J. ENVIRON. TOXICOL.
Vol. 21, No. 4, 317~322 (2006)

1, 2, 4-trimethylbenzene의 미생물복귀돌연변이시험

김수진, 조해원, 임경택※, 맹승희, 김현영

산업안전보건연구원 화학물질안전보건센터 독성연구팀

Bacterial Reverse Mutation Test of 1, 2, 4-trimethylbenzene

**Soo Jin Kim, Hae Won Cho, Kyung Taek Rim※,
Seung Hee Maeng and Hyeon Yeong Kim**

*Toxicological Research Team, Chemical Safety&Health Center, Occupational Safety & Health Research Institute,
104-8 Munji-dong, Yuseong-gu, Daejeon, KOREA*

ABSTRACT

We have investigated the genotoxicity of 1, 2, 4-trimethylbenzene using Ames reverse mutation test. In Ames reverse mutation test, 1, 2, 4-trimethylbenzene treatment at the dose of 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/plate did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA 1537 and in *Escherichia coli* WP2uvrA with and without metabolic activation. These results indicate that 1, 2, 4-trimethylbenzene has no mutagenic potential under the condition in this study.

Key words : reverse mutation, 1, 2, 4-trimethylbenzene

서 론

세계적으로 약 1,200만종의 기존화학물질을 포함 최근 산업의 급속한 발달로 매년 2천여 종의 신규화학물질이 개발되고 이들 중 유통화학물질은 국제적으로는 10만여 종, 우리나라에서도 3만8천여 종과 매년 300여 종의 신규화학물질이 추가되고 있다. 그러나 이러한 화학물질 중 만성 및 발암성을 포함 유해성이 충분히 밝혀진 물질은 2,500여 종에 불과하다. 이들 중 사용량이 많고 독성이 강한 물질로 근로자 건강장해 예방을 위해 유해성 평가를 토대로 우선적으로 작업환경 노출기준이 설정된 물질은 698종(노동부, 2002)이 있으며 허가대상물질은 14종(산업안전보건법, 2006), 관리대상물질 168종(산업보건기준에 관한 규칙, 2003), 사용금지물질은 66종(산업안전보건법, 2006)으로 유통화학물질의 대부분은 만성독성시험을 포함 명확한 유해성이 확인되지 않은 물질들이 많다. 그러나 이러한 화학물질중 독성이 강하고 휘발 또는 비산하기 쉬운 물질들은 장기간 취급할 경우 부주의로 인해 노출될 수 있으며 근로자의 호흡기나 피부흡수를 통하여 건강장해를 일으킬 수도 있다. 따라서 국내에서 사용되는 화학물질 중 국내외적으로 독성정보가 없거나 부족한 화학물질 중 사용량과 취급 근로자수가 많으며 독성이 강하게 예측되는 유해물질에 대해 유전독성시험 중 복귀돌연변이시험

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-42-869-0345, Fax: +82-42-863-9001
E-mail: ktrim@kosha.net

을 통하여 발암성의 예측 등에 활용하고자 하였다.

무색의 인화성 액체인 1, 2, 4-trimethylbenzene은 콜타르와 석유 원유에서 자연스럽게 발생된다.

1, 2, 4-trimethylbenzene에의 노출은 작업장, 공기, 물, 땅 또는 지하수 등에서 일어날 수 있으며, 가솔린 또는 페인트 등을 사용할 때 경구, 흡입 및 피부를 통하여 흡수될 수 있다(US EPA, 2006).

1, 2, 4-trimethylbenzene은 많은 작업장에서 사용되며, 주로 anhydride의 생산 원료로서 의약품 제조 및 염색업에서 사용된다.

이 물질의 분자량은 120.2, 발화점은 48℃, 융점은 −43.7℃, 비점은 168℃, 용제에 가용성이다(NLM-SIS, 2004).

주요한 건강위험성으로는 호흡기, 피부 및 눈에 자극, 중추신경계 억제 등이 있고, 단기간 노출시 두통, 졸음, 현기증 등을, 장기간 노출시 호흡곤란, 두통, 피로, 정서장애 등이 있을 수 있는 것으로 알려져 있다(한국산업안전공단, 2006).

1, 2, 4-trimethylbenzene은 산업안전보건법, 유해화학물질관리법 등 국내 화학물질관련 법령에 규제를 받는 목록에는 포함되어 있지 않지만, 유럽연합(EC) 유해화학물질로 등재되어 있다. 유럽연합(EC) 분류번호는 202-436-9이고, 유럽연합(EC) 유해성 분류는 인화성 물질, 유해물질, 자극성 물질로 되어있다(한국산업안전공단, 2006).

1, 2, 4-trimethylbenzene에의 직업적 노출은 trimethylbenzenes을 기준으로 하여 관리되며, OSHA와 ACGIH에서 정한 trimethylbenzenes의 노출기준은 25 ppm이다.

1, 2, 4-trimethylbenzene의 알려진 독성정보는 guinea pig LDLo (intraperitoneal) 1,788 mg/kg, rat LC50 (inhalation) 18 g/m^3/4H, rat LD50 (oral) 5 g/kg, rat LDLo (intraperitoneal) 1,752 mg/kg이다(NLM-SIS, 2004). 이 물질에 대한 유전독성 및 발생독성에 대한 자료는 보고된 것이 거의 없어 근로자 건강장해 예방에 기초 자료로 활용하는 데 어려움이 있었다.

본 연구에서는 국내 취급사업장 수가 5개소이고, 근로자 수는 4,000여 명에 이르며, 연간 취급량은 50톤 등으로 유통량이 많고 취급 근로자 수가 많으나(노동부, 2004)) 독성 및 유해성 평가 자료는 매우 국한되어 있는 1, 2, 4-trimethylbenzene을 대상으로 하였다. 이 물질은 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development)에서 대량생산화학물질 (high production volume, HPV)로 지정된 화학물질 5,000종에는 해당되지 않으며 2003년 12월까지 대량생산화학물질로 인한 위해성평가(screening information data set, SIDS) 물질로는 분류되어 있지 않으며, 또한 미국 NTP (National Toxicology Program)에서도 본 물질에 대한 해당 독성시험이 이루어지지 않은 것으로 확인되었다(NIOSH, 1998).

따라서 본 시험물질을 취급하는 근로자들의 건강장해 예방 및 사고 발생시 신속한 원인규명과 대책수립 등을 위해서 이에 대한 유전독성 자료를 생성하고자 미생물복귀돌연변이시험을 "화학물질 유해성시험 연구기관의 지정 등에 관한 규정(국립환경과학원, 2006)"에 준하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 시약

본 시험에 사용한 1, 2, 4-trimethylbenzene (CAS No. 95-63-6)은 1, 2, 5-trimethylbenzene, pseudocumene으로도 불리우며, 구조식은 $C_6H_3(CH_3)_3$이다. 동 물질의 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis MO., USA)에서 구입하여 사용하였다.

음성대조물질(용매)은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis MO., USA)를 사용하였다.

시험용 균주로는 염기쌍치환형 (base-pair substitution type) 돌연변이 검색을 위하여는 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA 1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2uvrA를 이용하였다. TA100, TA98, TA1535, TA1537, WP2 uvrA의 균주는 Moltox (BOONE, NC 28607 USA)로부터 구입하여 사용하였고, 균현탁액 0.8 mL, DMSO 0.07 mL의 조성으로 −80℃ deep freezer (Sanyo MDF-U3086S, Bensenville, IL., USA)에 보관하여 사용하였다.

S9은 Moltox로부터 구입하여 사용하였고, sprague dawley male rat에 유도물질 (Aroclor 1254)을 도살 5일전 단회 복강 투여 후 간 조직을 균질화한 것으로 −80℃ deep freezer에 보관하여 사용하였다.

2. 복귀돌연변이시험

시험은 Ames방법 (Maron D. M. *et al.*, 1983)에 준하여 수행하였고, 시험물질의 농도결정시험은 최고농도를 5,000 μg/plate로 공비 3～10으로 실시하였다. 본시험은 농도결정시험의 결과를 참고로 하여, 최고농도를 생육저해가 나타나는 농도 또는 5 mg～10 mg/plate로 공비 2～3으로 실시하였다.

확인시험은 본시험의 결과를 참조하여 공비 2～3으로 실시하였다. 표준작업지침서에 준하여 작성한 시험계획서에 따라 실시하되 시험물질을 처리한 균주를 37℃ 진탕배양기에 20분간 전배양하여 실시하는 preincubation법을 이용하는 것을 원칙으로 하였다.

아미노산 요구성, 자외선 감수성, 막변이 및 약제내성으로 이루어지는 유전적 성질을 확인하였다. 그 중 아미노산 요구성은 preincubation법으로 background 콜로니의 개수를 지표로 확인하였고, 자외선 감수성은 10 W의 자외선 등을 25 cm의 높이에서 점등하여 생육의 여부로 확인하였으며, 막변이는 crystal violet에 의한 생육정지의 유무로 확인하였다. 또한 약제내성에 대해서는 ampicillin, tetracyclin에 의한 생육정지의 유무로 확인하였다.

양성대조물질을 대상으로 시험을 실시하여 복귀돌연변이 콜로니수를 측정, 대사활성화를 실시한 경우와 실시하지 않은 경우의 각 균주에 해당하는 양성대조물질의 참고치와 비교, 확인하였다.

시험에 사용한 양성대조물질은 sodium azide (WAKO, Osaka, Japan), 9-aminoacridine (Sigma-Aldrich, St. Louis MO., USA), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (WAKO, Osaka, Japan), 2-aminoanthracene (WAKO, Osaka, Japan)를 각각 사용하였고, 용매로는 DMSO를 사용하였다.

시험물질용액의 조제는 DMSO를 사용하였고, 시험물질은 DMSO와 acetone에 대한 용해도가 5% 이상이고, 물에는 불용이므로 용매 휘발성이 낮은 DMSO를 용매로 선택하였다. 초음파 분산으로 제조하였으며, 시험물질들의 순도는 97% 이상이므로 순도환산은 하지 않았다.

전배양 시에는 50 mL 삼각플라스크에 nutrient broth (Oxoid, Hampshire, UK)를 이용 진탕배양장치 (Model 50, Precision, Winchester, VA., USA)로 180회/분 진탕배양하였다. 이때 배양액량은 15 mL, 접종균량은 30 μL로 하였다.

Top agar는 BD (Franklin Lakes, NJ., USA)로부터 bacto-agar (Lot No. 2087876)를, Minimum glucose agar plate는 Junsei (Tokyo, Japan)로부터 agar를 구입하여 사용하였다.

본 시험은 국립환경과학원 고시 제2006-4호에 의한 화학물질유해성시험방법 및 OECD테스트가이드라인 TG471 (OECD, 1997)에 따라 실시하되 preincubation법으로써 대사활성화계를 이용하는 방법과 대사활성화계를 이용하지 않는 방법을 병행하여 실시하였다.

Colony 수의 측정방법은 90 mm 직경의 플레이트(내경 86 mm)에 생성된 콜로니수를 자동 colony counter (BMS-400 system, 東洋測器株式會社, kanagawa, Japan)로 계수하였다. 생육저해유무의 확인방법으로는 실체현미경을 이용하여 40배의 배율로 모든 플레이트를 관찰하여 확인하였다. 균 농도의 측정방법으로는 표준작업지침서에 따라 단계희석법에 의한 생균수 측정방법에 의하여 균농도를 측정하였다. 무균시험으로 S9 Mix 및 시험물질용액을 0.1 mL씩 최소글루코즈 한천배지에 top agar를 중층시켜 37℃에서 48시간 배양하여 균의 생육의 유무를 육안으로 확인하였다. 결과해석을 위한 통계학적 수법으로 시험물질의 농도증가와 함께 복귀돌연변이 colony수가 증가하고 또 음성 대조군의 결과의 2배 이상으로 증가하고 재현성이 있을 때 양성으로 판정하나 본 시험은 그와 같은 결과를 얻지 못하였고 결과해석을 위한 통계학적 수법은 이용하지 않았다.

결과 및 고찰

Salmonella 4개 균주의 경우 대사활성계 적용 및 비적용시 모두 시험물질 농도의 증가에 따른 콜로니 수의 증가는 나타나지 않았으며, 항균성 또한 나타나지 않았다. *E. coli* WP2uvrA의 경우에도 대사활성계 적용 및 비적용시 모두 시험물질 농도의 증가에 따른 콜로니 수의 증가는 나타나지 않았으며, 항균성 또한 나타나지 않았다.

농도결정시험 및 본시험을 시험물질의 용해도를 고려하고 시험물질의 독성으로 생육저해를 나타내지 않는 농도인 100 μg/plate까지 실시하였으나 시

Table 1. Reverse mutation assay using *Salmonella* and *E. coli.* treated with 1, 2, 4-trimethylbenzene without (upper panel) and with metabolic activation (middle panel), respectively. The lower panel is positive control (without and with metabolic activation)

With/Without S9-mix	Concentration of test material (μg/plate)	Number of reverse mutation (colony number/plate)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (−)	0	77 93 86 (85)	21 15 6 (14)	25 13 21 (19)	11 16 5 (10)	5 6 5 (5)	
	6.25	100 83 (91)	12 23 (17)	24 25 (24)	19 15 (17)	5 2 (3)	
	12.5	93 105 (99)	16 4 (10)	19 15 (17)	10 18 (14)	9 2 (5)	
	25	74 74 (74)	11 13 (12)	17 20 (18)	15 17 (16)	5 9 (7)	
	50	65 26 (45)	4 6 (5)	10 25 (17)	7 4 (5)	5 6 (5)	
	100	61 71 (66)	8 2 (5)	12 19 (15)	7 10 (8)	1 1 (1)	
S9Mix (+)	0	117 106 126 (116)	15 9 15 (13)	23 30 30 (27)	38 19 12 (23)	9 11 6 (8)	
	6.25	112 94 (103)	14 22 (18)	26 13 (19)	23 19 (21)	8 6 (7)	
	12.5	108 112 (110)	17 26 (21)	18 20 (19)	23 32 (27)	10 7 (8)	
	25	117 130 (123)	26 23 (24)	17 27 (22)	18 22 (20)	5 4 (4)	
	50	80 127 (103)	13 25 (19)	22 16 (19)	19 21 (20)	9 10 (9)	
	100	92 64 (78)	8 14 (11)	21 19 (20)	22 20 (21)	4 11 (7)	
+Control	Without S9Mix: Strain	AF-2	NaN3	AF-2	AF-2	9-AA	
	Without S9Mix: Conc. (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Without S9Mix: Colony number /plate	406 344 390 (380)	119 120 99 (112)	98 97 117 (104)	155 248 225 (209)	61 60 42 (54)	
	With S9Mix: Strain	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	With S9Mix: Conc. (μg/plate)	1.0	2.0	10	0.5	2.0	
	With S9Mix: Colony number /plate	542 329 493 (454)	83 113 100 (98)	521 429 542 (497)	235 226 208 (223)	58 41 60 (53)	

험물질 농도 증가에 따른 복귀돌연변이 콜로니수 증가 양상이 나타나지 않았으며, 용매대조군의 콜로니 생성수의 2배를 초과하는 복귀돌연변이 콜로니의 상승도 대사활성화의 유무와 관계없이 관찰되지 않았다. 한편, 양성대조군에서는 각각의 균주에서 양성이라 판단한 수치범위에서 복귀돌연변이 콜로니가 유발되었으므로 본 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있었다. 따라서 본 시험물질은 해당 균주에 대한 복귀돌연변이시험 결과, 음성으로 판단되었다.

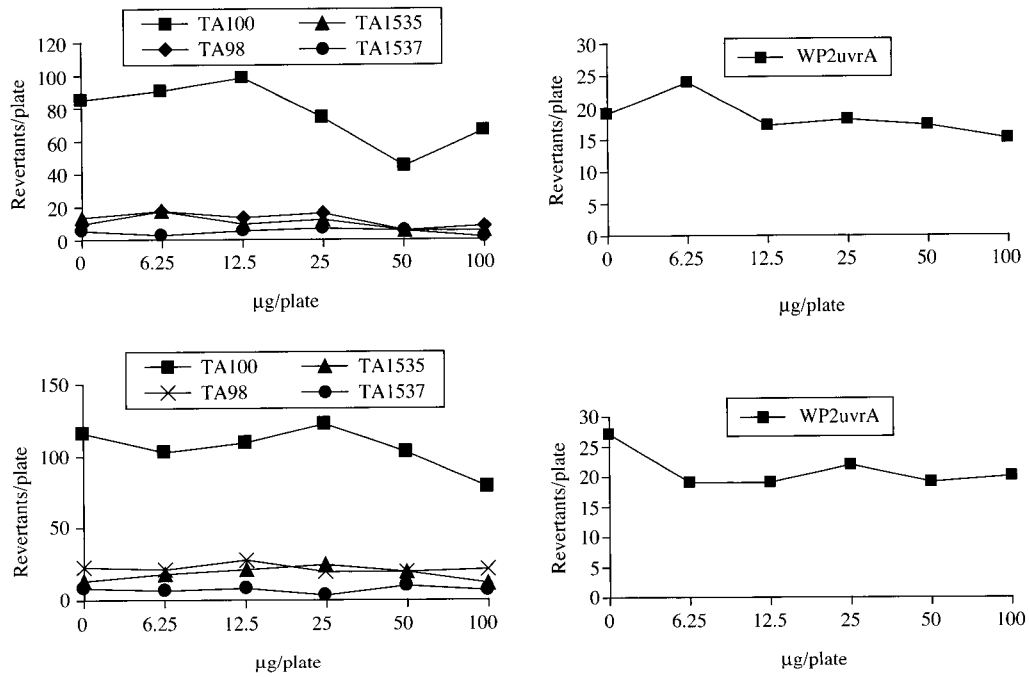

Fig. 1. Dose response curve without (upper panel) and with metabolic activation (lower panel), respectively.

본시험의 시험결과표 및 양반응 곡선은 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다.

농도결정시험 및 본시험을 시험물질의 용해도를 고려하고 시험물질의 독성으로 생육저해를 나타내지 않는 농도인 100 μg/plate 까지 실시하였으나 시험물질 농도 증가에 따른 복귀돌연변이 콜로니수 증가 양상이 나타나지 않았으며, 용매대조군의 콜로니 생성수의 2배를 초과하는 복귀돌연변이 콜로니의 상승도 대사활성화의 유무와 관계없이 관찰되지 않았다. 한편, 양성대조군에서는 각각의 균주에서 양성이라 판단한 수치범위에서 복귀돌연변이 콜로니가 유발되었으므로 본 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있었다. 따라서 이상의 결과, 본 시험물질은 해당 균주에 대한 복귀돌연변이시험에서 음성으로 판단되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질 1, 2, 4-trimethylbenzenems 본 시험조건 하에 사용한 시험균주에 대하여 복귀돌연변이를 일으키지 않아 유전독성 물질이 아닐 가능성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 노동부의 화학물질에 대한 유해성 평가 및 관리방안 연구사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

국립환경과학원. 고시 제2006-4호 「화학물질유해성시험연구기관의 지정 등에 관한 규정」, 2006.

노동부. 고시 제2002-8호 「화학물질 및 물리적인자의 노출기준」, 2002.

노동부. 화학물질별 취급 제조업체 현황, 2004.

산업안전보건법 제37조 [제조 등의 금지], 2006.

산업안전보건법 제38조 [제조 등의 허가], 2006.

산업보건기준에 관한 규칙 「제11장 관리대상유해물질에 의한 건강장해 예방」, 2003.

한국산업안전공단. 1, 2, 4-trimethylbenzene의 물질안전보건자료 (MSDS), 안전보건정보서비스 (KOSHANET), 2006. http://www.kosha.net/shdb/msds/main.jsp

Maron DM and Ames BN. Revised Methods for the Sal-

monella Mutagenicity Test, Mutation Res 1983; 113: 173-215.

National Institute of Occupational Safety and Health. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances 1998; DHHS (NIOSH) Publication No. 97-119.

National Library of Medicine. Specialized Information Services, 2004. http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp.

Organisation for Economic Co-operation and Development (1997). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG471. Bacterial Reverse Mutation Test. 1997.

US Environmental Protection Agency. Chemicals in the Environment: OPPT chemical fact sheets, 2006; EPA 749-F-94-022. http://www.epa.gov/chemfact/