에틸렌옥사이드(Ethylene oxide)에 노출된 병원 근로자들의 소핵 빈도와 유전적 감수성 지표와의 연관성

이선영 · 김양지* · 최영주 · 이종원 · 이영현 · 신미연** · 김원*** · 윤충식** · 김성균** · 정해원†

서울대학교 보건대학원 보건학과, *중앙대학교 교양학부대학,

서울대학교 보건대학원 환경보건학과, *노동환경건강연구소

Analysis of Micronuclei and Its Association with Genetic Polymorphisms in Hospital Workers Exposed to Ethylene Oxide

Sunyeong Lee, Yang Jee Kim*, Young Joo Choi, Joong Won Lee, Younhyun Lee, Mi Yeon Shin**,
Won Kim***, Chungsik Yoon**, Sungkyoon Kim**, and Hai Won Chung†

Graduate School of Public Health and Institute of Health and Environment,
Seoul National University, Seoul, Korea

*College of General Education, Chung-Ang University, Seoul, Korea

**Department of Environmental Health, Graduate School of Public Health and Institute of
Health and Environment, Seoul National University, Seoul, Korea

***Wonjin Institute of Occupational and Environmental Health

ABSTRACT

Objectives: Ethylene oxide (EtO) is classified as a human carcinogen, but EtO is still widely used to sterilize heat-sensitive materials in hospitals. Employees working around sterilizers are exposed to EtO after sterilization. The aim of the present study was to assess the exposure of EtO level, coupled with occupationally induced micronuclei from hospital workers. The influence of genetic polymorphisms of detoxifying genes (*GSTT1* and *GSTM1*) and DNA repair genes (*XRCC1* and *XRCC3*) on the frequencies of micronuclei in relation to exposure of EtO was also investigated.

Methods: The study population was composed of 35 occupationally exposed workers to EtO, 18 student controls and 44 unexposed hospital controls in Korea. Exposure to EtO is measured by passive personal samplers. We analyzed the frequencies of micronuclei by performing cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN assay) and *GSTM1*, *GSTT1*, *XRCC1*, and *XRCC3* were also genotyped by performing polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP).

Results: The frequencies of micronuclei in EtO exposure group, student controls and hospital controls were 18.00 ± 7.73 , 10.47 ± 7.96 and 13.86 ± 6.35 respectively and their differences were statistically significant, but no significant differences according to the level of EtO were observed. There was a dose-response relationship between the frequencies of micronuclei and cumulative dose of EtO, but no significant differences were observed. We also investigated the influence of genetic polymorphisms (*GSTM1*, *GSTT1*, *XRCC1*, and *XRCC3*) on the frequencies of micronuclei, but there were no differences in the frequencies of micronuclei by genetic polymorphisms.

Conclusions: The frequencies of micronuclei in EtO exposure group was significantly higher than control

†Corresponding author: Graduate School of Public Health and Institute of Health and Environment, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, Tel: +82-2-880-2715, Fax: +82-2-747-7082, E-mail: chunghw@snu.ac.kr
Received: 7 December 2011, Revised: 22 December 2011, Accepted: 28 December 2011

groups. A dose-response relationship was found between the level of EtO exposure and the frequencies of micronuclei, but no statistically differences were observed. We also found that the frequencies of micronuclei were increased according to cumulative EtO level. There was no association of the genetic *GSTM1*, *GSTT1*, *XRCC1*, and *XRCC3* state with the frequency of micronuclei induced by EtO exposure.

Key words: Ethylene oxide (EtO), Genetic polymorphism, Glutathione S-transferase (GST), Hospital workers, Micronuclei (MN), X-ray repair cross-complementing group (XRCC)

I. 서 론

Ethylene Oxide(이하 EtO라 함)는 가스 형태의 의료가 살균제로써 병원의 중앙공급실 등에서 의료가 기기가 고온다습한 조건에 약하거나 많은 양을 한꺼번에 살균해야할 경우에 주로 사용되며,¹⁾ 대부분 EtO의 직업적 노출은 살균과정 후 소독기계에서 의료가 기기를 수거할 때 주로 발생한다.²⁾ EtO를 취급하는 병원근로자들은 보호마스크, 보호장갑을 필수적으로 착용하여야 하지만, 업무시간 동안 계속 착용하기엔 현실적으로 불가능하여 보호기구 착용도 잘 이루어지지 않고 있어³⁾ 질환발생의 위험성이 크며 보건학적으로 문제가 제기되어 왔다.

EtO는 주로 눈, 호흡기관, 피부에 자극을 주고, 고농도 노출될 때 두통, 구토, 림프구 증가증을 동반하며, 만성적으로 노출될 때에는 여성의 유산을 증가, 신경전도 속도 저하, 백혈병 등의 발생이 증가한다고 보고되었다.⁴⁾ 또한 EtO는 직접적인 알킬화제로 대사과정 없이 세포 내 DNA와 단백질 등을 직접 알킬화하여⁵⁾ 염색체 이상, 자매염색체 교환, 소핵 빈도 증가 등과 같은 세포유전독성을 일으킨다고 보고되었다.⁶⁾ EtO를 취급하는 작업자들을 보호하기 위하여 미국산업위생전문가협회(American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH), 미국산업안전보건청(Occupational Safety and Health Administration, OSHA)에서 EtO에 대한 노출허용치로 8시간 노출기준을 1 ppm으로 정하였다.⁷⁾ 또한 IARC(국제암연구소)에서는 EtO를 인체발암원(Group 1)으로 분류하였지만,⁸⁾ 여전히 많은 양의 EtO가 병원에서 의료가 기기의 살균, 소독에 사용됨에 따라 병원근로자들은 지속적으로 EtO에 노출되고 있다. EtO 노출에 의한 건강영향을 살펴본 선행 연구들은 많이 존재하지만, 단지 EtO 노출 여부에 따른 건강영향 평가에 국한되어있고 실제 개인의 EtO 노출량에 따른 건강영향은 거의 연구되지 않았기 때문에, 개인

의 실제 EtO 노출량 증가에 따라 나타나는 건강영향을 조기에 평가할 필요가 있다. 노출로 인한 건강영향을 조기에 평가할 수 있는 생체지표에는 염색체 이상, 자매염색체교환 등이 사용되고 있지만, 일반 집단에 좀더 쉽게 적용이 가능하며, 간편하고 빠른 시간 내에 평가할 수 있는 소핵 분석이 널리 사용되고 있다.⁹⁾ 소핵은 유사분열 시 염색체가 절단되거나 방추체가 손상되어 딸 세포에 포함되지 못한 염색체 일부 혹은 전체가 따로 남아 생기는 것으로, 독성물질이나 방사선 등의 노출에 의한 유전독성 평가를 위한 조기 생물학적 영향지표로써,¹⁰⁾ 본 연구에서 소핵분석법을 이용하여 EtO 노출로 인한 건강영향을 살펴보고자 한다.

EtO 노출 시 유발되는 소핵 형성 정도는 같은 양의 EtO에 노출되었을지라도 EtO의 대사에 관여하는 유전자들의 유전적 다형성에 의한 개개인의 감수성에 따라 다를 것이라는 추측을 할 수 있으며, 이러한 유전적 다형성은 EtO에 의한 건강장애훈의 잠재적 위험요인으로 간주될 수 있으므로 유전적 다형성에 따른 EtO 노출로 인한 소핵빈도를 평가할 필요가 있다. *GSTs* (Glutathione S-transferase)는 phase II 대사효소로, *GST-α(GSTA)*, *GST-μ(GSTM)*, *GST-π(GSTP)*, *GST-θ(GSTT)* 4가지가 알려져 있다.¹¹⁾ *GSTM1*, *GSTT1*형의 경우 2개의 대립유전자가 모두 결실된 경우(Null type)와 그렇지 않은 경우(Positive type)로 두 가지 유전적 다형성을 나타내게 된다. *GSTT1*은 EtO의 가수분해 혹은 GSH와 결합함으로써 반응성이 낮은 수용성 대사산물로 배출될 때 관여한다.⁶⁾ EtO 노출로 인해 생성되는 헤모글로빈 부가체 중 N-(2-hydroxyethyl) valine (HEVal) 이 *GSTT1*-null type에서 유의하게 증가한다고 보고되었다. *GSTM1*은 여러 종류의 발암물질과 GSH와의 결합을 촉매하는 유전자로 알려져 있지만, EtO 대사과정에서 *GSTM1*의 역할에 대해서는 아직 정확하게 평가되지 않았다.¹²⁾ 하지만 *GSTM1*-null type인 사람

들이 EtO에 노출될 경우, 방광, 피부, 폐 등의 암 발생 위험도가 높아진다는 보고가 있다. 또한 EtO는 DNA를 알킬화할 뿐 아니라 그 결과로 DNA 가닥 절단을 유발한다.¹³⁾ DNA 손상복구 유전자의 한 종류인 X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1)은 염기절단수리(base excision repair, BER)와 DNA 단일가닥절단(single strand break, SSB) 복구에 중요한 역할을 한다. 또한 X-ray repair cross-complementing group 3 (XRCC3)는 DNA 두 가닥 절단(double strand break, DSB) 복구에 관여한다고 알려져 있다.¹⁴⁾

따라서 본 연구는 EtO를 사용하는 병원근로자들을 대상으로 EtO 노출여부뿐만 아니라 실제 개인 EtO 노출량에 따른 소핵 빈도를 분석하고, 해독계 효소유전자인 *GSTT1*, *GSTM1*과 DNA 손상복구 유전자인 *XRCC1*, *XRCC3* 유전자의 유전적 다형성이 EtO 노출로 인한 소핵형성에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 연구대상자 선정

본 연구는 국내 A, B, C, D, E, 5개의 종합병원에서 근무하는 근로자들을 대상으로 하였다. 노출군은 EtO를 직접 사용하는 병원근로자 35명을 선정하였고, EtO를 직접 취급하지 않는 병원근로자 44명과 병원에서 근무하지 않는 학생 18명을 대조군으로 선정하여, 총 97명을 연구대상자로 선정하였다.

2. Ethylene oxide 노출량 평가

EtO의 측정 및 분석은 OSHA method No. 1010을 참조하였다. 보증된 재현성과 이동이 잦은 작업 특성 및 간편성을 고려하여 배지형 passive sampler (3M, #3551)를 이용하여 대상자들의 EtO 노출량을 측정하였다. 대상자가 작업시간 동안 착용한 뒤 업무종료 후 배지를 수거하였고 3회 반복측정하였다. 배지에 MeOH 2 ml를 넣고 30분 동안 상온에서 방치한 후 이 용액을 GC/ECD (Gas chromatograph/Electron Capture Detector)를 이용하여 분석하였다. 3회 반복측정치를 기하평균으로 개인별 평균 EtO 노출량을 계산하였다. 또한 그룹별 평균 EtO 노출량 역시 기하평균을 이용하여 계산하였다. 개인의 EtO

누적노출량은 연구대상자들의 병원 근무년수를 고려하여 계산하였다. 하루 8시간, 일주일 중 5일 근무를 기준으로 연구대상자들의 병원 근무년수에 개인 EtO 배지로부터 측정된 EtO 노출량을 계산함으로써 EtO 누적노출량을 산출하였고 ppm-years로 나타내었다. 이는 Hagmar, L 등의 연구방법에 근거하여 누적노출량을 산출하였다.¹⁵⁾

3. 소핵 분석

노출군과 대조군에서 채혈한 혈액 1 ml과 10% 우태아혈청, penicillin (100 unit/ml)이 포함된 배지 RPMI 9 ml에 phytohemagglutinin (PHA-M, Sigma, St. Louis, MO)를 넣고 5% CO₂, 37°C 배양기에서 44시간 배양한다. 그 후 세포질 분열을 억제하기 위하여 cytochalasin-B (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 3 µg/ml 처리하고 28시간 추가 배양하였다. 배양 후 전혈에 0.075 M KCl을 처리하고 Canoy solution (methanol:acetic acid = 3:1)에 2회 반복처리한 후 slide glass에 소핵 표본을 만든다. 작성된 소핵 표본을 공기 중에서 건조시킨 후 5% Giemsa 용액에 10분간 염색하여 소핵을 관찰하였다. 한 사람당 간기세포 1000개를 광학현미경으로 무작위로 관찰하였고 분석방법은 Fenech¹⁶⁾ 기준을 따랐다.

4. DNA 추출

DNA 추출은 상업적으로 판매되고 있는 Wizard™ DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. 즉, Sodium heparin이 첨가된 말초혈액 1.5 ml을 cell lysis solution에 넣은 후 실온에서 1시간 방치해두고 2,000 × g, 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 버리고 다시 cell lysis solution을 넣고 실온에서 30분간 방치해두고 2,000 × g, 10분간 원심분리하였다. 또다시 상등액을 버리고 백혈구를 잘 풀어준 후 nucleic lysis solution과 protein precipitation solution을 넣고 충분히 섞어준 후 2,000 × g, 10분간 원심분리하여 단백질을 포함한 모든 불순물을 가라앉힌 후 상등액을 isopropanol 용액에 옮겨 담아 DNA를 추출하였다. 그 후 다시 원심분리를 하고 남은 펠렛을 70% ethanol로 탈수시키고 rehydration 용액을 첨가한 후 4°C에서 수화시킨 뒤 냉동보관(-20°C)하였다.

Table 1. Characteristics of control and exposure group

Variables	Student controls	Hospital controls	Exposure group
N	18	44	35
Sex ^a			
Male	13 (72.2) ^b	13 (29.6)	8 (22.9)
Female	5 (27.8)	31 (70.5)	27 (77.1)
Smoking status ^c			
Never and former	11 (61.1)	40 (90.9)	30 (85.7)
Current	7 (38.9)	4 (9.1)	5 (14.3)
Age (mean±S.D., years)	31.6 ± 12.5	34.4 ± 8.3	40.1 ± 9.7
Duration of work in hospitals (mean±S.D., years) ^d	-	8.04 ± 6.93 ^c	13.45 ± 10.52
EtO exposure level (ppm) ^{e,f}	0.001	0.002	0.010

^aSignificant difference by EtO exposure status (χ^2 test, $p=0.001$), ^bNumber (percentage is in parentheses),

^cSignificant difference by EtO exposure status (χ^2 test, $p=0.0148$), ^dSignificant difference between control and exposure group (Mann-Whitney U-test, $p=0.0041$), ^eThe mean shown is the geometric mean of the EtO exposure level,

^fSignificant difference by EtO exposure status (Kruskal-Wallis test).

5. 유전자 다형성 분석

PCR에 의한 증폭과정을 통해 유전적 다형성 분석을 하였다. Deoxynucleotide triphosphate (dNTP), KCl, Tris-HCl, MgCl₂, DNA polymerase가 적절하게 배합되어 있는 PCR premix (Bioneer Co., Seoul, Korea)에 각각의 DNA template와 각 유전자의 primer를 10 pmol씩 첨가하였다. *GSTMI*, *GSTT1* 유전자의 염기서열은 각각 Roodi, N., Schlade-Bartusiak, K.의 연구를 따랐고,^{17,18)} 판별의 오류를 줄이기 위해 positive control (*FX III*)을 함께 증폭하였다. *FX III*의 염기서열은 F: 5' - TCATCCCAGCAACTGGT TGC - 3', R: 5' - CTGGCTCATAGGGTGCAGG - 3'이며 생성물은 382 bp이다. *XRCC1* (Arg³⁹⁹Gln), *XRCC3* (Thr²⁴¹Met)는 각 유전자의 증폭조건은 Shen, M. R.과 Winsey, S. L.의 연구에 따라서 polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) 방법을 이용하였다.^{19,20)} 그 후 증폭된 유전자를 Ethidium bromide가 포함된 2% 아가로스 겔을 이용하여 전기영동과정을 거친 후 UV illuminator를 통해 유전자 다형성을 판별하였다.

Fig. 1. The frequencies of micronuclei by students, hospital control group, and EtO exposure group. *, Comparison between students and EtO exposure group ($p=0.001$), **, Comparison between students and hospital controls ($p=0.020$), ***, Comparison between hospital controls and EtO exposure group ($p=0.017$). All analysis was conducted with the use of Mann-Whitney U-test. Data are presented as the mean±S.D.

6. 통계분석

통계분석은 Statistical Analysis System software (version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여, EtO 노출군과 대조군 사이의 차이는 χ^2 test, Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis test로 분석하였다. 변수 별 소핵 빈도 차이는 Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis test를 이용하여 비교하였고, EtO 누적노출량에 따른 소핵 빈도 차이는 Kruskal-Wallis test를 이용하였다. 각 유전자의 빈도는 Hardy-Weinberg test를 이용하여 계산하였다.²¹⁾ 또한 각 유전자별 소핵 빈도 비교는 Mann-Whitney U-test를 이용하였다. 모든 분석은 $p < 0.05$ 으로 유의성 검사를 수행하였다.

III. 결 과

1. 연구대상자의 일반적 특성

연구대상자는 총 97명으로 학생 대조군은 남성 13명, 여성 5명, 병원 대조군은 남성 13명, 여성 31명, EtO 노출군은 남성 8명, 여성 27명이었다. 또 학생 대조군에서 7명, 병원 대조군에서 4명, 노출군에서 5명이 흡연자였고, 흡연자는 모두 남성이었다. 학생 대조군의 평균 연령은 31.6 ± 12.5 세, 병원 대조군은 34.4 ± 8.3 세, 노출군의 평균 연령은 40.1 ± 9.7 세이었

Table 2. The frequencies of micronuclei in control and exposure group

EtO (ppm)	Student control		Hospital control		Exposure group		p ^b	Total	
	N	Micronuclei ^a	N	Micronuclei ^a	N	Micronuclei ^a		N	Micronuclei ^a
0.001	5	10.00 ± 7.75	10	13.50 ± 6.69	2	19.50 ± 14.85	0.319	17	13.18 ± 7.88
0.001 < - ≤ 0.01	12	10.67 ± 8.38	31	14.26 ± 6.50	15	19.07 ± 7.81	0.007	58	14.76 ± 7.70
0.01 <	-	-	3	11.00 ± 4.00	17	16.88 ± 7.31	0.201 ^c	20	16.00 ± 7.17

^aData are expressed as mean ± standard deviation (S.D.). ^bComparison of the frequencies of micronuclei by EtO exposure status were conducted with the use of Kruskal-Wallis test. ^cComparison of the frequencies of micronuclei by EtO exposure status were conducted with the use of Mann-Whitney U-test.

다. 또한 병원 대조군의 병원 근무년수는 8.04 ± 6.93 년인데 반해, EtO 노출군은 13.45 ± 10.52 년으로 대조군에 비하여 병원 근무년수가 유의하게 높았다. EtO 평균 노출량은 학생 대조군의 경우 평균 0.001 ppm, 병원 대조군의 경우에 0.002 ppm, EtO 노출군의 경우 0.010 ppm이 측정되었다(Table 1).

2. EtO 취급 여부에 따른 EtO 노출량과 소핵 빈도

학생 대조군, 병원 대조군, EtO 노출군에 따른 소핵 빈도를 비교하였다(Fig. 1). 학생 대조군의 평균 소핵은 이핵세포 1000개당 10.47 ± 7.96 개, 병원 대조군은 평균 13.86 ± 6.35 개, EtO 노출군은 평균 18.00 ± 7.73 개의 소핵이 관찰되었다. 학생 대조군과 병원 대조군의 소핵 빈도 차이, 병원 대조군과 EtO 노출군의 소핵 빈도 차이, 학생 대조군과 EtO 노출군의 소핵 빈도 차이는 모두 통계적으로 유의하였다.

3. EtO 노출량에 따른 소핵 빈도

EtO 노출군, 학생 대조군, 병원 대조군 내에서 EtO 노출량에 따른 소핵 빈도를 관찰한 결과(Table 2), 모두 유의한 차이가 없었다(학생 대조군 $p = 0.917$, Mann-Whitney U-test; 병원 대조군 $p = 0.624$, 노출군 $p = 0.778$, Kruskal-Wallis test). 반면 EtO 노출군과 대조군을 통합하여 분석한 결과, EtO 노출량이 증가할수록 소핵 빈도도 증가하는 양-반응 관계를 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다($p = 0.330$, Kruskal-Wallis test). EtO 0.001 ppm 이하에 노출된 그룹에서 학생 대조군, 병원 대조군, EtO 노출군의 소핵의 빈도에 차이가 있었지만 통계적으로 유의하지 않았다($p = 0.012$, Kruskal-Wallis test). 또 0.001 ppm 초과, 0.01 ppm 이하 EtO 노출그룹에서 학생 대조군, 병원 대조군, EtO 노출군의 소핵 빈도는 유의한 차이를 보였다($p = 0.007$, Kruskal-Wallis test).

EtO 0.01 ppm을 초과하여 노출된 그룹에서는 병원 대조군보다 노출군의 소핵 빈도가 높았지만 유의하지 않았다($p = 0.201$, Mann-Whitney U-test).

4. 성별, 연령, 흡연 여부, 병원 근무년수에 따른 소핵 빈도

학생 대조군의 남성과 여성의 소핵 빈도는 각각 10.33 ± 8.55 개, 10.80 ± 7.22 개로 차이가 없었지만, 병원 대조군은 남성에 비해 여성의 소핵 빈도가 유의하게 높았고(10.46 ± 3.69 , 15.29 ± 6.72 , $p = 0.0206$), EtO 노출군에서도 남성에 비해 여성의 소핵 빈도가 높았으나 통계적으로 유의하지 않았다(14.29 ± 6.58 , 18.96 ± 7.83 , $p = 0.209$). 이는 여성의 소핵 빈도가 남성에서 보다 높게 나타난다는 보고가 있고²²⁾ 본 연구에서도 이와 유사한 결과를 얻었다. 또한 여성의 경우, 학생 대조군, 병원 대조군, EtO 노출군 사이의 소핵 빈도는 유의한 차이를 보였다($p = 0.032$). EtO 노출군은 연령이 증가할수록 소핵 빈도가 유의하게 증가하였고, 학생 대조군, 병원 대조군은 연령에 따라 소핵이 증가하는 경향을 보였으나 유의하지 않았다. 흡연 여부에 대한 소핵 빈도를 비교했을 때, 과거 흡연자 및 비흡연자와 현재 흡연자 사이의 소핵 빈도는 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편 병원 대조군에서 병원 근무년수가 증가할수록 소핵의 빈도가 유의하게 증가하였으나, EtO 노출군은 병원 근무년수가 증가할수록 소핵의 빈도가 증가하는 경향을 보이지만 통계적으로 유의하지 않았다(Table 3).

5. EtO 누적노출량과 소핵 빈도

병원에서 근무하지 않는 학생 대조군 18명을 제외한 전체 대상자들의 EtO 누적노출량과 소핵 빈도를 비교하였다(Fig 2). EtO 누적노출량이 0 ppm 이상, 25 ppm 미만인 그룹은 평균 13.79 ± 6.38 개, 25 ppm

Table 3. The frequencies of micronuclei by sex, age, smoking status, and duration of work in hospitals

Variables	Student control group			Hospital control group			Exposure group			p ^c
	N	Micronuclei ^a	p ^b	N	Micronuclei ^a	p ^b	N	Micronuclei ^a	p ^b	
Sex			0.716			0.021			0.209	
Male	12	10.33 ± 8.55		13	10.46 ± 3.69		7	14.29 ± 6.58		0.154
Female	5	10.80 ± 7.22		31	15.29 ± 6.72		27	18.96 ± 7.83		0.032
Age (years)			0.164 ^c			0.155 ^c			0.025 ^c	
≤ 25	4	6.00 ± 2.45		11	11.82 ± 6.19		3	7.00 ± 1.00		0.037
25 < - ≤ 35	11	10.09 ± 6.71		15	13.73 ± 7.16		5	16.80 ± 7.63		0.154
35 <	2	21.5 ± 14.85		18	15.22 ± 5.69		26	19.50 ± 7.24		0.163
Smoking status			0.342			0.670			0.894	
Former or never smoke	10	8.60 ± 5.91		40	14.08 ± 6.52		30	18.00 ± 8.06		0.001
Current smoke	7	13.14 ± 10.12		4	11.75 ± 4.19		4	18.00 ± 5.48		0.234
Duration of work in hospitals (years)			-			0.001 ^c			0.314 ^c	
Student controls	17	10.47 ± 7.96		-	-		-	-		-
≤ 10	-	-		24	10.71 ± 4.83		9	15.33 ± 6.36		0.053
10 < - ≤ 20	-	-		15	16.53 ± 5.60		9	18.56 ± 6.75		0.701
20 < - ≤ 30	-	-		1	23.00		7	20.14 ± 8.17		1.000
30 <	-	-		-	-		1	27.00		-

^aData are expressed as mean ± standard deviation (S.D.) ^bComparison of the level of micronuclei by EtO exposure were conducted with the use of Mann-Whitney U-test. ^cComparison of the level of micronuclei by age group and duration of work in hospitals were conducted with the use of Kruskal-Wallis test.

Fig. 2. The frequencies of micronuclei in relation to cumulative EtO exposure level. Data are presented as the mean ± S.D.

이상, 50 ppm 미만인 그룹은 평균 17.88 ± 5.19 개, 50 ppm 이상 노출된 그룹은 평균 18.13 ± 8.53 개의 소핵이 측정되어 EtO 누적노출량이 증가할수록 소핵의 빈도가 증가하는 경향을 보였으나 유의하지 않았다($p = 0.072$, Kruskal-Wallis test).

6. 유전자 다형성에 따른 소핵 빈도

1) 유전자 다형성 빈도

각 유전자의 다형성에 따라 대상자 빈도를 Table 4에 나타내었다. 학생 대조군 중 *GSTT1* 유전자가 없는 null type의 대상자는 47.1%, 유전자가 있는 positive type의 대상자는 52.9%를 차지하고 있었고, 병원 대조군은 *GSTT1* null type이 40.9%, *GSTT1* positive type은 59.1%를 차지하고 있었으며, EtO 노출군에서 null type의 대상자는 35.3%, positive type의 대상자는 64.7%이었다. *GSTT1*의 경우는 학생 대조군에서 null type이 58.8%, positive type이 41.2%이었고, 병원 대조군에서 null type이 47.7%, positive type이 52.3%, EtO 노출군에서 null type이 50%, positive type은 50%를 차지하였다. *XRCC1*의 경우는 학생 대조군에서 homozygous wild type이 52.9%, heterozygous variant 및 homozygous variant type이 각각 41.2%, 5.9%를 차지하고 있었고, 병원 대조군은 homozygous wild type 52.3%, heterozygous variant type 45.5%, homozygous variant type 2.3%를 차지하였다. 또 EtO 노출군에서는 homozygous

Table 4. Distribution of *GSTT1*, *GSTM1*, *XRCC1*, and *XRCC3* genotypes in the study population

Gene	No. of subjects (%)			
	Student controls	Hospital controls	Exposure group	Total
GSTT1				
Null	8 (47.1)	18 (40.9)	12 (35.3)	38(40.0)
Positive	9 (52.9)	26 (59.1)	22 (64.7)	57(60.0)
GSTM1				
Null	10 (58.8)	21 (47.7)	17 (50.0)	48(50.5)
Positive	7 (41.2)	23 (52.3)	17 (50.0)	47(49.5)
XRCC1 ³⁹⁹				
Arg/Arg	9 (52.9)	23 (52.3)	21 (61.8)	53 (55.8)
Arg/Gln	7 (41.2)	20 (45.5)	12 (35.3)	39 (41.1)
Gln/Gln	1 (5.9)	1 (2.3)	1 (2.9)	3 (3.2)
Allele frequency (Gln)	0.265	0.251	0.201	0.238
XRCC3 ²⁴¹				
Thr/Thr	16 (94.1)	40 (90.9)	32 (94.1)	88 (92.6)
Thr/Met	1 (5.9)	4 (9.1)	2 (5.9)	7 (7.4)
Met/Met	-	-	-	-
Allele frequency (Met)	0.030	0.046	0.030	0.037

Fig. 3. Effects of genetic polymorphisms on the frequency of micronuclei in control and exposure group; (a) *GSTT1* (School controls, $p = 0.812$; Hospital controls, $p = 0.972$; Exposure group, $p = 0.929$), (b) *GSTM1* (School controls, $p = 0.042$; Hospital controls, $p = 0.888$; Exposure group, $p = 0.324$), (c) *XRCC1* (School controls, $p = 0.570$; Hospital controls, $p = 0.255$; Exposure group, $p = 0.765$) and (d) *XRCC3* (School controls, $p = 0.762$; Hospital controls, $p = 0.373$; Exposure group, $p = 0.249$). Error bars represent standard deviation of the mean.

wild type이 61.8%, heterozygous variant 및 homozygous variant type이 각각 35.3%, 2.9%이었다.

*XRCC3*는 학생 대조군, 병원 대조군 그리고 EtO 노출군에서 homozygous wild type이 각각 94.1%,

90.9%, 그리고 94.1%, heterozygous variant type이 각각 5.9%, 9.1%, 5.9%를 차지하였고, homozygous variant type의 경우 모두 0명으로 *XRCC3* 유전자형은 대상자간 변이가 적었다.

2) 유전자 다형성에 따른 소핵 빈도

XRCC1, *XRCC3* 유전자의 경우 hetero, homozygous variant type의 대상자 빈도가 낮았기 때문에, hetero, homozygous variant type을 합하여 homozygous wild type과 비교하였다. 학생 대조군, 병원 대조군, 그리고 EtO 노출군에서 *GSTT1*, *GSTM1* positive type 일때 소핵의 빈도가 *GSTT1*, *GSTM1* null type 일 경우보다 오히려 높게 측정되었다. *XRCC1* 유전자의 경우에 학생 대조군, 병원 대조군에서 hetero, homozygous variant type (*XRCC1* - Arg/Gln + Gln/Gln)일 때 소핵 빈도가 효소가 정상적으로 발현되는 유전자형인 homozygous wild type (*XRCC1* - Arg/Arg) 일 때의 소핵 빈도보다 높게 측정되었다. *XRCC3* 유전자의 경우 효소가 정상적으로 발현되는 유전자형인 homozygous wild type (*XRCC3* - Thr/Thr)일 때의 소핵 빈도가 hetero, homozygous variant type (*XRCC3* - Thr/Met + Met/Met)일 때보다 높게 측정되었다(Fig 3). 또한 해독계 효소유전자 *GSTT1*, *GSTM1* 유전자형의 조합, DNA 손상복구 유전자 *XRCC1*, *XRCC3* 유전자형을 조합하여 소핵 빈도를 비교하였으나, 유전자간 상호작용으로 인한 소핵 빈도의 변화는 찾을 수 없었다(data not shown).

IV. 고 찰

병원근로자들은 급성 또는 만성으로 건강에 영향을 미칠 수 있는 마취가스, 고정제, 살균소독제 등 매우 다양한 화학물질을 사용하고 있다.²³⁾ 이런 화학물질에 노출될 시 흔히 자극 증상이나 피부염을 일으키며 백혈병, 천식 등의 질환이 발생한다. 특히 EtO는 많은 연구에서 두통, 구토, 림프구 증가증을 일으키며, 만성적으로 노출될 때에는 유산을 증가, 백혈병 등의 발생이 증가한다는 등의 보고가 있었고⁴⁾ 국제암연구소(IARC)에서 인체발암원(Group1)으로 분류하였지만,⁸⁾ 여전히 병원에서 많은 양이 사용되고 있다. EtO를 취급하는 근로자들을 보호하기 위

하여 ACGIH에서 규제하는 EtO 권장 허용농도는 TLV-TWA 1 ppm이고⁷⁾ 본 연구에서 EtO를 직접 사용하는 대상자들의 노출량은 허용치보다 훨씬 낮은 약 0.010 ppm에 노출되고 있었으며, 병원 대조군의 경우 0.002 ppm, 학생 대조군은 0.001 ppm의 EtO에 노출되고 있었다. 1회 측정치는 최대 0.7258 ppm에 노출된 것으로 조사되었고, 3회 평균 EtO 노출량이 1 ppm을 넘는 대상자는 존재하지 않았다.

소핵은 독성물질의 노출에 의하여 DNA 가닥이 절단되어 딸 핵으로 이동하지 못하고 작은 핵으로 따로 관찰되는 것으로,⁹⁾ 독성물질이나 방사선 등의 노출에 대한 유전독성을 측정하는 조기 생물학적 영향 지표로 널리 사용되고 있다.¹⁰⁾ EtO의 노출과 소핵 형성과의 상관관계에 관한 선행 연구는 각기 상반된 결과를 보고하고 있다. Ribeiro의 연구에서는 대조군에 비하여 EtO 노출군에서 소핵 빈도가 유의하게 높았다고 보고하고 있는 반면,²⁴⁾ Tates와 Sarto는 EtO 노출이 소핵 형성에 영향을 주지 않는 것으로 보고하고 있다.^{25,26)} 하지만 이와 같은 선행 연구들은 단순히 EtO의 노출 여부만을 확인하여 소핵 빈도와 상관관계를 분석한 것이 대부분이며, 개인의 EtO 노출량 및 개인의 유전적 감수성에 따른 소핵 빈도의 관련성 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 개인의 EtO 노출량에 따른 소핵 빈도, 해독계 효소 유전자 및 DNA 손상복구 유전자들이 EtO 노출에 따른 소핵 형성에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였으며, 이를 위해 개인의 EtO 노출량에 따른 소핵 빈도 분석과 해독계 효소유전자 및 DNA 손상복구 유전자 분석을 실시하였다.

본 연구에서 EtO에 노출된 종사자의 소핵 빈도는 학생 대조군, 병원 대조군의 소핵 빈도보다 유의하게 높았다. 학생 대조군, 병원 대조군의 EtO 노출량에 비해 EtO 노출군의 EtO 노출량이 유의하게 높았기 때문에 EtO 노출에 의해 소핵 빈도가 증가한 것이라고 할 수 있다. 한편 병원 대조군의 EtO 노출량과 학생 대조군의 EtO 노출량은 유의한 차이가 없었지만 소핵의 빈도는 학생 대조군보다 병원 대조군에서 유의하게 높게 측정되었다. 이는 EtO 노출의 영향으로 인한 소핵 빈도의 증가보다는 병원 내에 근무하는 근로자들이 다른 유해물질에 노출되었기 때문에 소핵의 빈도가 증가한 것으로 판단된다. 한편 개인별 EtO 노출량에 따른 소핵 빈도를 살펴

본 결과, EtO 노출량과 소핵 빈도 사이에 양-반응 관계가 나타났지만 통계적으로 유의하지 않았다. 본 연구에서 뱃지를 이용하여 개인별 EtO 노출량을 측정하였으나, 작업 시 착용한 보호기구의 유무에 따라 실제 인체에 흡수된 EtO 양은 뱃지를 통해 분석된 EtO 노출량과 다를 수 있다. 따라서 뱃지를 통해 측정된 EtO 노출량이 소핵 빈도를 정확하게 반영해주지 못했기 때문이라고 판단된다. 또한 소핵은 독성물질 노출에 의해 즉각적으로 생성되는 것이 아니라 일정시간이 지난 후 생성되는 것으로 본 연구에서 EtO 노출량 측정과 동시에 소핵 빈도 평가를 하였기 때문에 EtO 노출량과 소핵 빈도와의 상관성을 정확히 파악하지 못한 것이라고 사료된다.

EtO의 누적노출량에 따른 소핵의 빈도를 살펴본 결과, 통계적으로 유의하지는 않았지만 양-반응 관계를 나타냈다. 분석에 사용된 대상자 수가 적다는 한계점이 있지만, EtO를 사용하는 병원근로자들을 대상으로 추적조사하여 소핵 빈도를 분석하는 것은 이들의 EtO 노출에 의한 건강영향을 모니터링하는 방법으로 활용가능할 것으로 판단된다.

EtO는 체내에서 GSTs (Glutathione S-transferase) 유전자에 의해 수용성이고 반응성이 적은 대사산물로 대사되고,⁶⁾ GSTs에는 *GSTT1*, *GSTM1* 등이 포함되어 있다. *GSTT1* 유전자는 한국인의 48.5%가 존재한다고 보고되었고,²⁷⁾ 본 연구에서는 전체 대상자의 60%가 *GSTT1* 유전자가 존재하는 것으로 조사되어 기존 연구보다 높은 수치를 보였다. 또한 *GSTT1*-null type인 사람이 *GSTT1*-positive type인 사람보다 EtO 노출로 인한 자매염색체교환 발생에 더 취약하다고 보고되었다.²⁸⁾ *GSTM1* 유전자 빈도는 한국인을 대상으로 조사한 결과 *GSTM1*-null type의 경우 47.9%로 보고되었고,²⁷⁾ 본 연구에서는 50.5%로 비슷한 빈도를 보였다. *GSTM1*-null type의 경우, 방광, 피부, 폐 등의 암 발생위험도가 높아진다고 보고되었다.²⁹⁾ *GSTM1*의 경우 아직까지 EtO 대사에 직접 관여하는지 여부는 밝혀지지 않았지만,¹²⁾ *GSTT1*은 체내에 존재하는 EtO를 S-(2-hydroxyethyl) glutathione으로 변환해주는 유전자로 보고되었다.⁶⁾ 또한 EtO는 DNA를 알킬화할 뿐 아니라 그 결과로 DNA 가닥절단을 유발한다.¹³⁾ *XRCC1*은 DNA의 단일가닥절단, *XRCC3*는 DNA의 이중가닥절단을 복구하는데 중요한 역할을 한다. 한국인의 *XRCC1*, *XRCC3*

의 유전자형 빈도는 각각 homozygous wild type이 61.7%, 93.6%, heterozygous variant type이 33.0%, 6.4%, homozygous variant type이 5.3%, 0%로 본 연구 결과와 비슷한 빈도를 보였다.³⁰⁾ L. Godderis는 *XRCC3*의 Met/Met 형질에서 EtO에 의한 DNA 가닥절단 정도, 소핵 빈도가 높게 측정되었다고 보고하였다.³¹⁾ 본 연구에서 *GSTT1*, *GSTM1*, *XRCC1*, *XRCC3* 유전자 다형성에 따른 소핵 빈도를 비교하였을 때, 학생 대조군, 병원 대조군의 *XRCC1* homozygous wild type의 소핵 빈도가 heterozygous, homozygous variant type의 소핵 빈도보다 낮게 관찰되었다. 하지만 다른 유전자의 경우에는 예상과 다르게 효소 발현이 정상적으로 되지 않는 유전자형에서 오히려 소핵 빈도가 높게 나타났다. 또한 해독계 효소 유전자 *GSTT1*, *GSTM1* 유전자형의 조합, DNA 가닥절단 복구에 관여하는 *XRCC1*, *XRCC3* 유전자형을 조합하여 유전자간 상호작용이 EtO 노출로 인한 소핵 형성에 미치는 영향을 살펴보았으나 의미있는 결과를 얻지 못하였다. 이러한 결과들은 *GSTT1*, *GSTM1*의 경우 positive type이 null type보다 해독 효소의 활성도가 높다고 전제하였고, *XRCC1*, *XRCC3* 유전자의 경우 homozygous wild type이 heterozygous, homozygous variant type 보다 효소의 활성도가 높다는 전제와 상반된 것으로 이는 유전자의 유전형과 표현형의 상관관계가 명확하지 않을 수 있으며, *XRCC1*, *XRCC3*의 경우 variant type일 때 오히려 효소의 활성이 커질 수 있는 경우 등을 종합적으로 판단하여야 할 것으로 사료된다. 따라서 후속연구를 통해 유전자들의 mRNA 발현도, 단백질 활성도 등을 추가분석할 필요가 있고, 체내에서 EtO를 대사시켜주는 다른 유전자들 및 DNA 손상을 효과적으로 복구시켜주는 유전자들에 대한 다형성 분석과 단백질 발현도 등의 추가분석이 요구된다. 또한 본 연구는 적은 표본수와 단순히 4가지 유전자의 유전자형만 분석하여 소핵 형성에 미치는 영향을 평가하였다는 제한점이 있다.

V. 결 론

EtO에 노출되는 5개 종합병원 근로자들을 대상으로 EtO 노출여부뿐만 아니라, 개인의 EtO 노출량의 증가에 따른 소핵 빈도를 관찰함으로써 건강영향을

평가하고, 개인의 유전적 감수성이 EtO 노출에 의한 소핵 형성에 미치는 영향을 평가하고자 본 연구를 진행하였다. 그 결과 EtO 노출군의 소핵 빈도가 학생 대조군, 병원 대조군보다 유의하게 높게 측정되었고, 개인의 EtO 노출량에 따른 소핵 빈도를 평가한 결과, 통계적으로 유의하지 않았지만 EtO 노출량이 증가할수록 소핵 빈도가 증가하는 양-반응 관계를 보였다. 또한 EtO 누적노출량과 소핵 빈도는 유의하지는 않았지만 양-반응 관계를 보였다. 따라서 EtO를 사용하는 병원근로자들을 대상으로 추적하여 소핵 빈도를 조사하는 것은 이들의 EtO 노출에 의한 건강영향을 평가하는 방법으로 활용가능할 것으로 판단된다. 해독계 효소유전자(*GSTT1*와 *GSTM1*)와 DNA 손상복구 유전자(*XRCC1*과 *XRCC3*)의 유전적 다형성이 EtO 노출에 따른 소핵 형성에 미치는 영향을 살펴보고자 하였으나, 유전적 다형성과 소핵 빈도 사이의 상관관계를 찾지 못하였다. 본 연구에서는 단순히 유전자형만을 분석했기 때문에, 유전자의 mRNA 발현도, 단백질의 활성도 등에 대해서도 추가분석해야할 필요성이 있다.

감사의 글

본 연구는 산업안전보건연구원 (2010-69-886), Brain Korea 21 (BK21) 그리고 2011년도 한국연구재단(교육과학기술부)의 기초연구사업 (2011-0004942) 지원을 받아 수행된 것임.

참고문헌

1. Won JU. Health effects of chemicals used in hospitals among healthcare workers. J Korean Med Assoc. 2010; 53(6): 474-482.
2. Lin YK, Lee LH, et al. An integrated occupational health consultation model for the medical supply manufacturing industry. Industrial Health. 2010; 48(6): 749-757.
3. Chang SH, Lee WJ, Kim CS, Hwang CH, Park JT, Kim DS, et al. Sister chromatid exchanges in workers occupationally exposed to ethylene oxide. Korean J Occup Environ Med. 1998; 10(4): 428-437.
4. Jeon HJ, Kim TH, Choi SY, Chung HW. Analysis of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral lymphocytes of nurses in a hospital. Environmental Mutagens & Carcinogens. 2005; 25(4): 150-156.
5. Segerback D. Reaction products in hemoglobin and DNA after in vitro treatment with ethylene oxide and N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea. Carcinogenesis. 1990; 11(2): 307-312.
6. Thier R and Bolt HM. Carcinogenicity and genotoxicity of ethylene oxide: new aspects and recent advances. Critical Reviews in Toxicology. 2000; 30(5): 595-608.
7. Anonymous. Guide to occupational exposure values 2006. Cincinnati: ACGIH; 2006. p. 58.
8. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 97. 1, 3-butadiene, ethylene oxide and vinyl halides (vinyl fluoride, vinyl chloride and vinyl bromide). IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2008; 97: 3-471.
9. Fenech M, Perepetskaya G, Mikhalevich L. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experiences from the Chernobyl catastrophe. Environ. Mol. Mutagen. 1997; 30(2): 112-118.
10. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res. 2000; 455(1-2): 81-95.
11. Mannervik B, Alin P, et al. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985; 82(21): 7202-7206.
12. Fennell TR, MacNeela JP, et al. Hemoglobin adducts from acrylonitrile and ethylene oxide in cigarette smokers: effects of glutathione S-transferase T1-null and M1-null genotypes. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000; 9(7): 705-712.
13. Agurell E, Cederberg H, et al. Genotoxic effects of ethylene oxide and propylene oxide: a comparative study. Mutat Res. 1991; 250(1-2): 229-237.
14. Goode EL, Ulrich CM, et al. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002; 11(12): 1513-1530.
15. Hagmar L, Welinder H, et al. An epidemiological study of cancer risk among workers exposed to ethylene oxide using hemoglobin adducts to validate environmental exposure assessments. Int Arch Occup Environ Health. 1991; 63(4): 271-277.
16. Fenech M, Chang WP, et al. HUMN project:

- detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003; 534(1-2): 65-75.
17. Roodi N, Dupont WD, et al. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. *Cancer Research.* 2004; 64(4): 1233-1236.
 18. Schlade-Bartusiak K, Rozik K, et al. Influence of GSTT1, mEH, CYP2E1 and RAD51 polymorphisms on diepoxybutane-induced SCE frequency in cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 2004; 558(1-2): 121-130.
 19. Shen MR, Jones IM, et al. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Research.* 1998; 58(4): 604-608.
 20. Winsey SL, Haldar NA, et al. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Research.* 2000; 60(20): 5612-5616.
 21. Guo SW and Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 1992; 48(2): 361-372.
 22. Catalán J, Autio K, Kuosma E, and H Norppa. Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man. *Am J Hum Genet.* 1998; 63(5): 1464-1472.
 23. Lim HS, Ahn YS. Occupational diseases among health care workers approved by Korea Labor Welfare Corporation. *Korean J Occup Environ Med.* 2003; 15(2): 196-204.
 24. Ribeiro LR, Salvadori DM, et al. Biological monitoring of workers occupationally exposed to ethylene oxide. *Mutat Res.* 1994; 313(1): 81-87.
 25. Tates AD, Grummt T, et al. Biological and chemical monitoring of occupational exposure to ethylene oxide. *Mutat Res.* 1991; 250(1-2): 483-497.
 26. Sarto F, Tomanin R, et al. The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. *Mutat Res.* 1990; 244(4): 345-351.
 27. Garte S, Gaspari L, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10(12): 1239-1248.
 28. Hallier E, Langhof T, et al. Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes. *Archives of Toxicology.* 1993; 67(3): 173-178.
 29. Hayes JD and Pulford DJ The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30(6): 445-600.
 30. Cho YH, Kim YJ, et al. Micronucleus-centromere assay and DNA repair gene polymorphism in lymphocytes of industrial radiographers. *Mutat Res.* 2009; 680(1-2): 17-24.
 31. Godderis L, Aka P, et al. Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation. *Toxicology.* 2006; 219(1-3): 220-229.