

탄소성분 나노입자의  
변이원성 평가

연세대학교 보건대학원  
환경보건학과  
윤 지 예

탄소성분 나노입자의  
변이원성 평가

지도 신 동 천 교수

이 논문을 보건학석사 학위논문으로 제출함

2008년 6월 일

연세대학교 보건대학원

환경보건학과

윤 지 예

## 감사의 글

수정작업이 끝난 완성된 원문을 들여다보니 논문을 완성 했다는 기쁨과 좋은 결과에 대한 벅찬 마음이 밀려들어 옵니다. 좋은 결실을 위해 잘 해야겠다는 마음이 짐으로 주어진 일에만 충실하다보니 제가 논문을 진행하고 있다는 사실도 제대로 느끼지 못했었습니다. 하지만 완성된 원문을 보면서 그 부분들을 이제야 마음으로 느껴지는 것은 아마도 제가 바라던 논문을 완성했다는 것에 대한 보람과 안도감에 기인한 것 같습니다. 본 논문을 완성할 수 있는 기회와 용기를 주신 신동천 교수님께 깊이 감사드리며, 논문에 대한 배려를 아끼지 않으신 임영옥 교수님께 깊이 감사드립니다. 그리고 많이 부족한 제게 바쁘신 와중에도 세심한 지도와 많은 도움을 주셨던 양지연 교수님께도 진심으로 감사를 드리고 싶습니다. 논문을 쓰기까지 많은 어려운 상황들이 있었지만 그때 마다 양지연 교수님의 세심한 지도가 있었기에 무사히 진행할 수 있었고, 이에 감사의 마음을 전해드립니다. 지금의 완성분이 있게 된 계기는 바쁘신 와중에도 꼼꼼히 챙겨주시고 많은 가르침 아끼지 않으신 세 분 교수님께 진심으로 감사의 마음을 전해드립니다.

그리고 제 논문의 통계를 도와주셨던 보거대학원 관계자 선생님들에게 감사드리며, 실험을 도와준 두 후배님에게 고마움을 전합니다. 논문을 쓸때 많은 응원을 보내줬던 많은 친구들에게도 고마움을 전하는 바입니다.

대학원에 입학하게 된 계기를 부여해 주시고 언제나 제 편이 되어 사랑으로 아껴주시는 나의 어머니 그리고 늘 엄격하시지만 사회에서 훌륭하게 성장해주길 바라고 이 세상에서 나를 가장 많이 사랑해주시는 나의 아버지, 두 분에게 진심으로 감사를 드립니다. 힘들고 지칠 때 마다 내 말에 경청해 주고, 대학원 입학에 있어서 가장 많은 영향을 주었던 우리 언니에게도 고마운 마음을 전하고, 오빠와 남동생에게도 노력과 좋은 결실에 대한 기쁨을 가족과 함께 누리고 싶습니다.

지난날의 대학원 생활을 잠시 돌이켜보면 논문을 쓰기까지 많은 사연이 있었지만, 오늘의 좋은 결과를 위해 노력한 보람으로 생각을 하고 싶습니다. 본 논문이 저에게 늘 좋은 시작점의 역할이 되길 희망하면서 감사의 글을 마칩니다.

윤지예 올림

# 차 례

## 국문요약

I. 서론	1
II. 연구내용 및 방법	6
1. 연구내용	6
2. 연구방법	8
가. 대상물질 선정	8
나. 변이원성 시험 방법	8
1) 시약 및 재료	8
2) 실험 균주 선택	9
3) 대사활성체	11
4) 대조군 선정	11
5) 변이원성 시험 방법	12
다. 대상물질의 시험 용량 결정	15
1) 나노입자	15
2) 유기추출성분	15
라. 통계분석	17
III. 연구결과	18
1. 탄소성분 나노입자의 물리적 특성	18
가. 탄소성분	18
나. 나노입자	19
다. 탄소나노튜브	19

2. 나노입자의 변이원성 시험결과	21
가. 탄소입자	21
나. 탄소나노튜브	23
다. 디젤엔진연소분진	25
3. 유기추출의 변이원성 시험결과	27
가. 대상 시료에서 유기추출성분의 추출율 비교	27
나. 탄소입자 및 탄소나노튜브의 유기추출성분 변이원성	28
다. 디젤연소분진의 유기추출성분 변이원성	30
4. 탄소성분 나노입자의 변이원성 비교	33
가. 대상나노 입자별 변이원성 비교	33
나. 나노입자 물질별 변이원성 결과	34
다. 대상 나노입자의 유기추출성분별 변이원성 비교	36
라. 디젤연소분진 의 성분별 변이원성 비교	38
IV. 고찰	39
V. 결론	42
참고문헌	45
부록	52
Abstract	57

## 표 차례

표 1. <i>salmonella typhimurium</i> 균주의 특성 .....	11
표 2. 알려진 반응성 시약을 이용한 균주별 변이원성 반응 적합성 평가 .....	12
표 3. 대상 나노입자별 유기추출물 .....	28
표 4. 대상나노입자의 단위용량 당 변이원성 비교 .....	33
표 5. 유기추출성분의 동일 투여용량에 대한 나노입자 별 변이원성평가 .....	36
표 6. 유기추출율을 고려한 나노입자 변이원성 비교 .....	37
표 7. 디젤연소분진의 투여별 변이원성 비교 .....	38

## 그림 차례

그림 1. 연구의 틀 .....	7
그림 2. 균주확인 테스트 .....	10
그림 3. 변이원성 시험 과정 .....	14
그림 4. 유기성분 추출과정 .....	16
그림 5. 디젤엔진연소분진 SEM 사진 .....	20
그림 6. 탄소나노튜브 SEM 사진 .....	20
그림 7. 탄소나노입자의 균주 및 용량별 변이원성 평가 .....	22
그림 8. 탄소나노튜브의 균주 및 용량별 변이원성 평가 .....	24
그림 9. 디젤엔진연소분진의 균주 및 용량별 변이원성 평가 .....	26
그림 10. 탄소입자와 탄소나노튜브 유기추출물의 균주별 변이원성 평가 .....	29
그림 11. 디젤엔진연소분진 유기추출성분의 균주 및 용량별 변이원성 평가 .....	32
그림 12. TA 98 균주에 대한 나노입자별 변이원성 비교 .....	34
그림 13. TA100 균주에 대한 나노입자별 변이원성 비교 .....	35

## 국문 요약

급격한 경제발전과 산업화는 대기오염을 야기 시켰고, 부유분진은 이러한 대기 오염의 주된 원인이다. 대기 중 입자상으로 존재하는 분진은 수백 종의 서로 다른 유기 및 무기물질로 구성되어 있고 발암성 물질이 입자상으로 존재한다. 탄소입자가 잠재적 유해요소를 가진 분진의 주성분이 라는 사실은 탄소가 변이 원성과 발암성의 영향에 중요한 비중을 차지 한다는 것을 유추할 수 있다. 그리고 탄소를 포함한 모든 분진 속에는 여러 가지의 입자들과 그에 맞는 크기가 존재하는데, 여기서 입자는 입경에 따라 다른 독성을 반응을 나타낸다. 즉 탄소가 입경에 따라 다른 부위에 침착이 일어나고, 미세입자의 여부에 따라 폐포까지 침착된다는 것과, 작은 크기의 입자가 더 높은 흡착성과 세포독성을 일으키며 변이원성이 높게 나타난다는 여러 병리학적 선행 연구를 살펴보면 이를 알 수 있다.

따라서 본 논문은 대기오염원인 분진에 있어서 탄소성분과 나노입자를 기본으로 구성하고 있는 다양한 입자들을 선별하였고 그 크기를 나노 단위로 통일하였다. 또한 유기추출물의 강한 변이원성을 예상하고 전처리를 거치지 않는 입자의 독성 결과와 비교하기 위해 전체성분과 유기성분을 나눠서 변이원성 시험을 실시하였다. 실험물질로는 탄소입자(Carbon Black; CB), 디젤연소분진(Diesel Exhaust Particle; DEP), 탄소나노튜브(Thin-Multiwall Carbon Nano-tube; T-MWCNT)이며, 실험균주로는 살모넬라균속의 TA98, AT100, TA1535, TA1537을 선정 하였다. 실험의 투여용량은 1, 2.5, 5, 10mg/ml이며, 대사체의 활성을 보기 위해 간 대사효소(liver S9 mixture)를 사용하였다.

무기탄소 성분으로 구성된 탄소 입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)는 TA100 균주를 제외하고는 양성 변이원성이 관찰되지 않았으며, TA100도 150 revertant/mg의 미미한 수준이었다. 또한 모든 균주에서 용량-반응 관계가 관찰되지 않았다. 이에 비해 디젤연소분진(DEP)은 +S9mix 조건의 TA1535를 제외한 모든 균주에서 뚜렷한 용량-반응 관계가 관찰되었으며, TA98과 TA100 균주에서 500



revertant/mg 수준의 강한 변이원성을 보였다. 그리고 TA1535와 TA1537 균주는 대사활성체에 의해 다소 증가되었다. 유기추출성분의 변이원성에서는 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)가 낮은 추출률에 의한 농도 설정과 낮은 변이원성을 나타내어 결과 값에 대해 의미가 없었다. 반면 디젤엔진연소분진(DEP)만이 높은 결과가 관찰되었으며, 총 입자에 의한 변이원성 보다 더 높은 집락수치를 나타내었다. 디젤엔진연소분진(DEP)의 유기추출물에 의한 용량-반응 관계는 TA1535(+S9mix -S9mix)와 -S9mix의 TA1537을 제외한 나머지 균주에서만 관찰되었다.

이상의 연구결과를 통해 유기성분의 디젤엔진연소분진(DEP)이 무기성분의 탄소입자(CB)나 탄소나노튜브(CNT)보다 높은 발암성을 가지고 있으며, 특히 유기성분의 변이원성도가 더 높음을 확인했다. 중금속, 다환방향족 탄화수소(PAHs) 등 오염물질이 혼합되어 있는 것으로 알려진 디젤엔진연소분진(DEP)에서는 총 입자 및 유기추출물 모두 뚜렷한 용량-반응 관계가 높은 변이원성이 관찰되었다. 본 연구가 앞으로 발암성 물질을 함유하고 있는 탄소성분과 나노입자에 대한 유전독성평가에 활용될 기초자료가 되며, 변이원성 시험에 의한 탄소입자의 인체 위해성을 평가하는데 있어서 기초 자료로 이용되기를 기대한다.

---

Key word: 변이원성 평가, 변이원성, 탄소성분, 나노입자

# I. 서론

## 1. 연구의 필요성

우리나라의 급격한 경제발전과 산업화는 도시의 인구집중화와 자동차 증가를 야기시켰고, 이러한 인구집중과 그에 따른 산업시설은 부유분진과 각종 산업공해를 만들어 대기오염을 증가시켰다 (신동천, 1989).

이렇게 증가된 대기의 분진은 여러 연구들에 의해 인체에 대한 영향이나, 사망률들과 높은 관련성이 있음이 보고되었다(정장표, 1993; Tomatis, 1990). 대기오염에 가장 큰 영향을 미치는 요인이 부유분진이라는(정용, 1986) 지적과 더불어 부유분진에 대한 인체 위해성 인식 필요성이 요구되고 있다. 오늘날 이러한 부유분진이 관심을 받게 된 이유는 바로 발암성 물질이 분진상태로 존재하기 때문이고, 발암물질을 함유하고 있는 분진 속에는 탄소 입자(carbonaceous particulates)가 대부분을 구성하고 있기 때문이다(신동천 등, 1990). 탄소는 직경이 0.1 $\mu$ m~0.3 $\mu$ m의 극미세 입자로 폐포에 도달할 수 있는 크기이며(Schenker, 1980), 여기서 탄소 입자는 호흡기계 자체 정화기전을 방해하고 독성이 강한 물질을 제거하는 작용을 방해하거나 지연시킨다. 특히 이 입자들은 호흡기계를 통해 인체로 들어와 급성, 만성 독성을 일으킨다(박성은 등, 1995). 이 같은 유해물질을 포함하는 부유분진이 잘 노출되어 있는 지역이 주로 도시 지역인데, 이는 자동차에서 발생하는 입자들 때문이라고 알려져 있다(Faiz A et al., 1993). 대표적인 성분으로는 분진의 주된 오염원에 해당되는 자동차 배기가스 중 하나인 디젤엔진연소분진(Diesel Exhaust Particle; DEP)이다. 디젤분진(Diesel Exhaust Particle; DEP)은 디젤 연료가 불완전하게 연소되어 생성되는 대기오염물질로 산업화에 따른 교통량 및 산업시설의 증가로 인하여 발생하는 양이 해마다 증가하고 있는 추세이다(Bunn et al., 2002; Peterson and sexon, 1996). 디젤분진(Diesel Exhaust Particle; DEP)은 입자의 크기가 미세하기 때문에 탄소입자(carbonaceous particulates)와 같이 기관지나 폐포에 침전될 수 있다. 여러 병리학적 보고를 살펴보면 디젤분진의 대부분이 직경이 2.5  $\mu$ m이하로 폐저부(peripheral

lung)에 쉽게 흡입되어(Heyder, 1993) 새로운 호흡기계 질환을 유발하거나 기존의 염증성 호흡기계 질환을 악화 시킨다는 보고가 있다(Ichinose et al, 1995; Pope et al, 1995). 게다가 디젤연소분진은 난알부민 천식동물모델에서 기도과민성과 기도개형을 증가시켜 천식의 악화에 영향을 준다는 보고도 있다(송현미 등, 2006).

디젤분진(Diesel Exhaust Particle; DEP) 주요 성분 중 하나인 benzo(a)pyren은 환경잔류성 물질(persistent organic pollutants; Pops) 중 하나인 다환방향족 탄화수소류(polycyclic aromatic hydro carbon; PAH)로 발암성 및 독성, 난분해성, 생물축적성의 특성을 가지고 있으며, 대기, 수질, 토양 등 다양한 환경 매체에서 검출되고 있다(Lioy et al., 1998). 변이원성 또는 발암성에 관련해서는 디젤 분진(Diesel Exhaust Particle) 중에 함유된 다환방향족 탄화수소류(polycyclic aromatic Hydro carbins)가 그 원인 물질로써 알려져 있다. 또한 연소과정 중 이들 물질로부터 산화성 및 질산성 PAH 등 다양한 물질이 생성됨으로써 보다 복잡한 독성을 발현한다는 결과도 있다(Scheepers, 1992). 이렇듯 강한 독성을 내재한 디젤분진은 디젤자동차의 배기가스에 다량 함유된 중금속류와 발암성의 탄화수소류가 공기 중에 부유하여 생성되고, 물리적인 입자상 물질과 결합되어 인체에 장기적으로 노출될 경우 폐암, 천식, 알레르기성 비염, 기관지염, 만성 폐쇄성 기도질환 등의 호흡기질환들을 유발한다는 많은 연구결과가 있다(Ichinose et al., 1995; Mauderly et al., 1987; McClellan, 1987; Al-Humadietal, 2002). 또한 심혈관계 및 심근에도 영향을 미쳐 말초혈관에서의 혈전생성을 증가시키거나 심장 근육세포에 손상을 미친다(Nemmar, 2003). 특히 디젤분진(Diesel Exhaust Particle)의 유기 추출물에는 다양한 변이원성 혹은 발암성 물질들이 포함되어 있으며(Cantell and Watts, 1997; Leberchert and Czerczak, 1997; IARC, 1989), IARC (International Agency for Reserch on Cancer)에서는 디젤분진 (whole diesel exhaust)을 발암 의심 물질 (probable human carcinogen; classification 2A)로 분류하였다(IARC, 1989).

부유분진과 디젤분진의 주요 성분인 탄소는 많은 잠재적 위해성을 가지고 있지만, 성분 외에 주목해야 될 부분이 바로 입자의 입경이다. 대기 중 입자상으로 존재하는 물질의 크기는 주로 0.001~1000 um의 범위 이다. 다시 말해 입자 내에 수백 종의 구성 성분들이 다양하게 존재하는 만큼, 입자 크기에 있어서도 넓은 범위

가 존재하며 입경에 따라 위해성의 차이 또한 지대하다(Pope et al., 1995). 미세입자들은 큰 입자에 비해 비교적 넓은 표면적을 가지고 있어 발암성, 돌연변이원성을 가진 물질이 쉽게 흡착되고, PAH가 조대입자 보다는 미세 입자에 더욱 높은 흡착특성을 가지고 있으며 더 강한 세포독성을 일으키는 것으로 알려져 있다(임용 등, 2004). 또한 미세입자의 대사활성 돌연변이도 유의하게 높은 것으로 조사되었다(신동천 등, 1990). 또한 PM2.5가 PM10 보다 호흡기 관련 증상의 발생에 대해 상대적으로 더 큰 영향을 미친다는 연구가(홍종호 등, 2003)있는데, DEP10 보다는 DEP2.5가 세포독성과 함께 DNA손상을 야기 시키며, 산화적 DNA손상과 대사활성화에 의한 DNA손상의 증가를 나타내었다(허찬 등, 2004). 다양한 연구결과를 통해 입자의 크기가 미세할수록 위해성이 높음을 알 수 있었다. 따라서 크기에 대한 위해도를 주목할 필요가 있다.

탄소나노튜브(CNT)는 일반 대기에는 큰 영향을 주지는 않지만, 입자상으로 존재하는 공학적 작업의 밀폐된 공간에서는 인체에 많은 영향을 줄 수 있다. 탄소나노튜브를 다루는 밀폐된 공간에서도 폐에 도달하는 양은 미량이지만, 어떤 조건에서는 작은 상태로 물질이 공기 중에서 흡입되어 폐에 도달할 수 있다.(Maynard et al., 2004). 탄소나노튜브(CNT)를 흡입 시 염증반응 육아종(granuloma)과 생체기관내의 섬유조직 발생 및 증식(fibrogenic) 영향을 보여 주었다(Lam et al., 2004). 탄소나노튜브(CNT)는 세포증식을 억제하여 사멸을 유도하고, 인간의 신장 배아세포가 배아에 부착하는 것을 감소시킨다는 보고를(Cui, 2005) 볼 때 탄소나노튜브의 인체 독성을 예상할 수 있다. 또한 탄소나노튜브(CNT)를 실험동물의 복강에 주사한 결과 탄소나노튜브(CNT)가 뇌를 제외한 체내에 분포하고, 뼈에 축적되는 것을 관찰하였다. 즉 중금속과 마찬가지로 체내에 축적이 되고 배출과 분해가 어려운 물질(Wang, 2004)이라는 사실이 제조나노튜브에 대한 위해성의 정도를 가늠할 수 있다.

여러 연구사례들을 종합해 봤을 때 다음과 같은 유추를 할 수 있었다. 대기 중에 존재하는 분진성분 중에는 수많은 종류의 무기 및 유기성분과 함께 분진상태로 존재하는데 그중 탄소성분이 80%이상을 차지하고 있으며, 발암성 물질이 분진과 함께 대기상태로 존재하고 있다. 따라서 탄소입자(carbonaceous particulates)에

의한 발암성과 변이원성에 대해서도 높은 것이라고 그에 대한 위해성을 인식하게 되었다. 인체 영향평가에서는 디젤분진(Diesel Exhaust Particle)이 가장 많은 연구와 보고가 되어져 있다. 그리고 탄소입자(Carbon Black; CB)에는 관찰되지 않았으나 탄소나노튜브(CNT)의 세포독성과 폐의 염증 반응의 보고가 있다.

대기 입자 중 입경 2.5 $\mu\text{m}$ 이하의 미세입자의 유기추출성분이 돌연변이원성의 90%이상 차지한다는(장재연, 1988)결과가 있으며, 디젤분진의 유기 추출물에 다양한 변이원성, 혹은 발암성 의심 물질들이 포함 되었다(IARC, 1989). 앞의 연구 결과들을 보면 분진이 미세입자이지만, 분진과 같은 복합물질(Complex mixture)보다 유기추출성분이 인체에 대한 유전독성과 변이원성이 높고 이에 따라 발암성 또한 높을 것이라는 가설을 세우게 되었다.

지금까지 살펴본 돌연변이원성에 대한 연구 자료들은 대체적으로 한 가지 성분 에 대한 인체 위해성에 대한보고나 혹은 동물실험에 대한 결과이다. 디젤에 관한 연구사례는 주로 도시지역 중 주거환경과 교통 혼잡, 환경의 대기 질에 대한 비교가 많았다(Ohasawa,1983). 혹은 자동차 배기가스 다발지역인 도시지역의 분진에 대한 변이도 측정과 그로 인한 입자상의 물질로 함유된 유기물과 이들이 여러 분획의 농도에 의한 변이원성 결과들도 주를 이루었다(장재연, 1988). 디젤엔진연소 분진(DEP)에 대한 임상적 결과와 유기성분에 대한 발암물질의 제시 연구 사례도 다수 있었지만 시험물질 전부를 극미세인 나노입자로 선정하여 탄소를 기초로 한 가지 이상의 물질을 시험하여 각각의 유해성을 비교한 사례는 아직 알려지지 않고 있다. 사례가 부족하며, 나노입자와 유기추출성분의 변이원성에 대한 비교를 동시에 분석한 연구 또한 미비한 실정이다.

## 2. 연구의 목적

본 실험에서는 탄소성분을 포함한 물질들 중 세 가지 시료를 선택하여 변이원성 시험을 실시 하려고 한다. 대기 입자 중 입경 2.5 $\mu\text{m}$ 이하의 미세입자의 유기추출 성분이 돌연변이원성의 90%이상 차지한다는(장재연, 1988) 보고를 근거로 유기추

출성분의 유해성을 보기위해 전체 성분인 나노입자와 그 나노입자에 대한 유기물 추출성분을 동일한 조건과 방법으로 진행 하였고, 그 결과를 내어 물질에 대한 독성과 변이원성을 비교하였다. 그래서 높은 발암성을 보유하고 있는 물질과 조건들을 관찰해 보기로 하였다. 발암물질의 85%이상이 돌연변이원이라는 결과(Ames, 1975)가 변이원성 시험법에서 발암성 물질의 검증에 중요한 토대가 된다는 사실을 입증하며, 본 연구가 위해성 평가에 대해서도 기초 자료로 활용할 수 있음에 의미를 두었다. 따라서 본 연구의 목적은 다양한 탄소 입자의 인체 유해 영향에 대한 잠재적 유발 가능성을 평가하기 위한 방법으로, 나노 크기의 다양한 탄소 구성 입자들에 대한 변이원성 시험을 실시하였으며, 이를 위해 시행한 연구방법은 다음과 같다

첫째, 다양한 탄소성분 나노입자의 변이원성 시험을 위해 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP), 탄소나노튜브(T-MWCNT)를 시험 대상 물질로 선정하였으며,

둘째, 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP) 및 탄소나노튜브(T-MWCNT)의 입경 크기를 측정하고, 나노 입자 크기로 인한 영향 평가를 위해 전체 입자 성분에 대한 변이원성 시험을 실시하고,

셋째, 대상 물질들의 유기성분에 의한 영향을 평가하기 위해 유기추출성분(Extractable Organic Matter; EOM)에 대한 변이원성 시험을 실시하여,

넷째, 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP) 및 탄소나노튜브(T-MWCNT)의 전체 성분 및 유기추출성분에 의한 변이원성 시험 결과를 비교, 분석함으로써 다양한 탄소성분 나노입자의 잠재적인 인체 영향을 평가하였다.

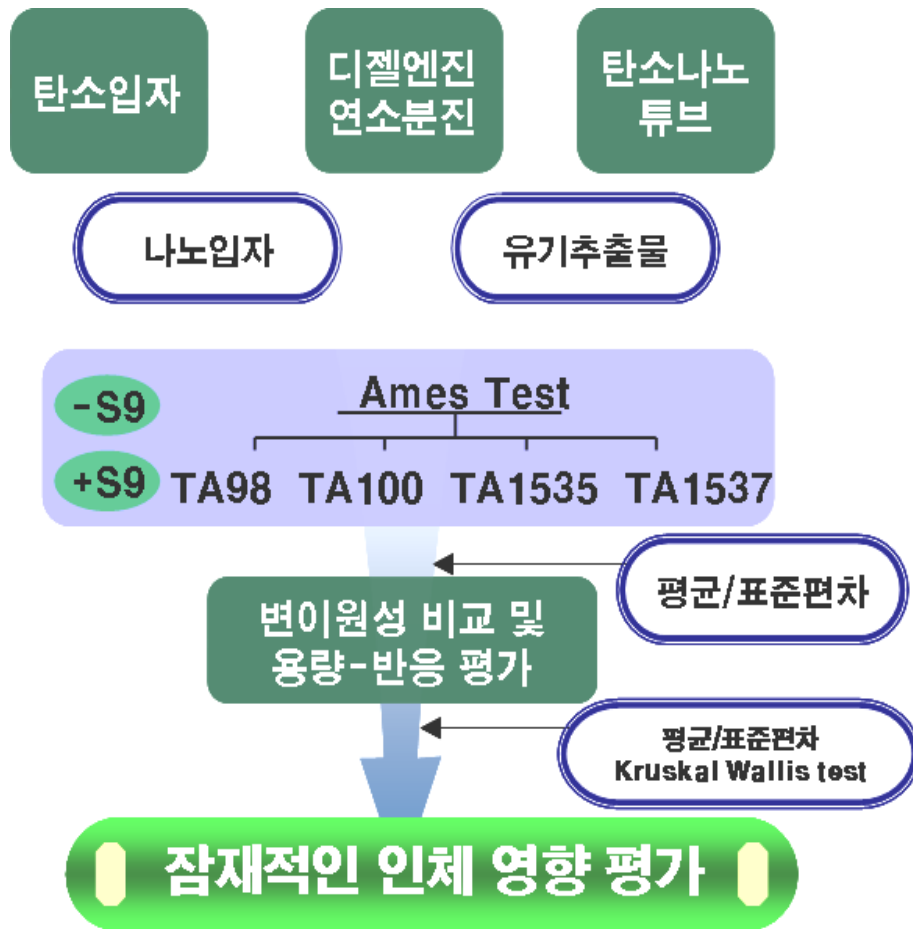
## II. 연구내용 및 방법

### 1. 연구내용

본 논문에서는 탄소성분의 인체 유해 영향과 잠재적 유발 가능성을 평가하기 위해서 나노크기의 다양한 탄소구성 입자들에 대한 변이원성 시험을 실시하였다.

실험물질로는 탄소성분을 기본으로 하는 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP), 탄소나노튜브(CNT)를 나노 크기로 선택하여 영향평가를 위해 전체성분(나노입자)와 유기추출성분의 두 가지 성분으로 변이원성 시험을 실시하여 결과를 비교 하였다.

실험의 선택 균주로는 살모넬라균 속중에 TA98, TA100, TA1535, TA1537을 선택 사용하였고, 대사활성체는 liver S9 mixture, 대조군에 사용된 시약은 음성반응물질 DMSO(dimethylsulfoxide)와 양성반응물질 Benzo(a)pyrene, NF(Nitro fluorene), ICR-191, Sodium Azide 사용하였다. 시험대상 물질은 4가지 농도 (1, 2.5, 5, 10mg/ml)로 나누었는데, 이는 농도에 따른 변이원성의 유의성을 보기 위함이다. 실험의 오차를 줄이기 위해서 한 실험 당 동일한 조건하에서 3번을 반복하였다. 세 가지 실험 대상 물질의 전체성분(나노입자) 및 유기추출성분(extractable organic matter; EOM)에 의한 변이원성 시험결과를 비교 분석함으로써 다양한 탄소성분 나노입자의 잠재적인 인체 영향 평가를 실시하였다. 그에 대한 연구의 틀은 다음과 같다.



[그림. 1] 연구의 틀



## 2. 연구방법

### 가. 대상 물질 선정

변이원성 시험에 사용된 실험물질로는 탄소성분을 기본으로 하는 물질인 나노 크기의 탄소입자(Carbon Black; CB), 디젤엔진연소분진(Diesel Exhaust Particle; DEP), 탄소나노튜브(Carbon Nano-tube; CNT)를 대상으로 하였다. CB는 시그마 알드리치사 (USA), DEP는 NIST사 (USA) 그리고 CNT 중 Thin-Multiwall Carbon Nano-tube(T-MWCNT)는 일진 나노텍사 (Korea) 에서 각각 구입하여 평가하였다.

### 나. 변이원성 시험 방법

#### 1) 시약 및 재료

본 논문에서는 대상 시료에 대한 변이원성을 평가하기 위하여 Ames가 제시한 방법으로 균주확인 예비실험을 실시하였고(Ames et al, 1983), 본 실험에서는 Ames test(Ames et al, 1983)가 제시한 방법을 변형한 Yahagi 방법(Yahagi et al, 1997)으로 변이원성 시험에 이용하였다. Ames test에서 사용한 대표적인 시약은 S9 mixture(S9 fraction, NADPH Regensys"A", NADPH Regensys"B")이며 MG plate에서는 Top agar(NaCl, 한천, 증류수)를 가장 많이 사용하였다. 그리고 EOM 추출에는 dichloromethan, methanol, 그리고 3차 증류수가 사용되었으며, 대조군으로는 DMSO(dimethylsulfoxide), Benzo(a)pyrene, 2-NF(nitro fluorene), Sodium azide, ICR-191 를 사용하였다. 그리고 균주확인 실험에서는 L-Histidine, ampicillin 3H<sub>2</sub>O, D-biotin 등을 사용하였다.

일반적으로 실험에 사용될 S9 fraction은 연구자가 직접 제조하여 사용하지만, 본 실험에서는 S9 fraction을 NADPH와 함께 우정 BSC사 (한국)에서 구입했고, 시약인 음성대조군물질의 DMSO는 시그마 알드리치사 에서 구입하였고 양성대조

군물질의 NF(nitro fluorene)와 Benzo(a)pyrene은(시그마사), ICR-191(Fluka사), Sodium azied(Fluka사)에서 각각 구입하였다.

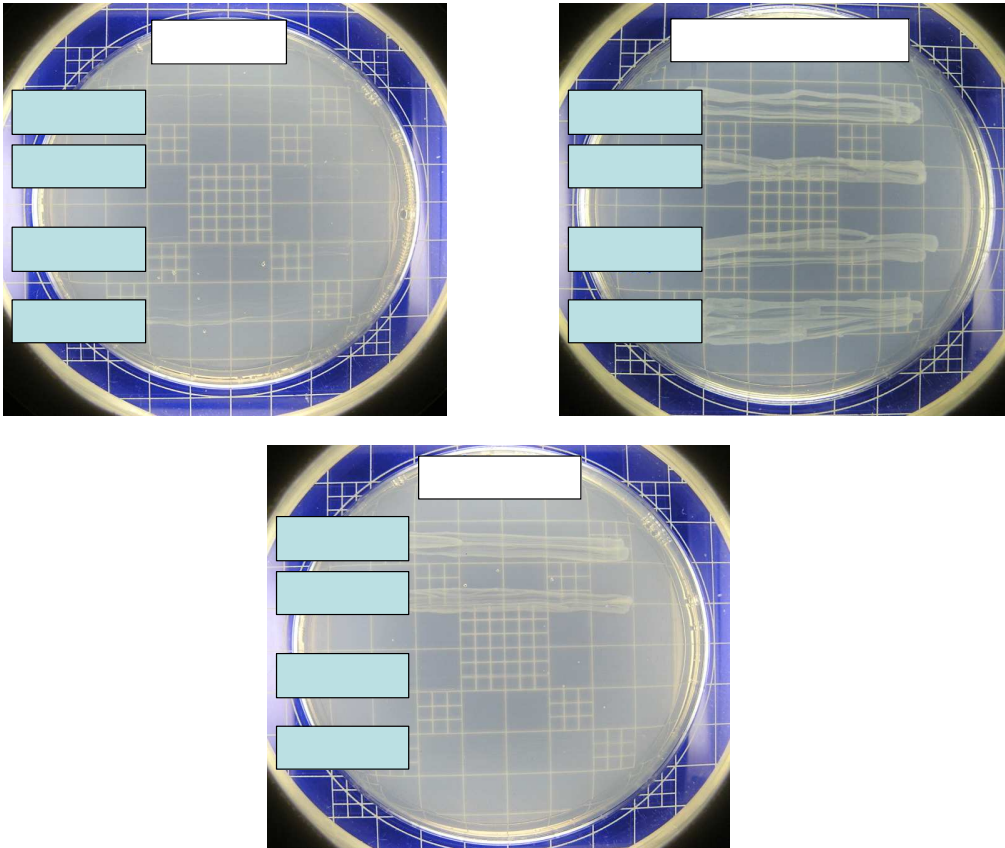
## 2) 실험균주 선택

본 연구에서 채택한 세 가지 물질들과 같이 대기상의 입자로 존재하는 물질은 포집을 해도, 그 시료의 양이 극소량이기 때문에 발암성에 대한 위해성을 동물 실험 보다는 주로 미생물을 이용한 *Salmonella typhimurium* 를 변이 시킨 균주채택에 대한 실험 제시가 보고 되어있다(Tokiwa 등, 1977; Teranish 등, 1978). 실제 많은 실험실에서 변이원성 시험에 이용되는 *Salmonella typhimurium* 균주는 시험물질에 대한 돌연변이 유발 감수성을 높일 수가 있으며 이 같은 목적으로 다양한 변이가 도입되어 있다. 이 같은 사실이 본 연구에서 *Salmonella typhimurium* 균주를 선정하게 된 근거가 되었으며 그 중 TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주를 선택하여 변이원성을 진행하였다. TA98 과 TA100 균주는 메드빌사 (Korea)에서 공급받았으며 TA1535 와 TA1537 균주는 경상대학교 의과대학 미생물학교실에서 공급받아 -80℃ 로 냉동 보관하여 사용하였다.

실험실에서 공급받은 균주는 정확한 결과를 위하여 각 균주들의 고유한 특성에 대한 균주 품질 관리확인 실험이 수행되어져야 한다. 따라서 암피실린 최소 포도당 배지 (Ampicillin MG plate), 히스티딘/비오틴 최소 포도당 배지 (Histidine/ Biotin MG plate), 비오틴 최소 포도당 배지 (Biotin MG plate)에서 각각 균주에 대한 확인 실험을 수행하였다.

균주확인 시험결과에 의하면 균주 TA98, TA1537은 돌연변이 발생 형태(mutation type)가 염기서열이 통째로 이동되는 구조이동형 돌연변이(frame-shift mutation)이고 TA100, TA1535 균주는 염기서열이 소실되는 DNA소실 돌연변이(missense mutation)를 나타내었다. 4종의 균주 모두 히스티딘 오페론에 변이를 가지고 있어서 히스티딘 요구성을 보이고 있으며, 암피실린에 내성을 나타내고 R-factor를 보유하는 균주는 TA98 과 TA100 뿐이다. 따라서 37 °C 조건하에 12~24시간 배양 후, 히스티딘/

비오틴 최소 포도당 배지 (Histidine/ Biotin MG plate) 에서는 모든 균주가 자라야 하고 비오틴 최소 포도당 배지 (Biotin MG plate) 에서는 모든 균주의 생육저해가 나타나야 하지만 암피실린 최소 포도당 배지 (Ampicillin MG plate) 에서는 TA98과 TA100은 생육저해를 나타내지 않아야 하며, TA1535와 TA1537은 생육저해를 나타내야 한다(Ames et al, 1983).



[그림. 2] 균주 확인 테스트

[표.1] *Salmonella typhimurium* 균주의 특성

	TA98	TA1537	TA100	TA1535
Mutation type	Frame-shift mutation		Missense mutation	
Histidine 요구성	+	+	+	+
R-factor	+	-	+	-
Positive control (-S9)	2-nitro fluorene(NF)	ICR 191	Sodium azide	Sodium azide
Positive control (+ S9)	Benzo(a)pyrene			
Negative control	DMSO (Dimethylsulfoxide)			

### 3) 대사활성체(S9 fraction)

대사활성체는 수컷 쥐(rat) 를 이용하며 포유류에 약물 대사 효소계의 유도체를 적절하게 선정하여 투여한 후 간장에서 S9 fraction을 조제하고, 이용 전까지 -80℃ 이하에서 보관한다. 이용 시에는 보효소 등을 첨가하여 S9 mixture을 만들고 혼합물 중의 S9 농도는 10% 이내로 하도록 한다. 본 실험에서는 시판된 것을 직접 구입하여 사용하였다.

### 4) 대조군 선정

음성대조군물질에 사용한 DMSO(dimethylsulfoxide)물질과 양성대조군물질로 사용한 2-Nitro fluorene(20ug/ml), sodium azide(20ug/ml), ICR-191(20ug/ml), benzo(a)pyrene(20ug/ml)의 물질에 대한 TA98, TA100, TA1535, TA1537은 liver S9 fraction 첨가 유무 값과 함께 전체 결과는 다음 [표. 2]와 같다. 직접 유발 돌연변이 물질(direct mutagen)인 2-Nitro fluorene은 TA98의 경우 -S9에서, 간접

유발 돌연변이 물질인 Benzo(a)pyrene은 +S9에서 많이 나온다. DMSO(dimethylsulfoxide)에 의한 자연 돌연변이는 전체 균주 중 TA100에서 더 민감하게 반응한다.

[표. 2] 알려진 반응성 시약을 이용한 균주별 변이원성 반응의 적합성 평가

대조군	균주	TA98		TA100		TA1535		TA1537	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
음성 반응 물질	DMSO	20±3	60±7	139±8	134±19	19±9	11±5	8±1	11±1
	2-Nitro fluorene	275±19	*	*	*	*	*	*	*
	sodium azide	*	*	1003±14	*	127±366	*	*	*
	ICR 191	*	*	*	*	*	*	3537±365	*
	B(a)P	*	248±6	*	262±35	*	13±4	*	77±6

\* ; 공식적인 반응성 시약이 알려진 바 없어, 반응성 평가를 수행하지 않았음

##### 5) 변이원성 시험 방법

Ames test와 같은 복귀돌연변이 시험법은 유전자돌연변이의 지표가 되는 시험으로서 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*) 또는 대장균(*Escherichia coli*) 을 이용한 복귀돌연변이시험이 제시되어 있다. 이 시험법은 발암성 물질에 대해 높은 감수성을 나타내는데 발암물질의 85%이상이 돌연변이원이라는 결론이 나온 이후 돌연변이 유발물질에 대한 연구는 발암물질의 규명을 위한 1차적 검증으로서 상당한 영향력을 지니게 되었다(Ames, 1975). 돌연변이원성이 항상 발암성을 예상하는 기준일 수는 없지만, 단기 돌연변이의 검사로는 저렴한 비용으로 간편하게 대상물질에 대한 유전독성(genotoxicity) 평가를 할 수 있다는 장점을 가지고 있다(Krewski and Thomas, 1992; Lewtas,1989). 따라서 본 실험에서는 Ames test(Ames et al,

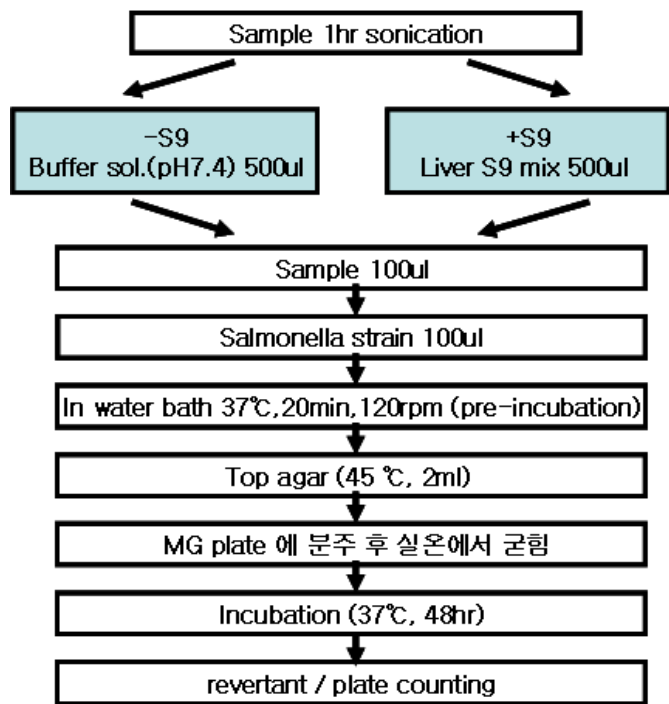
1983)가 제시한 방법을 변형한 Yahagi 방법(Yahagi et al, 1997)으로 실험을 진행하였다.

Vogel-Bonner medium E (50X) 제조를 위해 3차 증류수 약 200ml를 hot plate를 이용하여 45℃로 유지하고 50ml 용량플라스크에서 계속 유지하며  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g, Citric acid monohydrate 5g,  $K_2HPO_4$  25g, ,  $NaH_2N_4PO_4 \cdot 4H_2O$  8.75g 을 하나씩 녹인다. 모두 녹인 후 3차 증류수로 용량 50ml mess-up 한다. 40% 글루코스 용액(glucose solution) 은 100ml 용량의 용량플라스크에 소량의 증류수를 넣고, glucose 40g을 녹인 후 증류수로 100ml로 mess-up 한다. Agar solution 조제는 2 l 의 용량플라스크에 agar 30g을 넣고 증류수 1860ml를 넣은 후 녹인다. MG Plate를 만들기 위해서는 앞에서 제조한 Vogel-Bonner medium E (50X)와 40% 글루코스 용액(glucose solution) 그리고 한천 용액(Agar solution)을 121℃로 20분간 멸균하고, 각각 40ml, 100ml, 1860ml씩 혼합하여, 멸균된 초자 기구를 이용해 30ml씩 petri plate에 고르게 퍼트리면서 기포가 생기지 않게 넣는다. 뚜껑을 0.5 mm 가량 열어 식힌 후 균희진 MG plate는 랩으로 충분히 밀봉 후, 호일로 싸서 보관한다. 돌연변이원성 시험을 위해서는 시험 전에 48시간 동안 사전 배양을 시켜 오염 여부를 확인 후 사용한다.

탄소입자(Carbon Black; CB) 와 디젤엔진연소분진(Diesel Exhaust Particle; DEP), 탄소나노튜브(Thin-Multiwall Carbon Nano-tube; T-MWCNT)는 물질의 특성상 뭉침 현상이 심하여 DMSO(dimethylsulfoxide) 에 혼합 시킨 후 1시간 동안 초음파를 이용하여 고주파 용해시켰다. 실험에 사용되는 각각의 시험 시료 용액을 만든 후 함께 사용되는 양성 대조군 물질(positive control)과 음성 대조군 물질(negative control)을 준비한다. 양성 대조군 물질(positive control)은 대사활성체 (liver S9 mixture)의 유무와 균주에 따라 달라지는데 대사활성체가 없는 조건(-S9)에서 TA98 균주는 2-nitrofluorene, TA100과 TA1535 균주는 sodium azide, TA1537 균주는 ICR 191 을 사용하였다. 대사활성체가 있는 조건(+S9mix)에서는 모든 균주가 동일하게 benzo(a)pyrene을 양성 대조군 물질(positive control)로 사용하였다. 음성 대조군 물질(negative control)로는 대사활성체와 균주에 상관없이 DMSO(dimethylsulfoxide)를 사용하였다. 멸균한 시험관에 S9 buffer 500 $\mu$ l, 시료 100 $\mu$ l, salmonella 균주 100 $\mu$ l 씩을

넣어 섞은 후 37℃ 배양기(incubator)에서 120 rpm, 20분 동안 사전 배양을 실시한다. 사전 배양 시킨 시험관에 45℃ 정도의 Top agar 2ml을 추가하여 섞은 후 미리 준비한 MG plate에 고르게 분주한다. 이때 Top agar의 온도가 너무 높을 시 균주의 생존율이 감소하므로 주의하도록 한다. 분주 후 실온에서 굳혀 48시간 동안 37℃로 배양기에서 배양한다. 48시간 후 plate에서 발현된 균의 집락(colony) 개수를 측정한다. Ames 시험법에 관한 모식도는 [그림. 3]과 같다.

$$\text{순수변이 콜로니 수(변이 콜로니 수 보정값)} = \text{총 변이 콜로니 수} - \text{음성대조군 콜로니 수}$$



[그림. 3] 변이원성 시험 과정

## 다. 대상물질의 시험 용량 결정

### 1) 나노 입자

본 실험에서 사용된 나노입자는 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP), 탄소나노튜브(CNT)이며 이 세 가지 물질에 대한 변이원성 시험을 실시하여 변이원성에 대해 각각의 물질이 미치는 영향을 관찰하였다. 나노 입자 처리 시에는 별다른 전처리 과정 없이 직접 물질을 처리하여 실험을 진행하였다.

### 2) 유기추출성분

변이원성 실험에 이용할 나노입자와 같은 동일물질(CB, DEP, CNT)과 균주(TA98, TA100, TA1535, TA1537)를 동일한 조건하에서 유기추출성분에 대한 변이원성 시험을 시행하였다. 세 가지 나노입자를 유기추출과정을 통해 유기성분을 추출한 후에 질소농축과정으로 용매를 증발시키고 그 추출액을 정량해서 이용하였고, 유기추출과정은 다음과 같다.

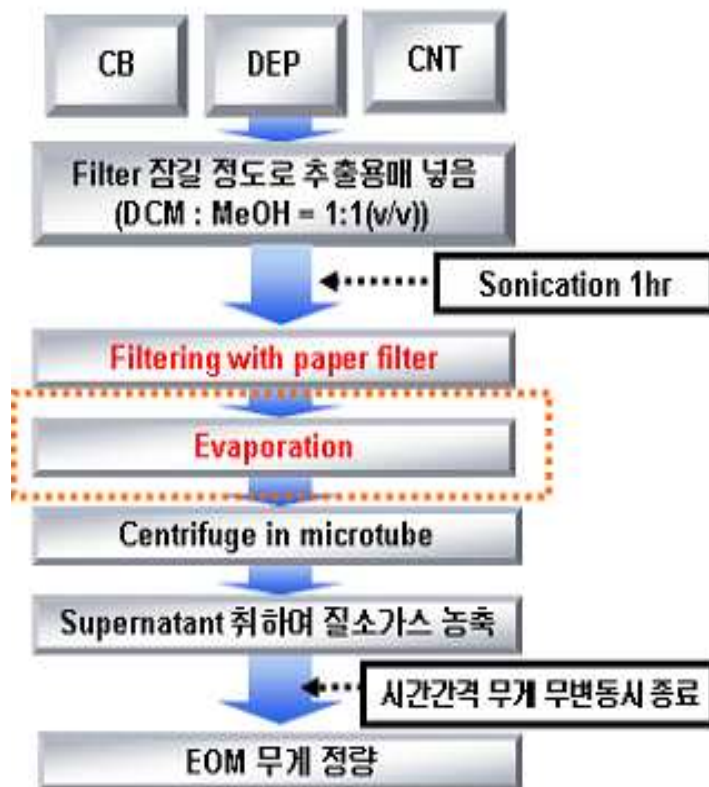
나노입자와 동일한 세 가지 시료인 탄소입자(Carbon Black; CB), 디젤엔진연소분진(Diesel Exhaust Particle; DEP), 탄소나노튜브(Thin-Multiwall Carbon Nano-tube; T-MWCNT)를 변이원성 평가를 위한 시료로 사용하기 위해 선별한 유기용매를 이용하여 추출한 후 정량하였다. 유기용매 선별은 메탄올, 에탄올, 헥산, 디클로로메탄 등을 사용하여 예비 추출을 시행해 본 결과 디클로로메탄과 메탄올을 1:1(v/v)로 섞은 용액에서 가장 높은 추출 비율을 보였기에 본 용액을 선정하였다.

각각의 실험물질을 50ml tube에 유기용매와 일정량씩 넣어 섞은 후 초음파 용해(sonicator)를 시켜 추출을 시행하였다. 1시간동안 초음파 용해(sonication)시킨 후 실험물질을 11um paper filter(Adventec, USA)를 이용해 11um 이하로 걸렀고 이들 입자의 유기 추출물만 남겨진 플라스크에 용매 제거 과정인 Evaporation을



실시하였다.

Evaporation 후 농축된 추출액을 micro spoide로 e-tube에 각각 넣어서 8000rpm 으로 5분간 원심분리(centrifuge)를 돌린다. 여기서 깨끗한 상등액 (surpernatant)만 유리 vial에 담고 남은 입자는 다시 용매와 suspension 하여 앞 의 과정을 2~3번 반복한다.(상등액이 맑아질 정도까지 반복) 모아진 추출액은 질 소가스 농축기를 이용하여 농축시킨다. 농축 후 반복 무게 정량 시 무게 변화가 없으면 추출이 완료된다. 추출에 대한 과정의 모식도는 [그림. 4] 와 같다.



[그림. 5] 유기성분 추출과정

## 라. 통계분석

변이원성 정도는 실험결과의 집락 수에 기인했으며 대상물질과 그 농도에 대한 평균과 표준편차 값으로 비교하였다. 실험물질의 농도가 집락 수에 미치는 영향을 분석하기 위하여 비모수적인 방법의 하나로 Kruskal-Wallis test를 시행하였다. 여기서 Chisq값과, p-value는 Kruskal-Wallis test 분석결과 값이며, 사후검정을 위하여 Student-Newman-Keuls method를 시행하였는데, 이는 Kruskal-Wallis test 결과 값 에서 유의한 경우에만 분석한 것이다.

### Ⅲ. 연구결과

#### 1. 탄소성분 나노입자의 물리적 특성

##### 가. 탄소성분(Total Carbon)

대기 중에 입자상으로 존재하는 탄소성분(total carbon)은 대체로 유기탄소(organic carbon; TC), 원소탄소(elemental; EC) 그리고 탄산염(carbonates)으로 구성되어 있다. 이 중 탄산염의 경우는 대부분이 2 $\mu\text{m}$  이상 거대입자에 포함되며 전체 입자 무게농도의 1% 이하로 존재하기 때문에 일반적으로는 입자상 탄소성분(total carbon)으로 고려하지 않는다(이중훈 등, 1997) 반면에 원소탄소(elemental carbon; EC)와 유기탄소(organic carbon; TC)는 대기환경 및 인체에 미치는 영향이 크다는 공통점을 가지고 있다. 이들 중 많은 영향을 미치고 있는 유기탄소(organic carbon; TC)는 미세입자 군에 포함되며 가스 상의 입자로 배출되어 대기 중에 확산 되어 있는데 인위적 발생원에서 직접 배출되거나, 대기 중에서 기체상 유기화합물이 광화학 반응 등에 의해 입자로 변환 되어 생성된다(Chow et al., 1994) 원소탄소(elemental carbon; EC)는 화석연료의 불완전 연소에 의해 배출되는 0.1 $\mu\text{m}$  크기 이하의 1차 오염 물질로서 물리 화학적 변환에 위해서는 생성되지 않는다. 이 같은 입자들을 구성하고 있는 탄소성분(total carbon)은 2 $\mu\text{m}$  이하의 미세입자 군에 속하며 대체적으로 인위적 활동을 수반하여 대기중 입자로 직접 배출되거나, Gas 상태로 배출되어 대기 중으로 확산 된 것이 대부분이다. 도심 지역과 같은 오염지역의 경우 탄소성분(total carbon)이 미세입자(PM<sub>2.5</sub>) 무게농도의 40%를 차지한다(백준남 등, 1996) 탄소성분은 대기 중에 있어서 화학반응의 촉매제로 작용하고, 대기의 가열 및 냉각에 관여함과 동시에 benzo(a)pyrene과 같은 높은 변이원성 물질을 장거리 수송하고 인체 내로 운반하는 흡착제의 역할을 한다.

## 나. 나노입자

나노입자는 10억분의 1m에 해당하는 길이로서 사람의 머리카락 굵기의 약 5만분의 1에 해당한다. 형태로는 넓은 표면적을 가진 콜로이드 상의 불균일한 분산 입자이며, 원하는 목적에 맞는 적절한 입도의 크기 및 분포에 맞게 입자의 크기를 수 nm에서 수백 nm로 가질 수 있으며, 1~100 nm를 나노 영역으로 구분한다(홍재민, 2005).

나노입자는 인체 내에서 주로 폐와 간에 분포를 하지만, 장기간 흡입 시 후각신경을 따라 뇌로 이동하고 폐에서 혈관을 따라 인체 내 장기로 분포 되며, 피부에도 흡수율이 높은 성질을 가지고 있다. 나노 입자에 대한 위해성의 보고들은 꾸준히 발표되어지고 있다.

그리고 입자의 입경이 작아질수록 표면에 분포한 원자의 비율이 증가하는 양자 크기 효과(quantum size effect)를 보유하는 부분도 나노의 특징 중 하나이다. 나노물질을 가공할 때 유용성, 촉매로써의 활성 및 광학 성질을 발현 할 수 있는 부분도 바로 양자 크기 효과 때문인 것으로 알려져 있다.

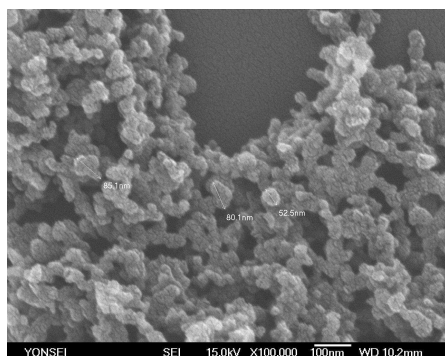
## 다. 탄소나노튜브(CNT)

탄소나노튜브(CNT)는 아크방전법으로 플러린 합성법을 연구하는 과정에서 발견된 철보다 훨씬 강하고 가벼운 탄소 소재의 물질로 현재 나노 소재로서 가장 많이 부각되고 있는 물질 중 하나이다. 물질의 형태에 있어서는 벌집 모양의 육원환 위에 이루어진 그래펜 시트를 둥근 원통 모양으로 만든 것이다. 탄소나노튜브(CNT)의 벽의 구성에 따라 단층과 다층으로 나누어 있다. 단층탄소나노튜브(Single-wall Carbon Nano-tube; SWCNT)는 외벽이 단일층으로 구성되어 있고, 다층탄소나노튜브(Multi-walled Carbon Nanotube; MWCNT)의 형태에 있어서 외벽은 복수의 원통이 크기대로 차례로 안쪽에 들어 있고, 대나무통 모양이며 양 끝

은 대부분 닫혀 있다. 다층탄소나노튜브의 내벽의 지름은 1~2nm 이고 바깥지름은 5~50nm이며 길이는 10um를 넘어 나노물질에 있어서는 상당한 가로세로비(aspect ratio)를 갖고 있다. 탄소나노튜브(CNT)는 철보다 강하면서 훨씬 가볍다는 것을 가장 큰 특징으로 들 수 있고 그 외에도 전기를 구리보다 더 잘 전달하며 열전달에 있어서는 다이아몬드를 능가한다는 보고도 있다(임상우, 2007).

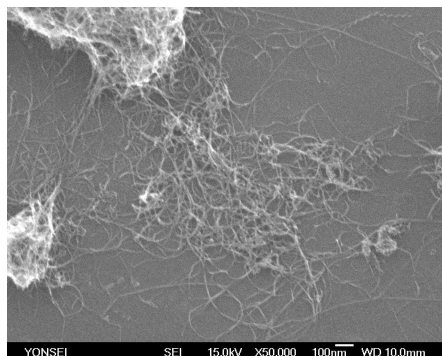
이렇듯 탄소성분과 나노입자는 여러 가지 성질이 있는데, 본 연구에서 사용된 나노크기의 탄소성분을 가진 세 가지 물질의 크기(size)는 탄소입자(Carbon Black; CB)가 30nm이며, 디젤연소분진(Diesel Exhaust Particle; DEP)이 40~80nm, 탄소나노튜브(Thin-Multiwall Carbon Nano-tube; T-MWCNT)는 직경 4~6nm에 길이 10~20um 이다. DEP와 CNT의 SEM상의 사진은 다음과 같다.

**in methanol (X100,000)**



[그림 6] DEP/SEM 사진

**in chloroform (X50,000)**



[그림 7] Thin-MWCNT/SEM사진

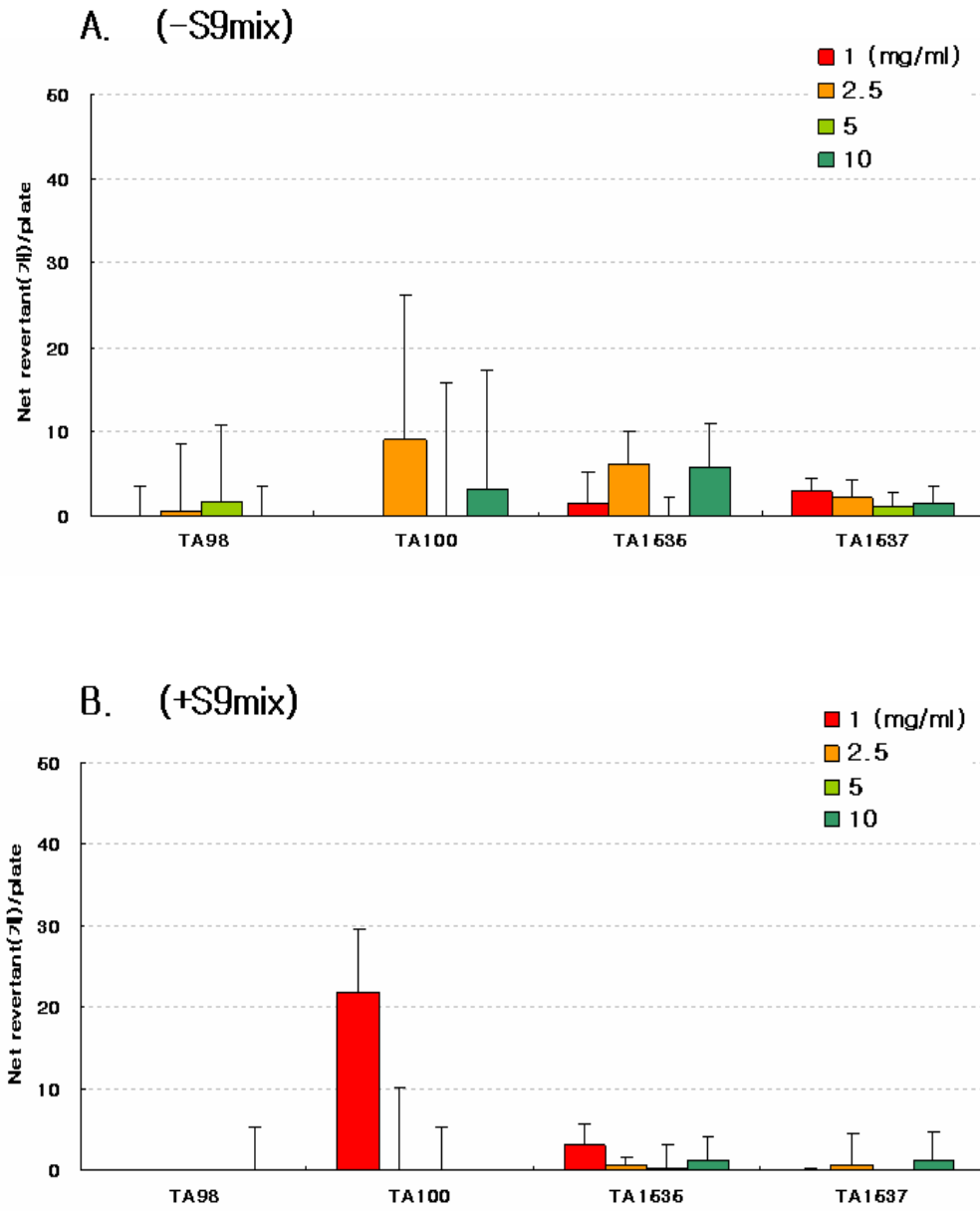
## 2. 나노 입자의 변이원성 시험 결과

순수하게 시험 시료에 의하여 변이가 일어난 균의 수를 알아내기 위하여 Net revertant 집락(colony) 개수를 산출하도록 한다. Net revertant의 집락(colony) 개수는 시험 시료에서 성장한 균의 수에서 DMSO(dimethylsulfoxide)의 음성 반응 물질에 의해 자연적으로 성장한 균의 개수를 제외하여 산출한다. OECD guideline에서는 plate 당 성장균수가 50개 이하일 경우는 변이원성이 없다고 판단하고, 이상일 경우 약한 변이원성이 있다고 판단하며, 100개를 상회할 경우에는 강한 변이원성 유발 물질로 평가한다.

### 가. 탄소입자(Carbon black; CB)

탄소입자(CB)에 대한 나노입자의 변이원성결과 실험균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537의 변이 집락 수를 보면 대사체(S9 mixture)의 유무와 관계없이 비슷한 집락 수를 보였다. TA98은 20~40개미만이였고, TA100은 120~160개 정도의 수치를 보였으며, TA1535, TA1537은 10~20개미만으로 가장 낮았다. 결과를 보면 TA100에서만 다른 균주들에 비해 비교적 높은 집락 수를 보였는데, 균주 확인 시험에 의한 TA100의 특성을 보았을 때, 탄소입자(CB)는 missense mutation을 일으키며 염기서열 치환에 의하여 야생형으로 복귀시키는 경향을 확인 할 수 있었다.

모든 균주들은 공통적으로 용량-반응 결과는 나타나지 않았다. 특히 Net revertant값을 관찰시 용량-반응이 유의하지 않다는 부분이 잘 드러났다. 결과에 대한 그래프는 S9 mixture의 여부와 함께 Net revertant를 동시에 구분하였으며 결과는 아래 [그림. 7]과 같다.



[그림. 8] 탄소나노입자(CB) 균주 및 용량별 변이원성 평가

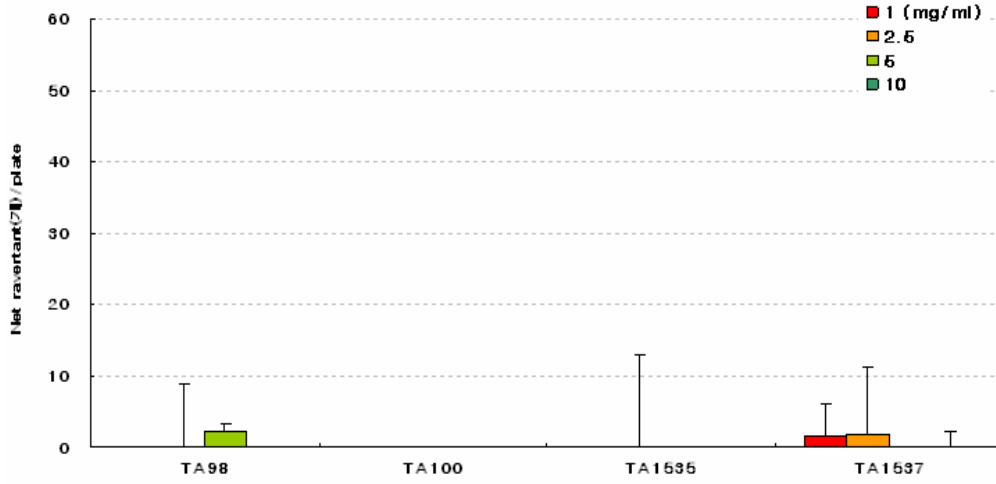
## 나. 탄소나노튜브(Thin-Multiwall Carbon Nano-tube; T-MWCNT)

탄소나노튜브(Thin-Multiwall Carbon Nano-tube; T-MWCNT)의 실험 결과 낮은 변이도가 관찰되었다. TA98의 경우는 최고 50개미만이었고, TA100은 170개미만이었으며, TA1535와 TA1537은 각각 10개미만으로 미미한 집락의 관찰을 보였다. 또한 전반적인 결과를 살펴보면 CB와 유사한 점을 몇 가지 관찰할 수 있는데 전체적인 균주의 집락 수에 비례하면 주로 TA100균주에서만 높은 수치를 얻을 수 있었고, TA1535와 TA1537은 거의 미미했다는 점이다. 그리고 높은 수치는 아니지만, TA1535와 TA1537에 비했을 경우 TA98에서 약간 높은 수치의 집락 수가 관찰되었다는 것을 알 수 있었다. TA100이 가장 높은 것으로 보았을 때, 이 역시 탄소입자(CB)와 같이 Missense mutation으로 전환을 하게 만드는 성질이 있다고 판단할 수 있었다. 그리고 TA100에 활성체(S9 mixture)가 첨가된 상태에서 약간의 용량-반응 결과가 관찰되었음을 확인되었다. 이에 대해 +S9에서 TA100의 미세 반응에 대한 정확성을 위해 사용되어진 검증 결과를 보면 +S9인 경우 TA100의 농도(1, 2.5, 5, 10mg/ml)별 평균값이 162, 172, 175, 185인데 p-value가 0.338로 유의수준 0.05보다 크므로 시료의 농도차이는 유의하지 않았다.

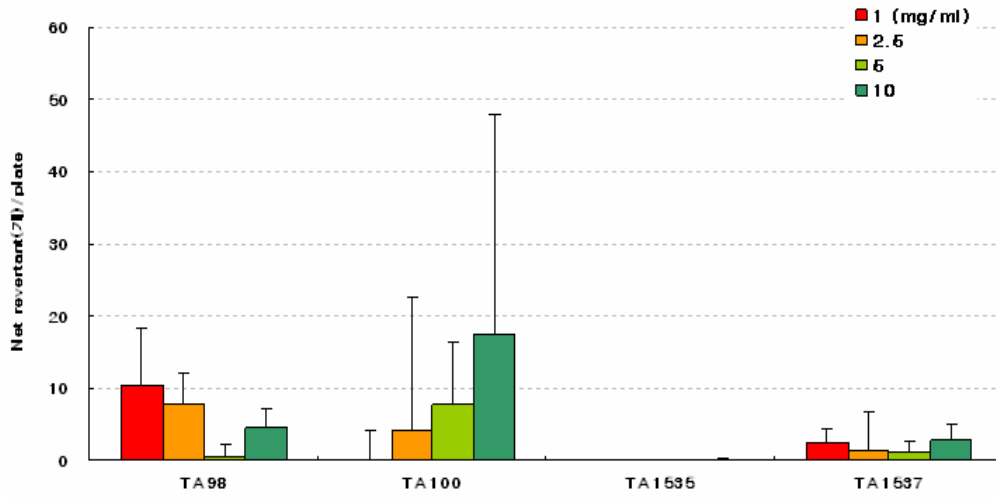
TA100에 대사체를 넣었을 경우 미세한 용량-반응이 관찰되었지만 결과적으로 봤을 때에는 유의한 해석에 영향을 주지 못했다. 탄소나노튜브(CNT)에 대한 실험 결과 그래프는 아래 [그림. 8]과 같다.



### A. (-S9mix)



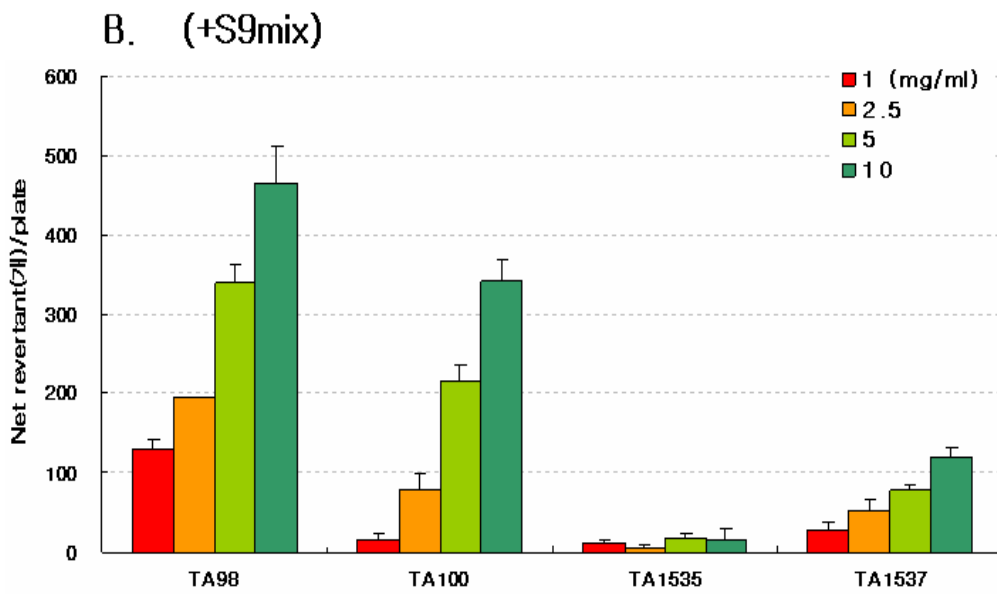
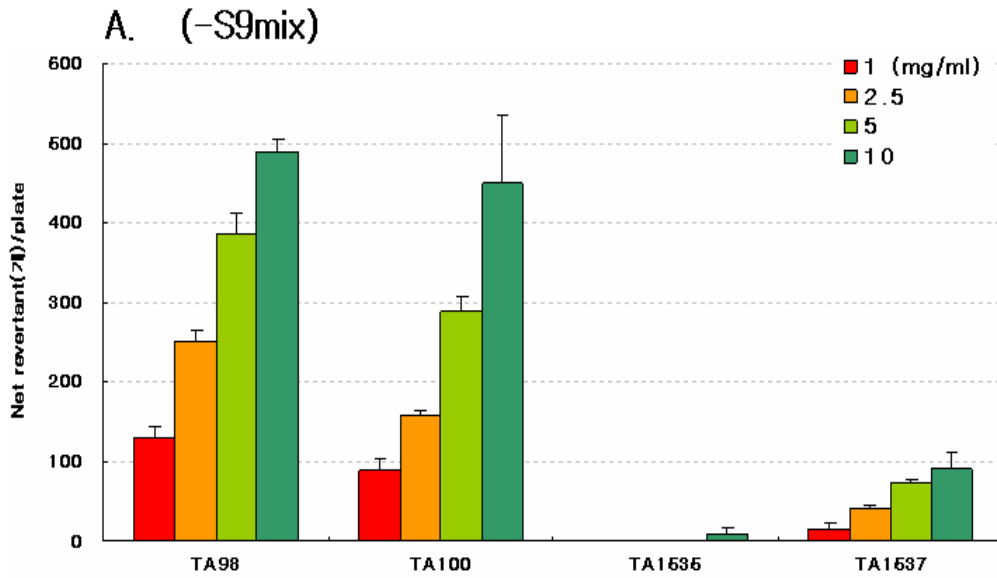
### B. (+S9mix)



[그림. 9] 탄소나노튜브(CNT)의 균주 및 용량별 변이원성 평가

## 다. 디젤엔진연소분진(Diesel Exhaust Particle; DEP)

결과 상 집락 수를 산정했을 때, 기존에 실험된 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)의 결과와 비교해 상대적으로 높은 수치를 보였다. 디젤엔진연소분진(DEP)의 실험 결과 모든 균주에 대한 집락 수는 TA98과 TA100의 수치가 가장 높았으며, 처리 농도별 1, 2.5, 5, 10mg/ml에 대해서도 점증적으로 높아짐에 따라 변이된 집락(colony)수 역시 점차적으로 상승하는 것을 보였다. 그에 비해 TA1535, TA1537 역시 농도대별 집락의 수치도 같이 높아졌지만, TA98과 TA100에 비해서는 낮은 집락을 보였다. 균주에 있어서 특징적인 양상을 보면 TA1535와 TA1537이 낮은 집락 수를 보였다는 부분은 탄소입자(CB), 탄소나노튜브(CNT)와 비슷한 결과가 나왔다. 그러나 TA98과 TA100은 월등히 높았으며, 이 실험의 결과가 기존에 연구가 되어진, 여러 선행논문의 디젤분진(DEP) 변이원성에 있어서 인체 유해성에 대한 연구 결과 보고들을 근거로, 세 실험물질 중 디젤분진(DEP)의 독성이 가장 강할 것이라는 부분을 확인하게 되었다. 그래프에 대한 전체적인 결과를 보면, +S9의 TA1535를 제외한 모든 균주에 대한 용량-반응 결과가 확연히 관찰되었다. 그리고 TA98, TA100의 높은 수치를 근거로 디젤분진(DEP)은 DNA소실 돌연변이(missens mutation)와 구조이동형 돌연변이(frame shift mutation)을 일으키는 경향이 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 디젤분진(DEP)에 대한 돌연변이원성 실험에서 frame shift mutation이 일어난다는 보고를(huisingh, 1978) 뒷받침 해준 비슷한 결과를 나타내었다. 디젤분진(DEP)의 실험결과에 대한 재검증을 위해 Kruskal-Wallis test를 실시해본 결과 -S9인 경우 모든 균주가 농도에 대한 유의수준이 0.05보다 작았으므로 농도별 유의한 차이가 있다는 것으로 나왔다. 그리고 +S9 역시 TA1535를 제외한 나머지 균주 역시 유의한 결과가 검증 되었다. +S9Mix의 TA1535는 각각의 농도에 대한 평균값이 26, 21, 32, 31로 p-value가 0.241이며 유의수준 0.05 보다 크므로 농도별 유의한 차이가 없었다. 디젤분진(DEP) 실험결과에 대한 그래프는 [그림.9] 이다.



[그림. 9] 디젤엔진연소분진(DEP)의 균주 및 용량별 변이원성 평가

### 3. 유기추출성분(EOM)의 변이원성 시험 결과

#### 가. 대상 시료에서의 유기추출성분의 추출율 비교

유기성분 추출 과정에서 제한점이 되었던 사항은 시료의 추출률이었는데, 특히 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)는 그 추출률이 매우 낮았다. 세 가지 대상물질 모두 각각 동일한 용량을 맞추어 추출을 진행하였고, 동일하게 유기추출법(EOM method)을 실행 하였다. 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT) 각각 비슷한 %의 용량으로 미량이 추출되었고, 디젤엔진연소분진(DEP) 역시 낮은 추출률을 보였지만, 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)에 비해 상대적으로 높았다. 따라서 추출률이 매우 낮은 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)는 한 번에 실험을 진행하였고, 디젤분진(DEP)는 독립적으로 시행을 하였다. 실험물질에 대한 유기추출물의 양은 다음과 같다.

탄소입자(CB) 추출은 전체 무게 250mg 중에서 2.605mg이 추출되었고(추출률 1%) 탄소나노튜브(CNT)는 250mg 중에서 2.98mg이 추출되었으며(추출률 1.2%), 디젤분진(DEP)은 150mg 중에서 26.36mg이 추출 되었다.(추출률 17.7%)

탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)는 극소량으로 추출 되었으므로 두 물질에 대한 농도의 설정에 있어서 어려움이 있었으며 때문에 각각 2.5 mg/ml의 단일 농도를 설정하여 돌연변이원성 시험(Ames test)를 진행 하였다.

한 가지 농도로 설정을 했기에 농도별에 대한 집락 비교는 불가능하여, 농도에 대한 용량-반응의 결과는 판별할 수 없었다. 그리고 농도 2.5mg/ml에 대한 변이원성은 낮게 나와, 실험의 가설에 대한 두 물질의 유기성분의 결과는 없었다. 반면 두 물질에 비해 추출률이 높았던 디젤엔진연소분진(DEP)은 앞서 진행한 나노입자의 변이원성 시험법 형태로 진행을 하였고, 그에 대한 결과는 나노입자보다는 유기물 입자의 변이원성이 월등히 높은 것으로 관찰되어, 디젤엔진연소분진(DEP)의 유기성분 결과는 예상했던 가설과 동일한 형태로 나왔다.

[표 3] 대상 나노입자별 유기추출물 비교

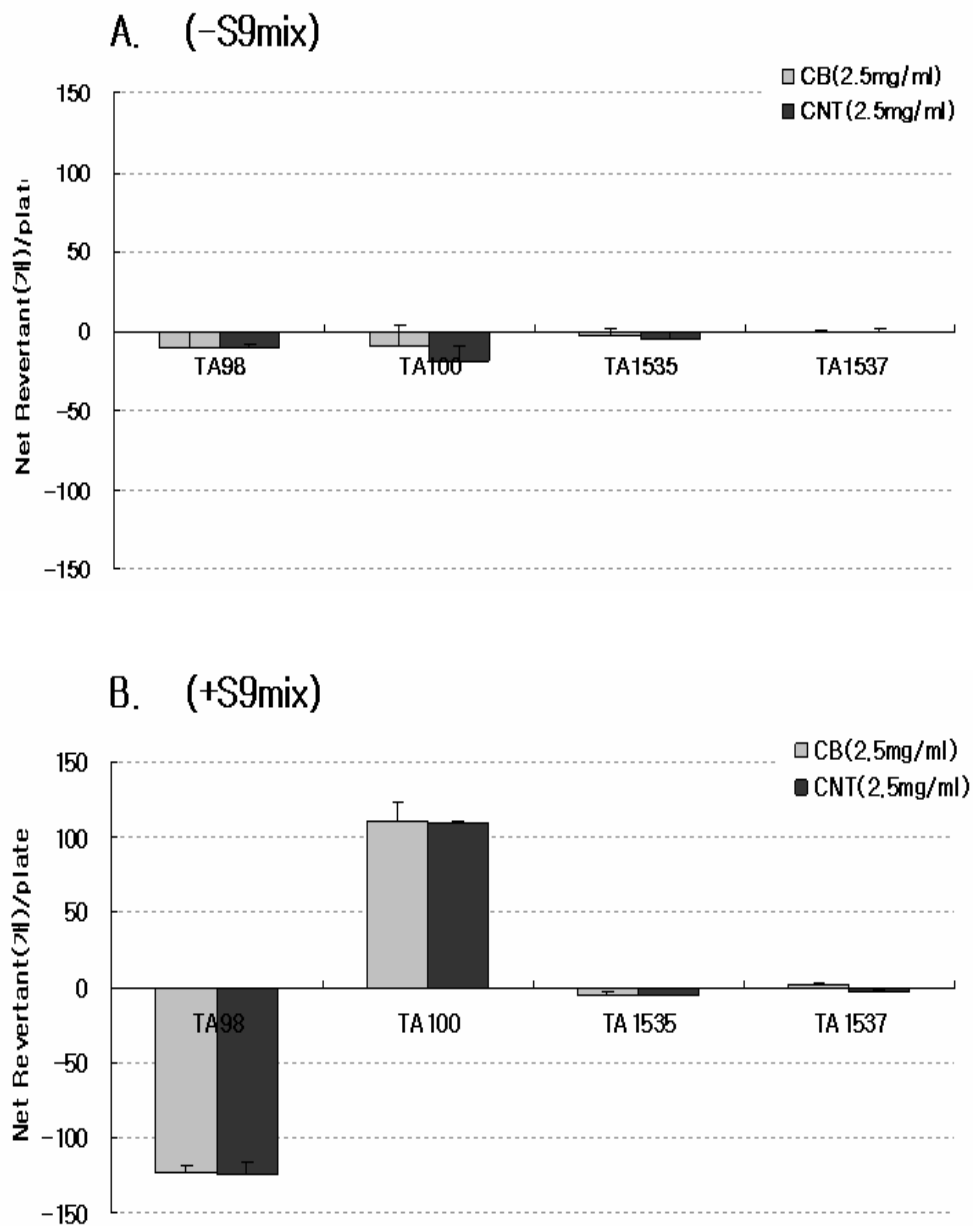
나노입자	사용 입자량(mg)	추출 입자량(mg)	추출률(%)
탄소입자(CB)	250	2.605	1
탄소나노튜브(CNT)	250	2.98	1.2
디젤엔진 연소분진(DEP)	150	26.36	17.7

\*추출률=추출입자량/사용입자량 X 100

#### 나. 탄소입자(CB) 및 탄소나노튜브(CNT)의 유기추출성분 변이원성

유기추출과정을 이용해 각각 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP), 탄소나노튜브(CNT)를 추출하였다. 추출과정에서 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)는 유기용매에 녹이고 filtering 과정 등을 거치면서 입자의 사용 용량에 비해 추출률이 매우 낮게 나왔다. 진행 과정에서의 제한점 등으로 인해 두 시료에 대한 유기추출성분의 변이원성 시험(Ames test)처리 농도는 2.5 mg/ml만을 가지고 진행하였다.

탄소입자(CB)과 탄소나노튜브(CNT)의 결과는 처리 농도를 한가지 밖에 하지 못하였기 때문에 용량-반응 결과를 관찰할 수 없었다. 각 균주별로는 나노입자 결과와 마찬가지로 TA100에서 높은 수치를 볼 수 있었지만, Net revertant 값에 의한 그래프는 모두 음수 값이 나와 해석에는 큰 의미가 없다. 하지만 상대적인 수치이기 때문에 S9이 첨가되어 있을 경우 다른 균주에 비해 TA100에서 많은 변이원성을 가진다고 판단할 수 있다. 결과 값에 대한 그래프는 [그림. 10] 과 같다.



[그림. 11] 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT) 유기추출물의 균주별 변이원성 평가

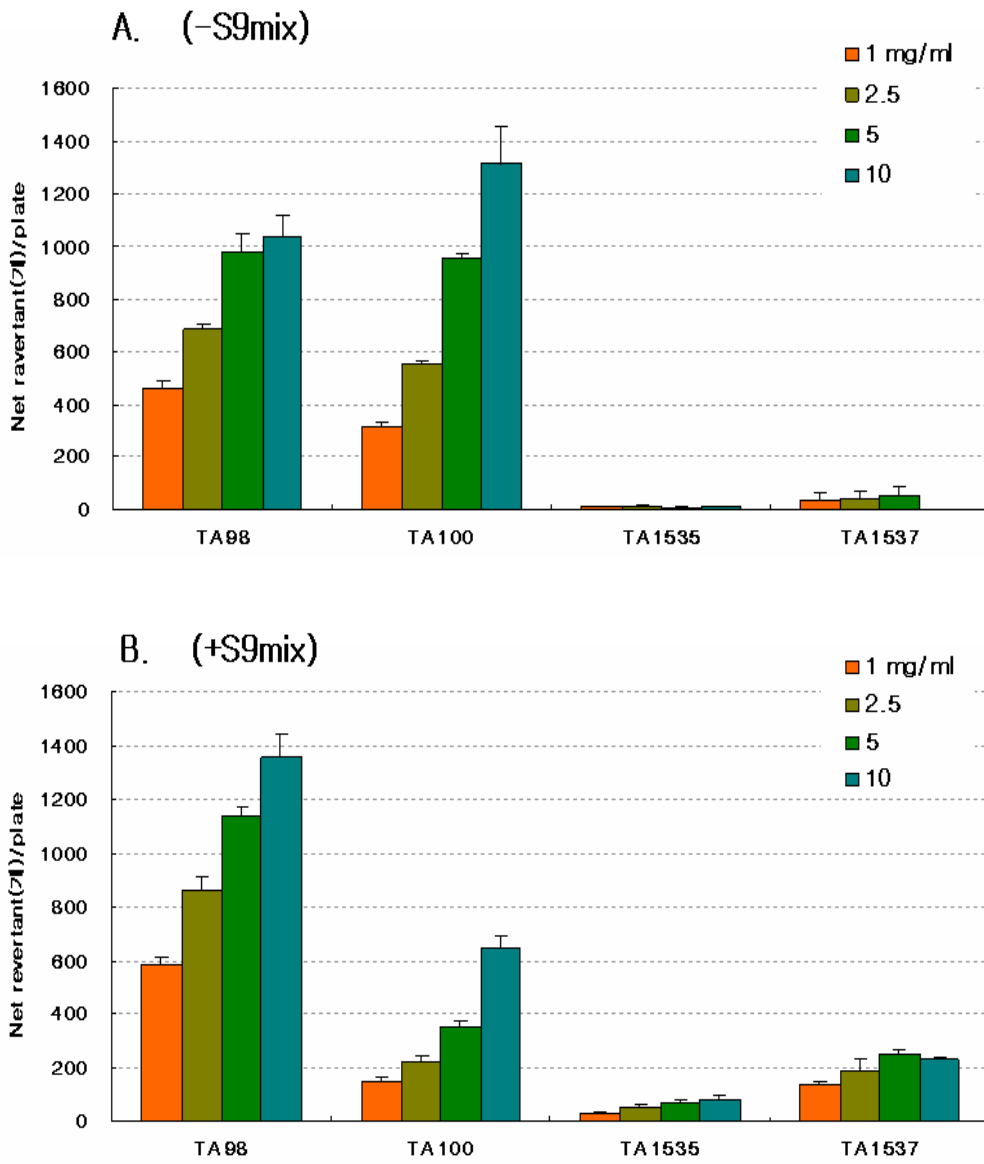
## 다. 디젤엔진연소분진(DEP)의 유기추출성분 변이원성

디젤엔진연소분진(DEP)은 추출물이 다른 선행 논문들의 비교치보다 많은 용량은 아니지만 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)에 비해서 상대적으로 높았기 때문에 실험진행에 있어서 전체입자 때와 같이 n수를 3으로 진행할 수 있었다.

전체적인 변이원성 결과를 봤을 때 다음과 같은 관찰을 할 수 있었다. 나노입자의 결과와 같이 농도별 집락의 개수가 점증적으로 증가하는 것을 볼 수 있으며, 대사체 S9 mixture를 첨가하지 않았을 경우 TA98은 가장 높은 농도인 10mg/ml에서 1020까지의 집락수를 보유하고, TA100의 경우도 10mg/ml에서 1420개/plate까지 보유한 것도 있었다. 농도가 가장 낮은 1mg/ml에서도 두 균주 다 400개가 넘는 집락수를 보였는데, 그에 비해 TA1535와 TA1537은 전반적인 집락수가 50개 미만 이었다. 대사체 S9를 넣었을 경우에는 TA98의 집락수가 월등히 높아졌는데, 10mg/ml의 농도를 기준으로 봤을 때 한배지 당 1400개의 집락 수를 보유하고 있었고, TA100의 경우는 같은 농도에서 400개의 집락 수를 나타내었다. 특이한 결과는 대사체인 S9 mixture가 첨가되지 않았을 경우 TA98과 TA100의 집락 보유수와 정반대로 나타낸 것인데, 예상하건데 TA100의 경우 디젤엔진연소분진(DEP)유기성분의 독성이 강하며 대사체를 넣은 경우 더 심하게 강한 독성 작용이 일어났기 때문에 균주들이 죽어버리는 역작용이 일어나는 것으로 생각이 된다. 그리고 TA98에서는 대사체가 오히려 균주 성장에 도움이 된 것으로 판단된다. 다른 균주인 TA1535, TA1537은 -S9 mixture때와 같이 전체적으로 낮은 수치를 나타냈지만, TA1537의 경우는 대사체를 첨가를 했을 경우 최고 200개 이상의 집락수의 변동을 관찰 할 수 있었다. 모든 실험의 결과를 봤을 때 대사체의 여부에 따라 집락 수에 대한 변동은 디젤엔진연소분진(DEP)의 유기추출물에서 처음 관찰이 되며, 이는 유기물에 의한 강한 독성작용 때문으로 판단되어 진다. 디젤엔진연소분진(DEP)의 결과는 다른 성분들과 비교해 용량-반응이 뚜렷하게 나타났으며, 변이원성의 정도를 비교를 했을 때 나노입자 보다는 유기추출물에 대한 값이 훨씬 높았다. 특히 TA98과 TA100의 경우는 2배정도 높은 집락값이 나왔다. 결과

를 보면 대사체(S9 mixture)를 첨가했을 경우 TA98과 TA100, TA1537에서 집락의 변화를 관찰 할 수 있다. -S9 mixture인 경우 TA100이 그리고 +S9 mixture인 경우 TA98이 높은 수치를 보였다. 다음 그래프는 실험에 대한 3배수의 결과를 평균으로 계산해서 나온 값이지만, 실제 결과 counting시 한 배지에 1600개 이상의 집락을 보유한 경우도 있었다. 결과 그래프를 보면 Net revertant의 값에서 TA1535와 TA1537는 대사체 +S9 mixture일 경우 -S9때보다 용량-반응의 결과를 잘 관찰할 수 있다. 위의 결과를 재확인하기 위해서 실시한 Kruskal-Wallis 검증결과 -S9 mixture인 경우 TA98은 p-value값이 0.022이므로 유의수준 보다 작기 때문에 농도별 차이는 유의하게 나왔으며, TA100은 p-value값이 0.016으로 역시 유의수준보다 작기 때문에 농도별 차이가 유의하는 해석을 할 수 있다. 그리고 TA1535과 TA1537은 유의하지 않게 나왔는데, TA1535의 경우 농도(1, 2.5, 5, 10mg/ml)에 대한 평균값이 22, 28, 19, 22 으로 p-value가 유의수준보다 큰 0.580으로 나왔으며, TA1537의 경우 49, 55, 68, 6으로 p-value값이 0.082이므로 역시 유의수준보다 크다. 따라서 TA1535와 TA1537은 농도대별 revertant값이 유의하지 않다는 것을 확인할 수 있었다. +S9 Mix인 경우 TA98과 TA100 그리고 TA1537은 유의한 결과가 나왔지만, TA1535의 경우는 p-value값이 0.078이었다. 따라서 유의수준인 0.05보다 크게 나왔으므로 농도별 revertant수치가 유의하지 않다는 부분을 확인할 수 있었다. 즉, 농도별 유의한 결과가 나온 것은 +S9 Mix(TA98, TA100, TA1537)/-S9 Mix(TA98, TA100)이다. 변이원성도의 정도로만 봤을 때 나노입자의 DEP에 대한 변이원성 결과보다, 유기추출물의 DEP에 대한 변이원성이 훨씬 높았다. Revertant 수치상으로는 유기성분이 높은 것이 사실이나, 농도의 차이에 대한 유의한 반응에 대해서는 나노입자에 대한 변이원성 시험 결과가 높았고, 그 군주 종류도 많았다. 결과에 대한 그래프는 [그림. 11]과 같다.





[그림. 11] 디젤엔진연소분진(DEP) 유기추출성분의 균주 및 용량별 변이원성 평가

#### 4. 탄소성분 나노입자의 변이원성 비교

유기추출 진행시 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)의 추출률이 낮아 실험 농도를 2.5mg/ml로만 진행을 하였고, 나머지는 각각 농도별로 진행을 하였다. 따라서 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)의 유기추출 성분의 변이원성 비교 단위는 1mg과 250ug으로 각각 나뉘서 비교 분석하였고, 그 외 나머지는 1mg으로 분석하였다. 물질의 돌연변이원성 비교는 아래와 같다.

##### 가. 대상 나노 입자별 변이원성 비교

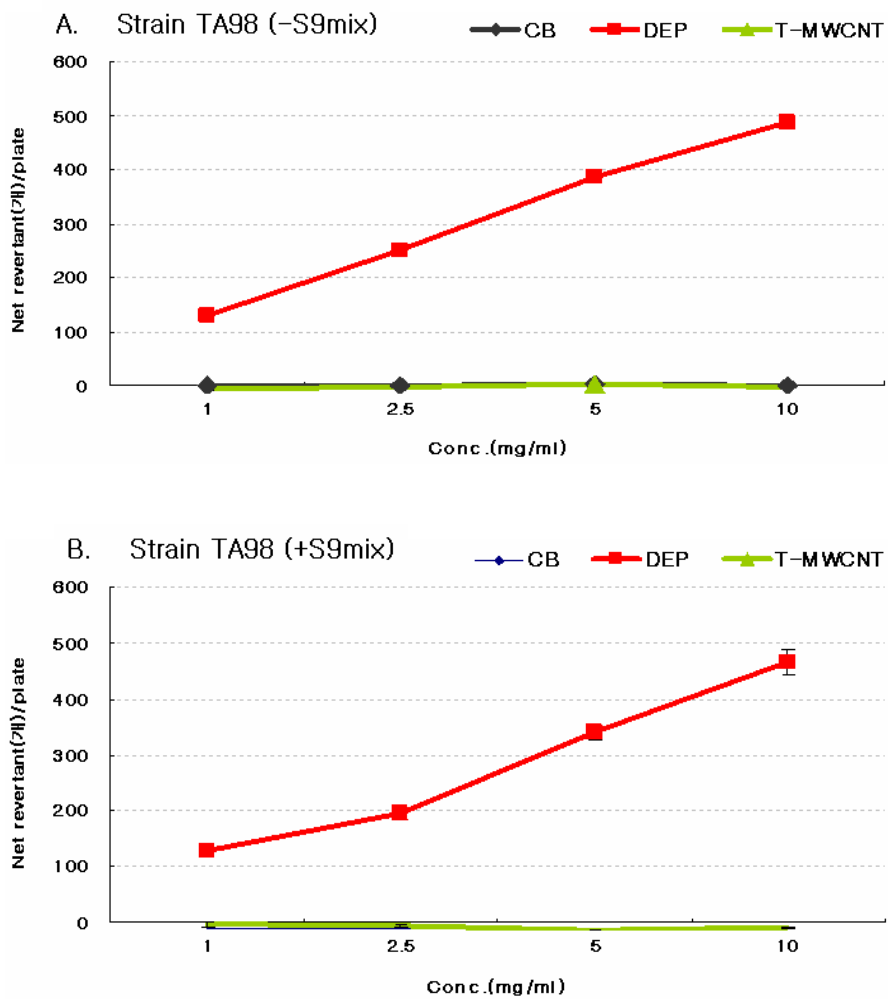
결과 비교를 보면 나노입자의 변이원성은 대사활성인자의 여부에 따라 대상물질에 대한 집락 수가 큰 차이는 없었다. 다만 비교적 TA100에서 높은 집락수가 발생함을 알 수 있다.

[표. 4] 대상 나노입자의 단위용량 당 변이원성 비교 (1mg당)

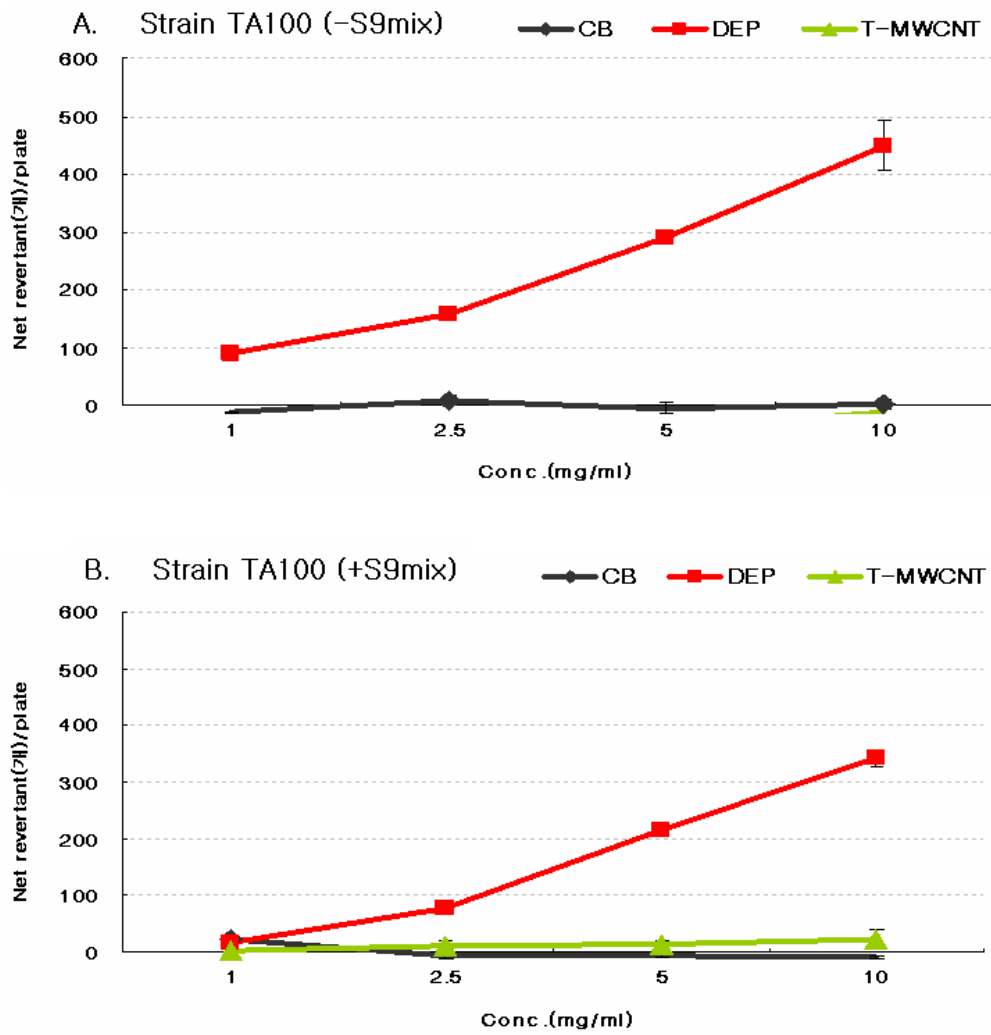
Sample	대사 활성화계	Colony수 (revertant/mg)			
	유무	TA98	TA100	TA1535	TA1537
CB	-S9	19±3	126±14	13±5	5±2
	+S9	33±11	127±6	9±3	9±4
DEP	-S9	504±16	414±18	55±8	105±20
	+S9	499±46	513±27	31±14	128±13
T-MWCNT	-S9	21±6	156±10	9±3	6±3
	+S9	29±3	185±31	13±3	9±2

## 나. 나노 입자의 실험물질 별 변이원성 결과

TA98과 TA100 균주 모두에서 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)에 비해 디젤 엔진연소분진(DEP)이 높은 집락수를 보임을 관찰할 수 있다. 또한 디젤엔진연소분진(DEP)에서만 용량-반응 결과를 나타내고 있다. [그림. 12] 와 [그림. 13] 그래프는 TA98과 TA100 균주에 대한 변이원성만을 따로 나타낸 것이다.



[그림. 13] TA98 균주에 대한 나노입자별 변이원성 비교



[그림. 14] TA100균주에 대한 나노입자별 변이원성 비교

## 다. 대상 나노입자의 유기추출성분별 변이원성 비교

### 1) 대상 나노입자의 유기추출성분별 변이원성 비교

탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)에서의 유기추출물은 약 1%내외의 매우 적은 양으로 추출되기 때문에 단위용량 1mg으로의 투여에 의한 변이원성 시험이 불가능하였다. 따라서 EOM이하 단위용량 당 물질별 변이원성 비교를 plate당 250ug을 투여하여 평가한 결과를 서로 비교하였다.

250ug을 기준으로 환산했을 경우 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)는 +S9일 경우 상대적으로 높아졌음을 알 수 있다. 그러나 한 가지 농도로만 실험을 하였으므로 그 외의 부분은 확인이 불가능하였다. 그리고 디젤엔진연소분진(DEP)의 집락수가 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)에 비해 높다.

[표. 5] 유기추출성분의 동일 투여용량에 대한 나노입자별 변이원성 비교(250ug)

Sample	대사 활성화계 유무	Colony수			
		TA98	TA100	TA1535	TA1537
CB	-S9	15±10	132±13	12±5	6±2
	+S9	33±5	141±12	10±3	10±2
DEP	-S9	703±17	692±9	28±6	55±25
	+S9	893±46	397±21	62±11	205±37
T-MWCNT	-S9	15±3	122±10	10±4	7±2
	+S9	32±8	141±1	10±1	7±2

2) EOM 추출물을 고려한 나노 입자 중 EOM 성분 함량에 대한 변이원성

탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)는 거의 0의 수치에 가까운 값으로 독성이 거의 없는 것으로 여겨진다. 하지만 디젤엔진연소분진(DEP)만이 상대적으로 높은 독성이 예상되는 수치였다.

[표. 6] 유기추출물을 고려한 나노입자의 변이원성 비교 (1mg당)

Sample	대사 활성화계 유무	Colony수(revertant/ mg)			
		TA98	TA100	TA1535	TA1537
CB	-S9	0.019±0.03	1.26±0.14	0.13±0.05	0.05±0.02
	+S9	0.33±0.11	1.27±0.06	0.09±0.03	0.09±0.04
DEP	-S9	89±3	73±3	10±1	18±4
	+S9	88±8	90±5	5±2	23±2
T-MWCNT	-S9	0.25±0.07	1.87±0.12	0.11±0.04	0.07±0.04
	+S9	0.35±0.04	2.22±0.37	0.16±0.04	0.11±0.02

라. 디젤엔진연소분진(DEP)의 성분별 변이원성 비교

본 연구에서 가장 뚜렷하게 변이원성을 보였던 물질은 디젤엔진연소분진(DEP)이다. 나노입자와 유기추출성분에 대한 모든 시험에 있어서 다른 물질보다 뚜렷이 높은 집락 수(colony)를 관찰할 수 있었는데, 더욱 정확한 비교를 위해 1mg당 발생하는 colony수를 정리해보면 다음 표와 같다. 디젤엔진연소분진(DEP) 1mg에 대한 각 균주별 발생정도는 나노입자는 TA98과 TA100에서 상대적으로 높은 값이 나왔고, 유기추출성분에서도 마찬가지였는데, 유기추출성분이 상대적으로 차이가 더 뚜렷하였다. 세 번째는 전체 디젤엔진연소분진(DEP)에 대해 추출물을 고려해서 1mg당 추출된 EOM 성분량에 대한 발생 집락수를 계산한 값이다. 유기추출성분의 추출률 값은 실제 추출과정에서 디젤엔진연소분진(DEP) 150mg를 사용하였을 때, 26.36mg이 추출되었으므로  $(26.36/150) \times 100$  으로 계산하여 나온 값이다.

[표. 7] 디젤엔진연소분진(DEP)의 투여성분별 변이원성 비교 (1mg당)

Sample	대사 활성화계 유무	Colony수 (revertant/mg)			
		TA98	TA100	TA1535	TA1537
DEP (Total)	-S9	504±16	414±18	55±8	105±20
	+S9	499±46	513±27	31±14	128±13
DEP (EOM)	-S9	1047±85	1455±136	22	6±6
	+S9	1390±91	815±50	90±12	242±7
DEP (Total중 EOM)	-S9	89±3	73±3	10±1	18±4
	+S9	88±8	90±5	5±2	23±2

## VI. 고 찰

본 연구는 나노크기의 다양한 탄소로 구성된 세 가지 물질인 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP), 탄소나노튜브(CNT)에 대한 변이원성 실험을 실시하였고, 세 물질의 변이원성을 각각 비교함으로써 유해 영향에 대한 잠재적인 유발가능성을 평가 하였다. 그리고 대상물질들의 유기성분에 의한 영향을 평가하기 위해 전체입자 및 유기추출물(EOM)에 의한 변이원성 시험을 실시하고 비교 분석하여, 탄소성분 나노입자의 잠재적인 발암성 평가에 목적을 두고 있다.

기존의 연구 자료에 의하면 부유분진 중 유기추출물은 동물실험 결과에서 폐암을 유발한다고 한다(Asahina et al., 1972). 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 국내에서 폐암으로 인한 사망률이 해마다 증가하고 있어(통계청, 1991) 그 위해성에 대한 관심을 가질 필요가 있다. 자료를 보면 우리나라의 분진의 농도와 인체의 위해성에 관련하여 주목을 해야 한다. 대기 중 입자상으로 존재하는 물질은 분진 시료에 대한 양이 적기 때문에 동물실험에 적용하기에는 어려움이 있으며 많은 비용이 든다는 점에서도 문제가 있다. 그 외에 인체위해성을 알아보기 위해서는 현실적으로 여러 가지 제한점들이 있는데, 이 제한점들을 간편하면서도 예민한 시험법으로 검사할 수 있는 방법이 바로 변이원성 시험이다(Teranishi, 1975). 변이원성을 갖고 있는 물질이 동물실험에서 발암성을 나타낼 가능성이 약 40%이며, 반면 발암성 물질이 돌연변이를 일으킬 확률은 90%정도이다(Rinkus et al., 1979). 이 점을 미루어 봤을 때 변이원성 시험은 단기 돌연변이의 검사로는 여러 가지 장점을 가지고 있다(Krewski and Thomas, 1992; Lewtas, 1989). 그리고 대기분진으로부터 유기 용매로 추출된 유기추출물이 균주에 의해 돌연변이원성이 검출되며 돌연변이 활성도가 대기 분진에 의한 돌연변이 위해를 증명하는데 이용된다(Teranish, 1978). 이러한 자료를 살펴보면, 대기상 존재하는 입자들은 전처리를 거치지 않는 변이원성에 대한 결과보다는 유기추출고정을 거친 변이원성 결과가 더 많은 변이도 와 유전독성을 갖을 것으로 판단이 된다. 이는 본 실험에서 유기추출물에 대한 독성을 알아보기 위한 전체성분과 유기성분에 대한 변이원성도를



비교 하게 된 근거가 되었다. 따라서 본 실험에서도 탄소를 포함한 물질에 대한 유기추출을 진행하였는데 그 중 디젤엔진연소분진(DEP)이 세 가지 물질 중 변이 원성과 독성작용 가장 높다는 것을 알 수 있었고, 유기추출물에서도 가장 높은 revertant/plate 수치를 나타냈다. 즉, 본 실험을 시행하기 전에 전체입자 보다 유기추출성분의 변이원성이 높을 것이라는 가설을 만족시킨 것은 바로 디젤엔진연소분진(DEP)뿐 이었다. 그리고 전체성분 보다는 유기추출물에서 확인한 revertant/plate수치를 나타내었기 때문에 디젤엔진연소분진(DEP)의 유해성 영향을 입증할 수 있었다. 따라서 디젤엔진연소분진(DEP)의 발암성에 관한 선행 연구들의 결과가 동일하게 발견되었지만(IARC, 1989) 돌연변이 형태(mutation type)에 있어서는 다른 결과가 나왔다. Jari의 (1988)연구에 의하면 음성대조군인 DMSO에 대한 자연돌연변이 수는 TA100균주 +S9에서  $85 \pm 12.5$ , -S9에서  $119 \pm 5.1$ 이고, TA98균주 +S9에서  $28 \pm 4$ , -S9에서  $19 \pm 4$ 로 TA100이 더 높은 수준이라고 하였다. 본 연구에서는 TA100과 TA98에서 대사체 S9 mixture 유무별로 각각의 차이는 있었다. TA100 균주는 +S9에서  $134 \pm 10$ , -S9에서는  $139 \pm 8$ , 그리고 TA98 균주에서는 +S9에서  $60 \pm 7$ , -S9에서는  $20 \pm 3$ 의 값이 나왔다. 즉 TA100에서는 -S9이 높고, TA98에는 +S9이 높게 관찰되었다. 그리고 TA100가 TA98보다는 높은 집락(colony) 수치를 나타내었다. 본 실험결과를 비추어 보면 세 가지 물질의 변이원성에 있어서 다른 균주에 비해 공통적으로 높게 나타난 균주가 바로 TA100였으며, 그 다음으로는 TA98 이었는데 비교적 높은 수치는 아닌 것으로 판명 되었다.

Ames에 의해 개발된 여러 *Salmonella* 균주 중에서 TA98은 구조이동형 돌연변이(frame shift mutation)이며 염기대결실형 균주이다. TA100은 DNA소실 돌연변이(missense mutation)이며 염기대치환형(base-pair substituent)균주이다. 기존의 연구 자료를 살펴보면 우리나라의 디젤 차량에서 배출되는 배출성분에서 이를 추출 시에 구조이동형 돌연변이(frame shift mutation)를 일으키는 물질들이 다수 함유되어 있다는 보고가 있다(Yoo,1994). 앞서 기술을 했지만 구조이동형 돌연변이(frame shift mutation)는 TA98의 특징적 사항인데, 이는 TA98이 변이원성 시험에 있어서 감수성이 높다는 것이고, 디젤분진(DEP)은 TA98에 대해 높은 발현력을 보인다고 할 수 있다. 또 다른 보고에 의하면 여러 종류의 *Salmonella* 균주를

이용한 디젤배기가스의 돌연변이원성 실험에서 구조이동형 돌연변이(frame shift mutation)가 일어나며 direct acting mutagenicity를 관찰할 수 있었다(Huisingh, 1978). 그리고 변이원성 시험에 있어서 TA98 균주는 1-nitropyrene과 다른 nireoarenes 의 돌연변이물질의 돌연변이에 반응력이 가장 뛰어나다(Rosenkranz, 1982). 이는 독성이 강한 물질로 인한 변이원성에 대한 결과는 대체적으로 TA98 과 구조이동형 돌연변이(frame shift mutation)형태의 결과가 나왔지만, 본 실험에서의 결과는 TA100에서 높게 나타났다. 다시 말해 TA98 보다 TA100이 높은 결과적 경향이 나왔으며, 가장 높은 변이원성을 나타낸 디젤엔진연소분진(DEP)의 경우에는 TA98 과 TA100이 동시에 높은 수치를 나타내었지만 정확한 revertant/plate수치를 나타내면 역시 TA100의 결과 값이 더 높았다. 다른 연구와 본 실험의 결과를 비교해 보면, *salmonella* 균주를 이용한 변이원성 시험은 대체적으로 구조이동형 돌연변이(frame shift mutation)를 보이는 경향이 있다. 주로 TA98이 높은 변이원성을 나타낸다는 결과들이 있었으나, 본 실험 결과에서는 TA98보다는 TA100에서 높은 집락수를 나타낸 관계로 DNA소실 돌연변이(missense mutation)의 관찰이 더 높았다. 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(T-MWCNT)의 경우는 DNA소실 돌연변이(missense mutation)의 경향을 보였고, 디젤엔진연소분진(DEP)는 구조이동성(frame shift mutation)과 DNA소실 돌연변이(missense mutation)를 같이 보였다는 점에서 기존의 연구 자료와 차이가 있었다. 다른 연구 자료에 의하면 디젤엔진연소분진(DEP)은 크기가 작아 세기관지와 폐포에 침착될 수 있고, 이로 인해 호흡기 질환을 유발시키거나 기존의 염증성 호흡기 질환을 악화시킨다고 한다(Inhinase et al, 1995). 이렇게 유해성분이 많이 함유하는 디젤엔진연소분진(DEP)은 디젤 연료는 오늘날 교통량과 여러 산업시설들의 증가로 인해 해마다 올라가고 있는 추세이다(Bunn et al, 2002). 그리고 본 실험에서 디젤엔진연소분진(DEP)가 가장 높은 수치의 변이원성을 나타냈고 그 유기추출물에 대한 독성이 강하다는 결과가 나온것을 미루어 볼 때 그 독성을 주목하며 점차적으로 증가하는 디젤배기가스에 대해 더욱 관심을 기울여야할 것이다. 따라서 본 연구에서 세 가지 물질 중에 가장 높은 변이원성을 가진 DEP는 발암성 또한 매우 높은 것을 것으로 판명된다.

## V. 결 론

탄소(carbon)성분을 기초로 하는 물질의 발암 위해성을 알아보고자 나노입자의 세 가지 물질로 변이원성 시험을 실시하였다. 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP), 탄소나노튜브(CNT) 입자 모두 10~80nm 정도의 입자(size)를 사용하여 크기에 동일성을 주었으며 용량에 대한 1mg당 발생결과에 대한 비교 값도 도출하였다. 또한 전체 나노입자와 유기추출성분 두 가지로 구분하여 변이원성 실험을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 나노입자의 독성을 알기 위해 나노입자 변이원성 실험 시행한 결과 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)는 낮은 변이원성의 수치를 보였고, 용량-반응 결과에 해당되는 균주는 나타나지 않았다. 그에 비해 디젤엔진연소분진(DEP)의 평균과 표준편차 값에 의한 막대그래프로는 모든 균주가 유의한 결과를 보인 것 같았으나 통계상으로는 +S9 mix 조건의 TA1535균주는 농도대별 용량-반응 결과가 나오지 않았다. (p-value값 0.245>0.05) 그 외에 나머지 균주에서는 용량-반응 결과가 관찰되었는데 그 중에 TA98과 TA100의 집락수치가 뚜렷했다

2. 유기성분에 의한 영향평가를 위해 유기추출물 변이원성 시험을 시행한 결과 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)의 경우는 추출률과 농도에 대한 제한점으로 인해 한가지 농도로만 설정을 하여 용량-반응에는 해석할 값이 없었으며 변이도는 나노입자 때 보다 더 낮은 값이 나왔기 때문에 두 물질에 대한 유기성분의 위해도값으로는 의미가 없었다. 반면 디젤엔진연소분진(DEP)의 경우에는 변이원성도가 뚜렷했다. 나노입자(전체성분)때 보다는 수치상으로 거의 2배 이상으로 월등히 높았기 때문에 디젤엔진연소분진(DEP)은 유기추출성분이 전체성분인 나노입자에 비해 변이원성이 높다는 결과 판정이 나왔다.

3. 디젤엔진연소분진(DEP)의 유기추출 성분에 대한 변이원성 정도는 높았지만,

반면 용량-반응 결과에 있어서는 나노입자(전체성분)의 변이원성 시험에서 더 많은 조건의 균주들이 해당되었다. 나노입자에 대한 변이원성 결과에는 +S9 mix의 TA1535만이 해당되지 않았었다. 그런데 의외로 나노입자(전체성분) 보다 독성이 강하여 높은 revertant/plate 수치를 보였던 유기추출성분의 경우 +S9 mix TA1535와 -S9mix TA1535 그리고 -S9 mix TA1537의 세 가지 조건에서 두 가지 균주들이 용량-반응결과가 나타나지 않았다. 따라서 나노입자 의 변이원성 결과가 유기성분 변이원성 결과보다 더 많은 조건의 균주들에 대한 농도별 유의한 값이 나왔다는 것을 알 수 있었다.

4. 나노입자의 변이원성 실험에는 탄소입자(CB)와 탄소나노튜브(CNT)에서는 TA100균주에 높은 변이원성 수치가 나타났고, 디젤엔진연소분진(DEP)의 경우는 전체성분과 유기성분인 둘 다 높은 변이원성이 나타났으며 TA98과 TA100 균주에서 높은 변이원성을 나타냈다.

본 연구의 결과에 의하면 대상물질 중 가장 유해한 물질은 자동차 배기가스에서 기인하며 변이원성 정도와 발암성은 비례하므로 발암성의 잠재적인 인체 영향을 유추할 수 있었다. 또한 자동차 배기가스의 유기 성분이 더 유해한 영향을 미친다는 사실을 확인할 수 있었다.

유기성분의 변이원성 시험에서 유의한 결과가 나오지 않는 경우는 두가지가 있는데 첫째는 실험물질의 독성이 지나치게 강하면, 실험균주들이 생존하지 못하고 사멸한다는 보고가 있다. 둘째는 유기추출물이 모든 균주에게 독성작용의 효력을 발휘하지 않고 부분적으로 적용된다는 것이다. 즉, 이번 실험에서 TA100에서만 높은 수치를 나타낸것과 유사한 방식이라 볼수 있고, 이 부분은 다음 실험에서 고려할 필요가 있겠다.

변이원성 시험이 독성평거나 발암성 등에 가장 기초가 되는 시험이기 때문에 본 실험의 결과에 대한 대표성은 가질 수 있으나, 더 자세한 대상물질에 대한 결과를 도출하기에는 한계가 있었다. 시험을 진행하는데 있어서 추출율과 관련해서

도 제한점이 있었는데 물질별로 추출률이 차이가 있어 진행에 있어서 어려움이 있었다. 디젤엔진연소분진(DEP)의 유기성분 추출률이 17.6% 였는데, 다른 실험에서 포집된 PM 2.5와 PM10의 타 시험 진행시 추출비율과 비교해 보면 각각 84%와 15%로 입자크기 별 차이가 있었으나 이를 바탕으로 봤을 때 디젤엔진연소분진(DEP) 유기성분 추출률이 높은 편은 아니다. 그러나 이에 비해 탄소입자(CB)과 탄소나노튜브(CNT)는 더 현저하게 낮은 비율로 유기성분이 추출되어 시험 농도 설정에 어려움이 있었다. 탄소성분을 기초로 하는 물질 중 대표로 세 가지 물질 탄소입자(CB), 디젤엔진연소분진(DEP), 탄소나노튜브(CNT)를 선정하여 진행하였지만 차후 발암성에 관련된 좀 더 정확한 원인을 유추하기 위해선 본 연구를 토대로 좀 더 전문적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 참고문헌

1. 박세종. 천식 유발 마우스에서 디젤분진(DEP) 및 미세분진(PM) 노출이 염증 인자발현과 폐조직 세포조성에 미치는 영향. 건국대학교 석사학위논문, 1997
2. 박희준. Ames test에 의한 정유의 돌연변이원성. 생약학회지 2002; 33(4): 372-375
3. 박성은. 대기중 부유분진의 오염도와 다환방향족 유기오염물질의 발암위해성에 관한 조사연구. 연세대학교 보건대학원 석사학위 논문, 1992.
4. 박성은. 대기중 복합물질의 돌연변이원성과 인체 위해도, 한국대기보전학회지 1988; 12(3): 269-278.
5. 백남준, 이종훈, 김용표, 문길주. 1994년 6월 서울지역 시정장애의 측정 및 분석. 한국 대기보전학회지 1988; 12(4): 407-420.
6. 신동천. 도시 대기중 유기오염물질의 농도와 돌연변이원성에 대한 연구. 연세대학교 대학원 보건학과 박사학위 논문. 1989
7. 신동천, 정용, 문영한, 노재훈. 서울시 대기중 유기오염물질의 농도와 돌연변이원성에 대한 연구, 1990 예방의학회지 제 23권 제1호: 43-56
8. 신동천, 정용, 김종만, 박성은, 임영욱. 서울시 일부 교통지역의 대기 부유분진 중 유기오염물질에 대한 발암 위해성 평가. 예방의학회지 1994 ; 27(2) 326-336
9. 신동천. 서울시 대기중 유기오염물질의 농도와 돌연변이원성에 대한 연구. 1989
10. 송현미, 장안수, 안미현 등. 천식동물 모델에서 디젤분진이 기도과민성과 개형에 미치는 효과. 천식 및 알레르기 학회지 2006; 26(1): 70-77
11. 소대섭, 김기일, 김석진, 한종훈. 심층정보분석 탄소 나노 튜브. 한국과학기술정보연구원, 2002
12. 이보람. 디젤분진이 백서 뇌에 미치는 영향. 순천향대학교 석사학위논문, 2006
13. 안승화. 나노기술과 소재. 인하대학교 출판부, 2004
14. 임상우. 3일만에 읽는 나노의 세계. 서울문화사, 2007
15. 임용, 김수연, 정규혁, 정진호, 문창규, 윤여표. 디젤분진이 사람 동맥 평활근

- 세포(VSMC)에 미치는 영향. *J. Environ. Toxicol* 2004; 19( 1): 109-117
16. 이종훈, 백남준, 심상규, 김용표, 문진주. 제주도 고산에서 1994~1995년 여름 입자상 탄소농도 측정. *한국대기보전학회지* 1997; 13(3): 179-191
  17. 장재연. 대기중 부유분진의 돌연변이원성 및 미량 유기오염 성분에 관한 분석적 연구. 서울대학교 박사학위논문, 1988
  18. 정장표. 부산시 부유분진의 특성과 오염원 기여도에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문, 1993
  19. 정용 외 2인. 오염물질 기준기수 (Pollutant standards Index)를 이용한 대기질의 평가. *예방의학회지* 1986; 19(1): 76-75
  20. 조성준. 대기 부유분진 중 nitroarenes 오염도와 그 돌연변이원성에 관한 조사 연구. 연세대학교 보건대학원 석사학위 논문, 1990
  21. 정장표. 부산시 부유분진의 특성과 오염원 기여도에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문, 1993
  22. 통계청. 사망원인 통계연보. 1991
  23. 황경철, 김희강. 서울지역 일부 대기중 부유먼지에 함유된 탄소성분과 Benzo(a)pyrene 성분의 농도 변동 양상에 관한 연구. *한국환경위생학회지*, 1997; 23(4) 91-96
  24. 허찬, 김남이, 정규혁, 문창규, 허문영. 디젤분진이 체세포에서의 DNA 손상에 미치는 영향. *환경독성학회지* 2004; 19(4): 335-334
  25. 홍재민, 이재혁. 나노입자의 개요와 기술동향 및 전망. 한국과학기술정보연구원, 2005
  26. 현원복. 나노기술과 인간. 까치출판사, 2005
  27. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 1975; 31: 347 - 363
  28. Ames BN, Maron DM. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Elsevier Biomedical Press 1983; 113: 173 - 215
  29. Al-Humadi NH, Siegel PD, Lewis DM, Barger MW, Ma JY, Weissman DN,

- Ma JK. Alteration of intra cellular cysteine and glutathione levels in alveolar macrophages and lymphocytes by diesel exhaust particle exposure. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 349-353
30. Asahina S et al. Carcinogenicity of organic fractions of particulate pollutants collected in New York City and administered subcutaneously to infant- mice. *Cancer Res* 1972; 32: 2263-2268
31. Burnett RT, Cakmak S, Raizenne ME, Stieb D, Vincent R, Krewski D, Brook JR, Phillips O, Ozkaynak H. The association between ambient carbon monoxide level and daily mortality in Toronto Canada. *J Air Waste Manag Assoc* 1998; 48: 689-700
32. Bunn WBIII, Valberg PA, Slavin TJ, Lapin CA. What is new in diesel. *Int Arch Occup Environ Health* 2002; 75: 122-132
33. Cantrell BK and Watts WF. (1997) Diesel exhaust aerosol Review of occupation exposure. *Applied Occupational Environmental Hygiene* 1997; 12(12): 1019-1027
34. Chow JC, Watson JG, Fujuta EM, Lu Z, and Lawson DR. Temporal and spatial variations of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> aerosol in the Southern California air quality study. *Atmos Environ* 1994; 28: 2061-2080
35. Dockery DW and Brunekreef B. Longitudinal studies of air pollution effects on lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(6Pt 2): 250-256
36. Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H. Effect of single wall carbon nanotube on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* 2005; 155: 73-85
37. Faiz A, Delardere JA. Automotive air pollution in developing countries, outlook and control strategies. *Sci Total Environ* 1993; 134: 325-34
38. Folinsbee LJ. Human health effects of air pollution. *Environ Health Perspect* 1993; 100: 45-56
39. Gilli G. Chemical Characteristics and Mutagenic Activity of PM<sub>10</sub> in



- Torino, a Northern Italian City. *Science Direct, Science of the Total Environment* 2007; 385: 97-107
40. Huisingh J, Bradow R, Jungers R, Claxton L, Zweidinger R, Tejada S, Bumgarner J, Duffield F, Waters M, Simmon VF, Hare C, Rodriquiz C, Snow L. Application of short-term bioassay in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures. plenum press. New York, 1978
  41. Ichinose T, Furutama A, Sagai M. Biological effects of diesel exhaust particles(DEP) II. Acute toxicity of DEP introduced in to lung by intratracheal instillation. *Toxicology* 1995; 99: 153-167
  42. IARC. Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitriarenes : IARC Monograph on the evaluation of cacinogenic risks to humans. 1989; 46
  43. Jari T. Polynuclear Aromation compounds and genotoxicity in particulate and vapor phases of ambient air. etfect of teorological conditions, E.S.T 1988; 22(10): 1228-1234
  44. Krewski D, R.D. Thomas. Carcinogenic mixtures. *Risk Analysis* 1992; 12(1): 105-113
  45. Leberchert G and Czerczak S. Spaliny silnika Diesla [Diesel combustion exhaust]. Wytyczne szacowania ryzyka zdrowotnego dla czynnikow rakotworczyc 1997; 6: 42-84
  46. Liroy PJ, Waldman JM and Greenberg A, et al. The total human Environmental Exposure Study (THERE) to benzo(a)pyrene: comparison of the inhalation and food pathways. *Archiv Environ Health* 1998; 43(4): 304-312
  47. Letwas J. Emerging methodologies for assessment of complex mixtures : application of bioassays in the integrated air cancer project. *Toxicology and Industrial Health* 1989; 5: 839-850
  48. Lam C, James JT, McCluskey R, Humter RL. Plumonary toxicity of

- single-wall carbon nano tubes in mice 7 and 90days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences* 2004; 77: 126-134
49. Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V. Exposure to carbon nanotubes material: aerosol release during the handling of unrefined single walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health* 2004; 67(1): 87-107.
50. Matsuo M, Shimada T, Uenishi R, Sasaki N, Sagai M. (2003) Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells. *Boil. Pharm. Bull.* 2003; 26(4): 438-447
51. McClellan RO. Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1987; 27: 279-300
52. Mauderly JL, Jones RK, Griffith WC, Henderson RF, McClellan RO. Diesel exhaust is a pulmonary carcinogen in rats exposed chronically by inhalation. *Fundam Appl Toxicol* 1987; 9: 208-221
53. Nemmar A, Hoet P.H.M, Dinsdale D, Vermylen J, Hoylaerts M.F and Nemery B. Diesel exhaust particles in lung acutely enhance experimental peripheral thrombosis. *Circulation* 2003; 107: 1202 - 1208
54. Ohasawa M, Sato K, Takahashi K and Ochi T. Modified distribution of lymphocyte subpopulations in blood and spleen from mice exposed to cadmium. *Toxicology Letters* 1983; 19: 29 - 35
55. OECD guideline for testing of chemicals(bacterial reverse mutation test). 2006
56. Pope CAIII, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151: 669-674
57. Peterson and Saxon, 1996 B. Peterson and A. Saxon, Global increases in allergic respiratory disease: the possible role of diesel exhaust particles,

- Ann. Allergy Asthma Immunol 1996; 77: 263 - 268
58. Poniak M and Makhniashvili L. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons during diesel combustion. Inter. J. Occup. safty & ergonomics 2003; 9(1)
  59. Rengasamy, A., Barger, M.W., Kane, E., Ma, J.K.H., Castranova, V. Diesel exhaust particle-induced alterations of pulmonary phase I and phase II enzymes of rats. J. Toxicology and Environmental Health 2003; 66: 153-167.
  60. Rinkus SJ, Legator MS. Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in sallmonella trphimurium system. Cancer Res 1979; 66: 520-525
  61. Rosenkranz H.S.(1982) Direct-acting mutagenes in diesel exhaust; magnetude of the problem. Mut, Res 1982; 101: 1-10
  62. Schenker MB. Diesel exhaust-an occupational carcinogen?. JOM 1980; 22(1): 41-46.
  63. Schwartz J. Particulate Air Pollution and Chronic Respiratory Disease. Environ. Res. 1993; 62: 7-13
  64. Schwartz, J. Air Pollution and Daily Mortality: A Review and Meta Analysis. Environ. Res. 1994; 64(1): 36-52
  65. Scheepers PT and Bos RP. Combustion of diesel fuel from a toxicological perspective II. Toxicity. Int, Arch. occup. Environ. Health. 1992; 64(3): 163-177.
  66. Tokiwa H, Morita K, Takeyoshi H, Takahashi K, Ohnishi Y. Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants. Mutation Res 1977; 48: 237 - 248
  67. Teranishi K, Hamada K, Watanabe H. Mutagenicity in Salmonella typhimurium mutants of the benzene-soluble organic matter derived from air-borne particulate matter and its five fractions. Mutation Res 1978; 56:

68. Tomatis L Ed. Air pollution and human cancer, Springer Verlag Berlin Heidelberg. Germany, 1990; 9-34.
69. Teranish K et al. Mutagenicity in Salmonella typhimurium mutants of the benzen soluble oranic matter derived from airborne particulate matter and its five fractions. Mut Res 1978; 56: 273-280
70. Tokiwa H et al. Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants.Mut Res 1977; 48: 237-248
71. Teranishi K, Hamada K, Watanabe H. Quantitative relationship between Carcinogenicity and mutagenicity of polyaromatic hydrocarbons in salmonella typhimurium mutants. Mutat Res 1975; 31(2): 97-102
72. Usanee V, Particulate matter, PM10 & PM2.5 levels, and airborne mutagenicity in chiang Mai, Thailand. Mutation Research 2002; 519: 121-131.
73. Wang H, Wang J, Deng X, Sun H, Shi Z, Gu Z, Liu Y, Zhaoc Y. (2004). Biodistribuyion of carbon singlewall carbon nanotubes in mice. J Nanosci Nanotech 2004; 4(8): 1019-1024
74. Xiansi zhao. Genotoxic activity of extractable organic matter from urban airborne particle in shanghai, china; Mutation Research 2002; 514: 177-192
75. Yahagid S, Kasaia T, Kawaib S, Kawanishic M. Evidence for facilitation of motor evoked potentials(MEPs) induced by motor imagery. Brain Research 1997; 744: 147 - 150
76. Yoo YS. Mutagenicity of diesel-exhaust particulates. J of Korea Pollution Research Association 1994; 10(E): 325-321

Ames test 시험 결과표

\* 실험날짜: 2008-03-14

\* 실험자: 윤지예

대사 활성 화계 여부	sample	Conc. (mg/ml)	Conc. (ug/plate)	colony 수 (revertant/plate)																																															
				TA98						TA100						TA1535						TA1537																													
				a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N																								
S9 Mix (-)	CB	1	100	15	21	21	19	3	0	112	112	109	111	2	-12	5	12	10	9	4	2	6	5	8	6	2	3	26	22	11	20	8	152	122	122	132	17	9	11	18	12	14	4	6	5	8	4	6	2	2	
		5	500	12	30	20	21	9	2	127	95	133	118	20	-5	5	10	5	7	3	-1	3	6	5	5	2	1	15	21	21	19	3	0	137	110	131	126	14	3	14	18	8	13	5	6	3	5	7	5	2	2
		1	100	34	25	24	28	6	-11	163	168	148	156	8	22	13	11	8	11	3	3	4	7	7	6	2	-2	23	26	33	27	5	-12	121	147	122	130	15	-5	7	9	8	8	1	1	8	4	12	8	4	1
		5	500	28	35	21	28	7	-11	136	118	135	130	10	-5	5	11	7	8	3	0	5	6	2	4	2	-3	46	28	26	33	11	-6	120	132	128	127	6	-8	6	8	12	9	3	1	12	9	5	9	4	1
negative control	S9 Mix (-)	평균		DMSO						DMSO						DMSO						DMSO																													
	colony/plate	16	22	19	4	132	114	123	13	7	8	8	1	4	3	4	1																																		
	DMSO	DMSO						DMSO						DMSO						DMSO																															
	colony/plate	49	29	39	14	144	125	135	13	5	10	8	4	8	7	8	1																																		
positive control	S9 Mix (-)	평균		2-Nitro fluorene						sodium azide						ICR 191																																			
	농도			20ug/ml						20ug/ml						20ug/ml																																			
	colony/plate	281	241	261	28	242	890	890	890	0	767	1110	1126	1118	11	1111	4604	3572	4088	730	4085																														
	평균	B(a)P						B(a)P						B(a)P																																					
S9 Mix (+)	농도		20ug/ml						20ug/ml						20ug/ml																																				
colony/plate	99	91	95	6	56	219	269	244	35	110	15	9	12	4	5	83	75	79	6	72																															

\* M-N : Mean-Negative control

Ames test 시험 결과표

\* 실험날짜: 2008-04-08

\* 실험자: 윤지예

\* M-N : Mean - Negative control

대사 활성화계 유형	sample	Conc. (mg/ml)	Conc. (ug/plate)	colony 수 (revertant/plate)																							
				TA98						TA100						TA1535						TA1537					
				a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N
S9 Mix (-)	DEP	1	100	161	138	136	145	14	130	230	204	214	14	90	18	13	17	16	3	-30	25	38	29	31	7	17	
		2.5	250	271	252	277	267	13	252	281	290	278	283	6	159	23	18	19	20	3	-26	61	52	51	55	6	41
		5	500	425	374	407	402	26	387	401	434	406	414	18	290	44	32	30	35	8	-10	89	90	83	87	4	73
		10	1000	491	499	521	504	16	489	511	672	535	573	87	449	64	53	49	55	8	10	127	99	88	105	20	91
S9 Mix (+)	DEP	1	100	173	167	149	163	12	130	189	195	178	187	9	16	21	29	29	26	5	12	39	43	24	35	10	27
		2.5	250	227	229	227	228	1	194	272	239	234	248	21	77	18	24	21	21	3	7	75	47	60	61	14	53
		5	500	382	346	391	373	24	340	364	407	388	386	22	215	28	27	40	32	7	18	92	88	78	86	7	78
		10	1000	549	487	460	499	46	465	521	483	535	513	27	342	47	25	21	31	14	17	113	135	135	128	13	120
negative control	S9 Mix (-)	평균		DMSO						DMSO						DMSO						DMSO					
	colony/plate	13	17	15	3	124	124	124	124	0	58	33	46	18	13	15	14	1									
positive control	S9 Mix (+)	평균		DMSO						DMSO						DMSO						DMSO					
	colony/plate	38	29	34	6	146	196	171	35	14	14	14	8	8	8	8											
S9 Mix (-)	2-Nitro fluorene	평균		sodium azide						sodium azide						ICR 191											
		농도		20ug/ml						20ug/ml						20ug/ml											
		colony/plate	202	216	209	10	988	1028	1008	28	940	1960	1450	721	2648	2648	2648	0									
		평균		B(a)P						B(a)P						B(a)P											
S9 Mix (+)	20ug/ml	평균		20ug/ml						20ug/ml						20ug/ml											
		colony/plate	69	198	2	16																					

Ames test 시험 결과표

\* 실험날짜: 2008-04-15

\* 실험자: 윤지혜

\* M-N : Mean-Negative control

대사 활성회계 유형	sam ple	Conc. (m g/m l)	Conc. (ug/plate)	colony수 (revertant/plate)																							
				TA98						TA100						TA1535						TA1537					
				a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N
S9 Mix (-)	T- MWCN T	1	100	17	21	18	19	2	-6	131	119	141	130	11	-37	8	10	12	10	2	-5	10	8	6	8	2	2
		2.5	250	22	21	24	22	2	-2	136	151	140	142	8	-25	13	15	17	15	2	0	11	7	7	8	2	2
		5	500	26	24	30	27	3	2	116	140	120	125	13	-42	9	8	12	10	2	-5	1	4	3	3	2	-4
		10	1000	18	18	26	21	5	-4	167	151	150	156	10	-12	10	11	6	9	3	-6	5	3	9	6	3	-1
S9 Mix (+)	T- MWCN T	1	100	39	26	40	35	8	11	158	155	173	162	10	-6	8	8	6	7	1	-8	8	11	8	9	2	3
		2.5	250	29	31	37	32	4	8	161	193	161	172	18	4	4	11	13	9	5	-6	6	14	4	8	5	2
		5	500	24	27	24	25	2	1	175	167	184	175	9	8	8	11	6	8	3	-7	6	9	8	8	2	1
		10	1000	32	28	27	29	3	5	219	160	176	185	31	18	15	10	13	13	3	-2	12	8	8	9	2	3
negative control	S9 Mix (-)	명량		DMSO						DMSO						DMSO											
	colony/plate	23	26	25	2	2	153	176	168	12	9	21	15	8	8	5	7	2									
positive control	S9 Mix (+)	명량		DMSO						DMSO						DMSO											
	colony/plate	38	39	39	1	1	154	167	161	9	5	13	9	6	16	17	17	1									
S9 Mix (-)	2-Nitro fluorene	명량		2-Nitro fluorene						sodium azide						ICR 191											
		농도		20ug/ml						20ug/ml						20ug/ml											
		colony/plate	250					1182				1228				3496											
		명량		B(a)P						B(a)P						B(a)P											
S9 Mix (+)	20ug/ml	명량		20ug/ml						20ug/ml						20ug/ml											
		colony/plate	584					326				16				192											

Ames test 시험 결과표

\* 실험일자: 2008-05-12

\* 실험자: 윤지예

\* M-N : Mean-Negative control

대사 활성 화개 유무	sample (EOM)	Conc. (mg/ml)	Conc. (ug/plate)	colony수 (revertant/plate)																							
				TA98				TA100				TA1535				TA1537											
				a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N						
S9 Mix (-)	CB	2.5	250	9	10	26	15	10	-11	120	129	146	132	13	-9	7	11	17	12	5	-3	5	6	8	6	2	-1
	CNT	2.5	250	18	15	13	15	3	-10	116	117	134	122	10	-19	7	8	15	10	4	-5	5	7	9	7	2	0
S9 Mix (+)	CB	2.5	250	28	33	38	33	5	-123	128	145	151	141	12	110	8	9	14	10	3	-6	9	10	12	10	2	1
	CNT	2.5	250	24	34	39	32	8	-124	140	140	142	141	1	110	9	10	11	10	1	-6	5	7	8	7	2	-2
negative control	S9 Mix (-)	명칭		DMSO					DMSO					DMSO													
	colony/plate	25	26	26	26		136	146	141		13	17	15		7	7	7										
positive control	S9 Mix (+)	명칭		DMSO					DMSO					DMSO													
	colony/plate	151	161	156		29	33	31		16	16	16		7	11	9											
S9 Mix (-)	명칭			2-Nitro fluorene					sodium azide					ICR 191													
	농도			20ug/ml					20ug/ml					20ug/ml													
S9 Mix (+)	명칭			B(a)P					B(a)P					B(a)P													
	농도			20ug/ml					20ug/ml					20ug/ml													
S9 Mix (-)	colony/plate	384		384		990		990		1273		1273		3452		3452											
	colony/plate	83		83		176		176		14		14		16		16											



Ames test 시험 결과표

\* 실험일자: 2008-05-20

\* 실험자: 윤지혜

\* M-N : Mean-Negative control

대사 활성화제 유무	sam ple (EOM)	Conc. (mg/ml)	Conc. (ug/plate)	colony수(revertant/plate)																							
				TA98						TA100						TA1535						TA1537					
				a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N	a	b	c	M	SD	M-N
S9 Mix (-)	DEP	1	100	445	476	507	476	31	460	445	446	473	455	16	316	23	17	26	22	5	11	27	45	74	49	24	38
		2.5	250	688	700	721	703	17	687	683	693	701	692	9	554	22	28	34	28	6	17	35	48	83	55	25	45
		5	500	944	972	1075	997	69	981	1083	1098	1105	1095	11	957	11	21	26	19	8	8	26	85	93	68	37	58
		10	1000	950	1083	1109	1047	85	1031	1389	1383	1612	1455	136	1316	22				22		11	2	3	12	6	-5
S9 Mix (+)	DEP	1	100	595	608	644	616	25	583	307	316	334	319	14	147	32	38	45	38	7	30	139	143	162	148	12	137
		2.5	250	840	917	921	893	46	860	381	389	420	397	21	225	51	63	72	62	11	54	162	225	227	205	37	193
		5	500	1150	1160	1208	1173	31	1140	499	517	548	521	25	349	68	83	86	79	10	71	249	262	274	262	13	250
		10	1000	1293	1390	1480	1390	91	1357	757	837	850	815	50	643	76	95	99	90	12	82	237	239	250	242	7	231
negative control	S9 Mix (-)	명령 농도		DMSO						DMSO						DMSO											
	colony/plate	11	22	17																							
positive control	S9 Mix (+)	명령 농도		DMSO						DMSO						DMSO											
	colony/plate	31	35	33																							
S9 Mix (-)	명령 농도	2-Nitro fluorene		sodium azide						sodium azide						ICR 191											
		20ug/ml																									
S9 Mix (+)	명령 농도	2-Nitro fluorene		B(a)P						B(a)P						B(a)P											
		20ug/ml																									
S9 Mix (-)	colony/plate	20ug/ml	239	249		244																					
		20ug/ml																									
S9 Mix (+)	colony/plate	20ug/ml	541	593		567																					
		20ug/ml																									

## Abstract

### The Evaluation of Mutagenicity of Carbonaceous Nano Particulates

Yoon Ji-Yea  
Graduate School of  
Public Health Yonsei University

(Directed by professor Shin, Dong Chun, M.D., Ph. D)

Rapid economic development and industrialization resulted in air pollution, suspended particulate is a major cause for the air pollution. Particle existing as particulates is composed of hundreds of different organic and inorganic materials, carcinogenic substance is spreaded in particulates, and carbonaceous particulates are a major ingredient of particle. So we must keep an eye on the fact that carbon consumes important weight in mutagenicity and carcinogenesis. And all of particles including carbon have several particulates and their appropriate sizes, and they have different poisonous reaction by size of particulates. That is to say, we can know that carbon is deposited on other part by size, deposited even to alveolus owing to minute particles, smaller particulates raise higher adsorptive feature, cell toxicity, and mutagenicity from some preliminary studies.

Accordingly, in this study, it selected various particulates composing carbonaceous ingredients and nano particulates in particle that is a cause of air pollution, nano particulates size was same in this study. Also it conducted Amse test to compare strong mutagenicity of extracted organic ingredients

with the result of toxicity of particulates, which didn't have toxicity treatment process, by dividing into total ingredients and organic ingredient. Carbon Black(CB), Diesel Exhaust Particle(DEP), and Thin-Multiwall Carbon Nano-tube(T-MWCNT) were used in experiment, and TA98, AT100, TA1535, and TA1537 in salmonella typhi were selected as organism. Amount of injection in this experiment was 1, 2.5, 5, and 10mg/ml, and liver S9 mixture was used to examine the activation of metabolites. Positive mutagenicity was not observed in CB and CNT which were composed of inorganic carbonaceous ingredients, except TA100 organism, and in case of TA100 also had insignificant measurement by 150 revertant/mg. Also the relation between capacity and reaction was not observed in all organisms. On the contrary, DEP had distinct relation between capacity and reaction in all organisms, except TA1535(+S9mix basis), and had strong mutagenicity in TA98 and TA100 organism by around 500 revertant/mg. And TA1535 and TA1537 organism was a little increased by activation of metabolites. For mutagenicity of organic, CB and CNT presented lower rate of extraction and mutagenicity, so there was no meaning on the result, and DEP only had higher result, specially it indicated much more numerical value of colony than that in Ames test for nano particulates. The relation between capacity and reaction by extracted organic matter of DEP was observed in TA98 and TA100, except TA1535(+S9, -S9mix) and TA1537(-S9mix)

As the result of this study, organic DEP had higher carcinogenesis than inorganic CB or CNT, and in particular organic ingredient had higher degree of mutagenicity. Specifically the total particulates and extracted organic ingredient had higher mutagenicity with apparent relation between capacity and reaction in DEP known as it had combination of pollution materials such as heavy metal, PAHs, and so on. This study is expected to be a fundamental data for applying in genetic toxicity evaluation of carbonaceous ingredients

and nano particulates involving carcinogenesis material, and be used as important data in evaluating the risk of carbonaceous particulates by Amse test.

---

Key word : mutagenicity, carbonaceous, nano particle