

연 구 자 료
화학연97-5-33

산업독성물질의 생체대사에 관한 연구

1997



한국산업안전공단
산업보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 연구 결과를 1997년도 산업보건 연구원 연구 사업 중 “산업 독성 물질의 생체 대사에 관한 연구”에 대한 최종 결과 보고서로 제출합니다.

1997년 12월 31일

제출자 : 인하대학교 의과대학 의약물독성연구소

정 윤 계

공동연구자: 인하대학교 의과대학 약리학교실

차 영 남

목 차

I. 서 론

1. 연구 배경	-----	1
2. 연구 목적	-----	3

II. 연구내용 및 방법

1. 연구 내용 및 범위	-----	4
2. 연구 방법	-----	4

III. 결과 및 고찰	-----	9
--------------	-------	---

IV. 결론 및 요약	-----	33
-------------	-------	----

V. 참고 문헌	-----	35
----------	-------	----

I. 서 론

1. 연구 배경

최근 조선업체에서 근로자들의 유기 용제의 집단 중독이 사회 문제로 대두되고 있다 (이준연외, 1996). 유기 용제는 비단 조선업체 뿐만 아니라 많은 작업 현장에서 흔하게 사용되는 물질이다. 현재 우리 나라의 작업장에서 사용하고 있는 대부분의 유기 용제들은 단일 물질보다는 두 가지 이상의 유기 용제들이 섞여 있다. 따라서 실제 작업 현장에서 이들을 사용하는 근로자들에게 복합 유기 용제 형태로 폭로되고 있다. 그러나 이 들 유기 용제의 주성분을 이루고 있는 단일 물질에 대한 독성학적 연구만이 많이 수행되어졌을 뿐 복합 물질에 대한 분포, 대사 및 독성 연구에 대해서는 아직 자료가 부족한 실정이다.

유기 용제 중에 주로 접착제, 잉크, 페인트 작업, 목재 가구 공장 등에서 사용되고 있는 락커 신나(lacquer thinner)류들은 그 사용 용도에 맞추어 유기 용제 성분과 함유량이 다양한 여러 가지 제품으로 생산되어 사용되고 있다. 신나를 구성하고 있는 유기 용제의 대부분은 방향족 탄화수소(aromatic hydrocarbon)들인데(Fuke et al, 1996) 그 중에서도 toluene, xylene, ethylacetate, ethylbenzene, ethyleneglycolmonoethylether, methylethylketone, isobutanol, isopropanol 등이 다양한 비율로 혼합되어 있다. 이 들 방향족 탄화수소는 급성 마취 효과, 기도 자극성, 피부 질환 등을 일으키고 신경계에 영향을 미쳐 신경행동학적 기능 장애를 일으킨다 (Angerer 1979).

이들 방향족 탄화수소 중에 ethyleneglycolmonoethylether는 특히 생식 독성이 있는 것으로 알려졌다(Oudiz and Zenick, 1986). Ethyleneglycolmonoethylether에 의한 생식독성은 그 자체에 의한 독성 발현이 아니라 ethyleneglycolmonoethyl-ether의 대사 물질인 ethoxyacetate로 인한 것으로 알려져 있다. 따라서 ethoxyacetate의 생성에 관여하는 여러 가지 요인이 ethyleneglycolmonoethyl-ether의 생식 독성의 경향을 좌우할 것이다. 더군다나 ethyleneglycolmonoethyl-ether는 도료 작업장에서 많이 사용되기 때문에 단독 폭로보다는 toluene이나 xylene 등과 함께 폭로되기 때문에 이들의 상호 작용에 대한 연구가 필요하다. 특히 최근 연구에 의하면 ethyleneglycolmonoethylether의 단독 폭로에 의한 생식

독성보다는 toluene과 xylene과의 복합 폭로된 쥐에서의 생식독성이 더 작은 것으로 나타났다(유일재 등 1997). 이에 대한 기전을 밝히는 일환으로 쥐에서 ethyleneglycolmonoethylether의 폭로로 생성되는 ethoxyacetate의 양에 대한 toluene과 xylene의 공동 폭로 영향을 측정하려 한다.

Toluene은 benzoic acid로 대사되어 hippuric acid로 배설되는데 반감기는 약 1-2시간이다. 15-20%의 toluene은 변환되지 않은 채 호흡기를 통하여 밖으로 배출된다. Xylene은 거의 전부가 o-, p-, m-methylbenzoic acid로 배설되는데 반감기는 약 30시간이다. 흡수된 ethylbenzene의 약 64%가 mandelic acid의 형태로 소변을 통해 배출되고 25% 정도는 phenylglyoxylic acid의 형태로 배출된다(Poggi et al, 1982).

Toluene은 P4501A2에 의하여 benzyl alcohol, o-cresol과 p-cresol로, 2B6, 2E1에 의하여 benzyl alcohol과 p-cresol로 대사되는 것으로 알려졌다(Nakajima et al, 1997). 반면에 흡연은 P4501A2 효소를 증가시키는 것은 이미 잘 알려진 사실인데도 Nakajima (1997) 등의 연구에서는 흡연자의 biopsy를 통해 채취한 간장 microsome에 의한 toluene의 benzyl alcohol로의 대사가 비흡연자의 그 것보다 작은 것으로 보고를 하고 있다. 또한 toluene만에 폭로된 경우보다 toluene과 benzene에 함께 폭로된 경우가 hippuric acid로의 대사가 감소하는 것으로 알려졌다(Tardif et al, 1992). 실험용 흰쥐에서는 2000ppm의 toluene에 6시간 폭로된 경우 P450 2E1과 2B1/2가 증가되었고 P4502C11은 감소한 것으로 보고되었다(Wang et al, 1993). Toluene과 xylene이 P450 2E1에 의하여 대사되는 것으로 보고되어(Tassanleyakul et al, 1996) 흡입된 toluene을 대사시키기 위하여 P450 2E1이 유도되는 것으로 사료된다. 한편 P450 2E1은 알코올에 의하여 유도되는 효소로 알려져 있어 유기 용제 대사 및 분포와 음주와의 상관성에 대한 연구가 필요하다.

한국보건사회연구원이 95년 7월에 전국의 15-69세의 2만2천명을 상대로 조사한 국민건강 실태조사 결과에 의하면 20세 이상의 성인 남자의 67.7%가 흡연을 하고 있는 것으로 나타나 세계에서 성인 남자의 흡연율이 가장 높으며 여자는 6.7%로 비교적 낮은 편에 속하는 것으로 나타났다. 95년 세계 보건 기구(WHO)의 보고에 의하면 담배 소비량 면에서 한국은 세계 5위를 기록한 것으로 나타났다. 또한 우리 나라의 음주율은 35.5%이며 매일 술을 마시는 사람도 6.6%인 것

으로 나타났다. 따라서 유기 용제를 직접 사용하는 한국의 근로자들에 대한 흡연율과 음주율에 대한 직접적인 통계는 없지만 우리 나라 평균을 적용하더라도 흡연과 음주가 흡입된 유기 용제의 분포, 대사 및 배출에 미치는 영향은 지대하다 하겠다.

그럼으로 근로자들의 흡연과 음주가 유기 용제의 중독 현상을 가속화시키는지 아니면 유기 용제의 배출을 촉진시켜 ethyleneglycolmonoethylether의 독성을 감소시키는지에 대한 기초 연구를 수행하기 위하여 실험용 흰쥐를 사용하여 ethyleneglycolmonoethylether의 대사체 형성에 있어서 toluene과 xylene의 영향을 검색하려한다. 또한 toluene과 xylene의 대사에 영향을 미치는 음주와 흡연 모델로써 acetone과 3-methylcholanthrene을 전처리한 쥐에서의 ethyleneglycolmonoethylether의 대사체 형성에 대한 toluene과 xylene의 영향을 검색하려한다.

2. 연 구 목 적

본 실험은 산업 현장에서 많이 사용되는 방향족 탄화수소 중에서 생식 독성이 있는 ethyleneglycolmonoethylether의 생식독성 유발 대사체인 ethoxyacetate의 형성에 대한 kinetics를 실험용 흰쥐에서 연구하여 ethyleneglycolmonoethylether의 생식 독성에 대한 기본 기전을 규명한다. Toluene과 xylene이 ethyleneglycolmonoethylether와 공동 폭로되었을 때 ethyleneglycolmonoethylether의 생식독성이 ethyleneglycolmonoethylether의 단독 폭로시의 생식독성보다 감소하는 것으로 알려졌다. 그 원인을 규명하는 차원에서 toluene과 xylene의 영향을 검색하려한다. 또한 toluene과 xylene은 P4501A2와 P4502E1 효소에 의하여 대사되는 것으로 알려져 있다. 반면에 흡연과 음주는 P4501A2와 P4502E1 효소를 각각 유도하는 것으로 알려져 있어 흡연과 음주가 toluene과 xylene의 대사에 영향을 줄 것이다. 실험용 흰쥐를 이용하여 흡연과 음주로 인하여 toluene과 xylene의 대사 변화가 ethyleneglycolmonoethylether의 대사 및 흡수에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구를 통하여 흡연과 음주를 하는 근로자에 폭로된 ethyleneglycolmonoethylether의 생식 독성을 예측할 수 있게 함이다.

II. 연구내용 및 방법

1. 연구 내용 및 범위

한국에서 사용되고 있는 신나를 구성하고 있는 유기 용제의 대부분은 방향족 탄화수소(aromatic hydrocarbon)들인데 그 중에서도 toluene, xylene, ethylacetate, ethylbenzene, ethyleneglycolethylether, methylethylketone, isobutanol, isopropanol 등이 다양한 비율로 혼합되어 있다. 근로자들은 실제 도장 현장에서 이들 방향족 탄화수소 중에 적어도 3개 이상의 성분에 노출되어 있다. 따라서 단일 유기 용제에 대한 연구가 유기 용제 독성에 대한 기본 정보는 제공하지만 근로자들이 처한 실제 상황과는 거리감이 있다. 뿐만 아니라 한국의 대부분의 근로자들이 흡연과 음주를 하고 있어 복합 유기 용제에 노출됨으로 예상되는 pharmacokinetics 현상보다 더욱 복잡하게 나타날 것이 예상된다.

도장 공사용 신나를 구성하고 있는 많은 방향족 탄화수소 성분 중에 toluene과 xylene의 상호 작용에 대한 연구는 전세계적으로 많이 수행되었다. 본 연구에서는 toluene과 xylene과 함께 세계적으로 연구가 잘 되어 있지 않은 ethyleneglycolethylether를 첨가하여 pharmacokinetics 현상에 대한 세 성분의 상호 작용을 연구하려 한다. 이 세 성분의 상호 작용 연구에 더불어 흡연과 음주의 영향에 관한 연구를 수행하려 한다.

동물 모델로는 실험용 흰 쥐 가운데 가장 많이 사용되는 Sprague-Dawley를 사용한다. toluene, xylene과 ethyleneglycolmonoethylether의 대사에 관련되는 P450 1A2, 2B6, 2E1 효소 중에 흡연과 관련되는 효소는 P450 1A2이다. 즉 흡연에 의하여 P450 1A2 효소가 증가한다. 따라서 흡연 모델은 P450 1A2를 증가시킬 수 있는 3-methylcholanthrene을 전처리한 실험용 흰쥐를 사용한다. 같은 방식으로 음주로 증가하는 효소는 P450 2E1이기 때문에 음주 모델로는 P450 2E1 효소를 증가시키는 acetone을 전처리한 실험용 흰쥐를 사용한다.

2. 연구 방법

1) 흰쥐의 P450 1A2와 P450 2E1의 유도

흡연 및 음주로 유도되는 효소인 P450 1A2와 2E1을 유도하기 위하여

3-methylcholanthrene과 acetone을 각각 흰쥐에 전처리한다. Acetone (an inducer of P450 2E1, 5ml/kg in 50% aqueous solution, a single oral administration)과 3-methylcholanthrene (P450 1A1/2, i.p., 40 mg/kg in corn oil for 3 days)을 각각 4마리의 Sprague-Dawley rat (250-300kg)에 전처리한다. 대조군은 corn oil 또는 saline만을 같은 경로를 통하여 투여 받는다. P450 1A2와 2E1의 유도가 발현되는 기관인 간장을 채취하여 두 효소의 양적 증가를 확인하기 위하여 먼저 microsome을 분리하여 sodium dithionite-CO binding 방법 (Matsubara et al., 1976)을 이용하여 P450의 total content를 조사한다.

2) Toluene, xylene와 ethyleneglycolmonoethylether의 투여 실험

Toluene(250mg/kg), xylene (500mg/kg)과 ethyleneglycolmonoethylether (200mg/kg)를 올리브유에 함께 섞어 각 시간군별로 4마리의 쥐에 2ml/kg의 부피로 경구 투여한다. 투여 후 0.5, 1.5, 2, 3, 6, 12, 18 시간에 secobarbital로 마취시킨 다음 blood를 heparin 튜브에 채취한 다음 1ml는 toluene과 xylene을 측정하기 위하여 GC headspace용 10ml 용기에 internal standard (acetanilide)와 함께 넣고 나머지 혈액은 plasma를 만들어서 toluene의 대사체인 hippuric acid와 xylene의 대사체인 3-methylhippuric acid, 그리고 ethyleneglycolmonoethylether의 대사체이며 생식독성 유발물질인 ethoxyacetate를 측정할 때까지 4℃에 보관한다. 혈액을 채취한 다음에는 brain, heart, kidney, liver, lung, testis 등의 기관들을 적출하여 GC headspace용 10ml 용기에 넣고 가위로 잘게(2-3mm) 자른 다음 마개를 하여 toluene과 xylene의 양을 GC로 분석한다.

Ethyleneglycolmonoethylether (200mg/kg)를 올리브유에 섞어서 시간군 별로 4마리의 쥐에 경구 투여한 다음 0.5, 1.5, 2, 3, 6, 12, 18 시간에 secobarbital로 마취시킨 다음 blood를 heparin 튜브에 채취한 다음 plasma를 준비하여 그 중에 있는 ethoxyacetate를 GC로 측정한다.

3) P4502E1 효소가 유도된 쥐에서의 toluene, xylene와 ethyleneglycolmonoethylether의 투여 실험

음주에 의한 P450 2E1 효소의 활성화 증가가 복합 유기 용매의 pharmacokinetics와 대사에 어떤 효과를 유발하는지를 검색하기 위하여 음주 모델로 선택한 acetone (5ml/kg in 25% aqueous solution, a single oral

administration)을 각각 시간군 별로 4마리의 Sprague-Dawley rat에 전처리한다. 2일째에 음주 모델군에 2)에서 수행한 toluene/xylene/ethyleneglycolmonoethyl-ether 투여실험과 ethyleneglycolmonoethylether 투여실험을 반복하여 흡연이 세 성분의 pharmacokinetics의 상호 작용과 대사에 어떻게 작용하는지를 검사한다.

4) P4501A2 효소가 유도된 쥐에서의 toluene, xylene와 ethyleneglycol-monoethylether의 투여 실험

흡연에 의한 P450 1A2 효소의 활성화도 증가가 복합 유기 용매의 pharmacokinetics와 대사에 어떤 효과를 유발하는지를 검색하기 위하여 흡연 모델로 선정한 3-methylcholanthrene (i.p., 40 mg/kg in corn oil for 3 days)를 Sprague-Dawley rat에 전처리한다. 대조군은 corn oil만을 3일 동안에 투여 받는다. 4일째에 흡연 모델군에 2)에서 수행한 toluene/xylene/ethyleneglycolmonoethylether 투여실험과 ethyleneglycolmonoethylether 투여실험을 반복하여 흡연이 세 성분의 pharmacokinetics의 상호 작용과 대사에 어떻게 작용하는지를 검사한다.

5) Hippuric acid와 3-methylhippuric acid의 분석 방법

100 μ l의 plasma에 internal standard인 100 μ l의 100 μ M acetanilide(in MeOH)을 섞은 다음 12,000g에서 원심 분리한 후 상층액 50 μ l을 HPLC에 주입하여 분석한다. HPLC는 millennium 프로그램이 장착된 컴퓨터로 조절되고 photo-diode가 장착된 510 pump의 Waters제이다. Nova-pak C18 column(3.9x150mm)에 5% tetrahydrofuran과 95%의 10mM potassium phosphate(pH 3)의 이동상을 0.6ml/min의 속도로 흐려서 hippuric acid 와 3-methylhippuric acid를 분석한다.

6) Toluene과 xylene의 분석 방법

조직과 혈액 속의 toluene과 xylene을 분석하기 위하여 60℃에서 20분 동안 가열된 sample을 headspace 방법으로 Gas chromatograph에 주입하여 분석했으며 분석 조건은 아래와 같다.

GC model: Hewlett Packard 5890 (series II)

Detector: Flame Ionization Detector (FID)

Column: Ultra I (25m x 0.32mm x 0.52 μ m, Hewlett Packard제)

Oven temp. : 50-100°C with 7°C/min.

Injector temp.: 210°C

Detector temp.: 230°C

Flow: 1ml/min

Split vent flow: 100ml/min

Split ratio: 50:1

Injection vol: 1 ml

7) Etoxyacetate의 분석 방법

혈액 속의 ethoxyacetate는 diazomethane으로 methylation시켜 GC로 분석하였다. Diazomethane은 Fales 등의 방법(1973)을 응용하여 만들었고 GC로 ethoxyacetate를 분석하는 방법은 Groeseneken 등의 방법(1986)을 응용하여 다음과 같이 분석하였다.

Diazomethane은 ethoxyacetate의 시료를 분석하기 바로 직전에 다음과 같이 만들어 사용한다. 3ml methylene chloride를 넣은 50ml conical tube를 얼음 위에 잠기게 한다. Conical tube 안으로 200mg의 N-methyl-N-nitroso-p-toluene-sulphonamide가 들어있는 5ml의 tube를 넣는다. 600 μ l의 20% KOH/80% MeOH(w/v)을 conical tube안에 있는 5ml tube에 조심스럽게 넣고 conical tube의 마개를 닫는다. 얼음에서 1시간동안 방치하면 5ml tube에서 발생한 노란색 기체인 diazomethane은 conical tube에 있는 methylene chloride에 녹아든다.

500 μ l의 plasma에 internal standard인 100 μ l의 10mM 2-furoic acid를 혼합한 후에 6시간 동안 speedvac으로 건조시킨다. 잔류물에 100 μ l의 methylene chloride를 넣어 ethoxyacetate를 resuspension시킨 다음 위에서 준비한 diazomethane을 100 μ l 넣고 5 μ l를 GC에 주입하여 분석했다. Gas chromatograph의 분석 조건은 아래와 같다.

GC model: Hewlett Packard 5890 (series II)

Detector: Flame Ionization Detector (FID)

Column: Ultra I (25m x 0.32mm x 0.52 μ m, Hewlett Packard제)

Oven temp. : 50-187°C with 12.5°C/min

Injector temp.: 230°C

Detector temp.: 230°C
Flow: 2ml/min
Split vent flow: 18ml/min
Split ratio: 10:1
Injection vol: 5 μ l

III. 연구 결과 및 고찰

1) Acetone과 3-methylcholanthrene을 이용한 흰쥐의 P4502E1과 1A2의 유도

먼저 acetone과 3-methylcholanthrene을 전처리시킨 쥐에서 간장을 추출하여 P450 함량을 조사하였다. Fig. 1에 나타난 것과 같이 acetone 전처리한 쥐에서 추출한 간의 P450 함량은 대조군의 간 P450 함량보다 유의하게 증가하지는 않았다. Acetone에 의한 P4502E1의 유도는 P450 함량의 총량에는 변화가 없고 총 P450 내에서 P4502E1 비율을 높이는 것으로 알려져 있다 (Chung et al, 1998). 본 실험에서도 같은 결과를 나타냈다.

3-methylcholanthrene을 전처리시킨 쥐의 간장 P450 함량은 대조군보다 1.94배 증가하였다. 3-methylcholanthrene은 전체 P450 함량을 증가시키면서 P450 1A1/2를 유도하는 것으로 알려졌다. 본 실험에서도 같은 결과를 나타냈다. 따라서 쥐에 acetone과 3-methylcholanthrene을 투여함으로 적절한 P4502E1과 1A2의 유도가 되었고 이 둘 쥐를 이용하여 toluene/xylene/ethyleneglycolmonoethylether의 kinetics와 대사체 연구를 수행하였다.

2) Acetone과 3-methylcholanthrene의 전처리가 toluene과 xylene의 각 기관의 분포에 미치는 영향.

Toluene과 xylene을 GC로 검출한 것을 나타낸 chromatogram이 Fig. 2이다. 대조군 쥐와 acetone, 3-methylcholanthrene을 전처리한 쥐의 혈액과 brain, heart, kidney, liver, lung와 testis의 6가지 기관에서의 toluene의 농도를 나타낸 것이 Table 1이다. 대조군 쥐와 3-methylcholanthrene 전처리한 쥐에서는 toluene의 농도가 최고에 이르는 시간인 Tmax는 toluene, xylene, ethyleneglycolmonoethylether의 경구 투여 후 3시간인데 비해 acetone을 전처리한 쥐의 Tmax는 2시간으로 앞당겨졌다 (Fig. 3, 4, 5). 이는 acetone 전처리한 쥐에서 유기용매의 빠른 흡수가 일어났음을 의미한다. Acetone의 경구투여 후 24시간만에 다시 toluene, xylene, ethyleneglycolmonoethylether의 혼합 유기 용매를 경구 투여했기 때문에 앞서 전처리된 acetone에 의하여 위나 소장의 세포막이 유기 용매의 흡수가 잘 일어나는 상태가 되었을 가능성이 크다.

대조군 쥐에서 최고 농도를 나타내는 Cmax의 기관 별 순위를 보면 kidney >

Table 1. Comparison of kinetic parameters for toluene distributions in control (CON), acetone (AC) and 3-methylcholanthrene (3MC) treated rats.

Organ	Treatment	Tmax(hr)	Cmax (mg/l or g)	Cmax ratio	AUC (mg · hr/l or g)	AUC ratio
Blood	CON	3	41.9		253.7	
	AC	2	125.2	2.99	798.6	3.15
	3MC	3	116.7	2.79	1177.0	4.64
Brain	CON	3	32.0		178.0	
	AC	0.5	97.9	3.06	343.1	1.93
	3MC	2	135.7	4.24	817.7	4.59
Heart	CON	3	43.1		202.5	
	AC	2	129.2	3.00	357.5	1.77
	3MC	3	87.7	2.03	569.3	2.81
Kidney	CON	3	114.4		722.9	
	AC	2	243.8	2.13	741.6	1.03
	3MC	3	192.2	1.68	1555	2.15
Liver	CON	3	80.9		361.9	
	AC	2	328.2	4.06	902.8	2.49
	3MC	3	176.8	2.19	1119.0	3.09
Lung	CON	3	42.9		188.6	
	AC	2	129.3	3.01	463.1	2.46
	3MC	2	106.1	2.47	738.5	3.92
Testis	CON	3	17.9		11.4	
	AC	2	49.7	2.78	297.2	2.67
	3MC	3	39.7	2.22	365.2	3.28
Total	CON	3.00 ± 0.0	373.0		2019.0	
	AC	1.79 ± 0.5	1103.3	2.96	3903.9	1.93
	3MC	2.86 ± 0.3	854.9	2.29	6341.7	3.14

Tmax: Time at highest concentration

Cmax: The highest concentration

Cmax ratio: Cmax AC or 3MC/Cmax CON

AUC: Area under concentration-time curve

AUC ratio: AUC AC or 3MC/AUC CON

liver > heart $\geq$ lung $\geq$ blood > brain > testis 순이다. 대략적으로 혈액을 받는 양과 비슷한 양상을 이루었다. Acetone 전처리한 쥐에서의 toluene의 최고 농도 Cmax의 순서는 liver가 최고이고 그 다음이 kidney로 둘만의 순서만 바뀌었을 뿐 다른 순서는 대조군 쥐의 Cmax의 순서와 같은 양상이다. 3-methylcholanthrene 전처리한 쥐에서는 toluene의 Cmax의 순서는 대조군과 비슷하지만 다만 대조군에서 6 번째이던 brain의 Cmax가 3번째가 되었고 대조군에서 3번째이던 heart의 Cmax가 6번째로 서로 순서를 바꾸었다. 이는 강한 지질 성인 3-methylcholanthrene이 역시 lipophilic한 brain에 어떤 특정한 작용을 한 것을 시사하는 대목으로 더욱 연구해야할 부분이다.

전체적으로 toluene의 Cmax에서 acetone 전처리한 쥐는 대조군의 그 것보다 2.96배 증가하였고 3-methylcholanthrene을 전처리한 쥐의 그 것보다는 2.29배 증가하였다 (Table 1). 따라서 Tmax가 비슷하다고 가정하면 acetone과 3-methylcholanthrene의 전처리가 Tmax가 비슷하다고 toluene의 흡수 속도를 빠르게 했다고 볼 수 있다.

Cmax와 함께 중요한 kinetic parameters가 몸 안에 시간대별로 어느 정도 농도가 있었는가를 시간의 함수로 합한 AUC(area under concentration-time curve)이다. 대조군에서의 AUC의 순서는 kidney > liver > blood > heart $\geq$ lung $\geq$ brain $\gg$ testis 순으로 대략적으로 Cmax의 순서와 비슷하다. 조그만 차이는 있지만 acetone과 3-methylcholanthrene 전처리한 쥐에서의 AUC는 대조군과 비슷한 양상을 이루었다. 그러나 전체적으로 볼 때에 acetone 전처리한 쥐는 대조군의 그 것보다 1.93배 증가하였고 3-methylcholanthrene을 전처리한 쥐의 그 것보다는 3.14배 증가하였다 (Table 1).

Cmax와 AUC를 함께 살펴보면 acetone를 전처리한 쥐는 Cmax에서 최고인데 비하여 3-methylcholanthrene을 전처리한 쥐는 AUC에서 최고임을 나타냈다. Fig. 4와 Fig. 5를 보면 쉽게 눈에 두드러지는 특징이 있는데 acetone을 전처리한 쥐는 2시간을 전후하여 기관에서의 toluene 농도가 급격히 증가했다가 급격히 감소하는 반면에 3-methylcholanthrene을 전처리한 쥐는 3시간까지 toluene 농도가 대조군보다는 급격하지만 acetone 처리군보다는 완만하게 증가했다가 그 이후에는 서서히 감소하는 경향을 보인다. 따라서 acetone 처리군과 3-methylcholanthrene을 처리군이 toluene의 분포와 배설을 다루는 기전이 서로

다름을 알 수 있다. 즉 acetone은 toluene의 흡수를 빨리 하게 하는 것과 동시에 배설도 빠르게 하지만 3-methylcholanthrene은 배설을 느리게 하는 기전을 작동시키는 것 같다. 이 것을 설명하는 연구도 더 진행되어야 정확한 해설이 가능할 것이다.

대조군 쥐와 acetone, 3-methylcholanthrene을 전처리한 쥐의 혈액과 brain, heart, kidney, liver, lung와 testis의 6가지 기관에서의 xylene의 농도를 나타낸 것이 Table 2이다. 대조군 쥐와 3-methylcholanthrene 전처리한 쥐에서는 xylene의 Tmax는 toluene, xylene, ethyleneglycolmonoethylether의 경구 투여 후 3시간인데 비해 acetone을 전처리한 쥐의 Tmax는 2시간으로 toluene과 같은 양상을 나타냈다 (Fig. 6, 7, 8, Table 2).

대조군에서의 Xylene에 대한 Camx의 순서는 kidney > liver > heart > blood $\geq$ lung $\geq$ brain > testis의 순으로 toluene의 순서와 비슷한 양상을 나타내었다. Acetone 군의 쥐에서도 비슷한 양상을 나타내었다. 3-methylcholanthrene 처리군은 toluene과는 다르게 lung이 가장 큰 Cmax를 나타내었다. 모든 처리군에서 AUC의 순서는 toluene의 AUC와 비슷한 양상을 나타내었다.

그러나 각 실험군에서 대조군과 비교하여 acetone 처리군에서 Cmax가 2.15배 증가하였을 뿐 나머지는 대조군과 커다란 차이가 없었다 (Table 2). 특히 xylene의 AUC는 거의 차이가 없어 acetone이나 3-methylcholanthrene의 처리가 xylene의 흡수와 배설에 별다른 영향을 주지 못 하는 것으로 나타났다. 다만 acetone 처리군에서 xylene을 빠르게 흡수하고 배설하는 효과만 나타내었다.

Table 2. Comparison of kinetic parameters for xylene distributions in control (CON), acetone (AC) and 3-methylcholanthrene (3MC) treated rats.

Organ	Treatment	Tmax	Cmax (mg/l or g)	Cmax ratio	AUC (mg · hr/l or g)	AUC ratio
Blood	CON	3	29.4		221.8	
	AC	2	112.5	3.83	246.3	1.11
	3MC	3	50.9	1.73	322.7	1.45
Brain	CON	3	27.7		167.1	
	AC	2	51.3	1.85	183.2	1.10
	3MC	3	57.6	2.08	343.8	2.06
Heart	CON	3	55.9		242.1	
	AC	2	74.9	1.34	172.1	0.71
	3MC	3	67.6	1.21	380.3	1.57
Kidney	CON	3	108.6		754.4	
	AC	2	142.5	1.31	596.2	0.79
	3MC	3	95.4	0.88	749.9	0.99
Liver	CON	3	65.8		360.5	
	AC	2	231.8	3.52	400.1	1.11
	3MC	3	97.4	1.48	405.2	1.12
Lung	CON	2	28.5		189.9	
	AC	2	74.5	2.61	307.1	1.62
	3MC	0.5	99.0	3.47	446.7	2.35
Testis	CON	3	14.6		94.35	
	AC	2	23.6	1.62	128.0	1.36
	3MC	3	18.8	1.29	157.3	1.67
Total	CON	2.86 ± 0.3	330.5		2030.15	
	AC	2.00 ± 0.0	711.1	2.15	2033.0	1.00
	3MC	2.64 ± 0.9	486.7	1.47	2805.9	1.38

Tmax: Time at highest concentration

Cmax: The highest concentration

Cmax ratio: Cmax AC or 3MC/Cmax CON

AUC: Area under concentration-time curve

AUC ratio: AUC AC or 3MC/AUC CON

3) Acetone과 3-methylcholanthrene의 전처리가 hippuric acid와 3-methylhippuric acid의 생성에 미치는 영향

대부분의 hippuric acid와 3-methylhippuric acid 연구들이 전체 분석시간을 5분내로 하면서 대사체들의 peak들이 서로 중첩한 경우가 많았었는데 본 연구에서는 Fig. 9의 hippuric acid와 3-methylhippuric acid의 HPLC chromatogram에 나타난 것 같이 retention time 차이를 크게 하면서 두 대사체와 internal standard를 분리하는데 성공하였다.

쥐에서 시간에 따른 hippuric acid의 생성에 대한 전체적인 윤곽을 Fig. 10에 나타냈다. Toluene의 대사체인 hippuric acid는 control rat에서 2시간까지 감소하는 경향을 보이다가 다시 증가하기 시작하여 6시간에 최고를 이루었다 (Table 3). 반면에 acetone 전처리한 쥐에서는 3시간에 최고를 이루었다가 12시간에 다시 작은 peak를 이루었다. 3-Methylcholanthrene을 전처리한 쥐에서는 2시간에 작은 peak를 이루었다가 12시간에 Cmax를 이루었다.

Tmax의 변화뿐 만 아니라 Cmax도 acetone 전처리한 쥐에서는 3.1배로 증가하였다. 체내에 얼마나 오래 머물러 있는가 하는 것을 나타내는 AUC도 acetone 전처리한 쥐에서는 80%가 증가하였다. AUC의 증가가 Cmax의 증가보다 적은 것은 대사체가 증가함으로 대사체 배설 능력의 극대화가 이루어져 빠르게 대사체가 체외로 배설되었을 가능성을 시사한다.

m-Xylene의 대사체인 3-methylhippuric acid의 형성에서도 비슷한 경향을 나타냈다 (Table 3, Fig. 11). Acetone 전처리한 쥐에서 Cmax와 AUC가 각각 2.9배와 2.3배가 증가하였다. 이렇게 Cmax와 AUC가 비슷한 양상으로 증가하는 것은 대사체 형성 자체가 증가함을 의미한다. 따라서 acetone에 의하여 toluene이나 xylene을 대사시키는 효소가 증가했음을 의미한다. 이는 Toluene과 xylene이 P450 2E1에 의하여 대사된다는 보고와 일치하는 결과이다 (Tassanleyakul et al, 1996, Nakajima et al, 1997).

반면에 3-methylcholanthrene의 전처리는 완만한 hippuric acid와 3-methylhippuric acid의 Cmax와 AUC를 각각 30-70% 정도씩 증가시켰다. 이는 P4501A2효소가 P4502E1보다는 toluene을 대사시키는 능력이 작다는 보고에서 유추할 수 있는 결과이다(Nakajima et al, 1997).

Table 3. Comparison of kinetic parameters for hippuric acid and 3-methylhippuric acid formations in control (CON), acetone (AC) and 3-methylcholanthrene (3MC) treated rats.

	Hippuric Acid			3-Methylhippuric Acid		
	CON	AC	3MC	CON	AC	3MC
Tmax (hr)	6	3	12	6	3	2
Cmax (mg/l plasma)	10.7	33.2	13.5	17.9	51.9	26.3
Cmax ratio	1.0	3.1	1.3	1.0	2.9	1.5
AUC (mg · hr/l plasma)	118.3	213.9	170.3	207.9	482.6	360.9
AUC ratio	1.0	1.8	1.4	1.0	2.3	1.7

Tmax: Time at highest concentration

Cmax: The highest concentration

AUC: Area under concentration-time curve

4) Toluene과 xylene이 ethyleneglycolmonoethylether의 대사에 미치는 영향

최근 보고에 의하면 쥐를 이용한 ethyleneglycolmonoethylether의 생식독성 실험에서 toluene과 xylene을 ethyleneglycolmonoethylether와 함께 투여하면 생식독성이 감소하였다 (유일재, 1997). Ethyleneglycomonoethylether의 생식독성은 그 자체보다는 대사체인 ethoxyacetic acid에 의하여 발현된다. 따라서 위의 결과를 확인하기 위한 첫 번째 과정이 toluene과 xylene에 의하여 ethyleneglycolmonoethylether의 ethoxyacetic acid로의 대사가 저해되는가 하는 것을 연구하는 것이다. 본 실험에서는 우선 ethyleneglycolmonoethylether를 쥐에 투여하여 0.5, 1.5, 2, 3, 6, 12, 18 시간에 쥐를 잡아 혈액을 취한 다음 plasma 중에 있는 ethoxyacetic acid를 HPLC로 검출하였다 (Fig. 12).

그 결과 대조군 쥐의 3시간에서 Tmax를 이루었고 Cmax는 640mg/l plasma이었으며 AUC는 4170 mg/l plasma이었으며(Fig. 13). 반면에 toluene, xylene과 함께 투여한 쥐의 ethoxyacetic acid 형성의 Cmax는 314mg/l plasma로 대조군이 49%이었으며 AUC는 2985 mg/l plasma로 대조군의 72%이었다. 따라서 toluene

과 xylene과 함께 투여된 쥐에서의 생식 독성의 감소는 ethoxyacetic acid 형성의 감소로 인함이라고 해석할 수 있다. 특이한 것은 ethyleneglycolmonoethylether만을 투여한 실험군에서는 ethoxyacetic acid의 형성이 급격하게 증가하는 0.5-3시간 사이에 세 복합 유기 용매를 투여한 실험군에서는 ethoxyacetic acid의 형성이 완만하게 이루어져 ethyleneglycolmonoethylether만을 투여한 실험군과 차이를 보이다가 6시간 이후에는 같은 양의 ethoxyacetic acid를 형성하는 것으로 나타났다 (Fig. 13). Fig. 3과 6에서 기관내의 toluene과 xylene의 농도 곡선에서 toluene과 xylene의 6시간 이후에 급격히 감소하는 것을 관찰하였다. 이 현상과 함께 6시간 이후에 toluene과 xylene이 ethoxyacetic acid의 형성을 저해하지 못하는 것은 toluene과 xylene에 의한 ethoxyacetic acid 형성 저해 기전을 연구할 수 있는 하나의 단서를 제공해 줄 것 같다.

따라서 그 작용 기전은 앞으로 밝혀야할 과제이지만 methanol 독성 치료에 ethanol을 이용하는 것과 같은 효과가 ethyleneglycolmonoethylether의 생식 독성에 다른 유기 용매의 복합 폭로로 인하여 일어나는 것 만은 사실이다.

5) Acetone과 3-methylcholanthrene의 전처리가 ethyleneglycolmonoethyl-ether의 대사에 미치는 영향

P450 1A2와 2E1이 toluene과 xylene의 대사에 관여하기 때문에 toluene과 xylene의 대사가 ethyleneglycolmonoethylether의 생식독성에 어떤 영향을 미칠 것인가 하는 것을 조사하기 위하여 P4502E1 유도체인 acetone과 P4501A2의 유도체인 3-methylcholanthrene을 쥐에 투여한 뒤 4)에서의 실험을 반복하였다.

그 결과 acetone 처리군에서는 ethyleneglycolmonoethylether만의 투여군이나 toluene, xylene과 함께 투여한 군에서 ethoxyacetic acid를 조금 빠르게 또는 많이 형성하는 것으로 나타났다 (Table 4). 반면에 3-methylcholanthrene 투여군에서는 ethyleneglycolmonoethylether만의 투여군에서는 ethoxyacetic acid의 형성이 30-40% 정도 감소하였다 (Fig. 14, Table 4). 그러나 복합 유기 용제의 투여군에서는 오히려 Cmax는 40%, AUC는 74%가 증가하여 ethoxyacetic acid에 의한 생식 독성이 증가시킬 가능성이 많다. 이 부분에 대한 기전도 더 연구가 되어야할 부분이다.

Table 4. Comparison of kinetic parameters for ethoxyacetate acid formations from ethyleneglycolmonoethylether in control (CON), acetone (AC) and 3-methylcholanthrene (3MC) treated rats.

	EGEE only			Tol + Xyl + EGEE		
	CON	AC	3MC	CON	AC	3MC
Tmax (hr)	3	1.5	2	6	3	1.5
Cmax (mg/l plasma)	639.9	647.3	438.6	314.1	410.5	435.4
Cmax ratio	1.0	1.0	0.68	0.49	0.64	0.68
AUC (mg · hr/l plasma)	4170	3947	2442	2985	4147	5185
AUC ratio	1.0	0.94	0.58	0.72	0.99	1.24

Tmax: Time at highest concentration

Cmax: The highest concentration

AUC: Area under concentration-time curve

EGEE only : Administration of only ethyleneglycolmonoethylether

Tol + Xyl + EGEE : Co-administration of toluene, xylene and
ethyleneglycolmonoethylether

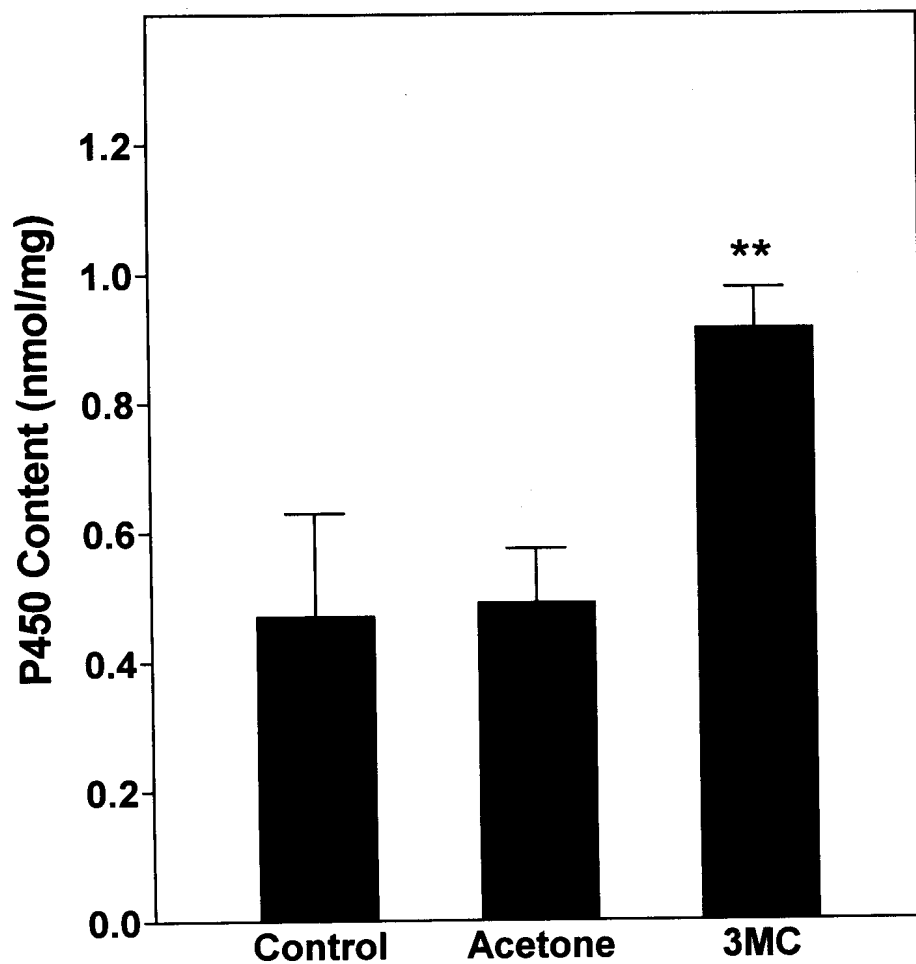


Fig. 1 Effect of acetone and 3-methylcholanthrene treatment on the hepatic P450 content in rats.

**p<0.01

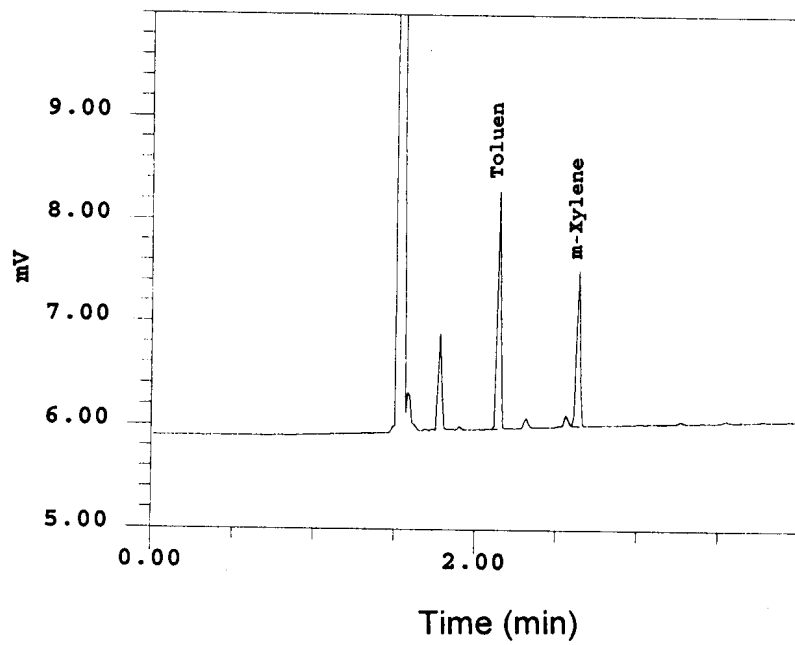


Fig. 2. Gas chromatogram of toluene and xylene

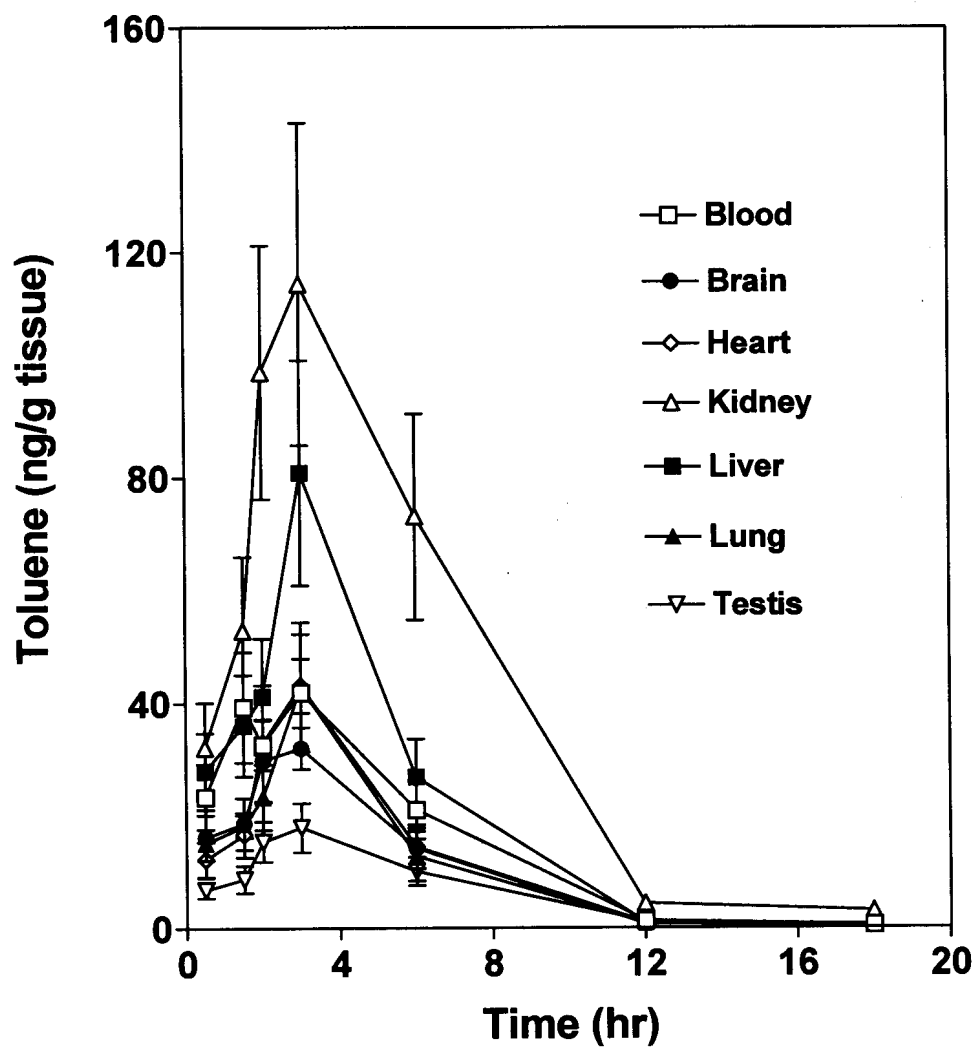


Fig. 3. Amount of Toluene in organs of control rats

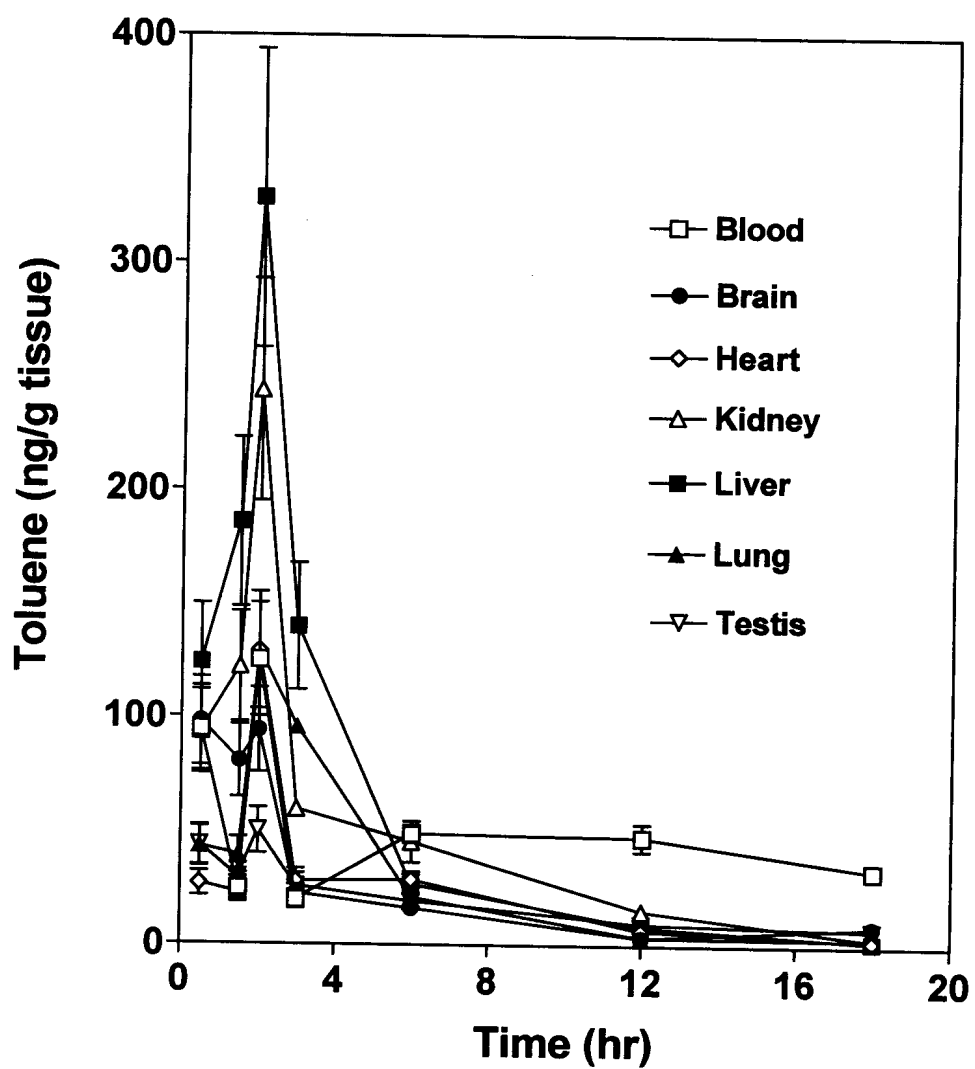


Fig. 4. Amount of Toluene in organs of acetone treated rats

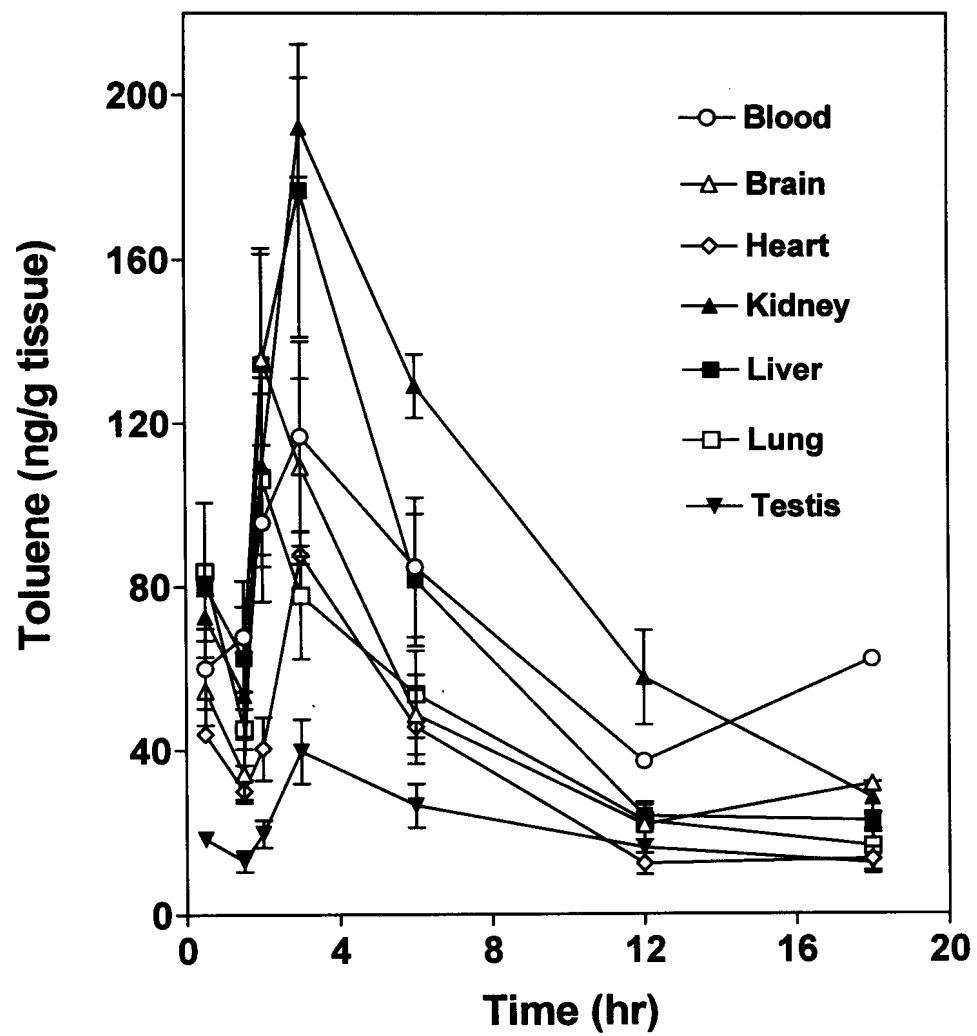


Fig. 5. Amount of Toluene in organs of 3-methylcholanthrene treated rats

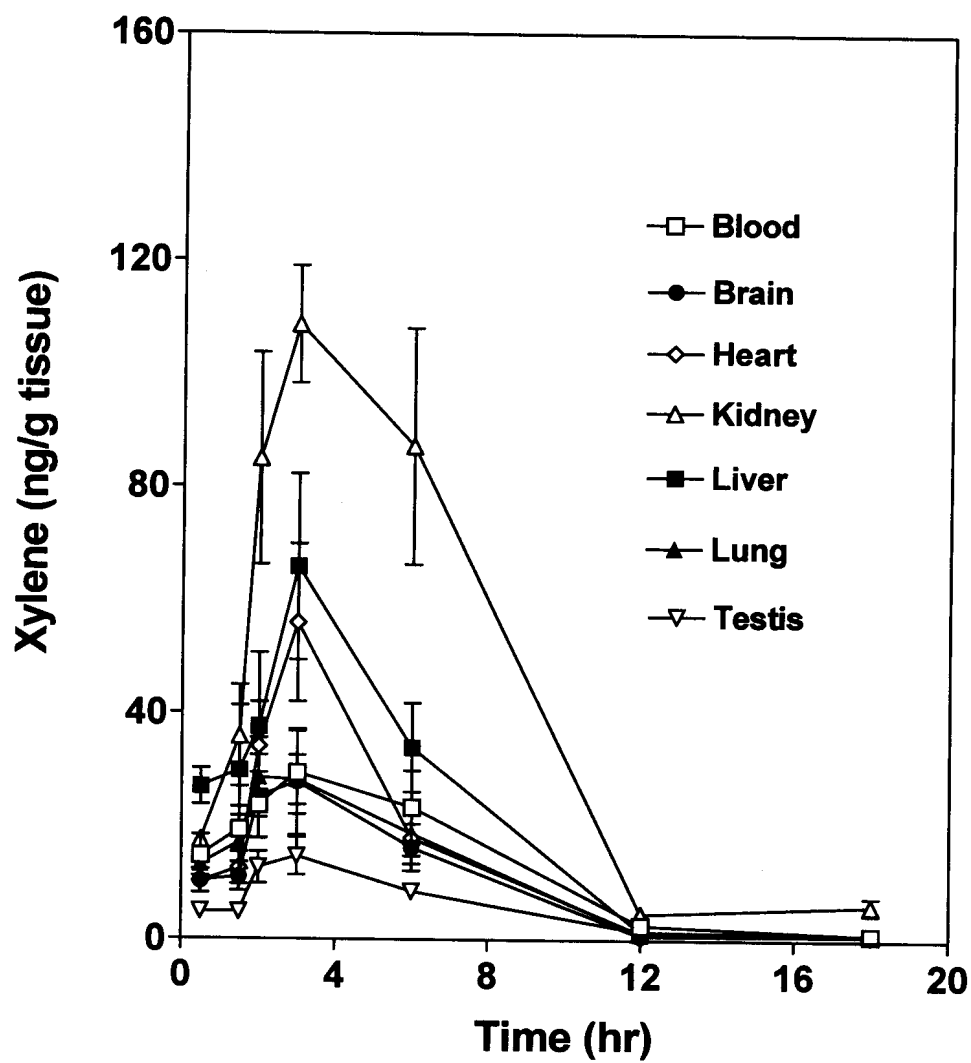


Fig. 6. Amount of Xylene in organs of control rats

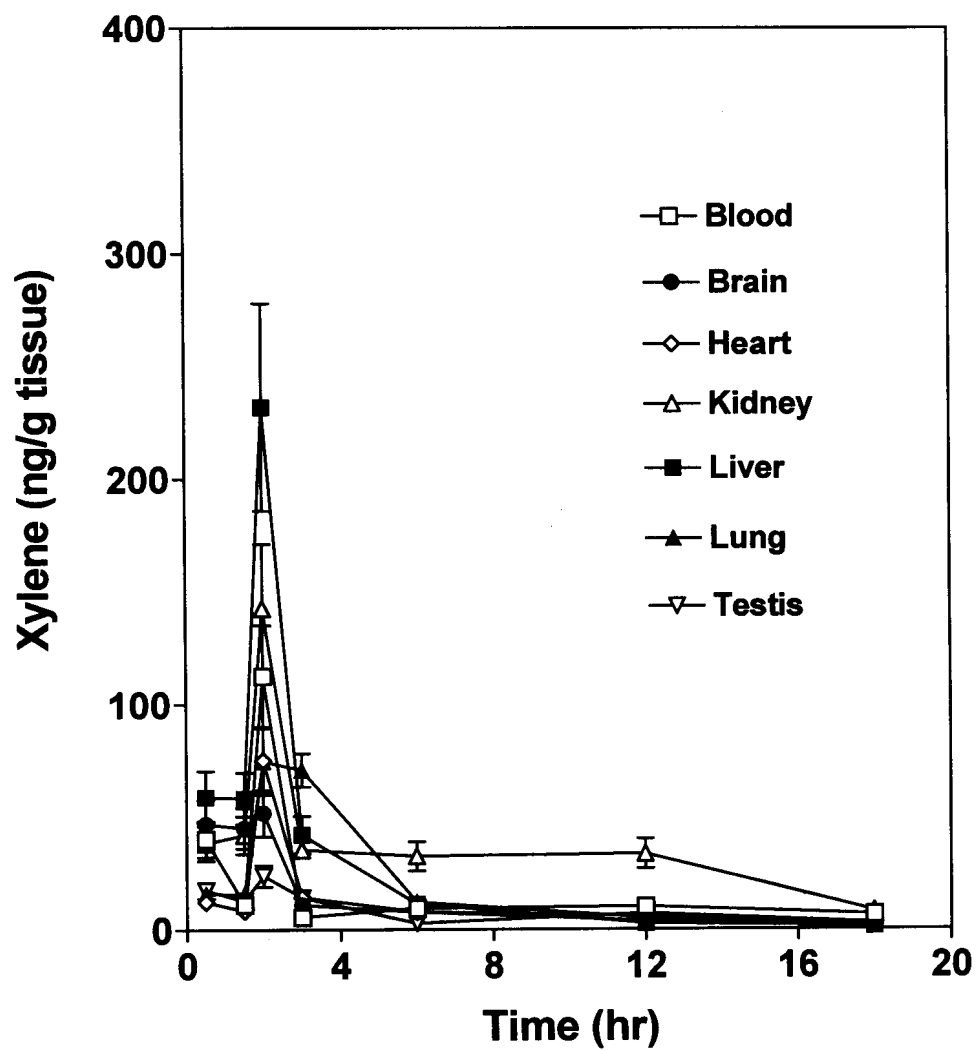


Fig. 7. Amount of Xylene in organs of acetone treated rats

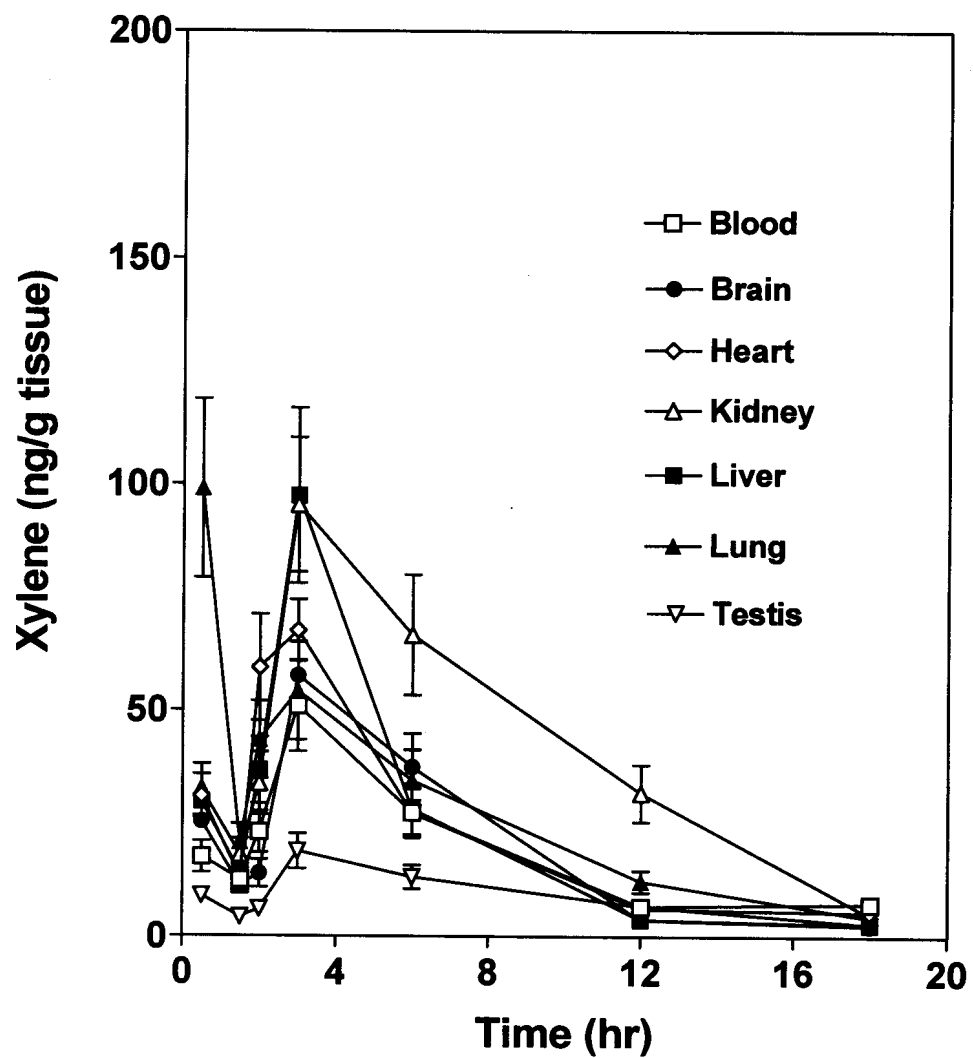


Fig. 8. Amount of Xylene in organs of 3-methylcholanthrene treated rats

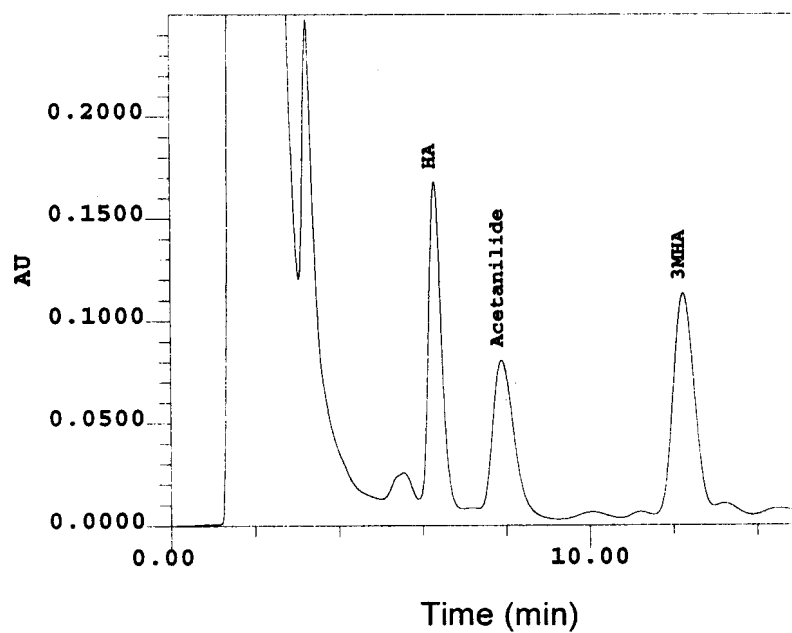


Fig. 9. HPLC chromatogram of hippuric acid (HA) and 3-methylhippuric acid (3MHA)

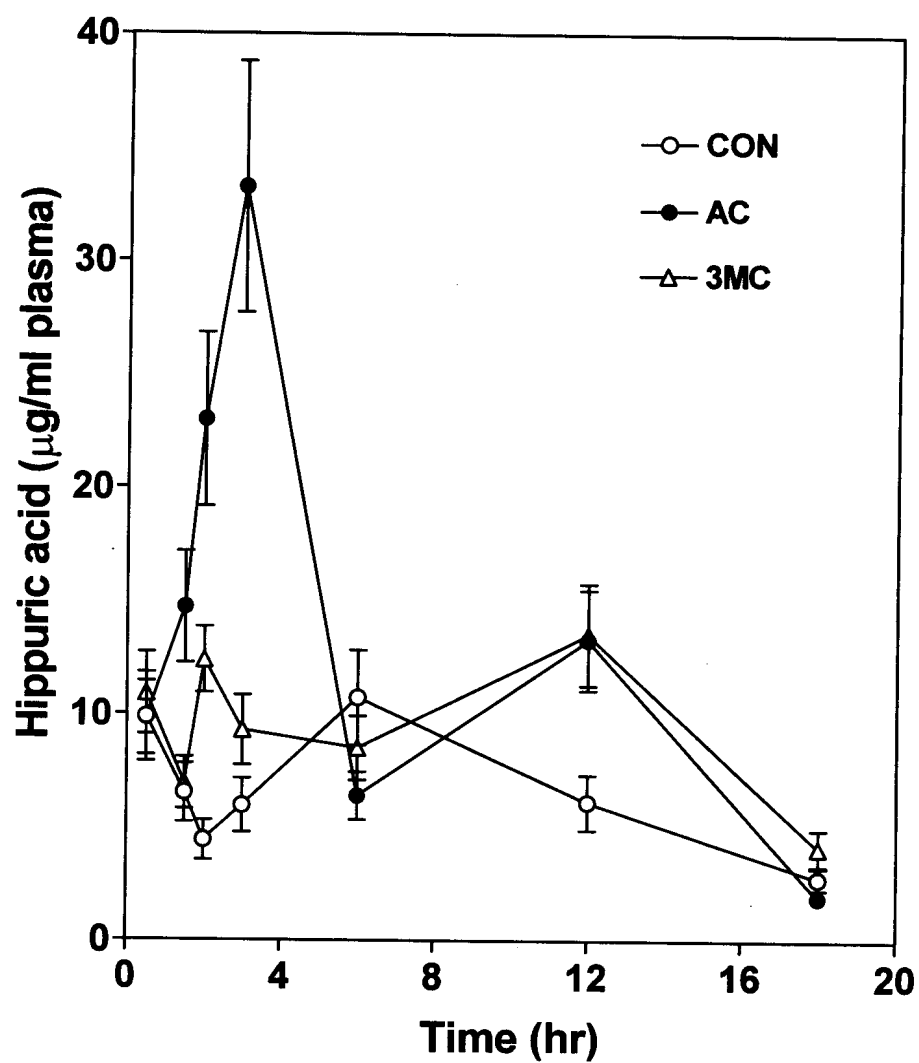


Fig. 10. Effect of acetone (AC) and 3-methylcholanthrene (3MC) on the hippuric acid formation in rats.

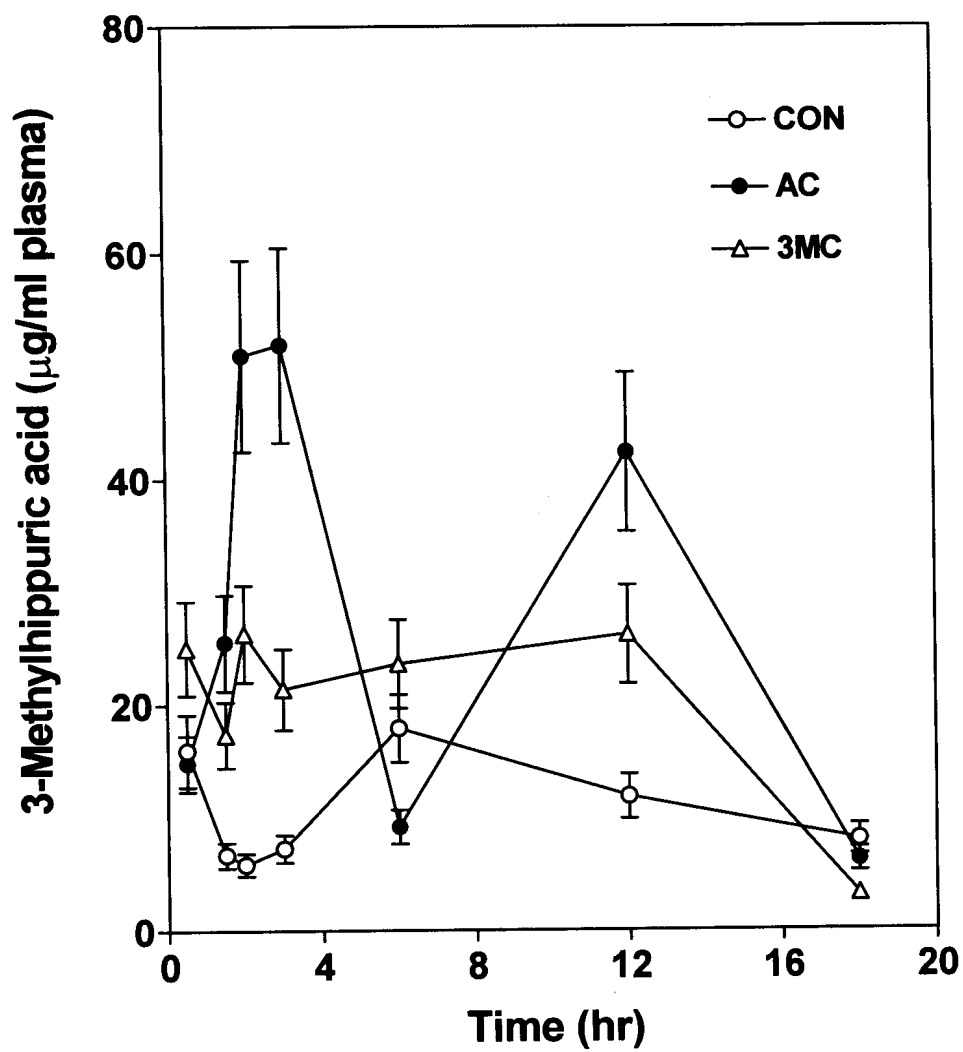


Fig. 11. Effect of acetone (AC) and 3-methylcholanthrene (3MC) on the 3-methylhippuric acid formation in rats.

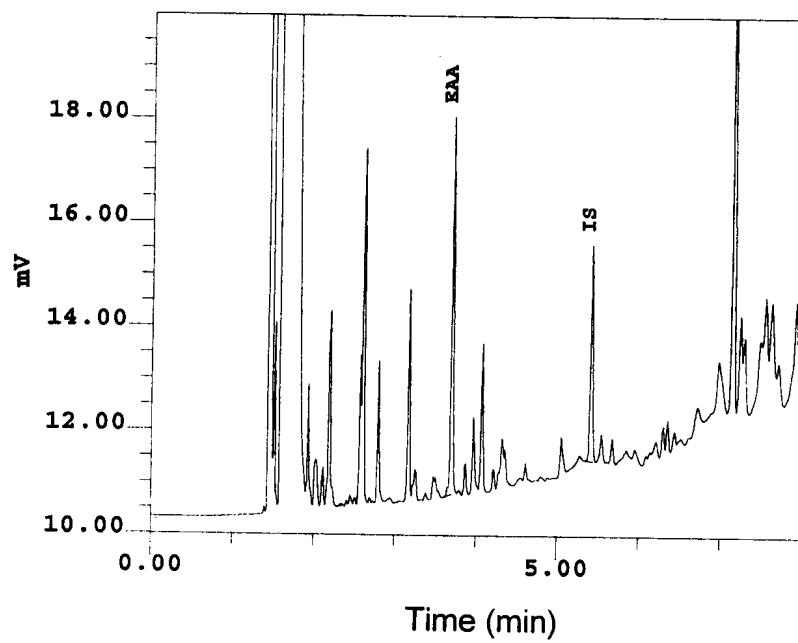


Fig. 12. Gas chromatogram of ethoxyacetate in blood

IS: acetanilide as an internal standard.

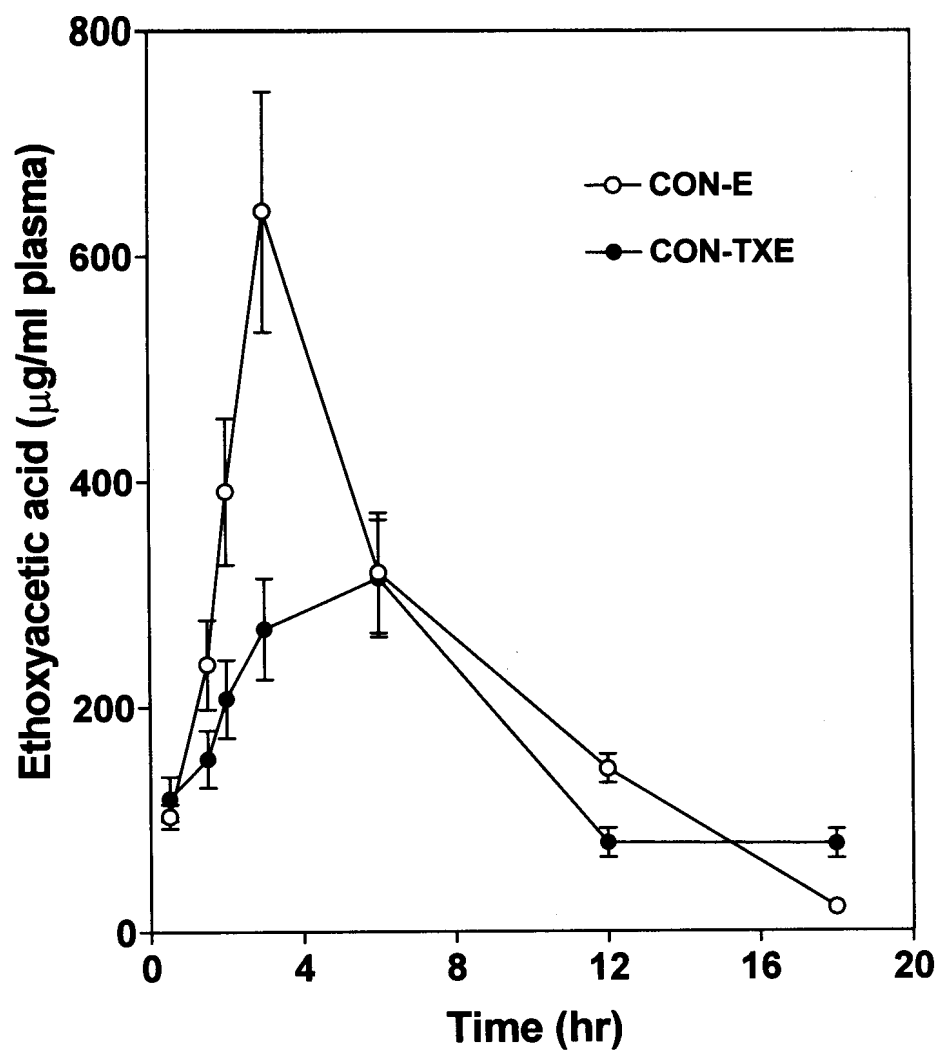


Fig. 13. Effect of co-administration of toluene and xylene on the ethoxyacetic acid formation in control rats.

CON-E: Administration of ethyleneglycolethylether only
CON-TXE: Co-admi. of Tol + Xyl + ethyleneglycolethylether

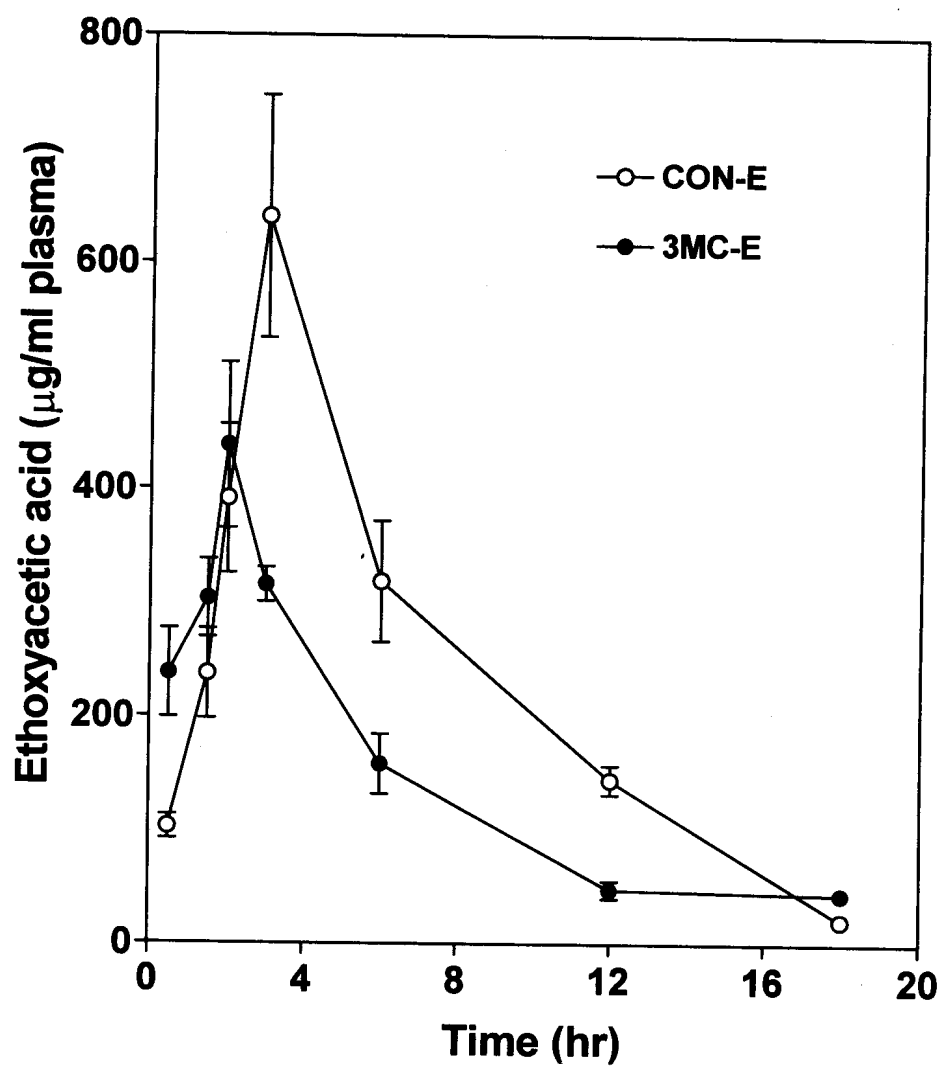


Fig. 14. Effect of 3-methylcholanthrene treatment on the ethoxyacetic acid formation in rats.

CON-E: Control rats

3MC-E: 3-methylcholanthrene treated rats

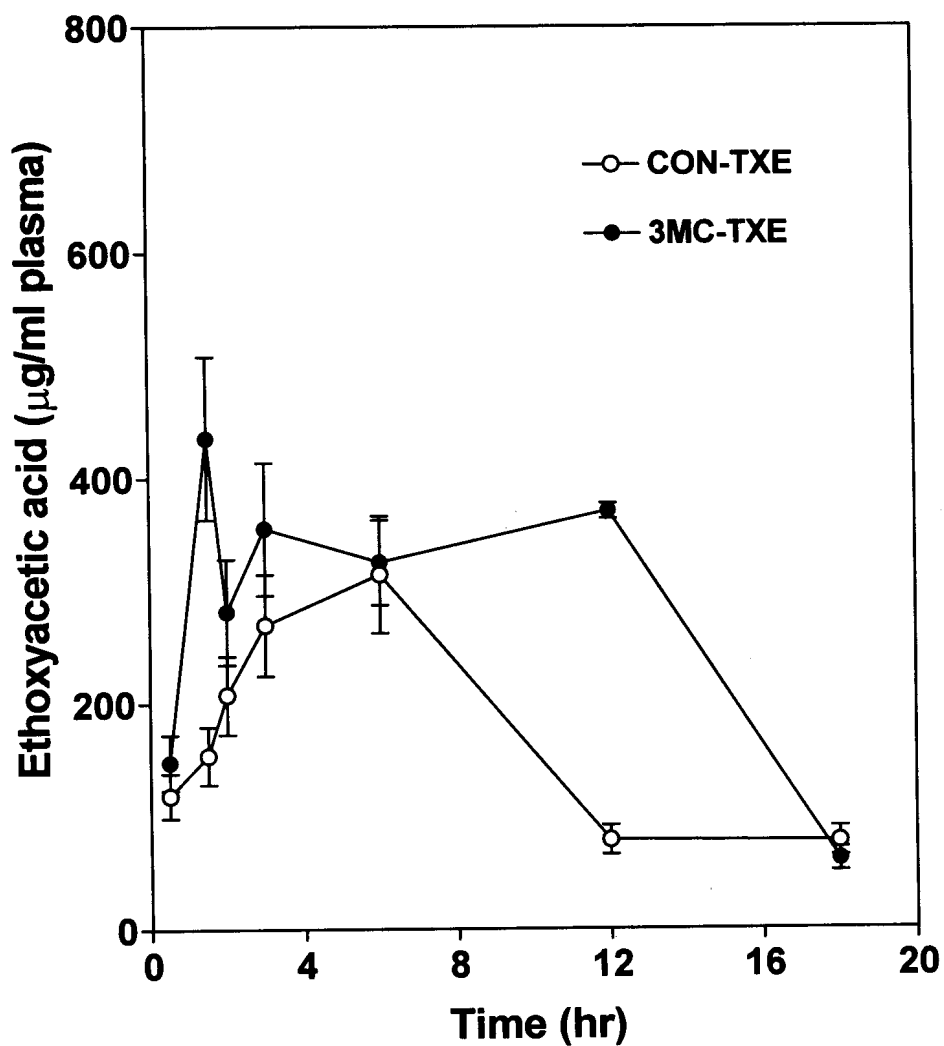


Fig. 15. Effect of 3-methylcholanthrene treatment on the ethoxyacetic acid formation from rats treated with Tol + Xyl + EGEE.

CON-TXE: Control rats

3MC-TXE: 3-methylcholanthrene treated rats

IV. 결론 및 요약

1. 실험용 쥐를 이용하여 toluene, xylene와 ethyleneglycolethylether의 혼합 용매 폭로에 의한 pharmacokinetics를 연구하여 한국의 작업 현장에서 사용되는 복합 유기 용제의 pharmacokinetics에 대한 정보를 얻기 위하여 본 연구를 수행하였고 특히 ethyleneglycolethylether의 생식독성에 미치는 toluene과 xylene의 역할을 규명하기 위하여 ethoxyacetic acid 대사체를 분석하였다.
2. 복합 유기용제의 pharmacokinetics에 대한 흡연과 음주의 영향을 검색하기 위하여 3-methylcholanthrene과 acetone을 전처리한 쥐를 이용하였다.
3. 대조군 쥐에서 toluene 과 xylene의 최고 농도를 나타내는 Cmax의 기관 별 순위를 보면 kidney > liver > heart $\geq$ lung $\geq$ blood > brain > testis 순이다. AUC의 순서는 kidney > liver > blood > heart $\geq$ lung $\geq$ brain $\gg$ testis 순으로 대략적으로 Cmax의 순서와 비슷하다. Acetone 전처리한 쥐에서의 Cmax의 순서는 대조군 쥐의 Cmax의 순서와 같은 양상이다. 3-methylcholanthrene 전처리한 쥐에서는 toluene의 Cmax의 순서는 대조군과 비슷하지만 다만 대조군에서 6 번째이던 brain의 Cmax가 3번째가 되었고 대조군에서 3번째이던 heart의 Cmax가 6번째로 서로 순서를 바꾸었다. 이는 강한 지질성인 3-methylcholanthrene이 역시 lipophilic한 brain에 특정한 작용의 가능성을 시사한다.
4. Toluene의 대사체인 hippuric acid의 Cmax와 AUC는 acetone 전처리한 쥐에서는 각각 210%와 80%가 증가하였다. AUC의 증가가 Cmax의 증가보다 적은 것은 대사체가 증가함으로 대사체 배설 능력의 극대화가 이루어져 빠르게 대사체가 체외로 배설되었을 가능성을 시사한다.
5. m-Xylene의 대사체인 3-methylhippuric acid의 형성에서 acetone 전처리한 쥐에서 Cmax와 AUC가 각각 2.9배와 2.3배가 증가하였다. 이렇게 Cmax와 AUC가 비슷한 양상으로 증가하는 것은 대사체 형성 자체가 증가함을 의미한다. 반면에 3-methylcholanthrene의 전처리는 hippuric acid와 3-methylhippuric acid의 Cmax와 AUC를 각각 30-70% 정도씩 증가시켰다. 이는 P4501A2효소가 P4502E1보다는 toluene을 대사시키는 능력이 작다는 것을 의미한다.

6. 쥐를 이용한 ethyleneglycolmonoethylether의 생식독성 실험에서 toluene과 xylene을 ethyleneglycolmonoethylether와 함께 투여하면 생식독성이 감소한 것을 확인하기 위하여 ethyleneglycolmonoethylether를 쥐에 투여하여 0.5, 1.5, 2, 3, 6, 12, 18 시간에 쥐를 잡아 혈액을 취한 다음 plasma 중에 있는 생식독성원인인 ethoxyacetic acid를 HPLC로 검출하였다. 그 결과 대조군 ethoxyacetic acid의 Cmax는 640mg/l plasma이었으며 AUC는 4170 mg/l plasma이었으며 반면에 toluene, xylene과 함께 투여한 쥐의 ethoxyacetic acid 형성의 Cmax는 314mg/l plasma로 대조군의 49%이었으며 AUC는 2985 mg/l plasma로 대조군의 72%이었다. 따라서 toluene과 xylene과 함께 투여된 쥐에서의 생식 독성의 감소는 ethoxyacetic acid 형성의 감소로 인함이라고 해석할 수 있다.
7. P450 1A2와 2E1이 toluene과 xylene의 대사에 관여하기 때문에 toluene과 xylene의 대사가 ethyleneglycolmonoethylether의 생식독성에 어떤 영향을 미칠 것인가 하는 것을 조사하기 위하여 P4502E1 유도체인 acetone과 P4501A2의 유도체인 3-methylcholanthrene을 투여한 쥐에서 실험을 수행하였다. 그 결과 acetone 처리군에서는 ethyleneglycolmonoethylether만의 투여군이나 toluene, xylene과 함께 투여한 군에서 ethoxyacetic acid를 조금 빠르게 또는 많이 형성하는 것으로 나타났다. 반면에 3-methylcholanthrene 투여군에서는 ethyleneglycolmonoethylether만의 투여군에서는 ethoxyacetic acid의 형성이 30-40% 정도 감소하였다. 그러나 복합 유기 용제의 투여군에서는 오히려 Cmax는 40%, AUC는 74%가 증가하여 ethoxyacetic acid에 의한 생식 독성이 증가시킬 가능성이 많다. 이 부분에 대한 기전도 더 연구가 되어야할 부분이다.
8. 결론적으로 toluene과 xylene은 ethyleneglycomonoethylether의 대사체이며 생식독성원인 ethoxyacetic acid의 형성을 감소시켜 복합 유기 용제의 폭로가 오히려 독성을 감소시킬 것이다. 그러나 음주(acetone 투여군)는 ethyleneglycolmonoethylether의 단독 폭로나 복합 유기 용제의 폭로와 관계없이 생식독성물질인 ethoxyacetic acid를 증가시켰고 흡연(3-methylcholanthrene 투여군)은 ethyleneglycomonoethylether의 단독폭로 시에는 ethoxyacetic acid를 감소시켰고 toluene, xylene과의 복합 폭로 시에는 증가시켜서 경우에 따라서 서로 상반된 효과를 나타냄으로 주의해야한다.

V. 참고 문헌

Angerer J., Occupational chronic exposure to organic solvents. VII. Metabolism of toluene in man. *Int Arch. Occup. Environ. Health* 43: 63-67 (1979)

Chung W.G., Roh H.K., Kim H.M., and Cha Y.N., Involvement of CYP3A1, 2B1 and 2E1 in C-8 hydroxylation and CYP1A2 and falvin-containing monooxygenase in N-demethylation of caffeine: Identified by using inducer treated rat liver microsome that are characterized with testosterone metabolic patterns, *Chem. Biol. Interact.* in press, 1998.

Fales H.M., Jaouni T.M., and Babashak J.F., Simple devices for preparing ethereal diazomethane without resorting to codistillation, *Anal. Chem.* 45, 2302-2303, 1973.

Fuke C., Berry C.L., and Pounder D.J., Postmortem diffusion of ingested and aspirated paint thinner, *Forensic Sci. Int.* 78: 199-207 (1996)

Groeseneken D., Van Vlem E., Veulemans H., and Masschelein R., Gas chromatographic determination of methoxyacetic acid and ethoxyacetic acid in urine, *Bri. J. Industr. Med.* 43, 62-65, 1986.

Matsubara T., Koike M., Touchi A., Tochino Y., and Sugeno K., Quantitative determination of cytochrome P450 in rat liver homogenate, *Anal. Biochem.* 75: 596-603 (1979)

Nakajima T., Wang R.S., Elovaara, Gonzalez F.J., Gelboin H.V., Raunio H., Pelkonen O., Vainio H., and Aoyama T., Toluene metabolism by cDNA expressed human hepatic cytochrome P450, *Biochem Pharmacol.* 53: 271-277, (1997)

Oudiz D., and Zenick H., In vivo and in vitro evaluations of spermatotoxicity induced by 2-ethoxyethanol treatment, *Tox. Appli. Pharmacol.*, 84:576-583

(1986).

Poggi G., Guisiani M., Palagie V., Paggiaro P.L., Loi W.M., Dazzi F., Siclari, C., and Baschieri L., HPLC for the quantitative determination of the urinary metabolites of toluene, xylene, and styrene, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 50:25-31 (1982).

Sonderfan A.J., Arlotto M.P., Dutton D.R., McMillan S.K., and Parkinson A., Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsome cytochrome P450, *Arch Biochem Biophys* 255: 27-41 (1987).

Tardif R., Plaa G.L., and Brodeur J., Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: 385-393 (1992)

Tassanleyakul W., Birkett D.J., Edwards J.W., Veronese M.E., Tassanleyakul W., Tukeg R.H., and Miners J.O., Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m-, p-xylene, *J. Pharm. Exp. Ther.* 276: 101-108 (1996).

Wang R.S., Nakajima T., Park S.S., Gelboin H.V., and Murayama N., Monoclonal antibody directed assessment of toluene induction of rat hepatic cytochrome P450 isozymes, *Biochem. Pharmacol.*, 46: 413-419, (1993)

이준연, 임철홍, 유일재, 실험동물을 이용한 복합 유기 용제의 흡입 폭로, 한국산업안전공단 산업보건연구원, (1996)

유일재, 복합 유기 용제의 생식독성 연구, 한국산업안전공단 산업보건연구원, (1997)