2022년 연구보고서

세포형질전환분석법을 이용한 단기 발암 예측연구

OSHRI

산업재해예방
안전보건공단
산업안전보건연구원

연구보고서

세포형질전환분석법을 이용한 단기 발암 예측연구

임철홍·신경민

산업재해예방
안전보건공단
산업안전보건연구원

요 약 문

● 연 구 기 간　2022년 1월 ~ 2022년 12월

● 핵 심 단 어　세포형질전환, 1,2-Dichlorobenzene, 2-Methoxyethanol, Anisole

● 연구과제명　세포형질전환분석법을 이용한 단기 발암 예측연구

1. 연구배경

○ 많은 실험동물의 희생이 요구되는 발암성시험의 개선이 필요

- 발암성 확인을 위한 핵심자료인 실험동물을 이용한 발암성시험은 장기간의 시험기간(4~5년)과 많은 실험동물의 희생(최소 400마리)이 요구되어 보다 효율적인 대체시험법이 요구되고 있다.

○ 현재 발암성 시험은 유전독성물질을 우선적으로 적용하고 있으나, 유전독성을 일으키지 않는 물질의 발암성 평가 중요성이 증가함

- 기존의 발암성평가는 주요 발암경로인 유전독성을 일으키는 물질을 중심으로 수행되어 왔다. 그 결과 유전독성을 일으키는 물질은 신소재 개발 등에서 사실상 배제되고 있으며, 최근에는 유전독성을 일으키지 않는 발암물질에 의한 유해우려가 증가함에 따라 비유전독성의 발암성시험 필요성이 높아지고 있다.
- OECD에서도 전문가 그룹을 구성하여 유전독성을 일으키지 않는 물질에 대한 통합적 접근법에 기초한 새로운 발암평가체계를 제안하고 있어 이에 대한 대응이 필요하다. 따라서 본 연구는 새로운 발암성평가 전략에서 핵심지표로 검토되는 세포를 이용한 형질전환분석법을 구축하고 적용하여 새로운 발암성평가체계에 대응하고자 한다.

2. 주요 연구내용

○ 시험물질

- 양성대조물질: 3-methylcholanthrene(발암 개시단계 시험), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(발암 촉진단계 시험)
- 시험 물질: 2-methoxyethanol, anisole, 1,2-dichlorobenzene

○ 연구방법

- 세포도입 및 배양: 유전자변형생물체 연구 지침에 따라 Bhas 42세포를 수입하였다. 수입된 세포는 계대 배양을 통하여 마스트스톡과 워킹스톡을 조제한 후, 세포형질전환시험은 워킹스톡을 10% FBS가 포함된 MEM 배양액으로 4일 간 배양한 후, 5% FBS가 포함된 DMEM/F12 배양액에 3일간 배양하여 사용하였다.
- 세포독성시험: 세포독성시험을 실시하여 세포형질전환분석법의 농도를 결정하였다. 세포독성시험은 96 well plate에 세포를 접종하여 7일간 배양한 후 용매처리군 대비 세포성장율로 구하였다. 시험물질처리는 발암 개시단계 시험에서는 1일에서 4일까지, 발암 촉진단계 시험에서는 4일에서 7일까지 처리하였다.
- 세포형질전환분석법: 96 well plate에 세포를 접종하여 20일간 배양 한 후 각 well에서의 배양된 세포의 초점(foci) 형성 여부를 기준으로 발암 여부를 판단하였다. 시험물질은 발암 개시단계 시험에서는 1일차에서 4일차까지, 발암 촉진단계 시험에서는 7일차에서 14일차까지 처리하였다.

○ 연구결과

- 세포형질전환분석법 타당성 확인: 발암 개시단계에서 발암여부를 확인하는 양성대조물질 3-methylcholanthrene과 발암 촉진단계에서 발암 여부를 확인하는 양성대조물질 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate를

이용하여 세포형질전환 초점의 정상적인 형성 및 용매대조군 대비 발암 초점의 증가여부를 확인하여 세포형질전환분석법 타당성을 확인하였다.

- 시험결과: 2-methoxyethanol, anisole, 1,2-dichlorobenzene은 모두 세포형질전환분석법에서 음성으로 암을 유발할 가능성이 높지 않는 것으로 나타났다.
- 의의: 세포를 이용한 형질전환분석법은 실험동물을 이용한 발암성시험 후보물질 선정에 있어 주요한 검토 자료가 될 수 있으며, 또한 비유전발암물질의 평가의 있어 주요한 정보로 활용될 것으로 기대된다.

3. 연구 활용방안

○ 발암성평가에 활용 가능한 시험법 확립

- 발암 개시단계 및 발암 촉진단계에서의 발암 영향을 형태학적으로 확인할 수 있어 유전독성 발암물질 뿐 아니라 비유전독성 발암물질 확인에도 활용 가능

○ 산업화학물질의 발암평가를 위한 정보 제공에 기여

- 화학물질 구조, 유전독성 등 제한적인 정보에 의존하던 발암성시험 후보물질 선정에 있어 형태학적 변화에 기반 한 발암가능성 정보를 제공하여 발암성시험 후보물질의 선정의 내실화 기여

4. 연락처

- 연구책임자 : 산업안전보건연구원 산업화학연구실 선임연구위원 임철홍
  - ☎ 042) 869.8532
  - E-mail : limch@kosha.or.kr

목 차

Ⅰ. 서론 ···················· 1

1. 연구배경 ···················· 3
2. 연구목적 ···················· 7

Ⅱ. 연구방법 ···················· 9

1. 시험물질 ···················· 11
2. 세포주 도입 및 및 세포계대 ···················· 11
3. 발암 개시단계 시험 ···················· 12
4. 발암 촉진단계 시험 ···················· 14
5. 결과의 평가 ···················· 15
6. 통계처리 ···················· 15

Ⅲ. 연구결과 ······ 19
1. 발암 개시단계 시험 ······ 21
1) 세포독성시험 ······ 21
2) 세포형질전환시험 ······ 22
2. 발암 촉진단계 시험 ······ 24
1) 세포독성시험 ······ 24
2) 세포형질전환시험 ······ 25
Ⅳ. 고찰 ······ 27
참고문헌 ······ 45
Abstract ······ 53

표 목차

〈표 Ⅲ-1〉 발암 개시단계에서의 세포형질전환시험결과 ································· 23
〈표 Ⅲ-2〉 발암 촉진단계에서의 세포형질전환시험결과 ································· 26

그림목차

[그림 Ⅰ-1] 미국 국가독성계획을 통한 발암성시험 수행 추이 ········· 5
[그림 Ⅱ-1] 발암 개시단계에서의 세포독성시험 일정 ········· 13
[그림 Ⅱ-2] 발암 개시단계에서의 세포형질전환시험 일정 ········· 13
[그림 Ⅱ-3] 발암 촉진단계에서의 세포독성시험 일정 ········· 14
[그림 Ⅱ-4] 발암 촉진단계에서의 세포형질전환시험 일정 ········· 15
[그림 Ⅱ-5] 발암성 음성 기준 및 표준 사진 ········· 16
[그림 Ⅱ-6] 발암성 양성 기준 및 표준 사진 ········· 17
[그림 Ⅲ-1] 발암 개시단계 시험을 위한 세포독성시험 결과 ········· 21
[그림 Ⅲ-2] 발암 촉진단계 시험을 위한 세포독성시험 결과 ········· 24
[그림 Ⅳ-1] 미국 OPPT 신규화학물질 변이원성시험 평가 체계 ········· 30
[그림 Ⅳ-2] 미국 OPPTS 살충제 변이원성시험 평가 체계 ········· 31
[그림 Ⅳ-3] 유럽연합 ECHA 유전독성 평가 체계 ········· 32
[그림 Ⅳ-4] 비유전독성 발암물질 시험 및 평가 통합접근법 ········· 34
[그림 Ⅳ-5] 검정시험에서의 세포독성시험 결과 ········· 36
[그림 Ⅳ-6] 세포형질전환 음성 결과 예제 ········· 37
[그림 Ⅳ-7] 세포형질 양성 예제 ········· 38

Ⅰ. 서 론

Ⅰ. 서 론

1. 연구배경

최근 암환자의 생존율이 증가하고는 있으나 암은 여전히 치유가 어려운 질환이다. 암은 우리나라에서 사망원인으로 가장 높은 비중을 차지하는데, 매년 10만 명 당 495.2명이 암에 걸리고 160명 이상이 사망하는 것으로 조사되고 있다(2019년 기준; 국립암센터, 2021; 통계청, 2022).

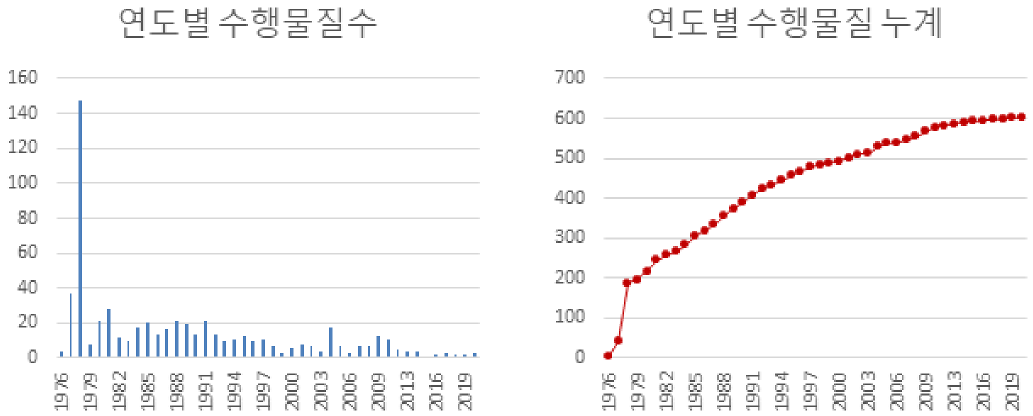
암을 일으키는 외부 요인으로는 바이러스가 5%, 방사선이 5%, 화학물질이 90%로 추정된다(Malarkey DE et al, 2013). 직업관련성 암의 비중은 산업의 종류 또는 국가에 따라 다를 수 있겠지만 전체 암의 4%에 이르고 있어(Doll R and Peto R, 1981; Steenland K et al, 2003), 국제노동기구(ILO, International labour office)에서도 「화학물질로 인한 직업암 예방과 통제 지침」을 통해서 오래전부터 직업암 예방의 중요성을 강조하였다(International labour Office, 1977).

발암물질을 적절히 관리하기 위해서는 먼저 작업장에서 사용되는 발암물질이 무엇인지 확인하는 것이 필요하다. 1965년 국제적 암 연구 협력을 위해 설립된 국제암연구소(IARC, International Agency for Research on Cancer)는 유해인자의 발암성평가 보고서인 모노그래프를 발간하고 있는 데(International Agency for Research on Cancer, 2022), 여기서 평가된 발암등급은 사실상 국제표준으로 활용되고 있다. 미국의 국가독성계획(NTP, National Toxicology program)에서 발간하는 발암물질보고서(RoC, Report on Carcinogens)와 유럽연합의 분류표지포장법(CLP, Regulation on classification, labelling and packaging)에서의 발암성분류 결과 또한 여러 나라에서 발암성분류의 주요자료로 활용되고 있다(Department of Health and Human Services, 2021; European Commission, 2008).

미국 등 선진국을 중심으로 한 노력에도 불구하고 발암성평가 결과를 이용할 수 있는 유해인자는 전체 유해인자 중 소수에 불과하고 대부분의 화학물질은 발암성평가가 이루어지지 않은 상태로 사용되고 있다. 기술적 어려움, 시험 비용과 더불어 최근에는 동물실험에 대한 생명윤리적 이해가 맞물려 발암성 시험이 감소하고 있기 때문이다. 국제암연구소도 자체적으로 평가 자료를 생산하지는 않고 공개된 정보만을 이용하여 발암성을 평가하고 있어 평가 자료가 없는 인자에 대해서는 발암성평가를 수행할 수 없는 태생적 한계를 가지고 있다(International Agency for Research on Cancer, 2019).

초기에 발암성이 확인된 소수의 유해인자는 사람에서의 경험을 통하여 확인되었지만, 실험동물을 이용한 발암성시험이 확립된 이후에는 대부분 동물시험을 통하여 발암성이 확인되었는데, 현재까지 천 여 건의 발암성시험이 이루어졌다(Yamagiwa K and Ichikawa K, 1977; National Toxicology Program, 2022; International Agency for Rearch on Cancer 2022). 실험동물을 이용한 발암성시험은 발암물질의 확인에 큰 기여를 하였으나 수행되는 시험 수는 갈수록 줄어들고 있다. 수십억 원에 달하는 시험비용, 5년 이상의 시험기간, 시험 당 1,000마리에 달하는 실험동물의 희생 등은 새로운 발암성시험을 어렵게 하고 있기 때문이다.

현재 수행된 발암성시험은 대부분 미국의 발암성평가 프로그램인 국가독성계획(NTP, National Toxicology Programn)에 의해 수행되었다고 해도 과언이 아니다. 미국 국가독성계획을 통한 독성시험은 후보물질의 공개적 지명, 의견청취 및 과학자문회의(BSC, Noard of Scinetific Counselors Meeting) 검토 과정을 거쳐 결정되는 데, 현재 까지 600여 건이 수행되었다. 사실 1971년 미국의 닉슨 대통령이 National Act of Cancer에 서명하고 암과의 전쟁을 선포하지 않았다면 실험동물을 이용한 발암성시험은 이렇게까지 많이 수행되지 않았을지도 모른다. 발암성시험은 1970년대 가장 적극적으로 수행되었으며, 현재는 연간 5건 이내로 수행되고 있다(그림 Ⅰ-1).



[그림 Ⅰ-1] 미국 국가독성계획을 통한 발암성시험 수행 추이

미국 국가독성계획을 제외하면 일본 후생노동성 산하의 바이오앗세이연구센터에서의 60건에 달하는 발암성시험결과가 이용 가능한 대표적인 시험자료이다(일본바이오앗세이연구센터, 2022).

현재까지 보편적으로 적용되는 발암성평가 전략은 발암 가능성이 높은 물질 즉, 유전독성물질을 우선적으로 평가하는 것이다. 다수의 발암물질이 발암 개시단계에서 유전자에 영향을 주는 것으로 확인되었기 때문이다(Berenblum I, 1941; Hernandez LG et a al, 2008). 80%에 이르는 발암물질이 유전독성물질인 것으로 조사되고 있어 발암성평가가 있어 이러한 전략은 효과적인 것으로 판단할 수 있다. 그러나 이러한 평가 전략은 유전독성을 일으키는 화학물질은 발암의 우려에 의해 개발단계에서부터 적용을 배제시키는 역할을 하게 되었고 20%에 이를 것으로 추정되지만, 발암성 평가체계에서 배제되다시피 한 비유전독성물질의 발암 우려는 증가하게 되었다. 따라서 최근 비유전독성물질의 발암성 확인을 위한 새로운 전략이 모색되었으며, 2016년에는 경제개발협력기구에 비유전발암물질의 국제적 통합시험 및 평가법 개발 전문가그룹(OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens)이 구성되어 비유전독성 발암물질의 통합적 시험

및 평가법이 제시되었다(Jacobs 등, 2020).

한편, 비유전독성물질의 발암성평가 중요성이 증가함에 따라 실험동물을 이용한 발암성시험의 대체법으로 연구되었지만 가이드라인으로는 인정되지는 못하여 연구 등 제한적으로만 사용되던 세포형질전환시험법의 가치가 다시 평가되고 있다. 이 방법은 세포를 이용하여 발암 개시단계 및 발암 촉진단계 각각에 대하여 형태학적인 방법으로 발암성 확인이 가능하였으나(Benigni R and Bossa C, 2011, 2012; Hwang SH et al, 2020), 발암 기전정보를 제공하지 않는다는 한계가 있어(Vasseur P and Lasne C, 2012; Organisation for Economic Co-operation and Development, 2006), 탐색적 발암연구에서만 제한적으로 활용되어 왔으나(Creton S et al, 2012; Jacobs MN et al, 2016, 2020; Luijten M et al, 2020), OECD 전문가그룹의 비유전독성 발암성물질 평가를 위한 통합적 시험 및 평가법(IATA, Integrated approaches to testing and assessment)에서 주요 자료로 인용되고 있어 발암성평가에서의 활용성은 더 확대될 것으로 기대되고 있다(Jacobs MN et al, 2016, 2020).

세포형질전환시험법으로 개발된 대표적인 방법으로는 SHE(Syrian Hamster Embryo) 형질전환시험법, 3T3 세포형질전환시험법, Bhas 42 세포형질전환 시법법 등이 있다. 이 중 시리아 햄스터의 배아를 이용한 SHE 형질전환시험법이 가장 먼저 개발되었고(Berwald Y and Sachs L, 1963), Balb/c 마우스의 배아의 섬유아세포에서 유래한 3T3 세포주를 이용한 Balb/c 3T3 세포형질전환 시험법도 개발되었다(Kakunaga T, 1973). 이 후 3T3 세포에 v-ha-ras oncogene 유전자를 형질 감염시킨 Bhas 42 세포를 이용한 형질전환시험법도 개발되었는데(Sasaki K et al, 1988), 특히 시리아 햄스터의 배아를 이용한 방법과 Bhas 42 세포를 이용한 방법은 OECD Guidance document로 개발되었다(Organisation for Economic Co-operation and Development, 2015; 2017). 여러 시험방법 중 Bhas 42 세포형질전환시험법(Sasaki K et al, 1988)은 SHE 형질전환시험법의 단점(세포의 형태변화 관찰이 어렵고, 실험동물로부터 직접 세포를 얻어야 함)과 3T3 세포형질전환시험법의 단점(약 6주의

긴 시험기간)을 개선하여 측정방법이 쉽고 비교적 짧은 시간에 결과를 도출할 수 있어(Sakai A et al, 2010a, b, 2011; Sasaki K et al, 2015), 담배, 환경오염물질 등의 발암성 스크리닝 연구 등에서 다양하여 활용되고 있다(Breheny D et al, 2017; Serra S et al, 2019).

2. 연구목적

이상과 같이 세포형질전환시험법은 비유전독성물질의 발암성평가 등에서 활용성이 커지고 있다. 본 연구에서는 산업안전보건연구원에서 수행하는 발암성 시험의 후보물질 선정에 정보를 제공할 수 있는 도구로서 Bhas 42 세포를 이용한 세포형질전환시험법을 구축하고 이를 이용하여 발암성평가 후보물질에 적용하여 화학물질의 발암성평가에 실질적으로 기여하고자 수행하였다.

Ⅱ. 연구방법

Ⅱ. 연구방법

1. 시험물질

Bhas 42 세포 형질전환시험의 발암 개시단계 양성대조물질은 3-methyl cholanthrene(MCA, Sigma-Aldrich 213942), 발암 촉진단계 양성대조물질은 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA, Sigma-Aldrich P8139)를 사용하였다. 시험 물질은 2-methoxyethanol(Samchun pure chemical E0399), anisole(Samchun pure chemical A2655), 1,2-dichloro benzene (Samchun pure chemical D2226)을 사용하였다.

2. 세포주 도입 및 세포계대

Bhas 42 세포를 수입하기 위하여 사전에 유전자변형생물체(LMO, Living Modified Organism) 연구승인을 받은 후(유전자제조합실험승인신청서, 생물 및 유전자변형생물체 관련 실험 유해성 평가서, 생물 및 유전자변형생물체 관련 실험 연구계획서 작성), 과학기술정보통신부의 승인을 득하였다.

JCRB(japanese Collection of research Bioresources Cell Bank)에서 냉동상태로 구입한 세포(Cell Number JCRB0149, vial 당 2.3 x 10^6 cells/㎖)는 마스트스톡과 워킹스톡으로 조제하였고, 시험에는 워킹스톡을 사용하였다. 마스트스톡은 수입된 세포를 M10F 배양액(MEM(Gibco 11095-080), 10% FBS(CytivaHyclone SH 30919.03), 100 unit/㎖ penicillin-streptomycin(CytivaHyclone SV30010))으로 1회 세척한 후, 10 ㎖의 M10F 배양액이 담긴 75 cm^2 플라스크(Thermo 156499)에 넣고 CO_2 배양기(Thermo 51030303-TIF)에서 37℃로 6일 배양(세포밀도 50~70% 수준)한 후 만들었다

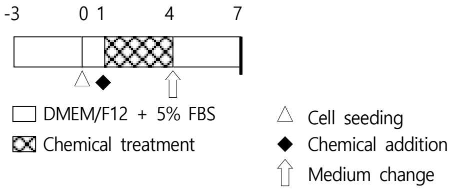
(2.5 x 10^5 cells/㎖ in M10F with 5% DMSO). 배양된 세포의 단세포화는 상층액을 제거한 후 칼슘/마그네슘 제거 인산생리완충액(calcium-magnesium free phosphate buffered saline, Gibco 10010-23)으로 1회 세척한 후, Trypsin-EDTA(Gibco 10010-23) 1.5㎖을 넣고 CO_2 배양기에서 약 2분간 배양하여 세포 간 결합단백질을 분해한 후 M10F 배양액 9 ㎖을 넣고 수 회 반복 피펫팅(배양액을 피펫에 넣고 비우는 조작)한 후 15 ㎖ 튜브에 넣고 4℃에서 5분간 1500 rpm으로 원심분리 하여(Hanil Combi S14R) 상층액에 남아있는 Trypsin-EDTA를 제거하는 방법으로 수행되었다. 워킹스톡은 마스트스톡을 2계대하여 만들었다(2.5 x 10^5 cells/㎖ 씩 0.5 ㎖로 분주).

각 세포형질전환시험은 워킹스톡을 M10F 배양액이 담긴 100 mm 배양접시에서 4일 간 배양한 후, 다시 DF5F 배양액((DMEM/F12 (Gibco 11320033), 5% FBS, 100 unit/㎖ penicillin-streptomycin)에서 3일간 배양한 세포를 사용하였다.

3. 발암 개시단계 시험

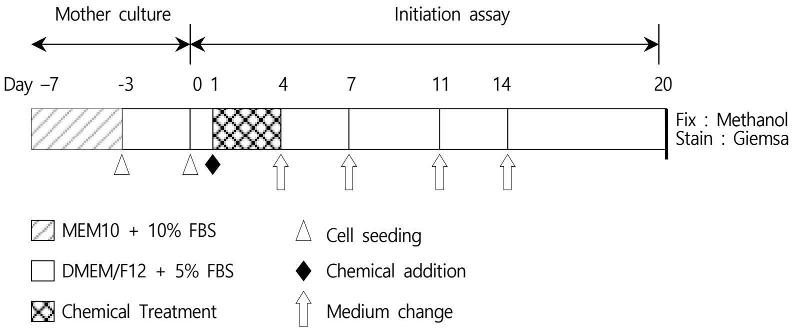
발암 개시단계 시험의 농도 결정을 위한 세포독성시험 일정은 [그림 Ⅱ-1]과 같다. Day 0에 계대 배양된 세포를 DF5F 배양액으로 4,000 cells/㎖로 조절한 후, 96 well plate의 각 well 당 50 ㎕씩 넣고 37℃의 CO_2 배양기에서 1일 배양한 후, Day 1에 DF5F 배양액으로 조제된 시험물질(또는 대조물질)을 50 ㎕ 처리하였다. Day 4에서는 DF5F 배양액 100 ㎕로 배양액을 교환하여 주었고, Day 7에 각 well 당 5배로 희석된 WST-8(AssayGenie, MAE0207-500) 50 ㎕을 넣고 1시간 추가 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용매대조군 대비 세포생존율은 아래의 공식을 사용하여 구하였다.

$$\text{Cell survival rate (\%)} = \frac{OD_{sample} - OD_{blank}}{OD_{control} - OD_{blank}} \times 100$$



[그림 Ⅱ-1] 발암 개시단계에서의 세포독성시험 일정

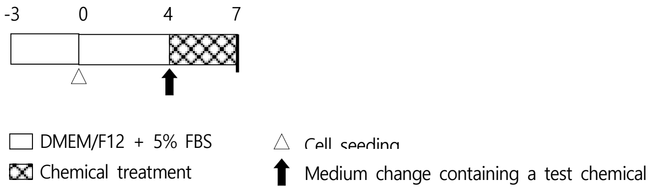
발암 개시단계에서의 세포형질전환시험 일정은 [그림 Ⅱ-2]와 같다. Day 0에 96 well plate의 각 well 당 4,000 cells/㎖로 조제된 세포 50 ㎕씩 넣고 37℃의 CO_2 배양기에서 배양한 후, Day 1에 DF5F 배양액으로 조제된 시험물질(또는 대조물질)을 50 ㎕ 처리하였다. 20일 간의 배양 기간 중 Day 4, Day 7, Day 11, Day 14에 배양액을 교환하여 주었으며, Day 20에 배양액을 제거한 후 각 well 당 50 ㎕ 메탄올(Merck 1.06009.1011)로 세포를 고정하고 5% Giemsa 염색액(5% Giemsa solution(Muto pure chemicals 1500-3), 95% Buffer tablets pH 6.8 (Merck 1.11374.0100))로 염색한 후 세포형질전환 초점이 있는 well 수를 계수하였다.



[그림 Ⅱ-2] 발암 개시단계에서의 세포형질전환시험 일정

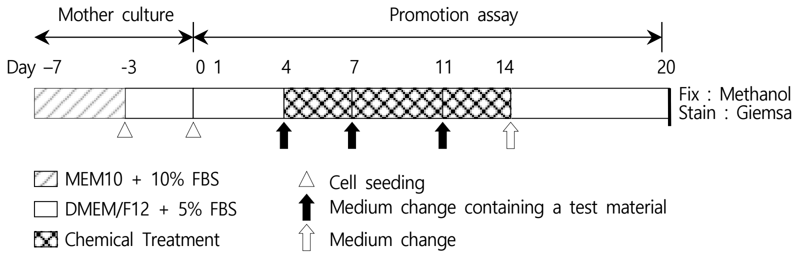
4. 발암 촉진단계 시험

발암 촉진단계 시험의 세포독성시험 일정은 [그림 Ⅱ-3]과 같다. Day 0에 계대 배양 세포를 DF5F 배양액으로 4,000 cells/㎖로 조절한 후, 96 well plate의 각 well 당 100 ㎕씩 넣고 37℃의 CO_2 배양기에서 4일간 배양한 후, Day 4에 신선한 DF5F 배양액으로 조제된 시험물질(또는 대조물질) 100 ㎕로 교환하여 주었다. Day 7에 각 well 당 5배로 희석된 WST-8 50 ㎕을 넣고 1시간 추가 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용매대조군 대비 세포생존율은 아래의 공식을 사용하여 구하였다.



[그림 Ⅱ-3] 발암 촉진단계에서의 세포독성시험 일정

발암 촉진단계에서의 세포형질전환시험 일정은 [그림 Ⅱ-4]와 같다. Day 0에 96 well plate의 각 well 당 4,000 cells/㎖로 조절된 세포 100 ㎕씩 넣고 37℃의 CO_2 배양기에서 배양한 후, Day 4, Day 7, Day 11에 DF5F 배양액으로 조제된 시험물질(또는 대조물질) 100 ㎕로 교환하였으며, Day 14에서는 신선한 DF5F 배양액으로 교환하였다. Day 20에 배양액을 제거한 후 각 well 당 50 ㎕ 메탄올을 가하여 세포를 고정한 후 100 ㎕의 5% Giemsa 염색액으로 염색하여 형질전환 초점이 있는 well 수를 계수하였다.



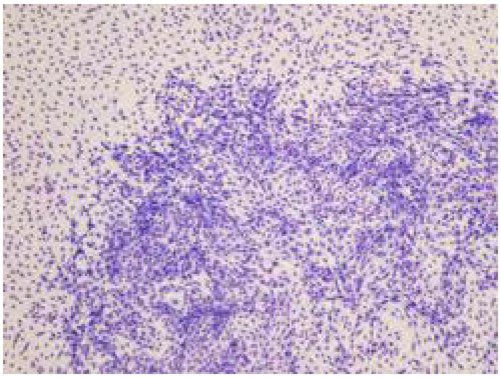
[그림 Ⅱ-4] 발암 촉진단계에서의 세포형질전환시험 일정

5. 결과의 평가

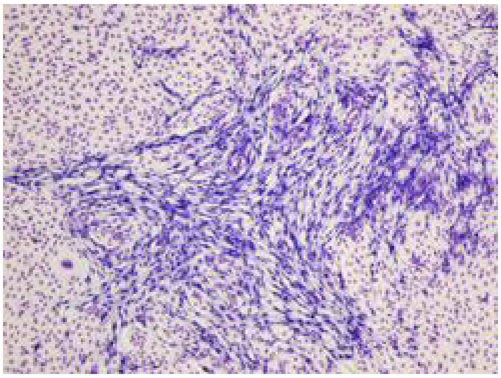
결과는 형질전환 초점(transformed foci)을 가지는 well의 수를 기준으로 용매처리군(0.1% DMSO 처리)과 비교하여 평가하였다. 형질전환 초점은 「접촉 억제 단층 세포와 모양이 다른 방추형 세포로 깊은 호염기성 염색, 무작위 방향세포, 세포의 조밀한 다층화, 접촉 세포의 주변 합류 단층으로의 침윤적 성장」의 특징을 가지고 있는데, 결과의 판정기준은 [그림 Ⅱ-5] 및 [그림 Ⅱ-6]과 같다(OECD Guidance Document No. 231 Annex 2: Photo catalog of foci in Bhas 42 CTA).

6. 통계처리

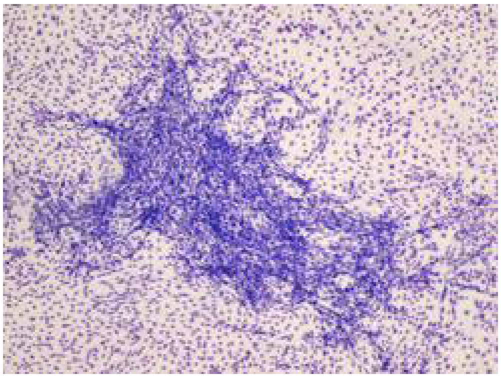
형질전환 초점은 양성대조물질의 경우 단측 chi-square test로 검증하였고, 시험물질은 Holm's test로 검증하였다.



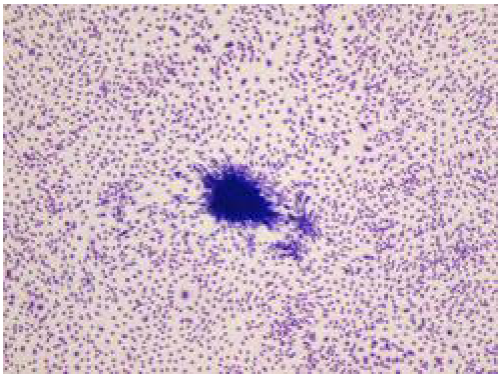
B- S- M- R- I-
The cells simply gather together (cluster).



B+/- S+ M- R- I-
The morphology of the cells changes to spindle-shaped. However, all other characteristics are negative.



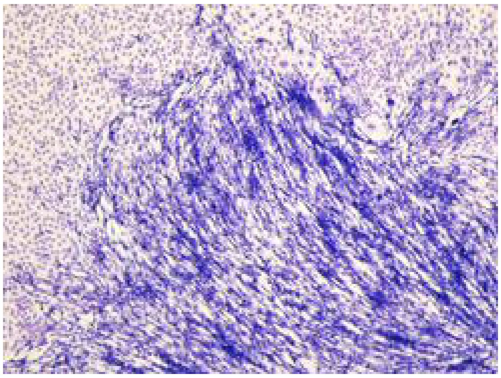
B+/- S+ M+/- R- I+
Piling up is scarcely observed and other positive characteristics are barely discernible.



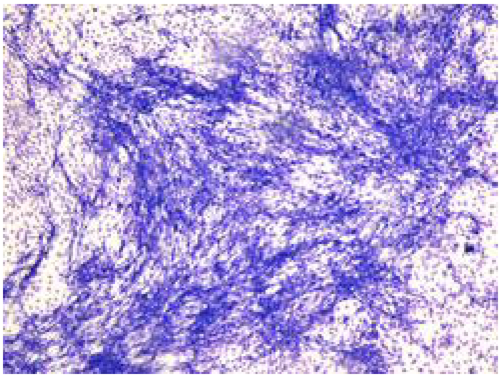
B+ S+ M+ R+ I+
Morphological characteristics resembling transformation are observed but the focus is exceedingly small.

[그림 Ⅱ-5] 발암성 음성 기준 및 표준 사진

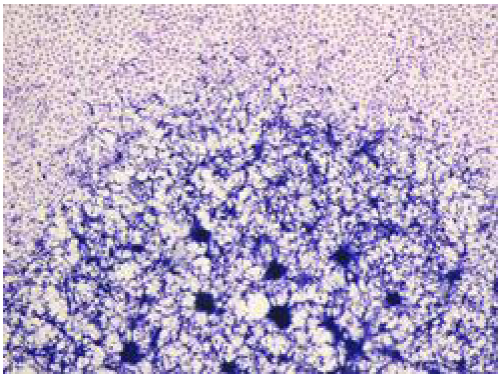
B, basophilic; S, Spindle-shaped; M, multilayer; R, random orientated; I, invasive



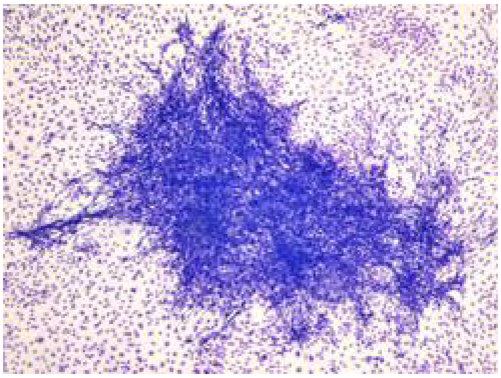
B+ S++ M+/- R+ I+
Piling up is limited. The cells comprising the
Focus are markedly spindle-shaped (tapered and elongated), displaying a swirling parallel arrangement.



B+ S++ M+ R+ I+
Some areas of piling up are observed within the focus. Foci consist of markedly spindle-shaped (tapered and elongated) cells generally aligned relative to each other.



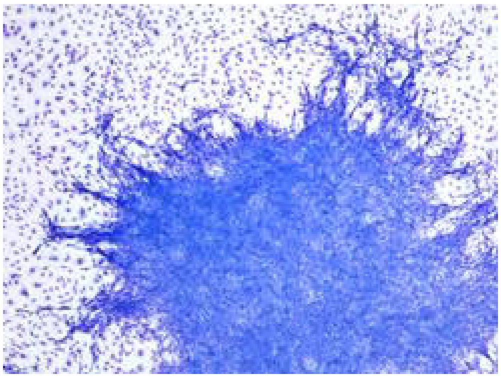
B+ S++ M+/- R++ I+
Scattered areas of piling up and knotting (dense clustering) of cells are observed. Cells are exceedingly spindle-shaped
(tapered and elongated) and randomly orientated.



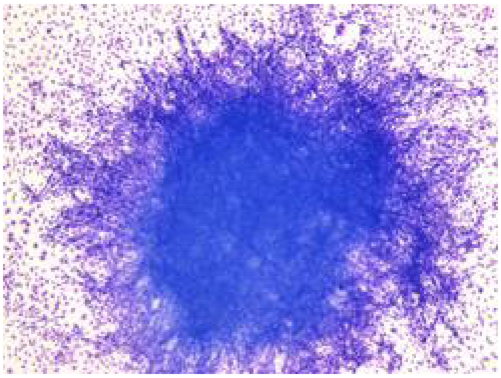
B+ S+ M+ R+ I+
All properties that are characteristic of the transformed phenotype are moderately expressed.

[그림 Ⅱ-6] 발암성 양성 기준 및 표준 사진

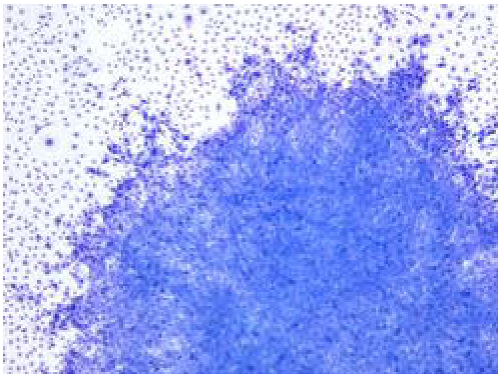
B, basophilic; S, Spindle-shaped; M, multilayer; R, random orientated; I, invasive



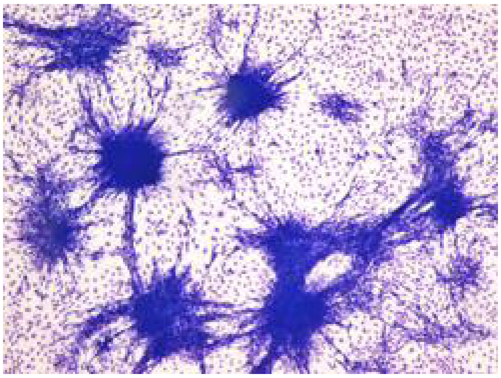
B+ S++ M++ R++ I+
All aberrant phenotypic characteristics are clearly visible. With the exception of multilayered areas, which are too dense to discern individual cell morphology, the atypical properties of the transformed focus are readily observed at the periphery of the focus.



B+ S+ M++ R+ I+
The cells comprising the periphery of the focus are less densely packed and their spindle-shape and random orientation, although apparent, are less striking. The interlaced cells at the edge of the focus invade the surrounding monolayer.



B+ S+ M++ R- I+
The multi-layering and density of cells are apparent throughout the focus. The cells comprising the periphery of the focus are not obviously spindle-shaped or randomly orientated but do invade the contact-inhibited monolayer.



B+ S++ M++ R++ I+
Daughter (secondary) foci originating from a single parent focus and exhibiting typical and uniform transformed morphology. These are found in close proximity, are often connected by cellular appendages, and are scored as one transformed focus.

[그림 Ⅱ-6] 발암성 양성 기준 및 표준 사진 (계속)

B, basophilic; S, Spindle-shaped; M, multilayer; R, random orientated; I, invasive

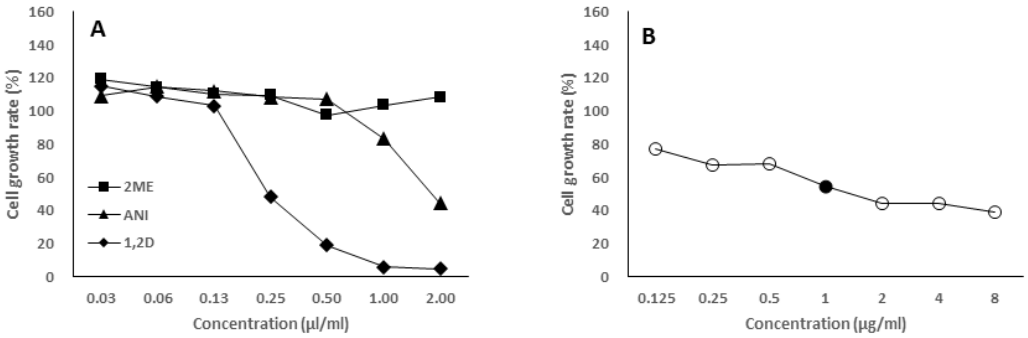
Ⅲ. 연구결과

Ⅲ. 연구결과

1. 발암 개시단계 시험

1) 세포독성시험

발암 개시단계에서의 세포형질전환시험 농도를 결정하기 위하여 실시한 세포독성시험의 결과는 [그림 Ⅲ-1]에 나타내었다. 용매처리군 대비 세포성장율은 0.03 ㎍/㎖, 0.06 ㎍/㎖, 0.13 ㎍/㎖, 0.25 ㎍/㎖, 0.5 ㎍/㎖, 1.0 ㎍/㎖, 2.0 ㎍/㎖ 각각에서 2-methoxyethanol은 119.4%, 114.5%, 110.2%, 109.5%, 97.4%, 103.6%, 108.5%였고, anisole은 109.0%, 114.8%, 112.1%, 108.3%, 107.1%, 83.4%, 44.7%, 1,2-dichlorobenzene은 115.2%, 108.7%, 103.0%, 48.1%, 19.1%, 5.8%, 4.8%였다(그림 Ⅲ-1A). 양성대조물질 3-methylcholanthrene의 시험 적용농도(1 ㎍/㎖)에서 용매 대조군 대비 세포성장율은 54.5%였고, 0.125 ㎍/㎖ ~ 8 ㎍/㎖의 범위에서는 77.1% ~ 39.4%였다(그림 Ⅲ-1B).



[그림 Ⅲ-1] 발암 개시단계 시험을 위한 세포독성시험 결과

A, 시험물질; B 양성대조물질 3-methylcholanthrene

2) 세포형질전환시험

세포형질전환시험의 농도는 세포독성시험결과와 OECD 지침문서에서 권고(세포독성을 일으키지 않는 1개 농도, 50% 이하 세포성장율 저하를 일으키는 2개 농도, 50% 이상 90% 이하의 세포성장율 저하를 일으키는 2개 농도)를 참조하여 2-methoxyethanol과 anisole은 2 ㎕/㎖를 최고농도로 하여 1.5 ㎕/㎖, 1.0 ㎕/㎖, 0.5 ㎕/㎖, 0.25 ㎕/㎖로 결정하였고, 1,2-dichlorobenzene은 0.4 ㎕/㎖, 0.3 ㎕/㎖, 0.2 ㎕/㎖, 0.1 ㎕/㎖, 0.05 ㎕/㎖로 결정하였다(Organisation of Economic Co-operation and Development, 2017).

세포독성시험결과, 1,2-dichlorobenzene은 용매 대조군 대비 세포성장율이 2 ㎕/㎖에서는 4.8%, 1 ㎕/㎖에서는 5.8%, 0.5 ㎕/㎖에서는 19.1%, 0.25 ㎕/㎖에서는 48.1%로 나타나, 50%이상 90% 이하의 세포성장율 저하를 일으키는 2개 농도로 0.4 ㎕/㎖, 0.3 ㎕/㎖를, 50% 이하의 세포성장율 저하를 일으키는 2개 농도는 0.2 ㎕/㎖, 0.1 ㎕/㎖를, 세포독성을 거의 일으키지 않는 농도는 0.05 ㎕/㎖를 선택하였다. Anisole은 2 ㎕/㎖에서는 55.3%, 1 ㎕/㎖에서는 16.6%의 세포성장율 저하를 유발하였고, 그 이하의 농도에서는 세포성장율 저하가 나타나지 않아 세포독성시험의 최고농도인 2 ㎕/㎖와 1.5 ㎕/㎖를 세포독성을 상당히 일으키는 농도로, 세포독성을 50% 이하로 일으키는 농도에는 1.0 ㎕/㎖와 0.5 ㎕/㎖를 선택하였으며, 세포독성을 거의 일으키지 않는 농도로는 0.25 ㎕/㎖를 선택하였다. 2-Methoxyethanol은 시험된 모든 농도에서 세포성장율 저하가 유발되지 않아 anisole과 같은 2 ㎕/㎖, 1.5 ㎕/㎖, 1.0 ㎕/㎖, 0.5 ㎕/㎖, 0.25 ㎕/㎖에서 세포형질전환시험을 수행하였다.

발암 개시단계에서의 세포형질전환시험 결과는 [표 Ⅲ-1]과 같다. 용매처리군에서 세포형질전환 초점은 6개로 시험지침서에서 권고하는 15이하를 충족하였다. 3-Methylcholanthrene을 처리한 양성대조물질 처리군에서는 세포형질전환 초점이 17 well에서 관찰되었는데, 용매처리군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보여 시험이 적절히 수행한 것으로 판단되었다.

시험물질을 대상으로 한 세포형질전환시험에서 2-methoxyethanol은

세포형질전환 초점이 관찰된 well의 수가 0.25 ㎕/㎖, 0.5 ㎕/㎖, 1.0 ㎕/㎖, 1.5 ㎕/㎖에서 용매처리군과 차이가 없었다. 최고농도인 2 ㎕/㎖에서는 초점이 관찰된 well의 수가 10으로 용매처리군의 6보다 높게 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. Anisole은 모든 농도에서 용매처리군과 세포형질전환 초점수의 차이는 없었다. 1,2-Dichlorobenzene은 최고농도인 0.4 ㎕/㎖에서 세포가 정상적으로 성장하지 못하여 형질전환 초점을 관찰할 수 없었고, 나머지 농도에서는 용매처리군과 비교하여 시험물질의 처리에 의한 세포형질전환 초점수의 차이는 없었다. 이상의 결과를 바탕으로 세포형질전환 시험이 수행된 2-methoxyethanol, anisole, 1,2-dichlorobenzene 모두 발암 개시단계에서 세포형질전환을 일으키지 않는 것으로 판단되었다.

〈표 Ⅲ-1〉 발암 개시단계에서의 세포형질전환시험결과

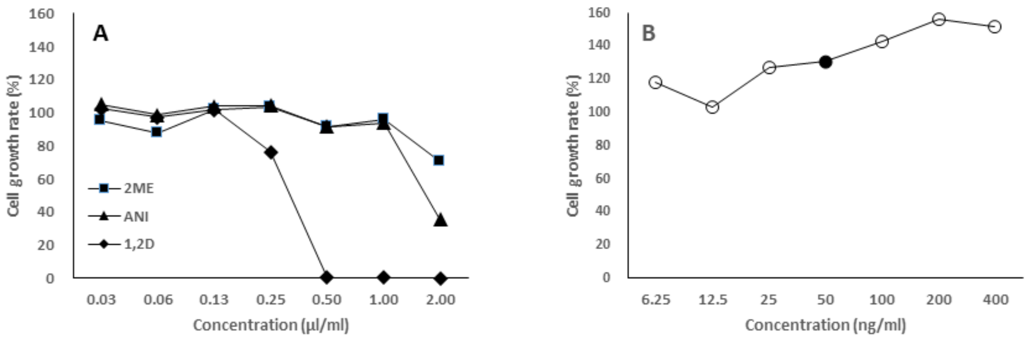
Chemicals	Concentration (㎕/㎖)	Foci/plate
DMSO	0.1[a]	6
3-Methylcholanthrene	1[b]	17
2-Methoxyethanol	0.25	7
	0.5	6
	1.0	6
	1.5	7
	2.0	10
Anisole	0.25	3
	0.5	8
	1.0	4
	1.5	8
	2.0	1
1,2-Dichlorobenzene	0.05	6
	0.1	6
	0.2	7
	0.3	7
	0.4	ND

[a], %; [b], ㎍/㎖. ND, Not determined because of toxicity.

2. 발암 촉진단계 시험

1) 세포독성시험

발암 촉진단계에서 2-methoxyethanol, anisole, 1,2-dichlorobenzene의 세포독성시험 결과는 [그림 Ⅲ-2]와 같다. 0.03 ㎍/㎖, 0.06 ㎍/㎖, 0.13 ㎍/㎖, 0.25 ㎍/㎖, 0.5 ㎍/㎖, 1.0 ㎍/㎖, 2.0 ㎍/㎖에서 용매처리군 대비 세포성장율은 2-methoxyethanol이 94.9%, 87.7%, 102.1%, 103.5%, 91.3%, 95.8%, 70.4%였고, anisole은 105.1%, 98.7%, 103.8%, 104.2%, 91.5%, 94.0%, 35.5%였고, 1,2-dichlorobenzene은 102.6%, 97.2%, 101.8%, 76.1%, 0.47%, 0.47%, 0.16%였다(그림 Ⅲ-2A). 양성대조물질 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate은 세포형질전환시험에서 적용되는 농도(50 ng/㎖)에서 세포성장율이 용매처리군 대비 130.7%였으며, 6.25 ng/㎖ ~ 400 ng/㎖의 범위에서 세포성장률은 118.6% ~ 156.4%였다(그림 Ⅲ-2B).



[그림 Ⅲ-2] 발암 촉진단계 시험을 위한 세포독성시험 결과

A, 시험물질; B 양성대조물질 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

2) 세포형질전환시험

세포독성시험 결과를 근거로 발암 촉진단계의 세포형질전환시험에서도 발암 개시단계에서와 같이 2-methoxyethanol과 anisole은 2 ㎕/㎖, 1.5 ㎕/㎖, 1.0 ㎕/㎖, 0.5 ㎕/㎖, 0.25 ㎕/㎖를 1,2-dichlorobenzene은 0.4 ㎕/㎖, 0.3 ㎕/㎖, 0.2 ㎕/㎖, 0.1 ㎕/㎖, 0.5 ㎕/㎖를 처리하였다. 발암 촉진단계에서의 세포형질전환시험 결과는 [표 Ⅲ-2]와 같다. 시험결과, 용매처리군에서 세포형질전환 초점은 11 well에서 관찰되어 시험지침서에서 권고하는 20이하를 충족하였다. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate를 처리한 양성대조군에서의 세포형질전환 초점은 36으로 용매처리군과 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

2-Methoxyethanol, anisole, 1,2-dichlorobenzene을 대상으로 한 세포형질전환시험에서 모든 물질, 모든 농도에서 형질전환 초점수가 음성대조군보다 적어 시험에 적용된 모든 시험물질은 발암 촉진단계에서 암을 유발하지 않는 것으로 판단되었다. 1,2-Dichlorobenzene은 최고농도인 0.4 ㎕/㎖에서 세포가 정상적으로 성장하지 못하여 형질전환 초점을 확인할 수 없었다.

〈표 Ⅲ-2〉 발암 촉진단계에서의 세포형질전환시험결과

Chemicals	Concentration (㎕/㎖)	Foci/plate
DMSO	0.1[a]	11
12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate	50[b]	36
2-methoxyethanol	0.25	8
	0.5	6
	1	6
	1.5	5
	2	8
anisole	0.25	9
	0.5	9
	1	9
	1.5	2
	2	9
1,2-Dichlorobenzene	0.05	8
	0.1	6
	0.2	6
	0.3	5
	0.4	ND

[a], %; [b], ng/㎖. ND, Not determined because of cytotoxicity.

Ⅳ. 고찰

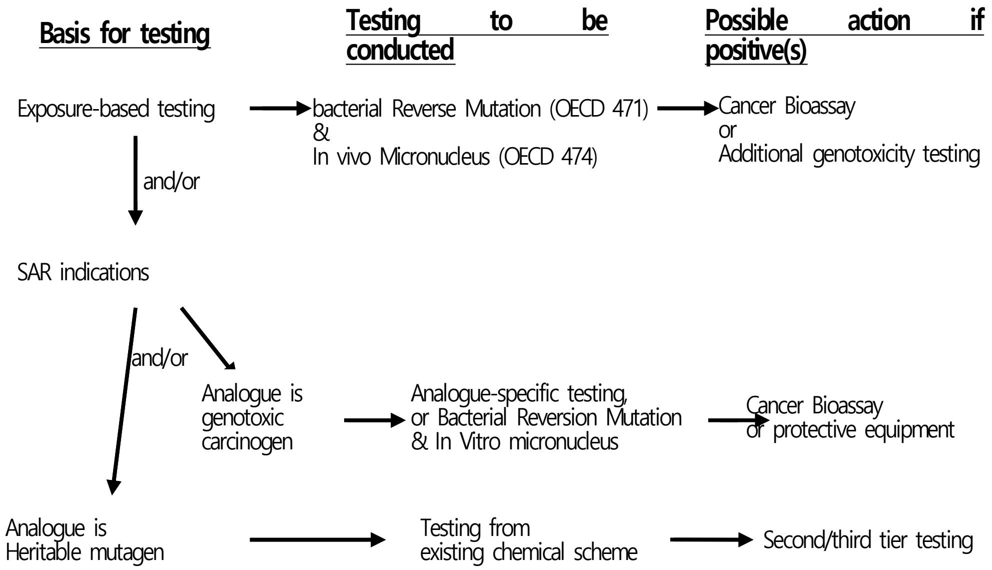
Ⅳ. 고찰

암은 사망의 주요 원인으로(2019년 기준 인구 10만 명 당 158.2명으로 전체 사망의 27.5%) 직업 관련성 암 또한 무시할 수 없는 수준이다(국립암센터, 2021; 통계청, 2022; Doll R and Peto R, 1981; Steenland K et al, 2003). 1918년 Yamagiwa와 Ichikawa가 동물실험을 통하여 굴뚝청소부에서 다수 발생하였던 음낭암을 입증한(Loeb LA and Harris CC, 2008; Yamagiwa K and Ichikawa K, 1977; Fujiki H, 2014) 이후 실험동물을 이용한 발암성 시험은 발암물질 확인의 핵심자료로 활용되어 왔다. 특히 미국에서는 국가독성계획(NTP, National Toxicology Program)을 설립하여 600여종의 유해인자에 대한 발암성시험을 수행하여 국제암연구소 등에서 발암성평가에서 주요자료로 활용되었다(National Toxicology Program, 2022; International Agency for Research on Cancer, 2019). 산업안전보건연구원에서도 2016년부터 산업현장에서 흡입노출이 이루어지는 화학물질에 대한 실험동물을 이용한 발암성시험을 수행하고 있다.

발암물질 확인에 있어 실험동물을 이용한 발암성시험의 중요성은 부정할 수 없지만, 최근에는 대량의 실험동물 희생에 따른 생명윤리적 문제 등으로 실험동물을 이용한 발암성시험의 수행건수는 감소하는 추세를 보이고 있다(그림 Ⅰ-1). 생명윤리적 문제가 아니더라도 실험동물을 이용한 발암성시험은 고비용과 장기간의 시험기간 등의 한계로 일부 선진국에서 국가 수준으로나 가능한 실정인 것 또한 사실이었다. 미국 국가독성계획에서 수행한 600여종의 유해인자와 일본 바이오앗세이연구센터에서 수행한 약 60종의 화학물질을 제외하면 이용 가능한 발암성시험 자료는 거의 없는 실정이다.

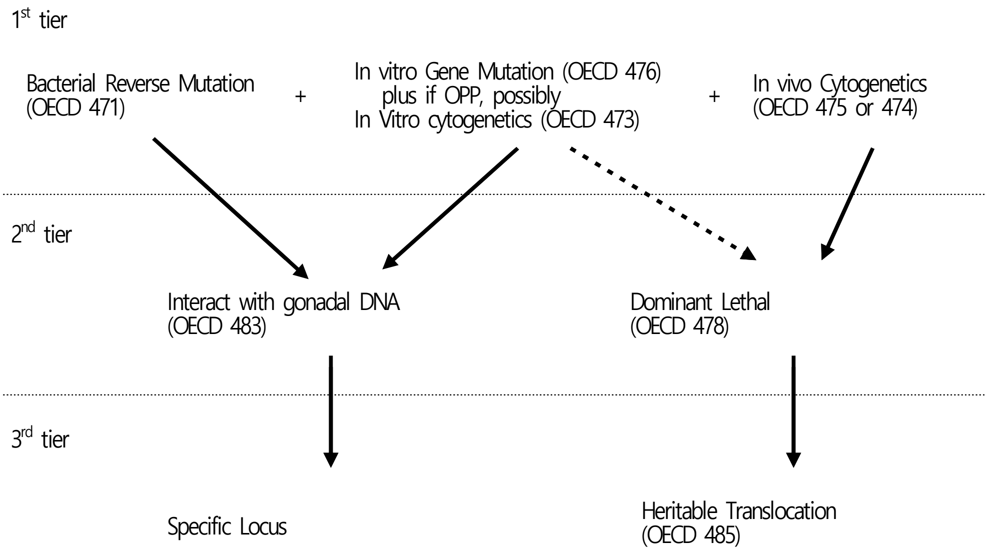
실험동물을 이용한 발암성시험은 고비용과 장기간의 시험기간이 요구되기 때문에 대부분의 경우 시험의 필요성을 확인하는 사전유해성평가 및 스크리닝 시험의 단계를 거친다. 미국 환경청 산하 오염방지 및 독성국(OPPT, Office

of Pollution Prevention and Toxics)에서는 주로 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험과 실험동물을 이용한 소핵시험을 이용하여 발암성시험의 필요성을 스크리닝 하였고(그림 Ⅳ-1), 의약품 및 농약과 일부 국가에서의 산업화학물질에 대한 발암성시험 필요성 여부는 미국환경청 농약 및 유독물질 예방국(OPPTS, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances)에서의 평가체계인 단계적 평가법(1단계에서「① 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(OECD 471), ② 체외 유전자 돌연변이 시험(OECD 476)과 가능하다면 체외세포유전학적 시험 (OECD 473), ③ 체내 세포유전학적 시험(OECD 475 또는 OECD 474)」자료를 이용하여 유전독성을 평가)을 참조하였다(그림 Ⅳ-2). 유럽에서는 미국과 다른 평가체계를 운영하고 있는 데, 화학물질의 등록 및 평가에 관한 법률(REACH, Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)에 이를 반영하고 있다(그림 Ⅳ-3)(임철홍 등 2020).



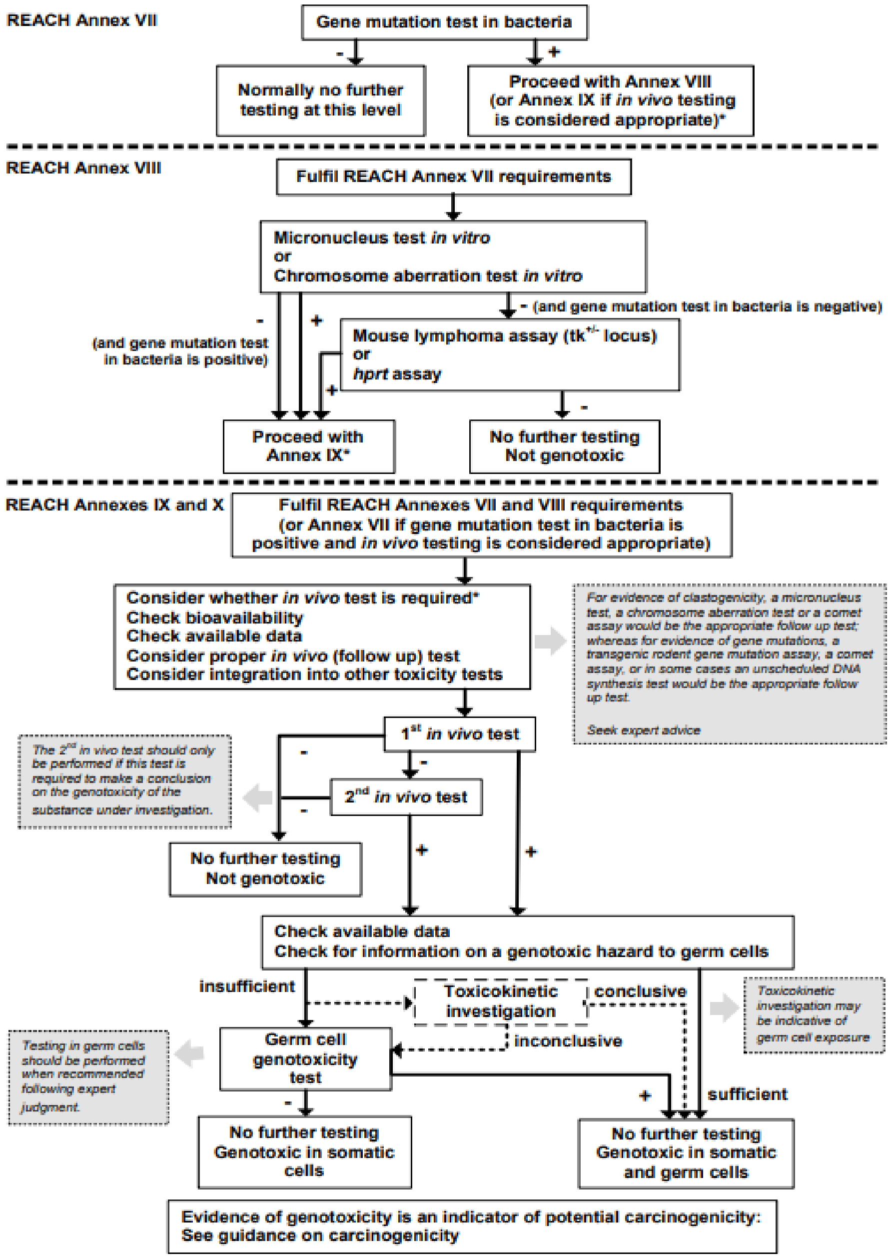
[그림 Ⅳ-1] 미국 OPPT 신규화학물질 변이원성시험 평가 체계

(from 임철홍 등, 2020 그림 5)



[그림 Ⅳ-2] 미국 OPPTS 살충제 변이원성시험 평가 체계

(from 임철홍 등, 2020 그림 4).



* Registrants should note that a testing proposal must be submitted for a test mentioned in Annex IX or X, independently from the registered tonnage. Following examination of such testing proposal ECHA has to approve the test in its evaluation decision before it can be undertaken.

[그림 Ⅳ-3] 유럽연합 ECHA 유전독성 평가 체계

(from 임철홍 등, 2020 그림 3).

유전독성에 기반을 둔 발암성평가 전략은 발암가능성이 높은 물질을 우선적으로 평가할 수 있도록 하는 데 기여를 하였으나, 유전독성을 일으키지 않는 발암성물질은 평가할 수 없는 한계가 있었다. 화학물질의 유해성 평가 초기에 시급히 발암물질을 확인하기 위해서는 발암가능성이 높은 물질을 우선적으로 평가해야 하였기에 이러한 한계가 문제되지 않았으나, 발암물질 및 발암기전이 상당히 밝혀진 현재에는 이러한 한계 또한 극복의 대상이 되었다. 더 이상 전체 발암물질의 20%에 이르고 있는 비유전독성 발암물질 평가를 미루기 어렵게 되었다(Hernandez LG et al, 2008). 또한 역설적이게도 새로운 화학물질의 개발단계에서 유전독성이 확인된 물질은 개발이 중지되는 경우가 많기 때문에 유전독성을 일으키지 않는 화학물질의 발암성 평가의 중요성은 높아지게 되었다.

이러한 배경에 따라 2016년 경제개발협력기구에 비유전발암물질의 국제적 통합시험 및 평가법 개발 전문가그룹(OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens)이 구성되었다(Jacobs MN et al, 2020). 통합적 시험 및 평가법(IATA, Integrated Approach for the Testing and Assessment)은 일반적으로 MIE(분자개시단계, Molecular Initiating Event), KE(주요사건, Key Event), AO(독성발현, Adverse Output)으로 구성되는 독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway)에 따라서 수행되는데, OECD 전문가 그룹은 화학물질에 의한 비유전발암성의 발현경로에서 주요사건을 4가지의 핵심모듈(염증, 면역반응, 유사분열신호전달, 세포손상), 지속적인 증식, 형태학적 변화로 구분하여(그림 Ⅳ-4), 유전독성을 일으키지 않지만 산업현장에서 대량으로 사용되어 근로자의 노출 우려가 높은 물질의 발암성평가에 적용할 수 있도록 하였다.

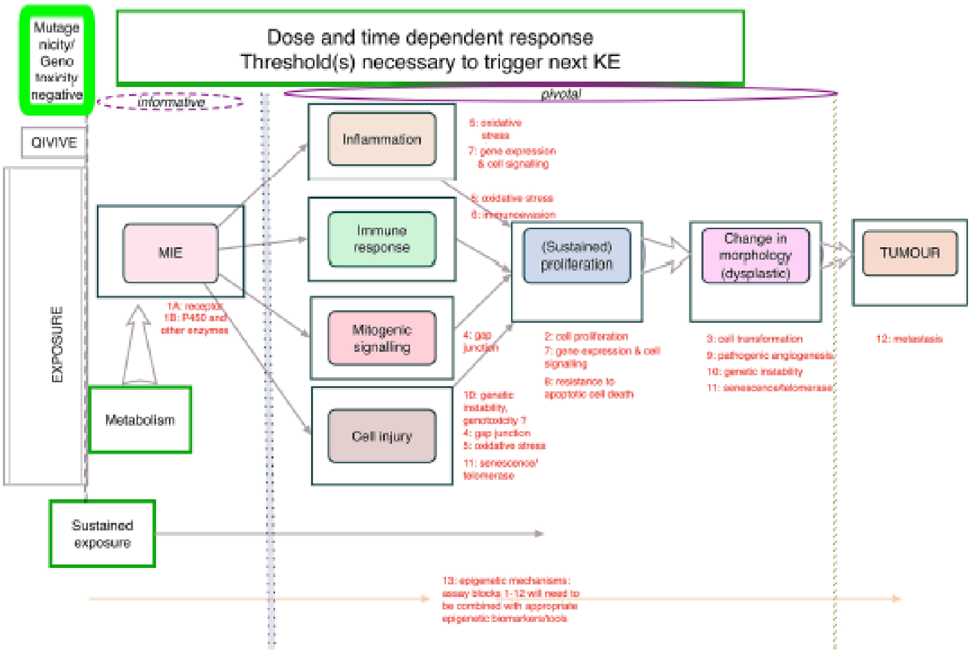


Fig. 3 A general integrated approach for the testing and assessment of non-genotoxic carcinogens.
The first step of a cancer endpoint hazard assessment is to conduct mutagenicity and genotoxicity testing (top far left hand thick green framed box), for which there are already well established in vitro and in vivo testing paradigms in regulatory toxicology. Considerations in relation to metabolism, exposure and quantitative in vitro and in vivo extrapolations (QIVIVE) would contribute to the overall risk assessment, as indicated on the far left. Sustained exposure is a critical consideration throughout all the modules of the IATA, as this is likely to trigger subsequent modules. Substances that are negative for mutagenicity and genotoxicity would enter the NGTxC IATA, particularly screening, for the cascade of downstream key events for which there are several suitable assays including some validated assays and TGs. Each module sits within a box frame that will be populated by relevant assays, including epigenetic and cofactor assay components, as many of the modules may be subjected to epigenetic deregulation known to be influential in modulating the specific hallmark module. Bound by broken lines on both the left and right-hand sides, central to the IATA, are six pivotal modules, of which four are not consequent or sequential to each other and can lead to (sustained) proliferation. These are as follows: inflammation (including assays that address the hallmark blocks covering oxidative stress and gene and cell signalling); immune response (again including assays for oxidative stress, but also immune evasion assay models, as they mark the passage /turning point from the body's immune defence to the immune evasion by the tumour); mitotic signalling (including assays addressing the gap junction hallmark); and finally cell injury (including assays addressing the hallmarks of genetic instability, gap junction, oxidative stress and senescence and telomerase). The fifth module is (sustained) proliferation, and here the essential assay hallmark to be addressed is cell proliferation, triggering investigations on gene and cell signalling and resistance to apoptotic cell death. The sixth module, a change in morphology (dysplastic change), represents the point at which adaptive (sustained) proliferation, -hyperplasia becomes mal-adaptive. The change in morphology module also includes early key events of cell transdifferentiation (at the cellular level that is conversion of one differentiated cell type into another cell type), such as changes in the organization of the cytoskeleton, acquisition of different morphology) and progression to mal-adaptive/irreversible modifications, specifically pathogenic angiogenesis (in contrast to neoangiogenesis which could be adaptive modifications), genetic instability, and then senescence and telomerase activation. The seventh and final module is the tumour stage that is addressed by the metastasis cancer hallmark

[그림 Ⅳ-4] 비유전독성 발암물질 시험 및 평가 통합접근법

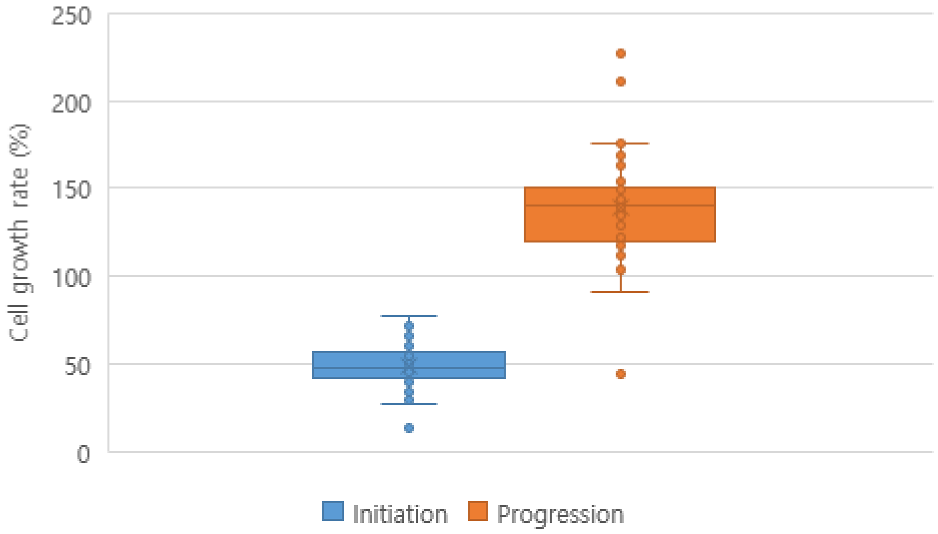
(from Jacobs MN et al, 2020)

비유전발암물질의 독성발현경로에 있어 마지막 주요 사건(형태학적 변화)의 확인이 가능한 세포형질전환시험법은 실험동물을 이용한 발암성시험의 대안으로 제안 및 검토되었으나, 발암기전을 확인할 수 없다는 한계 등으로 지침문서로 채택되지는 못하였다(Organisation for Economic Co-operation and Development, 2015, 2017). 그러나 비유전독성물질의 발암성평가 필요성이 강조됨에 따라 세포현질전환시험은 유전독성물질이 주로 작용하는 발암 개시단계와 비유전독성물질이 주로 작용하는 발암 촉진단계 모두에서 형태학적 변화를 근거로 발암 가능성을 확인함에 따라 발암성발현경로의 마지막 단계의 주요사건을 확인하는 시험법으로 인정되고 있다. 최근에는 유전학적 및 후성유전학적 기법을 통합한 세포형질전환시험도 연구되고 있어 발암성 평가에서의 역할은 커질 것으로 기대된다(Ohmori K et al, 2022; Mascolo MG, et al, 2018). 따라서 본 연구에서는 세포형진전환시험법을 확립하고 산업화학물질의 발암성평가에 있어 세포형질전환시험의 적용 성을 검토하기 위하여 현재 흡입발암성시험이 수행되고 있거나, 발암성시험이 필요하지 않다고 결정된 화학물질을 대상으로 세포형질전환시험법을 적용하고자 하였다.

연구 첫 단계에서 여러 종류의 세포형질전환시험법을 검토한 결과 현재까지 개발된 대표적인 세포형질전환시험인 시리안 햄스터 배아(SHE, Syrian hamster embryo)를 이용한 방법, balb/c 3T3를 이용한 방법, Bhas 42 세포를 이용한 방법 중, 생명윤리적 관점에서 실험동물을 사용한 시리안 햄스터 배아를 이용한 방법은 배제하고, 시험기간이 상대적으로 짧으며 OECD에서도 시험법이 검증된 Bhas 42 세포를 이용한 시험법을 선택하였다.

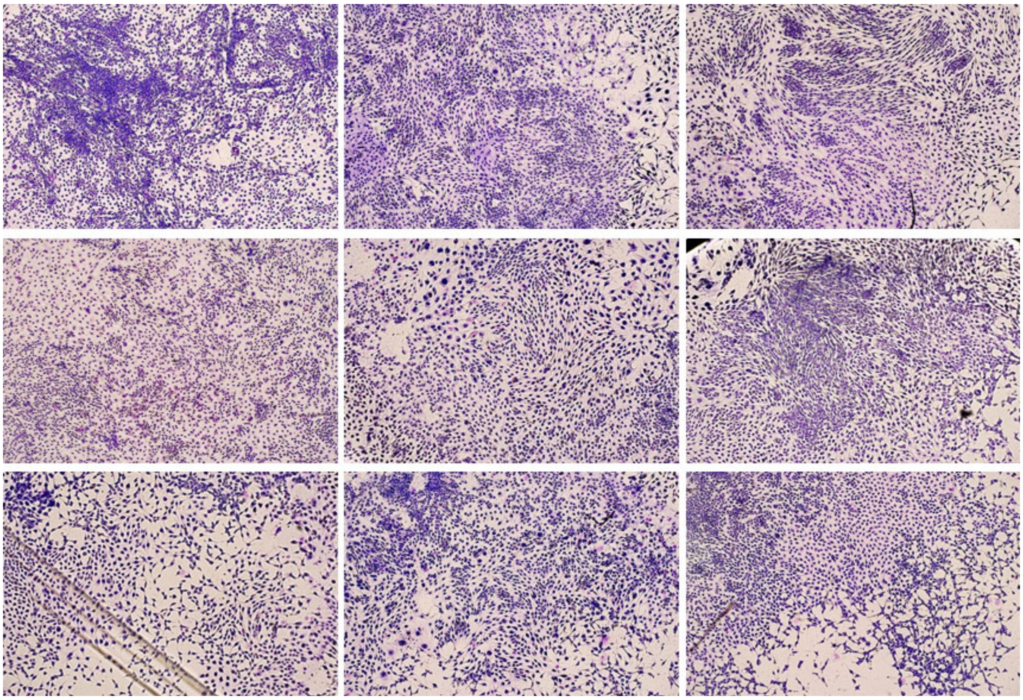
Bhas 42를 이용한 세포형질전환시험법의 시험조건을 확인한 결과, 발암 개시단계 시험에서 양성대조물질 3-methylcholanthrene을 1 ㎍/㎖ 처리한 결과 세포성장율이 용매처리군 대비 54.5%였고, 발암 촉진단계 시험에서 양성대조물질 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate을 50 ng/㎖ 처리시에는 세포성장율이 용매처리군 대비 130.7%였다(그림 Ⅲ-1). 이러한 결과는 Sakai A 등(2010a, b)이 수행한 검증연구에서의 발암 개시단계 시험에서 1 ㎍/㎖의

3-methylcholanthrene 처리시 세포성장률의 중앙값 48%과 상위 75%값 56.5% 사이에 해당되었으며, 발암 촉진단계 시험에서 50 ng/㎖의 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 처리 시 세포성장율의 중앙값 140%와 하위 25%값 120.5% 사이에 해당되어 발암 개시단계 및 발암 촉진단계 모두 양성대조물질이 적정 농도로 투여되었음을 확인할 수 있었다(그림 Ⅳ-5).

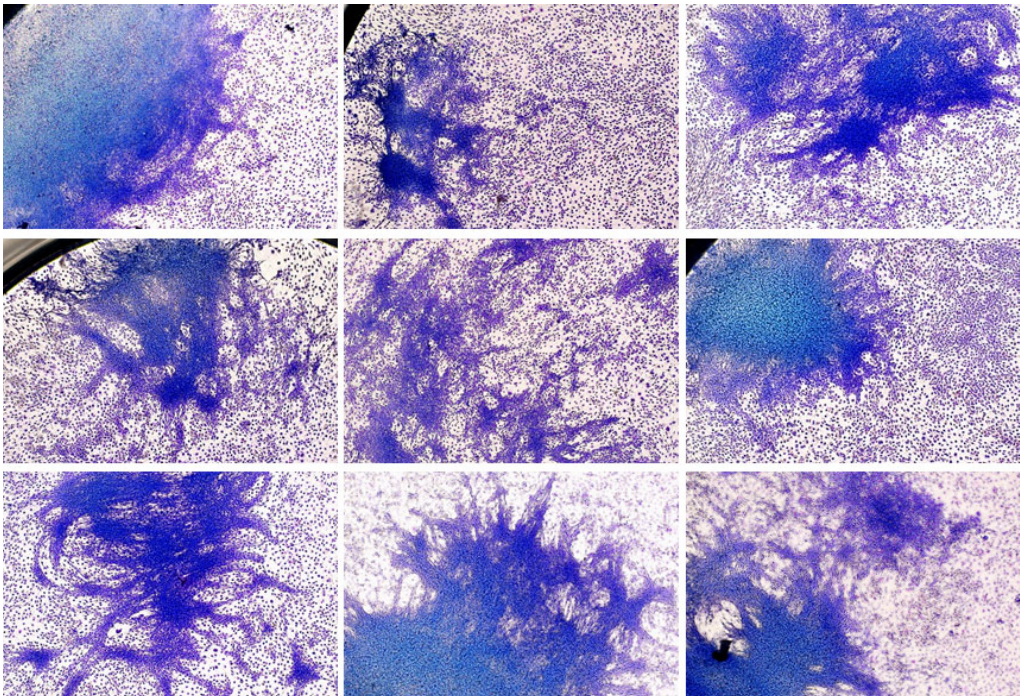


[그림 Ⅳ-5] 검정시험에서의 세포독성시험 결과

세포형질전환시험은 형태학적인 관찰을 통하여 발암에 해당하는 초점을 계수하는 시험이다. 초점은 형태학적 특성을 근거로 각 well 당 1개로 계수하게 되는데, 음성은 [그림 Ⅱ-5]의 음성 표준기준에 따라서, 양성은 [그림 Ⅱ-6]의 양성기준에 따라 계수하였다. 본 연구에서 음성으로 판단된 것과 양성으로 판단된 것은 사례는 [그림 Ⅳ-2] 및 [그림 Ⅳ-3]과 같다.



[그림 Ⅳ-6] 세포형질전환 음성 결과 예제



[그림 Ⅳ-7] 세포형질 양성 예제

각 plate에서 초점을 계수한 결과, 발암 개시단계 시험에서는 용매처리군에서 96 well 중 6 well에서 세포형질전환 초점이 확인되었는데, 이는 발암 개시단계 시험에서 용매처리군의 초점수를 15이하로 권고하는 OECD 시험지침서를 충족하는 결과였다. 양성대조물질 3-methylcholanthrene 처리군에서는 17 well에서 세포형질전환 초점이 확인되었는데, 용매대조군의 6개와 통계적으로 유의한 차이를 보여 발암 개시단계에서의 세포형질전환시험은 타당하게 수행된 것으로 판단할 수 있었다. 발암 촉진단계 시험에서도 용매처리군에서는 96 well 중 11 well에서 세포형질전환 초점이 확인되어 OECD의 권고 20 이하 요건을 충족하였다. 양성대조물질 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate 처리군에서는 세포형질전환 초점이 36으로 용매처리군과 통계적으로 유의한 차이를 보여 Bhas 42 세포를 이용한 세포형질전환 시험이 적정하게 수행되었음을 확인하였다.

본 연구에서는 세포형질전환시험 2-methoxyethanol, anisole, 1,2-dichlorobenzene 3종류의 유기용제를 시험물질로 선정하였다. 3종의 시험물질은 전 세계적으로 대량으로 사용되며 국내에서도 반도체 산업 등에 사용된다. 본 연구원에서는 발암성평가의 필요성 여부를 검토한 후 그 결과에 따라 anisole과 1,2-dichlorobenzene에 대해서는 발암성시험을 수행하고 있다. 2-Methoxyethanol은 유럽연합 기준으로 연간 1,000톤 이상 사용되며, 우리나라에서도 반도체 제조공장에서 검출되었다(박동욱, 2016; 박동욱 등, 2011). 유전독성시험결과 고농도에서 수행된 체외 소핵시험에서 소핵비율의 약한 증가와 이수성이 나타났으며, 체내 시험에서는 자매염색분체교환시험에서 약한 양성을 보였다. 코멧시험에서 체내 시험에서 가역적인 양성을 보였으며, 3차원 배양세포에서도 양성이었으나(European chemical Agency, 2022b; 임철홍 등, 2021), 유럽연합에서는 다른 유전독성 평가 지표에서 모두 음성인 것을 근거로 체외시험 및 체내시험에서 모두 음성으로 평가하였다.

2-Methoxyethanol은 산업안전보건연구원에서도 음성의 유전독성 평가결과 및 13주 반복시험에서 증식성 병변의 부재를 근거로 실험동물을 이용한 발암성 시험을 수행하지 않는 것으로 결정되어졌지만, 본 연구에서는 비유전독성 경로의 발암 가능성 여부의 확인이 필요하다고 판단되어 시험물질로 선정하였다. 현재 산업안전보건연구원에서 실험동물을 이용한 발암성시험이 수행중인 anisole과 1,2-dichlorobenzene은 발암성 평가를 위한 추가정보를 제공하고 추후 발암성 시험 결정여부를 판단하는 근거자료로서의 활용가능성을 타진하기 위하여 시험물질로 선정하였다. Anisole은 유럽연합 기준으로 연간 100톤 이상 사용된다. 체외 유전독성시험에서 미생물을 이용한 유전자돌연변이시험, 세포를 이용한 유전자 돌연변이시험, 염색체에 대한 영향 모두에서 음성으로 나타나 체외시험 및 체내시험 없이 유전독성은 일으키지 않는 것으로 결론이 났고 추가적인 유전독성 확인시험과 발암성시험은 수행되지 않았다(European Chemical Agency, 2022c). 산업안전보건연구원에서는 근로자 노출우려 및 13주 반복흡입독성시험에서의 결과를 근거로 흡입노출에 의한 발암성시험이 수행 중에 있다.

1,2-Dichlorobenzene은 유럽연합기준 연간 10,000톤 이상 사용되는 화학물질로, 유럽연합에서의 종합적인 유전독성 평가는 음성이었으나, 자매염색분체교환시험과 유전자돌연변이시험에서는 양성이었다. 1,2-Dichlorobenzene은 경구노출에 의한 발암성시험이 수행되었는데, 마우스와 랫드 모두에서 발암의 증거가 확인되지 않아(European Chemical Agency, 2022a) 국제암연구소에서는 Group 3, 미국산업위생전문가협회(ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists)에서는 A4로 구분하고 있다. 우리 연구원에서는 산업현장에서 근로자의 노출경로인 흡입노출에 의한 시험의 필요성에 따라 발암성시험이 수행되고 있다.

시험대상 물질인 2-methoxyethanol, anisole, 1,2-dichlorobenzene의 세포형질전환시험의 농도는 발암 개시단계와 발암 촉진단계 시험 모두 세포배양시험에서 일반적으로 선택되어지는 최고 농도인 2 ㎕/㎖을 최고 농도로 하여 공비 2의 7단계 세포독성시험을 실시하여 결정하였다. 각 시험물질에 대하여 2 ㎕/㎖ ~ 0.03 ㎕/㎖ 사이에서 세포독성시험을 실시한 결과, 발암 개시단계 시험에서 용매대조군 대비 세포성장율은 0.03 ㎍/㎖, 0.06 ㎍/㎖, 0.13 ㎍/㎖, 0.25 ㎍/㎖, 0.5 ㎍/㎖, 1.0 ㎍/㎖, 2.0 ㎍/㎖ 각각에 대하여 2-methoxyethanol은 119.4%, 114.5%, 110.2%, 109.5%, 97.4%, 103.6%, 108.5%였고, anisole은 109.0%, 114.8%, 112.1%, 108.3%, 107.%1, 83.4%, 44.7%였으며, 1,2-dichlorobenzene은 115.2%, 108.7%, 103.0%, 48.1%, 19.1%, 5.8%, 4.8%였다. OECD에서 권고하는 세포독성을 일으키지 않는 1개 농도(저독성 농도구간), 50% 이하의 세포성장율 저하를 일으키는 2개 농도(중독성 농도구간), 50% 이상 90% 이하의 세포성장율 저하를 일으키는 2개 농도(고독성 농도구간)를 최대한 충족시키기 위해 1,2-dichlorobenzene은 고독성 농도구간으로 80.9%의 세포성장율 저하를 일으키는 0.5 ㎍/㎖와 51.5%의 세포성장율 저하를 일으키는 0.25 ㎍/㎖의 사이에 있는 0.4 ㎕/㎖와 0.3 ㎕/㎖로 정하였고, 중독성 농도구간으로 51.5%의 세포성장율 저하를 일으키는 0.25 ㎍/㎖와 세포성장율 저하가 나타나지 않은 최고농도인 0.13 ㎍/㎖ 사이의 0.2 ㎕/㎖과 0.1 ㎕/㎖로

정하였으며, 저독성 농도구간은 0.13 ㎕/㎖ 이하로 세포상장율 저하가 나타나지 않는 0.05 ㎕/㎖로 하였다. Anisole은 2 ㎕/㎖에서 55.3%의 세포성장율 저하를 보였고, 1 ㎕/㎖에서는 16.6%의 세포성장율 저하를 보여, 고독성 농도구간은 세포독성시험 최고농도인 2 ㎕/㎖과 최고농도와 16.6%의 세포성장율 저하를 보이는 1.0 ㎕/㎖의 중간농도인 1.5 ㎕/㎖로 하였고, 중독성 농도구간으로 16.6%의 세포성장율 저하를 보이는 1.0 ㎕/㎖과 세포성장율 저하는 보이지 않았지만 1.0 ㎕/㎖의 절반인 0.5 ㎕/㎖로 하였다. 저독성 농도구간으로는 세포독성이 사실상 없을 것으로 예상되는 0.25 ㎕/㎖로 하였다. 2-Methoxyethanol은 최고농도인 2 ㎕/㎖에서도 사실상 세포독성의 징후가 없어 세포독성이 비교적 약한 anisole과 같은 농도단계로 세포형질전환시험을 수행하였다. 발암 촉진단계의 세포독성시험에서 용매처리군 대비 세포성장율은 0.03 ㎍/㎖, 0.06 ㎍/㎖, 0.13 ㎍/㎖, 0.25 ㎍/㎖, 0.5 ㎍/㎖, 1.0 ㎍/㎖, 2.0 ㎍/㎖에서 각각 2-methoxyethanol은 94.9%, 87.7%, 102.1%, 103.5%, 91.3%, 95.8%, 70.4%였고, anisole은 105.1%, 98.7%, 103.8%, 104.2%, 91.5.%1, 94.0%, 35.5%, 1,2-dichlorobenzene은 102.6%, 97.2%, 101.8%, 76.1%, 0.47%, 0.47%, 0.16%로 발암 개시단계 시험에서와 유사하여 발암 촉진단계에서의 세포형질전환시험도 발암 개시단계에서와 동일하게 2-methoxyethanol과 anisole은 2 ㎕/㎖, 1.5 ㎕/㎖, 1.0 ㎕/㎖, 0.5 ㎕/㎖, 0.25 ㎕/㎖에서 1,2-dichlorobenzene은 0.4 ㎕/㎖, 0.3 ㎕/㎖, 0.2 ㎕/㎖, 0.1 ㎕/㎖, 0.5 ㎕/㎖에서 수행하였다.

세포형질전환시험결과, 발암 개시단계 시험에서 2-methoxyethanol은 시험된 최고농도인 2 ㎕/㎖에서 초점수가 10으로 용매처리군보다 높았으나, 통계적으로 유의하지 않았으며, 나머지 농도에서는 용매처리군과 차이가 없었다. 발암 촉진단계에서는 모든 농도에서 용매처리군보다 오히려 낮게 측정되어 세포형질전환을 일으키지 않는 것으로 판단되었다. Anisole의 경우에도 발암 개시단계 및 발암 촉진단계 모두에서 세포형질전환을 유발하지 않았다. 1,2-Dichlorobenzene은 발암 개시단계 및 발암 촉진단계 모두에서 0.4 ㎕/㎖

에서 살아있는 세포가 거의 관찰되지 않았고, 그 이하의 농도에서는 모두 세포형질전환을 촉진하지는 않았다.

이상의 결과 3종의 시험물질은 모두 발암 개시단계에서 세포형질전환을 유발하지는 않는 것으로 판단되었으며, 이는 시험물질 모두 유전독성에서 음성이거나 제한적인 유전독성을 일으키는 것과 일치되는 결과로 볼 수 있다. 발암 촉진단계에서도 3물질 모두 음성의 결과를 보였는데, 이는 비유전적으로도 암을 유발하는 않을 가능성이 높을 것을 암시하고 있다. 즉, 본 연구에서 선정된 시험물질은 모두 발암 가능성이 낮을 것으로 판단된다. 즉, 실험동물을 이용한 발암성실험의 필요성이 없다고 평가된 2-methoxyethanol은 사람에서 암을 일으킬 수 있다는 추가적인 증거가 없는 한, 실험동물을 이용한 발암성시험은 필요하지 않을 것으로 판단된다. 한편, 본 연구의 결과에 의해 이미 발암성시험이 수행되고 있는 anisole과 1,2-dichlorobenzene의 경우에도 실험동물에서도 음성의 결과가 도출된다면 이 두 물질의 경우에도 추가적인 연구 없이 발암성이 낮은 것으로 평가할 수 있으리라 판단된다.

본 연구에서 사용한 세포형질전환시험은 여전히 실험동물을 이용한 체내시험보다는 민감도와 특이도가 높다고 할 수 없다. 그러나 최근 발암성평가에 있어 동물실험의 최소화 차원에서 가능한 많은 정보를 활용할 수 있는 발암성평가 전략이 제안되고 있어 본 연구를 통하여 확립된 세포형질전환시험은 새로운 발암성시험 및 평가 전략에서 좋은 도구로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 예를 들면 현재 산업보건연구원에서 실험동물을 이용한 발암성 시험 수행에 있어 물질구조에 따른 발암성예측 결과, 이용 가능한 유전독성시험자료 및 13주 반복독성시험결과를 이용하지만, 세포형질전환시험 결과를 추가하여 화학물질의 발암가능성을 형태학적으로 확인할 필요가 있다. 결론적으로 본 연구는 실험동물을 이용한 발암성평가의 적용에 있어 세포형질전환 시험을 수행하여 그 결과를 전문가에게 제공함으로써 전문가에 대한 정보제공 수준을 높여 산업화학물질의 발암성평가 수준을 손상시키지 않으면서도 화학물질로 인한 암으로부터 근로자의 건강보호에 기여하기를 기대한다. 다만, 발암성평가의 활용에

있어 안정적인 결과의 도출을 위해 후속과제 또는 사업을 통해 지속적으로 평가되는 물질 수를 증가시키고, 필요에 따라서는 양성대조물질의 수를 증가시킬 필요가 있다고 판단된다.

참고문헌

국립암센터. 국가암등록사업 연례 보고서(2018년 암등록통계). 발간등록번호 11-1352000-000145-10. 2021.

박동욱. 반도체 산업의 웨이퍼 가공 공정 유해인자 고찰과 활용 -화학물질과 방사선 노출을 중심으로 -. 한국산업보건학회지. 2016;26(1):1-10 p.

박동욱, 변혜정, 최상준, 정지연, 윤충식, 김치년, 하권철, 박두용. 반도체 웨이퍼 가공 공정 및 잠재적 유해인자에 대한 고찰. 대한직업환경의학회지. 2011:23(3);333-342 p.

일본바이오앗세이연구센터. 발암성시험실시결과. [cited 2022 Oct 14]. Available from: https://anzeninfo.mhlw.go.jp/user/anzen/kag/ carcino_digest.htm.

임철홍, 한정희, 유동진. 화학물질 독성 스크리닝을 위한 3차원 세포배양 기술 적용 타당성 연구. 산업안전보건연구원 연구보고서 2020-연구원-706. 2020.

임철홍. 신경민. DNA 손상지표 코멧시험(Comet assay)를 활용한 3차원 배양세포에서의 유전독성영향연구. 산업안전보건연구원 연구보고서. 2021-산업안전보건연구원-844. 2021.

통계청. 2020년 사망원인통계연보 (전국편) 발간등록번호 11-1240000- 000028-10. 2022.

Benigni R, Bossa C. Alternative strategies for carcinogenicity assessment: an efficient and simplified approach based on in vitro mutagenicity and cell transformation assays. Mutagenesis. 2011;36(3):455-460 p.

Benigni R, Bossa C. Tcheremenskaia O. In vitro cell transformation assays for an integrated, alternative assessment of carcinogenicity: a data-based analysis. Mutagenesis. 2012;28(1):107-116 p.

Berenblum I. The mechanism of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. cancer Res. 1941;1:807-814 p.

Berwald Y and Sachs L. In vitro cell transformation with chemical carcinogens. Nature. 1963;200:1182-1184 p.

Breheny D, Oke O, Pant K, gaca M. Comparative tumor promotion assessment of e-cigarette and cigarettes using the in vitri Bhas 42 cell transformation assay. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2017;58:190-198 p.

Creton S, Aardema MJ, carmichael PL, Harvey JS, martin FL, Newbold RF. et al. Cell transformation assays for prediction of carcinogenic potential: state of the science and future research needs. Mutagenesis. 2012:27(1);93-101.

Department of Health and Human Services. 15th report on carcinogens. 2021.

Doll R, Peto R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. Journal of the National Cancer Institute. 1981;66(6):1192-1308 p.

European Chemical Agency. 1,2-Dichlorobenzene. [cited 2022a Oct 14]. Available from: https://echa. europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13731.

European Chemical Agency. 2-Methoxyethanol. [cited 2022b Oct 14]. Available from: https://echa. europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/149192.

European Chemical Agency. Anisole. [cited 2022c Oct 14]. Available from: https://echa. europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14423.

European Commission. Regulation (EC) No 1272/2008 of the european parliament and of the council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending regulation (EC) No 1907/2006. 2008.

Fujiki H. Gist of Dr. Ktsusaburo Ymagiwa's papers entitled "Experimental study on the pathogenesis of epithelial tumors" 0I to VI reports). Cancer Sci. 2014;105:143-149 p.

Hernandez LG, Benthem J, Luijten M, Steeg H. Implications of not detecting non-genotoxic carcinogens in the absence of carcinogenicity tests under REACH guidelines. RIVM Report 340700003/2008. 2008.

Hwang SH, Yeom F, han BI, Ham BJ, Lee YM, Han MR, Lee M. Predicting carcinogenic mechanisms of non-genotoxic carcinogens via combined analysis of global DNA methylation and in vitro cell transformation. International Journal of Molecular Science. 2020;21:5387 p.

International Labour Office. Occupational safety and health series No. 39. Occupational cancer – prevention and control. 1977.

International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans, preamble. Lyon, France. 2019.

International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. [cited 2022 Oct 14]. Available from: https://monographs.iarc.who.int/monographs-available/.

Jacobs MN, Colacci A, Corvi R, Vaccari R, Vaccari M et al. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. Archives of Toxicology. 2020;94:2899-2923 p.

Jacobs MN, Colacci A, Louekari K, Luijten M, Hackkert BC, paparella M, Vasseur P. International regulatory needs for development of an IATA for non-genotoxic carcinogenic chemical substances. Altex. 2016;33(4):359-392 p.

Kakunaga T. A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from Balb/3T3. International Journal of Cancer. 1973;12(2): 463-473 p.

Loeb LA and Harris CC. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. Cancer Res. 2008;68(17):6863-6872 p.

Luijten M, Corvi R, Mehta J, Corvaro M, Delrue N, Felter S et al. A comprehensive view on mechanistic approaches for cancer risk

assessment of non-genotoxic agrochemicals. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2020;118:104789 p.

Malarkey DE, Hoenerhoff M, maronpot RR. Carcinogenesis: Mechanisms and manifestations. Haschek and Rousseau's handbook of toxicologic pathology, Third edition, 2013. 107-146 p.

Mascolo MG, Perdichizzi S, Vaccari M, Rotondo F, et al. The transformics assay: first steps for the development of an integrated approach to investigate the malignant cell transformation in vitro. carcinogenesis 2018;39:955-967 p.

National Toxicology Program. NTP Technical Reports Index. [cited 2022 Oct 14]. Available from: https://ntp.niehs.nih.gov/data/tr/index.html

Ohmori K, Kamei A, Watanabe Y, and Abe K. Gene expression over time during cell transformation due to non-genotoxic carcinogen treatment of Bhas 42 cells. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23:3216

Organisation for Economic Co-operation and Development. Detailed review paper on cell transformation assays for detection of chemical carcinogens. OECD Environment, health and safety publications sreies on testing and assessment No. 31. 2006.

Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidance document on the in vitro Bhas 42 cell transformation assay. Series on testing & assessment No. 231. ENV/JM/MONO(2016)1. 2017.

Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidance

document on the in vitro Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. Series on testing & assessment No. 214. ENV/JM/MONO(2015)18. 2015.

Sakai A, Sasaki K, Hatashi K, Muramatsu D, Arai S, Endou N et al. An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity. Mutat Res. 2011;725:57-77 p.

Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S, Hayashi J et al. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2010a;702:100-122 p.

Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S, Hayashi J et al. Erratum to "A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity" [Mutat. Res. 702(2010) 100-122]. Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2010b;703:209-226 p.

Sasaki K, Mizusawa H, and Ishidate M. Isolation and characterization of ras-transfecdted Balb/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. Jpn. J. cancer Res. 1988;79:921-930 p.

Sasaki K, Umeda M, Sakai A, yamazaki Y, Tanaka N. Transformation assay in Bhas 42 cells: a model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential

of chemicals. J. Environ Sci. Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2015;33(1):1-35 p.

Serra S, vaccari M, Mascolo MG, Rotondo F, Xanzi C, Polacchini L. Hazard assessment of air pollutants: The transforming ability of complex pollutant mixtures in the Bhas 42 cell model. ALTEX. 2019;35(4):623-633 p.

Steenland K, Burnett C, Lalich N, Ward E, Hurrel J. Dying for work: The magnitude of US mortality from selected causes of death associated with occupation. Am. J. ind. Med. 2003;43(5):461-82 p.

Vasseur P and Lasne C. OECD detailed review paper (DRP) number 31 on "Cell transformation assay for detection of chemical carcinogens": main results and conclusions. Mutat Res. 2012; 744(1):8-11 p.

Yamagiwa K and Ichikawa K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. Classics in Oncology. 1977;3:174-181 p.

Abstract

Short-term carcinogenesis screening study using Bhas 42 cell transformation assay

Objectives : This study was conducted to contribute to the selection of test substances for carcinogenicity tests using experimental animals by establishing a morphologically confirmable cell transformation assay in vitro.

Method : 200 cells (initiation assay) or 400 cells (promotion assay) were seed in 96 well plate. Test materials (2-methoxyethanol, anisole, and/or 1,2-dichlorobenzene) were treated for 1 ~ 4 days (initiation assay) or 4 ~ 14 days (promotion assay). After Giemsa staining on day 20 of culture, the transformed foci was observed and counted.

Results : The validity of the assay was confirmed by using the positive controls 3-methylcholanthrene and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, respectively, in the initiation assay and promotion assay. All test substances 2-methoxyethanol, anisole, and 1,2-dichlorobenzene were negative in both initiation assay and promotion assay.

Conclusion : A cell transformation assay using Bhas 42 cells was established and applied to three industrial chemicals, all of which gave negative results. The results of this study can be used as available data in a carcinogenesis assessment in the integrated approach to testing and

assessment (IATA). Plus, the cell transformation assay is expected to be used as evaluation data in the selection of candidate substances for carcinogenesis assay in experimental animals.

Key words : 1,2-Dichlorobenzene, 2-Methoxyethanol, Anisole, Bhas 42 cell, Cell transformation assay.

연구진

연 구 기 관 : **산업안전보건연구원**

연구책임자 : 임철홍(선임연구위원, 산업화학연구실)
연 구 원 : 신경민 (과장, 산업화학연구실)

연구기간

2022. 01. 01. ~ 2022. 12. 31.

본 연구보고서의 내용은 연구책임자의 개인적 견해이며,
우리 연구원의 공식견해와 다를 수도 있음을 알려드립니다.

산업안전보건연구원장

세포형질전환분석법을 이용한 단기 발암 예측연구
(2022-산업안전보건연구원-859)

발 행 일 : 2022년 11월 30일
발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 김은아
연구책임자 : 산업화학연구실 선임연구위원 임철홍
발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원
주 소 : (44429) 울산광역시 중구 종가로 400
전 화 : 042-869-8532
팩 스 : 042-869-8694
Homepage : http://www.kosha.or.kr/oshri
I S B N : 979-11-92782-54-6