

최종연구보고서

KIRAMS/RR-008/2005

방사선의 의학적 이용연구

Radiation Research for Clinical Application

방사선 생물학적 조사 지표 개발

Development of Radiation Biological Dosimetry

주관연구기관
한국원자력연구소
부설 원자력의학원

과 학 기 술 부

제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “방사선의 의학적 이용연구 사업” 과제 (세부과제 “방사선 생물학적 지표 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2005. 4. .

연구 기관 명 : 원자력의학원
연구 책임자 : 강 창 모
연구 원 : 조철구, 김태환
김천호, 손영숙
이동한, 김이화
정현숙, 김경중
최수용, 박미영
박현진, 권희경
서정화, 양승조

협동연구기관명 : 서울대학교 보건대학원
협동연구책임자 : 정 해 원
연구 원 : 조윤희, 김양지, 하성환

협동연구기관명 : 전남대학교 수의과대학
협동연구책임자 : 김 성 호
연구 원 : 김세라, 이해준, 방대원

최종연구보고서 초록

과제관리 번호		해당단계 연구기관	한국 원자력 연구소 부설 원자력의학원	단계구분	3/3		
연구사업명	중사업명	원자력중장기계획사업					
	세부사업명						
연구과제명	대과제명	방사선의 의학적 이용기술 개발					
	세부과제명	방사선 생물학적 지표 개발					
연구기관명 (연구책임자)	원자력의학원 (강창모)	해당단계 연구인력	내부	: 5.60 M·Y	연구비	정부	: 1,240,672 천원
			외부	: 18.32 M·Y		민간	: 천원
계	: 23.92 M·Y	계	: 1,240,672 천원				
위탁연구	연구기관: 서울대학교 보건대학원 연구책임자: 정해원 연구기관: 전남대학교 수의과대학 연구책임자: 김성호						
국제공동연구	상대국명:		상대국연구기관명:		참여기업		
색인어 (각5개이상)	한글	: 방사선생물학적 선량평가, 이동원염색체, 조기응축염색체, 염색체 전좌, 미소핵, 방사선 사고					
	영어	: radiation biodosimetry, chromosome aberration, PCC, FISH, micronucleus, radiation accident					
요약				면수	93		
<p>1. 연구개발목표 및 내용</p> <p>-연구개발 목표: 방사선 생물학적 피폭선량 측정 기술 개발에 의한 방사선 비상 진료 핵심 기반 기술 확립</p> <p>-연구개발 내용:</p> <p>(1) 개발된 방사선 피폭 선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립</p> <p>(2) 새로운 피폭 선량 예측 기술 개발</p> <p>2. 연구결과</p> <p>1. 개발된 방사선 피폭 선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립</p> <p>가. 염색체 이상법 (DC)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립</p> <p>나. Micronuclei (MN)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립</p> <p>다. Okadaic acid-PCC(premature chromosome condensation)를 이용한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립</p> <p>라. 방사선피폭의 생물학적 선량계로서 FISH 기법을 활용하기 위한 타당성 연구</p> <p>마. 만성 저선량 피폭환자의 세포 유전학적 평가기술 타당성 검토 및 모델 확립</p> <p>2. 새로운 피폭 선량 예측 기술 개발</p> <p>가. 생화학적 피폭 예측 신규 기술 개발 (생인공 피부 biosensor 법, P21 assay, DNA clusters assay)</p> <p>나. 생물학적 피폭 예측 신규 기술개발 - Ecobiodosimetry (환경 방사선 생물학적) 지표 개발</p> <p>3. 기대효과 및 활용방안</p> <p>- 불의의 방사선 피폭 사고에 대비한 의료적 처치에 필수적인 기본적인 자료로 방사선 재해에 대한 체계적인 대책 수립에 있어서 질적 향상을 도모함</p> <p>- 방사선 피폭에 의한 인체 장애의 정도를 예측하여 암 발생과 기형 발현을 최대한 경감하기 위한 생물학적 기초 자료로 이용 가능</p> <p>- 검색된 지표를 이용한 생물학적 피폭선량 측정법을 사용하여 방사선 피폭 선량을 신속하게 예측 내지 측정하여 방사선 피폭 환자의 긴급 의료 대책에 활용</p> <p>- 방사선 피폭자 진료 전문 병원에서의 진료 대책 수립을 위한 기본 자료로의 활용 및 원전과 방사선관련 산업체 그리고 연구소의 작업종사자들의 건강 증진대책과 더불어 핵사고에 대한 불안감 해소 및 안전 대책 수립에 기여하고 대 국민 교육과 홍보를 위한 기반자료로도 활용</p>							

요 약 문

I. 제 목

방사선 생물학적 지표 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

방사선 관련 산업의 확충으로 의료기관, 연구소 및 비파괴 검사업체 등의 개봉선원 사용증가에 따른 방사선 과피폭 사고 및 방사선원의 분실사고가 일어나고 있으며, 에너지원의 부재로 인한 전력 생산을 위한 원자력발전소에의 의존 등은 체르노빌 원전사고 및 일본 Tokaimura 우라늄 공장과 월성 원전의 방사능 누출사고와 같은 불의의 방사선 재해 발생의 위험성이 상주하게 하는 원인이 될 수 있다. 그리고 이에 대한 피폭환자의 피폭선량을 예측할 수 있는 방사선 생물학적 지표 개발 및 선량 측정법의 표준화를 위한 기술개발을 1, 2 단계의 연구과정 동안 수행하여 왔으며, 국내에서는 방사선 피폭환자의 피폭선량을 측정하여 피폭환자의 예후를 예측할 수 있는 생물학적 선량 측정법을 확립하기 위해 주로 원자력의학원에서만 체계적인 연구를 수행하고 있다. 아직 방사선재해에 대한 비상 진료 체계 확립을 위한 대책은 행정적으로만 수립되어 있을 뿐 실제상황에서는 현재의 능력으로는 대처하기 힘든 상황에 있으므로 본 연구과제는 국민의 안정적인 생활과 원자력 에너지에 대한 불안감해소와 함께 원자력 기술기반의 확립에 지대한 영향을 끼칠 수 있을 것으로 사료되기 때문에 반드시 범국가적 차원에서 시행 확립되어야 한다. 그러므로 불의의 방사선 사고에 대한 방재 대책의 일환으로 방사선 작업종사자, 방사선치료 암 환자 및 방사성 동위원소의 치료 환자 등의 추적조사 자료를 통한 방사선 피폭선량 예측과 인체 장해 정도를 평가할 수 있는 기반기술의 개발 및 방사선 영향 감소 대책을 위하여, 또한 발생 가능성이 있는 방사선 피폭환자의 비상 진료 체계 구축에 방사선 생물학적 지표 개발 및 피폭 선량평가법이 반드시 필요한 실정이다. 그러므로 본 연구는 방사선 생물학적 피폭선량 측정 기술 개발에 의한 방사선 비상 진료 핵심 기반 기술 확립을 위하여 기 개발된 방사선 피폭 선량 예측기술의 타당성을 검토하여 피폭환자에게 실제적으로 적용할 수 있는 모델을 확립하고 새로운 피폭 선량 예측 기술의 개발을 목표로 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 개발된 방사선 피폭 선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립

- 가. 염색체 이상법 (DC)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립
- 나. Micronuclei (MN)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립
- 다. Okadaic acid-PCC(premature chromosome condensation)를 이용한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립
- 라. 만성 저선량 피폭환자의 세포 유전학적 평가기술 타당성 검토 및 모델 확립
- 마. 방사선피폭의 생물학적 선량계로서 FISH 기법을 활용하기 위한 타당성 연구

2. 새로운 피폭 선량 예측 기술 개발

가. 생화학적 피폭 예측 신규 기술 개발

- (1) 피부 (생인공 피부) biosensor법
- (2) P21 biosensor 법
- (3) γ H2AX assay 법
- (4) Cluster DNA 손상 분석 기술

나. 생물학적 피폭 예측 신규 기술개발 - Ecobiodosimetry (환경 방사선 생물학적) 지표 개발

3. 방사선 피폭 선량 예측 표준 기술의 전수

IAEA 지원 Workshop 개최 (National Training Course on Biological Radiation Dosimetry, Programme: IAEA Ref. C7-ROK-9.045-001)

기 간: 2004년 11월 4일 ~ 11월 12일

장 소: 원자력의학원 방사선선량평가연구실

대 상: 국내 연구진 10인

IAEA biodosimetry specialist: Dr. Darroudi (Leiden University, The Netherlands),
Dr. Hayata (NIRS, Japan)

IV. 연구개발결과

- 가. 염색체 이상법 (conventional chromosome dicentric assay)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립: 기존의 확립된 방사선 피폭선량 측정법 중에서 IAEA에서 권고하고 있는 방사선 피폭환자의 체내 흡수선량을 가장 정확하게 예측할 수 있는 방법은 conventional chromosome dicentric assay 법으로 숙련된 연구자만이 반복적으로 정확한 data를 얻을 수 있는 고도의 기술과 시간을 필요로 하는 연구방법이며 정량화의 기술에 대해서 타당성을 검토한 결과 다음과 같은 공식을 산출하였다. $Y = 0.0023 + 0.0169D + 0.0672D^2$, $R^2 = 0.9997$ (단, Y는 임파구 1개 당 DC 수이고, D는 피폭선량(Gy)이다)
- 나. 미소핵 분석법 (micronuclei assay)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립: 기존의 확립된 방사선 피폭선량 측정법 중에서 방사선에 피폭된 환자의 체내 흡수선량을 가장 정확하게 예측할 수 있는 방법인 conventional chromosome dicentric assay 법과 함께 적용하여 빠른 시간 내에 data를 얻을 수 있는 방법으로 숙련된 연구자만이 반복적으로 정확한 data를 얻을 수 있는 고도의 기술과 시간을 필요로 하는 연구방법이며, 방사선 외의 영향을 배제하기 위해서는 dicentric assay 와 함께 적용하는 것이 필수적인 방법이며 정량화의 기술에 대해서 타당성을 검토한 결과 다음과 같은 공식을 산출하였다. Average: $Y = 0.0343 + 0.1129D + 0.0504D^2$, $R^2 = 0.9976$ (단, Y는 임파구 1개 당 MN 수이고, D는 피폭선량 (Gy)이다)
- 다. Okadaic acid PCC 법에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립: 세포융합을 이용하는 방사선 피폭선량 예측기술에 있어서는 방사선 피폭에 민감한 말초 혈액내 임파구와 CHO (Chinese hamster ovarian cell) 세포와의 세포융합(cell fusion)율이 매우 낮기 때문에 실제 피폭 환자의 정확한 피폭선량을 예측하는데 다소의 문제점이 있는 것으로 나타났다. 그러나 Okadaic acid PCC 법을 이용한 피폭선

량 예측기술은 방사선 피폭선량에 따른 선량반응효과가 선량에 의존하여 증가하는 경향으로 관찰되었으며, 선량-반응 효과 관계식은 $Y = 46 + (1.113 \pm 0.510)D + (0.372 \pm 0.071)D^2$, $R^2=0.987$ 로 나타났다. 따라서 기존세포 유전학적 선량측정법과 비교 평가하여 본 결과 okadaic acid PCC법은 기존의 세포유전학적 방사선 생물학적 피폭선량 측정법과 함께 사용하여 방사선 피폭자의 체내 피폭 흡수선량을 산정하는데 좋은 지표로 이용 가능한 것으로 관찰되었다.

라. 만성 저선량 피폭환자의 세포 유전학적 평가기술 타당성 검토 및 모델 확립: 기존의 확립된 방사선 피폭선량 측정법 중에서 방사선에 피폭된 환자의 체내 흡수선량을 가장 정확하게 예측할 수 있는 방법인 conventional chromosome dicentric assay는 만성 저선량 피폭환자에게는 사용할 수 없는 세포 유전학적 평가기술이므로 IAEA가 권장하고 있는 세포 유전학적 평가기술인 translocation (FISH) 방법을 사용해야만 한다. 또한 이 기술은 만성 저선량 피폭환자와 급성 피폭환자를 동시에 평가할 수 있는 기술이며, 만성피폭환자의 피폭량을 조사하기 위해서는 아래 그림에 나타나있는 data 중 stable translocation을 조사하면 된다. 하지만 본 기술은 매우 숙련된 연구자만이 반복적으로 정확한 data를 얻을 수 있는 고도의 기술과 시간을 필요로 하는 연구방법으로 정량화의 기술에 대해서 타당성을 검토한 결과 다음과 같은 공식을 산출하였다. Average: $Y = -0.001 + 0.1099D + 0.0501D^2$, $R^2 = 0.9952$ (단, Y는 임파구 1개 당 stable translocation 수이고, D는 피폭선량(Gy)이다)

마. 방사선피폭의 생물학적 선량계로서 FISH 기법을 활용하기 위한 타당성 연구: 방사선 조사한 후 DNA 손상회복 저해제인 3-AB와 Ara C 및 HU를 처리한 후 소핵과 bud 및 NPB의 빈도는 방사선량이 증가함에 따라 유의한 양-반응 관계가 관찰되었음 ($p<0.001$). Ara C만 처리했을 경우에만 bud의 빈도가 유의하게 증가되었으며 NPB의 경우에는 Ara C와 3-AB를 처리했을 경우에만 유의하게 증가되었다. c-myc 유전자를 대상으로 간기상태의 FISH와 소핵을 동시에 분석하여 c-myc 유전자가 위치하는 8번 염색체의 이수성을 조사한 결과 선량에 따라 총 이수성 빈도는 유의하게 증가하

는 양-반응관계를 보이고 있으며 DNA 손상 회복 억제제를 처리한 결과 방사선에 의해서 생성된 이수성의 빈도는 크게 증가하였는데 특히 Ara C를 처리한 경우 가장 많이 증가하였다. bud의 빈도와 c-myc 유전자의 signal를 포함한 bud의 빈도에서는 생성된 bud 중 13% 미만의 bud에서 signal이 관찰되었으며 이는 림프구의 방사선에 유도된 bud 생성과 c-myc 유전자 증폭과 연관성이 적은 것으로 해석될 수 있다. 또한 pancentromeric probe를 이용하여 interphase FISH와 소핵분석을 병행하여 분석한 결과, 방사선에 노출된 작업자와 대조군에서의 소핵의 빈도는 작업자에서 대조군보다 높게 나타났으며 Signal을 포함하는 소핵인 MNC+와 signal을 포함하지 않는 소핵 MNC-의 빈도를 관찰한 결과 MNC+의 빈도는 차이가 없었으나 MNC-의 빈도는 작업자에서 유의하게 증가하였다($p < 0.000$). 총 노출량, 최근 5년간 노출량 그리고 최근 1년간 노출량과 소핵 빈도와의 관계를 살펴 본 결과, 대조군에 비해 저노출, 중노출 그리고 고노출에서 총 소핵과 MNC-의 빈도는 증가하여 양 반응관계를 보였으나 MNC+의 빈도는 증가하지 않았음. 또한 근무년수 간 작업자들의 총 소핵, MNC 및 MNC- 빈도 모두에서 크게 차이가 나지 않았다.

2. 새로운 피폭 선량 예측 기술 개발

가. 생화학적 피폭 예측 신규 기술 개발

- (1) 피부 (생인공 피부) biosensor법: raft culture한 사람의 표피 조직에서 방사선 선량에 따른 biosensor 인 P53을 면역조직화학적으로 관찰하여 방사선에 노출된 피부의 피폭선량을 측정할 수 있는 방사선 생물학적 피폭선량 측정법을 개발하고자 인체 피부 keratinocyte의 raft culture로 완전히 계층화된 피부 조직으로 만들었으며, 계층화된 피부에 ^{137}Cs γ -rays를 조사한 후 각각 4 시간, 24 시간 후의 조직 절편을 취하여 피폭 선량에 따른 biosensor 인 P53의 출현 빈도를 광학현미경적으로 관찰하였다. 그 결과 basal layer에 P53단백질의 침착을 관찰할 수 있었으며, 피폭 후의 시간에 따라 P53의 발현은 다르게 나타났으며, 결과적으로 P53의 발현을 방사선 생물학적 피폭 선량 예측 기술로 사용하려면 피폭 후 24시간까지

는 2Gy이하에서 유효하게 사용할 수 있는 것으로 나타났다.

- (2) P21 biosensor 법: Human blood lymphocyte를 대상으로 P21의 발현을 조사하여 피폭 예측 기술로 사용할 수 있는 지 타당성을 검토하기 위해 연구를 수행한 결과, 이 기술이 방사선 피폭 예측 기술로 사용될 수 있을 것으로 예측되어지므로 피폭 후 48시간까지는 2Gy이하에서 유효하게 사용할 수 있는 것으로 나타났다.
- (3) γ H2AX assay 법: Human fibroblast의 primary culture를 대상으로 H2AX의 인산화형인 γ H2AX의 발현을 immunocytochemistry를 수행하여 피폭 예측 기술로 사용할 수 있는 지 타당성을 검토한 결과, 이 기술은 실질적인 방사선사고 시에는 방사선 생물학적 피폭 예측 기술로 사용하기 어려운 기술로 판명되었다.
- (4) Cluster DNA 손상 분석 기술: Cluster DNA 손상 분석 기술 확립 및 linear biodosimetry법 개발을 위하여 UPFE (unidirectional pulse filed electrophoresis), CHEF, TAFE 등으로 분석하였으며, 알고리즘 분석 프로그램으로 각 radiation dose 별로 각종의 DNA damage 분석하여 결과를 얻었다.

나. 환경 방사선 생물학적 (ecobiodosimetry) 지표 개발

소, 염소 및 돼지 유래의 림프구에서 CB세포의 형성 빈도 및 방사선 조사 후 발생하는 미소핵의 상황을 분석하고 소, 재래산양 및 돼지를 대상으로 혈액수치 및 세포질 분열차단 림프구에서 발생한 미소핵을 측정하여 울진, 월성 및 영광원자력발전소와 대조지역의 차이를 관찰하였으며 미소핵 발생 정도를 시험적으로 산출된 방사선 피폭 선량-반응 곡선식에 적용하여 추정선량을 파악하여 동물을 이용한 방사선 피폭 선량측정법을 확립하고 방사선 환경 평가 적용 가능성을 파악하였다. 원자력시설(울진, 월성 및 영광 원자력발전소) 지역 대상동물(소, 재래산양 및 돼지)을 선정하여 시료를 채취하고, 각 동물 종을 대상으로 확립된 세포질 분열 차단 림프구 미소핵 측정법을 적용하여 최적 선량-반응식을 도출하고, 대상동물의 림프구유래 미소핵을 측정하여 방사선 추정 피폭 정도를 평가하며 정상 대조지역과 비교 하였다. 원전지역 및 대조지역 사육 소, 재래산양 및 돼지의 혈액학적수치에서 각 군사이의 유의성 있는 차이는 없었으며 방사선 피폭 유무의

지표가 될 수 있는 림프구의 수치도 유의성 있는 차이는 없었다. 시험적 방사선 조사에 따른 미소핵의 발생 양상은 방사선조사에 따라 linear-quadratic model을 적용하여 다음과 같은 곡선식을 얻었다.

$$\text{소} : y = 0.1016D + 0.0118D^2 + 0.0147,$$

$$\text{재래산양} : y = 0.1353D + 0.004322D^2 + 0.00867,$$


$$\text{돼지} : y = 0.0183D + 0.0124D^2 + 0.0133$$

(y = CB 세포당 MN의 수, D = 방사선 조사량 Gy)였다.

이상의 결과에서 원전 지역 사육 동물과 대조지역 동물간의 혈액학적 및 미소핵 발생율의 관찰에서 차이점은 관찰되지 않았으며 추후 방사선 환경 평가연구에 자료로 활용될 수 있을 것이다.

3. 방사선 피폭 선량 예측 표준 기술의 전수

국내의 917개 방사선 동위원소 관련업체 및 국내 4개 지역의 20기의 원자력발전소에는 불의의 사고가 항상 발생할 수 있는 상황이므로 본 연구과제는 연구내용도 중요하지만 기술의 표준화 및 국내 관련 연구자들에게의 기술 전수도 매우 중요하므로 다음과 같은 업무를 수행하였다. 국내 multi-casualty 사고에 대비한 기술 protocol의 표준화 작업의 일환으로 IAEA에서 추천 초빙된 IAEA biodosimetry specialist인 Dr. Darroudi 와 Dr. Hayata를 모시고 국내 연구진 10인을 대상으로 IAEA 지원 Workshop (National Training Course on Biological Radiation Dosimetry)을 개최하여 Standard Technique Transfer (표준 기술 전수)를 지원하였다 (2004년 11월 4일 ~ 11월 12일).

ROK/9/045 Improving Medical Preparedness in Response to Radiation Emergencies		
Training Courses: Personnel - TRC Staff		
TRC#001 NATIONAL TRAINING COURSE ON BIOLOGICAL RADIATION DOSIMETRY		
Technical Officer:	<u>Watanabe, Naoyuki (NAHU)</u>	
Implementation Officer:	<u>Bischoff, Gerard Lucien (TCPA)</u>	
Implementation Clerk/Assistant:	<u>Voulgaris-Muchar, Jeanette (TCPA)</u>	
Course Director:	<u>Kang, Chang-Mo</u>	

V. 연구개발결과의 활용계획

- ◆ 불의의 방사선 피폭사고에 대비한 국가 비상진료 체계 확립을 위한 기초적인 자료로 이용하여 방사선 재해에 대한 체계적인 국가 비상 방재 대책 수립에 있어서 질적 향상을 도모함.
- ◆ 방사선 피폭에 의한 인체 장애의 정도를 예측하여 암 발생과 기형 발현을 최대한 경감하기 위한 생물학적 기초 자료로 이용
- ◆ 검색된 지표를 이용한 생물학적 피폭선량 측정법을 사용하여 방사선 피폭 선량을 신속하게 예측 또는 측정하여 긴급 진료 대책 확립에 활용함으로써 방사선 피폭자들의 생명을 효과적으로 구할 수 있는 구명대책에 필요
- ◆ 유전 공학, 방사선 생물학, 방사선 병리학 및 방사선 치료 등의 학문 발전에 이용할 수 있으며, 특히 방사선 방호제의 개발, 방사선 민감세포에 대한 기전적 연구등에 좋은 지표로 사용가능
- ◆ 방사선 피폭자 진료 전문 병원에서의 진료 대책 수립을 위한 기초 자료로의 활용 및 대국민 교육과 홍보를 위한 기반 자료로 활용
- ◆ 방사선 재해 시 유발되는 방사선 피폭자의 인체장애 및 손상의 지표로 한국적 상황에 알맞게 활용이 가능하며, 지역적 인종적인 방사선 민감도의 차이를 파악할 수 있는 기초자료로 활용
- ◆ 소, 재래산양, 돼지동물 유래 림프구를 이용한 방사선 피폭의 선량-반응식을 적용하여 원전 주변 동물을 이용한 방사선 생물학적 선량측정이 가능하였으며 이를 통하여 피폭선량 측정의 다양화를 이룩하고 방사선 시설 및 환경 방사선 오염 측정 등을 위한 자료로 제공
- ◆ 방사선 오염 가능지역 및 자연방사선 고준위 지역 등의 서식 동물을 대상으로 한 생물학적 계측이 가능

S U M M A R Y
(영 문 요 약 문)

I. Project Title

Development of Radiation Biological Dosimetry

II. Objectives and Importance of the Project

Recently there has been increase in number of nuclear power plants and radiation-related facilities in Korea because of little energy sources in Korea. So there are increases in interest of general population to radiation hazard because accidental radiation exposure would frequently be occurred in the radiation-related facilities such as Chernobyl “melt down“, Tokaimura accident in Japan. However, there were not effective biodosimetries to estimate early dose prediction of victims in case of radiation disaster before this project. We must make the exact biodosimetry to estimate the absorbed dose of the irradiated victims (sometimes retrospectively) for Radiation Emergency Medical Preparedness and Assistance Network against Radiation Hazard. Therefore, we have been studying the development of more useful biodosimetry for many years in Korea Institute of Radiological & Medical Sciences (KIRAMS) under the support of Ministry of Science and Technology. The purpose of the present investigation was to determine the quantitative system of the exposed dose as (sometimes retrospectively) biological dosimetry to establish the triage that we can divide victims according to the absorbed dose. The exact quantitative method to estimate the damages of the internal organ and radiosensitive tissues remains ill-defined yet. Especially, despite of increasing the use of atomic power because of not being an adequate another energy sources that is much more clean fuel yet, there didn't prepare the triage

and the medical management and care system of victims against radiation hazard, but only establish the administrative measure in Korea.

Therefore, we should need to establish the useful (sometimes retrospective) biological dosimetry for radiation injury of the irradiated victims for a comfortable life of people and establishment of technical foundation of national atomic energy. There is no medical management and care system according to the irradiated dose, and no establishment of biological dosimetry by which we can estimate the relationship between the pattern of clinical sign or the degree of cell damage and the exposed dose. Accordingly, there is also an urgent need to establish systematically biodosimetry to evaluate the medical phenomena of radiation damages and dose evaluation of victims by observing a variety of morphological and molecular biological changes in the human radiosensitive cells and organs. This study was carried out to determine the quantitative system in radiation biological dosimetry to establish the triage which we can evaluate the predicted dose and degree of radiation injury in the case of radiation accident.

III. Scope and Contents of the Project

1. Development of radiation biological dosimetry

1) Development of cytogenetic parameters for radiation biological dosimetry

We established not only the quantitative analysis and standardization of parameter such as chromosome dicentric assay, micronuclei assay, premature chromosome condensation assay, and translocation (FISH) assay which were the significant relationship between dose and cell damages to evaluate the absorbed dose as correct as possible using lymphocytes.

2) Development of new radiation biological indicators

We tried to develop the new techniques such as the bioartificial skin biosensor

assay, the P21 biosensor assay, the γ H2AX assay, the cluster DNA damage analysis assay, and ecobiodosimetry assay system to use for radiation biological dosimetric indicators.

IV. Results

1. Development of radiation biological dosimetry

1) Development of cytogenetic parameters for radiation biological dosimetry

We established the dose-response relationship and standardization of chromosome dicentric assay, micronuclei assay, premature chromosome condensation assay, translocation (FISH) assay. For the dose-response study in chromosome dicentric assay, the induced chromosome dicentrics were observed all doses, and the numerical changes according to doses. In dose-response curves fit linear-quadratic form $Y = 0.0023 + 0.0169D + 0.0672D^2$, $R^2 = 0.9997$, Y is the number of dicentrics per lymphocyte, D is exposed dose (Gy). For the dose-response study in micronuclei assay, the induced micronuclei were observed all doses, and the numerical changes according to doses. In dose-response curves fit linear-quadratic form $Y = 0.0343 + 0.1129D + 0.0504D^2$, $R^2 = 0.9976$, Y is the number of micronucleus per lymphocyte, D is exposed dose (Gy). For the dose-response study in translocation assay, the induced translocations were observed all doses, and the numerical changes according to doses. In dose-response curves fit linear-quadratic form $Y = -0.001 + 0.1099D + 0.0501D^2$, $R^2 = 0.9952$, Y is the number of translocation per lymphocyte, D is exposed dose (Gy). For the dose-response study in Okadaic acid PCC assay, the induced PCCs were observed all doses, and the numerical changes according to doses. In dose-response curves fit linear-quadratic form Average: $Y = 46 + (1.113 \pm 0.510)D + (0.372 \pm 0.071)D^2$, $R^2 = 0.987$, Y is the number of PCC ring per lymphocyte, D is exposed dose (Gy).

2) Development of new radiation biological indicators for biodosimetry

(1) Biochemical indicators for biodosimetry

(a) The bioartificial skin biosensor assay

The bioartificial skin biosensor assay was effective and well-directed technique for biodosimetry under 2 Gy and optimal period is before 24 hours after exposure.

(b) The P21 biosensor assay

The P21 biosensor assay was effective and well-directed technique for biodosimetry under 2 Gy and optimal period is before 48 hours after exposure.

(c) γ H2AX assay

γ H2AX assay was not proper biodosimetry assay.

2. Cytogenetic dosimetry for radiation exposure using animal

No significant difference was found in the counts between Nuclear power plant and control area. The peak of binucleated cell formation was found at a concentration of 2 %PHA and 4 ug/ml Cyt-B. The MN frequencies in unexposed lymphocytes were not significantly different from donor to donor. There was a significant relationship between the frequency of induced MN and dose of gamma-rays. Regression analyses of the data showed that a linear-quadratic model ($y = aD + bD^2 + c$; where D is dose in Gy and y is the number of MN per CB cell) gave an excellent fit. When analysed by linear-quadratic model the line of best fit was Cattle: $y = 0.1016D + 0.0118D^2 + 0.0147$, Goat: $y = 0.1353D + 0.004322D^2 + 0.00867$, Pig: $y = 0.0183D + 0.0124D^2 + 0.0133$. The incidence was expressed as the number of micronuclei per 1000 binucleated lymphocytes. The incidences in Wolsong, Uljin, Younggwang and control area were 9.87, 8.90, 9.20 and 9.60(1st experiment), 9.30(2nd experiment), respectively. An estimated MN

rates were calculated by best fitting linear-quadratic model based on the radiation-induced MN data over the range from 0 Gy to 4 Gy from the goat lymphocytes with in vitro irradiation. According to the dose response relationship, mean incidences of micronuclei of the cattle bred in the nuclear power plant (Wolsong, Uljin and Younggwang) and control area were equivalent to the results obtained by in vitro radiation exposure of gamma-rays at doses of -4.78 cGy, -5.71 cGy, -5.46 cGy and -5.05 cGy(1st experiment), -5.35 cGy(2nd experiment) exposure, respectively. The incidence was expressed as the number of micronuclei per 1000 binucleated lymphocytes. The incidences in Wolsong, Uljin and control area were 9.60, 6.83 and 9.88, respectively. According to the dose response relationship, mean incidences of micronuclei of the goat bred in the nuclear power plant (Wolsong, Uljin) and control area were equivalent to the results obtained by in vitro radiation exposure of gamma-rays at doses of 0.68 cGy, -1.39 cGy and 0.89 cGy exposure, respectively. The incidence was expressed as the number of micronuclei per 1000 binucleated lymphocytes. The incidences in Younggwang and control area were 10.60 and 11.60, respectively. According to the dose response relationship, mean incidences of micronuclei of the cattle bred in the nuclear power plant (Younggwang) and control area were equivalent to the results obtained by in vitro radiation exposure of gamma-rays at doses of -16.63 cGy and -13.21 cGy exposure, respectively. There were no significant differences in MN frequencies and hematological values in animals between nuclear power plant and control area.

V. Plan and Proposal of Application

We must use the exact biodosimetry to estimate the absorbed dose of the irradiated victims retrospectively for Radiation Emergency Medical Preparedness and Assistance Network against Radiation Hazard because there were not effective

biodosimetries to estimate early dose prediction of victims in case of radiation disaster.

- ◆ It can be used basic data of radiation-induced cancer and malformation through predicting degree of human hazard.
- ◆ Developed indicators will be needed to determine the quantitative system of the exposed dose rapidly as retrospectively biological dosimetry to establish the triage that we can divide victims according to the absorbed dose for saving people from radiation accident by Radiation medical Preparedness.
- ◆ This data should give scientific results in cytogenetics, radio-biology, radio-pathology, and radiotherapeutics, especially development of radioprotective drugs, and mechanical research of radiosensitive cells and be used as good indicators.
- ◆ It will be applied establishment of medical services for radiation accident in special hospital of treating irradiated victims and basic data for education and public information against radiation hazard.
- ◆ It should be applied indicators of human injury and degree of cell damage of victims in radiation-related international conference, and to evaluate differences of radiosensitivity between races or regions as the end point.
- ◆ The results of these studies demonstrate that using cytogenetic biomarkers of radiation exposure in cattle, goat and pig lymphocytes for environmental biodosimetry represents a useful methodology for conducting exposure assessments for organisms inhabiting radionuclide-contaminated environments, and would provide genetically relevant measurement endpoints for ecological risk assessments.
- ◆ Our radiobiological study confirmed that the cytogenetic response obtained in blood from cattle, goat and pig can be utilized for application in environmental studies.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of research project	-----	1
Chapter 2. Recent trends in domestic and abroad	-----	10
Chapter 3. Research activity and results	-----	17
Chapter 4. Achievement and contribution of the research activity	-----	77
Chapter 5. Plans for utilization of the research	-----	79
Chapter 6. Technological information	-----	85

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	-----	1
제 2 장	국내·외 기술개발 현황	-----	10
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과	-----	17
제 4 장	연구개발 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	-----	77
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	-----	79
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보	-----	85

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

- ◆ 우리나라는 에너지원의 부재로 2005년 현재 가동되고 있는 20기의 원자력 발전소에서 생산하는 원자력에너지에 40%이상을 의존하고 있기 때문에 체르노빌 원전사고 및 일본 Tokaimura 방사능 누출사고와 같은 불의의 방사선 재해 발생의 위험성이 매우 높은 실정임
- ◆ 또한 방사선 관련 산업의 확충으로 인해 의료기관, 연구소 및 비파괴 검사업체 등의 개봉선원의 사용이 증가하고 있기 때문에 방사선 과피폭 사고 및 방사선원의 분실사고가 증가하고 있음
- ◆ 이에 대한 방사선 피폭환자의 피폭선량을 비교적 정확히 측정할 수 있는 방사선 생물학적 선량측정법이 거의 준비되어 있지 않으며, 국가 비상 진료 체계는 최근에 들어서 원자력의학원 국가방사선비상진료센터를 중심으로 이제 시작을 하고 있는 실정에 있음
- ◆ 특히 국내에서는 방사선 피폭환자의 체내 흡수선량을 측정하여 피폭환자의 예후를 예측할 수 있는 생물학적 선량 측정법 개발 및 방사선 치료 암 환자의 치료 효율과 방사선 인체 영향 평가 기술 개발은 주로 원자력의학원에서만 체계적인 연구를 수행하고 있음
- ◆ 아직 방사선재해에 대한 비상 진료 체계 구축 및 방사선 치료 암 환자의 치료 효율 평가 기술은 아직 체계적으로 수립되지 못한 상황이므로 브라질 고이노니아 피폭사고와 체르노빌 원전사고와 같은 대형 피폭사고 시 피폭환자의 체내 피폭선량에 따른 방사선 인체 장해 정도 예측법의 정량화 및 손상조직의 영향감소와 치료기술을 개발하여야 함
- ◆ 또한 전남 대학교 병원의 방사선 치료 암 환자의 국소 고선량 방사선 피폭사고사와 같은 방사선 이용관련 방사선 인체 장해 평가 기술 및 방사선 치료 효율 평가 기술을 개발하는 본 연구과제는 국민의 안정적인 생활과 원자력 에너지에 대한 불안감해소와 함께 원자력 기술기반의 확립에 지대한 영향을 끼칠 수 있을 것으로 사료되기 때문에 반드시 범국가적 차원에서 시행 확립되어야 할 필요성이 있음
- ◆ 그러므로 본 연구 과제는 불의의 방사선 사고에 대한 방재 대책의 일환으로 원폭 피해자, 방사선 작업종사자, 방사선치료 암 환자 및 방사성동위원소의 치료 환자 등을 통한 방사선 피폭선량 예측과 인체 장해 정도를 평가할 수 있는 기반기술의 개발 및 방사선 영향 감소 대책이 향후 발생 가능성이 있는 피폭환자의 비상 진료 체계 구축에 필요하

며, 방사선 치료 암 환자의 치료 효율 평가 및 방사선 인체 장해 평가에 이용할 수 있는 필수적인 신기술로 판단됨

- ◆ 동물은 주위 환경에 존재하는 여러 가지 유해물질에 영향을 받으므로 가축은 인간의 생활환경을 공유한다는 관점에서 대상 자체의 장해뿐 만 아니라 인간에 대한 유해인자의 작용을 대변할 수 있어 주위 환경의 유해성 평가 분야에서 매우 중요하다할 수 있음 (16,17)
- ◆ 그러므로, 본 연구에서는 소, 재래산양 및 돼지를 대상으로 혈액수치 및 세포질 분열차단 림프구에서 발생된 미소핵을 측정하여 원자력발전소(월성, 울진 및 영광)와 대조지역의 차이를 관찰하였으며 미소핵 발생 정도를 시험적으로 산출된 방사선 피폭 선량-반응 곡선식에 적용하여 추정선량을 파악하였음
- ◆ 또한 소핵분석은 수적 이상이나 구조적 이상을 유발하는 물질의 유전 독성을 평가하는데 널리 이용되고 있으며 또한 염색체 이상 분석 보다 분석이 용이하고 시간이 적게 소요된다는 장점을 지니고 있어, 최근에 Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN)분석 방법이 개발되면서 그 활용성이 더욱 증대되고 있는데 (Fenech,1993) 특히 CBMN은 세포질 분열 억제제를 처리하여 세포질 안에 두개의 핵을 가진 세포만을 관찰할 수 있는 장점이 있어 첫 번째 분열하는 세포에서의 상태를 정확히 측정할 수 있음(Sgura et al., 1997)
- ◆ CBMN 분석은 소핵 외에 딸핵에 연결되어 소핵처럼 보이지만 소핵 분류 시 제외되었던 bud 및 두 개의 딸핵이 연결되어서 이동원 염색체라 추정되어지는 nucleoplasmic Bridge (NPB)를 함께 분석할 수 있는 장점을 지니며, bud는 방사선에 의해 염색체 절단이 일어나면 손상회복 과정 중 증폭된 특정 유전자로 인해 형성되고 시간이 지남에 따라 딸핵에서 떨어져 나와 소핵으로 발전한다고 보고됨으로써(Shimizu et al., 1998, Mitchell and Norman, 1987) 소핵 형성의 또 다른 기전으로 제시되었으며, Crott 등(2001)은 bud와 NPB는 소핵과 더불어 사람 림프구에서 folic acid deficiency의 생물학적 지표로서의 타당성을 검증하여 bud가 특정 유전자의 증폭에 대한 생물학적 지표로서도 활용할 수 있다고 보고하였음(Crott et al, 2001)
- ◆ 따라서 interphase FISH기법과 소핵분석 방법을 병행한 방법을 이용하여 bud의

생성 과정 중 특정 유전자의 증폭 및 딸핵으로부터 떨어져 나온 bud가 소핵형성에 기여하는 정도를 직접 확인할 수 있음

- ◆ 사람의 8번 염색체 말단(8q24)에 존재하며 발암과정에 관여하는 c-myc 유전자의 증폭을 FISH 기법을 통해 확인함으로써 bud가 c-myc 유전자 증폭의 생물학적 지표로서의 활용가능성을 검증하고 또한 bud가 소핵을 형성하는 또 다른 기전인지 여부를 구명하여 새로운 생물학적 선량계로서 bud의 활용성을 검토할 필요가 있음
- ◆ 또한 NPB는 두개의 딸핵이 선으로 연결되어서 이동원 염색체로 추정되어지고 있으므로 (Fenech, 1997, Crott, 2001) 일반적으로 NPB는 소핵과 같이 관찰되어 이는 염색체 절편으로 NPB가 이동원 염색체로 추정하는데 뒷받침하고 있으나 아직 까지 그에 대한 연구가 미비하기 때문에 새로운 생물학적 선량계로서의 활용성을 검증할 필요가 있음
- ◆ 한편, 소핵은 세포분열의 후기나 말기 시 염색체의 불분리 현상과 절단된 염색체에 의해 생성되며 최근에는 특정 유전자의 증폭으로 생성되는 bud에 의해 형성되어지는 것으로 추정되고 있지만 소핵 형성에 대한 정확한 기전은 아직까지 확실치 않음
- ◆ 방사선에 의해 형성된 소핵은 방사선량이나 방사선질에 따라 그 결과가 뚜렷이 구분되기 때문에 소핵분석이 방사선에 의해 유발되는 염색체 손상을 평가하는 대안적인 방법으로 연구되어왔으며 방사선 사고에 의한 노출을 비롯한 직업적 (Zwingmann et al., 1998 ;Fucic et al., 2000) 또는 치료(Thierens et al., 1996)에 의한 노출을 모니터링하는 생물학적 지표로 활용할 수 있음이 보고 되어 왔음 (Vral et al., 1997)
- ◆ 그러나 사람 림프구에 있어서 개인간의 자연발생적인 소핵 빈도수의 변이가 크고, 대부분의 자연발생적인 소핵의 기원은 염색체의 불분리 현상에 의해 형성되는 것으로 알려져 있으며 방사선에 의한 소핵 형성과정에서 불분리 현상에 의해 염색체 전체가 포함되는 경우보다 방사선에 의한 염색체 절단이 더 많이 기여한다는 것이 보고 되고 있음 (Vral et al., 1997)

- ◆ 따라서 방사선에 의한 염색체 손상을 평가할 때 소핵분석법을 활용하기 위해서는 이와 같은 낮은 민감도를 보완할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있으며, 또한 Weld joints, pipes, tanks, nuclear facilities의 안전 진단 분야에 종사하는 비과피 검사 근로자들은 방사선 관련 근로자들 중 가장 고선량에 노출되는 것으로 알려져 있는데 사고에 의한 과피폭자들에 있어서 뿐만 아니라 산업장에서의 radiographer (industrial radiographer)의 소핵, 염색체 이상의 빈도가 대조군에 비하여 유의하게 높다고 보고 되고 있으므로 저선량의 방사선에 직업적으로 노출되는 근로자들을 모니터링 할 수 있는 생물학적 지표 개발의 필요성이 증가하고 있음
- ◆ 또한 소핵 형성의 기전이 whole 염색체인지 또는 염색체 절편인지를 추정할 때 소핵의 크기에 의해 구분하기도 하였으나 염색체마다 크기가 다르고 염색체의 일부만이 소핵에 포함되는 경우가 있기 때문에 소핵형성에 어떠한 염색체가 관여하는 가를 파악하는 것이 불가능하였음
- ◆ 그러나 최근 도입된 interphase FISH 방법에 소핵분석을 동시에 수행하면 소핵 내 포함된 특정 염색체를 확인할 수 있기 때문에 특정오염물질에 노출되어 나타난 특정염색체의 손상을 파악할 수 있어 특정 염색체의 이수성과 염색체의 불분리에 대한 정보 및 소핵 내 물질 추정 등과 같은 소핵 형성과정에서 어떠한 기전이 포함되어 있는가를 쉽게 확인할 수 있음 (Zijno et al., 1994, Norppa et al., 1993)
- ◆ 따라서 소핵분석과 pan-centromeric probe를 사용한 FISH기법을 병행하여 whole chromosome에 의해 형성된 소핵과 염색체 절편에 의해 형성된 소핵을 centromeric signal 유무에 따라 구별함으로써 방사선에 의해 형성된 소핵의 기원을 파악함과 동시에 자연발생적인 소핵을 제외한 직접적인 방사선에 의한 영향만을 평가할 수 있는 분석방법으로 활용할 수 있음
- ◆ 본 연구에서는 새로운 방사선 노출의 세포 유전학적 지표로서 bud와 NPB의 활용 가능성을 확인하였으며, 본 연구에서는 사람 림프구에 방사선을 조사한 후 DNA 손상회복 저해물질, 즉 세포 주기 중 G1기에 DNA 복제 및 회복 과정에서

chromatin의 integrity를 유지하는데 필요한 효소인 ADP-ribosyl transferase의 작용을 억제하는 3-Aminobenzamide (3-AB)와 DNA polymerase의 작용을 억제하는 Cytosine Arabinoside(Ara C) 그리고 S기에 DNA 복제 및 회복 과정에서 ribonucleotide reductase의 작용을 억제하는 Hydroxyurea(HU)를 특정 세포주기에 처리한 후 관찰한 다음 기전이 각기 다른 DNA 회복합성 저해제에 의한 소핵 및 bud와 NPB 유발 빈도의 변화를 확인함으로써 그에 대한 기전을 파악하여 생물학적 선량계로서의 타당성을 검증하고자 하였음

- ◆ 그리고, *c-myc* LSI probe를 이용한 FISH기법을 소핵분석과 병행함으로써 bud의 생성 과정 중 *c-myc* 유전자의 증폭 및 딸핵으로부터 떨어져 나온 bud가 소핵형성에 기여하는 정도를 직접 확인함으로써 bud가 특정 유전자 증폭의 생물학적 지표로서의 활용가능성을 검증하고 bud가 소핵을 형성하는 또 다른 기전인지 여부를 구명하여 새로운 생물학적 선량계로서 bud의 타당성을 검증하고자 하였음
- ◆ 직업적으로 저선량의 방사선에 노출된 비파괴 근로자들을 대상으로 저선량 방사선에 의한 영향 보다 민감하게 평가하기 위해 소핵분석과 pan-centromeric probe를 사용한 FISH기법을 병행하여 whole chromosome에 의해 형성된 소핵과 염색체 절편에 의해 형성된 소핵을 구별함으로써 방사선에 의해 형성된 소핵의 기원을 파악함과 동시에 자연발생적인 소핵을 제외한 직접적인 방사선에 의한 영향만을 평가할 수 방법으로서의 타당성을 검증하고자 하였음
- ◆ 아래는 방사선생물학적 선량평가의 구체적인 필요성을 정리했음
 - ▶ 방사선 재해에 대한 전문적인 의료 체계의 구축을 위한 방사선 피폭 환자의 위험과 피폭 선량을 예측할 수 있는 생물학적 선량 측정법의 연구 개발은 피폭자의 치료와의 유기적인 대처 방안 확립의 입장에서 반드시 필요
 - ▶ 원자력발전소의 원자로 melt-down이나 방사성 핵종 누출사고, 핵무기관련 사고, 암 치료용 방사성 동위원소의 취급부주의나 도난으로 인한 피폭 사고, 연구용 방사성 동위원소의 오염사고, 특히 인명살상이 가능한 비파괴 검사용 고에너지 방사성 동위원소의 취급부주의나 도난사고로 인한 주민의 방사선 피폭사고로 발생하는 인체장해의 정도를 예측할 수 있는 물리학적 선량측정법

과 생물학적 선량측정법의 표준화 수립에 필요

- ▶ 세계보건기구에서 만든 REMPAN (radiation emergency medical preparedness and assistance)의 network이 완성되어 있지는 않지만, 우리나라의 관련 분야 전문가도 참여함과 동시에 핵사고의 위험성이 고조되고 있는 현 시점에서 범국가적인 차원의 비상진료대책 기구인 원자력의학원내에 신설된 국가방사선 비상진료센터의 신설과 더불어 피폭환자의 체내 피폭선량에 따른 방사선 인체 장해 정도 예측법의 정량화기술 개발 및 확립이 절실히 필요한 상황임
- ▶ 방사선에 대한 한국인 특이적인 생물학적 영향과 감수성 등의 차이에 대한 기초 자료에 근거한 피폭 환자의 적절한 응급 처치법 개발이 필요
- ▶ 방사선피폭 환자의 효율적인 치료를 위한 환자분류(triage)는 피폭 환자의 예후 판단과 치료효율 향상에 필요하며, 평시에는 방사선 치료환자 및 방사선 관련 종사자들의 지속적인 저선량 피폭에 대한 생물학적 선량측정법 확립 및 방사선 치료 효율 평가와 인체 장해 평가로 국민의 건강증대와 효율적인 관리체계에 필요
- ▶ 방사선 피폭자의 인체장해 정도예측을 위해 불의의 방사선 피폭자, 방사선 치료환자 및 종사자들에 대한 추적조사를 통한 cohort 구축으로 피폭자 관리체계의 구축에 필요
- ▶ 방사선 재해에 대한 전문적인 의료 체계의 구축을 위한 방사선 피폭 환자의 위험과 피폭 선량을 예측할 수 있는 생물학적 선량 측정법의 연구 개발은 피폭자의 치료와의 유기적인 대처 방안확립의 필요
- ▶ 방사성 핵종의 체내 오염과 방사선피폭으로 발생하는 인체장해를 경감시키고자 이미 본 연구팀에서 검증 확인된 배설촉진제, free radical scavenger, 면역증강제 및 소염/항생제 등의 투여방법과 용량의 정량화, 피폭선량에 따른 투여약제의 분류, 체내오염 방사성 핵종의 제염을 위한 제염제의 분류 및 투여량의 정량화를 통한 방사선 비상진료체계의 표준화에 필요

연구개발 필요성의 기술적 측면

- ▶ 원전 주변 주민 및 방사선 작업종사자 등의 방사선 보건 관리를 위하여 생물학적 선량 측정법에 의한 피폭 예측 선량 측정이 가능해 짐을 기대
- ▶ 방사선 피폭에 의해 발생하는 인체 장해를 파악하기 위하여 피폭선량과의 선량-반응 관계 규명의 필요
- ▶ 방사선에 의한 인체장해 발현의 분자생물학적 이론을 바탕으로 한 의학적 치료기술 선진화 기대
- ▶ 방사선 관련 종사자 및 방사선 피폭환자의 추적조사의 체계 확립으로 체계적인 방사선 피폭관련 자료의 확보 및 관리 업무를 수행가능
- ▶ 인체 방사선 장해의 방어 및 치료 방안 구축을 위해 생체 biomarker 및 indicator 등을 이용한 생물학적 선량 측정법 확립
- ▶ 방사선에 의한 인체장해 발현의 분자생물학적 이론을 바탕으로 한 의학적 치료기술 선진화 기대
- ▶ 원전 주변 주민 및 방사선 작업종사자 등의 방사선 보건 관리를 위하여 생물학적 선량 측정법에 의한 피폭 예측 선량 측정이 가능해 짐을 기대
- ▶ 방사선 피폭에 의한 인체 장해 경감 및 억제를 위한 기전적 영향 감소 체계 확립
- ▶ 상기 문제 해결에 필요한 생물학적 선량 측정법의 개발을 본 과제에서는 사람의 말초 혈액과 실험 동물을 이용하여 세포 조직학적인 변화를 관찰하여 방사선 장해에 따른 장해 발현의 임상 증상을 체계적으로 파악하여 피폭선량과의 연관성 연구가 필요

연구개발 필요성의 경제·산업적 측면

- ▶ 원자력 에너지 기반으로 한 산업구조의 획기적인 변화는 국내 원자력산업의 지속적인 성장을 위한 원자력산업의 경쟁력 유지에 필요한 원자력 기술 개발과 더불어 원전 사고와 같은 방사선 재해 시 신속하고 효율적으로 대처할 수 있는 의료 대책의 수립과 이에 필요한 의료기술의 개발이 필수적으로 병행되어야 함
- ▶ 따라서 원자력산업의 발달과 함께 방사선 관련 종사자의 의료복지증진과 진료대

책수립이 시급한 실정이며 특히 세계적으로 아직 이에 대한 체계적인 대응방안이 수립되어 있지 않으므로 인공피부의 개발로 최대의 유망산업으로 떠오르고 있는 생명공학산업의 경쟁력 제고에 기여할 것임

- ▶ 원자력 발전소 등 방사선 관련 산업체의 피폭 사고에 대한 국민 보건 체계 확립 필요
- ▶ 産學研 위탁 및 공동 연구를 통한 방사선 생물학 연구의 저변 확대 및 국내 관련 전문가의 연구력 향상과 연구 의욕 고취 필요성 대두
- ▶ 선진 기술 도입과 기술자의 영입 없이 자체적으로 방사선 장해 방어 체계를 구축하여 방사선 손상에 대한 판정 연구기술의 국내 활성화 시급

연구개발 필요성의 사회·문화적 측면

- ▶ 수립된 생물학적 선량 측정법의 타당성 여부를 검토하고, 가능한 한 신속하고 간단한 선량 측정법을 개발하여 피폭환자의 진단과 치료 대책 수립을 위한 기초 자료로 이용할 필요성이 있음
- ▶ 방사선 피폭자의 진료를 위한 첨단의료 기술개발에 관한 연구사업에의 국가적인 투자는 원자력 정책전반에 관한 국민의 신뢰도를 증진시킬 것임
- ▶ 원폭 피해자, 원전종사자와 인근주민, 그리고 방사성 동위원소를 이용한 연구 및 치료 등에 종사하는 종사자들의 건강진단과 추적 조사를 통하여 방사선 피폭으로 인한 이상유발의 조기진단과 치료에 적극적으로 활용할 수 있어 국민의 건강증진과 안전한 원자력 이용에 도움을 줄 것으로 사료됨
- ▶ 원자력 이용 시설 주변의 환경 모니터링 및 주변 환경에 대한 무조건적 불신 해소를 위한 자료 제공
- ▶ 방사선 피폭자의 진료를 위한 첨단 의료 기술개발에 관한 연구사업에의 국가적인 투자의 필요성과 원자력 정책 전반에 관한 국민의 신뢰도를 증진시킬 방안 강구의 필요성
- ▶ 국내 원자력관련 산업의 활성화뿐만 아니라 dirty weapon을 이용한 방사능 테러와 북한의 핵 위협에 대해 유연하게 대처할 수 있는 기술의 초석이 될 것으로 판단됨

- ▶ 원전 주변의 주민과 종사자 또는 기타 방사선 이용 시설 관련 종사자들의 방사선 피폭에 대한 불안감을 해소하며 원전 시설과 관련 업종의 안전성에 대한 국민의 신뢰성 고양

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 기술개발 현황과 연구결과가 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

- ◆ 방사선에 의한 체외 노출과 방사성 동위원소의 체내 오염으로 일어나는 방사선 피폭 사고에 의한 인체 장애의 기전을 판단 분석하는 생물학적 및 형태학적인 연구는 국내외적으로 아직 기초 연구 단계에 있는 실정이며, 방사선 피폭에 따른 세포, 장기 및 개체간의 방사선 민감도 분석 기술에 대한 연구가 계속 시도되고 있음
- ◆ 최근에 방사선에 의한 돌연변이 유발과 발암의 기전을 분자생물학적으로 규명하여 방사선 장애를 파악 예측할 수 있는 생물학적 선량측정법 개발 연구가 외국에서는 많이 진행되고 있지만 국내에서는 일부 연구기관에서 염색체 변형에 의한 생물학적 선량측정법 만이 비교적 활발히 연구되고 있음
- ◆ 방사선의 인체 장애에 대한 자료가 충분치 않은 국내에서는 방사선 치료 중에 발생하는 방사선 합병증의 형태로 간접적으로 세포의 손상을 알 수 있는 것이 대부분이며, 현재 발표된 대다수의 연구는 주로 세포주를 이용한 시험관내 실험이 많아 인체 적용에 많은 문제가 있음
- ◆ 방사선 손상의 세포 생물학적 연구는 지금까지 분자생물학적 및 세포학적인 영향 연구에 집중되어 염색체 또는 DNA 등을 이용한 방사선 생물학적 기전을 분석하는 여러 가지 측정법들의 시도로 다양한 parameter가 개발되어 있지만 불의의 방사선 피폭자에 대하여 신속하고 간단하게 인체 장애의 정도를 예측할 수 있는 정확한 생물학적 선량 측정법은 아직 수립되어 있지 않음
- ◆ 원폭 피해를 당한 일본에서는 지바의 放射線醫學總合研究所, 히로시마의 放射線影響研究所 및 기타 여러 대학 및 방사선 기초의학연구소를 중심으로 피폭에 의한 염색체 변이와 유전자 변화 등에 관한 연구는 물론 최근에는 우주방사선에 대한 연구가 추진되고 있으며, 특히 일본 정부의 다각적인 지원 하에 활발히 진행

중에 있으며, 피폭자 후송 체계와 진료 체계를 갖추고 있으나, 우리나라에서는 원자력의학원내의 국가방사선비상진료센터가 설립되어 시작단계에 있음

- ◆ 불의의 방사선 재해에 대비하여 미국의 Oak Ridge 연구소, 프랑스의 SCPRI 등에서는 피폭자의 임상 치료에 대한 치료 경험이 있으며, 가상 시나리오를 만들어 실제 상황에 대비한 훈련을 하고 있지만 우리나라는 아직 이에 대한 경험이 없음
- ◆ 방사성 동위원소의 이용 증대와 비과과용 방사성핵종의 사용이 증가하고 있어 불의의 방사선 피폭 사고자에 대한 응급 진료대책의 확립에 필요한 방사선 피폭자에 대한 생물학적 피폭 선량을 예측할 수 있는 생물학적 선량 측정법은 원자력의학원의 방사선선량평가 연구실만이 수행할 수 있는 실정임
- ◆ 국내에는 현재 20기 원자로의 가동에 의한 원자력 발전에 주로 의존하고 있는 국가적 에너지공급체제로 보아 체르노빌 원전사고와 유사한 사고의 발생가능성이 농후하므로 본 연구팀에서 지금까지 연구 개발한 생물학적 방사선 피폭선량 측정법을 이용하여 불의의 방사선 피폭환자들의 분류 (triage)법을 확립하고 있는 중에 있으며, 특히 원자력의학원에서 일어난 방사성 동위원소 도난 사고 시 용의자의 말초 혈액내 임파구를 채취 분석하여 체내 피폭선량을 측정한 결과를 토대로 하여 피폭된 범인을 검거하는데 일조한 바 있음
- ◆ 본 연구팀에서는 IAEA가 추천하고 있는 Dicentric assay, translocation assay, micronucleus assay, prematurely condensed chromosome assay 등과 같은 여러 parameter를 이용하여 방사선 피폭에 따른 세포, 장기 및 개체간의 피폭선량을 예측 산정하기 위한 분석기술법을 수년 동안 연구해 왔으며, 이미 연구 확립된 원자력의학원의 생물학적 선량측정법 수준은 선진국 수준에 도달해 있으며, 현재 방사선 피폭사고 환자에 대해 custom service를 수행하고 있으며, 보다 정확한 방사선 피폭 선량을 위한 정량화와 표준화를 위하여 다각도로 연구추진하고 있음
- ◆ 형광물질을 특정 염색체의 DNA probe에 표지시켜 염색체 재배열을 확인할 수 있는 FISH기법은 Pinkel 등(1986)에 의해 개발된 이후 FISH 기법의 활용성에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있음 (Natarajan et al., 1994, Baucinger et al.,

1993)

- ◆ 비파괴 종사자들에 대해 적용시킬 수 있는 FISH기법은 간기 및 중기 염색체를 대상으로 수행되며 특히 간기 상태의 FISH기법은 주로 이수성과 절단(breakage)을 관찰할 수 있다. 본 연구과제에서는 interphase FISH 방법에 소핵분석을 혼합한 독성기법을 사용하여 소핵내 포함된 염색체를 확인하였으며, 특정 염색체의 이수성과 염색체의 불분리에 대한 정보 및 소핵 내 물질 추정 등 비교적 빠르고 쉽게 다양한 정보를 얻을 수 있다는 장점을 지니고 있음
- ◆ Vral 등(1997)은 림프구에 0.1 - 2Gy 까지의 저선량 방사선을 조사한 후 소핵 분석과 FISH 기법을 병행하여 관찰한 결과 centromeric signal를 포함하지 않은 소핵의 빈도는 크게 증가한 반면, signal을 포함한 소핵은 대조군에 비해 거의 차이가 없었음을 보고하여 방사선 조사에 의해 유발되는 소핵은 대부분이 염색체 절단에 기인하는 것으로 보고하였음
- ◆ Krysgio 등(2001)은 우라늄광부 중 암환자를 대상으로 소핵과 pancentromeric probe를 이용한 FISH기법을 병행하여 분석한 결과 소핵의 빈도는 대조군과 차이가 없었지만 centromere signal을 포함한 소핵의 빈도는 대조군에 비해 낮은 것으로 나타나 signal이 포함되지 않은 소핵이 방사선에 대한 유전적 불안정성을 확인하는데 유용하며 방사선으로 인한 암의 위험성을 예측하는데 유용한 지표로 사용할 수 있다고 보고하였음
- ◆ CBMN 분석 시 관찰되는 bud는 초기에 budding 현상이 세포 분열과정에서 형성되지 않기 때문에 소핵이나 소핵과 관련된 현상으로 간주되어서는 안된다는 보고도 있었으나(Müller and Streffer, 1994) Montero등(1997)은 binucleated 세포에서 소핵과 비슷한 구조를 가지고 있지만 딸핵에 연결되어 있는 구조를 발견하여 이를 chromatin bud라고 명명 하였는데 이 구조는 소핵의 빈도가 증가하면 비례적으로 증가된다고 보고하였음
- ◆ Serrano-Garcia와 Montero-Montoya(2001)는 사람의 림프구에 소핵을 유발하는 colcemid 및 mytomicin C를 in vitro 처리한 결과 소핵과 chromatin bud가 비례적으로 유발된다는 것을 보고하였으며 bud는 증폭된 gene의 형성 및 진행을 관찰

하기 위한 생물학적 지표로서 활용하기에 적합하다고 제시되고 소핵형성이 염색체 절단이나 염색체 불분리현상 외에 유전자 증폭에 의해서도 기인될 수 있다는 실험적 증거가 제시되어졌음 (Mitchell and Norman,1987, Crott et al., 2001, Serrano-Garcia and Montero-Montoya, 2001)

- ◆ 또한 Shimizu 등(1998, 2000)은 암세포를 대상으로 소핵과 interphase FISH를 수행한 결과 bud 및 소핵 안에 double minutes(DMs)를 확인함으로써 bud와 DMs와의 연관성을 제시하였으나 이들의 활용과 생성기전에 대한 연구는 미비함
- ◆ 국내에는 방사선 피폭의 생물학적 감시자로서 FISH기법을 이용하려는 연구는 극히 드물어 제한적으로 이루어지고 있으며 특히 interphase FISH 기법과 소핵 분석법을 병행하여 생물학적 선량계로서 활용하고자 하는 연구는 본 연구자 이외에는 시도되지 않고 있음
- ◆ 또한 CBMN내 증폭된 gene의 형성 및 진행을 관찰하기 위한 생물학적 지표로서 제시된 bud와 이동원 염색체라 추정되어지는 NPB에 대한 연구는 국내에서 아직까지 이루어지지 않았음
- ◆ 인체에 대한 유전독성 평가는 기타 생물학적 실험법을 이용하여 투여용량, 경로, 세포의 유형 등을 근거로 수행되며 최종적으로 인체에 대한 결과 도출의 가능성을 확인하는 것이며, 세포유전학적 분석에 있어서 림프구는 주로 사용되는 세포로, 비교적 수명이 길고, 정상상태에서는 분열하지 않으며 표본의 채취가 용이하여 특히 방사선 피폭에 대한 생물학적 선량측정 방법으로 많이 사용되고 있으며, 기존의 염색체 분석법에 비하여 미소핵검사는 염색체 검사에 관한 특별한 숙련이나 기술 없이도 분석이 비교적 쉬우며 단기간에 수행될 수 있음
- ◆ 미소핵은 전리방사선의 직접효과 또는 free radical에 의한 염색체의 centromere의 부재(acentric fragment), 두개 이상의 centromere 존재, kinetochore의 결손 또는 방추사의 손상 등에 의해 세포분열 시 주핵(main nucleus)에 포함되지 못해 형성되는 것으로 알려져 있음
- ◆ 동물을 활용한 환경방사선 피폭의 생물학적 선량 측정을 위한 과제를 수행하여 확립된 ecobiodosimetry법을 적용하여 환경 방사선의 영향 등에 관한 지속적인

연구가 계속되어야 할 것으로 사료됨.

◆ 현기술상태의 취약성 :

- ▶ 방사선 장해에 대한 연구는 국내에서는 본 원자력의학원을 비롯한 방사선보건연구원, 서울대병원, 국립보건원 등에서 염색체 변이에 대하여 일시적으로 연구한 전례가 있지만, 현재의 상황은 원자력의학원에만 실제상황에서 피폭환자의 피폭선량을 체계적으로 정확히 측정할 수 있는 방법이 확립되어 있으므로 multi-casualties 사고를 대비할 수 있는 전문가 양성에 노력을 기울여야만 할 시점임
- ▶ 방사선의 생물학적 선량측정법을 통하여 방사선에 의한 발암 및 기형 발생의 예측과 인체의 세포 조직 간의 방사선 감수성의 차이를 관찰하여 방사선 피폭자의 효과적인 치료 대책에 활용할 만한 기초적인 연구 자료가 미미한 실정임
- ▶ 외국에서 보고 된 생물학적 선량측정법의 parameter에 대한 방사선 감수성과 적용성은 보고자의 견해와 연구 환경 등을 고려하여 방사선 피폭 사고자의 장해를 방호와 방사선 치료 암환자의 치료 효율 평가 및 방사선 인체 장해 평가에 활용할 수 있는 방사선 기초 의학의 자료로만 이용 가능함
- ▶ 방사선 치료는 물론이고 방사선에 종사자뿐만 아니라 폐기물 처리 등으로 발생되는 인체 내의 방사선 피폭 정도를 정확하게 측정할 수 있는 지표를 많이 개발하였지만 방사선에 대한 한국인의 개체별 특성 등 여러 가지의 factors를 고려할 자료가 미비함
- ▶ 방사선에 의한 DNA 및 염색체 이상은 관찰이 가능하지만 방사선 피폭 선량에 따른 발암 및 기타 인체 장해의 발생 빈도에 대한 정확한 자료는 현재 없음
- ▶ 현재까지 연구된 결과에 의하면, 방사선 피폭에 의해 비특정 부위에 노출된 인체의 장해 발현은 말초 혈액내의 임파구 등에서 미세핵 분석법, 염색체 변이 등을 통한 생물학적 피폭 선량 측정법 및 방사선피폭으로 인체 배설물 등

에 생성 함유된 biomarker의 농도를 통하여 측정하지만 아직 대부분 피폭선량, 선량율, 선질, 피폭시간 및 피폭 부위 등에 따른 문제와 피폭선량 산정에 필요한 요소의 적용문제가 해결되지 않아 이들 방법을 통한 측정 결과는 부정확할 수 있으므로, 지리적 환경적인 요소가 고려된 parameter을 개발 검색하여 실제 상황에서 이용 가능한 방법으로 정량화 및 표준화하여 우리나라 사람의 실정에 맞는 방사선 생물학적 피폭선량 측정법을 확립해야 함. 그러나 피폭 가능성이 있는 사람의 장해 발현 예측과 발현된 인체 장해를 다각적이며 체계적으로 파악할 방법이 없어 방사선 피폭자에 대한 진료 대책 수립이 어려운 실정임

- ▶ 불의의 방사선에 대한 노출 위험이 고조되고 있는 현 시점에서 체내외의 방사선 피폭선량 측정법 확립이 선행되어야 체계적으로 방사선 안전 관리 또는 응급 진료 체계를 구축할 수 있을 것으로 생각됨
- ▶ 불의의 방사선 피폭으로 인한 방사선 피폭자의 인체장해를 치료하고 추적 관리를 통하여 방사선 피폭자의 예후 예측을 위한 환자관리체계와 이들 환자에 대한 방사선 만성 효과 및 인체 영향 평가를 장기적인 안목에서 체계적이고 지속적으로 추적 관리할 수 있는 국가 방사선 비상 진료 센터의 행정체계 뿐만 아니라 비상진료에 관한 실험실 연구의 활성화도 시급한 상황임. 일본 지하에 소재하고 있는 放射線醫學總合研究所 (NIRS)의 체제가 좋은 모델이 될 수 있음.

제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

- ◆ 방사선 분야의 선진국은 IAEA가 제시하고 있는 수준의 방사선 생물학적 선량평가 기술인 dicentric assay, micronuclei assay, translocation assay, PCC assay 등의 기술을 보유하고 있음
- ◆ 국내에서는 본 연구팀만이 IAEA 기준의 방사선 생물학적 선량평가 기술을 보유하고 있는 실정이므로 본 연구과제가 지니는 기술개발 현황의 위치는 매우 높은 위치에 있다고 평가할 수 있으며, 계속적으로 국내 동일 분야의 연구자들에게 표준 기술을 전수할 계획임
- ◆ 방사선 분야의 선진국에서도 방사선 장해에 대한 분자생물학적 연구를 통해 얻은 많은 parameter를 방사선의 생물학적 선량측정법에 활용하고자 많은 연구가 수행되고는 있지만 본 원자력의학원이 보유하고 있는 방사선 생물학적 선량평가와 비교해서 기술적인 차이가 거의 없으며, 오히려 몇몇 기술 분야에서는 앞서 있는 실정임
- ◆ 방사선 피폭 사고의 대처 능력에 대해서는 일본 NIRS의 방사선 생물학적 선량측정팀과 같은 경우에는 Tokaimura 우라늄 누출사고로 피폭된 환자의 체내 피폭선량의 예측 등과 같은 실전 경험이 풍부하지만 국내에서는 아직 큰 사고가 없었던 관계로 만약의 사태에 대비한 연구자들의 능력 및 multi-casualties 사고를 대비할 수 있는 전문가 양성에 노력을 기울여야만 할 상황이므로 국내에서는 본 연구과제를 수행한, 국내 최고의 기술을 보유하고 있는 원자력의학원 방사선선량평가연구실에서는 계속적으로 국내 동일 분야의 연구자들에게 표준 기술을 전수할 계획임

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행내용

1. 개발된 방사선 피폭 선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립

가. 염색체 이상법 (DC)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립

- 채혈 및 방사선 조사: 건강한 20대에서 40대의 성인 남녀의 말초혈액(각 조사군당 2ml)을 제공받은 후, 각각 15ml conical tube에 2ml씩 분주한다. 방사선 조사는 선량을 3.6Gy/min인 Gammacell 3000 Elan (Nordion international INC.) ¹³⁷Cs source에서 저선량은 선량을 0.11cGy/min인 LDI - KCCH 137에서 1, 3, 5, 10 rad, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8 Gy 씩 각각 조사 후 37° C도에서 3시간 배양 (CO₂ incubator)한다 .
- 세포 배양: 각각의 conical tube에 FCS 20%, kanamycin 60 μg/ml를 포함하는 RPMI 1640 배지 8ml과 PHA-m form 1ml (3 μg/ml)를 가한 후, 37도 incubator에서 46시간 동안 배양한다. 세포 배양을 시작한지 46시간이 지난 후에 colcemid 200 μl - 500 μl (10 μg/ml)을 가한다.
- Harvesting: 배양된 세포를 1500 rpm에서 10분 동안 원심분리(또는 2000 rpm에서 5분)한 후 상등액을 재빨리 따라 버린다. 신선한 0.075M KCl 용액 (저영양액, 미리 37도 수욕상에서 데워진 액을 이용할 것) 8ml를 기벽을 통해 조심히 가한 후, 격렬하게 위, 아래로 수초간 흔든다. 37도 수욕상에서 20분간 반응시키고, 상온으로 꺼내 신선한 고정액 (조성이 acetic acid : methanol = 1 : 3인 용액, cold상태 유지)을 2ml씩 conical tube에 천천히 기벽을 따라 가한다. 조심히 위, 아래로 서너번 흔든 후 상온에서 각각 20분간 방치한다. 1500 rpm에서 10분동안 원심 분리한 후 상등액을 조심히 따라 버린다. 각각 conical tube에 고정액을 10ml 가한 후, 조심히 위, 아래로 서너번 흔든다. 그리고 conical tube 안의 침전이 깨끗한 미색이 될 때까지 고정액을 넣고, 원심 분리하는 작업을 2-3번 더 반복한다.

- Spreading: 깨끗한 침전이 얻어진 세포액을 1500 rpm에서 10분동안 원심 분리한다. 고정액을 침전의 양에 따라 조절하여, conical tube안에 넣고 위, 아래로 pipetting을 하여 골고루 현탁시킨다. 보통 800 μ l에서 1000 μ l을 슬라이드에 분포시킨다.
- 염색: 4 % Giemsa 용액(증류수 48 ml + Giemsa 2 ml)에서 10분간 염색한 후, 5분 동안 증류수에 담가 washing한다. 얼룩이 생기지 않게 타올로 조심히 눌러 슬라이드 위의 물기를 제거한 후, 자연건조 시킨다. 영구 보존을 위하여 슬라이드에 canadian balsa를 두 방울 떨어트린 후 coverslip을 덮는다. 남아있는 sample은 충분한 양의 고정액을 가한 후, 20C 냉동고에 영구 보관 가능하다.
- 분석 방법: 첫째, 각 방사선 조사군에서 500 -1000개의 metaphase상태인 염색체 중 이상 발현(dicentric, trivalent, ring, fragments, dots)을 보이는 세포 수, 이상 발현의 종류 및 그 수를 count한다. 둘째, 방사선량에 따른 이상 염색체를 가진 임파구수 및 이상염색체 수, 방사선량에 따른 dicentric chromosome과 ring chromosome의 분포를 나타내는 표를 작성한다. 셋째, 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 Gy의 방사선량에 따른 Qdr, Ydr를 구한다.

Ydr, Qdr을 구하는 식은 다음과 같다.

Ydr=dicentric chromosome의 수+ring chromosome의 수/counted metaphase

임파구 수

Qdr=dicentric chromosome의 수+ring chromosome의 수/dicentric

chromosome+ring chromosome을 가진 임파구 수

나. Micronuclei (MN)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립

- Sampling and irradiation: 헤파린 처리된 peripheral blood 10ml(Sodium Heparin 142Units/10ml)을 염색체 이상법과 동일한 선량으로 조사한 후 37°C에 3 h 동안 인큐베이터 안에 보관한다.
- Cell culture: 2ml의 혈액에 medium 8ml(containing FBS 20%, kanamycin 60 μ g/ml in RPMI 1640) 와 PHA(p-form) 5 μ g/ml(mouse: conconavalin A 2.5 ~ 3 μ g/

ml)을 넣어 37°C 인큐베이터에서 44 h 동안 배양한 후 cytochalasin B(3 μ g/ml)를 첨가하고 나서 전 배양시간 68 ~ 72 h 동안 배양한다.

- Harvesting: 1500 rpm에서 10 min 또는 2000rpm에서 5 min동안 centrifuge한 후에 상층액을 재빨리 제거하고 37°C에서 미리 warming-up 시킨 0.075M KCl hypotonic solution을 2ml 넣고 피펫을 사용해서 up&down 시킨다. 그 다음 5ml hypotonic solution을 튜브에 마저 넣고 세계 혼든 후 샘플을 37°C의 water bath에 넣고 20min동안 방치한다. 이 때 시간을 초과해선 안 된다. 샘플을 꺼내서 fixative(Methanol : Acetic acid=3:1) 1ml를 넣고 가볍게 혼든다. Centrifuge에 넣고 2000rpm에서 5min간 돌린다. 상층액을 재빨리 제거하고, fixative 10ml를 샘플에 넣는다. 이 때 fixative solution을 천천히 기벽에 흘려 pellet이 생기지 않도록 해야 하고, pellet이 생겼을 경우에는 재빨리 tube를 흔들어서 pellet이 생기지 않도록 한다. 이러한 과정을 2 ~ 3번 반복한다.
- Spreading: 샘플을 cetrifuge에서 2000rpm , 5 min정도 돌린다. ② fixative solution을 1 ~ 2ml정도 첨가시킨 뒤에 피펫을 사용해 up&down시킨다. 65°C의 waterbath에 rack을 넣고 그 위에 slide를 올려 humidified condition을 만든다. 피펫으로 100 ~ 150 μ l 정도의 샘플을 취해 slide위에 적당히 뿌린다. 약 90초 후에, 슬라이드를 꺼내고, 자연 건조시킨다.
- Staining: 4% Giemsa's stain solution 에 8 min동안 염색한 후 Slide를 6 min동안 물에 담그고 나서 Slide를 꺼내서 kimwipes로 물기를 제거한 뒤, 자연건조 시켜 Canadian balsam을 이용해서 coverslide를 덮는다.
- 분석 방법: Micronucleus(이하 MN이라 부르기로 한다.)는 세포 제 1분열 후기에 염색체 일부가 핵에서 떨어져 나와 생기는 소핵이다. 기본적으로 binucleate cell 상태에 있는 MN만을 count하고, 선량이 높을수록 MN의 수는 증가한다. MN은 전체 1000개의 cell을 세고, 그 중 MNs/cell with MNs과 MNs/total cell scored를 산출해서 각각의 SD와 Mean값을 구한다.

다. Okadaic acid-PCC(premature chromosome condensation)를 이용한 방사선 피폭선량

예측기술 타당성 검토 및 모델 확립

채혈 및 방사선 조사: 신체 건강한 성인 남녀의 말초혈액(각 조사군당 4ml)을 제공받아, 15ml conical tube에 4ml씩 각각 분주한다. 방사선 조사량은 염색체 이상법과 동일한 방법으로 1, 2, 4, 6, 8, 16 Gy를 조사한 후 37°C CO₂ incubator에서 3시간 배양한다.

세포 배양: 각각의 conical tube에 FCS 20%, kanamycin 60g/ml를 포함하는 RPMI 1640 배지 8ml과 PHA-m form 1ml (3g/ml)를 가한 후, 37°C incubator에서 47시간 동안 배양한 후에 okadaic acid를 500nM이 되게 (시판용 25g에 RPMI배지 620 μ l을 가한 후, 100 μ l을 각각 가하면 500nM) 가한다.

Harvesting: 배양된 세포를 1500 rpm에서 10분동안 원심분리(또는 2000 rpm에서 5분)한 후 상등액을 재빨리 따라 버린다. 신선한 0.075M KCl 용액 (저염양액, 미리 37도 수욕상에서 데워진 액을 이용할 것) 8ml를 기벽을 통해 조심히 가한 후, 격렬하게 위, 아래로 수초간 흔든다. 37°C 수욕상에서 20분간 반응시키고, 상온으로 꺼내 신선한 고정액 (조성이 acetic acid : methanol = 1 : 3인 용액, cold상태 유지)을 2ml씩 conical tube에 천천히 기벽을 따라 가한다. 조심히 위, 아래로 서너번 흔든 후 상온에서 각각 20분간 방치한다. 1500 rpm에서 10분동안 원심 분리한 후 상등액을 조심히 버린다. 그 후 각각 conical tube에 고정액을 10ml 가한 후, 조심히 위, 아래로 서너번 흔든다. conical tube안의 침전이 깨끗한 미색이 될 때까지 고정액을 넣고, 원심 분리하는 작업을 2~3번 더 반복한다.

Spreading: 깨끗한 침전이 얻어진 세포 부유액을 1500 rpm에서 10분동안 원심 분리한다. 고정액을 pellet의 양에 따라 조절하여, conical tube안에 넣고 위, 아래로 pipetting을 하여 골고루 현탁시킨다. 보통 800 μ l에서 1000 μ l을 슬라이드에 분포시킨다. 습식법은 65° C 수욕상에 놓인 슬라이드에 분포한 후, 90초 후에 상온에서 자연 건조시킨다. 그리고 건식법은 미리 80% ethanol에 적셔놓은 슬라이드에 분포한 후, 자연 건조시킨다.

염색: 4 % Giemsa 용액(증류수 48 ml + Giemsa 2 ml)에서 10분간 염색한 후, 5

분동안 증류수에 담가 washing한다. 얼룩이 생기지 않게 타올로 조심히 눌러 슬라이드 위의 물기를 제거한 후, 자연 건조시킨다. 영구 보존을 위하여 슬라이드에 canadian balsa을 두 방울 떨어트린 후 coverslip를 덮는다. 남아있는 sample은 충분한 양의 고정액을 가한 후, 20C 냉동고에 영구 보관 가능하다.

- 분석 방법: 첫째, 500개의 세포중 PCC cell, PCC ring의 발현율을 분석한다. 둘째, 각 방사선 조사군에서 50개의 PCC cell중 PCC ring 수를 count한다. 셋째, 0 - 16 Gy에서 PCC ring 수에 따른 용량반응곡선을 구한다.

라. 만성 저선량 피폭환자의 세포 유전학적 평가기술 타당성 검토 및 모델 확립

(1) Slide 전처리: Sample slide 제작과정은 DC assay 과정과 동일하며, 그 이후 과정은 다음과 같다. 먼저 sample slide를 50°C dry overn 에서 2시간동안 건조시키고 slide를 PBS에서 5분간 세척한 후 70%,90%,100% alcohol 에서 각각 5분간 세척하고 alcohol이 다 날아 갈 때까지 자연 건조시킨다. Rnase A(100 μ g/ml/2X SSC) 100 μ l slide에 처리하여 37°C moist chamber에서 1시간 반응 시킨 후 2 X SSC에서 5분간 3회 세척하고 PBS 에서 5분간 세척한다. pepsin(0.005%/10mM HCl)에 담귀 37°C 에서 10분간 반응시킨 후 PBS에서 5분간 2회 세척하고 50mM MgCl₂/PBS에서 5분간 세척한 다. 11. 1% formaldehyde/PBS/MgCl₂에서10분간 세척한 후 PBS에서 5분간 2회 세척하고 70%,90%,100% alcohol 에서 5분간 세척한 후 alcohol이 다 날아 갈 때까지 자연 건조한다.

(2) Probe denaturation and competition

- paint for specific chromosomes: -20°C 에 저장되어 있던 probe와 HB를 꺼내어 어두운 상온에서 5분간 방치한 후 42°C water bath에서 12분간 반응시킨다. sample mixture를 vortex하고 spin down 시킨 후 1개 slide 당 chromosome paints 3 μ l 와 HB 12 μ l를 섞어 65°C 에서 10분, 37°C 에서 1시간 반응시킨다.
- Pan-centromeric probe(CP): CP와 HB를 꺼내어 어두운 상온에서 5분간 방치한 후 37°C 에서 7분간 반응시킨다. 1개 slide당 CP3 μ l 와 HB 17 μ l를 섞어 85°C 에서 10분간 반응 시킨다.

- Prehybridization of slides: slide에 100 μ l 70% formamide/2X SSC/50mM PB를 가하고 80 $^{\circ}$ C Hot plate 에서 5분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 재빨리 차가운 70%,90%, 100% alcohol에 담귀 5분간 세척한 후 alcohol이 날아 갈 때까지 상온에서 자연건조시킨다.
- Hybridization: 반응이 끝난 paints와 CP를 잘 섞어 spin down 해서 25 μ l 씩 slide에 떨어트린다. Cow Gum으로 sealing하여 37 $^{\circ}$ C moist chamber에서 24시간 반응시킨다.

(3) Amplification step: 조심스럽게 Cow Gum을 제거 하고 2X SSC에서 5분간 세척하고 50% formamide/2X SSC에서 5분간 3회 세척한다. 0.1X SSC에서 5분간 3회 세척한 후 0.05% Tween/4X SSC에서 5분간 세척한다. Solution A 100 μ l를 처리하여 37 $^{\circ}$ C moist chamber에서 30분간 반응시킨다. 0.05% Tween/4X SSC에서 5분간 2회 세척한 후 1st layer 100 μ l를 처리하여 37 $^{\circ}$ C moist chamber에서 30분간 반응시키고 0.05% Tween/4X SSC에서 5분간 2회 세척한다. 2nd layer 100 μ l를 처리하여 37 $^{\circ}$ C moist chamber에서 30분간 반응시킨 후 0.05% Tween/4X SSC에서 5분간 2회 세척한다. 3rd layer 100 μ l를 처리하여 37 $^{\circ}$ C moist chamber에서 30분간 반응시킨 후 0.05% Tween/4X SSC에서 5분간 2회 세척한다. 1st layer 100 μ l를 처리하여 37 $^{\circ}$ C moist chamber에서 30분간 반응시키고 2nd layer와 3rd layer 과정을 한번 더 반복한 후 70%,90%,100% alcohol 에서 5분간 세척하고 alcohol이 다 날아 갈 때까지 자연 건조시킨다. DAPI 25 μ l를 처리하여 투명 메니큐어로 sealing하여 관찰전까지 보관한다.

(4) 관찰 및 사진 촬영

형광 현미경 (NIKON, Biophot)을 이용하여 triple band filter인 D/F/TXRD (DAPI/FICT/Texas Red, Chroma Technology Corp. 61002)를 사용하여 FITC, biotin, DAPI를 동시에 관찰하였다.

마. 방사선피폭의 생물학적 선량계로서 FISH 기법을 활용하기 위한 타당성 연구

(1) 소핵 슬라이드 표본작성

(가) 방사선 조사 및 소핵 슬라이드 작성

건강한 사람의 말초혈액을 선형 전자 가속기(LINAC, Vnrian 6/100)로 에너지 6MV x선을 1Gy, 2Gy 및 3Gy 조사(dose rate: 2.00Gy/min)하였다. 방사선이 조사된 말초혈액 1ml에 G1기 DNA 손상회복 억제제인 3-AB 및 Ara C를 각각 $2 \times 10^{-3}M$ 및 $5 \times 10^{-5}M$ 의 농도로 3시간 처리하고 인산완충용액으로세번 세척하였다. 이후 Phytohemagglutinin(PHA) 및 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI배지 9ml과 5% CO2가 공급되는 37°C 항온기에서 44시간 배양한 후 cytochalasin B를 처리한 다음 28시간 추가 배양한 후 소핵 분석 슬라이드를 작성한다. 또한 G2기 DNA 손상회복 억제제인 HU는 배양 41시간 후에 5×10^{-3} 의 농도로 3시간 처리한 뒤 인산완충용액으로 세 번 세척하고 cytochalasin B와 PHA를 처리한 뒤 37°C 항온기에서 24시간 추가 배양한 다음 소핵 분석 슬라이드를 작성한다.

(나) 비파괴 작업 종사자의 소핵 슬라이드 작성

① 연구 대상자: 2000년부터 2001년 까지 방사선에 직접적으로 노출이 되는 생산직 작업자 28명을 노출군으로 선정하였고 사무직 근로자를 비롯한 방사선에 직접 노출이 되지 않는 근로자들 24명을 대조군으로 선정하였다. 연령, 근무년수, 흡연, 음주, 병력, 약 복용과 같은 정보는 채혈 시 함께 수집 되었으며 총 누적 선량 및 연간 선량은 작업자의 피폭 기록을 통해 수집하였다.

② 세포 배양 및 소핵분석 슬라이드 작성: 각 연구대상자로부터 말초 혈액 1ml를 채취하여 10% 우태아 혈청과 phytohemagglutinin (PHA-M), BrdU 그리고 penicillin 및 steptomycin이 첨가된 RPMI 배지 9ml에 넣고 5% CO2가 공급되는 37°C 배양기에서 48시간 배양 한 후 염색체 슬라이드를 작성하였다. 소핵 슬라이드의 경우 배양기에서 44시간 배양한 후 cytochalasin B를 처리하고 37°C 항온기에서 28시간 추가 배양한 후에 슬라이드를 작성하였다.

(2) FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

본 실험에서는 Spectrum Orange가 표지된 c-myc 유전자의 LSI probe(Vysis)와 Spectrum Green이 표지된 pancentromeric probe (Cambio)를 이용하여 interphase FISH를 수행하였다.

- ① 소핵 Slide 준비: 준비된 슬라이드를 $2 \times$ SSC(Sodium chloride, Sodium citrate)용액에 37°C 에서 15분씩 2번 방치한 후 상온의 70%, 85%, 100% Ethanol series에서 각각 2분씩 탈수과정을 거치도록 했다. 탈수된 슬라이드는 $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 70% formamide / $2 \times$ SSC 용액에서 변성(Denaturation)시킨 후 -20°C 의 70%, 85%, 100% ethanol에서 각 2분씩 거친 후 상온에서 건조하였다.
- ② DNA probe 준비: Spectrum Orange로 표지된 c-myc 유전자 DNA probe (Vysis) $1\mu\text{l}$ 에 CEP hybridization buffer $7\mu\text{l}$ 와 $2\mu\text{l}$ 증류수에 섞어 만든 hybridization mix를 어두운 상태에서 $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 변성시킨 후, hybridization시키기 전까지 $45-50^{\circ}\text{C}$ 의 slide warmer에 배치하였다. 또한 Pan-centromeric probe $1\mu\text{l}$ 와 buffer $11.5\mu\text{l}$ 를 $85\mu\text{l}$ 에서 10분간 변성시킨 후, 변성시킨 probe를 소핵 슬라이드에 hybridization시켰다.
- ③ Hybridization: 준비된 슬라이드에 probe를 $10\mu\text{l}$ 를 점적한 후 $22\text{mm} \times 50\text{mm}$ cover glass의 가장자리에 rubber cement(BORDEN)를 적용하여 수분증발을 막도록 한 다음 수분이 유지되는 상자(Humidity box)에 넣어 충분히 hybridization되도록 42°C 의 배양기에서 16시간동안 방치하였다.
- ④ 세척: 슬라이드를 꺼내 Rubber cement를 조심스럽게 제거하고 슬라이드를 72°C 의 $0.4 \times$ SSC(AMRESCO)에 5분간 담궜은 후 꺼내어, $2 \times$ SSC(AMRESCO)에 $50\mu\text{l}$ 0.5% NP-40를 넣은 용액에 담가 2분간 세척하였다. 그 다음, slide를 말리고 DAPI II(4,6-diamidino-2-phenylindole, Vysis)로 대조 염색(counterstain)한 후, -20°C 에서 보관하였다. 또한 Pancentromeric probe를 이용한 FISH의 경우, 슬라이드를 꺼내 Rubber cement를 조심스럽게 제거하고 슬라이드를 37°C 의 $2 \times$ SSC(AMRESCO)에서 5분간 방치한 다음 50% fomarmide/ $2 \times$ ssc에 37°C 5min 간 담근다. 37°C 의 $2 \times$ SSC(AMRESCO)에서 5분간 세척 과정을 거쳤다. 이후 슬라이드를 건조시키고 amplification kit (Cambio)를 사용하여 증폭시킨 다음 DAPI II로 대조 염색한다.

(3) 관찰 및 사진 촬영

형광 현미경(NIKON, Biophot)을 이용하여 triple band filter인 D/F/TXRD (DAPI/FICT/Texas Red, Chroma Technology Corp. 61002)로는 Spectrum Orange, Green 및 DAPI를 동시에 관찰하였으며, UV-2A filter(NIKON, DM400)로는 DAPI를 관찰하였다.

(4) 소핵, bud 및 NPB 측정방법

본 연구에서는 Fenech (2000) 의해 제안된 분류기준에 따라 소핵을 분석하였다. 즉 두 개의 핵을 지닌 세포(Binucleated cells)의 선택기준은 두 개의 본 핵은 대체적으로 같은 크기이고 본 핵의 경계는 세포질과 구분되어야 하는데 핵질에 의해 본 핵이 연결되어진 경우만을 분석대상으로 하고 소핵은 본 핵의 1/3이하의 크기로 본 핵과 구분되는 것만을 분석대상으로 하였다. 딸핵에 연결되어 소핵처럼 보이지만 소핵 분류 시 제외되었던 bud는 Fenech (2000)에 의해 제시된 기준에 의거하여 분석하였다. Bud의 모양과 크기는 MN과 비슷하지만 이는 핵과 직접적으로 연결되어 있거나 bud의 지름보다 더 가는 선으로 연결되어있는 것을 분석대상으로 하였다. 또한 두 개의 딸핵이 연결되어서 이동원 염색체라 추정되어지는 NPB는 Fenech(2000)의 분류기준에 따라 두개의 본 핵이 본 핵 지름의 1/4 이하의 선으로 연결되어 있는 경우만을 분석대상으로 하였다. c-myc 유전자가 존재하는 8번 염색체의 방사선에 의한 이수성에 의한 평가의 기준은 Sgura et al.(1997)에 의해 제시된 기준에 의거하여 분석하였다.

㉞ 정상세포(하나의 염색체에 대한 기준)

- 하나의 딸세포 안에 2개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 2개의 signal : 2+2

㉟ 이수성 세포

- 하나의 딸세포 안에 3개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 1개의 signal : 3+1
- 하나의 딸세포 안에 4개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 0개의 signal : 4+0
- 하나의 딸세포 안에 2개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 1개의 signal과 소핵 내 1개의 signal : (2+1)+1
- 하나의 딸세포 안에 3개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 0개의 signal과 소핵 내 1개의 signal : (3+0)+1

- 하나의 딸세포 안에 1개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 1개의 signal과 소핵 내 2개의 signal : $(1+1)+2$
- 하나의 딸세포 안에 2개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 0개의 signal과 소핵 내 2개의 signal : $(2+0)+2$

(5) 통계분석

SPSS 10.0 통계패키지와 SAS 를 이용하여 소핵, 이수성, bud 및 NPB 빈도와 소핵 내 signal 빈도의 양-반응 분석은 켄달 τ 값을 가지고 분석했으며 방사선만 조사된 경우와 손상 회복 저해제를 처리하여 나타난 결과의 비교는 Mann-Whitney를 이용하여 분석하였다. 또한 signal을 포함하는 소핵(MNC+)과 signal을 포함하지 않는 소핵 (MNC-) 빈도의 결과는 Mann-Whitney를 이용하여 분석하였으며 노출 선량, 근무년수에 따른 소핵의 빈도는 켄달 τ 값을 가지고 분석하였다.

2. 새로운 피폭 선량 예측 기술 개발

가. 생화학적 피폭 예측 신규 기술 개발

(1) 피부 (생인공 피부) biosensor 법 확립

raft culture한 사람의 표피 조직에서 방사선 선량에 따른 biosensor 인 P53을 면역조직화학적으로 관찰하여 방사선에 노출된 피부의 피폭선량을 측정할 수 있는 방사선 생물학적 피폭선량 측정법을 개발하고자 인체 피부 keratinocyte의 raft culture로 완전히 계층화된 피부 조직으로 만들었으며, 계층화된 피부에 ^{137}Cs γ -rays를 조사한 후 각각 4 시간, 24 시간 후의 조직 절편을 취하여 피폭 선량에 따른 biosensor 인 P53의 출현 빈도를 광학현미경적으로 관찰하였다. biosensor인 P53의 관찰은 면역조직화학적으로 염색을 시행하였으며, H&E (hematoxylin/eosin) 염색을 대조군으로 하였다

(2) P21 biosensor 법

(가) 방사선 조사: 방사선 조사는 Human blood lymphocyte를 대상으로 선량을 3.6Gy/min인 Gammacell 3000 Elan (Nordion international INC.) ^{137}Cs

source에서 저선량은 선량을 0.11cGy/min인 LDI - KCCH 137에서 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 2, 4 Gy 씩 각각 조사하였다.

(나) 단백질 추출: lymphocyte를 PBS로 washing하고 cell lysis buffer(1% NP 40, 10mM tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA)를 1ml첨가한 후, 단백질 분해 효소와 탈인산화 효소의 작용을 억제하기 위해 2mM phenylmethyl-sulfonylfluoride (PMSF)와 1mM Sodium orthovanadate를 함께 첨가하고, 4°C에서 20분간 처리하여 세포를 용해시킨 후 12,000rpm, 4°C에서 20분간 원침한 후 상등액을 취하였다.

(다) 단백질 농도의 측정: BCA방법을 이용하여 다음과 같이 농도를 측정하였다. 각각의 단백질 용액 10 μ l을 BCA(bicinchoninic acid) : 4% CuSO₄ = 49 : 1로 혼합된 solution 2ml에 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 562nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도는 bovine serum albumn으로 미리 산출된 standard curve와 비교하여 환산하였다.

(다) Western Blot Analysis: SDS-PAGE를 행한 후 gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane에 100mV로 overnight transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane를 3% ponceau에 10분간 고정시키고, 증류수로 3번 세척한 후 blocking buffer(5% FBS, 0.2% Triton X-100, in PBS)로 1시간 상온에서 흔들어주며 반응시켰다. Primary antibody solution으로 1시간 동안 incubation한 후, 이를 blocking buffer로 3회 세척 후 horse radish conjugate(HRP) secondary antibody solution으로 1시간 동안 incubation하였다. 다시 blocking buffer로 3번 세척 후 membrane에 ECL solution을 첨가하여 발광시킨 후 X-ray 필름에 노출 시켜 단백질 발현 변화를 확인하였다.

나. 생물학적 피폭 예측 신규 기술개발 - Ecobiodosimetry (환경 방사선 생물학적) 지표 개발: 본 연구에서는 소, 염소 및 돼지 유래의 림프구에서 CB세포의 형성 빈도 및 방사선 조사 후 발생하는 미소핵의 상황을 분석하고 소, 재래산양 및

돼지를 대상으로 혈액수치 및 세포질 분열차단 림프구에서 발생된 미소핵을 측정하여 울진, 월성 및 영광원자력발전소와 대조지역의 차이를 관찰하였으며 미소핵 발생 정도를 시험적으로 산출된 방사선 피폭 선량-반응 곡선식에 적용하여 추정선량을 파악하여 동물을 이용한 방사선 피폭 선량측정법을 확립하고 방사선 환경 평가 적용 가능성을 파악하였다.

(1) 연구범위

원자력시설(울진, 월성 및 영광 원자력발전소) 지역 대상동물(소, 재래산양 및 돼지)을 선정하여 시료를 채취하고, 각 동물 종을 대상으로 확립된 세포질분열차단 림프구 미소핵 측정법을 적용하여 최적 선량-반응식을 도출하고, 대상 동물의 림프구유래 미소핵을 측정하여 방사선 추정 피폭 정도를 평가하며 정상 대조지역과 비교 하였다.

(2) 연구내용

(가) 혈액 수치 관찰

실험대상 동물의 말초혈액을 헤파린이 첨가된 vacutainer에 채취하여 동물전용 혈구분석기(Hemavet 850+, CDC Technologies Inc., USA)를 사용, 백혈구, 적혈구 및 혈소판의 상태를 검사항목 별로 분석하였다. 백혈구는 총백혈구, 호중구, 호산구, 호염구, 단핵구, 림프구를 감별 측정하고 총수 및 백분율을 산출하였으며, 적혈구는 총적혈구, hemoglobin, hematocrit 등을 산출하였다.

(나) 실험세포 및 배양

시험적 방사선 조사 후 선량-반응식을 도출하기 위하여 광주인근 지역의 건강한 3두의 소, 재래산양 및 돼지 말초혈액을 사용하였고, 월성, 울진 및 영광 원자력발전소 인근 2 km 이내 사육 농가의 소 및 전남 화순 지역 사육 소 각 10-15두의 혈액을 채취하여 원전 지역 사육 동물 실험군과 대조지역 사육 동물 실험군으로 적용하였다. 월성원자력발전소(5 두) 및 울진원자력발전소(6두) 내의 사육장에서 사육중인 재래산양 (1 - 2세) 및 전남 화순 지역(8두) 사육 재래산양 (1-2세)의 혈액을 채취하여 원전 사육 재래산양 실험군과 대조지역 사육 재래산양 실험군으로 적용하였다. 영광원자력발전소 주변 사육 돼지(10두) 및 전남 화순

지역 사육 돼지(10두)(1-2세)의 혈액을 채취하여 원전 사육 돼지 실험군과 대조 지역 사육 돼지 실험군으로 적용하였다. Histopaque-1077 kit (Sigma Chemical Co.)를 이용하여 림프구를 분리하여 HBSS (Sigma Chemical Co.)에 수세한 후 15% heat inactivated fetal bovine serum (Hyclone Co.), L-glutamine (Sigma Chemical Co.), 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co.)과 항생제가 첨가된 RPMI1640 (Gibco BRL) 배지에 부유시켰다. 림프구는 multi-well tissue culture plate (Falcon, Becton Dickinson)를 사용하여 배지 ml당 5×10^5 개의 농도로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지 ml당 1% 및 2%의 phytohaemagglutinin (PHA, Sigma Chemical Co.)을 첨가하고 2, 4, 6 또는 12 µg의 cytochalasin B (Cyt-B, Aldrich Chemical Co.)를 첨가한 후 이핵세포를 얻기 위한 최적농도를 파악하였다.

(다) 방사선조사

시험적 방사선 조사 후 선량-반응식을 도출하기 위하여, 분리된 림프구는 멸균된 polystyrene tube(Falcon, Becton Dickinson)에 분주하여 PHA첨가 직전에 1, 2, 4 Gy의 ⁶⁰Co 감마선을 1,000 cGy/min의 선량율로 1회 조사 (Gammacell 3000 Elan, Nordion International Co., Canada)하였다.

(라) Cytokinesis-blocked method

Cyt-B는 dimethylsulphoxide(Sigma Chemical Co.)에 ml당 2mg의 양으로 원액을 만들어 -70 °C에 보관하였으며 실험을 통하여 얻어진 최적용량을 적용하여 배양 44시간에 첨가하였다. 배양개시 후 72시간에 세포를 수확하였으며 cytocentrifuge를 이용하여 검경용 표본을 만들고 건조 후 Diff Quik kit(International Reagents Corp.)를 이용하여 염색하였다.

(마) 미소핵의 검경

미소핵은 유침하에서 1,000배 배율의 현미경으로 관찰하였으며 주핵에서 분리된 구형으로 지름이 주핵의 50% 이하이며 이핵세포의 세포질내에 존재하여야하고 빛의 반사와 같은 형상이 없고 염색성이 주핵에 비하여 진하지 않은 것을 미소핵으로 판정하였다. data분석은 Graph PAD In Plot program을 사용하였다.

제 2 절 연구 결과

본 연구과제에서는 방사선 피폭환자의 체내 흡수선량을 측정하여 예후를 예측할 수 있는 다양한 방사선 생물학적 피폭선량 측정법을 확립하고자 수행하였으며, 현재 우리나라에서는 방사선재해에 대한 비상 진료 체계 확립을 위한 대책은 행정적으로만 수립되어 있으며, 실제상황에 대한 대처 능력은 초보적인 수준이다. 그러므로 본 연구과제는 국민의 안정적인 생활과 원자력 에너지에 대한 불안감 해소와 함께 원자력 기술기반의 확립에 지대한 영향을 끼칠 수 있을 것으로 사료되어 불의의 방사선 사고에 대한 방재 대책의 일환으로 기존의 확립된 방사선 생물학적 선량측정법과 새로운 방사선 생물학적 피폭 선량 측정을 위한 지표개발을 통하여 방사선 피폭선량 예측과 인체 장애 정도를 평가할 수 있는 기반기술의 개발 및 방사선 영향 감소 대책을 수립함으로써 향후 발생 가능성이 있는 피폭환자의 비상 진료체계 구축에 필요할 것으로 판단되어 본 연구를 수행하였다

1. 개발된 방사선 피폭 선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립

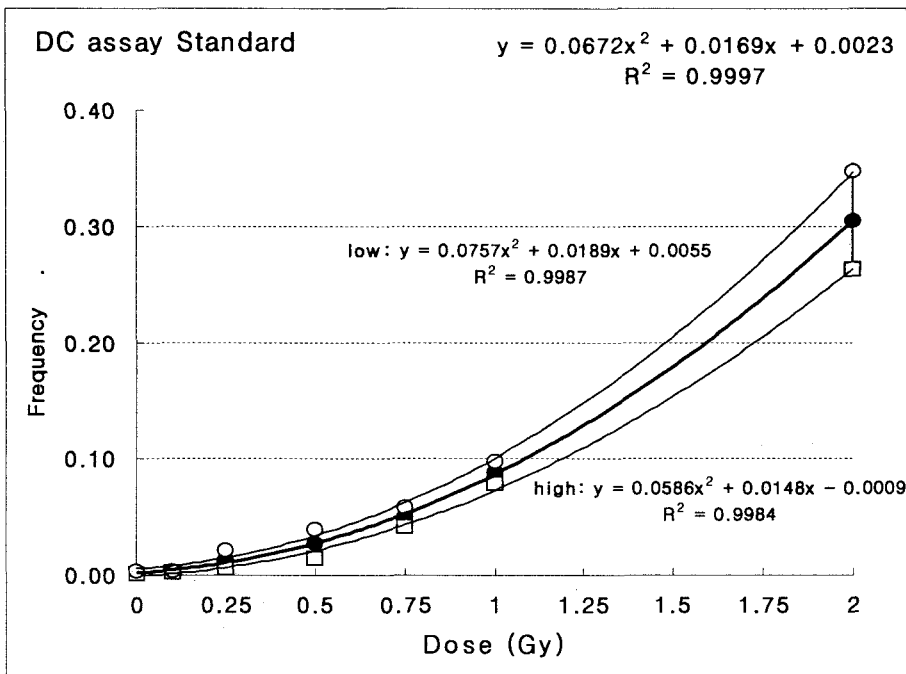
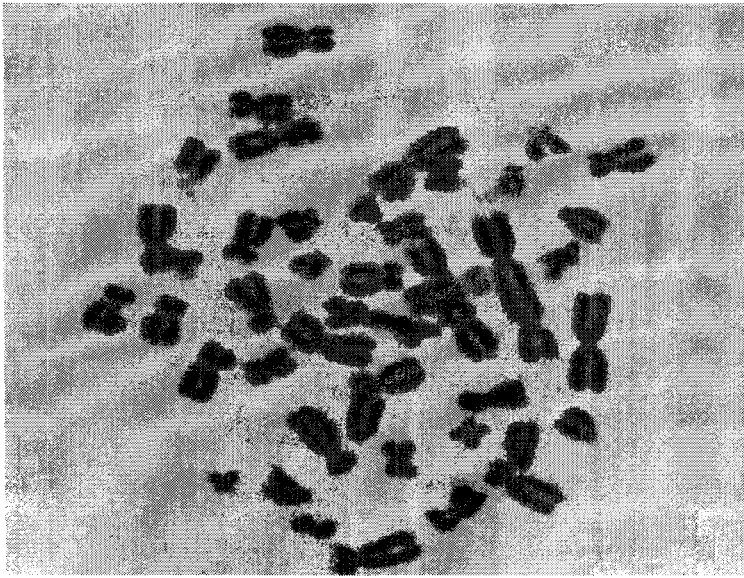
가. 염색체 이상법 (conventional chromosome dicentric assay)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립: 기존의 확립된 방사선 피폭선량 측정법 중에서 IAEA에서 권고하고 있는 방사선 피폭환자의 체내 흡수선량을 가장 정확하게 예측할 수 있는 방법은 conventional chromosome dicentric assay 법으로 숙련된 연구자만이 반복적으로 정확한 data를 얻을 수 있는 고도의 기술과 시간을 필요로 하는 연구방법이며 정량화의 기술에 대해서 타당성을 검토한 결과 다음과 같은 공식을 산출하였다.

$$\text{Average: } Y = 0.0023 + 0.0169D + 0.0672D^2, R^2 = 0.9997$$

$$\text{Low: } Y = 0.0055 + 0.0189D + 0.0757D^2, R^2 = 0.9987$$

$$\text{High: } Y = -0.0009 + 0.0148D + 0.0586D^2, R^2 = 0.9984$$

(단, Y는 임파구 1개 당 DC 수이고, D는 피폭선량(Gy)이다)



나. 미소핵 분석법 (micronuclei assay)에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립: 기존의 확립된 방사선 피폭선량 측정법 중에서 방사선에 피폭된 환자의 체내 흡수선량을 가장 정확하게 예측할 수 있는 방법인 conventional chromosome dicentric assay 법과 함께 적용하여 빠른 시간 내에 data를 얻을 수 있는 방법으로 숙련된 연구자만이 반복적으로 정확한 data를 얻을 수 있는 고도의

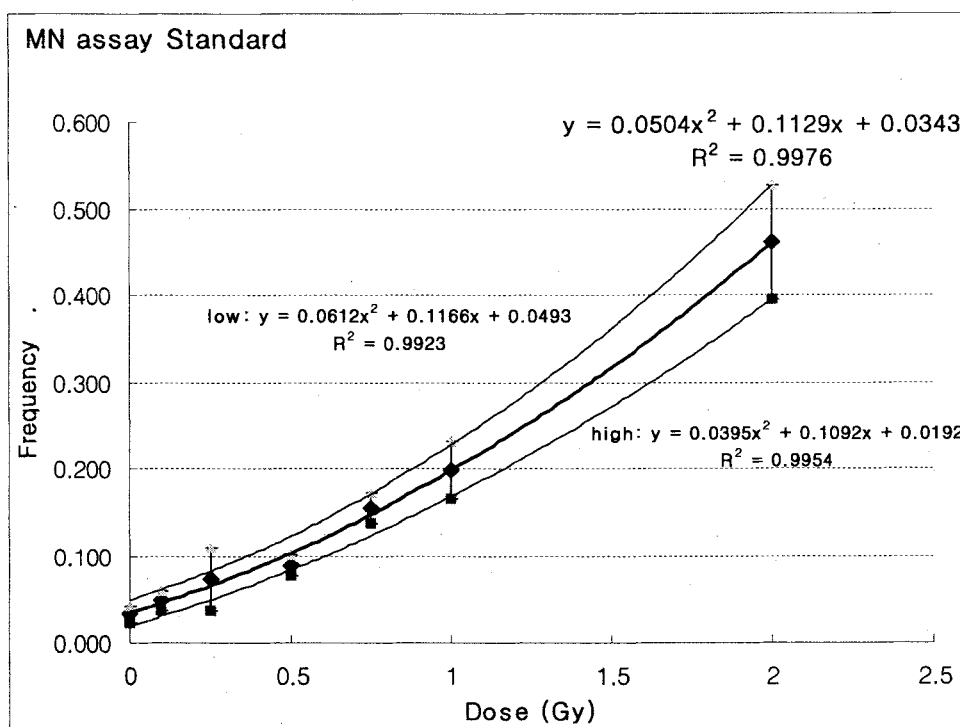
기술과 시간을 필요로 하는 연구방법이며, 방사선 외의 영향을 배제하기 위해서는 dicentric assay 와 함께 적용하는 것이 필수적인 방법이며 정량화의 기술에 대해서 타당성을 검토한 결과 다음과 같은 공식을 산출하였다.

Average: $Y = 0.0343 + 0.1129D + 0.0504D^2, R^2 = 0.9976$

Low: $Y = 0.0493 + 0.1166D + 0.0612D^2, R^2 = 0.9923$

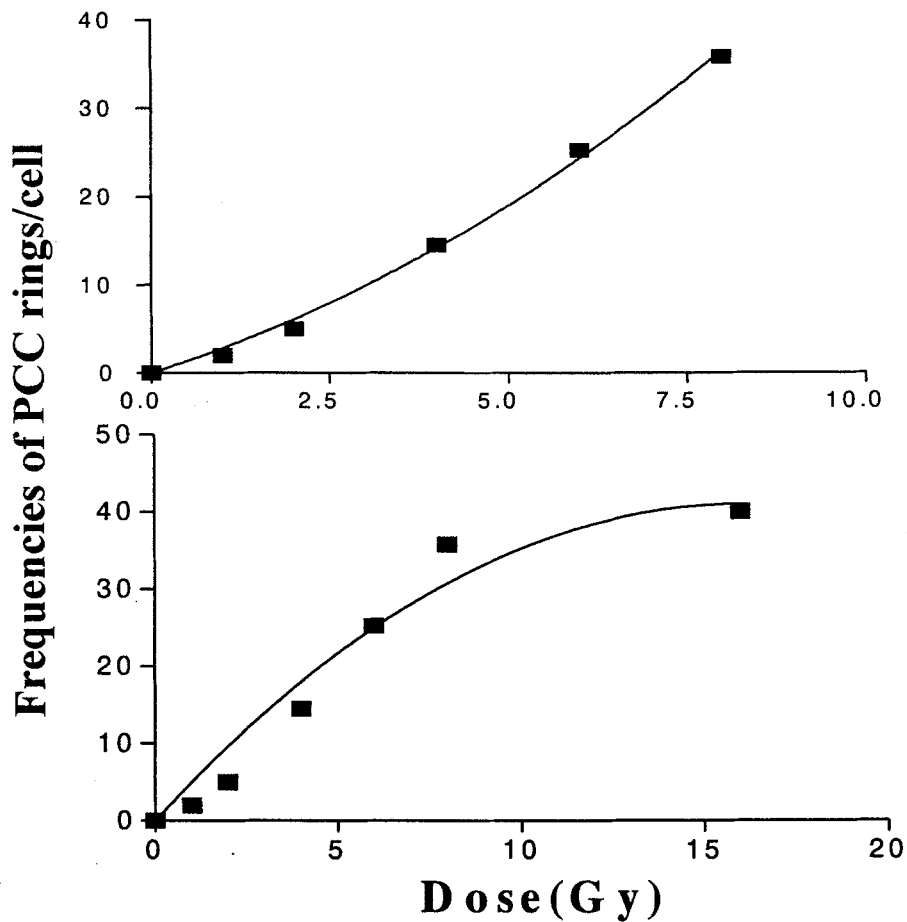
High: $Y = 0.0192 + 0.1092D + 0.0395D^2, R^2 = 0.9954$

(단, Y는 임파구 1개 당 MN 수이고, D는 피폭선량(Gy)이다)



다. Okadaic acid PCC 법에 의한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립: 세포융합을 이용하는 방사선 피폭선량 예측기술에 있어서는 방사선 피폭에 민감한 말초 혈액내 임파구와 CHO (Chinese hamster ovarian cell) 세포와의 세포융합(cell fusion)율이 매우 낮기 때문에 실제 피폭 환자의 정확한 피폭선량을 예측하는데 다소의 문제점이 있는 것으로 나타났다. 그러나 Okadaic acid PCC 법을 이용한 피폭선량 예측기술은 방사선 피폭선량에 따른 선량반응효과가 선량에 의존하여 증가하는 경향으로 관찰되었으며, 선량-반응 효과 관계식은 $y = 46 + (1.113 \pm 0.510)D + (0.372 \pm 0.071)D^2$, $R^2=0.987$ 로 나타났다. 따라서 기존세포 유전학적 선량측정법과 비교 평가하여 본 결과 okadaic acid PCC법은 기존의 세포 유전학적 방사선 생물학적 피폭선량 측정법과 함께 사용하여 방사선 피폭자의 체내 피폭 흡수선량을 산정하는데 좋은 지표로 이용 가능한 것으로 관찰되었다.





라. 만성 저선량 피폭환자의 세포 유전학적 평가기술 타당성 검토 및 모델 확립

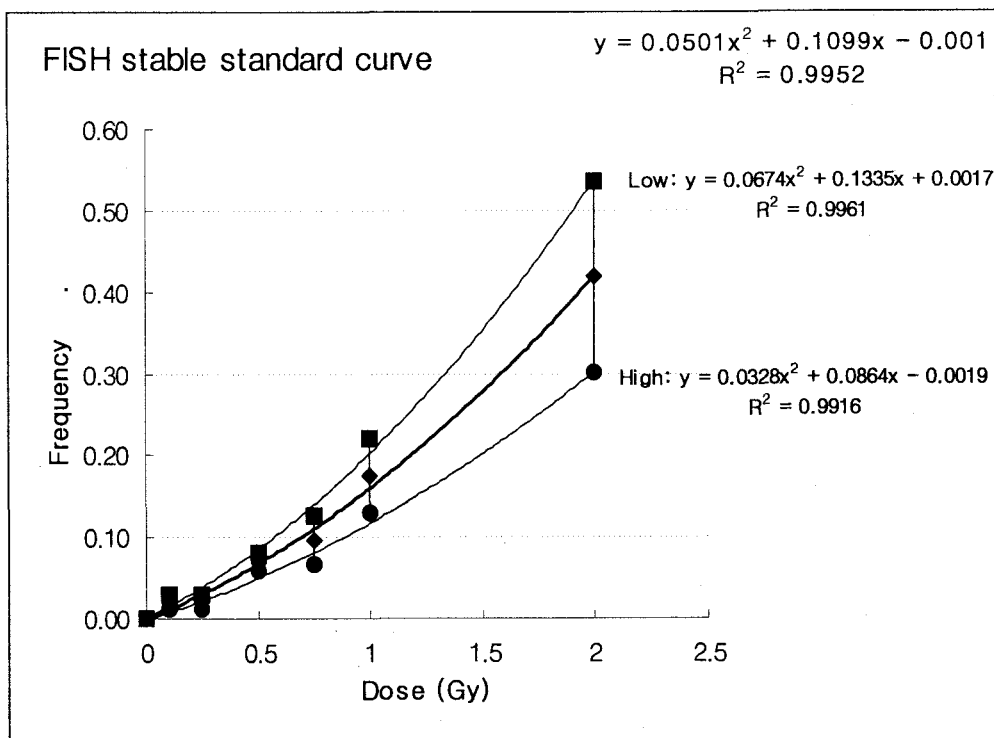
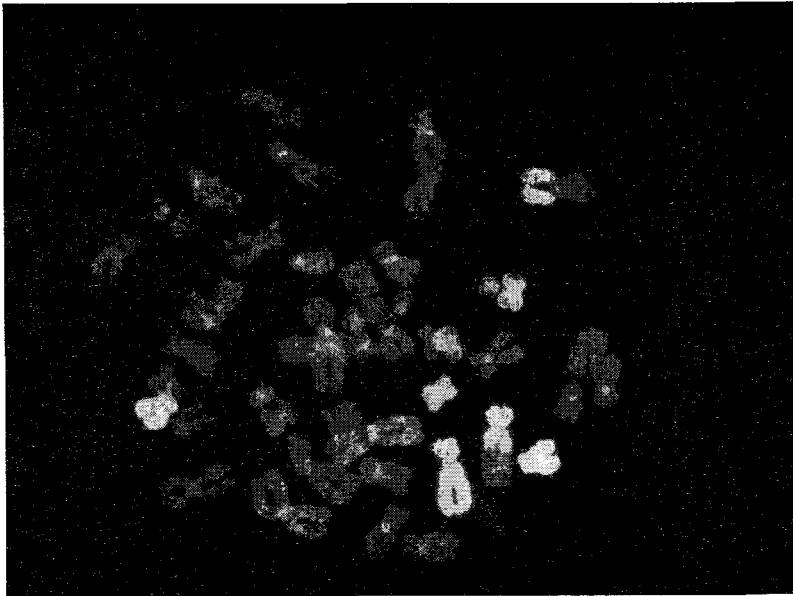
기존의 확립된 방사선 피폭선량 측정법 중에서 방사선에 피폭된 환자의 체내 흡수 선량을 가장 정확하게 예측할 수 있는 방법인 conventional chromosome dicentric assay는 만성 저선량 피폭환자에게는 사용할 수 없는 세포 유전학적 평가기술이므로 IAEA가 권장하고 있는 세포 유전학적 평가기술인 translocation (FISH) 방법을 사용해야만 한다. 또한 이 기술은 만성 저선량 피폭환자와 급성 피폭환자를 동시에 평가할 수 있는 기술이며, 만성피폭환자의 피폭량을 조사하기 위해서는 아래 그림에 나타나있는 data 중 stable translocation을 조사하면 된다. 하지만 본 기술은 매우 숙련된 연구자만이 반복적으로 정확한 data를 얻을 수 있는 고도의 기술과 시간을 필요로 하는 연구방법으로 정량화의 기술에 대해서 타당성을 검토한 결과 다음과 같은 공식을 산출하였다.

Average: $Y = - 0.001 + 0.1099D + 0.0501D^2, R^2 = 0.9952$

Low: $Y = 0.0017 + 0.1335D + 0.0674D^2, R^2 = 0.9961$

High: $Y = - 0.0019 + 0.0864D + 0.0328D^2, R^2 = 0.9916$

(단, Y는 임파구 1개 당 stable translocation 수이고, D는 피폭선량(Gy)이다)



다. 방사선피폭의 생물학적 선량계로서 FISH 기법을 활용하기 위한 타당성 연구 방사선 조사에 의해 유도되는 genomic instability는 여러 생물학적 지표에 의해 연구되어지고 있으며 최근 소핵분석을 위한 Cytokinesis Block Micronucleus (CBMN) 분석의 활용성이 증가되고 있는데 CBMN은 세포질 분열 억제제를 처리하여 세포질 안에 두개의 핵을 가진 세포만을 관찰할 수 있어 첫 번째 분열하는 세포에서의 상태를 정확히 측정할 수 있다는 장점이 있다(Sgura et al., 1997). 또한 CBMN 분석은 소핵 외에 딸핵에 연결되어 소핵처럼 보이지만 소핵 분류 시 제외되었던 bud 및 이동원 염색체라 추정되어지는 Nucleoplasmic Bridge (NPB)를 함께 분석할 수 있는 장점을 지닌다.

일반적으로 소핵형성은 방사선에 의한 염색체 절단이나 염색체 불분리현상에 기인한다고 알려져 있다. 그러나 최근 절단된 염색체의 homologous region에서 recombination 과정이 진행됨에 따라 특정 유전자가 증폭되며 이 증폭된 유전자 (acentric and atelomeric DNA)가 핵 밖으로 빠져나오게 되면서 bud를 형성하며 시간이 지남에 따라 bud는 소핵을 형성한다는 보고가 있다. 따라서 bud는 증폭된 gene의 형성 및 진행을 관찰하기 위한 생물학적 지표로서 활용하기에 적합하다고 보며 더 나아가 소핵형성이 염색체 절단이나 염색체 불분리현상 외에 유전자 증폭에 의해서도 기인될 수 있다는 것을 의미하는데 이에 대한 실험적 증거가 제시되어졌다. Mitchell 과 Norman(1987)는 방사선에 의해 유도된 림프구에서 소핵이 시간에 따라 증가(time dependent increase)하였음을 보였고 48시간 배양했을 때보다 72시간을 배양했을 때 소핵의 빈도가 높았으나 bud의 경우는 48시간 배양했을 때 72시간 배양했을 때보다 높게 관찰되었다. 즉 bud가 세포주기에 따라 본 핵에서 떨어져 나와 소핵으로 형성됨으로 보고하였다. 또한 bud는 사람 림프구를 비롯해 chicken fibroblast, Chinese hamster cells 과 같은 여러 세포종류에서 관찰되었으며 Serrano-Garcia와 Montero-Montoya(2001)는 사람의 림프구에 소핵을 유발하는 colcemid 및 mytomicin C를 in vitro 처리한 결과 소핵과 chromatin bud가 비례적으로 유발된다는 것을 보고하였으며 특히 흡연자와 비흡연자 그리고 Taenia soline

cysticerci 에 감염된 돼지의 혈액에서도 소핵과 bud가 비례적으로 유발됨을 보고하였다. Crott 등(2001)는 bud와 NPB는 소핵과 더불어 사람 림프구에서 folic acid deficiency의 생물학적 지표로서의 타당성을 검증하였고 본 연구 결과에서도 방사선량에 따라 bud 및 NPB의 빈도가 양-반응적으로 증가함에 따라 방사선 노출의 새로운 생물학적 지표로 제시할 수 있다고 시사된다.

본 연구에서는 림프구에 in vitro 상태에서 1, 2 및 3Gy의 방사선 조사 후 각종 DNA 손상회복저해물질, 3-Aminobenzamide(3-AB)와 Cytosine Arabinoside(Ara C) 그리고 G2기에 DNA 복제 및 회복 과정에서 robonucleotide reductase의 작용을 억제하는 Hydroxyurea(HU)를 특정 세포주기에 처리한 다음 소핵, bud 및 NPB를 분석한 결과, 방사선량에 따라 소핵의 빈도가 유의하게 증가하였고 DNA 손상회복 저해물질에 의해서도 소핵이 Ara c, 3-AB, HU순으로 유의하게 증가하였다. 또한 bud의 경우 Ara C만 처리했을 경우에만 bud의 빈도가 유의하게 증가되었으며 HU에 의해서는 약간 증가하였으나 유의하지 않았으며 3-AB에 의해서는 거의 변화가 없었다. NPB의 경우에는 Ara C와 3-AB를 처리했을 경우에만 NPB의 빈도가 유의하게 증가되었으며 HU에 의해서는 약간 증가하였으나 유의하지 않았다.

방사선과 같은 세포독성을 일으키는 물질에 의해 유도된 double strand break(DSB)는 3가지 기전에 의해 회복된다고 알려져 있는데 첫 번째는 homologous recombination(HRR)로서 절단점에서의 원래의 서열로 매우 정교하게 회복시키며, 두 번째는 single strand annealing(SSA)로서 이는 주로 interstitial deletion을 형성하게 되며, 세 번째는 nonhomologous DNA end joining(NHEJ)으로 두개의 손상된 말단점(break end)을 직접 연결시키고 보통 절단 부위에 base pair substitution 삽입 또는 deletion 등 작은 정도의 변화를 일으키게 된다. 일반적으로 NHEJ가 척추동물에서 주된 DSB 회복경로로 알려져 있으나 최근의 연구에서 HRR도 회복기전에 중요하게 관여한다고 알려져 있다(Obe et al., 2002). Takata 등(1998)은 chicken B cell line DT 40을 이용해서 DSB에 대한 회복과정을 살펴본 결과, NHEJ는 세포주기 G1기에 작용하고 HRR는 늦은 S기나 G2기에 관여한다고 보고하였다. 따라서 방사선에 의한 소핵형성은 주로 염색체 절단에 기인하기 때문에 NHEJ가 G1기에 진행되는 염색체

절단의 회복에 관여한다는 것을 고려할 때 NHEJ는 소핵의 빈도에 영향을 준다고 볼 수 있다. 또한 HRR은 주로 S기와 G2기에 작용하기 때문에 염색체 loss 및 non-disjunction을 유도할 수 있는 방추사 또는 kinetochore 단백질 등에 영향을 줄 수 있어 이수성의 빈도에 영향을 미칠 수 있다고 추정할 수 있다. 즉 NHEJ는 염색체 절편을 포함하는 소핵의 빈도에 영향을 주고 HRR은 염색체 전체를 포함하는 소핵의 빈도에 영향을 줄 수 있다고 추정한다면 Ara C와 3AB는 NHEJ 회복기전과 그리고 HU는 HRR 회복기전에 관련된다고 볼 수 있다. 또한 Allio 등(2000)은 p53 wild type cell line인 TK6와 p53 mutant cell line인 WTK1에 bleomycin과 Ara C를 처리하고 chromatid 이상을 보았을 때 p53 mutant cells에서만 Ara C가 염색분체형 이상을 증가시킴으로서 p53-dependent 회복 과정과 Ara C와의 연관성을 보여주었다. 즉 p53과 HRR 회복기전을 고려해 볼 때 Ara C가 NHEJ 회복기전과 더불어 HRR 회복기전에도 관여함을 보여주며 이는 Chung 등(2002)이 Ara C는 HRR 뿐만 아니라 NHEJ 회복에도 영향을 주기 때문에 방사선에 의해 유도된 상호전좌와 이동원 염색체의 빈도를 증가시킨다는 결과로 뒷받침된다. 따라서 Ara C는 NHEJ 뿐만 아니라 HRR 회복기전에 영향을 주어 소핵, bud 그리고 NPB의 빈도를 가장 많이 증가시키는 반면, 3AB는 NHEJ 회복기전에 영향을 미치지므로 bud의 빈도에는 영향이 없으나 소핵과 NPB의 빈도를 증가시키고 또한 HU는 HRR 회복기전에 관여함으로서 소핵 및 bud의 빈도에 영향이 있다고 추정할 수 있으나 정확한 기전을 확인하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. 그러나 본 연구결과에 의하면, bud가 HRR 과정 중에 생성됨에도 불구하고 HU에 의해서는 bud의 빈도가 크게 증가하지 않았다. 이에 대한 설명으로는 다음과 같다. 세포그룹이 cell cycle에 따라 크게 두그룹으로 나뉘는데 본 연구에서 HU는 seeding 후 41시간 뒤에 처리되었다. 이는 cell cycle이 시작되고 첫 번째 세포 그룹에 영향을 더 미칠 것으로 사료되고 분석시 관찰되어지는 binucleated cell의 bud는 두 번째 세포그룹에 속하는 것이어서 이러한 차이점을 지닐 수 있다고 본다. 그러나 본 연구에서 방사선량에 따라 Bud 및 NPB의 빈도 역시 유의하게 증가하였으며 Ara C를 처리한 경우 bud와 NPB의 빈도가 증가한 반면 3AB를 처리한 경우 NPB의 빈도는 증가하였으나 bud의 빈도는 증가하지 않았다. 즉 bud가 Ara C에

의해서는 증가되나 3AB에 의해서는 증가되지 않았다는 것은 bud의 형성과정에 homologous region recombination(HRR)과정이 관여될 수 있다는 것을 시사하고 있다.

또한 Chung 등(2002)은 Ara C와 3AB가 방사선에 의해 유도된 이동원 염색체의 빈도를 증가시킨다고 보고하였다. 이는 NPB가 이동원 염색체로 추정하는데 뒷받침될 수 있으나 하나의 세포에서 존재할 수 있는 다수의 이동원염색체를 확인할 수 없는 제한점이 있기 때문에 이를 구명할 수 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

유전자 증폭은 항암제에 대한 종양의 약제 저항성 및 종양의 진행과정에서도 흔히 나타나는 현상으로 밝혀지고 있다. 종양세포에서 흔히 발견되는 double minutes(DMs)나 homogeneously staining region(HSRs) 또는 abnormal banded regions(ABRs)은 증폭된 암유전자에 의한 결과로 알려져 있다(Collins et al., 1982, Dalla-Favera et al., 1982). C-myc 유전자는 원래 사람의 8번 염색체 말단 (8q24)에 존재하는데 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 또한 종양세포에서는 이 유전자가 전좌되거나 증폭되어 HSR 또는 ABR로 관찰됨이 보고 되고 있다.

본 연구에서는 interphase FISH기법과 소핵분석 방법을 병행한 방법을 이용하여 c-myc 유전자의 증폭을 FISH 기법을 통해 확인함으로써 bud가 c-myc 유전자 증폭의 생물학적 지표로서의 활용가능성을 검증하고 또한 bud가 소핵을 형성하는 또 다른 기전인지 여부를 구명하여 새로운 생물학적 선량계로서 bud의 활용성을 검토하였다. 연구 결과에 의하면 방사선량에 따라 bud 및 소핵 안에 c-myc 유전자의 빈도는 유의하게 증가하였지만 방사선에 의해 유도된 bud 및 소핵의 빈도를 고려해 볼 때 bud와 소핵안의 c-myc 유전자의 signal의 빈도는 13% 미만으로 적게 관찰되었다. 따라서 방사선에 의해 유도된 사람 림프구의 bud의 생성은 c-myc 유전자의 증폭과 연관성이 적은 것으로 사료된다.

또한 본 연구결과에서는 제시하지 않았으나 핵 내 3개 이상의 염색체를 포함하는 고배수성(hyperdiploidy)을 분석한 결과 하나의 핵에서 3 또는 4개의 염색체 signal을 보이는 경우가 대조군, 실험군 모두에서 관찰되었다. 이는 c-myc gene의 증

폭으로 해석되어질 수 있으나 실험상의 오류 즉, spot이나 염색체 probe의 비특이적 결합이거나 염색체 절단의 가능성도 있다(Eastmond et al.,1995). 방사선의 경우 염색체 손상은 거의가 절단에 해당하기 때문에 염색체의 일부, 즉 염색체 절편일 가능성도 있으나 본 연구에서 사용한 염색체 probe는 절단을 확인할 수 없다는 제한점이 있다. 본 연구를 통하여 방사선에 의해 유발된 유전독성을 평가하기 위하여 소핵 및 bud와 NPB 분석은 방사선 피폭시 생물학적 선량계로서 인구 집단에 적용할 수 있음을 확인하였다. 따라서 방사선의 종류 및 선질, 선량에 따라 유전독성의 효과가 달라 지므로 간기상태의 FISH 기법과 소핵 분석은 그 활용성이 증대할 것으로 기대되며, bud 및 nucleoplasmic bridge (NPB) 역시 방사선 조사의 새로운 생물학적 선량계로서의 활용가능성이 증대 할 것으로 기대할 수 있다.

방사선은 그 자체의 에너지로 DNA를 직접적으로 절단하기 때문에 방사선에 의한 상해는 염색체 절단(breakage)이 특징적이며, 염색체재배열, 자매염색체교환 및 소핵 등과 같은 세포 유전 독성을 유발하는 것으로 잘 알려져 있으나 방사선에 의해 형성된 소핵은 방사선량이나 방사선질에 따라 그 결과가 뚜렷이 구분되기 때문에 소핵분석이 방사선 감시를 위한 생물학적 선량계로서 활용할 수 있음이 보고 되고 있다 (Vral et al.,1997).

그러나 사람 림프구에 있어서 개인간의 자연발생적인 소핵 빈도수의 변이가 크고 대부분의 자연발생적인 소핵의 기원은 염색체의 불분리 현상에 의해 형성되는 것으로 알려져 있으며 Vral 등(1997)은 림프구에 0.1 - 2Gy 까지의 저선량 방사선을 조사한 후 소핵 분석과 FISH 기법을 병행하여 관찰한 결과 centromeric signal를 포함하지 않은 소핵의 빈도는 크게 증가한 반면, signal을 포함한 소핵은 대조군에 비해 거의 차이가 없었음을 보고하여 방사선 조사에 의해 유발되는 소핵은 대부분이 염색체 절단에 기인하는 것으로 보고하였다. 또한 Krysgio 등(2001)은 우라늄광부 중 암환자를 대상으로 소핵과 pancentromeric probe를 이용한 FISH기법을 병행하여 분석한 결과 소핵의 빈도는 대조군과 차이가 없었지만 centromere signal을 포함한 소핵의 빈도는 대조군에 비해 낮은 것으로 나타나 signal이 포함되지 않은 소핵이 방사선에 대한 유전적 불안정성을 확인하는데 유용하며 방사선으로 인한 암의 위험성을 예

측하는데 유용한 지표로 사용할 수 있다고 보고하였다. 이는 소핵분석과 FISH기법을 동시에 이용하여 방사선에 의한 염색체 상태를 측정할 때는 signal이 없는 소핵만을 측정할 경우가 정확한 분석방법으로 활용될 수 있다는 것을 의미한다.

따라서 본 연구에서는 비파괴 작업 종사자 28명과 대조군 24명을 대상으로 Cytokinesis block micronucleus(CBMN) 방법에 pan-centromeric probe를 사용한 FISH 기법을 결합하여 whole chromosome에 의해 형성된 소핵과 염색체 절편에 의해 형성된 소핵을 구별함으로써 방사선에 의해 형성된 소핵의 기원을 파악함과 동시에 자연발생적인 소핵을 제외한 직접적인 방사선에 의한 영향만을 평가할 수 방법으로서의 타당성을 검증하였으며 이를 저 선량 방사선에 노출된 방사선 작업 종사자들의 생물학적 모니터링으로서의 유용성을 확인하였다.

본 연구 결과에 의하면 대조군이나 방사선에 노출된 비파괴 관련 작업자들에게 centromere signal을 포함하는 소핵(MNC+)빈도의 차이가 없었음을 관찰되었으나 signal을 포함하지 않은 소핵(MNC-)의 빈도는 대조군에 비해 유의 하게 증가하였다. 이는 Vral 등(1997)과 Krysgio 등(2001)의 연구 결과 와 유사하였으며 소핵분석 시에는 MNC-만은 대상으로 관찰해야지만 방사선에 의해 유도된 소핵만을 민감하게 측정 할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 근무 년수에 따른 소핵빈도를 분석한 결과 근무 년수 별 소핵의 빈도는 양 반응 관계를 보이지 않았다. Leonard 등은 (1984) 원 전 종사자들이 대조군에 비해 이동원 염색체의 빈도가 더 높게 나타났으며 유의한 차이를 보고하였으나 림프구의 수명을 고려해 볼 때 근무 년수와 염색체 이상과의 양 반응관계는 보여주지 않는 다고 보고하여 본 연구를 뒷받침 해주고 있다. 또한 작업 중 총 노출선량, 최근 5년간 노출선량 및 최근 1년간 노출선량과 MNC+와 MNC-를 비롯한 소핵과의 관계를 살펴보면 모든 경우에 대조군에 비해 저노출, 중노출 그리고 고노출에서 총 소핵 빈도와 MNC-의 빈도가 증가하여 양 반응관계를 보였다.

따라서 본 연구 결과 방사선에 의해 형성된 소핵의 기원은 염색체 절단에 의한 것임을 확인하였으며 소핵분석과 FISH기법을 동시에 이용하여 방사선에 의한 염색체 상태를 측정할 때는 signal이 없는 소핵만을 측정할 경우가 정확한 분석방법으로써 저선량의 방사선에 노출된 근로자들에 대한 생물학적 모니터링 방법으로 활용될 수

있다는 것을 알 수 있었다.

사람 림프구에 방사선 조사한 후 DNA 손상회복 저해제인 3-AB와 Ara C 및 HU를 처리하여 bud와 NPB의 빈도를 분석한 결과 유도된 소핵과 bud 및 NPB의 빈도는 표 1, 2 및 그림 1과 같다. 1에서 3Gy까지의 방사선량이 증가함에 따라 소핵, bud와 NPB의 빈도는 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.001$).

방사선 조사 후 DNA 손상 회복 저해제, Ara C, 3-AB 및 HU를 처리한 결과, 모든 경우에서 방사선만 조사한 경우에 비해 소핵의 빈도가 유의하게 증가하였고 ($p < 0.001$), Ara C, 3AB, 그리고 HU 순으로 나타났다. 또한 bud의 경우 Ara C만 처리했을 경우에만 빈도가 유의하게 증가되었으며 3-AB와 HU에 의해서는 약간 증가하였으나 유의하지 않았다. NPB의 경우에는 Ara C와 3-AB를 처리했을 경우에만 빈도가 유의하게 증가되었으며 HU에 의해서는 약간 증가하였으나 유의하지 않았다.

c-myc 유전자를 대상으로 간기상태의 FISH와 소핵을 동시에 분석하여 c-myc 유전자가 위치하는 8번 염색체의 이수성을 조사한 결과 대조군, 1Gy, 2Gy 및 3Gy에서 각각 0.05%, 0.50%, 1.20% 및 3.30%의 이수성을 나타냈으며(표 3) 선량에 따라 총 빈도도 유의하게 증가하는 양-반응관계를 보이고 있다. 또한 표 3과 그림 2에서 보는 바와 같이 하나의 딸핵에 3개의 signal이 나타난 trisomy와 다른 딸핵에 1개의 signal이 나타나는 monosomy일 경우인 3+1, 한 쪽 딸핵에 4개의 signal이 모두 나타나는 경우인 4+0, 소핵 내에 염색체의 signal이 포함되어 있는 경우인 2+1+1MN, 1+1+2MN, 2+0+2MN, 1+1+1MN+1MN 및 1+0+3MN 등과 같은 이수성이 관찰되었으며 또한 정상 signal 수인 4개 이상의 signal을 가진 세포, 2+1+2MN 및 2+2+1MN도 관찰되었다. 총 이수성의 빈도는 방사선량에 따라 증가하였으며 DNA 손상 회복 억제제를 처리한 결과 방사선에 의해서 생성된 이수성의 빈도는 크게 증가하였는데 특히 Ara C를 처리한 경우 가장 많이 증가하였다.

표 4에서는 bud의 빈도와 c-myc 유전자의 signal를 포함한 bud의 빈도를 보여 주고 있는데 생성된 bud 중 13% 미만의 bud에서 signal이 관찰되었으며 이는 림프구의 방사선에 유도된 bud 생성과 c-myc 유전자 증폭과 연관성이 적은 것으로 해석될 수 있다. 따라서 림프구에서 bud의 생성과정에서 c-myc 유전자 이외에 다른 기전이

관여 할 수 있다는 것을 시사한다.

표5과 그림 4 에서와 같이 방사선에 노출된 작업자와 대조군에서의 소핵 빈도를 분석한 결과 소핵의 빈도는 작업자에서 대조군보다 높게 나타났으며 Signal을 포함하는 소핵인 MNC+와 signal을 포함하지 않는 소핵 MNC-의 빈도를 관찰한 결과 MNC+의 빈도는 대조군과 작업자에서 각각 1000개의 binucleated(BN) 세포당 6.25개와 6.96개로 차이가 없었으나 MNC-의 빈도는 대조군과 작업자에서 각각 1000개의 BN 세포당 3.62개와 15.14개로 작업자에서 유의하게 증가하였다($p < 0.000$).

또한 총 소핵과 MNC+ 및 MNC-빈도가 어느 시점에서 노출량을 반영할 수 있는지 알아보기 위해 총 노출량, 최근 5년간 노출량 그리고 최근 1년간 노출량과 소핵 빈도와의 관계를 살펴 본 결과, 대조군에 비해 저노출, 중노출 그리고 고노출에서 총 소핵과 MNC-의 빈도는 증가하여 양 반응관계를 보였으나 MNC+의 빈도는 증가하지 않았다 (표6,7,8). 표 9는 근무 년수에 따른 소핵의 빈도이다. 근무 년수의 범위는 1년에서 18년 이었으며 근무년수를 1-5년, 6-10년, 11-15년 그리고 16년 이상으로 나누어 살펴본 결과, 근무년수 간 작업자들의 총 소핵, MNC 및 MNC- 빈도 모두에서 크게 차이가 나지 않았다.

Table 1. The frequency of micronuclei(MN) in human lymphocytes induced by radiation

Dose(Gy)	No. of scored BN cells	No. of BN cells with different number of MN							Total No. of MN
		+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	
Control	2000	12	0	0	0	0	0	0	12(0.6)
Control +Ara C	2000	17	0	0	0	0	0	0	17(0.9)
Control +3AB	2000	15	0	0	0	0	0	0	15(0.8)
Control +HU	534	5	0	0	0	0	0	0	5(0.9)
1	2000	156	14	2	1	0	0	0	194(9.7)
1 + Ara C	2000	248	40	5	1	0	0	0	347(17.4)
1 + 3AB	2000	186	24	1	1	0	0	0	241(12.1)
1 + HU	1668	145	17	3	0	0	0	0	188(11.3)
2	2000	295	36	8	2	0	0	0	399(20.0)
2 + Ara C	2000	523	116	44	6	1	0	0	916(45.8)
2 + 3AB	2000	352	59	7	0	0	0	0	491(24.6)
2 + HU	1021	175	22	7	0	0	0	0	240(23.5)
3	2000	490	162	38	6	2	0	0	962(48.1)
3 + Ara C	2000	570	260	74	15	2	0	1	1389(69.5)
3 + 3AB	2000	491	210	68	8	3	0	0	1162(58.1)
3 + HU	678	156	66	8	1	1	0	0	321(47.3)

BN: Binucleated cell

Table 2. The effect of DNA repair inhibitors on x-ray induced micronuclei, bud and nucleoplasmic bridge in human lymphocytes in vitro

Dose(Gy)	No. of scored BN cells	Total No. of MN (%)	Total No. of bud (%)	Total No. of NPB (%)
Control	2000	12(0.6)	3(0.15)	0(0.00)
Control +Ara C	2000	17(0.9)	5(0.25)	2(0.10)
Control +3AB	2000	15(0.8)	3(0.15)	0(0.00)
Control +HU	534	5(0.9)	1(0.19)	0(0.00)
1	2000	194(9.7)	14(0.70)	10(0.50)
1 + Ara C	2000	347(17.4)	30(1.50)	26(1.30)
1 + 3AB	2000	241(12.1)	12(.60)	18(0.90)
1 + HU	1668	188(11.3)	16(0.96)	9(0.54)
2	2000	399(20.0)	37(1.85)	20(1.00)
2 + Ara C	2000	916(45.8)	57(2.85)	120(6.00)
2 + 3AB	2000	491(24.6)	36(1.80)	32(1.60)
2 + HU	1021	240(23.5)	22(2.15)	17(1.70)
3	2000	962(48.1)	56(2.80)	68(3.40)
3 + Ara C	2000	1389(69.5)	86(4.30)	160(8.00)
3 + 3AB	2000	1162(58.1)	58(2.90)	92(4.60)
3 + HU	678	321(47.3)	22(3.24)	27(4.00)

BN: Binucleated cell

MN: micronuclei

NPB: nucleoplasmic bridge

Tabel 3. The frequencies of different types of aneuploid binucleated(BN) cells and micronucleus(MN) with positive c-myc signals in human lymphocytes exposed to x-radiation

Dose(Gy)	No. of scored BN cells	Aneuploid BN cells								Total aneuploidy (%)
		with signal negative MN		with signal positive MN						
		3+0	4+0	1+1+2	2+1+1	2+0+2	1+1+1+1	1+0+3	multi	
Control	2000	0	0	0	1	0	0	0	0	1(0.05)
Control +Ara C	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0)
Control +3AB	2000	1	0	0	0	0	0	0	0	1(0.05)
Control +HU	534	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0)
1	2000	4	0	4	2	0	0	0	0	10(0.5)
1 + Ara C	2000	10	0	13	1	0	1	0	1	26(1.3)
1 + 3AB	2000	6	0	6	1	0	0	0	1	14(0.7)
1 + HU	1668	10	0	3	4	1	0	0	0	18(1.1)
2	2000	11	1	7	2	0	0	1	2	24(1.2)
2 + Ara C	2000	16	1	32	5	1	1	0	1	57(2.9)
2 + 3AB	2000	13	1	9	9	0	0	0	0	32(1.6)
2 + HU	1021	13	2	6	2	0	0	0	4	27(2.6)
3	2000	26	1	24	10	0	1	0	3	65(3.3)
3 + Ara C	2000	44	4	80	11	4	1	0	1	145(7.3)
3 + 3AB	2000	36	1	48	13	0	3	1	0	102(5.1)
3 + HU	678	10	2	13	5	0	0	0	1	31(4.6)

BN: Binucleated cell

Multi : the binucleated cell with more than 4 signals

Table 4. The Frequencies of buds with positive c-myc signals in human lymphocytes exposed to x-radiation

Dose(Gy)	No. of scored BN cells	Total No. of bud (%)	Total No. of bud with signal (%)
Control	2000	3(0.15)	0(0.00)
Control +Ara C	2000	5(0.25)	0(0.00)
Control +3AB	2000	3(0.15)	0(0.00)
Control +HU	534	1(0.19)	0(0.00)
1	2000	14(0.70)	0(0.00)
1 + Ara C	2000	30(1.50)	3(10.00)
1 + 3AB	2000	12(.60)	1(8.30)
1 + HU	1668	16(0.96)	2(12.50)
2	2000	37(1.85)	1(2.70)
2 + Ara C	2000	57(2.85)	3(5.30)
2 + 3AB	2000	36(1.80)	1(2.80)
2 + HU	1021	22(2.15)	2(9.10)
3	2000	56(2.80)	3(5.40)
3 + Ara C	2000	86(4.30)	5(5.8)
3 + 3AB	2000	58(2.90)	3(5.20)
3 + HU	678	22(3.24)	0(0.00)

BN: Binucleated cell

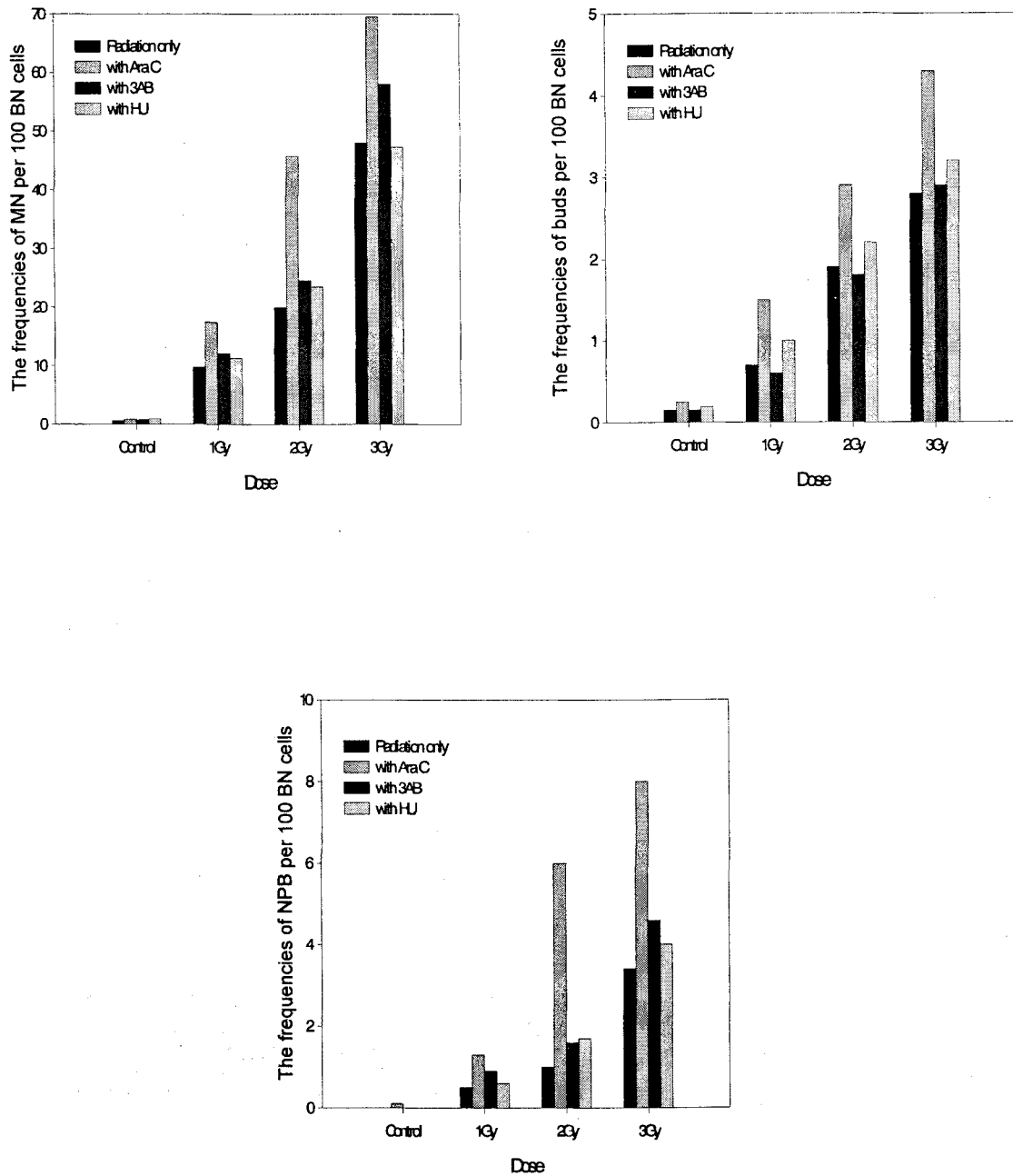


Figure 1. Effect of Ara C, 3AB and HU on x-ray induced micronuclei, bud and nucleoplasmic bridge in human lymphocytes cultured in vitro

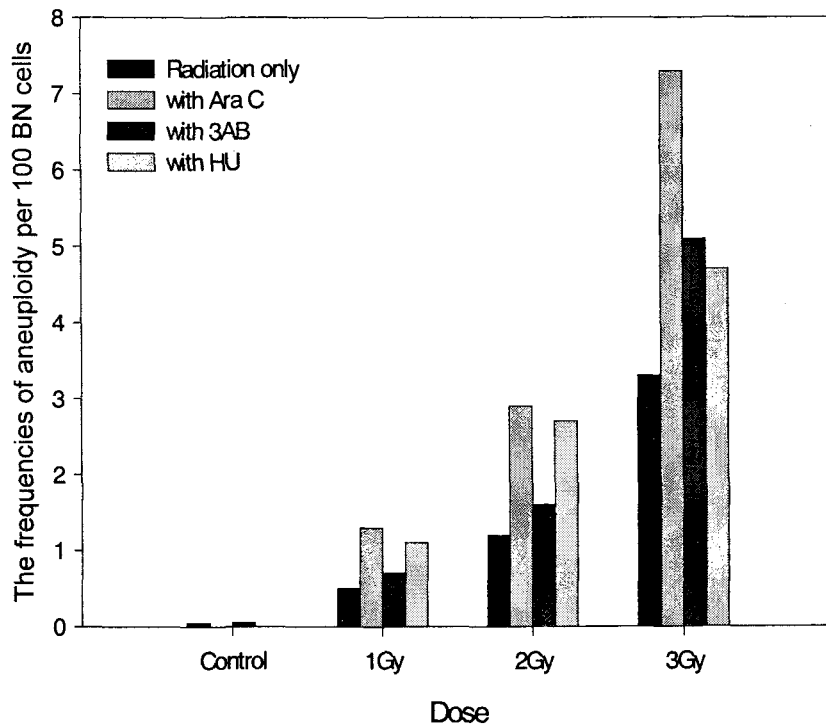


Figure 2. Effect of Ara C, 3AB and HU on x-ray induced aneuploidy in human lymphocytes cultured in vitro

Table 5. The frequencies of micronuclei with or without centromere signal (mean per 1000 binucleated cells) in the control and exposed workers

	Number	MNC+		MNC-		total MN	
		mean	S.E.M	mean	S.E.M	mean	S.E.M
Control	24	6.25	0.38	3.62	0.33	9.87	0.48
Exposed	14	6.96	0.33	15.14	0.68	22.11	0.77
p value		0.325		<0.0001		<0.0001	

S.E.M = standard error of the mean

Mann-whitney test was used to determine statistical analysis for exposed and control

Table 6. The frequencies of micronuclei with or without centromere signal (mean per 1000 binucleated cells) by cumulative radiation dose

Dose (mSV)	Number	MNC+		MNC-		total MN	
		mean	S.E.M	mean	S.E.M	mean	S.E.M
0	24	6.25	0.38	3.62	0.25	9.87	0.48
0<-<50	14	6.64	0.38	14.50	0.84	21.14	0.84
50≤-<100	10	7.77	0.56	15.22	1.33	23.00	1.72
100≤	4	6.25	1.10	17.25	1.75	23.50	1.50
p value		0.115		0.041		0.041	

S.E.M = standard error of the mean

Kendall's τ was calculated on cell bases.

Table 7. The frequencies of micronuclei with or without centromere signal (mean per 1000 binucleated cells) by recent 5-year dose

Dose (mSV)	Number	MNC+		MNC-		total MN	
		mean	S.E.M	mean	S.E.M	mean	S.E.M
0	24	6.25	0.38	3.62	0.25	9.87	0.48
0<-<25	11	6.63	0.36	14.09	1.14	20.72	1.16
25≤-<50	7	7.00	0.61	14.42	1.17	21.42	1.26
50≤	10	7.33	0.73	17.10	0.97	24.50	1.18
p value		0.118		0.043		0.037	

S.E.M = standard error of the mean

Kendall's τ was calculated on cell bases.

Table 8. The frequencies of micronuclei with or without centromere signal (mean per 1000 binucleated cells) by recent 1-year dose

Dose (mSV)	Number	MNC+		MNC-		total MN	
		mean	S.E.M	mean	S.E.M	mean	S.E.M
0	24	6.25	0.38	3.62	0.63	9.87	0.80
0<-<5	20	6.75	0.31	14.55	0.78	21.30	0.78
5≤-<10	4	6.25	0.85	17.25	1.37	23.50	1.50
10≤	4	9.00	1.00	16.75	2.05	25.75	2.95
p value		0.123		0.039		0.034	

S.E.M = standard error of the mean

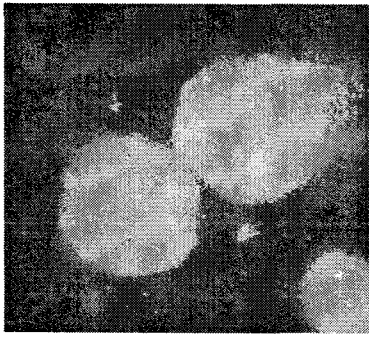
Kendall's τ was calculated on cell bases.

Table 9. The frequencies of micronuclei with or without centromere signal (mean per 1000 binucleated cells) by duration of work

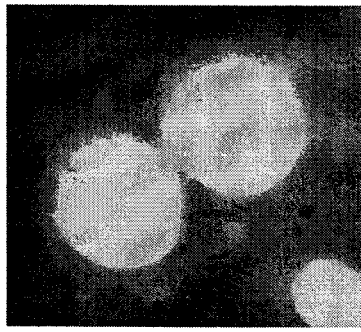
Duration of work (years)	Number	MNC+		MNC-		total MN	
		mean	S.E.M	mean	S.E.M	mean	S.E.M
0	24	6.25	0.38	3.62	0.25	9.87	0.48
1-5	11	7.09	0.36	14.18	0.96	21.27	1.01
6-10	10	6.70	0.80	16.50	1.37	23.20	1.71
11-15	5	7.20	0.37	15.40	1.11	22.60	1.28
> 16	2	7.50	0.49	14.50	2.49	22.00	1.99
p value		0.121		0.135		0.134	

S.E.M = standard error of the mean

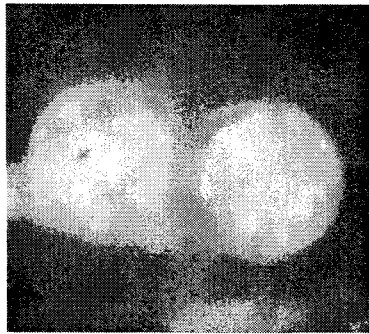
Kendall's τ was calculated on cell bases.



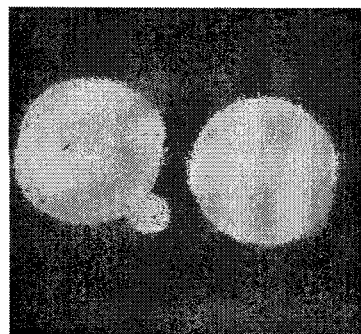
a-1



a-2



b-1



b-2

Figure 3. Photographs of binucleated cells scored in the CBMN assay. a-1 : a BN cell with a signal-positive micronucleus. a-2: the same nuclei as shown in panel a-1 counter-stained with DAPI. b-1 : a BN cell with a signal-negative micronucleus. b-2: the same nuclei as shown in panel b-1 counter-stained with DAPI.

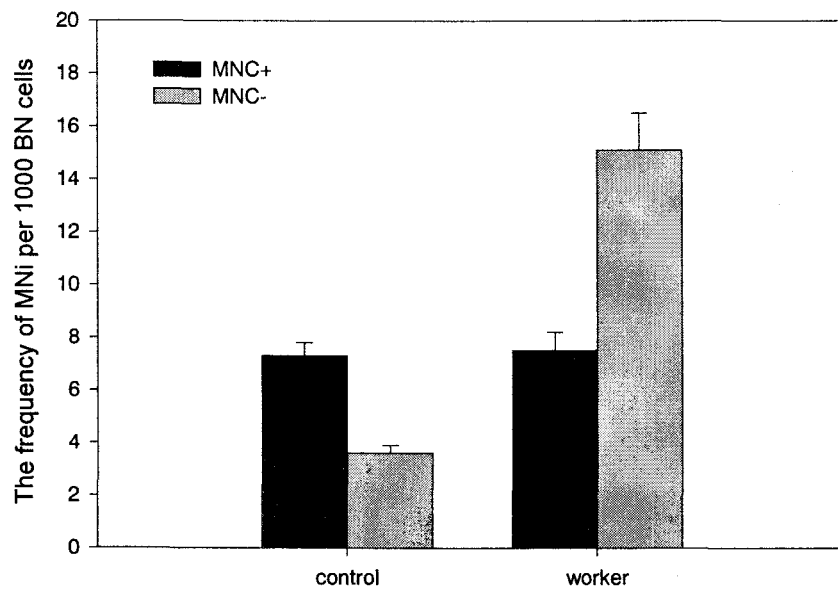


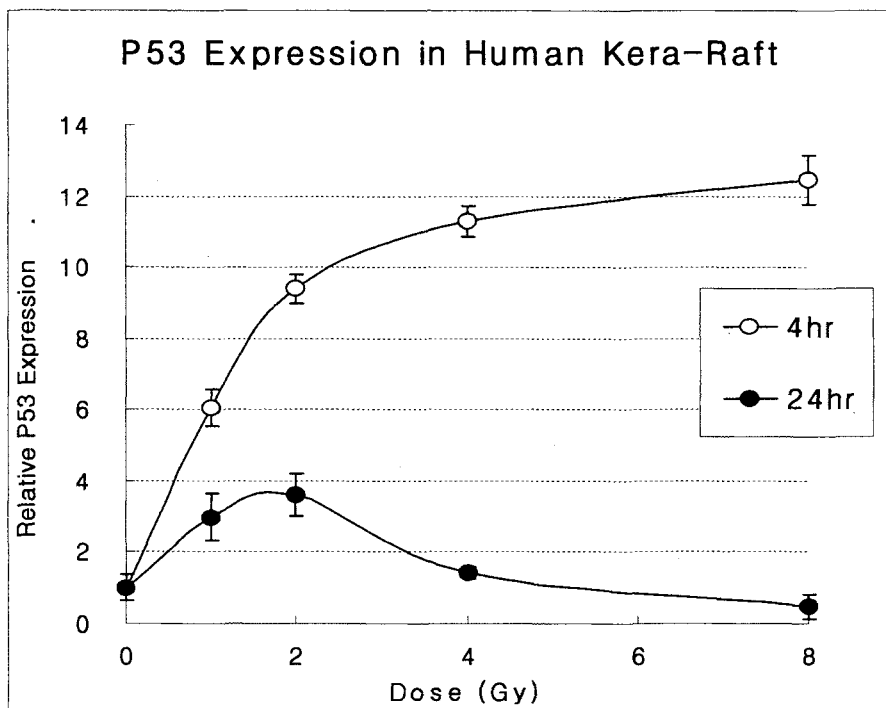
Figure 4. The frequencies of centromere signal positive(MNC+) or negative (MNC-) micronuclei in the control and exposed workers.

2. 새로운 피폭 선량 예측 기술 개발

가. 생화학적 피폭 예측 신규 기술 개발

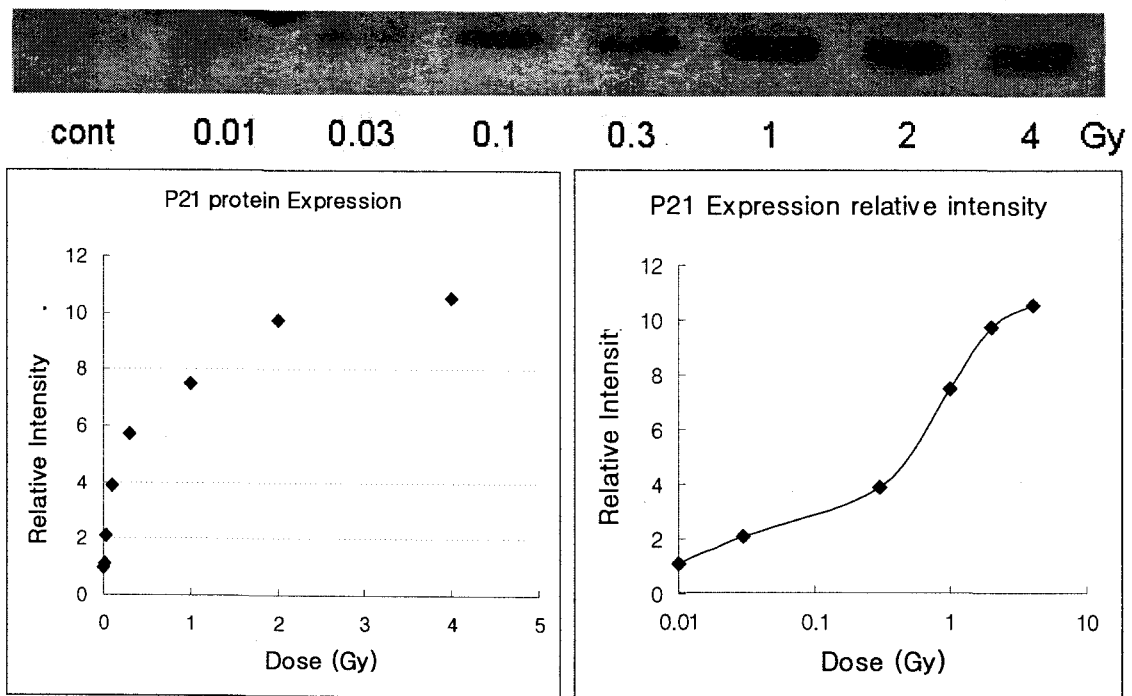
(1) 피부 (생인공 피부) biosensor법

raft culture한 사람의 표피 조직에서 방사선 선량에 따른 biosensor 인 P53을 면역조직화학적으로 관찰하여 방사선에 노출된 피부의 피폭선량을 측정할 수 있는 방사선 생물학적 피폭선량 측정법을 개발하고자 인체 피부 keratinocyte의 raft culture로 완전히 계층화된 피부 조직으로 만들었으며, 계층화된 피부에 ^{137}Cs γ -rays를 조사한 후 각각 4 시간, 24 시간 후의 조직 절편을 취하여 피폭 선량에 따른 biosensor 인 P53의 출현 빈도를 광학현미경적으로 관찰하였다. biosensor 인 P53의 관찰은 면역조직화학적으로 염색을 시행하였으며, H&E (hematoxylin/eosin) 염색을 대조군으로 하였다. 그 결과 basal layer에 P53단백질의 침착을 관찰할 수 있었으며, 피폭 후의 시간에 따라 P53의 발현은 다르게 나타났으며, 결과적으로 P53의 발현을 방사선 생물학적 피폭 선량 예측 기술로 사용하려면 피폭 후 24시간까지는 2Gy이하에서 유효하게 사용할 수 있는 것으로 나타났다.



(2) P21 biosensor 법

Human blood lymphocyte를 대상으로 P21의 발현을 조사하여 피폭 예측 기술로 사용할 수 있는 지 타당성을 검토하기 위해 3인을 대상으로 연구를 수행한 결과 아래와 같은 결과를 얻었다. 방사선 피폭 예측 기술로 사용할 수 있는 지 타당성을 검토하기 위해 수행된 위와 같은 결과는 이 기술이 방사선 피폭 예측 기술로 사용될 수 있을 것으로 예측되어지므로 피폭 후 48시간까지는 2Gy이하에서 유효하게 사용할 수 있는 것으로 나타났다.



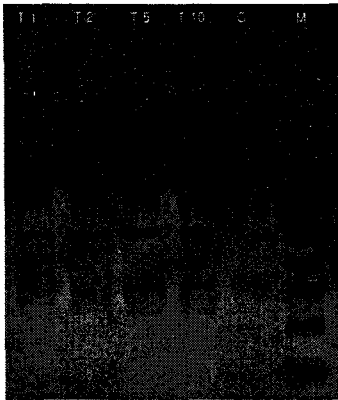
(3) γ H2AX assay 법

Human fibroblast의 primary culture를 대상으로 H2AX의 인산화형인 γ H2AX의 발현을 immunocytochemistry를 수행하여 피폭 예측 기술로 사용할 수 있는 지 타당성을 검토한 결과 이 기술은 실질적인 방사선사고 시에는 방사선 생물학적 피폭 예측 기술로 사용하기 어려운 기술로 판명되었다.

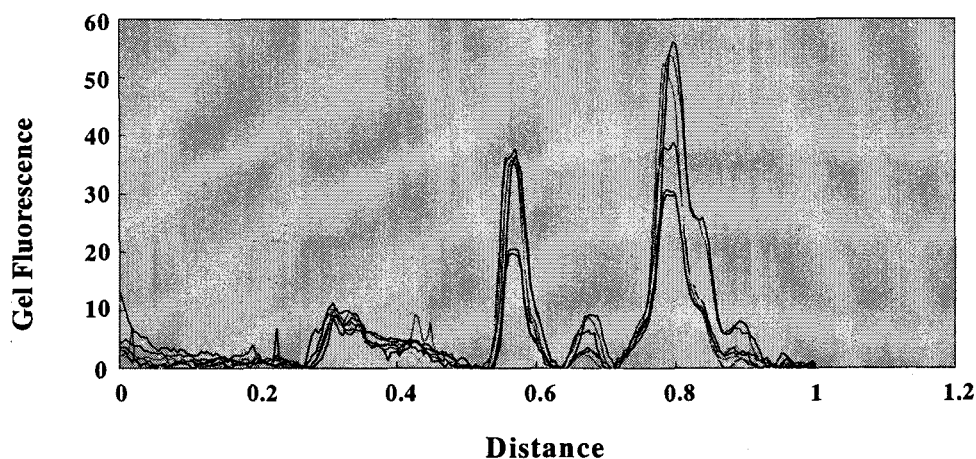
(4) Cluster DNA 손상 분석 기술

(가) 방사선 조사에 의한 small size DNA 의 영향 확인

- Small size DNA를 dose dependent(1Gy, 2Gy, 5Gy, 10Gy)하게 γ -ray 조사 후, 전기영동하여 Fluor-S Multimager(Bio- Rad)로 확인한 결과 dose가 증가함에 따라 gel fluorescence의 강도가 증가하였으며, 모든 범위에서 dose-dependent한 경향을 얻을 수 있었다. 또한 Distance에 따른 미세한 영향이 관측하였다.
- pBC를 dose dependent(1 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy)하게 γ -ray 에 조사한 후, 0.4 % agarose in Tris-acetate pH 8.0 에 60 V(30 V, 6°C)로 전기영동하여 Fluor-S Multimager (Bio- Rad) 로 확인하였다.



Photograph of a pseudocolor display of an image of an ethidium bromide-stained neutral agarose gel demonstrating the quantitation of γ -ray-induced damaged in pBC. T1: 1 Gy irradiation, T2: 2 Gy irradiation, T5: 5 Gy irradiation, T10: 10 Gy irradiation, C: control pBC, M: 1 kb ladder marker.



Integrated profile of all lanes from gel in upper Figure.

(나) 방사선 조사에 의한 T7 DNA 의 영향 확인

- Neutral gel은 double strand breakage만 측정하기 위한 것으로 모든 strand 의 cluster DNA damage를 관측하기 위해서 특정 효소를 사용해야 하며 본 실험에서는 Fpg protein site 인 oxidized purine 을 이용하여 set-up 하였다.
- 0.25 krad 로 조사된 Bacteriophage T7 DNA cluster damage 를 unidirectional pulsed field electrophoresis 로 분석한 결과 다음과 같이 Marker 의 Gel dispersion function 을 계산 할 수 있었다.

Distance	72	110	155	174	194	219	250
Length (kb)	48.5	40	23.1	9.4	6.6	4.3	2.15

- 이를 이용하여 T7 DNA cluster의 number average length 가 47.0745 ± 0.3876 kb, Length average length 가 47.4000 ± 0.3500 kb, Median length 가 47.1761 ± 0.3144 kb 임을 구할 수 있었다.

(다) 방사선 조사에 의한 DNA 손상확인

isolated λ DNA를 dose dependent(0Gy, 5Gy, 10Gy)하게 γ -ray 조사 후, 특위 부분 인식 효소를 처리하여 전기영동한 후, Fluor-S Multilmager(Bio- Rad)로 확인한 결과, DNA의 손상부위를 인식하여 잘라주는 효소의 기능으로 효소를 처리하지 않은 실험군보다 더 많은 단편으로 DNA가 잘려지는 것을 확인하였다.

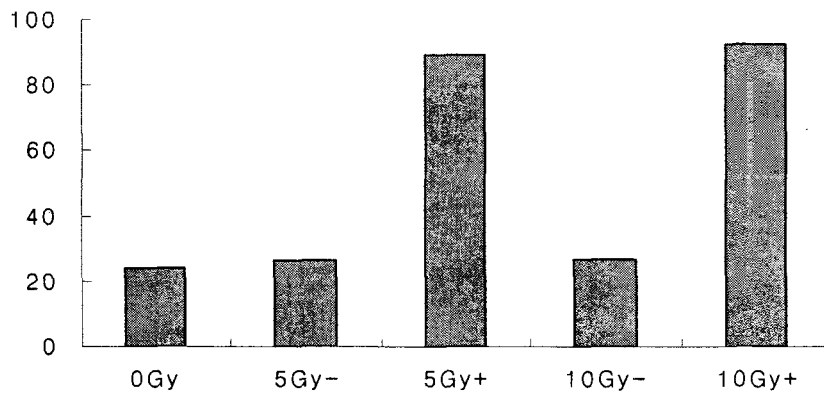
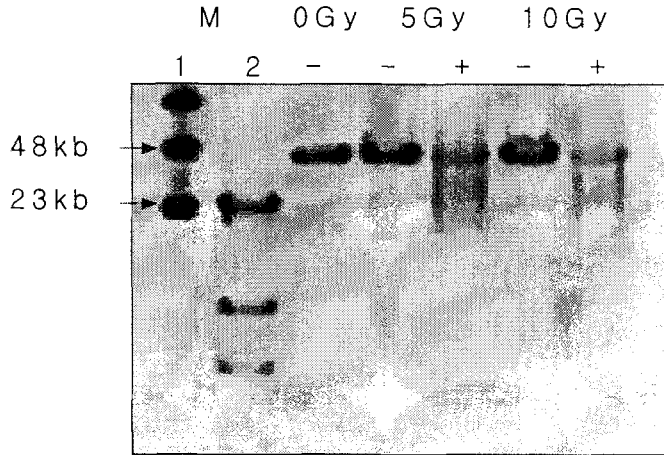
(라) 방사선 조사에 의한 DNA 손상 정량화

Fluor-S Multilmager(Bio-Rad)를 사용하여 전기영동 된 실험시료를 평균크기와 이동분포를 확인하여 피폭에 의한 손상정도의 수식화를 진행하였다.

- 방사선 조사에 의한 isolated λ DNA 의 영향 확인

isolated λ DNA를 dose dependent(0Gy, 5Gy, 10Gy)하게 γ -ray에 조사한 후, oxidized purines를 특이적으로 인지하는 Fpg 효소를 상온에서 처리한 후, 1.0% agarose in Tris-acetate pH 8.0에 switch time 1-6초, 11시간, 6v/cm, 120° , 14°C 로 전기영동하여 Fluor-S Multilmager(Bio- Rad)로 평균크기와 이동

분포를 확인하였다.



M1 : NEB Midrange II Marker (97kb, 73kb, 48.5kb, 24.5kb), M2 : λ DNA HindIII (23kb, 9.5kb, 4.3kb), - : Fpg specific enzyme treatment without, + : Fpg specific enzyme treatment with.

나. 환경 방사선 생물학적 (ecobiodosimetry) 지표 개발

원자력발전소를 대상으로 방사선 생물학적 선량 측정은 주로 시설 종사자를 대상으로 시행되었고, 염색체분석법을 대신하여 최근 세포질분열 차단 림프구의 미소핵 발생을 지표로 하고 있다. 동물 유래 세포를 이용한 방사선 피폭의 생물학적 측정은 과거 염색체의 이상유무 및 동물종 간의 감수성 차이가 조사되었으며, 최근 간편한 미소핵 발생에 관한 연구가 진행되면서 두 가지 세포유전학적

분석간의 차이 점 등이 알려지고 있다. 원전 주변 동물을 대상으로 한 연구는 체르노빌 원전 사고 후 방사성 물질의 내부오염에 대한 장기 별 방사능 물질의 축적 및 유즙내 방사성 물질의 유무를 파악하는 조사 연구가 주를 이루고 있다.

방사선 피폭에 대한 생물학적 선량측정 방법으로 세포유전학적 분석법인 미소핵검사시 림프구를 주로 사용하는데, 이는 비교적 수명이 길고, 정상상태에서는 분열하지 않으며 표본의 채취가 용이하기 때문이다. 또한 기존의 염색체 분석법에 비하여 미소핵검사는 염색체 검사에 관한 특별한 숙련이나 기술 없이도 분석이 비교적 쉬우며 단기간에 수행될 수 있다. 특히 세포질분열 차단 림프구의 사용에 따라 방사선생물학 분야의 연구가 더욱 용이하게 되었다. 미소핵은 전리방사선의 직접효과 또는 free radicals에 의한 염색체의 무중심절분절(acentric fragment), 두개 이상의 centromere 존재, kinetochore의 결손 또는 방추사의 손상 등에 의해 세포분열 시 주핵(main nucleus)에 포함되지 못해 형성되는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 원전 주변 사육 동물의 림프구 미소핵 발생을 지표로 한 방사선 피폭 가능성 판별을 위한 세포유전학적 보고로서, 원전 주변 사육 동물과 대조 지역 사육 동물에서 비슷한 혈액 수치 및 미소핵 발생 수치를 나타냄으로써 원전에 의한 주변 사육 동물의 방사선 생물학적 유해성은 없는 것으로 평가되었다. 가축 유래 세포를 사용한 연구에서는 대상 가축의 연령이 중요하며, 특히 환경적 유해요인의 평가에서 유해인자의 저농도 장기 노출이 보다 정확한 결과를 나타내리라 사료되며, 따라서 방사성 물질의 내부 오염이나 전리방사선의 외부 피폭 유무 판단을 위하여 원자력시설 주변의 가축에 대해서도 고령 가축을 대상으로 한 연구가 필요하다고 사료된다.

사람 및 기타 동물 유래 림프구에서 방사선에 대한 감수성의 비교는 염색체 이상 관찰 연구가 보고 되어 있으며 동물 종간의 감수성 차이는 림프구 동태(lymphocyte kinetics), 핵의 용량, DNA의 량, 염색체 수 또는 염색체팔 수(arm number) 등이 관계된다는 가설이 제시되었으나 확실한 결론적 근거는 밝혀지지 않았다. 염색체 이상 또는 미소핵 형성 시험에 있어서 장애의 판별은 DNA 손상의 지표와 함께 세포의 생존율을 동시에 관찰하는 것이 필요하다는 주장이 제시되었으며, 방사선에 의한 세포의 사멸에 따른 동물별 세포생존율의 차이 등의 요인이 관계된다는 보고가 있어 미소핵 측정은 염색체 이상의 결과에서 산출된 동물 별 방사선 감수성을 그대로 적용할 수는 없고 각 동물에 대한 직접적인 림프구 미소핵의 조사 연구가 필요하다고 하였다. 애완동물이나 가축은 인간의 환경을 공유하므로 직접 인체를 대상으로 하는 조사연구를 대체할 수 있는 동물을 대상으로 한 연구조사가 계속되어야 할 것으로 생각되며 이와 같은 관점에서 원

자력 시설 지역의 생물감시체계의 확립이 필요하다.

원전지역 및 대조지역 사육 소, 재래산양 및 돼지의 혈액학적수치에서 각 군 사이의 유의성 있는 차이는 없었으며 방사선 피폭 유무의 지표가 될 수 있는 림프구의 수치도 유의성 있는 차이는 없었다 (Table 1, 2, 3, 4). 울진원자력발전소 사육 재래산양의 혈소판이 높은 수치를 나타낸 것은 외부기생충 다중감염 또는 사육장의 구조에 따른 운동량 과다 등의 원인에 의한 것으로 생각된다.

예비실험에서 세포질분열 차단 림프구, 즉 2개의 핵을 가진 림프구의 유도는 PHA 2% 투여군에서 높게 유도되었고, Cyt-B의 첨가량이 증가할수록 전체림프구에 대한 이핵 림프구의 유도율은 증가하였으나 4핵 세포의 유도율과 Cyt-B 자체의 세포독성을 고려하여 최적농도는 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 통일하였다.

시험적 방사선 조사에 따른 미소핵의 발생 양상은 Fig. 1, Table 5, 6 및 7과 같으며 방사선조사에 따라 linear-quadratic model을 적용하여 얻은 곡선식은

$$\text{소} : y = 0.1016D + 0.0118D^2 + 0.0147,$$

$$\text{재래산양} : y = 0.1353D + 0.004322D^2 + 0.00867,$$

$$\text{돼지} : y = 0.0183D + 0.0124D^2 + 0.0133$$

($y = \text{CB}$ 세포당 MN의 수, $D = \text{방사선 조사량 Gy}$)였다.

월성원전 주변, 울진원전 주변 및 영광원전 주변과 대조지역 사육 소의 미소핵 발생은 1,000개의 세포질분열차단림프구 당 각각 평균 9.87개(월성), 8.90개(울진), 9.20개(영광) 및 9.60개(화순 1차), 9.30개(화순 2차)였으며. 대상 소의 모든 개체에서 세포 당 2개 이상의 미소핵을 가진 경우는 없었다 (Table 8, 9). 조사 대상 소의 미소핵 발생빈도를 시험적 방사선 조사 후 얻은 방사선량-반응식에 대입하여 추정선량을 파악하기 위하여, $y = aD + bD^2 + C$ 를 $D = [-a \pm \sqrt{a^2 - 4b(C-y)}] \div 2b$ 로 전환하고 위의 식을 근거로 세포 당 미소핵의 수를 대입한 바 추정선량은 선량-반응식 도출을 위한 소에서 방사선 비조사군의 발생을 보다 낮았으며, 강제적 추정선량은 월성원전 지역 사육소에서 -4.78 cGy, 울진원전 지역 사육소 -5.71 cGy, 영광원전 지역 사육소 -5.46 cGy, 대조지역 사육소에서 -5.05 cGy(1차) 및 -5.35 cGy(2차)였다.

월성 및 울진 원전과 대조지역 사육 재래산양의 미소핵 발생은 1000개의 이핵세포 당 각각 평균 9.60개, 6.83개 및 9.88개 였으며. 대상 재래산양의 모든 개체에서 세포 당 2개 이상의 미소핵을 가진 경우는 없었다 (Table 10). 조사 대상 재래산양의 미소핵 발생빈도를 시험적 방사선 조사 후 얻은 방사선량-반응식에 대입하여 추정선량을 파악한 바, 추정선량은 울진원전 사육 재래산양은, 선량-반응식 도출을 위한 재래산양에서 방사선 비조사군의 발생을 보다 낮았으며, 강제적 추정선량은 월성원전 사육 재래산양에서 0.68 cGy, 울진원전 사육 재래산양에

서 -1.39 cGy, 대조지역 사육 재래산양에서 0.89 cGy 였다.

영광원전 주변과 대조지역 사육 돼지의 미소핵 발생은 1,000개의 세포질분열 차단림프구 당 각각 평균 10.60개 및 11.10개 였으며, 대상 돼지의 모든 개체에서 세포 당 2개 이상의 미소핵을 가진 경우는 없었다 (Table 11). 조사 대상 돼지의 미소핵 발생빈도를 시험적 방사선 조사 후 얻은 방사선량-반응식에 대입하여 추정선량을 파악한 바 강제적 추정선량은 영광원전 지역 사육돼지에서 -16.63 cGy, 대조지역 사육돼지에서 -13.21 cGy 였다.

이상의 결과에서 원전 지역 사육 동물과 대조지역 동물간의 혈액학적 및 미소핵 발생율의 관찰에서 차이점은 관찰되지 않았으며 추후 방사선 환경 평가연구에 자료로 활용될 수 있을 것이다.

Table 1. Hematological values in cattle of Wolsong, Uljin nuclear power plant and control region (mean \pm S.D.)

Test group	Unit	Control region	Wolsong region	Uljin region
Erythrocytes	M/ μ l	7.16 \pm 0.50	7.48 \pm 1.30	8.78 \pm 1.10
Hemoglobin	g/dL	9.83 \pm 0.52	10.15 \pm 1.21	13.52 \pm 1.62
Hematocrit	%	29.90 \pm 1.96	33.13 \pm 3.51	43.02 \pm 5.26
Thrombocytes	K/ μ l	240.14 \pm 59.01	226.2 \pm 59.99	278.8 \pm 41.8
Leukocytes	K/ μ l	8.18 \pm 1.89	8.38 \pm 2.14	8.70 \pm 1.51
Neutrophils	K/ μ l	3.37 \pm 1.13	3.66 \pm 1.58	4.01 \pm 1.33
Lymphocytes	K/ μ l	4.49 \pm 1.47	3.99 \pm 1.12	4.14 \pm 0.42
Monocytes	K/ μ l	0.25 \pm 0.10	0.37 \pm 0.12	0.26 \pm 0.14
Eosinophils	K/ μ l	0.13 \pm 0.10	0.28 \pm 0.15	0.22 \pm 0.10
Basophils	K/ μ l	0.04 \pm 0.03	0.10 \pm 0.05	0.07 \pm 0.04

Table 2. Hematological values from cattles in the vicinity of Yeonggwang nuclear power plant and control region (mean \pm S.D.).

Test group	Unit	Control region	Yeonggwang region
Erythrocyte	M/ μ l	8.26 \pm 0.94	8.57 \pm 1.34
Hemoglobin	g/dL	10.81 \pm 0.32	12.30 \pm 1.89
Hematocrit	%	31.70 \pm 2.46	36.40 \pm 2.71
Thrombocyte	K/ μ l	340 \pm 46	390 \pm 84
Leukocyte	K/ μ l	8.97 \pm 1.79	9.18 \pm 2.16
Neutrophil	K/ μ l	3.17 \pm 1.22	2.97 \pm 0.94
Lymphocyte	K/ μ l	4.90 \pm 1.51	5.24 \pm 1.66
Monocyte	K/ μ l	0.75 \pm 0.11	0.80 \pm 0.25
Eosinophil	K/ μ l	0.11 \pm 0.10	0.12 \pm 0.08
Basophil	K/ μ l	0.04 \pm 0.04	0.05 \pm 0.04

Table 3. Hematological values in goat bred in Wolsong, Uljin nuclear power plant and control region (mean \pm S.D.)

Test group	Unit	Control	Wolsong	Uljin
Erythrocyte	M/ μ l	16.89 \pm 0.95	14.65 \pm 3.26	14.81 \pm 2.62
Hemoglobin	g/dL	11.13 \pm 0.95	9.98 \pm 1.78	7.62 \pm 1.16
Hematocrit	%	28.64 \pm 2.22	26.77 \pm 4.81	31.33 \pm 6.13
Thrombocyte	K/ μ l	452 \pm 186	300 \pm 164	1356 \pm 342*
Leukocyte	K/ μ l	15.69 \pm 3.69	13.31 \pm 2.21	15.33 \pm 3.75
Neutrophil	K/ μ l	3.75 \pm 2.00	3.95 \pm 0.98	4.72 \pm 1.39
Lymphocyte	K/ μ l	9.55 \pm 2.04	7.42 \pm 1.48	8.60 \pm 2.21
Monocyte	K/ μ l	2.12 \pm 0.67	1.58 \pm 0.62	1.73 \pm 0.55
Eosinophil	K/ μ l	0.21 \pm 0.17	0.26 \pm 0.23	0.19 \pm 0.10
Basophil	K/ μ l	0.07 \pm 0.05	0.11 \pm 0.11	0.09 \pm 0.04

*p<0.01 as compared with control group.

Table 4. Hematological values in pig of Yeonggwang nuclear power station and control region

Test group	Unit	Control region	Yeonggwang region
Erythrocytes	M/ul	7.44 \pm 0.18	7.29 \pm 1.34
Hemoglobin	g/dL	11.40 \pm 0.27	11.02 \pm 0.69
Hematocrit	%	38.47 \pm 1.65	39.97 \pm 6.63
Thrombocytes	K/ul	246.00 \pm 70.89	243.80 \pm 76.04
Leukocytes	K/ul	14.77 \pm 1.30	15.29 \pm 3.56
Neutrophils	K/ul	6.25 \pm 0.96	5.46 \pm 1.08
Lymphocytes	K/ul	8.18 \pm 0.45	10.02 \pm 2.50
Monocytes	K/ul	0.18 \pm 0.13	0.25 \pm 0.18
Eosinophils	K/ul	0.12 \pm 0.04	0.23 \pm 0.12
Basophils	K/ul	0.05 \pm 0.04	0.13 \pm 0.06

Table 5. Micronuclei (MN) per 500 cytokinesis-blocked lymphocytes following irradiation of cattle

Experimental group	No. of cells without MN	Number of micronuclei per cell				Total number of MN
		1	2	3	4	
donor 1						
0 cGy	493	7				7
100 cGy	451	43	6			55
200 cGy	392	80	24	4		140
400 cGy	279	173	36	11	1	282
donor 2						
0 cGy	492	8				8
100 cGy	452	44	4			52
200 cGy	401	75	19	5		128
400 cGy	282	167	47	12	2	305
donor 3						
0 cGy	493	7				7
100 cGy	441	53	6			65
200 cGy	384	89	25	2		145
400 cGy	252	189	41	17	1	326

Table 6. Micronuclei (MN) per 500 cytokinesis-blocked lymphocytes following irradiation of goat

Experimental group	No. of cells without MN	Number of micronuclei per cell				Total number of MN
		1	2	3	4	
donor 1						
0 cGy	496	4				4
100 cGy	437	52	11			74
200 cGy	375	100	21	4		154
400 cGy	274	151	59	15	1	318
donor 2						
0 cGy	495	5				5
100 cGy	432	61	7			75
200 cGy	380	92	26	2		150
400 cGy	281	143	61	15		310
donor 3						
0 cGy	496	4				4
100 cGy	439	50	11			72
200 cGy	389	85	20	6		143
400 cGy	281	155	50	10	4	301

Table 7. Micronuclei (MN) per 500 cytokinesis-blocked lymphocytes following irradiation of pig

Experimental group	No. of cells without MN	Number of micronuclei per cell				Total number of MN
		1	2	3	4	
donor 1						
0 cGy	495	5				5
100 cGy	474	22	7			30
200 cGy	462	32	6			44
400 cGy	393	80	22	4	1	140
donor 2						
0 cGy	493	7				7
100 cGy	479	19	2			23
200 cGy	459	34	6	1		49
400 cGy	392	79	23	6		143
donor 3						
0 cGy	495	5				5
100 cGy	476	21	3			27
200 cGy	461	32	7			46
400 cGy	390	79	25	6		147

Table 8. Micronucleus frequency in binucleated cells of bovine lymphocytes from Wolsong, Uljin nuclear power plant region and control region

Subject	Number of MN per 1,000 CB cells		
	Control region	Wolsong region	Uljin region
1	10	13	10
2	4	9	15
3	7	8	7
4	7	6	8
5	21	11	3
6	10	7	14
7	10	12	9
8	13	7	4
9	7	10	11
10	7	6	8
11	9	13	
12	8	10	
13	11	10	
14	8	12	
15	12	14	
Mean±S.D	9.60 ± 3.91	9.87 ± 2.64	8.90 ± 3.84

Table 9. Micronucleus frequency in binucleated cells of bovine lymphocytes from Younggwang nuclear power plant region and control region

Subject	Number of MN per 1,000 CB cells	
	Control region	Younggwang region
1	10	7
2	7	11
3	4	8
4	16	11
5	7	10
6	10	6
7	8	13
8	11	4
9	8	6
10	12	16
Mean±S.D	9.20 ± 3.68	9.30 ± 3.30

Table 10. Micronucleus frequency in binucleated cells of goat lymphocytes from Wolsong, Uljin nuclear power plant and control region

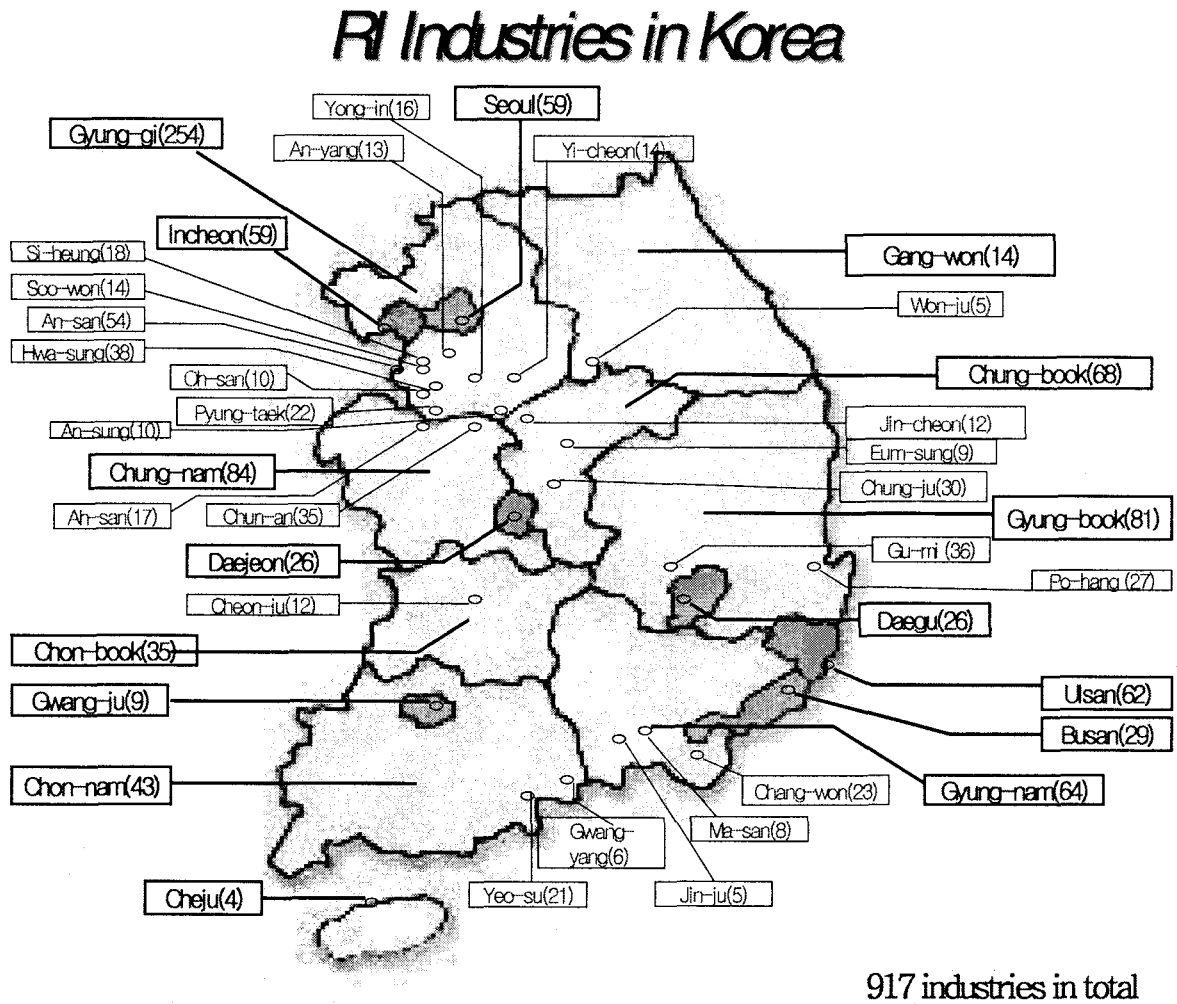
Subject	Number of MN per 1000 CB cells		
	Control	Wolsong	Uljin
1	6	8	9
2	16	6	5
3	8	12	7
4	5	9	6
5	6	13	6
6	15		8
7	13		
8	10		
Mean±S.D.	9.88 ± 4.32	9.60 ± 2.88	6.83 ± 1.47

Table 11. Micronucleus frequency in binucleated cells of swine lymphocytes from Yeonggwang nuclear power station and control region

Subject	Number of MN per 1000 CB cells	
	Control region	Yeonggwang region
1	16	8
2	7	16
3	14	15
4	12	4
5	8	7
6	15	13
7	11	14
8	7	4
9	8	9
10	13	16
Mean±S.D.	11.10 ± 3.41	10.60 ± 4.77

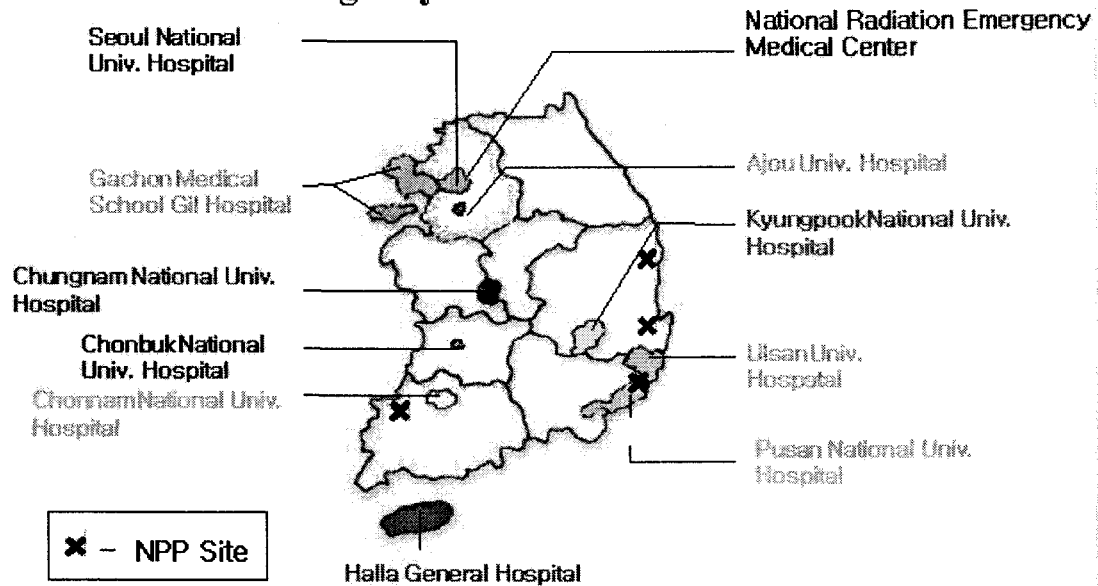
3. 방사선 피폭 선량 예측 표준 기술의 전수

아래는 국내의 방사선 동위원소 사용업체 및 원자력발전소에 대한 내용을 담고 있는 그림이다. 즉, 국내의 917개 방사선 동위원소 관련업체 및 국내 4개 지역의 20기의 원자력발전소에는 불의의 사고가 항시 발생할 수 있는 상황이므로 본 연구과제는 연구내용도 중요하지만 기술의 표준화 및 국내 관련 연구자들에게의 기술 전수도 매우 중요하므로 아래와 같은 업무를 수행하였다.




Radiation Emergency Medical Support System

☐ Radiation Emergency MC & NPP



- ◆ 국내 multi-casualty 사고에 대비한 기술 protocol의 표준화 작업의 일환으로 IAEA 에서 추천 초빙된 IAEA biodosimetry specialist인 Dr. Darroudi 와 Dr. Hayata를 모시고 국내 연구진 10인을 대상으로 IAEA 지원 Workshop (National Training Course on Biological Radiation Dosimetry)을 개최하여 Standard Technique Transfer (표준 기술 전수)를 지원하였음 (2004년 11월 4일 ~ 11월 12일)
- ◆ Workshop for National Training Course on Biological Radiation Dosimetry에 대한 IAEA 홈페이지에 게시된 내용을 첨부하였음.

ROK/9/045 Improving Medical Preparedness in Response to Radiation Emergencies		
Training Courses: Personnel - TRC Staff		
TRC#001 NATIONAL TRAINING COURSE ON BIOLOGICAL RADIATION DOSIMETRY		
Technical Officer:	<u>Watanabe, Naoyuki (NAHU)</u>	
Implementation Officer:	<u>Bischoff, Gerard Lucien (TCPA)</u>	
Implementation Clerk/Assistant:	<u>Voulgaris-Muchar, Jeanette (TCPA)</u>	
Course Director:	<u>Kang, Chang-Mo</u>	

◆ 아래에 Workshop 일정을 첨부하였음.

**National Training Course 2004 on Biological Radiation
Dosimetry Supported by IAEA for Management of Patients
with Radiation Exposures**

(Programme: IAEA Ref. *C7-ROK-9.045-001*)

Purpose: To establish nationally shared protocol of assessment of radiation biodosimetry.

Place: Lab. of Radiation Cytogenetics, KIRAMS, Seoul, Korea

Periods: November 4. (Thu) ~ November 12. (Fri), 2004.

Participants: Below 10 people from KAERI, KINS, RHRI, SNU

involved in radiation biological dosimetry and physical dosimetry

Lecturers: Dr. Hayata (Japan) & Dr. Darroudi (The Netherlands)

Contact to Dr. Chang-Mo Kang (+82-2-970-1361, kangcm@kcch.re.kr),

Secretary: Gieunn Kim (+82-2-970-1403, gieunn@kcch.re.kr)

Office FAX: +82-2-970-2404

Lectures

- 1) Role of cytogenetical biodosimetry in the radiation accident: Experience in Tokaimura criticality accident (Dr. Hayata)
- 2) General introduction of chromosome aberrations induced by radiation (Dr. Hayata)
- 3) Protocol for fusion-PCC (Dr. Darroudi)
- 4) Recent development in the field of cytogenetical radiation dosimetry (Dr. Hayata)
- 5) Effect of low and high LET radiation on DNA (Dr. Darroudi)
- 6) Intrinsic DNA damage and DNA repair mechanisms (Dr. Darroudi)
- 7) Current techniques in radiation mutagenesis (Dr. Darroudi)

Practices

- * FISH & fusion-PCC (Dr. Darroudi & Dr. Kang) * Chemical-PCC (Dr. Hayata & Dr. Kang)

세 부 일 정

- ◆ 일 시 : 2004. 11. 4(목) 09:00 - 12(금) 18:00
- ◆ 장 소 : 원자력의학원 국가방사선비상진료센터 3층 방사선선량평가연구실
- ◆ 일 정

11월 4일(목)

시간	강의/ 실험	지도
09:00-09:30	인사말	임상무
09:30-10:15	(강의) Cytogenetic assays to define DNA damage induction by physical and chemical agents	Firouz Darroudi
10:15-10:30	Coffee break	
10:30-11:10	(실험) Blood sampling and setting up lymphocytes cultures	강창모 Firouz Darroudi
11:10-12:00	(강의) Chromosome aberrations induced by radiation	Isamu Hayata
12:00-13:30	Lunch break	
13:30-14:20	(강의) Role of cytogenetic biodosimetry on the radiation accident	Isamu Hayata
14:20-18:00	(실험) Fusion of interphase human lymphocytes with CHO mitotic cells using PEG	Firouz Darroudi

11월 5일(금)

시간	강의/ 실험	지도
09:00-10:15	(강의) Low and high LET radiation induced chromosomal aberrations: Mechanisms and Spectra	Firouz Darroudi
10:15-10:45	Coffee break	
10:45-12:00	(강의) Recent development in the field of cytogenetically radiation dosimetry	Isamu Hayata
12:00-13:30	Lunch break	
13:30-14:45	(실험) Slide preparation	Firouz Darroudi
14:45-15:15	Coffee break	
15:15-17:30	(실험) PHA-stimulated lymphocytes will be treated with Calyculin A to induce PCC	Isamu Hayata

11월 6일(토)

시간	강의/ 실험	지도
09:00-09:15	(실험) To add Colcemid to cultures set up for metaphase analysis on Nov. 4	강창모
09:15-10:15	(실험) Slide preparation of PCC experiment using Calyculin A	Isamu Hayata
10:15-11:00	(실험) Coffee break with Discussion	Isamu Hayata
11:00-12:30	(실험) Fixation of cultures for metaphase analysis, and slide preparations	강창모 Firouz Darroudi

11월 8일(월)

시간	강의/ 실험	지도
09:00-10:15	(강의) Biological dosimetry using FISH-based translocation assay	Firouz Darroudi
10:15-10:45	Coffee break	
10:45-12:00	(강의) DNA repair syndromes relevant to X-rays	Firouz Darroudi
12:00-13:00	Lunch break	
13:00-18:00	(실험) Fluorescence in situ hybridisation (FISH) assay	강창모 Firouz Darroudi

11월 9일(화)

시간	강의/ 실험	지도
09:00-10:15	(강의) Lessons learned from Chernobyl catastrophe	Firouz Darroudi
10:15-10:30	Coffee break	
10:30-12:15	(실험) Staining and analysing preparations made from PCC experiments	강창모 Firouz Darroudi
12:15-13:00	Lunch break	
13:00-18:00	Discussion	강창모 Firouz Darroudi

11월 10일(수)

시간	강의/ 실험	지도
09:00-12:00	(실험) To continue for FISH assay using chromosome and centromere specific probes	강창모 Firouz Darroudi
12:00-13:00	Lunch break	
13:00-18:00	(실험) FISH assay	강창모 Firouz Darroudi

11월 11일(목)

시간	강의/ 실험	지도
09:00-12:00	(실험) FISH assay	강창모 Firouz Darroudi
12:00-13:00	Lunch break	
13:00-18:00	(실험) Cytology scoring (Metaphase/ dicentric analysis, PCC in G0/G1 and G2 cells)	강창모 Firouz Darroudi

11월 12일(금)

시간	강의/ 실험	지도
09:00-10:15	(강의) Modulating effect of inhibitors of DNA repair as a tool to improve radio- and chemo-therapy treatment	Firouz Darroudi
10:15-10:30	Coffee break	
10:30-12:15	(실험) Cytology scoring (FISH-based translocation analysis)	강창모 Firouz Darroudi
12:15-13:15	Lunch break	
13:15-17:00	(실험) Scoring discussion of results from practical	강창모 Firouz Darroudi
17:00-18:00	Closing	강창모 Firouz Darroudi

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

구분 단계	단계별 목표	달성도
3 단계 (2003-2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 방사선 피폭 선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 생화학적 및 생물학적 지표를 이용한 방사선 피폭선량 예측기술 타당성 검토 및 모델 확립 - Multi-casualty 사고에 대한 피폭 환자의 피폭 선량 평가법 확립 (PCC, MN, FISH) - 만성 저선량 피폭환자의 세포 유전학적 평가기술 타당성 검토 및 모델 확립 - 방사선 피폭환자 및 방사선 종사자의 피폭선량별 방사선 인체 장애 영향 평가법 구축 - 방사선 피폭환자의 비상진료를 위한 생물학적 선량측정법의 수학적 정량화 	100%
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 새로운 피폭 선량 예측 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 생화학적 피폭 예측 신규 기술 개발 (p21 assay, H2AX assay) - 피부 (생인공 피부) biosensor의 정량화 (p53 assay) - Cluster DNA 손상 분석 기술 확립 및 정량화 - Ecobiodosimetry (환경방사선 생물학적) 지표 개발 	100%

제 2 절 연구개발 성과의 정량화

구 분	1차년도 (2003.3.1 ~ 2004.2.28)		2차년도 (2004.3.1 ~ 2005.2.28)		합 계	
	국내	국외	국내	국외	국내	국외
논문게재	0	5	4	4	4	9
논문발표	14	7	21	5	35	12
특허출원	2				2	
특허등록						
프로그램등록						
기술이전						

제 3 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- ◆ 불의의 방사선 사고에 대비한 의료적 처치에 필수적인 기초적인 자료로 방사선 재해에 대한 체계적인 대책 수립의 기술발전예 질적인 향상을 도모하였음
- ◆ 본 연구에서 개발 확립한 방사선 생물학적 선량평가 방법들을 이용하여 불의의 방사선 피폭 환자 발생시 KINS, 한국 동위원소 협회 및 국가 방사선 비상진료 센터로부터 의뢰된 환자의 방사선 피폭선량을 측정하여 환자치료 및 관리에 활용토록 하였으며, 현재 방사선 피폭환자들에 대한 custom service를 하는 등 방사선 재해에 대한 국가 방재 체계 구축 기반 확립에 기여함.
- ◆ 선진 기술자의 영입 없이 자체적으로 방사선 생물학적 선량평가 체계를 구축하여 방사선의 생체 손상에 대한 판정 연구기술의 국산화에 기여함
- ◆ 방사선 피폭에 의한 인체장해의 각종 손상 발현의 근본적인 원인을 병리조직학적인 indicator 및 biomarker를 통하여 관찰할 수 있는 기술 개발로 피폭환자의 방사선 흡수선량을 예측하여 이에 필요한 치료 대책을 확립하는 데 기반확립을 함

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- ◆ 현재 방사선피폭환자들을 대상으로 custom service를 수행하고 있음
- ◆ 방사선 관련 종사자들의 피폭 사고에 의한 인체 장해 발현 예측에 따른 피폭환자의 치료 및 관리 체계 구축에 활용 기대
- ◆ 방사선에 의한 인체 장해 발현 기전의 분자 생물학적 이론 체계 확립으로 의학적 기초 연구 기술 선진화 및 기전적 방사선 인체 영향 감소 대책 마련 기대
- ◆ 원전주변 주민 및 방사선 작업종사자 등의 방사선 보건관리를 위하여 생물학적 선량 측정법에 의한 피폭선량 예측과 이에 따른 영향 평가로 진료체계 구축 기대
- ◆ 인체 방사선 장해의 영향 평가 및 치료 방안 구축과 방사선 암 환자 치료효율 평가법 구축을 위한 biomarker 및 indicator 등의 수학적 모델의 표준화 및 정량화
- ◆ 방사선 피폭에 의한 생물학적 영향 및 방호기전에 관한 연구에 필요한 기초 자료로 인체 장해의 예방 및 치료법 개발에 기여할 것임
- ◆ 방사선 장해에 대한 예측 평가 기술 향상으로 의료적 치료 대책 수립에 필요한 약제 개발 기법과 검증기술의 개발을 통한 국내 제약업계의 연구 활성화 및 약제 수입에 따른 외화 감소 효과의 경제성 기대
- ◆ 산학연 위탁 및 공동 연구를 통한 방사선 관련 분야 연구의 저변 확대 및 국내 관련 전문가의 연구력 향상과 연구 의욕 고취 기대
- ◆ 원자력 발전소 등 방사선 관련 사업체의 피폭 사고에 대한 국가비상 방재 체계 확립 기대
- ◆ 연수를 통하여 multi-casualties와 같은 대형 방사선사고 피폭환자에 대한 체내 피폭 선량 예측의 정확성 고양을 위하여 국가 상호간 방사선 재해 공동 대응 및 협력 체계 수립의 일환으로 6개국의 나라와 MOU 및 ROD를 체결하였으며, 전문가 양성 및 교육 실시와 상호 정보 교환하기로 함
- ◆ 방사선 생물학적 선량측정법을 통한 triage 확립은 불의의 방사선 사고에 대한 원전 주변의 주민들과 종사자들 그리고 방사선 시설의 작업 종사자뿐 아니라 일반 국민들

의 방사선 피폭에 대한 불안감과 공포를 해소하는데 기여하며 방사선 피폭환자들의 인체 장해 경감과 효과적인 치료를 통해 국민들의 건강 증진을 추구할 수 있을 것으로 사료됨

- ◆ 생물학적 선량측정법 개발은 방사선 직업종사자의 작업 환경 개선, 작업 능력 향상 및 피폭에 의한 장해의 예방 등의 조건 개선에 중요한 기반이 될 것이며 한국적 상황에 맞는 적절하고 효율적인 의료 체제 구축에 도움이 되며 피폭환자의 치료효능의 극대화에 이바지할 것으로 사료됨
- ◆ 방사선 장해에 대한 분자 생물학적 연구 결과를 기초로 하여 방사선피폭에 의한 인체의 각종 손상 발현의 근본적인 원인을 기전적으로 규명할 수 있는 기술을 개발함으로써 피폭 환자의 피폭 선량을 예측하여 이에 필요한 치료 대책을 확립하는데 도움을 줄 것으로 사료됨
- ◆ 방사선 관련 각종 연구가 단편적으로는 선진국 수준의 연구가 원자력의학원 연구팀에서 이루어지고 있지만 근본적인 방사선 장해에 대한 효과적인 연구를 위해서는 관련 분야의 상호 보완적인 연구가 수행되어야 하므로 각 분야의 전문 인력과 연구비의 지원이 우선적으로 되지 않는 상황에서는 핵무기 개발과 원자력 발전소 확충으로 인한 방사선 피폭사고와 방사성 동위원소의 이용 증가로 유발되는 방사능 오염에 대한 국민 우려의 불식과 행복한 삶의 질을 향상시키는데 큰 도움이 되지 않을 뿐만 아니라 방사선 장해의 근본적인 치료 대책 수립에 필요한 기초 자료를 활용하는데 문제점이 많을 것으로 생각된다. 그러므로 선진국 수준의 기술의 진보와 기초 연구를 위해서는 범국가적인 차원에서 많은 노력과 투자를 통하여 기술 자립이 확립될 것으로 전망됨
- ◆ 인체 세포와 동물을 이용한 방사선에 의한 염색체 이상, 미소핵 형성, translocation (FISH) assay, premature chromosome condensation 등의 선량측정법을 기초로 하여 방사선에 의한 장해 발현의 예측 즉 급성, 만성 피폭 장해 및 이차성 암 발현 등과 세포 조직의 방사선 감수성을 파악할 수 있는 방사선 피폭 환자의 치료 및 예방 대책의 수립에 매우 중요한 자료가 될 수 있으며, 이를 토대로 하여 방사선 적응 반응과 radiation hormesis 등의 연구에 지침으로 사용 가능할 것임

- ◆ 자연 방사선에 의한 피폭과 환경 공해에 의한 오존층의 파괴로 직접 인체에 노출되는 우주 방사선에 의해 뚜렷하게 피부암이 증가한다고 보고 되고 있으므로 우주 방사선과 자연 방사선에 의한 피폭으로 발생하는 방사선의 축적 효과와 같은 생물학의 연구에 좋은 초석이 될 것임
- ◆ Translocation (FISH) 법은 축적된 방사선 선량을 환경과 조건에 따라 항상 측정할 수 있기 때문에 population monitoring 이나 우주비행사나 조종사 등의 체내 피폭 흡수선량을 측정할 수 있어 우주방사선 피폭자들의 의료적 역학적 관리 시스템 구축에 이용 가능함
- ◆ 방사선 치료 암 환자의 치료 효율 평가 및 방사선 생물학적 영향 평가 기술 개발은 본 연구에서 개발 확립한 지표를 이용하여 방사선 선원, 방사선 선질, 방사선량, 방사선 선율등과 치료 암 환자의 연령, 성 및 지역적 환경을 고려한 방사선 영향 평가 표준화를 구축 가능함

- 경제적 측면

- ◆ 원자력 에너지 기반으로 한 산업구조의 획기적인 변화는 국내 원자력산업의 지속적인 성장을 위한 원자력산업의 경쟁력 유지에 필요한 원자력 기술 개발과 더불어 원전 사고 및 방사선 피폭 재해 시 신속하고 효율적으로 대처할 수 있는 의료대책의 수립과 이에 필요한 의료기술의 개발이 필수적으로 병행되어야 하므로 그 기본 기술을 제공함으로써 국가 경제적 손실을 막는데 필요한 기술로 제공
- ◆ 방사선 장해에 대한 예측 평가 기술 향상으로 의료적 치료 대책 수립에 필요한 약제 개발 기법과 검증기술의 개발을 통한 국내 제약업계의 연구 활성화 및 약제 수입에 따른 외화 감소 효과의 경제성 기대
- ◆ 방사선 재해 시 신속하고 효율적으로 대처할 수 있는 의료대책의 수립과 이에 필요한 의료기술의 개발 투자를 증진시킬 것임
- ◆ 선진 기술 도입 및 기술자의 영입 없이 자체적으로 방사선 장해 방어 체제를 구축하여 방사선 손상에 대한 판정 연구기술의 국산화에 기여

- ◆ 고비용을 필요로 하는 인체 대상 연구를 대체 할 수 있는 동물 시험법 개발 및 적용
- ◆ 원자력 관련 산업시설 주변 및 자연방사선 고준위지역 환경실태 파악의 기초 자료를 제공함으로써 사고 방지 및 불의의 사후 고비용 절감 효과
- ◆ 산학연 위탁 연구를 통한 방사선 생물학 연구의 저변 확대 및 국내 관련 전문가의 연구력 향상과 기술 제공으로 인한 연구 의욕 고취에 기여
- ◆ Radiotherapy 시 의학적 예후 추정 기술을 향상시킴으로써 종양의 완치율을 높이는데 기여하고 부작용을 감소시킴으로써 궁극적으로는 의료비용의 감소에 기여할 수 있음

- 사회적 측면

- ◆ 방사선 생물학적 피폭 선량 평가 방법을 구축함으로써 불의의 방사선사고 시 정확한 피폭 선량 계산을 할 수 있으므로 피폭환자에 대한 적절한 의료대책을 세울 수 있음
- ◆ 방사선 작업 종사자 및 원전주변 주민 등의 방사선 보건관리를 위하여 방사선 생물학적 피폭 선량 평가 시스템 측정법에 의한 피폭선량 예측과 이에 따른 영향 평가로 진료체계 구축
- ◆ 방사선 피폭자 진료 전문 병원에서의 진료 대책 수립을 위한 기초 자료로의 활용 및 원전과 방사선 관련 산업체 그리고 연구소의 작업종사자들의 건강 증진대책과 더불어 핵 사고에 대한 불안감 해소 및 안전 대책 수립에 기여하고 대 국민 교육과 홍보를 위한 기반자료로 활용
- ◆ 방사성 동위원소를 이용한 연구 및 치료 등에 종사하는 종사자, 원폭 피해자, 원전종사자 및 인근주민들의 건강진단과 추적 조사를 통하여 방사선 피폭으로 인한 이상유발의 조기진단과 치료에 적극적으로 활용할 수 있어 국민의 건강증진과 안전한 원자력 이용에 도움을 줄 것으로 사료됨
- ◆ 방사선과 다른 환경 돌연변이원과 인체 영향 차이 분석에 활용
- ◆ 방사선 상해분쟁가능성 및 대책수립에 관한 과학적 대응자료로서의 활용

- ◆ 방사선 방호 guideline설정을 위한 기초 자료로서의 활용가능
- ◆ 방사선 관련 작업종사자 및 원전지역 거주자의 지속적인 저준위 노출영향을 모니터링 하는 기술로 활용
- ◆ 자연방사선 고준위 지역 및 원자력 관련 산업의 환경실태 파악의 자료 제공
- ◆ 자연방사선 고준위 지역 및 원자력 시설 주변 환경에 대한 무조건적 불신 해소를 위한 시험자료 제공
- ◆ 환경오염 대비 자료 확립에 의한 원자력 이용 시설 주변의 환경 모니터링 및 주변 환경에 대한 무조건적 불신 해소를 위한 자료 제공
- ◆ 방사선 관련 종사자 및 방사선 피폭환자의 추적조사의 체계 확립으로 체계적인 방사선 피폭관련 자료의 확보 및 관리 업무 수행가능
- ◆ 방사선 피폭자의 진료를 위한 첨단의료 기술개발에 관한 연구사업에 대한 국가적인 투자 유도로 원자력 정책전반에 관한 국민의 신뢰도 증진

- 기술적 측면

- ◆ 방사선 피폭에 의해 발생하는 인체 장애를 파악하기 위한 피폭자의 피폭선량과 선량반응 관계 규명
- ◆ 방사선 관련 종사자 및 방사선 피폭환자의 추적조사의 체계 확립으로 종합적인 방사선 피폭관련 자료의 확보 및 관리 업무 수행가능
- ◆ 상기 문제 해결에 필요한 생물학적 선량 측정법의 개발을 본 과제에서는 사람의 말초 혈액과 동물을 이용하여 세포 유전학적인 변화를 관찰하여 방사선 장애에 따른 장애 발현의 임상 증상을 체계적으로 파악하여 피폭선량과의 연관성 연구를 가능케 함
- ◆ 원전 주변 주민 및 방사선 작업종사자 등의 방사선 보건 관리를 위하여 생물학적 선량 측정법에 의한 피폭 예측 선량 측정이 가능해 짐을 기대
- ◆ 방사선 피폭에 의한 생물학적 영향 및 방호기전에 관한 연구에 필요한 기초 자료로 인체 장애의 예방 및 치료법 개발에 기여
- ◆ 동물의 세포를 이용한 간편한 환경 방사선 생물학적 선량 측정법 개발 및 가축을

대상으로 선량측정법의 적용 가능성 확인으로 피폭의 선량-반응식 도출 가능

- ◆ 환경 방사선 오염여부의 지속적 확인을 위한 개선된 동물모델 설정함
- ◆ 원자력시설 주변 동물의 방사선 오염실태 파악을 위한 기술 확립함
- ◆ 자연방사선 고준위지역 거주 동물의 방사선 생물학적 평가를 위한 자료 획득
- ◆ 방사선에 의한 인체장해 발현의 분자생물학적 이론을 바탕으로 한 의학적 치료기술 선진화 기대됨
- ◆ 이온화 방사선에 의한 생물학적인 영향을 평가하는 방법으로 활용되고 있는 전통적인 소핵분석법에 Pan-centromeric probe를 사용하는 FISH기법을 사용함으로써 저선량의 방사선에 의한 염색체 손상을 평가할 때 제한점으로 여겨져 왔던 민감도를 향상시킴
- ◆ pancentromeric probe를 사용한 FISH기법을 통하여 방사선에 의한 영향 평가 시 동원체를 포함하지 않는 MN만을 선택적으로 scoring함에 따라 MN분석의 민감도를 향상시켜 직업적으로 저선량의 방사선에 노출된 근로자들에 대한 생물학적 모니터링 방법 확립

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

- Allio, T., Donner, E.M. and Preston, R.J., A combination of the roles of p53 mutation and Ara C inhibition in the enhancement of bleomycin-induced chromatid aberrations in mouse and human cells, *Mutat. Res.*, 447, 227-237, 2000
- Almasy Z, Krepinsky AB, Bianci A, Koteles GJ. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl Radiat Isot* 1987; 38: 241-249.
- Backer LC, Grindem CB, Corbett WT, Cullins L, Hunter JL. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci Total Environ* 2001; 274: 161-169.
- Bauchinger, M., E. Schmid, H. Zitselsberger, H. Braselmann and U. Nahrestedt, radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe, *International Journal of Radiation Biology*, 64, 179-184, 1993
- Brewen JG, Preston RJ, Jones KP, Gosslee DG. Genetic hazards of ionizing radiations: cytogenetic extrapolations from mouse to man. *Mutat Res* 1973; 17: 245-254.
- Brewen JG, Preston RJ, Littlefield LG. Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to ⁶⁰Co gamma-rays. *Radiat Res* 1972; 49: 647-656.
- Catena C, Asprea L, Carta S, Tortora G, Conti D, Parasacchi P, Righi E. Dose-response of X-irradiated human and equine lymphocytes. *Mutat Res* 1997; 373: 9-16.
- Chung HW, Kim SY, Sohn EH, Ha SW. Analysis of chromosome aberrations in nuclear-power-plant workers considering the lifetime of lymphocytes. *Int J Radiat*

Biol 2000; 76: 923-927.

Chung, H.W., S.J. Kang and S.Y. Kim, A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzotriol, *Mutat. Res.* 516, 49-56, 2002

Chung, H.W., S.Y. Kim, Y.H. Cho, T.H. Kim, C.G. Cho and S.H. Ha, Effects of 3-Amino benzamide and cytosine arabinoside on the frequencies of dicentric and translocation in human lymphocyte induced by radiation, *Environ. Mutagen & Carcinogen*, 22(3), 205-210, 2002

Collins, S.J. and M. Groudine, Amplification of endogeneous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature*, 298, 679-681, 1982

Crott, J.W., S.T. Mashiyama, B.N. Ames and M. Fenech, The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 10, 1089-1096, 2001

Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R.C. Gallo and C.M. Croce, Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7824-7827, 1982

Eastmond, D.A., M. Schuler and D.S. Rupa, Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells, *Mutat. Res.*, 348 (4), 153-162, 1995

Fenech M., The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.*, 285(1), 35-44, 1993

- Fenech, M., The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95, 2000
- Fenech, M., The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method, *Mutat. Res.*, 392, 11-18, 1997
- Fieldner TM, Nothdurft W, Steinbach KH. Blood cell changes after radiation exposure as an indicator for hemopoietic stem cell function. *Bone Marrow Trans* 1988; 3: 77-84
- Flores MJ, Pinero J, Ortiz T, Pastor N, Mateos JC, Cortes F. Both bovine and rabbit lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide show an adaptive response to radiation damage. *Mutat Res* 1996; 372: 9-15.
- Fucic, A., D. Markucic, A. Mijic, A.M. Jazbec, Estimation of genome damage after exposure to ionizing radiation and ultrasound used in industry, *Environ. Mol. Mutagen.* 36, 47-51, 2000
- Geng L, Potten CS. Changes after irradiation in the number of mitotic cells and apoptotic fragments in growing mouse hair follicles and in the width of their hairs. *Radiat Res*, 123:75-81, 1990.
- Griffin CS, Scott D, Papworth DG. The influence of DNA content and nuclear volume on the frequency of radiation-induced chromosome aberrations in *Bufo* species. *Chromosoma* 1970; 30: 228-230.
- Guskova AK, Barabanova AV, Baranov AY, et al. Acute radiation effects in victims of the Chernobyl nuclear power plant accident. *UNSCEAR Report*, 613-631, 1988.
- He JL, Jin HY, Jin LF, Gao SY. Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Biomed Environ Sci* 2000; 13: 32-36.
- IAEA. Biological dosimetry : chromosomal aberration analysis for dose assessment,

Technical report 260. IAEA publications, Vienna, 1986.

IAEA. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. Vienna:IAEA-SM-199/4, IAEA publications, Vienna, 1969.

Ishihara T, Sasaki M. Radiation-induced chromosome damage in man. New York: Alan R. Liss. 1983: 561-583.

Kim SH, Cho CK, Kim TH, et al. Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast-neutron irradiations. *Anticancer Res* 13:1587-1592, 1993.

Kim SH, Han DU, Lim JT, Jo SK, Kim TH. Induction of micronuclei in human, goat, rabbit peripheral blood lymphocytes and mouse splenic lymphocytes irradiated in vitro with gamma radiation. *Mutat Res* 1997; 393: 207-214.

Kim TH, Kim SH, Kim JH, et al. Measurement of apoptotic fragments in growing hair follicles following r-ray irradiation in mice. *Anticancer Res*, 16:189-192, 1996.

Klingermem AD, Halperin EC, Erexson GL, et al. The persistence of lymphocytes with dicentric chromosomes following whole-body X irradiation of mice. *Radiat Res*, 124:22-27, 1990.

Krysgio, A., W.U. Ulrich Muller, A. Wojdik, N. Kotschy, S. Grobelny and C. Strefer, A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay, *Int. J. Radiat. Biol.*, 77(11), 1087-1093, 2001

Leonard A, Gerber GB, Papworth DG, Decat G, Leonard ED, Deknudt G. The radiosensitivities of lymphocytes from pig, sheep, goat and cow. *Mutat Res* 1976; 36: 319-332.

Leonard, A., G. Deknudt, E.D. Leonard and G. Decat, Chromosome aberrations in

- employees from fossil-fueled and nuclear-power plants. *Mutat. Res.*, 138(2-3), 205-212, 1984
- Littlefield LG, Joiner EE, Colyer SP, et al. Modulation of radiation-induced chromosome aberrations by DMSO, an OH radical scavenger, 1. Dose-response studies in human lymphocytes exposed to 220 kV X-rays. *Int J Radiat Biol*, 53:875-890, 1988.
- Mitchell, C. and A. Norman. The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 52, 527-535, 1987
- Montero, R., L. Serrano and P. Ostrosky, In vitro induction of micronuclei in lymphocytes: the use of bromodeoxyuridine as a proliferation marker, *Mutat. Res.*, 391, 135-141, 1997
- Muirhead CR, Boice JD Jr, Raddatz CT, Yoder RC. Comparison of dose histories for U.S. nuclear power plant workers, based on records held by a major dosimetry service company and on the NRC REIRS database. *Health Phys* 1996; 70: 645-650.
- Müller W-U, Streffer C. Biological indicators for radiation damage. *Int J Radiat Biol* 1991; 59: 863-873.
- Müller, W.U. and C. Streffer, Micronucleus assays. In: Obe G, editor. *Advances in mutagen research*(Vol 5). Berlin: Springer-Verlag. p 1-34, 1994
- Natarajan, A.T., A.S. Balajee, J.J.W.A. Boei, S. Chatterjee, F. Darroudi, M. Grigorova, M. Noditi, H.J. Oh, P. Slijepcevic and S. vermeulen, Recent developments in the assessment of chromosomal damage, *Int. J. Radiat. Biol*, 66(5), 615-623, 1994
- Neel JV, Schull WJ, Awa AA, et al. The genetic effects of the atomic bombs:

- problems in extrapolating from somatic cell findings to risk for children, In Baverstock KF, Stather JW, ed Low dose radiation : Biological bases of risk assessment, Taylor & Francis, London:42-53, 1989.
- Norppa, H., L. Renzi and C. Lindholm, Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525, 1993
- Obe, G., P. Pfeiffer, J. R. K. Savage, C. Johannes, W. Geodecke, P. Jeppeson, A.T. Natarajan. W. Mortinez-Lopez, G.A. Folle and M.E. Drets, Chromosome aberrations' formation, identification and distribution, *Mutat. Res.*, 504, 19-36, 2002
- Pantelias GE, maillie HD. The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiat Res*, 99:140-150, 1984.
- Peace BE, Succop P. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values? *Mutat Res* 1999; 425: 225-230.
- Pinkel, D., T. Strauma and J.W. Gray, Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 2934-2938., 1986
- Potten CS, Geng L, Taylor P. Hair medullary cell counts : a simple and sensitive indicator of radiation exposure. *Int J radiat Biol*, 57:13-21, 1990.
- Ramalho A, Sunjevaric I, Natarajan AT. Use of frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mutat Res* 1988; 207: 141-146.
- Ramalho AJ, Nascimento ACH, Natarajan AT. Dose assesments by cytogenetic

- analysis in the Goiania(Brasil) radiation accident. *Radiat Protect Dosimetry* 1988; 25: 97-100.
- Scarfi MR, Lioi MB, Di Berardino D, Zeni O, Coviello AM, Matassino D. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in bovine lymphocytes. *Mutat Res* 1993; 289: 291-295.
- Scott D, Lyons CY, Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage. *Nature* 278:756-758, 1979.
- Serrano-Garcia, L. and R. Montero-Montoya, Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38, 8-45, 2001
- Sgura, A., A. Antoccia, M.J. Ramirez, R. Marcos, C. Tanzarella and F. Degrassi, Micronuclei, centromere-positive micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C or vincristine treatment, *Mutat. Res.*, 392 (1-2), 97-107, 1997
- Shimizu, N., N. Itoh, H. Utiyama and G. M. Wahl, Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The journal of Cell Biology*, 140, 1307-1320, 1998
- Shimizu, N., T. Shimura and T. Tanaka, Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research*, 448, 81-90, 2000
- Shliakhtenok AS. Dynamics of $^{134+137}\text{Cs}$ accumulation in insects inhabiting the 30-kilometer zone of Chernobyl Nuclear Power Station. *Radiats Biol Radioecol* 2003; 43: 93-96.
- Spirin EV. Reconstruction of I-131 in milk and exposure doses to the thyroid gland of

- cattle after the Chernobyl AES. *Radiats Biol Radioecol* 2002; 42: 564-568.
- Stenphan G, Hadnagy W, Hammermaier C, Imhof U. Biologically and physiologically recorded doses after an accidental exposure to ^{60}Co gamma-rays. *Health Phys* 1983; 44: 409-411.
- Straube E, Straube W, Romer T. Does occupational nuclear power plant radiation affect conception and pregnancy? *Early Pregnancy* 1995; 1: 130-133.
- Sutiakova I, Sulik E, Rimkova S, Sakalikova A, Sutiak V. Micronucleus frequency in cytokinesis-blocked bovine lymphocytes from regions with different pollution levels in Slovakia. *Bull Environ Contam Toxicol* 2001; 66: 449-455.
- Takata, M., M.S. Sasaki, E. Sonada, C. Morrison, M. Hashimoto and S. Takeda, Homologous recombination and non-homologous end-rejoining pathways of DNA double strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *EMBO J.* 17, 5497-5508, 1998
- Tamura H, Sakurai M, Sugahara T. Chromosome aberrations of the peripheral lymphocytes in rabbits exposed to single and fractionated whole-body X-irradiations. *J Radiat Res* 1978; 19: 108-114.
- Tempel K. Chernobyl and its consequences—some veterinary medical points of view. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 1997; 25: 401-405.
- Thierens H, Vral A, Barbe M, Aousalah B, De Ridder L. A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay. *Mutat Res* 1999; 445: 105-111.
- Thierens H, Vral A, Barbe M, Meijlaers M, Baeyens A, Ridder LD. Chromosomal radiosensitivity study of temporary nuclear workers and the support of the adaptive response induced by occupational exposure. *Int J Radiat Biol* 2002; 78:

1117-1126.

Thierens H, Vral A, Morthier R, Aousalah B, De Ridder L. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis* 2000; 15: 245-249.

Thierens, H., A. Vral and L. De Ridder, A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency, *Mutat. Res.* 360, 75-82, 1996

Thomson EJ. Perry PE. The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploid, *Mutagenesis*, 3:415-418, 1988.

UNSCEAR, Report : Sources and effects of ionizing radiation, Annex G, Early effects in man of high doses of radiation, chapter III : prognostic indicators and biological dosimetry (United Nations, New York), 583-612, 1988.

Vral, V., H. Thierens and D. Ridder, *In vitro* micronucleus -centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.*, 71 (1), 61-68, 1997

Zijno, A., F. Marcon, P. Leopardi and R. Crebelli, Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by *in situ* hybridization with a centromeric DNA probe: implications for the human lymphocyte *in vitro* micronucleus assay using cytochalasin B, *Mutagenesis*, 9, 225-232, 1994

Zwingmann, I.H., I.J. Welle, M. van Herwijnen, J.J.M. Engelen, P.A.E.L. Schilderman, T. Smid, J.C.S. Kleinjans, Oxidative DNA damage and cytogenetic effects in flight engineers exposed to cosmic radiation, *Environ. Mol. Mutagen.* 32, 121-129, 1998