

노인인구에서 요중 뮤콘산과 인슐린저항성의 관련성

서울대학교 의과대학 예방의학교실, 서울대학교 의학연구센터 환경의학연구소¹⁾,
서울대학교 보건대학원 보건통계학과²⁾

박현승 · 서정철 · 김진희¹⁾ · 배상혁¹⁾ · 임연희²⁾ · 조수현 · 홍윤철

— Abstract —

Relationship Between Urinary t, t-muconic Acid and Insulin Resistance in the Elderly

Hyun-Seung Park, Jeong-Cheol Seo, Jin-Hee Kim¹⁾, Sang-Hyuk Bae¹⁾,
Youn-Hee Lim²⁾, Soo-Hun Cho, Yun-Chul Hong

*Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Seoul National University
Institute of Environmental Medicine, Seoul National University Medical Research Center¹⁾
Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Seoul National University²⁾*

Objectives: To examine the associations between the urinary t, t-muconic acid (t, t-MA) concentration and three indices of insulin resistance; namely, the homeostasis assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, blood insulin level and fasting glucose level.

Methods: A panel study was performed on the elderly at a public health care center population in the northern area of Seoul between 2008 and 2010. The participants were 560 elderly, over 60 years of age whose urinary t, t-MA and insulin resistance indices had been measured; questionnaires were completed by these participants. A generalized linear mixed (GLM) analysis was adjusted for age, sex, drinking, urinary cotinine, exercise, vitamin intake and body mass index, at a significance level of $p < 0.05$.

Results: A total of 411 participants were finally analyzed after excluding those with diabetes and only one visit to the public health care center. Higher urinary t, t-MA concentrations were linearly associated with the HOMA-IR index, blood insulin level and fasting glucose level in the simple and fully adjusted GLM models. Although there were few limitations, a portion of insulin resistance was proven to be explained by exposure to benzene using r -squared. A significant relationship was also observed between urinary t, t-MA and malondialdehyde (MDA) using the same GLM models.

Conclusions: Urinary t, t-MA is related to the development of insulin resistance which is a key factor for development of diabetes and its complications induced by oxidative stress

Key words: Trans, Trans-muconic acid, Insulin resistance, Oxidative stress

서 론

요중에서 측정되는 trans,trans-muconic acid (t,t-MA)는 벤젠의 대사산물중 하나로 주로 요중 s-PMA와

함께 0.1~10 ppm 사이의 저농도에서 벤젠 노출을 평가하는데 유용한 것으로 알려져 있고, 또한 소변으로 배출된다는 장점 덕분에 측정도 용이하여 노출지표로서 이것들이 주로 이용되고 있다^{1,2)}. 0.1~10 ppm 사이의 저농

도 벤젠 노출인 경우에 대사과정을 살펴보면 간에서 여러 대사효소를 통하여 70~85% 정도가 phenol로 대사되고, 각 5~10% 정도는 catechol 및 trans,trans-muconic acid (t,t-MA)로 대사되며, 1% 미만에서는 s-phenylmercapturic acid (s-PMA)가 된다³⁾. 그런데 최근에는 근로자의 경우라도 직업에 따라서 앞서 언급한 수준보다 낮은 농도의 벤젠에 노출되는 경우도 있고 더군다나 일반인구집단에서 환경적인 원인에 의해서 노출되는 경우에는 아주 낮은 농도의 벤젠에 노출되게 된다. 실제로 2009년 대기환경연보에 따르면 서울의 경우에도 벤젠은 1 ppb를 밑도는 경우가 대부분이다⁴⁾. 따라서 기존에 벤젠의 대사산물로서 생체지표로 이용되던 t,t-MA나 s-PMA가 과연 이런 환경적인 아주 낮은 농도의 벤젠의 노출까지 반영할 수 있는지에 대한 논란이 있는 상태이다⁵⁾.

요중 t,t-MA의 원물질인 벤젠은 잘 알려진 직업적인 노출 뿐만 아니라 실외 혹은 실내 공기 중에도 매우 저농도로 존재하는데, 벤젠에 대한 규제가 잘 갖추어진 국가에서 대다수의 사람들에게는 이러한 환경적인 벤젠이 더 중요한 문제이며 이때 벤젠의 노출로는 주로 석유를 사용하는 교통수단의 배기가스와 흡연이 중요한 원인인자로 작용한다^{6,7)}. 벤젠의 장기적인 노출과 이로 인한 질병과의 관계는 직업적인 노출과 관련된 급성골수세포백혈병에서 가장 잘 알려져 있으며, 그 외에 최근에는 벤젠으로 인한 만성림프세포백혈병, 만성골수세포백혈병, 급성림프세포백혈병 및 호지킨병과의 관계도 밝혀지고 있다^{8,9)}. 이러한 직업적인 고농도 벤젠 노출에서의 건강영향을 밝힌 연구 외에도, 최근에는 1 ppm 미만의 저농도 벤젠에 직업적으로 노출된 사람들에게서 백혈구, 과립구, 림프구 및 혈소판의 숫자가 노출되지 않은 사람들에 비해 유의하게 감소한다는 연구도 있다¹⁰⁾.

벤젠의 대사 중 생성된 물질들 중에서 어떤 물질이 어떤 기전을 통하여 벤젠의 독성을 나타내지는 아직까지는 명확히 알려져 있지 않으나, 가능한 기전의 하나로 대사과정에서 생성되는 hydroquinone과 catechol 대사체가 생성하는 semiquinone과 활성산소물질에 의한 산화손상이 제시되고 있다^{2,6,11,12)}. 다른 연구들에 따르면 이러한 산화손상기전은 여러 질병의 발생에 있어서 그것만으로 충분하지는 않으나 필요조건으로 관찰되는 경우가 많은데¹³⁻¹⁵⁾, 벤젠의 경우에도 대사과정에서 활성산소물질이 발생되는 만큼, 기존에 잘 알려진 조절기계에 대한 건강영향 외에 다른 질병을 유발할 가능성도 충분히 있다고 할 수 있겠다.

특히 그 중 하나인 당뇨를 예로 들면 산화손상기전은 질병의 발생과 이후에 합병증으로 진행되는 과정에 영향을 주는 중요한 기전의 하나로 지적되고 있으며, 산화손상물질의 증가는 인슐린 저항성의 증가와 관련이 있다고

보고된 바 있다¹⁵⁾. 인슐린에 대한 비정상적인 생체 반응이 정상적인 인슐린 범위에서도 관찰되는 것을 인슐린 저항성이 있다고 하는데, 이는 특히 제 2형 당뇨 발생에 가장 중요한 위험인자인 동시에 대사증후군 발생의 핵심인자 중 하나로 지적된다¹⁶⁾. 인슐린저항성을 평가하기 위한 표준기법으로 알려진 것은 고인슐린혈증 정상혈당클램프법으로 혈중의 인슐린 농도를 일정하게 유지하면서 전신의 포도당 이용률을 측정하는 방법이다¹⁶⁾. 그러나 이 방법은 침습적이어서 이를 대체하기 위한 방법으로 Homeostasis assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, fasting glucose/insulin ratio (FGIR)이나 quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI)와 같은 생체 지표를 이용하여 간편하게 계산할 수 있는 방법들이 개발되어 널리 사용되고 있고, 그 중 HOMA-IR index는 민감도와 특이도가 높으면서도 간편하고, 저렴한 비용으로 짧은 시간 안에 비교적 쉽게 할 수 있는 방법으로 자주 사용된다¹⁷⁾.

본 연구의 첫째 목적은 노인인구집단에서 요중 t,t-MA와 인슐린저항성 사이에 유의미한 관계가 있는지를 파악하는 것이고, 둘째 목적은 만약 요중 t,t-MA와 인슐린저항성 사이에 유의미한 관계가 있다면 그 발생 기전으로 의심되는 산화손상지표의 하나인 소변 중 malondialdehyde (MDA)가 인슐린저항성과 어떤 관계가 있는지 밝혀내는 것이다.

연구대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 2008년에서 2010년 사이에 서울시 성북구에 위치한 치매지원센터와 길음종합사회복지관에 한번 이상 방문하여 건강검진을 받은 60세 이상의 노인들 중 연구에 대한 설명을 듣고 동의한 560명을 대상으로 시행되었다. 그 중에서 당뇨로 진단받은 뒤 치료를 하지 않았거나 치료중인 91명을 제외하였으며, 또한 최소한 2회 이상 반복해서 방문한 사람들만을 포함하였고 최종적으로 요중 t,t-MA의 측정치가 없는 10명을 제외한 최종 대상자 411명(72.3%)를 이용하여 패널연구를 수행하였다.

2. 연구 방법

1) 설문 조사

설문조사는 대상자들이 치매지원센터와 길음종합사회복지관에 처음으로 방문하였을 때 앞서 언급한 과정을 통하여 연구에 포함되는 경우에 시행되었으며, 면접 교육을 받은 조사원이 구조화된 설문지를 이용하여 각 대상자의

인구학적 정보, 생활 습관, 과거 및 현재의 질병력 및 주변 환경 노출력에 대한 정보를 얻어내었다.

2) 노출지표 및 임상적 검사

(1) 요중 trans,trans-muconic acid (t,t-MA)

소변 시료는 소변 시료컵 1개를 활용하여 채취하였다. 시료 채취 후 저온을 유지하기 위하여 고안한 아이스박스에 담아서 운반하였고, 분주하여 분석 전까지 섭씨 영하 70도에 보관하였다. 표준원액 t,t-MA (500 mg/L)와 내부표준용액용액(IVA, 2.5 mg/mL)은 각각 메탄올-물 (8:2, v/v)을 혼합한 용액을 이용하여 전처리하였다. 표준물질 5 mg/L는 표준원액을 60 mM의 염산용액으로 10배 희석하여 만들었다. 이동상 용액 A (9%, v/v 메탄올, 150 mM 오르토인산)을 이용해서 다양한 농도 (5~5000 µg/L)의 표준물질을 생성하였고, 50 µl의 t,t-MA에 각 농도 별 표준물질(5 mg/L)를 혼합하여 분석에 사용하였다. SupelcoVisiprep™ vacuum manifold, 24 ports model을 고체상추출(solid phase extraction)에 이용하였고, 세척과정에는 <10 ml/min의 속도를, 시료공급과정에는 <1 ml/min의 속도를 사용하여 주입하였다. 미량원심분리기의 튜브에는 50 µl의 산성화 처리된 소변에 50 µl의 IS 용액과 900 µl의 60 nM 염산용액을 혼합하여 넣었고, 13,000 g로 5분간 원심분리 시행 후 900 µl의 용액을 각 1 mL 씩의 메탄올과 물로 전처리한 BOND ELUT 96, SAX 100 mg을 사용하여 추출하였다. 용기는 1 mL 씩의 25 mM 암모니아-메탄올(95:5, v/v)과 초산에틸로 세척한 뒤 5분간 건조시켰다. 이후 포름산-초산에틸(2:98, v/v)로 만들어진 용리액 800 µl을 사용하여 검체를 추출하였다. SupelcoVisidry™과 Visiprep™ 장비를 사용해서 검체를 25분간 질소건조시킨 뒤, 잔여물을 이동상 용액 A를 사용하여 녹여낸 뒤 20 µl의 미세용기에 넣고 액체크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

(2) 요중 malondialdehyde (MDA)

우선 50 µl의 소변을 150 µl의 0.1125 N 과염소산과 150 µl의 40 mM 티오바르비톨산과 혼합한다. 혼합물은 섭씨 97도에 1시간 동안 배양한 뒤 얼음을 이용하여 20분간 냉각시킨다. 이후 300 µl의 메탄올과 100 µl의 20% 티오바르비톨산과 혼합한뒤 13,000 g의 속도로 5분간 원심분리한 뒤 100 µl의 상층액을 직접 HPLC-FLD system에 주입하여 분석한다. 크로마토그래피는 Agilent 1200 series HPLC (Agilent Technology)를 이용하였고, 50 mM 인산이수소칼륨(pH 6.8) -메탄올, 아세트나이트릴 1:1 용액(40:60, v/v)를 이동상 용액으로 사용하였다.

(3) 인슐린저항성 지표

대상자의 정맥에서 혈액을 채취하여 공복시 혈당과 혈중 인슐린을 측정하였다. 인슐린 저항성과 관계된 Homeostasis assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index을 이용하였고, HOMA-IR index는 혈중에서 췌혈당과 인슐린 수치를 이용하여 다음과 같은 식을 이용하여 계산한 것을 이용하였다: {혈당 (mmol/L) x 인슐린 (µU/L)} / 22.5.

3) 분석 방법

요중 t,t-MA의 성별과 매일 비타민 섭취량에 따른 평균의 차이를 파악하기 위하여 Student's t-test를 시행하고, 각 방문별 요중 t,t-MA의 평균과 요중 코티닌의 사분위수에 따른 각 군의 평균의 차이를 파악하기 위하여 분산분석을 시행하였다. 최종 연구 대상자에게서 반복적으로 측정된 요중 t,t-MA와 공복시 혈당, 혈중 인슐린 수치, HOMA-IR index 및 요중 MDA의 관계를 파악하기 위하여 generalized linear mixed (GLM) analysis를 시행하였다. GLM 분석은 아무것도 보정하지 않은 단순 모델(model 1)과 설문지에서 얻어진 연령, 성별, 음주여부(한다/하지 않는다), 규칙적인 운동여부(한다/하지 않는다), 종합비타민제 섭취여부(하루에 한 알 미만/하루에 한 알 이상), 요중 코티닌 수치 및 체질량지수를 보정한 모델(model 2) 그리고 여기에 추가적으로 PM₁₀, SO₂, O₃, NO₂, 및 CO 같은 대기오염물질을 보정한 모델(model 3)을 구축하여 시행하였다. 그 다음 요중 t,t-MA와 요중 MDA의 관계를 파악하기 위하여 같은 방법으로 보정된 모델들을 사용하여 GLM 분석을 시행하였다. 마지막으로 인슐린저항성 지표들과 요중 MDA가 얼마나 구축된 모델에 의하여 잘 설명되는지 파악하기 위하여 구축된 모델의 설명력을 대상자들 내에서 반복적으로 측정된 자료들로 계산한 r-squared 값(R1)과 서로 다른 대상자들의 측정된 자료로 계산한 r-squared 값(R2)를 Recchia가 고안한 HLMRSQ macro를 이용하여 계산하였다¹⁸⁾. 요중 t,t-MA와 요중 MDA는 요중 creatinine을 보정한 값을 분석에 이용하였으며, 분석에서 사용한 요중 t,t-MA와 공복시 혈당, 혈중 인슐린, HOMA-IR index 및 요중 MDA 수치는 정규분포를 하지 않았기 때문에, 분포의 정규성을 확보하기 위하여 각 변수의 로그 치환값을 이용하였다. 연구 대상자들이 흡연에 직접 혹은 간접으로 얼마나 노출되어 있는지 파악하기 위하여 요중 코티닌을 측정하였고, 수치는 LOD 값인 1 µg/g · crea 보다 작은 경우에 0.5 µg/g · crea으로 10,000 µg/g · crea 보다 큰 경우는 15,000 µg/g · crea으로 표기하였다. 통계 분석은 R (version 2.12.2)와 SAS (version 9.2) 프로그램을 사용하였고,

통계적 유의 수준은 0.05로 하였다.

결 과

연구에 참여한 560명 중 411명이 최종 분석에 포함되었으며, 평균 연령은 대상자 전체에서는 70.5세, 남성에서 71.4세 여성에서는 70.2세였다. 성별은 남성이 105명(25.5%) 그리고 여성이 306명(74.5%)으로 여성이 남성에 비하여 3배 정도 많이 포함되었다. 이를 연령 그룹으로 분리해보면 60대가 188명(45.7%), 70대가 205명(49.9%)이었고 80대 이상은 18명(4.4%)이었다. 연구

대상자중 309명(75.2%)은 음주를 하지 않는다고 답하였고 92명(22.4%)는 음주를 한다고 하였다. 350명(85.2%)의 대상자는 흡연을 하지 않았고, 28명(6.8%)이 과거흡연경험이 있었으며, 26명(6.3%)는 현재도 흡연을 하고 있었다. 규칙적으로 운동하는가에 대한 응답은 그렇다가 250명(60.8%), 아니다가 153명(37.2%)이었다. 종합비타민 섭취에 대한 문항은 302명(73.5%)에서 하루에 한 알보다 적게 먹는다고 답하였고, 73명(17.8%)이 하루에 한 알 이상 섭취한다고 대답하였다(Table 1).

최종 분석된 411명에게서 여러 번 측정하여 누적된 1354회의 반복 측정된 요중 t,t-MA 값의 평균은 0.034

Table 1. Demographic properties of study participants

		Number of participants (%)
Sex	Men	105 (25.5%)
	Women	306 (74.5%)
Age	60 to 69	188 (45.7%)
	70 to 79	205 (49.9%)
	>80	18 (4.4%)
Smoking status	Non-smoker	350 (85.2%)
	Past-smoker	28 (6.8%)
	Current-smoker	26 (6.3%)
	Missing	7 (1.7%)
Alcohol consumption	No	309 (75.2%)
	Yes	92 (22.4%)
	Missing	10 (2.4%)
Regular exercise	No	153 (37.2%)
	Yes	250 (60.8%)
	Missing	8 (2.0%)
Vitamin intake	<1 pill/day	302 (73.5%)
	≥ 1 pill/day	73 (17.8%)
	Missing	36 (8.7%)

Table 2. Urinary t,t-muconic acid by selected demographic variables

		N	Mean ± S.D.* (mg/g creatinine)	p-value
Urinary t,t-muconic acid (all)		1354	0.034 ± 0.041	
Urinary t,t-muconic acid (by visit)	First visit	411	0.023 ± 0.015	<0.01
	Second visit	327	0.047 ± 0.064	
	Third visit	296	0.031 ± 0.030	
	Fourth visit	267	0.035 ± 0.041	
	Fifth visit	53	0.041 ± 0.033	
Sex	Male	105	0.024 ± 0.019	0.51
	Female	306	0.023 ± 0.013	
Quartile for urinary cotinine	<25%	102	0.019 ± 0.009	<0.01
	25-50%	103	0.023 ± 0.015	
	50-75%	102	0.022 ± 0.015	
	>75%	104	0.028 ± 0.018	
Daily vitamin intake	<1 pill/day	302	0.024 ± 0.016	0.04
	≥ 1 pill/day	73	0.020 ± 0.011	

*standard deviation.

mg/g · crea (S.D. 0.041)이었다. 첫 방문에서 411명을 대상으로 측정된 요중 t,t-MA 값의 평균은 0.023 mg/g · crea (S.D. 0.015)이고, 둘째 방문에서는 327명에서 0.047 mg/g · crea (S.D. 0.064), 셋째 방문에서 296명에서 0.031 mg/g · crea (S.D. 0.041), 넷째 방문에서 267명에서 0.035 mg/g · crea (S.D. 0.041) 그리고 다섯째 방문에서 0.041 mg/g · crea (S.D. 0.033)이었다. 방문 시기 별 요중 t,t-MA 농도는 분산 분석을 시행한 결과 그룹 간에 유의한 차이가 있었다. 남자와 여자에 있어서 요중 t,t-MA의 값은 유의한 차이를 보이지 않았지만, 요중 코티닌의 값을 사분위수로 나눈 뒤 각 군에서의 요중 t,t-MA의 평균은 사분위수의 증가에 따라 유의하게 증가하는 경향을 보였다(Table 2).

요중 t,t-MA와 인슐린 저항성 지표와의 관계는 GLM 분석에서 HOMA-IR index, 혈중 인슐린, 공복시 혈당의 세 지표 모두가 아무것도 보정하지 않은 경우 (model 1)에서나 연령, 성별, 음주 여부, 규칙적인 운동여부, 요중 코티닌, 비타민 섭취 여부 및 체질량 지수를 보정한 경우(model 2) 그리고 model 2에 추가적으로 대기오염 기준물질인 PM₁₀, SO₂, NO₂, CO와 O₃을 보정한 경우 (model 3) 모두에서 매우 유의한(p<0.001)상관관계가 있었다. 구축된 각 모델 별 설명력을 살펴보면 인슐린저항성은 model 1에서 요중 t,t-MA만으로도 일부 설명이

가능하였지만 다른 교란변수들을 보정한 경우에(model 2) 그보다 설명력이 커졌으며 결과 변수를 놓고 살펴보면 혈중 인슐린, HOMA-IR index 그리고 공복시 혈당 순으로 설명력이 높았다. 또한 산화손상지표인 요중 MDA와 요중 t,t-MA의 관계도 같은 방법으로 구축된 세 가지의 모델을 이용하여 분석하였으며 세 모델 모두에서 매우 유의한(p<0.001)상관관계를 관찰할 수 있었으며 교란 변수를 모두 보정한 경우(model 3)에서 산화손상은 벤젠의 노출에 의하여 가장 잘 설명되는 것을 알 수 있었다 (Table 3). 추가적으로 요중 t,t-MA와 인슐린 저항성 지표들과의 선형적인 관계를 확인하기 위하여 generalized additive mixed (GAM) model을 사용하여 분석을 실시하였고, 앞서 언급한 model 3에서의 관련성을 살펴본 결과 요중 t,t-MA 농도는 공복시 혈당 및 혈중 인슐린과 HOMA-IR index와의 관계에서 선형성을 나타내었고, 또한 요중 MDA와의 관계 역시 선형성을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 1).

고찰

최근 독일에서 시행한 한 연구를 살펴보면 도시에 거주하는 이상 사람들은 벤젠과 같은 휘발성유기화합물에 지속적으로 노출될 수 밖에 없으며, 따라서 벤젠은 과거와

Table 3. Generalized linear mixed model and r-squared for insulin resistance and log t,t-muconic acid

	Model 1*			R-squared	
	Estimate	Std. error	p-value	Type 1 [§]	Type 2
log glucose	0.019	0.007	<0.001	0.007	0.075
log insulin	0.138	0.037	<0.001	0.021	0.073
log HOMA-IR	0.157	0.040	<0.001	0.025	0.076
log MDA	0.292	0.021	<0.001	0.108	0.088
	Model 2 [†]			R-squared	
	Estimate	Std. error	p-value	Type 1 [§]	Type 2
log glucose	0.017	0.007	<0.001	0.022	0.092
log insulin	0.138	0.037	<0.001	0.185	0.246
log HOMA-IR	0.156	0.041	<0.001	0.172	0.232
log MDA	0.286	0.024	<0.001	0.108	0.089
	Model 3 [‡]			R-squared	
	Estimate	Std. error	p-value	Type 1 [§]	Type 2
log glucose	0.034	0.008	<0.001	0.033	0.096
log insulin	0.125	0.037	<0.001	0.181	0.239
log HOMA-IR	0.158	0.040	<0.001	0.168	0.224
log MDA	0.273	0.024	<0.001	0.113	0.094

*simple GLM model.

[†] GLM model was adjusted for age, sex, drinking, exercise, vitamin intake, body mass index (BMI) and urinary cotinine level.

[‡] GLM model was adjusted for age, sex, drinking, exercise, vitamin intake, body mass index (BMI), urinary cotinine level, PM10 level, SO2 level, O3 level, NO2 level and CO level.

[§]R-squared value within measurements.

^{||}R-squared value within subjects.

HOMA-IR; Homeostasis assessment of insulin resistance index, MDA; malondialdehyde, Std. error; standard error.

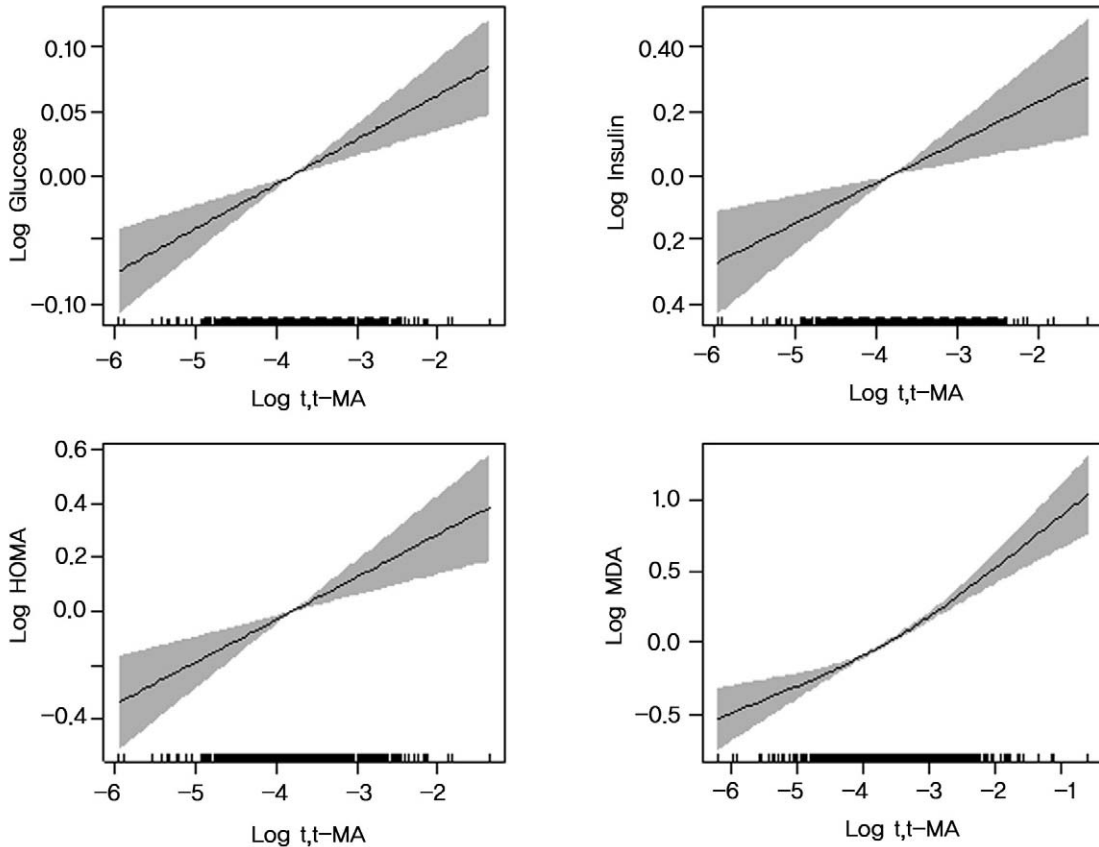


Fig. 1. Relationships between urinary t,t-muonic acid and insulin resistance indices and urinary MDA. Generalized additive model, model was adjusted for age, sex, drinking, exercise, vitamin intake, body mass index (BMI), urinary cotinine level, PM10 level, SO2 level, O3 level, NO2 level and CO level. Lines were drawn according to model, shaded areas shown 95% confidence intervals. MDA: malondialdehyde, HOMA-IR, t,t-MA: t,t-muonic acid, Homeostasis assessment of insulin resistance index.

비교하여 노출량이 줄었지만 일반 대중에서 아직도 공중 보건에 위해가 될 가능성이 있다고 결론짓고 있다¹⁹⁾. 그러나 생활 환경에서 사람에 대한 반복적인 저농도노출의 경우에 벤젠이 건강에 어떤 영향을 주는지는 알려진 바가 적다. 과거와 비교하였을 때, 벤젠에의 노출은 직업적인 노출에서 비직업적인 다시 말하면 환경적인 노출이 주가 되며 이는 아주 낮은 농도의 벤젠 노출을 의미한다. 현재 WHO 및 여러 국가의 벤젠 노출 기준은 1 ppm인데, 서론에서 언급하였듯이 100 ppb 이상의 벤젠 노출은 요중의 t,t-MA나 s-PMA가 잘 반영하지만 현재 대중에서의 실질적인 노출은 10 ppb 수준이어서 이러한 환경적인 아주 낮은 벤젠 노출을 이 지표들이 반영 가능한지에 대하여 논란이 있는 상태이다. 실제로 최근 연구들에서 환경적인 벤젠 노출을 평가하는데 있어 요중 t,t-MA나 s-PMA를 이용한 연구들이 있고, 해당 지표들과 대기 중 벤젠 노출과의 상관계수가 유의한 경우가 있었다^{5,20,21)}. 하지만 대기 중의 벤젠과 요중 t,t-MA와의 사이에 아무런 상관관계가 존재하지 않거나 존재하더라도 상관계수가

0.2 이하로 낮게 보고한 연구도 있다²²⁻²⁴⁾. 더불어 이러한 아주 낮은 수준의 벤젠 노출을 요중 t,t-MA로 평가할 때, 가장 큰 문제점으로 지적되는 것이 식이 중에서 간식, 빵, 치즈, 요거트, 육류, 염장식품, 과일가공식품, 마요네즈 같은 소스 등의 다양한 경로를 통하여 섭취되는 sorbic acid의 존재인데, 이 sorbic acid는 요중 t,t-MA로 변환이 가능하므로 아주 낮은 벤젠농도에서는 해석에 방해가 될 가능성이 있다^{23,25)}. 본 연구의 주 목적은 환경적인 아주 낮은 저농도 벤젠의 노출과 인슐린 저항성과의 관계를 파악하는 것이었다. 그런데 연구가 시행된 기간인 2009년의 대기측정자료를 포함하는 대기환경연보를 살펴보면, 연구대상자들이 거주하는 서울 지역에서 벤젠은 0.5 ppb 미만으로 확인되고 있어 개개인의 sorbic acid 섭취량을 보정하지 않은 본 연구결과에서의 요중 t,t-MA는 전량 벤젠에서 비롯되었다고 하기는 어렵다⁴⁾. 따라서, 연구결과는 요중 t,t-MA와 인슐린저항성과의 관계는 잘 보여주고 있지만 이를 벤젠과 직접적으로 연결시키는 것은 현재로서는 어렵다.

연구 대상자들을 분석한 결과 요증 t,t-MA가 증가하는 경우 그에 따라서 유의하게 인슐린 저항성의 지표들인 공복시 혈당이나 혈중 인슐린 및 HOMA-IR index가 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 요증 t,t-MA만을 포함하는 분석 모델의 설명력을 통해 요증 t,t-MA 단독으로도 인슐린저항성이 설명 가능하다는 것을 발견하였다. 교란변수를 보정하였을 때 설명력은 더 커졌고 그 중 HOMA-IR index와 혈중 인슐린에 대한 설명력이 크게 나타났다. 또한 요증 t,t-MA는 산화손상 지표인 요증 MDA와 매우 유의한($p < 0.001$)양의 상관관계를 보였고 이는 다시 말하면 산화 손상의 발생에 벤젠의 노출이 일부 기여하였을 가능성이 있다는 것을 의미한다. 하지만 결과를 저농도 벤젠의 노출과 관련지어 생각할 때 염두에 두어야 할 점은 앞에서 언급한 것과 같이 요증 t,t-MA가 진적으로 벤젠의 노출을 반영하지는 않는다는 것이다. 따라서 연구 결과를 벤젠으로 인한 효과라고 결론짓기는 어렵고, 현재까지의 지식에 따르면 정확하게는 인슐린저항성 지표들과 요증 t,t-MA와의 관련성이라고 보아야 한다는 것이다.

요증 t,t-MA의 값을 다른 나라의 일반 인구집단에서의 측정된 값과 비교해보면, 본 연구에서는 요증 t,t-MA의 평균은 $0.023 \text{ mg/g} \cdot \text{crea}$ 였으며, 독일에서 일반인을 대상으로 한 연구에서는 흡연자의 요증 t,t-MA의 중앙값이 $0.13 \text{ mg/g} \cdot \text{crea}$, 비흡연자에서는 $0.065 \text{ mg/g} \cdot \text{crea}$ 였고²⁶⁾, 이탈리아의 일반인에서는 흡연자의 요증 t,t-MA의 기하평균이 $0.038 \text{ mg/g} \cdot \text{crea}$, 비흡연자에서는 $0.016 \text{ mg/g} \cdot \text{crea}$ 여서²⁷⁾, 본 연구와 비슷하거나 약간 높은 수준이었다. 이 때 직접 혹은 간접흡연은 환경적인 벤젠 노출에서 가장 중요한 것으로, 흡연자의 경우 비흡연자에 비해 6~10배 정도 더 높은 농도의 벤젠에 노출되게 된다. 본 연구에서도 또한 요증 코티닌을 사분위수로 나누어서 보았을 때 요증 t,t-MA가 증가하는 경향을 유의하게 관찰할 수 있었으며, 요증 코티닌과 요증 t,t-MA는 일반선형회귀분석에서 유의한 관련성을 보이는 것을 확인하였다($\beta: 0.3451$, $p\text{-value} < 0.001$). 그러나 본 연구대상자들 중 단지 6.3%만 흡연자이며, 노령인구를 대상으로 한 연구이므로 타 연구대상자들과는 다르게 실내에 머무르는 시간이 많아 벤젠의 주요 노출요인 중 하나인 교통수단의 배기가스에 적게 노출되었을 것이라는 점을 고려하면 벤젠의 일반인구집단에서의 노출량은 다른 나라와 비교하여 차이가 거의 없는 것으로 생각할 수 있다.

환경적으로 혹은 직업적으로 노출되는 벤젠은 대사과정 중 산화손상을 유발할 수 있다는 것이 알려져 있고, 본 연구에서도 산화손상 지표인 요증 MDA가 요증 t,t-MA와 매우 유의한 상관관계를 보였다. 산화손상은 활성산소

물질의 생산이 증가되었거나 항산화능력이 감소되었거나 혹은 두 가지 현상이 동반된 경우를 말하는 것으로 이미 고혈압¹³⁾, 심혈관계 질환¹⁴⁾ 및 당뇨¹⁵⁾ 등 다양한 질병의 발생과 관계되어 있다는 것이 여러 연구를 통하여 잘 알려져 있는데, 특히 당뇨에 있어서는 질병 그 자체와 합병증의 발생 및 진행에도 기여하고 있는 것으로 잘 알려져 있다^{15, 28-30)}.

당뇨는 만성 고혈당, 인슐린 분비 장애 그리고 인슐린 저항성을 특징으로 하는 질병인데, 인슐린저항성의 발생에는 만성적인 경한 염증반응이 그 병리기전으로 지적되고 있고 만성 염증은 산화손상과 밀접한 관련을 가지고 있어 당뇨의 발생과 무관하다고 할 수 없다^{31, 32)}. 그 외에 당뇨에서 인슐린저항성의 발생에 관여하여 당뇨를 진행시키는 역할을 수행하는 것으로 여겨지는 비만과 대사증후군도 산화손상과 염증반응과 연관이 있는 것으로 알려져 있다^{33, 34)}. 또한, 산화손상기전이 인슐린저항성과 관계가 있으므로 항산화작용을 하는 비타민과 같은 물질들은 인슐린저항성을 개선하는 방향으로 작용할 것이라고 기대할 수 있으며 이는 여러 연구에서 밝혀진 바 있다^{34, 35)}. 본 연구에서도 공복시 혈당이 종합비타민을 하루 한 알 이상 섭취하는 군에서 그렇지 않은 군에 비해서 낮게 측정되었고 이는 통계적으로 유의하였다($p\text{-value} = 0.02$, 데이터는 제시하지 않음).

당뇨는 단일 질병으로 구분하고 있긴 하나 여러 증상이 모인 일종의 증후군이라고 할 수 있고, 발생에 있어서도 여러가지 원인이 관여하게 되므로 앞서 언급한 산화손상기전 외에도 다양한 기전이 그 발생과 진행에 관여하게 될 것이다. 본 연구에서 제시한 모델 설명력을 계산한 값에서 확인할 수 있듯이 요증 t,t-MA만을 이용한 model 1에서 인슐린저항성을 완벽하게 설명하지는 못하며, 다른 교란변수가 보정된 model 2에서 설명력이 2배 가량 증가하는 것을 볼 수 있는데, 각 교란변수들의 개별 효과를 분석해보면 model 2에 있어 설명력의 증가는 흡연의 지표인 요증 코티닌이 주로 기여하고 있었다. 이를 해석하기 위해서는 요증 t,t-MA의 농도가 매우 낮다는 점을 감안해야 하는데, 벤젠에의 노출은 인슐린저항성과 관련은 있지만 본 연구의 경우 벤젠 노출이 매우 저농도이므로 담배에 포함된 니코틴이나 일산화탄소 및 다른 물질들이 저농도인 벤젠의 노출보다 인슐린저항성에 기여하였기 때문이라고 생각할 수 있다³⁶⁾. 또한, model 2에서의 설명력은 0.3 미만으로 인슐린저항성에 대하여 본 연구에서 평가하지 못했던 개개인의 유전적인 혹은 환경적인 인자가 여기에 추가적으로 관련된다는 것을 시사한다. 비록 설명력이 크지는 않지만, 본 연구에서는 요증 t,t-MA와 인슐린저항성의 지표들이 매우 유의한 양의 상관관계를 보이고 있으므로 저농도의 벤젠의 노출일지라도

당뇨의 발생과 진행에 있어 필수적 요소인 인슐린저항성에 영향을 줄 가능성이 있으며, 그 기전으로 요중 MDA로 대변되는 산화손상이 관여한다는 증거를 찾을 수 있었다는 것을 밝혀낼 수 있었다. 또한 아무것도 보정하지 않은 경우에서(model 1) GLM 분석 결과가 유의하며, 모델의 설명력 역시 크지는 않지만 요중 t,t-MA만으로도 인슐린저항성의 지표를 일정 부분 설명한다는 사실은 연구결과를 의미있는 것으로 만들어 준다 할 수 있겠다.

본 연구의 첫째 강점은 연구 디자인에 있다. 연구에서는 패널연구를 시행하였고 한 사람에게서 여러 번 측정된 값을 분석에 사용하였기 때문에, 단면연구에 비하여 요중 t,t-MA와 인슐린저항성의 관련성을 규명하는데 충분한 근거를 제시해 줄 수 있을 것으로 기대한다. 둘째, 고찰에서도 언급하였듯이 환경적인 노출 수준의 벤젠과 인슐린저항성의 관계를 파악하는데 매우 중요한 교란변수인 흡연을 보정할 때, 단지 흡연 여부만을 정성적으로 평가한 것이 아니라, 요중 코티닌을 측정하여 그 수치를 분석 모델에 정량적으로 반영하였다는 것이다. 환경적인 벤젠 노출의 경우 노출량이 극소량이기 때문에 흡연으로 인하여 요중 t,t-MA의 값이 크게 변동될 소지가 있어 결과적으로 인슐린저항성 지표와의 관계를 파악하는데 큰 영향을 미칠 수 있었으므로 이를 보정해 준 것은 연구 결과에 큰 강점이라고 할 수 있겠다.

본 연구의 한계점으로는 첫째, 본 연구의 경우와 같이 대기중 100 ppb 미만의 벤젠 노출의 경우 식이 중 sorbic acid가 요중 t,t-MA로 변환되기 때문에, 섭취된 sorbic acid의 양에 따라서 요중 t,t-MA가 영향을 받을 수 있다는 사실이다. 추가적인 설문이나 대상자들의 식이를 관찰하여 개개인의 sorbic acid 농도를 분석에 반영하지 못하였기 때문에, 연구 결과는 유의하기는 했지만 벤젠의 노출과 인슐린저항성 지표의 관계를 온전히 반영했다고 결론 내리기는 어렵다. 논란이 있지만 몇 연구에서 100 ppb 이하의 대기 중 벤젠과 요중 t,t-MA 사이에 상관관계가 없거나 있더라도 상관계수가 작은 경우가 있었다²²⁾. 그러나 상관성이 없다고 결론내린 연구에서도 식이 중 sorbic acid를 분석에 반영하지 않은 경우가 대부분이어서 요중 t,t-MA의 생체지표로서의 유용성 여부는 보다 많은 연구가 필요하다 하겠다. 둘째, 서울의 성북구라는 특정 지역의 노인만을 대상으로 하였기 때문에 대상자 모집 과정에서 selection bias가 충분히 발생할 여지가 있었고, 따라서 본 연구에서 관찰된 결과는 일반 인구에 적용하는데 한계가 있다는 것이다. 셋째, 벤젠이 요중 t,t-MA으로 대사되는 과정은 개개인이 차이를 보일 수 있으며, 이런 차이의 원인으로 glutathione S-trans-

ferase와 같은 유전자의 발현여부의 차이가 지적되고 있다^{37,38)}. 그러나 본 연구에서는 개개인의 유전자분석은 시행하지 않아 이러한 관계를 관찰할 수는 없었다.

앞서 제시한 여러 가지 한계점에도 불구하고 본 연구는 요중 t,t-MA가 인슐린저항성을 나타내는 여러 지표들과 관련성이 있었고 따라서 저농도의 벤젠과도 관계가 있을 가능성을 반복적으로 측정된 자료를 통하여 평가한 논문으로 가치가 있으며, 한계점에서 지적한 부분들은 추후에 좀 더 정확하게 개개인의 노출을 평가하여 극복되어야 할 것이다.

요 약

목적: 생활환경에서의 저농도 벤젠 노출이 당뇨의 발생과 진행에 밀접하게 관련된 인슐린 저항성의 지표들과 어떤 연관성을 가지는지 살펴보고, 산화손상기전이 이와 관련이 있는지 연구하고자 하였다.

방법: 60세 이상인 서울시 성북구에 거주하는 노인 411명을 대상으로 벤젠의 노출지표인 요중 t,t-MA와 인슐린 저항성의 지표인 공복시 혈당, 혈중 인슐린 및 HOMA-IR index와 산화손상지표인 요중 MDA를 반복적으로 측정하였다. 요중 t,t-MA와 인슐린 저항성 지표들은 generalized linear mixed (GLM) analysis를 통하여 관련성이 있는지 분석하였고, 추가적으로 모델의 설명력을 계산하였다. 또한 설문지 조사를 시행하여 인구학적특성과 생활습관, 질병력 및 환경적인 노출을 조사하여 분석시 보정하였다.

결과: 요중 t,t-MA은 아무것도 보정하지 않은 단순 모델(model 1)과 설문지에서 얻어진 연령, 성별, 음주여부, 규칙적인 운동여부, 종합비타민제 섭취여부, 요중 코티닌 수치 및 체질량지수를 보정한 모델(model 2) 그리고 여기에 추가적으로 PM₁₀, SO₂, O₃, NO₂, 및 CO 같은 대기오염물질을 보정한 모델(model 3) 모두에서 인슐린 저항성의 세 지표와 매우 유의한(p<0.001)관련을 보이고 있었고, 동시에 동일한 모델들을 사용하여 GLM 분석을 시행하였을 때, 요중 MDA와도 유의한(p<0.001)관련성을 보였다. 요중 t,t-MA와 인슐린 저항성 관계를 파악하기 위하여 구축된 GLM 분석 모델들은 인슐린저항성의 지표 중 혈중 인슐린, HOMA-IR index 그리고 공복시 혈당 순으로 여러 한계점에도 불구하고 일정 부분 설명력을 갖는 것으로 나타났다.

결론: 요중 t,t-MA는 우리나라의 노령인구에서 인슐린 저항성의 지표들과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났으며, 그 기전으로는 산화손상기전이 관련되었을 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S, Johnson BA, Lan Q, Rothman N, Smith MT, Zhang L, Li G, Shen M, Yin S, Rappaport SM. Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogenesis* 2006;27:772-81.
- 2) Dougherty D, Garte S, Barchowsky A, Zmuda J, Taioli E. Nqo1, Mpo, Cyp2e1, Gstt1 and Gstm1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure--a literature review. *Toxicol Lett* 2008;182:7-17.
- 3) Rappaport SM, Kim S, Lan Q, Li G, Vermeulen R, Waidyanatha S, Zhang L, Yin S, Smith MT, Rothman N. Human benzene metabolism following occupational and environmental exposures. *Chem Biol Interact* 2010;184:189-95.
- 4) National Institute of Environmental Research. Report of air quality in Korea 2009. National Institute of Environmental Research. Incheon. 2010. pp 86-8. (Korean)
- 5) Weisel CP. Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact* 2010;184:58-66.
- 6) Mansi A, Bruni R, Capone P, Paci E, Pignini D, Simeoni C, Gnerre R, Papacchini M, Tranfo G. Low occupational exposure to benzene in a petrochemical plant: modulating effect of genetic polymorphisms and smoking habit on the urinary T,T-Ma/Spma ratio. *Toxicol Lett* 2011;
- 7) Johnson ES, Langard S, Lin YS. A critique of benzene exposure in the general population. *Sci Total Environ* 2007;374:183-98.
- 8) Khalade A, Jaakkola MS, Pukkala E, Jaakkola JJ. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Environ Health* 2010;9:31.
- 9) Vlaanderen J, Lan Q, Kromhout H, Rothman N, Vermeulen R. Occupational benzene exposure and the risk of lymphoma subtypes: A meta-analysis of cohort studies incorporating three study quality dimensions. *Environ Health Perspect* 2011;119:159-67.
- 10) Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, Rappaport SM, Shen M, Alter BP, Wu Y, Kopp W, Waidyanatha S, Rabkin C, Guo W, Chanock S, Hayes RB, Linet M, Kim S, Yin S, Rothman N, Smith MT. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 2004;306:1774-6.
- 11) Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen LE, Loft S. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* 2003;544:255-71.
- 12) Barreto G, Madureira D, Capani F, Aon-Bertolino L, Saraceno E, Alvarez-Giraldez LD. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: An oxidative DNA damage pathway. *Environ Mol Mutagen* 2009;50:771-80.
- 13) Schulz E, Gori T, Munzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res* 2011;34:665-73.
- 14) Sugamura K, Keaney JF, Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(5):978-92.
- 15) Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24-38.
- 16) Singh B, Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J Diabetes* 2010;1:36-47.
- 17) Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 2005;115:e500-3.
- 18) Recchia A. R-squared measures for two-level hierarchical linear models using sas. *Journal of Statistical Software* 2010;32:1-9.
- 19) Ragas AM, Oldenkamp R, Preeker NL, Wernicke J, Schlink U. Cumulative risk assessment of chemical exposures in urban environments. *Environ Int* 2011;37:872-81.
- 20) Protano C, Guidotti M, Manini P, Petyx M, La Torre G, Vitali M. Benzene exposure in childhood: role of living environments and assessment of available tools. *Environ Int* 2010;36:779-87.
- 21) Lovreglio P, Barbieri A, Carrieri M, Sabatini L, Fracasso ME, Doria D, Drago I, Basso A, D'Errico MN, Bartolucci GB, Violante FS, Soleo L. Validity of new biomarkers of internal dose for use in the biological monitoring of occupational and environmental exposure to low concentrations of benzene and toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 2010;83:341-56.
- 22) Qu Q, Shore R, Li G, Su L, Jin X, Melikian AA, Roy N, Chen LC, Wirgin I, Cohen B, Yin S, Li Y, Mu R. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chem Biol Interact* 2005;153-154:85-95.
- 23) Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Petyx M, Corradi M, Mutti A, Apostoli P. Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicol Lett* 2008;181:25-30.
- 24) Fustinoni S, Buratti M, Campo L, Colombi A, Consonni D, Pesatori AC, Bonzini M, Farmer P, Garte S, Valerio F, Merlo DF, Bertazzi PA. Urinary T,T-muconic acid, S-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem Biol Interact* 2005;153-154:253-6.
- 25) Hoet P, De Smedt E, Ferrari M, Imbriani M, Maestri L, Negri S, De Wilde P, Lison D, Haufroid V. Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: correlation with blood benzene and influence of confounding factors. *Int Arch Occup Environ Health* 2009;82:985-95.
- 26) Ruppert T, Scherer G, Tricker AR, Adlkofer F. Trans,Trans-Muconic acid as a biomarker of non-occu-

- pational environmental exposure to benzene. *Int Arch Occup Environ Health* 1997;69:247-51.
- 27) Cocco P, Tocco MG, Ibba A, Scano L, Ennas MG, Flore C, Randaccio FS. Trans,Trans-Muconic acid excretion in relation to environmental exposure to benzene. *Int Arch Occup Environ Health* 2003;76:456-60.
- 28) Tirosh A, Rudich A, Potashnik R, Bashan N. Oxidative stress impairs insulin but not platelet-derived growth factor signalling in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 2001; 355:757-63.
- 29) Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615-25.
- 30) Facchini FS, Hua NW, Reaven GM, Stoohs RA. Hyperinsulinemia: The missing link among oxidative stress and age-related diseases? *Free Radic Biol Med* 2000;29:1302-6.
- 31) Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1040-52.
- 32) Fridlyand LE, Philipson LH. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:136-45.
- 33) Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440:944-8.
- 34) Garcia-Bailo B, El-Sohemy A, Haddad PS, Arora P, Benzaied F, Karmali M, Badawi A. Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics* 2011;5:7-19.
- 35) Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011;51:993-9.
- 36) Thiering E, Bruske I, Kratzsch J, Thiery J, Sausenthaler S, Meisinger C, Koletzko S, Bauer CP, Schaaf B, von Berg A, Berdel D, Lehmann I, Herbarth O, Kramer U, Wichmann HE, Heinrich J. Prenatal and postnatal tobacco smoke exposure and development of insulin resistance in 10 year old children. *Int J Hyg Environ Health* 2011;214(5):361-8.
- 37) Verdina A, Galati R, Falasca G, Ghittori S, Imbriani M, Tomei F, Marcellini L, Zijno A, Vecchio VD. Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J Toxicol Environ Health A* 2001;64:607-18.
- 38) Gobba F, Rovesti S, Borella P, Vivoli R, Caselgrandi E, Vivoli G. Inter-individual variability of benzene metabolism to trans,trans-muconic acid and its implications in the biological monitoring of occupational exposure. *Sci Total Environ* 1997;199:41-8.