

## 카드뮴중독의 조기진단을 위한 생물학적 지표탐색 : 요중 Metallothionein 배설량의 의의

중앙대학교 의과대학 예방의학교실

박정덕 · 홍연표 · 장임원

— Abstract —

### Biological Indices for Early Detection of Cadmium Poisoning : Significance of Urinary Metallothionein

Jung-Duck Park, Yeon-Pyo Hong, Im-Won Chang

*Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University*

Metallothionein(MT) is a low molecular weight protein that is induced as a defence mechanism for cadmium(Cd) toxicity. In present study, urinary MT was determined using a competitive ELISA in Cd-exposed rats. In addition, measured the urinary, blood and renal Cd concentration and the urinary excretion of total protein,  $\beta_2$ -microglobulin(MG) and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase(NAG) at 1, 3, 7, 14, 28 days after Cd injection in Cd-exposed rats with doses of 0.8 and 1.6 mg Cd/kg body weight, respectively.

The urinary, blood and renal Cd were specific for Cd-exposure, that increased in proportional to dose of Cd. The urinary and blood Cd tended to slightly decrease, while renal Cd tended to increase by lapse of time after Cd exposure. This finding indicates that renal Cd is more specific than urinary and blood Cd for Cd exposure. The urinary excretion of MT showed a statistically significant increase in Cd exposed rats(0.8 and 1.6 mg Cd/kg body weight). The increase of urinary excretion of MT was more evident at 7, 14, 28 days after Cd exposure than the changes of urinary excretion of total protein,  $\beta_2$ -MG and NAG. The Pearson's correlation coefficients between urinary Cd and urinary MT,  $\beta_2$ -MG, NAG and total protein were 0.4344, 0.3727, 0.3307 and 0.2099, respectively. These findings indicate that the urinary MT is more sensitive and specific than total protein,  $\beta_2$ -MG and NAG for Cd exposure.

The present results suggest that the urinary MT, using a simple and rapid competitive ELISA, is a valuable index as screening test in epidemiologic study for Cd exposed group.

**Key Words :** Metallothionein,  $\beta_2$ -microglobulin, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, Cadmium, Competitive ELISA

\* 이 논문은 1996년 한국산업안전공단 산업보건연구원의 직업병예방을 위한 학술연구용역사업의 일환으로 연구되었음.

## 머 리 말

카드뮴(Cadmium, Cd)은 인체의 물질대사에는 불필요한 유해 중금속류(toxic and non-essential heavy metals)에 해당되는 금속으로서 여러 경로를 통해 흡수되면 체내에 축적되는 경향이 있어 미량일지라도 만성적으로 폭로되면 다양한 건강장애를 유발한다(Page 등, 1986). 카드뮴은 부식성에 대한 내성이 강하고 용점이 낮아 여러 분야에서 다양하게 이용되어 산업이 발달함에 따라 생산 및 사용량이 증가되었으며, 우리나라도 1991년의 생산량(refined cadmium)이 약 450ton으로 보고되어 있다(IARC, 1993). 따라서 산업장 근로자들의 경우 미량일지라도 다양한 작업공정에서 카드뮴에 폭로될 수 있다.

카드뮴을 취급하는 산업장 근로자들에서 외국의 경우 급·만성 중독에가 다수 보고된 바 있으나(Buell, 1975; Smith 등, 1986; Roels 등, 1993), 국내에서는 수년전 도금업체에 근무하는 근로자에서 카드뮴중독의 직업병 판정에 대해 논란이 제기된 바 있다(조수현 등, 1991). 그러나, 우리나라에도 카드뮴을 취급하는 업체가 다수 있을 뿐만 아니라(강성규 등, 1994), 금속 카드뮴의 용도가 매우 다양하여 앞으로 산업이 발달함에 따라 널리 이용될 것으로 추정되어 여러 종류의 작업공정에서 미량의 카드뮴에 폭로될 수 있으므로 산업장 근로자들에 있어서 미량의 카드뮴에 의한 만성적인 건강장애에 대해 안심할 수 만은 없는 실정으로 생각된다.

카드뮴을 취급하는 산업장 근로자들에 대한 급·만성 카드뮴 중독의 예방대책으로 카드뮴에 대한 폭로를 미연에 방지하는 1차 예방이 가장 바람직하다. 그러나, 여러 가지 여건상 미량의 카드뮴에 장기간 폭로되는 경우 카드뮴의 독성학적인 기전을 이해하고 이에 따른 효율적인 생물학적 감시체계(biological monitoring system)를 이용하여 임상증상이 나타나기 전에 검사실 소견으로서 카드뮴에 의한 건강장애를 조기에 발견하여 적절히 조치함으로써 더 이상의 진행과 손상을 방지하는 2차 예방이 현실적으로 최선의 방법이다. 따라서 효율적인 근로자의 건강관리를 위해서는 카드뮴 폭로에 대해 특이성이 높고, 카드뮴에 의한 건강장애를 조기에 민감하게 반

영해 줄 수 있는 생물학적 지표가 요구된다.

신장내 카드뮴 축적량과 혈액과 요중 카드뮴량은 카드뮴에 대한 폭로를 반영해 주는 특이적인 지표로 평가되고 있다. 그러나, 카드뮴에 의한 건강장애를 조기색출할 목적으로 이용되는 검사항목들은 카드뮴의 주 표적장기인 신장의 기능을 반영하는 지표들로서 카드뮴 폭로에 대해서는 비특이적이다(Shaikh 등, 1987). 과거 카드뮴의 생물학적 허용한계치(BEL, biological exposure index)로서 요중 카드뮴 10  $\mu\text{g/g}$  creatinine으로 권장한 바 있다(WHO Study Group, 1980). 그리하여 카드뮴에 의한 건강장애의 조기진단 목적으로 저분자단백질인  $\beta_2$ -microglobulin(MG)의 요중 배설량이 매우 유용하게 이용되어 왔다. 여러 학자들이 요중 카드뮴 10  $\mu\text{g/g}$  creatinine 이하에서도 subclinical tubular dysfunction이 동반된다고 보고(Chia 등, 1989; Mueller 등, 1989; Roels 등, 1993)하여 ACGIH(1994)에서는 혈액 5  $\mu\text{g/l}$ , 요 5  $\mu\text{g/g}$  creatinine으로 권장하여 좀더 민감하고 특이적인 새로운 지표의 개발에 대한 관심이 높다. Jung 등(1993)은 카드뮴 취급 산업장 근로자들에서 요중 카드뮴 10  $\mu\text{g/g}$  creatinine 이하에서도 요중 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase(NAG)활성도가 증가되어  $\beta_2$ -MG보다 민감한 지표로 보고한 바 있으나, 양-반응관계에 대해 다소 논란이 있다(Mason 등, 1988). 그러나, 아직까지 국내에서 카드뮴중독과 관련되어 요중 NAG활성도의 의의에 대해 연구된 바 없다.

Metallothionein(MT)은 카드뮴에 폭로시 카드뮴의 독성작용에 대한 방어기전으로 생체내에서 합성이 유도되는 분자량 약 6,500Da의 저분자 단백질로서 카드뮴과 결합하여 결합형 카드뮴(Cd-MT)을 형성함으로써 카드뮴의 독작용을 무독화시킨다(Goering과 Klaassen, 1983). 또한 MT는 카드뮴의 운반, 배설 및 신장의 손상기전에도 일부 관여하는 것으로 알려져(Dudley 등, 1985), 외국의 여러 학자들은 카드뮴 폭로군에 대한 생물학적 지표로서 MT의 의의에 대해 비교적 관심이 높은 편이나(Shaikh 등, 1990; Kido 등, 1992; Goering 등, 1995) 국내에는 아직까지 소개된 바 없다. 그러나, 최근 저자는 면역학적인 방법을 이용하여 생물학적 시료에 미량 존재하는 MT를 비교적 간편하고 빠르

계 정량할 수 있는 competitive ELISA방법을 확립하여 제시한 바 있다(박정덕 등, 1996).

본 연구에서는 카드뮴을 취급하는 산업장 근로자들에 대한 적용에 앞서 카드뮴에 폭로된 실험동물에 대해서 폭로량과 폭로후 경과시간에 따라 신기능 저하를 반영하는 지표들의 요소견 측, 요중 총단백질과  $\beta_2$ -MG의 배설량과 NAG활성도의 분석과 함께 ELISA방법으로 요중 MT배설량을 분석·비교하여 카드뮴 폭로에 대한 민감한 지표를 파악하고 아울러 카드뮴의 폭로에 대해 특이적인 지표인 신장조직내 카드뮴 축적량과 혈액과 요중 카드뮴 농도와 비교·분석하여 각 지표들의 상대적인 특이성을 파악함으로써 카드뮴의 폭로에 대한 효율적인 생물학적 지표의 탐색과 요중 MT배설량의 의의를 알아보고자 한다.

## 연구방법

### 1. 실험동물

체중 약 180~200g의 Sprague-Dawley계 랫트를 한림대학교로부터 구입하여 본 실험실에서 약 10일 동안 물과 랫트용 고형사료로 사육하여 적응시키면서 외견상 특별한 이상소견이 관찰되지 않음을 확인 후 실험동물로 사용하였다.

### 2. 실험동물처치

카드뮴 폭로에 따른 영향을 관찰하기 위하여 실험동물을 실험군과 대조군으로 구별하였다. 이때 카드뮴 폭로에 따른 요중 총단백질,  $\beta_2$ -MG, MT, Cd 배설량 및 NAG활성도의 변화는 실험동물에 카드뮴을 투여하기 전에 채취한 요를 대조군으로 하였고, 혈액과 신장내 카드뮴량의 변화를 관찰하기 위해서는 생리 식염수를 주사한 랫트를 대조군으로 하였다. 카드뮴 폭로량에 따라 실험동물의 체중 kg당 카드뮴 0.8mg투여군과 1.6mg투여군의 두군으로 구별하였으며, 각 군당 30마리로 하였다. 실험동물에 대한 카드뮴의 폭로는 염화카드뮴용액(0.08% 또는 0.16%)을 1회 꼬리정맥주사하였고, 대조군은 동일한 방법으로 생리 식염수를 주사하였다. 이때 주사용량은 약 0.2ml가 되게 조정하였다.

### 3. 시료채취

(1) 요 : 실험동물의 요는 metabolic cage를 이

용하여 분리·채취하였다. 이때 시료의 온도를 유지하기 위하여 ice-pack상에서 채취하였으며 채취 당일 약 10시간동안의 요를 채취하였다. 요의 채취는 카드뮴 폭로전일과 카드뮴 폭로후 1, 3, 7, 14 및 28일째 하였다. 채취한 요는 분석시까지 -20℃에서 일시 냉동·보관하였다.

(2) 혈액 : 카드뮴 폭로군은 카드뮴 폭로후 1, 3, 7, 14 및 28일째 카드뮴 투여군별로 각각 6마리의 실험동물을 심장천자하여 혈액을 채취하였다. 대조군은 주사후 7일째 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 분석시까지 -20℃에서 일시 냉동·보관하였다.

(3) 신장 : 카드뮴 폭로군은 카드뮴폭로후 1, 3, 7, 14 및 28일째 카드뮴 투여군별로 각각 6마리의 실험동물로부터 혈액을 채취한 다음 즉시 개복하여 신장을 적출하였고, 대조군도 동일한 방법으로 주사후 7일째 신장을 적출하였다. 적출한 신장은 분석시까지 -20℃에서 일시 냉동·보관하였다.

### 4. 시료분석

#### (1) 요

가. 카드뮴 : 요 2ml에 유해금속 분석용 농결산 0.5ml를 첨가하여 극초단파회화기(Microwave Digestion System, CEM)을 이용하여 5분간 습식회화한 후 증류수를 첨가하여 일정량으로 조정하였으며 이때 회화액에 modifier를 첨가하여 0.5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 로 맞추었다. 회화액에 함유된 카드뮴량은 Autosampler(Perkin-Elmer AS-60)와 Atomizer(Perkin-Elmer HGA-600)이 부착된 원자흡광분광광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer, Perkin-Elmer Model 5100)를 이용하여 flameless방법으로 분석하였다. 요중 카드뮴 분석시 분석조건은 background correction하여 파장 228.8 nm, Cd lamp current 5mA, slit 0.7 nm, argon gas flow rate 250 ml/min에서 15 $\mu$ l의 시료를 graphite tube에 주입하여 100℃에서 40초간 건조, 500℃에서 30초간 회화, 20℃에서 5초간 냉각후 1,550℃에서 3초간 원자화되게 하였다. 분석시 카드뮴 표준용액은 1,000ppm의 원자흡광분석용 용액(Hayashi Pure Chem. Indust. Ltd.)을 희석하여 사용하였다. 요중 카드뮴량은  $\mu\text{g/g creatinine}$ 으로 보정하여 나타내었다.

나. NAG활성도 : 요중 NAG활성도는 sodio m-cresolsulfonphthaleinyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide의 발색기질이 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase에 의해 N-acetyl-glucosamide와 m-cresolsulfonphthalein으로 가수분해되는 반응을 이용하여 이때 유리되는 m-cresolsulfonphthalein을 분광광도계로 측정하여 NAG 활성도를 정량 (Noto 등, 1983)하는 NAG 정량 kit (Shionogi 社)를 이용하여 측정하였다.

즉, NAG 측정 kit로 부터 합성기질액과 반응정지액을 제조한 후, 합성기질액 1ml을 37℃에서 5분간 보온한다. 이어 합성기질액에 냉동원심분리하여 얻은 요의 상청액 50 $\mu$ 를 첨가하여 혼화한 후 37℃항온조에서 15분간 보온한 다음 반응정지액 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 2ml을 첨가하여 충분히 혼화시킨다. 이때 증류수 50 $\mu$ 를 첨가한 기질 blank와 NAG 표준용액을 시료와 동일한 방법으로 조작하여 분광광도계를 이용하여 파장 580 nm에서 시료 및 NAG 표준용액의 흡광도를 측정한다.

미지의 시료중 NAG 활성도는

NAG 활성도(U/I) =

$$\frac{\text{시료의 흡광도(O.D.)}}{\text{NAG 표준용액의 흡광도(O.D.)}} \times \text{NAG 표준용액의 활성도(U/I)}$$

에 의해서 산출하였다. 요중 NAG 활성도는 U/g creatinine으로 보정하여 나타내었다.

다.  $\beta_2$ -MG : 요중  $\beta_2$ -MG량은 Enzygnost  $\beta_2$ -microglobulin micro kit (Behring 社)를 이용하여 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)방법으로 분석하였다.

즉, 채취한 요를 3,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리한 후 상청액 500 $\mu$ 에 sample buffer 500 $\mu$ 를 첨가하여 희석한다. 희석액 20 $\mu$ 를 이미 mouse monoclonal antibody to human  $\beta_2$ -MG이 coating 되어 있는 microplate의 각 well에 넣은 다음 연이어 conjugate solution ( $\beta_2$ -MG/POD conjugate) 100 $\mu$ 를 첨가한 후 37℃에서 1시간 동안 보온·정지한다. Incubation이 끝난 다음 washing solution (PBS/T)으로 3회 세척한 후 substrate 100 $\mu$ 를 각 well에 첨가하여 다시 30분 동안 실온(20℃, 암실)에서 정지한다.

다. 이어 반응정지액(0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 100 $\mu$ 를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 Microplate Reader (Bio-Rad Model 3550)을 이용하여 파장 490nm (reference wavelength : 690nm)에서 흡광도를 측정한다. 이때 이미 제조된 5단계 농도의  $\beta_2$ -MG 표준용액 (Behring 社)을 이용하여 시료와 같은 위의 방법으로 측정하여 얻은 표준검량곡선으로부터 요중  $\beta_2$ -MG량을 구하였다. 요중  $\beta_2$ -MG량은  $\mu$ g/g creatinine으로 보정하여 나타내었다.

라. MT : 요중 MT량은 Jin 등(1992)의 방법을 다소 수정한 박정덕 등(1996)의 double antigen double antibody를 이용한 competitive ELISA 방법을 이용하여 정량하였다. 이때 primary antibody는 박정덕 등(1996)이 랫트에 소량의 카드뮴을 반복투여하여 카드뮴의 독성에 대한 방어기전으로 랫트의 체내에서 합성이 유도된 MT를 랫트의 간장으로부터 분리·정제한 MT-I으로 면역된 토끼로부터 얻은 혈청(anti-MT-I sera)을 사용하였고, secondary antibody는 biotinylated anti-rabbit Ig G (DAKO)를 구입하여 사용하였다.

즉, 랫트의 간장에서 얻은 MT분획을 일정하게 적당량 희석하여 microplate의 각 well에 넣은 후 4℃에서 over-night하여 coating시킨다. 항원이 coating된 microplate를 PBS/T(phosphate-buffered saline with 0.1% Tween)로 3회 세척 후 1% BSA (bovine serum albumin, in PBS/T)으로 37℃에서 30분간 blocking 시킨 다음, 3,000rpm 4℃에서 10분간 원심분리한 요의 상청액 200 $\mu$ 를 각 well에 넣은 후 연이어 1:100으로 희석한 토끼의 혈청을 50 $\mu$  첨가하여 37℃에서 60분간 보온·정지한다. Incubation이 끝난 후 다시 PBS/T로 3회 세척 후 1:5,000 으로 희석한 secondary antibody를 200 $\mu$ 씩 각 well에 넣은 후 다시 37℃에서 60분간 보온·정지한 다음 3회 세척한다. Microplate의 각 well에 다시 1:5,000으로 희석한 peroxidase-labelled streptoavidin (DAKO) 200 $\mu$ 를 넣어 37℃에서 60분간 보온·정지한다. 이어 PBS/T로 3회 세척한 다음 substrate(OPD)를 200 $\mu$  넣은 후 37℃에서 24분간 반응시킨 후 반응정지액(8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 첨가하여 반응을 중지한다. 반응이 중지된 반응액의 흡광도를 Microplate Reader (Bio-Rad Model 3550)을 이

용하여 파장 490nm에서 측정한다. 이때 랫트의 간장에서 얻은 MT분획의 1:10,000 희석액의 MT량을 1 U로 임의의 단위화하여 여러 단계 농도의 표준용액을 상기 기술된 시료와 동일한 과정을 거쳐 얻은 흡광도로부터 MT의 표준검량곡선을 구하여 요중 MT량을 산출하였다. 요중 MT량은 U/g creatinine으로 보정하여 나타내었다.

마. 총단백질 : 요중 총단백질은 시료중 미지의 단백질에 결합되는 Coomassie Brilliant Blue dye를 정량하는 Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Ltd.)를 이용하여 Bradford(1976)의 방법에 의해 정량하였다.

바. 크레아티닌 : 요중 크레아티닌량은 Jaffe반응을 이용한 Bonsnes와 Taussky(1945)의 방법에 의해 정량하였다

### (2) 혈액

- 카드뮴 : 채취한 혈액 1ml에 유해금속 분석용 농질산 0.5ml을 첨가하여 극초단파회화기로 습식회화한 후 증류수를 첨가하여 일정량으로 조정된 다음 modifier를 첨가하여 회화액을 0.5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 로 맞추었다. 회화액에 함유된 카드뮴량은 원자흡광분광광도계를 이용하여 flameless방법으로 정량하였으며, 이때 분석기기의 조건은 요중 카드뮴분석시와 동일하였다. 혈중 카드뮴량은  $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 나타내었다.

### (3) 신장

- 카드뮴 : 적출된 신장조직 약 0.5g을 정량하여 유해금속 분석용 농질산 1ml를 첨가하여 극초단파회화기를 이용하여 습식회화하였다. 회화액을 증류수로 적당히 희석한 후 modifier를 첨가하여 회석액을 0.5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  농도로 맞춘 다음 원자흡광분광광도계를 이용하여 flameless방법으로 회석액내 카드뮴을 정량하였다. 이때 분석기기의 조건은 요중 카드뮴 분석시와 동일하였다. 신장조직내 카드뮴량은  $\text{mg}/\text{g}$  wet weight로 나타내었다.

## 5. 자료정리 및 분석

실험결과 얻은 자료의 정리는 Microsoft Excel 7.0을 이용하였고, 통계처리는 SAS package(version 6.08)을 이용하여 GLM과 Pearson's 상관분석방법 등으로 분석하였다.

## 연구결과

### 1. 카드뮴폭로에 대한 생물학적 지표의 변화

#### (1) 요중 총단백질, $\beta_2$ -MG, MT 및 카드뮴과 NAG활성도

##### 가. 카드뮴투여량에 따른 변화

실험동물에 카드뮴을 투여하기 전과 0.8mg/kg과 1.6mg/kg의 카드뮴을 투여하였을 때의 요중 총단백질,  $\beta_2$ -MG, MT 및 카드뮴 배설량과 NAG활성도는 Fig. 1과 같다.

즉, 실험군에 카드뮴을 투여하기 전인 대조군의 요중 총단백질의 평균 배설량은  $0.622 \pm 0.045$  g/g creatinine였고, 카드뮴 0.8mg/kg투여군에서는  $0.576 \pm 0.019$  g/g creatinine, 1.6mg/kg투여군에서는  $0.650 \pm 0.039$  g/g creatinine로서 카드뮴투여량에 따라 차이가 없었다. 대조군의 요중  $\beta_2$ -MG배설량은  $35.2 \pm 2.6$   $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinine였으며 카드뮴 0.8mg/kg투여군은  $39.0 \pm 2.7$   $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinine로서 차이가 없었으나, 1.6mg/kg투여군은  $50.7 \pm 4.2$   $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinine으로 대조군에 비해 유의하게 증가되었다( $p < 0.01$ ). 요중 NAG활성도는 대조군에서는  $3.495 \pm 0.399$  U/g creatinine, 0.8mg/kg투여군에서는  $4.078 \pm 0.349$  U/g creatinine으로 차이가 없었으나 1.6mg/kg투여군은  $5.820 \pm 0.746$  U/g creatinine로서 유의하게 증가되었다( $p < 0.01$ ). 대조군의 요중 MT의 평균 배설량은  $123.1 \pm 6.3$  U/g creatinine였으나 카드뮴 0.8mg/kg투여군에서는  $141.5 \pm 4.8$  U/g creatinine로서 대조군에 비해 유의하게 증가되었으며( $p < 0.05$ ) 1.6mg/kg투여군에서는  $159.2 \pm 8.0$  U/g creatinine로서 대조군에 비해 통계적으로 매우 유의하게 증가되었다( $p < 0.01$ ). 대조군의 요중 평균 카드뮴량은  $0.481 \pm 0.053$   $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinine였고, 0.8mg/kg투여군에서는  $1.624 \pm 0.097$   $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinine, 1.6mg/kg투여군은  $2.829 \pm 0.171$   $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinine로서 카드뮴투여량에 따라 거의 비례적으로 증가되었다( $p < 0.01$ ).

##### 나. 카드뮴투여후 경과시간에 따른 변화

실험동물에 카드뮴을 투여후 1, 3, 7, 14 및 28일에서의 요중 총단백질,  $\beta_2$ -MG, MT 및 카드뮴배설량과 NAG활성도는 Fig. 2와 같다.

즉, 요중 총단백질의 배설량은 카드뮴투여후 28일에서  $0.443 \pm 0.039$  g/g creatinine로서 투여전

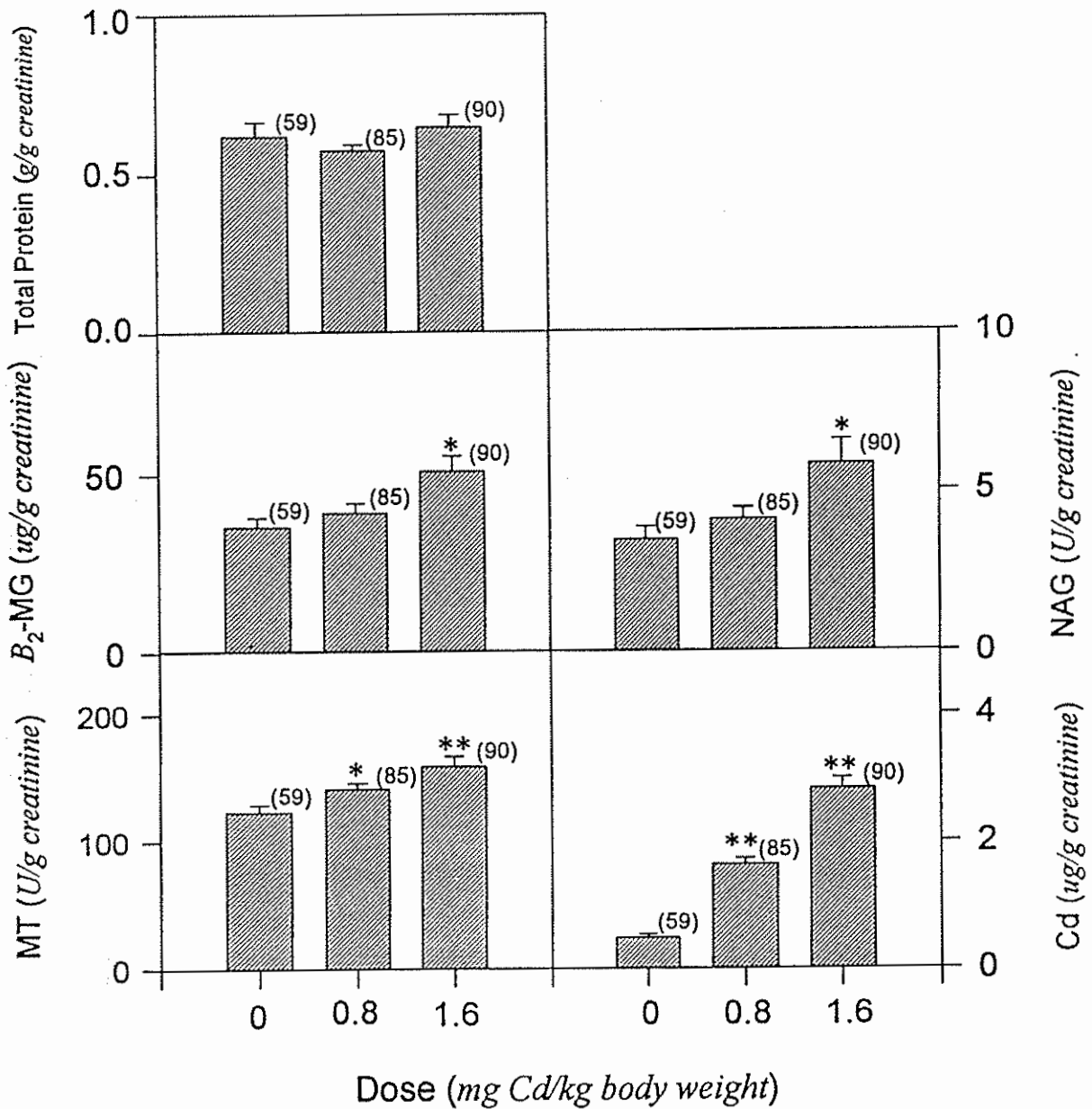


Fig. 1. The urinary level of total protein,  $\beta_2$ -MG, NAG activity, MT and Cd in Cd-exposed rats with the dosage of 0(control), 0.8 and 1.6 mg Cd/kg body weight. Vertical bar indicates standard error and numbers in parenthesis indicate sample size. \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  compared to control.

0.622±0.045 g/g creatinine에 비해 다소 감소되었으나 관찰 기간동안 카드뮴 투여후 경과시간에 따른 뚜렷한 경향은 관찰되지 않았다. 요중  $\beta_2$ -MG배설량은 카드뮴 투여후 28일에서 45.2±5.2  $\mu$ g/g creatinine로서 투여전 35.2±2.6  $\mu$ g/g creatinine에 비해 다소 증가되었으나 관찰 기간동안 경과시간에 따른 뚜렷한 경향은 관찰되지 않았다. NAG

활성도는 카드뮴 투여후 7일에서 6.987±1.647 U/g creatinine로서 투여전 3.495±0.399 U/g creatinine에 비해 유의하게 증가되었으며 14일에서는 5.637±0.766 U/g creatinine, 28일에서는 5.086±0.880 U/g creatinine로서 대조군에 비해 증가된 경향을 나타내었다. 요중 MT배설량은 카드뮴 투여후 7일째에 167.7±9.5 U/g creatinine,

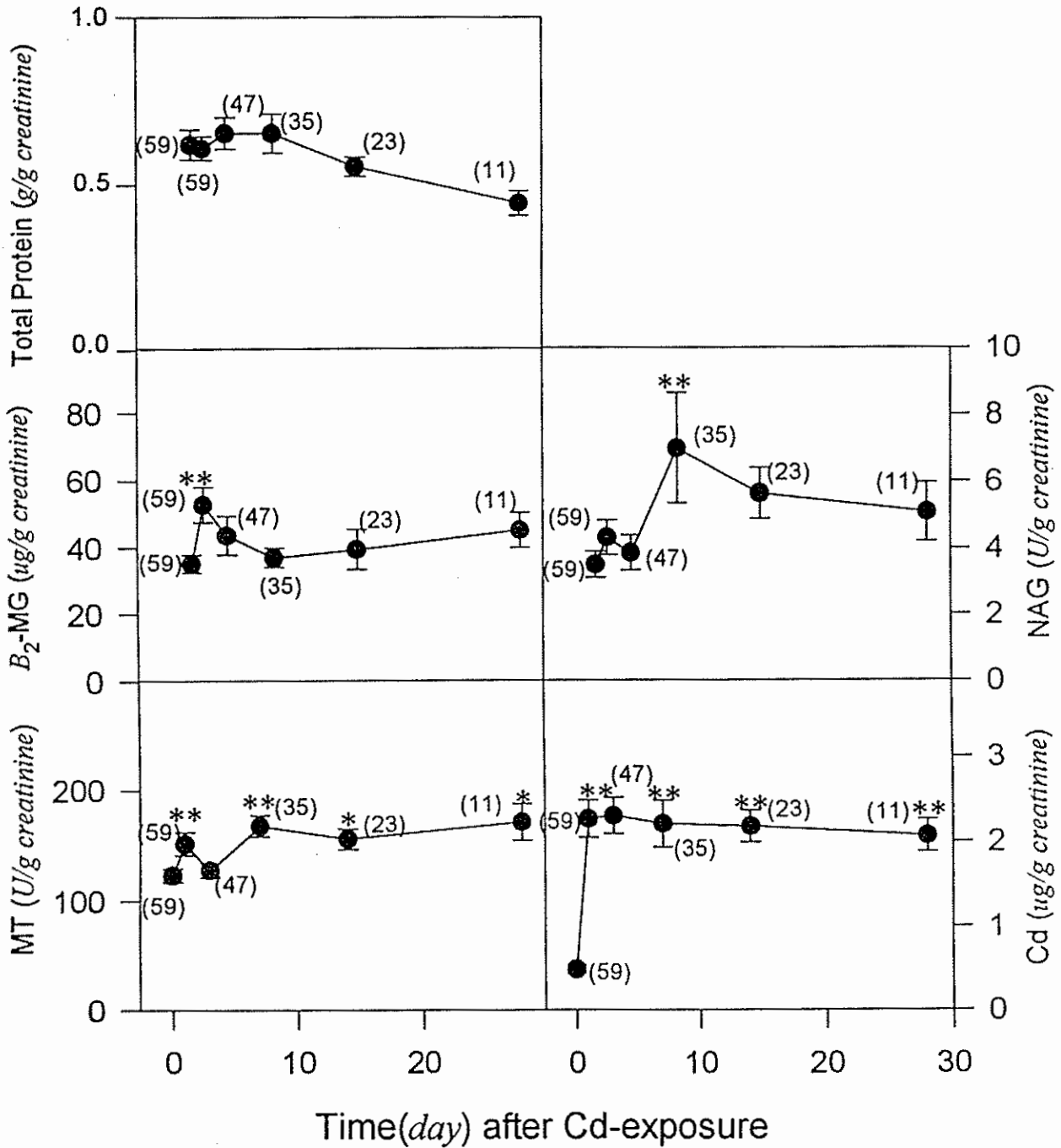


Fig. 2. The change of urinary level of total protein,  $\beta_2$ -MG, NAG activity, MT and Cd by the lapse of time after exposure to Cd in rats. Vertical bar indicates standard error and numbers in parenthesis indicate sample size. \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  compared to control.

14일째  $155.5 \pm 9.5$  U/g creatinine 및 28일째에  $170.8 \pm 16.3$  U/g creatinine로서 7일째 이후에서는 카드뮴 투여전의  $123.1 \pm 6.3$  U/g creatinine에 비해 증가된 경향이 뚜렷하였다. 카드뮴 투여전 실험동물의 요중 카드뮴 배설량은  $0.481 \pm 0.052$   $\mu\text{g/g}$  creatinine였으나 카드뮴투여후 1일째 평균 카드뮴

배설량은  $2.268 \pm 0.220$   $\mu\text{g/g}$  creatinine으로 매우 증가되었으며 이후 28일까지의 관찰 기간동안 다소 감소되는 경향을 나타내었으나 뚜렷한 변화양상은 관찰되지 않았다.

다. 총단백질,  $\beta_2$ -MG, MT배설량 및 NAG활성도의 요중 카드뮴과의 상관관계

실험동물의 체중 kg당 0.8~1.6mg의 카드뮴을 투여한 후 28일까지 관찰한 랫트의 요중 총단백질,  $\beta_2$ -MG, MT배설량 및 NAG활성도의 요중 카드뮴량과의 관계는 Table 1 및 Fig. 3과 같다.

즉, 요중 카드뮴량과의 상관분석 결과 MT배설량이 상관계수 0.4344로서 가장 높았고,  $\beta_2$ -MG배설량 0.3727, NAG활성도 0.3307, 총단백질 배설량 0.2099순으로서 모두 유의한 양의 관계를 나타내었다( $p < 0.01$ ).

(2) 혈액

대조군 실험동물의 혈중 평균 카드뮴 농도는  $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/dl}$ 였다. 실험군은 카드뮴 0.8mg/kg투여군은  $6.01 \pm 0.35 \mu\text{g/dl}$ 였고, 1.6mg/kg투여군은  $12.88$

$\pm 0.72 \mu\text{g/dl}$ 로서 혈중 카드뮴 농도는 투여량에 따라 거의 비례적으로 증가되었다(Fig. 4-A). 카드뮴 투여후 경과시간에 따른 혈중 카드뮴 농도는 카드뮴 투여후 1일에서  $9.71 \pm 1.51 \mu\text{g/dl}$ 로 증가되었으나 3일째  $9.46 \pm 1.53 \mu\text{g/dl}$ , 7일째  $10.82 \pm 1.76 \mu\text{g/dl}$ , 14일째  $9.63 \pm 0.99 \mu\text{g/dl}$ 로서 특별한 변화양상이 관찰되지 않았으나 카드뮴 투여후 28일에서는  $7.73 \pm 1.02 \mu\text{g/dl}$ 로서 다소 감소되었다(Fig. 5-A).

혈중 카드뮴 농도는 요중 생물학적 지표중 요중 카드뮴 배설량과 매우 유의한 상관관계가 있었다( $r=0.5914$ ,  $p < 0.01$ , Table 1, Fig. 6).

(3) 신장

대조군 실험동물의 신장조직내 평균 카드뮴 농도는  $0.037 \pm 0.003 \text{ mg/g wet weight}$ 였다. 실험동물의 체중당 카드뮴 0.8mg/kg투여군의 신장조직내 평

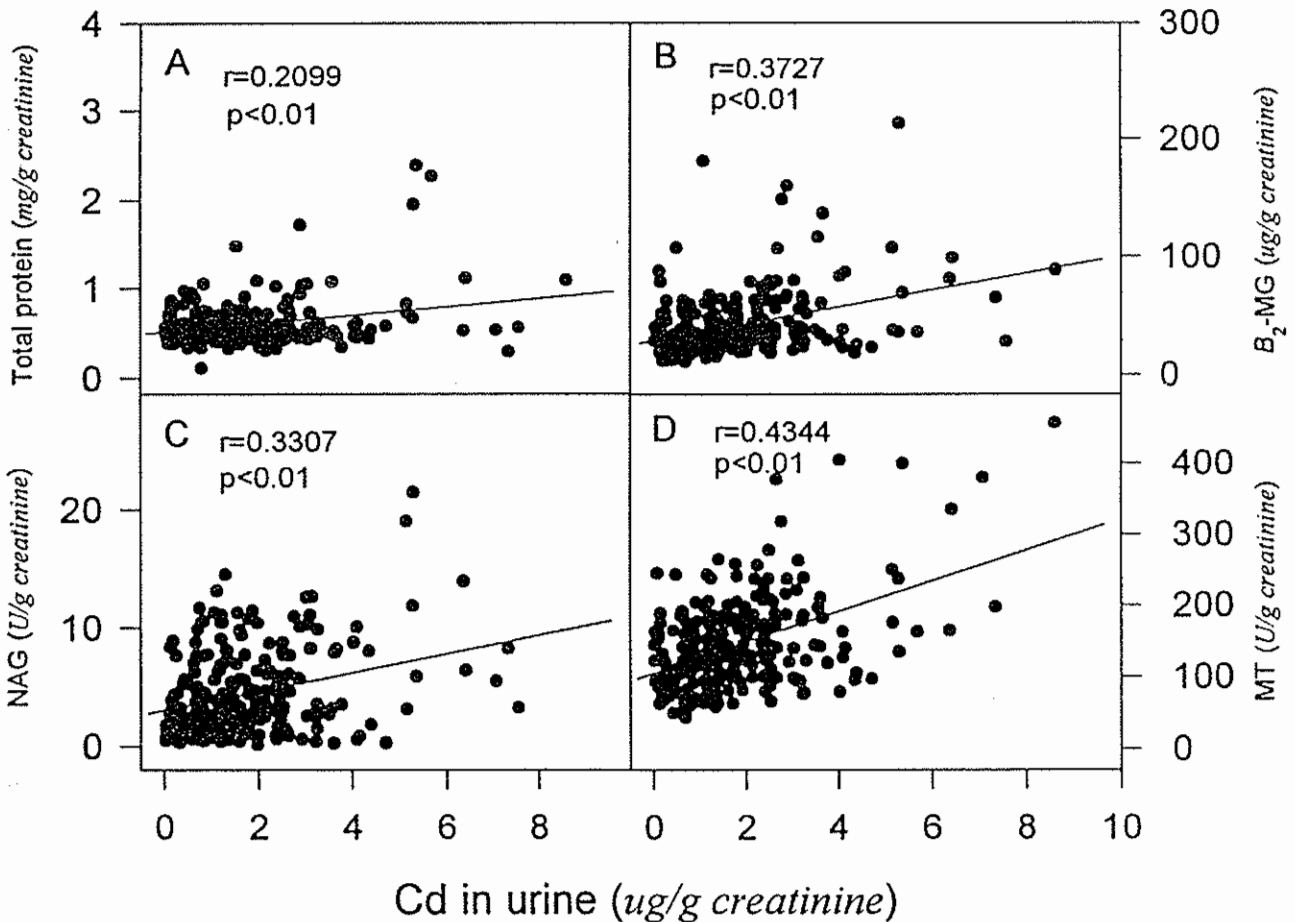
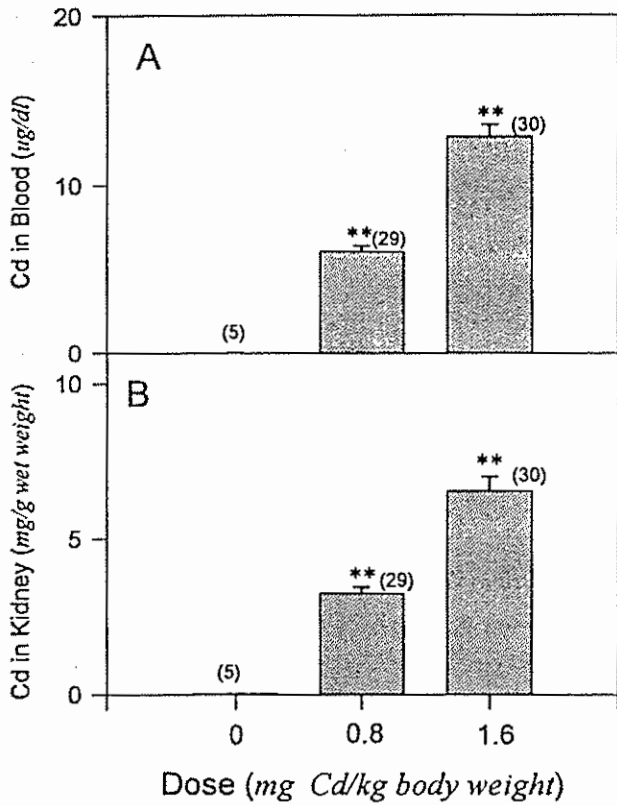
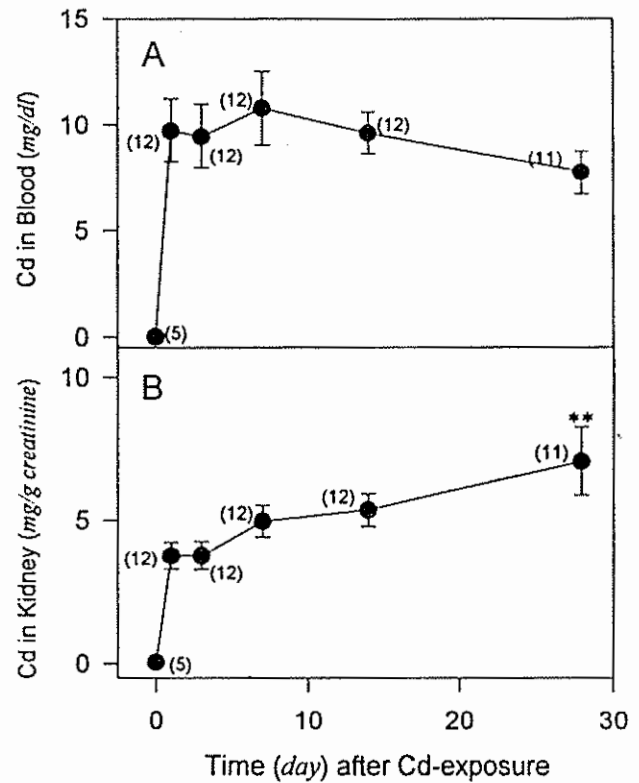


Fig. 3. The relationship between urinary Cd and renal function indices (Total protein, A ;  $\beta_2$ -MG, B ; NAG, C ; MT, D) in Cd-exposed rats.

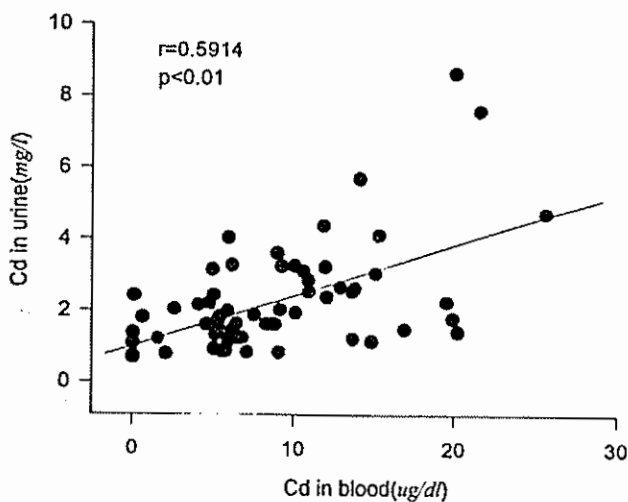




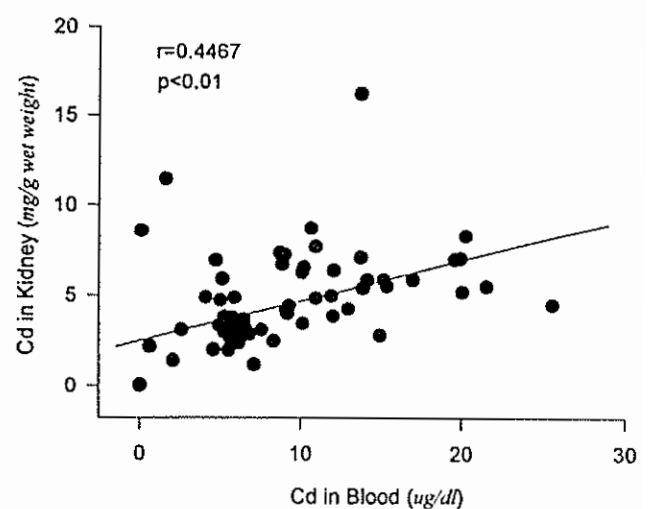
**Fig. 4.** The level of Cd in blood(A) and kidney (B) in Cd-exposed rats with the dosage of 0(control), 0.8 and 1.6 mg Cd/kg body weight. Vertical bar indicates standard error and numbers in parenthesis indicate sample size. \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  compared to control.



**Fig. 5.** The level of Cd in blood(A) and kidney (B) by the lapse of time after exposure to Cd in rats. Vertical bar indicates standard error and numbers in parenthesis indicate sample size. \*\* :  $p < 0.01$  compared to the level of Cd at the first day after Cd exposure to rats.



**Fig. 6.** The relationship between blood Cd and urinary Cd in Cd-exposed rats.



**Fig. 7.** The relationship between blood Cd and renal Cd in Cd-exposed rats.

균 카드뮴농도는  $3.252 \pm 0.206$  mg/g wet weight 였고, 1.6mg/kg투여군에서는  $6.580 \pm 0.461$  mg/g wet weight로서 실험군에서는 카드뮴 투여량에 따라 거의 비례적으로 증가되었다(Fig. 4-B). 실험군에서 카드뮴투여후 경과시간에 따른 신장조직내 평균 카드뮴 농도는 1일째에는  $3.757 \pm 0.469$  mg/g wet weight였고 3일째에는  $3.768 \pm 0.491$  mg/g wet weight, 7일째  $4.965 \pm 0.549$  mg/g wet weight, 14일째  $5.349 \pm 0.564$  mg/g wet weight 및 28일째에는  $7.058 \pm 1.185$  mg/g wet weight로써 카드뮴투여후 시간이 지남에 따라 증가되는 경향을 나타내었다(Fig. 5-B).

신장조직내 카드뮴 농도는 요중 생물학적 지표와는 통계적으로 유의한 상관성이 관찰되지 않았으나 혈중 카드뮴과는 매우 유의한 상관관계가 성립되었다( $r=0.4467$ ,  $p<0.01$ , Table 1, Fig. 7).

## 고 찰

카드뮴을 취급하는 산업장 근로자들에서 급성 카드뮴 중독은 고농도의 금속흡에 노출되거나 금속화합물을 삼키는 등 우발적 사고인 재해성 카드뮴 중독으로 매우 드물며 이때에는 폭로경로에 따라 증상이 다양하게 나타날 수 있다. 그러나 카드뮴에 의한 건강장애의 대부분은 미량의 카드뮴에 장기간 폭로됨으로서 서서히 유발되는 만성적인 건강장애로 주요 표적장기는 신장, 폐, 뼈 등이다. 이중 카드뮴에 의한 근위신세뇨관의 손상으로 인한 신장 기능의 장애가 카드뮴의 만성독성에 의한 건강장애의 조기지표로서 평가·이용되고 있다(WHO, 1992).

카드뮴에 의한 신장 기능장애의 조기진단 목적으로 널리 이용되고 있는  $\beta_2$ -MG은 분자량이 약 11,800 Da으로서 정상적으로 신사구체를 통과하여 근위신세뇨관에서 재흡수되는 저분자 단백질이다.  $\beta_2$ -MG은 근위신세뇨관 상피세포가 손상되는 경우 재흡수기능

**Table 1.** Pearson's correlation coefficients between renal function indices(total protein,  $\beta_2$ -MG, MT and NAG activity) and urinary, blood and renal cadmium in Cd-exposed rats

	Total Protein	$\beta_2$ -MG	NAG	MT	UCd	BCd	KCd
Total Protein	1	-	-	-	-	-	-
$\beta_2$ -MG	0.3054** (234)	1	-	-	-	-	-
NAG	0.3838** (233)	0.2215** (233)	1	-	-	-	-
MT	0.2601** (233)	0.4728** (233)	0.1375* (232)	1	-	-	-
UCd	0.2099** (231)	0.3727** (231)	0.3307** (230)	0.4344** (230)	1	-	-
BCd	0.1663 (59)	-0.0441 (59)	0.1549 (58)	0.1618 (59)	0.5914** (58)	1	-
KCd	-0.0538 (59)	-0.0622 (59)	0.0890 (58)	0.1363 (59)	0.1885 (58)	0.4467** (59)	1

cf. \* :  $p<0.05$ , \*\* :  $p<0.01$

( ) : number of the sample size

UCd : Cd in urine, BCd : Cd in blood, KCd : Cd in kidney

이 떨어짐으로 요중 배설량이 증가되는데, 카드뮴 폭로군에서 요중 카드뮴이 10  $\mu\text{g/g}$  creatinine 이상에서 요중  $\beta_2$ -MG배설량이 증가되는 것으로 알려져 민감도가 다소 낮은 것으로 평가되고 있다(강성규 등, 1995; Chia 등, 1989). NAG는 신세뇨관 상피세포의 리소소좀에 존재하는 효소로서 정상적으로 요중에 유리되는 효소로서 신세뇨관 상피세포가 손상되는 경우 요중으로 유리되는 양이 증가된다(Lockwood와 Bosmann, 1979; Kawada 등, 1989). 카드뮴을 취급하는 산업장 근로자들에서 요중 카드뮴이 10  $\mu\text{g/g}$  creatinine 이하에서도 요중 NAG활성도가 증가되어  $\beta_2$ -MG배설량보다 민감한 지표로 평가되나 (Chia 등, 1989; Jung 등, 1993)  $\beta_2$ -MG과 같이 비특이적이다.

MT는 포유동물에서 정상적으로 존재하는 분자량 약 6,500 Da의 저분자 단백질로서 대부분의 간장과 신장에는 2가지 형태의 MT 즉, MT-I과 MT-II의 isoform이 존재한다. MT-I과 MT-II는 분자량은 같으나 생화학적 성상이 서로 다른 단백질로서 카드뮴에 폭로시 MT-I의 합성이 더 많이 유도되는 것으로 알려져 있다(박정덕 등, 1996). 소량의 카드뮴에 반복적으로 폭로되면 카드뮴의 1차적인 축적장기인 간장에서 충분한 MT의 합성이 유도되어 카드뮴과 결합하여 결합형 카드뮴(Cd-MT)을 형성함으로써 카드뮴을 무독화시킨다(Goering과 Klaassen, 1983). 그러나, 일시에 과량의 카드뮴에 폭로되는 경우에는 MT와 결합되지 못한 유리형 Cd에 의해 간장의 손상이 유발된다(Dudley 등, 1982). 간장에서 MT와 결합된 형태의 카드뮴(Cd-MT)이 혈중으로 유리되어 신사구체를 통과후 근위신세뇨관의 상피세포에서 재흡수된 다음 리소소좀에서 결합형 카드뮴이 분해됨으로 카드뮴이 유리된다. 이때 유리된 카드뮴은 신장에서 합성된 MT와 결합되거나 또는 신장의 손상에 기여한다(Dudley 등, 1985; Dorian 등, 1992). 이와같이 카드뮴에 폭로시 MT의 합성과 역할을 고려해 볼 때 요중 MT배설량은  $\beta_2$ -MG과 NAG활성도에 비해 카드뮴 폭로에 대해 특이적이며, 분자량으로 볼 때  $\beta_2$ -MG보다 민감하게 카드뮴에 의한 신장기능의 장애를 반영해 줄 수 있는 하나의 의미있는 지표로서 추정할 수 있다.

실험동물의 체중당 0.8mg과 1.6mg의 카드뮴을 꼬리정맥을 통해 1회 투여한 후 신장과 혈액 및 요를

채취하여 카드뮴 농도를 분석하고 신기능을 반영해 주는 지표 즉, 요중 총단백질,  $\beta_2$ -MG, MT배설량 및 NAG활성도를 측정하여 대조군과 비교·분석한 결과, 신장조직내 카드뮴 축적량과 혈액과 요중 카드뮴 농도는 대조군에 비해 매우 현저히 증가되었으며 카드뮴 투여량에 따라 비례적으로 증가되어 카드뮴 폭로에 대해 특이적인 지표임을 확인할 수 있었다. 그러나, 카드뮴 투여후 관찰 기간동안의 혈액과 요중 카드뮴 농도는 시간이 지남에 따라 완만한 감소를 나타냈으나 신장조직내 카드뮴 축적량은 증가되는 경향을 나타내었다. 이는 체내에 흡수되어 각 장기로 분포되었던 카드뮴이 시간이 지남에 따라 신장으로 서서히 이동되어 축적됨을 시사하는 결과로 추정된다(이영구 등, 1994). 이와 같은 결과로 미루어 보아 미량의 카드뮴에 만성적으로 폭로되는 경우 카드뮴에 대한 폭로량을 반영해 주는 지표로서는 신장내 카드뮴 축적량이 가장 타당할 것으로 생각된다.

신기능을 반영하는 지표중 총단백질의 배설량은 카드뮴 투여군에서 카드뮴 투여전에 비해 유의한 차이가 없었고,  $\beta_2$ -MG배설량과 NAG활성도는 카드뮴 0.8mg/kg투여군에서는 투여전과 비교하여 유의한 차이가 없었으나 1.6mg/kg투여군에서는 증가되었다. 이는 이번 연구와 동일한 방법으로 동일 종의 실험동물에 카드뮴을 투여한 후 광학현미경으로 신장의 형태학적인 이상 소견을 관찰한 이전 연구(이영구 등, 1994)에서의 카드뮴 0.8mg/kg투여군에서는 신장조직에서 형태학적으로 특별한 이상 소견이 관찰되지 않았으나 카드뮴 1.6mg/kg투여군과 2.4mg/kg투여군에서는 근위신세뇨관 상피세포에서의 이상 소견이 관찰되어 실험동물의 체중 kg당 카드뮴 투여량 0.8~1.6mg 범위에서 카드뮴에 의한 신장조직의 손상이 초래됨을 시사한 연구결과와 비교해 볼 때 타당한 결과로 판단된다. 반면, MT배설량은 0.8mg/kg 투여군에서는 카드뮴 투여전에 비해 통계적으로 유의하게 증가되었으며 1.6mg/kg 투여군에서는 매우 유의하게 증가된 것으로 관찰되었다. 카드뮴 투여후 경과시간에 따른 변화양상을 관찰한 결과,  $\beta_2$ -MG배설량의 증가는 뚜렷한 경향을 나타내지 않았으나 NAG활성도는 폭로후 7일 부터는 대조군에 비해 증가된 경향이 지속적이었고, MT배설량은 카드뮴 투여후 7, 14, 28일에서 카드뮴 투여전에 비해 증가경향이 뚜렷하였다. 이상의 결과를 볼 때 이번 연구에서 평가

된 신기능 지표중 요중 MT배설량이 카드뮴 폭로에 대해 가장 민감한 지표로 나타났다. 요중 신기능 지표를 카드뮴 폭로에 대해 특이적인 지표로 확인된 요중 카드뮴과 상관분석한 결과에서 모두 유의한 양의 상관관계가 성립되었으나, MT배설량이 상관성이 가장 높게 나타나서 다른 지표들에 비해 상대적으로 특이적임을 시사하였다. 이러한 결과는 Kawada 등 (1990)이 카드뮴에 폭로되고 있는 산업장 근로자들을 대상으로한 연구에서 요중  $\beta_2$ -MG과 NAG활성도에 비해 RIA방법으로 정량한 요중 MT배설량이 요중 카드뮴 농도와의 상관이 높게 나타난 결과와 일치하였다. 그러나, 이번 연구에서 신기능 지표들이 신장조직내 카드뮴 농도와는 통계적으로 유의한 상관성이 관찰되지 않았다. 이는 이번 연구의 제한점으로 카드뮴의 폭로가 1회로, 그리고 관찰기간이 28일까지로 제한되어 반복적이고 만성적인 폭로에 의한 관찰이 이루어지지 않은 점에도 기인할 것으로 판단되나 향후 카드뮴의 만성적인 독성작용의 기전에 대한 조사·연구가 뒤따름으로 확인되어야 할 과제로 생각된다. 이번 연구에 이용된 competitive ELISA방법에 의한 요중 MT정량은 Kawada 등(1990)이 이용한 RIA방법에 비해서는 민감도가 다소 떨어지나, Ag-saturation 또는 Hg-saturation 방법에 의한 간접적인 MT정량법에 비해서는 매우 민감한 방법으로서 혈액과 요 등 생물학적 시료에 함유된 MT의 정량에는 충분히 민감한 면역화학적 방법으로서 동위원소를 필요치 않으면서 빠른 시간내에 비교적 간편하게 MT를 정량할 수 있다(Cousins, 1991).

이번 동물실험에서 카드뮴에 대한 폭로를 반영해 줄 수 있는 생물학적 지표로서 요중 MT의 타당성이 인정되며 또한 요중 MT정량에 이용된 competitive ELISA방법은 향후 카드뮴 폭로군에 대한 역학조사시 특이성이 높은 혈액과 요중 카드뮴 및 기존 검사방법과 함께 시행해 볼 수 있는 유용성있는 검사항목이라고 생각한다.

## 맺 음 말

카드뮴중독시 조기진단에 이용될 수 있는 민감하고 특이성있는 생물학적 지표를 탐색함에 있어 카드뮴의 독성에 대한 방어기전으로 생성되는 metallothionein(MT)의 요중 배설량의 유용성을 알아보

기 위하여 competitive ELISA방법을 이용하여 카드뮴에 폭로된 실험동물을 대상으로 요중 MT를 정량하였다. 아울러 카드뮴에 폭로된 실험동물의 요, 혈액 및 신장내 카드뮴 농도를 정량하고, 요중 총단백질과  $\beta_2$ -microglobulin(MG)배설량 및 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase(NAG)활성도를 측정하여 카드뮴 투여량과 투여후 경과시간에 따른 변화를 관찰하여 비교·분석하였다.

카드뮴을 투여한 실험동물의 요, 혈액 및 신장내 카드뮴 농도는 대조군에 비해 현저히 증가되었으며 투여량에 따라 거의 비례적으로 증가되어 카드뮴 폭로에 대해 특이적인 지표임을 확인하였다. 카드뮴 투여후 시간이 지남에 따라 혈액과 요중 카드뮴은 감소되는 경향을 나타내었으나 신장내 카드뮴은 점차 증가되는 경향을 나타내어 신장조직내 카드뮴이 카드뮴에 대한 폭로량을 예측할 수 있는 가장 바람직한 지표임을 시사하였다. 카드뮴 투여후 신기능지표의 변화를 관찰한 결과, MT배설량은 카드뮴 투여량에 따라 통계적으로 유의하게 증가되었고 카드뮴 투여후 경과시간에 따라서도 7, 14 및 28일에서 배설량의 증가가  $\beta_2$ -MG배설량과 NAG활성도에 비해 뚜렷하였으며, 요중 카드뮴 농도와도 상관관계가 가장 높게 관찰되어 상대적으로 민감하고 특이적임을 시사하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, competitive ELISA방법으로 비교적 간편하고 신속하게 정량할 수 있는 요중 MT배설량은 카드뮴 폭로에 대해 비교적 민감하고 특이적인 지표로서 앞으로 카드뮴 폭로군에 대한 역학조사시 유용한 하나의 검사항목으로 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- 강성규, 양정선, 김기웅, 장재연, 정호근. 우리나라 카드뮴 폭로 근로자들의 혈중, 요중 카드뮴과 누적폭로 추정량에 따른 신장장해 평가. 대한산업의학회지 1995;7:101-110.
- 강성규, 홍정표, 김기웅, 장재연, 정호근, 정규철. 국내 카드뮴 취급사업장의 카드뮴 폭로 실태 평가. 대한산업의학회지 1994;6:252-258
- 박정덕, 이우석, 공운, 홍연표, 장임원. 카드뮴폭로에 대한 생물학적 지표: Competitive ELISA에 의한 Metallothionein 정량. 대한산업의학회지 1996;8:258-271.

이영구, 박정덕, 최병선, 홍연표, 장임원. 카드뮴폭로후 고환, 신장 및 간장내 카드뮴축적량과 조직손상의 변화. 대한산업의학회지 1994;6:56-68.

조수현, 김현, 김선민. 아연 용융 도금작업 근로자의 카드뮴 폭로 가능성에 관한 조사연구. 대한산업의학회지 1991;3:153-164.

ACGIH. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. 1994, ACGIH, Cincinnati, Ohio. cited from 정규철. 산업중독편람. 서울:신광출판사, 1995.

Bonsnes RW, Taussky HH. On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. J Biol Chem 1945;158:581-591.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.

Buell G. Some biochemical aspects of cadmium toxicology. J Occup Med 1975;17:189-195.

Chia KS, Ong CN, Ong HY, Endo G. Renal tubular function of workers exposed to low levels of cadmium. Br J Ind Med 1989;46:165-170.

Cousins RJ. Measurement of human metallothionein by enzyme-linked immunosorbent assay. In Methods in Enzymology. Vol. 205, ed. Riordan JF and Vallee BL, San Diego: Academic Press, 1991;205:131-140.

Dorian C, Gattone VH II, Klaassen CD. Renal cadmium deposition and injuries as a result of accumulation of cadmium-metallothionein(Cd-MT) by the proximal convoluted tubules - A light microscopic autoradiography study with <sup>109</sup>Cd-MT. Toxicol Appl Pharmacol 1992;114:173-181.

Dudley RE, Gammal LM, Klaassen CD. Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: Likely role of cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1985;77:414-426.

Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen CD. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. Toxicol Appl Pharmacol 1982;65:302-313.

Goering PL, Klaassen CD. Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: Possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality. Toxicol Appl Pharmacol 1983;70:195-203.

Goering PL, Waalkes MP, Klaassen CD. Toxicology of cadmium. In Toxicology of Metals:

Biochemical Aspects. ed. Goyer RA and Cherian MG, Berlin: Springer-Verlag, 1995;189-214.

International Agency for Research on Cancer(IARC). International Agency for Research on Cancer Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. vol. 58, "Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry". 1993:IARC Sci Publ, Lyon.

Jin T, Nordberg M, Nordberg GF. Modulation of calciuria by cadmium pretreatment in rats with cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity. Toxicology 1992;75:29-37.

Jung K, Pergande M, Graubaum H, Fels LM, Endl U, Stolte H. Urinary proteins and enzymes as early indicators of renal dysfunction in chronic exposure to cadmium. Clin Chem 1993;39:757-765.

Kawada T, Toyama H, Suzuki S. Cadmium, NAG activity, and  $\beta_2$ -microglobulin in the urine of cadmium pigment workers. Br J Ind Med 1989;46:52-55.

Kawada T, Tohyama C, Suzuki S. Significance of the excretion of urinary indicator proteins for a low level of occupational exposure to cadmium. Int Arch Occup Environ Health 1990;62:95-100.

Kido T, Nogawa K, Ohmichi M, Honda R, Tsuritani I, Ishizaki M, Yamada Y. Significance of urinary cadmium concentration in a Japanese population environmentally exposed to cadmium. Arch Environ Health 1992;47:196-202.

Lockwood TD, Bosmann HB. The use of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in human renal toxicology: I. Partial biochemical characterization and excretion in humans and release from the isolated perfused rat kidney. Toxicol Appl Pharmacol 1979;49:323-336.

Mason HJ, Davison AG, Wright AL, Guthrie CGJ, Fayers PM, Venables KM, Smith NJ, Chettle DR, Franklin DM, Scott MC, Holden H, Gompertz D, Newman-Taylor AJ. Relations between liver cadmium, cumulative exposure, and renal function in cadmium alloy worker. Br J Ind Med 1988;45:793-802

Mueller PW, Smith SJ, Steinberg KK, Thun MJ. Chronic renal tubular effects in relation to urine cadmium levels. Nephron 1989;52:45-54.

Noto A, Ogawa Y, Mori S, Yoshioka M, Miyake T. Simple, rapid spectrophotometry of urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, with use of

a new chromogenic substrate. *Clin Chem* 1983;29:1713-1716.

Page AL, El-Amamy MM, Chang AC. Cadmium in the environment and its entry into terrestrial food chain crops. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Ed. Foulkes, EC, vol. 80, 1986, Berlin, Springer-Verlag, pp. 33-74.

Roels H, Bernard AM, Cardenas A, Buchet JP, Lauwerys RR, Hotter G, Ramis I, Mutti A, Franchini I, Bundschuh I, Stolte H, De Broe ME, Nuyts GD, Taylor SA, Price RG. Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. III Application to workers exposed to cadmium. *Br J Ind Med* 1993;50:37-48.

Shaikh ZA, Tohyama C, Nolan CV. Occupational exposure to cadmium: Effect in metallothionein and other biological indices of expo-

sure and renal function. *Arch Toxicol* 1987;59:360-364.

Shaikh ZA, Ellis KJ, Subramanian KS, Greenberg A. Biological monitoring for occupational cadmium exposure: the urinary metallothionein. *Toxicology* 1990;63:53-62.

Smith NJ, Topping MD, Stewart JD, Fletcher JG. Occupational cadmium exposure in jig solderers. *Br J Ind Med* 1986;43:663-666.

WHO. Kinetics and metabolism in laboratory mammals and humans. In *IPCS Environmental Health Criteria 134 Cadmium*. 1992, Geneva, WHO, pp. 67-96.

WHO Study Group. Recommended health-based limit in occupational exposure to heavy metals. *Tech Rep Ser Wld Hlth Org* 1980;647:21-35.