

제1차년도  
연구보고서

## 약효 및 독성시험지원 연구

New Methodology for the Efficacy and  
Toxicity Testings

## *In Vitro* 독성시험법 개발 연구 (I)

Studies on the Development of *In Vitro*  
Toxicity Tests (I)

연구기관

국립보건안전연구원

과 학 기 술 처

# 제 출 문

## 과 학 기 술 처 장 관 귀 하

본 보고서를 “약효 및 독성시험 지원연구”과제 (세부과제 : “*In vitro* 독성시험법 개발 연구”)의 연차보고서로 제출합니다.

1995. 7. .

주관연구 기관명 : 국립보건안전연구원

세부과제 책임자 : 문 화 회

제 1 연구책임자 : 김 정 구

제 2 연구책임자 : 김 부 영

제 3 연구책임자 : 장 성 재

제 4 연구책임자 : 하 광 원

제 5 연구책임자 : 선 우 연

# 요 약 문

## I. 제 목

세부과제명 : *In vitro* 독성시험법 개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 자연과학분야의 괄목할만한 발달로 환경오염물질, 의약품, 식품첨가물, 농약 및 화장품 등 새로운 화학물질이 쏟아져 나오고 있으며, 이러한 화합물들이 인체에 미치는 독성을 정확히 평가하는 것이 사회적으로 중요한 과제가 되고 있다. 따라서 독성을 초기에 정량적으로 검색할 수 있으며 독성 유발기전을 규명하여 독성감소 가능성도 제시할 수 있는 시험법의 개발은 필수적이다.

현재까지는 이러한 독성시험의 대부분이 *in vivo*로 행해지고 있으나 *in vivo* 독성시험법은 대량의 실험동물 사용, 과도한 인력자원과 경비 및 장기간의 시간이 소요될 뿐만 아니라 독성의 정량화가 어렵고 실험자의 주관에 따라 결과가 판정될 수도 있으며, 항상 일정 조건으로 시험계를 확립하기 어렵다는 단점을 갖고 있다. 이에 비하여 배양세포등을 이용한 *in vitro* 독성평가는 상기 단점을 보완할 수 있을 뿐만 아니라 일정조건에서 정확한 시험계를 확립시키는 것이 가능하고 독성을 정량적으로 평가할 수 있으므로 최근 여러나라에서는 독성시험법으로 많이 사용되고 있으나 우리나라에서는 아직 확립되어 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 독성평가의 전반에 걸쳐 기존 *in vivo* 시험법을 대체할 수 있는 적절한 *in vitro* 시험법을 개발·확립하여 실험동물의 복리, 실험 경비와 소요시간의 단축을 도모하며 의약품등 화학물질

의 독성평가를 신속·정확하고 정량적으로 수행하고 독성발현 기전을 규명하여 안전성을 확보하고자 한다.

화학물질의 노출에 의하여 가장 빈번하고 크게 독성을 받는 장기는 간장, 신장, 신경계등으로써 이러한 표적장기의 1차 배양 시스템을 확립하고 이를 이용한 *in vitro* 시스템에서 표적장기의 독성을 검색할 수 있는 특이지표를 개발하고자 하였으며 현재까지 토끼, 기니픽, 랫드등의 시험동물을 이용하여 실시하여 왔던 국소독성분야에서도 세포배양법을 이용한 *in vitro* 국소독성시험법을 개발하여, 피부에 접촉 가능성이 있는 화학물질의 안전성 평가방법을 개발하고자 하였다.

생식독성에 대한 안전성평가 시험법은 다른 독성시험에 비하여 특히 많은 동물을 필요로 할 뿐 아니라 그 소요기간도 길기때문에 최근 급증하는 환경 독성물질을 검색하기에는 매우 어려운 점이 있다. 그럼에도 불구하고 세계 각국에서 공식적으로 인정하는 생식독성 평가방법은 여전히 *in vivo* 시험법에 국한되고 있는데, 그 이유는 이것을 대체할 만한 방법에 대한 연구가 아직은 미진하며, *in vitro* 방법은 직접 모체를 매개로 하지 않는다는 한계를 가지고 있기 때문이다. 그러나, 최근 세계 각국의 실험실에서 *in vivo* 최기형시험의 대체법으로서의 *in vitro* 배양법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 최근 몇년 동안 축적된 자료와 정보는 *in vivo* 시험법의 대체법으로서의 가능성을 충분히 제시해 주고 있다. 현재, 화학물질의 생식독성중 최기형성을 기존의 방법보다 신속히 알아내기 위해 많은 연구가 진행중이며, 지금까지 virus, planaria, hydra, 초파리(Drosophila), 개구리(xenopus), 계태아(chick embryo), 배양세포, 설치류등 포유류의 배자 및 적출된 장기를 이용한 *in vitro* 시험법들이 진행되고 있다. 그러므로, 본 연구에서는

화학물질, 의약품등의 독성물질에 대한 안전성 평가방법으로 국내에도 이용할 수 있는 *in vitro* 생식독성시험법을 확립하여 *in vivo* 대체시험법으로서의 개발이용 및 그 독성기전 연구방법으로서의 활용범위를 넓히고자 하였다.

다른 독성시험에 비하여 *in vitro* 독성시험법이 주로 이용되고 있는 분야는 유전독성분야라 할 수 있으며 본 연구에서는 *in vitro* 및 *in vivo* 염색체이상시험을 이용하여 항돌연변이물질 검색법으로 확립하고, 그 작용기전을 고찰, 신의약품개발에 기초자료로 제공하고자 하였다. 국소적으로 도포하거나 전신적으로 투여하는 화학물질이 자외선 및 가시광선에 노출되었을 때 피부에 홍반이나 부종과 같은 이상반응이 나타나는데 이러한 것을 화학물질에 의해 야기되는 광독성이라고 한다. 광독성물질을 검색하는 이상적인 시스템은 간편하여야 하며 기기와 방법을 쉽게 이용할 수 있어야 하고 경제적이며 민감하여야 한다. 이러한 조건을 만족시키기 위하여 *in vitro* 시험법의 개발이 요구되었고 이상적인 시험법이 확립된다면 화학물질의 안전성평가에 많은 도움을 줄 것으로 생각된다.

### Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. *In vitro* 표적장기 독성시험법 개발

##### 가. *In vitro* 신장독성 시험법 개발

1차 세포배양을 이용한 *in vitro* 신장독성검색법으로 웅성 Sprague-Dawley계 랫드의 신장으로부터 collagenase, iron oxide와 이중 mesh를 이용하여 근위세뇨관 세포를 분리하여 1차 배양하였다. 근위세뇨관 신장세포주인 LLC-PK<sub>1</sub> 배양 시스템에서 대표적인 신장독성

물질인 시스플라틴을 처리하여 *in vitro* 독성평가의 가장 일반적인 방법인 배지내 LDH의 활성을 측정하였으며, 근위세뇨관에 많이 함유되어 있으며 지표효소로 알려진  $\gamma$ -GT의 활성도 측정하였다. 또한  $\alpha$ -methyl glucose를 이용하여 신장의 고유기능인 glucose uptake를 측정하여 효소유리 측정법과 비교하였다. 이와 함께 glucose uptake에 관여하는  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase와  $\text{Na}^+/\text{glucose}$  cotransporter가 존재하는 apical membrane의 지표효소인 alkaline phosphatase의 활성을 측정하였으며, 미토콘드리아의 기능을 측정하여 신장독성물질의 독성유발기전을 규명하고자 하였다.

#### 나. *In vitro* 신경독성 시험법 개발

임신 13.5일된 Long-Evans 랫드 태자로 부터 섬유아세포를 배양하였다. 소뇌과립세포의 배양은 생후 8일령된 Long-Evans 랫드의 brain으로 부터 순수하게 소뇌를 분리한 후 poly-L-lysine이 처리된 배양접시에서 배양하였다. Astrocyte 배양은 cerebrum을  $200\ \mu\text{m}$  Nitex mesh와  $100\ \mu\text{m}$  Nitex mesh로 filter한 후 7-9일간 배양한 다음 6시간 shaking, trypsin-EDTA로 처리등의 조작을 거쳐 배양하였다. 시험물질로는 methamphetamine(MAP), trimethyltin chloride (TMT), cadmium chloride(Cd), aluminum chloride(Al)를 사용하였으며, 독성평가 지표로는 MTT assay와 SRB assay를 실시하였다.

#### 다. *In vitro* 간장독성 시험법 개발

용성 SD계 랫드로 부터 two-step perfusion method를 이용하여 간세포를 분리하였다. 시험물질로는  $\text{CCl}_4$ 를 2.5, 5, 10 및 20mM의 농도로 1, 2, 5, 12, 및 24시간동안 처리하였고 아세트아미노펜은 0.5, 1.0 및 2.0mM의 농도로 24, 48 및 72시간 동안 처리하였다. 간세포에 시험물

질을 처리한 후, 시험물질에 의해 유도된 세포막 파괴에 의해 세포내에서 배양액으로 유출되어 나오는 LDH의 양을 측정하였으며, trypsin-EDTA 액을 처리하여 배양접시에 부착된 세포를 떼어낸 뒤 세포 현탁액에서 GSH의 양을 분석하였다.

## 2. Skin 구성세포를 이용한 *in vitro* 국소자극시험법 확립

사람피부세포를 이용하여 가장 민감하고 신속한 *in vitro* 검색법을 찾고자, 1차 배양한 human skin fibroblast를 이용하여 피부자극도를 평가할 수 있는 세포독성 시험방법을 검색하였다. 그 중 세포질내에 존재하는 효소인 lactate dehydrogenase (LDH)가 세포밖으로 누출되는 정도를 측정하고, mitochondria내의 succinate dehydrogenase를 측정하기 위하여 MTT reduction test를 실시하였다. 이러한 세포독성 시험방법의 *in vitro* 대체 시험법으로의 가능성을 확인하기 위하여 *in vivo* 시험인 human patch test와 rabbit intradermal safety test를 실시하여 *in vivo*, *in vitro* 시험 결과의 상관성을 분석하여, *in vitro* 피부자극 대체시험법의 가능성을 알아보았다.

## 3. Mid brain cell culture를 통한 생식독성시험법 확립

신경계의 태자기 발생과정은 매우 복잡한 현상의 연속이며, 인간의 뇌신경의 대부분은 분만이전에 형성되는데, 신경계의 발생과정중에는 독성물질에 의한 자극에 매우 민감하므로, 조그만 자극에 의해서도 형태적이상 및 기능이상 등의 장애가 유발될 수 있다. 이에, 1차년도에는 *in vitro* 생식독성 시험법의 하나로 일차 중뇌세포 배양법을 확립하고자, 사람의 뇌발생과 초기발생이 매우 유사한 설치류의 한 종인 랫드

의 배자를 이용하여 일차 증뇌 배양을 실시하였다. 증뇌세포를 랫드 배자로 부터 적출하여 트립신처리 및 물리적 분쇄 등으로 단일세포 부유액을 만들었다. 화학물질에 대한 독성을 평가하기 위하여, 세포부유액을 일정하게 세포배양판에 떨어뜨려 시험물질을 처리하고 배양하여 세포분화 및 세포독성에 관한 각각의 endpoint로서 foci 형성 억제와 세포수 감소를 조사하였다.

#### 4. 포유류배양세포를 이용한 항돌연변이물질검색법 확립

기존의 *in vivo*, *in vitro* 염색체이상시험을 실시하여 비교 고찰하고, 항돌연변이물질 검색수단으로서의 유용성 및 재현성을 검토하고자 하였다. 또한 작용기구가 잘 알려진 mitomycin C와 bleomycin을 변이원으로 선택하여 변이억제 특성의 규명 및 시험대상에 따른 항돌연변이물질의 작용특성을 연구하였다. 항돌연변이 후보물질로는 항산화효과가 있다고 밝혀진 결명자 추출물인 rubrofusarin을 선택하여 변이원인 mitomycin C, bleomycin과 병용처리하여 항돌연변이효과를 관찰하고자 하였으며, 미국 FDA에서 제 3상 임상시험을 실시하고 있는 항돌연변이 효과가 보고된  $\beta$ -carotene을 항돌연변이 지표물질로 선택하여, 항돌연변이 효과 및 그 작용기전을 확인해 보고자 하였다.

#### 5. *In vitro* 광독성 시험법의 개발

정상적인 사람의 피부 fibroblast를 neonatal foreskin explant로부터 분리·배양하였다. Fibroblast의 배양액은 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, 10% fetal bovine serum이 강화된 DMEM를 사용하였다. 96-well tissue culture plate에 well당  $2 \times 10^4$  세포를 넣은 후



37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간동안 배양하였다. 시험물질을 PBS에 200ug/ml에서 0.1ug/ml까지의 농도로 용해시킨 후 시험세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 시험물질에 1시간동안 노출시켰다. UVA(7.2J/cm<sup>2</sup>)를 조사한 다음 MTT 및 neutral red(NR) uptake assay를 실시하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. *In vitro* 표적장기 독성시험법 개발

###### 가. *In vitro* 신장독성 시험법 개발

웅성 SD계 랫드의 신장으로부터 근위세뇨관 세포를 효과적으로 분리·배양하였으며, 랫드 신장의 근위세뇨관 1차 배양 시스템을 이용한 *in vitro* 검색법으로 활용할 수 있는 기초를 마련하였다고 볼 수 있다. 근위세뇨관 신장세포주인 LLC-PK<sub>1</sub> 배양 시스템에서 시스플라틴 처리에 의하여 배지내로 유리되는 LDH와  $\gamma$ -GT의 활성을 측정한 결과 두 효소의 활성이 증가하다가 고농도에서는 오히려 감소하였다. 이것은 시스플라틴이 LDH나  $\gamma$ -GT의 활성을 직접 억제하기 때문인 것으로 생각되며, 따라서 시스플라틴의 독성평가에는 적절한 방법이 아닌 것으로 판단되었다.  $\alpha$ -Methylglucose uptake를 측정한 결과 시스플라틴 처리에 의하여 용량의존적으로 유의성있게 감소하였으며 이러한  $\alpha$ -MG uptake의 감소현상은 효소 유리가 관찰되지 않는 농도에서 나타났다. 따라서  $\alpha$ -MG uptake 측정은 cell death 전에 나타나는 신장의 특이적인 기능 이상을 평가할 수 있는 지표로서 *in vitro* 시스템에서 독성의 초기에 검색가능한 예민한 parameter로 활용할 수 있으리라 생각되었다. 세포내 ATP 양을 측정한 결과 시스플라틴 처리에 의하여 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으며 따라서 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG

uptake 감소현상은 시스플라틴이 미토콘드리아의 기능을 저하시킴으로써 ATP 생성량이 감소하여 유발된 것은 아닌 것으로 판단되었다. Basolateral membrane의 지표효소인  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성을 측정한 결과 시스플라틴 처리에 의하여 유의성 있는 활성감소가 나타났으나  $\alpha$ -MG uptake 감소현상이  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성저하보다 선행하므로  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성저하가  $\alpha$ -MG uptake 감소에 부분적으로 관련이 있으나 직접적인 원인은 아닌 것으로 생각되었다.  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter가 존재하는 brush border membrane의 지표효소인 alkaline phosphatase(ALP)의 활성을 측정한 결과 6시간 처리에 의해서는 유의성 있는 변화가 없었으며 24시간 처리시에는 뚜렷한 활성감소가 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 시스플라틴은 basolateral membrane과 미토콘드리아에 대한 영향보다는 brush border membrane에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각되며, 따라서 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake의 저하는 brush border membrane에 존재하는  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter에 대한 직접 억제작용이 더 크게 기여한 것으로 추측된다. 본 실험 결과 랫드 신장의 근위세뇨관 세포의 1차 배양 시스템은 *in vitro* 신장독성 검색법으로 유용하게 활용되리라 생각되며, glucose uptake 기능 측정법은 *in vitro*에서 신장독성 초기에 검색가능한 예민한 지표로 활용가능하고 이와 함께 glucose uptake 기능에 관여하는 효소와 미토콘드리아의 기능을 측정함으로써 독성물질의 독성유발기전도 규명할 수 있으리라 판단된다. 또한 본 시험에서 사용한 대표적인 신장독성물질인 시스플라틴에 대한 실험결과를 토대로 신약으로 개발중인 항생제와 항암제등의 독성평가에도 이 시스템을 응용하여 신장독성이 주 부작용인 이들의 독성평가를 신속하

게 수행함으로써 신약개발에 기여할 수 있으리라 생각된다.

#### 나. *In vitro* 신경독성 시험법 개발

소뇌과립세포(cerebellar granule cell) 배양결과 98% 이상 순수한 신경세포를 배양하였으며 10일후 배양중 신경세포의 system이 완성되었고 6주 이상 생존가능하였다. 신경교세포(astrocyte)를 배양한 결과 95% 이상 순수한 astrocyte를 배양하였으며 6주간 생존가능하였다. SRB assay에 의한 섬유아세포의 생존율과 형태적 변화를 관찰한 결과 MAP의 경우 LC<sub>50</sub>은 3200 $\mu$ M이며, 형태학적 변화양상은 세포내에 과도한 공포를 형성하고, AlCl<sub>3</sub>의 LC<sub>50</sub>은 2000 $\mu$ M이었다. TMT는 LC<sub>50</sub>이 3.8 $\mu$ M이며, processing의 억제로 인한 세포표면의 매끄러움과 외관상 삼각형의 모습을 나타내었고, CdCl<sub>2</sub>는 세포골격 단백질의 파괴를 나타내었다. MTT assay에 의한 소뇌과립세포의 생존율을 측정된 결과 LC<sub>50</sub>은 MAP의 경우 3mM, AlCl<sub>3</sub> 처리시에는 2mM, CdCl<sub>2</sub> 처리시에는 2 $\mu$ M, TMT 경우에는 4 $\mu$ M이었다. 이상의 결과들을 종합해 볼때 각각의 시험물질들의 독성발현 기전이 상이함을 확인 할 수 있었고, *in vitro* 모델이 신경독성이 의심되는 물질을 단기간의 검색하는데 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 다. *In vitro* 간장독성 시험법 개발

Collagenase를 이용한 two-step perfusion 법으로 랫드 간세포의 분리하였다. CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 대조군의 경우 1, 2, 5, 12 및 24시간 배양 후, 배양액으로 누출된 LDH는 낮은 농도로 유지되는데 비하여, 2.5mM CCl<sub>4</sub> 처리군의 경우 1시간 배양했을 때 이미 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보이고, 배양시간의 증가에 따라 더욱 증가하여 5시간 배양시 포화상태에 도달했다. 5mM 및 10mM을 처리하였을 때의

1, 2, 5 및 12시간에서의 LDH의 누출량은 배양시간에 따라 증가하여 5~12 시간에서 포화상태를 보이는 매우 비슷한 양상을 보였다. 즉 CCl<sub>4</sub>는 2.5mM 정도의 낮은 농도로도 충분히 간독성을 유발하였고, 농도 의존적인 LDH 유리를 보이며, 노출 초기에 급격한 독성을 발현하는 양상을 보였다. 2.5, 5, 10 및 20mM의 CCl<sub>4</sub>를 처리하였을 때, 어떤 배양시간에서도 GSH양은 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 아세트아미노펜을 0.5, 1 및 2 mM 농도로 24, 48 및 72 시간 동안 배양한 후의 LDH leakag는 0.5 및 1mM 농도에서 별다른 변화를 보이지 않았으며, 2mM 농도에서 대조군에 비해 유의성있는 증가의 결과가 48시간 이후에 나타났다. 한편 GSH 측정결과 LDH leakage와 반비례하여 GSH 양은 감소하는 결과를 보였다. 이상의 결과로서, isolated hepatocyte culture system은 다양한 xenobiotics의 간독성 발현기전의 상이함, 독성발현 농도및 노출기간등의 검색등 몇가지 제한점이 있으나, *in vivo* 모델을 조심스럽게 반영할 수 있으므로, 신속한 간독성 스크리닝에는 유용할 것으로 사료되며, *in vitro* 간독성 지표로 대표적인 LDH leakage 와 GSH content를 비교할 때, LDH leakage가 보다 일반적으로 적용될 수 있는 간독성 지표로 사용될 수 있으며, GSH content 는 아세트아미노펜과 유사한 대사과정을 갖는 약물의 간독성 과정을 평가하는데 유용할 것으로 사료된다

## 2. Skin 구성세포를 이용한 *in vitro* 국소자극시험법 확립

### 가. *In vitro* 세포 독성

10개의 계면활성제를 시험물질로하여 세포막 손상도와 미토콘드리아의 안정성을 측정하기 위하여, LDH assay와 MTT reduction test

를 실시하였다. 각 시험물질을 fibroblast에 3 시간 동안 처리한후 LDH 양의 변화를 측정하였으며, 그 결과는 각 cell의 총 LDH 양을 100 %로 환산하였을때의 시험물질별, 농도별 LDH 양의 변화를 %로 표시하였다. 시험물질의 농도가 높아짐에 따라 LDH 유출양도 용량 의존적으로 증가하였다. 또한 시험물질 처리 3 시간후 MTT test의 결과를 normal fibroblast의 mitochondrial succinate dehydrogenase양을 100 %로 환산하였을 때, 시험물질에 따른 변화량을 %로 표시하였다. 계면활성제의 농도가 높아질수록, 세포가 시험물질에 의해 손상을 받아 mitochondrial dehydrogenase양이 용량 의존적으로 감소하였다. 이렇게 하여 얻은 10개의 시험물질에 대한 용량반응곡선으로부터 각 시험물질의 EC<sub>50</sub> 값을 구하였다. LDH assay와 MTT reduction test의 EC<sub>50</sub> 값을 비교하여 보면 LDH의 EC<sub>50</sub> 값이 MTT의 EC<sub>50</sub> 값보다 낮음을 알 수 있다. 즉 본 시험계에서 LDH assay 방법이 MTT test보다 좀더 민감한 방법임을 알 수 있다.

#### 나. *In vitro*, *in vivo* 시험의 상관관계

*In vivo* 시험인 human patch test와 rabbit intradermal safety test를 실시하여 시험물질별 판정 결과를 점수화하여 자극도를 구분하였다. *in vivo* 시험 결과와 *in vitro* 시험 결과의 상관 관계를 알아보기 위하여 spearman's rank correlation coefficients를 구하였다. LDH와 human patch test와의 상관관계가 가장 좋았으며( $r=0.886$ ), MTT와 human patch test와의 상관관계는 LDH 보다 낮은 경향을 나타내었다( $r=0.757$ ). 이 결과는 본 실험에서 사용한 계면활성제의 경우 LDH assay가 MTT test보다 *in vivo* 시험 결과와 상관성이 좋은 것을 알 수 있다.

본 실험의 결과로 부터 LDH leakage assay와 MTT reduction test는 계면활성제의 상대적인 독성을 평가하는 방법으로 사용될 수 있으며, MTT test에서 감지하지 못한 독성도 LDH leakage assay 방법으로 독성 정도를 평가 할 수 있었다.

### 3. Mid brain cell culture를 통한 생식독성시험법 확립

임신 랫드로 부터 적출한 태자의 중뇌부위를 배양한 결과, 미분화된 신경상피세포로 부터 정상적인 발달상태를 보이는 신경세포가 분화되었으며, 배양 5일째에는 신경세포끼리 사이에 상호간의 process가 연결되어 발달하여 *in vivo* 상태의 뇌발달과 유사한 신경발생과정이 *in vitro* 상태에서 진행되었다. 배양된 세포에 대한 약물의 영향을 평가하기 위하여 최기형성물질인 hydroxyurea(HU)와 retinoic acid(RA)를 처리하였다. HU와 RA 모두 neutral red uptake방법으로 세포생존성을 검사한 결과, 농도의존적으로 세포독성을 유발하여 세포생존성이 감소되었으며, hematoxylin과 면역세포염색방법으로 세포분화도를 관찰한 결과, 세포분화도 또한 농도의존적으로 감소되었다. 이 결과로서, *in vitro* 일차중뇌세포배양법이 생식독성물질 중 최기형성물질을 검색하는 하나의 유용한 방법으로서 이용될 수 있을 것으로 생각되었다.

### 4. 포유류배양세포를 이용한 항돌연변이물질검색법 확립

포유동물배양세포를 이용한 *in vitro* 염색체이상시험을 항돌연변이물질 검색법으로 확립하기 위하여 예비시험을 거쳐 시험법을 확립하였다. 염색체이상시험방법중 직접법만을 채택하였고 변이원물질과 검체의 투여는 동시투여가 가장 효과가 좋았으며, 투여기간은 24시간이 적

절하였다. 시험대상은 CHL세포(Chinese hamster lung fibroblast cells)를 조직배양하여 사용하였다. 이 시스템을 사용하여 결명자로 부터 추출된 rubrofusarin의 항돌연변이 효과를 기존의 알려진 항돌연변이 물질인  $\beta$ -carotene과 비교 연구하였다. 변이유발물질로는 clastogen으로 많이 이용되고 있는 mitomycin C(0.2mg/ml)와 방사선에 의한 유전자 손상효과를 나타내는 bleomycin( $4\mu\text{g/ml}$ )을 사용하였다. Bleomycin을 변이유발물질로 사용하여 rubrofusarin 250,  $125\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 병용처리시 bleomycin의 염색체이상 유발율인 41%을 50% 정도 억제한 22%의 염색체이상을 나타내었다. 그 이하의 농도인 62.5, 31.25,  $15.6\mu\text{g/ml}$ 을 bleomycin과 병용투여했을때는 31-38%의 염색체이상을 보여 저해효과는 확인되었으나 농도의존성은 없었다. Mitomycin C를 변이유발물질로 처리하고, rubrofusarin  $250\mu\text{g/ml}$ 을 최고농도로, 공비 2의 5 농도로 처리하였을때, MMC에 의한 돌연변이 유발을 억제하지 않는 것으로 나타났다. *In vivo* 시험에서 항돌연변이 효과를 나타내는 것으로 알려진  $\beta$ -carotene은 bleomycin을 변이유발물질로 투여가능 최고농도인  $1\text{mg/ml}$ 로부터 공비 2의 5농도로 실험한 결과, 전농도에서 변이유발 저해효과를 볼 수 없었다.  $\beta$ -Carotene은 최고처리농도인  $1\text{mg/ml}$ 에서는 mitomycin C와 병용투여시 mitomycin C의 변이유발율인 35%를 50% 정도 억제하였으나, 그 이하의 농도에서는 농도 의존적으로 22-29%의 유발율을 나타내어 평균 25%의 억제효과를 나타내었다.

ddY 마우스를 이용한 *in vivo* 염색체이상시험 결과,  $\beta$ -carotene, rubrofusarin, corn oil 투여군에서는 2%이하의 염색체이상을, MMC투여군은 23%, bleomycin 투여군 11%의 염색체이상을 나타내었다. MMC와

$\beta$ -carotene 200, 100, 50mg/kg 병용투여군에서는 13%이하, rubrofusarin 10, 1, 0.1mg/kg 병용투여군에서는 19%이하의 염색체이상을 유발하여 MMC 단독투여군보다 염색체이상이 억제됨을 나타내었다. Bleomycin과  $\beta$ -carotene 200, 100, 50mg/kg 병용투여군에서는 5%이하, rubrofusarin 10, 1, 0.1mg/kg 병용투여군에서 8%이하의 염색체이상을 유발하여 bleomycin 단독투여군보다 억제되었음을 나타내었다.

따라서 본 시험의 조건에서  $\beta$ -carotene, rubrofusarin은 mitomycin C와 bleomycin에 대해 염색체이상 억제효과를 나타내어, 항돌연변이물질의 작용기전에 대한 연구와 광범위한 항돌연변이물질 검색법등을 통한 항돌연변이효과 검증으로 화학예방요법제로의 개발 및 항돌연변이물질검색법으로 확립하는데 이바지하고자한다.

## 5. *In vitro* 광독성 시험법의 개발

시험물질에 대해서 MTT 및 neutral red uptake assay를 실시하여 광독성여부를 알아본 바 대부분의 시험물질에서 광독성이 나타난 결과를 보여주었다. 그러나 piroxicam의 경우 neutral red uptake assay에서는 광독성이 나타나지 않았고 MTT assay에서 약한 phototoxicity를 보여주었다. 이러한 결과는 piroxicam이 photoallergen이며 약한 광독성을 일으킨다는 기존의 보고결과와 일치하였다. 이러한 실험결과에 따라 MTT assay가 neutral red uptake assay와 비교하여 대체적으로 보다 민감한 시험방법으로 사료된다. 부작용으로서 화학물질의 광독성가능성의 유무의 평가는 신물질 개발단계의 초기에 평가되어야하고 동물 및 임상시험이 요구되지 않는 경제적인 방법으로 진행되어야 한다. 현재의 연구는 광독성물질의 검색을 위한 *in vitro* 시험법을 디자인하



기 위해 고려해야 하는 parameter를 조사하기 위한 시험이었다. 이러한 광독성물질의 검색을 위한 중요한 변수들을 더 정확하게 파악된 광독성시험법을 확립하기 위하여 더 많은 연구가 진행되어야 한다고 생각된다. 그러나, 여기에서의 시험법은 빠르고 간편하며 생산적이며 경제적인 시험법으로서 신약 및 화장품의 신원료에 대한 스크리닝을 위한 *in vitro* 광독성시험법으로의 활용가능성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

# SUMMARY

## I . Subject

Studies on the development of *in vitro* toxicity test

## II . Objectives and Justification of the Project.

In recent years, due to the rapid development of scientific technology and industrialization of economy, numerous chemicals including environmental pollutants, medicinal drugs, food additives, pesticides and cosmetics have been produced and shown to cause serious hazards to the human. Therefore, it is essential to develop the toxicity testing systems which can quantitatively determine toxicity and elucidate the action mechanism of toxicity of chemicals.

Up to now, most of toxicity tests have been performed *in vivo* using whole animals. However, the *in vivo* toxicity tests have several shortcomings such as consumption of large number of animals and cost, spending of time, difficulty of quantitation of toxicity. These weak points in the conventional tests using animals have caused *in vivo* study to come under question on both ethical and scientific grounds, and have provided a great stimulus for development of alternatives. Recently, a multitude of *in vitro* toxicity test systems have been proposed and developed as alternatives to *in vivo* tests.

The purpose of this study is to develop and establish *in vitro* toxicity test systems which can be alternative to *in vivo* test systems. Successful accomplishment of our study contribute to promotion of public health through evaluation of toxicity, risk assessment and elucidation of toxic mechanism of chemicals.

Liver, kidney and nervous systems are major target organs which are frequently affected by exposure to chemicals. The present study was designed to establish *in vitro* toxicity test systems using primary cultures of these organs, and investigate the specific markers for the screening of the nephrotoxic, neurotoxic and hepatotoxic chemicals.

We developed the *in vitro* local toxicity test method for the chemicals which can be easily exposed to the skin, as an alternative to the *in vivo* test which uses the whole animals such as rabbits, guinea pigs and rats.

The teratological testing has been limited to the outcome of *in vivo* assay which needs a lot of animals, time and cost with our remarkable industrial development, the task load to screen environmental teratogens are overwhelmingly increasing year by year. The main reasons for which *in vivo* teratogenecity test is preferred by national agencies may be little accomplishment of alternative method and the recognition of its limitation that the *in vitro* assay for teratogens has no mediating effect of maternal pharmacokinetics. Fortunately, many informations compiled from

the continuous *in vitro* studies strongly suggested that the advent of *in vitro* screening come true as an alternative to *in vivo* assay. At present, much effort is being made in prenatal toxicology studies to identify a chemical compound's teratogenic potential more quickly than in conventional teratology studies. Many methods are already available; for example, techniques using viruses, planaria, hydra, *Drosophila*, frogs (*Xenopus*), chick embryos, cultured cells, rodent and mammalian embryos, and explanted organ as indicator organisms have been developed and applied to prenatal toxicology. The objectives of this study are developing short-term tests using *in vitro* methods as a teratogenicity screening assay to serve the priorities for the selection of chemicals that should be tested *in vivo*, to decrease the need for whole animal tests, and to accelerate the time in which potential teratogens can be evaluated, and examining the potential for using these methods to extend the applicability to evaluation and research.

Compared to other fields of toxicology, in the field of genotoxicology, *in vitro* toxicity test have been frequently used. To establish screening method of antimutagenic agents by using *in vitro* and *in vivo* chromosome aberration test, examine the mechanism and provide basic data, this genotoxicity study was performed.

Phototoxicity is an abnormal cutaneous response (erythema, edema) to ultraviolet or visible radiation associated with the presence of a

chemical, applied either locally or systemically. The ideal test system for evaluating chemicals as photosensitizers should be simple, involve readily-available methodology and equipment, be inexpensive and sensitive. To meet these requirements, *in vitro* assays are required. The establishment of *in vitro* phototoxicity test will help screening of drugs that cause phototoxicity in development phase of a new drug.

### **III. Scope and Contents of the Project.**

#### **1. Development of target organ toxicity test *in vitro***

##### **A. Nephrotoxicity test *in vitro***

Primary culture of proximal tubular cells was conducted in kidneys of male Sprague-Dawley rats by collagenase perfusion and double screen filtration methods. We investigated whether the uptake of  $\alpha$ -methylglucose( $\alpha$ -MG) could serve as a parameter to assess nephrotoxicity of cisplatin in the LLC-PK<sub>1</sub>, pig kidney epithelial cell line. The lactate dehydrogenase(LDH) leakage test which has been used to be as a conventional cytotoxic parameter *in vitro* was conducted to compare with  $\alpha$ -MG uptake. Activity of  $\gamma$ -glutamyltransferase( $\gamma$ -GT) was measured in culture media, because  $\gamma$ -GT is one of the marker enzyme in proximal tubular cell. To obtain mechanistic information, indicating the intracellular site of nephrotoxic action, activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase and alkaline

phosphatase which is marker enzyme in apical membrane and intracellular ATP contents were measured.

#### B. Neurotoxicity test *in vitro*

Fibroblasts were isolated from 13.5-day Long Evans rat embryo, and cerebellar granule cells were cultured on poly-L-lysine precoated petridish from 8-day postnatal Long Evans rats. Astrocyte were cultured by Nitex bag (200  $\mu$ m, 300  $\mu$ m) method, briefly say the initial cerebral neural cell mixture were cultured for 7-9 day, and then shaken at 200 rpm to isolate astrocyte. Test substances were MAP, TMT, Cd and Al. In our study, MTT assay and SRB assay were used to estimate of neurotoxicity of test substances.

#### C. Hepatotoxicity test *in vitro*

Hepatocyte were isolated from male Sprague-Dawley rats using two-step perfusion methods. Hepatocytes were incubated with 2.5, 5, 10 and 20mM of a potent hepatotoxicant, CCl<sub>4</sub>, for 1, 2, 5, 12 and 24 h. Another hepatotoxicant, acetaminophen was added to hepatocytes at the concentration of 0.5, 1.0 and 2.0mM for 24, 48 and 72 h. After treatments of chemicals, activity of LDH in the medium and intracellular glutathion content were determined.

## **2. *In vitro* alternatives to skin irritation**

*In vitro* alternatives are required as screening procedures to estimate the skin irritancy of a large number of compounds. We

investigated whether LDH leakage assay and MTT reduction test are sensitive methods of cytotoxicity test in cultured human skin fibroblast, and may be useful alternative model to human patch test, and rabbit intradermal safety test. Our studies were also performed to correlate *in vitro* with *in vivo* toxicity tests. This paper reports studies on surfactants selected as representative of known skin irritants.

### **3. Studies on the development of *in vitro* methods of reproductive toxicology**

The embryonic development of the nervous system is a very complex set of events. Most of the human brain neurons are produced in the antenatal period. Throughout the entire developmental period the central nervous system is sensitive to toxic insults, resulting in many disturbances including gross structural defects and brain dysfunction. In the first year of the study, we performed the primary midbrain culture using rat embryos to set up a model system for screening toxic chemicals and studying cellular effects of teratogens, because the sequence of early development of rodent CNS and that of the human are comparable. Midbrains were removed from the rat embryos and then trypsinized to prepare single cell suspensions in culture media. For the assessment of the teratogenicity of chemicals, we plated adequate cell suspensions on culture plates, and examined inhibition

of foci formation and reduction in cell number as endpoints for differentiation and cytotoxicity.

#### **4. Development of antimutagenicity test using mamalian cells**

We performed and compared the current *in vitro* and *in vivo* chromosome aberration tests and analyzed the effectivenesses and reproducibilites of them in detecting antimutagenic agents. And using mitomycin C and bleomycin because their action mechanisms are well known as mutagens, we identified the antimutagenic characteristics and studied the action characteristics of the antimutagenic agents according to different test materials. As a candidate of antimutagenic agent we used rubrofusarin, which was extracted from *Cassiae semen* and known to have an antioxidant effect, and after combining with mitomycin C and bleomycin we observed the antimutagenic effect of rubrofusarin and using beta-carotene, a substance which is now being examined by FDA at the 3rd phase clinical test, as an antimutagenic index substance, we intended to confirm the antimutagenic effect and its mechanism.

#### **5. Studies on the development of *in vitro* phototoxicity test**

Normal human skin fibroblast cultures were established from explants of freshly excised neonatal foreskin. The culture medium for fibroblasts consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1%



L-glutamine, and 10% fetal bovine serum.  $2 \times 10^4$  cells/well were seeded on 96-well tissue culture plates and allowed to incubate at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. Test compounds were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) at concentrations ranging from 200 µg to 0.1 µg/ml. The target cells were incubated with the test compounds for 1 hour at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The buffer containing test compounds was aspirated from the target cell cultures and 200 µl of PBS was added to each well. The target cells were irradiated for 40 minutes at a flux of 3 mW/cm<sup>2</sup> of UVA and exposure of 7.2 J/cm<sup>2</sup>. After irradiation, MTT and neutral red assays were performed.

#### **IV. Results and Proposals for Application**

##### **1. Development of target organ toxicity test *in vitro***

###### **A. Nephrotoxicity test *in vitro***

A preparation of isolated proximal tubular cells from rat kidneys was brought into primary culture. This primary culture system can be set up as *in vitro* system to study the nephrotoxicity of xenobiotics which allow exposure at low concentrations for long periods. Treatment with 50 µM of cisplatin for 24 hrs caused LDH and γ-GT leakage in LLC-PK<sub>1</sub>. However, above of 100 µM of cisplatin, activities of these enzymes in media were dramatically decreased to control level. These findings indicate that cisplatin

has direct inhibitory effect on the activities of these enzymes and make it doubtful to use enzyme leakage test to determine the cytotoxicity of chemicals such as cisplatin. Cisplatin inhibited  $\alpha$ -MG uptake in a dose-dependent manner at a low concentration which enzyme leakage was not observed. Therefore, compared to the enzyme leakage test,  $\alpha$ -MG uptake is a sensitive parameter which assess damage to the cell function at an early time point *in vitro* system. The ATP content of the cells was hardly affected by the treatment of cisplatin. These findings indicate that the inhibition of  $\alpha$ -MG uptake was not attributed to decrease of intracellular ATP content caused by disturbance of mitochondrial function. Cisplatin significantly inhibited the activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase which is a marker enzyme of basolateral membrane. However, inhibition of  $\alpha$ -MG uptake by cisplatin was not directly related to decrease of the activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase, because the decline in  $\alpha$ -MG uptake precedes the fall in the activity of this enzyme. The activity of ALP, a marker enzyme of brush border membrane which contains  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter, was significantly decreased by the treatment of low concentration of cisplatin for 24 hrs. Therefore, it can be thought that inhibition of  $\alpha$ -MG uptake with cisplatin is a possible cause of the direct inhibition of  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter in part.

This study shows that primary culture system of proximal tubular cell from rat kidney can be set up as an *in vitro* system to

study nephrotoxicity of xenobiotics which allow exposure at low concentrations for long periods. Determination of  $\alpha$ -MG uptake is very sensitive and rapid for the assessment of loss of cellular function, compared with enzyme leakage test. Additional mechanistic information, indicating the intracellular site of nephrotoxic action, can be gained by coupling the  $\alpha$ -MG uptake and ATP content or the activity of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase. *In vitro* nephrotoxicity test system in this study can be applied to evaluation of the toxicity of new medicinal drugs such as antibiotics and antitumor agents with the major toxic concern being kidney.

#### B. Neurotoxicity test *in vitro*

Neuronal cells from 8-day postnatal rat cerebrum were cultured. 98% of neuronal culture was prepared, and granule cells underwent morphological and biochemical differentiation to 10 day after and were survived for 6 weeks. Astrocyte cultures consist almost exclusively astrocyte cell(95% of all cell), they were survived for 6 weeks. To rule out the cytotoxic effects, concomittant fibroblast culture was also performed. In SRB assay of fibroblast for cytotoxicity of chemicals,  $\text{LC}_{50}$  of MAP, Al, and TMT were  $3200 \mu\text{M}$ ,  $2000 \mu\text{M}$  and  $3.8 \mu\text{M}$ , respectively. In MTT assay of granule cell for neurotoxicity of chemicals,  $\text{LC}_{50}$  of MAP, Al, and TMT were  $3000 \mu\text{M}$ ,  $2000 \mu\text{M}$  and  $2 \mu\text{M}$ , respectively. These results suggest that toxicity of each chemical was variable and *in vitro* model can be used in screening of potential neurotoxic chemicals.

### C. Hepatotoxicity test *in vitro*

Hepatocytes were isolated from rat using two-step method with collagenase. In control group LDH levels remained low after exposure to medium for 1, 2, 5, 12 and 24 hours. In group exposed to 2.5mM CCl<sub>4</sub>, LDH level was increased significantly on 1 hour, and was saturated in 5 hour. Groups exposed to 5mM and 10mM also showed increased LDH level with time and saturated on 5 and 12 hours, respectively. Thus, CCl<sub>4</sub> could induce hepatotoxicity with low concentration such as 2.5mM and increase LDH level in dose dependent manner. Also its effects seem to come out in early stage. However, in any group on any time GSH levels were not affected. Acetaminophen showed no significant effects on LDH level except in 2mM group on 48 hour. GSH level was decreased with inverse proportion to LDH level.

*In vitro* system using isolated hepatocyte culture, instead of difficulty in decision of concentration and exposure time, can be partially represent the *in vivo* system so used as a fast screening method of hepatotoxicity. LDH seems to be more reliable than GSH, and GSH level would be useful in evaluation of drugs with similar metabolic pathway to acetaminophen.

## **2. *In vitro* alternatives to skin irritation**

### A. Cytotoxicity of surfactants *in vitro*

The effects of 10 selected surfactants on the cell membrane integrity and mitochondrial integrity were assessed using the LDH and MTT assay. The cells were exposed to a broad concentration range of each particular surfactant for 3hrs and then LDH and MTT assay were performed. The clear dose-response relationship was established for all test substances and the EC<sub>50</sub> value of each surfactant was calculated from these dose-response plot. There was the increase in LDH leakage and decrease in MTT reduction which were concentration dependent for all tested surfactants. The results show that LDH assay is more sensitive than MTT test.

#### B. Correlation between surfactants toxicity *in vitro* and *in vivo*

The Cytotoxicity of surfactants *in vitro* systems were compared with their skin irritation potential in the Haye's chamber assay and rabbit intradermal safety test. Spearman's rank correlation coefficients are given. The closest relationship was found between LDH and human patch test ( $r=0.886$ ). Apparently, correlation coefficient between MTT and *in vivo* patch test ( $r=0.753$ ) was less than LDH assay. These results suggest that LDH assay is more pronounced method for these surfactants than MTT test.

These results show that LDH leakage and MTT reduction assay give valuable informations about the relative potency of the compounds tested, and these variables could be used in the early stages of surfactant screening. The evaluation of LDH leakage assay allows the detection of toxic effects by surfactants that are

ineffective on MTT reduction test.

### **3. Studies on the development of *in vitro* methods of reproductive toxicology**

When the mid-brain cells from pregnant rat embryo were grown in micromass culture, undifferentiated neural cells underwent differentiation processes closely resembling those taking place *in vivo*, and formed small aggregates interconnected by extensive network of neurites during 5 day culture. We tested 2 chemicals, retinoic acid(RA) and hydroxyurea(HU), using the micromass culture. Both chemicals showed dose-dependent decreases of viability assessed by neutral red uptake, and showed decreases in differentiation observed by hematoxylin staining and immunocytochemistry. From the results of this experiment, we think that *in vitro* primary mid-brain micromass culture method can be used for screening teratogens.

### **4. Development of antimutagenicity test using mamalian cells**

A. In order to develop new *in vitro* method for screening of antimutagenic effect, we modified *in vitro* chromosome aberration test using CHL(chinese hamster lung fibroblast) cells in culture. According to the results of preliminary tests, the direct method was adopted and the antimutagen candidate was treated together with known mutagen for 24 hours.

B. The system (described above) was used for evaluating newly purified natural compound rubrofusarin (methanolic extract from the seeds of *Cassia tora*) comparing to  $\beta$ -carotene which was known to have an antimutagenic effects in mouse micronucleus test *in vivo*. Two kinds of positive mutagen were used in this system. One is well known clastogen mitomycin C (MMC ;  $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) and the other is radiomimetic DNA damaging agent bleomycin ( $4.0 \mu\text{g/ml}$ ).

1) The antimutagenic effect of rubrofusarin on the mutagenicity induced by bleomycin was confirmed at the dose of  $250 \mu\text{g/ml}$  and  $125 \mu\text{g/ml}$ , the inhibition rate was about 50%, respectively. At the doses from below  $125 \mu\text{g/ml}$  to  $15.6 \mu\text{g/ml}$  showed effective action around 31-38% of inhibition rate but dose dependency was not detected.

2) The antimutagenic effect of rubrofusarin on the mutagenicity induced by MMC was not detected at the five doses (2-fold dilution) from 250 to  $15.6 \mu\text{g/ml}$ . Rubrofusarin had no inhibition effect against MMC induced chromosome aberrations.

3) The antimutagenic effect of  $\beta$ -carotene on the mutagenicity induced by bleomycin was not detected at the five doses (2-fold dilution) from 1mg to  $62.5 \mu\text{g/ml}$ . In spite of the good inhibition effect of  $\beta$ -carotene in mouse bone marrow micronucleus formation, it was not detected in this system.

4) The antimutagenic effect of  $\beta$ -carotene on the mutagenicity

induced by MMC was detected at the dose of 1mg/ml, the inhibition rate was about 50%. At the other five doses (2fold dilution) from 500–62.5  $\mu$ g/ml also showed inhibition effect around 22–29%.

C. To determine the antimutagenic effect of rubrofusarin, *in vivo* chromosome aberration test was done using ddY mice. We found that chromosome aberration was observed in less than 2% in groups treated with rubrofusarin,  $\beta$ -carotene, or corn oil, but that chromosome aberration was observed in 23% and 11% in group treated with MMC and bleomycin, respectively.

1) We found that chromosome aberration was observed in less than 13% in group treated with  $\beta$ -carotene (200, 100, or 50mg/kg) and MMC, and that chromosome aberration was observed in less than 19% in group treated with rubrofusarin (10, 1, or 0.1mg/kg) and MMC. This result indicates that rubrofusarin and  $\beta$ -carotene have antimutagenic effect against MMC.

2) We also found that chromosome aberration was observed in less than 5% in group simultaneously treated with  $\beta$ -carotene (200, 100, or 50mg/kg) and bleomycin, and that chromosome aberration was observed in less than 8% in group simultaneously treated with rubrofusarin (10, 1, or 0.1mg/kg) and bleomycin. This result indicates that rubrofusarin and  $\beta$ -carotene have antimutagenic effect against bleomycin.

Therefore, we conclude that these systems is a useful tool in screening antimutagenic agents and we suggest that rubrofusarin as



well as  $\beta$ -carotene may be a candidate of antimutagenic agents.

## **5. Studies on the development of *in vitro* phototoxicity test**

The results indicate that phototoxicity of test chemicals could be identified using MTT and neutral red assays. However, negative results were seen with piroxicam in neutral red assays and weak phototoxicity was seen with piroxicam in MTT assays. As reported, piroxicam is an photoallergen and exhibits weak phototoxicity. From the results of this experiment, MTT assay appeared to be more sensitive than neutral red uptake assay. Identifying the potential for phototoxicity as a side effect should be done early in the evaluation of new compounds and could be facilitated by an inexpensive method not requiring animals or humans. The present study is just the beginning of setting up the proper *in vitro* test for photosensitizing chemicals. Much more work is required to fully define all the important variables in such a test. However, the assays described here is rapid, simple, reproducible and inexpensive and have possibility of use *in vitro* screening the phototoxicity of new compounds in the product-development cycle for drugs and cosmetic ingredients.

*In Vitro* 독성시험법 개발 연구 (I)  
Studies on the Development of  
*In Vitro* Toxicity Tests (I)

*In Vitro* 표적장기 독성시험법 개발에 관한 연구 (I)  
Development of *In Vitro* Target Organ Toxicity Tests (I)

주관연구기관 : 국립보건안전연구원 독성부 일반독성과

과 학 기 술 처

# 제 출 문

## 과 학 기 술 처 장 관 귀 하

본 보고서를 “*In vitro* 독성시험법 개발 연구 - *In vitro* 표적 장기 독성시험법 개발”의 연차보고서로 제출합니다.

1995. 7.

주관연구기관명 : 국립보건안전연구원

연구책임자 : 김정구

보건연구관 : 김재현, 조대현

김효정

보건연구사 : 서경원, 박창원

김준규, 이윤숙

연구원 : 오미현, 이경민

이봉훈, 신수경

김은엽, 김연정

# 요 약 문

## I. 제 목

세부과제명 : *In vitro* 독성시험법 개발 연구

세세부과제명 : *In vitro* 표적장기독성시험법 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 자연과학분야의 괄목할만한 발달로 환경오염물질, 의약품, 식품첨가물, 농약 및 화장품 등 새로운 화학물질이 쏟아져 나오고 있으며, 이러한 화합물들이 인체에 미치는 독성을 정확히 평가하는 것이 사회적으로 중요한 과제가 되고 있다. 따라서 독성을 초기에 정량적으로 검색할 수 있으며 독성 유발기전을 규명하여 독성감소 가능성도 제시할 수 있는 시험법의 개발은 필수적이다.

현재까지는 이러한 독성시험의 대부분이 *in vivo*로 행해지고 있으나 *in vivo* 독성시험법은 대량의 실험동물 사용, 과도한 인력자원과 경비 및 장기간의 시간이 소요될 뿐만 아니라 독성의 정량화가 어렵고 실험자의 주관에 따라 결과가 판정될 수도 있으며, 항상 일정 조건으로 시험계를 확립하기 어렵다는 단점을 갖고 있다. 이에 비하여 배양세포등을 이용한 *in vitro* 독성평가는 상기 단점을 보완할 수 있을 뿐만 아니라 일정조건에서 정확한 시험계를 확립시키는 것이 가능하고 독성을 정량적으로 평가할 수 있으므로 최근 여러나라에서는 독성시험법으로 많이 사용되고 있으나 우리나라에서는 아직 확립되어 있지 않은 실정이다.

화학물질의 노출에 의하여 가장 빈번하고 크게 독성을 받는 장기는 간장, 신장, 신경계 등이며 독성증상은 여러 형태로 나타나게 된다.

따라서 본 연구에서는 독성물질의 주 표적장기인 간장, 신장, 신경에 대하여 이들의 1차 배양법을 확립하고 *in vitro*에서 독성을 검색할 수 있는 특이지표를 개발·확립함으로써 실험동물의 복리, 실험 경비와 소요시간의 단축을 도모하며 의약품등 화학물질의 독성평가를 신속·정확하고 정량적으로 수행하고 독성발현 기전을 규명하여 안전성을 확보하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. *In vitro* 신장독성 시험법 개발

1차 세포배양을 이용한 *in vitro* 신장독성검색법으로 웅성 Sprague-Dawley계 랫드의 신장으로부터 collagenase, iron oxide와 이중 mesh를 이용하여 근위세뇨관 세포를 분리하여 1차 배양하였다. 근위세뇨관 신장세포주인 LLC-PK<sub>1</sub> 배양 시스템에서 대표적인 신장독성물질인 시스플라틴을 처리하여 *in vitro* 독성평가의 가장 일반적인 방법인 배지내 LDH의 활성을 측정하였으며, 근위세뇨관에 많이 함유되어 있으며 지표효소로 알려진  $\gamma$ -GT의 활성도 측정하였다. 또한  $\alpha$ -methyl glucose( $\alpha$ -MG)를 이용하여 신장의 고유기능인 glucose uptake를 측정하여 효소유리 측정법과 비교하였다. 이와 함께 glucose uptake에 관여하는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase와 Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter가 존재하는 apical membrane의 지표효소인 alkaline phosphatase의 활성을 측정하였으며, 미토콘드리아의 기능을 측정하여 신장독성물질의 독성유발기전을 규명하고자 하였다.

#### 2. *In vitro* 신경독성 시험법 개발

임신 13.5일된 Long-Evans 랫드 태자로 부터 섬유아세포를 배양

하였다. 소뇌과립세포의 배양은 생후 8일령된 Long-Evans 랫드의 brain으로 부터 순수하게 소뇌를 분리한 후 poly-L-lysine이 처리된 배양접시에서 배양하였다. Astrocyte 배양은 cerebrum을 200 $\mu$ m Nitex mesh와 100 $\mu$ m Nitex mesh로 filter한 후 7-9일간 배양한 다음 6시간 shaking, trypsin-EDTA로 처리등의 조작을 거쳐 배양하였다. 시험물질로는 methamphetamine(MAP), trimethyltin chloride (TMT), cadmium chloride(Cd), aluminum chloride(Al)를 사용하였으며, 독성 평가 지표로는 MTT assay와 SRB assay를 실시하였다.

### 3. *In vitro* 간장독성 시험법 개발

용성 SD계 랫드로 부터 two-step perfusion method를 이용하여 간세포를 분리하였다. 시험물질로는 CCl<sub>4</sub>를 2.5, 5, 10 및 20mM의 농도로 1, 2, 5, 12, 및 24시간동안 처리하였고, 아세트아미노펜은 0.5, 1.0 및 2.0mM의 농도로 24, 48 및 72시간 동안 처리하였다. 간세포에 시험물질을 처리한 후, 시험물질에 의해 유도된 세포막 파괴에 의해 세포내에서 배양액으로 유출되어 나오는 LDH의 양을 측정하였으며, trypsin-EDTA 액을 처리하여 배양접시에 부착된 세포를 떼어낸 뒤 세포 현탁액에서 GSH의 양을 분석하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. *In vitro* 신장독성 시험법 개발

용성 SD계 랫드의 신장으로부터 근위세뇨관 세포를 효과적으로 분리·배양하였으며, 랫드 신장의 근위세뇨관 1차 배양 시스템을 이용한 *in vitro* 검색법으로 활용할 수 있는 기초를 마련하였다고 볼 수 있다.

근위세뇨관 신장세포주인 LLC-PK<sub>1</sub> 배양 시스템에서 시스플라틴 처

리에 의하여 배지내로 유리되는 LDH와  $\gamma$ -GT의 활성을 측정한 결과, LDH와  $\gamma$ -GT의 활성은 시스플라틴을 6시간 처리한 경우 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 시스플라틴을 24시간 처리한 경우에는 50 $\mu$ M 농도이상에서 배지내로 유리되는 LDH와  $\gamma$ -GT의 활성이 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였으며, 100 $\mu$ M 농도이상에서는 배지내로 유리되는 효소활성이 오히려 대조군 수준으로 감소하였다. 시스플라틴의 처리에 의하여 배지내 유리효소의 활성이 증가하다가 100 $\mu$ M이상 농도에서는 오히려 감소한 것은 시스플라틴이 LDH나  $\gamma$ -GT의 활성을 직접 억제하기 때문인 것으로 생각되며, 따라서 시스플라틴의 독성평가에는 적절한 방법이 아닌 것으로 판단되었다.  $\alpha$ -Methylglucose uptake를 측정한 결과 시스플라틴 25 $\mu$ M과 50 $\mu$ M 농도의 6시간 처리에 의해  $\alpha$ -MG uptake가 각각 대조군의 68% 와 53%로 유의성있게 감소하였으며 시스플라틴 24시간 처리에 의하여는 5 $\mu$ M 농도부터 감소하였다. 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake의 감소현상은 효소 유리가 관찰되지 않는 농도에서 나타났으며, 따라서  $\alpha$ -MG uptake 측정 은 cell death 전에 나타나는 신장의 특이적인 기능 이상을 평가할 수 있는 지표로서 *in vitro* 시스템에서 독성의 초기에 검색가능한 예민한 parameter로 활용할 수 있으리라 생각되었다. 세포내 ATP 양을 측정한 결과 시스플라틴을 6시간과 24시간 처리한 경우 모두에서 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으며 50 $\mu$ M을 24시간 처리한 경우에는 오히려 대조군의 150%로 증가하였다. Basolateral membrane의 지표효소인  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성을 측정한 결과 시스플라틴을 6시간 처리한 경우에는 100 $\mu$ M의 농도까지 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으며 24시간 처리한 경우에는 10 $\mu$ M 농도부터 유의성 있는 활성감

소가 나타났다.  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter가 존재하는 brush border membrane의 지표효소인 alkaline phosphatase(ALP)의 활성을 측정한 결과 6시간 처리에 의해서는 유의성 있는 변화가 없었으며 24시간 처리시에는  $5\mu\text{M}$  부터 활성감소가 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake 감소현상은 시스플라틴이 미토콘드리아의 기능을 저하시킴으로써 ATP 생성량이 감소하여 유발된 것은 아닌 것으로 판단되었으며,  $\alpha$ -MG uptake 감소현상이  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성저하보다 선행하므로  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성저하가  $\alpha$ -MG uptake 감소에 부분적으로 관련이 있으나 직접적인 원인은 아닌 것으로 생각되었다. 따라서 시스플라틴은 basolateral membrane과 미토콘드리아에 대한 영향보다는 brush border membrane에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각되며, 따라서 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake의 저하는 brush border membrane에 존재하는  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter에 대한 직접 억제작용이 더 크게 기여한 것으로 추측된다.

본 실험 결과 랫드 신장의 근위세뇨관 세포의 1차 배양 시스템은 *in vitro* 신장독성 검색법으로 유용하게 활용되리라 생각되며, glucose uptake 기능 측정법은 *in vitro*에서 신장독성 초기에 검색가능한 예민한 지표로 활용가능하고 이와 함께 glucose uptake 기능에 관여하는 효소와 미토콘드리아의 기능을 측정함으로써 독성물질의 독성유발기전도 규명할 수 있으리라 판단된다. 또한 본 시험에서 사용한 대표적인 신장독성물질인 시스플라틴에 대한 실험결과를 토대로 신약으로 개발중인 항생제와 항암제등의 독성평가에도 이 시스템을 응용하여 신장독성이 주 부작용인 이들의 독성평가를 신속하게 수행함으로써



신약개발에 기여 할 수 있으리라 생각된다.

## 2. *In vitro* 신경독성 시험법 개발

소뇌과립세포(cerebellar granule cell) 배양결과 98% 이상 순수한 신경세포를 배양하였으며 10일후 배양중 신경세포의 system이 완성되었고 6주 이상 생존가능하였다. 신경교세포(astrocyte)를 배양한 결과 95% 이상 순수한 astrocyte를 배양하였으며 6주 이상 생존가능하였다. SRB assay에 의한 섬유아세포의 생존율과 형태적 변화를 관찰한 결과 MAP의 경우 LC<sub>50</sub>은 3200 $\mu$ M이며, 형태학적 변화양상은 세포 내에 과도한 공포를 형성하고, AlCl<sub>3</sub>의 LC<sub>50</sub>은 2000 $\mu$ M이었다. TMT는 LC<sub>50</sub>이 3.8 $\mu$ M이며, processing의 억제로 인한 세포표면의 매끄러움과 외관상 삼각형의 모습을 나타내었고, CdCl<sub>2</sub>는 세포골격 단백질의 파괴를 나타내었다. MTT assay에 의한 소뇌과립세포의 생존율을 측정한 결과 MAP의 경우 250 $\mu$ M에서는 95.2%, 500 $\mu$ M에서는 75.6%, 1000 $\mu$ M에서는 64.4%, 2000 $\mu$ M에서는 56.0%, 4000 $\mu$ M에서는 48.9%가 생존했고, Al은 125 $\mu$ M에서는 99.1%, 250 $\mu$ M에서는 91.9%, 500 $\mu$ M에서는 75.8%, 1000 $\mu$ M에서는 71.6%, 2000 $\mu$ M에서는 56.8%가 생존했다. Cd는 0.125 $\mu$ M에서는 93.7%, 0.25 $\mu$ M에서는 88.3%, 0.5 $\mu$ M에서는 75.2%, 1 $\mu$ M에서는 65.1%, 2 $\mu$ M에서는 52.1%가 생존했고, TMT는 0.25 $\mu$ M에서는 94.8%, 0.5 $\mu$ M에서는 94.7%, 1 $\mu$ M에서는 76.9%, 2 $\mu$ M에서는 63.2%, 4 $\mu$ M에서는 60.7%가 생존하였다.

이상의 결과들을 종합해 볼때 각각의 시험물질들의 독성발현 기전이 상이함을 관찰할 수 있었고, *in vitro* 모델이 신경독성이 의심되는 물질을 단기간의 검색하는데 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.

## 3. *In vitro* 간장독성 시험법 개발

Collagenase를 이용한 two-step perfusion 법으로 랫드 간세포를 분리하였다. CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 대조군의 경우 1, 2, 5, 12 및 24 시간 배양 후, 배양액으로 누출된 LDH는 낮은 농도로 유지되는데 비하여, 2.5mM CCl<sub>4</sub> 처리군의 경우 1시간 배양했을 때 이미 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보이고, 배양시간의 증가에 따라 더욱 증가하여 5시간 배양시 포화상태에 도달했다. 5mM 및 10mM을 처리하였을 때의 1, 2, 5 및 12시간에서의 LDH의 누출량은 배양시간에 따라 증가하여 5~12 시간에서 포화상태를 보이는 매우 비슷한 양상을 보였다. 즉 CCl<sub>4</sub>는 2.5mM 정도의 낮은 농도로도 충분히 간독성을 유발하였고, 농도 의존적인 LDH 유리를 보이며, 노출 초기에 급격한 독성을 발현하는 양상을 보였다. 2.5, 5, 10 및 20mM의 CCl<sub>4</sub>를 처리하였을 때, 어떤 배양시간에서도 GSH양은 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 아세트아미노펜을 0.5, 1 및 2 mM 농도로 24, 48 및 72 시간동안 배양한 후의 LDH leakage는 0.5 및 1mM 농도에서 별다른 변화를 보이지 않았으며, 2mM 농도에서 대조군에 비해 유의성있는 증가의 결과가 48시간 이후에 나타났다. 한편 GSH 측정결과 LDH leakage와 반비례하여 GSH 양은 감소하는 결과를 보였다.

이상의 결과로서, isolated hepatocyte culture system은 다양한 xenobiotics의 간독성 발현기전의 상이함, 독성발현 농도및 노출기간등의 검색등 몇가지 제한점이 있으나, *in vivo* 모델을 조심스럽게 반영할 수 있으므로, 신속한 간독성 스크리닝에는 유용할 것으로 사료되며, *in vitro* 간독성 지표로 대표적인 LDH leakage 와 GSH content를 비교할 때, LDH leakage가 보다 일반적으로 적용될 수 있는 간독성

지표로 사용될 수 있으며, GSH content는 아세트아미노펜과 유사한 대사과정을 갖는 약물의 간독성 과정을 평가하는데 유용할 것으로 사료된다

# 목 차

제 1 장 서 론 -----	14
제 1 절 <i>In vitro</i> 신장독성 시험법 개발 -----	15
제 2 절 <i>In vitro</i> 신경독성 시험법 개발 -----	17
제 3 절 <i>In vitro</i> 간장독성 시험법 개발 -----	19
제 2 장 실험 방법 -----	20
제 1 절 <i>In vitro</i> 신장독성 시험법 개발 -----	20
1. 시험물질 -----	20
2. 세포배양 및 약물처리 -----	21
3. $\alpha$ -Methylglucose uptake의 측정 -----	21
4. ATP assay -----	22
5. Enzyme assay -----	22
6. 단백질 정량 -----	22
7. 랫드 신장으로부터의 근위세뇨관 세포의 1차 배양 -----	23
제 2 절 <i>In vitro</i> 신경독성 시험법 개발 -----	24
1. 섬유아세포배양 -----	24
2. 소뇌과립세포배양 -----	24
3. Astrocyte 배양 -----	25
4. 시험물질 및 투여약물 조제 -----	26
5. Colorimetric MTT assay -----	26
6. SRB assay -----	27
제 3 절 <i>In vitro</i> 간장독성 시험법 개발 -----	27
1. 간세포 분리 및 배양 -----	27

2. 시험물질 처치 -----	28
3. LDH leakage assay -----	29
4. Glutathione 측정 -----	29
5. 통계처리 및 분석 -----	30
제 3 장 연구결과 및 고찰 -----	30
제 1 절 <i>In vitro</i> 신장독성 시험법 개발 -----	30
1. 세포형태 관찰 -----	30
2. 효소유리 측정 -----	31
3. $\alpha$ -Methylglucose uptake 측정 -----	33
4. 세포내 ATP 양 측정 -----	34
5. $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPase 활성 측정 -----	34
6. Alkaline Phosphatase의 활성 측정 -----	35
제 2 절 <i>In vitro</i> 신경독성 시험법 개발 -----	35
1. 소뇌과립세포(cerebellar granule cell) 배양 -----	35
2. 신경교세포(astrocyte) 배양 -----	36
3. SRB assay에 의한 섬유아세포의 생존율과 형태적 변화 -----	37
4. MTT assay에 의한 소뇌과립세포의 생존율 측정 -----	37
제 3 절 <i>In vitro</i> 간장독성 시험법 개발 -----	40
1. 랫드 간장으로부터 간세포의 분리 및 1차배양 -----	40
2. LDH leakage assay -----	40
3. Glutathione 측정 -----	41
제 4 장 결 론 -----	42

제 1 절 <i>In vitro</i> 신장독성 시험법 개발 -----	42
제 2 절 <i>In vitro</i> 신경독성 시험법 개발 -----	43
제 3 절 <i>In vitro</i> 간장독성 시험법 개발 -----	44
제 5 장 참 고 문 헌 -----	45

## 표 목 차

**Table 1.** The effect of cisplatin on enzyme leakage in LLC-PK<sub>1</sub>

**Table 2.** The effect of cisplatin on  $\alpha$ -MG uptake and ATP content in LLC-PK<sub>1</sub>

**Table 3.** The effect of cisplatin on activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase and ALP in LLC-PK<sub>1</sub>

**Table 4.** Effect of neurotoxicants on fibroblast estimated by SRB assay in LE

**Table 5.** Effect of neurotoxicants on cerebellar granule cells estimated by MTT assay in LE

**Table 6.** The effect of CCl<sub>4</sub> on LDH leakage in hepatocytes

**Table 7.** The effect of acetaminophen on LDH leakage and GSH content in hepatocytes

## 제 1 장 서 론

최근 자연과학분야의 괄목할만한 발달로 환경오염물질, 의약품, 식품 첨가물, 농약 및 화장품 등 새로운 화학물질이 쏟아져 나오고 있으며, 이러한 화합물이 인체에 미치는 독성을 정확히 평가하는 것이 사회적으로 중요한 과제가 되고 있다. 따라서 독성을 초기에 정량적으로 검색할 수 있으며 독성 유발기전을 규명하여 독성감소 가능성도 제시할 수 있는 시험법의 개발은 필수적이다.

현재까지는 이러한 독성시험의 대부분이 *in vivo*로 행해지고 있으나 *in vivo* 독성시험법은 대량의 실험동물 사용, 과도한 인력자원과 경비 및 장기간의 시간이 소요될 뿐 만아니라 독성의 정량화가 어렵고 실험자의 주관에 따라 결과가 판정될 수도 있으며, 항상일정 조건으로 시험계를 확립하기 어렵다는 단점을 갖고 있다. 이에 비하여 배양세포등을 이용한 *in vitro* 독성평가는 상기 단점을 보완할 수 있을 뿐만 아니라 일정조건에서 정확한 시험계를 확립시키는 것이 가능하고 독성을 정량적으로 평가할 수 있으므로 최근 여러나라에서는 독성시험법으로 많이 사용되고 있으나 우리나라에서는 아직 확립되어 있지 않은 실정이다.

화학물질의 노출에 의하여 가장 빈번하고 크게 독성을 받는 장기는 간장, 신장, 신경계 등이며 독성증상은 여러 형태로 나타나게 된다.

따라서 본 연구에서는 독성물질의 주 표적장기인 간장, 신장, 신경에 대하여 *in vitro*에서 독성을 검색할 수 있는 시험법을 개발·확립함으로써 실험동물의 복리, 실험 경비와 소요시간의 단축을 도모하며 의약품 등 화학물질의 독성평가를 신속·정확하고 정량적으로 수행하고 독성발



현 기전을 규명하여 안전성을 확보하고자 한다.

## 제 1 절 *In vitro* 신장독성 시험법 개발

신장은 기능적, 형태학적, 그리고 생화학적으로 현저하게 상이한 여러 형태의 세포들로 구성되어 있으며, 고도로 분화되어 있는 장기이다. 많은 신장독성 물질들이 주로 신장에만 특이적으로 독성을 유발하는 데, 그 이유는 신장이 독성물질에 대한 특정부위의 감수성, 독성물질의 능동 수송과 농축시키는 능력, 독성이 더 강한 물질을 대사시킬 수 있는 능력을 가지고 있기 때문이라 할 수 있다. 특히 신장의 근위세뇨관은 여러가지 유기, 무기 화합물에 대한 능동 수송능과 광범위한 약물대사능으로 인하여 많은 신장 독성물질의 1차적 표적부위라 할 수 있다.

최근 세포배양을 이용한 기법이 독성시험 전반에 적용되고 있으며, 신장독성 분야에서도 세포주와 신장 근위 세뇨관 세포의 1차 배양을 이용한 *in vitro* 독성시험법이 개발되고 있다. 신장 세포주는 여러가지가 개발되어 있는 데 특히 돼지 신장의 상피 세포주인 LLC-PK<sub>1</sub>은 각 세포가 서로 강력하게 연결되어 있으며, 염과 물을 한쪽 방향으로 이동시키는 능력을 가지고 있고 특징적인 dome을 형성한다<sup>1,2,3)</sup>. LLC-PK<sub>1</sub>은 또한 근위 세뇨관에서 보이는 Na<sup>+</sup>-dependent active sugar transport system도 보유하고 있으며<sup>4,5,6,7)</sup>, 근위 세뇨관의 지표 효소를 비교적 높은 양으로 함유하고 있다<sup>8)</sup>. 따라서 LLC-PK<sub>1</sub>은 이러한 특성 때문에 일부 신장 상피세포 기능 평가에 유용하게 사용되고 있다.

*In vitro* 독성 검색의 일반적인 방법은 트립판 블루를 이용한 세포

독성 시험과 배지중으로 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)와 같은 효소 활성을 측정하는 효소유리 시험법등인 데, 이러한 평가법들은 거의 독성 말기에 나타나는 현상을 측정하는 것이다. 신장기능중 중요한 기능이 뇨로부터 혈액으로 또는 그 반대로 수행되는 능동 수송 기능이며 따라서 이러한 기능을 독성 지표로서 이용할 수 있다. 특히 *in vivo* 에서 뇨중으로 glucose가 유리되는 즉, glucose uptake 저하 현상은 근위 세뇨관 기능 장애 초기에 나타나는 것이며, 따라서 glucose transport 기능 측정은 근위 세뇨관의 장애를 초기에 예민하게 평가할 수 있는 지표가 될 수 있다.

세포는 한쪽면에 흡수 carrier가 있고 그 반대편에 분비하는 carrier가 있으므로 intact한 신장 조직을 이용한 실험에서는 *p*-aminohippurate, tetraethylammonium과 *N*-methylnicotinamide와 같은 유기이온의 수송능력이 세포내 기능평가 지표로 사용된다. 그러나 세포배양을 이용한 *in vitro* system에서는 이러한 세포에 의한 이온의 흡수와 분비가 배지내에서 동시에 일어나기 때문에 수송기능을 평가하는 것이 적합하지 않다. Glucose 그 자체는 역시 세포의 한쪽면으로 흡수되었다가 다른 쪽면으로 다시 분비되기 때문에 수송기능 측정에 적합하지 않다. 그러나 glucose의 유사체인  $\alpha$ -methyl-glucose ( $\alpha$ -MG, 1-*o*-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)는 대사되지 않으며, apical membrane에서 active Na<sup>+</sup>/glucose cotransport carrier에 의해 기질로 사용되거나 basolateral membrane에 있는 facilitated transport carrier에는 기질이 될 수 없어, 결국 세포내에 머무르게 된다<sup>9,10</sup>).

따라서 본 연구에서는 대표적인 신장 독성 물질인 시스플라틴을

사용하여 신장 세포주인 LLC-PK<sub>1</sub> 세포 배양 시스템에서  $\alpha$ -MG를 이용한 glucose uptake 기능 측정이 기존의 효소 유리 측정법에 비하여 독성 초기에 검색할 수 있는 예민한 지표인지의 여부를 보고자 하였으며, 또한 glucose uptake 기능과 관련된 세포내 효소 활성의 측정과 미토콘드리아 기능을 측정함으로써 glucose uptake 기능 저하의 기전을 밝혀보고자 하였다.

근위 세뇨관 특성을 가지고 있는 세포주들이 *in vitro* 독성시험에서 광범위하고 유용하게 사용되고는 있으나 변형된 세포로 구성되어 있고 상피세포의 전형적인 생리적 특성이 결핍되거나, 원위 세뇨관이 혼합된 경우도 종종있다<sup>11,12,13</sup>). 이러한 세포주의 단점으로 인하여 최근 신장으로부터의 1차 배양법이 시도되고 있으며 1차 배양된 세포들은 적절한 배양조건을 유지시키면 상당기간 유지가 가능하다. 현재까지는 주로 토끼의 신장으로부터 근위 세뇨관 세포를 분리하여 1차 배양하는 방법이 가장 많이 이용되고 있으나, 독성실험에 흔히 사용되는 동물인 랫드를 이용한 신장의 1차 배양법은 거의 시도된 바가 없다.

따라서 본 연구의 두번째 목적은 가장 많이 사용되는 실험 동물인 랫드의 신장으로부터 근위 세뇨관 세포를 1차 배양하여 이를 *in vitro* 신장 독성 검색 시스템으로 확립할 수 있는 기초를 마련해 보고자 하는 것이다.

## 제 2 절 *In vitro* 신경독성 시험법 개발

중추신경계는 다른 조직에 비해 다양한 세포들로 구성되어 있으며 세포간의 net-work는 극도의 복잡한 구조로 이루어져 있어 신경독성

을 평가하는데 상당한 어려움이 따르고 있다. 신경독성학적 연구의 발달은 약물 투여에 의한 실험동물의 행동학적 연구와 고전적인 은염색법(silver stain), 닛슬 염색(Nissl stain), 카테콜아민 형광염색을 이용한 신경조직의 변화 검색방법 등을 통해 이루어 졌고, 1970년대에 들어서면서 면역학분야의 발달로 특이항체제작과 단일클론제작법이 소개되면서 면역염색법이 발달하게 되었다. 또한 이와 더불어 *in vitro* 신경세포 및 신경교세포의 배양법의 발달은 신경독성분야의 급속한 발달을 가져오게 되었다. 신경조직배양, 그리고 넓은 의미에서의 동물조직 배양은 1906년에 미국의 Harrison 교수가 개구리 임파액중에서 올챙이 척수소편을 배양하고 신경세포의 신생발육을 관찰함으로써 시작되었다. 이 간편하고 실용적인 조직배양법이 고안된지 90년이 지난 오늘날 각종 동물의 신경계 조직의 조직 배양이 광범위하게 사용되고 있다. 최근에 이르러 *in vitro* 모델이 신경독성물질의 독성을 단기간에 검색하는데 유용할 것으로 여겨짐에 따라 심도 있는 연구가 진행되고 있다. 그러나 *in vitro* 모델을 이용한 신경독성검색법을 개발하기 위해서는 우선적으로 신경세포 및 신경교세포 배양법의 확립이 요구되는데 신경세포의 순수 배양은 뇌내 세포유형의 극도의 다양성과 신경세포의 특징인 재생중식불능, 까다로운 배양조건등으로 인해 아직 미진한 상태이며 현재 많은 연구자들에 의해 실험되고 있다.

본 실험에서는 신경세포(cerebellar granule cell)와 신경교세포(astrocyte)의 배양기술을 확립하고 이를 바탕으로 현재 문제시 되고 있는 마약류 및 산업환경화학물질로서 대표적인 methamphetamine (MAP), trimethyltin (TMT),  $AlCl_3$ ,  $CdCl_2$ 등의 신경독성을 *in vitro* 상태에서 검색하고자 하였다. 첫단계로 적용약물농도를 결정하기 위하

여 섬유아세포를 배양하여 위의 물질의 LC<sub>50</sub>과 형태학적 변화를 통해 세포독성의 정도 및 작용기전을 관찰하고, 이들 약물의 세포독성 및 작용기전을 바탕으로 배양된 소뇌과립세포에 대한 이들 약물의 신경독성을 세포수 변화의 측정, 세포형태의 변화를 관찰하고자 한다.

### 제 3 절 *In vitro* 간장독성 시험법 개발

간장은 의약품등 대부분의 xenobiotics 의 대사에 중요한 역할을 하며, 대사된 일부의 화학물질은 유독화되어 일차적으로 간에 독성을 유발하기 때문에 화학물질등이 간장에 미치는 영향을 평가하는 것은 안전성 검색에 있어서 매우 중요하다고 할수 있다. 따라서, 보다 빠른 시간내에 간독성평가를 가능케하는, *in vivo* 방법의 대체시험법으로서의 *in vitro* 간독성시험법의 개발이 요구된다<sup>14,15)</sup>.

간장독성 분야에서 간세포의 1차배양을 이용한 *in vitro* 독성시험법이 개발되고 있는데<sup>16,17,18)</sup>, 그 이유로서는 첫째, 간세포가 간의 주요 기능 단위이며, 간장 구성 세포의 60% 및 총 간장 부피의 80%에 해당하므로 *in vitro* liver model 을 대표할 수 있으며, 1차배양된 세포들은 적절한 배양조건을 유지시키면, 상당기간 생존이 가능하기 때문이다. 둘째, 분리된 간세포는 실험조건의 조작성이 용이하며, 다른 생리적 영향 (예를들면 내분비, 신경, 심혈관계의 영향) 으로부터 독립적이므로 특히 간독성을 유발하는 작용기전이 상이한 물질들의 연구에 있어 *in vivo* 시험보다 정확하고 민감하다는 장점을 가진다<sup>15,19)</sup>. 셋째, 파쇄된 세포는 간의 균질화(homogenization)나 분획화(fractionization)에 의해 몇몇 약물대사 경로가 손실 또는 제거될 가능성이 있지만, 분리된 간세포는 monooxygenase나 포합반응에 의한 대

사기능을 보유한다는 것이다. 이는 화학물질이 monooxygenase 에 의해 활성대사체로 되거나, 포합반응에 의해 무독화되는 물질의 경우, 또는 약물의 활성화나 해독경로가 세포내 다른 분획에 존재하는 경우에 더욱 중요한 장점이 된다. 간세포는 현탁액 (fresh suspension) 또는 1차배양 시스템 (primary cultures system) 으로 분리될 수 있으나, 그 중 1차배양 시스템은 1일 정도의 배양으로 collagenase perfusion이나 분리과정에서의 기능저하를 회복할 수 있고, 현탁액 상태보다 높은 생존율을 오래 유지할 수 있으므로 많이 사용된다<sup>15)</sup>. 그러므로, 본 시험에서는 분리 배양한 간세포를 이용한 *in vitro* 모델을 사용하였다.

본 연구에서는 랫드의 간세포를 분리하여 1차배양시스템의 최적조건을 설정하고, 대표적인 간장독성물질로서 간독성 작용기전이 잘 알려져 있고, *in vivo* 및 *in vitro* 모델에서의 독성물질의 영향에 대한 비교 및 상관관계가 높은 것으로 보고되고 있는 CCl<sub>4</sub> 및 아세트아미노펜을 이용하여<sup>19,20,21,22)</sup>, LDH (lactate dehydrogenase) leakage assay 및 GSH 정량법을 확립함으로써<sup>21)</sup> 간장 독성 검색 시스템을 확립할 수 있는 기초를 마련해 보고자 하였다.

## 제 2 장 실험 방법

### 제 1 절 *In vitro* 신장독성 시험법 개발

#### 1. 시험물질

시스플라틴, LDH assay kit,  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) assay

kit, alkaline phosphatase (ALP) assay kit, ATP assay kit 와 phosphorus assay kit는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)으로부터 구입하였으며,  $\alpha$ -[ $^{14}\text{C}$ ] methylglucose는 Amersham International PLC (Amersham U.K.)로부터 구입하였다.

## 2. 세포배양 및 약물처리

LLC-PK<sub>1</sub> 세포는 American Type Culture Collection (ATCC CRL-1392)으로부터 195 세대를 분양받아 197 - 200 세대를 사용하였다. 배지는 3% fetal bovine serum (FBS)과 항생제가 포함된 medium 199를 사용하였으며, 3-4일마다 계대배양 하였다. 접종후 4 일째에 시스플라틴을 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{M}$  의 농도로 6시간 또는 24시간 처리하여  $\alpha$ -methylglucose uptake, ATP assay, enzyme assay 등을 실시하였다.

## 3. $\alpha$ -Methylglucose uptake의 측정

약물처리후 세포를 Hanks-HEPES buffer(pH 7.40)로 2번 세척한 후 2.5%(w/v) BSA와 0.1mM [ $^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -methylglucose가 함유된 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(pH 7.40)로 배양하였다. Uptake가 끝나는 시점에 세포를 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(4°C)로 3번 세척하고 2N NaOH 1ml를 가하여 37°C에서 2시간 동안 방치시켜 세포를 용해하였다. 용해된 세포의 일부는 Insta-Gel XF (Packard, Downers Grove, Illinois, U.S.A.)을 사용하여 liquid scintillation counter로 방사능양을 측정하고 일부는 단백질 정량에 사용하였다.

#### 4. ATP assay

약물 처리후 phosphate buffered saline(PBS)으로 2번 세척하고 12% trichloroacetic acid (4°C, TCA)를 500  $\mu$  가하여 세포를 모은 후 500  $\mu$ 의 TCA를 더 가하여 첫번째 것과 합하였다. 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 모아서 12M KOH로 중화하고 침전은 1M NaOH로 가수분해 후 단백질을 정량하였다. ATP 양은 Sigma kit를 이용하여 340nm에서 spectrophotometer로 정량하였다.

#### 5. Enzyme assay

약물 처리후 배지내로 유리되는 LDH와  $\gamma$ -GT의 활성은 배지를 3000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액에서 Sigma kit를 이용하여 측정하였다. 세포내의 ALP 활성은 세포를 PBS로 2번 세척 후 5mM Tris-HCl과 0.9% NaCl이 함유된 PBS 500  $\mu$ 로 harvest 한 후 초음파로 level 7에서 1분간 분쇄하고, 5000rpm에서 5분간 원심분리후 상등액에서 Sigma kit를 이용하여 측정하였다.

$\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성은 상등액을 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 3mM ATP, 130mM NaCl, 20mM KCl, 30mM histidine이 함유된 반응액에서 30분간 반응시킨 후 25% TCA 1ml로 반응을 종결시키고, 3000g에서 10분간 원심 분리후 상등액을 취하여 Fisk-Sabbarow 등의 방법으로 ATP로 부터 유리되는 무기인을 Sigma kit를 사용하여 정량하였다.  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성은 총 ATPase 활성에서 ouabain으로 억제된 활성을 제외한 값으로 하였다.

#### 6. 단백질 정량



단백질 정량은 bovine- $\gamma$ -globulin을 표준 물질로 하여 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 Bradford(1976)법으로 정량하였다.

## 7. 랫드 신장으로 부터의 근위세뇨관 세포의 1차 배양

랫드 신장의 상피세포 1차 배양은 Chung<sup>23)</sup> 등의 토끼 신장 근위세뇨관 세포의 1차 배양법을 변형하여 실시하였다. 180-200g의 Sprague-Dawley 웅성 랫드를 펜토바르비탈(60mg/kg)로 마취하여 개복한 후 복대정맥과 대동맥을 노출시켰다. 대동맥은 묶을 준비를 하고 20 게이지 카테터를 삽입후  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -free Hank's balanced salt saline(HBSS)을 10ml/min의 속도로 10분간 관류시키면서 복대정맥을 신장아래부분에서 절개하였다.

0.1% collagenase와 0.5%(w/v) iron oxide가 함유된 HBSS를 5ml/min 속도로 18분간 관류시켰으며 이때 iron oxide는 glomerulus에 머무르게 된다. 관류후 신장을 적출하고 신장의 캡슐을 벗긴 후 0.1% collagenase가 함유된 HBSS에서 신장 피질과 수질을 분리시켰다. 피질부분을 가위로 조각낸 후 loose-fitting Dounce glass-on-glass homogenizer에 옮기고 0.1% collagenase가 함유된 HBSS를 10ml 가한 후 4번 stroke하여 homogenization시켰다. Homogenate를 pore size가 235 $\mu$ M(위), 85 $\mu$ M(아래)인 mesh로 구성된 이중 screen에 거르면 아래쪽 screen(85 $\mu$ M)에 세뇨관과 glomerulus 부분이 남아 있게 되며 이 부분을 conical centrifuge tube에 옮기고 HBSS를 가한 후 magnetic stir bar를 이용하여 iron oxide가 걸려있는 glomerulus를 제거하였다.

500rpm에서 5분간 원심분리후 0.1% BSA, 10% FBS, human

transferrin, insulin, hydrocortisone이 함유된 DMEM/Ham F12 배지에 resuspension시키고 collagen으로 코팅된 배양접시에 분주하였다. 24시간 후 배지를 교환하였으며 그 후는 2-3일에 한번씩 배지를 교환하였다.

## 제 2 절 *In vitro* 신경독성 시험법 개발

### 1. 섬유아세포배양

임신 13.5일된 Long-Evans 랫드를 경추탈구하여 자궁을 꺼낸 후 자궁막, 난황막, 태반을 제거하고, 태자의 심장, 간장 같은 연조직을 제거하였다. Antibiotic(50unit penicillin/ml & 50 $\mu$ g streptomycin/ml)을 포함한 PBS용액으로 2-3회 세척한 후 Trypsin-EDTA용액으로 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation하고, 10% FBS를 포함한 DMEM으로 중화하여 1000rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 취하였다. 그 후 세포수를  $3 \times 10^5$ 개/ml로 맞추는 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하며 3-4일 마다 계대배양 하였다.

### 2. 소뇌파립세포배양

생후 8일령된 Long-Evans 랫드 4-5마리를 단두하여 solution A (NaCl 7.07, KCl 0.36, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.166, NaHCO<sub>3</sub> 2.14, glucose 2.57, phenol red 0.015 + BSA 3, MgSO<sub>4</sub> 0.288 g/L)에 넣고 brain을 채취하였다. 대뇌와 연수, 교를 제거하여 순수하게 소뇌를 분리한 후 조심스럽게 meninges를 제거하였다. 0.4mm 두께로 chopping한후 total volume을 10ml로 맞추고 150g, 15초간 원심분리하고 상층액을

버리고 0.2mg/ml의 trypsin이 들어있는 solution A를 넣고 전체 부피를 10 ml로 맞추어 37°C에서 15분간 200rpm으로 shaking하였다. 43μg/ml DNase type I과 414μg/ml soybean trypsin inhibitor를 2ml 첨가하여 150g 15초간 원심분리하고 상층액은 버린 후, pellet에 80μg/ml DNase type I과 0.52mg/ml trypsin inhibitor 2.7mM MgSO<sub>4</sub>가 포함된 2ml solution A를 넣고 pipet으로 분쇄하여 15분간 방치하였다. 상층액(약1.5ml)을 취한 후 모아진 상층액을 약 3ml(3mg/ml BSA, 2.4mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>) KRB에 넣고 resuspension한 후 10분간 방치한 다음 상층액(95%)을 취한 후 10분간 방치하고 침전물이 보이지 않으면 150g로 10분간 원심분리하고 culture medium으로 resuspension 하였다. 그 후 poly-L-lysine이 처리된 6-well plate에 각 well당 2ml( $2 \times 10^6$ 개)씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

### 3. Astrocyte 배양

Cerebrum을 HBSS에서 분리한 후 DME/F12(serum free) medium으로 옮겨 200μm Nitex mesh로 분쇄하여 100μm Nitex mesh로 filter한 후 1000g로 5분간 원심분리하였다. 그 후  $15 \times 10^6$  cell/75Cm<sup>2</sup>로 세포수를 조정하고 75Cm<sup>2</sup> culture flask에서 7-9일간 배양한 다음 200rpm에서 6시간 shaking후 상층액을 버렸다(macrophage 분리). 그 후 또다시 200rpm에서 18시간(oligodendrocyte 분리), 24시간 shaking후 남아있는 astrocyte를 trypsin-EDTA로 처리한 후 80g로 centrifuge하여  $4 \times 10^5$  cell /35mm petridish로 세포수를 조정한 다음 배양하였다.

#### 4. 시험물질 및 투여약물 조제

Methamphetamine HCl (MAP, Sigma Co., U.S.A.), trimethyltin chloride (TMT, Aldrich Chemical Co., Inc. U.S.A.), cadmium chloride (Cd, Sigma Co., U.S.A.), aluminum chloride (Al, Aldrich Chemical Co., Inc. U.S.A.)는 증류수에 용해조제하여 filtration을 통해 멸균하여 사용하였다.

각 시험물질의 투여량은 섬유아세포배양의 경우 TMT와 Cd는 1, 2, 4, 8, 16 $\mu$ M 그리고 MAP와 Al은 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu$ M을 투여하였고, 소뇌과립세포배양의 경우에는 MAP는 250, 500, 1000, 2000, 4000 $\mu$ M, Al은 125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu$ M, Cd는 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 $\mu$ M, 그리고 TMT는 0.25, 0.5, 1, 2, 4 $\mu$ M을 투여하였다.

#### 5. Colorimetric MTT assay

Mosmann의 방법을 변형하여 실험을 실시하였다<sup>24)</sup>. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetazoliumbromide (MTT, Sigma Co., U.S.A.)을 PBS에 용해시켜 5mg/ml의 MTT solution을 만든 후 filtration을 통해 멸균시키고, HCl을 isopropanol과 혼합하여 0.04N Acid-isopropanol을 준비하였다.

약물처리 24시간후 medium을 well당 1ml씩만 남겨 놓고 MTT solution을 well당 100 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 배양한 후. Acid-isopropanol을 well당 100 $\mu$ l씩 넣고 dark blue crystal이 녹을 때 까지 흔들여 주었다. 그 후 96 well plate에 solution을 옮기고 570nm에서 microplate reader를 사용하여 optimal density를 측정하였

다.

## 6. SRB assay

약물처리 48시간 후 medium을 well에 부착된 세포가 떨어지지 않게 조심스럽게 버리고 0.9% NaCl 용액으로 1회 세척한 후 15% TCA 용액을 가하여 4-5℃에서 1시간동안 방치하였다. TCA용액에 의하여 세포가 well에 완전히 고정되면 TCA용액을 버리고 증류수로 5회 세척하고 완전히 말린 후 well당 1% acetic acid에 녹인 0.4% sulforhodamin B(SRB, Sigma Co., U.S.A.)용액을 0.4ml씩 넣고 상온에서 1시간동안 방치하였다. SRB용액을 버리고 1% acetic acid로 과량의 SRB를 5회 세척한 후 건조시킨 다음, 10mM tris 용액으로 세포단백과 결합한 SRB dye를 녹여 microplate reader를 사용하여 510nm에서 optimal density(OD)를 측정하였다.

## 제 3 절 *In vitro* 간장독성 시험법 개발

### 1. 간세포 분리 및 배양

간세포는 국립보건안전연구원에서 생산된 웅성 SD계 랫드 (200 ± 50g)를 펜토바르비탈 (60mg/kg, ip) 로 마취하여 Berry and Friend<sup>25)</sup> 및 Seglen 의 two-step perfusion method<sup>26)</sup>를 이용하여 분리하였다. 250ml 의 preperfusion buffer (135mM NaCl, 5mM KCl, 0.2mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05mM EGTA, and 10mM Na HEPES, pH 7.4)로 관류한 뒤, collagenase buffer (135mM NaCl, 5mM KCl, 0.2mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Na HEPES, 4mM CaCl<sub>2</sub> ,

collagenase 85 units/ml, and 0.005% Trypsin inhibitor) 250ml로 관류하였다. 형태를 소실하여 겔상으로 된 간장을 조심스럽게 절개하여 남아있는 collagenase 용액에 넣어 피펫으로 가볍게 분산시킨 다음 분산액을 mesh 에 여과하였다. 여과액은 50xg 에서 2분간 원심분리한 다음 상등액을 버리고 다시 같은 조작을 washing buffer (배양액에서 heated calf serum 만 제외한것) 로 2회 반복하여 세척한 뒤, 배양액에 분산시켜 간세포 현탁액 (cell suspension)을 얻었다. 간세포 현탁액의 일부를 취하여 trypan blue uptake 법으로 세포생존율을 구하여, hepatocytometer 로 세포수를 세어  $6 \times 10^6$  cells/ dish 가 되도록 collagen이 도포된 ( $10 \mu\text{g/ml}$ , for 2hr) 배양접시에 이식하여 배양하였다. 5% heated calf serum, 5% antibiotics, 4  $\mu\text{u/ml}$  insulin,  $1 \mu\text{M}$  dexametasone 이 보강된 William's medium E 배양액을 사용하였으며, 이식 후 4시간동안 기질에 부착시킨 후 조심스럽게 배양액을 교환하고, 24시간동안 세포기능 회복을 위한 배양을 하였다. 간세포는 일정한 습도를 유지하는  $37^\circ\text{C}$  배양기에서  $\text{O}_2$  (95%) 와  $\text{CO}_2$  (5%) 의 혼합기체를 계속 공급하면서 배양하였다.

## 2. 시험물질 처리

### 가. $\text{CCl}_4$ 처리

회복기 배양 (24hr) 후에 DMSO (dimethylsulfoxide) 에 녹인 2.5, 5, 10 및 20mM의  $\text{CCl}_4$  를 3ml 배양액에 각  $15 \mu\text{l}$ 씩 적용하여 1, 2, 5, 12, 및 24시간동안 배양하여 농도및 시간별 영향을 관찰하였다.

### 나. 아세트아미노펜 처리

회복기 배양 (24hr) 후에, 아세트아미노펜을 0.5, 1.0 및 2.0mM의

농도로 24, 48 및 72시간 동안 배양하여 농도 및 시간별 영향을 관찰하였다.

### 3. LDH leakage assay

간세포에 시험물질을 처리한 후, 시험물질에 의해 유도된 세포막 파괴에 의해 세포내에서 배양액으로 유출되어 나오는 LDH의 양을 Sigma assay kit (Sigma 228-20) 을 사용하여 LDH에 의해 NADH가 증가하는 양으로 측정하였다. CCl<sub>4</sub>는 2.5, 5, 10 및 20mM의 농도로 처리한 배양접시에서, 1, 2, 5, 12 및 24시간 후에 배양액 150 μl를 각각 취하였고, 아세트아미노펜은 0.5, 1 및 2mM 을 처리한 배양접시에서 24, 48 및 72 시간 후에 배양액 150 μl를 각각 취하여, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 100 μl를 취하여, 미리 37°C 로 가온된 lactate 와 NAD 혼합액 1ml에 가하여 340nm에서 1분 동안의 UV absorbance 의 변화를 측정하였다<sup>27)</sup>. 결과는 LDH leakage (U/L) 를 산출한뒤 % control 로 표시하였다.

### 4. Glutathione 측정

Trypsin-EDTA 액을 처리하여 배양접시에 부착된 세포를 떼어낸 뒤, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 세포 현탁액을 얻었다. 0.01M DTNB (Dithionitrobenzoic acid) 및 10 units/ml 의 GSH reductase, 2mg/ml의 NADPH 를 가하여 412nm 에서 2분 동안의 흡광도를 측정하여, standard curve로 부터 GSH의 양을 분석하였다<sup>28,29,30)</sup>

## 5. 통계처리 및 분석

Microplate reader에 의해 얻은 결과는 one-way analysis of variance test [SPSS/PC+(Version 2.0)]와 two-sample t-test [Minitab (Release 7.1, 1989)]를 사용하여 분석하였다. 통계학적 유의성은  $p \leq 0.05$ 에서 인정하였다.

# 제 3 장 연구결과 및 고찰

## 제 1 절 *In vitro* 신장독성 시험법 개발

### 1. 세포형태 관찰

LLC-PK<sub>1</sub> 세포는 monolayer로 성장하며 전형적인 상피세포의 형태학적 특징을 보였다. LLC-PK<sub>1</sub> 세포는 부착 후 24시간 안에 분열을 시작하고 섬모양을 형성하였으며 세포수가 증가함에 따라 섬의 크기가 증가하였다. 결국 섬은 특징적인 dome을 가지고 있는 일련의 confluent cell sheet를 형성하였으며 dome이 형성된 후 분열은 거의 멈추었다(Fig. 1).

LLC-PK<sub>1</sub> 세포는 monolayer를 형성하고 형태학적 극성을 나타내는데 위쪽은 *in vivo*에서 상피세포의 luminal 또는 mucosal membrane에 해당하고 배양접시에 접촉되어 있는 부분은 basolateral membrane에 해당한다. 이것은 transepithelial Na<sup>+</sup> transport mechanism의 기능적 극성이 존재하고 있음을 시사한다. 최근 연구에서 배양접시에 면하고 있는 세포막에 [<sup>3</sup>H] ouabain binding site가 국재되어 있다는 보고가 있었으며, 이는 이 membrane이 *in vivo*에서



basolateral membrane에 해당한다는 증거가 되고 이 세포가 능동수송능의 기능적 극성을 유지하고 있음을 시사한다<sup>2)</sup>.

랫드의 신장으로부터 분리하여 1차 배양한 근위세뇨관 세포의 현미경 사진이 Fig. 2에 나타나 있다. 근위세뇨관 세포는 접종 몇시간 후에는 대부분의 세포들이 덩어리 형태로 관찰되었다. 접종 하루후 single cell과 세포덩어리들이 배양접시에 부착하기 시작하였으며 3일째 부터는 강하게 부착하여 부착된 부분을 중심으로 하여 분열하면서 성장하였다. 세포는 접종 9일째에 confluence를 형성하였으며 전형적인 상피세포의 형태를 나타내었는데 중심에 있는 세포들은 조약돌모양을 보이고 중심에서 멀어질수록 더 편평한 세포형태가 되었다.

세포의 1차 배양은 생리과정에 대한 기전 연구에 유용한 도구이다. 일부 포유류, 특히 토끼의 신장으로부터 근위세뇨관 세포의 1차 배양이 성공적으로 이루어지고 있으며, 신장독성 평가에 효과적으로 응용되고 있으나 랫드 신장으로부터의 1차 배양은 거의 보고된 바가 없다. 본 실험결과 랫드의 신장으로부터 근위세뇨관 세포를 효과적으로 분리·배양하였으며, 랫드 신장의 근위세뇨관 1차 배양 시스템을 이용한 *in vitro* 검색법으로 활용할 수 있는 기초를 마련하였다고 볼 수 있다.

## 2. 효소유리 측정

LLC-PK<sub>1</sub>에 시스플라틴을 처리하여 *in vitro* 독성평가의 가장 일반적인 방법인 배지내 LDH의 활성을 측정하였으며, 근위세뇨관에 많이 함유되어 있으며 지표효소로 알려진  $\gamma$ -GT의 활성도 측정하였다.

표 1에서 보는 바와 같이 배지내로 유리되는 LDH와  $\gamma$ -GT의 활성은 시스플라틴을 6시간 처리한 경우 유의성 있는 변화를 나타내지 않

았다. 시스플라틴을 24시간 처리한 경우에는 50 $\mu$ M 농도에서 배지내로 유리되는 LDH의 활성이 대조군의 460%로 증가하였으며, 100 $\mu$ M 투여군에서는 대조군의 810%까지 현저하게 증가하였다. 그러나 100 $\mu$ M 농도이상에서는 배지내로 유리되는 LDH 활성이 오히려 대조군 수준으로 감소하였다.

배지내로 유리되는  $\gamma$ -GT의 활성도 시스플라틴에 의한 LDH의 활성변화와 유사한 경향을 나타내어 시스플라틴 24시간 처리에 의하여 50 $\mu$ M과 100 $\mu$ M에서 각각 대조군의 8.2배와 10배까지 증가하였으며 그 이상의 농도에서는 대조군 수준으로 감소하였다.

세포내에 존재하는 대부분의 크고 하전되어 있는 분자들은 막을 통하여 이동할 수 없으나 만약 세포막의 구조가 영향을 받으면 효소와 같은 커다란 원형질내 분자들이 빠져나가게 된다. 이러한 세포막의 변형을 독성의 지표로 이용하고 있으며 가장 일반적인 방법이 배지내로 유리되는 LDH의 활성을 측정하는 방법으로서, 많은 실험에서 시스플라틴의 독성평가에 LDH leakage test를 사용하였다<sup>31,32)</sup>.

본 실험결과 시스플라틴의 처리에 의해 배지내 LDH나  $\gamma$ -GT의 활성이 증가하다가 100 $\mu$ M이상 농도에서는 오히려 감소하였는데 이는 시스플라틴이 LDH나  $\gamma$ -GT의 활성을 직접 억제하기 때문인 것으로 생각되며, 따라서 시스플라틴의 독성평가에는 적절한 방법이 아닌 것으로 판단되었다. 배지내로 유리되는 LDH는 시스플라틴 50 $\mu$ M 처리시 보다 100 $\mu$ M 처리시 2배 정도 증가한 반면  $\gamma$ -GT의 활성은 50 $\mu$ M과 100 $\mu$ M 농도에서 거의 유사한 값을 나타내었다. 이것은 시스플라틴이 LDH 보다는  $\gamma$ -GT 활성에 대한 억제 영향이 더 크다고 생각할 수 있다.

### 3. $\alpha$ -Methylglucose uptake 측정

시스플라틴의 처리에 의해 용량의존적으로  $\alpha$ -MG uptake가 감소하였다(표 2). 시스플라틴을 25 $\mu$ M과 50 $\mu$ M 농도로 6시간동안 처리한 결과  $\alpha$ -MG uptake가 각각 대조군의 68% 와 53%로 유의성있게 감소하였다. 시스플라틴 24시간 처리에 의하여는 5 $\mu$ M 농도부터 감소하였으며 25 $\mu$ M 처리에 의하여 대조군의 50%까지 감소하였다. 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake의 감소현상은 효소 유리가 관찰되지 않는 농도에서 나타났으며, 따라서  $\alpha$ -MG uptake 측정은 cell death 전에 나타나는 신장의 특이적인 기능 이상을 평가할 수 있는 지표로서 *in vitro* 시스템에서 독성의 초기에 검색가능한 예민한 parameter로 활용할 수 있으리라 생각되었다.

$\alpha$ -MG는 apical membrane에 있는 Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter를 경유하여 근위세뇨관으로 흡수되며 이것은 basolateral membrane에 존재하는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase에 의하여 유지되는 sodium gradient에 의존한다. 또한, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase의 활성은 세포내 ATP 농도에 의존하며 이는 미토콘드리아 기능에 좌우되고, 따라서 만약 이러한 과정중 한 부분이라도 장애가 일어나면  $\alpha$ -MG uptake가 영향을 받게 된다. 즉, 독성물질에 의한  $\alpha$ -MG uptake의 감소는 독성물질이 Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter 또는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase에 영향을 미쳐서 나타날 수 있으며, 미토콘드리아 기능에 장애를 유발하여 세포내 ATP 양이 부족하여 유발될 수 있다.

따라서 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake 감소의 기전을 밝히고자 세포내 ATP의 양과 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase의 활성을 측정하였으며 apical

membrane의 지표효소인 ALP의 활성도 측정하였다.

#### 4. 세포내 ATP 양 측정

세포내 ATP 양을 측정한 결과 시스플라틴을 6시간과 24시간 처리한 경우 모두에서 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으며 50 $\mu$ M을 24시간 처리한 경우에는 오히려 대조군의 150%로 증가하였다(표 2). 이러한 결과로 미루어 볼 때 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake 감소현상은 시스플라틴이 미토콘드리아의 기능을 저하시킴으로써 ATP 생성량이 감소하여 유발된 것은 아닌 것으로 판단되었다.

세포내 ATP의 양이 감소하지 않은 또 다른 설명으로는 시스플라틴에 의하여 미토콘드리아의 기능저하가 일어나서 ATP의 생산량이 감소하였더라도 ATP를 소모하는  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase의 활성이 저하됨으로써 ATP 양에는 변화가 없었다고도 생각할 수 있다.

#### 5. $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPase 활성 측정

Basolateral membrane의 지표효소인  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성을 측정한 결과 시스플라틴을 6시간 처리한 경우에는 100 $\mu$ M의 농도까지 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으며 24시간 처리한 경우에는 10 $\mu$ M 농도부터 유의성 있는 활성감소가 나타났다(표 3).

시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake 감소현상이  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성저하보다 선행하므로  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성저하가  $\alpha$ -MG uptake 감소에 부분적으로 관련이 있으나 직접적인 원인은 아닌 것으로 생각되었다. 또한 시스플라틴 50 $\mu$ M의 24시간 처리시 세포내 ATP의 양이 증가한 현상은  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase의 활성저하에 따른 ATP 소모량 감소

에 의한 것으로 생각할 수 있다.

## 6. Alkaline Phosphatase의 활성 측정

$\alpha$ -MG의 uptake가 일어나는  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter는 brush border membrane에 존재하며 이 membrane의 지표효소는 alkaline phosphatase(ALP)로 알려져 있다. 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake 저하의 또 다른 원인으로  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter에 대한 직접 억제작용을 생각할 수 있으며 따라서 시스플라틴의 이 부분에 대한 영향을 간접적으로 살펴보고자 지표효소인 ALP의 활성을 측정하였다.

시험결과 시스플라틴의 6시간 처리에 의해서는 ALP의 활성에 유의성 있는 변화가 없었으며 24시간 처리시에는  $5\mu\text{M}$  부터 활성이 감소되었으며  $10\mu\text{M}$  농도부터는 유의성있는 감소가 관찰되었다(표 3). 이러한 결과로부터 시스플라틴은 basolateral membrane과 미토콘드리아에 대한 영향보다는 brush border membrane에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각되며, 따라서 시스플라틴에 의한  $\alpha$ -MG uptake의 저하는 brush border membrane에 존재하는  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter에 대한 직접 억제작용이 더 크게 기여한 것으로 추측된다.

## 제 2 절 *In vitro* 신경독성 시험법 개발

### 1. 소뇌과립세포(cerebellar granule cell) 배양

98% 이상 순수한 소뇌 과립신경세포를 배양하였으며 배양 10일 후 신경세포의 system이 완성되었고 6주이상 생존가능하였다(Fig.

3). 신경세포의 타입은 10,000여종이 있다고 보고되는 등 그 다양성으로 인해 어느 특정 신경세포를 단일하게 순수배양하는 것은 상당히 어렵다. 하지만 소뇌과립세포는 다른 신경세포와 달리 어느 일정지역에 밀집하게 분포되어 있고 또한 다른 대부분의 신경세포가 출생전 분화가 진행되는 것과 달리 출생후 증식, 이동, 분화가 진화가 진행되는 장점이 있다. 본 실험에서는 소뇌과립세포의 증식하는 단계의 생후 8일령의 rat를 사용하였으며 Giulio와 Levi의 실험방법을 변형하여 실험하였다<sup>33)</sup>.

## 2. 신경교세포(astrocyte) 배양

95% 이상 순수한 astrocyte를 배양하였으며 6주간 생존가능하였다 (Fig. 4). Astrocyte는 신경세포 및 다른 신경교세포보다 배양시 Culture dish 바닥에 부착능이 뛰어나기 때문에 이를 이용해 분리할 수 있었는데 부착능의 세기는 astrocyte, oligodendrocyte, macrophage, neuron 순이었다. Astrocyte는 protoplasmic astrocyte, fibrillary astrocyte의 두 타입으로 구별할 수 있는데 protoplasmic astrocyte가 손상을 받으면 fibrillary astrocyte로 전환되어 GFAP의 발현이 증가한다고 알려져 있으나 아직까지 분명치 않다. Glial fibrillary acidic protein은 astrocyte에만 존재하는 중간직경 필라멘트로 신경독성 파괴시 이를 정량하여 신경독성의 표지물질로 활용하는 방안이 현재 각광을 받고 있으나 GFAP의 발현기전은 아직 알려져 있지 않다. 본 실험에서는 Atterwill의 방법을 변형하여 실시하였다<sup>34)</sup>.

### 3. SRB assay에 의한 섬유아세포의 생존율과 형태적 변화

MAP의 경우 LC<sub>50</sub>은 3200 $\mu$ M이며, 형태학적 변화양상은 세포내에 과도한 공포를 형성하고, AlCl<sub>3</sub>의 LC<sub>50</sub>은 2000 $\mu$ M이었다(Fig. 5). TMT는 LC<sub>50</sub>이 3.8 $\mu$ M이며, processing의 억제로 인한 세포표면의 매끄러움과 외관상 삼각형의 모습을 나타내었고, CdCl<sub>2</sub>는 세포골격 단백질의 파괴를 나타낸다(Fig. 6, 7, 표 4).

### 4. MTT assay에 의한 소뇌과립세포의 생존율 측정

MAP의 경우 250 $\mu$ M에서는 95.2%, 500 $\mu$ M에서는 75.6%, 1000 $\mu$ M에서는 64.4%, 2000 $\mu$ M에서는 56.0%, 4000 $\mu$ M에서는 48.9%가 생존했고, Al은 125 $\mu$ M에서는 99.1%, 250 $\mu$ M에서는 91.9%, 500 $\mu$ M에서는 75.8%, 1000 $\mu$ M에서는 71.6%, 2000 $\mu$ M에서는 56.8%가 생존했다. Cd는 0.125 $\mu$ M에서는 93.7%, 0.25 $\mu$ M에서는 88.3%, 0.5 $\mu$ M에서는 75.2%, 1 $\mu$ M에서는 65.1%, 2 $\mu$ M에서는 52.1%가 생존했고, TMT는 0.25 $\mu$ M에서는 94.8%, 0.5 $\mu$ M에서는 94.7%, 1 $\mu$ M에서는 76.9%, 2 $\mu$ M에서는 63.2%, 4 $\mu$ M에서는 60.7%가 생존했다(표 5).

새로운 화합물의 독성작용기전의 이해를 돕고, 그 물질의 독성을 검색하는데 *in vitro* 모델 시험방법이 각광을 받기 시작하면서 신경독성분야에서도 이 방법의 활용이 심도있게 연구되고 있다. *In vitro* 시험법의 가장 큰 장점중의 하나는 동일한 조건하에서 화합물의 독성을 동물과 인간 모두에서 확인, 비교할 수 있다는 것이다. 또한 실험에 사용되는 동물 수와 실험기간을 줄임으로써 비용 절감효과를 볼 수 있다. 신경독성분야에서 *in vitro* 모델의 장점은 첫째 신경화학적 분석이 가능하고 둘째 chemical-defined 또는 serum-free배지에서 장기간 생존이 가능하기 때문에 신경전달물질의 작용을 확인할 수 있고,

셋째는 blood-brain barrier를 거치지 않고 직접 target cell에 작용할 수 있다는 점 등 *in vivo*모델에서의 제약을 극복하여 여러 실험을 시행할 수 있다. 때문에 *in vitro* 모델을 이용한 신경독성검색법을 개발이 요구되고 있어 이를 위해서는 우선적으로 신경세포 및 신경교세포 배양법의 확립이 요구되는데 신경세포의 순수 배양은 뇌내 세포유형의 극도의 다양성과 신경세포의 특징인 재생증식불능, 까다로운 배양조건등으로 인해 신경세포배양을 이용한 신경독성검색법 개발은 아직 미진한 상태이다. 이에 본 실험에서는 신경세포와 신경교세포의 배양기술을 확립하여 정확한 신경독성검색을 위해 활용하고자 신경세포의 배양법을 확립하는데 주력하여 소뇌과립신경세포와 성상교세포를 분리하여 98%이상의 순수한 소뇌과립신경세포를 얻을 수 있는 배양기술을 확립하였고, 95%이상 순수한 성상교세포의 배양기술도 확립하였다.

신경독성물질의 독성을 검색하기 위해서는 그 물질의 세포독성을 배제한 적정 적용농도를 결정하여야 하는데 이를 위하여 섬유아세포를 배양하여 SRB assay를 이용하여 그 물질의 LC<sub>50</sub>을 측정하였다. SRB(sulforhodamin B)는 음하전을 갖는 2개의 -SO<sub>3</sub> group이 있어, 생리적 pH하에서 양하전을 갖는 생체분자에 결합하는 밝은 pink색의 염료로써, TCA(trichloroacetic acid)로 고정시킨 세포에 대한 결합자리는 amino group이다. 즉, 단백질 착색제로써 세포단백질의 정량분석에 이용될 수 있고 또한 분석의 민감도와 세포수에 따른 직선관계를 신속 정확하게 측정할 수 있으며 수용성이며 안정하고, 가시적이어서 취급이 용이하고 생체대사와도 무관한 장점이 있다. 따라서 본 세포독성 실험에서의 세포수 측정을 위한 착색제로써 사용하였다.



그 결과는 LC<sub>50</sub>은 MAP; 3.2mM, AlCl<sub>3</sub>: 2mM, TMT: 3.8μM이었고, 형태학적 변화양상은 MAP는 세포내에 과도한 공포를 형성하고, CdCl<sub>2</sub>는 세포골격 단백질의 파괴를, TMT는 processing의 억제로 인한 세포 표면의 매끄러움이 나타났다.

각 약물의 세포독성 및 작용기전을 바탕으로 배양된 소뇌과립세포에 대한 이들 약물의 신경독성을 colorimetric MTT assay를 통한 세포생존율을 측정하였는데 colorimetric MTT assay의 장점은 분석에 소요되는 시간이 짧고, 세척 단계를 거치지 않으며, 생체대사과정에 영향을 미치지 않기 때문에 sample 간 변이도를 최소화할 수 있다는 점이다. 그 결과는 세포의 생존율이 MAP의 경우 500μM, 1000μM, 2000μM, 4000μM에서 유의성 있게 감소했으며, Al은 250μM, 500μM, 1000μM, 2000μM에서 유의성 있게 감소했고, Cd는 0.25μM, 0.5μM, 1μM, 2μM에서 유의성 있게 감소하였고, TMT는 1μM, 2μM, 4μM에서 유의성 있게 감소하였다

신경조직은 그 구조의 복잡성, 구성세포의 다양성으로 인해 신경독성의 추정이 매우 어렵다. 즉 개개의 신경독성물질마다 서로 다른 기전으로 서로 다른 부위에 작용을 나타내기 때문에 이를 검색하는데는 많은 어려움이 따른다. 때문에 *in vitro*모델을 이용하여 살아있는 세포의 수 측정, glutamic acid 와 glutamine synthetase의 농도 측정, electrolyte들의 농도 측정 등 여러 parameter를 종합하여 단기간에 신경독성 예상물질들의 독성을 검색할 수 있으리라 사료된다. 그러나 *in vivo*와 *in vitro*사이에는 엄연히 실험환경의 차이가 존재함으로 *in vitro*의 결과를 그대로 *in vivo*로 외삽할 수 없기 때문에 이 차이를 배제하기 위한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### 제 3 절 *In vitro* 간장독성 시험법 개발

#### 1. 랫드 간장으로부터 간세포의 분리 및 1차배양

Collagenase 를 이용한 two-step perfusion 법으로 랫드 간세포의 분리 및 1차배양법을 확립하여, 이 분리 배양된 간세포를 이용하여, 독성물질을 시험동물에 투여하였을 때의 간에 미치는 영향중 몇몇 특성들을 *in vitro* 상에서 확인하는 것이 가능하였다.

#### 2. LDH leakage assay

CCl<sub>4</sub>를 2.5, 5, 10 및 20 mM 의 농도로 1, 2, 5, 12 및 24시간 배양 후, 배양액으로 유리된 LDH를 측정된 결과, 2.5mM CCl<sub>4</sub> 처리군의 경우 1시간 배양했을 때 이미, 288.7 U/L 로 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보이고, 배양시간의 증가에 따라 310.5, 352.7 U/L 로 점차 증가하여 5시간 배양시 포화상태에 도달했다. 5mM 및 10mM을 처리하였을 때의 1, 2, 5 및 12시간에서의 LDH의 양은 361.0, 394.4, 464.0, 494.3 U/L 및 332.3, 419.3, 476.1, 502.5 U/L 로 5~12 시간에서 포화상태를 보이는 매우 비슷한 양상을 보였다. 그러나, 20mM를 처리하였을 때, 오히려 LDH의 유리가 줄어들었는데, 이는 CCl<sub>4</sub> 를 DMSO에 녹인 stock solution이 계면활성제인 DMSO의 양에 비해 CCl<sub>4</sub>의 양이 많아 CCl<sub>4</sub>가 배양 시스템 내에 용해되지 않아 간세포로의 접근이 용이하지 않았기 때문에, 오히려 간세포에 영향을 주지 못하였거나, 너무 높은 농도에서 CCl<sub>4</sub>가 LDH의 활성을 직접 억제했을것으로 사료되어, 적절한 농도의 선택이 간독성 검색에서 중요한 역할을 할것

으로 판단되었다. 즉 CCl<sub>4</sub>는 2.5mM 정도의 낮은 농도로도 충분히 간독성을 유발하였고, 농도 의존적인 LDH 유리를 보였으며, 노출 초기에 급격한 독성을 발현하는 양상을 보였다 (표 6 및 Fig. 8).

아세트아미노펜을 0.5, 1 및 2 mM 농도로 24, 48 및 72 시간동안 배양한 후의 LDH leakage는 0.5 및 1mM 농도에서 별다른 변화를 보이지 않았으며, 2mM 농도에서 대조군에 비해 유의성있는 증가가 48 시간 이후에 나타났다 (표 7 및 Fig. 9).

랫드 간세포는 CCl<sub>4</sub> 및 아세트아미노펜에 대해 민감하게 독성을 나타내었다. LDH leakage 로 측정된 CCl<sub>4</sub> 및 아세트아미노펜의 독성은 용량증가 및 시간증가에 따른 증가경향 및 포화현상을 보였다. 하지만, CCl<sub>4</sub> 및 아세트아미노펜의 독성 발현 시간은 상당히 다른 양상을 보였는데, 이는 CCl<sub>4</sub>와 아세트아미노펜의 대사에 있어서 대사경로 및 time course가 다르기 때문인 것으로 생각된다. CCl<sub>4</sub>의 경우 cytochrome p-450에 의해 활성대사체로 전환되어 비교적 초기부터 독성을 발현하는 것으로 알려져 있으며<sup>15,19)</sup>, 아세트아미노펜에 의한 간독성은 아세트아미노펜이 활성 대사체로 되는 초기 약물 대사과정과 활성대사체가 glucuronide 포함반응에 의해 해독되는 두번째 과정의 두 단계로 진행되는 것으로 알려져 있다. 아세트아미노펜의 독성이 발현되기 시작하는데 요구되는 24 시간정도의 노출기간은 세포내 GSH의 양이 감소되는데 걸리는 시간에 해당되는 것으로 사료된다<sup>18)</sup>.

### 3. Glutathione 측정

2.5, 5, 10 및 20mM의 CCl<sub>4</sub>를 처리하였을 때, 어떤 배양시간에서도 GSH양은 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았다(data not

shown).

한편 아세트아미노펜을 처리하였을때는 0.5 및 1mM 에서는 유의성있는 변화를 보이지 않았으나, 2mM 에서는 LDH leakage와 반비례하여 GSH 양은 감소하는 결과를 보였다 (표 7 및 Fig. 10) .

CCl<sub>4</sub> 및 아세트아미노펜 처리 후의 GSH content를 측정 한 결과, 아세트아미노펜 처리시에는 24시간째에 감소를 보이기 시작하였으나, CCl<sub>4</sub> 처리시에는 전 실험조건에서 유의성 있는 감소를 보이지 않았다.

이 또한 아세트아미노펜 대사과정에 glutathione이 관여하는 반면, CCl<sub>4</sub>의 대사는 glutathione 양에 거의 영향을 받지 않음을 지지하는 결과라고 할 수 있다.

이상의 결과로서, isolated hepatocyte culture system은 다양한 xenobiotics 의 간독성 발현기전의 상이함, 독성발현 농도및 노출기간 등의 검색등 몇가지 제한점이 있으나<sup>16)</sup>, *in vivo* 모델을 조심스럽게 반영할 수 있으므로, 신속한 간독성 스크리닝에는 유용할 것으로 사료되며, *in vitro* 간독성 지표로 대표적인 LDH leakage 와 GSH content를 비교할 때, LDH leakage가 보다 일반적으로 적용될 수 있는 간독성 지표로 사용될 수 있으며, GSH content 는 아세트아미노펜과 유사한 대사과정을 갖는 약물의 간독성 과정을 평가하는데 유용할 것으로 사료된다.

## 제 4 장 결 론

### 제 1 절 *In vitro* 신장독성 시험법 개발

1. 랫드 신장으로부터 근위세뇨관을 분리하여 1차 배양법을 확립하

였으며 이를 이용한 *in vitro* 신장독성시험법의 기초를 마련하였다.

2. 신장세포주를 사용한 *in vitro* 시스템에서  $\alpha$ -MG를 이용한 glucose uptake 기능 측정법은 *in vitro* 독성시험에서 일반적으로 사용되는 효소유리 측정법보다 독성의 초기에 검색할 수 있는 예민한 지표로 생각되었다.

3.  $\alpha$ -MG를 이용한 glucose uptake 기능 측정과 함께 미토콘드리아의 기능,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase의 활성,  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter에 대한 영향을 조사함으로써 독성물질이 장애를 일으키는 표적부위와 기전에 대한 정보를 얻을 수 있으리라 생각된다.

## 제 2 절 *In vitro* 신경독성 시험법 개발

*In vitro* 신경독성법을 개발하기 위해 선행되어야 할 신경세포 및 신경교세포배양법을 확립하고자 하였으며 현재 신경독성을 유발하는 것으로 알려진 물질중 마약류 및 산업환경화학물질로서 대표적인 methamphetamine(MAP), trimethyltin (TMT),  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$  등의 신경독성을 *in vitro* 상태에 적용시키고 SRB 및 colorimetric MTT assay를 이용하여 세포의 생존율과 형태학적 변화를 관찰하였는데 그 결과는 다음과 같다.

1. 98% 이상 순수한 cerebellar granule cell의 배양조건을 확립하였다.

2. 95% 이상의 순수한 astrocyte의 배양조건을 확립하였다.

3. 섬유아세포 배양 및 SRB assay

-  $\text{LC}_{50}$  : MAP; 3.2mM,  $\text{AlCl}_3$ ; 2mM,  $\text{CdCl}_2$ ; 4 $\mu$ M, TMT; 3.8 $\mu$ M

- 형태학적 변화양상

MAP : 세포내에 과도한 공포 형성,

CdCl<sub>2</sub> : 세포골격 단백질의 파괴,

TMT: processing의 억제로 인한 세포표면의 매끄러움 관찰

#### 4. 소뇌과립세포에 대한 MTT assay

-LC<sub>50</sub> : MAP; 3mM, AlCl<sub>3</sub>; 2mM, CdCl<sub>2</sub>; 2μM, TMT; 4μM

이상의 결과들을 종합해 볼때 각각의 시험물질들의 독성발현 기전이 상이함을 확인할 수 있었고, *in vitro* 모델이 신경독성이 의심되는 물질을 단기간의 검색하는데 유용하다는 것을 확인할 수 있었다.

### 제 3 절 *In vitro* 간장독성 시험법 개발

1. 랫드 간장으로부터 간세포를 분리하여 1차 배양법을 확립하였으며, 이를 이용한 *in vitro* 간장독성시험법의 기초를 마련하였다.

2. 확립된 1차 배양 간세포 시스템에서, 대표적인 간독성물질인 CCl<sub>4</sub> 및 아세트아미노펜을 이용한 LDH leakage assay 및 GSH 정량을 실시한 결과, 두 물질이 서로 상이한 작용기전으로 독성이 발현됨을 확인할수 있었으며, 독성발현시간 및 독성을 유도하는 물질의 농도가 1차배양 시스템에서는 중요한 조건이라고 판단된다.

3. 1차 배양 간세포 시스템에서의 LDH leakage assay 및 GSH 정량법은 *in vivo* 모델을 직접적으로 반영하는데에는 아직 제한점이 많이 있으나, 독성 기전을 밝혀낼 수 있는 *in vitro* parameter 들을 이용하여 *in vivo* 실험을 예측할 수 있을 것으로 사료되며, 계속적으로 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 동시에 수행하여 그 상관관계를 규명함으로써 *in vivo* 시험법의 대체법으로의 활용 가능성을 계속 연구해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 제 5 장 참 고 문 헌

1. Hull, R.N., Cherry, W.R. and Weaver, G.W. : The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK<sub>1</sub>. *In Vitro* (Rockville). **12**, 670-677, 1976.
2. Mills, J.W., Macknight, A.D.C., Dayer, J.M. and Ausiello, D.A. : Localization of [<sup>3</sup>H] ouabain-sensitive Na<sup>+</sup> pump sites in cultured pig kidney cells. *Am. J. Physiol.* **236**, C157-C162, 1979.
3. Mills, J.W., Macknight, A.D.C., Jarrell, J.A., Dayer, J.M. and Ausiello, D.A. : Interaction of ouabain with the Na<sup>+</sup> pump in intact epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **88**, 637-643, 1981.
4. Rabito, C.A. and Ausiello, D.A. : Na<sup>+</sup>-dependent sugar transport in a cultured epithelial cell line from pig kidney. *J. Membrane Biol.* **54**, 31-38, 1980.
5. Mullin, J.M., Weibel, J., Diamond, L. and Kleinzeller, A. : Sugar transport in LLC-PK<sub>1</sub> renal epithelial cell line : Similarity to mammalian kidney and the influence of cell density. *J. Cell. Physiol.* **104**, 375-389, 1980.
6. Misfeldt, D.S. and Sanders, M.J. : Transepithelial transport in cell culture ; D-Glucose transport by pig kidney cell line (LLC-PK<sub>1</sub>). *J. Membrane Biol.* **59**, 13-18, 1981.
7. Inui, K., Saito, H., Takano, M., Okano, Y., Kitazawa, S. and Hori, R. : Enzyme activities and sodium-dependent active

- D-glucose transport in apical membrane vesicles isolated from kidney epithelial cell line (LLC-PK<sub>1</sub>). *Biochim. Biophys. Acta* **769**, 514-518, 1984.
8. Perantoni, A. and Benett, W.M. : Nephrotoxic acute renal failure due to common drugs. *Am. J. Physiol.* **241**, F1-F8, 1981.
  9. Silverman, M. : Comparison of glucose transport mechanisms at opposing surfaces of the renal proximal tubular cell. *Biochem. Cell. Biol.* **64**, 1092-1098, 1986.
  10. Ullrich, K.J. : Polarity of the proximal tubular cell : Comparison of luminal and contraluminal transport systems for hexoses, dicarboxylates and sulfate. In *Endocrine Regulation of Electrolyte Balance* (F. Krueck and K. Thurau, Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, 28-35, 1986.
  11. Gstraunthaler G.J.A. : Epithelial cells in tissue culture. *Renal Physiol. Biochem.* **11**, 1-42, 1988.
  12. Kreisberg J.I. and Wilson P.D. : Renal cell culture. *J. Electr. Microsc. Techn.* **9**, 235-263, 1988.
  13. Striker L.J., Tannen R.L., Lange M.A. and Striker G.E. : The contribution of cell culture to the study of renal diseases. *Int. Rev. Exptl. Pathol.* **30**, 55-105, 1988.
  14. Guillouzo, A. : Hepatotoxicity. In *In Vitro Toxicity Testing*. John M. Frazier (Eds.). Marcel Dekker, INC, pp. 45-83, 1992.
  15. Sweeny, D.J. and Diasio, R.B. : The isolated hepatocyte and isolated perfused liver as models for studying drug-and



- chemical-induced hepatotoxicity. In *Hepatotoxicity*. Meeks, R.G. Harrison, S.D. Bull, R.J. (Eds.). CRC Press, Inc., pp. 215-239, 1991.
16. Klaassen, C.D. and Stacey, N.H. : Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment. In *Toxicology of the Liver*. Plaa, G. and Hewitt, W.R. (Eds.). Raven Press, New York, pp. 147-179, 1982.
  17. Guillouzo, A. : Use of isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism and cytotoxicity studies. In *Isolated and Cultured Hepatocytes*. Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C. (Eds.). Academic Press, Orlando, Florida, pp. 119-158, 1986.
  18. Begue, J.M., Le Bigot, J.F., Guguen-Guillouzo, C., Kiechel, J.R. and Guillouzo, A. : Cultured human adult hepatocytes ; A new model for drug metabolism studies. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1643-1646, 1983.
  19. Long, R.M. and Moore, L. : Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity ; Comparative studies *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**, 295-306, 1988.
  20. Tyson, C.A., Hawk-Prather, C., Story, D.L. and Gould, D.H. : Correlations of *in vitro* and *in vivo* hepatotoxicity for five haloalkanes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **70**, 289-302, 1983.
  21. Story, D.L., Gee, S.J., Tyson, C.A. and Gould, D.H. : Response of isolated hepatocytes to organic and inorganic cytotoxins *J. Toxicol. Environ. Health* **11**, 483-501, 1983.

22. Harman, A.W. and Fischer, L.J. : Hamster hepatocytes in culture as a model for acetaminophen toxicity ; studies with inhibitors of drug metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **71**, 330-341, 1983.
23. Chung, S.D., Alavi, N., Livingston, D., Hiller, S. and Taub, M. : Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J. Cell Biol.* **95**, 118-126, 1982.
24. Mosmann, T. : Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival ; Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immuno. Meth.*, **65**, 55-63, 1983
25. Berry, M.N. and Friend, D.S. : High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.* **43**, 506-520, 1969.
26. Seglen, P.O. : Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell Biol.* **13**, 29-83, 1975.
27. Moldeus, P., Hogberg, J. and Orrenius, S. : Isolation and use of liver cells. In *Methods in Enzymology*. ( Fleischer, S. and Packer, I. eds.) **52**, pp. 60-71. Academic press. New York, 1978.
28. Tietze, F. : Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione ; Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**, 502-522, 1969.
29. Griffith, O.W. : Determination of glutathione and glutathione

- disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212, 1980.
30. Stacey, N.H. and Klaassen, C.D. : Inhibition of lipid peroxidation without prevention of cellular injury in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **58** , 8-18, 1981.
31. Ormsyad, K., Orrenius, S. and Jones, D.P. : Preparation and characteristics of isolated kidney cells. *Methods in Enzymol.* **77**, 137-146, 1981.
32. Phelps, J.S., Gandolfi, A.J., Brendel, K. and Dorr, R.T. : Cisplatin nephrotoxicity ; *In vitro* studies with precision-cut rabbit renal cortical slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **90**, 501-512, 1987.
33. Levi, G., Aloisi, F., Ciotti, M. T., Thangnipon, W., Kingsbury, A. and Balazs, R. : Preparation of 98% pure cerebellar granule cell cultures, In a dissection and tissue culture manual of the nervous system, *Alan R. Liss, Inc.*, 211-214, 1989
34. Atterwill, C. K. and Steele, C. E. : Brain reaggregate culture in neurotoxicological investigations, In *In vitro* methods in toxicology, *Cambridge University Press*, 133-164, 1987

**Table 1. The effect of cisplatin on enzyme leakage in LLC-PK<sub>1</sub><sup>a</sup>**

Incubation Time	Concentration( $\mu$ M)	LDH	$\gamma$ -GT
6 hrs	0	100 $\pm$ 25.0	100 $\pm$ 9.4
	5	97.5 $\pm$ 7.0	-
	10	95.4 $\pm$ 9.2	-
	50	100.8 $\pm$ 4.0	151.1 $\pm$ 16.8
	100	88.3 $\pm$ 8.7	106.7 $\pm$ 20.0
	500	72.2 $\pm$ 3.6	170.0 $\pm$ 50.9
24 hrs	0	100 $\pm$ 24.0	100 $\pm$ 16.0
	5	84.9 $\pm$ 36.3	99.0 $\pm$ 5.5
	10	85.7 $\pm$ 19.0	76.1 $\pm$ 13.0
	50	594.8 $\pm$ 29.1*	821.7 $\pm$ 48.4*
	100	1039.2 $\pm$ 4.3*	1169.1 $\pm$ 47.9*
	500	111.5 $\pm$ 11.5	133.8 $\pm$ 19.0

<sup>a</sup> The values are expressed as % of control value  $\pm$  S.D.

\* Significantly different from control at  $p < 0.05$

**Table 2. The effect of cisplatin on  $\alpha$ -MG uptake and ATP content in LLC-PK<sub>1</sub><sup>a</sup>**

Incubation Time	Concentration( $\mu$ M)	$\alpha$ -MG uptake	ATP content
6 hrs	0	100 $\pm$ 12.0	100 $\pm$ 4.5
	5	-	93.9 $\pm$ 9.9
	10	-	89.6 $\pm$ 13.7
	25	68.0 $\pm$ 10.0*	-
	50	53.3 $\pm$ 13.2*	89.4 $\pm$ 11.5
	100	50.3 $\pm$ 8.4*	91.7 $\pm$ 8.6
	200	36.6 $\pm$ 7.3*	
24 hrs	0	100 $\pm$ 5.1	100 $\pm$ 9.7
	5	85.7 $\pm$ 5.6*	98.9 $\pm$ 15.6
	10	61.7 $\pm$ 1.1*	92.5 $\pm$ 6.8
	25	50.3 $\pm$ 2.9*	-
	50	-	156.3 $\pm$ 27.3*

<sup>a</sup> The values are expressed as % of control value  $\pm$  S.D.

\* Significantly different from control at  $p < 0.05$

**Table 3. The effect of cisplatin on activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase and ALP in LLC-PK<sub>1</sub><sup>a</sup>**

Incubation Time	Concentration(μM)	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase	Alkaline phosphatase
6 hrs	0	100 ± 15.3	100 ± 6.7
	5	128.3 ± 6.8	104.4 ± 9.2
	10	118.1 ± 16.0	112.6 ± 16.3
	50	104.0 ± 2.0	109.1 ± 9.7
	100	116.8 ± 7.1	115.5 ± 6.6
24 hrs	0	100 ± 8.5	100 ± 21.4
	5	128.0 ± 25.7	64.3 ± 20.2
	10	84.7 ± 5.2*	65.2 ± 11.4*
	50	62.5 ± 12.7*	62.1 ± 6.9*
	100	-	48.6 ± 3.7*

<sup>a</sup> The values are expressed as % of control value ± S.D.

\* Significantly different from control at  $p < 0.05$

**Table 4. Effect of neurotoxicants on fibroblast estimated by SRB assay in LE<sup>a</sup>**

약물농도(mM)	MAP(%)	AlCl <sub>3</sub> (%)	약물농도(μM)	TMT(%)	CdCl <sub>2</sub> (%)
1	79.4±0.5*	72.6±0.6*	1	85.7±0.4*	29.2±2.0*
2	77.0±0.3*	51.6±2.0*	2	81.8±0.3*	25.7±3.0*
3	57.1±1.0*	41.6±0.3*	4	44.4±1.5*	15.9±1.4*
4	41.1±3.0*	27.5±0.7*	8	35.7±0.6*	11.4±0.6*
5	13.0±0.3*	24.7±1.4*	16	11.0±0.3*	4.9±2.3*

<sup>a</sup> Values are expressed as means ± S.D.

\* Significantly different from control at  $p<0.05$

**Table 5. Effect of neurotoxicants on cerebellar granule cells estimated by MTT assay in LE<sup>a</sup>**

약물농도( $\mu\text{m}$ )	MAP(%)	AlCl <sub>3</sub> (%)	약물농도( $\mu\text{m}$ )	TMT(%)	CdCl <sub>2</sub> (%)
125	-	99.1 $\pm$ 0.3	0.125	-	93.7 $\pm$ 0.5*
250	95.2 $\pm$ 0.5	91.9 $\pm$ 1.5*	0.25	94.8 $\pm$ 1.2	88.3 $\pm$ 1.6*
500	75.6 $\pm$ 1.3*	75.8 $\pm$ 1.0*	0.5	94.7 $\pm$ 3.3	75.2 $\pm$ 3.0*
1000	64.4 $\pm$ 0.4*	71.6 $\pm$ 0.3*	1	76.9 $\pm$ 0.7*	65.1 $\pm$ 1.0*
2000	56.0 $\pm$ 1.2*	56.8 $\pm$ 0.4*	2	63.2 $\pm$ 0.6*	52.1 $\pm$ 0.6*
4000	48.9 $\pm$ 0.3*	-	4	60.7 $\pm$ 2.0*	-

<sup>a</sup> Values are expressed as means  $\pm$  S.D.

\* Significantly different from control at  $p < 0.05$



**Table 6. The effect of CCl<sub>4</sub> on LDH leakage in hepatocytes<sup>a</sup>**

Conc (mM) time (hr)	0	2.5	5	10	20
1	67.7 ± 3.1	288.7 ± 82.4*	361.0 ± 56.6*	332.3 ± 86.1*	228.8 ± 82.9*
2	74.3 ± 4.2	310.5 ± 95.5*	394.4 ± 80.5*	419.3 ± 122.4*	264.5 ± 113.9*
5	87.4 ± 5.9	352.7 ± 85.6*	464.0 ± 96.7*	476.1 ± 133.0*	307.2 ± 123.0*
12	104.3 ± 2.5	293.1 ± 97.6*	494.3 ± 120.8*	502.5 ± 194.0*	324.6 ± 106.4*
24	108.1 ± 18.6	310.4 ± 64.7*	361.0 ± 110.3*	457.1 ± 120.1*	303.6 ± 71.1*

<sup>a</sup> The values are expressed as mean(U/L) ± S.D.

\* Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

**Table 7. The effect of acetaminophen on LDH leakage and GSH content in hepatocytes<sup>a</sup>**

Concentration (mM)	Incubation timee (hrs)	LDH	GSH
0.5	24	96 ± 3.2	96.2 ± 7.3
	48	105 ± 5.3	93.8 ± 8.9
	72	107 ± 7.2	90.5 ± 11.9
1	24	95 ± 6.2	95.2 ± 15.6
	48	110 ± 7.2	85.3 ± 13.5
	72	123.2 ± 15.3	83.2 ± 9.2
2	24	96.9 ± 7.3	85.2 ± 5.2*
	48	141.1 ± 8.3*	50.8 ± 13.9*
	72	154.4 ± 10.2*	42.2 ± 20.5*

<sup>a</sup> The values are expressed as % of control values ± S.D.

\* Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

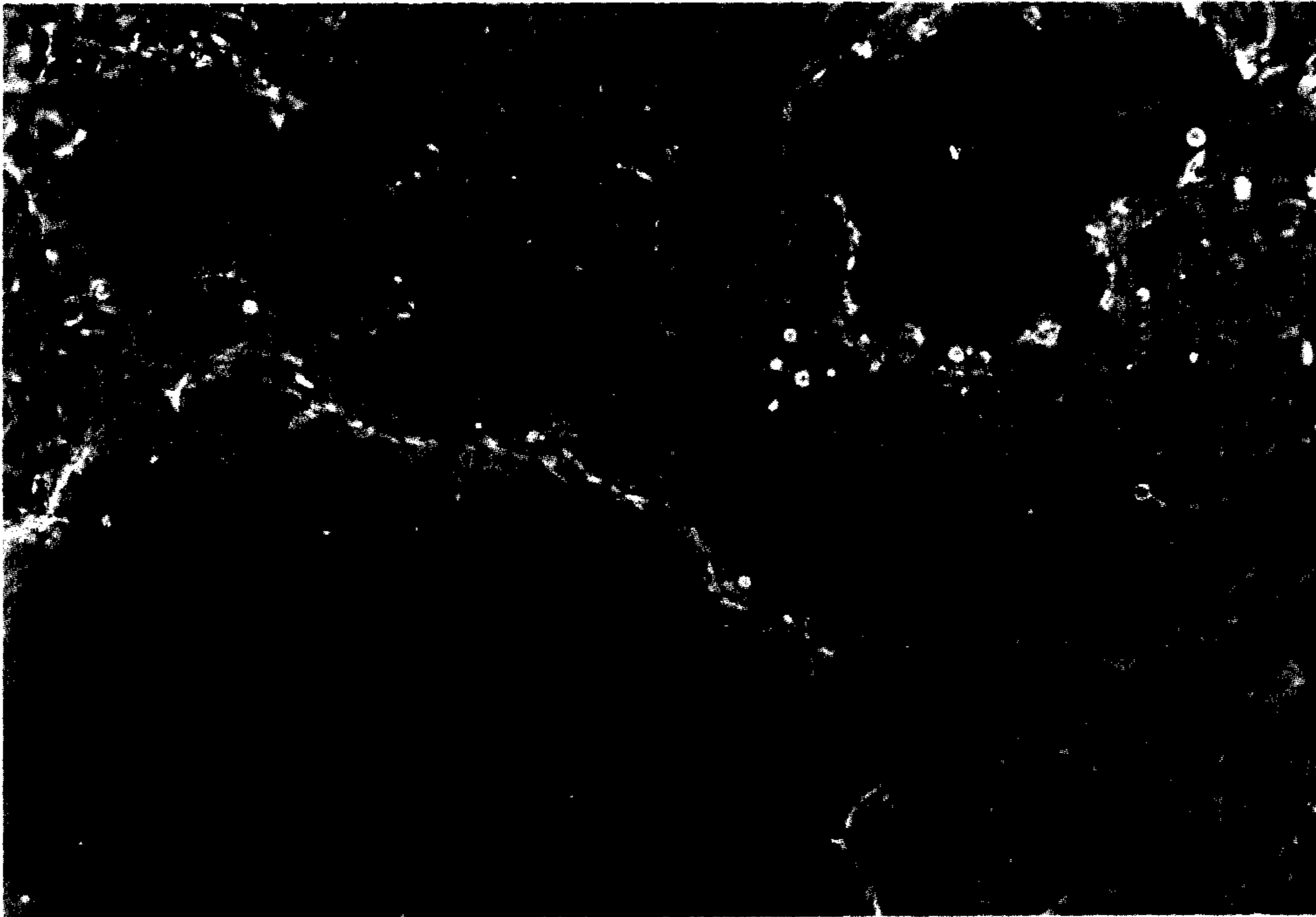
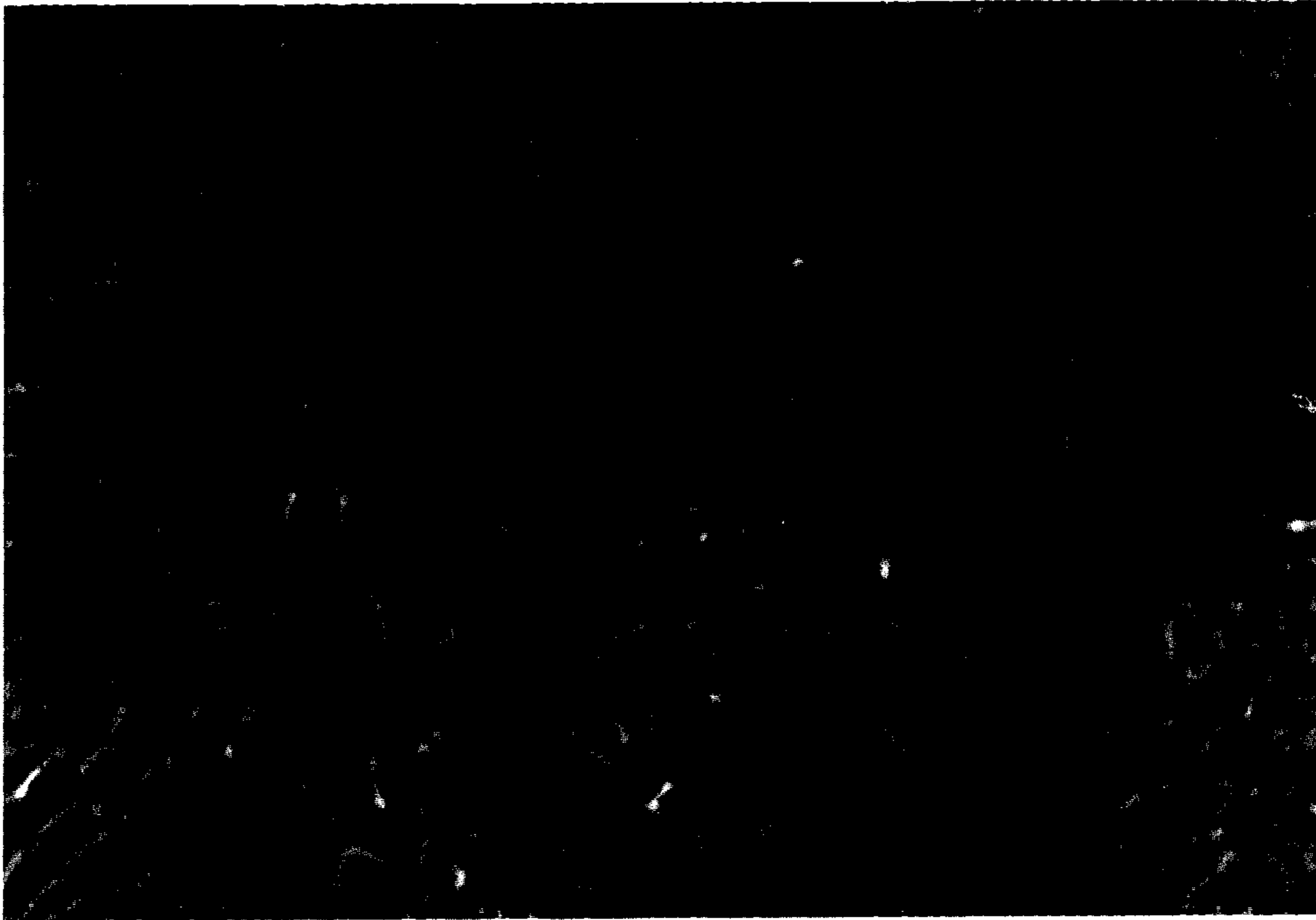


Fig. 1 Phase-contrast micrograph of LLC-PK<sub>1</sub> cells in culture. LLC-PK<sub>1</sub> cells are confluent and no gaps exist(A). Area where groups of cells appear out of focus are 'domes', first described by Hull et al(B)<sup>1)</sup>.

# 내용누락

# 내용누락

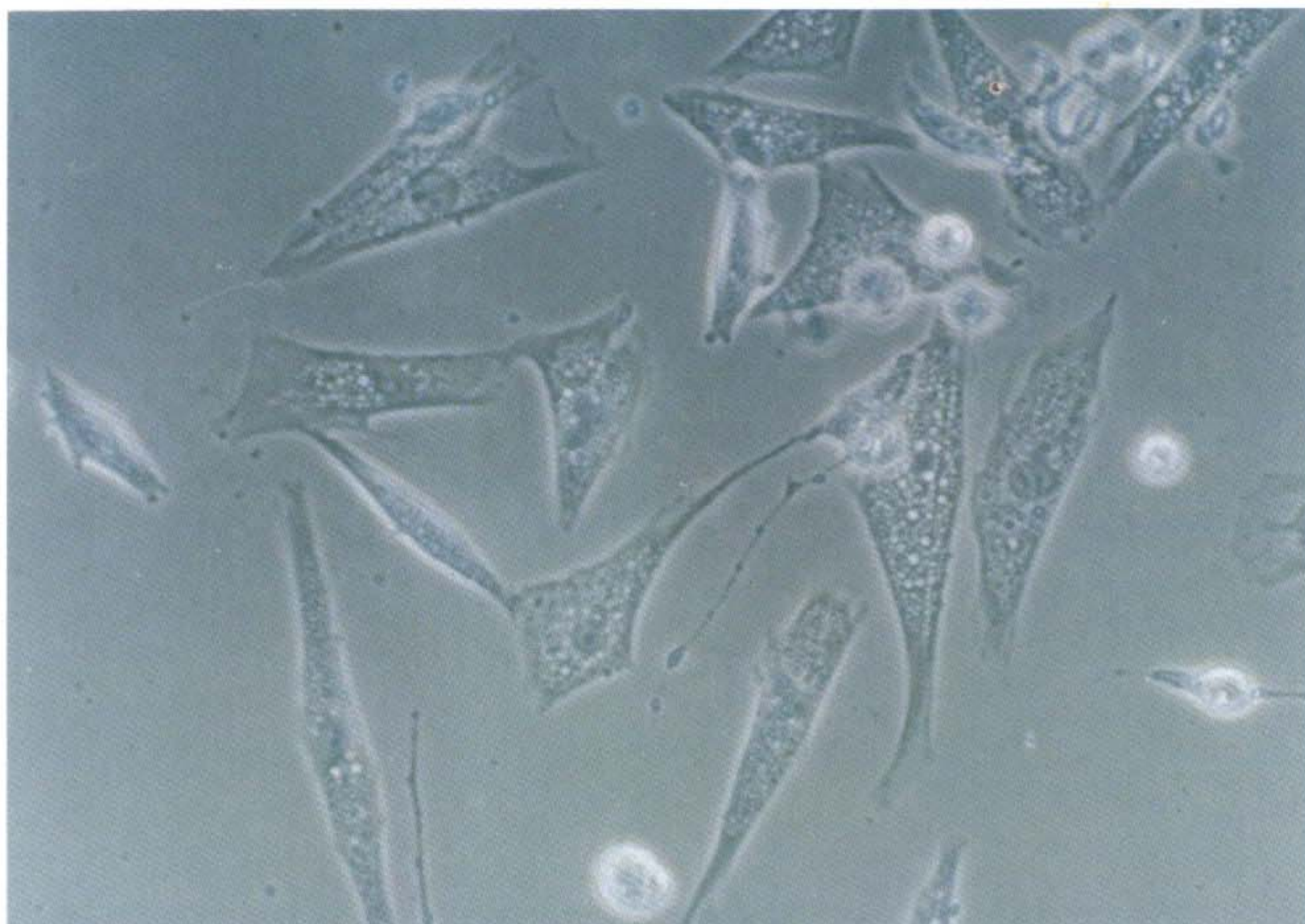


Fig. 5. Fibroblast treated with MAP(final concentration ; 5mM) for 24h from 13.5 day Long Evans embryo.



Fig. 6. Fibroblast treated with TMT(final concentration ; 16  $\mu$ M) for 24h from 13.5 day Long Evans embryo.

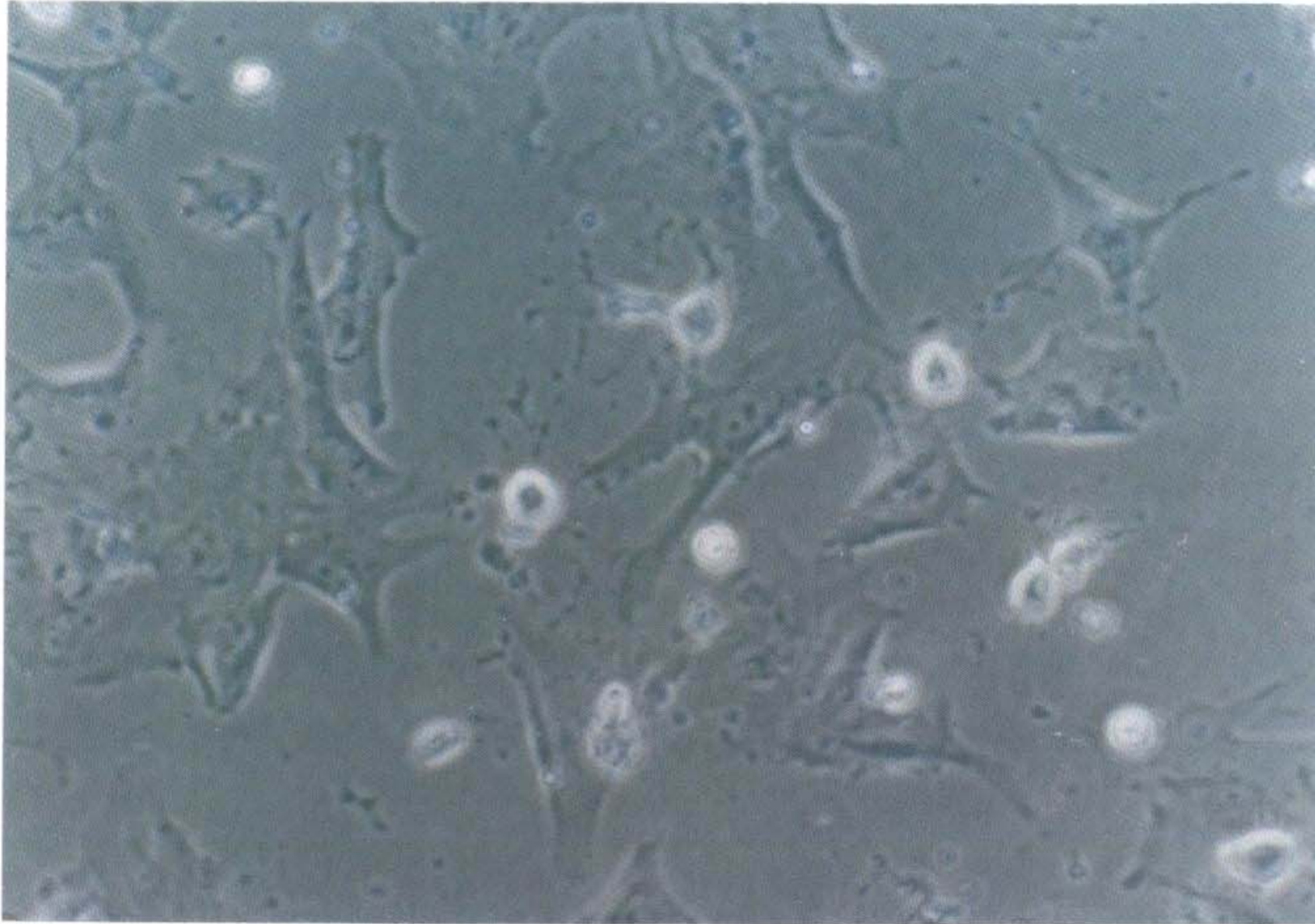


Fig. 7. Fibroblast treated with  $\text{CdCl}_2$ (final concentration ;  $4 \mu\text{M}$ ) for 24h from 13.5 day Long Evans embryo.

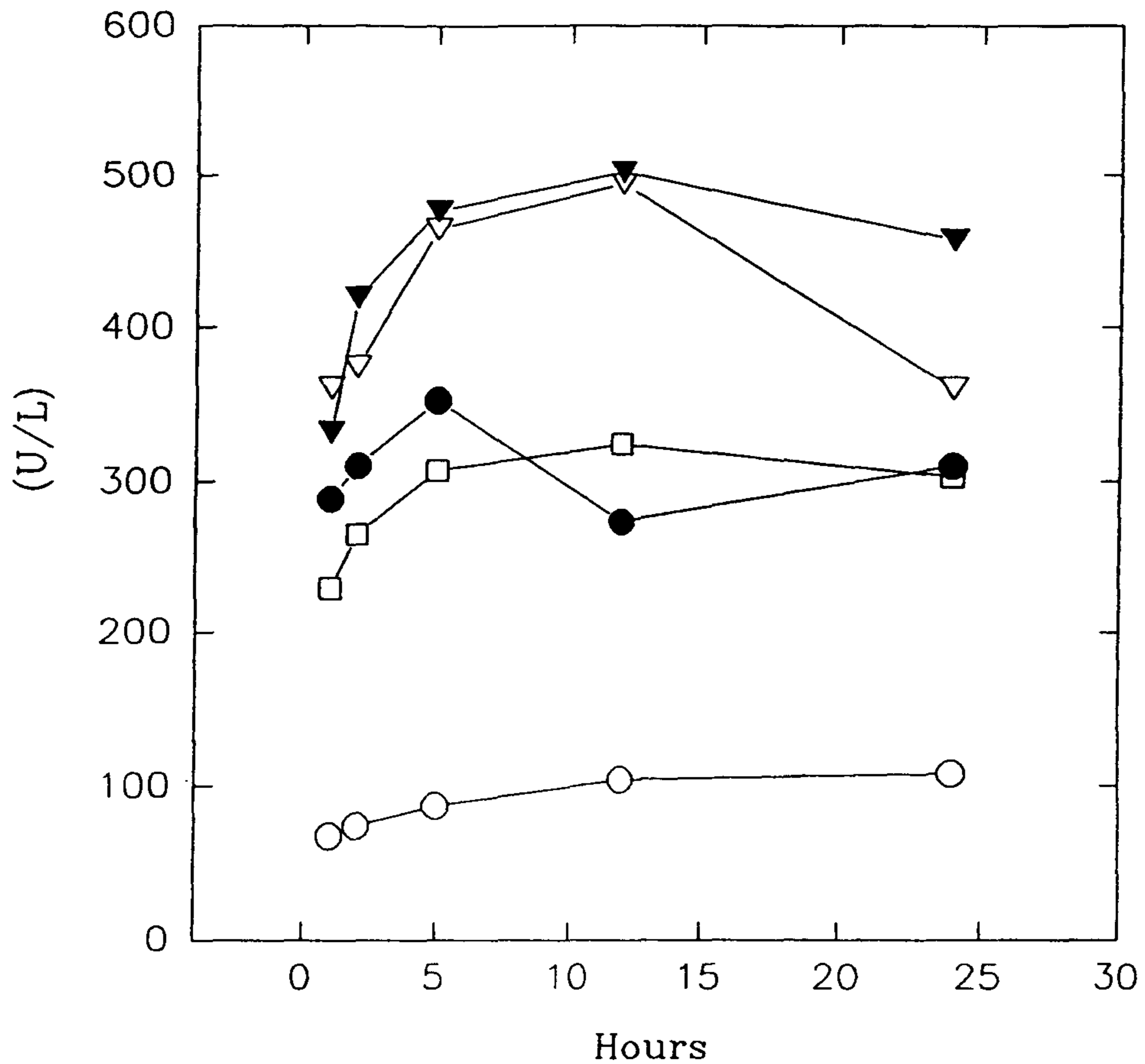


Figure 8. The effect of CCl<sub>4</sub> concentration and incubation time on LDH leakage in isolated rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated in the absence of (controls ○) and presence of CCl<sub>4</sub> in concentrations of 2.5 (●), 5 (▽), 10 (▼) and 20mM (□) for 1, 2, 5, 12 and 24hr. Values are expressed as mean ± S.D. of three cultures.



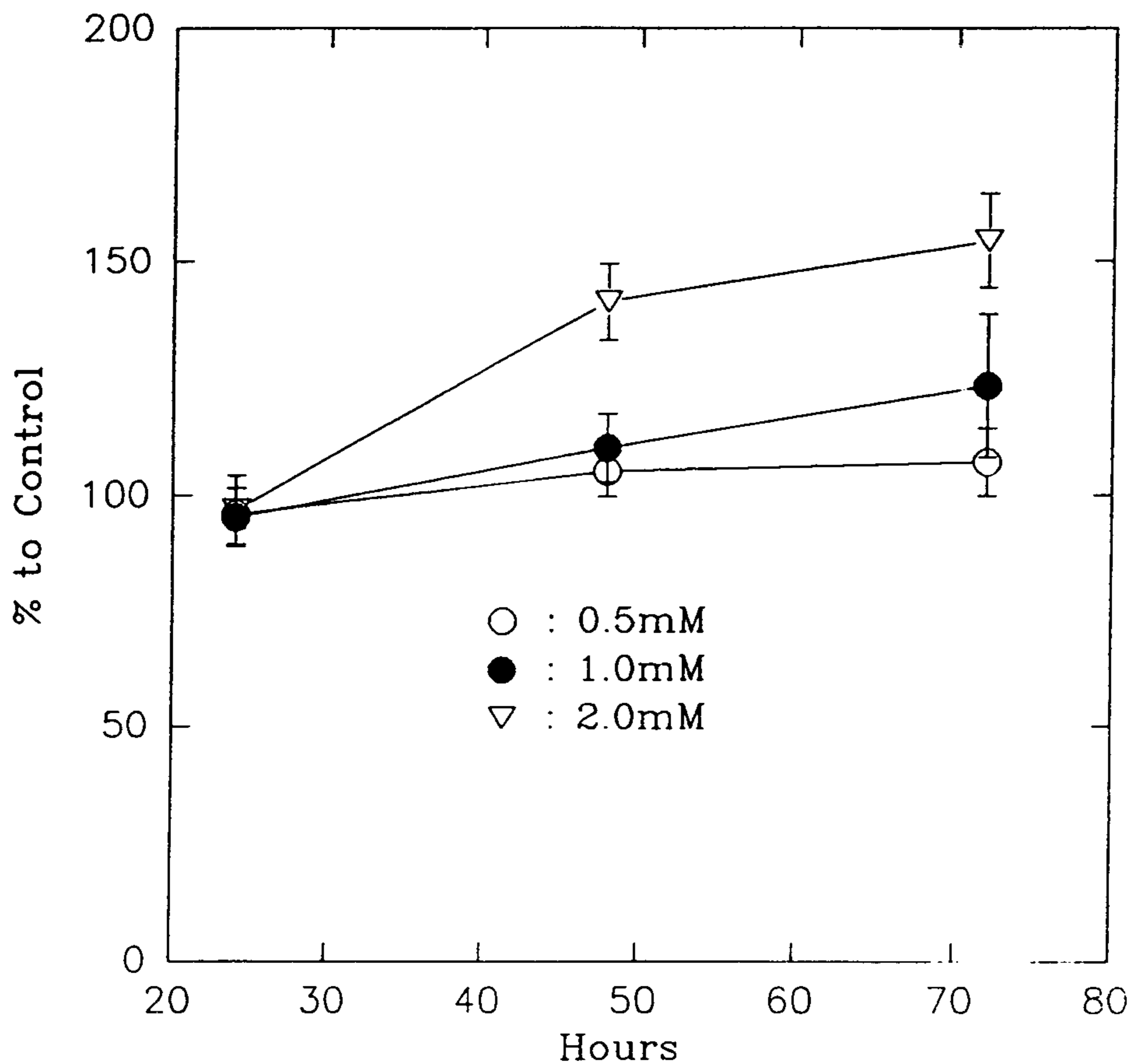


Figure 9. The effect of Acetaminophen concentration on LDH leakage in isolated rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated in the absence of (controls) and presence of acetaminophen in concentrations of 0.5 , 1, and 2mM for 24, 48 and 72hr. Values are expressed as % of control  $\pm$  S.D. of three cultures.

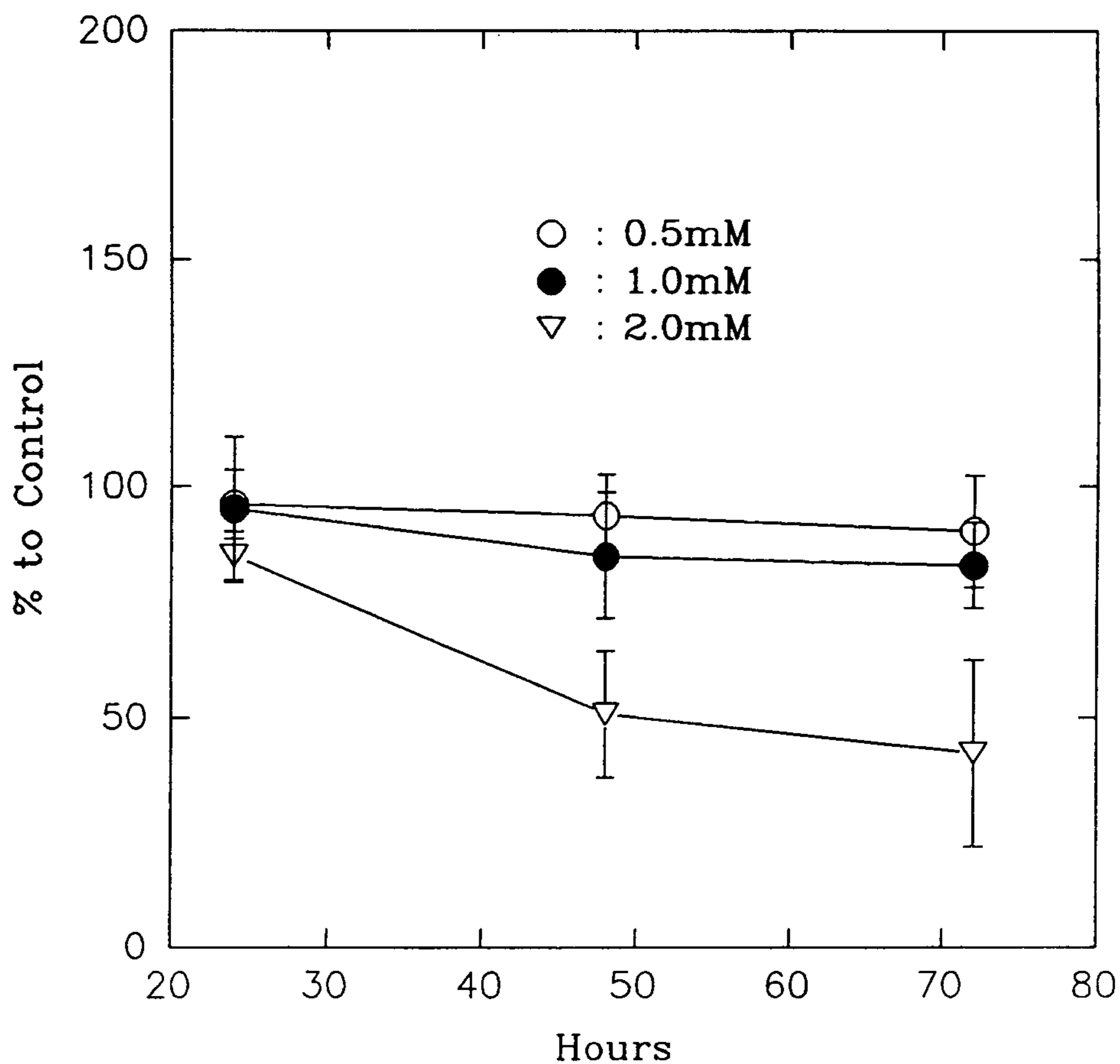


Figure 10. The effect of Acetaminophen concentration on GSH content in isolated rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated in the absence of (controls) and presence of acetaminophen in concentrations of 0.5, 1, and 2mM for 24, 48 and 72hr. Values are expressed as % of control  $\pm$  S.D. of three cultures.

*In Vitro* 독성시험법 개발 연구 (I)  
Studies on the Development of  
*In Vitro* Toxicity Tests (I)

*In Vitro* 국소독성시험법 개발에 관한 연구 (I)  
*In Vitro* Alternatives to Skin Irritation Test (I)

주관연구기관 : 국립보건안전연구원 독성부 특수독성과

과 학 기 술 처

## 제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “*In vitro* 독성시험법 개발 연구 .- *In vitro* 국소독성 시험법 개발에 관한 연구” 보고서로 제출합니다.

1995년    월    일

주관연구기관명 : 국립보건안전연구원

총괄연구책임자 : 문 화 회

연구책임자 : 김 부 영

보건연구관 : 김대병, 이선희

보건연구사 : 류종훈, 신대섭

이종권

연구원 : 류승열, 정경자

# 요 약 문

## I. 제 목

중 과 제 명 : 약효 및 독성시험지원연구

세부과제명 : *In vitro* 독성시험법 개발 연구

(*In vitro* 국소독성시험법 개발에 관한 연구)

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

### 1. 연구개발의 목적

현재까지 국소독성시험은 토끼, 기니피, 랫드등의 시험동물을 이용하여 실시하여 왔으나, 이러한 *in vivo* 시험시 인력과 경비가 많이 필요하며 시험기간도 상당히 요구되므로, 세포배양법을 이용한 *in vitro* 국소독성시험법을 개발하여, 피부에 접촉 가능성이 있는 화학물질의 안전성 평가 방법을 개발하고자 본 연구를 실시하였다.

### 2. 연구개발의 중요성

최근 산업의 발전에 따른 의약품, 식품첨가물, 농약, 화장품등과 새로운 합성물질 및 석유화학 물질등의 부산물에 의한 환경오염물질이 기하급수적으로 증가하고 있으나, 이러한 화학물질이 인체에 미치는 영향을 평가하는 연구는 부족한 상태이다. 따라서 이러한 화학물질들이 인체에 미치는 독성 정도를 평가하는 것은 중요한 과제가 되고 있으며, 그 중 피부에 접촉하여 국소독성을 나타내는 물질의 안전성을 평가하는 것은 상당히 중요한 문제로 대두되고 있다. 실제로 현

재까지의 안전성을 평가하는 방법인 *in vivo* 시험법은 다수의 동물을 이용하여 많은 시간과 노력, 경비를 필요로 하는 방법이다. 특히 국소독성시험은 시험동물로 토끼, 기니픽, 랫드등을 이용하고 있으며, 시험기간은 순화기간을 포함하여 총 4 주가 소요되는등 전체적으로 시간과 인력이 많이 소요됨에도 불구하고, 그 결과는 시험자의 주관에 따라 판정되는 단점을 가지고 있다. 따라서 시험동물을 이용하지 않는 *in vitro* 모델중에서 생체내의 대사관계를 고려하지 않고도 독성평가가 가능한 국소독성분야는 단기간내에 소수의 인력으로 객관적인 시험결과를 얻을 수 있는 *in vitro* 대체시험방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

### Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

사람피부세포를 이용하여 가장 민감하고 신속한 *in vitro* 검색법을 찾고자, 1차 배양한 human skin fibroblast를 이용하여 피부자극도를 평가할 수 있는 세포독성 시험방법을 검색하였다. 그 중 세포질내에 존재하는 효소인 lactate dehydrogenase (LDH)가 세포밖으로 누출되는 정도를 측정하고, mitochondria내의 succinate dehydrogenase를 측정하기 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] reduction test를 실시하였다. 이러한 세포독성 시험방법의 *in vitro* 대체 시험법으로의 가능성을 확인하기 위하여 *in vivo* 시험인 human patch test와 rabbit intradermal safety test를 실시하여 *in vivo*, *in vitro* 시험 결과의 상관성을 분석하여, *in vitro* 피부자극 대체시험법의 가능성을 알아보았다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. *In vitro* 세포 독성

10개의 계면활성제를 시험물질로하여 세포막 손상도와 미토콘드리아의 안정성을 측정하기 위하여, LDH assay와 MTT reduction test를 실시하였다. 각 시험물질을 fibroblast에 3 시간 동안 처리한후 LDH 양의 변화를 측정하였으며, 그 결과는 각 cell의 총 LDH 양을 100 %로 환산하였을때의 시험물질별, 농도별 LDH 양의 변화를 %로 표시하였다. 시험물질의 농도가 높아짐에 따라 LDH 유출양도 용량의존적으로 증가하였다. 또한 시험물질 처리 3 시간후 MTT assay의 결과를 normal fibroblast의 mitochondrial succinate dehydrogenase양을 100 %로 환산하였을 때, 시험물질에 따른 변화량을 %로 표시하였다. 계면활성제의 농도가 높아질수록, 세포가 시험물질에 의해 손상을 받아 mitochondrial dehydrogenase양이 용량의존적으로 감소하였다. 이렇게 하여 얻은 10개의 시험물질에 대한 용량반응곡선 으로부터 각 시험물질의 EC<sub>50</sub> 값을 구하였다. LDH assay와 MTT reduction test의 EC<sub>50</sub> 값을 비교하여 보면 LDH의 EC<sub>50</sub> 값이 MTT의 EC<sub>50</sub> 값보다 낮음을 알 수 있다. 즉 본 시험계에서 LDH assay 방법이 MTT test 보다 좀더 민감한 방법임을 알 수 있다.

### 2. *In vitro, in vivo* 시험의 상관관계

*In vivo* 시험인 human patch test와 rabbit intradermal safety test를 실시하여 시험물질별 판정 결과를 점수화하여 자극도를 구분하였

다. *in vivo* 시험 결과와 *in vitro* 시험 결과의 상관 관계를 알아보기 위하여 spearman's rank correlation coefficients를 구하였다. LDH와 human patch test와의 상관관계가 가장 좋았으며 ( $r=0.886$ ), MTT와 human patch test와의 상관관계는 LDH 보다 낮은 경향을 나타내었다. ( $r=0.753$ ). 이 결과는 본 실험에서 사용한 계면활성제의 경우 LDH assay가 MTT test보다 *in vivo* 시험 결과와 상관성이 좋은 것을 알 수 있다.

본 실험의 결과로 부터 LDH leakage assay와 MTT reduction test는 계면활성제의 상대적인 독성을 평가하는 방법으로 사용될 수 있으며, MTT test에서 감지하지 못한 독성도 LDH leakage assay 방법으로 독성 정도를 평가 할 수 있음을 알 수 있었다.



# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	10
<b>Chapter 2. Experimental methods</b> .....	14
Section 1. Test compound .....	14
Section 2. Methods .....	16
1. <i>In vitro</i> test	
2. <i>In vivo</i> test	
Section 3. Statistics .....	21
<b>Chapter 3. Results</b> .....	22
<b>Chapter 4. Discussion</b> .....	24
<b>Chapter 5. References</b> .....	26

# 목 차

제 1 장	서 론 .....	10
제 2 장	연구내용 및 방법 .....	14
제 1 절	시험물질 .....	14
제 2 절	시험방법 .....	16
1.	<i>In vitro</i> 시험	
2.	<i>In vivo</i> 시험	
제 3 절	결과분석 .....	21
제 3 장	연구결과 .....	22
제 4 장	고 찰 .....	24
제 5 장	참고문헌 .....	26

## List of Tables

- Table 1.** Cytotoxicity of surfactants on human fibroblast cells
- Table 2.** *In vitro* skin irritation potential of surfactants
- Table 3.** Correlation coefficient between *in vivo* and *in vitro* methods

## List of Figures

- Figure 1. Percentage of LDH leakage from fibroblasts after 3 hr exposure to surfactants
- Figure 2. Percentage of MTT mitochondrial reduction from fibroblasts after 3 hr exposure to surfactants
- Figure 3. Relationship of potency rank for LDH leakage and human patch test
- Figure 4. Relationship of potency rank for MTT reduction test and human patch test
- Figure 5. Photomicrographs of human skin fibroblasts  
(A) : Normal fibroblasts  
(B) : Fibroblasts exposed to surfactant

## 제 1 장 서 론

최근 산업의 발전에 따른 의약품, 식품첨가물, 농약, 화장품등과 같은 새로운 합성물질이 기하급수적으로 증가하고 있으며, 이러한 화학물질들이 인체에 미치는 독성정도를 평가하는 것은 중요한 과제가 되고 있다. 이러한 안전성 평가는 대부분 여러 종류의 실험동물을 대량으로 사용하는 *in vivo* 독성시험방법으로 수행되고 있으나, *in vivo* 시험은 많은 시간과 경비를 필요로하는등의 단점을 가지고 있으므로 실험동물을 이용하지 않는 *in vitro* 독성평가방법의 개발을 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>1,2)</sup> 일반적으로 독성시험 항목중에서 배양세포를 이용한 독성 평가로서 추정 가능한 항목은 급성독성, 피부자극성, 점막 자극성, 광독성, 알레르기성, 발암성, 최기형성, 신경독성 등이 있다. 이중에서 가장 진보된 분야이며 국제적으로도 인정된 방법론을 갖고 있는 연구분야는 발암성(변이원성)분야로 알려져 있다. 이 분야는 암에 대한 연구이므로 관심이 집중되는 분야이고, 연구비도 많이 투입되었던 결과라고 사료 된다. 그러나 *in vivo* 시험의 경우 생체내의 대사체에 의한 작용등 독성발현 기전이 *in vitro* 시험시 설명할 수 없는 많은 요인을 가지고 있으므로, 이의 한계성을 해결하지 못하고 있는 상태이다. 따라서 시험물질 자체를 평가하는면에서 보면 *in vitro* 시험시 생체내의 대사관계를 고려하지 않고도 독성평가가 가능한 국소 독성분야가 *in vitro* 대체시험법을 개발할수있는 가능성이 가장 높은 분야라고 할수있다. 그러나 현재까지 사람피부에 대한 피부자극도를 평가할수 있는 국제적으로 승인된 *in vitro* 방법은 없는 상태이며<sup>2)</sup>, 유럽공동체에서는 *in vitro* 대체 시험법이 가능한 경우에 있어

동물을 사용한 화장품 안전성 평가를 1998. 1. 1 까지만 실시할것을 제안하고 있다.<sup>3)</sup> 따라서 여러종류의 화학물질에 대한 피부자극도를 평가할수 있는 간단하며 재현성이 있는 *in vitro* 대체시험법 개발의 필요성이 요구되고 있다.

현재까지 국소독성시험으로 Draize법이<sup>4)</sup> 널리 이용되고 있다. 이 방법은 시험 물질을 피부에 직접 처리하여 피부를 구성하는 세포들에 물리, 화학적 장해를 발생시켜 시험물질에 의한 홍반, 가피, 부종등의 반응을 점수화하여 피부자극도를 평가하는 방법이다. 이 방법은 시간, 비용, 인력등이 많이 요구되며, 결과의 판정에서 시험자의 주관적 감각에 의존하여야 하며, 동물간에 개체차가 커서 재현성이 떨어지는등의 문제점이 있어 사람에게 대한 외삽조건으로서 예지성이 낮은 단점을 가지고 있다. 그러므로, 독성시험법중에서 시험물질을 직접 피부에 적용시켜 생체내에서 대사되지 않는 상태에서 작용한다는 점과, 결과 판정에 있어 보편 타당성을 갖는 객관성을 기대할 수 있으며, 경제적인 방법임을 고려해 보면, *in vivo* 독성시험법의 대체법으로 가장 가능성이 있는 분야가 국소 독성시험법이라고 할수있을 것이다. 또한 세포배양법을 이용한 *in vivo* 시험법은 동물 시험에서 알 수 없었던 독성 발현의 기전 연구에 있어서도 큰역할을 해오고 있으며,<sup>5)</sup> 특히 피부세포에 대한 시험물질의 직접적인 장해를 세포막의 파괴나 단백질 변성등의 세포의 기본적 기능에 대한 장해등으로 평가하여 배양세포를 이용한 안전성 평가 방법으로서 확립될 가능성이 가장 기대되는 분야이다.

배양세포를 이용한 세포독성시험법은 작용원리에 따라 세포의 증식능이나 접착능을 보는 방법<sup>6-9)</sup>, 세포막의 정상성을 보는 방법<sup>10-13)</sup>, 세포의 대사능을 보는 방법<sup>14-16)</sup> 등이 있다. 그중 세포의 증식이나 접

착능을 보는 방법으로 세포의 총 protein 양을 측정하는 시험이 이루어지고 있다. Marinovich등에<sup>17)</sup> 의하면 Murine epidermal cell line 을 이용하여 계면활성제 처리후 총 protein 양과 protein 합성저해능을 측정하였으며, 이를 세포손상도 측정시험인 lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay 와의 상관관계를 분석하였다. 그 결과 총 protein 양과 LDH assay 의 상관관계가  $r=0.860$  으로 protein 합성저해능과 LDH assay 상관관계보다 ( $r=0.763$ ) 좋게 나타나, *in vitro* 방법상의 상관성은 좋은것으로 나타났으며, Lee등의<sup>3)</sup> 보고에서도 세포의 protein 양과 neutral red uptake, MTT test와의 상관관계가 좋은것으로 나타났다. 그러나 Kortig등의 보고에 의하면<sup>1)</sup> 세포증식능 시험으로 총 protein 양의 변화를 측정하는 방법과 실험동물을 이용한 *in vivo* 시험과의 유의적인 상관성은 나타나지 않았다. 세포막 손상도를 관찰하는 시험으로는 LDH assay 와 세포의 viability를 측정하는 MTT reduction test, neutral red uptake 시험이 실시되고 있다. 그중 neutral red 시험결과가 human의 *in vivo* 시험과 상관관계가 좋은것으로 나타났으며<sup>1)</sup> Robert등의 보고에 의하면 rabbit cornea .cell 에서 LDH assay와 세포막 안정성을 측정하는 marker 로서 세포핵을 염색하는 propidium iodide 염색법을 실시한 결과 두 방법 모두 시간 변화에 따른 독성을 평가하는데 유용한 방법으로 사용될수 있었다. 또한 계면활성제중에서도 시험물질별, 노출시간별로 세포독성방법의 민감도가 서로 다르다고 보고하고있다. 본 실험실의 이전의 보고서에서도<sup>18)</sup>, chinese hamster lung cells을 이용하여 세포 생존수를 모니터하기 위한 MTT assay와 배양세포의 증식에 따라 형성된 colony를 염색하여 측정하는 colony forming assay를 실시하여 두 방법의 *in vitro* 시

험법의 가능성을 제시한바 있다

따라서 본시험에서는 시험물질로 계면활성제를 선택하여 세포막 손상도를 측정하며 *in vivo* 시험 결과와 상관성도 좋다고 보고된 LDH leakage assay와 mitochondria의 안전성을 측정하기 위하여 mitochondrial succinate dehydrogenase 효소 활성을 측정하는 MTT reduction test를 실시하였다. 이러한 *in vitro* 시험결과의 대체가능성을 확인하기 위하여 *in vivo* 시험으로 human patch test와, 토끼를 이용한 intradermal safety test를 실시하였다. 동물을 이용한 피부 자극 시험은 Draize 법을 이용한 1차 피부자극시험을 실시하는 것이 일반적이지만 human patch test의 결과를 확인하는 차원에서 간단하고 오차가 적은 본 시험법을 선택하였다.

시험물질로는 일반적으로 피부자극이 있는것으로 알려져 있는 계면활성제중 비이온 2 종, 음이온 2 종, 양이온 4 종, 양성이온 2 종 등 총 10 종을 선택하여 이들 시험물질에 대한 *in vitro* 시험법을 연구하였다. 시험에 사용한 세포로는 피부의 dermis에 많이 존재하며, human skin의 성질을 가지고 있고, *in vitro* 1차 배양이 용이한 human skin fibroblast를 선택하였다.

본 시험에서는 1차 배양한 human skin fibroblast를 이용한 *in vitro* 시험과 사람의 *in vivo* 시험결과의 상관성을 분석하여 *in vitro* 대체시험을 개발하고자 하였다.



## 제 2 장 연구내용 및 방법

### 제 1 절 시료

#### 1. 시험물질

시험물질로 실제 제품에 사용되는 양이온, 음이온, 양성이온 및 비이온계의 계면활성제를 선택하였으며, 시험물질은 Hank's balanced salt solution 또는 culture medium에 녹인 후 농도별로 희석하여 사용하였다.

Code	Name	Class
A	Tween 60	Nonionic
B	Triton X - 100	Nonionic
C	$\alpha$ -Olefin sulfate	Anionic
D	Ammonium laureth sulfate	Anionic
E	Behenyl trimethyl ammonium chloride	Cationic
F	Distearyl dimethyl ammonium chloride	Cationic
G	Stearyl trimethyl ammonium chloride	Cationic
H	Benzalkonium chloride	Cationic
I	Cocoamidopropyl betaine	Amphoteric
J	Cocoamphocarboxyglycinate	Amphoteric

## 2 시약 및 기구

### 가)시약

Name	Company
Collagenase	Sigma, USA
Dispase	Sigma, USA
Phosphate Buffer Saline	Gibco. BRL, USA
Minimal Essential Medium	Gibco. BRL, USA
Nutrient mixture F-12	Gibco. BRL, USA
Fetal bovine serum	Gibco. BRL, USA
Sodium bicarbonate	Sigma, USA
Penicilline-Streptomycine	Gibco. BRL, USA
Trypsin	Gibco. BRL, USA
Lactate dehydrogenase	Sigma, USA
MTT	Sigma, USA
Dimethyl sulfoxide(DMSO)	Sigma, USA

### 나)장비

Name	Company
CO <sub>2</sub> incubator	Vision Sci., Korea
Inverted microscope	Olympus, Japan
Stereo microscope	Olympus, Japan
Illuminator	Olympus, Japan
Clean bench	Daerim indus. Co., Korea
Table top centrifuge	Amsco, USA
Autoclave	Amsco, USA
UV-spectrophotometer	Milton Roy
Micro plate reader	Molecular Devices, USA

## 다)기구

- 부검세트
- Tissue culture flask (25cm<sup>3</sup>, 75cm<sup>3</sup>)
- 24 wells sterile multiple well plate (flat bottom)
- 96 wells sterile multiple well plate (flat bottom)
- Multiple channel pipette (200 $\mu$ l, 1ml)

## 제 2 절 시험방법

### 1. *In vitro* 시험

#### 1) Primary culture of human skin fibroblast

신생아의 dermal foreskin explant로 부터 fibroblast를 분리하였다. clean bench안에 37 °C로 pre-warming된 1% penicillin-streptomycin 을 포함한 phosphate buffered saline (pH 7.4) 과 배지를 10개의 petridish에 15 ml씩 넣어 둔다. 1일이내의 신선한 조직을 미리 준비한 phosphate buffered saline으로 3-4회 세척한다. forcep으로 lipid를 제거하고 fine scissor로 조직을 잘게 자른후 (0.5 cm<sup>2</sup>) phosphate buffered saline과 배지로 약 5 회정도 깨끗이 세척하여 조직 표면의 오염원들을 제거한다. dermis만을 분리하기 위하여 조직을 collagenase (1.0mg/ml), dispase (2.0mg/ml) 약 5 ml에 넣어 둔다. 이 효소액에서 37 °C로 1시간 동안 반응시킨후 현미경을 이용하여 forcep 으로 epidermis와 dermis를 분리하여 fibroblast가 존재하는 dermis만

을 취하였다. 분리된 조직 표면의 collagenase와 dispase를 제거하기 위하여 조직을 다시 phosphate buffered saline으로 수회 세척한다. dermis를 0.05% trypsin 용액에서 20분간 처리한다. 이때 trypsin의 농도와 처리 시간에 따라 분리된 세포가 죽을수도 있으므로 낮은 농도에서 단시간에 처리하는 것이 좋다. trypsin 반응이 끝난후 동량의 배지를 넣고 2-3회 pipetting 한후 15 ml centrifuge tube 에 담아 원심 분리하여 세포를 얻었다. 이렇게 분리된 세포를 nutrient mixture F-12, sodium bicarbonate, penicillin-streptomycin, 10 % fetal bovine serum이 보충된 minimal essential medium에서 약 1주일간 배양하였다. 세포는 3회 계대 배양한 것까지만 실험에 사용하였다.

LDH assay를 위하여  $10^5$  cells/ml를 24 well tissue culture plate 에, MTT reduction test를 위하여 96 well tissue culture plate에 seeding하여 24시간 동안 배양한후 실험에 사용하였다.

## 2) LDH Leakage assay

각 이온계별 계면활성제에 의한 세포막 손상 정도를 LDH leakage assay로 측정하였다. 실험하기 하루 전에 24 well에 seeding한후 실험에 사용하였다. 실험전에 배지를 모두 제거하였으며, 이때 pipette에 의해 세포가 손상받을 수 있으므로 조심스럽게 제거해야 한다. HBSS buffer를 용매로한 계면활성제를 각 농도별로 세포에 처리한다. 시험물질 처리 3 시간후 buffer 50  $\mu$ l를 취하여 30  $^{\circ}$ C 로 pre-warming된

lactate와 NAD를 포함한 sigma assay kit 용액에 넣어 반응시킨다. 세포내에서 세포외로 유출되어 나온 LDH가 lactate, NAD와 반응하여 pyruvate와 NADH가 되며 이때 생성되는 NADH 양의 변화로 LDH

leakage 정도를 측정하였다. LDH leakage는 UV-spectrophotometer를 사용하여 wavelength 340 nm에서 1분간 UV absorbance 변화로 측정하였다. 각 세포별 LDH 총량을 측정하기 위하여 충분한 양의 triton X-100을 가하고 pipetting하여 모든 세포막을 파괴한후 각 세포의 총 LDH 양을 측정하였다. 결과는 각 cell의 LDH 총량에 대한 퍼센트로 표시하였다<sup>20)</sup>.

### 3) MTT reduction test

MTT reduction test는 mitochondrial succinate dehydrogenase의 효소활성을 측정하여 mitochondria의 안정성과 세포 생존율을 검색하는 시험법이다. 실험하기 하루전에 fibroblast를 96 well plate에 seeding하여 배양한다. seeding할때 각 well에 일정한 수의 세포가 분포할 수 있도록 잘 혼합하여 seeding하여야 한다. 시험물질은 각 농도별로 배지를 이용하여 희석후 37 °C로 warming한다. 각 well의 배지를 모두 제거한 후 각 농도별로 시험물질 200  $\mu$ l를 가한다. 시험물질 처리 3 시간후 새로운 배지로 교체한후 MTT (2mg/ml) 50 $\mu$ l를 가하여 37 °C에서 3 시간 동안 반응 시킨다. 배지 220  $\mu$ l를 제거하고 crystal violet 30  $\mu$ l 만을 남긴다. 여기에 crystal formazan을 녹이기 위해 150  $\mu$ l의 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 약 5분간 shaking한후 microplate reader를 이용하여 540 nm 에서 optical density를 측정하였다. 시험결과는 정상 세포에 대한 퍼센트로 표시하였다<sup>21)</sup>

## 2. *In vivo* 시험

1) Human patch test

20-35 세의 피부질환이 없는 건강한 성인지원자 30명을 대상으로 patch test를 실시하였다. 시험하기전에 지원자의등을 70 % ethanol로 세척 건조한다. 시험물질을 1 %로 희석한후 Haye's chamber에 5 ul 씩 적하한후 지원자의 등에 첩포하고 자극이 없는 테이프로 고정시킨다. 48시간동안 폐쇄첩포하고, 첩포 제거후에 marking pen으로 시험 부위를 표시하고 30 분, 24 시간에 피부반응을 평가하였다. 피부자극 반응은 ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group) 의 규정에 따라 판정하였다<sup>22)</sup>.

판정기준

기 호	판 정 기 준
±	의심스러운 또는 미미한 홍반등
+	약한반응(소수포를 동반하지 않음), 홍반, 구진
++	중정도 반응(소수포를 동반함), 홍반, 구진, 소수포
+++	강한 반응, 대수포 반응
-	음성

판정

Score	Finding
0 - 0.9	slight irritant
1.0 - 2.9	mild irritant
3.0 - 4.9	moderate irritant
5.0	severe irritant

2) Rabbit intradermal safety test

건강한 토끼를 선택하여 1주일간 순화시키고 시험당일 등피부가

얇고 두께가 일정한 동물을 제모한다. Evans blue 1 % 생리식염수 용액 4ml/kg을 귀의 정맥으로 서서히 주입한뒤 곧바로 등부위에 각 계면활성제 (1 %) 0.1ml를 피내 주사한다. 피내주사 1시간뒤에 등피부를 박리하고 색소 누출 반응과 경결반응을 관찰한다.

1) Blue area (B.A.)의 판정 기준

Grade	Blue area (diameter,mm)
0	색소 누출 반응이 관찰되지 않음.
0.2	색소 누출 반응의 흔적이 관찰됨.
0.5	- 3.0
1.0	3.1 - 5.0
1.5	5.1 - 7.0
2.0	7.1 - 9.0
2.5	9.1 - 11.0
3.0	11.1 - 13.0
3.5	13.1 - 15.0
4.0	15.1 - 17.0
4.5	17.1 - 19.0
5.0	19.0 -

$$* B. A. = \frac{\text{장경} + \text{단경}}{2}$$

2) Non blued area (N.A.)의 판정 기준

Grade	Non blued area (mm)
+ 0.2	- 2.0
+ 0.5	2.1 - 4.0
+ 1.0	4.1 -

$$* N. A. = \frac{\text{장경} + \text{단경}}{2}$$

3) Color intensity (C.I.)의 판정 기준

Grade	Color intensity (mm)
- 0.5	light blue
0	normal
+ 0.5	deep blue

Total injured area (TIA) = BA + NA + CI

#### 4) 판정

TIA	Finding
- 0.9	non irritant (무자극)
1.0 - 1.9	slight irritant (경자극)
2.0 - 2.9	mild irritant (중자극)
3.0 이상	severe irritant (강자극)

### 3. 결과 분석

시험물질의 각 농도별 세포독성 시험 결과를 log-dose response curve로 표시하고 각 시험물질별 EC<sub>50</sub>값을 구하였다. EC<sub>50</sub>값은 Litchfield & Wilcoxon I 방법으로 계산하였으며, 그 값으로부터 각 물질별 세포독성을 비교하였다. *In vitro* 시험 결과로 EC<sub>50</sub>값과 *In vivo* 시험결과로 피부자극도를 계산한 후, 이들의 상관관계를 Spearman's rank correlation analysis로 분석하였다.



## 제 3 장 결 과

### 1. *In vitro* 세포 독성

#### 1) LDH leakage assay

Fibroblast에 이온계별 계면활성제를 처리하였을 때의 세포막 손상도를 독성을 측정하고자 LDH leakage assay를 실시하였다. 시험물질을 세포에 처리하였을 때 일차적으로 세포막에 손상이 나타나며 이때 세포내에 존재하는 효소인 LDH가 세포내에서 세포밖으로 유출되어 세포막 손상정도를 측정할 수 있다. 각 시험물질을 fibroblast에 3시간 동안 처리한 후 LDH양의 변화를 측정하였으며 그 결과를 각 well에 있는 cell의 최대 LDH양을 100 %로 환산했을 때 각 이온계별, 시험물질 농도별 LDH 양의 변화를 퍼센트로 표시하였다. 10개의 시험물질 모두 농도가 높아짐에 따라 LDH의 유출되는 양도 용량의존적으로 증가하였다. (Fig.1) log-dose graph로 부터 각 시험물질별 50% effective concentration ( $EC_{50}$ )을 구하였다. 이온계별로 구분하여 보면 비이온계 계면활성제가 가장 높은 농도에서 세포독성을 나타냈으며, 양성이온, 비이온계 계면활성제가 그 다음 순서의  $EC_{50}$  값을 나타냈고, 양이온계 계면활성제가 가장 낮은 농도에서 세포독성을 나타내는 경향을 나타냈다. 이 결과는 일반적으로 알려져 있는 계면활성제의 피부 자극도와 비슷한 경향을 나타냈다.

#### 2) MTT reduction test

계면활성제에 의한 세포의 생존율을 측정하고자 세포내의

mitochondrial succinate dehydrogenase 효소 활성을 MTT reduction test로 측정하였다, 시험물질 처리 3시간 후에 MTT test를 실시하였으며, 그 결과는 normal fibroblast의 enzyme의 양을 100 %로 환산하였을때 시험물질에 따른 변화량을 퍼센트로 표시하였다. 계면활성제의 농도가 높아질수록 세포가 시험물질에 의해 손상을 받아 세포내에 존재하는 효소양은 용량의존적으로 감소하였다 (Fig.2). 이렇게 얻은 10개의 시험물질에 대한 용량 반응 곡선으로 부터 개개의 시험물질의 EC<sub>50</sub> 값을 구하였다. 이온계별로 EC<sub>50</sub> 값을 비교해 보면 양이온 < 음이온 ≍ 양성이온 < 비이온 순서로 LDH assay 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 같은 이온계의 물질중에서도 계면활성제에 따라 세포독성이 다르므로 물질별로 지속적인 실험데이터가 축적되어야 할것이라고 사료된다.

### 3) 세포독성 시험 비교

LDH leakage assay와 MTT reduction test 시험결과 EC<sub>50</sub>값을 Table 1.에 표시하였다. 시험 방법별로 EC<sub>50</sub>값을 비교해 보면 Tween 60과 Distearyl dimethyl ammonium chloride를 제외한 대부분의 물질에서 LDH assay의 EC<sub>50</sub> 값이 MTT test의 EC<sub>50</sub> 값보다 낮음을 알 수 있었다. 즉 본시험계에서 LDH assay 방법이 MTT test보다 좀더 민감한 방법임을 알수있다.

## 2. *In vivo* 시험

본시험에서 선택한 *in vitro* 시험방법이 *in vivo* 피부자극시험을

대체 할수있는가를 확인하기 위해 *in vivo* 시험으로 human patch test와 rabbit intradermal safety test를 실시하였다. 건강한 지원자의 등에 시험물질을 2 일동안 부착한후 피부자극도를 평가한 결과가 Table 2, Column 1 에 표시되어있다. 이온계별로 피부자극도를 비교하여 보면 비이온 < 음이온 ≒ 양성이온 < 양이온 순서로 나타나 이전의 다른 보고와 일치하였다. human patch test의 시험결과를 확인하기 위하여 rabbit intradermal safety test를 실시한 결과 (Table 1, Column 2) human patch test와 동일한 경향을 나타내었다.

### 3. *In vitro, in vivo* 시험의 상관관계

*In vitro* 시험결과와 *in vivo* 시험결과와의 상관관계를 Spearman's rank correlation 방법으로 분석하여, 시험방법별로 시험물질에 대한 rank를 그래프로 나타냈다. LDH assay와 human patch test와의 상관관계는 Fig 3. 에서 보는바와 같이  $r=0.886$  으로 상관성이 좋은 것으로 나타났다. 즉 본시험계에서 MTT test와 human patch test와의 상관계수는  $r=0.757$  (Fig 4.) 로서 나타났으나 LDH와 human patch test와의 상관성 보다는 낮은 경향을 나타냈다. 이결과는 본시험에서 사용한 계면활성제의 경우 LDH assay가 MTT test보다 좀더 유용한 방법으로 사료된다.

## 제 4 장 고 찰

여러가지 *in vitro* 독성시험법의 *in vivo* 피부자극시험의 대체시험법으로서의 가능성에 대한 연구가 상당히 진행되고 있다. 그러나 시

험물질 및 시험방법에 따라 *in vitro* 시험결과가 상이하므로 지속적인 시험 데이터가 축적되어야 할 것으로 사료된다. 본시험에서는 *in vitro* 세포독성시험 방법중 *in vivo* 피부자극시험의 대체 시험법으로서의 가능성을 시사해주는 LDH, MTT assay 방법을 선택하였다.<sup>1,3,10)</sup> 본 시험의 결과로부터 LDH assay가 MTT test 보다 EC<sub>50</sub>값이 작아 좀더 민감한 방법으로 나타났다. 이것은 계면활성제가 세포에 접촉하였을때 세포막에 손상을 나타낸후 세포내 소기관에 영향을 미쳐 세포내에 손상을 주기 때문에, 세포막 손상에 의해 세포내에서 세포밖으로 유출되어 나오는 lactate dehydrogenase의 양을 측정하는 LDH 방법이, 세포내의 mitochondria의 안정성을 측정하여 세포내 소기관의 독성정도를 규명하는 MTT 방법보다 더욱 민감한 것으로 사료된다. 또한 LDH assay 와 human patch test 와의 상관성이 MTT test 와 *in vivo* 시험의 상관성보다 더 좋게 나타났다. 이것은 LDH assay가 *in vivo* 시험과 상관성이 좋다는 이전의 보고<sup>10)</sup>와 일치하며, 이러한 비특이적이고 민감한 방법인 LDH assay법이 점막에 작용하는 물질의 독성을 평가하는데 사용될 수 있음을 나타내 주고 있다.

본 실험의 결과로 부터 LDH leakage assay와 MTT reduction test는 계면활성제의 상대적인 독성을 평가하는 방법으로 사용될 수 있으며, MTT test에서 감지하지 못한 독성도 LDH leakage assay 방법으로 독성 정도를 평가 할 수 있다.

## 제 5 장 참고문헌

1. Hans, C.K., Thomas, H., Anton, H., Martina, K., Thomas, A., and Howard, I.M., : Discrimination of the irritancy potencial of surfactants *in vitro* by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts : correlation with *in vivo* data from a soap chamber assay. J. Dermatol. Sci., 7, 119-129, 1994.
2. William, K-P., Sambele, M., and Siegers, C-P. : Quantative *in vitro* assessment of N-alkyl sulphate induced cytotoxicity in human keratinocytes(HaCaT) comparison with *in vivo* human irritation tests. Br. J. of Dermatol., 130, 18-23, 1994.
3. Lee, M.H., Kim, C.D., and Ahn, H.J. : Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by neutral red uptake assay, MTT assay and cell protein assay. Korean J. Toxicol., 10(2), 215-220, 1994.
4. Draize, J.H., Woodrard, G. and Calverg, H.O. : Methods for the study of irritation and toxicity of substance applied topically to the skin and mucous membrane. J. Pharmacol. Exp. The., 83, 377-390, 1994.
5. Montesane, R. : Long-term and short-term assays for carcinogen: A critical appraisal, IARC Scientific Puiblication, No 83, Lyon, 1986.
6. Schlatter, C. and Reinhart, A. : Acute irritation tests in risk assasment. Fd. Chem. Toxic., 23(2), 145-148, 1985.
7. Northroot, H., Yackovich, F., Demetrulias, J., Gacula, M. and Heinze, J. E. : Evaluation of an *in vitro* celll toxicity test using rabbit corneal cells to predict the eye irritation potential of surfactants. Toxicology letter, 14, 207-212, 1982.
8. Balls, M. and Horner, S. A. : The frame interlaboratory programme on *in vitro* cytotoxicology. Fd. Chem.Toxi., 23(2), 209-213, 1985.

9. Shopsis, C. and Eng, B. : Rapid cytotoxicity testing using a semi-automated protein determination on cultured cells. *Toxicology letter.*, 26, 1-8, 1985.
- 10 Kemp, R. B., Meredith, R. W. J., Gamble, S. and Frost, M. : A rapid cell culture technique for assaying the toxicity of detergent-based products *in vitro* as a possible for eye irritancy *in vivo*. *Cytobios.*, 36, 153-155, 1983.
11. Scaife, M. C. : An investigation of detergent action on cell *in vitro* and possible correlation with *in vivo* data. *Inter. J. of Cos. Sci.*, 4, 179-193, 1982.
12. Borenfreud, E. and Puerner, J.A. : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays(HTD/NF-90). *J. of Tissue cul. Method*, 9(1), 7-9, 1984.
13. Finlay, G. J. : Comparison of *in vitro* activity of cytotoxic drugs forward human cell carcinoma and leukemia cell line. *Eur. J. Cancer Cli. Oncol.*, 22, 655-662, 1986.
14. Kemp, R. B., Cross, D. M. and Meredith, R. W. J. : Adenosine triphosphate as an indicator of cellular toxicity *in vitro*. *Fd. J. Chem. Toxic.*, 24, 465-466, 1986.
15. Shopsis, J. and Sathe, S. : Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test : Correlations with the Draize test. *Toxicol.*, 29, 195-206, 1984.
16. Selling, J. and Ekwall, B. : Screening for eye irritancy using cultured HeLa cells. *Xenobiotic.*, 15(8/9), 713-717, 1985.
17. Marinovich, M., Tragni, E., Corsini, A., and Galli, C.L. : Quantative of *in vitro* cytotoxicity of surfactants : correlation with their eye irritation potential. *J. Toxicol. Cut. & Ocular Toxicol.* 9(3), 169-178, 1990.
18. Kim, H. S., Hong, Y. S., Kim, D. B. and Kim, P. Y. : Evaluation of *in vitro* cell toxicity test using murine skin fibroblast cells and chinese hamster lung cells to replace *in vivo* dermal irritation test. *The report of NISR*, 5, 78-84, 1992.

19. Park, N.H., Min, B.M., Li, S.L., Huang, M.Z., Cherick, H.M., and Doniger, J. : Immortalization of normal human oral keratinocyte with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis*, 12(9), 1627-1631, 1991.
20. Kodavanti, P.S., Shin, D.S., Tilson, H.A., Harry, G.J. : Comparitive effects of two polychlorinated biphenyl congeners on calcium homeostasis in rat cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 123, 97-106, 1993.
21. Grant, R.L., and Acosta, D. : Delayed toxicity of benzalkonium chloride and sodium dodecyl sulfate evaluated in primary cultures of rabbit cornea epithelial cells. *Toxicology Methods*, 4(4), 259-273, 1994.
22. Smiles, K.A., and Pollack, M.E. : A quantitative human patch testing procedure for low level skin irritants. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 28, 755-764, Dec. 1977.
23. Harvell, J.D., Tsai, Y.C., Maibach, H.I. : An *in vivo* correlation with three *in vitro* assays to assess skin irritaion potential. *J. Toxicol. Cut. and Ocular Toxicol.*, 13(2), 171-183, 1994.

Tabl 1. Cytotoxicity of surfactants on human fibroblast cells.

Surfactants	LDH assay (EC <sub>50</sub> , $\mu\text{g/ml}$ )	Rank	MTT assay (EC <sub>50</sub> , $\mu\text{g/ml}$ )	Rank
A	8920	10	1885	10
B	97	8	707	9
C	24.3	4	129	6
D	16	2	38	3.5
E	33	5	33	2
F	943	9	313	7
G	8.2	1	38	3.5
H	23.4	3	13	1
I	35.1	6	58	5
J	76.7	7	462	8



Table 2. *In vivo* skin irritation potential of surfactants.

	Human Patch Test			Intradermal Safety Test		
	Finding	Score	Rank	Finding	TIA	Rank
A	slight	0.42	10	non-irritant	0.5	10
B	mild	2.5	6.5	severe	5.0	4.5
C	severe	0.42	3	severe	3.8	7
D	severe	7.92	4	severe	5.0	4.5
E	mild	2.50	6.5	mild	2.8	8
F	mild	2.08	8.5	mild	2.0	9
G	severe	21.67	2	severe	5.8	1.5
H	severe	39.17	1	severe	5.8	1.5
I	severe	6.25	5	severe	5.3	3
J	mild	2.08	8.5	severe	4.5	6

TIA : Total Injured area

Table 3. Correlation coefficient between *in vivo* and *in vitro* methods

Method	LDH leakage assay	MTT reduction test
Patch test	0.886	0.757
Intradermal safety test	0.700	0.553

The data was presented as spearman's rank correlation coefficient

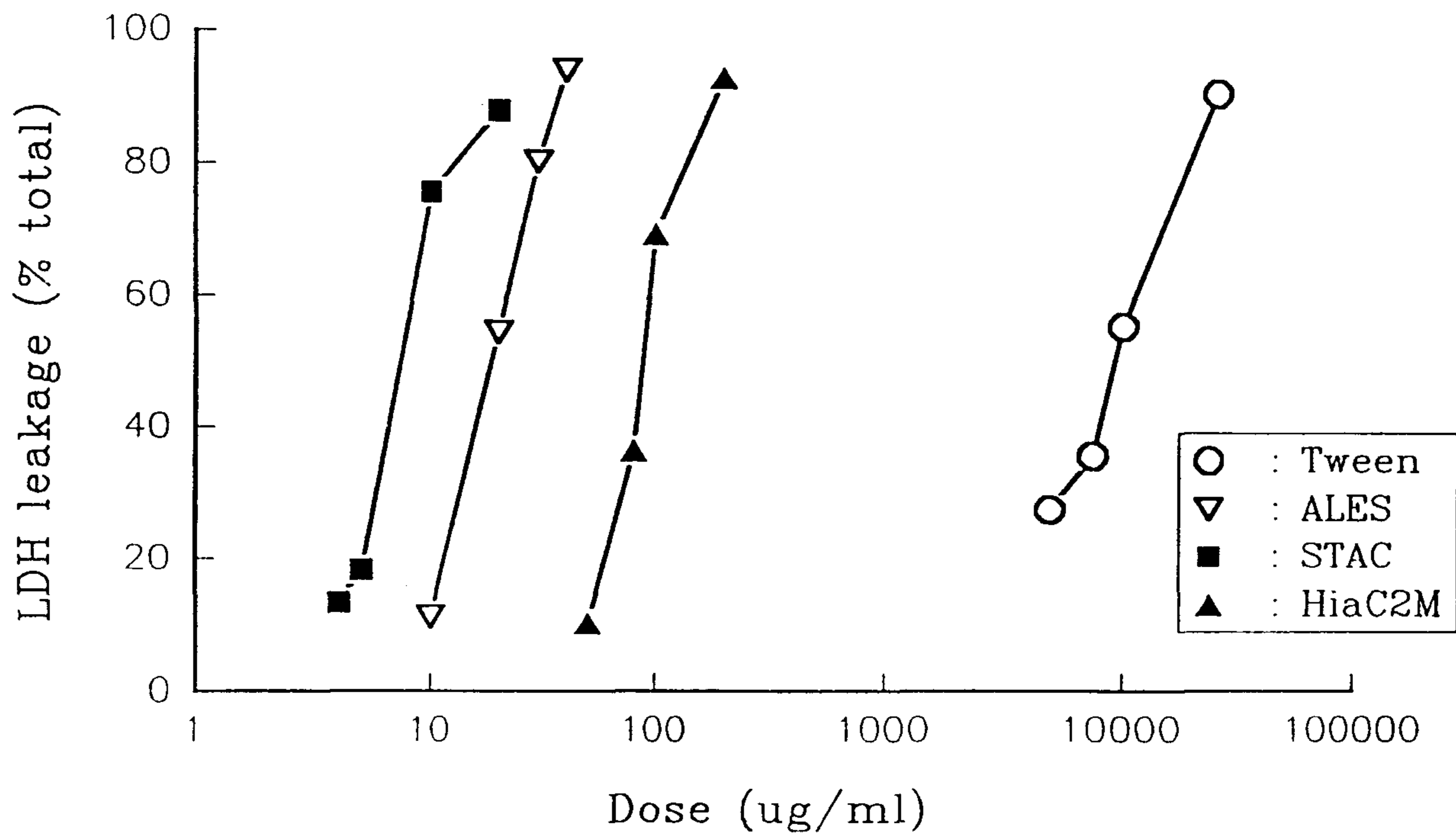


Fig 1. Percentage of LDH leakage from fibroblasts after 3 hr exposure to surfactants

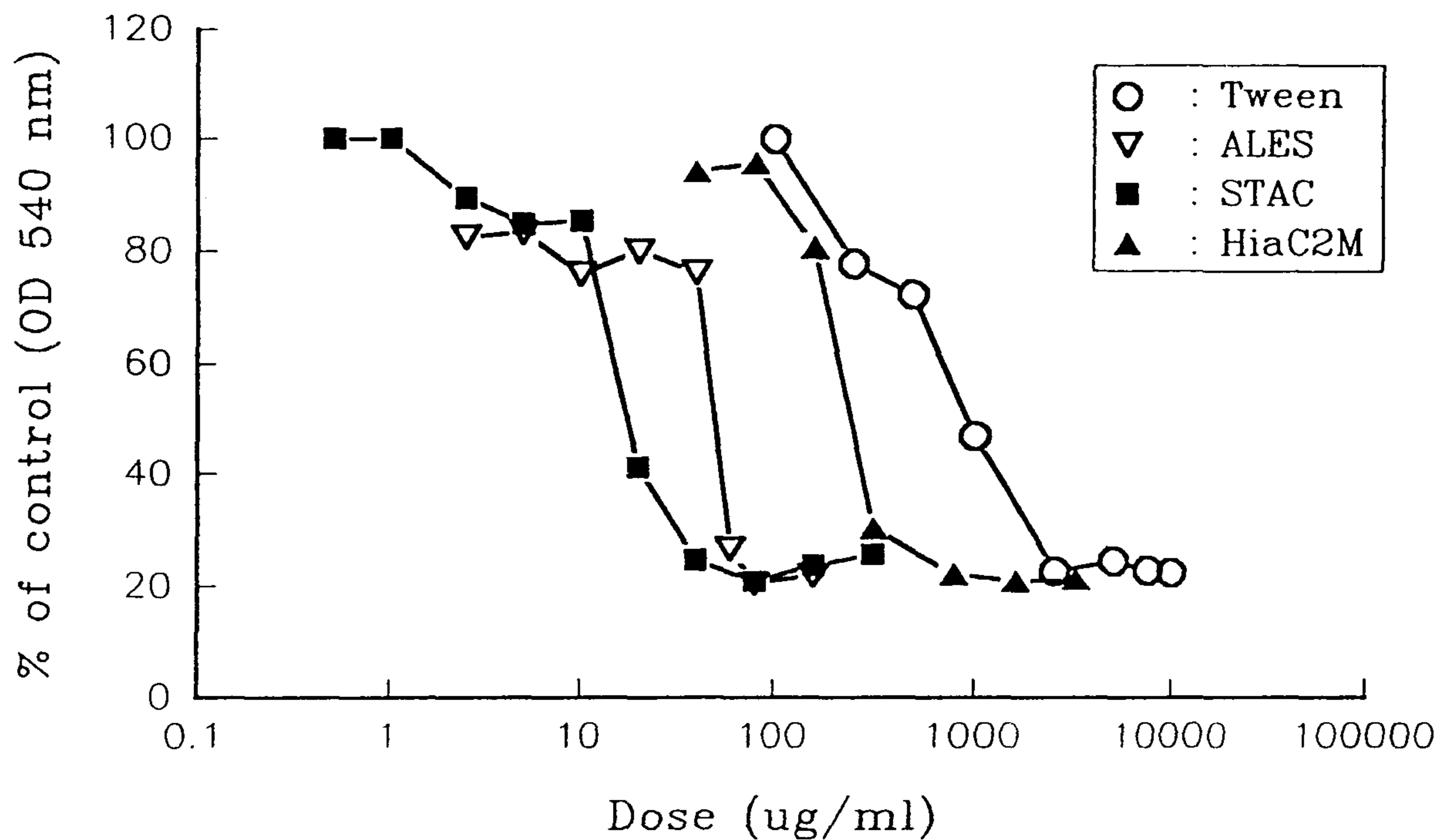


Fig 2. Percentage of MTT mitochondrial reduction from fibroblasts after 3 hr exposure to surfactants

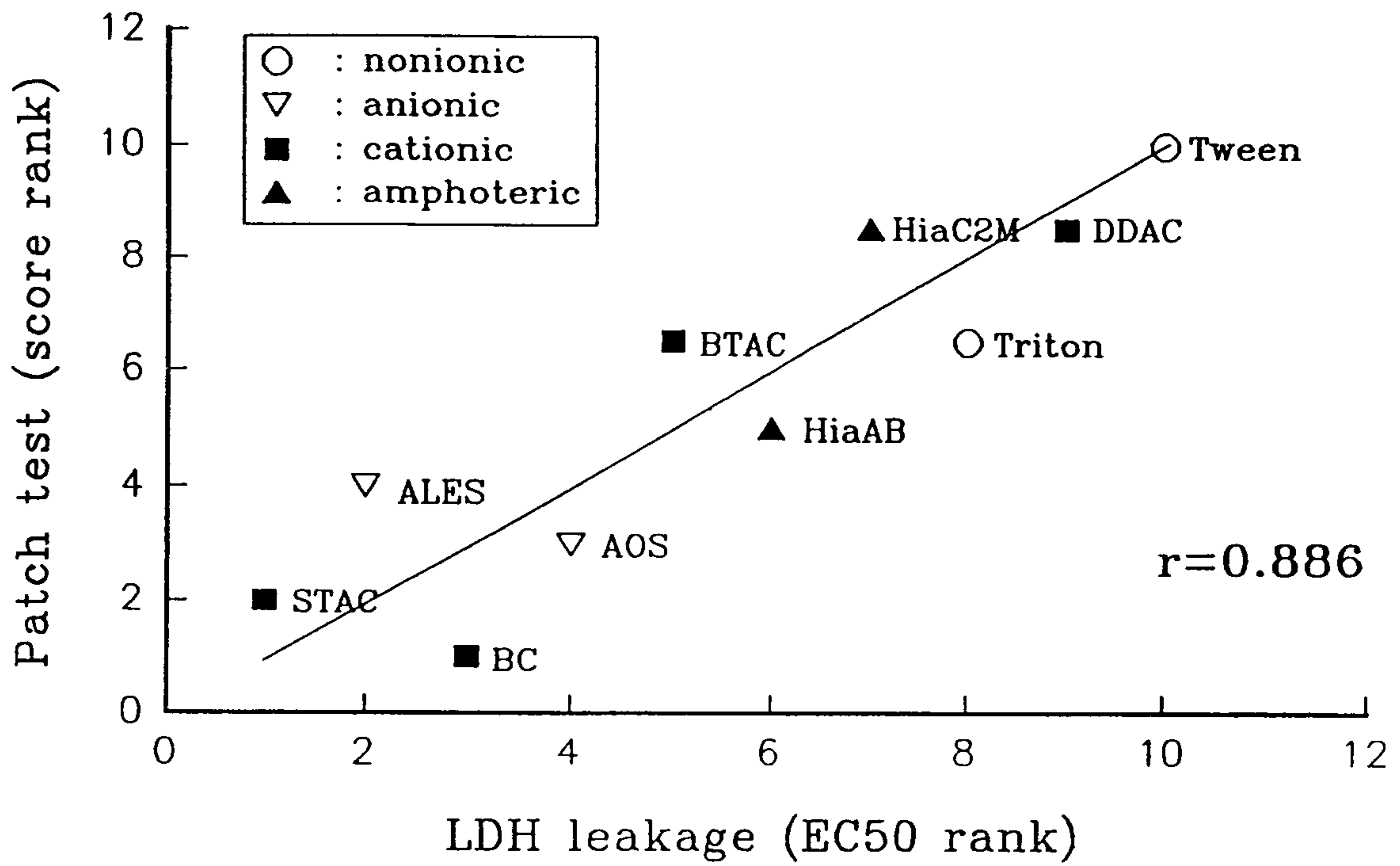


Fig 3. Relationship of potency rank for LDH leakage and human patch test

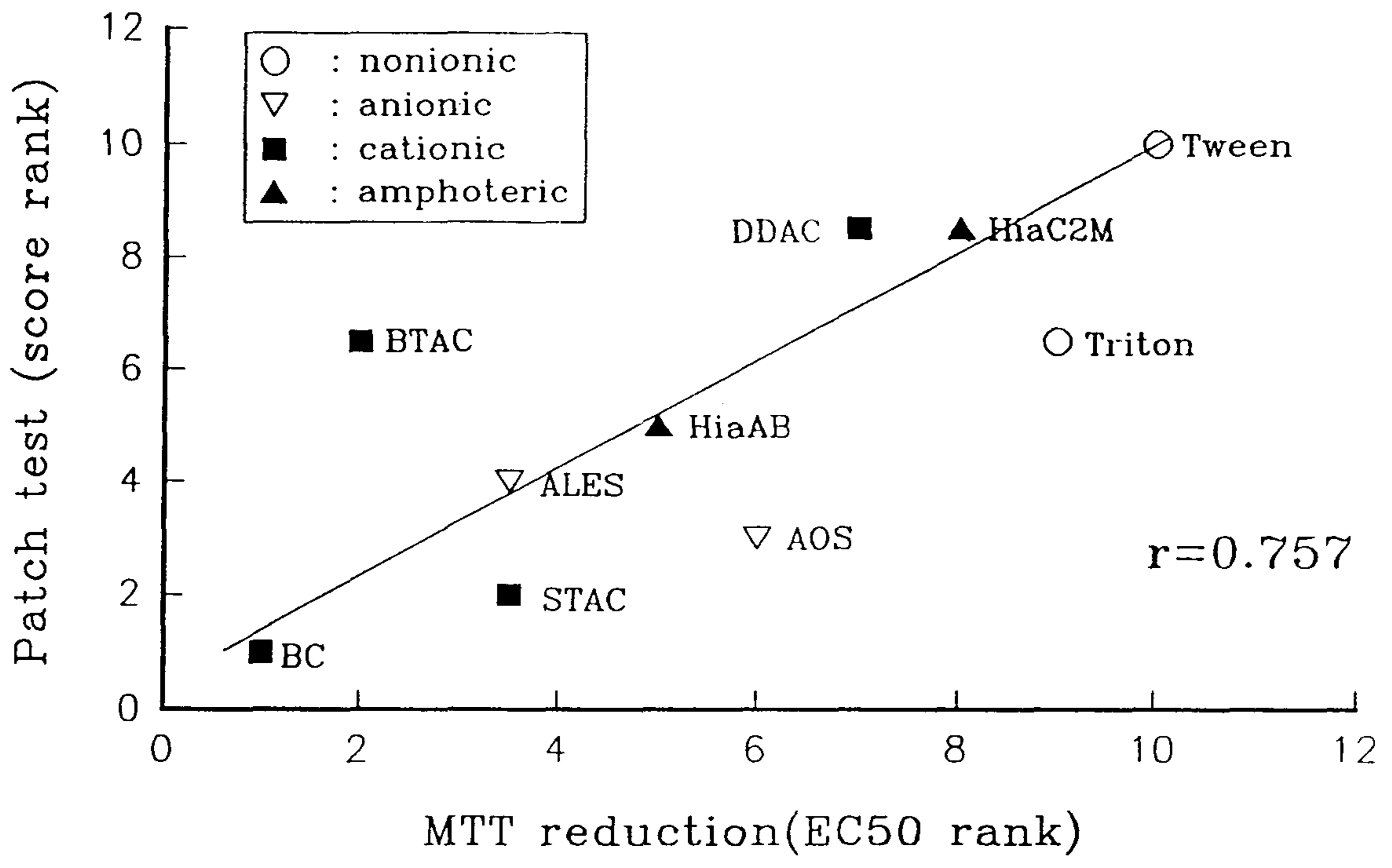
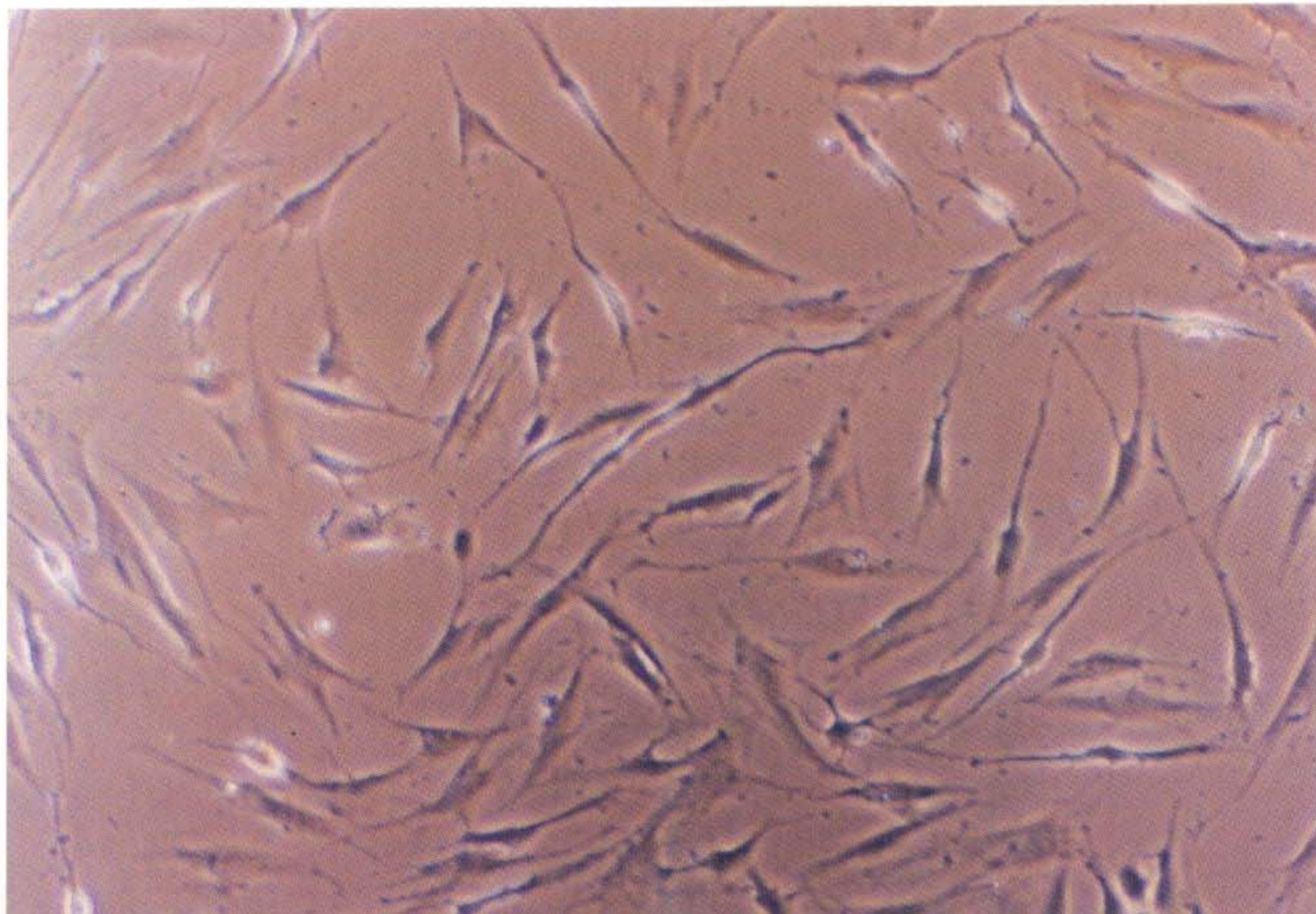


Fig 4. Relationship of potency rank for MTT reduction test and human patch test

(A)



(B)

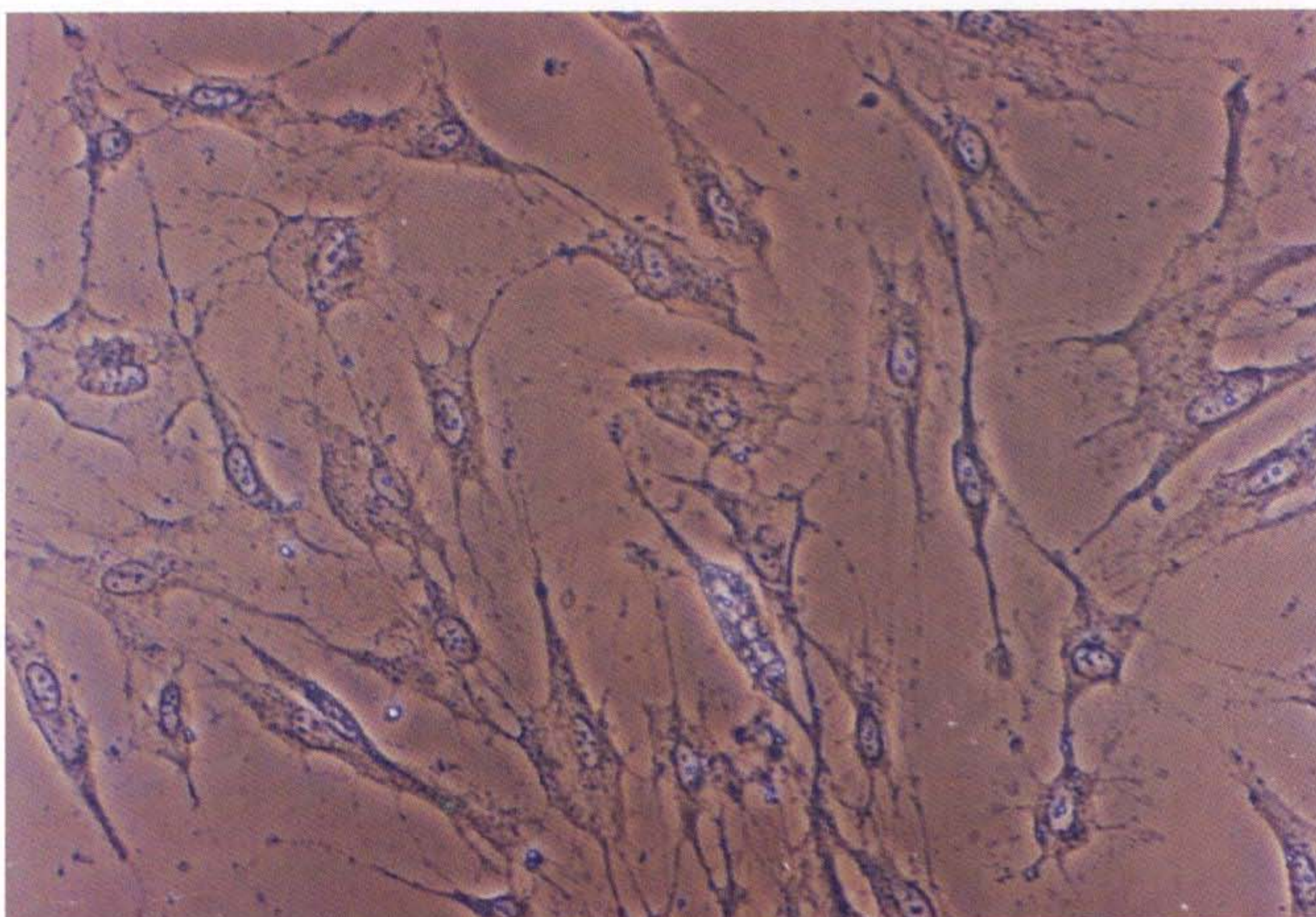


Fig 5. Photomicrographs of human skin fibroblasts

(A) : Normal fibroblasts

(B) : Fibroblasts exposed to surfactant

*In Vitro* 독성시험법 개발 연구 (I)  
Studies on the Development of  
*In Vitro* Toxicity Tests (I)

*In Vitro* 생식독성시험법 개발에 관한 연구 (I)  
Development of *In Vitro* Reproductive Toxicity Test (I)

주관연구기관 : 국립보건안전연구원 독성부 생식독성과

과 학 기 술 처



# 제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “*In vitro* 독성시험법 개발연구(I) - *In vitro* 생식독성시험법 개발에 관한 연구(I)” 보고서로 제출합니다.

1995년 7월 일

주관연구기관명 : 국립보건안전연구원

총괄연구책임자 : 문 화 회

연구책임자 : 장 성 재

보건연구원 : 박 귀 례, 한 순 영

보건연구사 : 김 판 기, 이 유 미

신 재 호

연구원 : 권 석 철, 김 윤 정

박 은 석

# 요 약 문

## I. 제 목

중 과 제 명 : 약효 및 독성시험지원연구

세부과제명 : *In vitro* 독성시험법 개발(I)

(*In vitro* 생식독성시험법 개발에 관한 연구)

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

현대사회에서는 산업발전에 따른 새로운 합성물질과 각종 산업의 부산물 및 환경오염물질들이 기하급수적으로 증가하고 있으며, 우리나라에서도 각종 공업단지조성과 산업의 발달로, 매년 생활환경으로 유입되는 독성물질의 수는 이루 헤아릴 수가 없는 실정이다. 따라서 현대인은 각종 오염물질로부터 생활환경과 인체를 보호해야 할 실정에 이르렀다. 그러나 이렇게 급증하는 화학물질과 독성물질의 생체내에서의 안전성을 평가하는 시설과 방법 그리고 연구기관이 부족한 상태이며, 실제로 안전성을 평가하는 종래의 방법인 *in vivo* 시험법은 다수의 동물을 필요로 하고, 많은 시간과 노력, 그리고 많은 예산을 필요로 한다. 특히 생식독성에 대한 안전성평가 시험방법은 많은 동물을 필요로 할 뿐 아니라 그 소요기간도 길기 때문에 최근 급증하는 환경 독성물질을 검색하기에는 매우 어려운 점이 있다. 그럼에도 불구하고 세계 각국에서 공식적으로 인정하는 생식독성 평가방법은 여전히 *in vivo* 시험법에 국한되고 있는데, 그 이유는 이것을 대체할 만한 방법에 대한 연구가 아직은 미진하며, *in vitro* 방법은 직접 모체를

매개로 하지 않는다는 한계를 가지고 있기 때문이다. 그러나, 최근 세계 각국의 실험실에서 *in vivo* 최기형시험의 대체법으로서의 *in vitro* 배양법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 최근 몇년 동안 축적된 자료와 정보는 *in vivo* 시험법의 대체법으로서의 가능성을 충분히 제시해 주고 있다. 현재, 화학물질의 생식독성증 최기형성을 기존의 방법보다 신속히 알아내기 위해 많은 연구가 진행중이며, 지금까지 virus, planaria, hydra, 초파리(Drosophila), 개구리(Xenopus), 계태아(chick embryo), 배양세포, 설치류등 포유류의 배자 및 적출된 장기를 이용한 *in vitro* 시험법들이 진행되고 있다. 그러므로, 본 연구에서는 화학물질, 의약품등의 독성물질에 대한 안전성 평가방법으로 이용할 수 있는 *in vitro* 생식독성시험법을 확립하여, *in vivo* 시험에 적용시킬 대상화학물질들의 priority를 단기간내 선별하고, 동물을 이용한 실험에서 소요되는 인력 및 경비를 절감시키며, 시험물질 평가에 소요되는 시간을 단축하고 안전성 평가방법으로서 *in vivo* 대체시험법으로서의 개발이용 및 그 독성기전 연구방법으로서의 활용범위를 넓히고자 하였다.

### Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

신경계의 태자기 발생과정은 매우 복잡한 현상의 연속이며, 인간의 뇌신경의 대부분은 분만이전에 형성되는데, 신경계의 발생과정중에는 독성물질에 의한 자극에 매우 민감하므로, 조그만 자극에 의해서도 형태적이상 및 기능이상 등의 장애가 유발될 수 있다. 이에, 1차년도에는 *in vitro* 생식독성시험법의 하나로 일차 중뇌세포배양법을 확립하

고자, 사람의 뇌발생과 초기발생이 매우 유사한 설치류의 한 종인 랫드의 배자를 이용하여 일차 중뇌 배양을 실시하였다. 중뇌세포를 랫드 배자로 부터 적출하여 배양배지에서 트립신처리 및 물리적 분쇄 등으로 단일세포 부유액을 만들었다. 화학물질에 대한 독성을 평가하기 위하여, 세포부유액을 일정하게 세포배양판에 떨어뜨려 시험물질을 처리하고 배양하여 세포분화 및 세포독성에 관한 각각의 endpoint로서, foci 형성 억제와 세포수 감소를 조사하였다.

#### IV. 결과 및 건의사항

임신 랫드로 부터 적출한 태자의 중뇌부위를 배양한 결과, 미분화된 신경상피세포로부터 정상적인 발달상태를 보이는 신경세포가 분화되었으며, 배양 5일째에는 신경세포끼리 사이에 상호간의 process가 연결되어 발달하여 *in vivo* 상태의 뇌발달과 유사한 신경발생과정이 *in vitro* 상태에서 진행되었다. 배양된 세포에 대한 약물의 영향을 평가하기 위하여 최기형성물질인 hydroxyurea(HU)와 retinoic acid(RA)를 처리하였다. HU와 RA 모두 neutral red uptake방법으로 세포생존성을 검사한 결과, 농도의존적으로 세포독성을 유발하여 세포생존성이 감소되었으며, hematoxylin과 면역세포염색방법으로 세포분화도를 관찰한 결과, 세포분화도 또한 농도의존적으로 감소되었다. 이 결과로서, *in vitro* 일차중뇌세포배양법이 생식독성물질 중 최기형성물질을 검색하는 하나의 유용한 방법으로서 이용될 수 있을 것으로 생각되었다.

## LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Microdissection line to remove mesencephalon. .... 26
- Fig. 2. Procedure of immunocytochemical staining used for the  
detection of neurofilament of neurons ..... 27
- Fig. 3. Biphasic contrast microscopy of micromass midbrain cells  
cultured for 5 days.  $\times 100$ . .... 28
- Fig. 4. Rat embryo midbrain cells(A) after 5 days culture.  $\times 25$ .  
(B): A magnification of (A) showing well developed processes  
between micromasses.  $\times 100$ , Hematoxylin stain. .... 29
- Fig. 5. Rat embryo midbrain cells(A) after 5 days culture.  $\times 25$ .  
(B): A magnification of (A) showing positive reaction to the  
anti-neurofilament antibody in cell body and neurites.  $\times 400$ .  
ABC stain. .... 30
- Fig. 6. The effects of HU on cytotoxicity and cell differentiation  
in midbrain micromass culture on day 5. .... 31
- Fig. 7. The effects of HU (0.1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on cell growth (A,  
B, C).  $\times 100$ . .... 32
- Fig. 8. The effects of HU (1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on cell differentiation (A:  
 $\times 100$ , B: $\times 400$ ). ABC stain. .... 34
- Fig. 9. The effects of RA on cytotoxicity and cell differentiation  
on day 5. .... 35
- Fig. 10. The effects of RA on cell differentiation. (A):DMSO  
vehicle control, (B): RA 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .  $\times 25$ , ABC stain. .... 36

## LIST OF TABLE

Table 1. Concentrations of HU and RA Inducing 50% Decrease in Viability and Cell Differentiation of Midbrain Micromass Culture .....	37
--	----

# 목 차

제 1 장	서 론 .....	1
제 2 장	연구추진방법(실험방법) .....	6
제 1 절	실험동물 .....	6
제 2 절	태자중뇌세포의 일차배양 .....	6
제 3 절	세포독성검사를 위한 고정 및 염색 .....	9
제 4 절	세포분화도 검사를 위한 배양후 고정 및 염색 .....	9
제 5 절	면역조직학적 염색 .....	10
제 3 장	연구결과 및 고찰 .....	11
제 1 절	일차중뇌세포 배양법 확립 .....	11
제 2 절	배양된 중뇌세포에 대한 약물의 영향 .....	14
제 4 장	결 론 .....	19
제 5 장	참고문헌 .....	20

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	1
Chapter 2. Experimental Design .....	6
Section 1. Experimental Animals .....	6
Section 2. Primary Culture of Embryo Midbrain .....	6
Section 3. Fixation and Stain for Cytotoxicity Test .....	9
Section 4. Fixation and Stain for Cell Differentiation Assay ..	9
Section 5. Immunocytochemistry .....	10
Chapter 3. Results and Discussion .....	11
Section 1. Establishment of Primary Midbrain Micromass Culture Method .....	11
Section 2. Effects of Chemicals on the Cultured Cells .....	14
Chapter 4. Conclusions .....	19
Chapter 5. References .....	20



## 제 1 장 서 론

오랜기간동안 태아는 모체의 자궁속에서 대부분의 외부 화학물질로부터 방어되거나 절연되어지는 것으로 알려져왔으나, 1960년대에 나타난 thalidomide 사건에 의한 최기형 태아의 분만은 심각한 사회적 관심뿐만 아니라 자연과학적 관심도 유발시켰다. 이후로 태아 및 영아가 외부 독성물질에 노출되었을때, 심각한 손상을 일으키는 물질과 그 물질의 작용기전, 그 물질에 대한 모체의 방어방법 및 기전에 대한 광범위하고 심도있는 연구가 시작되었다.

현재 세계 여러나라에서는 신물질에 대한 독성평가 guideline에서 화학물질의 최기형성 평가를 위해 실험동물을 이용한 *in vivo* 실험결과를 요구하고 있으며, 이 자료는 또한 각 국가들로부터 중요한 독성평가자료로서 활용되고 있다. 그러나, 실험동물 전체(whole animal)를 이용한 실험은 평가를 위해 많은 동물이 이용되며(주로 토끼 또는 설치류), 실험동물비외의 유지비등으로 많은 비용이 소모되고 많은 시간과 노동력이 필요할 뿐만 아니라 시험에 사용할 화합물도 많은 양이 필요하다. 따라서, 현재 진행되고 있는 동물을 이용한 *in vivo* 실험은 지금까지 개발되어 있는 많은 물질이나 매년 새로이 개발되고 있는 물질을 신속, 원활하게 검색하기에 적절하지 못하기 때문에, 이 문제에 대한 해결 방법으로서 최기형성 평가를 위한 *in vitro* 실험방법의 개발 및 적용에 대한 독성학자들과 발생생물학자들의 관심이 수년간 증대되었으며, 이 문제에 대한 workshop이 1989년에 있는 이후로 이 분야에 대한 연구가 급속히 증가되었다(Schwetz 등, 1991).

단기 *in vitro* 최기형성 시험은 *in vivo* 실험에 적용될 화학물질의

서열을 정하거나 그 수를 선택적으로 감소시킬 수 있으므로 동물을 이용하는 실험을 대체하지는 못하더라도 그 실험에 요구되는 시간, 노동력 및 비용을 줄일 수 있으며, 최종적으로는 사람에게 영향을 미치는 최기형성물질 및 그 최기형성작용기전을 밝힐 수 있으며, 한편으로는 그 독성에 대한 억제제를 개발하는데도 도움이 될 수 있을 것이다. 독성물질의 평가 및 정상적인 기관형성을 연구하기 위해 많은 *in vitro* 실험방법이 개발, 진행되고 있는데(Prati 등, 1993), 이 실험은 인체를 포함한 포유류 또는 비포유류의 세포, 기관, 전배자 등을 이용하고 있다(Schmid, 1985; Pratt와 Willis, 1985). 현재 시도된 *in vitro* 시험으로는 랫드를 이용한 전배자 배양법(Sadler 등, 1982), 랫드 및 닭의 태자의 지아(limb bud) 배양법(Kocchar, 1975), 랫드의 이용한 태자의 증뇌소세포배 배양법(Flint, 1983), 닭의 신경능(neural crest) 및 지아세포의 소세포배(micromass) 배양법(Wilk 등, 1980), hydra 배양법(Johnson, 1980; Wilby 등, 1986), 포유동물 종양세포 배양법(Braun 등, 1979), 초파리(Drosophila) 배자세포배양법(Bournias-Vardiabasis와 Teplitz, 1981), 개구리(Xenopus) 배자 배양법(Dumont 등, 1982) 및 virus와 planaria를 이용한 시험법(Schmid, 1985)등이 있다.

현재 산과 및 소아과에서 발생되고 있는 주요 질병중의 하나인 선천성기형은 그 원인이 아직 잘 알려지지 않고 있다. 약 20%의 선천성기형은 유전적 소인에 의한것으로 알려졌으며, 약 5%는 외부영향에 의한 것으로 알려져 있으나, 대부분이 그 원인이 밝혀져 있지 않은 상태이다(Saxen, 1988). 또한, 현재 치료 목적의 의약품, 화장품 및 각종첨가물등 수 많은 화학물질이 생성되고 있는 가운데 태자 또는 배자에 대해 안전한 화학물질로 알려진 것은 매우 적은 실정이다. 이는

화학물질의 종류가 너무 많으며 한편으로는 평가방법이 부적절하기 때문이기도 하다. 따라서 많은 과학자들이 이에 관한 새로운 방법을 연구개발하거나 시행 또는 실험에 이용하고 있다. 많은 연구자들이 영향요인을 검출하기 위해, 또는 그 물질의 물리화학적, 생물학적 영향을 예측하거나, 그 기전에 관한 연구를 위해 최기형성을 예측하기 위한 실험을 여러가지 방법으로 진행중이다. 실질적으로 화합물의 대부분의 실험이 동물 model을 이용한 *in vivo* 시험이 주종을 이루고 있으며, 몇몇 *in vitro* 변이원성 시험이 유전독성평가에서는 유용하게 이용되는 것과 달리 *in vitro* 최기형성시험은 아직도 검토 진행중에 있다. 몇몇 *in vitro* 실험은 실질적으로 중요성을 지닌 기본적인 방법으로 증명되고 있으나, 대부분의 실험이 세포생물학자나 발생학자들에게서 시작되었으므로 그 응용성이 비기관적수준(non-organismal level)으로 제한되어 있기는 하나 세포 또는 조직적 수준에서 일어나는 변화발생에 대한 분석에 특히 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 *in vitro* 시험방법은 세포의 이동, 상호작용, 증식 및 분화등과 관련된 기형유발물질에 민감한 시기인 기관형성기동안 일어나는 여러가지 배자 발생 과정중의 일부 또는 전기관의 발생과 관련이 있다. 그러나, 한가지의 *in vitro* 시험방법으로는 기관형성기동안 일어나는 전기관의 모든 변화를 반영할 수 없으므로, 최기형성물질을 검색하기 위해서는 두개 이상의 *in vitro* 실험방법이 서로 보합적으로 battery를 이루어 진행되어야 할 것으로 생각되고 있다(Welsch, 1992).

배자의 신경계 발달은 매우 복잡한 단계의 연속이며, 사람의 경우 태자 뇌의 발달은 1분에 수백만개의 세포가 증가되며, 대부분의 뇌세포는 분만전(prenatal period)에 생성된다. 형태학적 변화가 기능적인

변화와 동시에 일어나기 때문에, 신경세포는 성숙함에 따라 각각의 특별한 기능을 지니게 된다. 용해되어 있거나, 세포막에 결합되어 있는 많은 신경성인자(neurotrophic factor)가 뇌발달에 관여하며, 뇌발생기간동안은 독성물질에 의한 조그만 자극에도 매우 민감하여 손상받기 쉽다(Grimm, 1987). 뇌가 발달하는 동안, 신경세포는 자라면서 세포 상호간 발달된 interlacing ramified network에 의해 연결되며, 이 과정은 기관형성기중 뇌발생의 중요한 단계이다. 배자에 노출된 독성물질은 태자나 신생자에 여러가지 장애를 유발하는데, 특히 발생·분화과정중의 조그만 변화는 육안적인 형태기형 뿐만 아니라 심각한 기능 이상을 초래한다. 많은 기형 또는 행동기형학자들이 신경계에 대한 원인을 밝히기 위하여 많은 실험동물 model을 이용하여 연구하고 있으며, 설치류 중추신경계의 초기 발생과정은 사람의 발생과정과 매우 유사하여, 랫드와 마우스는 신경계 기형연구에 많이 이용되고 있다(Walum 과 Flint, 1988).

실험적으로 이용되는 배자신경세포(embryonic neuronal cell)는 배양시 *in vivo* 상태에서 일어나는 것과 유사한 형태학적·생화학적 분화를 진행하는 것이 알려지면서, 신경세포에 유래된 세포배양시 관찰되는 신경세포 분화과정은 초기형성물질의 세포적 영향연구에 이용되었다(Welsh, 1987). 여러동물의 신경세포 및 신경계 종양세포를 이용하여 진행되고 있는 많은 연구중 태자 뇌세포로부터 분리된 신경계 세포를 키우는 방법도 개발·이용되고 있다. 특히, 인간과 랫드의 초기 뇌발달과정은 매우 유사하여, 랫드 배자 중뇌 신경아세포(embryonic mid-brain neuroblast)를 소세포괴배양(micromass culture)한 결과, 신경세포로 분화되는 세포들은 배양시작후 1시간내에

같이 배양된 다른 세포로부터 떨어져 소세포괴를 이루며, 시간이 지나 감에 따라 neurite의 network와 상호연결되어 형태학적으로 이 세포들이 분화되었을 뿐만 아니라 대부분의 세포들이 생화학적으로도 분화하였다고 보고되었다(Flint, 1983).

세포수의 감소 또는 foci형성의 억제를 각각 세포독성과 세포분화에 대한 독성물질의 endpoint로 이용함으로써, 랫드 배자 중뇌 소세포괴 배양법(rat embryo mid-brain micromass culture)은 랫드배자 지아 소세포괴 배양법(limb bud micromass culture)과 더불어 기형효과를 예측하기 위한 한 실험모델로서 현재 많이 이용되고 있으나(Flint, 1987; Seeley와 Faustman, 1995), 우리나라에서는 이에 대하여 연구보고된 적이 없다. 이 실험법을 이용하여 여러가지 물질에 대해 최기형성에 대한 유효성검사를 한 결과 약 90% 이상의 높은 예측도로 최기형성이 관찰되어 신경계 발달 초기에 미치는 subteratogenic effect 여부의 관찰에 이 방법이 유용하게 사용될 수 있다고 하였다(Flint와 Orton, 1984; Walum와 Flint, 1990).

따라서 본연구에서는 태자뇌세포를 이용한 랫드 배자 중뇌 소세포괴배양방법 및 조건을 확립하고, *in vivo* 동물실험시 최기형성물질로 알려진 retinoic acid(RA)와 hydroxy urea(HU)를 이용하여 배양된 중뇌세포에 미치는 독성 및 분화도를 관찰하여 일차중뇌소세포괴배양법을 *in vitro* 생식독성시험법의 하나로서 확립하고자 하였다.

## 제 2 장 연구추진방법(실험방법)

### 제1절 실험동물

실험동물로서 국립보건안전연구원의 barrier 시설내에서 사육된 특정병원성부재(specific pathogen free : SPF) Wistar계 암수랫드를 사용하였다. 실험중 사육상자당 5수씩 수용하고, 고품사료(신촌사료) 및 수도물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육조건은 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $55\pm 5\%$ , 명암 1일 12시간(오전 6시~오후 6시)씩 교대로 유지시켰다.

교배는 교배일 오후 4시에서 6시 사이에 암컷과 수컷을 2:1로 교배시켰다. 다음날 아침 질전(vaginal plug)을 확인할 수 있거나, 질도말법으로 정자가 발견된 것을 실험에 이용할 임신동물로 배정하였으며, 이날의 새벽 0시를 임신 0일의 기준으로 하였다.

### 제2절 태자중뇌세포의 일차배양

#### ① 임신자궁의 적출

랫드 중뇌(midbrain)의 소괴배양법(micromass culture)은 Flint (1983)의 방법을 응용하여 실시하였다. 임신 11~13일째의 암컷 랫드를 경추탈골시켜 살처분하고 70% ethanol로 복부를 닦은 후 복부를 절개하였다. 복강아래쪽에 있는 자궁을 가위와 forceps로 주위 지방이 붙어있지 않도록 주의하여 적출한후 멸균된 생리식염수가 담겨진 petri dish에 옮겨 배양실험실로 운반하였다.

## ② 배자로부터 중뇌 적출

적출된 임신자궁을 약 37°C로 수조에서 데워진 멸균된  $Ca^{++}$ 과  $Mg^{++}$ 이 첨가되지 않은 Dulbecco's phosphate buffered saline(이하 CMFPBS)로 3회이상 세척하였다. 입체현미경하에서 임신자궁으로부터 배자가 들어있는 각각의 conceptus를 적출하여 CMFPBS가 담겨진 새로운 petri dish에 옮겼다. 나머지 수태산물은 폐기시켰으며, 옮겨진 conceptus로부터 배자를 적출하여 petri dish의 한쪽 부분으로 모아 Pasteur pipette를 이용하여 CMFPBS가 담겨진 새로운 petri dish에 옮겼다.

## ③ 배양전 분리된 조직의 처리

모여진 중뇌는 26 1/2 gauge의 바늘이 달려있는 주사기를 이용하여 배자의 전뇌와 후뇌부위를 제거한 중뇌부분(mesencephalon)을 분리하였다(Fig. 1). 분리된 중뇌부분을 Pasteur pipette으로 시험관에 옮긴후, 시험관내의 여분의 CMFPBS를 제거한 뒤 새 CMFPBS로 3회 조직을 세척하였다.

CMFPBS와 조직이 담겨진 시험관을 37°C의 배양기내에서 20분간 정치시킨후, CMFPBS를 1% trypsin이 녹아있는 CMFPBS로 대치한 뒤 다시 20분간 37°C의 배양기내에서 정치시켰다. 정치시킨 시험관으로부터 trypsin이 함유된 CMFPBS를 제거하고, 새 CMFPBS만으로 짧게 2회 세척한 후, 1.3ml의 10% FBS가 함유된 F12 medium과 Dulbecco's modified eagle's medium이 1:1로 함유된 배양배지(이하 FDM)로 대치시켰다.

#### ④ 중뇌조직의 처리 및 단일세포(single cell) 분리

분리된 조직을 내경이 0.7mm정도인 Pasteur pipette를 이용하여 15~20회 정도 거품이 생기지 않도록 주의하면서 배양배지와 함께 반복적으로 흡입, 배출하여 세포를 물리적으로 분리, 균질화시켰다. 세포 부유액(cell suspension)을 멸균된 10 $\mu$ m nylon mesh filter가 들어있는 Swinney filter holder가 부착된 5ml 주사기에 부어, 통과시킨 후 새로운 시험관에 모았다.

세포 부유액 10 $\mu$ l을 적출하여 동량의 0.1% trypan blue로 생염색(vital stain)한 후 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포수를 측정하였으며, 세포수가 많을 때에는 10배 희석하여 세포수를 측정하였다. 세포수가 1ml당 5 $\times$ 10<sup>6</sup>개가 되도록 세포농도를 조정하였으며, 세포수가 많은 경우는 새 FDM을 첨가하여 최종농도로 맞추었으며, 세포수가 적을 경우는 세포부유액을 1000rpm에서 5분간 원심분리시켜 세포 부유액을 제거한 다음 새로운 배양배지로 재부유시켰다.

#### ⑤ 중뇌세포배양

재부유시킨 세포부유액은 micropipet을 이용하여 96 well 배양판(culture plate)에는 10 $\mu$ l을, 6 well 배양판속에 미리 처치하여 넣어둔 cover glass 위에는 10 $\mu$ l씩 5방울을 떨어뜨려, 2시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양시켜 세포들을 배양판의 바닥에 충분히 부착시킨 후, 96 well 배양판에는 200 $\mu$ l, 6 well 배양판에는 2ml의 배지(FDM)를 채워 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 분압하에서 5일 동안 배양배지의 교환없이 계속적으로 배양하였다.



## ⑥ 약물 처치

처치한 약물중 hydroxyurea는 직접 배지에 녹였으며, retinoic acid는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 미리 stock solution을 만든 후 배양배지로 적정농도로 희석하여 배양판에 넣었다. 용매로 사용된 DMSO는 배양배지 1ml당 5 $\mu$ l가 넘지 않도록 가하였으며, 희석배지는 10배수가 넘지 않도록 하였으며, 배양전기간중 약물처치군, 대조군 모두 배양배지는 교환하지 않았다.

## 제3절 세포독성검사를 위한 고정 및 염색

배양배지를 흡입폐기하고 0.005%의 neutral red를 넣은후 37 $^{\circ}$ C에서 3시간동안 방치하였다. Neutral red를 제거한 후 37% formaldehyde-Ca soln.에 1분간 고정한 뒤 200 $\mu$ l의 acid alcohol(19% v/v acetic acid in 50% ethanol)로 10분 이상 elution 시켰다. 색정도를 540nm에서 plate-reader를 이용하여 흡광도(absorbance)를 측정하였다.

## 제4절 세포분화도 검사를 위한 배양후 고정 및 염색

Cover glass를 0.1% HCl 용액에 20분 이상 담근다음 수도물과 증류수로 씻은후 100% 에탄올에 2시간 이상 담군후 먼지가 없는 곳에서 공기에 노출시켜 잘 말린다음 멸균하였다. Clean bench내에서 멸균된 cover glass를 배양판에 넣고 poly-*l*-lysine을 충분히 가하여 5분간 둔다음 진공 pump로 poly-*l*-lysine을 흡입·폐기한후 CMFPBS로 2번 세척후 건조시켜 사용하였다.

배양후 배양배지를 배양판으로 부터 흡입폐기한 후, PBS 로 희석된 4% formalin 용액을 100 $\mu$ l(96 well) 또는 1ml(6 well)씩 넣은 후 냉장고에서 20분간 고정시킨후 PBS로 세척하였다. 세포를 hematoxylin으로 10초간 염색하고 수도물로 세척한후, 공기에 노출시켜 완전히 건조시켜서 현미경으로 관찰하였다.

## 제5절 면역조직학적 염색

Hsu 등(1981)이 사용한 ABC 법을 변형하여 Fig. 2와 같이 실시하였다. 배양판에서 배양배지를 흡입폐기한 후 4% formalin용액으로 실온에서 30분간 고정하였다. 그후 PBS용액에 15분간 immersion후 0.1% Triton-X가 함유된 PBS용액에 15분간 immersion한 뒤 다시 PBS용액으로 15분간 세척한뒤 1차항체를 처리하였다. 1차항체인 anti-neurofilament Ab는 BSA 0.3%, Triton-X 0.3% 가 함유된 PBS에 50:1로 희석하여 5시간가량 실온에서 처치한 후 PBS로 세척하였으며, biotin이 표지된 2차항체는 1시간에서 1시간 30분 정도로 실온에서 처리한 뒤 PBS용액으로 세척하였다. ABC용액을 30분간 처리한 뒤 PBS용액으로 세척하여 DAB용액을 발색이 될 때까지 약 2-5분간을 처리하여 수도물로 세척한 후 관찰하였다.

## 제 3 장 연구결과 및 고찰

### 제1절 일차중뇌세포 배양법 확립

안전성 평가방법으로 이용할 수 있는 *in vitro* 단기최기형시험법으로써, 임신 11일~13일령의 암컷 랫드로 부터 적출된 태자의 중뇌(mesencephalon)세포를 이용한 소세포괴(micromass) 배양법을 확립하였다. Flint(1993)의 방법을 수정하여 임신 랫드로부터 분리된 배자의 중뇌를 적출하여 배양한 결과 미분화 신경상피세포(undifferentiated neuroepithelium)는 다른 세포로부터 격리되어 서로 뭉쳐 덩어리를 이루면서 성장하였으며, 5일째에는 foci로부터 neurite가 뻗어 상호 연결되어 *in vivo* 신경계발생과 유사한 과정이 진행되었고, 다른 세포는 소세포괴로부터 떨어져 배양전기간 동안 납작해지면서 섬유아세포(fibroblast)와 유사해졌다(Fig. 3).

랫드 배자의 중뇌는 1% trypsin 처리 및 물리적 분쇄(trituration)과정을 통하여 세포가 분리되었으며, 10 $\mu$ m의 nylon mesh를 통과하면서 세포외의 간질조직은 대부분 제거되어 최종세포부유액은 거의 단세포(single cell)로만 구성되어 있었다. 배양시작후 한시간째에는 세포들이 배양판에 붙으면서 모여 조그만 덩어리(clump)를 이루기 시작했다. 시간이 경과함에 따라 덩어리의 크기는 증가하였으며, 덩어리에 속해 있지 않은 다른 세포는 배양판에 따로 붙으면서 납작해져 유섬유아세포(fibroblast-like cell) 형태로 변했으며, 덩어리는 점점 커지면서 덩어리내에 작고 불규칙한 foci를 형성하였다. 형성된 foci는 세포덩어리마다 크기가 다르며, 중심부분으로 모여 있었다. 배양 5일째에는

각각의 focus는 바닥으로 부터 약간 올라온 상태였으며, focus로 부터 나온 세포의 가는 돌기는 덩어리내에서 뿐만 아니라 주위의 다른 덩어리까지 상호연결되어 있었다.

본실험에서 임신 11일부터 13일령의 암컷랫드로 부터 적출된 배자의 중뇌세포를 각각 분리하여 모두 배양을 시도하였다. 임신 11일령, 12일령, 13일령 랫드 배자로 부터 각각 분리된 중뇌세포를 소세포괴 배양한 결과 신경세포로 분화된 세포괴가 모두 생성되었으며, 각각의 세포괴는 다른 세포괴들과 상호 process에 의해 연결되어 모두 *in vivo*와 유사한 발달과정을 나타내었다. 그러나, 임신 11일령의 랫드 배자는 크기가 작고, 중뇌로 부터 분리된 세포수가 많지 않을 뿐만 아니라, 일부 랫드 배자는 중뇌형성이 제대로 이루어지지 않고 신경공이 개존되어 있는 배자도 관찰되어 많은 배자가 필요한 *in vitro* 배양법에는 11일령의 배자가 부적합한 것으로 사료되어, 임신 12일령 및 13일령 랫드 배자를 실험에 이용하였다. 소세포괴 배양시 Brown 등 (1989)은 교미후 13일령의 체절(somite)수가 24~36개인 배자를 이용하였으며, Ribeiro와 Faustmann(1990 a, b)은 12.5일령의 배자를 이용하여 중뇌세포 배양하였고 Flint (1983)는 34~36개의 체절을 가지고 있는 13일령의 배자를 이용하여 중뇌세포를 배양한 결과 각각 신경세포로 분화하였다고 하였다.

대부분의 세포 배양시 일어나는 세포의 크기 및 수의 증가는 과성장된 세포들에 의한 상호억제 효과가 있기 전까지는 배양시간에 대체적으로 비례한다고 알려져 있다(Levine 등, 1965; Ceccariui와 Eagle, 1971; Sefton과 Rubin, 1970). 5일동안 소세포괴 배양을 했을때 배양된 중뇌세포 또한 다른 세포와 유사한 발달을 하였으며, 소세포괴내의

세포성장은 다른 conventional 세포 성장에서 관찰된 세포증가와 유사하다고 하였다(Flint, 1983). 본 실험에서도 소세포피내의 세포수가 시간이 지남에 따라 증가하였으며, 소세포피내에서는 소피단위로 세포들이 뭉쳐지면서 점점 커져 주위로 확산되어 신경세포로 분화되는 현상이 관찰되었다. 5일째 관찰된 hematoxylin에 진하게 염색된 foci는 뭉쳐진 세포덩어리로서 배양판에 붙어있는 세포덩어리의 다른 세포들과 구별되었는데, 이 세포피는 분화된 신경세포로 구성되어 있었다(Fig. 4). 이 세포는 세포형태상 전형적인 신경세포모양을 하고 있으며, 배자 신경발생시 나타나는 것과 유사한 구조인 세포돌기가 나와 다른 foci 또는 일부 유섬유세포와 연결되어 있었다. 신경세포에만 특수하게 염색되는 anti-neurofilament를 사용하여 소세포피를 면역세포 염색한 결과 주위세포에서는 양성반응 보이지 않았으나, 소세포피내의 foci에서는 양성반응을 보여 태자의 중뇌세포배양 5일째에 미분화된 신경상피세포가 정상적인 신경세포로 분화되어 있음이 관찰되어(Fig. 5), *in vitro* 배양시 *in vivo* 와 유사한 신경발달과정이 진행됨을 알 수 있었다.

신경세포는 배양시 천천히 자라기 때문에, 빠르게 분열성장하는 유섬유세포인 교세포(glial cell)등에 의해 일정한 시간이 지나면 성장이 억제되는 현상이 일어나기 때문에 신경세포 배양시 특별한 처치가 요구된다고 하였다(Pettmann 등, 1979; Dimpfel, 1980; Fedovoff와 Hall, 1979). 본 실험에서는 10% FBS가 첨가된 FDM을 사용하였으며, 96 well의 세포배양판 사용시에는 특별한 처리를 하지 않아도 잘 부착되어 성장하였으며 면역염색을 하기 위해서 cover glass에 세포를 배양했을 때에는 신경세포는 poly- $\ell$ -lysine으로 coating된 배양접시에서

부착(adhesion)이 잘 된다고 보고되어있어(Pettmann 등, 1979), poly-l-lysine으로 처리하여 세포가 cover glass로 부터 떨어지는 것을 방지하였다.

신경세포 배양시 생기는 또 다른 문제점은 배양기간동안 분화된 신경세포의 일부 또는 전부가 역분화(dedifferentiation)되는 것인데 (Giacobin, 1980), 본 실험에서는 배양기간동안 역분화되는 신경세포가 관찰되지 않았으며 본실험조건에서 배양기간인 5일내에는 분화된 신경세포가 역분화되지 않는 것으로 사료되었다.

본 실험에서 배양시작시 배지 1ml 당  $5 \times 10^6$ 개의 세포수가 되도록 높은 농도의 세포부유액을 만든 다음 일정량을 배양판에 넣어 부착시켜 실험하였다. 배자세포(embryonic cell)는 *in vitro* 배양시 분화가 일어나긴하나 주로 배양세포가 높은 밀도로 존재할 때에만 분화되기 때문에(Umansky, 1966), 배자세포를 배양·분화시키기 위해서는 이러한 조건을 충족시켜야하므로 Ahrens 등 (1977)이 배자조직으로 부터 얻은 배자세포를 될수록 작은 용적에 높은 밀도로 균질화시킨다음 균일하게 분주한 후 소세포괴형태로 배양하는 방법을 시도한 이후로, 이 실험법은 배양조건의 동질성때문에 형태분석학적 실험이나 생화학적 실험의 정량적 분석에 많이 이용되고 있다(Hassell 등, 1978; Flint, 1980).

## 제2절 배양된 중뇌세포에 대한 약물의 영향

세포 분화 및 배양에 중뇌 소세포괴 배양법을 이용하여, 세포배양 및 분화에 대한 약물의 영향을 평가하기 위하여 기형유발물질인

hydroxyurea(HU)와 retinoic acid(RA)가 배양된 증뇌세포의 세포생존성 및 분화도에 미치는 영향을 대조군 및 용매대조군과 비교하였다.

만성과립구성 백혈병치료제이며 항암제인 HU를 증뇌세포에 처리했을 때,  $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 이하에서는 신경세포의 분화 및 소세포피의 성장과 크기에 영향을 주지 않았으나 농도가 증가됨에 따라 농도 의존적으로 소세포피의 수가 대조군보다 감소하였으며 그 크기도 감소하였다. 세포의 생존성을 평가하기 위해 neutral red uptake 실험한 결과, acidic alcohol에 의해 elution된 neutral red의 양이 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하여 농도에 따른 상관관계를 보였으며, 본 실험에서 세포의 생존성을 50% 감소시키는 HU의 농도는  $4.298\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다 (Fig. 6).

HU를 처리하고 5일간 배양한 후 세포를 관찰했을 때, 세포피의 밀도가 농도 의존적으로 감소했으며 세포피사이의 process는 짧아지거나 소실되었다. HU를  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  이상 처리하였을 때에는 세포피가 소실되었다(Fig. 7). 세포를 hematoxylin으로 염색하여 관찰한 결과 세포피의 밀도가 감소했으며 염색된 세포의 수 및 염색도도 감소하였다. 화상분석기를 이용하여 hematoxylin에 의해 염색된 면적을 구하여 합산 하한 후 처리 농도간의 비교를 실시한 결과, 농도에 따른 상관관계를 보이면서 농도 의존적으로 감소하였으며 본 실험에서 세포의 분화도를 50% 감소시키는 HU의 농도는  $2.135\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 또한 HU는 같은 농도조건에서 세포 생존성보다 세포분화도를 더 저해시키는 것을 알 수 있었다. 또한 신경세포로의 분화가 억제되어 세포피들을 상호 연결시키고 있는 process가 대조군과는 달리 처리군에서는 미약하게 관찰되었다. 고농도처리군( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 소세포피가 소실되었으며

주위 유섬유세포도 감소되어 세포밀도가 낮게 관찰되었다. 또, anti-neurofilament 항체로 면역염색한 결과 HU 처치군의 경우 농도가 높아질수록 양성반응이 약하게 관찰되었으며, 특히 세포피간의 process의 소실과 더불어 세포피의 크기도 작아졌다(Fig. 8).

랫드에 HU를 노출시켰을때 limb bud에서 과도한 세포사망이 일어나 만기분만시 기형이 관찰되었고 과량투여시 태자가 사망하거나 흡수되었다고 보고된 바 있다(Scott, 1971). 또한, gold hamster의 경우는 중추신경계 이상이 유발되었으며(Ferm, 1966), 마우스 배자를 전배자 배양하였을때 HU는 신경관기형 및 외뇌증 등의 신경계 기형을 유발한다고 하였다(Warner 등, 1983).

중뇌세포배양계에 RA를 처리하여 그 영향을 조사해 본 결과, RA는 농도의존적으로 세포독성 및 세포분화지연을 유발하였다. RA를 투여한 군을 neutral red uptake 실험한 결과 RA의 세포독성에 의해 세포생존성이 감소되어 농도의존적으로 흡광도가 감소되었으며 본 실험에서 RA의 EC<sub>50</sub>은 0.174 $\mu$ g/ml이었다(Fig. 9). 세포를 hematoxylin으로 염색하고 anti-neurofilament 항체로 면역시험한 결과 소세포피수 및 크기가 감소하였으며, 염색된 세포의 수 및 염색도도 감소하였다. 본 실험에서 관찰된 세포분화도를 50% 억제시키는 농도는 0.087 $\mu$ g/ml이었다. 면역세포염색에서 대조군 및 용매(DMSO) 대조군에서는 neurite를 포함한 신경세포 전반에 걸쳐 과립 또는 점형태의 양성반응이 관찰되었으나, 처치군의 경우 농도가 높아질수록 neurite부터 점점 양성염색반응이 약해졌으며, 10 $\mu$ g/ml 이상 처치시 양성반응이 소실되었다(Fig. 10). 본 실험에서는 HU는 직접배양배지에 녹여 처치하였으나, RA처치시에는 약물의 특성상 DMSO에 녹여 stock 용액을 만들어



이용하였으며, DMSO의 양은 배양배지 1ml 당 5 $\mu$ l을 넘지 않도록 하였다. DMSO의 농도가 1ml 당 10 $\mu$ l 이상일 경우는 DMSO의 독성에 의하여 세포의 생존성이 저하되어, DMSO가 세포에 영향을 미치지 않는 농도 범위인 배양배지 1ml 당 5 $\mu$ l 범위내에서 사용하였다.

본 실험에서는 all-trans RA를 이용하여 실험하였는데, RA는 최기형성에 종차가 있는 것으로 알려졌으며, 동물을 이용한 최기형성 시험에서 최저 최기형용량은 피하주사했을때 랫드의 경우 5-10mg/kg/day이며, 마우스의 경우 1-3mg/kg/day로 알려져 있으나, RA의 다른 형태의 isomer인 cis form은 약 50-150mg/kg/day인 것으로 알려졌다(Rosa 등, 1986).

본실험에서 증뇌소세포괴 배양법을 이용하여, HU와 RA에 대한 영향평가방법으로 세포생존성 및 세포분화도를 50% 억제하는 농도(EC<sub>50</sub>)을 각각 구하여 비교하였다(Table 1). 본실험에서는 각각의 물질에 대하여 반복실험하여 평균을 구해 비교하였다. 각각의 실험마다 유사한 경향을 보여 실험에 따른 영향이 없었으며, 재현성이 높아 매 실험마다 높은 상관성이 나타났다.

RA와 HU 모두 세포생존성 및 세포분화도를 억제시켰으며, RA의 세포생존성 및 세포분화도에 대한 각각의 EC<sub>50</sub>이 모두 HU의 EC<sub>50</sub> 보다 낮았고, 또한 RA 및 HU의 세포분화도에 대한 EC<sub>50</sub>이 세포생존성에 대한 EC<sub>50</sub>보다 낮았다. RA 및 HU는 최기형유발물질로 알려져 있는데, 본 실험에서도 증뇌소세포괴 배양법에서 세포생존성 및 분화도를 endpoint로 하여 실험한 결과 세포생존성 및 분화도를 억제시켜, 이 실험법이 최기형성물질에 대한 *in vitro* 실험법으로서 높은 민감도를 가지고 있는 것으로 생각된다. RA와 HU 모두 세포생존성에 대한

EC<sub>50</sub>보다 세포분화도에 대한 EC<sub>50</sub>이 모두 낮았는데, Walum과 Flint(1990)는 시험물질이 세포독성을 유발하는 농도보다 낮은 농도에서 세포분화도를 억제하는 경우 잠재적인 최기형성물질(potential teratogen)로 사료되어진다고 보고하였으며, 중뇌소세포과 배양법을 이용하여 화학물질의 최기형성을 검색한 결과, 최기형성물질을 검색하는 검색민감도와 비최기형성물질에 대한 특수성(specificity)이 높은 것으로 보고되었다(Flint 등, 1984; Flint와 Orton, 1984; Gregotti 등, 1994).

중뇌소세포과 배양법은 신경독성과 관련된 잠재적인 최기형성물질을 조사하는 재현성이 높은 *in vitro* 세포 배양시험법으로서, 세포독성 및 신경형성과 관련된 분화도로 기형유발을 판단하는 최기형성 검색 방법의 하나로서 이용되는 한편, 발생독성물질 중 최기형성물질의 분자 및 세포학적 기전연구의 한 model로서 효과적으로 이용될 수 있으리라 생각된다.

## 제 4 장 결 론

1. 랫드태자의 중뇌세포를 트립신 및 물리적 분쇄방법으로 분리한 후, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 10% FBS가 함유된 DMEM/F12 media에서 배양하여 일차중뇌소세포배양법의 조건을 확립하였다.

2. 중뇌세포를 분리하여 분리, 배양한 결과 미분화된 신경상피세포(neuroepithelium)로 부터 정상적인 발달상태를 보이는 신경세포가 분화되었으며, 신경세포들 사이에 상호간의 process가 연결되어 *in vivo* 상태의 뇌발달과 유사한 신경발생과정이 진행되었다.

3. 세포배양 및 분화에 대한 약물의 영향을 평가하기 위하여 기형 유발물질인 hydroxyurea(HU)와 retinoic acid(RA)를 처리한 후, 세포의 생존성(viability)과 세포의 분화도(differentiation)를 관찰한 결과, 생존성과 분화도 모두 농도의존적으로 감소하였으며, 생존성을 50% 감소시키는 농도는 HU가 4.298 $\mu$ g/ml, RA가 0.174 $\mu$ g/ml이었고, 세포분화도에 대해서는 각각 2.135 $\mu$ g/ml 및 0.087 $\mu$ g/ml이었다. 따라서 두 물질 모두 세포분화도에 대한 영향이 세포생존성에 대한 영향보다 큰 것을 알 수 있었다.

이상과 같이 *in vitro* 일차중뇌소세포배양법의 조건을 확립하였으며, *in vitro* 일차중뇌소세포배양법이 최기형성물질을 검색하기 위한 하나의 방법으로 이용될 수 있으리라 생각된다.

## 제 5 장      참고문헌

- Ahrens, P. B., M. Solursh, and R. S. Reiter (1977). Stage related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Devl. Biol.*, 60: 69~82.
- Bournias-Vardiabasis, N., and R. Teplitz (1981). An *in vitro* assay of teratogenesis. *Mutat. Res.*, 85: 281~282.
- Braun, A. G., D. J. Emerson, and B. J. Nicholson (1979). Teratogenic drugs inhibit tumor cell attachment to lectin-coated surfaces. *Nature*, 282: 507~509.
- Brown, L. P., J. R. Foster, T. C. Orton, O. P. Flint, and G. G. Gibson (1989). Inducibility and Functionality of rat embryonic/foetal cytochrome P-450: A study of differentiating limb-bud and mid-brain cells *in vitro*. *Toxic. in vitro*, 3: 253~260.
- Ceccarini, C., and H. Eagle (1971). Induction and reversal of contact inhibition of growth by pH modification. *Nature, New Biol.* 233: 271~273.
- Dimpfel, W. (1980). Rat nerve cell cultures in pharmacology and toxicology. *Archs. Toxicol.*, 44: 55-62.
- Dumont, J. N., T. W. Schultz, and S. M. Newman (1982). A frog embryo teratogenesis assay: Xenopus(FETAX)- A model for teratogen screening. *Teratology*, 25: 37A.
- Fedoroff, S. and C. Hall (1979). Effect of horse serum on neural

- cell differentiation in tissue culture. *In Vitro*, 13: 641-648.
- Ferm, V. H. (1966). Severe developmental malformations. Malformations induced by urethane and hydroxyurea in the hamster. *Arch. Pathol.*, 81: 174~177.
- Flint, O. P. (1987). An *in vitro* test for teratogens using cultures of rat embryo cells. In: Atterwill C. K., eds. *In vitro* methods in toxicology. Cambridge: Cambridge University Press: 339-363.
- Flint, O. P. (1980). The effects of sodium salicylate, cytosine arabinoside, and eserine sulfate on rat limb buds in culture. In *Teratology of the Limbs* (ed. H. -J. Merker, H. Nau and D. Neubert), 325~338. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Flint, O. P. (1983). A micromass culture method for rat embryonic neural cells. *J. Cell. Sci.*, 61: 247~262.
- Flint, O. P. (1993). *In vitro* tests for teratogens: desirable endpoints, test batteries and current status of the micromass teratogen test. *Repro. Toxicol.*, 7: 103~111.
- Flint, O. P. and T. C. Orton (1984). An *in vitro* assay for teratogens with cultures of rat embryo midbrain and limb bud cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 76: 383~395.
- Flint, O. P. T. C. Orton, and R. A. Ferguson (1984). Differentiation of rat embryo cells in culture: Response following acute maternal exposure to teratogens and non-teratogens. *J. Appl. Toxicol.*, 4: 109~116.
- Gregotti, C. F., Z. Kirby, L. Manzo, L. G. Costa, and E. M.

- Faustman (1994). Effects of styrene oxide on differentiation and viability of rodent embryo cultures. *Toxico. Appl. Pharmacol.*, 128: 25~35.
- Grimm, V. E. (1987). Effect of teratogenic exposure on developing brain: research strategies and possible mechanisms. *Develop. Pharmacol. Teratol.*, 10: 328~345.
- Hassell, J. R., J. P. Pennypacker, and C. A. Lewis (1978). Chondrogenesis and cell proliferation in limb bud cultures treated with cytosine arabinoside and vitamin A. *Expl. Cell Res.*, 112: 409~412.
- Hsu, S. M., L. Raine, and H. Fanger (1981). Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577~580.
- Johnson, E. M. (1980). Detection of teratogenic potential of drugs and chemicals by an artificial embryo. *Anat. Records*, 196: 80A.
- Kocchar, D. H. (1975). The use of *in vitro* procedures in teratology. *Teratology*, 11: 273~288.
- Levine, E. M., Y. Becker, C. W. Boone, and H. Eagle (1965). Contact inhibition, macromolecular synthesis and polyribosomes in cultured human diploid fibroblasts. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 53: 350~356.
- Prati, M., E. Giavini, and E. Menegola (1993). Alternatives to *in*

- vivo* tests for teratologic screening. *Ann. Ist. super. Sanità*, 29: 41~46.
- Pratt, R. M., and W. D. Willis (1985). *In vitro* screening assay for teratogens using growth inhibition of human embryonic cells. *P. N. A. S.*, 92: 5791-5794.
- Ribeiro, P. L., and E. H. Faustmann (1990 a). Embryonic micromass limb and CNS cultures: Different cell cycle kinetics during differentiation *in vitro*. *Toxicol. in vitro*, 4: 602~608.
- Ribeiro, P. L., and E. M. Faustmann (1990 b). Chemically induced growth inhibition and cell cycle perturbations in cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104: 200~211.
- Rosa, F. W., A. L. Wilk, and F. O. Kelsey (1986). Teratogen update : vitamin A congeners. *Teratology*, 33: 355~364.
- Sadler, T. W., W. E. Horton, and C. W. Warner (1982). Whole embryo culture: A screening technique for teratogens. *Teratogen. Carcinogen. and Mutagen*, 2: 243~253.
- Saxen, L. (1988). Teratogenesis *in vitro*. Adverse drug react. *Acute poisoning Rev.*, 2: 75~94.
- Schmid, B. P. (1985). Xenobiotic influences on embryonic differentiation, growth and morphology *in vitro*. *Xenobiotica*, 15: 719~726.
- Schwetz, B. A., R. E. Morrissey, F. Welsch, and R. A. Kavlock (1991). *In vitro* teratology. *Environ. Health Perspect*, 94: 265

~268.

- Scott, W. J., E. J. Ritter, and J. G. Wilson (1971). DNA synthesis inhibition and cell death associated with hydroxyurea teratogenesis in rat embryos. *Dev. Biol.*, 26: 306~315.
- Seeley, M., and E. M. Faustman (1995). Toxicity of four alkylating agents on *in vitro* rat embryo differentiation and development. *Funda. Appl. Toxicol.*, 26: 136~142.
- Sefton, B. M., and H. Rubin (1970). Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes. *Nature, Lond.* 227: 743~845.
- Pettman, B., J. C. Louis, and M. Sensenbrenner (1979). Morphological and biochemical maturation of neurones cultured in the absence of glial cells. *Nature, Lond.* 281: 378-380.
- Umansky, R. (1966). The effect of cell population density on the developmental fate of reaggregating mouse limb bud mesenchyme. *Dev. Biol.*, 13: 31-56.
- Walum, E., and O. P. Flint (1988). Acrylamide, 2, 5-hexanedione and  $\beta$ -aminopropionitrile toxicity tested in rat embryo mid-brain cell cultures. *ATLA*, 15: 238~244.
- Walum, E., and O. P. Flint (1990). Midbrain micromass cultures: a model for studies of teratogenic and sub-teratogenic effects on CNS development. *Acta Physiol. Scand.*, 140: 61~72.
- Warner, C. W., T. W. Sadler, J. Shockey, and M. K. Smith (1983). Comparison of the *in vivo* and *in vitro* response of



- mammalian embryos to a teratogenic insult. *Toxicology*, 38: 271 ~ 282.
- Welsch, F. (1992). *In vitro* approaches to the elucidation of mechanisms of chemical teratogenesis. *Teratology*. 46: 3~14.
- Welsh, J. J. (1987). Teratological research using *in vitro* systems. IV. Cells in culture. *Environ. Health Perspect.*, 72: 225~235.
- Wilby, O. K., D. R. Newall, and J. M. Mesh (1986). A hydra assay as a pre-screen for teratogenic potential. *Food Chem. Toxic.*, 24: 651~652.
- Wilk, A. L., J. H. Greenberg, E. A. Horigan, R. M. Pratt, and G. R. Martin (1980). Detection of teratogenic compounds using differentiating embryonic cells in culture. *In vitro*, 17: 269~276.

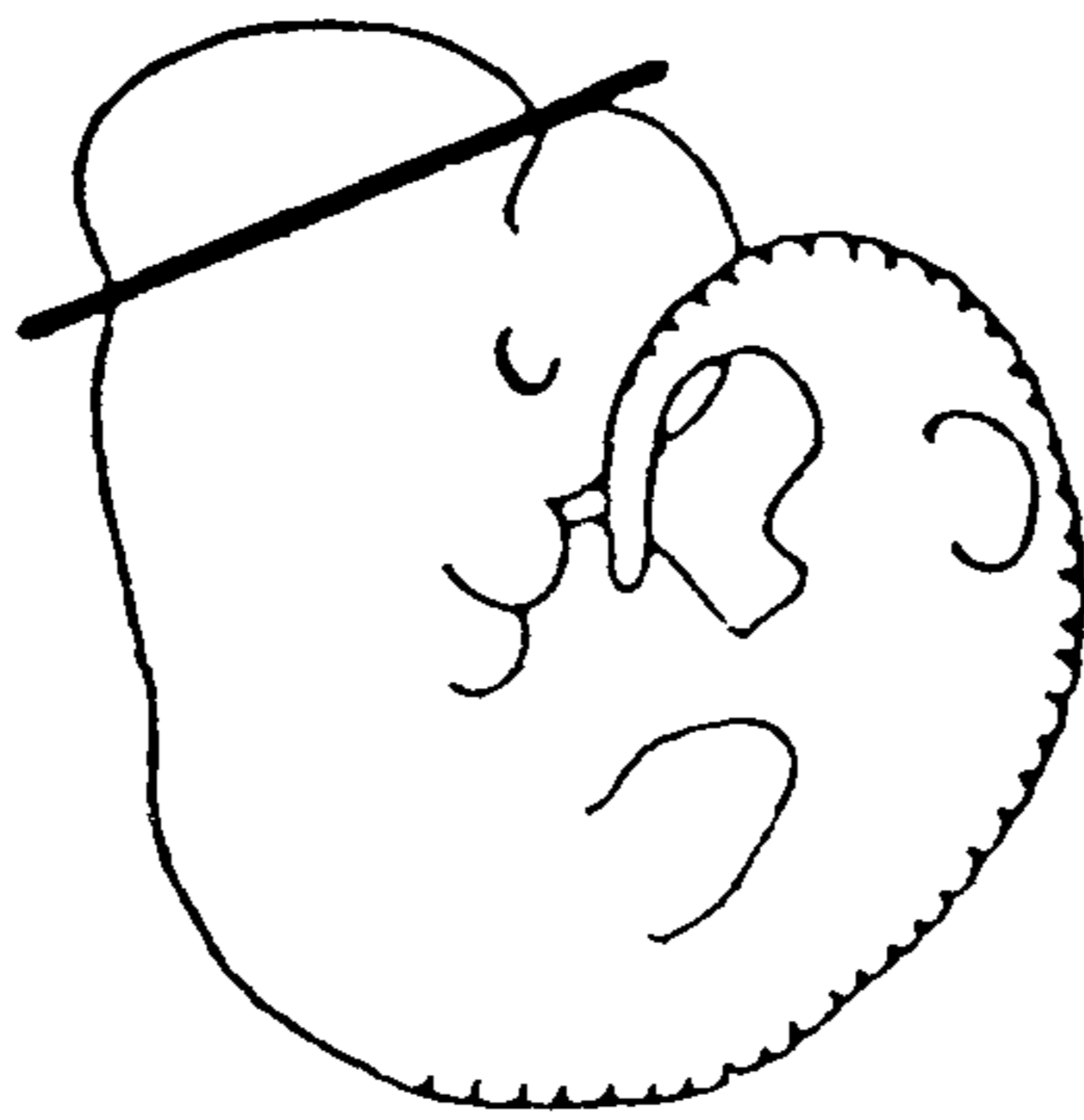


Fig. 1. Microdissection line to remove mesencephalon

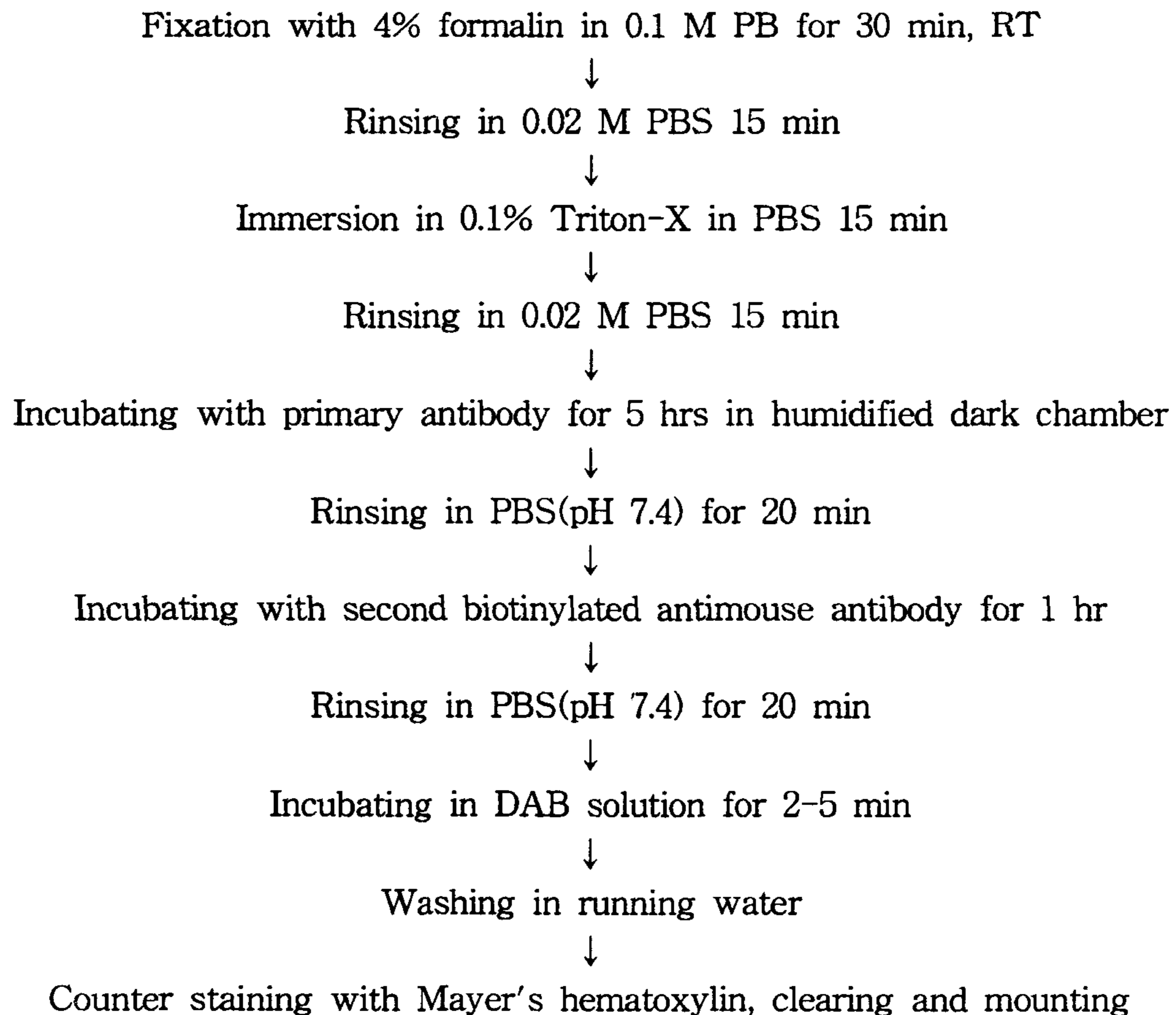


Fig. 2. Procedure of immunocytochemical staining used for the detection of neurofilament of neurons.

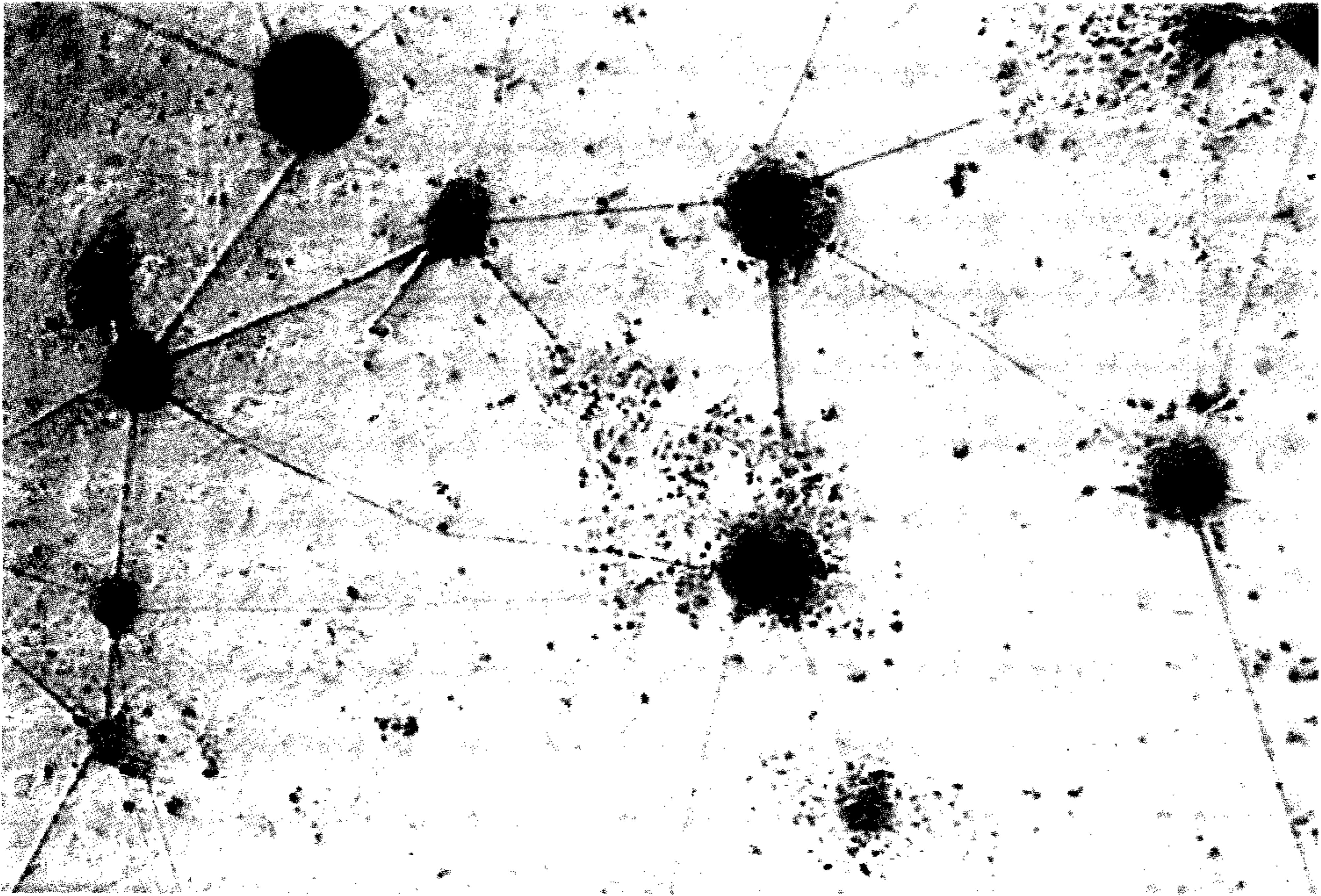


Fig. 3. Biphasic contrast microscopy of micromass midbrain cells cultured for 5 days.  $\times 100$ .

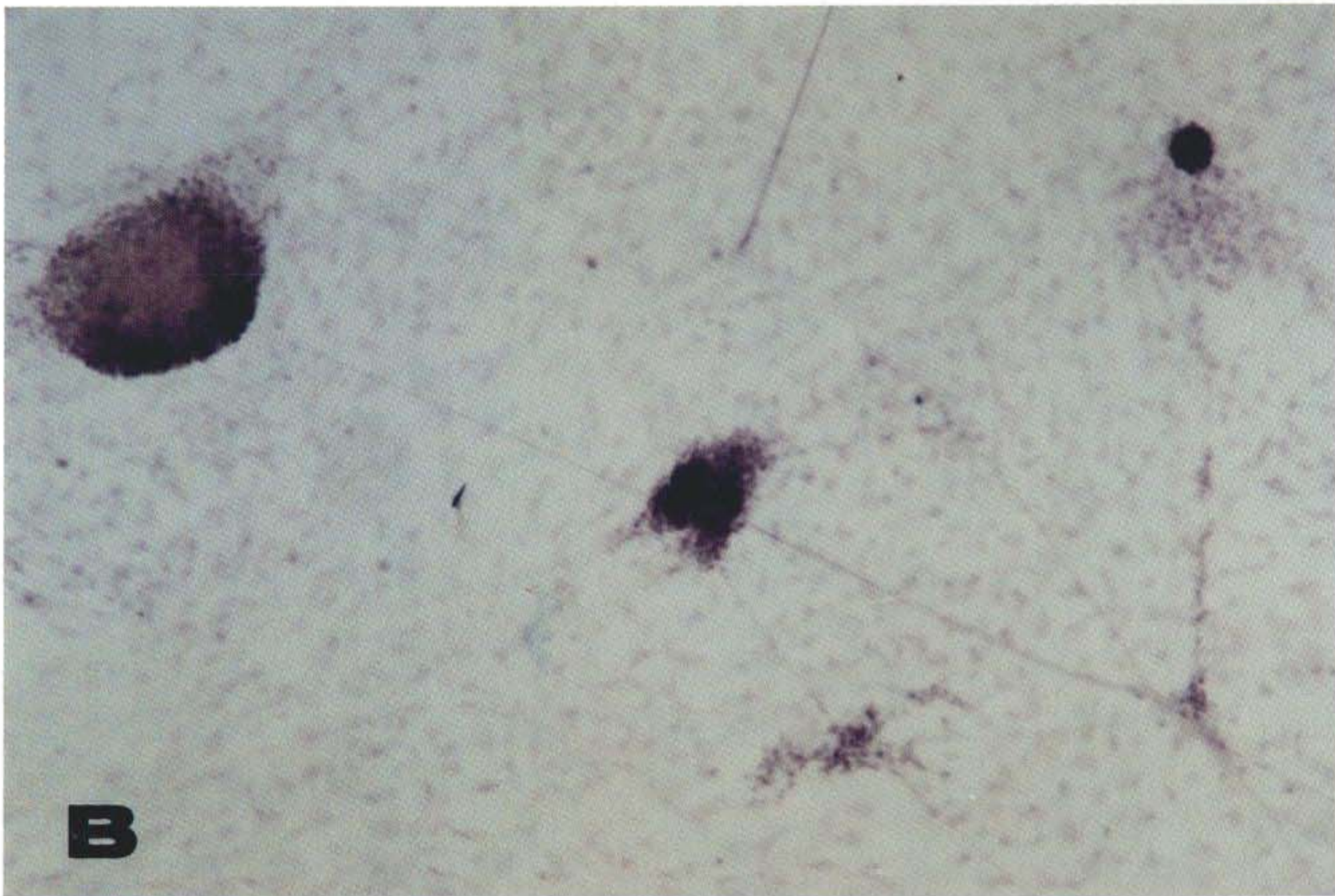
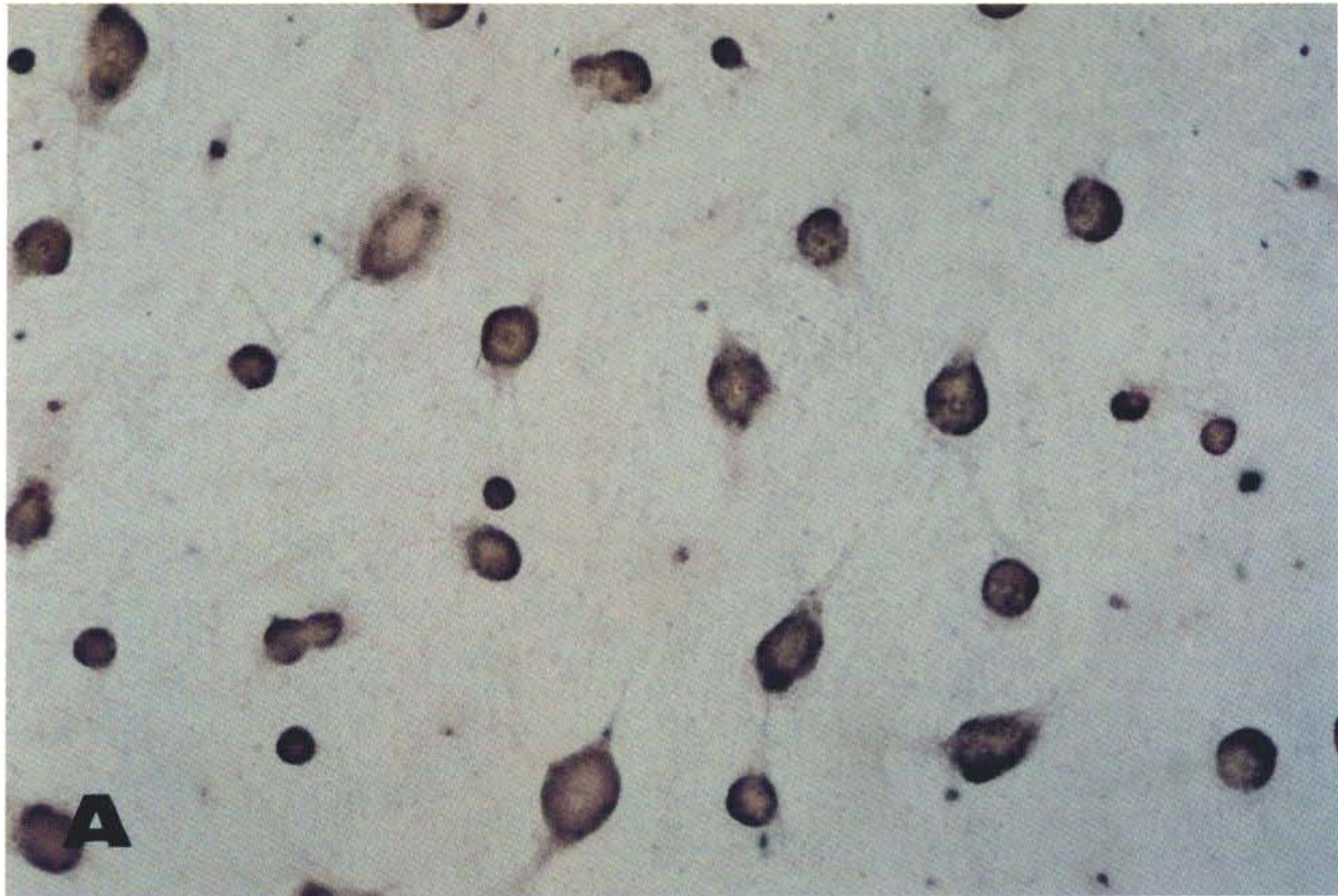


Fig. 4. Rat embryo midbrain cells(A) after 5 days culture.  $\times 25$ .  
(B): A magnification of (A) showing developed processes  
between micromasses.  $\times 100$ , Hematoxylin stain.

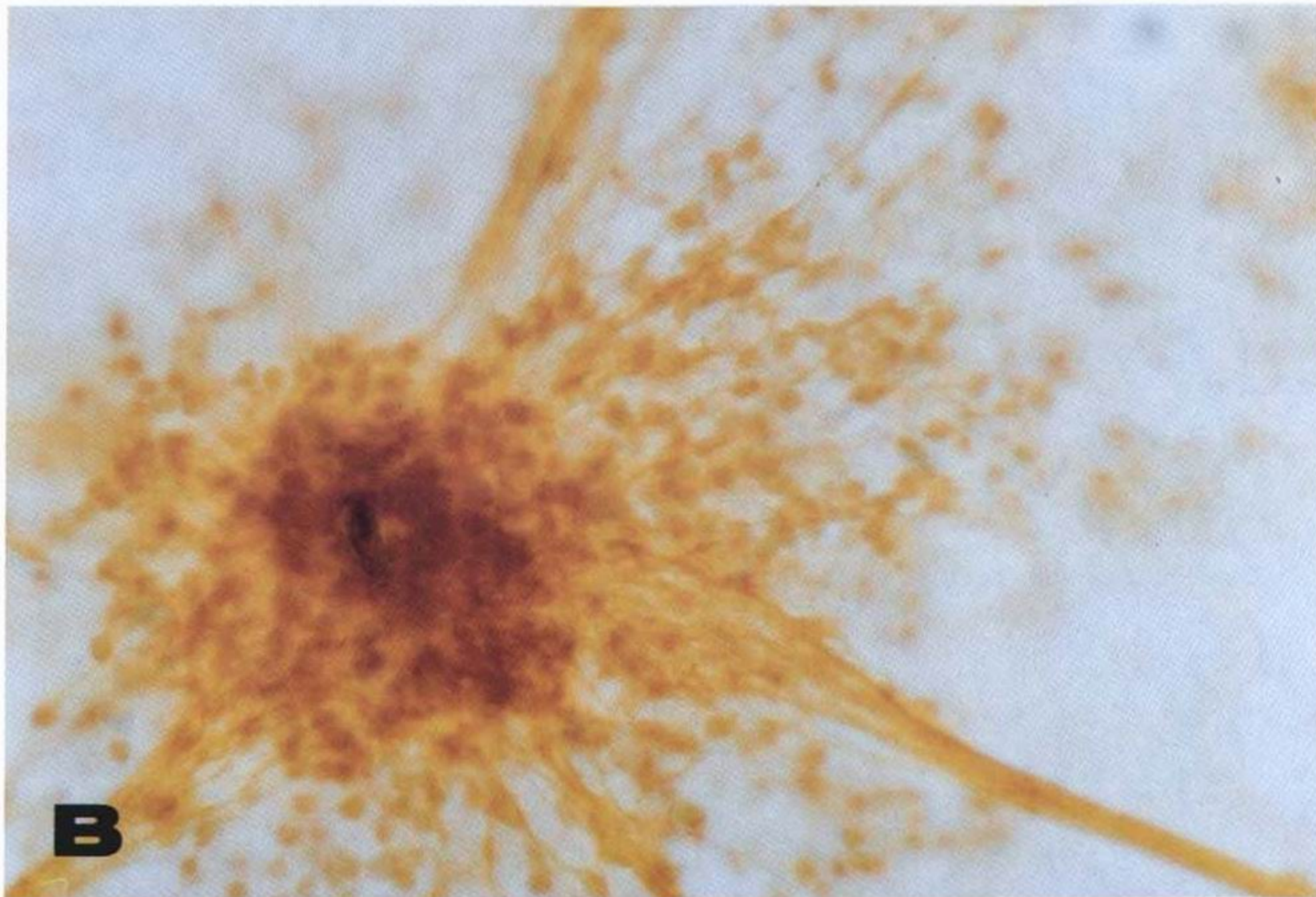
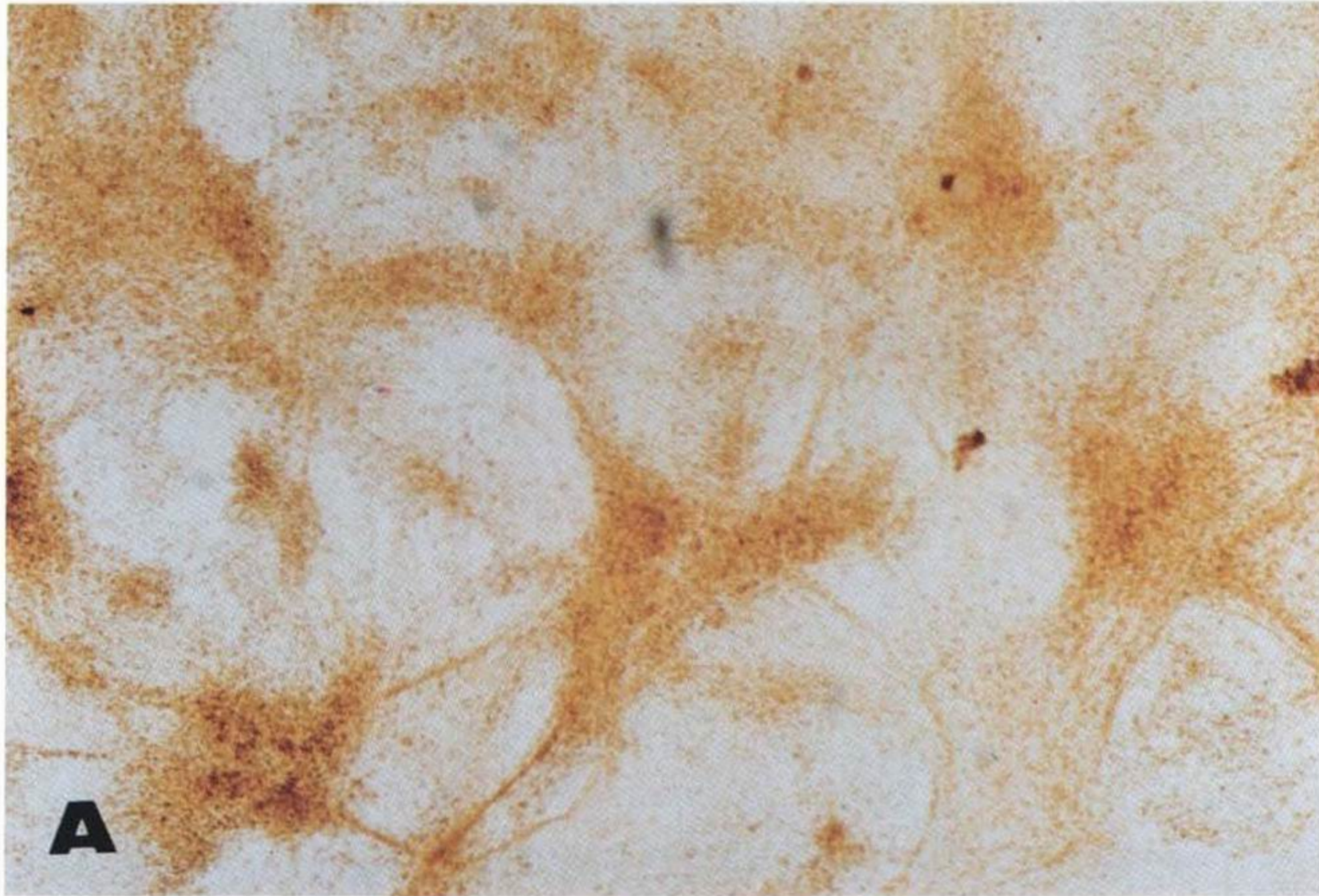


Fig. 5. Rat embryo midbrain cells(A) after 5 days culture.  $\times 25$ .  
(B): A magnification of (A) showing positive reaction to the anti-neurofilament antibody in cell body and neurites.  
 $\times 400$ , ABC stain.

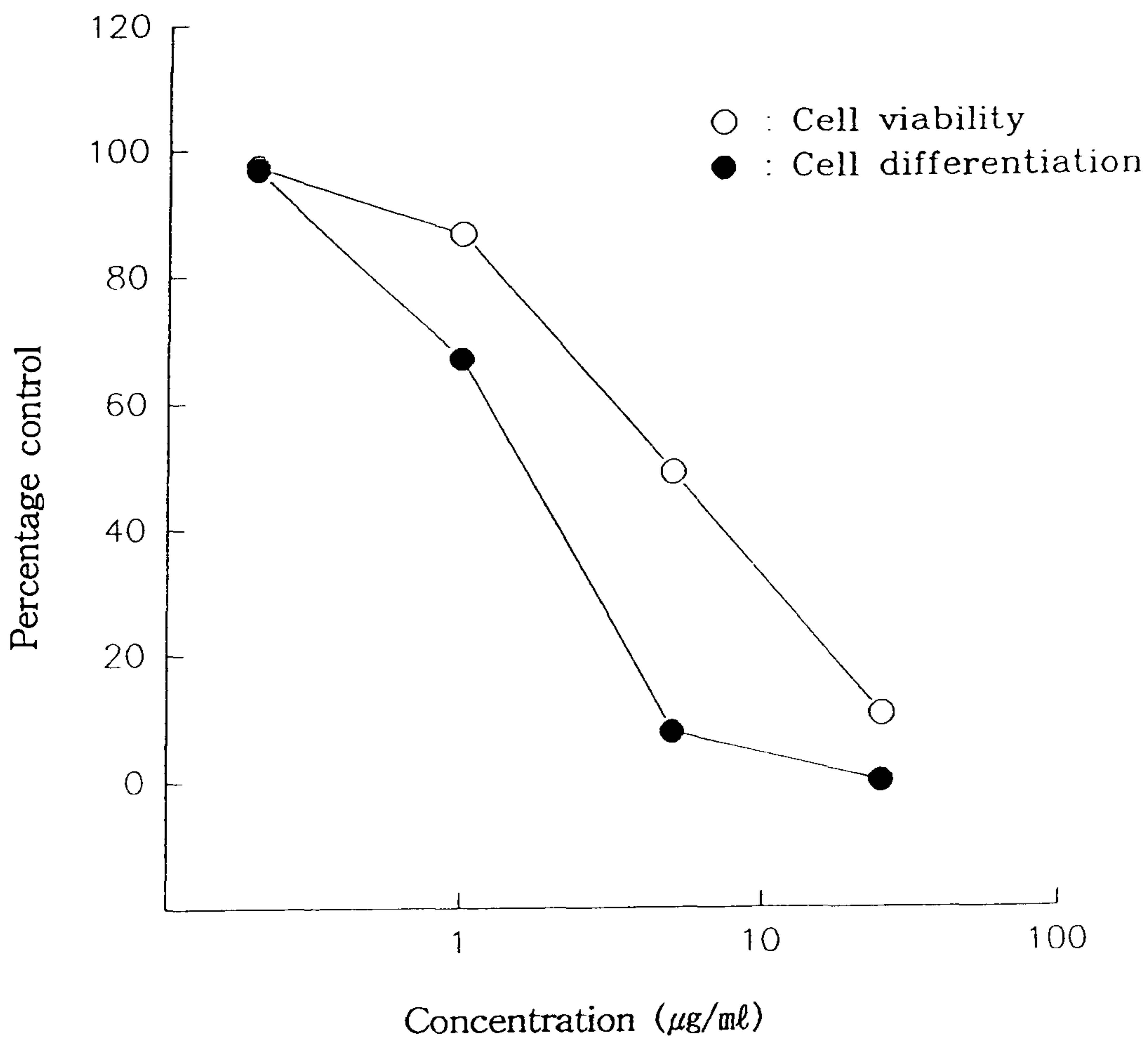


Fig. 6. The effects of HU on cytotoxicity and cell differentiation in midbrain micromass culture on day 5.

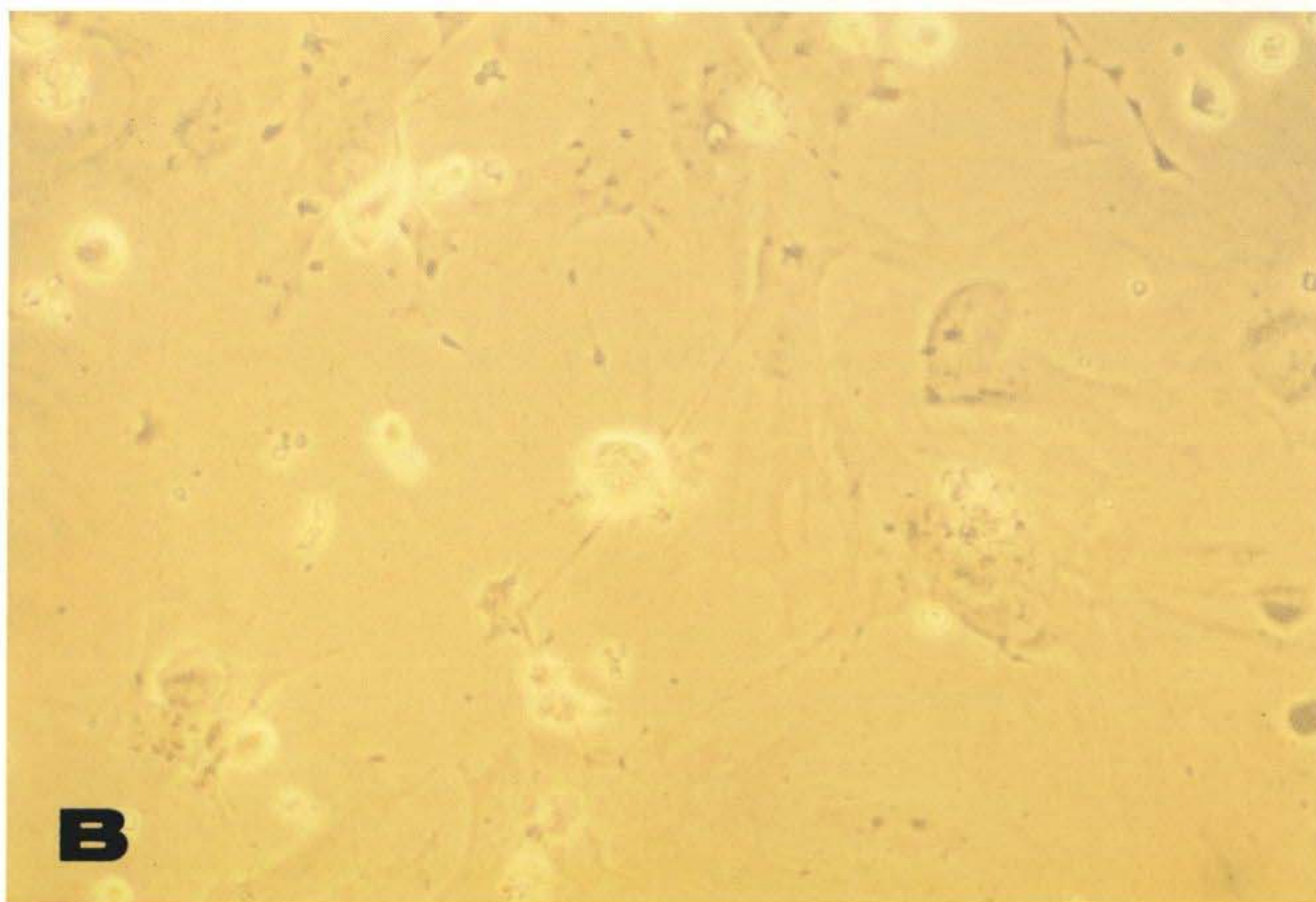
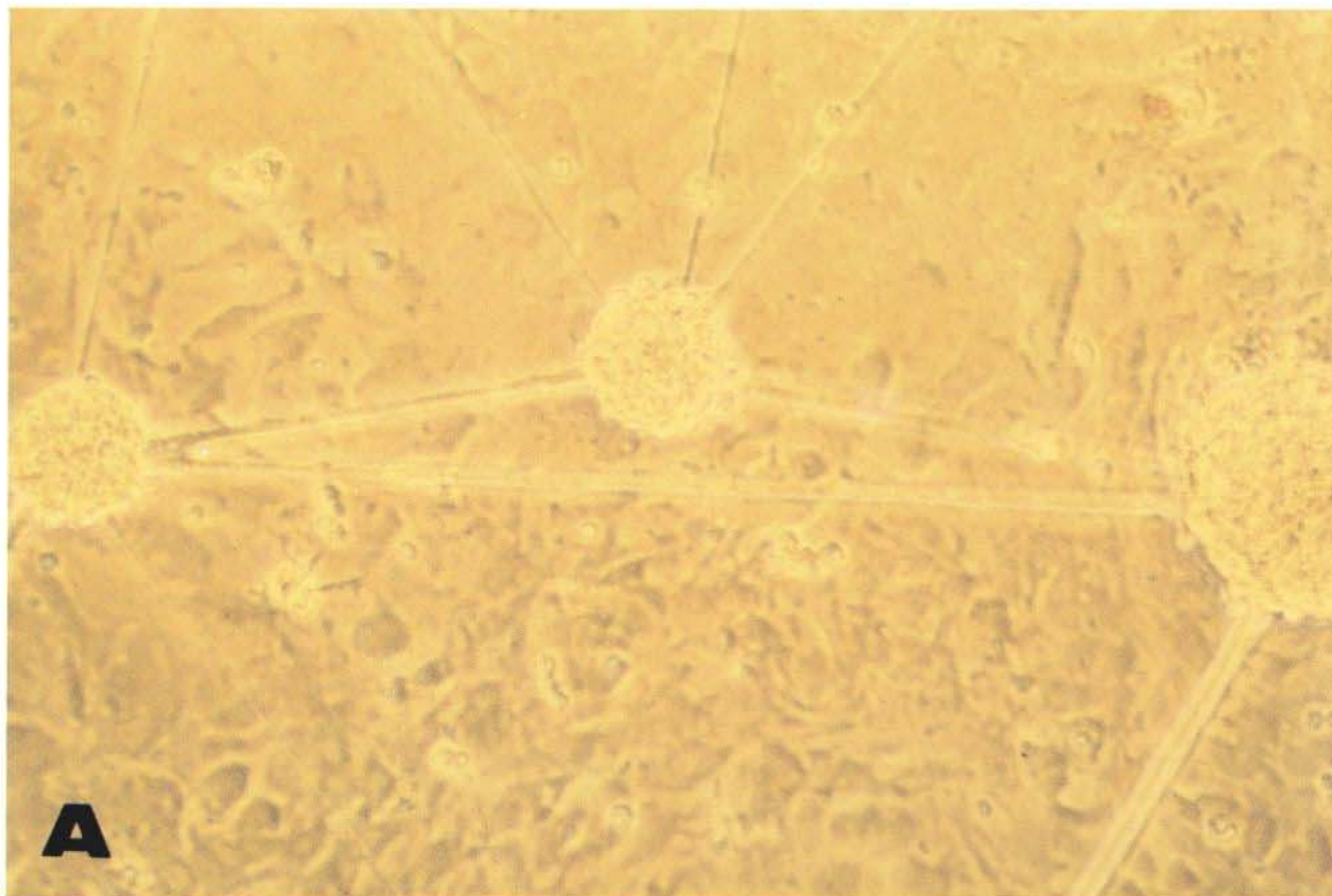


Fig. 7-1. The effects of HU (0.1, 10 $\mu$ g/ml) on cell growth (A, B).  
 $\times 100$ .



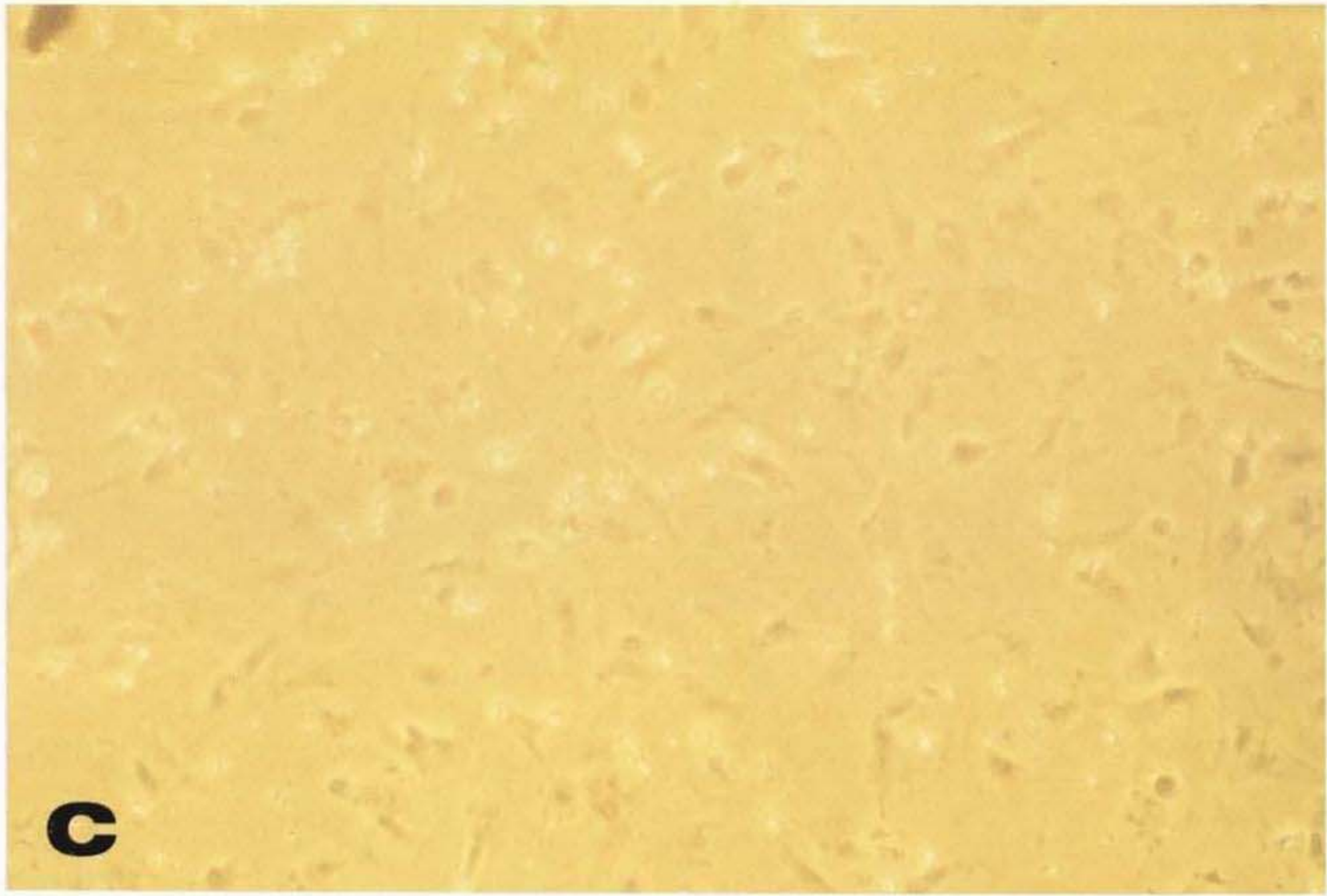


Fig. 7-2. The effects of HU ( $100\mu\text{g/ml}$ ) on cell growth (C).  $\times 100$ .

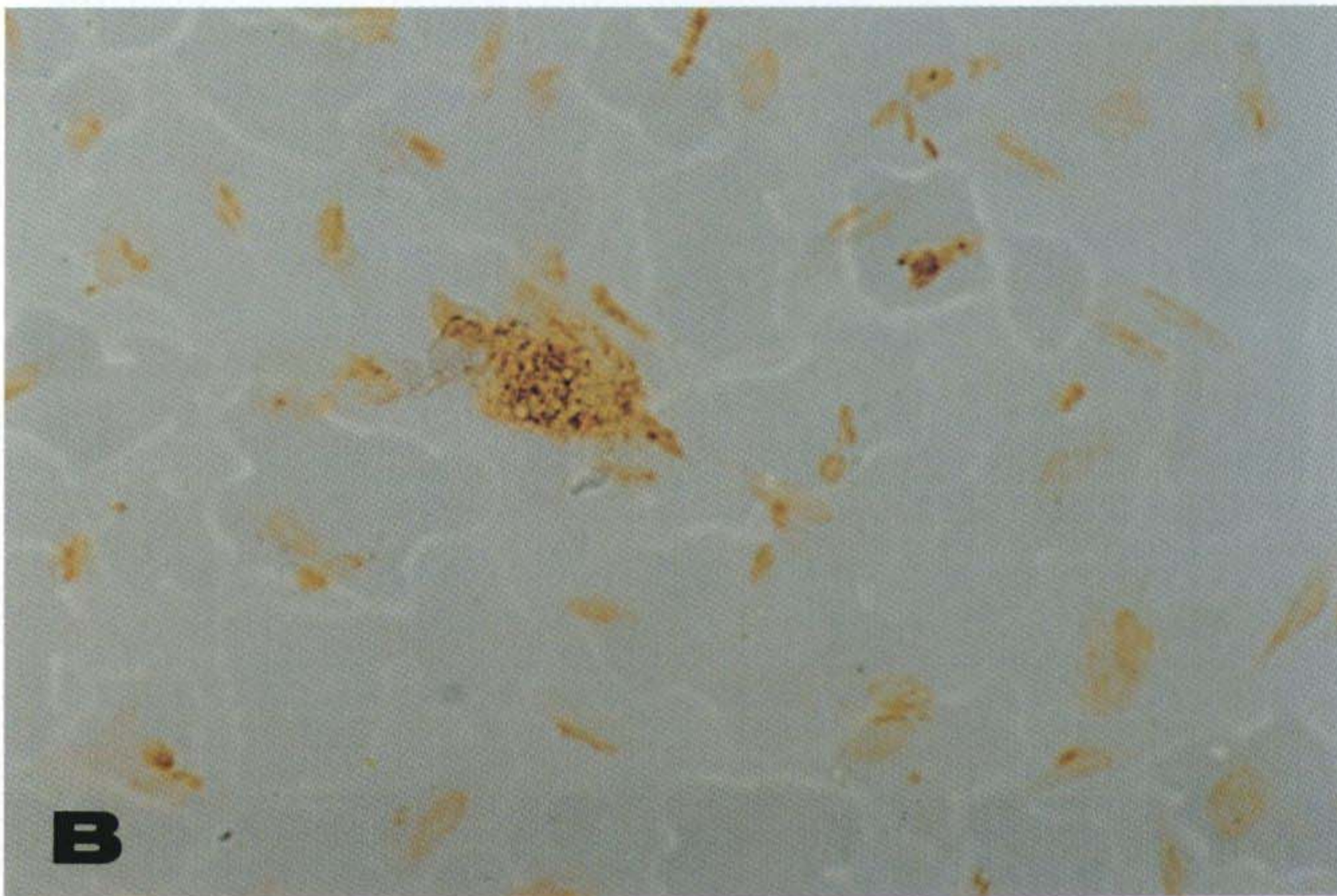
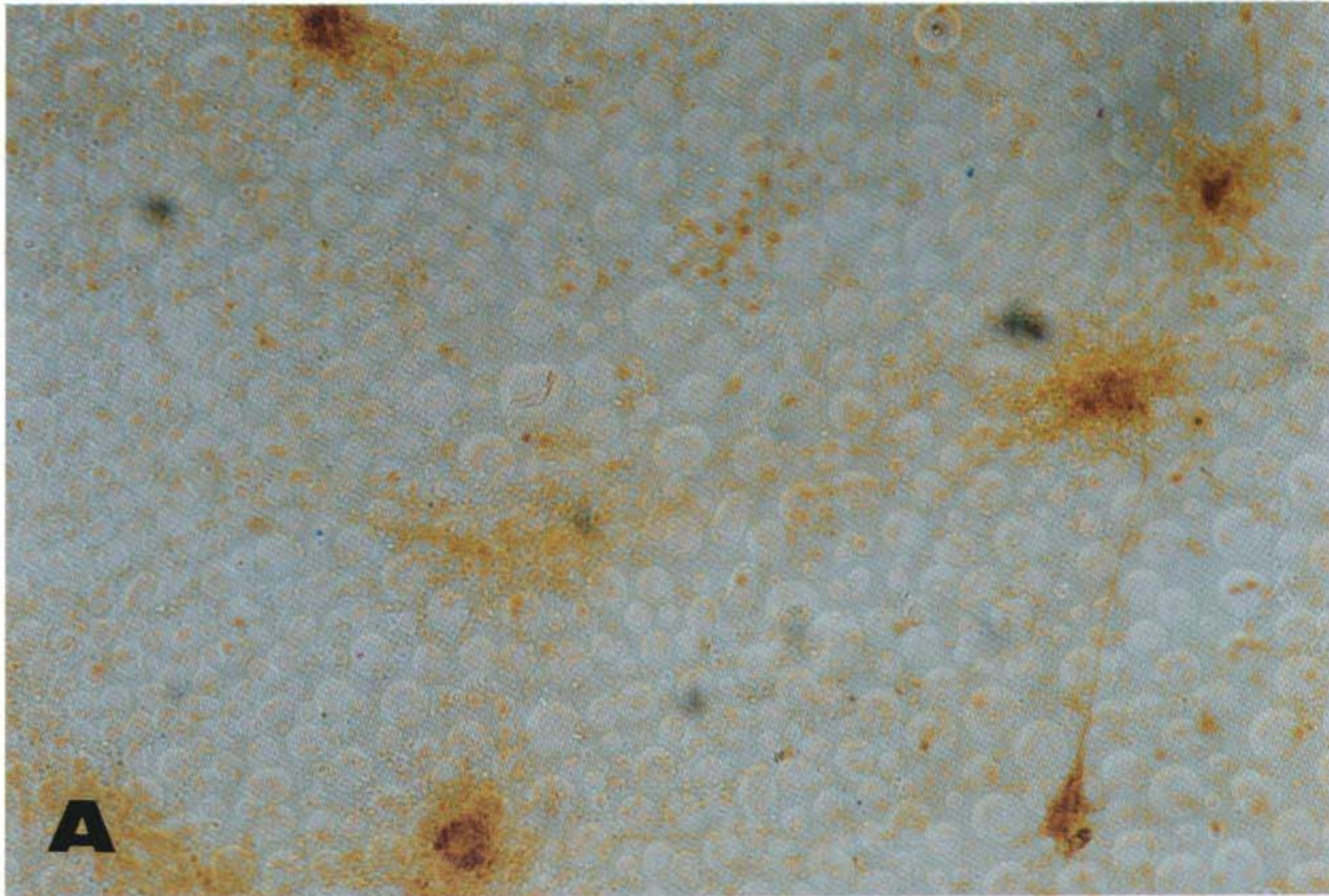


Fig. 8. The effects of HU (1, 10 $\mu$ g/ml) on cell differentiation (A:  $\times$ 100, B:  $\times$ 400). ABC stain.

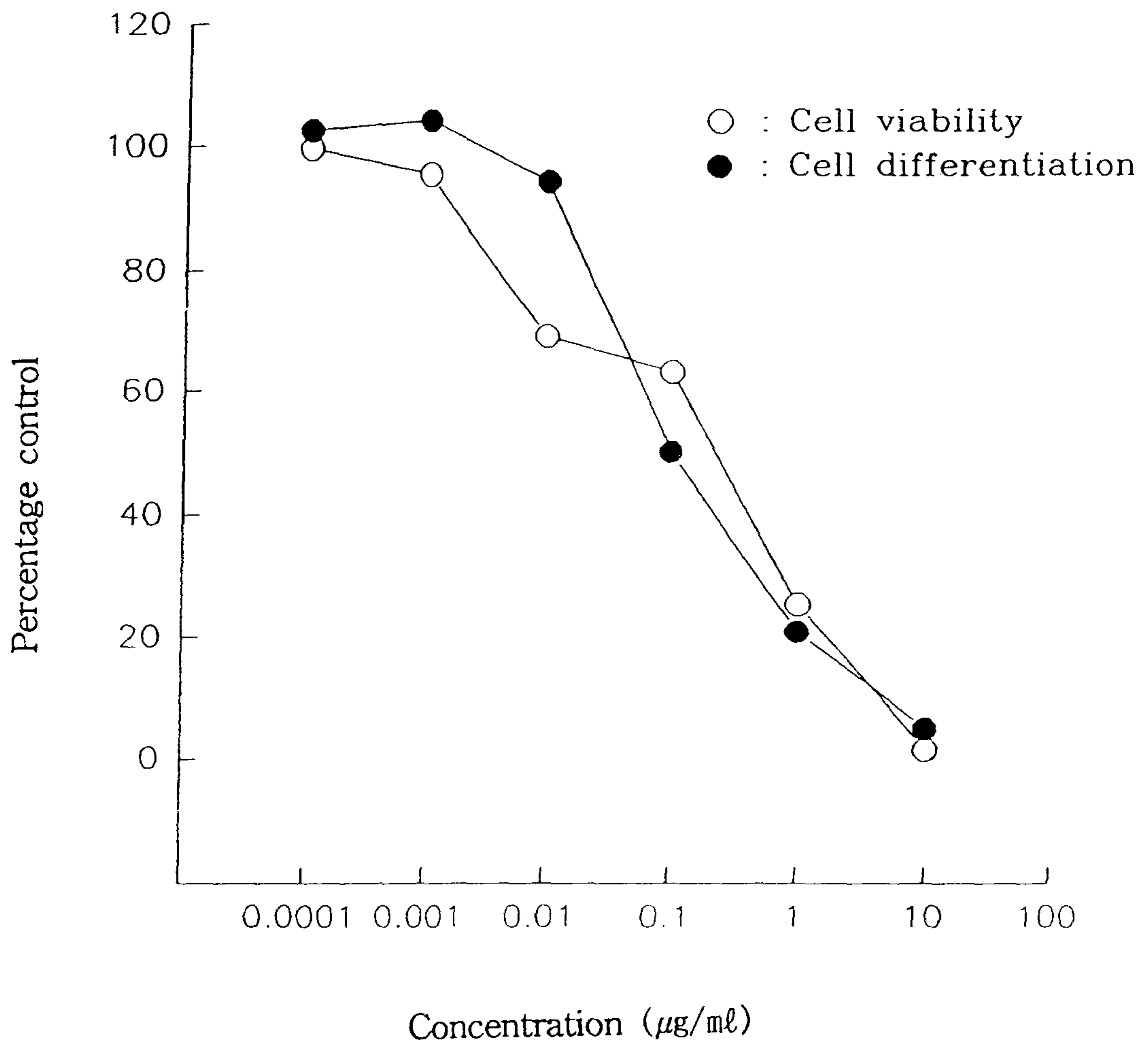


Fig. 9. The effects of RA on cytotoxicity and cell differentiation on day 5.

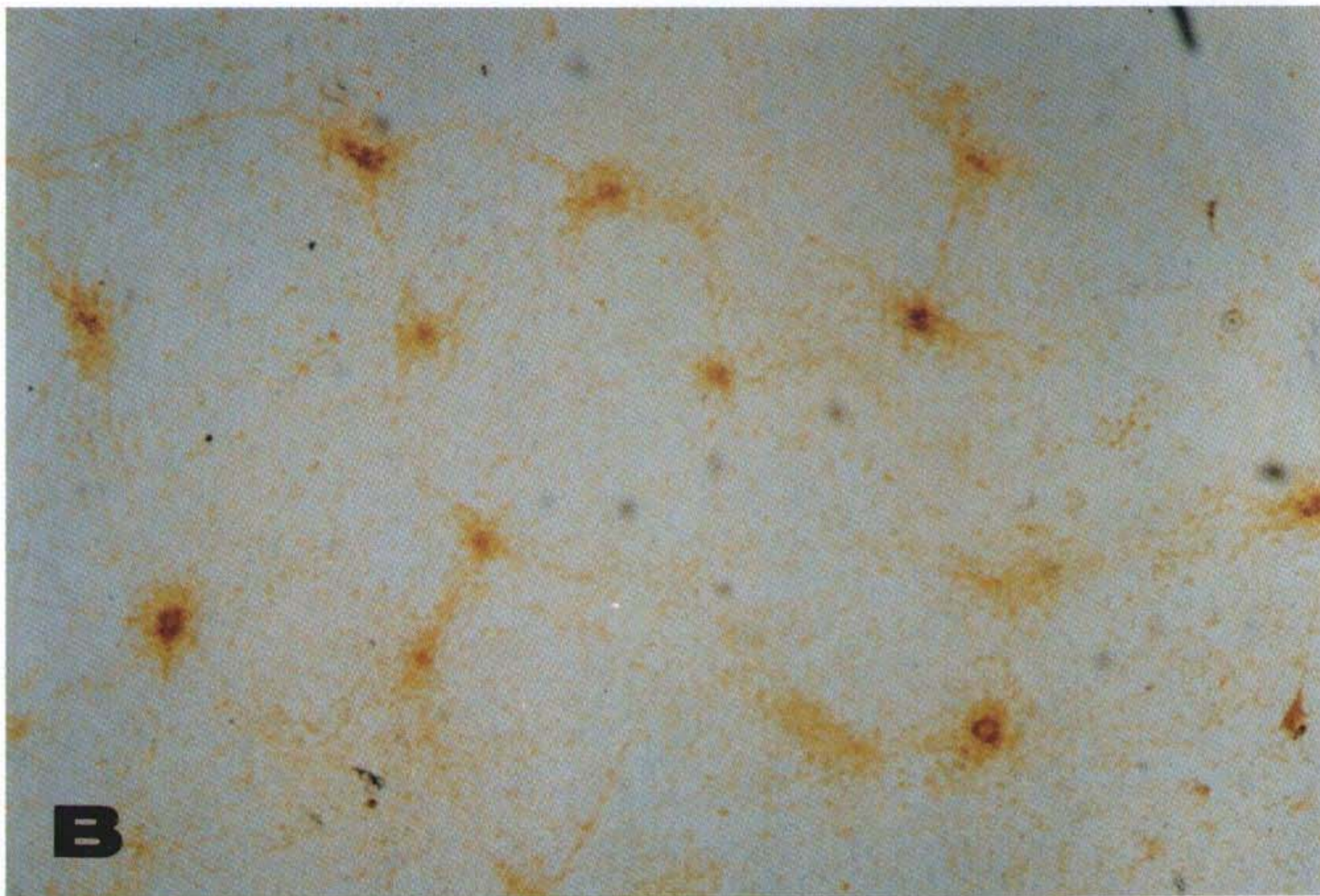
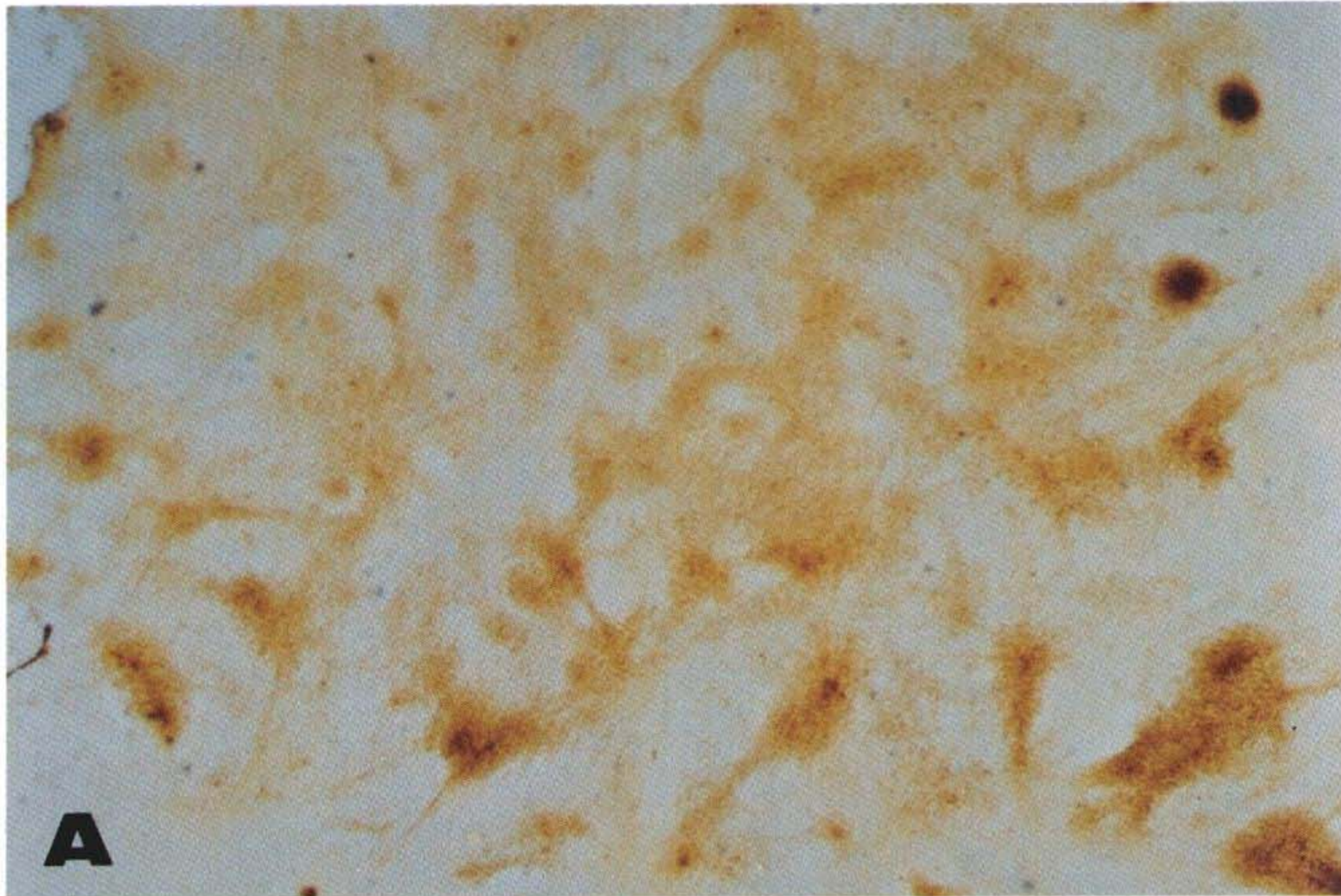


Fig. 10. The effects of RA on cell differentiation. (A): DMSO vehicle control, (B): RA 0.1 $\mu$ g/ml.  $\times$ 25, ABC stain.

Table 1. Concentrations of HU and RA Inducing 50% Decrease in Viability and Cell Differentiation of Midbrain Micromass Culture

(unit : $\mu\text{g/ml}$ )		
Endpoint	HU	RA
Viability (Neutral red assay)	4.298	0.174
Differentiation (Foci formation)	2.135	0.087

*In Vitro* 독성시험법 개발 연구 (I)  
Studies on the Development of  
*In Vitro* Toxicity Tests (I)

포유류 배양세포를 이용한  
항돌연변이물질 검색법의 확립 (I)  
Development of Antimutagenicity Test  
Using Mammalian Cells (I)

주관연구기관 : 국립보건안전연구원 독성부 유전독성과

과 학 기 술 처

# 제 출 문

## 과 학 기 술 처 장 관 귀 하

본 보고서를 “*In vitro* 독성시험법 개발 연구 - 포유류 배양 세포를 이용한 항돌연변이물질 검색법의 확립”의 연차보고서로 제출합니다.

1995. 7.

주관연구기관명 : 국립보건안전연구원

연구책임자 : 하 광 원

보건연구관 : 오 혜 영, 박 장 환

보건연구사 : 손 수 정, 허 옥 순

한 의 식

연구 원 : 김 소 희, 이 중 영

# 요 약 문

## I. 제 목

포유류 배양세포를 이용한 항돌연변이물질 검색법의 확립

## II. 연구목적 및 중요성

과학기술의 발달에 따라 수 많은 화학물질들이 생산 및 통용되고, 이들 화학물질에 의한 발암율이 인류 암발생의 약 80%정도를 차지한다고 보고되고 있어, 암의 발생을 억제시키거나, 암의 진전을 억제시키려는 노력이 계속되고 있다. 그 한 방법으로 일상생활에서 쉽게 접할 수 있는 천연물로부터 항돌연변이 또는 항암효과를 가진 생리활성 물질을 찾아 화학예방요법제로 개발하려는 연구가 계속되고 있다.

항돌연변이물질은 유전자변이, 염색체 손상등의 작용기전에 따른 기존 변이원성시험등을 이용하여, 항돌연변이물질을 여러 방법으로 병용 처리하는데, 본 연구에서는 *in vitro* 및 *in vivo* 염색체이상시험을 이용하여 항돌연변이물질 검색법으로 확립하고, 그 작용기전을 고찰, 신의약품개발에 기초자료로 제공하고자 시험을 실시하였다.



### III. 연구개발의 내용 및 범위

기존의 *in vivo*, *in vitro* 염색체이상시험을 실시하여 비교 고찰하고, 항돌연변이물질 검색수단으로서의 유용성 및 재현성을 검토하고자 하였다. 또한 작용기구가 잘 알려진 mitomycin C (MMC)와 bleomycin을 변이원으로 선택하여 변이억제 특성의 규명 및 시험대상에 따른 항돌연변이물질의 작용특성을 연구하였다. 항돌연변이 후보물질로는 항산화효과가 있다고 밝혀진 결명자 추출물 rubrofusarin을 선택하여 변이원인 MMC, bleomycin과 병용처리하여 항돌연변이효과를 관찰하고자 하였으며, 미국 FDA에서 제 3상 임상시험을 실시하고 있는 항돌연변이 효과가 보고된  $\beta$ -carotene을 항돌연변이 지표물질로 선택하여, 항돌연변이 효과 및 그 작용기전을 확인해 보고자 하였다.

### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 포유동물배양세포를 이용한 *in vitro* 염색체이상시험을 항돌연변이물질 검색법으로 확립하기 위하여, 염색체이상 시험법중 직접법만을 택하여 변이원물질과 검체를 동시투여하여 24시간동안 배양하였다. 시험대상은 CHL세포 (Chinese hamster lung fibroblast cells)를 조직배양하여 사용하였다.

결명자로부터 추출된 rubrofusarin과 기지의 항돌연변이 물질  $\beta$ -carotene의 항돌연변이 효과를 검색하고자, 변이유발물질로 clastogen인 MMC (0.2mg/ml)와 radiomimetic effect를 가진 bleomycin (4 $\mu$ g/ml)을 사용하였다.

1) Bleomycin을 변이 유발물질로 사용하여 rubrofusarin 250, 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 병용처리시, bleomycin의 염색체이상 유발율인 41%을 50%정도 억제한 22%의 염색체이상을 나타내었다. 그 이하의 농도인 62.5, 31.25, 15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  병용투여군에서는 31~38%의 염색체이상을 보여 저해효과는 확인되었으나, 농도 의존성은 나타내지 않았다.  $\beta$ -carotene은 세포내 투여가능 최고농도인 1mg/ml으로부터 공비 2의 5 농도로 bleomycin과 병용투여한 결과, 전 농도에서 변이유발 억제효과를 나타내지 않았다.

2) MMC를 변이유발물질로 처리하고, rubrofusarin 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 최고농도로, 공비 2의 5농도로 처리하였을때, MMC에 의한 돌연변이 유발은 억제하지 않는 것으로 나타났다.  $\beta$ -carotene은 최고 처리농도인 1mg/ml에서 MMC와 병용투여시 MMC의 변이유발율인 35%를 50%정도 억제하였으나, 그 이하의 농도에서는 농도 의존적으로 22~29%의 유발율을 나타내어 평균 25%의 억제효과를 나타내었다.

2. ddY 마우스를 이용한 *in vivo* 염색체이상시험에서는  $\beta$ -carotene, rubrofusarin, corn oil 투여군에서는 2%이하의 염색체이상을 나타내었고, MMC 2mg/kg투여군에서 23%의 염색체이상, bleomycin 80mg/kg투여군에서는 11%의 염색체이상을 나타내었다.

1) MMC와  $\beta$ -carotene 200, 100, 50mg/kg 병용투여군에서는 13%이하의 염색체이상유발을 나타내었고, rubrofusarin 10, 1, 0.1mg/kg 병용투여군에서는 19%이하의 염색체이상을 유발하여, MMC 단독 투여군보다 염색체이상이 유의성있게 억제됨을 나타내었다.

2) Bleomycin과  $\beta$ -carotene 200, 100, 50mg/kg 병용투여군에서는 5% 이하의 염색체이상을 유발하였으며, rubrofusarin 10, 1, 0.1mg/kg을 병용 투여한 군에서는 8%이하의 염색체이상을 유발하여 bleomycin 단독투여 군보다 유의성있게 억제되었음을 나타내었다.

따라서 본 시험의 조건에서  $\beta$ -carotene, rubrofusarin은 MMC와 bleomycin에 대해 염색체이상 억제효과를 나타내었으며, 항돌연변이 물질의 작용기전에 대한 연구와 광범위한 항돌연변이물질 검색법등을 통한 항돌연변이효과 검증으로 화학예방요법제로의 개발 및 항돌연변이물질 검색법으로 확립하는데 이바지하고자한다.

# 목 차

제 출 문 .....	1
요 약 문 .....	2
목 차 .....	6
LIST OF TABLES .....	8
LIST OF FIGURES .....	9
제 1 장 서 론 .....	10
제 2 장 실험 방법 .....	15
제 1 절 실험재료 .....	15
1. 시약 .....	15
2. 실험기기 및 기구 .....	15
3. 실험동물 .....	16
제 2 절 <i>In vitro</i> 염색체이상시험 .....	16
1. 사용세포 및 배양방법 .....	16
2. 세포독성시험 .....	17
3. <i>In vitro</i> 염색체이상시험 .....	17
4. <i>In vitro</i> 염색체표본 제작방법 .....	18

5. 결과의 판정 .....	18
제 3 절 <i>In vivo</i> 염색체이상시험 .....	20
1. 예비독성시험 .....	20
2. <i>In vivo</i> 염색체이상시험 .....	20
3. <i>In vivo</i> 염색체표본 제작방법 .....	21
4. 결과의 판정 .....	21
<b>제 3 장 실험 결과 및 고찰 .....</b>	<b>23</b>
제 1 절 <i>In vitro</i> 염색체이상시험 .....	23
1. 세포독성시험 .....	23
2. <i>In vitro</i> 염색체이상시험 .....	23
제 2 절 <i>In vivo</i> 염색체이상시험 .....	25
1. 예비독성시험 .....	25
2. <i>In vivo</i> 염색체이상시험 .....	29
제 3 절 고찰 .....	33
<b>제 4 장 결론 .....</b>	<b>41</b>
<b>제 5 장 참고 문헌 .....</b>	<b>43</b>

## LIST OF TABLES

Table 1. Effect of $\beta$ -carotene on the frequency of cells with chromosome aberration induced by MMC <i>in vitro</i> . .....	24
Table 2. Effect of rubrofusarin on the frequency of cells with chromosome aberration induced by MMC <i>in vitro</i> . .....	26
Table 3. Effect of $\beta$ -carotene on the frequency of cells with chromosome aberration induced by BLM <i>in vitro</i> . .....	27
Table 4. Effect of rubrofusarin on the frequency of cells with chromosome aberration induced by BLM <i>in vitro</i> . .....	28
Table 5. Effect of treatment on the frequency of cells with chromosome aberration <i>in vivo</i> . .....	30
Table 6. Effect of $\beta$ -carotene on the frequency of cells with chromosome aberration induced by MMC <i>in vivo</i> . .....	31
Table 7. Effect of rubrofusarin on the frequency of cells with chromosome aberration induced by MMC <i>in vivo</i> . .....	32

Table 8. Effect of $\beta$ -carotene on the frequency of cells with chromosome aberration induced by BLM <i>in vivo</i> . .....	34
Table 9. Effect of rubrofusarin on the frequency of cells with chromosome aberration induced by BLM <i>in vivo</i> . .....	35

## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Chemical structure of mitomycin C. ....	12
Fig. 2. Chemical structure of bleomycin. ....	12
Fig. 3. Chemical structure of $\beta$ -carotene. ....	14
Fig. 4. Chemical structure of rubrofusarin. ....	14

## 제 1 장 서 론

돌연변이는 핵산을 구성하는 염기배열의 변화로 그 유전정보가 변화된 것을 의미하며, 돌연변이의 유발은 자연발생적인 것과 돌연변이원에 의한 것으로 나뉘어져,<sup>1)</sup> 후자의 경우 다시 물리적인 요인과 화학적인 요인으로 나뉘어진다. 이 중 화학적 요인에 의한 것은 우리 생활 주변환경이 과학기술의 발달에 따라 수 많은 화학물질들이 생산 및 통용되므로써 환경이 오염되어, 이들 물질들이 직접 또는 간접적으로 인체에 흡수되어 어떠한 유전독성을 일으키며, 궁극적으로 발암, 노화의 원인으로 작용하는지에 관한 연구가 지대한 관심을 불러 일으키고 있다<sup>2)</sup>. 이들 화학물질에 의한 발암율이 인류 암발생의 약 80%정도를 차지한다고 보고되고 있고, 그 중 30~40%가 식이에 의한 것으로 밝혀지고 있다<sup>3~5)</sup>.

1971년 Ames등은 *Salmonella typhimurium*을 이용한 Ames test를 개발함으로써<sup>6,7)</sup>, 돌연변이 및 암을 유발하는 많은 변이원성물질들을 미생물을 이용한 *in vitro* 수준에서 검색하기 시작하였고<sup>8,9)</sup>, 1975년 Schmid등에 의하여 소핵시험이 개발되어<sup>10)</sup>, 염색체이상을 유발시키는 물질 (clastogen)들을 포유동물을 이용한 *in vivo* 수준에서 식품, 식품첨가물, 의약품뿐만 아니라 각종 환경오염물질들로부터 검색하게 되었다<sup>11~16)</sup>.

대부분의 발암물질들은 장기간에 걸친 반복섭취와 생체내에서의 활성화에 의하여 암을 유발하기 때문에, 우리가 평상시 섭취할 수 있는 물질로 항돌연변이 및 항암효과를 나타내며, 세포독성, 유전독성이



없는 물질을 사전에 투여함은, 암이나 유전물질의 손상을 예방할 수 있는 방법으로 많이 이용되고 있다<sup>17~19)</sup>. 항돌연변이 효과를 나타내는 대표적 물질로는 hemoprotein, tannin, chlorophyllin, riboflavin, flavonoid, gallic acid 등이 밝혀져 있으며, 항암효과를 나타내는 물질로  $\beta$ -carotene, vitamin C, ellagic acid, indole-3-carbinol, selenium 등이 밝혀져, 천연물로부터 얻어진 생리활성물질들을 암화학예방요법제로 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>20)</sup>.

항돌연변이물질은 유전자변이, 염색체 손상등의 작용기전에 따른 기존 변이원성시험등을 이용하여, 항돌연변이물질을 여러 방법으로 병용처리하여 항돌연변이효과 및 작용기전을 검색하는 방법을 많이 이용하고 있다.

본 시험에서는 MMC와 bleomycin을 변이유발원으로 *in vitro* 및 *in vivo* 염색체이상시험을 실시하고, 항돌연변이 효과가 있다고 예상되는 천연 추출물을 병용처리하여, 그 효과를 보고자 하였다. MMC (Fig. 1)는 bifunctional한 알킬화제로 DNA 부가체를 형성, DNA의 이중나선을 묶어버리는 cross linking agents로 DNA 절단, 염색체이상등의 변이를 야기시키는 것으로 밝혀지고 있다. 또한 Bleomycin (Fig. 2)은 *Streptomyces veticillus*로부터 추출된 항균, 항바이러스, 항암작용을 가지고 있는 radiomimetic agents로 체내에서 활성화되어 apurinic/apyrimidine (AP) site를 형성시켜, DNA를 손상, 세포분열시 염색체이상을 유발시키는 것으로, 현재 많이 사용되고 있는 대표적인 항암제이다<sup>21~25)</sup>.

항돌연변이 후보물질로는 항산화 효과가 있다고 밝혀진<sup>26)</sup>, 결명자 (*Cassiae semen*) 추출물 rubrofusarin을 선택하여, MMC, bleomycin

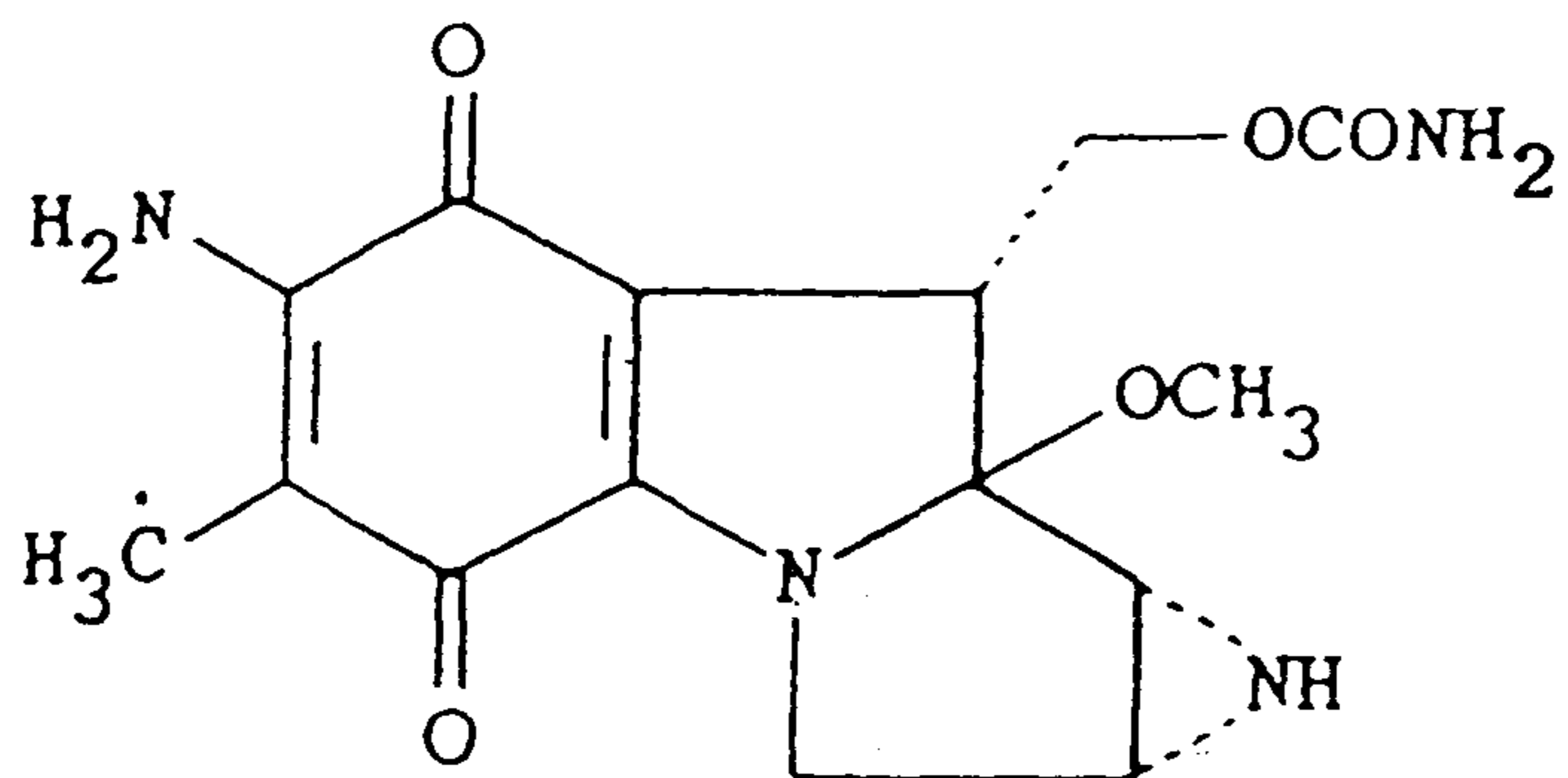


Fig. 1. Chemical structure of mitomycin C

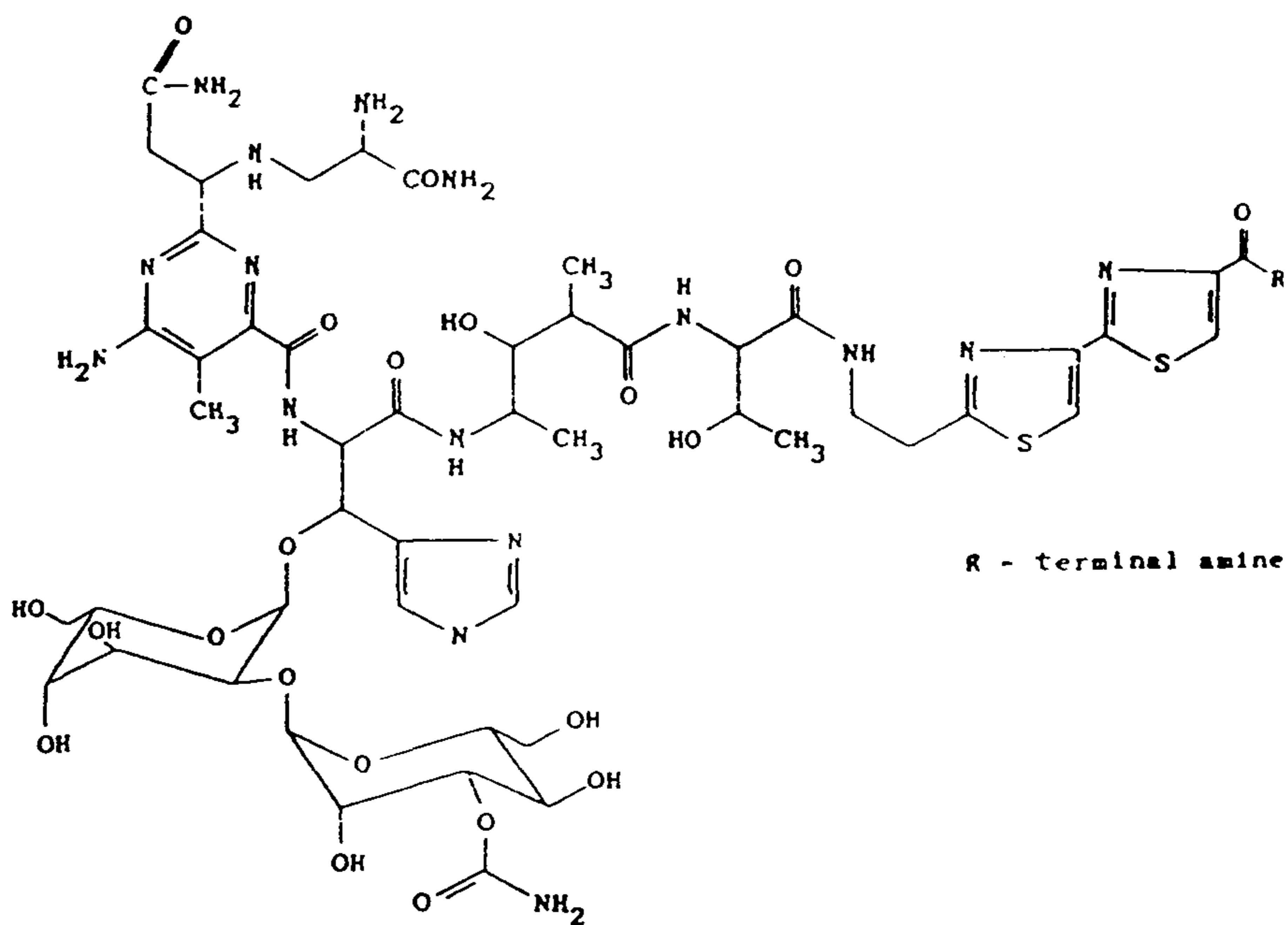


Fig. 2. Chemical structure of bleomycin

과 병용처리하여 항돌연변이효과를 관찰하고 그 작용기전을 연구하고자 하였다.

항돌연변이시험법으로의 적합성을 비교, 관찰하기 위하여, 항돌연변이 효과가 있다고 보고된 바 있고<sup>27~28)</sup>, 미국 FDA에서 제 3상 임상 시험을 실시하고 있는  $\beta$ -carotene을 항돌연변이 지표물질로 선택하여, 항돌연변이 효과 및 그 작용기전을 확인해 보고자 하였다.

본 연구에서는 서로 다른 작용기전을 가진 MMC와 bleomycin을 변이유발원으로 선정하여, *in vitro* 및 *in vivo* 염색체이상시험을 실시하였고, 항돌연변이 효과가 있다고 예상되는 천연 추출물 rubrofusarin을 병용처리함으로써, 항돌연변이 효과 및 그 작용기전을 밝히고,  $\beta$ -carotene의 항돌연변이 효과와 비교 분석함으로써, 항돌연변이물질 검색법으로 확립하고자 하였다.

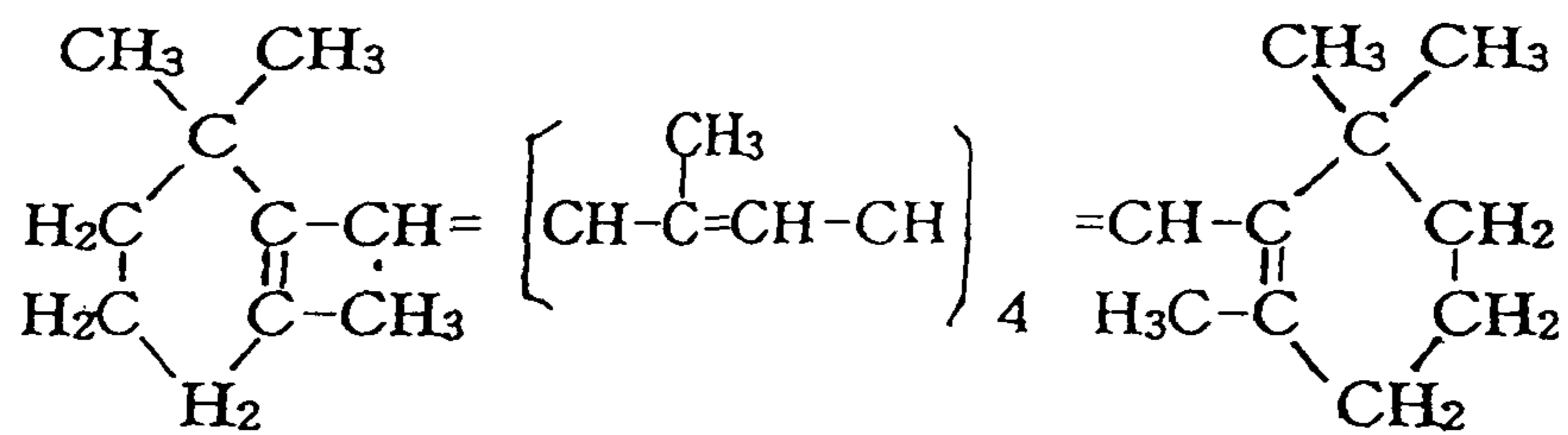
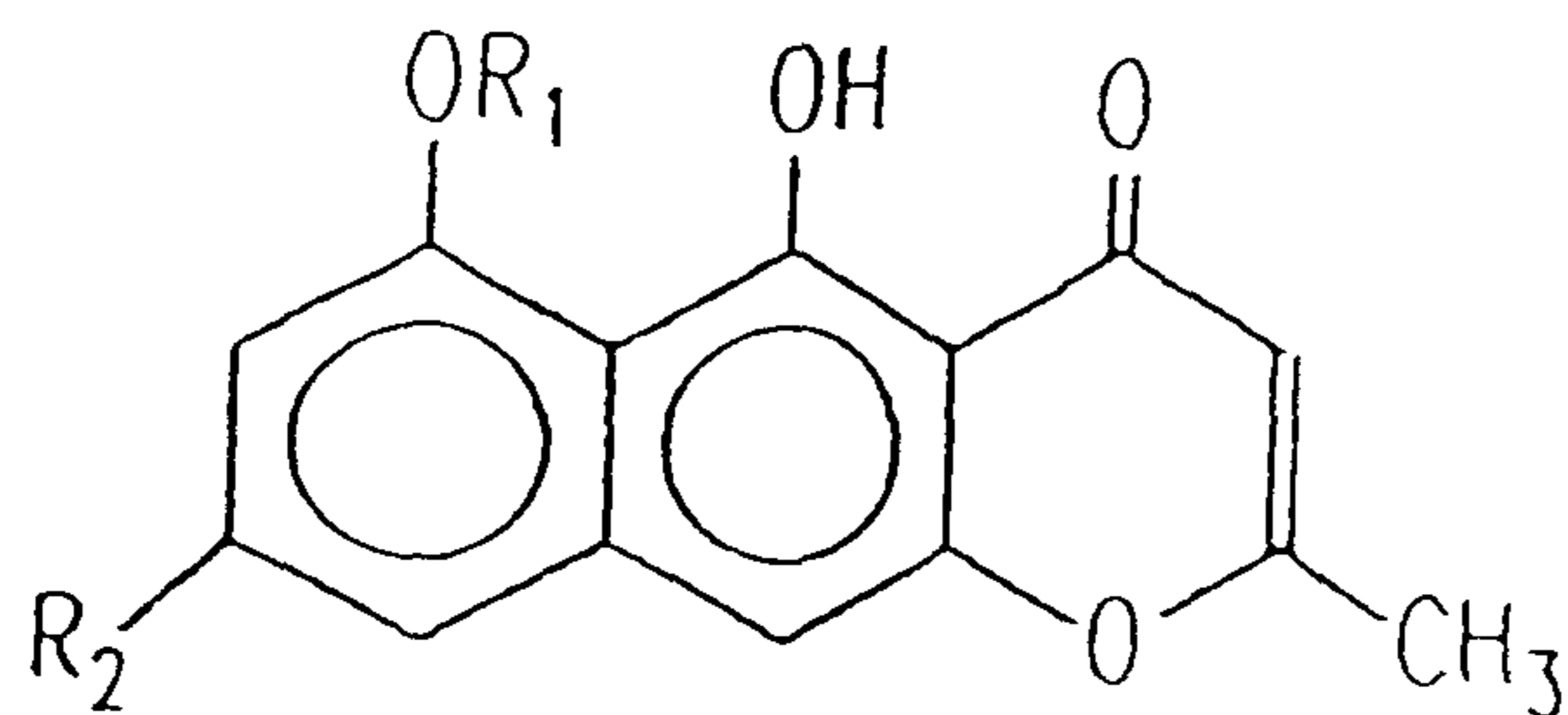


Fig. 3. Chemical structure of  $\beta$ -carotene



compound 8 : R<sub>1</sub>=glucoside, R<sub>2</sub>=OH  
 compound 9 : R<sub>1</sub>=gentiobioside, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>

Fig. 4. Chemical structure of rubrofusarin

## 제 2 장 실험 방법

### 제 1절 실험재료

#### 1. 시약

점체인 MMC는 Sigma사에서 구입하였으며, bleomycin은 동아제약에서 구입하여 사용하였다. 또한,  $\beta$ -carotene 은 Sigma사에서 구입하여 사용하였고, rubrofusarin은 부산수산대학교 약학대학 최재수 교수님으로부터 결명자에서 methanol 추출한 노란색 분말을 받아 사용하였다.

Eagle's minimum essential medium, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin solution, phosphate buffered saline, colcemid 등은 GIBCO사에서 구입하여 사용하였으며, colchicine,  $\beta$ -nicotine amide diphosphate (NADP), glucose-6-phosphate (G-6-P), magnesium chloride, potassium chloride, corn oil 등은 Sigma사에서, Giemsa 는 Gurr사에서 구입하여 사용하였으며, saline은 중외제약에서 그 밖의 모든 시약은 특급시약을 사용하여 실험하였다.

#### 2. 실험기기 및 기구

Clean bench (Kong Shin, Korea), CO<sub>2</sub> incubator (Shel-Lab,

USA), inverted microscope (Olympus, Japan), microscope (Zeiss, Germany), water bath shaker (Taitec, Japan), centrifuge (Heraeus, Germany)등의 기기를 이용하여 실험하였으며, 수술용 해부가위와 핀셋을 제외한 기타 모든 초자기구는 1회용 및 121℃에서 15분간 멸균한 것을 사용하였다.

### 3. 실험동물

국립보건안전연구원 실험동물실에서 사육된 SPF동물, ddY 마우스 5주령이상 된 것을 공급받아 10일간 예비사육하면서, 발육상태를 관찰하였다. 사육실 환경은 온도  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도는  $55\pm 5\%$ , 명암교대 약 12시간으로 조정하였으며, 사료는 고형사료를, 음료수는 수돗물을 자유롭게 섭취하게 하였다. 순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 소정의 범위에 드는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 5마리씩 배분하였다. 개체의 식별은 색소 (피크린산액)에 의한 부위별 피모 염색법과 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다.

## 제 2절 *In vitro* 염색체이상시험

### 1. 사용세포 및 배양방법

사용한 포유동물 세포 Chinese hamster lung (CHL) cell line은 일본 국립위생소로부터 분양받아 유지 및 보존 중인 것을 사용하였으며,

modal chromosome number가 25, 세포주기가 15시간이다. 배양액은 Eagle's minimum essential medium에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin solution을 첨가하여 사용하였으며, 포화습도에서 5% CO<sub>2</sub> 를 공급하는 37°C의 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 3~5일마다 0.05% trypsin-EDTA 용액을 이용하여 계대배양하여 유지하였다.

## 2. 세포독성시험

배양세포의 50% 증식 억제 농도를 구하고자, 세포 계대시 1회용 24 well plate에 1 plate당  $1 \times 10^4$ 개의 세포를 파종하여 2일간 배양하였다. 한 농도당 네개의 well을 할당하고 시험물질을 용매인 DMSO 및 saline에 희석하여, 공비 2로 5단계의 농도를 설정하여 처리하였다. 용매대조군으로는 saline 및 DMSO (최종농도, 배지에 대하여 0.5%)를 처리하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후, 배지를 버리고 미리 37°C 수욕상에서 가온한 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 0.5ml로 2회 세척한 후, methanol로 10분간 고정하였다. 5% Giemsa (in phosphate buffer pH 6.8)로 20분간 염색한 후, 50% 세포독성 농도를 구하였다.

## 3. *In vitro* 염색체이상시험

CHL 세포를 60mm의 petri dish에  $1 \times 10^5/5\text{ml}$  되도록 파종하여 2일간 배양한 후, 각각 시험 물질과 양성 대조물질등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간동안 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid를  $0.2\mu\text{g/ml}$  되도록 처리한 후, 2시간 동안 더 배양하여 총 검체 처리시간이 24시간

이 되도록 하였다.

MMC는 기지의 변이 유발농도인  $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 생리식염수로 조제하여 처리하였으며, bleomycin은 세포독성 시험결과 50% 세포독성을 나타내지 않아, 염색체 '표본제작시 30%이상의 염색체이상을 유발하는 농도인  $4.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 생리식염수에 녹여 처리하였다.  $\beta$ -carotene은 용해 최고농도인  $1\text{mg}/\text{ml}$ 을 용매인 DMSO로 희석하여 공비 2의 5단계 농도로, 변이 원인 MMC, bleomycin과 각각 동시에 병용처리하였으며, rubrofusarin은  $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 최고농도로 하여, 공비 2의 5단계 농도로 용매인 DMSO에 희석하여 변이원과 각각 동시 병용처리하였다.

#### 4. *In vitro* 염색체표본 제작방법

검체처리 후 24시간째에 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 떨어뜨려 15ml 원심분리관에 세포를 모은 후, 37°C의 저장액 (0.075M KCl) 4ml에 잘 현탁 시켜 37°C water bath에 20분간 방치하였다. 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1)으로 3회 고정, 원심분리를 반복한 후, 냉동고에 보관된 깨끗한 슬라이드 글라스에 세포 부유물을 떨어뜨려, 공기 건조 방법으로 슬라이드를 제작하였다. 5% Giemsa로 20분간 염색한 후, 1000배의 배율에서 관찰하여 염색체이상을 평가하였다.

#### 5. 결과의 판정

한 시험 농도당 100개의 세포분열 증기상을 현미경하에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상 (structural



aberrations)과 숫적이상 (numerical aberrations)으로 분류하고, 그것을 관찰하는 대상은 다음과 같다.

- 구조이상 : gap (염색분체형 chromatid gap,  
 염색체형 chromosome gap)  
 염색분체절단 (chromatid break)  
 염색분체교환 (chromatid exchange)  
 염색체절단 (chromosome break)  
 염색체교환 (chromosome exchange)

숫적이상 : 배수체 (polyploidy)

이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류는 각각 기록하였다. CHL세포의 경우 통상 음성대조군에서 염색체 이상을 가진 세포의 출현율은 3%를 초과하는 일이 거의 없다. 그러므로 시험결과를 다음의 기준에 따라 평가하였다.

이상세포의 평균 출현율	최종판정
5% 미만	음성 (-)
5% 이상 10% 미만	의양성 (±)
10% 이상 20% 미만	양성 (+)
20% 이상 50% 미만	양성 (+)
50% 이상	양성 (+)

또한 변이유발물질에 대한 억제율을 구하고, chi-square test를 이용하여  $p < 0.01$  수준에서 유의성을 평가하고 Regression & Correlation으로  $p < 0.05$  수준에서 농도 의존성을 관찰하였다.

### 제 3절 *In vivo* 염색체이상시험

#### 1. 예비독성시험

Bleomycin은 마우스에서 복강내 투여시 468mg/kg의 LD<sub>50</sub>치를 나타내어, 최고농도를 LD<sub>50</sub>치의 1/3농도인 150mg/kg로 설정하고, 100, 80mg/kg의 3농도로 10ml/kg으로 1회 복강투여한 후, 염색체표본 슬라이드를 제작하였다.  $\beta$ -carotene은 최고 용해농도인 200mg/kg을 corn oil에 녹여 5ml/kg으로 경구투여하였으며, 결명자 추출물인 rubrofusarin은 10mg/kg을 최고농도로 corn oil에 녹여, 1ml 일회용 주사기와 마우스용 존대를 사용하여 경구투여하였다. 음성대조군으로는 용매로 사용한 corn oil을 5ml/kg 투여하였다.

모든 검체투여 후 22시간째에 colchine 4mg/kg을 1회 복강투여하였으며, 2시간 경과 후에 동물을 경추탈구에 의해 도살하고 대퇴부로 부터 골수를 채취하여 염색체표본 슬라이드를 제작하였다.

#### 2. *In vivo* 염색체이상시험

MMC는 기지의 변이유발농도인 2mg/kg을 생리식염수로 조제하여 1

회 복강투여하였으며, bleomycin은 염색체이상을 가장 많이 유발한 80 mg/kg을 1회 복강투여하여 변이를 유발하였다.  $\beta$ -carotene은 최고농도 200mg/kg에서 염색체이상을 유발하지 않아, 200mg/kg을 최고농도로 공비 2의 비율로 100, 50mg/kg 3농도를 각각 1회 경구투여하고, 2시간 후에 변이원을 병용투여하였다. Rubrofusarin은 10mg/kg을 최고농도로 corn oil에 현탁, 희석하여 공비 10의 비율로 1, 0.1mg/kg의 3농도를 각각 1회 경구투여하고, 2시간 후에 변이원을 각각 병용투여하였다.

### 3. *In vivo* 염색체표본 제작방법

변이원 투여 후 22시간째에 colchicine 4mg/kg을 투여하고, 24시간째에 동물을 경추탈구에 의해 도살하고, 양쪽 대퇴골로부터 0.5ml의 saline을 주입한 1회용 주사기 (23G)를 사용하여 골수를 현탁, 채취한 후 원심분리하였다. 원심분리 후 침전된 골수세포를 37°C, 0.075M KCl 저장액에 고르게 현탁시켜 20분간 water bath에 방치하고, *in vitro* 염색체 이상시험의 염색체표본 슬라이드 제작과 동일한 방법으로 fixation하여 슬라이드를 제작하였다. 5% Giemsa에 20분간 염색한 후, 1000배의 배율에서 염색체이상을 일으킨 100개의 증기세포를 관찰하였다.

### 4. 결과의 판정

한 시험 농도당 100개의 세포분열 증기상을 현미경하에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 *in vitro* 염색체이상시험의 판정기준과 마찬가지로 gap, 염색분체 절단, 염색분체 교환, 염색체

절단. 염색체 교환으로 구분하여 관찰하고, 이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하여 기준에 따라 판정하였다.

염색체이상을 유발한 세포의 각각 평균을 구하였고, 변이유발물질에 대한 억제율을 구하여, t-test를 통하여 유의성을 평가하고, ANOVA test를 통하여 농도 의존성을 평가하였다.

## 제 3 장 실험 결과 및 고찰

### 제 1절 *In vitro* 염색체이상시험

#### 1. 세포독성시험

배양세포의 50% 증식 억제농도를 구하고자, bleomycin을 1mg/ml로부터 공비 2의 비율로 10농도를 농도당 네개의 well을 할당하여 용매인 saline에 희석하여 처리하였다. 그 결과 최고농도에서 50%이상의 생존율을 나타내었으며, 16 $\mu$ g/ml이상의 농도에서는 염색체 표본 제작이 불가능하여, 염색체 표본제작이 가능한 농도에서 30%의 염색체이상 유발율을 나타내는 4.0 $\mu$ g/ml을 변이농도로 설정하였다.  $\beta$ -carotene 1mg/ml, rubrofusarin 250 $\mu$ g/ml도 최고농도에서 50% 세포독성을 나타내지 않아 이 농도를 본시험의 최고농도로 설정하였다.

#### 2. *In vitro* 염색체이상시험

MMC 0.1 $\mu$ g/ml을 투여하였을 때 35%의 염색체이상을 유발하였다. MMC와  $\beta$ -carotene 1mg/ml을 동시 병용투여하였을 때에는, 16%의 염색체이상을 나타내어, MMC 단독투여시의 변이유발율을 50% 정도 억제한  $p < 0.01$ 의 유의성 있는 억제율을 보여주었다. (Table 1)

**Table 1. Effect of  $\beta$ -carotene on the frequency of cells with chromosome aberration induced by MMC *in vitro*.**

Treatment MMC + $\beta$ -carotene ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		No. of cells analyzed	Types of aberration						Suppression rate (%) <sup>1</sup>	
			gap	ctb	cte	csb	cse	pol		nor
-	-	100							100	
0.1	-	100	5	2	29	1	2		65	
0.1	1000	100	5	1	13				84 <sup>*a</sup>	54.3
0.1	500	100	4	4	17				78 <sup>a</sup>	37.1
0.1	250	100	11	7	11				77 <sup>a</sup>	34.3
0.1	125	100	4	4	24	1	3		71 <sup>a</sup>	17.1
0.1	62.5	100	2	5	25	2			76 <sup>a</sup>	31.4

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange  
MMC : mitomycin C

$$^1\text{Suppression rate} : 100 - \frac{\text{aberration cells of sample}}{\text{aberration cells of positive control}} \times 100$$

\* $p < 0.01$  : Chi-Square test

<sup>a</sup>Significant dose-dependent decrease (  $p < 0.05$  : Regression & Correlation )

또한  $\beta$ -carotene 500, 250, 125, 62.5 $\mu$ g/ml의 농도를 MMC와 병용 처리한 군에서는 22, 23, 29, 24%의 염색체이상 유발율을 나타내어, 전반적으로 염색체이상을 억제함을 보여주었다. Rubrofusarin 최고농도 250 $\mu$ g/ml, 최저농도 15.6 $\mu$ g/ml 처리군에서는 MMC 투여군보다 15% 정도의 염색체이상 억제율을 나타내었고, 125, 62.5, 31.25 $\mu$ g/ml 처리군에서는 6.5, 4.3, 6.5의 억제율을 나타내어, 유의성 있는 억제율을 관찰할 수 없었다. (Table 2)

Bleomycin 4 $\mu$ g/ml을 투여시에는 31%의 염색체이상 유발율을 나타내었고,  $\beta$ -carotene 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu$ g/ml을 동시 병용투여하였을 때에는, 유의성 있는 억제율을 나타내지 않았다. (Table 3)

Rubrofusarin 250, 125 $\mu$ g/ml을 bleomycin과 병용처리하였을 때에는, bleomycin의 염색체이상 유발율인 41%을 50%정도 억제한 22%의 염색체이상을 나타내어  $p < 0.05$ 의 유의성 있는 억제율을 보여주었다. 그 이하의 농도인 rubrofusarin 62.5, 31.25, 15.6 $\mu$ g/ml을 bleomycin과 병용투여하였을때는, 31~38%의 염색체이상을 보여 저해효과는 확인되었으나 농도 의존성은 나타나지 않았다. (Table 4)

## 제 2절 *In vivo* 염색체이상시험

### 1. 예비독성시험

Bleomycin 150, 100, 80mg/kg의 3농도를 1회 복강투여한 후, 24시간

Table 2. Effect of rubrofusarin on the frequency of cells with chromosome aberration induced by MMC *in vitro*.

Treatment MMC + Rubrofusarin ( $\mu\text{g/ml}$ )		No. of cells analyzed	Types of aberration						Suppression rate (%) <sup>1</sup>	
			gap	ctb	cte	csb	cse	pol		nor
-	-	100	2		1				97	
0.1	-	100	3	2	30	12	1		54	
0.1	250	100	8	1	25	4	4		61	15.2
0.1	125	100		1	33	11	2		57	6.5
0.1	62.5	100	1		30	8	11		56	4.3
0.1	31.25	100	3	1	28	7	6		57	6.5
0.1	15.6	100	3	1	31	6	5		61	15.2

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange  
MMC : mitomycin C

$$^1\text{Suppression rate} : 100 - \frac{\text{aberration cells of sample}}{\text{aberration cells of positive control}} \times 100$$



**Table 3. Effect of  $\beta$ -carotene on the frequency of cells with chromosome aberrations induced by BLM *in vitro*.**

Treatment		No. of cells analyzed	Types of aberration						Suppression rate (%) <sup>1</sup>	
BLM	+ $\beta$ -carotene ( $\mu\text{g/ml}$ )		gap	ctb	cte	csb	cse	pol		nor
-	-	100	1						99	
4.0	-	100	7	1	22	2	4		69	
4.0	1000	100	14		16				70	3.22
4.0	500	100	4	3	28	1	2		68	-
4.0	250	100	3	4	27		5		70	3.22
4.0	125	100	7	4	18	1	3		72	9.7
4.0	62.5	100	5	3	15	5	3		65	-

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange  
BLM : bleomycin

$$^1\text{Suppression rate} : 100 - \frac{\text{aberration cells of sample}}{\text{aberration cells of positive control}} \times 100$$

**Table 4. Effect of rubrofusarin on the frequency of cells with chromosome aberration induced by BLM *in vitro*.**

Treatment BLM + Rubrofusarin ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of cells analyzed	Types of aberration							Suppression rate (%) <sup>1</sup>	
		gap	ctb	cte	csb	cse	pol	nor		
-	-	100							100	
4.0	-	100	8	3	22	5	16		59	
4.0	250	100	5	3	13		4		78*	46.3
4.0	125	100		2	20				78*	46.3
4.0	62.5	100	5	4	33				62	7.3
4.0	31.25	100	8		17				67	19.5
4.0	15.6	100	7	5	20		3		69	24.2

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange  
BLM : bleomycin

$$^1\text{Suppression rate} : 100 - \frac{\text{aberration cells of sample}}{\text{aberration cells of positive control}} \times 100$$

\*p<0.05 : Chi-Square test

후에 염색체표본을 제작하여 염색체이상을 관찰한 결과, 80mg/kg에서 11%정도의 염색체이상을 유발하였다. 그 이상의 농도에서는 염색체이상 유발율은 80mg/kg과 비슷하였지만, 염색체 표본제작시 증기세포의 수가 적고, 잘 퍼진 염색체표본을 관찰하기 어려워, 예비시험 결과 80mg/kg을 bleomycin의 최고농도로 설정하였다.  $\beta$ -carotene 200mg/kg과 rubrofusarin 10mg/kg의 최고농도 투여시, 시험기간 중 동물의 이상여부는 관찰할 수 없었고, 염색체이상도 용매대조군과 유사한 정도의 유발율을 나타내어 변이원성이 없는 것으로 판정되었다.

## 2. *In vivo* 염색체이상시험

$\beta$ -carotene 200mg/kg투여군, rubrofusarin 10mg/kg투여군에서는 용매대조군인 corn oil투여군과 같은 정도의 2%이하의 염색체이상을 유발하여 변이원성이 없는 것으로 판정되었다. (Table 5)

MMC 2mg/kg 단독투여군에서는 23%의 염색체이상을 유발하였으며,  $\beta$ -carotene 200, 100, 50mg/kg을 각각 1회 경구투여한 후, 2시간 뒤에 MMC를 1회 복강투여한 군에서는, 13%정도의 농도 의존적인  $p < 0.01$ 의 유의성 있는 억제율을 관찰할 수 있었다. (Table 6)

MMC와 rubrofusarin 10, 0.1mg/kg 병용투여군에서는 15%, 17%의 염색체이상 유발율을 나타내어, 농도 의존적인  $p < 0.01$ 의 억제율을 나타내었다. Rubrofusarin 1mg/kg과 MMC 병용투여군에서는 19%의 염색체이상을 나타내어  $p < 0.05$ 의 유의성있는 억제율을 보여주었다. (Table 7)

Table 5. Effect of treatment on the frequency of cells with chromosome aberration *in vivo*.

Treatment (mg/kg)	No. of cells analyzed	Types of aberrations							Mean no. of aberration cells
		gap	ctb	cte	csb	cse	pol	nor	
Corn oil	100	2		1				97	2.2
	100	1	1					98	
	100	1						99	
	100	1		2				98	
	100	2	1					97	
$\beta$ -carotene 200	100	1	1					98	1.2
	100							100	
	100							100	
	100	1		1				98	
	100	2						98	
Rubrofusarin 10	100		1	1				98	1
	100							100	
	100							100	
	100	1		1				98	
	100	1						99	

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange

Table 6. Effect of  $\beta$ -carotene on the frequency of cells with chromosome aberration induced by MMC *in vivo*.

Treatment MMC + $\beta$ -carotene (mg/kg)	No. of cells analyzed	Types of aberrations							Mean no. of aberration cells	Suppression rate(%) <sup>1</sup>
		gap	ctb	cte	csb	cse	pol	nor		
2	0	100	14	9	13	7	1	72		
2	0	100	13	6	7			77		
2	0	100	13		8			79	23.4 <sup>a</sup>	
2	0	100	12	1	9			78		
2	0	100	14	1	8			77		
2	200	100	5	1	7			88		
2	200	100	10	3	1			86		
2	200	100	12	4	3			85	13.8 <sup>**a</sup>	41.0
2	200	100	11	2	1			86		
2	200	100	11	4	1			84		
2	100	100	12	3	1			86		
2	100	100	11	1	2			87		
2	100	100	9	6	1			84	12.2 <sup>**a</sup>	47.9
2	100	100	4	3	4			89		
2	100	100	7					93		
2	50	100	10	6	2			82		
2	50	100	6	4	2			88		
2	50	100	6	9	4			84	13.0 <sup>**a</sup>	44.4
2	50	100	11	1				88		
2	50	100	7					93		

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange  
MMC : mitomycin C

$$^1\text{Suppression rate} : 100 - \frac{\text{aberration cells of sample}}{\text{aberration cells of positive control}} \times 100$$

Significantly different from the control group at \*p<0.05 and \*\*p<0.01

<sup>a</sup>Significant dose-dependent decrease ( p<0.01 : ANOVA )

Table 7. Effect of rubrofusarin on the frequency of cells with chromosome aberration induced by MMC *in vivo*.

Treatment MMC+Rubrofusarin (mg/kg)	No. of cells analyzed	Types of aberrations							Mean no. of aberration cells	Suppression rate (%) <sup>1</sup>
		gap	ctb	cte	csb	cse	pol	nor		
2	0	100	14	9	13	7	1	72		
2	0	100	13	6	7			77		
2	0	100	13		8			79	23.4 <sup>a</sup>	
2	0	100	12	1	9			78		
2	0	100	14	1	8			77		
2	10	100	10	3	3			84		
2	10	100	8	2	2	1		87		
2	10	100	10	3	2			85	14.8 <sup>**a,b</sup>	36.8
2	10	100	11	2	1			86		
2	10	100	11	4	1			84		
2	1	100	13	4	4			79		
2	1	100	11	4	3			82		
2	1	100	12	3	7			80	19.0 <sup>*a,b</sup>	18.8
2	1	100	13	2	3			82		
2	1	100	10	3	5			82		
2	0.1	100	13	4	1			82		
2	0.1	100	15	3	1			81		
2	0.1	100	12	2	3			83	17.2 <sup>**a,b</sup>	26.5
2	0.1	100	10	3	1			86		
2	0.1	100	12	4	2			82		

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange

MMC : mitomycin C

$$^1\text{Suppression rate} : 100 - \frac{\text{aberration cells of sample}}{\text{aberration cells of positive control}} \times 100$$

Significantly different from the control group at \*p<0.05 and \*\*p<0.01

<sup>a</sup>Significant dose-dependent decrease ( p< 0.01 : ANOVA )

<sup>b</sup>Significant dose-dependent decrease ( p< 0.01 : ANOVA )

Bleomycin 80mg/kg투여군에서는 11%의 염색체이상을 나타내었다.  $\beta$ -carotene 200, 100, 50mg/kg을 각각 1회 경구투여한 후, 2시간 후에 bleomycin을 1회 복강투여한 군에서는 5%이하의 염색체이상 유발율을 나타내어, 농도 의존적인  $p < 0.01$ 의 유의성 있는 억제율을 나타내었다. (Table 8)

Rubrofusarin 10, 1mg/kg투여군에서는 8%이하의 염색체이상 유발율을 나타내어, 농도 의존적인  $p < 0.05$ 의 염색체이상 유발율을 나타내었으며, rubrofusarin 0.1mg/kg 병용투여군에서는 6%이하의 염색체이상을 유발하여  $p < 0.01$ 의 유의성 있는 억제효과를 보여주어, bleomycin 단독투여군보다 염색체이상이 억제되었음을 나타내었다. (Table 9)

### 제 3절 고 찰

암은 고대 이집트의 상형문자 기록에서도 나타나는 오래된 질병의 하나로서, 그동안 인류의 역사와 더불어 많은 과학자들의 연구노력에도 불구하고 현재까지 뚜렷한 치료법이나 예방책이 제시되지 않고 있는 질병으로 남아 있다. 최근 우리나라의 사망통계를 보면 암이 첫째 원인을 차지하고 있으며, 특히 가정적으로나 사회적으로 중요한 시기인 40대 이후의 발생률이 가장 높게 나타나고 있다. 암에 대처하는 방안은 지금까지는 조기발견외에는 없는 상황에서, 암을 예방 할 수 있는 암예방제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

암은 인체세포가 환경성 돌연변이물질 또는 발암물질에 노출되어, 세포내 유전물질의 복잡한 유전적 변화가 야기(initiation)되어, 그 후

Table 8. Effect of  $\beta$ -carotene on the frequency of cells with chromosome aberration induced by BLM *in vivo*.

Treatment BLM + $\beta$ -carotene (mg/kg)	No. of cells analyzed	Types of aberration						Mean no. of aberration cells	Suppression rate (%) <sup>1</sup>
		gap	ctb	cte	csb	cse	pol nor		
80	0	100	2	6	2				
80	0	100	1	5	10				
80	0	100	1	4	6			11.2 <sup>a</sup>	
80	0	100	5		6				
80	0	100	3		6				
80	200	100	3		2				
80	200	100			3				
80	200	100	1		4			3.8 <sup>**a</sup>	66.1
80	200	100	2		2				
80	200	100	2						
80	100	100			4				
80	100	100	1	2	2				
80	100	100	2	1				3.8 <sup>**a</sup>	66.1
80	100	100	3						
80	100	100	2	2					
80	50	100	3		6				
80	50	100	2		4				
80	50	100	3		1			4.8 <sup>**a</sup>	57.1
80	50	100	1		1				
80	50	100	2		1				

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange

BLM : bleomycin

$$^1\text{Suppression rate : } 100 - \frac{\text{aberration cells of sample}}{\text{aberration cells of positive control}} \times 100$$

Significantly different from the control group at \*p<0.05 and \*\*p<0.01

<sup>a</sup>Significant dose-dependent decrease ( p<0.01 : ANOVA)



**Table 9. Effect of rubrofusarin on the frequency of cells with chromosome aberration induced by BLM *in vivo*.**

Treatment BLM + Rubrofusarin (mg/kg)	No. of cells analyzed	Types of aberrations							Mean no. of aberration cells	Suppression rate (%) <sup>1</sup>
		ctg	ctb	cte	csb	cse	pol	nor		
80	0	100	2	6	2					
80	0	100	1	5	10					
80	0	100	1	4	6				11.2 <sup>a</sup>	
80	0	100	5		6					
80	0	100	3		6					
80	10	100	2	1	8					
80	10	100	3		5					
80	10	100		1	6				7.8 <sup>*a</sup>	30.4
80	10	100	3	1	2					
80	10	100	4	1	3					
80	1	100		2	7					
80	1	100			3					
80	1	100	2	1	3				7.2 <sup>*a</sup>	35.7
80	1	100	5	2	3					
80	1	100	7	1	1					
80	0.1	100	1	2	5					
80	0.1	100	1	3	4					
80	0.1	100		2	2	1			5.6 <sup>**a</sup>	50.0
80	0.1	100	3	1						
80	0.1	100	1		2					

gap : chromatid and isochromatid gap, ctb : chromatid breakage, cte : chromatid exchange, csb : chromosome breakage, cse : chromosome exchange

BLM : bleomycin

$$^1\text{Suppression rate : } 100 - \frac{\text{aberration cells of sample}}{\text{aberration cells of positive control}} \times 100$$

Significantly different from the control group at \*p<0.05 and \*\*p<0.01

<sup>a</sup>Significant dose-dependent decrease ( p<0.01 : ANOVA )

짧게는 몇 개월에서 수 년의 전암상태를 거쳐, 발암촉진인자등에 의하여 발생하게 된다. 따라서 취장암등의 일부 암은 조기진단이 불가능한 경우가 대부분이다. 돌연변이를 일으키는 물질이 모두 암을 유발한다고 단정할 수는 '없으나, 기존의 발암물질을 유전독성 단기시험법으로 분석해보면, 살모넬라를 이용한 복귀돌연변이시험 (Ames test)의 경우 시험대상물질 54종 중 43종 (80%)이 양성을 나타내었고, 염색체이상 시험은 48종 (89%)이 양성으로 나타남이 보고되었다<sup>29)</sup>. 이러한 결과로 볼 때, 유전독성 단기검색방법을 이용하여, 돌연변이 발생을 억제하는 물질을 검색하는 것은 의미있는 시도로, 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다.

지금까지의 연구결과에 의하면 식물성분 중 야채와 과일에 많이 포함되어 있는, 배당체 형태의 후라보노이드 화합물, 플라페놀 성분, 비타민류등이 이에 속하며, 미국의 국립 암연구소에서 이 중 비교적 효과가 크다고 알려져 있는 retinoids와  $\beta$ -caroten, vitamin C 와 E에 대하여 암 발생 위험도가 높은 사람을 대상으로 임상시험을 실시하고 있다<sup>18)</sup>. 항돌연변이 물질은 작용양식에 따라 2개의 유형으로 나뉘어지는 데<sup>30)</sup>, 첫째, 변이원 불활화물질 (desmutagen)로, 변이원이 DNA에 장애를 일으키기 전에 변이원에 직접 작용하여 변이활성을 불활화시키는 물질로서, 환원제, 항산화제등에 의한 수식, peroxidase등에 의한 효소적 수식, 섬유성분등 생체 고분자에 의한 흡착등이 이에 속한다. 둘째로는, 일단 변이원에 의해 손상이 일어난 세포에 DNA 수복이나 복제과정에 작용하여 돌연변이 유발빈도를 낮추는 효과를 갖는 물질로 전자의 desmutagen과 구별하여 항돌연변이물질 (bio-antimutagen)이라 칭한다.

본 연구에서는 기존의 *in vivo* 및 *in vitro* 염색체이상시험을 이용하여 천연물에서 항돌연변이 효과를 나타내는 물질을 검색함으로써, 항돌연변이물질 검색법으로 확립하고자 하였다.

항돌연변이물질로는 천연물인 결명자 (*Cassia tora*, Leguminosae)에서 추출한 항산화효과가 있다고 보고된 rubrofusarin을 선정하였으며, 항돌연변이 효과가 있다고 보고된  $\beta$ -carotene을 선정하여, 항돌연변이물질 검색법으로 확인하고자 하였다. 변이유발물질인 MMC와 bleomycin은 서로 다른 작용 기전을 가진 변이원으로 그 사용빈도가 높고, 돌연변이 생성기전이 잘 밝혀져 있어 검체로 선택하였다.

*In vitro* 염색체이상시험은 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호 (1994. 4. 14) 의약품등의 독성시험기준에서 규정하는 염색체이상시험법에 따라 실시하였으며, 예비시험에 의하여 시험물질의 투여농도를 결정하였다.

Bleomycin의 투여 농도는 세포독성을 일으키지 않고, 염색체이상을 30%이상 나타내는  $4.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 처리하여  $\beta$ -carotene과 병용투여한 결과,  $\beta$ -carotene의 bleomycin에 대한 변이유발 억제효과는 확인되지 않았으며, MMC에 대하여는  $\beta$ -carotene  $1\text{mg}/\text{ml}$ 에서 50%이상의 억제효과, 그 이하의 농도에서 농도 의존적인 약 30%의 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 현재까지 알려진  $\beta$ -carotene에 대한 *in vivo* 시험결과가 70~85%정도의 억제효과<sup>31)</sup>를 보이는 것과는 상이한 결과로, 시험계가 다르고 변이원인 bleomycin과 MMC에 대한 억제작용기전으로 비교, 판단하기는 어려울 것으로 생각된다. 따라서 *in vitro* 염색체이상시험 방법 중, 간의 homogenate인 S9 mix를 첨가하는 생체와 가장 유사한 효과를 나타낼 수 있는 대사활성화법 등의 추

가시험등을 통하여 보다 *in vivo* 효과와 근접한 *in vitro* 항돌연변이물질 검색법으로의 개발이 필요하다고 생각된다.

Rubrofusarin의 경우는 투여농도를 예비 소핵시험자료<sup>32)</sup>를 참고로 하여, 고농도보다  $10^{-5}$ 이하의 저농도에서 항산화 효과와 free radical scavenging effect가 큰 것으로 나타나, 이 농도를 기준으로 시험하였다. 그 결과, MMC와 병용투여시 변이유발 억제효과가 유의성 없는 것으로 나타났으며, bleomycin과 병용투여한 경우에는 고농도 250, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 45%이상의 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. 또한, 저농도에서도 억제효과를 나타냈으나 농도 의존성은 없었다. 이는  $\beta$ -carotene과 상반된 결과로, rubrofusarin이 MMC에 대하여 억제 효과를 나타내고, bleomycin에 대해서는 억제효과를 나타내지 않는 것으로 나타나, *in vitro* 시험이라도 생체내 효과와 가장 비슷한 효과를 볼 수 있는 S9 mix를 이용한 대사활성화법의 시험 및 rubrofusarin 작용기전에 대한 추가시험으로 작용기전을 고찰하여야 될 것으로 사료된다.

*In vivo* 염색체이상시험은 마우스의 bone marrow로 부터 골수를 채취하여, 염색체표본을 제작하는 일반적인 Sram (1975)의 방법을 이용하여<sup>33~36)</sup> 시험하였으며, MMC의 투여 농도는 tannic acid, krestin, lentinan, glutathione등의 항돌연변이 효과시험에서 변이원으로 설정되었던 농도 2mg/kg을 설정하여 시험하였다<sup>37~39)</sup>. Bleomycin의 투여농도는 Paul 등의 논문<sup>40)</sup>을 참조하여 마우스 골수세포에 염색체이상을 유발하는 농도를 예비시험을 통하여 시험하였으며, green tea등의 천연물질들로 부터 항돌연변이 효과를 검색한 논문등을 통하여 시험법을 확립하였다<sup>41~44)</sup>.  $\beta$ -carotene은 Abraham등의 논문에 따라<sup>45)</sup> 항돌연변이 효과를 나타내는 투여농도와 투여방법등을 결정하여 투여하였다.

$\beta$ -Carotene과 rubrofusarin의 용매인 corn oil 투여군에서는 3%이하의 염색체이상을 나타내었으며,  $\beta$ -carotene의 최고투여농도 200mg/kg과 rubrofusarin 10mg/kg 에서 용매대조군인 corn oil 투여군과 같은 정도의 염색체이상을 나타내어, 항돌연변이물질 자체에서는 변이원성이 없는 것으로 판단되었다.

MMC와  $\beta$ -carotene을 병용투여한 군에서는, 40% 이상의 유의성 있는 억제율을 나타내었고, bleomycin에 대해서도 60% 의 높은 억제율을 나타내어,  $\beta$ -carotene이 *in vivo*에서 생체내 대사를 거쳐, 큰 변이억제 효과를 나타냄이 확인되었다.

MMC와 rubrofusarin을 병용투여한 군에서는 10mg/kg 투여용량에서 36%, 1, 0.1mg/kg 병용투여군에서 20% 정도의 억제율을 나타내어,  $\beta$ -carotene과 비교하여 상대적으로 아주 적은 저용량에서도 큰 변이억제 효과를 나타냄을 볼수 있었다.

Bleomycin의 경우에는 rubrofusarin 10, 1mg/kg 병용투여군에서 30%이상의 억제율을, 0.1mg/kg 병용투여군에서는 50%의 억제율을 나타내어, 저용량에서 큰 변이억제효과를 보여주었다.

따라서, *in vivo* 시험결과로 rubrofusarin은 자체로는 변이원성이 없으면서, MMC와 bleomycin 모두에 대하여, 저용량에서도 큰 항돌연변이효과를 갖는 물질임이 확인되었고,  $\beta$ -carotene과 유사한 농도설정을 통한 추가시험등으로 항돌연변이 효과를 보다 근접한 수치로 비교하여 봄으로써, 새로운 암화학예방요법제로 개발 가능성이 큰 물질이라 생각한다.

유전독성을 검색하는 방법에는 염색체이상시험 이외에도 지표(end point)와 시험대상 (세균, 배양세포, 동물개체)에 따라 많은 시험

법들이 확립되어있다. 이들 각 시험법의 특성을 이용하여 검색하고자 하는 물질들을 서로 다른 돌연변이 생성과정에서의 저해효과로 종합적으로 분석하고, 항돌연변이물질을 최종적으로 찾기 위해서는, 앞으로 많은 유전독성시험법들이 항돌연변이물질 검색법으로 재고되어야 할 것으로 사료된다.

## 제 4 장                    결            론

1. 포유동물배양세포인 CHL cell을 이용하여 *in vitro* 염색체이상시험을 항돌연변이물질 검색법으로 확립하고자, 염색체이상 시험법 중 직접법만을 택하여 실험하였다.

1)  $\beta$ -Carotene은 MMC (0.2mg/ml)와 병용투여시, 최고농도 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  에서 50%, 그 이하의 공비 2의 4농도에서도 농도 의존적인 높은 억제율을 나타내었다. Bleomycin (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과  $\beta$ -carotene 병용투여시에는 염색체이상 억제효과는 나타내지 않았다.

2) 결명자 추출물인 rubrofusarin은 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 최고농도로 공비 2의 5농도로 MMC (0.2mg/ml)와 동시 병용투여시, MMC에 의한 염색체이상은 억제하지 않았다. Rubrofusarin과 bleomycin (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 동시 병용투여한 경우에는 250, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 45%이상의 억제율을 나타내었으며, 그 이하의 농도에서도 염색체이상 억제를 나타내었다.

2. ddY 마우스를 이용한 *in vivo* 염색체이상시험 결과에서는,  $\beta$ -carotene, rubrofusarin, corn oil 최고농도의 단독투여군에서 3% 이하의 염색체이상을 나타내었고, MMC 단독투여군은 23%, bleomycin 단독투여군은 11%의 염색체이상을 나타내어 각각 음성, 양성 대조치 범위의 염색체이상 유발율을 나타내었다.

1) MMC (2mg/kg)와  $\beta$ -carotene 200, 100, 50mg/kg 병용투여군에서

는 40% 이상의 큰 염색체이상 억제율을 유의성 있게 나타내었다. 또한, bleomycin과  $\beta$ -carotene 200, 100, 50mg/kg 병용투여군에서도, 60%이상의 높은 염색체 이상 억제율을 나타내었다.

2) Rubrofusarin 10mg/kg과 MMC 병용투여군에서는 35%이상의 염색체이상억제율을 나타내었고, 그 이하의 1, 0.1mg/kg의 농도에서도 유의성 있는 높은 억제율을 나타내었다. Rubrofusarin 10, 1mg/kg과 bleomycin 병용투여군에서는 30%이상의 염색체이상억제율을 유발하였으며, rubrofusarin 0.1mg/kg에서는 50%의 유의성 있는 염색체 이상 억제율을 나타내어, rubrofusarin이 저농도에서도 큰 변이억제 효과가 있음을 보여주었다.

본 시험 조건에서 *in vitro*, *in vivo* 염색체이상시험을 실시한 결과, rubrofusarin은  $\beta$ -carotene과 같이 MMC와 bleomycin에 대한 항돌연변이제 및 항염색체손상제로 암화학예방요법제로의 응용가능성이 큰 물질이라 사료되며, 대사활성화등을 통한 *in vitro* 독성시험법들의 개선등을 통하여, 앞으로 많은 유전독성시험법들을 각 시험법들의 특성을 이용한, 항돌연변이물질 검색법으로 재고되어야 할 것으로 사료된다.



## 제 5 장      참 고 문 헌

- 1) Singleton, P. and Sainsbury : *Dictionary of Molecular biology and Microbiology* (1987)
- 2) Ames, B. N. : Identifying Environmental Chemicals Causing Mutation and Cancer. *Science*, 204, 587~593 (1979)
- 3) Phillips, D. H. : Chemical carcinogenesis. In : The molecular Basis of Cancer, *Wiley-Interscience, New York*, 133~179 (1985)
- 4) Clemens, M. R. : Free radicals in chemical carcinogenesis, *Klinische Wochenschrift*, 69, 1123~1134 (1991)
- 5) Doll, R. and Peto, R. : The causes of cancer : Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J. Natl. Cancer Inst.*, 66(6), 1192~1265 (1981)
- 6) Ames, B. N. , Kammen, H. O. and Yamasaki, E. : Hair dyes are mutagenic : Identification of variety of mutagenic ingredients, *Proc. Natl. Acad. sci., U.S.A.*, 72, 2423~2427 (1975)
- 7) Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E. : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 70, 782~786 (1973)
- 8) Ames, B. N. and Maron, D. M. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mut. Res.*, 113, 473~215 (1983)
- 9) Mccann, J., Choe, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : Detection

- of carcinogens as mutagens in the Salmonella / microsome test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 72, 5135 (1975)
- 10) Schmid, W. : The micronucleus test, *Mut. Res.*, 31, 9~15 (1915)
  - 11) Mavournin, K. H., Blakey, D.H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. : The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mut. Res.*, 239, 29~80 (1990)
  - 12) Devi, P. S. and Polasa, H. : Mutagenic evaluation of tromaril, an novel antiinflammatory drug, using mammalian test system, *Mut. Res.*, 170, 41~45 (1986)
  - 13) Wild, D. : Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by the micronucleus test, *Mut. Res.*, 56, 319~327 (1978)
  - 14) Krishna, G., Xu, J., Peterson, M. and Ong, T. : *In vivo* cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide, *Mut. Res.*, 158, 81~87 (1985)
  - 15) Misra, R. N. and Misra, B. : Genetic toxicological testing of some dyes by the micronucleus test, *Mut. Res.*, 170, 75~78 (1986)
  - 16) Blagoeva, P. M., Balansky, R. M., and Mircheva, T. J. : Potentiation by caffeine of the frequency of micronuclei induced by mitomycin C and cyclophosphamide in young mice, *Mut. Res.*, 246, 123~127 (1991)

- 17) Rita, P., Geetanjali, D. and Reddy, P. P. : Effects of glutathione on mitomycin C-induced micronuclei in bone marrow erythrocytes of Swiss albino mice, *Mut. Res.*, 260, 131~135 (1991)
- 18) Shankel, D. M., Hartman, P. E., Kada, T., and Hollaender, A., Eds. : Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms, *Plenum Press, New York* (1986)
- 19) Wall, N. E., Wani, M. C., Manikumar, G., Abraham, P., Taylor, H., Hughes, T. J., Warner, J. and McGivney, R. : Plant antimutagenic agents. 2. Flavonoids, *J. Nat. Prod.*, 51, 1084~1091 (1988)
- 20) Hayatsu, H., Arimoto, S. and Negishi, T. : Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mut. Res.*, 202, 429~446 (1988)
- 21) Chatterjee, A., Raman, M. J. : A comparison of aberration distribution and cell-cycle progression in cells treated with bleomycin with those exposed to X-ray., *Mut. Res.*, 202, 551~57 (1988)
- 22) Povirk, L. F. and Austin, M. J. F. : Genotoxicity of bleomycin, *Mut. Res.*, 257, 127~143 (1991)
- 23) Stubbe, J. : Mechanisms of Bleomycin-induced DNA degradation, *Chem. Rev.*, 87, 1107~1136 (1987)
- 24) Vig, Baldev K. and Lewis, Roger : Genetic Toxicology of Bleomycin., *Mut. Res.*, 55, 121~145 (1978)
- 25) Vijayalaxmi and Burkart, W. : Resistance and cross-resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin., *Mut. Res.*, 211, 1~5 (1989)

- 26) Choi, J. S., Lee, H. J. and Kang, S. S. : Alateamin, Cassiaside and Rubrofusarin gentiobioside, Radical Scavenging Principles from the Seeds of *Cassia tora* on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) Radical, *Arch. Pharm. Res.* 17(6), 462~466 (1994)
- 27) Salvadori, D. M. F., Ribeiro, L. R., Oliveira, M. K. M., Pereira, C. A. B. and Becak, Willy : The protective effect of  $\beta$ -carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide., *Mut. Res.*, 265, 237-244 (1992)
- 28) Daisy M. F. Salvadori, Lucia R. Ribeiro and A. T. Matarajan : The anticlastogenicity of  $\beta$ -carotene evaluated on human hepatoma cells., *Mut. Res.*, 303, 151~156(1993)
- 28) Ishidate, Jr. M. : 식품의 안전성 평가 ( 학회 출판센타, 일본) , 163~164, (1983)
- 29) Kada, T., Inoue, T., Ohta, T. and Shirasu, Y. : Antimutagens and their modes of action, D. M. Shankel (eds), *Plenum Press, New York* 181~196 (1986)
- 31) Renner, H. W. : *In vivo* effects single or combined dietary antimutagens of mutagen-induced chromosomal aberrations, *Mut. Res.*, 244, 185~188, (1990)
- 32) 허 문영 : Rubrofusarin의 항산화효과 및 Free radical scavenging effect, 미발표자료, (1995)
- 33) Madrigal-Bujaidar, E., Cadena, S. R., Trujillo-Valdes, V. M. and Cassaci, M. : Sister-chromatid exchange frequencies induced by metrifonate in mammalian *in vivo* and *in vitro* systems., *Mut.*

- Res.*, 300, 135~140 (1993)
- 34) Kazimirova, A. and Jablomicka A. : Evaluation of potential mutagenic effect of the liquid smoke preparation UTP *in vivo* : cytogenetic analysis of mouse bone marrow., *Mut. Res.*, 323, 89~92 (1994)
- 35) Jha, A. M. and Singh, A. C. : Clastogenicity of lanthanides: induction of chromosomal aberration in bone marrow cells of mice *in vivo.*, *Mut. Res.*, 341, 193~197 (1995)
- 36) Zhang, L. : Cytogenetic adaptive response induced by pre-exposure in human lymphocytes and marrow cells of mice, *Mut. Res.*, 334, 33~37 (1995)
- 37) Sasaki, Y. F., Matsumoto, K., Imanishi, H., Watanabe, M. Ohta, T., Shirasu Y. and Tutikawa K. : *In vivo* anticlastogenic and antimutagenic effects of tannic acid in mice., *Mut. Res.*, 244, 43~47 (1990)
- 38) Hasegawa, J., Hosokawa, M., Okada, F. and Kobayashi, H. : Inhibition of mitomycin C-induced sister-chromatid exchanges in mouse bone marrow cells by the immunopotentiators Krestin and Lentinan., *Mut. Res.*, 226, 9~12 (1989)
- 39) Rita, P., Geetanjali, D. and Reddy, P. P. : Effect of glutathione on mitomycin C-induced micronuclei in bone marrow erythrocytes of Swiss albino mice., *Mut. Res.*, 260, 131~135 (1991)
- 40) Paul P. W. van Buul and Goudzwaard, J. H. : Bleomycin-induced structural chromosomal aberrations in spermatogonia and bone-

- marrow cells of mice, *Mut. Res.*, 69, 319~324 (1980)
- 41) Brockman, H. E., Stack, H. F. and Waters, M. D. : Antimutagenicity profiles of some natural substances., *Mut. Res.*, 267, 157~172 (1992)
- 42) Ito, Y., Ohmishi, S. and Fujie, K. : Chromosome aberrations induced by aflatoxin B<sub>1</sub> in rat bone marrow cells *in vivo* and their suppression by green tea., *Mut. Res.*, 222, 253~261 (1989)
- 43) Gebhart, E. : Anticlastogenicity in cultured mammalian cells., *Mut. Res.*, 267, 211~220 (1992)
- 44) Heo, M. Y., Kwon, C. H., Sohn, D. H., Lee, S. J., Kim, S. W., Kim, J. H. and Au, W. W. : Effects of Flavonol derivatives on the Micronuclei Formation by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine and the Enhancement of Bleomycin-induced Chromosome Aberration by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, *Arch. Pharm. Res.*, 16, 196~204 (1993)
- 45) Abraham, S. K., Sarma, L. and Kesavan, P. C. : Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and  $\beta$ -carotene against  $\gamma$ -radiation-induced *in vivo* chromosomal damage., *Mut. Res.*, 303, 109~112 (1993)

*In Vitro* 독성시험법 개발 연구 (I)  
Studies on the Development of  
*In Vitro* Toxicity Test (I)

*In Vitro* 광독성시험법 개발에 관한 연구 (I)  
Development of *In Vitro* Phototoxicity Test (I)

주관연구기관 : 국립보건안전연구원 독성부 면역독성과

과 학 기 술 처

## 제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “*in vitro* 독성 시험법 개발 연구 - *in vitro* 광독성 시험법 개발에 관한 연구” 보고서로 제출합니다.

1995년 7 월 일

주관연구기관명 : 국립보건안전연구원

총괄연구책임자 : 문 화 회

연구책임자 : 선 우 연

보건연구원 : 한 형 미

보건연구사 : 정승태, 김필선, 손경희

연구원 : 최경백, 박현애, 오현정



# 요 약 문

## I. 제 목

*In vitro* 광독성 시험법 개발에 관한 연구

## II. 목적 및 중요성

광에너지(비이온성 전기파)는 생체계의 근원이 되는 에너지 자원으로  
서 biological system에 직·간접적으로 관여하여 사람의 피부의  
7-dehydrocholesterol으로부터 비타민 D<sub>3</sub>을 합성하는 유익한 작용을  
하거나 노화 및 다른 질환과 관련된 해로운 영향을 미치기도 한다.  
특히 피부와 눈은 직접적 영향을 받는 유일한 기관으로서 자외선 및  
가시광선의 조사를 받는 경우 세포성분 중 DNA의 pyrimidine, purine  
환의 conjugate에 의한 dimer형성, DNA-protein간의 비공유성 결합,  
DNA의 변이, protein의 변이 등이 나타날 수 있다. 자외선의 흡수에  
의한 DNA 및 단백질의 변이는 세포에 돌연변이를 일으키거나 심지어  
는 세포를 죽이기도 한다. 피부는 자외선의 노출에 의한 세포의 피해  
를 최소화하는 stratum corneum, keratin, melanin 등의 보호장치를  
가지고 있다. 그러나 이러한 보호장치에도 불구하고 피부는 자외선의  
노출에 의하여 쉽게 이상증상을 나타낼 수 있다. 국소적으로 도포하거  
나 전신적으로 투여하는 화학물질이 자외선 및 가시광선에 노출되었  
을 때 피부에 홍반이나 부종과 같은 이상반응이 나타나는데 이러한

것을 화학물질에 의해 야기되는 광독성이라고 한다. 만성적으로 자외선에 노출될 때 조기노화 및 피부암이 발생하기도 한다. 이러한 화학물질의 광독성을 검색할 수 있는 많은 시험법의 개발이 시도되었는데 아직까지 뛰어난 검색방법은 개발되지 않았고 한 두 가지의 결점을 가지고 있다. 광독성의 가능성을 정확하게 측정할 수 있는 것이 개발단계에서 화학물질의 안전성을 평가하는 데 중요한 요소로 남아 있다. 동물을 사용하는 광독성시험법은 비경제적이고 시간이 소요되며 특별한 동물관리시설이 요구된다. 더욱이 동물의 피부에서 나타난 반응은 양적으로나 질적으로 사람의 피부에서 나타난 반응과 다르다. 광독성물질의 검색하는 이상적인 시스템은 간편하여야 하며 기기와 방법을 쉽게 이용할 수 있어야 하고 경제적이며 민감하여야 한다. 이러한 요구에 만족시키기 위하여 *in vitro* 시험법의 개발이 요구되었고 이러한 시험법이 확립된다면 화학물질의 안전성평가에 많은 도움을 줄 것이다.

### III. 내용 및 범위

정상적인 사람의 피부 fibroblast를 neonatal foreskin explant로부터 분리배양하였다. Fibroblast의 배양액은 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, 10% fetal bovine serum이 강화된 Dulbecco's Minimal Essential Medium(DMEM)를 사용하였다. 96-well tissue culture plate에 well당  $2 \times 10^4$  세포를 넣은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간동안 배양하였다. 시험물질을 phosphate-buffered saline(PBS)

에 200ug/ml에서 0.1ug/ml까지의 농도로 용해시킨 후 시험세포를 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 시험물질에 1시간동안 노출시켰다. UVA(7.2J/cm<sup>2</sup>)를 조사한 다음 MTT 및 neutral red(NR) uptake assay를 실시하였다.

#### IV. 결과 및 활용에 대한 건의사항

시험물질에 대해서 MTT 및 neutral red uptake assay를 실시하여 광독성여부를 알아본 바 대부분의 시험물질에서 광독성이 나타난 결과를 보여주었다. 그러나 piroxicam의 경우 neutral red uptake assay에서는 광독성이 나타나지 않았고 MTT assay에서 약한 phototoxicity을 보여주었다. 이러한 결과는 piroxicam이 photoallergen이며 약한 광독성을 일으킨다는 기존의 보고결과와 일치하였다. 이러한 실험결과에 따라 MTT assay가 neutral red uptake assay와 비교하여 대체적으로 보다 민감한 시험방법으로 사료된다. 부작용으로서 화학물질의 광독성가능성 유무의 평가는 신 물질 개발단계의 초기에 평가되어야 하고 동물 및 임상시험이 요구되지 않는 경제적인 방법으로 진행되어야 한다. 현재의 연구는 광독성물질의 검색을 위한 *in vitro* 시험법을 디자인하기 위하여 고려해야 할 parameter를 조사하기 위한 시험이었다. 이러한 광독성물질의 검색을 위한 중요한 변수들을 더 정확하게 파악된 광독성시험법을 확립하기 위하여 더 많은 연구가 진행되어야 한다고 생각되지만 그러나 여기에서의 시험법은 빠르고 간편하며 생산적이고 경제적인 시험방법으로

서 신약 및 화장품의 신 원료에 대한 스크리닝을 위한 *in vitro* 광독  
성시험법으로의 활용가능성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Intorduction</b> .....	10
<b>Chapter 2. Experimental methods</b> .....	14
Section 1. Target cells .....	14
Section 2. Test compounds .....	15
Section 3. UV irradiation .....	15
Section 4. MTT assay .....	16
Section 5. Neural red uptake assay .....	17
Section 6. Determination of phototoxicity in MTT and neutral red uptake assays .....	18
<b>Chapter 3. Results and discussion</b> .....	19
<b>Chapter 4. Conclusion</b> .....	25
<b>Chapter 5. References</b> .....	26

# 목 차

제 1 장	서 론	10
제 2 장	실험방법	14
제 1 절	시험세포	14
제 2 절	시험물질	15
제 3 절	UV 조사	15
제 4 절	MTT assay	16
제 5 절	Neutral red uptake assay	17
제 6 절	MTT 및 neutral red uptake assay에서 광독성의 결정	18
제 3 장	연구결과 및 고찰	19
제 4 장	결 론	25
제 5 장	참고문헌	26

## LIST OF TABLES

**Table 1.** Phototoxicity of different concentrations of test chemicals using a MTT assay.

**Table 2.** Phototoxicity of different concentrations of test chemicals using a neutral red uptake assay.

## LIST OF FIGURES

Figure 1. *In vitro* phototoxicity of chlorpromazine as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays.

Figure 2. *In vitro* phototoxicity of piroxicam as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays.

Figure 3. *In vitro* phototoxicity of chlortetracycline as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays.

Figure 4. *In vitro* phototoxicity of 8-MOP as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays.

Figure 5. *In vitro* phototoxicity of nalidixic acid as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays.

Figure 6. *In vitro* phototoxicity of promethazine as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays.



## 제 1 장 서 론

광에너지(비이온성 전기파)는 생체계의 근원이 되는 에너지 자원으로 biological system에 직·간접적으로 관여하여 사람의 피부의 7-dehydrocholesterol으로부터 비타민 D<sub>3</sub>를 합성하는 유익한 작용을 하거나 노화 및 다른 질환과 관련된 일련의 해로운 영향을 미치기도 한다.<sup>1)</sup> 특히 피부와 눈은 직접적 영향을 받는 유일한 기관으로서 자외선 및 가시광선의 조사를 받는 경우 melanocyte의 증가<sup>2)</sup>와 epidermis, stratum corneum층의 증식을 통해 좀 더 깊은 dermis층으로의 투과를 감소시키는 보호과정<sup>3)</sup>을 일으킨다. 그러나 생물학적 활성이 큰 파장(UVA: 320-280nm, UVB: 280-320nm, UVC: 200-280nm)의 빛에 강하게 장기간 노출된 경우 혹은 빛을 흡수하여 인접분자에 영향을 주는 광민감성분(photosensitizers)이 생체에 부분적, 전신적으로 존재한 경우 세포성분 중 DNA의 pyrimidine, purine환의 conjugate에 의한 dimer형성, DNA-protein간의 비공유성 결합, protein 간의 cross linkage에 의한 DNA합성저해 및 효소 활성 상실 등의 생체반응 이상을 초래하게 된다.<sup>1)</sup> 수종의 의약품 및 화학물질이 태양광 및 인공광에 의하여 광과민반응(photosensitivity reactions)을 일으키는데, 이러한 화학물질을 광과민물질(photosensitizers)이라 부른다.<sup>1, 4)</sup>

약물에 의해 야기되는 광과민반응은 광독성(phototoxicity)과 광알러지(photoallergy) 반응으로 분류된다.<sup>5)</sup> 어떤 약물은 두 종류의 반응이 같이 나타나기도 한다. 광독성과 광알러지는 피부에서 나타나는 반응의 양상이 유사하여 구분이 어려우나, 일반적으로 광독성의 경우는 알러지나 광알러

지와는 달리 개체 특이성이 없어 거의 모든 개체에서 나타나며 광량이나 노출된 화학물질의 양과의 관계에서 용량의존성<sup>6)</sup>을 나타내며 감각의 과정 없이 반응이 일어난다.<sup>4, 6)</sup> 두 종류의 반응 모두 적당한 파장의 빛에 노출되어야 하고 피부에 약물이 존재하여야 한다. Phototoxic reaction을 일으키는 빛의 파장은 300nm에서 400nm의 범위에 있다. 광알러지 반응의 경우 290nm에서 450nm의 파장의 빛이 반응을 일으킨다.<sup>7)</sup> 광독성반응에서 약물은 UVA로부터 에너지를 흡수하고 이 에너지를 피부로 방출하여 cellular damage를 일으킨다. 빛에 의한 약물의 excitation은 nuclear DNA 또는 cellular membrane과 결합하는 singlet oxygen, free radicals 및 toxic product를 생산하며 산소를 요구하는 반응은 photodynamic reaction이라 한다. 또한 Amiodarone, chlorpromazine 같은 약물은 metabolite가 광독성을 일으키는 데에 중요한 역할을 한다.<sup>8, 9)</sup>

광독성은 태양광에 의한 심한 화상이 특징이며<sup>2)</sup> 태양에 노출된 후 2 내지 6시간 안에 두드러기(urticaria)를 동반하여 빠르게 일어나며 24시간 후에 홍반(erythema) 및 압통(tenderness)이 나타난다. 심한 반응에는 수포(bulla) 또는 소포(vesicles)가 존재할 수도 있다. 또한 Phototoxic reaction의 후유증으로 색소과잉침착(hyperpigmentation)이 나타날 수 있다. 조직학적으로 광독성은 비특이적인 피부염증성침윤(dermal inflammatory infiltrate)으로 나타난다.<sup>10)</sup> 광과민성분이 있을 때 피부에서 홍반, 부종 등의 염증반응을 유발시키는 광독성은 더 악화되어 피부암으로도 발전하게 될 수도 있다.

광알러지(photoallergy)는 약물이 빛의 영향에 의해서 구조적인 변화를 일으켜 피부의 단백질과 결합하는 합텐(hapten)으로 작용하여 일어나는 면역학적 매개반응(immune-mediated reaction)이다. 일단 항원

(hapten-protein complex)이 형성되면 피부의 상피층에 존재하는 랑게르한스 세포는 과민반응을 일으키는 immunocompetent cell에 항원을 제공할 수 있다. 광알러지는 광독성과 비교하여 드물게 일어난다. 최근 유럽의 공동연구에서 2000건의 광과민반응 중 약 5%가 광알러지로 간주되었다.<sup>11)</sup> 일반적으로 광알러지는 약물에 국소적으로 노출된 후에 일어나는 반응으로 광접촉성 피부염(photocontact dermatitis)이라고 한다. 약물에 의하여 일어나는 광알러지는 접촉성 피부염(contact dermatitis)과 유사하게 약물에 계속적인 노출 후 5~10일 후에 발달된다. 약물과 빛에 재노출된 후 24시간 후에 반응이 일어날 수 있다. 이것은 보통 소양감(pruritus) 과 습진(eczema)성 반응으로 나타나지만 구진(papules) 및 판(plaques)의 증상으로 보다 분명하게 나타날 수 있다. 조직학적으로 광알러지는 진피에서 밀도있는 혈관주위의 구상세포 침윤(perivascular round-cell infiltrate)을 가지는 접촉성피부염(contact dermatitis)과 동일하다.<sup>12)</sup>

일반적으로 자외선 또는 가시광선을 흡수할 수 있는 과장영역을 가진 화학물질이 광독성을 일으킬 소지가 많은 것으로 알려져 있는데 이는 광독성의 기전과도 밀접한 관련이 있다.<sup>13)</sup> 광의의 광독성은 정상조직에서 광선중의 광자(photon)의 흡수에 의한 염증반응으로 정의할 수 있으며, 흔히 말하는 광과민 반응 전체를 통틀어 말한다. 협의의 광독성은 320nm-400nm의 광조사하에서 광독성을 가진 외부의 화학물질에 의하여 일어나는 반응으로 일컬을 수 있다. 오늘날 경제적으로 생활이 여유가 생김에 따라 야외 레저활동에 대한 일반의 요구 증가와 환경오염에 따른 오존층의 파괴에 의한 자외선 량의 증가로 인해 자외선의 폐해는 자못 심각한 상태에 이르렀으므로 화학물질에

대한 광독성 및 광알러지에 대한 학자 및 일반인의 관심이 증가하고 있다.

광독성은 화학물질에 의해서 비면역학적으로 일어나는 피부의 자외선 및 가시광선등 광자극에 대한 이상반응으로, 광알러지와는 달리 충분한 광량과 약물로 반응강도의 예측이 가능하다. 화학물질의 광독성의 평가를 위하여 기존의 방법은 기니픽<sup>14)</sup> 또는 마우스<sup>15)</sup> 등의 동물을 사용하여 수행되어 왔으나 이러한 방법은 동물을 관리하는 데 소요되는 경비 및 인력 그리고 많은 시간이 소요되는 단점이 있고 또한 EC 국가에서는 동물보호차원에서 동물을 사용하는 전임상시험을 금지하고 있는 추세이다. 따라서 이러한 문제점들을 해결하는 방안으로 보다 객관적이며 경제적이고 간편한 방법으로 광독성을 예측할 수 있는 배양세포계를 이용한 *in vitro* 시험법이 확립된다면 신약 후보물질의 광독성유무에 대한 스크리닝을 용이하게 할 수 있어 신약개발단계인 전임상시험에 소요되는 많은 인력과 시간을 절감할 수 있으리라 사료된다. 이에 세포독성을 측정하는 방법인 MTT<sup>16, 17)</sup> 및 neutral red(NR) uptake assay<sup>18)</sup>를 사용하여 광독성시험을 실시하여 광독성물질을 보다 민감하게 검색할 수 있는 시험법을 개발하고자 본 연구를 실시하였다.

## 제 2 장 실험방법

### 제 1 절 시험세포

Neonatal foreskin dermal explant에서 분리한 normal human fibroblast를 분리하였다. 분리된 fibroblast를 1% penicillin - streptomycin (Sigma Co., USA), 1% L-glutamine(Sigma Co., USA.), 10% fetal bovine serum (FBS ; Gibco, USA)이 강화되어 있는 Dulbecco's Minimal Essential Medium(sDMEM; Gibco, USA)로 수차례 계대배양하여 시험세포로 사용하였다. 시험세포의 분리방법은 다음과 같다. Clean bench안에서 피부조직을 Petri dish에 넣고 phosphate-buffered saline(PBS; Sigma Co., USA)로 1회 세척한 후 fine scissor로 lipid를 제거하고 작은 조각(0.5cm<sup>2</sup>)으로 자른다음 PBS로 3회, FBS가 들어 있지 않은 DMEM으로 3회 세척하였다. 세척된 조직을 Petri dish에 넣고 collagenase(1mg/ml ; Gibco, USA)와 dispase(2mg/ml ; Gibco, USA) 용액을 조직이 잠길 정도로 넣어 준 후 37°C incubator에서 45분간 방치하였다. 45분 후 collagenase 및 dispase의 작용을 중화하기 위하여 sDMEM를 동량 넣어 준 후 용액을 분리하여 원심분리하여 시험세포를 얻었다. 나머지 조직은 분리하여 Petri dish에 넣고 0.25% Trypsin을 처리하여 37°C에 45분간 incubation 시켰다. 이 때 Petri dish의 둘레를 parafilm으로 감아서 CO<sub>2</sub>에 의한 pH 하강을 막았다. 45분 후 sDMEM를 동량 넣어 준 후 조직을 2-3회 pipetting하고 용액을 50ml conical tube에 담아 원심분리하여 조직에

서 유리된 세포들을 모은다음 분리된 세포를 tissue culture flask에 넣어 배양하였다. MTT 및 neutral red uptake assay 실시하기 전에 이 시험세포를 96-well tissue culture plate에 well당  $2 \times 10^4$  cells/200ul의 농도로 seedling한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 에서 24시간 동안 배양하였다.

## 제 2 절 시험물질

Chlorpromazine(Sigma Co., USA), piroxicam(Sigma Co., USA), chlortetracycline(Sigma Co., USA), 8-methoxypsoralen( 8-MOP; Sigma Co., USA), nalidixic acid(Aldrich Chemical Co., USA), promethazine(Sigma Co., USA) 등의 시험물질을 Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>- free phosphate-buffered saline(PBS ; Sigma Co., USA)에 0.1ug에서 200ug/ml로 용해하여 사용하였다.

## 제 3 절 UV 조사

시험세포가 배양된 plate의 각 well의 배양액을 제거한 후 시험물질을 용해한 PBS로 넣은 후 시험세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건에서 1시간 동안 시험물질에 노출시켰다. 1시간 후에 시험물질이 용해되어 있는 PBS를 제거한 후 각 well에 200ul의 PBS를 넣은 후 plate의 lid를 제거한 후 7.2J/cm<sup>2</sup> 광도인 3mW/cm<sup>2</sup>의 UVA를 40분간 조사하였다. UVA irradiator는 Sellas UVA( Dr. Selmeier Co, Dusseldorf. West

Germany)를 사용하였고 UV meter(Vilver Lourmat, France)를 이용하여 조사량을 측정하였다.

#### **제 4 절 MTT assay**

Mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT (3-(4, 5 - dimethylthiazol - 2-yl-) 2, 5, - diphenyltetrazolium bromide; Sigma Co., USA) colorimetric reduction assay를 수행하여 UV를 조사한 후 시험물질에 대한 세포의 viability를 측정하였다. UVA를 조사한 후 각 well의 PBS를 제거한 다음 100ul의 신선한 배지를 넣고 10ul의 MTT 용액(5ug/ml)을 첨가하였다. 시험세포를 37°C에 4시간 배양한 다음 각 well에서 80ul의 용액을 조심스럽게 제거한 후 DMSO를 110ul용량으로 넣었다. Formazan 결정체가 용해될 때까지 plate를 약 10분간 진동시킨 다음 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 630nm(reference wavelength)와 570nm(test wavelength)에서 흡광도를 측정하였다. 모든 결과는 MTT를 넣지 않은 well에서 측정된 background absorbance로 교정되었다.

## 제 5 절 Neutral red uptake assay

Neutral red(Sigma Co., USA)용액은 빛의 투과를 차단한 0.4% aqueous stock solution으로 준비하였다. sDMEM으로 stock solution을 1:80의 비율로 희석한 후 상온에서 24시간동안 침전시켰다. 1500g에서 10분간 원심분리한 후 상층 액을 assay에 사용하였다. UVA를 조사한 후 시험세포가 배양된 plate의 각 well로부터 PBS를 제거하였다. 그리고 neutral red가 포함되어 있는 200ul의 sDMEM을 넣은 후 이 시험세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 에서 3시간동안 배양하였다. 시험세포에 흡수되지 않은 neutral red를 plate에서 제거한 후 시험세포를 고정하고 남아 있는 unincorporated neutral red을 제거하기 위하여 각 well을 200ul formal-calcium 용액(0.4% formaldehyde 와 10% CaCl<sub>2</sub>)으로 세척하였다. 시험세포에 흡수된 neutral red dye를 추출하여 양을 정량하기 위하여 formal-calcium 용액을 진공흡수하여 제거한 후 200ul extraction solution (19% glacial acid - 50% ethanol solution)을 각 well에 넣었다. 5-10분간 추출한 후 추출용액이 섞이도록 plate를 흔들어 준 다음 microplate reader를 사용하여 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 모든 결과는 neutral red를 넣지 않은 well에서 측정된 background absorbance로 교정되었다.



## 제 6 절. MTT 및 neutral red uptake assay에서 광독성의 결정

각 시험물질당 2개의 96-well plate를 사용하였다. 한 plate는 UV를 조사하였고 다른 한 plate는 UV를 조사하지 않은 광비조사대조군으로 하였다. 각 plate의 24 well들은 control well로 사용하기 위하여 시험물질을 넣지 않았고 이 각 plate의 control well들의 평균흡광도를 구하여 시험세포의 배양시 성장률차이 및 UVA조사시 시험세포에 대한 직접적인 효과에 의한 plate와 plate간의 variation를 교정하기 위하여 plate correction control로 사용하였다. 남아 있는 다른 well들은 시험물질의 한 농도당 3개의 well을 사용하여 농도별로 시험물질을 넣었다. UVA 와 시험물질에 노출된 triplicate culture well의 흡광도와 UVA의 조사없이 시험물질만으로 노출시킨 대조군의 triplicate culture well의 흡광도를 plate correction control로 각 plate간의 variation를 교정한 후 서로 비교하여 MTT 및 neutral red uptake 각각의 대조군에 대한 백분율로 광독성의 유무를 결정하였다.

### 제 3 장 연구결과 및 고찰

Chlorpromazine, piroxicam, chlortetracycline, 8-methoxypsoralen(8-MOP), nalidixic acid, promethazine을 0.1~200 ug/ml의 농도로 제조하여 human fibroblast 에 1시간 동안 노출시킨 후 UVA(7.2J/cm<sup>2</sup>)를 조사하여 MTT 및 neutral red uptake assay를 실시한 결과를 Table 1 및 2 에 나타내었다. Chlorpromazine을 사용하여 MTT 및 neutral red uptake assay를 실시한 결과 0.1ug/ml 및 1ug/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 약물의 phototoxicity에 의한 viability가 약간 감소하였으나 5ug/ml의 농도에서는 시험약물의 농도가 증가함에 따라 viability의 감소가 훨씬 크게 나타났다. 이러한 시험세포의 viability의 감소는 MTT assay에서 보다 높게 나타났다. 50ug/ml이상의 농도에서는 chlorpromazine의 직접적인 세포독성때문에 UVA에 의한 시험물질 자체의 phototoxicity정도를 결정할 수 없었다(Figure 1). Piroxicam은 neutral red uptake assay에서 모든 농도에서 phototoxicity이 나타나지 않았다. MTT assay에서는 100ug/ml 및 200ug/ml의 농도에서 각각 83.8%, 83.8%의 viability가 나타났다(Figure 2). 이 결과는 piroxicam은 photoallergen이고 약한 phototoxicity을 나타낸다는 보고와 일치한다.<sup>19, 20)</sup> Chlortetracycline은 neutral red uptake assay에서는 20ug/ml 이상의 농도에서 viability의 감소가 나타났지만 100ug/ml, 200ug/ml의 농도에서는 MTT assay에서 훨씬 높게 viability의 감소가 나타났다(Figure 3). 8-methoxypsoralen는 MTT assay에서 100ug/ml, 200ug/ml 농도에서 79.0%, 41.8%의 viability를 나타내었으며

neutral red uptake assay에서는 59.6%, 48.5%의 viability가 나타내었다 (Figure 4). Nalidixic acid는 MTT assay에서 0.1ug/ml의 농도에서부터 viability의 감소가 나타났지만 neutral red uptake assay에서는 10ug/ml이상의 농도에서부터 viability의 감소가 나타났다(Figure 5). Promethazine의 경우에는 MTT assay에서는 50ug/ml, 100ug/ml의 농도에서는 66.2% 및 32.3%의 viability를 나타냈으며, neutral red uptake assay에서는 10ug/ml, 20ug/ml, 50ug/ml의 농도에서 77.0%, 52.9%, 46.5%의 viability를 나타내었다(Figure 6).

이상의 MTT 및 neutral red uptake assay을 이용하여 6개의 시험 물질을 가지고 시험을 실시한 바 고농도에서는 대부분이 viability의 감소가 나타났으며, piroxicam의 경우 MTT assay에서는 약간의 phototoxicity가 나타났지만 neutral red uptake assay에서는 phototoxicity가 나타나지 않았다.

Chlorpromazine은 1950년도 psychiatric therapy에 도입된 이후 광독성을 일으키는 것으로 보고되어 왔으며 Chlorpromazine은 적혈구에서 membrane의 파괴<sup>21)</sup>를 일으키거나 DNA chain을 절단하거나 protein과 상호작용<sup>22)</sup>을 하는 등 세포수준에서 한가지 이상의 방법으로 광독성을 일으키며 어떠한 경우에는 toxic photoproduct에 의해서 일어나기도 한다.<sup>23)</sup> 또한 Chlorpromazine과 같은 phenothiazine계인 promethazine도 UV를 흡수하여 사람에게서 photoirritancy를 일으키는 물질로 *in vitro* 시험인 MTT 및 neutral red uptake assay에서도 광독성을 나타내었다.

염증치료에 주로 쓰이는 non-steroidal antiinflammatory drug(NSAID)계의 약물이 임상적으로 photoreaction을 일으킨다는 것이 보고된 바 있다.<sup>24)</sup> Piroxicam은 이러한 NSAID의 계열의 약물로서

piroxicam으로 치료를 받은 경우 며칠이내에 photosensitivity가 나타난 것으로 보아 phototoxic mechanism을 의미할 수도 있지만 일어난 피부반응양상은 습진성이므로 photoallergy 반응에 더 일치되는 것으로 보고되어 있다.

Tetracycline계의 약물은 임상적으로 잘 알려진 photosensitizers이다.<sup>25)</sup> Tetracycline계의 약물의 광독성 기전은 아직 잘 알려져 있지 않지만 동물시험<sup>26, 15)</sup> human lymphocyte<sup>27)</sup> 등의 여러 시험을 통해 cell membrane injury가 나타나는 것이 보고된 바있다. Tetracycline에 의한 광독성의 특이한 점은 UVA에 조사되었을 때 tetracycline이 phototoxic properties을 가진 photoproduct를 형성하여 광독성을 일으킨다는 것이다. 광독성을 일으키는 과정은 크게 두 가지의 과정으로 나누어지는데 첫 번째 과정은 biologic molecule과 약물의 photosensitization에 의하여 일어나는 과정이고, 두 번째 과정은 약물이 빛에 조사되면 한개 이상의 photoproduct가 형성되어 광독성이 일어난다는 것이다. 광선과 세포와의 관계를 살펴보면 특정파장의 광선을 흡수하는 물질이 세포에 함유되어 있지 않다면 광선은 세포를 투과할 것이고 광선은 세포에 아무런 영향도 미치지 아니할 것이다. 그러나 이 특정 파장의 빛을 흡수하는 물질이 세포 속에 존재한다면 문제는 달라진다. 흡수된 에너지는 다른 분자들에게 전달될 수 있으며, 또 광을 흡수한 물질 자체가 변화되어 세포에 영향을 줄 수 있다. 그러한 반응의 결과로 생성된 free radical이 발생하고, 여러 가지 암반응이 진행되어, 세포막의 지질이 산화되어 투과성이나 수송능이 영향을 받게 되고, 여러 가지 효소들이 불활성화되어 심각한 대사기능장애를 가져오거나, DNA의 전사가 되지않거나 부적절한 전사를 초래하고 RNA 역시 잘못된 해독으로 인한 심각한 해를 입게 된다. Tetracycline계의 약물의 임상시험

에서 광독성은 UVB에 의한 것이 아니라 UVA에 의해 주로 야기되는 것으로 보고되었다.<sup>28)</sup> Tetracycline계의 약물은 종류에 따라 phototoxic potency가 다르고 demethylchlortetracycline(DMCT)와 chlortetracycline가 가장 높은 photoactive compound로 알려졌다. 본 실험에서의 결과도 마찬가지로 chlortetracycline는 광독성이 나타나는 것으로 확인되었다.

Nalidixic acid을 가지고 mice에 피내주사 하거나 전신적으로 투여한 연구에는 광독성이 나타나지 않은 것으로 보고된 바도 있으나,<sup>29)</sup> mouse tail technique를 이용한 nalidixic acid를 경구투여한 시험<sup>15)</sup> 및 다른 시험<sup>30)</sup>에서는 광독성이 나타났다. 더욱이 nalidixic acid의 metabolite인 7-hydroxylated species가 주요 반응물질로 확인되었으며 이러한 결과는 약물의 대사체가 광독성 반응을 일으킨다는 것을 알 수 있다. MTT 및 neutral red uptake assay를 실시하여 nalidixic acid의 광독성을 평가한 결과는 기존의 보고와 일치한 것으로 보아 nalidixic acid의 경우 *in vitro*와 *in vivo*의 실험결과가 차이가 없는 것을 알 수 있다.

8-methoxypsoralen(8-MOP)도 MTT 및 neutral red uptake assay에서 모두 광독성이 나타났다. 이 결과는 동물시험<sup>31)</sup>뿐만 아니라 임상시험<sup>32, 33)</sup>에서 보고된 결과와 일치한다.

이상의 여러 가지 시험물질을 가지고 시험한 결과에서 나타난 바와 같이 각 시험물질은 phototoxicity이 나타나지 않는 농도가 존재하므로 한 농도만 가지고 시험을 실시할 때는 잘못된 결과를 가져올 수도 있다.

광독성검색법은 외용제 및 화장품의 안전성평가에 필수적인 시험으로 전신적으로 적용되는 의약품이라 할 지라도 광독성을 나타내는 경우가 종종 있어 광독성은 의약품의 안전성을 평가하기 위한 전임상시

험에서 반드시 고려되어야 할 사항으로 사료된다. 광독성의 여부는 여러 가지 보고에서 시험법에 따라 엇갈리는 경우가 있는데, 이런 경우 임상에서의 안전한 사용을 위하여 정확히 예측 가능한 시험법의 개발은 필수불가결하다고 하겠다. 광독성물질은 또 흔히 자외선 또는 가시광선에 의한 발암성의 증가와도 밀접한 관련이 있어,<sup>34)</sup> 광독성물질의 검색은 암예방등 보건향상에 지대한 영향을 미친다고 할 수 있다. 광독성을 평가하기 위하여 mammalian 및 human model을 사용한 많은 기술이 제공되어 왔다. 사람에게 대한 intradermal testing<sup>28)</sup>과 약의 임상 사용에 대한 결과<sup>35)</sup> 등이 가장 효과적인 광독성 시험방법이지만 이러한 시험들이 실시되기에는 지원자 및 환자가 필요하게 되어 많은 종류의 화학물질에 대한 human phototoxicity를 스크리닝하기에는 유용한 방법이 아니다. 동물시험을 사용하여 화학물질의 광독성 가능성을 평가하는 방법이 훨씬 정량적이며 신약개발의 초기단계에서 화학물질을 스크리닝하는 데 효과적으로 적용될 수 있다. 그러나 윤리적인 면 때문에 독성지표로서 동물의 사용은 어려워져 가고 있으며 화학물질을 대단위로 검색하기에는 효과적이지 못하다.

최근에는 배양된 세포를 화학물질에 노출시킨 후 MTT cleavage 및 neutral red uptake 이용하여 세포독성을 평가하는 방법이 화학물질의 독성평가방법으로 개발되어 왔다. 본시험에서는 이 두 가지 세포독성시험법을 이용하여 여러 가지 화학물질의 phototoxicity를 평가한 결과 동물 및 임상시험에서 보고된 결과와 대부분이 일치함을 알 수 있었다. 부작용으로서 화학물질의 광독성가능성 유무의 평가는 신물질 개발단계의 초기에 평가되어야 하고 동물 및 임상시험이 요구되지 않는 경제적인 방법으로 진행되어야 한다. 현재의 연구는 광독성물질의

검색을 위한 *in vitro* 시험법을 디자인하기 위하여 고려해야 하는 parameter를 조사하기 위한 시험이었다. 이러한 광독성물질의 검색을 위한 중요한 변수들이 보다 정확하게 파악된 광독성시험법을 확립하기 위하여 더 많은 연구가 진행되어야 한다고 생각된다. 그러나, 여기에서의 시험법은 빠르고 간편하며 생산적이며 경제적인 시험법으로 신약 및 화장품의 신원료에 대한 스크리닝을 위한 *in vitro* 광독성시험법으로 활용가능성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

## 제 4 장 결 론

Chlorpromazine, piroxicam, chlortetracycline, nalidixic acid, promethazine, 8-methoxy-psoralen 등의 시험물질을 0.1ug/ml~200ug/ml의 여러 가지 농도로 제조하여 fibroblast에 1시간 동안 incubation한 후 UVA(7.2J/cm<sup>2</sup>)를 조사하여 MTT assay 및 neutral red uptake assay 를 시행하였다.

MTT assay의 시험결과 chlorpromazine, chlortetracycline, nalidixic acid, promethazine, 8-methoxy-psoralen에서는 phototoxicity가 나타났고 piroxicam에서는 약한 phototoxicity가 나타났다. Neutral red uptake assay에서는 chlorpromazine, chlortetracycline, nalidixic acid, promethazine, 8-methoxy-psoralen에서는 phototoxicity가 나타났고 piroxicam에서는 phototoxicity가 나타났지 않았다. Piroxicam이 neutral red uptake assay 보다 MTT assay 에서 약한 phototoxicity가 나타난 것으로 보아 MTT assay가 대체적으로 보다 민감한 방법으로 생각된다.

본 시험에서의 시험법들은 빠르고 간편하며 생산적이며 경제적인 시험법으로 신약 및 화장품의 신원료에 대한 스크리닝을 위한 *in vitro* 광독성시험법으로 활용가능성을 가지고 있는 것으로 사료된다.



## 제 5 장 참고문헌

1. Dicarlo FJ, Öehme FW. Drug and Chemical Toxicology, Vol. 5 (Photobiology of the skin and eye). Marcel Bekker Inc., New York · Basel, 33-39.
2. Kornhauser A, Wamer WG, Lambert LA. Light-induced dermaltoxicity: effects on the cellular and molecular level. In: Marzulli FN, Howard HI, eds. Dermatotoxicology. 4th ed. New York: Hemisphere; 1991.
3. Beadle PC, Burton JL. Absorption of ultraviolet radiation by skin surface lipid. Br J Dermatol 1981; 104: 549-51.
4. Emmitt EA. Phototoxicity from exogenous agents. Photochem Photobiol 1079; 30: 429-436.
5. Epstein JH, Wintroub BU. Photosensitivity due to drugs. Drugs 1985; 30: 42-57.
6. Wagai N, Yamaguchi F, Sekuguchi M et al. Phototoxic potential of quinolone antibacterial agents in Balb/c mice. Toxicol Lett 1990; 54: 299-308.

7. Pathak MA. Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 285-312
8. Ferguson J, Addo HA, Jones S et al. A study of cutaneous photosensitivity induced by amiodarone. *Br J Dermatol* 1985; 113: 537-49.
9. Ljunggren B, Moller H. Phenothiazine phototoxicity: an experimental study on chlorpromazine and its metabolites. *J Invest Dermatol*. 1977; 68: 313-7.
10. Rosen C. Photo-induced drug eruptions. *Semin Dermatol* 1989; 8: 149-57.
11. Holzle E, Neumann N, Hausen B et al. Photopatch testing: the 5-year experience of the German, Austrian and Swiss photopatch test group. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 59-68.
12. Epstein JH, Photocontact allergy in humans. In: Marzulli FN, Maibach HI, eds. *Dermatotoxicology*. 4th ed. New York: Hemisphere; 1991.

13. Motten AG, Chignell CF, Mason RP. Spectroscopic studies of cutaneous photosensitizing agents-VI. Identification of the free radicals generated during the photolysis of musk ambrette, musk xylene and musk ketone. *Photochem Photobiol* 1983; 38: 671-678.
14. Stott CW, Stasse J, Bonomo R, Campbell AH. Evaluating the phototoxic potential of topically applied agents using long-wave ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 1970; 55: 335-338.
15. Ljunggren B, Moller H. Drug phototoxicity in mice. *Acta Dermatovener(Stockhol m)* 1978; 58: 125-130.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 53-63.
17. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods* 1984; 70: 257-268.
18. Riddell RJ, Clothier RH, Balls M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. *Fd Chem Toxic* 1986; 24: 469-471.

19. Kochevar IE, Wujek Hoover K, Gawienowski M. Benoxaprofen photosensitization of cell membrane disruption. *J Invest Dermatol* 1984; 82: 214-218.
20. Servano G, Bonillo J, Aliaga A, Gargallo E, Peluto C. Piroxicam-induced photosensitivity. *J Am Acad Dermatol* 1984; 11: 113-120.
21. Johnson BE. Cellular mechanisms of chlorpromazine photosensitivity. *Proc R Soc Med* 1974; 67: 871-873.
22. Rosenthal I, Ben-Hur E, Prager A, Riklis E. Photochemical reactions of chlorpromazine. Chemical and biochemical implications. *Photochem Photobiol* 1978; 28: 591-594.
23. Ljunggren B. Phenothiazine phototoxicity: toxic chlorpromazine photoproducts. *J Invest Dermatol* 1977; 69:383-386.
24. Kligman AM, Kaidbey KH. Phototoxicity to benoxaprofen. *Eur J Rheum Inflamm* 1982; 5: 124-137.
25. Hoigne R. Penicillins, cephalosporins and tetracyclines. In: Dukes MNG, ed. *Side effects of drugs*. Amsterdam, Oxford: Excerpta Medica 1975; 8: 571-601.

26. Stratigos JD, Magnus IA. Photosensitivity by demethyl-chlortetracycline and sulphaniamide. *Br J Dermatol* 1968; 80: 391-405.
27. Glette J, Sandberg S, Haneberg B, Solberg C. Effect of tetracyclines an UV light on oxygen consumption by human leukocyte. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 489-492.
28. Kaidbey K, Kligman A. Identification of systemic phototoxic drugs by human intradermal assay. *J Invest Dermatol* 1978; 70: 272-274.
29. Ramsey CA, Obreshkova E. Photosensitivity from nalidixic acid. *Br J Dermatol* 1974; 91: 523-528.
30. Keane JT, Pearson RW, Malkinson FD. Nalidixic acid - induced photosensitivity in mice: a model for pseudophophyria. *J Invest Dermatol* 1984; 82: 210-213.
31. Hakim RE, Freeman RG, Griffin AC, Knox JM. Experimental toxicologic studies on 8-methoxypsoralen in animals exposed to the long ultraviolet. *J Pharmacol Exp Ther* 1961; 131: 394-399.

32. Epstein JH. Chemical phototoxicity in humans. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 265-268.
33. Swanbeck G, Thyresson-Hok M, Bredberg A, Lambert B. Treatment of psoriasis with oral psoralens and longwave ultraviolet light. *Acta Dermatol* 1975; 55: 367-376.
34. Frost P, Weinstein GD, Gomez EC. Methacycline and demeclocycline in relation to sunlight. *JAMA* 1971; 216: 326-329.
35. Frost P, Weinstein GD, Gomez EC. Phototoxic potential of minocycline and doxycycline. *Arch Dermatol* 1972; 105: 681-683.

**Table 1.** Phototoxicity of different concentrations of test chemicals using a MTT assay. Human fibroblasts were exposed to chemicals for 1 hour and subsequently irradiated with 7.2J/cm<sup>2</sup> UVA. The data are reflected as a percentage( % viability) compared to a control plate in which the cells were exposed to identical amounts of drug without UV exposure.

Test chemicals	Concentration(ug/ml)							
	0.1	1	5	10	20	50	100	200
chlorpromazine	86.6	92.5	56.7	25.1	3.6			
piroxicam	97.4	90.3	94.7	98.3	94.4	89.6	83.8	83.8
chlortetracycline	104.5	117.7	114.4	97.1	93.0	66.7	31.1	10.0
8-methoxypsoralen	101.4	100.2	100.4	92.8	95.2	94.0	79.0	41.8
nalidixic acid	72.9	77.3	82.2	56.0	66.2	69.5	42.5	32.3
promethazine	126.7	111.1	113.9	97.2	86.3	66.2	32.3	

**Table 2.** Phototoxicity of different concentrations of test chemicals using a neutral red uptake assay. Human fibroblasts were exposed to chemicals for 1 hour and subsequently irradiated with 7.2J/cm<sup>2</sup> UVA. The data are reflected as a percentage( % viability) compared to a control plate in which the cells were exposed to identical amounts of drug without UV exposure.

Test Chemicals	Concentration (ug/ml)							
	0.1	1	5	10	20	50	100	200
chlorpromazine	86.5	85.0	46.7	50.8	51.5			
piroxicam	99.4	114.4	102.2	108.8	105.9	106.4	104.5	103.3
chlortetracycline	103.7	102.7	92.5	94.2	76.8	50.2	48.2	50.3
8-methoxypsoralen	130.8	101.9	96.7	73.3	65.8	55.6	59.6	48.5
nalidixic acid	122.6	105.5	103.1	89.3	79.5	80.0	60.3	64.9
promethazine	108.2	91.3	92.1	77.0	52.9	46.5		



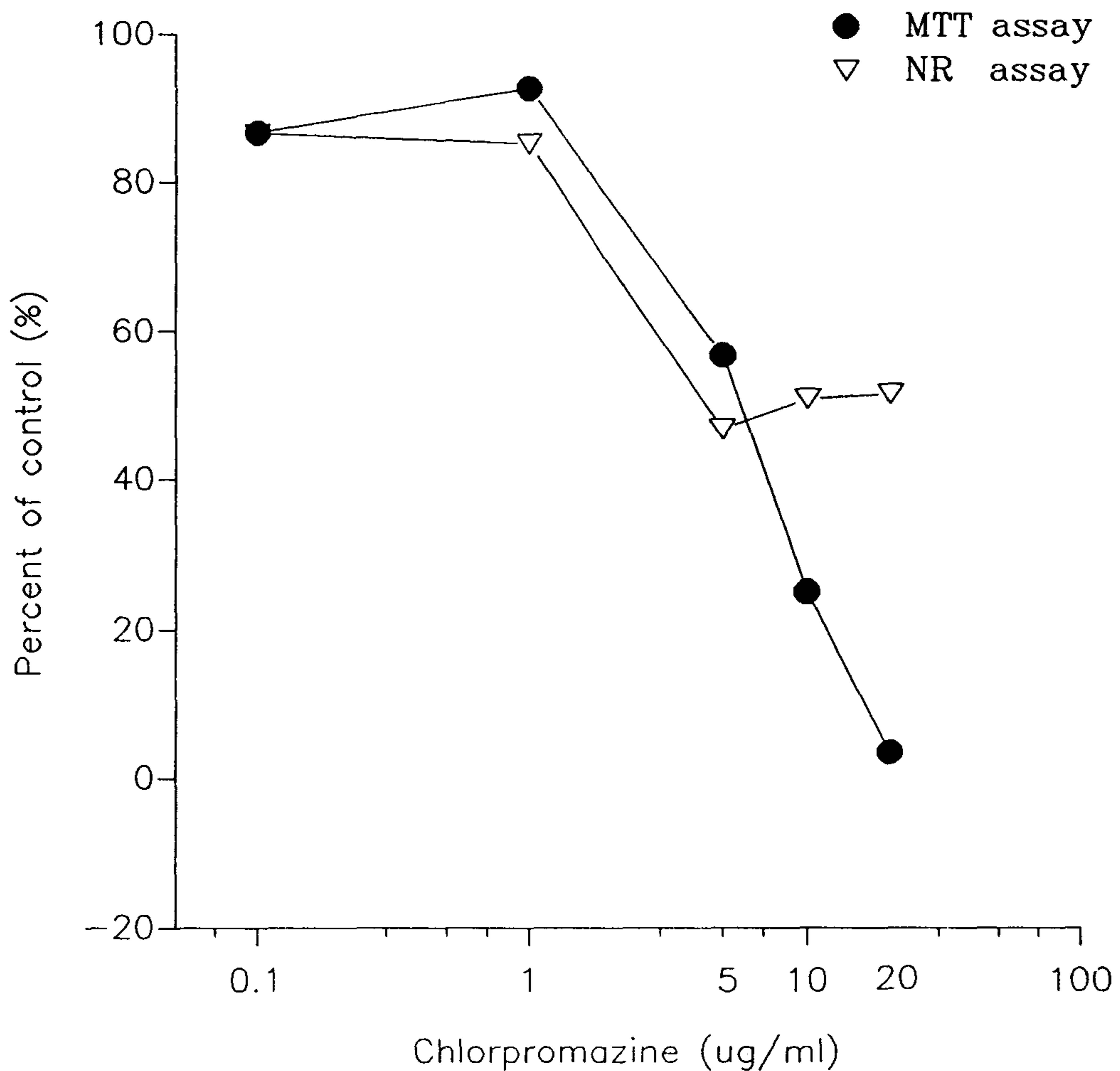


Figure 1. In vitro phototoxicity of chlorpromazine as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays. Human fibroblasts were exposed to chemicals for 1 hour and subsequently irradiated with  $7.2\text{J}/\text{cm}^2$  UVA. Data shown are the mean of 6 experiments each performed in triplicate.

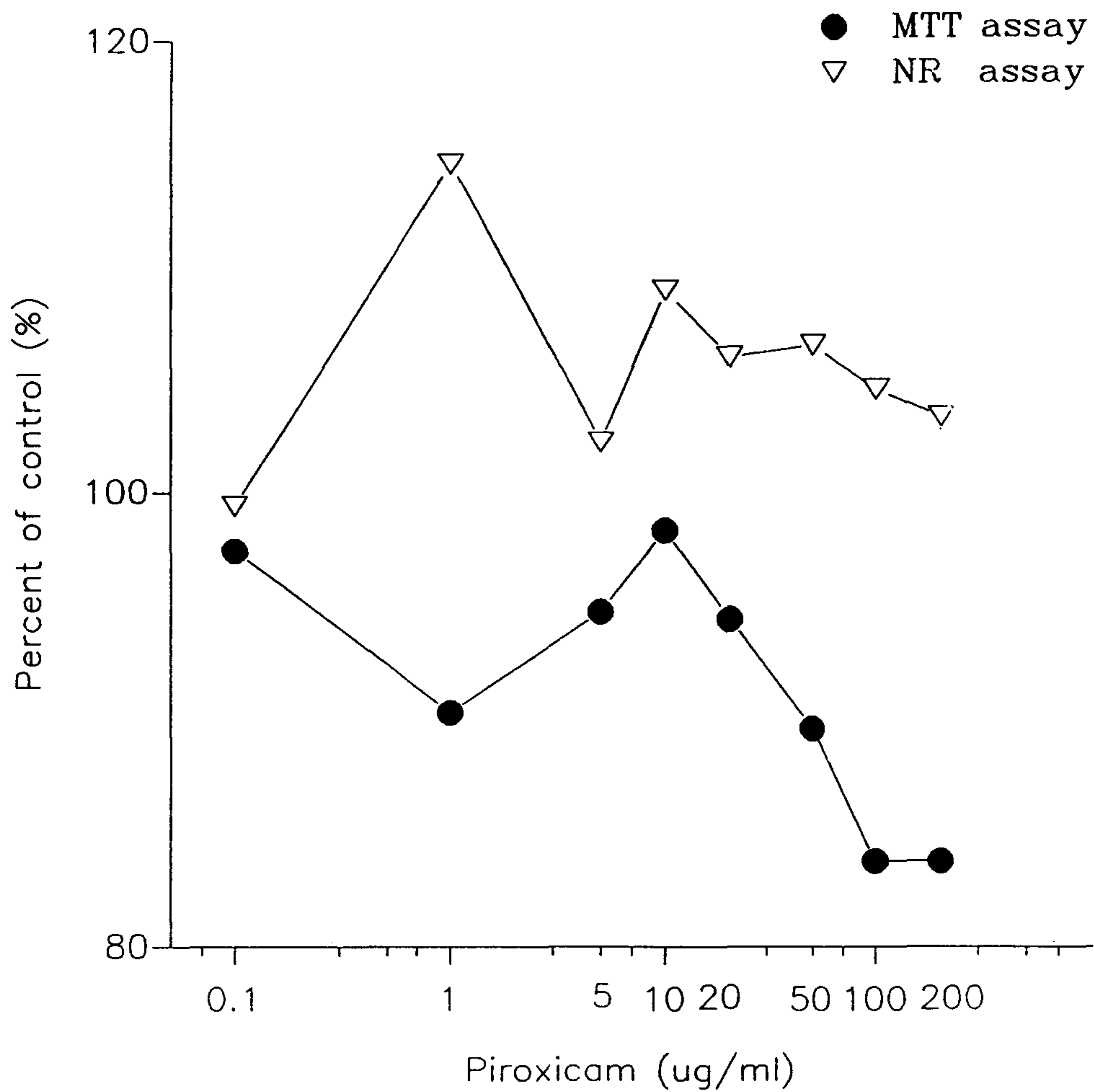


Figure 2. In vitro phototoxicity of piroxicam as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays. Human fibroblasts were exposed to chemicals for 1 hour and subsequently irradiated with  $7.2\text{J}/\text{cm}^2$  UVA. Data shown are the mean of 6 experiments each performed in triplicate.

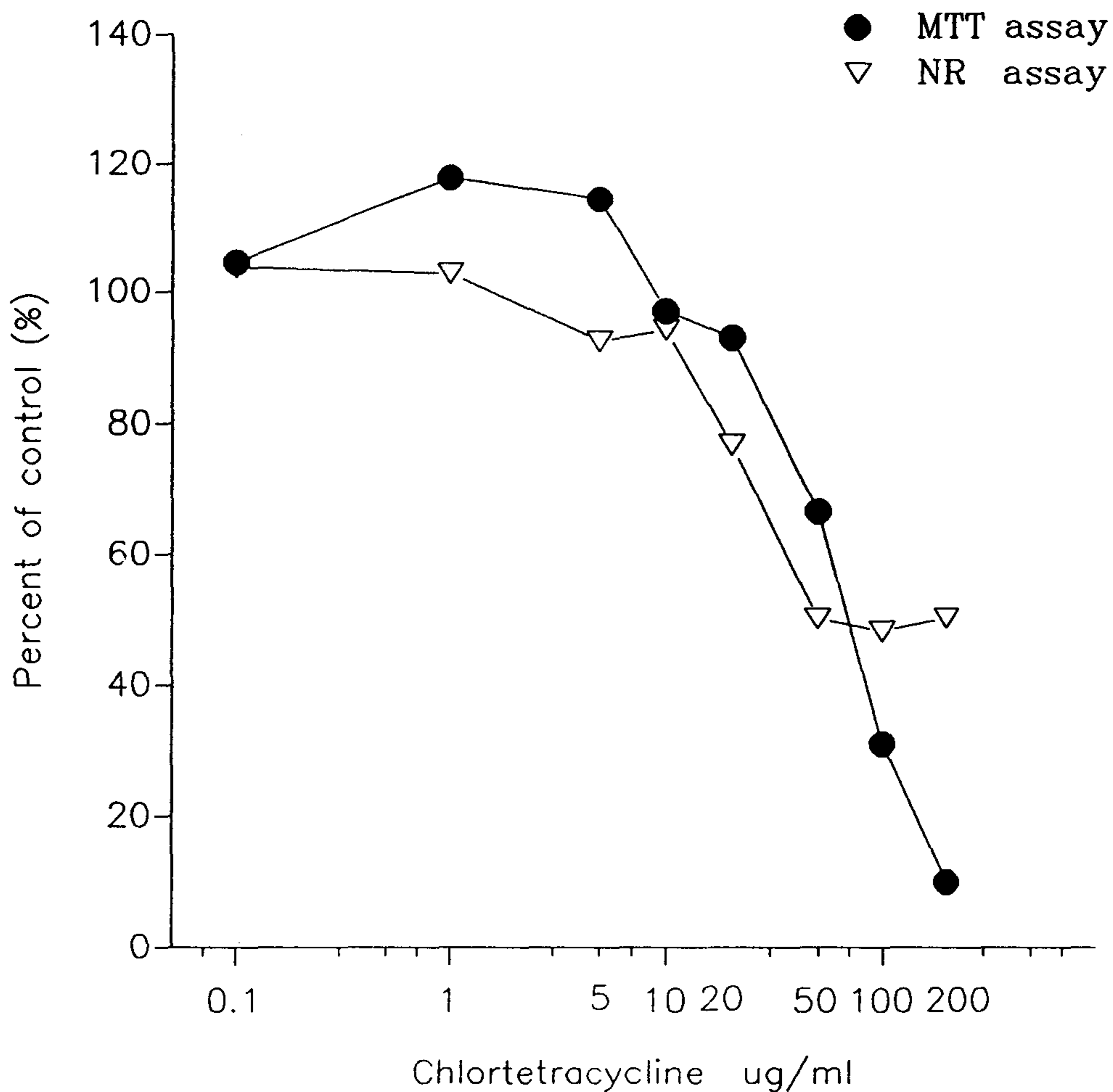


Figure 3. In vitro phototoxicity of chlortetracycline as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays. Human fibroblasts were exposed to chemicals for 1 hour and subsequently irradiated with  $7.2\text{J}/\text{cm}^2$  UVA. Data shown are the mean of 6 experiments each performed in triplicate.

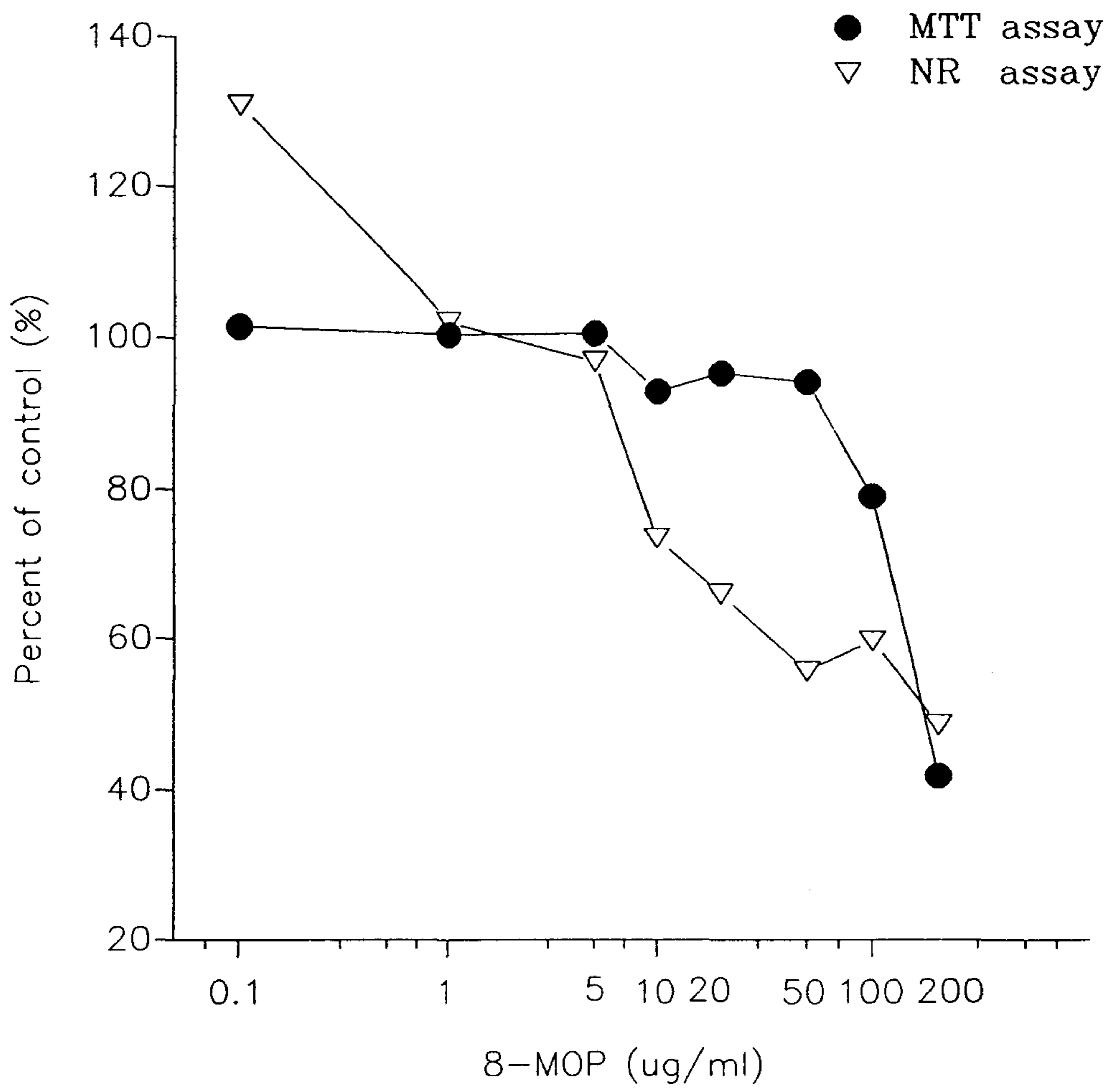


Figure 4. In vitro phototoxicity of 8-methoxypsoralen as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays. Human fibroblasts were exposed to chemicals for 1 hour and subsequently irradiated with  $7.2\text{J}/\text{cm}^2$  UVA. Data shown are the mean of 6 experiments each performed in triplicate.

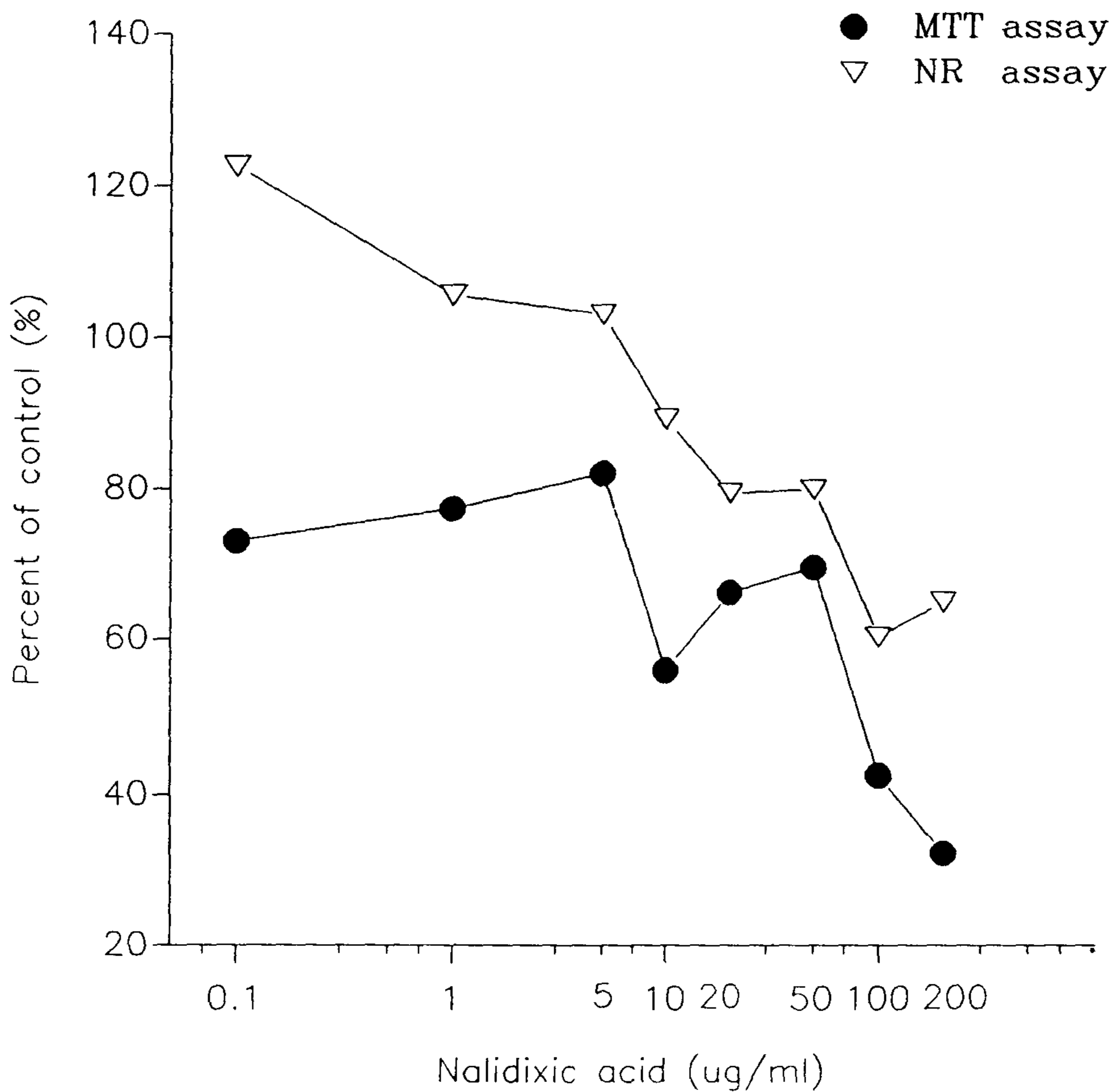


Figure 5. In vitro phototoxicity of nalidixic acid as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays. Human fibroblasts were exposed to chemicals for 1 hour and subsequently irradiated with 7.2J/cm<sup>2</sup> UVA. Data shown are the mean of 6 experiments each performed in triplicate.

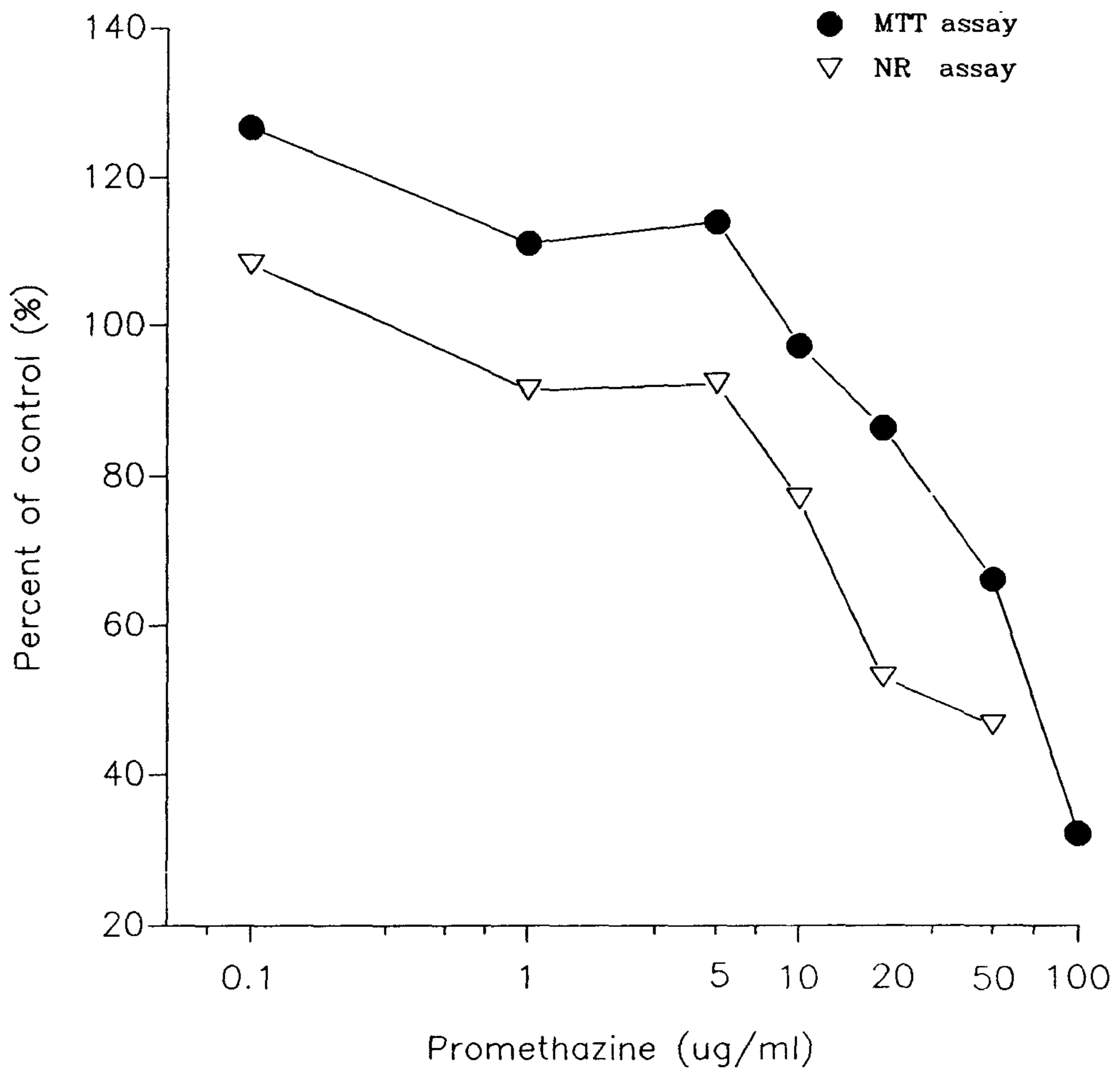


Figure 6. In vitro phototoxicity of promethazine as evaluated with the MTT and neutral red uptake assays. Human fibroblasts were exposed to chemicals for 1 hour and subsequently irradiated with  $7.2\text{J}/\text{cm}^2$  UVA. Data shown are the mean of 6 experiments each performed in triplicate.