

제 2 단계
최종보고서

화학물질의 안전성평가기술

**A Study on the Toxicological Research for
Chemical compounds**

화학물질의 안전성연구

**A Study on the Toxicological Research for
Chemical compounds**

연구기관

한국화학연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “화학물질의 안전성평가기술”과제(세부과제 “화학물질의 안전성연구”)의 2
단계 최종보고서로 제출합니다.

1998 년 7 월 30 일

주관연구기관명 : 한국화학연구소
총괄연구책임자 : 노 정 구

연 구 원 : 한상섭, 강부현, 이성규, 김은주
하창수, 정문구, 김형진, 신천철
이현걸, 박종일, 송시환, 차신우
정태천, 신호철, 양승돈, 김 균
김정한, 연선홍, 염동혁, 김종춘
서정은, 유제권, 조규혁, 유승룡
최규갑, 김갑호, 김희연, 배주현
이상준, 임광현, 이현숙, 윤홍길
김정철, 김재수, 황용희, 허진백
이필수, 홍미영, 최재분, 양병철
허정두, 김희영, 송진숙, 김영희
이봉재, 최선주, 천영진, 구희경
문신자, 황선구, 김현숙, 김양희
심희옥, 조경자, 백지영, 손화영
최용선, 이영미, 김용범, 박정아
김하강, 육희경, 김보령, 길기현
김영길, 김낙순, 김호경, 임선화
유지현, 이내경, 조성순, 윤명순
홍지상, 김재민, 이영철, 정윤주
김문수, 최인영, 전금희, 오정순

협동연구기관명 : 한국과학기술연구원

협동연구책임자 : 박호군/진창배

협동연구기관명 : 한국화학연구소

협동연구책임자 : 공 재 양

요 약 문

I. 제 목

화학물질의 안전성연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현대문명의 발달과 함께 화학물질의 종류 및 사용이 증가함에 따라 그 화학물질이 인체 및 환경에 미치는 영향을 정확히 평가하고자 안전성연구 분야를 국가적으로 지원하고 있는 것이 세계적 추세이며 또한 관심의 증가에 따라 관련법규도 강화되고 있다. 또한 새로운 의약품과 농약의 개발과 관련하여 안전성평가 연구는 후보물질의 전임상시험 단계에서 시험물질의 부작용을 예측, 선별하고 신물질의 유용성 및 유통여부를 결정하는데 중요한 역할을 담당한다. 따라서 이에 관련된 기술, 자료의 축적 및 질적향상은 새로운 화학물질의 개발에 필수적 역할을 담당하고 있다.

그동안 화학기술의 발전과 함께 우리나라에서도 새로운 의약품, 농약 및 기타 화학물질을 합성하는 단계에 도달하였으며 특히 물질특허의 도입과 관련하여 국내에서도 자체적으로 신물질 개발이 활발히 추진되고 있으므로 화학물질의 안전성평가기술 확보 및 국제수준의 시설, 인력, 운영체제의 확립은 신물질 창출에 필수적이다. 이러한 안전성연구의 필요성에 비추어 볼 때 국내의 기술수준은 선진국에 비하여 짧은 역사, 전문기술 및 전문인력의 부족으로 국제수준의 종합적인 독성평가가 이루어지지 않고 급성 및 아급성독성 등 일반적인 독성검색만을 수행하고 있어 신물질 개발에 필요한 그외의 다양한 독성시험 등은 국외 용역기관에 의뢰해야 하는 실정이다. 그러므로 국내의 신물질 창출사업을 명실공히 지속적으로 지원하기 위해서는 국내에 국제적 수준의 종합적인 독성평가체제의 구축이 시급이 필요하다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. OECD GLP 운영을 위한 체계확립

가. OECD GLP 운영을 위한 체계확립

OECD GLP 체제분석을 위하여 우선 OECD 사무국 및 OECD 회원국들의 GLP 체제 과정을 연구하고자 하였다. 그 방법으로는 프랑스의 파리에 있는 OECD의 Environmental Health and Safety Division에서 새로이 간행한 GLP Consensus Documents의 최신 개정안(1997년 1월 6일)과 이를 근거하여 일본정부(후생성)가 조치한 GLP 개정 작업내용을 입수해서 이를 연구하고자 하였다.

나. 단기독성시험에서의 OECD GLP 도입 및 SOP 확립

OECD의 생체내 독성시험기준에서는 단기독성시험과 장기독성시험으로 크게 2가지로 구분되는 바, 본 연구기간동안 단기독성시험들이 새로운 OECD GLP에 만족하게 운영되게끔 해당 SOP를 새로이 작성하고자 하였다. 또한 그 동안 국내 GLP 기준에 맞게 운영되어온 본 안전성연구센터내 GLP 기준을 새로이 OECD GLP 기준도 적용될 수 있게끔 기존 GLP 시스템의 개선을 시도하고자 하였다.

다. 독성시험수행의 전산처리에 대한 OECD GLP 적용 및 SOP 확립

GLP 기준에 있어서 컴퓨터 하드웨어 및 소프트웨어 프로그램은 그 운영면을 객관적으로 검증받아야 하며, 아래와 같은 조건을 만족하는지 자체적으로 확인할 필요가 있다. 그것은 첫째, 호스트 컴퓨터가 적절한 구조와 설비를 갖추었는가, 둘째, 컴퓨터 데이터의 보관관리가 GLP 기준을 만족하는가, 셋째, 시험자료의 통계처리 방법등에 이용되는 컴퓨터의 소프트웨어 프로그램은 그 성능이 검증되었는가 등이다. 따라서 본 연구기간동안 위의 내용이 OECD GLP에 적합하도록 독성시험수행의 전산처리에 대한 연구 및 SOP 개정작업을 시도하였다.

2. 소동물을 이용한 장기투여 독성시험법의 확립 및 보완

가. 랫트에서의 미정맥내 연속투여법의 확립

무마취 비수술적인 방법으로 랫트의 미정맥내에 카테터를 삽입하고 보호장치를 장착한 후 infusion pump를 이용하여 연속 투여하는 기술에 관한 연구

를 실시하였고, K-799를 이용한 24시간 투여 급성독성시험, K-378과 K-566을 이용한 2주간 연속투여 독성시험을 수행하여 시험법의 개선과 유용성을 확인하였다.

나. 독성동태 이론을 이용한 시험물질 용량설정기술의 확립

소동물을 이용한 독성시험의 용량설정 기술개발 및 정량적 독성평가를 위하여 독성동태(toxicokinetics) 실험기술을 도입한 연구를 수행하였다. 그 내용은 생체시료 정량분석법 개발(K-581, 585), 용량설정을 위한 약물동태시험기술의 개발(K-585), 독성평가를 위한 독성동태시험기술의 개발(K-581)을 포함하고 있다.

다. 병리조직학적 변화를 검색하기 위한 다양한 특수염색방법의 확립

병리조직학적 변화를 검색하기 위한 다양한 특수염색방법을 여러단계의 실험을 통해 확립하였으며, 소동물을 이용한 독성시험에서 병리부분의 결과를 좀 더 확고히 할 수 있는 토대를 마련하였다. 또한 다양한 특수염색법을 토대로 기존의 실험방법에 대한 개선점을 연구하여 병변의 발생기전, 병변의 조기진단 및 병변예측을 가능하게 하며, 또한 독성시험기간의 단축, 비용의 절감 등의 효과를 거둘 수 있도록 하였다. 이를 확립하기 위해 최근 시행되고 있는 여러 가지 염색방법을 이용하거나 새롭게 응용하여 그 이용분야를 넓히고자 소동물을 이용한 시험을 수행하여 그 응용기반을 확립하였으며, 또한 전자현미경의 새로운 이용기술을 확립하였다.

3. 소동물을 이용한 특수독성 시험법의 확립 및 보완

가. 신경독성 시험방법의 확립

신경독성 검색방법의 확립을 위하여 신경독성의 표지물질인 brain 조직내 GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein)양을 측정하기 위한 Sandwich Elisa법을 확립하였고, 소동물을 이용한(In vivo) 학습능력 및 기억능력 검색방법인 Morris water maze 및 8-arm radial maze 시험방법을 확립하여 다양한 시험물질 투여

에 의한 신경독성 작용을 조사하였다.

나. 면역독성시험방법의 확립 및 보완

소동물을 이용한 면역독성 평가방법의 확립과 면역독성기작 연구법의 개발을 위하여 2-bromopropane 및 ethyl carbamate를 대상으로 T-세포의존형 및 T-세포 비의존형 항체반응에 대한 연구, lipopolysaccharide와 concanavalin A에 대한 비장세포의 유약화 반응, 면역조직 병리검사, 혈액학 및 혈청생화학 지표의 변화, 그리고 면역장기의 중량변화 등 다양한 면역독성 평가 방법을 이용한 면역독성의 평가를 실시하였으며, 면역독성 기작연구법의 개발을 위하여 역시 2-bromopropane 및 ethyl carbamate를 대상으로 비장 및 흉선세포의 표면항원 분석 연구를 수행하였다. 또한 화학물질의 면역독성 유발에 있어 대사활성화 과정의 역할을 규명할 수 있는 연구법의 개발을 목적으로 자체로는 면역독성 및 간독성을 유발하지 않는 모델 약물대사효소 유도제인 β -ionone의 약물대사능 유도 특성을 효소활성도, Western immunoblotting 및 reverse transcriptase-polymerase chain reaction 실험을 통하여 연구하였고 실제 독성연구에 응용하여 모델 약물대사 유도제로써의 활용가능성을 대사활성화가 필요한 간독성물질인 thioacetamide를 대상으로 연구하고자 하였다. 또한 현재 식품의약품청 고시 <의약품 등의 독성시험기준>에 수재되어 있는 면역독성시험 지표들 뿐만 아니라 미국의 National Toxicology Program에서 권장하고 있는 각종 면역독성 시험방법들에 관한 표준작업 지침서를 구비하여, 한국화학연구소 안전성 연구센터의 주 기능인 산업계의 신농의약 개발에 요구되는 전임성 시험의 지원을 위한 준비를 하여 국내 신약개발 분야의 발전을 위한 기틀을 마련하고자 하였다.

다. 유전자전이(transgenic animal)동물을 이용한 유전독성시험법의 확립

화학물질의 인체에서의 발암성 여부를 예측하기 위하여 이용되는 변이원성시험법 중 최근에 개발된 방법인 유전자전이동물(transgenic animal)을 이용한 방법(transgenic system)을 도입, 확립하였다. 이 시험법은 종래의 in vitro 유전

자 돌연변이 검출시험의 한계를 더 넓혀서, *in vitro* 시험법의 원리를 동물에 적용한 것이다. 본 연구에서는 도입한 이 방법으로 발암성물질을 검출할 수 있는가의 여부를 확인하기 위하여 이미 발암성물질이면서 전술한 transgenic system에서도 양성으로 검출되는 것으로서 알려진 dimethylnitrosamine을 표준돌연변이 물질로서 사용하였고, 아울러 랫트에서는 간암을 유발하나 변이원성시험 결과에서는 확실한 결론이 나지 않고 있는 물질인 methapyrilene hydrochloride를 사용하여 그 물질의 변이원성 여부도 시험하였다.

라. In vitro 최기형성 시험법의 확립

In vitro 최기형성 시험법의 일종인 전배자배양법(whole-embryo culture method)을 확립하였다. 배양배지로서는 랫드 혈청을 사용하였고 임신 9.5일령 랫드배자를 New(1978)의 방법에 따라 48시간 동안 배양한 후 배자의 성장 및 형태를 평가하였다. 이 방법을 이용하여 항전간제인 phenytoin의 기형유발성을 조사하였다.

4. 중동물을 이용한 일반 및 특수독성 시험법의 확립 및 보완

가. 중동물을 이용한 독성시험에서의 시험물질 용량설정기술의 적용

중동물을 이용한 독성평가 연구에 있어서 용량설정의 이론적 근거와 독성평가의 타당성을 확보하기 위해 동태론적 기술을 도입하여 본 과제를 수행하였다. 시험물질 K-580을 대상으로 개의 혈중 동시분석법을 Microbore - HPLC를 이용하여 분석법을 개발하였다. 반복투여시의 steady-state kinetics, 단회투여, 3개월 및 6개월간 투여시의 동태를 해석하여 용량상관성의 비선형성동태 발현, 축적여부 등을 비교 검토하였다.

나. 광독성 및 광감작성시험방법의 확립 및 SOP 작성

광독성 및 광감작성시험에 관한 SOP(Standard Operating Procedure)의 작성을 완료하고 각 시험에 관련된 조사기기, 보호구 및 시험에 필요한 시약 등을 구입하여 국제적 독성시험 기준에 부합되는 시험법을 확립하였다.

다. 중동물을 이용한 항원성시험법의 확립 및 보완

Beagle dog을 이용한 항원성시험법 보완을 위한 연구를 위하여 항원에 특이적인 항체의 생성여부를 혈청중에서 검출할 수 있는 효소면역화학적 검사법(ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay)을 확립하였다. 일반적으로 국내 '의약품등의 독성시험기준'에 수재된 기니픽 및 마우스 등의 소동물을 이용한 항원성시험에 사용하는 시험법들을 개에서는 그대로 적용하기 어렵고, 개에서의 항원성 여부를 판단하는 것이 좀 더 사람에게 가까운 결과를 도출할 수 있어 일반독성시험에 사용하는 동물에서 소량의 혈액을 취하여 혈중에 생성된 시험물질에 대한 특이적인 항체가 생성되는지를 검사하여 소동물에서의 결과와 비교하고자 하였다.

5. 환경독성시험법 및 GLP체계 확립

가. 송사리를 이용한 생육초기독성 시험법 확립

송사리 수정란을 이용하여, 생육초기독성 시험법 확립에 필요한 시험조건을 확립하였다. 연구한 시험조건은 (1) 수온, (2) 부화수조의 상하왕복 운동 횟수, (3) 부화수조의 망목크기, (4) 수정란의 pooling 가능일수 등이고, 관련생육인자는 (1) 부화율, (2) 부화 소요일수, (3) 부화후 성공률 등을 조사하였다.

나. 어류의 혈액학적, 혈액생화학적 및 조직학적 지표를 이용한 독성시험법 연구

어류의 만성독성 지표를 알기 위하여, 메기에 대해 카드뮴을 급성독성 값의 1/2과 1/10 수준으로 48시간 동안 처리하여 혈액학적, 혈액생화학적 및 병리조직학적 조사를 실시하였다.

다. 환경내 대사 및 동태시험법 연구

농약에 환경중 동태를 알기위하여 농약의 토양과 대상식물 중의 분해, 대사물의 동정, 생성양상 등을 연구하고 광에 의한 수중분해 양상을 조사하였다.

라. 환경독성시험 GLP체제 확립

GLP 시험기관으로 인정을 받기 위하여 분배계수시험, 미생물분해시험, 조류성장저해시험, 물벼룩류 급성독성시험, 어류급성독성시험, 생물농축성시험에 대하여 시험법을 확립하였으며, 이들 시험항목을 수행하기 위하여 필요한 표준작업지침서(SOP)를 작성하였으며, 해당직원에 대한 교육 및 훈련을 실시하였다.

6. 실험동물 육종기술 확립

가. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 대량 육종기술 확립(II)

선도기술개발 연구의 1단계(92~94)의 성공에 따라 더욱 양질의 실험동물을 대량 생산할 수 있는 체계를 공고히 하고자 하였다. 이는 약효검정과 안전성 시험 data의 신뢰성을 높이고자 하는데 그 목적이 있다. 약효검정과 안전성 시험의 국제적인 신뢰성의 제고 없이는 국제적인 경쟁력을 갖출 수 없기 때문이며, 결국은 국내의 신물질 창출의 어려움이 가속될 것이기 때문이다.

나. Nude mouse의 육종기술 확립

항암제 약효검색과 기초연구를 위하여 새로운 마우스가 필요하게 되었다. Nude mouse는 육종이 매우 어려우며, 수입할 경우 매우 고가이기 때문에 정기적인 대량 약효검색과 연구에 경제적인 부담이 크다. 따라서 본 연구소에서 생산하여 사용할 수 있게 하여 항암제 약효검색에 차질이 없도록 하였다. 아울러 양질의 nude mouse를 국내외 연구자들에게 저렴한 가격으로 안정적으로 공급할 수 있도록 하였다.

다. 새로운 질환모델동물의 확립과 연구

사람 질환의 연구와 치료제의 개발을 위해서는 새로운 질환모델을 필요로 한다. 현대 의학의 발달과 식생활의 변화는 노령사회를 만들고 있으며, 노화 자체와 노화에 수반되는 질병으로 인한 개인적인 고통과 사회적인 부담은 매우 급

속히 증가하고 있다. 노화와 노인성 질병의 연구를 위해서는 노화모델 동물이 중요하다. 이런 요구에 부응하기 위하여 노화모델동물(SAM, Senescence-accelerated mouse)을 육종 정착한 바가 있으며, 이 동물을 이용한 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발결과

1. OECD GLP 운영을 위한 체계확립

가. OECD GLP 체제분석

OECD의 Environmental Health and Safety Division에서 새로이 간행한 GLP Consensus Documents의 최신 개정안(1997년 1월 6일)과 이를 근거하여 일본정부(후생성)가 조치한 GLP 개정 작업내용을 입수해서 번역하여 첨부하였으며, 또한 이를 관련 정부기관(보건복지부, 환경부 등)에 통보하여 한국 GLP 기준의 개정시 반영토록 노력하였다. 아울러 본 안전성연구센터내 GLP 관련 직원들에 대한 교육을 실시하여 새롭게 변경된 GLP 기준의 내용을 숙지시켰다.

나. 단기독성시험에서의 OECD GLP 도입

이번 연구기간동안 일반증상관찰법 만이라도 국제공용의 GLP 기준의 검사법으로 통일하기 위하여 노력하고 있는 중에, 마침 OECD GLP에 맞추기 위하여 일본 후생성산하 국립위생시험소가 주도가 만든 일본후생성 GLP 임상관찰법(가칭)을 입수 및 번역하여 이를 본 센터내 SOP에 반영시켰으며 이를 첨부하였다. 아울러 단기독성시험의 수행과 밀접한 연관이 있는 Toxicokinetics(독성동태학)에 대한 GLP 적용의 시도가 일본에서 실시되고 있어 이중 일본후생성이 관련자료를 입수후 번역하여 첨부하였다.

다. 독성시험수행의 전산처리에 대한 OECD GLP 적용 및 SOP 확립

GLP 기준의 전산처리에 있어서 컴퓨터 하드웨어적인 구축으로는 각 동물실과 실험실에 펜티엄급 컴퓨터를 설치하였으며, 각 동물실과 실험실을 Lan으로 연결하는 작업이 진행되었다. 소프트웨어적인 측면에서는 미국

Innovative Programming Associates (IPA)사에서 개발한 GLP의 Labcat Module인 Body weight(체중, 사료섭취량, 물섭취량, 투여량, 일반증상관찰 등), Hematology(혈액학), Clinical Chemistry(혈액생화학), Organ weight(장기중량, 부검소견), Histopathology(병리조직), Acute Toxicity(급성독성)의 6개 프로그램을 구입 및 개량하여 안전성연구센터의 동물실 및 혈액학, 혈액생화학 및 병리조직부문에서 발생하는 자료들을 직접 입력하고 있으며, 통계처리 및 자료정리에 사용하고 있다.

한편, OECD GLP 기준하의 독성시험수행의 전산처리를 위하여 컴퓨터의 운영, 일반독성시험에서 컴퓨터 프로그램의 사용법, 급성독성시험에서 컴퓨터 프로그램의 사용법, 컴퓨터를 이용한 최종보고서 작업, 컴퓨터 디스켓 및 프로그램사용법 반출, 시험기초자료의 통계학적 방법 및 혈액학에 있어서 프로그램 사용법 등 7건의 SOP를 작성하였고 이에 따라 선진국 수준의 GLP용 전산처리를 시도하고 있다.

2. 소동물을 이용한 장기투여 독성시험법의 확립 및 보완

가. 랫트에서의 미정맥내 연속투여법의 확립

Needle catheter, 두터운 양면접착테이프, 운반상자 보호용 얇은 철망 및 cable tie의 도구를 이용하여, 랫트의 미정맥내에 카테터를 삽입해서 연속투여하는 방법을 확립하였다. 한편, 시험물질에 따라 연속투여가 단회투여 보다 생체 효과가 더욱 강하게 나타나거나 약하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

나. 독성동태 이론을 이용한 시험물질 용량설정기술의 확립

분석기술의 개발과 독성시험에 있어서 TK 연구이론을 응용한 용량설정의 방법, 그리고 생식독성평가를 위한 용량상관성 등 약물동태 이론을 도입하여 정량적, 객관적 위해성 평가기술을 확립하였다. 상세한 독성동태해석 및 parameter 비교, 결과의 활용 등은 본문에 언급하였다.

다. 병리조직학적 변화를 검색하기 위한 다양한 특수염색방법의 확립

병리조직학적 변화를 검색하기 위한 다양한 특수염색방법을 확립하기 위하여 실험동물을 이용한 정소독성평가 시험을 수행하였다. 최근 국내에서 환경유해물질로 문제가 되었던 2-bromopropane (2-BP)이 정자형성단계에 미치는 영향과 표적 정세포를 알아보기 위하여 광학현미경적, 면역조직화학적, 전자현미경적 관찰 및 flow cytometry(FCM)검사를 실시하였다. 그 결과 2-BP는 blood-testis barrier의 이상없이 정조세포의 변성을 유발하고, 정조세포의 변성이 정모세포, 정자세포의 소실을 야기함으로써 정자형성에 이상을 유발하였으며, 정자형성의 이상에 의한 고환의 위축은 투여정지 70일 후에도 완전히 회복되지 않았다. 또한 용량에 따라 그 독성 발현양상에 차이를 나타내어 2-BP를 고용량으로 투여한 경우에는 정자형성단계나 정세포의 종류에 관계없이 변성을 유발하였으며, Sertoli세포에도 변성을 유발하였다.

3. 소동물을 이용한 특수독성 시험법의 확립 및 보완

가. 신경독성 시험방법의 확립

Sprague Dawley 랫트에 Kainic acid(0.1, 1 mg/kg)을 정맥투여한 후 투여후 1, 2, 7 및 28 day에 brain 조직, 즉 cortex, hypothalamus, hippocampus, cerebellum, striatum에서의 GFAP 양을 본 연구에서 확립된 Sandwich Elisa assay 방법을 이용하여 측정된 뒤 대조군의 GFAP 양과 비교한 결과는 Kainic acid 0.1 및 1 mg/kg 투여군에서 유의성있게 증가하였다(control 보다 >15% 이상 증가한 양을 유의성이 있다고 봄). 이러한 증가는 투여후 1 및 2 day에서는 현저했으나 투여후 7 및 28 day에서는 회복되는 경향이 나타났다. 따라서 Kainic acid는 brain에 독성작용을 야기시키는 물질로 추정된다.

시험동물인 Sprague Dawley 랫트에 양성대조물질인 Scopolamine 및 시험물질인 K-886, K-887을 투여하고 동물의 학습능력 및 기억능력을 측정하는 시험방법인 Morris water maze 및 8-arm radial maze 방법으로 시험한 결과는 scopolamine 투여군에서 모두 유의성있게 학습능력 및 기억능력이 저하되었으나 시험물질인 K-886과 K-887 투여군은 대조군과 비교하여 학습능력 및 기억능력의 저하가 나타나지 않았다.

나. 면역독성시험방법의 확립 및 보완

2-Bromopropane을 Sprague Dawley계 랫트 수컷에 100, 330 및 1000 mg/kg의 용량으로 28일 간 연속 경구 투여하였을 때, 혈액학적 지표중 백혈구 수의 감소 등이 뚜렷하게 나타났으며, 비장세포를 이용한 T-세포의존형 항체반응이 고용량에서 유의성있게 억제되는 결과를 보여주었고, 비장 및 흉선 세포의 표면분석 결과 흉선에서 각종 세포 종의 유의성 있는 감소가 확인되었다. Ethyl carbamate의 면역독성기작을 연구하기 위하여 세포표면항원 분석을 시행하여 비 특이적으로 모든 면역세포에 독성을 나타내는 사실을 확인하였고, 면역병리조직 검사에서도 독성을 확인할 수 있었다. 또한 부신에서 생성되고 호르몬의 영향을 실험하기 위하여 부신을 적출한 동물에서 ethyl carbamate의 독성여부를 실험한 결과 비장의 면역세포에서 부신의 홀몬이 어떤 역할을 할 것이라는 사실을 예측할 수 있었다. 항원성 시험의 보완을 위하여 혈청내에 생성되는 특정 항원에 대한 항체를 효소 면역화학적 방법으로 검출 할 수 있는 방법을 확립할 수 있었다. 한편, 화학물질에 의한 면역독성 발현시 체내 약물대사효소에 의한 대사활성화 과정이 매우 중요하므로 독성이 없는 모델 약물대사 유도제의 탐색에 관한 연구를 수행하였는데, 본 연구에서는 그 동안 연구를 해왔던 β -ionone이라는 유도제의 약물대사효소 유도특성을 효소활성도 측정, Western immunoblotting 및 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법을 동원하여 알아보았다. 그 결과 β -ionone은 랫트 및 마우스에서 P450 2B1을 비롯한 몇가지 P450 isozyme을 유도시키는 결과를 얻었고, 이러한 P450 유도는 특정 mRNA의 증가에 기인한다는 사실을 밝힐 수 있었으며, 간을 구성하는 각 엽(lobe)별로 P450 유도정도가 달라 독성 연구에 있어서 중요한 기초정보를 얻을 수 있었다. 또한 β -ionone을 모델 약물대사효소 유도제로 실제 사용하여 대사활성화 과정이 독성발현에 요구되는 간독성 물질인 thioacetamide의 간독성 증강을 확인하여, 앞으로 대사활성화 작용이 요구되는 면역독성 물질 및 간독성 물질의 독성기작 연구에 활용할 수 있도록 하였다. 그리고 GLP 체제하의 면역독성시험 수행을 위하여

35종의 각종 면역독성시험법에 관한 표준작업 지침서를 작성하여, 앞으로 폭주가 예상되는 면역독성에 관한 산업계 수탁 연구에 대한 대비를 할 수 있었다.

다. 유전자전이(transgenic animal)동물을 이용한 유전독성시험법의 확립

표준돌연변이 물질인 DMN에 대하여 transgenic system을 적용한 결과 마우스 및 랫트에서 양성의 결과를 얻어서, 본 시험계가 정상적으로 발암성 물질을 검출할 수 있음을 확인하였다. 아울러 시험물질인 MPH는 transgenic 랫트에서만 변이원성을 가지는 것으로 나타나 이 물질 역시 양성으로 판정하였다. 이 결과는 transgenic animal system이 어떤 화학물질의 동물에 있어서의 발암성을 효과적으로 예측할 수 있음을 보여주었다.

라. In vitro 최기형성 시험법의 확립

임신 9.5일령 랫드 배자를 New (1978)의 방법에 따라 48시간동안 배양한 후 배자의 성장 및 형태를 평가하였고 in vivo 배자성적과 비교하였다. 조사 결과 in vitro 배자의 난황낭 직경, 머리엉덩이간 길이, 머리길이, 체절수, 형태학적 평점 및 배자당 총단백질량은 in vivo 배자와 거의 동일한 수치를 나타냈다. 또한 상기의 확립된 방법을 이용하여 배양배지에 항전간제인 phenytoin을 0, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처치하여 기형유발성을 조사한 바 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치군에서 배자의 난황낭 직경, 머리엉덩이간 길이, 머리길이, 체절수, 형태학적 평점 및 배자당 총단백질량이 매체대조군 (DMSO)에 비하여 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 또한 난황낭순환과 배자혈행의 이상, 두개안면부의 저형성 및 회전이상, 아가마궁의 결손 등의 기형이 매우 높은 빈도 (100%)로 발견되었다. 반면 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치군에서는 배자의 성장 및 형태 이상이 관찰되지 않았다.

4. 중동물을 이용한 특수독성 시험법의 확립 및 보완

가. 중동물을 이용한 독성시험에서의 시험물질 용량설정기술의 적용

시험물질 K-580 및 그의 주요대사물질을 개의 혈중분석법을 통해 검토한

결과, 체내 ADME의 포화성 kinetics와 같은 현저한 비선형성 약물동태를 나타내지 않아 장기독성시험의 용량으로 비교적 잘 설정된 것으로 판단되었다. 대사체의 미량 정량이 가능하여 본 시험물질의 대사물 동태를 파악하기 위한 중요한 기술을 제공할 수 있게 되었다. 이러한 독성동태연구를 통하여 용량설정의 이론적 근거를 확보함과 동시에 독성발현에 있어서의 대사물의 체내동태, 용량상관적 비선형성 약물동태, 측정성여부 등 속도론적 해석 등도 가능하게 되었다. 상세한 약물동태해석은 본문에 언급하였다.

나. 광독성 및 광감작성시험방법의 확립 및 SOP 작성

광독성 및 광감작성시험은 광원 290~320 nm의 파장을 이용하여 실험동물의 피부를 자극하고 이에 따라 경피흡수성을 증가시켜 allergy성 발현기작을 규명하는 시험이다. 본 시험의 수행에 필요한 U.V.(ultra violet)를 이용한 평가 system의 확립을 위하여 기기(U.V. 자외선 조사장치)를 확보하고, 보다 빠른 연구진척과 효율적인 연구수행을 위하여 해당시험(광독성 및 광감작성시험)에 관한 표준작업지침서(SOP/IMM/013)를 작성하였다.

다. 중동물을 이용한 항원성시험법의 확립 및 보완

단백질성 시험물질(TA#1)에 대하여 기존의 마우스 및 기니픽에서의 항원성 시험인 전신성 아나필락시 쇼크반응, 마우스-랫트계 및 기니픽-기니픽계의 수신 피부아나필락시 시험, 그리고 간접적혈구 응집반응을 수행한 결과 항원성을 전혀 보이지 않았다. 반면에 28일간 beagle dog에 시험물질을 정맥으로 반복 투여한 후 혈청을 분리하여 혈청내 생성된 시험물질에 대한 특이적인 항체(IgG)를 효소면역화학적으로 측정된 결과 모든 투여군에서 특이적인 항체가 검출되었다. 따라서 기존의 소동물을 이용한 항원성 시험에서는 검출이 불가능한 항원성을 beagle dog에서는 검출이 가능하여 중동물을 이용한 항원성 시험법의 개발 및 이러한 시험법의 이용이 시험물질의 항원성 여부의 판단에 매우 중요한 것으로 판단되었다.

5. 환경독성시험법 및 GLP체계 확립

가. 송사리를 이용한 생육초기독성 시험법 확립

수온이 25℃일 때 상하 왕복 운동 횟수를 분당 15회로 주는 경우와 28℃에서 상하 왕복 운동 횟수를 분당 10회, 15회를 주는 경우, 부화수조의 상하 왕복 운동 횟수, 수정란의 pooling 일수 및 수온에 통계학적인 유의성이 있었고, 수정란의 pooling은 냉장 보관 2일까지 가능하였다. 이러한 조건하에서 송사리의 수정란은 부화율이 62-92 %, 부화에 소요된 일수는 6.5-8.8 일, 부화후 성공률은 71-100 %이었다. 따라서 어류의 생육 초기 독성 시험법에 부화수조의 망목 크기는 영향이 없었다. 그러나 수온은 25℃ - 28℃, 부화 수조의 상하 왕복 운동 횟수: 분당 10회 - 15회가 적당하며, 수정란은 채집 직후, 1-2일 정도의 냉장 보관은 부화율 및 발생에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이때 송사리의 수정란은 부화율은 84 %이상, 부화에 소요된 일수는 약 7.3일, 부화후 생존율은 86-97 %로 OECD/EPA guideline에서 요구하는 기본적인 시험 조건을 만족시킬 수 있었다.

나. 어류의 혈액학적, 혈액생화학적 및 조직학적 지표를 이용한 독성시험법 연구

카드뮴에 노출된 물고기는 RBC, Hct, Hb가 증가하였으며, 혈중 글루코스, 단백질, 지질, 전해질(Na, K, Cl)의 변동이 있었다. 카드뮴의 노출수준이 높은 경우 낮은 수준에 비하여 빠르게 반응하였고, 전해질, 혈장 단백질, 지질의 변동과 RBC수, Hct, Hb의 증가는 영향을 받은 어체의 보상성 반응이며 혈액과 조직사이의 삼투조절에 변화를 야기하였다. 조직학적 결과에서 아가미, 신장, 소장, 뇌, 등의 기관에서 의미 있는 병변이 거의 발견되지 않았으나, 간과 피부에 약간의 병변이 발견되었다. 카드뮴 분석결과로는 카드뮴의 노출시간과 농도에 따라 어체내 농도는 증가하였으며, 어체내 수준은 0.7-1.4%, 시험수내 수준은 68-82%수준이었다. 따라서 혈액학적, 혈액화학적 변화는 상대적으로 단기간 노출시에도 유도될 수 있으며, 그들의 변화는 조직 병리학적 변화에 비해 치사 농도이하의 노출에 따른 변화를 검출함에 있어서 민감하였

고, 그 분석도 간단하였다. 이러한 결과들은 카드뮴의 준치사 농도 노출시 한국산 메기에 있어서 혈액학적 변화의 조사가 수계에서 카드뮴의 오염 수준을 평가하거나, 낮은 농도의 카드뮴 독성을 측정할 수 있는 초기 독성 증상의 지표로 활용할 수 있음을 시사하고 있다.

다. 환경내 대사 및 동태시험법 연구

(1) 토양대사 연구

본 연구는 농약의 토양대사 연구법의 확립에 대한 것으로 농약이 토양중에서 대사되는 전반적 행적을 구명하여 농약의 환경 및 인간에 대한 안전성 평가의 기본자료를 구하고자 수행되었다. 시험토양은 밭토양(양토)을 채취하여 사용하였으며 수분은 1/3 bar에서의 포장용수량의 75%로 유지한 후 ^{14}C -alachlor를 토양에 처리하고 25°C의 암조건에서 보관하면서 0, 3, 7, 14, 28, 60일 경과후에 추출용매, $^{14}\text{CO}_2$, 휘발성 물질 및 용매 비추출성 잔류물의 방사능의 분포를 분석하였다. ^{14}C -Alachlor는 처리후 60일후에 처리방사능의 1.6%로 감소하였으며 토양중 반감기는 13.6일로 계산되었다 ($R^2=0.9473$). 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양은 60일후에 최초 투여 방사능량의 1.7%에 달하였으며 휘발성 화합물은 전혀 검출되지 않았다. 용매 비추출성의 방사능은 처리후 60일에 69.7%였고, 6개의 대사물 생성됨을 확인하였으나 2-chloro-2',6'-diethylacetamide (M1)과 2,6-diethylacetanilide (M2)이 동정되었다. 실험기간 중의 전체적인 material balance는 108.0-87.3%로 유지되었다.

(2) 식물대사 연구

본 연구는 식물 성체에 농약(Flupyrzofos) 살포 후의 대사 연구기법 확립에 중점을 두고 유묘를 이용하여 뿌리를 통한 농약의 흡수 이행도 관찰하였다. 대상 식물인 배추를 acetone으로 추출하였고 방사능 표지 Flupyrzofos와 그 대사물에 대한 회수율은 모두 90% 이상이었다. ^{14}C -Flupyrzofos를 처리한 후, 0, 7, 14 그리고 28일에 수확한 각각의 배추 시료의 TRR과 용매 추출액 중의 방사능은 시간 경과에 따라 점차 감소하였으며 고체 잔류물의 방사능은 낮은 수준이지만 증감 양상을 보였다. TLC상에서

Flupyrzofos와 대사물들의 동정과 정량을 위해 DAR(Digital Autoradiograph) 과 Image plate를 비교 사용하였으며 Image plate에서 선명하게 화합물들의 분리가 관찰되어 동정과 정량이 가능하였다. 배추중 Flupyrzofos는 시간이 지남에 따라 감소되어 28일 후에는 TRR의 약 29%가 되었고 origin을 비롯한 Flupyrzofos-oxon, 미확인 대사물들은 소량 생성 되었으며, Flupyrzofos-oxon의 경우 약 6%에 달하였다. Flupyrzofos의 반감기는 약 18일로 계산되었고 전체적인 material balance는 28일을 제외하고 90% 이상 이었다. 흡수 이행 시험 결과, 주로 뿌리에 의한 흡수 증가가 관찰되었는데, 10시간 후에는 수경액 처리량의 9.7%가 뿌리에 흡수되어 식물체내에서 이행성이 낮았고 이는 Image plate에 의한 autoradiogram의 결과로도 확인되었다.

(3) 수중광분해 연구

농약의 광 분해 연구의 중요한 과제인 수중에서의 광분해 실험 방법을 확립하고 국내에서 최초로 개발된 유기인계 살충제인 Flupyrzofos의 수중 광분해에 대한 정보를 획득하고자 실험을 실시하였다. Flupyrzofos의 회수율은 0.1, 0.4 ppm 두 수준 모두에서 100% 이상의 좋은 회수율을 보였다. Direct photolysis의 경우 광에 노출된 시료와 광이 차단된 시료 모두가 유사한 분해 양상을 보였는데 반감기는 7.5일로 나타났으며, 이 수치는 가수 분해 반감기(pH 7.0, 25℃)와 동일하여 수중에서 Flupyrzofos의 분해가 대부분 가수분해에 의한 것임을 확인하였다. Indirect photolysis test의 경우는 산소의 유무 상태나 광에 노출 유무 경우를 불구하고 모두 SHW에서의 분해율이 PW에서 보다 높았으며 또한 공기로 포화시킨 경우는 광에 노출시킨 시료의 분해가 PW와 SHW 경우 모두 더 빠른 것으로 나타났다.

그리고 SHW의 photobleaching은 산소가 존재하는 조건에서 더 많이 진행되었음을 알수 있었다.

라. 환경독성시험 GLP체제 확립

분배계수시험, 미생물분해시험, 조류성장 저해시험, 물벼룩류 급성독성시험, 어류급성독성시험, 생물농축성시험에 대하여 시험법을 확립하였으며, 이들

시험항목을 수행하기 위하여 필요한 표준작업지침서(SOP)를 8개 종류로 분류하여 총 82개의 SOP를 작성하여 해당부서에 배포하였다. 또한 작성된 SOP에 대하여 해당직원에게 대상으로 교육 및 훈련을 실시하였으며, 1998년 1월 13일자로 이들 6개 시험항목에 대하여 환경부의 화학물질유해성시험 연구기관으로 지정을 받았다.

6. 실험동물 육종기술 확립

가. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 대량 육종기술 확립(II)

선도기술개발 연구의 1단계(92~94)의 성공에 따라 더욱 양질의 실험동물을 대량 생산할 수 있는 체계를 공고히 하였다.

나. Nude mouse의 육종기술 확립

항암제 약효검색과 기초연구를 위하여 새로운 마우스가 필요하게 되었다. Nude mouse는 육종이 매우 어려우며, 수입할 경우 매우 고가이기 때문에 정기적인 대량 약효검색과 연구에 경제적인 부담이 크다. 따라서 본 연구소에서 생산하여 사용할 수 있게 하여 항암제 약효검색에 차질이 없도록 하였다. 아울러 양질의 nude mouse를 국내외 연구자들에게 저렴한 가격으로 안정적으로 공급할 수 있도록 하였다.

다. 새로운 질환모델동물의 확립과 연구

사람 질환의 연구와 치료제의 개발을 위해서는 새로운 질환모델을 필요로 한다. 이에 부응하기 위하여 노화모델동물 정착과 기초연구를 하였다. 따라서 약효검색과 독성시험 및 생명공학연구에 절대적으로 필요한 양질의 실험동물을 생산하여 소내외에 공급하였다. Nude mouse의 육종기술을 확립하여 nude mouse의 생리학적 기초자료를 산출하여 양질의 nude mouse임을 확인하였다. 이 양질의 nude mouse를 소내외에 공급하여 항암스크리닝을 효율적으로 할 수 있도록 하였다. 또한 질환모델동물의 정착과 연구의 일환으로 노화촉진마우스 (Senscence-accelerated mouse, SAM)의 기초 data를 완성하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. OECD GLP 운영을 위한 체계 확립

본 연구를 통하여 본 센터에서 현재 수행하고 있는 독성시험에 OECD GLP를 적용할 수 있어 독성시험자료에 대한 선진국 수준의 신뢰성을 확보할 수 있으며, 이를 활용하여 국내에서도 비임상시험(독성시험) 자료의 국제공인화가 가능하다고 사료된다.

2. 소동물을 이용한 장기투여 독성시험법의 확립 및 보완

가. 랫트에서의 미정맥내 연속투여법의 확립

생명공학적 의약품 및 수액제 등 24시간 연속투여하는 신약의 독성시험에서 본 연구를 통하여 확립한 연속투여 방법으로 수행 가능하리라 판단되었다.

나. 독성동태 이론을 이용한 시험물질 용량설정기술의 확립

장기독성시험에 있어서 이론적 용량설정과 객관적 독성평가를 위해 본 독성동태연구는 매우 중요한 의미를 지니고 있다. 앞으로 진행되는 독성연구의 질적수준 향상과 보다 과학적 위해성 평가연구에 이러한 연구기술이 필수적으로 응용될 것이다.

다. 병리조직학적 변화를 검색하기 위한 다양한 특수염색방법의 확립

병리조직학적 변화를 검색하기 위한 다양한 특수염색방법의 확립을 위해 여러방법을 통해 수행하였으며, 이를 응용하여 화학물질의 발암성검색이나 조직내의 병리학적 변화를 검색할 수 있을 것이다. 이러한 검색기술을 적용함으로써 현재 공인되고 있는 여러 가지 독성시험방법의 단점을 보완할 수 있으리라 사료된다.

3. 소동물을 이용한 특수독성 시험법의 확립 및 보완

가. 신경독성 시험방법의 확립

본 시험방법은 화학물질, 특히 중추신경계에 작용하는 약물 등의 투여에 의한 신경계에 미치는 영향을 검색할 수 있는 간편하고 유용한 방법으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다..

나. 면역독성시험방법의 확립 및 보완

국내 '의약품등의 독성시험기준'뿐만 아니라 선진 각국의 면역독성시험에 관한 내용을 종합하여 작성한 각종 표준작업 지침서를 국내 신약개발 분야에 대한 지원체제로써 적극 활용할 예정이며, 본 연구에서 확립 및 개발한 각종 시험법도 독성기작의 연구 및 독성시험에 적극 활용할 예정이다. 현재 선진 각국의 면역독성학계의 추세가 단순한 독성여부의 판단에서 분자수준에서의 독성기작의 규명에 초점이 모아지고 있어, 앞으로 분자수준의 면역독성평가방법의 개발에 관한 연구에 정부의 적극적인 지원이 필요한 것으로 사료된다.

다. 유전자전이(transgenic animal)동물을 이용한 유전독성시험법의 확립

이 시험법은 어떤 화학물질의 실험동물에 대한 발암성을 예측하기 위한 진일보한 방법으로서, 화학물질의 안전성시험에 널리 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

라. In vitro 최기형성 시험법의 확립

상기의 전배자양법은 새로운 의약품과 농약의 일차검색을 위한 효율적인 방법으로서 널리 활용될 수 있고 아울러 기형유발물질의 작용기전에 관한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 중동물을 이용한 일반 및 특수독성 시험법의 확립 및 보완

가. 중동물을 이용한 독성시험에서의 시험물질 용량설정기술의 적용

장기독성시험에 있어서 이론적 용량설정과 객관적 독성평가를 위해 본 독성동태연구는 매우 중요한 의미를 지니고 있다. 앞으로 진행되는 독성연구의 질적수준 향상과 보다 과학적인 위해성 평가연구에 이러한 연구기술이 필수적

으로 응용될 것이다.

나. 광독성 및 광감작성시험방법의 확립 및 SOP 작성

본 시험방법의 확립에 따라 국내 개발 광과민 유발물질들에 대한 체계적이고 안정적인 안전성평가가 이루어져 산업계의 신약개발 연구분야에 대한 지원 연구체제의 정립과 더불어 광과민 유발기작에 대한 연구 및 새로운 시험방법의 도입이 가능해질 것으로 판단된다.

다. 중동물을 이용한 항원성시험법의 확립 및 보완

기존의 시험법을 보완하는 연구를 진행하여 중동물을 이용한 항원성시험법을 확립하였으며 이는 시험물질의 항원성 여부의 판단에 필수적으로 보여지며, 일반독성시험과의 연계를 통하여 경비 및 노동력의 절감도 가능해질 것으로 판단된다.

5. 환경독성시험법 및 GLP체계 확립

- 국내 산업계의 신개발 또는 기존제품의 개발지원 연구수행
- 국내 산업계의 안전성 관련 국내외 요구자료 용역연구 수행
- WHO, OECD 등에서 취하고 있는 안전성평가 관련 연구 및 분석방법의 표준화에 참가하여 국제연구 수행

6. 실험동물 육종기술 확립

가. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 대량 육종기술 확립 (II)

현재 생산하고 있는 양질의 실험동물을 사용하여, 약효검색, 독성시험, 그리고 생명공학의 연구의 data의 신뢰성을 제고할 수 있다. 또한, 실험동물의 육종 기술과 지식을 타 육종 기관에 기술과 지식의 전수하거나 직접 산업화하여 많은 연구자와 시험자들이 혜택을 누리도록 하여야할 것이다.

나. Nude mouse의 육종기술 확립

현재 매월 약 200마리의 nude mouse를 생산하여, 항암제 스크리닝에 사용하도록 하였으며, 소내에 저가로 공급하였다. Nude mouse는 T cell을 생산하는 thymus가 결손되어 있는 동물이므로 면역 기능이 매우 저하되어 있어, 생산과 유지가 매우 어렵다. 현재 육종이 확립된 nude mouse는 T cell이 현저히 감소되어 있음이 확인되었다. 각종 암세포를 정착시켜 항암제 약효 검색에 이용할 수 있다.

다. 새로운 질환모델동물의 확립과 연구

질병의 기전연구와 원인 유전자의 분석 뿐 아니라 미래에는 신약개발을 위한 약효검색과 독성시험에도 사람 질병의 모델동물의 사용이 불가피하다. 따라서 각종 사람 질병의 병태와 원인이 유사한 질병모델 동물의 생산 연구와 사용은 매우 의의가 있다. 본 연구를 통해 노화촉진모델 동물인 SAM을 육종하여 기초 data를 확립하였다. 이 두 연구의 결과는 기전 연구와 신약 개발에 크게 기여할 것으로 사료된다.

여 백

SUMMARY

I. Title

A Study on the Toxicological Research for Chemical Compounds

II. Objectives and Justification

Nowadays, due to the increased use of chemicals following the rapid industrialization, the adverse effects of chemicals and pollutants on human and environment have become worldwide concern. In addition, related laws and regulations concerning this field have also been rapidly amended and reinforced in the developed countries.

Evaluation of the adverse effects of chemicals needs techniques to measure the toxic potential of candidate compounds among newly developed pharmaceuticals, pesticides, and industrial chemicals. The toxicity result constitutes an essential part of the data required for registration of the developed chemicals. In addition, it has also been playing a critical role in the process of decision making whether the compound is to be marketed. Therefore, the techniques for the toxicological evaluation plays and will play an important role in the development of new compounds.

During the last decade, Korea has demonstrated remarkable progresses in the field of science and technology. The Korean fine chemical industry has already showed ability to create new chemicals and has sufficient experience in the synthesis and production of pesticides, pharmaceuticals, and other industrial chemicals. Establishment of the Pharma-Agro National Research Center (PANARC) in 1991 after the introduction of the international patent law in 1987 reflects the eagerness of the Korean

government and chemical industry to invent a new chemical. Development or set-up of new toxicological evaluation methods and application of the already developed methods to newly developed compounds are both essential tasks of personnel involved.

III. Area and scope of the study in the period

1. Establishment of the system for OECD GLP accreditation

We have tried to develop the KRICT-TRC (Toxicology Research Center) GLP system for OECD GLP operation. The areas studied were as follows;

(1) Analysis of OECD GLP Operation

(2) Study of OECD GLP system and establishment of SOPs for the short-term toxicity testing

(3) Study of OECD GLP system and establishment of SOPs for the operating computer-system on toxicity tests.

2. Establishment and improvement of repeated dose toxicity testing methods using rodent

(1) Establishment of continuous infusion method in the rat tail vein

A rapid and simplified technique of intravenous catheterization to the unanesthetized rat was developed for continuous infusion. An acute toxicity test of K-799 and 14-day subacute toxicity tests of K-378 and K-566 were conducted in order to improve the method, to compare the difference of toxicologic response between the continuous infusion and bolus infusion, to convince the utility of the method, and to propose the necessity of the continuous infusion in toxicity tests.

(2) Toxicokinetic application for dose-range finding in the long-term toxicity studies

Toxicokinetic studies for K-581 and K-585 were performed to develop dose-range finding techniques and to assess further quantitative toxicity evaluation in the long-term toxicity testings. These studies included development of analytic technique using high-performance liquid chromatography system in the biosamples, development of dose-range finding techniques and assessment of quantitative toxicity evaluation in a developmental toxicity testings.

(3) Establishment of special staining methods in histopathology

The toxicological studies using laboratory animals were conducted to establish special staining methods in histopathology. The accomplishment of the related techniques would be applied for developing and expanding the current toxicology studies.

3. Establishment of special toxicity testing methods using rodent

(1) Establishment of neurotoxicity testing methods

In order to establish the methods for detecting chemical-induced neurotoxicity and to develop the methods, a variety of neurotoxicity parameters was used in present study. In this study, the GFAP assaying protocol using a Sandwich Elisa method and Morris water maze and 8-arm radial maze tests for detecting learning and memory attitude in rodent animals, were established and tested with test drugs.

(2) Development of methods for studying chemical-induced immunotoxicity in rodents

In order to establish the methods for detecting chemical-induced immunotoxicity and to develop the methods for studying mechanisms of immunotoxicity in rodents, a variety of immunotoxicity parameters was

used in the present study. For example, T-dependent and T-independent antibody responses, spleen cell mitogenicity by lipopolysaccharide and concanavalin A, immunohistopathology, hematology, serum biochemistry, and changes in immune-related organ weights were introduced to determine the mechanism of immunotoxicity induced by 2-bromopropane and ethyl carbamate. In addition, the flow cytometric analyses of immune cell surface markers were performed. Because many toxicants exert their toxicity after metabolic activation to their toxic metabolites, it is of importance to develop model inducers of drug-metabolizing enzymes which may be neither hepatotoxic nor immunotoxic. In the present study, the effects of β -ionone as a model inducer of cytochrome P450 induction were investigated in mice and rats. To detect the induction of certain isozymes of P450, isozyme-specific monooxygenases, Western immunoblottings and reverse transcriptase-polymerase chain reaction were used. In addition, β -ionone was practically applied to a study in which the potentiation of hepatotoxicity induced by a well-known hepatotoxicant thioacetamide could be obtained by the pretreatment of mice with β -ionone. On the other hands, to meet the regulatory requirement and to serve the demands on immunotoxicity assessment on newly developed drug candidates from Korean industries, the standard operating procedures(SOPs) on immunotoxicity testings were prepared based on the Korean GLP guidelines and the United States' National Toxicology Program.

(3) Establishment of in vivo mutagenicity test methods using transgenic animals

A series of experiments were performed to establish the BigBlueTM assay system in Toxicology Research Center, KRICT. The transgenic mice(male C57BL/6) and transgenic rats(male Fischer 344) were used to

estimate *in vivo* mutagenic potential of two chemicals, dimethylnitrosamine and methapyrilene hydrochloride, to validate the capability of this assay system for detecting mutagens.

(4) Establishment of *in vitro* teratogenicity method

The method of culturing whole rat embryos (days 9.5-11.5 of gestation, i.e. at the early stage of organogenesis) was established. We used rat serum as culture medium and cultured embryos under standardized experimental conditions as recommended in the original procedure of New (1978). Using the established method, we examined the teratogenicity of phenytoin *in vitro*.

4. Establishment of general and special toxicity testing methods using non-rodents

(1) Application of dose-range finding technique in the toxicity studies using non-rodents

Toxicokinetic study for K-580 were performed to establish dose-range finding technique and toxicity evaluation in a chronic toxicity testing using dogs. An microbore high-performance liquid chromatography system was developed for simultaneous determination of KH-580 and its metabolites, SA and SM, in the dog plasma. The main topics were steady-state kinetics during multiple dosing, comparative toxicokinetics for single dose, 3-month dosing and 6-month dosing, nonlinear kinetics relating to dose levels and accumulation.

(2) Establishment of phototoxicity and photosensitization test and document of SOP

The Standard Operating Procedure(SOP) for phototoxicity and

photosensitization tests were prepared to meet the GLP requirement. The illuminating instrument, protectors and reagents for these tests were purchased.

(3) Development of methods for antigenicity tests in dogs

In order to establish a testing method for detecting immunogenicity of testing articles in beagle dogs, a system of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was introduced in the present study. Generally in the Korean toxicity testing guidelines for drugs issued by Korea Food and Drug Administration, the antigenicity tests in guinea pigs and mice are required, and these methods cannot be applied to dogs. Because a testing system with dogs may be able to provide more accurate results which can be manifested in humans, the antigenicity tests in small-size animals and dogs were compared.

5. Establishment of environmental toxicological testing methods and GLP system

- (1) Establishment of methodology for fish toxicity testing in early life stage
- (2) Study on blood and histopathological parameters to assess toxic response in fish following sublethal exposure to cadmium
- (3) Study of environmental fate, soil metabolism, plant metabolism and aquatic photolysis of pesticide in environment, and establishment of respective testing methodology
- (4) Establishment of GLP system in environmental toxicological testing

In order to be accredited as an official GLP testing institute, following efforts have been done: 1) establishment of testing methods for partition coefficient, microbial degradation test, algae growth inhibition test,

daphnids and fish acute toxicity testing, and bioconcentration testing, 2) completion of standard operating procedure(SOP) on the above-mentioned testing items, and 3) education and training of personnel.

6. Establishment of breeding methods and technologies of laboratory animals

(1) The establishment of mass production of high quality laboratory animals

We successfully produced high quality of laboratory animals for the first period of this project. The screening and safety of new materials require high quality of laboratory animals and this became more important for international qualification of the new materials for human use. We, therefore, focused on production of high quality of animals more efficient way to produce more animals using the same space and materials, while maintaining or enhancing the quality.

(2) The establishment of breeding methodology for nude mice

The screening and research of cancer require animal models which either develop cancer spontaneously or can adopt cancer cells without rejection. Nude mouse, whose immune system is destroyed and thus immunodeficient, is a good tool for cancer screening. The problems of nude mice are the difficulty of breeding and the expences of importation, which make the screening expensive and unstable. We, therefore, established the breeding system of nude mice for stable and continuous screening of cancer drugs at KRICT and cancer researches nationwide.

(3) Research on a new animal model for human disease

The research and development of diseases require animal models. The progress of modern medicine prolngns expectancy of human life. The aging

and aging-related diseases became issues of modern society beyond personal problem, and became burdern of whole society. We successfully bred SAM(Senescence-accelerated mouse) and focused on testings feasibility as animal model of human aging and aging-related chronic diseases.

IV. Results

1. Establishment of the system for OECD GLP accreditation

We established new KRICT-TRC GLP system for OECD GLP operation with an emphasis on the followings;

- (1) Analysis of OECD GLP operation
- (2) Study of OECD GLP system and establishment of SOPs for the short-term toxicity testing
- (3) Study of OECD GLP system and establishment of SOPs for operating computer-system on toxicity tests.

2. Establishment and improvement of repeated dose toxicity testing methods using rodent

(1) Establishment of continuous infusion method in the rat tail vein

We established the continuous infusion method in the rat tail vein using a needle catheter, thickened two side adhesive tape, thin wire mash protector and cable tie. It was observed that there were difference in the biologic response between the continuous injection and bolus injection in accordance with the character of articles.

(2) Toxicokinetic application for dose-range finding in the long-term toxicity studies

The current analytical technique using an HPLC system and the toxicokinetic research have well been applied to establish dose-range finding

of K-585 in both single- and repeated-dosing and to assess a developmental toxicity of K-581 in the rats. Thus, it should be understood that the toxicokinetic approach is a valuable tool in the development of new drugs. The detailed method for toxicokinetic analysis including the kinetic parameter comparison was discussed in the text.

(3) Establishment of special staining methods in histopathology

The toxicological studies using rats were conducted to establishment of special staining methods in histopathology. The effects of 2-bromopropane(2-BP) on spermatogenesis were evaluated using light microscopy, electron microscopy, and immunohistochemical examination and flow cytometry analysis. On the basis of the results, it is concluded that 2-BP would disturb the spermatogenesis by the destruction of spermatogonia followed by the depletion of spermatocytes and spermatids resulting in testicular atrophy and that the testicular atrophy would not be completely recovered within 10 weeks of the recovery period in SD rats treated with a relatively high toxic dose of 2-BP.

3. Establishment of special toxicity testing methods using rodent

(1) Establishment of neurotoxicity testing methods

The neurotoxic effect of Kainic acid using GFAP assay was investigated in male and female Sprague Dawley rats. The animals were administered Kainic acid at 0.1 and 1 mg/kg intravenously. Following the decapitation, brains immediately were removed and placed on a cold plate after 1, 2, 7, 28 days of toxicant administration. With the aid of curved forceps, striatum, hypothalamus, cortex, cerebellum, hippocampus were dissected from rat. Brain parts were weighed, homogenized in 10 volumes of hot(90~95°C) 1%(w/v) SDS and stored frozen at -70°C before Elisa assay.

The concentration of GFAP in homogenates of specific regions of the rat brain after kainic acid administration was significantly higher (>15% of control group) than the control group. Kainic acid caused large increases of GFAP values on first and second day of toxicant administration. The concentration of GFAP on 7 and 28 days did not much differ from control group. It was suggested that the damage of brain by neurotoxicant was recovered after some time periods.

The learning and memory behavior of test animals (SD rat, male) after administration of scopolamine, p.o. and test drugs, K-886 and K-887 was determined. The mean latencies in second was significantly increased in the scopolamine-treated animal group, but no significance was observed in the test drug treated animal groups compared with the control animal groups. These results suggested that scopolamine cause the decrease of learning and memory ability in animals, and that the test drugs, K-886 and K-887 may not produce any effects in these tests.

(2) Development of methods for studying chemical-induced immunotoxicity in rodents

Immunotoxic effects of 2-bromopropane was investigated in male Sprague Dawley rats. The rats were administered 2-bromopropane at 100, 300, and 1000 mg/kg orally for 28 days. The body and thymus weights were significantly reduced by the administration of 2-bromopropane at the highest dose. In addition, the number of splenic and thymic cells was decreased by 2-bromopropane. In hematology, the number of white blood cells, red blood cells, and platelets was significantly decreased. The antibody response to sheep red blood cells was significantly suppressed at the highest dose. With unimmunized animals, immunophenotyping of splenic and thymic cells was performed to investigate the changes of the

number of macrophages, B-, and T-cells (total T-cells, T-helper and T-cytotoxic cells) in spleen and the number of CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ cells in thymus by 2-bromopropane. No significant change in the number of each cell type was observed in spleen. Meanwhile, due to the marked decrease in the total cell numbers in thymus, all four kinds of thymic cells were significantly decreased. The present results suggest that 2-bromopropane may have an immunotoxic potential in male Sprague Dawley rats when exposed for 28 days. Immunotoxicity induced by a multi-carcinogen, ethyl carbamate, was investigated in female BALB/c mice. When mice were administered 200 mg/kg of ethyl carbamate intraperitoneally for 7 days, the cell numbers in spleen and thymus were significantly reduced. Histopathologically, the atrophy in spleen and thymus was observed in association with the decrease in cell numbers. Flow cytometric analyses showed not only that the numbers of splenic macrophages, B-, and T-cells were significantly reduced, but also that the number of thymic CD4⁺CD8⁻ cells was significantly reduced. Interestingly, however, the number of thymic CD4⁻CD8⁺ cells was not changed. When the adrenalectomized animals were used, we observed a possibility that adrenal hormone may have a role in ethyl carbamate-induced immunosuppression. We have recently reported that β -ionone induces cytochrome P450 (P450) 2B1 in rats. In the present study, effects of β -ionone and an isomer, α -ionone, on the expression of liver P450 1A and 2B were also investigated in Sprague Dawley rats. Administration with α - and β -ionone subcutaneously induced the liver microsomal P450 1A and P450 2B proteins, possibly by the accumulation of their corresponding mRNAs. The induction by β -ionone was much greater than that by α -ionone. The present results indicated that β -ionone may be more potent inducer of P450 2B1 than α

-ionone in rats and that both ionones may be useful inducers of P450 enzymes in studying the role of metabolic activation in chemical-induced toxicity where metabolic activation is required. Because the preparation of standard operating procedures on the immunotoxicity testings is essentially required to conduct the contract works from the industry, we have prepared 35 SOPs on the immunotoxicity testings in mice and rats, in which all methods included in the guidelines of toxicity testings for pharmaceuticals issued by the Korean Food and Drug Administration.

(3) Establishment of in vivo mutagenicity test methods using transgenic animals

DMN induced apparant increase in mutation frequency (MF) in liver, kidney, and spleen of transgenic mice. DMN also induced increase in MF in liver of transgenic rats. MPH did not induce increase of MF in liver and kidney of transgenic mice. The mutagenic potential of MPH in spleen of transgenic mice was not clear. However, it was concluded that the spleen may not be the target organ of MPH. In contrast of this result there was an increase in MF in the liver of rats treated with MPH. Thus, MPH induces mutations in rat liver cells but not in liver of mice. These results, as a whole, reflect the carcinogenicity of the chemicals in animals. In conclusion, the BigBlueTM assay system established in Toxicology Research Center, KRICT is capable of detecting mutagens, and could be used to evaluate mutagenic potential of chemicals.

(4) Establishment of in vitro teratogenicity method

The following evaluations were performed subsequent to culturing of 20 embryos : yolk sac diameter, crown-rump length, head length, No. of somite pairs, morphological score and protein concentration. Embryonic

growth and morphology parameters in vitro did not differ from those in vivo. Using the established method, we examined the teratogenicity of phenytoin, an anticonvulsant agent, in vitro. Embryos treated with 25, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were compared with embryos treated with an equimolar concentration of DMSO. At 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, yolk sac diameter, crown-rump length, head length, No. of somite pairs, morphological score and protein concentration were significantly decreased, when compared with those of controls. In addition, various types of malformations occurred at an incidence of 100%. Characteristic malformations included altered yolk sac and embryonic circulation, abnormal axial rotation, craniofacial hypoplasia, and branchial arch defects, among others. There were no embryotoxicity at 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4. Establishment of general and special toxicity testing methods using non-rodent

(1) Application of dose-range finding technique in the toxicity studies using non-rodents

The current analytical technique using an microbore HPLC system and toxicokinetic reserach have been well applied to establish dose-range finding and toxicity evaluation for K-580 in a chronic toxicity testing. From the present work, the metabolite kinetics of KH-580 was successfully characterized in dogs. The detailed toxicokinetic analysis including dose-related nonlinear kinetics, accumulation and dose-range finding kinetics was discussed in the text.

(2) Establishment of phototoxicity and photosensitization test and document of SOP

To establish the methods of phototoxicity and photosensitization

testings, the illuminating instrument and reagents were purchased. To meet the GLP requirement, the Standard Operating Procedures were prepared.

(3) Development of methods for antigenicity tests in dogs

When a proteinous testing article (TA#1) was tested for its antigenic potential no antigenicity was observed in the systemic anaphylactic shock test, the passive cutaneous anaphylaxis in mouse-rat and guinea pig-guinea pig systems. However, When the TA#1 was intravenously administered to beagle dogs for 28 days, the TA#1-specific antibody (i.e., IgG) was clearly detected from low dose in sera by the ELISA. Therefore, beagle dogs may give more accurate immuogenicity results when compared to mice and guinea pigs. So it would be of great importance that the development of testing methods to detect immunogenic potential of testing articles in beagle dogs may provide important results.

5. Establishment of environmental toxicological testing methods and GLP system

(1) Establishment of methodology for fish early life stage toxicity testing

To establish the fish early-life stage toxicity testing method, exposure parameters, such as water temperature, oscillation frequency of exposure chamber, sieve size in exposure chamber, and pooling periods of embryo were examined using the embryo of Japanese medaka(*Oryzias latipes*). The hatching success, days to end of hatching, and post-hatch success were observed as growth factors. The result showed that all factors except sieve size in exposure chamber affected the growth factors. The statistical significance was shown at the following exposure conditions : 15 rpm of oscillating frequency at 25°C and 10 or 15 rpm of oscillating frequency at

28°C. Pooling of embryo was possible for 2 days when being kept in refrigerator. Under these exposure conditions, the growth factors were as following : hatching success ranged over 62~92%, days to end of hatching ranged over 6.5~8.8 days, and post-hatching success ranged over 71~100%. Therefore, the following test conditions for "Fish, Early-Life Stage Toxicity Test", would be recommended to meet OECD and USEPA test guidelines : water temperature, 25°C~28°C; frequency of oscillation of exposure chamber, 10~15 rpm; and possible pooling periods of embryo, up to 2 days. Under the conditions, embryo showed 84% of hatching success, average 7.3 days till hatching, and 86~97% of post-hatching success.

(2) Study on blood and histopathological parameters to assess toxic response in fish following sublethal exposure to cadmium

Exposure of fish to cadmium resulted in the increase in red blood cell(RBC), haematocrit(Hct) and hemoglobin(Hb) as well as the alterations in plasma glucose, protein, lipid, electrolytes(Na, K and Cl) and enzymes. No significant histopathological changes were observed in gills, kidney, intestine and brain compared to the control. But significant morphological changes were observed in the liver(the microdroplet fatty change) and skin(hypertropy of epidemis; increase of lymphatic and serous cell) of korean catfish exposed to 1.78 mg/L of cadmium. The accumulation of cadmium in tissue was increased with exposure time and concentration. The haematological and biochemical responses can be detected from a relatively short-term and low level exposure. Therefore, sublethal effects of cadmium on fish were more easily detectable in those parameters than the histopathological responses. The results indicated that the changes in biochemical or hematological parameter would be useful endpoints to

indicate an early sign of toxicity by chemicals in fish.

(3) Study of aerobic soil metabolism

To elucidate metabolic fate of alachlor in soil, an aerobic soil metabolism was investigated with ^{14}C -alachlor. The study was conducted for 60 days with a loamy soil of which the moisture content was maintained at 75% of field capacity (1/3 bar). Incubation of treated soil was carried out at 25°C under dark condition and the radiocarbon distribution in solvent extract and nonextractable residue were analyzed at 0, 3, 7, 14, 28, 60 days after treatment, as well as radioactive CO_2 and volatiles. The material balance at each sampling day ranged from 108% to 87.3% and the half-life of ^{14}C -alachlor in soil was calculated to be 13.6 days. Among the six metabolites observed in the study 2-chloro-2',6'-diethylacetamide and 2,6-diethylacetanilide were identified. Evolved $^{14}\text{CO}_2$ accounted for up to 1.7% of applied radiocarbon and no volatiles were detected. Nonextractable ^{14}C -residue accumulated up to 69.7% of that applied at 60 days after treatment.

(4) Study of plant metabolism

Establishment of methodology for the pesticide(Flupyrzofos) metabolism in plant after spray was carried out and absorption/translocation of pesticide through the roots of seedlings was investigated. Chinese cabbage was extracted with acetone giving good recovery of better than 90% for the Flupyrzofos and metabolites. TRR and radioactivity of solvent extract of samples harvested on days 0, 7, 14, and 28 day were decreased with time. Solvent non-extractable residues contained low level of radioactivity with fluctuation. In the comparison of DAR and Image plate

for the identification and quantitation of Flupyrzofos and metabolites. Image plate gave more clear separation of those compounds to be quantitated. Flupyrzofos in Chinese cabbage was decreased with time to reach 29% of TRR on day 28. Origin, Flupyrzofos-oxon and unknown metabolites were formed in low quantity and Flutyrazofos-oxon was formed up to about 6% half life of Flupyrzofos was calculated to be about 18 days and material balance was better than 90% except on 28th day. In absorption/translocation experiments, absorption in root was observed mainly. At 10 hours after treatment only 9.7% was absorbed in root, which suggesting low absorption/translocation properties of Flupyrzofos. These results were also confirmed by Image plate autoradiogram.

(5) Study of aquatic photolysis

Present study was conducted for the establishment of methodology in aqueous photolysis of pesticide which is one of the important subjects in the related area. Organophosphorus insecticide Flupyrzofos which developed originally in Korea was used in this study to obtain aqueous photolysis informations. Recovery of extraction method was good to give better than 100% in 0.1 and 0.4 ppm level of Flupyrzofos. In direct photolysis, similar photolysis rate was observed regardless of light exposure and half life was calculated to be 7.5 day. This value is the same as hydrolysis rate, suggesting that Flupyrzofos was degraded by simple hydrolysis. In indirect photolysis, photolysis rate of SHW was more rapid than PW regardless of the presence of oxygen or light exposure. In case of air saturation, photolysis rate of light exposure sample was more rapid than non exposure sample in both of SHW and PW. In addition, more photobleaching was progressed in the air saturation sample.

(6) Establishment of GLP system in environmental toxicological testing

First, testing methods and SOPs for partition coefficient, microbial degradation test, algae growth inhibition test, daphnids and fish acute toxicity testing, and bioconcentration testing have been established. The SOPs which are essential in carrying out GLP testing have been divided into 8 different kinds for each testing item, thus total 82 SOPs have been completed and distributed to the related departments. Education and training of research personnel regarding relevant SOPs also have been done. As a result of these efforts, KRICT has been accredited by Ministry of Environment, as a GLP toxicity testing institute in the above 6 toxicity testings.

6. Establishment of breeding methods and technologies of laboratory animals

(1) The establishment of mass production of high quality laboratory animals

We successfully produced high quality of laboratory animals for the first period of this project. We tried to produce such a high quality of animals in a more efficient way to produce more animals using the same space and materials. We produced high quality of rats and mice for screening and toxicology testing and distributed them to Screening Division and Toxicology Division and other research institutes nation wide.

(2) The establishment of breeding methodology for nude mice

The screening of anti-cancer agents and cancer research require animal models which either develop cancer spontaneously or can adopt cancer cells without rejection. Nude mouse whose immune system is destroyed is a good

tool for anti-cancer drug screening. The problem of nude mice is the difficulty of breeding and the expences of importing, which makes the screening expensive. We, therefore, established the breeding system of nude mice in order to enable the continuous screening of anti-cancer drugs. The nude mice we are producing were lack of T cells implying the absence of thymus gland and thus proved to be a good animal for anti-cancer drug screening. We also obtained physiological data of SAM mice as aging models.

(3) Research on a new animal model for human disease

The development of therapeutics against human diseases requires animal models. We obtained the basic physiological data of SAM, an aging model.

V. Recommendation for the application

1. Establishment of the system for OECD GLP accreditation

In this study, the GLP and SOPs of KRICT-TRC for general and special toxicity tests were developed according to OECD GLP requirement. The accomplished GLP system would be applied to achieve the international accreditation of the toxicity data of KRICT-TRC.

2. Establishment and improvement of repeated dose toxicity testing methods using rodent

(1) Establishment of continuous infusion method in the rat tail vein

The continuous injection would be conducted to the toxicity test of some articles which should be continuously injected to the man.

(2) Toxicokinetic application for dose-range finding in the long-term

toxicity studies

The role of toxicokinetics in the dose-range finding study and toxicity evaluation study has well been described in this work. Therefore, these toxicokinetic techniques will be used as an essential tool for theoretical and scientific evaluation of toxicities of new drug candidates.

(3) Establishment of special staining methods in histopathology

The accomplished techniques would be applied for developing and expanding histopathology in toxicology studies.

3. Establishment of special toxicity testing methods using rodent

(1) Establishment of neurotoxicity testing methods

The testing methods established in this study could be used to evaluate the neurotoxic potential of chemicals.

(2) Development of methods for studying chemical-induced immunotoxicity in rodents

The established testing methods for immunotoxicity will be applied to assess immunotoxic potential of newly developed drugs. In addition the methods established in this study can also be used in investigation of immunotoxic mechanism. The grant support should be continued for our institute to develop the methods for studying molecular mechanism of chemical-induced immunotoxicity.

(3) Establishment of in vivo mutagenicity test methods using transgenic animals

The BigBlue™ assay system established in Toxicology Research Center, KRICT is capable of detecting mutagens, and could be used to

evaluate mutagenic potential of chemicals.

(4) Establishment of in vitro teratogenicity method

The whole-embryo culture method can be used broadly as an efficient method to prescreen new drugs and agrochemicals. It can also provide insight into the mechanisms by which a test chemical is teratogenic.

4. Establishment of general and special toxicity testing methods using non-rodents

(1) Application of dose-range finding technique in the toxicity studies using non-rodents

The role of toxicokinetics in the dose-range finding study and toxicity evaluation study has well been described in this work. Therefore, these toxicokinetic techniques will be used as an essential tool for theoretical and scientific evaluation of toxicities of new drug candidates.

(2) Establishment of phototoxicity and photosensitization test and document of SOP

Because now it is available to test the photosensitization inducing materials in this institute, the support system for new drug development from industries are more improved. To study the mechanism of photosensitization and to implement new testing methods, the continuous support from government is going to be essential.

(3) Development of methods for antigenicity tests in dogs

Further improvement would be required to use the ELISA method as antigenicity testing method with dogs in preclinical testings. When these methods are performed in association with the general toxicity

testings, the labor and cost can be saved.

5. Establishment of environmental toxicological testing methods and GLP system

- Accomplishment of studies for supporting the domestic industries to develop new chemicals and to improve existing chemicals.

- Accomplishment of studies to prepare materials concerning the safety evaluation required by the domestic industries.

- Accomplishment of studies to improve and standardize the methods and techniques of the safety evaluation to the level of WHO and OECD.

6. Establishment of breeding methods and technologies of laboratory animals

(1) The establishment of mass production of high quality lab animals(II)

The quality assurance of various safety testing and drug efficacy testing is deeply dependant on the quality of testing animals. The use of high quality animals we produce will inevitably assure the test results. The breeding technology can also be transferred to the industry for mass production of high and standard quality of rodent animals.

(2) The establishment of breeding methodology for nude mice

We currently produce about 200 nude mice monthly and provide them to use for anti-cancer drug screening in the Screening Division. The production and maintenance of nude mice are difficult due to the compromised immune system. We proved the absence of thymus gland in the nude mice we produce and these animals can serve for cancer research and anti-cancer drug screening continuously.

(3) Research on a new animal model for human disease

Animal models for human diseases play an important role not only for elucidation of disease mechanisms and identification of disease genes, but the drug efficacy testing and toxicology testing for drug development. The research of animal models mimicking human diseases are the first step toward the therapy and prevention of human from diseases. In the present studies, we established the basic physiological data of SAM and found the fine location of cataract gene in CXS(D) mice. These results will increase the knowledge of hypertension and cataract and will eventually serve to elucidate the mechanisms of the diseases.

CONTENTS

Chapter 1. Establishment of the system for OECD GLP accreditation	1
Section 1. Introduction	1
Section 2. Analysis of OECD GLP operation	1
Section 3. Study of OECD GLP system and establishment of SOPs for the short-term toxicity testing	23
Section 4. Study of OECD GLP system and establishment of SOPs for the operating computer-system on toxicity tests	80
Chapter 2. Establishment and improvement of repeated dose toxicity testing methods using rodent	89
Section 1. Establishment of continuous infusion method in the rat tail vein	89
1. Introduction	89
2. Development of catheterization in the rat tail vein	90
3. A 14-day continuous dosing toxicity study of K-378 in the rats	97
4. A 14-day continuous dosing toxicity study of K-566 in the male rats	118
5. A 24-hour continuous dosing acute toxicity study of K-799 in the female rats	141
6. Discussion and Conclusions	153
7. References	155
Section 2. Toxicokinetic application for dose-range finding in the long-term toxicity studies	156
1. Introduction	156
2. Materials and Methods	157

3. Results	158
4. Discussion and Conclusions	173
5. References	175
Section 3. Establishment of special staining methods in histopathology	176
1. Introduction	176
2. Materials and Methods	179
3. Results	183
4. Discussion and Conclusions	190
5. Legends for Figures	199
6. References	225
Chapter 3. Establishment of special toxicity testing methods using rodent	234
Section 1. Establishment of neurotoxicity testing methods	234
1. Introduction	234
2. Measurement of Kainate-induced increase in GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein) by Sandwich Elisa assay	235
3. Measurement of memory behavior using Morris water maze and Radial 8-arm maze	248
Section 2. Development of methods for studying chemical-induced immunotoxicity in rodents	260
1. Introduction	260
2. Materials and Methods	264
3. Results	274
4. Discussion and Conclusions	327
5. References	334
Section 3. Establishment of in vivo mutagenicity test methods using transgenic animals	342

1. Introduction	342
2. Materials and Methods	347
3. Restuls	351
4. Discussion and Conclusions	354
5. References	355
Section 4. Establishment of in vitro teratogenicity method	367
1. Introduction	367
2. Materials and Methods	368
3. Results	371
4. Discussion and Conclusions	379
5. References	384
Chapter 4. Establishment of general and special toxicity testing	
methods using non-rodent	387
Section 1. Application of dose-range finding technique in the	
toxicity studies using non-rodents	387
1. Introduction	387
2. Materials and Methods	388
3. Results	390
4. Discussion and Conclusions	401
5. References	403
Section 2. Establishment of phototoxicity and photosensitization test	
and document of SOP	404
1. Introduction	404
2. Materials and Methods	404
3. Results	406
4. Discussion and Conclusions	407
5. References	407
Section 3. Development of methods for antigenicity tests in dogs	408

1. Introduction	408
2. Materials and Methods	409
3. Restuls	413
4. Discussion and Conclusions	423
5. References	425
Chapter 5. Establishment of environmental toxicological testing methods and GLP system	426
Section 1. Introduction	426
Section 2. Study on ecological toxicological testing methods	428
1. Establishment of early-life stage toxicity testing methods using killifish	428
2. Study on toxicological testing methods using blood and histopathological parameters	440
Section 3. Study on metabolism and fate testing methods in environment	464
1. Study on soil metabolism	464
2. Study on plant metabolism	486
3. Study on aquatic photolysis	508
Section 4. Establishment of GLP system in environmental toxicological testing	524
1. GLP organization and operating system of environmental toxicology team	524
2. Classification, numbers and management of SOP	525
Chapter 6. Establishment of breeding methods and technologies of laboratory animals	535
Section 1. Introduction	535
Section 2. Materials and Methods	536
1. The establishment of mass production of high quality	

laboratory animals	536
2. The establishment of breeding methodology for nude mice	538
3. Research on a new animal model for human disease	543
Section 3. Results	547
1. The establishment of mass production of high quality laboratory animals	547
2. The establishment of breeding methodology for nude mice	553
3. Research on a new animal model for human disease	570
Section 4. Discussion and Conclusions	572
1. The establishment of mass production of high quality laboratory animals	572
2. The establishment of breeding methodology for nude mice	572
3. Research on a new animal model for human disease	576
Section 5. References	580
Chapter 7. Tasks for collaborative research between SRI and KRICT	586
Section 1. Introduction	586
Section 2. Content	587
Section 3. Conclusions	600
Chapter 8. Final reports for tasks of subcontract	601
1. Development of immunotoxicity test methods	602
2. Establishment of toxicological evaluation system of carcinogenic materials based on molecular genetic methodology	630
3. Solubilization of poorly water soluble drugs using disperse systems	716

목 차

제 1 장 OECD GLP 운영을 위한 체계화립	1
제 1 절 서 론	1
제 2 절 OECD GLP 체제분석	1
제 3 절 단기독성시험에서의 OECD GLP 도입 및 SOP 확립	23
제 4 절 독성시험수행의 전산처리에 대한 OECD GLP 적용 및 SOP 확립	80
제 2 장 소동물을 이용한 장기투여 독성시험법의 확립 및 보완	89
제 1 절 랫트에서의 미정맥내 연속투여법의 확립	89
1. 서 론	89
2. 미정맥내 카테터 장착법의 개발	90
3. Infusion pump를 이용한 K-378의 미정맥내 연속 또는 반복 투여가 랫트에 미치는 영향 차이	97
4. Infusion pump를 이용한 K-566의 미정맥내 연속 또는 반복투여 가 수컷 랫트에 미치는 영향 차이	118
5. Infusion pump를 이용한 K-799의 암컷 랫트를 이용한 미정맥내 연속투여 급성독성시험	141
6. 고찰 및 결론	153
7. 참고문헌	155
제 2 절 독성동태 이론을 이용한 시험물질 용량설정기술의 확립	156
1. 서 론	156
2. 재료 및 방법	157
3. 결 과	158
4. 고찰 및 결론	173
5. 참고문헌	175
제 3 절 병리조직학적 변화를 검색하기 위한 다양한 특수염색방법의 확립	176

1. 서 론	176
2. 재료 및 방법	179
3. 결 과	183
4. 고찰 및 결론	190
5. Legends for Figures	199
6. 참고문헌	225
제 3 장 소동물을 이용한 특수독성시험법의 확립 및 보완	234
제 1 절 신경독성 시험방법의 확립	234
1. 서 론	234
2. Measurement of Kainate-induced increase in GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein) by Sandwich Elisa assay	235
3. Measurement of memory behavior using Morris water maze and Radial 8-arm maze	248
제 2 절 면역독성시험방법의 확립 및 보완	260
1. 서 론	260
2. 재료 및 방법	264
3. 결 과	274
4. 고찰 및 결론	327
5. 참고문헌	334
제 3 절 유전자전이동물(Transgenic animal)을 이용한 유전독성시험법의 확립	342
1. 서 론	342
2. 재료 및 방법	347
3. 결 과	351
4. 고찰 및 결론	354
5. 참고문헌	355
제 4 절 In vitro 최기형성 시험법의 확립	367
1. 서 론	367

2. 재료 및 방법	368
3. 결 과	371
4. 고찰 및 결론	379
5. 참고문헌	384
제 4 장 중동물을 이용한 일반 및 특수독성시험법의 확립 및 보완 ...	387
제 1 절 중동물을 이용한 독성시험에서의 시험물질 용량설정기술의 적용	387
1. 서 론	387
2. 재료 및 방법	388
3. 결 과	390
4. 고찰 및 결론	401
5. 참고문헌	403
제 2 절 광독성 및 광감작성시험방법의 확립 및 SOP 작성	404
1. 서 론	404
2. 재료 및 방법	404
3. 결 과	406
4. 고찰 및 결론	407
5. 참고문헌	407
제 3 절 중동물을 이용한 항원성시험법의 확립 및 보완	408
1. 서 론	408
2. 재료 및 방법	409
3. 결 과	413
4. 고찰 및 결론	423
5. 참고문헌	425
제 5 장 환경독성시험법 및 GLP체계 확립	426
제 1 절 서 론	426
제 2 절 생태독성시험법 연구	428
1. 송사리를 이용한 생육초기독성시험법 확립	428

2. 어류의 혈액화학, 혈액생화학적 및 조직학적 지표를 이용한 독성시험법 연구	440
제 3 절 환경내 대사 및 동태시험법 연구	464
1. 토양대사 연구	464
2. 식물대사 연구	486
3. 수중광분해 연구	508
제 4 절 환경독성시험 GLP 체제확립	524
1. 환경독성팀의 GLP 조직 및 운영체제	524
2. SOP 분류, SOP 번호 및 관리	525
제 6 장 실험동물 육종기술 확립	535
제 1 절 서 론	535
제 2 절 재료 및 방법	536
1. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 대량 육종기술 확립(II)	536
2. Nude mouse의 육종기술 확립	538
3. 새로운 질환모델 동물의 확립과 연구	543
제 3 절 결 과	547
1. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 대량 육종기술 확립(II)	547
2. Nude mouse의 육종기술 확립	553
3. 새로운 질환모델 동물의 확립과 연구	570
제 4 절 고찰 및 결론	572
1. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 대량 육종기술 확립(II)	572
2. Nude mouse의 육종기술 확립	572
3. 새로운 질환모델 동물의 확립과 연구	576
제 5 절 참고문헌	580
제 7 장 국제공동(SRI)과제 보고서	586
제 1 절 서 론	586
제 2 절 위탁과제 내용	587
제 3 절 결 론	600

제 8 장 위탁과제 보고서	601
1. 새로운 면역독성 평가방법의 개발	602
2. 발암성 물질에 대한 분자유전학적 독성평가방법의 확립	630
3. 분산계를 이용한 난용성약물의 가용화기술 확립	716

그림 목 차

Fig. 2-1-1. The setting of needle catheter, syringe and tubings	96
Fig. 2-1-2. A rat in a polycarbonate cage connected to the infusion assembly	96
Fig. 2-2-1. Linearity for the standard K-585 spiked in the plasma by HPLC analysis	163
Fig. 2-2-2. Stability of K-585 under the various conditions	164
Fig. 2-2-3. Retention and peak response characteristics of K-585 on the HPLC chromatogram at various pHs of buffer or at various ACN fractions in the mobile phase	166
Fig. 2-2-4. Plasma time <i>vs</i> concentration curves of K-585 after a single oral administration to the rats at various doses	167
Fig. 2-2-5. Nonlinear toxicokinetics for the $AUC_{0-120min}$ of K-585 after the oral at various doses in the rats	168
Fig. 2-2-6. Nonlinear kinetics for the CL_{app}^{-1} of K-585 after the oral at various doses in the rats	169
Fig. 2-2-7. Steady-state kinetics for initial repeated dosing and serum concentration curves of K-585 after the oral 3 month-repeated administration of K-580 to the rats	170
Fig. 2-2-8. Time course of LGC-40863 plasma concentration after a single intravenous dose of 100 mg/kg to female rats	171
Fig. 2-2-9. Cumulative excretion of total radioactivity in the urine and feces after a single oral administration of LGC-40863 at doses of 500 and 2000 mg/kg spiked with [^{14}C]LGC-40863 (200 Ci/kg) to female rats	172
Fig. 2-3-1. Scheme of rat spermatogenesis	204
Fig. 2-3-2. Photomicroscopic finding of the testis shows severe atrophy comparing with normal(N)	205

Fig. 2-3-3. Photomicroscopic finding of the epididymis shows severe atrophy comparing with normal(N)	205
Fig. 2-3-4. Normal seminiferous tubule in stage I	206
Fig. 2-3-5. a,b; seminiferous tubules in stage I have degenerating spermatogonia(↑)	206
Fig. 2-3-6. Normal seminiferous tubule in stage VII	207
Fig. 2-3-7. Seminiferous tubule in stage VII shows depletion of preleptotene spermatocytes	207
Fig. 2-3-8. Normal seminiferous tubule in stage X	208
Fig. 2-3-9. a; seminiferous tubules in various stages show depletion of spermatogonia and early spermatocytes, and spermatid retention in stage IX	208
Fig. 2-3-10. Seminiferous tubule in stage VII shows complete delpletion of spermatocytes	209
Fig. 2-3-11. Seminiferous tubule shows delpletion of spermatocytes and round spermatid and regenerating spermatogonia	209
Fig. 2-3-12. Epididymal tubules show oligospermia or aspermia	210
Fig. 2-3-13. Seminiferous tubules show complete delpletion(*) or regeneration(↑) of germ cells	210
Fig. 2-3-14. Seminiferous tubules show complete depletion of germ cells and Leydig cell hyperplasia	211
Fig. 2-3-15. Seminiferous tubule shows regeneration of germ cells and degenerating multinucleated giant cells(↑)	211
Fig. 2-3-16. Epididymal tubules show oligospermia and exfolated germ cells	212
Fig. 2-3-17. Atrophy and vacuolation of spermatogonia by hypertonic fixative without detachment of spermatocytes, and	

spermatid from the Sertoli cells	212
Fig. 2-3-18. Electron micrograph of normal seminiferous tubule in stage IV	213
Fig. 2-3-19. Electron micrographs of degenerating spermatogonia show extensive heterochromatin, chromatin margination, or pyknosis	213
Fig. 2-3-20. Electron micrograph of interstitium shows normal appearance	214
Fig. 2-3-21. Electron micrograph of interstitium shows normal appearance	214
Fig. 2-3-22. Electron micrograph of severe atrophic seminiferous epithelium	214
Fig. 2-3-23. Lanthanum particle is deposited between the Sertoli cell and spermatogonia(Sg), Sc; Spermatocyte, M; myeloid cell	214
Fig. 2-3-24. Normal seminiferous tubules in various stages. Spermatogonia(arrow head) spermatocytes(↑) show positive reaction for PCNA antibody	215
Fig. 2-3-25. Seminiferous tubules in stages VI-VII show depletion of PCNA positive cells	215
Fig. 2-3-26. Seminiferous tubules in stages XIII and III have PCNA positive cells	216
Fig. 2-3-27. Seminiferous tubules in stages I-III have PCNA positive cells	216
Fig. 2-3-28. Seminiferous tubules show increased PCNA positive cells	217
Fig. 2-3-29. Seminiferous tubules show markedly increased PCNA positive cells	217
Fig. 2-3-30. a; numerous interstitial cells show PCNA antibody positive reaction(↑), Bar=20μm. b,c; high magnification of	

PCNA positive cells	218
Fig 2-3-31. Relative proportions of cells with haploid, diploid and tetraploid states of DNA ploidy in the testicular cell suspensions of the Sprague-Dawley rats treated with 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for once daily 3 consecutive days	219
Fig. 2-3-32. Seminiferous tubules in various stages show depletion of spermatogonia and early spermatocytes or severe exfoliation and degeneration of germ cell, and cytoplasmic vacuolation of Sertoli cells	220
Fig. 2-3-33. Seminiferous tubules show severe degeneration and exfoliation of germ cell, and cytoplasmic vacuolation of Sertoli cells	220
Fig. 2-3-34. Electron micrograph of seminiferous tubule shows degenerating spermatocytes(↑) and Sertoli cell(S)	221
Fig. 2-3-35. Electron micrograph of multinucleated giant cell formed by degenerating spermatids	221
Fig. 2-3-36. Seminiferous tubules show complete depletion of germ cells(*) or degeneration of spermatids(↑), and interstitium shows Leydig cell hyperplasia with eosinophilic materials	222
Fig. 2-3-37. Epididymal tubules show oligospermia and exfoliated germ cells(↑) in lumen	222
Fig 2-3-38. Relative proportions of cells with haploid, diploid and tetraploid states of DNA ploidy in the testicular cell suspensions of the Sprague-Dawley rats treated with 0.5g/kg/day of 2-bromopropane orally for 8 weeks	223
Fig. 2-3-39. Seminiferous tubules show germ cell degeneration, exfoliation, and multinucleated giant cells	224
Fig. 2-3-40. Seminiferous tubule shows severe germ cell degeneration, vacuolation, and exfoliation. Intratesticular injection of 30 μ l 2-bromopropane	224

Fig. 3-1-1. Sample preparation flow chart for GFAP and second-tier assays	238
Fig. 3-1-2. GFAP level in specific regions of male rat brain after intravenous administration of kainic acid(1 mg/kg) determined by Sandwich ELISA	243
Fig. 3-1-3. GFAP level in specific regions of female rat brain after intravenous administration of kainic acid(1 mg/kg) determined by Sandwich ELISA	244
Fig. 3-1-4. GFAP level in specific regions of male rat brain after intravenous administration of kainic acid(0.1 mg/kg) determined by Sandwich ELISA	245
Fig. 3-1-5. GFAP level in specific regions of female rat brain after intravenous administration of kainic acid(0.1 mg/kg) determined by Sandwich ELISA	246
Fig. 3-1-6. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats in Morris water maze test	251
Fig. 3-1-7. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats after first trial session in Morris water maze test	252
Fig. 3-1-8. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats in Morris water maze test	253
Fig. 3-1-9. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats after first trial session in Morris water maze test	254
Fig. 3-1-10. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats in radial 8-arm maze test	255
Fig. 3-1-11. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats in radial 8-arm maze test	256
Fig. 3-2-1. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on hematological parameters in male Sprague Dawley rats	276

Fig. 3-2-2. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on biochemical parameters in male Sprague Dawley rats	277
Fig. 3-2-3. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on T-dependent antibody response in male Sprague Dawley rats	278
Fig. 3-2-4. Flow cytometric analyses of immune cells	279
Fig. 3-2-5. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on splenic lymphocyte subpopulation in male Sprague Dawley rats	280
Fig. 3-2-6. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on thymic lymphocyte subpopulation in male Sprague Dawley rats	281
Fig. 3-2-7. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on splenic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice	286
Fig. 3-2-8. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on splenic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice	287
Fig. 3-2-9. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on thymic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice	288
Fig. 3-2-10. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on histopathology of spleen in female BALB/c mice	289
Fig. 3-2-11. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on histopathology of thymus in female BALB/c mice	291
Fig. 3-2-12. Effects of adrenalectomy (ADX) in ethyl carbamate-induced changes of splenic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice	295
Fig. 3-2-13. Effects of adrenalectomy (ADX) in ethyl carbamate-induced changes of thymic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice	296
Fig. 3-2-14. Effects of sera from ethyl carbamate-treated mice on LPS-induced lymphoproliferation of splenocyte cultures	297
Fig. 3-2-15. Optimization of LPS and ConA mitogenicity using the	

nonradioactive colorimetric lymphoproliferation assay	299
Fig. 3-2-16. An example of LPS and ConA mitogenicity using the nonradioactive colorimetric lymphoproliferation assay	301
Fig. 3-2-17. An example of mixed lymphocyte response using the nonradioactive colorimetric lymphoproliferation assay	302
Fig. 3-2-18. Effect of intravenous and subcutaneous immunization on IgM production in rats	303
Fig. 3-2-19. Effect of intravenous and subcutaneous immunization on IgG production in rats	305
Fig. 3-2-20. RT-PCR amplification of P450 1A2, 2B1, 2B2, 2C6 and NADPH-P450 reductase mRNAs	307
Fig. 3-2-21. Induction of P450 2B by α - and β -ionone in liver microsomes of male Sprague Dawley rats	309
Fig. 3-2-22. An RT-PCR amplification of P450 2B1 mRNAs from rat livers treated with either α - or β -ionone	310
Fig. 3-2-23. Time-course studies of P450 mRNA induction by β -ionone. A) P450 2B1; B) P450 1A2	311
Fig. 3-2-24. Effects of the routes of administration on P450 2B induction by β -ionone	312
Fig. 3-2-25. Sex difference in the induction of P450 2B by α - and β -ionone	313
Fig. 3-2-26. Effects of α - and β -ionone on the expression of P450 1A proteins in male Sprague Dawley rats	314
Fig. 3-2-27. Nomenclature used for lobes of rat liver	315
Fig. 3-2-28. Western immunoblotting for P450 2B protein in rat liver S-9 fractions isolated from livers treated with α - and β -ionone	321
Fig. 3-2-29. Pretreatment of male BALB/c mice with β -ionone	

potentiates thioacetamide-induced elevation of SGPT and SGOT activities	323
Fig. 3-2-30. Liver histopathology. 200X magnification	324
Fig. 3-2-31. Effects of β -ionone on P450 2B1-selective benzyloxyresorufin O-debenzylase (BROD) and pentoxyresorufin O-depentylase (PROD) activities in liver S-9 fractions	326
Fig. 3-4-1. Photograph of a GD 9.5 rat decidua removed from uterus	373
Fig. 3-4-2. Photograph of a GD 9.5 rat conceptus. Reichert's membrane has been torn open. The embryo is in head-fold stage.	373
Fig. 3-4-3. Photograph of a control conceptus, showing normal appearance.	374
Fig. 3-4-4. Photograph of a control embryo, showing no abnormalities	374
Fig. 3-4-5. Photograph of a conceptus treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHT, showing abnormal rotation	375
Fig. 3-4-6. Photograph of a conceptus treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHT, showing altered yolk sac and embryonic circulation	375
Fig. 3-4-7. Photograph of a embryo treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHT, showing growth retardation, abnormal rotation, craniofacial hypoplasia, missing optic vesicle, enlarged cardiac tube, open caudal neuropore, limb bud hypoplasia, and blunted tail	376
Fig. 3-4-8. Photograph of a embryo treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHT, showing growth retardation, abnormal rotation, craniofacial hypoplasia, absence of the second branchial bar, limb bud hypoplasia, enlarged cardiac tube and pericardium, and blunted tail	376
Fig. 4-1-1. Linearity for the standard SA spiked in the plasma by HPLC analysis.	391

Fig. 4-1-2. Serum concentration curves of SA after the oral single administration of K-580 to the beagle dogs	392
Fig. 4-1-3. Serum concentration curves of SA after the oral 3 month-repeated administration of K-580 to the beagle dogs	393
Fig. 4-1-4. Steady-state kinetics of SA after the oral multiple administration of K-580 during a period of 5 days in the beagle dogs	394
Fig. 4-1-5. Toxicokinetic linearity for the AUC_{0-24hr} of SA in the oral single administration and repeated administration of K-580 at the three doses to the beagle dogs	395
Fig. 4-1-6. Toxicokinetic linearity for the C_{max} of SA in the oral single and repeated administration of K-580 to the beagle dogs ...	396
Fig. 4-1-7. Toxicokinetic linearity for the T_{max} of SA in the oral single and repeated administration of K-580 to the beagle dogs ...	397
Fig. 4-1-8. Toxicokinetic linearity for the K_{el} of SA in the oral single and repeated administration of K-580 to the beagle dogs ...	398
Fig. 4-1-9. Toxicokinetic linearity for the $t_{1/2}$ of SA in the oral single and repeated administration of K-580 to the beagle dogs ...	399
Fig. 4-1-10. Toxicokinetic linearity for the $AUC_{0.5day}$ of SA relating to steady-state condition after the oral multiple administration of K-580 at the beagle dogs	400
Fig. 4-3-1. Detection of IgG in sera from male beagle dogs by ELISA	421
Fig. 4-3-2. Detection of IgG in sera from female beagle dogs by ELISA	422
Fig. 5-2-1. Continuous flow system used in this test	431
Fig. 5-2-2. Experimental scheme for this study	443
Fig. 5-3-1. Soil metabolism apparatus	470

Fig. 5-3-2. DAR Autoradiogram of ¹⁴ C-alachlor	473
Fig. 5-3-3. Chemical structure of alachlor, 2-chloro-2',6'- diethylacetamide, 2,6-diethylacetanilide	473
Fig. 5-3-4. Mass spectrum of 2-chloro-2',6'-diethylacetamide	474
Fig. 5-3-5. ¹⁴ CO ₂ evolution rate from ¹⁴ C-alachlor treated soil	474
Fig. 5-3-6. Distribution of radiocarbon in acetone extract and soil	475
Fig. 5-3-7. DAR autoradiograms of alachlor and metabolites	477
Fig. 5-3-8. Degradation rate of ¹⁴ C-alachlor	478
Fig. 5-3-9. Formation of metabolites.	479
Fig. 5-3-10. DAR autoradiogram of ¹⁴ C-Flupyrzofos	491
Fig. 5-3-11. Chemical structure of ¹⁴ C-Flupyrzofos, ¹⁴ C-PTMHP and ¹⁴ C-Flupyrzofos oxon	491
Fig. 5-3-12. Time course of TRR, and radioactivity of extract and residue	496
Fig. 5-3-13. Photodegradation rate of Flupyrzofos	497
Fig. 5-3-14. DAR autoradiogram of solvent extract	498
Fig. 5-3-15. Image autoradiogram of solvent extract	499
Fig. 5-3-16. Time course of Flupyrzofos and metabolites	500
Fig. 5-3-17. Radioactivity absorption pattern for plant parts	501
Fig. 5-3-18. Image autoradiogram of seedlings	502
Fig. 5-3-19. Chemical structure of Flupyrzofos	511
Fig. 5-3-20. Flupyrzofos photodegradation rate by light	515

Fig. 5-3-21. Flupyrazofos degradation rate under dark condition	516
Fig. 5-3-22. Photodegradation of Flupyrazofos under air saturated condition	517
Fig. 5-3-23. Photodegradation of Flupyrazofos under nitrogen saturated condition	518
Fig. 5-4-1. GLP organization of toxicology research center	524
Fig. 5-4-2. Cover page of environmental toxicology research team's SOP	527

표 목 차

Table 1-3-1. Observation of clinical sign on the GLP regulation	25
Table 2-1-1. Mortality of female rats in the 14-day study of K-378	102
Table 2-1-2. Clinical findings of female rats in the 14-day study of K-378	102
Table 2-1-3. Mean body weights of female rats in the 14-day study of K-378	104
Table 2-1-4. Mean food consumption of female rats in the 14-day study of K-378	104
Table 2-1-5. Mean water consumption of female rats in the 14-day study of K-378	105
Table 2-1-6. Hematological values of female rats in the 14-day study of K-378	106
Table 2-1-7. Differential leucocyte count of female rats in the 14-day study of K-378	107
Table 2-1-8. Serum biochemical values of female rats in the 14-day study of K-378	108
Table 2-1-9. Gross findings of female rats in the 14-day study of K-378	110
Table 2-1-10. Absolute organ weights of female rats in the 14-day study of K-378	111
Table 2-1-11. Relative organ weights of female rats in the 14-day study of K-378	113
Table 2-1-12. Histopathological findings of female rats in the 14-day study of K-378	115
Table 2-1-13. Mortality of male rats in the 14-day study of K-566	123

Table 2-1-14. Clinical findings of male rats in the 14-day study of K-566	123
Table 2-1-15. Body weights of male rats in the 14-day study of K-566	126
Table 2-1-16. Food consumption of male rats in the 14-day study of K-566	126
Table 2-1-17. Water consumption of male rats in the 14-day study of K-566	127
Table 2-1-18. Urinalysis of male rats in the 14-day study of K-566	128
Table 2-1-19. Hematological values of male rats in the 14-day study of K-566	130
Table 2-1-20. Differential leucocyte count male rats in the 14-day study of K-566	131
Table 2-1-21. Serum biochemical values of male rats in the 14-day study of K-566	132
Table 2-1-22. Gross findings of male rats in the 14-day study of K-566	133
Table 2-1-23. Absolute organ weights of male rats in the 14-day study of K-566	134
Table 2-1-24. Relative organ weights of male rats in the 14-day study of K-566	136
Table 2-1-25. Histopathological findings of male rats in the 14-day study of K-566	138
Table 2-1-26. Mortality of female rats in the acute toxicity study of K-799	145
Table 2-1-27. Clinical findings of female rats in the acute toxicity study of K-799	146
Table 2-1-28. Incidence of clinical signs of female rats in the acute	

toxicity study of K-799	148
Table 2-1-29. Body weights of female rats in the acute toxicity study of K-799	149
Table 2-1-30. Gross findings of female rats in the acute toxicity study of K-799	151
Table 2-2-1. Findings at cesarean section in dams treated with LGC-40863 during the organogenesis period	159
Table 2-2-2. Pharmacokinetics of LGC-40863 after an intravenous bolus administration of 100 mg/kg to rats	160
Table 3-1-1. GFAP level in specific regions of rat brain as determined by Sandwich ELISA	242
Table 3-1-2. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats	257
Table 3-1-3. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats after first trial session	257
Table 3-1-4. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats	257
Table 3-1-5. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats after first trial session	258
Table 3-1-6. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats	258
Table 3-1-7. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats	259
Table 3-2-1. Testing panels for detecting drug-induced immunotoxicity: a guideline from the Ministry of Health and Welfare, Korea	261
Table 3-2-2. Effects of ethyl carbamate, vinyl carbamate, ethyl N-hydroxycarbamate, and methyl carbamate on the antibody response to lipopolysaccharide in	

splenocyte cultures isolated from female BALB/c mice	283
Table 3-2-3. Effects of ethyl carbamate, methyl carbamate, and ethyl N-hydroxycarbamate on lymphoproliferative responses in splenocyte cultures from BALB/c mice	284
Table 3-2-4. Summary of histopathology in spleen and thymus	293
Table 3-2-5. Effects of β -ionone on liver microsomal monooxygenases in Sprague Dawley rats	306
Table 3-2-6. Effects of α - and β -ionone on ethoxyresorufin O-deethylase in male Sprague Dawley rats	316
Table 3-2-7. Effects of α - and β -ionone on methoxyresorufin O-demethylase in male Sprague Dawley rats	318
Table 3-2-8. Effects of α - and β -ionone on pentoxyresorufin O-depentylase in male Sprague Dawley rats	319
Table 3-2-9. Effects of α - and β -ionone on benzyloxyresorufin O-debenzylase in male Sprague Dawley rats	320
Table 3-2-10. Effects of pretreatment with β -ionone on thioacetamide-induced changes of serum clinical parameters in male BALB/c mice	325
Table 3-3-1. Induction of mutant plaques in livers of male transgenic mice	351
Table 3-3-2. Induction of mutant plaques in kidneys of male transgenic mice	352
Table 3-3-3. Induction of mutant plaques in spleen of male transgenic mice	353
Table 3-3-4. Induction of mutant plaques in livers of male transgenic rats	353
Table 3-4-1. Embryonic growth parameters and morphogenesis of rat whole-embryos grown from GD 9.5 for 48hrs <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	377

Table 3-4-2. Effects of <i>in vitro</i> exposure to PHT on embryonic growth and differentiation of GD 11.5 rat embryos explanted on GD 9.5 and cultured 48 hrs	377
Table 3-4-3. Morphological defects induced by <i>in vitro</i> exposure to PHT in GD 11.5 rat embryos explanted on GD 9.5 and cultured 48 hrs	378
Table 4-3-1. Sensitization of mice for heterologous passive cutaneous anaphylaxis and indirect hemagglutination test	414
Table 4-3-2. Sensitization of guinea pigs for active systemic anaphylaxis and homologous passive cutaneous anaphylaxis	415
Table 4-3-3. Active systemic anaphylaxis in guinea pigs	416
Table 4-3-4. Four-hours passive cutaneous anaphylaxis test in guinea pigs with sera from sensitized guinea pigs	417
Table 4-3-5. 24-hours heterologous passive cutaneous anaphylaxis test in rats with sera from sensitized mice	418
Table 4-3-6. Indirect hemagglutination test with sera isolated from sensitized mice	419
Table 5-2-1. Test conditions	430
Table 5-2-2. Hatching success of the embryo exposed to the various exposure conditions	432
Table 5-2-3. Days to end of hatching of the embryo exposed to the various exposure conditions	434
Table 5-2-4. Post-hatching success of the embryo exposed to the various exposure conditions	435
Table 5-2-5. Times to reach the developmental stage of embryo exposed to different water temperature	436
Table 5-2-6. Water quality used in this test	442

Table 5-2-7. Haematological results of korean catfish(<i>Silurus asotus</i>) following to expose at 1.78 mg/l of cadmium	447
Table 5-2-8. Haematological results of korean catfish(<i>Silurus asotus</i>) following to expose at 0.35 mg/l of cadmium	448
Table 5-2-9. Blood chemistry values of korean catfish, <i>Silurus asotus</i> , exposed to 1.78 mg/l of cadmium	451
Table 5-2-10. Blood chemistry values of korean catfish, <i>Silurus asotus</i> , exposed to 0.35 mg/l of cadmium	453
Table 5-2-11. Histopathological changes of liver, skin, gill, brain, kidney and intestine of korean catfish, <i>Silurus asotus</i> , exposed to 0.35 mg/l and 1.78 mg/l of cadmium	456
Table 5-2-12. Cadmium concentrations in the tissue and water during the test	457
Table 5-3-1. Physicochemical properties of the test soil	468
Table 5-3-2. Total ¹⁴ C material balance from a ¹⁴ C-alachlor treated soil	476
Table 5-3-3. Recovery of radiochemicals from plant	495
Table 5-3-4. TRR, and radioactivity of extract and residue	497
Table 5-3-5. Relative % of absorbed radioactivity	501
Table 5-3-6. Flupyrzofos recovery	514
Table 5-3-7. Rate constant and half-life of Flupyrzofos	519
Table 5-3-8. Photo bleaching of SHW	520
Table 5-4-1. Kinds of SOP regarding environmental toxicity testing, classification code	526
Table 6-2-1. The list of microorganisms for microbiological monitoring	536

Table 6-2-2. Chemical composition of diet	540
Table 6-2-3. Formula and composition of diet	541
Table 6-3-1. The results of microbiological monitoring of animals in SPF condition	548
Table 6-3-2. Results of microbiology monitoring of animal rooms	549
Table 6-3-3. Results of microbiology monitoring of animal rooms (falling microbes)	549
Table 6-3-4. Results of microbiology monitoring of animal rooms (Smear test)	549
Table 6-3-5. Microbiology test of diet	550
Table 6-3-6. Environmental control of animal rooms	550
Table 6-3-7. Reproductive performance of rats and mice	551
Table 6-3-8. The number of animals distributed	551
Table 6-3-9. The list of institutes using KRICT animals and the strains	552
Table 6-3-10. Changes of body weight in nude and BALB/c Mice with age (unit : g)	553
Table 6-3-11. Changes of organ weight in Nude and BALB/c male mice with age. (Unit : g)	555
Table 6-3-12. Changes of organ weight in Nude and BALB/c female mouse with age. (Unit : g)	556
Table 6-3-13. Abbreviations, units and analysis methods of the hematology	557
Table 6-3-14. Changes of blood hematology in Nude and BALB/c male mice with age	558
Table 6-3-15. Changes of blood hematology in nude and BALB/c	

female mice with age	559
Table 6-3-16. WBC differential counts in nude and BALB/c male mice with age	560
Table 6-3-17. WBC differential counts in nude female mice with age	561
Table 6-3-18. Abbreviations, units and analysis methods of the biochemistry	562
Table 6-3-19. Changes of biochemistry in nude and BALB/c male mice with age	563
Table 6-3-20. Changes of biochemistry in Nude and BALB/c female mice with age	564
Table 6-3-21. Urinalysis in Nude and BALB/c male mice with age	566
Table 6-3-22. Urinalysis in Nude and BALB/c female mice with ages	567
Table 6-3-23 Comparison of spleen B & T-cell in nude and BALB/c mice	568
Table 6-3-24. Reproductive performance in BALB/c, BALB/c nu/+, and Nude mice	569

제 1 장 OECD GLP 운영을 위한 체계 확립

제 1 절 서 론

OECD(Organization for Economic Cooperation and Development ; 경제개발협력 기구) GLP(Good Laboratory Practices ; 안전성시험관리기준)는 주로 새로이 개발되거나 기존에 개발된 화학물질(의약품, 농약, 화합물등)이 인체 및 환경에 미치는 안전성을 확보하기 위하여 실시되는, 비임상독성시험에 사용되는 장비의 운용, 시험계획 및 실시, 시험물질 및 대조물질의 조작, 시험의 작업사항을 조직적으로 체계있게 관리하는 기준이다. GLP 기준이 요구하는 목적은 높은 수준의 독성자료 작성을 촉진하는 것에 있다. 이는 각국간에 상호 비교할 수 있는 수준의 독성시험자료는 각국간의 해당자료의 상호 인정을 위한 기초가 되기 때문이다. 어느 국가가 다른 나라에서 작성되었던 독성시험자료를 신뢰할 수 있다면 시험의 반복실시를 피할 수 있고, 비용이나 시간을 절약할 수 있다. 국가들간에 이들 원칙이 적용되면 무역상의 기술적 장해를 제거할 수 있게 되고 나아가 인간의 건강과 환경보호개선에 도움이 될 것이다. 따라서 위와 같은 상황에서 우리나라가 OECD에 가입됨에 따라 본 연구센터는 현재 실시중인 KGLP(한국 GLP)에 부가하여 OECD GLP화를 구축하기 위하여 OECD GLP 체제를 체계적으로 연구하고자 하였다. 이에 연구항목으로는 (1) OECD GLP 체제분석, (2) 단기 독성시험에서의 OECD GLP 도입 및 SOP 확립 및 (3) 독성시험수행의 전산처리에 대한 OECD GLP 적용 및 SOP 확립의 분야이었다.

제 2 절 OECD GLP 체제분석

OECD GLP 체제분석을 위하여 우선 본 센터내 신뢰성보증부서(QAU ; Quality Assurance Unit)가 OECD 사무국 및 OECD 회원국들의 GLP 체제 과정을 연구하

였다. 그 방법으로는 프랑스의 파리에 있는 OECD의 Environmental Health and Safety Division에서 새로이 간행한 GLP Consensus Documents의 최신 개정안(1997년 1월 6일)과 이를 근거하여 일본정부(후생성)가 조치한 GLP 개정 작업내용을 입수해서 번역하여 아래에 첨부(첨부자료 1-1)하였고, 또한 이를 관련 정부기관(보건복지부, 환경부 등)의 관계자에게 통보하여 한국 GLP 기준의 개정시 반영토록 노력하였다. 아울러 본 센터내 GLP 관련 직원들에 대한 교육을 실시하여 새롭게 변경된 GLP 기준의 내용을 전파하였다. 또한 OECD 및 일본 후생성에서 간행한 이들 GLP 기준을 본 센터내 GLP에 접목시키기 위한 SOP 개정작업 등을 1년여의 기간에 걸쳐 실시하였다. 그 작업중 한 예를 들면 새롭게 정의된 OECD 및 일본 후생성의 GLP 용어를 국문으로 문서화하는 작업이었다.

결론적으로 금번 OECD GLP 체계분석을 통하여 이를 본 안전성연구센터내 GLP 기준에 접목시키므로써 본 연구센터의 독성시험자료가 OECD 회원국 내에서 통용될 수 있는 국제적 조화를 도모하기 위함이다.

첨부자료 1-1. OECD-GLP 기준

제 1 장 서 문

머릿말

1. 범위

2. 용어의 정의

2.1. 안전성 시험 관리 기준(GLP)

2.2. 시험시설의 조직에 관련된 용어

2.3. 인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 비임상 시험에 관련된 용어

2.4. 시험물질에 관련된 용어

제 2 장 GLP 기준

1. 시험시설의 조직과 직원

1.1. 시험시설 운영책임자의 직무

1.2. 시험책임자의 직무

1.3. 주임연구자의 직무

1.4. 시험종사원의 직무

2. 신뢰성 보증 프로그램

2.1. 총론

2.2. 신뢰성 보증 직원의 직무

3. 시험단계

3.1. 총론

3.2. 시험계의 시설

3.3. 시험물질 및 대조물질의 취급 시설

3.4. 자료보관시설

3.5. 폐기물 처리

4. 기기, 재료, 시약

5. 시험계

- 5.1. 물리적 화학적 시험계
- 5.2. 생물학적 시험계
- 6. 시험물질 및 대조물질
 - 6.1. 수령, 취급, 표본 추출 및 보관
 - 6.2. 특성
- 7. 표준작업지침서
- 8. 시험의 실시
 - 8.1. 시험계획서
 - 8.2. 시험계획서의 내용
 - 8.3. 시험의 실시
- 9. 시험결과의 보고
 - 9.1. 총론
 - 9.2. 최종보고서의 내용
- 10. 기록과 시험기초자료의 보관과 보존

제 1 장 서 문

머릿말

정부와 기업은, 위해성 평가의 기초가 되는 인간의 건강과 환경에의 영향을 조사하는 비임상 시험의 질 향상에 관심을 두게 되었다. 그 결과, OECD 회원국에서는, 이러한 시험 실시를 위한 기준을 확립하고 있다.

화학물질의 국제무역을 방해하는 서로 다른 기준의 시행을 피하기 위하여 OECD 회원국은, 시험방법과 시험실시 기준의 국제적 조화를 위한 특별한 회의를 가져야 한다는 인식을 갖고 있었다. 1979년과 1980년에, 화학물질 규제에 관련된 특별계획 아래 설치되었던 국제적 전문가 그룹은, 여러 가지의 국내적 및 국제적 자료부터 공통의 운영과 과학 기술, 경험을 기초으로 하여, 「OECD 안전성 시험관리 기준(GLP)」을 정리하였다. GLP 기준은, 화학물질 평가 데이터 수입시의 합의에 관련한 이사회 결의 [C(81)30(Final)]의 첨부서류(ANNEX)로서, 1981년, OECD 이사회에서 채택되었다.

1995년과 1996년에, 이 원칙을 개정하기 위하여, 새로운 전문가 그룹이 결성되었으며, 이 책자는 위 그룹에서 도출된 결과로서, 1981년에 채택됐었던 원래의 원칙을 파기하고, 이로서 대체된 것이다.

GLP 기준의 목적은, 높은 수준의 데이터 작성을 촉진하는 것에 있다. 상호 비교할 수 있는 수준의 시험 데이터는, 각국간의 데이터의 상호 인정을 위한 기초가 된다.

각국이 다른 나라에서 작성되었던 데이터를 신뢰할 수 있다면, 시험의 반복 실시를 피할 수 있고, 비용이나 시간을 절약할 수 있다. 이들 원칙의 적용은 무역상의 기술적 장해를 제거할 수 있게 하고, 나아가 인간의 건강과 환경 보호 개선에 도움이 될 것이다.

1. 범 위

의약품(의료용 기구를 포함), 농약, 화장품, 동물용 의약품, 최초 식품첨가물, 사료첨가물, 공업용 화학물질 등을 포함하는 시험물질의 비임상적 안전성 시험에, 이러한 GLP 기준이 적용된다. 이러한 시험물질의 대부분은 합성 화학

물질일 것 같지만, 자연계의 것이나 생물 유래의 것, 나아가, 경우에 따라서는 생물 그 자체일 때도 있다. 이들의 시험물질을 시험하는 목적은, 인간의 건강과 환경에 대한 이들의 성질이나 안전성에 관련한 각종 데이터를 얻기 위함이다.

GLP 기준이 적용되는 인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 비임상 시험에서는, 실험실 내 만이 아니라, 온실이나 포장에서 행해지는 시험도 포함된다.

자국에서의 법률에 따라 특별히 면제되고 있지 않는 한, 의약품(의료용 기구를 포함), 농약, 식품첨가물, 사료첨가물, 화장품, 동물용 의약품, 최초 관련 물질의 등록이나 허가용에, 또한 공업용 화학물질의 규제용에, 법률로 요구되고 있는 인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 모든 비임상 시험에 대하여 이 GLP 기준이 적용된다.

2. 용어의 정의

2.1. 안전성 시험관리 기준(GLP)

(1) 「GLP」란 인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 비임상 시험이 계획되고, 실시되며, 점검되고, 기록되며, 자료가 보관되고, 보고되는 시설에서의 조직적인 조치 및 그 상황에 관련된 뛰어난 시스템이다.

2.2. 시험시설의 조직에 관계하는 용어

(1) 「시험시설」이란 인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 비임상시험을 실시하는데 필요한 사람, 건물, 조작 구역을 의미한다. 2개소 이상의 여러 지점에서 행해지는 시험(다지점 시험)에서의 시험시설은, 시험책임자가 있는 지점과 모든 개개인의 시험지점으로서 구성된다. 그들은, 각기 혹은 집약적으로 시험시설이라고 간주하는 것도 가능하다.

(2) 「시험지점」이란 시험의 어떤 단계가 실시되는 장소를 의미한다.

(3) 「운영책임자」란 이 GLP 기준에 따르는 시험시설의 조직 및 기능에 대한 권한 및 정식적인 책무를 가진 사람을 의미한다.

(4) 「시험지점책임자」(만약, 임명된다면)이란 자신이 책임을 갖는 시험의 어

면 단계가 이 GLP 기준에 따라 실시되고 있다는 하는 것을 보증할 책임을 갖고 있는 사람이다.

(5) 「시험책임자」란 인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 비임상시험 실시의 전반에 책임을 갖는 개인을 말한다.

(6) 「주임연구자(Principal Investigator, PI)」란 여러 지점에서 행해지는 시험에 있어서, 시험책임자의 대리로서, 시험의 위임된 단계에 대한 기술적 책임을 가지는 개인이다. 시험실시에 대한 시험책임자의 전체적 총괄 책무를 위임하는 것은 아니지만 시험계획서 및 그 수정의 승인, 최종보고서의 승인 및 적용 가능한 모든 GLP 기준에 따른다는 것을 보증함이 그의 책임이다.

(7) 「신뢰성 보증 프로그램」이란 시험실시에 관여 하지 않고, 시험이 GLP 기준을 준수하고 있는 것을 운영책자에게 대하여 보증하기 위해서 마련되었으며, 직원을 포함한 명확한 제도이다.

(8) 「표준작업지침서(SOP)」란 시험계획서나 시험 지침에 상세하게 기록되고 있지 않는 검사나 조작의 통상 실시 방법을 기록하여 문서화 하였던 수순이다.

(9) 「시험의뢰자」란 인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 비임상시험을 위탁하고, 또는 지원하는 실존체제를 말한다.

(10) 「시험일정총괄표」란 시험시설에서 행해지는 시험의 일람 및 작업량 평가를 위한 정보 편집물을 말한다.

2.3 인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 비임상 시험에 관계하는 용어

(1) 「인간의 건강과 환경에서의 영향을 조사하는 비임상 시험(이후로는 간단히 시험이라고만 말하겠음)」이란 관련된 규제 당국에게 제출을 의도하여 시험물질의 특성 혹은 그 안전성에 관계하는 데이터를 얻기 위한 실내 조건 아래나 혹은 환경 조건 아래에서의 실험 또는 일련의 실험을 말한다.

(2) 「시험계획서」란 시험목적이나 시험실시용의 실험계획을 규정하는 문서를 말하며, 모든 변경도 포함할 수 있다.

(3) 「시험계」란 시험에 이용되는 생물적, 화학적 또는 물리체계 혹은 그들이 조합된 계통을 말한다.

(4) 「시험기초자료」란 시험의 관찰이나 업무에 관련된 모든 시험시설의 원래

기록, 문서 또는 그들의 정확한 복사를 말한다. 또, 시험기초자료에는, 예를 들면, 사진, 마이크로필름, 마이크로피시 카피, 컴퓨터로 읽어서 이해 가능한 매체, 관찰 결과를 구술하여 받아들여졌던 것, 자동 기기부터의 출력 데이터 또는 정보를 항구적이고 동시에 확실하게 보관하고 있다고 인정받고 있는 기타의 매체가 포함되고 있다.

(5) 「검체」란 검사나 분석 또는 보관을 위해 시험계로 부터 얻어진 것을 말한다.

(6) 「실험개시일」이란 처음으로 시험 특유의 데이터가 수집되었던 날을 의미한다.

(7) 「실험종료일」이란 시험부터 데이터가 직접 수집되었던 최후의 날을 의미한다.

(8) 「시험개시일」이란 시험책임자가 시험계획서에 서명 했었던 날을 의미한다.

(9) 「시험종료일」이란 시험책임자가 최종보고서에 서명 했었던 날을 의미한다.

(10) 「시험계획서의 변경」이란 의도적으로 행한 시험계획서의 변경을 의미한다.

(11) 「시험계획서의 이탈」이란 시험계획서의 의도적이지 않는 변경을 의미한다.

(12) 「단기간 시험」이란 널리 이용하고 있는 범용의 기술을 이용했었던 단기간의 시험을 의미한다.

2.4. 시험물질에 관련된 용어

(1) 「시험물질」이란 시험에 제공된 물질을 말한다.

(2) 「대조물질」이란 시험물질과 비교하기 위한 목적으로 이용되어지는 모든 재료를 말한다.

(3) 「Batch」란 균질성을 갖도록 설계, 계획되었던 일정의 제조 사이클로 만들어진 시험물질, 대조물질의 특정의 양 또는 로트를 말한다.

(4) 「부형제」란 시험계의 시험물질 또는 대조물질의 적용을 용이하게 하기

위하여, 혼합, 분산, 용해를 시키기 위한 목적으로 이용되는 물질을 말한다.

제 2 장 GLP 기준

1. 시험시설의 조직과 직원

1.1. 시험시설 운영책임자의 직무

(1) 각 운영책임자는 GLP 기준이 시험시설 내에서 적용되고 있는 지를 확인해야 한다.

(2) 최소한, 아래의 사항을 실행해야 한다.

(a) GLP 기준의 규정에 의하여 운영 관리의 책무를 다하고 있는 개인이 시험시설 내에 있었다고 하는 것을 보여 주는 진술서가 존재함을 보증.

(b) 충분한 수의 유능한 직원과 적절한 시설, 장치 및 자재를 이용할 수 있는 것을 확인.

(c) 각각의 전문 연구자 및 기술원에 관련된 자격, 훈련, 경험, 직무분담의 기록 보관.

(d) 시험종사원이 본인이 실시해야 하는 직무를 명확히 이해하고 있는지를 확인하고, 필요에 따라 이들의 직무에 관련된 훈련을 부여할 것.

(e) 적절하며 동시에 기술적인 뒷받침의 어떤 표준 작업지침서(SOP)가 정해지며, 준수되고 있는 것을 확인. 또한, 모든 SOP의 원본과 개정을 승인.

(f) 신뢰성 보증 프로그램의 존재와 그에 대한 직원이 지명되고 있는지를 확인 및 신뢰성 보증의 책무가 GLP 기준에 따라 실시되고 있는 것의 보증

(g) 시험책임자에 의해 시험계획서의 승인이 기록되고 있는지를 확인.

(h) 시험책임자가 승인한 시험계획서를 신뢰성보증담당자가 이용할 수 있도록 하고 있는 지를 확인.

(i) 종래부터 이용되어 왔던 일련의 SOP의 보관.

(j) 각 시험을 실시하기 전에, 적절한 자격, 훈련, 경험을 갖는 개인이 시험책임자로서, 또한 필요하면 주임연구자도, 임명되고 있는 지를 확인.

(k) 여러 지점에서 행하여지는 시험에 있어서, 주임연구자가 위임받은 단

계를 감독하기 위하여 적절하게 훈련받고, 자격, 경험을 가진 것인지의 확인.
시험책임자내지 주임연구자의 변경은, 규정된 순서에 따라 행하여야 하며, 그 기록은 문서화 되어야 한다.

(l) 자료보관 시설관리를 위한, 특정의 책임자가 정해지고 있는지를 확인
(m) 시험일정총괄표의 보관, 유지의 확인.

(n) 시험시설에 공급되어진 것이, 시험으로의 적절한 사용에 합치되고 있는 지를 확인.

(o) 여러 지점에서 행해지는 시험에 있어서는, 시험책임자, 주임연구자, 신뢰성 보증 프로그램, 시험담당자의 사이에 명확한 연락망이 있는지를 확인.

(p) 시험물질과 대조물질의 적절한 특성이 유지되고 있는지를 확인

(q) 컴퓨터 시스템이 목적에 합치하며, GLP 기준에 따라 개발되고, 검증되며, 조작되고, 보수되고 있는 지를 확인하기 위한 순서를 정할 것.

(3) 시험의 어떤 단계가 어떤 시험지점에서 행해질 때에는, 시험지점책임자 (혹시 임명되고 있다면)는, 1.1. (2)의 중 (g) (h) (j) (o)을 제외한 모든 것에 대한 책임을 진다.

1.2. 시험책임자의 직무

(1) 시험책임자는 유일한 시험관리자로서, 그 시험의 전반적인 실시와 최종보고서에 책임을 가진다.

(2) 이들의 책임에는 아래의 것이 포함되지만, 그것에 한정되는 것은 아니다.

(a) 시험계획서및 그 수정서에 서명하고, 날짜를 기입하여 승인.

(b) 신뢰성 보증 담당자가 제때 시험계획서와 그 수정서의 사본을 갖고 있는 지의 확인 및 신뢰성 보증 프로그램의 시험 진행중의 요구에 대처하여 효과적인 연락을 갖는 것.

(c) 시험계획서와 그 수정서 및 SOP가 시험담당자에게 이용될 수 있게 되어 있는 지를 확인.

(d) 시험실시상의 주임연구자의 관계가, 시험계획서로 정의되고, 명확히 되고 있는 지를 확인.

(e) 시험계획서로 규정된 방법이 준수되고 있는 지를 확인, 또, 시험의 신

뢰성과 완전성에 관계되는 시험계획서로부터의 이탈이 주는 영향을 평가, 기록하고, 필요에 따라서 적절한 개정 작업을 하는 것 및 시험 실시중에 SOP로부터의 이탈을 인지할 것.

(f) 얻을 수 있었던 모든 시험기초 자료가 문서화되며, 기록되고 있는지를 확인.

(g) 데이터의 정당성에 대한 책임을 인정하기 위하여 또는 그들이 GLP 기준을 따르고 있는 지를 입증하기 위하여, 최종보고서에 서명하고 날짜를 기입할 것.

(h) 시험완료 후(종료 후도 포함), 시험계획서, 최종보고서, 시험기초자료, 기타 시험부터 얻을 수 있었던 것들이 자료보관 시설로 이관되고 있는 지를 확인.

(i) 시험에 이용하였던 컴퓨터 시스템의 검증이 실시되고 있는지를 확인.

1.3. 주임연구자의 직무

주임연구자는, 위임받은 시험의 단계가 GLP 기준에 따라 실시되고 있는 지를 확인함.

1.4. 시험종사원의 직무

(1) 시험의 실시에 관련된 모든 시험종사원은 해당 GLP 기준의 조항을 숙지하고 있어야 한다.

(2) 시험종사원은 시험계획서와 시험실시상에 관련되는 SOP을 입수 하고 이들의 서류에 기록된 지시에 따라야 한다. 그들의 지시와 다른 이탈에 관해서는 문서로 기록하고, 시험책임자 및 혹시 임명되어 있으면 주임연구자에게 직접 연락해야 한다.

(3) 모든 시험종사원은 시험기초자료를 GLP 원칙에 따라 신속하고 동시에 정확하게 기록해야 하며, 또한, 그 시험기초자료의 신뢰성에 책임을 진다.

(4) 시험종사원은 자기 자신이 받는 위험성을 최소화 하고 시험의 완전성을 확보하기 위하여, 건강에 충분히 주의해야 한다. 시험에 영향이 우려되는 작업으로부터 제외될 수 있도록 자신의 건강상, 의학상의 상태를 잘 알고있는 적절한 사람과 연락을 취해야 한다.

2. 신뢰성 보증 프로그램

2.1. 총론

(1) 시험시설은, GLP 기준에 따라 시험이 실시된다는 것을 보증하기 위하여 문서화 한 신뢰성 보증 프로그램을 가져야 한다.

(2) 신뢰성 보증 프로그램은, 그 시험의 방법에 익숙한 사람중에서 운영책임자에 따라 지정되고, 운영책임자에 대한 책임을 갖는 개인 또는 복수의 사람에 의하여 실시되어야 한다.

(3) 위의 사람은, 보증해야 할 시험의 실시에 참가하여서는 안된다.

2.2. 신뢰성보증직원의 직무

(1) 신뢰성보증직원의 책임에는 아래의 것이 포함되지만, 그것에 한정되는 것은 아니다.

(a) 시험시설에서 사용되고 있는 승인된 시험계획서와 SOP의 모든 사본을 보관, 유지하고, 최신의 시험일정총괄표의 사본을 입수할 것.

(b) GLP 기준을 준수하기 위해서 필요한 내용이 시험계획서에 포함되고 있는지를 확인할 것. 이 확인은 문서화 되어야 한다.

(c) 모든 시험이 GLP 기준을 준수하여 행하여지고 있는지를 확인하기 위해서 사찰을 실시할 것. 사찰에 따라, 시험계획서와 SOP가 시험실시 직원에게 이용 가능하고, 또 그것이 준수되고 있는지를 확인한다. 사찰은 신뢰성 보증 프로그램의 SOP로 다음의 세개의 타입으로 분류할 수 있다.

- 시험베이스(base)의 사찰
- 시설베이스의 사찰
- 시험실시 단계 베이스의 사찰

이러한 사찰의 기록은 보관되어야 한다.

(d) 사용 방법, 조작이나 관찰결과가 정확히 기술되고 있는 지, 보고되었던 결과가 시험의 시험기초자료 데이터를 정확히 반영하고 있는지를 확인하기 위하여, 최종보고서를 정밀히 심사할 것.

(e) 얻을 수 있는 소견은 문서로서 운영책임자와 시험책임자에게 신속하게 보고할 것. 또, 임명되어 있다면, 주임연구자 및 시험지점책임자에게도 보고할

것.

(f) 사찰을 하였던 날짜, 사찰의 타입 및 운영책임자와 시험책임자에게 결과물을 보고하였던 날짜를 기입한 최종보고서에 포함된 진술서를 작성하고, 서명할 것. 이 진술서는 또한, 최종보고서가 시험기초자료를 반영하고 있는 것을 확인하게 한다.

3. 시 설

3.1. 총 론

(1) 시험시설은, 시험의 신뢰성을 손상하는 장애를 최소화하여 시험에 적합하도록, 적절한 크기, 구조 및 배치를 갖고 있어야 한다.

(2) 다른 업무에 관하여는 각각의 시험이 적절하게 실시될 수 있도록, 적절히 분리를 한 시험시설의 설계가 이루어져야 한다.

3.2. 시험계의 시설

(1) 시험시설은, 유해성이 알려지거나 또는 의심되는 물질이나 생물을 포함하여, 개개의 시험계 및 프로젝트의 분리를 확보하기 위해서 충분한 수의 방 또는 구역을 갖추어야 한다.

(2) 시험계에 용인하기 어려운 장애가 미치는 것을 막기 위하여, 질병의 진단, 치료, 제어를 위한 적절한 방 또는 구역이 이용 가능해야 한다.

(3) 보급품이나 기기를 위하여 필요한 보관실이나 보관구역이 있을 것. 보관실이나 보관구역은 시험계 수용실 또는 구역으로부터 격리되고, 감염, 오염 및 품질 저하로부터 적절하게 보호되어야 한다.

3.3. 시험물질 및 대조물질의 취급 시설

(1) 오염 또는 혼동을 피하기 위하여, 시험물질과 대조물질의 입수와 보관 및 부형제와 시험물질의 혼합을 위한 분리된 방 또는 구역을 마련해야 한다.

(2) 시험물질의 보관실 또는 구역은 시험계를 수용하고 있는 방 또는 구역으로부터 분리되지 않으면 안된다. 또한, 그 동일성, 농도, 순도, 안정성을 갖기에 적당해야 하며, 유해성 물질의 안전한 보관이 확보되어야 한다.

3.4. 자료보관시설

(1) 시험기초자료, 보고서, 시험물질 및 대조물질의 시료, 표본의 보관과 검색용의 보관 시설을 갖추어야 한다.

3.5. 폐기물 처리

(1) 폐기물의 취급과 처리는, 시험의 완전성을 해치지 않도록 실시되어야 하며, 여기에는 적절한 수집, 보관, 처리시설, 오염제거, 운반법을 포함한다.

4. 기기, 재료, 시약

(1) 입증된 컴퓨터 시스템을 포함하여, 데이터의 작성, 보관, 수정을 위한 기기나 시험의 환경조건 제어장치는 적절하게 배치되고, 적절한 설계와 충분한 처리능력을 갖추어야 한다.

(2) 시험에 이용되는 기기는, SOP에 따라 정기적으로 검사, 청소, 보수, 교정되어야 한다. 또한 이들의 작업의 기록은 보관되어야 한다. 교정은 필요에 따라, 국내 또는 국제적인 표준에 따라야 한다.

(3) 시험에 이용되어지는 기기와 재료는 시험계에 악영향을 주는 것이어서는 안된다.

(4) 화학물질, 시약, 용액은 라벨을 붙이고, 식별(필요하다면 농도등에 따라) 유효기한, 특정의 보관 조건을 명시할 것. 입수원, 조제일, 안정성에 관련된 정보도 이용할 수 있도록 해야 한다. 유효 기한은, 문서화한 평가내지, 분석에 근거하여 연장하여도 좋다.

5. 시험계

5.1. 물리적 화학적 시험계

(1) 물리적 화학적 데이터 작성을 위하여 사용되는 기기는 적절하게 배치되고, 적절한 설계와 충분한 처리능력을 갖추어야 한다.

(2) 물리적 화학적 시험계의 완전성이 확보되어야만 한다.

5.2. 생물학적 시험계

(1) 데이터의 우량성을 확보하기 위해서, 생물시험계를 수납하고, 취급하며 사육하는데 적절한 조건이 정해지고, 또한 유지되어야 한다.

(2) 새롭게 도입되었던 동물 및 식물의 시험계는, 그들의 건강 상태가 확인될 때까지는 격리되어야 한다. 만약 예측치 못한 사망이나 질병이 발생된 경우에는, 이 로트는 시험에 사용 하지 않고, 즉시, 인도적으로 처분해야 한다. 실험 개시일에, 시험계가 시험의 목적내지 실시에 지장을 초래할 것 같은 질병 또는 상태에 있으면 안된다. 시험 진행중에 발병하거나, 장애를 받았던 시험계는 시험의 완전성을 유지하는데 필요할 시, 격리내지 치료하여야 한다.

(3) 시험계의 입수원, 도착 날짜, 도착시의 상태 등은 기록되어 보관되어야 한다.

(4) 생물시험계는, 실험개시전의 적당한 기간, 시험 환경에 순화되어야 한다.

(5) 시험계의 적절한 식별에 필요한 정보는, 모두 그 수납 장소나 용기에 명기하여야 한다. 시험실시중, 수납·사육 장소나 용기부터 나온 개개의 시험계는 가능한 한 적절한 식별이 이루어져야 한다.

(6) 시험계의 수납·사육 장소나 용기는 적절한 간격으로 청소·소독되어야 한다. 시험계와 접촉한 자재는, 혼입물이 시험에 영향을 주는 수준이 아니어야 한다. 깔집등은 확실한 근거에 기초하여 적절한 빈도로 교환하여야 하고, 살충제 등을 사용할 경우는 기록을 남겨 두어야 한다.

(7) 포장시험으로 사용하는 시험계는, 분무기의 흐름이나 과거에 사용하였던 농약의 영향을 회피할 수 있도록 설치되어야 한다.

6. 시험물질 및 대조물질

6.1. 영수, 취급, 표본 추출 및 보관

(1) 시험물질 및 대조물질의 특성, 수령 날짜, 유효 기한, 수령한 양과 시험에 이용했던 양은 기록되어 보관되어야 한다.

(2) 균일성과 안정성을 가능한 한 확보하기 위하여 또는 오염이나 혼동을 막기위하여, 취급, 표본 추출, 보관의 방법이 확립되어 있어야 한다.

(3) 보관용기에는 식별에 관계된 정보, 가장 짧은 사용 기한의 날짜, 특정의 보관 조건을 기재할 것

6.2. 특성

(1) 각 시험물질 및 대조물질은 적절하게 식별되어야 한다(예를 들면 코드나 CAS 번호(Chemical Abstracts Service Registry Number), 명칭, 생물학적 패러미터).

(2) 각 시험에 있어서 시험물질 또는 대조물질의 각 패치를 적정히 판별할 수 있도록, 패치 번호, 순도, 조성, 농도, 다른 특성을 포함한 식별이 명확히 이루어져야 한다.

(3) 각종 보관조건 아래서의 시험물질 및 대조물질의 안정성이, 모든 시험에서 명확히 되고 있어야 한다.

(4) 정해진 시험조건 아래서의 시험물질 및 대조물질의 안정성이 모든 시험에서 명확히 되어야 한다.

(5) 시험물질이 부형제와 함께 투여 또는 적용되는 경우에는, 그 부형제 중의 시험물질의 균일성, 농도와 안정성이 확인되어야 한다. 포장시험에 이용되는 시험물질(예를 들면 탱크 믹스)은, 별도의 연구실에서의 실험에 의하여 확인하게 된다.

(6) 단기간 시험을 제외한 모든 시험에 있어서, 시험물질의 각 패치로부터 분석용 샘플을 보관하여야 한다.

7. 표준작업지침서 (SOP)

7.1. 시험시설은 그 시험시설에서 획득할 수 있는 자료의 우량성과 완전성을 확보하기 위하여, 시험시설 운영책임자에 의해 승인되었던 SOP를 문서화하여 작성하여야 한다.

7.2. 각 시험실에서는 시험시설의 각 부서 또는 구역에서는, 실시하는 시험업무에 관련된 SOP를 언제라도 이용할 수 있도록 비치해 두어야 하고 이들의 SOP를 보충하는 것으로서 공개된 교과서, 문헌 및 매뉴얼을 사용할 수 있다.

7.3. 시험에 관하여 기술되었던 SOP로부터의 이탈은, 시험책임자 및 임명되어 있다면 주임연구자에 의하여 승인되어야 한다. SOP의 개정은 시험시설 운영책임자에 따라 승인되어야 한다.

7.4. SOP는 시험시설 업무중 아래의 범위에 관하여 작성되어야 하지만 그것에 한정되는 것은 아니다. 각 표제와 함께 기술한 부분은 어디까지나 하나의 예이다.

(1) 시험물질 및 대조물질

영수, 식별, 라벨링, 취급, 표본 추출, 보관.

(2) 기기, 재료 및 시약

(a) 기기

사용, 보수, 청소 및 교정

(b) 컴퓨터 시스템

개발, 확증, 조작, 보수, 안전 대책, 변경 제어 및 백업

(c) 재료, 시약과 용액

조제와 라벨링

(3) 기록의 보존, 보고, 보관 및 검색

시험의 코드화, 자료 수집, 보고서 작성, 검색 시스템, 컴퓨터화된 데이터 시스템의 사용을 포함한 데이터의 취급.

(4) 시험계

(a) 시험계를 위한 방, 실온, 환경 조건

(b) 시험계의 입수, 이동, 적절한 배치, 특성, 식별, 관리 순서

(c) 시험전, 시험중 및 시험 종료시에서의 시험계의 준비 및 관찰 검사

(d) 시험기간중에 빈사 상태 또는 사망하였던 시험계의 개체 취급

(e) 부검 및 병리 조직검사를 포함한 표본의 수집, 식별과 취급

(f) 시험구역에서의 시험계의 설치 및 배치

(5) 신뢰성보증 순서

시험의 계획, 실시, 기록, 보고의 사찰 시에 행한 신뢰성 보증 담당자의 작업

8. 시험의 실시

8.1. 시험계획서

(1) 각 시험 개시에 앞서, 시험계획서가 작성되어 있어야 하며, 시험계획서는 시험책임자의 날짜 기입과 서명에 따라 승인되어야 한다. 시험을 실시하는 나라의 규칙이나 법률로 규정되어 있다면, 시험 계획서는 운영책임자와 시험의뢰자의 승인을 같이 받아야 한다.

(2)(a) 시험계획서의 변경은, 시험책임자가 그 이유를 명확히 쓰고, 날짜를 기입하여 서명함으로써 승인되며, 시험계획서와 함께 보관, 유지되어야 한다.

(b) 시험계획서부터의 이탈은, 기록되고, 설명되어야 하며 시험책임자에 의하여 제때에 날짜를 기입하여 승인이 이루어지고 난 뒤 시험의 기초자료와 함께 보관되어야 한다.

(3) 단기간 시험으로는 일반적으로 시험계획서에, 그 시험의 특수한 부분을 보충하여 사용하여도 좋다.

8.2. 시험계획서의 내용

시험계획서는 아래의 항목을 포함하여야 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

(1) 시험의 종류, 시험물질 및 대조물질의 식별

(a) 표제의 기술

(b) 시험의 성질과 목적을 기술

(c) 코드 또는 명칭(IUPAC, CAS번호 등)에 따르는 시험물질의 식별

(d) 사용한 대조물질

(2) 시험의뢰자 및 시험시설에 관계된 정보

(a) 시험의뢰자의 명칭과 주소

(b) 모든 시험시설과 관련된 시험지점의 명칭과 소재지

(c) 시험책임자의 명칭과 주소

(d) 주임연구자의 명칭과 주소 및 시험책임자에 의하여 위임된 주임연구자가 책임을 갖는 시험의 단계

(3) 날짜

(a) 시험책임자가 서명함에 의한 시험계획서의 승인일. 시험이 실시되는 나라의 규칙이나 법률로 규정되어 있다면, 시험시설 운영책임자 및 시험의뢰자

가 서명하는 것에 의한 시험계획서의 승인일

(b) 실험 개시 및 종료 예정일

(4) 시험 방법

(a) 채용한 OECD 시험 지침 또는 다른 지침의 기재

(5) 기타의 사항 (필요에 부응함)

(a) 시험계의 선택의 근거

(b) 시험계의 특성에 관하여, 예를 들면 종류, 계통, 아계통, 공급원, 수량, 체중 범위, 성, 연령, 기타의 필요한 정보

(c) 투여 방법과 그 선택 이유

(d) 투여 또는 적용 용량, 농도, 투여 횟수, 투여 기간

(e) 시험의 경시적 순서, 실시하는 분석·측정·관찰·검사의 모든 방법, 시험 재료·조건·종류·빈도 및 혹시 이용된다면 사용한 통계검정법 등의 기술을 포함하는 시험 계획에 관련한 상세한 정보

(6) 기록

(a) 보관되는 것이 당연한 기록류의 목록

8.3. 시험의 실시

(1) 각 시험마다 명확한 식별을 하여야 하며, 시험에 관련한 모든 것에 이의 식별을 붙여야 한다. 시험부터의 표본은, 기원을 확인하기 위한 식별이 이루어져야 한다. 이 식별은, 표본이나 시험에 따라 출처 등이 추적될 수 있어야 한다.

(2) 시험은 시험계획서에 따라 실시되어야 한다.

(3) 시험의 실시중에 얻을 수 있었던 모든 데이터는, 데이터를 기입하는 개인에 의하여 직접, 신속, 정확 및 명료히 기록되어야 하고, 이들의 기록에는 서명 또는 약어를 쓰고, 날짜를 기록해 둔다.

(4) 시험기초자료에서의 어떠한 변경도 종전의 기록을 불명료히 하지 않도록 행하여져야 한다. 필요에 따라 변경의 이유를 표시하고, 변경을 하는 기록자의 서명 또는 약어, 날짜를 명기해야 한다.

(5) 컴퓨터에 직접 입력하는 데이터는, 입력 데이터에 책임을 가지는 사람이

데이터 입력시에 확인하여야 한다. 컴퓨터 시스템의 설계는 원래 데이터를 불명료하게 함이 없이, 모든 데이터 변경의 역사를 알 수 있어야 한다. 모든 데이터의 변경과 그 변경자를, 예를 들면 일시나 전자 서명의 사용에 의하여, 입력이 가능하도록 하여야 한다. 더욱이 변경 이유도 첨부하여야 한다.

9. 시험결과와 보고

9.1. 총론

(1) 시험마다 최종보고서가 작성되어야 한다. 단기간 시험에 있어서는 표준 최종보고서에 특수 부분을 가필하여 최종보고서를 작성하여도 좋다.

(2) 시험에 관여했던 주임연구자나 과학자의 보고에는, 이들에 의한 서명날짜가 기입되어야 한다.

(3) 최종보고서에는 데이터의 정당성에 대하여 책임을 갖는 것을 보여주기 위해서 시험책임자에 의한 서명, 날짜를 붙여야 한다. 또한, GLP 기준 준수 범위에 관하여 명시하여야 한다.

(4) 최종보고서에 대한 수정 및 추가는 정정의 형식을 가져야 한다. 이 정정에는, 수정이나 추가의 이유를 명기하고, 시험책임자에 의한 서명, 날짜를 기입하여야 한다.

(5) 등록이나 규제를 위하여 행정 당국의 제출 요구에 부응할 목적으로 행하여지는 최종보고서의 재편성으로는 최종보고서에 대해서 교정이나 추가, 수정의 필요는 없다.

9.2. 최종보고서의 내용

최종보고서에는 아래의 정보를 포함하여야 하나, 이것에 한정되는 것은 아니다.

(1) 시험의 종류, 시험물질 및 대조물질의 식별

(a) 표제의 기술

(b) 코드 또는 명칭 (IUPAC, CAS 번호, 생물학적 패러미터 등)에 따르는 시험물질의 식별

(c) 화학명에 의한 대조물질의 식별

- (d) 순도, 안정성, 균일성을 포함한 시험물질의 특성
- (2) 시험의뢰자 및 시험시설에 관련한 정보
 - (a) 시험의뢰자의 명칭과 소재지
 - (b) 모든 시험시설과 관련된 시험지점의 명칭과 소재지
 - (c) 시험책임자 및 임명되어 있다면 주임연구자의 성명과 주소
 - (d) 최종보고서 작성용에 보고서를 제출한 연구자의 성명과 주소
- (3) 날짜
 - (a) 실험을 개시하였던 날짜와 종료하였던 날짜
- (4) 진술서
 - (a) 사찰을 실시하였던 날짜, 사찰의 타입 및 결과가 운영책임자와 시험 책임자에 보고되었던 날짜를 열거한 신뢰성 보증 프로그램에 따르는 진술서
- (5) 시험 재료와 시험 방법의 기술
 - (a) 이용한 방법과 시험 재료의 기술
 - (b) OECD 시험 지침 또는 다른 시험 지침내지 시험 방법의 참조
- (6) 결과
 - (a) 시험 결과의 요약
 - (b) 시험계획서로 요구되었던 모든 정보와 데이터
 - (c) 계산 및 통계학적 유의성 검정을 포함한 결과의 표시
 - (d) 결과의 평가와 고찰, 가능하다면 결론
- (7) 보관
 - (a) 시험계획서, 시험물질과 대조물질의 샘플, 표본, 시험기초자료, 최종 보고서의 보관 장소

10. 기록과 시험기초자료의 보관과 보존

10.1. 각국의 규제 당국에 의하여 정해졌던 기간이 시험기초자료의 보관기관 이 되며, 아울러 다음의 것이 보존되어야 한다.

- (a) 시험계획서, 시험기초자료, 시험물질과 대조물질의 샘플, 표본, 각 시험의 최종보고서

- (b) 신뢰성보증 프로그램에 의하여 실시되었던 모든 사찰의 기록
- (c) 직원의 자격, 훈련, 경험, 직무 분담의 기록
- (d) 기기류의 보수, 교정의 기록과 보고
- (e) 컴퓨터 시스템의 확증 기록
- (f) 종래부터 이용되고 있었던 일련의 표준작업지침서 모든 것

보관기간의 지정이 없는 경우에는 시험에 이용하였던 재료의 최종 처분일은 기록하여야 한다. 어떤 이유로 시험물질이나 대조물질 및 표본을, 요구한 보존 기간보다 조기에 처분할 때에는, 그 이유와 기록을 확실히 남겨 두어야 한다. 시험물질이나 대조물질 및 표본은, 그 품질이 평가에 견딜 만한 기간중에는 보존하여야 한다.

10.2. 자료보관 시설에 보관된 시험기초자료는, 정연하게 보관하며, 검색을 신속, 용이하게 하기 위하여 색인을 붙여야 한다.

10.3. 운영책임자에 의하여 권한을 받은 직원 이외는 자료보관 시설에 입실해서는 안된다. 보관시설부터의 시험기초자료의 출납이나 이동은 적절하게 기록되어야 한다.

10.4. 혹시 시험실시 시설 또는 자료보관 수탁시설이 업무를 정지하고 법정후계자가 없는 경우는, 그 보관 시험기초자료는 해당 시험의 시험의뢰자의 시설에 이관되어야 한다.

제 3 절 단기독성시험에서의 OECD GLP 도입 및 SOP 확립

OECD의 In vivo(생체내) 독성시험기준에서는 화학물질의 독성시험을 크게 2등분하여 짧은 기간동안 시험하는 단기독성시험(short term toxicology)와 장기간 동안 시험하는 장기독성시험(long term toxicology)으로 대분하고 있다. 이중 단기독성시험에는 급성경구독성시험, 급성경피독성시험, 국소독성시험, 28일 아급성독성시험 및 최기형성시험등이 포함되고 이들은 모두 중요한 시험항목으로서 본 연구기간동안 이들 시험들이 새로운 OECD GLP에 만족하게 운영되게끔 각종 SOP(표준작업지침서)를 재작성 및 정비를 완료하였고 이에 맞게 해당 시험종사원을 훈련시켰다. 즉 이들 단기독성시험법에서 공통적으로 수행되는 시험항목으로서 일반증상관찰, 체중측정, 사료 및 물섭취량 측정, 안검사, 뇨검사, 혈액검사, 부검소견 및 병리조직학적 검사등의 항목이 있다.

GLP 기준의 독성시험 수행은 전반적 시험진행과정이 투명성과 정밀성 및 신뢰성을 필요로 하기 때문에 본 센터내에서는 위 시험항목이 객관적이고 통일되게 수행되고 아울러 시험자료의 투명한 기록 및 문서화를 위하여 GLP 기준의 컴퓨터 시스템을 도입한 바, 그 동안 체중측정, 사료 및 물섭취량 측정, 혈액검사등은 balance 기기등을 이용하여 시험측정치를 직접 컴퓨터로 입력되도록 조치하여 시험결과의 신뢰성과 객관성을 확보하고 있다. 그러나 일반증상관찰과 병리조직학적 검사는 그 검사법의 다양성과 전문성등의 이유로 그 동안 독성시험기관마다 표기방법이나 표기정도가 각각이어서 GLP 기준 독성시험자료의 상호인정의 걸림돌이 되어왔다. 따라서 금번 연구기간동안 일반증상관찰법 만이라도 국제공용의 검사법으로 통일하기 위하여 노력하고 있는 중에, 마침 OECD GLP에 맞추기 위하여 일본 후생성산하 국립위생시험소가 주도가 되어 만든 일본후생성 GLP 임상관찰법(가칭)을 입수 및 번역하여 이를 본 센터내 SOP에 반영시켰으며 이는 Table 1-3-1로서 첨부하였다. 아울러 단기독성시험의 수행과 밀접한 연관이 있는 Toxicokinetics(독성동태학)에 대한 GLP 적용의 시도가 일본

에서 실시되고 있어 일본후생성의 관련자료를 입수후 번역하여 첨부(첨부자료 1-2)하였다.

Table 1-3-1. Observation of clinical sign on the GLP regulation

1. 증상의 구분

Code	전신적 증상		해설
A	외관	General appearance	
A01	사망 또는 폐사	Death	생물본래의 대사기전이나 기능이 완전히 정지한 상태를 말한다. 호흡, 순환 및 중추신경의 정지를 사망으로 본다. 임상적으로는 심장박동의 정지 또는 호흡정지를 사망으로 본다. 사망개체는 발견시 사망, 절박도살(빈사상태에서의 도살), 계획도살, 동종섭식(cannibalism), 자가용해(Autolysis)에 대해서 기록한다.
A02	빈사	Moribund	동물이 사망직전에 이른상태, 대부분의 경우 자발운동이 정지하고 호흡이나 맥박의 이상, 여윌, 탈수상태, 빈혈 또는 체온저하 등을 보이는 경우가 많다. 또한 횡와나 복와 등의 자세를 취하고 소리등 외부로 부터의 자극에 대한 반응이 매우 저하되어 있음
A03	쇠약	Weakening	쇠약 또는 빈사전 상태로서 자발운동의 감소, 외부자극에 대한 반응이 둔해지며 피부색이 퇴색하고 호흡수 및 심박수의 상태도 변화되어 있는 상태를 가리킨다. 통상 여위어 있는 상태가 많다.
A04	야윈	Emaciation	신체가 현저히 가느다랗게 된 상태로 지방조직이 현저히 감소되어 있는 일이 많다.
A05	비만	Obesity	피하지방이 매우 증가되어 있는 상태
A06	식욕부진	Anorexia	사료에 대하여 의욕을 보이지 않고 섭취량이 감소된 상태
A07	거식	Refusal to feed	완전히 사료를 먹지 않는 상태
	섭식행동	Eating and drinking	사료 및 물을 먹거나 마시는 행동은 일상의 관찰만으로는 충분히 파악할 수 없기 때문에 물 및 사료섭취량을 측정해야 한다. 사료 또는 물에 시험물질을 혼합하여 투여하는 경우에는 그 냄새, 맛(기호성, Palatability)에 따라 섭취량에 영향을 미치게 된다.
	사료섭취량의 증감	Increase or decrease in food consumption or food intake	사료섭취량의 증가 또는 감소는 소화기 기능과 중추신경 특히 시상하부 기능의 변화가 중요한 요소이지만 기타 전신적인 이상도 관여될 수 있다.

Code	전신적 증상		해 설
	물섭취량의 증감	Increase or decrease in water consumption	물섭취량의 증감은 신장의 기능, 하수체의 기능이 관여하지만 기타 전신적인 이상도 관여될 수 있다.
B	체위, 자세	Posture, Body position	
B01	복와위	Prone position	체중의 대부분을 배로 떠받치고 있는 상태. 동물을 일으켜 세워도 다시 복부를 아래로 하고 고개를 숙인 상태로 되 돌아온다. 정상적인 상태일때의 자세(예를 들면, 정지해 있을 때 복와에 가깝고 수면중에는 횡와)와 혼동하지 않도록 한다.
B02	기느자세	Crawing position	배를 바닥에 대고 거의 팔꿈치로 몸을 지지하고 있는 상태
B03	측와, 횡와 위	Lying on side	옆으로 누워 있으며 동물을 일으켜 세워도 다시 횡와자세(체중의 대부분을 어깨 및 몸통의 측면으로 받치고 있는 상태)로 돌아온다.
B04	배와위, 양 위	Dorsal position	누워있는 상태
B05	입위(立位)	Standing position	후지로만 서있는 상태가 오랜동안 지속된다.
B06	좌위	Sitting position	후지를 구부리고 허리를 아래로하여 상반신을 세운자세
B07	원배위, 굴 곡위	Hunchback position	등중앙을 둥그렇게 웅크린 자세
B08	웅크린 자세	Crouching position	사지를 구부리고 몸을 작게하여 웅크린 자세
B09	강직(强直)	Catalepsy	근육의 경직을 특징으로 부자연스런 자세를 일정시간이상 계속 유지하며 자세를 바꾸어주면 그 자세를 계속 유지한다.
B10	기대어 있는 상태	Leaning	평형감각에 장애가 있는 경우에 보이는 증상
B11	기립불능	Ananastasia	일어서려고 하지만 불가능한 상태
C	의식,태도	Consciousness Attitude	
	[의식]정상	Normal	의식이 정상인 동물은 주변에서 발생하는 일에 민감하게 주의를 기울이며 자기의 환경을 잘 파악하고 있다. 다음과 같은 징후를 보임

Code	전신적 증상		해설
			마우스, 랫트: 관찰자가 손을 갖다대면 민첩하게 도피한다. 개, 원숭이: 관찰자가 입실할 경우에 활발히 움직여 반응 하지만, 사람의 일상생활에 대하여 안정된 태도를 보인다.
C01	흥분	Excitement	정신적으로 활동성이 고양된 상태, 자발운동이 항진되며 심화되면 발성도 한다. 중추신경자극에 의한 흥분으로는 주위에 대한 이해, 반응성이 오히려 나빠진다.
C02	의식고양	Elation	환희, 기대등 경도의 중추흥분약의 영향으로 정신적 활동성이 높아져 있음. 대개 생리적인 흥분상태를 고양(高揚)이라고 한다. 자발운동이 항진되고 사람이나 다른 동물에 대한 반응이 활발하다.
C03	불안	Restlessness	안정되어 있지 않고 안절부절하는 상태가 계속된 상태, 중추신경의 작극, 신체 특히 내장의 동통, 이상, 변의(便意) 등을 반영한다. 경련의 전구증상이 있음
C04	과민	Hypersensitivity	불안과 같이 이상한 흥분을 나타내는 증상. 불안은 사육상자 밖에서 관찰되지만 과민은 조작에 의해서 유발되는 피자극성이 항진된 상태. 만지거나 빛, 소리 등의 자극에 대하여 발성, 공격 등을 나타낸다.
C05	공격성	Agression	흥분이 고조된 상태, 손을 내밀면 물거나 하는 공격성을 보인다.
C06	투쟁	Fighting	동물끼리 공격하는 것을 말함. 복수동물이 동거할 경우 볼 수 있으며 수컷동물에서 많다.
C07	생기저하	Inanimation	비교적 경도의 정신적 또는 신체적 이상 때문에 활동이 억제되어 자극에 대한 반응 또는 원기도 없는 상태, 생기없음.
C08	의식장애	Cloudiness	주변상황에 대한 이해 및 반응이 저하된 상태. 자주 조는 듯한 상태를 동반. 또한 장애의 종류와 정도에 따라서는 반사기능이나 호흡, 순환기능의 이상도 나타날 수 있다.
C09	무관심	Indifference	자극에 대한 민첩한 반응성이 없는 상태. 사료 및 물섭취, 사회적 행동에 의욕이 없음
C10	혼미	Stupor	자극에 대한 반응성이 저하되어 강한 자극외에는 반응하지 않는 상태
C11	혼수	Coma	강한 자극에도 반응하지 않는 가장 심한 의식장애

Code	전신적 증상		해설
C12	수동성	Passivity	조작 등에 저항하지 않고 조작된 상태 그대로를 유지하고 있는 상태. 의식혼탁의 상태에 따라 수동성의 정도가 다르게 나타난다.
C13	착란	Confusion	의식이 혼탁한 상태에서의 행동, 특히 주위환경에 대한 이해없이 무의미한 행동을 하는 상태를 말한다.
	수면	Usual sleep	생리적 수면은 원칙적으로 일정주기로 나타나고 적당한 자극에 의해 각성할 수 있다. 또한 수면중에는 각종 반사 및 호흡순환등은 정상상태에 있다. 그러나 중추신경기능의 억제가 수면의 형태로 나타나는 병적인 경우에는 자극의 반응성저하 등 의식장애를 나타낼수 있다.
C14	꾸벅졸음	Somnolence	잠이 들어 꾸벅꾸벅거리고 있는 상태, 잠이 얕고 자극에 대하여 둔하지만 쉽게 반응한다.
C15	혼면(昏眠)	Sopor	깊이 잠든 상태. 자극에 대해 각성하지 못함
C16	기면(嗜眠)	Lethargy	잠이 지속되는 상태. 자극에 대해 각성하지만 바로 잠이 든다.
C17	진정	Sedation	원래 진정은 시험물질 투여 등에 의해서 나타난 흥분상태에 대처하여 그것을 억제하는 것을 말하나 그 결과에 의해 초래된 억제상태를 말하기도 한다. 관찰조작에 의해 일시적인 흥분반응의 자연적인 종식이나 자연적으로 일어나는 수면 또는 평안한 상태를 진정과 혼동해서는 안된다. 진정은 수면상태로 이행하기 쉽지만 원칙적으로 각성되어 있고 통증이나 공포에 의한 불만이 억제되어 있는 상태다. 이런상태에서는 자발운동은 저하되며 자극에 대한 반응도 둔해진다.
D	행동	Behavior	
	사회적행동	Social behavior	사육상자내 여러동물이 있을 때 동물들간에 대하는 태도
	접촉행동	Contact behavior	새로운 동물이 2마리가 같은 사육상자내 있을 때 서로 냄새를 맡고 가볍게 서로 접촉하는 행동
	우위성	Domination	여러마리를 계속 사육하면 그 중에서 우위성의 순위가 정해진다. 이것은 개,원숭이 뿐만아니라 랫트,마우스에서도 관찰되며 순위가 낮은 동물의 안면털이 뽑히거나 외상을 받기도 한다. 마우스, 랫트들은 꼬리부위가 물리기도 한다.

Code	전신적 증상		해 설
D01	군거성의 손실	Loss of huddling	마우스, 랫트, 햄스터, 기니픽 등의 집단 사육 시 서로의 신체를 접촉하여 무리를 이루는 습성이 있다. 어떠한 중추신경의 이상으로 이러한 행동을 볼 수 없는 경우가 있다.
	탐색행동	Exploration Curiosity Attentive walking	동물을 새로운 환경에 두면 그것을 탐색하는 행동을 보인다. 마우스, 랫트를 새로운 장소로 옮기면 정상적으로는 먼저 주변을 정찰하는데, 냄새를 맡고, 접촉하면서 돌아다닌다. 때때로 서서 움직이지 않고 윗쪽을 탐색하기도 한다. 통상 수분간 계속된 후 몸치장을 하는 행동을 하며 평정을 찾는다.
D02	탐색행동의 향진	Increase in exploration	중추신경 흥분에 의해 탐색행동이 양적, 시간적으로 증가하는 일이 많다.
D03	탐색행동의 저하	Decrease in exploration	중추신경 흥분에 의해 억제되는 경우도 있다. 자발운동이 증가해도 탐색행동은 감소하고 의미없는 움직임도 있고 수평방향의 운동이 증가하기도 하고 상하운동이 감소하는 것과 같은 변화를 보이기도 한다.
D04	탐색행동의 소실	Loss of exploration	탐색운동의 저하가 심화되면 이와같은 행동을 볼 수 없게 된다.
D05	몸단장행동의 증가	Increase in grooming	정상적인 동물은 자주 자신이나 다른 동물의 몸을 핥거나 사지로 털을 정리하는 단장행동을 한다.
D06	몸단장행동의 감소	Decrease in grooming	이것은 동물의 안정된 상태를 반영하는 것으로 생각된다. 중추신경의 흥분 또는 억제시에는 빈도가 증가하거나 감소한다.
D07	세안행동	Face washing	양전지로 얼굴 특히 코 및 입을 닦는 행동. 몸단장의 일종으로 볼 수 있으나 비강 및 구강내 불편감을 반영하기도 한다.
D08	긁기	Scratching	체표에 손발톱을 강하게 대고 문지른다.
D09	문지르기	Rubbing	손가락 끝이나 손바닥 등을 몸의 표면에 대고 가볍게 미끄러뜨리듯이 움직인다. 케이지에 체표를 대고 문지르는 경우도 있다.

Code	전신적 증상		해 설
	자발운동	Locomotor activity Spontaneous activity	동물의 자발운동은 환경조건 및 시각에 따라 달라진다. 랫트,마우스에서는 사육케이지에서의 자발운동은 야간에 잘 관찰되고 낮에는 자고있는 경우가 많으므로 관찰되지 않는 것이 있다. 따라서
	a. 이동 b. 보행 c. 기어오르기 d. 꼬리쫓기 e. 일어서기	Ambulatory movement, Ambulation Walk, Walking Climbing Chasing the tail Rearing	시험계획에 고려하는 것이 좋다. 케이지로부터 끄집어내면 [반응성의 자발운동]을 관찰할수 있으나 이것은 엄밀히 말하면 [자발]은 아니고 반응성의 활동이다. 그러나 이들은 구별되지 않고 사용되고 있는 것이 실정이다. 또 [자발운동]에서는 주로 이동을 동반하는 것을 평가하고 있으나 몸단장 등의 이동을 동반하지 않는 것도 본질적으로는 자발운동이다. 동물은 기분에 따라 자기의 꼬리를 쫓아 회전하거나 케이지 벽에서 천정까지 기어오르거나 한다. 랫트,마우스 등에서는 뒷다리로 서는 것도 있다.
D10	자발운동의 향진	Increased in locomotor activity	여러 가지 원인에 의한 정신적 흥분에 의해서 일어난다. 또 신체적 이상 또는 환경으로부터의 자극에 대한 반응으로 일어나는 경우도 있다.
D11	자발운동의 저하 자발운동의 억제	Decrease in locomotor activity	진정상태에서는 자발운동이 감소한다. 또 신체적 이상이 있는 때에도 감소한다. 쇠약상태 또는 사지의 운동기능의 장애(사지의 손상,신경,근육의 장애)가 있을때도 운동은 제약된다.
D12	자발운동의 소실	Loss of locomotor activity	D11의 변화가 극도로 미치게 되면 자발운동이 소실된다. 즉, 상당히 긴 시간의 관찰중 운동이 있다고 판단되지 않는 상태
D13	뛰어오름 도약	Jumping	흥분 때문에 자발운동이 고도로 향진되면 동물은 뛰어오르거나 달리거나 하는 경우가 있다.
D14	달리기 질주	Running	이것은 도피행동으로 잡으려고 하는 것을 피해 다니거나, 케이지로부터 뛰어나와 도망하려고 하는 것과는 구분하여야만 한다. 또 경련을 일으킬 때 동물의 신체가 뛰어오르는 수가 있으나 이것은 도약이라 하지 않고 경련으로 평가한다.
D15	회전 회전	Rolling	동물의 체측의 주위로 회전(회전)하거나 일정방향으로 원을 그리며 빙글빙글 회전을 하거나 하는 이상행동은, 신경학적인(운동기능의) 이상인 경우가 많다.
D16	선회	Circling	

Code	전신적 증상		해 설
D17	피보팅	Pivoting	뒷다리의 기능부전(또는 발달지연)때문, 앞다리만의 운동으로 생기는 선회운동이다.
D18	이상발성	Vocalization	흥분이 고도에 달하면 마우스, 랫트등 정상적인 상태에서는 우는 소리를 내지 않는 동물도 혼자서 발성하게 된다. 그러나 이들을 자극해서 잡거나, 동통을 가하거나 하면 우는소리를 내는 것은 정상이다. 중추신경흥분의 경우의 이상발성은 동물이 서로 번갈아내는 우는 소리와는 달리 부자연스럽게 우는 소리이다. 개, 원숭이 및 기니픽은 일반적으로 여러 우는 소리를 내기 때문에 이상발성에관해서도 그 성상의 기제가 필요하다.
D19	거미 (꼬리를 마는것)	Tail elevation	마우스에서 현저하게 관찰되는 상태로서 꼬리를 긴장시켜 말아올려 공중에 유지시키는 것이다. 척추의 흥분을 반영하는 것으로 모르핀나 카페인 등의 처치로 유발되는 것이 전형적이다. 고도화되면 꼬리끝은 높아지고 꼬리전체는 활처럼 긴장해 지속적으로 말아올린다. 개의 꼬리의 위치는 기분을 나타낸다.
D20	자상	Self biting	이상한 흥분에 의해 자기의 신체를 물어 상처를 내는 행동
D21	상동행위 상동행동	Gnawing, Chewing, Licking, Biting, Sniffing, Shivering, Scratching, rearing, Quick running, Rolling, Circling, etc.	같은 운동이 목적없이 반복되는 것으로 대뇌의 이상이 생각된다. 그 동작에는 입을 움찔움찔한다. 입술을 핥는다. 자신이 깨문다. 쿵쿵 냄새를 맡는다. 몸서리를 치며 바닥을 긁는다. 직립한다. 빙글빙글 돈다. 선회운동을 한다. 등등이 있다.
D22	환각행동	Hallucinatory behavior	실제로는 하지 않는 것을 인정해 그것에 대해 반응하고 있는 것 같은 행동. 예를 들어 보이지 않는 적에게 덤비는 것 같은 행동을 한느 경우가 있다.
D23	보행실조 비틀거리는 보행	Ataxic gait	사지 또는 후지의 운동협조성(coordination)을 상실했기(ataxia) 때문에 일어나는 불안정, 불규칙적인 보행. 보행의 특징을 관찰하면 이상을 갖는 다리에 마비, 근경직, 경직이 없는 것을 확인해야만 한다. 실조는 심화되면 보행불능이 된다.

Code	전신적 증상	해 설
D24	마비성보행 날인보행 경(직)성보행 후지마비	Paralytic gait 운동신경의 장애에 의해 사지 또는 일부의 다리의 마비가 일어나, 보행이 불충분하게 된다. 날인보행은 한다리의 마비에서는 걸을 때 그 다리를 들어올려 던져내듯이 전진한다. 그 때문에 마비된 다리가 스텝프처럼 바닥에 놓인다. 경성보행은 운동신경 1차 뉴우런의 장애에 의해 일어나는 사지근의 경성마비에 의한 보행 장애이다.
D25	보행이상 이상보행 이상보조 보행곤란 질질끄는보행 후지의 반전 과행 무력성보행 원배보행 조선보행 요고보행	Abnormal gait Dragging of hindlimbs Shuffling gait Foot eversion Limping, Lameness Asthenic gait Tip toe gait Reluctance to walk 보행실조 또는 마비성 보행과는 판단되지 않는 것도 일괄해서[보행이상]으로 한다. 예를 들어, 걸을 때 후지의 전방으로 당겨올리는 것이 늦어지고 후지를 질질끄는 듯한, 극단적으로 되면 족저가 뒤집어지는 듯한 걸는 방식이나 한쪽발의 이상으로 한쪽 다리를 끄는 듯한 것이 있다. 또 전신적 쇠약 또는 국소적 근력저하 때문에 허리가 흔들리거나하는 경우가 있다. 이러한 흔들리는 방식은 실조보행의 흔들림과는 양상이 다르다.
	통각반응	Pain reaction Pain response 동통자극에 대해 일으키는 반응, 자극으로는 핀셋으로 집거나, 날카로운 것으로 찌르는 등의 조작 등을 통해 나타난 반응으로 운다, 뒤돌아본다, 물려고 대든다, 뿌리친다, 등의 행동이 있다.
D26	비틀기	Struggling 자극성의 액체를 복강내에 주사된 소동물은 신체를 비꼬는 특징적인 자세를 반복하여 나타낸다.
D27 D28	통각과민 통각둔마	Hyperalgesia Hypesthesia 아픔자극에 대한 반응의 강도에 의해 통각의 이상을 판단하던가 반복검사에 의해서도 반응이 변화하기 때문에, 통각의 소실 이외는 판단하기가 용이하지 않다.
	식분	Coprophagy 자기의 또는 동거동물의 분을 섭취하는 것. 배설후의 분을 섭취하는 외에 배설중의 것을 섭취하는 경우도 있다. 토끼는 분식을 생리적으로 필요로하며, 정상행동으로 행하여진다. 마우스, 랫트에서는 사료의 결핍시에 통상 관찰된다.
	토물섭취	Vomitus eating 개에서는 원래 토물을 섭취,먹는 습관이 있고 병적원인에 의한 구토의 경우에서도 섭취하고자 하는 경우도 있다.
	편식	Unbalanced diet 음식물에 좋아하는 것과 싫어하는 것이 있어 한쪽으로 치우친 섭식을 하는것
	이미증 이식증	Pica Cissa Allotriophagy 식이로서 부자연스러운것(돌, 금속편, 육식동물에 있어서의 풀등)을 섭취하거나 또는 핥거나 하는 것을 말한다. 만성소화기장애, 기생충성 질환 및 철결핍등 영양장애시에 나타나는 경우가 있다.

Code	전신적 증상		해설
E	신경계	Nervous System	
E01	신전(몸을 떨)	Shivering	몸을 떠는 동작, 생리적으로는 추위등으로 불수의적으로 발생하고, 때로는 일과성, 특히 반복성이다. 병적으로는 만성 몰핀중독의 금단시(통상 시험으로는 퇴약시)에 나타나는 것이 있다.
E02	진전	Tremor	불수의적인 사지 또는 체간의 떨림으로 작은, 연속적인 근수축이, 사지의 굴신이나 몸의 이동에는 이르지 않는다. 전신에 나타나는 수도 있다. 진전의 평가에는 그 발생부위, 속도, 진폭과 발현, 증감의 조건에 관해 검토하는 것이 중요하다. 진전은 정지시에 보이는 것과, 운동시에 일어나는 것이 있으며 그 중에도 의도적인 운동을 일으켰을 때 목적물에 손을 가까이 하면 떨림이 고도로되는 기도진전은 소뇌장애를 나타내는 특징적인 것이다.
E03	경련	Convulsion	전신의 골격근 또는 일부의 골격근에서 일어나는 불수의적인 발작성 수축이다. 전신성경련은 중추신경세포의 흥분성 항진으로 일제히 방전이 일어난 것으로 중추신경흥분제, 뇌의 기계적 자극(출혈, 부종, 종양, 염증), 순환장애 등의 원인으로 유발된다. 경련의 종류가 인식가능한 경우는 이하의 항목(a~e)로 한다.
E04	a.강직성경련 후궁반장 궁반경련 전만경련 후지신전	Tonic convulsion Opisthotonus Goisthotonus Tonic extension of hindlimbs	전신성 경련에는 관여하는 근육전체가 동일하게 지속적으로 수축하는 강직성 경련과 길항근이 번갈아 수축하는 간대성 경련이 있다. 전신성 강직성 경련에는 일반적으로 신근군의 장력이 굴근군의 장력에 이기기 때문에 사지를 신전하여, 경부와 배부를 뒤로 젖혀 후궁반장을 나타내는 수가 많으나 마우스에서는 경부를 전굴하여 후지를 신전하는 전만경련이 된다.
E05	b.간대성경련	Clonic convulsion	전신성간대성 경련에서는 사지등이 굴곡신전을 반복하므로 신체가 몇번이고 뛰어오른다. 이 경련에 들어가기 전에 동물이 도약하는 듯한 상태를 지나나 경련의 부분현상으로 생각해 도약으로는 기재하지 않는 것이 좋다. 간대성경련은 사지외에 교근이나 안면근에도 발생하고, 혀를 씹어 출혈하는 수가 종종 있다.
E06	c.강직성간대성경련 d.간대성강직성경련	Tonic-clonic convulsion Clonic-tonic convulsion	강직성경련에 계속하여 간대성경련이 일어나는 경우와 그 반대의 경우가 있다. 마우스의 pentetrazol에 의한 유발경련에서는 간대성경련이 주로 일어나나 중증이 되면 강직성 경련으로 이행한다.

Code	전신적 증상		해설
E08	질식성경련	Asphyxial convulsion	뇌의 무산소상태에서도 경련이 유발된다. 대부분이 강직성 경련이다. 호흡부전의 증상인 cyanosis 등을 동반한다.
	[근의 부분적 불수의 수축]		
E09	근연축	Twitch	골격근의 단회수축을 말한다. 운동신경 또는 근에 직접 자극을 가할 때 근이 1회 수축하는 생리적인 현상을 연축(단수축)Twitch로 하나 동일하게 Twitch라는 말로 이상한 근의 수축도 표현하고 있다. 이것은 대부분의 근섬유의 부분적인 불수의적 단회 수축으로 사지나 체간의 움직임에는 달하지 않는다. 말초운동신경 또는 골격근의 흥분성의 향진에 의해 나타나는 것이나 중독등에서는 전신성으로 골격근의 경련을 낳는 수가 있다. (증상이 구별가능한 경우는 이하의 항목(a,b)로 한다.)
E10	a.섬유성수축	Fibrillation	근섬유근이 자발적으로 불규칙한 수축을 반복하는 것으로 신경근 접합부의 이상으로 근섬유의 흥분성향진이 생긴 것을 나타낸다. 이것에는 cholinesterase 저해약중독과 운동성 2차 뉴우런의 저해로 근섬유가 과민해진 경우를 예로 들 수가 있다.
E11	b.섬유속성수축	Fasciculation	동시에 수축하는 근섬유의 단위가 큰 경우에는 섬유성 수축보다는 조대한 수축을 낳는 섬유속성수축이라고 불리는 것이된다. 이것도 섬유성 수축과 같은 원인으로 생긴다.
	*근긴장	Muscle tone Tonus	정지한 근장력의 상태를 나타내며 외력을 가해 근을 진전할 때의 저항에 의해 측정한다.
E12	a.근긴장향진 접는 나이프 현상	Spasticity	근긴장이 높아진 상태로 건반사의 향진을 동반한다. 외력에 대한 저항은 접는 나이프를 꺾는 것처럼 어떤점에서 갑자기 없어진다.
E13	b.근경직 기아모양의 경직	Rigidity	근이 굳어진 상태로 외력에 대한 저항은 높아져 있으나, 기아모양(툽니바퀴)의 지속하는 저항을 나타낸다.
E14	c.근긴장저하 근이완	Hypotonia	근긴장이 약해지고, 근은 부드럽고 힘이없다.

Code	전신적 증상		해설
E15	근력저하	Muscle weakness	근력저하의 증상으로서 예를들어 토끼의 귀가 늘어지는 것, 목이 늘어지는 것 등이 있다. 근력저하에는 단일의 근 또는 다리의 기능이상에 근이완약, 마취약의 영향이나 전신적인 쇠약, 순환허탈에 동반되는 것도 있다.
E16	근위축	Muscle atrophy	근의 조직량이 감소해 국소적으로 마른상태(조직학적인 근거는 반드시 필요하지는 않다) 근력저하를 동반하는 수가 많다. 근을 지배하는 신경(운동신경 2차 뉴우런)의 장애에 속발하는 외에 근육을 사용하지 않는 상태가 계속될 때 일어난다.
	반사 소실 감소 정상 항진 간대	Reflex Loss Absence Decrease Hyporeflexia Normal Prompt reaction Increase Hyper reflexia Clonus	각종의 반사중에 잘 검출되는 것은 자세의 반사 postural reflex의 정향반사 및 후지의 건반사 tendon reflex 그외의 척추반사 spiral reflex이다. 반사의 평가는 반사가 신속(정상)한지 불완전 또는 소실, 또는 정상이상의 반사의 항진을 관찰하여 행한다. 반사항진이 극도에 달하면 근의 반복수축=크로누스(간대)가 유발되게 된다.
E17	a.정향반사의 소실	Loss of righting reflex	정향반사는 두부를 중력의 방향에 대해 정상의 위치를 회복하는 듯이 하는 반사운동이나 공중에서 던져올려 공중제비시켜 사지로 착지시키는 것같은 시험법에서는 그외의 신경기능도 관련된다.
E18	b.후지철거반사의 소실 굴곡반사의 소실	Loss of with drawal reflex	동물의 뒷다리를 잡는다. 또는 통자극을 가하면 동물은 그 다리를 굴곡하여 도망가려 한다. 이것은 척추반사이고, 반사궁의 어느것인가의 장애로 나타난다. 또 더 격렬한 자극에서, 한쪽의 굴곡반사로 유발할 때 다른 쪽의 다리의 신전이 일어난다. (같은쪽 굴근반사 : Ipsilateral flexor reflex, 반대쪽(교차성)반사, crossed extensor reflex)
E19	c.슬개건반사의 소실	Loss of patellar reflex	반사의 가운데에서는 무릎 슬개건 반사가 가장 잘 검사된다. 슬개건 반사는 슬개골의 하부의 인대를 두드림으로써 대퇴사두근을 신전해 반사적인 수축의 유발을 하퇴의 이동으로 판단한다.

Code	전신적 증상		해설
F	호흡	Breathing	
F01	불규칙호흡	Irregular respiration	호흡의 리듬이 흐트러져 있는 상태. 마우스, 랫트 등에서는 촉박, 심대, 천표, 감소, 호흡빈도의 혼란등이 혼재하여 명확히 표현할 수 없는 경우에 총칭으로 이용한다.
F02	체인-스토크스 호흡	Cheyne-Stokes's respiration	호흡의 깊이와 수가 규칙적으로 증가하는 호흡기와 무호흡기가 번갈아 나타나는 이상호흡, 불규칙호흡의 하나로 얕고 늦은 호흡이 다음에 깊고 빨라지고 최대가 되고 다시 얕고 늦게 되어 정지한다. 이것을 반복한다. 통상 죽음의 직전에 나타난다. 이 원인은 중추성호흡중추의 저산소증(Anoxia)에 의한 것과 또 동맥혈 순환의 불량 또는 저산소혈(Anoxiemia)에 의한 것으로 되어있다.
F03	비웃호흡	Biot's respiration	심호흡과 무호흡이 번갈아 나타난다. 불규칙호흡의 하나로 호흡중지기의 상태로부터 급히 심대한 호흡을 시작해 환기증가의 상태로 되는 호흡이다.
F04	천속호흡 천호흡 할딱이는 호흡	Panting	몸체표면만을 얇게 움직여 호흡하고 있는 상태. 적은 환기량을 동반하는 빠르고 얕은 호흡으로 짧은 흡기와 약간 긴 계속되는 호기로 구성된다. 구강내와 기도경으로부터 수분증발에 의한 방열반응으로서 보여지는 얕고 빠른 호흡. 개에서는 운동후 천속호흡의 상태를 나타내는 수가 있다.
F05	호흡수증가	Increased respiration rate	호흡의 깊이와 수가 이상적으로 증가하는 것. 이상으로 빈도가 높아진 호흡으로 우선 호흡의 깊이가 증가하는 과호흡이 일어나고 계속해서 호흡수만이 증가하는 빈호흡이 일어난다. 정상상태와 비교하여 호흡수가 빨라져 있는 경우를 경도로하고 월등히 빨라진 경우를 고도로 한다. 호흡수가 이상적으로 증가한 상태.
F06	호흡수감소	Decreased respiration	호흡이 이상적으로 늦은 상태. 흉식(Costal), 복식(abdominal), 흉복식(Costo-abdominal)이 있다. 정상상태와 비교하여 호흡수가 적어져 있는 경우를 경도로 하고, 월등히 늦은 경우를 고도로 한다. 또, 고도의 호흡저하에서는 대체로 불규칙호흡, 호흡곤란 등을 동반한다.

Code	전신적 증상		해설
F07	호흡심대 심호흡	Deep respiration	깊고 큰 호흡. 1회의 환기량이 정상의 환기량보다 많은 호흡. 심대한 호흡이 연속하고, 확실한 호흡잡음이 섞인다. 지속적인 깊고 큰 호흡으로 혈액이 산성화될때 일어난다. 이 호흡은 각종의 대사산 및 그것에 의한 acidosis가 호흡중추에 영향을 주는 것에 의한다.
F08	호흡곤란 헐떡거리는 호흡	Dyspnea	입으로 호흡을 하지만 간격이 긴 것, 또 가끔씩 밖에 호흡이 되지 않는 것 같은 고통스러운 무리한 호흡으로 숨이 끊기는 듯한 상태. 이 증상은 빈사상태의 동물에 잘 나타난다. 보통 중도의 심장이나 폐의 병변에 동반하여 생긴다. 입을 열고 깊이 부자연한 노력성의 호흡으로 이상한 흉곽운동이 보여지는 상태로 천명음을 동반한다. 중추신경계-호흡중추의 장애, 폐수종, 기도의 분비물의 저류등이 원인이다.
F09	비익호흡 (鼻翼呼吸)	Nasal alar breathing	코끝만으로 겨우 호흡한다.(호흡곤란의 일부). 호흡곤란시에는 필요한 환기량을 얻기위해 통상의 호흡근만 아니라 보조 호흡근도 움직여 호흡하고 있다. 흡기때에 비익이 넓어지는 울동적 운동을 말한다.
F10	종말호흡	Terminal respiration	죽음의 직전에 나타나는 것으로 입을 삐끔 삐끔 열어 호흡한다.
F11	무호흡	Apnea	강제호흡에 계속한 호흡의 일시적인 정지, 중추신경계-호흡의 중추, 심폐기능부전, 혈액중의 CO2 농도가 일정치 이상으로 감소하면 호흡의 교대성이 소실해 호흡은 잠시 정지한다.
	호흡음 이상		호흡에 동반하는 음의 이상
F12	수포음 건성랏세르음 습성랏세르음	Rale Dry rale Moist rale	휴휴, 고보고보, 객, 삐삐 음 등의 총칭으로서 호흡의 부잡음, 건성수포음은 기도내의 액체가 적은 경우에 일어난다. 습성수포음은 기도내 액체가 많은 경우에 일어난다.
F13	염발음	Crepitant whistle	랏세음의 하나, 끈끈한 기가 있는 호흡음. 기관지점막의 종장과 분비물에 의해 소기관지의 내벽이 밀착한 경우에 공기가 통하는 때 들린다.

Code	전신적 증상		해 설
F14	신음	Groaning	고통스럽게 운다. 우우, 움움 등의 음의 총칭, 동통 및 불쾌감을 호소하는 경우에 내는 이상음으로 횡경막의 수축을 동반한다.
F15	천명 (씨근거리기)	Stridor	제제 하는 소리. 후두에서 발하는 일종의 이상음으로 상기도의 염증 등의 이물이 정체해 각출되지 않고 기관이 협착될때 일어난다.
F16	기침	Cough	강한 호식운동으로 심호흡, 성대의 폐쇄, 폐내의 공기압박, 급격한 성대의 개구에 의해 일어난다. 후두염, 기관지염, 폐렴 등에서 나타난다.
F17	재채기	Sneezing	상부기도점막의 자극에 의해 반사적으로 일어나는 호식운동으로 비점막의 염증 및 이것에 원인을 둔 참출물의 자극에 의한 것이 많다.
F18	하품	Yawning	입을 크게 연 불수의적 흡기
F19	딸국질	Hiccup Singultus	횡경막의 경련성 수축에 의해 짧은 반사성 및 경련성 흡기로 횡경막신경의 자극·흥분에 의해 나타난다.
F20	코골음	Snore	구개수와 연구개의 진동에 의한 거칠고 시끄러운 호흡음, 기민, 빈사시, 심마취시, 코 및 인두의 종량 또는 염증 등에서 나타난다.
F21	비음	Nasal noise	비강 폐색이나 비분비물에 의해 나타나는 호흡음
F22	혀를참	Clicking	코막힘때에 입으로 호흡할때의 잡음
G	심·혈관계	Cardiovascular system	
G01	서맥	Bradycardia	정상범위 이하로 맥박(심박)수가 감소한 상태. 자율신경이상, 폐, 심부전 등에 의해 나타난다.
G02	빈맥	Tachycardia	정상범위 이상으로 맥박(심박)수가 증가한 상태. 자율신경이상, 폐, 심부전 등에 의해 일어난다.
G03	부정맥	Arrhythmia	심박리듬의 이상이나 심수축을 나타낸 상태. 자극의 이상에 의한 것.(동성부정맥, 조기박동, 심방세동)과 흥분전달이상에 의한 것(방실 차단)이 있다. 개개서는 안정시에 호흡성부정맥이 보이는 수도 있다.

Code	전신적 증상	해 설	
H	체온	Body temperature	
H01	체온상승 발열	Hyperthermia	손으로 만졌을때의 감각으로 확실히 체표온도가 높다고 인정된 것. 혈관확장에 의한 피부, 꼬리, 혀, 귀, 발, 결막낭의 홍조, 자율신경, 중추신경계의 이상, 폐, 심부전, 심박출량 및 호흡수의 증가 등에 의해 일어난다.
H02	체온하강 체온저하	Hypothermia	손으로 만졌을 때 감각으로 확실히 체표온도가 낮다고 인정되는 것. 혈관 수축에 의한 피부의 창백정도와 백색화 및 진정 또는 운동억제를 나타낸다. 자율신경, 중추신경계의 이상, 폐, 심부전, 심박출량저하 등에 의해 나타난다.
J	피모	Fur, Hair, Coat	
J01	입모	Piloerection	접촉등이 없어도 피모가 역립해 있는 상태. 교감신경흥분 때문에 털이 역립해 있는 상태로 털이 얇게 보인다. 체온하강시에도 보인다. 모포의 입모근의 발기세포의 수축에 의한 조모, 자율신경이상, 마우스, 랫트등 소동물에 있어서는 입모의 판정을 어렵고 명확히 입모로 판정된 경우만 기록한다.
J02	탈모	Loss of fur	피모가 뭉치거나 듬성듬성 빠져 명백히 피부가 노출해 있는 것. 정상적으로는 보이지 않기 때문에 증상이 발현한 시점에서 관찰기록하고 탈모부위, 크기 등을 주의해서 기록한다. 피부에는 특히 병변을 인정하지 않고 국한성 또는 전신성으로 탈모한다. 피부조직의 기능장애로 보여지고 있다.
J03	피모상태의 이상 피모거침	Abnormal fur Rough fur	일반상태가 불량으로 몸단장을 하지 않는 것에 의한다. 피모에 색조가 없고 털결이 거칠어져 있는상태. 피모상태의 이상은 털결의 악화, 피모광택소실, 피모조강화의 3점을 지표로해 이 3요소가 극히 확실하게 인정되는 경우를 고도로 하고 그 이하의 것을 경도로 한다. 피모상태는 성장상태에 의해 변화하므로 관찰은 항상 그 시점에서 대조군과 비교하여 행한다.

Code	전신적 증상		해설
J04	피모의 오염 유성피모 피모습윤	Soiled fur Oily fur Moist fur Stained fur	몸단장이 정상적으로 행하여지지 않고 피모의 외관에 변화가 일어난 상태
K	피부	Skin	
K01	발한 다한	Sweating	땀을 흘리고 있는 상태. 아포크린 땀선으로 부터의 분비물이 증가해 동물 특유의 체취도 발산하는 경우. 신경의 흥분을 초래하는 동물성 질환, 호흡곤란, 심장질환등에서 보인다.
K02	건조	Dryness	피부가 말라있는 상태. 탈수 등에 의해 일어난다.
K03	황달	Jaundice	피부나 안점막이 황색으로 물들어 있는상태. 용혈성, 간세포성, 간내 담즙물대성, 폐색성 등의 원인으로 혈중담즙색소농도의 상승에 의해 일어난다.
K04	조홍	Flush	귀와 꼬리를 포함한 전신이 붉게 되는 상태로 일과성의 발적이다.
K05	창백	Paleness	피부 또는 점막이 하얗게 되는 상태로 혈관수축에 의해 일어난다.
K06	빈혈양상	Anemic	붉은기가 없어지고 창백하게 보이는 상태. 특히 이개 및 사지에서 현저하다.
K07	사이아노시스	Cyanosis	피부(꼬리, 발바닥)와 점막(입)이 보라색으로된 상태. 동맥혈산소포화도가 저하될때 발현하는 환원헤모글로빈의 증가가 원인으로 모세혈관이 정맥혈로 확장되어 있어 농청~동사색으로 나타난다. 특히, 이개, 코, 사지말단등 말초부가 현저히 자색이 되는 주로 심폐기능부전에 의해 일어난다.
K08	발진 피진	Eruption	피부 또는 점막에 급속하게 퍼지는 피부병. 특히, 어떤종의 피진과 같이 전신적 질환이 국소 증상으로 나타날때에 사용된다. 발진에는 이하처럼 구진, 담마진, 홍반, 자반, 백반(a~e)을 포함, 이들의 식별이 곤란할때에 발진으로 한다.
K09	a.구진	Papule	피부면에서 융기한 변화(수mm~1cm정도)로 대다수는 피부의 조직내의 세포침윤에 의해 일어나 있다.

Code	전신적 증상		해설
K10	b.담마진	Urticaria	국한성으로 진피상층의 부종이 발생하기 때문에 피부면이 국한성, 경계선명하게 편평하게 융기하는 것. 모세혈관의 투과성 향진에 의해 혈장성분이 조직내에 유입하는 것에 의해 나타난다.
K11	c.홍반 발적	Erythema	피부표면 일부가 빨강게 된 상태. 진피상피의 혈행장애에 의해 혈관이 염증성으로 확장하는 것에 의해 나타난다. 따라서 유리판으로 압박하면 퇴색한다.
K12	d.자반 울혈반	Purpura	피부표면 일부가 자색으로 된 상태. 진피 또는 피하조직내의 출혈에 의한 것으로 압진으로 사라지지 않는다.
K13	e.백반	Leukoderma	피부색소가 사라진 백색반상의 변화. 국소적 탈색(local depigmentation)
K14	피부의 퇴색 피부의 탈색	Depigmentation of skin	피부색소가 사라져 피부전체의 색이 연해진 상태
K15	종창	Swelling	신체의 국부가 부은 것 이것에는 충혈(hyperemia), 울혈(congestion), 부(수)종(edema), 기종(emphysema)가 포함되고 부풀어 올라있고 축축하다(습기가 많음). 부어 있으나 다소 부드럽다. 그외의 것도 포함할지 판별가능하면 이하의 항목(a~c)으로 한다.
K16	a.충혈	Hyperemia	어떤 국소의 유혈량이 정상보다 증가해있는 상태. 충혈을 일으킨 국소에서는 선홍색을 띠고, 조직온도가 높아지고 용적이 증가한다.
K17	b.울혈	Congestion	국소의 정맥 및 모세관내의 정맥혈이 증가한 상태. 정맥의 환류장애에 의해 국소의 cyanosis, 발적, 종창을 일으킴. 원인이 지속되는 경우에는 그 조직내의 수종, 출혈 등의 2차 병변을 일으키는 것이 있다.
K18	c.부종	Edema	국소적 또는 전신적으로 피하조직의 조직간에 조직액이 증가 저류해 있는 상태
K19	종양 결절	Mass Nodule	만지면 덩어리의 것을 느낀다. 커지면 육안적으로 이상한 융기로 관찰된다. 농포, 수포상의 부드러운 것, 딱딱한 것이 있다. 서서히 커지는 것이 많다.

Code	전신적 증상		해설
	창상	Wound	피부나 점막의 손상 표면이 외력에 의해 손상된 상태. 절상, 좌상, 찰과상, 교상등이 있다. 외상은 그 수와 출혈 정도로 3단계로 나뉜다. 경도로는 상처는 1~2개소에서 출혈은 적거나 거의 없다. 중등도에서는 상처는 몇군데에서 보이고 출혈이 인정된다. 고도에서는 전신이 상처투성으로 다량의 출혈이 보인다. 동물을 집단으로 장기간 사육하고 있으면 수컷의 경우 군내에서 싸워 많은 외상이 나타난다. 경도의 외상은 그 부위도 기록하도록 한다.
K20	a.교상	Bite wound	물린 상처로 경도의 것은 단지 치흔을 세기고 피하에 일혈반을 남기는 것에 지나지 않으나 때로는 체강까지 달해 장기의 손상, 내출혈을 일으키는 것도 있다.
K21	b.좌상	Contused wound	충돌, 전도, 타박등. 둔성외력에 의한 피부, 점막의 개방성 손상으로 복잡하게 조직의 파괴, 괴사, 감염이 현저하다.
K22	c.소창	Scratched wound	손발톱 등에 의해 긁는것에 의해 개방성 손상을 낳은 것으로 피부 또는 동시에 다른 조직과 연결이 끊어지거나 또는 이들 조직의 일부에 결손을 낳은것
K23	d.절상	Incised wound	예리한 물건이나 견인성으로 작용하여 조직의 연결이 끊어진 것으로 상처은 예리하게 열려있고, 상처부위는 평활하고 주위 조직의 손상이 적고 출혈이 많다.
K24	e.열상	Lacerated wound	둔체에 의해 상처를 입은 것으로 국소는 상처가 열리고 갈기갈기 찢긴 상처로 되기 쉬움
K25	f.찰상	Excoriation	외력이 피부표면에 평행하게 작용한 잔재성의 창상
K26	출혈	Hemorrhage	혈액이 혈관밖으로 유출해 있는 것이 명확할 때 사용한다. 분명한 경우는 적색반, 적색액, 적색고형물 등의 표현을 한다. 혈관의 파괴 및 혈관벽의 투과성 항진에 의해 일어난다.

Code	전신적 증상		해 설
K27	육아	Granulation	미세하며 등근 육질결합조직돌기가 상처 궤양, 염증 등의 표면에 치유의 과정에서 형성된 조직
K28	경결 경화	Induration	만지면 딱딱한 응어리가 있다. 조직 또는 그 일부가 예를들어 충혈, 염증등 때문에 결합조직 증식을 가져와 딱딱하게 되는 것을 말한다.
K29	농양 화농	Abscess	부풀어 올라 있고, 탄력이 있으며 농즙이 확실 히 인정되는 것.
K30	수포	Bulla	표피 또는 피하에 장액이 국한성으로 저류해 융기하고 그 내용이 피막을 통해 보인다.
K31	등포	Pustule	수포내 내용이 혼탁해 황색으로 보이는 경우
K32	미란	Erosion	피부 또는 점막이 뚫어진 것과 같은 상태. 수포 가 깨어져 생긴다. 진피, 점막상피의 표층이 국 한해 결손된 것으로 치유후 반흔을 남기지 않 는다.
K33	궤양	Ulceration	미란보다 깊은 진피이하에 달한 결손으로 출혈 이 있고 종종 농태로 덮여진다. 궤양은 육아에 의해 파묻히고 주위로부터 표피가 늘어나 이것 을 덮고 반흔을 형성한다.
K34	가피형성	Crust formation	딱지가 붙어 있는 상태. 창상이나 궤양의 치유과정에서 창구에 있는 백 혈구, 섬유소 또는 응혈, 괴사조직편등이 합체 응고해 가피를 형성한다. 피부상피가 각질편이 되어 탈락하는 것
K35	표피박리	Exfoliation	피부상피가 각질편이 되어 탈락하는 것
K36	반흔 상처	Scar	궤양 등의 조직결손의 치유후 그 표면에서 다 소 융기하거나 함몰하는 것이 있다. 색소가 가 라지거나 침착을 동반한다.
K37	섬유증 못(굳은살)	Callosity	압력 또는 마찰에 의한 압박자극이 장기간에 걸쳐 반복해서 가해진때에 생기는 표피각질층 의 국한성 증식, 비후

Code	전신적 증상		해 설
K38	귀열 열창	Fissure	피부가 분리하여 피부염을 일으킨 것으로 상처가 얇은 상태
K39	부육의 형성	Sloughing	피부의 피사부에서 탈락한 조직(부육)을 형성하는 것을 말한다(딱지).
K40	피부의 착색 화	Coloring of skin	투여한 피검물질이 원인으로 피부가 착색된 상태
K41	유선의 경화	Induration of mammary gland	난포호르몬과 황체호르몬의 분비가 장기간에 걸쳐 지속작용하여 유선이 발달한 상태. 일반적으로는 임신기간의 후기에 인정된다. 분만후는 포유를 위해 경화되었다가 수유가 충분히 이루어지지 않은 경우 경화상태는 지속된다. 호르몬제의 투여나 하수체종양의 경우에도 인정되는 경우가 있다.
K42	수컷유선의 발달	Gynecomastia	유선, 유두가 팽대해 탄력을 갖고있는 상태. 호르몬제, 항정신약 등의 투여에 의해 일어난다.
K43	유두비대	Hypertrophy of mamilla	유두가 변색, 팽대해 탄력이 있고 활기를 띠는 상태. 통상임신 후기부터 인정되나 호르몬제의 투여에 의해 인정되는 경우도 있다.
K44	성피	Sexual skin	월경주기의 전반(배란전)에, 에스트로젠의 작용에 의해 회음주위, 미근부의 피부가 종장, 홍조를 띤다. 빨간머리 원숭이, 부다오원숭이에서 특징적이다.
K45	꼬리의 결락	Loss of tail	꼬리의 일부또는 전부가 떨어진 상태. 외상 또는 환경의 온도, 습도이상에 의한 순환기 장애가 원인이 된다.
L	두부, 경부	Head and Neck	
L01	사경	Wryneck	경부근육의 수축에 의해 머리가 돌아가고 경부를 한쪽으로 기울인 상태로, 외력에 의해서도 정상으로 회복시키는 것이 불가능한 상태. 주로 내이염 그외 뇌염, 하수체선종에 의해 일어난다.
L02	두부추락	Head drop	경근의 탈력에 의해 경부를 지지하지 못하는 상태. 운동신경말초로서 근육과 신경과의 접합부, 즉 근조직내 신경말단의 흥분성의 소실에 의해 일어난다.
L03	두부 반전동 작	Head shaking	두부를 반복하여 흔드는 동작

Code	전신적 증상		해 설
M	눈, 안구	Eye, Eyeball	
M01	안검종창	Swelling of lid margin	안검이 확실히 부은 상태
M02	안검부종	Palpebral edema	과다한 수분저류에 의한 눈거풀의 종창(때로 수포 또는 블록블록 부은 것처럼 외관을 나타내는 경우가 있다)이 있는 상태
M03	안검연의 발적	Erythema of lid margin	눈거풀 주위의 염증 등에 의한 충혈 및 발적(때로 발진이 있는 것이 있다)
M04	안검연의 미란	Erosion of lid margin	눈거풀의 주위가 침적되고 얇은 궤양상으로 된 상태
	안검폐쇄	Palpebral closure	안검의 폐쇄상태로 충칭적으로 사용한다. 또 신경독성 스크리닝검사에 있어서 등급을 매겨 (eyelid wide open, Ptosis, Eyelid completely shut) 이용할 때도 있다.
M05	안검탈색	Depigmentation of eyelid	안검주위의 색소가 없어지고 백색으로 되는 상태
M06	안검하수	Ptosis	상안검이 내려오고 눈이 충분히 떠 있지 않고 안검을 일단 뜨고는 곧 감는 상태. 동안신경 또는 안면신경이 마비되어 상안검의 거근의 마비에 의한 미비성하수와 상안검권근의 발육결여, 안구함몰, 종양, 혈종 등에 의한 기계적 하수가 있다.
M07	반안	Incomplete eyelid opening	눈을 반만 뜬 상태. 마약중독의 상태에서 나온다.
M08	폐검 폐안 안검폐쇄	Lid closure Eyelid closure Closing eyelids Closed eyelid	안검을 자극하거나 몸을 손으로 만지면 눈을 뜨나 다시 감으려하는 상태. 경도의 자율신경, 중추신경의 억제의 경우에 일어난다.
M09	안검유착 안구유착	Symblepharon	안검이 유착에 의해 떠지지 않는 상태. 또는 안검이 안구에 유착한 상태
M10	개검부전 개검지연	Fused eyelid Retarded eyelid opening	정상의 개검예정일에 안검이 떠져있지 않은 상태
M11	안검경련	Blepharospasm	안륵근 또는 안검륵근의 경련에 의해 불수의적으로 안검이 깜박이는 상태
M12	안검반사의 소실	Loss of eyelid reflex	건모 또는 안검에 접촉하면 폐안하는 반사가 소실한 상태

Code	전신적 증상		해 설
M13	결막종창	Swelling of conjunctiva	결막이 완전히 부은 상태
M14	결막부종	Chemosis	결막의 과도한 수분저류에 의해 각막 주위에 생긴 종창(때로 수포를 동반하는 경우가 있다)
M15	결막충혈	Hyperemic conjunctiva	결막이 혈관확장에 의해 충혈한 상태
M16	결막출혈	Conjunctival hemorrhage	결막에 혈관으로부터 출혈이 인정된 상태
M17	결막빈혈 결막창백	Conjunctival anemia	결막이 빈혈에 의해 정상보다 창백해진 상태
M18	순막종장	Swelling of nictating membrane	순막(제 3안검)이 명확하게 부어있는 상태
M19	순막노출	Exposure of nictating membrane	순막은 통상내 안각에 있으나 이것이 염증이나 종양, 비대 등에 의해 눈에 노출된 상태
M20	순막이완	Relaxation of nictating membrane	순막이 이완해 명백히 안구의 일부를 덮고 있는 상태
M21	유루	Lacrimation	과도한 투명 또는 유색눈물의 유출로 눈이 젖어 있다.(정상상태에서도 눈은 젖어있기 때문에 판정에 주의한다) 또는 눈의 주위가 젖어 있는 상태
M22	적색유루	Reddish tear	안검에 적색 또는 흑색의 배출물이 유출 또는 부착되어 있는 상태. 홍루는 하드리안선의 분비물에 포함된 폴리핀이 빛에 반응해 적색을 띠는 것에 기인한다. 혈루로도 불리나 혈액은 아니다. 자율신시경 이상, stress에 의해 일어난다.
M23	안지 안루	Eye discharge	눈이나 눈의 주위에 부착해 있는 눈꼽으로 장액성과 농성이 있다. 안구 및 안점막의 손상, 종양, 이물, 국소의 감염에 의한 자극 등에 의해 일어난다.
M24	안구돌출	Exophthalmos	안구가 이상적으로 돌출해 있는 상태. 안와내용의 증대, 외안근긴장의 감소, 자율시경이상, 안와나 주변부의 순환이상에 의해 일어난다.

Code	전신적 증상		해설
M25	안구팽대 안구종대	Enlargement of eyeball	안구가 이상적으로 팽윤해 돌출해 있는 상태. 안구의 증대(출혈, 염증, 종양)에 의해 일어난다.
M26	안구탈구	Luxation of eyeball	안구돌출의 정도가 크고, 안구의 적도부 이상이 안검부외로 탈출해 있는 상태
M27	안구함몰 안구함입	Enophthalmos	안구가 임상적으로 안와의 안쪽에 위치해 있는 상태
M28	안구위축	Phthisis of eyeball	안구가 명확하게 위축 또는 연화된 상태
M29	안구건조	Dry eye	안구표면이 마른 상태
M30	안구파열	Rupture of eyeball	안구가 파열된 상태
M31	안구혼탁	Opacity of eyeball	투명해야할 안구가 혼탁한 상태. 초자체 혼탁 (opacitas corporis vitrei)과 수정체혼탁의 판별하기 어려운 경우에 일반적으로 사용하기도 한다.
M32	안구변색 안구빈혈	Discoloration of eyeball Anemic eyeball	눈의 적색이 퇴색 내지 암적색을 띠고 있는 상태(때로 눈의 색조가 피검물질에 의해 변색한상태도 말한다)
M33	안구출혈	Hemophthalmia	안구내에 혈액이 삼출되어 있는 상태
M34	안구진탕	Nystagmus	안구의 불수의한 빠른 운동(수평, 수직, 회전 및 이들의 합병)
M35	강막의 충혈	Scleral congestion	강막(백안)부분이 충혈되어 있는 상태
M36	강막의 출혈	Scleral hemorrhage	강막부분에 점상 또는 반상으로 출혈한 상태
M37	각막혼탁	Corneal opacity	각막의 혼탁상태에 총칭적으로 이용한다. (이하의 a~d와 같이 분류해 사용하는 경우가 있다)
M38	a.각막백반	Corneal leukoma	각막실질, 심층의 병적변화로 계속해서 각막으로 반흔혼탁이 남고 혼탁이 괴상으로 투시되지 않는 상태
M39	b.각막반	Corneal spot	상기의 경우에서 혼탁이 얇고 투시되는 상태
M40	c.각막편문	Corneal nubecula	상기의 경우에서 혼탁이 흐리고 홍채의 조리개도 투시가능한 상태

Code	전신적 증상		해 설
M41	d.각막부종	Corneal edema	각막이 이상적으로 과도한 수분으로 부풀어진 (비후)상태로 수포, 혼탁을 동반하기도 한다.
M42	각막미란 각막상피의 결손	Corneal erosion	각막의 상피부분이 침식되어 얇은 궤양상의 상태. 심해지면 각막궤양이 된다. 형광 점안으로 염색해서 관찰
M43	각막혈관신 생	Corneal vascularization	각막에 주위로부터 혈관이 새로 형성되어 침입한 상태
M44	파누수	Pannus	육아조직의 증식을 동반한 각막의 표재성 혈관 신생
M45	각막반사 소 실	Loss of corneal reflex	각막을 건드려도 안점을 달지 않는 상태. 신경근, 지각신경 장애가 생긴 경우 일어난다.
M46	홍채유착	Synechia	홍채가 각막의 이면에 유착(전유착) 또는 수정체에 유착(후유착)한 상태
M47	홍채종창	Iris swelling	홍채가 이상으로 부풀어 있는 상태
M48	홍채충혈	Iris congestion	홍채혈관이 확장해 충혈해 있는 상태
M49	홍채출혈	Iris hemorrhage	홍채로부터 출혈하는 것. 출혈이 일어나면 적색반을 나타낸다.
M50	동공부동	Anisocoria	라우의 동공피가 부동의 상태
M51	동공반사소 실	Loss of pupillary reflex	빛을 쬐어 동공의 수축이 인정되지 않는 상태
M52	산동	Mydriasis Pupillary dilation	빛의 유무에 관계없이 동공의 산대로서 빛을 가해도 완전히 축동하지 않으며 동공이 열린 상태. 교감시경 흥분등으로 일어난다.
M53	축동	Miosis	빛의 유무에 관계없이 동공의 극도로 축소한 상태. 부교감 신경흥분등으로 일어난다.
M54	수정체탈구 수정체변위 수정체전위	Lens luxation	수정체가 정상의 위치로부터 떨어진 상태
M55	백내장 수정체혼탁	Cataract	수정체가 혼탁된 상태. 조직학적으로는 수정체 상피 및 수정체섬유의 변성이 인정된다. 랫트에서는 동물실의 조명의 영향에 의해 백내장이 보이는 것이 많다.

Code	전신적 증상		해설
N	귀	Ear	
	음에 대한 반응	Sound response	음에 대한 반응은 동물 앞에서 가볍게 손을 두드리거나 손가락을 울리거나 케이지를 가볍게 두드려 그때의 반응을 관찰한다.
N01	청각반응향진 음에 대한 반응의 향진	Increase in auditory response	음자극에 대해 놀라 뛰어오르는 것. 놀라 뛰어오르거나 빙글빙글 뛰어다닌다. (때로 발성을 동반한다)
N02	청각반사감소 음에 대한 반응의 소실	Decrease in auditory response	음자극에 대해 반응이 완전히 없는 것. 반응에 극단적으로 둔한 것. 명확하게 둔한 것이 있다.
N03	이개반사소실	Loss of pinna reflex	귀의 내측을 가볍게 문지르는 것에 의해 생기는 이개의 연축. 감각, 신경근, 자율신경의 이상
N04	이루	Otorrhea	귀로부터 이상하게 분비물이 배출되는 것. 외이도(External auditory meatus)로의 부드러운 황갈색의 배출물. 귀지와는 구별이 된다.
N05	이공의 출혈	Auditory meatus bleeding	귀구멍에서 출혈된 상태
P	코	Nose	
P01	비즙	Nasal discharge	비점막으로부터의 분비물 비강에서의 분비물의 배출로 그것에 의해 비강 주위가 더러워져 있는 경우가 있다. 정상상태에서는 보이지 않는 것으로 증상이 발현한 시점에서 관찰기록한다. 단 유연과 혼동되지 않도록 주의해서 관찰한다. 감염증 등에 의해 비즙이 보이는 경우도 있다.
P02	비농루	Nasal pyorrhea	기도에 있어서 병적인 삼출에 의해 비강으로 배출된 삼출물을 비루라 한다. 특히 점액성 더욱이 농성의 비루를 다량으로 배출하는 경우를 비농루라 한다. 폐농양등에서 보인다.

Code	전신적 증상		해 설
P03	코주위의 오염 비단의 오염	Dirty nose	코끝이 비즙등으로 오염된 상태. 소동물에서는 전신상태가 나빠진 경우등에서 나타난다.
P04	비출혈	Nasal hemorrhage Nasal bleeding Epistaxis	비공으로의 출혈 외비공으로부터의 혈성 배출물이 나타나나 반드시 비점막의 혈관손상에 의한것만이 아니다. 폐출혈, 폐수종때의 각출물일 때도 있다.
P05	비단의 건조	Dry nose	개, 고양이는 비단에 특수한 분비조직을 갖고 있어 건강한 것은 항상 습해 있다. 발열 및 체내의 대사부전이 지속할 때는 비단은 건조해지고 심하면 갈라지기도 한다.
Q	입	Mouth	
Q01	유연	Salivation	타액의 분비과다의 상태로 입안이 타액으로 젖어있거나 입의 주위, 아래턱이 그 때문에 젖어 있다. 시험물질의 작용이외에 피검물의 쓴맛(자극성)에 의해서도 야기된다. 자극성에 의해 야기된 유연은 투여직후에만 보이고 그외의 유연은 시험물질의 자율신경에의 작용을 나타낸다. 유연은 그 양에 따라 3단계로 나누어 입주변에만 유연이 보이는 것을 경도로 하고 입에서 턱까지 유연이 나타나 있는 경우를 중등도, 더욱 넓은 범위로 된 상태를 고도로 한다. 부교감신경의 흥분 등에 의해 나타난다. 개에서는 구토의 전구증상으로 또 조건반사적으로 일어나는 것이 많다.
Q02	구토	Vomiting	구토는 운동에 의해 위내용물이 토출하는 경우 입으로부터 위내용물을 제지하지 못하고 구출하는 상태로, 소화관의 운동장애때 많이 보이고 구토중추의 흥분에 의해 나타난다. 뇌압항진, 뇌순환장애, 소환관으로부터의 자극등이 원인이다.
Q03	입주위의 더러움	Staining around mouth	입주위가 더러워져 있거나 그 원인(비즙, 유연, 구토물)이 식별되지 않는것.
Q04	토혈	Hematemesis	혈액의 토출. 구강, 식도, 위 및 십이지장으로부터 출혈한 혈액의 토출을 말한다. 혈액으로 확인된것만, 다른 것은 적색의 토액으로 한다.

Code	전신적 증상		해 설
Q05	구토물	Vomitus	혈액성, 포상 또는 식물 잔사가 섞인 토물등이 있다.(혈액이 확인되지 않는 경우는 적색토물)
Q06	구역질	Nausea	위내용이 토출되지 않는 구토운동. 구토의 전조로 위점막의 자극, 염증, 장질환등. 구토중추를 직접 또는 반사적으로 자극하는 것에 의한다. 구토운동의 발생을 예상시키는 운동(유연, 활기, 불안한 듯한 운동)을 동반하는 것이 있다.
Q07	혀로 핥기	Licking chops	혀로 입주위를 돌려가며 핥는 것
Q08	개구장애	Lockjaw	3차 신경장애 등에 교근의 경련으로 입이 열려지지 않게되는 증상을 말한다.
Q09	이의 과성장	Overgrown teeth	이가 이상적으로 성장하는 상태. 부정교합 또는 분말사료섭취에 의해 이의 마모부족으로 생기는 경우가 있다.
Q10	부정교합 교합이상	Malocclusion	정상적으로 씹기가 불가능한 상태
Q11	이의 결손 이의 파절	Loss of teeth	이가 치추로부터 빠지거나 또는 부러진 상태
Q12	이의 변색	Discoloration of teeth	피검물질 등에 의해 이의 색이 변한 것
Q13	치육종창	Epulis	치육에 생긴 비교적 딱딱한 종창
Q14	치육의 출혈	Gingival bleeding	치육으로부터의 출혈 치색의 집적, 치주골막염, 충치, 영양불량, 감염증, 비타민 결핍증, 중금속중독시에 나타난다.
Q15	치육의 퇴색	Gingival discoloration	빈혈상태 등의 때에 치육이 퇴색화한다.
Q16	구취	Halitosis	구강, 상기도, 식도, 위 등의 질환이나 그외의 호흡기질환에 의해 나타난다.
Q17	혀의 변색	Discoloration of tongue	빈혈, 청색증, 말초혈관확장등, 피검물질에 의한 착색, 염증에 의한 발적등이 원인이 된다.
Q18	혀의 건조	Dryness of tongue	정상의 혀는 습해 있으나 탈수상태, 타액분비억제 등의 경우 건조상태가 된다.
Q19	설태	Coated tongue	혀표면(상면 특히 중앙부)에 부착하는 상피의 성분의 집적, 구강건조를 일으킨 경우.

Code	전신적 증상		해설
Q20	혀의 위축	Atrophy of tongue	혀를 지배하는 운동신경의 마비에 의해 근위축이 일어난다. 위축된 혀는 얇고 작아지며 표면이 요철을 일으킨다. 2차 뉴우런의 장애에서는 위축으로 섬유성수축을 동반한다.
Q21	혀의 종창	Swelling of tongue	갑상선 기능저하중에서의 점액수종이나 아밀로이드증상때에 보이고 또 염증을 일으킨 경우도 종창이 관찰된다.
Q22	혀의 표면평활	Smooth surface of tongue	혀유두의 위축에 의한다. 종종 발적을 동반한다. 비타민 B ₁₂ 결핍증등 영양장애에서 보인다.
Q23	혀의 궤양	Ulcer of tongue	피검물질의 영향으로 혀나 구강전막의 미란 또는 궤양이 생기기도 하나 다른 열성질환이나 소화기장애 등의 전신이상 있을 때 생긴다.
Q24	혀의 상처	Wound of tongue	자기의 이로 손상하는 경우가 많으나 그 원인이 되는 것은 잦은 기침. 구토 또는 간대성 경련이다. 투여때 외상도 발생한다.
Q25	구개의 종창	Swelling of palate	구강내의 염증 등의 경우에 구개점막이 붓는 상태
Q26	구개의 퇴색	Discoloration of palate	빈혈, 혈압저하등 국소혈액순환의 변화에 의해 구개의 색조가 붉게 된 상태에서부터 창백해지는 것. 단 개의 경우 구개가 흑색의 경우가 있고 판단할 수 없는 경우가 있다.
Q27	구개의 손상	Wound of palate	투여, 씹는것 등의 물리적 영향에 의해 구개가 상해를 입는 것. 구개열이 생긴 경우에는 비공으로부터 출혈이 보일때도 있다.
Q28	인두의 종창	Swelling of pharynx	염증, 반복하는 구토, 기침 등의 때에 인두가 붓는 것. 발적을 동반하는 경우도 있다.
Q29	인두의 퇴색	Discoloration of pharynx	빈혈, 혈압저하등 국소혈액순환의 변화에 의해 인두의 색조가 붉게 된 것으로부터 창백해지는 것
Q30	인두의 손상	Wound of pharynx	딱딱한 고형의 물질의 연하 또는 구토 등의 물리적 영향에 의해 인두가 상처를 입는 것

Code	전신적 증상		해 설
R	복부	Abdomen	
R01	복부팽만	Abdominal distention	복부가 이상적으로 팽창해 있는 상태. 장기의 비대 또는 복강내에 다량의 장액이 저류해 있는(복수)것이 있다. 울혈, 림프계 순환장애, 저단백증등이 원인이 된다.
R02	고창	Flatulence	소화관내에 다량의 가스가 저류해 복부팽창을 일으킨 상태. 빈호흡 내지 호흡곤란, 순환장애, 심계항진이 보인다.
S	항문, 성기부	Anogenital region	
S01	음경돌출 감돈포경	Prolapse of penis	피룬내지 포피구의 협착 때문에 음경이 포피강내에 들어갈 수 없게 된 상태. 감돈포경이라고도 한다. 음경돌출에 포피, 음경의 종창, 괴사 또는 외상도 보인다.
S02	사정분비물	Ejaculatory discharge	성선으로부터의 분비물(사정물). 색조, 양, 성상등을 관찰한다. 랫트에서는 케이지의 트레이, 원숭이에서는 피모부착물을 본다. 원숭이에서는 자위행위도 드물게 보인다. 요로계 질환에 의한 분비물과 식별한다.
S03	정소하강	Testicular descent	정상의 마우스, 랫트에서는 생후 5주까지 완료한다. 유약랫트, 마우스의 독성시험일반적으로는 생식독성시험)을 실시하는 경우에 관찰한다.
S04	발정성 변화 외음부종창	Swelling of vulva	암컷의 음부가 종창하여 질부터 출혈이 보인다. 개는 1년에 1~2회 발정한다. 발정지속기간은 2주간이내. 비글견에서는 통상 9~11월령에서 보인다.
S05	월경	Menses Menstruation	영장류의 질에서 출혈. 성숙한 암컷의 자궁점막에서 일어나는 주기적 출혈로 이때 자궁점막도 기저층을 남기고 이탈하므로 혈액과 섞여 외성기에서 배설된다. 통상 원숭이는 3세이상에서 보이고 1~1.5개월에 1회 보인다.
S06	질분비물	Vaginal discharge	질에서의 분비물이나 발정혈(개), 월경혈(원숭이)과 구별한다.
S07	비뇨, 생식기 출혈	Urogenital bleeding	비뇨기 및 생식기로부터의 출혈, 비뇨기 또는 생식기계의 염증 및 종양 등에 의해 보이는 경우가 있다. 발정혈(개), 월경혈(원숭이)과 구별한다.
S08	질구출혈	Vaginal bleeding	질로부터의 출혈, 외상 또는 유산(태반박리, 자궁과열) 등에 의해 보이는 것이 있다. 발정혈(개), 월경혈(원숭이)과 구별한다.

Code	전신적 증상		해 설
S09	질탈	Colpoptosis	질 이탈출 또는 하강하여 외부로 나와있는 상태
S10	하복부의 오염 회음부주위의 오염 항문주위의 오염	Soiled perineal region	실금, 설사, 연변, 혈액 등에 의해 하복부가 더러워진 상태
S11	탈항	Prolapse of anus	항문이 외부로 돌출한 상태. 노령의 동물에 있어 가끔 나타나는 경우가 있다.
T	배설	Excretion	
T01	뇨실금	Incontinence of urine Urinary	배뇨의 제어가 결여된 상태를 가르킨다. 뇨루라고도 한다. 방광이 충만하지 않고 일어나는 경우를 진성, 방광이 충만해 일어나는 것을 위성이라 한다. 방광 괄약근의 기능장애가 최대의 원인이다.
T02	빈뇨	Pollakiuria	배뇨횟수가 증가한 것으로 빈회배뇨라고도 한다. 뇨량증가에 의한 신경성, 방광주위 장기의 영향, 요로의 염증, 방광벽의 신전성쇠약, 방광내 이물 등의 원인이 있다. 무처치 동물에 비해 배뇨횟수가 많은 경우를 말한다.
T03	다뇨	Polyuria	배설횟수도 많고 뇨배설량이 많은 상태에서 깔개를 사용하고 있는 경우는 그 젖은 정도로 판단가능하다. 음수량의 증가, 사구체여과율의 증가, 뇨농축능 저하, 진상피의 분비작용의 항진, 신혈관의 수축에 의한 혈압상승, 고침투압 이뇨 등에서 보인다. 뇨붕증, 당뇨병에서도 보인다.
T04	뇨량감소	Oliguria	뇨배설량이 감소해 있는 상태로 깔개를 사용하고 있는 경우는 젖은 정도로 판단가능한 경우도 있다. 사구체 여과율의 저하, 신혈류량의 감소, 뇨세뇨관 재흡수의 항진등으로 나타난다. 원인으로서는 섭취수분의 감소, 설사, 구토나 발한 등에 의한 수분의 손실, 복막염으로 삼출액이 저류한 시기, 신장 또는 심기능장애등이 있다.
	뇨폐	Retention of urine	뇨가 방광에 충만해 있음에도 불구하고 배뇨할 수 없는 상태로 방광경부로부터의 뇨

Code	전신적 증상		해 설
			도입구까지의 어디엔가 생긴 내장의 폐색에 의해 일어나는 증상이다. 요도협착, 뇨도이물(결석, 출혈시의 혈병), 뇨도종양 및 외상성 뇨도열과 같은 뇨도질환 및 전립선 비대 등의 경우에 일어나기 쉽다. 또 뇨도에 통과장애가 없어도 방광이 방광이완증의 말기에는 폐뇨가 온다.
T05	무뇨	Anuria	배뇨가 완전히 보이지 않는 상태. 정의에서는 무뇨는 신장에서 뇨가 생성되지 않는 것을 말한다. 신혈류량의 현저한 감소, 고도의 뇨세관장애에 의해 일어난다. 뇨는 생성되나 뇨로 통과장애에 의해 일어나는 뇨폐와는 구별된다.
T06	혈뇨	Hematuria	이상적으로 다수의 적혈구가 혼입해있는 뇨로 방광, 사구체 또는 뇨세관장애때의 적혈구가 누출되어 일어난다.
T07	적색뇨	Reddish urine	적색의 뇨로적혈구 또는 철색소가 없는 것을 확인한다. 피검물질에 의한 적색착뇨의 경우도 있다.
T08	혈색소뇨 헤모글로빈 뇨	Hemoglobinuria	무언가의 원인으로 대량의 적혈구가 파괴되 유리한 철색소가 간장, 비장중에 모두 수용하지 못해 뇨중에 배설된 것. 뇨는 적갈색 내지 암갈색을 띠고 다량의 단백질을 포함하나 적혈구는 없다. 그러나 철색소의 침전이 과립상, 괴상 또는 원주상으로 존재한다. 물과 같은 정장액을 정맥내 투여하면 혈관내 용혈 때문에 철색소뇨가 보이나 이것은 신질환은 아니다.
T09	녹색뇨	Glucosuria	트립토판의 장관내 분해물 때문에 녹색의 색조를 띠는 뇨.
T10	착색뇨	Chromaturia	뇨중에 이상한 색소가 배설되어 생긴다.
T11	농뇨	Pyuria	농이 혼입된 뇨. 농은 농장 및 농구로 되어있고 농장은 삼출된 혈장성의 체액성분으로 항체 또는 단백분해효소를 포함하고 농구는 세포성분으로 주로 백혈구 및 그들이 변성한 것이다.

Code	전신적 증상		해설
T12	농축뇨	Oligohydria	농도가 이상하게 높은뇨. 즉 고비중 뇨이고 열성병, 신염 등의 경우에 뇨량은 감소해 비중이 높아진다. 당뇨병의 경우에는 뇨량도 많아지고 비중도 높아진다.
T13	혼탁뇨	Cloudy urine	뇨가 흰것같이 혼탁해있다. 백탁뇨(white turbid urine)이라고도 한다. 토끼에서는 정상이다. 토끼의 뇨에는 결정성의 성분으로 triple phosphate, calcium, carbonate을 함유한다.
T14	대변실금	Involuntary defecation	대변의 배설억제가 불가능한 상태. 척추질환에 의한 직장점막의 자각장애, 항문반사장애, 괄약근의 손상 등의 원인에 의해 일어난다.
T15	탈분	Defecation	처치후에 보이는 배변행동으로 정상적인 것이 아닌 변화가 발생한 경우를 말한다.
T16	연변	Soft stool	정상변보다도 부드러운 설사로는 되지 않는 정도의 변. 변은 일단 형태를 형성하고 있다. 부드럽기는 하나 일부원형을 지키는 상태.
T17	설사	Diarrhea	수분이 많은 액상 또는 액상에 가까운 변을 배설하는 것으로 항문주위에 변이 부착해 있는 것으로도 확인된다. 장관내에 흡수되기 힘든 고침투압성의 물질이 다량으로 존재하는 경우, 장관으로의 분비가 이상으로 항진한 경우, 장관점막의 투과성이 이상적으로 항진한 경우 장관운동의 이상에 의한 경우등이 있다.
T18	수양변	Watery diarrhea	물과 같은 변,대량의 장액에 의해 부드럽게 된 분변이 배설된다.
T19	죽상변 니상변	Pasty stool Muddy stool	액상변과 연변의 중간상태
T20	점액변	Mucous stool	다량의 점액을 포함한 끈적한 변. 붕등으로 짙으면 묻어나는 상태
T21	포말변	Spluttery stool	기포가 혼입한 상태의 변

Code	전신적 증상		해설
T22	혈변	Bloody stool	혈액이 혼입한 상태의 변
T23	점혈변	Mucous and bloody stool	점액과 혈액이 부착된 분변
T24	적색변	Reddish stool	붉은색을 띤 변(혈구가 확인된 경우는 혈변으로 한다) 피검물질 또는 그 대사물 등의 영향 때문에 혈변처럼 보이는 경우가 있다.
T25	흑색변	Blackish stool	흑색점조(콜타르상태)를 띤 변으로 소화관의 출혈을 의심시킨다. 토끼의 점막피막변(토끼의 연분)은 정상이므로 제외한다.
T26	회백변	Grayish stool	회거나 회색같은변. 피검물질이 혼입한 경우 또는 담도 폐색의 때에도 보인다. 토끼에서는 백탁뇨로 오염되어 보여진다.
T27	녹색변	Greenish stool	녹색을 띤 변,담즙을 많이 포함한 분변, 공복상태가 길면 보인다.
T28	무변	No stool	트레이 등에 장시간 변이 보여지지 않는 상태. 공복상태가 길면 보인다.
T29	제리상변	Jelly like stool	제리상의 부드러운 변. 장에서 담즙색소를 혼입하지 않고 배변된 것. 젤라틴 캡슐이 분해되지 않고 배설되는 경우에 제리상변에 유사한 경우가 있다.
T30	약물혼입변	Compound-colored feced	시험물질이 원인으로 착색된 변. 배변후 시간의 경과에 따라 변색하는 경우 또는 분무된 소독액과 피검물질이 반응하여 발색하는 것도 있다.
T31	이취	Odor	항문선으로부터 분비하는 불쾌한 냄새. 예를들어 개에서는 흥분 또는 경악한 때에, 토끼(음부의 양측의 서경선 inuinal glands)에서는 번식기에 이취를 발산한다.

2. 동물종별 해당증상

A : 외관(General appearance)

Code	증상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
A01	사망	Death	○	○	○	○	
A02	빈사	Moribundity	○	○	○	○	
A03	쇠약	Weakening	○	○	○	○	정도
A04	야윈	Emaciation	○	○	○	○	정도
A05	비만	Obesity	○	○	○	○	정도
A06	식욕부진	Anorexia	○	○	○	○	정도
A07	거식	Refusal to feed			○	○	

B : 체위, 자세(Posture, Body position)

Code	증상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
B01	복와위	Prone position	○	○	○	○	
B02	기느자세	Crawling position	○	○	○	○	
B03	횡와위	Lying on side	○	○	○	○	
B04	배와위	Dorsal position	○	○	○	○	
B05	입위	Standing position				○	
B06	좌위	Sitting position			○	○	
B07	원배위	Hunchback position	○	○	○	○	
B08	웅크린자세	Crouching position	○	○	○	○	
B09	강직	Catalepsy	○	○	○	○	
B10	기대어있는자세	Leaning			○	○	
B11	기립불능	Ananastasia	○	○	○	○	

C : 의식, 태도(Consciousness, Attitude)

Code	증상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
C01	흥분	Excitement	○	○	○	○	
C02	의식고양	Elation	○	○	○	○	
C03	불안	Restlessness	○	○	○	○	
C04	과민	Hypersensitivity	○	○	○	○	
C05	공격성	Aggression	○	○	○	○	

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비 고
C06	투쟁	Fighting	○		○	○	
C07	생기저하	Inanimation	○	○	○	○	정도
C08	의식장애	Clouding of consciousness	○	○	○	○	정도
C09	무관심	Indifference	○	○	○	○	
C10	혼미	Stupor	○		○	○	
C11	혼수	Coma	○	○	○	○	
C12	수동성	Passivity	○	○	○	○	정도
C13	착란	Confusion		○	○	○	정도
C14	꾸벅꾸벅졸음	Somnolence	○	○	○	○	
C15	혼면	Sopor	○	○	○	○	
C16	기면	Lethargy	○	○	○	○	
C17	진정	Sedation	○	○	○	○	정도

D : 행동(Behavior)

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비 고
D01	군거성의 소실	Loss of huddling	○				
D02	탐색행동 항진	Increase of exploration	○		○		정도
D03	탐색행동 저하	Decrease of exploration	○		○		정도
D04	탐색행동 증가	Loss of exploration	○		○		
D05	몸단장행동증가	Increase of grooming	○	○	○	○	정도
D06	몸단장행동감소	Decrease of grooming	○	○	○	○	정도
D07	세안행동	Face washing	○	○	○	○	정도
D08	긁기	Scratching	○	○	○	○	부위, 정도
D09	문지르기	Rubbing	○	○	○	○	부위, 정도
D10	자발운동 항진	Increase in locomotor activity	○	○	○	○	정도
D11	자발운동 저하	Decrease in locomotor activity	○	○	○	○	정도
D12	자발운동 소실	Loss of locomotor activity	○	○	○	○	
D13	도약	Jumping	○	○	○	○	정도
D14	달리기	Running	○	○	○	○	정도
D15	회전	Rolling	○	○	○	○	정도
D16	선회	Circling	○	○	○	○	정도
D17	피보팅	Pivoting	○	○	○	○	정도
D18	이상발성	Vocalization	○	○	○	○	정도
D19	거미	Tail elevation	○				정도

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
D20	자 상	Self-biting	○		○	○	정도
D21	상동행동	Stereotypy	○	○	○	○	정도
D22	환각행동	Hallucinatory behavior	○			○	정도
D23	보행실조	Ataxic gait	○	○	○	○	정도
D24	마비성보행	Paralytic gait	○	○	○	○	정도
D25	보행이상	Abnormal gait	○	○	○	○	정도
D26	비틀기	Struggling	○				정도
D27	통각과민	Hyperalgesia	○	○	○	○	정도
D28	통각둔마	Hypesthesia	○	○	○	○	정도

E : 신경계(Nervous system)

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
E01	신 전	Shivering	○	○	○	○	정도
E02	진 전	Tremor	○	○	○	○	정도
E03	경 련	Convulsion	○	○	○	○	정도
E04	강직성경련	Tonic convulsion	○	○	○	○	정도
E05	간대성경련	Clonic convulsion	○	○	○	○	정도
E06	강직성간대성경련	Tonic-clonic convulsion	○	○	○	○	정도
E07	간대성강직성경련	Clonic-tonic convulsion	○	○	○	○	정도
E08	질식성경련	Asphyxial convulsion	○	○	○	○	정도
E09	근수축	Twitch	○	○	○	○	정도
E10	섬유성수축	Fibrillation	○	○	○	○	정도
E11	섬유속성수축	Fasciculation	○	○	○	○	정도
E12	근긴장항진	Spasticity	○	○	○	○	정도
E13	근경직	Rigidity	○	○	○	○	정도
E14	근긴장저하	Hypotonia	○	○	○	○	정도
E15	근력저하	Muscle weakness	○	○	○	○	정도
E16	근위축	Muscle atrophy	○	○	○	○	정도
E17	정향반사 소실	Loss of righting reflex	○		○		
E18	후지철거반사소실	Loss of Withdrawal reflex	○		○		
E19	슬개건반사소실	Loss of patellar reflex		○	○	○	

F : 호흡(Breathing)

Code	증 상	Symptomas	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
F01	불규칙 호흡	Irreguar respiration	○	○	○	○	정도
F02	체인-스트로크호흡	Cheyne-Strokes' respiration	○	○	○	○	정도
F03	비웃호흡	Biot's respiration	○	○	○	○	정도
F04	천속호흡	Panting	○	○	○	○	정도
F05	호흡수증가	Increased respiration rate	○	○	○	○	정도
F06	호흡수감소	Decreased respiration rate	○	○	○	○	정도
F07	호흡심대	Deep respiration	○	○	○	○	정도
F08	호흡곤란	Dyspnea	○	○	○	○	정도
F09	비익호흡	Nasal alar breathing	○	○	○	○	정도
F10	종말호흡	Terminal respiration	○	○	○	○	정도
F11	무호흡	Apnea	○	○	○	○	정도
F12	수포음	Rale	○	○	○	○	정도
F13	염발음	Crepitant Whistle	○	○	○	○	
F14	신 음	Groaning	○	○	○	○	
F15	천명(씨근거리기)	Stirdor			○	○	정도
F16	기 침	Cough			○	○	정도
F17	채채기	Sneezing	○	○	○	○	정도
F18	하 품	Yawning	○	○	○	○	정도
F19	딸꾹질	Hiccp				○	정도
F20	코골음	Snore			○	○	정도
F21	비 음	Nasal noise			○	○	정도
F22	혀를 참	Clicking	○				

G : 심혈관계(Cardiovascular system)

Code	증 상	Symptomas	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
G01	서 맥	Bradycardia	○	○	○	○	정도
G02	빈 맥	Tachycardia	○	○	○	○	정도
G03	부정맥	Arrhythmia	○	○	○	○	정도
G04	심잡음	Cardiac murmur			○		정도

H : 체온(Body temperature)

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
H01	체온상승	Hyperthermia	○	○	○	○	정도
H02	체온하강	Hypothermia	○	○	○	○	정도

J : 피모(Fur, Hair, Coat)

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
J01	입 모	Piloerection	○	○	○	○	정도
J02	탈 모	Loss of fur	○	○	○	○	정도,부위
J03	피모상태이상	Abnormal fur	○	○	○	○	정도,부위
J04	피모오염	Soiled fur	○	○	○	○	정도,부위

K : 피부(Skin)

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
K01	발 한	Sweating				○	정도
K02	건 조	Dryness	○	○	○	○	정도
K03	황 달	Jaundice	○	○	○	○	정도
K04	조 홍	Flush	○	○	○	○	부위,정도
K05	창 백	Pale skin	○	○	○	○	부위,정도
K06	빈혈상	Anemic	○	○	○	○	정도
K07	사이아노시스	Cyanosis	○	○	○	○	정도
K08	발 진	Eruption	○	○	○	○	부위,정도,모양,수,크기
K09	구 진	Papule	○	○	○	○	부위,정도,모양,수,크기
K10	담마진	Urticaria	○	○	○	○	부위,크기
K11	홍 반	Erythema				○	부위,정도,모양,수,크기
K12	자 반	Purpura	○	○	○	○	부위,수,크기
K13	백 반	Leukoderma	○	○	○	○	부위,수,크기
K14	피부탈색	Discoloration of skin	○	○	○	○	정도
K15	조 창	Swelling	○	○	○	○	부위,정도,크기
K16	충 혈	Hyperemia	○	○	○	○	부위,정도,크기
K17	울 혈	Congestion	○	○	○	○	부위,정도,크기
K18	부 종	Edema	○	○	○	○	부위,정도,크기
K19	종 양	Mass	○	○	○	○	부위,정도,수,크기
K20	교 상	Bite wound	○	○	○	○	부위,정도,수,크기

Code	증상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
K21	좌상	Contused wound	○	○	○	○	부위,정도,수,크기
K22	소상	Scratched wound	○	○	○	○	부위,정도,수,크기
K23	절상	Incised wound	○	○	○	○	부위,정도,수,크기
K24	열상	Lacerated wound	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K25	찰상	Excoriation	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K26	출혈	Hemorrhage	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K27	육아	Granulation	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K28	경화	Induration	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K29	농양	Abscess	○	○	○	○	부위,정도,수,크기
K30	수포	Bulla	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K31	농포	Pustule				○	부위,정도,크기,수
K32	미란	Erosion	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K33	궤양	Ulcer	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K34	가피형성	Crust formation	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K35	인설	Exfoliation	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K36	반흔	Scar	○	○	○	○	부위,정도,크기,수
K37	섬유증	Callosity	○	○	○	○	부위,크기, 수
K38	귀열	Fissure	○	○	○	○	부위,크기, 수
K39	부육형성	Sloughing	○	○	○	○	부위,정도,수,크기
K40	피부착색화	Coloring of skin	○	○	○	○	부위,정도,색조
K41	유선경화	Induration of mammary gland			○	○	정도
K42	수컷유선발달	Gynecomastia	○	○	○	○	정도
K43	유두비대	Hypertrophy of mamilla			○	○	정도
K44	성피	Sexual skin				○	정도
K45	꼬리결락	Loss of tail	○			○	정도

L : 두부, 경부(Head and Neck)

Code	증상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
L01	사경	Wryneck	○	○	○	○	정도
L02	헤드드롭	Head drop		○			
L03	두부반전동작	Head shaking	○	○	○	○	정도

M : 눈(Eye)

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫 트	토끼	개	원숭이	비 고
M01	안검종창	Swelling of lid margin	○	○	○	○	정도
M02	안검부종	Palpebral edema	○	○	○	○	정도
M03	안검연발적	Erythema of lid margin	○	○	○	○	정도
M04	안검의 미란	Erosion of lid margin	○	○	○	○	정도
M05	안검탈색	Depigmentation of lid margin	○	○	○	○	정도
M06	안검하수	Ptosis	○	○	○	○	정도
M07	반안	Incomplete eyelid opening	○	○	○	○	정도
M08	폐안	Eyelid closure	○	○	○	○	정도
M09	안검유착	Symblepharon	○	○	○	○	
M10	개검지연	Retarded eyelid opening	○	○	○	○	
M11	안검경련	Blepharospasm	○	○	○	○	정도
M12	안검반사소실	Loss of eyelid reflex	○	○	○	○	
M13	결막종창	Swelling of conjunctiva	○	○	○	○	정도
M14	결막부종	Chemosis	○	○	○	○	
M15	결막충혈	Hyperemic conjunctiva	○	○	○	○	정도
M16	결막출혈	Conjunctival hemorrhage	○	○	○	○	정도
M17	결막빈혈	Conjunctival anemia	○	○	○	○	정도
M18	순막종창	Swelling of nictating membrane		○	○		정도
M19	순막노출	Exposure of nictating membrane		○	○		정도
M20	순막이완	??elaxation of nictating membrane		○	○		정도
M21	유루	Lacrimation	○	○	○	○	정도, 색, 색조, 성상
M22	적색유루	Reddish tear	○	○	○	○	
M23	안지(눈꼽)	Eye discharge	○	○	○	○	정도
M24	안구돌출	Exophthalmos	○	○	○	○	정도
M25	안구팽대	Enlarged globe	○	○	○	○	정도
M26	안구탈구	Luxation of eyeball	○	○	○	○	정도
M27	안구함몰	Enophthalmos	○	○	○	○	정도
M28	안구위축	Phthisis of eyeball	○	○	○	○	정도
M29	안구건조	Ery eye	○	○	○	○	정도
M30	안구파열	Rupture of globe	○	○	○	○	정도

Code	증상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
M31	안구혼탁	Opacity of eyeball	○				정도
M32	안구변색	Discoloration of eyeball	○	○			정도,색,색조
M33	안구출혈	Hemophthalmia	○	○	○	○	정도
M34	안구진탕	Nystagmus	○	○	○	○	정도
M35	각막충혈	Scleral congestion	랫트	○	○	○	정도
M36	각막출혈	Scleral Hemorrhage	랫트	○	○	○	정도
M37	각막혼탁	Corneal opacity	○	○	○	○	정도
M38	각막백반	Corneal leukoma		○	○	○	
M39	각막반	Corneal spot		○	○	○	
M40	각막편문	Corneal nubecular		○	○	○	정도
M41	각막부종	Corneal edema	○	○	○	○	정도
M42	각막미란	Corneal erosion	○	○	○	○	정도
M43	각막혈관신생	Corneal Vascularization	○	○	○	○	정도
M44	판누스	Pannus	○	○	○	○	
M45	각막반사소실	Loss of corneal reflex	○	○	○	○	
M46	홍채유착	Synechia	○	○	○	○	
M47	홍채종창	Iris swelling	○	○	○	○	
M48	홍채충혈	Iris congestion	○	○	○	○	
M49	홍채출혈	Iris hemorrhage	○	○	○	○	정도
M50	동공부동	Anisocoria	○	○	○	○	정도
M51	동공반사소실	Loss of pupillary reflex	○	○	○	○	정도
M52	산동	Mydriasis	○	○	○	○	정도
M53	축동	Miosis	○	○	○	○	정도
M54	수정체탈구	Lens luxation	○	○	○	○	정도
M55	백내장	Cataract	○	○	○	○	정도

N : 귀(Ear)

Code	증상	Symptom	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
N01	청각반응항진	Increase in auditory response	○	○	○	○	정도
N02	청각반사감소	Decrease in auditory response	○	○	○	○	정도
N03	이개반사소실	Loss of pinna reflex	○	○	○	○	정도
N04	이루	Otorrhea	○	○	○	○	정도,성상
N05	이공출혈	Auditory meatus bleeding	○	○	○	○	정도

P : 코(Nose)

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
P01	비루	Nasal discharge	○	○	○	○	정도,성상
P02	비농루	Nasal pyorrhea	○	○	○	○	정도,성상
P03	코주위오염	Dirty nose	○	○	○	○	정도
P04	비출혈	Nasal hemorrhage	○	○	○	○	정도
P05	비단의 건조	Dry nose			○		정도

Q : 입(Mouth)

Code	증 상	Symptom	마우스, 랫 트	토 끼	개	원숭이	비 고
Q01	유연	Salivation	○	○	○	○	정도,성상
Q02	구토	Vomiting			○	○	정도
Q03	입주위오염	Staining around mouth	○	○	○	○	정도
Q04	토혈	Hematemesis	○	○	○	○	정도
Q05	구토물	Vomitus	○	○	○	○	정도,색,색 조,성상
Q06	구역질	Nausea			○	○	정도
Q07	혀로 핥기	Licking chops	○	○	○	○	정도
Q08	개구장애	Lockjaw	○	○	○	○	정도
Q09	이의과성장	Overgrown teeth	○	○			정도
Q10	부정교합	Malocclusion	○	○	○	○	정도
Q11	이의결손	Loss of teeth	○	○	○	○	수
Q12	이의변색	Discoloration of teeth	○	○	○	○	정도,색,색 조
Q13	치육종창	Epulis			○	○	정도
Q14	치육출혈	Gingival bleeding	○	○	○	○	정도
Q15	치육퇴색	Gingival discoloration	○	○	○	○	정도
Q16	구취	Halitosis	○	○	○	○	정도
Q17	혀변색	Discoloration of tongue	○	○	○	○	색,색조
Q18	혀건조	Dryness of tongue	○	○	○	○	
Q19	설태	Coated tongue			○	○	
Q20	혀위축	Atrophy of tongue			○	○	정도
Q21	혀종창	Swelling of tongue			○	○	정도
Q22	혀표면평활	Smooth surface of tongue			○	○	정도

Code	증상	Symptomas	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
Q23	혀궤양	Ulcer of tongue			○	○	정도, 크기
Q24	혀상처	Wound of tongue	○	○	○	○	정도
Q25	구개종창	Swelling of palate			○	○	정도
Q26	구개퇴색	Discoloration of tongue			○	○	정도
Q27	구개손상	Wound of palate			○	○	정도
Q28	인두종창	Swelling of pharynx			○	○	정도
Q29	인두퇴색	Discoloration of pharynx			○	○	정도
Q30	인두손상	Wound of pharynx			○	○	정도

R : 복부(Abdomen)

Code	증상	Symptomas	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
R01	복부팽만	Abdominal distention	○	○	○	○	정도
R02	고창	Flatulence	○	○	○	○	정도

S : 항문성기부(Anorectal region)

Code	증상	Symptomas	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
S01	음경돌출	Prolapse of penis	○				정도
S02	사정분비물	Ejaculatory discharge	○	○		○	정도, 성상
S03	정소하강	Testicular descent	○				
S04	발정성변화	Swelling of vulva			○		
S05	월경	Menstruation				○	
S06	질분비물	Vaginal discharge	○	○	○	○	정도, 성상
S07	비뇨생식기출혈	Urogenital bleeding	○	○	○	○	정도
S08	질구출혈	Vaginal bleeding	○	○	○	○	정도
S09	질탈	Colpoptosis	○	○	○	○	정도
S10	하복부오염	Soild perineal region	○	○	○	○	정도
S11	탈항	Prolapse of anus		○	○	○	정도

T : 배설(Excretion)

Code	증상	Symptomas	마우스, 랫트	토끼	개	원숭이	비고
T01	뇨실금	Incontinence of urine		○	○	○	정도
T02	빈뇨	Pollakiuria	○	○	○	○	정도
T03	다뇨	Polyuria	○	○	○	○	정도
T04	뇨량감소	Oliguria	○	○	○	○	정도
T05	무뇨	Auria	○	○	○	○	정도
T06	혈뇨	Hematuria	○	○	○	○	정도
T07	적색뇨	Reddish urine	○	○	○	○	정도
T08	혈색소뇨	Hemoglobinuria	○	○	○	○	정도
T09	녹색뇨	Glaucosuria	○	○	○	○	정도
T10	착색뇨	Chromaturia	○	○	○	○	정도
T11	농뇨	Pyuria	○	○	○	○	정도
T12	농축뇨	Oligohydruria	○	○	○	○	정도
T13	혼탁뇨	Claudy urine	○	○	○	○	정도
T14	대변실금	Involuntary defecation	○	○	○	○	정도
T15	탈분	Defecation	○	○	○	○	
T16	연분	Soft stool	○	○	○	○	정도
T17	설사	Dirrhea	○	○	○	○	정도
T18	수양설사	Watery diarrhea	○	○	○	○	
T19	죽상변	Pasty stool	○	○	○	○	
T20	점액변	Mucous stool	○	○	○	○	
T21	포말변	Spluttery stool	○	○	○	○	
T22	혈변	Bloody stool	○	○	○	○	
T23	점혈변	Mucous and bloody stool			○	○	
T24	적색변	Reddish stool	○	○	○	○	
T25	흑색변	Blackish stool	○	○	○	○	
T26	회색변	Grayish stool	○	○	○	○	정도
T27	녹색변	Greenish stool	○	○	○	○	정도
T28	무변	No stool	○	○	○	○	
T29	제리상변	Jelly like stool	○	○	○	○	정도
T30	약물혼입변	Compound-colored stool	○	○	○	○	정도
T31	이취	Odor	○	○	○	○	정도

(1) 부위

Code	부위명	위치 (Location)	Code	부위명	위치 (Location)
01	전신	Whole body	29	우경부	Right neck
02	두부	Head	30	전경부	Anterior neck
03	안면부	Face	31	좌경부	Left neck
04	코	Nose	32	후경부	Posterior neck
05	귀	Pinna	33	우액와부	Right axillary region
06	경부	Neck	34	좌액와부	Left axillary region
07	흉부	Chest	35	우흉부	Right chest
08	복부	Abdomen	36	중흉부	Middle chest
09	배부	Back	37	좌흉부	Left chest
10	생식기-항문	Anogenital region	38	우복부	Right abdominal region
11	전지	Forelimb	39	중복부	Middle abdominal region
12	후지	Hindlimb	40	좌복부	Left abdominal region
13	미부	Tail	41	우배부	Right back
14	우두개부	Right cranium	42	중배부	Middle back
15	중두개부	Middle cranium	43	좌배부	Left back
16	좌두개부	Left cranium	44	우요부	Right lumber region
17	후두개부	Posterior cranium	45	중요부	Middle lumber region
18	우안면부	Right face	46	후요부	Left lumber region
19	좌안면부	Left face	47	우서경부	Right inguinal region
20	우비부	Right nose	48	좌서경부	Left inguinal region
21	좌비부	Left nose	49	음낭	Scrotum
22	우구순부	Right oral region	50	우전지	Right forelimb
23	좌구순부	Left oral region	51	좌전지	Left forelimb
24	우이부	Right pinna	52	우후지	Right hindlimb
25	좌이부	Left pinna	53	좌후지	Left hindlimb
26	우하악부	Right mandible	54	발바닥	Foot pad
27	중하악부	Middle mandible	55	반신	Y2 whole body
28	좌하악부	Left mandible			

(2) 정도

Code	소견	등급 (Grade)
01	경도	Slight
02	중등도	Moderate
03	중도	Severe
04	고도	Hight
05	강도	Grate
06	부드러움	Soft
07	딱딱함	Hard
08	적음	Small amount
09	많음	Large amount
10	소실	Disappearance

(3) 형상(결절에 사용)

Code	모양 및 경도	Shape and Hardness
01	연한 구상의	Soft globular
02	다소 딱딱한 구상의	Slightly hard globular
03	딱딱한 구상의	Hard globular
04	연한 난상의	Soft egg-shaped
05	다소 딱딱한 난상의	Slightly hard egg-shaped
06	딱딱한 난상의	Hard egg-shaped
07	연한 편평상의	Soft and flat
08	다소 딱딱한 편평상의	Slightly hard and flat
09	딱딱한 편평상의	Hard and flat

(4) 수 (필요한 경우에 사용)

Code	숫자범위	Number range
01	1개	One
02	2개	Two
03	3~5개	Three to five
04	6개이상	6 or more

(5) 크기

Code	직경범위	Diameter range
01	< 1 cm	< 1 cm
02	1 cm ≤ < 2 cm	1 cm ≤ < 2 cm
03	2 cm ≤ < 4 cm	2 cm ≤ < 4 cm
04	4 cm ≤ < 6 cm	4 cm ≤ < 6 cm
05	6 cm ≤ < 10 cm	6 cm ≤ < 10 cm
06	10 cm ≤ < 15 cm	10 cm ≤ < 15 cm
07	15 cm ≤	15 cm ≤

(6) 색 (착색 또는 색조에 관한 증상에 사용)

Code	색	Color
01	적색	Red
02	오렌지색	Orange
03	황색	Yellow
04	녹색	Green
05	청색	Blue
06	자청색	Purple-blue
07	자색	Purple
08	흑색	Black
09	갈색	Brown
10	회색	Gray
11	무색	Colorless

(7) 밝기

Code	색조	Tone of color
12	암	Dark
13	명	Light

(8) 성상

Code	분비물의 성상	Secretory appearance
1	혈액상	Bloody
2	수양상	Watery
3	점액상	Mucous
4	유성	Oily
5	포말상	Foamy
6	젤리상	Gelatinouse
7	치즈상	Caseous
8	고형상	Soild

첨부자료 1-2. 「Toxicokinetics의 GLP 적용 상황에 관하여」

「Toxicokinetics의 GLP 적용 상황에 관하여」

(Toxicokinetics(이하 「TK」이라고 말함.)을 실시하고 있는 시설은 아래에 관하여 기재할 것. 또한 *인의 항목에 관하여는 TK만의 수탁시설의 경우는 기재할 필요가 없다.)

이 작성요령에서의 용어의 의미 :

TK시험 VS TK측정

TK시험 : 동물에게 시험물질 투여, 생체시료 채취부터 TK 측정을 포함

TK측정 : TK을 목적으로 채취되었던 생체시료중의 측정 대상물질의 정량

TK측정시료 : TK시험의 시험계획서에 근거하여 투여, 채취되고 필요한 직후 처리를 실시한 생체시료

TK측정 실측시료 : TK 측정의 기초데이터를 얻는 직접 시료

TK 측정 대상 표준물질 : 안전성시험을 실시하는 시험물질의 미변화체 또는 그 대사산물의 표준물질

내표준물질 : TK 측정 대상물질에 유사의 chromatographic 성질을 갖추었던 비교적 용이하게 입수할 수 있는 안정한 물질

표준 시료용액 : 부정 매트릭스 용액

검량선용 표준시료 용액 : 매트릭스 용액

TK 측정계획서 : TK 측정의 부분을 안전성시험의 시험계획서와 별도로 작성하고 있는 경우의 TK측정에 관련한 계획서

TK 측정보고서 : TK 측정의 부분을 안전성시험의 최종보고서와 별도로 작성하고 있는 경우의 TK 측정에 관련한 보고서

TK 측정책임자 : 그 시험의 TK 측정 실시 전반에 관련되어 책임을 갖는 것.

QC 샘플 : 기질 농도의 표준물질 첨가 매트릭스 용액

사용목적에 따라

1. TK 측정 시료의 보존중에서의 안정성 보증을 위한 병행 보존용
2. 측정계의 정밀도 관리용
3. 기타(전처리 조작중의 안정성, 오조작 등에 대하는 정밀도 관리 등)

「재측정」에는 주로 아래 2개의 의미가 있는

재실측 : 「TK 측정 실측 자료」를 재차 HPLC 등으로 실측하는 경우(전처리를 실시하였던 시료를 단지 확인 때문에 실측하는 경우)

재분석 : 「TK 측정 시료」를 재차 전처리를 실시하고 HPLC 등으로 분석하는 경우

[1] 조직·직원

1. TK 측정 실시부문과 GLP 적용시험의 조직과의 관계는 다음의 어느쪽에 해당될까 ?

(1) TK 측정 실시부문은 안전성시험 실시 부문과 동일한 GLP 조직하에 있다.

가. 안전성시험 실시부문이 TK 측정을 실시하고 있다.

나. 안전성시험 실시부문과는 별도로 TK 측정 실시부문이 있다.

(가) TK 측정 실시부문의 소재지는 안전성시험 실시부문과 동일하다.

(나) TK 측정 실시부문의 소재지는 안전성시험 실시부문과 다르다.

(2) TK 측정 실시부문은 안전성시험 실시부문과는 독립되었던 GLP 조직하에 있다.

(가) TK 측정 실시부문의 소재지는 안전성시험 실시부문과 동일하다.

(나) TK 측정 실시부문의 소재지는 안전성시험 실시부문과 다르다.

(3) 기타(· · · 구체적으로 기재할 것)

2. 운영관리자가 TK 측정 실시부문의 소재지가 다른 시설에 관하여

3. TK 측정 담당자의 GLP 교육·훈련에 관하여(방법, 사고방식 등)

[2] 신뢰성 보증 부문

*1. 안전성시험 실시부문과 TK 측정 실시부문의 소재지가 다른 시설에 관하여 (해당되는 시설만 기재할 것)

신뢰성 보증 부문의 사찰방법에 관하여 유의하고 있는 사항

*2. 다음에 관한 신뢰성보증 부문의 사찰 순서(간략하게 기재할 것)

(1) TK 시험실시의 SOP와의 조합

(2) 분석 validation의 기초데이터 및 보고서의 보관

(3) 정량에 이용하였던 분석 기기류의 특성변화(정기점검과 사용시 점검)

예 1. HPLC법의 경우

가. 정기업자 점검 실시(업자의 기준에 따라 실시)의 확인

나. 사용시 점검(column의 열화(성능이 낮아짐), 펌프의 성능 등

HPLC 시스템의 특성 확인)실시의 확인

예 2. Immuno-assay법의 경우

가. 정기업자 점검 실시(업자의 기준에 따라 실시)의 확인

나. 사용시 점검 실시의 확인

- (4) TK 측정 대상 표준물질(시험물질의 미변화체 또는 그 대사물), 내표준물질의 관리 및 사용기록
- (5) 표준시료용액(부정 매트릭스), 검량선용 표준시료용액(매트릭스), QC 샘플 및 내표준 시료용액 등의 조제, 보존, 사용기록
- (6) TK 측정 시료 실측시의 측정계의 정밀도 관리(검량선의 작성, QC 샘플에 따른 체크의 타당성 등)
- (7) 데이터의 채용기준, 기입방법
- (8) 재측정(재실측 또는 재분석)의 기록 및 그 이유
- (9) 기타, GLP상 필요로 되는 사항의 체크
시험계획서(또는 TK 측정계획서), SOP, 사용기기, 기초데이터의 조합, 직원, 교육, 보고서의 관리·보관, 변경수속의 타당성 등

[3] 시설

*TK 측정을 실시하기 위한 구역(시험조작구역, TK 측정 대상물질 및 TK 측정 시료의 보관구역, 내표준물질 및 QC 샘플등의 보관구역 등)에 관하여 시설의 평면도에 사선 등으로 보여주는 것.

[4] 기기

1. TK 측정에 사용하는 기기의 명칭, 형식, 수량
2. 정량에 사용하는 기기(HPLC등)에 관하여 다음의 사항을 기재할 것.
 - (1) 기기의 명칭 및 형식
 - (2) 해당 기기의 보수 점검, 교정의 방법 및 그 기록의 유무
 - (3) 해당 기기의 고장과 수리의 유무 및 그 기록의 유무

[5] 시약

구입 또는 조제하였던 시약(액체)의 용기에 대한 표시방법 및 보관방법

[6] 표준조작 수순서(SOP)

1. TK 시험에 관련한 다음의 조작에 관하여 SOP를 작성하고 있는지에 관하여는 그 타이틀 및 번호를 기재할 것

- (1) 안전성시험에 짜넣어졌던 TK(concomitant TK)시험 실시의 순서
- (2) 안전성시험에 속한 보조적(후에 따름) TK 시험실시의 순서
- (3) TK 측정 시료의 채취법
- (4) TK 측정 시료의 취급(채취 직후처리, 표시식별, 일시보관, 이관, 수송, 영수보관, 사용관리 등)
- (5) TK 측정 실시의 순서(안전성시험 실시 시설내 실시, 사내위탁, 사외위탁)
- (6) TK 측정 대상 표준물질(시험물질의 미변화체 또는 대사산물) 및 내표준물질 등의 배포, 영수, 표시, 보관, 취급, 시험물질의 사용기록 및 반환 또는 폐기 등
- (7) 설비 및 기기의 사용법, 보수점검 및 수리
- (8) HPLC등의 주요 분석 기기의 조작순서
- (9) 기초데이터의 정의
- (10) 데이터의 정정 방법
- (11) 데이터의 채용기준, 기입방법
- (12) 재측정을 하는 경우의 실시기준, 실시시기

2. TK 측정에 관련한 정량법

정량법을 SOP에 규정하고 있는 경우에는 어떤 항목에 관하여 규정하고 있는가 ?

[7] TK 측정 시료 및 병행 보존용 QC 샘플

1. 수송중의 안정성 확보 등에 관하여 다음의 사항에 관하여 기재할 것.
 - (1) 채취되었던 혈액/뇨시료 등의 처리(혈자/혈청분리, 항응고제, 방부제, 안정제 첨가 등)의 방법 및 채취시 병행 보존용 QC 샘플의 조제의 유무, 무의 경우는 그 이유
 - (2) TK 측정 시료의 식별표시의 방법
 - (3) TK 측정 시료의 일시보관의 방법
 - (4) TK 측정 시료의 수도시(건넬)의 방법, TK 측정 시료의 수송중의 안정성 확보의 방법
 - (5) TK 측정 시료를 TK 측정 실시부문이 받는 경우의 수속의 방법(TK 측정 시료 영수책임자 등을 마련하고 있는 경우는 그 지정방법)
 - (6) TK 측정 시료 및 병행보존용 QC 샘플의 보존(조건 및 기간) 및 사용기록
 - (7) TK 측정 시료의 보존중의 안정성 보증의 방법(특히, QC 샘플의 병행 보

존을 하지 않는 경우)

- (8) TK 측정 시료의 보존기기의 명칭·형식 및 그 작동불량의 유무 및 유의 경우의 조치의 방법
 - (9) 보존 TK 측정 시료의 혼돈방지의 방법(예를 들면, 냉동고 안의 적절한 구분, 시료라벨, 식별테이프 등)
2. TK 측정 대상 표준물질, 내표준물질, QC 샘플에 관하여 관리(보관, 사용기록 등)이 이루어지고 있는 것을 확인한다.

[8] TK 측정계획서 및 TK 측정의 실시

- 1. TK 측정에 관하여는 시험계획서에 기재하는 것으로 할까? 또는 TK 측정계획서를 별도로 작성하고 있을까? 또, TK 측정계획서를 작성하고 있는 경우는 그 작성방법(TK 측정계획서의 작성 및 승인의 순서등)에 관하여 규정하였던 SOP가 있는가?
- 2. TK 측정계획서에는 아래의 사항이 기재되어 있는가? 아닌 경우는 그 이유
 - (1) TK 측정의 표제와 목적
 - (2) TK 측정 실시 시설의 명칭과 소재지
 - (3) TK 측정책임자의 성명
 - (4) 준수된 TK 가이드스(안내)명 및 준수된 GLP의 명칭
 - (5) TK 측정 실시기간
 - (6) 시험물질, TK 측정대상물질(시험물질의 미변화체 또는 대사산물), 내표준물질의 명칭과 사용하는 시약명
 - (7) TK 측정의 순서
 - 가. TK 측정 대상물질의 검량선 작성을 위한 표준시료용액(매트릭스) 및 QC 샘플의 조제방법
 - 나. TK 측정 실측 시료의 조제방법(제단백, 추출, 농축, 희석, 유도체화 등의 전처리법 및 회수율 등)
 - 다. 검량선의 작성방법, 농도산출, 정량한계 및 측정치의 표시방법
 - 라. TK 측정 시료 실측시의 측정계의 정밀도 관리의 방법(자동 샘플러 사용시의 QC 샘플의 사용 및 그 배치법 등)
 - (8) 데이터의 채용기준, 기입방법(SOP에 규정하고 있지않는 경우)
 - (9) 재측정을 하는 경우의 실시기준, 실시시기(SOP에 규정하고 있지 않는 경우)
 - (10) 데이터의 처리방법(통계처리 및 TK 매개변수 계산법 등)
 - (11) 보관되는 기록 및 자료

- (12) 운영관리자(위탁시험의 경우에 있어서는 시험위탁자 등도 포함함)에 따른 승인 및 TK 측정책임자의 서명 또는 날인(날짜)
3. TK 측정계획서는 TK 측정의 실시에 앞장서서 작성되고 TK 측정책임자 및 운영관리자의 서명 또는 날인에 따른 승인을 얻어 두고, 안전성시험책임자의 확인을 얻고 있는가 ?
4. 분석법 validation의 보고서 및 재 validation의 보고서
- (1) 분석법 validation의 보고서에는 아래의 항목의 실시 결과가 포함되어 있는가 ? 아닌 경우는 그 이유
- . 특이성
 - . 진실도(재현성(일내, 일간))
 - . 정밀도(재현성(일내, 일간))
 - . 검량선
 - . 정량한계 및 범위
 - . 측정시료의 안정성
 - . 회수율
- (2) 재 validation 실시의 유무, 유의 경우 실시항목과 이유
- (3) 분석법 validation 및 재 validation의 보고서 및 기초데이터의 보관방법
5. 정량법에 관해서
- (1) 정량법(분석법 validation에 근거하였음)은 SOP 또는 TK 측정계획서의 어느 쪽인가에 기재되어 있는가 ?
- (2) 정량법의 원리가 신약개발의 도중에 변경되었던 경우, 그 대응방법 및 그 타당성

[9] 보고 및 기록

- *1. TK 측정에 관하여는 최종보고서에 기재하는 것으로 할까 ? 또는 TK 측정 보고서를 별도로 작성하고 있는가 ?
- *2. TK 측정보고서가 최종보고서와는 별도로 작성되고 있는 경우에는 아래의 항목이 포함되어 있는가 ? 아닌 경우는 그 이유
- (1) TK 측정의 표제와 목적
 - (2) TK 측정 실시시설의 명칭과 소재지
 - (3) TK 측정책임자 및 측정담당자의 성명
 - (4) TK 측정실시기간(TK 측정책임자의 TK 측정계획서에의 서명 혹은 날인 일로부터 TK 보고서에의 서명 또는 날인일)
 - (5) 시험물질, TK 측정대상물질(미변화체 또는 대사산물), 내표준물질의 명

칭

- (6) 실시하였던 측정방법의 개략 및 그 특성
 - (7) 예기치 않았던 사태 및 TK 측정계획서부터의 일탈
 - (8) 데이터의 해석법
 - (9) 얻을 수 있었던 성적, 그 고찰 및 요약
 - (10) 기초데이팅 및 기록의 보관장소
 - (11) 보고서 작성자(TK 측정담당자) 및 TK 측정책임자의 서명 또는 날인(날짜)
 - (12) 신뢰성보증 부문이 작성하고 서명 또는 날인했었던 문서
- *3. TK 측정의 보고가 최종보고서에 짜넣어지고 있는 경우에는 상기 TK 측정 보고서의 항목내에 필요한 것이 포함되고 있는가? 아닌 경우는 그 이유
- *4. 분석법 validation의 기록(포함하는 기초데이터) 및 TK 측정계획서, TK 측정정보보고서, TK 측정에 관계하는 기초데이터의 보관방법

제 4 절 독성시험수행의 전산처리에 대한 OECD GLP 적용 및 SOP 확립

GLP 기준에 있어서 컴퓨터 하드웨어 및 소프트웨어 프로그램은 그 운영면을 객관적으로 검증받아야 하며 아래와 같은 조건을 만족하는지 자체적으로 확인할 필요가 있다. 그것은 첫째, 호스트 컴퓨터가 적절한 구조와 설비를 갖추었는가, 둘째, 허가된 사람만 전산실에 출입할 수 있게 관리되고 있는가, 셋째, 컴퓨터 데이터의 보관관리가 GLP 기준을 만족하는가, 넷째, 시험자료의 통계처리 방법 등에 이용되는 컴퓨터의 소프트웨어 프로그램은 그 성능이 검증되었는가 등이다. 따라서 본 센터에서는 이를 위하여 다음과 같은 연구를 시도하였다.

GLP 기준의 전산처리에 있어서 컴퓨터 하드웨어적인 구축으로는 각 동물실과 실험실에 펜티엄급 컴퓨터를 설치하였으며 각 동물실과 실험실을 Lan으로 연결하는 작업이 1996년도에 완료되었다. 동물실에서의 컴퓨터 하드웨어적인 구축작업은 주로 전자저울과 컴퓨터를 연결하여 체중, 사료섭취량, 물섭취량 및 투여들을 자동으로 입력하는 시스템을 구축하는 것이다. 또한 각 실험실에서도 혈액 및 혈액생화학 기기와 컴퓨터를 연결하여 시험자료를 컴퓨터에 직접 입력하고 있으며 부검실에서도 부검시 장기중량을 전자저울을 통하여 컴퓨터에 입력하고 있다.

소프트웨어적인 측면에서는 1987년부터 미국 Innovative Programming Associates (IPA)사에서 개발한 GLP의 Labcat Module인 Body weight(체중, 사료섭취량, 물섭취량, 투여량, 일반증상관찰 등), Hematology(혈액학), Clinical Chemistry(혈액생화학), Organ Weights(장기중량, 부검소견), Histopathology(병리조직), Acute Toxicity Test(급성독성)의 6개 프로그램을 구입하여 안전성연구센터의 동물실 및 혈액학, 혈액생화학 및 병리조직부문에서 발생하는 자료들을 직접 입력하고 있으며, 통계처리 및 자료정리에 사용하고 있다. 안전성연구센터에서는 IPA의 Labcat Module이 센터내의 환경에 알맞도록 GLP 기준내의 프로그램의 일부 수정도 요구하고 있으며 이에 따른 경비가 매년 지출하고 있다. 예로서 현재 수행하고 있는 일반

독성의 경우 off-line으로 데이터를 입출력하고 있으나 이러한 시스템은 on-line으로 운영하는 체계보다 번거롭고 시험오류의 가능성도 높음에 따라, 현재 화학연구소에서 이미 설치한 컴퓨터 전산망을 이용하여 실험실에서 GLP 시험하에서 필요로 하는 모든 시험자료를 신속하고 정확하게 자동으로 입출력하여 연구실이나 전산실에서 그 결과를 바로 출력하여 확인할 수 있는 on-line 체계를 구축하기 위하여 미국 IPA(Innovative Programming Associates, Inc., USA)사로부터 In-Life Data Collection and Reporting(Ver. 5.03) Module을 구입하여 시험가동을 실시하였다.

본 Module에서 지원하는 작업으로는 GLP 기준에 따른 ① 시험계획서 작성, ② 5개의 life periods 지원, ③ 최대 4가지 종류의 시험물질을 투여할 수 있도록 지원, ④ 각 동물에 대한 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량과 물섭취량에 대한 작업스케줄 지원, ⑤ 암수당 16개의 그룹과 그룹당 동물수 100마리까지 지원한 시험당 최대동물수 1000마리까지 입력 등이 있다. 또한 본 module에서는 상기의 항목외에 철저한 Password의 관리, 자료의 임의정정 불가 등의 GLP 체계에서 요구되는 것에 대한 설계가 되어있는 것이 특징이었다.

본 Module을 사용했을 때의 효과로서는 On-line으로 자료를 처리하게 되므로 임의 수정이 불가능하여짐에 따라 자료에 대한 신뢰성을 높일 수 있는데 현재는 일반독성시험의 자료들만을 처리하고 있으나 차후에는 생식독성시험에서 필요로 하는 내부장기검사와 골격검사 등의 기능을 추가하여 시험수행에 사용할 수 있을 것으로 평가되었다. 특히 이 Module에서는 입력된 자료들에 대한 통계처리를 자동적으로 실시할 수 있는 것으로 보아 새로 개발된 In-Life module은 앞으로 안전성연구센터에서 사용할 때 매우 많은 기능과 통계처리방법을 추가하여 생식독성시험에 있어서도 이 프로그램을 적용함으로써 자료처리시간의 절약과 자료오류의 감소, 그리고 빠른 시간안에 자동적인 통계처리로 보다 더 신속하고 정확한 독성결과의 평가해석을 통하여 GLP 체계의 확립과 안전성평가에 효과를 증진할 수 있을 것으로 기대되었다.

또한 부검시의 부검소견, 장기중량, 혈액검사결과 및 병리조직학적 결과를 MS-DOS 운영체제에서 별도의 Module로 수행하고 있으나 차후에 Windows 운영체제로 upgrade하여 In-Life 실험과 상호 연관을 유지하는 것이 바람직하다는 결과를 얻었다. 상기의 프로그램을 사용하지 않고 발생한 자료에 대한 통계처리시 사용하고 있는 프로그램으로는 SAS Institute Inc.에서 개발한 SAS/STAT (version 6)을 이용하여 시험기초자료의 통계학적 방법에 대한 SOP(SOP/COM/006)에 따라 처리하고 있다.

또한 본 센터에서는 컴퓨터를 이용한 독성시험을 원활히 수행하기 위하여 신입소원 및 센터내 시험종사원들에게 SOP에 따른 컴퓨터 사용법과 독성시험 프로그램 사용법에 대한 훈련을 지속하고 있다. 본 센터는 위의 컴퓨터 시스템에 GLP 적용사항을 정착시키기 위한 일환으로 컴퓨터 담당자의 해외훈련으로 해마다 열리고 있는 Labcat User Meeting에 파견하여 Labcat module의 문제점과 새로 개발되거나 Upgrade된 프로그램의 현황을 사용자들에게 알려주고 추가된 내용에 대해서는 사용법을 교육시키는 모임에 참석하여 많은 정보를 얻고 있다. 또한 외국 독성시험시설인 Novartis Corporation 제약회사를 방문하여 그곳에서 실시되고 있는 독성시험자료의 입력방법, 통계처리법 등을 비교해 볼 수 있는 기회도 마련되었다.

한편 위와 같은 내용을 교육훈련하기 위하여 본 센터에서는 컴퓨터의 운영, 일반독성시험에서 컴퓨터 프로그램의 사용법, 급성독성시험에서 컴퓨터 프로그램의 사용법, 컴퓨터를 이용한 최종보고서 작업, 컴퓨터 디스켓 및 프로그램사용법 반출, 시험기초자료의 통계학적 방법 및 혈액학에 있어서 프로그램 사용법등 7건의 SOP를 작성하여 실제 독성시험에 적용하고 있으며 계속적으로 해당 SOP를 계속 작성하여 선진국 수준의 GLP용 전산처리를 시도하고 있다. 아울러 일본후생성에서 간행한 'GLP에 있어서 컴퓨터 사찰'이란 자료(첨부자료 1-3)를 입수하여 이를 해당 SOP에 반영시킴으로서 한단계 높은 OECD GLP 수준의 전산처리운영을 실시하고 있다.

첨부자료 1-3. GLP에 있어서 컴퓨터 사찰

GLP에 있어서 컴퓨터 사찰

[1] 컴퓨터 하드웨어 및 컴퓨터실

목적 : 호스트컴퓨터가 적절한 조건에서 적절하게 배치되어 있는지를 사찰한다.

1. 호스트컴퓨터가 적절한 조건하에 설치되어 있는지를 조사한다.

(1) 건물의 위치, 구조등

(2) 전자계산기실의 배치, 구조내장, 설비등

(3) 공기조화장비

2. 호스트컴퓨터실이 허가된 사람만 출입할 수 있게 관리되고 있는지를 조사한다.

3. 자기기록매체중의 데이터를 시험기초자료로 하는 경우, 데이터를 보관하는 실 및 데이터의 보관관리가 GLP기준의 제28조 규정을 만족하고 있는지를 조사한다.

[2] 컴퓨터 시스템의 개발

목적 : 컴퓨터 시스템이 적절한 설계와 충분한 처리능력을 갖도록 개발되었는지를 확인한다.

A. 소프트웨어를 자기회사에서 개발한 경우

1. 개발시 요원의 작업규범이 되는 문서 및 개발시의 요원관리에 대한 문서가 구비되어 있고, 그것에 따라 개발작업이 행하여 졌는지를 조사한다.

2. 하드웨어, 소프트웨어의 사양을 포함함 문서에 대하여, 다음의 사항을 조사한다.

(1) 컴퓨터로 직접데이터를 기록하는 시스템에 있어서는 GLP상 필요한 다음의 기능이 포함되어 있는가.

가) [4], 1의 가) - 라)을 기록할 것

- 나) 컴퓨터의 자기매체중의 데이터를 변경하는 경우, 최초의 기록사항은 남길 것과 함께, 변경의 이유 및 일자와 더불어 그 데이터의 입력자를 기록할 것.
 - 다) 자격확인, 액세스(정보를 컴퓨터 기억장치에 넣고 빼고 하는 것) 관리
 - 라) 데이터의 종합처리의 관리
- (2) 사용자 부문의 요구사항을 만족하고 있는가
 - (3) 현행의 하드웨어의 사양과 일치하고 있는가
 - (4) 하드웨어, 소프트웨어의 변경때마다 개정되어 질 수 있는가
3. 프로그램에 관한 문서에 대하여 다음의 사항을 조사한다.
 - (1) 프로그램 작성자의 직무경험과 자격
 - (2) 개개의 프로그램의 사양을 모은 자료(소스코드를 포함)가 작성되어져 있고, 그 내용이 별도의 프로그램 작성자에게 이해되는 내용인가.
 4. 프로그램의 테스트에 관한 문서에 대하여 다음의 사항을 조사한다.
 - (1) 프로그램의 테스트계획서, 테스트결과 및 그것들의 조사, 승인의 기록이 있는가
 - (2) 컴퓨터 시스템에 일치되는 기능에 대하여, 프로그램의 테스트의 기록이 있는가
 5. 컴퓨터 시스템의 이행시에 있어서 시스템의 사양 및 작동의 확인에 대한, 다음의 사항을 조사한다.
 - (1) 사양 및 작동의 확인을 위해, 테스트계획서, 테스트결과, 및 이들의 조사, 승인의 기록이 있는가
 - (2) 발생한 문제가 모두 처리되어지면 기록되어져 있는가
 6. 위의 기록문서가 검증(Validation)의 문서로서 체계적으로 정리, 보관되고, 컴퓨터 시스템의 신뢰성이 평가되어 승인되고 있는지를 확인한다.

B. 시판의 소프트웨어를 구입하여 개발한 경우

1. 컴퓨터 시스템의 사양서가 있는지, 또, 컴퓨터로 직접 데이터를 기록하는 시스템에 있어서는 GLP상 필히 다음의 기능의 포함되어져 있는지를 조사한다.

- (1) [4], 1의 가) - 라)를 기록하고 있는가
 - (2) 컴퓨터의 자기매체중의 데이터를 변경하는 경우, 최초의 기록 사항을 남길 것과 함께 변경의 이유 및 일자와 더불어 그 데이터의 입력자를 기록하는가
 - (3) 자격확인, 액세스 제어
 - (4) 데이터의 종합처리의 관리
2. 소프트웨어를 개발한 회사로부터 소프트웨어의 신뢰성을 입증하는 다음의 정보를 입수하고 있는가를 확인한다.
- (1) 개발수준이 [2]의 A에 준하여 행하여지고 있는가를 확인한 정보
 - (2) 소프트웨어를 도입하고 있는 다른 사용자에 관한 정보
 - (3) 소프트웨어의 개발시에 있어서 테스트결과등의 확인기록
3. 컴퓨터시스템의 이행시에 있어서, 시스템의 사양 및 작동의 확인에 대하여, 다음의 사항을 조사한다.
- (1) 사양 및 작동의 확인을 위한 테스트계획서, 기록, 테스트결과 및 그것들의 조사, 승인의 기록이 있는가
 - (2) 발생한 문제가 모두 처리되고, 그것이 기록되고 있는가
4. 시판의 소프트웨어를 일부 변경한 경우, 소프트웨어의 수준에 따라 행하여지고 있는가, 또, 변경한 소프트웨어에 대하여 [2]의 A에 언급한 기록이 있는가를 조사한다.
5. 시판의 소프트웨어에 참가하여, 일부의 소프트웨어를 자기회사에서 개발한 경우에는 [2]의 A에 언급한 기록이 있는가를 조사한다
6. 위의 기록, 문서가 확증의 문서로서 체계적으로 정리, 보관되고, 컴퓨터시스템의 신뢰성이 평가되어 승인되고 있는가를 조사한다.

C. 기존의 컴퓨터시스템의 경우(개발시의 [2]의 A혹은 B에 따라 행하여지지 않은 시스템)

- 1. 컴퓨터 시스템이 사양에 따라 기능을 갖고 있는지를, 개발 및 운용시의 가동 실적의 기록에 의하여 후에 추적되어 확인되고 있는가를 조사한다.

2. 컴퓨터 시스템의 신뢰성을 확인하기 위하여, C의 1에 의한 확인을 행한 테스트계획, 기록, 조사, 승인의 기록을 조사한다.
3. 위의 기록, 문서가 확증의 문서로서, 체계적으로 정리, 보관되어져 있고, 컴퓨터 시스템의 신뢰성이 평가되어 승인되어져 있는가를 확인한다.

[3] 컴퓨터 시스템의 운용관리

목적 : 컴퓨터 시스템이 설계된 대로 정확히 가동되어지고, 운용관리되고 있는가를 조사한다.

1. 컴퓨터 시스템의 운용관리의 책임자 및 관리체제가 정해져 있는지를 조사한다.
2. 컴퓨터 시스템의 기능을 유지하기 위하여, 점검, 보수, 테스트 등의 방법 및 스케줄이 정해져 있어 그것에 따라 실시되고 있는지를 조사한다.
3. 소프트웨어의 변경의 시험기초자료의 변경과 동일한 수순에 따라 행하는 것이 정해져 있는지, 또, 그것에 따라 실시되고 있는가를 조사한다.
4. 하드웨어, 소프트웨어를 변경한 경우, 변경에 의한 부분에 대하여 [2]의 A에 언급한 기록이 모아져 있는가를 조사한다.
5. 사용중의 소프트웨어에 관하여, 다음의 사항이 행하여지고 있는가를 조사한다.
 - (1) 프로그램과 마스터 copy의 대조
 - (2) 마스터 및 backup copy의 대조
 - (3) 사용중의 소프트웨어가 최신판의 것의 확인
6. 시스템에 사고 및 장애가 발생한 때의 처치의 수순이 확립되고 있는지, 및 그것에 따라 기록되고, 해결되고 있는가를 조사한다.
7. 소프트웨어 및 시험데이터의 정도관리에 관하여 다음의 사항을 조사한다.
 - (1) 시험종사자, 시험책임자, 컴퓨터 시스템의 운용자, 신뢰성보증부서, 운영책임자가 소프트웨어의 작성, 변경 및 시험데이터의 수집, 변경, 확인 등의 작업중 어느쪽을 행하는 자의 자격을 결정하여, 운영책임자의 승인을 받고 있는가

- (2) 소프트웨어(변경을 포함)이 운영책임자에 의해 승인되고 있는가
8. 소프트웨어가 변경된 경우, 관련한 표준작업지침서가 개정되어 있는지를 확인한다.
 9. 컴퓨터 시스템의 표준작업지침서, 운용관리에 관한 수순서가 있는지를 조사한다.
 10. 상기 1~7에 관한 기록, 문서가 정기적으로 통합적으로 조사되어, 컴퓨터 시스템의 신뢰성이 평가되고 있는지를 확인한다.

[4] 컴퓨터로 직접 데이터를 기록하는 경우, 데이터의 GLP적합성의 사찰

목적 : 컴퓨터시스템에 의한 데이터처리가 GLP에 적합한 지를 조사한다.

1. 시험기초자료별로 조사하여, 그것이 GLP기준에 언급된 시험기초자료의 조건을 만족하고 있는지를 확인한다.

시험기초자료의 조건이란, 데이터가 그것에 대응하는 다음의 기록을 이행하고 있는지.

- (1) 시험마다의 고유의 식별, 시험조작의 종류
 - (2) 시험물질, 투여군, 성별, 동물의 개체, 장기등
 - (3) 데이터의 입력자, 입력일, 필요에 따라서는 시각
 - (4) 사용기기(데이터 수집단말)
2. 시험기초자료의 변경의 기록에 관하여 조사하고, 그것이 GLP 기준에서 언급한 변경의 조건을 만족하고 있는지를 확인한다.

변경기록의 조건이란 데이터가 그것에 대응하는 다음의 기록을 동반하고 있을 것

- (1) 변경전의 데이터(데이터 및 상기 1. (1)부터 (4)의 정보)
- (2) 변경한 데이터에 관하여 변경의 이유, 일자, 변경자
- (3) 사용기기(데이터 수집단말)

[5] 신뢰성보증부서에 의한 컴퓨터 시스템의 사찰

목적 : 신뢰성 보증부서가 컴퓨터시스템을 사찰하여, 시스템이 GLP에 적합하게

설계되고, 설계대로 기능을 갖게끔 개발되었는지, 또, 작동하고 있는지를 확인하고 있는가를 조사한다.

1. 신뢰정보증부서에 의한 컴퓨터시스템의 사찰의 수순서가 있는지를 조사한다.
2. 컴퓨터 시스템의 신뢰정보증부서의 사찰을 가능하게끔 기능을 갖추고 있는지, 또 신뢰정보증부서가 단독으로 사용할 수 있는 단말을 갖고 있는지를 조사한다.
3. 신뢰정보증부서가 컴퓨터시스템의 개발에 관하여 그 전과정을 사찰하여, 기록하고 있는지를 확인할 것
4. 신뢰정보증부서가 컴퓨터시스템의 운용관리에 대하여 정기적으로 사찰하여 기록하고 있는지를 조사한다.
5. 신뢰정보증부서가 컴퓨터시스템에 의한 데이터처리의 신뢰성을 정기적으로 사찰하여 기록하고 있는지를 조사한다.
6. 사찰대상시험에 관계된 데이터를 처리한 컴퓨터 시스템이 경신 등에 의하여 이동되어 현재 가동하지 않는 경우에는 그 컴퓨터 시스템에 관하여 보관되고 있는 문서, 기록에 의하여, [1]부터 [5]에 대하여 확인 혹은 조사를 행한다. 특히, 컴퓨터의 자기매체를 시험기초자료고 하고 있는 경우, [4]에 언급한 조사에 의하여, 사찰대상시험에 관계한 시험기초자료를 여기서 얻었다는 것을 확인한다.

제 2 장 소동물을 이용한 장기투여 독성시험법의 확립 및 보완

제 1 절 랫트에서의 미정맥내 연속투여법의 확립

1. 서 론

새로운 의약품이 많이 개발되면서 독성시험의 필요성은 더욱 증가하고 있다. 그 중에 실험동물을 이용한 일반 독성시험은 생체에 대한 전반적인 영향을 평가하여 추후 있을 다른 독성시험과 사람에게의 안전성평가에 기초자료를 제공해 주는 시험으로 여겨지고 있다. 한편 최근 들어 생물학적인 제재가 많이 개발되고 있고 이러한 생물학적인 제재들은 생체에서 필수적인 단백질 또는 호르몬 및 혈액제재로서 사람에게 적용될 때 직접 정맥내로 연속투여하는 것이 일반적이다. 그 이유는 이러한 물질들 중에서 생체에 지속적으로 적용되는 것이 많기 때문이다. 아울러 단회 과량투여되면 독성이 심하게 나타나는 어떤 종류의 항암제는 혈중농도를 낮게 유지하면서 지속적으로 효과를 발휘하게 되기 위하여 또한 정맥내 연속투여가 필수적이다. 특히 반감기가 짧은 물질의 경우에도 약물이 지속적인 효과를 발휘하게 하기 위해서는 연속 투여하는 것이 효과적이다. 이렇듯 임상예정 경로가 정맥내 연속투여인 경우 독성시험에 있어서도 같은 투여 방법을 선택하여 시험을 수행하는 것이 바람직하다. 이 경우 시험동물에게 연속적으로 시험물질을 적용하기 위해서는 infusion pump를 이용하거나, 삼투압을 이용한 osmotic pump를 이용하고있다.

랫트에서의 infusion pump를 이용한 연속투여시험은 일반약리시험이나 약리대사연구에서 경정맥이나 대퇴정맥에 수술적인 방법으로 카테터를 장착하여 수행해 왔다. 그러나 이 방법은 수술을 해야 한다는 부담과 수술에 따르는 stress와, 마취제나 항생제 처리에 따르는 대사 효소들의 변화 가능성이 있기 때문에 정상적인 동물을 이용해야 하는 일반독성시험에서는 여러 가지 제약이 따르고 있다. 따라서 무마취하에 비수술적인 방법으로 연속 투여하는 기술이 필요하게 되었다. 이러한 비수술적인 방법에 의해 미정맥내 연속투여는 이미

다른 연구자들(Born & Moller, 1974. Rhodes & Patterson, 1979)이 발표한 바 있다. 그러나 이러한 방법들은 카테터를 삽입하고 보호장치를 유지하는 데에 어려움이 있어 장기간의 시험에는 문제가 있었다. 그리고 Osmotic pump를 피하에 삽입하여 약물을 서서히 방출하게 하는 경우 많은 양의 물질을 적용할 수 없고 정맥내로 적용하는 것과 흡수과정이 다르기 때문에 생체 반응의 차이가 나타날 수 있다.

본 시험에서는 마취와 수술을 하지 않고 미정맥내에 카테터를 장착하는 방법을 찾아내고, 이 방법을 이용하여 유전자 재조합기법으로 개발한 상피세포성장호르몬(EGF)인 K-378 및 백금착제 항암제로 개발중인 K-566의 14일간 연속 투여하는 독성시험과 국내에서 캄프토테신계 항암제로 개발중인 K-799의 24시간 연속투여 급성독성시험을 수행하여 미정맥내 연속투여의 가능성을 살펴보고 각각의 물질에 대한 기존방법의 투여시험과 비교함으로써 연속투여의 필요성을 확인하였다. 그리고 이들 시험들을 통하여 랫트에서 미정맥내에 연속 투여하는 시험법을 확립하였다.

2. 미정맥내 카테터 장착법의 개발

가. 서론

랫트의 미정맥내에 카테터를 장착하는 방법은 몇 가지가 보고되어 있다 (Born and Moller, 1974, Rhodes and Patterson, 1979, Saarni and Viikari, 1976). 그러나 기존에 보고된 방법들은 카테터를 삽입하는 방법이 비교적 까다롭고 시간이 많이 소요되며 장착한 후에 동물에게 스트레스를 많이 주는 것으로 판단되어 잘 사용되지 않고 있다. 따라서 카테터를 정맥 내에 삽입하는 기술을 보완하고 보호장치를 새롭게 장착하는 방법이 필요하게 되었다. 본 보고서에서는 장착법 확립을 위한 시험, 2회에 걸친 14 일간의 연속투여 시험 및 24시간 연속투여 급성독성시험을 통하여 최종적으로 확립된 방법에 대하여 기술한다.

나. 재료 및 방법

(1) 재료

24 G needle catheter, polyethylene tubing(I. D. 0.58mm과 0.28 mm 의 2 종류), 랫트용 고정기, swivel, spring protector(dia., 2-3 mm), 얇은 철망 (동물운반용 상자의 내부의 상자 보호용으로 사용되는 재질), 의료용 반창고, 두툼한 양면 점착테이프(두께 2 mm), 가는 구리철사(0.2 mm), cable tie, 주사기, 25G 주사침, 생리식염액, 소독용 알코올솜, 폴리카보네이트 사육상자, infusion pump

(2) 준비

1) Catheter의 준비(Fig. 2-1-1)

① Needle catheter의 catheter part를 기시부를 잘라 몸체와 분리하고 주사침에는 직경 0.58 mm의 polyethylene tubing을 1 cm의 길이로 잘라 주사침에 끼우고 점착제를 이용하여 몸체와 연결해 놓는다.

② Catheter part의 기시부를 끝을 무디게 한 23 G needle을 이용하여 깊이 3 mm 정도 되게 직경을 넓혀주고 이 부분에 직경 0.28 mm인 polyethylene tubing을 삽입하고 순간점착제를 살짝 칠하여 카테터와 tubing을 연결해 놓는다. 점착제를 사용한 후 표면을 매끈하게 다듬어 놓는다.

③ Catheter part와 연결된 polyethylene tubing의 길이를 35 cm 정도로 하고 끝 부분을 길이 10 cm의 직경 0.58 mm의 polyethylene tubing과 연결한다.

④ ①, ② 및 ③에서 준비된 것을 이용하여 catheter part의 기시부로부터 1 cm 되는 곳에서 주사침을 catheter의 바깥으로부터 찢러 catheter를 통과하여 카테터의 끝부분으로 나오게 결합해 놓는다.

2) 보호장치의 준비

① 얇은 철망을 넓이 7 cm 정도, 길이 10 cm되게 자르고 절단 부위의 사면을 넓이 1 cm정도로 완전히 접어 5 x 8 cm의 직사각형으로 만들고 긴 변의 한쪽에 1 cm 되는 지점에서 swivel에 연결되어 있는 spring protector를 가는(직경 0.2 mm) 구리 철사를 이용해서 연결해 놓는다(Fig.

2-1-1).

② 반창고의 비접착면에 양면접착테이프를 붙이고 다시 접착면에 양면접착테이프의 유지를 부착시킨 후 길이 5 cm, 넓이 3 mm의 크기로 잘라 여러 개를 준비한다.

3) 보호장치와 catheter 부분 및 주사기의 결합

① 1)의 ④에서 준비된 polyethylene tubing을 2)의 ①에서 준비된 보호장치 속에 굵은 polyethylene tubing을 보호철망 부분으로부터 넣어 spring protector를 통과시켜 swivel에 연결해 놓는다.

② Needle catheter와 생리식염액이 들어 있는 주사기를 연결하고, swivel에도 polyethylene tubing이 연결되어 있지 않은 다른 쪽에 다시 적당한 길이의 polyethylene tubing(직경, 0.58 mm)과 생리식염액이 들어있는 주사기를 연결해 놓는다.

(3) 방법

1) 카테터의 미정맥내 삽입

① 랫트를 미정맥내로 투여할 때와 같은 방법으로 랫트용 고정기에 고정하고 꼬리를 소독한다.

② 보호장치 및 주사기 등과 결합되어 준비된 needle catheter를 미정맥투여 방법대로 정맥내에 삽입하고 needle catheter와 연결된 주사기의 피스톤을 뒤로 잡아 당겨서 혈관 내로 정확히 삽입된 것을 확인한다.

③ 혈액이 확인되면 오른손 엄지와 무명지를 이용하여 꼬리와 함께 혈관속에 삽입된 카테터를 힘껏 잡고 needle catheter의 금속주사침을 좌우로 약간씩 회전하면서 뒤로 잡아 빼어 혈관내에는 카테터부분만 남도록 한다.

④ 오른손 엄지와 무명지로 쥐고 있던 꼬리와 카테터를 풀어주고 (이 때 금속제 주사침이 삽입되었던 부분에서 혈액이 삼출된다.) 소독된 핀셋을 이용하여 카테터 및 카테터와 연결된 polyethylen tubing을 카테터의 끝부분이 꼬리 기시부 2 cm 까지 밀어 넣는다. 이 때 처음 카테터 부분이 완전히 삽입된 후 polyethylen tubing의 끝과 연결된 주사기의 피스톤을 뒤로 당

겨 tubing 내로 혈액이 들어오면 제대로 삽입된 것이므로, 응고를 방지하기 위하여 주사기의 피스톤을 다시 살짝 밀어 주고 tubing을 계속 삽입하면 된다.

⑤ 삽입된 부분에 지압을 이용하거나 반창고를 이용하여 지혈을 실시한다. 동물을 고정한 상태로 시험물질을 연속 주입하기 위해서는 카테터 보호장치가 필요 없으므로 단기간(수십분-수시간) 연속주입은, 반창고로 꼬리와 카테터를 고정만 하면 이 과정까지만으로도 가능하다.

2) 보호장치의 장착

① Polyethylen tubing의 삽입이 완료된 후 이미 준비된 양면접착 테이프를 카테터가 삽입된 꼬리의 혈관이 통과하지 않는 부분에 반창고 부분이 피부에 접착되도록 하여 혈관과 나란하게 3-4 곳에 부착한다.

② 양면 접착테이프의 꼬리와 접착되지 않은 부분의 유지를 떼어낸다.

③ 양면 접착테이프가 부착된 부분을 완전히 감싸도록 철망을 꼬리와 함께 감싼다.

④ 철망을 양면접착테이프와 잘 접착되도록 외부에서 힘을 주어 단단하게 감싸준다.

⑤ 철망의 외부에서 cable tie를 이용하여 위와 아래 부분을 끝 마무리를 하면서 감아주어 풀어짐을 방지한다.

3) 사육상자에 수용 및 Infusion pump와 연결(Fig. 2-1-2)

① 동물을 폴리카보네이트 사육상자(240W x 390L x 175H mm)에 넣고 고정기에서 풀어준다.

② Polyethylen tubing과 연결되어 있는 주사기를 빼고 sweivel을 폴리카보네이트사육상자 뚜껑의 벌어진 틈을 통과시키고 infusion pump에 장착된 시험물질이 준비되어 있는 주사기의 23 G의 주사침에 polyethylen tubing을 연결한다.

③ Swivel을 시험관 고정집게로 고정하고 다시 시험관 고정집게를 폴리카보네이트사육상자 뚜껑에 클립을 이용하여 고정한다.

④ Infusion pump를 작동시킨다.

다. 결과 및 고찰

본 시험에서 기자재의 준비를 완전히 갖춘 후 미정맥내에 카테터를 삽입하고 보호장치 및 swivel을 연결하는데에 소요되는 시간은 마리당 10 분 이내였다. 따라서 본 방법으로 미정맥내에 카테터를 장착하는 것은 기존의 방법보다도 시간이 적게 소요되는 것으로 판단되었다. 한편 그동안 수행해 왔던 보호장치의 장착이 가장 큰 어려움이었으나 얇은 철망을 이용함으로써 시간의 절약과 꼬리의 손상을 줄이는 이중의 효과를 거둘 수 있었다. 따라서 needle catheter와 설치류 운반용 상자의 내부 보호용으로 사용되는 얇은 철망을 이용하여 미정맥내에 카테터를 삽입하고 보호덮개로 이용하는 미정맥내 연속투여 방법을 확립하였다.

본 방법으로 카테터를 미정맥내에 삽입하는 방법은, 정맥내 투여 기술만 있으면 누구나 카테터를 무마취, 비수술적인 방법으로 미정맥내에 삽입할 수 있는 간단하고 좋은 방법으로 사료되었다. 지금까지 발표된 미정맥내 카테터 장착법인 cut-down catheterization 방법은 꼬리에 손상을 주고 정맥의 협착을 일으켜서 기술적인 어려움이 따르고, Rhodes와 Patterson이 발표한 19 G 주사침을 이용한 percutaneous catheterization 방법(Born CT and Moller, 1974)은 비수술적이고 비교적 쉬운 방법이지만 직경이 큰 주사침을 사용하기 때문에 미정맥내에 정확한 삽입이 어렵고 지혈에도 문제가 있었다. 본 방법은 needle catheter를 이용함으로써 위의 두가지 방법의 단점을 보완할 수 있었다. 만일 동물을 고정기내에 고정한채로 시험물질을 연속주입하거나 bollmann cage를 이용하는 시험을 설계할 경우에는 동물이 카테터를 손상 입히는 것을 방지하기위한 보호장치를 사용하지 않아도 되므로 더욱 간단하고 유용한 방법으로 사료되었다.

본 시험에 앞서 보호 덮개를 얇은 연철판 또는 electrical sheathing을 사용하였는데 두터운 양면접착테이프를 사용하였음에도 불구하고 이들을 고정하기 위하여 외부에서 cable tie 등으로 세게 조여주어 꼬리 끝의 암적색화와 괴사

가 발생하였다. 그러나 보호덮개를 얇은 철망을 이용하므로써 외부에서 무리하게 힘을 줄 필요성이 없게 되어 꼬리에 변화를 일으키는 것이 많이 줄었다. 그렇지만 아직 미정맥내에 카테터를 장기간 장착할 때 꼬리부분의 손상을 적게 주기 위하여 외부에서 느슨하게 감아주면 장착이 풀어져서 재장착하는 경우가 많았다. 그리고 장착이 한번 풀린 동물이 다시 풀리는 경우가 많았는데 이는 개체의 특성으로 인해 장착하고 난 후 비교적 많이 움직이는 동물이 계속하여 심하게 장착을 풀려고 움직여서 나타난 결과로 사료된다. 특히 어린 동물에게 시험을 시작하는 경우에 꼬리가 작아 보호장치의 부착이 어렵고 성장속도가 빠르므로 카테터 장착 보호장치에 의한 꼬리의 손상이 많은 것으로 사료된다. 본 시험에서도 5~6주령의 수컷 동물을 사용하였는데 이 기간은 랫드가 가장 빠른 성장기를 보이는 시기로서 장착한 보호장치에 의한 손상과 장착의 풀림도 비교적 많았다. 본 시험에서도 꼬리가 카테터 장치의 압박으로 혈류가 차단되어 연속적으로 3일 이상 지나면 꼬리의 해당부분에서 암적색화와 부종이 발생하는 경우가 종종 있었고 카테터 끝 부분과 접하는 부분에서 괴양이 발생하는 경우가 있어, 미정맥내로 카테터를 장착하고 연속투여하는 시험의 단점으로 판정되었다. 그리고 이따금 카테터 끝 부분의 위치에서 꼬리에 궤양이 관찰된 것은 카테터와 혈관벽과의 마찰로 인한 부작용으로 발생한 것으로 사료되었다.

지금까지 미정맥내에 카테터를 장착하고 연속 투여하는 시험이 많지 않은 것은 보호장치를 동물에게 손상을 입히지 않고 완전하게 장착할 수 있는 방법을 찾지 못하였기 때문으로 사료되는데 본 방법은 이러한 단점을 많이 개선하였다고 사료된다. 그렇지만 미정맥이란 생체내 위치상 극복할 수 없는 단점으로 인하여 아직 해결해야할 문제점들이 있었다. 따라서 본 방법으로 시험을 수행하는 경우에는 생후 6주 이상된 성체를 이용하는 것이 바람직하다고 사료되며 카테터의 장착시간이 짧게 소요되기 때문에 하루 24시간 연속투여보다도 하루중 1시간에서 6시간 정도 연속투여하는 시험에 적합하다고 사료되었다.

결론적으로 본 방법은 쉽고도 안전하게 미정맥내에 카테터를 장착하는 방법으로 사료되었고 6주 이상의 성숙된 랫트에 있어서 24시간 연속투여시험과,

하루에 0.5~6시간 정도 연속투여를 반복하는 시험에 적합하다고 사료되었다

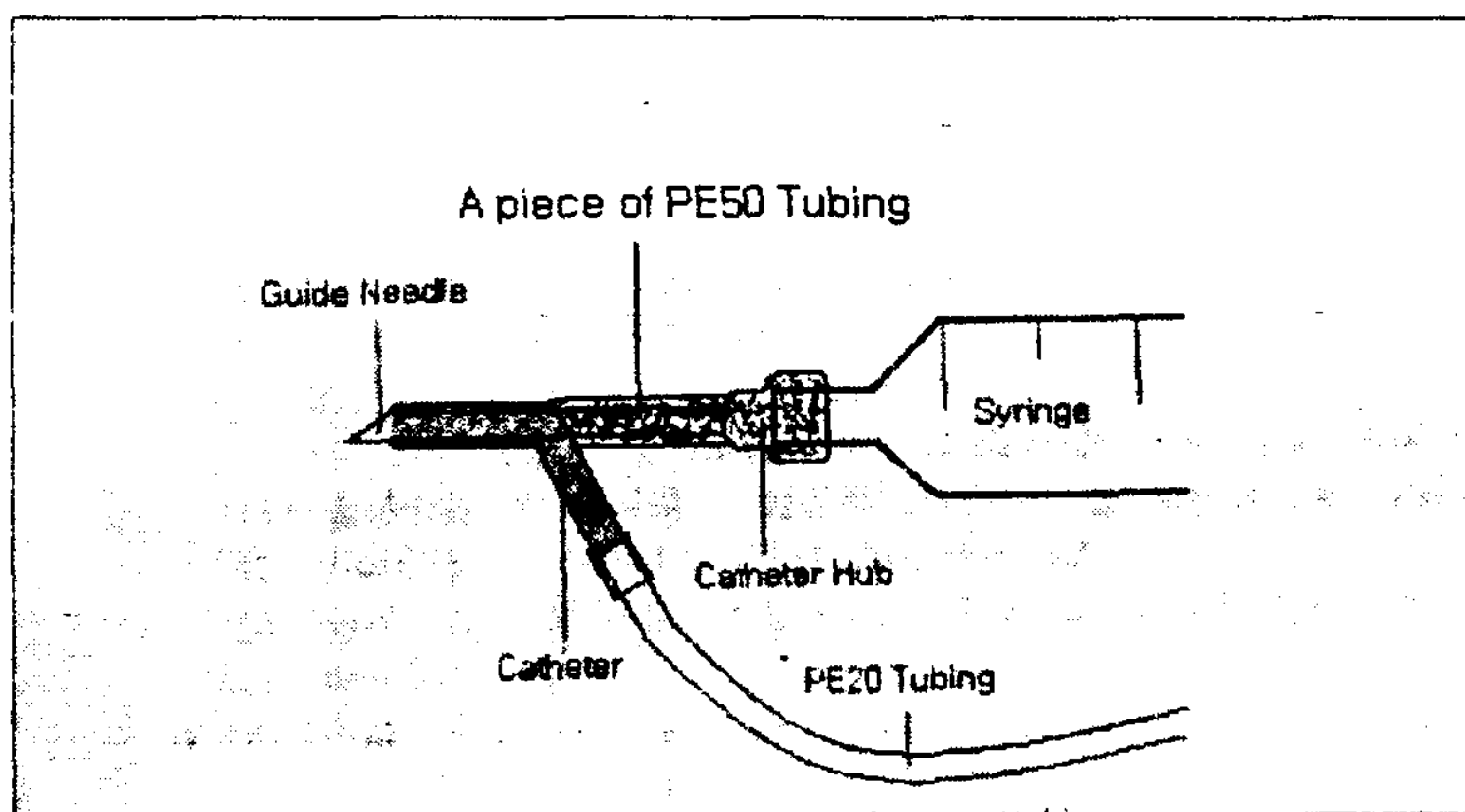


Fig. 2-1-1. The setting of needle catheter, syringe and tubings

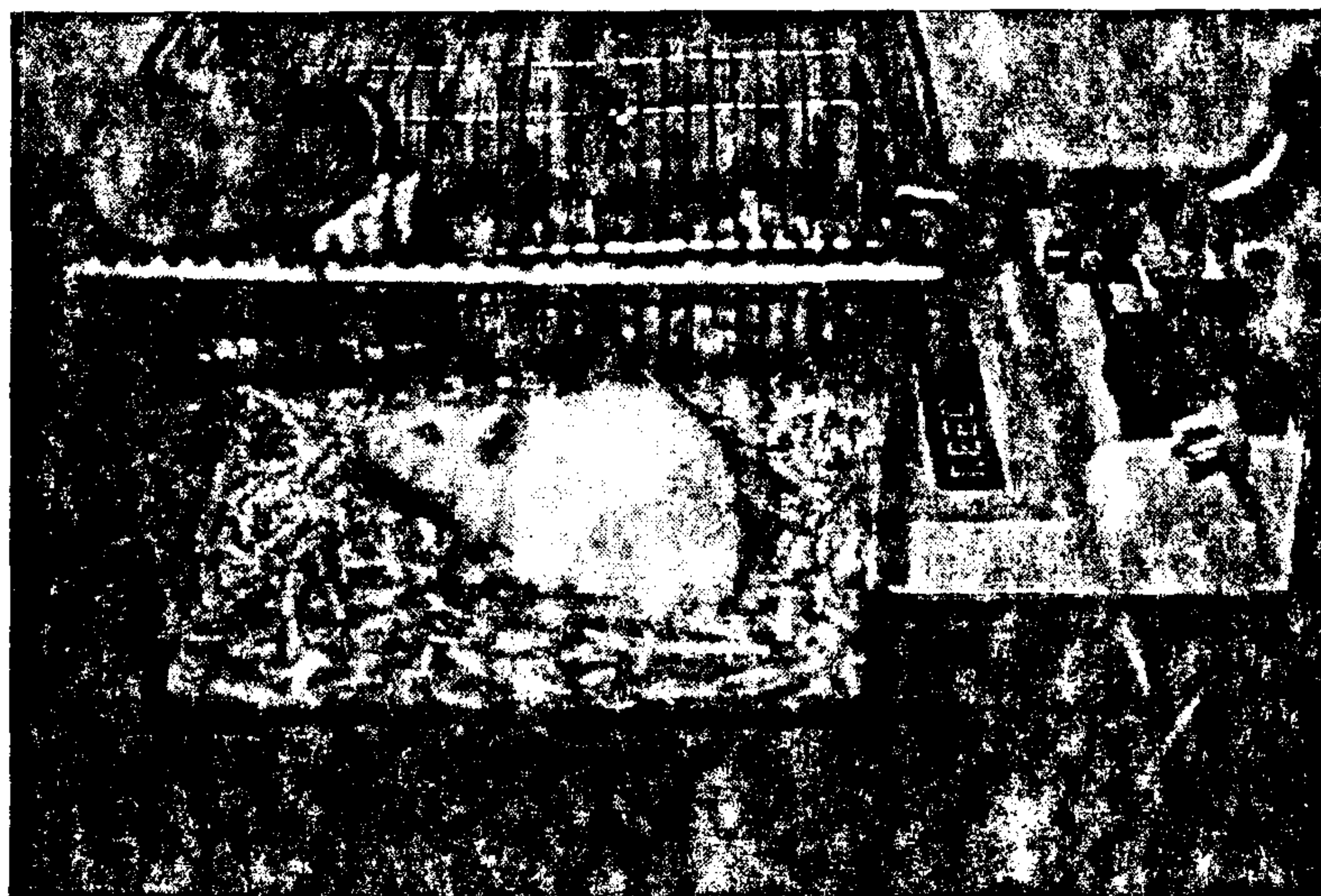


Fig. 2-1-2. A rat in a polycarbonate cage connected to the infusion assembly

3. Infusion pump를 이용한 K-378의 미정맥내 연속 또는 반복투여가 암컷 랫트에 미치는 영향 차이

가. 서 론

본 시험은 국내의 D제약회사에서 유전자 재조합기법으로 개발한 상피세포성장호르몬(EGF)인 K-378을 투여시간의 차이를 두어 미정맥내에 연속 또는 반복투여하여 투여속도가 생체에 미치는 영향의 차이를 알아보고 본 시험법의 유용성을 확인하고자 실시하였다.

EGF(epidermal growth factor)는 다양한 상피세포의 강력한 세포분열 촉진인자로서 신체의 체액중에 널리 분포하고 있다(Carpenter, 1985). EGF는 53 개의 아미노산 잔기를 가진 single chain polypeptide이고 생리적인 작용에 중요한 역할을 하는 3 개의 intramolecular disulfide bond를 갖고 있다(Taylor 등, 1972; Savage 등, 1973). 의약품으로서의 용도는 현재 안과에서 각막 치료용으로 사용하고 있고 유전자 재조합 기술의 발달로 다량 합성이 가능하게 되어 다양한 목적으로 개발하고 있다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험물질

D제약회사로부터 공급 받은 유전자재조합 기법으로 만들어진 상피세포성장인자인 rhEGF인 K-378을 시험에 사용하였다. 시험물질은 용매인 PBS(phosphate buffered saline)에 용해하여 사용하였다. 대조군은 PBS를 투여하였다.

(2) 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구센터의 실험동물육종실에서 공급된 4주령의 암컷 SPF Sprague-Dawley 랫트를 사용하였다. 입수된 동물은 2주간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물을 선별하여 6주령에 시험에 공하였다.

사육환경은 온도 23~26 °C, 상대습도 40~60 %, 환기회수 10~20회/시간, 조도 150~300 lux 및 조명시간 12시간(07~19)시로 설정된 SPF 사육구역에서 스테인레스제 망사육상자(220W x 200L x 200H mm)에 1마리씩 수용하여 사

육하였다. 시험기간 중 사료는 (주)제일사료에서 생산한 실험동물용 고품사료를 방사선조사(2.0 Mrad)로 멸균하여, 물은 상수도수를 미세여과장치와 자외선 유수살균장치를 통과시킨 것을 물병을 이용하여 자유 섭취시켰다.

(3) 투여시간 및 투여량의 설정과 시험군의 구성

본 시험에서는 시험물질을 0.1 mg/kg으로 투여하였다. 이 용량은 한국화학연구소 안전성연구센터에서 실시한 본 시험물질의 독성시험에서 확실중독량으로서 본 시험에서는 투여시간의 차이에 따른 독성학적인 변화를 살펴보기 위해 이 확실중독량을 투여량으로 선택하였다. 시험군의 구성은 전체의 시험물질을 각각 1(T1), 0.05(T2), 0.0083(T3) 및 0.0021(T4) ml/rat/day로 투여하는 4개의 군으로 나누었다. 시험물질의 투여량은 모두 3 ml/rat이므로 상기의 시험군을 투여시간으로 구분하면 3분, 1시간, 6시간 및 24시간 투여하는 시험물질투여군을 두었다. 매체대조군은 투여시간을 1 ml/rat/min.으로 하고 infusion pump를 사용하지 않고 매체를 투여하는 infusion pump 무처리 대조군(C1)과 투여시간을 0.0021ml/rat/min.으로 하고 infusion pump를 사용하여 매체를 투여하는 24시간투여 매체 대조군(C2)의 2군을 설정하였다.

Dosage and grouping in the 14 day study of K-378

Group	No. of Animals	Animal Number	Dosage Vol. (ml/rat/day)	Dose (mg/kg/day)	Time of Adm. (min/rat/day)
C1 (PBS)	4	1 ~ 4	3	0	3
C2 (PBS)	4	5 ~ 8	3	0	1440
T1	4	9 ~ 12	3	0.1	3
T2	4	13 ~ 16	3	0.1	60
T3	4	17 ~ 20	3	0.1	360
T4	4	21 ~ 24	3	0.1	1440

(4) 시험물질의 투여방법

랫트의 좌 또는 우측의 미정맥내에 needle catheter를 이용하여 카테

터를 장착하고 이 카테터와 주사기를 three way stop cock를 이용하여 연결한 후 infusion pump를 이용하여 투여하였다. 카테터가 장착된 꼬리에는 카테터의 보호를 위하여 양면접착테이프, 반창고 및 연철판을 사용하였다. 장착이 풀리거나 이상이 있는 동물의 경우 카테터를 재장착하는 방법으로 시험물질을 투여하였다. 한편 infusion pump를 사용하지 않은 대조군의 경우에는 랫드를 고정기에 고정한 후 좌 또는 우측의 미정맥내에 24G의 주사침과 3 ml용 주사기를 이용하여 좌 또는 우측의 미정맥내에 직접 주사하였다.

(5) 관찰 및 검사항목

일반증상관찰은 매일 실시하였고 체중 측정은 투여전, 투여후 7일, 및 12일에 측정하였으며 사료와 물의 섭취량은 투여 후 7일과 12일에 측정하였다. 부검일에 후대정맥에서 채혈하여 일부는 EDTA-2K로 처리된 채혈병에 전혈을 채취하여 혈액학적인 검사를 실시하였고, 일부는 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 혈청을 이용 하여 혈액생화학적인 검사를 실시하였다. 부검소견은 전장기에 대하여 관찰하였고 장기중량은 뇌, 뇌하수체, 갑상선, 폐장, 심장, 간장, 비장, 신장 및 부신에 대하여 측정하였다. 병리조직검사는 신장, 방광, 간장, 비장, 난소, 피부(유선) 및 뇌에 대하여 실시하였다.

(6) 통계학적인 방법

통계학적인 방법은 일반증상과 부검소견 및 병리조직소견을 제외한 모든 검사항목을 구간 다중비교분석법인 Duncan's method를 화학연구소 안전성연구센터에서 사용하고있는 독성시험 무른모인 Labcat system을 이용하여 실시하였다. 일반증상, 부검소견 및 병리조직소견은 백분율로 표시하였으며 필요에 따라 Fisher's exact test를 실시하였다. 유의 수준은 5% 및 1%에서 검정하였다.

다. 연구결과

(1) 일반증상

일반증상에서는 시험물질 투여와 관련한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 다만 카테터보호장치의 장착에 의한 부작용으로 인하여 C2군에서

3례, T1군에서 3례, T2군에서 1례, T3군에서 4례 및 T4군에서 2례에서 꼬리의 암적색조, 피사, 궤양 및 부종이 투여후 3일 부터 관찰되었다.

(2) 체중의 변화

모든 시험물질 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

(3) 사료 및 물섭취량

사료섭취량에서는 군간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 물섭취량에서는 시험물질을 24시간 투여군(T4)에서 다른군에 비해 전 시험기간 동안 통계학적으로 유의성있게 증가하였고 6시간 투여군(T3)에서 대조군(C1, C2)에 비해 8일째와 13일째에 통계학적으로 유의성있게 증가하였다.

(4) 혈액학적인 검사

혈액학적인 검사에서는 C1군에 비해 적혈구수가 T1군과 T4군에서 유의성있는 감소, 헤모글로빈량이 C2, T1 및 T4군에서 유의성 있는 감소 및 헤마토크리트치의 T1 및 T4군에서 유의성있는 감소가 관찰되었다. 반면에 C2군과의 비교에 있어서는 적혈구수의 경우 T2군에서 유의성 있는 증가, T4군에서 유의성 있는 감소가 관찰되었으며, 헤모글로빈의 경우 T2와 T3군에서 증가가 T4군에서 감소가 유의성 있게 관찰되었고 헤마토크리트치에 경우 T2군에서 유의성 있는 증가가 T5군에서 유의성있는 감소가 관찰되었다. 한편 T5군의 경우 적혈구수, 헤모글로빈량 및 헤마토크리트치에 있어서 다른 모든 군에서 보다 통계학적으로 유의성 있는 감소가 관찰되었다.

(5) 혈액생화학적인 검사

혈액생화학적인 검사에서는 C1군에 비해 glucose가 T2, T3 및 T4군에서 통계학적으로 유의성있게 증가하였다. 한편 ALT(alanine aminotransferase)는 C2군에서, TCHO(total cholestrol)는 T2군에서 통계학적으로 유의성 있게 증가하였으며 C2군에서 알부민의 감소와, C1군과 T2군에서 알부민, 글로블린비(A/G ratio)의 감소가 통계학적으로 유의성있게 감소하였다.

(6) 부검소견

부검소견에서는 꼬리의 카테터장착부위 이하에서 궤양, 발적, 부종 및 괴사가 관찰되었다. 꼬리 소견의 발생 빈도를 보면 C2, T1, T2, T3, 및 T4군의 순으로 3, 3, 1, 4 및 2례에서 관찰되었다. 그 밖의 관찰된 소견은 T1군의 1례에서 우측 신장의 신우확장, T3군의 1례에서 뇌하수체의 중간엽이 백색으로 종대, T4군의 1례에서 좌우신장의 신우확장과 우측 신장의 피질에 불규칙한 회백색조의 변색부가 관찰되었다.

(7) 장기중량

장기중량에서는 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 다만, T4군에서 대조군에 비해 신장, 난소, 갑상선 및 비장의 중량이 증가하는 경향이 관찰되었다.

(8) 병리조직학적인 소견

병리조직학적인 소견에서는 방광상피세포의 증생이 T3군과 T4군에서 각 4례에서 관찰되었고 비장의 골수외 조혈기능항진이 C2군에선 1례, T1군에서 2례, T3군에서 3례, T4군에서 4례가 관찰되었다. 그밖에 관찰된 변화는 Table 2-1-12에 나타내었다.

Table 2-1-1. Mortality of female rats in the 14-day study of K-378

DOSE(mg/kg)	TEST ON DAYS														Final mortality	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
C1 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/4
C2 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/4
T1 (0.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/4
T2 (0.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/4
T3 (0.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/4
T4 (0.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/4

Table 2-1-2. Clinical findings of female rats in the 14-day study of K-378

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
0 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
1 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
2 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
3 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
4 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
5 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
6 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	3 75%
Wound		0	0	0	0	0	1 25%
7 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-2. Clinical findings of female rats in the 14-day study of K-378

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
8 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
9 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
10 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
11 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
12 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
13 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
14 DAY							
No. Observed		4	4	4	4	4	4
Terminal sacrifice		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%
Normal		4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%

(END OF REPORT)

Table 2-1-3. Mean body weights of female rats in the 14-day study of K-378

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
0 DAY	MEAN	154.6	157.8	157.8	156.0	158.1	158.7
	S.D.	5.54	11.01	11.91	5.60	6.11	7.79
	N	4	4	4	4	4	4
7 DAY	MEAN	172.6	173.4	180.8	172.0	174.6	170.1
	S.D.	3.38	11.40	14.50	13.30	10.10	4.26
	N	4	4	4	4	4	4
13 DAY	MEAN	181.7	180.7	188.8	185.5	194.9	184.1
	S.D.	3.27	11.57	14.36	10.43	11.47	4.16
	N	4	4	4	4	4	4

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

Table 2-1-4. Mean food consumption of female rats in the 14-day study of K-378

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
1 DAY	MEAN	22.7	19.4	22.5	22.4	22.6	21.9
	S.D.	1.66	1.01	3.69	0.61	2.46	1.38
	N	4	4	4	4	4	4
8 DAY	MEAN	21.5	22.8	23.8	25.4	23.9	24.3
	S.D.	2.23	1.89	3.03	3.97	0.31	1.60
	N	4	4	4	4	4	4
13 DAY	MEAN	18.3	20.8	21.4	20.9	21.4	22.2
	S.D.	1.28	2.30	2.09	3.24	0.46	1.66
	N	4	4	4	4	4	4

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

Table 2-1-5. Mean water consumption of female rats in the 14-day study of K-378

PERIOD	GROUP:	C1	C2	T1	T2	T3	T4
	DOSE: (mg/kg)	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1
1 DAY	MEAN	21.0	16.4	19.3	18.8	22.3	26.0
	S. D.	2.12	2.30	1.69	1.32	6.62	4.64
	N	4	4	4	4	4	4
8 DAY	MEAN	24.0	23.7	28.9	33.8	33.3	45.7**
	S. D.	3.19	4.24	7.91	9.78	4.02	11.63
	N	4	4	4	4	4	4
13 DAY	MEAN	22.2	28.4	28.9	28.3	32.8	44.0**
	S. D.	4.09	7.21	5.42	12.70	4.37	11.01
	N	4	4	4	4	4	4

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

* : Significantly different from control group (p<0.05)
 ** : Significantly different from control group (p<0.01)

Table 2-1-6. Hematological values of female rats in the 14-day study of K-378

TEST(s): UNITS:	WBC thousand	RBC millions	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg
Group: C1 : 0 (mg/kg)						
MEAN	9.69	7.22	14.4	42.7	59.2	20.1
SD	3.379	0.450	0.54	1.20	2.09	0.62
N	4	4	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)						
MEAN	9.55	6.76	13.3*	39.7	58.6	19.6
SD	2.690	0.303	0.64	1.43	1.16	0.77
N	4	4	4	4	4	4
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)						
MEAN	9.93	6.54*	13.2*	39.1*	59.8	20.3
SD	3.306	0.394	0.34	1.53	1.91	0.89
N	4	4	4	4	4	4
Group: T2 : 0.1 (mg/kg)						
MEAN	7.29	7.09	14.2	42.3	59.6	20.0
SD	2.784	0.330	0.29	2.17	1.74	0.61
N	4	4	4	4	4	4
Group: T3 : 0.1 (mg/kg)						
MEAN	7.91	6.86	13.7	40.7	59.4	19.9
SD	0.564	0.392	0.65	2.01	0.71	0.28
N	4	4	4	4	4	4
Group: T4 : 0.1 (mg/kg)						
MEAN	11.85	6.21**	12.6**	37.4* *	60.3	20.4
SD	3.780	0.128	0.39	0.76	1.82	0.79
N	4	4	4	4	4	4

TEST(s): UNITS:	MCHC g/dl	PLT thousand	RET. # /1000
Group: C1 : 0 (mg/kg)			
MEAN	33.9	1331	18.0
SD	0.37	95.9	12.70
N	4	4	4
Group: C20 (mg/kg)			
MEAN	33.4	1516	25.0
SD	0.88	47.2	9.63
N	4	4	4
Group: T10.1 (mg/kg)			
MEAN	33.9	1426	18.3
SD	0.90	20.7	10.40
N	4	4	4
Group: T20.1 (mg/kg)			
MEAN	33.7	1478	18.8
SD	1.09	54.6	7.85
N	4	4	4
Group: T30.1 (mg/kg)			
MEAN	33.5	1430	25.8
SD	0.29	12.3	3.20
N	4	4	4
Group: T40.1 (mg/kg)			
MEAN	33.8	1213	25.5
SD	0.40	23.0	6.61
N	4	4	4

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure
Significantly different from control group (*:p<0.05, **:p<0.01)

Table 2-1-7. Differential leucocyte count of female rats in the 14-day study of K-378

TEST(s): UNITS:	Neutrophil thousand	Eosinophil thousand	Basophils thousand	Lymphocyte thousand	Monocytes thousand
Group: C1 : 0 (mg/kg)					
MEAN	0.29	0.00	0.00	9.40	0.00
SD	0.130	0.000	0.000	3.352	0.000
N	4	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)					
MEAN	2.19*	0.00	0.00	7.36	0.00
SD	1.109	0.000	0.000	2.270	0.000
N	4	4	4	4	4
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)					
MEAN	1.83*	0.07	0.00	8.03	0.00
SD	0.985	0.054	0.000	2.921	0.000
N	4	4	4	4	4
Group: T2 : 0.1 (mg/kg)					
MEAN	0.71	0.01	0.00	6.57	0.00
SD	0.376	0.025	0.000	2.953	0.000
N	4	4	4	4	4
Group: T3 : 0.1 (mg/kg)					
MEAN	0.81	0.02	0.00	7.08	0.00
SD	0.328	0.040	0.000	0.649	0.000
N	4	4	4	4	4
Group: T4 : 0.1 (mg/kg)					
MEAN	1.86*	0.04	0.00	9.95	0.00
SD	1.007	0.075	0.000	3.287	0.000
N	4	4	4	4	4

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

* : Significantly different from control group (p<0.05)
 ** : Significantly different from control group (p<0.05)

Table 2-1-8. Serum biochemical values of female rats in the 14-day study of K-378

TEST(s): UNITS:	AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	BUN mg/dl	CRE mg/dl	GLU mg/dl	T-CHO mg/dl	T-BIL mg/dl	TP g/dl	ALB g/dl
Group: C1 : 0 (mg/kg)										
MEAN	108.4	25.4	304.5	22.7	0.59	111.4	69.2	0.18	6.35	4.28
SD	46.03	1.50	63.36	3.53	0.080	12.48	14.92	0.010	0.381	0.199
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)										
MEAN	109.9	34.8**	339.8	21.5	0.57	126.6	79.7	0.18	6.50	3.74**
SD	13.98	3.78	55.67	3.02	0.070	13.56	12.98	0.006	0.297	0.263
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)										
MEAN	129.0	27.0	288.8	22.4	0.53	133.4	68.3	0.18	6.59	4.15
SD	38.80	5.17	47.73	3.00	0.046	7.84	5.36	0.008	0.235	0.162
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T2 : 0.1 (mg/kg)										
MEAN	120.2	27.0	339.8	23.8	0.61	145.7**	101.0*	0.17	6.92	4.33
SD	46.01	2.07	94.58	3.42	0.034	15.43	21.07	0.015	0.081	0.096
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T3 : 0.1 (mg/kg)										
MEAN	116.1	27.0	413.4	25.7	0.60	162.9**	70.7	0.18	6.65	4.21
SD	17.94	3.47	85.89	4.12	0.058	15.99	12.08	0.010	0.278	0.214
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T4 : 0.1 (mg/kg)										
MEAN	119.1	22.5	311.7	25.5	0.55	140.8*	72.7	0.18	6.45	4.04
SD	39.06	2.41	49.81	4.24	0.041	14.80	11.88	0.014	0.131	0.142
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-8. Serum biochemical values of female rats in the 14-day study of K-378

TEST(s):	CPK	TG	CA	IP	PL-E	A/G	NA	K	CL
UNITS:	IU/L	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	ratio	mmol/l	mmol/l	mmol/l
Group: C1 : 0 (mg/kg)									
MEAN	271.8	19.9	9.11	8.16	109.5	2.07	143.5	5.03	107.5
SD	244.92	9.20	0.290	0.637	24.24	0.099	1.29	0.525	1.73
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)									
MEAN	180.4	18.1	8.97	8.12	113.1	1.37**	143.8	5.02	109.5
SD	125.42	3.51	0.351	0.662	14.35	0.177	0.96	0.825	1.00
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)									
MEAN	350.9	17.8	8.83	7.50	104.1	1.72	144.0	4.57	108.8
SD	213.66	3.37	0.299	0.529	8.25	0.217	0.82	0.594	0.50
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T2 : 0.1 (mg/kg)									
MEAN	318.2	29.8	9.20	8.44	130.3	1.68*	143.8	5.09	107.0
SD	196.62	8.64	0.320	1.531	17.72	0.138	0.96	1.584	1.41
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T3 : 0.1 (mg/kg)									
MEAN	240.0	21.3	9.06	8.62	101.8	1.76	143.5	4.98	107.8
SD	84.42	9.00	0.318	0.653	8.55	0.319	1.29	0.343	0.96
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T4 : 0.1 (mg/kg)									
MEAN	257.1	18.6	9.01	8.01	107.4	1.69	143.0	4.57	108.5
SD	159.68	6.88	0.184	0.744	17.02	0.143	1.15	0.198	1.29
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

* : Significantly different from control group (p<0.05)
 ** : Significantly different from control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 2-1-9. Gross findings of female rats in the 14-day study of K-378

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
HYPOPHYSIS						
No. of Observations	4	4	4	4	4	4
Enlargement of median lobe	0	0	0	0	1 25%	0
NO GROSS FINDINGS	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	3 75%	4 100%
KIDNEY-LEFT						
No. of Observations	4	4	4	4	4	4
Pelvis dilation	0	0	0	0	0	1 25%
NO GROSS FINDINGS	4 100%	4 100%	4 100%	4 100%	3 75%	3 75%
KIDNEY-RIGHT						
No. of Observations	4	4	4	4	4	4
Pelvis dilation	0	0	1 25%	0	0	1 25%
NO GROSS FINDINGS	4 100%	4 100%	3 75%	4 100%	4 100%	3 75%
TAIL						
No. of Observations	4	4	4	4	4	4
Ulceration	0	3 75%	1 25%	0	3 75%	0
Reddness	0	1 25%	1 25%	0	1 25%	0
Necrosis	0	1 25%	2 50%	1 25%	1 25%	2 50%
Cut	0	0	1 25%	0	0	0
Edema	0	1 25%	0	0	0	2 50%
NO GROSS FINDINGS	4 100%	1 25%	1 25%	3 75%	0	2 50%

Table 2-1-10. Absolute organ weights of female rats in the 14-day study of K-378

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
BODY WEIGHT (G)						
MEAN	165.7	165.0	173.4	170.0	173.6	162.3
SD	3.18	9.50	15.38	1.85	11.55	3.68
N	4	4	4	4	4	4
BRAIN (G)						
MEAN	1.731	1.674	1.619	1.692	1.730	1.750
SD	0.0445	0.0270	0.1375	0.1623	0.0743	0.0717
N	4	4	4	4	4	4
HYPOPHYSIS (G)						
MEAN	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
SD	0.0010	0.0024	0.0038	0.0000	0.0014	0.0030
N	4	4	4	4	4	4
ADRENAL GLAND-LEFT (G)						
MEAN	0.030	0.028	0.035	0.032	0.036	0.036
SD	0.0039	0.0024	0.0059	0.0050	0.0064	0.0034
N	4	4	4	4	4	4
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)						
MEAN	0.030	0.029	0.034	0.032	0.031	0.032
SD	0.0019	0.0015	0.0042	0.0056	0.0031	0.0049
N	4	4	4	4	4	4
LIVER (G)						
MEAN	5.046	5.255	5.576	5.386	5.485	5.562
SD	0.3261	0.6296	0.4423	0.1575	0.4034	0.2298
N	4	4	4	4	4	4
SPLEEN (G)						
MEAN	0.527	0.597	0.579	0.541	0.554	0.605
SD	0.0716	0.1954	0.1210	0.0912	0.0802	0.0572
N	4	4	4	4	4	4
KIDNEY-LEFT (G)						
MEAN	0.705	0.689	0.758	0.684	0.699	0.826
SD	0.0404	0.0542	0.0439	0.0420	0.0368	0.2035
N	4	4	4	4	4	4
KIDNEY-RIGHT (G)						
MEAN	0.700	0.714	0.726	0.683	0.719	0.839
SD	0.0711	0.0473	0.0318	0.0528	0.0430	0.2160
N	4	4	4	4	4	4
HEART (G)						
MEAN	0.654	0.658	0.687	0.693	0.698	0.708
SD	0.0247	0.0526	0.0694	0.1028	0.0153	0.0567
N	4	4	4	4	4	4

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-10. Absolute organ weights of female rats in the 14-day study of K-378

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
LUNG (G)						
MEAN	0.859	0.870	0.918	0.846	0.914	0.878
SD	0.0628	0.0508	0.0430	0.0519	0.0759	0.0306
N	4	4	4	4	4	4
OVARY-LEFT (G)						
MEAN	0.038	0.036	0.042	0.036	0.041	0.048
SD	0.0057	0.0010	0.0159	0.0056	0.0087	0.0142
N	4	4	4	4	4	4
OVARY-RIGHT (G)						
MEAN	0.036	0.036	0.042	0.035	0.042	0.050
SD	0.0046	0.0051	0.0161	0.0054	0.0123	0.0155
N	4	4	4	4	4	4
THYROID-LEFT (G)						
MEAN	0.005	0.005	0.005	0.008	0.005	0.008
SD	0.0021	0.0016	0.0015	0.0008	0.0018	0.0017
N	4	4	4	4	4	4
THYROID-RIGHT (G)						
MEAN	0.006	0.006	0.006	0.008	0.006	0.008
SD	0.0025	0.0022	0.0025	0.0025	0.0015	0.0017
N	4	4	4	4	4	4
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (G)						
MEAN	0.061	0.057	0.069	0.064	0.067	0.069
SD	0.0053	0.0012	0.0096	0.0091	0.0090	0.0083
N	4	4	4	4	4	4
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (G)						
MEAN	1.404	1.403	1.484	1.368	1.418	1.665
SD	0.1112	0.0987	0.0631	0.0866	0.0661	0.4181
N	4	4	4	4	4	4
OVARY-LEFT+OVARY-RIGHT (G)						
MEAN	0.074	0.072	0.084	0.071	0.083	0.098
SD	0.0095	0.0043	0.0313	0.0090	0.0207	0.0295
N	4	4	4	4	4	4
THYROID-LEFT+THYROID-RIGHT (G)						
MEAN	0.011	0.011	0.011	0.016	0.011	0.016
SD	0.0045	0.0038	0.0026	0.0028	0.0026	0.0030
N	4	4	4	4	4	4

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

(END OF REPORT)

Table 2-1-11. Relative organ weights of female rats in the 14-day study of K-378

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
BRAIN (% BODY WEIGHT)						
MEAN	1.04	1.02	0.93	0.99	1.00	1.08
SD	0.039	0.054	0.049	0.086	0.046	0.062
N	4	4	4	4	4	4
HYPOPHYSIS (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01
SD	0.000	0.002	0.002	0.000	0.001	0.002
N	4	4	4	4	4	4
ADRENAL GLAND-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
SD	0.003	0.001	0.002	0.003	0.004	0.002
N	4	4	4	4	4	4
ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
SD	0.001	0.001	0.002	0.004	0.003	0.003
N	4	4	4	4	4	4
LIVER (% BODY WEIGHT)						
MEAN	3.05	3.19	3.22	3.17	3.16	3.43
SD	0.212	0.360	0.122	0.063	0.201	0.129
N	4	4	4	4	4	4
SPLEEN (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.32	0.36	0.34	0.32	0.32	0.37
SD	0.039	0.110	0.078	0.052	0.032	0.042
N	4	4	4	4	4	4
KIDNEY-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.42	0.42	0.44	0.40	0.40	0.51
SD	0.022	0.043	0.021	0.022	0.035	0.119
N	4	4	4	4	4	4
KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.42	0.43	0.42	0.40	0.42	0.52
SD	0.040	0.031	0.035	0.027	0.033	0.127
N	4	4	4	4	4	4
HEART (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.39	0.40	0.40	0.41	0.40	0.44
SD	0.019	0.022	0.006	0.058	0.028	0.041
N	4	4	4	4	4	4
LUNG (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.52	0.53	0.53	0.50	0.53	0.54
SD	0.046	0.049	0.036	0.031	0.030	0.031
N	4	4	4	4	4	4

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-11. Relative organ weights of female rats in the 14-day study of K-378

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.1	T3 0.1	T4 0.1
OVARY-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03
SD	0.004	0.001	0.007	0.003	0.006	0.010
N	4	4	4	4	4	4
OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03
SD	0.003	0.003	0.008	0.003	0.008	0.010
N	4	4	4	4	4	4
THYROID-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SD	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001
N	4	4	4	4	4	4
THYROID-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SD	0.002	0.002	0.001	0.001	0.000	0.001
N	4	4	4	4	4	4
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
SD	0.004	0.002	0.004	0.006	0.007	0.005
N	4	4	4	4	4	4
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.85	0.85	0.86	0.80	0.82	1.02
SD	0.061	0.074	0.054	0.043	0.064	0.246
N	4	4	4	4	4	4
OVARY-LEFT+OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05	0.06
SD	0.006	0.002	0.015	0.005	0.014	0.020
N	4	4	4	4	4	4
THYROID-LEFT+THYROID-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
SD	0.002	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002
N	4	4	4	4	4	4

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

(END OF REPORT)

Table 2-1-12. Histopathological findings of female rats in the 14-day study of K-378

GROUP:	C1	C2	T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1
NUMBER OF ANIMALS:	4	4	4	4	4	4
	# %	# %	# %	# %	# %	# %
KIDNEY	#EX 4	4	4	4	4	4
Hydronephrosis	1 25	0	1	0	0	1 25
Mineralization (Tubular epithelium)	2 50	2 50	2 50	1 25	1 25	1 25
Hyperplasia(Urothelium)	0	0	0	0	1 25	0
Infarct	0	0	0	0	0	1 25
Urinary Bladder	#EX 4	4	4	4	4	4
Hyperplasia(Urothelium)	0	0	0	0	4	4
LIVER	#EX 4	4	4	4	4	4
Microgranuloma	2	3	2	0	3	2
Lymphocytic infiltrates	0	0	0	1	0	0
Acute inflammation	0	0	0	1	0	0
SPLEEN	#EX 4	4	4	4	4	4
Extramedullary hematopoiesis	0	1	2	0	3	4
Ovary	#EX 3	4	4	4	4	4
Hyperplasia(Urothelium)	0	0	0	0	2	0

라. 고찰 및 결론

독성시험을 수행할 때에 임상예정 경로로 투여 경로를 선택하는 것이 일반적이다. 그러나 정맥내 연속투여의 경우 독성시험에서는 잘 사용되지 않고 있다. 그 이유는 동물에게 수술적인 처치를 해야 하므로써 처치 과정에서 동물에게 스트레스를 주게 되거나 마취제를 사용하게 되어 시험물질의 대사에 영향을 줄 가능성이 있는 것과, 처치과정에서 고도의 기술과 많은 시간이 소모되는 것 때문이다. 본 시험은 비수술적인 방법으로 미정맥내에 카테터를 장착하고 infusion pump를 이용하여 24시간 연속투여하는 방법을 개발하고 연속투여와, 반복투여시 나타나는 생체반응의 차이를 알아보려고 수행하였다. 본 시험에 사용된 K-378은 D제약(주)에서 유전자재조합기법으로 개발한 상피세포성장인자(epidermal growth factor)로서 일종의 내인성호르몬으로 반감기가 짧은 물질이다. 따라서 체내에서 약물의 농도가 steady-state에 도달한 상태에서의 독성약리적인 자료를 얻고자 본 시험물질을 연속투여 물질로 선택하였다.

본 시험에서 관찰된 결과는 6시간 이상 연속 투여군에서 1시간 이하 투여군에 비해 생체에 일으키는 변화가 더 컸다. 본 시험에서 조직검사를 선택한 장기는 K-378에 대한 랫트와 마우스를 이용한 아급성시험에서 이상이 관찰된 장기들이었다. 아급성 시험에서는 투여경로를 피하로 하였던 바 2 주간의 정맥내 투여로 13주간 투여한 동물에서 관찰된 변화를 관찰할 수 있었다. 본 시험에서 관찰된 병리조직학적인 변화들은 피하투여 아급성독성시험에서 관찰된 변화들(송시환 등 1996, Maraschin 등, 1995)과 유사하였다. 이는 2 주간 투여하였음에도 변화가 관찰되었던 바 정맥내 투여에 의한 효과가 피하투여에 비해 컸음을 알 수 있었다. 한편 물 섭취량의 통계학적으로 유의성($p < 0.01$) 있는 증가가 6시간 투여군과 24 시간 투여군에서 관찰되었는데 이 것으로 보아도 연속 투여군에서 더욱 많은 영향을 받았다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 K-378의 정맥내 연속투여는 반복단회투여하는 것보다 동물에게 미치는 영향이 더욱 크다는 것을 시사하고 있다. 반면에 항암제와 같이 세포독성이 강한물질의 경우 반복단회투여 하는 것이 연속투여 하는 것보다 같은 용량을 투여할 경우, 일시적으로 혈중 농도를 상승시켜 독성을 더 발휘할 가능성도 있

다. 이러한 것으로 보아 임상투약경로가 사람이나 동물에게 연속 투여되는 물질의 경우 동물 실험도 연속투여를 유도하는 것이 바람직하다.

본 시험에서 infusion pump를 장착한 대조군과 장착하지 않은 대조군과의 차이가 헤모글로빈양, 호중구수, ALT, ALB 및 A/G ratio에서 관찰되었는데 모두 카테터와 infusion pump를 장착하는 과정에서 카테터를 보호하기 위하여 알루미늄 판을 이용하여 보호막을 장착하였는데 이 때의 압박으로 인하여 꼬리의 피부에 손상을 입힌 것과 관련이 있는 변화로 사료되었다. 이는 부검 소견에서 일부의 동물에서 관찰된 꼬리의 보호장치를 설치한 부분에서 괴사, 출혈 및 부종이 관찰되었고 카테터의 끝 부분에서 농양이 관찰된 것과 일치하는 변화였다. 그러나 다른 시험물질 투여군에서는 이러한 변화가 관찰되지 않아 이 변화가 반드시 꼬리의 손상에 의해 나타난 변화로만 판단할 수는 없었다. 이러한 보호장치는 Born과 Moller 및 Rhodes와 Patterson이 발표한 electrical sheathing을 이용하고 이 장치를 꼬리에 고정하는 방법을 개선하면 훨씬 좋은 결과를 얻을 수 있다고 생각되었다.

본 시험에서 미정맥내에 카테터를 삽입하는 것은 쉽게 해결하였으나, 카테터를 보호하는 장치를 고정하는 방법이 다소 미흡하여 꼬리에 손상이 있었던 바 장기간 연속 투여를 할 경우에는 이에 대한 보안책도 요구된다. 꼬리의 손상이 카테터를 장착한 후 4일 쯤부터 관찰되었던 바 3일정도의 연속투여는 본 시험에서 사용한 방법으로도 가능하므로 미정맥내 연속투여에 의한 급성독성 시험은 충분하다고 사료되었다.

이상의 결과로 보아 K-378의 미정맥내 연속투여는 반복 bolus 투여하는 군에서보다 더욱 많은 약리독성학적인 변화를 나타낼 수 있을 것으로 나타났다. 그리고 본 시험방법으로 미정맥내 연속 투여하는 급성독성시험은 가능하다고 판단되었으며 보호장치와 장착방법의 개선으로 꼬리의 손상을 줄인다면 미정맥에 2주간 연속투여 시험도 가능하다고 판단되었다.

4. Infusion pump를 이용한 K-566의 미정맥내 연속 또는 반복투여가 수컷 랫트에 미치는 영향 차이

가. 서 론

본 시험은 국내의 I제약회사에서 새롭게 개발한 백금착계 항암제인 K-566을 투여시간의 차이를 두어 미정맥내에 연속 또는 반복 투여하여 투여속도가 생체에 미치는 영향의 차이를 알아보고 본 시험법의 유용성을 확인하고자 실시하였다. 본 시험에서는 앞에서 실시한 시험에서 사용한 연철판 대신에 electrical sheathing나 cable tie를 사용하여 시험을 수행하였다.

백금착계 항암제는 일반적으로 분열이 왕성한 세포의 DNA와 직접 결합하여 세포분열을 억제하는 기능을 가진 약물로서 다양한 암에 대한 항암효과가 인정되어 있다. 본 시험에서는 이 K-566을 24시간 연속 투여하는 군과 단회 반복 투여하는 군으로 구분하여 그 결과를 비교하고자 시험을 수행하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험물질

I제약회사로부터 공급 받은 백금착계 항암제인 K-566을 시험에 사용하였다. 시험물질은 용매인 생리식염액에 용해하여 사용하였다. 대조군은 생리식염액을 투여하였다.

(2) 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구센터의 실험동물육종실에서 공급된 4주령의 수컷 SPF Sprague-Dawley 랫트를 사용하였다. 입수된 동물은 약 2주간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물을 선별하여 5~6 주령에 시험에 공하였다.

사육환경은 온도 23~26 °C, 상대습도 40~60%, 환기회수 10~20회/시간, 조도 150~300 lux 및 조명시간 12시간(07~19)시로 설정된 SPF 사육구역에서 스테인레스제 방사육상자(220W x 200L x 200H mm)에 1마리씩 수용하여 사육하였다. 시험기간 중 사료는 (주)제일사료에서 생산한 실험동물용 고형사료를 방사선조사(2.0 Mrad)로 멸균하여, 물은 상수도수를 미세여과장치와 자외선 유수살균장치를 통과시킨 것을 물병을 이용하여 자유 섭취시켰다.

(3) 투여시간 및 투여량의 설정과 시험군의 구성

본 시험에서는 시험물질을 0.1, 0.5 및 2.5 mg/kg으로 연속 투여하였다. 이 용량은 한국화학연구소 안전성연구센터에서 실시한 독성시험에서 확실 중독량이 5.4 mg/kg 과 0.9 mg/kg 사이에 존재할 것으로 사료되어 이들 두 용량의 중간정도에 최고용량군 2.5 mg/kg 투여군을 두고 공비 5로 하여 아래로 2 용량군을 설정하였다. 한편 최고 용량군에서 투여 시간의 차이에 따른 독성학적인 변화를 살펴보기 위해 최고용량군에서 반복 투여하는 군을 두었다. 대조군은 생리식염액을 24시간 연속 투여하는 연속투여 대조군과 반복 투여하는 대조군을 설정하였다. 투여액량, 투여량 및 투여시간 및 군의 구성은 아래 표에 나타내었다.

Dosage and grouping in the 14 day study of K-566

Group	No. of Animals	Animal Number	Dosage Vol. (ml/rat/day)	Dose (mg/kg/day)	Time of Adm. (min/rat/day)
C1 (생리식염액)	5	1 ~ 5	5	0	1440
C2 (생리식염액)	5	6 ~ 10	1	0	3
T1	5	11 ~ 15	5	0.1	1440
T2	5	16 ~ 20	5	0.5	1440
T3	5	21 ~ 25	5	2.5	1440
T4	5	26 ~ 30	1	2.5	3

(4) 시험물질의 투여방법

랫트의 좌 또는 우측의 미정맥내에 needle catheter를 이용하여 카테터를 장착하고 이 카테터와 주사기를 three way stop cock를 이용하여 연결한 후 infusion pump를 이용하여 투여하였다. 카테터가 장착된 꼬리에는 카테터의 보호를 위하여 양면접착테이프, 반창고, electrical sheathing 및 cable tie를 사용하였다. 시험도중에 장착이 풀린 경우에는 재장착을 실시하여 시험물질을 투여하였다. 다만 C1, T1 및 T2군의 각 1례는 재장착에 실패하여 시험에서 제외하였다. 한편 T4군과 infusion pump를 사용하지 않은 대조군의 경우에는

랫트를 고정기에 고정한 후 좌 또는 우측의 미정맥내에 24G의 주사침과 3 ml 용 주사기를 이용하여 좌 또는 우측의 미정맥내에 직접 주사하였다.

(5) 관찰 및 검사항목

일반증상관찰은 매일 실시하였고 체중 측정은 투여전, 투여후 3, 7, 10 및 13일에 측정하였으며 사료와 물의 섭취량은 투여 후 1, 4, 8 및 11일에 측정하였다. 노검사는 부검 전일에 철망사육상자에서 자연 채뇨하여 노스틱 (Multisticks-SG)을 이용하여 정성검사를 실시하였다. 부검일에 후대정맥에서 채혈하여 일부는 EDTA-2K로 처리된 채혈병에 전혈을 채취하여 혈액학적인 검사를 실시하였고, 일부는 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 혈청을 이용하여 혈액생화학적인 검사를 실시하였다. 부검소견은 전 장기에 대하여 관찰하였고 장기중량은 뇌, 뇌하수체, 갑상선, 폐장, 심장, 간장, 비장, 신장, 흉선 및 부신에 대하여 측정하였다. 병리조직검사는 신장, 간장, 비장, 폐장, 흉선, 악하림프절, 정소, 흉골, 꼬리(투여부위) 및 뇌에 대하여 실시하였다.

(6) 통계학적인 방법

통계학적인 방법은 일반증상과 부검소견 및 병리조직소견을 제외한 모든 검사항목을 군간 다중비교분석법인 Duncan's method를 화학연구소 안전성연구센터에서 사용하고있는 독성시험 무른모인 Labcat system을 이용하여 실시하였다. 일반증상, 부검소견 및 병리조직소견은 백분율로 표시하였으며 필요에 따라 Fisher's exact test를 실시하였다. 유의 수준은 5% 및 1%에서 검정하였다.

다. 연구결과

(1) 일반증상

일반증상에서는 시험물질 투여와 관련한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 다만 카테터보호장치의 장착에 의한 부작용으로 인하여 T1군에서 꼬리의 부종, 암적색조 및 괴사가 1례씩, T2꼬리의 부종, 상흔, 괴사가 1례씩, T3군에서는 부종, 농포, 궤양 및 꼬리의 암적색조가 1 또는 2례에서 관찰되었다.

(2) 체중의 변화

모든 시험물질 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

(3) 사료 및 물섭취량

사료섭취량에서는 1일째에 infusion pump를 장착하지 않은 군인 C2군과 T4군에서 다른 군보다 통계학적으로 유의하게 사료섭취량이 증가하였고 그 밖의 모든 시험기간동안에도 C2군과 T4군에서 증가한 경향이 관찰되었다. 물섭취량에서도 역시 1일째에 C2군과 T4군에서 infusion pump를 장착한 다른 군들에 비해 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었고 투여 후 4일째에는 T4군에서 통계학적으로 유의하게 증가한 것이 관찰되었다. 그 밖의 다른 기간에도 C2군과 T4군에서 증가하는 경향이 관찰되었다.

(4) 뇨검사

뇨검사에서는 시험물질 투여와 관련된 어떠한 이상도 관찰되지 않았다. 다만 T3군에서 잠혈이 다른군들 보다 통계학적으로 높게 관찰되었는데 이는 꼬리의 괴사된 부분으로 부터 외상성 출혈이 있었기 때문이었다.

(5) 혈액학적인 검사

혈액학적인 검사에서는 T4군에서 다른 모든 시험군에서 보다 통계학적으로 유의성있는 망적혈구수의 감소가 관찰되었다.

(6) 혈액생화학적인 검사

혈액생화학적인 검사에서는 T4군에서 다른 모든 시험군에 비해 blood urea nitrogen(BUN)이 통계학적으로 유의성있게 증가하였고 Na가 매체 연속투여 대조군(C1)에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 그리고 T1군에서도 Na가 C1군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 한편 A/G비가 반복투여 대조군(C2)에서 C1군에 비해 통계학적으로 유의성있게 증가하였다.

(7) 부검소견

부검소견에서는 꼬리의 카테터장착부위 이하에서 궤양, 발적, 부종 및 괴사가 관찰되었다. 그 밖의 관찰된 소견은 T1군의 1례에서 우측 신장의 신

우확장이 있었다.

(8) 장기중량

장기중량에서는 다른 모든 시험군에 비해 T4군에서 비장과 흉선의 중량이 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 그리고 C2군에서 C1군에 비해 부신의 중량이 감소한 경향이 관찰되었다.

(9) 병리조직학적인 소견

병리조직학적인 소견에서 시험물질 투여와 관련된 소견은 비장의 위축, 악하림프절의 위축, 흉선의 위축 및 꼬리의 염증이였다. 비장의 위축은 C1, C2, T1, T2, T3 및 T4군 순으로 각각 0, 0, 0, 1, 2 및 4례에서 관찰되었고 흉선의 위축은 T2, T3 및 T4군에서 각각 4례씩, 악하림프절의 위축은 T3군과 T4군에서 각각 2례와 1례에서 관찰되었다. 투여부위인 꼬리의 염증은 C1, C2, T1, T2, T3 및 T4군 순으로 각각 3, 0, 4, 4, 5 례 및 0례에서 관찰되었다. 그 밖에 많이 관찰된 소견으로는 간장의 소육아종이 C1, C2, T1, T2, T3 및 T4군 순으로 각각 1, 3, 2, 4, 5 및 1례에서 관찰되었다. 그 밖에 신장에서 만성 신증, 수신증의 증상이 용량상관성 없이 관찰되었다. 그밖에 관찰된 변화는 Table 2-1-25에 나타내었다.

Table 2-1-13. Mortality of male rats in the 14-day study of K-566

DOSE(mg/kg)	DAYS ON TEST														Final Mortality	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
0.1	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/5
0.5	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/5
2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

*Exclusion from the data because of necrosis of tail

Table 2-1-14. Clinical findings of male rats in the 14-day study of K-566

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
0 DAY							
No. Observed		5	5	5	5	5	5
Normal		5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%
1 DAY							
No. Observed		5	5	5	5	5	5
Normal		5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%
2 DAY							
No. Observed		5	5	5	5	5	5
Normal		5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%
3 DAY							
No. Observed		5	5	5	5	5	5
Normal		5 100%	5 100%	4 80%	4 80%	5 100%	5 100%
Necrosis of Tail		0	0	1 20%	1 20%	0	0
4 DAY							
No. Observed		5	5	5	5	5	5
Normal		5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%
5 DAY							
No. Observed		5	5	5	5	5	5
Sacrificed		0	0	1 20%	1 20%	0	0
Normal		4 80%	5 100%	4 80%	4 80%	5 100%	5 100%
Dark Red of Tail		1 20%	0	0	0	0	0

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-14. Clinical findings of male rats in the 14-day study of K-566

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
6 DAY							
No. Observed		5	5	4	4	5	5
Normal		4 80%	5 100%	4 100%	3 75%	4 80%	5 100%
Blood loss		0	0	0	1 25%	0	0
Edema		0	0	0	1 25%	0	0
Dark Red of Tail		1 20%	0	0	0	1 20%	0
7 DAY							
No. Observed		5	5	4	4	5	5
Normal		4 80%	5 100%	4 100%	3 75%	4 80%	5 100%
Edema		0	0	0	1 25%	0	0
Scar		0	0	0	1 25%	0	0
Dark Red of Tail		1 20%	0	0	0	1 20%	0
8 DAY							
No. Observed		5	5	4	4	5	5
Normal		4 80%	5 100%	3 75%	3 75%	3 60%	5 100%
Edema		0	0	0	1 25%	1 20%	0
Scar		0	0	0	1 25%	0	0
Ulceration		0	0	1 25%	0	0	0
Necrosis of Tail		1 20%	0	0	0	1 20%	0
9 DAY							
No. Observed		5	5	4	4	5	5
Normal		4 80%	5 100%	3 75%	2 50%	2 40%	5 100%
Edema		0	0	0	1 25%	2 40%	0
Scar		0	0	0	1 25%	0	0
Ulceration		0	0	1 25%	1 25%	1 20%	0
Necrosis of Tail		1 20%	0	0	1 25%	1 20%	0
Dark Red of Tail		0	0	1 25%	0	0	0
10 DAY							
No. Observed		5	5	4	4	5	5
Normal		3 60%	5 100%	3 75%	2 50%	2 40%	5 100%
Edema		0	0	1 25%	1 25%	2 40%	0
Pustule		0	0	0	1 25%	2 40%	0
Ulceration		1 20%	0	0	1 25%	2 40%	0
Necrosis of Tail		1 20%	0	0	1 25%	1 20%	0
Dark Red of Tail		0	0	1 25%	0	0	0
11 DAY							
No. Observed		5	5	4	4	5	5
Normal		3 60%	5 100%	3 75%	2 50%	2 40%	5 100%
Edema		0	0	1 25%	0	2 40%	0
Pustule		0	0	0	1 25%	2 40%	0
Ulceration		1 20%	0	0	1 25%	2 40%	0
Necrosis of Tail		1 20%	0	0	1 25%	1 20%	0
Dark Red of Tail		0	0	1 25%	0	0	0

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-14. Clinical findings of male rats in the 14-day study of K-566

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
12 DAY							
No. Observed		5	5	4	4	5	5
Normal		3 60%	5 100%	3 75%	2 50%	2 40%	5 100%
Sacrificed		1 20%	0	1 25%	0	2 40%	0
Edema		0	0	1 25%	0	2 40%	0
Pustule		0	0	0	1 25%	2 40%	0
Ulceration		1 20%	0	0	1 25%	2 40%	0
Necrosis of Tail		1 20%	0	0	1 25%	1 20%	0
Dark Red of Tail		0	0	1 25%	0	0	0
13 DAY							
No. Observed		4	5	4	4	5	5
Normal		3 75%	5 100%	3 75%	2 50%	2 40%	5 100%
Edema		0	0	1 25%	0	2 40%	0
Pustule		0	0	0	1 25%	2 40%	0
Ulceration		1 25%	0	0	1 25%	2 40%	0
Necrosis of Tail		1 25%	0	0	1 25%	1 20%	0
Dark Red of Tail		0	0	1 25%	0	0	0
14 DAY							
No. Observed		4	5	4	4	5	5
Terminal sacrifice		4 100%	5 100%	4 100%	4 100%	5 100%	5 100%
Normal		3 75%	5 100%	3 75%	2 66%	2 40%	5 100%
Edema		0	0	1 25%	0	2 40%	0
Pustule		0	0	0	1 25%	2 40%	0
Ulceration		1 25%	0	0	1 25%	2 40%	0
Necrosis of Tail		1 25%	0	0	1 25%	1 20%	0
Dark Red of Tail		0	0	1 25%	0	0	0

(END OF REPORT)

Table 2-1-15. Body weights of male rats in the 14-day study of K-566

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
0 DAY	MEAN	179.8	182.8	180.5	184.5	182.5	183.8
	S. D.	23.76	11.22	19.54	12.18	13.66	15.75
	N	5	5	5	5	5	5
3 DAY	MEAN	194.2	202.0	187.9	195.5	189.1	199.5
	S. D.	22.36	12.98	31.72	14.56	22.01	19.64
	N	5	5	5	5	5	5
7 DAY	MEAN	218.4	234.3	218.7	209.1	212.8	221.4
	S. D.	19.02	15.55	46.88	26.31	22.57	19.25
	N	5	5	4	4	5	5
10 DAY	MEAN	236.9	259.0	242.6	223.6	228.9	234.9
	S. D.	20.69	19.13	51.44	24.86	26.59	20.72
	N	5	5	4	4	5	5
13 DAY	MEAN	258.3	279.6	259.1	251.5	244.6	241.8
	S. D.	22.45	20.80	56.67	14.02	28.13	20.21
	N	5	5	4	4	5	5

Analysis of Variance using Scheffe's Procedure

Table 2-1-16. Food consumption of male rats in the 14-day study of K-566

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
1 DAY	INTAKE (g)	21.0	29.9*	23.5	20.6	21.7	31.7**
	S. D.	3.98	2.87	6.27	7.04	4.28	4.24
	N	5	5	5	5	5	5
4 DAY	INTAKE (g)	27.3	32.7	29.3	28.2	29.5	31.8
	S. D.	3.25	2.17	2.71	6.35	3.00	3.33
	N	5	5	5	5	5	5
8 DAY	INTAKE (g)	25.9	31.8	28.1	22.6	24.8	31.4
	S. D.	1.74	3.03	6.53	3.57	5.20	5.90
	N	5	5	4	4	5	5
11 DAY	INTAKE (g)	27.7	33.3	28.6	27.5	26.4	32.4
	S. D.	2.73	3.47	7.13	1.10	3.85	5.70
	N	5	5	4	4	5	5

Analysis of Variance using Scheffe's Procedure

* : Significant difference from c1 group (p<0.05)
 ** : Significant difference from c1 group (p<0.01)

Table 2-1-17. Water consumption of male rats in the 14-day study of K-566

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
1 DAY	INTAKE (g)	17.3	27.9*	19.3	14.9	18.9	26.8*
	S. D.	8.28	1.20	4.82	7.43	5.38	2.17
	N	5	5	5	5	5	5
4 DAY	INTAKE (g)	28.1	33.5	33.8	28.0	29.8	35.3*
	S. D.	3.37	2.95	4.19	4.52	4.26	5.19
	N	5	5	5	5	5	5
8 DAY	INTAKE (g)	29.9	32.4	31.1	25.0	28.2	34.2
	S. D.	2.34	5.21	6.78	5.17	5.70	4.70
	N	5	5	4	4	5	5
11 DAY	INTAKE (g)	33.9	35.5	30.7	31.0	28.8	32.7
	S. D.	3.98	4.67	8.74	3.35	3.45	3.98
	N	5	5	4	4	5	5

Analysis of Variance using Scheffe's Procedure

* : Significant difference from c1 group (p<0.05)

Table 2-1-18. Urinalysis of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP: DOSE: (mg/kg)		C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
NO. OF ANIMALS EXAMINED		3*	5	4	4	5	5
1) GLUCOSE	- : 0	3	5	4	4	5	5
	+/- : 1	0	0	0	0	0	0
	1+ : 2	0	0	0	0	0	0
	2+ : 3	0	0	0	0	0	0
	3+ : 4	0	0	0	0	0	0
2) BILIRUBIN	- : 0	2	5	1	2	4	5
	1+ : 1	1	0	3	2	1	0
	2+ : 2	0	0	0	0	0	0
	3+ : 3	0	0	0	0	0	0
3) KETONE	- : 0	0	0	0	0	1	2
	+/- : 1	3	5	3	3	2	3
	1+ : 2	0	0	1	1	2	0
	2+ : 3	0	0	0	0	0	0
	3+ : 4	0	0	0	0	0	0
4) SPECIFIC GRAVITY	≤ 1.005 : 0	0	0	0	0	0	1
	1.010 : 1	0	0	0	0	0	0
	1.015 : 2	0	0	0	0	1	1
	1.020 : 3	1	0	2	1	1	1
	1.025 : 4	0	5	1	1	2	1
	≥ 1.030 : 5	2	0	1	2	1	1
5) pH	5.0 : 0	0	0	0	0	0	0
	5.5 : 1	0	0	0	0	0	0
	6.0 : 2	0	0	1	0	0	0
	6.5 : 3	0	0	0	0	0	0
	7.0 : 4	0	0	0	1	0	0
	7.5 : 5	2	1	0	1	1	0
	8.0 : 6	1	4	1	2	2	3
	8.5 : 7	0	0	2	0	2	1
	≥ 9.0 : 8	0	0	0	0	0	0
6) PROTEIN	- : 0	0	0	0	0	0	1
	+/- : 1	0	0	0	0	1	1
	1+ : 2	1	2	3	1	2	1
	2+ : 3	2	3	0	1	1	2
	3+ : 4	0	0	1	2	1	0

*Animal was not properly collected the urin

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-18. Urinalysis of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP: DOSE: (mg/kg)		C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
NO. OF ANIMALS EXAMINED		3	5	4	4	5	5
7) UROBILINOGEN	0.1 : 0	3	3	2	1	3	4
	1.0 : 1	0	2	2	2	2	1
	2.0 : 2	0	0	0	1	0	0
	4.0 : 3	0	0	0	0	0	0
	≥8.0 : 4	0	0	0	0	0	0
8) NITRITE	- : 0	3	5	4	4	5	4
	+ : 1	0	0	0	0	0	1
9) OCCULT BLOOD	- : 0	3	5	4	3	2	4
	+/- : 1	0	0	0	0	1	1
	1+ : 2	0	0	0	0	0	0
	2+ : 3	0	0	0	0	0	0
	3+ : 4	0	0	0	1	2	0

Kruskal-Wallis's H-test using Scheffe's Procedure

(END OF REPORT)

Table 2-1-19. Hematological values of male rats in the 14-day study of K-566

TEST(s): UNITS:	WBC thousand	RBC millions	HGB g/dl	HCT %	MCV fl
Group: C1 : 0 (mg/kg)					
MEAN	9.38	7.12	15.2	44.7	62.8
SD	2.870	0.219	0.46	2.06	1.05
N	4	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)					
MEAN	8.94	6.82	14.8	42.6	62.5
SD	3.415	0.276	0.47	1.41	1.36
N	5	5	5	5	5
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)					
MEAN	9.72	6.86	14.8	42.4	61.8
SD	3.109	0.282	.90	2.87	1.75
N	4	4	4	4	4
Group: T2 : 0.5 (mg/kg)					
MEAN	9.05	6.98	14.7	42.2	60.5
SD	1.258	0.392	0.74	2.21	1.70
N	4	4	4	4	4
Group: T3 : 2.5 (mg/kg)					
MEAN	11.58	6.69	14.6	41.6	62.1
SD	3.304	0.369	1.21	3.03	1.48
N	5	5	5	5	5
Group: T4 : 2.5 (mg/kg)					
MEAN	8.83	6.40	13.9	40.1	62.9
SD	2.625	0.503	0.58	1.74	3.94
N	5	5	5	5	5

TEST(s): UNITS:	MCH pg	MCHC g/dl	PLT thousand	RET. # /1000
Group: C1 : 0 (mg/kg)				
MEAN	21.4	34.1	1275	37.8
SD	0.14	0.68	168.9	11.32
N	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)				
MEAN	21.7	34.7	1115	39.2
SD	0.73	0.56	38.3	8.07
N	5	5	5	5
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)				
MEAN	21.6	35.0	1212	24.5
SD	0.41	0.49	75.8	17.97
N	4	4	4	4
Group: T2 : 0.5 (mg/kg)				
MEAN	21.0	34.7	1441	34.8
SD	0.44	0.26	116.3	6.65
N	4	4	4	4
Group: T3 : 2.5 (mg/kg)				
MEAN	21.8	35.0	1399	38.8
SD	0.70	0.38	167.4	13.90
N	5	5	5	5
Group: T4 : 2.5 (mg/kg)				
MEAN	21.9	34.7	1283	16.8*
SD	1.49	0.29	207.5	6.80
N	5	5	5	5

Analysis of Variance using Scheffe's Procedure

* : Significant difference from c1 group (p<0.05)

Table 2-1-20. Differential leucocyte count male rats in the 14-day study of K-566

TEST(s): UNITS:	Neutrophil thousand	Eosinophil thousand	Basophiles thousand	lymphocyte thousand	Monocytes thousand
Group: C1 : 0 (mg/kg)					
MEAN	1.42	0.04	0.00	7.93	0.00
SD	0.939	0.070	0.000	2.209	0.000
N	4	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)					
MEAN	1.16	0.04	0.00	7.74	0.00
SD	0.267	0.066	0.000	3.384	0.000
N	5	5	5	5	5
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)					
MEAN	1.24	0.02	0.00	8.42	0.04
SD	0.835	0.030	0.000	3.386	0.090
N	4	4	4	4	4
Group: T2 : 0.5 (mg/kg)					
MEAN	1.79	0.10	0.00	7.16	0.00
SD	0.837	0.091	0.000	1.435	0.000
N	4	4	4	4	4
Group: T3 : 2.5 (mg/kg)					
MEAN	3.15	0.05	0.00	8.32	0.06
SD	1.619	0.112	0.000	3.594	0.055
N	5	5	5	5	5
Group: T4 : 2.5 (mg/kg)					
MEAN	1.73	0.04	0.00	7.06	0.00
SD	0.813	0.052	0.000	2.419	0.000
N	5	5	5	5	5

Analysis of Variance using Scheffe's Procedure

Table 2-1-21. Serum biochemical values of male rats in the 14-day study of K-566

TEST(s):	AST	ALT	ALP	BUN	CREA	GLU	T-CHO	T-BIL	TP
UNITS:	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	g/dl
Group: C1 : 0 (mg/kg)									
MEAN	208.8	47.9	488.7	14.3	0.51	107.6	83.7	0.07	5.90
SD	46.86	21.38	23.91	1.68	0.045	17.80	10.00	0.005	0.232
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)									
MEAN	160.1	36.7	480.9	13.3	0.46	105.2	76.2	0.07	5.57
SD	36.60	1.18	53.06	2.52	0.042	17.92	15.22	0.016	0.154
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)									
MEAN	164.0	41.0	498.6	12.8	0.45	103.2	105.2	0.06	5.90
SD	40.52	3.41	30.92	1.47	0.064	6.17	19.25	0.000	0.170
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T2 : 0.5 (mg/kg)									
MEAN	182.1	46.0	491.6	13.0	0.44	105.4	88.2	0.06	5.68
SD	68.00	6.76	132.86	0.81	0.033	26.30	6.76	0.005	0.245
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T3 : 2.5 (mg/kg)									
MEAN	169.2	47.9	503.2	13.6	0.45	134.9	85.4	0.07	6.13
SD	43.40	7.43	96.56	2.73	0.086	39.99	13.63	0.011	0.437
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Group: T4 : 2.5 (mg/kg)									
MEAN	182.8	45.7	632.8	20.4*	0.51	147.4	78.7	0.07	6.13
SD	63.99	20.05	155.04	5.77	0.062	34.33	17.24	0.018	0.442
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
TEST(s):	ALB	CPK	TG	CA	IP	PL-E	A/G	NA	K
UNITS:	g/dl	IU/L	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	ratio	mmol/l	mmol/l
Group: C1 : 0 (mg/kg)									
MEAN	3.99	574.1	49.6	9.85	11.08	134.2	2.11	144.5	6.30
SD	0.126	129.18	27.19	0.514	1.608	12.19	0.277	1.29	1.705
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)									
MEAN	4.07	471.8	62.2	9.52	10.04	131.7	2.74*	142.2	5.27
SD	0.148	111.72	10.52	0.278	0.628	16.81	0.296	1.10	0.973
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)									
MEAN	3.72	463.0	61.2	9.66	10.52	160.5	1.72	141.8*	7.22
SD	0.167	186.91	22.04	0.140	1.272	15.51	0.130	1.71	2.293
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T2 : 0.5 (mg/kg)									
MEAN	3.73	473.0	39.2	9.10	9.31	135.4	1.93	143.8	5.54
SD	0.239	219.63	2.78	0.417	0.478	8.71	0.283	0.96	0.386
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Group: T3 : 2.5 (mg/kg)									
MEAN	3.97	444.4	61.4	9.87	9.60	138.8	1.87	142.8	5.98
SD	0.492	226.31	16.60	0.859	1.016	14.19	0.393	0.84	1.307
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Group: T4 : 2.5 (mg/kg)									
MEAN	4.05	437.2	41.3	9.61	8.95	131.5	1.98	141.4**	5.18
SD	0.516	203.48	16.98	0.329	0.816	12.54	0.389	1.67	0.653
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-21. Serum biochemical values of male rats in the 14-day study of K-566

TEST(s):	CL
UNITS:	mmol/l
Group: C1 : 0 (mg/kg)	
MEAN	102.8
SD	0.96
N	4
Group: C2 : 0 (mg/kg)	
MEAN	102.2
SD	0.45
N	5
Group: T1 : 0.1 (mg/kg)	
MEAN	102.5
SD	2.38
N	4
Group: T2 : 0.5 (mg/kg)	
MEAN	104.2
SD	1.71
N	4
Group: T3 : 2.5 (mg/kg)	
MEAN	101.2
SD	2.68
N	5
Group: T4 : 2.5 (mg/kg)	
MEAN	101.6
SD	3.05
N	5

Analysis of Variance using Scheffe's Procedure

* : Significant difference from c1 group (p<0.05)
 ** : Significant difference from c1 group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 2-1-22. Gross findings of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP:	C1	C2	T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.1	0.5	2.5	2.5
KIDNEY-RIGHT						
No. of Observation	4	5	4	4	5	5
Dilatation of pelvis	0	0	1 25%	0	0	1 25%
NO GROSS FINDINGS	4 100%	5 100%	3 75%	4 100%	5 100%	4 80%
TAIL						
No. of Observation	4	5	4	4	5	5
Ulceration	2 50%	0	0	1 25%	0	0
Necrosis	0	0	2 50%	1 25%	2 40%	0
NO GROSS FINDINGS	2 50%	5 100%	2 50%	2 50%	3 60%	5 100%

Table 2-1-23. Absolute organ weights of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
BODY WEIGHT (G)						
MEAN	229.8	253.3	233.2	224.3	218.7	221.6
SD	21.37	18.77	51.45	9.94	26.65	21.24
N	4	5	4	4	5	5
BRAIN (G)						
MEAN	1.847	1.769	1.789	1.871	1.851	1.815
SD	0.0568	0.0640	0.1248	0.0490	0.0710	0.0585
N	4	5	4	4	5	5
ADRENAL GLAND-LEFT (G)						
MEAN	0.027	0.025	0.025	0.029	0.026	0.022
SD	0.0026	0.0058	0.0041	0.0012	0.0024	0.0031
N	4	5	4	4	5	5
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)						
MEAN	0.025	0.021	0.022	0.027	0.022	0.021
SD	0.0035	0.0039	0.0038	0.0034	0.0027	0.0033
N	4	5	4	4	5	5
LIVER (G)						
MEAN	7.096	7.890	7.439	6.636	6.717	7.539
SD	0.5009	0.8211	1.5398	0.2731	0.5965	0.9144
N	4	5	4	4	5	5
SPLEEN (G)						
MEAN	0.516	0.514	0.573	0.509	0.560	0.370**
SD	0.0643	0.0248	0.0712	0.0200	0.0654	0.0295
N	4	5	4	4	5	5
KIDNEY-LEFT (G)						
MEAN	1.059	1.046	1.093	0.983	0.985	0.997
SD	0.0769	0.0377	0.1731	0.1114	0.0556	0.0665
N	4	5	4	4	5	5
KIDNEY-RIGHT (G)						
MEAN	1.094	1.083	1.086	1.011	1.005	1.013
SD	0.1003	0.0419	0.1711	0.1533	0.0649	0.0696
N	4	5	4	4	5	5

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-23. Absolute organ weights of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
HEART (G)						
MEAN	0.937	0.957	0.942	0.893	0.817	0.829
SD	0.0917	0.0782	0.2052	0.0677	0.0771	0.1028
N	4	5	4	4	5	5
THYMUS (G)						
MEAN	0.577	0.620	0.611	0.507	0.510	0.408*
SD	0.1349	0.0937	0.1205	0.0559	0.0604	0.0663
N	4	5	4	4	5	5
LUNG (G)						
MEAN	1.140	1.178	1.186	1.112	1.102	1.069
SD	0.0963	0.1035	0.1047	0.0348	0.1339	0.1061
N	4	5	4	4	5	5
TESTIS-LEFT (G)						
MEAN	1.281	1.258	1.282	1.354	1.278	1.301
SD	0.1202	0.0437	0.1191	0.0902	0.0685	0.0445
N	4	5	4	4	5	5
TESTIS-RIGHT (G)						
MEAN	1.300	1.283	1.287	1.358	1.311	1.307
SD	0.1432	0.0634	0.1179	0.1149	0.0817	0.0737
N	4	5	4	4	5	5
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (G)						
MEAN	0.053	0.045	0.047	0.056	0.049	0.043
SD	0.0058	0.0089	0.0078	0.0039	0.0050	0.0051
N	4	5	4	4	5	5
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (G)						
MEAN	2.153	2.130	2.179	1.994	1.990	2.010
SD	0.1723	0.0653	0.3440	0.2637	0.1136	0.1356
N	4	5	4	4	5	5
TESTIS-LEFT+TESTIS-RIGHT (G)						
MEAN	2.581	2.541	2.569	2.712	2.588	2.608
SD	0.2625	0.1068	0.2292	0.2009	0.1499	0.1174
N	4	5	4	4	5	5

Analysis of Variance using Scheffe's Procedure

* : Significant difference from control group (p<0.05)

** : Significant difference from control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 2-1-24. Relative organ weights of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
BRAIN (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.807	0.700	0.800	0.836	0.855	0.824
SD	0.0554	0.0388	0.1993	0.0557	0.0923	0.0738
N	4	5	4	4	5	5
ADRENAL GLAND-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.012	0.010	0.011	0.013	0.012	0.010
SD	0.0010	0.0022	0.0018	0.0008	0.0013	0.0010
N	4	5	4	4	5	5
ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.011	0.008**	0.010	0.012	0.011	0.009
SD	0.0008	0.0014	0.0013	0.0017	0.0011	0.0011
N	4	5	4	4	5	5
LIVER (% BODY WEIGHT)						
MEAN	3.095	3.111	3.202	2.960	3.091	3.404
SD	0.1507	0.1410	0.1603	0.0316	0.2798	0.3056
N	4	5	4	4	5	5
SPLEEN (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.224	0.204	0.252	0.227	0.258	0.168*
SD	0.0147	0.0214	0.0445	0.0076	0.0333	0.0221
N	4	5	4	4	5	5
KIDNEY-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.465	0.415	0.478	0.438	0.454	0.452
SD	0.0633	0.0318	0.0649	0.0318	0.0421	0.0356
N	4	5	4	4	5	5
KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.479	0.429	0.475	0.449	0.463	0.459
SD	0.0623	0.0218	0.0646	0.0501	0.0350	0.0324
N	4	5	4	4	5	5
HEART (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.408	0.378	0.405	0.398	0.375	0.374
SD	0.0296	0.0245	0.0280	0.0302	0.0160	0.0296
N	4	5	4	4	5	5

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-24. Relative organ weights of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP: DOSE : (mg/kg)	C1 0	C2 0	T1 0.1	T2 0.5	T3 2.5	T4 2.5
THYMUS (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.250	0.247	0.269	0.226	0.234	0.185
SD	0.0434	0.0510	0.0578	0.0182	0.0162	0.0350
N	4	5	4	4	5	5
LUNG (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.498	0.465	0.524	0.496	0.505	0.483
SD	0.0447	0.0082	0.0899	0.0143	0.0343	0.0218
N	4	5	4	4	5	5
TESTIS-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.560	0.498	0.569	0.604	0.590	0.591
SD	0.0567	0.0251	0.1189	0.0311	0.0642	0.0596
N	4	5	4	4	5	5
TESTIS-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.568	0.507	0.569	0.605	0.605	0.593
SD	0.0627	0.0248	0.1032	0.0355	0.0661	0.0590
N	4	5	4	4	5	5
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.023	0.018**	0.021	0.025	0.023	0.019
SD	0.0010	0.0026	0.0030	0.0022	0.0024	0.0008
N	4	5	4	4	5	5
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.944	0.844	0.953	0.887	0.917	0.911
SD	0.1240	0.0516	0.1296	0.0818	0.0754	0.0674
N	4	5	4	4	5	5
TESTIS-LEFT+TESTIS-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	1.128	1.006	1.137	1.209	1.194	1.185
SD	0.1189	0.0492	0.2210	0.0629	0.1298	0.1178
N	4	5	4	4	5	5

Analysis of Variance using Scheffe's Procedure

* : Significant difference from control group (p<0.05)

** : Significant difference from control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 2-1-25. Histopathological findings of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP: DOSE : (mg/kg)		C1 0		C2 0		T1 0.1		T2 0.5		T3 2.5		T4 2.5	
NUMBER OF ANIMALS:		4		5		4		4		5		5	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
KIDNEY	# EX	4		5		4		4		5		5	
Chronic nephropathy		1	25.0	0	0.0	1	25.0	1	25.0	0	0.0	0	0.0
Mineralization		0	0.0	1	20.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	40.0
Hydronephrosis		0	0.0	1	20.0	0	0.0	0	0.0	2	40.0	1	20.0
Cyst		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	25.0	0	0.0	0	0.0
LIVER	# EX	4		5		4		4		5		5	
Microgranuloma		1	25.0	3	60.0	2	50.0	4	100.0	5	100.0	1	20.0
SPLEEN	# EX	4		5		4		4		5		5	
Atrophy		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	25.0	2	40.0	4	80.0
SUBMADIBULLAR LYMPH NODE	# EX	4		5		4		4		5		5	
Atrophy		0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	40.0	1	20.0
LUNG	# EX	4		5		4		4		5		5	
Microgranuloma		0	0.0	1	20.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
ADRENAL GLAND	# EX	4		5		4		4		5		5	
BRAIN	# EX	4		5		4		4		5		5	
STERNUM	# EX	4		5		4		4		5		5	
TESTIS	# EX	4		5		4		4		5		5	

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-25. Histopathological findings of male rats in the 14-day study of K-566

GROUP:	C1		C2		T1		T2		T3		T4	
DOSE : (mg/kg)	0		0		0.1		0.5		2.5		2.5	
NUMBER OF ANIMALS:	4		5		4		4		5		5	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
TAIL	#	EX	4		5		4		4		5	
Inflammation	3		75.0		0		0.0		4		100.0	
Epidermal necrosis	0		0.0		0		0.0		0		0.0	
HEART	#	EX	4		5				4		5	
THYMUS	#	EX	4		5				4		5	
Atrophy	0		0.0		0		0.0		4		100.0	
									4		80.0	

(END OF REPORT)

다. 고찰 및 결론

본 시험은 I제약(주)에서 개발 중에 있는 백금착제 항암제인 K-566의 연속투여에 의한 독성을 알아보려고 시험물질을 0, 0.1, 0.5 및 2.5 mg/kg으로 2주간 연속 투여하는 군과, 2.5 mg/kg 투여군과 대조군에서 반복투여하는 시험군을 추가하여 일반증상관찰, 체중의 측정, 사료 및 물섭취량 측정, 뇨검사, 혈액검사, 부검소견관찰, 장기중량측정 및 병리조직학적인 검사를 실시하였다.

본 시험의 일반증상에서 관찰된 꼬리의 암적색조, 부종, 피사 및 궤양은 카테터 보호장비를 장착하기위해 electrical sheathing을 사용하였는데 외부에서 압박이 많이 가해진 동물에서 관찰되었다. 이러한 변화는 K-378의 연속투여 시험에서 관찰된 변화와 그 정도와 발생율이 유사하였다. 사료와 물섭취량이 카테터를 장착한 군들에서 카테터를 장착하지 않은 군들 보다 작았는데 이는 동물들이 카테터 장착에 의한 스트레스 때문에 발생하였다고 사료된다. 이러한 변화는 4일째가 되면서 경향은 계속 유지되었지만 통계학적인 유의성은 인정되지 않았다. 따라서 카테터장착에 의한 독성시험을 수행할 경우 시험물질을 적용하기 3일전 정도에 장착을 완료하고 적용기간과 장착의 완전성을 확인한 후 시험을 시험물질을 적용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

혈액학적인 검사에서는 T4군에서만 망적혈구가 유의한 감소를 나타내었는데 이는 본 시험물질이 항암제로 세포 분열이 왕성한 조직이나 장기인 조혈기계통에 영향을 주어 관찰된 변화로 판단되며 조직학적인 소견에서 조혈장기의 변화가 관찰된 것과 연관성이 있다고 생각되었다. 혈액생화학적인 검사에서도 BUN이 T4군에서 유의하게 증가하여 비록 신장의 조직학적인 변화는 유의하게 관찰되지 않았지만 시험물질의 영향으로 사료되었다. 한편 혈액생화학검사에서 관찰된 Na의 변화는 용량상관성이 없어 시험물질의 영향으로 판단하기는 어려웠다. 장기중량에서 관찰된 흉선과 비장의 중량감소 또한 T4군에서만 유의하게 관찰되었다. 그러나 병리조직학적인 검사에서 비장의 위축은 T2, T3 및 T4군 순으로 각각 1, 2 및 4례에서, 흉선의 위축은 T2, T3 및 T4군 모두 각 4례에서 관찰되어 시험물질의 투여에 의한 변화로 생각되었다. 악하림프절

의 위축 또한 T3군과 T4군에서 각각 2례와 1례에서 관찰되어 시험물질 투여와 관련이 있다고 판단되었다. 한편 꼬리의 염증은 일반증상에서 관찰된 것과 마찬가지로 카테터를 장착하고 연속 투여한 모든 시험군에서 높은 빈도로 관찰되어 아직 해결해야할 문제점으로 판단되었다. 이는 electrical sheathing 자체의 무게와 철망사육상자에서 한쪽 방향으로 지속적으로 힘을 받기 때문에 장착의 풀어짐을 방지하기 위하여 cable tie를 너무 세게 조여 주었기 때문인데 장치 방법의 개선이 필요하였다.

이상의 결과로 보아 본 시험에서의 표적장기는 흉선, 비장 및 림프절이었고 무해용량은 어떠한 이상소견도 관찰되지 않은 0.1 mg/kg이었고 확실중독량은 흉선과 비장의 위축이 관찰된 0.5 mg/kg이었다. 그리고 2.5 mg/kg 이 투여된 T3군과 T4군을 비교 할 때 반복 투여된 T4군에서 T3군에서 관찰된 조직학적인 변화뿐만이 아니라 혈액학, 혈액생화학 및 장기중량의 변화도 관찰된 것으로 보아 K-566의 경우 반복투여 되는 것이 독성이 더 강하게 나타난다고 생각되었다. 한편 꼬리의 염증반응과 괴사 등의 소견으로 보아 아직 카테터를 삽입하고 보호장치를 장착하는데에 보완 해야할 문제점이 있었다.

5. Infusion pump를 이용한 K-799의 암컷 랫트를 이용한 미정맥내 연속투여 급성독성시험

가. 서 론

본 시험은 infusion pump를 이용한 급성독성시험의 수행 가능성을 조사하기 위하여 국내의 C제약회사에서 새롭게 개발한 캄프토테신계 항암제인 K-799를 24시간 연속 투여하는 급성독성을 수행하였다.

캄프토테신계 항암제는 고형암에 대량으로 분포하는 세포 분열 시에 필요한 topoisomerase-1 효소의 기능을 억압하는 기능을 가진 항암제로 세포분열이 왕성한 조직이나 장기에 작용하여 독성을 유발한다. 일반적으로 급성독성시험의 경우 단회 bolus로 적용하여 시험을 수행하지만 사람에게 서서히 주사되는 경우 임상경로와 같은 방법으로 시험을 수행하는 것이 바람직하다. 본 시험에서는 그 동안의 시험을 바탕으로 카테터 보호장치와 사육상자를 바꾸어서 시

험을 수행하였다. 본 시험에서도 연속투여와 단회투여의 차이를 알아보고자 단회투여하는 군과 연속 투여하는 군을 설정하여 시험에 공하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험물질

C제약회사로부터 공급받은 캄프토테신계 항암제인 K-799를 시험에 사용하였다. 시험물질은 역시 C제약회사에서 공급받은 증류수 200 ml에 mannitol 20 g과 tartaric acid 12ml이 들어간 용액에 용해하여 사용하였다. 대조군은 이 매체로 사용된 용액을 그대로 투여하였다.

(2) 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구센터의 실험동물육종실에서 공급된 4주령의 수컷 SPF Sprague-Dawley 랫트를 사용하였다. 입수된 동물은 약 2주간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물을 선별하여 6주령에 시험에 공하였다.

사육환경은 온도 23~26 °C, 상대습도 40~60%, 환기회수 10~20회/시간, 조도 150~300 lux 및 조명시간 12시간(07~19)시로 설정된 SPF 사육구역에서 폴리카보네이트사육상자(240W x 390L x 175H mm)에 1마리씩 수용하여 사육하였다. 시험기간 중 사료와 물은 당 연구소 SOP에 준하여 급여하였다.

(3) 투여시간 및 투여량의 설정과 시험군의 구성

본 시험에서는 시험물질을 2.6, 4.0, 5.9 및 8.9 mg/kg으로 24시간 연속투여하였다. 이 용량은 한국화학연구소 안전성연구센터에서 실시한 K-799의 급성독성시험을 토대로 24시간 연속 투여하는 예비독성시험을 실시한 결과 LD₅₀ 값이 단회투여에 의한 급성독성에서 보다 10배정도 적은 것을 참조하여 설정하였다. 한편 단회투여 급성독성시험에서의 LD₅₀ 값이 암컷에서 60.1 mg/kg(송시환 등, 1997)이었던 바 8.9 mg/kg 투여군에서 단회투여의 경우 사망이 관찰되지 않을 것으로 추측되어 이 용량군을 비교군으로 하기위하여 단회투여 대조군(T4-2)으로 설정하였고 보호장치의 장착에 대한 효과를 보기 위하여 단회 투여하고 가처치 대조군(T4-1)을 설정하였다.

투여액량, 투여량 및 투여시간 및 군의 구성은 아래 표에 나타내었다.

Dosage and grouping in the acute toxicity study of K-799

Group	No. of Animals	Animal Number	Dosage Vol. (ml/rat/day)	Dose (mg/kg/day)	Time of Adm. (min/rat/day)
C1	5	1 ~ 5	5	0	1440
T1	5	6 ~ 10	5	2.6	1440
T2	5	11 ~ 15	5	4.0	1440
T3	5	16 ~ 20	5	5.9	1440
T4	5	21 ~ 25	5	8.9	1440
T4-1	5	26 ~ 30	10(ml/kg)	8.9	3
T4-2	5	31 ~ 35	10(ml/kg)	8.9	3

(4) 시험물질의 투여방법

랫트의 좌 또는 우측의 미정맥내에 needle catheter를 이용하여 카테터를 장착하고 이 카테터와 주사기를 three way stop cock를 이용하여 연결한 후 infusion pump를 이용하여 투여하였다. 카테터가 장착된 꼬리에는 카테터를 보호하기 위하여 양면접착테이프, 반창고, electrical sheathing 및 cable tie를 사용하였다. 한편 T4-1군과 infusion pump를 사용하지 않은 대조군의 경우에는 랫트를 고정기에 고정한 후 좌 또는 우측의 미정맥내에 24G의 주사침과 3ml용 주사기를 이용하여 좌 또는 우측의 미정맥내에 직접 주사하였다.

(5) 관찰 및 검사항목

일반증상관찰은 매일 14일간 실시하였고 체중 측정은 투여전, 투여후 1, 3, 7 및 14일에 측정하였으며 투여 14일 후에 부검하여 부검소견을 관찰하였다.

(6) 통계학적인 방법

통계학적인 방법은 화학연구소 안전성연구센터에서 사용하고있는 독성시험 무른모인 Labcat system을 이용하여 체중의 경우 평균과 표준편차를 이용하여 나타냈으며 LD₅₀ 값은 Probit법으로 산출하였다.

다. 연구결과

(1) 일반증상 및 사망을

시험물질의 투여와 관련된 일반증상은 투여일 8.9 mg/kg 연속투여군(T4군)에서 관찰된 유루와 활동력감소 및 투여 후 4일째부터 2.6 mg/kg 이상의 연속투여 시험군(T1, T2, T3 및 T4군)에서 관찰된 수양변 입모, 활동력감소, 허약 및 탈모였다. 한편 시험물질을 투여하는 과정에서 연속투여 시험군에서 꼬리의 부종, 괴사, 암적색조, 궤양 및 괴사탈락이 투여 일일부터 관찰되어 부검 시까지 지속되었다. 꼬리의 암적색조는 매체를 연속으로 투여한 대조군(C군)과 시험물질을 8.9 mg/kg 단회 투여하고 가치치한군(T4-1군)에서도 각각 2례 및 1례씩 관찰되었다.

사망동물은 T4군에서 투여 후 2일째부터 14일째까지 5례가 4.0 mg/kg 연속투여군(T2군)에서 투여 후 8일째에 1례에서 관찰되었다. 그러나 T4군과 같은 용량의 시험물질을 투여한 T4-1군과 T4-2군에서는 특이한 일반증상 및 사망동물은 전혀 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 K-799의 24시간 연속 투여에 의한 암컷 랫트에서의 LD₅₀ 값은 6.5 mg/kg(95%신뢰한계:4.7-10.5 mg/kg)으로 산출되었다.

(2) 체중의 변화

시험물질을 연속 투여하는 모든 군에서는 투여 후 7일까지 평균체중이 대조군에 비해 증가량이 억제되거나 감소하는 경향이 관찰되었다. 그러나 T4-1군과 T4-2군에서는 투여후 1일째에만 감소가 관찰되었다가 3일째부터는 회복되었다.

(3) 부검소견

부검소견에서는 시험물질의 투여와 관련된 증상으로 시험물질을 연속 투여한 모든 군에서 계획도살된 동물의 비장의 종대가 관찰되었고 T2군 이상의 투여군에서 흉선의 위축이 관찰되었다. 사망동물들에서는 위장관의 암적색조 또는 암적색내용물, 비장의 위축이 관찰되었고 T2군의 사망한 1례에서는 간장의 창백함, T4군의 1례에서는 폐의 암적색조와 부종이 관찰되었다. 그러나 T4-1군에서는 꼬리의 괴사가 1례에서만 관찰되었을 뿐 단회투여군에서는

시험물질의 투여와 관련된 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

Table 2-1-26. Mortality of female rats in the acute toxicity study of K-799

MORTALITY SUMMARY REPORT																	
DEFINED LD-50																	
STUDY : BG9801-2																	
FEMALE																	
			NUMBER OF DEATHS														
			DAYS AFTER DOSING														
GROUP	DOSE (mg/kg)	NO. DEAD/ NO. DOSED	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CONTROL	0	0/5															
T1	2.6	0/5															
T2	4.0	1/5									1						
T3	5.9	0/5															
T4	8.9	5/5			1	1			1	1							1
T4-1	8.9	0/5															
T4-2	8.9	0/5															

Table 2-1-27. Clinical findings of female rats in the acute toxicity study of K-799

TOXIC SIGNS SUMMARY REPORT			
DEFINED LD-50 STUDY : BG9801-2 FEMALE			
GROUP	DOSE (mg/kg)	OBSERVATIONS	RANGE
CONTROL	0	DARK RED OF TAIL	DAY 1 (09:49)-DAY 14(10:43)
T1	2.6	WATERY STOOL	DAY 4 (09:45)-DAY 6 (11:35)
		DECREASED LOCOMO. ACTIVITY	DAY 4 (09:51)-DAY 6 (11:35)
		PILOERECTION	DAY 4 (09:50)-DAY 6 (11:35)
		DARK RED OF TAIL	DAY 1 (11:04)-DAY 3 (11:12)
		EDEMA OF TAIL	DAY 1 (10:59)-DAY 3 (11:16)
		ULCERATION	DAY 2 (11:15)-DAY 3 (11:16)
		CUT TAIL	DAY 3 (11:16)-DAY 14(10:51)
		ULCERATION OF TAIL	DAY 4 (09:48)-DAY 7 (10:02)
		SCAR OF TAIL	DAY 8 (09:57)-DAY 14(10:51)
T2	4.0	BLANCHING OF SKIN COLOR	DAY 7 (10:03)-DAY 14(10:51)
		WATERY STOOL	DAY 4 (09:52)-DAY 7 (10:05)
		DECREASED LOCOMO. ACTIVITY	DAY 7 (10:03)-DAY 8 (10:03)
		DARK MATERIALS AROUND EYE	DAY 7 (10:05)-DAY 14(10:51)
		PILOERECTION	DAY 4 (09:52)-DAY 14(10:51)
		EMACIATION	DAY 4 (09:54)-DAY 14(10:51)
		DARK RED OF TAIL	DAY 0 (20:59)-DAY 7 (10:03)
		EDEMA OF TAIL	DAY 1 (11:10)-DAY 14(10:51)
		ULCERATION	DAY 3 (11:17)-DAY 3 (11:18)
		CUT TAIL	DAY 7 (10:05)-DAY 14(10:51)
		ULCERATION OF TAIL	DAY 4 (09:52)-DAY 7 (10:05)
		INCONTINENCE OF URINE	DAY 7 (10:04)
		SCAR OF TAIL	DAY 8 (10:02)-DAY 14(10:51)
T3	5.9	BLANCHING OF SKIN COLOR	DAY 7 (10:06)-DAY 12(08:51)
		WATERY STOOL	DAY 4 (09:56)-DAY 6 (11:35)
		DECREASED LOCOMO. ACTIVITY	DAY 7 (10:07)-DAY 9 (09:52)
		PILOERECTION	DAY 4 (09:58)-DAY 9 (09:52)
		EMACIATION	DAY 8 (10:04)-DAY 12(08:51)
		DARK RED OF TAIL	DAY 0 (20:59)-DAY 6 (11:35)
		EDEMA OF TAIL	DAY 1 (11:17)-DAY 3 (11:20)
		ULCERATION	DAY 2 (11:17)-DAY 3 (11:19)
		CUT TAIL	DAY 4 (09:56)-DAY 14(10:52)
		ULCERATION OF TAIL	DAY 4 (09:56)-DAY 14(10:52)

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-27. Clinical findings of female rats in the acute toxicity study of K-799

TOXIC SIGNS SUMMARY REPORT			
DEFINED LD-50 STUDY : BG9801-2 FEMALE			
GROUP	DOSE (mg/kg)	OBSERVATIONS	RANGE
T4	8.9	WATERY STOOL	DAY 4 (09:14)-DAY 6 (11:23)
		DECREASE LOCOMO. ACTIVITY	DAY 1 (17:53)
		DARK RED OF TAIL	DAY 1 (11:05)-DAY 13(10:43)
		LACRIMATION	DAY 1 (17:53)
		EDEMA	DAY 2 (09:17)-DAY 6 (11:23)
		EMACIATION	DAY 3 (09:03)-DAY 13(10:43)
		HAIR LOSS	DAY 4 (09:14)-DAY 13(10:43)
		DIRTIFIED FUR	DAY 4 (09:15)-DAY 13(10:43)
		DARK MATERIALS AROUND EYE	DAY 6 (11:22)-DAY 13(10:43)
		BLANCHING OF SKIN COLOR	DAY 7 (09:20)-DAY 13(10:43)
T4-1	8.9	APPEARS NORMAL	DAY 0 (12:20)-DAY 14(10:52)
		DARK RED OF TAIL	DAY 1 (11:27)-DAY 1 (17:31)
		ULCERATION OF TAIL	DAY 7 (10:08)
T4-2	8.9	APPEARS NORMAL	DAY 0 (12:21)-DAY 14(10:52)

(END OF REPORT)

Table 2-1-28. Incidence of clinical signs of female rats in the acute toxicity study of K-799

INCIDENCE OF CLINICAL SIGNS REPORT							
DEFINED LD-50 STUDY : BG9801-2 FEMALE							
SIGNS OBSERVED	DOSE (mg/kg)						
	Control	T1	T2	T3	T4	T4-1	T4-2
	0	2.6	4.0	5.9	8.9	8.9	8.9
BLANCHING OF SKIN COLOR	0/5	0/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5
WATERY STOOL	0/5	4/5	2/5	2/5	2/5	0/5	0/5
DECREASED LOCOMO. ACTIVITY	0/5	1/5	2/5	1/5	2/5	0/5	0/5
DARK MATERIALS AROUND EYE	0/5	0/5	1/5	0/5	2/5	0/5	0/5
PILOERECTION	0/5	2/5	3/5	1/5	0/5	0/5	0/5
EMACIATION	0/5	0/5	2/5	2/5	2/5	0/5	0/5
DARK RED OF TAIL	2/5	2/5	4/5	3/5	4/5	1/5	0/5
EDEMA OF TAIL	0/5	4/5	4/5	3/5	3/5	0/5	0/5
ULCERATION	0/5	2/5	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5
CUT TAIL	0/5	1/5	1/5	3/5	0/5	0/5	0/5
ULCERATION OF TAIL	0/5	4/5	5/5	2/5	0/5	1/5	0/5
INCONTINENCE OF URINE	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
SCAR OF TAIL	0/5	5/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5
DEATH	0/5	0/5	1/5	0/5	5/5	0/5	0/5

Table 2-1-29. Body weights of female rats in the acute toxicity study of K-799

BODY WEIGHTS SUMMARY REPORT							
DEFINED LD-50 STUDY : BG9801-2 FEMALE							
GROUP	DOSE (mg/kg)	ANIMAL NUMBER	BODY WT. (G)				
			DAY 0	DAY 1	DAY 3	DAY 7	DAY14
CONTROL	0	1	182.6	187.4	197.5	207.0	215.7
		2	165.3	160.9	173.8	188.0	197.4
		3	186.5	185.9	189.6	202.5	226.4
		4	194.3	197.8	207.8	232.6	229.2
		5	195.0	198.4	206.9	220.5	239.4
		MEAN	184.7	186.1	195.1	210.1	221.6
		SD	13.07	15.21	14.06	17.10	15.95
	N	5	5	5	5	5	
T1	2.6	6	209.1	196.5	196.8	214.2	222.1
		7	172.2	164.7	158.1	172.2	191.3
		8	207.1	186.3	178.5	209.0	232.4
		9	200.5	181.7	179.0	203.0	212.3
		10	200.9	182.3	164.7	196.0	234.1
		MEAN	198.0	182.3	175.4	198.9	218.4
		SD	14.89	11.49	14.95	16.39	17.52
	N	5	5	5	5	5	
T2	4.0	11	184.2	172.4	158.1	154.9	--
		12	200.4	182.9	171.0	186.6	232.5
		13	196.0	180.5	175.7	195.4	215.5
		14	205.3	186.3	180.3	205.8	228.0
		15	180.3	172.4	160.6	147.0	208.1
		MEAN	193.2	178.9	169.1	177.9	221.0
		SD	10.65	6.28	9.56	25.71	11.22
	N	5	5	5	5	4	
T3	5.9	16	189.1	181.9	176.2	181.1	199.3
		17	201.5	196.8	205.3	225.5	242.0
		18	204.6	205.9	216.4	234.0	256.4
		19	196.0	184.5	178.9	202.1	238.2
		20	170.7	158.4	154.1	148.2	181.3
		MEAN	192.4	185.5	186.2	198.2	223.4
		SD	13.48	17.97	24.80	34.77	31.65
	N	5	5	5	5	5	

-- DATA UNAVAILABLE

(REPORT CONTINUED)

Table 2-1-29. Body weights of female rats in the acute toxicity study of K-799

BODY WEIGHTS SUMMARY REPORT							
DEFINED LD-50 STUDY : BG9801-2 FEMALE							
GROUP	DOSE (mg/kg)	ANIMAL NUMBER	BODY WT. (G)				
			DAY 0	DAY 1	DAY 3	DAY 7	DAY14
T4	8.9	21	189.9	170.6	154.9	--	--
		22	169.6	167.1	154.5	154.2	--
		23	198.0	181.9	168.0	--	--
		24	191.9	174.6	--	--	--
		25	188.6	178.9	--	--	--
		MEAN	187.6	174.6	159.1	154.2	--
		SD	10.69	6.00	7.68	--	--
	N	5	5	3	1	--	

T4-1	8.9	26	196.1	180.8	202.2	214.0	224.8
		27	195.9	188.0	202.5	215.0	234.5
		28	198.5	196.0	205.7	214.8	235.2
		29	196.6	192.6	206.7	218.9	237.6
		30	203.9	196.8	213.5	227.7	243.4
		MEAN	198.2	190.8	206.1	218.1	235.1
		SD	3.35	6.60	4.57	5.70	6.74
	N	5	5	5	5	5	

T4-2	8.9	31	198.6	186.3	194.0	219.3	229.4
		32	203.2	186.6	200.8	219.7	239.3
		33	214.6	197.4	213.1	230.5	239.8
		34	191.5	183.1	195.2	207.3	220.6
		35	201.3	187.0	208.0	225.3	244.5
		MEAN	201.8	188.1	202.2	220.4	234.7
		SD	8.40	5.44	8.23	8.65	9.62
	N	5	5	5	5	5	

-- DATA UNAVAILABLE

(END OF REPORT)

Table 2-1-30. Gross findings of female rats in the acute toxicity study of K-799

GROSS NECROPSY SUMMARY REPORT					
DEFINED LD-50 STUDY : BG9801-2 FEMALE					
GROUP	DOSE(mg/kg)	GROSS OBSERVATION		FREQUENCY	
		LOCATION	OBSERVATION	DECEDENTS	SURVIVORS
CONTROL	0	TAIL	NECROSIS	0/0	2/5
			ULCERATION	0/0	1/5
T1	2.6	TAIL	NECROSIS	0/0	5/5
		SPLEEN	ENLARGEMENT	0/0	5/5
T2	4.0	TAIL	NECROSIS	0/1	4/4
		SPLEEN	ENLARGEMENT	0/1	3/4
		THYMUS	ATROPHY	1/1	0/4
		LIVER	PALENESS	1/1	0/4
		STOMACH	DARK-RED CONTENTS	1/1	0/4
		MESENTERY LYMPH NODE	PALENESS	1/1	0/4
T3	5.9	TAIL	NECROSIS	0/0	3/5
			ULCERATION	0/0	2/5
		SPLEEN	ENLARGEMENT	0/0	3/5
		THYMUS	ATROPHY	0/0	2/5
		<NO GROSS FINDINGS>		0/0	1/5
T4	8.9	SPLEEN	ATROPHY	2/5	0/0
		THYMUS	ATROPHY	2/5	0/0
		STOMACH	DARK-RED		
			DISCOLORATION	2/5	0/0
			DARK-RED CONTENTS	1/5	0/0
		SMALL INTESTINE	DARK-RED		
			DISCOLORATION	1/5	0/0
			DARK-RED CONTENTS	1/5	0/0
		LUNG	EDEMA	1/5	0/0
			DARK-RED		
			DISCOLORATION	1/5	0/0
		<NO GROSS FINDINGS>		1/5	0/0
T4-1	8.9	TAIL	NECROSIS	0/0	1/5
		SPLEEN	DEPRESS OF CENTER	0/0	1/5
		<NO GROSS FINDINGS>		0/0	3/5
T4-2	8.9	<NO GROSS FINDINGS>		0/0	5/5

라. 고찰 및 결론

본 시험은 C제약(주)에서 개발 중에 있는 캄프토테신계 항암제인 K-799의 급성독성을 알아보고자 시험물질을 0, 2.6, 4.0, 5.9 및 8.9 mg/kg으로 24시간 연속투여하고 사망의 관찰, 일반증상관찰, 체중의 측정 및 부검소견관찰을 실시하였다. 한편 단회투여하여 나타난 결과와 비교하기 위하여 최고용량군에서 단회투여하는 군과 단회투여하고 카테터와 보호장치를 가 처치한 군을 추가로 설정하였다.

본 시험의 일반증상에서 관찰된 꼬리의 암적색조, 부종, 괴사 및 궤양은 카테터 보호장치의 장착으로 압박에 의한 것으로 사료되었다. 그러나 시험물질 투여군의 경우 대조군에 비해 그 정도가 심하였고 발생 빈도도 또한 높게 관찰되어 시험물질의 연속투여가 꼬리의 부종을 일으키고 결과적으로 회복되지 않아 변화가 더 심하였다고 판단되었다. 이러한 꼬리의 변화는 앞서 실시한 2주간의 연속투여 시험에서보다 심하였다. 일반증상에서 관찰된 수양변과 탈모는 본시험물질의 투여에 의하여 관찰된 특이한 증상으로 판단되었다. 한편 허약, 입모, 활동력감소 및 눈주위의 암적색응고물의 증상은 동물이 사망하거나 독성증상이 심하게 나타나면서 관찰되는 증상들로써 본 시험물질의 투여에 의한 특이한 반응으로 판단할 수는 없었다. 부검소견에서 관찰된 비장과 흉선의 변화, 그리고 위장관의 변화는 본 시험물질이 항암제로서 세포분열이 왕성한 조직에서 독성을 발휘한다는 사실을 뒷바침 해 주는 변화들로 생각되었다. 사망동물의 각 1례에서 관찰된 간장의 창백함과 폐장의 암적색조 및 부종 또한 시험물질의 투여와 관련된 변화로 생각되지만 그 발생 빈도가 낮아 정확한 판단은 어려웠다.

본 시험에서 관찰된 꼬리의 변화로 보아 보호장치로 electrical sheathing을 사용하는 것에는 다소 문제점이 있었고 자극성이 있는 물질의 경우 24시간 연속투여가 어려운 것으로 사료되었다. 본 시험이 종료된 후 보호장치를 얇은 철판으로 바꾸어 장착하였는데 장착하는 시간도 단축할 수 있었고 자체의 무게가 적어 꼬리의 손상도 줄일 수 있어 추후의 시험에서는 보호장치를 electrical sheathing 대신에 얇은 동물운반용 상자의 내부에 보호용으로 사용

하는 철망을 사용하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

한편 K-799의 단회투여 급성독성시험에서의 LD₅₀ 값이 암컷 랫트에서 60 mg/kg 정도였는데 본시험에서는 거의 8배 정도나 낮게 산출되어 매우 큰 차이가 있었다. 8.9 mg/kg 투여군의 경우 연속투여군이 반복(bolus)투여군에 비해 훨씬 강한 독성반응을 보여주어 이의 결과를 뒷바침해주고 있다. 이러한 원인에 대하여는 아직 정확한 규명을 알 수 없으나 체내에서 본 시험물질의 steady-state 상태 및 혈중축적효과가 아닌가 생각된다.

이상의 결과로 보아 K-799의 연속투여는 랫트에서 위장관의 변화, 흥선 및 비장의 변화를 유발하였고 이에 따르는 사망을 포함한 독성 증상이 관찰되었다. 그리고 K-799의 암컷 랫트에 대한 연속투여 급성독성시험에서 LD₅₀ 값은 6.5 mg/kg(95% 신뢰한계:4.7~10.5)으로 산출되어 단회투여 급성독성시험(한국 화학연구소, 1997)에서 관찰된 50.3 mg/kg 보다 약 8배 정도 낮았다.

6. 고찰 및 결론

본 시험은 미정맥내 카테터를 설치하고 연속 투여하는 시험법을 확립하기 위하여 우선 카테터를 설치하는 방법을 개발하였고 카테터 보호장치를 여러가지 방법으로 장착하여 실제 시험을 수행하였다. 한편 연속투여의 필요성을 확인하기 위하여 각각 성질이 다른 3종류의 시험물질을 사용하여 연속투여와 반복투여의 차이점을 확인하였다.

미정맥내에 카테터를 장착하는 방법은 여러 사람들이 보고한 바 있으나 그 부작용에 대하여는 언급을 하지 않아 실제 시험 수행에 있어서는 꼬리의 울혈, 궤양, 괴사 및 심한 경우 절단을 일으키는 단점도 발견되었다. 특히 3일 정도의 투여기간은 꼬리의 심한 변화 없이 연속투여 가능하였으나 그 이상의 기간의 경우 여러 가지로 제약이 있었음을 알 수 있었다. 그러나 본 시험에서도 비록 꼬리의 변화가 관찰되기는 하였으나 비수술적인 처치로 마취 등의 부작용을 줄일 수 있으며 시간이 많이 절약되는 장점이 있었다. 특히 needle catheter를 이용하여 간단하게 카테터를 삽입할 수 있었으며 투터운 양면 점착 테이프를 사용하여 꼬리의 손상을 줄일 수 있었다. 따라서 24시간 연속 투여

에 의한 급성독성시험은 별다른 문제없이 수행할 수 있는 기술을 확립하였고 장기간 투여시험도 6시간 이내의 연속투여에 의해 수행 할 수 있을 것으로 사료되었다. 다만 국소적으로 자극성이 있는 물질의 경우 꼬리의 손상을 너무 많이 일으키기 때문에 어려움도 있을 것으로 판단된다.

한편 K-387의 시험물질의 경우 연속투여가 약리독성학적인 효과를 많이 나타냈으나 K-566의 경우 반복투여군에서 많은 독성효과를 나타내었다. 그리고 K-799의 경우 LD₅₀ 값을 비교할 때에 연속투여군에서 단회투여군 보다 10 배 정도 더 독성이 강하게 나타났다. 이러한 결과는 시험물질의 연속투여와 반복투여에 의한 생체 반응은 매우 큰 차이가 있다는 것을 나타내고 있다. 일반적으로 반감기가 길고 축적성이 있는 물질의 경우 연속투여에 의해 그 효과가 크게 나타날 수 있다. 그러나 K-387의 경우처럼 낮은 용량에서도 효과를 발휘하면서 반감기가 매우 짧은 물질의 경우도 연속투여에 의해 그 효과가 증대됨을 알 수 있었다. 반면에 K-566과 같이 독성이 약물농도가 어느 일정한 혈중 농도값 이상이 되었을 때 독성이 나타나는 물질의 경우 낮은 용량으로 서서히 주입하게 되면 거의 독성효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과로 보아 어떠한 신물질이 개발되었을 때 임상예정 경로가 정맥내 연속적인 적용이라면 독성시험에서도 같은 경로로 시험을 수행하는 것이 유용한 독성약리적 정보를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 본 시험법으로 무마취 비수술적인 방법으로 미정맥내에 카테터를 삽입하고 보호장치를 장착하는 방법은 시간과 경비를 절약할 수 있었다.

(2) 본 시험 방법으로 급성독성 시험을 수행하는 방법을 확립하였고 최종적으로 방법을 개선하면 2주 이상의 아급성독성시험도 가능하다고 판단되었다.

(3) 약물에 따라 연속투여와 단회투여에 따르는 생체 반응이 다르게 나타났다. 따라서 임상예정경로가 정맥내 연속적용되는 약물의 경우 동물실험에서도 연속투여를 실시하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

7. 참고문헌

- (1) Born CT and Moller (1974) : A simple procedure for long-term intravenous infusion in the rat. *Lab. Ani. Sci.*, 24:335-358.
- (2) Rhodes ML and Patterson CE (1979) : Chronic intravenous infusion in the rat : A nonsurgical approach. *Lab. Ani. Sci.*, 29:82-84.
- (3) Saarni H and Viikari J (1976) : A simple procedure for continuous intravenous infusion under neuroleptic tranquilization. *Lab. Anim.* 10:69-72
- (4) Maraschin R et al (1995) : Toxicological evaluation of u-hEGF. *Toxicol. Pathol.*, 23(3):356-366
- (5) 송시환 등 (1996) : Recombinant Human Epidermal Growth Factor (DWP- 401)의 마우스를 이용한 피하투여 아급성독성시험. *한국응용약물학회지*, 4:138-147
- (6) 한국화학연구소 안전성연구센터 (1997) : KI-30606의 랫트를 이용한 단회 정맥내 투여 급성독성시험.

제 2 절 독성동태 이론을 이용한 시험물질 용량설정기술의 확립

1. 서 론

신약을 비롯하여 많은 화학물질을 개발하는데 전임상단계로서 동물을 이용한 약효시험 또는 안전성 평가과정을 수행하게 되는 바, 미국의 FDA, OECD, 일본의 후생성 등에서는 보다 신뢰성 있는 평가자료를 얻기 위해 생체약물동태 연구의 중요성을 강조하고 있다. 약물동태학(pharmacokinetics, PK)은 약물의 약효검정 또는 독성평가를 위해 필수적으로 요구되는 생체내 약물의 흡수, 분포, 대사 및 배설(ADME) 과정을 속도론적으로 규명하고자 하는 연구분야의 하나로 특히 독성평가에 있어서 약물의 대량노출에 대한 PK연구를 독성동태학(toxicokinetics, TK)로 표현한다. 미국, 일본, 유럽공동체의 의약품규제기관과 제약산업체의 전문가들로 구성된 ICH(의약품규제기준 통일위원회)에서도 독성시험에 있어서 TK의 적용을 심도있게 논의하여 최근 각국에 최종 합의 사항이 통보되어 있는 상황으로 독성시험의 추가항목으로 채택하고 있다. 유럽공동체의 경우를 보더라도 1995년 6월부터 TK연구가 독성시험의 guideline으로 채택되었으며 일본에서도 1997년부터 도입하여 규정하고 있다. 우리나라에서도 물질특허제도 도입후 몇 개의 후보물질이 도출되어 있는 단계로 TK 연구의 필요성이 요구되고 있다. 특히 독성시험에서의 독성동태연구의 중요성은 용량설정의 이론적, 정량적 판단기준자료로 이용될 수 있으며 투여경로에 따른 생체이용성의 차이, 체내 축적성의 검토 등 시험물질의 제반 생체내 동태를 파악할 수 있는 중요한 도구가 되고 있다. 시험계획단계 뿐 아니라 시험결과에 대한 독성판정을 위해서도 객관적 자료로서 중요한데 대량투여에 의한 비선형성 약물동태의 발현, 반복투여에 따른 생체 용량반응의 포화성 등 실로 그 이용성이 크다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 독성시험에서 PK연구이론을 응용하여 TK연구에 근거한 독성시험 용량설정의 기술을 개발하고 또 독성평가를 위한 용량상관성 등 약물동태 이론의 도입을 통해 정량적, 객관적 독성평가를 하고자 하였으며 나아가 신약개발에서 필수적인 임상시험의 합리적인 계획 및 동물시험 결과에 대한

과학적 평가법을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 생체시료 정량분석법 개발

시험물질 K-585를 대상으로 HPLC를 이용하여 랫드 혈액을 중심으로 한 생체시료중의 정량분석법을 개발하였다. HPLC 분석조건은 UV detection system(WL 306 nm)으로 ODS column(3.9 x 300 nm)을 이용하였으며 이동상은 인산완충액을 사용하였다. 혈액시료는 혈장을 분리하여 유기용매의 단순추출법을 이용 제단백을 하였으며, 주입량은 20 μ l로 하였다. 분석파라미터로는 혈장회수율, 정량 또는 검출한계, 농도의존적 피크반응의 상관관계, 완충액의 pH와 유기용매(ACN)의 여러조건하에서의 피크의 반응 등을 검토하였다. 본 시험물질의 분해성도 검토하여 안정한 분석조건을 찾았다.

시험물질 K-581에 대해서도 HPLC를 이용한 생체시료중 정량분석법을 개발하였다. 분석파라미터로는 혈장회수율, 정량 또는 검출한계, 농도의존적 피크반응의 상관관계, 이동상조건 등을 검토하였다.

시험물질 K-580 등을 대상으로 만성독성시험에서 설정된 3개의 투여용량 13, 50, 200 mg/kg의 조제시험물질에 대해서도 안정성 및 균질성을 검토하였다. 본 시험물질은 각각의 농도에서 CV값을 산정하여 균질성을 나타냈으며, 조제후 72시간 동안의 분석결과를 초기의 농도에 대한 상대치로 안정성을 검토하였다.

시험물질 K-580 등을 대상으로 만성독성시험에서 설정된 3개의 투여용량 13, 50, 200 mg/kg의 조제시험물질에 대해 안정성 및 균질성에 관해 검토하였다. 본 시험물질은 각각의 농도에서 CV값을 산정하여 균질성을 나타냈으며, 조제후 72시간 동안의 분석결과를 초기의 농도에 대한 상대치로 안정성을 검토하였다.

나. 용량설정을 위한 약물동태시험기술의 개발

K-585에 대한 경구 단회투여 독성동태학적 실험을 수행하였다. 급성독성 시험 및 단기투여 독성시험의 결과 등을 참고로 하여 K-585의 장기독성시험에

서의 용량을 충분히 포함할 수 있는 다섯 용량(13, 42, 100, 300 그리고 1000 mg/kg)을 설정하여 랫드에 투여 후 시간에 대한 농도추이를 조사하여 kinetic parameter $AUC_{0-120 \text{ min}}$ 및 $clearance^1(AUC/D)$ 를 나타내기 위해 경구투여시의 겉보기 $clearance(CL_{app})$ 를 산출하여 독성동태론적 비교검토를 하였다. 이러한 독성동태학적 결과를 토대로 예비시험에서의 독성소견 등을 참고로 아급성독성 시험(S-653)의 용량설정을 20, 80 그리고 320 mg/kg으로 결정하였다. 이러한 용량범위에서는 연속투여시의 동태시험도 수행하여 용량상관성, 비선형성 동태의 발현 또는 축적성 등도 관찰하여 용량설정의 타당성을 위한 객관적 자료를 확보하였다.

다. 독성평가를 위한 독성동태시험기술의 개발

랫트에 있어서 시험물질 K-581에 대한 최기형 독성시험을 수행하였는데 임신 6~15일간에 500, 1000 및 2000 mg/kg/day의 용량으로 경구투여를 한 바 전군 모두 특이적 모체 및 배독성은 관찰되지 않았다. 그러나 특이적으로 최저용량군에서만 몇몇 기형이 발견되어 본 약제의 투여에 기인된 것인가의 의문점이 제기되어 최기형 독성평가를 위한 객관적 자료가 요구되었다. 더욱이 이상의 관찰된 기형에는 본 연구실에서 자연발생적 발생빈도보다 훨씬 높은 수치를 나타내었다. 외표관찰에서 몇몇 특이적 기형이 최저용량군에서만 특이적으로 관찰되었는 바 본 기형이 시험약제에 의한 발생인가 아니면 자연발생기형인가의 기전을 밝히고자 독성동태학적 이론을 도입하여 연구를 수행하였다. 본 연구는 생식독성의 일부로 수행되었지만 생식독성 동태학적 연구기술의 독성평가에 응용하고자 하였다.

3. 결 과

시험물질 K-580에 대한 만성독성시험에서 설정된 3개의 투여용량 13, 50, 200 mg/kg의 조제시험물질에 대해 안정성 및 균질성에 관해 검토한 결과, 본 시험물질은 각각의 농도에서 96%이상(CV 10% 이하)의 높은 균질성을 나타냈으며, 조제후 72시간 동안의 분석결과 95% 이상의 안정성이 유지되는 것으로 나타났

다.

시험물질 K-585를 대상으로 HPLC를 이용하여 랫드 혈액을 중심으로 한 생체 시료중의 정량분석법을 개발하였는데 다음과 같은 조건에서 가장 좋은 결과를 얻었다. HPLC set-up 조건은 UV detection system(WL 306 nm)으로 ODS column(3.9 x 300 nm)을 이용하였으며 이동상은 인산완충액을 사용하였다. 혈액시료는 혈장을 분리하여 유기용매의 단순추출법을 이용 제단백을 하였으며, 주입량은 20 μ l로 하였다. 분석파라미터로 process std recovery는 97.4%로 높은 성적을 얻었으며 detection limit는 0.3 ng/inj였다. Fig. 2-2-1에서와 같이 농도 의존적 피크반응의 상관관계도 높은 직선성을 나타냈다. 최적이동상의 조건검토를 위해 완충액의 pH와 유기용매(ACN)의 여러조건하에서의 피크의 반응을 검토한 결과 Fig. 2-2-3에서와 같이 pH 7.6 및 ACN 42%에서 좋은 성적을 얻었다. 한편 본 시험물질은 분해되기 쉬운 물질로 알려지고 있어 본 시험물질의 안정성을 조사해 본 결과(Fig. 2-2-2) 이동상, 유기용매(EtOH) 및 혈장에서 비교적

Table 2-2-1. Findings at cesarean section in dams treated with LGC-40863 during the organogenesis period

Parameters	Dose (mg/day/kg of body wt.)			
	0	500	1000	2000
No. of pregnant animals	22	21	23	25
Fetal deaths				
Resorptions(total)	24	28	15	24
early	24	28	15	19
late	0	0	0	5
Dead fetuses	0	0	0	2
External anomalies				
Fetuses examined	292	272	318	347
Fetuses affected (%)	2 (0.7) ^a	6 (2.2) ^b	1 (0.3) ^c	1 (0.3) ^d
litters examined	22	21	23	25
litters affected (%)	2 (9.1)	6 (29)	1 (4.3)	1 (4.0)

a Gastroschisis, vestigial tail

b Agnathia, anophthalmia, brachycephaly, club foot, edema, hematoma, kinky tail, lordosis, micrognathia, microcephaly, omphalocele

c Intraparietal hernia

d Hematoma

Table 2-2-2. Pharmacokinetics of LGC-40863 after an intravenous bolus administration of 100 mg/kg to rats

PK parameters (unit)	Mean ± S.E. (n=3)
A (g/ml)	21.73 ± 13.79
B (g/ml)	2.703 ± 0.419
α (hr ⁻¹)	1.368 ± 0.420
β (hr ⁻¹)	0.139 ± 0.035
$t_{1/2}$, (hr)	0.592 ± 0.140
$t_{1/2}$, (hr)	5.658 ± 1.386
k_{12} (hr ⁻¹)	0.506 ± 0.099
k_{21} (hr ⁻¹)	0.334 ± 0.047
k_{10} (hr ⁻¹)	0.667 ± 0.366
V1 (l/kg)	9.292 ± 5.432
V2 (l/kg)	19.91 ± 8.813
Vd, (l/kg)	26.53 ± 8.893
AUC (ghr/ml)	35.34 ± 9.486
CLt (ml/min/kg)	56.52 ± 17.97
MRT (hr)	8.371 ± 2.762

$t_{1/2}$, and $t_{1/2}$, represents half life and terminal half life, respectively.
 k_{12} , distribution rate constant for transfer from central to peripheral compartment
 k_{21} , distribution rate constant for transfer from peripheral to central compartment
 k_{10} , elimination rate constant from central compartment
V1 & V2, volume of central and peripheral compartment
MRT, mean residence time

안정하였으나 수용액(H₂O)중에서는 높은 분해를 보여 약 20시간 경과 후에는 거의 전량이 분해되는 것으로 나타났다. 그리고 각종의 산화방지제 또는 환원제의 효과도 전혀 인정되지 않아 본 시험물질은 주로 가수분해에 의해 분해되는 것으로 나타내었다. 따라서 가수분해방지를 위한 시료 및 분석처리를 도모하여 안정한 분석조건을 찾았다.

시험물질 K-581에 대한 독성동태시험을 위해 HPLC를 이용한 생체시료중 정량분석법도 개발하였다. 과정 recovery는 약 85%로 비교적 양호한 성적을 얻었으며 detection limit는 5 ng/inj였다. 최적이동상의 조건은 ACN 52%에서 가장 좋은 성적을 얻었다.

K-585에 대한 경구 단회투여 독성동태학적 실험을 수행하였는데 동태론적으

로 재현성 높은 분석결과를 얻었다 (Fig. 2-2-4). 단기투여 독성시험의 결과 등을 참고로 하여 K-585의 장기독성시험에서의 용량을 충분히 포함할 수 있는 용량을 설정하여 랫드에 투여 후 시간에 대한 농도추이를 조사하여 kinetic parameter $AUC_{0-120 \text{ min}}$ 및 $\text{clearance}^{-1}(AUC/D)$ 를 산출하여 독성동태론적 비교 검토를 한 결과 42 mg/kg 용량 이상에서는 AUC에 대한 용량상관성의 선형성 동태성격을 나타내었으나 저용량 13 mg/kg에서는 비교적 현저한 AUC의 저하를 보였다(Fig. 2-2-5). 또한 Fig. 2-2-6에서와 같이 clearance^{-1} 의 값도 다른 용량에 비해 현저한 저하를 보였다. 이러한 독성동태학적 결과를 토대로 예비시험에서의 독성소견 등을 참고로 아급성독성시험(S-653)의 용량설정을 20(T1), 80(T2) 그리고 320 mg/kg(T3)으로 결정하여 연속투여시 동태시험을 실시한 결과 포화성 kinetics와 같은 현저한 용량상관성 비선형성 동태를 나타내지는 않았다(Fig. 2-2-7). 초회투여시 및 연속투여시의 steady-state kinetics와 3개월간의 반복투여후의 동태를 조사하여 비교에서 2~3회 투여로 신속한 혈중 Steady-state 도달이 관찰되었으며 비교적 AUC의 용량상관성도 선형적으로 관찰되었다. 3개월간의 반복투여후의 혈중 프로파일은 보면 초회투여시와의 현격한 차이를 나타내지는 않는 것으로 관찰되었으며 AUC 및 C_{max} , T_{max} 에서 용량간에 특이적 차이 또는 비선형성이 관찰되지 않았다.

랫드에 있어서 K-581에 대한 최기형독성시험을 수행하였는데 임신 6~15일 간에 500, 1000 및 2000mg/kg/day의 용량으로 경구투여를 한 바 전군 모두 특이적 모체 및 배독성은 관찰되지 않았다 (Table 2-2-1). 그러나 외표관찰에서 brachcephaly, microcephaly, micrognathia 등의 기형(2.2%)이 최저용량군에서만 특이적으로 관찰되었다. 따라서 본 기형이 시험약제에 의한 발생인가 여부를 규명하기 위해 독성동태시험을 다음과 같이 수행하였다. 정맥투여시의 혈중농도 프로파일은 Fig. 2-2-8과 같이 two-compartment 모델에 적합한 형태를 나타내었으며 Table 2-2-2에서와 같이 동태파라미터가 산출되었다. 약 3개월간의 반복투여시의 혈중동태를 관찰한 결과 초회투여 및 투여최종시에도 세 용량 500, 1000 및 2000 mg/kg/day 모두에서 본 시험물질이 검출되지 않았다 (<50 ng/ml). 생식독성시험과 임신동물, 투약기간 등 동일한 조건하에서 실시된 동

태시험에서도 본 시험물질은 정량되지 않았다. 그리고 태자 체조직에서의 분석결과도 유사하게 나타내었다. 생체활성대사물의 관련성을 규명하기 위해 방사성표식화합물을 이용하여 배설동태를 파악한 결과도 용량구분없이 노와 분증 유사한 회수율을 보였다(Fig. 2-2-9).

Spiked standard Curve

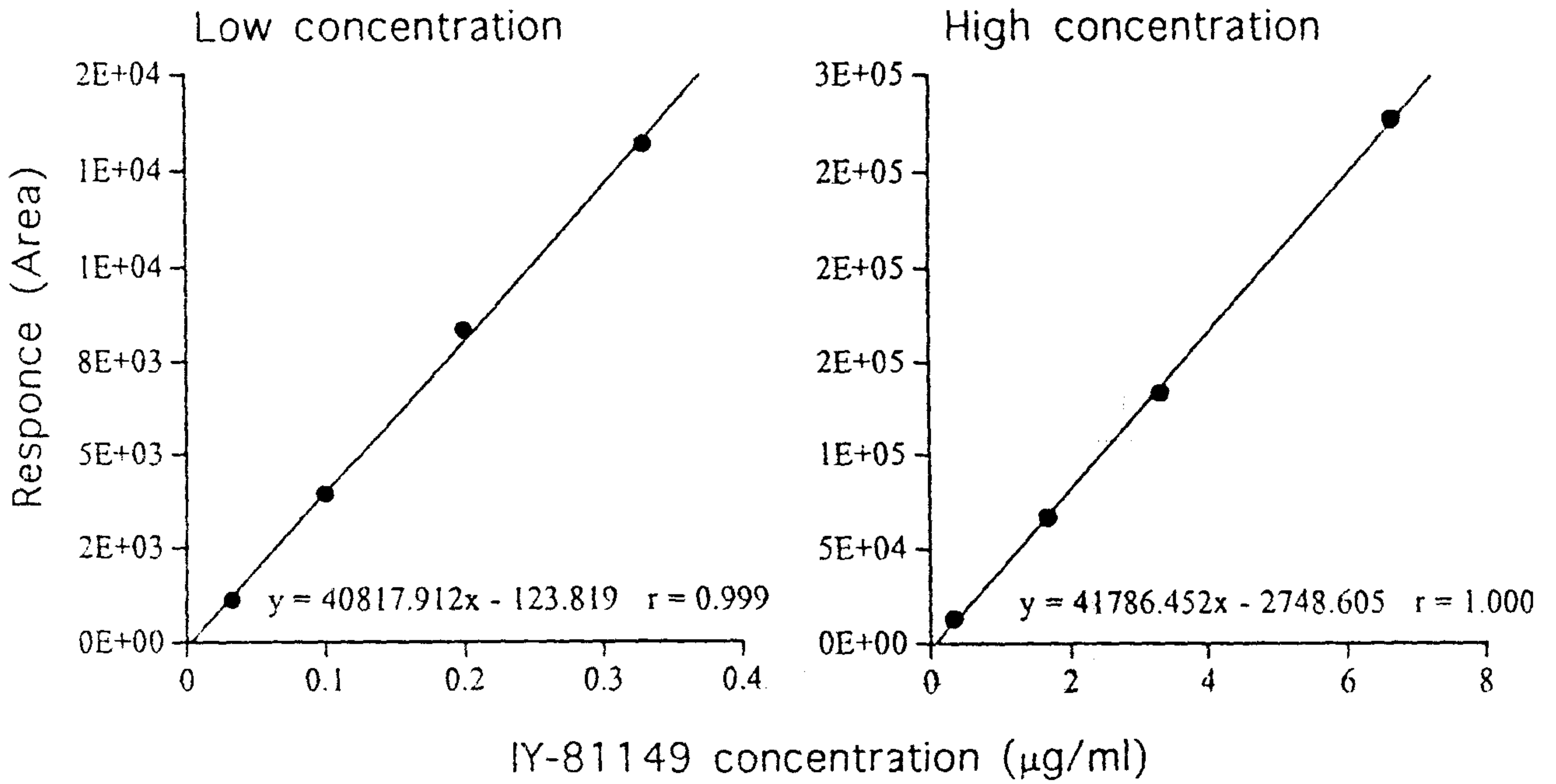


Fig. 2-2-1. Linearity for the standard K-585 spiked in the plasma by HPLC analysis.

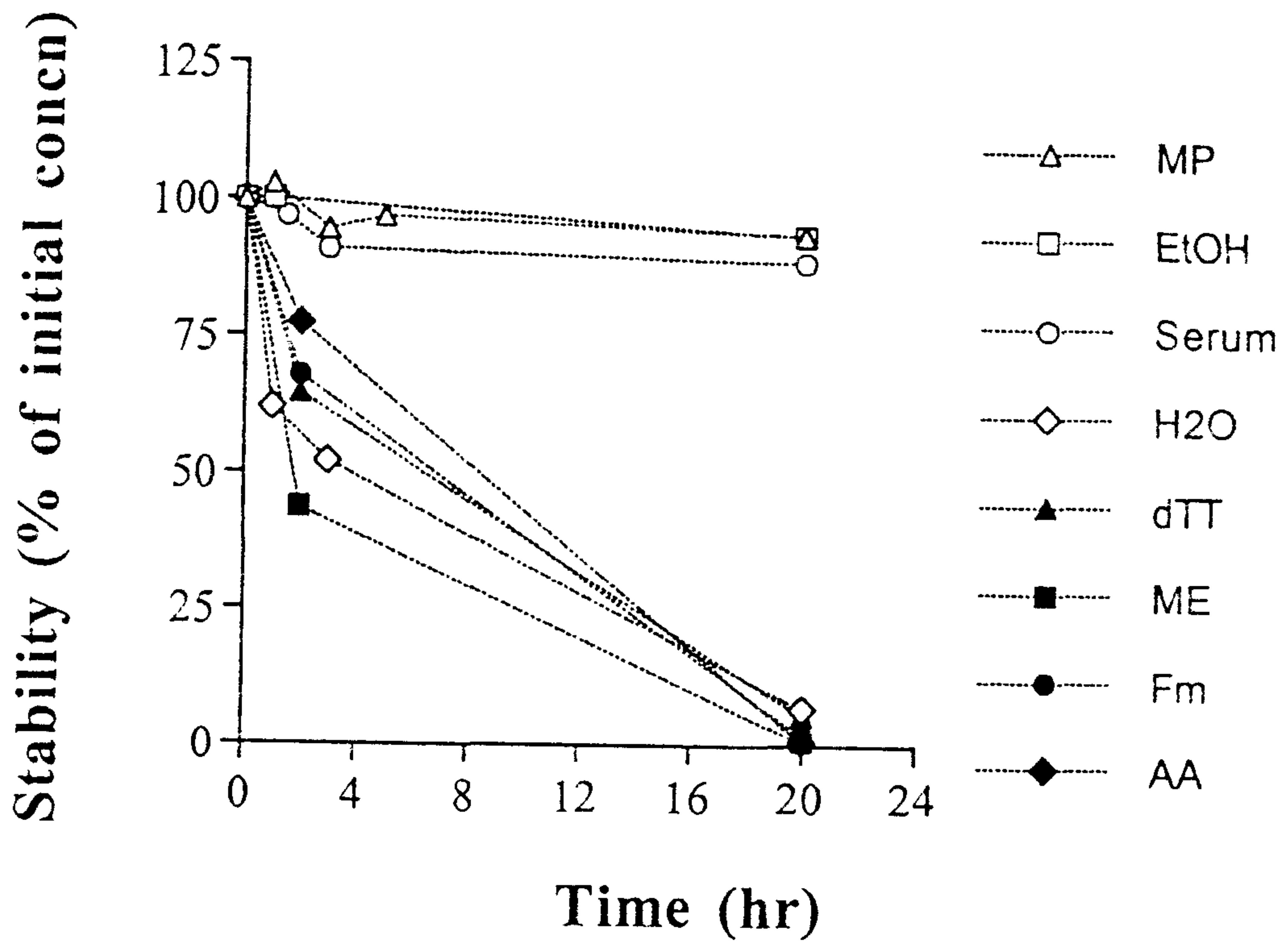


Fig. 2-2-2. Stability of K-585 under the various conditions. Each point represents the mean \pm SE of the three different determinations.

여 백

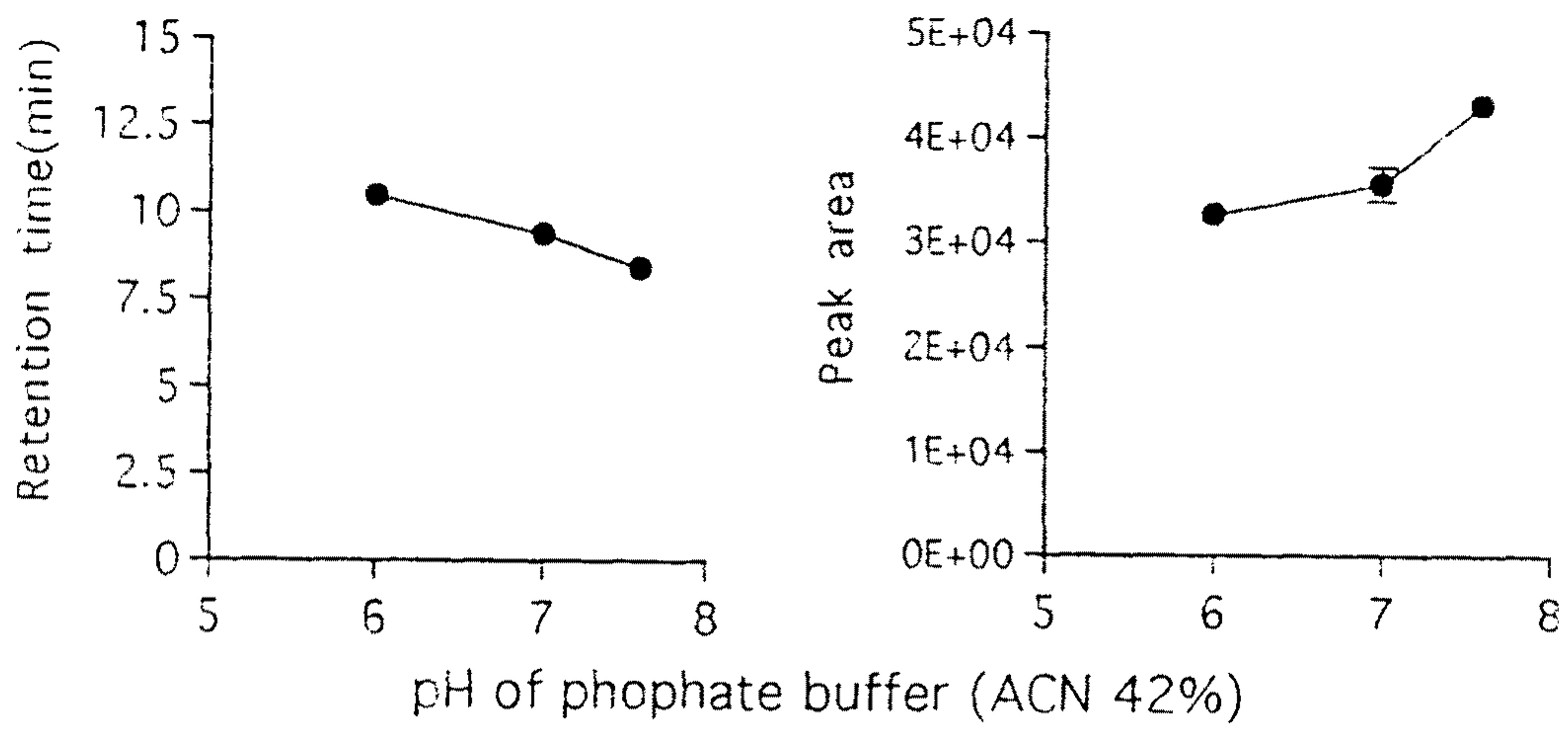
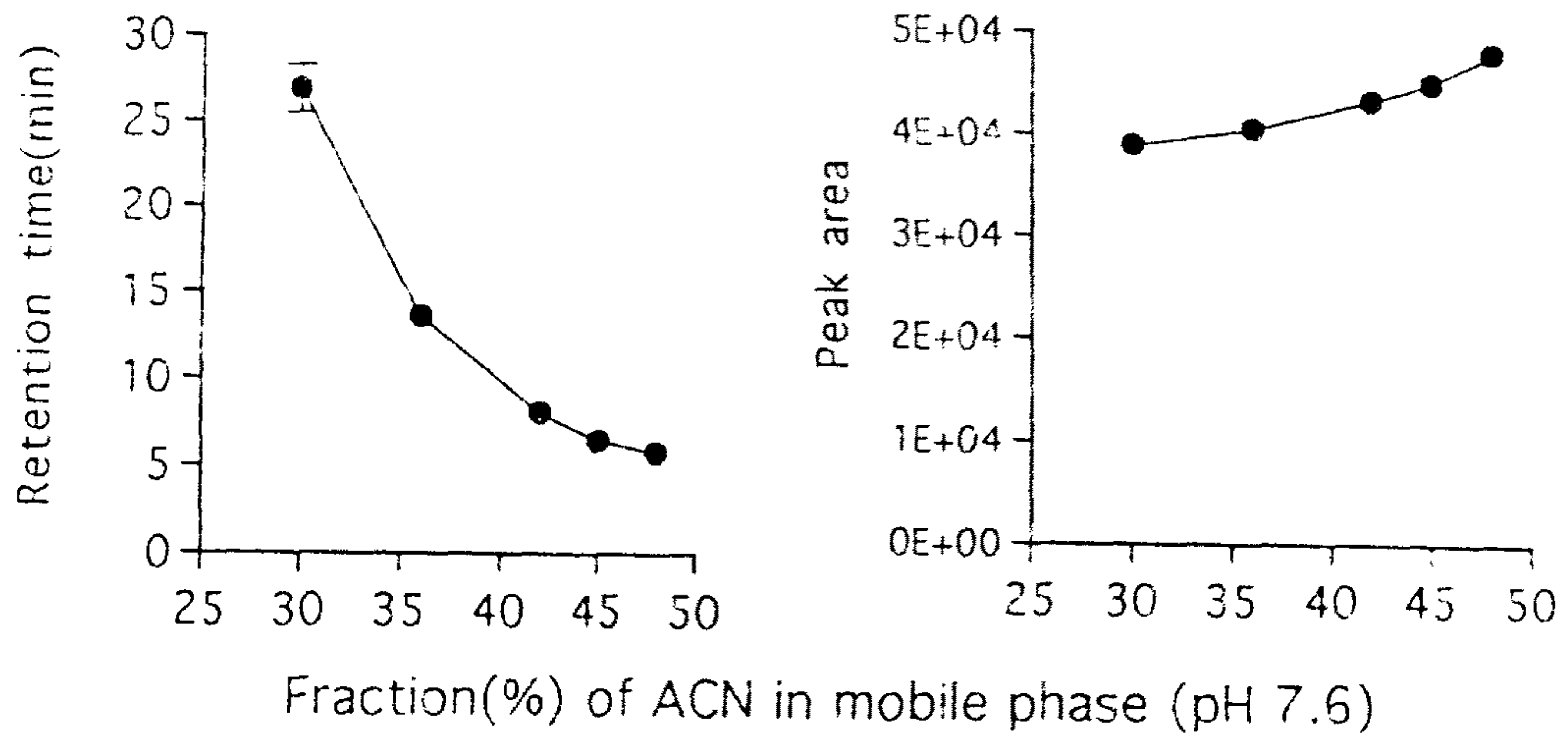


Fig. 2-2-3. Retention and peak response characteristics of K-585 on the HPLC chromatogram at various pHs of buffer or at various ACN fractions in the mobile phase. Each point represents the mean \pm SE of the different three determinations.

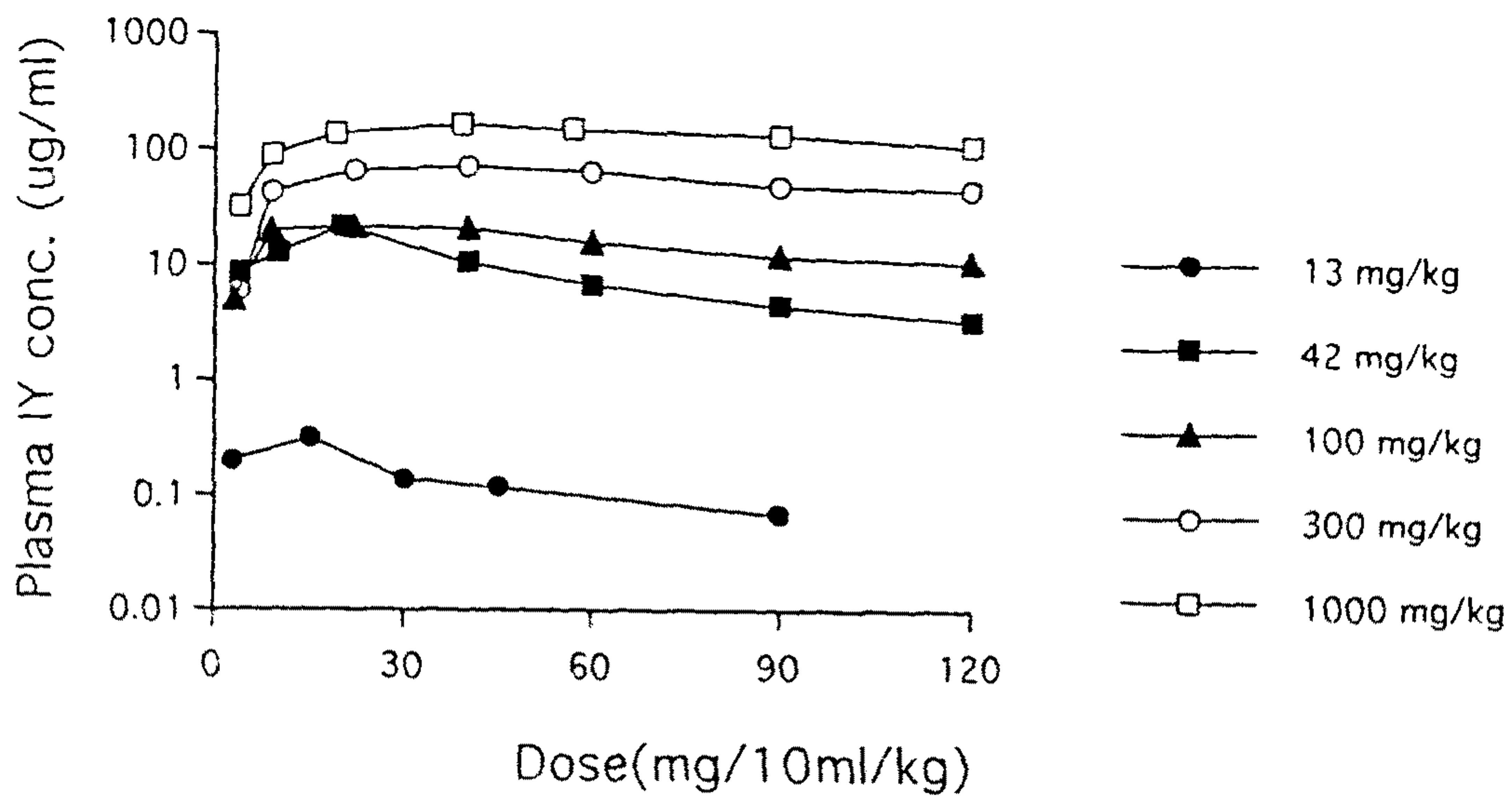


Fig. 2-2-4. Plasma time vs concentration curves of K-585 after a single oral administration to the rats at various doses.

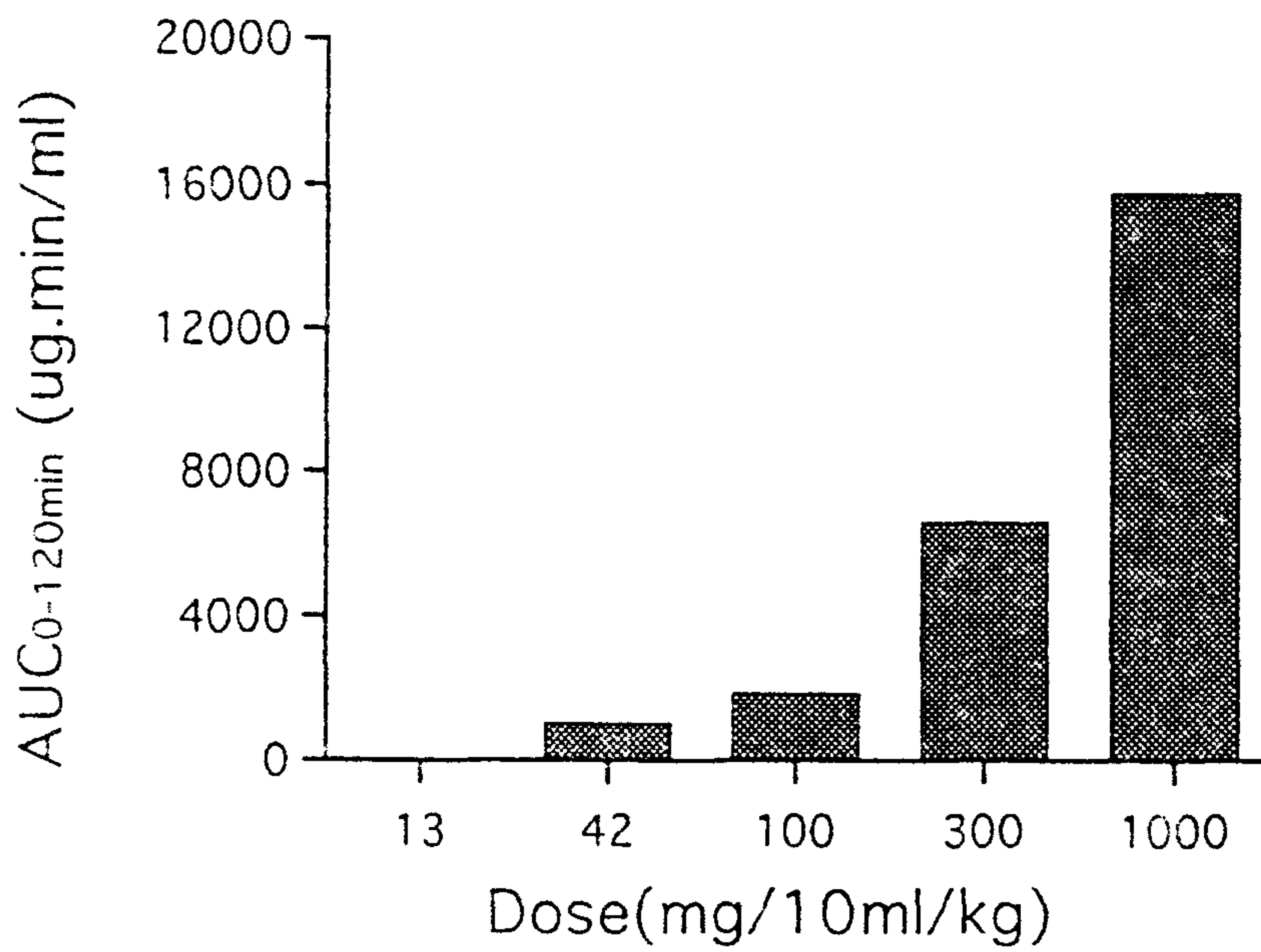


Fig. 2-2-5. Nonlinear toxicokinetics for the AUC_{0-120min} of K-585 after the oral at various doses in the rats.

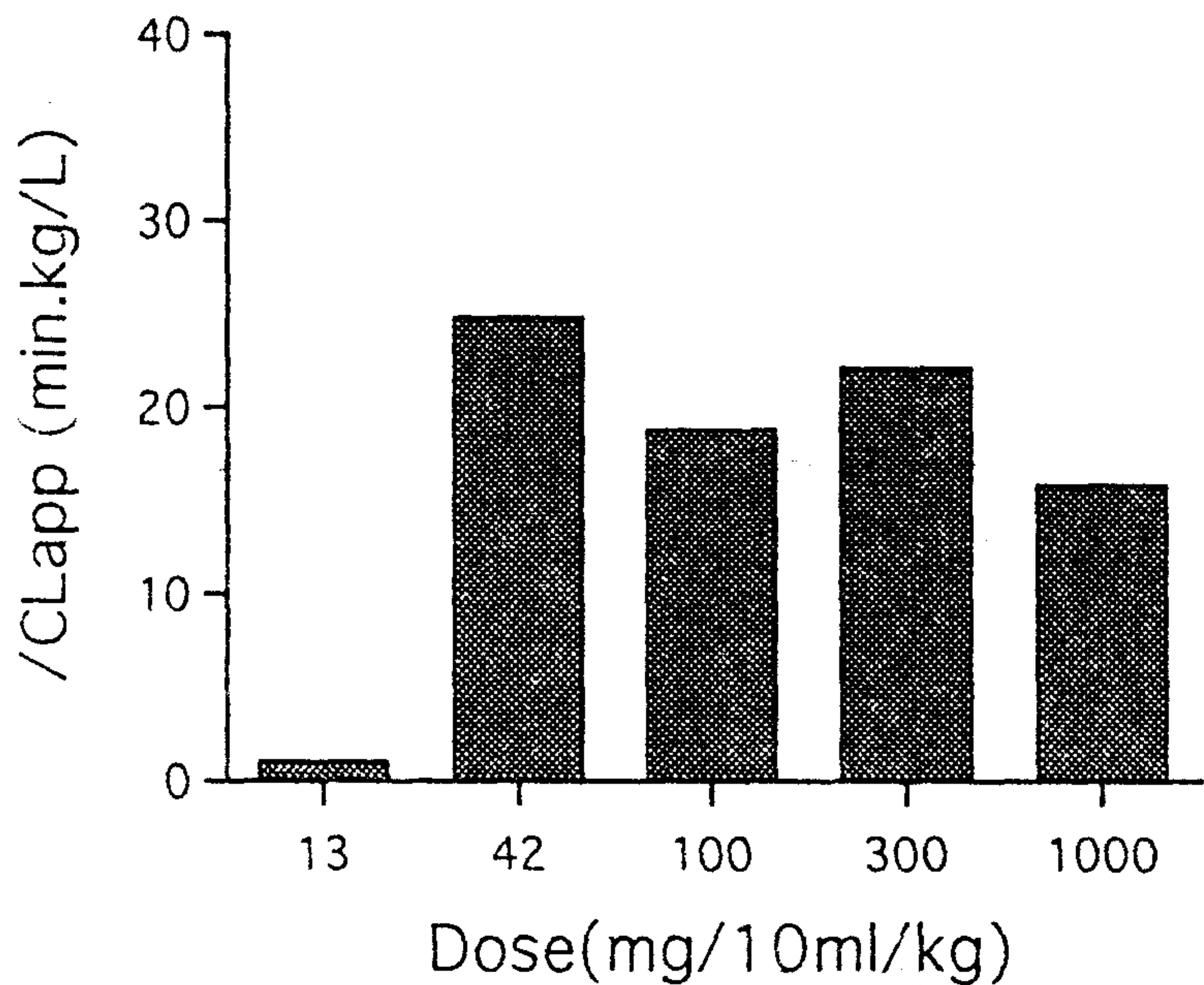


Fig. 2-2-6. Nonlinear kinetics for the CL_{app}^{-1} of K-585 after the oral at various doses in the rats.

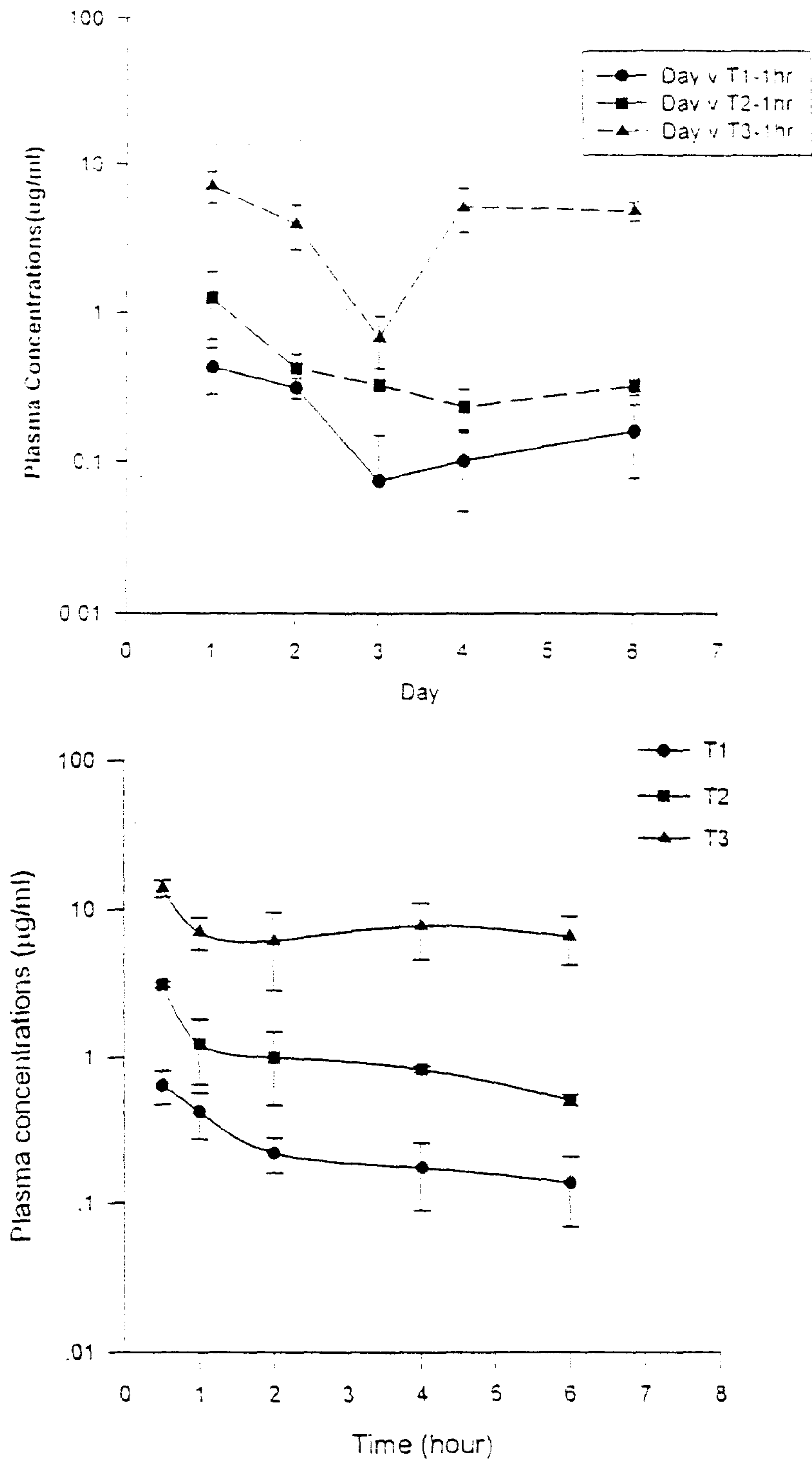


Fig. 2-2-7. Steady-state kinetics for initial repeated dosing and serum concentration curves of K-585 after the oral 3 month-repeated administration of K-580 to the rats. Each point represents the mean \pm SE of three rats.

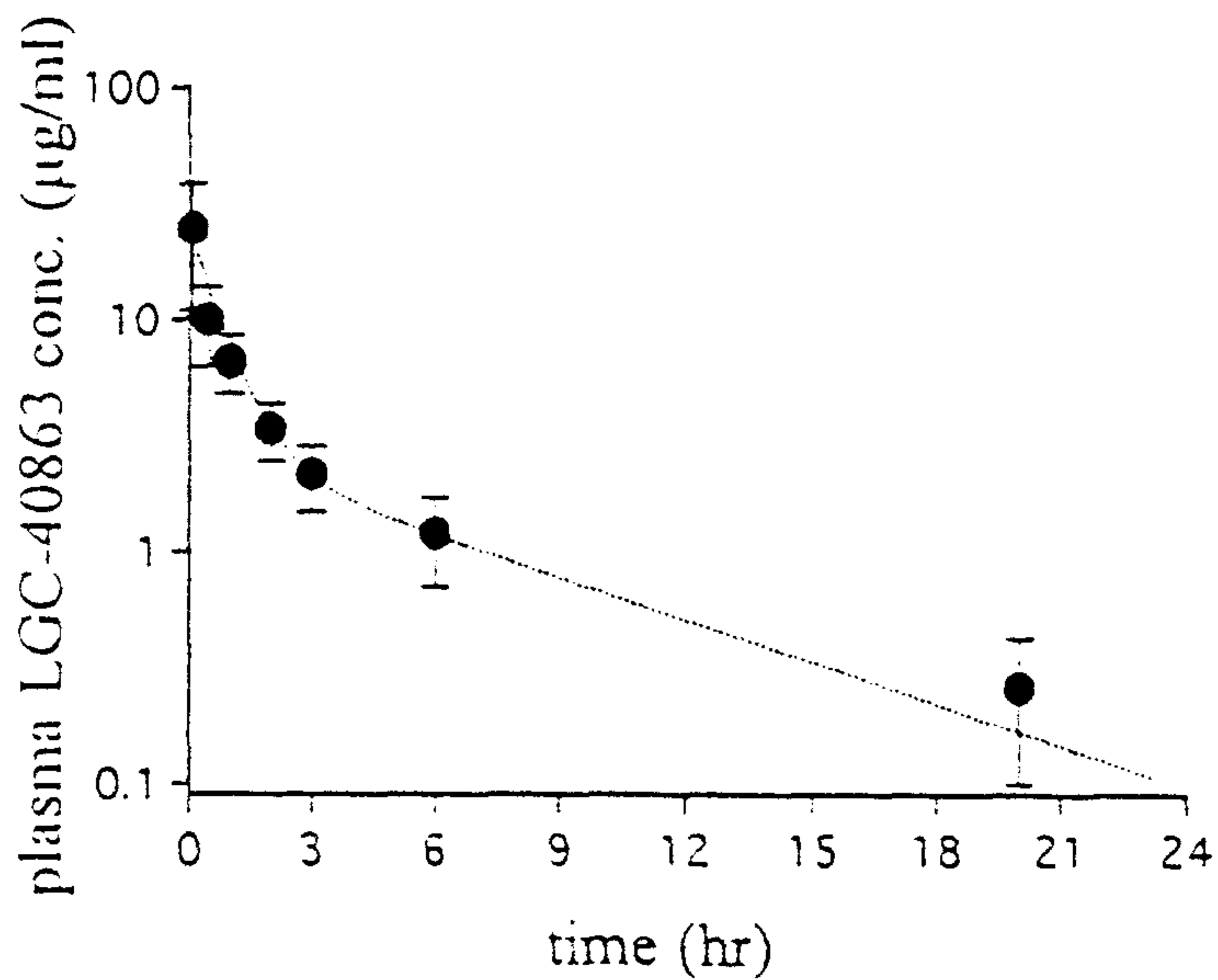


Fig. 2-2-8. Time course of LGC-40863 plasma concentration after a single intravenous dose of 100 mg/kg to female rats. Dotted curve represents the calculated curve obtained by fitting the two-compartment open model. Each value and vertical bar represent the mean of three rats.

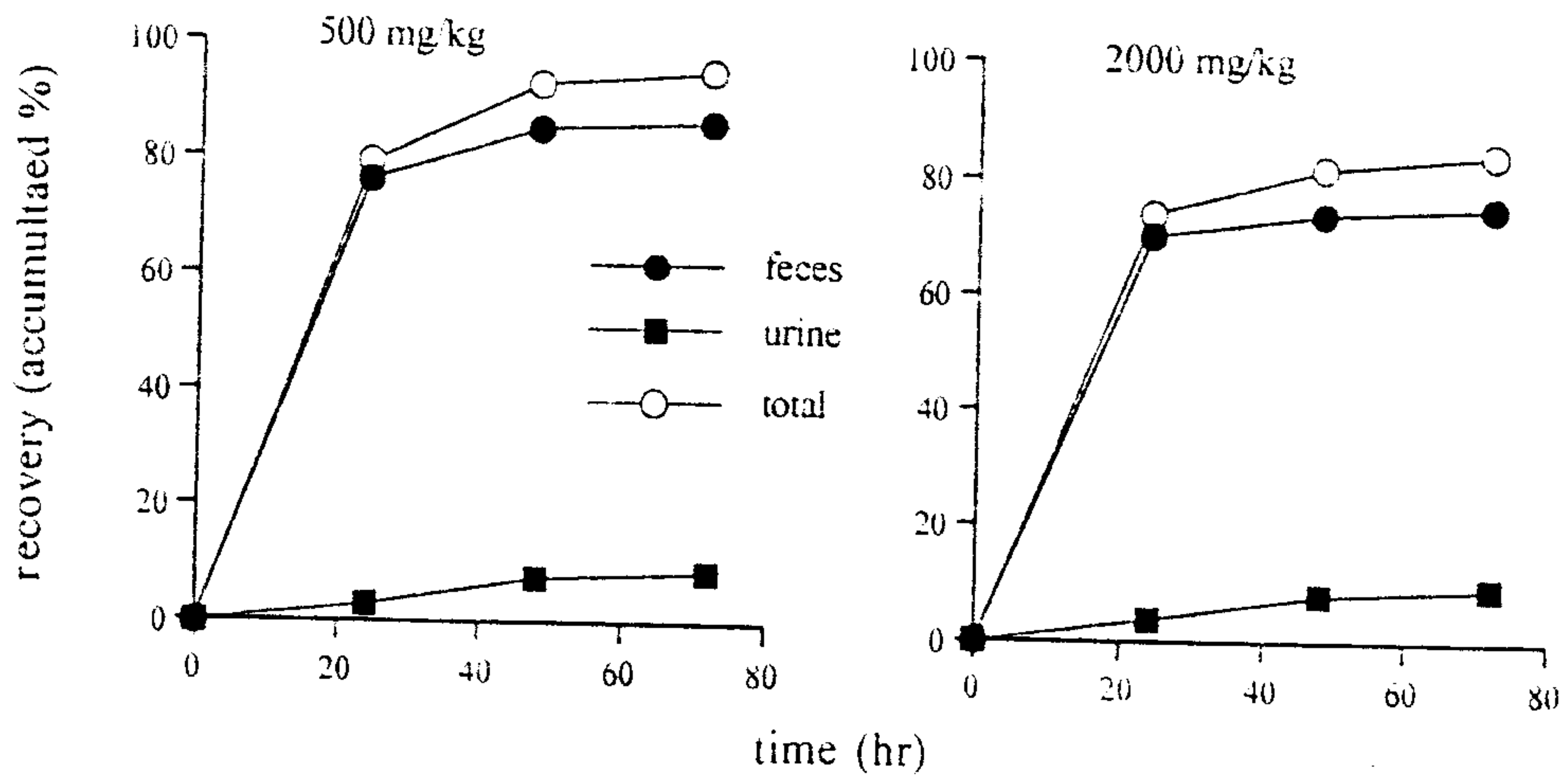


Fig. 2-2-9. Cumulative excretion of total radioactivity in the urine and feces after a single oral administration of LGC-40863 at doses of 500 and 2000 mg/kg spiked with [¹⁴C]LGC-40863 (200 Ci/kg) to female rats.

4. 고찰 및 결론

K-580 등 몇몇 대상 조제시험물질에 대한 안정성 및 균질성에 관한 검토 결과 대부분의 경우 높은 CV 값이 산출되었고 재현성, 안정성도 확보되어 장기독성 시험을 위한 시험물질 조제에 있어서 조제간격에 대한 정량적·객관적 근거자료가 확보되고 조제의 기술상 문제점이 없음을, 그리고 분석기술의 충분한 숙지를 확인할 수 있었다. 시험물질 K-585를 대상으로 HPLC를 이용하여 랫드 혈액을 중심으로 한 생체시료종의 정량분석법도 개발하였는데 혈장회수율이 97.4%, detection limit는 0.3 ng/inj, 농도의존적 피크반응의 상관관계도 높은 직선성을 나타내 양호한 성적을 얻었다. 본 시험물질은 분해되기 쉬운 물질로 알려지고 있어 본 시험물질의 안정적 분석과 시료처리를 위해서도 이동상, 유기용매 (EtOH) 및 혈장, 수용액(H₂O)중에서는 분해성도 확보되었고 각종의 산화방지제 또는 환원제의 효과도 비교 검토되어 안정한 분석이 가능해졌다. 시험물질 K-580에 대해서도 HPLC를 이용하여 생체시료종 정량분석법을 개발하였는데 이동상 pH 7.6 및 ACN 42%에서 회수율은 97.4%, detection limit는 0.3 ng/inj 으로 높은 성적을 얻었다. 이러한 결과들은 본 대상시험물질의 용량설정 등을 위한 약물동태시험에서의 충분한 분석조건을 제시할 수 있음을 보여준 결과라 하겠다. 이상의 분석조건을 검증하기 위하여 경구 단회 투여에 대한 독성동태학적 실험도 수행하였는데 동태론적으로 재현성 높은 분석결과를 얻었다.

K-585의 장기독성시험에서의 용량설정을 위한 단회투여동태시험을 다섯 용량, 13, 42, 100, 300 그리고 1000 mg/kg으로 설정하여 랫드에 투여 후 독성동태론적 검토를 하였는데 42 mg/kg 용량 이상에서는 AUC에 대한 용량상관성의 선형성 동태성격을 나타내었으나 저용량 13 mg/kg에서는 비교적 현저한 AUC의 저하를 보였다. 또한 Fig. 2-2-6에서와 같이 clearance⁻¹의 값도 다른 용량에 비해 현저한 저하를 보였다. 용량간의 현저한 elimination상의 비선형성동태를 보이고 있지 않는 점으로 볼 때 이러한 저하는 대사 등과 같은 클리어런스요인 보다는 소화관의 흡수율저하와 같은 bioavailability (F) 면에서의 영향이 아닌가 예상된다. 그 이유의 하나로써 실제 K-585에 대한 F 값이 수%에 불과하여 저농도 투여군에서는 용해성 등에 의해서 AUC의 변동은 클 수 있다고 보기 때문이

다. 따라서 분명한 것은 상기의 용량 범위내에서는 포화성 동태를 나타내지 않은 것이라 하겠다. 이러한 독성동태학적 결과를 토대로 아급성독성시험(S-653)의 용량설정을 20, 80 그리고 320 mg/kg으로 결정하였다. 이러한 용량범위에서 실시된 아급성독성시험에서의 동성동태연구로는 초회투여시 및 연속투여시의 steady-state kinetics와 3개월간의 반복투여후의 동태를 조사하여 비교하였다. 2-3회 투여로 신속한 혈중 Steady-state 도달이 관찰되었으며 비교적 AUC의 용량상관성도 선형적으로 관찰되었다. 3개월간의 반복투여후의 혈중프로파일을 보면 초회투여시와의 현격한 차이를 나타내지는 않는 것으로 관찰되었으며 AUC 및 Cmax, Tmax에서 용량간에 특이적 차이 또는 비선형성은 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 부터 볼 때 본 시험물질의 용량설정은 비교적 선형성 범위 내에서 잘 이루어진 것으로 판단되며 체내축적 등의 독성동태학적 문제는 없는 것으로 판단된다.

랫트에 있어서 K-581에 대한 생식독성 동태시험에서는 특이적으로 최저용량 군에서만 몇몇 기형이 발견된 것이 본 약제의 투여에 기인된 것인가의 의문점이 제기되었으나 본 약물독성동태학적 시험에 의하여 독성평가가 객관적으로 가능하게 되었다. 임신기간중 경구반복투여시의 혈중동태는 용량에 상관없이 검출되지 않아 극히 낮은 생체이용율을 보였으나 정맥투여 적용시에는 파라미터의 산출 등 two-compartment 혈중동태를 명확히 나타내었던 점으로부터는 parent 물질이 500 mg/kg에서의 기형발생과 관련 가능성이 없음을 제시한다 할 수 있다. 그리고 생식독성과 동일한 임신조건과 태자조직에서의 미검출결과는 이러한 가능성을 더욱 배제하는 결과라 하겠다. 생체활성대사물의 관련성을 규명하기 위해 방사성표식화합물을 이용하여 배설동태를 파악한 결과도 용량구분없이 뇨와 분중 유사한 회수율을 보여 그 기형과의 관련 가능성도 배제되었다. 따라서 관찰된 기형의 발생은 시험물질에 의한 변화로 보기보다는 자연발생의 기형일 가능성이 높은 것으로 판단되었다. 따라서 생식독성의 일부로 독성발현의 약물관련성을 검토하기 위해 수행되었지만 동태학적 연구기술의 독성평가에 응용한 좋은 하나의 방법을 제시하게 되었다.

결론적으로 정리해 보면, 본 연구들은 소동물을 이용한 장기독성시험에 있

어서 시험물질 용량설정기술의 확립과 생식독성에 있어서 독성평가기술개발의 목적으로 수행되어 비선형성 발현용량 등 용량설정의 이론적 근거를 제시하게 되었고 독성평가를 위해서도 그 중요성이 잘 강조된 결과라 하겠다. 이러한 연구 결과들은 정리하여 국제학술지 등에 투고중에 있으며 본 연구는 계획의 100% 이상 목표에 달성된 것으로 판단된다 (H.C. Shin et al., *Journal of Chromatography*, in press, 1998; H.C. Shin et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(2): 795-779, 1998.).

5. 참고문헌

- (1) Hendrie, T.A., Rowland, J.R., Binkerd, P.E. And Hendrickx, A.G.: Developmental toxicity and pharmacokinetics of phenytoin in the rhesus macaque: an interspecies comparison. *Reprod. Toxicol.* 4: 257-266, 1990.
- (2) Koo, S.J., Ahn, S.C., Lim, J.S., Chae, S.H., Kim, J.S., Lee, J.H. and Cho, J.H.: Biological activity of the new herbicide LGC-40863. *Pesticide Sci.* 51: 109-114, 1997.
- (3) Mattison, D.R., Blann, E. and Male, A.: Physiological alterations during pregnancy: impact on toxicokinetics. *Fundam. Appl. Toxicol.* 16: 215-218, 1991.
- (4) Medinsky, M.A. and Klaassen, C.D.: Toxicokinetics. In Casarett & Doulls *Toxicology* (5th edi.), ed. by C.D. Klaassen, pp. 187-198, McGraw-Hill, NY, 1996.
- (5) Monro, A.: Drug toxicokinetics: Scope and limitations that arise from species differences in pharmacodynamic and carcinogenic responses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 22: 41-57, 1994.
- (6) Nau, H.: Pharmacokinetic considerations in the design and interpretation of developmental toxicity studies. *Proc. Pharmacokinetics in Dev. Toxicity* Vol. 1: 219-221, 1991.
- (7) Peck, C.C., Barr, W.H., Benet, L.Z., Collins, J., Desjardins, R.E., Furst, D.E., Harter, J.G., Levy, G., Ludden, T. and Rodman, J.H.: Opportunities for integration of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicokinetics in rational drug development. *J. Clin. Pharmacol.* 34: 111-119, 1994.
- (8) Reiners, J., Loeffberg, B., Creech Kraft, J., Kochhar, D.M. and Nau, H.: Transplacental pharmacokinetics of teratogenic doses of etretinate and other aromatic retinoids in mice. *Reprod. Toxicol.* 2: 19-29, 1988.

제 3 절 병리조직학적 변화를 검색하기 위한 다양한 특수염색방법의 확립

1. 서 론

병리조직학적 변화를 검색하기 위한 새로운 염색방법은 분자생물학적 기술의 발달과 더불어 급속히 발전하고 있으며, 따라서 이를 습득하거나 새로운 방법을 개발하는 것은 매우 중요하다. 병리조직학적 변화를 검색하기 위한 특수 염색방법을 확립하기 위해 다양한 특수염색법을 토대로 기존의 실험방법에 대한 개선점을 연구하여 병변의 발생기전, 병변의 조기진단 및 병변예측을 가능하게 하며, 또한 독성시험기간의 단축, 비용의 절감 등의 효과를 거둘 수 있다. 이를 확립하기 위해 최근 시행되고 있는 여러 가지 염색방법을 이용하거나 새롭게 응용하여 그 이용분야를 넓히고자 소동물을 이용한 시험을 수행하였다.

최근 50여년간 사람의 정자수는 급격히 감소하였다는 보고^{1,2)}가 있어 환경유해물질에 의한 생식기의 이상에 대해 최근 많은 관심이 모아지고 있다. 이러한 정자 감소의 원인은 에스트로젠, 의약품, 식품첨가물, 산업화학물질, 유기용매, 농약등 여러가지가 있다^{3,4)}.

사람에서 약물의 생식기에 대한 독성을 검사하기 위해서는 실험동물을 이용한다. 그러나 동물실험에서 생식기계통의 독성이 밝혀진 물질들이 모두 사람에서 독성을 야기하지는 않는다⁵⁾. 그 이유는 첫째, 사람에서 수태능력을 정확히 측정할 수 있는 방법이 없다는 점이다. 정자수의 측정이 가장 흔히 사용되는 방법이나 이는 정밀한 측정이 불가능하며 재현성이 떨어지고, 또한 사람에 따라서 정자수의 차이가 많이 나며, 같은 사람이라도 정자를 채취한 시간에 따라서도 차이가 많이 나타난다. 둘째, 사람의 수태능력에 영향을 미친 화학물질을 결정하기 위한 역학조사에 어려움이 있기 때문이다. 그러나 사람에서 생식기능의 이상을 유발한 약물들은 모두 랫트에서도 이상을 유발하였기 때문에⁶⁾ 랫트에서의 독성시험 결과를 토대로 사람에서의 생식기에 대한 부작용을 예측할 수 있다⁷⁾. 랫트는 사람과 생식기의 구조가 같지는 않으나 어느정도 유사하며, 정상적인 생식기의 구조, 생리 및 생화학에 대한

자료가 풍부하기 때문에 일반독성시험 뿐만 아니라 생식독성 시험에 많이 이용되고 있다⁸⁾. 랫트의 고환은 정세관과 간질로 구성되어 있고, 정세관은 성장단계가 각기 다른 정세포와 Sertoli 세포로 구성되어 있으며, 간질에는 Leydig 세포, 큰포식세포, 비만세포, 섬유모세포, 미분화 세포, 림프관, 혈관, 신경섬유, 결합조직 등이 있다. 이들 세포들은 시상하부 및 뇌하수체와 상호작용하여 정자의 형성에 관여하는데 Sertoli 세포는 독성물질이나 면역세포들이 정세관내로 들어가지 못하도록 Sertoli cell barrier를 형성하여 정세포를 보호하고 androgen-binding protein(ABP)을 합성하여 정세관내의 테스토스테론량을 증가시킴으로서 정자성숙에 영향을 주며, 뇌하수체의 난포자극호르몬 분비를 조절하는 inhibin을 합성, 분비함으로서 정자형성을 조절한다⁹⁻¹¹⁾. Leydig 세포는 황체호르몬의 자극을 받아 테스토스테론을 분비하여 정자형성에 관여한다¹²⁾. 정세관 상피는 정조세포, 정모세포, 정자세포로 구성되어 있으며, 일련의 생화학적 및 형태학적 변화과정을 거쳐 정조세포로부터 정자를 형성한다. 기능적인 측면에서 정조세포가 정모세포와 새로운 정조세포로 분화하는 유사분열기, 정모세포가 감수분열하여 haploid의 정자세포를 형성하는 감수분열기, 정자세포가 형태학적 변화를 거쳐 정자가 형성되는 정자완성(spermiogenesis)기로 분류한다¹³⁻¹⁵⁾. 이와같은 정자형성단계는 정세관을 종축으로 잘랐을 때 정세관을 구성하는 정세포의 종류에 따라 여러단계로 구분하는데 동물에 따라 각각 다르며, 마우스는 12단계¹⁶⁾, 개는 8단계¹¹⁾, 랫트에서는 14단계로 구분하여 로마자로 I-XIV까지 표기한다¹³⁾(Fig. 2-3-1). I기(stage)에서 XIV기까지의 일련의 과정을 1주기(cycle)라 하며, 1주기에 소요되는 시간은 동물에 따라 다르다. Sprague-Dawley(SD) 랫트에서는 12.9일이 소요되며¹⁷⁾, 정조세포가 성숙되어 정자가 되는 데는 보통 4.5주기가 소요된다고 하였다¹¹⁾. 이러한 정자형성 단계에 기초해 볼 때 화학물질들이 고환에 독성을 유발하는 방법은 각각 다르며, 특정 정세포에 친화성을 나타내기 때문에^{8,18)} 병리조직학적 검사를 통해 환경유해물질의 정자형성에 미치는 영향을 구명할 수 있고 고환독성의 상세한 평가를 할 수 있으며, 수태능력이상, 기형 등과의 연계성을 알아볼 수 있다.

할로겐알칸들은 촉매, 유기용매, 탈지화합물, copolymer cross-linking agent, 농약등으로 많이 사용되고 있으며¹⁹⁾, 이들 화합물중 대표적인 것은 1955년부터 생산되어 농약으로 사용된 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP)으로서 변이원성 및 발암성이 있으며, 신장, 간장, 조혈기 및 고환에 대한 독성이 오래전부터 보고되어 왔다²⁰⁻²⁴⁾. 2-bromopropane(2-BP)은 브롬(Br)이 프로판의 두 번째 탄소에 결합한 형태(CH₃CHBrCH₃)로서 분자량은 122.9, 비점은 59.35(60-61)°C, 어는점은 -89°C이며, 휘발성이 강한 물질로서 독성학적 성질은 아직 명확하게 알려져 있지 않다²⁵⁾.

2-BP는 1995년 8월 경상남도 양산 소재의 한 전자부품공장에서 집단 중독사고를 일으켰던 물질로서 전자제품 제조 및 조립공정시 사용하는 침지액인 솔벤트-5200의 주성분인 유기용제며, 솔벤트-5200은 1994년 2월 프레온이 환경규제물질로 공표된 후 그 대체물질로서 국내 산업체에서 수입하여 사용하고 있는 물질이다. 이 공장 근로자에 대한 역학조사결과 남자근로자 8명중 5명에서 생식기능저하, 1명에서 골수기능과 생식기능저하가 관찰되었으며, 여자근로자에서는 총 25명 중 11명에서 생식기능저하, 6명에서 골수기능과 생식기능저하가 관찰되어 인체의 생식기와 조혈계에 심각한 장애를 유발하는 것으로 나타났다²⁶⁾.

최근의 연구에서 2-BP는 *Salmonella typhimurium* TA 100을 이용한 복귀돌연변이 시험에서 염기쌍 치환형의 돌연변이를 유발하였으며, Chinese hamster lung cells을 이용한 염색체이상시험과 소핵시험에서는 음성의 결과를 보였다²⁷⁾. 한편, 2-BP의 SD 랫트를 이용한 28일 복강내 반복투여시험²⁸⁾과 Wistar 랫트를 이용한 흡입독성시험²⁹⁾ 결과 고환과 조혈기에 영향이 있다고 하였고, 암컷 SD 랫트를 이용한 14일 복강내 반복투여 시험에서는 용량과 상관성있게 발정주기가 지연되었다고 하였다³⁰⁾. 이 이외에 2-BP의 독성에 대한 자료는 복강투여에 의한 반수치사량(LD₅₀)³¹⁾, 흡입에 의한 반수치사농도(LC₅₀)³²⁾등이 알려져 있을 뿐 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 독성학적 성질이 명확하게 알려져 있지 않은 2-BP를 SD랫트에 단기간 경구투여한 후 정자형성단계에 기초하여 경시적으로 관

찰함으로서 표적정세포 및 정자형성단계에 미치는 영향 등에 대한 정확한 평가를 하고, 또한 장기간 투여와 고환내 투여를 실시하여 투여기간 및 투여 방법에 따른 독성발현 양상의 차이를 알아보기 위하여 광학현미경적, 면역조직화학적, 전자현미경적 관찰 및 flow cytometry 검사를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시동물 및 사육환경

한국화학연구소 스크리닝-안전성연구센터 실험동물실의 차폐시설에서 생산된 10주령의 수컷 SD 랫트를 사용하였다. 공시동물은 철망사육상자(410mm×220mm×200mm)에 2-3마리씩 배치하여 온도는 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $55\pm 5\%$, 환기회수는 시간당 13-18회, 조도는 150~300Lux에서 12시간 조명하는 조건에서 사육하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료주식회사)를 자유섭취하게 하였으며, 음수는 수도물을 자유섭취하게 하였다.

나. 시험물질 및 투여방법

시험물질은 2-bromopropane[isopropyl bromide, $(\text{CH}_3)_2\text{CHBr}$; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA]을 corn oil(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 혼합하여 사용하였다. 경구투여용 주사기(sonde)를 사용하여 체중 kg당 10 ml를 강제투여하였으며, 투여량은 주 1회 측정된 체중을 기초로 하여 산정하였다.

다. 시험계획

(1) 단기투여시험

① 2-BP를 단기간 투여하여 최초로 변성되는 정세포를 찾고, 경시적으로 정자형성단계에 미치는 영향과 회복정도를 알아보기 위하여 체중 kg당 3.5g을 하루에 1회, 3일간 경구투여한 후 1, 3, 5, 7, 14, 28, 42, 70일째에 각각 5마리와 대조군 3마리를 부검하여 관찰하였다.

② 2-BP의 용량에 따른 독성발현양상의 변화를 알아보기 위하여

체중 kg당 5g을 하루에 1회, 3일간 경구투여한 후 1일과 7일째에 각각 5마리와 대조군 3마리를 부검하여 관찰하였다.

(2) 장기투여시험

2-BP의 장기투여에 의한 고환의 독성변화를 단기투여시험과 비교하기 위하여 랫트에서 정조세포가 정자로 성장하는 데 소요되는 기간동안인 약 8주간 체중 kg당 0.5 g의 용량으로 일주일에 6회 경구투여한 후에 10마리와 대조군 10마리를 부검하여 관찰하였다.

(3) 고환내투여시험

2-BP를 고환에 직접 주입함으로써 고환에 대한 독성여부를 알아보고, 이 변화를 경구투여 시험과 비교하고자 하였다. 랫트는 군당 2마리씩 배치하였으며, 고환에 각각 5, 10, 20, 30 μ l의 용량으로 corn oil에 혼합하여 50 μ l를 투여하였다. 랫트를 에테르 마취한 후 고환집을 통하여 고환의 뒤쪽 1/3의 중앙 1/3부위에 혈관을 피하여 26 게이지 주사바늘을 사용하여 시험물질을 직접 주입하였다. 오른쪽 정소에는 2-BP를 주입하였으며, 왼쪽 정소에는 용매로 사용된 corn oil을 50 μ l 주입하였다. 투여 후 5분, 10분, 30분, 1시간 또는 2시간 후에 각각 부검하여 고환을 채취한 후 고정하여 주사부위의 인접부위와 고환의 중앙부위를 단축으로 잘라 조직표본을 만들어 관찰하였다.

라. 병리학적 검사

(1) 조직의 처리

시험에 사용된 랫트는 에테르로 전신 마취시킨 다음, 흉강을 열고 관류용 cannula를 좌심실에 삽입한 후 심이를 절개하고 이 관을 통하여 먼저 0.85% 생리식염수를 주입하여 혈관내의 혈액을 관류 수세하였으며, 이어서 Karnovsky³³⁾(4% paraformaldehyde-5% glutaraldehyde) 용액으로 45분간 관류고정하였다. 이렇게 고정된 고환 및 부고환을 채취하여 세절한 다음 동일한 고정액에 추가로 수 시간 침지고정하여 전자현미경 시료제작 또는 hydroxyethyl methacrylate(HEMA) 포매에 이용하였다.

일부 동물은 Sertoli세포 사이의 견고결합을 관찰하기 위하여 10% sucrose가 함유된 10% 중성완충포르말린 용액으로 관류고정하였으며, 대조군은 10% sucrose가 함유되지 않은 10% 중성완충포르말린 용액으로 관류고정하여 HEMA로 포매하여 광학현미경적 관찰에 사용하였다. 나머지 고환은 Bouin용액에 고정하여 일반적인 파라핀 포매하여 광학현미경적 관찰에 사용하였다.

HEMA 포매를 위해 고정된 고환은 두께가 1mm를 넘지 않도록 삭정하여 6.8 % sucrose가 함유된 PBS(pH 7.4)로 4°C에서 하룻밤 동안 수세하였다. 100% 아세톤으로 4°C에서 1시간 동안 탈수하였으며, 처음에는 용액이 맑아질 때까지 계속 교환하였다. HEMA(Jung HistoResin™ Plus, Jung, Heidelberg, Germany)를 사용하여 포매한 후 조직을 1-1.5 μ m로 박절하여 37°C에서 2시간 가량 건조하여 4°C에서 보관하였다. 염색시 0.01% trypsin이 포함된 CaCl₂(pH 7.8)용액으로 37°C에서 5분 동안 처리한 후 H-E phloxine³⁴⁾, PAS-hematoxylin, toluidine blue염색 등을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 전자현미경적 관찰

정세포, Sertoli 세포, Leydig 세포의 변화를 관찰하기 위하여 관류 고정된 고환은 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)로 수세한 후 1% OsO₄로 1-2시간 후고정 하였다. 알콜과 propylene oxide로 탈수하고 epon으로 포매하여 준초박절편을 제작하고, toluidine blue로 가온염색하여 관찰부위를 정한 다음 초박절편하여 0.5% uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 전자현미경(Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 또한 blood-testis barrier를 관찰하기 위하여 Neaves³⁵⁾의 방법에 따라 0.1M cacodylate buffer로 2% lanthanum hydroxide(La(NO₃)₃, pH 7.8) 용액을 만들고 동량의 4% glutaraldehyde(0.1M cacodylate buffer, pH 7.8)를 혼합하여 1% lanthanum-2% glutaraldehyde용액을 만들었다. 이 용액에 고정된 고환조직을 1mm³⁾ 가량 취하여 실온에서 5시간 처리하였으며, glutaraldehyde가 포함되지 않은 lanthanum용액으로 4°C에서 하룻밤 처리한 후 1% lanthanum용액

을 함유한 1% OsO₄(0.1 M S-collidine buffer, pH 7.8)로 1-2시간 후고정 하였다. 알콜과 propylene oxide로 탈수하여 epon으로 포매하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 전자현미경으로 관찰하였다.

(3) 면역조직화학적 관찰

파라핀 포매한 조직은 5 μ m의 두께로 잘라 면역조직화학적 관찰에 이용하였다. 슬라이드는 Henderson 등³⁶⁾의 방법에 따라 aminoalkylsilane을 사용하여 조직의 탈락을 방지하였다. 항체는 proliferating nuclear antigen(PCNA, BioGenex, San Ramon, CA, USA)에 대한 단클론항체를 이용하였으며, avidin-biotin system(ABC Vectastain Elite kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)을 이용하여 염색한 후 DAB kit(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA.)로 발색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

마. Flow cytometry 검사

시간의 경과에 따른 정세관 상피세포의 수적 변화를 측정하기 위하여 flow cytometry 검사를 하였다. Hirsch 등³⁷⁾의 방법에 따라 단기투여시험(1)에서 적출하여 고정한 고환의 일부 조직을 일정한 크기로 세절한 다음 유리 슬라이드 위에서 으깨어 세포를 분리시켜 citrate buffer에 넣어 부유한 다음 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 고환세포부유액은 Coulter[®] Z1(Coulter Electronics Limited, Luton, Beds, England)를 이용하여 세포수를 측정한 후 세포의 농도가 ml당 2x10⁷개 정도가 되도록 조정하였다. 고환세포부유액은 바로 0.5% trypsin이 함유된 spermine-tetrahydrochloride buffer로 실온에서 10분간 처리하였다. Trypsin의 작용을 중지시키고 double strand ribonucleic acid를 제거하기 위하여 trypsin 억제제와 ribonuclease A(12mg/ml)를 10분간 처리하였다. propidium iodide(50mg/ml)와 spermine-tetrahydrochloride buffer를 가하여 10분간 암실에서 염색하였다. 분석은 FACSort(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Joes, CA, USA)를 이용하여 시료 증 핵 10,000개에 대한 haploid(n), diploid(2n), tetraploid(4n)의 비율을 측정하였으

며, 결과는 그래프로 나타내었다.

3. 결 과

가. 단기투여시험(1)

(1) 육안적 및 광학현미경적 관찰

육안적으로 투여 초기에는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 투여 4주 후부터 고환과 부고환의 위축이 관찰되기 시작하였으며, 6주 후에는 정상 크기의 2/3 크기까지 위축되었다(Figs. 2-3-2, 2-3-3). 시험의 종료 후에도 고환의 크기는 원상으로 회복되지 않았다.

광학현미경적 관찰에서 투여 후 1일째에는 I-IV기의 정세관에서 변성된 정조세포가 관찰되었다. 변성된 정조세포의 핵은 위축되어 진하게 염색되거나 분리되어 파편으로 나타났으며, 세포질은 호산성으로 진하게 염색되어 있었다(Figs. 2-3-4, 2-3-5a,b). 일부 변성된 세포가 주위의 Sertoli세포에 의해 탐식되는 것도 관찰되었다. 그러나 다른 기의 정세관에서는 정세포의 변성이 관찰되지 않았으며, 간질과 부고환에서도 큰 변화는 나타나지 않았다.

투여 후 3일째는 I-IV기의 정세관에서는 정조세포가 거의 관찰되지 않았으며, V-VI기의 정세관에서만 일부 정조세포들이 관찰되었다. 변성된 정조세포의 수는 투여 후 1일째보다 적게 관찰되었다.

투여 후 5일째에는 I-VI기의 정세관에서 정조세포가 거의 관찰되지 않았으며, 비후기(pachytene)의 정모세포가 Sertoli세포와 함께 정세관 기저층에 위치하고 있었고 변성된 세포는 거의 관찰되지 않았다. 또한 VII-VIII기에서는 세사전기(preleptotene)의 정모세포가 거의 소실되어 기저막가까이에는 비후기의 세포가 위치해 있는 것이 관찰되었다(Figs. 2-3-6, 2-3-7). 그러나 IX-XI기 사이의 정세관에서 세사기(leptotene)와 비후기의 정모세포는 정상으로 나타났으며, XII-XIV기에서도 접합기(zygotene)와 비후기의 정모세포를 정상적으로 관찰할 수 있었다. 부고환에서는 큰 변화는 관찰되지 않았으며, 간질에서도 큰 변화는 나타나지 않았다.

투여 후 7일째에는 IX-XI기 사이의 정세관에서 세사기의 정모세포가 거의

소실되었으며, XII-XIV기에서도 접합기 정모세포의 현저한 감소가 인정되었다. 또한 II-IV기의 일부 정세관에서 비후기의 정모세포가 감소하는 경향을 보였으며, V-VI기에서는 현저한 감소가 인정되었고, VI-XIV기와 I기에서는 비후기의 정모세포가 정상적인 수준으로 관찰되었으나 Sertoli세포와 함께 정세관 기저층에 위치하고 있었다(Figs. 2-3-8, 2-3-9a,b). IX-X기의 정세관에서는 정자의 방출이 지연되어 19단계(step)의 정자세포가 9-10단계의 정자세포 사이에서 관찰되었다(Figs. 2-3-9a,b). I-III기의 정세관에서 초기비후기의 정모세포가 변성되는 소견이 소수 관찰되었다. 부고환에서는 소수의 탈락된 정세포가 관찰되었으나 정자의 수는 거의 정상적인 수준이었다.

투여 후 14일째에는 거의 대부분의 정세관에서 정세포들의 현저한 감소가 인정되었다. 대부분의 기에서 정조세포와 정모세포가 소실되어 정자세포가 정세관의 대부분을 차지하고 있었다(Fig. 2-3-10). I-VII기의 정세관에서는 정모세포가 완전히 소실되어 둥근정자세포(round spermatid)가 기저막에 연해 위치해 있었으며, VIII기에서는 일부 정세관에서 간혹 비후기의 정모세포가 관찰되었으나 극히 소수였다. IX-XIV기에서만 비후기 정모세포들이 Sertoli세포와 함께 정세관 기저층에 위치하고 있었다. IX-X기의 정세관에서는 정자의 방출이 지연되어 19단계의 정자세포가 9-10단계의 정자세포 사이에서 관찰되었다. 부고환에서는 소수의 탈락된 정세포들 관찰할 수 있었으나 정자는 거의 정상과 같은 수준이었으며, 간질에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

투여 후 28일째에는 모든 정세관에서 둥근정자세포가 완전히 소실되어 타원형정자세포(elongate spermatid)만이 관찰되었으며, Sertoli세포만 남아있는 정세관도 소수 관찰되었다. 정조세포와 정모세포가 일부 기를 알 수 없는 정세관에서 간혹 관찰되었다(Fig. 2-3-11). 대부분의 정조세포와 정모세포는 타원형 정자세포가 기저막에 근접하고 있는 정세관에서 관찰되었는데 이것은 I-VI기로 판단되었다. 타원형 정자세포가 정세관 내강 가까이에 위치하는 VII-VIII기에서는 정모세포가 소수만이 관찰되었으며, IX-XII기에서는 이 세포들이 관찰되지 않았다. IX-XI기의 정세관에서는 정자의 방출이 지연되어 19단계의 정자세포가 9-11단계의 정자세포 사이에서 관찰되었다. 간질에는 큰

형태학적 변화는 없었다. 부고환의 미부에서는 정자감소(oligospermia)가 관찰되었으며, 변성되어 탈락된 정세포가 소수 관찰되었다(Fig. 2-3-12). 두부에서는 현저한 정자감소가 인정되었고, 일부에서는 무정자증(aspermia)도 관찰되었으며, 내강은 호산성의 단백질양 물질로 차 있었다.

투여 후 42일째에는 타원형 정자세포가 완전히 소실되어 모든 정세관에서 관찰되지 않았다. 일부 소수의 정세관에서는 정세포들이 모두 소실되어 Sertoli세포만 관찰되었으며, 이런 정세관의 내강은 기저막으로부터 분리된 Sertoli 세포들이 내강으로 돌출되어 불규칙하게 배열되어 있었다. 그러나 대부분의 정세관에 정조세포와 정모세포의 현저한 증가가 인정되어었다(Fig. 2-3-13). 둥근정자세포도 대부분의 정세관에서 관찰되었으며, 일부 정세관에서 소수의 타원형 정자세포도 관찰되었다. 간질에는 호산성의 단백질양 물질이 균질하게 나타났으며, Leydig 세포의 미약한 증식이 관찰되었으나 세포의 형태는 큰 변화가 없었다. 부고환에서는 두부의 내강에서 무정자증이 나타났으며, 변성되어 탈락된 정세포가 소수 관찰되었다. 미부에서는 현저한 정자감소가 인정되었으며, 탈락된 정세포의 수가 약간 증가하는 경향이였다.

투여 후 70일째에는 정상적인 정세포의 구성을 가진 정세관이 일부 관찰되었다. 정상적인 정세관들에서는 정조세포, 정모세포, 둥근정자세포 및 타원형 정자세포가 전부 관찰되었으나 다수의 다른 정세관에서는 정세포들이 모두 소실되어 Sertoli세포만 관찰되었다(Fig. 2-3-14). 일부 정세포가 남아있는 정세관에서는 변성된 정세포가 소수 관찰되었으며, 둥근 정자세포들이 서로 융합되어 형성된 다핵거대세포(multinucleated giant cell)도 정세관내에서 관찰되었다(Fig. 2-3-15). 간질에는 호산성의 단백질양 물질이 미만성으로 균질하게 나타났으며, Leydig 세포의 증식이 관찰되었으나 세포의 형태는 큰 변화가 없었다(Fig. 2-3-14). 부고환의 두부에서는 무정자증이 나타났으며, 소수의 변성되어 탈락된 정세포가 관찰되었고 미부에서는 현저한 정자감소가 인정되었으며, 탈락된 정세포의 수가 현저히 증가하는 경향이였다(Fig. 2-3-16).

고장액을 이용하여 Sertoli 세포연접의 이상을 관찰한 결과 무처리 대조군

과 처치군 모두에서 유사한 소견을 보였다. 즉, 정세관의 정조세포는 위축되어 기저막으로부터 분리되어 공포가 형성되었다. 그러나 Sertoli 세포와 정세관 내강의 정세포들의 분리는 관찰되지 않았다(Fig. 2-3-17).

(2) 전자현미경적 관찰

전자현미경적 관찰에서 I-IV기의 정세관에서 정조세포가 변성을 나타내었다(Figs. 2-3-18, 2-3-19a,b,c). 이들 변성된 세포는 핵이 구형으로 진하게 염색되었으며, 염색질이 핵의 주변으로 치우쳐 나타나거나 여러조각으로 분리되어 나타났다. 세포질은 진하게 염색되었으며, 매우 불규칙한 구조를 보였다. 그 이외에 다른 정세포에서는 주목할만한 변화는 관찰되지 않았으며, Sertoli세포와 Leydig세포에서도 큰 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2-3-20). 시험의 종료시에 Leydig 세포는 유의한 변화가 관찰되지 않았으며(Fig. 2-3-21), Sertoli세포의 핵이 매우 불규칙하게 나타났으나 미세구조에는 큰 변화가 없었다. 그러나 정세관의 기저막은 구불구불하게 변형되고 일부 공포도 관찰되었다.(Fig. 2-3-22). Lanthanum을 이용한 blood-testis barrier의 관찰에서는 lanthanum이 정조세포와 Sertoli세포의 경계를 따라 균질하게 침착되어 이상이 없는 것으로 나타났다(Fig. 2-3-23).

(3) 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 관찰에서 PCNA 항체에 양성반응을 보인 세포는 정조세포, 세사전기, 세사기, 접합기의 정모세포와 초기의 비후기 정모세포였다(Fig. 2-3-24). 시험기간 중 초기에는 모든 정세관에서 양성반응을 보인 세포가 관찰되었으나 시간이 경과할 수록 양성반응을 보인 세포의 분포에 변화가 나타났다. 즉, 투여 후 1일째에는 정조세포의 감소가 I-III기의 정세관에서 인정되었으나 현저하지는 않았다. 투여후 3일째에는 I-IV기의 정세관에서 양성반응을 보인 정조세포의 현저한 감소가 인정되었으나 양성반응을 보인 정모세포는 정상적인 수준 이었으며, V-VI기의 정세관에서는 양성반응세포가 약간 감소하는 경향이였다. 투여 후 5일째에는 V-VI기에서 양성반응세포가 대부분 소실되어 정조세포의 소실은 시사하였으며, VII-VIII기에서는 소수의 양성반응세포만이 정모세포에서 관찰되었는데 이는 정조세포와 세사전기

정모세포의 소실을 시사한다. 그 이외의 정세관에서는 양성반응세포가 관찰되었다(Fig. 2-3-25). 투여 후 7일째에는 VII-VIII기에서 양성반응을 보인 세포가 관찰되지 않아 세사전기 세포의 완전한 소실을 나타내었으며, IX-XI기에서는 양성반응세포가 감소하는 경향을 보여 세사기 정모세포의 감소를 알 수 있었다. 반면 XII-III기에서는 양성반응세포가 정상수준으로 관찰되어 접합기의 정모세포와 초기 비후기정모세포의 존재를 알 수 있었다(Fig. 2-3-26). 투여 후 14일째에는 IX-XIV기의 정세관에서 양성반응세포가 관찰되지 않아 세사기, 접합기 및 초기비후기 정모세포의 완전한 소실을 뒷받침하였다. 그러나 I-III기의 정세관에서는 소수의 양성반응세포가 관찰되어 정세포의 재생이 시작됨을 알 수 있었다(Fig. 2-3-27). 투여 후 28일째에는 대부분의 정세관에서 양성반응을 보이는 세포가 관찰되어 정세포의 재생이 현저하게 일어남을 알 수 있었으나 어느 기에서 재생이 시작되는지는 둥근정자세포의 소실로 구분할 수 없었다(Fig. 2-3-28). 투여 후 42일째에는 많은 정세관에서 양성 반응을 보인 세포가 현저히 증가하여 대부분의 정세관에서 관찰되었다(Fig. 2-3-29). 반면 일부 정세관은 정세포가 모두 소실되어 Sertoli세포만 관찰되어 반응을 보이지 않는 경우도 있었다. 간질에서도 양성반응을 보인 세포가 소수 관찰되었다. 투여 후 70일째에는 양성반응을 보인 세포가 42일에 비해 감소하는 경향이 있었다(Fig. 2-3-30a). 많은 정세관에서 정세포가 소실되어 Sertoli세포만 관찰되었으며, 양성반응세포는 관찰되지 않았다. 간질에서는 양성반응을 보인 세포가 증가하였는데 이러한 세포는 핵은 난원형으로 Leydig 세포와 유사하였으며, 때로 두개가 인접하여 나타나기도 하였다(Figs. 2-3-30b,c).

(4) Flow cytometry 검사

Flow cytometer를 사용하여 정세관 상피세포의 배수성(ploidy)을 검사한 결과 대조군에서는 haploid 세포가 $51.9 \pm 3.10\%$, diploid 세포가 $25.3 \pm 1.15\%$, tetraploid 세포가 $9.49 \pm 0.74\%$ 의 비율로 관찰되었다. 3일째에는 haploid 세포가 $61.5 \pm 1.51\%$, diploid 세포가 $15.95 \pm 0.83\%$, tetraploid 세포가 $9.63 \pm 0.58\%$ 의 비율로 관찰되어 diploid세포의 수가 현저히 감소하였다. 5일

째에는 haploid 세포가 $84.00 \pm 1.72\%$, diploid 세포가 $16.08 \pm 0.77\%$, tetraploid 세포가 $5.81 \pm 0.35\%$ 의 비율로 관찰되어 diploid와 tetraploid 세포의 수가 감소였다. 7일째에는 haploid 세포가 $78.24 \pm 1.65\%$, diploid 세포가 9.87 ± 2.02 , tetraploid 세포가 $5.00 \pm 0.59\%$ 의 비율로 관찰되었다. 14일째에는 haploid 세포가 $88.28 \pm 1.54\%$, diploid 세포가 $6.15 \pm 0.13\%$, tetraploid 세포가 $3.26 \pm 0.81\%$ 의 비율로 관찰되었다. 28일째에는 haploid 세포가 $95.45 \pm 1.99\%$, diploid 세포가 $3.03 \pm 0.57\%$, tetraploid 세포가 $1.25 \pm 0.35\%$ 의 비율로 관찰되어 diploid와 tetraploid 세포의 수가 현저히 감소하였다. 42일째에는 haploid 세포가 $51.29 \pm 4.42\%$, diploid 세포가 $18.77 \pm 4.02\%$, tetraploid 세포가 $19.37 \pm 0.67\%$ 의 비율로 관찰되어 diploid와 tetraploid 세포의 수가 현저히 증가하였다. 70일째에는 haploid 세포가 $64.89 \pm 2.23\%$, diploid 세포가 10.39% , tetraploid 세포가 12.8% 로 관찰되어 42일째에 비해 diploid와 tetraploid 세포의 수가 감소하였다(Fig. 2-3-31).

나. 단기투여시험(2)

(1) 육안적 및 광학현미경적 관찰

체중 kg당 5g을 1일에 1회, 3일간 투여한 후 1일째, 7일째에 부검하여 관찰한 결과 육안적으로 고환에서 특별한 소견은 관찰되지 않았다. 투여 후 1일째 고환의 광학현미경적 관찰에서는 일부 정상적인 정세포의 구성을 가진 정세관과 심한 정세포의 변성을 보인 정세관이 함께 관찰되었다(Fig. 2-3-32). 단계의 구분이 가능한 I-IX기의 정세관에서는 정자세포와 정모세포가 정상적인 구조를 보였으나 정조세포와 초기 정모세포는 소실되어 관찰되지 않았다. 정세포가 변성된 정세관은 정자세포가 모두 변성되거나 탈락되어 단계를 구분할 수 없었으며, Sertoli세포의 공포화와 정조세포, 정모세포 및 정자세포의 변성이 모두 관찰되었다. 변성된 정모세포는 핵이 진한 염색성을 나타내거나 세포질에 공포가 관찰되었다. 정자세포는 핵에 원형으로 밝게 염색되는 부분이 관찰되었으며, 세포질은 호산성으로 짙게 염색되었다. 7일 후에는 기저막에 Sertoli세포만 관찰되고 정세포는 모두 탈락되어 공포가

다수 형성되어 있었다. 변성된 정자세포들이 모여 다핵거대세포를 형성하여 정세관내강으로 분리 탈락되어 있었다(Fig. 2-3-33). Sertoli세포는 세포질에서 커다란 공포가 다수 관찰되었다. 간질에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

(2) 전자현미경적 관찰

Sertoli 세포, 정조세포, 정모세포와 정자세포 모두에서 변성이 관찰되었다. Sertoli 세포는 핵의 변연부가 함몰되어 모양이 매우 불규칙한 형태를 보였으며, 세포질에는 많은 공포가 나타났다. 변성된 정조세포와 정모세포의 핵은 염색질이 여러조각으로 분리되어 매우 불규칙한 형태로 나타났으며, 세포질은 다수의 공포가 형성되어 매우 불규칙한 구조를 보였다(Fig. 2-3-34). 정자세포의 핵에서는 핵의 중앙부분이 투명하거나 핵주위에 투명대가 관찰되었다(Fig. 2-3-35). 간질에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

다. 장기투여시험

고환은 육안적으로 정상 크기의 1/2 수준으로 위축되었으며, 고환내에는 약간 투명한 수양성의 물질이 들어있는 것처럼 관찰되었다. 피막은 주글 주글하고 매우 유약하여 쉽게 함몰되었으며, 탄력이 소실되어 있었다. 광학 현미경적 관찰에서 정세관 상피세포는 거의 대부분 소실되었으며, 일부 정세관에서는 Sertoli세포만 관찰할 수 있었다. 일부 정세관에서는 정조세포, 정모세포, 정자세포를 관찰할 수 있었으나 그 수는 극히 적었다(Fig. 2-3-36). 일부를 제외하고 정세포가 대부분 소실되어 기를 구분할 수는 없었으며, 대부분의 정세관 내강에서는 탈락된 정세포들이 관찰되었다. Sertoli세포의 핵은 기저막으로부터 떨어져 정세관 내강에 위치하고 있었으며, 형태는 매우 불규칙하였다. 고환의 간질에서는 호산성의 단백질양 물질이 균질하게 분포하였으며, Leydig 세포의 증식이 인정되었다. 또한 부고환에서는 현저한 정자감소가 인정되었으며, 변성되어 탈락된 정세포들이 많이 관찰되었다(Fig. 2-3-37).

면역조직화학적 관찰에서는 대부분의 정세관에서 PCNA 항체에 양성반응을 보인 세포를 관찰하기가 어려웠으며, 일부 정세관에서 소수의 양성반응을

보인 세포가 관찰되었다. 간질에서는 양성반을 보인 세포의 수가 대조군에 비해 증가하였다.

Flow cytometry 검사에서 대조군에서는 haploid 세포가 $56.29 \pm 3.06\%$, diploid 세포가 $27.36 \pm 1.73\%$, tetraploid 세포가 $8.97 \pm 1.48\%$ 의 비율로 관찰되었다. 8주후에는 haploid 세포가 $39.81 \pm 1.65\%$, diploid 세포가 $35.49 \pm 0.83\%$, tetraploid 세포가 $13.44 \pm 1.12\%$ 의 비율로 관찰되어 haploid 세포의 수가 현저히 감소하였다(Fig. 2-3-38).

라. 고환내 투여시험

육안적으로는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 광학현미경적 관찰에서 corn oil투여군과 $5\mu\text{l}$ 투여 군에서는 간질의 확장소견 이외에 큰 변화는 관찰되지 않았으며, 간질세포에서도 큰 변화가 없었다. 그러나 10, 20, $30\mu\text{l}$ 를 투여한 군에서는 특정한 기의 구분 없이 정세관의 변성이 투여부위와 인접한 부위에서 관찰되었다. 정세관내에는 정세포의 변성 및 탈락이 관찰되었으며, 타원형 정자세포가 서로 융합하여 다형핵거대세포 모양의 구조를 이루어 정세관내강으로 탈락되어 있었다(Fig. 2-3-39). 심한 경우 정세관내강의 대부분이 탈락된 정세포들로 차 있었으며, 일부 정세관에서는 Sertoli세포가 기저막으로부터 탈락되어 소실된 것도 관찰되었다. 변성된 정세포의 핵은 농축되어 진하게 나타났으며, 세포질은 심하게 팽창되어 나타났다(Fig. 2-3-40). Sertoli 세포의 세포질은 정세포들이 탈락되어 형성된 것으로 생각되는 다수의 공포가 관찰되었다. 간질에서도 간질세포핵의 농축, 공포화가 관찰되었으며, 세포질도 공포화와 팽창 소견이 관찰되었다. 용량이나 투여 후 시간의 경과에 따른 큰 차이는 관찰되지 않았으며, 변성부위도 투여부위 주위에서만 나타났으며, 투여부위에서 먼 부위에서는 정상소견을 보였다.

4. 고찰 및 결론

사람이나 실험동물에서 고환의 독성을 검사하는 방법은 고환, 부고환, 부속생식선의 형태적, 기능적, 병리조직학적 검사 및 정액, 호르몬치, 수태능력의

검사등 여러 가지가 있다³⁸⁻⁴⁰⁾. 이전의 지침서에서는 수컷의 생식기능을 검사하는 방법중 수태능력을 가장 중요하게 간주하였으나 최근에는 생식의 이상을 초기에 민감하게 알아낼 수 있는 방법으로 병리조직학적 검사의 중요성을 강조하고 있다⁴⁾. 많은 연구자들이 생식기능 이상을 검사하는 데 수태능력시험이 상대적으로 덜 정확한 검사법이라고 하였으며⁴¹⁻⁴³⁾, Takayama등⁴⁴⁾은 잘 알려진 14개의 고환독성물질에 대해 연구하여 병리조직학적 검사가 가장 민감하고 신뢰할 만한 결과를 준다고 하였으며, 수태능력의 검사는 덜 민감한 방법이라고 하였다. 고환의 병리조직학적 검사에 의한 독성평가는 질적인 평가⁴⁵⁻⁴⁹⁾와 양적인 평가⁵⁰⁻⁵³⁾로 분류할 수 있다. 질적인 평가는 Leydig세포의 형태, 혈관의 이상, 간질액의 증감, 정세관내로 간질세포의 침윤등 간질의 검사, 정세관 기저막의 이상, 변성된 정세관의 검사, 다형핵 거대세포의 존재, Sertoli세포의 이상, 정자방출의 지연, 특정 정세포의 소실, 정세포 발달의 이상, 정세관 내강의 소실, Sertoli세포내의 지방함량 증가, Sertoli 세포에 의한 barrier이상 등을 관찰함으로써 고환의 독성을 평가하는 것이다. 양적인 평가는 고환의 무게, 수태능력의 검사³⁹⁾, 정세관 직경 측정, 정자생산량 측정, 정세관 구성세포의 비율검사, 형태학적인 방법으로 세포수 측정⁵⁴⁾, 변성된 정세관의 비율측정 등에 의한 방법으로 고환의 독성을 평가하는 것이다¹¹⁾. 따라서 고환의 독성을 정확하게 평가하기 위해서는 질적인 평가와 양적인 평가를 종합적으로 실시한 관찰이 필요하다. 본 시험에서도 병리학적 검사에 의해 2-BP에 의한 고환의 독성발현 양상을 확인할 수 있었으며, 양적인 검사로서 flow cytometry검사를 실시하여 정세포의 비율을 측정한 결과도 병리학적 검사와 유사한 결과를 보였다. 따라서 질적인 검사와 양적인 검사를 병행하면 고환의 독성을 작은 변화라도 정확하게 평가할 수 있다고 사료된다.

포유류에서 정세포의 변성은 정자발생과정중에 정상적으로도 발생하며⁴⁶⁾, 환경적 요인, 즉, 열, 방사선, 허혈, 세포독성물질에 노출되었을 경우 발생한다⁵⁵⁾. 고환의 정세관 상피세포에 장애를 일으키는 물질은 대략 다섯가지의 기전으로 그 독성을 나타낸다. 첫째, 정세관상피세포에 직접 영향을 미치는 물질로 정세포에서의 단백질합성을 억제하거나 Sertoli세포에 장애를 유발하여 독성

을 야기한다. Cyclophosphamide, procarbazine, adriamycin 등과 같은 alkylating agent는 핵산의 합성을 억제함으로써 유사분열을 방해하여 정조세포나 정자세포의 괴사를 야기하며, nitrobenzene, 1,3-dinitrobenzene, phthalate esters, 2,5-hexanedione 등은 Sertoli 세포에 영향을 주어 정세관상피 세포의 장애를 초래한다. 둘째, 호르몬에 이상을 야기하여 간접적으로 spermatogenesis에 영향을 야기하는 것으로 4가지 기전에 의해 작용한다. (1) 표적세포에서 androgen의 생산과는 상관없이 그 작용을 억제함으로써 작용하는 antiandrogen으로서 cyproterone acetate가 해당한다. (2) Leydig 세포에서 steroid 합성이나 대사작용에 이상을 야기하여 테스토스테론의 합성을 억제하는 물질로 ethane-1,2-dimethanesulfonate, spiromolactone, aminoglutethimid 등이 속한다. (3) gonadotropin의 분비를 억제함으로써 작용하는 물질로 시상하부나, 뇌하수체로부터 호르몬의 방출을 억제하며, estrogen, androgen, progestogen 같은 물질이 이에 해당한다. (4) prolactin의 생성을 자극하는 물질로서 reserpine, haloperidol, sulpyrife 등은 dopamine의 작용을 차단하여 hyperprolactinemia를 일으켜 혈중 테스토스테론치를 감소시켜 고환의 위축을 야기한다. 셋째, 직접 또는 간접적으로 정자에 영향을 주어 정자의 수정능력 소실이나 사멸을 일으키는 물질로 chlorhydrin은 수출관내에서 정자의 ATP치를 감소시킴으로써 수정을 하지 못하게 하며, methyl chloride는 부고환 상피세포에 급성염증을 야기하여 정자의 이상을 야기한다. 넷째, 순환장애를 일으켜 고환의 독성을 야기하는 것으로 고환실질의 광범위한 괴사를 일으키며, cadmium과 같은 중금속이 이에 해당한다. 다섯째, 기타 비타민 A 또는 아연 결핍과 같은 영양부족에 의해서도 고환의 장애가 일어난다^{4,56-58}). 이와 같은 분류로 볼 때 본 시험에 사용된 2-BP는 정조세포에만 변성을 초래하였으며, 기타 정모세포, 정자세포, Leydig 세포 및 Sertoli 세포에는 큰 변화를 야기하지 않아 정세포에 직접 작용하는 독성을 발현하는 것으로 사료된다.

할로젠 화합물들은 여러종류가 있으며, 이들은 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 고환의 DNA에 손상을 일으킨다고 하였다⁵⁹). 또한 할로젠의 위치와 수에 따라 독성효과가 다르며, 3개의 할로젠을 가진 알칸으로 브롬이 두 개 이상인 것이 가

장 독성이 강하다고 하였다. 그리고 첫 번째에 브롬을 가진 것이 염소(Cl)를 가진 것보다 독성이 강하다고 하였으나 첫 번째, 두 번째에 브롬을 가지고 세 번째에 할로젠을 가지지 않은 1,2-dibromopropane은 독성이 없다고 하였다^{59,60}. 이 결과에 비추어 볼 때 2-BP는 브롬이 하나로서 구조적으로 독성이 강하지 않으며, 본 시험에서도 체중 kg당 5g을 3회 경구투여한 후에 사망동물이 없어 독성은 매우 약한 것으로 나타났으나 다른 할로젠 화합물들과 마찬가지로 고환에 대해서는 독성을 나타내었다. 이들 할로젠 화합물들은 간에서 glutathione과의 결합에 의해 mercapturic acid로 대사되며⁶¹, 1-halogenopropanes은 N-acetyl-S-n-propyl-L-cysteine와 같은 n-propylmercapturic acid, 2-hydroxypropylmercapturic acids 및 n-propylmercapturic acid sulfoxide로서 신장을 통해 배설되며, 2-BP의 경우에는 sulphur함유 대사산물이 매우 소량이라고 하였다⁶². 이 이외에 3-bromopropionic acid, N-acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cysteine, N-acetyl-S-(2-carboxyethyl)cysteine 등으로 대사된다⁶¹. Omichinski등⁶³에 의하면 배양된 고환세포는 DBCP를 DNA손상 유발물질로 변환시킬 수 있다고 하였으며, 이는 diethylmaleate에 의해 현저히 억제된다고 하였다. 즉, 고환세포를 DBCP와 함께 배양하면 1,3-bis(S-glutathionyl)-propan-2-ol과 S-(2,3-dihydroxypropyl) glutathione이 형성되며, 또한 소량의 S-(3-chloro-2-hydroxypropyl) glutathione이 형성되었다. 따라서 DBCP에 의한 고환의 독성 발현기전은 고환에서 DBCP가 glutathione S-transferase에 의해 대사되어 episulfonium ion이 생성되고 이것이 DNA에 작용하여 DNA strand의 단절을 일으키며, poly(ADP-ribosyl)transferase가 활성화됨으로서 세포내 NAD⁺가 고갈되어 세포내 변화를 초래하여 결국에는 세포의 괴사에 이른다고 하였다⁵⁹. *In vivo*에서도 Pearson⁶⁶이 DBCP는 glutathione S-transferase에 의해 대사활성화되어 DNA의 손상을 유발한다고 보고하였으며, Holme 등⁶⁵과 Lag 등¹⁹도 유사한 보고를 하였다. Lag 등¹⁹은 DBCP, 1,3-dibromo-2-chloropropane, 1-bromo-2,3-dichloropropane, 1,3-dichloro-2-bromopropane, 1,2,3-tribromopropane은 고환의 DNA 손상을 유발하였으며, 1,2-dibromopropane은 DNA손상을 유발하지 않았다고 하였다. 따라서 일반적으로 이들 할로젠화합물

들의 세포변성은 DNA의 손상으로부터 시작된다고 하였다. 그러나 이들과 유사한 화합물인 2-BP에 관한 보고는 없어 같은 기전에 의해 고환에서 독성을 유발하는지는 알 수 없으나 본 시험에서 고환에 독성을 유발한 것으로 보아 다른 할로젠화합물과 유사한 기전으로 추측되나 되나 본 시험에서는 투여용량이나 투여방법에 따라 병변의 발생양상에 차이가 있어 이를 명확히 알 수 없었다. 또한 고환내로 직접 시험물질을 투여하여 관찰한 결과, 매체대조군과 5 μ l 투여군에서는 정세포에 큰 변화가 없었으나 10 μ l 이상 투여군에서는 정자형성단계와 정세포의 종류에 관계없이 세포의 변성 및 탈락이 관찰된 점으로 보아 표적정세포인 정조세포에 대한 독성은 대사활성에 의해 나타날 가능성이 있는 것으로 사료되며, 앞으로 2-BP의 독성발현에 있어서 대사활성에 관한 연구가 더 필요하다. 고환내로 시험물질을 직접 투여하는 방법에 관하여 Russell등¹¹⁾은 소량의 시험물질을 이용하여 독성을 쉽게 검사할 수 있으며, 시간이 단축되고 비용이 절감되며, 또한 시험물질이 대사에 의해 독성을 발현하는지 직접 정세포에 작용하는지를 알 수 있고 다른 장기에 독성이 강하여 고환에 독성을 나타내는데 필요한 용량을 전신적으로 투여할 수 없는 경우에 이용할 수 있다고 하였다. 그러나 본 시험에서와 같이 표적세포를 찾기가 쉽지 않으며, 시험물질의 용매에 의한 변화를 간과할 수 없다. 또한 병변이 정세관에 전체적으로 관찰되지 않고 투여부위에 국한되며, 시험물질이 대사에 의해 독성을 나타내는 경우 이를 알아내기가 용이하지 않다⁶⁶⁾. 그러나 제한적이거나 빠르고 간편하게 고환의 독성을 평가하는 방법으로는 유용하다고 사료된다.

위축된 고환의 회복에 관하여는 Shemi 등⁶⁷⁾이 랫드에 DBCP를 20mg/kg/day로 주 1회, 3주간 복강투여한 결과, 3-7주사이에 70% 가량의 동물에서 정세관의 손상이 관찰되었고, 27주 후에는 53%의 동물에서 부분적으로 회복되었으며, 일부 변성이 더 진행되는 동물도 있다고 하였다. 반면 Saegusa⁶⁸⁾는 랫드에 DBCP를 10, 30, 100mg/kg/day의 용량으로 주 2회, 12주간 투여한 후 12주, 24주, 48주에 각각 관찰한 결과 정세관의 위축이 용량상관성있게 나타났으며, 이 변화는 부검시기와 관계없이 관찰되었다고 하였다. 따라서 낮은 용량의 DBCP를 반복투여하면 위축된 고환은 회복이 불가능해지며, 이는 DBCP의 축

적에 의한 영향이라고 하였다. Leone 등⁶⁹⁾도 랫드에 DBCP를 10mg/kg/day로 2주간 피하투여한 군에서는 정세관의 회복이 관찰되지 않았으며, 같은 용량으로 단회투여한 군에서는 12주 후에 70%의 정세관에서 회복이 되었다고 하였다. 또한 Kaplanski 등²⁴⁾은 랫드에 DBCP를 50 mg/kg으로 단회 피하투여하여 관찰한 결과 전신적인 병변은 시간의 경과에 따라 감소하였으나 고환의 병변은 증가하였다고 하였다. 본 시험에서는 3회 투여 후 10주간 관찰한 결과 병변은 시험의 경과에 따라 증가하였으며, 42일 후에 현저한 회복이 관찰되었으나 70일 후에는 다시 회복되는 정세관의 수가 감소하여 Shemi 등⁶⁷⁾, Leone 등⁶⁹⁾ 및 Kaplanski 등²⁴⁾의 보고와 어느정도 일치하는 결과를 보였다. 0.5 g/kg/day의 용량으로 8주간 경구투여한 경우에는 거의 정세관의 회복이 관찰되지 않아 Saegusa⁶⁸⁾의 보고와 유사한 결과를 보였다. 따라서 이들 할로겐화합물들에 의한 정세관 손상의 회복에 관해서는 시험기간이나 시험방법이 달라 정확한 비교는 어려우나 투여용량, 투여기간 및 회복기간 등에 따라 정세관의 재생여부가 결정되는 것으로 보인다. 따라서 2-BP의 정세관의 회복에 관해서는 용량, 투여기간 및 회복기간에 따른 비교연구가 필요하며, 또한 시험물질 투여의 종료 후에도 정세관내에서 정세포의 지속적인 변성이 관찰되어 시험물질의 잔류독성이나 생리학적 이상을 유발하여 지속적인 병변을 야기하는 것으로 사료되는데 이를 명확히 하기 위해서는 추가적인 시험이 요망된다.

Blood-testis barrier의 이상은 전자투과도가 낮은 물질이나 tracer를 이용하여 이들 물질이 정세관내로 들어가는지 또는 차단되는 지를 확인함으로써 쉽게 관찰할 수 있다. 이에 가장 많이 이용되는 물질은 lanthanum^{71,72)}과 horseradish peroxidase⁷⁰⁾로서 여러 연구자들에 의해 사용되고 있다. 그러나 이런 형태학적인 검사는 이러한 물질보다 분자량이 더 적은 물질들이 통과할 수도 있기 때문에 blood-testis barrier의 정확한 방법은 아니지만 매우 유용하다고 여겨진다. 또한 고장액을 이용한 관찰은 dextrose나 sucrose를 이용하여 고정액을 고장액으로 만들어 고환을 관류고정하여 정세관의 변화를 관찰하는 방법으로 blood-testis barrier의 이상을 쉽게 알아볼 수 있는데 blood-testis barrier가 이상이 없을 경우에는 기저막주위에만 위축이 일어나며, 정세관내의

세포에는 변화가 없으나 blood-testis barrier에 이상이 있을 경우에는 고장액이 정세관내로 들어가기 때문에 정세관내강의 정세포에 위축이 일어나 정세포가 서로 분리되어 나타난다⁷³⁾. Weber등⁷⁴⁾은 이 이외에도 filipin, 정세포에 대한 항체, ³H-inulin 등을 이용하여 blood-testis barrier를 관찰하였다. 본 시험에서는 가장 많이 이용되는 lanthanum과 고장액을 이용하여 2-BP에 의한 blood-testis barrier의 이상을 관찰한 결과, 단기투여군(3.5 g/kg/day)에서 lanthanum이나 고장액에 의해 Sertoli 세포 연접을 관찰한 결과 큰 변화는 관찰되지 않았으며, 전자현미경적으로 관찰한 미세구조에도 큰 변화가 없어 이 물질은 Sertoli 세포에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. 이는 Shemi⁷⁵⁾등이 랫드에 DBCP를 50 mg/kg/day로 피하투여한 결과 Sertoli세포에는 변화가 없다고 한 바 있어 같은 결과를 보였다. 그러나 본 시험에서 투여후 14일째 이후에 IX-XI기의 정세관에서 정자의 방출 지연이 관찰되었다. 정자의 방출지연은 정세관에 이상이 있을 경우 관찰되며^{76,77)}, 자연적으로도 발생하나^{46,77)} 아직 그 발생 원인은 명확하지 않다. Sertoli세포는 비정상적인 정자세포를 탐식하는 기능을 하는데 이와 관련된 소견으로 판단되나 Sertoli세포에 이상이 있을 경우 정상적인 정자세포를 탐식한다는 것이 알려져 있어¹¹⁾ 이에 관해서는 자세한 연구가 요망된다. 한편, 5g/kg/day을 3회 투여한 경우에는 Sertoli 세포, Leydig 세포, 정세포의 미세구조변화를 관찰한 결과, Sertoli세포에서는 핵의 모양이 매우 불규칙하게 나타났으며, 세포질내에서 공포가 다수 관찰되었다. 또한 정모세포의 변성 및 정자세포에서는 핵의 중앙부가 투명하게 관찰되었고 다핵거대세포도 나타나 용량에 따른 독성발현 양상의 차이를 보였다. 이러한 결과는 Sertoli세포가 표적세포인 경우에 Sertoli 세포의 변화는 세포질의 공포화, 핵의 공포화로 나타나고, 결국 불특정한 정세포가 변성되는 다른 연구결과와 일치하였다⁴⁹⁾. 이들 할로젠 화합물들 중에서 DBCP를 제외한 다른 화합물들에 대한 보고가 없어 화합물간에 비교하기는 어려우나 이런 독성발현양상의 차이는 구조가 유사한 시험물질이라도 투여용량이나 시험기간, 투여경로 등의 다른 요인에 의해 나타날 수 있다고 사료된다. 그러나 2-BP의 용량에 따른 독성발현양상의 차이에 대해서는 시험물질의 대사나 호르몬, 전신적인 이상에

의한 이차적인 변화 등을 고려한 연구가 더 필요하다.

고환에서 Leydig 세포의 변화는 호르몬의 이상 또는 독성물질의 자극등에 의해 가능하다. Leydig세포의 변화에 관해서는 Johnson등⁷⁸⁾이 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)에 의해 정자형성에는 큰 변화없이 Leydig 세포의 수가 용량상관성 있게 감소하였음을 보고한 바 있다. 반면 고환의 위축이 있는 경우 Leydig 세포의 증식이 관찰되는 경우가 많으며, 여러 연구자들이 이를 관찰하여 보고한 바 있다^{79,80)}. Mitsumori등⁸¹⁾은 nitrobenzene에 의한 간질의 증식을 관찰하였으며, Lui등⁸²⁾은 DBCP투여에 의해 정세관 상피세포의 위축과 더불어 간질의 증식이 나타난다고 하였다. Jonsz와 Pomeranz⁸³⁾, Kerr 등⁸⁴⁾, Sod-Moriah등²³⁾도 같은 결과를 보고한 바 있다. 반면 Leone등⁶⁹⁾은 10mg/kg을 2주간 피하투여한 경우와 단회 투여한 경우에서 Leydig세포의 큰 변화를 관찰하지 못하였다고 하여 차이를 보였다. Mendis-Handagama⁸⁵⁾는 17 β -estradiol을 16주간 투여한 후 Leydig세포의 변화를 여러가지 관찰방법으로 비교하여 관찰방법에 따라 차이가 있음을 보고한 바 있다. 이는 고환의 위축에 따라서 간질이 상대적으로 수축되어 수가 증가한 것처럼 보일 수도 있는 변화로서 시험물질에 의한 영향이 아닐 수도 있으나 이에 관련된 연구는 많지 않다. 그러나 본 연구에서는 2-BP에 의해 단기투여시험의 말기와 장기투여시험군에서 모두 Leydig세포의 수가 증가된 소견이 관찰되었으며, 간질에서 PCNA 양성반응 세포의 증가가 관찰되어 이를 이용하여 Leydig세포의 증가를 간접적으로 증명할 수 있었으며, 고환의 위축에 따른 상대적인 간질의 변화가 아님을 알 수 있었다. Naka등⁸⁰⁾은 ethanedimethanesulfonate(EDS)에 의한 Leydig세포의 변화를 BrdU를 이용하여 관찰한 결과 양성반응세포는 mesenchymal cell로서 이들 세포가 분열하여 Leydig세포로 된다고 하였으며, 이들 세포는 주로 정세관 주위에서 관찰되었다고 하였다. 그러나 본 연구에서 양성반응을 보인 세포는 핵이 난원형으로 Leydig 세포와 형태가 유사하였으며, 주로 간질의 중앙부에서 관찰되어 차이를 보였다. 이러한 차이는 EDS는 Leydig세포를 완전히 소실시키나 2-BP는 직접적으로 독성이 없기 때문에 나타나는 차이로 사료되며, 이에 관해서는 앞으로 더 연구해야 할 필요가 있다.

이들 Leydig세포는 정세포의 분화와 성장에 매우 중요하기 때문에 정세포가 현저히 감소한 경우 이들 세포가 증식되어 정세포의 분열을 자극하는 것으로 이는 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있으며⁸⁰⁾, 본 연구에서도 같은 결과를 얻었다.

PCNA는 분자량이 36kD이며, DNA 복제에 관여하는 DNA polymerase delta의 보조단백질로서⁸⁶⁾ G1기에 합성되기 시작하여 S기에 최고에 달하고 G2와 M기에 감소한다⁸⁷⁾. 따라서 PCNA는 세포의 증식과 DNA의 합성과 직접적인 관련이 있다. 따라서 전암병변이나 종양의 진단에 많이 사용되고 있다⁸⁸⁻⁹²⁾. 본 시험에서 이를 이용한 정세관의 염색결과 정조세포와 초기의 정모세포에서 양성반응세포가 관찰되어 Santamaria등⁹³⁾의 보고와 일치하였다. 정세관내에서 양성반응 세포를 관찰한 결과 시험의 경과에 따라 양성 반응세포의 수가 감소하는 경향을 보였고 재생이 관찰되는 42일 후에는 현저한 증가가 인정되었으며, 70일 후에는 양성반응세포의 감소가 인정되어 양성반응세포의 변화에 따라 정세포의 독성변화진행 과정 및 표적세포를 추적할 수 있었다. 이러한 결과는 H-E염색 소견과 일치하는 것으로서 PCNA 항체를 이용한 면역조직화학적 염색은 고환의 독성시험에서 소실된 정세포를 쉽게 알아 볼 수 있는 방법으로 특히 정조세포와 정모세포를 표적세포로 하는 물질의 독성평가에 매우 유용함을 알 수 있었다.

Flow cytometry(FCM) 검사는 환경적 또는 직업적으로 독성물질에 노출되거나 의약품에 의한 치료시 나타나는 고환의 독성변화를 신속하고, 민감하게 검사할 수 있다⁹⁴⁾. FCM검사는 세포의 크기, cytoplasmic granularity, 핵의 모양 및 형광물질의 광도에 따라 세포질내 지방(Nile red)이나 핵(Hoechst 33342)의 DNA함량 등을 측정할 수 있으며, surface-bound marker를 항체나 fluorescent-tagged ligands를 이용해 측정할 수 있다⁹⁵⁾. 또한 소량의 sample로 측정이 가능하며, 신속하게 검사할 수 있다⁹⁶⁾. 고환은 정세포의 성숙단계에 따라 DNA함량이 달라지기 때문에 정세관상피세포의 연구에 FCM는 매우 유용하며, 이를 이용한 고환 이상의 검사는 여러연구자들에 의해 사람^{37,94,96-98)}과 동물⁹⁹⁻¹⁰²⁾에서 많이 이루어 졌다. FCM를 이용하여 정세포를 히스토그램으로 나

타별 경우 대개 haploid, diploid, tetraploid의 3개 주요 peak로 나타난다. Haploid는 정자세포와 정자로 구성되어 있고 diploid에는 정조세포(G1 기), 세사전기 정모세포, 이차정모세포 및 Sertoli 세포, Leydig세포, 결합조직 세포등으로 구성되어 있으며, tetraploid에는 정조세포(G2 기), 세사기, 세사전기의 일차정모세포로 구성되어 있다. S기의 세포들은 diploid와 tetraploid사이의 peak에 나타난다^{94,97}). 따라서 독성물질 또는 다른 원인에 의해 정세관의 이상이 야기된 경우 DNA ploidy의 구성에 이상이 나타나기 때문에 FCM을 이용하여 화학물질에 의한 정자형성에 미치는 영향을 쉽게 검사할 수 있으며, 또한 시간의 경과에 따른 변화를 측정함으로써 표적세포를 추적할 수 있다^{99,102}). 본 시험에서도 2-BP의 단기투여(3.5g/kg/day)에 의한 고환의 독성을 평가하는데 FCM을 이용하여 관찰한 결과, 시험초기에 diploid, tetraploid 세포의 감소가 나타났으며, 42일째에는 diploid와 tetraploid 세포의 증가가 관찰되었다. 70일째에는 다시 diploid와 tetraploid 세포의 감소가 관찰되어 병리조직학적 소견과 일치하는 결과를 보였다. 따라서 FCM를 이용한 2-BP의 고환독성 검사는 매우 유용함을 확인할 수 있었으며, FCM에 의한 고환의 DNA ploidy검사는 병리학 적 검사를 뒷받침해 주거나 또는 병리조직학적 검사전에 독성을 신속하게 알아볼 수 있는 방법으로서 많은 도움을 준다고 사료된다.

결론적으로 2-BP는 blood-testis barrier의 이상없이 정조세포의 변성을 유발하고, 정조세포의 변성이 정모세포, 정자세포의 소실을 야기함으로써 정자형성에 이상을 유발하였으며, 정자형성의 이상에 의한 고환의 위축은 투여정지 70일 후에도 완전히 회복되지 않았다. 또한 용량에 따라 그 독성 발현양상에 차이를 나타내어 2-BP를 고용량으로 투여한 경우에는 정자형성단계나 정세포의 종류에 관계없이 변성을 유발하였으며, Sertoli세포에도 변성을 유발하였다.

5. Legends for Figures

Fig. 2-3-1. Scheme of rat spermatogenesis.

Fig. 2-3-2. Photomicroscopic finding of the testis shows severe atrophy comparing with normal(N). 42 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Scale=3cm.

- Fig. 2-3-3. Photomicroscopic finding of the epididymis shows severe atrophy comparing with normal(N), 42 day after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Bar=1cm.
- Fig. 2-3-4. Normal seminiferous tubule in stage I. 15St; step 15 spermatid, S; Sertoli cell, Sc; spermatocyte, Sg; spermstogonia. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-5. a,b; seminiferous tubules in stage I have degenerating spermatogonia(\uparrow). 1 day after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-6. Normal seminiferous tubule in stage VII. P;pachytene spermatocyte, PL; preleptotene spermatocyte. H-E stain. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-7. Seminiferous tubule in stage VII shows depletion of preleptotene spermatocytes. P; pachytene spermatocyte, St; step 7 spermatid. 5 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. PAS. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-8. Normal seminiferous tubule in stage X. P; pachytene spermatocyte, L; leptotene spermatocyte. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-9. a; seminiferous tubules in various stages show depletion of spermatogonia and early spermatocytes, and spermatid retention in stage IX. Arrow; residual body. Bar=20 μ m. b; seminiferous tubule in stage X shows spermatid retention. P; pachytene spermatocyte, arrow heads; step 19 spermatids. 7 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-10. Seminiferous tubule in stage VII shows complete delpletion of spermatocytes. 14 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-11. Seminiferous tubule shows delpletion of spermatocytes and round spermatid and regenerating spermatogonia. 28 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-12. Epididymal tubules show oligospermia or aspermia. 28 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-13. Seminiferous tubules show complete delpletion(*) or regeneration(\uparrow) of germ cells. 42 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=20 μ m.

- Fig. 2-3-14. Seminiferous tubules show complete depletion of germ cells and Leydig cell hyperplasia. 70 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=20 μ m.
- Fig. 2-3-15. Seminiferous tubule shows regeneration of germ cells and degenerating multinucleated giant cells(\uparrow). 70 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-16. Epididymal tubules show oligospermia and exfoliated germ cells. 70 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-17. Atrophy and vacuolation of spermatogonia by hypertonic fixative without detachment of spermatocytes, and spermatid from the Sertoli cells. 1 day after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Toluidine blue, Bar=10 μ m.
- Fig. 2-3-18. Electron micrograph of normal seminiferous tubule in stage IV. Spermatogonia(Sg), step 4 spermatid(St) and Sertoli cells(Se) in the stage IV. Bar=2 μ m.
- Fig. 2-3-19. a,b,c; electron micrograph of degenerating spermatogonia show extensive heterochromatin, chromatin margination, or pyknosis. 1 day after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Bar=2 μ m.
- Fig. 2-3-20. Electron micrograph of interstitium shows normal appearance. 1 day after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. L; Leydig cell. Bar=4.66 μ m.
- Fig. 2-3-21. Electron micrograph of interstitium shows normal appearance. 70 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. L; Leydig cell. Bar=3.18 μ m.
- Fig. 2-3-22. Electron micrograph of severe atrophic seminiferous epithelium. Note the presence of an infolded Sertoli cell(S) nucleus, convoluted basement membrane(\uparrow). M; myeloid cell. 70 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Bar=4.66 μ m.
- Fig. 2-3-23. Lanthanum particle is deposited between the Sertoli cell and spermatogonia(Sg), Sc; Spermatocyte, M; myeloid cell. 1 day after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Bar =3.18 μ m.
- Fig. 2-3-24. Normal seminiferous tubules in various stages. Spermatogonia(arrow head) spermatocytes(\uparrow) show positive reaction for PCNA antibody. Immunohistochemical stain for

PCNA antibody. Bar=20 μ m.

- Fig. 2-3-25. Seminiferous tubules in stages VI-VII show depletion of PCNA positive cells. 5 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Immunohistochemical stain for PCNA antibody. Bar=20 μ m.
- Fig. 2-3-26. Seminiferous tubules in stages XIII and III have PCNA positive cells. 7 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Immunohistochemical stain for PCNA antibody. Bar=20 μ m.
- Fig. 2-3-27. Seminiferous tubules in stages I-III have PCNA positive cells. 14 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Immunohistochemical stain for PCNA antibody. Bar=20 μ m.
- Fig. 2-3-28. Seminiferous tubules show increased PCNA positive cells. 28 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Immunohistochemical stain for PCNA antibody. Bar=20 μ m.
- Fig. 2-3-29. Seminiferous tubules show markedly increased PCNA positive cells. 42 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Immunohistochemical stain for PCNA antibody. Bar=20 μ m.
- Fig. 2-3-30. a; numerous interstitial cells show PCNA antibody positive reaction(\uparrow), Bar=20 μ m. b,c; high magnification of PCNA positive cells. 70 days after 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Immunohistochemical stain for PCNA antibody. Bar=10 μ m.
- Fig 2-3-31. Relative proportions of cells with haploid, diploid and tetraploid states of DNA ploidy in the testicular cell suspensions of the Sprague-Dawley rats treated with 3.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for once daily 3 consecutive days. a. control. b. 3 day after the completion of administration, showing proportions of decreased diploid cells. c. 5 days after, showing proportions of decreased diploid and tetraploid cells. d. 7 days after, showing proportions of decreased diploid and tetraploid cells. e. 14 days after, showing proportions of decreased diploid and tetraploid cells. f. 28 days after, showing proportions of markedly decreased diploid and tetraploid cells. g. 42 days after, showing proportions of markedly increased diploid and tetraploid cells. h. 70 days after, showing proportions of decreased diploid and tetraploid cells comparing with g.
- Fig. 2-3-32. Seminiferous tubules in various stages show depletion of spermatogonia and early spermatocytes or severe exfoliation and

degeneration of germ cell, and cytoplasmic vacuolation of Sertoli cells. 1 day after 5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=20 μ m.

Fig. 2-3-33. Seminiferous tubules show severe degeneration and exfoliation of germ cell, and cytoplasmic vacuolation of Sertoli cells. Arrow ; exfoliated multinucleated giant cells. 7 days after 5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. H-E. Bar=20 μ m.

Fig. 2-3-34. Electron micrograph of seminiferous tubule shows degenerating spermatocytes(↑) and Sertoli cell(S). Sertoli cells show irregular shape of nucleus and cytoplasmic vacuolation. Spermatocyte shows a extensive heterochromatin. 1 day after 5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Bar =2 μ m.

Fig. 2-3-35. Electron micrograph of multinucleated giant cell formed by degenerating spermatids. 7 day after 5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 3 consecutive days. Bar =2 μ m.

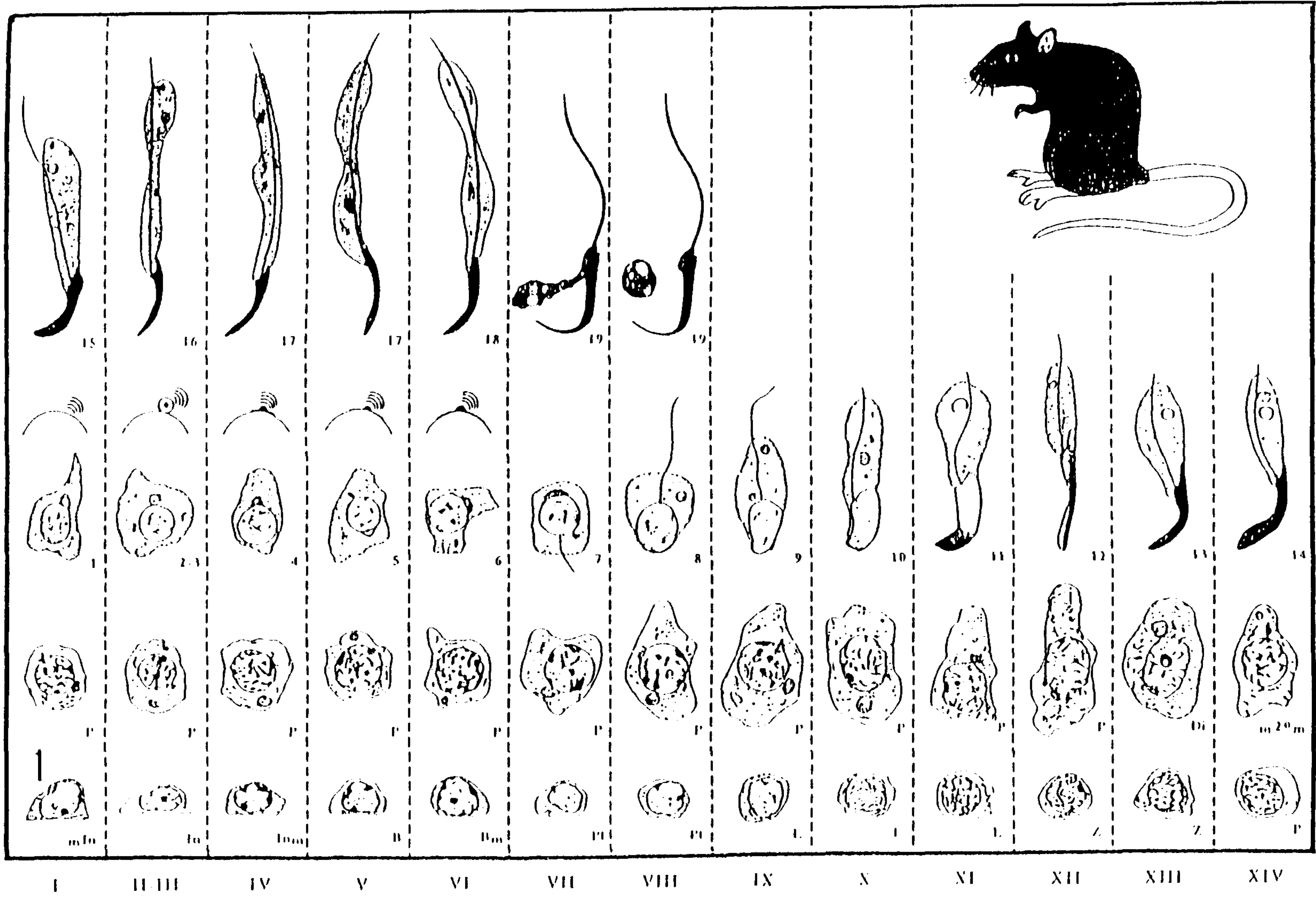
Fig. 2-3-36. Seminiferous tubules show complete depletion of germ cells(*) or degeneration of spermatids(↑), and interstitium shows Leydig cell hyperplasia with eosinophilic materials. 8 weeks after 0.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 8 consecutive weeks. H-E. Bar =20 μ m.

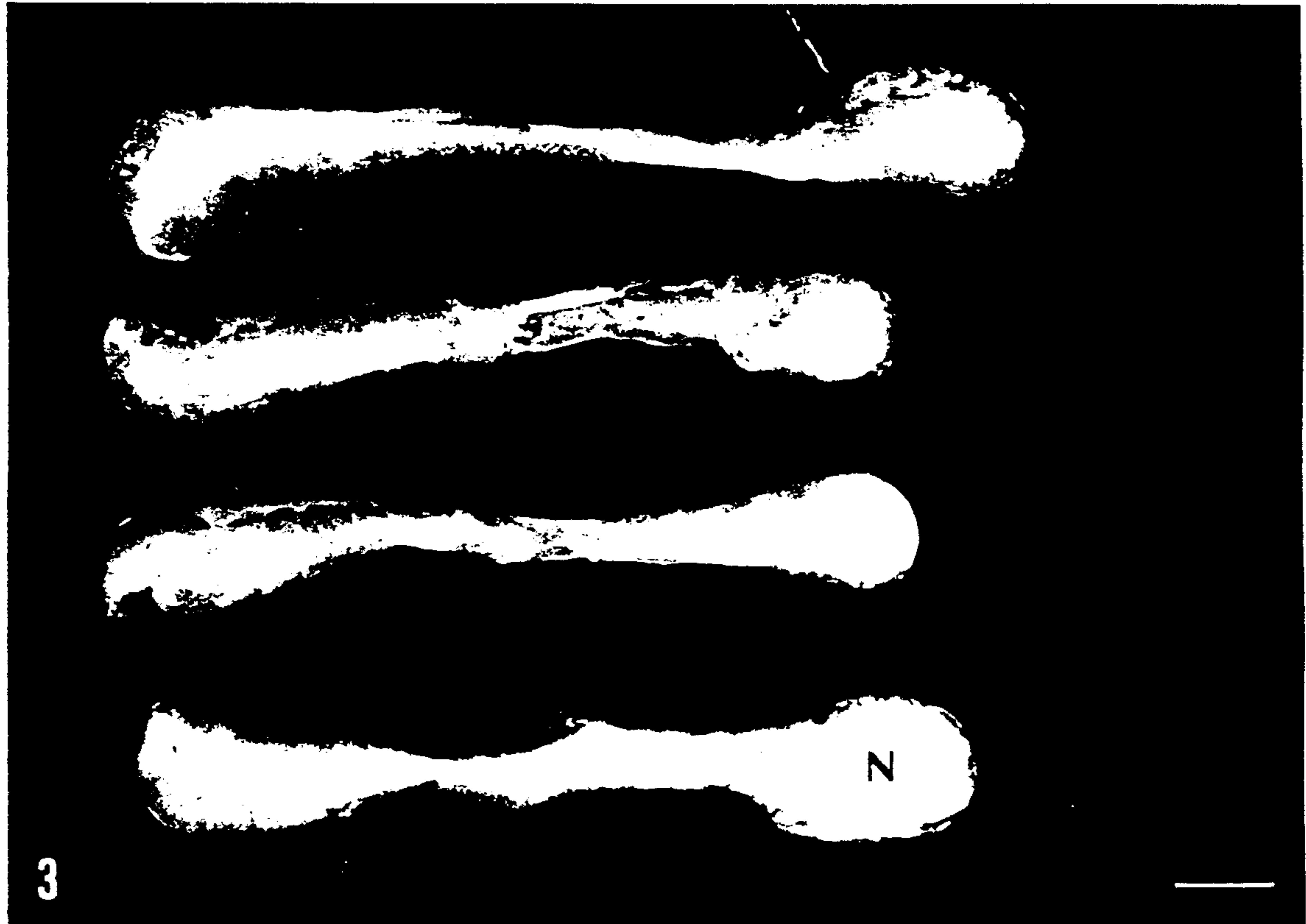
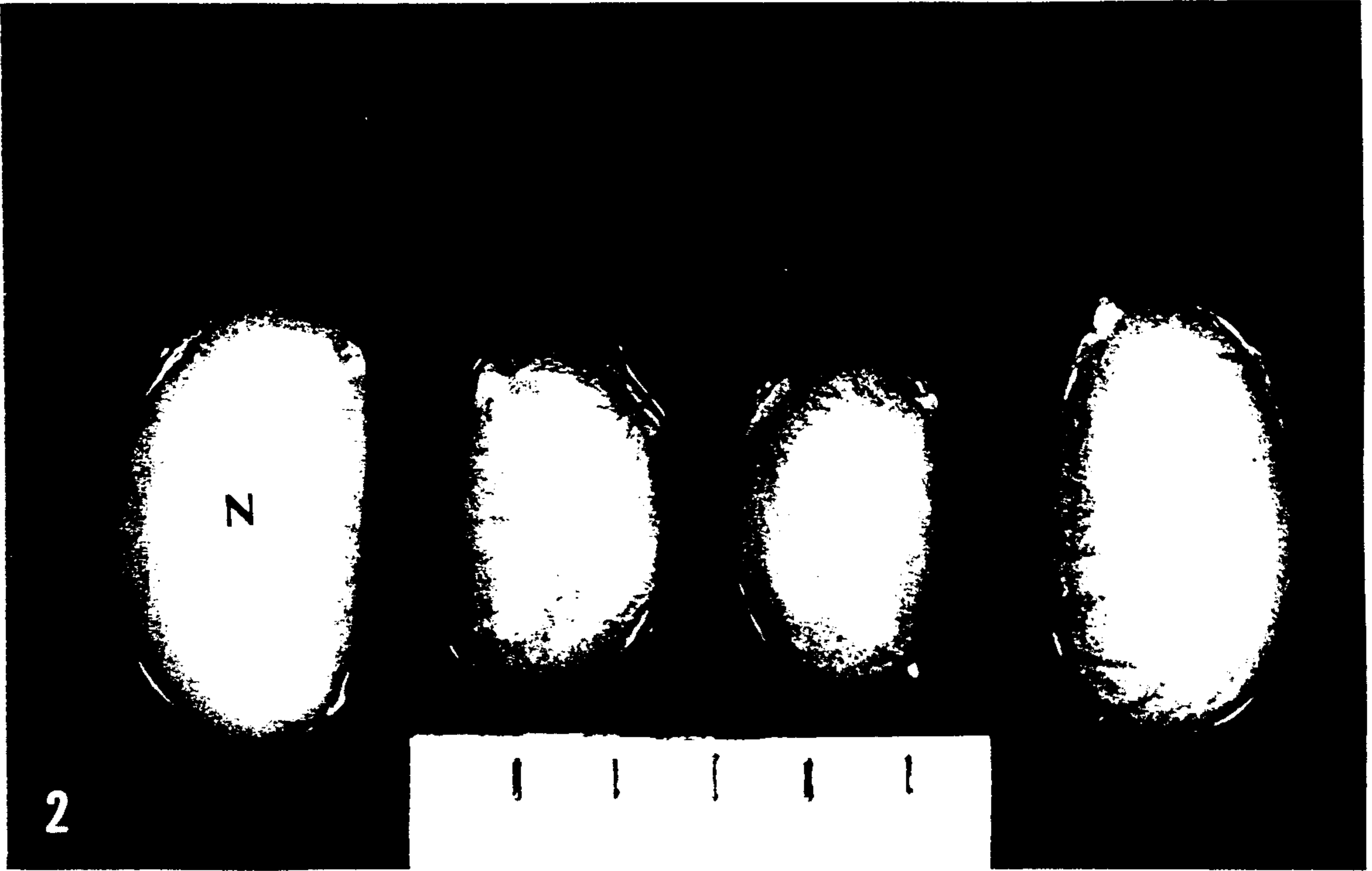
Fig. 2-3-37. Epididymal tubules show oligospermia and exfoliated germ cells(↑) in lumen. 0.5g/kg/day gavage of 2-bromopropane for 8 consecutive weeks. H-E. Bar=10 μ m.

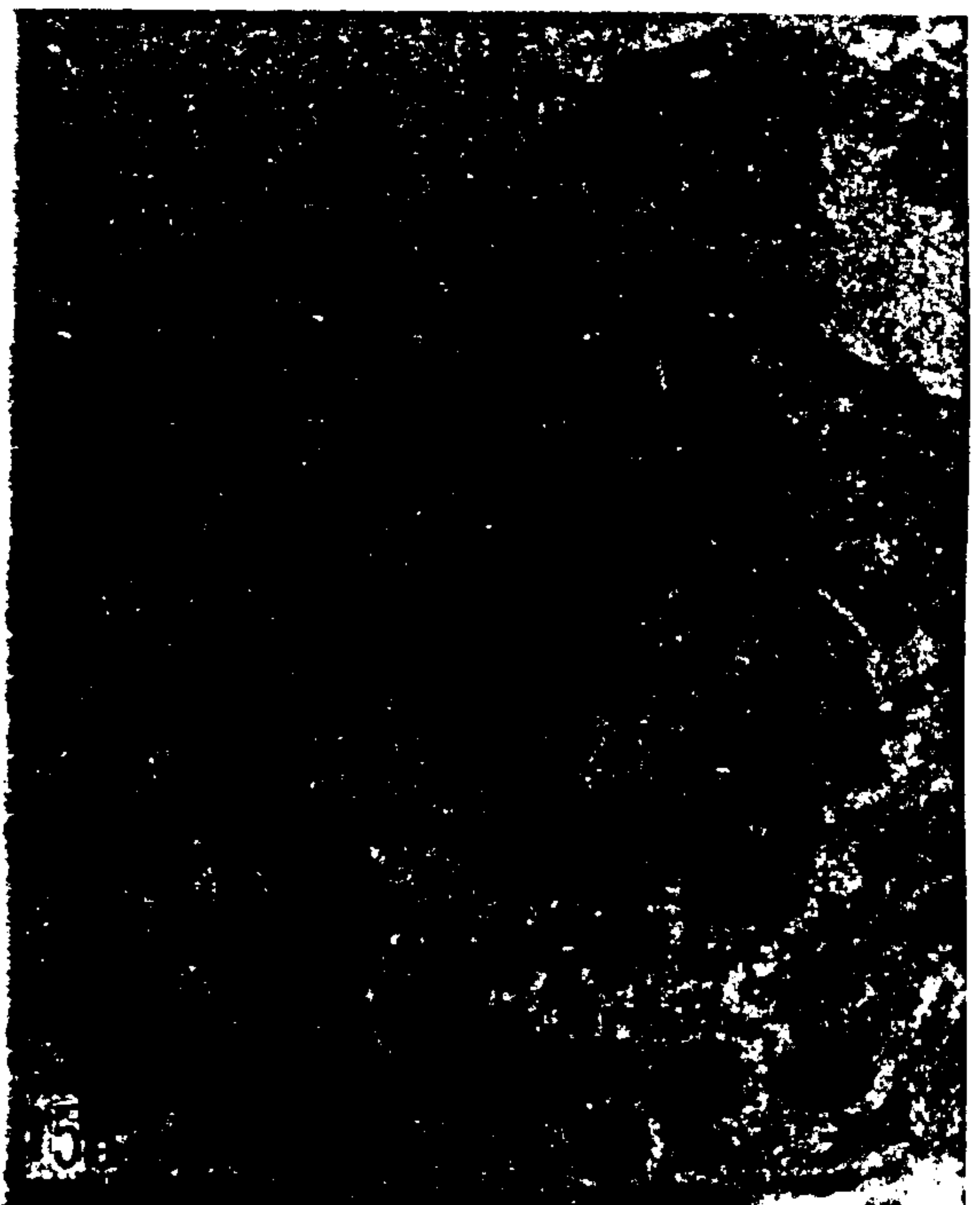
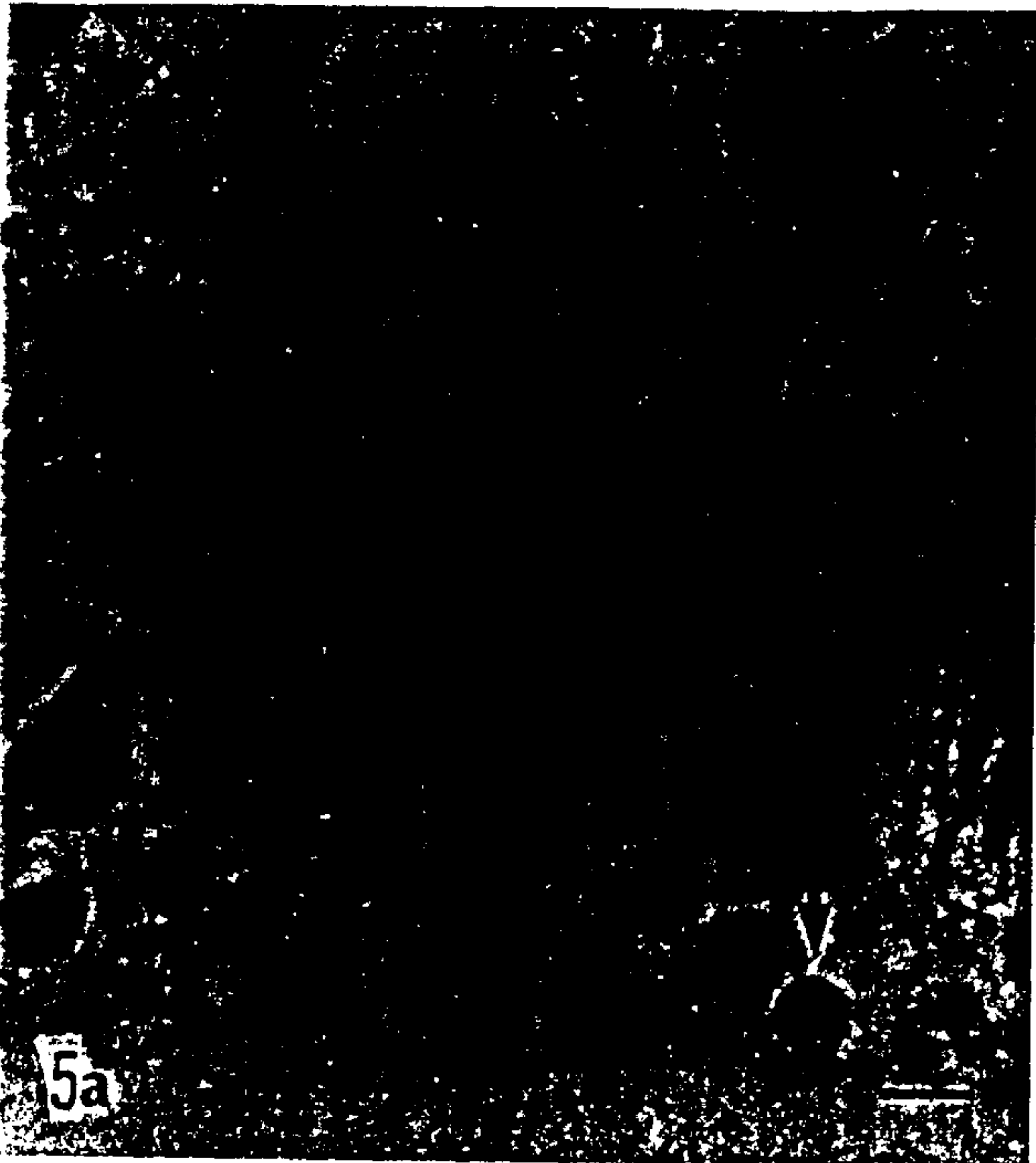
Fig 2-3-38. Relative proportions of cells with haploid, diploid and tetraploid states of DNA ploidy in the testicular cell suspensions of the Sprague-Dawley rats treated with 0.5g/kg/day of 2-bromopropane orally for 8 weeks. a. control b. 8 weeks after the completion of administration, showing proportions of decreased haploid cells.

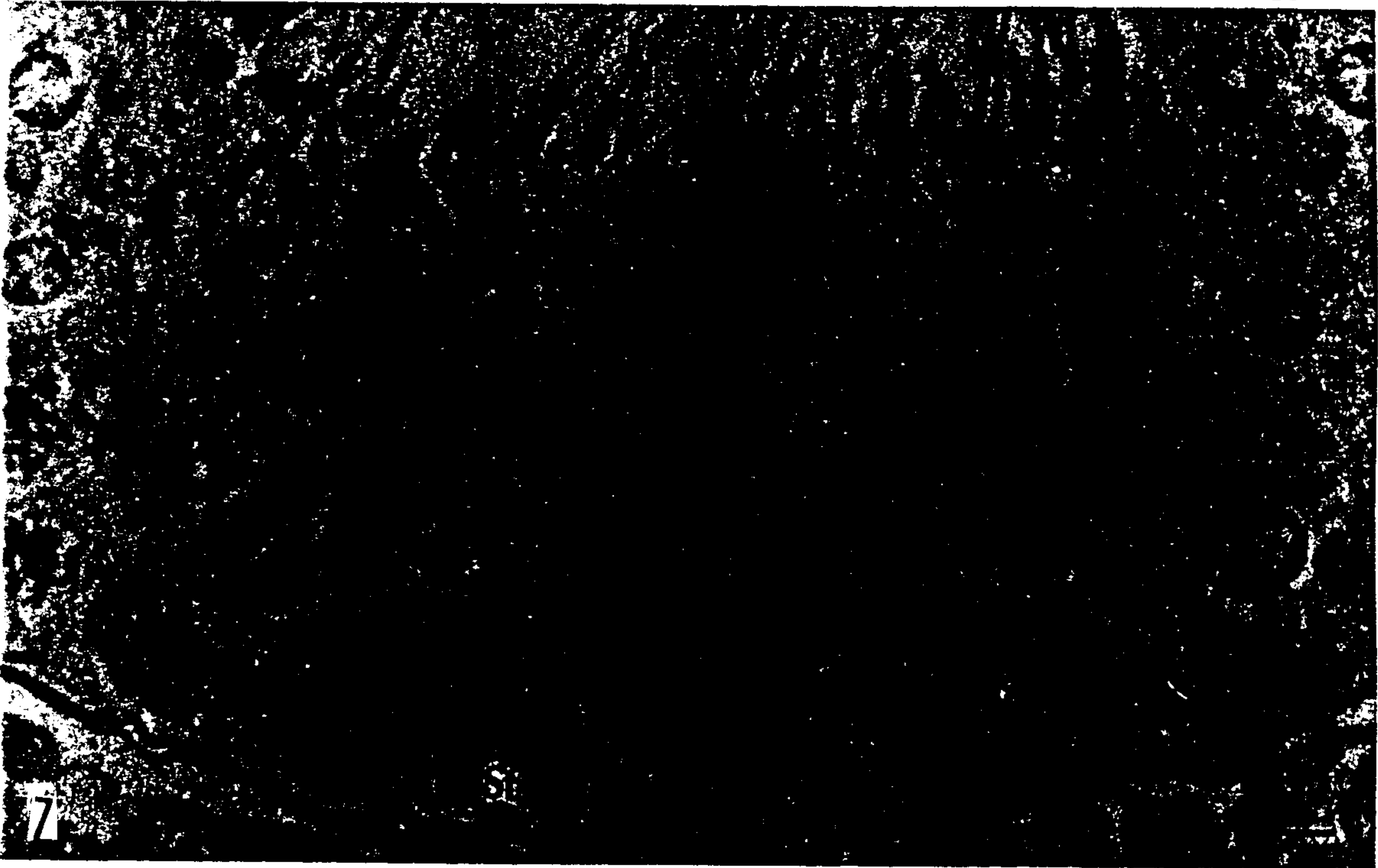
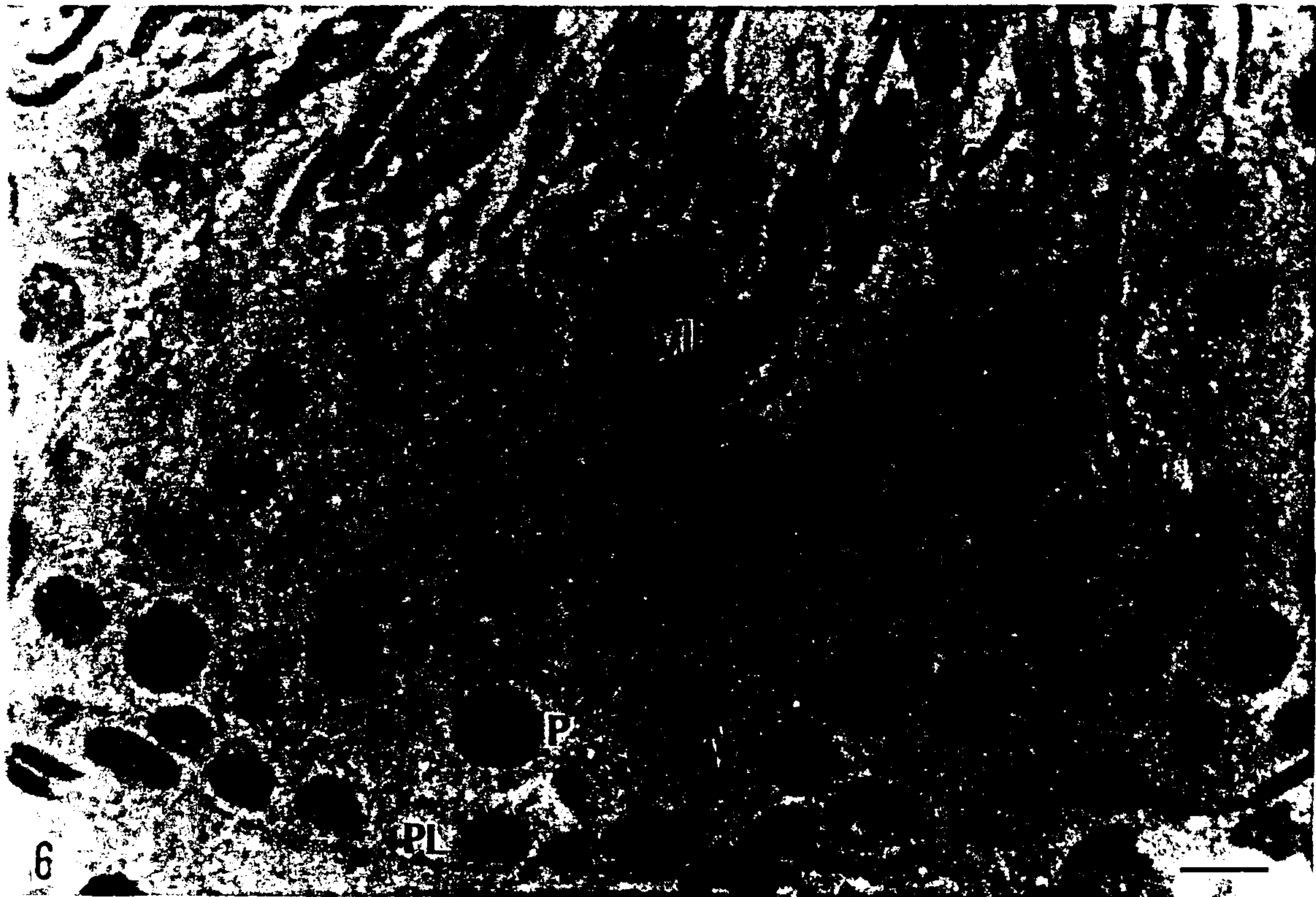
Fig. 2-3-39. Seminiferous tubules show germ cell degeneration, exfoliation, and multinucleated giant cells. Intratesticular injection of 10 μ l 2-bromopropane. H-E. Bar=20 μ m.

Fig. 2-3-40. Seminiferous tubule shows severe germ cell degeneration, vacuolation, and exfoliation. Intratesticular injection of 30 μ l 2-bromopropane. H-E. Bar=10 μ m.



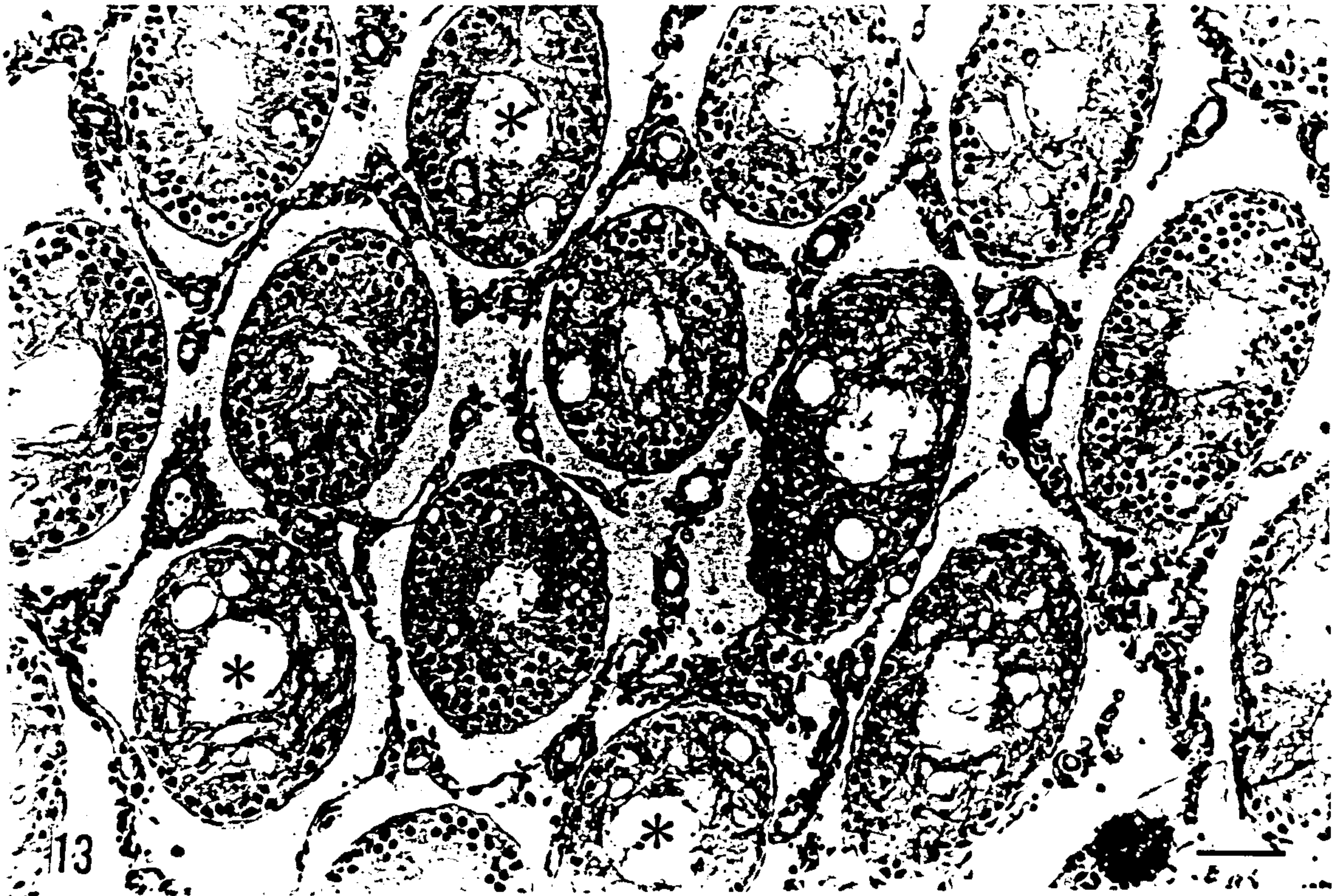


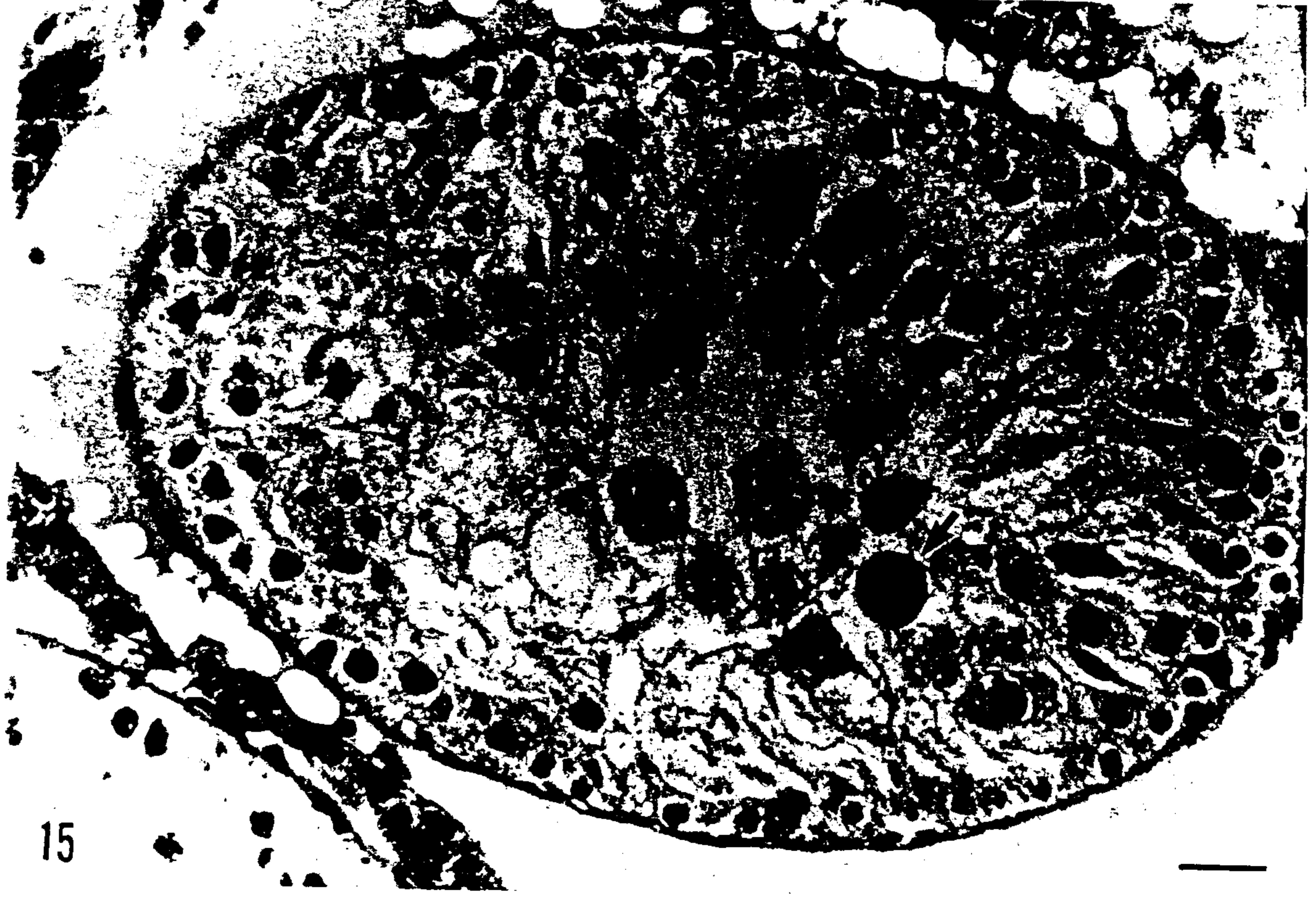


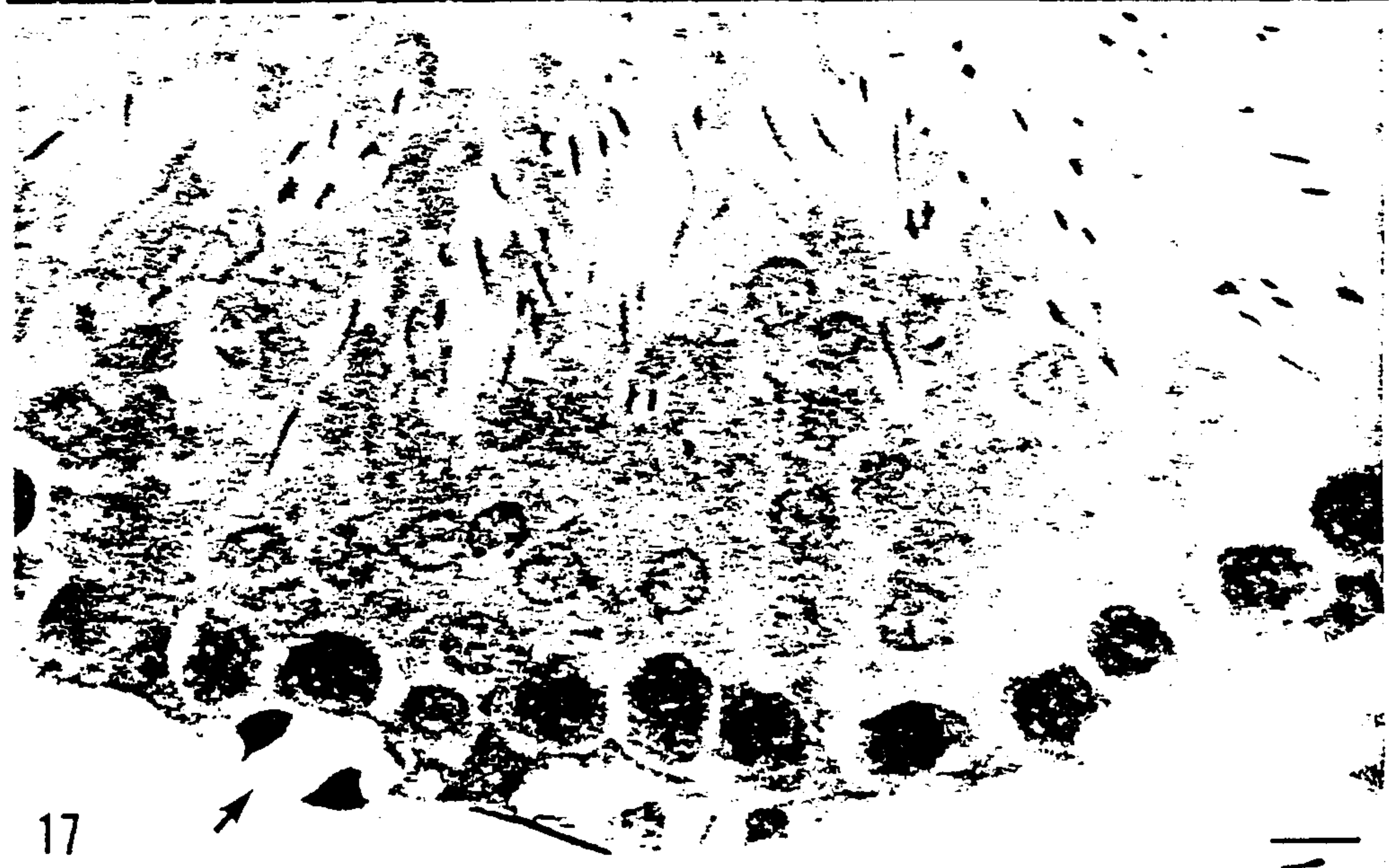




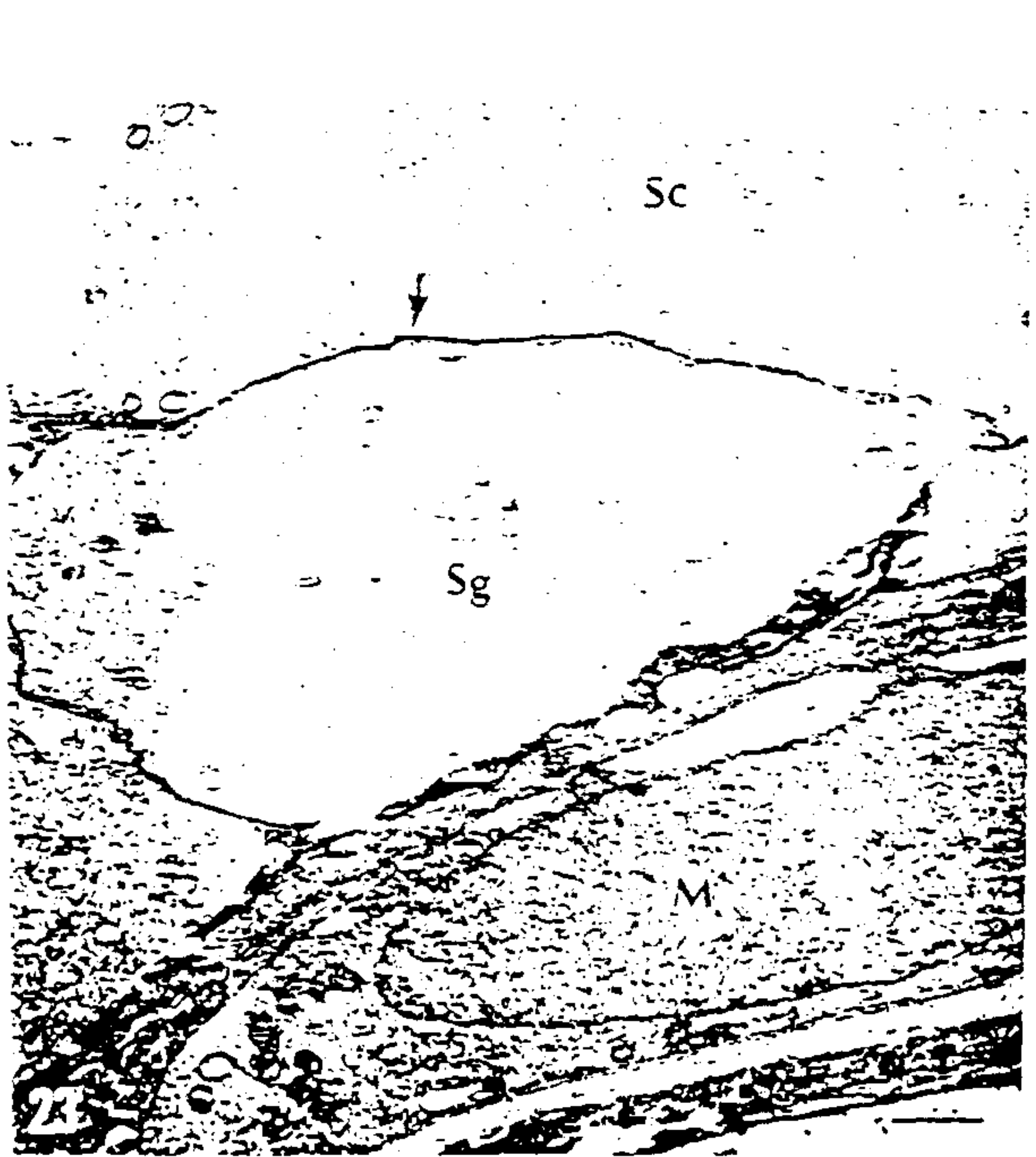


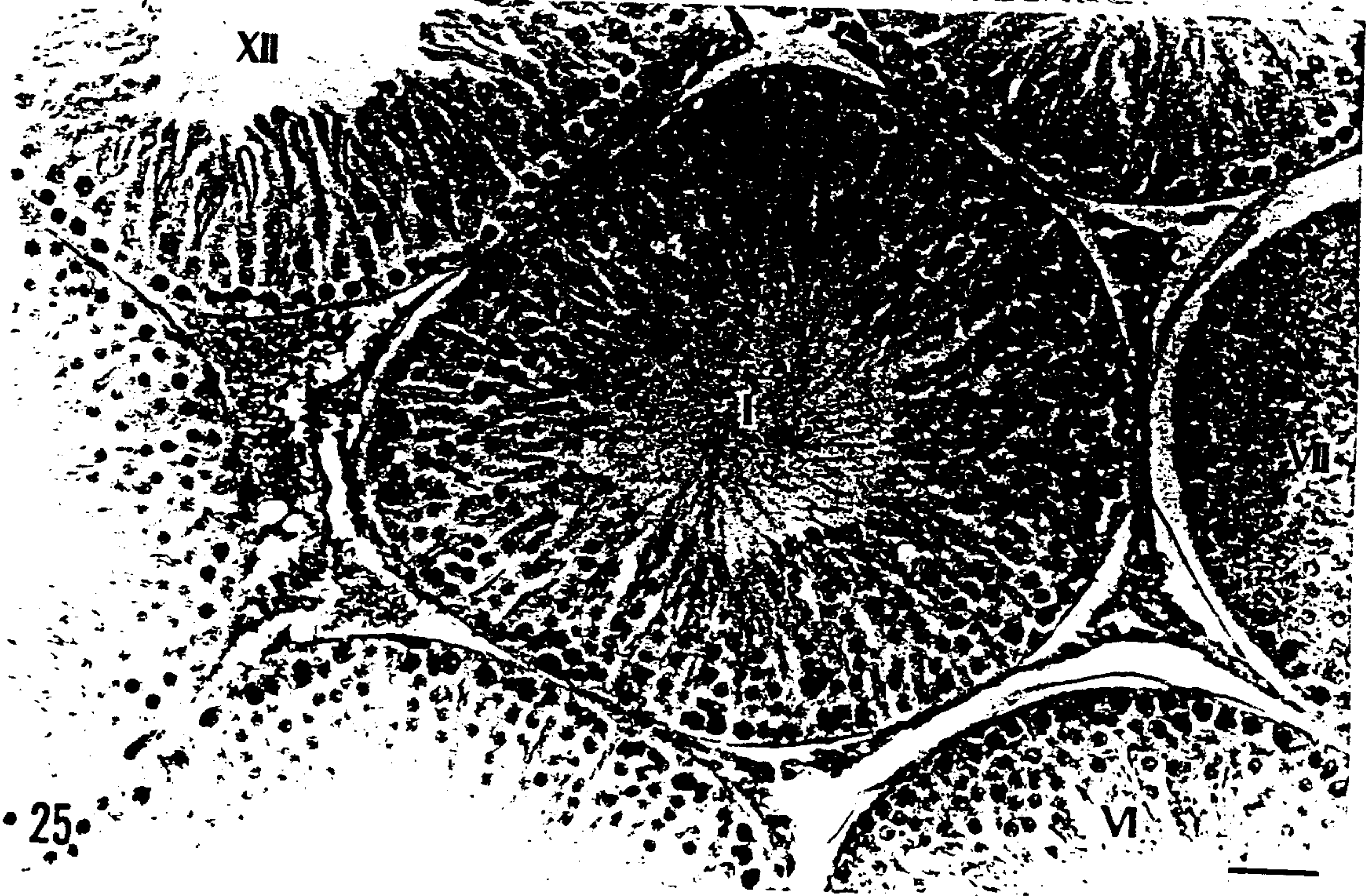
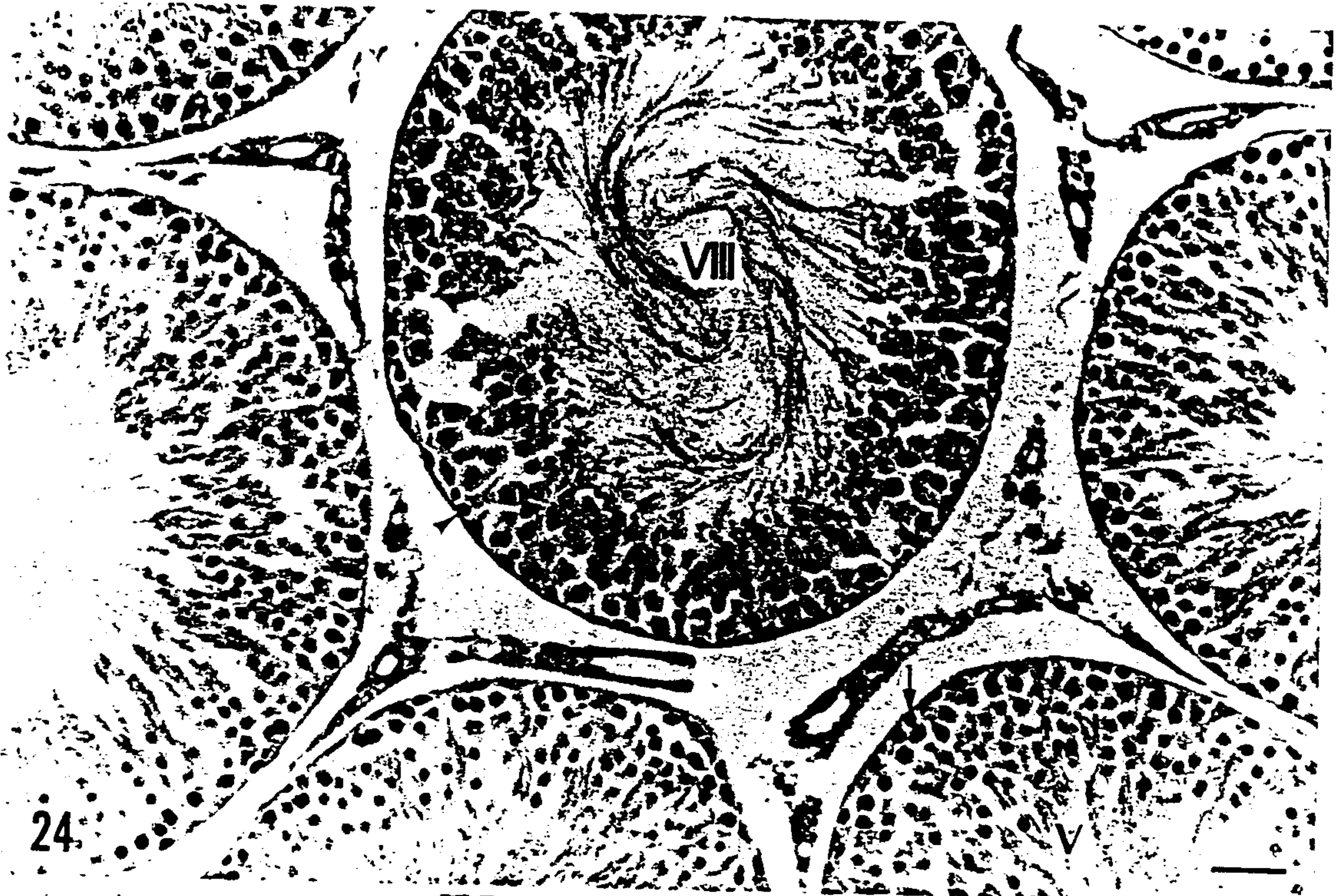


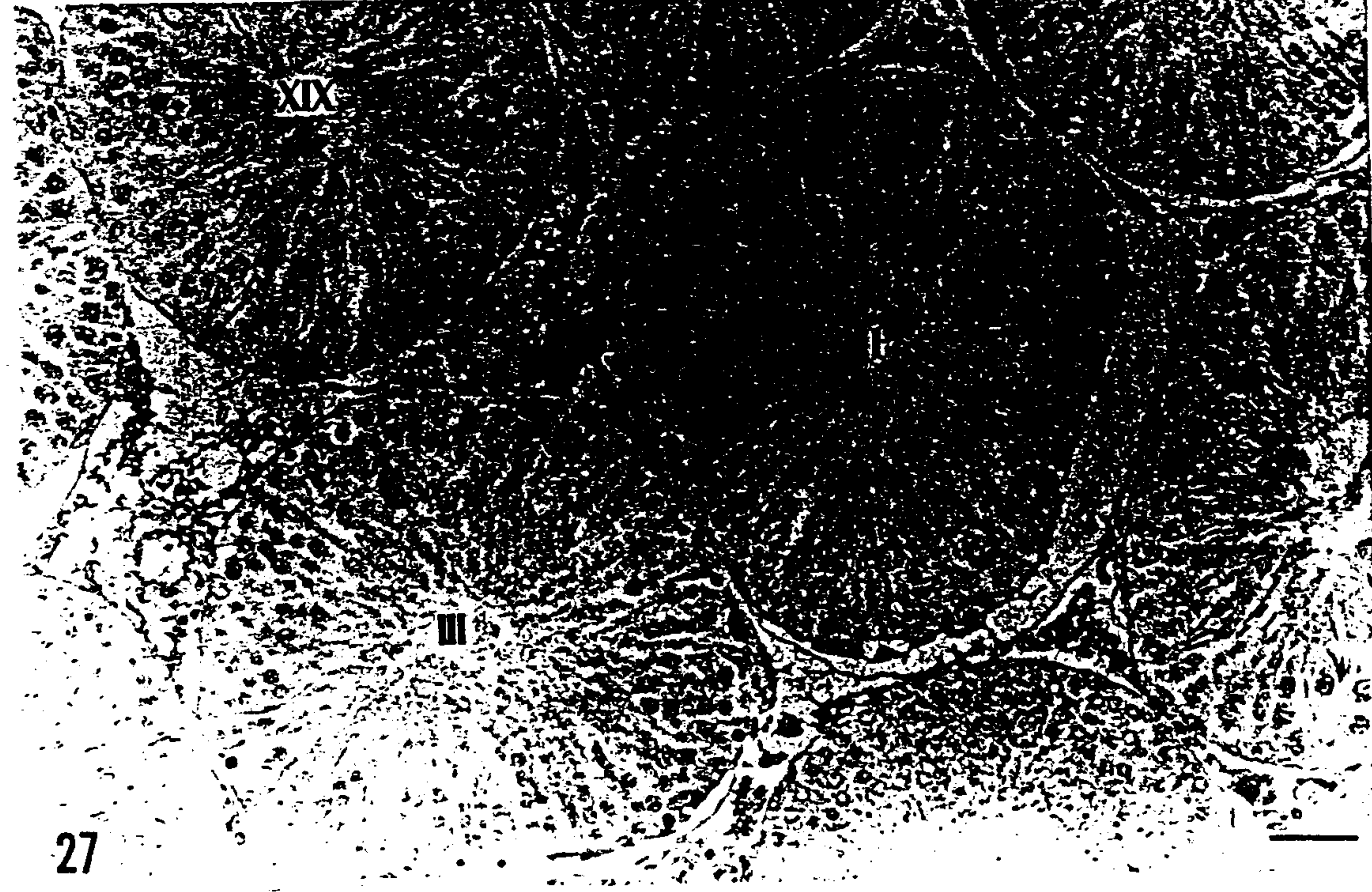
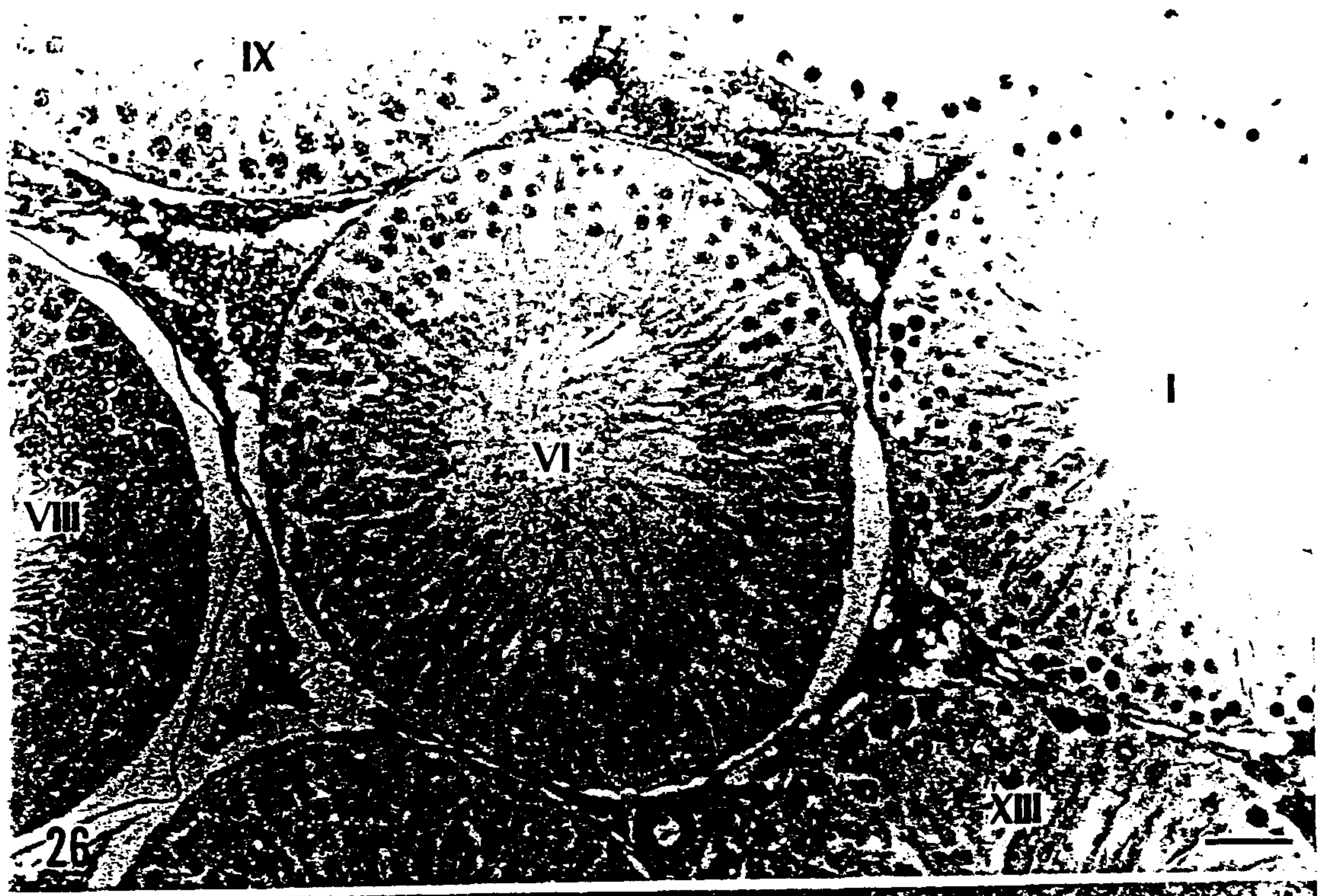


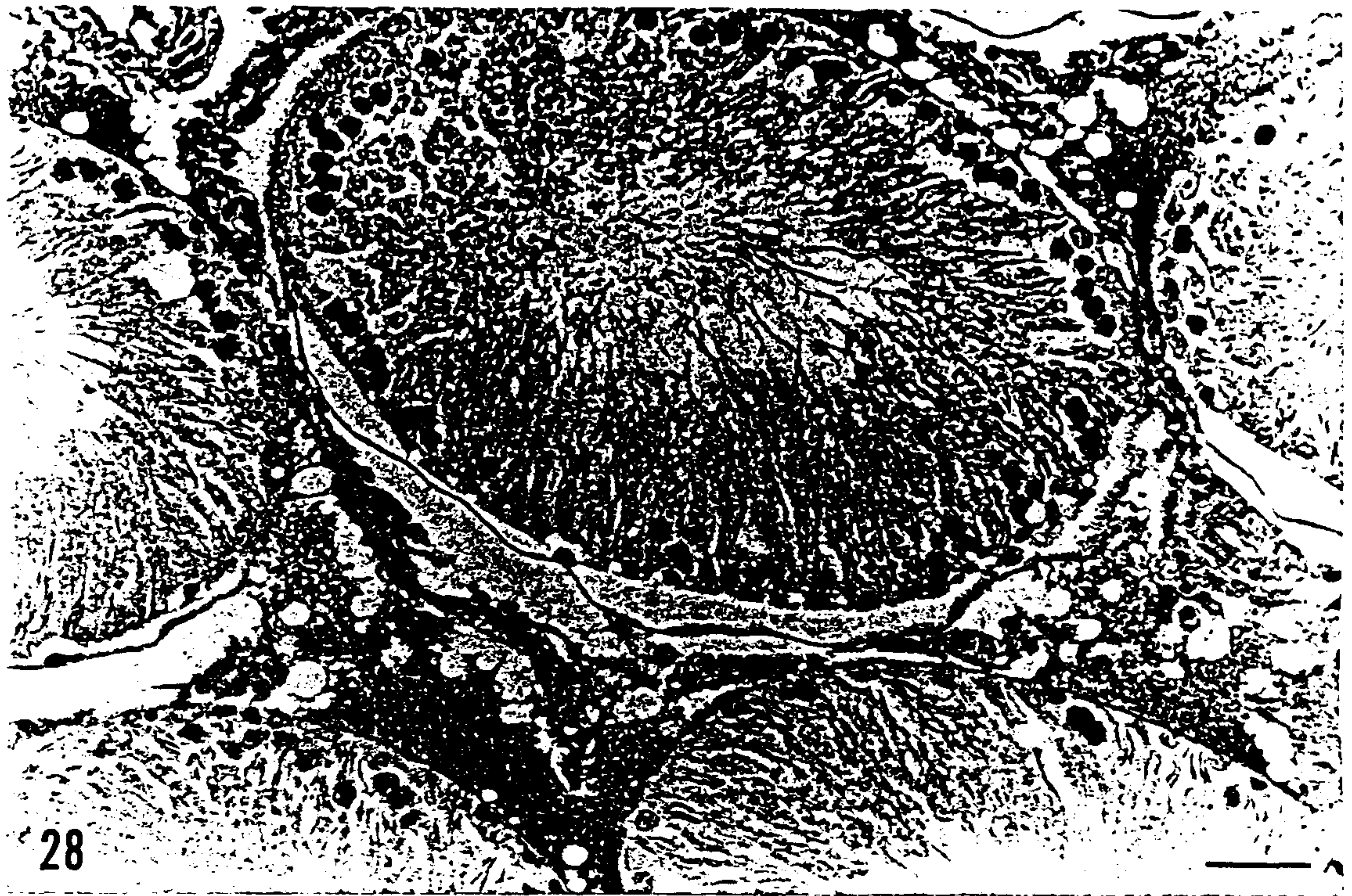


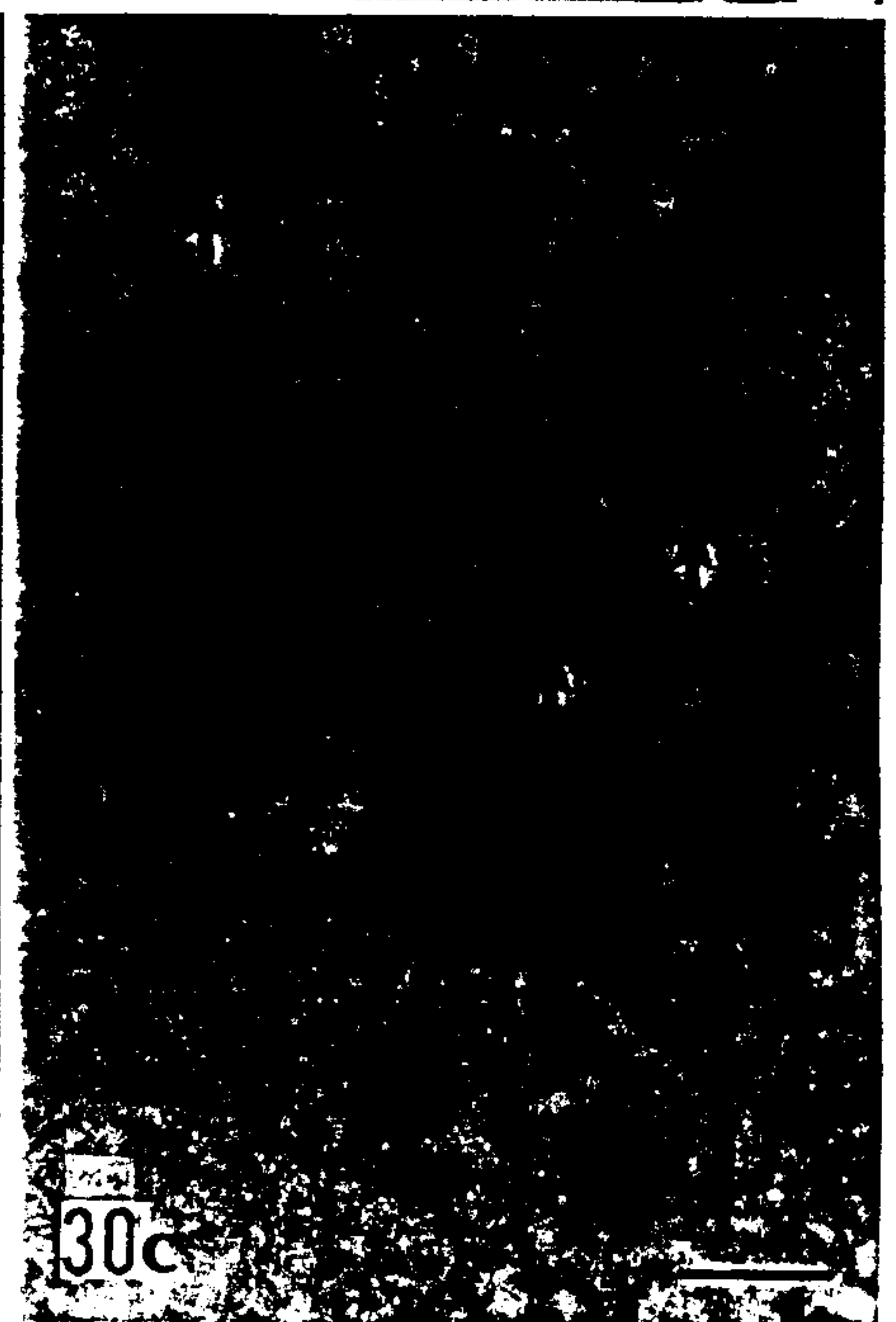
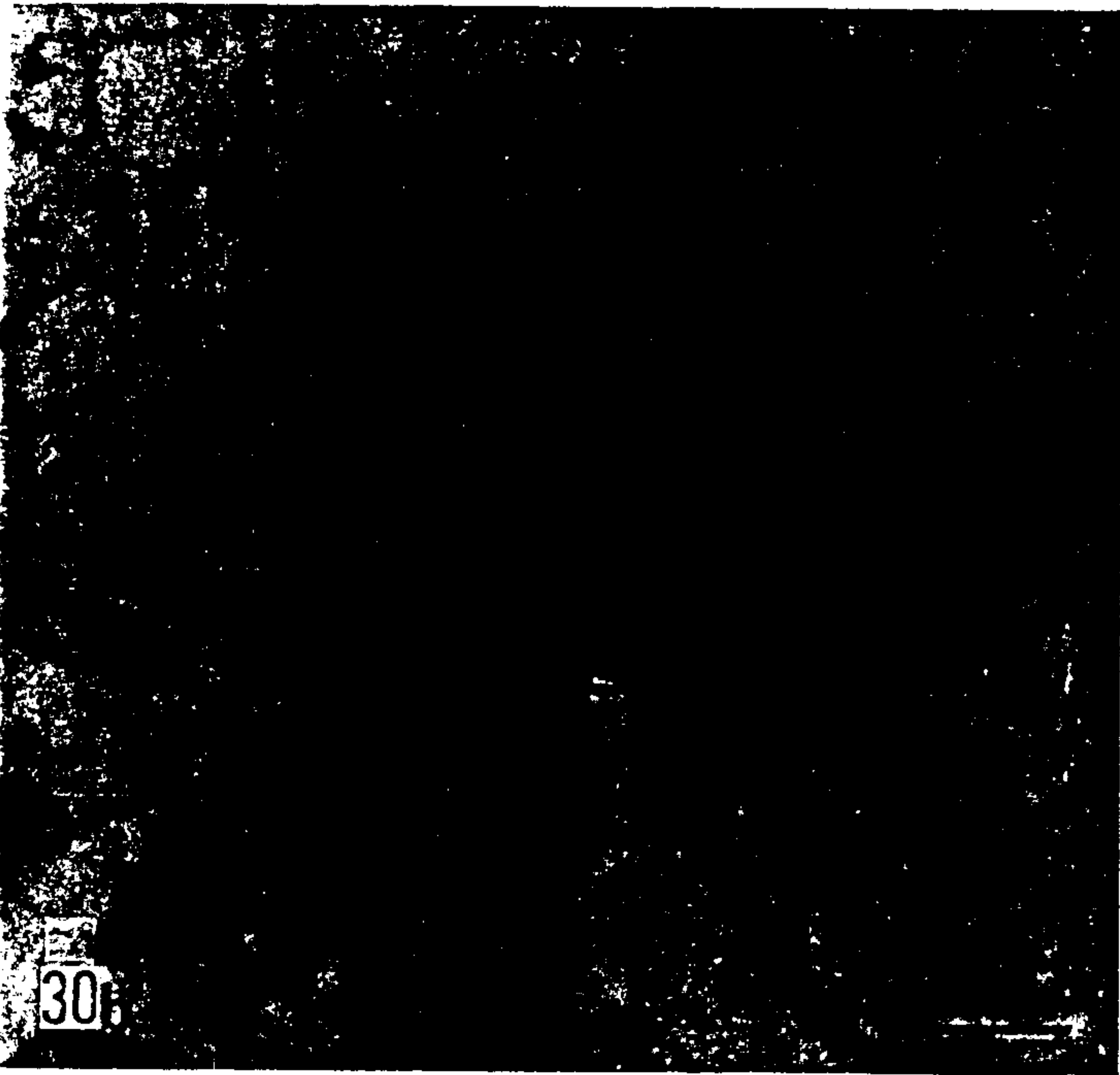
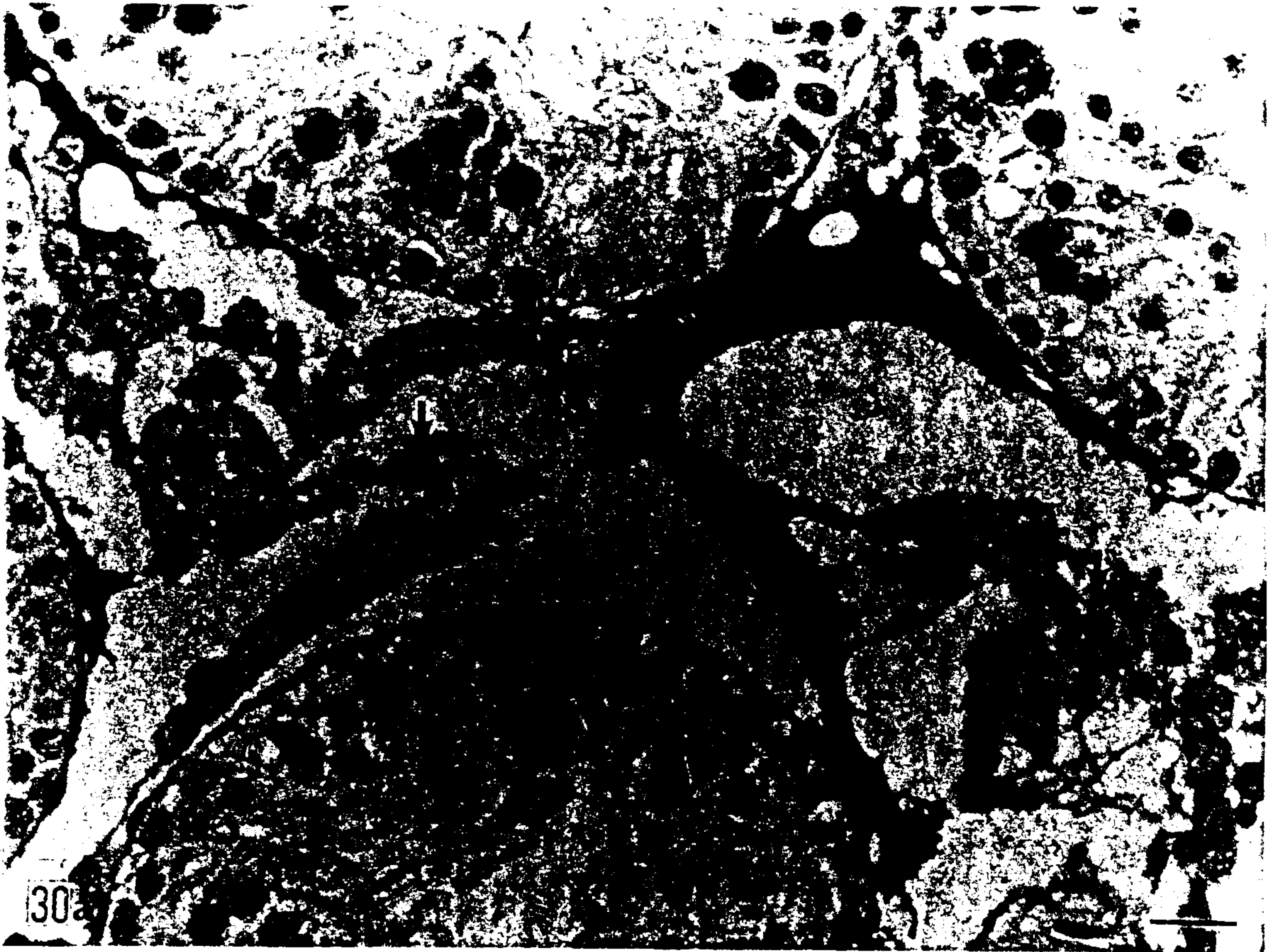












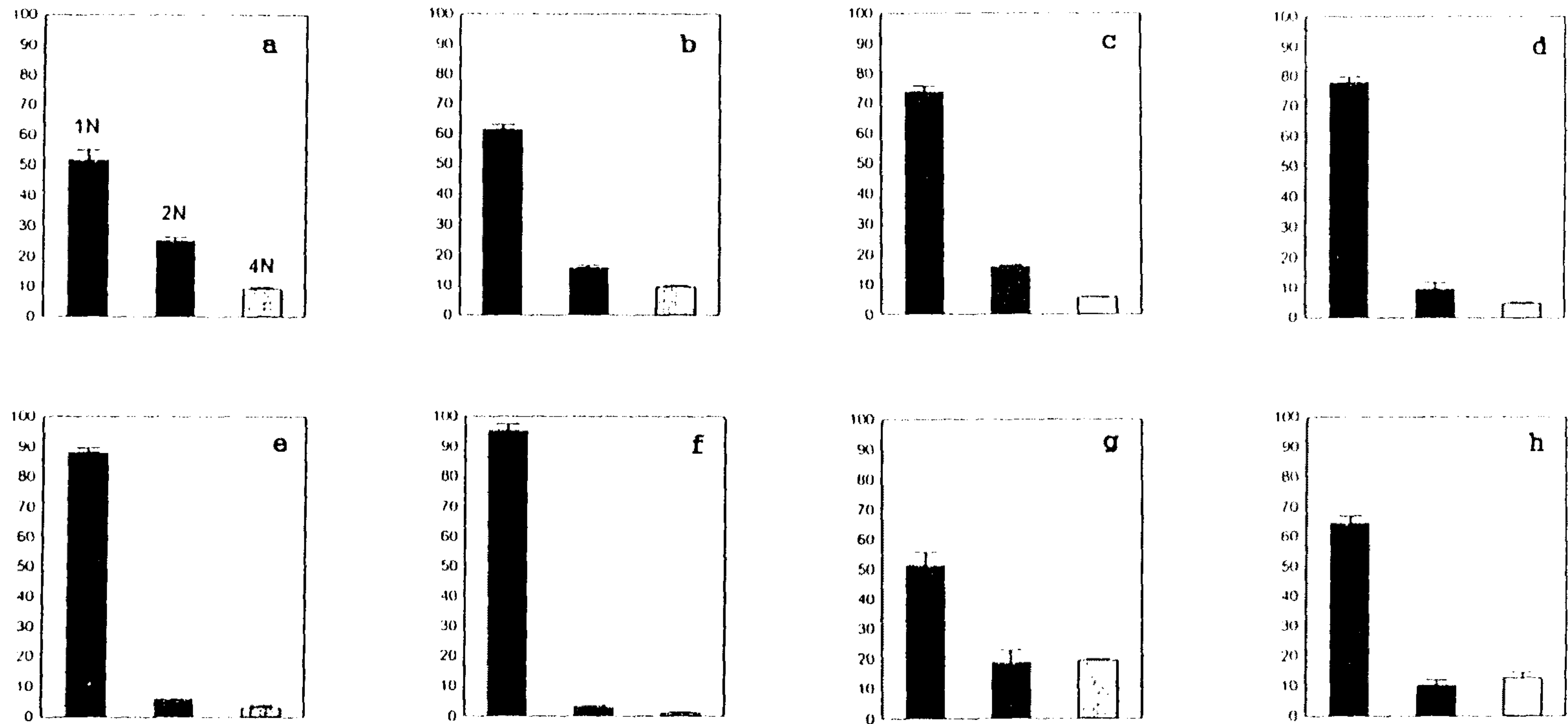
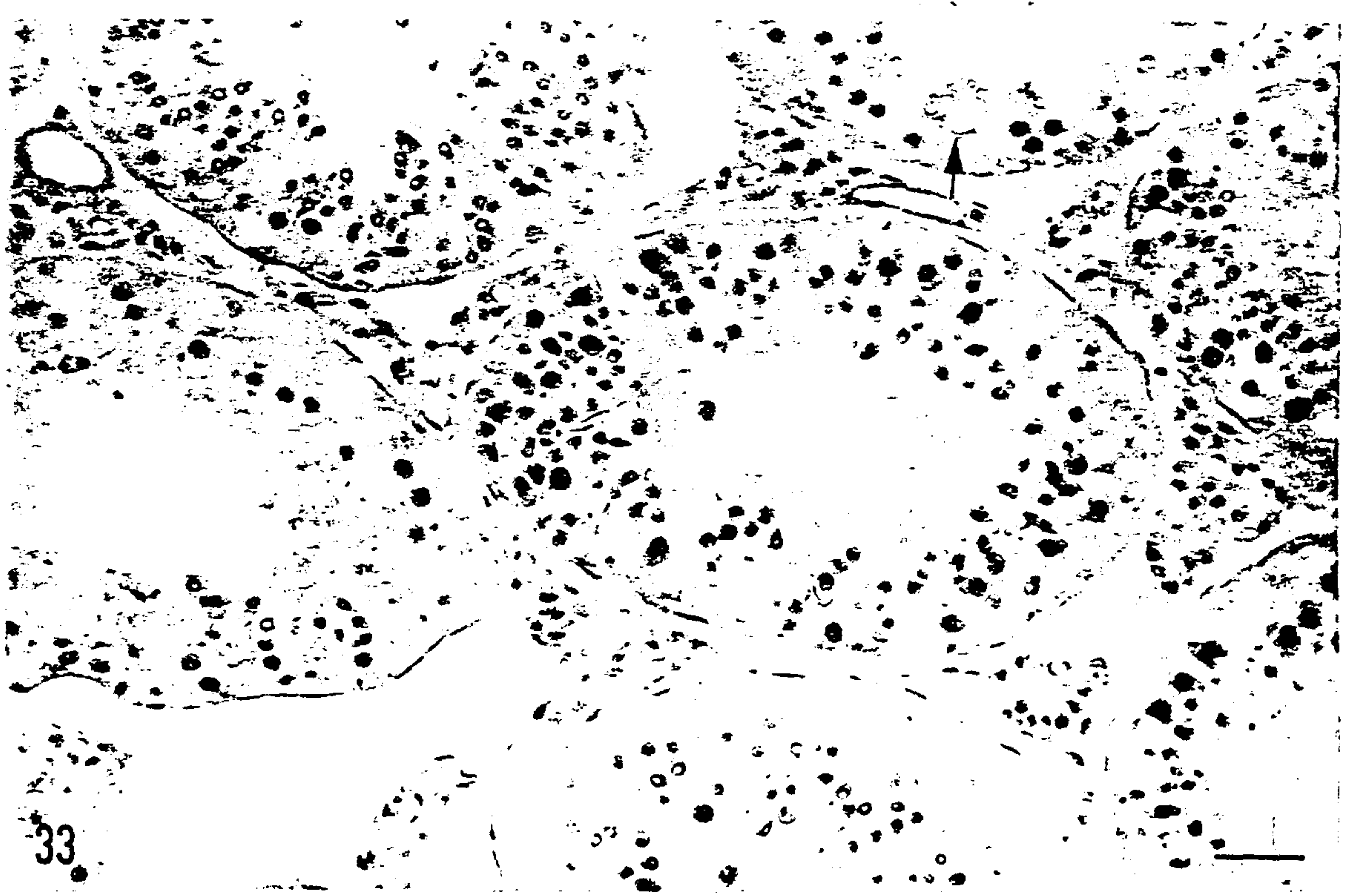
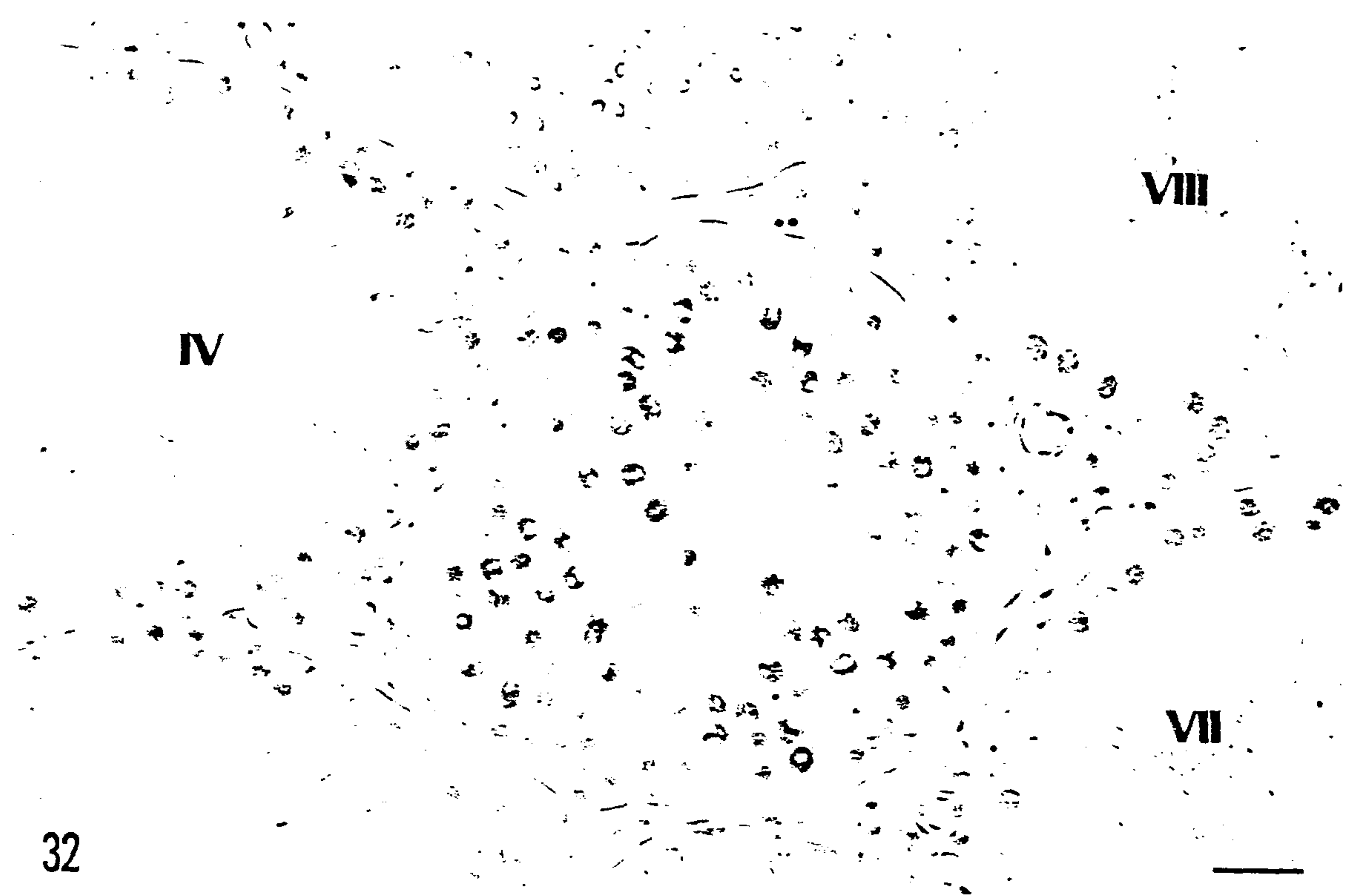


Fig. 31. Relative proportions of cells with haploid, diploid and tetraploid states of DNA ploidy in the testicular cell suspensions of the Sprague-Dawley rats treated with 3.5g/kg/day of 2-bromopropane orally for 3 consecutive days. a. control. b. 3 day after the completion of administration, showing proportions of decreased diploid cells. c. 5 days after, showing proportions of decreased diploid and tetraploid cells. d. 7 days after, showing proportions of decreased diploid and tetraploid cells. e. 14 days after, showing proportions of markedly decreased diploid and tetraploid cells. f. 28 days after, showing proportions of decreased diploid and tetraploid cells. g. 42 days after, showing proportions of markedly increased diploid and tetraploid cells. h. 70 days after, showing proportions of decreased tetraploid cells comparing with g.

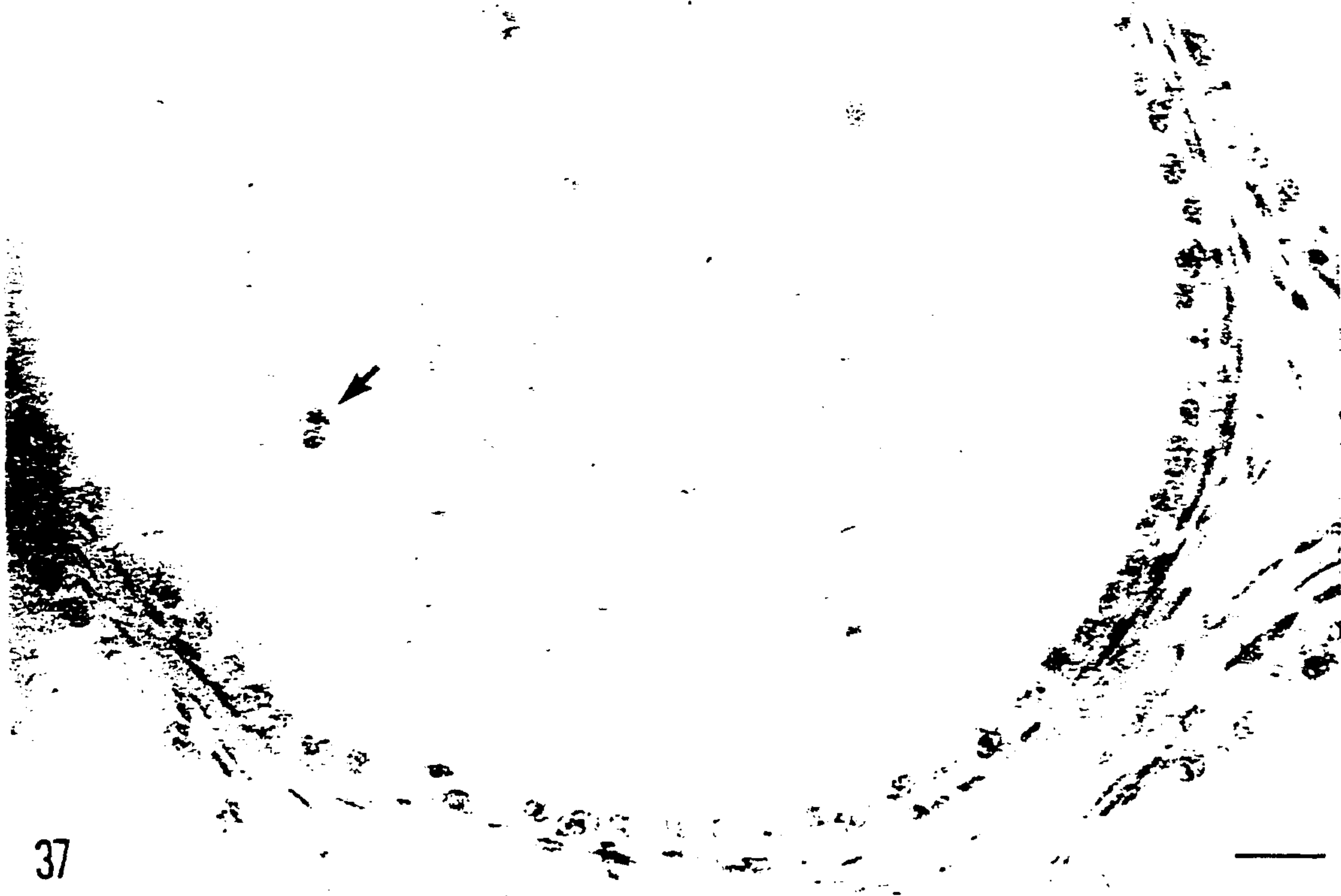
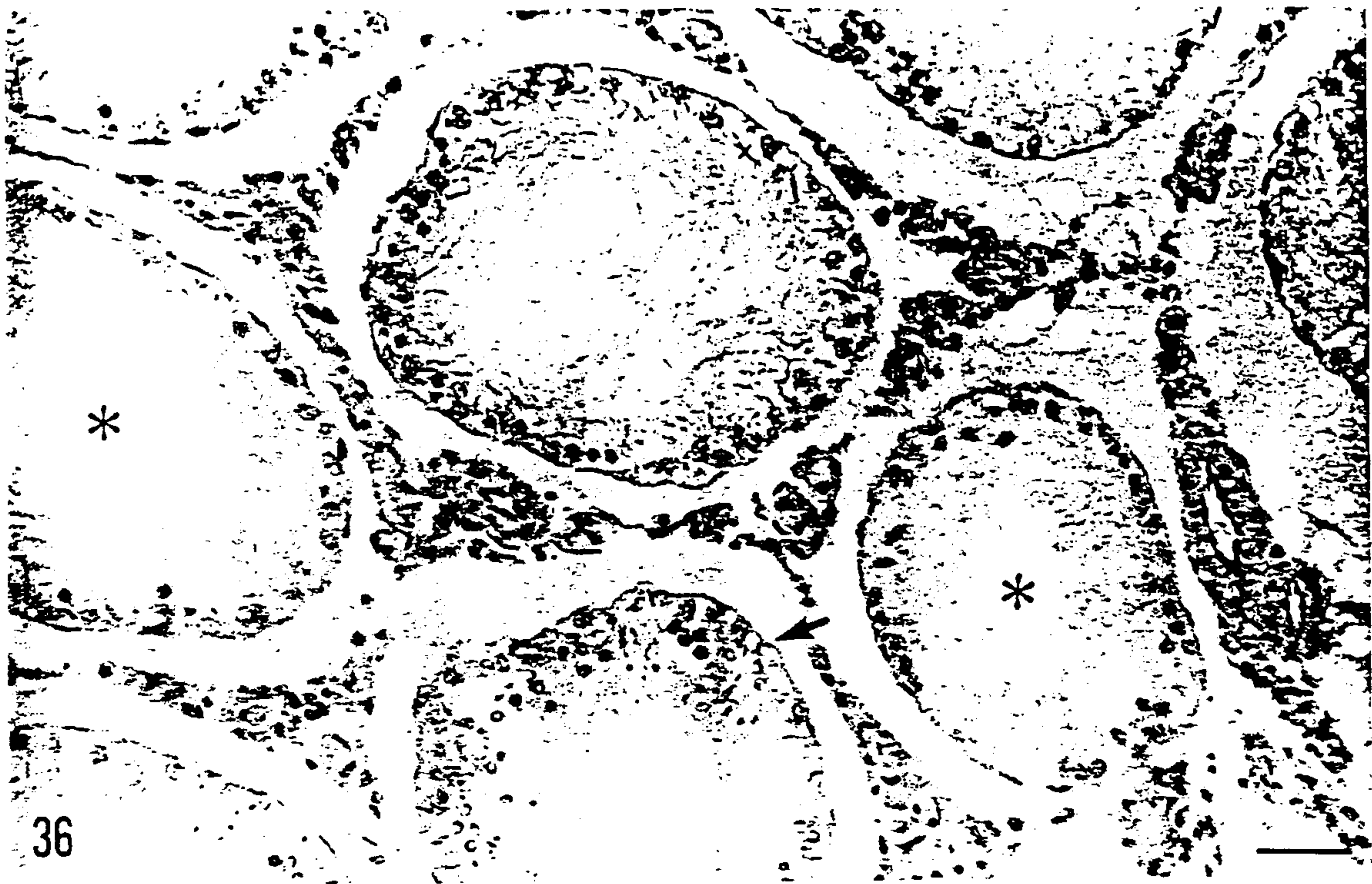




34



35



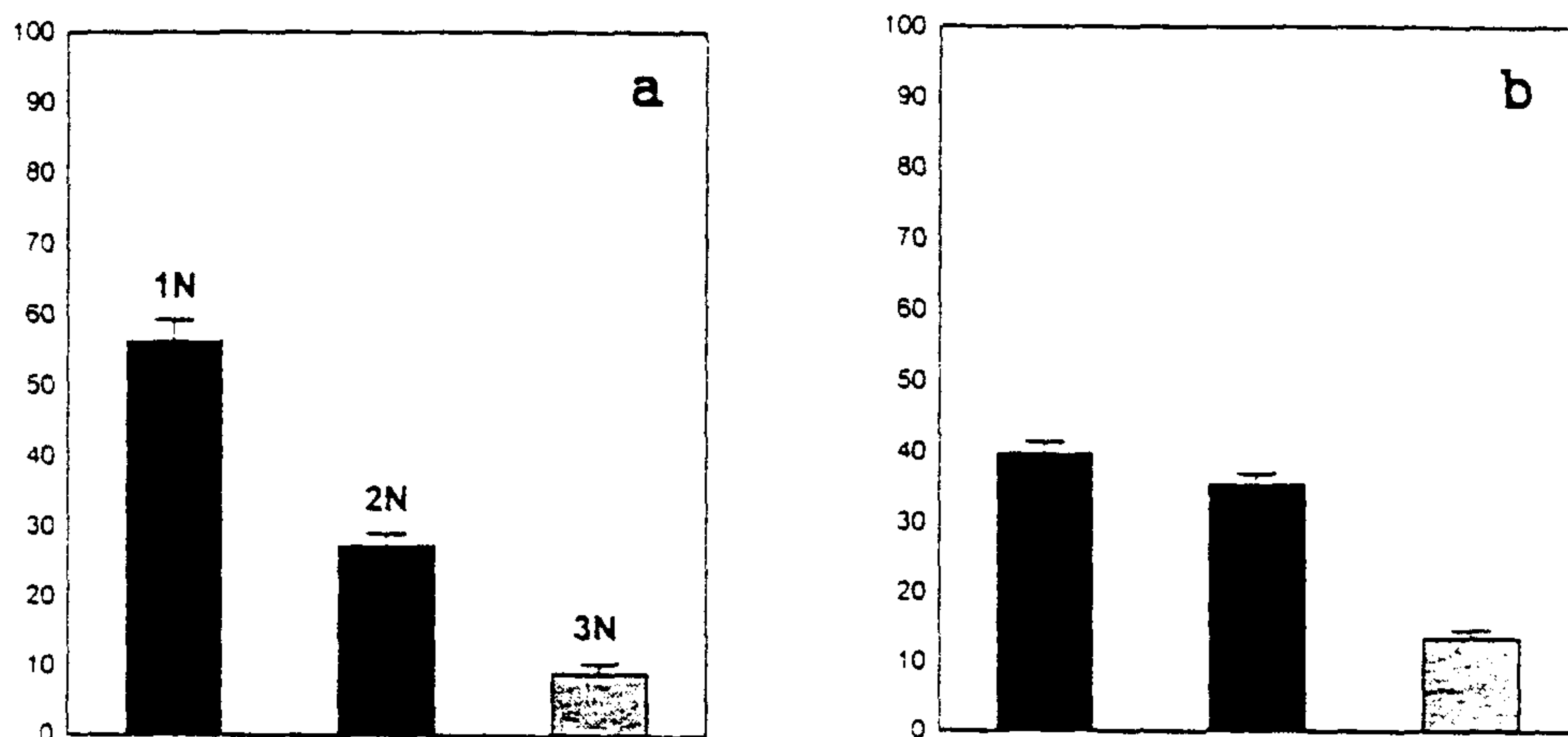
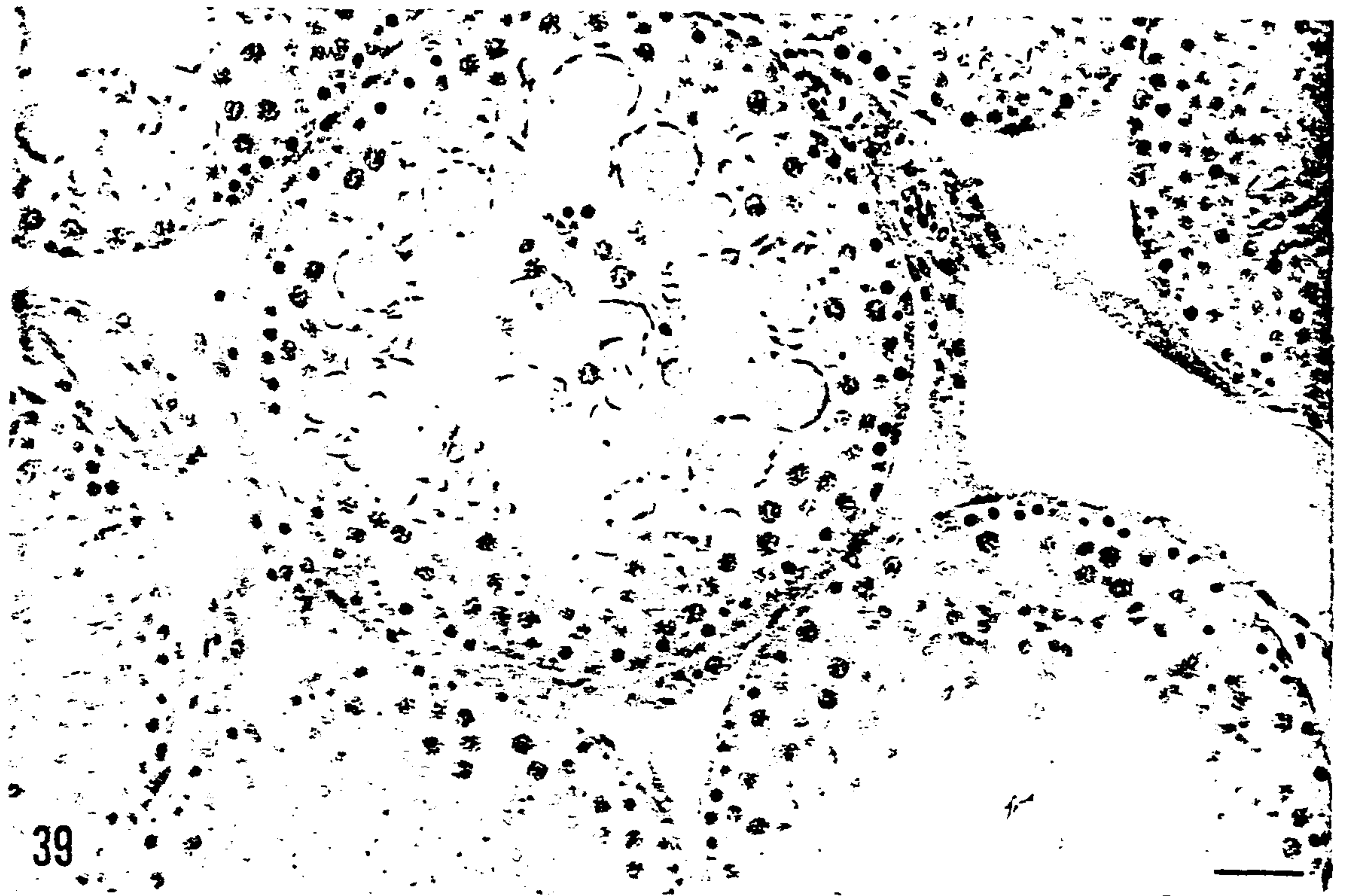
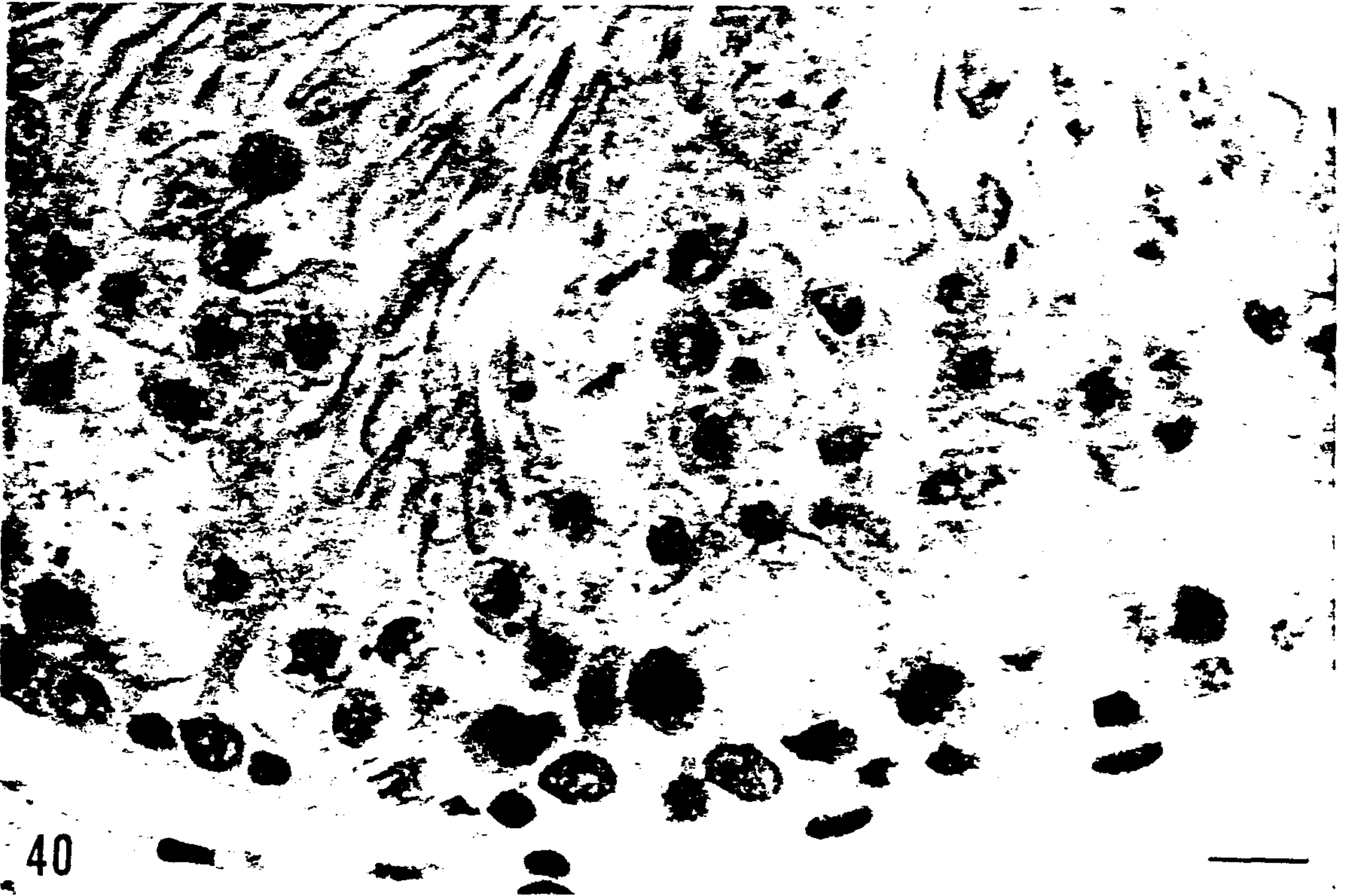


Fig 38. Relative proportions of cells with haploid, diploid and tetraploid states of DNA ploidy in the testicular cell suspensions of the Sprague-Dawley rats treated with 0.5g/kg/day of 2-bromopropane orally for 8 weeks. a. control b. 8 weeks after the completion of administration, showing proportions of decreased haploid cells.



39



40

6. 참고문헌

- (1) Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, and Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 305, 609-613, 1992.
- (2) Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, and Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in paris during the past 20 years. *New Eng. J. Med.* 332, 326-328, 1995.
- (3) Sharpe RM. Declining sperm counts in men-Is there an endocrine cause? *J. Endocrinol.* 136, 357-360, 1995.
- (4) Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: The appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol. Pathol.* 25, 119-131, 1997.
- (5) Schrag SD and Dixon RL. Occupational exposures associated with male reproductive dysfunction. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 567-592. 1985.
- (6) Foster PMD. Testicular organization and biochemical function. In: *Physiology and Toxicology of Male Reproduction*. Lamb JC IV and Foster PMD eds. London, Academic Press. pp. 7-34, 1988.
- (7) Thomas JA. Reproductive hazards and environmental chemicals: a review. *J. Toxic. Subs.* 2, 318-348, 1981.
- (8) Clegg JA. Male reproductive toxicity testing. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 13(4), 235-47, 1994.
- (9) Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev.* 12(1), 45-77, 1991.
- (10) Russell LD, and Peterson RN. Sertoli cell junctions: Morphological and functional correlates. *Int. Rev. Cytol.* 94, 177-211, 1985.
- (11) Russell LD, Etllin RA, Hikim APS, and Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Florida, Cache River Press. 1990.
- (12) Mori H, and Christensen AK. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testes. *J. Cell. Biol.* 84, 340-354, 1980.
- (13) Leblond CP, and Clermont Y. Spermatogenesis of rat, mouse, hamster, and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulphurus acid' technique. *Am. J. Anat.* 90, 167-206, 1952.
- (14) Clermont Y, and Leblond CP. Renewal of spermatogonia in the rat. *Am. J. Anat.* 93, 475-502, 1953.

- (15) Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. *Am. J. Anat.* 111, 111-129, 1962.
- (16) Oakberg EF. A description of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 99, 391-414, 1956.
- (17) Clermont Y, and Harvey SC. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinol.* 76, 80-89, 1965.
- (18) Okumura K, Lee IP, and Dixon RL. Permeability of selected drugs and chemicals across the blood-testis barrier of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 194, 89-95, 1975.
- (19) Lag M, Söderlund EJ, Omichincki JG, Brunborg G, Holme JA, Dahl JE, Nelson SD, and Dybing E. Effect of bromine and chlorine positioning in the induction of renal and testicular toxicity by halogenated propanes. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 528-534, 1991.
- (20) Torkelson TR, Sadek SE, Rowe VK, Kodama JK, Anderson HH, Loquvam GS, and Hine CH. Toxicological investigations of 1,2-dibromo-3-chloropropane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 3, 545-559, 1961.
- (21) Kluwe WM. Acute Toxicity of 1,2-Dibromo-3-chloropropane in the F344 male Rat. I. Dose-response relationships and differences in routes of exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 71-83, 1981.
- (22) Heindel JJ, Berkowitz AS, Kyle G, Luthra R, and Bruckner JV. Assessment in rats of the gonadotoxic and hepatorenal toxic potential of dibromochloropropane(DBCP) in drinking water. *Fundamental and Appl. Toxicol.* 13, 804-815, 1989.
- (23) Sod-Moriah UA, Shemi D, Potashnik G, and Kaplanski J. Age-dependent differences in the effects of 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP) on fertility, sperm count, testicular histology and hormonal profile in rats. *Andrologia.* 22, 455-462, 1989.
- (24) Kaplanski J, Shemi D, Waksman J, Potashnik G, and Sod-Moriah UA. The effect of 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP) on general toxicity and gonadotoxicity in rats. *Andrologia.* 23(5), 363-366, 1991.
- (25) Buckingham J., and Macdonald F. ed., Dictionary of organic compounds. 6th ed., Chapman and Hall., Cambridge, University Press. pp. 1098-1099, 1996.

- (26) Park JS, Kim YH, Park DW, Park SH, and Choi KS. An epidemiological study on workers of LG electronics at Yangsan, Industrial Health Research Institute, Korea Industrial Health Research Institute, Korea Industrial Safety Corporation. 1995.
- (27) Maeng SH, and Yu IJ. Mutagenicity of 2-bromopropane. *Ind. Health.* 35, 87-95, 1997.
- (28) Ichihara G, Asaeda N, Kumazawa T, Tagawa Y, Kamijima M, Yu X, Kondo H, Nakajima T, Kitoh J, Yu IJ, Moon YH, Hisanaga N, and Takeuchi Y. Reproductive and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane. SOT Annual Meeting. p. 357, 1997.
- (29) Yu IJ, Chung YH, Lim CH, Maeng SH, Lee JY, Kim HY, Lee SJ, Kim CH, Kim TG, Lim CH, Park JS, and Moon YH. Reproductive toxicity of 2-bromopropane. SOT Annual Meeting. p. 358, 1997.
- (30) Lim CH, Maeng SH, Lee JY, Chung YH, Park JH, Kim HY, Moon YH, and Yu IJ. Effect of 2-bromopropane(2-BP) on female reproductive function in Sprague-Dawley rats. SOT Annual Meeting. p. 357, 1997.
- (31) Sweet DV. ed., Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), TX4111000, National Institute for Occupational Safety and Health(NIOSH), Washington DC., U.S. Government Printing Office, 1995.
- (32) Kim HY, Chung HY, Yi KH, Kim JG, and Yu IJ. LC₅₀ of 2-bromopropane. *Ind. Health.* 34, 403-407, 1996.
- (33) Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137, 1965.
- (34) Marlene D, and Castro BA. A hematoxylin-eosin phloxine stain for tissues embedded in glycol methacrylate. *J. Histotech.* 8(1), 23-24, 1985.
- (35) Neaves WB. Permeability of Sertoli cell tight junctions to lanthanum after ligation of ductus deferens and ductuli efferentes. *J. Cell Biol.* 59, 559-572, 1973.
- (36) Henderson C. Aminoalkylsilane: An unexpansive, simple preparation for slide adhesion. *J. Histochem.* 12(2), 123-124, 1989.
- (37) Hirsch IH, McCue P, Kulp-Hugues D, Sedor J, and Flanigan M. Validation of flow cytometry analysis in the objective assessment of spermatogenesis: comparison to the quantitative testicular biopsy. *J. Urol.* 150, 342-346, 1993.
- (38) Thomas JA. Toxic responses of the reproductive system. In: *Casarrett*

and Doull's toxicology. 4th ed. Amdur MO, Doull J, and Klaasen CD, eds. New York, Pergamon Press, pp. 484-520, 1991.

- (39) Zeinick H, and Clegg ED. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*. 2nd ed. Hayes AW. ed. New York, Raven Press, pp. 275-309, 1989.
- (40) Szczech GM, and Russell LD. Commentary on application of refined morphologic evaluation of the testis to the practice of toxicologic pathology. *Toxicol. Pathol.* 25(2), 230-237, 1997.
- (41) Schwetz BA, Rao KS, and Park CN. Insensitivity of tests for reproductive problems. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 3, 81-98, 1980.
- (42) Linder RE, Strader LF, Slott VL, and Suarez JD. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to 14 reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 6, 491-505, 1992.
- (43) Ulbrich B, and Palmer AK. Detection of effects on male reproduction-A literature survey. *J. Am. Coll. Toxicol.* 14, 2293-3327, 1995.
- (44) Takayama S, Akaike M, Kawashima K, Takahashi M, and Kurokawa Y. A collaborative study in japan on optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorders induced by drugs in rats. *J. Am. Coll. Toxicol.* 14, 266-292, 1995.
- (45) Hew KW, Ericson WA, and Michael JW. A single low cadmium dose cause failure of spermiation in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121, 15-21, 1993.
- (46) Lee KP, Frame SR, Sykes GP, and Valentine R. Testicular degeneration and spermatid retention in young rats. *Toxicol. Pathol.* 21(3), 292-302, 1993.
- (47) Mebus CA, Welsch F, and Working PK. Attenuation of 2-methoxyethanol-induced testicular toxicity in the rat by simple physiological compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99, 110-121, 1989.
- (48) Blackburn DM, Gray AJ, Lloyd SC, Sheard CM, and Foster PMD. A comparison of the effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testis in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92, 54-64, 1988.
- (49) Creasy DM, Foster JR, and Foster MD. The morphological development of di-phenyl phthalate induced testicular atrophy in the rat. *J. Pathol.* 139, 309-321, 1983.
- (50) Matsui H, Mitsumori K, Yasuhara K, Onodera H, Shimo T, and Takahashi M. Morphological evaluation of cyclophosphamide testicular toxicity in rats using quantitative morphometry of

- spermatogenic cycle stages. *J. Toxicol. Sci.* 20, 407-414, 1995.
- (51) Wing TY, and Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* 165, 13-25, 1982.
- (52) Creasy DM, Flynn JC, Gray TJB, and Butler WH. A quantitative study of stage-specific spermatocyte damage following administration of ethylene glycol monomethyl ether in the rat. *Exp. Mol. Pathol.* 43, 321-336, 1985.
- (53) Russell LD, and Russell JA. Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Am. J. Anat.* 192, 142-168, 1991.
- (54) Elias H, and Hyde DM. An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy). *Am. J. Anat.* 159, 412-446, 1980.
- (55) Allan DJ, Hormon BV, and Kerr JFR. Cell death in spermatogenesis. In: *Perspectives on Mammalian Cell Death*. Potten CS, ed. New York, Oxford Univ. Press, pp. 229-257, 1987.
- (56) Zschauer A, and Hodel C. Drug-induced histological changes in rat seminiferous tubular epithelium. *Ach. Toxicol. Pathol.(suppl)*. 4, 466-470, 1980.
- (57) Mattison DR, Plowchalk DR, Meadows MJ, Al-Juburi AZ, Gandy J, and Malek A. Reproductive toxicity: Male and female reproductive systems as target for chemical injury. *Med. Clinics North Am.* 74(2), 391-411, 1990.
- (58) Takahashi M, and Matsui H. Mechanisms of testicular toxicity. *J. Toxicol. Pathol.* 6, 161-174, 1993.
- (59) Dybing E, Soderlund EJ, Lag M, Brunborg G, Holme JA, Omichinski JG, Pearson PG, and Nelson SD. Testicular metabolism and toxicity of halogenated propanes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 283, 471-6, 1991.
- (60) Lag M, Omichinski JG, Dybing E, Nelson SD, and Soderlund EJ. Mutagenic activity of halogenated propanes and propenes: effect of bromine and chlorine positioning. *Chem. Biol. Interact.* 93(1), 73-84, 1994.
- (61) Jones AR, and Walsh DA. The oxidative metabolism of 1-bromopropane in the rat. *Xenobiotica.* 9(12), 763-72, 1979.
- (62) Barnsley EA, Grenby TH, and Young L. Biochemical studies of toxic agents. The metabolism of 1- and 2-bromopropane in rats. *Biochem J.* 100(1), 282-8, 1966.

- (63) Omichinski JG, and Nelson DS. Synthesis of six specifically deuterated analogs of 1,2-dibromo-3-chloropropane. *J. Labelled Comp. Radiopharmaceut.* 25, 263-265. 1988.
- (64) Pearson PG, Söderlund EJ, Dybing E, and Nelson SD. Metabolic activation of 1,2-dibromo-3-chloropropane. Evidence for the formation of reactive episulfonium ion intermediates. *Biochemistry.* 29, 4971-4981, 1990.
- (65) Holme JA, Soderlund EJ, Lag M, Brunborg C, and Dybing E. Prevention of 1,2-Dibromo-3-chloropropane(DBCP)-induced kidney necrosis and testicular atrophy by 3-aminobenzamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 118-128, 1991.
- (66) Russell LD, Saxena NK, and Weber JE. Intratesticular injection as a method to assess the potential toxicity of various agents and to study mechanisms of normal spermatogenesis. *Gamete Res.* 17, 43-56, 1987.
- (67) Shemi D, Sod-Moriah UA, Kaplanski J, Potashnik G, and Yanai-Inbar I. Suppression and recovery of spermatogenesis in dibromo-chloropropane treated rats. *Andrologia.* 14, 191-199, 1982.
- (68) Saegusa J. Cumulative effects of 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP) on kidney and testis. *Ind. Health.* 27(2), 49-58, 1989.
- (69) Leone M, Costa M, Capitanio GL, Palmero S, Prati M, and Leone MM. Dibromochloropropane(DBCP) effects on the reproductive function of the adult male rat. *Acta Europaea Fertilitatis.* 19(2), 99-103, 1988.
- (70) Fawcett DW, Leak LV, and Heidger PM Jr. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J. Reprod. Fertil.(Suppl.)* 10, 105-122, 1970.
- (71) Imazawa T, Sato M, Furukawa F, Shinoda K, Yoshimura H, Toyoda K, and Takahashi M. Ultrastructural study of the blood-testis barrier in rat by the lanthanum method. *Eisei. Shikenjo. Hokoku.* 109, 67-71, 1991.
- (72) Dym M, and Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod. Fertil.(Suppl.)* 10, 105-122. 1970.
- (73) Gilula NB, Fawcett DW, and Aoki A. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Devel. Biol.* 50, 142-168, 1976.
- (74) Weber JE, Turner TT, Tung KSK, and Russell LD. Effects of cytochalasin D on the integrity of the Sertoli cell(blood-testis) barrier. *Am. J. Anat.* 182, 130-147, 1988.

- (75) Shemi D, Waksman J, Sod-Moriah UA, Abraham M, Friedlander M, Potashnik G, and Kaplanski J. Ultrastructure of testicular cells in rats treated with dibromochloropropane(DBCP). *Andrologia*. 21(3), 229-36, 1989.
- (76) Russell LD, Malone JP, and Karpas SL. Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by distribution of its hormonal stimulation. *Tissue & Cell*. 13, 369-380, 1981.
- (77) Russell LD, and Clermont Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone-treated hypophysectomized rats. *Anat. Rec.* 187, 347-366, 1977.
- (78) Johnson L, Dickerson R, Safe SH, Nyberg CL, Lewis RP, and Welsh TH Jr. Reduced Leydig cell volume and function in adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin without a significant effect on spermatogenesis. *Toxicology*. 76(2), 103-118, 1992.
- (79) Nelson AA. Giant interstitial cells and extraparenchymal interstitial cells in the human testis. *Am. J. Pathol.* 14, 831-841, 1938.
- (80) Naka Y, Inui T, Okada H, Izumo Y, Shoji T, Okuda M, Watanabe A, and Mori S. Rapid recovery of Leydig cell population in rat cryptorchid testes after ethanedimethanesulfonate injury: Immunohistochemical studies. *Acta Histochem. Cytochem.* 24(2), 257-265, 1991.
- (81) Mitsumori K, Kodama Y, Uchida O, Takada K, Saito M, Naito K, Tanaka S, Kurokawa Y, Usami M, Kawashima K, Yasuhara K, Toyoda K, Onodera H, Furukawa F, Takahashi M, and Hayashi Y. Conformation study, using nitrobenzene, of the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity test protocol proposed by the organization for economic cooperation and development(OECD). *J. Toxicol. Sci.* 19, 141-149, 1994.
- (82) Lui EMK, and Wysocki GP. Reproductive tract defects induced in adult male rats by postnatal 1,2-dibromo-3-chloropropane exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90, 299-314, 1987
- (83) Jonsz GF, and Pomerantz DK. Fetal irradiation increases androgen production by dispersed Leydig cells of the rat. *J. Androl.* 5, 344-350, 1984.
- (84) Kerr JB, Rich KA, and DeKretser DM. Alterations of the fine structure and androgen secretion of the interstitial cells in the experimentally cryptorchid rat testis. *Biol. Reprod.* 20, 409-422, 1979.
- (85) Mendis-Handagama SMLC. Estimation error of Leydig cell numbers in atrophied rat testes due to the assumption of spherical nuclei. *J.*

Microscopy. 168(1), 25-32, 1992.

- (86) Bravo R, Frank R, Blundell PA, and MacDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature*. 326, 515-517, 1987.
- (87) Kurki P, and Vanderian M. Expression of proliferating cell nuclear antigen(PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp. Cell. Res.* 166, 209-219, 1986.
- (88) Casasco A, Giordano M, Danova M, Casasco M, Cornaglia AI, and Calligaro A. PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissue. *Histochem.* 99, 191-199, 1993.
- (89) Foley JF, Dietrich DR, Swenberg JA, and Maronpot RR. Detection and evaluation of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in rat tissue by an improved immunohistochemical procedure. *J. Histochemol.* 14(4), 237-241, 1991.
- (90) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, and Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunologicalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* 162, 285-294, 1990.
- (91) Connolly KM, and Bogdanffy MS. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: A dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *J. Histochem. Cytochem.* 41(1), 1-6, 1993.
- (92) Wijsman JH, van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJH, and Cornelisse CJ. Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen compared with bromodeoxyuridine incorporation in normal and neoplastic rat tissue. *J. Pathol.* 168, 75-83, 1992.
- (93) Santamaria L, Martin R, Codesal J, and Paniagua R. Myoid cell proliferation in rat seminiferous tubules after ischemic testicular atrophy induced by epinephrine. Morphometric and immunohistochemical(bromo-deoxyuridine and PCNA) studies. *Int. J. Androl.* 18, 13-22, 1995.
- (94) Spano M, Evenson DP. Flow cytometric analysis for reproductive biology. *Biol. Cell.* 78(1-2), 53-62, 1993.
- (95) Woodruff TK, Borree J, Attie KM, Cox ET, Rice GC, and Mather JP. Stage-specific binding of inhibin and activin to subpopulations of rat germ cells. *Endocrinology*, 130(2), 871-81, 1992.

- (96) Hittmair A, Rogatsch H, Mikuz G, and Feichtinger H. Quantification of spermatogenesis by dual-parameter flow cytometry. *Fertil. Steril.* 61(4), 746-750, 1994.
- (97) Hittmair A, Rogatsch H, Dffner F, Feichtinger H, Ofner D, Mikuz G. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and semiquantitative histology of spermatogenesis: a comparative study. *Fertil. Steril.* 58(5), 1040-1045, 1992.
- (98) Hartmann W, and Hettewer H. The flow cytometry for diagnosis of male fertility. *Acta Histochem.* 73(2), 243-9, 1983.
- (99) Evenson DP, Bear RK, Jost LK, and Gesch RW. Toxicity of thiotepa on mouse spermatogenesis as determined by dual-parameter flow cytometry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82, 151-163, 1986.
- (100) Toppari J, Mali P, and Eerola E. Rat spermatogenesis in vitro traced by quantitative flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 34(8), 1029-1035, 1986.
- (101) Crotty KL, May R, Kilvicki A, Kumar D, and Neal Jr. DE. The effect of antimicrobial therapy on testicular aspirate flow cytometry. *J. Urol.* 153, 835-838, 1995.
- (102) Scoog SJ, Evans CP, Hayward IJ, Griffin JL, and Hitchcock CL. Flow cytometry of fine needle aspirations of the Sprague-Dawley rat testis: Defining normal maturation and the effects of multiple biopsies. *J. Urol.* 146, 620-623, 1991.

제 3 장 소동물을 이용한 특수독성 시험법의 확립 및 보완

제 1 절 신경독성 시험방법의 확립

1. 서 론

현재 전 세계적으로 수많은 화학물질이 일상생활에서 이용되고 있고 또한 많은 화학관련 물질이 신물질개발연구로 인하여 환경 및 인체에 노출되고 있다. 이러한 화학물질들은 뇌의 기능변화를 일으킬 수 있는 신경독성 유발 가능성을 내포하고 있다. 실제로 1990년대초 캐나다 해변지역의 해조류의 demoic acid 오염으로 인해 인근 주민들에게서 나타난 학습력, 기억력 상실 및 심할 경우 사망에까지 이르는 사건발생 및 농약사용으로 인한 주민들에게서 나타난 기억력상실 및 Parkinson's diseases 등의 유발 등이 보고된 바 있다.

미국 및 OECD 국가들에서는 화학물질 사용으로 야기될 수 있는 신경독성 작용에 대비하기 위하여 신경독성 시험에 대한 규제를 강화하고 있으며 표준시험 지침을 마련하고 있다. 이미 잘 알려진 바와 같이 brain 기관은 타기관에 비교하여 볼 때 매우 복잡하고 다양한 세부조직과 기능으로 이루어져 있어 어떠한 화학물질이 뇌기관에 영향을 주는 작용도 매우 다양하므로 시험방법도 매우 다양하다. 특히 전 세계적으로 인정받을 수 있는 보편적인 신경독성 시험방법의 확립이 매우 중요한 관건이다.

본 연구에서는 미국의 EPA나 FDA, OECD 지침의 신경독성 검색시험방법인 GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein) 측정시험 및 학습능력 및 기억력 기능측정 방법인 Morris water maze와 Radial 8-arm maze 시험방법을 확립하고 양성대조물질 및 시험물질을 이용하여 시험하였다. 화학물질이 뇌조직에 노출되면 1차적으로 뇌내 GFAP protein의 양이 유의성있게 증가하므로 신경독성의 예민한 표지물질로 보고되어지고 있으며 전세계 화학물질의 규제기관에서도 본 시험방법의 실시를 추천하고 있다.

지금까지 보고된 바에 의하면 뇌조직내 GFAP protein의 변화는 화학물질이 병

리조직학적으로 독성변화를 일으키기 전에 검색할 수 있는 변화로 현재는 Sandwich-Elisa 방법을 이용한 간편한 assay 방법이 개발되어 이용되고 있다. 본 연구에서 이를 이용하여 신경독성의 스크리닝 검색을 하고자 하였다.

또한 동물에서의 학습능력 및 기억력 기능 측정은 현재 Morris water maze, Radial 8-arm maze, Y-arm maze, Conditioned avoidance, Passive avoidance 방법 등의 이용이 보고되어지고 있다. 본 연구에서는 Morris water maze와 Radial 8-arm maze 방법을 이용하여 동물에서의 학습능력 및 기억능력을 측정하고자 하였다.

2. Measurement of Kainate-induced increase in GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein) by Sandwich Elisa assay

가. 재료 및 방법

(1) 재 료

1) 시약은 아래와 같은 제품을 구입하여 사용하였다.

시 약 명	제조회사 및 제조번호
① Rabbit anti-bovine GFAP	Dako corp. (Santabarbara, CA) ; DAKO Cat# Z0334, 1 ml, 224,800
② Monoclonal anti-porcine GFAP	Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) ; BM Cat# 814-369, 1 ml, 262,600
③ Alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-mouse IgG	Jackson Immno Research Laboratories (West Grove, PA) ; Cat# 315-055-003, 1 ml, 148,500
④ Alkaline phosphatase substrate kit (p-nitrophenyl phosphate)	Bio Rad Lab. (Rochmond, CA) ; Cat# 172-1063, 135,000
⑤ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Bko-rad Cat# 161-0301
⑥ Bicinchoninic acid(BCA)	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)
⑦ BSA	Sigma Cat# A7888
⑧ Nonfat dry milk	Bio-rad Cat# 170-6404
⑨ KCl	Sigma CA# P9541
⑩ NaCl	Sigma Cat# S3014
⑪ Na ₂ HPO ₄	Sigma Cat# S9763
⑫ K ₂ HPO ₄	Junsei Chemical Co. Cat# 84185-1250
⑬ Triton X-100	Sigma Cat# T8787

2) 기기는 아래와 같은 기기를 사용하였다.

기 기 명	모델명 및 제조회사
① Spectrophotometer	Beckman, DU-650
② Microplate Reader	Molecular devices, Emax
③ Homogenizer	Janke & Kunkel IKA-labortechnik, Ultra-Turrax T-25
④ Incubator	Tokyo Rikakikai Co. Eyela MMS-1
⑤ Balance	Mettler, AT200
⑥ Flat-bottom microtiter plate	Costar Cat# 9018

3) 실험동물

한국화학연구소 실험동물육종센터에서 공급한 6주령의 건강한 Sprague Dawley 계통의 암수컷 랫트를 사용하였다. 동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대 습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국화학연구소 안전성연구센터 BS2동 6호실에서 사육하였다. 시험기간중 동물실의 온습도는 자동온습도 측정기에 의하여 매시간 측정되었으며 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적(월 1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 인정되지 않았다. 사료는 실험동물용 고형사료(제일사료 주식회사)를 자유섭취시켰다. 물은 상수도를 자외선 살균기로 소독시킨 후 물병을 이용하여 자유섭취 시켰다.

(2) 방 법

1) Toxicant administration 및 brain 조직분리 : 시험동물의 뇌조직 손상은 6주령의 암수컷 Sprague Dawley 랫트에 Kainic acid를 0.1 및 1.0 mg/kg으로 정맥투여한 후 투여후 1, 2, 7 및 28일에 동물을 decapitation하여 뇌를 분리하였고 cortex, hippocampus, hypothalamus, striatum, cerebellum을 외과용 핀셋과 메스를 사용하여 분리하였다. 분리된 뇌의 각 부분의 무게를 측정후 10 volume의 hot($80 \sim 90^\circ\text{C}$) 1%(w/v) SDS(Sodium Dodecyl Sulfate) 용액으로 homogenize 시켰고 assay전까지 -70°C 에 냉동보관하였다.

2) Total protein assay : 전체 단백질량의 측정은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay 방법을 이용하여 측정하였다¹⁾.

3) Bicinchoninic Acid(BCA) Protein 방법을 이용한 Protein량 측정법

① Mix 1 volume of sample with 20 volumes of SWR (i.e. 100 μ l and 2 ml) [Standard Working Reagent (SWR) : 50 volumes BCA solution, 1 volume $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4%) solution]

② Incubate at 37°C for 30 minutes.

③ Cool to room temperature

④ Read A_{562} .

Tube No.	μ l Water	μ l Protein Standard	μ l Unknown Sample	ml protein Reagent
1	100	0	-	2.0
2	95	5	-	2.0
3	90	10	-	2.0
4	80	20	-	2.0
5	70	30	-	2.0
6	60	40	-	2.0
7	40	60	-	2.0
8	20	80	-	2.0
9	0	100	-	2.0
10	95	-	5	2.0
11	90	-	10	2.0

4) Sandwich Elisa assay

GFAP protein의 양 측정 시험방법의 도식도는 Fig. 3-1-1에 나타내었다.

Elisa assay에 필요한 buffer 및 용액조성

• PBS(Phosphate-buffered saline) (pH 7.4, 5 L)

137 mM	NaCl	(58.45 g)	40.04 g
2.7 mM	KCl	(74.56 g)	1.01 g
1.4 mM	KH_2PO_4	(136.09 g)	0.95 g
8.0 mM	Na_2HPO_4	(142 g)	5.68 g

Flow Chart for Performing GFAP and Miscellaneous Second-Tier Assays

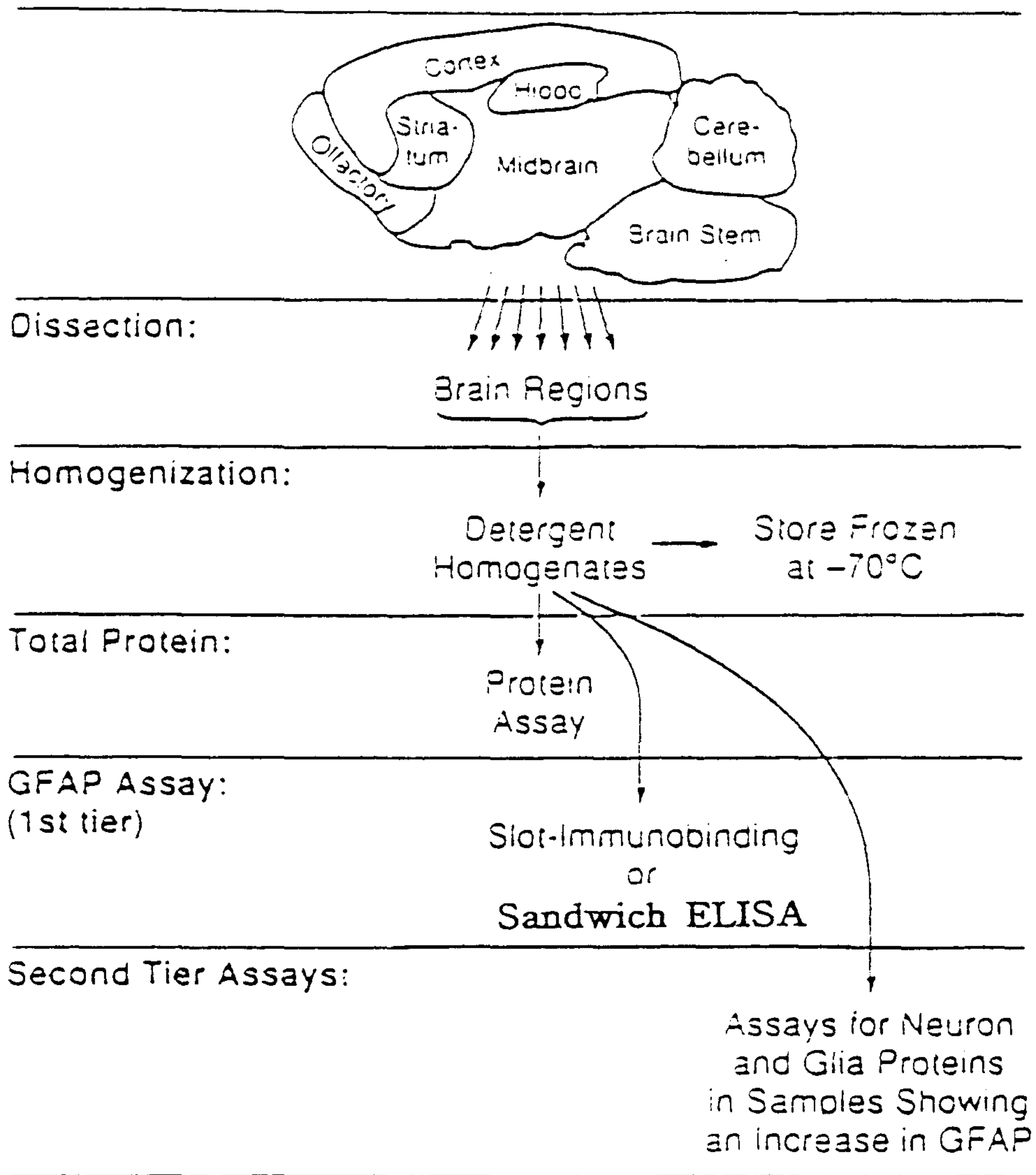


Fig. 3-1-1. Sample preparation flow chart for GFAP and second-tier assays

• **Sample buffer/Washing buffer : (pH 7.4)**

137 mM	NaCl	(58.45 g)
2.7 mM	KCl	(74.56 g)
1.4 mM	KH ₂ PO ₄	(136.09 g)
8.0 mM	Na ₂ HPO ₄	(142 g)

• **Coating**

Polyclonal anti-GFAP (Dako Z334, 4.1 g/L), 10 mL
1.0 μg total immunoglobulin/100 μl in PBS
24.4 μl polyclonal anti-GFAP/9,975.6 μl PBS

• **Blocking : (100 mL)**

5% (w/v) nofat dry milk in PBS 5 g

• **Second Ab**

monoclonal anti-GFAP (BM 814369, 40 μg), 10 mL
monoclonal anti-GFAP (1:500)/0.5 triton X-100 + blocking sol.
20 μl monoclonal anti-GFAP/9,980 μl

• **Enzyme**

Alkaline phosphate conjugated anti-mouse IgG, 10 mL
(Jackson Immunoresearch Lab. 315-055-003, 06 mg/ml)
Alkaline phosphate conjugated anti-mouse IgG(1:3000)/0.5% triton X-100 +
blocking sol.
APC IgG(1:30)/0.5% triton X-100 + blocking sol. 100 μl/9,900 μl

5) Sandwich ELISA 시험법

① 1% SDS sample을 sample buffer [PBS (137 mM NaCl/2.7 mM KCl/1.4 mM KH₂PO₄/8.0 mM NaH₂PO₄·7H₂O), 0.5% Triton X-100 포함]에서 전체 단백질 최종농도 10 μg/ml (1 μg/100 μl로 희석)하였다.

② Standard curve는 sample buffer에서 0.05~10 μg total protein/100 μl로 희석된 것을 사용하였다(0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 및 10 μg/100 μl).

③ Sample high in GFAP (예; cerebellum) : 5 μg/μl

Sample low in GFAP (예; striatum) : 20 μg/μl

④ 1.0 μg total immunoglobulin/100 μl in PBS, polyclonal anti-GFAP

의 IgG fraction으로 flat-bottom microtiter plate coating. 37°C에서 1~2시간 항온 처리후 4°C에서 overnight하였다. 모든 다른 항온처리는 reciprocating shaker에서 moderate shaking으로 실온에서 실시하였다.

⑤ Wash 4 x with PBS, 200 μ l/well

⑥ BLOTTO[5% (w/v) nonfat dry milk in PBS], 100 μ l/well로 1시간 blocking 하였다.

⑦ 1시간 동안 duplicate로 standard와 sample(100 μ l/well)을 항온처리하였다.

⑧ 0.5% triton X-100을 포함하는 PBS(200 μ l/well)로 4번 씻어주었다.

⑨ 0.5% triton X-100을 포함하는 (100 μ l/well) BLOTTO에서 만들어진 monoclonal anti-GFAP(1:500)으로 1시간 항온처리하였다.

⑩ 0.5% triton X-100을 포함하는 PBS(200 μ l/well)로 4번 씻어주었다.

⑪ 0.5% triton X-100을 포함하는(100 μ l/well) BLOTTO에서 만들어진 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG(1:3000)으로 30분 항온처리하였다.

⑫ 0.5% triton X-100을 포함하는 PBS(200 μ l/well)로 4번 씻어주었다.

⑬ 100 μ l p-nitrophenyl phosphate substrate를 첨가하고 10분 후 100 μ l 0.4N NaOH로 반응을 멈추었다.

⑭ Substrate solution : Immediately before use, mix together 1 ml of 5x diethanolamine buffer and 4 ml of water for each tablet. Make sure each tablet completely dissolves. Substrate solution should be colorless or pale yellow.

⑮ After last rinse of phosphate conjugate, add 100 μ l well substrate solution. Develop until bright yellow of reaction product occurs.

⑯ Read at 405 nm using microplate reader

나. 결 과

Rat brain specific region의 homogenate에서 GFAP의 농도를 Sandwich ELISA를 사용하여 측정하였다. 본 실험에서는 신경독성의 first-tier indicator로써 GFAP를 확인하기 위하여 positive control 물질인 Kainate를 사용하였다.

Kainate에 의해 야기된 GFAP specific activity를 percent of control로 요약한 결과는 Table 3-1-1과 같다. Sprague Dawley 랫트(Male, 6 weeks)에 1 mg/kg Kainate를 i.v. injection 후 1, 2, 7 및 28일에 각각 다른 region (cortex, hypothalamus, hippocampus, cerebellum, striatum)에서 GFAP의 농도를 측정하였다. 1일에서는 cortex, hypothalamus, hippocampus에서 control에 비해 15% 이상 증가하여 유의성이 있었고, cerebellum과 striatum에서는 유의성이 없었다. 2일에서는 모든 region에서 유의성이 있었다. 7일에서는 hippocampus와 striatum에서만 유의성이 있었고 그외 region에서는 유의성이 없었다. 반면에 28일에서는 전 region에서 유의성이 없었다(Figure 3-1-2).

Figure 3-1-3의 경우에는 성별만이 다른 조건에서 Sprague Dawley 랫트(female, 7 weeks)에 1 mg/kg Kainate를 i.v. injection 후 1, 2, 7 및 28일에 각각 다른 region(cortex, hypothalamus, hippocampus, cerebellum, striatum)에서 GFAP의 농도를 측정하였다. 1일에서는 hypothalamus, hippocampus, cerebellum에서 유의성이 있었고, cortex와 striatum region에서는 control 보다 GFAP activity가 약간은 증가했으나 유의성은 관찰되지 않았다. 2일에서는 cerebellum에서만 유의성이 있었고 다른 region에서는 유의성이 나타나지 않았다. 7과 28일에서는 모든 region에서 유의성이 나타나지 않았다.

Figure 3-1-4에서 Kainate 농도만이 다른 조건에서 Sprague Dawley 랫트(male, 5 weeks)에 0.1 mg/kg Kainate를 i.v. injection 후 1, 2, 7 및 28일에 각각 다른 region(cortex, hypothalamus, hippocampus, cerebellum, striatum)에서 GFAP의 농도를 측정하였다. 1일에서는 cortex, hypothalamus, hippocampus, cerebellum regions에서 유의성이 관찰되었고, striatum에서는 유의성이 관찰되지 않았다. 2, 7 및 28일에서는 각각 유의성이 관찰되지 않았다.

Figure 3-1-5에 성별이 다른 조건에서 Sprague Dawley 랫트(female, 7 weeks)에 0.1 mg/kg Kainate를 i.v. injection 후 1, 2, 7 및 28일에 각각 다른 region(cortex,

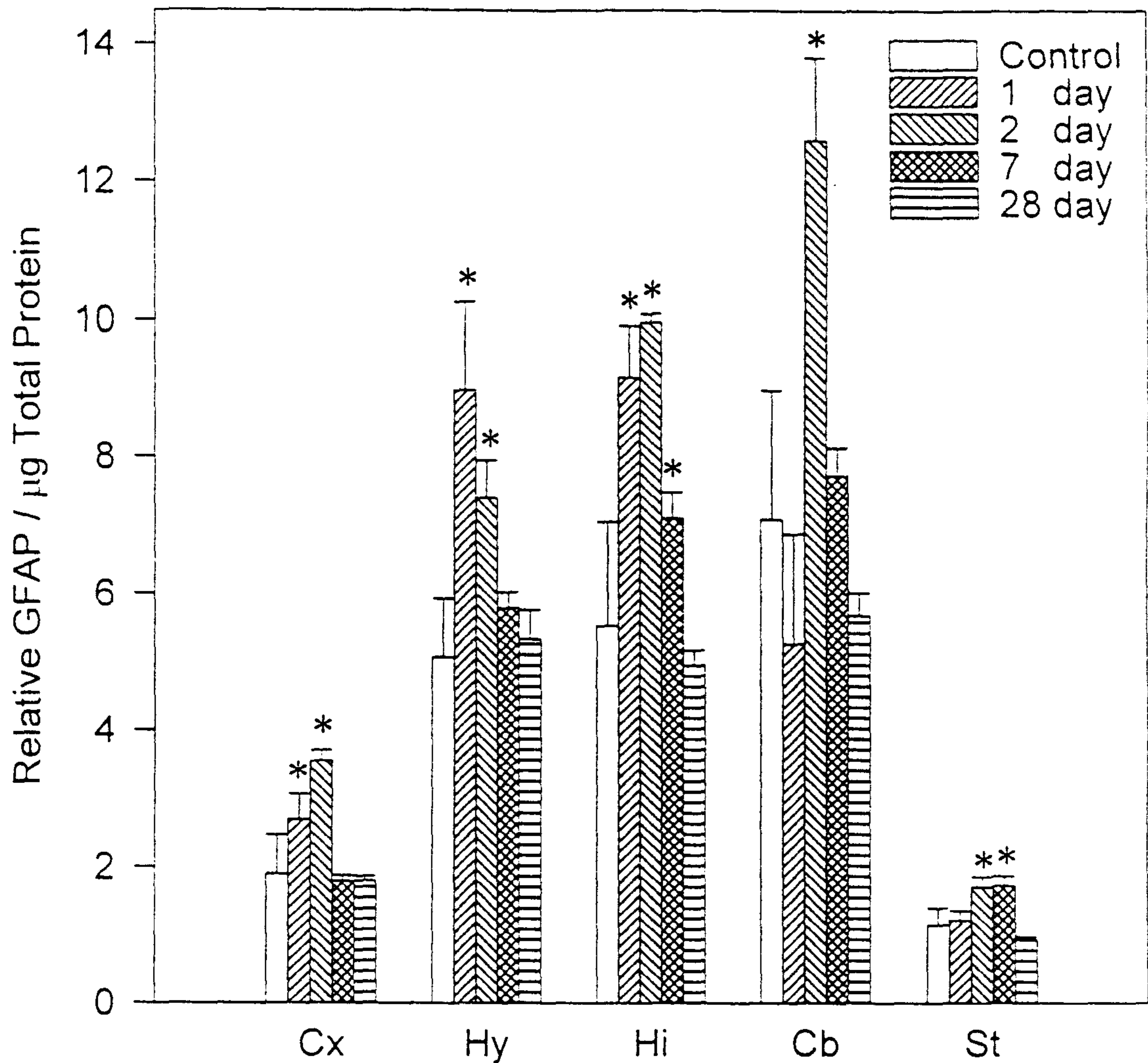
hypothalamus, hippocampus, cerebellum, striatum)에서 GFAP의 농도를 측정하였다. 1일에서는 hypothalamus만을 제외하고 다른 region에서는 유의성이 관찰되었다. 2일에서는 striatum을 제외하고 다른 region에서는 유의성이 관찰되었다. 7일에서는 모든 region에서 유의성이 관찰되었다. 28일에서는 hypothalamus, hippocampus region에서는 유의성이 관찰되었고, cortex, cerebellum, striatum에서는 유의성이 관찰되지 않았다.

전체적으로 볼 때 Sprague Dawley 랫트에 Kainate를 i.v. injection 후 1, 2, 7 및 28일에 각각 다른 region(cortex, hypothalamus, hippocampus, cerebellum, striatum)에서 GFAP의 농도를 측정한 본 시험에서는 0.1, 1 mg/kg 두 농도에서만 상관은 뚜렷하게 구별되지 않았고, 성별과 각 region별 다양성은 관찰할 수 있었다. 또한 거의 모든 농도와 regions에서 1, 2일에 증가된 GFAP 농도가 7일과 28일에서 다시 control level로 회복됨을 관찰하였다. 이전에 보고된 것처럼 GFAP의 농도는 뇌의 각 region 마다 다르며, Kainate-induced brain damage는 GFAP를 증가시키는 것으로 사료된다.

Table 3-1-1. GFAP level in specific regions of rat brain as determined by Sandwich ELISA

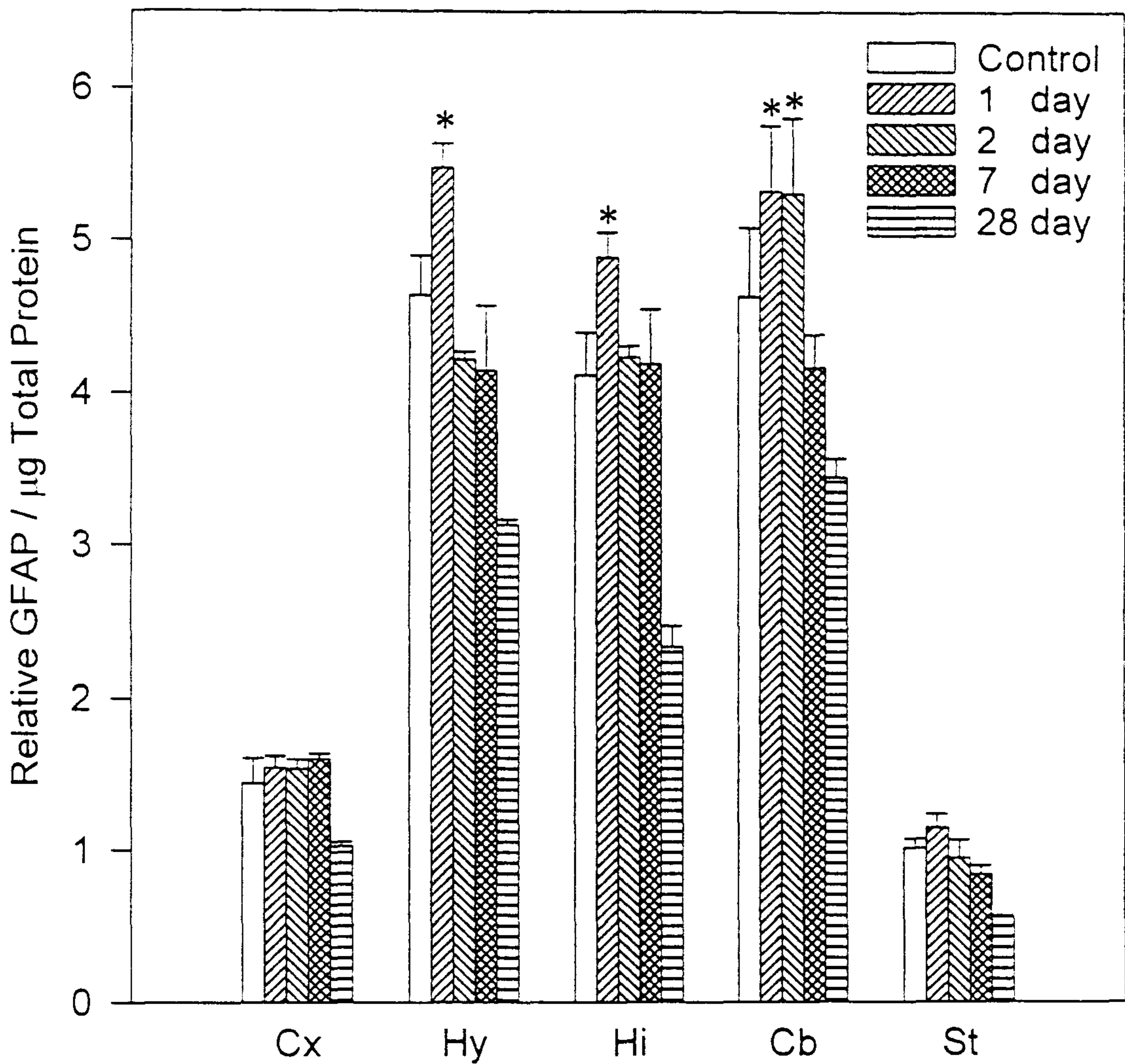
Sex	Drug (mg/kg,i.v.)	Day	GFAP Specific Activity (% of control)				
			Cx	Hy	Hi	Cb	St
Male	Kainate (0.1)	1	162*	122*	117*	121*	91
		2	79	83	90	99	69
		7	106	79	88	89	78
		28	70	113	73	90	104
Female	Kainate (0.1)	1	167*	90	113*	165*	130*
		2	141*	123*	134*	134*	102
		7	131*	144*	134*	124*	122*
		28	113	122*	127*	97	88
Male	Kainate (1)	1	143*	177*	166*	75	106
		2	188*	146*	180*	178*	149*
		7	95	114	128*	109	151*
		28	95	105	90	80	82
Female	Kainate (1)	1	107	118*	119*	129*	114
		2	107	91	103	115*	94
		7	111	89	102	90	83
		28	71	67	57	74	55

* : Significant difference from control group (% of control > 15%, n=4)



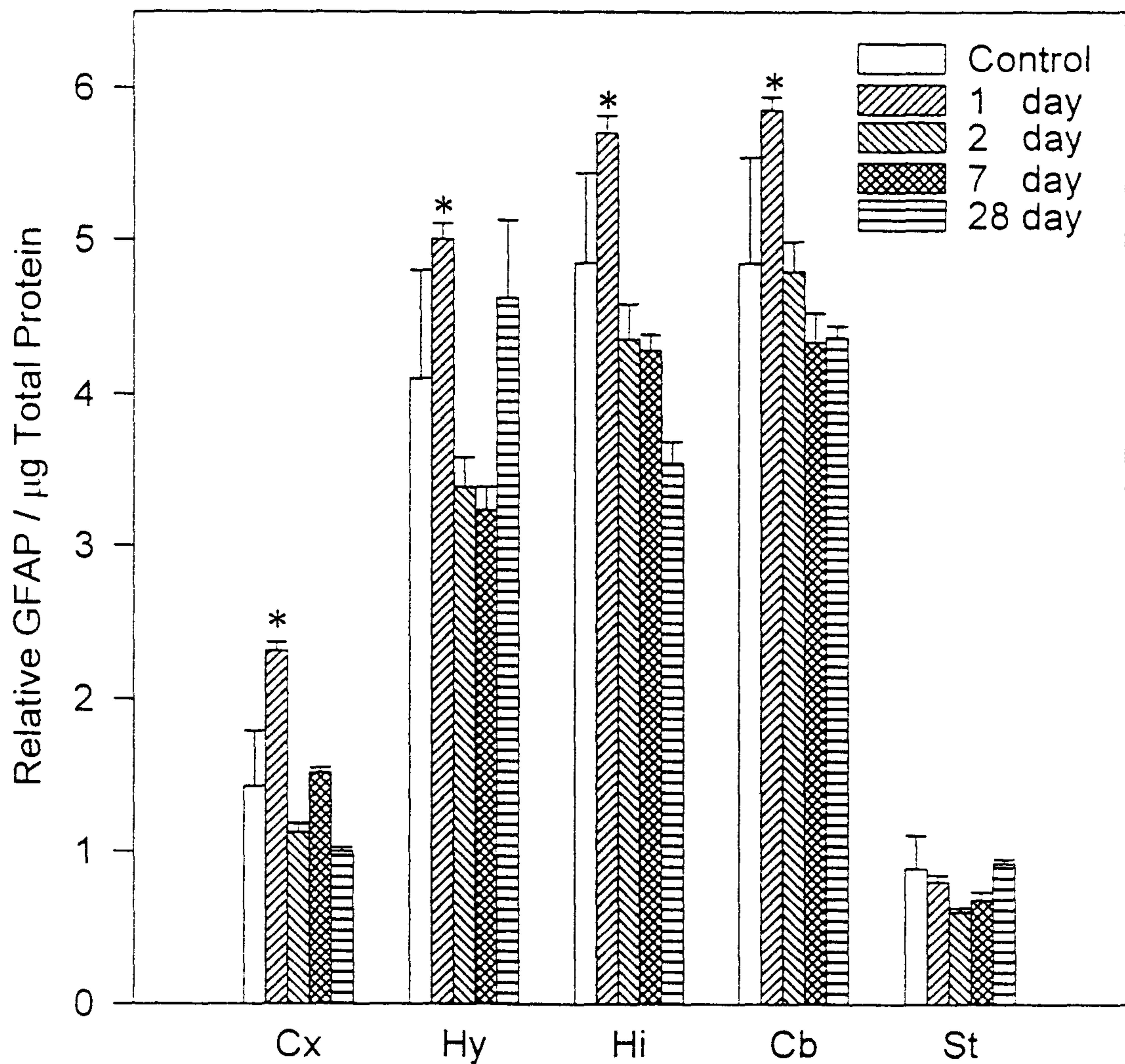
*: Significantly different from control group (% of control > 15, mean SEM, n=4)
 Cx: Cortex, Hy: Hypothalamus, Hi: Hippocampus, Cb: Cerebellum, St: Striatum

Fig. 3-1-2. GFAP level in specific regions of male rat brain after intravenous administration of kainic acid(1 mg/kg) determined by Sandwich ELISA



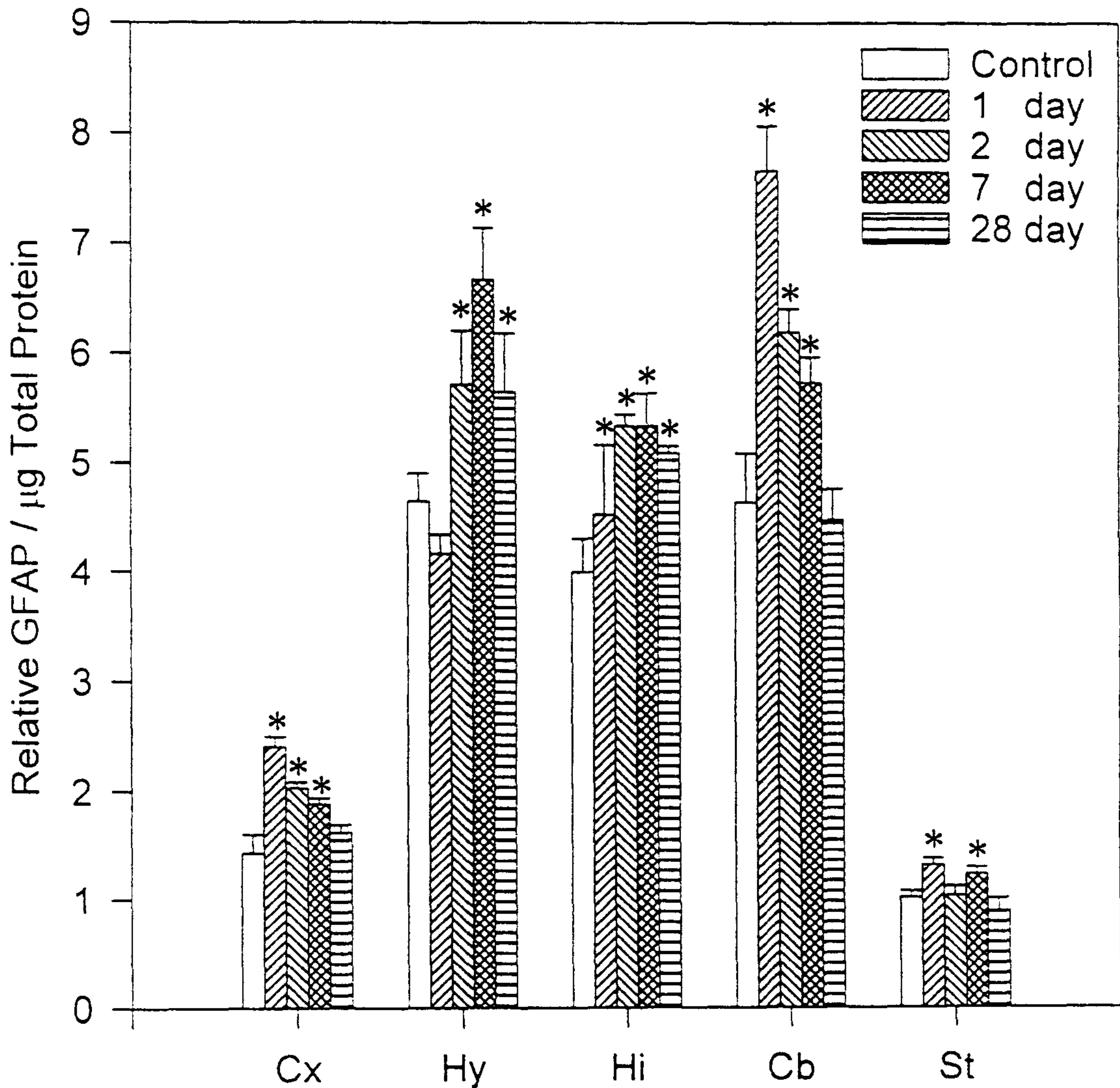
*:Significantly different from control group (% of control > 15, mean SEM, n=4)
 Cx: Cortex, Hy: Hypothalamus, Hi: Hippocampus, Cb: Cerebellum, St: Striatum

Fig. 3-1-3. GFAP level in specific regions of female rat brain after intravenous administration of kainic acid(1 mg/kg) determined by Sandwich ELISA



*: Significantly different from control group (% of control > 15, mean SEM, n=4)
 Cx: Cortex, Hy: Hypothalamus, Hi: Hippocampus, Cb: Cerebellum, St: Striatum

Fig. 3-1-4. GFAP level in specific regions of male rat brain after intravenous administration of kainic acid(0.1 mg/kg) determined by Sandwich ELISA



*:Significantly different from control group (% of control > 15, mean SEM, n=4)
 Cx: Cortex, Hy: Hypothalamus, Hi: Hippocampus, Cb: Cerebellum, St: Striatum

Fig. 3-1-5. GFAP level in specific regions of female rat brain after intravenous administration of kainic acid(0.1 mg/kg) determined by Sandwich ELISA

다. 고찰 및 결론

본 연구에서 확립된 Sandwich ELISA 방법을 이용한 GFAP assay는 sensitive한 신경독성 검색방법으로써 기존화학물질, 신개발 의약, 농약 및 화학물질의 뇌에 미치는 작용의 측정에 간편하면서도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 본 시험방법은 시간 및 경비가 많이 소요되는 병리조직학적 검사 이전에 뇌손상을 간편하고 빠른 시간내에 측정할 수 있는 방법으로 많은 화학물질을 손쉽게 스크리닝 할 수 있다는 장점이 있다.

라. 참고문헌

- (1) P.K. Smith, R.I. Krohn : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85, 1985.
- (2) J.P. O'Callaghan : Quantification of glial fibrillary acid protein ; comparison of slot-immunobinding assays with a novel Sandwich ELISA. *Neurotoxicology and Teratology* 13, 275-281, 1991.
- (3) N.V. Regemorter : Value of glial fibrillary acidic protein determination in amniotic fluid for prenatal diagnosis of neural tube defects. *Clinican Chimica Acta* 165, 83-88, 1987.
- (4) Vincent A. Memoli : Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in peripheral nerve sheath tumors. *Ultrastructural Pathology* 7, 269-275, 1984.
- (5) J.P. O'collaghan : Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction : can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13, 113-122, 1992.
- (6) J. Ruutiainen : Measurement of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP antibodies by solid-phase radioimmunoassays. *Acta Neurol. Scandinav.* 63, 297-305, 1981.
- (7) J.W. Palfreyman : Glial fibrillary acidic protein (GFAP) . *J. of Neurological Sciences* 41, 101-113, 1979.
- (8) J.P. O'Callaghan : The concentration of glial fibrillary acidic protein.

Increase with age in the mouse and rat brain. *Neurobiology of Ageing* 12, 171-174, 1991.

(9) P.J. Spencer, J.L. Mattsson : Neurotoxicity screening methods are sensitive to experimental history. *Int. J. of Psychophysiology* 14, 5-19, 1993.

(10) C.N. Pegram : Monoclonal antibodies reactive with epitopes restricted to glial fibrillary acidic proteins of several species. *Neurochemical Pathology*.

(11) J.P. O'Callaghan : Assessment of neurotoxicity : use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomedical and Environmental Sciences* 4, 197-206, 1991.

(12) M. Frankfurt, J. O'Callaghan : 5,7-Dihydroxytryptamine injections increase glial fibrillary acidic protein in the hypothalamus of adult rats. *Brain Research* 549, 138-140, 1991.

3. Measurement of memory behavior using Morris water maze and Radial 8-arm maze

가. 재료 및 방법

(1) 사용동물

시험동물인 S.D. 랫트(SPF)는 생후 3주령의 수컷동물을 한국화학연구소 실험동물육종실에서 공급받아 사용하였다. 동물은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국화학연구소 안전성연구센터 BS2동 6호실에서 사육하였다. 시험기간중 동물실의 온습도는 자동온습도 측정기에 의하여 매시간 마다 측정되었으며 환기 횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적(월 1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 인정되지 않았다. 사료는 실험동물용 고형사료(제일사료 주식회사)를 자유섭취시켰다. 물은 상수도를 자외선 살균기로 소독시킨 후 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

(2) 사용기기

Videotrack system(View point, France), Morris water maze pool (150 cm

Ø, height 60 cm), Radial 8-arm maze plate(170 cm Ø, height 24 cm, arm length 70 cm)

나. 시험방법

(1) Morris water maze

시험군의 구성은 대조군, 양성대조군(Scopolamine 0.5 mg/kg i.p.) 및 시험물질 투여군 I(K-885), II(K-886)으로 각군당 10마리씩 사용하였다. 시험물질인 K-885와 K-886은 2주간 경구투여하였고 대조군은 생리식염수를 2주간 경구투여하였다. 양성대조군은 scopolamine을 0.5 mg/kg으로 시험개시전에 복강투여하고 연속하여 4일간 시험개시전에 투여하였다. 시험을 위하여 water maze pool (Ø 150 cm)에 platform(goal)을 북동(NE)쪽에 고정시키고 서쪽(WE) 지점에 위치시키고 동물이 goal을 찾기까지의 시간 및 이동거리를 측정하였다. 한 번 시험에 goal을 찾는 기회를 각 동물에 3번씩 부여하고 goal을 찾는 시간은 최대 80초로 지정을 하였다. 동물이 goal을 찾을 경우 platform 위에서 30초간 휴식을 취하도록 한 후 연이어 다음 시도를 실시하였다. 만약 동물이 정한 시간까지 goal을 찾지 못할 경우 인위적으로 platform 위에 올려놓은 후 30초간 휴식을 취하게 하였다. 이러한 시험과정은 오전, 오후에 각각 시행하였다. 또한 이러한 과정을 4일간 연속적으로 측정하고 4일간 휴식기를 가진 후 다시 4일간 연속적으로 시험을 실시하였다.

(2) Radial 8-arm maze

시험동물은 water maze 시험이 끝난 동물군을 사용하여 시험하였다. 시험동물은 시험시작전 하루 12시간 동안 체중이 약 85% 정도 감소할 때까지 절식을 시키고 물은 제한하지 않았다. 본 시험에 앞서 7일간 매일 동물을 8-arm maze plate에서 10분간 training시키는데 이때 먹이는 무작위로 두군데에 놓아두며 동물은 plate의 중간지점에 놓는다. 본 시험일인 일주일의 훈련기간 후에는 먹이를 plate의 한곳에만 고정시키고 동물은 plate의 중간지점에 놓고 동물이 먹이를 찾기까지의 시간 및 이동거리를 하루 3회 측정하였다. 이때 동물이 먹이를 찾지 못할 경우 인위적으로 먹이가 있는 곳으로 옮겨 잠시 머물도록하여 위치를 확인시킨 후 다음 시도를 실시하였다.

(3) 통계학적 방법

통계학적 분석은 조사시점별 각 시험항목에 대하여 다중비교 검정법을 실시하였다. Water maze 시험의 경우 goal을 찾는 시간과 이동거리, 8-arm maze 시험의 경우 먹이가 있는 지점을 찾는 시간과 이동거리를 측정하여 일원배치 분산분석을 유의수준 $\alpha=0.05$ 혹은 $\alpha=0.01$ 로 검정하였다. 일원배치분산분석의 검정결과가 $p<0.05$ 혹은 $p<0.01$ 인 경우에는 군들간의 유의한 차이가 있으므로 대조군과 투여군의 다중비교법인 Dunnett's test를 실시하여 군간의 유의차를 조사하였다.

다. 결 과

(1) Water maze 시험

시험물질인 K-885, K-886이 기억력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시험물질을 2주 경구투여한 후 시험한 결과는 Table 3-1-2 및 Figure 3-1-6에 나타내었다. 또한 양성대조물질로는 뇌의 기억력을 저하시키는 작용으로 보고되어있는 scopolamine을 투여하였다.

Table 3-1-3에서 볼 수 있듯이 시험물질인 K-885, K-886은 대조군과 비교하여 아무런 영향도 나타나지 않았으나 scopolamine 투여군에서는 시험첫째날과 셋째날에 유의성있게 goal을 찾는 시간의 증가가 관찰되었다. 또한 두 번째 시험시도에서도 scopolamine 투여군은 2, 3, 일째에 유의성있는 goal을 찾기까지의 시간 증가가 관찰되었다(Table 3-1-3, Figure 3-1-7). 또한 goal을 찾기까지의 이동거리에 대한 결과에서도 scopolamine 투여군에서는 유의성있는 증가가 첫 번째 및 두 번째 시도에서도 관찰되었으나 시험물질 투여군에서는 대조군과 비교하여 유의성있는 증가가 관찰되지 않았다(Table 3-1-3, 3-1-4, Figure 3-1-8, 3-1-9).

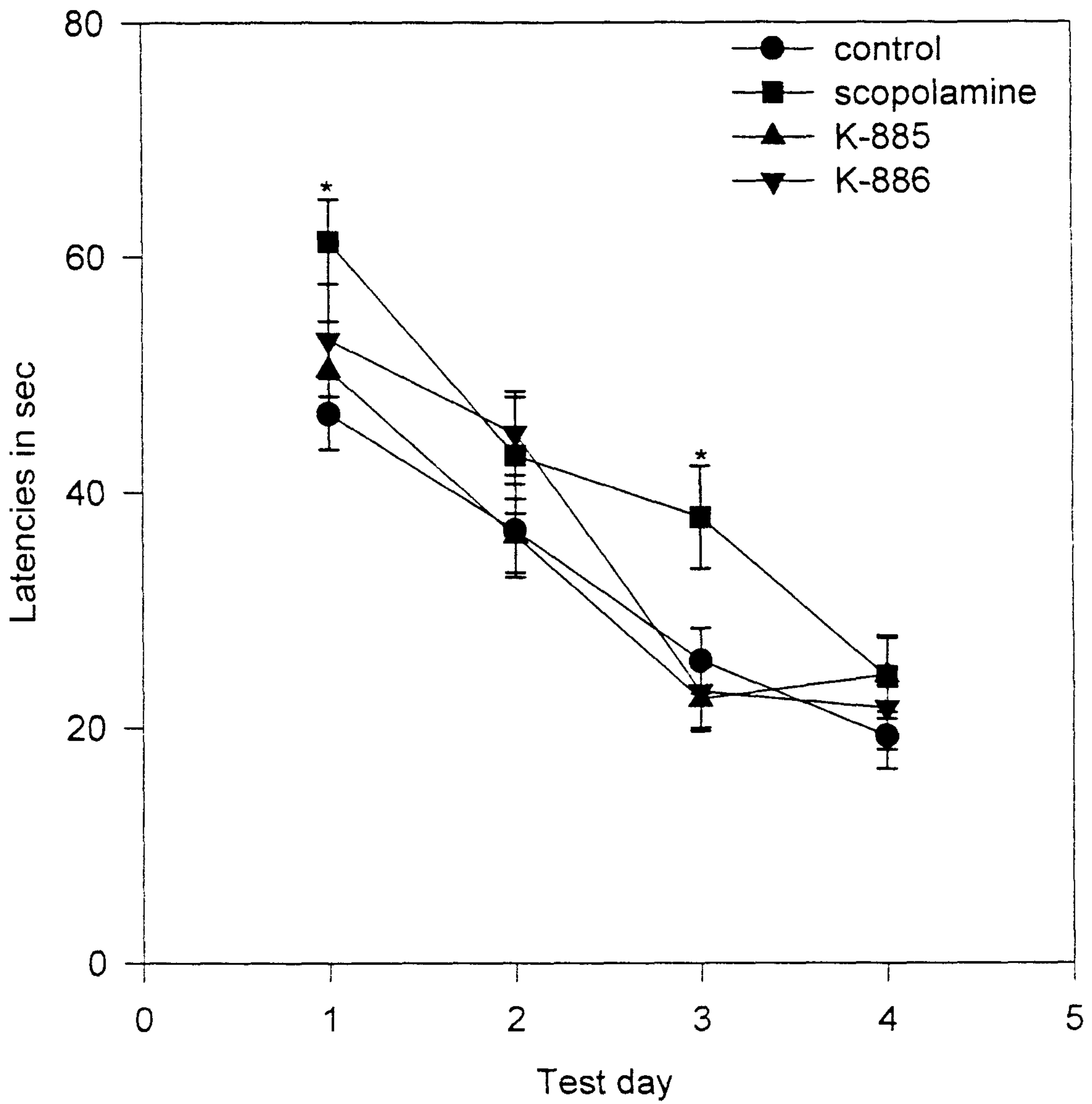


Fig. 3-1-6. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats in morris water maze test

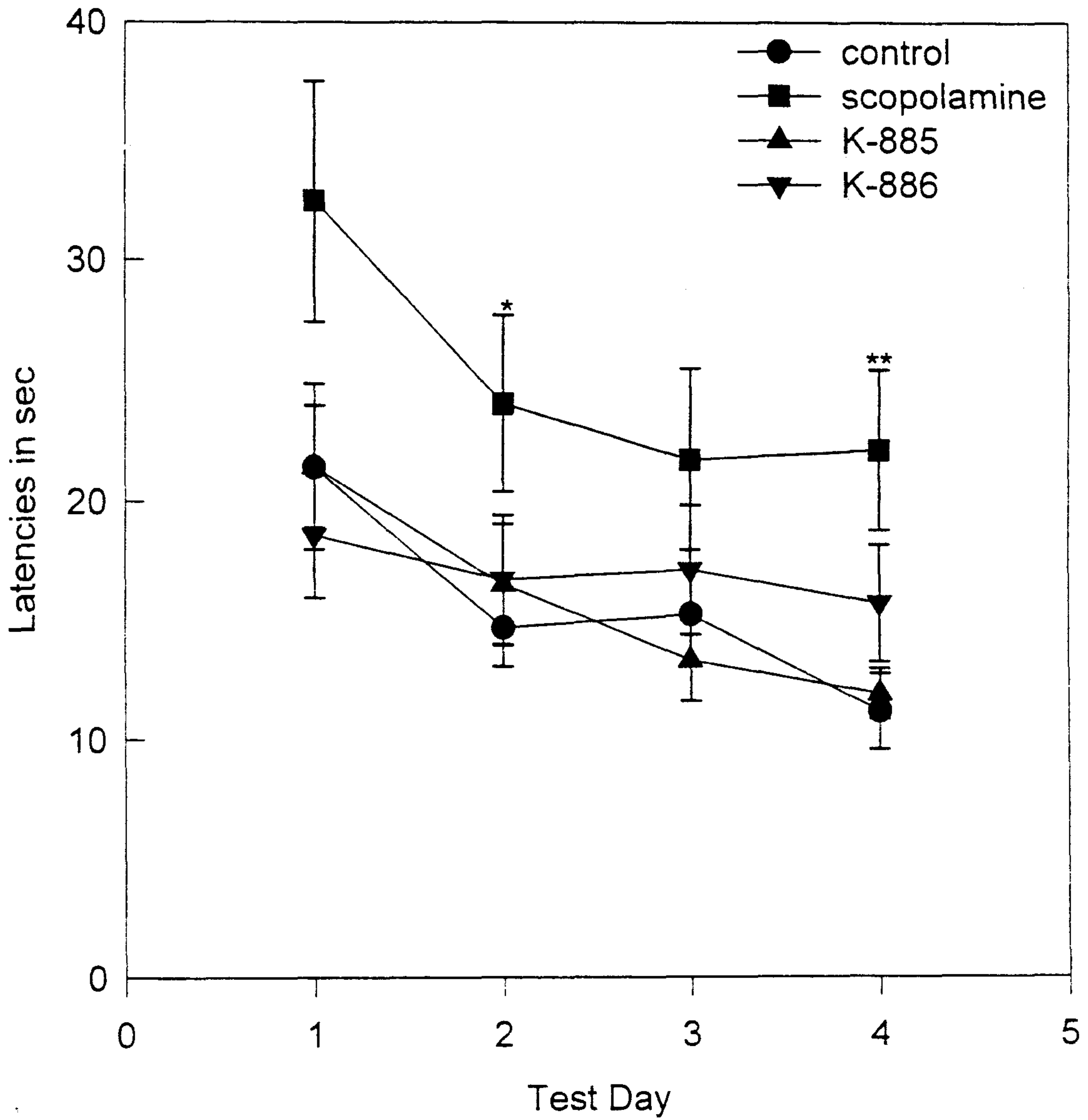


Fig. 3-1-7. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats after first trial session in morris water maze test

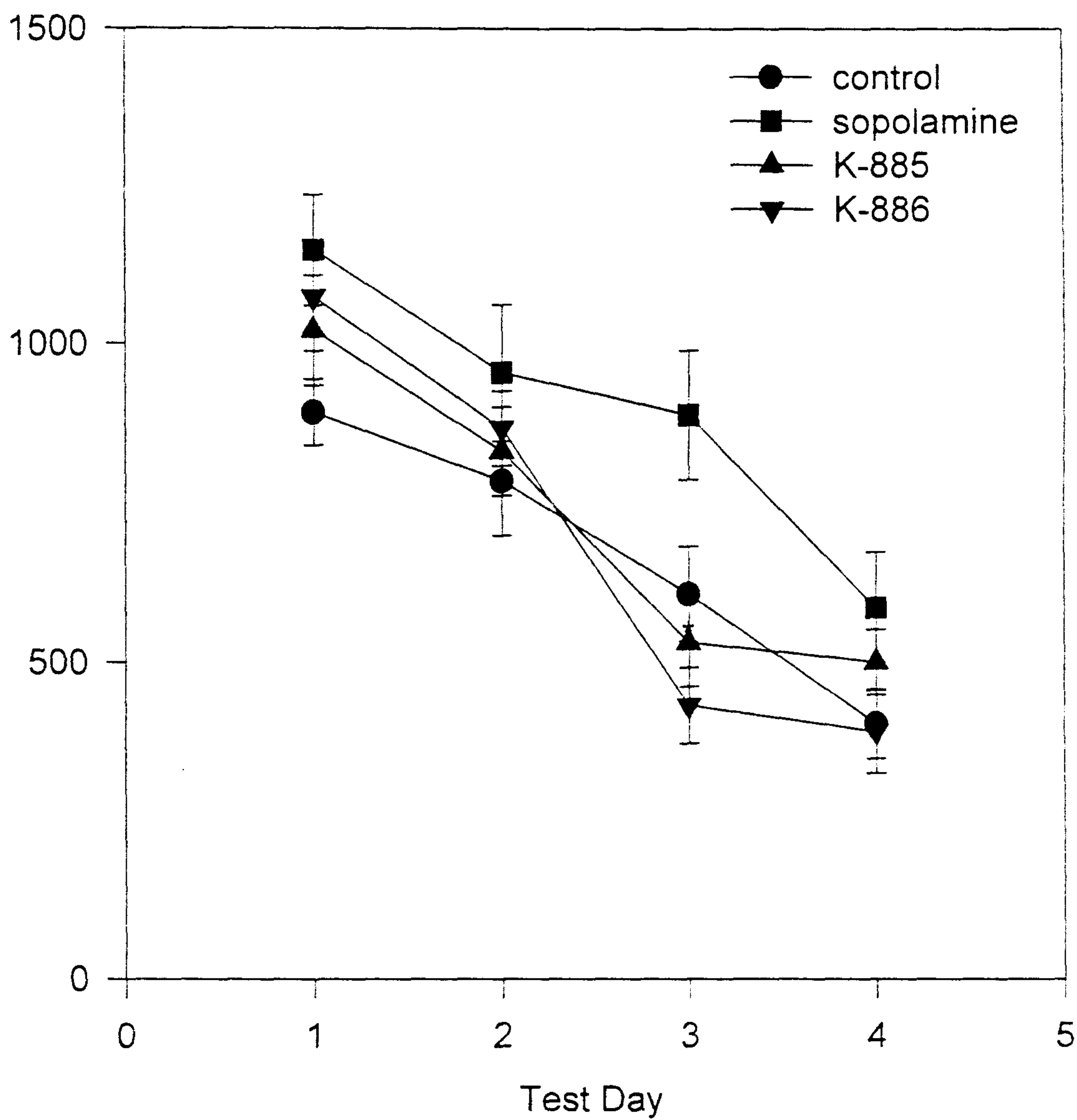


Fig. 3-1-8. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats in morris water maze test

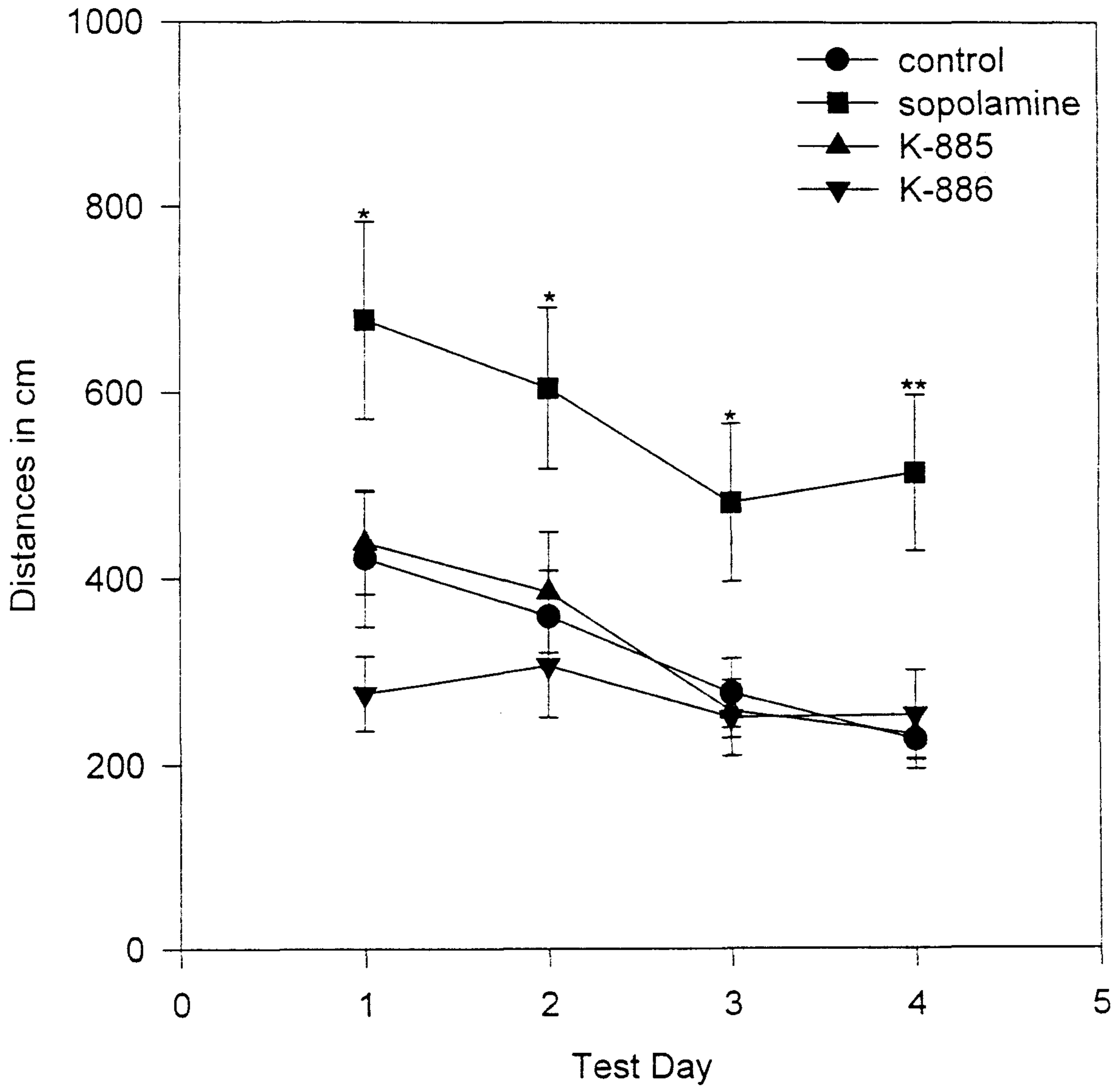


Fig. 3-1-9. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats after first trial session in morris water maze test

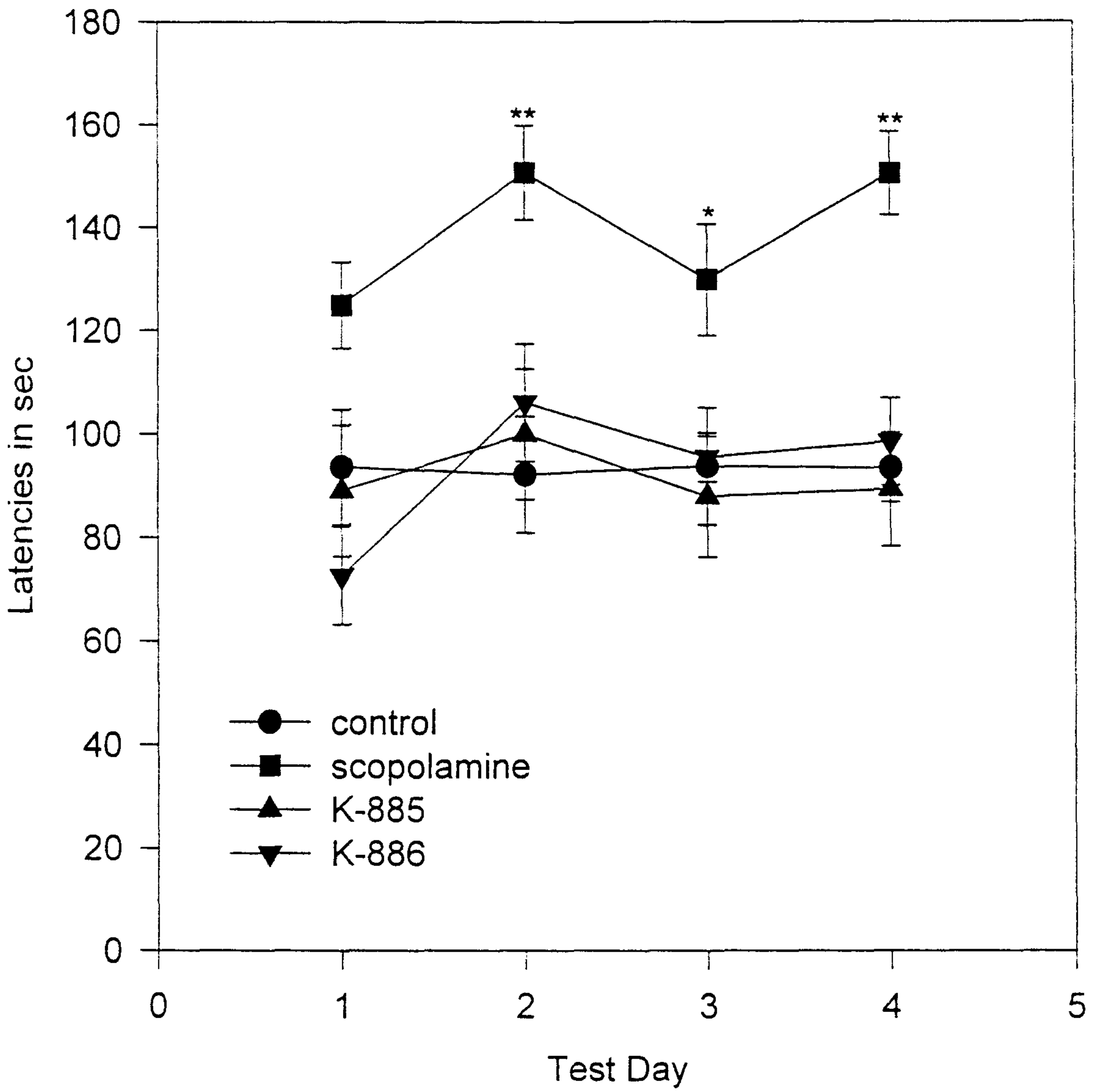


Fig. 3-1-10. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats in radial 8-arm maze test

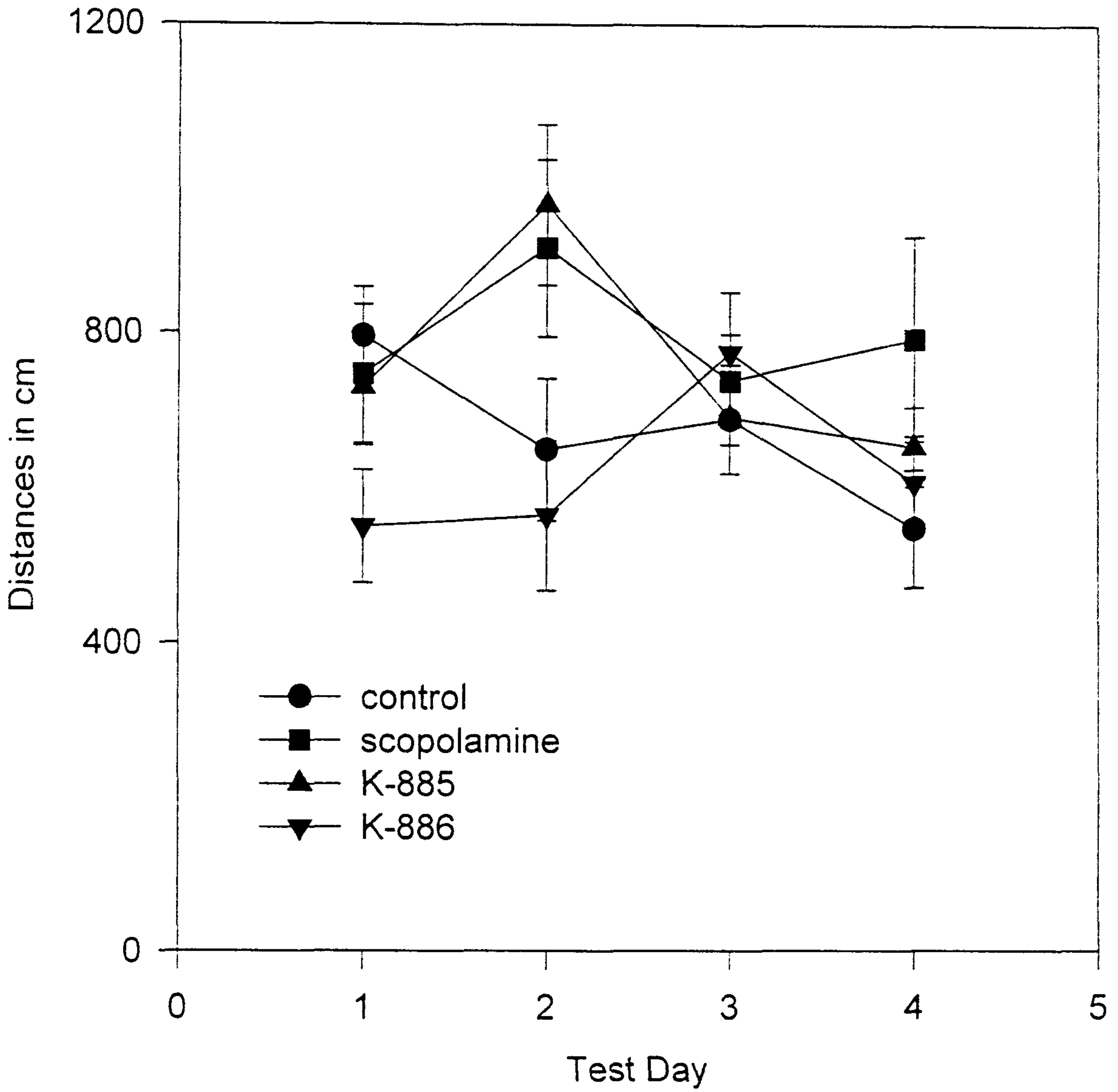


Fig. 3-1-11. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats in radial 8-arm maze test

Table 3-1-2. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats

Group	Dose (mg/kg)	Route	Test Day (sec)			
			1	2	3	4
Control	0	p.o.	46.69 ± 3.00	36.71 ± 3.97	25.64 ± 2.77	19.27 ± 2.78
Scopolamine	0.5	i.p.	61.31 ± 3.61*	43.12 ± 4.96	37.86 ± 4.41*	24.26 ± 3.51
K-885	374	p.o.	50.40 ± 4.12	36.27 ± 3.14	22.38 ± 2.67	24.45 ± 3.14
K-886	6875	p.o.	52.94 ± 4.76	44.99 ± 3.54	23.02 ± 3.04	21.63 ± 3.53

Significant difference from control group (*; p < 0.05)

Each value represents the mean ± S.E. (n=10).

Table 3-1-3. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats after first trial session

Group	Dose (mg/kg)	Route	Test Day (sec)			
			1	2	3	4
Control	0	p.o.	21.42 ± 3.45	14.69 ± 1.62	15.24 ± 2.14	11.17 ± 1.59
Scopolamine	0.5	i.p.	32.45 ± 5.03	24.05 ± 3.64*	21.74 ± 3.77	22.11 ± 3.33**
K-885	374	p.o.	21.45 ± 2.53	16.51 ± 2.55	13.30 ± 1.68	11.91 ± 1.06
K-886	6875	p.o.	18.58 ± 2.64	16.71 ± 2.72	17.12 ± 2.73	15.70 ± 2.46

Significant difference from control group (*; p < 0.05, **; p < 0.01)

Each value represents the mean ± S.E. (n=10)

Table 3-1-4. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats

Group	Dose (mg/kg)	Route	Test Day (cm)			
			1	2	3	4
Control	0	p.o.	892.16 ± 51.44	785.06 ± 85.66	607.35 ± 74.60	402.27 ± 54.68
Scopolamine	0.5	i.p.	1145.76 ± 86.04	952.31 ± 105.89	986.36 ± 99.82*	586.06 ± 86.59
K-885	374	p.o.	1019.44 ± 86.03	830.80 ± 68.69	530.52 ± 69.52	499.61 ± 51.67
K-886	6875	p.o.	1071.12 ± 84.11	866.39 ± 57.72	430.99 ± 59.90	389.57 ± 65.20

Significant difference from control group (*; p < 0.05)

Each value represents the mean ± S.E.

Table 3-1-5. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats after first trial session.

Group	Dose (mg/kg)	Route	Test Day (cm)			
			1	2	3	4
Control	0	p.o.	421.77 ± 73.49	359.44 ± 49.51	277.58 ± 36.91	227.49 ± 31.74
Scopolamine	0.5	i.p.	677.63 ± 105.93*	604.99 ± 86.34*	482.28 ± 84.87*	514.00 ± 83.74**
K-885	374	p.o.	438.49 ± 55.22	385.67 ± 64.88	258.18 ± 28.76	233.17 ± 26.16
K-886	6875	p.o.	276.55 ± 40.02	306.76 ± 55.67	251.13 ± 40.81	253.73 ± 48.23

Significant difference from control group (*; p<0.05, **; p<0.01)

Each value represents the mean ± S.E.

(2) Radial 8-arm maze 시험

Radial 8-arm maze 시험의 경우 양성대조물질인 scopolamine 투여군에서는 동물이 먹이를 찾기까지 걸린 시간이 대조군과 비교하여 유의성있게 증가 (Table 3-1-6, Figure 3-1-9)하였으나 시험물질 투여군인 K-885 및 K-886 투여군에서는 대조군과 비교하여 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 Table 3-1-7 및 Figure 3-1-10에서 볼 수 있듯이 동물이 먹이를 찾기까지 이동한 거리를 측정 한 결과에서는 대조군, 양성대조군, 시험물질 투여군에서 아무런 유의성있는 변화도 나타나지 않았다.

Table 3-1-6. Mean response latencies on 4 retention trials of 3 weeks old male rats

Group	Dose (mg/kg)	Route	Test Day (sec)			
			1	2	3	4
Control	0	p.o.	93.58 ± 11.09	92.10 ± 11.27	93.73 ± 11.38	93.39 ± 6.57
Scopolamine	0.5	i.p.	124.82 ± 8.35	150.54 ± 9.19**	129.80 ± 10.75*	150.39 ± 8.16**
K-885	374	p.o.	89.02 ± 12.67	99.91 ± 12.54	87.88 ± 11.71	89.31 ± 11.01
K-886	6875	p.o.	72.61 ± 9.40	106.01 ± 11.31	95.50 ± 4.72	98.46 ± 5.45

Significant difference from control group (*; p<0.05, **; p<0.01)

Each value represents the mean ± S.E.

Table 3-1-7. Mean response distances on 4 retention trials of 3 weeks old male rats

Group	Dose (mg/kg)	Route	Test Day (cm)			
			1	2	3	4
Control	0	p.o.	795.81 ± 62.73	649.15 ± 91.96	688.86 ± 70.16	547.74 ± 75.68
Scopolamine	0.5	i.p.	746.61 ± 89.24	908.92 ± 114.30	738.56 ± 59.87	792.36 ± 131.84
K-885	374	p.o.	730.18 ± 75.25	765.11 ± 104.41	691.35 ± 35.07	653.07 ± 51.39
K-886	6875	p.o.	549.86 ± 72.73	563.85 ± 96.89	774.77 ± 77.81	606.58 ± 60.84

Each value represents the mean ± S.E.

라. 고찰 및 결론

본 연구를 통하여 동물에서의 학습능력 및 기억능력을 측정할 수 있는 시험방법 즉, Morris water maze나 Radial 8-arm maze 방법이 확립되었고 다양한 시험물질을 이용한 시험을 수행하여 본 방법이 학습능력 및 기억능력 변화를 검색하는데 적합한 방법임을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 확립된 시험방법은 추후 농·의약, 기타 화학물질, 기능성 식품첨가물 개발에 이용될 수 있을 것이다. 또한 현대사회가 고령화가 되어감에 따라 급증하고 있는 Dementia성 치매 등을 예방할 수 있는 국민식이개선연구 등에도 이용될 수 있을 것이라고 사료된다.

마. 참고문헌

(1) Daphna Joel : Effects of electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex or its subfields on 4-arm baited, 8-arm radial maze, two-way active avoidance and conditioned fear tasks in the rat. Brain Research 765, 37-50, 1997.

(2) Tomoko Bessho : Effects of the novel high affinity choline uptake enhancer on deficits of water maze learning in rats. Anzheim-Forscher. 46(1), 369-373, 1996.

제 2 절 면역독성시험방법의 확립 및 보완

1. 서 론

다양한 종류의 세포들에 의해 기능조절이 이루어지고 있는 복잡한 생체의 면역기구는 바이러스나 박테리아 등 미생물들의 침입으로부터 생체를 보호하는 매우 중요한 방어기구로써, 약물 또는 환경독성물질 등에 의해 그 조절기구나 기능에 이상이 발생하면, 면역능의 저하 또는 항진, 자가면역증상 (autoimmunity), 또는 알러지 현상을 유발하게 된다¹⁾. 미국의 National Toxicology Program (NTP)에서는 1970년대 초 미시간주 주민들에게서 polybrominated biphenyl의 오염에 의한 심각한 면역독성이 발생한 이래²⁾, 면역독성의 중요성을 인식하고 면역독성 시험법의 개발에 힘을 쏟아, 다양한 시험으로 구성된 면역독성 시험에 관한 가이드라인을 제정하기에 이르렀다. 이 가이드라인은 Tier system으로 구성되어 Tier I에 속한 비교적 단순한 시험을 먼저 수행하고, 면역독성이 의심이 되면 Tier II에 속한 좀 더 구체적인 실험을 수행하도록 체계가 되어 있다¹⁾. 지난 10여 년간 이러한 가이드라인에 준하여, 현재까지 약 50여종 이상의 약물 또는 환경독성물질에 대하여 면역독성 여부에 관한 연구가 진행되어 왔으며³⁾, 새로운 면역독성 검출방법의 개발에 관한 연구도 이에 병행하여 국내외에서 진행되어 왔다^{4,7)}. 그리고 미국의 환경청 (EPA)과 식품의약청(FDA)에서도 농약, 항 바이러스 제제 및 식품첨가물 등에 대한 면역독성에 관한 중요성이 날로 증대되고 있다^{8,9)}. 일본의 경우, 국립위생시험소가 주관이 되어 1988년부터 국제 화학물질 안전성 계획(IPCS, International Programme on Chemical Safety)에서 실시하는 국제공동 연구에 참여하여 면역독성 시험방법의 조기확립을 이루고 있는데, 현재까지 면역억제제로 사용되고 있는 azathioprine 과 cyclosporin A에 대하여, 전 세계 17개국 22개 연구기관에서 동일한 시험물질과 동일한 시험방법 하에서 연구를 수행하므로써 전 세계적으로 면역독성시험에 관한 표준화를 위해 노력하고 있는 실태이다¹⁰⁻¹²⁾. 한편 국내에서는 1994년 4월에 당시 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호 '의약품의 독성시험기준'을 통하여 면역독성 시험법중 일부가 추가되어 앞으로 면역독성시험과 관련한 산업계

로부터의 수탁 가능성이 매우 높아졌다¹³⁾. 이 고시에 따르면 아급성, 만성독성 시험 등의 결과로부터 면역기능 및 면역장기의 이상이 의심될 경우, 세포성 면역시험 및 체액성 면역시험에 대하여 각 1종 이상의 시험을 실시하여 면역독성에 대한 총체적 평가를 하도록 하였으며, 필요시에 대식세포의 기능과 자연살해세포의 기능에 관한 시험을 추가로 하도록 되어있다(Table 3-2-1).

Table 3-2-1. Testing panels for detecting drug-induced immunotoxicity: a guideline from the Ministry of Health and Welfare, Korea.

Parameters	Procedures
· Antigenicity	<ul style="list-style-type: none"> · Anaphylactic shock reaction · Passive cutaneous anaphylaxis reaction · Indirect hemagglutination
· Cellular immunity	<ul style="list-style-type: none"> · Lymphoproliferation assay with concanavalin A, phytohemagglutinin, or specific antigens · Mixed leukocyte response · Delayed-type hypersensitivity to ovalbumin, Tuberculin, or <i>Listeria</i>
· Humoral immunity	<ul style="list-style-type: none"> · Splenic plaque-forming cell assay · Blood concentration of antibodies to T-cell dependent antigens · Blood concentration of antibodies to T-cell independent antigen, lipopolysaccharide · Lymphoproliferation with lipopolysaccharide
· Macrophage functions	<ul style="list-style-type: none"> · Phagocytic activity to <i>Listeria monocytogenes</i> · Cytotoxic activity to YAC-1 cells in mice and K562 cells in human · Carbon clearance test
· Natural killer cell function	<ul style="list-style-type: none"> · Cytotoxicity to YAC-1 cells in mice and K562 cells in human

그러나 국내에서는 아직 면역독성시험에 관한 수요가 많지 않은 편인데 이는 시험항목의 중요성이 낮아서가 아니라, 아직 국내 연구기반이 다른 독성시험부분

에 비해 늦게 시작함에 따라 나타난 것으로 판단하며, 한국이 OECD에 참여하였고, 국내 독성시험 시장이 개방되고 있는 추세를 고려한다면, 면역독성시험 부분에 대한 수요가 폭증할 것으로 사료되며, 이러한 배경으로 화학연구소 안전성 연구센터에서는 1994년부터 면역독성시험 부문을 설치하여 산업계의 면역독성 시험에 관한 수요에 대한 대비를 하여 왔고, 본 연구를 통하여 그 기반이 완전히 조성되어 국내 신약개발 연구에 대한 준비가 모두 이루어진 것으로 판단된다. 그 동안 각종시험법 등에 관한 35건의 표준작업지침서의 완비와 면역독성 기작에 관한 연구, 그리고 Flow cytometer를 이용한 면역독성연구 등의 부문에 집중적인 연구를 진행하였다. 본 연구에서는 2-bromopropane과 ethyl carbamate를 대상물질로하여 면역독성의 검증과 독성기작에 관한 연구를 수행하였다.

2-Bromopropane은 전자제품 제조 및 조립공정시 사용하는 침지액인 Solvent 5200의 주성분이 되는 유기용제로 1994년 2월 Freon이 환경규제물질로 공포된 후 그 대체물질로 국내 산업체에서 수입하여 사용하고 있는 물질이다. 최근 이 물질을 사용하는 산업장의 근로자들 가운데 여성에게서는 무월경 등의 난소 기능저하증, 남성에게서는 정자생성기능 저하증 등의 생식기능 장애를 보였으며, 이들 중 일부는 재생불량성 빈혈 등의 골수기능저하 소견을 함께 보였다¹⁴⁾. 이와 같은 집단적인 건강장애 문제가 발행한 이후 한국산업안전공단 산업보건연구원에서 실시한 역학조사 결과 2-bromopropane을 가장 유력한 원인물질로 추정하였고¹⁴⁾, 2-bromopropane의 유해성에 대한 관심이 고조되고 있으나 2-bromopropane의 독성에 관한 연구자료는 매우 한정적인 것으로 설치류에서의 반수치사량 정도만 언급되어 있을 뿐이었다^{15,16)}. 최근의 연구결과에 의하면 2-bromopropane은 포유류 배양세포에 대한 염색체 이상시험 결과에서 음성의 결과를 나타내었고, 흰쥐를 이용한 소핵시험결과 소핵의 유발을 관찰할 수 없었으나, 전적혈구수당 다염성 적혈구의 비율에 있어서는 매체대조군에 비해 현저한 감소가 확인되어 골수에서의 적혈구 생성과정에 다소 영향이 있음을 확인하였다. 또한 살모넬라균을 이용한 복귀돌연변이 시험에서는 양성의 결과를 나타냄으로서 2-bromopropane가 살모넬라 균주에 있어서 염기쌍 치환형의 돌연변이를 유발함을 확인하였다¹⁷⁻¹⁹⁾. 2-Bromopropane의 복강내 반복투여시험과²⁰⁾ 흡

입독성시험 결과²¹⁾ 2-bromopropane의 표적장기가 정소이며 조혈기관에 영향이 있음이 보고되었다. 암컷 랫트를 이용한 14일 복강내 반복투여 시험에서 2-bromopropane은 용량 상관성 있게 estrous cycle을 지연시킴으로써 여성근로자들의 월경불순이 증명되었다고 하였다²²⁾. 그러나, 2-bromopropane이 면역독성을 유발할 가능성이 골수 기능저하 등의 증상에서 예측이 되었지만 현재까지 면역독성 여부 및 그 기작에 관한 연구가 전혀 수행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 Sprague Dawley계 랫트에 2-bromopropane을 28일간 투여할 때 항체생성능의 변화 및 비장과 흉선세포의 표면항원 변화를 살펴봄으로써 면역독성 기작을 예측하고자 하였다.

항 종양치료제로써 사용이 되었던 ethyl carbamate(urethane)는 유기합성 반응의 중간체 및 살충제 등의 용해제로 쓰이며, 실험동물의 마취제로도 쓰이는 물질로써, 발효음식이나 술에 에탄올과 carbamyl phosphate 간의 반응에 의해 자연적으로 생성되어 소량 존재하는 것이 알려져 있다^{23,24)}. Ethyl carbamate는 마우스, 랫트, 햄스터 등의 실험동물에서 매우 강력한 발암원으로 작용하여 leukemia, lymphoma, lung adenoma, hepatoma, 그리고 melanoma를 일으키는 것이 보고되어 있다^{25,26)}. 한편, 종양유발 가능정도의 용량을 마우스에 투여할 때 ethyl carbamate는 면역계에 대한 독성도 역시 유발하여 natural killer cell 활성도의 급격한 저해, B16F10 melanoma 세포의 제거능 감소, 폐의 종양발육증가, 그리고 면양적혈구(SRBC)에 대한 T-세포 의존형 항체반응의 억제 등이 보고된 바 있다²⁷⁻²⁹⁾. 이러한 ethyl carbamate의 발암성 및 면역독성은 구조-활성관계가 매우 뚜렷해서 methyl carbamate나 propyl carbamate의 경우 발암성이 거의 없으며²⁴⁾, methyl carbamate의 경우 면역독성도 없음이 증명되었다²⁸⁾. Ethyl carbamate의 면역독성 기작에 관한 본연구실의 연구결과 phenobarbital과 같은 P450 유도제로 BALB/c 마우스를 전처리할 때 ethyl carbamate에 의해 억제되는 면양적혈구에 대한 비장세포의 항체반응이 더욱 억제되는 결과를 얻었으며, 비장세포 배양에 간 microsome과 ethyl carbamate를 일정기간 공동배양할 때에도 ethyl carbamate에 의한 항체생성능의 억제가 더욱 증가되는 결과를 얻어, ethyl carbamate의 면역독성에는 대사활성화 과정이 요구될 것이라는 예측을 가능케 하였다. 또한 ethyl carbamate의 면역독성에 있어 P450에 대한 억제제를 in

vivo 및 in vitro 실험에 도입하여 사용한바 있어, 본 연구에서는 ethyl carbamate와 P450 대사물들을 이용하여 T-세포 비의존형 항체생성반응 및 B-세포 및 T-세포의 유약화 반응 등의 억제능을 시험하여 실제로 P450 대사물이 ethyl carbamate 자체보다 면역억제능이 더 강한가를 알아보고자 하였다. 그리고 대사활성화와 면역독성간의 관계에 대한 연구 시에 필수적으로 확립이 요구되는 P450 관련 효소활성도 측정법 등을 연구하여 향후 연구에 확립된 기술을 활용할 수 있는 기틀을 마련하고자 하였다. 아울러 본 연구에서는 ethyl carbamate에 의한 면역독성 기작의 연구를 위하여 flow cytometer를 이용한 면역세포 표면항원 분석을 실시하였으며 기타 시험법의 확립에도 연구를 진행하여 앞으로 수요가 예상되는 산업계의 면역독성 시험에 관한 수용에 대비하였다.

한편 면역독성물질은 체내 유입후 독성발현을 위하여 대사활성화 과정이 요구되는 경우가 많은데, 이를 동물실험에서 검증하기 위해서는 시험물질을 투여하기 전에 약물대사효소계를 유도하는 P450 유도제를 전처리하여, 대조군의 결과와 비교하여 판단할 수 있다. 이러한 실험을 위해서는 P450 유도 용량에서 면역독성이나 간독성을 일으키지 않는 모델 P450 유도제의 개발이 필수적으로 요구되어, 본 연구에서는 그동안 연구해온 ionone류의 P450 유도 특성을 여러 가지 시험방법을 통하여 연구하였으며, 실제 대사활성화 과정이 요구되는 간독성 물질인 thioacetamide를 대상으로 독성시험에 응용하여 시험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험동물

한국화학연구소 실험동물 육종실에서 입수한 6-8주령의 BALB/c계 마우스 암컷과 6-8주령의 Fischer 344계 또는 Sprague Dawley계 랫트를 실험에 사용하였다. 4-5주령의 동물을 입수하여 무작위로 폴리카보네이트 cage에 5마리씩 분리 수용하여 최소한 1주 이상 순화시켰으며, 감마선을 조사시킨 제일사료(대전)와 자외선 살균수를 자유로이 섭취시켰다. 동물실의 환경조건은 실내온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 40-60%를 유지하였고, 150-300 Lux의 조도로 12시간씩 명암을 조절하였다.

조절하였다.

나. 실험재료

Ethyl carbamate, DEAE-dextran, 2-mercaptoethanol, agar, albumin, corn oil, phosphate-buffered saline, sodium azide, ionone류 그리고 Alserver's solution은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, 미국) 제품을 구입하여 사용하였고, Earle's balanced salt solution (EBSS), fetal bovine serum 그리고 guinea pig complement는 Gibco 사(Grand Island, NY, 미국) 제품을 사용하였다. mRNA 분리시약 및 first-strand cDNA synthesis kit는 Pharmacia Biotech(Uppsala, 스웨덴) 제를 사용하였다. RT-PCR을 위한 P450 1A2, 2C6, 2B1 및 2B2 primer 등은 Integrated DNA Technology(Coralville, IA, 미국)에서 화학적으로 합성하여 실험에 사용하였다. FITC-conjugated anti-rat CD4 (w3/25), phycoerythrin-conjugated anti-rat CD8(MRC OX-8), FITC-conjugated anti-rat CD45R (MRC OX-33), 그리고 FITC-conjugated anti-rat pan T (MRC OX-52) 단일클론항체는 Cedarlane사 (Westbury, NY, 미국) 제품을 구입하여 사용하였고, FITC-conjugated anti-rat macrophage(ED2)는 Serotec사 (Kidlington, 영국) 제품을 사용하였다. 마우스에 대한 각종항체는 Pharmingen사 또는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다. 면양적혈구 (SRBC)는 Korea Medica 사 (서울, 한국) 제품을 구입하여 사용하였고, 구입 즉시 1배량의 Alserver's solution에 현탁하여 4℃에 보관하였다. 이밖의 시약도 시판 특급시약을 구입하여 사용하였다.

다. 혈액 생화학적 검사

실험동물의 부검시 ether 마취하여 개복후 후대정맥에서 혈액을 채취하여 상온에서 30분간 방치한 후 3000 rpm에서 20분간 원심하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 생화학적 검사를 실시하기 전까지 -70℃에서 보관하였으며, 생화학적 검사는 아래의 항목을 혈액자동 분석기(Shimadzu, 일본)를 이용하여 측정하였다.

항 목	단 위	방 법
· GOT(Glutamic-oxaloacetic transaminase)	IU/l	UV-Rate 법
· GPT(Glutamic-pyruvic transaminase)	IU/l	UV-Rate 법
· ALP(Alkaline phosphatase)	IU/l	P-NPP 법
· CPK(Creatinine phosphokinase)	IU/l	UV-Rate 법
· GLU(Glucose)	mg/dl	Enzyme 법
· TP(Total protein)	g/dl	Buret 법
· ALB(Albumin)	g/dl	BCG 법
· A/G(Albumin/globulin 비)		
· BUN(blood urea nitrogen)	mg/dl	Urease-UV 법
· CRN(Creatinine)	mg/dl	Jaffe 법
· TG(Triacylglyceride)	mg/dl	Enzyme 법
· PL(Phospholipid)	mg/dl	Enzyme 법
· TCHO(Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme 법
· TBIL(Total bilirubin)	mg/dl	Jendrassik-Cleghorn 법
· Ca(Calcium)	mg/dl	OCPC 법
· IP(Inorganic phosphorus)	mg/dl	Enzyme 법

라. 혈액학적 분석

실험동물을 ether로 마취한 후 개복하고 후대정맥으로부터 채혈한 혈액을 이용하여 다음의 항목을 측정하였으며, 이때 혈구자동계측장치인 T-540 Coulter counter(Coulter Electronics, 미국)를 이용하였다.

항 목	단 위	방 법
Ⓐ WBC(White blood cell count)	$\times 10^3/\text{mm}^3$	전자저항법
Ⓑ RBC(Red blood cell count)	$\times 10^6/\text{mm}^3$	전자저항법
Ⓒ HGB(Hemoglobin concentration):Hb	g/dl	시안메트헤모글로빈법
Ⓓ HCT(Hematocrit):Ht	%	Ⓑ,Ⓒ 항목으로 산출
Ⓔ MCV(Mean corpuscular volume)	fl	전자저항법
Ⓕ MCH(Mean corpuscular hemoglobin)	pg	Ⓑ,Ⓒ 항목으로 산출
Ⓖ MCHC(Mean corpuscular hemoglobin concentration)	g/dl	Ⓒ,Ⓓ 항목으로 산출
Ⓗ Platelet	$\times 10^3/\text{mm}^3$	전자저항법

마. 조직병리검사

부검시간, 비장 및 흉선을 10% 중성포르말린 용액에 고정하고, 각 조직을 3 mm 정도의 두께로 트리밍하여 파라핀 절편을 제조하였고, 미세박편 slide 을 제조하여 Hematoxilin & Eosin염색을 실시한 후 병리조직 전문가에게 의뢰하여 현미경하에 조직검사를 실시하였다.

바. 면양적혈구에 대한 in vivo 항체생성반응

마우스는 경우 일정기간 시험물질을 투여한 후 항체생성 세포수를 측정하기 4일전에 5×10^8 의 SRBC를 0.5 ml EBSS 용량으로 각 동물에 복강 투여하였다. 부검일에 비장을 적출하여 3 ml EBSS에 재 현탁시켰다. 비장세포액 100 μ l를 2.9 ml의 EBSS에 옮겨 30배 희석을 실시한 후, 변형한 Jerne plaque assay를 이용하여 항체생성 세포(antibody-forming cells; AFCs)를 측정하였다³⁰⁾. 랫트를 이용한 항체생성반응의 경우, 따로 언급이 없는 한 부검 4일 전에 2.5%의 면양적혈구 1 ml를 미정맥을 통하여 투여하였고, 비장은 5 ml의 EBSS에 현탁시켜 0.1 ml을 2.9 ml의 EBSS로 옮겨 항체생성세포수를 측정하였다³¹⁻³²⁾. 먼저 0.05%의 DEAE-dextran을 가열하여 녹인 0.5% agar용액에 넣고 47°C에서 유지시키고, 400 μ l의 용해된 agar 용액을 12x75 mm 시험관(Corning)에 각각 분주한 다음, 50 μ l의 비장세포액, 25 μ l의 guinea pig complement, 그리고 25 μ l의 SRBC를 각각 넣은 다음 잘 혼합하고, 그 중 200 μ l을 취하여 100x15 mm Petri dish에 놓고 현미경 검경용 커버글라스로 용액을 덮어 얇게 도포시켰다. 상온에서 약간 방치하여 agar 용액이 굳도록 한 다음, 수분을 포화시킨 37°C 항온기에서 3 시간 동안 방치하여 항체생성에 의한 용혈플라크가 생기도록 유도하였다. 플라크의 수를 Stereomaster plaque viewer를 사용하여, 20x의 배율에서 측정하고, 비장세포액내 비장세포의 수를 Coulter counter를 사용하여 측정한 다음, 결과를 AFCs/ 10^6 spleen cells로 표현하였다.

사. Flow cytometry^{33,34)}

시험물질을 일정기간 투여한 후 각 동물에서 비장 및 흉선을 적출하여 각각 3 ml의 EBSS용액에 넣고 주사기 plunger를 이용하여 단일 세포액을 제조하

였다. 각 세포액은 EBSS로 다시 한 번 원심세척하고, 비장세포에 대해서는 macrophage, B- 및 T-세포의 구성비를 FACSort(Becton Dickinson, 미국)장비를 이용하여 검사하였고, 흉선세포에 대해서는 CD4⁺ 및 CD8⁺세포에 대한 구성비를 조사하였다. 비장세포액 및 흉선 세포액을 10 ml의 0.017M Tris, 0.75% NH₄Cl(pH 7.2)용액으로 실온에서 5-10분간 방치하여 RBC를 용혈시킨 후 5% FBS 및 0.1% NaN₃ 함유 phosphate-buffered saline(PBS) 용액 (pH 7.4)으로 2회 원심 세척하였다. 각 세포액을 5% FBS 및 0.1% NaN₃함유 PBS 용액(media A)으로 2x10⁷세포/ml의 농도가 되도록 희석하여 96-well culture plate의 해당 well에 50 μl(1x10⁶ 세포)씩 분주하였다. 다음에는 각 단일클론 항체를 10배량 희석하여 50 μl 씩 해당 well에 분주하고 어두운 곳에서 4℃로 30분간 방치하였고, 4℃에서 media A로 2회 세척하였다. 최종적으로 각 세포액을 0.5% bovine serum albumin과 0.1% NaN₃이 함유된 PBS (pH 7.2) 용액 1 ml로 현탁한 후 10 mg/ml의 propidium iodide 용액 10 μl를 각 well에 분주하고 세포분석을 실시하였다.

아. Lipopolysaccharide(LPS)에 의한 in vitro 항체생성 시험

무처치 BALB/c 계 마우스 암컷으로부터 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 배지에서 비장세포액을 제조하였고, 세포의 농도를 5x10⁶세포/0.9 ml로 조절하였다. 48-well 조직배양용 plate의 각 well에 0.45 ml의 비장세포액을 분주하고 각 농도의 시험물질 50 μl를 가하였다. 다음으로 각 well에 lipopolysaccharide용액을 100 μg/ml의 농도로 처리하고 37℃의 CO₂ 항온기에서 2일간 배양하였다. 세포배양액으로는 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit의 penicillin, 100 μg streptomycin 그리고 50 μM의 2-mercaptoethanol을 함유하는 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 배양후 50 μl의 비장세포액을 사용하여 Kim 등의 방법³⁵⁾에 준하여 항체생성 세포수를 측정하였다. 이때 SRBC의 표면에 picrylsulfonic acid를 haptenize한 TNP-SRBC를 지시세포로 사용하였다³⁶⁾. Coulter counter를 사용하여 각 well내 세포수를 측정한다음, 결과를 AFC/10⁶ spleen cells 또는 AFC/culture로 표현하였다.

자. 세포유약화 반응의 측정³⁷⁾

B-임파구 증식능을 측정하기 위하여 LPS를 사용하였으며, T-임파구 증식능의 측정을 위하여 Con A를 사용하였다. 마우스를 경추 탈구한 다음, 비장을 무균적으로 적출하여 단일세포액으로 만들고 RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후, 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit penicillin, 100 μ g streptomycin 및 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol을 함유하는 RPMI 1640 complete 배지에 균질화 하고 세포의 농도를 2×10^6 세포/0.9 ml이 되도록 조정하였다. 90 μ l의 세포액을 96-well 배양접시(Costar)에 분주하고 시험목적에 맞도록 시험물질과 LPS 또는 Con A를 적절히 조제하여 well당 총용량이 200 μ l이 되도록 통일시켰다. 모든 처리가 끝나면 plate를 37°C의 CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양하여 유약화 반응을 유도하였다. 한편, 세포회수 20시간 전에 [³H]-thymidine(1 μ Ci/well)을 처리하였고 세포회수기 (Cambridge Technology Inc. Cambridge, MA)를 이용하여 회수된 비장세포의 DNA에 함유된 방사능의 양을 scintillation counter (Beckman Instruments, Fullerton, CA)를 이용하여 측정하였다. 비장세포의 증식정도는 DPM/well로 표현하였다. Dye를 이용한 세포유약화 반응의 측정을 위해서는 방사능 물질의 처리 조작 및 세포의 회수단계를 생략하고, 배양시작후 3일째에 Promega 사제의 Cell Titer 96[®] Aqueous Non-radioactive Proliferation Kit를 사용하였다. 20 μ l의 dye를 각 well에 처리하고 37°C의 5% CO₂ incubator에서 2-4시간 동안 배양하여 발색을 유도한 다음 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 비장세포의 증식정도는 Abs₄₉₀/well로 표현하였다.

차. ELISA를 이용한 혈청내 항체검출

96-well ELISA용 plate의 해당 well에 anti-rat IgM 또는 IgG를 100 μ l를 분주하고 37°C에서 2시간 동안 coating하였다. PBS 200 μ l로 각 well을 4회 세척한 다음, 0.5% non-fat dry milk를 200 μ l씩 넣어 37°C에서 1시간 동안 blocking 시켰다. 다시 0.05% Tween 20을 함유한 PBS로 4회 세척한 다음, 적당한 배율로 희석한 각 혈청시료를 100 μ l씩 해당 well에 분주하고 37°C에서 2시간 동안 incubate하였다. Incubation이 끝난 후 0.05% Tween 20을 함유한 PBS

로 다시 4회 세척하고 rabbit anti-rat IgM 또는 IgG-alkaline phosphatase conjugate(Sigma Chemical Company)를 100 μ l씩 해당 well에 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 효소반응은 p-nitrophenyl phosphate 기질(Bio-Rad Laboratory, Richmond, CA)을 100 μ l씩 각 well에 분주하고 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 405 nm의 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, 미국)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

카. 혼합백혈구 증식시험(Mixed leukocyte response, MLR)

먼저 무처리 마우스로부터 비장세포를 분리하여, 세포의 농도를 1×10^6 세포/ml RPMI 1640으로 조절하였다. RPMI 1640 배지는 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units penicillin, 10 μ g streptomycin, 그리고 5×10^{-5} 의 2-mercaptoethanol을 첨가해준 후 사용하였다. 이 비장세포액을 반응세포(responder cell)로 사용하였고, 증식자극 세포(stimulator cell)로는 DBA/2 마우스로부터 무균적으로 분리한 비장세포액을 이용하였다. 자극세포는 먼저 2×10^7 세포/ml RPMI 1640으로 조절하고 40 μ g/ml의 mitomycin C를 처리하고 37°C에서 45분간 5% CO₂ incubator 내에서 배양하여 불활성화시켰다. 불활성화된 자극세포는 RPMI 1640 배지로 4번 원심세척하여 용액중 존재하는 mitomycin C를 제거하였으며, 최종적으로 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 μ g streptomycin, 그리고 5×10^{-5} 의 2-mercaptoethanol이 첨가된 RPMI 1640 배지에 4×10^6 세포/ml의 세포농도로 현탁시켰다. 반응세포와 자극세포 각 100 μ l씩을 96-well round bottom culture plate에 넣고 37°C의 5% CO₂ incubator에서 세포를 5일간 배양하여 반응세포의 증식을 유도하였다. 비장세포의 증식은 Cell Titer 96[®] AQueous Non-radioactive Proliferation Kit를 사용하였다 즉, 20 μ l의 dye를 각 well에 가하고 37°C의 5% CO₂ incubator에서 2-4시간 동안 배양하여 발색반응을 유도한 후, ELISA reader를 이용하여 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 Abs 490 nm로 표시하였다.

타. Microsome 분획의 분리³⁸⁾

실험에 사용한 유도제를 일정용량으로 일정기간 투여한 동물을 경추 탈

구한 후, 간을 적출하여 3배량의 냉 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.4)을 가하여 균질화시켰다. 이 균질액을 4°C에서 10분간 9,000xg로 원심분리하고 상등액만을 주의해서 취한 후, S-9 fraction을 재차 4°C에서 90분간 105,000xg로 원심분리하여 얻은 microsomal pellet을 20% glycerol, 1 mM EDTA 그리고 1 μ M dithiothreitol이 첨가된 0.1 M potassium phosphate 완충용액에 균질화시켰다. 이렇게 얻은 microsome 분획은 0.5 ml씩 분주하여 -70°C에 보관하였으며, 분획내의 단백질은 bovine serum albumin을 표준품으로 삼아 Bradford의 방법에 준하여 정량하였다³⁹⁾. 시험물질의 투여는 따로 규정이 없는 한 다음과 같이 하였다. TCDD는 corn oil에 녹여 10 μ g/kg의 용량으로 단회 복강투여하였으며, phenobarbital은 80 mg/kg의 용량으로 3일간 복강투여하였고, ethanol은 5 ml/kg을 3일간 경구투여하였고, β -ionone의 경우는 300, 600 및 1200 mg/kg의 용량으로 corn oil을 대조군으로하여 부검 72시간 및 48시간 전에 각각 1회씩 총 2회를 피하투여하였다.

파. Monooxygenase의 측정

Ethoxyresorufin O-deethylase(EROD) 활성은 Burke와 Meyer의 방법에 준하여 약간 변형된 방법으로 측정하였다⁴⁰⁾. 반응용액은 2 mg/ml의 bovine serum albumin, 10 μ M dicumarol, 5 mM glucose 6-phosphate, 5 units/ml의 glucose 6-phosphate dehydrogenase 및 5 μ M NADPH를 가한 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)을 사용하였으며, 기질로는 2.5 μ M의 7-ethoxyresorufin을 이용하였다. 반응 생성물인 resorufin은 585 nm에서의 형광을 측정하여 정량하였고, 그 결과를 pmole resorufin/min per mg protein으로 표현하였다. Pentoxyresorufin O-dealkylase(PROD) 활성은 Lubet 등의 방법에 준하여 EROD 활성측정과 동일한 방법으로 측정하였다⁴¹⁾. 모든 시험조건 및 반응물의 조성은 EROD 활성측정과 동일하였고 기질의 경우에만 2.0 μ M의 pentoxyresorufin을 사용하였다. Methoxyresorufin O-demethylase(MROD)와 benzyloxyresorufin O-debenzylase(BROD)의 활성도도 상기의 방법에 준하여 측정하였다. NADPH-P450 reductase 활성을 간접적으로 측정하기 위하여 NADPH-cytochrome c reductase 활성을 측정하였다⁴²⁾. 이를 위하여 0.12 mM의

NADPH을 가한 다음 550 nm의 파장에서 cytochrome c가 환원되는 속도를 측정하였다. p-Nitrophenol hydroxylase(PNPH) 활성은 Koop의 방법에 준하여 p-nitrophenol이 4-nitrocatechol로 변환되는 양을 측정하였다⁴³⁾. 반응용액은 1 mM NADPH를 첨가한 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 7.4)을 사용하였고, 기질로는 100 μ M의 p-nitrophenol을 이용하였다. 기질용액을 최종적으로 가한 후 30분간 37°C에서 가온하여 반응을 진행하였고, 0.5 ml의 0.6 N perchloric acid로 반응을 종결시켰다. 반응액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액 1.0 ml에 0.1 ml의 10 N NaOH 용액을 가하여 발색시킨 후, 512 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 pmole 4-nitrocatechol/min per mg protein으로 표현하였다. Erythromycin N-demethylase(ERDM)과 aminopyrine N-demethylase(APDM)의 활성은 Nash 및 Johnson 등의 방법에 준하여, erythromycin으로부터 생성되는 formaldehyde를 정량하여 결정하였다^{44,45)}. 반응용액은 0.8 mM NADPH, 5.0 mM MgCl₂, 3.0 mM glucose 6-phosphate, 1 unit의 glucose 6-phosphate dehydrogenase 및 7.5 mM semicarbazide를 첨가한 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 7.4)을 사용하였고, 기질로는 400 μ M의 erythromycin 또는 1 mM의 aminopyrine을 각각 사용하였다. 기질용액을 가하여 반응을 시작하였고, 37°C에서 30분간 가온한 후, 0.5 ml의 20% trichloroacetic acid 용액으로 반응을 종결하였다. 3000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액 1.4 ml에 Nash 시약 0.7 ml을 가하고, 60°C에서 10분간 가온하여 발색하였다. Nash 시약은 6 M ammonium acetate와 60 mM acetylacetone이 첨가된 0.15 M acetic acid 용액으로써, 사용당일에 제조하여 암소에 보관하여 사용하였다. 생성된 formaldehyde는 412 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, 효소활성은 pmole formaldehyde/min per protein으로 표현하였다.

하. Western immunoblotting

해당 유도제의 처리 후 실험동물을 경추탈구하고 방혈시킨 다음, 간을 적출하여 원심분리한 microsomal fraction을 이용하여, 10 또는 20 μ g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 상에서 전기영동한 후,

nitrocellulose filter에 전기적으로 단백질을 이동시켰다. 이 filter를 2.5% non-fat dry milk 용액으로 30분간 처리하여, 비특이적인 항체결합을 방지하였고, 특정 P450 isozyme에 대한 polyclonal antibody 용액 (1:2000 희석액)을 상온에서 2시간 반응시켰다. 여기에 alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibody를 2시간 반응시켰다. 면역화학적 염색을 위하여 nitrocellulose filter에 5-bromo-4-indolyl phosphate, nitroblue tetrazolium 그리고 0.1 M Tris 완충액이 1:1:10으로 혼합된 용액을 사용하여 발색시켰다. 각 단계마다의 filter세척을 위해 Tween-20이 0.5% 함유되어 있는 Tris-buffered saline을 이용하였다.

거. mRNA의 분리

조직 100 mg을 extraction buffer 0.4 ml에 넣고 균질화 한 후 elution buffer 0.8 ml을 넣은 후 65°C에서 incubate하였다. Homogenate를 5000xg~16000xg 사이에서 1분간 원심분리한 후 oligo-dT cellulose pellet에 1 ml을 가하여 섞은 다음, 16000xg에서 10분간 원심분리하였다. 다음에 high-salt buffer 1 ml을 가하고 10초간 원심분리하고, 이 조작을 4회 반복하였다. low-salt buffer 1ml로 1회 더 반복하여 원심분리한 다음, 0.3ml의 low-salt buffer를 넣고 재현탁시킨 후 microspin column에 옮겨 5초간 원심분리하여 용출시켰다. low-salt buffer를 이용한 용출을 2회 더 반복하였다. Column을 새로운 microcentrifuge tube에 옮기고, prewarmed elution buffer 0.2 ml을 가하고 5초간 원심분리하여 mRNA를 용출시켰다.

너. RT-PCR

10 ng~2 μ g의 mRNA(33 μ l)와 control mix 33 μ l를 65°C에서 5분간 가열하고, 다시 37°C에서 5분간 가온하고 first-strand reaction mix에 옮겨 5분간 더 가온하였다. 혼합액을 잘 섞어 37°C에서 1시간 동안 가온하여 first-strand를 합성하였다. 그런 다음, 90°C에서 5분간 가열하여 RNA-cDNA duplex를 denature시키고, reverse transcriptase를 불활성화시켰다. cDNA 합성을 위하여 10X PCR buffer, dNTP mix, upstream 및 downstream primer 그리고 Taq polymerase를 넣은 다음 mineral oil을 혼합액 위에 가하였다. PCR 조건은 95°C

-1분, 55°C-30초, 72°C-30초로 하여 30 cycle을 수행하였다. 랫트의 P450 1A2, 2B1, 2B2 및 2C6 그리고 NADPH P450 reductase^{46,47}에 특이적인 primer는 각각 302-, 443-, 534-, 275- 그리고 407-bp의 PCR 산물이 생성되도록 설계하여 사용하였으며, 랫트의 P450 2B1 및 2B2에 특이적인 primer는 active site근처의 sequence를 선택하여 합성하였다. 대조군을 위해 glucose 3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)에 특이적인 primer를 사용하였으며, 이때 983-bp의 PCR 산물이 나오도록 하였다. PCR 생성물은 well 당 10 µl씩 1.5% agarose gel (0.5 µg/ml ethidium bromide 함유) 상에서 전기영동하여 확인하였다.

더. 통계처리

모든 실험의 결과는 평균값±표준오차 또는 표준편차로 표시한 후, 대조군에 대비한 유의성의 여부를 p<0.05 또는 p<0.01 수준에서 Dunnett's t-test 를 실시하여 검정하였다. 유의성이 확인된 시험군은 별표(*)로 표시하였다.

3. 결 과

본 연구에서는 면역독성 평가방법의 확립과 면역독성기작 연구방법을 개발하기 위하여 마우스 및 랫트를 이용한 다양한 시험을 수행하였다. 특히 확립된 방법을 이용하여 최근 전자제품 제조 공장에서 문제가 된 유기용제인 2-bromopropane과 발암성 물질인 ethyl carbamate에 의한 면역독성 기작에 관한 연구를 수행하였다. 2-Bromopropane은 전자제품 제조 및 조립공정시 사용하는 침지액인 Solvent 5200의 주성분이 되는 유기용제로 국내에서도 다량 사용되고 있는 물질이다. 최근 이 물질을 사용하는 사업체에 근무하는 여성들에게서 무월경 등의 난소기능 저하증과 남성에게서는 정자생성기능 저하 등의 생식기능의 장애를 보이는 것이 보고되었고, 일부에서는 재생불량성 빈혈 등의 골수기능 저하 증상도 관찰되어 면역독성을 유발할 가능성이 예측되었다. 본 연구에서는 28일간 2-bromopropane을 Sprague Dawley계 랫트 수컷에 경구투여할 때 나타나는 면역독성을 혈액학적 지표와 혈청 생화학적 지표, 비장세포의 면양적 혈구에 대한 항체생성 반응, 그리고 비장 및 흉선세포의 세포표면항원 분석 등에 관한 연구를 수행하였다.

Figure 3-2-1에서는 2-bromopropane에 의한 혈액학적 지표의 변화를 나타내었는데, 실험한 여러 지표들 가운데 백혈구수, 적혈구수 및 혈소판수의 유의성 있는 감소가 최고용량인 1000 mg/kg 투여군에서 나타났다. 특히 백혈구수의 감소가 두드러지게 나타나 2-bromopropane 이 면역독성을 유발한다는 사실을 예측할 수 있었다. Figure 3-2-2에서는 혈청 생화학적 지표의 변화를 나타내었는데, 실험한 여러 지표들 가운데 SGPT의 유의성있는 감소가 최고 용량군에서 나타났다으며, 특이하게 chloride농도가 330 mg/kg 투여군부터 유의성있게 증가된 결과를 얻었다. 그러나 이러한 결과는 2-bromopropane의 면역독성 기작과 직접적으로 어떤 연관이 있는지는 현재로서는 판단할 수 없었고 추후 계속적인 연구가 필요하다고 사료된다. Figure 3-2-3에서는 부검 4일전에 T-세포 의존형 항원인 면양적혈구(sheep red blood cells, SRBCs)를 투여하여 비장세포의 항체생성을 유도하여 2-bromopropane이 랫트의 체액성 면역능에 미치는 영향을 실험하였다. 그 결과 항체생성 세포수가 최고 용량군에서 대조군에 비하여 유의성있는 억제현상을 보였으며, 비장세포의 수도 유의성있는 감소를 보여 세포독성에 의해 면역독성이 나타나는 것으로 판단되었다. 다음으로는 2-bromopropane이 특정 면역세포에 특이적으로 독성을 미치는가를 알아보기 위하여 비장세포 및 흉선세포의 표면항원 분석을 몇가지 단일클론 항체를 사용 flow cytometer상에서 분석을 실시하였다. Figure 3-2-4는 flow cytometer를 이용하여 각종 면역세포를 분석하는 예를 나타내었는데, B-세포의 분석을 위하여 anti-rat CD45R-FITC conjugate를 사용하였으며, T-세포의 분석에는 anti-rat CD3-FITC conjugate를, macrophage의 분석에는 anti-rat Mac-1-FITC conjugate를, T-helper 세포의 분석을 위해서는 anti-rat CD4-FITC conjugate를, 그리고 T-cytotoxic 세포의 분석에는 anti-rat CD8-PE conjugate를 각각 사용하였다. 이러한 방법으로 비장세포를 분석한 결과는 Figure 3-2-5에 나타내었다. 비장세포의 총수는 100 및 330 mg/kg 투여군에서는 약간 증가하였고, 1000 mg/kg 투여군에서는 약간 감소하여, 각종세포에 대한 분석 결과도 유사한 양상으로 나타났고, 대조군에 비하여 유의성있는 증가나 감소는 관찰되지 않았다. 한편 Figure 3-2-6에 나타낸 바와 같이 흉선에 대한 분석을 시행한 결과 흉선세포는 2-bromopropane에 의하여 용량상관성을 보이며 감소되었다. 항체생성능 시험

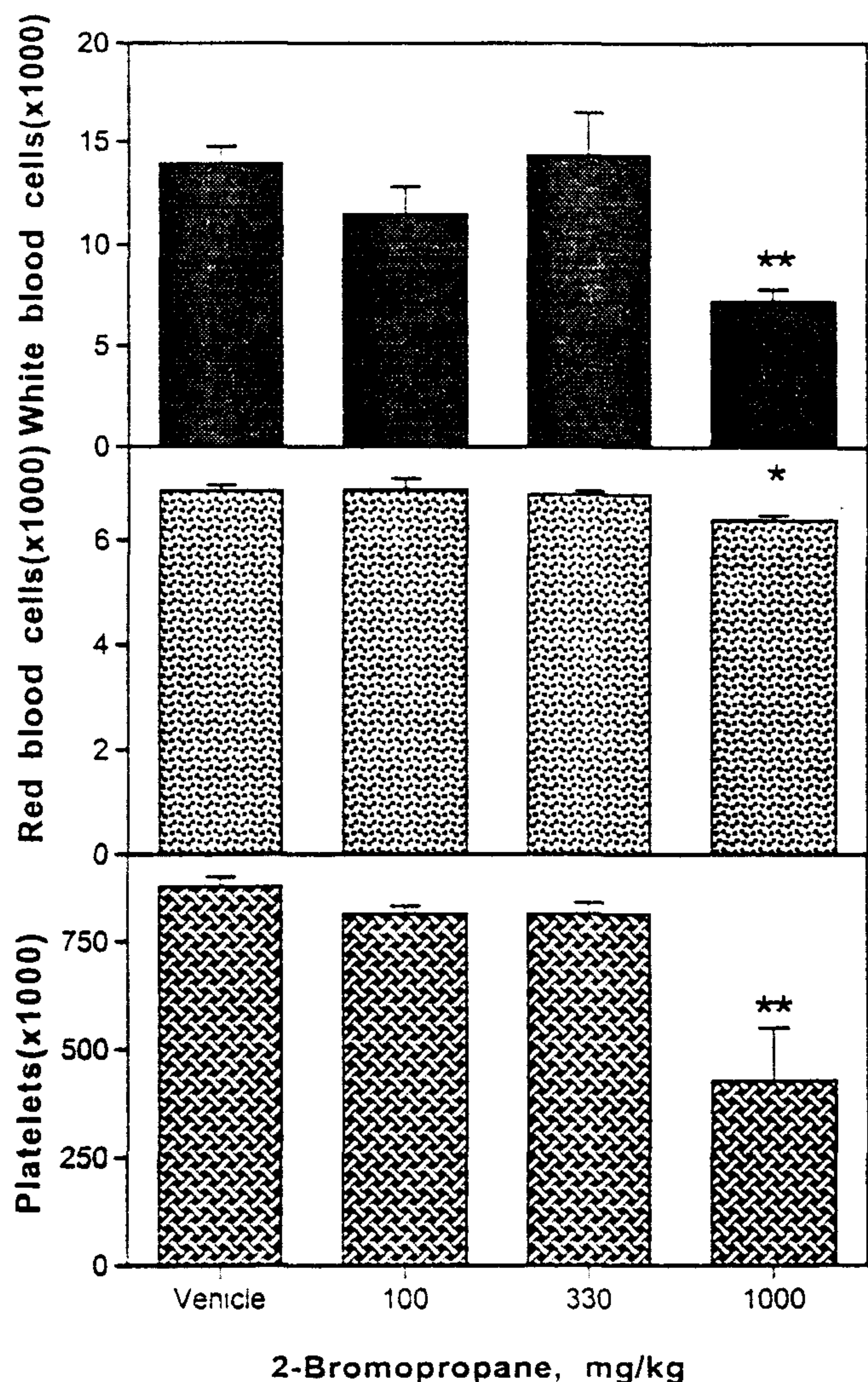


Figure 3-2-1. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on hematological parameters in male Sprague Dawley rats. 2-Bromopropane in corn oil (10 ml/kg) was administered orally to rats for 28 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells. Following the overnight fasting, the blood was collected to an EDTA vial for hematology. Each bar represents the mean \pm SE of five animals. The asterisks indicate the value significantly different from the vehicle control at $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**).

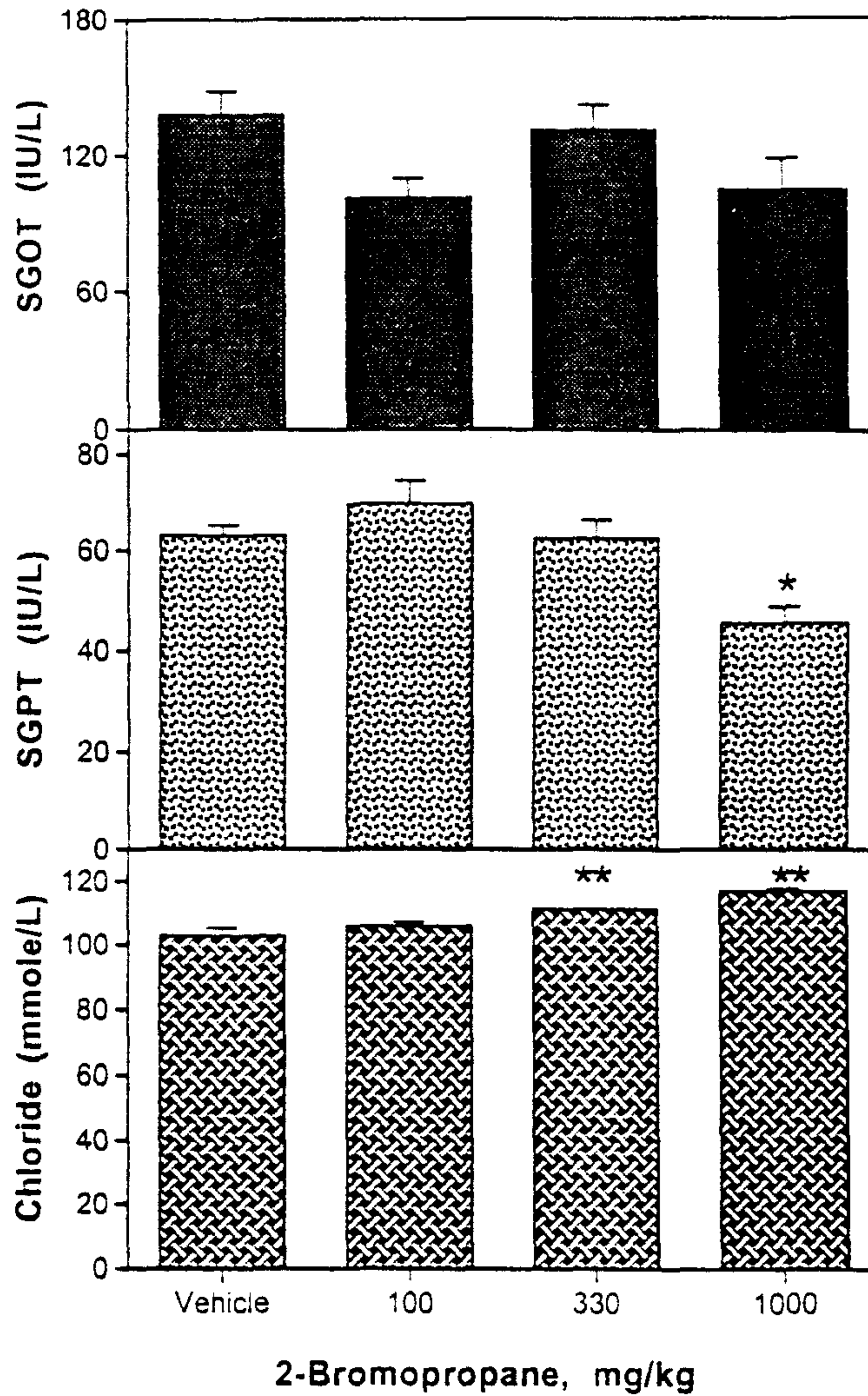


Figure 3-2-2. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on biochemical parameters in male Sprague Dawley rats. 2-Bromopropane in corn oil (10 ml/kg) was administered orally to rats for 28 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells. Following the overnight fasting, the blood was collected to prepare serum for clinical chemistry. Each bar represents the mean \pm SE of five animals. The asterisks indicate the value significantly different from the vehicle control at $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**).

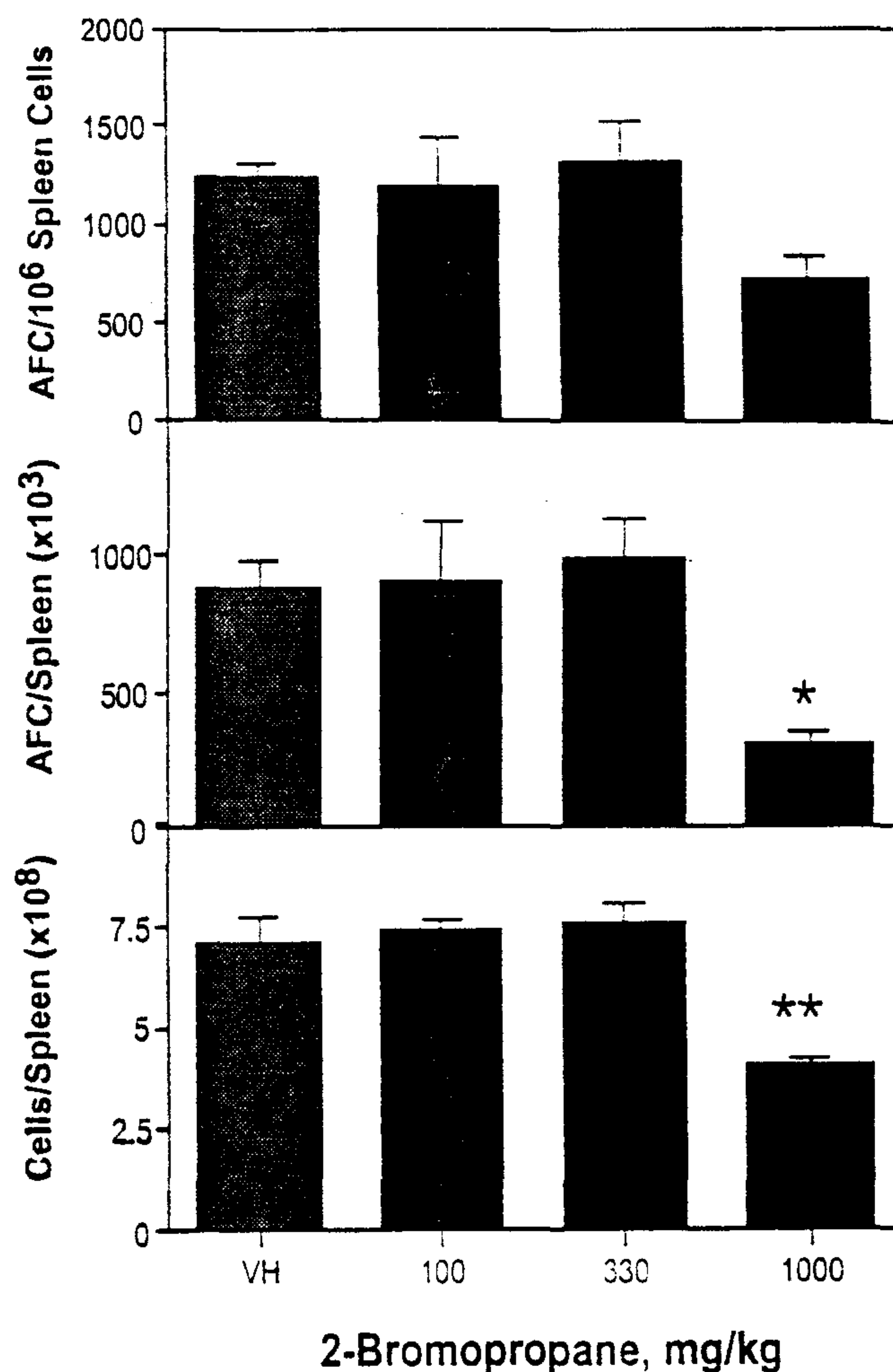


Figure 3-2-3. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on T-dependent antibody response in male Sprague Dawley rats. 2-Bromopropane in corn oil (10 ml/kg) was administered orally to rats for 28 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells (AFCs). Each bar represents the mean \pm SE of five animals. The asterisks indicate the value significantly different from the vehicle control at $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**).

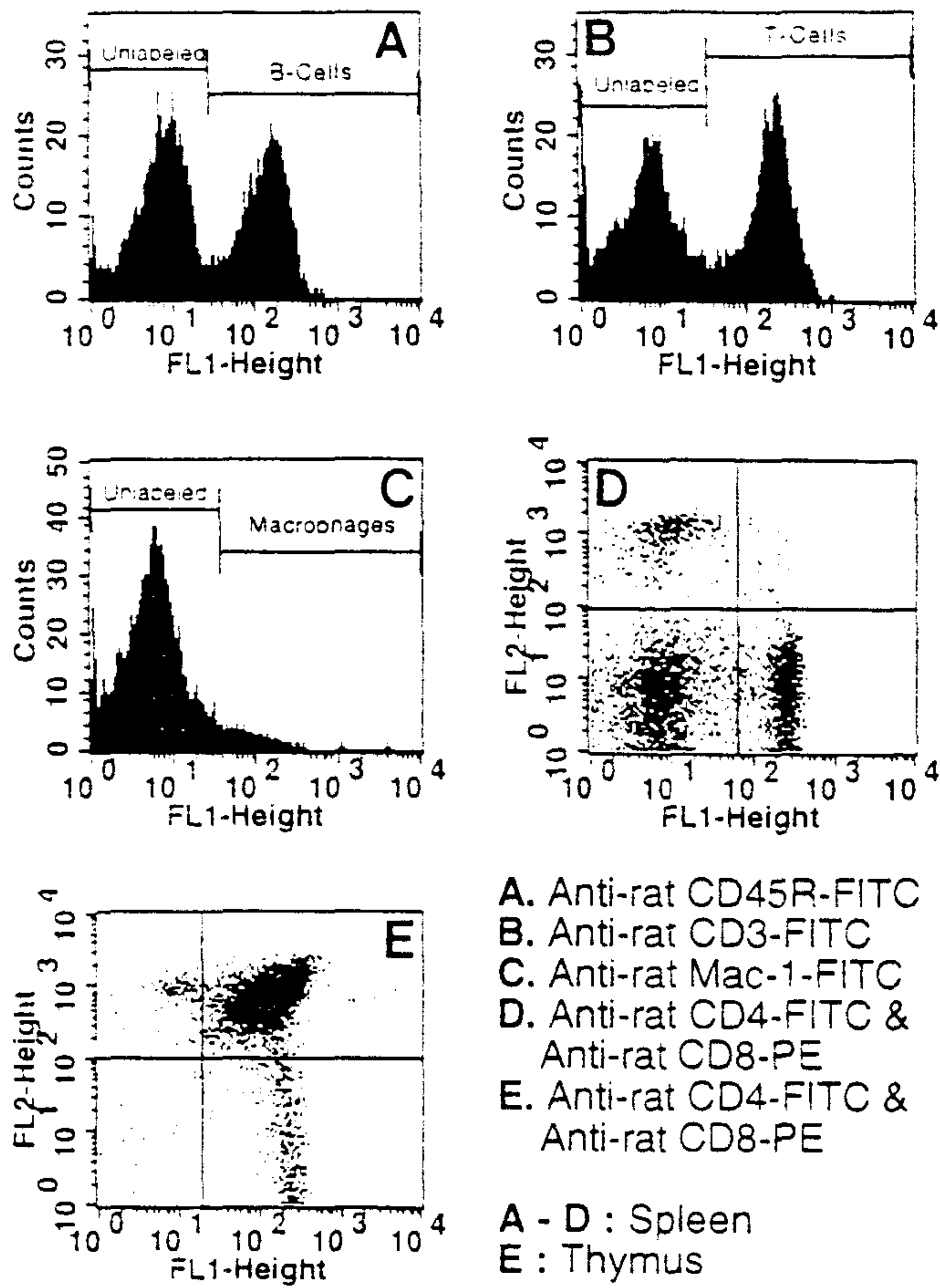


Figure 3-2-4. Flow cytometric analyses of immune cells. To analyze macrophages, B-cells, T-cells and T-cell subsets (CD4⁺ helper and CD8⁺ suppressor T-cells), each of the respective cell types was labeled with an appropriate monoclonal antibody conjugated to a fluorescent probe.

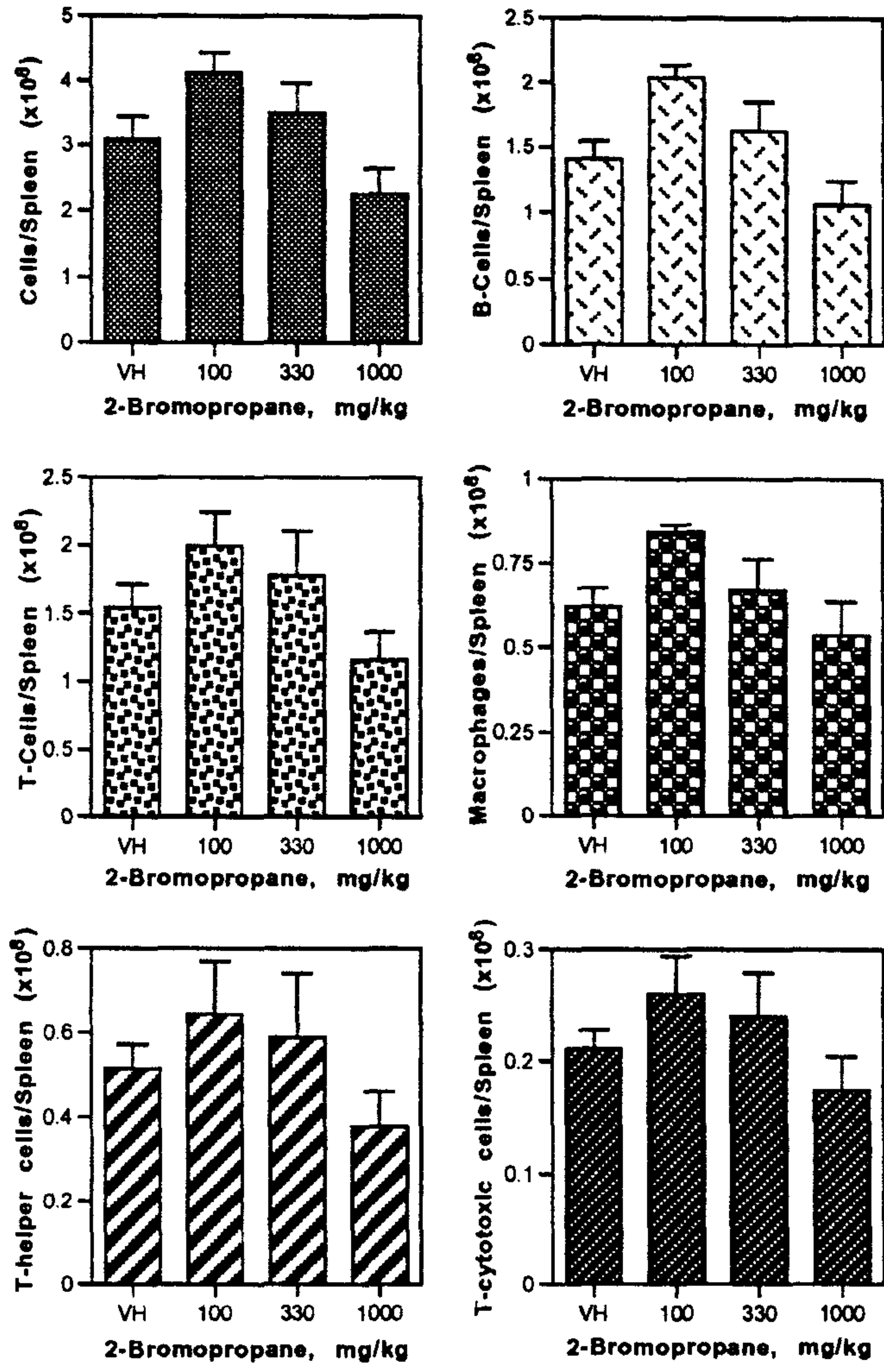


Figure 3-2-5. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on splenic lymphocyte subpopulation in male Sprague Dawley rats. 2-Bromopropane in corn oil (10 ml/kg) was administered orally to rats for 28 consecutive days. Each bar represents the mean \pm SE of five animals.

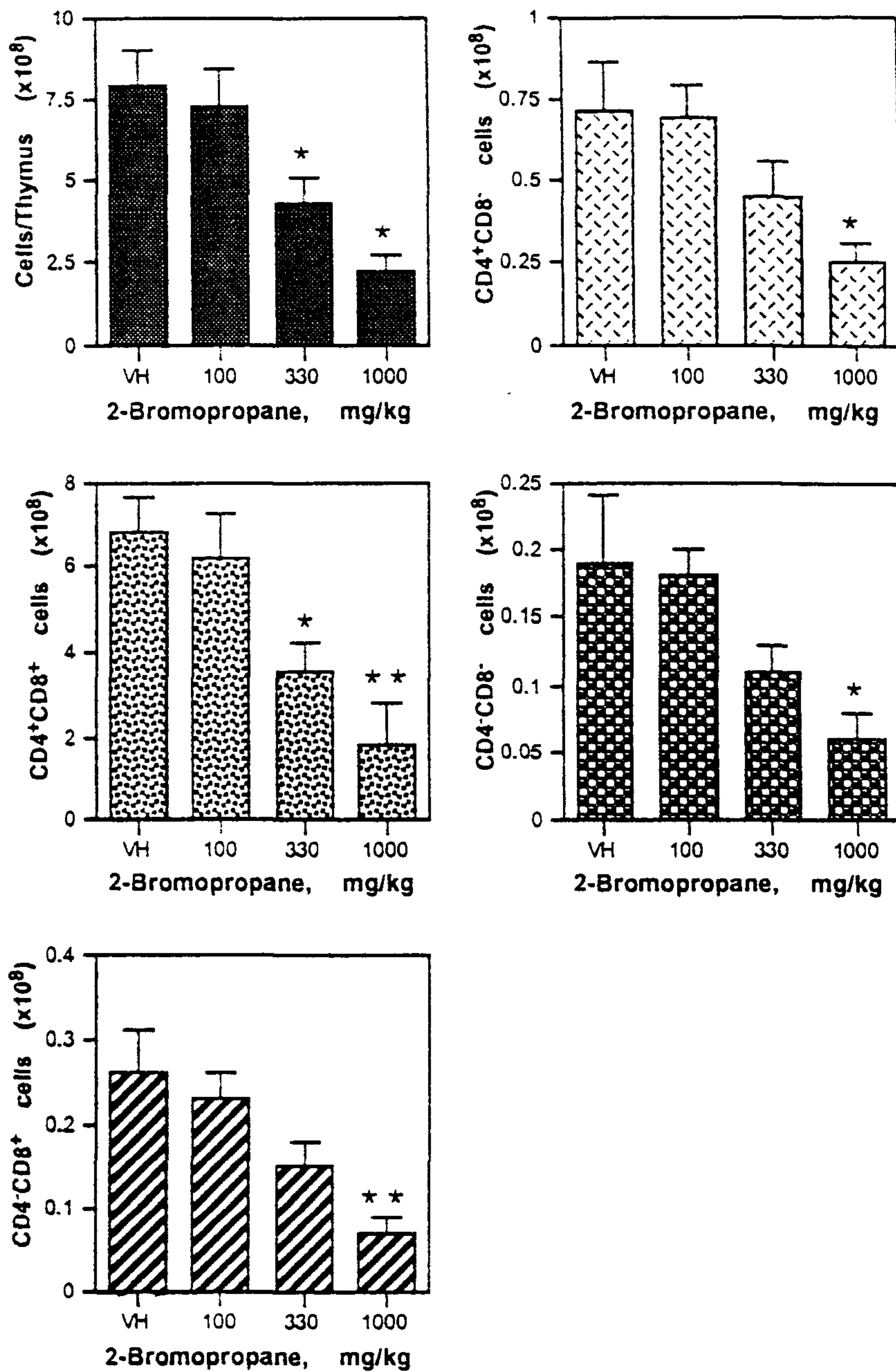


Figure 3-2-6. Effects of 28-day exposure to 2-bromopropane on thymic lymphocyte subpopulation in male Sprague Dawley rats. 2-Bromopropane in corn oil (10 ml/kg) was administered orally to rats for 28 consecutive days. Each bar represents the mean \pm SE of five animals. The asterisks indicate the value significantly different from the vehicle control at $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**).

에서는 비장세포의 수가 최고용량군에서 상당히 감소한 반면 flow cytometry 실험에서는 그렇지 않았는데, 이는 아마도 항체 생성능 시험시 투여한 항원인 면양적혈구에 의해 비장세포의 증식 및 분화가 유도되어 나타난 결과로 판단된다. 따라서 2-bromopropane을 Sprague Dawley계 랫트 수컷에 28일간 경구투여할 때 면역독성을 유발함을 알 수 있었다.

Ethyl carbamate는 유기합성 반응의 중간체 및 살충제 등의 용해제로 쓰이며, 실험동물의 마취제로도 쓰이는 물질로써, 발효음식이나 술에 ethanol과 carbamyl phosphate 간의 반응에 의해 자연적으로 생성되는 것이 알려져 있는 강력한 발암원이다. 본 연구실에서는 그 동안 ethyl carbamate에 의한 면역독성 연구를 지속적으로 수행하여 ethyl carbamate가 면역독성을 일으킨다는 사실을 밝혔으며, 이때 약물대사효소에 의한 대사활성화가 필요함을 밝혀 국제저널에 결과를 발표한바 있다. 본 연구에서는 계속해서 ethyl carbamate에 의한 면역독성 기작을 밝히고자 다양한 면역독성지표들을 이용하여 연구를 진행하였다. Table 3-2-2에서는 ethyl carbamate와 cytochrome P450에 의한 대사체로 알려진 vinyl carbamate와 ethyl N-hydroxycarbamate 그리고 발암성이 약한 것으로 보고된 대조물질인 methyl carbamate가 in vitro polyclonal antibody response에 미치는 영향을 비장세포 배양에서 살펴보았다. 그 결과 ethyl carbamate와 methyl carbamate는 독성이 매우 약한 반면에 대사체인 ethyl N-hydroxycarbamate와 vinyl carbamate는 독성이 매우 강하여 대사활성화 작용이 ethyl carbamate의 독성에 매우 중요한 역할을 할 것이라는 본 연구실의 가설을 입증해 주었다. Table 3-2-3에서는 또 다른 면역독성의 지표인 mitogen에 의한 비장세포 증식능에 미치는 각 대사물의 영향을 실험하였다. 이때에도 역시 항체생성능 시험시와 유사한 결과를 보여주었는데 ethyl N-hydroxycarbamate만이 100 μ M의 농도에서부터 독성을 나타냈고, 특히 lipopolysaccharide에 의한 비장세포의 증식능이 Con A에 의한 증식능보다 더 큰 영향을 받아 B-세포가 더 감수성이 높지 않은가 하는 예측을 할 수 있었다. Figure 3-2-7에서는 ethyl carbamate를 100, 200 및 400 mg/kg의 용량으로 7일간 연속 복강투여할 때 비장의 각종 세포의 숫자 변화를 flow cytometer를 이용하여 세포표면 분석을 수행함으로써 알아보았다. 그 결과 비장당 총 세포수에 있어서도 200 mg/kg 투여

Table 3-2-2

Effects of Ethyl Carbamate, Vinyl Carbamate, Ethyl N-Hydroxycarbamate, and Methyl Carbamate on the Antibody Response to Lipopolysaccharide in Splenocyte Cultures isolated from Female Balb/C Mice

[mM]	Ethyl carbamate	Ethyl N-hydroxy-carbamate	Vinyl carbamate	Methyl carbamate
(AFCs/10 ⁶ Spleen Cells)				
NA	165±35	148±16	147±21	165±35
0.05	184±18	101±13	97±6*	146±16
0.1	157±32	88±8*	33±8*	146±19
0.5	174±13	48±8*	16±3*	151±18
1.0	174±21	32±5*	7±4*	142±17
5.0	111±3*	37±7*	4±4*	153±12
(AFCs/Culture)				
NA	782±113	950±60	1013±56	782±113
0.05	914±39	725±48	569±45*	806±67
0.1	805±78	519±26*	131±28*	861±84
0.5	844±43	200±32*	56±12*	776±59
1.0	801±71	113±16*	13±7*	800±60
5.0	469±59*	88±16*	1±1*	807±80
(Cells/Spleen x 10 ⁶)				
NA	5.117±0.701	6.574±0.446	7.155±0.702	5.117±0.701
0.05	5.108±0.494	7.514±0.981	5.841±0.237*	5.580±0.176
0.1	5.396±0.439	6.080±0.687	3.990±0.089*	6.008±0.247
0.5	4.934±0.392	4.230±0.055*	3.415±0.161*	5.224±0.236
1.0	4.735±0.505	3.618±0.158*	1.759±0.128*	5.730±0.229
5.0	4.217±0.471	2.398±0.180*	1.577±0.702*	5.258±0.312

Splenocytes were isolated from untreated female Balb/C mice. 5 x 10⁶ cells were transferred to each well of a 48-well tissue culture plate and cultured in a humidified 5% CO₂ incubator in the presence of given concentrations of chemicals and 100 µg/ml of bacterial lipopolysaccharide for 2 days. The antibody-forming cells (AFCs) were determined using a modified Jerne plaque assay using a trinitrophenyl-haptenated sheep erythrocytes. Each value represents the mean ± SE of quadruplicate cultures. An asterisk indicates the value significantly different from the naive (NA) controls at P<0.05.

Table 3-2-3

Effects of ethyl carbamate, methyl carbamate, and ethyl N-hydroxycarbamate on lymphoproliferative responses in splenocyte cultures from female Balb/C mice

Compounds tested	LPS, 10 µg/ml	LPS, 100 µg/ml	Con A, 0.5 µg/ml	Con A, 1.0 µg/ml
Ethyl carbamate, mM				
NA	110918±4969	107155±5223	692404±18254	717749±15528
0.05	129842±3312	123577±4334	712121±5285	745078±8268
0.1	125731±1722	114281±1181	715251±5992	715987±16860
0.5	124798±3011	118197±2967	711978±5067	700856±17223
1.0	117081±6933	111063±2720	714676±5590	703585±17505
5.0	113086±1000	108280±1324	686777±14698	730753±16491
10	127753±3848	104934±2549	702650±6538	742136±4414
Methyl carbamate, mM				
NA	62160±4401	56481±765	337285±14835	215256±9614
0.05	70603±7994	64241±2299	N.D.	N.D.
0.1	79260±2739	69582±2049	305706 ±6603	250889±11604
0.5	71207±5638	67103±4058	311175±7147	235334±2643
1.0	80343±3031	65936±3160	313413±8027	202880±26355
5.0	73430±3168	64616±3031	335301±17260	242755±13401
10	76908±3105	69169±1382	319293±3500	229214±9451
Ethyl N-hydroxycarbamate, µM				
NA	76209±2114	61307±847	270769±36264	210805±1835
1.0	77511±1502	72314±2824	309583±8032	209579±3244
5.0	89341±2902	74532±918	327439±5290	253161±4910
10	92002±4889	67590±1034	330261±12219	283728±17350
50	83924±1704	59376±3421	376494±1732	342026±6470
100	30904±847	28767±1105	320708±5319	337199±2253
500	2630±140	1734±98	10296±1070	8093±1376

Splenocytes isolated from female Balb/C mice were cultured with a given concentration of either ethyl carbamate, methyl carbamate, or ethyl N-hydroxycarbamate for 72 hr in the presence of either bacterial lipopolysaccharide (LPS) or concanavalin A (Con A). The cells were pulsed with 1 µCi of [³H]-thymidine for 20 hr. Each value represents the mean DPM/well±S.E. of quadruplicate wells. An asterisk indicates the value significantly different from the naive (NA) control at P<0.01. N.D., Not determined.

군부터 크게 감소하는 경향을 보여주었고, 이러한 경향은 본 시험에서 분석한 B-세포, macrophage 그리고 T-helper 및 T-cytotoxic 세포를 포함한 pan T-세포가 모두 ethyl carbamate에 의해 감소되는 경향을 나타냈다. 따라서 ethyl carbamate에 의한 면역독성에 있어서 항체 생성반응에 영향을 주는 모든 세포들이 영향을 받음을 알 수 있었다. Figure 3-2-8에서는 동일한 실험을 면양적혈구를 감작시킨 동물에서 수행하였는데, 항원을 감작해도 동일한 결과를 보여주었다. 이는 실험수행에 매우 중요한 사실을 제공하는데, 즉, 면역기능시험을 위해 보통 동물에 항원을 감작시켜 면역세포의 변화가 초래될 수 있는데, 감작과 상관없이 유사한 결과를 보여주므로써 세포표면 항원 분석을 위한 시험과 항체 생성능 시험을 동시에 수행할 수 있음을 의미한다. 이는 실험의 경비절감 면에서도 매우 중요한 사실로 판단된다. Figure 3-2-9에서는 흉선세포의 표면항원분석 결과를 도시하였는 바, ethyl carbamate에 의해 흉선의 세포수도 감소하는데 $CD4^+CD8^-$ 세포의 수는 유의성있게 감소한 반면 $CD4^-CD8^+$ 세포의 수는 변화가 거의 없음을 보여주었다. 면역독성시험의 수행에는 면역장기에 대한 병리·조직학적 검사가 필수적으로 요구되고 있어 Figure 3-2-10에서는 ethyl carbamate를 투여할 때 비장조직의 변화를 살펴보고자 하였다. 정상적인 비장에서는 white pulp와 red pulp의 구분이 명확한데 400 mg/kg의 ethyl carbamate를 7일간 투여할 때 비장의 위축과 white pulp에서의 소형 임파구의 소실과 red pulp에서는 소형 lymphocyte 및 적혈구의 소실이 관찰됨을 알 수 있었다. 흉선의 경우에는 Figure 3-2-11에 나타냈는데, 여기에서도 정상조직에서는 cortex와 medulla간의 경계가 뚜렷한 반면에 ethyl carbamate 투여군에서는 흉선의 위축과 cortex에서의 세포소실이 뚜렷하여 cortex와 medulla 간의 경계가 불분명해 진 것을 알 수 있었다. 그러나 좀더 확실한 면역독성의 평가를 위해서는 각종 면역세포에 대한 면역염색화학 검사법을 실시하는 것이 좋은 것으로 사료되었다. Table 3-2-4에서는 이러한 면역조직 병리 검사를 확대하여 ethyl carbamate의 대사작용에 초점을 맞추어 수행한 실험결과를 요약하였다. Ethyl carbamate는 cytochrome P450과 esterase에 의해 대사가 되는데 cytochrome P450 pathway는 대사활성화 작용으로, esterase pathway는 대사무독화 과정으로 이해되고 있다. 따라서 본 실험에서는 esterase inhibitor 인 diazinon을 40 mg/kg로 전투여

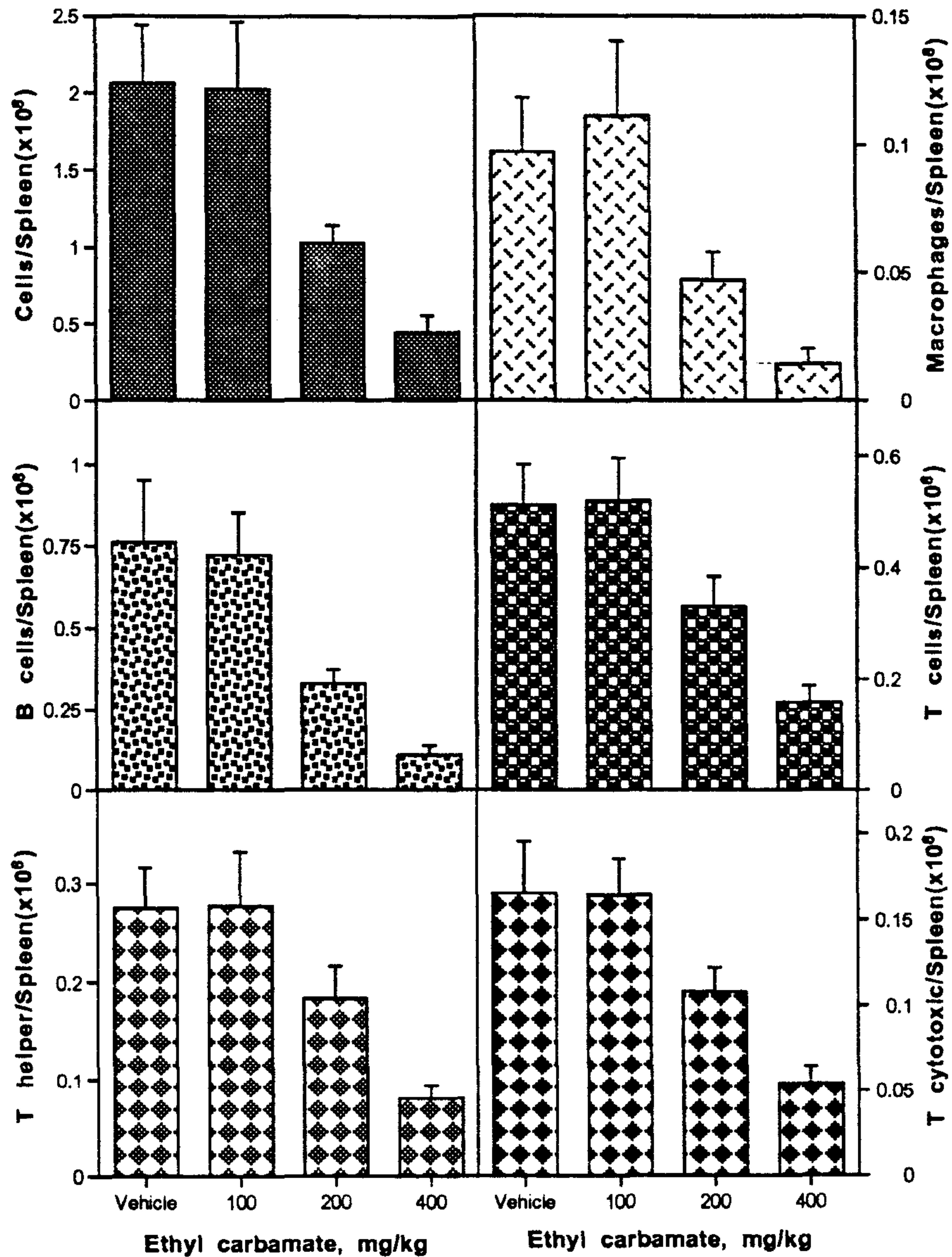


Figure 3-2-7. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on splenic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice. Ethyl carbamate in saline (10 ml/kg) was administered intraperitoneally to mice for 7 consecutive days. Each bar represents the mean \pm SE of five animals.

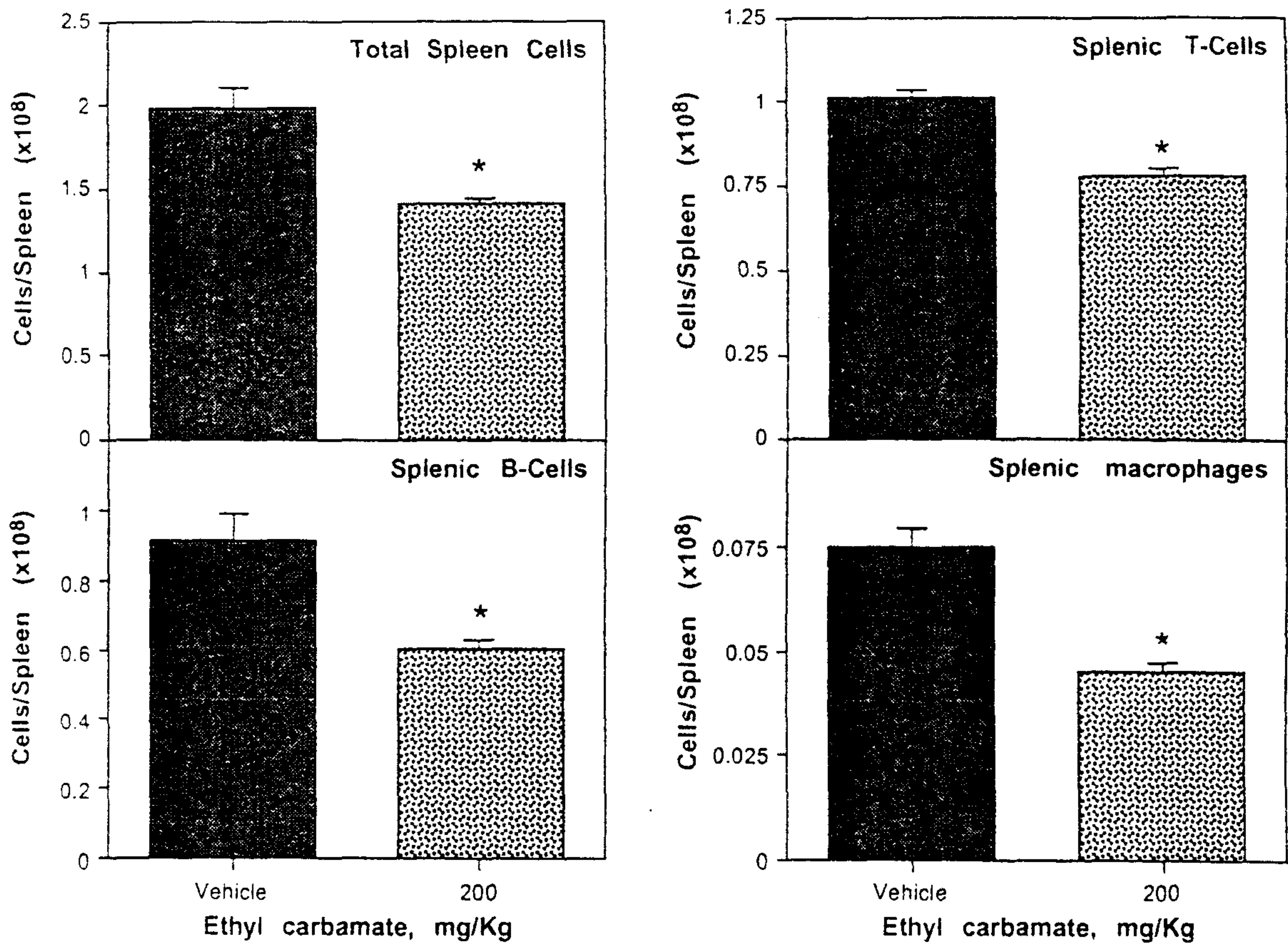


Figure 3-2-8. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on splenic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice. Ethyl carbamate in saline (10 ml/kg) was administered intraperitoneally to mice for 7 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells (AFCs). Each bar represents the mean \pm SE of five animals. An asterisk indicates the value significantly different from the vehicle control at $P < 0.05$.

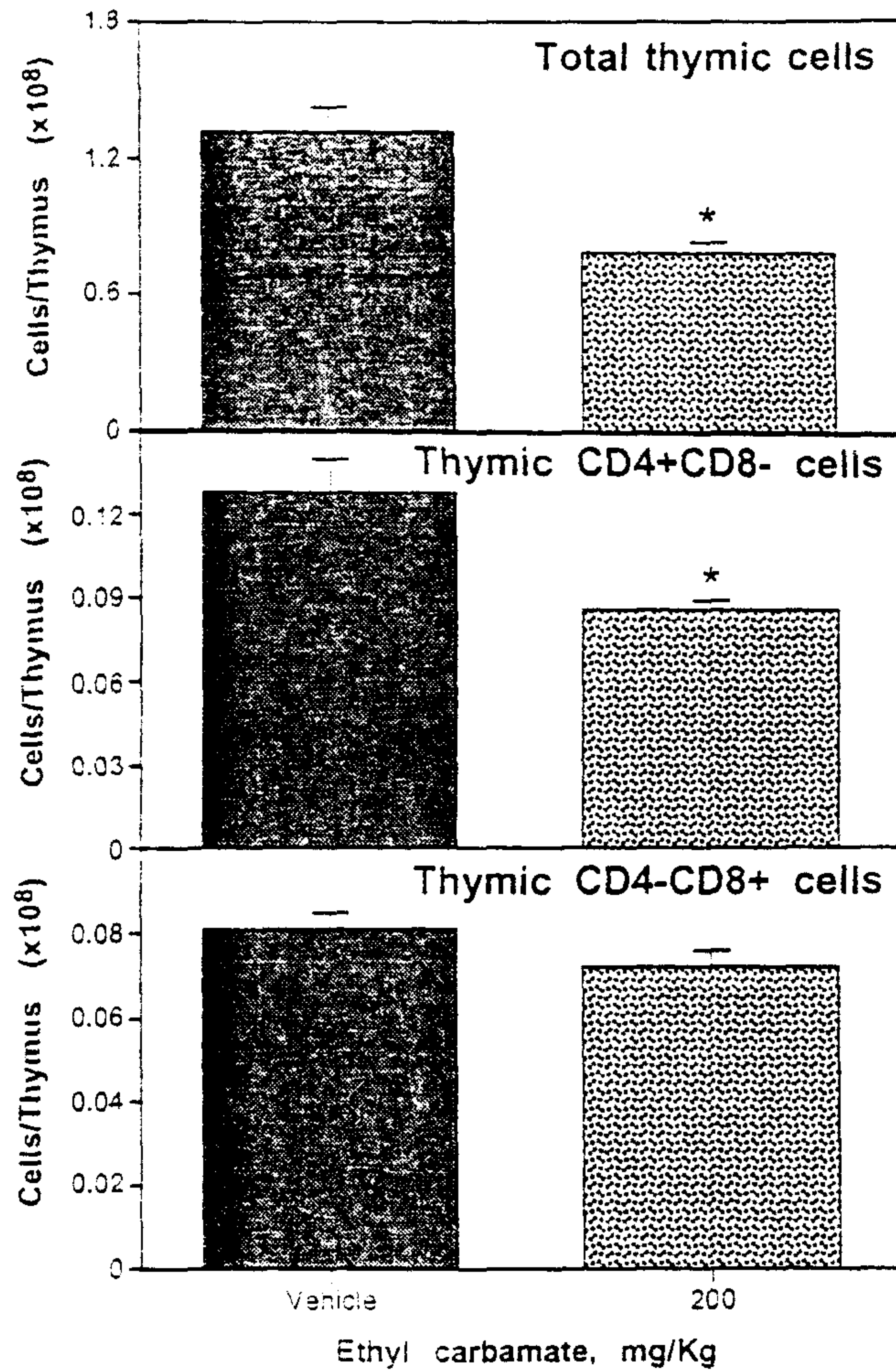


Figure 3-2-9. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on thymic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice. Ethyl carbamate in saline (10 ml/kg) was administered intraperitoneally to mice for 7 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells (AFCs). Each bar represents the mean \pm SE of five animals. An asterisk indicates the value significantly different from the vehicle control at $P < 0.05$.

Spleen: Control
(A, x40; B, x100; C, x200; D, x400)

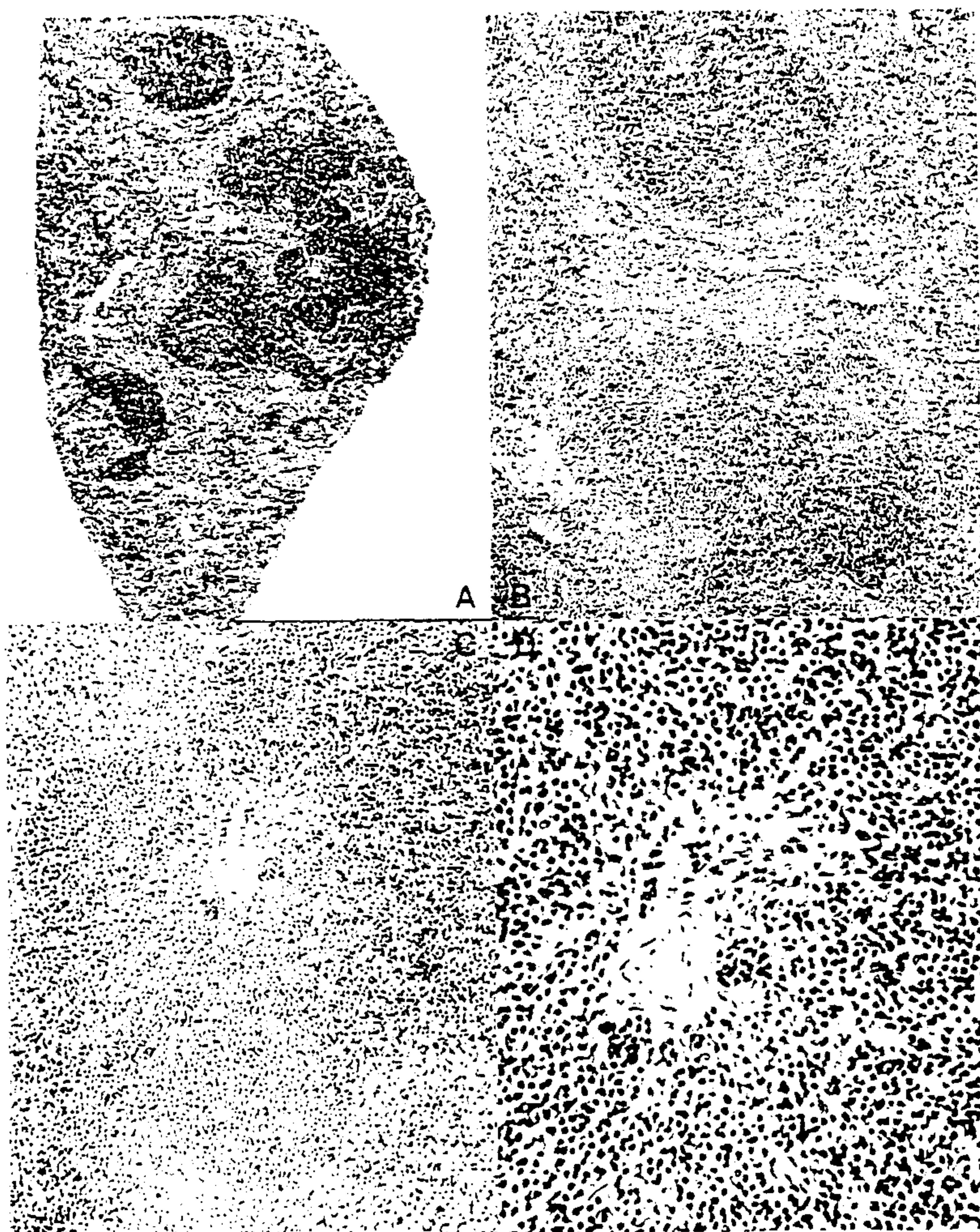


Figure 3-2-10. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on histopathology of spleen in female BALB/c mice. Ethyl carbamate in saline (10 ml/kg) was administered intraperitoneally to mice for 7 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells (AFCs). The spleen was stained with hematoxylin and eosin.

Spleen: Ethyl carbamate, 400 mg/kg
(A, x40; B, x100; C, x200; D, x400)



Figure 3-2-10. (Continued)

Thymus: Control
(A, x40; B, x100; C, x200; D, x400)

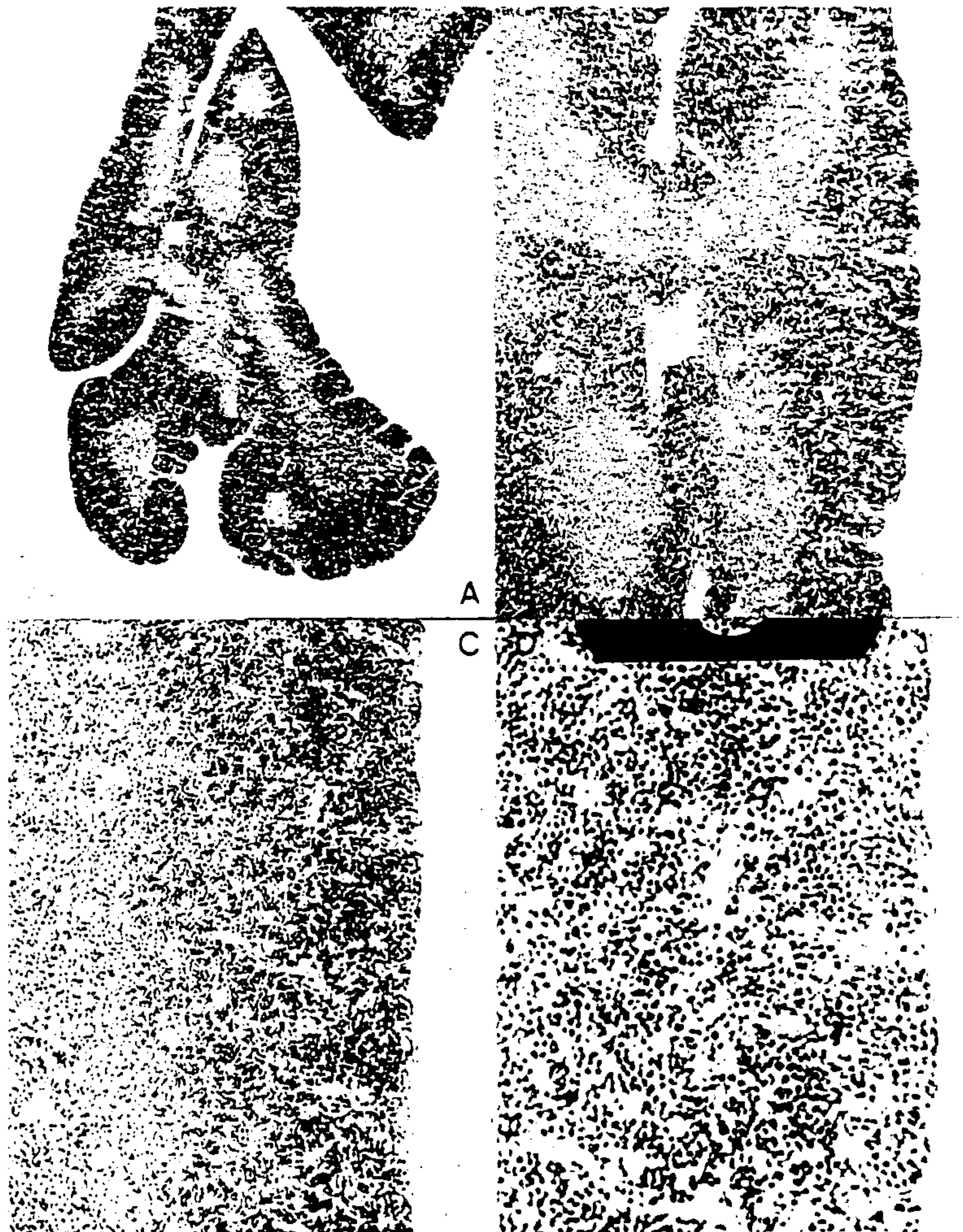


Figure 3-2-11. Effects of 7-day exposure to ethyl carbamate on histopathology of thymus in female BALB/c mice. Ethyl carbamate in saline (10 ml/kg) was administered intraperitoneally to mice for 7 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells (AFCs). The thymus was stained with hematoxylin and eosin.

Thymus: Ethyl carbamate, 400 mg/kg
(A, x40; B, x100; C, x200; D, x400)



Figure 3-2-11. (Continued)

Table 3-2-4

Summary of histopathology in spleen and thymus

Groups (ethyl carbamate, mg/kg)	Spleen		Thymus
	Atrophy & depletion of small lymphocytes in white pulps	Atrophy & depletion of small lymphocytes and RBC in red pulps	Atrophy and depletion of cells in cortex
Corn oil/Vehicle	-	-	-
Corn oil/200	--	-	-
Corn oil/400	----	----	----
Diazinon/Vehicle	-	-	-
Diazinon/200	---	---	---
Diazinon/400	---	---	---

Severity of lesions: -, normal; +, minimal; --, slight; ---, marked; +---, severe

할 때 ethyl carbamate의 면역독성이 증강되는 지를 알아보려고 하였고, 항체 생성능에 있어서는 diazinon의 전처리에 의해 ethyl carbamate의 독성이 증강되는 것을 이미 확인하였고, 여기에서는 비장 및 흉선의 조직병리 검사를 통하여 확인하고자 하였다. 그 결과 ethyl carbamate 200 mg/kg 투여군에서 비장 및 흉선조직의 병리조직 소견이 diazinon의 전투여에 의해 더욱 증강되는 사실을 얻어, 역시 예측한 대로 esterase pathway는 대사 무독화 과정임을 알 수 있었다. 다음에는 ethyl carbamate에 의한 면역독성에 있어서 흉선에 의한 2차적인 작용기작의 여부를 연구하고자 1차적으로 부신에서 생성되는 흉선에 초점을 맞추어 부신적제술 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 BALB/c 마우스 암컷 동물에서 부신을 적출하여 2주이상 순화를 시켜 정상적인 동물과 비교실험을 수행하였고, 면역독성의 지표로는 비장 및 흉선세포의 표면항원분석법을 이용하였다. Figure 3-2-12에서는 비장세포의 표면항원 분석결과를 도시하였는데, 무처리 대조군과 sham 대조군에서는 비장의 총세포수가 대조군에 비해 감소되었고 이러한 감소는 특히 macrophage, B-세포 및 T-helper세포 그리고 총 T-세포에서 뚜렷하였으며, T-cytotoxic 세포는 ethyl carbamate에 의한 감소가 뚜렷하지 않았다. 한편 부신적제 수술을 받은 동물에서는 비장세포수의 감소가 ethyl carbamate 투여군에서 감소되지 않았을 뿐만 아니라 비장을 구성하는 각종 면역세포들도 ethyl carbamate를 투여한 시험군에서도 관찰되지 않아 부신 흉선 (예, corticosterone 등)이 ethyl carbamate의 면역독성에 있어서 중요한 역할을 할 것이라는 예측을 가능하게 하였다. Figure 3-2-13에서는 흉선 세포의 표면항원분석 결과를 도시하였는데, 이 때에는 부신적제술이 별 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다. 따라서 앞으로 부신적제술을 이용하여 다른 면역독성 지표들에 대한 ethyl carbamate의 독성을 확인하면 독성기작의 판단이 가능할 것으로 사료되었다. Figure 3-2-14에서는 역시 혈청에 존재할 수 있는 2차적인 면역독성 인자를 찾기 위한 연구를 수행하였다. 즉, ethyl carbamate는 현재까지 본 연구실에서 얻은 시험 결과에 의하면 cytochrome P450 에 의한 대사활성화 과정이 필수적이어서 ethyl carbamate를 단독으로 비장세포 배양에 처리하면 독성이 거의 나타나지 않는다. 이는 in vivo에서 ethyl carbamate를 투여하면 대사작용이 활발한 간에서 1차적으로 ethyl carbamate가 대사활성화되어 대사체가 비장으로 이동,

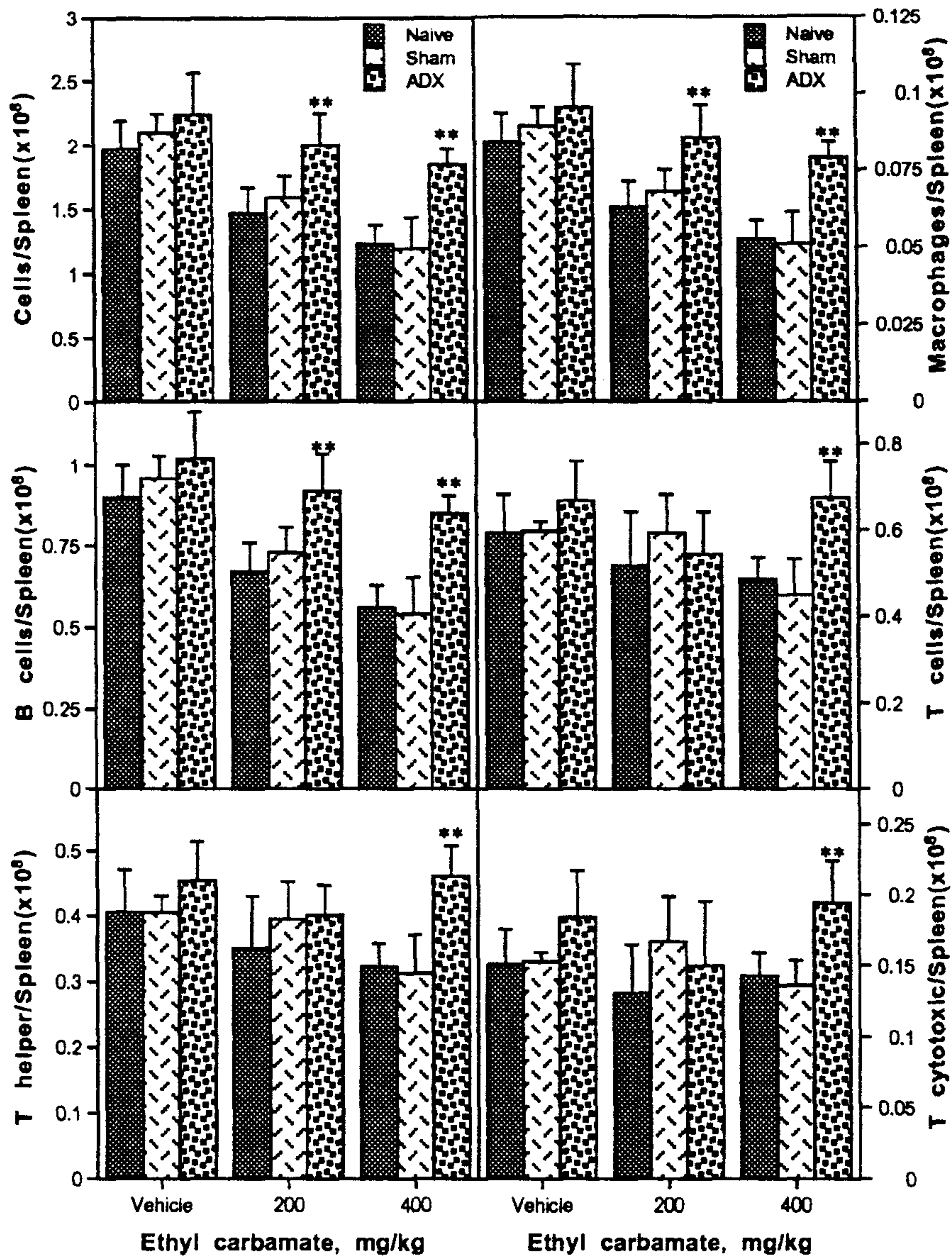


Figure 3-2-12. Effects of adrenalectomy (ADX) in ethyl carbamate-induced changes of splenic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice. Ethyl carbamate in saline (10 ml/kg) was administered intraperitoneally to either naive, sham operated, or adrenalectomized mice for 7 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells (AFCs). Each bar represents the mean \pm SE of five animals. The asterisks indicate the value significantly different from the individual naive controls at $P < 0.01$.

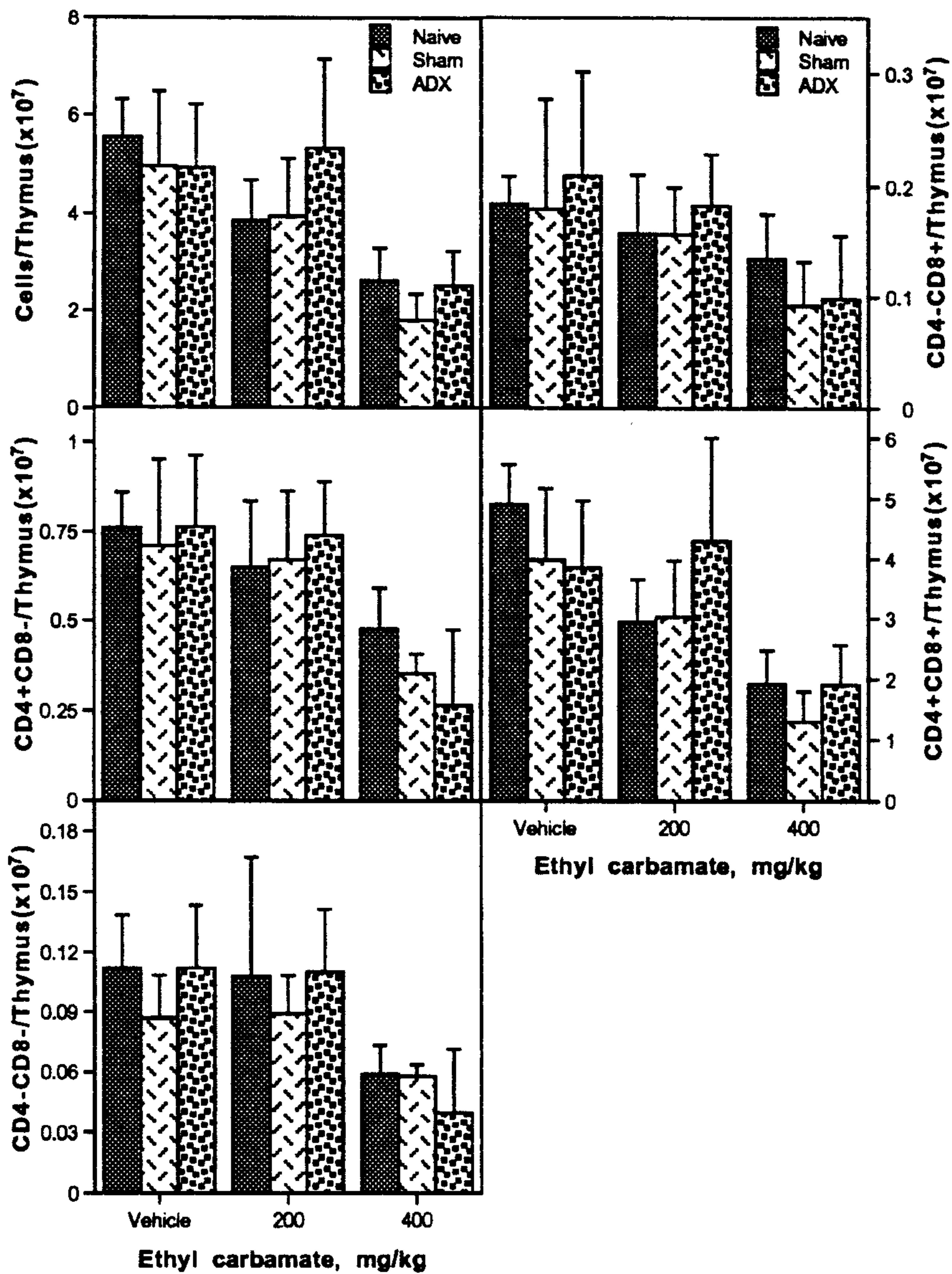


Figure 3-2-13. Effects of adrenalectomy (ADX) in ethyl carbamate-induced changes of thymic lymphocyte subpopulation in female BALB/c mice. Ethyl carbamate in saline (10 ml/kg) was administered intraperitoneally to either naive, sham operated, or adrenalectomized mice for 7 consecutive days. Four days prior to the necropsy, individual animals were immunized with 1 ml of 2.5% sheep red blood cells to enumerate the antibody-forming cells (AFCs). Each bar represents the mean \pm SE of five animals.

Effects of sera from ethyl carbamate-treated mice on LPS-induced lymphoproliferation of splenocyte cultures

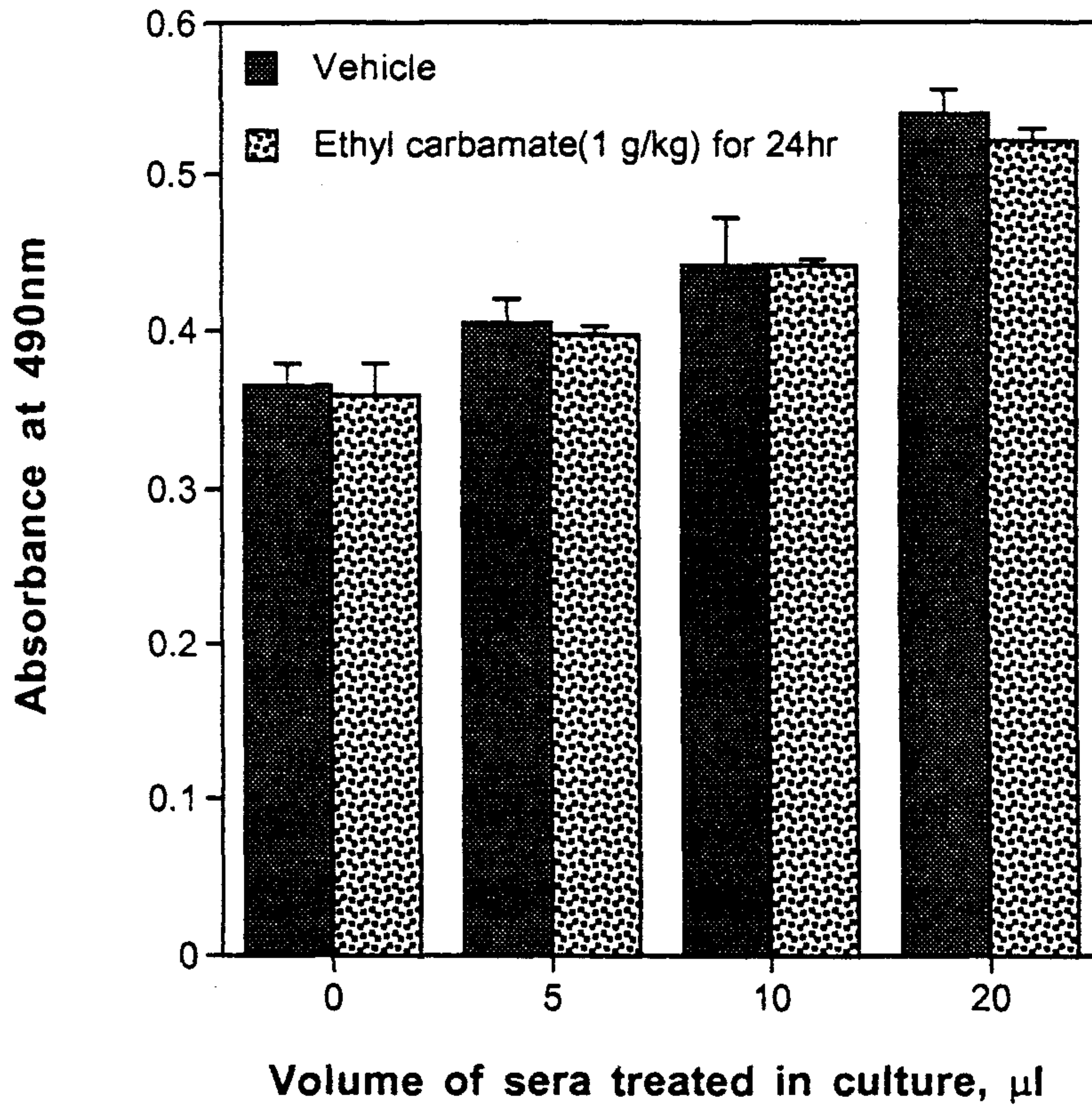


Figure 3-2-14. Effects of sera from ethyl carbamate-treated mice on LPS-induced lymphoproliferation of splenocyte cultures. The sera were prepared from mice pretreated with 1 g/kg of ethyl carbamate and added to a normal splenocyte culture isolated from female BALB/c mice in the presence of 100 µg/ml of lipopolysaccharide. Each bar represents the mean \pm SE of quadruplicate cultures.

면역독성을 유발하던지, 아니면 ethyl carbamate가 간에 독성을 1차적으로 미치고 손상을 받은 간세포에서 면역독성 물질이 유리되어 비장으로 수송되어 독성을 나타내는 것으로 가정할 수가 있다. 비장세포가 보유한 대사능이 극히 제한적인 것도 이러한 가설을 가능하게 해준다. 따라서 본 연구실에서는 1 g/kg의 ethyl carbamate를 투여한 동물로부터 혈청을 분리하여 이를 in vitro에서 비장세포 배양에 처리함으로써 혈중에 존재하는 면역독성 물질의 유무를 판단하고자 하였다. Figure 3-2-14에 그 결과를 도시하였는데, 무처리 동물에서 분리한 혈청과 ethyl carbamate를 투여한 동물의 혈청에서 차이점을 발견할 수 없었다. 이는 ethyl carbamate에 의해 단백질성의 면역독성 인자가 간에서 유리되는 가설은 설득력이 약하고 간에서 상당히 불안정한 ethyl carbamate 대사체가 생성되어 이것이 면역독성을 유발하는 가설이 더 신빙성이 있어 보이나 앞으로 많은 추가적인 실험이 필요한 것으로 판단되었다.

다음에는 산업계 지원 연구에 필요한 면역독성 시험법의 확립에 대한 연구를 진행하였다. 우선 국내의 <의약품 등의 독성시험기준>에 기재된 시험법들에 초점을 맞추어 비장세포의 유약화 반응을 확립하였다. 비장세포 유약화 반응 시험을 기존에는 방사능 물질인 [³H]-thymidine을 세포회수 18-24시간 전에 배양세포에 처리하여 DNA에 합입되는 방사능을 측정하여 왔으나 이 방법은 방사능 물질을 사용해야 하고 세포를 glass fiber filter에 회수하여 scintillation cocktail을 이용해서 각 well의 방사능을 측정하게 되어 시료가 많을 경우 많은 노동력과 시간이 소요되는 단점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 비장세포의 유약화 반응을 측정하는 비방사능 방법을 확립하고자 Promega사에서 시판하는 유약화 반응 kit를 사용해보고자 하였다. 이 방법은 96-well culture plate에 증식능 측정용 dye를 2-4시간 동안 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 시료의 전처리 조작없이 그대로 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정함으로써 많은 시료의 처리가 가능한 방법이다. Figure 3-2-15에서는 LPS 및 Con A에 의한 비장세포의 유약화 반응 조건을 찾기 위한 실험의 결과를 도시하였다. 여러 농도의 비장세포를 100 µg/ml의 LPS 또는 1.0 µg/ml의 Con A를 처리하고 48시간 또는 72시간 동안 배양한 후 증식능을 측정하였다. 그 결과 비장세포의 증식능을 사용한 세포의 농도에 비례해서 나타났으며, dye의 처리시간을 1-4시간 동안 실험한 결과

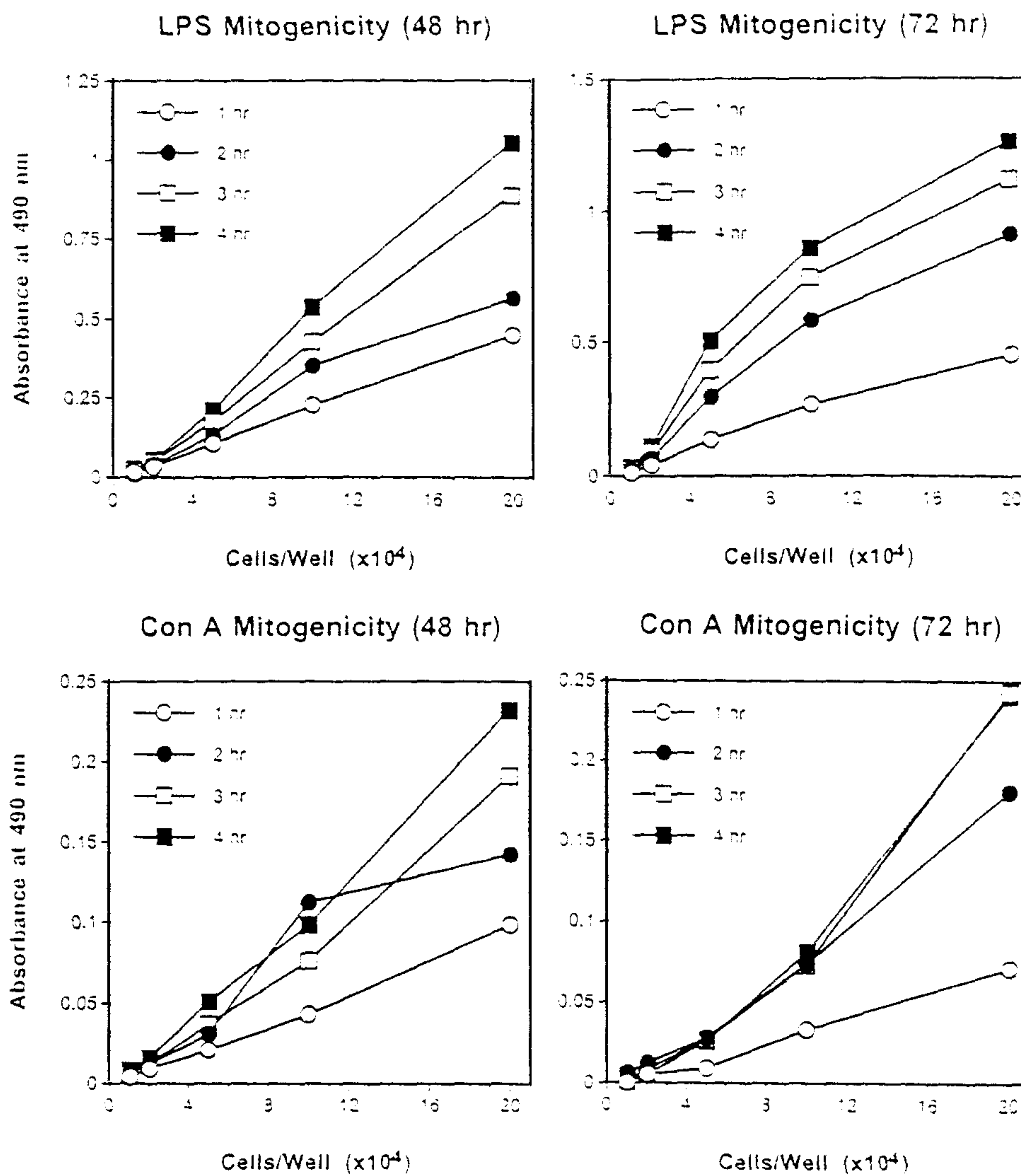


Figure 3-2-15. Optimization of LPS and ConA mitogenicity using the nonradioactive colorimetric lymphoproliferation assay. Various number of cells were cultured for either 48 or 72 hr in the presence of either 100 μ g/ml of lipopolysaccharide or 1.0 μ g/ml of concanavalin A. Twenty μ l of proliferation assay reagent was added into each well for the given time. The absorbance at 490 nm was monitored in an ELISA reader. Each value represents the mean of duplicate wells.

처리시간에 비례해서 나타났고, Con A mitogenicity의 경우에는 72시간 동안 세포배양을 할 때 dye의 처리를 2시간만 해도 된다는 결과를 얻었다. Figure 3-2-16에서는 실제 시험물질을 사용하여 할 때 LPS와 Con A에 의한 비장세포 유약화 반응을 실험한 결과를 도시하였다. 본 시험에 사용한 시험물질은 0.1 mg/ml의 농도부터 용량 상관성을 보이며 LPS 및 Con A mitogenicity를 억제하는 것을 보여주었다. Figure 3-2-17에서는 혼합 백혈구 증식시험의 예를 도시하였다. 혼합 백혈구 증식시험은 서로 다른 strain의 비장세포를 혼합할 때 동종 항원(alloantigen)에 의해 자극을 받아 증식이 유도되는 반응을 측정하는 시험으로, 이 시험에서도 [³H]-thymidine을 이용하여 DNA에 합입되는 방사능을 측정하여 왔다. 본 시험에서는 비장세포 유약화 반응에서와 마찬가지로 dye를 이용한 증식능 측정시험을 시도하고자 하였다. 먼저 BALB/c 마우스 암컷에서 비장세포를 분리하여 이를 DBA/2 마우스 암컷에서 얻은 비장세포와 혼합한 후 시험물질과 함께 5일간 배양하였다. DBA/2 마우스의 비장세포는 혼합전에 mitomycin C를 처리하여 불활성화시켜 BALB/c 마우스의 비장세포만 반응하여 증식이 되도록 유도하였다. 그 결과 반응세포만을 5일간 배양한 군에 비해 자극세포를 혼합할 때 증식이 유도되는 것을 dye method로 확인할 수 있었고, 시험물질의 처리에 의해 혼합 백혈구 반응이 억제되는 것을 확인할 수 있어 기존의 방사능물질 사용법의 대용으로 dye를 이용하여 용이하게 증식능을 측정할 수 있을 것으로 판단되었다. 다음에는 항체 생성능 시험과 항원성 시험에 대한 보완을 위하여 ELISA방법으로 혈중에 존재하는 항원 특이성을 갖는 항체의 정량법을 연구하고자 하였다. Figure 3-2-18에서는 항원 감작을 정맥 또는 피하로 실시할 때 IgM 생성능에 대한 조건을 확립하고자, keyhole limpet hemocyanin(KLH)을 항원으로 7일 간격으로 2회 감작시키고 최종감작 7일 후에 혈청을 분리하여 IgM의 정량에 사용하였다. KLH에 특이적인 항체를 검출하기 위하여 먼저 anti-rat IgM antibody를 ELISA plate의 각 well에 coating하고 여기에 항혈청을 일정량 binding 시키고 다시 anti-KLH antibody-alkaline phosphatase conjugate를 binding 시켰다. 실험결과, KLH에 대한 IgM 항체를 검출할 수 있었고 두 감작경로 모두 항체 생성 시험에 적합함을 알 수 있었으며, 특히 2 mg/head로 KLH를 감작시킬 때에는 정맥을 통한 감작이 더 효과적

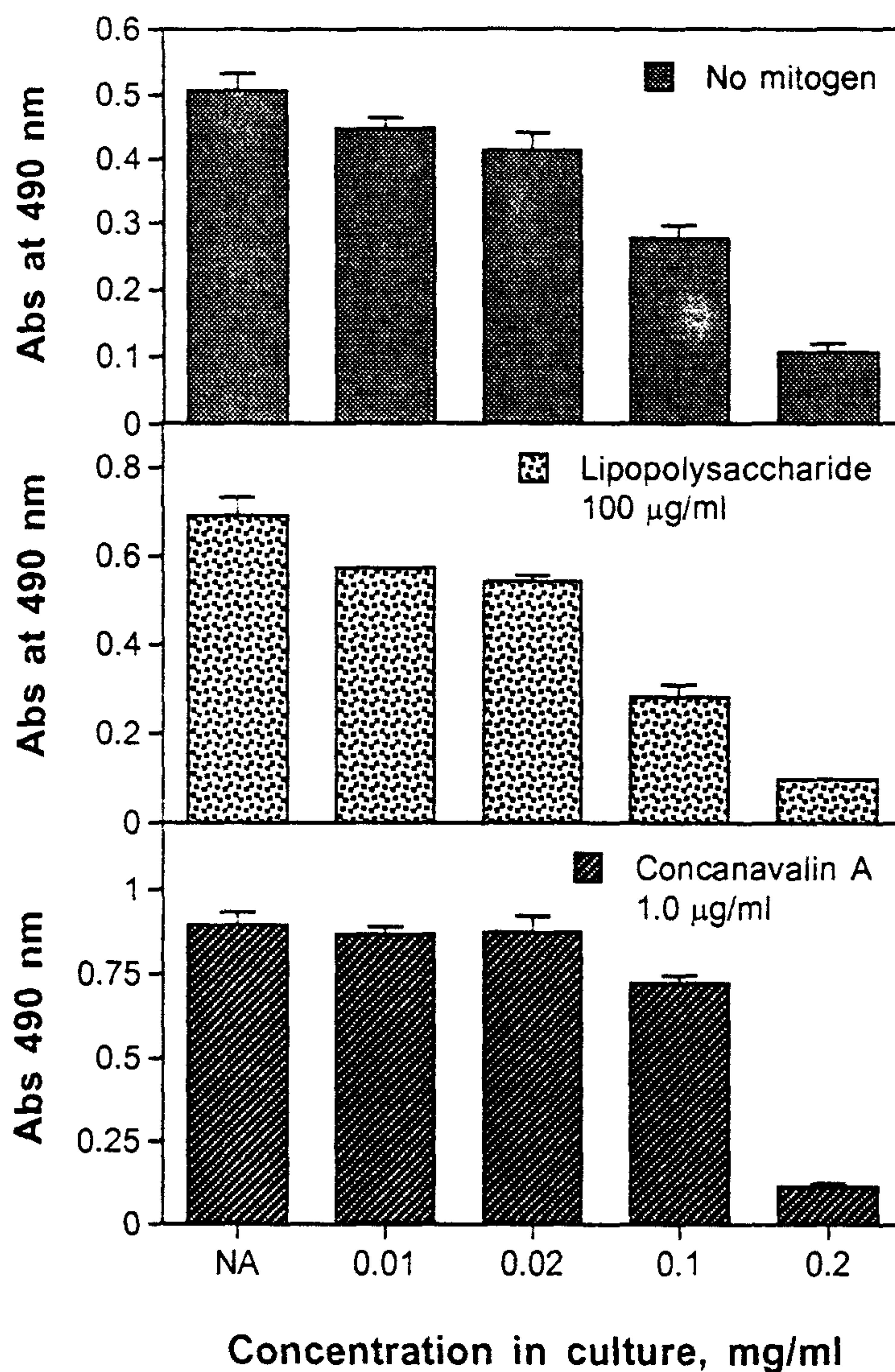


Figure 3-2-16. An example of LPS and ConA mitogenicity using the nonradioactive colorimetric lymphoproliferation assay. 2×10^5 cells were cultured with a test substance for 72 hr in the presence of either 100 μ g/ml of lipopolysaccharide or 1.0 μ g/ml of concanavalin A. Twenty μ l of proliferation assay reagent was added into each well for 4 hr. The absorbance at 490 nm was monitored in an ELISA reader. Each value represents the mean \pm SD of quadruplicate wells.

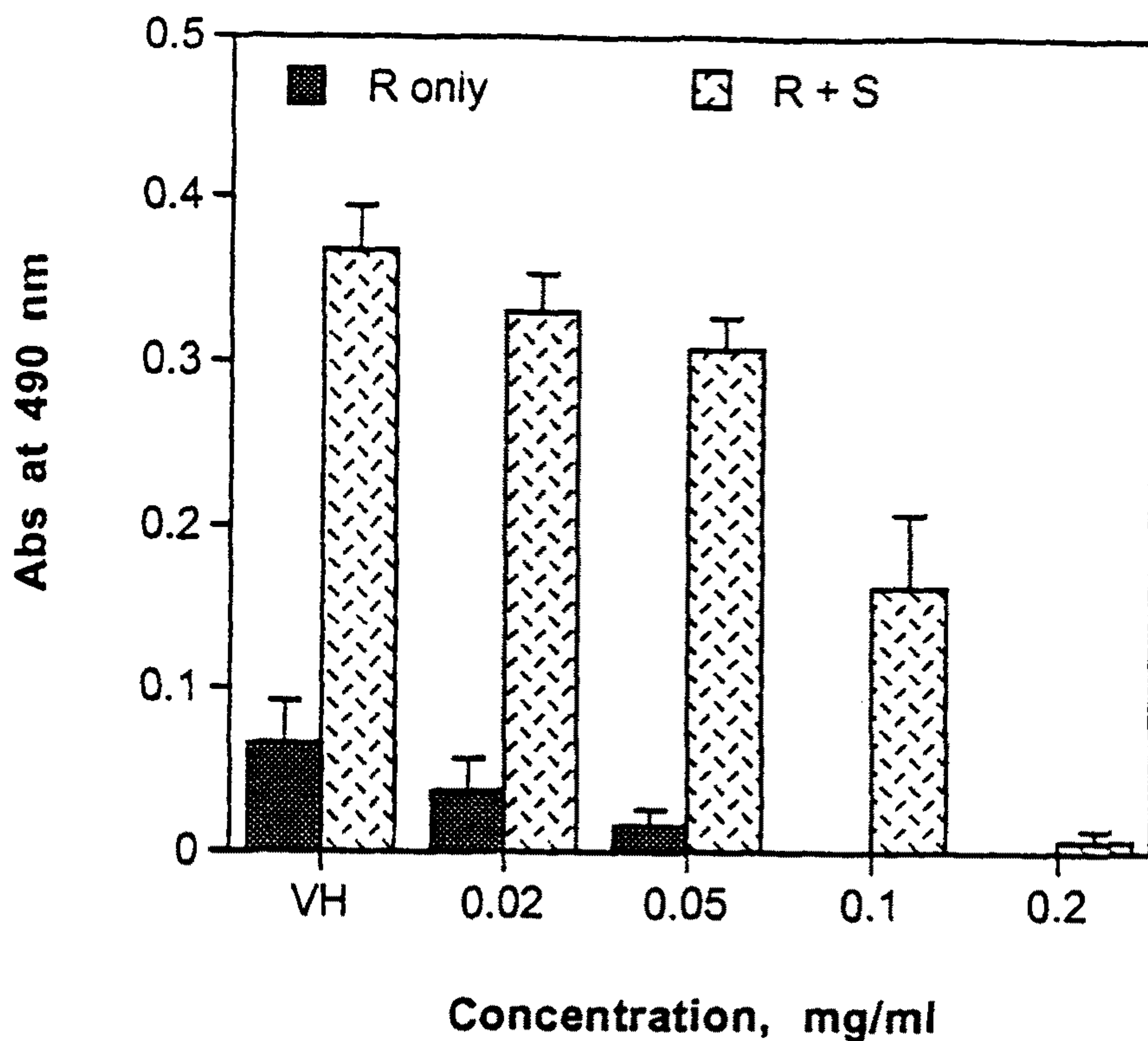


Figure 3-2-17. An example of mixed lymphocyte response using the nonradioactive colorimetric lymphoproliferation assay. 2×10^5 responder cells from female BALB/c mice were co-cultured with 8×10^5 mitomycin C-inactivated stimulator cells from female DBA/2 mice in the presence of a test substance for 120 hr. Twenty μ l of proliferation assay reagent was added into each well for 4 hr. The absorbance at 490 nm was monitored in an ELISA reader. Each value represents the mean \pm SD of quadruplicate wells.

Effect of iv and sc immunization on IgM production in rats

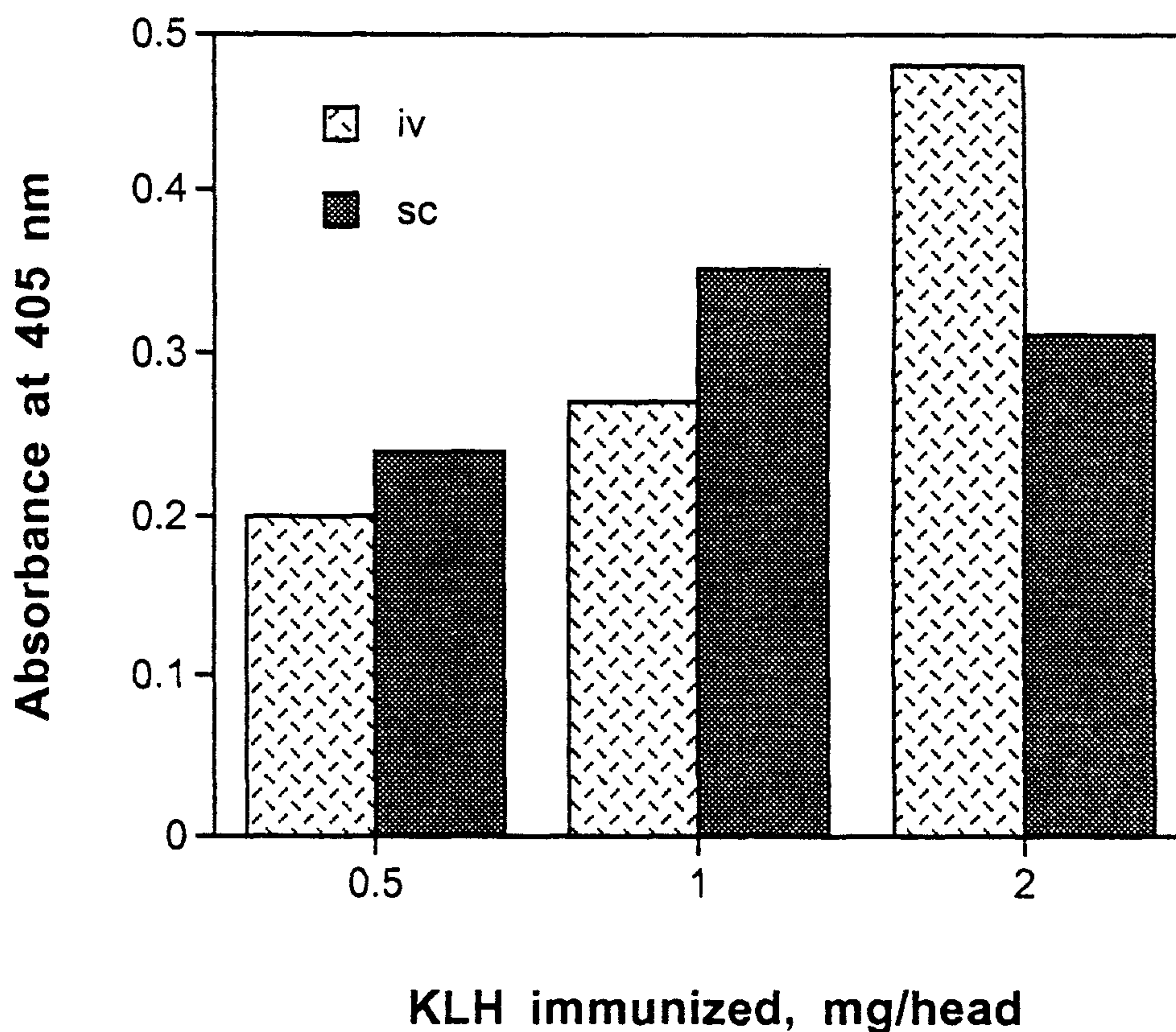


Figure 3-2-18. Effect of intravenous and subcutaneous immunization on IgM production in rats. Male Fischer 344 rats were immunized once per week for two times with keyhole limpet hemocyanin (KLH). Seven days after the last immunization, the sera were prepared and the KLH-specific IgM antibody was assayed by the ELISA method. Each bar represents the mean absorbance at 405 nm of two animals.

이었다. Figure 3-2-19에서는 KLH에 대한 IgG 항체 생성을 시험한 결과를 도시하였는데, 여기에서도 역시 두 감작경로가 모두 적절한 경로로 판단되었고 특히 피하를 통한 감작이 IgG 생성에 효과적임을 알 수 있었다. 이외에도 국내 guideline 및 외국의 guideline을 참조로 여러 가지 시험법의 확립과 각 시험에 대한 표준작업 지침서를 작성하여, 국내 신약개발 연구분야의 지원을 위한 면역독성 연구체제를 갖추고자 하였으며, 현재에는 산업계 지원연구체제가 갖추어져 앞으로 수요가 예상되는 면역독성 시험체제를 가동하기 시작하였다. 현재 국내 독성시험 기준에는 면역기능시험이 일반독성시험을 수행한 결과 면역계의 독성이 의심될 때 수행하도록 되어 있으나 앞으로는 면역기능 시험도 항원성 시험과 마찬가지로 독립적으로 수행되어야 할 것으로 판단되기 때문에 이에 대한 시설 및 인력 보완이 필요한 것으로 사료된다.

화학물질에 의한 면역독성의 기작을 연구하기 위하여 본 연구에서는 모델 약물대사유도제의 특성에 관한 연구를 병행하였다. 화학물질이 독성을 유발할 때 그 자체로 독성을 미칠 수도 있지만 많은 경우 cytochrome P450 등의 대사계에 의해 활성화 되는 과정이 필요하므로 대사활성화 작용의 역할을 규명하기 위해서는 면역독성이 없는 모델 약물대사 유도제의 이용이 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 그 동안 지속적으로 연구해온 모델 약물대사 유도제인 β -ionone의 cytochrome P450 유도 특성을 연구하고자 하였다. Table 3-2-5에서는 Sprague Dawley 랫트에서 β -ionone이 효소활성도에 미치는 영향을 실험한 결과를 요약하였다. β -Ionone은 암수 모두에서 P450 1A1에 특이적인 ethoxyresorufin O-deethylase 활성을 유도하였으며, NADPH-P450 reductase 등의 효소활성도도 유도가 되는 것을 알 수 있었다. Figure 3-2-20에서는 각종 isozyme에 대한 mRNA 발현에 미치는 β -ionone의 영향을 시험하기 위하여 600 mg/kg의 β -ionone을 6시간 동안 처리한 다음 간으로부터 mRNA를 분리하여 RT-PCR시험을 수행하였다. 이때 각 isozyme에 대한 mRNA 발현을 조사하기 위하여 isozyme-specific primer를 합성하여 사용하였고, 양성대조군으로는 강력한 P450 유도제인 TCDD를 처리한 동물에서 분리한 mRNA를 비교하였다. 그 결과 TCDD는 P450 1A2, 2B1, 2B2 및 2C6 mRNA를 증가시켰으며, β -ionone 역시 P450 2B1 및 2B2 mRNA외에 P450 1A2, 2C6 및 NADPH-P450

Effect of iv and sc immunization on IgG production in rats

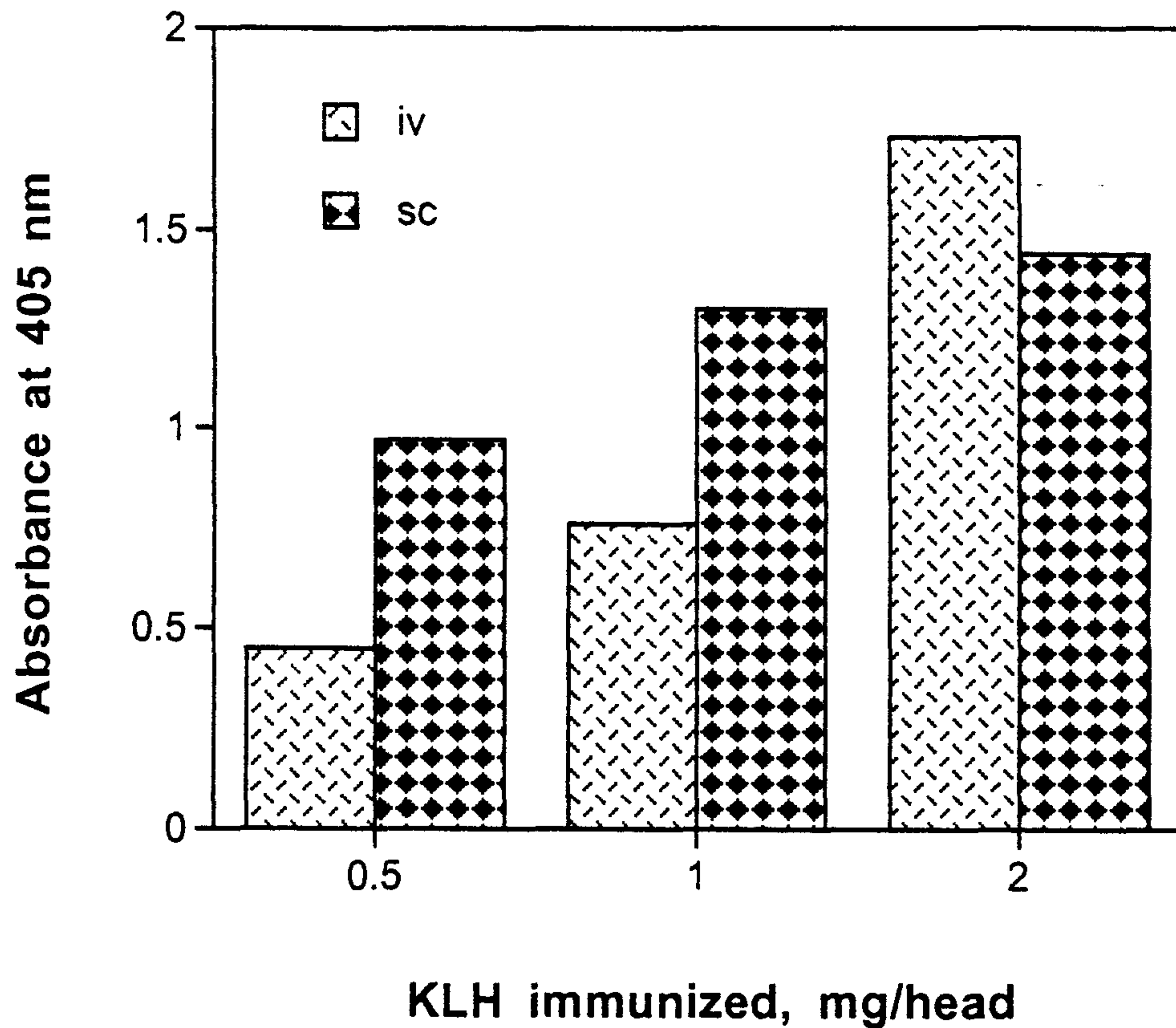


Figure 3-2-19. Effect of intravenous and subcutaneous immunization on IgG production in rats. Male Fischer 344 rats were immunized once per week for two times with keyhole limpet hemocyanin (KLH). Seven days after the last immunization, the sera were prepared and the KLH-specific IgG antibody was assayed by the ELISA method. Each bar represents the mean absorbance at 405 nm of two animals.

Table 3-2-5

Effects of β -ionone on liver microsomal monooxygenases in Sprague Dawley rats.

β -Ionone (mg/kg)	EROD ^{a)}		PNPH ^{b)}		APDM ^{c)}		ERDM ^{d)}		Reductase ^{e)}	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Vehicle	1.20±0.18	0.76±0.04	146±17	75±9	1.37±0.18	0.91±0.13	335±48	128±11	43±8	128±13
300	2.09±0.19*	1.69±0.13*	158±9	90±13	1.58±0.04	1.16±0.13	309±21	79±7*	119±4*	112±27
600	1.85±0.16*	1.97±0.12*	186±34	89±10	1.57±0.14	1.30±0.06*	334±40	91±6*	132±40*	183±16
1200	2.34±0.25*	2.81±0.39*	192±0.18*	125±17*	2.01±0.18*	1.71±0.06*	388±42	143±14	103±7*	98±14

The rats were administered β -ionone in corn oil subcutaneously 72 and 48 hr before sacrificing animals. Each value represents the mean activity±S.E. of four animals. An asterisk indicates the value significantly different from the vehicle control at $p < 0.05$.

a) ethoxyresorufin O-deethylase, nmole resorufin formed/min per mg protein.

b) *p*-nitrophenol hydroxylase, pmole 4-nitrocatechol formed/min per mg protein.

c) aminopyrine N-demethylase, nmole formaldehyde formed/min per mg protein.

d) erythromycin N-demethylase, pmole formaldehyde formed/min per mg protein.

e) NADPH-P450 reductase, nmole/min per mg protein.

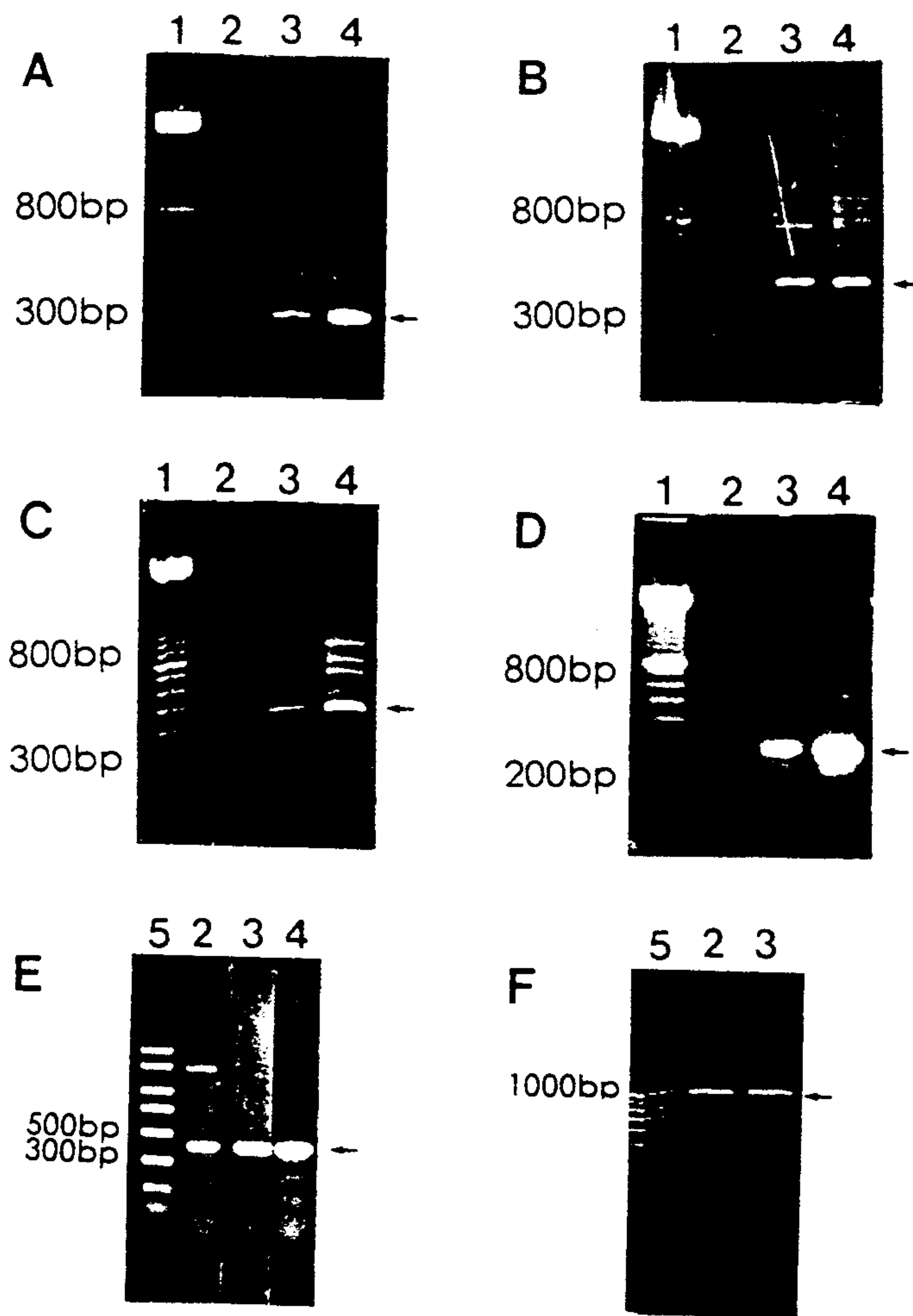


Figure 3-2-20. RT-PCR amplification of P450 1A2, 2B1, 2B2, 2C6 and NADPH-P450 reductase mRNAs. β -Ionone at 600 mg/kg were treated to rats subcutaneously for 6 hr and poly(A⁺) mRNAs were prepared. A, P450 1A2; B, P450 2B1; C, P450 2B2; D, P450 2C6; E, NADPH-P450 reductase; F, glucose 3-phosphate dehydrogenase. Lane 1, mw marker showing 100-bp ladder; lane 2, untreated control; lane 3, β -ionone-treated; lane 4, TCDD-treated at 10 μ g/kg intraperitoneally once for 3 days; lane 5 in E, mw marker showing 2000-, 1500-, 1000-, 750-, 500-, 300-, 150-, and 50-bp ladders from top; lane 5 in F, 100-bp markers from 1000-bp.

reductase mRNA도 증가시켰다. 반면 음성대조군인 glucose 3-phosphate dehydrogenase mRNA는 β -ionone에 의해서 변화가 없었다. 따라서, 이전에 본 연구실에서 밝힌 β -ionone의 P4502B1 유도외에, β -ionone은 다른 P450 isozyme들도 유도시키고, 이러한 유도는 mRNA 증가와 관련이 있다는 사실을 밝힐 수 있었다. 이어서 β -ionone의 이성체인 α -ionone의 영향을 비교하는 실험을 P450 1A 및 2B에 초점을 두어 진행하였다. Figure 3-2-21에서는 α - 및 β -ionone이 모두 랫트 간의 micrososome에서 P450 2B단백질을 유도시킴을 보여주고 있다. 랫트에 ionone류를 피하로 투여할 때, P450 2B 단백질을 용량상관성을 보이며 유도되었으며, β -ionone에 의한 유도정도가 α -ionone보다 뚜렷하게 나타났다. Figure 3-2-22에서는 RT-PCR방법을 이용하여 P450 2B1 mRNA발현에 미치는 두 물질의 영향을 실험하기 위하여, 랫트에 6시간 동안 각 ionone을 투여한 후 간에서 mRNA를 분리하여 실험하였다. 그 결과 Western immunoblotting 실험에서와 마찬가지로 β -ionone에 의해 P450 2B1 mRNA가 더 증가되었음을 알 수 있었다. Figure 3-2-23에서는 β -ionone이 P450 2B1과 1A2 mRNA의 발현에 미치는 영향을 time-course 실험을 통해 알아보았는데, 모두 투여후 12시간째에 mRNA 발현이 최고를 나타내었다. Figure 3-2-24에서는 투여경로에 따른 영향을 살펴보았는데, 기존의 피하투여보다 경구투여시 P450 2B1 단백질의 유도가 더 잘 일어났다. Figure 3-2-25에서는 α - 및 β -ionone의 P450 2B 유도에 있어 성차를 비교하였으며, 수컷에서 유도가 더 잘되었다. 그리고 Figure 3-2-26에 도시한 바와 같은 두 물질은 모두 P450 1A 단백질도 현저히 유도시킴을 알 수 있었다. 다음으로는 간을 구성하는 6개의 각 엽(lobe)에 따라 약물대사효소의 발현이 다르게 나타나는 연구보고에 착안하여 각 엽에 대한 영향을 각각 연구하였다. 간을 구성하는 각 간엽의 위치는 Figure 3-2-27에 도시하였다. Table 3-2-6에서는 α - 및 β -ionone이 P450 1A 특이적인 EROD에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타내었다. EROD 활성은 유의성은 없었으나, 우측 중간엽 (right median lobe) 및 좌엽 (left lobe)에서 상대적으로 높았고, 우측 후엽 (right posterior lobe)에서 낮게 나타났다. 한편 시험물질 투여시 각 엽마다 서로 다른 양상으로 EROD 활성이 유도되었는데, 특히 α -ionone의 경우 우측 중간엽과 좌엽에서 용량상관성을 보이며 유도가 많이 일어났고, β -ionone의 경우에

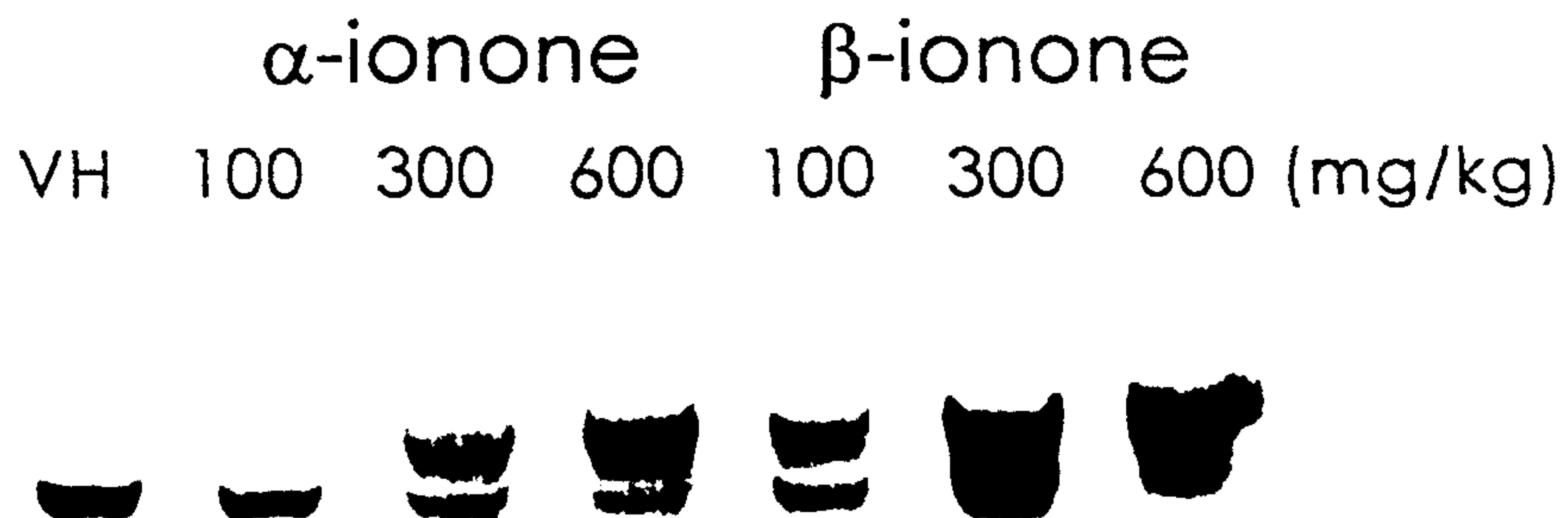


Figure 3-2-21. Induction of P450 2B by α - and β -ionone in liver microsomes of male Sprague Dawley rats. The rats were administered subcutaneously with either α - or β -ionone in corn oil 72 and 48 hr before sacrifice. The microsomal proteins (10 mg/well) were resolved on a 10% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose filter for the Western immunoblotting. The filter was incubated with the primary antibody against P450 2B proteins, followed by an incubation with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG. Then the filter was developed using the 1:1:10 mixture of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, nitroblue tetrazolium and 0.1 M Tris buffer. The upper band indicates P450 2B proteins and the lower band indicates a non-specific binding.

α -ionone β -ionone
M 600 300 100 VH 100 300 600 (mg/kg)



Figure 3-2-22. An RT-PCR amplification of P450 2B1 mRNAs from rat livers treated with either α - or β -ionone. The rats were treated with ionones subcutaneously for 6 hr. M, molecular weight size markers showing 100-bp ladders; VH, corn oil-treated vehicle control.

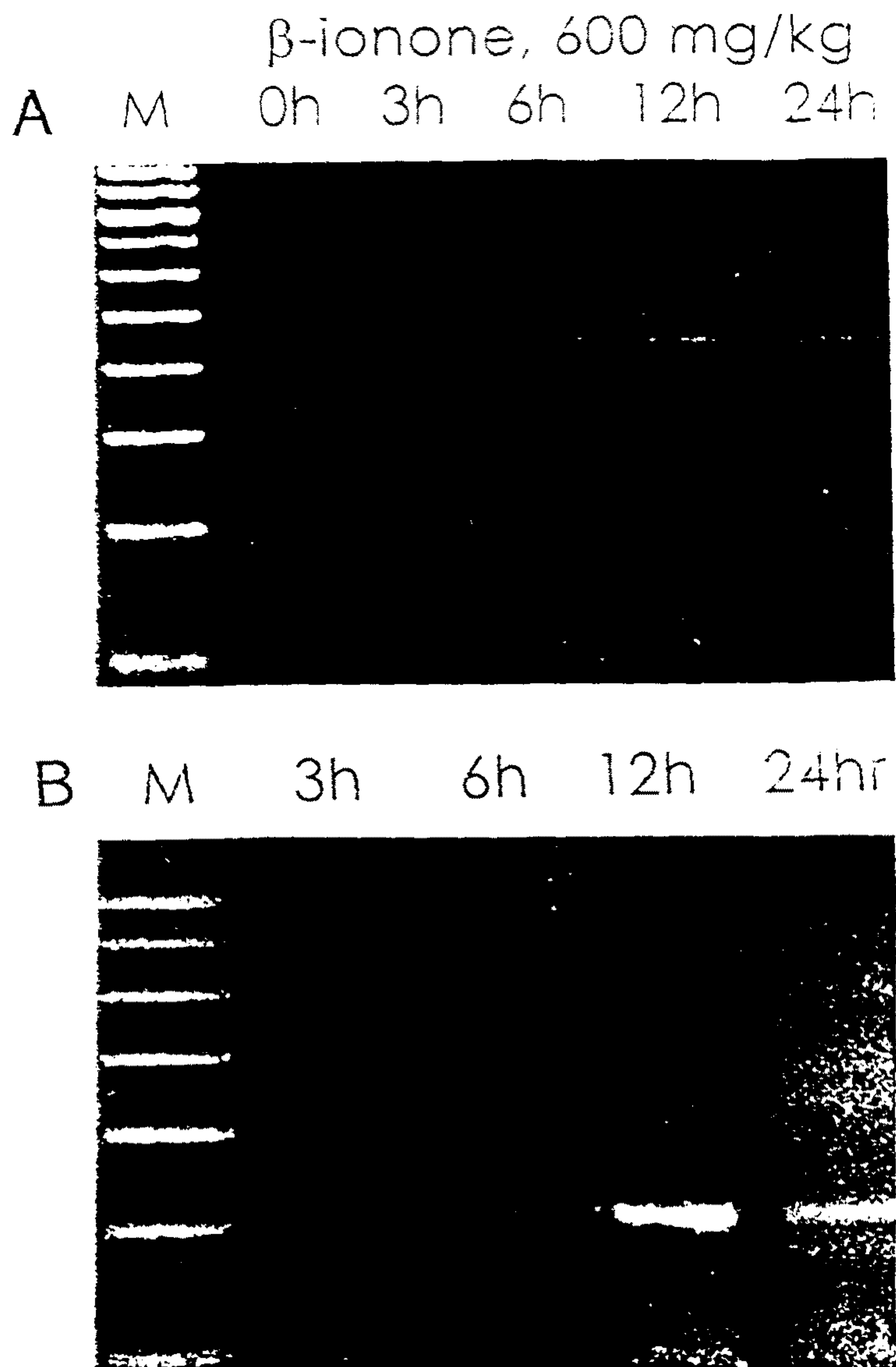


Figure 3-2-23. Time-course studies of P450 mRNA induction by β -ionone. A) P450 2B1; B) P450 1A2. The rats were treated with 600 mg/kg β -ionone subcutaneously for the designated time. M, molecular weight size markers showing 100-bp ladders.

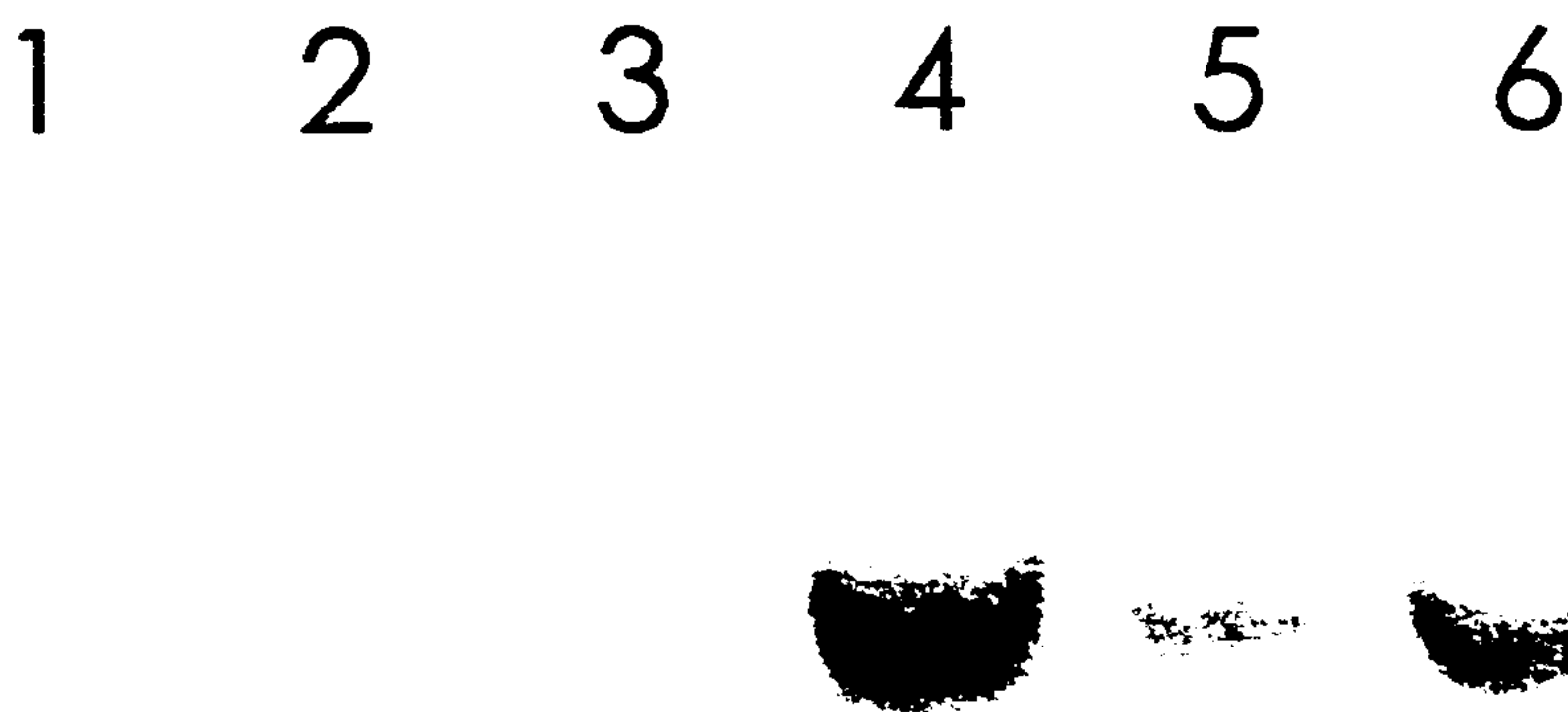


Figure 3-2-24. Effects of the routes of administration on P450 2B induction by β -ionone. β -Ionone was administered either subcutaneously or orally at 300 mg/kg 72 and 48 hr before sacrificing the animals. The liver microsomal proteins (10 mg/well) prepared from individual inducers-administered male Sprague Dawley rats were resolved on a 10% SDS-PAGE. Lane 1, untreated control; lane 2, 10 mg/kg TCDD-treated once for 3 days, ip; lane 3, 5 g/kg ethanol-treated daily for 3 days, po; lane 4, 80 mg/kg phenobarbital-treated daily for 3 days, ip; lane 5, β -ionone treated subcutaneously; lane 6, β -ionone treated orally.

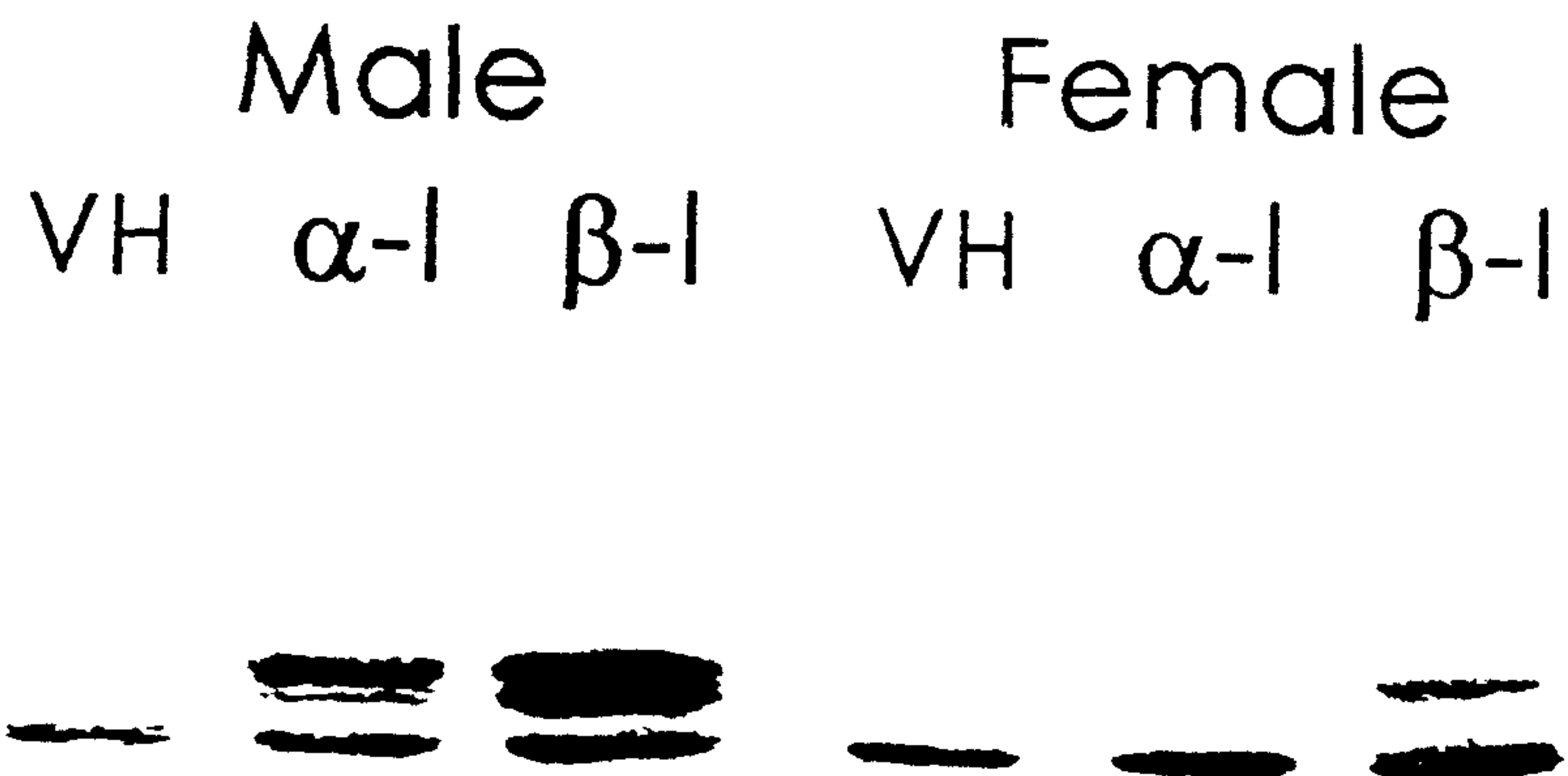


Figure 3-2-25. Sex difference in the induction of P450 2B by α - and β -ionone. α - and β -ionone were administered orally at 100 mg/kg for 24 hr. The liver microsomal proteins (10 mg/well) were resolved on a 10% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose filter for the Western immunoblotting. The lower band indicates a non-specific binding. α -I, α -ionone; β -I, β -ionone.

VH α -I β -I



Figure 3-2-26. Effects of α - and β -ionone on the expression of P450 1A proteins in male Sprague Dawley rats. Ionones were administered orally at 100 mg/kg for 24 hr. The liver microsomal proteins (10 mg/well) were resolved on a 10% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose filter for the Western immunoblotting. α -I, α -ionone; β -I, β -ionone.

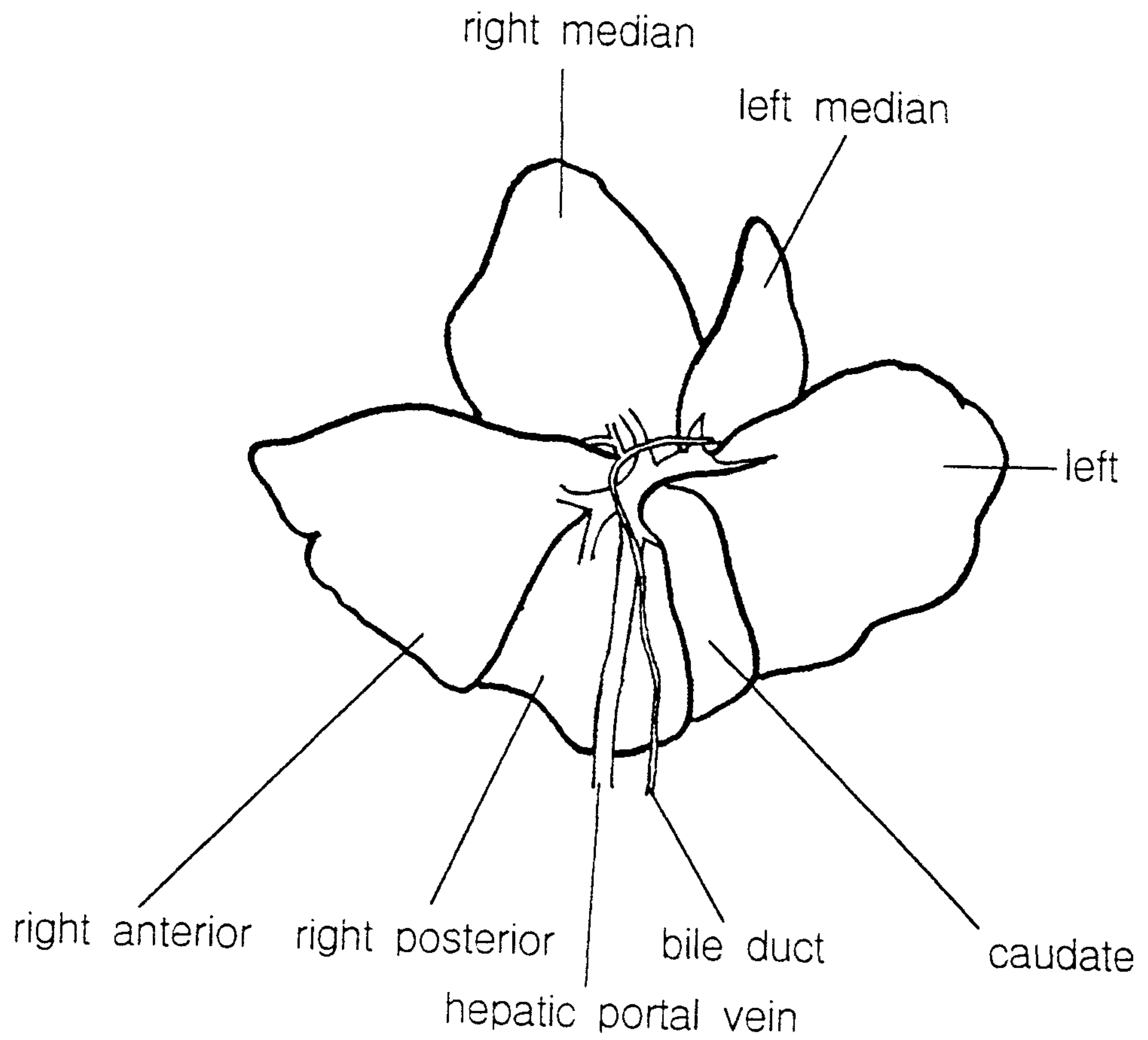


Figure 3-2-27. Nomenclature used for lobes of rat liver. A view of the dorsal surface of the liver.

Table 3-2-6

Effects of α - and β -ionone on ethoxyresorufin O-deethylase in male Sprague Dawley rats.

Lobes	Dose (mg/kg)	Vehicle	α ionone			β ionone		
			100	300	600	100	300	600
Caudate		4.50 ± 0.36	3.51 ± 0.55	3.60 ± 0.80	3.94 ± 0.66	4.03 ± 0.41	5.83 ± 0.22	6.16 ± 1.27
Right posterior		3.04 ± 0.21	3.05 ± 0.36	6.16 ± 1.24*	4.10 ± 0.60	2.89 ± 0.38	5.54 ± 1.38	4.19 ± 0.23
Right anterior		4.62 ± 0.25	5.09 ± 0.62	5.61 ± 0.82	5.99 ± 0.81	5.88 ± 0.49	5.13 ± 0.28	5.03 ± 0.88
Right median		4.78 ± 0.23	4.93 ± 0.63	6.26 ± 0.57	7.80 ± 0.19**	6.05 ± 0.54	5.21 ± 0.13	4.96 ± 0.25
Left median		3.90 ± 0.25	4.80 ± 0.30	5.57 ± 0.98	4.16 ± 0.30	4.11 ± 0.22	5.77 ± 0.36*	3.60 ± 0.25
Left		4.72 ± 0.24	6.16 ± 0.06**	7.42 ± 0.50**	5.59 ± 0.28*	7.78 ± 0.89	6.93 ± 1.04	7.21 ± 1.11

The values indicate mean activity ± S.E. of three animals

Activity = nmole resorufin produced/min per mg protein

* P < 0.05; **, P < 0.01.

도 마찬가지로였으나 용량상관성과 유의성을 보이지는 않았다. Table 3-2-7에서는 P450 1A2에 비교적 특이성이 높은 MROD에 미치는 영향을 나타내었다. MROD 활성은 정상군의 경우 유의성은 없었으나, caudate lobe와 우측 전엽(right anterior lobe)이 상대적으로 활성이 높았다. 한편, 시험물질 투여시 우측 중간엽 및 좌엽에서 유도가 많이 일어났고, β -ionone의 경우에는 우측 후엽(right posterior lobe)에서도 유도현상을 관찰할 수 있었다. Table 3-2-8에서는 P450 2B에 특이적인 PROD활성에 미치는 영향을 실험한 결과를 나타내었다. PROD 활성은 정상군의 경우 우측전엽과 좌엽을 제외하고는 각 엽별로 큰 차이가 없었고, 대부분의 엽에서 α -와 β -ionone의 투여시 유도현상을 관찰할 수 있었다. 각 물질에 의한 유도현상의 양상은 차이를 보여 α -ionone의 경우 우측 중간엽과 좌엽에서 PROD 활성의 유도가 뚜렷한 반면, β -ionone보다 약하게 나타났다. Table 3-2-9에서도 P450 2B에 특이적인 BROD 활성에 미치는 영향을 실험한 결과를 도시하였다. BROD 활성은 정상군에서 큰 차이는 없었고, α - 및 β -ionone 처리시에 역시 서로 다른 BROD 활성의 유도를 나타내었다. 즉, α -ionone 투여시에는 우측 중간엽에서 BROD 활성이 약 2배 정도 유도되는데 반하여, β -ionone 투여시에는 우측 중간엽에는 영향이 적었고 좌엽에서 약 2배 이상 유도되었다. Figure 3-2-28에서는 α - 및 β -ionone 투여시 각 엽에서 발현되는 P450 2B1 단백질의 발현변화를 알아보려고 Western immunoblotting 실험을 수행한 결과를 나타내었다. 그 결과 전체적으로 α -ionone 및 β -ionone 투여시 각 엽에서 P450 2B 단백질의 증가를 확인할 수 있었으며 전체적으로 β -ionone이 α -ionone에 비하여 P450 2B 단백질을 잘 유도시키며 우측 중간엽과 좌엽에서 특히 유도가 잘 일어나, 효소활성측정의 결과와 일치한 것으로 사료되었다. 그러나 우측 중간엽(Figure 3-2-28D)의 경우에는 20 μ g의 단백질은 사용하였고, 다른 엽은 10 μ g의 단백질을 사용하여 엽간의 정확한 단백질 발현을 비교하기에는 어려움이 있었다. 결론적으로 α - 및 β -ionone을 랫트에 24시간 동안 투여할 때, P450 2B 효소활성을 유의성 있게 증가시켰으며, 이는 P450 2B 단백질의 증가에 기인한 것으로 판단되었다. 또한 P450 2B 효소활성 및 단백질의 유도는 간의 각엽별로 서로 차이를 보여, P450 2B에 의해 대사활성화가 일어나는 약물 및 독성물질의 독성발현도 각 엽별로 서로 다르게 나타날 수 있음을

Table 3-2-7

Effects of α - and β -ionone on methoxyresorufin O-demethylase in male Sprague Dawley rats.

lobes	Dose (mg/kg)	Vehicle	α -ionone			β -ionone		
			100	300	600	100	300	600
Caudate		3.16 ± 0.12	2.98 ± 0.33	2.61 ± 0.10	3.05 ± 0.61	2.36 ± 0.09	3.22 ± 0.22	3.74 ± 0.52
Right posterior		2.47 ± 0.36	2.75 ± 0.12	3.89 ± 0.22	2.40 ± 0.22	2.27 ± 0.20	4.07 ± 0.50	3.89 ± 0.63
Right anterior		3.17 ± 0.43	3.20 ± 0.04	2.75 ± 0.16	2.99 ± 0.43	2.86 ± 0.09	3.70 ± 0.35	2.98 ± 0.09
Right median		2.44 ± 0.17	2.93 ± 0.40	3.44 ± 0.26	4.12 ± 0.46*	3.39 ± 0.33	3.33 ± 0.23	3.83 ± 0.43
Left median		2.70 ± 0.29	3.13 ± 0.21	3.32 ± 0.43	2.97 ± 0.04	3.21 ± 0.17	3.52 ± 0.21	3.14 ± 0.22
Left		2.42 ± 0.20	3.92 ± 0.26**	3.80 ± 0.46**	2.76 ± 0.04	3.13 ± 0.16	3.26 ± 0.20	3.48 ± 0.28*

The values indicate mean activity ± S.E. of three animals

Activity = nmole resorufin produced/min per mg protein

*, P < 0.05; **, P < 0.01.

Table 3-2-8

Effects of α - and β -ionone on pentoxyresorufin O-depentylase in male Sprague Dawley rats.

lobes	Dose (mg/kg)	Vehicle	α -ionone			β -ionone		
			100	300	600	100	300	600
Caudate		1.50 ± 0.28	2.05 ± 0.48	2.99 ± 0.48*	4.50 ± 0.97*	1.65 ± 0.09	4.39 ± 0.44**	3.85 ± 1.11*
Right posterior		1.65 ± 0.12	2.55 ± 0.56	3.90 ± 1.11*	3.20 ± 0.06*	1.58 ± 0.05	1.95 ± 0.11	3.39 ± 1.35
Right anterior		1.00 ± 0.09 ^{a)}	1.59 ± 0.30	3.10 ± 0.31**	4.89 ± 0.73**	2.27 ± 0.28	3.38 ± 0.64**	3.34 ± 0.60*
Right median		1.26 ± 0.06	2.02 ± 0.10*	5.98 ± 1.14**	11.35 ± 1.17**	2.91 ± 0.40	4.40 ± 0.37**	5.19 ± 0.82**
Left median		1.49 ± 0.11	2.03 ± 0.25	4.70 ± 0.99**	5.01 ± 1.65**	1.82 ± 0.08	4.46 ± 0.37**	3.41 ± 0.70**
Left		1.05 ± 0.09	1.77 ± 0.33	4.11 ± 0.87**	8.93 ± 2.15**	2.96 ± 0.48*	4.40 ± 0.39**	9.18 ± 0.40**

The values indicate mean activity ± S.E. of three animals

Activity = nmole resorufin produced/min per mg protein

*, P < 0.05; **, P < 0.01.

a) Significantly different from caudate lobe at P<0.05.

Table 3-2-9

Effects of α - and β -ionone on benzyloxyresorufin O-debenzylase in male Sprague Dawley rats.

Lobes	Dose (mg/kg)	Vehicle	α -ionone			β -ionone		
			100	300	600	100	300	600
Caudate		3.35 \pm 0.18	3.26 \pm 0.12	3.27 \pm 0.11	3.44 \pm 0.37	2.75 \pm 0.11	3.86 \pm 0.47	4.39 \pm 0.65
Right posterior		2.51 \pm 0.27	2.93 \pm 0.07	3.78 \pm 0.36*	3.13 \pm 0.56	2.71 \pm 0.46	4.00 \pm 0.58	3.48 \pm 0.14
Right anterior		3.07 \pm 0.34	3.02 \pm 0.17	3.11 \pm 0.22	3.87 \pm 0.44	3.22 \pm 0.14	3.71 \pm 0.26	3.76 \pm 0.19
Right median		2.98 \pm 0.30	3.06 \pm 0.48	3.71 \pm 0.24	5.88 \pm 0.66*	3.59 \pm 0.39	4.41 \pm 0.27*	3.93 \pm 0.15
Left median		2.88 \pm 0.37	3.13 \pm 0.26	3.66 \pm 0.19	3.60 \pm 0.21	3.41 \pm 0.04	4.04 \pm 0.25	3.73 \pm 0.27
Left		2.45 \pm 0.04	3.59 \pm 0.35*	4.28 \pm 0.39**	3.31 \pm 0.16	3.43 \pm 0.35	4.61 \pm 0.43**	5.22 \pm 0.52**

The values indicate mean activity \pm S.E. of three animals

Activity = nmole resorufin produced/min per mg protein

*, P < 0.05; **, P < 0.01.

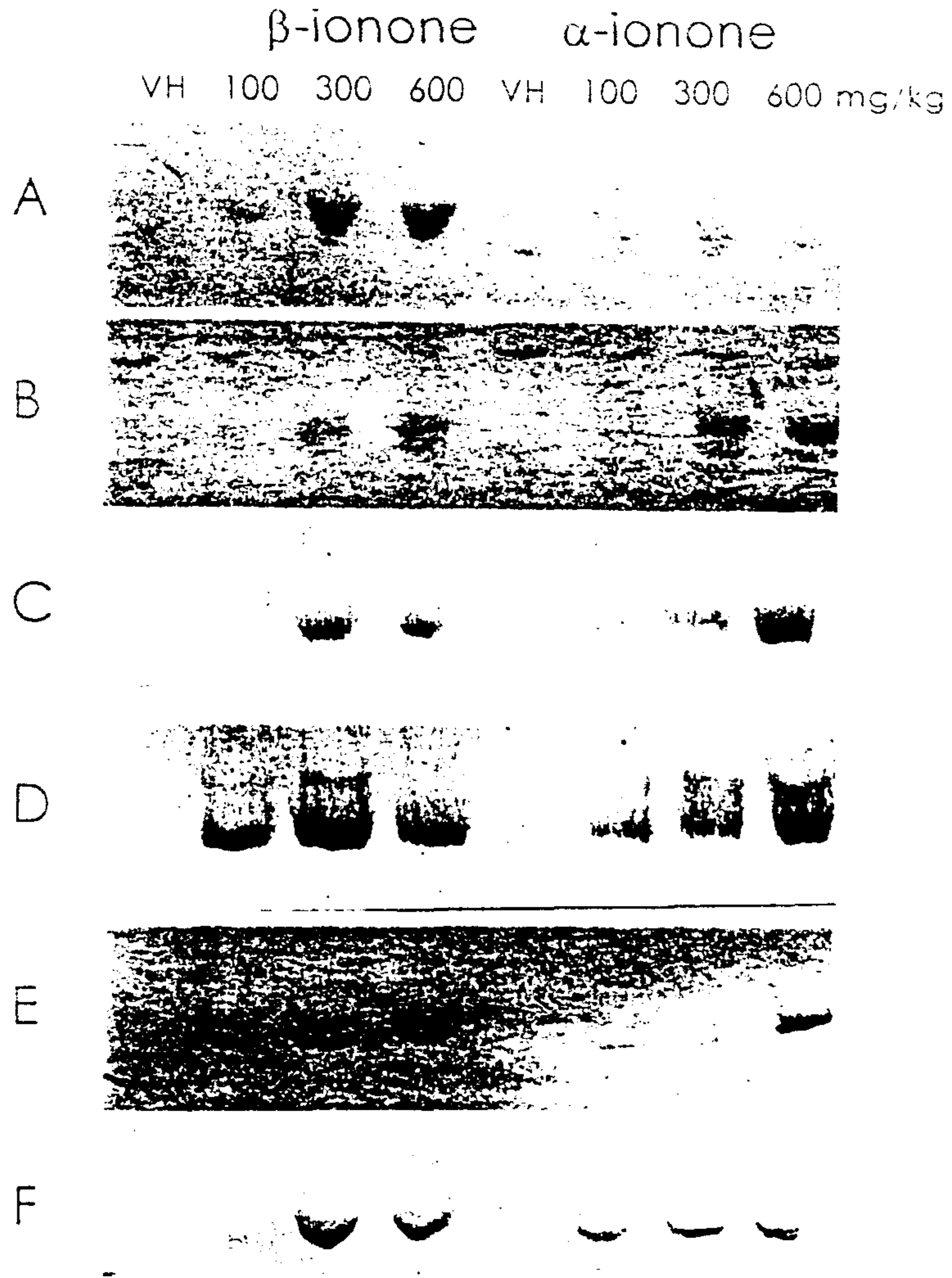


Figure 3-2-28. Western immunoblotting for P450 2B protein in rat liver S-9 fractions isolated from livers treated with α - and β -ionone. The proteins from S-9 fractions isolated from liver lobes were used. A, caudate; B, right posterior; C, right anterior; D, right median; E, left median; F, left lobe.

암시해 주었다. 계속해서 실제로 β -ionone을 모델 약물대사 유도제로써 독성기작연구에 활용할 수 있는지를 시험하기 위하여, BALB/c 마우스 수컷에 β -ionone 600 mg/kg을 시험물질 투여 전 72시간 및 48시간 전에 피하투여를 하고, 100 및 200 mg/kg의 thioacetamide를 복강투여한 후 24시간 후에 혈청 생화학적 지표와 간의 조직병리 검사를 실시하였다. Thioacetamide는 체내에서 P450 2B1에 의하여 대사활성화가 일어나는 것으로 이미 알려져 있어 표준 독성물질로 사용하였다. Figure 3-2-29에 나타낸 바와 같이 β -ionone을 전투여해도 혈청내 GPT 및 GOT활성은 변화가 없는 것을 알 수 있었고, thioacetamide를 투여하면 간독성이 심하게 일어남을 알 수 있었다. 한편 β -ionone 전투여군에서는 corn oil만을 전투여한 대조군에 비하여 200 mg/kg thioacetamide 투여군에서 유의성있는 SGPT 및 SGOT활성의 증강을 확인하여 실제 독성기작 연구에서 β -ionone을 모델 P450 유도제로 사용할 수 있음을 입증하였다. 이러한 결과는 Figure 3-2-30에서와 같이 간의 조직 병리 검사에서도 뚜렷하여 thioacetamide에 의한 간의 괴사 및 다중핵 세포의 침착 등의 소견이 β -ionone의 전투여에 의해 더욱 심해짐을 확인할 수 있었다. Table 3-2-10에서는 기타 혈청생화학적 지표들의 변화를 요약하여 나타내었다. Figure 3-2-31에서는 간조직에서 S-9 분획을 분리하여 thioacetamide의 대사활성화에 관여하는 것으로 밝혀진 P450 2B1 효소에 대한 특이적인 활성도인 benzyloxyresorufin O-debenzylase와 pentoxyresorufin O-dealkylase 활성을 측정하였는데, 실제로 β -ionone 전투여군에서 효소활성이 뚜렷하게 유도되었음을 확인할 수 있었다.

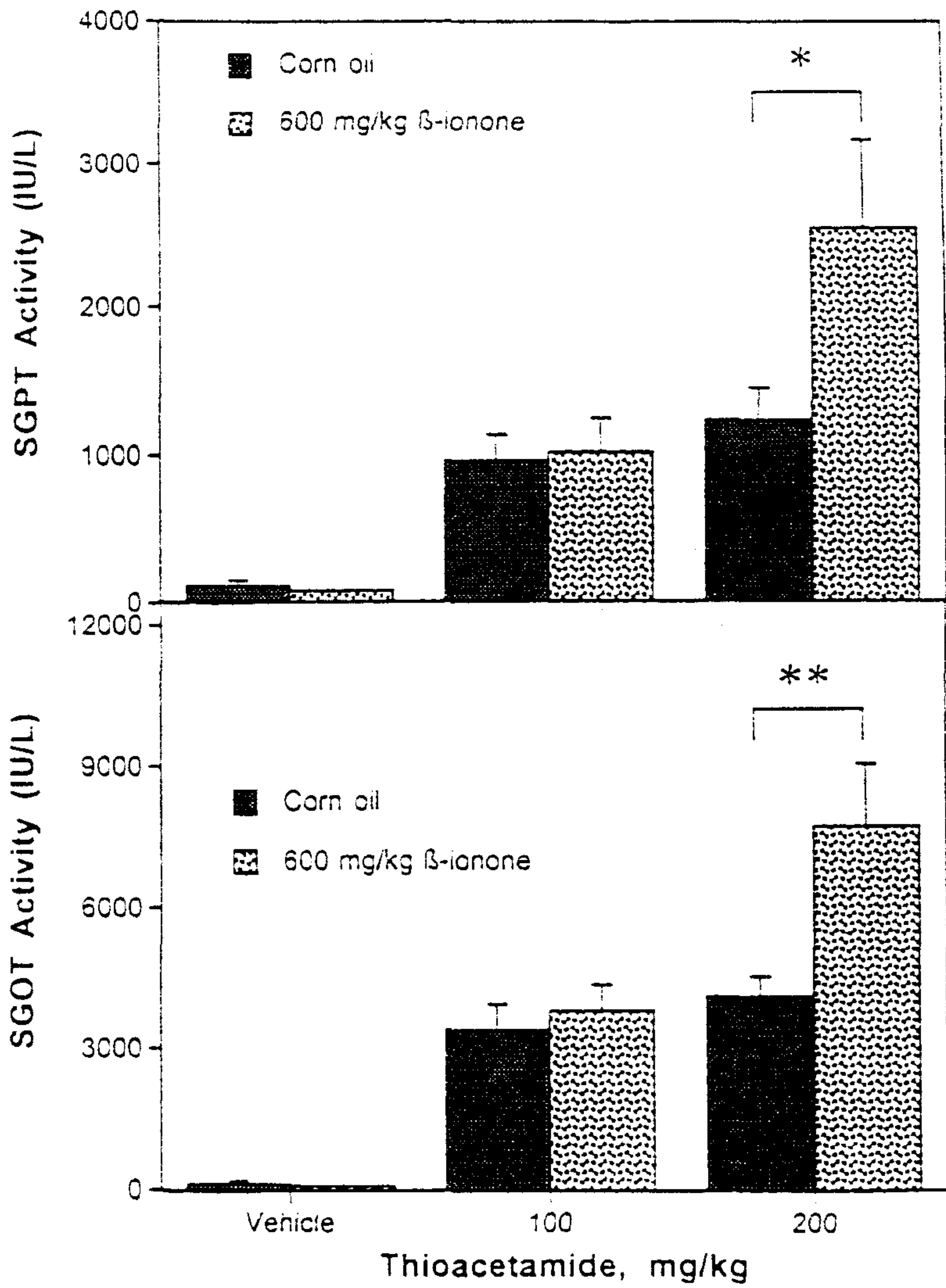


Figure 3-2-29. Pretreatment of male BALB/c mice with β -ionone potentiates thioacetamide-induced elevation of SGPT and SGOT activities. Mice were pretreated with 600 mg/kg of β -ionone 72 and 48 hr prior to an administration with thioacetamide. Twenty four hr later, the serum was prepared. Each bar represents the mean activity \pm SE of five animals. The asterisks indicate the values significantly different from each corn oil-treated control at $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**).

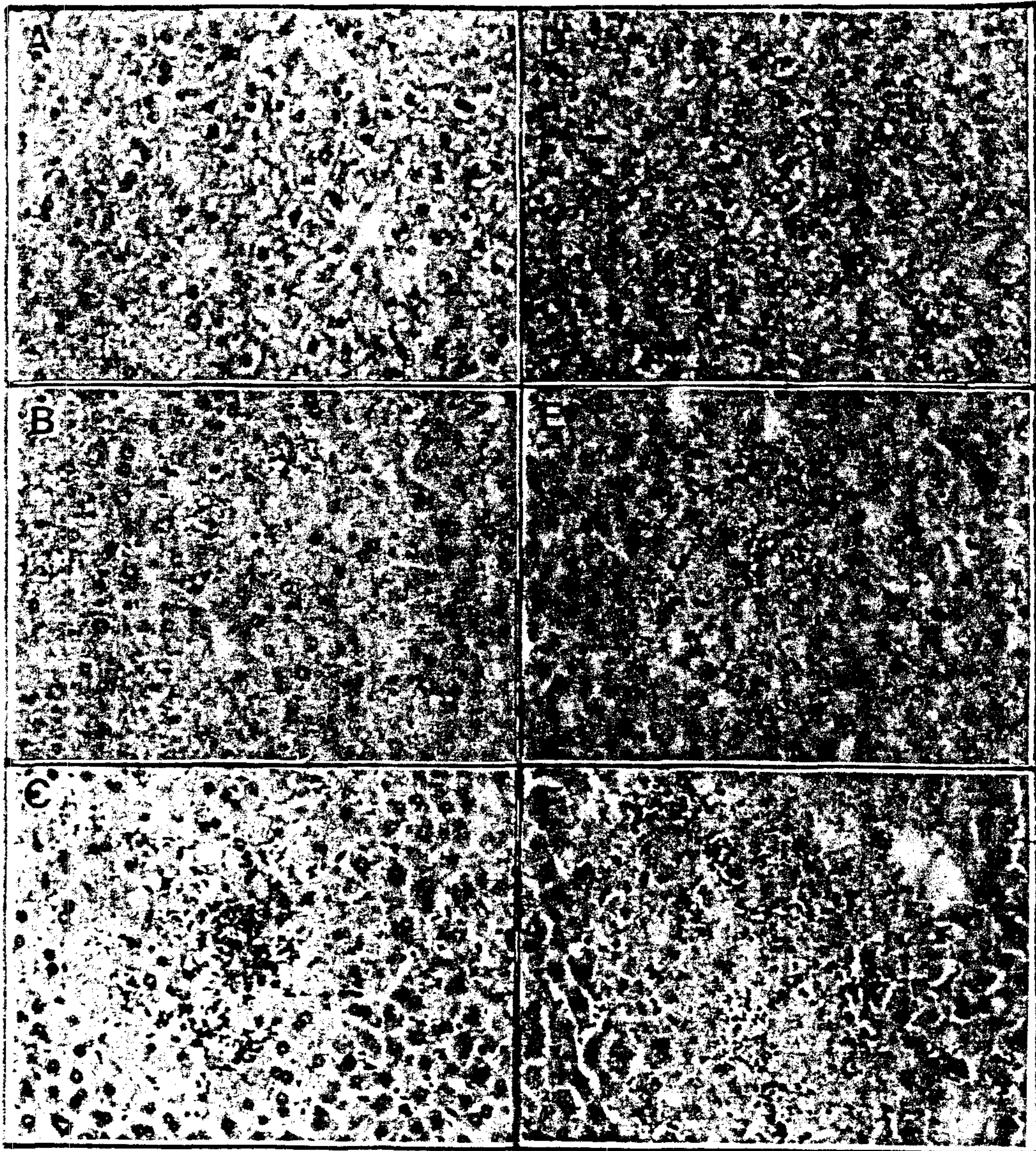


Figure 3-2-30. Liver histopathology. 200X magnification. A, vehicle control; B, 100 mg/kg of thioacetamide; C, 200 mg/kg of thioacetamide; D, 600 mg/kg of β -ionone; E, β -ionone plus 100 mg/kg thioacetamide; F, β -ionone plus 200 mg/kg thioacetamide. Severe hepatic necrosis and congestion and mild infiltration of polymorphonuclear cells were obviously observed in panel F.

Table 3-2-10

Effects of pretreatment with β ionone on thioacetamide induced changes of serum clinical parameters in male BALB/c mice.

Parameters	Saline		Thioacetamide, 100 mg/kg		Thioacetamide, 200 mg/kg	
	Com Oil	β Ionone	Com Oil	β Ionone	Com Oil	β Ionone
ALP (IU/l)	300 ± 9	471 ± 21	503 ± 12	359 ± 21	490 ± 22	499 ± 28
BUN (mg/dl)	242 ± 35	23 ± 0.43	200 ± 0.67	22.4 ± 1.36	208 ± 1.51	22.3 ± 0.63
CREA (mg/dl)	0.568 ± 0.114	0.296 ± 0.029	0.338 ± 0.104	0.556 ± 0.123	0.394 ± 0.107	0.436 ± 0.074
GLU (mg/dl)	266 ± 26	166 ± 8	164 ± 6	238 ± 23*	216 ± 12	169 ± 19
TCHO (mg/dl)	143 ± 6	110 ± 4	117 ± 2	151 ± 6	116 ± 6	110 ± 4
TBL (mg/dl)	0.033 ± 0.01	0.054 ± 0.008	0.038 ± 0.009	0.040 ± 0.017	0.034 ± 0.009	0.044 ± 0.011*
TP (g/dl)	5.11 ± 0.112	4.67 ± 0.08	4.60 ± 0.12	5.11 ± 0.17	4.52 ± 0.107	4.47 ± 0.058
ALB (g/dl)	3.17 ± 0.064	2.99 ± 0.049	3.02 ± 0.063	3.14 ± 0.05	2.97 ± 0.068	2.95 ± 0.043
CPK (IU/l)	64 ± 3	105 ± 26	68 ± 5	54 ± 8*	46 ± 2	51 ± 4*
TG (mg/dl)	182 ± 17	57 ± 14	23 ± 4	190 ± 13	43 ± 15	16 ± 2
Ca (mg/dl)	9.98 ± 0.41	9.17 ± 0.24	9.42 ± 0.37	9.61 ± 0.17	10.1 ± 0.45	9.34 ± 0.45
IP (mg/dl)	10.5 ± 0.7	8.25 ± 0.24	9.01 ± 0.39	9.94 ± 0.59	9.70 ± 0.89	9.90 ± 0.52
PUE (mg/dl)	320 ± 12	262 ± 14	281 ± 11	339 ± 6	270 ± 14	257 ± 8
A/G ratio	1.632 ± 0.025	1.788 ± 0.047	1.838 ± 0.059	1.616 ± 0.083	1.906 ± 0.038	1.928 ± 0.050

Mice were pretreated with 600 mg/kg of β ionone 72 and 48 hr prior to an administration of thioacetamide. 24 hr later, the serum was prepared and analyzed by using an Shimadzu clinical analyzer. Each value represents mean ± S.E. of five animals. An asterisk indicates the value significantly different from each com oil treated control at P<0.05(*) or P<0.01(**).

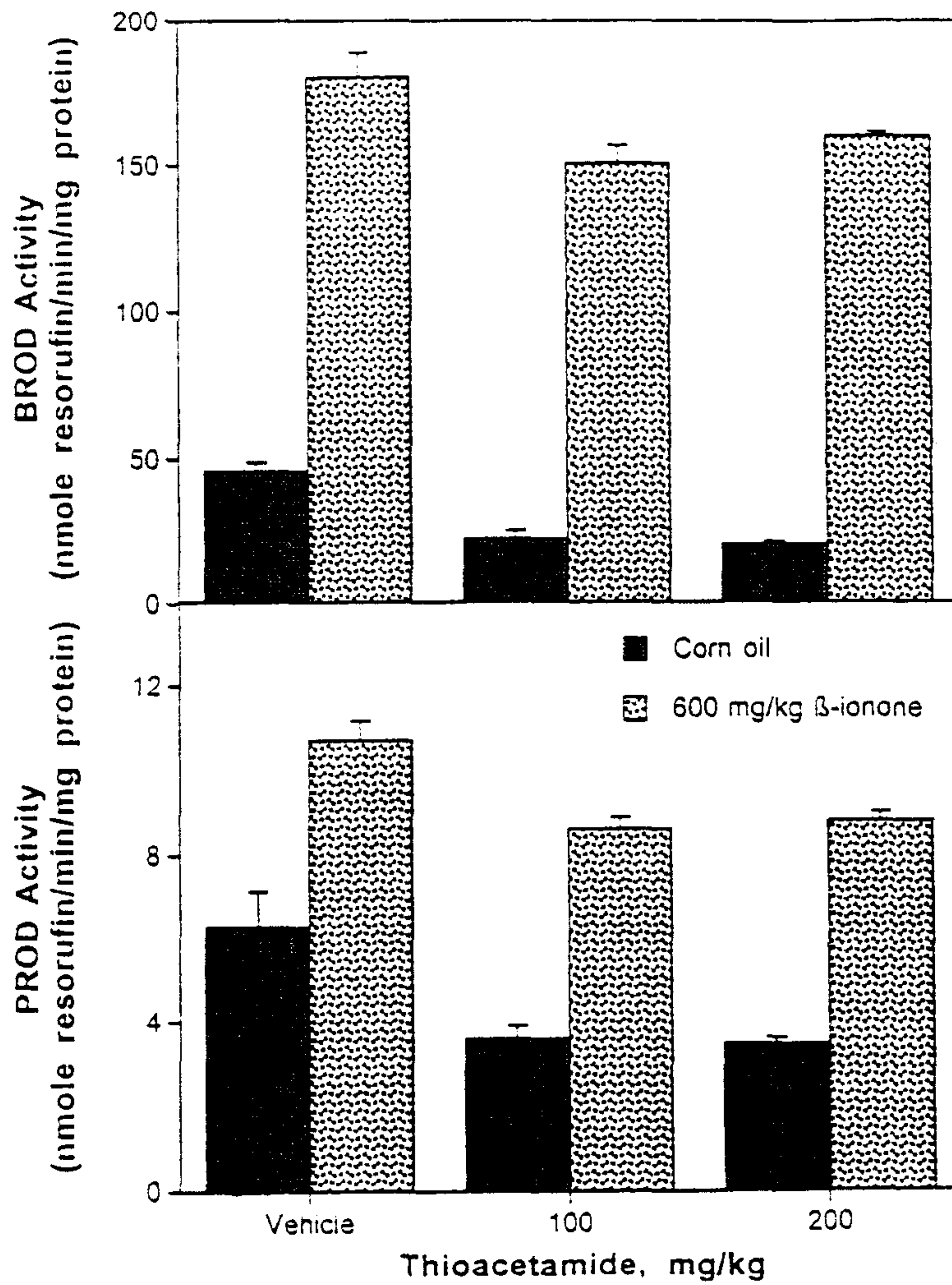


Figure 3-2-31. Effects of β -ionone on P-450 2B1-selective benzyloxyresorufin O-debenzylase (BROD) and pentoxyresorufin O-depentylase (PROD) activities in liver S-9 fractions. Mice were pretreated with 600 mg/kg of β -ionone 72 and 48 hr prior to an administration of thioacetamide. Twenty four hr later, livers were removed to prepare the S-9 fractions.

4. 고찰 및 결론

화학물질의 면역독성 유무의 판단에는 한가지 시험으로는 불가능하여 여러 시험법이 종합된 tier system이 권장되어 사용되고 있으며, 국내의 '의약품 등의 독성시험기준'에 포함된 면역독성 관련 시험항목에서도 10가지의 시험방법을 제시하여 이중 2가지 정도의 시험을 선택하여 사용하도록 권장하고 있다. 따라서 본 연구에서도 한국화학연구소 안전성연구센터의 주요기능 중 하나인 산업계 수탁 지원연구를 효율적으로 준비하기 위하여 여러가지 면역기능 시험법들의 정립과 효소면역학적 기법을 이용한 항원성 시험방법의 보완, 그리고 면역독성기작의 연구를 위해 flow cytometer를 이용한 면역세포의 표면분석에 대한 연구를 진행하였으며, 저면역독성의 약물대사유도제 개발 연구를 진행하였다. 또한 GLP 체제하의 산업계 신약개발연구의 지원을 위해 각종 해당시험에 관한 표준작업지침서를 마련하고자 하였다. 2-Bromopropane에 대한 일반독성, 생식독성 및 조혈기 장애는 노출근로자들의 건강장해 발생이후 제한적이거나 수행되었다. 그러나 면역기능에 대한 시험은 아직 수행되어지지 않았다. 따라서 2-bromopropane의 노출과 관련된 면역관련 장기 및 면역세포의 변화를 살펴보기 위하여 Sprague Dawley계 랫트 수컷에 100, 330, 1000 mg/kg의 농도로 28일간 연속 경구투여한 후 부검하여 면역독성학적 검사를 실시하였다. 본 연구에서 실시한 비장세포의 항체생성 세포수를 측정하는 것은 면역기능 시험방법 중 그 정확도가 매우 높은 것으로 알려져 가장 널리 사용되고 있는 방법인데, 일반독성 시험의 결과로는 면역기능의 이상을 판정할 수 없으나 항체생성능을 측정함으로써 실제 면역기능의 이상을 판정하게 된다. 또한 비장세포를 구성하는 macrophage, B- 및 T-세포와 흉선세포를 구성하는 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포에 대한 분석을 실시하였는데 B-세포는 항체를 생산하는 체액성 면역에 관여하고 T-세포는 B-세포의 증식에 필요한 항원인식 등에 관여하며 macrophage는 항원의 processing 및 presentation에 관여하는 등 각기 독특한 특성을 보유하므로 특정 화학물질이 면역독성을 유발할 때, 어느 세포에 주로 작용하는가를 예측할 수 있는 매우 중요한 정보를 flow cytometer를 이용하여 얻을 수 있다^{31,32}. 면역독성학적 시험결과 부검시 체중과 흉선의 감소(결과는 보이지 않았음)와 혈액학적 지표의 변화가 인정되어 면역기능의 감소가 예상되었고, 이는 비장의 면양적혈

구에 대한 항체 형성능의 억제로서 확인되었다(Figure 3-2-3). 또한 비장의 면역 기능에 있어서 2-bromopropane의 항체형성능력 억제가 비장내 각종 면역세포들의 수적변화와 관계가 있는지를 측정된 결과 2-bromopropane의 투여에 의하여 비장세포수에는 커다란 변화를 가져오지 않았음을 관찰하였다. 비장에서 2-bromopropane에 의한 각 세포의 subset 수의 변화는 인정되지 않았더라도 항체형성반응에서 66%의 감소효과를 나타낸 것으로 보아 항체형성에 필요한 macrophage, T- 및 B-세포의 기능에는 영향을 나타낸 것으로 생각된다. 2-bromopropane의 투여에 의한 비장의 항체형성능 억제와 흉선 무게의 뚜렷한 감소는 주목할 만하다. 비장의 flow cytometry 결과와는 다르게 흉선에서 T-cells는 모든 종류의 세포가 용량상관성을 보이며 뚜렷하게 감소되는 결과를 보여주었다. 병리조직학적 결과에서도 흉선의 위축이 관찰되었고, 1000 mg/kg 투여군에서는 모든 동물에서 관찰되었다(결과는 보이지 않았음). 그러나 330 mg/kg 투여군의 경우 현미경적 소견에서는 큰 변화가 관찰되지 않아 용량상관성 있는 감소를 보인 flow cytometry의 결과와는 차이를 보였다. 현미경적 검사에서는 세포의 변형이 아닌 단순한 세포수의 감소는 현저한 경우가 아니면 발견하기 어려운 점이 있어 이에 따른 차이로 사료된다. 흉선에서 T-세포의 현저한 감소에 의한 T-세포의 기능손실이 비장내에서 T-의존형 항체생성에 어느 정도의 영향을 미치는지는 확실치 않으나 장기간 시험물질에 노출되었으므로 충분히 연관이 있는 것으로 판단된다. 또한 T-의존형 항체 형성반응의 억제와 흉선의 위축은 어떤 공통적인 기전에 의한 것일 수 있다는 가능성을 제시해 주었다.

Ethyl carbamate는 마우스, 랫트, 햄스터 등의 실험동물에서 매우 강력한 발암원으로 작용하여 leukemia, lymphoma, lung adenoma, hepatoma 그리고 melanoma를 일으키는 것이 보고되어 있다^{25,26}). 한편, 종양 유발가능 정도의 용량을 마우스에 투여할 때 ethyl carbamate는 면역계에 대한 독성도 역시 유발하여 natural killer cell 활성도의 급격한 저해, B16F10 melanoma 세포의 제거능 감소, 폐의 종양발육 증가, 그리고 면양적혈구 (SRBC)에 대한 T-세포 의존형 항체반응의 억제 등이 보고된 바 있다²⁷⁻²⁹). 이러한 ethyl carbamate의 발암성 및 면역독성은 구조-활성 관계가 매우 뚜렷해서 methyl carbamate나 propyl

없음이 증명된 바 있다^{24,28)}. Ethyl carbamate는 그 자체로는 돌연변이 유발능이 없고 cytochrome P450(P450)에 의해 대사된 대사산물인 vinyl carbamate의 발암성이 더욱 강한 것으로 보고되었으며^{48,49)}, 여러 동종효소(isozyme) 중에서 알콜유도형인 P450 2E1이 ethyl carbamate가 발암원으로 대사활성화되는 과정에 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다^{50,51)}. 본 연구실에서도 ethyl carbamate에 면역독성 연구를 수행하여 in vivo 및 in vitro에서 모두 대사활성화 과정이 독성 발현에 요구된다는 사실을 밝혀 국제저널에 연구결과를 게재한 바 있다^{52,53)}. 한편, ethyl carbamate는 체내 유입시 두 가지 대사경로, 즉 esterase와 cytochrome P450에 의한 대사를 따르게 되며, 90% 이상의 대부분이 esterase에 의해 대사 되어 ethanol, CO₂ 및 NH₃으로 불활성화 되고, 5~10% 정도의 소량만이 cytochrome P450 2E1에 의한 대사를 받아 vinyl carbamate, ethyl N-hydroxycarbamate, 그리고 2-hydroxyethyl carbamate 등으로 대사 활성화됨이 보고된 바 있다⁵⁴⁾. 이는 불활성화 과정인 esterase 대사경로를 인위적으로 억제할 때, ethyl carbamate의 대사를 cytochrome P450 대사쪽으로 이동시켜줄 것이고, 이럴 경우 ethyl carbamate의 면역독성이 더욱 증가되면 cytochrome P450에 의한 대사가 면역독성 발현에 매우 중요할 것이라는 예측이 가능한데, 실제로 본 연구실에서 수행했던 시험결과, diazinon으로 esterase 대사경로를 완전히 억제하였을 때, ethyl carbamate의 면역독성이 증강되었고, cytochrome P450에 의한 대사경로의 중요성이 다시 한 번 입증되었다 실제 diazinon은 cocaine의 면역독성 연구에 도입이 된 바 있다. 즉, cocaine도 ethyl carbamate와 유사하게 esterase 대사경로와 cytochrome P450에 의한 대사경로에 의해 불활성화 또는 활성화가 되는 바, diazinon 전처리에 의해 cocaine의 면역독성이 크게 증강된 것이다. 한편, 대사경로상으로는 ethyl carbamate와 cocaine은 esterase 및 cytochrome P450 대사경로는 유사하나 ethyl carbamate는 cytochrome P450 2E1이 주로 관여하고, cocaine은 cytochrome P450 2B1이 주로 관여하는 것이 차이점이다^{55,56)}. 두 물질의 면역억제에 있어 가장 큰 차이점은 간독성의 유무로 사료된다. 대부분의 면역억제물질들은 간독성을 일으켜서 2차적으로 면역독성을 일으키는 경우가 많은데, 예를 들면 사염화탄소를 들 수 있다. 사염화탄소는 cytochrome P450 2E1에 의해 대사활성화가 일어나 간에 심각한

탄소는 cytochrome P450 2E1에 의해 대사활성화가 일어나 간에 심각한 독성을 유발하고 이때 손상된 간으로부터 transforming growth factor β 1(TGF- β 1) 등의 면역억제물질이 분비되어 2차적으로 면역계에 독성을 일으키는 것으로 받아들여지고 있다⁵⁷⁾. 그러나 ethyl carbamate의 경우 본 연구에 사용한 용량에서는 간 독성이 전혀 없음이 밝혀져, 이 경우에는 ethyl carbamate의 대사물이 직접 면역계에 작용할 가능성이 큰 것으로 사료된다^{52,53)}. 본 연구에서도 이러한 가설을 뒷받침하는 결과를 얻었는데, ethyl carbamate를 투여한 동물에서 분리한 혈청내에 면역독성을 유발하는 인자가 없는 것으로 나타나(Figure 3-2-14), 불안정한 ethyl carbamate의 대사체가 비장세포의 항체생성능에 영향을 주는 것이 아닌가 사료되었다. Ethyl carbamate의 면역독성에 있어서 2차적인 작용기작의 여부를 연구하기 위하여 본 연구에서는 부신적제술을 시행한 동물에서 ethyl carbamate의 영향을 실험하였다. Figure 3-2-12와 Figure 3-2-13에 도시한 바와 같이 무처리 대조군, sham 대조군, 그리고 부신적제 동물군으로 분류하여 세포표면항원을 분석한 결과 ethyl carbamate에 의해 비장의 각종 면역세포가 감소되는 것을 부신적제동물에서는 관찰할 수 없어 부신에서 생성되는 호르몬이 독성에 중요한 역할을 할 것이라는 예측을 가능하게 하였다. 실제로 부신적제술을 이용하여 corticosterone이 면역독성에 중요한 역할을 담당한다는 보고가 morphine과 cocaine 등에서 보고된 바 있어 앞으로 ethyl carbamate의 면역독성 기작의 규명을 위하여 항체생성 시험과 같은 면역독성 지표에 대한 연구를 더 수행해 보아야 할 것으로 판단되며, corticosterone의 정량시험, anti-glucocorticoid 약제인 RU 486을 이용한 연구 등을 통해 확인해 보아야 할 것으로 판단된다^{58,59)}. 본 연구에서는 또한 ethyl carbamate에 의한 비장 및 흉선 세포의 변화를 표면항원분석을 통하여 시험하였는데, 보통 면역독성시험을 위해서는 면양적혈구와 같은 항원을 감작시키므로 해서 여러 지표들을 동시에 시험하는데 제약이 따르고 있다. 그래서 본 연구에서는 면양적혈구에 대한 항체생성반응 시험과 flow cytometry를 동시에 수행할 수 있는지를 연구하였는데, 면양적혈구의 감작이 세포표면항원 분석에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타나(Figure 3-2-7과 3-2-8), 항체생성능 시험과 세포표면항원 분석을 동시에 실시해도 좋을 것으로 보인다. T-세포 의존형 항체 생성능 시험과 세포표면항원 분

석시험은 현재까지 알려진 여러 면역독성 지표중 가장 좋은 방법으로 판단되므로 이 두 가지 시험법을 동시에 실시하므로써 면역독성물질의 검색에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

한편 독성시험 연구를 GLP 체제하에서 진행할 때 필수적으로 표준작업지침서(SOP)를 비치해야하는데, 이는 시험방법을 통일시켜 항상 재현성 있는 결과를 얻을 수 있고, 시험 종사원에 대한 훈련을 위해서도 필수적인 사항이다. 이러한 이유로 본 연구에서도 연구결과를 산업계 지원연구에 적극 활용하고자 기타 면역독성 시험법들에 대한 확립연구와 마우스 및 랫트를 이용한 면역독성시험에 관한 표준작업지침서를 35종 작성하였고, 내용에 관한 수정작업을 거쳐 최신내용으로 개정하여 완전한 지원연구체제를 갖추고자 하였다.

면역독성 유발물질은 체내 유입후 독성발현을 위해 대사활성화 과정이 요구되는 경우가 많은데, dimethylnitrosamine, cyclophosphamide 및 carbon tetrachloride 등이 그 예이다. 현재까지 대사활성화 과정의 필요 여부를 판정하기 위하여 다양한 in vivo 및 in vitro 시험방법이 연구되어 왔다. In vivo 실험에서는 시험물질을 투여하기 전에 약물대사 효소계를 유도(induction)하는 P450 유도제를 전처리하고, 전처리하지 않은 대조군과 결과를 비교하게 된다. P450 유도제로는 P450 1A1을 유도시키는 3-methylcholanthrene과 β -naphthoflavone, P450 2B1을 유도시키는 phenobarbital과 β -ionone, P450 2E1을 유도시키는 ethanol, 또는 실험동물의 절식, 그리고 P450 3A1을 유도시키는 dexamethasone 등이 있지만 이들 중 현재까지의 연구결과를 보면 오직 phenobarbital과 β -ionone만이 자체의 면역독성이 없었을 뿐 나머지 유도제들은 자체가 면역독성을 유발하여 P450과 면역독성의 관계를 연구할 때 별도로 도움이 되지 못하는 것으로 알려져 있다⁶⁰⁻⁶²). 따라서 1A1, 2E1, 3A1 등에 의해 대사되는 독성물질의 면역독성 검출에는 in vivo 연구방법이 완벽하지는 않은 것으로 보인다. 그러나 phenobarbital의 전투여시 2B1 활성뿐만 아니라 1A1과 2E1활성도 크게 증가시키고 β -ionone 전투여시에도 2B1 외에 1A1과 2C의 활성을 증가시키는 것이 밝혀져 있어, 어느 정도의 예측은 가능한 것으로 보인다^{52,63}). 한편, in vivo 실험시에 P450 유도제의 전처리에 의해 면역독성의 증감이 확인되었을 때, P450 억제제들을 전투여하는 시험을 추가로 진행하므로써 화학

물질의 면역독성과 P450에 의한 대사간의 관계를 확증할 수가 있다. P450 억제제로는 SKF 525-A, disulfiram, aminoacetonitrile 및 기타 특정 isozyme에 특이적인 억제제들이 많이 알려져 있으므로 선택적으로 실험목적에 맞도록 사용하면 되는데, 여기에서도 이들 억제제 자체에 의한 면역독성은 없어야 한다. 현재까지의 연구결과로는 2E1 억제제인 aminoacetonitrile은 P450 억제용량에서 면역독성이 없음이 밝혀져 사염화탄소, dimethylnitrosamine 그리고 ethyl carbamate 등 2E1에 의해 대사가 되는 면역독성 물질의 대사활성화 과정의 역할 규명에 이용이 되었다⁶⁴⁾. 최근 특정 isozyme에 대한 억제제들이 많이 보고가 되고 있으므로 이들 억제제의 효용성을 살펴보는 연구가 진행된다면 in vivo에서 P450과 면역독성간의 관계를 규명하는 좋은 시스템을 개발할 수 있을 것으로 보여진다. 따라서 본 연구에서는 먼저 면역독성이 없는 것으로 알려진 β -ionone의 P450 유도특성 및 기작을 규명하기 위하여 효소활성도의 측정, Western immunoblotting, 그리고 RT-PCR 시험법을 이용하여 P450 isozyme들의 발현에 대한 연구를 수행하여, P450 1A2, 2B1, 2B2, 및 2C6 그리고 NADPH-P450 reductase의 유도가 일어나며, mRNA 전사수준에서 발현이 조절되는 것으로 판단되었다.

P450은 체내 물질의 대사뿐만 아니라 체내에 유입된 화학물질의 대사 무독화에 직접적으로 관여하는 매우 중요한 효소군으로 다양한 동종효소(isozyme)들로 구성되어 있다. 또한 P450은 자체로는 독성이 없는 일련의 화학물질의 체내 대사 활성화에도 관여하기 때문에 독성학 연구 분야에서도 매우 중요하다. 화학물질에 의해 유발되는 독성의 기작 연구시에 P450에 의한 대사활성화 작용이 필요한가의 연구를 위해서는 P450 유도제나 억제제가 요구되는 관계로 이에 관한 연구가 필요하여 최근에는 특정 동종효소에 대해 특이성이 높은 유도제나 억제제의 개발 연구가 활발하다. 본 연구에서는 화학물질에 의해 유발되는 면역독성 및 간독성에 있어서 대사활성화의 역할을 규명하기 위한 연구의 일환으로 P450 유도제의 탐색에 대한 연구를 수행하여 β -ionone 이란 천연물질이 면역계 및 간에 독성을 유발하지 않으면서 P450 2B1을 유도시키는 사실을 밝혔다^{62,63)}. β -Ionone은 그 화학식이 4-[2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-one으로 *Boronia megastigma*를 비롯한 많은 식물에 존재하는 성분으로

retinoic acid, β -carotene, 및 vitamin A의 모핵이 되는 구조를 갖고 있다. β -ionone이 P450을 유도할 것이라는 예측은 1969년에 최초로 biphenyl 4-hydroxylase 활성의 증가와 hexobarbital 수면시간의 연장에 영향을 준다는 사실을 밝혀 가능해졌으나⁶⁵⁾, 이후 약물대사 효소계에 대한 영향이 정확히 평가되지 못한 채로 모델 P450유도제로 사용되었다. 즉, cocaine은 심각한 간독성을 유발하는데, 이때 P450 효소에 의한 대사활성화가 필요하여 β -ionone을 전투여할 때 cocaine의 간독성이 크게 증가되는 것이 보고되었고^{66,67)} 최근, cocaine의 면역 독성기작 연구에서도 β -ionone이 모델 P450 유도제로 사용된 바 있다^{30,62)}. β -ionone은 약물대사 및 독성연구에 가장 널리 쓰이는 실험동물인 Sprague Dawley계 랫트에서도 P450 2B1 효소를 유도시키는 사실을 밝힌 바 있다⁶³⁾. 본 연구에서는 β -ionone의 P450 유도현상을 더욱 연구하기 위하여 P450 1A 및 P450 2B 효소 활성화에 대한 영향을 간의 각 엽별로 연구하고자 하였고, 또한 구조적 이성질체인 α -ionone(4-[2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-one)의 영향도 살펴보고자 하였다. 그 결과 α - 및 β -ionone 모두 Sprague Dawley계 랫트에서 P450 2B 효소활성을 크게 증가시켰으며, 이러한 사실은 Western immunoblotting 실험에서도 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서 시도한 경구를 통한 단회 투여에 의해서 24시간 내에 약물대사능의 유도가 일어나는 것을 확인하여 앞으로 이들 물질을 모델 P450 유도제로 사용할 때 기존의 피하를 통한 2회 반복 투여경로를 대체할 수 있을 것으로 사료되었다. 실제로 본 연구자들의 연구에 의하면 P450 2B1에 의해 대사활성화가 일어나는 thioacetamide에 의한 간독성이 β -ionone을 전처리할 때 더욱 증강되는 것을 확인하였으며 이때 β -ionone 전처리는 실험동물의 간기능에 전혀 영향을 주지 않을 것으로 나타나 약물대사효소계와 관련한 화학물질의 독성기작 연구에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 시사해 주었다. 한편 α - 및 β -ionone 투여시 간의 각엽에서 유도되는 효소활성의 양상이 모든 엽에서 동일하지 않았고 우측 중간엽 및 좌엽에서 특히 유도가 많이 일어나, 간을 구성하는 각 엽에서의 약물대사 효소발현이 동일하게 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 실제로 Matsubara 등(1982)은 랫트의 간엽에 따라 P450 효소활성이 서로 다르게 분포되어 있음을 밝힌 바 있는데⁶⁸⁾, 이들의 연구에 의하면 P450 함량이 중간엽에 많이 분포되어 있으며,

phenobarbital을 투여할 때 중간엽에서 역시 많이 증가하며, β -naphthoflavone 투여시에는 간의 모든 엽에서 고르게 P448, 즉 P450 1A 동종효소들이 증가한다고 보고하였고, P450 1A에 특이적인 효소활성인 7-alkoxycoumarin O-dealkylation은 좌엽에서 특히 많이 증가한다고 보고하였다. 또한 Matsubara 등(1983)은 간독성물질인 사염화탄소를 랫트에 투여할 때, P450의 불활성화가 중간엽에서 가장 심하게 일어나며, 간손상의 정도(괴사 및 변성)도 중간엽 및 우측엽에서 심각하게 일어나는 것을 보고하여 각 간엽이 대사활성화가 요구하는 사염화탄소와 같은 독성물질에 대한 감수성이 서로 다름을 암시하였다⁶⁹⁾. 또한 Dyroff 등(1986)도 diethylnitrosamine을 이용한 간암 유도 모델에서 중간엽 및 좌엽이 우측 전후엽 및 caudate lobe보다 더 감수성이 크다는 결과를 보고한바 있다⁷⁰⁾. 이러한 결과들은 본 연구의 결과와도 일치하는 결과로 사료되어 각종의 P450 동종효소에 대한 본격적인 연구가 필요한 것으로 여겨진다. 본 연구의 결과, α - 및 β -ionone은 P450 2B 효소활성을 중간엽 및 좌엽에서 비교적 크게 유도시킨 바, 간독성 물질을 투여할 때 이들 엽에서의 독성이 심각하게 나타날 것이라고 예상된다. 또한 각 간엽별로 P450의 분포가 다르게 나타나므로, 독성시험에 수반되어 진행되는 간에 대한 병리조직검사에 있어서도 모든 엽별로 조직검사를 수행할 수는 없더라도 최소한 동일한 엽의 유사 위치에서의 시료제작이 조직검사의 정확성을 기하기 위하여 필요한 것으로 사료된다.

5. 참고문헌

- (1) Luster MI, Munson AE, Thomas PT, Holsapple MP, Fenters JD, White KL Jr, Lauer LD, Germolec DR, Rosenthal GJ, and Dean JH (1988) Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. **Fund. Appl. Toxicol.** 10: 2-19.
- (2) Bekesi JG, Holland JF, Anderson HA, Fischbein AS, Rom W, Wolff HS, and Selikoff IJ (1973) Lymphocyte function of Michigan dairying farmers exposed to polybrominated biphenyls. **Science** 199: 1207-1209.
- (3) Luster MI, Portier C, Pait DG, White KL Jr, Gennings C, Munson AE, and Rosenthal GJ (1992) Risk assessment in immunotoxicology. I. sensitivity and predictability of immune tests. **Fund. Appl. Toxicol.** 18: 200-210.

- (4) Exon JH, Koller LD, Talcott PA, O'Reilly CA, Henningsen GM (1986) Immunotoxicity testing: an economical multiple-assay approach. **Fund. Appl. Toxicol.** 7: 387-397.
- (5) Smialowicz RJ, Simmons JE, Luebke RW, and Allis JW (1991) Immunotoxicologic assessment of subacute exposure of rats to carbon tetrachloride with comparison to hepatotoxicity and nephrotoxicity. **Fund. Appl. Toxicol.** 17: 186-196.
- (6) Kim DH, Yang KH, Johnson KW, and Holsapple MP (1987) Suppression of in vitro antibody responses by dimethylnitrosamine in mixed cultures of mouse splenocytes and mouse primary hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 87: 32-42.
- (7) Pollock PL, Germolec DR, Comment CE, Rosenthal GJ, and Luster MI (1994) Development of human lymphocyte-engrafted SCID mice as a model for immunotoxicity assessment. **Fund. Appl. toxicol.** 22: 130-138.
- (8) Sjoblad RD (1988) Potential future requirements for immunotoxicity testing of pesticides. **Toxicol. Ind. Health** 4: 391-395.
- (9) Hinton DM (1992) Testing guidelines for evaluation of the immunotoxic potential of direct food additives. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 32: 173-190.
- (10) Terao T (1988) International collaboration in studying immunotoxicity of chemicals. **위생시험소 보고 (일본)** 106: 1-10.
- (11) Matsumoto K, Sekita K, Ochiai T, Takagi A, Takada K, Furuya T, Kurokawa Y, Saito Y, Teshima R, Suzuki K, Sawada J-I, Terao T, and Tobe M (1990) Evaluation of immunotoxicity testings using azathioprine-treated rats: the International Collaborative Immunotoxicity Study(Azathioprine). **위생시험소 보고 (일본)** 108: 34-39.
- (12) Ochiai T, Naito K, Murakami O, Ohno K, Sekita K, Furuya T, Kurokawa Y, Matsumoto K, Saito Y, Hachisuka A, Teshima R, Yamazaki T, Ikebuchi H, and Sawada J-I. (1993) Evaluation of immunotoxicity tests using cyclosporin A-treated rats: the International Collaborative Immunotoxicity Study II(Cyclosporin A). **위생시험소 보고 (일본)** 111: 91-99.
- (13) 국립보건안전연구원 (1994) 의약품 등의 독성시험 기준. 고시 제 94-3호.
- (14) 한국산업안전공단 산업보건연구원 (1995) 양산 LG전자부품(주) 역학조사 보고서.

- (15) National Institute for Occupational Safety and Health(NOISH) (1995) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances(RTECS). RTECS number TX 4111000.
- (16) 한국화학연구소 안전성연구센터 (1995) Solvent #5200 혼합용매의 랫트에 있어서 급성 경구 독성시험.
- (17) Maeng SH and Yu IJ (1997) Mutagenicity of 2-bromopropane. **Industrial Health**, 35: 87-95.
- (18) 한국화학연구소 안전성연구센터 (1995) Solvent #5200 혼합용매의 CHO-KI 세포를 이용한 염색체 이상시험.
- (19) 한국화학연구소 안전성연구센터 (1995) Solvent #5200 혼합용매의 살모넬라를 이용한 복귀돌연변이시험.
- (20) Ichihara G, Asaeda N, Kumazawa T, Tagawa Y, Kamijima M, Yu X, Kondo H, Nakajima T, Kitoh J, Yu IJ, Moon YH, Hisanaga N and Takeuchi Y (1997) Reproductive and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane. **Toxicologists** 36(1): 357.
- (21) Yu IJ, Chung YH, Lim CH, Maeng SH, Lee JY, Kim HY, Lee SJ, Kim CH, Kim TG, Lim CH, Park JS and Moon YH (1997) Reproductive toxicity of 2-bromopropane. **Toxicologists** 36(1): 358.
- (22) Lim CH, Maeng SH, Lee JY, Chung YH, Park JH, Kim HY, Moon YH and Yu IJ (1997) Effect of 2-bromopropane(2-BP) on female reproductive function in Sprague-Dawley Rats. **Toxicologists** 36(1): 357.
- (23) Guengerich FP and Kim DH (1991) Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1, N⁶-ethenoadenosine. **Chem. Res. Toxicol.** 4: 413-421.
- (24) Miller JA and Miller EC (1983) The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. **Br. J. Cancer** 48: 1-15.
- (25) Mirvish SS (1968) The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-hydroxyurethan. **Adv. Cancer Res.** 11: 1-42.
- (26) International Agency for Research on Cancer (1974) Urethane: evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. **IARC monograph** 7: 111-140
- (27) Dean JH and Murray MI (1991) Chapter 9. Toxic responses of the immune system. IN Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Sciences

of Poisons, (eds.) Amdur MO, Doull J, and Klaassen CD, pp. 282-333, Pergamon Press, New York.

- (28) Luster MI, Dean JH, Boorman GA, Dieter MP, and Hayes HT (1982) Immune functions in methyl and ethyl carbamate treated mice. **Clin. Exp. Immunol.** 50: 223-230.
- (29) Parmiani G (1970) Immune-depressive effect of urethan on the homograft response in mice. **Int. J. Cancer** 5: 260-265.
- (30) Jeong TC, Jordan SD, Matulka RA, Stanulis ED, Kaminski EJ, and Holsapple MP (1995) Role of metabolism by esterase and cytochrome P450 in cocaine-induced suppression of the antibody response. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 272: 407-416.
- (31) Smialowicz RJ, Riddle MM, Williams WC, and Diliberto JJ (1994) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on humoral immunity and lymphocyte subpopulations: differences between mice and rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 124: 248-256.
- (32) Blot C, Lebec H, Roger R, Bobuon R, and Pallardy M (1994) Immune parameters are affected differently after cyclosporine A exposure in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice: implications for immunotoxicology. **Toxicology** 94: 231-245.
- (33) Pruett SB, Barnes DB, Han Y-C, and Munson AE (1992) Immunotoxicological characteristics of sodium methyldithiocarbamate. **Fund. Appl. Toxicol.** 18: 40-47.
- (34) LeVier DG, McCay JA, Stern ML, Harris LS, Page D, Brown RD, Musgrove DL, Butterworth LF, White KL Jr, and Munson AE (1994) Immunotoxicological profile of morphine sulfate in B6C3F1 female mice. **Fund. Appl. Toxicol.** 22: 525-542.
- (35) Kim BS, Jeong TC, Choe SY, and Yang KH (1992) Immunosuppressive effects of safrole in BALB/c mice. **Korean J. Toxicol.** 8: 191-203.
- (36) Rittenberg MB and Pratt KL (1969) Trinitrophenyl (TNP) plaque assay: primary response of BALB/c mice to soluble and particulate immunogen. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 132: 575-581.
- (37) Jeong TC, Matulka RA, Jordan SD, Yang KH, and Holsapple MP (1995) Role of metabolism in cocaine-induced immunosuppression in splenocyte cultures from B6C3F1 female mice. **Immunopharmacol.** 29: 37-46.
- (38) Jeong TC, Yang KH, and Holsapple MP (1994) Recovery of

dimethylnitrosamine-induced immunosuppression by pargyline in the mixed cultures of murine hepatocytes and splenocytes. **Life Sci.** **54**: 605-613.

- (39) Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**: 248-254.
- (40) Burke MD and Meyer RT (1975) Inherent specificities of purified cytochrome P450 and P448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. **Drug Metab. Dispos.** **3**: 245-253.
- (41) Lubet RA, Meyer RT, Cameron JW, Nims, RW, Burke MD, Wolff T, and Guengerich FP (1985) Dealkylation of pentoxyresorufin: A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. **Arch. Biochem. Biophys.** **238**: 43-48.
- (42) Vermillion J and Coon MJ (1978) Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase. **J. Biol. Chem.** **253**: 8812-8819.
- (43) Koop DR (1986) Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isozyme 3a. **Mol. Pharmacol.** **29**: 399-404.
- (44) Nash T (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. **Biochem. J.** **55**: 416-421.
- (45) Kim DH, Kim EJ, Han SS, Roh JK, Jeong TC, and Park JH (1995) Inhibitory effects of H₂-receptor antagonists on cytochrome P450 in male ICR mice. **Human Exp. Toxicol.** **14**: 623-629.
- (46) Oinonen T, Saarikoski S, Husgafvel-Purisiainen K, Hirvonen A, and Lindros KO (1994) Pretranslational induction of cytochrome P450 1A enzymes by β -naphthoflavone and 3-methylcholanthrene occurs in different liver zones. **Biochem. Pharmacol.** **48**: 2189-2197.
- (47) Zaphiropoulos PG and Wood T (1993) Identification of the major cytochrome P450s of subfamily 2C that are expressed in brain of female rats and in olfactory lobes of ethanol treated male rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **193**: 1006-1013.
- (48) Dahl GA, Miller EC, and Miller JA (1980) Comparative carcinogenicities and mutagenicities of vinyl carbamate, ethyl carbamate, and ethyl N-hydroxycarbamate. **Cancer Res.** **40**: 1194-1203.
- (49) Park KK, Surh YJ, Stewart BC, and Miller JA (1990) Synthesis and

properties of vinyl carbamate epoxide, a possible ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **11**: 463-473.

- (50) Guengerich FP, Kim DH, and Iwasaki M (1991) Role of human cytochrome P450 2E1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. **Chem. Res. Toxicol.** **4**: 168-179.
- (51) Yoo JSH, Cheung RJ, Patten CJ, Wade D, and Yang CS (1987) Nature of N-nitrosodimethylamine demethylase and its inhibitors. **Cancer Res.** **47**: 3378-3383.
- (52) Jeong TC, Cha SW, Park JI, Ha CS, Han SS, and Roh JK (1995) Role of metabolism in ethyl carbamate-induced suppression of antibody response to sheep erythrocytes in female BALB/c mice. **Int. J. Immunopharmacol.** **17**: 1035-1044.
- (53) Jeong TC, Kim HJ, Cha SW, Park JI, Shin HC, Kim DH, Han SS, and Roh JK (1996) Effects of ethyl carbamate and its metabolites on the antibody response in splenocyte cultures from female BALB/c mice. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** **18**: 91-103.
- (54) Page DA and Carlson GP (1994) The effect of pyridine on the *in vitro* and *in vivo* metabolism of ethyl carbamate (urethane) by rat and mouse. **Carcinogenesis** **15**: 2177-2181.
- (55) Guengerich FP and Kim DH (1991) Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1,N⁶-ethenoadenosine. **Chem. Res. toxicol.** **4**: 413-421.
- (56) Boelsterli UA, Lanzotti A, Goldlin C, and Oertle M (1992) Identification of cytochrome P4502B1 as a cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured rat hepatocytes. **Drug Metab. Dispos.** **20**: 96-101.
- (57) Delaney B and Kaminski NE (1993) Induction of serum-born immunomodulating factors in B6C3F1 mice by carbon tetrachloride. I. Carbon tetrachloride-induced suppression of helper T-lymphocyte function is mediated by a serum borne factor. **Toxicology** **85**: 67-84.
- (58) Bryant HU, Bernton EW, Kenner JR and Holaday JW (1991) Role of adrenal cortical activation in the immunosuppressive effects of chronic morphine treatment. **Endocrinology** **128**: 3253.
- (59) Freier DO and Fuchs BA (1994) A mechanism of action for morphine induced immunosuppression: corticosterone mediates morphine induced suppression of natural killer activity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**

270: 1127.

- (60) White KL Jr, Lysy HH, and Holsapple MP (1985) Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: A structure activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. **Immunopharmacology** 9: 155-164.
- (61) Holsapple MP, Eads M, Stevens WD, Wood SC, Kaminski, NE, Morris DL, Poklis A, Kaminski EJ and Jordan SD (1993) Immunosuppression in adult B6C3F1 mice by chronic exposure to ethanol in a liquid diet. **Immunopharmacology** 26: 31-51.
- (62) Jeong TC, Jordan SD, Matulka RA, Stanulis ED, Park SS, and Holsapple MP (1996) Immunosuppression induced by acute exposure to cocaine is dependent on metabolism by cytochrome P450. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 276: 1257-1265.
- (63) Jeong TC, Kim HJ, Yun C-H, Lee SS, Yang K-H, Han SS, and Roh JK (1995) Induction of liver cytochrome P450 2B1 by β -ionone in Sprague Dawley rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 216: 198-202.
- (64) Haggerty HG, Boise LH, Jordan SD, and Holsapple MP (1998) Differential effects of co-administration of aminoacetonitrile on immunosuppression and hepatotoxicity produced by dimethylnitrosamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 247: 774-780.
- (65) Parke, DV and Rahman H (1969) The effects of some terpenoids and other dietary nutrients on hepatic drug-metabolizing enzyme. **Biochem. J.** 113: 12p.
- (66) Roth L, Harbison, RD, James RC, Tobin T and Roberts SM (1992): Cocaine hepatotoxicity: Influence of hepatic enzyme inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. **Hepatology** 15: 934-940.
- (67) Thompson ML, Shuster L, Casey E and Kanel GC (1984) Sex and strain differences in response to cocaine. **Biochem. Pharmacol.** 33: 1299-1307.
- (68) Matsubara T, Touchi A and Ogawa A (1982) Heterogeneous distribution of the cytochrome P450 monooxygenase system in rat liver lobes. **Jpn. J. Pharmacol.** 32: 999-1011.
- (69) Matsubara T, Mori S, Touchi A, Masuda Y and Takeuchi Y (1983) Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: evidence for different susceptibilities of rat liver lobes. **Jpn. J. Pharmacol.** 33: 435-445.
- (70) Dyroff MC, Richardson FC, Popp JA, Bedell MA and Swenberg JA (1986) Correlation of O⁴-ethyldeoxythymidine accumulation, hepatic

initiation and hepatocellular carcinoma induction in rats continuously administered diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 7: 241-246.

제 3 절 유전자전이동물(Transgenic animal)을 이용한 유전독성시험법의 확립

1. 서 론

가. 변이원성시험

우리나라에서는 최근 수십년 간 지속된 화학과 공업의 발달 및 이로 인한 생활 수준의 향상에 힘입어 우리가 사용하는 화학물질의 종류와 그 사용량은 비약적으로 증가하였다. 새로운 의약, 농약 등의 창출을 위해 다양한 화합물이 합성되고 있으며, 이들의 인체에 대한 안전성 여부는 제품화 내지 상품화의 성공 여부에 필수적인 조건이다. 따라서 화학물질의 안전성 평가에 관한 연구는 세계 각국에서 주요 과제가 되어 있다. 화학물질의 안전성 평가 항목 중 특히 발암성 여부는 가장 중요한 항목 중 하나이다.

현재로서는 어떤 특정 화학물질이 인체에 암을 유발할 수 있느냐 하는 물음에 답하기 위한 이상적인 시험법은 확립된 바 없다. 그러나 발암성 예측을 위한 현실적인 접근은 동물을 사용한 발암성시험을 실시하는 것이나 이 시험은 적어도 3년 이상의 시간과 막대한 경비를 필요로 한다. 그러나 의약이나 농약 등 상품화를 목적으로 합성된 수많은 물질 모두를 대상으로 이런 시험을 실시하는 것은 불가능하므로, 이들 다양한 물질의 발암성을 단시간 내에 경제적으로 예측할 수 있는 시험법이 요청되어 왔다. 이런 목적으로 널리 수행되는 것이 변이원성시험(mutagenicity test)이다. 이는 곧 유전물질인 DNA 자체 혹은 DNA를 담고있는 염색체에 일어나는 변화를 검출하는 방법이다.

변이원성시험의 결과로 발암성을 예측할 수 있다는 근거로 크게 세 가지를 들 수 있다. 첫째, 모든 생물의 유전물질은 기본적으로 DNA(혹은 RNA)라는 것과, DNA의 복제 및 이와 관련된 일련의 생화학적 반응이 미생물에서 고등동물에 이르기까지 공통된 기작을 공유한다는 사실이다. 둘째, 발암성 물질은 대부분 돌연변이 유발 물질이라는 실험적 근거(Ames et al., 1973)이며, 셋째, 정상 세포가 암세포로 전환되는 데에는 일련의 유전적인 변화 즉 돌연변이가 관련되어 있다는 점 및 다양한 유전병에 염색체의 이상이 직접 관련되어 있다는 증거들이

다. 이런 점들을 근거로 하여, 어떤 물질이 돌연변이를 유발한다면 그것은 발암 물질일 가능성이 높다고 판단하는 것이다.

이들 시험법을 응용하여 수많은 물질이 시험 대상이 되어왔으며, 발암성이 없는 물질을 선택하여 제품화하는데 기여해왔다. 뿐만 아니라 변이원성 시험법은 환경 내에 존재하는 발암성 물질의 검출이라든가 생물학적인 감시 방법으로 응용되고 있다. 현재 세계 각국에서는 화학물질의 생산, 판매, 유통, 수출입에 필요한 등록 자료를 구비함에 있어 공인된 기관에서 수행된 변이원성시험 결과를 필수적인 사항으로 요구하고 있다.

변이원성 시험법은 유전자에 대한 손상, 염색체에 대한 영향, 그리고 DNA에 대한 손상을 검출하는 시험으로 대별할 수 있으며, 이를 위해 미생물, 배양세포, 설치류 등 다양한 시험계가 이용되고 있다. 유전자에 일어나는 변이를 검출하는 방법으로는 살모넬라균을 이용한 Ames test가 가장 널리 알려져 있으며, 진핵세포에 있어서 이에 대응하는 것으로는 Chinese hamster ovary 세포를 사용하는 CHO/HGPRT assay, 마우스 유래 임파선종 세포를 이용하는 L5178Y mouse lymphoma cell forward mutation assay(MLA)등이 널리 실시되고 있다. 염색체에 대한 영향을 검출하는 방법으로는 다양한 종류의 배양세포를 이용한 염색체이상시험이 수행되고 있고, DNA에 대한 손상의 검출을 위해서는 일차배양 간세포 등의 시험계를 이용한 비주기성 DNA 합성(Unscheduled DNA Synthesis, UDS) 시험 및 자매염색분체교환(Sister Chromatid Exchange, SCE)시험 등이 널리 응용된다. 많은 연구자들은 이들 기존의 시험법 외에도 예측성이 높은 시험법을 개발하기 위해 다양한 방법을 시도하고 있다.

최근 위의 시험법들이 가지는 한계를 극복하고 좀 더 신뢰성이 높은 결과를 얻기 위한 노력에서 개발된 방법이 유전자 전이 동물(transgenic animal)을 이용하는 시험법이다. 이 시험법은 유전자돌연변이 검출의 한 방법으로, *in vitro* 시험법의 원리를 동물에 적용한 것이다. 이 방법의 장점으로는, 미생물이나 배양세포가 동물의 체내에서 일어나는 반응을 충실히 재현할 수 없다는 점을 보완함과 동시에, 이론적으로는 시험자가 원하는 어떤 장기에 대해서도 돌연변이 유발 여부를 검출할 수 있다는 것이다. 현재 미국의 FDA를 시작으로 각국의 규제기관에서도 이 시험법으로 얻은 자료를 인정하는 추세에 있다.

나. 유전자 전이 동물(transgenic animal)을 이용한 변이원성 시험

현재까지 유전자 돌연변이를 검출하는 방법으로는 Aems test가 가장 널리 사용되며 이와 함께 대장균 혹은 효모, 배양세포, 설치류 등도 많이 이용된다. 여기서 미생물을 이용한 시험법은 간편성과 신속성, 경제성으로 인해 널리 사용되기는 하지만 시험계 자체가 동물에 비해 단순한 미생물을 사용하므로, 그 결과를 사람의 경우에 적용하는 단계에 있어서는 어느정도 제한이 있다고 할 수 있다. 따라서 동물을 이용한 간편하면서도 신뢰도가 높은 시험법이 요청되고 있다.

동물을 사용하는 유전자 돌연변이 시험은 그 방법이 확립되어 있기는 하나, 변이가 일어난 유전자 자체를 회수하여 변이의 양상이나 변이의 기작 등에 대해 분자 수준에서 연구하기에는 난점이 많다. 이는 동물의 유전자 자체가 DNA 상에서 1 개의 구역으로 되어있지 않고 여러 구역으로 나뉘어 있기도 하고, 한 구역 내에서도 정보를 가진 부분인 exon과 그렇지 않은 부분인 intron 등이 혼재하여 구조가 복잡하기 때문이다. 이런 점으로 인해, 어떤 물질에 의한 돌연변이의 유발 여부는 알 수 있다고 하더라도 그 변이의 구체적인 양상 등에 대해서는 연구가 매우 어려운 실정이다.

최근 이런 난점을 해결하기 위한 노력의 일환으로 나타난 시험법 중의 하나가 transgenic animal을 이용한 *in vivo*에서의 돌연변이 시험법이다. Transgenic animal은 "외부에서 인위적으로 삽입되었으나 안정된 유전을 지속하는 1 개 혹은 그 이상의 유전자를 그의 핵형(genome)에 가지고 있는 동물"로 정의된다. 이 시험법은 최근 십 수 년간 발전한 바이러스학과 유전자 공학, 유전자 공학에서 이용되는 핵산 제한 효소 이용법, DNA를 다루는 기법 등과, 발생학, 미생물학, 미세 조작술(micro-technology) 등의 종합으로 이루어졌다. Transgenic animal은 Jaenisch 등(1975)에 의해 마우스를 이용해 처음 시도된 이래 최근에는 랫드, 토끼, 양, 돼지 등 다양한 동물종에 대해서도 이 기법이 응용되고 있으나, 변이원성시험에는 주로 transgenic mice와 transgenic 랫드가 사용되고 있다. Transgenic system에서는 원하는 유전자를 동물에 삽입하고, 동물에 시험물질을 투여한 후 그 유전자를 다시 회수하여 그에 일어난 돌연변이 양상을 구체적으로 알아볼 수 있다는 장점이 있다(Mirsalis et al., 1993). 또 하나의 장점은, 기존 시

험 방법에서는 골수 혹은 혈액 등 돌연변이 여부를 조사할 수 있는 조직이 제한되어 있는데 비해 새로운 transgenic animal을 이용한 방법으로는 각종 내부 장기를 비롯하여 피부 등, 이론적으로는 시험자가 원하는 모든 부위의 조직에 있어서의 돌연변이를 검출할 수 있다는 점이다. 더우기 이 시험법에서는 *in vitro* 시험법과는 달리, 정상적인 동물 체내에서 일어나는 대사작용이 시험 결과에 반영된다는 장점이 있다.

Transgenic animal은 *in vivo* 돌연변이 시험에 응용할 수 있을 뿐 아니라 유전학에 있어서 핵심적인 문제들을 비롯하여 분자생물학, 발생학, 면역학, 내분비학, 발암성 연구 등에도 바로 사용할 수 있다(Cordaro, 1989). 발암성 연구에 있어서는 이미 알려진 암유전자(oncogene)의 특정한 돌연변이가 어떻게 암 형질 발현에 관계되는가 하는 점을 연구하는 데 응용할 수 있으며, 최근 문제가 되고 있는 AIDS 바이러스의 유전자를 가진 transgenic animal을 만들어 이의 치료에 대한 연구에도 응용할 수 있을 것으로 전망되고 있다(Cordaro, 1989).

돌연변이 연구에 응용되는 transgenic 마우스 혹은 랫드는 주로 lacZ 혹은 lacI 유전자를 삽입하여 만든 것이 사용되고 있으며 그 원리는 다음과 같다. 우선 lacZ 혹은 lacI 유전자를 가진 박테리오파지 람다(bacteriophage lambda)의 shuttle vector를 마우스의 유전자에 삽입하여 안정된 transgenic mice를 만든다. 이 동물에 시험물질을 투여한 후 도살하여 필요한 장기를 적출한 다음 조직 세포로부터 DNA를 추출하여 lambda phage의 단백질(packaging extract) 등과 혼합한다. 이 반응에서 lambda phage는 마우스의 유전자로부터 자신의 유전자를 잘라내어 완전한 phage로 재생한다. 이것을 대장균에 감염시켜 한천배지에서 배양하면, phage에 감염된 대장균이 용해되어 투명한 플라크(용균반)를 형성하는데, 이 중 돌연변이를 일으킨 lacZ 혹은 lacI 유전자에서 유래한 플라크를 계수하여 돌연변이의 정도를 산출하는 것이다. 최근 미국의 Hazelton Laboratories (Kensington, MD)와 Stratagene(La Jolla, CA)은 독립적으로 transgenic mice를 이용한 *in vivo* 돌연변이 시험법을 개발하여, 비슷한 시기인 1990년 초반에 "MutaMouse" 및 "BigBlue"라는 상품명으로 제품화 한 바 있다.

먼저 MutaMouse 시험을 살펴보면, 이 시스템은 Gossen 등(1989)이 고안한 것이며 미국의 Hazelton Laboratories에서 상품으로 발전하였다(Myhr, 1991). 이는

CD2F1(BALB/c X DBA/2) 마우스에 lacZ 유전자를 이식한 것으로, 돌연변이를 일으킨 lacZ 유전자에서 유래한 플라크는 투명한데 반해 정상 플라크는 청색으로 염색되어 나타난다. 이와는 대조적으로 BigBlue system에서는 B6C3F1 및 C57BL/6 마우스를 사용하며, lacZ 대신 lacI target gene 및 lacZ reporter gene 을 사용한 것이다(Provost et al., 1990, Kohler et al., 1990). 또한 BigBlue system에서는 MutaMouse와는 대조적으로, 돌연변이 플라크는 청색으로, 정상 플라크는 투명하게 나타난다. 두 시스템의 원리는 비슷하나 BigBlue에서는 투명 플라크의 배경에 나타나는 청색 플라크를 계수하므로 이 것이 다수의 청색 플라크 중에 나타나는 소수의 투명 플라크를 계수해야 하는 MutaMouse에 비해 유리한 점이다.

본 연구에는 이런 점을 감안, Stratagene의 BigBlue system에 의한 돌연변이 시험법(Stratagene Co., 1994)을 도입하여 확립하고자 하였다.

다. 시험 대상 물질 선정

Dimethylnitrosamine(DMN)은 미생물, 배양세포, 동물 등 다양한 시험계에서 돌연변이 혹은 암을 유발하는 물질로, 변이원성 시험에 표준물질로 널리 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 DMN을 돌연변이 유발 표준물질로 채택하여, 시험계가 정상적으로 발암성 물질을 검출할 수 있는지의 기준으로 삼았다.

이와 함께 변이원성 여부를 조사할 물질로 염산메타피릴린(Methapyrilene hydrochloride, CAS No. 135-23-9)을 선택하였다. 원래 메타피릴린(Methapyrilene, CAS No. 91-80-5)은 미국 Monsanto사의 특허물질(1952년 U.S. patent 2,581,868)로, Histamine H1 receptor의 길항제로 작용하는 약제이다. 이러한 특성으로 인해 이 물질의 염산염인 염산메타피릴린(이하 MPH)은 1970 년대에 수면제, 감기약, 알레르기 증상 등에 처방되어 광범위하게 사용되었다. 그러나 Lijinsky 등(1980)이 MPH가 Fischer 344 랫트에서 간암을 유발한다고 보고한 이래 사용이 중단된 약제이다. 이 결과가 발표된 이래 MPH의 발암성은 수 차례 확인된 바 있다(Brennan and Creasia, 1982; Lijinsky, 1984; Habs et al., 1986). 현재 MPH가 사람을 대상으로 사용되지는 않으나 이 약제

가 시판될 당시 이를 복용했던 사람에 대한 발암의 가능성은 배제할 수 없는 실정이다.

MPH의 발암성이 보고된 이래 MPH의 변이원성 검출에 대한 시험이 현재까지 여러 연구자들에 의해 수행되어왔다. 이는 MPH의 발암성과 변이원성시험 결과를 비교하여, 기존 변이원성시험들의 신뢰성에 대한 평가의 기초 자료로 활용할 수 있는 좋은 사례가 되기 때문이다. 동시에 MPH의 분자 구조는 기존 발암성 물질들과 전혀 다르며 작용 기작도 알려지지 않았기 때문에 발암성 혹은 변이원성을 나타내는 또하나의 범주를 이루는 물질일 가능성이 높기 때문이다. 그러나 MPH의 발암성 기작에 있어서는 아직 뚜렷한 의견이 없으며, 변이원성에 있어서는 일치된 견해가 없는 상태이다(Mirsalis, 1987). 이런 상황에서 MPH를 "non-genotoxic carcinogen"으로 분류하는 연구자들(Iype et al., 1985)도 있는 반면, "genotoxic carcinogen"으로 취급하는 연구자들도 있다(Turner et al., 1987).

MPH의 발암성에 관한 보고들(Lijinsky et al., 1980; Lijinsky, 1984; Habs et al., 1986)에 근거하여 MPH가 랫드에서 간암 유발물질로 작용함이 충분히 검증되었다는 전제하에, 본 연구에서는 Transgenic animal을 이용한 새로운 변이원성 시험법을 도입하면서 이 시스템을 통해 MPH의 발암성을 예측할 수 있을 것 인가를 알아보고자 하였다.

또한 MPH가 랫드에서는 간암을 유발하나 마우스에서는 발암성이 없다는 점을 감안, 두 가지 동물을 모두 사용해 시험하였으며, 랫드에 있어서는 기존의 발암성 시험(Lijinsky et al., 1980)에 사용된 것과 동일한 종의 랫트를 사용하므로써 결과의 신뢰도를 높이고자 하였다. 이런 목적으로 본 연구에는 전술한 transgenic C57BL/6 마우스 및 transgenic Fischer 344 랫드를 사용하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시험재료

Transgenic 마우스(수컷 C57BL/6)

Transgenic 랫드(수컷 Fischer 344)

기타 15 종 : Stratagene Co. #720010 등

DMN : Sigma N-3632, Lot 18F02691

Methapyrilene hydrochloride : Sigma M-9125

Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol 25:24:1 액 : Sigma P-3803, Lot 103H0309

Chloroform : Sigma C-2432 Lot 94H0351

N,N-Dimethylformamide : Sigma D-8654 Lot 24H3712

DNA Extration Kit : Stratagene # 200600

Absolute ethanol : Hayman Ltd.(UK)

나. 시험동물

Stratagene으로부터 약 6 주령의 수컷 transgenic 마우스(C57BL/6)와 약 4 주령의 수컷 transgenic 랫드(Fischer 344)를 구입, 한국화학연구소 안전성연구센터의 동물사육실(BS-2동)에서 사육하여 사용하였다.

다. 시험동물 사육환경

사육실 온도는 23 ± 3 °C, 습도는 $50 \pm 10\%$ 로 유지하였고 환기 횟수는 시간당 13-18회(공조방식)로 하였다. 온도와 습도는 자동 계측기에 의해 측정되었다. 조명은 형광등을 사용하였고(조도 200-300 룩스) 명암 사이클은 12 시간 주기(07:00-19:00)로 하였다. 사육상자는 240W X 390L X 175H mm 크기의 폴리 카보네이트제를 사용하였고 순화 기간 중에는 사육상자당 5 마리, 시험기간 중에는 4 마리를 수용하였다. 시험군의 식별은 칼라 식별 카드로, 개체식별은 꼬리 표시법으로 하였다. 사료는 제일사료주식회사(대전광역시 대덕구 대화동 40-36)로부터 구입한 실험동물용 고품사료를 사용하였으며 사료 중의 오염물질 분석은 한국화학연구소 분석실에 의뢰해 룩트별로 1 회 실시하였다. 물은 자외선 살균기로 소독한 상수도수를 급여했으며, 사료와 물은 자유섭취시켰다. 물의 오염물질의 검사는 대전광역시 보건환경연구원(대전광역시 서구 용문동 594-1)에 검사를 의뢰하여 실시하였다. 시험 기간에 걸쳐 사육 조건 및 시험 결과에 악영향을 미칠 만한 점은 없었다.

라. 시험물질 및 양성대조물질의 조제

MPH는 생리식염수에 용해하여 10 mg/ml로 조제하였다. DMN은 0.9% NaCl 용액(생리식염수)에 용해하여 100 mg/ml 원액을 조제하고 이 원액 60 μ l를 동일한 생리식염수 9.9 ml에 희석하여 0.6 mg/ml 액을 조제하였다.

마. 시험물질의 투여

10주령의 수컷 transgenic 마우스(이하 TGM) 및 5주령 transgenic 랫드(이하 TGR)를 사용, 각 투여군당 4 마리의 동물로 투여군을 구성하였다. 군분리는 체중 범위에 따른 무작위 추출로 하였으며, 각 투여군에 걸쳐 가능한 한 체중이 균일하게 분포하도록 동물을 배정하였다.

TGM의 경우 DMN은 기존 문헌을 참고하여 일회 투여 용량을 3 및 6 mg/Kg으로하여 1 일 1 회씩 5 일간 연속 복강투여하였고, MPH는 일회 투여 용량을 50 및 100 mg/Kg으로하여 1 일 1 회씩 5 일간 연속 강제경구투여하였다.

TGR의 경우 DMN은 일회 투여 용량을 6 mg/Kg으로하여 1 일 1 회씩 5 일간 연속 복강투여하였고, MPH는 일회 투여 용량을 25 및 50 mg/Kg으로하여 1 일 1 회씩 5 일간 연속 강제경구투여하였다. 개체당 투여 액량은 투여 직전 측정된 체중을 근거로 산출하였으며 DMN은 5 ml/Kg, MPH는 10 ml/Kg으로 하였다. 음성대조군에는 생리식염수를 동량 경구투여하였다.

개체당 투여 액량은 투여 직전 측정된 체중을 근거로 산출하였으며 DMN은 5 ml/Kg, MPH는 10 ml/Kg으로 하였다. 음성대조군에는 생리식염수를 동량 경구투여하였다.

바. 시험동물의 부검 및 장기 적출

시험물질에 의해 유발된 돌연변이의 형질 발현을 위해 시험물질 투여 후 13일째(TGM) 및 14일째(TGR)에 동물을 도살, 간을 적출하였다.

모든 동물은 도살시 체중을 측정 후 경추탈구로 도살, 신속히 간 및 비장 등의 장기를 적출하여 약 100 mg 정도의 조각으로 잘라 냉동 바이알에 넣은 다음 즉시 액체질소에 넣어 급속냉동한 후 -80 ° C의 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

사. 돌연변이 유발 평가

돌연변이 빈도의 평가는 Stratagene에서 제공한 표준 시험법에 따랐다. 개략적인 방법은 다음과 같으며 세부 사항은 첨부자료에 넣었다.

- (1) 동물을 입수-순화기간을 거친후 시험물질을 복강 또는 경구투여한다.
- (2) 약 2 주간의 expression time을 경과한다.
- (3) 동물을 경추탈구로 죽여 부검, 각 조직을 적출해 급속냉동한다.
- (4) 각 조직으로부터 chromosomal DNA를 추출한다.
- (5) 추출한 DNA 적량과 전용 packaging extract를 혼합하여 반응시킨다.
- (6) 반응이 끝난 후 1 차 plating을 위해 로 위 반응물 적량을 45 ° C로 유지한 top agar에서 대장균과 혼합한다. 나머지 반응물은 냉장보관한다.
- (7) Base agar를 포함한 30 X 30 cm 디쉬에 위 혼합물을 부어 굳게한 후 37 ° C에서 약 24시간 배양한다.
- (8) 디쉬당 나타나는 전체 용균반 및 청색 용균반을 계수한다.
- (9) 1 차 plating에서 디쉬당 나타난 용균반의 밀도를 참고하여, 반응시킬 DNA의 양을 결정해 나머지 DNA를 순서 (5)-(8)과 같이 실시한다.

아. 결과 해석 및 판정

각 투여군 동물의 조직으로부터 얻은 전체 용균반의 수 및 그 중에 나타나는 청색 돌연변이 용균반의 수를 계수하였으며, 각 조직으로부터 시험한 복수의 플레이트로부터 얻은 용균반 수를 합산하였다. 각 투여군당 용균반 수의 합계가 최소한 10^5 개 이상일 때 결과가 유효한 것으로 판정하였다. 돌연변이 빈도 (Mutation frequency, MF)는 10^5 개의 용균반당 나타나는 변이용균반의 수로 나타내었으며, 각 군의 동물에서 시험물질의 투여 용량에 따라 MF가 용량의존적으로 증가하면서 음성대조군에 비해 2 배 이상 증가할 때 양성으로 판정하였다.

3. 결 과

가. Transgenic mouse를 이용한 시험 결과(Table 3-3-1~3-3-3)

매체대조군과 DMN 투여군 및 MPH 50 mg/Kg 투여군의 동물은 부검-장기 적출 때까지 모두 생존하였으나 MPH 100 mg/Kg 투여군은 1 회 투여 후 다음날 4 마리 중 2 마리(동물번호 M18, M19)가 사망하였으므로 이후의 투여는 중단하였다. 부검시 체중 측정 결과 투여군 모두에서 음성대조군과 현저한 차이는 없었다. 시험 결과는 다음과 같다.

시험물질을 투여한 동물의 간(liver)에서 추출한 DNA를 시험하여 관찰된 용균반 수는 3.7×10^5 개(음성대조군), $3.0 - 3.3 \times 10^5$ 개(DMN 투여군) 및 $1.5 - 3.0 \times 10^5$ 개(MPH 투여군) 였으며, 변이용균반의 빈도(MF)는 음성대조군, DMN 투여군(I) 및 DMN 투여군(II)의 순으로 1.07, 9.67, 13.17로, DMN 투여군에서는 음성대조군의 각각 904%(투여군 I) 및 1232%(투여군 II)로 현저한 증가를 나타내었다.

MPH 투여군에서는 음성대조군의 123%(투여군 I) 및 124%(투여군 II)로, 음성대조군과 비슷한 정도의 빈도를 보였다(Table 3-3-1)

Table 3-3-1. Induction of mutant plaques in livers of male transgenic mice

Treatments of test articles (mg/kg X times)	No. of animals used	No. of plaques analyzed	No. of mutant plaques	Mutation Frequency (X 10^5)	% of control
Control	4	374063	4	1.07	100
DMN 3 x 5	4	300035	29	9.67	904
DMN 6 x 5	4	326567	43	13.17	1232
MPH 50 x 5	4	304630	4	1.31	123
MPH 100 x 1	2	150995	2	1.32	124

Control : Normal saline

DMN : Dimethylnitrosamine

MPH : Methapyrilene hydrochloride

시험물질을 투여한 동물의 신장(kidney)에서 추출한 DNA를 시험하여 관찰된

용균반 수는 1.4×10^5 개(음성대조군), $1.4 - 1.7 \times 10^5$ 개(DMN 투여군) 및 $1.2 - 1.8 \times 10^5$ 개(MPH 투여군) 였으며, 변이용균반의 빈도(MF)는 음성대조군, DMN 투여군(I) 및 DMN 투여군(II)의 순으로 2.82, 2.94, 11.94로, DMN 투여군에서는 음성대조군의 각각 104%(투여군 I) 및 423%(투여군 II)로 현저한 증가를 나타내었다.

MPH 투여군에서는 음성대조군의 101%(투여군 I) 및 29%(투여군 II)로, 음성대조군에 비해 증가를 보이지 않았다(Table 3-3-2).

Table 3-3-2. Induction of mutant plaques in kidneys of male transgenic mice

Treatments of test articles (mg/kg X times)	No. of animals used	No. of plaques analyzed	No. of mutant plaques	Mutation Frequency (X 10^5)	% of control
Control	4	141711	4	2.82	100
DMN 3 x 5	4	170145	5	2.94	104
DMN 6 x 5	4	142383	17	11.94	423
MPH 50 x 5	4	176217	5	2.84	101
MPH 100 x 1	2	123381	1	0.81	29

Control : Normal saline

DMN : Dimethylnitrosamine

MPH : Methapyrilene hydrochloride

시험물질을 투여한 동물의 비장(spleen)에서 추출한 DNA를 시험하여 관찰된 용균반 수는 1.8×10^5 개(음성대조군), $1.9 - 2.2 \times 10^5$ 개(DMN 투여군) 및 $1.1 - 1.9 \times 10^5$ 개(MPH 투여군) 였으며, 변이용균반의 빈도(MF)는 음성대조군, DMN 투여군(I) 및 DMN 투여군(II)의 순으로 1.78, 4.94, 5.72로, DMN 투여군에서는 음성대조군의 각각 277%(투여군 I) 및 321%(투여군 II)로 현저한 증가를 나타내었다.

MPH 투여군에서는 음성대조군의 117%(투여군 I) 및 353%(투여군 II)로, 투여군 II에서만 음성대조군에 비해 증가를 보였다(Table 3-3-3).

Table 3-3-3. Induction of mutant plaques in spleen of male transgenic mice

Treatments of test articles (mg/kg X times)	No. of animals used	No. of plaques analyzed	No. of mutant plaques	Mutation Frequency (X 10 ⁵)	% of control
Control	2	112129	2	1.78	100
DMN 3 x 5	4	222895	11	4.94	277
DMN 6 x 5	4	192359	11	5.72	321
MPH 50 x 5	3	143483	3	2.09	117
MPH 100 x 1	2	111113	7	6.30	353

Control : Normal saline
 DMN : Dimethylnitrosamine
 MPH : Methapyrilene hydrochloride

나. Transgenic rat를 이용한 시험 결과(Table 3-3-4)

장기 적출시까지 죽은 동물은 없었으며, 특이한 현상도 관찰되지 않았다. 시험물질을 투여한 동물의 간(liver)에서 추출한 DNA를 시험하여 관찰된 용균반 수는 2.8 x 10⁵ 개(음성대조군), 2.3 x 10⁵ 개(DMN 투여군) 및 2.8 - 3.1 x 10⁵ 개(MPH 투여군)였으며, 변이용균반의 빈도(MF)는 음성대조군 및 DMN 투여군의 순으로 1.09 및 3.07로, DMN 투여군에서는 음성대조군에 비해 281%의 증가를 나타내었다.

MPH 투여군에서는 음성대조군의 237%(투여군 I) 및 258%(투여군 II)로, 음성대조군에 비해 2 배 이상의 증가를 보였다.

Table 3-3-4. Induction of mutant plaques in livers of male transgenic rats

Treatments of test articles (mg/kg X times)	No. of animals used	No. of plaques analyzed	No. of mutant plaques	Mutation Frequency (X 10 ⁵)	% of control
Control	4	275014	3	1.09	100
DMN 6 x 5	4	228053	7	3.07	281
MPH 25 x 5	4	309743	8	2.58	237
MPH 50 x 5	4	284491	8	2.81	258

Control : Normal saline
 DMN : Dimethylnitrosamine
 MPH : Methapyrilene hydrochloride

4. 고찰 및 결론

DMN은 상당한 정도의 간세포 증식을 유도하는 간암 유발 물질인 것으로 알려져 있다. DMN은 세포 내에서 주로 DNA와 결합하여 N⁷-methylguanine을 포함한 다양한 DNA adduct를 형성하고, 변이성이 매우 강한 O⁶-methylguanine도 형성하는 것으로 알려져 있다(Swan and Magee, 1968; Beranek, 1990). DMN은 mouse에서 발암성을 나타내는 데 여러 종류의 mouse의 간, 신장 및 폐 등에 tumor를 형성하는 것으로 밝혀졌다. DMN이 돌연변이를 나타내기 위해서는 DNA와 결합하기 전에 대사활성화 과정이 필요하다. 이에 따라 주로 간이나 신장 등에서 보다 높은 변이성을 나타내고, 마우스의 peripheral erythrocyte에서는 micronuclei를 형성하지 않음이 보고되었다(Mirsalis 등, 1985; Steinmetz 등, 1990). Mirsalis 등(1993)의 결과에 따르면 lacI gene을 갖는 transgenic B6C3F1과 C57BL/6 mice에서 DMN은 주로 C:G에서 T:A로의 transition mutation을 발생하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 DMN에 의한 돌연변이 유발 빈도는 시험에 적용한 3 개 장기 모두에서 양성의 결과를 나타내었으며, 간에서 최대치를 나타내었고 그 다음으로 신장 및 비장의 순으로 나타났다. 간에서의 돌연변이 유발 빈도가 신장이나 비장에서의 경우보다 높은 것은 각 장기에 있어서 DMN의 대사활성화(metabolic activation)에 관여하는 cytochrome P450의 함유량과 깊은 연관이 있으리라고 생각된다. 비장에서는 DMN에 의한 돌연변이의 증가가 상대적으로 낮았는데, 이는 비장내에서 cytochrome P450들의 발현이 극히 낮다는 기존 결과와 상통하는 것이다.

랫드의 간에서는 같은 용량으로 투여한 DMN이 양성의 결과를 나타내기는 하였으나 돌연변이 유발 정도가 마우스 간의 경우에 비해 상대적으로 낮았다. 이는 마우스와 랫트 간에 DMN의 대사활성화 정도가 다르기 때문인 것으로 추측되나 본 시험만으로는 자세한 내용을 알 수 없었다.

DMN과는 대조적으로 MPH는 마우스의 간이나 신장에서 돌연변이를 유발하지 않았다. 마우스의 비장에서 MPH는 음성대조군의 약 3.5 배에 이르는 변이율의 증가를 유발하였으나, 유독 비장만이 MPH의 표적장기라고 판단하기는 어렵다고 생각된다. 이 군의 경우 회수한 용균반의 수가 1.1×10^5 개로 다른 군에 비해 가장 낮은 점도 이런 결론을 내리기 어렵게 하는 요인이다. 그러나 랫트의 간

에 있어서는 MPH가 거의 DMN과 유사한 정도의 돌연변이를 유발하였는데, 이는 MPH가 랫트에서 간암을 유발한다는 결과(Lijinsky et al., 1980)를 뒷받침하는 것으로 판단된다. 이는 MPH가 여러 연구자들의 논란에도 불구하고 변이원성 발암물질(genotoxic carcinogen)임을 시사한다. MPH가 랫트의 liver에서 선택적으로 돌연변이를 유발한다는 것은 이 물질이 랫트에서만 선택적으로 간암을 유발한다는 것을 설명하는 것이라고 판단된다.

본 시험에서 적용한 BigBlue assay가 단기 시험인 것에 반해 Lijinsky 등(1980)이 보고한 발암성 시험은 약 1 년간의 투여로 얻은 결과임을 감안한다면, 본 연구에서 나타난 유전자돌연변이가 장기간 누적될 때는 충분히 발암성으로 이어질 수 있다고 판단된다. 암 유발은 결국 살아있는 동물에 나타나는 현상이며 발암과정은 돌연변이와 상관관계가 있음을 감안할 때 BigBlue assay를 이용한 *in vivo* 돌연변이 시험 결과는 *in vitro* 시험에서 얻은 결과보다는 더욱 신뢰성이 있다고 생각된다.

본 시험의 결과를 종합해 볼 때 transgenic animal을 이용한 시험 결과는 기존의 발암성 시험 결과를 잘 반영한다고 할 수 있으며, 이 시험법으로 변이원성 물질을 효과적으로 검출할 수 있음을 증명하는 것으로 사료된다.

5. 참고문헌

Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki and F.D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens : a simple system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2281-2285.

Beranek, D.T. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* 231, 11-30.

Brennan, L.M. and D.A. Creasia (1982) The effects of methapyrilene hydrochloride on hepatocarcinogenicity and pentobarbital-induced sleeping time in rats and mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 66, 252-258

Cordaro, J.C. (1989) Transgenic mice as future tools in risk assessment, *Risk Analysis*, 9(2), 157-168

Gossen, J.A., W.J.F. deLeeuw, C.H.T. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H.M. Lohman, D.L. Knook, and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice : A model for studying mutations in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7971-7975.

Habs, M., P. Shubik, and G. Eisenbrand (1986) Carcinogenicity of methapyrilene hydrochloride, mepyramine hydrochloride, thenyldiamine hydrochloride, and pyribenzamine hydrochloride in Sprague-Dawley rats, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 111, 71-74.

Iype, P.T., Corazon D. Bucana, and Susan P. Kelley (1985) Carcinogenesis by nonmutagenic chemicals: Early response of rat liver cells induced by methapyrilene, *Cancer Res.*, 45, 2184-2191.

Jaenisch, R., J. Fan, and B. Croker (1975) Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus : tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 4008-4012.

Kohler, S., S. Provost, P. Kretz, M. Dyaico, J. Sorge, and J.M. Short (1990) Development of a short-term, in vivo mutagenesis assay: the effects of methylation on the recovery of a lambda phage shuttle vector from transgenic mice, *Nucleic Acids Res.*, 18(10), 3007-3013.

Lijinsky, W., Reuber, M.D., and Blackwell, B.N. (1980) Liver tumors induced in rats by oral administration of the antihistamine methapyrilene hydrochloride. *Science* 209, 817-819.

Lijinsky, W. (1984) Chronic toxicity of pyrilamine maleate and methapyrilene hydrochloride in F344 rats, *Food Chem. Toxicol.*, 22, 27-30.

Mirsalis, J.C., Tyson, C.K., Loh, E.N., Steinmetz, K.L., Bakke, J.P., Hamilton, C.M., Spak, D.K. and Spalding, J.W. (1985) Induction of hepatic cell proliferation and unscheduled DNA synthesis in mouse hepatocytes following in vivo treatment. *Carcinogenesis* 6, 1521-1524.

Mirsalis, J.C. (1987) Genotoxicity, toxicity, and carcinogenicity of the antihistamine methapyrilene, *Mutat. Res.*, 185, 309-317.

Mirsalis, J.C., Provost, G.S., Matthews, C.D., Hamner, R.T., Schindler, J.E., O'Louhlin, K.G., MacGregor, J.T. and Short, J.M. (1993) Induction of hepatic mutations in lacI transgenic mice. *Mutagenesis* 8, 265-271.

Provost, G.S., S.W. Kohler, A. Fieck, P.L. Kretz, T. Molina, J.M. Short, Stratagene Cloning systems (1990) Short-term germ line and somatic cell mutagenesis testing with LacI lambda phage shuttle vectors in transgenic mice, *Strategies in Mol. Biol.* 4, 55-56.

Steinmetz, K.L., Garin, K.E., Hamilton, C.M., Bakke, J.P., MacGregor, J.T., and Mirsalis, J.C. (1990) Multiple end point in vivo genetic toxicology assay: evaluation of hepatic unscheduled DNA synthesis, S-phase synthesis and peripheral blood micronuclei following repeated dosing of male B6C3F1 mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 15(Suppl. 17), 58.

Swan, P.F. and Magee, P.N. (1968) Nitrosamine-induced carcinogenesis: the alkylation of nucleic acids of the rats by N-methyl-N-nitrourea, dimethylnitrosamine, dimethylsulfate, and methylmethanesulphonate. *Biochem. J.* 110, 39-43.

Turner, N.T., Woolley, J.L., Hozier, J.C., Sawyer, J.R., and Clive, D. (1987) Methapyrilene is a genotoxic carcinogens: Studies on methapyrilene and pyrilamine in the L5178Y TK+/- mouse lymphoma assay. *Mutat. Res.* 189, 285-297.

첨부자료 : 시험법 수순서

Transgenic animal mutagenicity test

DAY 1

<I. DNA Isolation>

Whole tissue 1 g 당 약 250-1100 μ g의 DNA를 추출 가능함.

조직은 Sol. 2를 더할 때까지 dry ice에 보관해야 한다.

준비물 : Clean Wheaton 7 ml dounce (glass homogenizer) with pestle B

DNA isolation Kit(Stratagene #200600)

적출하여 냉동한 장기

15 ml conical tube (Falcon 2098)

50 ml conical tube (Falcon 2097)

1. Dounce homogenizer에 조직 250 mg을 넣고 Kit의 용액 #2를 14 ml 더한다.
2. 조직을 pestle B로 수 회 분쇄한 다음 내용물을 15 ml conical tube(A)에 옮겨 붓는다.
3. Pronase stock을 (A)에 더해(0.44 μ l/ml) 최종농도를 100 μ g/ml로 만든다.
4. (A)를 55 $^{\circ}$ C에서 2시간(혹은 37 $^{\circ}$ C에서 밤새) shaking 한다.
5. (A)를 ice bath에서 10분간 냉각한다.
6. (A)에 Kit의 용액 #3을 5 ml 더하고 tube를 뒤집으며 수 회 혼합한다.
7. Ice bath에 5분간 방치한다.
8. (A)를 4 $^{\circ}$ C에서 2000 Xg (= 3,500 rpm)로 15분간 원심분리해 침전시킨다.
9. Large bore pipet으로 상등액을 50 ml conical tube (B)에 옮긴다.
10. RNase 용액을 (B)에 더해(2 μ l/ml) 최종농도를 20 μ g/ml로 만든다.
11. (B)를 37 $^{\circ}$ C water bath에 15분간 둔다.
12. 상등액 양의 2배에 해당하는 양의 100 ethanol을 더해 tube를 가볍게 뒤집으며 혼합해 DNA를 침전시킨다.

13. 멸균한 유리봉으로 침전한 DNA를 꺼내 유리봉에 부착한 채로 70% ethanol에 담궈 rinse한 후 그대로 흡수지에 대어 ethanol을 제거한다.
14. DNA를 500 μ l의 buffer(10 mM Tris, 0.1 mM EDTA)에 부드럽게 resuspend 하여 4°C에 보관한다. 이 때 tube를 vortex 하거나 pipetting 하면 안된다.
15. DNA의 농도를 측정한다. 1 OD₂₆₀ = 50 μ g/ml이 된다.
16. TE를 이용해 DNA sample 농도를 500 μ g/ml로 조정한다. DNA가 T-E 내에서 충분히 퍼지기 위해 다음날 까지 냉장보관한다.

<II. Preparation of Plating Cells>

STREAKING A PLATE

Glycerol로 냉동한 균주의 stock culture로부터 각각 wire loop로 agar plate에 streak 하여 37 ° C에서 다음날 까지 배양한다(1 주 마다 새로 준비한다).

* SCS-8 은 12 μ g/ml tetracycline 함유한 NZY plate 에서 select.

* VCS257 은 tetracycline 없는 plate에 배양.

1. 2 개의 멸균 conical tube 에 멸균한 NZY media 를 각각 20 ml씩 분주해 두 균주를 freshly streaked plate 로부터 single colony 취해 접종한다.
2. 37 ° C, 250 rpm shaker로 overnight incubation 개시 (Day 2 에사용).

접종 2 tubes : SCS-8 : For plating packaged genomic DNA only.

VCS257 : For plating packaged λ type DNA only.

* Tetracycline 12 mg/ml DW 조제하여 배지 1 ml당 1 μ l씩 첨가.

Tissue 1개당 NZY plate 4개씩 준비.

DAY 2

Tissue 한개당 ;

NZY tray 4개 (50 μ l/tray 1개 + 남은 것 3등분한 것 각각 1개씩 3개) 및 SCS-8 균주 (OD 0.5) 8 ml 소요. 따라서 넉넉히 20 ml X 5 tube 접종한다.

<I. Preparation of Bacterial Plating Cultures>

준비물 : Bacterial overnight cultures containing the host strains

100 ml sterile NZY medium

Maltose/MgSO₄ sol.

Sterile 10 mM MgSO₄ sol.

50 ml conical tubes (A),(B)

1. (A): SCS-8, (B): VCS257 접종 위해;
(A) 8개 + (B) 1개의 50 ml tube에 각각 20 ml씩 NZY 분주, Maltose/MgSO₄ sol 250 μ l씩 첨가. 이 때 tetracycline은 사용하지 않는다.
2. 각 균주의 Overnight culture 200 μ l씩을 취해 (A), (B)에 각각 접종.
3. (A), (B)를 37 ° C, 250 rpm 에서 3-4 hr 이상 배양(OD₆₀₀ = 1.5-2.0)
4. (A), (B)를 centrifuge at 1000 xg for 10 min. 상등액 제거.
5. 각 tube에 10 mM MgSO₄액 20 ml을 가해 resuspend 한 다음 같은 균을 한 곳에 합하여 OD₆₀₀을 측정.
6. Sterile 10 mM MgSO₄ 액을 사용, OD 600 = 0.5 되도록 균액을 희석한다(이렇게 희석한 SCS-8 균액이 2 ml/tray 로 필요하다).
7. Plating culture는 사용시 까지 얼음에 보관한다.

<II. Packaing Genomic & control DNA> - Plating culture 배양중에 실시

준비물 : Transpack(6 orange tube of 10 μ l + 1 blue tube of 60 μ l/set)

Control λ DNA (ci857 Sam 7 lambda DNA)

Dry ice

Wide bore tip

Chloroform

Regular bore tip

DNA sample

Sterile SM buffer

Packaging은 DNA sample 6개씩 1조로 실시한다.

1. Orange색 transpack(10 μ l/vial) 6 개와 blue tube(60 μ l/vial) 1개를 -70 ° C freezer에서 꺼내 dry ice에 보관한다(사용 직전 하나씩 손바닥에서 녹인다).
2. Transpack이 3/4 정도 녹으면 각 sample로부터 genomic DNA 8 μ l씩 취해

각 orange tube에 분주, mix, 30 ° C에서 90 분 배양한다(매 Transpack 10 μ l + genomic DNA 8 μ l = A).

3. Control λ DNA는 1 μ l 취해 같은 요령으로 혼합한다(생략 가능).
4. 90 min 경과 후 Blue transpack(60 μ l/vial)을 1.의 요령으로 녹여서 각 orange색 vial(A)에 regular bore tip으로 10 μ l 씩 분주한다. 이 때 혼합물을 pipet으로 aspirate 하지말고 조용히 저어서 혼합한다.
5. 혼합물을 30 ° C에서 다시 90 min 배양한다(이 때 packaging이 진행).
6. 90분 후에 SM buffer 1 ml을 (A)에 첨가하여 반응을 중지시키고 vortex로 느리게 10 초 정도 mix한 후 ice bath에 쬐는다. 이 상태의 sample을 C:P sol.이라 한다.
7. 우선 각 sample당 packaged DNA 50 μ l을 plating한 후 나머지 sample에 chloroform 50 μ l을 첨가하여 가볍게 vortex하여 plating할 때까지 냉장한다.*

50 μ l/tray로 plating한 tray를 37 ° C에서 약 24 시간 배양한 후 plaque를 count하고, 이로부터 대략 15,000 plaques/tray가 되도록 plating할 sample의 volume을 결정한다(Packaged DNA를 다시 사용할 때는 잠시 원심분리하여 chloroform을 완전히 제거해야 하며 대개 5-50% titer가 손실된다).

- * 냉장보관 과정을 생략하기 위해 : Sample당 4 개의 tray를 준비하여 Tray #1에는 50 μ l, #2, #3, #4에는 나머지를 대략 3등분하여 300 μ l씩 plating하면 된다. 냉장보관 후 다음날 plating을 진행하기 위해서는 두 균주를 다시 접종, overnight culture하여 DAY 2의 과정을 새로 시작한다.

<III. Plating Packaged Genomic DNA>

준비물 : Prepared SCS-8 plating cultures in 10 mM MgSO₄ sol.

1000 ml molten top agarose (30 ml/assay tray) : 50 ° C 유지

매 sample 당 4 개의 Big Blue assay trays(200 ml NZY agar/tray, 미리 예열)

1.5 g X-gal

N,N-dimethylformamide

50 ml polypropylene screw cap conical tubes

1. 1000 ml의 Top agar in 48-50 ° C water bath를 준비한다.
2. Sample 당 4 개의 50 ml tube에 번호를 기입한 후 각 tube에 SCS-8 균주를 2 ml씩 분주한다. λ DNA도 함께 plating 할 경우 tube 1 개를 추가한다.
4. C:P sol.을 37 ° C 에서 15 분간 배양한다. 이 때 tube는 손으로 만져보아 따뜻해야 한다. 따뜻하지 않으면 추가로 5-10 분 더 경과한다.
5. 이 시간 동안 X-gal 1.5 g 을 6 ml N,N-dimethylformamide 에 녹인 후 이 용액 전량을 top agar 1000 ml에 첨가한다(final 1.5 mg/ml top agar).
6. 50 ml tube 모두에 각각 2 ml의 SCS-8 cell culture 를 분주한다.
7. 각 sample로부터 C:P sol.을 50 μ l씩 취해 각 조의 #1 tube에 분주한다.
8. #1 tube에 X-gal 함유한 top agar 30 ml씩 분주하여 뚜껑을 닫고 4,5회 뒤집어 혼합한 후 즉시 NZY plate에 부어 고루 퍼지게 한다.
9. 나머지 sample의 1/3등분 한 양을 취해 #2 tube의 균주에 혼합하고 순서대로 top agar 30 ml을 분주, 순서 8과 같이 plating한다.
10. 37 ° C 에서 16-24 hr 배양한 후 plaque를 계수한다.

<IV. Plating Color Mutants>

For check control plating conditions for optimal mutant detection/for color comparison. CM1 은 항상 사용해야 함.

준비물 : Big Blue plaque color control (CM1, CM2, CM3)

SCS-8 cultures

Big Blue trays with 0.4 cm deep NZY bottom agar

Molten top agar (with 1.5 mg X-gal/ml)

1. 각 color mutant 당 50 ml tube 를 준비하여 각 tube 에 SCS-8 균주배양 한 것을 2 ml 씩 분주한다.
2. 각 tube 에 각 color mutant 50 μ l를 분주해 15 분간 37 ° C에 배양한다.
3. 각 tube 에 top agar 30 ml을 분주, 혼합하여 plating.
4. 37 ° C overnight 배양 후 관찰한다.

<V. Plating Packaged control λ DNA>

준비물 : VCS-257 culture

Molten top agar (with 1.5 mg X-gal/ml)

Sterile SM buffer

100 mm round plate containing sterile NZY agar

<Packaging Genomic & control DNA>의 순서 6.의 λ packaging reaction 으로부터 2단계 1:100 dil.액을 만들어 사용하는 과정임.

1. λ DNA의 C:P sol. $10\mu\text{l}$ 를 $990\mu\text{l}$ SM buffer에 희석한 후 다시 $10\mu\text{l}$ 취해 $990\mu\text{l}$ SM buffer 에 희석해 최종 10,000 배 희석한다.
2. VCS257 배양한 것 2 ml 에 10,000 배 희석액 $10\mu\text{l}$ 을 첨가하여 infection 시킨 후 15 min at 37°C 배양.
3. Top agar 3 ml 을 분주하여 mix 한 후 100 mm plate 에 plating 한다.
4. 37°C 에서 overnight 배양한다.

DAY 3

<I. check Color Control Mutants>

CM1 (or CM2 or CM3 is used) 관찰 : 대략 25-50 mutants/5000 non-mutants

CM1은 연한 청색, CM2, CM3은 진한 청색이어야함. CM1의 색이 제대로 나타나지 않으면 다른 assay tray에서도 mutant들이 제대로 안나온다고 보아야 함.

<Calculation of Control λ Efficiency>

Control plate 의 plaque count.

VCS257이 lacZ gene 을 발현했으므로 Bacterial lawn과 plaques는 청색이 됨.

plaques X dil. factor X Total packaging volume

of micrograms X # of microliters plated

ex. 200 plaques are observed;

200 pfu X 10^4 X $1000\mu\text{l}$

 $0.2\mu\text{g} \times 10\mu\text{l}$ = 1×10^9 pfu/mg DNA

Tanspack은 10^9 pfu/mg의 λ DNA 를 packaging할 수 있음.

<II. Determination of Rescue Efficiency>

2 개의 dilution tray의 모든 plaque를 계수하여 평균을 취해 packaging reaction 당 얻은 total plaque 수를 산출한다.

ex. 2 dil. plates 246/236 counts = av. 241 plaques/50 μ l

$$\frac{\text{Av. \# plaques}}{0.05 \text{ ml}} \times \text{total vol. of C:P} = \# \text{ of plaques in reaction.}$$

$$\frac{241 \text{ plaques}}{0.05 \text{ ml}} \times 21 \text{ ml} = 101,220 \text{ plaques per packaging reaction.}$$

이 수를 실제로 측정한 값 (stencil 사용) 과 비교해 보아야 함. 오차는 10% 이내임.

<III. Determination of Mutant Frequency>

Mutant 를 count한다. 이 때 plate 상에 plaque를 동그라미를 치면서 계수한다. plaque 수는 tray 당 15,000 개가 적당함.

$$\frac{\text{Blue plaques}}{\text{Total plaques}} = \text{MF. 대개 } 10^{-5} \text{ 단위로 표시함.}$$

1 개의 transpack으로 1 sample을 packaging한 후 나누어 plating한다.

<IV. Verification of Putative Mutant Plaques>

1. Mutation plate로부터 의심스런 colony를 찍어낸다.
2. 500 μ l SM buffer에 suspend한 후 50 μ l chloroform을 더해 vortex(= A)(이 상태에서 수개월간 냉장보관 가능).
3. A를 SM buffer에 1:200으로 희석하여 vortex로 혼합한다(= B).
4. B 액 1-2 μ l를 200 μ l SCS-8 균주와 혼합하여 15 분간 37 ° C에 배양한다(이를

- = C)라 한다.
5. C에 top agar 3 ml(X-gal 함유)을 더해 혼합하여 100 mm NZY agar plate에 plating 한다.
 6. 37 ° C에서 overnight 배양한 후 청색인지를 확인한다.

Table 1. 조직 양에 따른 TE 사용량

TISSUE	VOLUME OF TE(μ l)
Bone marrow	75 - 150
Testis (single organ)	500 - 1000
Ovary (both organ)	150 - 300
Spleen	1000 - 2000
Liver	1000 - 2000
Kidney (single organ)	500 - 1000
Brain	250 - 500
Testicular germ cells	150 - 300
Bladder	70 - 150

Testis 사용시에만 collagenase 필요함.

기본 용액 조제법

재료 : Tris.HCl(MW 157.6) 및 EDTA.2Na(MW 336.2)

0.5 M EDTA (pH 7.5) : EDTA.2Na 16.8 g/100 ml- 1 N NaOH로 pH 조정

10% SDS (w/v) : 10 g/100 ml DW

1 M Tris.HCl (pH 7.5) : Tris.HCl 15.76 g/100 ml DW ;

이 때 NaOH 약 2.5 g을 70 ml 증류수에 미리 녹이고, 이 액에 Tris.HCl을 넣어 녹여야 pH가 대략 조절 가능한 범위로 올라간다. 여기서부터 1 N NaOH로 pH를 미세조정 해야한다.

TE buffer (pH 7.5) ;

Tris.HCl 1576 mg + EDTA.2Na 336 mg/L DW - 1 N NaOH로 pH 조정

NZY media 조제- 1 L를 pH 7.0으로 조정하는데 1 N NaOH액 약 1 ml 소요됨.

참고문헌

Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki and F.D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens : a simple system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2281-2285.

Beranek, D.T. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* 231, 11-30.

Brennan, L.M. and D.A. Creasia (1982) The effects of methapyrilene hydrochloride on hepatocarcinogenicity and pentobarbital-induced sleeping time in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 66, 252-258.

제 4 절 In Vitro 초기형성 시험법의 확립

1. 서 론

현대사회는 산업의 발달로 인하여 수 많은 새로운 화학물질들이 개발되게 되었고 이러한 화학물질들은 현대인의 삶의 질을 향상시키는데 크게 기여하게 되었다. 그러나 새로운 화학물질의 개발과 이들의 사용증가는 지속되어온 많은 문제점들을 해결한 반면 이에 따른 부작용도 적지 않은 실정이다. 일상생활에서 유해 화학물질에 대한 노출 가능성은 더욱 높아졌으며 의약품의 오용이나 남용 또한 사회적 문제로 등장하게 되었다. 1960년대 초 유럽에서 개발되어 시판된 thalidomide는 임산부에게 투약시 뛰어난 임신구토억제효과를 나타내는 반면에 신생아에게 심각한 사지기형 (phocomelia)을 유발하는 것이 확인되었다.^{1,2)} 이러한 비극적인 사건을 계기로 세계 각국은 화학물질의 안전성 평가의 중요성을 크게 인식하게 되었으며, 새로운 독성시험기준을 제정하여 더욱 엄격하게 적용하게 된 계기가 되었다.

생식독성시험에 있어서 발생독성 (developmental toxicity)의 평가시 현재 널리 사용되고 있는 실험동물을 이용한 생체내 (*in vivo*) 시험법은 개체수준에서 독성을 직접 확인할 수 있는 좋은 방법이기도 하지만 많은 동물과 인력, 경비 및 시간이 소요되는 단점으로 인하여 최근 급증하는 신규 화학물질에 대한 발생독성을 검색하기에는 많은 어려움이 있었다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 단기간에 많은 정보를 얻을 수 있는 단기 시험법 (short-term test) 개발의 필요성이 대두되게 되었으며, 근래에는 포유동물을 이용한 세포배양법, 조직배양법, 기관배양법, 배자배양법 등 시험관내 (*in vitro*) 독성시험법이 개발되었으며³⁾ 이러한 시험법들은 생체내 발생독성시험 결과의 외삽성 (extrapolation)을 더욱 충실하게 해줄 것으로 기대되고 있다.

1970년대 이후 시험관내에서 발생독성을 평가할 수 있는 많은 진보된 방법들이 고안되어 생리학적인 연구와 착상후 배자 (post-implantation embryo)의 발달 등에 대해 폭 넓게 연구되게 되었다. 특히 Cambridge 대학의 New 등⁴⁾은 시험관내에서 임신 9.5일령의 랫드 배자 (head-fold stage)를 48시간 동안 배양하여

생체내에서와 거의 동일한 배자발달 결과를 얻었으며, Sadler⁵⁾는 New 등의 배양조건을 보완하여 임신 8일령의 마우스 배자 (early somite stage)를 배양하는데 성공하게 되었다. 그 후 설치류를 이용한 전배자배양법 (whole-embryo culture method)이 그 가치를 인정받기 시작하였으며 최근에는 개발초기과정에서 수없이 많이 합성되는 화학물질에 대한 최기형성 (teratogenicity) 여부를 소량으로 신속하게 판단하기 위한 일차검색방법 (prescreening method)으로서의 가능성에 대해 많이 연구되고 있다.

전배자배양법은 발생독성의 평가에 이용할 경우 생체내 시험에 비해 보다 많은 정보를 보다 간편하고 신속하게 얻을 수 있으며 시험조건을 목적에 맞게 정확히 조절할 수 있는 장점이 있다. 또한 배자의 주요기관이 형성되는 배양기간 동안 연속적으로 관찰할 수 있기 때문에 기관발생 (organogenesis)에 영향을 주는 독성물질의 작용기전을 규명할 수 있으며 특히 기형학 (teratology) 분야의 연구에 활발하게 이용되고 있다.

본 연구에서는 동물실험의 대체법의 하나인 전배자배양법을 이용하여 신규 화학물질의 일차검색을 위한 최기형성 평가방법을 확립하고자 임신 9.5일령의 전배자를 48시간 동안 배양한 후 배양배자의 형태, 발육, 분화정도 및 총단백질량을 임신 11.5일령의 생체내 배자와 비교·고찰하였다. 또한 본 연구를 통해 확립된 전배자배양법을 이용하여 생체내 시험에서 최기형성 물질로 알려져 있는 phenytoin (PHT)의 랫드 배자에 대한 시험관내 최기형성 효과를 평가해 보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구부 실험동물육종실 (대전광역시 유성구 장동 100)로부터 입수한 특정병원체부재 (specific pathogen free) 동물인 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 사육환경은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 13~18회/hr., 인공조명 (오전 8시~오후 8시), 조도 200~300 Lux로 설정하였고, 사료는 실험동물용 고품사료 [제일사료 (주)]를 방사선 조사 (2.0 Mrad) 멸균하여, 그리고 물은 상수도수를 자외선 유수살균기로 소독시킨 후 자유섭취

시켰다. 9주령의 동물을 입수하여 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 암수 2:1로 교배시켜 질도말시 정자가 확인된 날의 오전 0시를 임신 0일로 정하였다.

나. 배양배지의 조제

배양배지는 수컷 랫드의 전혈로부터 얻은 IC (immediately centrifuged) 혈청을 이용하였다. 채혈은 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 이용하였으며 채혈 전 날 절식시켰다. 동물을 마취용 데시케이터에 넣어서 에테르로 충분히 마취한 다음 복부를 알코올로 소독하고 절개하여 복대동맥을 노출시켰다. 10 ml 주사기를 이용하여 동물의 호흡이 멈출 때까지 채혈하였고 이 때 용혈을 방지하기 위해 주사기를 부드럽게 흡입하였다. 채혈한 혈액은 즉시 4 °C에서 2700 rpm으로 8분간 원심분리한 다음 섬유소 응괴 (fibrin clot)가 완전하게 형성되도록 30분 이상 냉장고에 방치하였다. 1차 분리한 혈장층에서 면봉을 이용하여 섬유소 응괴 내의 혈청은 분리하고 섬유소 성분은 제거하였다. 이것을 다시 한번 원심분리하여 얻은 상층액을 모아 -20 °C에서 보관하였다. IC 혈청은 사용하기 전에 56 °C에서 40분간 열비동화 (heat inactivation)하였으며 비동화 과정중 15분과 30분경에 배양시 사용하는 혼합가스를 혈청표면에 30초간 부드럽게 흘려 보내어 혈청 내에 용존하는 에테르가 휘발되도록 하였다. 비동화가 끝난 IC 혈청은 실온으로 만든 다음 0.22 μm 의 microfilter (Millipore, USA)로 여과멸균을 하여 사용하였다.

다. 배자적출

임신 9.5일령의 랫드를 에테르로 마취하고 70% 에탄올로 복부를 소독한 다음 절개하여 자궁을 적출하였다. 적출한 자궁을 0.05% glucose와 0.03% sodium bicarbonate가 함유된 Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 넣어서 혈액을 제거한 다음 HBSS 용액이 담긴 용기에 옮겼다. 핀을 이용하여 자궁의 양쪽을 고정하고 미세가위로 자궁벽을 절개하여 배자가 들어있는 탈락막 (decidua, Fig 3-4-1)을 노출시켰다. 입체현미경 (stereoscope, Nikon, Japan)하에서 두개의 미세한 포셉을 이용하여 탈락막내에 있는 수태산물 (conceptus, Fig 3-4-2)을 분리시킨 후 라이케르트막

(Reichert's membrane)을 제거하였다.

라. 배자배양

상기한 방법으로 얻은 수태산물중 배자의 발생상태를 관찰하여 머리주름기 (head-fold stage)를 나타내는 배자를 배양에 이용하였으며 적출중 손상되었거나 발생상태가 다른 배자는 배양에서 제외하였다. 선별된 배자는 IC 혈청이 3 ml씩 들어있는 15 ml의 배양병에 2~3마리씩 넣어서 전배자배양기 (whole-embryo culture system, Ikemoto Co., Japan)에서 48시간 동안 배양하였다.

마. 배양조건

배양기내의 온도는 37.5 ± 0.5 °C였으며, 회전장치의 회전속도는 35 rpm으로 하였다. 배양병에는 혼합제조된 가스 [대성산소 (주)]를 0.45 μ m의 microfilter (Millipore, Ireland)를 통하여 멸균한 다음 습윤하게 하여 연속공급하였다. 배양 시작후 17시간은 산소 5%, 이산화탄소 5%, 질소 90%의 혼합가스를, 그 다음 7시간은 산소 20%, 이산화탄소 5%, 질소 75%의 혼합가스를, 그리고 마지막 24시간은 산소 40%, 이산화탄소 5%, 질소 55%의 혼합가스를 분당 150 ml의 비율로 공급하였다.

바. 배양배자의 관찰

배양이 끝난 배자는 난황낭직경 (yolk sac diameter), 머리엉덩이간 길이 (crown-rump length), 머리길이 (head length) 및 체절수 (somite number)를 측정하였다. 난황낭직경은 최대치와 최소치를 각각 측정하였으며, 머리엉덩이간 길이는 중뇌 (mesencephalon)의 침단부로부터 엉덩이까지의 최대 길이를 그리고 머리길이는 전뇌 (prosencephalon)의 전외측 팽출부인 종뇌 (telencephalon)에서부터 능뇌 (rhombencephalon)미측부까지의 최대 길이를 측정하여 기록하였다. 배자의 형태, 발육 및 분화정도에 대해서는 Van Maele-Fabry 등⁶⁾의 평가 기준에 따라 점수화하였으며, 배자당 총단백질량은 Bradford 법⁷⁾에 따라 측정하였다. 48시간 배양배자의 성장정도를 동일령의 생체내 배자와 비교하기 위해 임신 11.5일령의 랫드 5마리를 부검하여 모동물당 4마리씩의 배자에 대해서 배양

배자와 동일한 방법으로 관찰하였다.

사. PHT 시험군의 구성 및 시험물질의 처치

예비시험결과를 기초로 하여 PHT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 고용량으로 정하고 공비를 2로 하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 중용량과 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 저용량 및 매체 대조군 등의 4개군으로 구성하였다. PHT와 DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma사 제품 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 구입하여 사용하였으며, PHT는 0.5% DMSO에 녹여서 4 mg/ml 을 만든 다음 조제물질 또는 희석물질을 각 군의 농도에 맞게 배양배지에 첨가하였고, 대조군에는 동량의 매체를 첨가하였다. 배자의 배양은 상기한 방법과 동일하게 실시하였다.

아. 통계학적 분석

시험자료에 대한 통계분석은 SAS 프로그램 (SAS, Version 6.04, Cary, NC, USA)을 이용하였다. 난황낭직경과 머리엉덩이간 길이, 머리길이, 체절수, 형태학적 점수 및 배자의 총단백질량은 일원배치분산분석 (ANOVA)과 Dunnett 다중비교검정법을, 기형배자수는 Chi-square 검정을 실시하였으며 5% 수준에서 유의차 검정을 하였다.

3. 결 과

회전식 배자배양기를 이용하여 임신 9.5일령의 랫드 전배자를 48시간 동안 배양하였다. 최초 배양시 배자의 발생기 (developmental stage)는 뇌형성 초기단계인 머리주름기를 나타내고 있었으며 외태반원뿔 (ectoplacental cone)을 포함한 수태산물의 총 길이는 2.10 ± 0.30 mm 이었다. 48시간의 배양이 완료된 수태산물과 배자의 성장 및 분화상태에 대해서 동일령의 생체내 수태산물과 배자와 비교한 결과는 Table 3-4-1과 같다. 배양한 수태산물의 관찰시 난황낭막 (yolk sac membrane)에는 혈관이 잘 발달되어 있어 활발한 난황낭순환 (yolk sac circulation)을 관찰할 수 있었고, 난황낭의 최대직경은 3.91 ± 0.30 mm 이었으며 최소직경은 3.59 ± 0.24 mm 이었다. 배자의 머리엉덩이간 길이는 3.18 ± 0.30 mm 이었고 머리길이는 1.53 ± 0.17 mm 이었으며 체절수는 22.36 ± 2.16 개였다. 배자의

형태학적 평점은 53.91 ± 1.58 이었고 배자당 총단백질량은 $273.2 \pm 32.8 \mu\text{g}$ 이었다. 이 결과를 동일령의 생체내 배자와 비교할 때 난황낭의 직경은 다소 증가하였고, 배자의 머리엉덩이간 길이와 머리길이, 체절수, 형태학적 평점 및 배자당 총단백질량은 다소 감소하였으나 그 차이는 극히 미미한 수준으로서 생체내에서와 거의 동일한 배자발달결과를 얻었다.

배양배지에 PHT을 처치한 시험군의 배자배양결과는 Table 3-4-2와 같다. 48시간 동안 배양한 매체대조군의 수태산물 (Fig. 3-4-3)과 배자 (Fig. 3-4-4)는 모두 정상적인 성장결과를 나타내었으며, 25와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치군에서의 배양배자도 대조군과 유사한 결과를 나타내었다. 반면 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치군에서는 난황낭의 직경이 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 배자의 머리엉덩이간 길이와 머리길이, 체절수, 형태학적 점수 및 배자당 총단백질량이 유의성있게 감소하였다. 배자의 형태학적 이상을 관찰한 결과는 Table 3-4-3에 나타내었다. 매체대조군에서는 1마리의 배자에서 회전 이상 (abnormal rotation)과 신경관 개열 (neural tube schisis)이 관찰되었고 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치군에서는 회전 이상 (Fig. 3-4-5)이 1례 및 2례 관찰되었다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치군에서는 배양한 12마리의 모든 배자에서 여러가지의 형태 이상이 관찰되어 매체대조군에 비해 통계학적 유의성이 인정되었는데(Fig. 3-4-6, 3-4-7, 3-4-8), 난황낭 순환과 배자혈행의 이상 (Altered yolk sac and embryonic circulation), 두개안면부의 저형성 (craniofacial hypoplasia) 및 회전 이상이 각각 12례, 아가미궁의 결손 (branchial arch defects)이 7례, 신경관 개열이 6례, 지아의 저형성 (limb bud hypoplasia)이 5례, 체절의 비틀림 (kinked somite)이 4례, 심장관과 심낭막의 비대 (enlarged cardiac tube and pericardium)가 3례, 안포결손 (missing optic vesicle)과 꼬리의 뭉뚱함 (blunted tail)이 2례씩 나타났다.

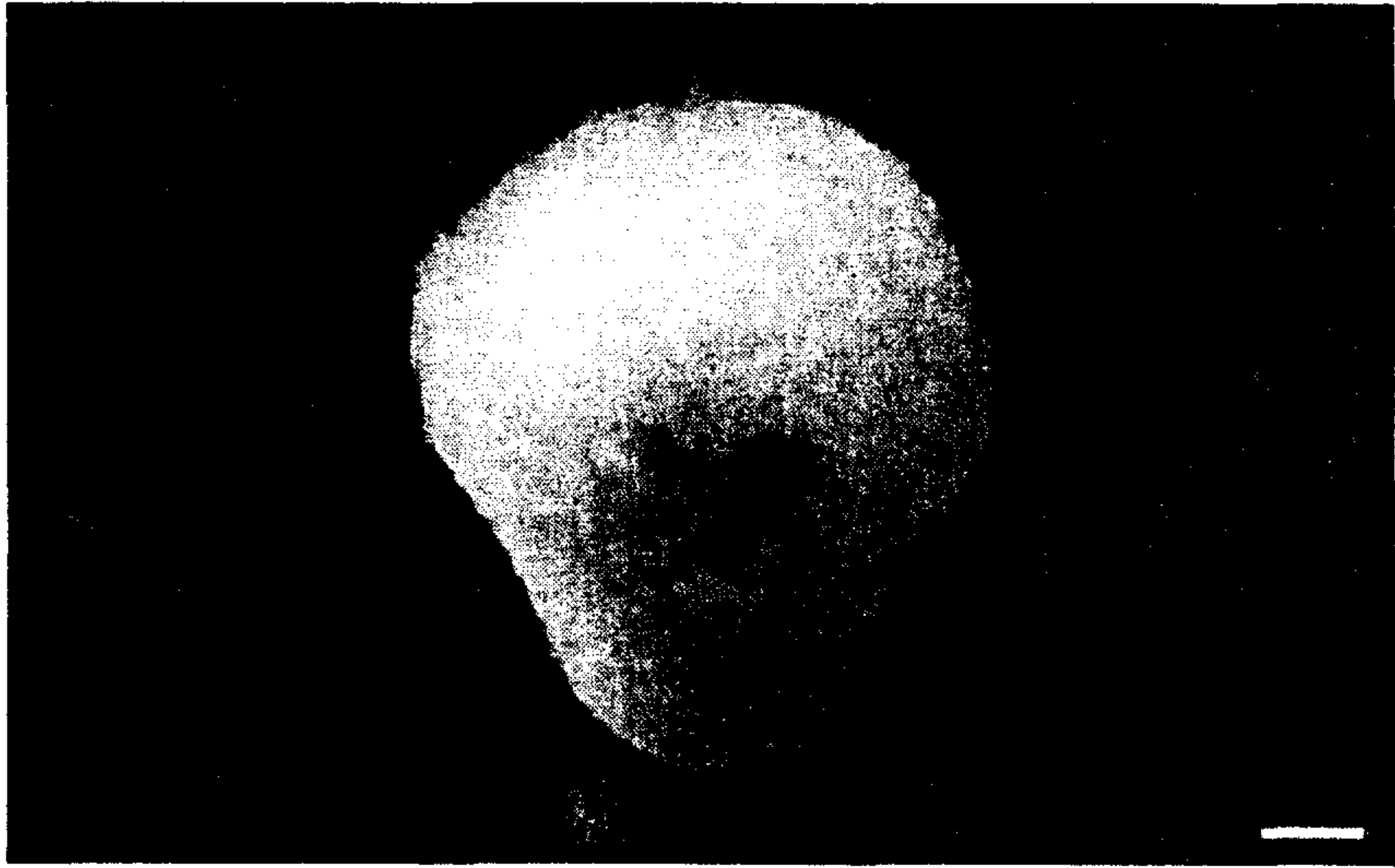


Fig. 3-4-1. Photograph of a GD 9.5 rat decidua removed from uterus. Scale bar is 1mm.

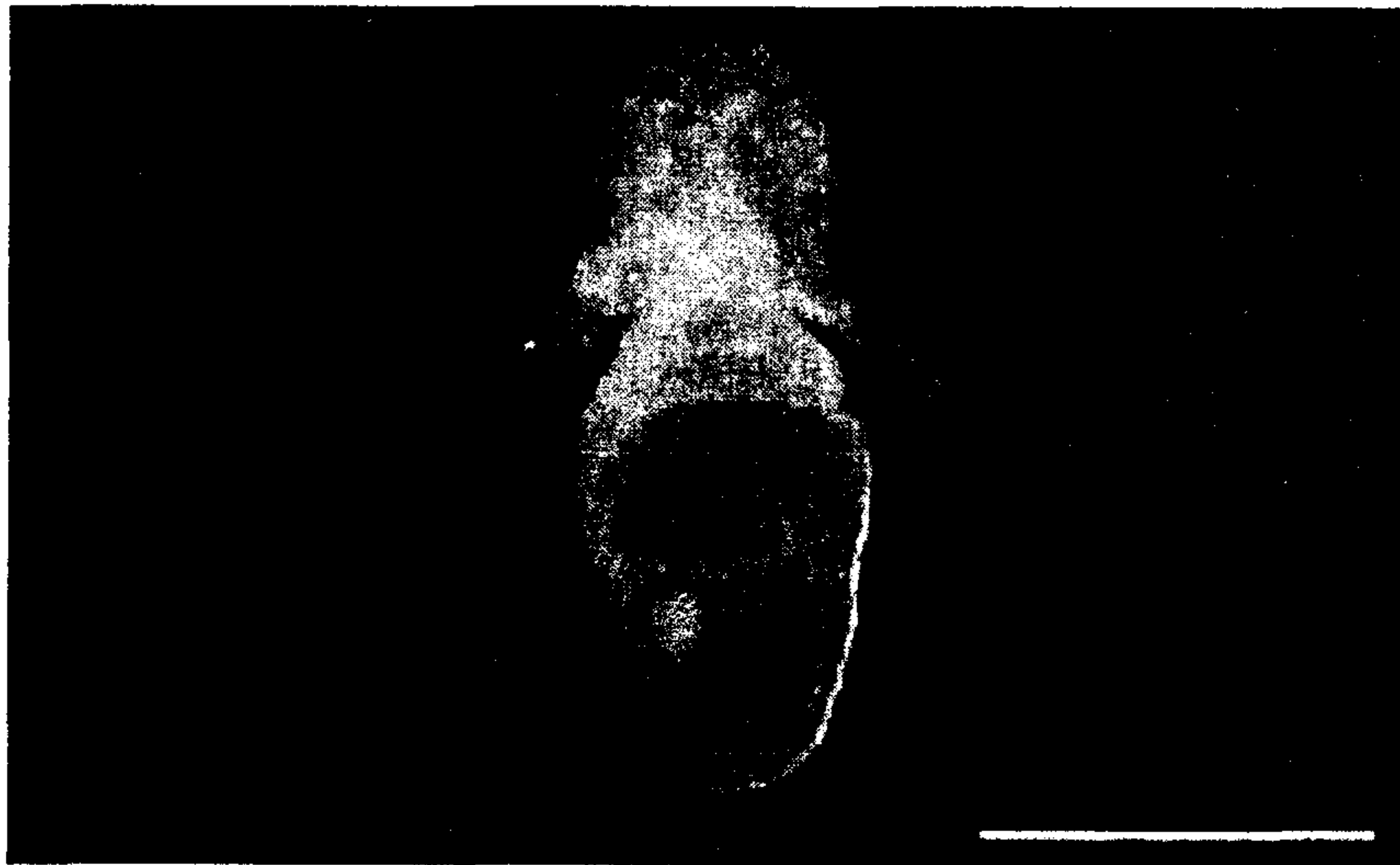


Fig. 3-4-2. Photograph of a GD 9.5 rat conceptus. Reichert's membrane has been torn open. The embryo is in head-fold stage. Scale bar is 1mm.

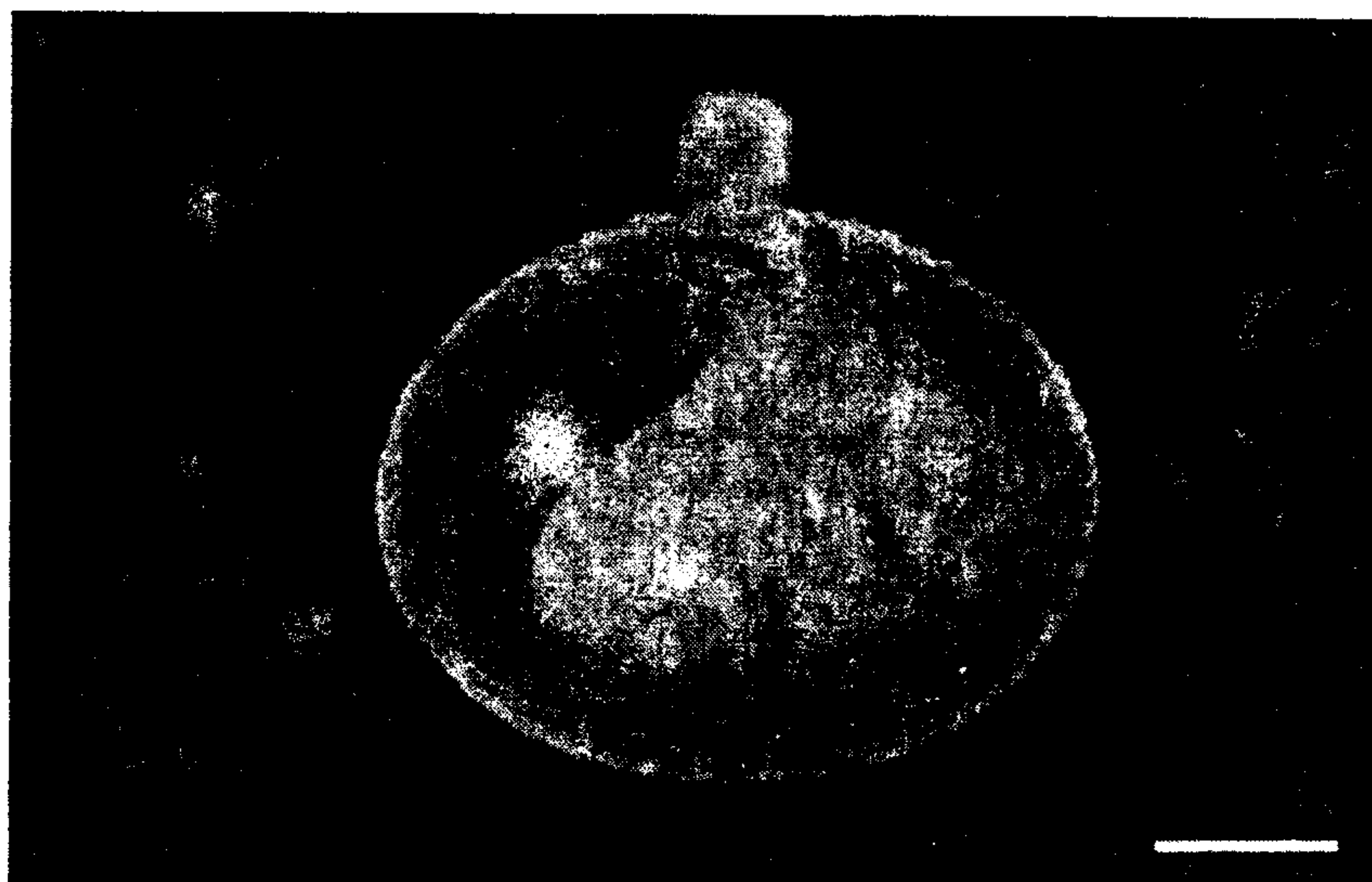


Fig. 3-4-3. Photograph of a control conceptus, showing normal appearance. Scale bar is 1mm.

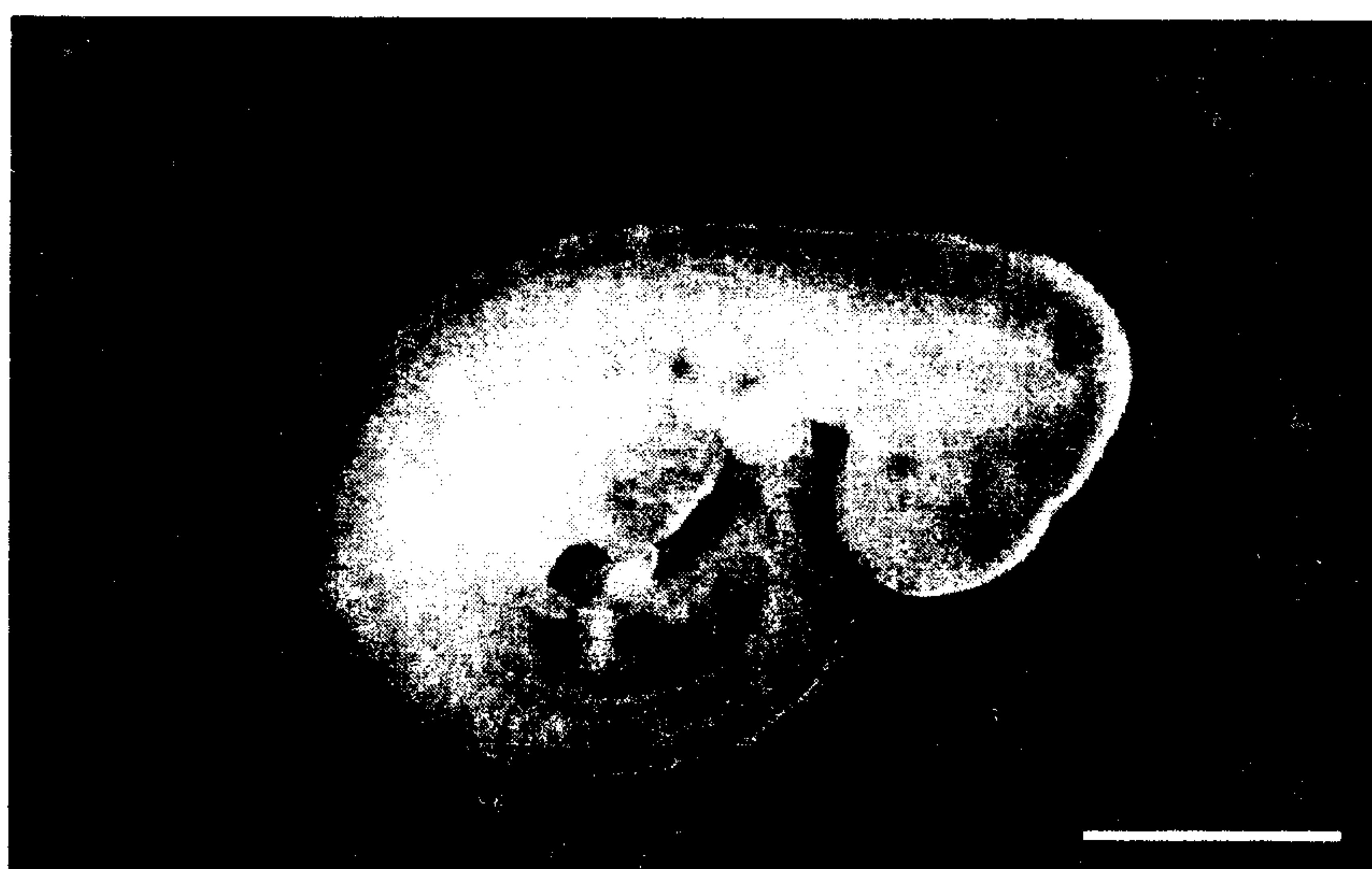


Fig. 3-4-4. Photograph of a control embryo, showing no abnormalities. Scale bar is 1mm.

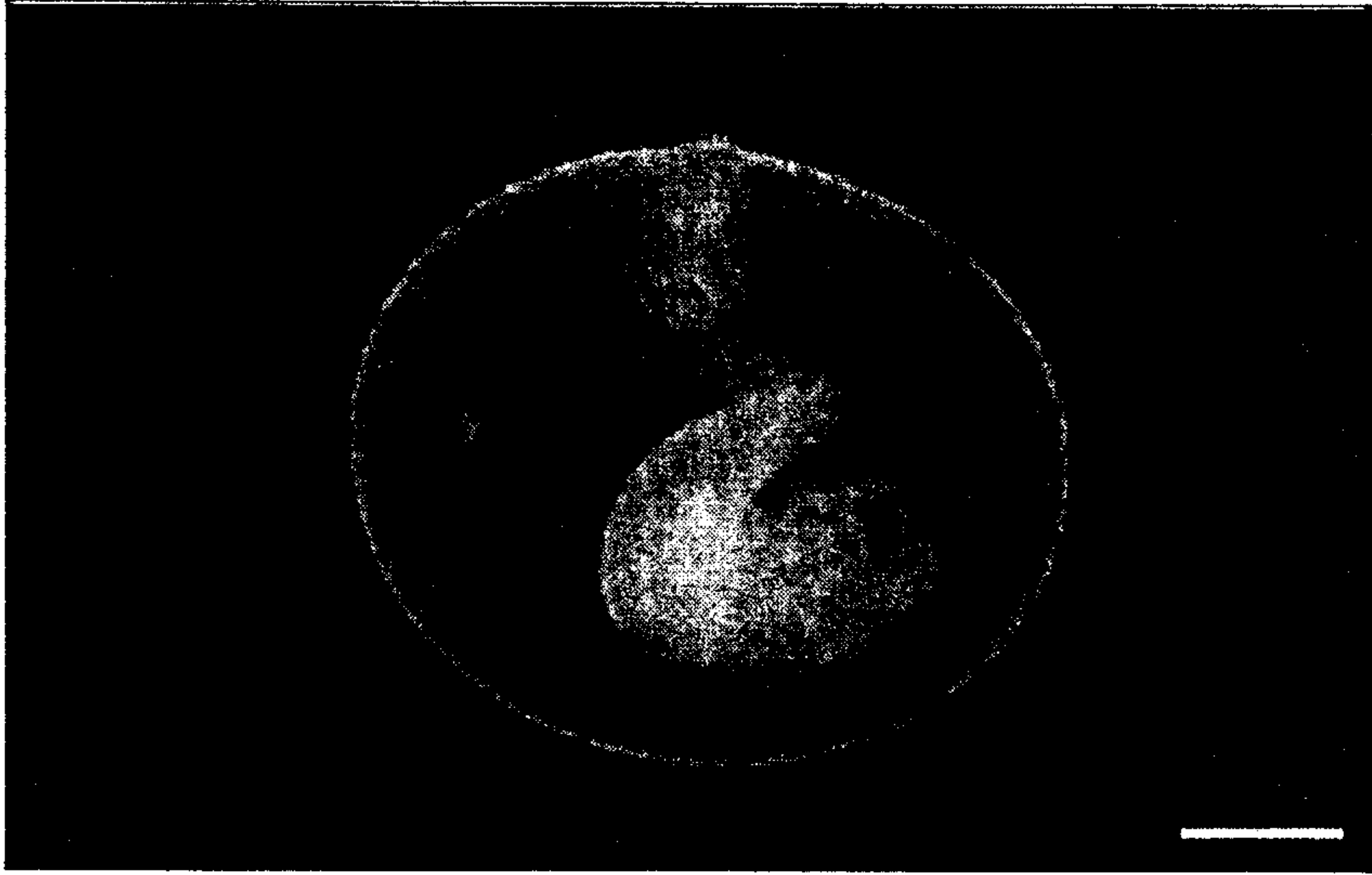


Fig. 3-4-5. Photograph of a conceptus treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ PHT, showing abnormal rotation. Scale bar is 1mm.

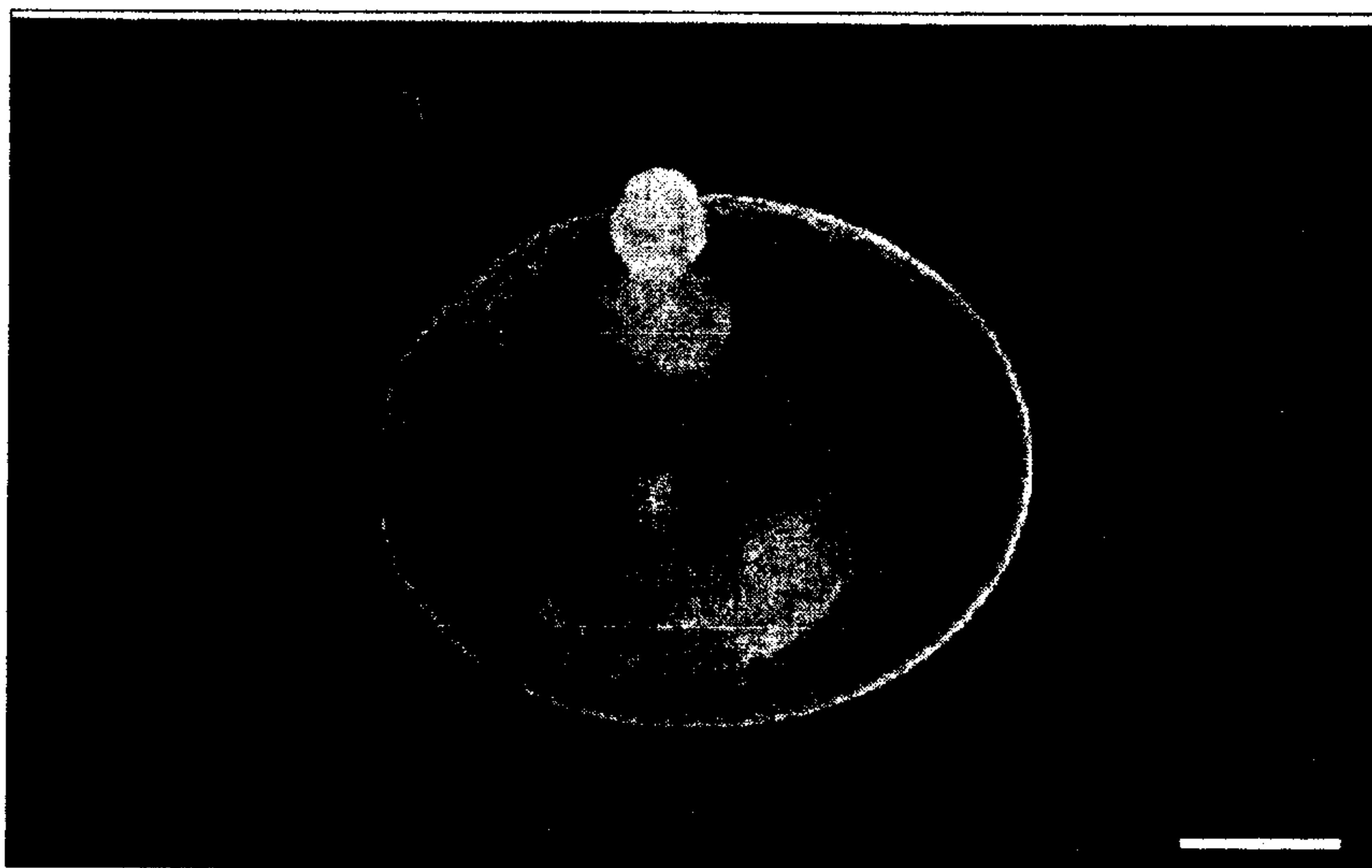


Fig. 3-4-6. Photograph of a conceptus treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ PHT, showing altered yolk sac and embryonic circulation. Scale bar is 1mm.



Fig. 3-4-7. Photograph of a embryo treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHT, showing growth retardation, abnormal rotation, craniofacial hypoplasia, missing optic vesicle, enlarged cardiac tube, open caudal neuropore, limb bud hypoplasia, and blunted tail. Scale bar is 1 mm.

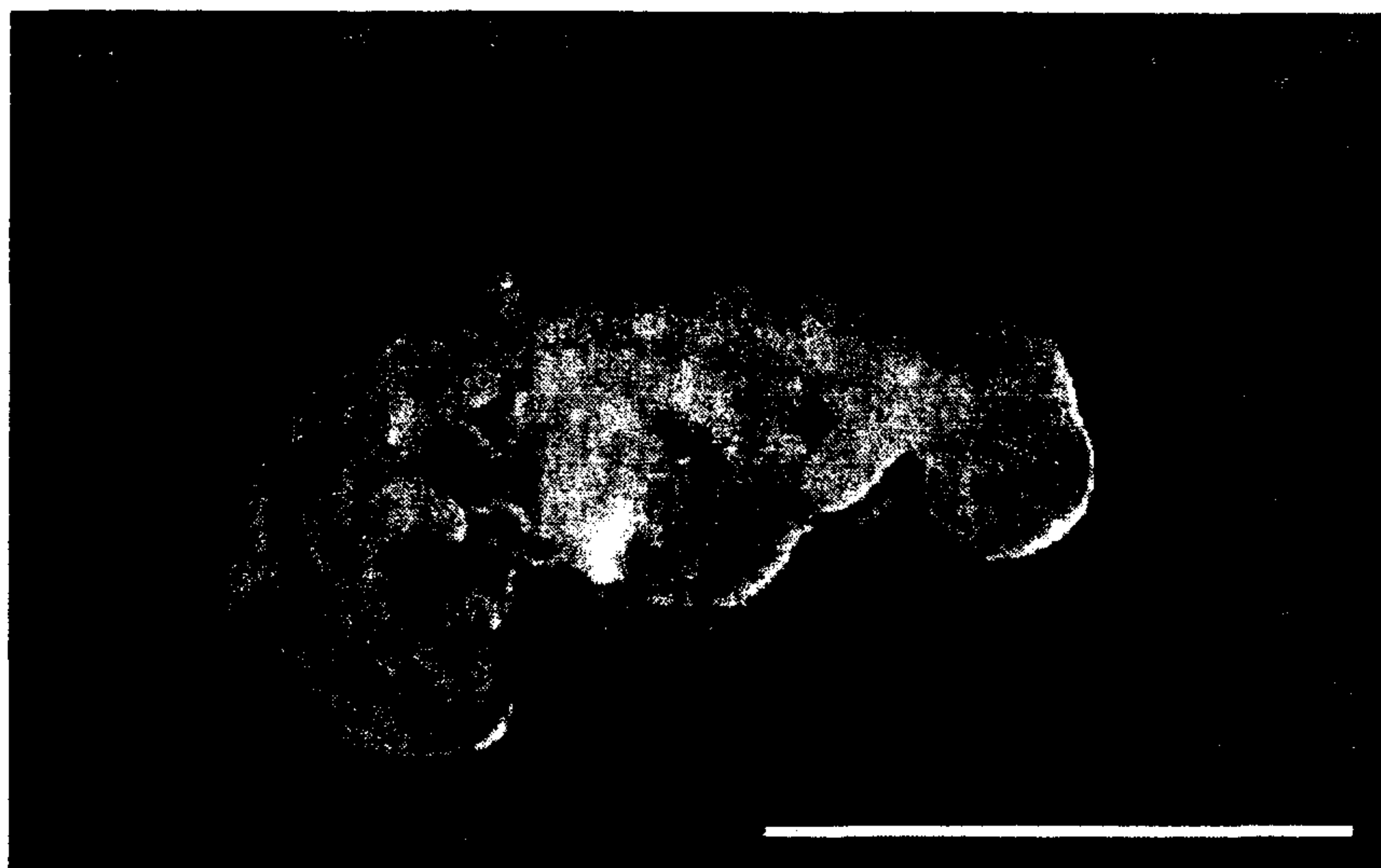


Fig. 3-4-8. Photograph of a embryo treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHT, showing growth retardation, abnormal rotation, craniofacial hypoplasia, absence of the second branchial bar, limb bud hypoplasia, enlarged cardiac tube and pericardium, and blunted tail. Scale bar is 1 mm.

Table 3-4-1. Embryonic growth parameters and morphogenesis of rat whole-embryos grown from GD 9.5 for 48hrs *in vivo* and *in vitro*.

Parameters	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Number of embryos examined	20	20
Yolk sac diameter (mm): Max.	3.90 ± 0.14	3.91 ± 0.30
Min.	3.51 ± 0.14	3.59 ± 0.24
Crown-rump length (mm)	3.24 ± 0.28	3.18 ± 0.30
Head length (mm)	1.54 ± 0.12	1.53 ± 0.17
Number of somite pairs	22.42 ± 1.78	22.36 ± 2.16
Morphological score (points)	54.42 ± 1.44	53.91 ± 1.58
Protein concentration (µg/embryo)	286.7 ± 25.3	273.2 ± 32.8

Values are mean ± S.D.

Table 3-4-2. Effects of *in vitro* exposure to PHT on embryonic growth and differentiation of GD 11.5 rat embryos explanted on GD 9.5 and cultured 48hrs.

Parameters	Phenytoin concentration (µg/ml)			
	Control	25	50	100
No. of embryos examined	11	11	11	12
No. of viable embryos	11	11	11	12
Yolk sac diameter (mm): Max.	4.07 ± 0.37	4.05 ± 0.37	3.84 ± 0.30	3.62 ± 0.40**
Min.	3.74 ± 0.42	3.72 ± 0.30	3.52 ± 0.22	3.32 ± 0.34*
Crown-rump length (mm)	2.93 ± 0.30	2.95 ± 0.30	2.92 ± 0.28	1.91 ± 0.27**
Head length (mm)	1.37 ± 0.16	1.35 ± 0.18	1.36 ± 0.19	0.80 ± 0.12**
No. of somite pairs	22.91 ± 1.38	22.73 ± 1.42	23.00 ± 2.00	19.16 ± 3.74**
Morphological score (points)	55.01 ± 2.41	55.00 ± 1.73	54.44 ± 1.33	38.75 ± 0.50**
Protein concentration (µg/embryo)	254.2 ± 28.6	247.2 ± 34.9	245.2 ± 34.3	115.7 ± 21.9**

Values are mean ± S.D. * and ** indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels when compared with the control group.

Table 3-4-3. Morphological defects induced by *in vitro* exposure to PHT in GD 11.5 rat embryos explanted on GD 9.5 and cultured 48hrs.

Parameters	Phenytoin concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	Control	25	50	100
No. of embryos examined	11	11	11	12
No. of embryos with anomalies	1 (9.1)	1 (9.1)	2 (18.2)	12 (100)**
Altered yolk sac and embryonic circulation	0	0	0	12
Abnormal axial rotation	1	1	2	12
Craniofacial hypoplasia	0	0	0	12
Missing optic vesicle	0	0	0	2
Branchial arch defects	0	0	0	7
Neural tube schisis	1	0	0	6
Enlarged cardiac tube and pericardium	0	0	0	3
Kinked somite	0	0	0	4
Limb bud hypoplasia	0	0	0	5
Blunted tail.	0	0	0	2

** indicates significant difference at $P < 0.01$ level when compared with the control group.

4. 고찰 및 결론

발생독성의 평가시 많이 이용되고 있는 실험동물인 랫드는 임신기간이 21일로서 수정이 이루어지면 수정란이 포배 (blastocyst)가 된 후 임신 5~6일경에 착상이 이루어 진다. 임신 7~8일에는 원시양막강 (proamniotic canal)과 외배엽, 내배엽의 2중층으로 구성된 난원통형기 (egg cylinder stage)로 분화되고 8~9일에는 양막강 (amniotic cavity)의 확대와 융모막 (chorion), 양막 (amnion)이 형성되는 원시선조기 (primitive streak stage)로 성장한다. 임신 9일에서 13일은 뇌 형성 단계에 이어 심혈관계 (cardiovascular system), 아가미궁 (branchial arches), 체절 (somite), 중추신경계 (central nervous system) 등 주요기관들을 형성하게 되는데,⁸⁾ 이 시기가 발생단계에서 가장 중요한 기간으로 생체이물 (xenobiotics)에 대해 매우 민감한 시기이다. 따라서 발생독성의 평가시 실험동물을 이용한 초기형성 시험에서는 주요기관형성기인 임신 6일에서 16일까지 시험물질을 투여하여 기형유발성을 검사하며, 또한 전배자배양시험에서도 생체내에서와 유사한 성장결과를 얻을 수 있는 9.5일령의 배자를 주로 이용하고 있다

설치류를 이용한 배자배양법은 Cambridge 대학의 New 등³⁾이 처음으로 보고한 후 그 가치를 인정받기 시작하였으며, 최근에는 화학물질에 대한 초기형성 유무를 소량으로 신속하게 판단하기 위한 일차검색방법으로서의 가능성에 대해 많이 연구되고 있다. 국내에서는 마우스⁹⁾와 랫드^{10,11)}를 이용한 전배자배양법이 소개된 바 있으나 아직까지 활발하게는 이용되지 못하고 있다. 본 실험실에서는 랫드 전배자배양법을 이용한 초기형성 평가방법을 확립하고자 임신 9.5일령의 전배자를 48시간 동안 배양하여 생체내에서와 거의 동일한 성장결과를 얻는데 성공하였다.

전배자배양시 배자를 성공적으로 배양하기 위해서는 여러가지 사항을 주의해야 한다. 특히 배양과정중에 오염이 발생하지 않도록 하여야 하는데, 사용하는 모든 기구는 멸균된 것을 사용하고 배양기기도 멸균상태를 유지하도록 해야 하며 임신동물을 개복할 때에는 clean bench내에서 복부를 알콜로 소독한 후 절개하여 자궁을 적출하도록 하여야 한다. 적출한 자궁에서 탈락막을 분리할 때는 배자가 손상되지 않도록 주의하여야 하며 탈락막에서 분리한 수태산물은 배자의 발생상태를 관찰하여 동일한 발생기를 나타내는 배자를 배양하여야 한다. 이

것은 동일령 배자뿐만 아니라 동복배자 (litter)들도 개체에 따라 발생상태에 상당한 변이가 있을 수 있으며¹²⁾ 발생기가 다른 배자를 배양할 경우 배양결과에 큰 차이가 있을 수 있기 때문이다. 설치류에 있어서 배자발생기의 분류는 Theiler¹³⁾의 발생기가 가장 보편적으로 사용되고 있는데, 발생기의 구분은 분명한 형태의 특징에 근거한 것으로서 배자의 연령이나 크기와는 크게 관계가 없다고 한다. 본 시험에서는 이 발생기를 개량한 Fujinaga 등¹⁴⁾의 분류를 따랐으며, 뇌형성 초기단계로서 머리주름기를 나타내는 11c기의 배자를 배양에 이용하였다.

수태산물을 배양할 때는 반드시 라이케르트막을 제거하여야 배양이 가능하다. 라이케르트막은 장측 난황낭 (visceral yolk sac)의 바깥쪽에 있는 얇고 투명한 세포성의 용모막 잔유물로서 외태반원뿔의 반대쪽에 작은 공간을 형성하고 있는데, 생체에서는 난황낭과 같은 비율로 성장하지만 배양시에는 거의 팽창하지 않기 때문에 난황낭과 배자가 정상적으로 성장하지 못하게 된다고 한다.¹⁵⁾ 라이케르트막을 제거할 때는 두개의 미세한 포셉을 이용하여 막의 양쪽을 잡고 외태반원뿔 부위까지 당겨서 찢어야 하며 이 과정에서 수태산물에 손상이 가지 않도록 주의하여야 한다.

자궁에서 배자를 채취한 후 배양을 시작할 때까지 소요되는 시간은 2시간 이내가 좋다고 한다. Kachilele와 New¹⁶⁾에 따르면 적출한 배자를 여러 온도에 놔 둔 후 배양했을 때 실온에서 적출후 2~3시간내에 배양을 시작해야 함을 보고한 바 있다. 또한 기관형성기중의 랫드 배자는 2시간에 약 1쌍의 체질이 증가하는 빠른 성장을 나타내기 때문에 되도록 빠른 시간내에 배양과 평가를 완료해야 한다.¹⁷⁾ 본 연구실에서는 숙달된 2명의 연구자가 2시간내에 모동물 3~4마리의 자궁을 적출하여 40~50마리의 배자를 배양할 수 있었다.

배양액은 랫드부터 채혈한 혈액을 즉시 원심분리하여 얻은 100%의 IC 혈청을 이용하였는데, IC 혈청에서 배자를 배양하면 채혈한 혈액이 응고된 후에 원심분리하여 얻은 DC (delayed centrifuged) 혈청에서 배양할 때보다 배자의 성장이 원활하고 이중심장 (double hearts) 등의 기형발생이 방지된다고 한다.¹⁸⁾ IC 혈청은 사용하기 전에 56 °C에서 40분간 열비동화하여야 하는데, 비동화된 혈청에서는 배자의 단백질 합성량이 증가하고 심장, 신경관, 요막 등의 이상이 감소한

다고 한다.³⁾ 채혈시 동물을 마취할 때 사용하는 에테르가 혈청내에 존재하게 되면 배양시 배자의 성장을 크게 억제하게 되는데, 혈청내에 용존하는 에테르가 휘발되도록 하기 위해서는 비동화 과정중 15분과 30분경에 배양시 사용하는 혼합가스를 혈청표면에 30초간 부드럽게 흘려 보내 주어야 한다.

상기한 바와 같이 배자의 채취 및 배양의 모든 단계에서 주의하여 48시간 동안 랫드 전배자를 배양하였을 때 배양한 모든 배자가 정상적으로 성장하였고 또한 배자의 형태, 발육, 분화정도 및 총단백질량도 동일령의 생체내 배자와 거의 동일함을 확인할 수 있었다.

Phenytoin (diphenylhydantoin)은 1938년에 처음 소개된 hydantoin 항전간제 (anticonvulsant agent)로서 약효가 뛰어나고 부작용이 적기 때문에 임상에서 일반적으로 많이 처방되고 있는 약제중의 하나이다. 그러나 생식독성학적 측면에서는 랫드, 마우스, 토끼, 고양이 등의 실험동물뿐만 아니라 사람에서도 최기형성이 보고된 바 있어서 특히 임신부에게 투약시에는 세심한 주의가 필요하다.¹⁹⁾ 간질병을 가진 임신부에게 투약할 경우 신생아의 선천성 기형의 발생빈도는 자연발생적인 빈도보다 2~3배가 높다고 하는데,²⁰⁾ Fetal hydantoin syndrome (FHS)로 알려진 특이한 기형소견을 나타내며 특히 두개안면부 이상 (craniofacial abnormality)과 말단 지절골 형성부전 (distal digital hypoplasia), 선천성 심장기형, 비뇨생식기와 중추신경계 이상 등이 많이 보고되어 있다.²¹⁾ 이러한 선천성 이상의 증가는 임신부의 질환인 간질병이나 또는 투약된 PHT에 의해서 유발된 것인지 아니면 이들에 의한 복합적인 원인에 기인된 것인지 명확하게 밝혀지지 않았으나²²⁾ 근래에는 PHT에 의해 최기형성이 유발된다는 많은 증거가 보고되고 있다. PHT의 최기형성 기전으로서는 엽산대사 장애, 비타민 K 대사이상, cytochrome P-450에 의해 반응성 독성 중간체의 생활성화, hydantoin 핵에서 유리기 중간체와의 보조산화, 배자의 심장에 저산소증 (hypoxia) 유발 등이 보고되어 있다.²³⁾

본 연구를 통해 확립된 전배자배양법을 이용하여 생체내 시험에서 최기형성 물질로 알려져 있는 phenytoin의 *in vitro* 최기형성 효과를 평가하였다. 매체대조군에서 관찰된 회전 이상과 신경관 개열은 이상의 정도와 빈도로 미루어 보아 자연발생적 또는 발육지연에 기인된 것으로 판단되며, 또한 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처

치균에서 소수레씩 관찰된 회전 이상은 대조군과 유사한 빈도로 나타나 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치농도는 랫드 배자에 무해한 것으로 나타났다. 반면 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치군에서는 모든 배자에서 머리엉덩이간 길이와 머리길이, 체질수, 형태학적 점수 및 총단백질량이 감소하여 배자의 발육지연효과를 관찰할 수 있었다. 또한 전 배자에서 형태학적 이상이 관찰되었으며, 난황낭 순환과 배자혈행의 이상, 두개안면부의 저형성, 회전 이상, 아가미궁의 결손, 신경관 개열, 지아의 저형성, 체질의 비틀림, 심장관과 심낭막의 비대, 안포결손 및 꼬리의 뭉뚱함 등이 높은 빈도로 나타났다. 본 시험의 랫드 배자에서 나타난 이상소견들은 사람의 Fetal hydantoin syndrome²¹⁾에서 주로 관찰되는 두개안면부 이상과 말단 지질골 형성부전, 선천성 심장기형, 비뇨생식기와 중추신경계 이상 등과 매우 유사한 형태를 나타내었다.

랫드 배자에 있어서 난황낭은 융모요막성 태반 (chorioallantois placenta)이 확립되기 전의 기간에 배자에 중요한 영양공급역할을 하게 되는데 일부 화학물질들은 임신동물에게 배자의 기관형성기 동안 투여하면 모체나 배자에 직접 작용하지 않고 난황낭의 구조와 기능에 장애를 주어 그 결과로서 배자의 성장과 분화에 영향을 끼치게 된다고 한다.²⁴⁾ 전배자배양에서는 난황낭이 배양배지에서 첨가된 시험물질에 직접적으로 노출되기 때문에 배양액에 첨가된 화학물질에 의해 유발된 부작용이 배자발달에 직접적 간섭으로 인한 것인지 아니면 난황낭 기능의 손상을 통하여 간접적으로 유발된 것인지 추론하기는 어렵다. 그러나 난황낭의 약한 발달이나 난황낭 순환의 이상은 배자의 퇴화를 일으키는 것으로 예상된다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처치군에서는 난황낭의 직경이 감소하였고 난황낭막의 혈관이 거의 관찰되지 않았는데 이러한 소견으로 미루어 보아 PHT의 처치에 의해 랫드 전배자의 난황낭의 발달이 저해되고 기능장애가 유발된 것으로 생각되며 이 결과가 배자의 발육지연과 형태이상을 유발하였는지는 추후 세밀한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

상기한 바와 같이 phenytoin을 랫드 전배자에 직접적으로 노출하였을 때 배자의 발육지연과 형태학적 이상이 유발되었으며 이러한 결과는 PHT가 간 대사 효소계의 영향없이 원물질 자체로서 랫드 전배자에 직접적으로 간섭하여 발생 독성을 일으킨 것을 암시해 주었다.

전배자배양법은 생체내 시험에 비해 보다 적은 수의 동물을 이용하여 많은 정보를 단기간내에 얻을 수 있으며, 시험조건을 목적에 맞게 정확히 조절할 수 있기 때문에 동물실험에서는 얻을 수 없는 정보도 얻을 수 있게 된다. 이러한 배양법은 배자의 주요기관이 형성되는 배양기간동안 연속적으로 관찰할 수 있기 때문에 기관형성기에 영향을 주는 독성물질의 작용기전을 규명할 수 있고, 배양배지에 원물질 (parent compounds) 또는 대사물질 (metabolites)을 노출시킴으로써 초기형성 물질의 기형발현이 체내의 간 대사효소계 (cytochrome P-450)의 영향을 받는지를 알아볼 수 있다. 그러나 전배자배양법은 정상적인 배자발달기간과 이용 가능한 실험동물이 제한되는 단점이 있다.²⁵⁾ 배양한 배자는 모체자궁에서 자라는 배자와 비교시 약 2~3일 정도만 형태학적 및 생화학적으로 유사한 발달결과를 나타내기 때문에 그 이상의 배양에는 많은 문제점이 있으며, 랫드와 마우스, 토끼 등 일부 실험동물의 배자만이 배양 가능한 실정이다. 또한 일부 화학물질들은 임신동물에게 배자의 기관형성기 동안 투여하면 모체나 배자에 직접 작용하지 않고 난황낭의 구조와 기능에 장애를 주어 그 결과로서 배자의 성장과 분화에 영향을 끼치게 되는데, 전배자배양에서는 난황낭이 배양배지에 첨가된 시험물질에 직접적으로 노출되기 때문에 배양액에 첨가된 시험물질에 의해 유발된 부작용이 배자발달에 직접적 간섭으로 인한 것인지 아니면 난황낭 기능의 손상을 통하여 간접적으로 유발한 것인지 추론하기는 어려우며, 또한 인간의 태아는 설치류의 난황낭 태반 (yolk sac placenta)과 같은 것을 가지고 있지 않기 때문에 동물실험평가지 주의해야 할 것으로 판단된다.

전배자배양법에는 상기한 바와 같이 여러가지의 장단점이 있는데, 기존 동물 시험의 대체법으로 유효화하기 위해서는 배양배자의 생존력 향상을 위한 연구가 필요하며 더 많은 화학물질에 대하여 *in vivo*와 *in vitro*의 비교실험, 종차 비교연구 등이 체계적으로 연구되어야 할 것으로 판단된다. 따라서 배양배자의 정상적 발달기간의 연장을 위한 발생생리학적 연구와 배자발달시기에 따른 외부 환경요건의 변화들을 단계적으로 규명하여 전배자배양에 응용한다면 기존 동물 시험법의 대체 수단으로서 유효하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

5. 참고문헌

- (1) Speirs AL (1962) : Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*, 1 : 303-305.
- (2) Taussing HB (1962) : A study of the German outbreak of phocomelia. The thalidomide syndrome. *JAMA*, 180 : 1106-1114.
- (3) Balls M and Clothier R (1983) : Differentiated cell and organ culture in toxicity testing. *Acta Pharmac Tox*, 52(Suppl 2) : 115-137.
- (4) New DAT (1978) : Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol Rev*, 53 : 81-122.
- (5) Sadler TW (1979) : Culture of early somite mouse embryos during organogenesis. *J Embryol Exp Morphol*, 49 : 17-25.
- (6) Van Maele-Fabry G, Delhaise F and Picard JJ (1990) : Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. *In vitro*, 4:149-156.
- (7) Bradford MM (1976) : A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anat Biochem*, 72 : 248-254.
- (8) Witschi E (1962) : Development: Rat. pp. 304-314. in : *Biological Handbooks: Growth Including Reproduction and Morphological Development*. Altman PL and Dittmer DS eds, Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington.
- (9) Kwon SC, Byun TH and Lee SH (1995) : *In vitro* teratogenicity of TCDD in mouse postimplantation embryos at 7 1/2 and 8 1/2 days of gestation. *Korean J Toxicol, Proceedings*, pp. 18.
- (10) 한순영, 신재호, 권석철, 강명옥, 이유미, 김판기, 양미라, 박귀례, 장성재 (1995) : 효소유도제 및 glutathion이 전배자배양된 랫드 태자에서 cyclophosphamide의 독성에 미치는 영향, *한국독성학회지*, 11 : 31-36.
- (11) 박형우, 이혜정, 설은영, 유병기 (1996) : 흰쥐의 배자배양에서 배양온도의 변화에 의해 유도된 apoptosis I. 발생 9일 흰쥐 배자의 배양, *대한해부학회지*, 29 : 409-418.

- (12) Fujinaga M, Jackson EC and Baden JM (1990) : Interlitter variability and developmental stage of day 11 rat embryos produced by overnight and morning short-period breeding regimens. *Teratology*, 42 : 535-540.
- (13) Theiler K (1989) : *The house mouse: Atlas of embryonic development*. Springer-Verlag, New York.
- (14) Fujinaga M, Jackson EC and Baden JM (1992) : Comparison of staging systems for the gastrulation and early neurulation period in rodents: a proposed new system. *Teratology*, 46 : 183-190.
- (15) New DAT and Stein KF (1964) : Cultivation of post-implantation mouse and rat embryos on plasma clots. *J Embryol Exp Morphol*, 12 : 101-111.
- (16) Kachilele SG and New DAT (1988) : Effects of temporary cooling, and of different explantation and storage conditions, on the subsequent development of post-implantation rat embryos *in vitro*. *Teratology*, 38 : 381-387.
- (17) Brown NA (1990) : Routine assessment of morphology and growth: scoring systems and measurements of size. pp. 93-108. in : *Postimplantation Mammalian Embryos, A Practical Approach*. Copp AJ and Cockroft DL eds, IRL Press, Oxford.
- (18) Steele CE and New DAT (1974) : Serum variants causing the formation of double hearts and other abnormalities in explanted rat embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 31 : 707-719.
- (19) Finnell HR and Dansky LV (1991): Parental epilepsy, anticonvulsant drugs, and reproductive outcome: Epidemiologic and experimental findings spanning three decades; 1: animal studies. *Repro Toxicol*, 5 : 281-99.
- (20) Speidel BD and Meadow SR (1972): Maternal epilepsy and abnormalities of the fetus and newborn. *Lancet*, 2 : 839-43.
- (21) Hanson JW (1986): Teratogen update: Fetal hydantoin effects. *Teratology*, 33:349-53.

- (22) Janz D (1982): Antiepileptic drugs and pregnancy: Altered utilization patterns and teratogenesis. *Epilepsia*, 23(Suppl. 1) : S53-S63.
- (23) Danielsson BR, Azarbayjani F, Skold AC and Webster WS (1997): Initiation of phenytoin teratogenesis: Pharmacologically induced embryonic bradycardia and arrhythmia resulting in hypoxia and possible free radical damage at reoxygenation. *Teratology*, 56 : 271-281.
- (24) Beckman DA, Koszalka TR, Jensen M and Brent RL (1990) : Experimental manipulation of the rodent visceral yolk sac. *Teratology*, 41 : 395-404.
- (25) New DAT (1990) : Whole-embryo culture, teratogenesis, and the estimation of teartogenic risk. *Teratology*, 42 : 635-642.

제 4 장 중동물을 이용한 일반 및 특수독성 시험법의 확립 및 보완

제 1 절 중동물을 이용한 독성시험에서의 시험물질 용량설정기술의 적용

1. 서 론

신약을 비롯하여 화학물질을 개발하는데는 전임상단계로서 동물을 이용한 약리시험 및 안전성평가 과정을 필수적으로 수행하게 되며, 미국의 FDA, 유럽의 OECD, 일본의 후생성 등에서는 이미 오래 전부터 인체에 좀 더 근접한 안전성평가 자료를 얻기 위해 설치류 뿐만 아니라 비설치류에 대한 독성시험자료를 요구하고 있다. 특히 개나 원숭이 등과 같은 비설치류가 실험동물로서 각광받고 있는 것은 이미 보편화된 국제적인 추세로서 국내에서도 그 중요성이 인정되기 시작하여 국립보건안전연구원 제 94-3호 '의약품등의 독성시험 기준(1994. 4. 14)'에 비설치류에 대한 독성시험 항목을 포함시키게 되었다. 비설치류를 이용한 독성연구에는 주로 beagle 견이 전 세계적으로 보편화 되어 이용되고 있는데, 그 이유는 일반적인 기초자료가 풍부하기 때문에 시험결과의 해석 및 평가가 용이하므로 FDA, OECD 및 일본후생성에서 비설치류의 안전성평가 연구를 적극 권장하고 있다.

약물동태학(pharmacokinetics, PK)은 약물의 독성평가 또는 약효점정을 위해 필수적으로 요구되는 생체내 약물의 흡수, 분포, 대사 및 배설(ADME) 과정을 속도론적으로 규명하고자 하는 연구분야의 하나다. 독성평가에 있어서 약물의 대량노출에 대한 PK연구를 독성동태학(toxicokinetics, TK)로 표현하기도 하는데 미국, 일본, 유럽공동체의 의약품규제기관과 제약산업체의 전문가들로 구성된 ICH에서도 독성시험에 있어서 TK의 적용이 심도있게 논의되어 최근 각국에 가이드라인으로 채택되고 있는 실정이다. 우리나라에서도 물질특허제도 도입후 몇 개의 후보물질이 도출되어 있는 단계에 있으나 아직 TK이론에 근거하여 독

성시험을 실시하고 있다고 보기에는 미약한 형편이 아닐 수 없다. 선진국에서의 제약 허가시 많은 어려움이 예상되고 있을 뿐 아니라 TK연구에 근거한 독성시험이 이루어져야만 신약개발 초기단계에서부터 시행착오 및 중복투자를 피할수 있을 것이다. 우리나라에서는 신약개발연구에서 설치류를 이용한 약효스크리닝의 일환으로 약물동태학적 개념에 의한 생물학적동등성시험 및 ADME는 비교적 넓게 인식되어 왔으나 비설치류 동물에서의 독성평가지관관련된 TK의 연구는 사실 전무한 상황이 아닐 수 없었다. 따라서 본 연구를 통해 국내에서도 TK연구에 대한 개념을 적극 도입하여 설치류동물 뿐 아니라 비설치류에서의 PK연구기술도 확립하여 전임상시험의 합리적인 계획 및 동물시험 결과에 대한 과학적 외삽, 그리고 타당한 독성용량의 설정 그리고 독성평가의 객관적, 이론적 근거를 제시하고자 한다. 나아가 국내의 독성시험의 PK연구 guideline이 근 시일내 정착될 수 있도록 방향도 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

중동물을 이용한 독성시험에 있어서 시험방법측정 및 보안을 위하여 본 연구 과제를 시험물질 K-580 및 그의 주요대사체를 대상으로 개의 혈중 분석법에 대해 Microbore-HPLC분석법을 이용하여 검토하였다. 시험물질 K-580 및 주대사물 SA, SM의 생체시료 혈청중의 정량분석을 위해 다음과 같은 조건에서 실시하였다. HPLC set-up조건은 UV detection system, microbore ODS column(2x250mm)을 이용하였으며 이동상은 0.02% TFA 수용액과 ACN의 혼합액을 사용하였다. 혈액시료는 혈청을 분리하여 methylene chloride 용매추출법을 이용하여 제단백 및 정제를 하여 분석하였으며 주입량은 10 μ l로 하였으며유속은 1.0ml/min으로 하였다. 분석파라미터로 process std recovery, detection limit를 K-580, SA 및 SM에 대해 각각 검토하였다. 재료 및 시약은 모두 analytical grade를 사용하였다. 시험물질과 대사물질에 대한 직선성 검토는 0.1-10 μ g/ml 농도범위에서 혈장에 첨가하여 검토하였다. linear-regression equation과 correlation coefficient는 least-squares method에 의해 산출하였다. 검량한계(detection limit)는 signal to noise ratio (S/N ratio)로부터 산출하였다.

동물은 Sprague-Dawley 랫드 (ca. 250g of body weight, 한국화학연구소 실험

동물실험)를 SPF조건하에서 사육하였으며 멸균수도수와 설치류용사료 (제일사료)를 자유급여시켰다. 혈액은 미정맥으로부터 채취하여 헤파린처리후 사용하였으며 원심분리후 상층액을 이용 HPLC 분석에 공하였다.

동태파라미터는 elimination rate constant(k_{el})은 모델 fitting으로부터, terminal phase elimination half-life ($t_{1/2}$)는 $0.693/k_{el}$ 로부터 산출하였다. Area under the plasma concentration-time curve (AUC)는 trapezoidal rule로 계산하였다.

3. 결 과

시험물질 K-580 및 그의 주요대사물을 개의 혈중 분석법을 통해 검토한 결과 소량의 시료를 이용한 동시정량분석의 Microbore-HPLC분석법을 개발하였다. 시험물질 K-580 및 주대사물 SA, SM을 대상으로 생체시료 혈청중의 정량분석으로 다음과 같은 조건에서 가장 좋은 결과를 얻었다. HPLC set-up조건은 UV detection system (WL 238nm)으로 microbore ODS column(2x250mm)을 이용하였으며 이동상은 0.02% TFA 수용액과 ACN의 혼합액을 사용하였다. 혈액시료는 혈청을 분리하여 methylene chloride 용매추출법을 이용하여 제단백 및 정제를 하여 분석하였으며 주입량은 10 μ l로 하였다. 분석파라미터로 process std recovery는 K-580, SA 및 SM에서 각각 56.24, 70.11, 85.07%로 나타났으며 detection limit는 K-580, SA 및 SM에서 각각 0.1, 0.2, 0.15ng/inj였다.

Fig. 4-1-1에서와 같이 농도의존적 피크반응의 상관관계도 각 용량에서 높은 직선성을 나타냈다. Dog혈중의 K-580 및 그 대사물을 검출하기 위한 예비시험으로 K-580을 50mg/kg 경구투여(n=1)하여 혈중대사체를 조사하여 본 바 대사체 SA가 현저한 농도로 검출되었으나 parent compound K-580은 detect되지 않았으며 대사체 SM도 투여후 30분의 혈액에서만 미량으로 검출되었다. 따라서 본 연구에서는 K-580의 주대사체 SA를 중심으로 연구를 수행하였는데 SA는 이미 잘 알려진 물질로서 여러 독성이 있음이 보고되고 있어 연구의 독성학적 의미가 크다고 판단되었다.

이상의 분석조건을 이용하여 단회 및 반복투여, 그리고 장기 투여후의 혈중 동태실험을 수행하였는데 독성동태론적으로 분석하기에 충분한 결과를 얻었다 (Fig. 4-1-2~4-1-4). 4주간의 반복투여독성시험(S-456)의 결과를 참고로 하여 K-580의 만성독성시험에서의 용량(8.3, 20 및 50mg/kg)을 설정하였는데 반복투여에 따른 용량별 주대사체 SA의 혈중축적성과 steady-state 도달시점에 관한 kinetics를 비교검토하였으며 단회투여 및 3개월, 6개월간 투여후에 시간에 대한 농도 추이도 조사하여 SA에 대한 kinetic parameter AUC_{0-24hr} , C_{max} , T_{max} , k_{el} , 및 $t_{1/2}$ 를 산출하여 독성동태론적으로 장기반복투여에 대한 효과 그리고 용량상관성의 대사체의 비선형성동태발현을 비교 검토한 결과 Fig. 4-1-5~4-1-9와 같다.

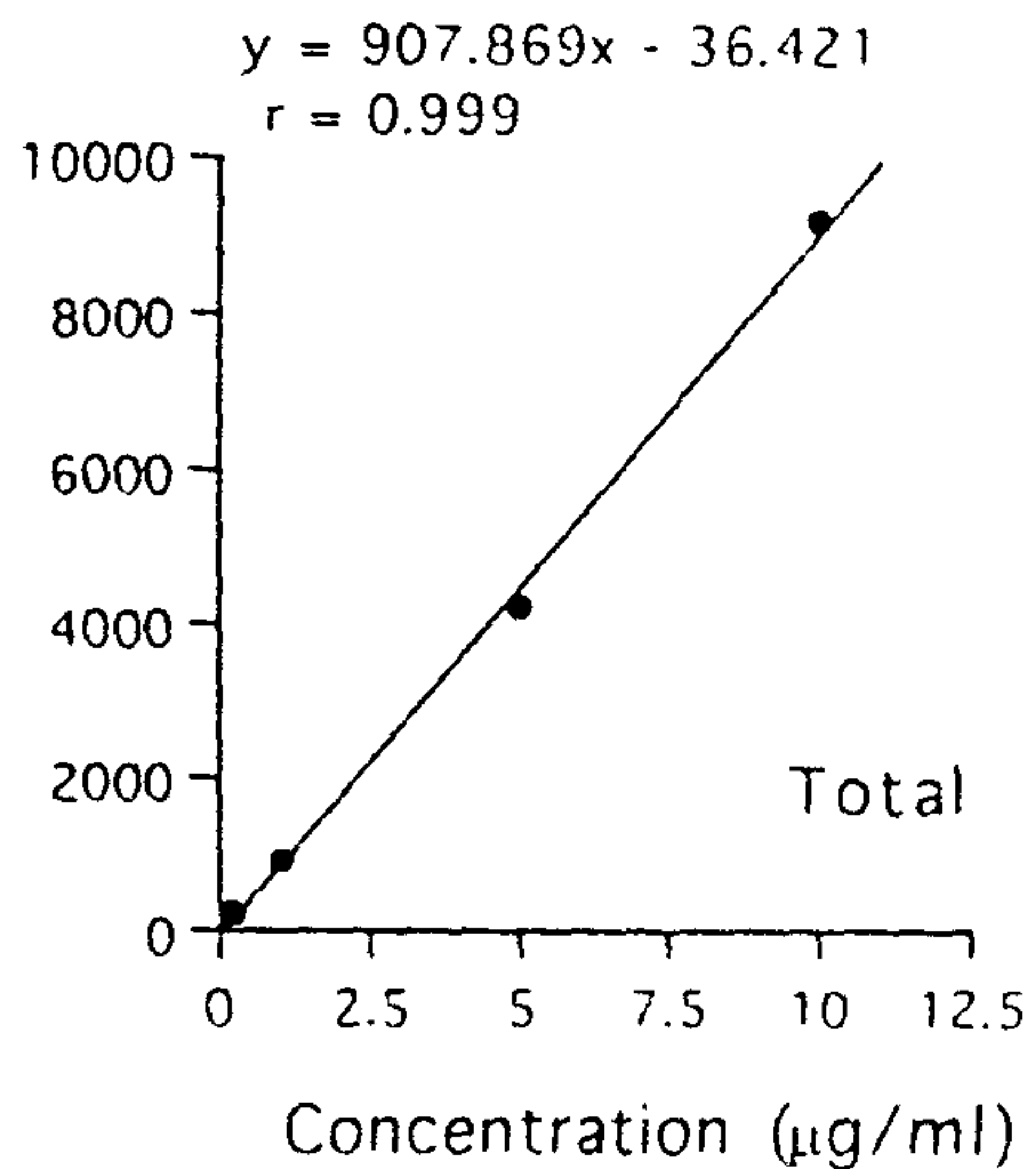
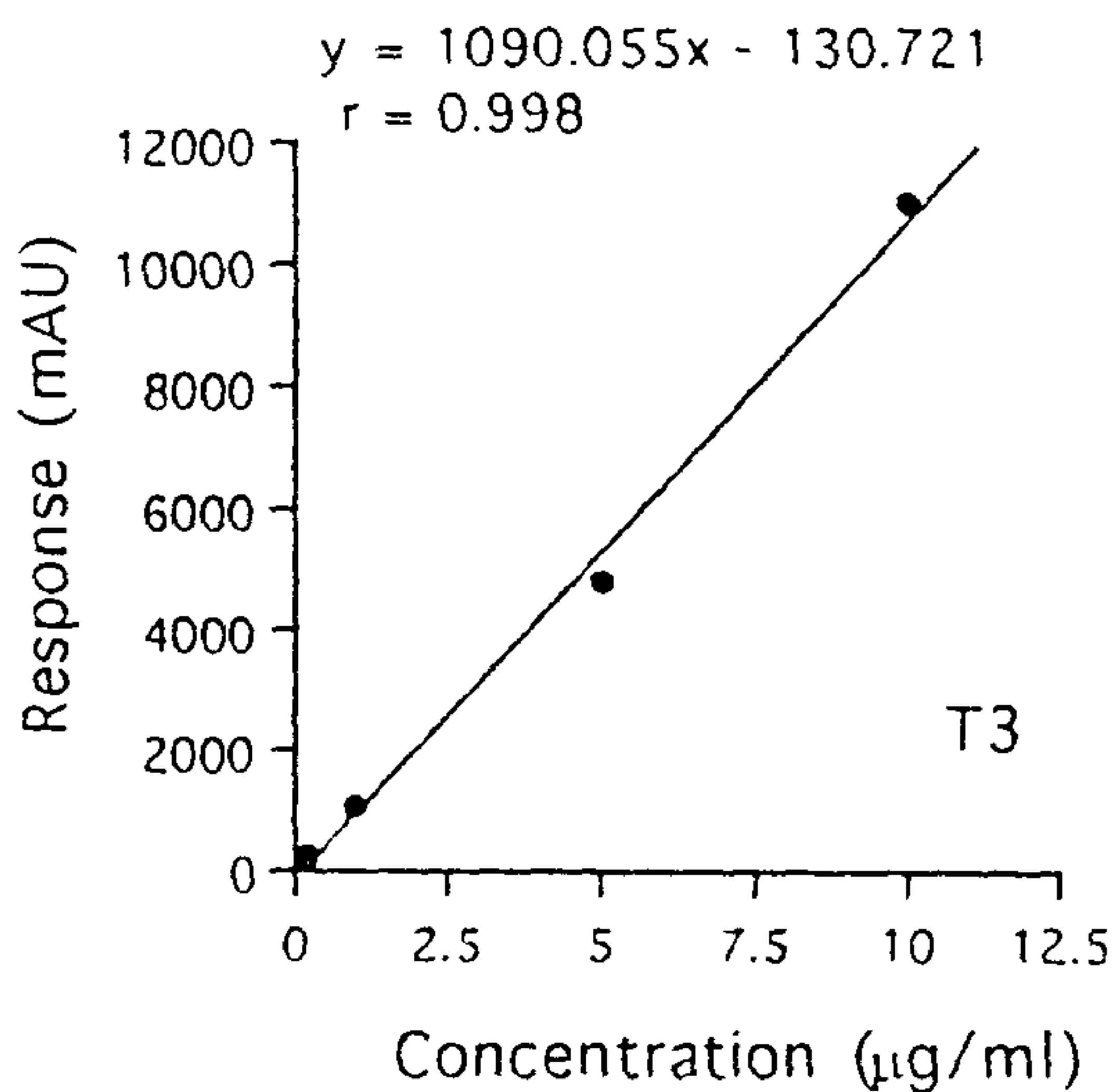
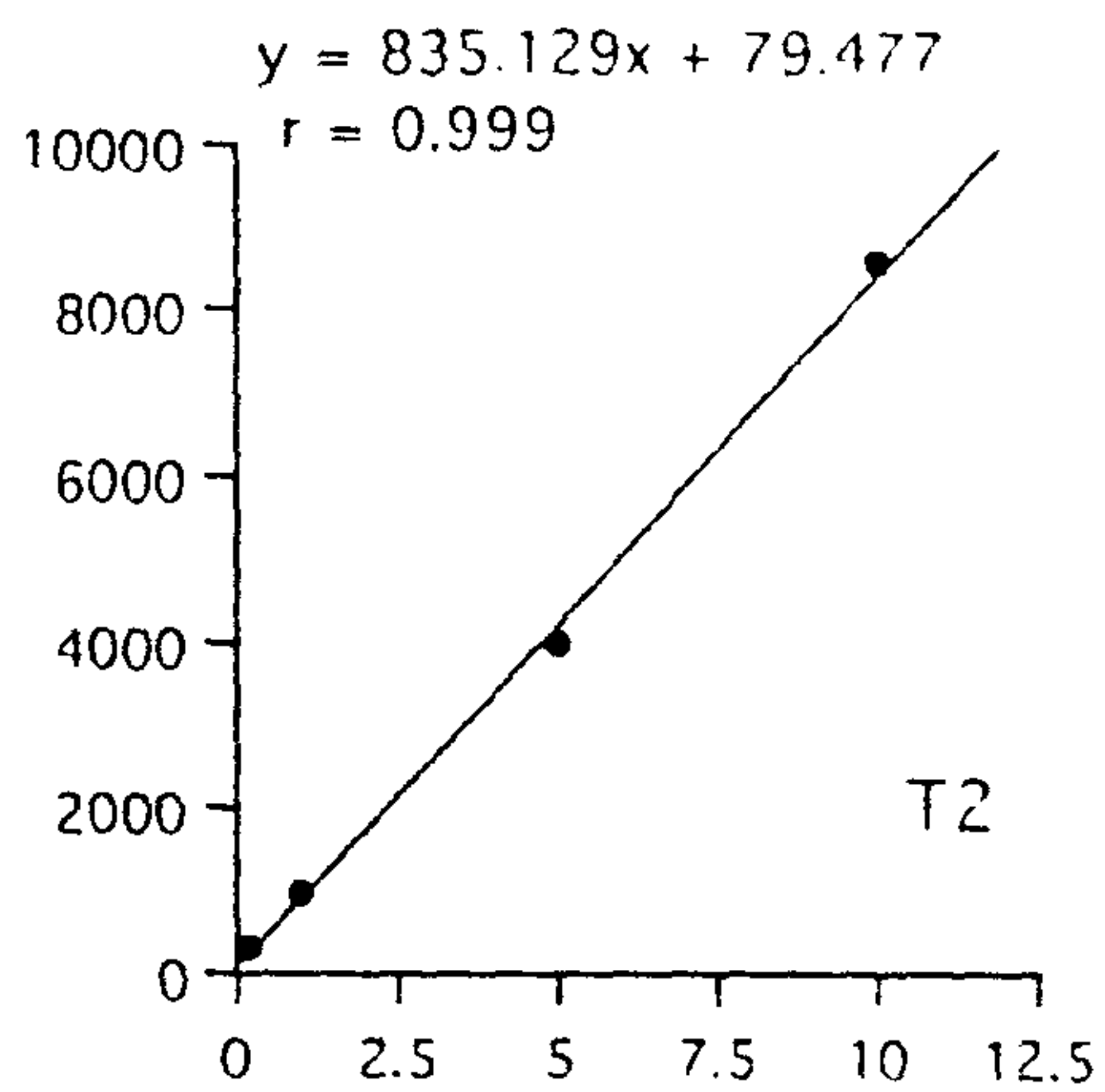
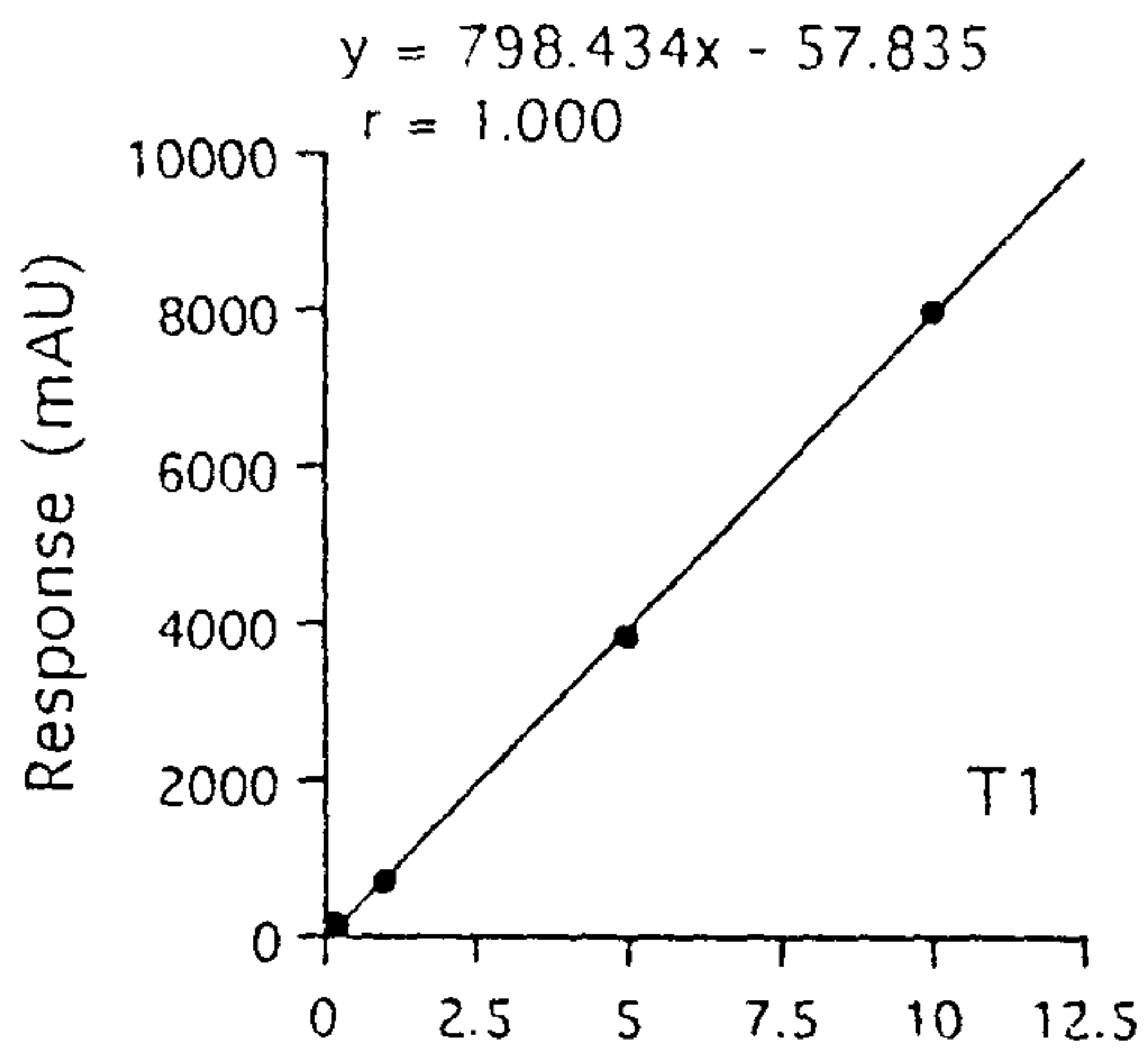


Fig. 4-1-1. Linearity for the standard SA spiked in the plasma by HPLC analysis.

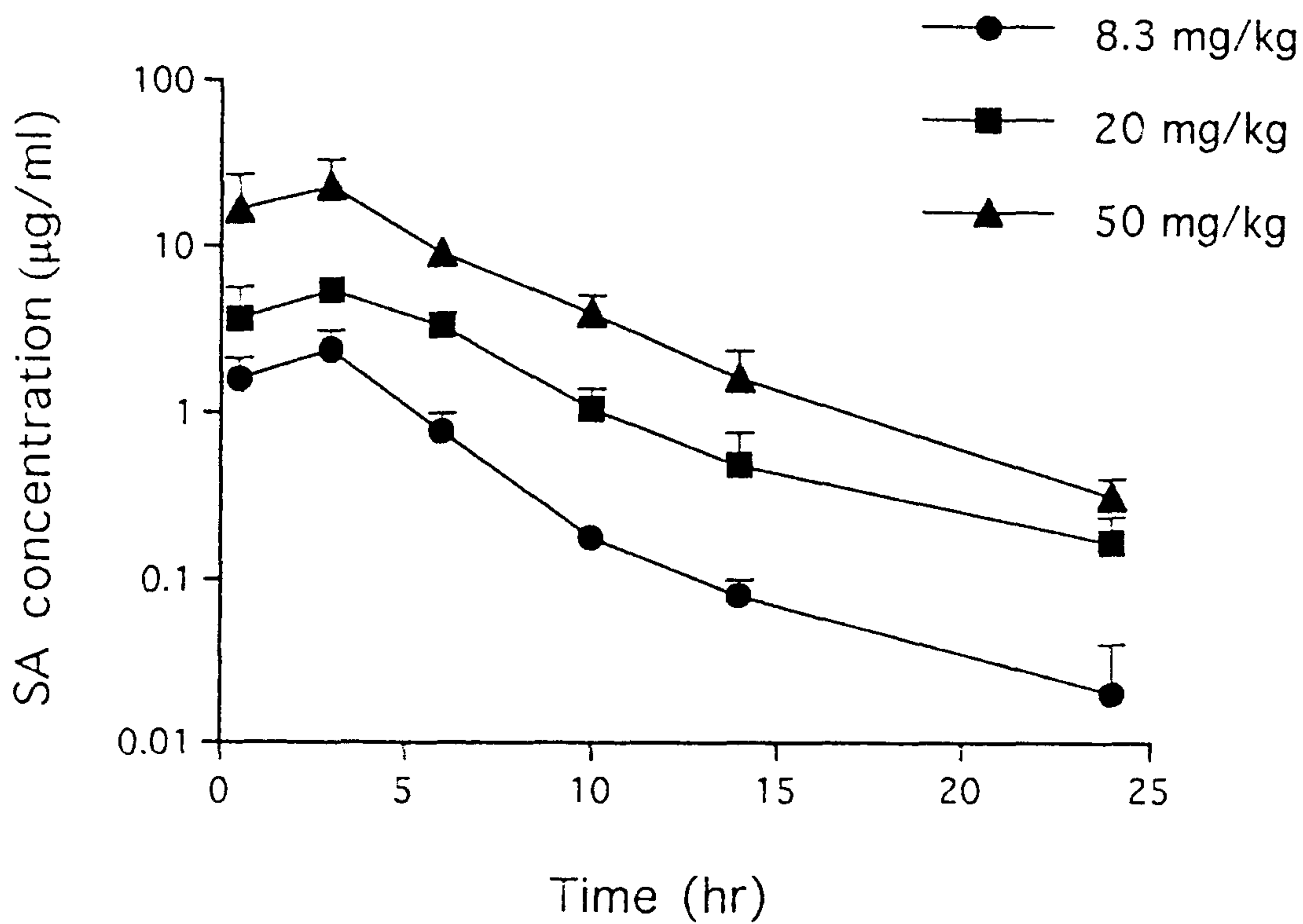


Fig. 4-1-2. Serum concentration curves of SA after the oral single administration of K-580 to the beagle dogs. Each point represents the mean \pm SE of three dogs.

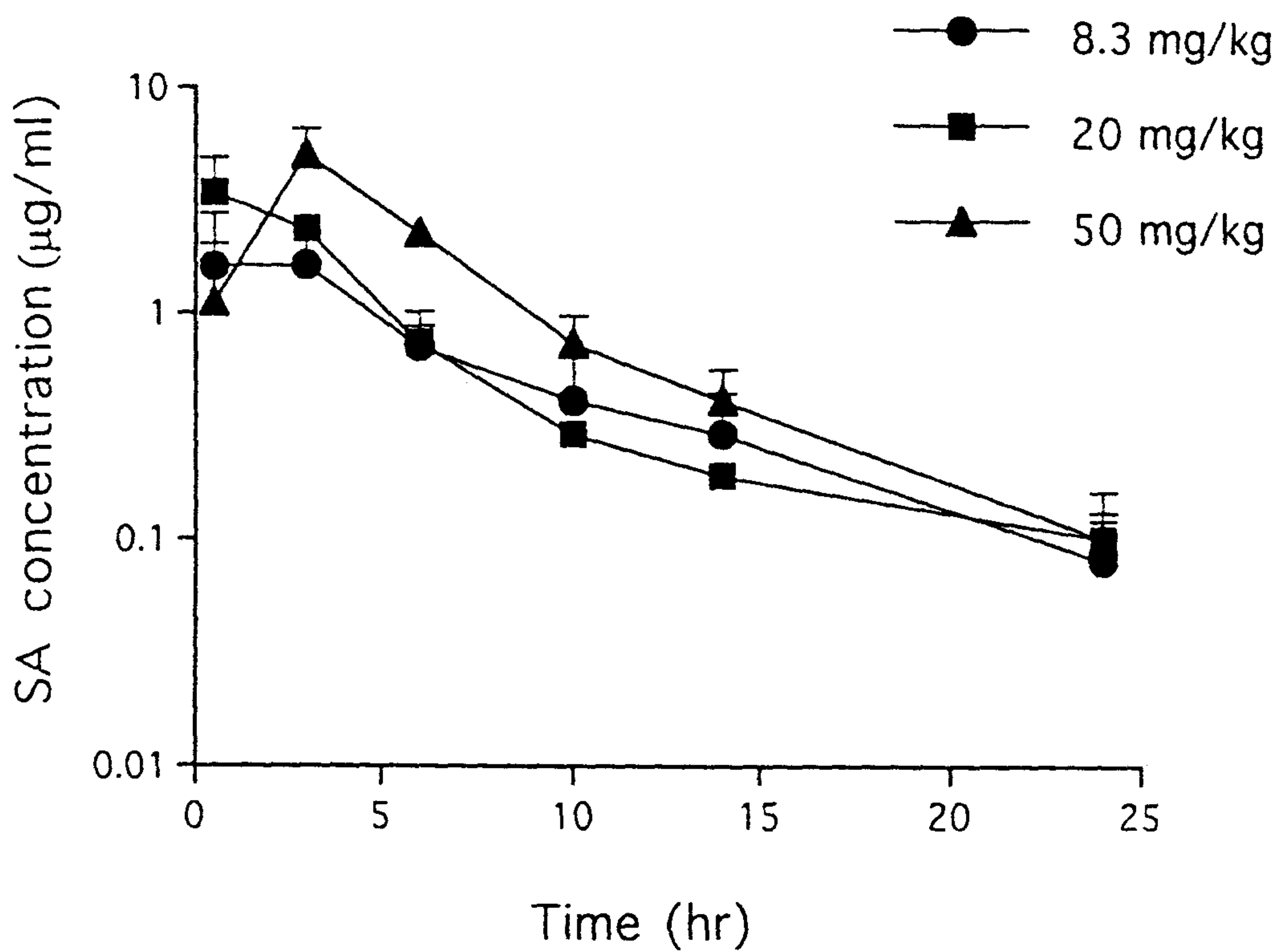


Fig. 4-1-3. Serum concentration curves of SA after the oral 3 month-repeated administration of K-580 to the beagle dogs. Each point represents the mean \pm SE of three dogs.

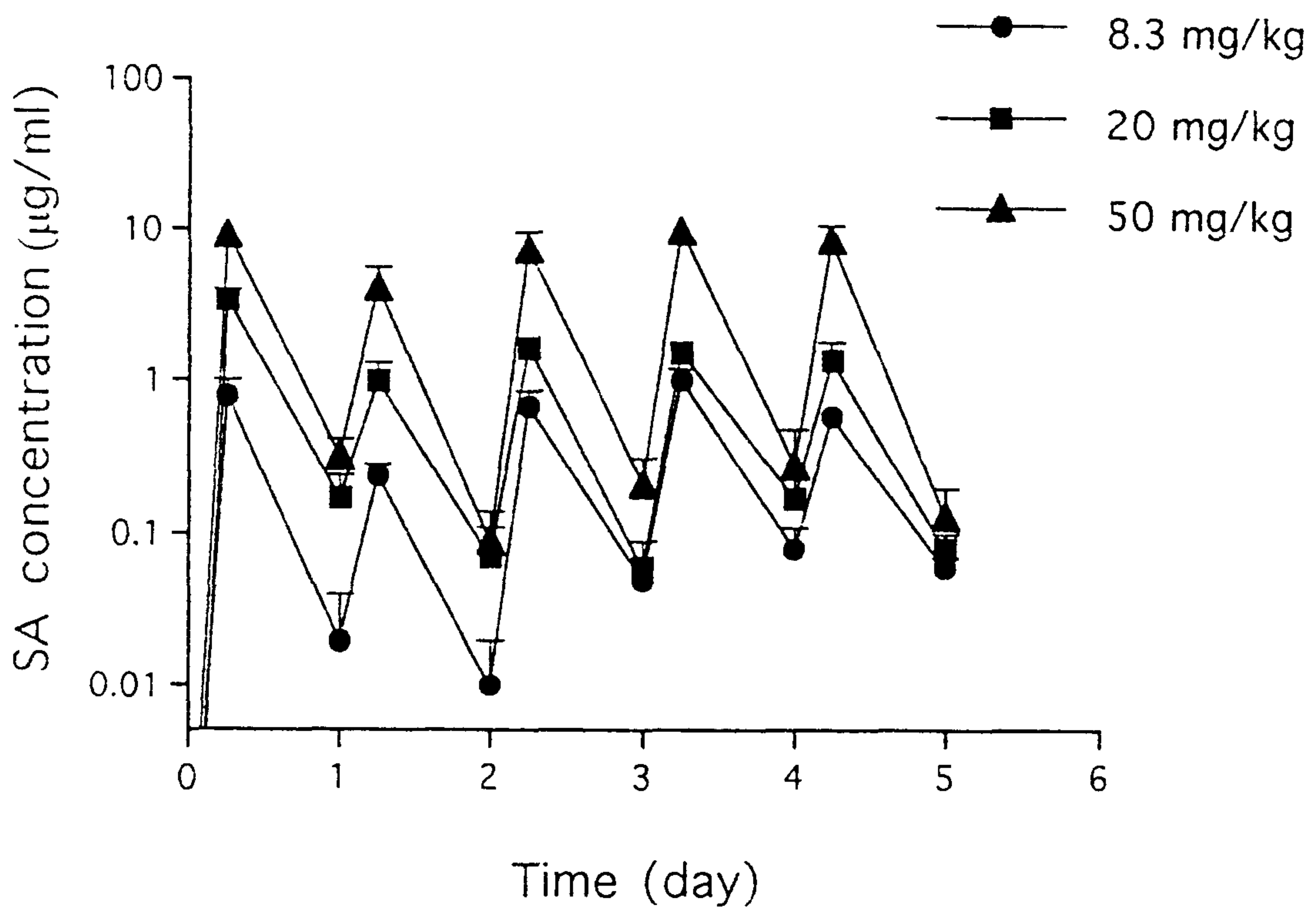


Fig. 4-1-4. Steady-state kinetics of SA after the oral multiple administration of K-580 during a period of 5 days in the beagle dogs. Each point represents the mean \pm SE of three dogs.

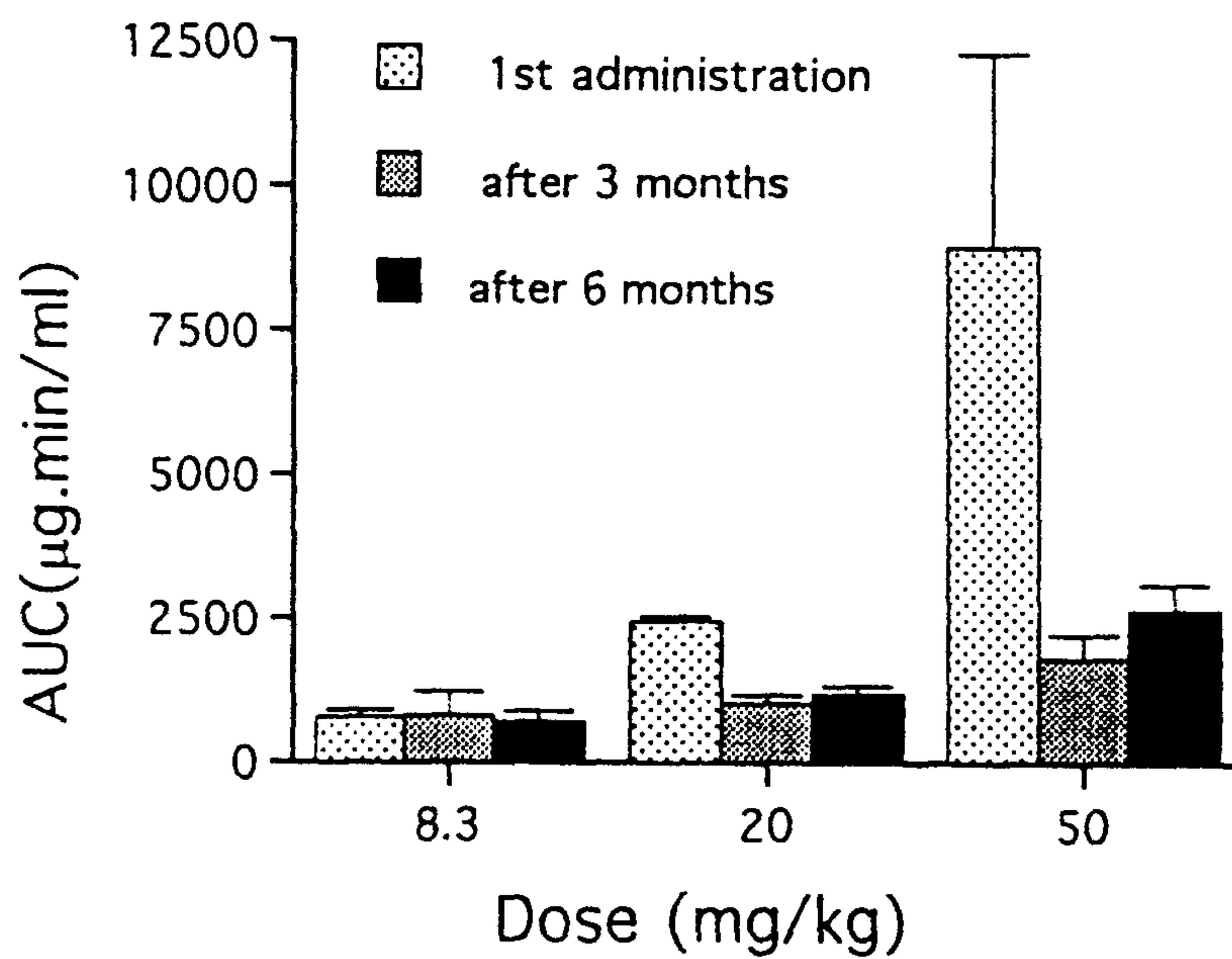


Fig. 4-1-5. Toxicokinetic linearity for the AUC_{0-24hr} of SA in the oral single administration and repeated administration of K-580 at the three doses to the beagle dogs. Each value represents the mean \pm SE of three dogs.

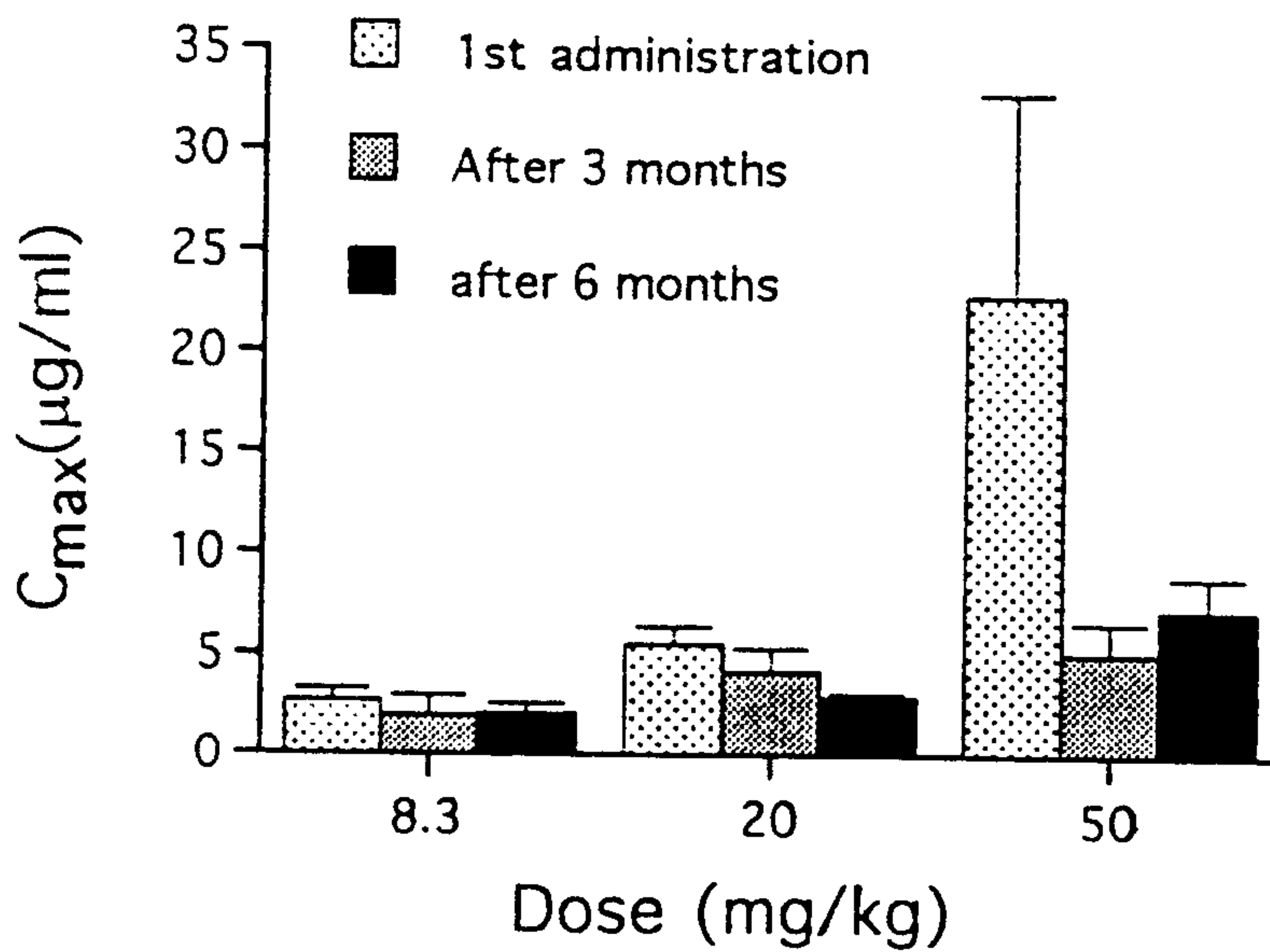


Fig. 4-1-6. Toxicokinetic linearity for the C_{max} of SA in the oral single and repeated administration of K-580 to the beagle dogs. Each value represents the mean ± SE of three dogs.

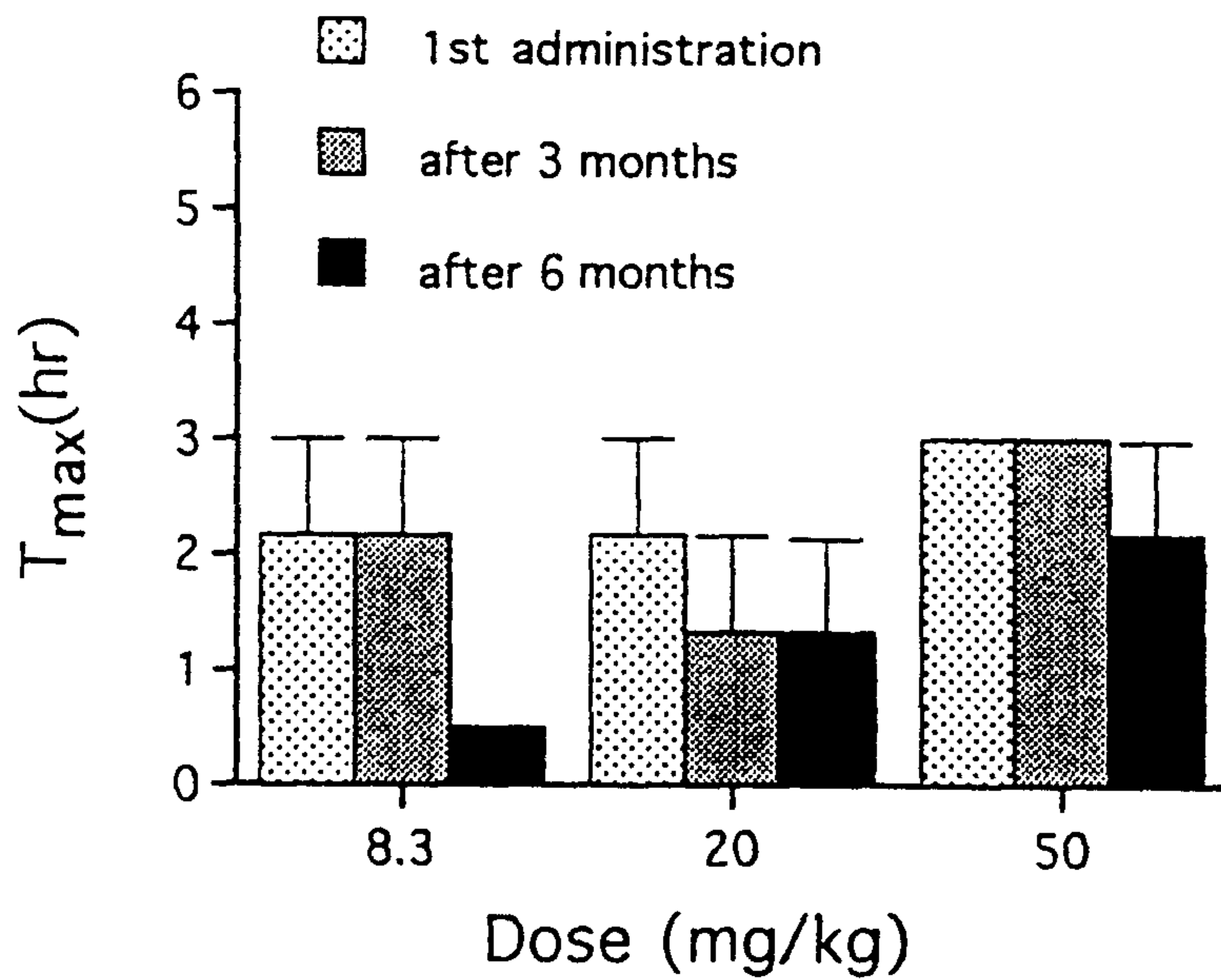


Fig. 4-1-7. Toxicokinetic linearity for the T_{max} of SA in the oral single and repeated administration of K-580 to the beagle dogs. Each value represents the mean \pm SE of three dogs.

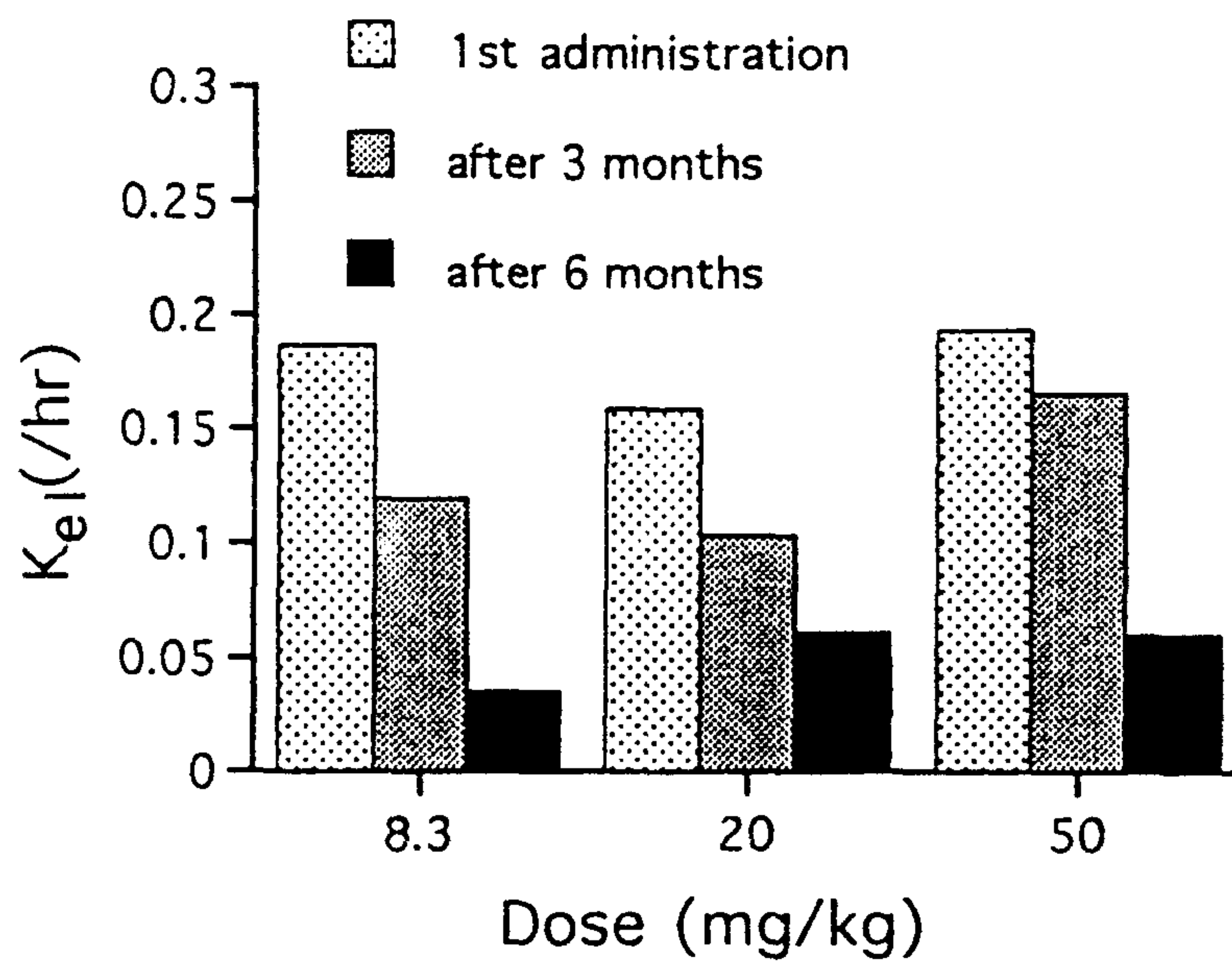


Fig. 4-1-8. Toxicokinetic linearity for the K_{e1} of SA in the oral single and repeated administration of K-580 to the beagle dogs. Each value represents the mean \pm SE of three dogs.

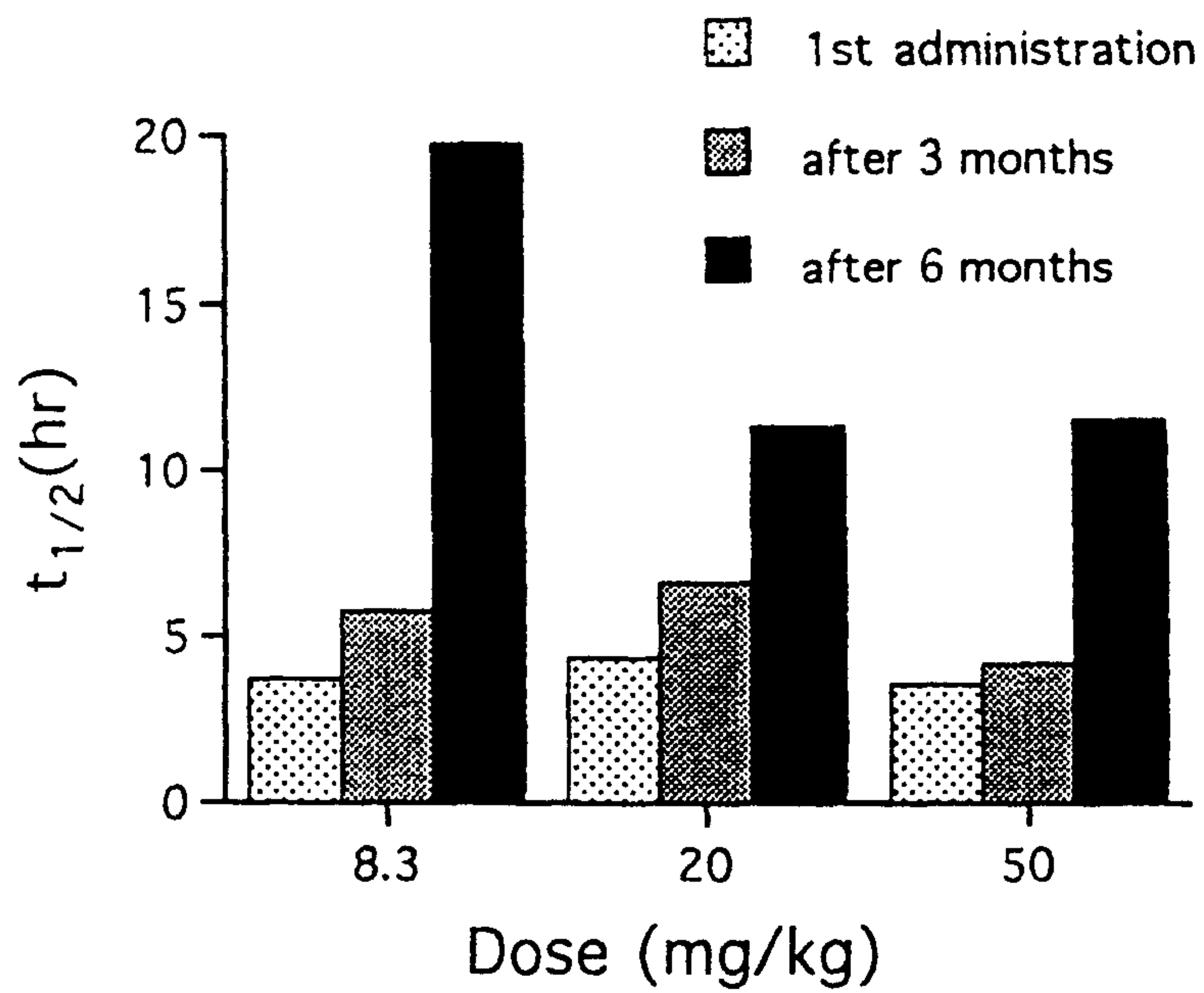


Fig. 4-1-9. Toxicokinetic linearity for the $t_{1/2}$ of SA in the oral single and repeated administration of K-580 to the beagle dogs. Each value represents the mean \pm SE of three dogs.

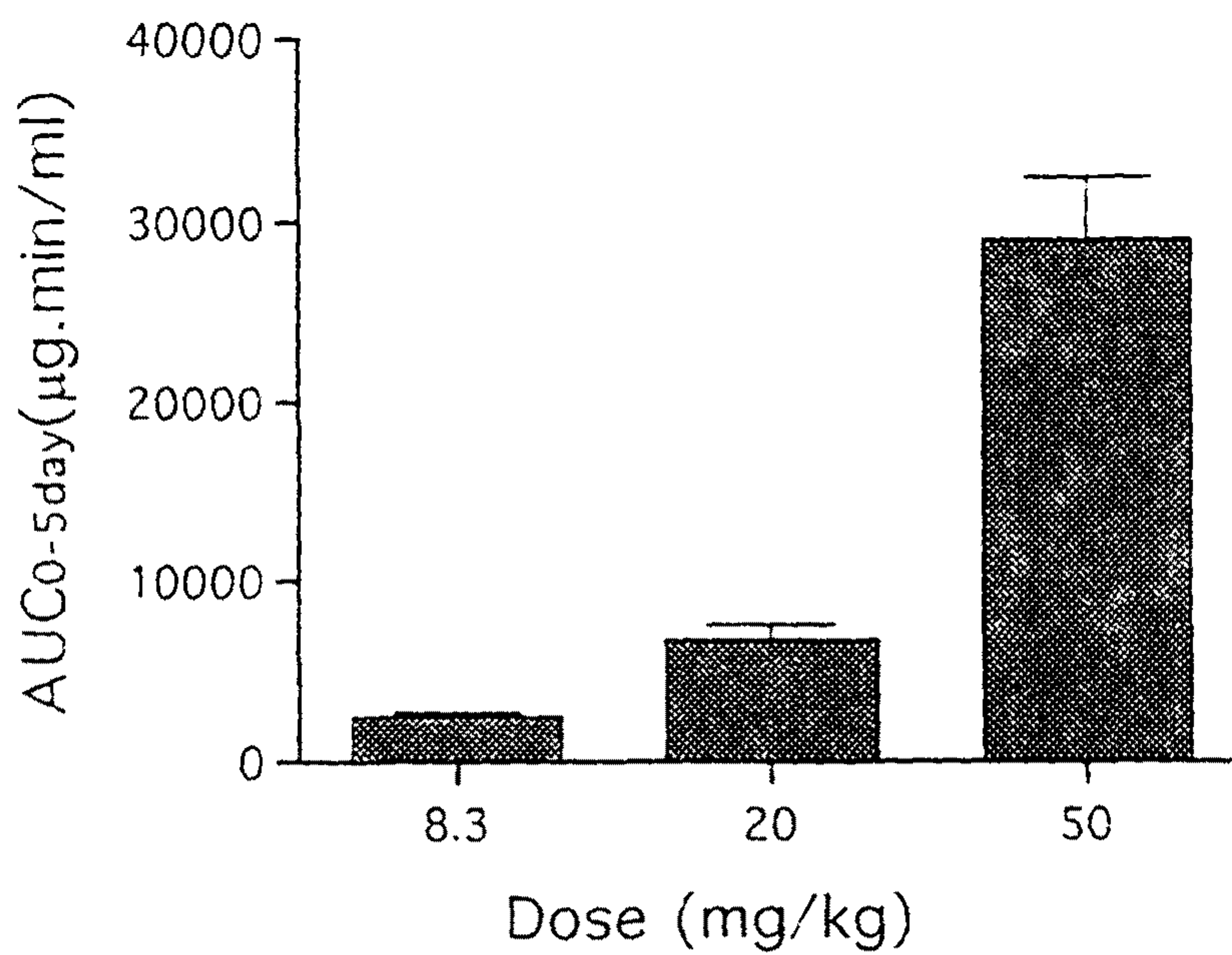


Fig. 4-1-10. Toxicokinetic linearity for the AUC_{0-5day} of SA relating to steady-state condition after the oral multiple administration of K-580 at the beagle dogs. Each value represents the mean \pm SE of three dogs.

Fig. 4-1-4에서는 K-580의 주대사체 SA의 steady-state kinetics를 나타내는데 각 투여용량 8.3, 20 및 50 mg/kg에서 공통적으로 2-3회의 반복투여로 steady-state에 도달하여 비교적 빠른경과를 보였으며 반복투여에 의한 최고혈중농도(6hr)의 증가도 세 용량 모두에서 초회투여시에 비해 큰 차이를 보이지 않았으며 Kinetic parameter AUC_{0-5day} (Fig. 4-1-10)의 용량간 비교에서도 현저한 비선형성동태를 나타내지는 않았다.

Fig. 4-1-5에서는 AUC_{0-24hr} 를 비교하고 있는데 20 및 50 mg/kg용량에서 단회투여시에 비해 3개월 및 6개월간의 투여후의 값이 저하된 것을 알 수 있었다. Fig. 4-1-6에서의 C_{max} 의 결과도 유사하게 나타내었다. Fig. 4-1-8, 4-1-9에서는 parameter k_{el} 및 $t_{1/2}$ 을 나타내고 있는데 단회 투여시의 경우에 용량간의 유의적 차이를 보이지 않았다. 3개월간의 반복투여후에 50mg/kg용량에서는 단회 투여시에 비해 유사한 값을 나타내었으나 8.3 및 20 mg/kg용량에서 다소 k_{el} 의 감소 및 $t_{1/2}$ 의 증가경향도 관찰되었다. 6개월간의 반복투여후에는 k_{el} 의 감소 및 $t_{1/2}$ 의 증가경향이 관찰되었다. 그러나 AUC_{0-24hr} 를 비교해 보면 3개월후의 값과 차이가 거의 인정되지 않았으며 C_{max} 의 경우도 유사한 결과를 얻었다. 최고혈중농도 도달시간(T_{max})의 변화에서는 초회투여시와 3개월후의 경우에 비해서 투여최종주에서 다소 단축되는 경향은 있었다(Fig. 4-1-7).

4. 고찰 및 결론

Microbore-HPLC분석법을 이용하여 dog의 혈청중에서 시험물질 K-585 및 그의 대사물 SA, SM, AS 등을 대상으로 소량의 시료를 이용한 동시정량법을 확립하였다. 혈액시료는 혈청을 분리하여 methylene chloride 용매추출법을 통해 제단백 및 정제를 하였으며 process std recovery는 K-580, SA 및 SM에서 각각 56.24, 70.11, 85.07%로, detection limit는 K-580, SA 및 SM에서 각각 0.1, 0.2, 0.15ng/inj으로 독성동태시험을 위한 충분한 분석조건으로 확립되었다.

본 연구에서는 K-585의 주대사체 SA를 중심으로 독성동태연구를 수행하였는데 초회투여시의 K-580의 주대사체 SA의 혈중농도 프로파일은 용량간에 유사한 elimination상을 나타내며 T_{max} 도달시간도 3시간째의 시료에서 공통적으로 관찰되었다. 반복투여에 따른 SA의 동태론적 성격을 파악해 볼 때 steady-state

도달이 각 투여용량 8.3, 20 및 50 mg/kg에서 공통적으로 2-3회의 반복투여로 빠른 경과를 보였으며 반복투여에 의한 $C_{max}(6hr)$ 의 변화도 세 용량 모두에서 초회투여시에 비해 큰 차이를 보이지 않아 본 연구에서 설정된 용량은 현저한 비선형성을 나타내는 용량으로는 보이지 않는다. AUC_{0-24hr} 를 반복투여후에 비교해 보더라도 3개월후의 값과 6개월후의 값의 차이가 거의 인정되지 않았으며 C_{max} 의 경우도 유사한 결과를 얻었다. 따라서 parent compound도 반복투여시에도 검출되지 않았던 점 그리고 SA의 steady-state kinetics의 패턴을 고려해 볼 때 본 약물의 24시간 투여간격으로 dog에서의 적용은 체내축적을 초래하지 않을 것으로 보이며 이러한 용량 조건하에서의 반복투여로 인한 현격한 체내 ADME의 saturation kinetics은 나타내지 않는 것으로 사료되었다. 최고혈중농도 도달시간(T_{max})의 변화에서는 초회투여시와 3개월후의 경우에 비해서 투여최종주에서 다소 단축되는 결과도 얻었는데 이것은 장기간 투여에 따른 흡수속도의 개선 또는 대사전환속도의 향상의 가능성도 있다고 볼 수 있다. 따라서 이러한 독성동태연구를 통하여 용량설정의 이론적 근거를 확보하게 되었는데 독성동태연구를 통하여 용량설정의 이론적 근거를 확보함과 동시에 독성발현에 있어서의 대사물의 역할, 용량과 독성발현의 상관성의 규명, 대사전환의 속도론적 해석 등도 가능하게 된다.

이상의 내용을 정리해 보면 이러한 용량범위에서는 체내 ADME의 포화성 kinetics와 같은 현저한 비선형성약물동태를 나타낼 것으로 보이지는 않아 축적에 의한 독성발현의 가능성은 적을 것으로 보여 독성동태학적 면에서 볼 때 장기 독성시험의 용량으로 비교적 잘 설정된 것으로 판단된다. 용량설정의 이론적 근거를 제시하고 또 용량설정의 타당성을 확보할 수 있는 좋은 결과로 판단되며 결과도 정리하여 투고중에 있어 계획의 100% 이상 목표에 달성된 것으로 판단된다. 현재 선진국가간의 공동기구인 OECD는 화학물질 및 신의약에 대한 독성 시험 가이드라인에 의거하여 물질의 독성동태평가를 규정하고 있고, 국내의 “의약품의 독성시험 기준”에도 비설치류에 대한 안전성 평가를 규정하고 있고 앞으로 근시일내 비설치류를 이용한 약물동태시험기준의 설정이 예상되는 바 본 연구의 성과가 독성평가검정에 크게 기여할 것으로 사료된다.

5. 참고문헌

- (1) Humpel M, Sostarek-D, Gieschen H, Labitzky C; Studies on the biotransformation of lonazolac, bromerguride, leisured in laboratory animals and their hepatocytes. *Xenobiotica* 19 : 361-77, 1989
- (2) Liao JT, Collins WT, Merriman TN, Michlewicz KG, Boss SM; Acute Toxicity in Mice and Pharmacokinetics and Dose Range-Finding in dogs of Carmethizole(602668D). *Govet Reports Announcements & Index (GRA&I)*. 1989.
- (3) Greener Y, Ohi H, Uchida T, Komori M, Kitada M, Damataki T; Subchronic oral and intravenous (i.v.) safety evaluation and pharmacokintics in rats and dogs of ipazilide fumarate (Win 54, 117-14), and antiarrhythmic agent. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18 18 : 581-9. 1992
- (4) Uchida H, Masaki Y, Taira M, Maruyama S, Yasuda S; Long-term toxicological studies with mazoribine (Bredinin) in beagle dogs (the first report). Blood chemistries, pharmacokinetics of mizoribine and ferillity studies of the male dogs. *J. Toxicol. Sci.*, 10 : 53-49. 1985
- (5) Uchida H, Masaki Y, Taira M, Maruyama S, Yasuda S; Long-term toxicological studies with mazoribine (Bredinin) in beagle dogs (the first report). Blood chemistries, pharmacokinetics of mizoribine and ferillity studies of the male dogs. *J. Toxicol. Sci.*, 10 : 33-49. 1985
- (6) Russel FG, Wouterse AC, Van Ginneken CA; Physiologically based pharmacokinetic model for the renal clearance of iodopyracet and the interation with probenecid in the dog. *Biopharm. Drug. Dispos.*, 10:137-52. 1989.
- (7) Ecobichon DJ, D'Veer AS, Ehrhart W; Drug dispostition and biotransformation in the developing beagle dog. *Fudam. Appl. Toxcol.* 11:29-77. 1988.
- (8) Ecobichon DJ, Comeau AM, O'Neil WM, Marshall WD; Kinetics, distribution, and biotransformation of the chemical HI-6 in the rat, dog, and rhesus monkey. *Can. J Physiol. Pharmacol.*, 68:614-21. 1990.
- (9) Mishiyama M, Kobayashi S, Abe S, Yamato C; Metabolic fate of indometacin farnesil, a prodrug of indomethacin: characteristic biotransformation of indometacin farnesil in rats. *Xenobiotica.* 20:135-46. 1990
- (10) Russel FG, Wouterse AC, Van Ginneken CA; Physiologicall based pharmacokinetic model for the renal clearance of salicyluric acid and the interaction with pheolsufonphthalein in the dog. *Drug. Metab. Diosps. Biol. Fate. Chem.*, 15:695-701. 1987.

- (11) Shin, H.C., H.S. Lee, S.W. Cha, S.S. Han, J.K. Roh, J.S. Kim, W.C. Lee : Toxicokinetics of rifapentine in beagle dogs. Korean J. Vet. Res. 35(4):815-822, 1995.

제 2 절 광독성 및 광감작성시험방법의 확립 및 SOP 작성

1. 서 론

OECD 가입에 발맞추어 광독성 및 광감작성시험법의 확립은 절실히 요구되고 있는 실정이나, 국내의 경우 아직까지 이에 대한 충분한 검토가 이루어지고 있지 않은게 현실이다. 선진각국에서는 광독성 및 광감작성분야의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 많은 독성시험수탁기관에서도 수탁지원연구가 원활히 수행되고 있다. 또한 국제 공동연구를 통하여 본 시험법에 관한 국제적인 통일화에 대한 시도와 시험법의 개발에 박차를 가하고 있다. 한편 이러한 추세에 따라 관련 산업계로부터의 수탁지원연구의 수요가 매우 높아질 것으로 예상되어 본 시험법의 확립을 위하여 광독성 및 광감작성시험에 관한 SOP를 작성하고 관련기기 및 보호장비, 시약등을 구입하여 실험실내에 setting하였다. 광과민증에 관여하는 콜타르유도체, 진균제, 이노제, 신경안정제, 항생물질, 선스크린제, 항진균제, 항히스타민제, 화학요법제, 경구당뇨제, 색소류 및 향료류등의 광독성을 나타내는 화학물질의 안전성 평가는 시험물질과 광(자외선)의 상호기작에 따른 광독성 및 광감작에 대하여 Nakayama(1985)와 Sato등(1980)의 방법에 따라 기니픽 및 토끼등을 이용하여 피부반응(홍반 및 부종)에 나타난 결과에 따라 알레르기반응의 발생여부를 검색하고 있다.

2. 재료 및 방법

가. 재 료

- (1) 인공태양등
- (2) 자외선 강도계
- (3) Surgical tape, chamber, 그 외

- (4) 전기 Clipper
- (5) 전기 Shaver 또는 탈모제
- (6) 동물고정대
- (7) 실시자의 광선방어 용구(보호구)

나. 방 법

(1) 감작

- ① 사용동물의 경배부를 제모한다.
- ② FCA(0.1 ml)를 2×4 cm 구역의 4부위에 피내투여한다.
- ③ 24시간 방치한다.
- ④ ②의 구역내의 피부각층을 셀로판 tape로 박리(Stripping)한다. 350 g정도의 Guinea pig에는 3회 박리할때에 경도의 염증을 가져온다.
- ⑤ 약물을 개방도포 또는 폐쇄도포한다.
- ⑥ 약물의 경피흡수 data를 참고로 하여 도포시간을 설정한다. 통상은 30 분부터 1시간을 목안으로 한다.
- ⑦ 도포된 tape등을 제거하고, 그 후 정지하든지 그대로 조사하든지 조건을 확실히 하고 조사한다.
- ⑧ 조사할 때에는 glass filter를 이용한다. BLB Lamp의 광선중에 U.V.B.가 20%가량 함유되어 있는 것에 주의한다. 감작광선의 energy는 대체적으로 8~20 joule/cm의 범위이나 10 joule/cm로 보고된 것이 많다.

(2) 유발

- ① 최종감작 2주간 후 동물의 배부를 제모한다.
- ② 척추 정중선을 따라서 좌, 우 대칭으로 조사부위와 비조사부위를 설정한다.
- ③ 약물을 개방도포 또는 폐쇄도포 한다. 이 때 유발은 2 dose 내지 4 dose를 설정하는 것이 좋다.
- ④ 도포시간은 통상은 감작시간과 동일하게 한다. 비조사부위의 차광을 충분히 한다.

(3) 판정

① 반응부위를 제모한다(판정을 용이하게 하기 위함).

② 아래의 평가법에 따라 판정한다.

평가법

[0] : 육안적으로 변화없음

[1] : 경도 또는 드문드문한 홍반

[2] : 중등도의 홍반

[3] : 강도의 홍반 또는 부종을 동반한 괴사

③ Ether 마취등을 실시하여 Label을 표시한 후 사진촬영한다. 광감작성의 판정을 검체도포 광조사 부위와 검체도포 차광부위 및 검체 무도포 조사 부위(이하 대조조사 부위로 칭함)와의 비교에 의해 판정한다. 즉, (I) 광조사만으로는 피부에 염증이 생기지 않는 경우 ; 검체도포 광조사부위 > 검체도포 차광부위의 경우, 광감작성은 양성으로 한다. (II) 광조사만으로도 피부에 염증이 생긴 경우 ; 검체도포 광조사부위 < 대조조사 부위의 경우 광감작성 반응을 양성으로 한다.

(4) 통계학적 처리

양성출현율을 구한다. 예를 들어 1군에 15마리를 사용하여 2마리가 양성예가 있을 경우는 2/15로 기록한다. 조사부위와 비조사(차광)부위와의 차이를 t-검정으로 평가한다.

3. 결 과

광과민물질들에 대한 독성학적인 평가를 위하여 광독성 및 광감작성시험에 관한 SOP를 작성하였으며 실험동물(마우스, 랫트, 기니픽 및 토끼)을 이용한 시험의 실시에 앞서 U.V.자외선 조사기기인 U.V. Biotronic과 U.V. Protector등을 생산하는 세계유수의 자외선 조사 및 분석장비업체인 France의 VILBER LOURMAT사를 방문, 견학하였으며 본 시험법을 통해 화장품 및 향료등의 개발에 선두를 달리고 있는 France의 C.I.T.(Centre International de Toxicologie : 국제독성센터)와 CLARINS를 방문하여 수행중인 실험을 견학하고 연구협력에 대한 의견을 교환하였다. 또한 본 시험에 필요한 자외선 조사기기(U.V. Biotronic), 자외선 보호장비 및 시약(양성감작물질인 8-MOP, Bithionol)등을 구

입하였다. 한편 본시험의 원활한 수행을 위하여 현재 널리 사용되고 있는 진보된 "Adjuvant and Strip"법을 개발한 일본 자생당연구소의 독성시험부문연구원들과 긴밀한 협력을 하고 있다.

4. 고찰 및 결론

광과민증(photosensitivity)은 생체내 및 피부표면중의 물질의 광화학반응의 결과 나타나는 병적반응으로서, 광화학반응으로 생긴 물질이 직접 세포장해를 일으키는 중독반응인 광독성반응(phototoxic reaction)과 광화학반응 생성물질이 면역계에 작용하여 일어나는 광감작성반응(photoallergic reaction)이 있다. 이러한 광독성 및 광감작성시험에 대한 신속하고도 정확한 안전성 평가 수행을 위하여 SOP를 작성완료하였고, 필요장비 등을 구입하였다.

본 시험법의 확립에 따라 국내 개발 광과민 유발물질들에 대한 체계적이고 안정적인 안전성평가가 이루어져 산업계의 신약개발 연구분야에 대한 지원 연구체제의 정립과 더불어 광과민 유발기작에 대한 연구 및 새로운 시험방법의 도입이 필수적인 것으로 판단되며, 이를 위해 정부관련 부처의 지속적인 관심과 계속적인 지원이 필요하다고 사료된다. 현재 국내에는 의약품의 경우 "의약품등의 독성시험 기준(1998. 4. 29. 식품의약품안전청고시 제98-56호)", 농약에 대한 "농약의 등록 시험기준과 방법(1997. 1. 25. 농촌진흥청고시 제1997-3호)" 및 화학물질에 대한 "화학물질 유해성시험연구기관의 지정등에 관한 규정(1997. 12. 22. 국립환경연구원고시 제1997-9호)"등의 가이드라인이 제정되어 있으나 본 시험법에 관하여는 전혀 반영되어 있지 않다. 그러나 선진외국의 경우를 비추어 볼 때 국내에서도 이들 시험법의 제정이 매우 절실한 것으로 사료된다.

5. 참고문헌

- (1) Ison, A., Blank, H. : Testing Drug Phototoxicity in Mice, J. Inv. Derm., 49:508-511, 1967.
- (2) Harber, L.C., Shalita, A.R. : Immunologically mediated contact photosensitivity in guinea pig. Chapter 14. Advances in Modern Toxicology Vol 4. John Wiley and Sons.

- (3) Appraisal of the Safety for chemicals in Foods and Cosmetics by the Staff of the Division of Pharmacology Food and Drug Administration, Department of Health Education and Welfare, Pub. 1959. by F.D.A. Officials of U.S. Business Office : 52-53.
- (4) Kaidbey, K.H., Kligman, A.M. : Phtomaximization test for identifying photoallergic contact sensitizers. Contact Derm., 6 : 161-169, 1989.
- (5) Morikawa, F., Nakayama, Y., Fukuda, M., Hamano, M., Yokoyama, Y., Nagura, T., Ishihara, M., and Toda, K : Techniques for evaluation of phototoxicity and photoallergy in laboratory animals and man. In "Sunlight and Man" (ed by T.B. Firzpatrick), University of Tokyo Press, pp 529-557, 1974.
- (6) Maurer, Th., Weirich, E. G and Hess, R. : Predictive animal testing for photocontact allergenicity, Br. J. Dermatol., 103, 593-605, 1980.
- (7) 佐藤悦久, 勝村芳雄, 市川秀之, 小林敏明, モルモットによる光接觸減作性試験法(Adjuvant-strip method). 西日皮膚, 42, 831-837, 1980.
- (8) 中山晴久, 長沼雅子 : 光毒性試験法, 香粧會誌, 9(1), 47-54, 1980.

제 3 절 중동물을 이용한 항원성시험방법의 확립 및 보완

1. 서 론

분자생물학적 기법의 발전에 힘입어 유전자 재조합 제품, 단일클론항체, cell line 제제, anti-sense약물 및 vaccine 제제 등의 다양한 생물공학제품이 개발되고 있어, 이들에 대한 독성연구의 필요성이 날로 증가하고 있다. 즉, 이들 제제는 대부분 사람 유래의 단백질이나 약효를 나타내기 위하여 전신에 노출을 시켜야 되기 때문에 예상치 못하는 독성을 유발할 수 있다. 특히 독성시험에 사용하는 동물종에 따라 약효가 나타나지 않는 수도 있어 독성시험의 디자

인 시에 시험물질이 실제로 사용동물에서도 약효를 보이는가가 중요한 factor 가 될 수 있고, 단백질의 특성상 사람에서는 항원성이 없을 수도 있으나 동물 실험에서는 약효를 증화시키는 항체가 생성되어 치료효과를 상쇄시키거나 생리반응의 변화를 유발하고 과민반응을 일으킬 가능성도 있어, 이들에 대한 시험은 영장류 등 사람과 발생계통학적으로 유의성이 있는 동물종의 사용이 필수적이다. 물론 대형동물을 사용하기 위해서는 비용이 많이 드는 단점은 있으나 사람에게 적용할 수 있는 의미있는 시험결과를 제공해주는 장점이 있어 중동물을 이용한 항원성 시험의 수행이 선진 각국의 전임상 시험 기관에서는 많이 이루어지고 있는 실정이다. 예를 들면, 침팬지와 마우스에서 유전공학적으로 재조합한 여러가지 구조의 변형된 plasminogen activator의 항원성을 시험한 결과 마우스를 이용할 때는 침팬지를 이용할 때에 비하여 충분한 자료를 제공하지 못하는 것으로 밝혀져 있다¹⁾. 대부분의 사람 유래 단백질을 DNA 재조합 기법을 이용하여 생산할 때 이들 단백질이 실험동물에서 항원성을 나타내기 때문에 기존의 전임상 시험으로는 항원성을 정확히 예측하기 어렵다. 또한 유전자 재조합시 원래의 단백질과는 다른 아미노산 sequence를 갖게 되고 당류의 결합도에도 차이가 있어 임상시험시 항원성이 매우 중요한 문제로 대두되나 실험동물에서는 이를 정확히 판단하기가 어렵다. 따라서 본 연구에서는 유전자 재조합 기술로 생산한 단백질성 시험물질(TA#1)을 이용하여 기존의 마우스와 기니픽을 이용한 항원성과 beagle dog에서의 항원성을 비교, 평가하여 항원성 시험 방법의 보완을 이루고자 하였다. Beagle dog에서의 항원성 평가는 특히 28일간 정맥 투여를 실시하는 일반 독성시험과 연계하여 진행하였으며, 최종 투여후 혈청을 분리하여 혈청내에 존재하는 시험물질에 특이적인 IgG 항체를 효소면역화학적 방법을 통하여 검출하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험동물

본 연구에 사용한 마우스 및 랫트는 한국화학연구소 안전성연구센터에서 공급받아 사용하였으며, 기니픽은 삼육실험동물연구센터에서 구입하여 사용하였다. 그리고 beagle dog은 미국의 Marshall Farm에서 6개월령을 구입하

여 사용하였다. 마우스는 BALB/c계 수컷으로 10주령을 사용하였고 랫트는 Sprague Dawley계 수컷으로 10주령을, 기니픽은 Hartley계 수컷으로 7주령을 시험에 각각 사용하였다. 실험동물은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 와 습도 $50 \pm 10\%$ 의 사육환경에서 사육하였고, 12시간씩 명암주기를 반복하여 환경조절을 하였고, 마우스와 랫트는 실험동물용 고형사료(제일사료 주식회사, 대전)를 기니픽과 개 사료는 퓨리나 주식회사에서 구입하여 자유로이 섭취시켰으며, 음수는 자외선 멸균 수도수를 사용하였다. 기니픽의 사육시에는 1 g/l의 vitamin C를 음수에 함께 공급하였다.

나. 실험재료

Complete Freund's adjuvant는 Difco Laboratory(Detroit, MI, 미국)에서 구입하였고, aluminum hydroxide gel(Alum)은 본 연구실에서 합성하여 사용하였다. Rabbit anti-dog IgG-alkaline phosphatase conjugate는 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였고, p-nitrophenyl phosphate 기질은 Bio-Rad Laboratory(Richmond, CA, 미국)에서 구입하여 사용하였다.

다. 마우스의 감작

마우스에 대한 감작 일정은 Table 4-3-1에 나타내었다. 시험물질 (TA#1)은 10 ml/kg의 투여액량으로 I, II 및 V군의 경우 일주일에 3회씩 3주간 투여하여 총 9회 감작시켰으며, III 및 IV군의 면역보조제 혼합투여군은 3주에 1회씩 6주간 총 3회 감작시켰다. 최종감작 6일 후에 좌우 안와정맥총으로부터 채혈하여 혈청을 분리하고 사용시까지 -80°C 에 보관하였다.

라. 기니픽의 감작

기니픽의 감작 일정은 Table 4-3-2에 나타내었다. 시험물질 (TA#1)을 10 ml/kg의 투여액량으로 I, II 및 V군의 경우 일주일에 3회씩 3주간 투여하여 총 9회 감작시켰고, III 및 IV군의 면역보조제 혼합투여군은 3주에 1회씩 6주간 총 3회 감작시켰다. 최종 감작 12일 후에 좌우 안와정맥총으로부터 채혈

하여 혈청을 분리하고 사용시까지 -80℃에 보관하였다.

마. 개의 감작

Beagle dog을 이용한 28일간 반복투여 독성시험과 연계하여 실시하였기 때문에 시험물질 (TA#1)을 정맥으로 투여하였고 최종투여 다음날에 채혈하여 혈청을 분리하고 이를 사용시까지 -80℃에 보관하였다.

바. 전신성 아나필락시 쇼크반응 시험

기니픽을 최종감작 2주후에 후지 정맥을 통하여 고용량의 시험물질 (TA#1) 또는 1.67 mg/kg의 ovalbumin을 투여하여 아나필락시 쇼크반응을 야기시켰다. 야기후 30분간 나타나는 쇼크 증상을 [-]는 무증상, [±]는 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 활음 증상을 보이는 것으로 경미증상, [+]는 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변 및 유루 증상을 보이는 것으로 중등도의 증상으로, [++]는 호흡곤란, 짹짹거리는 소리, 청색증, 보행불안, 도약, 혈떡거리고 몸부리침, 경련, 황와 및 Cheyne-Stokes 호흡을 보이는 것으로 심한 증상으로, 그리고 [+++]는 사망을 보이는 것으로 등급을 나누어 판정하였다.

사. 기니픽을 이용한 수신 피부 아나필락시 반응시험

감작 기니픽으로부터 분리한 혈청을 10배에서 5120배까지 생리식염수로 희석하고 배부를 clipper로 제모한 recipient 기니픽에 50 μ l씩 피내투여하였다. 4시간이 경과한 후에 시험물질 (TA#1) 고용량 또는 1.67 mg/kg의 ovalbumin을 후지정맥에 1% Evans blue와 혼합하여 반응을 야기시켰다. 30분 후에 배부피부를 각피하여 dye의 유출로 생긴 청색반점의 유무를 이용하여 PCA titer를 결정하였다. PCA 반응의 판정은 청색 반점의 크기가 직경 5 mm 이상일 때 양성으로 하였다.

아. 랫트를 이용한 수신 피부아나필락시 반응 시험

시험물질을 감작한 마우스에서 분리한 혈청을 10배에서 5120배까지 생리식염수를 이용하여 희석하고 배부를 clipper로 제모한 recipient 랫트에 50 μ l

씩 피내 투여하였다. 24시간 후에 시험물질 고용량 또는 2.5 mg/kg의 ovalbumin을 1% Evans blue와 혼합하여 미정맥을 통하여 야기시켰다. 30분 후에 배부피부를 각피하여 dye의 유출로 생긴 청색 반점의 유무를 이용하여 PCR titer를 결정하였다. PCA 반응의 판정은 청색반점의 크기가 장단경의 평균이 5 mm 이상일 때 양성으로 하였다.

자. 간접적혈구 응집반응

시험물질을 감작한 마우스에서 분리한 혈청을 간접적혈구 응집반응에 이용하였다. 신선한 면양적혈구를 0.005% tannic acid 용액내에서 37°C로 1시간 동안 가온한 다음 tanned SRBC를 phosphate-buffered saline에 현탁시켰다. 다음에는 항원을 37°C에서 2시간 동안 tanned SRBC 액과 혼합하여 피복시켰다. 항원을 피복시킨 SRBC액을 PBS를 이용하여 1% 용액으로 제조하였다. 96-well 간접적혈구 응집반응용 plate의 각 well에 시험할 혈청을 10배에서 20,480배까지 단계 희석시킨 다음 항원 피복 SRBC 용액을 1:1로 가하고 2시간 이상 실온에 방치하여 적혈구의 응집반응을 유도하였고, 응집반응을 보이는 최고 희석배율을 항체가로 결정하였다. 본 연구에서는 항원에 특이적인 항체가를 결정하기 위하여 무피복 SRBC와 ovalbumin 피복 SRBC를 동시에 비교하여 교차실험을 수행하였다.

차. ELISA를 이용한 beagle dog 혈청내 항체검출

96-well ELISA용 plate의 해당 well에 항원인 TA#1 100 μ l을 분주하여 37°C에서 2시간 동안 3회 coating하였고, 4회째는 4°C에서 overnight하였다. PBS 200 μ l로 각 well을 4회 세척한 다음, 0.5% non-fat dried skim milk를 200 μ l씩 넣어 37°C에서 1시간 동안 blocking 시켰다. 다시 0.05% Tween 20 함유 PBS로 4회 세척한 다음, 10배로 희석한 각 혈청시료를 100 μ l씩 해당 well에 분주하고 37°C에서 2시간 동안 incubate하였다. Incubation이 끝난 후 0.05% Tween 20 함유 PBS로 4회 세척하고, 10,000배로 희석한 rabbit anti-dog IgG-alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)를 100 μ l씩 각 well에 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응

시켰다. 효소반응은 p-nitrophenyl phosphate 기질(Bio-Rad Laboratory, Richmond, CA, USA)을 100 μ l씩 각 well에 분주하고 37℃에서 30분간 반응시켰으며, 405 nm의 파장에서 EIA reader(Molecular Device, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 본 시험에서는 개의 항체만에 대한 특이성을 알아보기 위하여 랫트의 정상혈청을 음성 대조군으로 동일한 실험을 실시하였다.

3. 결 과

본 연구에서는 beagle dog을 이용한 항원성 시험의 보완을 위하여 기존의 마우스 및 기니픽을 이용한 항원성 시험과 beagle dog을 이용한 일반독성시험 시 생성되는 시험물질에 특이적인 항체의 검출시험을 비교 연구하였다. Table 4-3-3에서는 기니픽을 이용한 전신성 아나필락시 쇼크반응의 결과를 나타내었다. 국내의 <의약품 등의 독성시험기준>에는 20가지의 증상을 토대로 아나필락시 유발 정도를 평가하도록 되어 있어, 이를 토대로 판정한 결과 시험물질(TA#1)에 의한 증상으로는 배뇨(urination)와 배변(evacuation) 등의 증상이 나타났고, 양성대조군인 ovalbumin 감작군에서는 불안(restlessness), 기모(piloerection), 코를 문지르거나 핥음 (rubbing or licking nose), 재채기(sneezing), 호흡촉진(hyperpnea), 배뇨, 배변, 유루(lacrimation), 짹짹거리는 소리(rhon chus), 보행불안(staggering gait), 도약(jumping), 헐떡거리고 몸부림침(gasping and writhing), 경련(convulsion) 및 횡와(side position) 등 전반적인 아나필락시 쇼크 증상을 나타내었다. Table 4-3-4에서는 기니픽-기니픽계를 이용한 수동 피부 아나필락시 반응(PCA) 시험을 수행한 결과를 나타냈으며, 시험물질(TA#1)은 음성의 결과를 보인 반면, 양성대조군에서는 시험에 사용한 모든 동물에서 x10에서 x1280의 PCA titer를 보여주었다. Table 4-3-5에서는 마우스-랫트계를 이용한 수동피부 아나필락시 반응을 수행한 결과를 나타냈으며, 기니픽-기니픽계의 시험결과와 마찬가지로 시험물질은 모두 음성의 결과를 보인 반면, 양성대조군은 x640에서 x1280의 PCA titer를 보여주었다. Table 4-3-6에서는 감작 마우스에서 분리한 혈청을 이용하여 간접 적혈구 응집반응 시험을 수행한 결과를 나타내었으며, 시험물질 투여군에서는 모두 음성의 결과를 보여주었고, 양성대조군에서는 x640에서 x1280의 항체가를 보여주었다.

Table 4-3-1

Sensitization of mice for heterologous passive cutaneous anaphylaxis and indirect hemagglutination test.

Group	Substance	Sex	No. of animals	No. of treatment	Dose(IU/kg)	Route
I	TA#1	♂	5	9 ^a	5 x 10 ⁴	i.p.
II	TA#1	♂	5	9 ^a	5 x 10 ³	i.p.
III	TA#1+Alum	♂	5	3 ^b	5 x 10 ³	i.p.
IV	OVA+Alum	♂	5	3 ^b	330 μg/kg	i.p.
V	Vehicle ^c	♂	5	9 ^a	-	i.p.

^a3 Times in a week (every other day).^bOnce in 3 weeks^cDiluent solution (10 ml/kg).

Table 4-3-2

Sensitization of guinea pigs for active systemic anaphylaxis and homologous passive cutaneous anaphylaxis.

Group	Substance	Sex	No. of animals	No. of treatment	Dose(IU/kg)	Route
VI	TA#1	♂	5	9 ^a	5 x 10 ⁴	s.c.
VII	TA#1	♂	5	9 ^a	5 x 10 ⁷	s.c.
VIII	TA#1+CFA	♂	5	3 ^b	5 x 10 ⁷	s.c.
IX	OVA+CFA	♂	5	3 ^b	2.5 mg/kg	s.c.
X	Vehicle ^c	♂	5	9 ^a	-	s.c.

^a3 Times in a week (every other day).^bOnce in 3 weeks.^cDiluent solution (1 ml/kg).

Table 4-3-3

Active systemic anaphylaxis in guinea pigs.

Group	Sensitizing antigen	Challenging antigen	No. of animals	Severity of anaphylaxis ^{d)}				
				[-]	[+]	[++]	[+++]	[+]
VI	TA#1(5 x 10 ⁴ IU/kg)	TA#1(5 x 10 ⁷ IU/kg)	4	4				
VII	TA#1(5 x 10 ⁷ IU/kg)	TA#1(5 x 10 ⁷ IU/kg)	4	4	2			
VIII	TA#1+CFA(5 x 10 ⁷ IU/kg)	TA#1(5 x 10 ⁷ IU/kg)	5	5	2			
IX	OVA+CFA(2.5 mg/kg)	OVA (1.67 mg/kg)	5	5	1		4	
X	Vehicle (1 ml/kg)	TA#1(5 x 10 ⁷ IU/kg)	5	5	2			

^{d)} Severity of anaphylaxis was expressed as follows;

- | | | | |
|-----------------|---------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 1. restlessness | 2. piloerection | 3. tremor | 4. rubbing or licking nose |
| 5. sneezing | 6. coughing | 7. hyperpnea | 8. urination |
| 9. evacuation | 10. lacrimation | 11. dyspnea | 12. rhonchus |
| 13. cyanosis | 14. staggering gait | 15. jumping | 16. gasping and writhing |
| 17. convulsion | 18. side position | 19. Cheyne-Stokes respiration | 20. death |

[-]: Asymptomatic.

[+]: Mild; symptoms of 1 to 4.

[++]: Moderate; symptoms of 1 to 10.

[+++]: Severe; symptoms of 1 to 19.

[++++]: Death.

Table 4-3-4

Four-hours passive cutaneous anaphylaxis test in guinea pigs with sera from sensitized guinea pigs.

Group	Sensitizing antigen	Challenging antigen	PCA titer ^{b)}	Positive ratio
VI	TA#1(5×10^4 IU/kg)	TA#1(5×10^3 IU/kg)	- ^{c)}	0/8
VII	TA#1(5×10^3 IU/kg)	TA#1(5×10^3 IU/kg)	-	0/8
VIII	TA#1+CFA(5×10^3 IU/kg)	TA#1(5×10^3 IU/kg)	-	0/10
IX	OVA+CFA(2.5 mg/kg)	OVA (1.67 mg/kg)	x1280~x2560	10/10
X	Vehicle (1 ml/kg)	TA#1(5×10^3 IU/kg)	-	0/10

^{a)} Challenging antigen was intravenously injected 4 hours after sensitization of guinea pigs with sera.

^{b)} PCA titer represents the maximum dilution fold of original serum which showed positive reaction.

^{c)} Specific antibodies were not detected in 10-fold dilution of original sera.

Table 4-3-5

24-hours heterologous passive cutaneous anaphylaxis test in rats with sera from sensitized mice.

Group	Sensitizing antigen	Challenging antigen	PCA titer ^{a)}	Positive ratio
I	TA#1(5 x 10 ¹ IU/kg)	TA#1(5 x 10 ² IU/kg)	- ^{c)}	0/10
II	TA#1(5 x 10 ⁷ IU/kg)	TA#1(5 x 10 ² IU/kg)	-	0/10
III	TA#1+Alum(5 x 10 ² IU/kg)	TA#1(5 x 10 ² IU/kg)	-	0/8
IV	OVA+Alum(330 μg/kg)	OVA (2.5 mg/kg)	x640 ~ x1280	10/10
V	Vehicle (10 ml/kg)	TA#1(5 x 10 ² IU/kg)	-	0/10

^{a)} Challenging antigen was intravenously injected 24 hours after sensitization of rats with sera.

^{b)} PCA titer represents the maximum dilution fold of original serum which showed positive reaction.

^{c)} Specific antibodies were not detected in 10-fold dilution of original sera.

Table 4-3-6

Indirect hemagglutination test with sera isolated from sensitized mice.

Group	Sensitizing antigen	IHA with uncoated SRBC		IHA with TA#1-coated SRBC		IHA with OVA-coated SRBC	
		IHA titer ^{a)}	Positive ratio	IHA titer	Positive ratio	IHA titer	Positive ratio
I	TA#1(5×10^4 IU/kg)	- ^{b)}	0/5	-	0/5	-	0/5
II	TA#1(5×10^7 IU/kg)	-	0/5	-	0/5	-	0/5
III	TA#1+Alum(5×10^7 IU/kg)	-	0/5	-	0/5	-	0/5
IV	OVA+Alum(330 ug/kg)	-	0/4	-	0/4	x640 ~ x1280	4/4
V	Saline (10 ml/kg)	-	0/5	-	0/5	-	0/5

^{a)} IHA titer represents the maximum dilution fold of original serum which showed the positive hemagglutination.

^{b)} Specific antibodies were not detected in 10-fold dilution of original sera.

따라서 기존의 소동물을 이용한 항원성 시험방법에 따라 시험물질(TA#1)에 대한 실험을 수행한 결과 항원성이 없는 것으로 판단되었다.

이어서 beagle dog을 이용한 28일간 정맥투여 독성시험 수행과 연계하여 시험물질의 최종투여후 각 동물로부터 혈청을 분리한 다음, 혈청중에 존재하는 시험물질에 특이적인 항체의 존재여부를 효소면역화학적 검사(ELISA)를 통하여 연구하였다. 기존의 항원성 시험에 관한 기준을 개에 적용하는 것은 무리라고 판단되어 ELISA 방법을 선택하여 실험하였다. 일반독성시험에서 시험물질의 반복투여시 실험동물에서 쇼크유사 반응이 관찰되었으며, 혈청중에 시험물질에 대한 항체의 생성여부를 판정하고자 ELISA를 이용한 immunoglobulin G의 생성여부를 실험하였다. 시험물질에 대한 항체의 생성여부를 시험하기 위하여 먼저 96-well plate를 시험물질인 TA#1을 coating하였는데, 이때 충분한 항원을 coating하기 위하여 시험물질 원액을 4회에 걸쳐 coating하여 약 200 μ g정도의 시험물질을 coating하였다. 그리고 시험물질을 투여한 개에서 혈청을 분리하여 10배 희석액으로 만든 후 이를 binding시킨 다음, rabbit anti-dog IgG-alkaline phosphatase conjugate를 사용하여 개의 혈청중에 시험물질에 대한 항체중 IgG형을 검출하고자 하였다. 그 결과 Figure 1 및 2에서 도시한 바와 같이 암수 모두에서 대조군을 제외한 시험물질을 투여한 전 동물에서 시험물질에 대한 IgG형 항체가 검출되었으며, 투여량에 따른 용량-상관성은 인정되지 않았다. 한편, 음성대조군으로 개혈청 시료 대신 랫트의 정상혈청을 사용하였을 경우에는 항체가 검출되지 않아, 본 시험에 사용한 검출방법이 개에 특이적인 반응이었음을 알 수 있었다. 결론적으로 본 시험에서는 혈청시료의 10배 희석액을 시료로 사용하여 항체생성여부를 판정하였는데, 이는 보통 항원성시험에서는 훨씬 저농도까지 희석된 혈청을 사용하는 것으로 미루어 시험물질의 항원성이 큰편은 아닌 것으로 판단되나, 개에 반복투여시에 경미한 쇼크를 일으킬 정도의 항체는 생성시키는 것으로 사료되었다.

이상의 결과를 종합하면, 항원성의 판단에 사용하는 기존의 소동물에서의 시험법으로는 시험물질의 항원성을 정확히 판단하기는 어려우며, 개를 이용한 일반독성시험과 연계한 시험이 병행되어야 할 것으로 판단되며 원숭이 등의

Specific IgG in Male Beagle Dogs

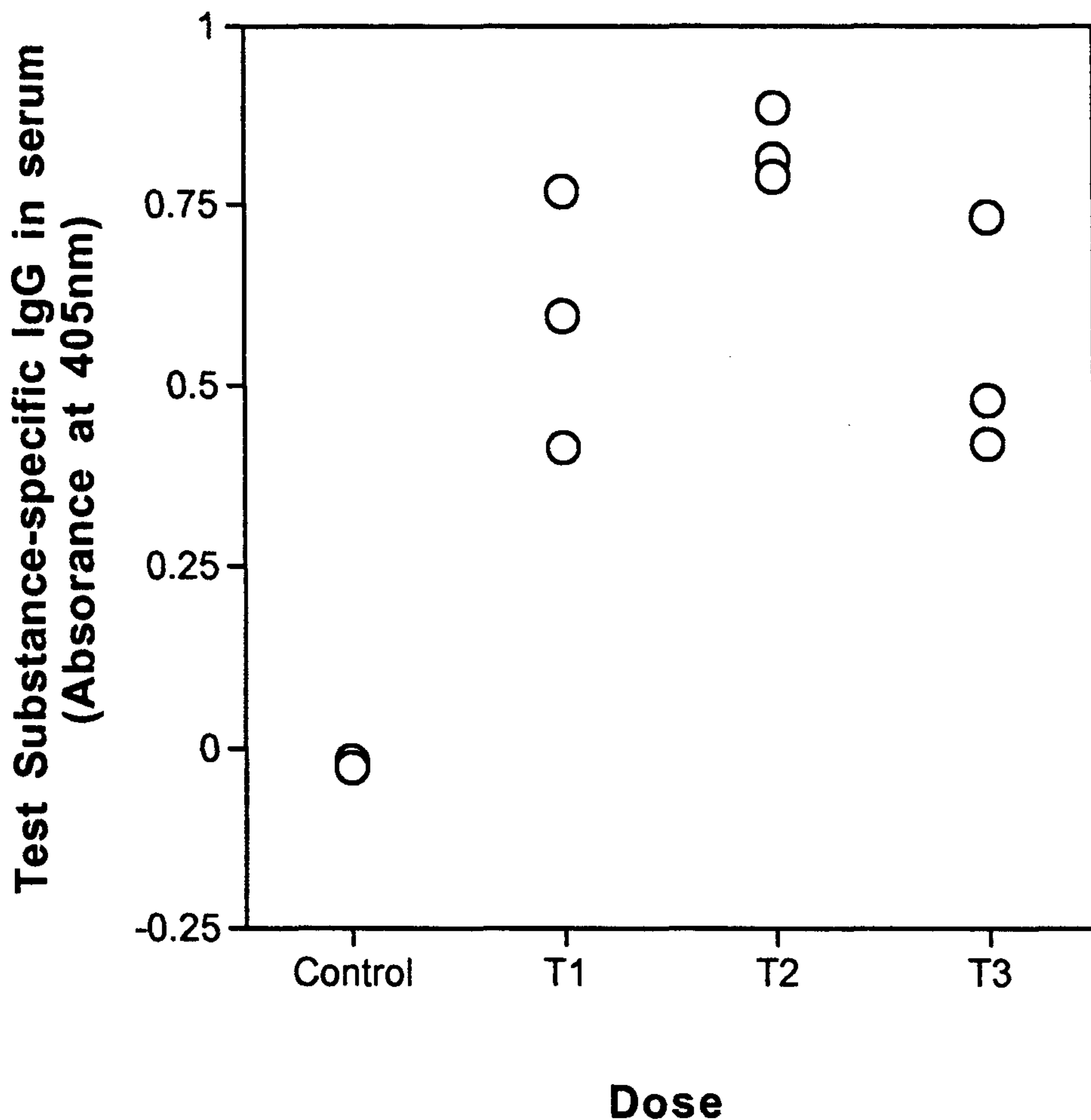


Figure 4-3-1. Detection of IgG in sera from male beagle dogs by ELISA. Male beagle dogs were treated intravenously with a test substance for 28 consecutive days. The sera were prepared from individual animals to analyze the test substance-specific antibodies by the ELISA. In a 96-well plate coated with the test substance, sera were added. Rabbit anti-dog IgG-alkaline phosphatase conjugate was used to detect the antibodies. Each value represents the absorbance at 405 nm of each animal.

Specific IgG in Female Beagle Dogs

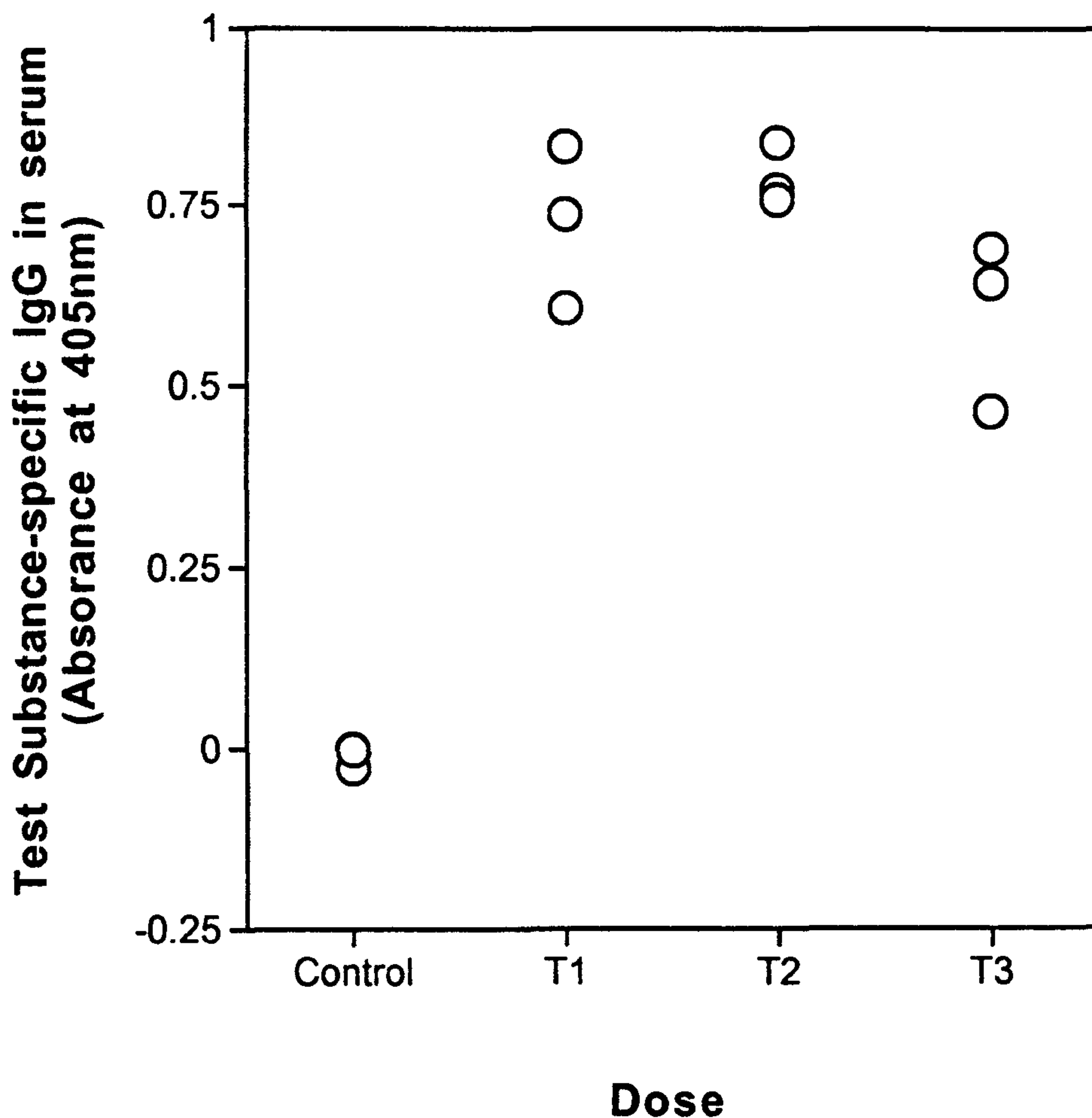


Figure 4-3-2. Detection of IgG in sera from female beagle dogs by ELISA. Female beagle dogs were treated intravenously with a test substance for 28 consecutive days. The sera were prepared from individual animals to analyze the test substance-specific antibodies by the ELISA. In a 96-well plate coated with the test substance, sera were added. Rabbit anti-dog IgG-alkaline phosphatase conjugate was used to detect the antibodies. Each value represents the absorbance at 405 nm of each animal.

영장류를 이용한 연구도 필수적일 것으로 판단되었다.

4. 고찰 및 결론

본 연구에서는 beagle dog을 이용한 항원성 시험법 확립을 위한 연구를 위하여 항원에 특이적인 항체의 생성여부를 혈청중에서 검출할 수 있는 효소면역화학적 검사법(ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay)을 확립하였다. 일반적으로 국내 <의약품 등의 독성시험기준>에 수재된 기니픽 및 마우스 등의 소동물을 이용한 항원성시험에 사용하는 시험법들을 개에서는 그대로 적용하기 어렵고, 개에서의 항원성 여부를 판단하는 것이 좀더 사람에 가까운 결과를 도출할 수 있어, 일반독성시험에 사용하는 동물에서 소량의 혈액을 취하여 혈청에 생성된 시험물질에 대한 특이적인 항체가 생성되는지를 검사하여 소동물에서의 결과와 비교하고자 하였다.

국내의 <의약품 등의 독성시험기준>에는 마우스 및 기니픽을 이용한 전신성 아나필락시 쇼크 반응, 수동피부 아나필락시 반응, 그리고 간접적혈구 응집 반응의 3종의 시험법이 수재되어 있어, 화학물질 및 단백질성 물질의 항원성 여부를 판단에 이용되고 있다. 이 시험법들의 기존의 약물들에서는 어느 정도 효과적으로 항원성 여부를 판단할 수 있는 정보를 제공해 주어 아직도 일본의 경우에는 항원성 연구에 널리 보급되어 사용되고 있는 실정이다. 기니픽을 이용한 PCA 시험은 30여년전에 개발된 시험법으로 무처치 기니픽에 단계 희석한 감작 혈청을 피내투여하고 피부의 mast cell 표면의 Fc receptor에 혈청 중의 IgG1 항체가 결합하도록 4시간에서 5일 정도 방치한 후, 항원과 Evans blue dye를 정맥으로 투여하여 항원과 mast cell 표면의 항체가 결합 mast cell의 degranulation을 유도하므로써 국소적인 histamine의 유리가 주위혈관의 투과성 (vascular permeability)을 증진하게 되고, 그 결과 dye가 피부에 침착하게 되어 청색 반점이 출현하게 되는 원리를 이용한 것이다²⁾. 이 방법은 매우 감도가 좋은 것으로 평가되고 있긴 하지만, 시험자체가 장시간이 요구되고 비교적 시험단가도 높고, 야기시 추가 동물을 사용하게 되며, 동물간의 차이를 보이는 단점이 있어, 특정 IgG1 항체를 검출할 수 있는 ELISA 시험법의 개발에 관한 시도가 많았다³⁾. 본 연구에서도 단백질 시험물질의 항원성 여부

를 판단하기 위하여 기존의 소동물을 이용한 항원성 시험을 수행하였고, beagle dog을 이용하여 혈청내 항체를 검출하고자 하였다. 그 결과 마우스 및 기니픽에서는 항원성을 보이지 않은 시험물질이 개에서는 항원성을 나타내 기존의 항원성 시험방법을 보완할 필요가 있음을 알 수 있었다. 특히 개를 이용한 시험에서는 일반독성시험과 연계하여 혈청중에 존재하는 시험물질에 특이적인 항체를 검출하기 위하여 ELISA 방법을 시도하였으며, 이러한 시험법을 이용한다면, 본 연구에서 검출한 IgG 외에 각 type의 immunoglobulin들을 모두 검출 정량할 수 있어, 기존 항원성 시험시 문제점을 보완할 수 있을 것으로 판단되며, 따라서 앞으로 이에 관한 연구비의 지원이 필요한 것으로 사료된다. 특히, DNA 재조합 기술과 hybridoma 기술의 발전은 과거에는 불가능했던 많은 종류의 단백질 제제를 대량 생산할 수 있는 길을 열어 수많은 제약 기업들이 이 분야의 고부가 가치성을 인식하고 많은 투자를 아끼지 않고 있어 이들 제제에 대한 안전성 평가에 있어서도 기존의 독성시험 개념의 변화를 요구하고 있다. 생물공학제제의 안전성평가는 자칫 그 중요성을 간과할 수가 있는데, 이는 구조 및 성질이 완전히 동일 제제이므로 전혀 문제가 되지 않을 것으로 생각하기가 쉽기 때문이다. 그러나 많은 경우 생물공학제제도 일반 화학물질 이상으로 독성을 유발하게 되는데, 그 이유는 체내 일부조직에서 극소량으로 생산되어 인접 장기에만 약효농도를 유지하며 약리작용을 나타내는 물질을 목표장기에서 약효농도를 유지하기 위하여 전신적으로 과량을 투여하게 되므로써 일어날 수 있는 여러 심각한 문제점들과 아직까지 완전히 이해되지 못한 생물공학제제의 체내 생리작용이 많기 때문이다. 따라서 생물공학제제의 안전성평가도 화학물질의 평가이상으로 그 중요성이 있으며, 특히 항원성 등이 문제가 되므로 영장류를 이용한 시험이 필수적이다. 이는 계통학적으로 인간에 가까운 종일수록 인간에서 일어나는 생리, 약리 및 독성의 판단에 좋을 뿐만 아니라, 생물공학제제에 대한 안전성평가를 설치류로 사용할 때 항체 반응의 유도 및 중화항체의 생성 등으로 인하여 시험의 결과가 무의미해질 수 있기 때문이다.

5. 참고문헌

- (1) Katsutani N, Yoshitake S, Takeuchi H, Kelliher JC, Couch RC and Shionoya H (1992) Immunogenic properties of structurally modified human tissue plasminogen activators in chimpanzees and mice. **Fund. Appl. Toxicol.** 19: 555-562.
- (2) Ovary Z, Benzcerraaf B and Bloch KJ (1963) Properties of guinea pig 7s antibodies. II. Identification of antibodies involved in passive cutaneous and systemic anaphylaxis. **J. Exp. Med.** 117: 951-964.
- (3) Kawabata TT, Babcock LS, Gauggel DL, Asquith TN, Fletcher ER, Horn PA, Ratajczak HV and Graziano FM (1995) Optimization and validation of an ELISA to measure specific guinea pig IgG1 antibody as an alternative to the in vivo passive cutaneous anaphylaxis assay. **Fund. Appl. Toxicol.** 24: 238-246.

제 5 장 환경독성시험법 및 GLP체계 확립

제 1 절 서 론

각국에서는 화학물질들의 안전한 사용을 위해 여러가지 형태의 규제와 정책, 법령 등을 통해서 화학물질의 안전성을 평가하고, 관리하고 있다. 따라서 OECD, 미국, EU 등에서는 신규화학물질 또는 기존화학물질의 위해성 평가를 위하여 기본적인 자료목록을 제출하도록 하고 있다. 자료는 크게 여섯 종류로 구분되는데, 첫째는 물질의 동질성에 대한 자료로 CAS번호, 물질명칭, 구조이고, 둘째는 물리화학적 자료로 용융점, 비등점, 증기압, 물/옥타놀 분배계수, 수용해도 등이며, 셋째로는 노출원과 노출수준에 대한 것으로 생산량, 사용형태, 사용범주가 포함된다. 넷째는 환경중 동태와 이동경로로 호기적 생분해성, 비생물적 분해, 환경중 동태, 경로 및 농도추정 등이 포함되고, 다섯째, 생태독성에 대한 자료로 어류급성독성, 물벼룩에 대한 급성 및 만성 독성, 조류에 대한 독성, 육상생태계에 대한 독성 등이 포함되며, 여섯째, 독성자료로는 급성독성, 반복투여독성, 유전독성, 생식독성 등에 관한 자료를 필요로 한다.

예를 들어, 농약의 경우에 우리나라, 일본, 미국의 경우를 보면 원료와 제제등에 대해 필수 요구 자료가 있어 이를 충족시켜야 농약 등록, 사용이 가능한데, 일본은 한국과 유사하게 25개 항목의 환경독성자료를 요구하고 있고 미국은 최대 72개 항목의 독성자료를 요구할 수 있도록 규정하고 있다. 그런데 이와같이 법적으로 요구하는 독성 및 환경독성자료들은 화학물질의 합리적 관리를 위해 필수적이기 때문에, 제출자료항목, 시험방법, 우수실험실 운영기준(Good Laboratory Practice : GLP) 등이 법적으로 명시되어 있고, 아울러 화학물질의 안전성을 보다 잘 평가할 수 있는 여러가지 환경독성시험기술들이 개발, 새로운 시험방법으로 추가되기도 한다.

우리나라에서 유해화학물질 관리는 1991년 유해화학물질 관리법이 제정, 시행되면서 본격적인 관리개념이 도입되어, 신규화학물질의 등록 및 기존화

화학물질의 관리를 위해 자료요구항목이 제시되었으나, 거기에 따라야 하는 국가표준시험방법의 제시와 GLP제도의 도입이 뒤를 받쳐 주지 못하였다. 그러나 1996년 OECD가입의 추진으로 국가화학물질관리체도가 OECD수준으로의 변신이 요구되어, 국내에서도 화학물질의 시험방법의 확립, 관리제도의 개선, GLP제도의 도입 등이 당면과제로 대두되었다.

특히 1996년말 우리나라의 OECD가입이 확정되면서 OECD의 화학물질관리 프로그램들인 ①기존화학물질의 체계적 협력조사, ②화학물질 평가자료의 상호인증, ③기타 화학물질 관리에 대한 OECD의 규정 등에 능동적으로 대처하기 위해서는, 국내의 제도개선뿐만 아니라, 국내의 시험기관육성이 시급히 요구되었다.

따라서 본 연구에서는 국제적인 test guideline에 따라서 시험할 수 있는 역량을 키우기 위하여, 1) 최근에 어류의 만성독성시험을 대체할 수 있는 시험법으로 많이 연구되고 있는, 어류생육초기 독성시험을 수행할 수 있는 방법을 확립하고, 2) 화학물질이 어류의 병리 및 혈액화학적 인자에 미치는 영향을 연구하여, 화학물질의 만성적 영향을 민감하게 검출할 수 있는 인자를 찾고, 3) 토양에서의 농약의 대사시험법을 확립하고, 4) 농약의 식물대사에 대한 연구를 수행하여, 관련시험법을 정립하고, 5) 화학물질의 수중에서의 광분해에 대한 연구를 수행하였다. 아울러 환경독성시험분야에 대해서 GLP체제를 도입하여, 모든 시험자료가 GLP체제에서 만들어지게 함으로써, 우리 연구소에서 생산되는 자료의 신뢰성을 높여, 국내에서는 물론 국제적인 경쟁력이 있도록 하였다.

제 2 절 생태독성시험법 연구

1. 송사리를 이용한 생육초기독성시험법 확립

가. 연구배경

어류를 이용한 독성 시험은 급성독성시험, 14일 독성시험, 만성 독성시험, 생육초기독성시험 등이 있다. 급성독성시험은 가장 1차적으로 환경 위해성 물질의 독성 정도를 평가하는 시험으로, 짧은 시간 동안에 많은 시험을 수행할 수 있고, 노력과 비용이 적게 든다는 장점이 있으나, 실제 환경에서의 영향을 평가할 수 있는 예측성(predictability)이 낮다. 이러한 단점을 다소라도 보완하기 위해서 노출 기간을 좀 길게 14일로 늘인 독성시험이 제안되었으나, 현재 국제적으로 널리 사용되지 않고 있다. 급성독성시험 결과에 따라 만성적 영향에 대한 시험이 필요하게 되는 경우, 만성독성시험을 하게 된다. 이러한 만성독성시험은 1967년 이래로 많은 독성시험이 수행되어 왔으나,^{1,2)} 독성시험 기간이 embryo-adult-embryo일 경우, 최소 6개월에서 최고 2년이 소요되므로 비용과 인력이 상당히 집중되어야 한다. 따라서 매년 1000여종 이상의 새로운 물질들에 대하여 여러 가지 환경 생태독성을 평가해야 하는 현실을 감안하여 볼 때, 어류에 대한 안전 농도를 보다 빠르고, 경제적으로, 그러나 신뢰성 있게 평가할 수 있는 방법의 개발이 요구되어 왔다. 이러한 문제를 해결하기 위해 1970년 이후 어류의 수정란에서부터 치어(larvae)단계를 거쳐 자어(early juvenile)단계에 이르는 어류의 생육초기 단계를 이용한 독성 시험(early life stage toxicity test)이 개발·연구되어왔다. 어류의 생육단계 중에는 외부의 자극에 특히 민감한 시기가 있으며, 이 시기의 독성 시험 결과를 토대로 만성 독성을 예측하고 있다.³⁾ 어류생육초기 독성시험을 이용하면 어류의 크기, 연령 등으로 인하여 실험실적 사육이 부적합한 어종에 대해서도 어류의 생육·번식 등에 대한 최대허용농도(Maximum Acceptable Toxicant Concentration, MATC)를 구할 수 있는 장점들이 있다.³⁾ 이러한 효용성 때문에 OECD/EPA Guideline 에서도 어류 생육초기 독성시험을 정규

항목으로 채택하였다.⁴⁵⁾ 이러한 어류의 생육초기 독성 시험을 신뢰성 있게 수행하기 위해서는 먼저 대상 어종의 몇 가지 성장 인자(부화율, 부화 소요일수, 부화후 성공율 등)에 대한 기본적 요구 조건을 만족시킬 수 있는 시험 체계가 확립되어야 한다. 본 시험에서는 어류의 생육 초기 단계를 이용한 독성 시험을 수행함에 있어서 OECD/EPA Guideline에서 요구하는 성장 인자에 대한 기본적 요구 조건을 만족시키기 위한 최적 조건에 대한 시험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

1) 수정란(embryo)의 처리 및 관찰

본 시험에 사용한 수정란은 한국 화학 연구소·환경 생태 연구실내 사육실에서 사육하고 있는 송사리(*Oryzias latipes*)를 이용하였다. 수정란을 얻기 위해서 본시험이 시작하기 3일전부터 1일 간격으로 포란된 어체에 붙어 있는 수정란을 직접 채집, 200개씩 각각 냉장보관(4℃) 하였다. 시험직전에 냉장 처리된 수정란을 해부현미경으로 검경하여, 냉장 보관 0일, 1일, 2일, 3일별로 부화수조에 20개씩 넣고 3반복으로 동시에 처리하였다. 각 부화용 비이커 안의 수정란을 해부 현미경을 통해 매일 검경한 후, 썩은 알은 제거하고 부화 개체, 치사어 등을 기록하였다. 전체적으로 부화된 송사리가 90% 이상 되면, 부화용 비이커를 제거하여 부화된 송사리가 자유롭게 유영하도록 하였고, 동시에 상하 왕복 운동장치를 제거하였다. 시험 기간은 수정란에서 시작하여 20일이 경과 될 때까지 수행하였다.

2) 처리조건

시험처리한 각 인자별 시험조건은 다음과 같다.

- 수온 : 25℃, 28℃ b)
- 냉장 보관일수(pooling 일수) : 채집 직후, 1일, 2일, 3일
- 부화 수조의 망목 크기 : 100 μ m, 500 μ m
- 상하 왕복 운동의 횟수 : 1회, 5회, 10회, 15회

상기의 처리 조건을 조합하면 Table 5-2-1과 같다.

Table 5-2-1. Test conditions

Temp.(°C)	Sieve size(μm)	rpm	Temp.(°C)	Sieve size(μm)	rpm
		1			1
	100	5		100	5
		10			10
28		15	25		15
		1			1
	500	5		500	5
		10			10
		15			15

3) 노출 방법

노출은 유수식 노출장치(continuous flow system)에서 실시하였다(Fig. 5-2-1). 이 장치는 본 연구실에 설치되어 있는 mini-dilution system에서 head chamber와 dilution chamber를 제거하고 dilution water reservoir의 희석수(지하수)를 peristaltic pump를 이용하여 분당 20ml을 mixing chamber에 공급하고, 사이펀 원리에 의해 splitter chamber에 보내고, 다시 4등분하여 노출수조(exposure chamber)에 들어가서 3반복 처리된다. 노출 수조의 크기는 가로 18.7cm \times 세로 7cm \times 수위높이 6.5cm 로 희석수가 700ml 가 들어가며, 들어오면 들어온 양만큼 standpipe를 통해 배출토록 하였다. 수정란 노출용 비이커는 100ml용 비이커의 바닥에 직경 2cm의 구멍을 뚫고 여기에 망목(망목 크기 100 μm , 500 μm)을 각각 붙인다. 이 비이커에 수정란을 넣고 노출수조 안에 띄운 후 oscillating apparatus(상하 왕복 운동장치)를 이용하여 분당 1회, 5회, 10회, 15회 상하로 각각 움직여 주었다. 희석수는 지하수를 1 μm membrane filter로 여과한 후, 카트리지형 활성탄소를 통과시킨 후 dilution water reservoir안에서 가온하여 공급하였다. 시험 시작하는 첫날에 각 수조의 DO와 pH를 측정하였다.

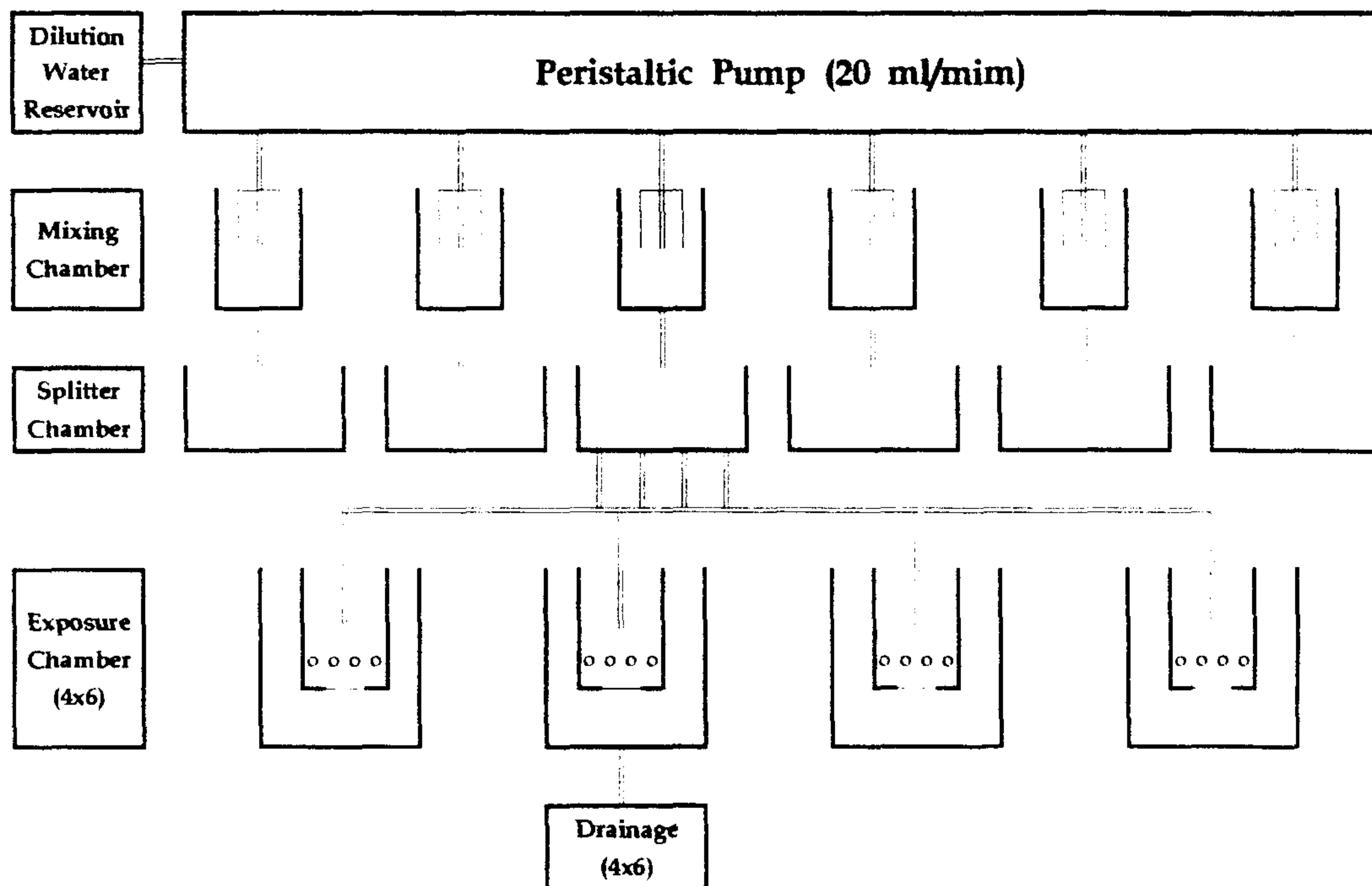


Fig 5-2-1. Continuous flow system used in this test.

4) 먹이 급여

부화직후에는 Tetramin^R baby fish food 먹이를 소량 공급하고 3일 경과후 부터는 Artemia를 부화시켜 매일 충분량을 공급하였다.

5) 통계적 처리

먼저 시험군내에서 반복간의 유의성을 보기 위해서 F-Test하였고, 동일성 검정에서 유의성이 없었기 때문에, 각 처리군 간에 다중 비교 검정을 실시 하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 부화율

각 처리군 별 수정란의 부화율을 다음의 Table 5-2-2에 정리하였다.

Table 5-2-2. Hatching success of the embryo exposed to the various exposure conditions

Temp. (°C)	Sieve size(μm)	RPM	Storage period after collection at refrigerator(day)			
			0	1	2	3
28	100	1	10	28	32	25
		5	60	60	52	13
		10	92	82	80	68
		15	87	86	78	62
	500	1	25	28	25	38
		5	57	67	72	18
		10	88	83	78	65
		15	91	87	75	50
25	100	1	53	32	5	5
		5	10	5	10	12
		10	58	65	70	47
		15	83	82	72	70
	500	1	70	43	18	5
		5	21	12	14	5
		10	62	70	50	48
		15	87	87	78	80

망목의 크기에 관계없이 수온이 28°C에서, 상하왕복운동 횟수 10회, 15회와 수온 25°C에서, 상하왕복운동 횟수 15회의 처리 조건에서 부화율이 평균 84% 이상이었으며, 대체적으로 수온에 관계없이 상하왕복운동 횟수가 5회이하이

면 부화율이 60%이하의 수준을 보였다. 통계 처리 결과, 수온 28℃와 25℃에서 상하왕복운동 횟수 10회, 15회에서 각각 유의성이 인정되었고, 특히 수온 28℃, 상하왕복운동 횟수 10회, 15회와 수온 25℃, 상하왕복운동 횟수 15회에서 냉장보관 0일, 1일, 2일의 조건에서 매우 유의한 것으로 판명되었다. 한편 OECD지침서에서는 송사리에 대한 부화율에 대한 기준은 없으나, 무지개송어, fathead minnow의 경우, 기준이 최소 66%이상으로 제시하고 있으며, 미국 EPA에서는 송사리에 대한 기준을 90%이상으로 제시하고 있다. 따라서 이러한 기준을 만족시키기 위해서는, 망목크기의 처리에 관계없이 수온 28℃, 상하왕복운동 횟수 10회 또는 15회이거나, 수온 25℃에서 상하왕복운동 횟수 15회의 조건에서 냉장 보관 2일 이내의 수정란을 pooling하거나, 0일, 1일, 2일의 수정란을 각각 처리할 경우 이러한 기준을 만족시킬 수 있을 것이다.

2) 부화에 소요된 일수

다음의 Table 5-2-3은 수정란을 처리한 후, 부화된 개체수를 매일 누적적으로 기록하고, 이를 근거로 하여 각 처리군 별로 부화하는데 소요되는 일수를 나타낸 것이다.

결과에 의하면, 망목의 크기에 관계없이 수온 28℃에서, 상하왕복운동 횟수 10회와 15회 그리고 수온 25℃에서 상하왕복운동 횟수 15회의 조건에서 냉장 보관 0일, 1일, 2일의 처리시에만 유의성이 있었으며, 부화에 소요된 일수는 7.3 ± 0.49 이었다. 나머지 처리군에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 미국의 EPA 자료에 의한 송사리 수정란의 평균 부화 소요일수는 9.1 ± 0.16 으로 본 연구실의 결과는 충분히 만족할 만한 수준이라 생각된다.

3) 부화후의 성공률

각 처리군의 부화후 성공률은 다음의 Table 5-2-4에 정리하였고, 통계처리 결과 유의성이 없었다. 그러나 수온 25℃ - 28℃에서 상하왕복운동 횟수를 10회와 15회를 주는 경우, 부화후 성공률이 86-97%이 이르러 이는 미국의 EPA자료의 84%를 상회하였다.

Table 5-2-3. Days to end of hatching of the embryo exposed to the various exposure conditions

Temp. (°C)	Sieve size(μm)	RPM	Storage period after collection at refrigerator(day)			
			0	1	2	3
28	100	1	8.0	7.4	7.3	6.8
		5	7.7	7.4	7.7	8.7
		10	6.7	7.7	7.7	6.8
		15	7.0	7.1	7.5	7.0
	500	1	7.4	6.8	6.8	6.6
		5	7.3	7.5	7.7	7.0
		10	6.5	7.5	7.6	7.0
		15	7.2	7.3	6.7	6.8
25	100	1	6.7	7.1	7.3	7.0
		5	7.6	8.7	8.7	7.8
		10	10.5	9.3	10.1	9.5
		15	8.5	8.4	8.8	8.6
	500	1	7.8	7.6	8.2	9.0
		5	8.7	8.9	8.3	8.0
		10	9.9	8.7	9.8	9.1
		15	8.5	8.6	8.7	8.7

Table 5-2-4. Post-hatching success of the embryo exposed to the various exposure conditions

Temp. (°C)	Sieve size(μm)	RPM	Storage period after collection at refrigerator(day)			
			0	1	2	3
28	100	1	56	69	86	56
		5	91	48	84	67
		10	85	88	80	91
		15	100	96	100	98
	500	1	73	92	84	91
		5	93	88	87	87
		10	95	96	100	92
		15	98	98	98	93
25	100	1	67	27	33	67
		5	50	33	100	92
		10	91	81	91	74
		15	98	98	93	91
	500	1	42	46	53	33
		5	93	100	100	66
		10	90	89	94	71
		15	96	96	94	100

4) 수정란의 관찰

처리수온을 달리 했을 때, 수정란의 발달 정도를 관찰한 결과는 다음 Table 5-2-5와 같다. 관찰 결과 각 중요한 발달단계에 도달하는 시간을 보면, early neurula stage까지 걸리는 시간이 28°C에서는 1일이 소요되나, 25°C에

서는 2일이 걸렸다. 심장 박동이 28℃에서는 3일만에, 25℃에서는 4일만에 관찰되었다. 전체적으로는 부화에 걸린 시간이 28℃에서는 7.7일 소요되었고, 25℃에서는 9.3일로 약 1.6일 빠른 것으로 나타났다.

Table 5-2-5. Times to reach the developmental stage of embryo exposed to different water temperature

No	Main development feature	Time after fertilization(Day)	
		28℃	25℃
1	Activated egg stage (oocyte maturation)	0	0
2	Blastodisc stage	0	1
3	Morula stage	0	1
4	Blastula stage	0	1
5	Gastrula stage	1(Late)	1(Early)
6	Early neurula stage	1	2
7	Late neurula stage	2	3
8	Somite stage(ventriculation)	2	3
9	Heart activity(beat)	3	4
10	Body movement Pigmentation of eye	4	5
11	Pectoral fin formation Blood circulation stage	5	6
12	Pericardial cavity formation stage Many melanophore appear on eye	6	7
13	Fin movement	7	8
14	Hatching	7.7	9.3

위의 시험결과에 따라서 기존의 표준시험법에서 요구하는 기준을 만족시킬수 있는 시험조건을 요약하면 다음과 같다.

처리조건, 시험조건			부화율 (%)	부화 소요일수(일)	부화후 성공율(%)
냉장보관 0일 (채집직후.)	10RPM 28±1℃ (27.5-28.3)	100(μm) DO: 7.3-7.4 pH: 7.0-7.2	85	7.4±0.47	86
냉장보관 1일. 냉장보관 2일		500(μm) DO: 7.0-7.4 pH: 6.9-7.1	83	7.2±0.05	97

어류의 생육초기 독성시험을 위한 최적 조건은 부화수조의 망목의 크기에 관계없이 (1) 수온: 25℃ - 28℃, (2) 부화 수조의 상하 왕복 운동 횟수: 10회 - 15회/분당 (3) 수정란의 pooling 가능 일수: 채집 직후부터 냉장 보관 2일 까지의 조건을 주면, 부화율은 72% 이상, 평균 84%으로 OECD지침서의 기준인 최소 66%이상이며, 부화에 소요되는 일수는 약 7.3일로, EPA 지침서가 제시하고 있는 7.5일의 수준을 충분히 만족시키며, 부화후 성공률 또한 86 - 100%에 이르러 OECD 기준의 80%, EPA 기준의 84%를 상회함으로 본 연구의 처리가 OECD/EPA Guideline 이 요구하는 기본적인 시험 조건을 충분히 만족시킬 수 있다.

라. 결론

어류 생육 초기 독성 시험(Fish Early-Life Stage Toxicity Test) 방법을 확립하기 위하여 송사리 (*Oryzias latipes*)의 수정란을 이용한 기초 시험을 수행하였다. 시험에서 조사된 조건은 (1) 수온, (2) 부화 수조의 상하 왕복 운동 횟수, (3) 부화 수조의 망목 크기, (4) 수정란의 Pooling 가능 일수이고, 이들 요인이 수정란의 부화율, 부화 소요 일수, 부화후 성공율등의 성장 요인에 미치는 영향을 실험하였다. 실험 결과, 부화 수조의 망목 크기는 성장 요인에 영향을 주지 않았으나, 수온, 부화수조의 상하 왕복 운동 횟수, 수정란의 pooling가능 일수는 수정란의 발달에 영향을 주었다. 수온이 25℃일 때 상하 왕복 운동 횟수를 분당 15회로 주는 경우와 28℃에서 상하 왕복 운동 횟수를 분당 10회, 15회를 주는 경우, 부화수조의 상하 왕복 운동 횟수, 수정란의 pooling 일수 및 수온에 통계학적인 유의성이 있었고, 수정란의 pooling은 냉장 보관 2일까지 가능하였다. 이러한 조건하에서 송사리의 수정란은 부화율이 62-92 %, 부화에 소요된 일수는 6.5-8.8 일, 부화후 성공률은 71-100 %이었다. 따라서 어류의 생육 초기 독성 시험법에 부화 수조의 망목 크기는 영향이 없었다. 그러나 수온은 25℃ - 28℃, 부화 수조의 상하 왕복 운동 횟수: 10회 - 15회가 적당하며, 수정란은 채집 직후, 1-2일 정도의 냉장 보관은 부화율 및 발생에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이때 송사리의 수정란은 부화율은 84 %이상, 부화에 소요된 일수는 약 7.3일, 부화후 생존율은 86-97 %로 OECD/EPA guideline에서 요구하는 기본적인 시험 조건을 만족시킬 수 있었다.

마. 참고문헌

1. Eaton J.G 1974 Chronic toxicity of Cd to the bluegill (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) Trans Am Fish Soc 103 : 929-735
2. Mount DI, Stephan CE: 1969 Chronic toxicity of copper to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) in soft water, J Fish Res Bd Can 26:2449-2457.
3. Gary M. Rand, Sam R. Petrocelli, 1984. Fundamentals of Aquatic Toxicology :58-59
4. OECD, 1992. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS OECD/210/Adopted: 17.07.92
5. US EPA 1991. Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka(*Oryzias latipes*) EPA/600/3-91/063

2. 어류의 혈액화학, 혈액생화학적 및 조직학적 지표를 이용한 독성시험법 연구

가. 연구배경

어류를 이용한 독성시험에서 관찰하는 인자는 급성독성시험인 경우, 치사를 보고, 만성독성시험인 경우는 성장, 생식 등을 측정한다. 그래서 만성독성시험은 시험에 소요되는 기간이 최소 6개월에서 2년까지 소요되고, 비용 또한 많이 든다. 이러한 이유로 해서 만성독성시험을 하는 경우는 많지 않으나, 실제로 화학물질의 안전농도를 구하는 것은 화학물질 관리에 있어서 매우 중요하다. 근래에 어류를 이용하여 유해화학물질과 질병, 스트레스의 원인을 생물적 지표를 도입, 독성의 정도를 예측하고 있으며, 특히 조직병변 또는 감염과 전해질과 효소를 포함한 혈청 지표들간의 상관 관계를 규명함으로써 유해물질로 인한 손상과 기능 상실의 예측과 진단이 가능할 것이다. 여기에 활용되는 혈액학적 지표에는 헤모글로빈, 헤마토크리트치, 평균 적혈구 농도, 평균 헤모글로빈 농도, 평균 적혈구 용적, 적혈구 계수뿐만 아니라, 그들의 형태학적 관찰 등이 이용되고 있으며, 또한 혈장 글로블로빈, 단백질, 나트륨, 인, 염소 등을 포함한 혈중 전해질 등의 연구가 중금속의 급성 내지 아급성, 만성 노출에 따른 영향을 평가하는데 활용되고 있다.^{1,2)} 그들은 또한 각기 다른 어종간의 건강 상태의 본질적인 지표와 더불어 수환경의 오염 수준을 모니터링하는 유용한 도구로 지목 받고 있다.³⁾ 중금속은 중요한 수질오염물질로, 특히 카드뮴은 수생물에 높은 독성을 나타내고⁴⁾ 반감기가 길어 수환경의 중요 오염물질로 널리 알려져 있다. 최근의 보고에서 물고기의 카드뮴 노출에 따른 급성, 아급성 영향을 혈액학적, 생화학적 견지에서 해석하려는 시도가 수행되고 있다.^{5,6,7)} 혈액은 외부와 내부 환경에서 특이한 보상성 기작을 가지고 있으며, 특히 중금속의 영향을 받은 물고기에 있어서 혈중에 빠른 변화를 야기하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 중금속의 노출에 따른 물고기의 혈액학적, 혈액 화학적 지표에 관한 연구는 오염원의 노출, 질병과 저산소증 등에 관한 생리학적 변동을 검출하는데 이용되고 있다.^{8,9)} Paul 등¹⁰⁾은 연준모치 (*Pimephales promelas*)에서 카드뮴을 12ppm 수준으로 노출시킨 후 1주 간격으

로 30일간 조직학적 관찰을 수행하였으며, George 등¹¹⁾은 넙치(*Fundulus heteroclitus*)에서 카드뮴을 50 ppm 수준으로 노출시킨 후 소장, 신장, 아가미의 조직 병리학적 관찰을 통하여 카드뮴의 독성을 평가하려 시도하였다. 그들은 모두 어류를 모델로 조직 병리학적 관찰을 통하여 중금속의 독성을 평가하려 하였다. 다양한 노출 수준과 유해 물질 등에 의한 스트레스 양상들은 어체내 혈액과 조직내의 생리학적 변동을 통해 몇몇 연구자에 의해 조사되어 왔으나, 준치사농도 수준에서 단기간의 독성 영향을 노출과 연관지어 해석함에는 미흡함이 있다.^{12,13,14)} 이에 본 연구는 한국에서 서식하는 담수어종 중에 경제적으로 중요하고, 서식 분포적 우점종인 한국산 메기를 이용하여, 아급성(준치사) 수준으로 카드뮴에 노출시켜, 어체에 미치는 독성학적 영향을 혈액학, 혈액화학 및 조직학적 관점에서 접근, 해석하려 하였다.

나. 재료 및 방법

1) 시험 어종

충청남도 논산 인근의 양어장에서 한국산 메기 치어를 실험시작 2주 이전에 입수하여, 본 연구실의 외부 순환여과 방식의 사육수조에서 순화하여 공시하였다. 순화기간 동안 매일 어체의 2-4%에 상응하는 메기 육성사료를 2회 공급하였다. 실험 하루전, 평균 체장 16.24 cm 와 평균 체중 15.73 g의 건강한 메기를 200 마리 선별하였고, 시험 기간동안 사료에 의한 대사성 장애를 최소화하기 위해 먹이 급여를 중지하였다.

2) 시험조건

(1) 수질

물고기의 순화와 실험에 사용하는 시험수 및 사육수는 지하수를 본 연구실의 활성 여과 방식으로 여과한 것으로, 대전 보건환경연구원에서 3개월 간격으로 분석하였다. 또한 경도 및 알카리도는 1개월 간격으로 실험실에서 분석하였다. DO, pH 및 NH₃는 전시험 기간동안 매일 분석하였다. 시험 기간동안의 수질 분석결과는 다음 Table 5-2-6과 같다. 광주기는 16L:8D(광조건:

암조건)로 하였고, 광도는 180-200 Lux수준을 유지하였다.

Table 5-2-6. Water quality used in this test

Temperature (°C)	pH	DO (mg/L)	Hardness (mg/L as CaCO ₃)	Total alkalinity (mg/L as CaCO ₃)	NH ₃ (mg/L)
24.2 - 26.5	6.5 - 7.3	5.8 - 8.0	103	102	< 0.25

(2) 노출

준치사 농도 노출수준을 결정하기 위해, OECD guideline에 준해 급성독성 시험을 수행하였다.¹⁵⁾ 각기 다른 농도로 각 수조마다 7마리씩 노출시키고 96시간동안, 24시간 간격으로 치사, 수질 및 이상 행동을 관찰하였다. 반수치사농도(LC50)는 probit 법에 의해 계산하였다.¹⁶⁾ 시험은 각 처리군과 대조군을 한 쌍으로 7 group으로 구성하고, 다시 4개의 노출군과 노출후 48시간 경과후의 3개의 회복군으로 설정하였다. 각 group마다 20L수조에 18L의 시험수를 채우고, 무작위로 선별한 물고기를 18마리씩 투여하고, 계속 공기를 주입하였다. 시험 농도는 과거의 보고에서 제시하고 있는 48시간 반수치사농도의 1/2와 1/10 수준에 상응하는 농도를 처리하였다.^{5, 10, 17, 18)} 우선 각각의 7 group을 48시간 LC 50 값의 1/2수준으로 48시간동안 노출한 후, 3개의 회복군은 깨끗한 물로 바꾸어 공기를 계속 주입하였고, 카드뮴 노출이 전혀 없는 대조군에서도 같은 방법으로 노출시켰다. 일련의 과정을 48시간 LC50값의 1/10수준에서도 반복 실시하였다. 시료는 처리군과 대조군에서 1, 12, 24, 48시간마다 물고기와 물시료를 채취하였고, 48시간 경과 후 회복기간에도 1, 12, 24시간마다 시료를 채취하였다. 물고기는 각각의 시험 기간동안 치사와 중독(독성) 증상을 기록하고, 죽은 물고기는 수질의 악화를 방지하기 위해 관찰 즉시 제거하였다. 물고기의 체중 및 체장은 각 시험군의 노출시간 직후,

마취로 인한 혈액의 변동을 최소화하기 위해 마취없이 측정하였다.

(3) 독성 반응을 평가하기 위한 방법

혈액학적, 혈액 화학적, 및 분석학적 기법을 도입하고 다음에 그림으로 도식하였다.(Fig. 5-2-2)

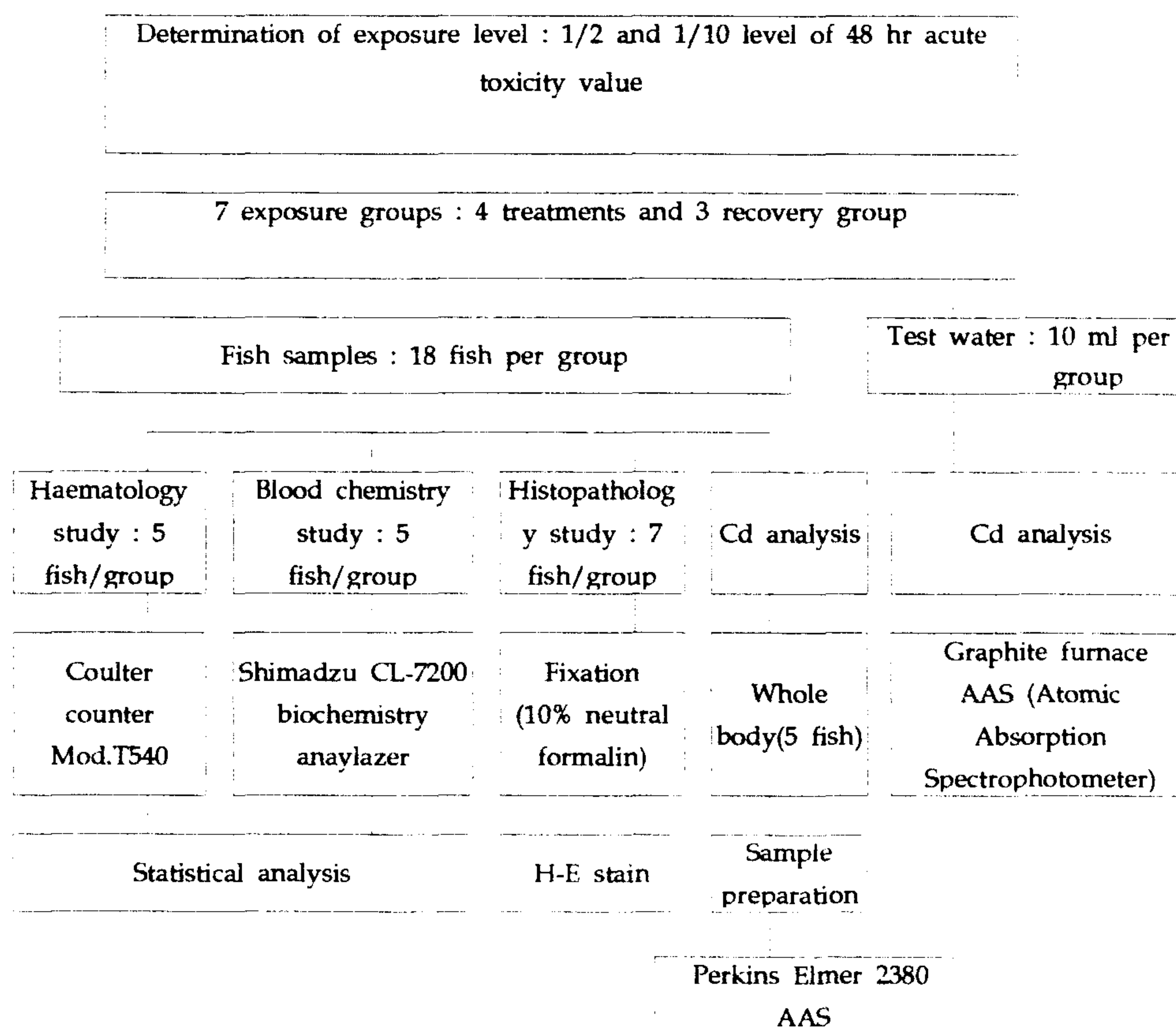


Fig. 5-2-2. Experimental scheme for this study.

① 혈액학 및 혈액생화학적 접근

어체 취급, 마취, 항응고제, 외과적 처치에 따른 혈액치의 변동을 최소화하기 위해 다음과 같이 처리하였다. 가능한 한 스트레스를 피하기 위해 작

고 부드러운 뜰채를 이용하여 물고기를 재빨리 잡아 시험대 위에 올려놓고 움직임을 적게하기 위해 눈을 가리고 미근부의 채혈부위를 설정한다. 채액과 조직액의 유입을 최소화하기 위해 모세혈관용 카테터의 앞부위를 2cc 주사기에 연결하여 미부혈관(미동맥, 미정맥)에 직접 삽입, 채혈한다. 혈액학적 자료를 위해 혈액을 즉시 EDTA가 처리된 주사기를 이용하여 EDTA채혈병에 넣은 후, 바로 Coulter Counter(Model T540, Coulter Electronics, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액 생화학적 자료는 EDTA가 처리되지 않은 주사기를 사용하고, 어체의 혈액량 부족에 따른 문제점을 극복하기 위해 과거 보고³⁾에 근거하여 10마리 개체의 혈액을 섞은 후, 5개의 시료로 나누어 4℃에서 1시간 방치후, 응고된 혈액을 3000 rpm, 10분간 고속 원심 분리기를 이용하여 혈청을 분리한 후, 지속적인 혈청 시료를 사용하기 위해 -80℃에서 보관하였다. 혈청은 자동혈청분석기(Shimadzu CL-7200)를 이용하여 분석하였고, Na, Cl, K 등의 전해질은 전해질 분석기(Model 644, Ciba-Corning, Germany)를 이용하였다. 혈액에 관한 자료의 분석과 통계는 SAS프로그램으로 처리하였다.

② 조직 병리학적 접근

조직 병리학적 관찰은 group당 7마리를 채혈후 10% 중성 포르말린에 1주 가량 고정하고, 흐르는 물에서 1일간 수세한 후, 단계별 시리즈의 ethanol에서 탈수하고 파라핀 포매한후 횡으로 4 μ m씩 cutting한 후, 헤마톡시린-에오신으로 염색하고 아가미, 피부, 간, 뇌, 소장, 신장 등을 광학 현미경하에서 관찰하였다.

③ 카드뮴의 분석

각 group당 시험수와 어체에서 분석하였다. 카드뮴이 처리된 시험수는 전처리 과정없이 pyrolytic THGA-tube를 이용한 graphinate furnace AAS(Atomic Absorption Spectrophotometer)로 직접 분석하고, 어체내 카드뮴의 정량은 전처리한 후, CC-5524 Sigma Standard로 보정된 Perkin Elmer 2380 AAS로 측정하였다. 전처리 과정은 어체를 작게 잘라 100℃로 3시간 가열하여, 시료를 5g 준비하고, HNO₃와 HClO₄가 2:1로 섞인 혼합액을

넣는다. 120℃에서 3시간 가량 분해하고, 여기에 다시 10 ml의 HNO₃를 첨가하였다. 다시 한번 300℃에서 4시간 분해시킨 후, 온도를 650℃까지 서서히 올렸다. 마지막으로 증류수를 첨가하여 50 ml로 보정후 분석하였다. 이들의 분석조건은 파장 228.8 nm, 검출한계는 0.025 mg/L로 hollow cathode lamps를 이용하였고, 0.028 mg/L의 sensitivity 조건에서 분석하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 급성 독성 시험

한국산 메기를 카드뮴에 노출시킨 후, 독성 증상을 24시간 간격으로 관찰한 결과, 수조의 한 모퉁이에 모여, 불안, 광분 유영 및 경련 등의 증상을 보였으며, 때때로 균형을 상실하고 약간의 점액을 분비하며 피부가 창백해졌다. 수조 벽면으로 붙거나 수조 바닥에 가라앉아 죽었다. 48시간 LC50값은 25℃에서 3.55 mg/L이었고, 96 시간 LC50값은 1.52 mg/L이었다. Kargins(1996) 등은 틸라피아(*Tilapia aurea*)를 이용한 카드뮴의 LC50값을 0.7-20 mg/L로 보고하였고, McCarty(1978)는 금붕어(*Carassius asratus*)에 대한 LC50값이 연수(soft water)에서 각각 2.76 mg/L(48시간)과 2.13 mg/L(96시간)로 보고하고 있으며, 경수(hard water)에서는 46.8 mg/L과 46.9 mg/L로 각각 보고하고 있다. 이같은 결과로 볼 때, 카드뮴의 독성은 경도(hardness)에 따라 큰 차이가 있음을 알 수 있다.^{19, 20)}

2) 혈액학적 지표

적혈구수(RBC), 헤모글로빈(Hb), 헤마토크리트(Hct)치는 카드뮴을 1.78 mg/L 수준으로 노출후, 24시간과 48시간에 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내었고, 이와같은 상승치는 회복기에 들어 대조군의 수준으로 돌아갔다. 0.35 mg/L 수준으로 노출하였을 때는 Hb와 Hct의 변동은 없으나, 적혈구수가 노출후 24시간에 약간의 일시적 변동이 관찰되었다. 평균 Hb 농도(MCHC), 평균 적혈구수(MCH), 평균 적혈구 용적(MCV)은 모든 처리농도(1.78 mg/l과 0.35 mg/L)에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.(Table 5-2-7,

5-2-8) 넙치(*Pleuonectes flesus*)에서 아급성 수준으로 9주간 노출 후 Hb, Hct, RBC의 증가가 관찰되었으나, Smiths 등(1976)과 Calabres(1975)는 메기(*Ictalurus punctatus*)와 넙치(*Pleuonectes flesus*)에서 유의한 차이가 없음을 보고하였다.^{21, 22)} MCH, MCV, MCHC의 변동이 일어나지 않는 상태에서 RBC가 증가함은 Hb의 증가에 기인되는 것으로 사료되며, Hb의 증가는 Hct의 증가와 직결된다. RBC와 Hct의 변동은 RBC의 팽창과 위축에 관련이 있는데, 혈액 희석(hemodilution)과 혈액 농축(hemoconcentration)은 무지개 송어와 타 어종에서 Hct가 영향을 받을 경우 나타나는 증상들로, 1) 혈액과 근육, 2) 혈액과 환경, 3) 이노 즉 배설의 증감, 3) 수동 이동, 안배 사이의 삼투압 작용과 밀접한 연관이 있다. Hb의 농도는 RBC 증감에 영향을 받고, 혈액중 Hct의 변동은 Hb대사, 철의 결핍 및 조혈기능의 이상과 연관이 있다.^{13, 23, 24)} 혈액 희석은 스트레스를 받은 어체의 혈액내 수분의 유입에 따른 초기 반응으로 카드뮴에 노출된 물고기의 중금속 스트레스에 적응하려는 보상성 반응으로 표출되는 것이다. 이와 같은 보상성 반응은 일시적으로 나타나며, 즉시 혈액내 수분 불균형을 탈피하기 위해 혈액내 수분을 제거하려는 혈액농축현상이 일어난다.^{8, 25)} 혈액 농축에 관해서는 카드뮴에 노출된 잉어(*Cyprinus carpio*)와 왕송어(*Salvelinus fontinalis*)에서 보고된 바 있으며, Milligan(1982)은 Hct와 Hb의 상승을 세포외액에서 세포내액으로 체수분의 재분배를 삼투압 기작과 연관하여 설명하고 있다.²⁶⁾ Buckley(1976)²⁷⁾는 구리와 아연과 같은 중금속에 노출되었을 때, RBC의 증가를 순환 미성숙 적혈구 수의 증가에 기인하는 것으로 보고하고, 또한 조혈 장기의 자극에 기인되어 O₂와 CO₂의 이동이 증가하며, 그 결과들은 gas교환에 의한 대사활동과 아가미 세포막의 파괴로 설명하고 있다.¹⁴⁾ 위의 결과를 종합하면, 준치사농도의 카드뮴에 노출되면 대조군과 비교하여, MCV, MCH, MCHC의 변동없이 RBC, Hb, Hct가 증가하는 것은 혈액과 조직 사이의 삼투 조절 변화를 야기하는 어체의 보상성 기작이라고 설명할 수 있다. 특히 RBC, Hct 및 Hb의 증가현상은 혈장의 혈관 이외로의 이동 혹은 혈장 수분의 감소와 같은 혈액과 조직 사이의 삼투 조절의 변화(osmoregulatory change)로 인한 혈액 농축의 결과이거나 혹은 카드뮴에 의해 영향을 받은 어체 체내에서 신경성 호르몬 자극(neuro-hormonal

stimulation)이 일어나 혈중 catecholamine 농도가 증가함으로 인하여 비장 (spleen)이 수축된 결과에 기인된 것으로 사료된다.

Table 5-2-7. Haematological results of korean catfish(*Silurus asotus*) following to expose at 1.78 mg/l of cadmium

Treatment		RBC ($\times 10^{12}/l$)	Hb (g/dl)	Hct (l/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT ($\times 10^9/l$)
Exposure								
1	Control	2.32 \pm 0.117	8.0 \pm 0.554	27.3 \pm 1.750	126.4 \pm 2.040	37.1 \pm 0.760	30.2 \pm 0.406	12.5 \pm 7.533
	Treatment	2.14 \pm 0.145	8.1 \pm 0.618	27.9 \pm 1.687	126.8 \pm 1.511	38.0 \pm 0.787	29.7 \pm 0.432	10.0 \pm 5.715
12	Control	2.22 \pm 0.124	7.8 \pm 0.390	27.6 \pm 1.002	126.3 \pm 2.868	37.6 \pm 1.123	27.8 \pm 0.764	10.0 \pm 3.464
	Treatment	2.26 \pm 0.136	8.1 \pm 0.413	28.6 \pm 2.374	127.0 \pm 1.753	36.4 \pm 1.232	27.9 \pm 2.372	18.5 \pm 6.103
24	Control	2.20 \pm 0.117	7.5 \pm 0.541	27.2 \pm 1.551	125.1 \pm 3.417	34.5 \pm 2.773	29.3 \pm 1.761	11.5 \pm 2.693
	Treatment	2.54 \pm 0.119 ^{**}	8.9 \pm 0.714 ^{**}	30.4 \pm 1.182 ^{**}	124.9 \pm 2.708	36.9 \pm 2.430	29.5 \pm 1.026	26.6 \pm 12.04
48	Control	2.16 \pm 0.122	6.9 \pm 0.887	26.2 \pm 1.355	128.6 \pm 3.294	35.8 \pm 0.798	28.1 \pm 1.564	14.5 \pm 4.770
	Treatment	2.43 \pm 0.133 ^{**}	8.1 \pm 0.258 ^{**}	30.8 \pm 1.912 ^{**}	130.1 \pm 2.362	36.7 \pm 1.189	27.0 \pm 1.492	14.5 \pm 3.354
Recovery								
1	Control	2.22 \pm 0.160	7.6 \pm 0.545	26.8 \pm 2.265	123.4 \pm 4.345	37.1 \pm 2.414	28.8 \pm 0.473	11.8 \pm 6.139
	Treatment	2.18 \pm 0.130	7.9 \pm 0.418	27.5 \pm 1.923	125.8 \pm 5.387	36.5 \pm 1.318	29.0 \pm 1.034	10.6 \pm 4.409
12	Control	2.17 \pm 0.168	7.1 \pm 0.702	26.4 \pm 1.769	128.6 \pm 4.907	35.2 \pm 1.038	27.9 \pm 0.270	10.0 \pm 4.637
	Treatment	2.10 \pm 0.218	7.4 \pm 0.262	27.4 \pm 2.362	130.1 \pm 4.688	37.0 \pm 0.975	29.4 \pm 0.573	12.4 \pm 6.086
24	Control	2.14 \pm 0.165	7.4 \pm 0.411	24.7 \pm 1.247	124.5 \pm 4.008	35.8 \pm 1.327	29.8 \pm 0.249	11.3 \pm 2.055
	Treatment	2.15 \pm 0.098	7.2 \pm 0.367	25.3 \pm 2.039	123.7 \pm 4.864	36.7 \pm 1.281	29.3 \pm 1.089	7.0 \pm 5.339

Each values was expressed as the mean \pm S.D. of 5 fishes. (**:p<0.01)

Remarks>

RBC; red blood cell count

Hb; hemoglobin

Hct; hematocrit

MCV; mean corpuscular volume

MCH; mean cell hemoglobin

MCHC; mean cell hemoglobin concentrations

Table 5-2-8. Haematological results of korean catfish(*Silurus asotus*) following to expose at 0.35 mg/l of cadmium

Treatment	RBC ($\times 10^{12}/l$)	Hb (g/dl)	Hct (l/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT ($\times 10^9/l$)
Exposure							
1 Control	1.93 \pm 0.082	7.0 \pm 0.453	25.3 \pm 2.044	126.2 \pm 4.603	32.6 \pm 2.050	26.4 \pm 0.735	15.0 \pm 2.236
Treatment	2.02 \pm 0.121	7.2 \pm 0.415	26.1 \pm 2.081	129.4 \pm 5.280	33.7 \pm 0.768	27.6 \pm 0.901	15.0 \pm 6.442
12 Control	2.09 \pm 0.129	7.4 \pm 0.660	24.8 \pm 2.866	133.2 \pm 4.313	37.2 \pm 1.994	30.8 \pm 1.003	23.6 \pm 10.143
Treatment	2.14 \pm 0.142	8.0 \pm 0.968	26.2 \pm 2.461	131.7 \pm 2.880	35.8 \pm 1.105	29.2 \pm 1.062	13.0 \pm 2.142
24 Control	1.97 \pm 0.245	7.2 \pm 0.745	26.1 \pm 1.873	130.6 \pm 1.655	34.8 \pm 2.418	29.2 \pm 2.049	12.5 \pm 3.500
Treatment	2.29 \pm 0.121	7.8 \pm 0.575	27.1 \pm 1.623	131.6 \pm 3.107	35.9 \pm 2.906	28.5 \pm 0.962	13.2 \pm 2.040
48 Control	2.02 \pm 0.160	7.2 \pm 0.212	25.8 \pm 1.166	126.4 \pm 3.601	34.8 \pm 2.288	27.9 \pm 1.189	13.0 \pm 03.674
Treatment	2.04 \pm 0.125	7.5 \pm 0.415	28.3 \pm 1.592	130.8 \pm 2.189	35.9 \pm 1.182	29.0 \pm 0.894	16.0 \pm 7.403
Recovery							
1 Control	2.12 \pm 0.182	8.0 \pm 1.002	25.0 \pm 2.837	126.9 \pm 2.469	36.2 \pm 0.665	29.1 \pm 0.540	14.4 \pm 3.441
Treatment	2.16 \pm 0.149	7.5 \pm 1.372	26.0 \pm 1.998	128.7 \pm 0.970	35.8 \pm 1.558	29.6 \pm 1.686	13.0 \pm 2.046
12 Control	2.03 \pm 0.189	8.2 \pm 0.852	25.6 \pm 2.822	129.2 \pm 3.565	36.8 \pm 2.097	31.5 \pm 1.094	9.3 \pm 1.700
Treatment	2.16 \pm 0.158	8.1 \pm 0.764	26.5 \pm 2.777	125.7 \pm 5.118	37.5 \pm 1.638	30.6 \pm 1.538	16.0 \pm 7.563
24 Control	2.08 \pm 0.235	7.6 \pm 0.899	26.1 \pm 2.940	124.9 \pm 1.844	36.4 \pm 1.733	31.8 \pm 0.955	18.5 \pm 7.921
Treatment	2.07 \pm 0.260	7.7 \pm 0.897	25.4 \pm 1.494	125.4 \pm 3.393	35.1 \pm 0.876	28.8 \pm 1.510	11.0 \pm 3.286

Each values was expressed as the mean \pm S.D of 5 fishes. (*:p<0.05)

Remarks>

RBC; red blood cell count

Hb; hemoglobin

Hct; hematocrit

MCV; mean corpuscular volume

MCH; mean cell hemoglobin

MCHC; mean cell hemoglobin concentrations

3) 혈액 생화학적 지표

(1) 혈장 glucose

1.78 mg/l과 0.35 mg/L의 카드뮴에 노출하였을 때, 혈중 glucose는 대조군에 비해 유의한 수준의 증가를 나타내고, 회복기에 이르러 정상치(대조군)에 근접하였다.(Table 5-2-9, 5-2-10) 혈중 glucose의 변동에 대해서는 여러 물고기에서 연구되어 왔다.^{2, 28)} Shaffi(1979, 1980)^{29, 30)}는 잉어, 농어, 메기에서 카드뮴과 아연을 5 mg/L 수준으로 처리하였을 때, 혈중 glucose의 상승을 보고하고, 이 변동들은 조직으로부터 혈중으로 glucose가 이동된 결과로 설명하고 있다. Das와 Banerje(1988)는 블루길에서 카드뮴 노출시 glucose의 증가를 보고하고 있으며, 이것은 glucose이동의 이상에 기인됨이라고 설명하고 있다.^{2, 28, 31)} 이와 같은 변화는 어체가 중금속 영향에 빠르게 반응하고 있음을 간접적으로 시사하는 것으로, 중금속외에도 유기인계 농약과 같은 유해물질의 노출에 의해서도 glucose의 변동이 관찰되며, 이를 모두 stress의 초기 반응으로 설명하고 있다.^{2, 14, 28, 31)} 그러나 glucose나 cortisol 등의 변화는 중금속내지 유해 화학물질에 의해 생길 수 있으나, 아울러 다른 환경요인(취급시 stress, 온도, pH, 수질 환경, 저 산소증, 계절적 변동 등)에 의해 야기될 수 있으므로 해석에 유의해야 할 것이다.^{14, 18)}

(2) 혈장 단백질

혈장 단백질은 1.78 mg/L수준으로 처리하였을 때, 유의성 있는 증가를 나타냈으며, 상승치는 대조군의 수준으로 정상화 되지 않고 증가수준을 유지하였다.(Table 5-2-9, 5-2-10) 문헌에 따르면, 산(acids), oil 및 phenol에 어류를 노출시킬 경우, 어류의 혈장 단백질은 일정한 수준으로 증가되고, 이같은 현상은 Hct와 Hb등의 혈액학적 지표와 연관지어 해석하고 있으며, 또한 전해질 소실에 따른 세포외액의 세포내액으로의 체수분 재분배와 밀접한 관련이 있다고 한다.¹⁴⁾

(3) 혈장 전해질

두처리수준(1.78 mg/L와 0.35 mg/L)에서 혈장의 sodium(Na)과 choride

(Cl)농도는 유의한 수준으로 증가하였고, potassium(K)농도는 감소하였다.(Table 5-2-9, 5-2-10) 여러 가지 stress에 의한 삼투압의 변동은 혈중 Na, Cl, K, Ca, Mg 등의 농도에 영향을 주며, 특히 Na, K 및 Cl 등은 혈중 삼투압의 유지와 이동의 조절에 중요한 역할을 한다.¹⁸⁾ 이처럼 Na, K, Cl의 증감은 곧 혈장의 삼투압 조절에 변화가 있음을 암시하며, 이는 외부의 유해물질(중금속을 포함)에 대한 어체의 반응으로 설명할 수 있다.³³⁻³⁶⁾ 주위 저장액에 노출된 물고기의 세포 외액으로 부터의 Na, Cl, 누출 및 아가미를 통한 이 같은 이온들의 유입, 유출 등이 stress 반응의 중요한 요인인 것이다.³⁷⁾ 혈중 Cl의 감소는 세포막 삼투압 조절에 영향을 주어, 전해질과 혈장사이의 불균형을 초래하고, 이를 극복하기 위해 K의 증가를 나타내므로, Cl의 감소 현상은 일시적으로 전해질 불균형으로 인해서 나타나는 반응으로 해석된다.³⁸⁾ 또한 K의 유의성 있는 증가는 Na의 감소에 의하여 일어나는 삼투압 차이를 보상하기 위한 기작으로 보이며, 유사한 증가는 틸라피아에서도 보고되었다.³⁹⁾ 이상의 결과로서 이온 유입 및 유출에 따른 전해질의 증감은 손상된 조직의 회복 및 stress반응의 초기 증상으로 사료된다.

(4) AST(aspartate amonotransferase), ALT(Alanine aminotranferase)

1.78 mg/L수준으로 처리했을 때, 혈장내 AST수준은 유의성있게 증가하였고, 회복기에 들어서도 정상 수준으로 회복되지 않았고, ALT수준은 변화가 없었다.(Table 5-2-9, 5-2-10) 대부분의 보고에서 Cd, Zn, Cu, Al과 같은 중금속에 노출된 어류의 혈장내 AST수준이 증가하였으며, 특히 이 같은 지표는 특정장기인 간에 대한 영향을 예측할 수 있다.¹⁴⁾

(5) 기타 혈액 화학적 지표

TCHO(total cholesterol), triglyceride 는 1.78 mg/L 노출 수준에서 경미한 수준으로 증가하였고, blood urea nitrogen(BUN), ALP(alkaline phosphatase) 및 creatinine은 1.78 mg/L과 0.35 mg/L 수준의 노출에서 대조군과 비교하여 유의한 증가를 나타내었다.(Table 5-2-9, 5-2-10) 위의 lipid계물질은 어류에 있어서 대체적 에너지원으로 활용되는 것으로, 과삼투압성 환경의 혈장 전해질 유입 및 유출과 연관지어 설명이 가능하다. BUN은 사구체

여과율의 감소와 신장의 손상을 암시하나, 그 수준은 경미한 것으로 사료된다. ALP 수준의 상승은 간손상과 간기능 장애와 연관되며 그 같은 병변은 조직병리학적 관찰로서 확증된다.¹⁴⁾

Table 5-2-9. Blood chemistry values of korean catfish, *Silurus asotus*, exposed to 1.78 mg/l of cadmium

Treatment	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mmol/l)	CREA (μ mol/l)	GLU (mmol/l)	TCHO (mmol/l)
Exposure							
1 Control	188.8 ± 25.647	55.6 ± 6.929	102.9 ± 12.838	1.1 ± 0.371	0.20 ± 0.040	67.8 ± 13.369	81.3 ± 8.727
Treatment	292.4 ± 20.282 ^{**}	41.1 ± 7.820	89.1 ± 14.030	3.4 ± 0.800	0.20 ± 0.050	90.8 ± 6.015	145.6 ± 24.482
12 Control	181.5 ± 15.820	36.5 ± 8.746	66.8 ± 16.083	1.7 ± 0.771	0.20 ± 0.020	43.0 ± 4.002	89.0 ± 10.392
Treatment	318.4 ± 16.585 ^{**}	46.7 ± 3.628	73.8 ± 16.557	1.8 ± 0.371	0.27 ± 0.109	113.2 ± 14.564 ^{**}	129.6 ± 12.472 ^{**}
24 Control	186.1 ± 21.616	56.2 ± 8.386	58.4 ± 24.743	1.3 ± 0.280	0.13 ± 0.085	42.6 ± 4.782	85.1 ± 14.937
Treatment	327.6 ± 21.285 ^{**}	40.1 ± 5.425	112.8 ± 13.358	2.9 ± 0.223	0.39 ± 0.062	129.7 ± 12.409 ^{**}	149.0 ± 10.682 ^{**}
48 Control	187.6 ± 16.382	47.3 ± 2.033	74.8 ± 18.033	2.0 ± 0.379	0.17 ± 0.104	47.9 ± 5.650	88.2 ± 14.878
Treatment	327.1 ± 19.362 ^{**}	39.1 ± 4.273	101.6 ± 17.592	1.6 ± 0.546	0.16 ± 0.115	105.8 ± 19.172 ^{**}	142.2 ± 10.119 ^{**}
Recovery							
1 Control	285.0 ± 20.094	45.3 ± 7.368	88.5 ± 16.657	1.2 ± 0.232	0.21 ± 0.590	45.4 ± 7.263	85.8 ± 8.529
Treatment	376.0 ± 14.258 ^{**}	38.8 ± 7.987	75.8 ± 19.177	1.8 ± 0.508	0.20 ± 0.075	56.1 ± 8.418	170.7 ± 14.682 ^{**}
12 Control	271.7 ± 23.389	54.3 ± 6.849	79.0 ± 19.059	1.8 ± 0.221	0.21 ± 0.139	42.3 ± 6.519	89.9 ± 9.375
Treatment	385.3 ± 25.855 ^{**}	54.9 ± 7.184	75.2 ± 22.792	2.4 ± 0.053	0.26 ± 0.130	51.2 ± 8.677	175.1 ± 19.536 ^{**}
24 Control	260.4 ± 23.037	44.1 ± 7.432	75.3 ± 12.137	2.2 ± 0.196	0.24 ± 0.118	43.5 ± 5.635	79.7 ± 10.007
Treatment	388.8 ± 24.333 ^{**}	34.4 ± 8.045	73.6 ± 15.170	1.4 ± 0.484	0.29 ± 0.068	53.0 ± 10.296	163.4 ± 14.563 ^{**}

Each values was expressed as the mean ± S.D. of 5 fishes. (*: p<0.05, **:p<0.01)

Remarks:

AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; Alkaline Phosphatase, BUN; Blood urea nitrogen, CREA; creatinine, GLU; serum glucose, TCHO; serum total cholesterol.

Table 5-2-9. (continued)

Treatment	TBIL ($\mu\text{mol/l}$)	TP (g/l)	ALB (g/l)	TG (mmol/l)	A/G ratio	Na (mmol/l)	Cl (mmol/l)	K (mmol/l)
Exposure								
1 Control	0.41 \pm 0.102	3.26 \pm 0.862	0.94 \pm 0.087	233.4 \pm 23.977	0.50 \pm 0.049	114.0 \pm 5.292	102.0 \pm 1.871	5.58 \pm 0.45
Treatment	4.78 \pm 0.250	4.20 \pm 0.580	1.63 \pm 0.176	246.1 \pm 25.843	0.65 \pm 0.055	110.5 \pm 3.640	95.0 \pm 0.707	7.04 \pm 0.604
12 Control	0.40 \pm 0.034	2.43 \pm 0.341	0.80 \pm 0.125	152.0 \pm 32.573	0.50 \pm 0.012	114.6 \pm 6.651	102.0 \pm 2.280	6.18 \pm 0.360
Treatment	3.43 \pm 0.657	4.93 \pm 0.106	1.54 \pm 0.138	184.9 \pm 19.456	0.63 \pm 0.063	106.0 \pm 1.414	91.0 \pm 0.894	8.64 \pm 0.825
24 Control	0.46 \pm 0.061	3.19 \pm 0.459	1.03 \pm 0.213	176.8 \pm 26.621	0.49 \pm 0.024	111.8 \pm 8.207	103.8 \pm 3.345	6.17 \pm 0.160
Treatment	3.47 \pm 0.380	4.64 \pm 0.427	1.74 \pm 0.147	204.5 \pm 15.561	0.60 \pm 0.032	104.7 \pm 5.247	94.7 \pm 0.471	7.71 \pm 0.592
48 Control	0.43 \pm 0.081	2.64 \pm 0.085	0.99 \pm 0.238	168.5 \pm 20.573	0.49 \pm 0.052	121.4 \pm 5.678	107.8 \pm 2.561	5.88 \pm 0.879
Treatment	4.12 \pm 0.386	5.37 \pm 0.560	1.68 \pm 0.113	195.8 \pm 15.623	0.63 \pm 0.077	106.3 \pm 0.542	93.7 \pm 0.247	8.93 \pm 0.451
Recovery								
1 Control	0.41 \pm 0.083	2.61 \pm 0.244	1.01 \pm 0.286	173.2 \pm 30.798	0.49 \pm 0.600	119.6 \pm 5.004	105.8 \pm 2.681	4.93 \pm 0.634
Treatment	4.10 \pm 0.294	5.64 \pm 0.934	2.03 \pm 0.185	179.2 \pm 13.622	0.57 \pm 0.060	110.8 \pm 2.586	97.8 \pm 0.299	6.44 \pm 0.085
12 Control	0.38 \pm 0.063	2.74 \pm 0.352	0.95 \pm 0.105	177.8 \pm 15.593	0.53 \pm 0.044	120.0 \pm 2.211	105.4 \pm 3.382	4.82 \pm 0.142
Treatment	4.07 \pm 0.534	6.61 \pm 0.787	2.19 \pm 0.354	161.8 \pm 26.232	0.52 \pm 0.094	108.5 \pm 0.541	97.5 \pm 1.803	7.89 \pm 0.423
24 Control	0.43 \pm 0.235	3.14 \pm 0.722	1.00 \pm 0.165	148.4 \pm 28.920	0.48 \pm 0.040	117.6 \pm 3.033	106.4 \pm 1.960	5.33 \pm 0.486
Treatment	3.64 \pm 0.430	6.67 \pm 0.641	1.81 \pm 0.670	149.6 \pm 16.872	0.53 \pm 0.095	111.0 \pm 3.317	99.5 \pm 3.354	7.02 \pm 0.371

Each values was expressed as the mean \pm S.D. of 5 fishes. (*:p<0.05, **:p<0.01)

Remarks:

TBIL; serum total bilirubin, TP; serum total protein, TG; triglyceride,

ALB; serum albumin, A/G; albumin/globulin ratio,

Na; sodium, K; potassium, Cl; chloride

Table 5-2-10. Blood chemistry values of korean catfish, *Silurus asotus*, exposed to 0.35 mg/l of cadmium

Treatment		AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mmol/l)	CREA (μ mol/l)	GLU (mmol/l)	TCHO (mmol/l)
Exposure								
1	Control	174.7 \pm 25.471	45.3 \pm 11.572	77.2 \pm 21.270	1.4 \pm 0.283	0.10 \pm 0.033	59.8 \pm 7.587	83.8 \pm 13.557
	Treatment	272.7 \pm 28.149 [~]	35.4 \pm 11.264	67.2 \pm 23.007	1.4 \pm 0.456	0.16 \pm 0.092	102.5 \pm 18.86 [~]	91.3 \pm 11.876
12	Control	204.0 \pm 23.033	52.1 \pm 6.145	103.3 \pm 25.023	1.5 \pm 0.240	0.19 \pm 0.075	65.7 \pm 2.761	75.1 \pm 6.263
	Treatment	329.5 \pm 18.144 [~]	22.7 \pm 13.986	43.2 \pm 16.500	2.0 \pm 0.357	0.19 \pm 0.080	123.3 \pm 14.84 [~]	84.8 \pm 11.136
24	Control	196.4 \pm 18.430	41.8 \pm 15.609	106.2 \pm 20.511	1.6 \pm 0.399	0.17 \pm 0.078	41.0 \pm 2.915	75.7 \pm 5.101
	Treatment	408.4 \pm 26.982 [~]	65.1 \pm 6.450	96.0 \pm 24.193	3.2 \pm 0.416	0.13 \pm 0.103	101.1 \pm 12.82 [~]	74.4 \pm 11.726
48	Control	264.2 \pm 25.726	50.8 \pm 10.722	96.7 \pm 26.247	1.6 \pm 0.408	0.20 \pm 0.088	41.2 \pm 4.904	79.3 \pm 5.379
	Treatment	396.3 \pm 14.456 [~]	66.5 \pm 3.001	77.5 \pm 25.868	1.8 \pm 0.427	0.15 \pm 0.148	90.7 \pm 12.581 [~]	77.5 \pm 16.819
Recovery								
1	Control	366.6 \pm 16.047	55.8 \pm 13.054	98.5 \pm 12.220	0.5 \pm 0.089	0.30 \pm 0.125	41.8 \pm 6.362	82.0 \pm 13.342
	Treatment	411.8 \pm 27.956	63.5 \pm 8.354	103.3 \pm 19.986	0.8 \pm 0.294	0.20 \pm 0.120	52.6 \pm 6.118	70.2 \pm 14.601
12	Control	245.5 \pm 24.174	45.3 \pm 9.659	69.6 \pm 15.697	0.6 \pm 0.240	0.20 \pm 0.045	47.7 \pm 10.377	83.6 \pm 5.571
	Treatment	548.0 \pm 24.319 [~]	48.3 \pm 13.036	65.5 \pm 19.458	1.0 \pm 0.182	0.22 \pm 0.020	48.9 \pm 10.82 ⁹	97.8 \pm 13.218
24	Control	233.8 \pm 23.891	51.0 \pm 14.777	97.7 \pm 26.166	1.0 \pm 0.126	0.16 \pm 0.042	46.3 \pm 4.929	79.8 \pm 11.446
	Treatment	540.1 \pm 27.226 [~]	53.8 \pm 15.22 ⁹	88.9 \pm 35.978	1.4 \pm 0.218	0.17 \pm 0.084	47.5 \pm 2.992	91.1 \pm 16.498

Each values was expressed as the mean \pm S.D of 5 fishes. **: p<0.01

Remarks:

AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; Alkaline Phosphatase, BUN; Blood urea nitrogen, CREA; creatinine, GLU; serum glucose, TCHO; serum total cholesterol.

Table 5-2-10. (continued)

Treatment	TBIL ($\mu\text{mol/l}$)	TP (g/l)	ALB (g/l)	TG (mmol/l)	A/G ratio	Na (mmol/l)	Cl (mmol/l)	K (mmol/l)
Exposure								
1 Control	0.38 \pm 0.098	2.85 \pm 0.235	0.95 \pm 0.078	229.9 \pm 18.279	0.45 \pm 0.096	123.3 \pm 5.117	109.5 \pm 1.118	4.72 \pm 0.255
Treatment	0.42 \pm 0.113	3.07 \pm 0.286	1.03 \pm 0.095	169.5 \pm 31.927	0.50 \pm 0.017	114.3 \pm 5.429	102.0 \pm 1.414	6.65 \pm 0.871
12 Control	0.41 \pm 0.045	2.99 \pm 0.221	1.00 \pm 0.068	143.1 \pm 22.767	0.46 \pm 0.019	113.0 \pm 5.657	105.5 \pm 1.500	3.91 \pm 0.243
Treatment	0.40 \pm 0.158	3.28 \pm 0.311	1.03 \pm 0.091	124.4 \pm 29.751	0.54 \pm 0.029	99.8 \pm 1.023	96.7 \pm 2.005	7.93 \pm 0.654
24 Control	0.40 \pm 0.030	2.87 \pm 0.132	0.97 \pm 0.057	109.9 \pm 19.055	0.46 \pm 0.041	119.4 \pm 6.531	109.3 \pm 0.829	5.07 \pm 0.524
Treatment	0.43 \pm 0.112	3.79 \pm 0.151	1.17 \pm 0.304	162.2 \pm 27.161	0.51 \pm 0.044	100.3 \pm 1.247	99.7 \pm 1.247	6.98 \pm 0.664
48 Control	0.41 \pm 0.049	2.97 \pm 0.114	1.04 \pm 0.047	183.2 \pm 15.540	0.48 \pm 0.050	127.0 \pm 3.391	108.3 \pm 1.299	4.75 \pm 0.874
Treatment	0.41 \pm 0.021	3.96 \pm 0.346	1.25 \pm 0.302	146.5 \pm 14.058	0.53 \pm 0.048	102.3 \pm 1.639	97.8 \pm 2.278	6.21 \pm 0.723
Recovery								
1 Control	0.43 \pm 0.047	3.46 \pm 0.803	1.19 \pm 0.194	193.0 \pm 20.291	0.49 \pm 0.059	126.8 \pm 3.832	111.3 \pm 1.090	5.94 \pm 0.526
Treatment	0.42 \pm 0.085	3.56 \pm 0.312	1.35 \pm 0.062	149.5 \pm 14.639	0.53 \pm 0.054	119.8 \pm 5.492	104.8 \pm 2.040	5.98 \pm 0.415
12 Control	0.45 \pm 0.069	2.56 \pm 0.312	0.95 \pm 0.062	149.5 \pm 24.639	0.50 \pm 0.046	119.8 \pm 5.492	104.8 \pm 2.040	4.55 \pm 0.425
Treatment	0.41 \pm 0.088	4.72 \pm 0.866	1.56 \pm 0.189	214.4 \pm 27.599	0.59 \pm 0.054	109.5 \pm 3.050	104.0 \pm 2.000	6.32 \pm 0.539
24 Control	0.41 \pm 0.089	2.98 \pm 0.494	0.98 \pm 0.094	175.7 \pm 20.630	0.49 \pm 0.042	126.3 \pm 2.211	109.4 \pm 2.059	4.62 \pm 0.326
Treatment	0.40 \pm 0.067	4.32 \pm 0.392	1.37 \pm 0.303	176.5 \pm 19.042	0.50 \pm 0.063	113.00 \pm 0.82	106.7 \pm 1.247	5.49 \pm 0.296

Each values represents the mean \pm S.D. of 5 fishes. *: p<0.05 **:p<0.01

Remarks:

TBIL; serum total bilirubin, TP; serum total protein, TG; triglyceride,

ALB; serum albumin, A/G; albumin/globulin ratio,

Na; sodium, K; potassium, Cl; chloride

4) 조직 병리학적 지표

카드뮴에 노출시킨 메기에 대한 조직병리학적 소견은 Table 5-2-11과 같다. 1.78 mg/L 수준에서 카드뮴에 노출시켰을 때, 메기의 신장, 아가미, 뇌, 소장등에서는 조직 병변이 발견되지 않았으나, 간과 피부에서 약간의 병변이 경미하게 나타났다. 간에서는 지방변성(microdroplet fatty change)이, 피부에서는 면역 활성 세포(lympatic cell)과 점액 세포(serous cell)가 증가하였다. 이는 사료내 영양성 지방의 침착 결과이거나, 카드뮴에 의해 영향을 받은 메기의 반응으로 사료되나, 피부의 보상성 기작을 고려할 때, 카드뮴의 영향에 기인된 것으로 추측된다. Paul 등(1983)¹⁰⁾은 연준모치를 이용한 카드뮴의 실험에서 12 ppm 수준(LC50의 1/2수준)으로 30일간 노출하였을 때, 상피세포의 괴사 뿐만 아니라 신장, 아가미상피, 소장점막 및 조혈장기의 손상등을 보고하였다. 또한 Geroge 등(1970)¹¹⁾은 카드뮴에 노출후(LC50의 1/2 수준), 1시간만에 소장, 12시간 경과 후에 신장, 20시간 후에 아가미 호흡성 상피의 손상을 광학현미경으로 관찰하고 있다. 본 연구는 치사수준이하로 노출했을 때의 병변으로 장기 손상을 확증할 수는 없으나, 카드뮴에 의한 영향은 있는 것으로 판단된다. 조직학적 병변 발생의 빈도와 정도는 어종, 노출수준, 노출시간 및 수질 환경에 의하여 커다란 영향을 받는 것으로 알려져,^{40, 41)} 낮은 농도에서 단기간의 노출로서 병변을 검출함에는 다른 지표와의 상호 연관성을 파악하고 평가하는 것이 매우 중요할 것이다.

5) 카드뮴 분석

노출기간동안 어류 체내와 시험수에서 카드뮴을 분석한 결과는 Table 5-2-12와 같다. 회수율은 90% 이상이었고, 대조군에서는 검출수준이하였다. 노출후 48시간의 어체내 수준은 노출 농도의 0.7-1.4%를 나타내고, 시험수 내 수준은 68-82% 수준이었다. 대조군에서 약간의 검출정도는 타 연구에서와 같이 양어장에서 오염된 것으로 추측된다. Honda 등(1983)⁴³⁾은 카드뮴의 조직내 축적을 노출 농도와 기간이 증가함에 따라 증가함을 보고하고 있으며, 본 연구에서도 카드뮴의 노출 시간과 농도에 따라 증가하였다. 그리고 회복기에서도 카드뮴이 검출되었는데, 이는 카드뮴이 체내에 축적된 결과로 보인다.

Table 5-2-11. Histopathological changes of liver, skin, gill, brain, kidney and intestine of korean catfish, *Silurus asotus*, exposed to 0.35 mg/l and 1.78 mg/l of cadmium

Times(hr)	Concentration		Liver	Skin	Gill	Brain	Kidney	Intestine	
	(mg/L)								
Exposure	1	0.35	control	NSL ^{a)}	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
		treatment	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
		1.78	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
	12	0.35	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
		1.78	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
	24	0.35	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
		1.78	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
48	0.35	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	
		treatment	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
	1.78	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	
		treatment	5/7 ^{b)}	5/7	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
Recovery	1	0.35	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
		treatment	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
		1.78	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	3/7	5/7	NSL	NSL	NSL	NSL
	12	0.35	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	4/7	4/7	NSL	NSL	NSL	NSL
		1.78	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	4/7	3/7	NSL	NSL	NSL	NSL
	24	0.35	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	5/7	4/7	NSL	NSL	NSL	NSL
		1.78	control	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
			treatment	5/7	4/7	NSL	NSL	NSL	NSL

a) NSL; No significant lesion,

b) Incidences are represented as the number of fishes exhibiting the lesion over the number of fishes examined.

Table 5-2-12. Cadmium concentrations in the tissue and water during the test

Treatment	Time (hour)	Exposure concentration (mg/L)	Cd concentration	
			In Tissues ($\mu\text{g/g}$ wet wt.)	In Water (mg/L)
Exposure	1	control	0.9	ND
		0.35	1.0	0.328
		1.78	4.0	1.654
	12	control	0.4	ND
		0.35	3.0	0.315
		1.78	5.0	1.588
	24	control	0.6	ND
		0.35	2.2	0.259
		1.78	6.8	1.345
48	control	0.8	ND	
	0.35	4.6	0.241	
	1.78	12.0	1.169	
Recovery	1	control	0.6	ND
		0.35	3.2	ND
		1.78	6.4	ND
	12	control	0.5	ND
		0.35	3.6	ND
		1.78	7.8	ND
	24	control	1.0	ND
		0.35	2.1	ND
		1.78	8.2	ND

In tissue, each value was expressed as the mean of 5 whole body fishes.
 ND: Not detected. (< 0.002 ppm)

라. 결론

카드뮴은 수계 환경에서 대표적인 유해 중금속의 하나로 돌고기와 같은 수서 생물에 강한 독성을 나타낸다. 카드뮴은 물고기의 혈액에 여러 가지 변화를 야기하는 것으로 널리 알려져 있다. 본 연구는 카드뮴을 치사농도 이하로 처리했을 때, 담수어종인 한국산 메기에 나타나는 혈액 및 조직 병리학적 변화들을 조사하여, 이러한 반응 지표의 변화와 수계의 카드뮴 농도와의 상관성을 규명코자 하였다.

카드뮴에 노출된 물고기는 RBC, Hct, Hb가 증가하였으며, 혈중 글루코스, 단백질, 지질, 전해질(Na, K, Cl)의 변동이 있었다. 카드뮴의 노출수준이 높은 경우 낮은 수준에 비하여 빠르게 반응하였고, 전해질, 혈장 단백질, 지질의 변동과 RBC수, Hct, Hb의 증가는 영향을 받은 어체의 보상성 반응이며 혈액과 조직사이의 삼투조절에 변화를 야기한다. 조직학적 결과에서 아가미, 신장, 소장, 뇌, 등의 기관에서 의미 있는 병변이 거의 발견되지 않았으나, 간과 피부에 약간의 병변이 발견되었다. 카드뮴 분석결과로는 카드뮴의 노출시간과 농도에 따라 어체내 농도는 증가하였으며, 어체내 수준은 0.7-1.4%, 시험수내 수준은 68-82%수준이었고, 회복기에서도 검출되어 체내축적이 이루어진 것으로 보였다. 이상의 결과로 볼 때, 혈액학적, 혈액화학적 변화는 상대적으로 단기간 노출시에도 유도될 수 있으며, 그들의 변화는 조직 병리학적 변화에 비해 치사 농도이하의 노출에 따른 변화를 검출함에 있어서 민감하였고, 그 분석도 간단하였다. 이러한 결과들은 카드뮴의 준치사 농도 노출시 한국산 메기에 있어서 혈액학적 변화의 조사가 수계에서 카드뮴의 오염 수준을 평가하거나, 낮은 농도의 카드뮴 독성을 측정할 수 있는 초기 독성 증상의 지표로 활용할 수 있음을 시사하고 있다.

마. 참고문헌

1. Fromm, P.O. (1980) A review of some physiological response of freshwater fish to acid stress. *Env. Bio. Fish.* 5(1):79-93
2. Tort, L. and Torres, P. (1988) The Effects of sub-lethal concentrations of cadmium on haematological parameters in the dog fish. *Scyliorhinus canicula* L. *J. Fish Biol.*, 32:277-282.
3. Chandrasekar, S. and N. Jayabalan (1993) Hematological responses of the common carp, *Cyprinus carpio* L. exposed to the pesticide Endosulfan. *Asian Fisheries Science* 6;331-340
4. Clarke G.M., (1993) Fluctuating assymetry of invertebrate population as a biological indicator of environmental quality. *Environ. Pollut.* 82 :207-211
5. Christensen, G., E. Hunt, and J. Fiandt (1977) The effect of methylmercuric chloride, cadmium chloride, and lead nitrate on six biochemical factors of the brook trout(*Salvelinus fontinalis*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 42:523-530
6. Irfan, Z., Qureshi ,M.A., Hafeez and S.A. Shaikh (1995) Haematological response of the fish, *Cyprinion watsoni*, to hypoxia, anemia and hyperthermia. *Parkistan J. Zool.*, Vol 27(3) pp 219-227
7. Reddy S.L.N., (1989) N.B.R.K. Venugopal, and J.V. Ramana Rao In vivo effects of cadmium chloride on certain aspects of carbohydrate metabolism in the tissue of a freshwater field crab guerini *Barytelphusa*. *Bull. Environ. Toxicol.* 42:847-853
8. Duthie G.G. and Tort L (1985) Effect of dorsal aortic cannulation on the respiration and haematology of the Mediterranean dog fish (*Scyliorhinus canicula*) L. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A:879-883

9. Ruparaelia S.G., Yogendra Verma, S.R. Saiyed, and U.M. Rawal (1995) Effect of cadmium on blood of tilapia, *Oreochromis mossabicus* (Peters), during prolonged exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45:305-312
10. Paul C., Stromberg, John G. Ferrante, Stanley Carter (1983) Pathology of lethal and sublethal exposure of fathead minnow, *PIMEPHALES PROMELAS*, to cadmium : a model for aquatic toxicity assessment. *J. of Toxicology and Environmental Health* 11: 247-259.
11. George R., Gardner and P. P.Yevich (1970) Histological and haematological response of an estuarine teleost to cadmium. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 27:2185-2196
12. Cornelius B, Murphy J.R., OBien (1983) Bioaccumulation and toxicity of heavy metals and related trace elements *J. Wat. Poll. Cont. Fed.* 55:816-822
13. Johnsson-Sjoberck M.L., Larsson A. (1978) The effect of cadmium on the hematology and on the activity and hematopoietic tissues of the flounder(*Pleuronectes americanus*) *Environ. Res.* 17:191-204
14. Leroy C., Folmar (1993) Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish : A bibliography and synopsis of selected effects. *Environmental Toxicological and Chemistry* 12:337-375
15. OECD(1984) OECD Guideline for testing of chemicals.
16. U.S. EPA (1985) Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms.
17. Areechon N. and J.A. Plumb. (1990) Sublethal effects of malation on channel catfish, *Ictalurus Punctatus*. *Bull. Environ. Comtam. Toxicol.* 44:435-442
18. Heath A.G. (1987) Water pollution and fish physiology. pp 245 C.R.C.

Press, Inc., Boca Raton, FL.

19. Kargin. F. (1996) Elimination of cadmium from cd-contaminated tilapia(*Tilapia zilli*) in media containing EDTA and freshwater: changes in protein levels *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57:211-216
20. McCarty L.S., Herry, J.A.C. and Houston, A.H (1978) Toxicity of Cd to goldfish, *Carassius auratus* in hard and soft water *J. Fish. Res. Bd. Can.* 35:35-42
21. Smith, B.P., Hejtmncik, E., and Cam, B.J. (1976) Acute effects of cadmium on *Ictalurus punctatus* (catfish) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15:271-277
22. Calabres A., Thurberg F.P., Dawson A., Wendloff D.R. (1975) Sublethal physiological stress induced by cadmium and mercury in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). In:Koemann J.H., Strik JJTWA (ed) Sublethal Effects of Toxic Chemicals on Aquatic Animals. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp 15-21
23. Dick, P.T. and Dixon, D.G., (1985) Changes in circulating blood cell levels on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *J. Fish. Biol.*, 26:275-481
24. Waidwood, K.G., (1980) Changes in haematocrit of rainbow trout exposed to various combinations of water hardness, pH and copper. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109:461-463
25. Nobuo Egami (1981) Fishes, as laboratory animals 228-242
26. Milligan, L.C. and C.M. Wood (1982) Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Biol.* 99:397-415

27. Buckley J.A. (1976) Heinz body hemolytic anemia in coho salmon(*Oncorhynchus kisutch*), exposed to chlorinated waste water. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34:215-224
28. Das, K.K. and Banerjee, S.K. (1980) Cadmium toxicity in fishes. *Hydrobiologia*, 75:117-121
29. Shaffi, S.A. (1979) Effects of zinc intoxication on freshwater fishes. 2. accumulation of metabolic products. *Toxicol. Lett.*, 3:319-323
30. Shaffi, S.A. (1980) Zinc intoxication in some fresh water fishes 1. variations in tissue energy reserve. *Limnology*, 16:91-97
31. Malte, H. (1986) Effects of aluminium in hard, acid, water on metabolic rate, blood gas tensions and ionic status in the rainbow trout. *K. Fish. Biol.* 29:187-198
32. Hille S. (1982) A literature review of the blood chemistry of rainbow trout(*Salmo gairdneri*). *Rich. J. Fish. Biol.* 20:535-569
33. Anderson J., At. Absorpt. Newsl (1972). Wet Digestion versus Dry Ashing for the Analysis of Fish Tissue for Trace Metals.
34. Lorz H.W. and Mcpherson B.P. (1976) Effects of copper or zinc in fresh water on the adaptation to sea water and ATPase activity, and the effects of copper on migratory disposition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33:2023-2030
35. Stagy P.N. and Shutteworth, T.J. The accumulation of copper in *Patichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentration. *J. Fish. Biol.* 20:491-501
36. Van Der Putte I. Laurier, M.B. H.M and Van Eijk G.J.M. (1982) Respiration and osmoregulation in rainbow trout(*Salmo gairdneri*) exposed to hexavalent chromium at different pH values. *Aquatic.*

toxicol. 2:99-112

37. Ake Larsson, Karl-Johan Lehtinen and Carl Haux. (1980) Biochemical and haematological effects of a titanium dioxide industrial effluent on fish. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 25, 427-435
38. Wepener (1990) The effect of heavy metals at different pH on the blood physiology and metabolic enzymes in *Tilapia sarrmanii* (Cichlidae) M.S. -Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.
39. Shah, S.L., M.A. Hafez and S.A. Shaikh (1995) Changes in haematological parameters and plasma glucose in the fish, *Cyprinon watsoni*, in response to zinc and copper treatment. *Pakistan J. Zool* vol27(3) pp:249-253
40. Gardner G.R. and P.P. Yevich. (1969b) Toxicological effects of cadmium on *Fundulus heteroclitus* under various oxygen, pH, salinity and temperature regime. *Amer. Zool.* 9: 1096(Abstr.)
41. Pickering Q.H. and C. Henderson (1966) The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes. *J Lab.Clin. Med.* 28: 316-322
42. Honda K., Sahrul M., Hidaka H. and Tatsukawa R. (1983) Organ and tissue distribution of heavy metals and their growth-related changes in Antarctic fish, *Pagothenia borchgrevinki*. *Agric Biol Chem.* 47:2521-2532

제 3 절 환경내 대사 및 동태시험법 연구

1. 토양대사 연구

가. 연구배경

농약이 작물의 병, 해충 및 잡초의 방제를 위해 사용되면 환경중에서 비산, 휘발 등에의해 공기중으로 휘산되거나 토양의 수분이나 미생물 등에 의해 분해, 소실되고 식물체에 부착, 흡수, 이행되어 여러가지 생화학적인 반응을 거치면서 대사되며 또한 비나 관개수 등에의해 수계로 이동되어 가수분해 및 미생물에 의한 분해를 받게된다. 이러한 과정 중에 새로이 생성되는 대사물들과 원래의 농약들은 그 농도나 독성적 수준에 따라 환경오염은 물론 이에 노출된 인간 및 다른생물들에 생물, 생태학적으로 나쁜 영향을 끼치게 수 있다. 따라서 농약의 환경중 대사 연구(토양, 식물, 수중)는 환경에 존재하는 농약의 행적과 동태의 파악 및 예측을 위해 필요 할뿐만아니라 세계 각국에서 신농약의 사용을 위한 등록자료로서 필히 제출해야할 항목으로 지정되어 있어 (EPA 등) 농약의 올바른 대사연구기술의 개발과 GLP 체계에 의한 세계적 수준으로의 기술정립은 필수불가결한 것이다.

특히, 농약이 직접 토양에 처리되거나 식물체에 처리되면서 또는 처리후 직접 또는 간접적으로 토양에 존재하게 되어 토양에서 농약의 운명에 대한 연구는 농업적 면에서 뿐 만아니라 환경에서 안전성 평가의 측면에서도 매우 중요한 과제이다.

농약의 분해는 화학적, 미생물학적, 그리고 광화학적 과정으로 이루어지는데 화학적 분해는 대부분 가수분해와 산화과정인데 점토나 유기물 또는 금속 산화물이나 이온 등에 의해 이루어진다. 미생물학적 분해는 미생물 활동에의한 생화학적 반응에의한 것으로 가장 중요하게 다루어 지고 토양 표면에서는 태양광에 의한 광화학적 분해가 진행된다.

이와같이 분해에 의해 생성된 대사물과 잔류된 원래의 농약은 환경에 생물, 생태학적인 영향을 끼칠 뿐만아니라 작물체내로 흡수이행되어 수확물에 잔류하여 만성독성의 위험을 내재하게 된다. 그러므로 토양에 잔류되는 처리농약의

수준과 대사물의 생성, 확인, 분해를 연구하여 농약이 토양에서 대사되는 전반적 행적을 구명함과 더불어 생태환경 및 만성독성의 안전성 평가의 중요한 기본자료를 구할 수 있다.

토양대사 연구 규모에 따라 실내 시험과 포장시험으로 나눈다. 포장시험은 실내시험에 비하여 오직 자연조건이라는 유리함이 있으나 시험조건을 조절하기 불가능하고 방사성 화합물을 사용하기에는 많은 제약과, 환경으로의 휘발(Vaporization), 유출(run off), 용탈(leaching) 등의 위험성이 있으며 토양대사의 전체적 mass balance를 구할 수 없는 단점이 있어 위에서 언급한 토양중 농약의 분해과정 및 대사산물의 성질과 형성정도에 대한 중요한 정보는 표준화된 조건으로 조절된 실험실적 조건에서의 토양대사연구에서 얻어진다. 실내 토양대사 연구는 주로 호기적 및 혐기적 조건에서 이루어지고 농약의 분해 양상과 속도 및 주요대사산물이 동정되어야 한다. 토양대사연구의 결과는 잔류분석법의 확립을 위한 자료로 쓰일 뿐만 아니라 인체 위해성 평가의 기본 자료로 활용된다.

실내에서의 농약의 전환을 연구하기 위하여 여러가지 접근방법이 시도되었으며 크게 다음 네개의 범주-soil perfusion systems, biometer-type systems, gas flow-through systems, integrated systems-로 분류될 수 있다.

Soil perfusion systems은 원래는 토양에서의 미생물적 변환과정, 예를 들면, 질산화, 탈질작용, 황과 같이 물에 잘 녹지 않은 화합물의 미생물적 이용에 대한 연구에 이용되. 그러한 연구에서 농약을 처리한 토양은 증류수로 관주하거나 토양을 농약수용액으로 세척한다. 분해는 농약이 사라지는 속도 또는 분해산물의 형성속도를 측정한다. 그러나 이러한 장치에서 얻어진 결과는 세균이 번식하거나 장치 자체의 비자연적 조건으로 인하여 토양환경에서 실제적으로 일어나는 현상을 대표할 수 없다는 문제가 있어 현재는 이러한 방법에 의한 토양대사실험은 수행하지 않는다.

Biometer-type systems는 ^{14}C 으로 표지된 농약의 대사를 연구하는데 이용되고 있다. 이 장치는 Bartha & Pramer가 고안한 방법을 기초로 하여 발전되었으며 크게 농약을 처리한 토양과 이산화탄소를 포집하기 위한 NaOH용액으로 구성된다. 이 장치의 주요한 결점은 혐기적 조건이 되기 쉽다는 것이다.

그럼에도 불구하고 이 장치는 조작성이 간단하고 비용이 적게 들고 산소bulb등으로 산소가 부분적으로 도입할 수도 있기 때문에 농약대사연구에 자주 사용되고 있다.

Flow-through systems는 토양에서의 농약의 대사 실험에 널리 이용되고 있다. 이 장치에서는 공기의 흐름을 조절할 수 있고 이산화탄소와 휘발물질을 분리하여 포집할 수 있는 장점이 있으며 biometer-type에 비해 처리된 농약의 분해가 빠르게 일어난다. 그러나 공기의 유속조절에 따라 유기물의 분해속도에 차이가 생겨 이산화탄소의 생성량이 변화하므로 주의가 요구된다. 비교적 이 장치는 복잡하고 비용이 많이 들어가는 단점이 있으나 혐기성으로 될 염려가 없고, 일단 설치되면 포집병들만 교체하면 되기 때문에 현재 농약의 대사실험에서 가장 많이 사용되고 있다.

이 장치에서 휘발물질의 포집에는 ethylene glycol, sulfuric acid, 혹은 polyurethane foam plugs나 resin등이 흡착제가 사용된다. $^{14}\text{CO}_2$ 의 포집을 위해서는 ethanalamine, ethanalamine-methylcellosolve mixture 혹은 KOH 와 NaOH 등의 알칼리 용액이 사용된다.

Integrated systems은 포장상태를 모방한 작은 모의실험장치로 농약이 처리된 토양에 식물을 심어 농약의 토양중 분해, (CO_2 발생, 농약의 휘발,) 식물내로의 농약의 이동, 농약의 토양중 용출 등을 동시에 측정할 수 있는 장점이 있지만 단점으로 일단 너무 복잡하여 수행하기가 용이하지 않고 실제 환경을 모방하기에는 역시 부족하며, 시스템의 복잡성은 결과를 해석하기가 곤란하게 하는 요인이 되기도 한다. 또한 별로 중요하지 않은 부분의 연구를 위해 이 시험을 일상적으로 수행하기에는 불합리하여 농약의 환경중에서의 운명에 대한 각각의 과정은 특정 과정을 연구하기 위하여 고안된 단순한 모델에서 측정되어야만 할 것으로 여긴다.

Alachlor

시험대상농약인 alachlor는 Chloroacetanilide계에 속하며 발아 전에 사용되는 선택성 제초제로서 Monsanto사가 1966년에 Lasso라는 이름으로 개발하여 밭 잡초 방제용으로 현재까지 사용되고 있다. 우리나라에는 1969년에 소개되어 콩, 옥수수, 감자, 고구마, 고추 등의 잡초 제거용으로 유제 (알라유제,

43.7%) 및 입제 (알라 입제, 5%)가 사용되고 있으며 1994년에는 482,985 M/T 이 소비되어 국내 제초제 중에서 3번째로 많이 쓰였다.

Alachlor의 작용기작은 잡초의 어린 눈이나 뿌리등으로 흡수되어 체내 단백질의 생합성을 저해함으로써 세포분열을 억제하여 살초작용을 한다.

Alachlor의 급성경구독성은 낮고(LD₅₀ (rat)=2,095-3,116mg) 미국 EPA에서는 B2 또는 "probable human carcinogen"으로 분류하고 있으나 미국 등의 여러 나라에서 "제한사용"의 범위 내에서 여전히 많은양이 사용되고 있다. 그러나 Canada에서는 1985년 부터 alachlor의 사용이 금지되었다.

Alachlor의 대사연구는 토양, 식물, 동물등 에서 활발히 연구가 되었으며 토양 대사의 경우 일반적으로 토양 미생물에 의해 다양한 aromatic >amine과 acetanilide로 분해 되는데 주로 2,6-diethylaniline이 마지막 대사물로서 인정되고 있으며 산화반응은 별로 중요하지 않아 ¹⁴CO₂로의 무기화는 관찰되지 않았다. 따라서 대사 생성된 여러 가지의 대사물들은 장기간 또는 최종 잔류물로서 토양 등의 환경에 축적되어 오염원이 될 가능성을 예측할수 있는데 실제 미국에서는 지표수 오염 및 지하수 오염의 사례가 보고되고 있다.

또한 이들 대사 생성물들의 발암 가능성에 대한 시험결과 2-hydroxy-2',6'-diethylacetanilide와 2-chloro-2',6'-diethyl-acetanilide가 Salmnella strain TA 100에 약한 발암성을 보여 이들 대사물들에 대한 정량적인 연구가 필요한 상황이나 가능한 대사물들의 동정에 관한 연구는 다수 진행된 반면 대사 중 대사물들의 생성 및 분해에관한 정량적 연구는 아직까지 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구는 위의 여러 가지 대사연구 중에서 가장 기본적이면서도 중요한 호기성 토양대사시험으로, 호기적 조건에서 alachlor의 토양대사 중 전체의 mass balance를 유지할 수 있도록 시험을 설계하여 중요한 대사물들의 동정, 생성 분해에 대한 정량적 분석도 수행함으로써 alachlor의 환경독성적 평가에 도움이 되고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) 재료

(1) 시약

- 모든 용매(HPLC grade) : Burdick & Jackson Co.

- Ethylene glycol, potassium hydroxide : Ducksan Pharmaceutical Co.(Korea)
- Insta-gel XFTM, Permafluor E^{++TM}, Carbo-sorb ETM, CombustaidTM : Packard Instrument Co.(USA)
- Cellulose powder : Whatman paper Ltd.(England)
- 기타 합성용 시약 : Aldrich

(2) 시험토양

시험토양은 대전직할시 유성구 화학연구소에서 채취하였으며 실온에서 24시간 풍건하고 2mm체를 통과시킨 후 시험에 사용하였다(Table 5-3-1).

Table 5-3-1. Physicochemical properties of the test soil.

pH	organic mater(%)	CEC (meq/100 g soil)	field moisture (at 1/3 bar, %)	texture		
				sand (%)	silt (%)	clay (%)
5.6	1.38	13.5	18.5	47.3	33.3	19.4

(3) 방사능 동위원소 시험물질

¹⁴C-alachlor (total radioactivity ; 13.5 uCi/0.165mg.)를 사용하였고 방사능 순도는 TLC로 전개한 후 digital autoradiography분석 하였으며 99% 이상 이었다.

(4) 분석용 표준품

alachlor 표준품(순도 99.9%)은 Monsanto사에서 분양받았다.

대사물인 2-chloro-2',6'-diethylacetamide는 다음과 같이 합성하였다. 2,6-diethylaniline 498mg을 CH₂Cl₂ 10ml에 녹인 후 triethylamine 485ul을 가하고 0 °C에서 교반하였다. 상기의 용액에 chloroacetyl chloride 285ul 을 서서히 가한 후 1시간동안 0 °C에서 교반하고, 반응이 끝난 다음 H₂O 각 30ml로 세 번 세척하고 무수 Na₂SO₄로 용매층을 건조시켜 감압하에 용매를 증발, 연갈

색의 고체를 얻었다. (784mg, 90.1%)

또다른 대사물인 2,6-diethylacetanilide는 다음과 같이 합성하였다.

2,6-diethylaniline 490mg을 CH_2Cl_2 10ml에 녹인 후 triethylamine 485ul을 가하고 0 °C에서 교반하였다. 상기의 용액에 acetyl chloride 250ul 을 서서히 가한 후 1시간동안 0 °C에서 교반하고, 반응이 끝난 다음 H_2O 각 30ml로 세 번 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 용매층을 건조시켜 감압하에 용매를 증발, 연갈색의 고체를 얻었다. (578mg, 88.2%)

2) 토양대사 기구

본실험에서 사용한 대사장치는 250ml 대사플라스크, 유리관, 세 개의 가스분산포집실린더, air flow meter 및 air pumps로 구성되었다.(Figure 1). 대사플라스크는 시험토양을 포함하고 ground glass stopper 및 teflon stopcock로 밀봉되었으며 휘발물질을 흡착시키기 위하여 유리관에는 두 개의 polyurethane foam plug를 삽입하고 한 개의 가스분산포집실린더에는 ethylene glycol(50ml)을 채웠다, $^{14}\text{CO}_2$ 포집을 위해 두 개의 가스분산포집실린더에 1N KOH(50ml)을 채웠다. 포집은 air pump를 사용하여 10ml/min의 속도로 공기를 30분 동안 장치 내로 통과시켜 수행하였다.

3) 실험방법

(1) 분석기기

EI-MS spectra는 JEOL JMS-DX 303 mass spectrometer를 사용하여 측정하였다. Digital autoradiogram은 Berthold digital autoradiograph을 이용하여 측정하였고 용액의 방사능 측정은 Packard model Tricarb 1500 liquid scintillation counter (LSC)를 사용하였다.

Sample combustion은 Packard model 307 sample oxidizer를 이용하였고 oxidizer counting solution으로 Carbo-sorb E^{TM} (10ml)과 Permafluor $\text{E}^{++\text{TM}}$ mixture(10ml)를 사용하였다.

(2) 크로마토그래피 및 방사능계측

TLC (silica gel 60 F₂₅₄, 0.25mm, Merck)는 hexane/acetone(10:4, v/v)용매로 전개하였으며 이때의 방사능 표지 화합물의 동정은 표준물질과의 cochromatography방법을 이용하였고 자외선 및 digital autoradiograph로 검

출하였다. 액체시료의 방사능은 Insta-gel scintillation cocktail(10ml)을 혼합하여 LSC로 측정하였고 external quenched standards를 사용하여 시료의 quenching을 보정하였다. 용매 비추출성 토양의 ^{14}C -잔류물은 토양시료(200-400mg)와 cellulose powder(100-200mg), Combustaid(100-200 μl)를 혼합하여 pellet으로 만들어 sample oxidizer로 연소한 후 LSC에 의해 방사능을 측정하였다. 연소효율 및 방사능의 회수율은 보정표준물질을 사용하여 구하였고 시료의 방사능 정량시 보정시켰다.

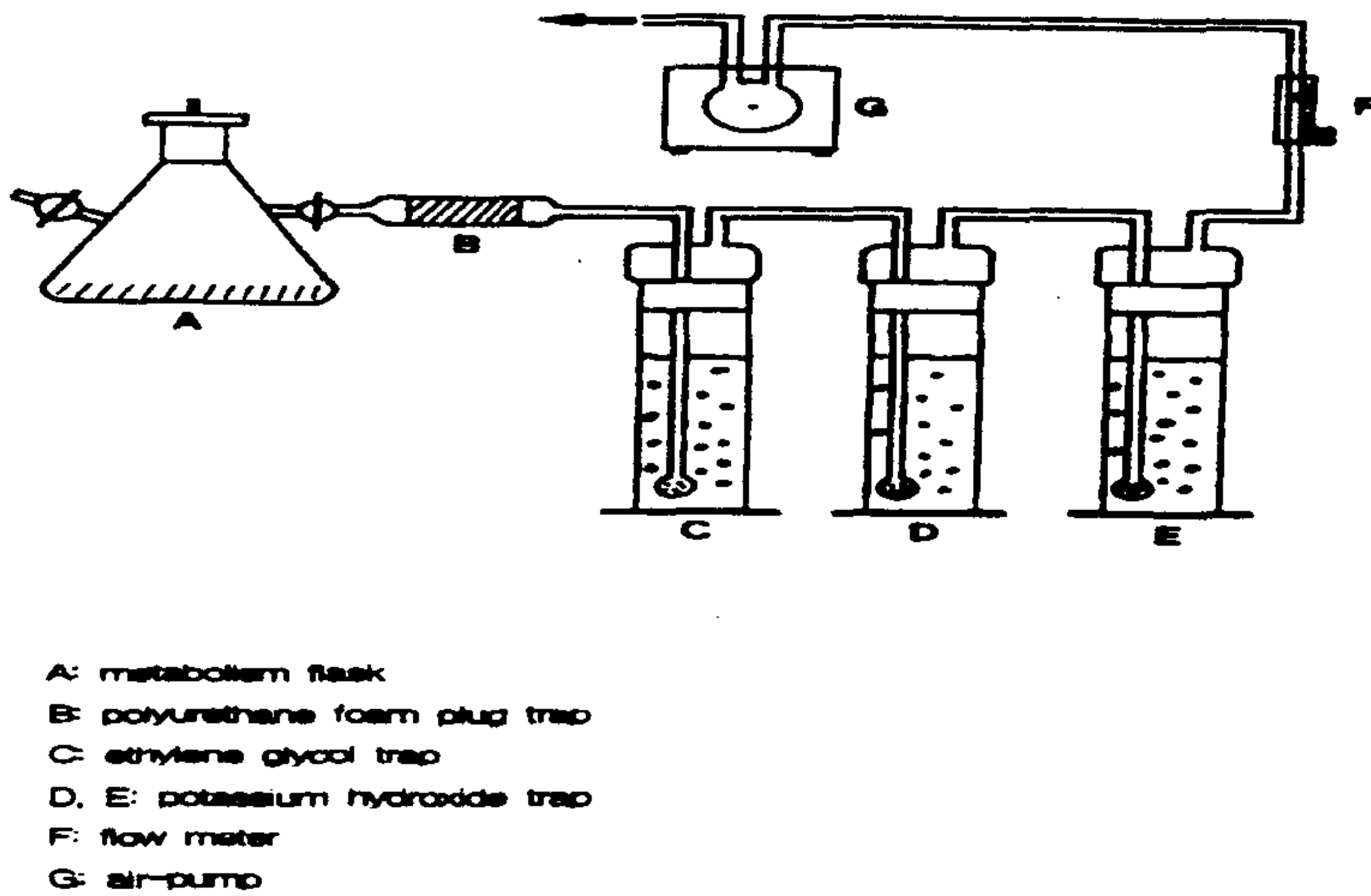


Fig. 5-3-1. Soil metabolism apparatus

(3) 토양의 용매 추출회수율

토양(50.0 g-건토기준)을 포장용수량의 75%수준으로 맞춘 다음, ^{14}C -alachlor (97,000 dpm, 0.44uCi in 100 μl acetonitrile)를 토양표면에 마이크로시린지를 이용하여 투여한 후)잘 섞고 1 시간 후 토양을 100ml 아세톤을 사용하여 250ml 원심분리병에 옮기고 1시간 동안 진탕한 후 3500rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. 상기의 과정을 추출액의 방사능이 자연

방사능 수준이 될 때까지 3-4회 더 반복하여 상징액을 합하여 총부피를 500ml로 맞추고 2ml를 취하여 방사능 활성을 측정하였다.

(4) 토양의 농약처리, 항온배양 및 분석

250ml 대사플라스크에 시험토양(50.0g-건토기준)을 넣고 수분을 포장용수량의 75%수준으로 맞춘 후 25℃, 암조건하에서 3주동안 미리 항온배양하였다. ^{14}C -alachlor (97,000 dpm, 0.44uCi in 100 μl acetonitrile)를 토양표면에 마이크로시린지를 이용하여 투여한 후 잘 섞고 25 \pm 1℃하에서 항온배양하였다. 휘발성 물질과 $^{14}\text{CO}_2$ 의 포집, 토양수분 보정은 1주일 단위로 행하여 졌으며 각각의 시료채취일 (농약 처리 후 0, 3, 7, 14, 28, 60일)에도 가스포집(실험 3-5, 3-6)을 행하고 토양은 용매로 추출, 분석 (실험 3-7, 3-8, 3-9)하였다

(5) 휘발성 물질의 포집

휘발물질은 두 개의 polyurethane foam plug와 ethylene glycol(50ml)을 사용하여 포집하였으며 포집이 끝난 후 foam plug는 메탄올(30ml)에 담가서 추출하였다. 포집 후 ethylene glycol 1 ml을 메탄올은 2ml과 혼합하고, 추출 메탄올은 그대로 2ml를 취하여 방사능을 측정하였다.

(6) $^{14}\text{CO}_2$ 의 포집 및 확인

$^{14}\text{CO}_2$ 는 KOH(1N, 50ml)를 이용하여 포집하였으며 2ml를 취하여 cocktail과 혼합한 후 chemiluminescence를 최소화하기 위하여 4℃에서 12시간 동안 보관한후 방사능을 측정하였다.

(7) 토양 추출

실험 3-3에서와 같은 방법으로 토양을 아세톤을 사용하여 추출, 원심분리하여 상징액을 합한 후 총부피를 320에서 500ml로 맞추었다. 이 추출액 2ml를 취하여 방사능 활성을 측정하고 나머지는 농축하였다.

(8) 용매 비추출성 토양잔류물(Bound Residue)의 분석

실험 3-7에서 용매 추출후의 토양은 건조, 분쇄하여 200-300mg를 연소, $^{14}\text{CO}_2$ 를 포집하여 LSC로 방사능 양을 측정하였다.

(9) 대사물의 동정과 정량

상기 3-8에서의 추출후의 농축액을 5ml의 메탄올에 녹인후 일정양 (10,000-40,000dpm)을 TLC로 전개한 후 digital autoradiography분석 하였으며

대사물은 합성한 표준물질과 비교하여 동정하였다.

다. 결과 및 고찰

1) ^{14}C -alachlor 및 대사물의 합성

^{14}C -alachlor의 방사능 순도와 표준품 alachlor의 화학적 순도는 99%이상이었으며(Figure 5-3-2) 예상 대사물로서 2-chloro-2',6'-diethylacetamide와 2,6-diethylacetanilide를 합성하였다 (Fig. 5-3-3). 대사물합성 반응은 용이하게 이루어졌으며 수율은 88%이상이었다. 화합물의 동정은 Mass spectrometry를 이용하였고 molecular ion $m/z = 225$ (2-chloro-2',6'-diethylacetamide)와 $m/z = 119$ (2,6-diethylacetanilide)을 확인하였다 (Fig. 5-3-4).

2) Material balance

(1) 휘발물질의 포집

일반적으로 휘발물질은 ethylene glycol, resin(e.g. Amberlite), polyurethane foam plug 및 sulphuric acid 등을 사용하여 포집한다. Alachlor의 증기압은 2.9mPa이고 polyurethane foam plugs와 ethylene glycol을 사용하여 휘발물질을 포집하였으나 전혀 검출되지않아 alachlor나 대사물들이 휘발성이 크지 않음을 알수 있었다.

(2) $^{14}\text{CO}_2$ 의 포집 및 확인

$^{14}\text{CO}_2$ 는 ethanolamine, ethanolamine-methylcellosolve mixture, KOH, NaOH 용액등으로 포집하는데 본 실험에서는 KOH 용액을 사용하였다. KOH에 포집된 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양은 시험 시작 후 서서히 증가하여 60일 후에는 투여방사능의 1.7%에 달하였다.(Fig. 5-3-5)

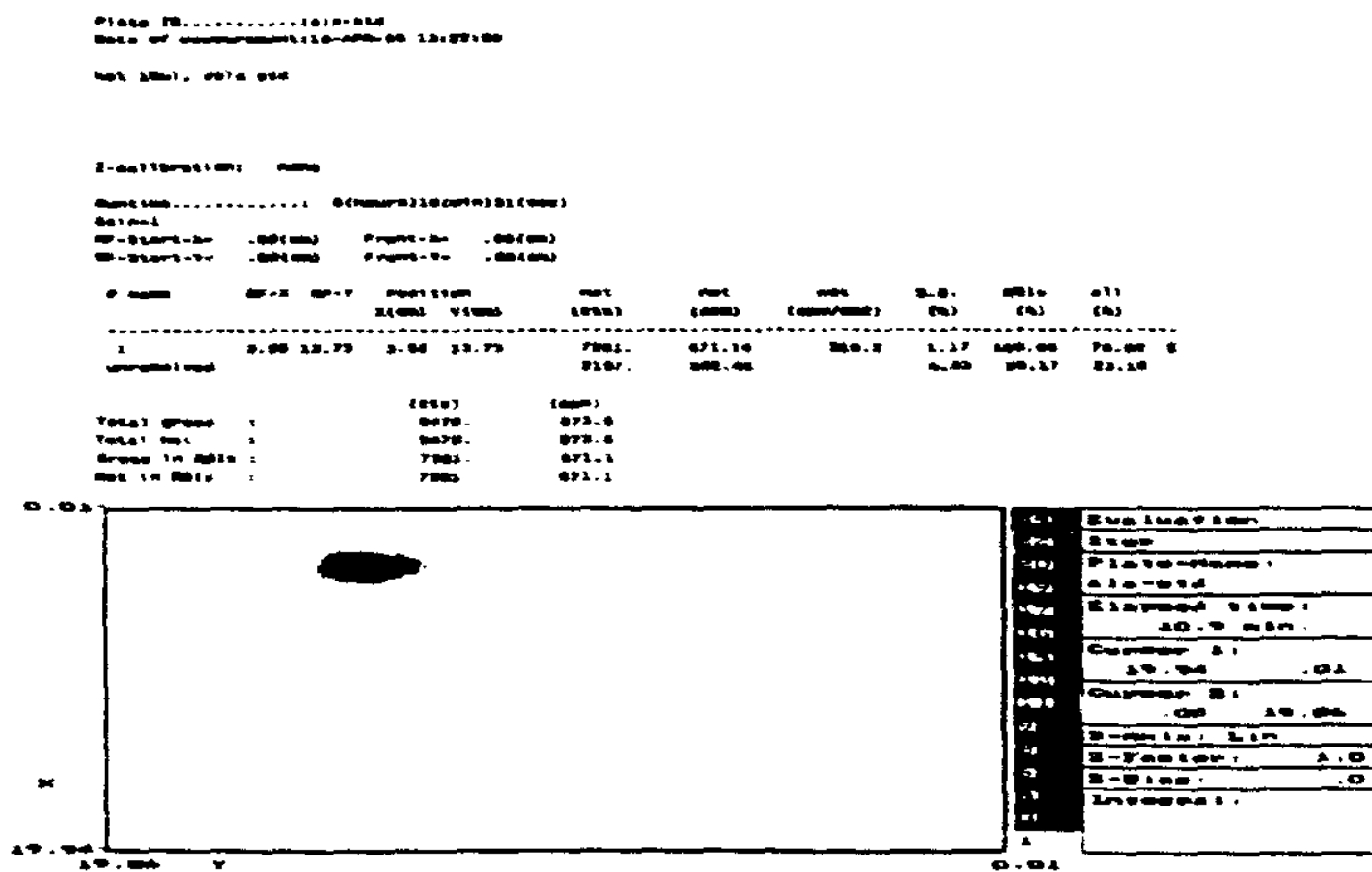


Fig. 5-3-2. DAR Autoradiogram of ¹⁴C-alachlor

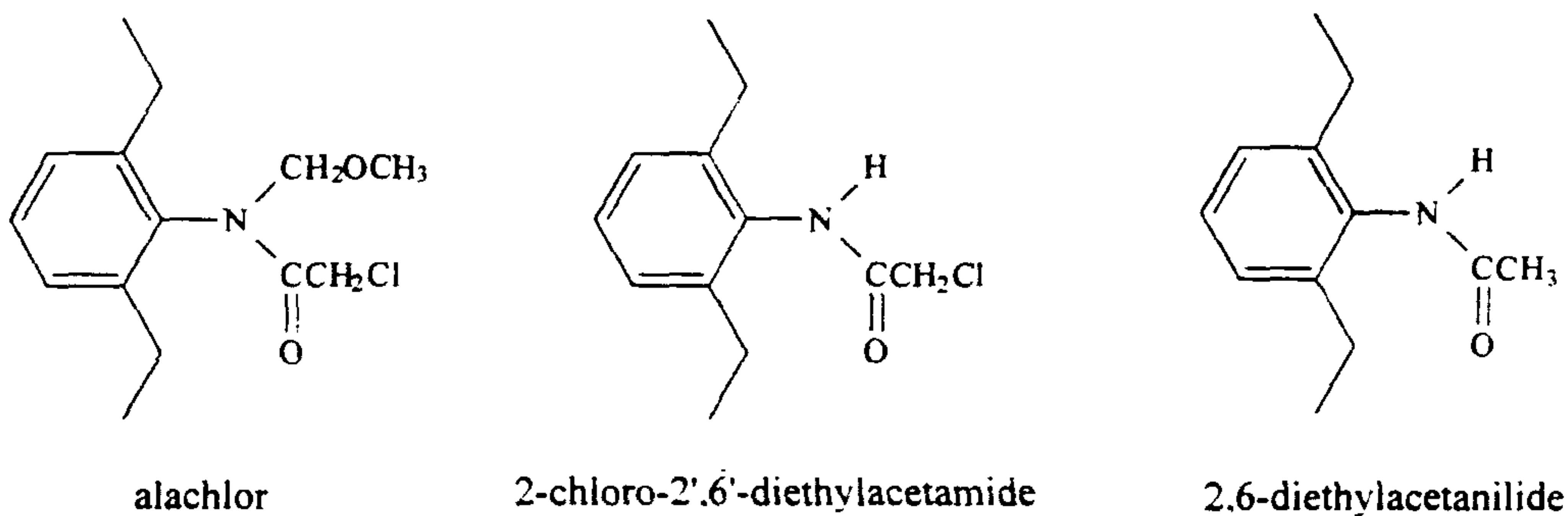


Fig. 5-3-3. Chemical structure ofalachlor, 2-chloro-2',6'-diethylacetamide, 2,6-diethylacetanilide

MASS SPECTRUM Data File: PFK 11-JUN-96 13:43
 Sample: RLA-1
 RT: 8.29 EI (Pos.) GC 1.4c BP: m/z 176.0000 Int. 646.2896 Lw 0.88
 Scan# (38)

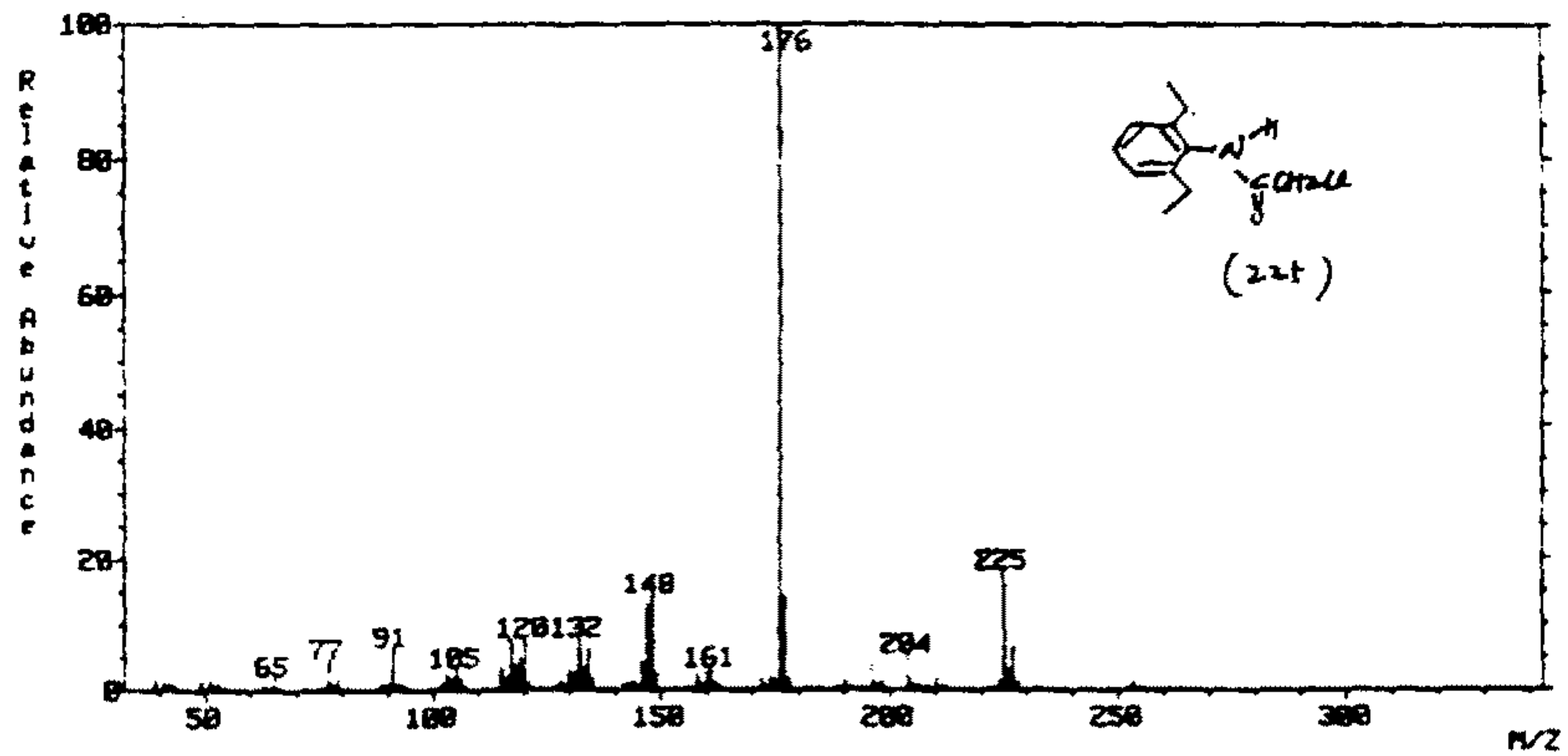


Fig. 5-3-4. Mass spectrum of 2-chloro-2',6'-diethylacetamide

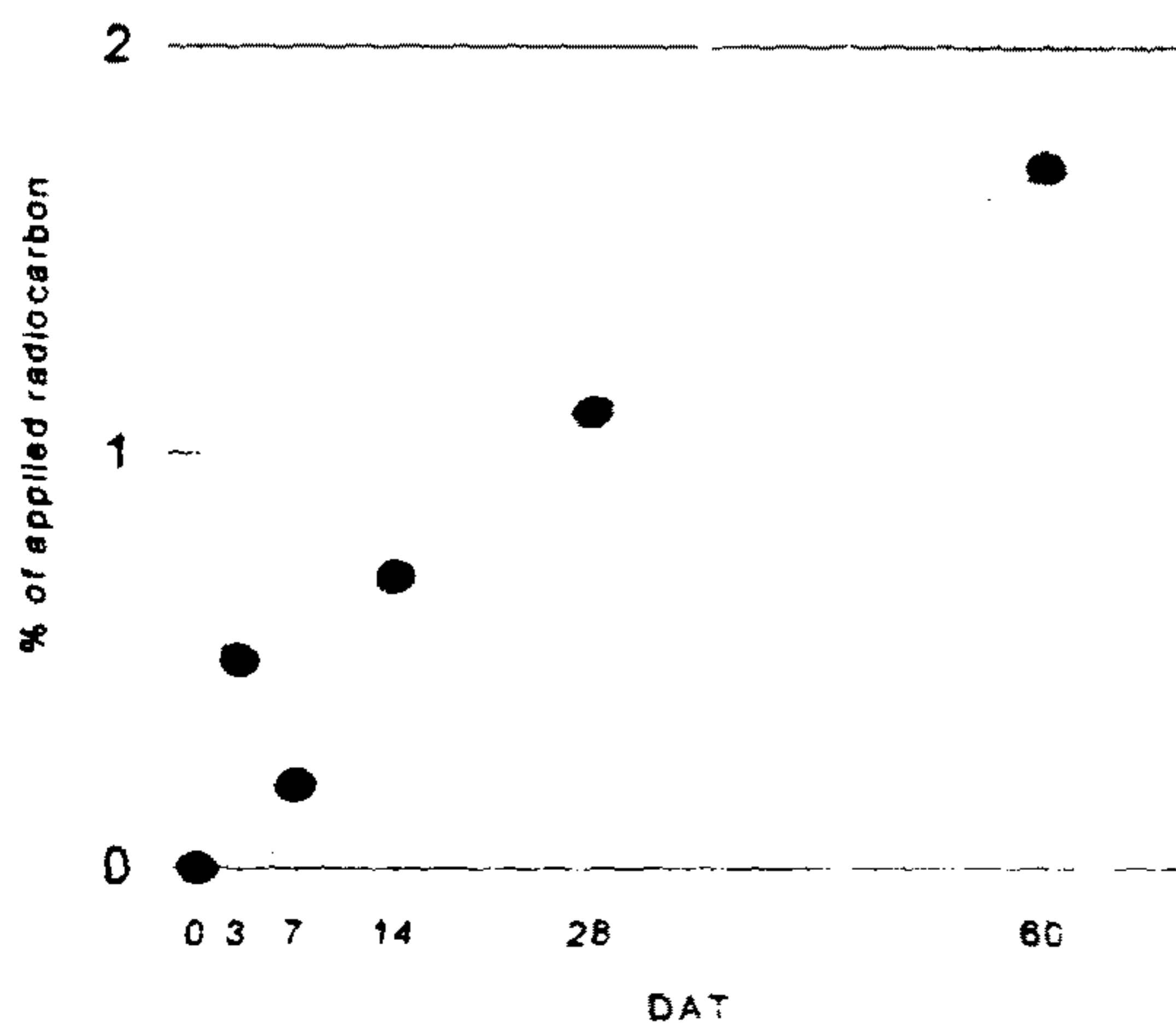


Fig. 5-3-5. ^{14}C evolution rate from ^{14}C -alachlor treated soil

(3) 토양 추출과 분석

토양의 용매 추출회수율(실험 3-6)은 96.6%로 아주 좋았고 따라서 휘발물질과 $^{14}\text{CO}_2$ 를 포집한 후 토양은 아세톤으로 ^{14}C -alachlor와 그 대사산물을 추출하였다. 시간에 따른 추출율은 0 DAT(days after treatment)에서는 96.6%이었으나 시간이 지남에 따라 감소하여 60 DAT에서는 15.9%이었다 (Fig. 5-3-6).

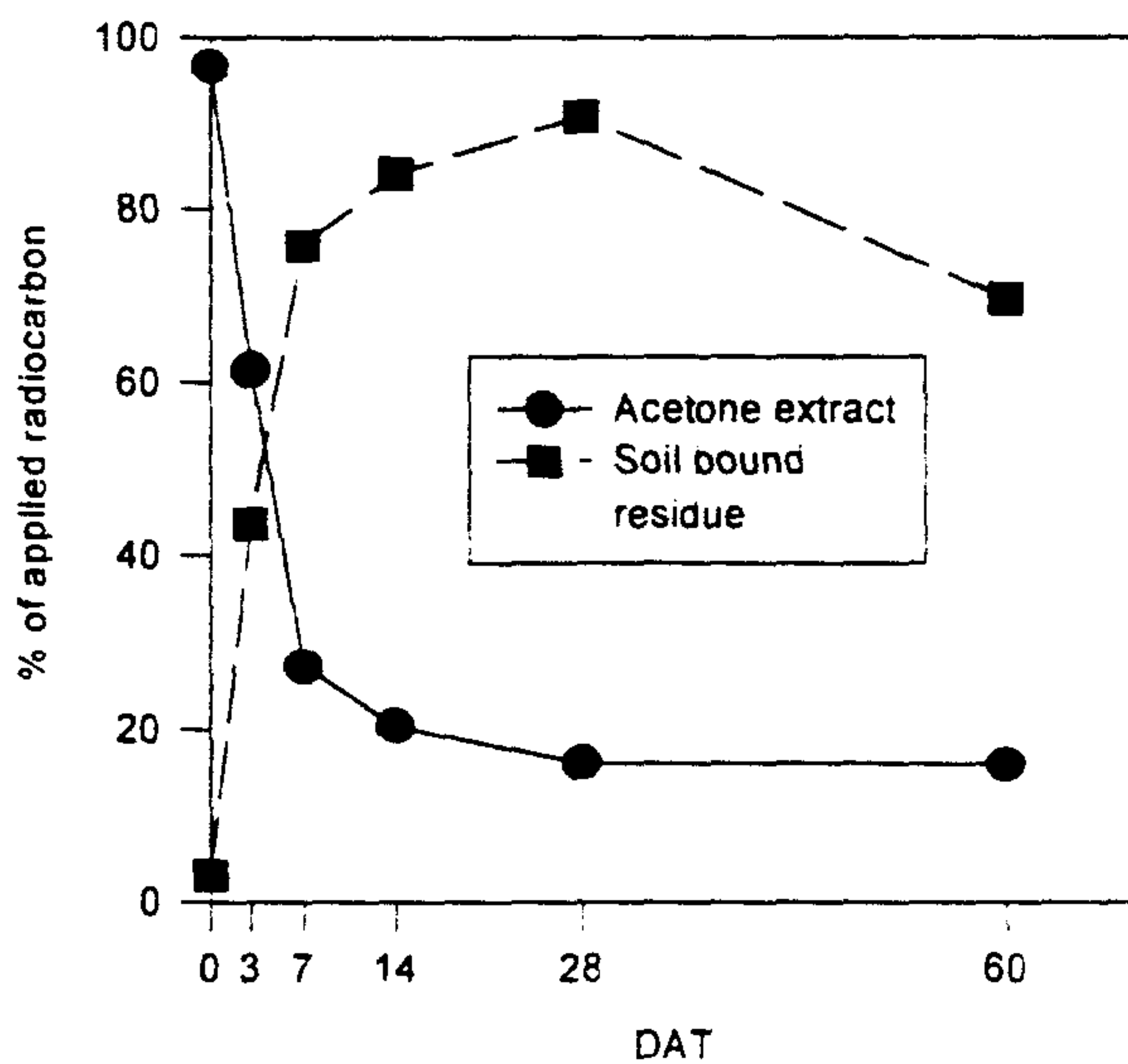


Fig. 5-3-6. Distribution of radiocarbon in acetone extract and soil

(4) 용매 비추출성 토양 잔류물의 분석

용매 추출이 끝난 토양은 비추출성 잔류 방사능의 양을 sample oxidizer로 측정하였다. 이때 토양의 완전한 연소를 위하여 토양을 잘 갈아서 고온

분말로 만든 후 cellulose powder와 섞고 Combustaid를 첨가하여 pellet을 만들었다. 용매 비추출성 잔류 방사능은 처리 후 시일이 지남에 따라 계속 증가하여 60일 후에는 투여 방사능 양의 69.7%에 달하였다 (Fig. 5-3-6). 이상의 결과는 alachlor 및 그 대사산물들이 토양에서 배양시간이 길수록 더욱 극성이 강한 물질로 전환 되거나 토양 성분과 강하게 결합하고 있음을 보여주었다.

(5) Material balance

시험기간동안 휘발성 물질, $^{14}\text{CO}_2$ 용매추출, 용매비추출성 잔류물의 material balance는 108-87.3%였으며(Table 5-3-2) 이는 토양대사 시험시 통상적으로 요구되는 수준(90-110%)을 유지하였다.

Table 5-3-2. Total ^{14}C material balance from a ^{14}C -alachlor treated soil

DAT	% of applied radiocarbon				total recovered radiocarbon (%)
	volatiles	$^{14}\text{CO}_2$	solvent extract	non-extractable radiocarbon	
0	-	-	96.6	3.1	99.7
3	-	0.5	61.5	43.8	105.8
7	-	0.2	27.3	75.8	103.3
14	-	0.7	20.4	84.1	105.2
28	-	1.1	16.1	90.8	108.0
60	-	1.7	15.9	69.7	87.3

3) 토양 추출물 분석

앞의 실험에서 농축시킨 용매추출액을 TLC/DAR을 이용하여 alachlor 및 그 대사물들을 분석, 정량하였다 (Fig. 5-3-7).

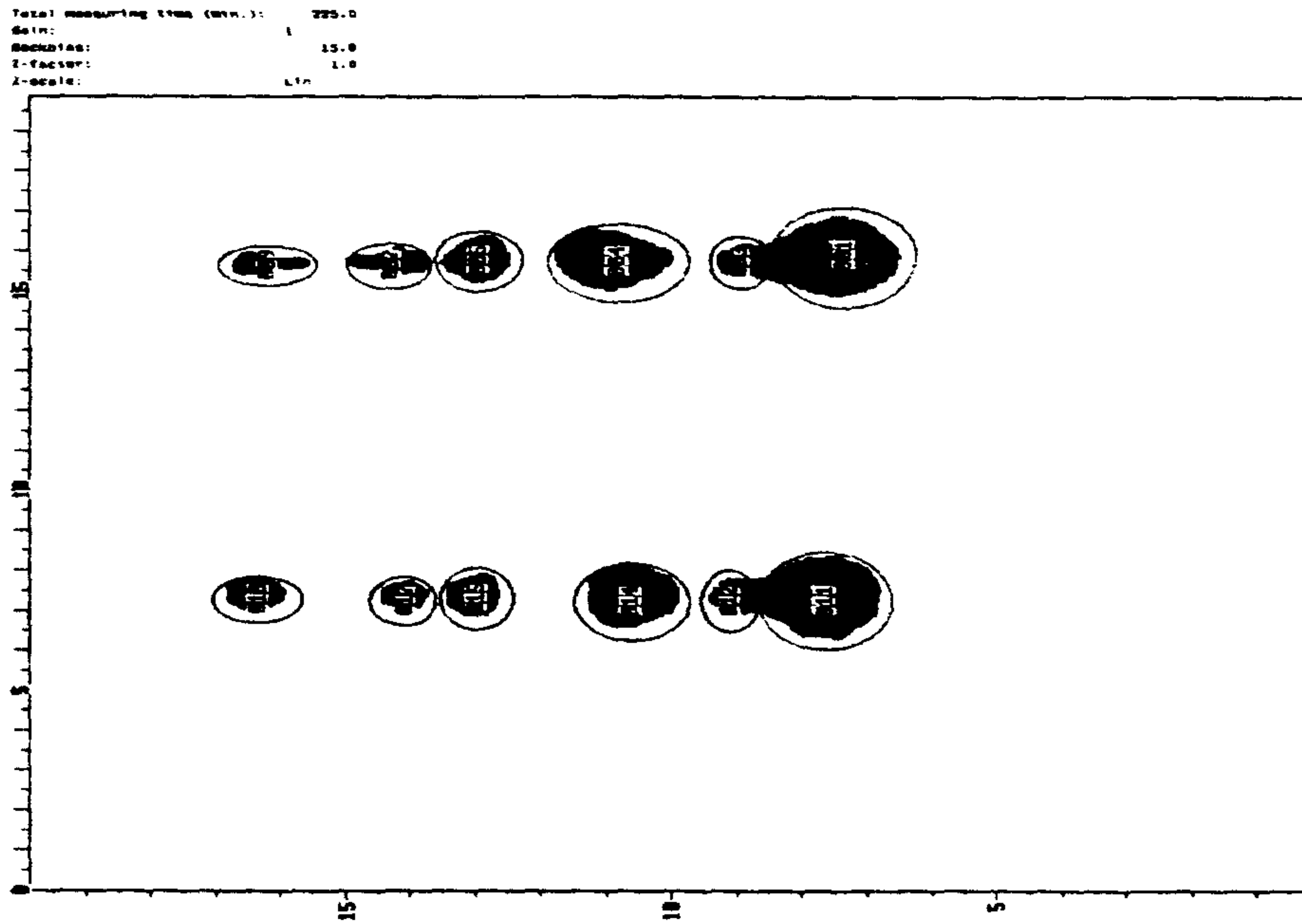


Fig. 5-3-7. DAR autoradiograms of alachlor and metabolites

(1) Alachlor의 분해

농약 처리 직후인 0 DAT에서 96.6%였던 alachlor는 시간이 지남에 따라 계속 감소되어 처리후 60일후에는 1.6%(36.9ng/g)까지 분해가 진행이 되었다. Alachlor의 분해양상은 1차 kinetics를 따랐으며($R^2=0.9473$) 토양중 반감기는 13.6일로 계산이 되었다(Fig. 5-3-8). 농약이 토양중에서 1-12주내에 분해되는 경우는 비잔류성농약으로 분류가 되고 있으며 현재 국내에서는 토양중 반감기가 180일 이상이 되는 경우 사용이 금지되고 있다.

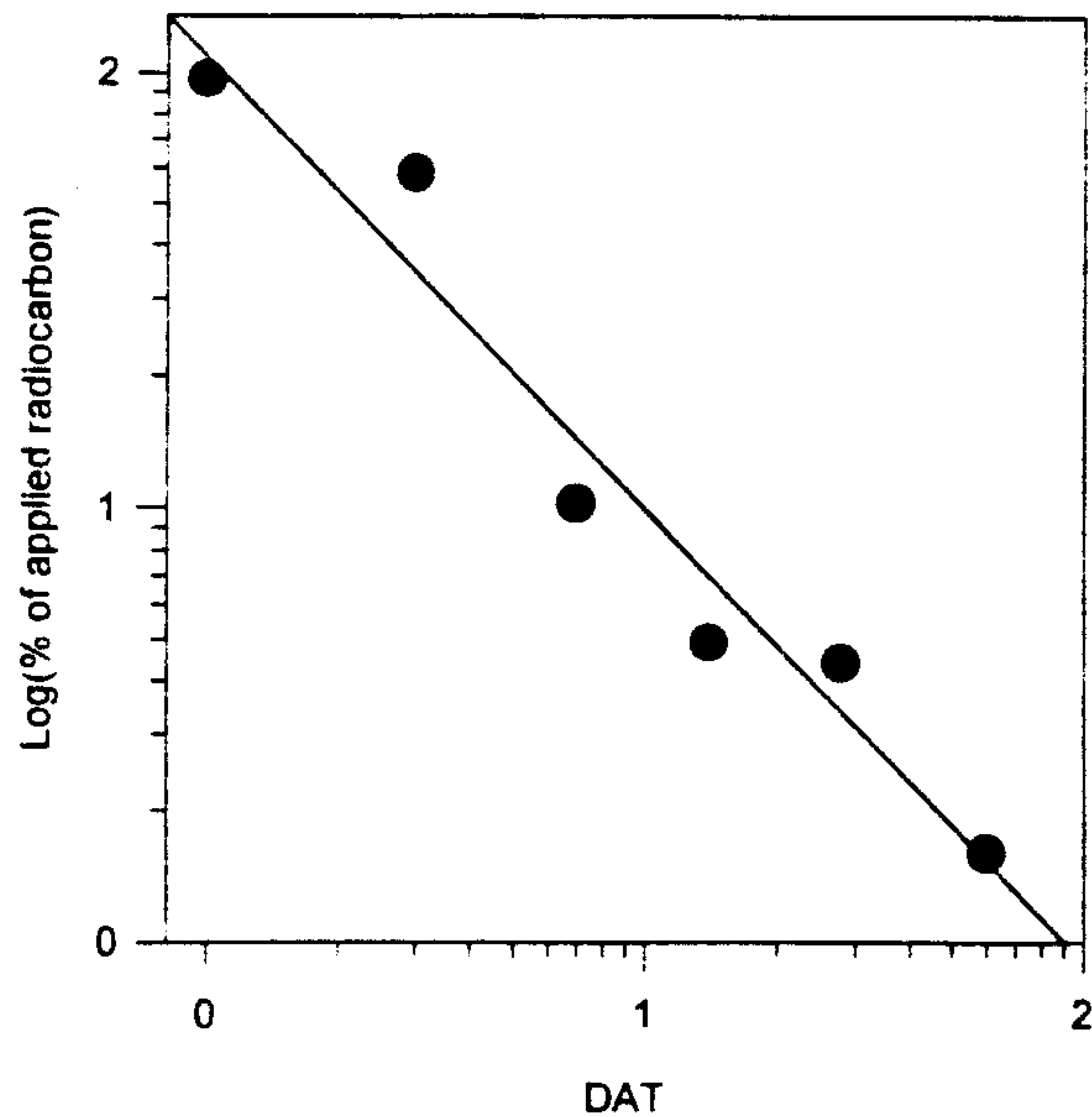


Fig. 5-3-8. Degradation rate of ^{14}C -alachlor

(2) 대사물의 동정

토양 추출물에서는 잔존 alachlor 외에도 6개의 대사물이 발견되었는데 2-chloro-2',6'-diethylacetamide (M1)과 2,6-diethylacetanilide (M2)이 동정되었고 주요 대사물은 2-chloro-2',6'-diethylacetamide (M1) 이었다. M1은 3일 후부터 생성이 관찰 되었고 (4.5%) M2, Unknown1, 2, 3 (U1, 2, 3) 대사물들은 7일 후부터, M4는 tlc plate의 origin에 해당하고 14일 후부터 관찰되었다. M1은 7일 째 최대치를 보인 후 (7.1%) 계속 감소하여 60일 후에는 1.6%에 달하였으며 M2 및 U4는 감소하다가 다시 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 5-3-9)

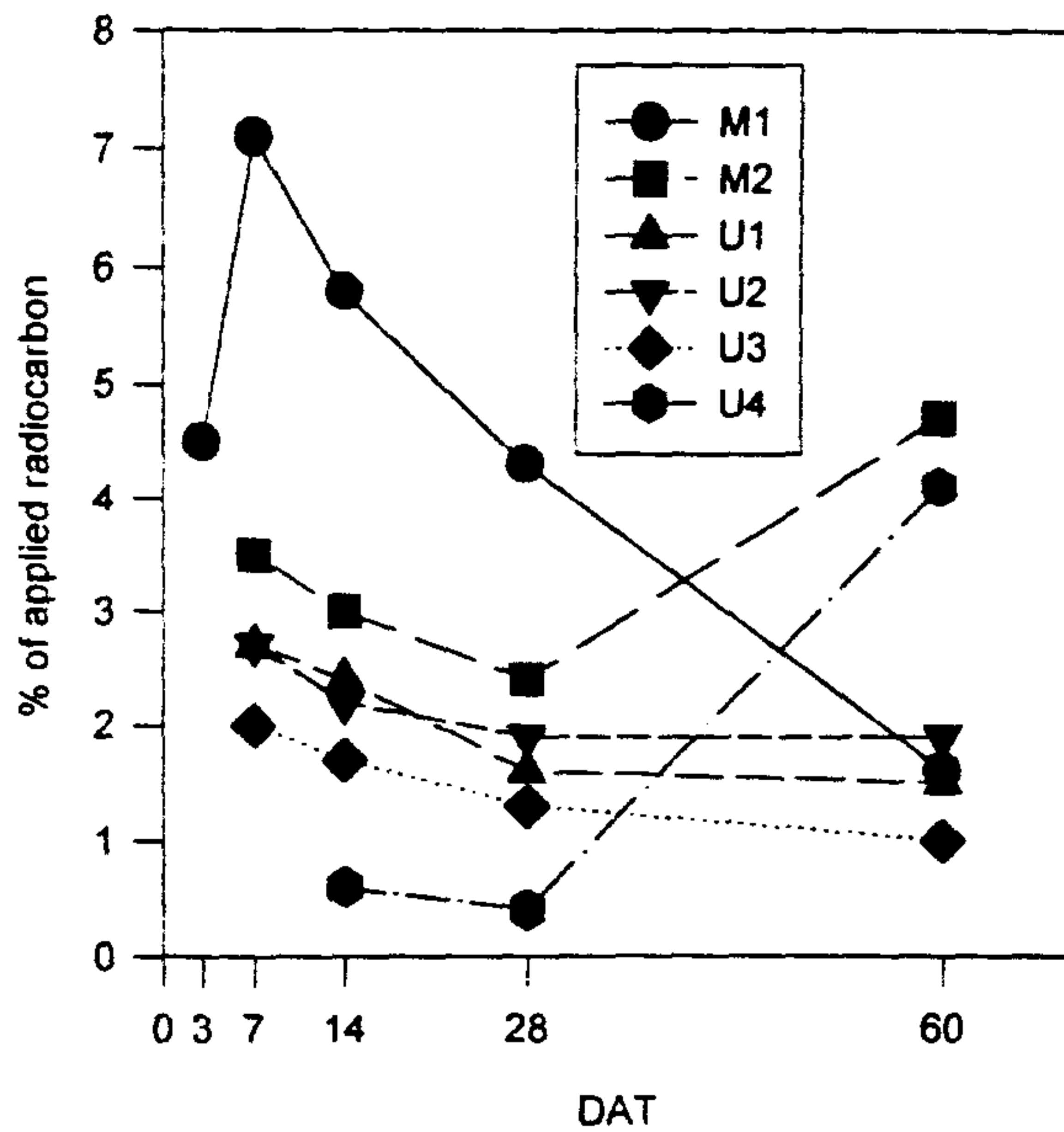


Fig. 5-3-9. Formation of metabolites.

라. 결론

본 연구는 농약의 토양대사 연구법의 확립에 대한 것으로 농약이 토양중에서 대사 되는 전반적 행적을 구명하여 농약의 환경 및 인간에 대한 안전성 평가의 기본자료를 구하고자 수행되었다. 시험토양은 밭토양(양토)을 채취하여 사용하였으며 수분은 1/3bar에서의 포장용수량의 75%로 유지한 후 ^{14}C -alachlor를 토양에 처리하고 25°C의 암조건에서 보관하면서 0, 3, 7, 14, 28, 60일 경과후에 추출용매, $^{14}\text{CO}_2$, 휘발성 물질 및 용매 비추출성 잔류물의 방사능의 분포를 분석하였다. ^{14}C -Alachlor는 처리후 60일후에 처리방사능의 1.6%로 감소하였으며 토양중 반감기는 13.6일로 계산되었다

($R^2=0.9473$). 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양은 60일후에 최초 투여 방사능량의 1.7%에 달하였으며 휘발성 화합물은 전혀 검출되지 않았다. 용매 비추출성의 방사능은 처리후 60일에 69.7%였고, 6 개의 대사물 생성됨을 확인하였으나 2-chloro-2',6'-diethylacetamide (M1)과 2,6-diethylacetanilide (M2)이 동정되었다. 실험기간중의 전체적인 material balance는 108.0-87.3%로 유지되었다.

마. 참고문헌

1. M. Matthies, Transport and behavior in soil in *Chemical Exposure Predictions*, Davide Calamari, Ed., 1993, Lewis Publishers, Chapter 7
2. L. Somasundaram and Joel R. Coats, Pesticide transformation products in the environment in *Pesticide Transformation Products- Fate and Significance in the Environment*, 1991, American Chemical Society, pp2-9
3. The British Crop Protection Council, *The Pesticide Manual*, Clive Tomlin Ed., 10th Ed.
4. Kenneth A. Hassall, *The Biochemistry and Uses of Pesticides*, 2nd Ed., 1990, VCH Publishers, pp113-115
5. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Environmental Fate Branch, Metabolism Studies, in *Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate*, EPA-540/9-82-021, U.S. Government Printing Office, 1982, pp54-59
6. Henry P. Nelson and Silvia C. Termes, Ambiguities and Deficiencies in U.S. EPA Guidelines for conducting Laboratory Environmental Fate Studies on Pesticides in *Agrochemical Environmental Fate, State of the Art*, Marguerite L. Leng, Elizabeth M. K. Leovey, Paul L. Zubkoff, Eds, 1995, Lewis Publishers, pp51-69
7. Johann A. Guth, Experimental Approaches to Studying the Fate of Pesticides in Soil in *Progress in Pesticide Biochemistry*, D. H. Hutson and T. R. Roberts, Eds, John Wiley & Sons, 1981, p85
8. Audus L. J., A new soil perfusion apparatus, *Nature*, 1946, 158, p419
9. Lees, H., and Quastel, J. H., Biochemistry of nitrification in soil. Addendum by H. Lees. a soil perfusion apparatus, *Biochem. J.* 1946, 40, 812-815

10. Temple, K. L., A modified design of the Lees soil percolation apparatus, *Soil Sci.*, 1951, 71, 209-210
11. Sperber, J. I., and Sykes, B. J., A perfusion apparatus with variable aeration, *Plant and Soil*, 1964, 20, 127-130
12. Kimura, R., and Yamaguchi, M., Microbial decomposition of 2-oxo-4-methyl-6-ureido-hexahydropyrimidine in soil, *Soil Biol. Biochem.*, 1978, 10, 503-508
13. Fung, K. K. H., and Uren, N. C., Microbial transformation of s-methyl N-[(methylcarbamoyl)oxy]thioacetimidate(methomyl) in soils, *J. Agric. Food Chem.*, 1977, 25, 966-969
14. Organization for Economic Co-operation and Development, Inherent Biodegradability in Soil in *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, 304A, 1981, OECD Publications
15. Don L. Bull and G. Wayne Ivie, Fate of O-[4-[(4-chlorophenyl) thio]phenyl] O-ethyl S-propyl phosphorothioate(RH-0994) in soil, *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 30, 150-155
16. Robert L. Chrzanowski and Robert E. Leitch, Metabolism of O-ethyl O-(4-nitrophenyl)[¹⁴C]phenylphosphonothioate in cotton and soil, *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 30, 155-161
17. Pamela M. Betts, Catherine W. Giddings, and James R. Fleeker, Degradation of 4-aminopyridine in soil, *J. Agric. Food Chem.*, 1976, 24, 571-574
18. Jeffrey D. Wolt, Joelene K. Smith, Jerry K. Slims, and Dennis O. Duebelbeis, Products and kinetics of cloransulam-methyl aerobic soil metabolism, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 324-332
19. Stephen C. Wagner, Robert M. Zablutowicz, Lewis A. Gaston, Martin A. Locke,

- and Jim Kinsella, Bentazon degradation in soil: Influence of tillage and history of bentazon application, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 1593-1598
20. Bartha, R, and Pramer, D., Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil, *Soil Sci.*, 1965, 100, 68-70
 21. D. A. Laskowski, R. L. Swann, P. J. McCall, and H. D. Bidlack, Soil degradation studies, *Residue Rev.*, 1983, 85, 139-147
 22. Kenneth D. Racke and Joel R. Coats, Enhanced degradation of isofenphos by soil microorganisms, 1987, 35, 94-99
 23. Philip W. Lee, Stephen M. Stearns, Hector Hernandez, Walter R. Powell, and Motupalli V. Naidu, Fate of dicotophos in the soil environment, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 1169-1174
 24. Gail E. Schneiders, Mary K. Koeppe, Motupalli V. Naidu, Peter Horne, Alethia M. Brown, and Cecilia F. Mucha, Fate of rimsulfuron in the environment, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41, 2404-2410
 25. Parr, J. F., and Smith, S., A mutipurpose manifold assembly: Use in evaluating microbiological effects of pesticides, *Soil Sci.*, 1969, 107, 271-276
 26. Goswami, K. P., and Koch, B. L., A simple apparatus for measuring degradation of ¹⁴C-labelled pesticides in soil, *Soil Biol. Biochem.*, 1976, 8, 527-528
 27. Kearney, P. C., and Konton, A., A simple system to simultaneously measure volatilization and metabolism of pesticides for soils, *J. Agric. Food Chem.*, 1976, 24, 424-426
 28. Parr J. F., and Reuszer, H. W., Organic matter decomposition as influenced by oxygen level and flow rate of gases in the constant aeration method, *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 1962, 26, 552-556
 29. Philip W. Lee, Jon M. Fukuto, Hector Hernandez, and Sephen M. Stearns,

- Fate of monocrotophos in the environment, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 567-573
30. James P. Kruger, Robert G. Butz, and Douglas J. Cork, Aerobic and anaerobic soil metabolism of dicamba, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 995-999
 31. David B. Johnson and Byron L. Cox, Aerobic soil metabolism and residue uptake in plants of an organophosphorus carbamate insecticide, *J. Agric. Food Chem.*, 1985, 33, 255-259
 32. Jae-Koo Lee and Kee-Sung Kyung, Rice plant uptake of fresh and aged residues of carbofuran from soil, 1991, 39, *J. Agric. Food Chem.*, 588-593
 33. Shinoi Sakata, Nobuyoshi Mikami, Tadashi Matsuda and Junshi Miyamoto, Degradation and leaching behavior of the pyrethroid insecticide cypermethrin in soils, *J. Pesticide Sci.*, 1986, 11, 71-79
 34. Yoshio Izawa, Atsuko Hirano, Shunji Funayama and Matazaemon Uchida, Degradation of Fenpyroximate in upland soils under laboratory conditions, *J. Pesticide Sci.*, 1993, 18, 67-75
 35. Beverly V. Truker and Donald E. Pack, Bux insecticide soil metabolism, *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20, 412-416
 36. Kiyoshi Sato, Shin-ichi Maki, Yasuhiro Kato, Osami Matano and Shinko Goto, Fate and behavior of fungicide guazatine in soils, *J. Pesticide Sci.*, 1984, 9, 39-48
 37. Ann M. Smith, John Mao, Rebeca A. Doane, and Marin F. Kovacs, Jr., Metabolic fate of [¹⁴C]acrolein under aerobic and anaerobic aquatic conditions, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 2497-2503
 38. Best, J. A. and Weber, J. B., Disappearance of s-triazine as affected by soil pH using a balance-sheet approach, *Weed Science*, 22, 1974, 364-373

39. Lichtenstein, E. P., Fuhremann, T. W., and Schulz, K. R., Transformation and metabolism of [¹⁴C]phorate as affected by percolating water in a model soil-plant ecosystem, *J. Agric. Food Chem.*, 22, 1974, 991-996
40. Harvey, J. and Reiser, R. W., Metabolism of methomyl in tobacco, corn and cabbage, *J. Agric. Food Chem.*, 21, 1973, 775-783

2 식물대사 연구

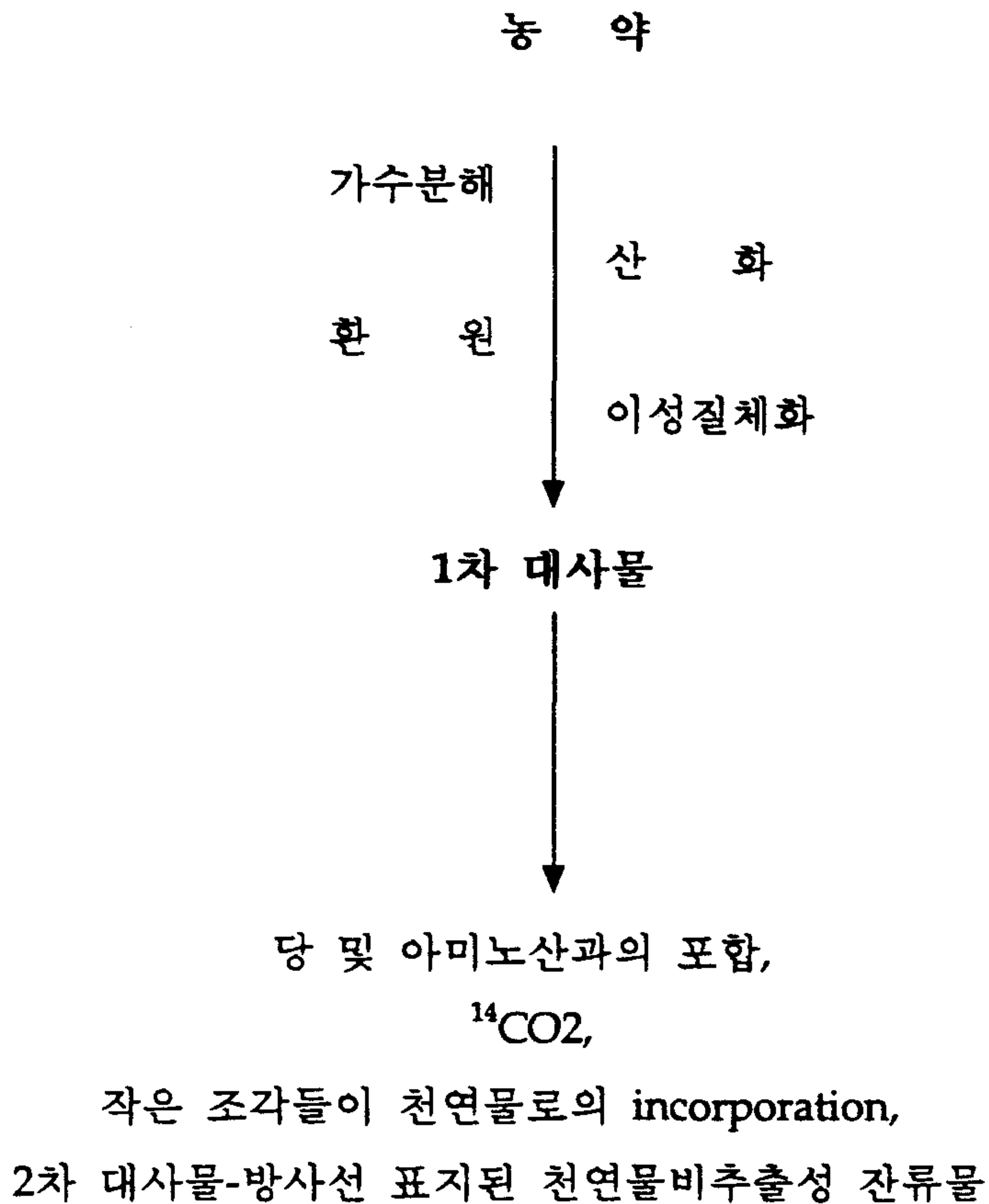
가. 연구배경

현대 농업에서 식량의 증산과 품질 향상, 노동력 감소와 생산비 절감 등에 절대적으로 기여하고 있는 농약은 농업에 사용된 이래로 그 사용량이 계속 증가하고 있으며 신뢰성 있는 평가에 의하면 농약을 사용하지 않는 경우 작물 생산량의 약 35%가 병충해, 잡초 등과 같은 생물적 요인에 의해 감소되었다. 그러나 농약은 대상체에 처리된 후, 환경중의 다양한 요인들에 의해서 변화하게 되는데, 이러한 분해나 대사과정을 통해 만들어진 새로운 분해물 또는 대사물은 농약이 식물에 처리된 이후 수확 시까지 전 기간 동안에 걸쳐 생성, 변환된다. 따라서 처리된 모화합물과 그 분해, 대사산물은 환경 및 작물내에서 잔류물로서 존재하게 되며 인간이나 가축에 의해 섭취될 가능성이 있기 때문에 그 잔류물의 구조나 독성학적 특성 등을 밝히는 것은 매우 중요하다. 더욱이 새로 합성된 농약의 경우 잔류 분석 방법을 확립하기 위해 대사 실험이 가장 우선적으로 수행되어야 하며 그럼으로써 농약과 그 대사물의 환경 또는 작물체중의 생성 양상과 대사 기작을 밝힐 수 있게 된다. 이러한 대사 실험은 각각의 농약에 대해서 동물, 식물, 토양 그리고 수중, 공기 중에서 모두 수행되어야 하며 실험을 통해 얻어진 정보들을 통해 그 농약의 전반적인 대사 양상과 그 변화 기작을 규명 할 수 있게 된다.

작물에 처리된 농약은 표면에 잔류하거나 내부로 침투하게 되며 표면에 남아있는 농약은 증발, 비, 바람 등에 의해 대기, 토양 그리고 수계 등으로 이동되어 진다. 이중 작물의 표면에 잔류하거나 내부로 침투되어 여러 화학적, 생화학적인 경로에 의해 변화되는 농약의 대사 양상에 대한 연구가 식물대사의 목적이며 식물 대사 실험은 식물체내 농약 잔류 분석법의 개발에 있어서 반드시 선행되는 필요 조건이고 결과를 통해 농약과 그 대사물의 식물체중에서의 행적과 변화 양상에 대한 예측이 가능하다. 즉, 농약 처리 후, 작물중의 잔류 또는 대사물의 성분을 정의하고 그 흡수, 이행, 분포 양상을 밝혀내며 다양한 잔류 또는 대사물의 가장 효과적인 추출, 분석 방법을 확립하는 것이 실험의 목적이 된다. US EPA에서는 다음의 네가지를 대사 실험의 목적으로 정의하고 있다. 첫째는 농약을 처리한 작물에서 전체 잔류물량을 평가한다. 둘째는 최종

적인 잔류물의 주성분을 밝힘으로써 잔류 실험에서 찾고자하는 성분을 알아낸다. 셋째는 실험을 통해 잔류물의 작물체내 분포를 밝혀낸다. 예를 들어 농약의 흡수 경로가 뿌리인지 잎인지, 이행이 일어났는지, 그리고 잔류물이 표면에 잔류하고 있는지를 밝힌다. 마지막으로 네 번째는 잔류물의 다양한 성분들에 대한 효과적인 추출 방법을 확립하는 것이다. 이러한 대사 실험은 농약의 주 대상 작물들에 대해서 최소 3 종류의 작물에 대해서 실시해야 하는데 예를 들어 콩의 대사 실험 결과는 콩과식물들에 대해서는 유사한 적용을 할 수 있지만 감자나 당근과 같은 뿌리 채소에는 그러한 결과를 이용 할 수 없는 것이다. 반면에 각기 다른 세 종류의 작물들에서 유사한 대사 경로가 나타났다면 더 이상의 대사 실험은 필요하지 않다.

일반적으로, 식물에 처리된 농약은 특히 식물체내에서 화학 반응과 효소 반응에 의해 여러 대사 단계를 거치면서 그 특성과 구조가 변화하게 되는데 식물체 고유의 자기 방어 기작 또는 무독화 현상 등으로 설명 할 수 있으며 농약의 침투, 식물체내의 분포, 배설 등의 속도와 경로는 생리적, 생화학적 그리고 그 밖의 요소들에 의해 결정된다. 이러한 대사 반응은 크게 두 단계로 구분하는데 첫 단계에서는 화학, 생화학적으로 가수 분해되거나 산화되면서 그 분자 구조가 바뀌면서 대부분의 농약들은 물에 난용성이지만 이러한 반응에 의해 극성기를 갖게 되거나 극성기가 노출되어 수용성이 높아지게 됨으로써 대사물이 항상은 아니지만 원래의 모화합물 보다 더 낮은 독성을 갖게 되면서 체외로의 배설이 쉽게 된다. 이러한 일련의 반응들을 1차 대사라고 하며 이러한 1차 대사물들은 때로 2차 대사에 의해 conjugates으로 변화하기도 하는데 이 경우는 더욱 배설이 용이한 분자 상태로 만들기 위해 식물체내의 다른 성분들과 conjugation 반응을 거치게 되고 이 단계의 반응은 보다 복잡한 단계로 구성 된다. (scheme-1)



scheme-1 : Flow diagram of pesticide plant metabolism

Flupyrazofos는 1987년에 화학연구소에서 국내최초로 합성된 유기인계 살충제로서 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 활성을 가지고 있으며 다른 유기인계 살충제와 마찬가지로 acetylcholinesterase를 저해하는 것으로 보고되었다. 물에 대한 용해도는 0.80mg/L이고 증기압은 2.81×10^{-5} torr이다. 식물에 대한 약해는 없는 것으로 판정이 되었으며 rat에 대한 급성경구독성은 372 - 605mg/kg, carp에 대한 EC₅₀ (48 hours)은 0.9ppm이었다. 변이원성과 최기형성 및 지발성 신경독성은 없었다. 열에 대해서는 50℃에서 안정하였으나 10

0℃에서는 불안정하였다. 광에는 비교적 안정하였으며 rat liver의 마이크로좀을 이용한 *In vitro* 대사실험에서는 대사산물로서 Flupyrazofos oxon [O, O-diethyl O-(1-phenol-3-trifluoromethyl -5-pyrazoyl) phosphorothioate]과 PTMHP (1-phenyl-3-trifluoro-methyl-5-hydroxy pyrazol)가 동정되었다.

따라서 본 연구는 식물에서 농약 대사연구 중에서 가장 수행하기에 까다로운 상황인 식물 성체에 농약 살포 후의 대사 연구기법 확립에 중점을 두고 농약의 분해와 대사물의 동정, 생성양상은 물론 material balance의 유지를 조사하고 유묘를 이용하여 뿌리를 통한 농약의 흡수 이행도 관찰하였다.

나. 재료 및 방법

1) 재료

(1) 시약

- 모든 용매(HPLC grade) : Burdick & Jackson Co.
- Insta-gel XFTM, Permafluor E^{++TM}, Carbo-sorb ETM, CombustaidTM : Packard Instrument Co.(USA)
- Cellulose powder : Whatman paper Ltd.(England)
- 기타 합성용 시약 : Aldrich

(2) 대상식물

Flupyrazofos의 처리대상 작물인 배추를 수확 전 약 30일 정도의 성체를 충남 대학교에서 분양 받아 간이 온실에서 재배하며 약제 살포후 대사실험에 사용하였다.

유묘에 의한 흡수 이행 실험을 위해 배추 종자를 실내 온도가 25±1℃로 유지되는 암조건으로 petridish에서 발아시켰다. 발아시킨 유묘는 수분이 충분한 원예용 상토를 포함한 pot에 이식한 후, growth cabinet에서 5-6일간 생육시키면서 3-4 엽기가 되었을 때 실험에 사용하였다.

(3) 방사능 동위원소 화합물

① ¹⁴C-Flupyrazofos

본 실험에 사용한 ¹⁴C-Flupyrazofos는 독일의 GSF와 화학연구소의 공동 연구로 합성하였고, 방사화학적 순도는 99% 이상, 방사능 비활성은 28.2

mCi/mmol(74.2 μ Ci/mg) 이었다 (Fig. 5-3-10, 5-3-11)

② 14 C-PTMHP

14 C-Flupyrazofos (355.9mg, 0.94mmol, 11.57mCi)를 acetone(5ml)에 녹인 후 1N NaOH solution(4ml)을 첨가하여 5시간동안 환류하였다. 이 반응액에 2N HCl을 첨가하여 pH를 2로 조정한 후 농축시키고 다시 아세톤에 녹인 후, NaCl은 여과하였다. 아세톤 용액을 농축한 후 남은 황색고체는 water/hexane(1:1, 10ml), cyclohexane(20ml), dichloromethane(10ml)로 씻은 후 10ml ethyl acetate로 녹이고 무수 sodium sulfate를 통과시켜 건조, 농축하였다. 남은 잔사를 다시 무수 hexane(20ml)로 씻은 후 흰색고체(156.0mg, 7.24mCi, yield: 73.1%)를 얻었다.

③ 14 C-Flupyrazofos oxon

PTMHP(49.7mg, 0.22mmol, 2.64mCi)를 벤젠(15ml)에 녹인 후 potassium carbonate(0.8g)를 가하여 환류하면서 물을 제거한 후 벤젠(5ml)을 증류한 다음 온도를 낮추어(70-75 $^{\circ}$ C) diethyl chlorophosphate(43.3 μ l, 0.30mmol)를 첨가하고 환류를 계속(18시간)하였다. 환류가 끝난 후 반응액에 벤젠(40ml)를 가하여 분액깔때기에 옮기고 5% potassium carbonate solution(3 \times 40ml), water(3 \times 30ml)로 세척하고 무수 sodium sulfate로 건조시킨 후 감압 농축하여 황색액체를 얻었다(101.6mg, 2.68mCi, yield: 128.1%).

2) 간이 온실 및 흡수 이행 실험장치

(1) 간이 온실

투명한 비닐로 만든 간이 온실 (가로, 3m x 세로, 1.5m x 높이, 1m(중앙 1.5m))을 제작하였는데 만약의 경우 방사성 동위원소의 외부 오염 가능성을 완전히 차단하기 위해 바닥을 비닐 3겹으로 덮었으며 이어서 온실 가장자리로 약 30cm정도 올라오도록 하였다.

(2) 흡수 이행 장치(Growth cabinet)

가로, 세로, 높이가 각각 155, 60, 50 cm인 Growth cabinet을 제작하였다. 광원으로는 자연광과 유사한 파장을 내는 true lite(Duro test[®], USA)와 일반 형광등을 각각 2개, 4개를 설치하고 중앙에 3개의 백열 전구를 실험에 사

Plate-Name:K502 std-2 Elapsed time: 0.0 min. Lin
 Date/Time: 18-APR-96 10:50:15 View-Point R= 100.0 Phi= 20.0 Theta= 40.0

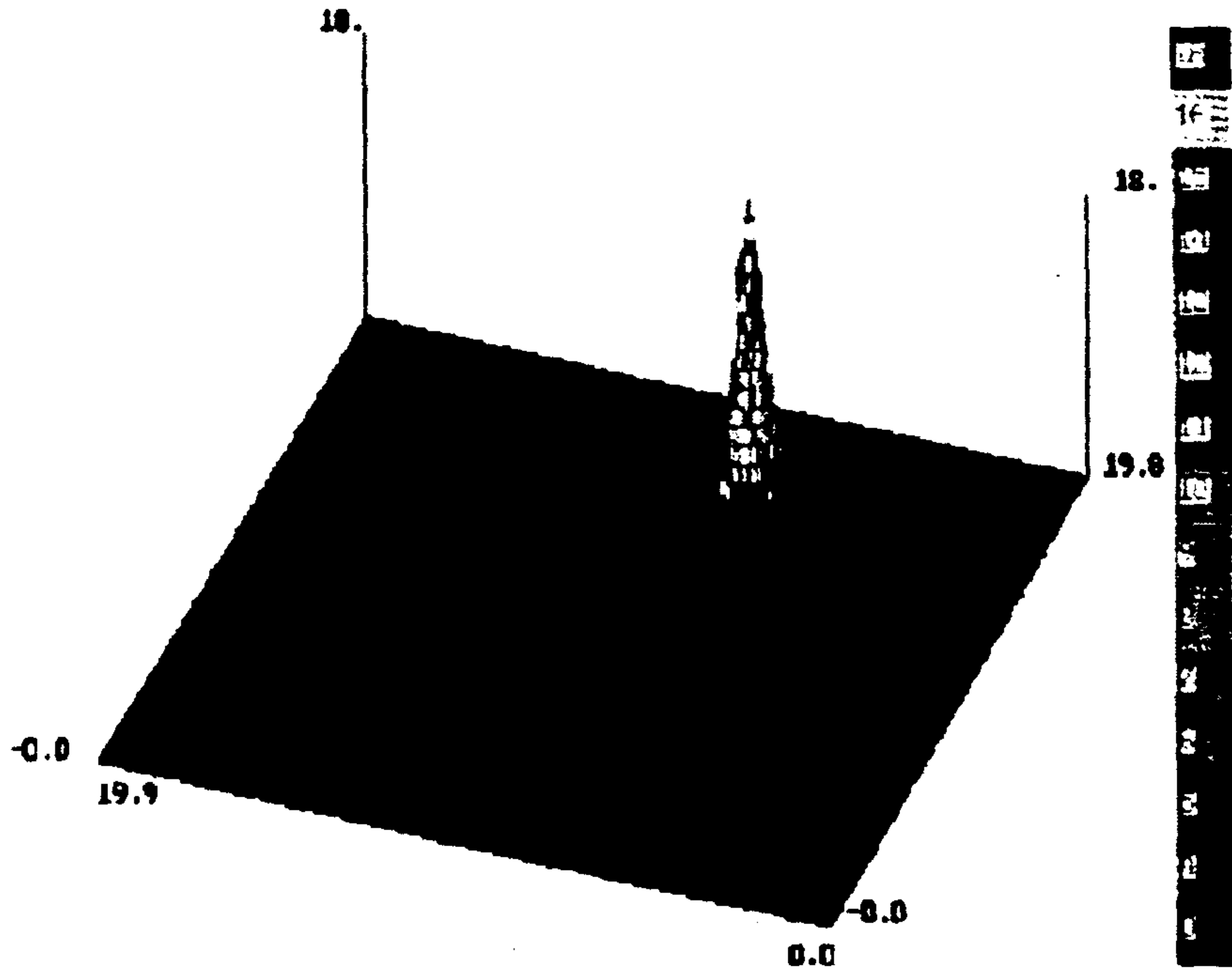


Fig. 5-3-10. DAR autoradiogram of ¹⁴C-Flupyrzofos

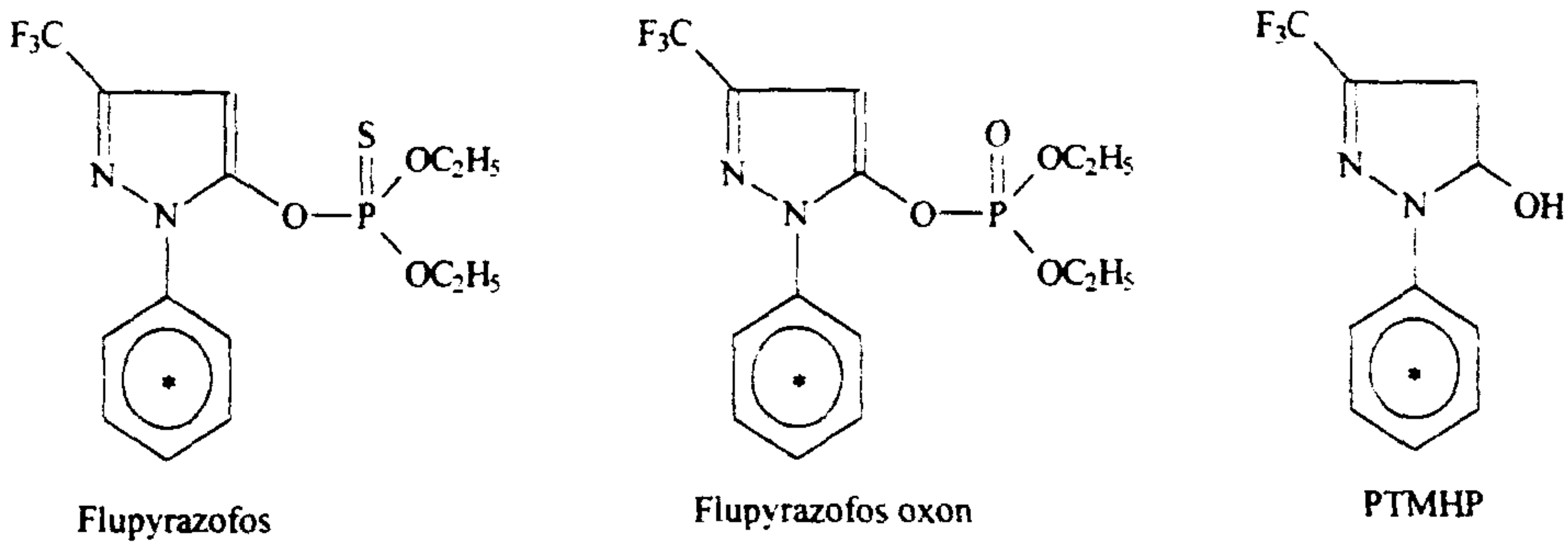


Fig. 5-3-11. Chemical structure of ¹⁴C-Flupyrzofos, ¹⁴C-PTMHP and ¹⁴C-Flupyrzofos oxon

용되는 어린 묘와의 거리가 약 25cm가 되도록 설치하였으며 이 위치에서의 조도는 5000-6000 lux를 나타내었다. 고온에 의한 영향을 배제하기 위해 Growth cabinet의 사면을 개방하였으며 전체 실험 기간 동안의 온도는 30℃ 이하로 유지되도록 하였고 1일 10시간 동안 광이 조사되도록 하였다.

3) 실험방법

(1) 기구 및 기기

Food processor(Moulinex[®]), Homogenizer(Brinkmann), Wrist action shaker(BURREL MODEL 75), Centrifuge(HERMLE ZK 380), Liquid scintillation counter(TRI-CARB 1500, PACKARD), Sample oxidizer(Model 307, PACKARD), Digital AutoRadiograph(EG & G BERTHOLD), Bio image Analyzer(Fuji Co.)

(2) 크로마토그래피 및 방사능계측

TLC (silica gel 60 F₂₅₄, 0.25mm, Merck)는 acetone:n-hexane (1:1, v/v)용매로 전개하였으며 이때의 방사능 표지 화합물의 동정은 표준물질과의 co-chromatography방법을 이용하였고 자외선 및 digital autoradiograph로 검출하였다.

액체시료의 방사능은 Insta-gel scintillation cocktail(10ml)을 혼합하여 LSC로 계측하였고 external quenched standards를 사용하여 시료의 quenching을 보정하였다.

용매 비추출성 식물잔류물은 일정량을 pellet으로 만들어 sample oxidizer로 연소한 후 LSC에 의해 방사능을 측정하였다. 연소효율 및 방사능의 회수율은 보정표준물질을 사용하여 구하였고 시료의 방사능 정량시 보정시켰다.

(3) 용매 추출 회수율

마쇄한 배추 시료 50 g을 원심 분리 튜브(250 ml)에 취하고, ¹⁴C-Flupyrzofos(806,884dpm), ¹⁴C-Flupyrzofos oxon (723,830dpm) ¹⁴C-PTMHP (788,640dpm)를 각각 처리한 후 acetone 100 ml을 가하여, homogenizer로 마쇄, 추출하였다. 마쇄가 끝난 후 4000 rpm (24℃, 20 min.)으로 원심 분리하고 상정액을 500 ml volumetric flask에 옮겼다. 남은 잔

류물에 다시 acetone 100 ml을 가하고 1 시간 동안 진탕, 추출, 원심 분리를 하였는데 총 4회 추출한 경우 상정액의 방사능이 자연 방사능 수준으로 내려와 더 이상 추출이 필요치 않았다. 추출 전 과정이 끝난 후에 용매 추출물은 500ml의 부피로 맞추고 방사능을 측정하고 남은 고체 잔류물은 Hood내에서 건조시켜 무게(70 mg)를 측정한 후 sample oxidizer로 연소시켜 LSC로 그 방사능을 측정하였다.

(4) Flupyrzafos 처리

① 처리량

배추의 지름이 평균 50 cm일 때 배추의 처리 면적은 1,964 cm²가 된다. Flupyrzafos의 표준 처리량이 0.015 kg/10a 이므로 배추의 포기 당 처리량은 2.964 mg이 되며 여기에 여분의 10%를 추가, 3.0 mg으로 계산하였고 수확 때의 배추의 평균 무게가 약 1.5 kg이고 추출용인 50 g 당 100만 dpm을 예상하여 포기 당 3000만 dpm의 처리를 예상하였는데 ¹⁴C-Flupyrzafos용액의 방사능이 164,000 dpm/μg이므로 3000만 dpm처리시는 약 200 μg 이 계산되었다. 그러므로 ¹⁴C-Flupyrzafos 200 μg 과 비 방사능 Flupyrzafos 2.8 mg을 H₂O/MeOH (1:1, v/v) 15ml에 희석하여 처리 약제로 사용하였다.

② Flupyrzafos 처리

처리자의 방사능 오염을 최소화하기 위해 전신 보호의, 장갑, 마스크, 발 덮개 등을 착용하였으며 처리전 온실은 외부와 완전히 차단한 후, control을 제외하고 온실 내에 위치시킨 각각의 배추 시료를 비닐 주머니로 전체를 둘러싸고 노즐이 긴 sprayer로 최대한 가까운 거리에서 각각의 vial에 담긴 처리 약액(15ml, 약 3000만 dpm) 전량을 고르게 살포하였다. 처리가 끝나고 약 2 시간 후, 배추 잎의 표면에서 약액이 건조되었을 때 비닐 덮개를 벗겨내었다.

(5) 시료 수확

처리 당일 control 1개와 처리된 배추 시료 1 개를 수확하였고, 처리 후 7일, 14일 그리고 28일에 시료 2개씩 수확 하였다. 수확 시 작업자 및 주위 오염을 방지하기 위해 각 pot의 배추를 충분한 크기의 비닐 주머니로 윗 부분부터 덮어 씌운 후, 칼로 배추의 밑 부분을 자르고 곧바로 비닐 주머니에 넣어서 입구를 밀봉한 후 실험실로 옮겨 무게를 측정하였다.

(6) 시료 추출 및 분석

비닐을 5겹으로 바닥을 덮은 Hood내에서 유리판을 깔고 그 위에서 무게를 측정한 배추 시료를 가능한한 잘게 자르고 동시에 dry ice 분말과 섞어서 동결 시켰다. 동결된 배추 시료를 food processor를 이용해 더욱 잘게 부수는데 이때 시료가 녹아 수분이 배어 나오지 않도록 dry ice를 계속 첨가하였다. 처리가 끝난 시료는 시료 보관용 비닐 주머니에 옮긴 후, 냉동실에서 dry ice가 모두 승화되도록 하루 정도 보관하였다.

Dry ice가 모두 승화된 시료 중에서 약 400mg를 sample oxidizer로 연소시켜 TRR(Total Radioactive Residue)을 구하고, 다시 50 g을 원심 분리 튜브(250 ml)에 취하고 위의 방법 (3-3)에 의해 추출 후 용매 추출액과 비 추출성 잔류물의 방사능을 측정하였다.

(7) Flupyrzofos 및 대사물 동정

500ml의 용매 추출액을 100 μ l 당 5000-15000 dpm이 되도록 농축시킨 후 100 μ l를 TLC plate 에 점적하고 acetone:n-hexane (1:1, v/v)을 전개 용매로 사용하여 전개하였다. 전개가 끝난 다음 plate를 건조 시키고 Digital AutoRadiograph(300 분)로 방사능을 측정하였고 또한 Image plate에 약 7일 동안 노출시킨 후 Image analyzer를 이용하여 autoradiogram을 얻어 약제 및 대사물을 동정, 정량하였다.

(8) 흡수 이행 실험

3-4 엽기의 유묘를 뿌리가 다치지 않도록 pot에서 빼낸후, 흐르는 물로 뿌리에 묻어있는 흙을 제거하고 20 ml glass vial에 16 ml의 증류수(200,000 dpm)를 채우고 유묘를 삽입하였다. 이때 유묘를 지지하기 위해 스폰지 plug를 vial 입구에 설치하였다.

흡수 이행 분석을 위한 유묘 시료는 control, 실험 후 0, 1, 2, 4, 10 시간에 각각 5 개씩을 수확하여 수경액에 노출되었던 뿌리 4개를 MeOH 20ml로 세척하였다. 또한 유묘를 지지하던 스폰지 plug도 4개를 모아서 MeOH 20ml로 세척하였고 상기의 세척액은 농축을 하여 방사능(1ml)을 측정하였다. 채취한 유묘 중 1 개는 control으로, 1개는 Autoradiogram용으로 사용하였으며 나머지 3 개는 뿌리, 줄기, 상업, 하엽으로 나누어 칭량한 후 sample oxidize로 연

소시켜 각 부분에 이행된 방사능을 측정하였다. 또한, control, 0, 1, 2시간 유묘는 Image plate에 한달간 노출시켜 흡수이행 autoradiogram을 얻었다.

다. 결과 및 고찰

1) 용매 추출 회수율

배추 시료에서의 회수율 실험은 추출 용매로 많이 쓰이는 acetone을 선택하여 수행하였다. 각각의 방사능 표지 화합물에 대한 회수율은 모두 90 % 이상으로 좋은 회수율을 보였다(Table 5-3-3).

Table 5-3-3. Recovery of radiochemicals from plant

	용매 추출액(%)	고체 잔류물(%)	전체 회수율(%)
¹⁴ C-Flupyrzofos	93.5 ± 3.4	0.2 ± 0.1	93.6 ± 3.3
¹⁴ C-Flupyrzofosoxon	93.5 ± 4.8	1.4 ± 0.1	94.8 ± 4.9
¹⁴ C-PTMHP	93.9 ± 4.5	4.4 ± 0.6	98.2 ± 4.6

2) 약제 살포 후 대사

(1) TRR과 Material balance

¹⁴C-Flupyrzofos를 처리한 후, 0, 7, 14 그리고 28일이 지난 다음 수확한 각각의 배추 시료의 TRR과 용매 추출액 중의 방사능 activity는 시간 경과에 따라 예상대로 점차 감소하였으며 고체 잔류물의 방사능은 낮은 수준이지만 증감 양상을 보였다.

(2) Flupyrzafos 및 대사물 분석

TLC상에서 Flupyrzofos와 대사물들의 분리를 조사하고 동정과 정량을 위해 DAR(Digital Autoradiograph)과 Image plate를 사용하여 비교하였다. DAR은 검출 시간을 단축시킬 수 있었으나 Flupyrzofos와 oxon등의 대사물

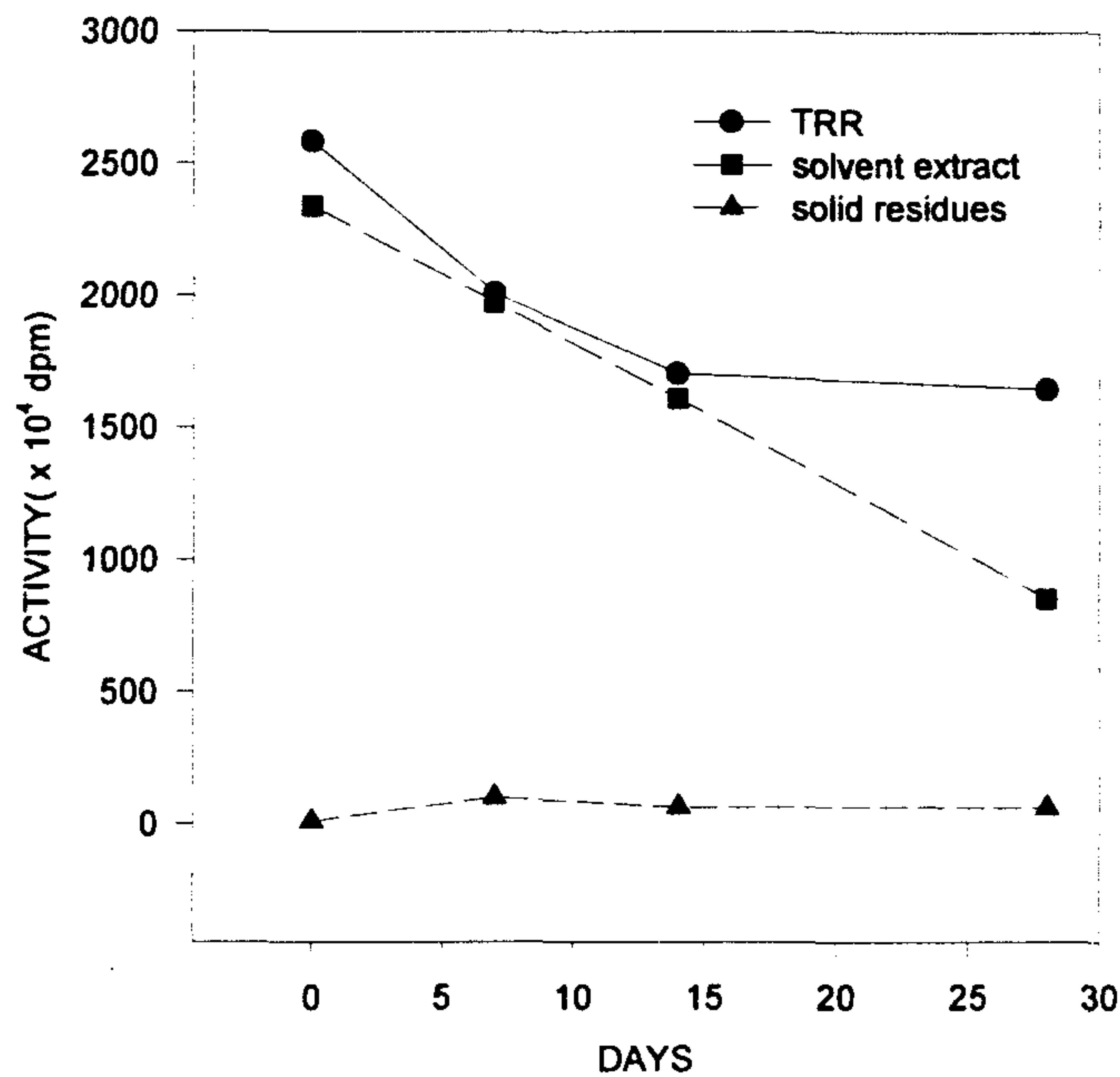


Fig. 5-3-12. Time course of TRR, and radioactivity of extract and residue.

분리 정도를 정확히 구분할수 없었다.(Fig. 5-3-14) 반면에 Image plate는 선명하게 화합물들의 분리가 관찰되어(Fig. 5-3-15) 동정과 정량이 가능하였다.

Flupyrzofos는 시간이 지남에 따라 감소되어 28일 후에는 TRR의 약 29%가 되었고 origin을 비롯한 Flupyrzofos-oxon, 미확인 대사물들은 생성이 증가하였으며, Flupyrzofos-oxon의 경우 약 6%에 달하였다.(Fig. 5-3-7)

시험 결과에 의해 계산된 Flupyrzofos의 반감기는 약 18일이었고(Fig. 5-3-4) 전체적인 material balance는 28일을 제외하고 90% 이상 이었다.(Table 5-3-4)

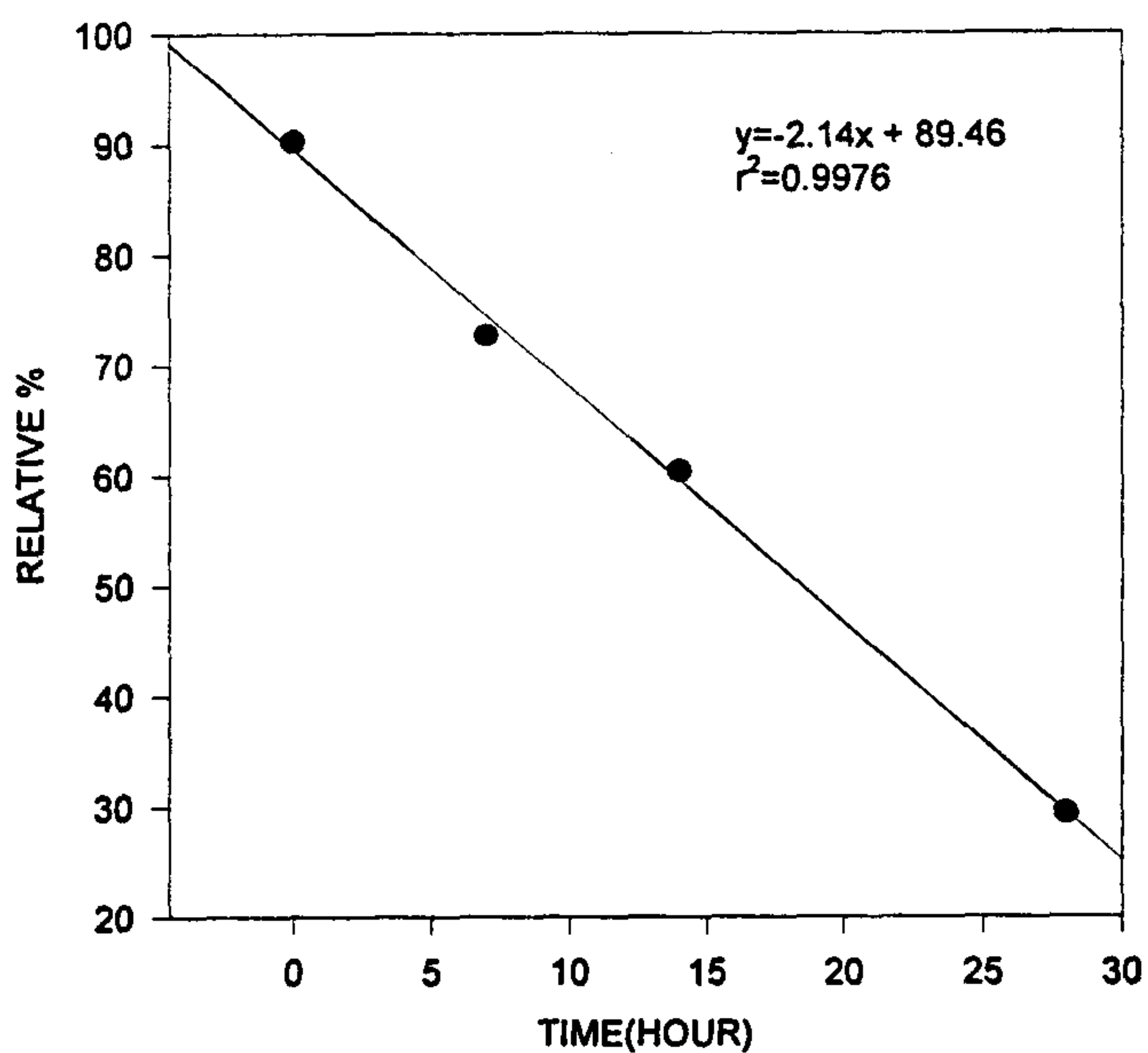


Fig. 5-3-13. Photodegradation rate of Flupyrazofos

Table 5-3-4. TRR, and radioactivity of extract and residue

DATE (days after treatment)	Solvent Extracts(%)				Solid Residues (%)	Recovery (%)
	Flupyrazofos	Flupyrazofos- oxon	unknown- metabolite	origin		
0	90.3	0	0	0	0.2	90.5
7	72.7	5.9	5.9	14.7	4.7	103.9
14	60.4	9.4	6.6	17.9	3.4	97.7
28	29.4	6.1	3.0	11.7	3.4	53.6

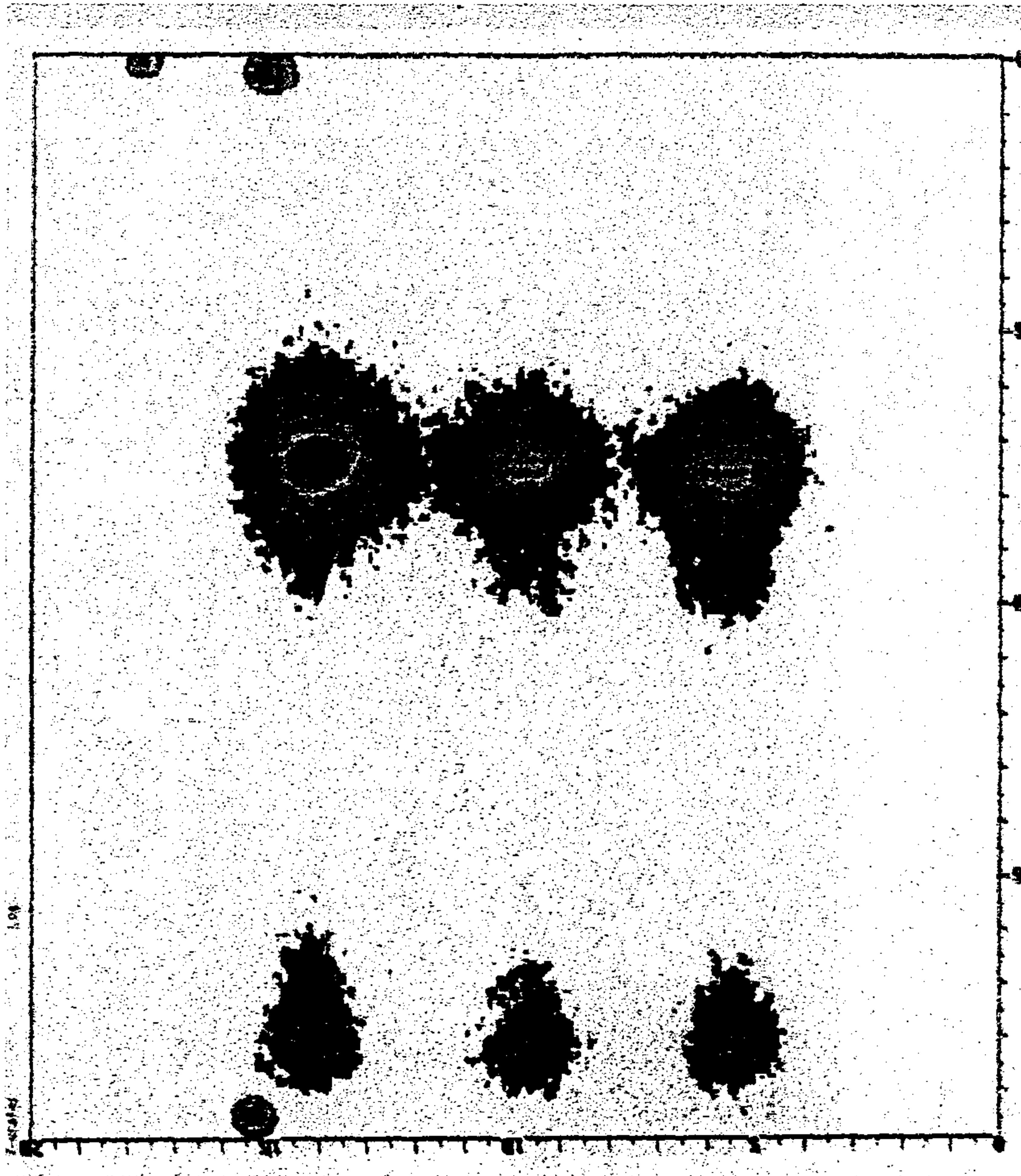


Fig. 5-3-14. DAR autoradiogram of solvent extract

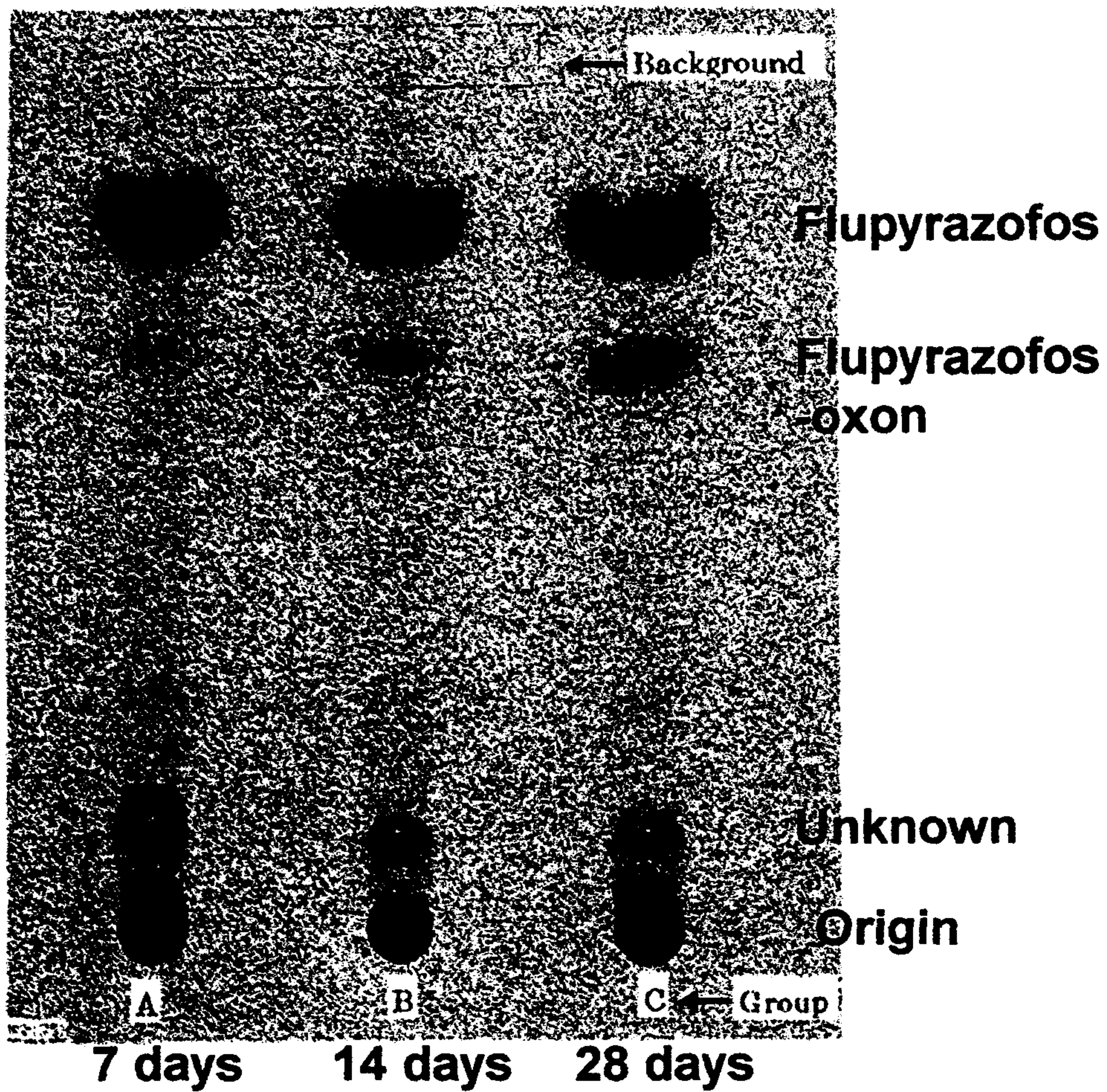


Fig. 5-3-15. Image autoradiogram of solvent extract

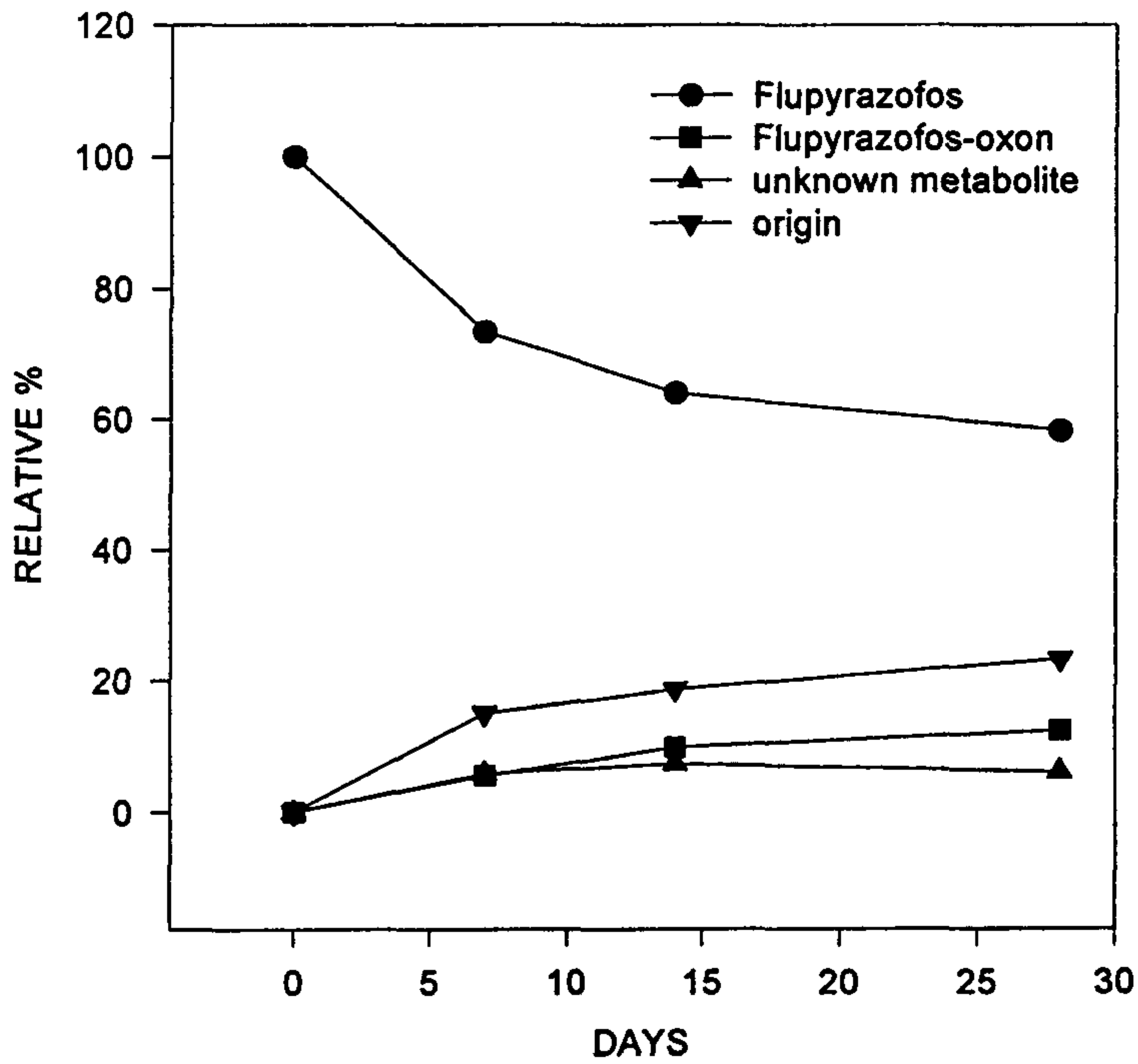


Fig. 5-3-16. Time course of Flupyrazofos and metabolites.

3) 흡수 이행

10시간 후 줄기에의 이행이 약간 관찰되었으나 주로 뿌리에 의한 흡수 증가가 이루어졌으며, 10시간 후에는 약 15,000dpm에 달하였다(Fig. 5-3-17) 이는 수경액 처리량의 9.7%에 해당하는 양이며(Table 5-3-5) Image plate에 의한 autoradiogram의 결과를 보아도(Fig. 5-3-18) Flupyrazofos는 식물체내에서 이 행성이 낮은 것으로 사료된다.

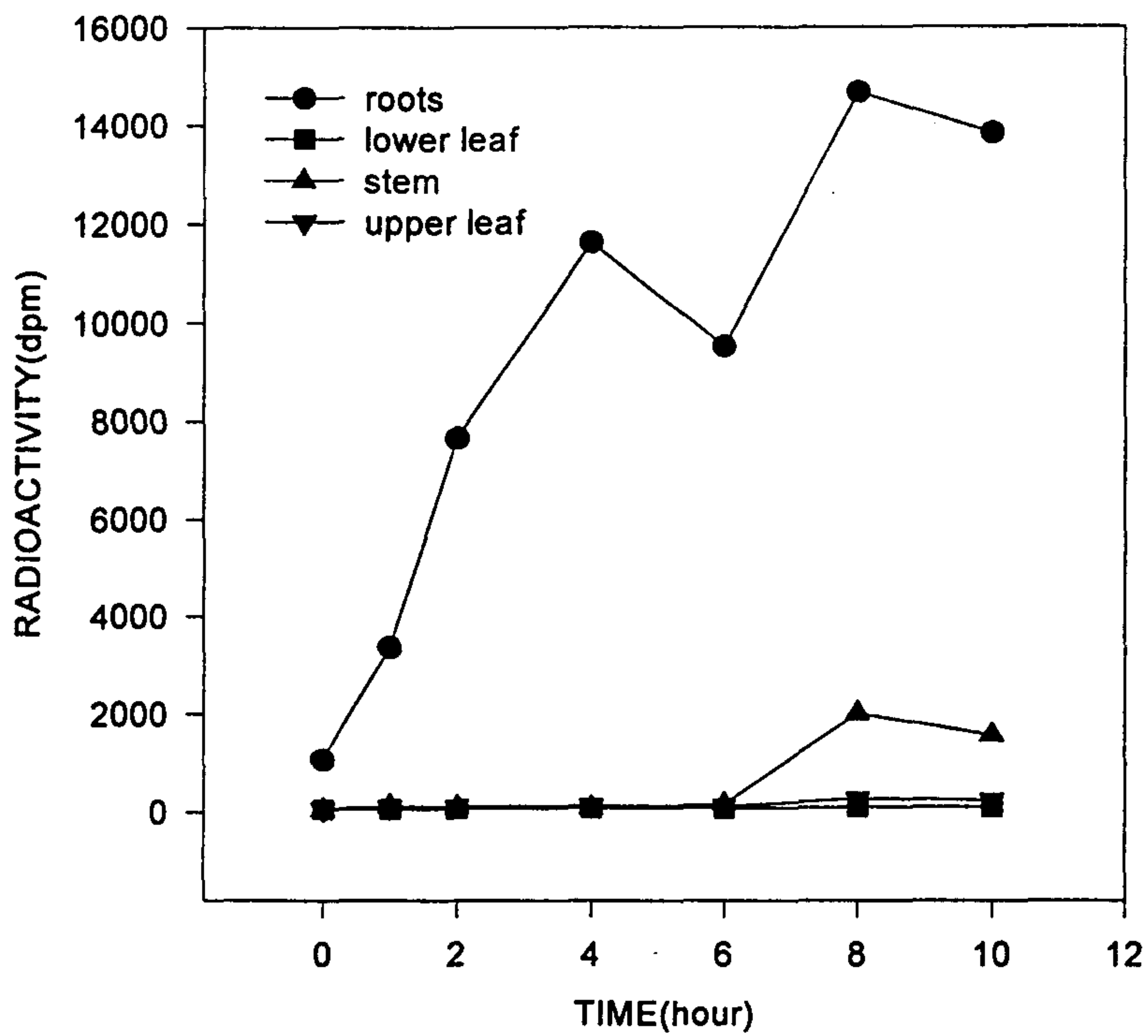


Fig. 5-3-17. Radioactivity absorption pattern for plant parts

Table 5-3-5. Relative % of absorbed radioactivity

Hour	Root	Stem	Low leaf	Upper leaf	Total
0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.7
1	2.2	0.1	0.0	0.1	2.4
2	5.6	0.1	0.0	0.1	5.8
4	8.2	0.1	0.1	0.1	8.5
10	9.7	1.1	0.1	0.2	11.1

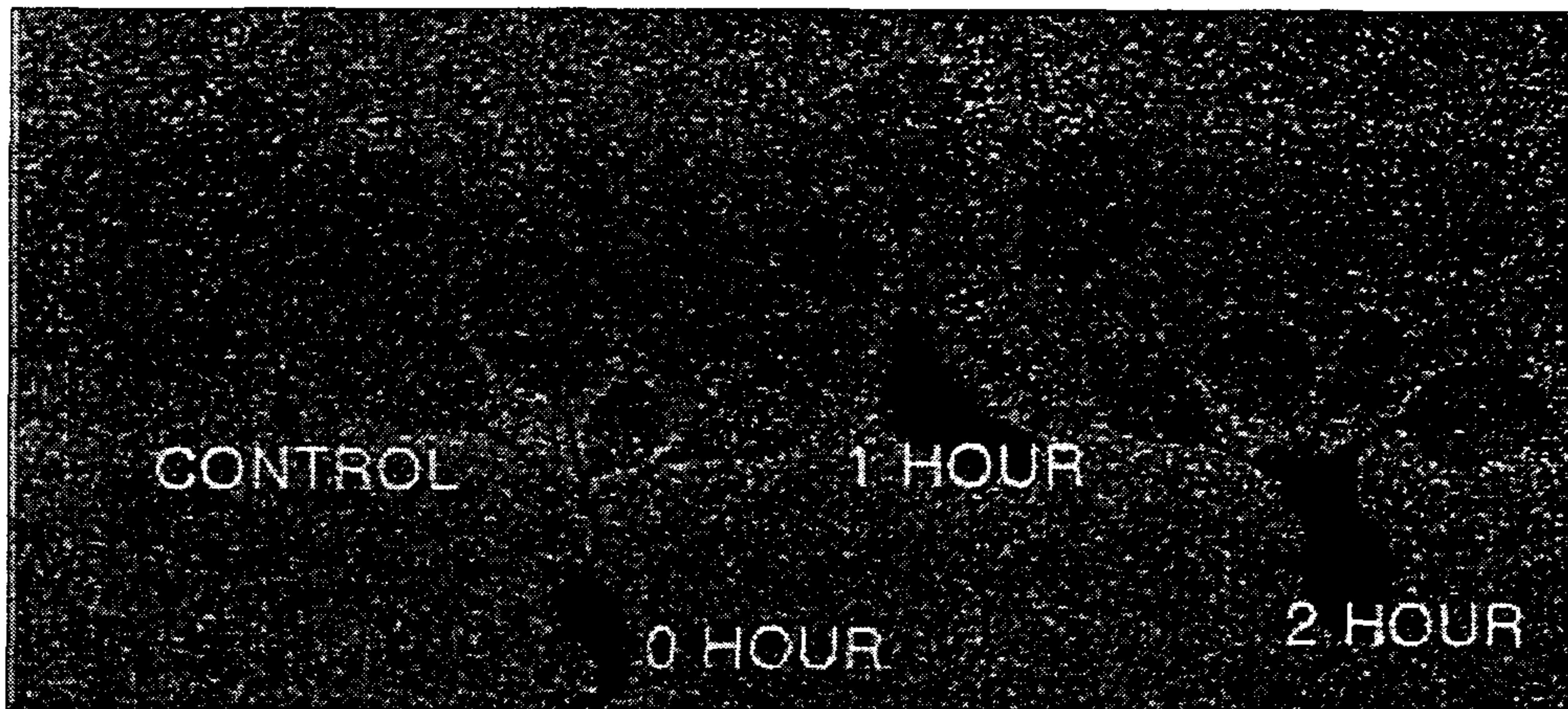


Fig. 5-3-18. Image autoradiogram of seelings

라. 결론

본 연구는 식물 성체에 농약(Flupyrzofos) 살포 후의 대사 연구기법 확립에 중점을 두고 유묘를 이용하여 뿌리를 통한 농약의 흡수 이행도 관찰하였다.

대상 식물인 배추를 acetone으로 추출하였고 방사능 표지 Flupyrzofos와 그 대사물에 대한 회수율은 모두 90 % 이상이었다.

¹⁴C-Flupyrzofos를 처리한 후, 0, 7, 14 그리고 28일에 수확한 각각의 배추 시료의 TRR과 용매 추출액 중의 방사능 activity는 시간 경과에 따라 점차 감소하였으며 고체 잔류물의 방사능은 낮은 수준이지만 증감 양상을 보였다. TLC상에서 Flupyrzofos와 대사물들의 동정과 정량을 위해 DAR(Digital Autoradiograph)과 Image plate를 비교 사용하였으며 Image plate에서 선명하게 화합물들의 분리가 관찰되어 동정과 정량이 가능하였다.

배추중 Flupyrzofos는 시간이 지남에 따라 감소되어 28일 후에는 TRR의 약 29%가 되었고 origin을 비롯한 Flupyrzofos-oxon, 미확인 대사물들은 소량 생성 되었으며, Flupyrzofos-oxon의 경우 약 6%에 달하였다.

Flupyrzofos의 반감기는 약 18일로 계산되었고이었고 전체적인 material balance는 28일을 제외하고 90% 이상 이었다.

흡수 이행 시험 결과, 주로 뿌리에 의한 흡수 증가가 관찰되었는데, 10시간 후에는 수경액 처리량의 9.7%가 뿌리에 흡수되어 식물체내에서 이행성이 낮았고 이는 Image plate에 의한 autoradiogram의 결과로도 확인되었다.

마. 참고 문헌

1. Wilhm, J.L., W.F. Meggitt, and D. Penner. Effect of acifluorfen and benzoate on absorption and translocation of haloxyfop and DPX-Y6202 in Quackgrass (*Agropyron repens*). *Weed Science*. 34:333-337, 1986.
2. Wills, G.D., and C.G. McWhorter. Effect of environment on the translocation and toxicity of acifluorfen to showy crotalaria. *Weed Science*. 29:397-401. 1981.
3. Sharma, M.P., W.H. Vanden born, H.A. Friesen, and D.K. McBeath. Penetration, translocation, and metabolism of ¹⁴C-Difenzoquat in wild oat and barley. *Weed Science*. 24(4):379-384. 1976.
4. Chun, J.C., and S.Y. Ma. Investigation of herbicide safeners and its mode of safening action. Effect of N-(4-chlorophenyl)maleimide on metolachlor absorption and metabolism. *Korean J. Environ. Agric.* 13(3):271-278. 1994.
5. Chun, J.C., and K.W. Han. Effect of mineral nutrients and mixed herbicides on the absorption and translocation of bensulfuron-methyl in rice. *Korean J. Environ. Agric.* 13(1):60-65. 1994.
6. Park, C.K, and E.C. Hwang. Studies on the selectivity of herbicide alachlor. Phytotoxicity and glutathione conjugation. *Korean J. Environ. Agric.* 6(1):44-49. 1987.
7. Schultz, M.E. and O.C. Burnside. Absorption, translocation, and metabolism of 2,4-D and glyphosate in hemp dogbane (*Apocynum cannabinum*). *Weed Science*. 28(1):13-20. 1980.
8. Kim, P.J., and C.K. Park. Identification of water soluble metabolites of pentachlorophenol (PCP) in the suspension cultures of soybean and rice cells. Metabolic conversion of PCP to glucose conjugates. *Korean J. Environ. Agric.* 11(3):215-223. 1992.
9. Yu, S.J., U. Kiigemagi, and L.C. Terriere. Oxidative metabolism of aldrin

- and isodrin by bean root fractions. *J. Agr. Food Chem.* 19(1):5-9. 1971.
10. Carris, L.M., and P.R. Bristow. Absorption and translocation of metalaxyl in cabbage, red raspberry, and strawberry. *J. Agr. Food Chem.* 35(6):851-855. 1987.
 11. Root, D.D., T. Hongtrakul, and W.C. Dauterman. Studies on the absorption, residues and metabolism of cyromazine in tomatoes. *Pestic. Sci.* 48:25-30. 1996.
 12. Kansouh, A.S.H., and T.L. Hopkins. Diazinon absorption, translocation and metabolism in bean plants. *J. Agr. Food Chem.* 16(3):446-450. 1968.
 13. Harvey, J.Jr., and R.W. Reiser. Metabolism of methomyl in tobacco, corn and cabbage. *J. Agr. Food Chem.* 21(5):775-783. 1973.
 14. Hall, J.C., and W.H. Vanden Born. The absence of a role of absorption, translocation, or metabolism in the selectivity of picloram and clopyralid in two plant species. *Weed Science.* 36:9-14. 1988.
 15. Ritter, R.L., and H.D. Coble. Influence of temperature and relative humidity on the activity of acifluorfen. *Weed Science.* 29:480-485. 1981.
 16. Soteres, J.K., D.S. Murray, and E. Basler. Absorption of 2,4-D, dicamba and glyphosate by excised honeyvine milkweed (*Cynanchum laeve*) leaves. *Weed Science.* 31:271-274. 1983.
 17. Nalewaja, J.D., and G.A. Skrzypczak. Absorption and translocation of fluazifop with additives. *Weed Science.* 34:572-576. 1986.
 18. Leys, A.R., and F.W. Slife. Absorption and translocation of ¹⁴C-chlorsulfuron and ¹⁴C-metsulfuron in wild garlic (*Allium vineale*). *Weed Science.* 36:1-4. 1988.
 19. Grafstrom Jr., L.D., and J.D. Nalewaja. Uptake and translocation of fluazifop in green foxtail (*Setaria viridis*). *Weed Science.* 36:153-158. 1988.

20. Bovey, R.W., H. Hein Jr., and F.N. Keeney. Phytotoxicity, absorption, and translocation of five clopyralid formulations in honey mesquite (*Prosopis glandulosa*). *Weed Science*. 37:19-22. 1989.
21. Baltazar, A.M., and T.J. Monaco. Uptake, translocation, and metabolism of ventazon by two pepper species (*Capsicum annuum* and *capsicum chinense*). *Weed Science*. 32:258-263. 1984.
22. Schlaghauser, C.D., and R.N. Arteca. The uptake and metabolism of brassinosteroid by tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *J. Plant Physiol.* 138:191-194. 1991.
23. Sharma, S.D., R.C. Kirkwood and T.L. Whateley. Effect of non-ionic nonylphenol surfactants on surface physicochemical properties, uptake and distribution of asulam and diflufenican. *Weed Research*. 36:2278-239. 1996.
24. Pylypiw Jr., H.M., F.J. Bugbee and C.R. Frink. Uptake of pre-emergent herbicides by corn: distribution in plants and soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50:474-478. 1993.
25. Rouchaud, J., F. Gustin, F. Van de Steene, C. Pelerents, J. Gillet, F. Benoit, N. Ceustermans and L. Vanparys. Metabolism of chlorfenvinphos in both soil and plant of cauliflower and brussels sprouts field crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43:920-928. 1989.
26. Hussain, M., I.P. Kapoor, C.C. Ku and S. Stout. Metabolism of AC 206,784 Herbicide [2-Chloro-N-(2,3-dimethylphenyl)-N-(1-methylacetamide)] in soybean plants. *J. Agric. Food Chem.* 31:232-236. 1983.
27. L.B. Brattsten. Chapter 3- Resistance mechanisms to carbamate and organophosphate insecticides. *Managing Resistance to Agrochemicals*. 1990.
28. Devine, M.D., H.D. Bestman, c. Hall, and W.H. Vanden Born. Leaf wash techniques for estimation of foliar absorption of herbicides. *Weed Science*. 32:418-425. 1984.

29. Ozair, C.A., L.J. Moshier, and G.M. Werner. Absorption, translocation and metabolism of foliage- applied chloramben in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and soybean (*Glycine max*). *Weed Science*. 35:757-762. 1987.
30. Devlin, D.L., D.R. Gealy and L.A. Morrow. Retention, absorption and loss of foliage- applied metribuzin. 35: 775-779. 1987.
31. David Coupland. The effect of temperature on the activity and metabolism of glyphosate applied to rhizome fragments of *Elymus repens* (= *Agropyron repens*). *Pestic. Sci.* 15:226-234. 1984.
32. Buman, R.A., D.R. Gealy and A.G. Ogg, Jr. Effect of temperature on root absorption of metribuzin and its ethylthio analog by winter wheat (*Triticum aestivum*), jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) and downy brome (*bromus tectorum*). *Weed Science*. 40:517-521. 1992.

3. 수중광분해 연구

가. 연구 배경

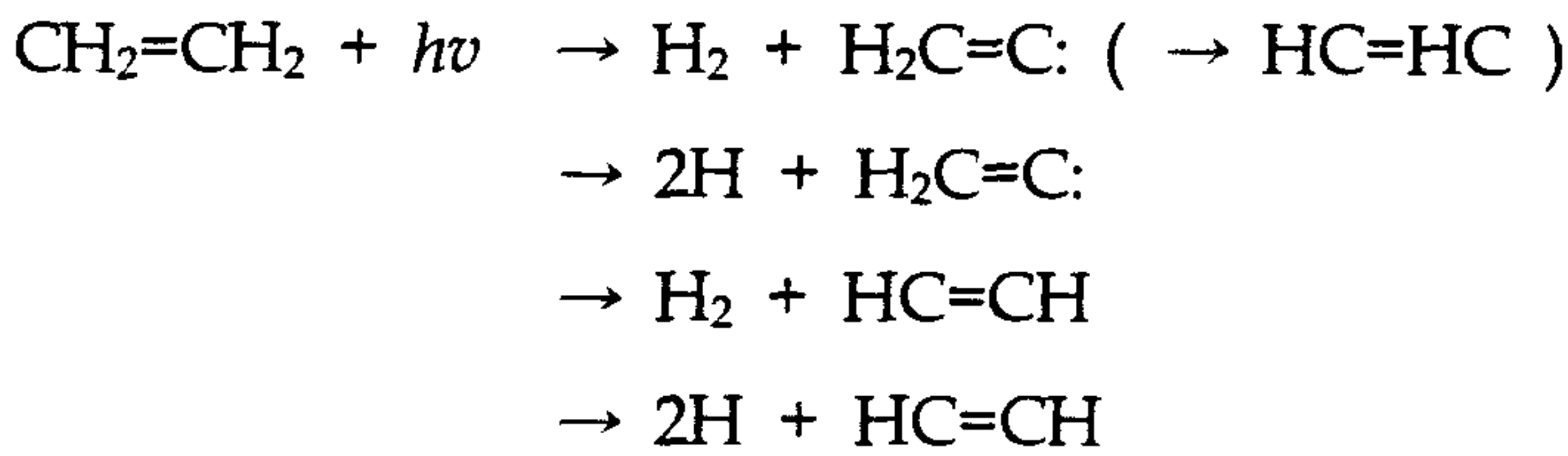
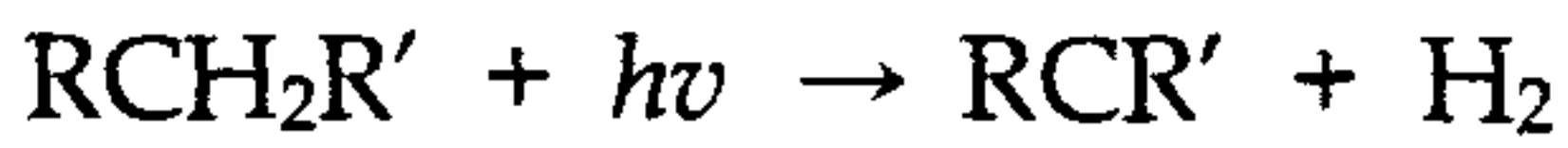
현재 전세계적으로 광범위하게 사용되고 있는 농약을 비롯한 수많은 화학 물질들은 환경 중에 노출되어 동물, 식물, 미생물과 같은 생물 요인과 가수 분해, 열분해, 광에 의한 분해와 같은 무생물적인 요인등의 다양한 매체를 통해 모 화합물과는 다른 형태와 성질로 변하게 된다. 이러한 변화를 일으키는 매체들로는 대표적으로 대기, 토양 그리고 수중이 있으며 각 매체들은 그 구성 성분의 물리, 화학적 특이성으로 인해 다른 양상의 변형을 유도하게 된다. 이중 많은 화학 물질들이 유거수의 형태나 직접 살포등의 다양한 경로를 통해 수계로 유입되게 되며 유입된 화학 물질들은 강이나 바다등의 표면에서 태양 에너지에 의해 광화학적인 반응을 받게 된다. 따라서 환경 중에서 일어나는 화학 물질의 변화 양상에 대한 연구는 그 물질의 환경 중 동태에 관한 정보를 획득함에 있어서 매우 중요한 과제이다. 현재 수행되고 있는 광분해 연구의 경향은 광에 의한 분해 산물의 동정, 산화 기작과 화학 물질의 구조와 관련한 반응성의 관계를 설명하고 다양한 지리적, 계절적 요인을 고려하여 화학 물질의 분해율을 예측하기 위한 연구가 수행되고 있다. 또한 지구상에 도달하지 못하는 UV 파장 영역(<290nm)의 강한 에너지를 이용하여 화학 물질의 분해 양상과 산물을 조사하기 위한 연구와 photosensitizer의 존재 유무에 따른 광분해율의 차이를 밝히고 그 기작을 설명하고자 하는 연구가 활발히 수행되고 있으며, US EPA에서도 새로운 농약의 등록을 위해서 광분해 data의 제출을 요구하고 있다. 그러나 현재 국내에서는 이러한 광분해 연구의 중요성에 불구하고 data가 매우 부족한 상태이다. 따라서 본 연구는 농약의 광 분해 연구의 중요한 과제인 수중에서의 광분해 실험 방법을 확립하고 국내에서 최초로 개발된 유기인계 살충제인 Flupyrzofos의 수중 광분해에 의한 정보를 획득하고자 실시하였다.

Direct photolysis

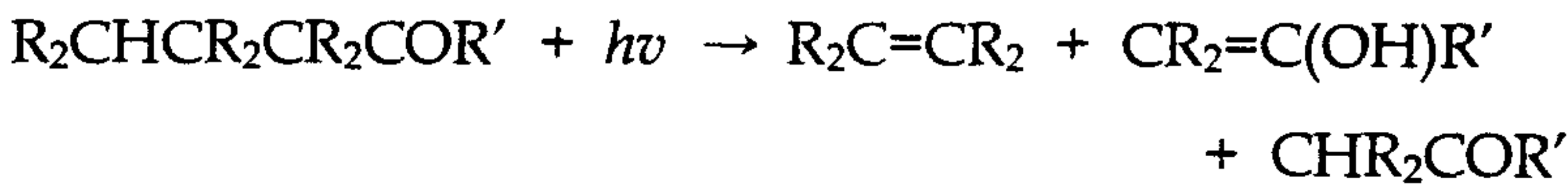
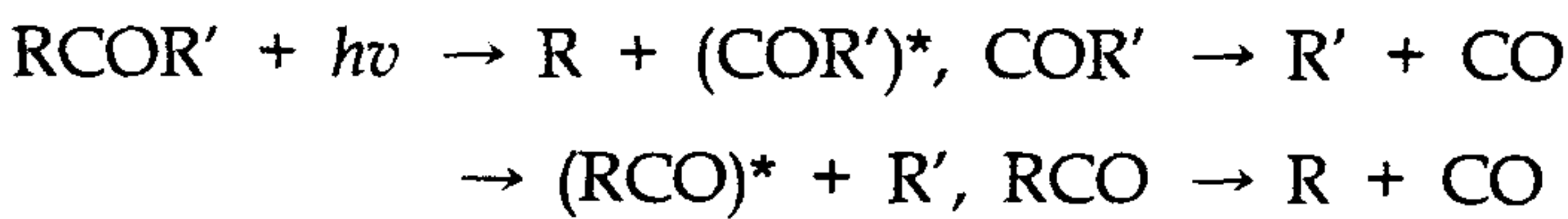
수중에 유입된 화학 물질은 두가지 형태로 광분해 반응을 받게 된다. 파장 290nm 이상의 광을 흡수할수 있는 물질의 경우는 태양 광 에너지에 의한 직

접적인 결합의 붕괴로 분해가 일어날 수 있으며 이를 direct photolysis라 하는데 광이 직접 화학물질과 반응하게 되면 분자간 결합이 끊어지고 새로운 화합물을 생성하거나, 생성을 유도할 수 있는 반응성이 높은 종으로 변화하게 되며 다음과 같은 예가 있다.

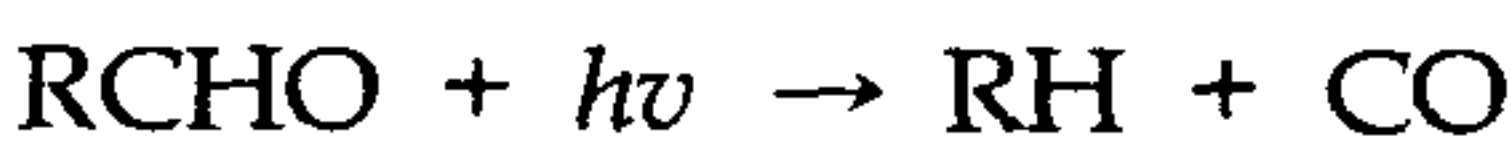
Hydrocarbons



Carbonyl group



Aldehyde



Indirect photolysis

수중에서 광을 흡수하지 못하는 물질이라도 실제 자연 수계에서는 광에 의한 분해가 일어나게 되는데 이것은 수중에 존재하면서 파장 290nm 이상의 광에너지를 흡수하는 photosensitizer의 역할 때문이다. 수계의 표면에서 광을 흡수한 sensitizer가 전달하는 에너지에 의해 농약등의 형태 전환이 일어나게 되는데 이것을 indirect photolysis 혹은, sensitized photolysis라고 한다. sensitizer는 광을 흡수한 후, singlet oxygen(1O_2), peroxy radical(RO_2), superoxide

anion(O_2^-), hydroperoxy radical(HO \cdot)과 같은 반응성이 강한 물질을 생성하여 농약과 같은 화학 물질과 반응하게 된다. photosensitizer에 의한 반응은 다양한 경로를 통해 일어나며 O_2 존재하에서는 다음과 같이 반응한다.



이렇게 생성된 triplet state sensitizer(${}^3\text{sensitizer}$)는 다른 물질과 직접 반응하거나 분자상의 산소(O_2)와 반응하게 되는데 O_2 와 반응할 경우, excited singlet oxygen(1O_2)이 생성되어 유기 화합물을 산화 시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 광산화 반응은 수계내의 각 물질의 농도와 pH 그리고 용존 산소등에 의해 크게 영향 받는다. 자연 수계중에 존재하며 sensitizing 효과를 나타내는 대표적인 sensitizer로는 humic acid를 비롯한 methylene blue, riboflavin, rosebengal등이 있다. US EPA guideline에서는 직접적인 광분해가 어려운 화학 물질의 경우, humic acid를 sensitizer로 하여 간접적인 광분해 실험을 실시하도록하고 있다.

광원

수중 광분해 실험시 사용되는 광원으로는 자연광과 인공광이 있다. 자연 상태의 광을 실험에 이용할 경우는 자연 상태의 환경 조건과 유사한 결과를 얻을 수 있으나 노출 기간 동안의 여러 환경 요인으로 인해 결과에 영향을 받을 수 있으며 이러한 이유로 인해 반감기가 1일 이하인 물질의 경우는 분해율이 노출 시간과 광의 조사 정도에 크게 영향을 받게 된다. 이러한 많은 변이 요인들을 배제하기 위해 최근의 실험에서는 다양한 형태의 인공광이 사용되고 있다. xenon lamp의 경우는 태양광과 유사한 spectrum을 방출하며 총 실험 기간이 단축될 수 있고, 지리적, 계절적인 변이 요인들을 최소화 할 수 있는 장점이 있기 때문에 최근의 실험에 많이 사용되고 있다.

Flupyrzofos

Flupyrzofos는 국내에서 최초로 개발된 유기인계 살충제로 배추 좀나방의 방제에 효과가 있는 것으로 알려져있고 물에 대한 용해도는 0.8mg/L, 증기압 2.81×10^{-5} torr로 열에 대해서는 100 $^\circ$ C 이하에서 안정하였고 최대 흡광도가 234nm로 일반적인 환경 중에서는 광에 안정한 것으로 나타났다. 가수 분해에 의한 반감기는 7.5일(pH 7.0, 25 $^\circ$ C) 이었다.(Fig. 5-3-19)

나. 재료 및 방법

1) 재료

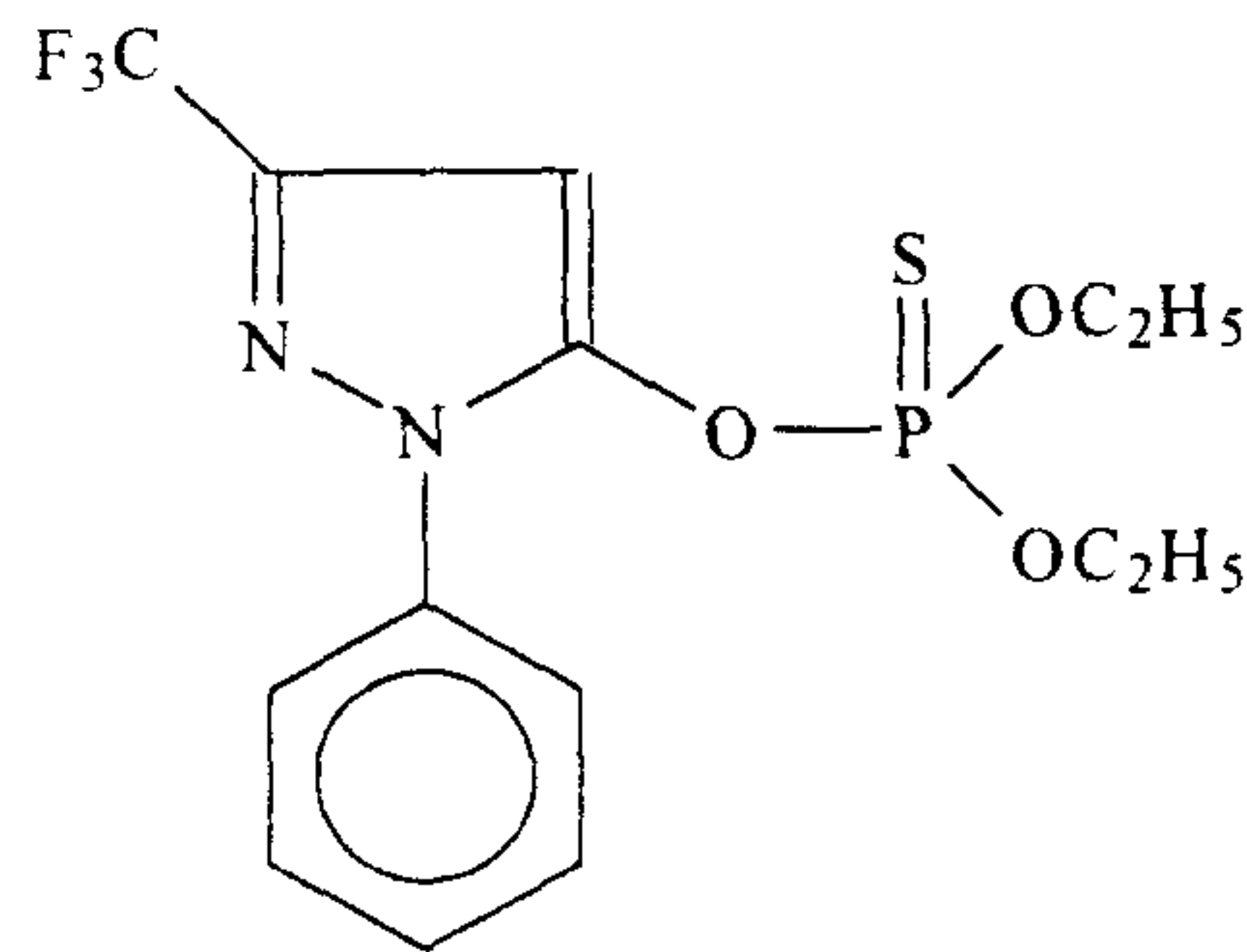
(1) 시약

-추출, 분석용 용매(HPLC grade) : Burdick & Jackson Co.

-Humic acid : Aldrich Co.

(2) 대상 농약

-Flupyrzofos, [O,O-Diethyl O-(1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazoyl) thiophosphoric acid ester]



Flupyrzofos

Fig. 5-3-19. Chemical structure of Flupyrzofos

2) 광분해 실험 장치

SUNTEST(HANAU Co.) 장치를 사용하였는데 xenon arc lamp가 광원이며 광의 밝기는 150klux이고 파장 300-830nm의 광 강도는 830W/m² 이다 UV filter를 부착하지 않을 경우는 300nm 이하의 파장도 생성 가능하지만 자연광에 유사한 파장(290-800 nm)을 얻기 위해 UV filter를 부착하였다.

실험이 수행되는 동안 내부는 fan에 의해 공기로 냉각하여 고온 발생을 억제할수 있으나 적절한 실험 온도인 25±1℃로 유지하기 위해 photoquartz cell이 놓여지는 밑부분을 차가운 물로 순환시켜 온도를 유지하도록 하였다.

3) 실험 방법

(1) 기구 및 기기

Gas Chromatograph(Hewlett packard Co. GC6890) : HP-5 column (5% Phenyl Methyl Siloxane, Capillary 30.0m x 530 μ m x 1.50 μ m), Inlet 온도 250 $^{\circ}$ C, Oven 온도 230 $^{\circ}$ C, Detector(NPD) 온도 280 $^{\circ}$ C, 운반 개스 ; N₂ (30ml/min, splitless)

UV-spectrophotometer (Beckman Co.)

(2) 시험 용액의 제조

Synthetic Humic Water(SHW)

US EPA guideline에 따라 조제 되었다. humic acid 10g을 0.1% NaOH 용액 1 liter로 녹이고 실온에서 1시간 교반 시켰다. 암갈색 상정액을 일차 여과하고 0.4 μ m microfilter를 통과시킨 후, H₂SO₄(diluted)로 pH를 7.0으로 맞추었다. 이 용액을 자연광에서 약 3일간 노출시켜 preaging을 하고 파장 370nm에서 Absorbance가 0.5가 되도록 HPLC grade water로 희석 하였으며 이렇게 만들어진 SHW stock 용액은 시료 용액 조제시까지 냉장보관하였다. 그리고 실제 시료 용액을 조제할때는 10배로 희석하여 사용하였다.

Flupyrzofos 용액(0.4 ppm)

EPA의 수중 광분해 실험 guideline에 명시된 바와 같이 실험의 초기 농도는 Flupyrzofos의 수용성 0.8ppm에 대한 절반 수준인 0.4ppm으로 조제 되었다. Flupyrzofos의 수용성이 낮기 때문에 Acetonitrile을 첨가하였는데 guideline에서 허용하고 있는 전체 용액중의 1% 미만으로 Acetonitrile을 포함시켰다. 먼저 400ppm의 Flupyrzofos를 acetonitrile 용매로 만들고 이중 1ml을 취한후, 조제된 SHW또는 순수한 증류수로 각각 1 liter가 되도록 하여 0.1%의 acetonitrile이 함유된 0.4ppm Flupyrzofos 용액을 조제, 실험에 사용 하였다.

(3) 회수율 실험

방법 3-2)로 조제된 0.1, 0.4 ppm의 Flupyrzofos 용액 20 ml을 hexane 20 ml로 25분간 3회 진탕, 추출하였다. 추출액은 무수 sodium sulfate층을 통과시켜 건조한 후, 감압 농축하여 최종 양을 5 ml로 맞추고 GC(1 μ l)를 이용해 분석하였다.

(4) Direct photolysis test

8개의 photoquartz cell에 Flupyrzofos 시험 용액(0.4 ppm, 30 ml)을 각각 채우고 control로는 위와 동일한 시료 용액을 20 ml glass vial에 넣고 aluminium foil로 싸서 광 노출을 차단하였다. 14일간 광에 노출 시키며 0, 5, 9, 14일에 시료를 채취하였다(20 ml). 채취한 시료는 가수 분해의 진행을 막기 위해 즉시 추출하였는데 test tube(50 ml)에 취해서 20 ml의 Hexane을 가한 후, 25분간 3회 진탕 추출하였다. 추출액은 무수 sodium sulfate층을 통과시켜 건조한 후, 감압 농축하여 최종 양을 5 ml로 맞추고 GC(1 μ l)로 분석하였다.

(5) Indirect photolysis test

Humic acid에 의한 sensitizing 효과를 확인하기 위해 US EPA의 Indirect photolysis test guideline에 의해서 SHW를 제조하였고 SHW stock solution (파장 370nm에서 0.518 Abs, pH 7.0)을 10배로 희석하여 실험에 이용하였다. 순수한 물(PW, Pure Water) 역시 비교를 위해서 동일한 방법으로 실험을 수행하였고 총 노출 시간은 72 시간이었으며 시료는 첫 번째만 6 시간, 그 이후는 12 시간 마다 채취하였다.

① 호기성 Indirect photolysis test

광분해 실험에 있어서 산소의 존재가 광 분해에 미치는 영향을 알아보기 위해 PW와 SHW로 0.4 ppm Flupyrzofos 용액을 만들고 공기로 하루동안 purging하여 포화 시킨 후, 광을 차단한 위의 용액을 control로서 사용하며 동일한 방법으로 suntest에서 광에 노출 시켰다.

② 혐기성 Indirect photolysis test

위의 방법과 동일하나 공기 대신 질소 개스로 purging 시킴으로써 산소를 배제한 상태에서 동일한 실험을 수행하였다.

(6) Photobleaching

실험에 사용된 SHW의 초기 시료와 72 시간 동안 광에 노출된 시료, 노출 시키지 않은 시료를 UV spectrophotometer를 이용해 파장 370nm에서 Abs.를 측정하여 산소의 존재 유무하에서 photobleaching 효과의 차이를 비교하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 회수율

시험 용액으로부터 Flupyrzofos의 회수율은 두 수준 모두에서 100 %이상의 좋은 회수율을 보였다.(Table 5-3-6)

Table 5-3-6. Flupyrzofos recovery

Flupyrzofos	Recovery	Aver.
0.1 ppm	0.103 ppm(103%)	0.107 ppm(107.7±5.7%)
	0.106 ppm(106%)	
	0.114 ppm(114%)	
0.4 ppm	0.395 ppm(98.8%)	0.420 ppm(105±6.8%)
	0.449 ppm(112.3%)	
	0.416 ppm(104%)	

2) Direct photolysis test

광에 노출된 시료와 광이 차단된 시료 모두가 유사한 분해 양상을 보였는데 (Fig. 5-3-20, 5-3-21),

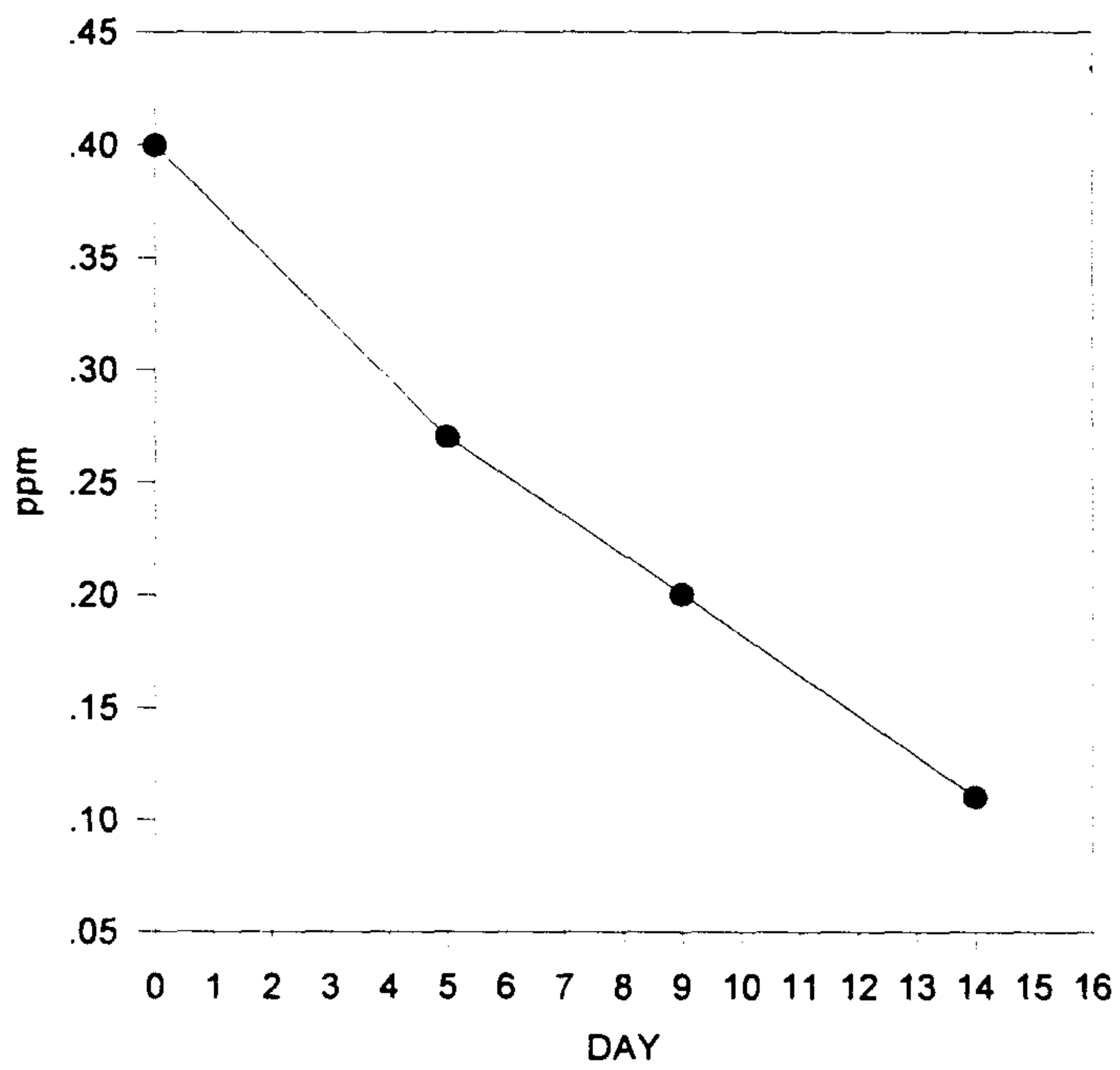


Fig. 5-3-20. Flupyrzofos photodegradation rate by light

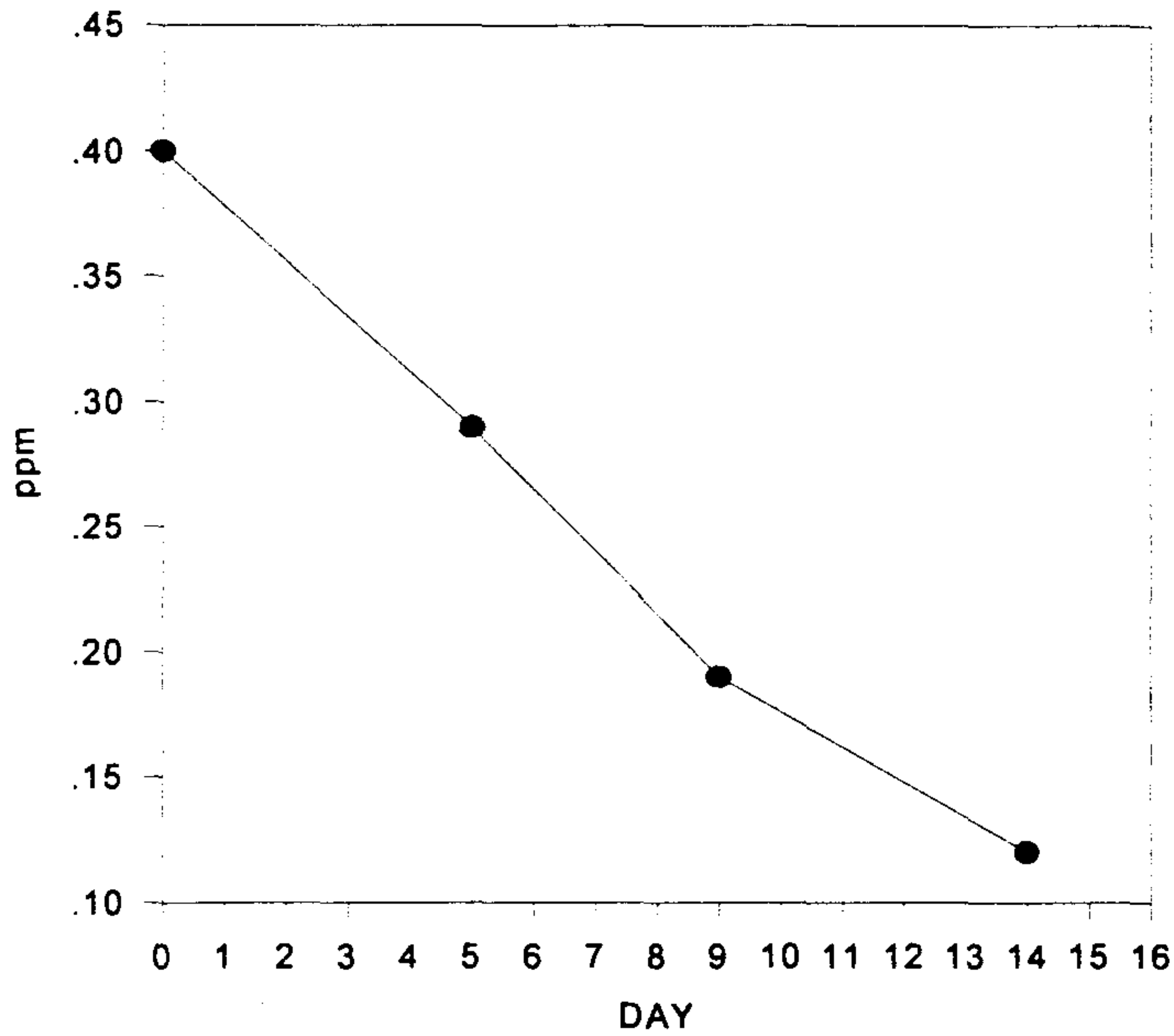


Fig. 5-3-21. Flupyrazofos degradation rate under dark condition

아래의 식에 의한 두 시료의 분해율 계산 결과, 반감기는 7.5일로 나타났으며, 이 수치는 가수 분해 반감기(pH 7.0, 25°C)와 동일하였다.

$$\text{rate constant } K_p = 1/t \ln(C_0/C_t),$$

$$\text{Half-life } t_{1/2} = 0.693/K_p$$

따라서, Flupyrazofos는 순수한 물에서는 광에 매우 안정하며, 대부분의 분해가 가수 분해에 의한것임을 확인하였다.

위의 결과를 통해서 Flupyrazofos의 효과적인 수중 광분해를 위해서는 적절한 photosensitizer의 적용이 필요하며, 불의 조건을 변화시킴으로써 광분해율의

변화를 확인할 필요가 있음을 발견하였다.

3) Indirect photolysis test

공기로 포화시킨 용액과 질소 개스로 포화 시킨 용액 모두에서 SHW에서의 분해율이 광에 노출된 경우와 그렇지 않은 경우 모두, PW에서 보다 높았으며 이러한 경향은 공기로 포화시킨 경우는 24시간 만에, 질소 개스로 포화시킨 경우는 36시간 만에 일정한 경향을 나타내었다. 또한 공기로 포화시킨 경우는 광에 노출시킨 시료의 분해가 PW와 SHW 모두, 더 빠른 것으로 나타났으나 질소 개스로 포화 시킨 경우는 광에 노출된 시료의 분해가 노출 시키지 않은 시료보다 더 느린 것으로 나타났다. 이것은 humic acid의 sensitizing 효과가 산소가 존재할 경우에 나타나며, 산소가 없는 곳에서는 오히려 quencher로 작용하여 Flupyrzofos의 분해를 저해하는 것으로 추정된다.(Fig. 5-3-22, 5-3-23)

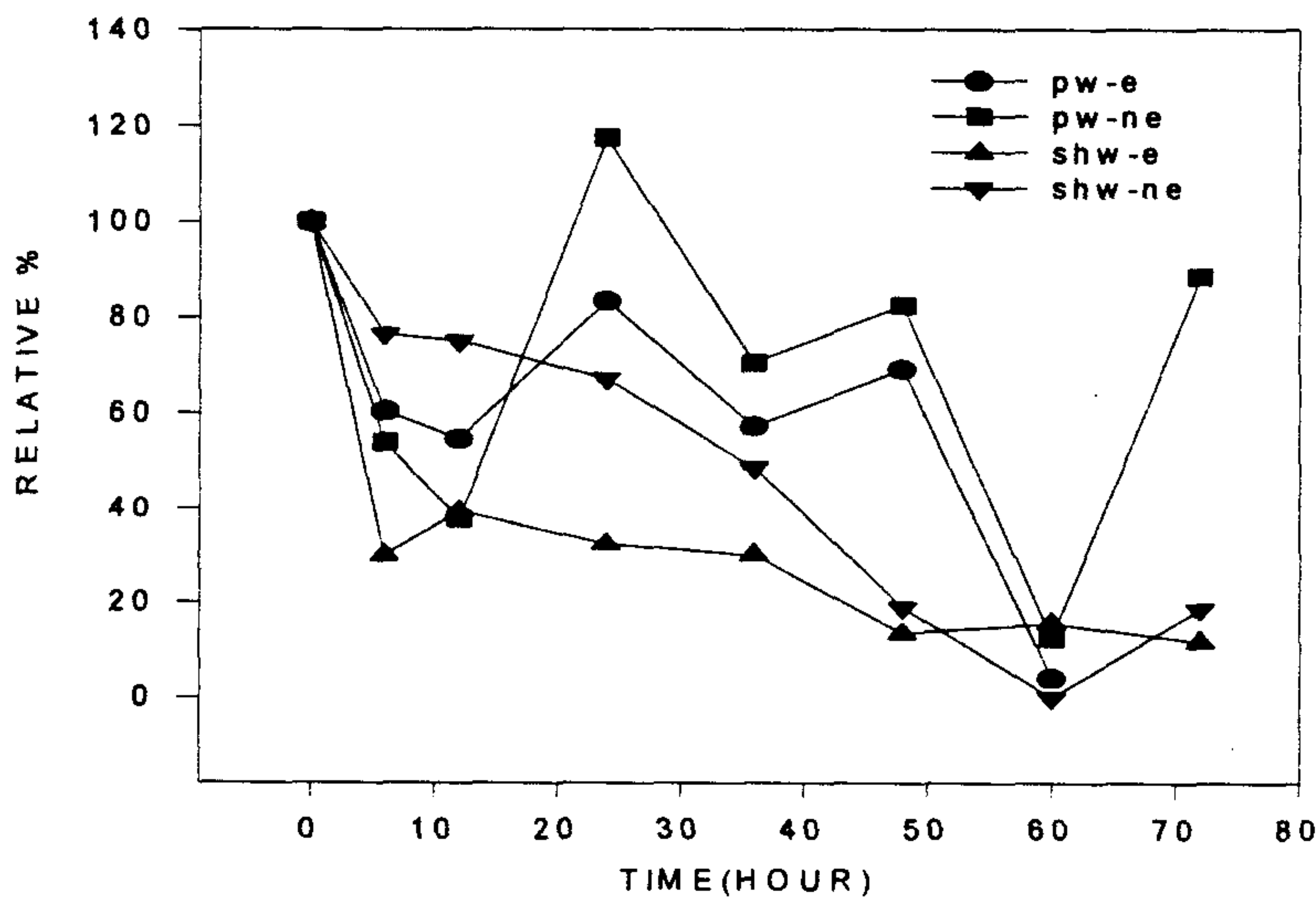


Fig. 5-3-22. Photodegradation of Flupyrzofos under air saturated condition

PW : pure water(pH 7.0, sterilized, air saturated)

SHW : synthetic humic water(pH 7.0, sterilized, air saturated)

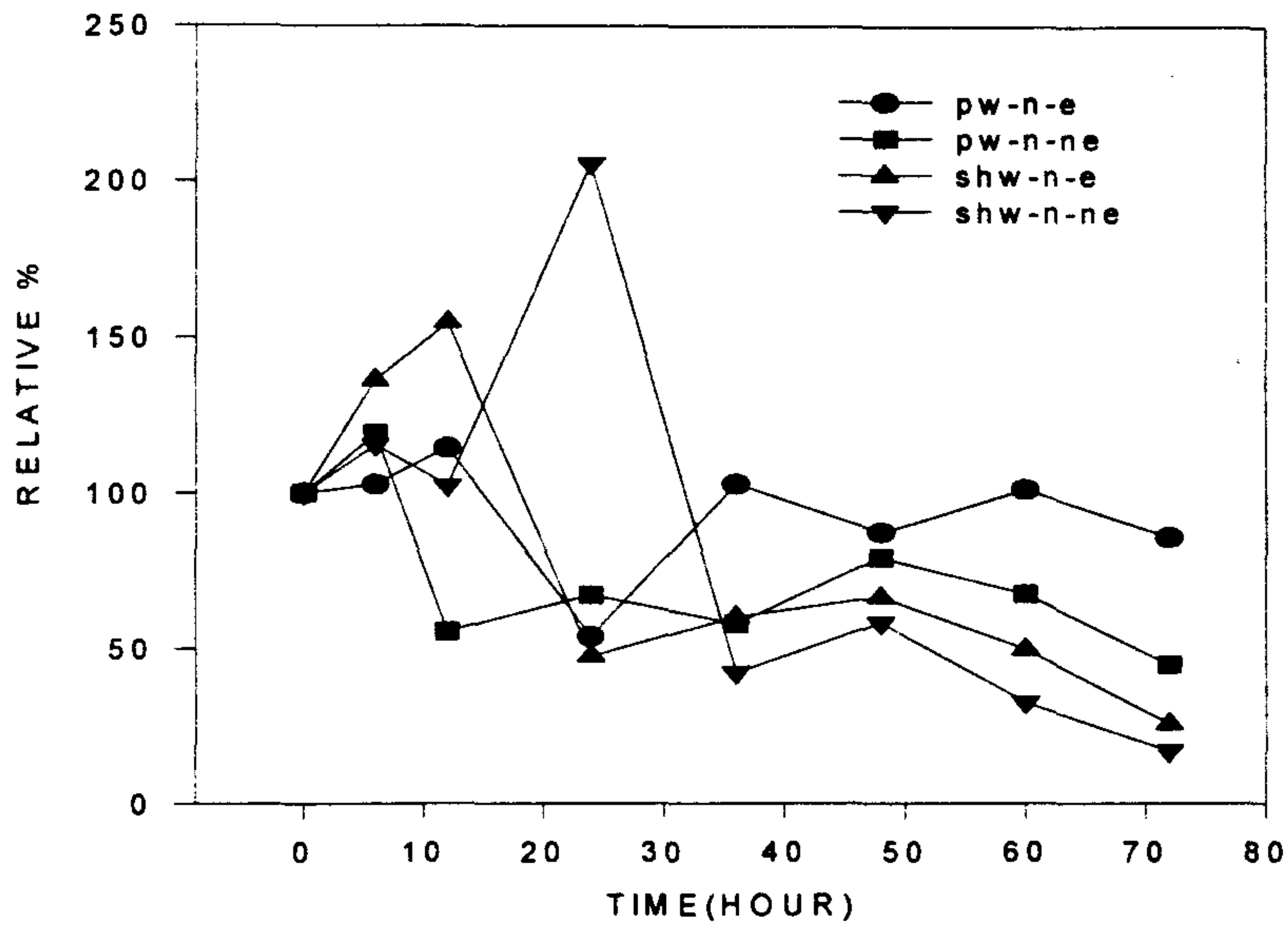


Fig. 5-3-23. Photodegradation of Flupyrzofos under nitrogen saturated condition

PW-N : pure water(pH 7.0, sterilized, nitrogen gas saturated)

SHW-N : synthetic humic water(pH 7.0, sterilized, nitrogen gas saturated)

한편, 동일한 시간동안 노출 시킨 SHW와 PW 용액에서의 광분해율 계산 결과는 각각의 실험 조건에서 공기로 포화 시킨 경우 더 짧은 분해 반감기를 나타내었다.(Table 3-5-7)

Table 5-3-7. Rate constant and half-life of Flupyrzofos

	K_p	$t_{1/2}$
Air saturated		
Pure Water(72hr exposed)	0.054/hr	12.8 hr
Pure Water(not exposed)	0.035/hr	19.8 hr
Synthetic Humic Water(72hr exposed)	0.035/hr	18.2 hr
Synthetic Humic Water(not exposed)	0.024/hr	28.9 hr
N₂ saturated		
Pure Water(72hr exposed)	0.002/hr	346.5 hr
Pure Water(not exposed)	0.011/hr	63 hr
Synthetic Humic Water(72hr exposed)	0.019/hr	36.5 hr
Synthetic Humic Water(not exposed)	0.024/hr	28.9 hr

* $K_p = 1/t \ln(C_0/C_t)$, K_p : 분해율 상수
 t : 노출 시간
 C_0 : 시료의 초기 농도
 C_t : 시료의 최종 농도

* $t_{1/2} = 0.693/K_p$

4) Photobleaching

photobleaching은 시간이 지남에 따라 SHW의 효과가 영향을 받게 되는 것인데 긴 시간 동안의 실험에 이용될 경우는 이로 인한 sensitizing 효과에 역 영향을 미치게 된다. 실험 결과 산소가 존재하는 조건에서 더 큰 photobleaching 효과가 일어났음을 알수 있었다.(Table. 5-3-8)

Table 5-3-8. Photo bleaching of SHW

	Abs at 370nm	
	Air saturated	N ₂ gas saturated
initial	0.0429	0.0463
72 hour exposed	0.0117	0.0235
not exposed	0.0466	0.0512

라. 결론

농약의 광 분해 연구의 중요한 과제인 수중에서의 광분해 실험 방법을 확립하고 국내에서 최초로 개발된 유기인계 살충제인 Flupyrzofos의 수중 광분해에 의한 정보를 획득하고자 실험을 실시하였다.

Flupyrzofos의 회수율은 0.1, 0.4 ppm 두 수준 모두에서 100 %이상의 좋은 회수율을 보였다

Direct photolysis 경우 광에 노출된 시료와 광이 차단된 시료 모두가 유사한 분해 양상을 보였는데 반감기는 7.5일로 나타났으며, 이 수치는 가수 분해 반감기(pH 7.0, 25°C)와 동일하여 수중에서 Flupyrzofos의 대부분의 분해가 가수 분해에 의한것임을 확인하였다.

Indirect photolysis test의 경우는 산소의 유무 상태나 광에 노출 유무 경우를 불구하고 모두 SHW에서의 분해율이 PW에서 보다 높았으며 또한 공기로 포화시킨 경우는 광에 노출시킨 시료의 분해가 PW와 SHW 경우 모두 더 빠른 것으로 나타났다.

그리고 SHW의 photobleaching은 산소가 존재하는 조건에서 더 많이 진행되었음을 알수 있었다.

마. 참고 문헌

1. B.Y. Cho et al. 1993. Photolysis of a new insecticide KH-502 [O,O-diethyl O-(1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazoyl) thiophosphoric acid ester]. Korean J. Environ. Agric. 12(2):176-183.
2. B.G. Brownlee et al. 1992. Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and related benzothiazoles. Environ. Toxic. Chem. 11:1153-1168.
3. W.R. Haag et al. 1990. Aquatic environmental fate of nitroguanidine. Environ. Toxic. Chem. 9:1359-1367.
4. C.A. Weerasinghe et al. 1992. Aquatic photodegradation of albendazole and its major metabolites. 2. Reaction quantum yield, photolysis rate, and half-life in the environment. J. Agric. Food Chem. 40:1419-1421.
5. J.A. Amador et al. 1991. Degradation of aromatic compounds bound to humic acid by the combined action of sunlight and microorganisms. Environ. Toxic. Chem. 10:475-582.
6. S. Parker et al. 1988. Development of a method to investigate the photodegradation of pesticides. Brighton Crop Protection Conference.
7. M.B. Swanson et al. 1995. Direct photolysis of fenpyroximate in a buffered aqueous solution under a xenon lamp. J. Agric. Food Chem. 43:513-518.
8. J.E. Yager et al. 1988. Evaluation of the xenon arc lamp as a light source for aquatic photodegradation studies: comparison with natural sunlight. Environ. Toxic. Chem. 7:1003-1011.
9. M. Mansour et al. 1997. Experimental approaches to studying the photostability of selected pesticides in water and soil. Chemosphere 35:39-50.
10. R.A. Larson et al. 1989. Flavin-sensitized photodecomposition of anilines and phenols. Environ. Toxic. Chem. 8:1165-1170.

11. R.G. Zepp et al. 1976. Light-induced transformations of methoxychlor in aquatic systems. *J. Agric. Food Chem.* 24(4).
12. G.L. Mills et al. 1990. Photochemical degradation rates of tetraphenylborate and diphenylboric acid sensitized by dissolved organic matter in stream water. *Environ. Toxic. Chem.* 9:569-574.
13. J.R. Yao et al. 1989. Photodecomposition of metalaxyl in an aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* 37:1518-1523.
14. P. Dureja. 1989. Photodecomposition of monocrotophos in soil, on plant foliage and in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43:239-245.
15. A.J. Archer et al. 1984. Photodecomposition of propachlor. *J. Agric. Food Chem.* 32:226-230.
16. M.J. Climent et al. 1997. Photodegradation of dichlorprop and 2-naphthoxyacetic acid in water, combined GC-MS and GC-FTIR study. *J. Agric. Food Chem.* 45:1916-1919.
17. N. Mikami et al. 1980. Photodegradation of fenvalerate (sumicidine) in water and on soil surface. *J. Pesticide Sci.* 5:225-236.
18. N. Takahashi et al. 1985. Photodegradation of the pyrethroid insecticide fenprothrin in water, on soil and on plant foliage. *Pestic. Sci.* 16:119-131.
19. C.A. O'Neil et al. 1995. Photoisomerization of β -Carotene by photosensitization with chlorophyll derivatives as sensitizers. *J. Agric. Food Chem.* 43:631-635.
20. K.B. Woodburn et al. 1989. Photolysis of picloram in dilute aqueous solution. *Environ. Toxic. Chem.* 8:769-775.
21. E. Romero et al. 1994. Photolysis of pirimicarb in water under natural and simulated light conditions. *Pestic. Sci.* 41:21-26.
22. P.P Choudhury et al. 1996. Phototransformation of chlorimuron-ethyl in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* 44:3379-3382.

23. E. Mansfield et al. 1996. Phototransformation of dichlorophen in aqueous phase. *Pestic. Sci.* 48:73-76.
24. F.M. Pirisi et al. 1996. Photodegradation of pesticides. Photolysis rates and half-life of pirimicarb and its metabolites in reaction in water and in solid phase.. *J. Agric. Food Chem.* 44:2417-2422.
25. R.G. Zepp et al. 1987. Photoproduction of hydrated electrons from natural organic solutes in aquatic environments. *Environ. Sci. Technol.* 21:485-490.
26. D. Dulin et al. 1986. Products and quantum yields for photolysis of chloraromatics in water. *Environ. Sci. Technol.* 20:72-77.
27. M. Jang et al. 1997. Products of benz[a]anthracene photodegradation in the presence of known organic constituents of atmospheric aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 31:1046-1053.
28. R.G. Zepp. 1978. Quantum yields for reaction of pollutants in dilute aqueous solution. *Am. Chem. Soc.* 12(3).
29. J. Kiwi. 1994. Role of oxygen at the TiO₂ interface during photodegradation of biologically difficult-to-degrade anthraquinone-sulfonate dyes. *Environ. Toxic. Chem.* 13(10):1569-1575.
30. T. Mill. 1989. Structure-activity relationships for photooxidation processes in the environment. *Environ. Toxic. Chem.* 8:31-43.
31. K.B. Woodburn et al. 1993. The aqueous photolysis of triclopyr. *Environ. Toxic. Chem.* 12:43-45.
32. J.P. Aguer et al. 1996. Transformation of fenuron induced by photochemical excitation of humic acids. *Pestic. Sci.* 46:151-155.

제 4 절 환경독성시험 GLP 체제 확립

1. 환경독성팀의 GLP 조직 및 운영체제 확립

본 연구소의 안전성연구센터 독성연구팀은 GLP 조직을 확립하여 1988년 보건복지부의 KGLP(의약품 등의 안전성시험 관리기준) 시험기관으로 지정을 받아 약 10년 동안 GLP 조직을 운영해왔다. 그 동안 본 연구센터의 환경독성연구팀은 비 GLP 조직으로 연구업무를 중심으로 운영해오다 1995년부터 GLP 조직을 운영하기 위하여 준비작업을 진행하여 1997년 3월 3일부터 본 안전성연구센터의 환경독성연구팀도 본 연구센터의 GLP 적용을 받게됨으로서 한국화학연구소 안전성연구센터는 환경독성연구팀을 포함한 다음과 같은 GLP 조직을 확립하였다.

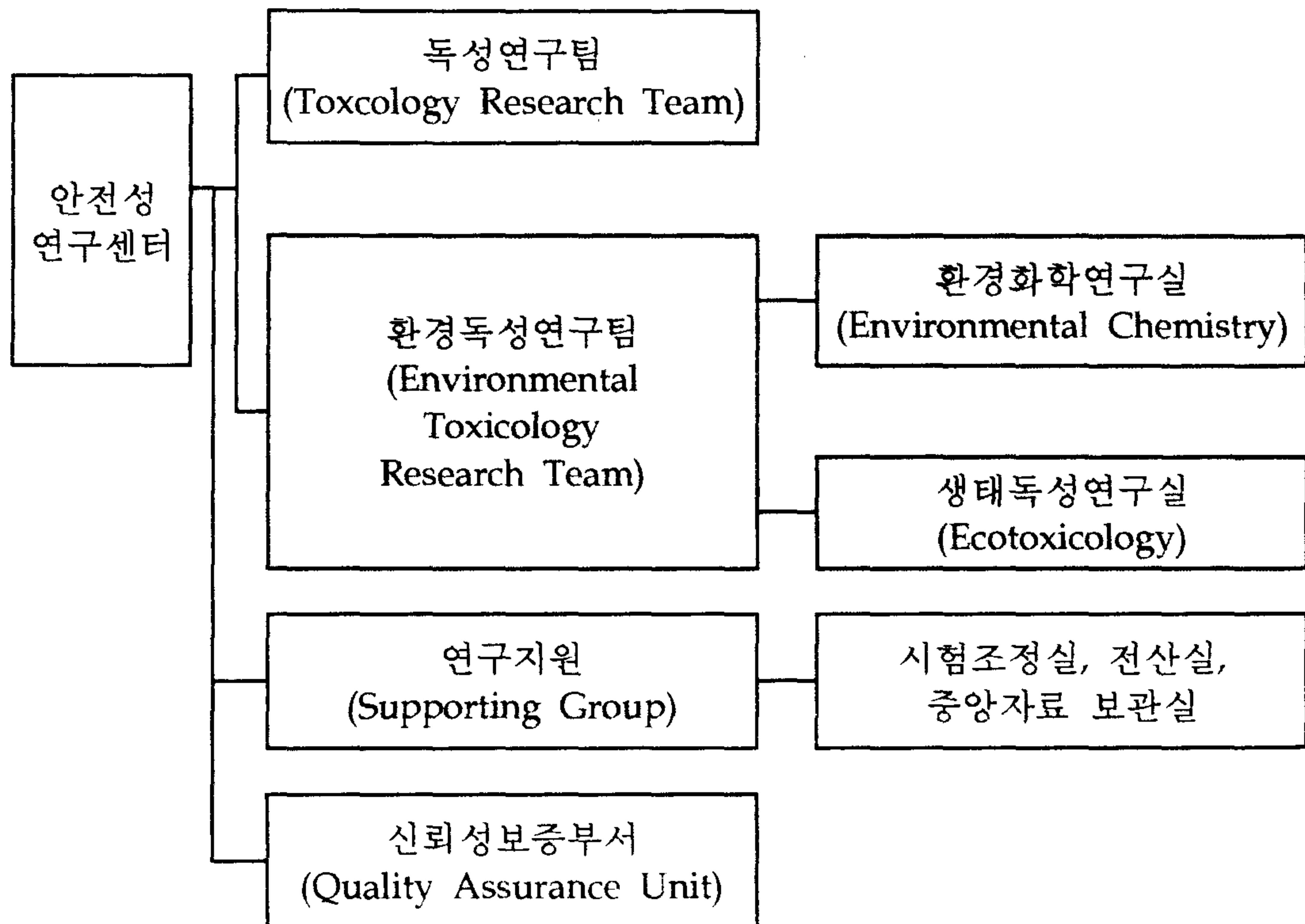


Fig. 5-4-1. GLP organization of toxicology research center.

환경독성팀의 GLP 조직이 확립됨에 따라, 운영책임자, QAU 담당자, 시험 조정실, 중앙자료보관실 등과 같은 GLP 조직을 운영하는데 있어 필수적으로 요구되는 부서 및 관련 소프트웨어를 기존의 독성연구팀 운영체제를 공유하는 방법으로 환경독성연구팀의 GLP 운영체제를 확립하였으며, 1998년 1월 13일자로 물리화학적성질 시험분야의 분배계수시험, 생태영향시험분야의 조류생장 저해시험, 물벼룩류 급성독성시험, 어류급성독성시험, 미생물 및 생물농축성시험분야의 미생물분해시험, 생물농축성시험 등 총 6개 항목에 대하여 환경부의 화학물질유해성시험 연구기관으로 지정을 받았다.

2. SOP 분류, SOP 번호 및 관리

가. SOP의 종류, 코드화 및 취급책임자

환경독성에 관한 시험을 실시할 때에 사용하는 SOP를 ① 시험물질 조제 및 취급 SOP (SOP/ESAM), ② 기타 일반 사항 SOP (SOP /ETOT), ③ 각종 시험자료 보관 SOP(SOP/EDOC), ④ 신뢰성 보증부서 SOP (SOP/EQAU), ⑤ 기기관리 SOP(SOP/EMAI), ⑥ 생태독성 공시생물의 사육 SOP (SOP/ECUL), ⑦ 수질분석 및 측정 SOP(SOP/ENA), ⑧ 생태독성 시험법 SOP (SOP/ETOX), ⑨ 환경화학 시험법 SOP(SOP/ETEM) 등 총 9개의 분야로 분류하고 코드화하였으며, 각 SOP 종류별로 취급책임자를 지정하여 SOP을 작성하고, 개정 및 관리를 하도록 하였다.

그러나 2년 동안 GLP 시스템을 운용해본 결과, SOP 개정 및 제정 작업, SOP 교육 및 관리 등을 실제적으로 각 SOP 작성자 중심으로 이루어지는 것이 보다 효율적으로 판단되어, 3차 년도에는 유명무실화된 각 SOP 취급책임자 제도를 폐지하고, 모든 기능을 각각의 SOP 작성자 중심으로 이전하였다. 또한 각종 시험자료 보관에 관한 SOP(SOP/EDOC/)를 기타 일반사항에 관한 SOP(SOP/ETOT/)로 합쳐 1개로 통합하여 현재에는 아래와 같이 총 8개 분야 SOP를 분류하여 코드화 하였다.

Table 5-4-1. kinds of SOP regarding environmental toxicity testing,
classification code

SOP 종류	SOP 분류코드
1) 시험물질 조제 및 취급 SOP	SOP/ESAM/
2) 기타 일반사항 SOP	SOP/ETOT/
3) 신뢰성 보증부서 SOP	SOP/EQAU/
4) 기기관리 SOP	SOP/EMAI/
5) 생태독성 공시생물의 사육 SOP	SOP/ECUL/
6) 수질분석 및 측정 SOP	SOP/EANA/
7) 생태독성 시험법 SOP	SOP/ETOX/
8) 환경화학 시험법 SOP	SOP/ETEM/

나. SOP 번호

각 SOP의 번호부여는 각 시험 및 작업에 따라 부여한 각 SOP 종류별 분류코드와 세자리 숫자(001)를 사용하여, "SOP/SOP 종류별 분류코드/일련번호" 과 같이 부여하였다. 각 SOP에는 고유번호를 부여하였으며, 될 수 있는 한 각 SOP에 포함되는 시험(작업)의 실시순서에 따라 번호를 정하였다.

다. SOP 작성 및 등록

SOP는 가능한 단위 시험항목마다 작성하였으며, 시험자가 이해하기 쉽도록 한글을 사용하여 구체적으로 기재하였다. SOP의 표지에는 SOP번호, 제정/개정일, SOP의 종류, SOP의 제목 제정/개정자(인), 확인자(인), 승인자(인) 등에 관한 제정/개정기록과 SOP 배부처를 기재하였다. 표지 다음에 목차를 기재하였으며, 목차 다음에는 목적, 내용, 참고문헌 및 첨부자료 순으로 기재하였다. 시험수행 시 사용되는 야장(worksheet), 서식 등의 각종 양식은 각 SOP에 첨부하며, 각 양식의 좌측하단에는 '한국화학연구소 안전성연구센터'를 우측하단에는 '구분번호' 를 표시하였다.

SOP 번호	SOP/ /
--------	--------

SOP의 제목	
---------	--

제정/개정 기록						
제정/개정일	제정/개정자		확인자		승인자	
A. 19						
B.						
C.						
D.						

S O P 배 부 처	1. 중앙자료보관실	8.
	2. 운영책임자실	9.
	3. 시험책임자실	10.
	4. 신뢰성보증부서	11.
	5.	12.
	6.	13.
	7.	

Fig. 5-4-2. cover page of environmental toxicology research team's SOP.

4) SOP 제정, 개정 및 SOP 교육

환경독성시험과 관련되어 SOP 작성이 요망되는 86개 항목의 SOP 중에서 외부의뢰가 증가되고 있는 어류 급성독성시험, 물벼룩 급성독성시험, 담수조류 생육저해시험, 미생물 분해시험 등 4개 시험항목을 중심으로 본 연구팀이 이미 확립한 시험방법을 기초로 하여, 이미 10년 전부터 보건복지부의 KGLP(의약품 등의 안전성시험 관리기준) 적용을 받고 있는 안전성연구센터의 일반독성연구팀의 SOP, 영국과 미국의 환경독성시험 관련기관의 SOP를 입수하여, 환경독성시험에 관련된 SOP를 작성하였다. 1997년 3월 24일자로 수질분석 및 측정에 관한 SOP (SOP/EANA) 2개, 생태독성 공시생물의 사육에 관한 SOP(SOP/ECUL) 5개, 각종 시험자료의 보관 및 취급에 관한 SOP (SOP/EDOC) 7개, 기기사용 및 관리에 관한 SOP (SOP/EMAI) 14개, 시험물질 조제 및 취급에 관한 SOP (SOP/ESAM) 7개, 환경화학 시험법에 관한 SOP (SOP/ETEM) 8개, 기타 일반사항에 관한 SOP (SOP/ETOT) 10개, 생태독성 시험법에 관한 SOP (SOP/ETOX) 5개 등 총 58개 SOP를 시험관련 부서와 시험담당 부서에 배포하였다.

배포된 SOP를 대상으로 시험책임자 및 SOP 취급자를 중심으로 시험담당자가 숙지해야 되는 기본적인 내용에 대한 SOP 교육을 실시함과 동시에 해당 시험항목에 GLP 적용을 시작하였다. GLP 적용과 함께 안전성연구센터의 신뢰성보증부서(QAU)를 통한 내부 사찰을 통하여, 문제점이 제기되는 기존의 SOP에 대한 수정작업을 하고, 아울러 새로운 SOP를 작성하여 1997년 12월까지 총 82개 항목에 대한 SOP를 작성하여 해당부서에 배포하였으며, 배포된 82개 항목에 대한 SOP 목록은 아래와 같다.

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/EANA 목록

1. SOP/EANA/001 ————— 정도 측정
2. SOP/EANA/002 ————— 알칼리도 측정
3. SOP/EANA/003 ————— 송사리 사육수 분석의뢰

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/ECUL 목록

1. SOP/ECUL/001 ————— 송사리 사육방법
2. SOP/ECUL/002 ————— 송사리 먹이급여
3. SOP/ECUL/003 ————— 송사리 사육실 관리
4. SOP/ECUL/004 ————— *Daphnia magna* 사육 및 관리
5. SOP/ECUL/005 ————— 담수조류(Algae) 배양 및 관리

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/EDOC 목록

1. SOP/EDOC/001 ————— 각종 시험자료의 보관
2. SOP/EDOC/002 ————— 규칙요령집의 보관
3. SOP/EDOC/003 ————— SOP의 보관
4. SOP/EDOC/004 ————— 시험자료보관실의 보안
5. SOP/EDOC/005 ————— 시험종사원의 인감과 서명 및 약호
6. SOP/EDOC/006 ————— 시험자료보관실의 환경보존
7. SOP/EDOC/007 ————— 자료보관에 관한 각종 기록서의 보관장소
8. SOP/EDOC/008 ————— 문서자료의 건식복사실시

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/EMAI 목록

1.	SOP/EMAI/001	-----	Gas Chromatography의 사용 및 관리
2.	SOP/EMAI/003	-----	HPLC의 사용 및 관리
3.	SOP/EMAI/004	-----	Spectrophotometer의 사용 및 관리
4.	SOP/EMAI/005	-----	pH meter(ORION 720A)의 사용 및 관리
5.	SOP/EMAI/006	-----	용존산소 측정기(YSI 57)의 사용 및 관리
6.	SOP/EMAI/007	-----	BOD meter의 사용 및 관리
7.	SOP/EMAI/008	-----	BOD incubator의 사용 및 관리
8.	SOP/EMAI/009	-----	Clean bench의 사용 및 관리
9.	SOP/EMAI/010	-----	Plant Growth Chamber의 사용 및 관리
10.	SOP/EMAI/011	-----	전자저울의 사용 및 관리
11.	SOP/EMAI/012	-----	냉동, 냉장고의 사용 및 관리
12.	SOP/EMAI/013	-----	증류장치의 사용 및 관리
13.	SOP/EMAI/014	-----	Autoclave의 사용 및 관리
14.	SOP/EMAI/015	-----	현미경의 사용 및 관리
15.	SOP/EMAI/017	-----	감압농축기의 사용 및 관리
16.	SOP/EMAI/018	-----	초음파 세척기의 사용 및 관리
17.	SOP/EMAI/020	-----	Micropipettman의 사용 및 관리
18.	SOP/EMAI/021	-----	Digital Burette의 사용 및 관리
19.	SOP/EMAI/022	-----	실험실 온도조절장치의 사용 및 관리
20.	SOP/EMAI/023	-----	버니어캘리퍼스의 사용 및 관리
21.	SOP/EMAI/024	-----	건조기의 사용 및 관리
22.	SOP/EMAI/025	-----	조도계의 사용 및 관리
23.	SOP/EMAI/026	-----	원심분리기의 사용 및 관리
24.	SOP/EMAI/027	-----	진탕기(shaker)의 사용 및 관리
25.	SOP/EMAI/028	-----	TOC Analyzer의 사용 및 관리
26.	SOP/EMAI/029	-----	Turbidimeter의 사용 및 관리

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/ESAM 목록

1. SOP/ESAM/001 ----- 시험물질의 송부의뢰
 2. SOP/ESAM/002 ----- 시험물질, 표준물질, 대조물질의 보관 및 취급
 3. SOP/ESAM/003 ----- 시약과 유기용매의 보관 및 취급
 4. SOP/ESAM/004 ----- 생태독성 시험물질용액 조제
 5. SOP/ESAM/005 ----- 환경독성 시험물질 조제
 6. SOP/ESAM/006 ----- 표준용액 조제
 7. SOP/ESAM/007 ----- 시험물질의 반환 및 폐기
-

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/EITEM 목록

1. SOP/EITEM/001 ----- 증기압 측정
 2. SOP/EITEM/002 ----- 수용성 측정
 3. SOP/EITEM/003 ----- 옥탄올/물 분배계수시험
 4. SOP/EITEM/008 ----- 미생물 분해시험
 5. SOP/EITEM/009 ----- 미생물 분해시험용 기초배양액 조제
 6. SOP/EITEM/010 ----- 활성오니 채취
 7. SOP/EITEM/011 ----- 미생물 배양방법
 8. SOP/EITEM/012 ----- 생물농축시험
-

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/ETOT 목록

-
- | | | |
|------------------|------|------------------------------------|
| 1. SOP/ETOT/001 | ———— | SOP 작성 및 취급 |
| 2. SOP/ETOT/002 | ———— | 직무경험기록 |
| 3. SOP/ETOT/003 | ———— | 교육기록 |
| 4. SOP/ETOT/004 | ———— | 시험번호의 부여 및 표시 |
| 5. SOP/ETOT/005 | ———— | 시험일정총괄표의 작성, 제출 및 보관 |
| 6. SOP/ETOT/006 | ———— | 송사리 급성독성 시험계획서 작성 |
| 7. SOP/ETOT/007 | ———— | <i>Daphnia magna</i> 급성독성 시험계획서 작성 |
| 8. SOP/ETOT/008 | ———— | 담수조류 급성독성 시험계획서 작성 |
| 9. SOP/ETOT/011 | ———— | 송사리 급성독성 최종보고서 작성 |
| 10. SOP/ETOT/012 | ———— | <i>Daphnia magna</i> 급성독성 최종보고서 작성 |
| 11. SOP/ETOT/016 | ———— | 환경독성 시험계획서 작성 |
| 12. SOP/ETOT/017 | ———— | 환경독성 최종보고서 작성 |
| 13. SOP/ETOT/018 | ———— | 시험자료의 수정, 확인 |
| 14. SOP/ETOT/019 | ———— | 자료의 정리, 편집 |
| 15. SOP/ETOT/024 | ———— | GLP 기본 및 전문교육 |
| 16. SOP/ETOT/100 | ———— | 초자기구 세척 |
| 17. SOP/ETOT/101 | ———— | 폐기물의 취급, 반출, 보관, 처리 |
-

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/ETOX 목록

-
1. SOP/ETOX/001 ————— 송사리(*Oryzias latipes*) 급성독성시험
 2. SOP/ETOX/002 ————— 독성시험용 송사리 순화 및 절식
 3. SOP/ETOX/003 ————— 물벼룩(*Daphnia magna*) 급성독성시험
 4. SOP/ETOX/004 ————— 담수조류 생육저해시험
 5. SOP/ETOX/007 ————— LC₅₀/LD₅₀/EC₅₀/ED₅₀의 계산
 6. SOP/ETOX/008 ————— 어류의 체장, 체중 측정
-

■ 한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성연구팀 SOP/EQAU 목록

-
1. SOP/EQAU/001 ————— 신뢰성보증부서의 업무와 책임
 2. SOP/EQAU/002 ————— 신뢰성보증
 3. SOP/EQAU/003 ————— 시험별 점검
 4. SOP/EQAU/004 ————— 최종보고서의 점검
 5. SOP/EQAU/005 ————— 정기적인 점검
 6. SOP/EQAU/006 ————— 행정당국의 사찰에 대응
-

또한 1998년 1월 13일 환경부의 화학물질유해성시험 연구기관 지정과 함께 이미 배포된 SOP에 대한 검토 작업을 실시하여, 환경부 GLP 기준에 맞지 않는 내용, 그동안 문제점으로 논의해온 내용, 그리고 환경독성 시험수행시 사용되는 각종 야장 및 서식들을 포함하는 SOP 개정작업을 실시하여 현재까지 총 66개 SOP에 대하여 개정작업을 완료하여 해당부서에 배포하였다. 또한 각종 시험자료의 보관에 관한 SOP(SOP/EDOC)를 기타 일반사항에 관한 SOP(SOP/ETOT)로 통합시킴으로서 발생하는 문제와 일반독성연구팀과의 업무협조 및 효율성을 위하여 7개 항목에 대한 SOP를 공유하게 됨으로써 환경독성연구팀의 관련 SOP를 폐지하였다.

5) 환경부 화학물질유해성시험 연구기관 지정

1997년 3월 3일 미생물 분해시험, 어류급성독성시험, 물벼룩 급성독성시험, 담수조류 생육저해시험 등 4개 항목에 대하여 본 연구센터에서 GLP 적용 시험을 수행하면서 GLP 기관 인증을 준비해온 결과, 1998년 1월 13일자로 물리화학적성질 시험분야의 분배계수시험, 생태영향시험분야의 조류생장저해시험, 물벼룩류 급성독성시험, 어류급성독성시험, 미생물 및 생물농축성시험분야의 미생물분해시험, 생물농축성시험 등 총 6개 항목에 대하여 환경부의 화학물질유해성시험 연구기관으로 지정을 받음으로서 환경독성연구팀에서는 국내 최초로 환경부 인정의 GLP 수탁기관으로 인정을 받았다.

제 6 장 실험동물 육종기술 확립

제 1 절 서 론

실험동물을 이용한 동물실험의 필요성은 나날이 증가하는 추세이다. 더욱이 각종 질병의 기전의 연구나, 질병에 대한 약물의 개발에는 실험동물이 필수적이다. 많은 질병관련 유전자들이 실험동물의 연구를 통하여 이루어지고 있으며, 성공의 예들이 급속히 늘고 있는 추세이다. 새로운 질병 치료 방법인 유전자 치료의 적용도 눈앞에 다가왔다. 실험동물의 중요성은 다음과 같이 요약할 수 있다. 첫째, 신약개발 연구를 위한 약효검정 시험, 안전성 평가 및 생명과학 특히 의학분야에 있어서 실험동물의 필요성은 절대적이다. 둘째, 실험동물은 동물의 생체반응을 관찰, 측정, 해석하는데 이용되는 것으로 동물실험은 약물, 화학물질, 생물학적 제제 등의 효력의 단위 혹은 역가에 관하여 생물학적 검정을 할 수 있는 가장 좋은 방법이다. 셋째, 실험동물은 의학과 생물학 분야는 물론 수의학, 축산학 등의 연구를 위해서도 필요하는 등 광범위하게 사용된다.

실험동물의 중요성이 강조되면 될 수록 실험과 시험의 data의 신뢰성은 실험동물의 질 (Quality와 Standardization)과 적절한 모델 동물의 선택에 달려있다.

한국화학연구소의 실험동물연구팀은 다음과 같은 근거와 사회적 요구에 부응하여 양질의 실험동물과 사람질환 모델 동물의 개발과 연구에 박차를 가하고 있다. 첫째, 난병치료, 유전학 등의 생명과학 분야에 있어서 병인과 치료기전 연구를 위한 기초적 연구로서 실험동물의 위치는 지대하다. 둘째, 실험목적에 알맞는 다양하고 특정한 실험동물이 필요하다. 셋째, 양질의 실험동물의 효율적 생산을 위한 육종 system 의 연구가 절실하다.

이런 요구에도 불구하고 국내 실험동물의 실험동물의 육종기술, 동물실험기술 등이 현대과학이 요구하고 있는 것에 비하여 너무 낙후되어 있는 실정이고, 향후 신약 개발 연구, 생명 과학 연구 등을 위해 본 연구는 필히 수행되어야 할 과제가 되어있는 것이 현실이다.

본 과제를 통하여 다음과 같은 목표를 두고 연구를 수행하였으며, 그 결과를

보고한다. 즉, 1) 표준화된 양질의 SPF 실험동물 대량 육종기술 확립 (II), 2) Nude mouse의 육종기술 확립, 3) 새로운 질환모델 동물의 확립과 연구이며, 보고서는 각 분야별로 구성되어있다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 대량 육종기술 확립 (II)

가. SPF시설 운용에 관한 미생물, 환경 모니터링의 측정

(1) 미생물 모니터링

SPF 실험동물에 대한 health monitoring을 위해 각 strain 별 육종실을 3월에 1번씩 3개월 이상된 실험동물을 대상으로 SPF 규제 미생물을 검색하였다. 아래 Table 6-2-1은 SPF규제 미생물의 목록이다.

Table 6-2-1. The list of microorganisms for microbiological monitoring

Organisms	Methods
Pseudomonas aeruginosa	NAC
Salmonella spp.	McC
Escherichia coli 0115a, c:K(B)	McC
Bordetella bronchiseptica	McC
Corynebacterium kutsheri	HIB
Pasteurella pneumotropica	BAP
Streptococcus pneumoniae	BAP
Mycoplasma pulmonis	ELISA
Mouse hepatitis virus (MHV)	ELISA
Sendai virus (HVJ)	ELISA
Giardia muris	Microscopic examination
Hexamita muris	Microscopic examination
Syphacia spp.	Microscopic examination

(2) 환경모니터링

SPF실험동물시설에 대한 각 육종실의 환경(온도, 습도, 조도, 취기, 환기횟수 및 소음)을 매월 1회 측정하였다. 또한, 사육기기 smear 및 공중 낙하균

검사를 월1회 측정하였다. 또한 사료 및 음수에 대해서도 미생물 검사를 3개월에 1회 실시하였다.

(3) 사육환경에 대한 미생물모니터링

a) 사육환경 측정 : 주사육실별로 디지털 온습도 측정기, 소음 측정기, 풍량 풍속계, 취기 측정기, 조도측정기를 이용하여 매월 측정하였다.

b) 녹농균 검사 : Nutrient broth, NAC agar 및 NAC broth배지를 준비하고, 음수·노즐·바닥·하수구 소독조에 대하여 sample를 채취, 37°C incubation하여, NAC agar에 배양한 후 형광빛 녹색집락의 발육유무 판정하였다.

c) 낙하균 검사 : TSA, MCA S#110, SDA배지를 준비하여 동물실에 지정된 장소에 30분 노출시킨 후, 노출된 배지로 37°C에 incubation한 후, 발육 집락수를 세어 50개/30분/90cm을 양호로 판정하였다.

d) Smear 검사 : NAC broth, BAP배지를 준비하여, rack, 벽면, 바닥, 흡기구, 배기구 및 소독조 등을 smear한 sample를 NAC broth에 넣어 24시간 배양하여 자란 균을 BAP배지에서 24시간 배양하여 집락의 균종을 동정, SPF규제 미생물의 유무를 판정하였다.

e) 사료 및 깔집 음수 검사 : NAC agar, Selenite broth, Lactose broth, MCA, EMB agar 및 PBS을 준비하여 일반세균검사, 대장균검사 및 Salmonella균 검사를 실시하였고, 집락이 검출되지 않는 것을 원칙으로 하였다.

나. 실험동물에 대한 Health 모니터링

Health 모니터링을 위해 동물의 준비 및 각종 배지 (혈액한천배지, DHL, Macconkey배지, Nac 배지)는 준비하고 동물을 마취, 외관 관찰, 채혈, 피하관찰, 내부장기 관찰, 맹장내용물 채취도말, 기도 내용물 채취 및 도말을 하였다. 세균 배양 및 동정은 독립된 집락을 채취하여 37°C에서 incubation한 후, Gram 염색법과 VITEK(BioMerieux사)을 이용 생화학적 검사를 실시하였다.

다. 양질의 SPF 실험동물 대량 생산

양질의 SPF 실험동물의 유지 및 대량 생산을 위하여 ICR, BALB/C, BDF1, C57BL/6, DBA/2 mice 및 SD Fisher rat를 대상으로 실시하였다. 각 strain을 대상으로 조사한 번식성적 항목으로는 평균산자수(average of litter size), 임신율(delivery rate), 임신기간(gestation period), 그리고 이유율(weaning rate)이었으며, 총출산 마리수를 출산모체수로 나눈 평균산자수(litter size of average), 총교배모체수에 출산모체수의 비율을 나타내는 임신율(delivery rate), 초산은 교배일로부터 출산일 까지, 2산부터는 전분만일로부터 다음 분만일까지의 기간은 임신기간(gestation periods) 그리고 출산 태자수에서 이유된 태자수로 나눈 수를 비율로 나타내는 이유율(weaning rate)을 조사하였다.

2. Nude mouse의 육종기술 확립

가. Nude mouse 실험동물 시설

Nude마우스는 면역이 저하된 마우스로 고품질의 nude마우스를 생산하기 위해서는 특별히 design된 사육시설을 필요로 한다. 특히 nude마우스는 murine hepatitis, Seudai virus가 일반 마우스에 비해 감염되기 쉬우므로, 성공적인 육종을 하기 위해서는 매우 엄격한 사육관리 조건을 갖추어야 한다.

(1) Housing system

Nude 마우스 사육시설은 chambers, hoods, rack 등의 기기들은 환기로부터 분리 폐쇄되어야하며 동물과 접촉되고 있는 시설은 항상 공기의 양압(positive air flow)을 유지하도록 해야한다. 그리고, Air shower, autoclave, pass room, 그리고 pass box가 포함되도록 하였고, 육종실 내에서는 멸균된 작업복, 마스크, 모자, 장갑, 장화를 갖추어야 하며, 사료, 깔집, 사육장비 등은 멸균기를 통하여 멸균하여 사용하였다.

(2) 환경조건

Nude 마우스 사육시설에 대한 온도, 습도, 환기, 조도, 취기, 소음 등은 SPF시설에 준하게 설계하였으며, 특히 Nude mouse는 털이 없기 때문에 온도는 26~28℃로 조절하여 사육하였다.

나. Nude 마우스의 육종 및 유지관리

(1) 육종 system

Nude 마우스를 육종하기 위해서는 크게 4개의 colony로 나뉜다. 첫번째로 nude 마우스 변이체가 발생된 원계통 즉 BALB/c 계통은 계속해서 근교계로 유지되는 군과 두번째로는 backcross 교배(검정교배)를 실시하는데, nude마우스는 형태학적으로 포육능력이 없어 hetero 계통을 유지하여 후대를 털이 없는 군을 생산하기 위한 군이며 세번째로 hetero마우스와 nude마우스의 후에 종축을 늘리는 증식군(expansion group), 네번째로 증식된 군에서 번식성적이 양호한 계통을 선정하여 육종에 이용되는 생산군(productive colony)이 있다. 이러한 자료에 기초하여 육종을 실시하였다.

(2) Nude 마우스의 유지관리

동물의 관리는 멸균된 작업복, 마스크, 양말, 장화를 착용하였으며, 수술용 장갑을 끼고 동물을 handling을 하였다. nude마우스에 공급된 사료는 방사선 멸균을 하였으며, 나머지 잔량은 cage교환 시에 폐기하였다. 동물을 사육한 cage의 교환은 분만 7일, 14일 그리고 21일에 교환을 하였고, 사육기자재 즉 cage, wire, rack등은 청소 및 소독을 매주 실시하였다. 차세대 종축의 선정은 태자의 발육이 양호하고, nu/nu의 태자가 2마리 이상인 모체에서 선발을 하였다. 번식용종축이 퇴출은 동거 42일이 되어도 임신이 되지 않은 개체, 이유 35일이 되어도 임신이 되지 않은 개체, 5산 종료 후, 태자살식 2회, 포육불능 2회, 동거중 암수모체 사망 및 물사고 등이 있으면 이에 해당하였다.

다. 공시동물

본 시험에 사용된 동물은 Charles River Japan 유래의 BALB/c와 nude (nu/nu) 마우스 모체를 입수하여 당 연구소 barrier system 그리고 laminar flow cabinet을 이용하여 육종 번식 시킨 F1을 5 주령, 10 주령, 18 주령의 3 군으로 나누어 각 군당 암수 각 15 마리씩 또는 20마리 총 120 마리를 사용하였으며, 번식 시험은 암수 각각 30마리 또는 50마리를 10주에 교배 시켰다.

라. 사육환경

Barrier system 동물실 사육환경 조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 소음 60 phone 이하, 취기 20 ppm 이하, 조명 150-300 lux, 조명시간 12 시간 명암주기, 환기 횟수 13-15 회/시간으로 사육하였다. 사육상자는 polycarbonate cage (420W x 180D x 175H mm)를 사용하여 1 상자당 3마리씩 사육하였고, 깔짚은 칠레산 육송을 깎아 만든 실험동물 전용 깔짚을 사용하였으며, 주 2 회 사육상자를 교환하였다. 동물실내에서 사용되는 모든 기자재 및 깔짚에 멸균은 고압증기멸균기(121°C , 20분 멸균, 30분 건조)를 이용하였다.

마. 사료 및 음수

사료는 마우스·랫트용 실험동물 고형사료 (제일사료주식회사)를 구입한 후, 방사선 조사 (그린피아주식회사, 2.0 Mrad) 를 실시하여 자유 급여시켰다. 사료의 주요성분 비율 및 원료배합 비율은 Table 6-2-2와 Table 6-2-3에 나타나 있다. 음수는 상수도를 filtering 한 후, 자외선 유수 멸균기 (Dynamics, M600, USA) 를 통과한 음수를 공급하였다.

Table 6-2-2. Chemical composition of diet

Ingredients	Percent(%)
Moisture	13.85
Crude Protein	23.27
Crude Fat	4.41
Crude Fiber	4.03
Crude Ash	6.55
Calcium	1.07
Phosphate	0.73

Table 6-2-3. Formula and composition of diet

Ingredients	percent(%)
Yellow Corn	15.0
Wheat	16.0
Wheat Ban	25.0
Soyabean	21.0
Fish Meal	5.04
Limestone	1.60
Animal Fat	1.24
Calcium phosphate	0.06
Salt	0.50
K ₂ SO ₄	0.16
Na ₂ SO ₄	-
기타	14.40
Total	100.00

마. 체중측정

Nude 및 BALB/c를 이유전(28일령)까지 신생자 체중측정은 실시하지 않았으며, Nude 그리고 BALB/c, 각각 4주령부터 18 주령까지 매주 1회씩 Nude 암수 각각 20마리, 그리고 BALB/c 암수 각각 15마리를 오전 10시에서 12시 사이에 체중을 측정하였다.

사. 장기중량측정

Nude 및 BALB/c 장기중량 측정을 위한 부검은 5주령, 10주령, 그리고 18주령에 각각 15마리씩을 대상으로 부검전 약 6시간 절식을 시켰다. 오전 9 시

에서 오전 12시 사이에 ethyl ether를 이용하여 대상동물을 흡입마취 시킨 후, 적출 대상 장기 즉 뇌, 비장, 심장, 폐, 간, 신장(좌,우), 정소(좌,우), 또는 난소(좌,우), BALB/c의 흉선을 적출하여, Top leading electric balance (Sartorius)를 이용하여 장기 무게를 측정하였다.

아. T 세포, B 세포의 분포조사

Nude 및 BALB/c T 세포, B 세포의 분포조사는 10주령 마우스를 각각 10마리씩을 대상으로 Nude는 Spleen을 BALB/c는 Spleen과 Thymus를 무균상태에서 적출하였다. Spleen은 FITC-antiIgG는 B-cell, FITC-antiThy 1, 2는 T-cell 그리고 흉선은 FITC-CD4+(T-helper cell)과 PE-CD8+ (cytotoxic T cell)을 넣어 불인 후, FACSort에 넣어 각각의 세포를 분석하였다.

자. 혈액학 및 혈액 생화학적 검사

Nude 및 BALB/c 혈액 및 혈청 분석을 위해 5주령, 10주령, 그리고 18주령에 각각 15마리씩을 대상으로 오전 9 시에서 오전 12시 사이에 ethyl ether를 흡입마취 시킨 후 실시하였으며, 채혈전 약 6시간 절식을 시켰으며, 후대정맥으로부터 채혈을 실시하였다. 혈액검사를 위한 채혈용기는 EDTA-2K 가 처리된 병 (CBC bottle, 녹색자) 을 사용하여 응고를 방지하였고, 혈액생화학적 검사를 위해서는 혈청분리관 (polyethylene tube) 을 사용하였다. 혈액학적 검사는 채혈후 20 분 이내에 coulter S-880 을 사용하여 검사하였고, 혈액생화학적 검사는 채혈후 40분 이내에 3000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후, 분리된 혈청은 deep freezer(-80℃)에 보관하여, 혈청분리 후 3 개월 이내에 Clinalyzer (FAX VX-1000)를 이용하여 측정하였다.

차. 백혈구 백분을 감별

Nude 및 BALB/c 백혈구 감별은 5주령, 10주령, 그리고 18주령에 각각 15마리씩을 대상으로 후대정맥으로부터 채혈한 혈액을 슬라이드 그라스에 도말 표본을 만들어 건조시킨 후 Wright 염색을 실시하여 광학 현미경으로 검정하였

으며, 혈액세포를 100개 counted하여 각 세포별로 백분율을 계산하였다.

카. 뇨의 생화학적 검사

Nude 및 BALB/c 뇨의 생화학적 검사는 5주령, 10주령, 그리고 18주령에 각각 15마리씩을 대상으로 오전 9 시에서 10 시 사이에 강제채뇨법으로 채뇨시켜, 소독된 트레이에 뇨를 받은 후, 뇨를 Multistick에 고루 묻여서, 뇨자동분석기 (Clinitek 100) 를 이용하여 분석하였다.

타. 번식성적

번식성적은 Nude, BALB/c, 그리고 BALB/c nu/+ 마우스를 각각 50쌍, 30쌍, 그리고 50쌍을 동시에 교배를 실시하였으며, 이를 대상으로 산차별로 임신율, 산자수, 이유율, 성비율(숫컷/암컷), 분만간격에 대한 항목을 조사 하였다.

파. 통계학적 처리

각 실험항목에서 얻어진 즉 체중, 장기중량, 혈액 및 혈액생화학, 그리고 백혈구 백분율은 Nude와 BALB/c 각각의 Sex별로 Grapad Software V2.05a, 951189s Program을 이용하여 Unpaired t-test을 실시하였고, T-cell 그리고 B-cell 에 분포는 Nude와 BALB/c 성에 관계없이 One-way ANOVA를 $P<0.05$, $P<0.01$ 그리고 $P<0.001$ 에서 유의차 검정을 실시하였다.

3. 새로운 질환모델 동물의 확립과 연구

가. 공시동물 및 사육환경

본 실험에 사용된 동물은 Takeda로 부터 SAMP8 와 SAMR1를 분양 받아 화학 연구소 실험 동물 육종실에서 SPF조건으로 형매교배를 통하여 육종, 번식시키고 있는 동물로 암수 각각 3, 5, 7, 13월령으로 균을 나누어 실험에 사용하였다. 동물실의 사육 환경 조건은 온도 23 ± 2 °C, 상대 습도 55 ± 5 %, 소음 60 phone 이하, 취기 20 ppm 이하, 조도 150~300 Lux, 조명 시간 12시간 명암 cycle, 환기 횟수 12~18회/시간으로 KGLP(의약품 안전성 관리 기준)

에 적합한 환경 조건하에서 사육하였다. 사육 상자는 polycarbonate cage (420W×180D×175H)를 사용하여 1 상자당 3~4마리씩 사육하였으며, 깔짚은 칠레산 육송을 깎아 만든 실험 동물 전용 깔짚을 사용했고, 주 2회 사육 상자를 교환하였다. 동물실내에서 사용되는 모든 기자재 및 깔짚의 멸균은 고압 증기 멸균(121℃, 20분)을 실시하여 사용했다. 사료는 마우스, 랫트용 실험 동물 고형 사료(제일 사료)를 방사선 조사(⁶⁰Co, 2.0 Mrad, 그린피아)로 멸균하여 자유급여 시켰다. 음수는 상수도를 filtering 시킨 후 자외선 유수 멸균기 (Dynamics M600, USA)를 통하여 살균시켜 자유 급수시켰다.

나. 체중 및 장기중량측정

각 군의 암수 각 10마리를 5주령부터 5개월령까지 매주 1회씩 animal balance (Sartorius MC1, USA)를 이용하여 체중을 측정하였고, 5개월령부터는 2주에 1회씩 측정하였다. 장기 중량을 측정하기 위해서 3, 5, 7, 13개월령에 체중을 측정한 후 오전 9시에서 11시 사이에 ethyl ether를 사용해 흡입 마취시켜 부검을 실시하였다. 뇌, 뇌하수체, 비장, 심장, 폐, 간, 신장(좌,우), 부신(좌,우), 정소(좌,우), 난소(좌,우), 흉선을 적출하여 각 장기의 중량을 측정하였다.

다. 장기의 세포질액

모든 과정은 저온실이나 ice-bath을 사용하여 수행하였다. 마우스 신장을 적출하여 10배 부피(volume:weight)의 30 mM HEPES buffer (pH 7.4)를 가하여 Homogenizer로 균질화 한 후 700 × g 에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 이를 다시 10,000 × g에서 12분간 고속 원심 분리 한 후 상등액과 침전물을 분리하였다. 상등액은 초고속 원심분리기를 이용하여 105,000 × g에서 1시간 동안 초고속 원심 분리하여 상등액을 장기의 세포질액(cytosol)으로 -70℃에 보관 하였다. 단백질 함량은 Bio Rad protein assay kit를 이용하여 분석하였으며 흡광도는 spectrophotometer (DU-650, Beckman)을 사용하여 595 nm에서 측정하였고 표준시료는 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 사용하였다.

라. 지질과산화 측정

지질과산화는 TBA(Thiobarbituric acid) 방법을 이용하여 세포질액내의 TBARS(thiobarbituric acid reacting substance)량을 측정하였다(Uchiyama와 Mihara,1978). 반응액의 조성은 20 % Acetic acid 0.5 ml, 8.1 % SDS 0.075 ml, 증류수 0.025 ml, 세포질액 0.067 ml 이다. 여기에 1.2 % Thiobarbituric acid 0.333 ml 를 가하고 vortex로 잘 교반 후 유리구슬로 시험관을 막고 30분간 100 °C에서 중탕 가열하여 반응 시킨 후 실온에서 30분간 방치하였다. 600 × g에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 취하여 532 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

마. Protein-bound -SH과 GSH 함량

(1) Protein-bound -SH

Protein-bound -SH는 total -SH에서 non protein-bound -SH를 뺀 수 치로 계산하였다. total -SH의 측정방법은 다음과 같다. 반응액은 세포질액 25 μ l, 증류수 75 μ l, 0.02 M Tris buffer(0.02 M EDTA; pH 8.2) 300 μ l, 0.01 M DTNB(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) 20 μ l, 메탄올 1580 μ l 이다. 상온에서 15분 동안 반응시킨 후 3000 × g 에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 spectrophotometer로 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) GSH

GSH는 non protein-bound -SH를 측정하였다(Sedlak와 Lindsay, 1968). 세포질액 내의 단백질을 제거하기 위하여 50 % TCA(trichloroacetic acid) 200 μ l, 세포질액 250 μ l, 증류수 1550 μ l를 혼합한 후 상온에서 15분간 반응시킨 후 3000 × g 에서 15분간 원심 분리하여 상등액 1 ml를 취하였다. 여기에 0.4 M Tris buffer(0.02 M EDTA; pH 8.9) 2 ml 와 0.01 M DTNB 0.05 ml 를 가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. Superoxide dismutase(SOD) 활성

반응액의 조성은 buffer(50 mM potassium phosphate; 0.1 mM EDTA; pH 7.9) 2.1 ml, 0.5 mM xanthine 0.3 ml, 증류수 0.1 ml, 50 μ M cyanide 0.1 ml, xanthine oxidase 20 μ l 이다. 여기에 세포질액 10 μ l를 가한 후 spectrophotometer로 550 nm에서 흡광도의 변화율을 측정하여 SOD활성을 분석하였다(Oyanagui, 1948).

사. Catalase 활성

반응액의 조성은 완충용액 (130 mM phosphate buffer; pH 7.0) 0.5 ml, 증류수 0.66ml, 과산화수소(15 mM) 1.8 ml이고 여기에 세포질액 40 μ l를 가한 후 240 nm에서 분당 흡광도의 변화율을 측정하여 catalase 활성을 분석하였다 (Britton과 Maehly, 1995).

아. 행동실험

(1) 수동회피실험

수동회피는 step-through test를 실시하였으며 acquisition trial과 retention test로 나누어 실시하였다(Miyamoto 등, 1986). 3, 5, 7, 13개월령에 수동 회피를 실시하였다. 사용된 step-through 수동 회피 실험 기구는 두 부분으로 나누어져 있으며 전실은 빛을 환히 쬐여 주는 백색의 밝은 상자(18×18×25cm)이며 여기에 연결된 후실은 검은색의 어두운 상자(18×18×25cm)로 되어 있다. 두 부분 모두 바닥이 grid로 되어 있으며 두 상자 사이의 벽에는 아래 부분에 직경 4cm되는 원형 구멍이 뚫려 있고 이 구멍은 길로틴 형의 문으로 개폐시킬 수 있도록 되어 있다. 마우스를 한마리씩 다른 cage에서 1분간 방치한 후, 빛이 환히 쬐이는 (40cm위, 60W 전구)전실에 넣고 10초간 적응을 시킨 후 길로틴 형 문을 올려서 마우스가 자유로이 기구 속을 다니도록 하였다. 마우스의 4발이 어두운 전실로 모두 들어가면 길로틴형 문을 재빨리 닫고 전실에서 후실로 들어가는데 걸린 시간(제한시간 300초)을 측정하고, shock generator-scrambler transfer (Bio medica LTD.)를 사용하여 0.5mA의 교류를

1.5초 동안 흘려 전기 자극을 주었다. 전기 자극을 받은 마우스를 꺼내어 다른 cage에서 1분간 휴식을 시킨 후 원래의 cage에 넣어 주었다. 마우스가 어두운 방으로 들어가서 전기shock를 받을 때까지를 acquisition trial이라 하였고, 24시간 후 기구의 전실에 다시 마우스를 넣어서 후실로 들어가는 지를 300초 동안 관찰하여, 전실에 남아 있는 시간이 얼마나 되는지 관찰하였는데(제한 시간 300초) 이것을 retention test 라 하였다.

(2) 능동회피실험

능동회피실험은 shuttle box test로 실시하였으며(Miyamoto 등, 1986), 3, 5, 13개월령의 마우스 각각을 3일간 연속하여 실험을 공여하였다. 이 실험에 사용된 기구는 두 상자(각각 24×24×22cm)가 연결되어 있으며 두상자 사이에는 직경 8cm의 원형 구멍이 뚫려있어 마우스가 두 상자 사이를 자유로이 왕래할 수 있도록 되어 있다. 두 부분 모두 바닥에 정류가 흐를 수 있는 grid로 되어 있다. 먼저 마우스를 한 부분에 넣고 1분간 두 상자 사이를 자유로이 왕래하면서 환경에 적응하도록 한 후 10초간 빛과 소리 자극을 동시에 준 후(이 자극을 conditioned stimuli라 함) 10초간 전기 자극(shocker-scrambler, Rhema- Labortechnik) 주고 난 후 40초간의 휴지기를 주었다. 이 cycle을 연속해서 5분간 반복하였다. 빛과 소리 자극 기간동안 다른 실로 이동할 경우 빛과 소리 자극이 끊기면서 1 cycle이 끝나며, 이때를 회피하였다고 판정하였다.

제 3 절 결 과

1. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 육종기술 확립 (II)

현재 본 연구실에서 수행중인 양질의 SPF실험동물을 육종을 위한 번식성적, 분양실적에 대하여 다음과 같이 결론을 얻었다.

가. 미생물과 환경 모니터링

SPF시설 운용에 따른 미생물 모니터링 결과 사육기구 smear 검사, 사료

및 깔집 검사는 SPF사육기준에 합격판정을 받았고, 환경조건도 양호하였다. 다음 항목들을 검사한 결과 현재까지 본 실험동물사육실, 사육시설, 사육되고 있는 실험동물에서 SPF barrier system이 잘 유지되고 있는 것으로 판명되었으며, 그 결과는 Table 6-3-1, 6-3-2, 6-3-3, 6-3-4 및 6-3-5와 같다.

Table 6-3-1. The results of microbiological monitoring of animals in SPF condition

검사기간	동물종	마리	항목	방법	결과	비고
95. 11. 21. ~ 98. 6. 4	SD rat	9	Pseudomonas aeruginosa	NAC	0/9	양호
			Salmonella SPP.	DHL	0/9	양호
			Escherichia coli 0115 α , C:K(B)	DHL	0/9	양호
			Bordetella bronch:sept:ca	DHL	0/9	양호
			Corynebacterium Kutscheri	HIB	0/9	양호
			Pasterurella Pneumotropica	BAP	0/9	양호
			Streptococcus pnemoniae	BAP	0/9	양호
			Mouse hepatitis virus	ELISA	0/9	양호
			Mycoplasma pulmonis	"	0/9	양호
			Sendai virus	"	0/9	양호
			Giardia muris	microscopic	0/9	양호
			Hexamitamuris	"	0/9	양호
			Syphacia SPP.	"	0/9	양호
95. 11. 21. ~ 98. 6. 4	ICR mouse	9	Pseudomonas aeruginosa	NAC	0/9	양호
			Salmonella SPP.	DHL	0/9	양호
			Escherichia coli 0115 α , C:K(B)	DHL	0/9	양호
			Bordetella bronch:sept:ca	DHL	0/9	양호
			Corynebacterium Kutscheri	HIB	0/9	양호
			Pasterurella Pneumotropica	BAP	0/9	양호
			Streptococcus pnemoniae	BAP	0/9	양호
			Mouse hepatitis virus	ELISA	0/9	양호
			Mycoplasma pulmonis	"	0/9	양호
			Sendai virus	"	0/9	양호
			Giardia muris	microscopic	0/9	양호
			Hexamitamuris	"	0/9	양호
			Syphacia SPP.	"	0/9	양호

Table 6-3-2. Results of microbiology monitoring of animal rooms

실시기간	실번호	검사대상	결과	비고
95. 9. 7~98. 5. 7.	1호실	feces, water.nozzle	0/27	양호
	2호실	"	0/27	양호
	3호실	"	0/27	양호
	4호실	"	0/27	양호
	5호실	"	0/27	양호

Table 6-3-3. Results of microbiology monitoring of animal rooms (falling microbes)

실시기간	검사장소	낙하균 수				결과
		총호수	그람음성균	포도상구균	진균류	
95. 9. 7 ~ 98. 5. 7	1호실 1	13.56±10.17	0.00±0.00	10.78±7.73	0.00±0.00	양호
	" 2	9.33±4.16	0.00±0.00	6.62±4.94	0.00±0.00	양호
	2호실 1	151.33±54.78	0.00±0.00	120.33±48.18	0.00±0.00	재검후 양호
	" 2	169.89±62.25	0.00±0.00	148.56±75.93	0.00±0.00	재검후 양호
	3호실 1	11.4±8.39	0.00±0.00	15.67±16.22	0.00±0.00	양호
	" 2	12.33±12.41	0.00±0.00	10.89±10.65	0.00±0.00	양호
	4호실 1	19.44±9.27	0.00±0.00	21.11±14.37	0.00±0.00	양호
	" 2	25.56±17.56	0.00±0.00	20.0±9.84	0.00±0.00	양호

Table 6-3-4. Results of microbiology monitoring of animal rooms(Smear test)

실시일	실번호	검사대상	결과
95. 9. 19 ~ 98. 4. 16	1호실	rack, 벽, 바닥, 흡기구, 배기구, 소독조	양호
	2호실	"	양호
	3호실	"	양호
	4호실	"	양호

Talbe 6-3-5. Microbiology test of diet

실시일	검체	일반사료수(m/g)	살모넬라	대장구균
95. 9. 26.	사료1	0	0	0
	사료2	0	0	0
	사료3	0	0	0

본 실험동물사육실에 대한 환경측정결과는 Table 6-3-6과 같으며 이는 SPF barrier system에 합당한 기준이다.

Talbe 6-3-6. Environmental control of animal rooms

방번호/ 항목	온도	습도	소음	환기횟수	조도	취기
1	22.58 ± 4.86	57.36 ± 4.86	57.22 ± 3.58	18.09 ± 4.25	156-255	5ppm이하
2	23.32 ± 0.59	57.62 ± 4.42	58.61 ± 1.51	15.6 ± 2.45	150-247	"
3	22.63 ± 0.72	56.63 ± 5.08	58.17 ± 1.11	19.11 ± 2.95	143-242	"
4	22.8 ± 0.67	56.86 ± 4.94	58.28 ± 1.42	16.02 ± 2.58	148-264	"

* 측정기간 : 1995년 9월 ~ 1998년 5월(27회 측정)

나. 번식성적

1:1 상시동거에 의한 각종 실험동물 번식성적인 임신기간에 ICR에서 19~21일, SD에서 21~23일 이었는데, 계획생산 방법에 의한 결과와 ICR : 22.5일, SD : 23.2일보다 짧았다. 번식 성적 결과는 Table 6-3-7과 같다.

Table 6-3-7. Reproductive performance of rate and mice

동물 종	Strain	평균 산자수 (litter size, 마리)	임신율 (delivery rate, %)	임신기간 (gestation, 일)
Rat	SD	11-13	88-92	21-23
	F344	6-8	65-75	21-23
Mouse	ICR	13-15	94-96	19-21
	C57BL/6	5-7	80-85	19-21
	DBA/2	3-5	45-55	19-21
	BDF1	7-9	85-95	19-21
	Balb/c	5-7	80-90	20-23

다. 대량생산과 보급

본 실험실에서 육종한 실험동물에 대한 생산 성적은 Table 6-3-8, 반출기관 및 반출된 계통은 Table 6-3-9와 같다.

Table 6-3-8. The number of animals distributed

년	안전성		의약활성		기업, 연구소, 학교		합계
	마우스	랫트	마우스	랫트	마우스	랫트	
95	2,178	5,874	21,055	3,426	23,388	2,824	58,745
96	5,090	6,007	18,033	3,071	20,950	4,327	57,478
97	5,592	7,094	21,212	3,059	19,493	3,680	60,130
합계	12,860	18,975	60,300	9,556	63,831	10,831	176,353

Table 6-3-9. The list of institutes using KRICT animals and the strains

사용기관	사용 strain
충남대	BALB/c
럭키연구소	SD
유전공학연구소	ICR, BDF1
과학기술원	ICR, SD, BALB/c
고신의료원	BALB/c
명진기계	ICR, BDF1, SD, C57BL/6
금호화학	ICR
포항공대	ICR, C57BL/6
부산수산대	ICR
원광대	C57BL/6
충대의대	SD
한국식품개발연구원	SD
전북의대	SD, ICR, BALB/c
충북대	BALB/c
원자력병원	BALB/c
경북대	SD
아주대	BALB/c
대전대	ICR, C57BL/6, SD
전북대	BALB/c
계룡과학	BALB/c, SD
울산대	SD
건국대	BDF1, C57BL/6
인제대	SD
서울대	C57BL/6
전남대	BALB/c
원자력연구소	SD
배재대	SD, ICR
예수병원(전주)	BALB/c
목원대	ICR
영남대	SD
산업보건안전연구원	SD, ICR
세브란스 병원	BALB/c, C57BL/6
연세대	BALB/c, C57BL/6
삼양사	SD
한국한의학 연구소	SAM, SD

2. Nude mouse의 육종기술 확립

가. Nude mouse의 성장

(1) 체중

Nude 및 BALB/c를 이유 후 4 주령에서 18 주령까지의 체중변화 측정 결과는 Table 6-3-10과 같다. 이유시 체중은 Nude 수컷 17.24g, 암컷 15.20g

Table 6-3-10. Changes of body weight in nude and BALB/c Mice with age.

Age (weeks)	Sex	Nude		BALB/c	
		Male (g)	Female (g)	Male (g)	Female (g)
4		17.24 ± 1.223	15.20 ± 0.959	18.33 ± 1.557	17.24 ± 0.879
5		18.68 ± 1.252	16.16 ± 0.865	23.40 ± 0.799***	20.63 ± 0.623 ***
6		21.39 ± 1.650	18.24 ± 1.158	24.65 ± 1.063***	20.41 ± 0.735 ***
7		22.25 ± 1.499	19.42 ± 0.863	26.41 ± 0.851***	21.18 ± 0.588 ***
8		22.57 ± 1.372	19.50 ± 1.307	27.82 ± 0.957***	22.03 ± 0.558 ***
9		22.80 ± 1.362	19.83 ± 0.925	28.18 ± 0.917***	22.67 ± 0.590 ***
10		23.10 ± 1.372	19.50 ± 1.307	28.60 ± 1.041***	22.58 ± 0.544 ***
11		23.60 ± 1.657	20.51 ± 1.082	28.72 ± 1.216***	22.97 ± 0.807 ***
12		24.72 ± 1.438	20.87 ± 1.054	28.92 ± 1.218***	23.31 ± 0.952 ***
13		24.64 ± 2.075	20.72 ± 1.065	29.58 ± 1.098***	23.38 ± 1.021 ***
14		26.22 ± 1.611	21.24 ± 0.980	29.56 ± 1.863***	23.59 ± 0.985 ***
15		26.22 ± 1.338	22.03 ± 1.003	30.28 ± 1.253***	24.37 ± 1.233 ***
16		26.60 ± 1.302	22.54 ± 1.053	31.02 ± 1.394***	24.48 ± 1.322 ***
17		26.86 ± 1.295	22.49 ± 1.189	31.52 ± 1.318***	25.44 ± 1.344 ***
18		27.01 ± 1.154	22.62 ± 1.145	31.92 ± 1.300***	25.42 ± 1.410 ***

*** indicates significant difference at $p < 0.001$ level when compared with the nude mice male and female groups, respectively

- 1) Measured balance of body weight : Model, Sartorius LC 6200S
- 2) Number of animals : BALB/c male and female mice group, 16 animals ; nude male and female mice group, 20 animals
- 3) Grapad Software V2.05a, 951189s Program, Unpaired t-test

이었고, BALB/c는 수컷 18.33g, 암컷 17.24g으로 비슷하였다. 그러나 발육기로 접어드는 5주령부터 Nude와 BALB/c에 체중 차이는 컸다. 그리고 Nude와 BALB/c 마우스는 시험기간 전체기간 동안 체중은 증가 하였다. 가장 많은 체중의 증가는 보인 주령은 Nude 마우스 수컷, 암컷 모두 5 주에서 6 주 사이로 수컷은 평균 2.71g, 암컷은 평균 2.08g 이였으며, BALB/c 마우스는 수컷, 암컷 모두 4 주에서 5 주 사이로 평균 5.07g, 암컷은 평균 3.39g 이였다.

(2) 장기중량

Nude 및 BALB/c에 5 주령, 10 주령 그리고 18 주령에 측정된 장기 중량의 변화는 Table 6-3-11 그리고 Table 6-3-12와 같다. Nude 5주령 및 10주령 수컷 간의 중량은 각각 1.012g 그리고 1.309g, BALB/c 5주령 및 10주령 수컷 간의 중량은 각각 1.393g, 그리고 1.491g 으로 BALB/c의 중량이 무거웠다. Nude 5주령 및 18주령 수컷 비장 중량은 각각 0.094g 그리고 0.125g, BALB/c 5주령 및 18주령 수컷 비장 중량은 각각 0.108g, 그리고 0.107g 으로 5주령에는 BALB/c의 중량이 무거웠으나, 반대로 18주령에는 Nude의 중량이 무거웠다. Nude 5주령 및 18주령 수컷 좌우 정소 중량은 각각 0.072g, 0.074g, 0.098g 그리고 0.098g이였고, 0.125g, BALB/c 5주령 및 18주령 수컷 좌우 정소 중량은 각각 0.058g, 0.058g, 0.088g 그리고 0.088g이였는데, 5주령 및 18주령에서 Nude의 중량이 무거웠다. Nude 5주령 및 18주령 암컷 비장 중량은 각각 0.088g 그리고 0.128g 이였고, BALB/c 5주령 및 18주령 수컷 비장 중량은 각각 0.106g, 그리고 0.113g 으로 수컷과 동일하게 5주령에는 BALB/c의 중량이 무거웠으나, 반대로 18주령에는 Nude에 중량이 무거웠다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 암컷 폐 중량은 각각 0.123g, 0.143g 그리고 0.142g, BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 암컷 폐 중량은 각각 0.142g, 0.164g 그리고 0.172g으로 전체 주령에서 BALB/c의 중량이 매우 유의하게 무거웠다.

Table 6-3-11. Changes of organ weight in Nude and BALB/c male mice with age. (Unit : g)

weeks Strain	5		10		18	
	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c
Brain	0.417±0.032	0.394±0.037	0.423±0.022	0.440±0.014*	0.435±0.018	0.441±0.020
Liver	1.012±0.226	1.393±0.151***	1.309±0.089	1.491±0.102***	1.551±0.077	1.625±0.129
Spleen	0.094±0.015	0.108±0.015*	0.102±0.014	0.108±0.007	0.125±0.017b)	0.107±0.009
Kidney(R)	0.144±0.031	0.157±0.019	0.187±0.016	0.206±0.017**	0.228±0.024	0.250±0.023*
Kidney(L)	0.149±0.024	0.158±0.020	0.188±0.014	0.204±0.010***	0.228±0.022	0.248±0.023*
Heart	0.110±0.012	0.109±0.016	0.128±0.012	0.148±0.009***	0.149±0.014	0.168±0.017**
Lung	0.141±0.015	0.151±0.013*	0.150±0.012	0.175±0.010***	0.168±0.010	0.189±0.014***
Testis(R)	0.072±0.011c)	0.058±0.007	0.082±0.010	0.082±0.010	0.098±0.011a)	0.088±0.009
Testis(L)	0.074±0.012c)	0.058±0.006	0.086±0.011	0.084±0.009	0.098±0.009b)	0.088±0.009
Thymus	-	0.065±0.016	-	0.044±0.009	-	0.031±0.007

Indicates significant difference when compared with the nude male mice groups (***;p<0.001, **;p<0.01, *;p<0.05).

Indicates significant difference when compared with the BALB/c male mice groups(a);p<0.05, b);p<0.01, c);p<0.001).

- 1) Measure balance of organ weight : Model, Sartorius Analytic AC 210S
- 2) Number of animals : 15 animals/group
- 3) Grapad Software V2.05a, 951189s Program, Unpaired t-test.

Table 6-3-12. Changes of organ weight in Nude and BALB/c female mouse with age. (Unit : g)

Age (weeks) Strain organs	5		10		18	
	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c
Brain	0.394±0.025	0.405±0.024	0.430±0.020	0.434±0.018	0.436±0.025	0.443±0.030
Liver	0.962±0.118	1.029±0.098	1.048±0.105	1.039±0.053	1.269±0.133	1.223±0.077
Spleen	0.088±0.015	0.106±0.011 ***	0.100±0.013	0.113±0.009 **	0.128±0.019 a)	0.113±0.009
Kidney(R)	0.111±0.010	0.111±0.011	0.133±0.011	0.129±0.007	0.152±0.010 a)	0.143±0.008
Kidney(L)	0.114±0.010	0.112±0.009	0.137±0.016	0.130±0.006	0.154±0.013	0.151±0.010
Heart	0.096±0.015	0.097±0.007	0.110±0.012	0.113±0.008	0.125±0.010	0.127±0.008
Lung	0.123±0.018	0.142±0.016 ***	0.143±0.013	0.164±0.011 ***	0.142±0.013	0.172±0.009 ***
Ovary(R)	0.0030±0.0024	0.0045±0.0037	0.0033±0.0016	0.0041±0.0009	0.0072±0.0035	0.0065±0.0019
Ovary(L)	0.0034±0.0028	0.0978±0.0171	0.0030±0.0011	0.0052±0.0032 **	0.0075±0.0034	0.0071±0.0015
Thymus	-	0.098±0.017	-	0.057±0.006	-	0.037±0.009

Indicates significant difference when compared with the Nude female mice groups (***)p<0.001, **;p<0.01).

a) Indicates significant difference at p < 0.05 level when compared with the BALB/c female mice groups.

1) Measure balance of organ weight : Model, Sartorius Analytic AC 210S

2) Number of animals : 15 animals/group

3) Grapad Software V2.05a, 951189s Program, Unpaired t-test

나. Nude mouse의 생리학적 변화

(1) 혈액학적 검사

Table 6-3-13에는 약어 (Abbreviations), unit, 분석방법 (analysis method) 등을 정리하였다. Nude 및 BALB/c에 5 주령, 10 주령 그리고 18 주령에 동물을 대상으로 채취한 혈액을 대상으로 혈액학적 검사 결과는 Table 6-3-14 그리고 Table 6-3-15와 같다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 WBC는 각각 $3.83 \times 10^3/\text{mm}^3$, $3.04 \times 10^3/\text{mm}^3$ 그리고 $3.83 \times 10^3/\text{mm}^3$ 이었으며, BALB/c

5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 WBC는 각각 $6.62 \times 10^3/\text{mm}^3$, $4.48 \times 10^3/\text{mm}^3$ 그리고 $5.25 \times 10^3/\text{mm}^3$ 로 Nude에 비해서 유의하게 높았다. 그리고 HGB, MCV, 그리고 PLT에서 수컷 Nude는 각각 15.69g/dl, 49.53fl 그리고 $897.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ 이었으나, 수컷 BALB/c는 각각 16.66g/dl, 50.7fl 그리고 $1104.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ 으로 BALB/c가 유의하게 높았다. 그러나 10주령 PLT에서는 수컷 Nude $981.7 \times 10^3/\text{mm}^3$, 수컷 BALB/c $765.9 \times 10^3/\text{mm}^3$ 로 Nude가 유의하게 높았다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 암컷 WBC는 각각 $1.62 \times 10^3/\text{mm}^3$, $3.68 \times 10^3/\text{mm}^3$ 그리고 $1.62 \times 10^3/\text{mm}^3$ 이였으며, BALB/c 5주령, 10주령, 그리고 18주령 암컷 WBC는 각각 $7.00 \times 10^3/\text{mm}^3$, $5.49 \times 10^3/\text{mm}^3$ 그리고 $5.47 \times 10^3/\text{mm}^3$ 로 Nude에 비해서 유의하게 높았다. HGB 그리고 MCV에서 암컷 Nude는 각각 15.49g/dl 그리고 49.82fl 이었으나, 암컷 BALB/c는 각각 16.43g/dl 그리고 50.45fl로 BALB/c가 유의하게 높았다. 그러나 18주령 PLT에서는 암컷 Nude $878.0 \times 10^3/\text{mm}^3$, 암컷 BALB/c $745.9 \times 10^3/\text{mm}^3$ 로 Nude에서 높았다.

Table 6-3-13. Abbreviations, units and analysis methods of the hematology.

Abbreviation	Full name	Units	Method
WBC	White blood cell	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Electrical resistance
RBC	Red blood cell	$\times 10^6/\text{mm}^3$	Electrical resistance
HGB	Hemoglobin	g/dl	Cyanomethemoglobin
HCT	Hematocrit	%	calculated from MCV and RBC
MCV	Mean corpuscular volume	fl	Electrical resistance
MCH	Mean corpuscular hemoglobin	pg	calculated from MGB and RBC
MCHC	Mean corpuscula Hemoglobin concentration	g/dl	calculated from MGB and HCT
PLT	Platelet	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Electrical resistance

Table 6-3-14. Changes of blood hematology in Nude and BALB/c male mice with age.

Age (weeks)	5		10		18	
	Strain					
Items	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c
WBC	3.83 ± 1.189	6.62 ± 1.378 ***	3.04 ± 0.869	4.48 ± 0.864 ***	3.83 ± 1.19	5.25 ± 0.95 **
RBC	9.53 ± 0.925	9.83 ± 0.472	9.75 ± 0.608	9.81 ± 0.347	9.53 ± 0.94	9.79 ± 0.93
HGB	15.69 ± 0.60	16.66 ± 0.70 ***	15.98 ± 0.43	16.06 ± 0.66	15.69 ± 0.6	15.83 ± 1.6
HCT	47.22 ± 4.67	49.86 ± 2.78	47.64 ± 3.01	48.02 ± 1.99	47.22 ± 4.6	48.57 ± 4.9
MCV	49.53 ± 0.72	50.70 ± 0.66 ***	48.86 ± 0.44	48.91 ± 0.46	49.53 ± 0.7	49.59 ± 0.5
MCH	16.60 ± 1.68	16.95 ± 0.32	16.43 ± 0.89	16.36 ± 0.29	16.6 ± 1.68	16.2 ± 0.32
MCHC	33.51 ± 3.31	33.45 ± 0.86	33.65 ± 1.83	33.43 ± 0.59	33.5 ± 3.31	32.6 ± 0.50
PLT	897.1 ± 137.8	1104.3 ± 146.0 **	981.7 ± 113.6 a)	765.9 ± 139.8	897.1 ± 137.8	860.2 ± 83.6

Indicates significant difference at $p < 0.001$ level when compared with the nude male mice group(***; $p < 0.001$, **; $p < 0.01$).

a) indicates significant difference at $p < 0.001$ level when compared with the BALB/c male mice group.

1) Number of animals : 13 animals/group

2) Grapad Software V2.05, 951189s Program, Unpaired t-test

Table 6-3-15. Changes of blood hematology in nude and BALB/c female mice with age.

Age (weeks)	5		10		18	
	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c
WBC	1.62±0.499	7.00±1.780 ***	3.68±0.608	5.49±1.799 **	1.62±0.499	5.47±1.560 ***
RBC	9.37±0.809	9.76±0.336	9.80±0.263	9.65±0.296	9.37±0.809	9.56±0.598
HGB	15.49±0.345	16.43±0.824 ***	15.92±0.409	15.91±0.491	15.49±0.345	15.74±0.678
HCT	46.68±4.028	49.24±2.150	48.89±1.538	47.98±1.603	46.68±4.028	47.84±3.017
MCV	49.82±0.283	50.45±0.769 *	49.88±0.625	49.68±0.424	49.82±0.283	50.04±0.729
MCH	16.69±1.695	16.84±0.425	16.32±0.248	16.47±0.210	16.69±1.695	16.49±0.862
MCHC	33.49±3.413	33.39±0.654	32.72±0.475	33.16±0.243	33.49±3.413	32.95±1.764
PLT	878.0±101.4	889.9±356.2	964.6±102.2	902.2±139.8	878.0±101.4 a)	745.9±182.8

Indicates significant difference when compared with the nude female mice group(***;p<0.001, **;p<0.01, *;p<0.05).

a) indicates significant difference at p < 0.001 level when compared with the BALB/c female mice group.

1) Number of animals : 13 animals/group

2) Grapad Software V2.05, 951189s Program, Unpaired t-test

(2) 백혈구백분율 감별

Nude 및 BALB/c에 5 주령, 10 주령 그리고 18 주령에 동물을 대상으로 혈액을 도말하여 관찰한 백혈구 백분율 감별 결과는 Table 6-3-16 그리고

Table 6-3-16과 같다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 Lymphocyte는 각각 48.67%, 74.47% 그리고 71.8% 이였으며, BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 Lymphocyte는 각각 64.73%, 85.07% 그리고 82.13%로 BALB/c가 Nude에 비해서 유의하게 높았다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 Neutrophil은 각각 49.33%, 24.93% 그리고 27.6% 이였으며, BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 Neutrophil은 각각 34.87%, 14.27% 그리고 17.53%로 Nude가 BALB/c에 비해서 유의하게 높았다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 암컷 Lymphocyte는 각각 56.6%, 73.62% 그리고 67.53% 이였으며, BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 암컷 Lymphocyte는 각각 77.67%, 88.47% 그리고 84.73%로 BALB/c가 Nude에 비해서 유의하게 높았다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 암컷 Neutrophil은 각각 42.33%, 24.62% 그리고 31.87% 이였으며, BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 암컷 Neutrophil은 각각 21.27%, 10.93% 그리고 14.93%로 Nude가 BALB/c에 비해서 유의하게 높았다. 암컷 Nude 그리고 암컷 BALB/c에 Basophil은 5주령, 10주령 그리고 18주령에서 전혀 관찰되지 않았다.

Table 6-3-16. WBC differential counts in nude and BALB/c male mice with age. (unit : percent Mean \pm S.D)

Strains	Items	Age (week)		
		5	10	18
Nude	Lymphocyte	48.67 \pm 17.00	74.47 \pm 7.84	71.8 \pm 8.45
	Neutrophil	49.33 \pm 16.77 b)	24.93 \pm 7.73 a)	27.6 \pm 7.98 a)
	Monocyte	0.6 \pm 0.74	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0
	Eosinophil	1.4 \pm 1.81	0.53 \pm 0.99	0.6 \pm 0.63
	Basophil	0.00 \pm 0.0	0.07 \pm 0.26	0.00 \pm 0.0
BALB/c	Lymphocyte	64.73 \pm 10.99 **	85.07 \pm 4.61 ***	82.13 \pm 4.14 ***
	Neutrophil	34.87 \pm 11.21	14.27 \pm 4.25	17.53 \pm 4.21
	Monocyte	0.00 \pm 0.00	0.07 \pm 0.26	0.00 \pm 0.0
	Eosinophil	0.4 \pm 0.63	0.6 \pm 0.74	0.33 \pm 0.62
	Basophil	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0

Indicates significant difference level when compared with the nude male mice

group(***;p<0.001, **;p<0.01).

Indicates significant difference when compared with the BALB/c male mice group(a);p<0.001, b);p<0.01).

1) Number of animals : 15 animals/group

2) Grapad Software V2.05, 951189s Program, Unpaired t-test

Table 6-3-17. WBC differential counts in nude female mice with age (unit : percent Mean ± S.D)

Strain	Items	Age (week)		
		5	10	18
Nude	Lymphocyte	56.6 ± 13.76	73.62 ± 15.27	67.53 ± 10.67
	Neutrophil	42.33 ± 13.78 a)	24.62 ± 14.03 b)	31.87 ± 10.15 a)
	Monocyte	0.07 ± 0.26	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
	Eosinophil	1.0 ± 1.0	1.77 ± 1.79	0.6 ± 1.06
	Basophil	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
BALB/c	Lymphocyte	77.67 ± 7.37 ***	88.47 ± 4.24 **	84.73 ± 5.61 ***
	Neutrophil	21.27 ± 7.56	10.93 ± 3.96	14.93 ± 5.54
	Monocyte	0.4 ± 0.63	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
	Eosinophil	0.67 ± 0.72	0.6 ± 0.91	0.27 ± 0.46
	Basophil	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0

Indicates significant difference when compared with the nude female mice group(***;p<0.001, **;p<0.01).

Indicates significant difference when compared with the BALB/c female mice group(a);p<0.001, b);p<0.01).

1) Number of animals : 15 animals/group

2) Grapad Software V2.05, 951189s Program, Unpaired t-test

다. Nude mouse의 혈액 생화학적 검사

Table 6-3-18에는 혈액생화학 검사의 약어 (Abbreviations), unit, 분석방법 (analysis method)이 나와 있다. Nude 및 BALB/c에 5 주령, 10 주령 그리고 18 주령에 동물을 대상으로 채취한 혈액에서 분리한 혈청을 분석한 혈액생화학적 검사 결과는 Table 6-3-19 그리고 Table 6-3-20과 같다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 CREA, TCHO, TG는 BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 CREA, TCHO, TG에 비해 유의하게 낮았다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 K는 각각 4.993mmol/ℓ, 5.083mmol/ℓ 그리고 5.432mmol/ℓ

ℓ 이였으며, BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 K는 6.353mmol/ ℓ, 6.23mmol/ ℓ 그리고 7.214mmol/ ℓ 로 Nude에 비해 높았다. 그러나 A/G, Na 그리고 Cl은 Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷에서 각각 2.903g/dℓ, 154.1mmol/ ℓ 그리고 112.1mmol/ ℓ 이였고, BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷 A/G, Na 그리고 Cl은 각각 1.816g/dℓ, 150.4mmol/ ℓ 그리고 107.8mmol/ ℓ 로 Nude가 BALB/c가 높았다. Nude 5주령 그리고 18주령 암컷 AST는 각각 67.1IU/ ℓ 그리고 78.17IU/ ℓ 이였으며, BALB/c 5주령 그리고 18주령 암컷 AST는 95.24IU/ ℓ 그리고 61.76IU/ ℓ 로 5주령에는 Nude에 비해 BALB/c가 높았으나, 18주령에는 BALB/c에 비해 Nude가 높았다. Nude 5주령, 10주령 그리고 18주령 암컷 TCHO, PLE는 BALB/c 5주령, 10주령 그리고 18주령 수컷에 비해 유의하게 낮았다.

Table 6-3-18. Abbreviations, units and analysis methods of the biochemistry.

Abbreviation	Full name	Units	Method
AST	Aspartate aminotransferase	IU/ ℓ	UV-Rate
ALT	Alanine aminotransferase	IU/ ℓ	UV-Rate
ALP	Alkaline phosphatase	IU/ ℓ	P-NPP
GLU	Glucose	mg/dℓ	Enzyme
TP	Total protein	g/dℓ	Biuret
BUN	Blood urea nitrogen	mg/dℓ	Urease-UV
CRE	Creatinine	mg/dℓ	Jaffe
PL	Phospholipid	mg/dℓ	Enzyme
TCHO	Total cholesterol	mg/dℓ	Enzyme
TBIL	Total bilirubin	mg/dℓ	Enzyme
Na ⁺	Sodium	mmol/ ℓ	Flame photometer
K ⁺	Potassium	mmol/ ℓ	Flame photometer
Ca ⁺⁺	Calcium	mg/dℓ	OCPC
Cl ⁻	Chloride	mmol/ ℓ	Coulometric titration
A/G	Albumin-globulin ratio	ratio	ALB/(TP-ALB)
CPK	Creatine Kinase	IU/ ℓ	UV-Rate
TG	Triglyceride	mg/dℓ	Enzyme
ALB	Albumin	g/dℓ	BCG
IP	Inorganic phosphorus	mg/dℓ	UV-Rate

Table 6-3-19. Changes of biochemistry in nude and BALB/c male mice with age.

Age(weeks) Items \ Strain	5 week		10 week		18 week	
	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c
AST	77.89 ± 28.87	103.0 ± 19.91 *	58.17 ± 4.946	53.34 ± 10.23	51.99 ± 6.472	51.84 ± 4.716
ALT	51.68 ± 24.70	71.53 ± 14.67 *	37.83 ± 3.741	39.48 ± 7.868	35.39 ± 5.578	44.58 ± 6.785 ***
ALP	462.5 ± 47.37	536.3 ± 49.67 **	275.8 ± 36.98	263.0 ± 28.99	200.8 ± 20.69	199.1 ± 19.52
BUN	24.69 ± 6.891	29.75 ± 4.907	23.02 ± 3.930	24.68 ± 3.960	24.91 ± 4.882	28.82 ± 3.518 *
CREA	0.449 ± 0.051	0.738 ± 0.227 ***	0.501 ± 0.105	0.802 ± 0.179 ***	0.475 ± 0.101	0.818 ± 0.098 ***
GLU	215.9 ± 43.03	261.2 ± 53.66 *	202.5 ± 30.16	208.1 ± 16.68	239.7 ± 48.10	269.7 ± 26.66
TCHO	90.14 ± 8.430	118.6 ± 11.05 ***	71.88 ± 10.85	108.5 ± 9.819 ***	74.21 ± 5.648	115.7 ± 11.23 ***
TBIL	0.050 ± 0.012	0.075 ± 0.014 ***	0.088 ± 0.020	0.100 ± 0.020	0.087 ± 0.020	0.098 ± 0.024
TP	4.821 ± 0.249	5.862 ± 2.491	4.734 ± 0.179	5.223 ± 0.131 ***	5.001 ± 0.337	5.335 ± 0.237 **
ALB	3.535 ± 0.328	3.313 ± 0.228	3.084 ± 0.088	3.292 ± 0.177 ***	3.017 ± 0.108	3.208 ± 0.079 ***
CPK	114.4 ± 25.71	270.9 ± 103.7 ***	88.62 ± 19.01	95.33 ± 101.1	33.51 ± 9.476	44.76 ± 17.12 *
TG	64.24 ± 22.44	247.4 ± 92.67 ***	86.90 ± 19.02	150.2 ± 41.13 ***	45.41 ± 14.74	207.76 ± 63.3 ***
CA	11.18 ± 2.589	10.25 ± 0.670	9.3310.524	9.092 ± 0.503	9.683 ± 0.696	9.327 ± 0.660
IP	12.21 ± 1.284	12.50 ± 3.122	8.584 ± 1.361	9.946 ± 1.093 **	8.231 ± 1.533	9.597 ± 0.891
PLE	219.4 ± 20.90	248.8 ± 28.52 ***	194.1 ± 20.22	258.0 ± 18.76 ***	198.3 ± 10.56	259.9 ± 21.19 *
A/G	2.903 ± 0.907 a)	1.816 ± 0.202	1.882 ± 0.161	1.735 ± 0.303	1.547 ± 0.198	1.517 ± 0.092
Na	154.1 ± 1.832 a)	150.4 ± 2.644	153.8 ± 2.073	154.4 ± 2.392	154.3 ± 2.272	152.8 ± 1.422
K	4.993 ± 0.403	6.353 ± 1.766 *	5.083 ± 0.856	6.230 ± 0.958 **	5.432 ± 1.029	7.214 ± 1.351 ***
Cl	112.1 ± 2.234 a)	107.8 ± 1.545	111.9 ± 1.821	114.9 ± 1.929 ***	113.4 ± 1.788	113.2 ± 2.610

Indicate significant difference when compared with the nude male mice group(***;p<0.001, **;p<0.01, *;p<0.05).

a) Indicate significant difference at p < 0.001 level when compared with the BALB/c male mice.

- 1) Number of animals : nude mice, 16 animals ; BALB/c male mice, 12 animals
- 2) Grapad Software V2.05, 951189s Program, Unpaired t-test

Table 6-3-20. Changes of biochemistry in Nude and BALB/c female mice with ages.

Age(weeks) Strain Items	5 week		10 week		18 week	
	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c
AST	67.10 ± 9.642	95.24 ± 39.26 *	79.58 ± 10.74	78.34 ± 24.58	78.17 ± 12.44 b)	61.76 ± 12.70
ALT	37.33 ± 7.578	56.70 ± 37.09	43.73 ± 8.143	39.81 ± 7.563	42.94 ± 8.643	39.49 ± 15.49
ALP	454.3 ± 33.21	383.1 ± 145.2	258.2 ± 57.40	344.2 ± 112.8 *	195.7 ± 12.27	231.2 ± 34.18 ***
BUN	16.10 ± 3.317	25.39 ± 3.167 ***	21.04 ± 7.437	28.79 ± 5.424 **	32.46 ± 4.98 a)	27.48 ± 5.520
CREA	0.670 ± 0.075	0.635 ± 0.123	0.552 ± 0.172	0.734 ± 0.187 *	0.444 ± 0.155	0.563 ± 0.089 *
GLU	196.8 ± 16.24	210.4 ± 30.87	213.7 ± 35.63	213.0 ± 36.27	214.2 ± 29.62	235.1 ± 56.56
TCHO	61.03 ± 5.528	80.00 ± 8.909 ***	55.76 ± 4.34	80.75 ± 10.01 ***	55.61 ± 6.914	79.37 ± 7.423 ***
TBIL	0.061 ± 0.012	0.058 ± 0.016	0.085 ± 0.028 c)	0.048 ± 0.022	0.045 ± 0.011	0.055 ± 0.010 *
TP	4.742 ± 0.334	4.935 ± 0.214	4.995 ± 0.496	5.083 ± 0.213	5.172 ± 0.274 a)	4.949 ± 0.170
ALB	3.219 ± 0.097	3.273 ± 0.089	3.277 ± 0.166	3.616 ± 0.355 **	3.295 ± 0.104	3.339 ± 0.176
CPK	115.1 ± 25.92	140.4 ± 86.96	110.7 ± 67.19	127.6 ± 35.96	40.63 ± 25.82	87.62 ± 116.2
TG	103.1 ± 21.65	126.1 ± 42.31	79.28 ± 26.04	119.9 ± 29.22 ***	39.38 ± 11.99	95.88 ± 34.17 ***
CA	9.220 ± 0.682	9.588 ± 0.362	9.531 ± 0.372	9.531 ± 0.372	8.778 ± 0.660	8.945 ± 0.311
IP	9.237 ± 0.918	9.368 ± 2.689	9.143 ± 1.506	9.835 ± 1.744	8.196 ± 0.798	8.732 ± 1.181
PLE	160.6 ± 6.205	182.4 ± 25.70 **	149.9 ± 10.14	193.6 ± 19.05 ***	150.9 ± 14.53	172.0 ± 18.48 **
A/G	2.159 ± 0.289	1.985 ± 0.185	1.989 ± 0.372	2.563 ± 0.687 **	1.783 ± 0.215	2.121 ± 0.412 **
Na	146.7 ± 1.231	149.5 ± 2.276 ***	147.4 ± 1.258	146.3 ± 13.79	148.1 ± 1.408	149.5 ± 1.243 *
K	4.378 ± 0.659	5.698 ± 1.194 **	5.378 ± 0.823	5.682 ± 0.651	5.140 ± 0.488	5.956 ± 0.931 **
Cl	110.2 ± 1.030	111.4 ± 2.392	113.4 ± 0.619	114.9 ± 10.34	116.6 ± 1.408	115.6 ± 1.311

Indicate significant difference when compared with the nude female mice group (***; p<0001, **; p<0.01, *; p<0.05).

Indicate significant difference at $p < 0.05$ level when compared with the BALB/c female mice group(a); $p < 0.05$, b); $p < 0.01$, c); $p < 0.001$).

- 1) Number of animals : nude mice, 16 animals ; BALB/c male mice, 12 animals
- 2) Grapad Software V2.05, 951189s Program, Unpaired t-test

라. Nude mouse의 뇨 생화학적 검사

Nude 그리고 BALB/c에 5 주령, 10 주령 그리고 18 주령에 동물을 대상으로 강제채뇨법으로 채취한 신선뇨를 분석한 뇨 생화학적검사 결과는 Table 6-3-21 그리고 Table 6-3-22와 같다. pH 값은 Nude 그리고 BALB/c에 5 주령, 10 주령 그리고 18 주령 암수 공히 주령이 증가함에 따라 약산성에서 중성으로 나타냈다. Protein 값은 암수 모두 Nude는 positive하게 나타났으며, BALB/c는 수컷에 10주령, 그리고 18주령에서 positive하게 나타났다. Ketone body는 수컷 Nude 그리고 수컷 BALB/c에서 주령이 증가될수록 trace 또는 positive를 나타냈다. Nitrogen은 수컷 Nude 그리고 수컷 BALB/c에서 Negative 였다.

Table 6-3-21. Urinalysis in Nude and BALB/c male mice with ages.

Items	Degree	5 weeks		10 weeks		18 weeks	
		Nude	BALB/c	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c
pH	6.0	3	1	2	0	0	0
	6.5	8	2	4	0	1	0
	7.0	1	6	4	4	9	8
	7.5	0	3	1	6	1	6
	8.0	0	0	1	2	1	0
	8.5	0	0	0	0	0	0
Specific gravity	< 1.005	0	0	0	0	0	0
	1.01	0	0	2	1	1	0
	1.02	0	3	2	5	1	1
	1.025	1	6	4	5	2	8
	> 1.03	11	3	4	1	8	5
Protein	-	0	2	0	0	0	2
	+/-	0	1	0	0	0	0
	30	3	4	3	1	0	0
	100	6	4	6	7	2	7
	>300	3	1	3	4	10	5
Glucose	-	7	5	3	6	4	7
	0.1	5	5	2	4	5	2
	0.25	0	2	5	2	2	5
	0.5	0	0	2	0	1	0
	>1.0	0	0	0	0	0	0
Ketonbody	-	5	4	0	0	0	2
	+/-	7	7	4	8	4	6
	+1	0	1	4	3	7	6
	>1	0	0	4	1	1	0
Bilirubin	-	11	9	9	11	12	14
	+1	1	2	3	1	0	0
	+2	0	1	0	3	0	0
	+3	0	0	0	0	0	0
Occultblood	-	12	10	6	10	12	13
	+/-	0	2	2	0	0	1
	+	0	0	4	2	1	0
Urobilinogen	0.1	12	12	12	12	11	10
	1	0	0	0	0	1	4
Nitrogen	-	12	12	12	12	12	14
	+	0	0	0	0	0	0

Protein & Ketonbody unit ; mg/dl, Urobilinogen unit ; Ehrlich/dl
 Glucose unit ; g/dl

Table 6-3-22. Urinalysis in Nude and BALB/c female mice with ages.

Items	Degree	5 weeks		10 weeks		18 weeks	
		Nude	BALB/c	Nude	BALB/c	Nude	BALB/c
pH	6.0	2	0	9	1	2	6
	6.5	6	3	1	2	7	4
	7.0	3	6	1	6	3	2
	7.5	1	2	1	0	0	1
	8.0	0	1	0	2	0	1
	8.5	0	0	0	0	0	0
Specific gravity	< 1.005	0	1	0	0	0	0
	1.01	1	3	0	1	0	1
	1.02	1	3	1	0	0	1
	1.025	1	3	0	7	3	0
	> 1.03	9	2	11	3	9	12
Protein	-	0	3	1	0	0	2
	+/-	2	2	0	0	0	2
	30	1	2	1	9	4	3
	100	8	3	7	2	8	6
	>300	1	2	3	0	0	1
Glucose	-	5	1	10	6	9	7
	0.1	5	4	1	4	2	2
	0.25	2	3	0	0	1	3
	0.5	0	3	0	1	0	2
	>1.0	0	1	1	0	0	0
Ketonbody	-	2	3	0	0	6	4
	+/-	9	4	4	9	6	7
	+1	1	2	7	2	0	2
	>1	0	3	1	0	0	1
Bilirubin	-	5	8	1	1	5	1
	+1	7	3	8	10	7	10
	+2	0	1	0	0	0	3
	+3	0	0	0	0	0	0
Occultblood	-	10	4	11	10	12	14
	+/-	1	2	0	1	0	0
	+	1	6	1	0	0	0
Urobilinogen	0.1	12	12	5	11	10	8
	1	0	0	7	0	2	6
Nitrogen	-	12	11	8	11	12	11
	+	0	1	4	0	0	3

Protein & Ketonbody unit ; mg/dl, Urobilinogen unit ; Ehrlich/dl
 Glucose unit ; g/dl

마. T 세포 그리고 B 세포의 분포조사

Nude 및 BALB/c 마우스 10주령에서 T 세포 그리고 B 세포 분포 비율을 측정한 결과는 Table 6-3-23과 같다. B-cell은 Nude 암·수에서 각각 78.97% 그리고 75.98% 이였고, BALB/c 암수에서는 각각 52.16% 그리고 54.12% 로 Nude 에서 매우 유의하게 높은 비율을 보였다. T-cell은 Nude 암수에서 각각 6.86% 그리고 7.85% 이였고, BALB/c 암수에서는 각각 33.88% 그리고 33.5% 로 BALB/c에서 매우 유의하게 높은 비율을 보였다.

Table 6-3-23. Comparison of spleen B & T-cell in nude and BALB/c mice (FACs anlysis).

Type of cells	Anti - Ig ⁺ cells				Anti-Mouse Thy1.2 ⁺ cells			
	Nude		BALB/c		Nude		BALB/c	
Strtain	Nude		BALB/c		Nude		BALB/c	
Sex	male	female	male	female	male	female	male	female
% cell (positive/ total cells) (Mean±SD)	78.9±2.9 a)	75.9±3.5 b)	52.2±2.2	54.1±1.9	6.9±1.01	7.8±0.82	33.9±3.4 c)	33.5±5.5 d)

- a) Significantly different from the BALB/c male mice at p < 0.001 level.
- b) Significantly different from the BALB/c female mice at p < 0.001 level.
- c) Significantly different from the Nude male mice at p < 0.001 level.
- d) Significantly different from the Nude female mice at p < 0.001 level.
- 1) Number of animals : 10 animals/group.
- 2) Grapad Software V2.05, 951189s Program, One-way ANOVA

바. 번식성적

Nude, BALB/c 그리고 BALB/c heterogygote(BALB/c nu/+) 마우스를 성숙이 이른 10 주령 동물을 상시동거에 의해 얻어진 번식성적 결과는 Table 6-3-24와 같다. Nude, BALB/c 그리고 BALB/c nu/+(이하 Hetero)에 1산차에 임신율을 보면, 각각 96.1%, 100% 그리고 95.9%이였으며, 평균산자수는 Nude,

BALB/c 그리고 Hetero에 1산차에서 각각 6.17마리, 5.22마리, 그리고 4.5마리였다. 이유율은 Nude, BALB/c 그리고 Hetero에 1산차에서 각각 91.6%, 91.3% 그리고 92.9%로 포유능력 높았다. 분만간격은 Nude, BALB/c, 그리고 Hetero에서 임신율은 각각 26.5일, 22.6마리 그리고 29.2일로 나타냈다.

Table 6-3-24. Reproductive performance in BALB/c, BALB/c nu/+, and Nude mice.

Items	Parity Strain	1 parity	2 parity	3 parity	4 parity	5 parity	6 parity
Parturation rate (%)	BALB/c	100	100	100	100	96.6	89.7
	Hetero	95.9	91.8	85.7	75.0	47.9	13.3
	Nude	96.1	92.2	88.2	80.4	62.8	49.0
Litter size (No. of animals)	BALB/c	4.5 ± 2.08	4.41 ± 2.17	4.75 ± 1.82	4.78 ± 2.07	4.96 ± 2.06	4.60 ± 1.94
	Hetero	5.22 ± 2.74	6.00 ± 2.62	4.63 ± 2.27	4.74 ± 2.19	4.55 ± 1.54	4.25 ± 1.75
	Hetero and Nude	6.17 ± 2.48	7.07 ± 3.17	5.19 ± 2.28	5.74 ± 2.06	6.00 ± 2.66	5.03 ± 2.62
	Nude	2.91 ± 1.53	2.91 ± 1.53	2.52 ± 1.67	2.74 ± 1.67	2.72 ± 1.99	2.41 ± 1.87
Sex ratio (male/female) <Total No. of male animals/ Total No. of female animals>	BALB/c	1.82/2.17 <51/61>	2.32/2.28 <58/57>	2.4/2.8 <60/70>	2.1/2.75 <42/55>	2.23/2.88 <58/75>	2.13/2.71 <51/65>
	Hetero	2.59/2.44 <106/100>	3.0/3.15 <117/123>	2.37/2.28 <102/98>	2.21/2.86 <64/83>	2.22/2.96 <51/68>	2.06/2.44 <33/39>
	Nude	1.09/1.82 <49/82>	1.95/2.12 <80/87>	1.39/1.47 <50/53>	1.43/1.51 <50/53>	1.41/1.56 <38/42>	1.78/1.39 <32/25>
Weaning rate (%)	BALB/c	91.6 ± 18.7	87.1 ± 31.4	92.0 ± 26.7	79.4 ± 40.6	95.0 ± 20.1	100
	Hetero	91.3 ± 25.1	99.4 ± 3.8	94.1 ± 17.2	97.2 ± 16.7	99.0 ± 4.4	100
	Nude	92.9 ± 23.8	99.1 ± 3.9	96.3 ± 16.8	99.6 ± 2.5	94.7 ± 14.1	100
Parturation interval (day)	BALB/c	22.6 ± 2.18	28.5 ± 11.5	23.3 ± 4.53	30.6 ± 10.4	29.2 ± 9.8	28.0 ± 9.0
	Hetero	29.2 ± 9.92	37.3 ± 13.1	41.8 ± 16.9	34.6 ± 14.9	31.8 ± 12.6	27.3 ± 9.6
	Nude	26.5 ± 8.04	37.2 ± 11.4	35.2 ± 11.0	32.7 ± 10.3	29.1 ± 10.3	29.4 ± 12.4

1) 50 Pairs of Nude mice were mated, 50 Pairs of Hetero mice were mated, and 30 Pairs of BALB/c mice were mated.

3. 새로운 질환모델 동물의 확립과 연구

가. 체 중

SAMP8와 SAMR1의 암수에서 가령에 따른 체중의 변화는 5주령에서 SAMP8 수컷은 24.15 ± 1.5 g, 암컷은 20.39 ± 0.99 g이고, SAMR1 수컷은 24.87 ± 1.87 g, 암컷은 21.6 ± 0.64 g 이었다. 10개월령에서 SAMP8 수컷의 체중이 감소하기 시작한 반면 SAMR1 수컷의 체중은 완만한 증가를 나타내었고, 13개월령에서의 SAMP8 수컷의 체중은 36.53 ± 6.01 g이고 SAMR1 수컷의 체중은 40.38 ± 6.74 g이었다. 암컷은 거의 동일하였다.

나. 장기중량

SAMP8와 SAMR1 암수의 개월령에 따른 각각의 장기 중량결과에 의하면 뇌와 뇌하수체의 중량은 SAMR1이 더 무거웠고, 두 strain에서 모두 암컷이 무거웠다. SAMR1과는 달리 SAMP8의 수컷 흉선 중량은 3개월령에 비해 13개월령에서의 감소가 나타났고 13개월령의 SAMR1 수컷 흉선보다도 가벼웠다. 수컷에 있어서 신장은 SAMP8가 조사된 모든 월령에 있어서 SAMR1보다 가벼웠고, 이와는 반대로 암컷에서는 SAMR1이 더 작았다. 정소는 조사된 모든 월령에 있어서 SAMP8가 SAMR1 보다 더 무거웠을 뿐만 아니라 가령에 따른 감소도 나타나지 않았으나 난소는 두strain 모두 가령에 따라 감소하였다.

다. 지질과산화

신장에서의 지질과산화는 암수 및 두 strain간의 차이가 없었고 가령에 따른 유의성 있는 변화도 없었다.

라. Protein - bound -SH 과 GSH 함량

신장에서의 GSH와 protein-bound -SH는 가령에 따른 유의성 있는 변화가 없었으며 strain간 및 암수간의 차이도 없었다.

마. SOD 활성

신장의 세포질액에서의 SOD활성은 수컷은 가령에 따라 증가 한 반면 암컷은 증가하지 않았으며 두 strain간의 차이는 없었다.

바. Catalase 활성

가령에 따른 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았으며 5개월령과 7개월령에서 SAMP8 가 SAMR1보다 catalase활성이 높았다. 두 strain에서 수컷이 암컷보다 높았다.

사. 수동회피실험

Acquisition trial: 어두운 상자로 들어가는데 걸리는 시간을 보면 SAMR1에서 평균 106.6초, SAMP8에서 평균 53.8초로써 SAMP8이 SAMR1보다 빨리 어두운 상자로 들어갔다.

Retention test: 전기자극을 준 후, 다음날 다시 전실에 넣었을 때, 전기자극을 받은 것을 기억하는지 여부를 알아보았다. 결과 두 strain 모두에 있어 유의성 있는 차이는 없었다.

아. 능동회피실험

능동회피는 소리와 빛 자극만이 가해질 때, 즉 그러한 전 자극만 있고 전기자극이 시작되지 않았을 때 다른 쪽 상자로 도피하는 경우를 회피에 성공한 것으로 보았다. 전체적으로 SAMR1의 회피율이 SAMP8보다 높게 나타났으나, 5개월령을 제외하고는 유의성있는 차이는 나타나지 않았다. 5개월령의 SAMR1은 훈련 일수에 따라 점차적으로 회피 정도가 증가($P < 0.001$)하는 반면, SAMP8은 증가의 양상을 보이지 않았다.

제 4 절 고찰 및 결론

1. 표준화된 양질의 SPF 실험동물 육종기술 확립 (II)

가. 고찰

미생물 모니터링과 동물실 환경의 결과는 본 실험실의 동물실 운영이 충분한 barrier system 하에서 운영된다는 것을 시사하고 있다. 또한 각 동물종과 strain별 번식성적, 성장 등을 고려해볼 때 양질의 실험동물임이 밝혀졌다. 이는 각종 혈액생화학치와 각종 분석치에서도 잘 나타나 있다.

나. 결론

본 실험실의 육종팀에서 생산되는 실험동물은 양질의 SPF 동물로 각종 실험과 시험에 있어 좋은 재로로 사용될 수 있다.

2. Nude mouse의 육종기술 확립

가. 고찰

실험동물을 이용하는 *In vivo* 실험에 있어서 고려해야 할 사항 중에 하나는 실험에 사용된 동물이 정상적인 상태에서 어떤 특성을 지니고 있는가에 대한 기초자료가 확립되어 있어야만, 어떤 실험결과를 해석하는데 있어 유효하게 작용을 한다는 보고가 있다. 이를 위해 본 실험을 실시하였으며 본 실험에서 얻어진 결과를 토대로 고찰하고자 한다.

본 실험의 결과에서 얻어진 체중 변화는 4주령에 BALB/c 마우스와 비교하였을 때에 차이를 보이지 않았으나 5주령 이상에서는 유의한 차이를 보였다. 또한 일본 Charles River사에서 사육된 8주령 BALB/c nude 마우스에 측정 결과, 암·수컷의 평균체중이 각각 19g 그리고 23g 이였고, 일본 SLC사에서 사육된 10주령 BALB/c nude 마우스에서 암·수컷의 평균체중이 각각 $14.5 \pm 1.0g$ 그리고 $19.7 \pm 2.2g$ 이였다. 본 실험에 측정결과는 10주령 암·수컷의 평균체중이 각각 $19.5 \pm 1.307g$ 그리고 $22.57 \pm 1.372g$ 이였으나, 일본 Charles River사에 8주령

동물과 비교한 결과보다는 적었으나, 일본 SLC사에서 사육된 10주령 BALB/c nude 마우스보다는 다소 차이가 있었다. 또한 BALB/c 마우스에 체중측정 결과는 일본 Charles River사에서 사육된 10주령 BALB/c nude 마우스와 비교했을 때에는 암·수컷의 평균체중이 각각 21.8g 그리고 26g 이었으나, 본 실험의 결과는 10주령 암·수컷의 평균체중이 각각 $19.5 \pm 1.307g$ 그리고 $22.57 \pm 1.372g$ 로 본 결과의 체중이 암·수 모두에서 높았다.

장기중량을 보면, 일본 SLC사에서 사육된 10주령 BALB/c계 암(수)컷 Nude 마우스에서 간 0.681g(0.937g), 폐 0.108g(0.130g), 비장 0.072g(0.089g), 정소 0.117g(0.117g)이었으며, 본 실험에 10주령 BALB/c nude 마우스에 결과는 간 1.048g(1.309g), 폐 0.143g(0.150g), 비장 0.100g(0.102g), 정소 0.082g(0.086g)으로 정소를 제외한 다른 장기의 무게는 본 실험에 결과가 무거웠다. 한편 BALB/c 마우스를 보면, 일본 Charles River사에서 사육된 10주령 BALB/c 마우스에 실험결과는 암(수)컷 각각 간 0.91g(1.22g)이었고, 폐 0.145g(0.161g), 비장 0.094g(0.087g), 정소 0.098g(0.094g)이었으며, 본 실험의 결과는 암(수)컷 각각 간 1.039g(1.491g), 폐 0.164g(0.175g), 비장 0.113g(0.108g), 정소 0.082g(0.084g)로 본 실험의 결과와 약간에 차이가 있었다. 이는 부검자에 따른 해부조건, 그리고 동물의 체중에 차이 등이 이러한 상이한 결과를 보인다고 사료되며, 특히 Nude 암·수 마우스 비장에서 5주령, 10주령에는 BALB/c 마우스에 비교해 무게가 유의하게 적었으나, 18주령에서는 암·수 모두 유의하게 증가했음을 볼 수 있다. 이는 lymph node에 결손에 따른 immune system이 spleen에서 그 기능이 증진됨에 따라 무게가 증가되었을 것으로 추론되지만 장기에 무게와 면역증진와는 큰 상관관계가 없으리라 사료된다.

본 실험에 B-cell 분석 결과는 Nude 마우스는 암수 각각 75.98%와 78.97% 이었고, BALB/c는 암수 각각 54.12%와 52.12%로 Nude 마우스가 B-cell 기능이 항진 되었음을 알 수 있고, T-cell이 차지하는 비율은 Nude 마우스는 암수 각각 7.85%와 6.86%였으나, BALB/c는 암수 각각 33.50%와 33.88%로 비교하여 볼 때, 누드마우스에서 T lymphocyte는 정상적으로 생성이 되지 않았다. 이는 논문에서 T-cell이 결핍된다는 결과 보고와 같다. 그러나 누드마우스는 실제적으로

T-cell이 없지는 않으며, BALB/c 유전적 배경을 갖는 성숙한 누드마우스에 경우 2~4%정도의 T-cell 를 갖는다는 보고와 거의 같다. 따라서 본 실험실에서 육종된 Nude 마우스는 면역계통에 질환모델동물로써 Spontaneously T-cell이 결핍으로 인한 면역이 약화로 사람에게 각종 종양 이식에 유용하게 이용될 수 있다고 사료된다.

혈액학적 결과는, 일본 Charles River사(95년)에서 사육된 10주령 BALB/c nude 마우스에 결과로 암·수 각각 WBC $6.3, 5.9 \times 10^3/\text{mm}^3$, RBC 8.69, $9.01 \times 10^4/\text{mm}^3$, PLT 82.4, $85.0 \times 10^4/\text{mm}^3$ 이었고, 일본 SLC 사에서 사육된 10주령 BALB/c Nude 마우스에 결과는 암·수 각각 WBC 1.0, $1.1 \times 10^3/\text{mm}^3$, RBC 9.46, $8.95 \times 10^4/\text{mm}^3$ 이었다. 그리고 본 실험의 결과는 암·수 각각 WBC 3.68, $3.04 \times 10^3/\text{mm}^3$, RBC 9.8, $9.75 \times 10^4/\text{mm}^3$, PLT 96.5, $98.1 \times 10^4/\text{mm}^3$ 이였다. 다른 기관에서 분석한 혈액학적 수치를 비교해 볼 때, 본 실험 결과와 차이를 보인 항목은 WBC로 본 실험에 결과가 낮았으며, 다른 항목은 거의 같았다. 이는 일본 Charles River사에 동물보다 질병에 대한 저항성이 약했으나, 일본 SLC 사에 동물보다는 높았다고 사료된다. BALB/c 마우스에 혈액학적 분석치를 보면, 일본 Charles River사에서(85년) 사육된 10주령 BALB/c 마우스는 암·수 각각 WBC $3.64, 3.28 \times 10^3/\text{mm}^3$, RBC 10.25, $10.89 \times 10^4/\text{mm}^3$, PLT 87.3, $94.8 \times 10^4/\text{mm}^3$ 이였으나, 본 실험 결과는 암·수 각각 WBC 5.49, $4.48 \times 10^3/\text{mm}^3$, RBC 9.65, $9.81 \times 10^4/\text{mm}^3$, PLT 90.2, $76.6 \times 10^4/\text{mm}^3$ 이였다. 이 두 실험의 결과에서, 본 실험의 결과와 차이를 보인 항목은 WBC로 본 실험 결과가 높았다. 다음으로 백혈구 백분율을 보면, 일본 Charles River사(95년)에서 사육된 10주령 BALB/c nude 마우스는 Lymphocyte는 암·수 각각 48.8%와 43.5%, Neutrophil는 암·수 각각 51.2%와 44.5%였으나, 본 실험 결과는 Lymphocyte는 암·수 각각 73.62%와 74.47%, Neutrophil는 암·수 각각 24.62%와 24.93%로서 많은 차이가 보였다. 또한 일본 Charles River사에서 사육된 10주령 BALB/c 마우스와 비교했을 때에는 Lymphocyte는 암·수 각각 84.4%와 81.6%였고, Neutrophil는 암·수 각각 18.3%와 16.2%였으며, 본 실험의 결과는 Lymphocyte는 암·수 각각 88.47%와 85.07%, Neutrophil는 암·수 각각 10.93%와 14.27% 로 거의 같았다.

혈액생화학적 검사치로 일본 SLC사에서 사육된 10주령 BALB/c nude 마우스 결과로는 AST 암·수 각각 67, 62 I.U/ℓ, ALT 16, 28 I.U/ℓ, GLU 137, 106 mg/dℓ, 그리고 TP 4.9, 4.6 g/dℓ 이었으며, 본 실험의 결과는 AST 암·수 각각 79.58, 58.17 I.U/ℓ, ALT 43.73, 37.83 I.U/ℓ, GLU 213.7, 202.5 mg/dℓ, 그리고 TP 4.995, 4.734 g/dℓ 이었다. AST와 TP는 두 실험의 결과치가 유사하였으나, ALT와 GLU는 상이한 결과를 보였다. 또한 일본 Charles River사에서 사육된 10주령 BALB/c 마우스에 결과로는 암·수 각각 AST 51.5, 39.6 I.U/ℓ, ALT 24.8, 19.5 I.U/ℓ, GLU 131, 151 mg/dℓ, 그리고 TP 4.2, 4.6 g/dℓ 이었으며, 본 실험의 결과는 AST 암·수 각각 78.34, 53.34 I.U/ℓ, ALT 39.81, 39.48 I.U/ℓ, GLU 213.0, 208.1 mg/dℓ, 그리고 TP 5.083, 5.223g/dℓ 이었다. 이는 본 실험의 Nude 마우스에 결과와 마찬가지로 AST, ALT, GLU, TP 모든 항목에서 본 실험 결과가 높았다. 이는 혈액학 및 혈액생화학적 분석치에 영향을 미치는 요인들로 동물계통, 주령, 성별, 사료, 질병요인, 사육방법, 육종장소, 샘플 채취시간, 샘플저장, 마취방법, 절식시간, 채혈자, 채혈부위, 채혈방법, 혈액의 희석방법, 분석방법 및 분석기기 등 여러 가지 요인에 의해 차이가 있다는 보고들이 있으며, 이러한 약간에 차이는 위에 요인으로 기인되는 것으로 사료된다.

노분석은 실험동물을 위한 분석기기의 미비로 사람에서 사용하는 기기를 사용하는데, 분석치에서 나오는 수치를 사람의 결과와 같이 비교를 하면 큰 오류를 범하게 된다.

노성상에 관한 검사는 신장의 장애, 신장 기능의 이상을 감별할 수 있는 중요한 지표가 된다. 그리고 설치류인 랫트에서 비중의 범위는 1.040~1.076, pH의 범위는 7.3~8.5, 노단백은 30mg/dℓ이하를 정상적이라고 보고하였다. 일본 Charles River사에서 보고된 10주령 BALB/c 마우스에 노분석 결과로 pH는 6~7, urin protein 함량은 30마리 전체에서 30mg/dℓ이하, Bilirubin은 negative를 나타냈다. 본 결과에서의 BALB/c는 이 범위에 거의 들었으나, Nude 마우스는 pH, 비중, Bilirubin은 정상적인 범위에 들었으나, 그 외에 urin protein, ketonbody, occultblood는 정상치의 범위를 벗어나, 면역이 결핍으로 인한 결과로 사료된다. 또한 신세포 종양주를 이식하여 tumor의 발생이 현저하게 높은 것

을 보면, 신장에 abnormalities가 간접적으로 있음을 시사한다.

누드마우스에 번식·육종하기 위해서는 크게 모체 유지집단(foundation stocks), 종축 확장집단(expansion colonies), 생산집단(production colonies)로 나뉘는데, 같은 SPF 조건하에서 생산된 Nomura 등에 번식성적 즉 임신율 95.2%, 산자수 6.3마리였고, 본 실험의 결과는 임신율 95.9%, 산자수 6.17마리로 거의 같았다.

나. 결 론

기초 data 제공을 위한 Nude 마우스에 체중측정, 장기중량측정, T-cell 그리고 B-cell의 분포, 혈액학, 혈액생화학검사, 백혈구 백분을 감별, 노생화학 분석 그리고 번식성적 등의 시험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 체중, 장기중량은 정상적인 발달을 보였으며, T-cell 그리고 B-cell의 분포는 T-cell의 형성부전 및 B-cell에 기능이 항진되었으며, 그리고 혈액학, 혈액생화학, 노 생화학적 결과는 각각의 parameter에서 일반적인 마우스보다 면역에 결핍된 결과로 개체내 존재하는 저항력이 다소 떨어졌다. 마지막으로 번식성적은 환경적·유전적·미생물학적 콘츰롤이 잘 되고 있는 외국에 타기관에서 사육되고 있는 Nude 마우스에 비하여 번식성적이 떨어지지 않았다. 따라서 본 실험실에서 육종되고 있는 Nude 마우스는 정상적인 생리적인 성장, 무모, 무흉선, T-cell의 결핍, B-cell의 기능항진, 정상적인 번식·육종 등 제특성을 발현하는 것으로 결론 내린다.

3. 새로운 질환모델 동물의 확립과 연구

가. 고 찰

SAM의 평균수명은 P계가 9.7 ± 0.12 개월, R계가 13.3 ± 0.22 개월이다. 노화도(grading score of senescence)는 행동의 민첩성, 피부의 광택, 거칠음, 탈모, 눈 주위의 병변 및 백내장, 척추의 만곡 등을 정도의 경중에 따라 점수를 주어 마우스의 노화 정도를 표현하는 방법이다(Hosokawa 등, 1984). 8개월령에서 노화도는 R계가 평균 3.21이고 P계에서는 평균 6.07이다. 그러나 본 실험에 사용한 SAMP8의 노화도는 3.98로 P계 평균에 비해 낮은 노화도를 나타내

는 것으로 알려져있다(Takeda 등, 1991). 체중은 일반적으로 가령에 따라 R계가 P계보다 무거우나 SAMP6는 SAMR1보다 더 무겁다. 그러나 이같은 결과는 conventional 조건하에서 사육하면서 보고된 결과이며 SPF조건하에서 사육되었을 때에는 노화도가 유의성 있게 낮으며 전신성 아밀로이드침착증, 폐렴 등이 관찰되지 않는 등의 차이점들이 보고되었다(Akio 등, 1987). 본 실험에 있어서 사용된 동물은 SPF조건하에서 육종되고 사육된 것으로 체중은 10개월령 이후에 수컷에서 SAMR1와 SAMP8간 차이를 보이고 있고 암컷은 두 strain간의 차이를 보이지 않았다. 장기증량의 경우, 뇌의 증량은 SAMP8가 더 가벼웠는데 이는 SAMP8가 SAMR1에 비해 학습능력과 기억력의 감퇴가 심하다는 보고(Yagi 등, 1988)와 관련이 있는 것으로 사료된다. 뇌하수체는 호르몬의 증추로서 SAMP8와 SAMR1의 뇌하수체 증량이 차이가 나는 것으로 보아 호르몬 조절기능에 있어서의 차이가 있을 것으로 여겨진다. SAMP8의 수컷 흉선증량이 13개월령에 감소한 것은 SAM에서 노화의 촉진은 흉선과 부신의 이상에서 시작하며 병리조직학적 관찰에서 SAMP8 흉선에서 가령에 따라 림프구가 감소하는 것이 관찰되었다는 보고와 관련이 있는 것으로 여겨진다(Akio 등, 1987).

본 실험에 있어서 신장에서의 지질과산화는 SAMR1와 SAMP8간에 유의성 있는 차이가 없었으며 가령에 따른 증가도 없었다. 이같이 지질과산화가 다르게 나타나는 것은 과산화지질을 측정하는 TBA (thiobarbituric acid) 법에서는 malondialdehyde (MDA) 를 측정하여 지질과산화를 조사하는데 MDA는 산화지질의 최종분해산물이 아니고 aldehyde dehydrogenase등의 효소에 의해 이산화탄소로 분해되어 체외로 배출되며(Siu와 Draper, 1982), 또한 지질이 과산화 되기까지는 여러 가지의 항산화계 요소들이 관여하기 때문으로 여겨진다. Liu와 Mori(1993)는 SAM에 있어서 뇌와 간의 GSH는 가령에 따라 감소한다고 하였고, Uejima 등(1993)은 SAM의 간, 신장, 폐, 혈중에 있어서 가령에 따른 감소나 P계와 R계간의 차이가 없었으며 16개월령에 있어서 눈에서 GSH이 감소하였다고 보고했다. 본 실험에서는 신장의 GSH은 가령에 따른 차이가 없었다. 가령에 따른 GSH의 변화와 노화에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않은

상태로 조직 내에서 GSH의 농도는 노화의 지표로 유용 할 것이라는 보고 (Naryshkin 등, 1981)가 있는가 하면 조직내 GSH의 농도를 생물노화의 지표로 보기에에는 부족하다는 의견도 있다. 이의 해결을 위해서는 GSH과 관련된 대사 계에 대한 많은 연구가 필요하다. Nomura 등(1989)은 12개월령된 SAM의 간에서 SAMP8가 SAMR1에 비해 낮은 수준의 SOD활성을 나타냄을 보고하였다. 그러나 Liu 와 Mori(1993)는 SAMP8의 간에서 가령에 따라 SOD활성이 증가함을 보고하였다. 본 실험에서 관찰된 SOD는 SAMP8와 SAMR1간의 차이가 없었으며 수컷은 가령에 따른 변화가 없었으나 암컷은 가령에 따라 유의성있게 증가하였다.

Ji 등(1990)은 랫트간의 균질액에서 Lopez 등(1994)은 hairless 마우스의 피부에서 가령에 따라 catalase활성의 변화가 없음을 보고하였고, Matsuo 등(1992)과 Carrillo 등(1992)은 랫트 수컷의 간에서 catalase활성이 감소 하였으며 28개월령에서 암수간의 차이가 있었고 가령에 따른 변화 보다는 성에 의존적이라고 하였다. 본 실험에서 SAM의 신장에서 catalase는 가령에 따른 변화는 관찰되지 않았으며 5개월령과 7개월령에서 두 strain간의 차이가 있었고 암수간의 차이가 있었다.

Matsuo 등(1992)은 랫트에서 전체적인 항산화력은 노화하는 동안에 큰 변화는 없으며 일부 항산화계 요소의 감소는 다른 요소의 증가에 의해 보상되어진다고 하였고 Carrillo 등(1992)은 노화에 따른 항산화계 효소들은 변화가 없으며 성에 따른 차이가 있다고 주장하였다. 또한 Lopez 등(1994)은 hairless마우스의 피부의 노화는 조직의 항산화력의 감소에 의한 것이 아니며 radical stress의 지속적인 축적 때문 일 것이라고 하였다. 본 실험에서 관찰된 SAMP8와 SAMR1에서의 항산화력은 가령에 따라 큰 변화가 없었으며 두 strain간에도 차이가 없었다. 단지 신장의 SOD와 catalase에 있어서는 성차가 관찰되었다. 이 같은 사실로 미루어볼때 SAMP8는 SAMR1와 호르몬체계에서의 차이가 예견된다. 본 실험에는 항산화계의 효소중 일부만을 관찰하였고 13개월령보다 더 노화된 동물을 사용하지도 않았고 장기도 신장만을 대상으로 하였기 때문에 아직 SAMP8와 SAMR1의 항산화력의 정확한 변화는 알수없다. 그러나 신

장에 있어서 항산화력은 연령에 따른 큰 변화는 없었으며 성에 의존적인 차이를 보였다. 수동회피 시험시 전기자극을 받기 전에 밝은 곳에서 어두운 곳으로 이동하는데 걸린 평균시간은 SAMR1이 SAMP8보다 2배정도 길었다. 이 시간은 자발적으로 어두운 곳으로 이동한 마우스들의 경우만 계산한 것인데 실제로는 SAMR1의 경우 전기 자극을 주기전에 밝은 상자에 넣었을 경우 3분이 되도록 어두운 상자로 들어가지 않는 마우스가 많았다(이 경우 실험에서 제외시킴). 그러나 SAMP8의 경우는 대부분이 1분 이내에 어두운 상자로 이동하였다. 이것은 SAMP8이 정서불안과 낮선 곳에 대한 두려움이 없다는 보고와 연관시켜 생각할 수 있겠다. 또한 이러한 두 strain간의 차이를 고려하여 실험계획을 세워야 할 것 같다. 또한 Takeda 등(1981, 1991)의 보고를 보면, 능동 회피보다는 수동 회피에서 SAMP8의 특성이 나타난다고 보고하였으나, 본 실험에서는 능동 회피에서 차이를 발견했다. 그 이유는 첫째, 본 연구실에서는 마우스를 개별 cage에서 사육하였으며, 둘째, 수동 회피 기구의 규격 차이(Miyamoto 등, 1986)로 생각되며, 셋째, 능동 회피 실험 기구의 자동성 여부에 기인한다고 생각된다. 본 연구실에서는 현재 연구실에서 보유하고 있는 수동 회피 실험 기구를 사용하여, SAMP8의 특성을 알아보기 위해서 수동 회피 실험의 시간을 10분간 실시하였을 때, SAMP8이 SAMR1에 비해 유의성있는 기억 능력의 감소 현상을 관찰할 수 있었다(결과는 제출하지 않았음). 능동 회피 실험의 경우, SAMR1과 SAMP8 모두 3, 13개월에서는 기억력의 향상을 보이지 않았으나 5개월령에서는 유의성있는 기억력의 차이가 관찰되었다. 이것은 3개월령에서는 SAMR1이 아직 완전히 성숙되지 않았고, 13개월령에는 SAMR1에서도 노화가 일어나기 시작한 때문으로 사료된다.

나. 결 론

본 연구 결과에 의하면 Taketa로부터 분양받은 한국화학연구소의 SAMP8은 SAMR1과 비교해볼 때, 같은 연령에 있어서 기억력이 유의성있게 감소하는 결과와 기타 항산화능이 저하되었다. 따라서, SAMP8은 인간의 질환과 유사한 기전을 가진 노화모델 동물로써 현대 문명의 이기 속에 부산물로

발병되는 질환의 치료 및 예방을 위한 생명공학 연구에 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

5. 참고문헌

- (1) Boven Z., and Winograd B. (1991) "The nude mouse in oncology research CRC press"
- (2) Fogh J. and Giovanella. B.C. (1978) "The nude mouse in experimental and clinical research" Academic Press
- (3) Hua-Kang Wu, Hisamaru Hirai, Ken Inamori, Kiyoshi Kitamura and Fumimaro Takaku (1992) Anti-tumor Effects of Interleukin-4 and Interleukin-5 against Mouse B Cell Lymphoma and Possible Mechanisms of Their Action, *Jpn, J, Cancer Res.* 83:200-210, February
- (4) Institute of Laboratory Animal Resources, (1969) "Rodents: Standards and guidelines for the breeding, care and management of laboratory animal." *Natl. Acad. Sci, WashingtonD.C.*
- (5) Masayoshi Kojima, Fumitaka Kikkawa, Hidenori Oguchi, Koji Tamakoshi, Osamu Maeda, Nobuhiko Suganuma and Yutaka Tomoda (1994) Potentiation of cis-Diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platinum(II) by Amphotericin B in BALB/c Nude Mice Bearing Human Ovarian Carcinoma cells, *Jpn, J, Cancer Res.* 85:1159-1164, November
- (6) Motoo Saito, Osamu Ichimura, Motoyuki Kataoka, Yoichiro Moriya, Kouko Ueno, Yutaka Sugawara, Masaki Nanjo, and Nakao Ishida, (1986) Pronounced antitumor effect of LAK-line cells induced in the peritoneal cavity of mice after intraperitoneal injection of OK-432, a killed Streptococcal preparation, *Cancer Immunol Immunother* 22:161-168
- (7) Pantelouris E.M. (1973) Athymic development in the mouse. *Differentiation* 1:437- 450
- (8) Pantelouris E.M. and Hair J. (1970) Thymus dys genesis in nude(nu/nu) mice, *J. Embryol Exp. Morphol.* 24:615~623,

- (9) Tateshi kataoka, 2Naomi Matsuura, Fujiko Oh-hashii, and Yasuji Suhara (1985) Treatment Regimen and Host T-Cell-dependent Therapeutic Effect of Interferon in Mouse Solid Tumors¹, *Cancer Research* 45:3548-3553, August
- (10) Akio, S., T. Ryoichi, O. Yoshiaki, M. Takao. 1987. Histopathologic observations on the senescence-accelerated mice(SAM) reared under specific pathogen free conditions. *Acta. Pathol. Jpn.*, 37(9):1465-1475.
- (11) Britton, C. and A. C. Maehly. 1955. Assay of catalase and peroxidase, *Enzymology*, 2:764-775.
- (12) Carrillo, M. C., S. Kanai, Y. Sato and K. Kitani. 1992. Age-related changes in antioxidant enzyme activities are region on organ, as well as sex, selective in the rat. *Mech. Ageing Dev.*, 65(2-3):187-198.
- (13) Hosokawa, M., R. Kasai, K. Higuchi, S. Takeshita, K. Shimizu, H. Hamamoto, A. Honma, M. Irino, K. Toda, A. Matsumura. 1984. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.* 26(1):91-102.
- (14) Ji, L. L., D. Dillon and E. Wu. 1990. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.*, 258:R918-923.
- (15) Liu, J. and A. Mori. 1993. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM):a compraison with ddY mice. *Mech. Ageing Dev.*, 71(1-2):23-30.
- (16) Lopez, T. M., Y. Shindo and L. Paker. 1994. Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative average in murine epidermis and dermis. *J. Invest. Dermatol.*, 102(4):476-480.
- (17) Matsuo, M., F. Gomi, M. M. Dolley. 1992. Age-related alteration in antioxidants capacity and lipid peroxidation on brain, liver and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech. Ageing Dev.*, 64(3):273-292.
- (18) Miyamoto, M., Y. Kiyota, N. Yamazaki, A. Nagaoka, T. Matsuo, Y. Nagawa and T. Takeda. 1986. Age-related changes in learning and

memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiology and Behavior*, 38:399-406.

- (19) Naryshkin, S., L. Miller, R. Lindeman and C. A. Lang. 1981. Blood glutathione : A biochemical index of human aging. *Fed. Proc.*, 40:179.
- (20) Nomura, Y., B. X. Wang, S. B. Qi, T. Namba and S. Kaneko. 1989. Biochemical changes related to aging in the senescence-accelerated mouse. *Exp. Gerontol.* 24:49-55.
- (21) Oyanagui, Y. 1948. Revaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 42:290-296.
- (22) Sedlak, J. and R. H. Lindsay. 1968. Estimation of total protein-bound and non protein-bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25:192-196.
- (23) Siu, G. M. and H. H. Draper. 1982. Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids*, 17:349-355.
- (24) Takeda, T, M. Hosokawa, S. Takeshita, M. Irino, K. Higuchi, T. Matsushita, Y. Tomita, K. Yasuhira, H. Hamamoto, K. Shimizu, M. Ishii and T. Yamamuro. 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.*, 17:183-194.
- (25) Takeda, T., H. Hosokawa and K. Higuchi. 1991. Senescence-accelerated mouse(SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 39:911-919.
- (26) Takeshita, S., M. Hosokawa, M. Irino, K. Higuchi, K. Shimizu, K. Yasuhira and T. Takeda. 1982. Spontaneous age associated amyloidosis in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.*, 20:13-23.
- (27) Uchiyama, M. and Mihara M.. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, 86:271-278.
- (28) Uejima, Y., Y. Fukuchi, S. Teramoto, R. Tabata and H. Orimo. 1993. Age changes in visceral content of glutathione in the senescence accelerated mouse(SAM). *Mech. Aging Dev.*, 67:129-139.

- (29) Yagi, H., S. Katoh, I. Akiguchi, T. Takeda. 1988. Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in Senescence Accelerated Mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain Res.*, 474:86.
- (30) 高木芳一 (1994) : SPF 動物. 日本 SLC 株式會社. pp 24.
- (31) Pantorinous EM (1968) : Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature(Lond.)*, 217 : 370~371.
- (32) Komuro K and Boyase EA (1973) *J. Exp. Med*, 138 : 479.
- (33) Raff MC (1973) : *Nature(Lond.)* 246 : 350.
- (34) Holub M, Rosman P, Tlaskalova H, Vidmarova H (1975) : Thymus rudiment of the athymic nude mouse. *Nature(Lond.)*, 256 : 491~493.
- (35) Reed ND, and Jatila JW (1972) : Immune response of congenitally thymusless mice to heterogous erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 139 : 1234.
- (36) Sprent J (1974) : Migration and lifespan of circulation B lymphocytes of nude(nu/nu) mice in proceedings of the first Int : Workshop Nude mice. Regaard J and Povlson CO Eds, Gustaw Fischer Verlag, Stuttgart. 36. Loo F and Roelants GE (1975) : High frequency of T lineage lymphocytes in nude mouse spleen. *Nature(Lond.)* 251 : 229.
- (37) Murincola FM (1989) : The nude mouse as a model for the study of human. *J. Surg. Res*, 47 : 520.
- (38) Sharkey Fe, and Fogh J (1984) : Consideration in the use nude mouse for cancer research. *Cancer Metast, Rev*, 3 : 341.
- (39) Trope C, Johnsson JE, Alm P, Landberg T, Olsson H, and Wennerberg J (1981) : Human malignant melanoma heterotransplanted to nude mice. *Neoplasma*, 28 : 585.
- (40) Mattern J, Jager S, Sonca J, Wayss K, and Volm M (1985) : Growth of human bronchial carcinomas in nude mice. *Br. J. Cancer*, 51 : 195.
- (41) Osborne CK, Hobbs K, and Clark GM (1985) : Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cell in athymic nude

- mice. *Cancer Res.*, 45 : 584.
- (42) Hajdu SI, Lemos LB, Kozakewich H, Helson L, and Beattie EJ (1981) : Growth pattern and differentiation of human soft tissue sarcomas in nude mice. *Cancer*, 47 : 90.
- (43) Shapiro WR, Basler GA, Chernik NL, and Posner JB (1979) : Human brain tumor transplantation in to nude mice. *J. Natl. Cancer Inst*, 62 : 447.
- (44) Houghton PJ, Mirro J, Goorha RM, Raimondi SC, Fridland A, and Hoaghton JA (1989) : Growth and differenation of a human T-cell leukemia cell line, CCRF-CEM grafted in mice. *Cancer Res. Res.*, 49 : 7124.
- (45) Broven E, and Winogard B (1991) : The nude mouse in Oncology research. Chap. 3. Nomura T, Breeding and microbiological control. CRC press, pp 25~41.
- (46) Rygaard J (1975) : Thymus and self : Immunology of the mouse mutant nude. Compenhagen.
- (47) Welford ST, Schroer RA, Gallos PP, Gohs FX, Brodeck M, Falk HB and Ruherd R (1986) : Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environ Health*, 18 : 161~168.
- (48) Charles River Japan Inc. (1996) : Charles River의 SPF/VAF 實驗動物. pp 51.
- (49) Lefkovits I (1973) : In vitro complementation experiments with nude mouse. I. The allogenic effect in the antibody response to sheep red cells. *Eur, J, Immunol*, 3 : 397.
- (50) Loor F and Roelants GE (1974) : High frequency of T lineage lymphocytes in nude mouse spleen. *Nature*, 251 : 229.
- (51) Choi YK, Lyu SJ, Hyun BH, Lee CH, Yoon WK, Jeong KS, Nam YY, Kang BH, and Choi JY (1997) : A study on the basic data of SCID mice : body weight, organ weight, hematology and serum chemistry. *Korean J. of Anim. Sci*, 13 : 49~54.

- (52) Song CW, Cho KH, Han HS, and Han SS (1994) : The effect of fasting time on hematological and blood biochemical parameters in SD rats. Korean J. of Anim. Sci, 10 : 73~80.
- (53) 谷本 義文 (1988) : 実験動物の 血液と 尿生化学. Soft science Inc, Tokyo, Japan. pp.
- (54) Apostolou A, Saidt L and Brown WR (1976) : Effect of overnight fasting of young rats on water consumption, body weight, blood sampling and blood composition. Lab. Ani. Sci., 26 : 959~960.
- (55) Baker HJ, Lindsey JS, Weisbroth SH (1979) : The laboratory rat. Vol I. Bology and disease. Academic press, pp 105~118.
- (56) Munro IC, Moodie CA, Kuiper-Goodman T, Scott PN, and Grice HC (1974) : Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of ochratoxin A. Toxicol. Appl. Phamacol, 28 : 180~188.
- (57) Dilley JV, Carter VL, and Harris ES (1974) : Fluoride ion excretion by male rats after inhalation of one of several fluoroethylenes or hexfluoropropene. Toxicol. Appl. Phamacol, 27 : 582~590.
- (58) 田鳥嘉雄 (1989) : 実験動物の 生化学的 特性 テイタ. Soft science, Tokyo, pp 204~217.

제 7 장 국제공동 위탁과제

제 1 절 서 론

본 안전성연구센터에서는 신의약 개발연구 특히 제품개발과제의 경쟁성 확보 및 성공적인 개발진행을 위하여 미국 SRI 연구소와의 국제공동 위탁과제 연구를 다음과 같은 내용을 바탕으로 수행하였다.

1. 과제의 필요성

- (1) 신의약 개발연구, 특히 제품개발과제의 경쟁성 확보 및 성공적인 진행을 위한 연구속도 가속화 필요
- (2) 공동연구와 기술도입을 통한 진전단계 안전성체계의 조기확립 필요
- (3) 국내개발제품의 외국허가를 획득하기 위해서는 국제적 공신력 있는 외국 연구기관의 평가체계를 따른 자료 확보 필요
- (4) 공동연구를 통하여 우리의 기술을 객관적으로 평가받을 수 있는 기회 제공 및 이에 따른 질적 수준 향상

2. 과제현황

- (1) KRICT, 안전성연구센터는 지난 3년간 국내 미확립독성 및 효능시험을 미국 SRI에 위탁 의뢰하여 data, 시험방법 및 과정을 확보
- (2) KRICT의 연구원을 SRI에 파견하여 관련기술 도입, SRI 전문가의 국내초빙 및 활용등으로 필요기술의 국내도입 추진
- (3) KRICT와 SRI간에 독립적인 독성효능평가 연구센터(Center for advanced pharmacology and Toxicology)설립을 추진키로 하고 가칭 "CAPT" 설립의 사전 타당성 검토를 위한 MOU를 교환함(1995. 5)
- (4) KRICT/SRI 독성연구센터 설립이 상호 대등한 관계로 추진되기 위해서는

우선적으로 KRICT, 안전성연구센터의 자체 기술수준향상 및 시설확충이 필요함

3. 과제목적

- (1) SRI의 QAU 체계를 도입하여 KRICT 자료의 국제신뢰성 확보
- (2) 국내 미확립 및 취약분야인 신경독성, 유전독성, In vitro pharmacokinetics 평가에 관한 SRI 기술도입
- (3) 신의약창출 및 사업의 전반적인 R & D 전략자문

제 2 절 위탁과제 내용

1. 2단계 위탁과제 요약

가. 1차년도 (1995. 8. 1~1996. 7. 30)

순번	제목	시험물질명	시험비용(US \$)
1	90 day repeated dose dog toxicity study	IY-81149	135,000
2	Comparative metabolism study of YH-1885	YH-1885	41,500
3	AAALAC preparation for KRICT, TRC (미국 SBR 위탁 과제)		24,000
		총액	160,000 천원

나. 2차년도 (1996. 8. 1~1997. 7. 30)

순번	제목	시험물질명	시험비용(US \$)
1	KR-31080의 개 2주 아급성독성 예비시험	KR-31080	118,700
2	KR-31080의 개 4주 아급성독성 시험	KR-31080	22,800
3	IY-81149의 개 4주 아급성독성 시험	IY-81149	76,500
4	AAALAC preparation for KRICT, TRC(미국 SBR 위탁과제)		30,000
		총액	200,000 천원

다. 3차년도 (1997. 8. 1~1998. 7. 30)

순번	제목	시험물질명	시험비용(US \$)
1	MDR-modulating effects of KR-35005 in nude mouse	KR-35005	50,000
2	AAALAC preparation for KRICT, TRC (미국 SBR 위탁과제)		10,000
		총액	100,000 천원

2. 세부과제내용

가. 1차년도 과제 요약

(1) 90 day repeated dose dog toxicity study

IY-81149 was administered orally in capsules once daily for 13-weeks at dose levels of 12.5, 25 and 50 mg/kg/day to groups containing

four male and four female dogs. A control group received an equal number of gelatin capsules only. Clinical signs, body weights, food and water consumption were recorded; ophthalmologic and electrocardiographic examinations were performed pretest and during Week 13; clinical pathology determinations (hematology and clinical chemistry) were made during Weeks 4 and 13; urinalysis was conducted at terminal sacrifice; and drug analysis was conducted on blood plasma samples collected at intervals after dosing on Days 1 and 86. A complete necropsy was conducted on all dogs at the end of the study on Days 91-94 (1/sex/dose group/day). Organ weights were recorded and histopathologic evaluation of tissues was performed for all dogs in all groups.

The clinical signs attributed to treatment with IY-81149 included incidences of diarrhea, drooling, emesis (vomiting), hypoactivity, and ulceration of the mouth and tongue. Except for vomiting, which was observed only on Day 1, all signs were limited to the 50 mg/kg group. Body weight gain over the course of the study was notably lower in male dogs receiving 25 and 50 mg/kg/day (not statistically significant) and in female dogs receiving the 50 mg/kg/day (statistically significant), coincident with apparent decreases in food and water consumption in the male, but not female, dogs in these groups. No ophthalmologic or electrocardiographic changes related to treatment with IY-81149 were observed. Clinical pathology changes observed in this study were minimal. At the interim and terminal sacrifices, modest decreases in hemoglobin content and hematocrit (up to 13-14%) were noted in both males and females in the 50 mg/kg group. Although all values were within the normal ranges, the consistency of this observation with those in the predecessor study (SRI Study no. M060-96, dated July 10, 1997) is noted. No clear, treatment-related effects were seen in

clinical chemistry or urinalysis parameters.

At necropsy, no treatment related gross pathology or differences in organ weights and weight ratios were found; however, a trend toward higher liver-to-body weight ratio values in both sexes with increasing dose was observed. Drug peak levels after the final dose were found to have decreased to only 10 to 20% of those seen at the beginning of the study. This changes and the apparent increase in relative liver weights are consistent with induction of drug metabolizing enzymes that alter metabolism of IY-81149 and its pharmacokinetic properties as a result of repeated dosing. The most prominent microscopic effects were lesions of bile duct hyperplasia in the liver and mesenteric lymph node erythrophagocytosis. The incidence of each lesion was dose-related.

A no observable adverse effect level (NOAEL) for IY-81149 following oral administration for 90 days to beagle dogs was not established in this study. Signs of toxicity (emesis and mesenteric lymph node erythrophagocytosis) were seen at the lowest dose level (12.5 mg/kg/day), although it should be noted that these effects at this dose level were slight. The principal target organs identified in this study are the gastrointestinal tract (as determined from clinical signs) and the liver and mesenteric lymph nodes (as identified microscopically).

(2) Comparative metabolism study of YH-1885

The objective of this study was to incubate YH1885, 10 and 100 μ M, with S9 (post mitochondrial supernatant from centrifugation at 9,000 x g) prepared from rat, dog, monkey and human liver and determine the metabolite profile produced by the four species. The metabolites were then analyzed using HPLC with radiochemical detection. YH1885 was

metabolized by liver S9 from all four species. Control incubations containing S9 but no cofactors, contained essentially no metabolites. The relative rate of metabolism of YH1885 varied with species as follows: dog>rat>rhesus monkey>human. metabolism of YH 1885 apparently became saturated in the concentration range studied because the % of YH1885 metabolized decreased with increasing drug concentration for all four species. Six to nine metabolite peaks were detected in the incubations and the particular profile of metabolites varied with species. The major metabolite peak formed by rat liver S9 eluted near the solvent front on the HPLC or remained at the origin in TLC, indicating that it contained one or more polar metabolites, possibly glucuronide or sulfate conjugates. Dog liver S9 incubations contained four major metabolites that each accounted for about 15 to 20% of the total radioactivity at the low concentration of YH1885. The metabolite profiles of YH1885 appeared to be similar in incubations with rhesus monkey and human liver S9. The amount of metabolites formed by rhesus monkey liver preparations was greater than that of human liver but both species exhibited profiles that contained the same 6 metabolites. Additional studies would be required to definitively determine the identity of the metabolites formed *in vitro* by rat, dog, monkey and human liver.

나. 2차년도 과제 내역

(1) KR-31080의 2주 아급성독성 예비시험

KR-31080의 개에 있어서 4주 경구투여 아급성독성시험의 실시를 위한 용량설정을 위하여 개를 이용하여 2주간 경구투여 아급성독성 예비시험을 실시하여 결과를 구하였으며 구해진 결과를 이용하여 30, 100, 300 mg/kg으로 설정하여 본시험을 실시하였다.

(2) KR-31080의 개에 있어서 4주간 아급성독성시험

KR-31080 was administered orally in gelatin capsules once daily for 28 days at dose levels of 30, 100 and 300 mg/kg/day to groups containing three male and three female dogs each. A control group received an equal number of gelatin capsules only. Clinical signs, body weights, and food and water consumption were recorded; clinical laboratory determinations (hematology, clinical chemistry and urinalysis) were conducted at terminal sacrifice. A necropsy was conducted on all dogs at the end of the study on Day 29 (male dogs) or Day 30 (female dogs) and organ weights were recorded; histopathologic evaluation of tissues was performed for the control and high dose groups.

There were no clinical signs attributed to treatment with KR-31080. Food consumption appeared to be slightly increased in female dogs receiving the test article at all dose levels, but body weights of both male and female dogs receiving the test article were comparable to those of the control dogs throughout the study. No significant weight loss (maximum of -2.5% in one female dog in the 100 mg/kg/day group) was observed in any of the animals and almost all gained weight or maintained their predose body weight at study termination. Water consumption was not affected by treatment with the test article. At terminal sacrifice, modest, dose related decreases in RBC count, hemoglobin content, and hematocrit were noted in male and female dogs receiving the test article (statistically significant only for the latter two parameters for female dogs in the 300 mg/kg/day dose group); however, since other parameters for erythrocyte evaluation (MCV, MCH and MCHC) were within normal limits, the biological relevance of this effect is unknown. There were no treatment related effects on serum chemistry or urinalysis parameters and no gross pathological findings were

noted at necropsy that could be attributed to treatment. The increased kidney weight (13-17%) and weight ratios in male dogs receiving 30 and 300 mg/kg/day did not demonstrate a dose related response (mean absolute kidney weight for male dogs in the 100 mg/kg group was 6% lower than that of the control group) and no lesions were observed microscopically in the kidneys of male dogs in the 300 mg/kg group that would indicate a test article related effect; therefore this findings was not considered related to treatment with the test article. There were no microscopic findings in dogs in the 300 mg/kg/day group that were considered to be related to treatment with the test article.

Based on these results, the no observable adverse effect level of KR-31080 administered orally for 28 consecutive days to male and female beagle dogs was 300 mg/kg/day. A maximum tolerated dose (MTD) was not established in this study.

(3) IY-81149의 개에 있어서 4주 아급성독성시험

IY-81149 was administered orally in capsules at dose levels of 10, 33 and 100 mg/kg to groups containing two male and two female dogs. A control group received an equal number of gelatin capsules only. Clinical signs, body weights, and feed consumption were recorded; clinical pathology determination (hematology and clinical chemistry) were made pretest and at terminal sacrifice; and plasma was collected at intervals after dosing on Day 27. Necropsy was conducted on all dogs at the end of the study on Day 29 and 30, and organ weights were recorded; histopathologic evaluation of tissues was performed for the control and high dose groups, and for target tissues in the intermediate dose groups.

The clinical signs attributed to treatment with IY-81149 included diarrhea,

diarrhea with sanguinous fluid (appearance of blood), emesis (vomiting) and anorexia. These clinical signs were all also observed in control, low and mid-dose animals, but with a much lower frequency and lower severity than in the high dose animals. Significant weight loss occurred only in male dogs receiving 100 mg/kg/day, and coincided with a significant decrease in food and water consumption. Clinical pathology changes observed in this study were minimal. At the terminal sacrifice, reticulocytes were absent in both male dogs at the highest treatment level, and modest decreases in RBC counts, hemoglobin content, and hematocrit were also apparent at this level. However, none of these changes was statistically significant, presumably because of the small group sizes. No other treatment related changes were observed. The principal effect of IY-81149 in male and female dogs was on the gastrointestinal tract. Gross pathology examinations found the colon, cecum, duodenum, jejunum, and mesenteric lymph nodes discolored red in animals from the mid-and high dose treatment groups. The microscopic findings were of colonic hemorrhage, colonic and cecal congestion, and mesenteric lymph node hemorrhage and congestion in the dogs receiving 33 and 100 mg/kg/day, with the more severe changes noted in the animals treatment with the high dose of IY-81149.

The no effect dose for IY-81149 following oral administration for 28 days to beagle dogs was 10 mg/kg/day. The effects observed microscopically in dogs receiving 33 mg/kg/day were minimal to slight and the dogs were asymptomatic. Recommendations for dose levels to be administered for 90 days would be to include 33 mg/kg/day as the high dose.

(4) AAALAC preparation for KRICT. TRC.

AAALAC(American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care) 협회에서는 실험동물생산 및 실험동물을 이용하여 실험을 실시하는 기관에서의 관리,운영상태가 실험동물의 사용이 적합하게 이루어지는지를 심사하여 공인을 제공하는 기관으로서 본 협회는 미국 실험동물협회에서 권장하여 주로 미국내 기관을 사찰하여 공인을하여 주고 있다. 그러나 최근에는 유럽의 많은 기관에서도 본 협회에 사찰을 의뢰하여 본 협회의 공인을 획득하고 있다. 상기협회의 공인획득은 일반적으로 실험동물의 질 및 시험의 대외적 신뢰성 구축에 이용될 수 있다.

본 안전성 연구센터에서는 아시아국가에서는 처음으로 본 협회의 공인을 획득하기 위한 작업으로 3년간의 준비작업 및 사찰(1998. 4월 실시)을 통하여 현재 조건부 공인을 획득하였으며 협회에서 제시한 항목에 대한 보완을 함으로써 곧 정식 공인을 득할 예정이다. 본 작업을 통한 AAALAC Accreditation 획득은 본 센터에서 실시한 시험자료의 국제공인화에 이바지하리라 사료된다.

첨부자료. AAALAC 실사를 위한 준비목록

1. 동물실 출입기록
2. 배출시설 및 방지시설 운영기록
3. 사료오염물질, 성분성적서
4. 사료 멸균기록
5. 사체냉장고 사용기록지
6. 소각로 사용기록지
7. 소독수 교환기록
8. 수질검사 성적서
9. 시설 및 운영에 관한 점검
10. 실험동물의 마취 및 안락사 기록
11. 연구소 소독필증
12. 외부동물 운송기록례
13. 유해 화학물질 취급 및 폐기에 관한 SOP
14. 음수 필터 교환기록
15. 이상사태에 관한 기록
16. 정기환경측정보고서
17. 정전현황 및 비상발전기 가동시간
18. 질병검사, 낙하균, 녹농균, Smear, 사료미생물
19. 화학물질 폐기물 반출기록지
20. 휴일근무자 기록
21. AAALAC 관련 표준작업지침서
22. Autoclave 사용기록
23. Autoclave 청소, 점검, 고장기록
24. SOP목록(국문 및 영문)
25. 시험일정총괄표

AAALAC 관련 표준작업지침서 목록

26. 교육기록
27. 시험계 및 관련기자재의 식별
28. 식별법-GTN
29. 개체표식-국소
30. 소독약 및 살충제 사용
31. 실험동물 취급자의 안전위생
32. 동물의 수용, 이동
33. 마우스, 랫트의 사육관리 작업
34. 실험동물의 마취 및 안락사
35. 비설치류의 사육관리 작업
36. AAALAC 관련자료
 1. AAALAC 신청서 (서명지)
 2. 장비 List
 3. 연구소 안전, 보건 관리규정
 4. 연구소 특정폐기물 관리요령
 5. 실험동물의 사육 및 관리 등에 관한 기준
 - 보건복지부 고시 제 1996-3호
 6. 안전성연구센터 건물 및 실험실 면적
 7. 연도별 동물사용 현황
 8. 연도별 과제금액
 9. 실험동물실 사육동물종 및 STRAIN
 10. 한국실험동물학회 FAX
 - 동물실험지침선포에 관한 사항 토의 예고
 11. 사육상자 SIZE
 12. 1991년 5월 국회통과한 동물보호법
 - 수의사회지 1991년 5월호 개재
 13. 화학연구소내 건물배치도
 14. 각 동물실 건축재질
37. ACUC 관련자료

1. 안전성 시험번호 일람
 2. AAALAC 신청서 준비사항- 1998. 4. 14.
 3. AAALAC 신청자료 NEW FORMAT의 항목에 대한 미비사항 보충
- 1998. 4. 9.
 4. AAALAC 준비사항-1998. 3. 30.
 5. AAALAC 영문신청서 수정본
 6. 수혼비 제단용 꽃 연중구입금을 위한 알리는 글
 7. 유해물질 취급 및 폐기에 관한 SOP
 8. 유해물질 보호장비 현황
 9. 의약품 반입출 대장서식
 10. 정전현황 및 발전기 가동시간
 11. AAALAC 신청자료 NEW FORMAT의 항목에 대한 미비사항 보충
-Breeding colony maintenance 1998. 4. 20.
 12. Animal Care and Use Protocol - 시험계획서의 ACUC 제출서식
38. ACUC Meeting 자료
1. 한국화학연구소 안전성연구센터 동물관리위원회 정관
 2. 센터내 동물관리 위원회 조직도
 3. 동물관리위원회 명단
 4. ACUC Meeting 기록 - 1996. 4. 22.
 5. ACUC Meeting 기록 - 1996. 5. 15.
 6. ACUC Meeting 기록 - 1996. 11. 20.
 7. ACUC Meeting 기록 - 1997. 5. 29.
 8. ACUC Meeting 기록 - 1997. 9. 24.
 9. ACUC Meeting 기록 - 1997. 10. 6.
 10. ACUC Meeting 기록 - 1997. 11. 3.
 11. ACUC Meeting 기록 - 1998. 2. 16.
 12. ACUC Meeting 기록 - 1998. 3. 27.
 13. ACUC Briefing 자료(Dr. Han) - 1998. 3. 27.
 14. 동물사육관리에 관한 직원교육 기록지
-NIH Guideline
39. AAALAC Mail 기록

40. 1998년 지정시험 시험계획서
41. 수혼제 기록앨범
42. 사육동물의 일일 관찰기록례
43. 개체식별카드
44. 연구소 및 센터 팸플렛
45. 환경부 적격시험기관 지정서
46. 복지부 적격시험기관 지정서
47. 일본 농수산부 적격시험기관 수리서
48. 실험동물 사용현황
49. 유해물질 보호장비 현황
50. 연구소내 센터배치도
51. AAALAC 국문신청자료
52. 환경부 적격시험기관 신청자료 2부
53. 복지부 적격시험기관 신청자료
54. 구 AAALAC 신청서
55. TRC 총괄 SOP
56. 온습도 기록 - 2개(청색화일)
57. 기초자료(S-707 : 토끼 안점막)
58. 기초자료(S-754 : 랫트 최기형)
59. 기초자료(S-600 : 랫트 수태능)
60. 기초자료(S-847 : 개 아급성)
61. 시험관련 증거기록(BS-1, 중동물)
62. 시험관련 증거기록(BS-2, 조제실)
63. 환경측정 보고서 - 4권
64. Guide for the Care and Use of lab. Animal(영문)
65. Guide for the Care and Use of lab. Animal(국문)
66. 의약품 안전성 시험관리기준
67. 의약품 등의 독성시험기준
68. KGLO 해설서
69. 실험동물 사육관리에 관한 지침
70. 연구소 식지- 신입소원 안전과 보안교육

제 3 절 결 론

본 G7 연구과제를 통하여 국내에서 개발하여 의약품으로 개발코자 하는 물질인 IY-81149, YH-1885, KR-31080의 전 임상허가자료에 필요한 독성시험 data를 확보하였고 이들 물질에 대한 임상시험이 진행중이거나 예정되어 있으며 본 안전성연구센터는 AAALAC협회의 사찰을 실시하여(1998. 4.) 현재 조건부 공인을 승인받았다. 또한 국내의 미확립 및 취약연구부문인 신경독성, 유전독성, 대사 및 병리연구에 대한 이들 분야에 대한 기술이 확립되었다. 3차년도 위탁연구는 국내 외환사정으로 인하여 위탁협약이 연기되어 현재 실험이 진행중이다.

제 8 장 위 탁 과 제

위탁과제 1. 새로운 면역독성 평가방법의 개발

위탁연구책임자 : 양규환

위탁과제 2. 발암성물질에 대한 분자유전학적 독성평가방법의 확립

위탁연구책임자 : 김은희

위탁과제 3. 분산계를 이용한 난용성약물의 가용화기술확립

위탁연구책임자 : 김종국

새로운 면역독성 평가방법의 개발
Development of Immunotoxicity Test Methods

연구기관
한국과학기술원

한국화학연구소

요 약 문

1. 제 목

새로운 면역독성 평가방법의 개발

2. 연구개발의 목표 및 중요성

선진 각국에서는 화학물질에 의한 면역독성을 검출, 평가할 수 있는 연구방법을 개발하기위하여 막대한 연구비를 투자하여 왔으며, 그 결과 미국의 경우 National Toxicology Program에서 Tier I 및 Tier II 시스템으로 구성된 가이드라인을 제정하여 이용하고 있다. 국내에서도 면역독성의 중요성을 인식하여 이에 대한 연구가 활성화 되기 시작하고 있고, 1994년 4월에는 국립 보건안전연구원에서 고시한 '의약품 등의 독성시험기준'에 면역독성시험의 일부가 포함되어, 면역독성 연구분야의 활성화가 가속화될 예정이다.

한편, 화학물질에 의한 면역독성을 평가하는 기존의 시험은 화학물질 자체에 의한 평가에 초점이 맞추어져 발전되어 왔지만, 실제로는 화학물질이 체내에 흡수되었을 경우 약물대사효소에 의해 대사되어 나타나는 대사체에 의해 독성을 유발하는 경우가 많이 보고되고 있다. 따라서, 화학물질의 안전성 평가 및 면역독성작용연구를 효과적으로 수행하기 위해서는 화학물질 자체의 면역 독성 평가 방법 개발과 함께, 약물대사효소활성을 가진 시스템을 접목시킨 면역독성평가방법이 절실히 요구되는 바이다. 본 연구에서는 대사력이 없는 면역세포를 이용한 면역독성평가방법을 확립함과 동시에 *in vitro* 약물대사시스템을 확립하여 결합시킨 면역독성평가방법을 확립하여, 대사과정이 필요없이 직접 면역독성을 유발하는 경우 뿐만아니라 체내유입 후 약물대사효소에 의해 대사된 대사체가 면역독성을 유발하는 경우까지도 효과적으로 검증하는 시스템을 개발하는 것을 목표로 하였다. 본 연구결과는 *in vitro*로 간편하고 효과적인 실험방법을 제공하므로, 환경유해 물질, 신약 및 의약품, 식품 첨가물, 농약 등의 안전성 평가 및 면역독성기작 연구를 위해 유용하게 사용될 것이며, 산업적 이용뿐만아니라 학문적 가치로도 큰 의의를 가져 그 파급효과가 크리라 사료된다.

3. 연구의 내용 및 범위

면역독성평가방법으로는 *in vitro*에서 간편하면서도 정확도가 높고 재현성이 뛰어난 방법을 구현하기 위하여, 최근에 널리 이용되고있는 competitive reverse-transcriptase chain reaction (competitive RT-PCR) 방법을 도입하여 IL-2 및 IL-2 수용체의 발현을 측정하는 시스템을 확립하였다. 특히, mRNA의 RT-PCR 생산물과 길이가 다르지만 동일 primer에 의해 증폭되는 Internal Standard를 디자인하여 실험군들간의 비교분석 및 전사된 mRNA의 수를 예측할 수 있도록 하였다. 한편, 화학물질이 대사활성화를 통해 독성물질로 변형되어 면역독성을 일으키는 경우를 위하여, Cytochrome P450 효소를 발현하는 면역세포 시스템을 구축하였다. 면역세포는 대사효소를 거의 가지고 있지 않으므로, Cytochrome P450 isozymes 유전자를 expression vector에 넣고 면역세포에 transfection시켜 효소발현을 유도하였다. 또한, Cytochrome P450 대사효소는 reductase와 결합하여 enzyme complex를 이뤄 작용하므로, reductase 유전자도 expression vector에 넣어 함께 발현되도록 하였다. 그러나, 대부분의 약물이 한 개 이상의 Cytochrome P450 isozymes에 의해 대사되는 점과 체내에서 대사체를 생성하는 조직 (간세포)과 면역독성 유발이 유발되는 곳 (면역담당기관)이 분리되어 있다는 점 등을 고려할 때, 체내의 대사시스템과 좀더 유사한 시스템의 확립이 요구되어 일차배양 간세포와 면역세포의 혼합배양법을 개발/확립하였다. 즉, 일차배양 간세포는 생체와 똑같이 다양한 약물대사효소들을 가지고 있고, 대사장소 (일차배양 간세포)와 면역반응이 일어나는 곳 (혼합배양 면역세포)이 분리되어 있어 실제 생체에서의 상황과 똑같은 시스템을 제공해 준다.

4. 연구결과 및 활용에 대한 건의

약물대사시스템을 접목시킨 면역독성 평가방법의 개발은 *in vivo* 실험에 비해 신속, 정확함은 물론 면역저해가 실험물질 자체에서 유발되는지, 아니면 실험물질이 대사되어 생성된 대사체에 의해 일어나는지를 규명할 수 있는 직접적 증거를 제시할 수 있으므로 면역기능평가, 면역독성물질 검출, 신약 및 식품의 안전성 평가, 면역기능 증강제 개발 등 광범위하게 이용될 수 있어, 학문적, 기술적, 사회문화적으로 크게 기여할 것이다.

제 1 장 서 론

현재까지 개발되어 널리 쓰여지고 있는 면역 독성 시험방법은 면역기능을 담당하는 기관들의 크기변화측정, 혈청학적 분석, B-cell 및 T-cell mitogen assay 등 현상학적인 테스트가 주종을 이루어 왔다. 그러나, 최근 몇 년동안 생물공학적 기법이 고도로 성장하게 되었고, 이를 바탕으로 독성시험에서의 테크닉도 신기술들을 접목한 새로운 방법들이 개발되고 있는 중이다. 이런 세계적 추세에 발맞추어 본 연구진은 보다 간편하고 정확도가 뛰어나며 신뢰도가 높은 새로운 면역독성 평가방법을 개발하고자 하였다. 특히, 면역 독성 시험과 아울러 그 기작까지도 규명할 수 있는 테크닉은 비용절감과 함께 독성의 원인규명을 통한 치료제 개발에도 대단히 중요한 정보를 줄 수 있으리라 사료된다.

IL-2는 T세포들 (B-cell proliferation에 필수적인 T helper cell을 포함한)의 분화 및 증식에 꼭 필요한 cytokine으로 알려져 왔으며, 현재 강력한 면역억제제인 장기이식에 널리 사용되고있는 cyclosporin A나 FK506등과 같은 면역억제물질들의 molecular target이라고 보고 되었다. 또한, IL-2 receptor alpha (IL-2Ra)는 T세포에 의해 분비된 IL-2를 받아들이는 수용체로 IL-2가 정상적으로 분비될 때라도 IL-2Ra가 정상적으로 발현되지 못하면 IL-2에 의한 면역세포증식작용이 가능하지 못하다. 따라서 본 연구진은 IL-2와 IL-2Ra의 mRNA발현이 면역체계유지에 필수적이라고 보고, 면역억제물질들이 이 두가지 유전자의 발현에 주는 영향을 알 수 있는 실험방법을 확립하기로 하였다. 한편, 기존의 면역독성시험방법은 mother compound자체에 초점이 맞추어져 있으므로, 대사효소에 의해 활성화되어야 면역독성을 일으키는 화학물질들의 경우는 기존의 면역 독성 시험방법들에 제재로 규명되지 못하는 어려움이 있어 왔다. 실제로 aflatoxin, cyclophosphamide, 7,12-dimethylbenzanthracene 등 다수의 면역독성물질이 compound자체보다는 신체내 대사효소들에 의해 대사를 받아 생성된 대사체들에 의해 면역억제가 일어난다고 보고되어 있다. 이러한 시점에서 in vitro 대사 활성화 시스템을 면역시험에 접목시킨 실험방법을 확립한다면, 식품 및 의약품의 안전성 평가에 관련된 산업적 측면에 큰 파급효과를 줄 뿐아니라, 면역독성

메카니즘까지 분석할 수 있다는 장점으로 인해 학문적으로도 큰 의의를 가진다 하겠다.

제 2 장 재료 및 방법

1. IL-2 와 IL-2 Receptor alpha 발현 측정법 개발

(1) Primary Mouse Splenocytes Culture

17~20 g 의 female BALB/c마우스에서 aseptic하게 비장세포를 추출한 후, RPMI complete media (10% FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol 포함) 에서 5×10^6 cells/ml 로 맞추어 5% CO₂ humidified incubator에서 37°C를 유지하면서 배양한다.

(2) RNA 정제 및 cDNA 합성

비장세포에 시험물질을 처리한 후 10분 뒤 2 µg/ml ConA를 처리한 다음 Chomczynski and Mackey 방법으로 RNA를 정제한다. 정제된 RNA는 정량하여 동일한 양의 RNA를 oligo(dT)를 primer 로 42°C에서 90분간 역전사시켜 cDNA를 만든다.

(3) Internal Standard 제조 및 competitive RT-PCR

위에서 설명된 방법에 따라 제조된 cDNA의 중간부분을 일부 deletion시켜 size는 작고, 동일한 primer에 의해 증폭될 수 있는 cDNA를 Internal Standard로 10배수로 희석시킨 일련의 set를 각각 cDNA product에 넣어주어 사용했다. IL-2 는 TGAGAATTCCATCAGCAATATCAGA를 forward primer 로, GTTGAATTCATTTTTGAGCCCTTGG를 reverse primer로 이용해 cDNA를 증폭하였고, IL-2Ra는 CTCCTGCAGCTCATCAGCATCCTCCTC를 forward primer로, GAAGAATTCCCACACCATCTCAGCTCC를 reverse primer로 cDNA를 증폭하였다. Internal standard와 함께 증폭된 cDNA는 8% polyacrylamide gel electrophoresis한 후 EtBr 염색하여 UV로 측정하였다.

2. In vitro 대사시스템 구축

가. 면역세포 내에서 cytochrome P450 유전자의 발현연구

(1) P450 1A1, P450 3A4, 및 reductase expression vector 구축

미국의 Dr. F. P. Guengerich (Vandervilt Univ.)으로부터 humal P4501A1, P4503A4, 및 P450 reductase 유전자에 대한 full-length cDNA를 입수하여 P4501A1와 P4503A4 유전자는 pRC-CMV에, P450 reductase 유전자는 pCI-neo expression vector의 polyclonig site에 각각 subcloning 하였다.

(2) Transfection and Expression Cell Selection

Heterologous expression system으로는 humal T cell line 인 Jurkat 을 사용하였고, cell 내로의 transfection 방법으로는 eletroporation (960 μ F, 200 V)을, selection에는 G418 (1 mg/ml)을 사용하였다. Transfection의 control로 사용한 β -gal 유전자의 full-length cDNA는 pSV- β -gal (Promega)에 들어있는 것을 이용하였다.

(3) Western Blotting and Dot Blotting

Transfection시켜 selection한 세포에서 각 효소를 발현하고 있는가를 확인하고자, total protein을 추출하여 P4501A1 및 P4503A4 항체를 이용해 Western Blotting을 수행하였고, total RNA를 추출하여서 Dot Blotting Assay를 수행하였다.

(4) P450 Reductase Assay

Untransfected Jurkat cells, P450 reductase-expressing Jurkat clones, 그리고 HepG2 cell을 100 mm tissue culture plate에 배양한 후, sonication 방법으로 세포를 파괴한다. Debris를 제거한 다음 TL-100 centrifuge로 55,000 rpm에서 1시간 30분간 원심분리하여 침전된 microsome을 homogenizing buffer에 녹인 후 reductase activity assay에 사용하였다.

나. 일차배양 간세포와 면역세포의 혼합배양

Female BALB/c 마우스에서 collagenase perfusion technique에 의해 추출된 간세포는 1×10^6 cells/ml로 맞추어 collagen-coated plate에서 단층세포배양하였다. 배양 24시간 후에 배지를 제거하고 washing한 후에, 마우스 비장세포를 추출해 attached hepatocytes에 넣어주어 혼합배양에 들어간다. 혼합배양시 시험물질을 넣어 주어 일차배양 간세포에 의해 대사된 대사체가 비장세포에 충분히 흡수되도록 한 다음 4시간 후, 비장세포만을 정제하여 배지를 교환 한다. 비장세포는 다시 ConA에 16시간 노출시켜 IL-2 및 IL-2 receptor alpha가 발현되도록 한 후, RNA를 정제해 competitive RT-PCR을 수행한다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

1. Competitive RT-PCR을 이용한 IL-2, IL-2Ra mRNA 측정방법확립

Fig. 1에서 보는 바와 같이 oligo(dT)를 primer로 사용하여 cDNA를 합성한 후, Dra I제한효소로 중간 일부분을 잘라 pUC19 plasmid에 subcloning하여 Internal Standard를 만들었다. 그 결과, Fig. 1의 (B)에서 보는바와 같이 IL-2 mRNA는 334bp길이의 cDNA를, IL-2 internal standard는 249bp의 product를 각각 생산하도록 설계하였다. IL-2Ra의 경우는 Sau 3A1제한효소를 이용해 IL-2와 동일한 방법으로 디자인하여, 387bp의 cDNA product를, 302bp의 internal standard product를 생산할 수 있도록 하여 실험에 사용하였다. Fig. 2의 (A)는 ConA를 처리한 mouse splenocytes에서 RNA를 추출한 후, 10^{-14} 에서 10^{-11} M의 Internal Standard를 2배수로 넣어주고 RT-PCR을 하여 internal standard PCR product당 mRNA product를 plotting한 것이다. 또한, IL-2 mRNA양과 RT-PCR product사이에 비례관계가 있는가를 알기위하여 0.05 μ g에서 5 μ g까지 RNA를 증가시키면서 RT-PCR을 수행하였다 (Fig. 2, B). 위 두 실험은 r^2 이 0.98로, Internal standard양을 증가시킴에 따라 비례적으로 IL-2 mRNA PCR product가 감소하는 경향을 보였고, 또한 IL-2 mRNA와 IL-2 mRNA PCR product사이에 비례관계가 있음을 알 수 있었다. IL-2Ra의 경우도 마찬가지로, r^2 이 0.99로 Internal standard와 IL-2Ra mRNA PCR product사이에 비례적 competition이 있었고, IL-2Ra mRNA와 IL-2Ra mRNA PCR product사이에 비례관계가 있음을 알 수 있었다 (data not shown). 다음실험으로, mouse spleen cell에 ConA를 처리하고 몇시간 후에 RNA를 추출할 때 IL-2 mRNA와 IL-2Ra mRNA가 최고조에 이르는가를 알기위해 time-course effect를 보았다. Fig. 3의 (A)와 (B)에서 보는바와 같이, IL-2 mRNA는 ConA처리 2시간 후부터 증가추세를 보여 8시간째에 $6 \times 10^5/100$ ng RNA정도로 최고조에 이른 후 감소하기 시작하여 30시간 이후로는 background수준으로 점차 줄어들음을 알 수 있었다. IL-2Ra는 ConA에 의한 induction pattern이 좀 다른 경향을 보였다. ConA처리 4시간 후부터 증가를 보여 8, 16, 30, 80시간이 갈수록 계속해서 증가함을 알아

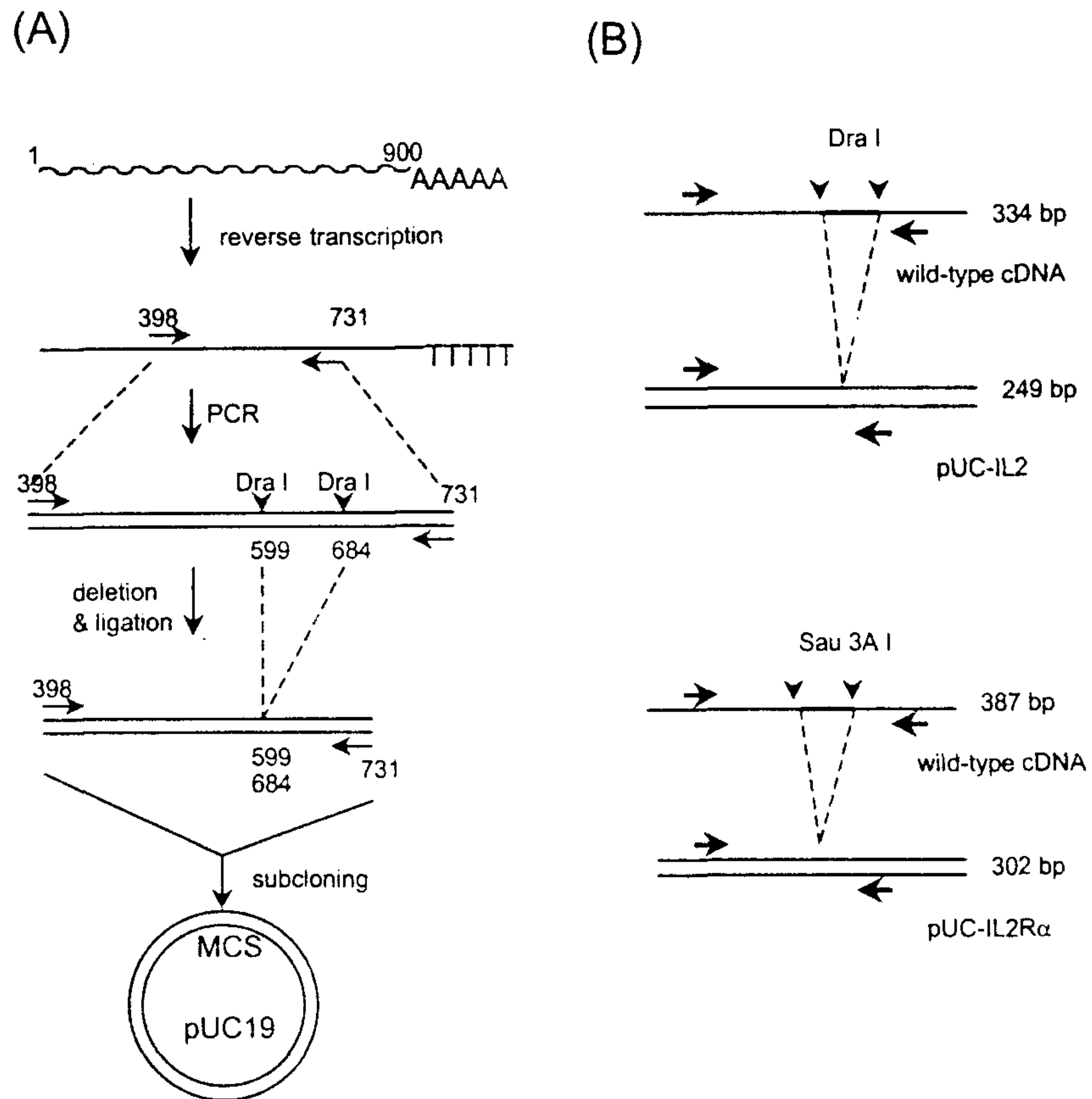


Fig. 1 (A) Schematic view of construction of internal standard for IL-2 (pUC-IL2) and IL-2R α (pUC-IL2R). (B) Difference of internal standard from wild-type cDNA

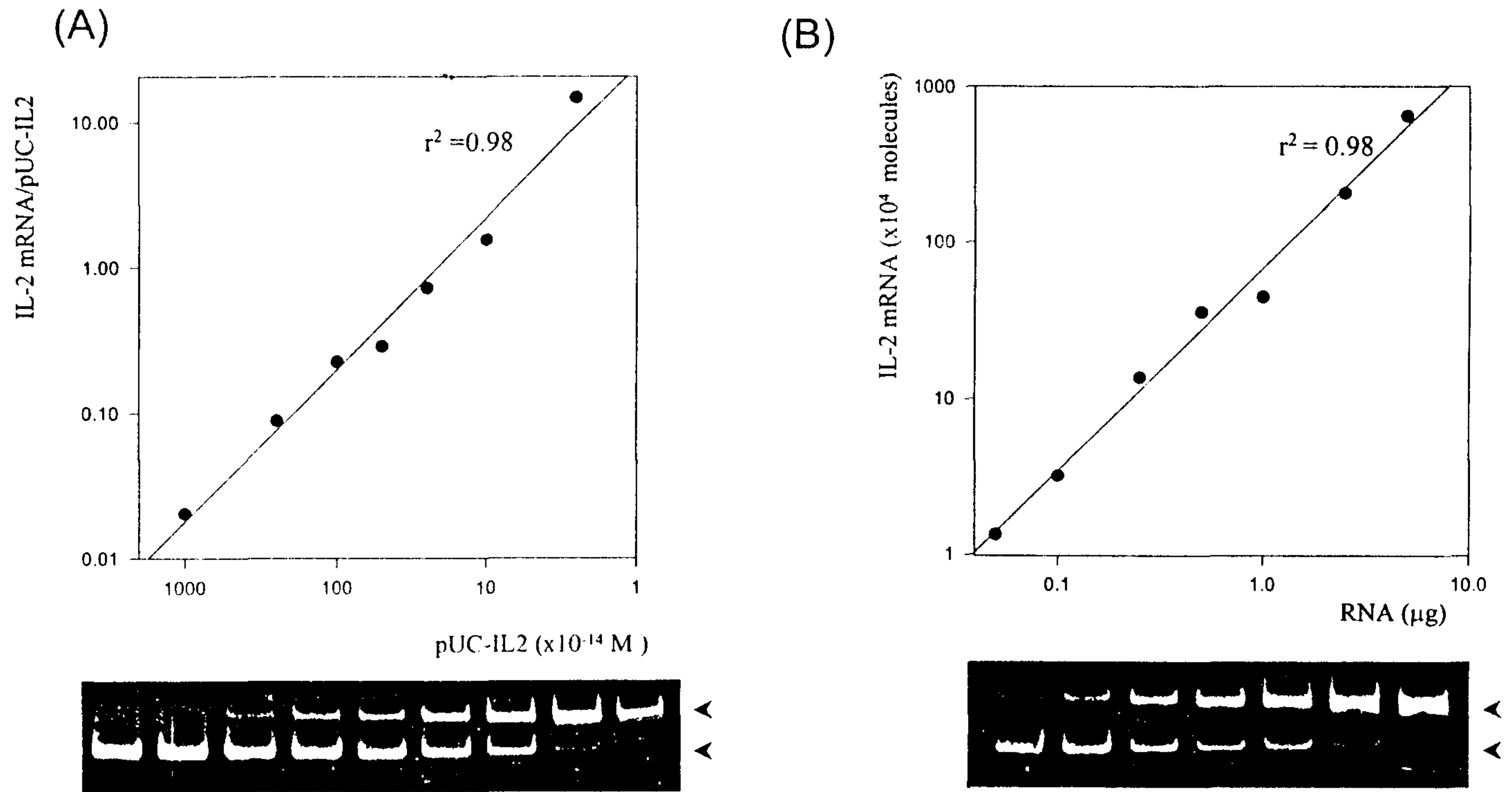


Fig. 2 (A) Plotting narrow range competitive PCR as log (IL-2 mRNA/pUC-IL2) vs. log (input pUC-IL2). lane 1: pUC-IL2 only, lane 9: RT product only, from lane 2 to lane 8: 100, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.25 $\times 10^{-13}$ M of pUC-IL2 and equal amount of RT product were added in each tube. (B) Plotting PCR products as log (IL-2 mRNA) vs. log (input amount of RNA used in RT reaction). 3 μ l of the RT product and 3 μ l of equal amount (10^{-13} M) of pUC-IL2 were added in each tube.

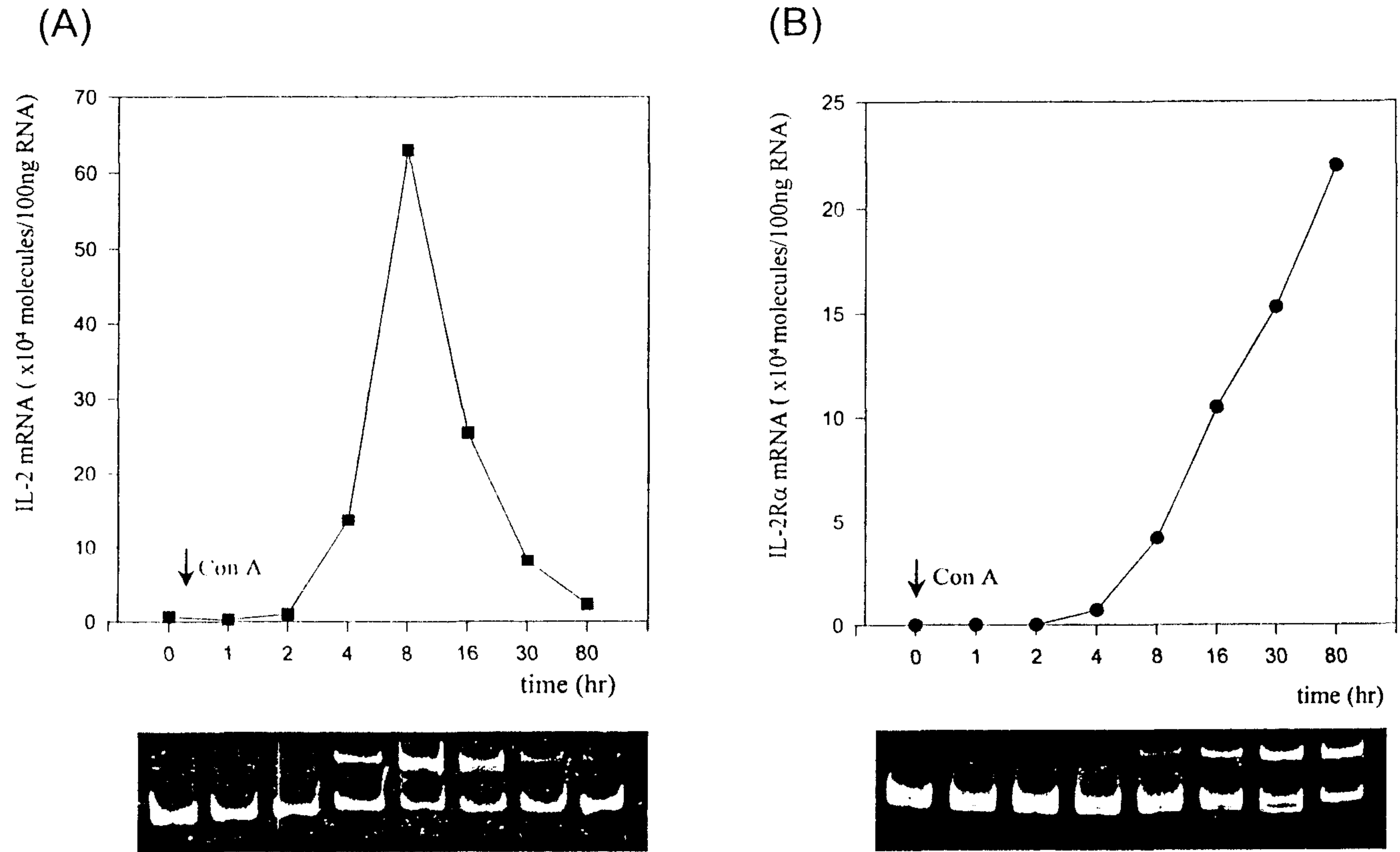


Fig. 3 Time-course of IL-2 (A) and IL-2R α (B) mRNA expression in Con A-induced mouse splenocytes. In each tube, RT product of 150ng of total RNA and 3 μ l of 10⁻¹³ M pUC-IL2 (A) or pUC-IL2R α (B) were added in 20 μ l volume PCR reaction.

내었다. 따라서, 본 연구진은 mouse splenocytes에 시험독성물질과 ConA를 처리하고 16시간째에 RNA를 분리하여 IL-2 및 IL-2Ra의 mRNA를 internal standard를 이용한 competitive RT-PCR로 분석하였다.

2. Cyclosporin A (CsA), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-acetylaminofluorene (AAF), 및 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)의 IL-2 mRNA에 미치는 영향

우선, 면역억제물질로 널리 알려져 있는 CsA로 IL-2 mRNA에 대한 영향을 먼저 알아보았다. CsA는 장기이식시 조직거부반응을 없애기 위해 널리 사용하는 물질로 T세포가 IL-2 gene을 expression하는 것을 강력하게 억제한다고 알려져 왔다. Fig. 4의 (A)에서 보듯이 10 ng/ml농도에서 50%정도의 억제를 보였으며, 50 ng/ml농도에서부터는 거의 background수준까지 억제함을 알 수 있었다. CsA를 preliminary experiment로 수행한 다음, AAF, IQ, TCDD의 IL-2 gene expression에 대한 영향을 알아보았다. AAF는 10 μ M보다 낮은 농도에서는 아무 영향이 없었으나 20, 50 μ M로 AAF의 양을 증가시킴에 따라 dose-dependent하게 IL-2 mRNA양이 감소함을 알 수 있었다. IQ의 경우는 50, 100, 200 μ M의 농도범위에서 실험하였는데, 역시 dose-dependent하게 감소됨을 알 수 있었다. TCDD의 경우는 면역독성을 일으킨다고 알려진 농도인 1에서 10 nM농도범위에서 IL-2 mRNA발현에 대한 영향을 알아보았다. Fig. 4.의 (D)에서 보듯이 TCDD는 IL-2 mRNA발현에 큰 영향을 주지 못함을 알 수 있었다. 따라서, CsA, AAF, 및 IQ는 IL-2 mRNA 발현억제를 통해 면역억제를 일으킴을 알 수 있었다. 한편, 위 실험에서와 동일한 조건에서 추출한 RNA를 가지고, IL-2Ra mRNA를 증폭한 결과가 Fig. 5에 있는데, 이 결과를 토대로 보면, CsA, AAF, IQ 모두 IL-2 mRNA 발현을 억제시킨 농도에서 IL-2Ra mRNA를 dose-dependent하게 억제시키는 것을 알 수 있었다. 이 결과를 토대로 CsA, AAF, IQ는 IL-2 및 IL-2Ra mRNA 발현을 억제시켜 면역억제를 일으킴을 알 수 있었다.

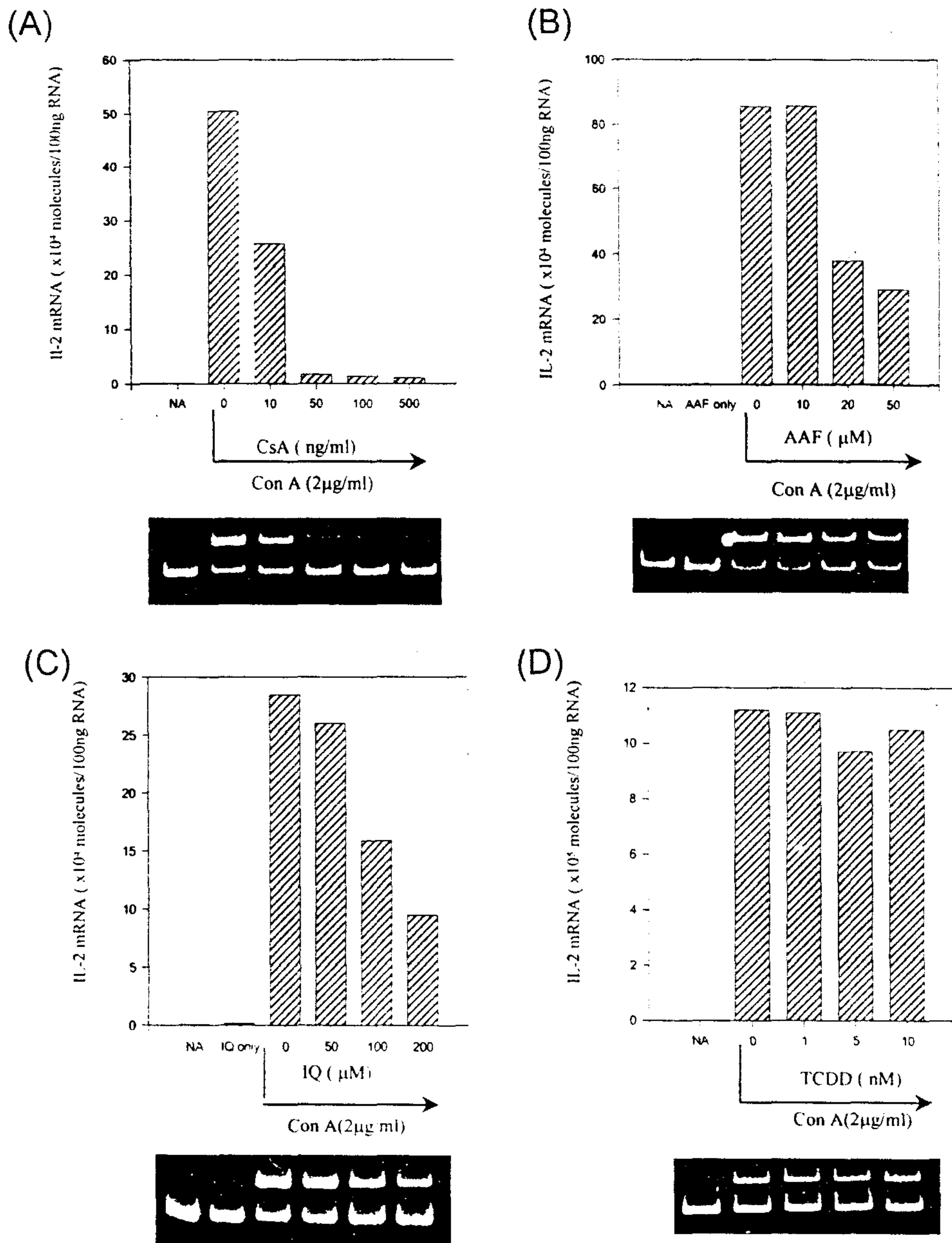


Fig. 4 Effect of various kinds of carcinogenic immunosuppressants on IL-2 mRNA expression in Con A-induced mouse splenocytes. Cells are harvested 16 hr after Con A treatment and subsequently RNA was isolated. In each sample, RT product of 150ng of total RNA was used in PCR with 3 µl of 10⁻¹³ M pUC-IL2 (20 µl reaction volume).

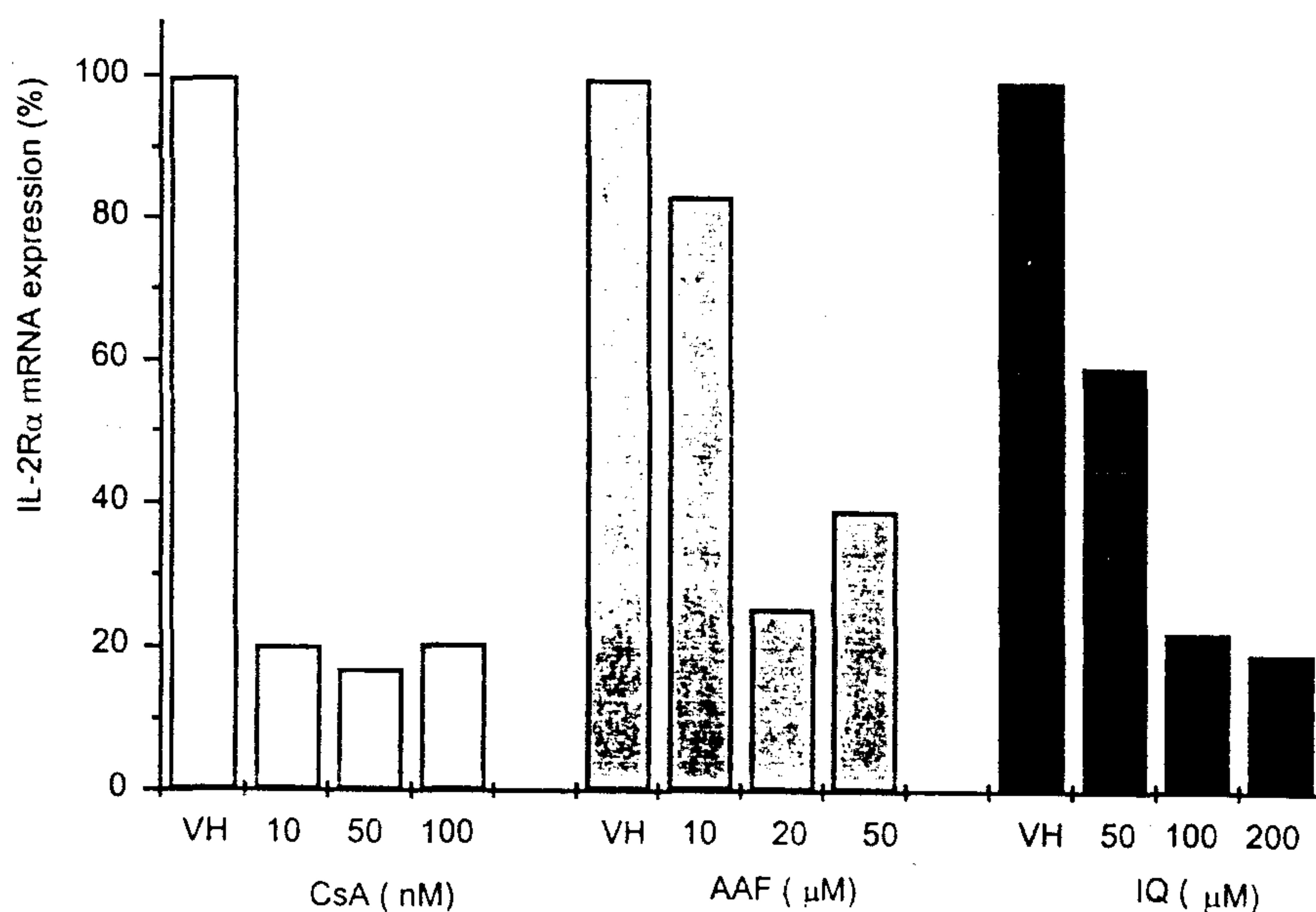


Fig. 5 Effect of various kinds of carcinogenic immunosuppressants on IL-2R α mRNA expression in Con A-induced mouse splenocytes. Cells are harvested 16 hr after Con A treatment and subsequently RNA was isolated. In each sample, RT product of 150 ng of total RNA was used in PCR with 3 μ l of 10^{-13} M pUC-IL2R α (20 μ l reaction volume).

3. In vitro 대사화 시스템 구축

외래물질이 체내에 유입되었을 때, 약물배사효소에 의한 대사작용은 대부분 phase I enzyme인 cytochrome P450 isozymes에 의해 이루어진다. Cytochrome P450 isozymes중에서도 제일 연구가 많이 진행되고 있는 P450 1A1, P450 3A4를 expression vector에 넣어 대사효소가 없는 면역세포인 human Jurkat T세포에 transfection시키기로 하였다. 또한, cytochrome P450은 환원력을 요구하는 효소로 reductase와 결합해 작용한다고 알려져 있으므로, human P450 reductase cDNA를 expression 시킬 수 있는 vector도 제작하여 transfection시키기로 하였다. Fig. 6은 human cytochrome P450 1A1을 pRC-RSV expression vector에 insertion시킨 것을 보여준다. 대장균의 expression vector에 P450 1A1 cDNA가 끼워져 있는 plasmid vector에서 Nde I 제한효소로 cDNA만을 잘라내어 Klenow효소를 처리해 blunt end로 만든 후, 역시 Xba I, Not I 제한효소에 의해 blunt end로 만든 pRC-RSV animal cell expression vector에 insertion 시켰다. P450 1A1 cDNA가 올바르게 연결된 것을 restriction mapping을 통해 확인하였다 (Fig. 6). 또한, reading frame이 변화없이 expression vector가 형성되었음을 확인하기 위해 pRC-RSV vector와 inserted P450 cDNA 양쪽부분을 다시 pUC19 plasmid에 subcloning하는 실험도 수행하였었다 (data not shown). Cytochrome P450 3A4 cDNA는 Nde I과 Bgl II로 *E. coli* expression vector에서부터 잘라낸 후, pCI-neo plasmid의 Sma I site에 subcloning하여 animal cell expression vector를 제작한 후, 역시 restriction mapping을 통해 확인하였다 (Fig. 7). Cytochrome P450 reductase의 경우는 rat originated gene이 available하여 rat P450 reductase를 사용하였다. pBluscript plasmid내에 들어있던 full-length P450 reductase cDNA를 animal cell expression vector인 pRC-CMV의 CMV promoter 다음에 있는 polycloning site내의 Hind III와 Not I site에 subcloning하여 pRC-CMV/red를 만들고 이를 restriction mapping에 의해 확인하였다 (Fig. 8). 이렇게 만들어진 cytochrome P450 1A1, P450 3A4, 및 P450 reductase expression vector들은 electroporation 방법으로 Jurkat human T cell에 transfection시켰고, 항생제인 G418에 내성을

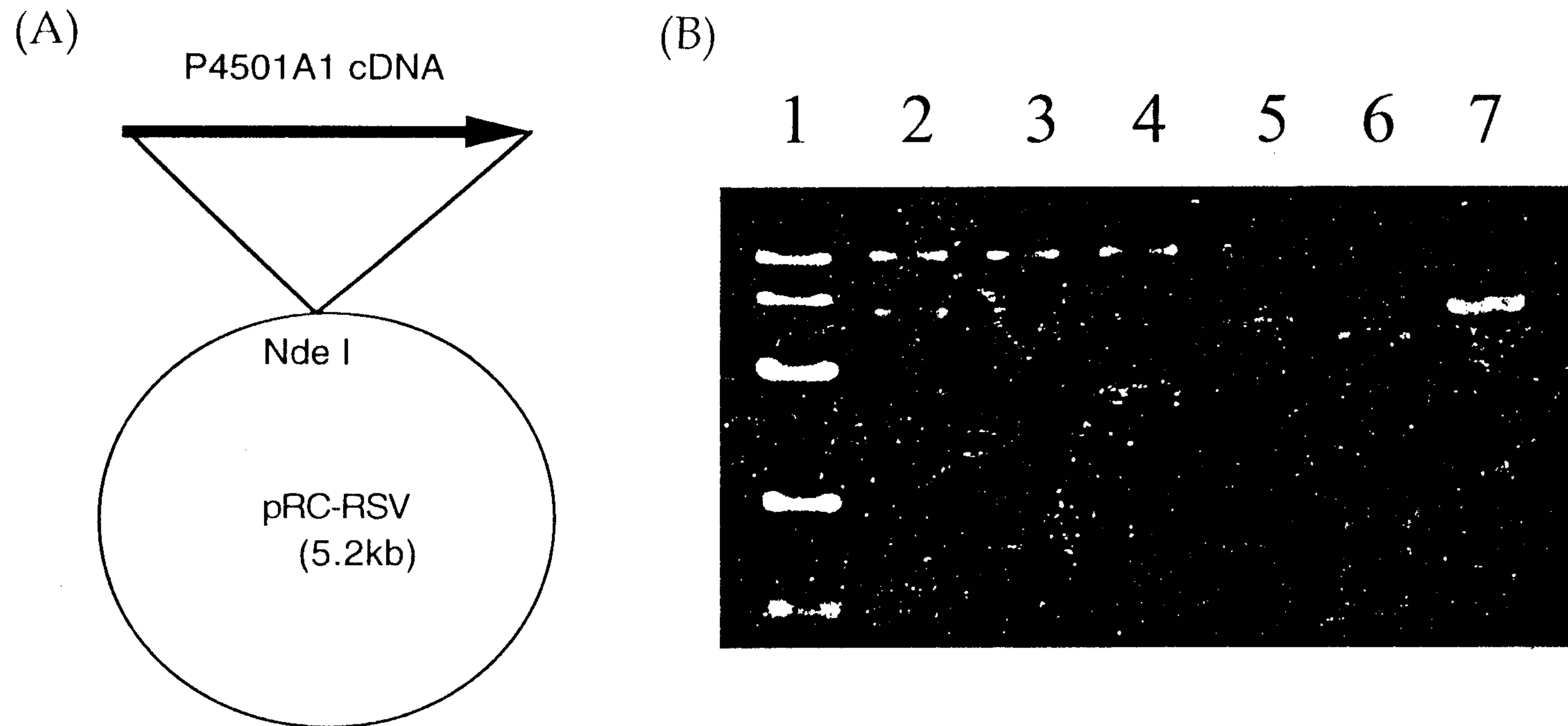


Fig. 6 Insertion of cytochrome P4501A1 cDNA into pRC-RSV. (A) Schematic view of pRC-RSV/1A1 construction. (B) Restriction enzyme mapping of the recombinant plasmid. Lane 1; Not I, lane 2; Hind III, lane 3; Sma I, lane 4; Pst I, lane 5; EcoR I, lane; no enzyme.

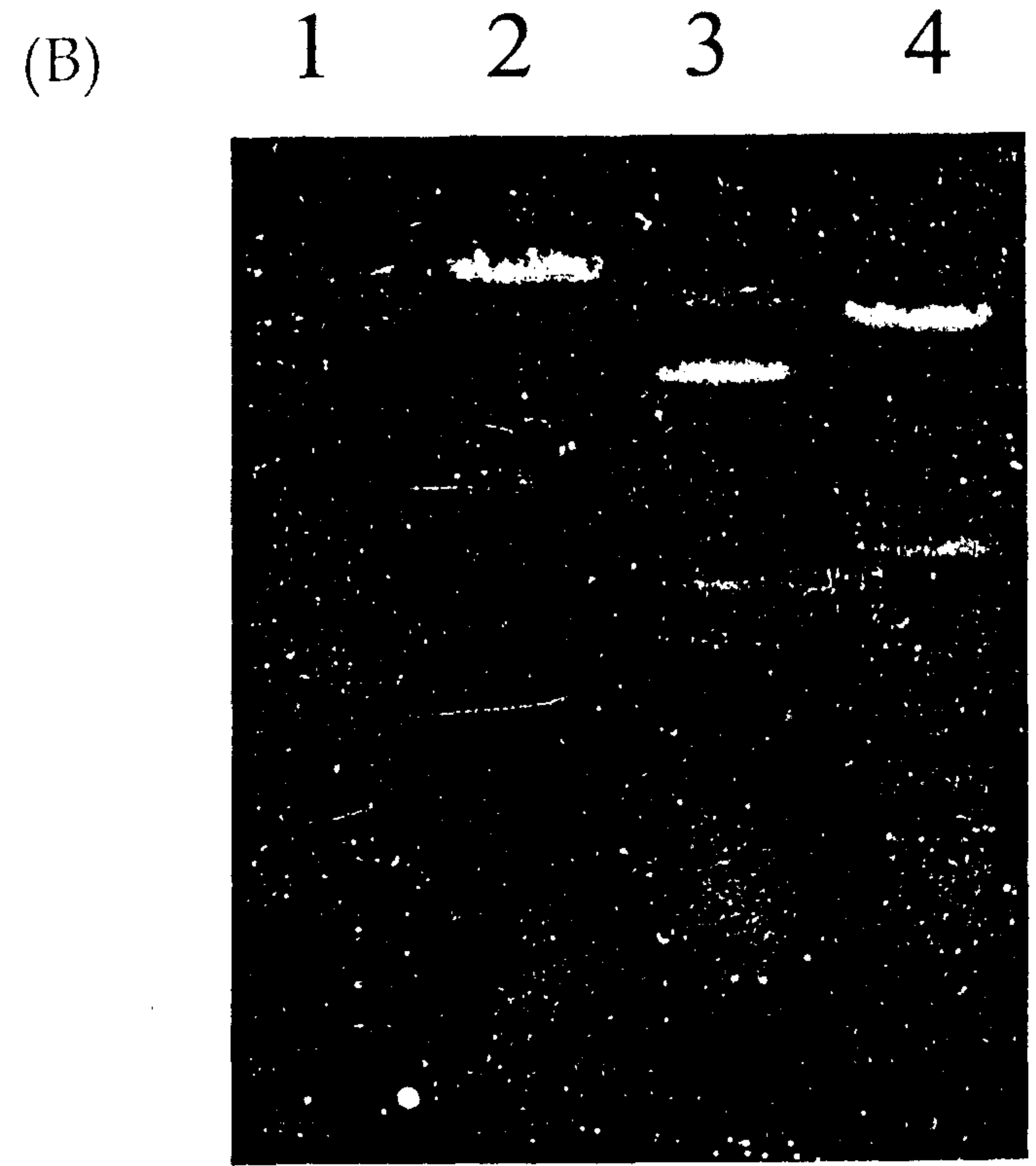
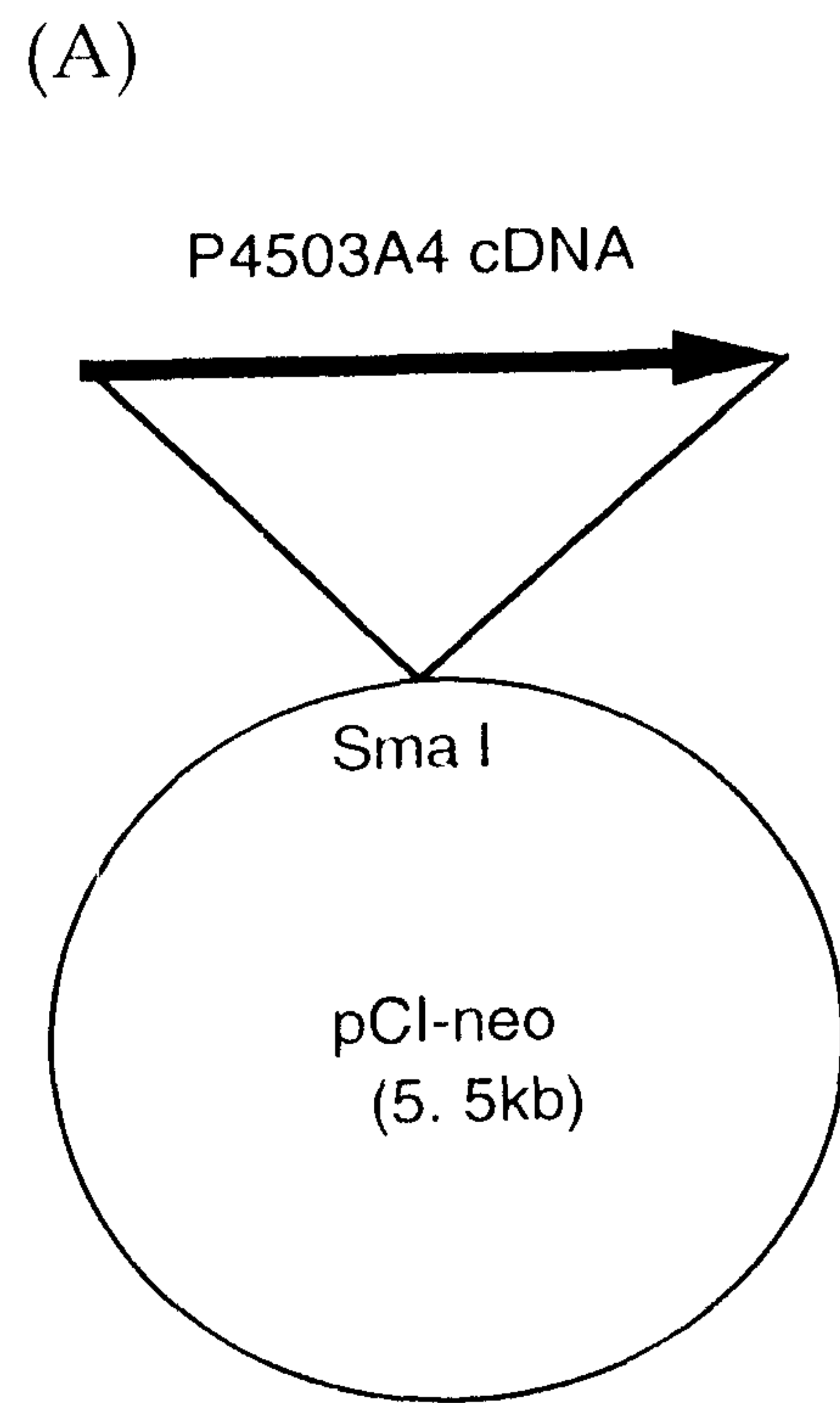
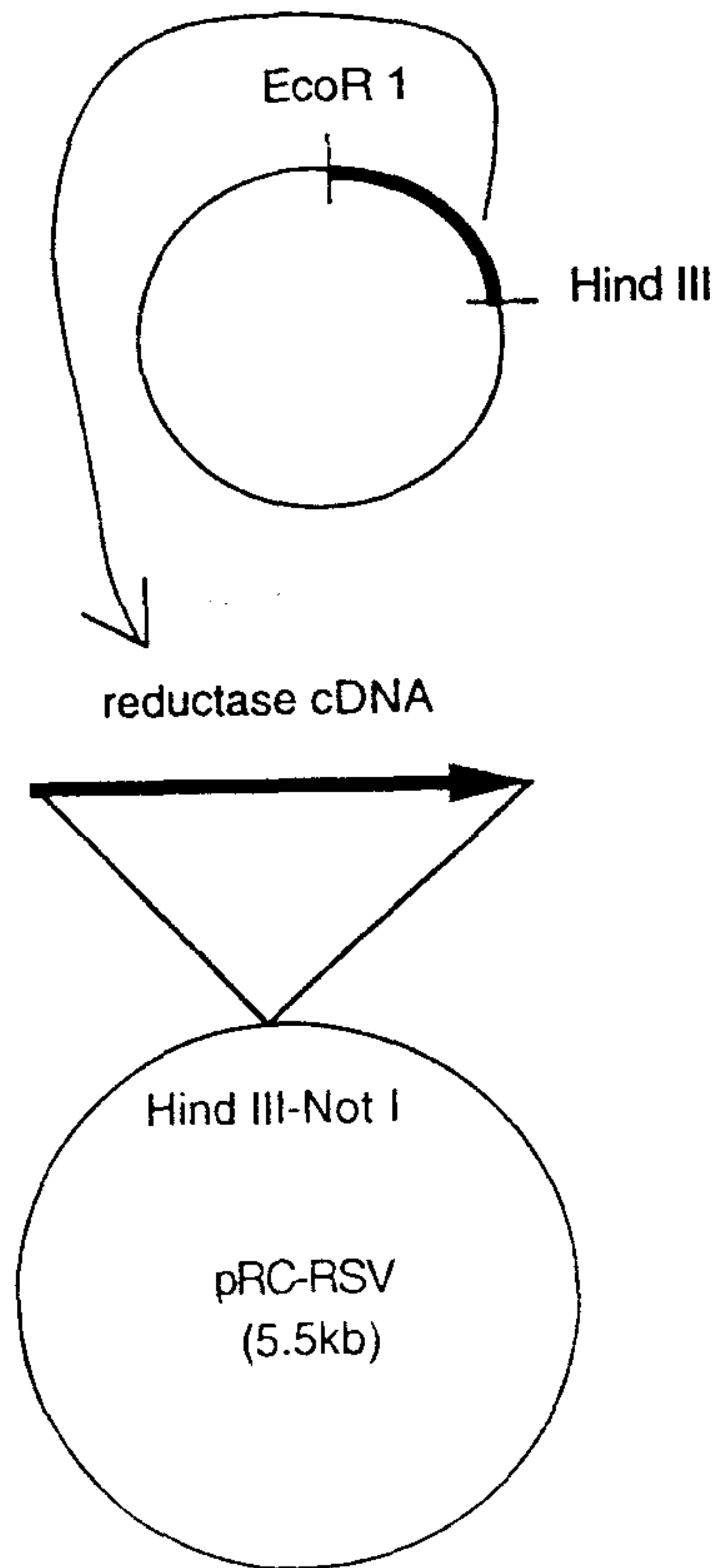


Fig. 7 Insertion of cytochrome P4503A4 cDNA into pCI-neo. (A) Schematic view of pCI-neo/3A4 construction. (B) Restriction enzyme mapping of the recombinant plasmid. Lane 1; size marker, lane 2; EcoR I, lane 3; Pst I.

(A)



(B)

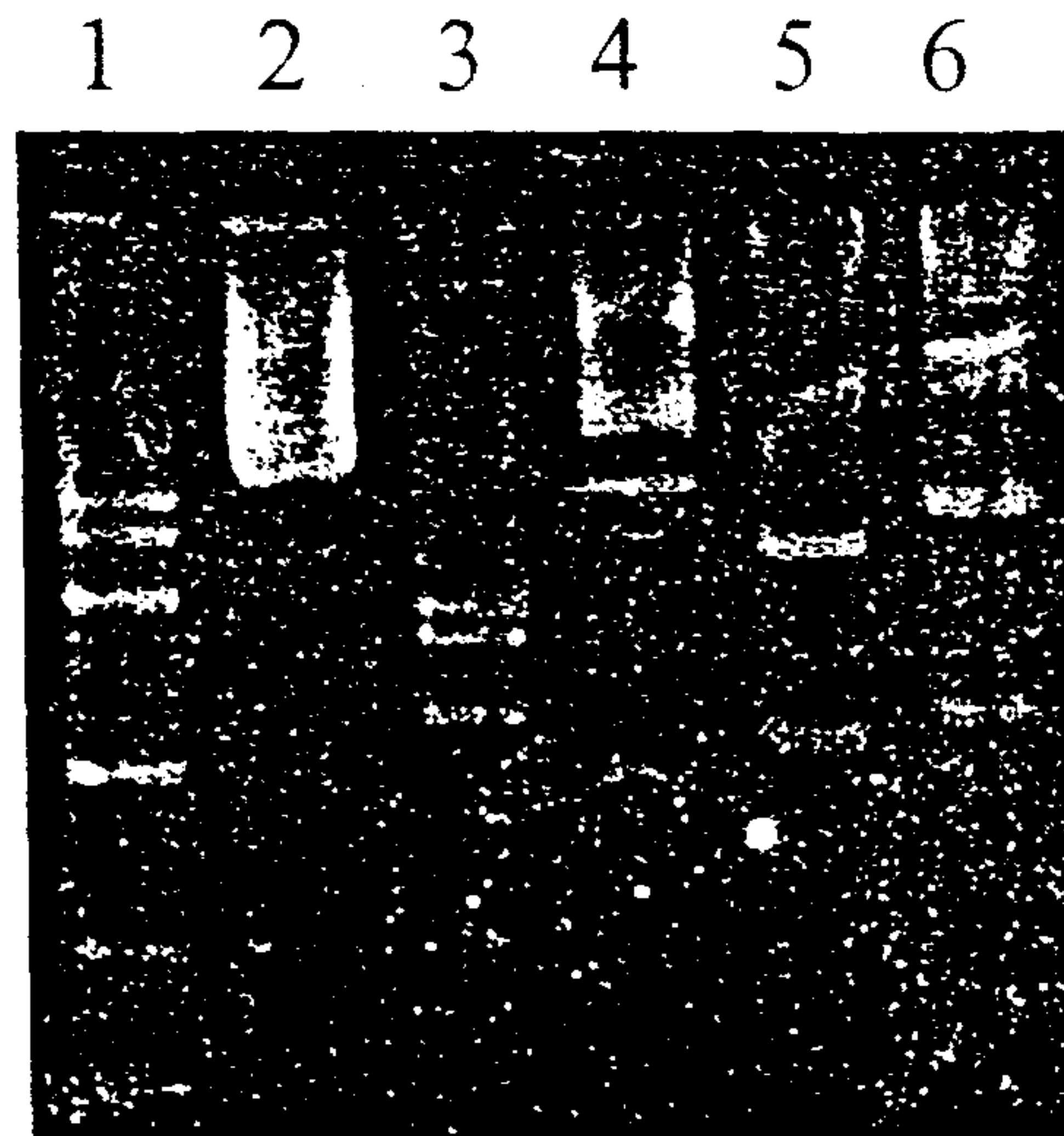


Fig. 8 Insertion of cytochrome P450 reductase cDNA into pRC-CMV. (A) Schematic view of pRC-CMV/red construction. (B) Restriction enzyme mapping of the recombinant plasmid. Lane 1; size marker, lane 2; no enzyme, lane 3; BamH I, lane 4; Hind III, lane 5; Sma I, lane; Not I and Nde I.

가지는 세포주만을 selection하여, 각 효소들을 제대로 발현시키는가를 알아보았다. Fig. 9는 cytochrome P4501A1을 발현하는 정도를 보기위해 P4501A1 항체로 Western Blotting을 수행한 실험이다. Lane 1은 cytochrome P4501A1을 특이적으로 induction시키는 3-methylcolanthrane (MC)을 처리한 간세포에서 얻은 cytosol extract로 positive control marker로 사용하였고, lane 2 - lane 8은 selection한 clone들로부터 얻은 단백질 sample이고, lane 9은 *E. coli* expression vector를 *E. coli*에 transformation시켜 얻은 cytosol extract로 역시 positive size marker로 사용하였다. Fig. 9에서 보듯이, transfected cell에서 cytochrome P4501A1을 발현하기는 하나 *E. coli*에서 expression시킨 것과 MC에 의해 induced된 간세포에서 발현하는 cytochrome P4501A1에 비해 적게 발현됨을 알 수 있었다. 이는 transfection된 cytochrome P4501A1 cDNA로부터 mRNA발현이 많지 않음이 Dot Blot Analysis를 통해 증명되었다 (Fig. 10). Cytochrome P4503A4 cDNA를 expression 할 수 있는 plasmid를 transfection시켜 얻은 clone들에 있어서도 마찬가지로 결과를 얻었다 (Fig. 11). 한편, P450 reductase cDNA expression하는 plasmid를 transfection시켜 얻은 clone은 비교적 많은 양의 reductase를 발현하고 있음을 알았다 (Fig. 12와 Fig. 13). Fig. 12는 reductase enzyme assay를 한 것으로 untransfected Jurkat cell과 HepG2 human hepatoma cell line을 control로 비교분석하였고 Fig. 13은 Western Blot으로 분석하였다. 이상의 결과들을 토대로 볼 때, Jurkat 세포에 약물대사효소인 cytochrome P4501A1과 cytochrome P4503A4를 인위적으로 발현시키게도록 디자인하여 확립시킨 in vitro 대사화 시스템은 실제 간세포에서 induction되는 약물대사효소의 양에 비해 부족하므로, 시험하고자하는 약물을 충분히 대사시키기에 부족하다고 사료되어, 일차배양 간세포를 통한 대사를 통해 이를 구현하고자 하였다. 이에 본 연구진은 mouse 간세포를 collagenase perfusion technique을 사용해 viable hepatocytes를 분리하여 collagen-coated animal cell culture dish에서 배양한 후, 대사능력이 없는 Jurkat human T cell을 혼합배양 하였다. 혼합배양액에 4시간동안 시험물질을 처리해 그 대사체가 Jurkat T 세포에 노출되도록 한 후, 다시 Jurkat 세포만을 분리해 ConA로 IL-2 transcription을 유도한

여 백

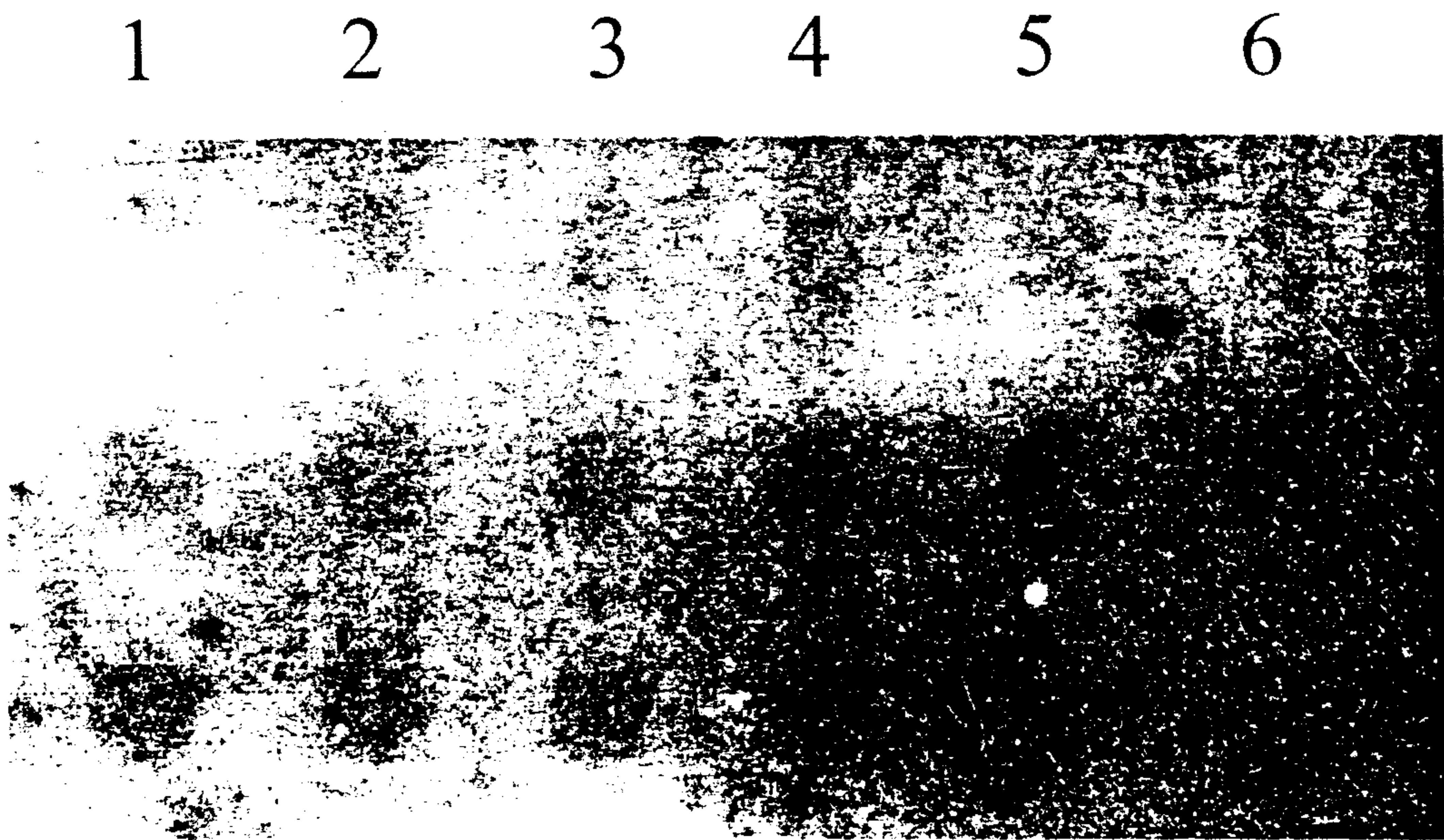


Fig. 10 Dot blot analysis of cytochrome P4501A1 mRNA in pRC-RSV/1A1-transfected Jurkat cells. Lane 1; cytochrome P4501A1 mRNA untransfected naive Jurkat cells, lane 2-4; cytochrome P4501A1 mRNA G418-selected clones of pRC-RSV/1A1-transfected Jurkat cells, lane 5-6; cytochrome P4501A1 mRNA expressed in E. coli.

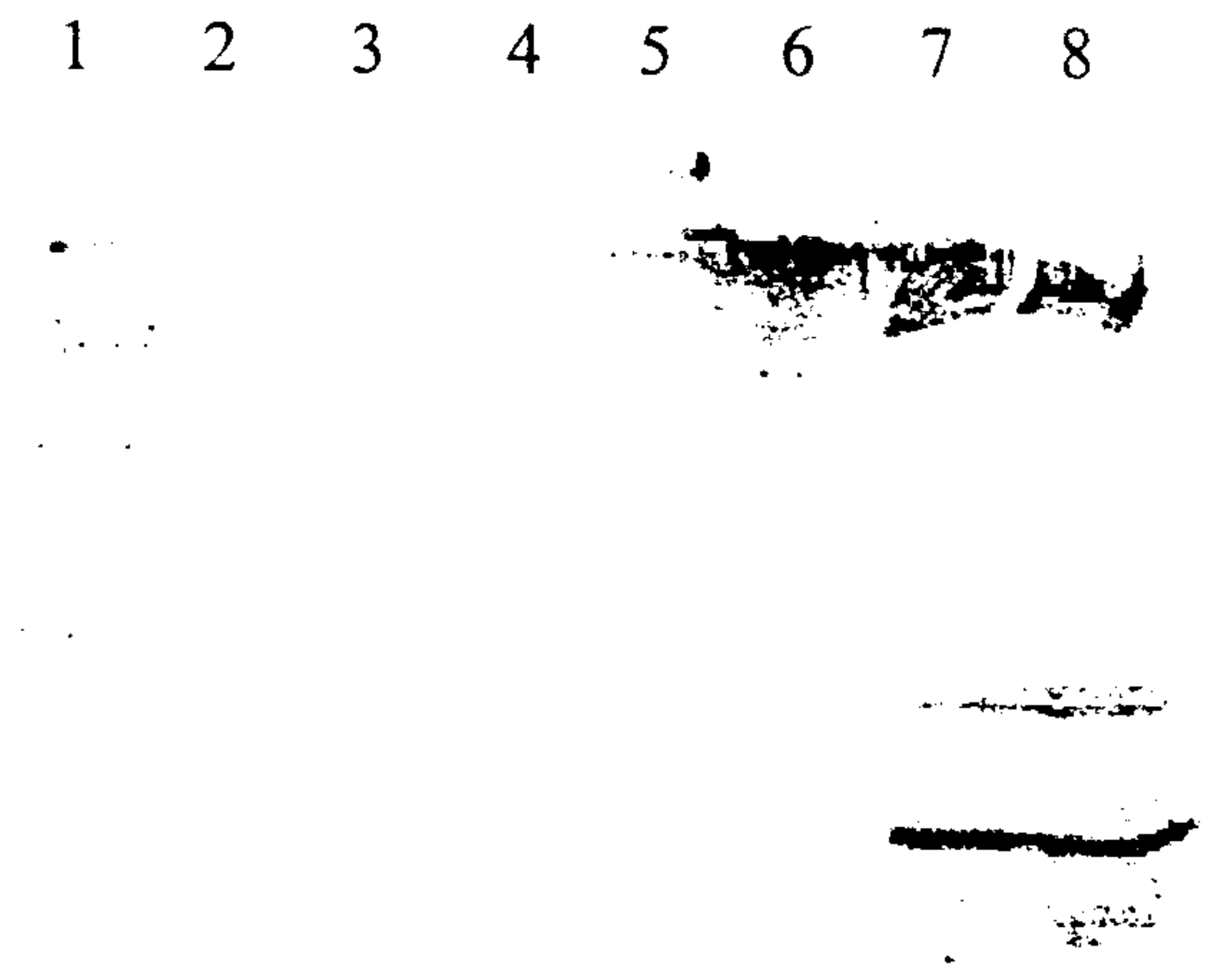
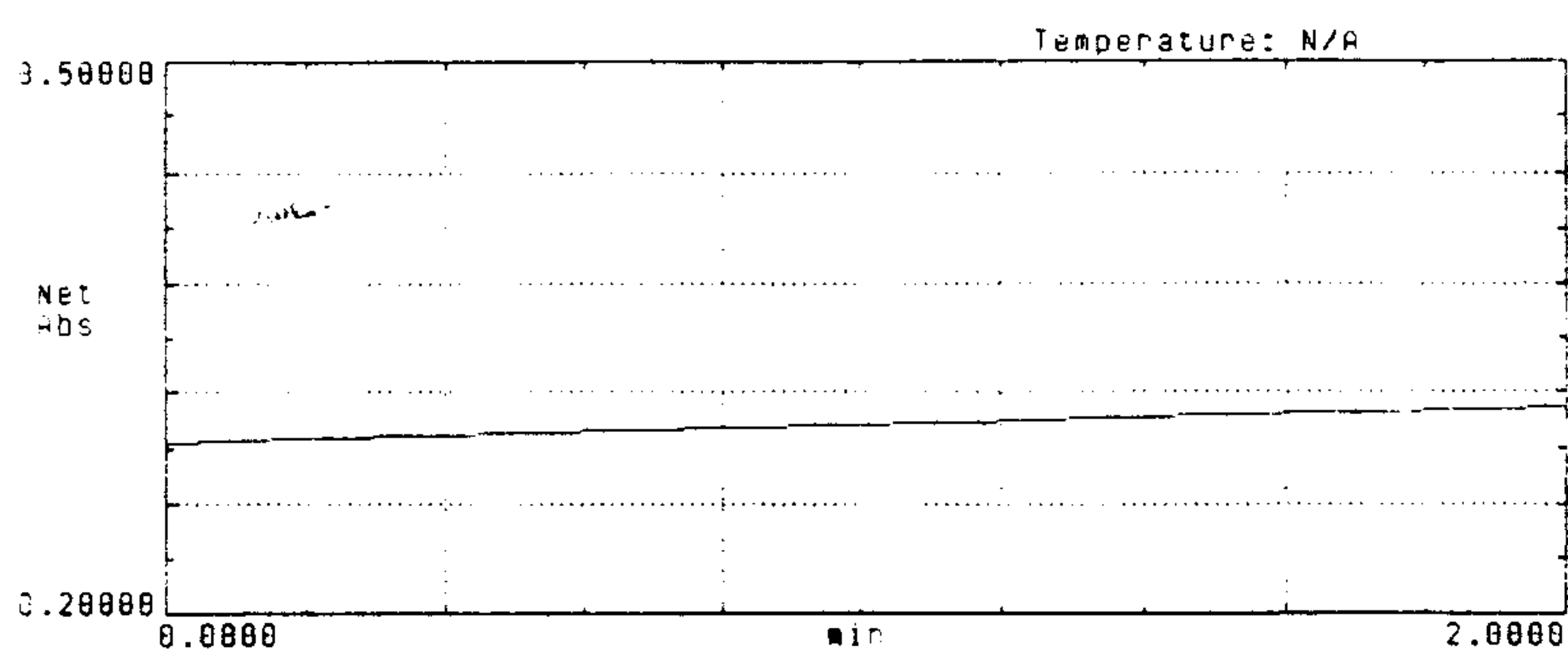
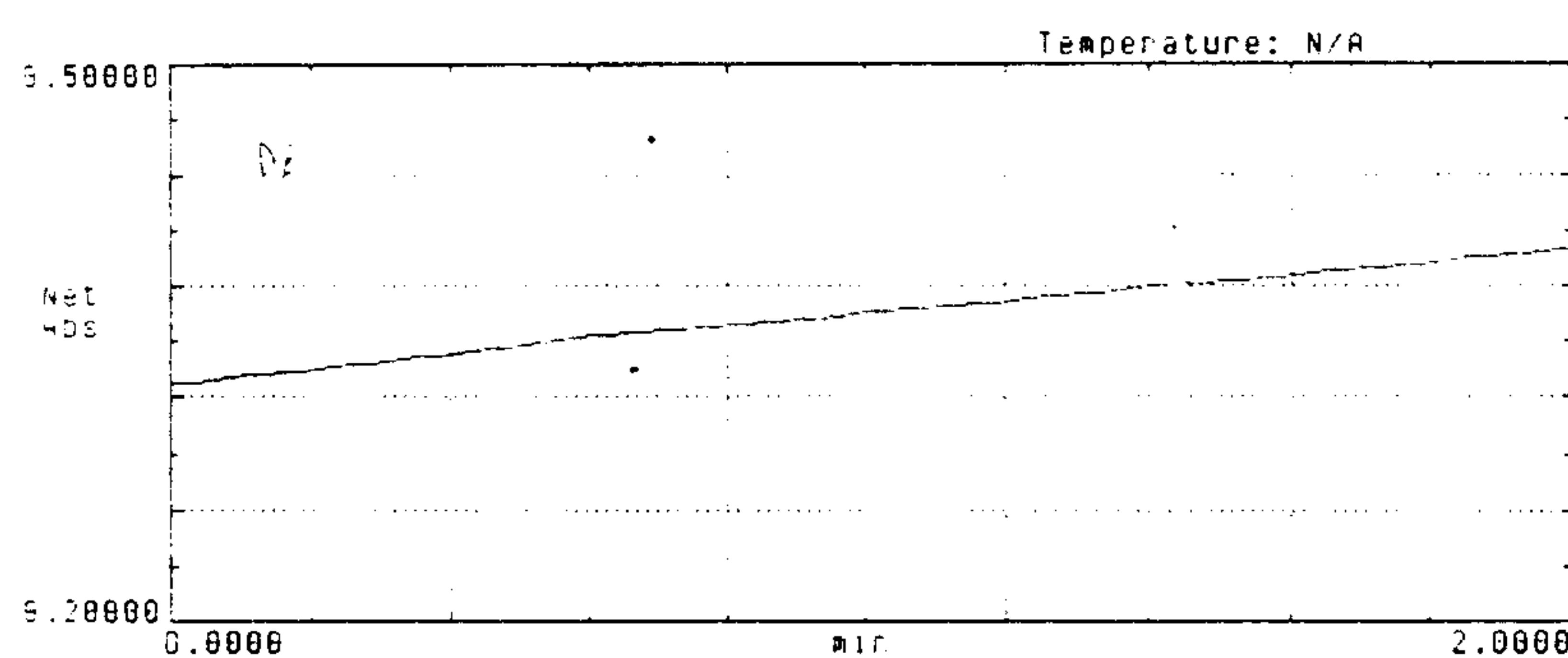


Fig. 11 Western blot analysis of cytochrome P4503A4 in pCI-neo/3A4-transfected Jurkat cells. Lane 1; size marker, lane 2; cytochrome P4503A4 in from untransfected naive Jurkat cells, lane 3-5; cytochrome P4503A4 in G418-selected Jurkat clones, lane 6-8; cytochrome P4503A4 expressed in E. coli.

(A) Untransfected Jurkat



(B) Transfected Jurkat



(C) HepG2

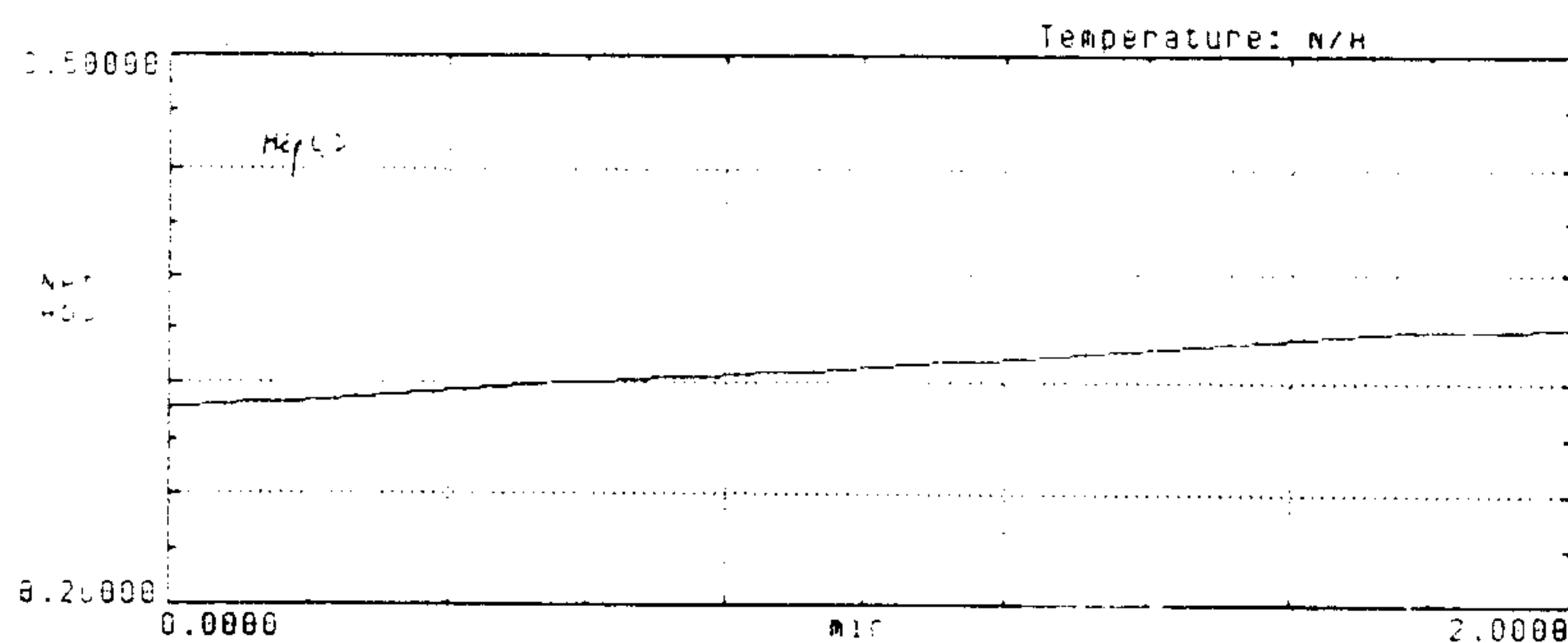


Fig. 12 Reductase activity assay. (A) in naive Jurkat cells, (B) in pRC-CMV/red-transfected Jurkat cells, (C) in HepG2, human hepatoma line.

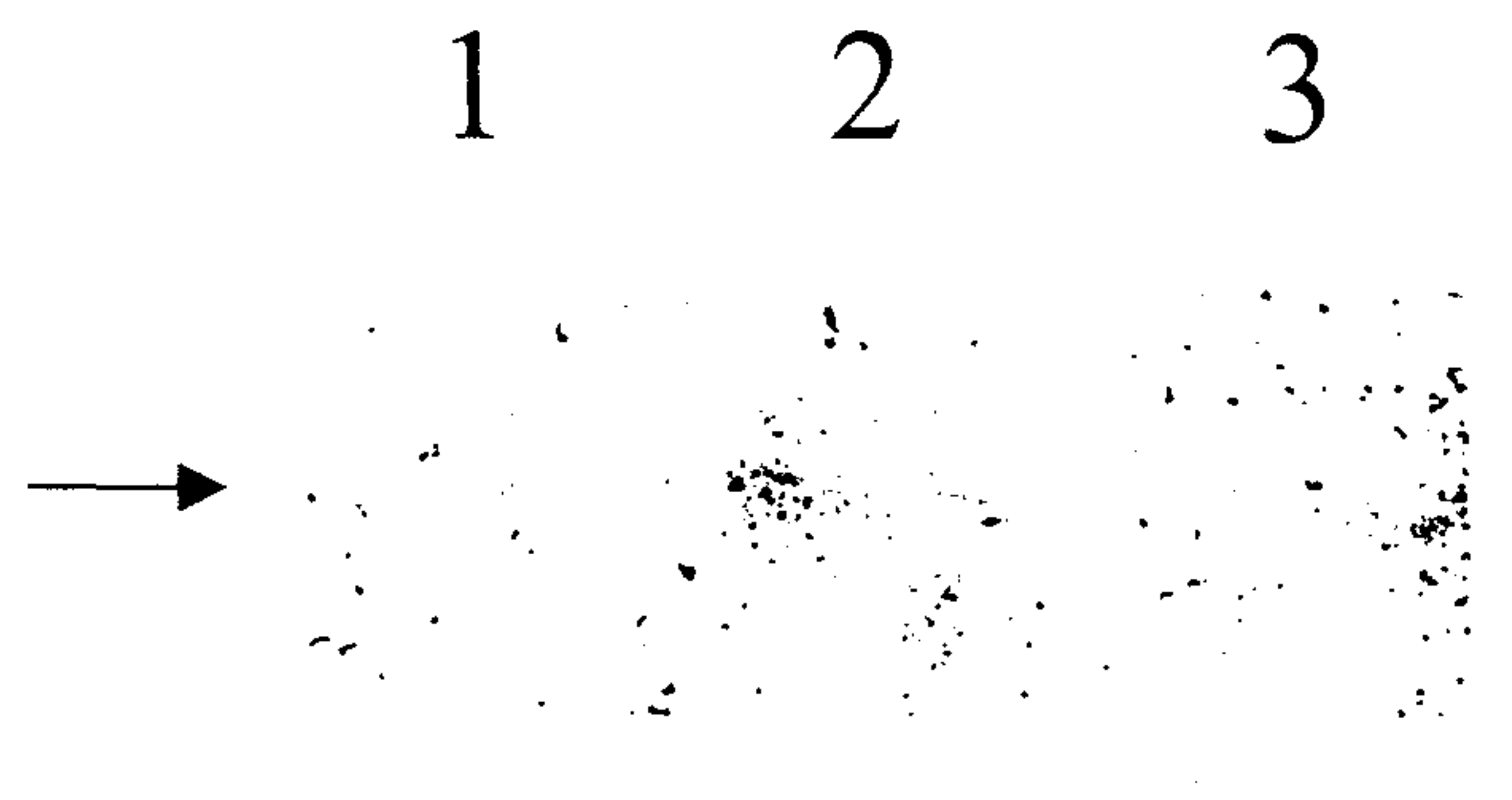


Fig. 13 Western blot analysis of cytochrome P450 reductase in pRC-CMV/red-transfected Jurkat cells. Lane 1; cytochrome P450 reductase from untransfected naive Jurkat cells, lane 2-3; cytochrome P4503A4 in G418-selected Jurkat clones.

후 competitive RT-PCR로 IL-2 mRNA를 측정하였다.

4. In vitro hepatocytes-Jurkat 혼합배양 시스템에서, Aflatoxin B1(AFB1), 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), Cyclophosphamide (CP), Dexamethasone (DEX)에 의한 IL-2 mRNA 발현에 의한 영향

대사효소에 의해 대사작용을 거쳐서 면역독성을 유발한다고 알려진 물질들의 IL-2 mRNA 발현에 대한 영향을 보기 위하여, 일차배양 간세포와 Jurkat세포의 혼합배양과 Jurkat 세포 단일배양시 IL-2 mRNA에 대한 영향을 알아보았다. AFB1은 50 μ M, CP는 1 mM, DEX는 1 μ M, DMBA는 10 μ M에서 각각 실험한 결과, AFB1과 CP는 대조군과 비교해 별 차이가 나지 않았고, DEX는 간세포와 혼합배양했을 때와 Jurkat cell단독배양시 모두 IL-2 mRNA를 감소시키는 결과를 얻었다. 한편, DMBA는 Jurkat cell단독배양시 IL-2 mRNA expression에 큰 영향을 주지 않았으나, 간세포와의 혼합배양을 통한 대사과정을 거친 실험군에서는 50%이상 감소를 보였다. 이 실험을 통해 본 연구진은 AFB1과 CP의 면역억제효과는 IL-2 mRNA 발현 변화를 거치지 않는 반면, DEX는 대사체가 아닌 mother compound가 IL-2 mRNA 발현을 억제하여 면역억제효과를 나타내는 것으로 보이고, DMBA의 경우 대사과정을 거쳐야만 IL-2 mRNA 발현을 억제해 면역저해효과를 나타낸다는 결론을 얻었다.

이상의 일련의 실험을 통하여, IL-2 및 IL-2Ra mRNA 발현변화를 competitive RT-PCR을 통해 측정하는 방법이 면역독성 실험에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였고, 일차배양 간세포와 면역세포를 혼합배양함으로써 인해 in vitro로 대사시킬 수 있는 시스템을 확립한 것이 대사를 필요로 하는 면역독성물질의 면역독성효과 및 그 메커니즘을 규명하는데 적합한 tool로 사용될 수 있으리라는 확신을 얻었다.

Table 1. Effect of AFB1, CP, DEX, and DMBA in primary hepatocytes-splenocytes cocultures on IL-2 gene expression.

The concentration of immunosuppressants were 50 μ M for AFB1, 1 mM for CP, 1 μ M for DEX, and 10 μ M for DMBA, respectively.

treatment	VH	AFB1	CP	DEX	DMBA
w/o metabolic activation	100	135.4	110.9	12.9	93.6
w/ metabolic activation	100	123.5	110.6	14.7	44.8

제 4 장 참고문헌

1. Luster, M. I., Munson, A. E., Thomas, P.T., Holsapple, M. P., Fenters, J. D., White, Jr, K. L., Lauer, L. D., Germolec, D. R., Rosenthal, G. J., and Dean, J. H. (1988) Methods evaluation; Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fund. Appl. Tox.*, 10, 2-19.
2. Luster, M. I., Portier, C., Pait, D. G., White, Jr, K. L., Gennings, C., Munson, A. E., and Rosenthal, G. J. (1992) Risk assessment in immunotoxicology; I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fun. Appl. Tox.*, 18, 200-210.
3. MacDonald, H. R., and Nabholz, M. (1986) T cell activation. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 2, 231-253.
4. Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (1996) Interleukin-2 receptor signaling mechanisms. *Adv. Immunol.*, 61, 147-199.
5. Kaempfer, R. (1994) Regulation of the human interleukin-2/interleukin-2 receptor system: A role for immunosuppression. *P. S. E. B. M.*, 206, 176-180.
6. Yang, K. H., Kim, B. S., Munson, A. E., and Holsapple, M. P. (1986) Immunosuppression induced by chemicals requiring metabolic activation in mixed cultures of rat hepatocytes and murine splenocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 83, 420-429.
7. Chomczynski, P. and Machey, K. (1995) Substitution of chloroform by bromochloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Annal. Biochem.*, 225, 163-164.

발암성물질에 대한 분자유전학적 독성평가방법의 확립

**Establishment of toxicological evaluation system of
carcinogenic materials based on molecular genetic
methodology**

**연구기관
배재대학교**

한국화학연구소

요 약 문

I. 제 목

발암성 물질에 대한 분자 유전학적 독성 평가 방법의 확립

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구과제는 신의약 개발에 필요한 독성 평가 방법 가운데 분자 유전학적 방법론을 도입하여 보다 정밀하며 진일보한 독성 평가 방법을 확립하고자 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 신의약 후보물질들에 대하여 세포내에서의 특정 유전자 (*p53*)에 대한 변이 여부를 평가함.
2. 약물대사에 중요한 P450 효소군에 대하여 한국인 집단에서의 유형 분류를 위한 PCR - SSCP 및 RFLP 법을 확립하고자 함.

IV. 연구결과

1. Adriamycin 과 cisplatin에 의한 apoptosis 유발을 위한 실험조건이 확립되었다. Adriamycin 은 apoptosis 시에 *p53*에 대한 돌연변이를 거의 일으키지 않는 것으로 나타났다.
2. P450 유전자중 *CYP2D6*을 선별적으로 증폭할 수 있는 primer를 선정하였다.
3. 한국인 집단을 대상으로 P450에 대한 mutation frequency 를 PCR-RFLP, PCR-SSCP 방법으로 결정하였다.
4. P450의 여러 allele을 형별하고, 염기서열을 결정하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

신의약 독성평가 시 본 과제에서 확립된 분자 유전학적 방법이 응용될 것이며, 이 방법론이 응용된 유전자좌에서의 자료는 한국인의 표준치로 활용될 것이다.

요 약 문

I. 제목: 알키닐벤젠 유도체의 P450 효소계에 미치는 영향

II. 연구개발의 목적과 필요성

천연물로부터 추출된 여러 화학물질중에서 알키닐벤젠유도체를 선택하여, P450 효소활성계에 대해 유의성있는 *in vivo* 및 *in vitro* 영향을 나타내는 물질을 조사하고, 이들 알키닐벤젠유도체에서 파생되는 active metabolite의 존재를 확인하여 유용한 물질을 개발한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

알키닐벤젠유도체의 P450 효소활성계에 대한 *in vivo* 및 *in vitro* 영향을 조사하고, active metabolite의 존재를 확인하기위해서 사람간 소포체에서의 myristicin대사연구를 수행한다. 궁극적으로 유해한 약물 및 화학물질의 안전성평가에 사용할 수 있는 *in vitro* system 개발에 요구되는 기반기술을 개발한다.

IV. 연구개발결과

알키닐벤젠유도체가 각종류에따라 P450 1A, P450 2B, P450 2E1의 활성 및 생성량증가를 나타내었다. 특히 safrole과 myristicin의 경우 TCDD의 효과와 유사한 결과를 나타내었다. *In vitro*영향은 *in vivo*의 경우와는 다르게 농도에 의존적으로 P450 효소의 활성을 저해시켰다. 이 결과는 active metabolite의 존재가능성을 나타내는데, 이러한 *in vivo/in vitro*의 차이를 규명하기 위해서 대사연구를 수행하였다. myristicin의 대사물질인 5-allyl-1-methoxy-2,3-dihydroxybenzene은 NADPH-generating system의 존재하에서만 생성되는 것으로 보아, P450에 의한 반응임을 알 수 있었다. 사람 간 소포체에

서 myristicin의 대사와 순수분리한 각 P450의 효소활성사이의 상관성을 조사한 결과, myristicin의 대사는 P450 3A4 및 P450 1A2에 의한 것임을 알 수 있었다. 순수 분리한 P450 3A4와 P450 1A2, 그리고 *E. coli*에서 발현시킨 이들 효소를 각각 이용하여 myristicin의 대사력을 측정한 결과 모든 시료에서 myristicin의 대사가 활발히 일어남을 알 수 있었다. Chemical inhibitor와 P450 3A4 및 P450 1A2에 대한 항체만이 각각 75%와 25%의 myristicin 대사를 억제하였으므로, 사람의 간에서 myristicin의 대사에는 P450 3A4와 P450 1A2효소들이 관여한다.

V. 연구개발결과의 활용계획

P450 효소system를 이용하여 xenobiotics의 체내대사효소에대한 영향및 대사연구를 수행할수있는 in vitro system의 개발을 이룩하였고, 신규 의약품 및 농약등의 대사에 관한 정확한 정보를 얻을 수 있는 방법을 확립하였다.

SUMMARY

I. TITLE

Establishment of toxicological evaluation system of carcinogenic materials based on molecular genetic methodology.

II. Aim and need for this research

This project aimed to establish more fine and advanced molecular genetic methodology to toxicological evaluation for new drug development.

III. Contents and limits of this research

1. Evaluation of p53 gene mutation in cell by newly developed candidate drugs.
2. Establishment of PCR-SSCP and RFLP methodology for typing P450 genes which are important in drug metabolism among Koreans.

IV. Results

1. Experimental condition was established for apoptosis by adriamycin and cisplatin.
2. The primers to selectively amplify *CYP2D6* among P450 genes were determined.
3. Mutation frequencies of P450 among Koreans were determined by PCR-SSCP and PCR-RFLP.
4. Various alleles of P450 were typed and sequenced.

V. Future usage of this results

The molecular genetic methods established in this project will be applied for toxicological evaluation of newly developed drugs. And the data of the locus to which this method was applied will serve as standard data of Koreans.

Part II

Summary

I. Title

EFFECTS OF ALKENYLBENZENE DERIVATIVES ON RAT AND HUMAN P450 ENZYME SYSTEMS

II. Objective

In vivo and in vitro effects of alkenylbenzene derivatives on P450 enzymes are investigated and a possibility of the presence of active metabolites is also examined.

III. Content

In vivo and in vitro effects of alkenylbenzene derivatives on P450 enzymes were investigated and a possibility of the presence of active metabolites is also examined.

IV. Results

It was observed that the activity and expression of P450s 1A, 2B, and 2E1 were increased depending on the treatment of alkenylbenzene derivatives. In vitro effect is quite different from that of in vivo. The difference suggests the presence of active metabolite(s).

Metabolism study in human liver microsomes showed the myristicin was metabolized pending on the P450 enzyme system and the major metabolite was 5-allyl-1-methoxy-2,3-dihydroxybenzene. P450s 3A4 and

1A2 were found to be the major enzymes involved in the oxidation of myristicin.

V. Contribution

The scheme used in this study can be useful to study the in vivo and in vitro effects of xenobiotics on the P450 enzyme system. It also can be used to get informations in detail about the metabolism of new fine chemicals including drugs.

제 1 장 서론 및 기술개발 현황

세포의 자살현상 (Apoptosis) 은 항암제를 이용한 치료법에 중요하다 (Lowe *et al.*, 1994). Clarke 의 연구보고에서 보여주듯 p53 유전자의 knockout 된 쥐에서 항암제에 의한 세포의 자살현상이 실패된다는 사실을 보여주는 것처럼 p53 은 세포 자살을 유발하여 암 세포를 죽이는데 핵심적 요소임이 밝혀지고 있다. (Enoch and Norbury, 1995 ; Lowe *et al.*, 1994 and 1993). 그러나 또 다른 연구 집단에서는 p53 과 무관한 세포 자살 경로에 대한 결과 보고를 보여주고 있다 (Gaftenhous *et al.*, 1996). 때문에 다양한 세포주내에서 세포자살을 유발하는 약물과 p53 유전자 상태 사이의 알아보는 것이 필요하다고 사료된다. 약물투여 p53 유전자의 상태는 약품의 화학주성치료활성 (chemotherapeutic action) 이 일어나는 동안에 변화를 보일 것으로 생각되어진다. 아드리아마이신은 항암제로서 널리 사용되고 있는 약품으로서 세포의 자살현상을 유도한다고 보고되고 있다 (Cullirane *et al.*, 1994 ; Vichi *et al.*, 1992 ; Powis, 1987). 또한 아드리아마이신의 98% 이상이 세포내에서 DNA에 결합됨으로서 세포자살현상을 유도한다고 보고되고 있다 (Cullinane *et al.*, 1994).

본 연구에서는 유전독성적 항암제인 아드리아마이신이 세포내에서 p53 유전자에 손상을 줄수도 있다는 생각에 항암제인 아드리아마이신에 의하여 유도된 세포 자살 과정에서 p53 유전자의 돌연변이가 일어나는지를 관찰하고자 하였다

P450 효소군은 인체가 섭취하는 약물과 식품 등을 대사하여 발암 능력을 갖는 활성화된 물질 (carcinogenic active metabolite)로 변환시킬수 있는 능력으로 인하여, 발암독성의 측면에서 주목을 받고 있는 효소군이다. 발암성 화합물들은 그 자체로서는 유전적 손상을 초래하지 못하는 경우가 많으나 체내에서 대사과정을 통하여 활성화되면 (metabolic activation) 세포내 단백질 및 핵산 등에 결합하여 세포의 기능저해를 유발하며 그 결과로 세포 독성을 초래한다. 그러므로 화합물에 의한 발암 가능성으로 인하여 P450 dp 관한 관심이 집중되고 있다. 현재 사람에게서 20 종 이상의 P450 효소들이 알려졌으며 이들

각각의 조절 기작과 기질 특이성은 서로 다른 것으로 보고되고 있다 (Nelson *et al.*, 1993).

P450 효소들은 이렇게 다양할 뿐만 아니라, 그 각각의 활성화에 관하여도 개인 간의 차이가 있음이 알려졌다. P450 효소 가운데 개인간의 효소 활성이 10배 가량 차이가 나는 경우가 알려졌으며, 더욱이 이러한 차이와 특정암에 대한 감수성간에 유의적인 상관 관계가 있다는 사실이 보고되었다 (Wolf *et al.*, 1992; Nebert, 1991; Idle, 1989; Kaisary *et al.*, 1987). 이러한 사실에 기초하여 P450 효소군의 다형성의 본질을 파악하려는 연구가 활발하게 되었다. 최근에는 이들 효소의 대립 유전자 (allele) 각각에 대한 유전자 구조가 밝혀지면서 P450 loci 에 있어서 인종간의 대립 유전자 유형분포 양상의 차이가 보고되어 있다. 이때 P450 효소군의 다형성은 곧바로 약물 대사의 개인차로 연결되어, 이는 특정 의약품에 대한 특정 인종에서의 화합물 대사 결함과 직결되므로 P450 유전자들에 관한 각 인종간의 다형성에 관한 연구가 활발한 실정이다. P450 유전자들에 대한 최근의 연구동향은, 각 인종에서의 대립 유전자형 분포 상황과 genotype을 분석함으로써 특정 allele 과 특정암에 대한 감수성과의 상관 관계를 연구하는 방향으로 모아지고 있다. 이러한 자료를 제약업계에 즉각적으로 feedback 하려는 시도가 활발하다. 이러한 시점에서 본 연구자는 한국인 집단에서의 P450 유전자 가운데서 특정암에 대한 감수성과 가장 유의성있는 관련을 가진 것으로 알려진 CYP2D6 에 관한 유전자 유형 분석방법을 확립하고자 한다.

CYP2D6는 debrisoquine-4-hydroxylase를 암호화하는 유전자로서, 화합물의 활성화 대사과정을 통하여 폐암 및 방광암에 대한 감수성에 영향을 미치는 것으로 알려졌다 (Kaisary *et al.*, 1987; Ayesh *et al.*, 1984). CYP2D6 유전자는 22q13.1 에 mapping 되었으며, genomic clone 도 보고되었다 (Kimura *et al.*, 1989). CYP2D6는 Caucasian 에게서 다형적인 것으로 나타났으며, 각각의 genotype 과 debrisoquine 의 대사능력간에 상관 관계가 있었으며 이들을 각각 PM (poor metabolizer) phenotype 과 EM (extensive metabolizer) phenotype 으로 분류하였다 (Meyer, 1991). 이들의 연구를 뒷받침하는 결과들

중에는, EM 에게서 폐암 발생률이 증가하였다는 보고들 (Hirvonen *et al.*, 1992; Caporaso *et al.*, 1989; Ayesh *et al.*, 1984) 과 PM 들의 간 조직으로부터 Western 분석을 실시하면 단백질 산물을 발견할 수 없었다는 연구 결과 (Gonzalez *et al.*, 1988) 가 있었다. PM phenotype 은 XbaI을 이용한 RFLP 에 의하여 다시 3종류의 대립 유전자로 분류되는데, 이들은 각각 44kb, 11.5kb 와 16+9kb 의 DNA 절편으로 나타났다. 또한 직접 염기 서열을 결정하여 돌연변이 대립 유전자를 동정한 결과, 2 종류의 대립 유전자가 추가로 발견되었다 (Heim and Meyer, 1990). CYP2D6 유전자는 각 인종간의 대립 유전자 분포 상황에도 큰 차이를 보이는 것으로 나타난바, Caucasian 집단의 5-10% 가 PM 으로 분류되었으나 중국계와 일본계에 있어서는 <1%가 PM 으로 분류되었다 (Wang *et al.*, 1993; Bertilsson *et al.*, 1992; Gough *et al.*, 1990; Hanioka *et al.*, 1990). 한국인 집단에서의 CYP2D6 유전자에 관한 분석 자료는 전무한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 specific primer을 이용한 CYP2D6 만을 증폭할 수 있는 조건과 single base 의 차이도 해상할 수 있는 SSCP 와 RFLP 등을 이용한 한국인 집단에서의 대립 유전자 유형을 확인할 수 있는 방법을 확립하고자 하였다.

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용

1. 신의약 물질에 대한 독성 평가

기존의 의약품들과 비교하여 경쟁력있는 신의약을 개발하기 위하여, 우수한 efficiency 를 가지면서도 low toxicity를 보이는 의약품을 개발 하고자 노력을 경주하고 있다. 최근에는 분자 생물학적인 방법론이 급속히 발전함에 따라, 독성 연구의 분야에 있어서도 분자 생물학적인 방법의 개발이 활발히 추진되고 있다. 그러므로 이러한 추세에 발 맞추어 본 연구에서는 apoptosis를 세포 독성에 대한 하나의 parameter 로 인식하고, 이를 정량화할 수 있는 분자 생물학적 assay를 확립하고자 하였다.

가. Apoptosis 유발 여부 조사

Cell 은 약물 자극으로부터 apoptosis를 유발할 수 있음이 알려졌다. 세포가 apoptosis를 일으키게 되면 여러가지 생리적 변화를 나타내게 되지만, 특히 endonuclease 의 활성화로 인하여 DNA 의 degradation 이 일어나 nucleosome 단위로 끊어지게 됨을 agarose gel 을 이용하여 비교적 손쉽게 관찰할 수 있으므로 본 연구에서는 DNA degradation 을 assay 하였다.

나. p53 유전자의 돌연변이 여부 조사

p53 는 암 억제 인자 중 가장 많은 관심을 받고 있는 인자로서, 세포내 생리적 기능을 살펴보면 DNA 복제 후 세포 분열이 일어날때에 복제 실수로 인한 불완전한 DNA 가 교정(repair)되지 않은채로는 세포 분열이 일어나지 않게 하는 cell cycle 상의 브레이크와 같은 역할을 한다. 그러므로

p53에 돌연변이가 일어나게 되면, 새로 생기는 세포들이 보유하는 DNA 의 신뢰성 (fidelity) 에 문제가 생기게 되어 세포가 transformation 되는 과정에 큰 영향을 미치는 것으로 생각되고 있다. 실제 임상에서 암 환자들의 종양 조직을 채취하여 DNA를 분석해 보면, p53 유전자 의 돌연 변이가 일어난 경우가 매우 빈번함이 보고되고 있다.

p53 유전자의 돌연 변이 여부를 알아보하고자 p53 의 돌연 변이 빈발 부위 (hot spot) 을 포함하는 exon을 genomic DNA 로 부터 직접 PCR하여 그들의 점 돌연변이 (point mutation) 여부를 알아보하고자 double-strand sequencing을 실시하여 sequence 을 비교함으로써 돌연 변이 존재 여부를 스크리닝하였다.

2. 다형적 유전자 분석 방법 확립

P450 효소군은 인체가 섭취하는 약물과 식품 등을 대사하여 발암 능력을 갖는 활성화된 물질 (carcinogenic active metabolite) 로 변환시킬수 있는 능력으로 인하여, 발암 독성의 측면에서 주목을 받고 있는 효소군이다. P450 효소군은 매우 다양한 기질 spectrum을 갖는 효소군 일뿐 아니라, 각각 효소들의 loci 들도 다형적 (polymorphic) 인 것으로 알려졌다. 이때 주목할 것은 다형적인 대립 유전자 형태들의 대사 능력에도 차이가 있어, 이러한 차이가 특정암에 대한 개개인의 감수성의 차이를 유발한다는 점이다. 즉 이 경우 유전적 다형성이 생리적 다양성과 직결된다하겠다. 그러므로 특정 의약품 및 식품에 관하여, 대사 기작을 파악하려면 P450 효소군에 대한 유전학적 조사가 필수적이라 하겠다. 이러한 관점에서 본 연구에서는 폐암에 관한 감수성과 깊은 관련이 있다고 알려진 CYP2D6 의 다형성을 분석할 수 있는 방법을 확립하였다.

가. Genomic DNA 추출을 위한 Sample 수집

혈액 공여자 100여명으로부터 5ml 씩을 채혈하여 이를 Blin and Stafford (1976) 의 방법을 변형하여 genomic DNA을 추출하였으며, 차후 이를 이용하여 PCR-SSCP 와 PCR-RFLP 에 이용하였다.

나. 다형적 유전자 분석 조건 확립

(1). Primer 선정

CYP2D6는 높은 염기서열 유사도를 갖는 pseudogene 인 CYP2D7, CYP2D8 이 있으므로 이들을 구별하기에는 대단한 어려움이 있었다. 본 실험에서는 이를 해결하기 위하여 CYP2D6 을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer 을 선정하였다.

(2). 다형적 유전자 증폭 방법 확립

현재 GenBank 에 등록되어 있는 CYP2D6, CYP2D7 과 CYP2D8 의 genomic DNA 염기서열에 대하여 제한효소 절단 부위를 비교함으로써 CYP2D6 만을 구별할 수 있는 절단 부위를 선정함으로써 PCR 산물로부터 CYP2D6 단편만을 확인하였다.

(3). Nested PCR 조건 확립

특이적으로 증폭된 CYP2D6 단편을 이용하여 pseudogene 이 contamination 되지 않은 exon을 PCR 할 수 있는 조건을 확립하고자 했다. 본 연구에서는 CYP2D6 gene 에서 높은 유전적 다형성을 보여주고 있는 exon 중 PCR-SSCP 에 가장 적당한 단편크기를 갖는 exon9 을 선택하여 그 조건을 확립하였다. 확립된 조건에 따라 차후 CYP2D6 의 alleles 들을 스크리닝 하였다.

(4). SSCP 분석 조건 확립

SSCP 분석은 여러조건에 따라 그 양상에 있어 현저한 차이를 보여줌으로써 우리는 최적의 SSCP 조건을 확립하고자 gel matrix , gel 의 길이, gel 의 두께, buffer 의 조건, 전기 영동시 gel 의 온도 등을 변화시킴으로써 더 좋은 다형성 분석 방법을 확립하고자 하였다. 이러한 조건확립으로 인한 각 exon 의 PCR product에 대한 신속한 typing을 위하여 SSCP를 실시하여 유형 분석을 한다. 다른 형태의 band 가 나타날 경우, PCR artifact 가 아님을 확인하고자 적어도 3회이상 PCR 반응을 하여 band의 재현 여부를 분석함으로써 확인된 band 에 대하여 이를 cloning 하였고 염기 서열을 결정하였다.

(5). Silver stain 조건 확립

우리는 non-isotopic 한 staining 방법인 silver stain 을 이용함으로써 조작의 편리성과 빠른 시간내에 확인 가능하다는 장점을 이용하여 분석방법의 효율성을 증진시켰다.

(6). RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism) 조건 확립

PCR product 의 확인 및 다형성 여부를 판단하고자 적절한 제한 효소를 사용함으로써 PCR product 의 digestion pattern 에 따른 진실성 여부와 polymorphism을 PCR-SSCP 와 비교함으로써 유전자 유형분석을 실시하였다..

(7). PCR 산물의 cloning

SSCP 에 의해서 출현하는 여러형태의 allele 들에 대하여, primer 에 linker 로 *Bam* H1 과 *Eco* R1 을 이용함으로써 쉽고 간편하게 cloning 하였다.

(8). 염기서열 분석

우리는 asymatric sequencing 을 이용하여 cloning 과정을 생략함으로써 좀더 빠른시간내에 염기서열을 분석하고자 하였다. 그러나 이 방법에 의한 sequencing 은 예상보다도 많은 background 의 출현으로 최적의 조건을 확립하는데 어려움이 있어 본 연구에서는 cloning vector 를 이용한 double

strand sequencing 에 의한 염기서열 분석 조건을 확립함으로써 돌연변이 존재 여부를 스크리닝하였다.

제 2 절 연구결과

1. 신의약 물질에 대한 독성 평가 방법

항암제인 아드리아마이신, Cisplatin, Methotrexate 등을 투여 농도 범위에서 chronic myelogenous leukemia cell을 이용하여 세포자살 (apoptosis) 유발 여부를 internucleosomal DNA fragment 로 확인하여 apoptosis 을 유발하는 농도를 결정하였다. 동일 cell 에 대한 cisplatin, methotrexate을 통한 apoptosis 유발 농도와 HeLa-60 (promyelocytic leukemia), CHO (chinese hamster ovary cell)을 대상으로 위의 약물을 통한 apoptosis 유발을 조사하였다.

가. 세포 배양조건 확립

Chronic myelogenous leukemia cell (K-562)은 이화여자대학교 약대 생분자 분석실에서 제공 받았다. K-562 cell 은 10% FBS (fetal bovine serum), 1% antibiotic (penicillin and streptomycin) 이 첨가된 RPMI 1640 medium (pH 7.4) 으로 Nunc T25-plate에서 37°C, 5% CO₂ atmosphere에서 80% confluent 하게 배양하였다. 현재 1×10^7 세포수로 1.8ml cryotube 에 0.5ml 씩 분주하여 액체질소에 동결 보관하고 있다.

세포수를 확립하기 위해 3.0×10^4 - 1.0×10^7 cell을 각각 수거하였다. 아드리아마이신을 처리하여 Skladanowski, A 의 DNA 제조 방법에 의해 얻은 DNA를 agarose gel에서 조사하여 보았다 (Skladanowski, A *et al.* 1993). 3.0×10^4 , 3×10^5 , 3×10^6 cell 에서는 아무런 변화를 볼수 없었으나, 1×10^7 cell에 24시간 drug 처리된 lane 에서 전반적인 DNA 분절현상을 확인함으로써 세포자살 (apoptosis)을 확인하기 위해서는 1×10^7 세포가 필요함을 알 수 있었다.

Barry 등의 보고 (1990) 에 의하면 total DNA의 0.5% - 5%의 분절된

DNA fragment를 검출할 수 있다고 한다 .

나. Apoptosis 조건을 위한 약물 투여 농도 조건 확립

(1) 세포배양

2.에서 살펴 본 바와 같이 chronic myelogenous leukemia cell을 1×10^7 cell number 로 harvesting 하기위해 Nunc T75-plate 에 2×10^5 cell/ml (total 30ml) 로 seed하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ atmosphere에서 incubation 함으로써 4×10^5 cell/ml (double time 24시간) 가 됨을 볼 수 있었다. 여기에 1mM adriamycin 3ul, 30ul, 300ul, 3ml을 첨가함으로써 각각 final 0.1uM, 1uM, 10uM, 100uM 의 농도로써 adriamycin을 처리하여 주었다 (Fig. 1). 각 농도별로 0시간, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간의 time point 로 배양하여 수거하였다 (Fig. 2).

(2) DNA fragment assay

Adriamycin을 농도별, 시간별로 처리된 sample을 2,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 수거하였다. 세포 pellet을 400ul 의 lysing buffer (10mM NaCl, 0.5% SDS, 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7.4, 0.5mg/ml proteinase K) 로 현탁시킨다. 이 현탁용액을 50°C에서 1시간 동안 처리함으로써 proteinaseK 의 활성을 돕는다. 1시간후 100ug/ul RNase을 0.5ug/ul 로 처리하여 50°C에서 2시간 동안 처리시켰다. 여기에 5M NaCl을 final 1M NaCl 이 되도록 첨가하여 2,000rpm에서 30분 동안 원심분리 하였다. 상등액을 회수하여 2 배의 100% ethanol을 첨가하여 -20°C에서 overnight 하였다. 이를 다시 12,000rpm 에서 30분간 원심분리하고 pellet을 10ul 현탁용액 (10mM Tris-HCl, 15mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.4)을 첨가하여 현탁하였으며 이를 전량 1.5% agarose gel에서 분석하였다.

분석결과 0.1uM adriamycin 처리된 cell 에서는 24시간이 지나도 아무런 변화가 없었으며, 10uM 과 100uM adriamycin 처리된 세포에서는 처리후

1시간만에 smear 하게 끌리는 것을 확인할 수 있었다. 1uM의 농도로 처리된 cell 에서는 3시간 처리된 세포에서부터 24시간 지난 세포까지 DNA의 fragment 를 300 - 700bp 범위에서 볼 수 있었다. 특히 12시간 처리된 세포에서 가장 잘 확인 되었다 (Fig. 3, 4). Fig. 5는 Fig. 4에서 보여주는 현상을 그림으로 모식한 것이다.

본 실험에서 사용한 세포를 lysis하여 loading 시 high molecule에 의해 pipetting 이 매우 어려울 뿐만아니라 gel 상태에서 Smearly background 로 인하여 DNA ladder 확인이 조금 분명하지않다. 이문제를 피하기 위해 phenol : chloroform extraction 도 실시하여 보았으며 high molecule을 제거하기 위하여 syringer 도 사용하여 보았지만 좋은 결과를 얻을 수 는 없었다. 또한 적은 양의 DNA에 sensitive 한 silver stain 방법을 실시하여보았다.

(3) Silver Staining

6% acrylamide gel (5X sample buffer 0.8ml, 30% acrylamide 0.8ml, 1% bis-acrylamide 0.4ml, d.H₂O 2ml, 10% APS 32ul, TEMED 4ul)을 이용하여 total 3×10^6 cell에서 얻은 DNA을 5ul (1.5% agarose gel에 비해 cell number가 10배 가량 감소)을 loading하여 1mA, 40V, 3시간 동안 electrophoresis 하였다. 이 gel을 40% methanol에 30분간 fixation 시킨후, 10% ethanol로 15분씩 2회 fixation 하였다. 이 gel에 oxidizer를 첨가하여 3분간 gel을 산화시켰다. 3차 증류수로 3회 정도 세척한 후 silver reagent을 첨가하여 15분간 처리한다. 이를 3차 증류수로 세척한 후 현상하였다. 이를 5% acetic acid로 처리하여 반응을 중단시키고 gel dryer을 이용하여 건조하였다.

Silver stain 한 결과 smeary band 들에 의해 전체적으로 stain 되어 확인이 곤란하였으나, 300 - 700bp 부근에서의 굵은 band를 확인할 수는 있었다 (Fig. 6).

다. p53 유전자의 돌연변이 여부 조사

(1) Genomic DNA 분리

우리는 1uM adriamycin 에 따른 상위 check point gene 인 p53 (Fig. 17) 에서의 mutation 을 확인하고자 하였다. p53 gene 은 2,030 bp 의 염기서열로 11개의 exon 과 10개의 intron 으로 구성된 gene 으로 codon 171 - 281 region (exon 5 - 8) 에 hot spot이 존재함이 많이 보고 되어 있다 (Fig. 15, 16). 본 연구결과에서 보여주듯 apoptosis 를 유발시켰던 1uM adriamycin 을 시간별 (zero time, 12 시간, 24시간)로 전 처리된 1×10^7 HeLa-60 세포주를 회수하여 genomic DNA 를 분리하였다 (Fig. 7, DNA 분리 과정은 앞의 DNA fragment assay 과정과 동일).

P53 유전자의 모든 exon 보다는 hot spot 지역인 exon5 - 8 를 확인하기를 원하였기 때문에 exon5, exon7, exon8 을 각각 *EcoRI* linker primer 을 사용하여 PCR 하였다. 초기 계획에는 각 exon 을 PCR 하여 SSCP 분석법에 의해 mutation을 확인 하고자 하였다. 그러나 p53 의 각 exon 별 linker primer 의 확보로 인하여 직접 cloning 하고 염기서열을 분석하는 것이 더 용이하였다. 우리가 확보한 primer 은 서울 이화여자대학교 약대로 부터 확보된 primer 로 exon5, exon7, exon8 에는 각기 *EcoRI* linker 가 존재하여 PCR 하였으나, exon6 primer 에는 linker 가 존재하지 않아 실험에서 생략하였다 (Fig. 8). PCR product 와 exon 별 size 를 Table 1 에서 보여 주고 있다.

(2) PCR Method

25mM MgCl₂ 5ul (final 2.5mM), 10X PCR buffer 5ul, 10mM d.NTP 2ul (final each 0.1mM), 50pmol/ul primer 를 각각 forward primer 2ul, reverse primer 2ul, Taq polymerase (1U/ul) 1ul 를 혼합하여 각각 eppendorf tube 에 48ul 씩 분주하고, 여기에 약처리 시간별로 분리한 HeLa-60 cell line 의 DNA solution 을 각각 2ul 씩 첨가하여 PerkinElmer PCR 기기를 이용하여 증폭하였다. PCR 조건은 94°C → 30sec, 94°C → 5sec, 60°C → 10sec, 72°C → 60sec, 72°C → 120sec 로 35 cycle 하였다 (Fig. 9).

Fig 9A 는 exon 8 을 그림 B 는 exon 5 와 exon 7 를 각각 PCR 한 결과로서, 그림 A 의 exon8 은 하나의 깨끗한 band 로 나타난 반면, 그림 B 의 exon5 에서는 많은 background를 볼수 있었다. 좀더 깨끗한 band 를 얻기 위해 gel purify 과정을 거쳐 깨끗한 하나의 band를 얻을 수 있었다. Gel 은 2% agarose gel 을 이용하여 확인하였다.

(3) Cloning Method

EcoRI linker 를 갖고 있는 table 1 의 각 PCR product 20ul (exon 8 ; total 6ug, exon 7 ; 1ug, exon 5 ; 1ug) 에 *EcoRI* (6U/ul) 를 각각 2ul (12U) 를 첨가하여 37°C 에서 overnight 함으로써 완전히 절단 시킨후 이를 GeneClean II kit 를 이용하여 purify 하였다. 이를 cloning하기 위해서 pBS SKII vector 를 이용하였으며 위와 같은 방법에 의하여 vector 도 동일하게 처리해 줌으로써 *EcoRI* site을 갖고 있는 linear vector 를 얻을 수 있었다.

vector 와 insert 을 ligation 시키기 위해 1:3 의 몰비로 로 pBS SKII/*EcoRI* vector (100ng) 1ul, insert (exon8 : 15ug, exon7 : 15ng, exon5 : 21ng) 5ul, 10X T4 ligase buffer 1ul, ligase 1ul 를 첨가하여 final volum 10ul 로 맞추어 14°C 에서 12시간 반응하였다. 이를 host competent cell *E.Coli* DH5a 을 이용하여 transformation 하여 ampicillin (100ug/ml) 과 Bluo-gal (200ug/mg) 이 첨가된 LB agar plate 에 spreading 함으로써 α -complementation 에 의해 color selection 하였다.

White color 를 띠는 단일 colony 로 부터 plasmid DNA 를 분리하여 DNA 농도의 2배 가량의 *EcoRI* 를 처리하여 37°C 에서 3시간 incubation 한 후 2% gel 에서 insert DNA 의 존재 여부를 확인하였다 (Fig. 10).

이렇게 insert 가 확인된 DNA 중 enzyme (*EcoRI*) 이 처리되지 않은 plasmid DNA solution 에 polyethyleneglycol soln (13% PEG with 1.6M NaCl) 을 동량을 첨가하고 vortex 하여 얼음에서 30분간 방치한 후, 4°C 에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 pellet 을 70% EtOH 1ml 로 세척 한 후 pellet 를 건조하여 증류수로 녹였다. 이 DNA solution 을

sequencing 반응의 templete 로 사용하였다.(Fig. 11).

(4) Sequencing method

우리는 USB sequenase versio 2.0 (Amersham,USA)을 이용하여 DH5a cell 로 부터 직접 추출한 cloning 된 pBS SKII vector 을 이용하여 double-strand sequencing 방법을 사용하였다. 방법은 아래에서 보고된다.

Double-strand pBS SKII vector 를 single-strand 로 만들고자 denaturation solution (2M NaOH, 2mM EDTA) 을 templete DNA solution 의 1/10 배 첨가 한후, 37°C 에서 30분 동안 처리하였다. 여기에 neutralize solution (3M Na.Ace, pH5.2) 을 최종부피의 1/10 배를 첨가하고 멸균 증류수로써 반응 부피를 맞춘다. Neutralize solution 을 첨가하여 간단히 vortexing 하여 준 후, 75ul 100% EtOH 를 첨가하여 -70°C 에서 10분간 방치한 후, 0°C 에서 12,000rpm 으로 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고, 여기에 200ul 의 70% EtOH 를 첨가하여 pellet 을 12,000rpm 에서 5분동안 세척하여 준다. 생성된 pellet 을 건조 시킨후 6ul 의 증류수로 현탁시킨다. 이 현탁용액에 5X sequencing buffer 와 primer (vector 내에 존재하는 universal primer ; T3, T7, -40 primer) 를 혼합하여 최종부피를 10ul 로 맞춘다. Primer 는 single-strand sequencing 에 비해 많은 양을 넣어주어야 하는데 우리의 실험에서는 30ng/ul T7 primer 를 2ul (final 60ng) 사용하였다. 이 mixture 를 65°C 에서 2분간 가열한 후 온도가 37°C 로 내려갈때 까지 primer 를 annealing 시킨다. 여기에 labelling mixture (DTT 1ul, Dil.lab mixtuer 2ul, 35S-dATP 1ul, Dil.Sequenase 2ul) 6ul 를 첨가하여 용액을 37°C 에서, 5분 동안 처리시켰다. 이때 ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) 를 각각 독립된 tube 에 2.5ul 씩 분주하여 37°C 에서 같이 반응시켰다. 5분후 ddNTP 가 들어 있는 각 tube 에 3.5ul 씩 solution 을 transfer 하여 다시 37°C 에서 5분간 반응시킨다. 각 반응은 분석하고자 하는 염기서열의 길이에 따라 변경 할 수 있다. 이들 각 tube 에 termination solution 4ul 첨가하여 75°C - 80°C 에서 5분간 가열하여 secondary structure 를 풀어준 후, 바로 얼음에 방치한다.

6% sequencing gel 은 40% acrylamide 15ml, urea 45g, 5X TBE 20ml, 최종부피를 100ml 로 맞추어 제조하였으며 sample running 1시간전 1,500V, 40mA (60W 를 넘지 않는 범위에서 조정) prerunning 한 후 sample을 loading 하여 bromophenol blue 가 gel 을 완전히 통과 하였을때 running 을 멈추고 3MM paper 를 이용하여 gel 을 80℃ 에서 evaporator 를 이용하여 3 시간 동안 gel 을 건조하였다. Dry 된 gel 을 아그파 X-fay film 과 함께 cassette 에 놓고 -70℃ 에서 50시간 방치시킨후 현상하였다.

우리의 실험에서는 Table 2 에서 보여주는 바와 같이 선택된 sample을 각각 sequencing 하였으며 Fig. 12 에서 보여 주는 것 처럼 보고된 p53 DNA 염기서열 과 비교해 본 결과 1uM adriamycin 을 처리하지 않은 zero time 에서는 발표된 염기 서열과 모두 동일한 염기서열임을 보여주고 있고, 또한 12 시간 처리한 p53 exon 별로 뚜렷한 차이는 없지만, exon5 에서 7개의 sample 중 하나만이 mutation 되었음을 볼 수 있다 (Fig. 12 ~ 14) . 이 mutation 이 Taq polymerase 의 error 인지 또는 adriamycin 에 의한 진정한 돌연변이인지 확인하기가 어려웠다. 전체적으로 볼때 adriamycin 은 apoptosis 시 p53 의 돌연변이율이 낮음을 확인하였다.

2. 다형적 유전자 분석 조건 확립

본 연구에서는 P450 효소군 중 화합물의 활성화 대사과정을 통하여 폐암 및 방광암에 대한 감수성에 영향을 미치는 것으로 알려진 (Kaisary *et al.*, 1987; Ayesh *et al.*, 1984) debrisoquine-4-hydroxylase 를 암호화하는 CYP2D6 유전자를 이용하여 이 유전자의 다형성을 분석할 수 있는 PCR-SSCP 와 PCR-RFLP 방법을 확립하고자 하였다.

가. Genomic DNA 추출

우리는 혈액 공여자로부터 5ml 씩을 채혈하고 여기에 1ml 의 ACD 용액 (25mM Citric acid, 45mM Sodium citrate, 82mM Glucose)을 첨가하여 1300 g에서 15분간 원심분리하여 buffy coat 를 수거하였다. 여기에 5ml 의 DNA extraction buffer 을 첨가하여 잘 섞어 준 후 20ug/ml 의 RNase 를 첨가하여 37°C 에서 1시간 배양한 후 100ug/ml 의 proteinase K 를 가해서 50°C 에서 3시간 반응하였다. 이 용액과 동일 부피의 phenol:chloroform (1:1) 을 첨가하여 잘 섞어 준 후 12,000rpm 에서 2분간 원심분리함으로써 상등액만을 회수하였다. 상등액의 0.1 배 만큼의 3M sodium acetate 를 가하고 여기에 두배의 100% ethanol 를 첨가하여 실처럼 떠오르는 genomic DNA 를 회수하였다. 이를 70% ethanol 로 세척한 후 건조시켜서 이를 TE buffer (pH 8.0) 에 현탁하여 260nm 과 280nm 에서 흡광을 측정함으로써 농도와 순도를 결정하였다.

나. primer 선정

초기의 실험에서 pseudogene 의 contamination 에 대해서는 생각하지 못하였다. 때문에 CYP2D6 gene 의 exon 9 을 genomic DNA 로부터 직접 PCR 하였었다. 이때 사용한 primer 서열은 Table 3 (2D6E9S, 2D6E9AS) 에서 보여주고 있으며, 간편한 cloning 을 위해 primer 에 제한 효소 절단 부위 linker를 삽입하였다 (5'-Bam H1, 3'-Eco R1). Primer 에 의해서 증폭된 PCR 산물은 상당히 깨끗하였다. 우리는 이를 바탕으로 SSCP 를 하여보았다. 약간의 조건이 잡힌 상태의 SSCP gel 에서 상당히 여러종류의 type 이 나오고 있었다. 이들 type 각각을 cloning하여 sequencing 한 결과 대부분이 CYP2D6 의 pseudogene 인 CYP2D7 에서의 새로운 allele 들이었다. 이러한 결과로 인하여 오랜 기간 동안 잘못된 방법에 의해서 실험이 진행되었었다. 때문에 우리는 이 문제를 특이적인 primer 를 사용함으로써 해결하기로 하였다. 우리의 전략은 Heim and Meyer (Heim and Meyer., 1990) 의 방법을 약간 변형한 것으로 Heim and Meyer 에 의해서는 특이적 primer 로써 CYP2D6 의 intron

2 에서부터 intron 6 의 일부 단편을 얻을 수 있었다. 반면, 우리는 2D6ASI2S (primer 1) 과 2D6E9AS (primer 2) primer 를 사용함으로써 CYP2D6 의 intron 2 에서 exon 9 을 포함한 3.003kb 의 단편을 얻을 수 있었다. 이 단편 을 이용하여 exon 9 에 대한 nested PCR 이 수행되었다 (Primer 에 대해서는 Table 3에서 보여 줌).

다. 다형적 유전자 단편의 증폭 여부 확인

Computer database 을 통해서 2D6ASI2S 와 2D6E9AS primer 를 사용 하였을때 출현하는 단편에 대해서 CYP2D6, 2D7, 2D8 등을 비교한 결과 CYP2D6 에만 Bam H1 site 이 있음을 알았다 (Fig. 18에서 보여줌). Bam H1 으로 처리할 경우 1.759kb 와 1.244kb 가 출현한다는 사실에 입각하여 분리된 CYP2D6 단편에 대해 다음과 같이 enzyme 을 처리하였다. PCR 산물 10ul (3ug), 10X Bam H1 buffer 2ul, Bam H1 1ul (10U), 멸균 증류수 6ul 을 혼합 하여 37°C 에서 3시간 동안 방치한 후 이를 1.5% agarose gel 에서 15분간 전기영동후 이를 확인하였다. Gel 을 살펴본 결과 절단되지 않고 남아 있는 band 를 확인 할 수 없었으며, 모두 절단되어 1,759kb 와 1.244kb 부근에서 band 가 출현함을 볼 수 있었다 (Fig. 19). 이것으로 우리는 확실한 CYP2D6 단편을 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

라. PCR 조건 확립

(1) long range (3.003 kb) PCR 조건 확립

위에서 살펴본 바와 같이 CYP2D6 만을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer 을 이용하여 genomic DNA 로부터 PCR 하였다. 일반적인 annealing 온도인 50 - 60°C 에서는 PCR 시 많은 background 가 출현하여 3.003kb

band 을 구별하기가 어려웠다. 이렇게 background 가 출현하는 이유는 primer set 중 sense primer 는 CYP2D6 에만 100% 의 유사도를 보여주지만 anti-sense primer 는 CYP2D6 gene 내에서도 여러곳에 10 base 이하의 유사도를 보여 주는 곳이 산재되어 있기 때문에 약간의 background 가 생기는 것이었다. 그러나 이러한 문제는 annealing 온도를 65°C 올려 줌으로써 소수의 background 와 확실하게 구별할 수 있는 3.003kb 의 단편을 얻을 수 있었다 (genomic DNA 에 따라 3.003kb band 만 이 존재할때도 있음). 우리는 이때 존재할 수 있는 Taq error 을 생각하여 교정기능이 있는 TaKaRa ex-Taq (5U/ul) 을 이용함으로써 extention error 의 문제를 해결하였다. PCR 조건은 아래와 같다.

구분	10X buffer	10mM d.NTP	50pmol /λ primer	DNA (100ng/λ)	5U/λ Taq	D.W.	Total reaction Volume
	5λ	4λ	2λ, 2λ	2λ	0.4 λ	34.6λ	50λ
최종 농도.	1X (1.5mM MgCl ₂)	each 200uM	100pmol	200ng	2U		

* Reaction condition (Bio-Rad Gene-cycler)

- 94°C ----- 5 min
- 94°C ----- 1 min
- 65°C ----- 1 min
- 72°C ----- 2 min / 35 cycle
- 72°C ----- 7 min

(2) Nested PCR 조건 확립

Long range PCR 산물을 gel 로부터 정제하여 exon 9 에 대한 PCR 을 수행하였다. Exon 9 primer set 의 G.C ratio 가 상당히 높기 때문에 낮은 annealing 온도에서는 증폭이 이루어지지 않는다. 우리의 결과 67°C 의 높은

annealing 온도에서 깨끗한 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 물론 이렇게 높은 온도로 PCR 하게된 또 하나의 원인은 TaKaRa *ex-Taq* 의 활성이 다른 *Taq* 들에 비해 상대적으로 높은 활성을 보여줌으로써 완전한 background 을 제거하기 위해서였다. 처음의 PCR 시에는 교정기능이 없는 Promega *Taq* 을 이용하였다. 이를 사용하게된 동기는 일반 *Taq* 들의 error 율이 $2 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-4}$ 로서 우리의 PCR 산물인 270bp 증폭시에는 별 문제가 없을 것이라고 생각하였다. 그러나 아래에서도 이야기되겠지만 상당히 높은 error 율을 보여주고 있어서 PCR -SSCP 에는 사용할 수 없다는 판단을 내렸다. 때문에 TaKaRa *ex-Taq* 을 사용하였다. Exon 9에 대한 최적 nested PCR (Fig. 20) 조건은 아래와 같다.

구 분	10X buffer	10mM d.NTP	50pmol / λ primer	DNA (100ng/ λ)	5U/ λ <i>Taq</i>	D.W.	Total reaction Volume
부 피	5 λ	4 λ	2 λ , 2 λ	2 λ	0.4 λ	34.6 λ	50 λ
최종 농도	1X (1.5mM MgCl ₂)	each 200uM	100pmol	200ng	2U		

* Reaction condition (Bio-Rad Gene-cycler)

94°C ----- 5 min (hot start)

94°C ----- 30 sec

67°C ----- 15 sec

72°C ----- 30 sec / 40 cycle

72°C ----- 7 min (terminal extention)

마. SSCP 분석 조건 확립

SSCP (single strand conformation polymorphism) 은 non-denaturing gel 을 이용하여 각 sample 의 고유한 conformation 에 따른 mobility 을 분

석하는 방법으로 우리는 여러 조건을 변형하므로써 최적의 SSCP 분석 조건을 확립하고자 하였다. 일반적인 방법을 간단히 기술하자면 다음과 같다. 목적하는 PCR 산물에 95% formamide loading buffer (95% formamide, 0.25% Xylene cyanol, 0.25% bromophenol blue) 또는 50% glycerol loading buffer (50% glycerol, 0.25% Xylene cyanol, 0.25% bromophenol blue) 등을 각각 1:16 ~ 1:1 (Lee *et al*, 1995 ; Oto *et al*, 1993; Ainsworth *et al*, 1991) 으로 희석하여 이를 90℃ 에서 3분간 denaturation 한 후, 바로 ice 에 방치하여 이를 non-denaturing gel 을 통하여 전기 영동한다. Gel 조성에 있어서는 stacking gel 일 경우에는 3% gel 을 이용하였으며, running gel 일 경우에는 조건에 따라 6 ~ 12% gel 을 선택하여 이용하였다.

(1) MDE gel (FMC, USA.) 을 통한 SSCP 분석

High-resolution gel 인 MDE gel 을 통하여 여러 조건별로 SSCP 하였다. MDE gel 에 glycerol 농도에 따라 mobility 의 차이가 있다는 연구보고 (Lee *et al*, 1995) 에 따라 여러 농도의 glycerol을 실험한 결과 10% glycerol 이 최적인 것으로 나타났다. 우리는 우선 상온에서의 전기영동과 4℃ 에서의 전기 영동의 차이를 살펴 보았다. 아래의 gel 사진(Fig. 21A)에서 보여 주는 바와 같이 상온에서 전기영동시 전체적인 band 의 모양들이 끌리는 현상을 볼수 있다. 이 사진의 결과 상온 보다는 4℃ (Fig. 21B)에서의 전기 영동이 더 효과적임을 알 수 있다. 또한 loading buffer 에 따른 효과를 살펴보기 위해서 가장 많이 사용되고 있는 95% formamide loading buffer 와 50% glycerol loading buffer 을 비교하여보았다 (data not shown). 두 buffer 사이에서는 band 의 mobility 의 차이는 없지만 glycerol loading buffer 에서는 높은 농도의 glycerol 에 의해 loading 시 pipeting 이 잘 되지 않는 어려움이 있었다. 때문에 우리는 formamide loading buffer 을 계속적으로 사용하게 되었다. 우리는 MDE gel system (FMC, ME04841, USA.) 에 의해서 좋은 효과를 얻지 못한 것으로 보여 다른 gel matrix 을 사용하기로 하였다. MDE gel 조작용 다음과 같이 조성되었다. 3.7ml 의 2X MDE gel (final 0.5X) 용액을 0.9 ml 의

10X TBE buffer (pH 8.0, 최종농도 0.6X), 1.5 ml glycerol (최종농도 10%), 8.9 ml 의 증류수, 40 ul 10% APS 와 4 ul TEMED 을 혼합하여 Hoefer vertical gel system 에 gel 을 만들어 230V 에서 7 시간 전기 영동하였다.

(2) Acrylamide gel matrix를 이용한 SSCP 분석

Acrylamide gel 을 사용할 때 얼마만큼의 농도에서 어느 정도 runing 하는 것이 좋은지를 우선적으로 선택하여야 했다. 일반적으로 보고된 바에 의하면 4~12% 사이에서 많이 이용한다는 것에 착안하여 8% acrylamide gel 에 서 270 bp 의 exon 9 PCR 산물을 이용하여 SSCP 하였다 (Savov *et al.*, 1992 ; Glavac and Dean., 1993 ; Hayashi and Yandell., 1993). 우리는 acrylamide gel 을 조성할 때 glycerol (final 7%) 이 존재하는 8% acrylamide gel 과 glycerol 이 없이 TBE buffer 만이 존재하는 gel 을 서로 비교하여 보았다 (data not shown). 비교 결과 glycerol 이 존재하지 않는 gel 에서는 band 의 pattern 을 확인 할 수 없을 정도로 전체적으로 끌리는 현상만을 볼 수 있었다. 때문에 우리는 glycerol 이 존재하는 acrylamide gel 을 이용하기로 하였다. 또한 acrylamide gel 조성시 gel sample buffer 로써 Tris-borate (pH 8.3 ; data not shown), Tris-sulfate (pH 8.3) 와 Tris-glycine sample buffer (pH 8.3) 을 사용하므로써 나타나는 효과를 살펴보았다 (Fig. 22). Tris-borate 와 Tris-glycine sample buffer 에 있어서는 band 의 판명 여부가 불확실하였으며, Tris-sulfate sample 을 이용하였을때는 좋은 resolution 을 보여줌으로써 Tris-sulfate buffer 가 더 좋은 system 임을 알수 있었다. 뿐만아니라 동일 조건하에서 MDE gel 에서 살펴본 바와 같이 온도 변화에 따라서, loading buffer 에 따라서 살펴본 결과 비슷한 결과를 얻을 수 있었다 (data not shown). 계속적인으로 더 좋은 resolution 조건을 확립하기 위하여 sample loading시 weak denaturing agent (0.01% NP-40, 0.01% Triton X-100) 의 첨가에 따른 효과를 살펴본 결과 Fig. 23 에서 보여주는 바와 같이 agent 을 첨가할 때 보다는 첨가하지 않을때가 더 좋은 분석 pattern 으로 나타나고 있다. 위의 모든 결과를 종합하여 본 연구실에서 최적 조건으로 확립한 6%

acrylamide gel 과 8% acrylamide gel 을 Fig. 24 에서 보여주었다.

(3) Gel size 변화에 따른 SSCP 분석

일반적으로 gel 의 길이와 gel 의 두께에 따라 해상력이 크게 다를 수 있다. 현재 우리가 사용했던 gel 의 두께는 모두 0.4mm 로써 쉽게 조작할 수 있는 최저치라고 할 수 있다. 때문에 gel 의 두께보다는 gel 의 길이에 변화를 줌으로써 그 차이가 나타날 것이라고 생각하였다. 때문에 우리는 지금까지의 실험에 사용되었던 Hoefer gel system (가로 18 cm × 세로 16 cm) 과 Owl sequencing system (가로 20 cm × 세로 45 cm) 을 비교함으로써 그 효과를 살펴 보았다 (Fig.25). 처음에는 sequencing gel 에 stacking gel (3%)을 하지 않은 상태에서 running gel 만으로 분석하였는데 이때 나타난 band 들의 pattern 들은 stacking을 한 gel 보다 더 굵은 band 로 출현하였다. 결국 stacking gel 을 사용함으로써 우리의 예상대로 쉽게 분석할 수 있는 좋은 resolution 과 sharktooth-comb 을 사용함으로써 side by side 로 sample을 loading 하기 때문에 band 의 미세한 차이까지도 쉽게 구별할 수 있을 뿐만 아니라 많은 sample을 빠른 시간내에 분석가능하다는 점에서 가장 최적의 system 으로 볼 수 있었다. 전압에 따른 running 시간의 차이에 의해서는 큰 차이를 발견하지 못하였다. 그러나 270bp 을 기준으로 할 때 xylene cyanol 의 위치가 gel 의 맨 아래에 위치할 때 gel 의 running을 멈춤으로써 gel 의 중간 위치에 single strand conformation band 을 확인할 수 있었으며, 우리는 500 ~ 1500 V 에서 자유롭게 시간을 정하여 실험을 실시하였었다.

바. Silver staining

본 실험에서는 silver stain 을 사용함으로써 isotope 에 대한 위험성에서 탈피했을 뿐만 아니라 빠른 시간내에 많은 sample 을 분석할 수 있게 되었다. 본 실험에서 사용된 kit 는 Bio-Red에서 시판되고 있는 silver stain kit (Bio-Rad, USA) 로써 실험 방법은 다음과 같다. 먼저 gel 을 40% methanol

용액에서 30분 동안 fixation 시킨후 methanol 을 버리고 여기에 10% ethanol 로 15 분 동안 두 번 fixation 시켰다. 그후 ethanol 을 버리고 10X oxidizer 를 gel 이 잠길 정도로 채운후 3분간 방치하였다가 oxidizer 의 노란색이 모두 없어질 때 까지 3차 멸균 증류수로 씻어 주었다. 여기에 10X silver reagent 를 첨가하여 15분간 교반한 후 이를 3차 증류수로 한 번정도 씻어주었다. Oxidizer 와 silver reagent 을 잘 씻어주지 않으면 gel 의 색이 짙은 갈색으로 변한다. 여기에 적정량의 developer 를 첨가하여 색이 검게 변할 때 마다 새로운 developer 로 바꾸어 교반하여 줌으로써 band 의 출현을 관찰하였다. Staining protocol 에서 보여주는 양보다도 더 많은 PCR 산물이 (50 ~ 100ng) 있어야 깨끗한 gel 을 유지할 수 있다. 그렇지 못하면 developing 을 오랫동안 해야 하므로 gel 의 검게 변하게 되어 band 의 분석이 어려웠다.

사. Nested PCR-RFLP

Long-range PCR product을 template 로 이용한 Nested PCR 후, PCR product는 특정 enzyme 에 의해 digestion 시켰다. 이때 절단된 product 를 1.5 - 3% agarose gel에서 해상시켰다. 각 product 에 사용한 제한효소들은 Table 2에서 보여주었다. 각각의 enzyme (New England Biolabs. USA.) 은 알맞은 10X buffer, 온도 (37°C ~60°C), 시간 (3~6) 조건하에서 20ul 의 mixture 를 반응시켰다. 각 돌연변이 type 에 따른 frgment pattern 은 아래 Table 4 에서 보여주었다.

아. cloning

우리가 사용한 primer 자체내에 *Bam*H1, *Eco*R1 linker 가 있기 때문에 PCR 산물로부터 바로 두 enzyme 을 반응시켜 이를 Gene Clean II Kit (Bio 101, USA) 로 깨끗하게 정제하여 동일 enzyme 으로 처리된 cloning vector

인 pBSK II (2.961 kbp) 에 ligation 시켰다. ligation 조건은 다음과 같다. Enzyme 처리된 2ul PCR 산물 (60ng) 을 1ul pBSKII vector (100ng), 1ul 의 10X ligation buffer, 1ul 의 2mM ATP, 0.5ul 의 T4 DNA ligase (3U/ul) 와 4.5ul 의 멸균증류수를 혼합하여 16°C 에서 10 시간 배양하였다. 우리는 vector 와 insert 의 비를 1:3 몰비로 계산하여 ligation 하였다. 이러한 ligation 용액을 electroporation 에 의해 형질전환하였다. Colony 선정은 color selection 에 의해 흰 colony 만을 선택하였다. 이들 colony 을 alkali plasmid DNA 제조 방법에 의해서 vector 을 추출한 후 이를 *Bam*H1 과 *Eco*R1 으로 처리하여 insert 의 여부를 확인하여 insert 를 갖고 있는 vector 에 한하여 염기서열 분석에 사용되었다.

자. 염기서열 분석

초기 pseudogene 과 구별하지 않은 상태에서 Fig. 24 에서 보여주는 이상한 band를 갖는 sample에 대해서 clone 하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석 결과 MDE gel 에서 보여주는 다른 pattern 의 band 가 pseudogene 에 의한 결과임을 알게되었다. 물론 그 band 의 차이는 single base 에 의한 차이임이 sequencing 결과 확실하게 알수 있었다. 비릇 잘못된 판단으로 인한 실험이었지만 여기서 우리는 *CYP2D7* 의 새로운 두 allele 과 아직은 불확실하지만 *CYP2D6* 의 3'-UT region 에서 single base substitution 이 있는 새로운 allele 을 찾을 수 있었다 (Table 5). 때문에 우리는 위에서 언급한 바와 같이 새로운 전략에 의해 다시 처음서부터 다시 시작하게 되었다. 물론 새로 시작하는 단계에서도 promega *Taq* 에 의해서 나타났던 SSCP 의 차이 나는 pattern 이 proof-reading 기능이 있는 TaKaRa *ex-Taq* 사용함으로써 재현되지 않은 것을 확인하여 이 모든 것을 TaKaRa *ex-Taq* 에 의해서 다시 진행함으로써 4가지 type 을 SSCP 에서 확인하여 cloning 하는상태로써 아직 이들에 대한 sequencing 은 이루어지지 못한 상태이다.

3. 한국인의 CYP2D6 mutation 빈도 결정

위에서 확립된 각 조건들을 이용하여 한국인의 CYP2D6 특정 region 의 mutation 빈도를 보여주고자, 앞의 Long-range PCR 조건에 의해 한국인 108 명으로부터 PCR product을 얻을 수 있었다.

가. 한국인 CYP2D6 의 nested-PCR

현재까지 보고된 바에 의하면 CYP2D6 의 alleles은 모두 16개로 보고되고 있다 (Sachse et al., 1997). 16개의 alleles 들은 개개의 특정위치에 mutation 여부에 의하여 구별할 수 있다. 우리는 이러한 mutation site을 RFLP 조건하에서 확인하고자하였다. 본연구에서 실시한 부분은 mutation position 1795, 1846, 1934 로써 이지역은 Fig. 26 에서 보여주는 것처럼 335bp 의 PCR product 의 분석에 의해서 알 수 있다. PCR 조건은 다음과 같다. PCR 3 은 hot start 을 94°C 에서 5분 실시한 후, 94°C에서 30초 (denaturation), 68°C에서 20초 (annealing), 72°C에서 30초 (extention) 으로 40cycles 실시한 후 마지막을 72°C에서 7분 동안 실시하였다 (Fig. 27).

나. 한국인 CYP2D6 의 RFLP

PCR 3 (335bp)는 각각 *Bst*NI (position 1795, 1934) 과 *Msp*I (position 1846) restriction endonuclease 에 의해서 60°C 와 37°C 에서 6시간 동안 108 sample 에 대하여 절단하였다. Position 1795 에 있어서 wild type sequence 는 "T" 로 제한효소에 의해 173bp/162bp 로 절단되지만, 반면 mutation type 에서는 "T" deletion 으로 인해 173bp/138bp/24bp 로 나타날 것이다. 그러나 우리의 결과 108명 모두 wild type 으로 나타났다.

Position 1846 에 있어서 wild type sequence 는 "G" 로써 제한효소에 의해서 260bp/75bp 로 나타날 것이며 반면 mutation type 에서는 "T" 또는 "A" 로 치환되어 제한효소 부위가 없어지므로 335bp 로 절단되지 않는 상태로 나타났다. 본 실험에서는 108명중 1 명 에서만 mutation allele을 갖는 Heterozygote 만을 볼수 있었다 (Fig. 28).

Position 1934 에 있어서 wild type sequence 는 "G" 로써 제한효소에 의해서 173bp/162bp 로 나타날 것이며 반면 mutation type 에서는 "A" 로 치환되어 제한효소 인식 부위가 없어지므로 335bp 로 나타난다. Position 1846 과 같이 108명중 1 명 에서만 mutation allele을 갖는 Heterozygote 만을 볼수 있었다 (Fig. 28). 이로써 한국인과 Caucasian을 비교해보았을 때 position 1795 와 1846 에 있어서는 큰 차이를 볼 수 없지만, position 1934 에 있어서는 19% 이상 높은 mutation 현상을 Caucasian에서 볼 수 있다. 이것은 아마도 한국인이 Caucasian 보다는 유전적으로 안정하다라고 생각할 수 있다 (Table 6).

다. SSCP 에 의한 mutation allele 확인

본 실험에서 확립된 PCR-SSCP를 이용하여, 앞에서 살펴본 PCR-RFLP 에 의해 확인된 mutation을 확인하고자 하였다. 우리는 Owl gel system을 이용하여 실험을 실시하였다. 8% native acrylamide gel을 이용하여 nested PCR product 1ul 와 SSCP loading dye 10ul을 혼합하여 4°C, 1,500V에서 runing을 하였다. runing 된 gel 은 앞에서 설명된 silver stain 에 의해서 확인하였다.

본 실험실에서 확립된 방법에 의하여 아래 Fig. 29 에서 보여주 듯 PCR-RFLP에서 보여주던 sample 에 대해서만 band pattern 이 다름을 보여주었다. 우리는 이를 cloning 하여 sequencing 으로 증명하기로 하였다.

라. Cloning and Sequencing of CYP2D6 mutant allele

다른 band pattern을 보여준 sample 의 PCR product 에 kinase 와 klenow fragment을 처리하여 Blunt end 로 만든후, vector (pBSKII) 에는 EcoRV을 처리한후 CIP을 처리하여 self-ligation을 막아준후 enzyme 처리된 PCR product 와 vector를 각각 3 : 1 mole 비로 14℃에서 12시간 blunt end ligation을 실시하였다. 우리는 Blue-gal 에 의한 color selection을 하여 white colony을 획득하였다. Insert 여부를 확인하기 위해 EcoRV을 flanking 하고 EcoRI 과 HindIII site을 이용하여 확인하였다. 이렇게해서 얻은 clone을 autosequencing 에 의해 확인하였다.

그 결과 아래 Fig. 30 에서 보여주는 것 처럼 position 1846 의 "G" 가 "A" 로 치환되었음을 볼수 있었고, position 1934 역시 "G" 가 "A" 로 치환되었음을 증명할 수 있었다.

본 실험에서 확립된 Nested-PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP 등에 의하여 CYP2D6 의 mutation allele을 확인 할 수 있음을 보여주었다. 때문에 이러한 방법에 의하여 약물 대사관련 유전자의 typing 이 가능함을 보여주었다. 그러므로 더 많은 연구에 의해서 특정 의약품 및 식품에 관여하는 P450 효소군에 대한 한국인의 유전학적 통계자료를 확립하므로서 현재 존재하는 의약품은 물론 신약의 안전성 평가에 도움이 되리라 생각된다.

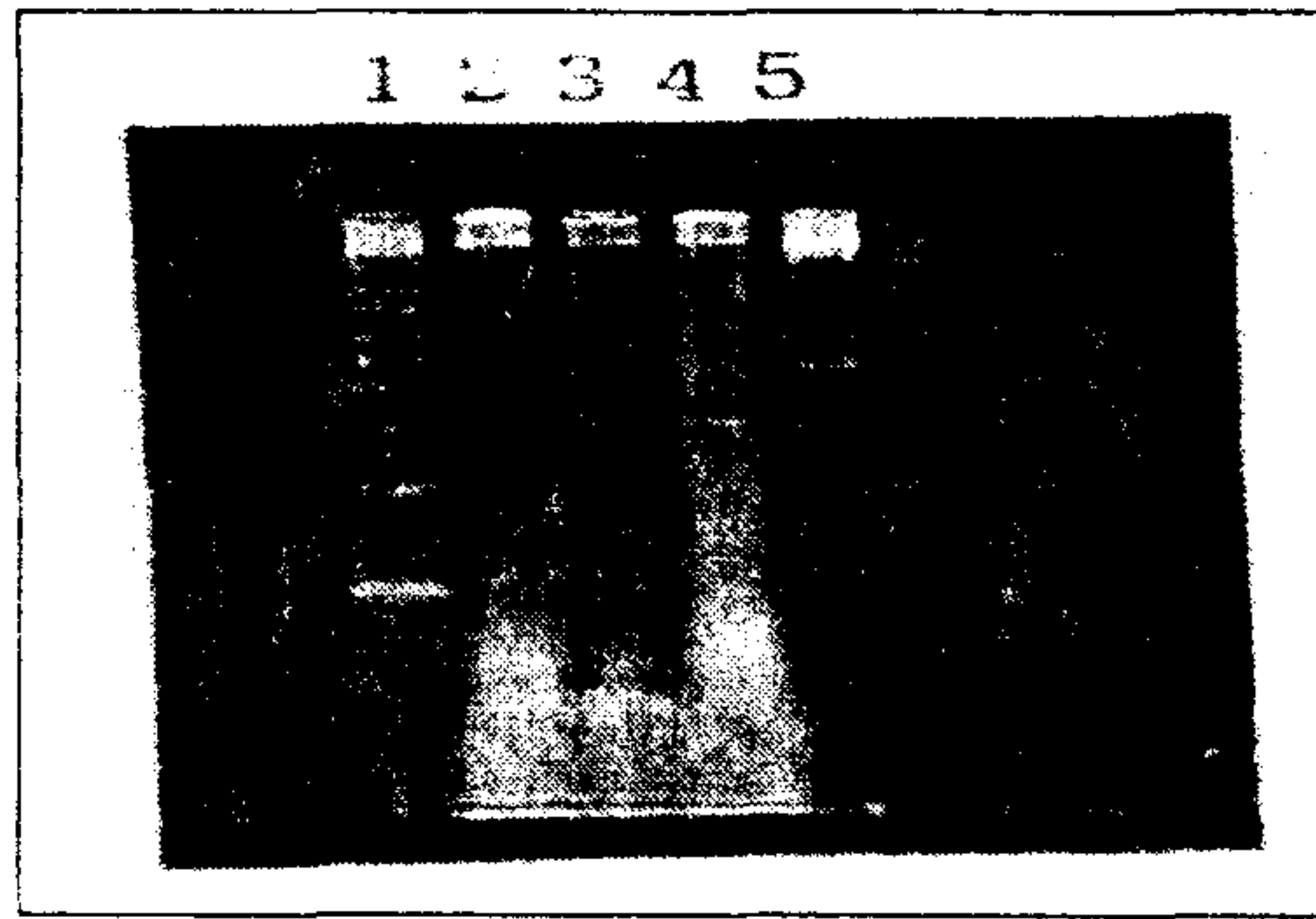


Figure 1. Adriamycin 농도 결정 (K562)

lane 1 : 123 ladder DNA Marker. lane 2 : 0.1uM. lane 3 : 0.5uM. lane 4 : 1uM. lane 5 : λ HindIII DNA marker. * Time point : 12 시간

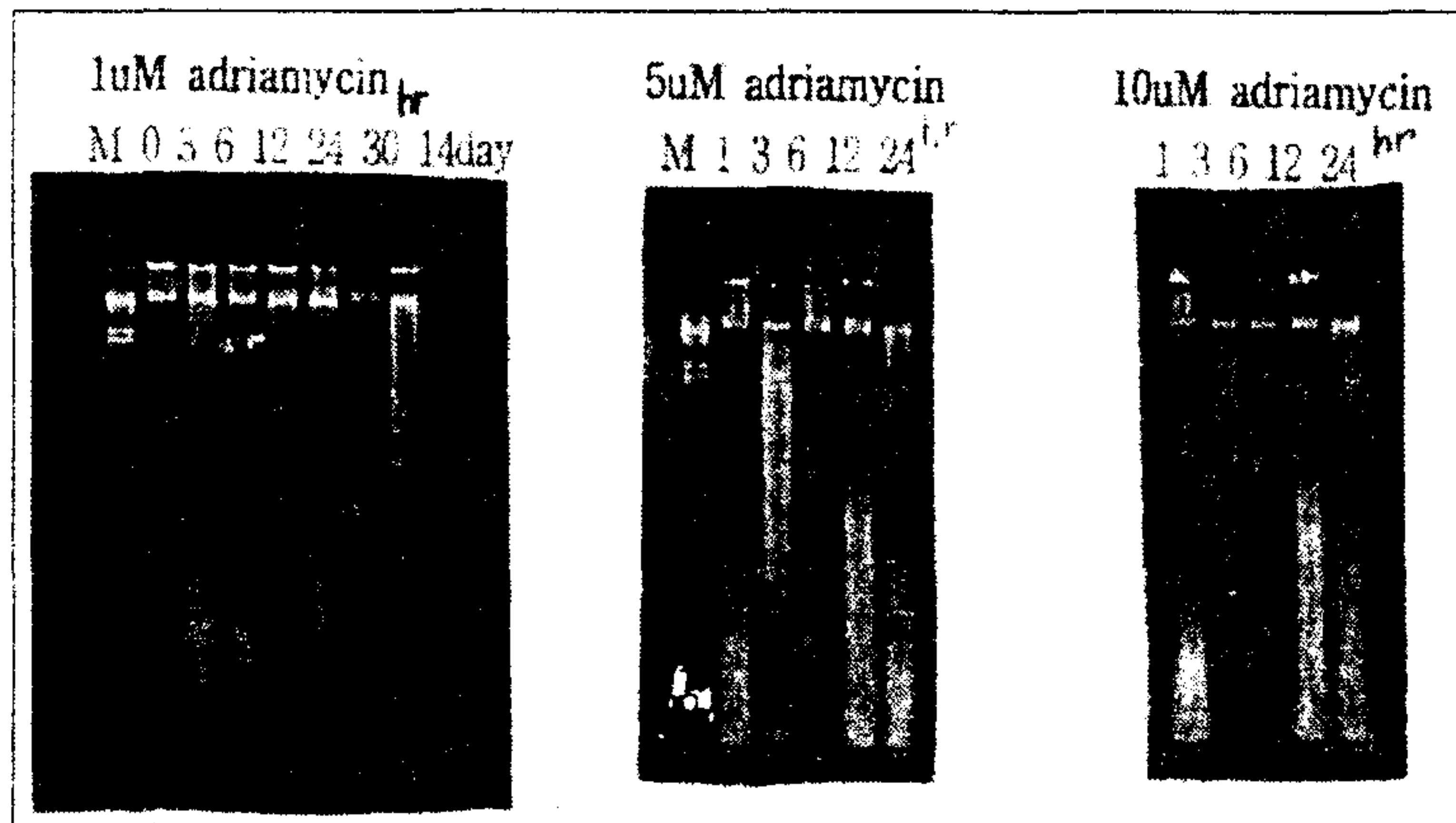


Figure 2. Adriamycin 농도 결정 (HeLa)

lane 1 : 123 ladder DNA Marker. lane 2 : No Drug. lane 3 : 1uM Adriamycin. lane 4 : 10uM Adriamycin. lane 5 : 100uM Adriamycin. lane 6 : λ HindIII DNA marker.

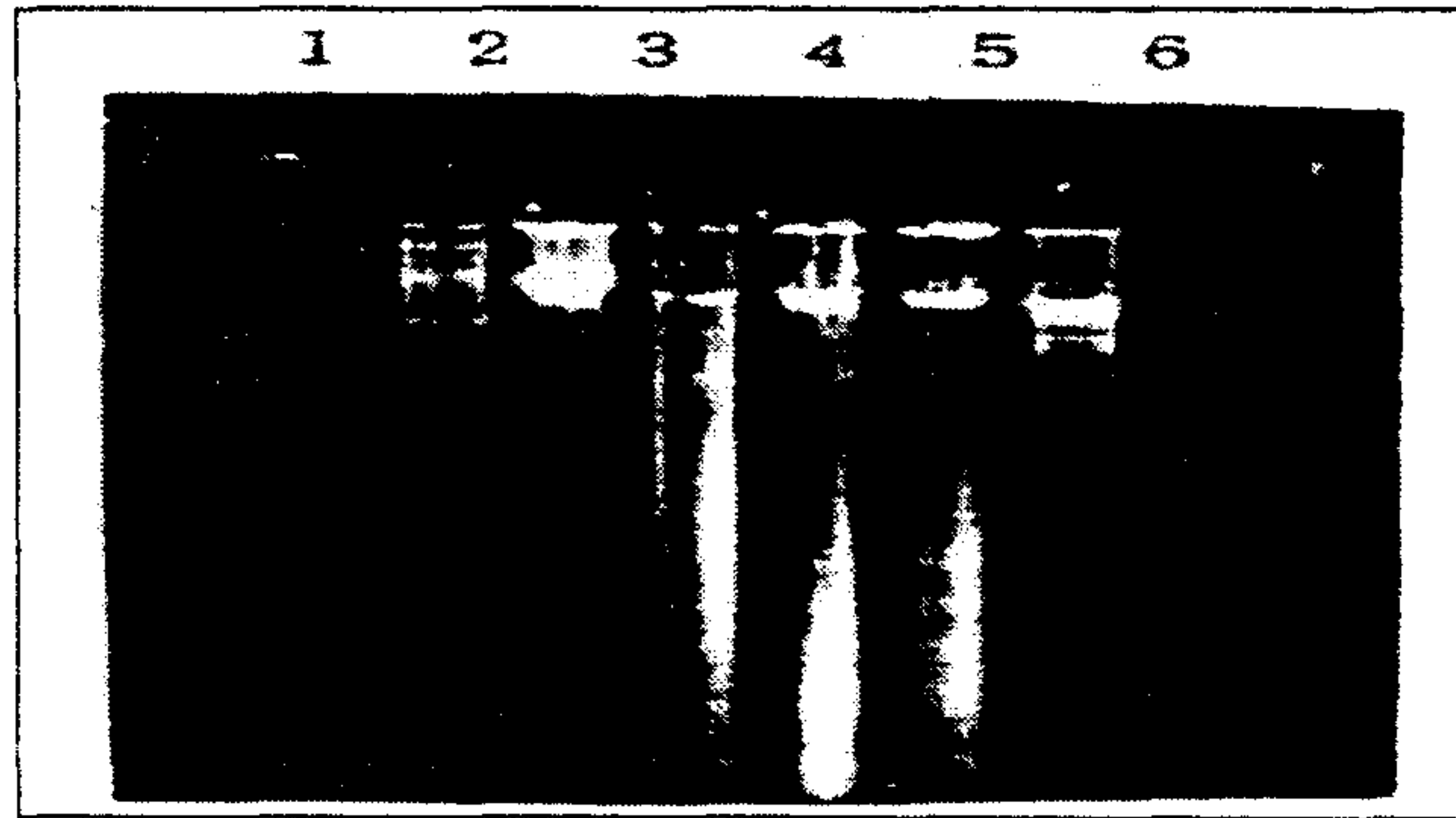


Figure 3. Adriamycin 처리 시간 결정 (K562)

M : λ HindIII DNA marker. Time point : 0, 1, 3, 6, 12, 24, 30 시간. 14 day : 14일 (약 처리하지 않음).

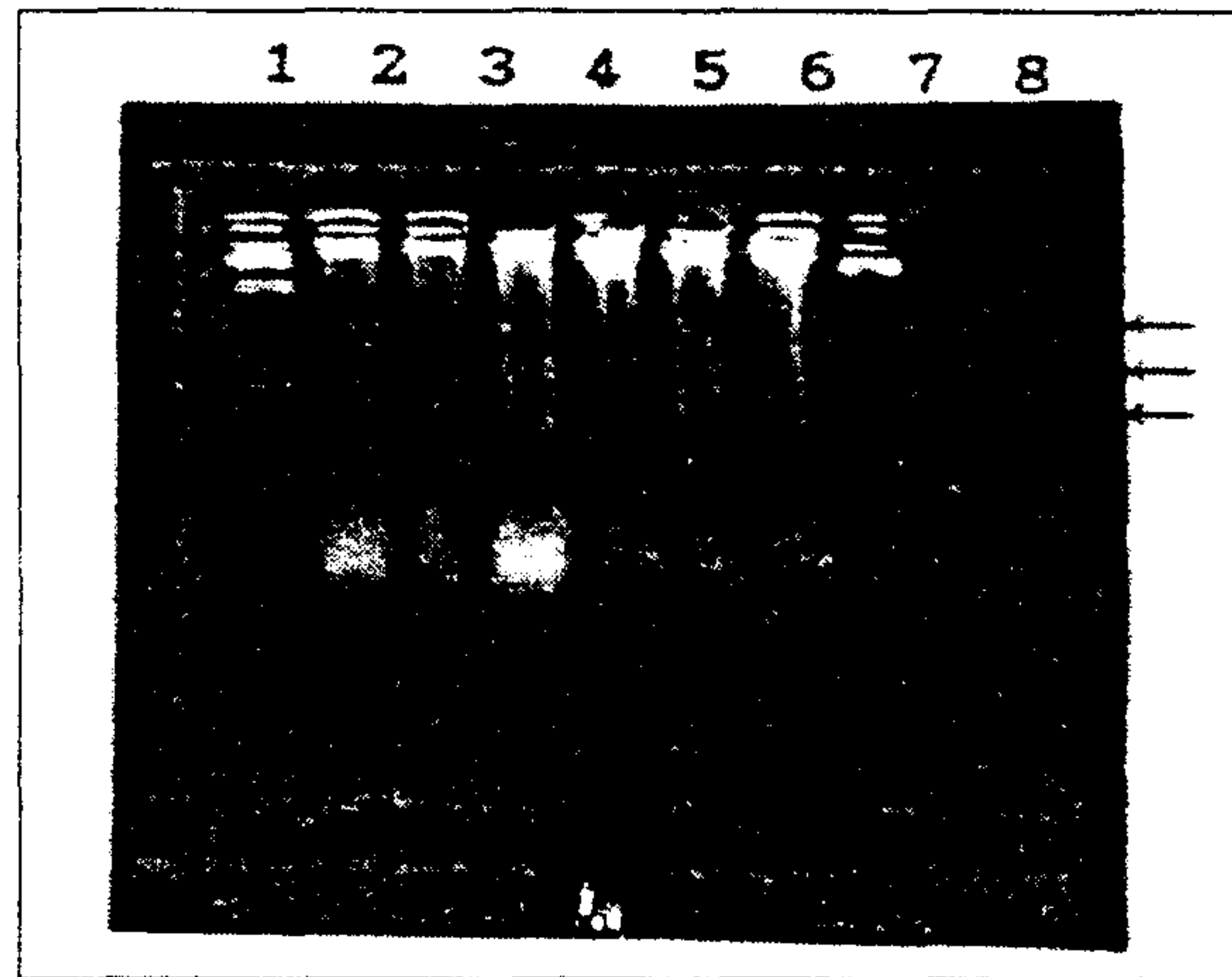


Figure 4. 1uM Adriamycin 에 의한 DNA fragment 확인

Lane 1 : λ /Hind III DNA marker. Lane 2 : No drug.
 Lane 3 : 1시간 drug 처리. Lane 4 : 3시간 drug 처리.
 Lane 5 : 6시간 drug 처리. Lane 6 : 12시간 drug 처리.
 Lane 7 : 24시간 drug 처리. Lane 8 : 123 DNA ladder marker.

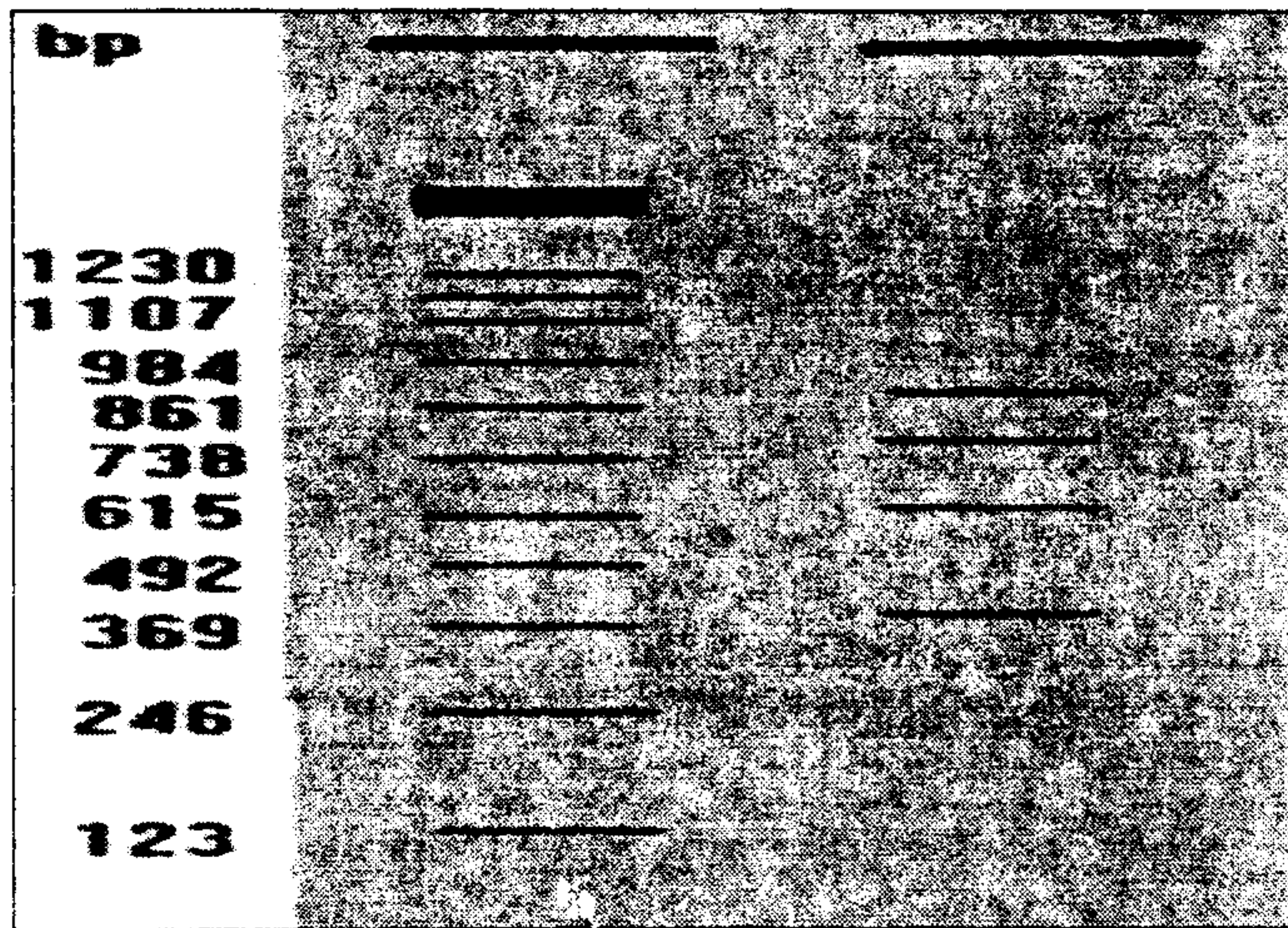


Figure 5. DNA fragmentation (DNA ladder)



Figure 6. Silver stain 에 의한 DNA fragment 확인

Lane 1 : No drug. Lane 2 : 3시간 drug 처리. Lane 3 : 6시간 drug 처리. Lane 4 : 12시간 drug 처리. Lane 5 : 24시간 drug 처리. Lane 6 : λ /Hind III DNA markerind.

1 2 3 4 5 6 7

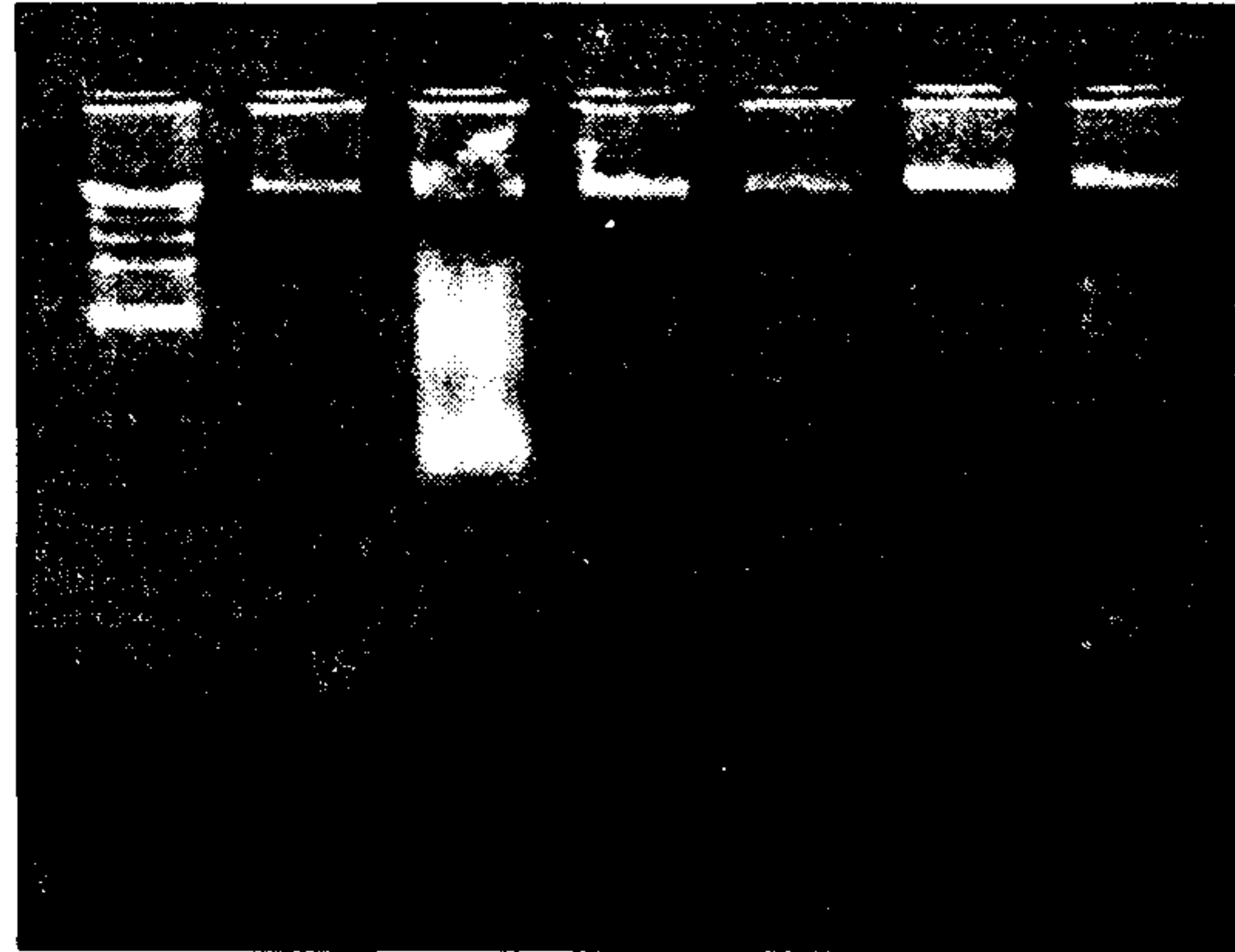


Figure 7. HeLa-60 Cell line 으로부터 genomic DNA 분리

line 1 : λ /HindIII DNA marker. line 2 : Ho (HeLa-60, zero time). line 3 : H12(HeLa-60, 12 시간 전 처리후). line 4 : H24(HeLa-60, 24 시간 전 처리후). line 5 : K0 (K-562, zero time). line 6 : K12(K-562, 12 시간 전 처리후). line 7 : K24 (K-562, 24 시간 전 처리후)

. exon5 FW : 5'-GGA ATT CCT CTT CCT GCA GTA CTC-3' (24mer)
RW : 5'-GGA ATT CGC CCC AGC TGC TCA CC-3' (23mer)
. exon7 FW : 5'-GGA ATT CCT AGG TTG GCT CTG AC-3' (23mer)
RW : 5'-GGA ATT CAA GTG GCT CCT GAC-3' (21mer)
. exon8 FW : 5'-GGA ATT CCT ATC CTG AGT AGT GGT-3' (24mer)
RW : 5'-GGA ATT CGC TTA GTG CTC CCT GG-3' (23mer)

Figure 8. p53 의 exon 별 sequence

음영되어있는 부분은 EcoR1 site 를 표기 한 것임.

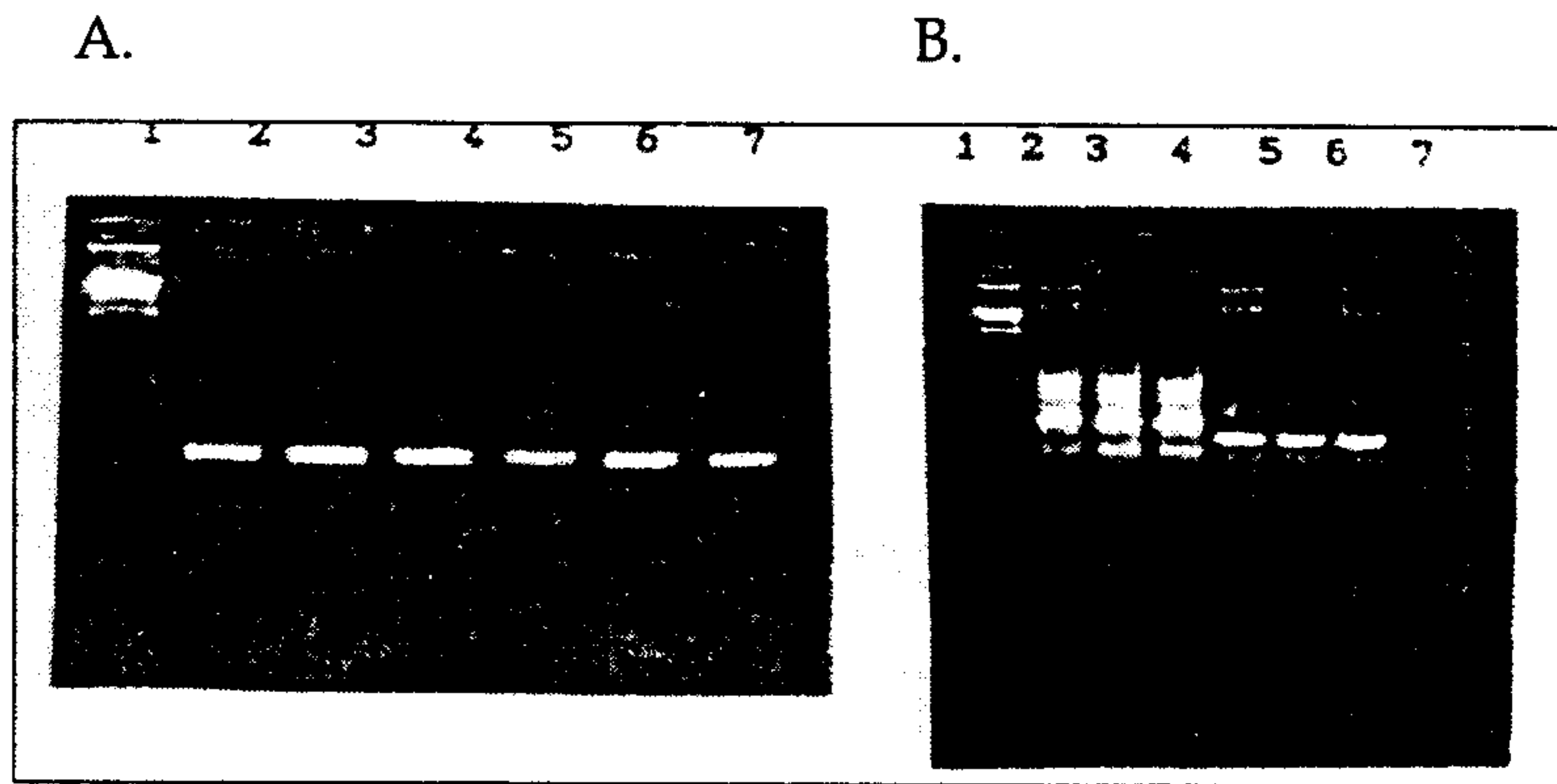


Figure 9. p53 유전자의 exon 별 PCR 결과
 각 lane 은 약물 처리시간별 (0시간, 12시간, 24시간)로
 구별된 것임. Lane 2, 3, 4는 HeLa cell line 에 대한 것
 이며, lane 5, 6, 7은 K546 cell line 에 대한 PCR 사진.
 Lane 1은 λ /HindIII DNA size marker.

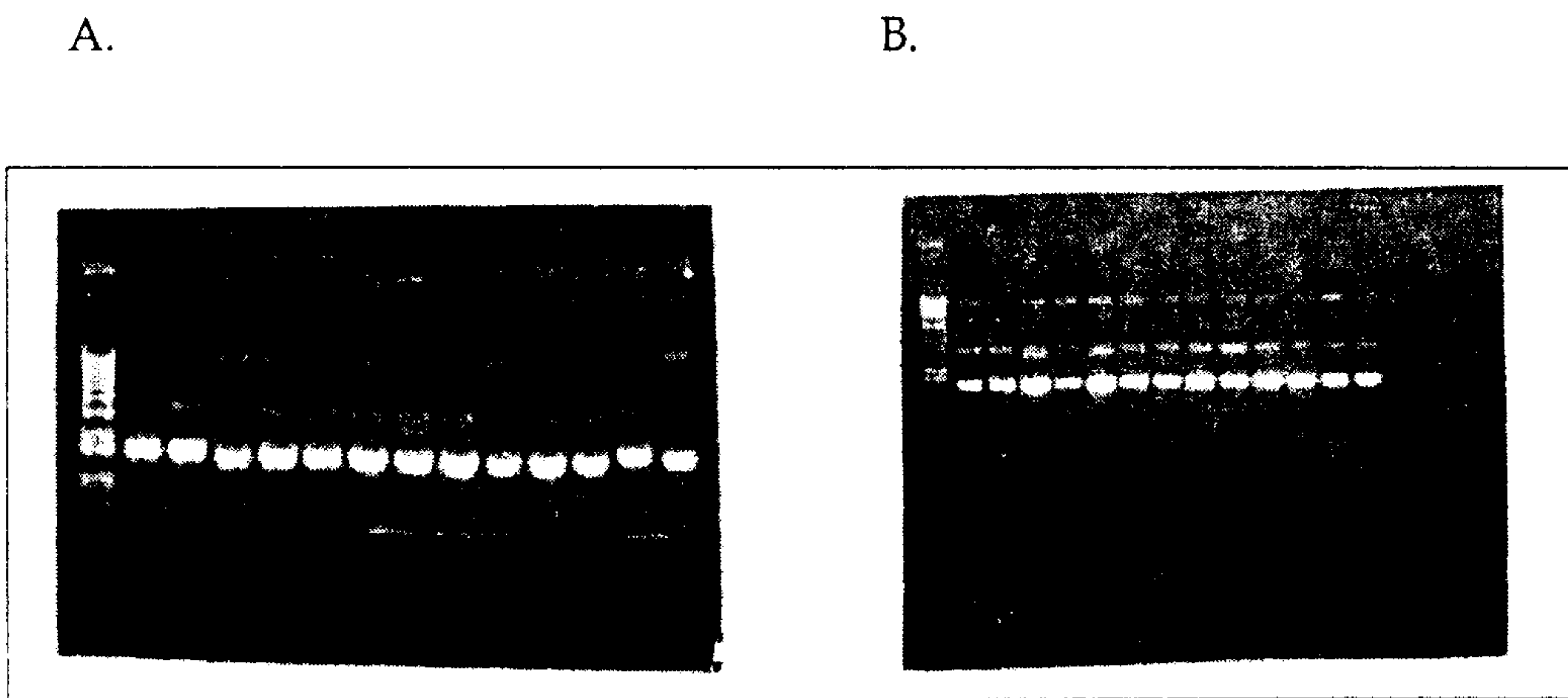


Figure 11. PEG 처리에 의한 DNA 정제

A : PEG 처리 전. B : PEG 처리 후.

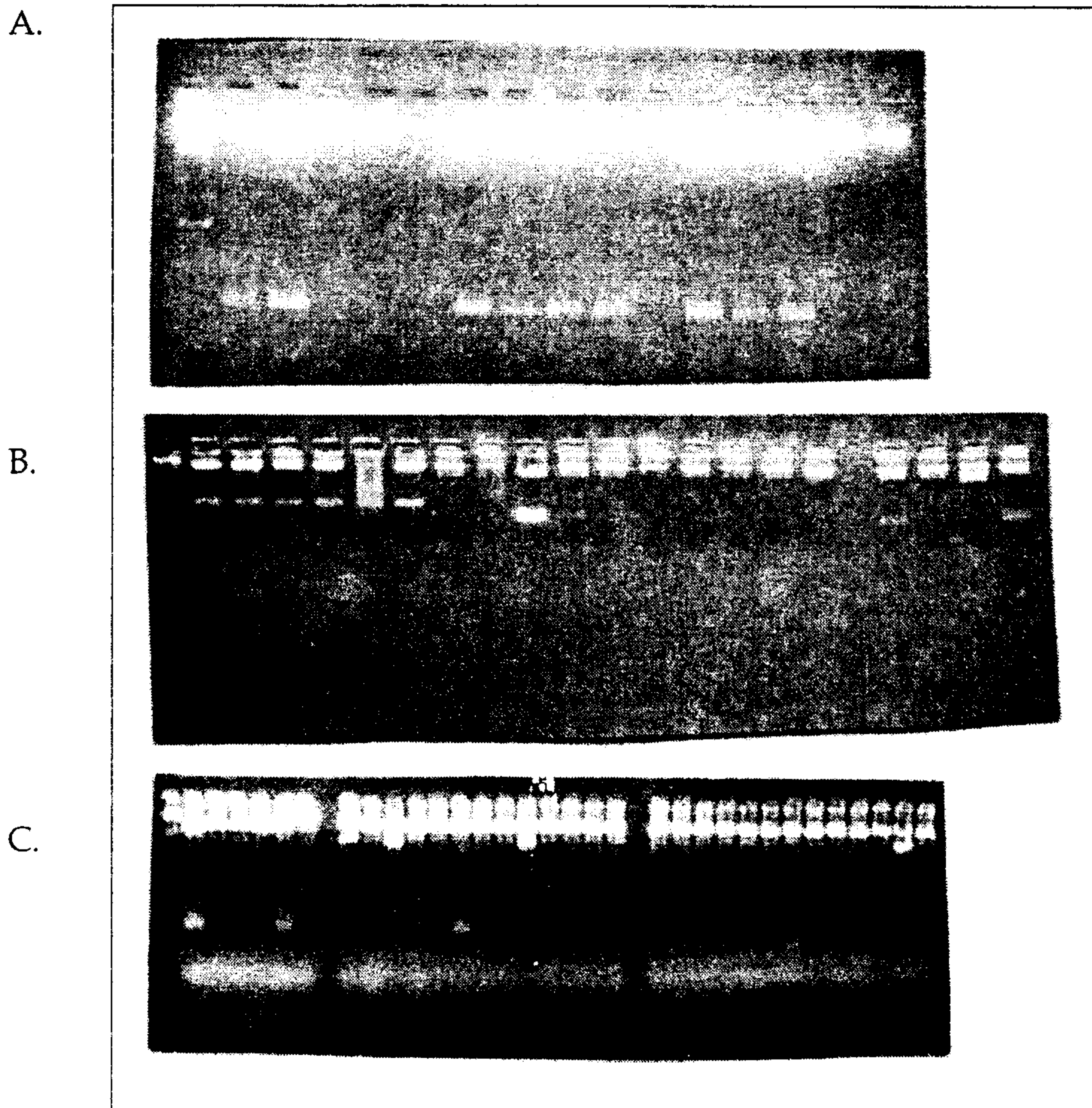
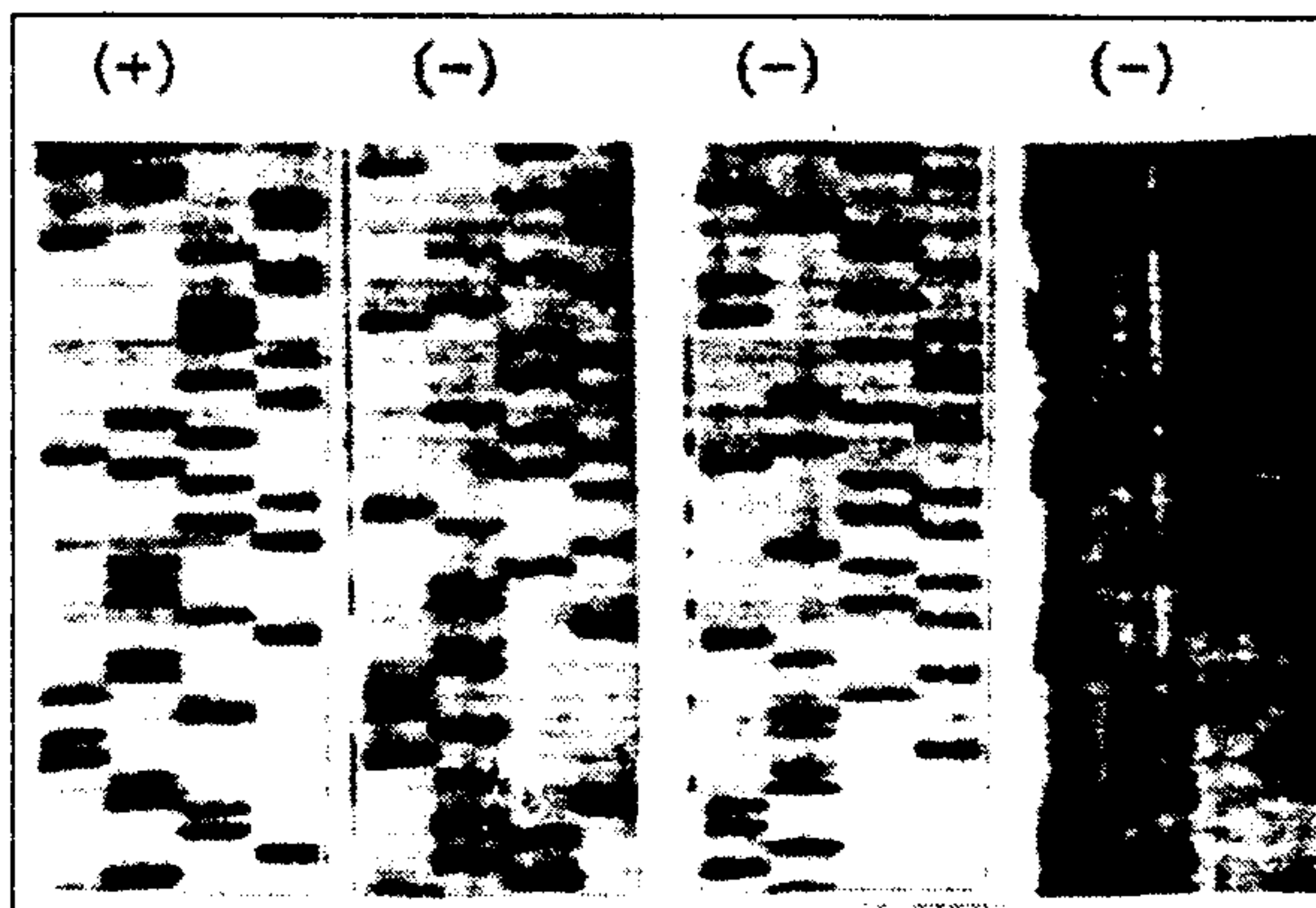
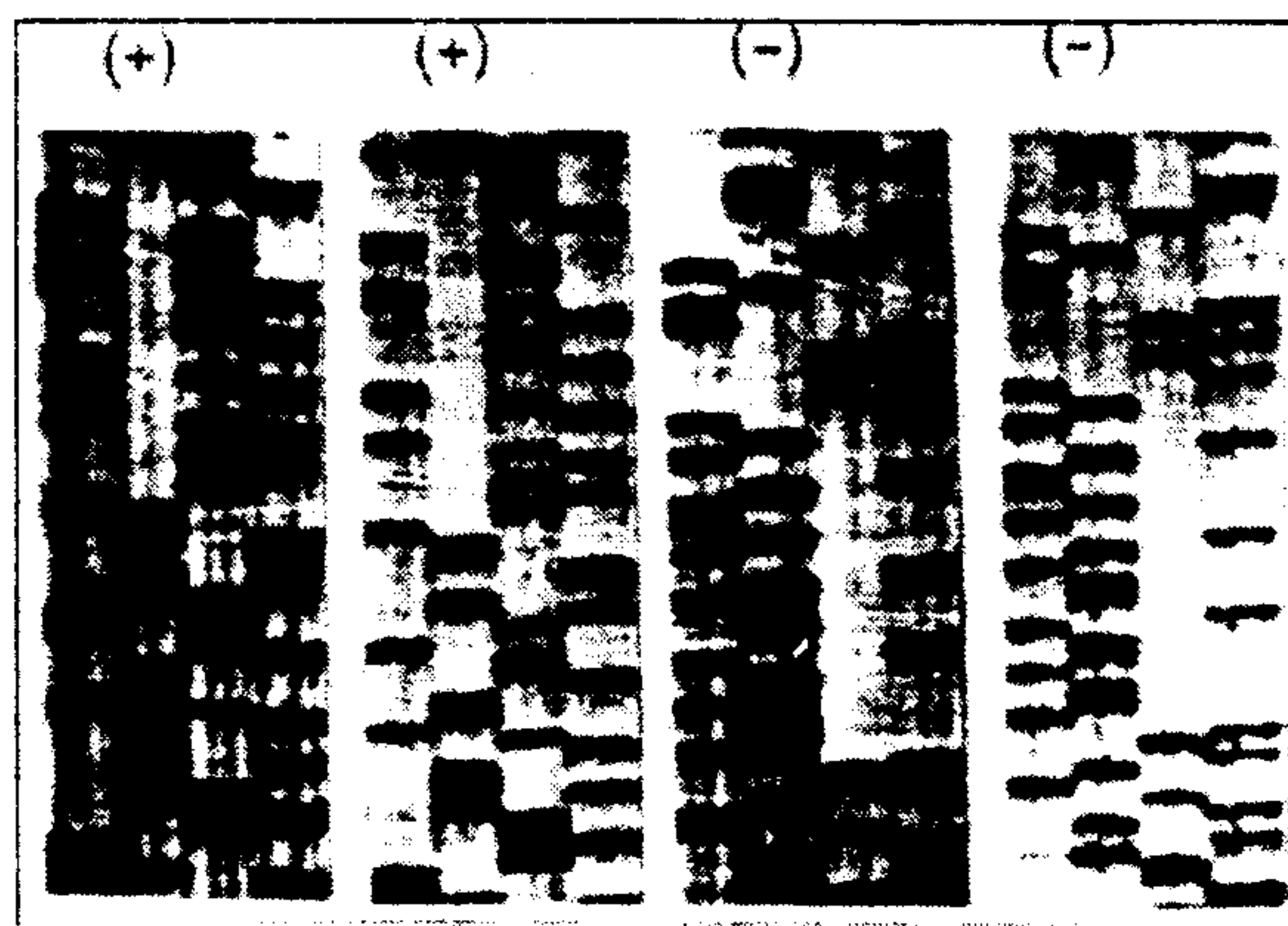


Figure 10. p53 유전자의 exon 별 subclone 확인
 A, B, C 는 각각 exon 8, exon 7, exon 5 에 대한 insert 로서 각각의 insert size 는 Table 1 에서 보여줌.

A.



B.



C.

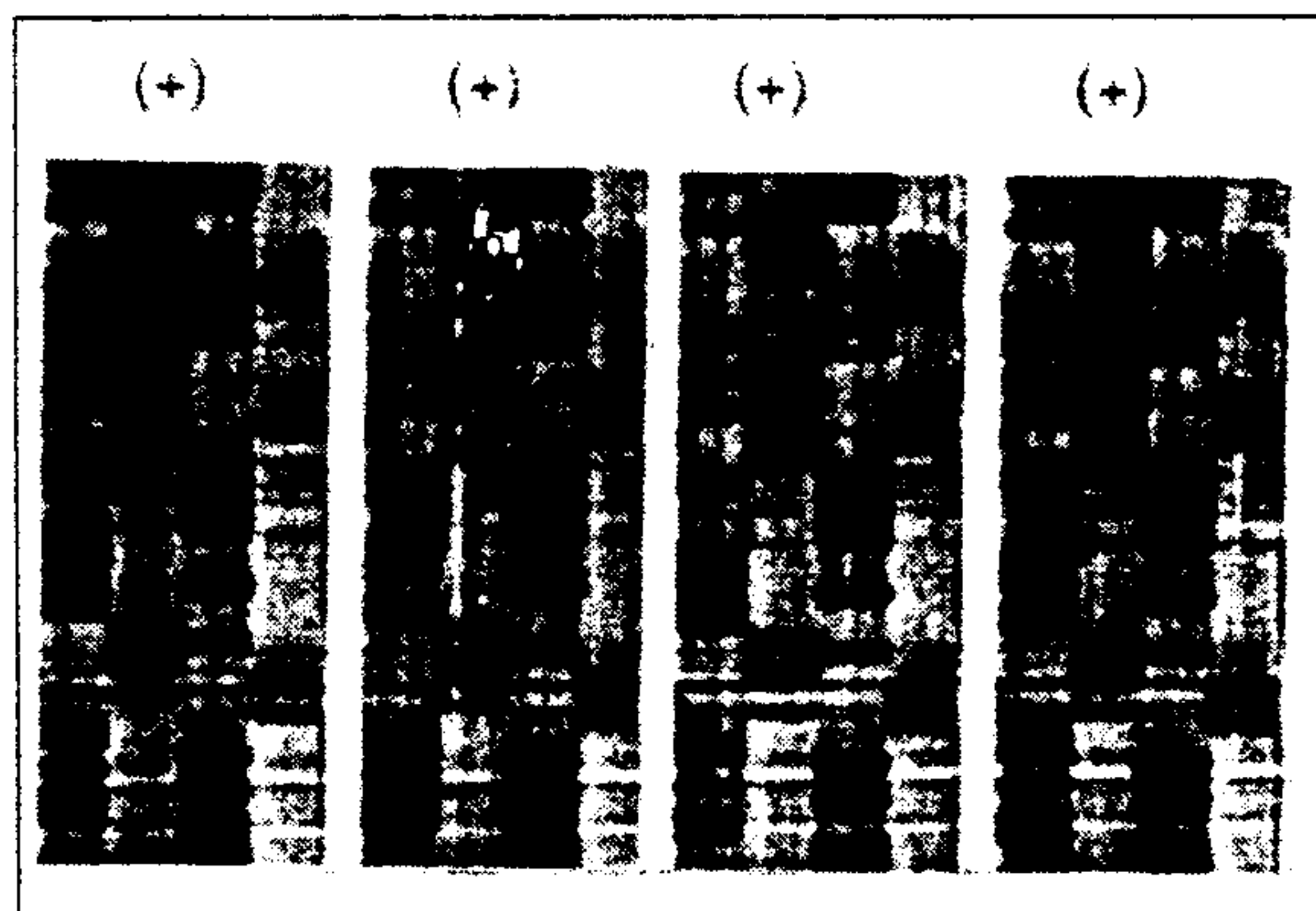


Figure 12. P53 Exon 별 염기서열 분석

A, B, C 는 각각 p53 유전자의 exon 5, exon 7, exon 8임. +, - 는 각각 DNA strand +strand 와 - strand 을 표기함

```

atggaggagc cgcagtcaga tcttagcgtc gagcccctc tgagtcagga aacattttca
gacctatgga aactacttcc tgaasacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg
gatgatttga tgctgtcccc ggaagatatt gaacaatggt tcaactgaaga ccaggtcca
gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct cccccctgg cccctgcacc agcagctcct
acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggcccctgt catcttctgt ccttccacag
aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag
tctgtgactt gcacgtatca cctgtccctc aaccagatgt ctgtccaccg ggcagagac
tgcctctgac agctgtgagt tgattccaca cccccccccg cccccccccg cccccccccg
gacatctcac agcagtcaca gcaatgagc ggggttgtc ggggttgtc ggggttgtc
gactctctca atagcagatg tctggcccct cctcagcacc ttatccagat ggaaggaat
ttcctgtgag agtatttggg tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat
gagccgctct aggttggctc tgaactgacc accatccact acaactacat gttatccagt
tctgtcagtg gggccatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactgc
agtgttaata tactgggagc gaacagcttt gaggtgcagc tttgtgctc tctggggaga
gacccggcga cagaggaaga gaatctccgc agaaaagggg accctcacca cgaactggc
caggggagca ctaagcagc actgcccacc aacaccagct cctctcccca gccaaagaag
aaaccactgg atggagaata ttcaccctt cagatccgtg gggtgagcg cttcgagatg
ttcagagagc tgaatgagc cttggaactc aaggatgcc aggtgggaa ggagccagg
ggagcaggc ctcactccag ccacctgaa tccaaaagg gtcagctac ctccgccat
aagaaactca ttttcaagac aagagggctt gactcagact ca

```

Figure 13. p53 유전자의 exon 5 ~ 8 염기서열.
(GenBank accession # K01700)

```

A I Y K Q S Q H M T E V V R R C P H H E
* * * * *
481 491 501 511 521 531
GCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCCCTGCCCCACCATGAG

R C S D S D G L A P P Q H L I V E G N
* * * * *
541 551 561 571 581 591
CGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAAT

A I Y K Q S Q H M T E V V R R S P H H E
* * * * *
481 491 501 511 521 531
GCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCCCTGCCCCACCATGAG

R C S D S D G L A P P Q H L I R V E G N
* * * * *
541 551 561 571 581 591
CGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAAT

```

Figure 14. p53 유전자 exon5 의 amino acid 변화 예

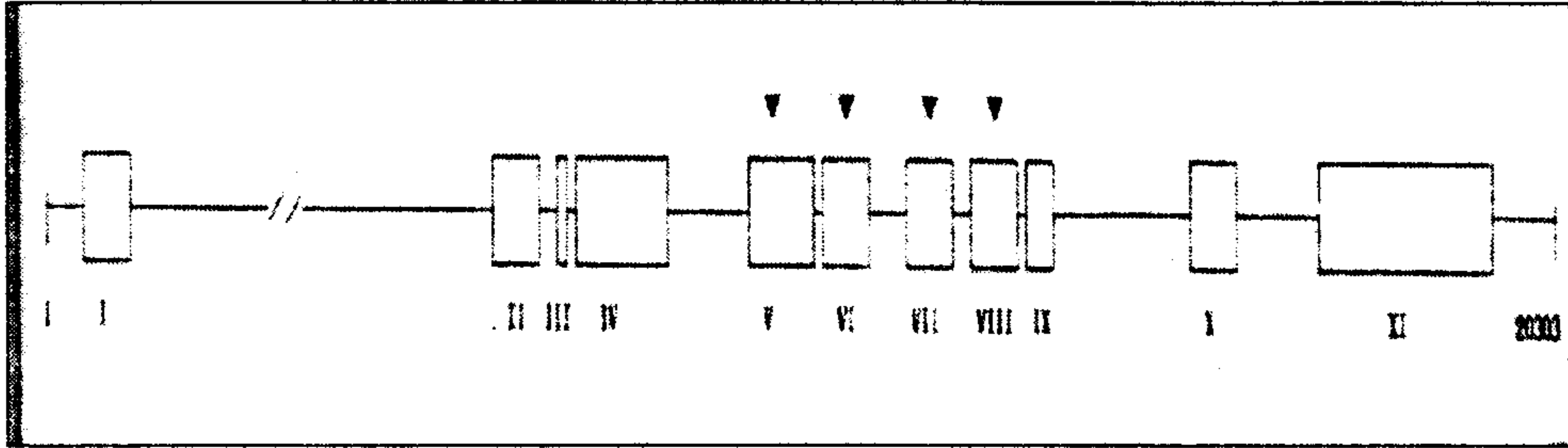


Figure 15. P53 유전자의 구조 모식도

그림 아래의 로마자는 exon 번호이며, ▼는 돌연변이 빈발 지점을 나타냄

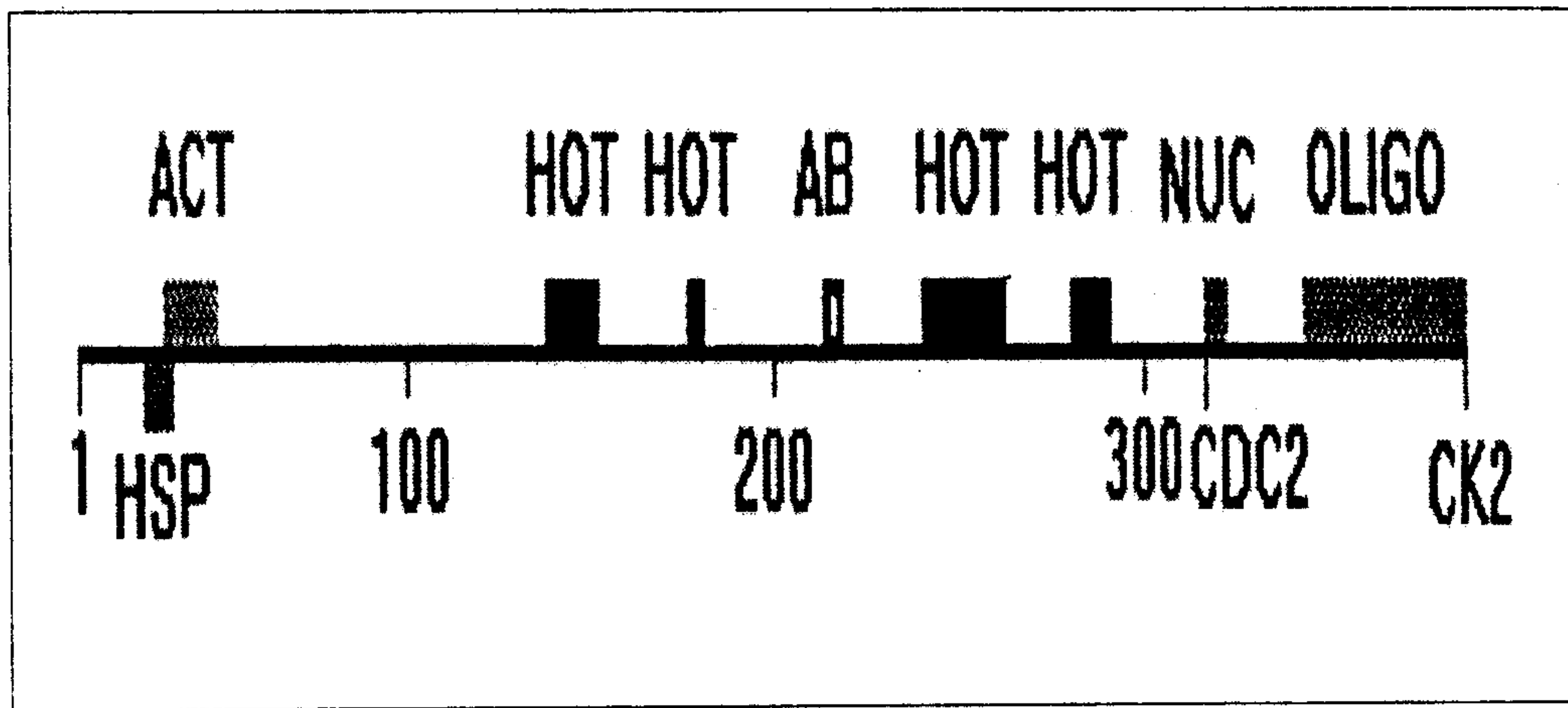


Figure 16. p32 Domain Map.

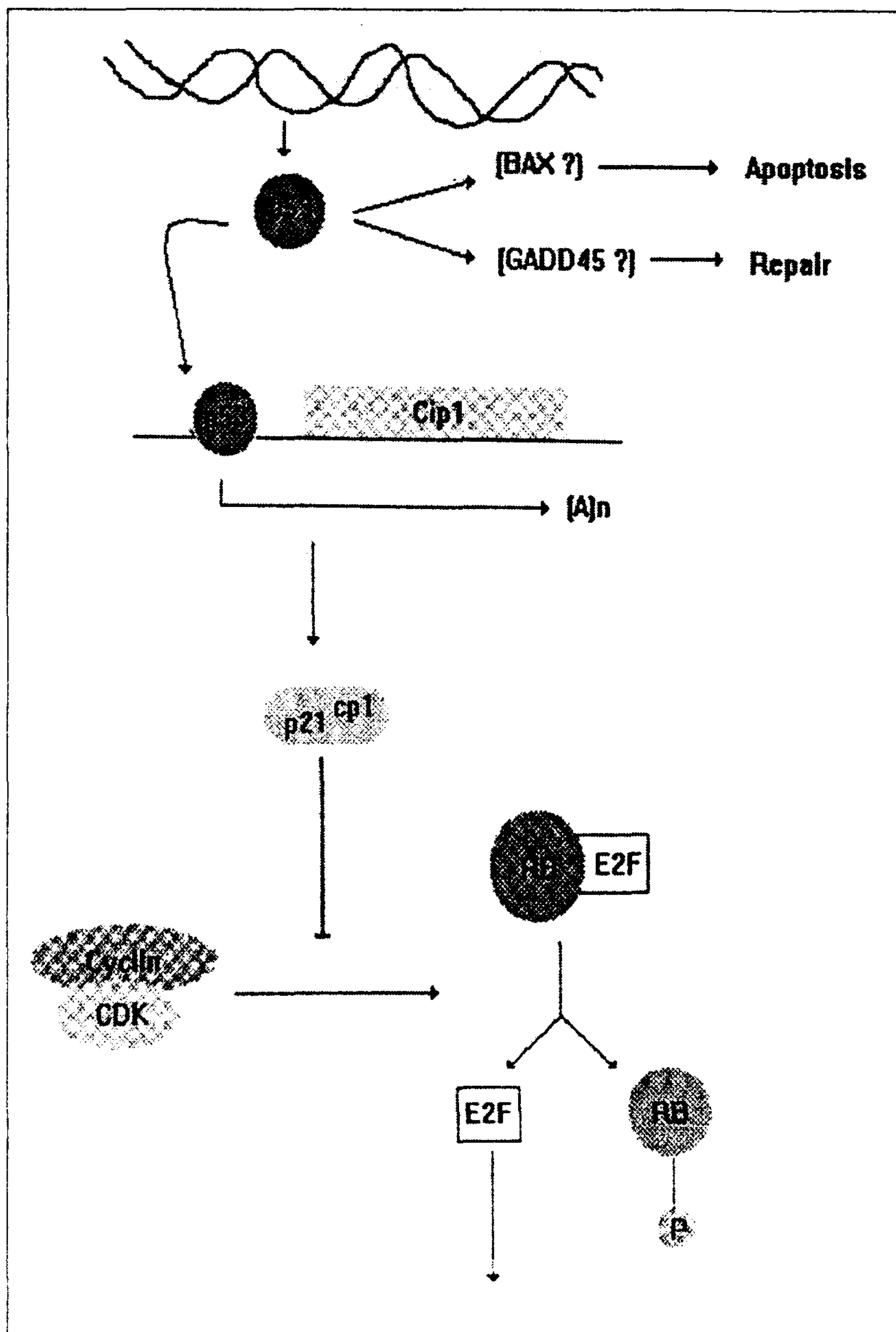


Figure 17. DNA 손상시 p53 의 역할 모식도

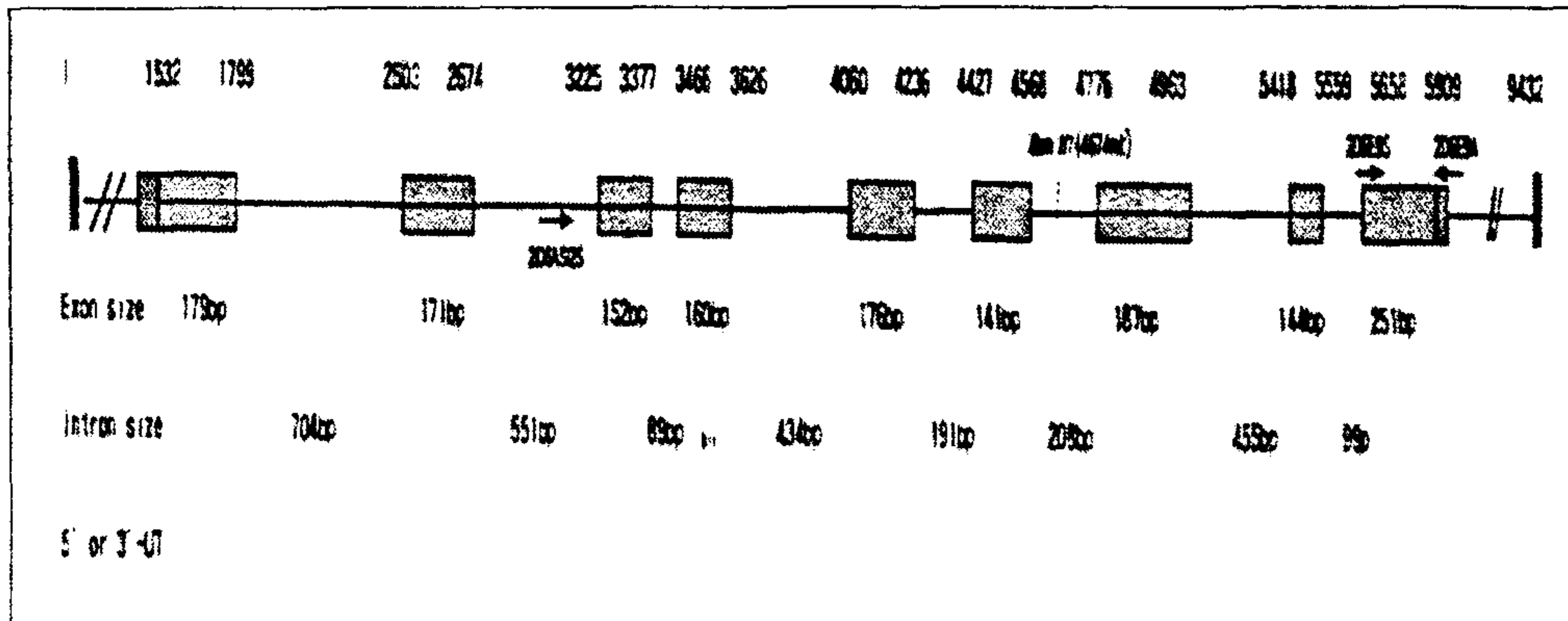


Figure 18. CYP2D6 Gene Map.

각각의 화살표는 primer를 의미하며 맨 윗줄의 번호는 nucleotide 번호를 의미한다.

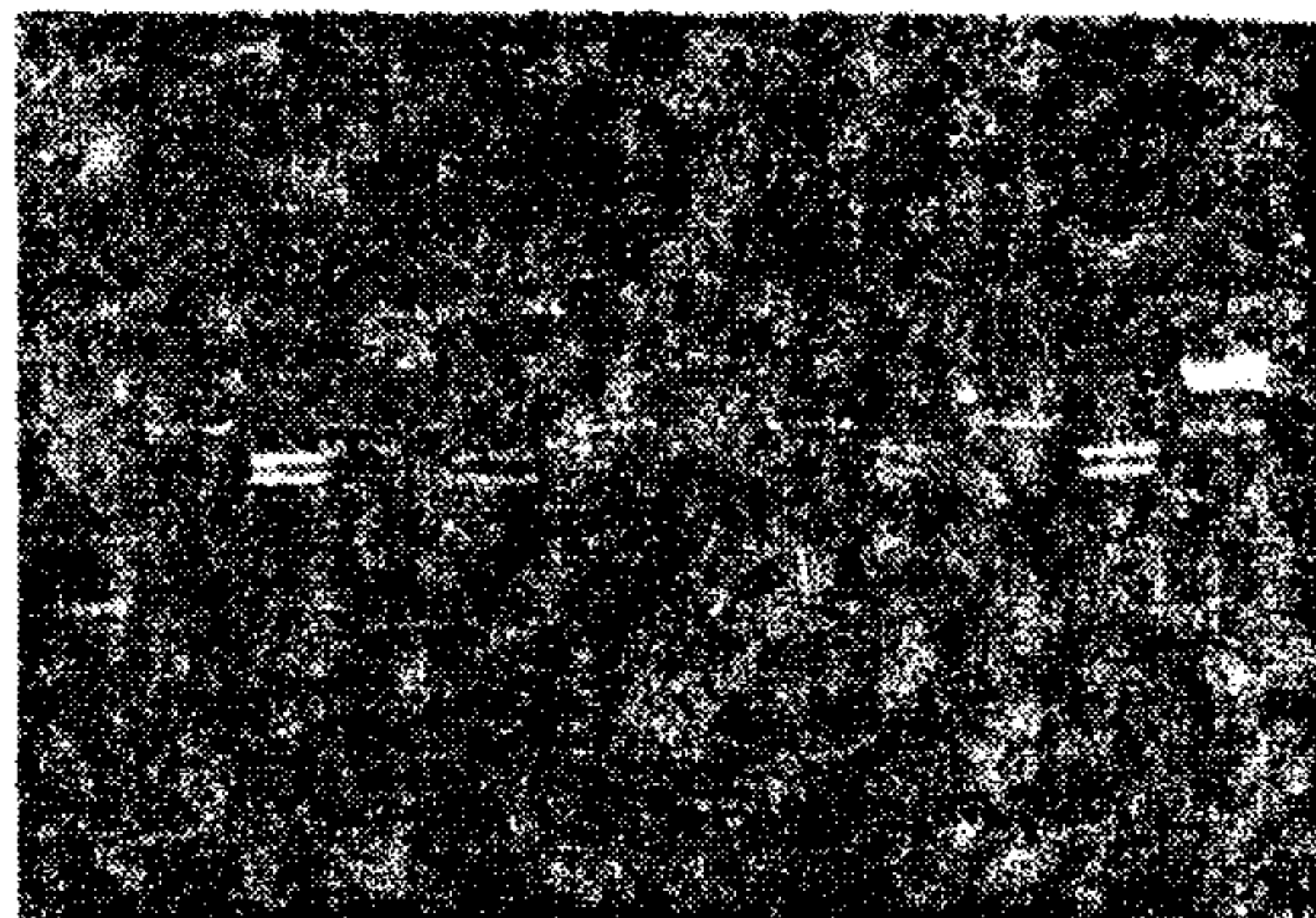
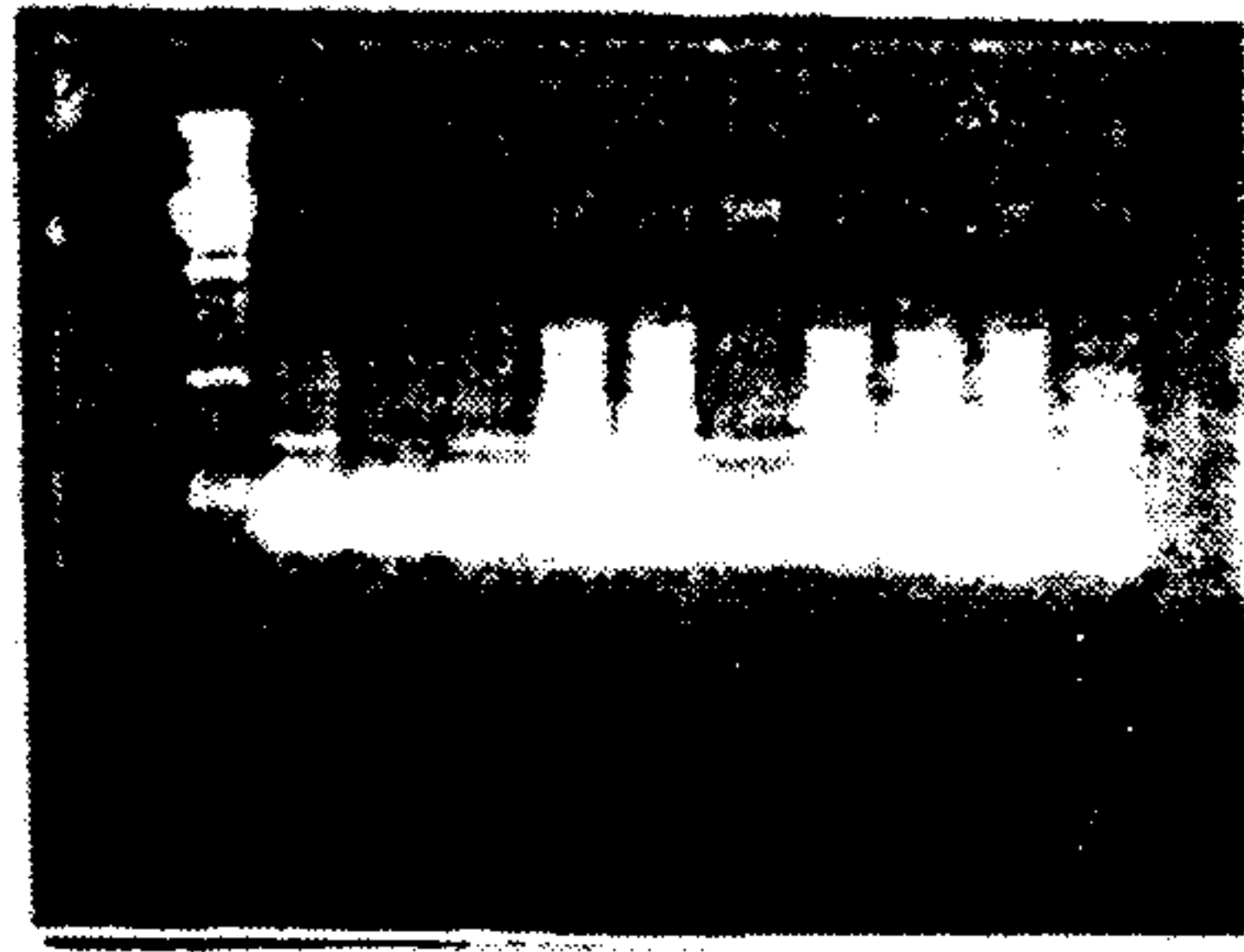


Figure 19. CYP2D6 gene 의 증폭여부 확인.

Lane 1 과 12 는 각각 123DNA ladder marker, Δ /Hind III marker. Lane 2, 4, 6, 8, 10 은 Fig. 1의 2D6AS2s 와 2D6E9as primer를 이용하여 증폭한 long range PCR 산물 (3.01kb). Lane 3, 5, 7, 9, 11 은 long range PCR 산물을 Bam H1 처리한 것임.

A.



B.

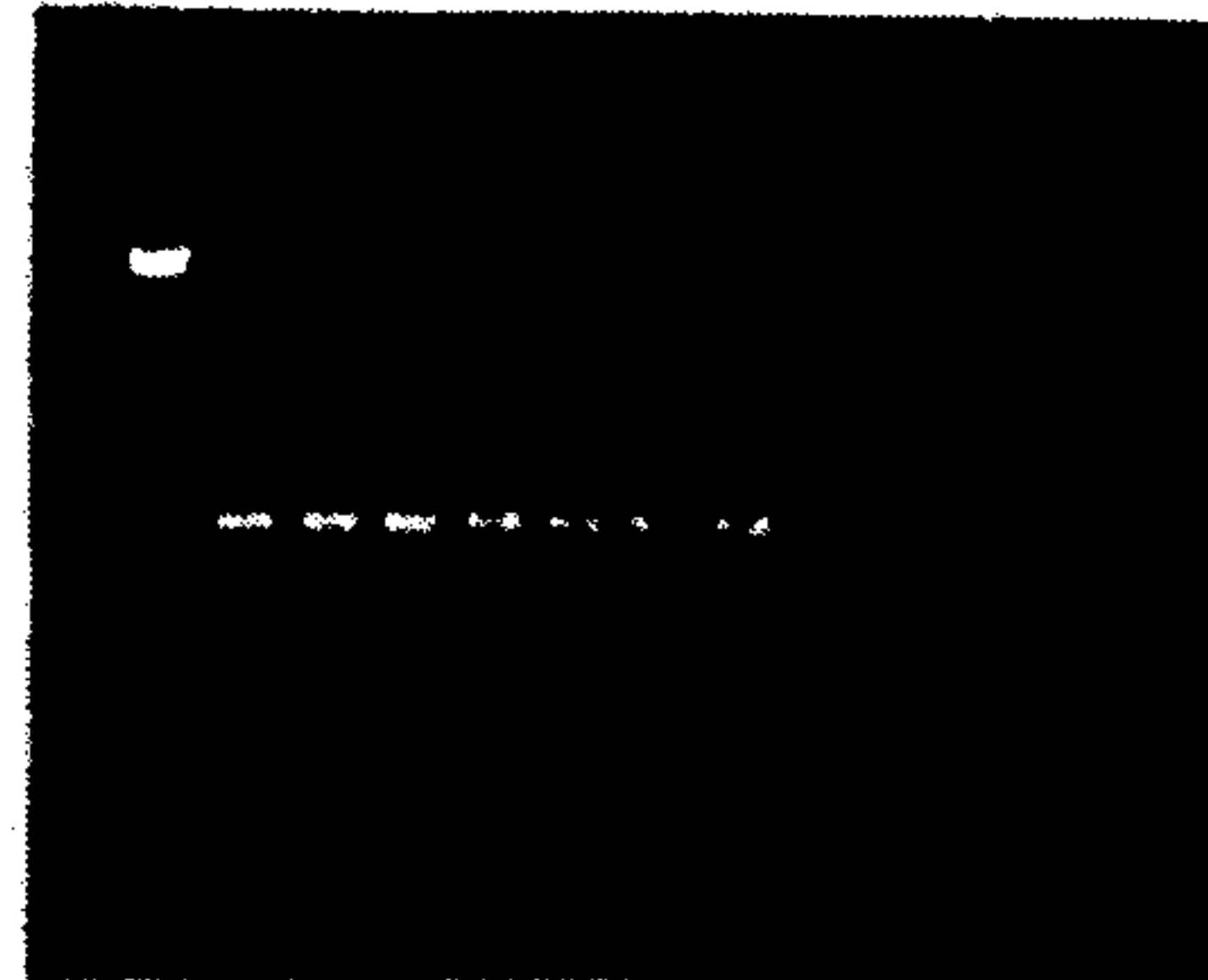
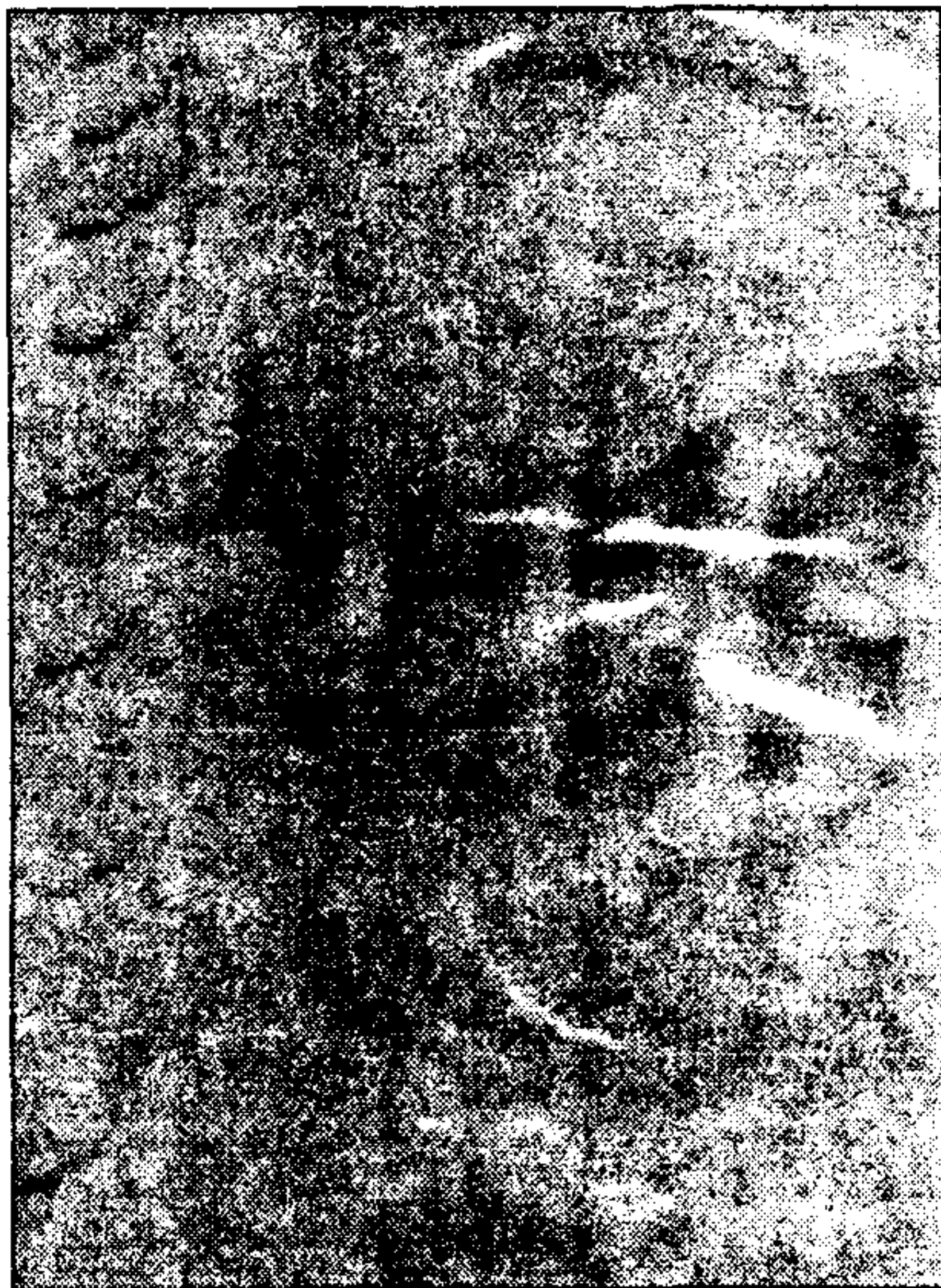


Figure 20. Annealing 온도에 따른 exon 9 의 nested PCR.

A: annealing 온도가 60°C 인 PCR 사진 (TaKaRa *ex-Taq*). B: annealing 온도가 67°C 인 PCR 사진 (TaKaRa *ex-Taq*).

A.



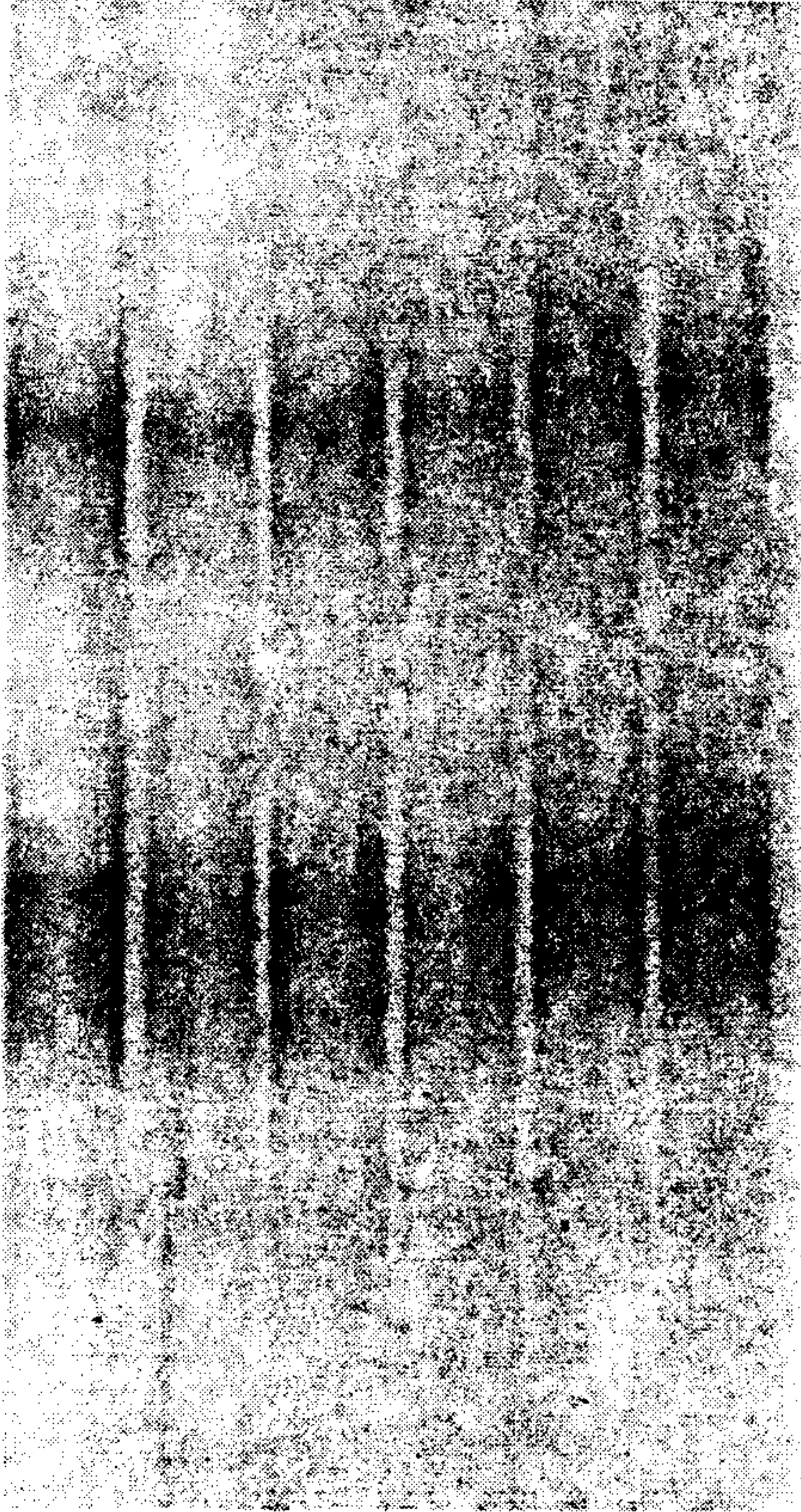
B.



Figure 21. MDE gel을 이용한 온도 변화에 따른 효과.

A 는 상온 (20~18°C) 에서의 전기영동. B 는 4°C 에서 전기영동.

A.



B.

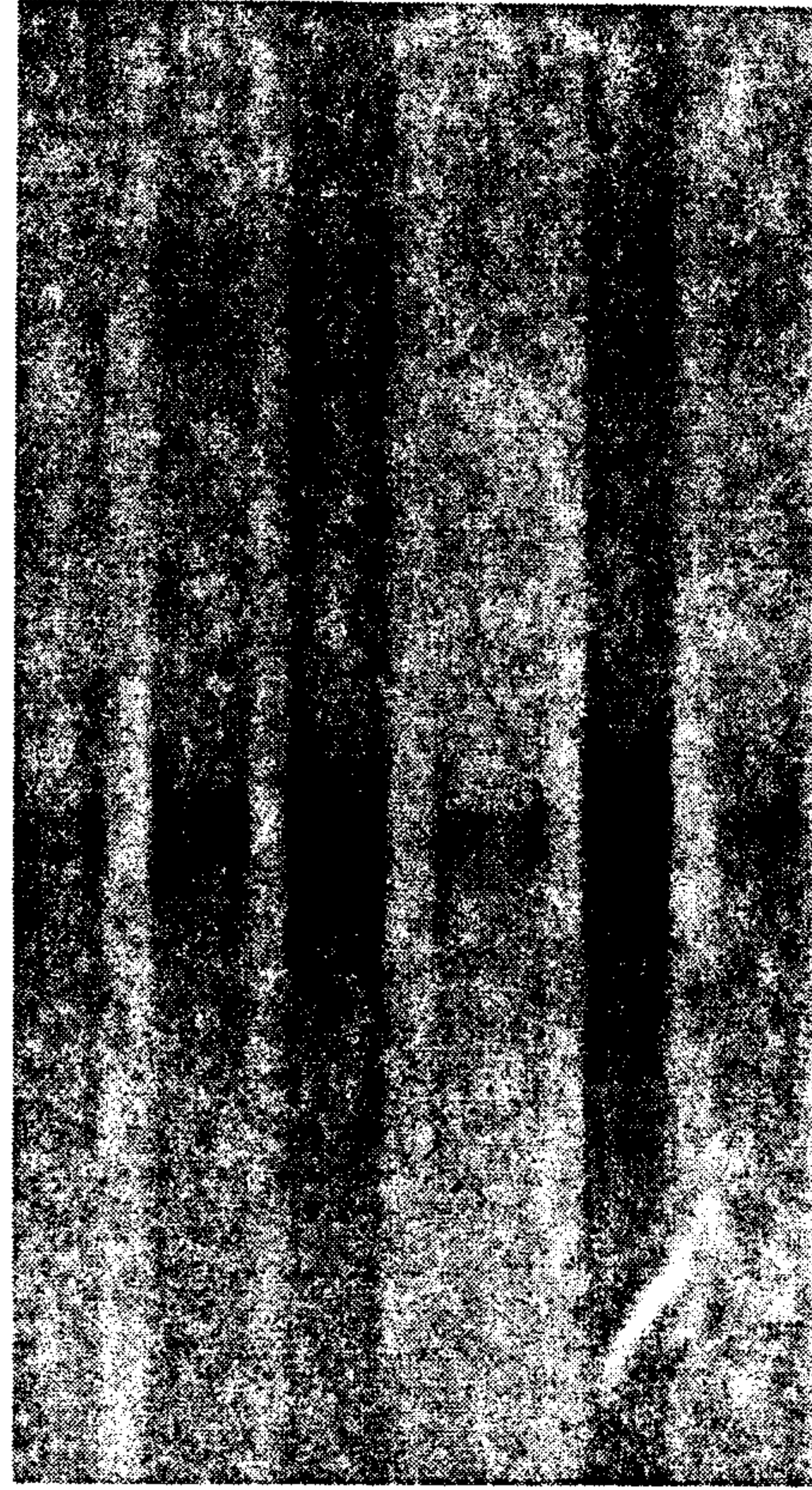


Figure 22. Sample buffer 조성에 따른 효과.

그림 A 는 Tris-glycine buffer 에 의한 사진이며, 그림 B 는 Tris-sulfate buffer 에 의한 사진. 모든 gel 은 8% acrylamide gel.

1 2 3 4 5 6 7

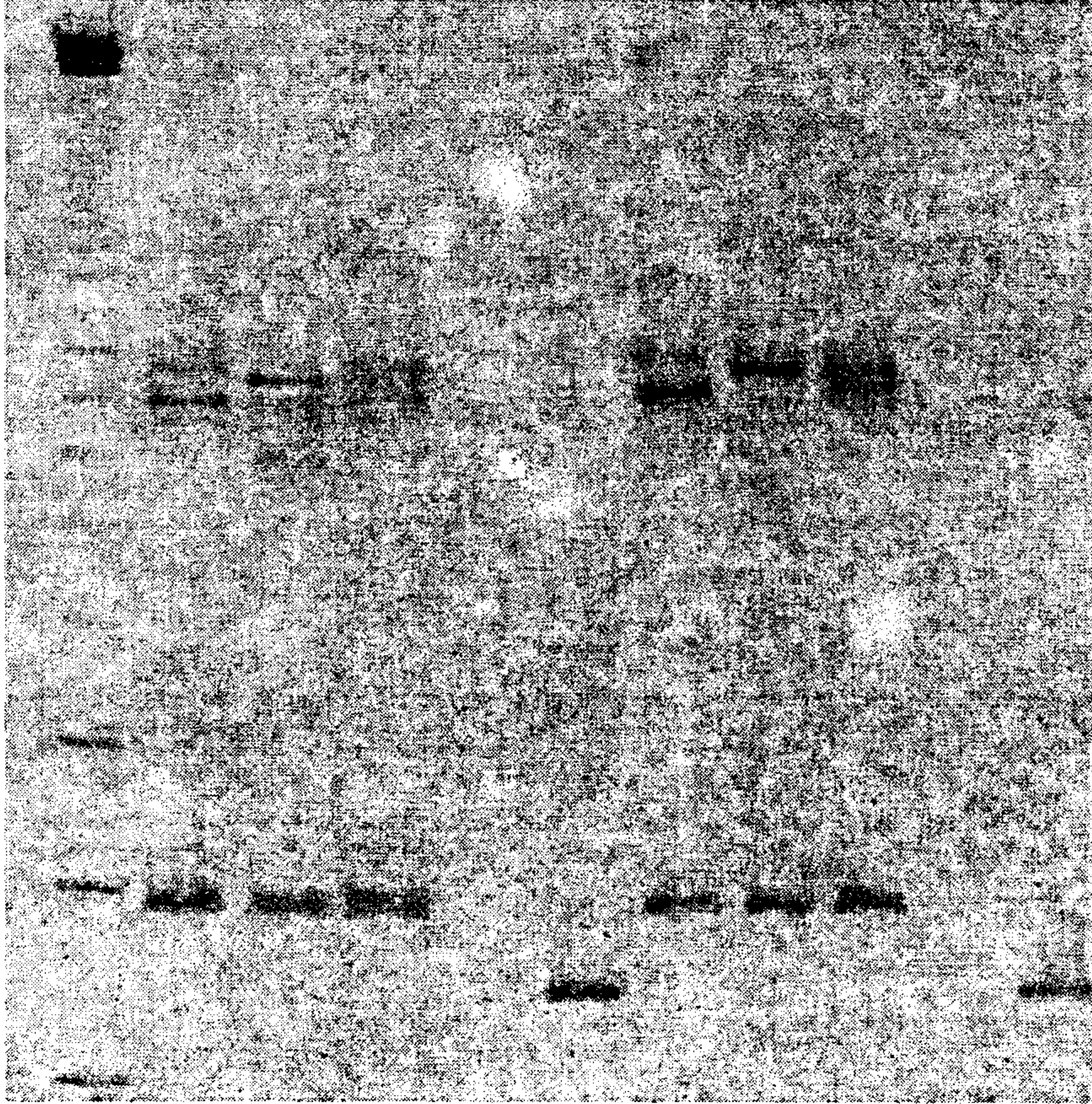
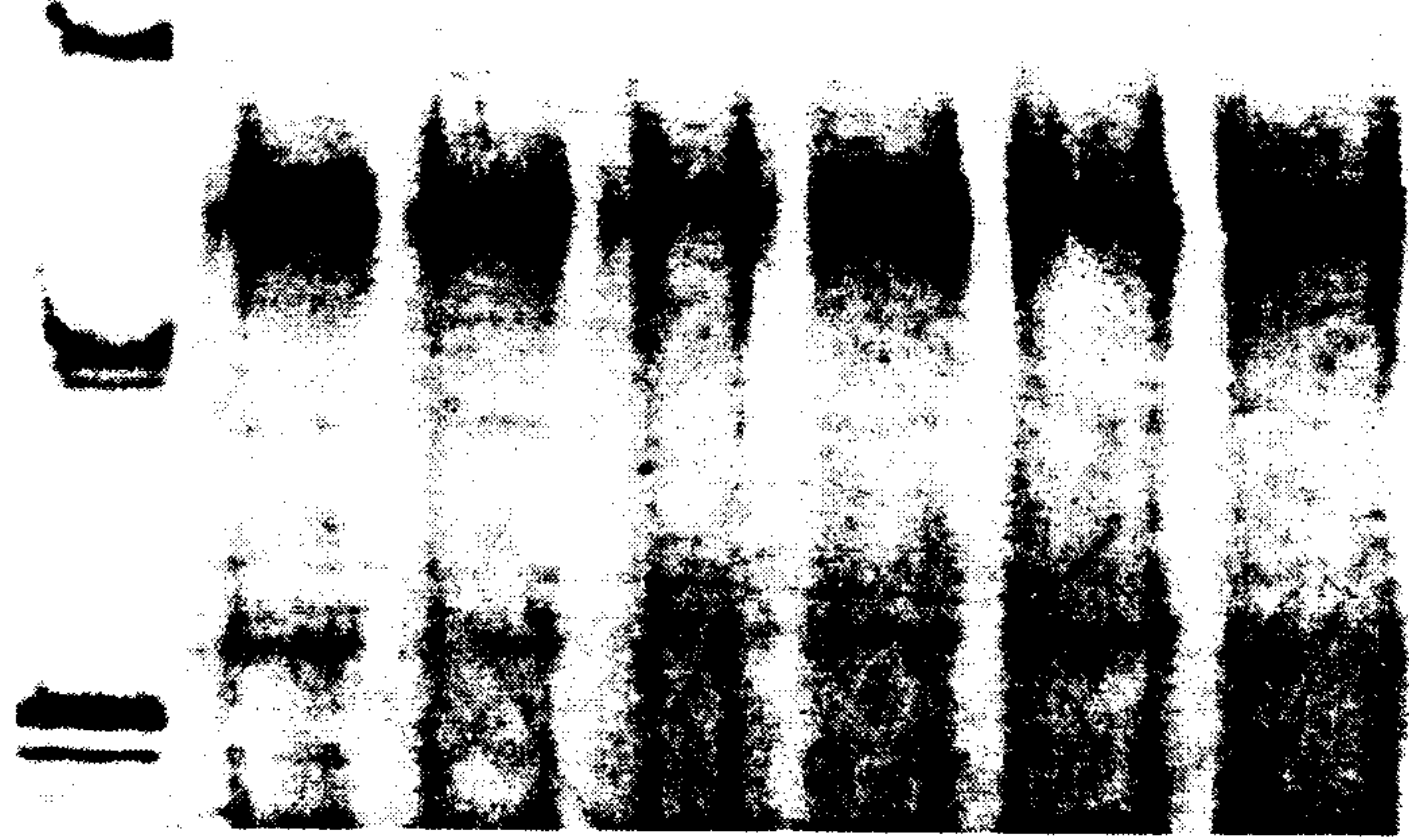


Figure 23. Weak denaturing agent 의 존재 유무에 따른 비교. Lane 1 은 123 DNA ladder marker 로써 size 의 비교 marker 라기 보다는 pattern location marker 의 역할을 수행한다. lane 2, 3, 4 는 0.01% NP-40 과 0.01% Triton X-100 이 존재 할 때, lane 5, 6, 7은 존재하지 않을때의 그림

A.



B.

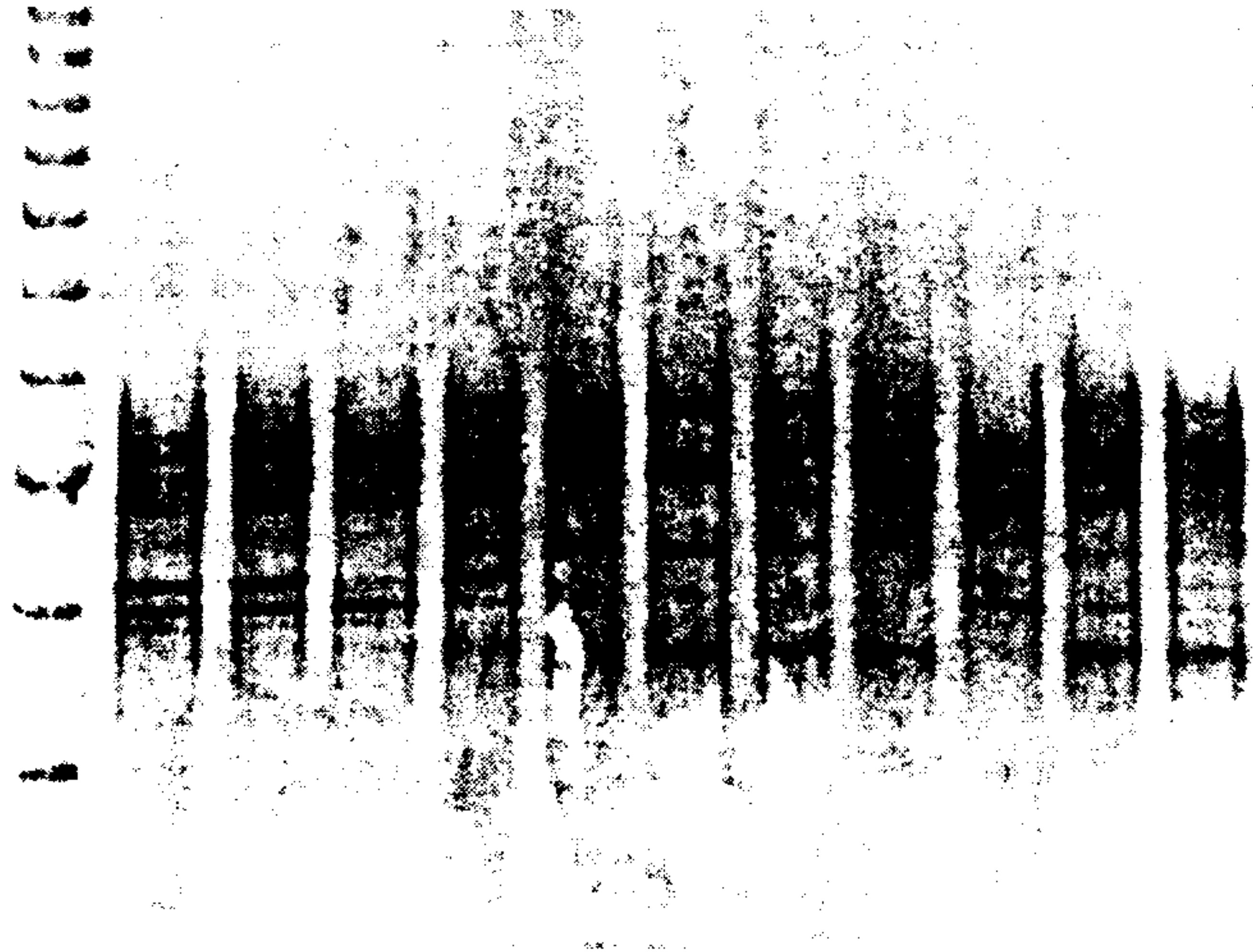


Figure 24. 최적 조건에 따른 6%, 8% acrylamide gel
에서의 해상력 차이. 그림 A 는 6% gel, 그림 B 는 8%
gel



Figure 25. 분석 gel 의 길이에 따른 효과.

본 사진은 Owl system을 이용한 것으로 사진상에서 출
현 되는 band 의 주위만을 오려서 보여주는 것임

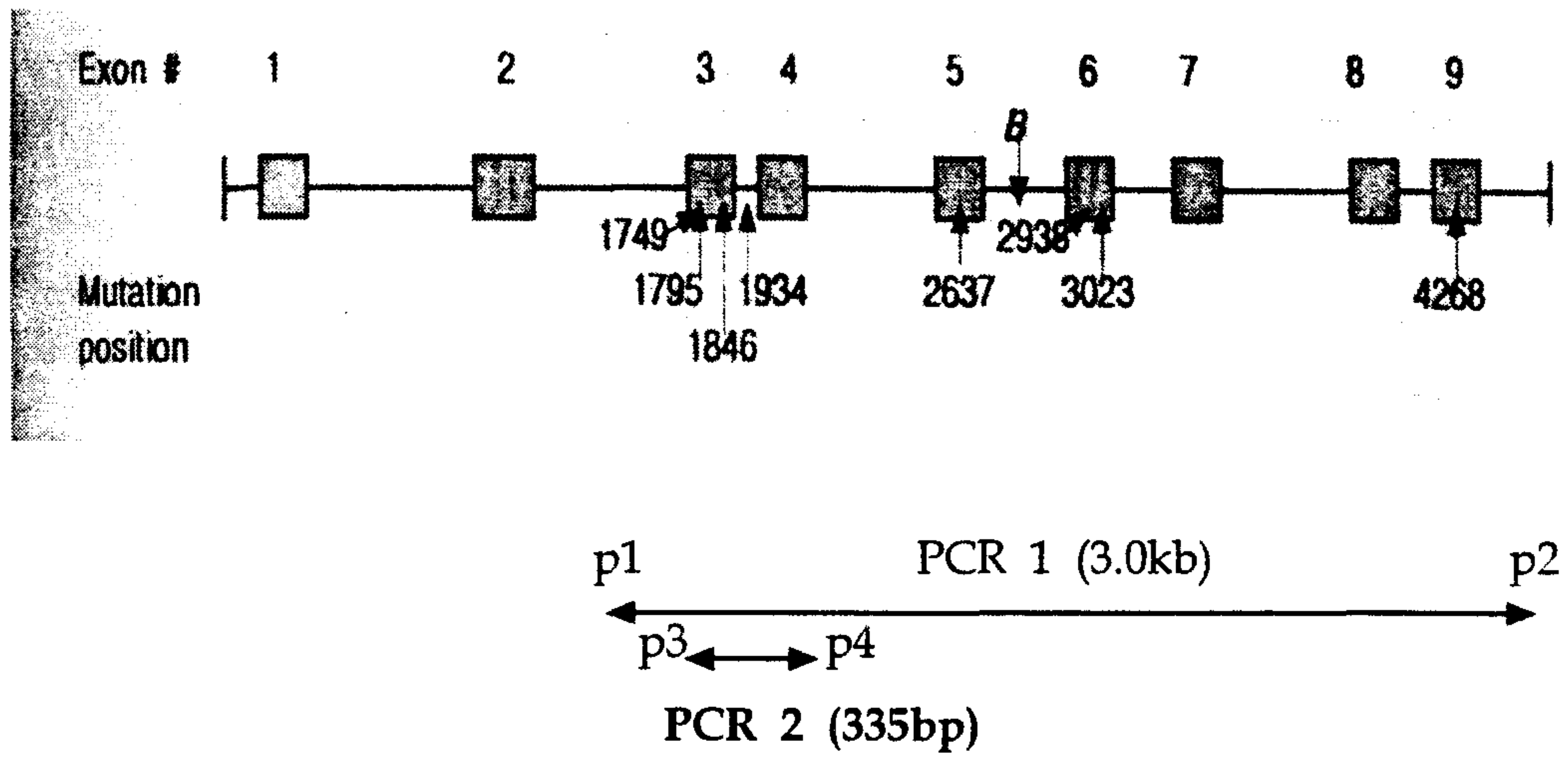


Figure 26 .CYP2D6 내에 존재하는 다형성 위치. B는 Bam H1 restriction sites을 표기한 것이며 p1~p4 은 primer을 나타낸다.

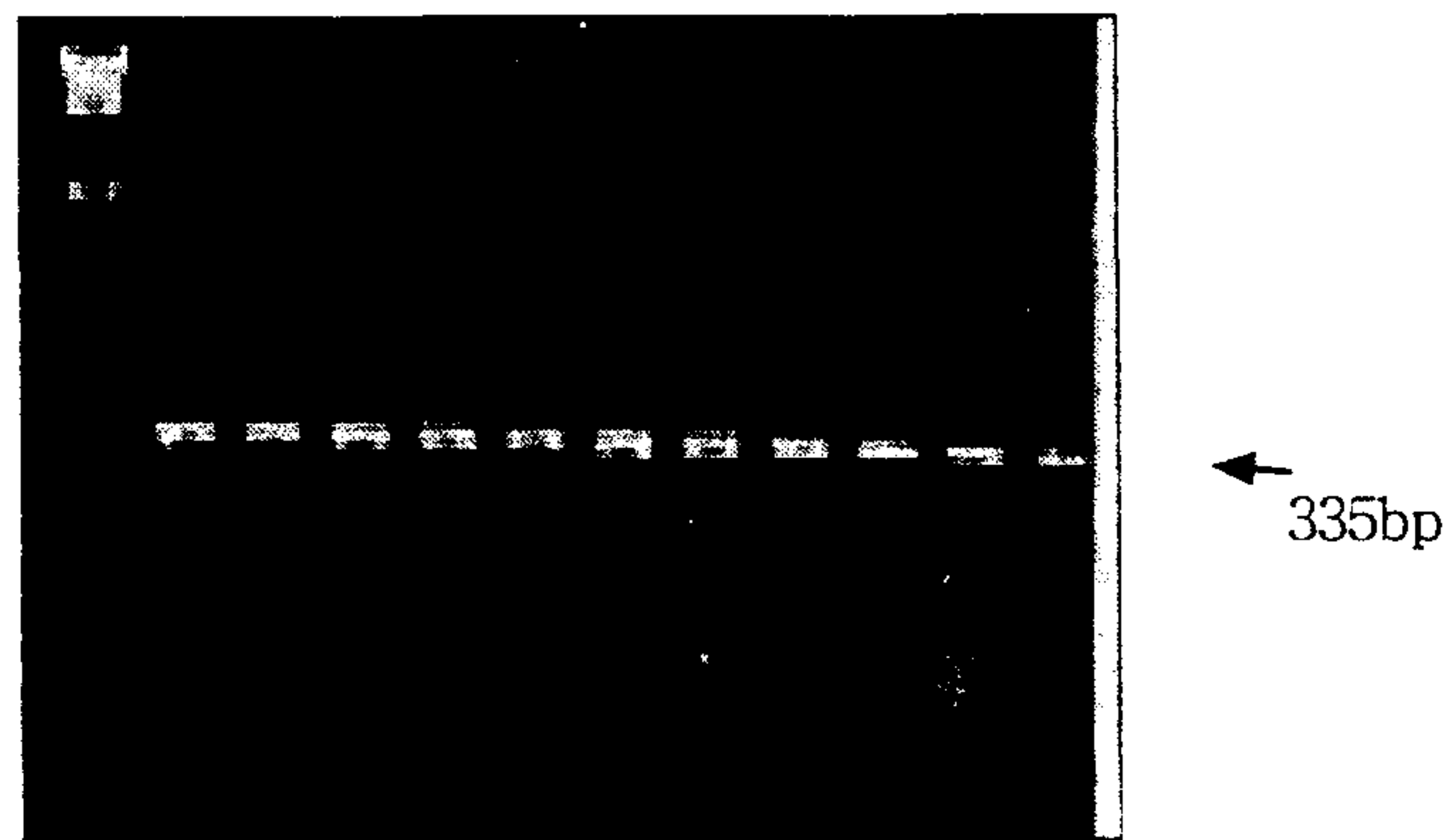


Figure 27 . Optimized condition of Nested-PCR product

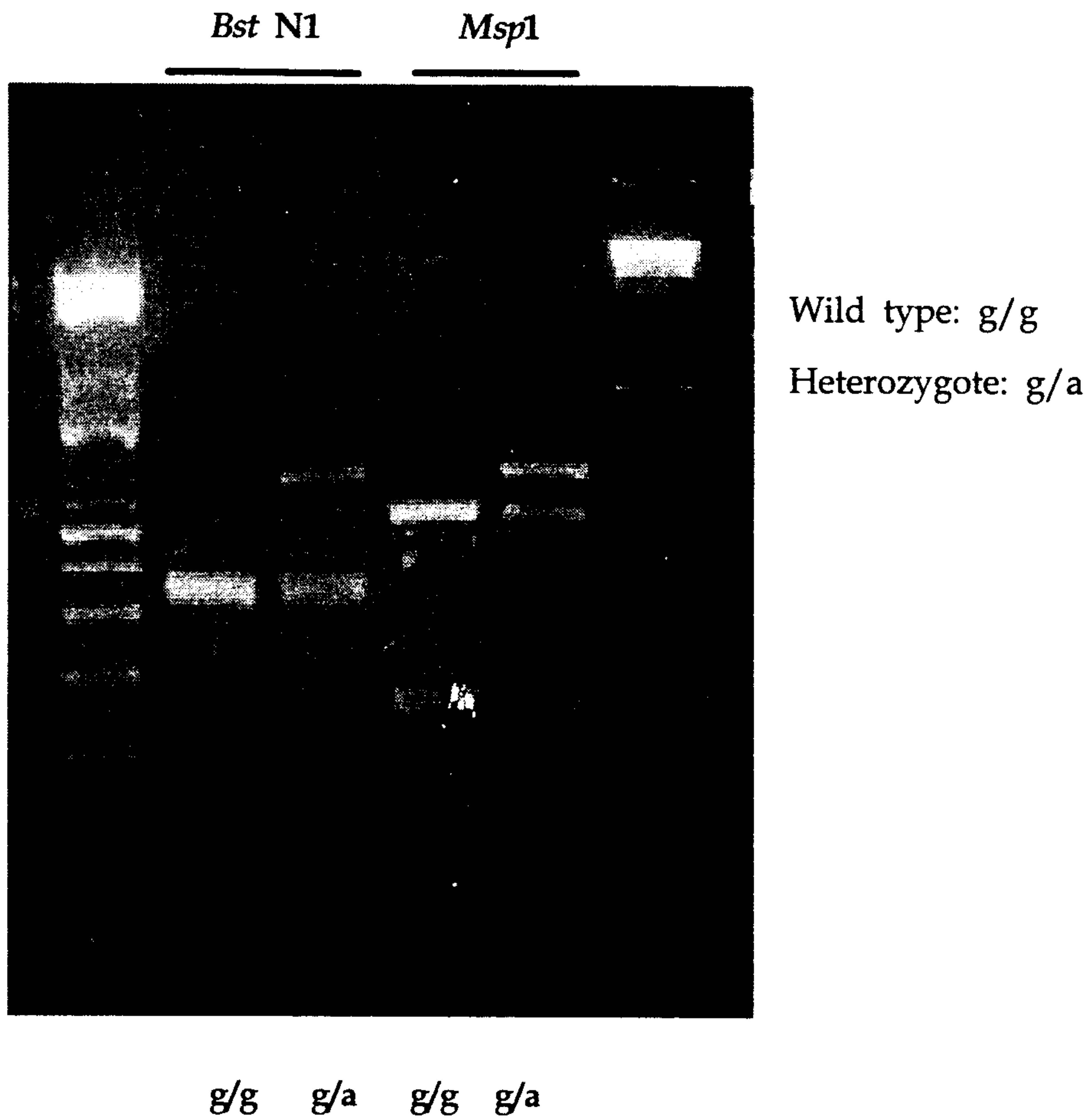
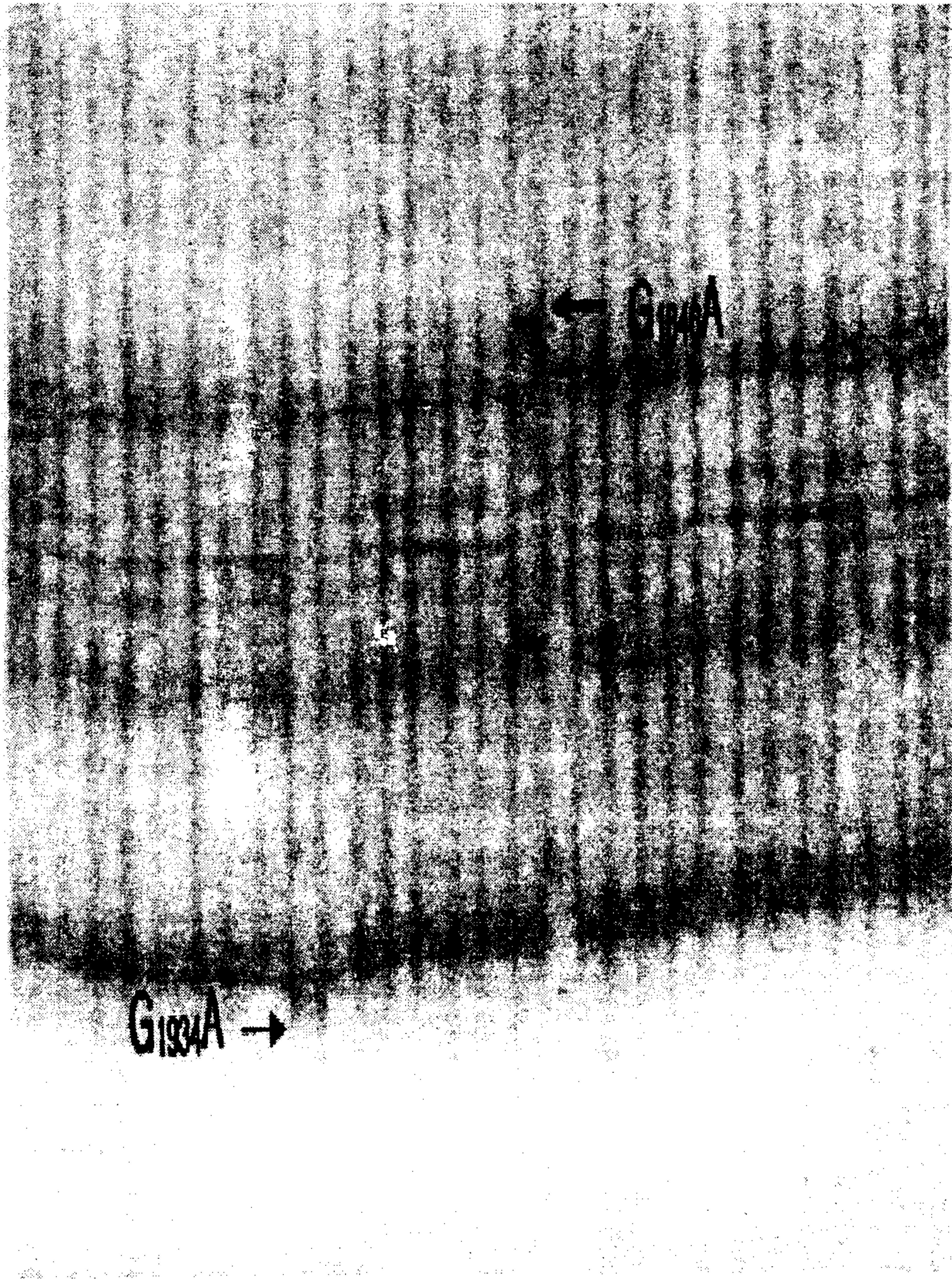
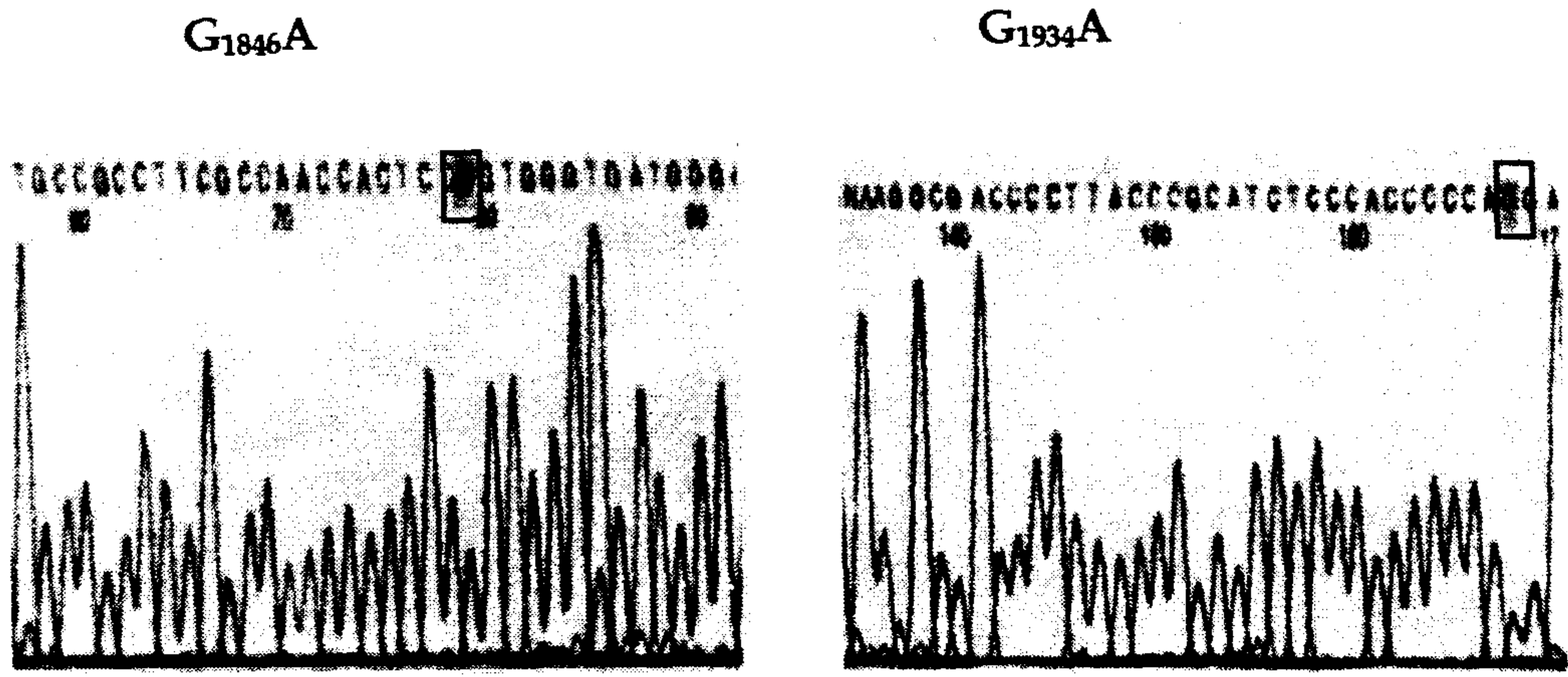


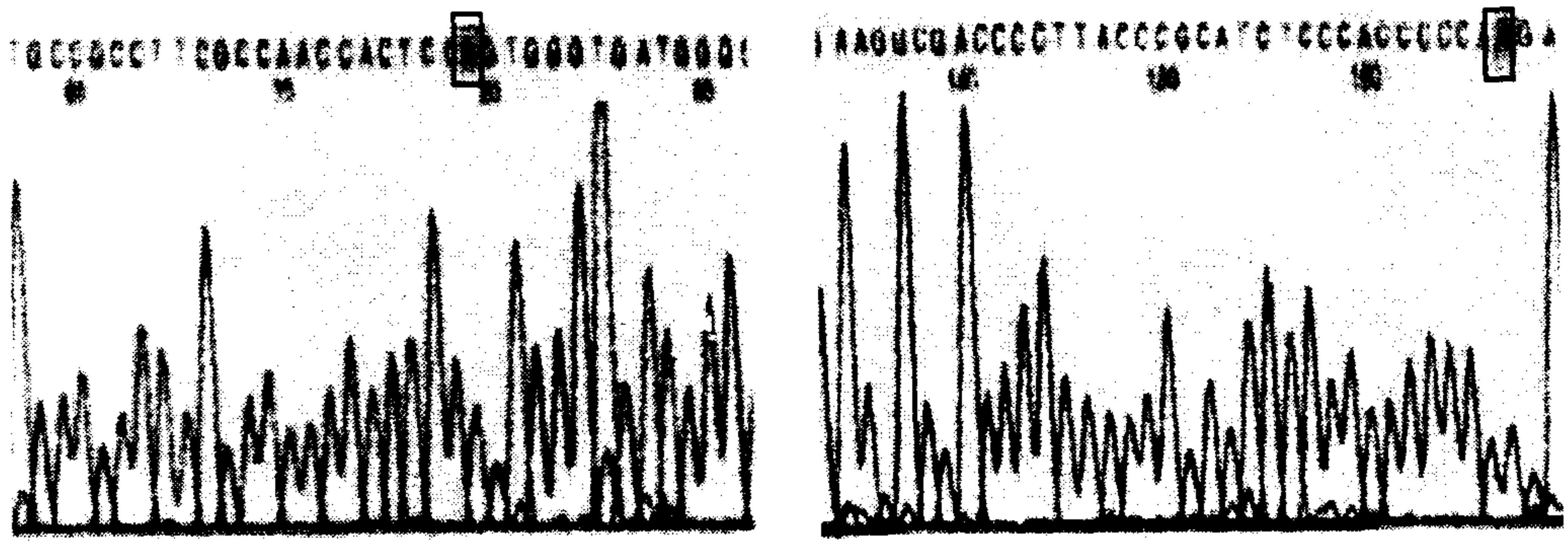
Figure 28. Restriction band pattern of the point mutation for the position 1846, 1934



**Figure 29 . Identification of CYP2D6 point mutation
by nested PCR - SSCP(A).**



Wild type



point mutation

Figure 30. Identification of CYP2D6 point mutation by sequencing.

Table 1. Exon 과 PCR product size

Exon	PCR product size	exon size
exon 5	203	184
exon 7	142	110
exon 8	161	137

Table 2. 염기서열을 분석한 sample 수

구분	exon 5			exon 7			exon 8		
	(+)	(-)	계	(+)	(-)	계	(+)	(-)	계
H0	1	1	2	0	0	0	1	1	2
H12	4	3	7	6	3	9	9	0	9

(+) : + strand

(-) : - strand

Table 3. Long range / Exon 9 PCR 에 이용된 primer set

Template	Primer 서열	PCR product size (bp)
Intron 2 - exon 9	Sense: 5'-ATTTCCTCCAGCTGGAATCC-3' (1) Antisense: 5'-ACCGAATTCGGAAGTACCACATTGCTT-3'(2)	3003
exon 9	Sense: 5'-TCCGGATCCGCCGCGTGCATGCCTCG-3' Antisense: 5-ACCGAATTCGGAAGTACCACATTGCTT-3'	270

* 각 primer 는 *Bam* HI linker (Sense primer) 와 *Eco* RI linker (Antisense primer) 를 포함하여 설계되었음. Linker 서열은 이탤릭체로 표기되었음.

Table 4. Design of RFLP tests for CYP2D6 mutations

Mutation nested Positions	Restriction PCR #*	Enzyme	Fragment Pattern	
			wild type allele	Mutant type allele
1795	2	<i>Bst</i> NI	173/162	173/138/24
1846	2	<i>Msp</i> I	260/75	335
1934	2	<i>Bst</i> NI	173/162	335

Table 5. CYP2D6 와 CYP2D7 의 새로운 allele

- New one allele of CYP2D6 exon 9

Type	보고된 sequence 와 비교		
	position	nucleotide change	amino acid change
published type (GenBank database CYP2D6)	.	.	.
6SW1	3'-UT region (5874 bp, GenBank database accession # M 33388 과 비교)	A — G	No

- New two allele of CYP2D7 exon 9

Type	보고된 sequence 와 비교		
	position	nucleotide change	amino acid change
published type	GenBank database, 2D7AP		
7SW1	5392 bp (GenBank database accession # X58468 과 비교)	T — C	# 475 (third base)
7SW2	3'-ut region (5442 bp, GenBank database accession # X 58468 과 비교)	T — C	No

Table 6 . CYP2D6 Mutation Frequencies of Koreans

Mutation Position	Del T₁₇₉₅	G_{1846A}	G_{1934A}
Caucasian (%)	0.93	0.00	20.7
Korean (%)	0.00	0.46	1.38

제 3 장 참고 문헌

Ainsworth, P.J., Surh, L.C. and Coulter-Mackie, M.B. 1991. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Res.* 19:405-406

Alan, C.G., John, S.M., Spurr, N.K., Moss, J.E., Gaedigk, A., Eichelbaum, M. and Wolf, C.R. 1990. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature*, 347:773-776

Allday, M.J., Sinclair, A., Parker, G., H-Crawford, D. and Farrel, P.J. 1995. Epstein virus efficiently neutralizing the function p53. *The EMBO journal*, 14:1382-1391.

Alvan, G., P. Bechtel, L. Iselius. and Reimy, U.G. 1990. Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39:533-537

Ayesh, R., Idle, J.R., Ritchie, J.C., Crothers, M.J. and Hetzel, M.R. 1984. Metabolic oxidation phenotypes as markers of lung cancer susceptibility. *Nature*, 312:169-170

Barry, M.A., Behnke, C.A. and Eastman, A. 1990. Activation of programmed cell death (Apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochemical pharmacology*, 40:2353-2362.

Brown, D.G., Sun, X.M. and Cohen, G.M. 1993. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to

internucleosomal fragmentation. *J. Biol. Chem.* 268:3037-3039.

Chapman, R.S., Whetton, A.D., Chresta, C.M. and Dive, C. 1995. Characterization of drug resistance mediated via the suppression of apoptosis by abelson protein tyrosine kinase. *Mol. Phar.* 48:334-343.

Danesi, R., Figg, W.D., Teed, E. and Myers, C.E. 1995. Paclitaxel (Taxol) inhibits protein isoprenylation and induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Mol. Phar.* 47:1106-1111.

Daly, A.K. and Steward, A. 1995. Use of the Expand Long Template PCR System in Genotyping for Polymorphisms in the Human Cytochrome P450 CYP2D6 Gene. *Biochemica*, 4:31-32

Dole, M., Nunez, G., Merchant, A.K., Maybaum, J., Rode, C.K., Bloch, C.A. and Castle, V.P. 1994. Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Research*, 54:3253-3259.

Dolzan, V., Rudolf, Z. and Breskvar, K. 1995. Human CYP2D6 gene polymorphism in Slovene cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis*, 16:2675-2678

Enoch, T. and Norbury, C. 1995. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *TIBS*. 20:426-430.

Gilbert, C. 1994. Cellular responses to cisplatin. *J. Biol. Chem.*, 269:787-790.

Glavac, D. and Dean, M. 1993. Optimization of the single-strand

conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum. Mutat.* 2:404-414

Hayashi, K. and Yandell, D.W. 1993. How sensitive is PCR-SSCP ?. *Hum. mutat.* 2:338-346

Heim, M. and Meyer, U.A. 1990. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCT amplification. *The Lancet*, 336:529-532

Hemminki, K., Dickey, C., Karlsson, S., Bell, D., Hsu, Y., Tsai, W.Y., Mooney, L.A., Savela, K., Perera, F.P. 1997. Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*, 18:345-350

Hirvonen, A., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Sorsa, M. and Vainio, H. 1992. Metabolic cytochrome P450 genotypes and assessment of individual susceptibility to lung cancer. *Pharmacogenetics*, 2:259-263

Huang, P., Chubb, S. and Plunkett, W. 1990. Termination of DNA synthesis by 9- β -D-Arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. *J. Biol. Chem.* 265:1667-16625.

Huang, P., Rovertson, L.E., Wright, S., and Plunkett, W. 1995. High molecular weight DNA fragmentation: A critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells. *Clinical Cancer Research*, 1:1005-1013.

- Imaoka, S., Nagashima, K. and Funae, Y. 1990. Characterization of three cytochrome P450s purified from renal microsomes of untreated male rats and comparison with human renal cytochrome P450. *Arch.Biochem.Biophys.*, 276:473-480
- Jacobson, M.D., Burne, J.F., King, M.P., Miyashita, T., Reed, J.C. and Raff, M.C. 1993. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, 361:365-368.
- Johansson, I., Oscarson, M., Yue, Q.Y., Bertilsson, L., Sjoqvist, F. and Magnus, I.S. 1994. Genetic Analysis of Chinese Cytochrome P4502D locus:Characterization of Variant CYP2D6 Genes Present in Subjects with Diminished Capacity for Debrisoquine Hydroxylation. *Molecular Pharmacology*, 46:452-459
- Kaufmann, S.H., Desnoyer, s., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research*, 57:3976-3985.
- Lasorella, A., Iavarone, A. and Israel, M.A. 1995. Differentiation of neuroblastoma enhances Bcl-2 expression and induces alterations of apoptosis and drug resistance. *Cancer Research*, 55:4711-4716.
- Lee, S.T., Park, S.K., Lee, K.H., Holmes, S.A. and Spritz, R.A. 1995. A non-radioactive Method for simultaneous detection of single-strand conformation polymorphisms (SSCPs)and Heteroduplexes. *Mol. Cells*, 5:668-672

Meyer, U.A. 1991. Molecular mechanism causing genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes. in Ruckpaul, k. and Rein, H. (eds), *Frontiers in Biotransformation*, Akademie Verlag, Berlin, 4:3-32

Mohabeer, A.J., Hiti, A.L. and Martin, W.J. 1991. Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia 'PhastSystem'. *Nucleic Acids Res.* 19:3154

Miyashita, T. and Reed, J.C. 1992. *bcl-2* Gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI 7.2 lymphoid cell to cell death and fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Research*, 52:5407-5411.

Mrozikiewicz, P.M., Cascorbi, I., Brockmoller, J., Roots, I. 1997. CYP1A1 mutations 4887A, 4889G, 5639C and 6235C in the Polish population and their allelic linkage, determined by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping. *Pharmacogenetics*, 7:303-307

Murgia, M., Pizzo, P., Sandona, D., Zanovello, P., Rizzuto, R. and Virgilio, F.D. 1992. Mitochondrial DNA is not fragmented during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 267:10939-10939.

Nakamura, K., Goto, F., Ray, W.A., McAllister, C.B., Jacqz, E., Wilkinson, G.R. and Branch, R.A. 1985. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquine and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 38:402-408

Nebert, D.W. and Nelson, D.R. 1991. P450 gene nomenclature based on evolution. IN: Water M.R. Johnson E.F. eds. Cytochrome P450. *Methods Enzymol.* Orlando. Florida: Academic Press., 206:3-11

Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. and Nebert, D.W. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6:1-42

Noll, W.W. and Collins, S.M. 1987. Detection of human DNA polymorphisms with a simplified denaturing gradient gel electrophoresis technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:3339-3343

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5:874-879

Oto, M., Miyake, S. and Yuasa, Y. 1993. Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislab gel electrophoresis apparatus. *Analytical Biochemistry*, 213:19-22

Savov, A., Angelicheva, D., Jordanova, A., Eigel, A. and Kalaydjieva, L. 1992. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res.* 20:6741-6742

Skoda, T.C., Gonzalez, F.J., Demierre, A. and Meyer, U.a. 1988. Two mutant

alleles of the human cytochrome P-450db1 gene(P450C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Medical Sciences*, 85:5240-5243

Sinha, B.K., Yamazaki, H., Eliot, H.M., Schneider, E., Borner, M.M. and O'Connor, P.M. 1995. Relationships between proto-oncogene expression and apoptosis induced by anticancer drugs in human prostate tumor cells. *Biochimica Biophysica Acta*, 1270:12-18.

Skladanowski, A. and Konopa, J. 1993. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochemical Pharmacology*, 46:375-382.

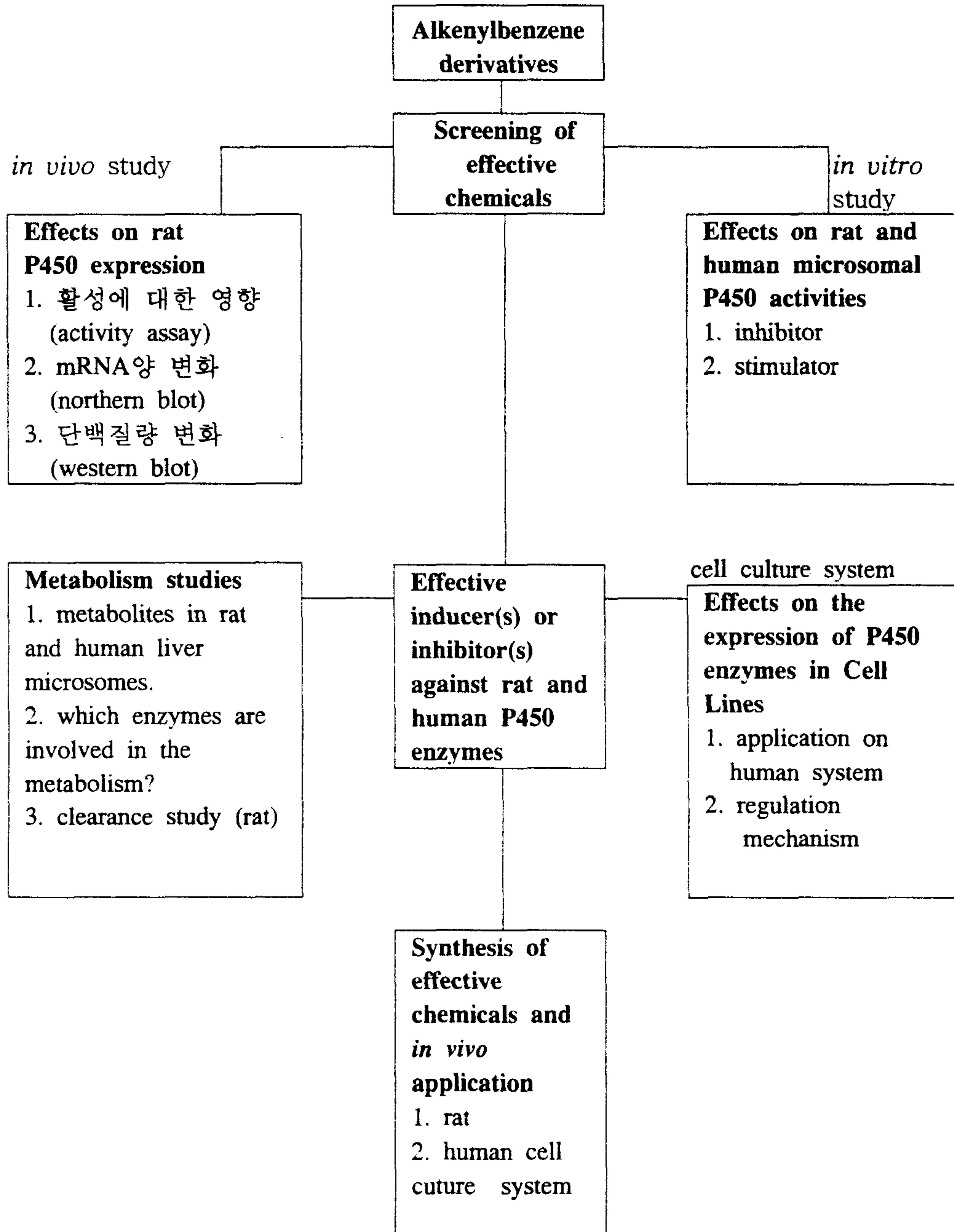
Stucker, I., Cosme, J., Laurent, P., Cenee, S., Beaune, P., Bignon, J., Depierre, A., Milleron, B. and Hemon, D. 1995. CYP2D6 genotype and lung cancer risk according to histologic type and tobacco exposure. *Carcinogenesis*, 16:2759-2764

Williams, G.T., Simith, C.A., Spooncer, E., Dexter, T.M. and Taylor, D.R. 1990. Hemopoietic colony stimulation factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*, 343:76-79.

Wolff, M.P., Bertoglio, J., Bressac, B., Bohuon, C. and Pallardy, M. 1995. Structure-activity relationships in glucocorticoid-induced apoptosis in T lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, 50:103-110.

제 1 장 서론

제 1 절 추진체계



제 2 절 목표

1. 알킬닐벤젠유도체의 P450 효소활성계에 대한 *in vivo* 영향
2. 알킬닐벤젠유도체의 P450 효소활성계에 대한 *in vitro* 영향
3. 사람간 소포체에서의 myristicin 대사연구
4. 유해한 약물 및 화학물질의 안전성평가에 사용할 수 있는 *in vitro* system 개발

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 실험내용 및 방법

쥐간 소포체의 분리에 사용한 쥐 (S.D.)는 한국화학연구소로부터 공급받았다. NADP⁺, glucose 6-phosphate, glucose 6-phosphate dehydrogenase, resorufin, sodium cholate, nifedipine과 diethyldithiocarbamate 그리고 myristicin 등의 alkenylbenzene 유도체들은 Sigma Chemical Co.로 부터 구입하였으며, penthoxyresorufin과 ethoxyresorufin은 Molecular Probe Co.로부터 구입하였다. 7,8-benzoflavone 과 ketoconazole은 Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI) 제품을 구입하였다. 다른 시약들도 시판 특급시약을 구입하여 실험에 사용하였다.

Myristicin의 대사연구 및 P450 (Nelson et al., 1993; Guengerich, 1991) 효소분리에 사용한 사람간 소포체 시료는 F. Peter Guengerich 교수 (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA)로부터 공급받았다.

동물을 이용한 생체시스템을 이용한 알킬닐벤젠유도체들로부터의 P450 활성조절물질의 IN VIVO 스크리닝은 200-250 g의 male Sprague-Dawley rat에 여러종류의 알킬닐벤젠유도체를 각각 corn oil에 섞어서 500 μ mol/kg weight의 농도로 복강주사한다. 처리후 24시간지나후에 동물들을 희생시킨다. 이때 각 group은 4마리의 SD rat을 사용한다. Control animals는 corn oil만 투여한다. SD rat들을 희생시킨후 즉시 간을 제거하여 0.15 M KCl 용액으로 perfusion 시키고 microsome을 분리하였다 (Jeong and Yun, 1995).

1. P450 효소활성분석방법

약물에 의해 induction되는 효소들로 알려진 P450 1A1/2와 P450 2B1/2의 표지효소활성은 spectrofluorometer를 이용한 ethoxyresorufin

O-deethylation (EROD)와 pentoxyresorufin O-dealkylation (PROD) assay로 각각 측정하였으며, P450 2E1의 효소활성은 p-nitrophenol hydroxylation (PNPH) assay로 측정하였다 (Guengerich, 1989; Guengerich et al., 1991).

2. 알킬닐벤젠유도체의 P450 효소활성에대한 in vitro 영향 분석방법

쥐간 microsome을 이용하여 (3)의 방법대로 시료를 준비한다음 NADPH generating system 존재하에서 각각의 알킬닐벤젠유도체를 20, 50, 100 μ M 농도로 처리하고, 10분간 반응시킨다. 각 시료에 기질을 첨가하여 (3)의 방법대로 반응을 시켜 알킬닐벤젠유도체의 여러 P450 효소에대한 영향을 관찰했다.

3. Myristicin의 대사연구방법

단백질 정량, P450 스펙트럼 측정 및 P450 효소의 분리기존의 방법에 따라 수행하였다 (Guengerich, 1989). Myristicin의 대사는 HPLC분석법을 이용하여 정량하였으며, immunoinhibition 실험에서는 사람 간 microsome을 여러 농도의 anti-P450 antibody와 함께 23 $^{\circ}$ C에서 20분간 incubation한 후, 효소반응에 필요한 성분들을 첨가해서 반응 시켰고, 대조군에서는 pre-immune IgG를 이용하였다. 7,8-Benzoflavone, ketoconazole 등에 의한 myristicin 대사물질의 형성 억제 시험에서는 시험물질과 microsome, 그리고 NADPH-generating system을 50 μ l 용량에서 10분간 incubation하고, 10배로 희석한 다음 효소반응을 진행시켰다.

가. HPLC분석방법

- (i) Column: Capcell C18 (5 μ m, 2.0x250 mm)
- (ii) Mobile phase: 45% acetonitrile
- (iii) Flow rate: 1.0 ml/min

(iv) Detection: absorbance at 254 nm.

제 2 절 연구수행 내용 및 결과

1. 알킬닐벤젠유도체의 P450 효소활성에대한 영향

각각의 P450효소에대한 marker enzyme activity의 변화를 측정하였다 (Table 1). 거의 모든 알킬닐벤젠유도체가 EROD와 PROD의 활성증가를 나타내었으며 safrole과 myristicin의 경우 EROD와 PROD의 활성을 3-6배, 4-10배 정도 증가시켰다. PNPH의 경우 역시 safrole과 myristicin이 2배정도 활성을 증가시켰으며 다른 유도체들은 유의성있는 변화를 나타내지 못했다.

2. 알킬닐벤젠유도체의 P450 단백질생성에대한 영향

각각의 효소의 생성변화를 각효소에대해 특이성을 나타내는 항체를 이용한 western blot을 이용하여 생성량의 변화를 untreated rat의 경우와 비교하였다 (Figure 1). 알킬닐벤젠유도체의 P450 효소의 활성증가(in vivo) 효과와 마찬가지로 P450 효소의 apoprotein이 생성됨을 나타내었다. P450 1A의 경우 untreated에 비교해서 활성증가의 효과와 유사한 결과를 나타내었는데 주로 P450 1A2의 증가를 나타내었고, safrole과 myristicin의 경우 P450 1A1의 생성이 뚜렷이 증가되었다. safrole과 myristicin의 경우 TCDD의 효과와 유사한 결과를 나타내었는데 매우 흥미로운 결과이므로 비교실험이 요구된다. P450 2B의 경우도 활성증가와 유사한결과를 얻었으며, P450 2E1의 경우 safrol과 myristicin의 증가를 확인하였다.

3. 알킬닐벤젠유도체의 P450 효소활성에대한 *in vitro*영향

In vitro 영향은 *in vivo*의 경우와는 다르게 농도에 의존적으로 P450 효소의 활성을 저해시켰다 (Table 2). 이 결과는 효소수준에서의 효과와 발현에 대한 영향이 다름을 보여주고 있다. 즉 active metabolite의 존재가능성을 나타낸다.

4. 사람간 소포체에서의 Myristicin의 대사연구

먼저 사람의 간을 미국 Vanderbilt University의 Dr. Guengerich로부터 얻어서 Figure 2에 도시한 바와 같이 여러 P450 isozyme들을 분리하였다 (Guengerich, 1989; Yun et al., 1991, 1992a,b). Microsome을 Sodium cholate에 용해시킨 다음, n-octylamino-Sepharose 4B, hydroxyapatite, DEAE-, CM-Sepharose 6B의 순서대로 column chromatography를 수행하였고, 전기영동과 활성 측정등으로 각 P450 효소들을 분리할 수 있었으며, 순수 분리한 P450 효소들의 항체는 항원 첫 투여 후 5주째에 혈액을 분리하여 실험에 사용하였다 (Kaminsky et al., 1981; Soucek et al., 1995).

Table 3에서는 분리과정중의 P450함량과 분리한 isozyme의 함량을 나타내었으며, purification yield를 표시하였다.

여러 형태의 P450 효소들의 활성을 구분하기 위하여 각 효소의 표지효소활성을 HPLC 또는 산물의 형광분석를 이용한 활성분석법을 이용하여 HL118에서 분리한 각 isozyme의 활성을 조사한 결과 Table 4와 같았다. 이때 토끼에서 분리한 NADPH-P450 reductase를 이용하였다 (Yasukochi and Masters, 1976).

Figure 3에서는 myristicin을 사람 간 microsome과 incubation하여 생성되는 대사물인 5-allyl-1-methoxy-2,3-dihydroxybenzene의 HPLC분석을 통한 확인과정을 도시하였고, 5-allyl-1-methoxy-2,3-dihydroxybenzene은 NADPH-generating system의 존재하에서만 생성되는 것으로 보아, P450에 의한 반응임을 알 수 있었다.

Table 5에서는 사람 간 microsome에서 myristicin 1ml 대사과 순수분리

한 각 P450의 효소활성사이의 상관성을 조사한 결과를 나타낸 것으로, P450 3A4 효소활성인 nifedipine 대사와 P450 1A2의 효소활성인 phenacetin 대사와 상관관계가 매우 높은 것으로 보아, myristicin의 대사는 P450 3A4 및 P450 1A2에 의한 것임을 알 수 있었다.

Table 6에서는 간 microsome, 순수 분리한 P450 3A4 및 P450 1A2, 그리고 *E. coli*에서 발현시킨 P450 3A4과 P450 1A2 (Guengerich et al., 1996)를 각각 이용하여 myristicin의 대사력을 측정한 결과를 나타내었는데, 모든 시료에서 myristicin의 대사가 활발히 일어남을 알 수 있었다.

^aNeither purified P450 2A6, P450 2C9, P450 2D6, nor P450 2E1 catalyzed myristicin at a detectable rate (<1 pmol product formed/min/nmol P450).

^bResults are expressed as means of duplicate assays, which differed <10%

Figure 4에서는 myristicin 대사에 미치는 여러 chemical inhibitor의 영향을 살펴보았는데, 그 결과 역시 P450 3A4 및 P450 1A2 효소활성에 대한 억제제인 ketoconazole과 7,8-benzoflavone (Yun et al., 1992)이 specific하게 억제하여, P450 3A4과 P450 1A2 효소의 역할을 확인할 수 있었다. 이 경우 P450 3A4가 많이 발현된 경우(HL110)에는 ketoconazole이 P450 1A2가 많이 발현된 경우(HL127)에는 7,8-benzoflavone (ANF)이 특이한 저해 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

Figure 5에서는 myristicin 대사에 미치는 여러 anti-P450 antibody들의 영향을 살펴보았다. 이 실험에서는 anti-P450 1A2, anti-P450 2A6, anti-P450 2C, anti-P450 2E1 그리고 anti-P450 3A4등을 이용하여 immunoinhibition 여부를 알아보았는데, P450 3A4 및 P450 1A2에 대한 항체만이 각각 75%와 25%의 myristicin 대사를 억제하였고, 다른 항체들은 10% 이하의 억제를 보여 사람의 간에서 myristicin의 대사에는 P450 3A4와 P450 1A2효소들이 관여한다는 결론을 도출할 수 있었다.

제 3 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 Myristicin과 safrole의 구조와 기능비교실험의 필요성

Safrole은 carcinogen으로 알려져있고, P450 2E1을 induction시키는 것으로만 알려져왔으나 (Koop and Tierney, 1990; Larson et al., 1991), 다른 기능에 대해서는 연구가 많이 수행되지않았다. Safrole에의한 P450 효소의 Induction에 대한 영향은 myristicin과 유사한 특성을 나타내었다. Myristicin은 독성이 없고 음식물에 많이 함유되어있는 식물성기름이다. 그러나 유사한 구조를 갖고있는 safrole은 발암물질로 알려져있다. 쥐간의 모든 P450 효소들을 유도하는 결과는 '음식물과 약물대사및 암유발'에서의 관점에서 연구가 계속수행되어야한다. Safrole과 myristicin의 대사연구로 유사한 화합물의 상이한 효과에 대한 분자수준에서의 연구가 수행되어야한다.

제 2 절 In vivo/ in vitro correlation:

알킬닐벤젠유도체의 P450 효소활성에 대한 in vivo 영향

In vitro영향은 in vivo의 경우와는 다르게 농도에 의존적으로 P450 효소의 활성을 저해시켰다 (Table 2). 이 결과는 효소수준에서의 효과와 발현에 대한 영향이 다름을 보여주고 있다. 즉 active metabolite의 존재가능성을 나타내는데, 이러한 in vivo/ in vitro의 차이를 규명하기위해서는 in vivo/ in vitro에서의 대사연구가 요구된다.

제 3 절 사람간 소포체에서의 Myristicin의 대사

본 연구에서는 사람의 간 microsome을 이용하여, 약물의 대사에 관여하는 P450 isozyme을 결정하기 위한 방법을 정립하기 위하여, marker 활성과의 상관관계 조사, chemical inhibition, immunoinhibition, enzyme

reconstitution, 그리고 heterologous cDNA expression 등의 시험을 종합적으로 이용하였다. 그 결과, myristicin의 대사에는 P450 3A4과 P450 1A2가 거의 전적으로 역할을 하고 있음을 밝혔으며, 본 연구에서 활용하여 정립한 시험기법을 이용하여 개발신약의 대사연구에 중요한 정보를 제공해 줄 것으로 판단되었다.

P450 3A4는 여러가지 화학물질들의 대사에 중요한 역할을 하고 있음이 많이 보고되어 있었으며, barbiturate류, antibiotic류, 그리고 dexamethasone등에 의해 유도되는 것이 알려져 있었다. 따라서 P450 3A4 enzyme의 유도 또는 억제능이 있는 약물을 함께 복용하였을때 myristicin의 대사에 변화를 초래할 수 있음이 확실하며, myristicin의 혈중농도도 변화하여 약리효과에 커다란 차이를 보일 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서 약물상호작용의 연구를 통한 효과적 약용량 투여 및 독성물질로의 변환등을 예측할 수 있는 연구기법으로써, 본 연구에서 사용한 시험기법의 적극적인 활용이 기대된다.

P450 1A2는 주로 사람의 간과 소장에서만 발현되고 다른 장기에서는 발현되지않는 특징을 갖고 있다. 여러 환경화학물질, 흡연, 그리고 여러 음식물에의해 발현이 유도되는 것으로 알려져있다. 또한 여러 발암물질의 bioactivation에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있는 중요한 효소이다. 이 효소의 과다한 발현과 직장암과의 상관성도 이미 보고되었다 (Guengerich, 1995).

제 4 절 Allybenzene 유도체의 생체내 영향에 대한 연구의 필요성

이상의 연구결과를 종합해볼 때 앞으로 culture system 등을 통한 세포와 분자수준에서의 직접적인 연구가 요구된다. 이연구에서 확립된 연구방법을 이용하면 allylbenzene유도체들의 대사물질중에서 쥐간의 여러 P450효소의 과다한 발현을 유도하는 물질 즉, active metabolite의 확인을 확인 할수있을 것으로 기대된다.

P450	blot with specific antibody							
1A								
2B								
2E1								
no.	1	2	3	4	5	6	7	8

Figure 1. Effect of allylbenzene derivatives on the formation of P450 apoproteins. The numbers are the same as those of table 1.

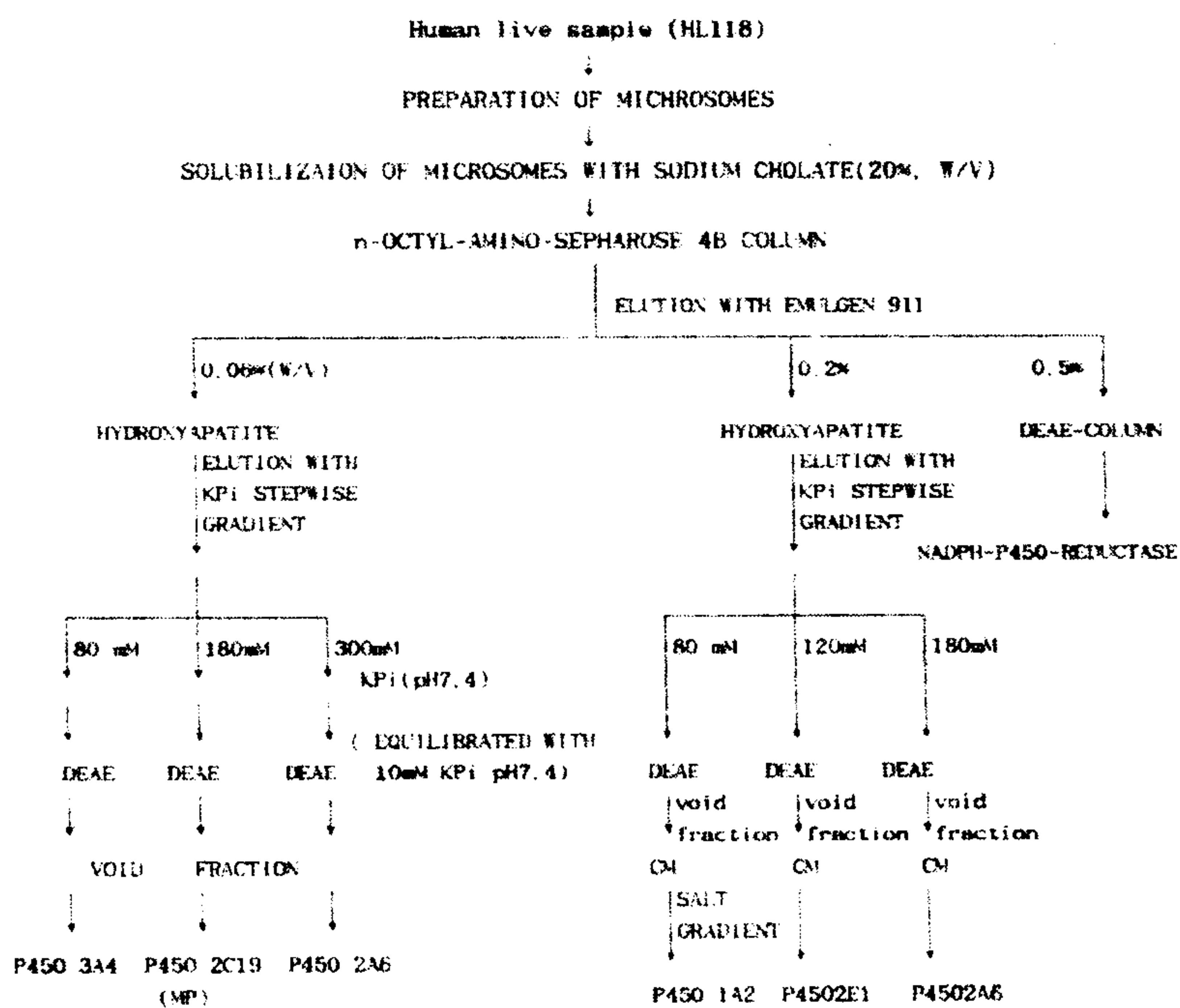


Fig. 2. Scheme of purification from one human liver sample.

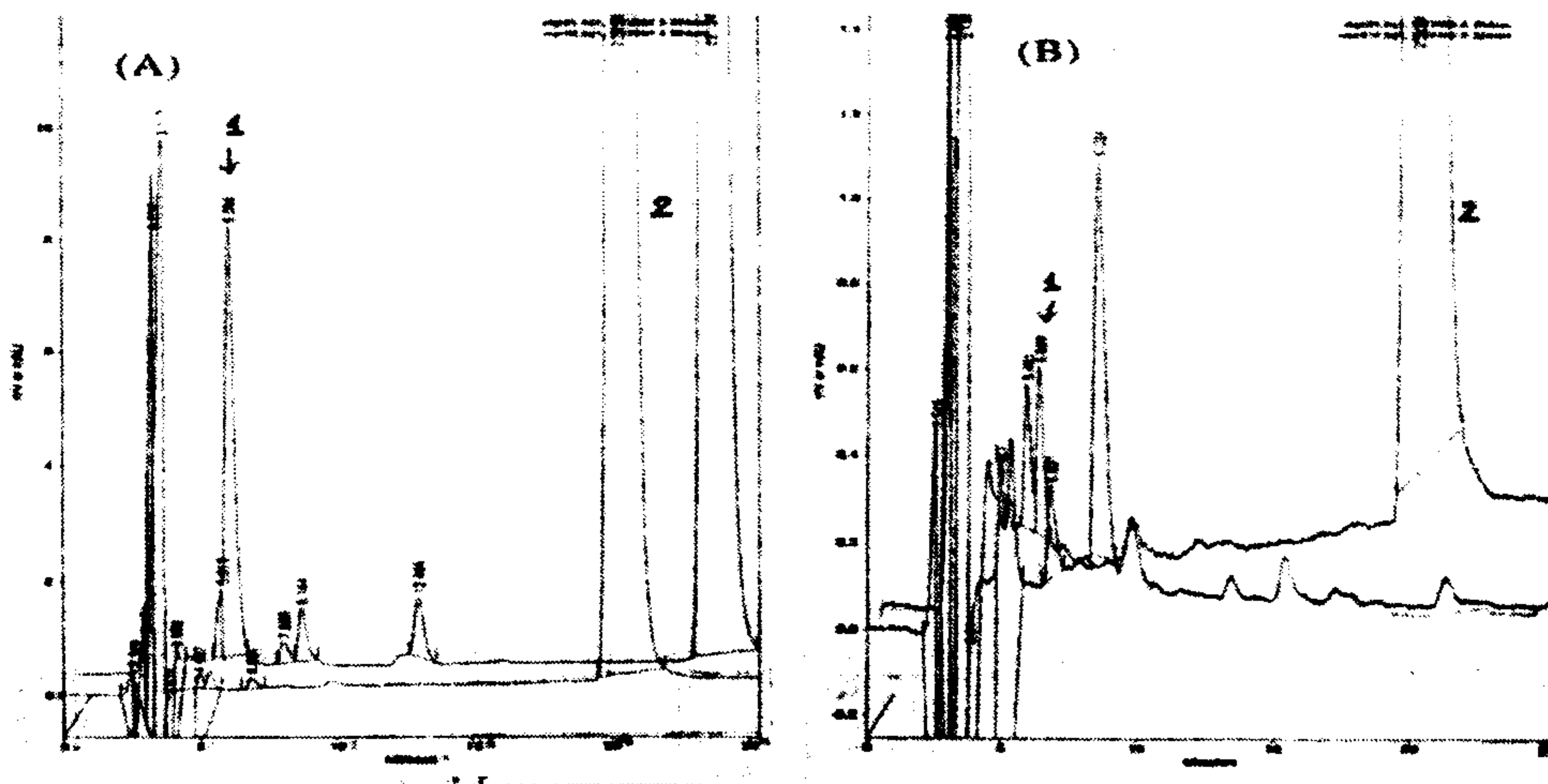


Figure 3. HPLC of CH_2Cl_2 extracts of incubations of myristicin with (A) human liver microsomes and (B) purified P450 3A4. 1, 5-allyl-1-methoxy-2,3-dihydroxybenzene; 2, myristicin.

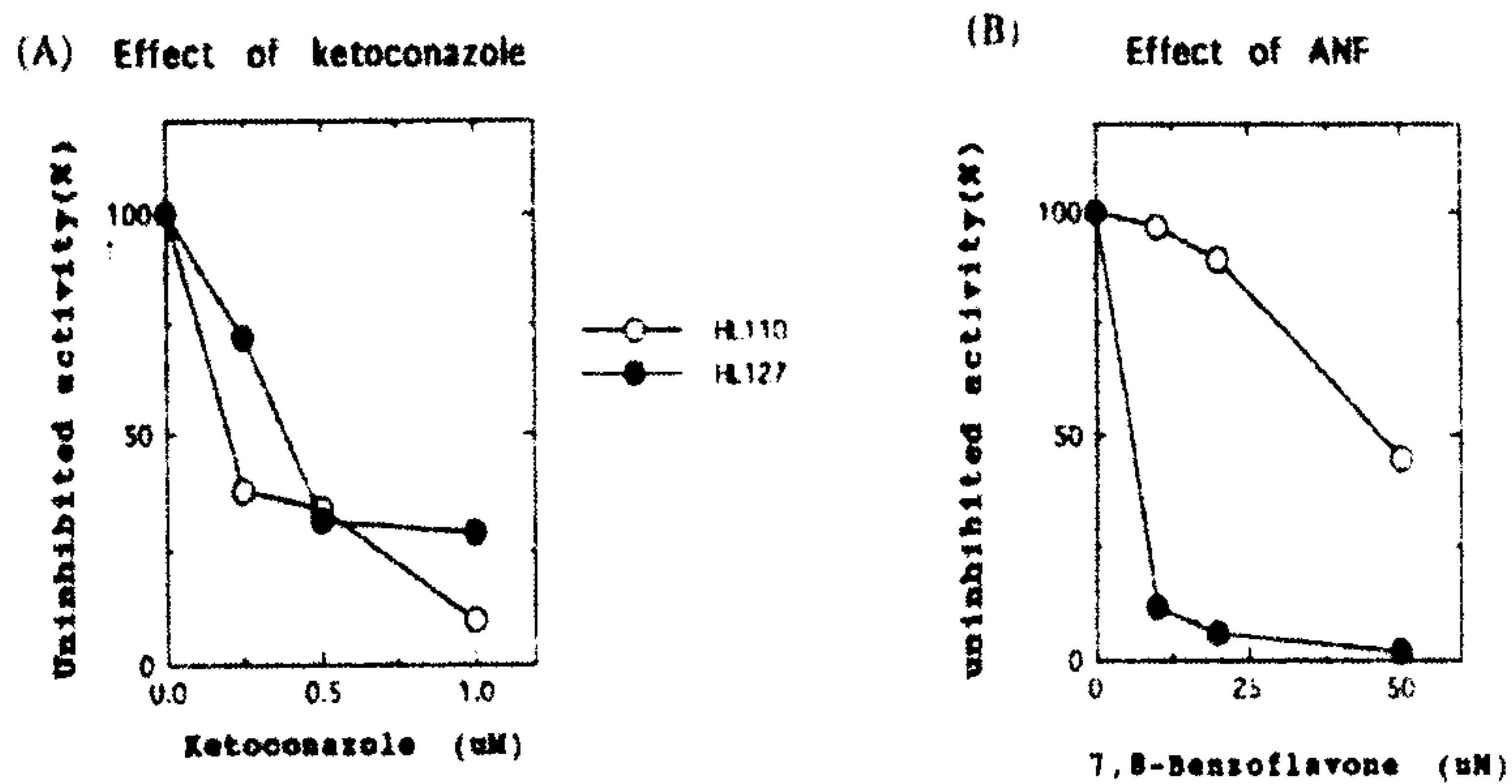


Figure 4. Inhibition of myristicin oxidation by ketoconazole (A) and 7,8-benzoflavone (B) in human liver microsomes.

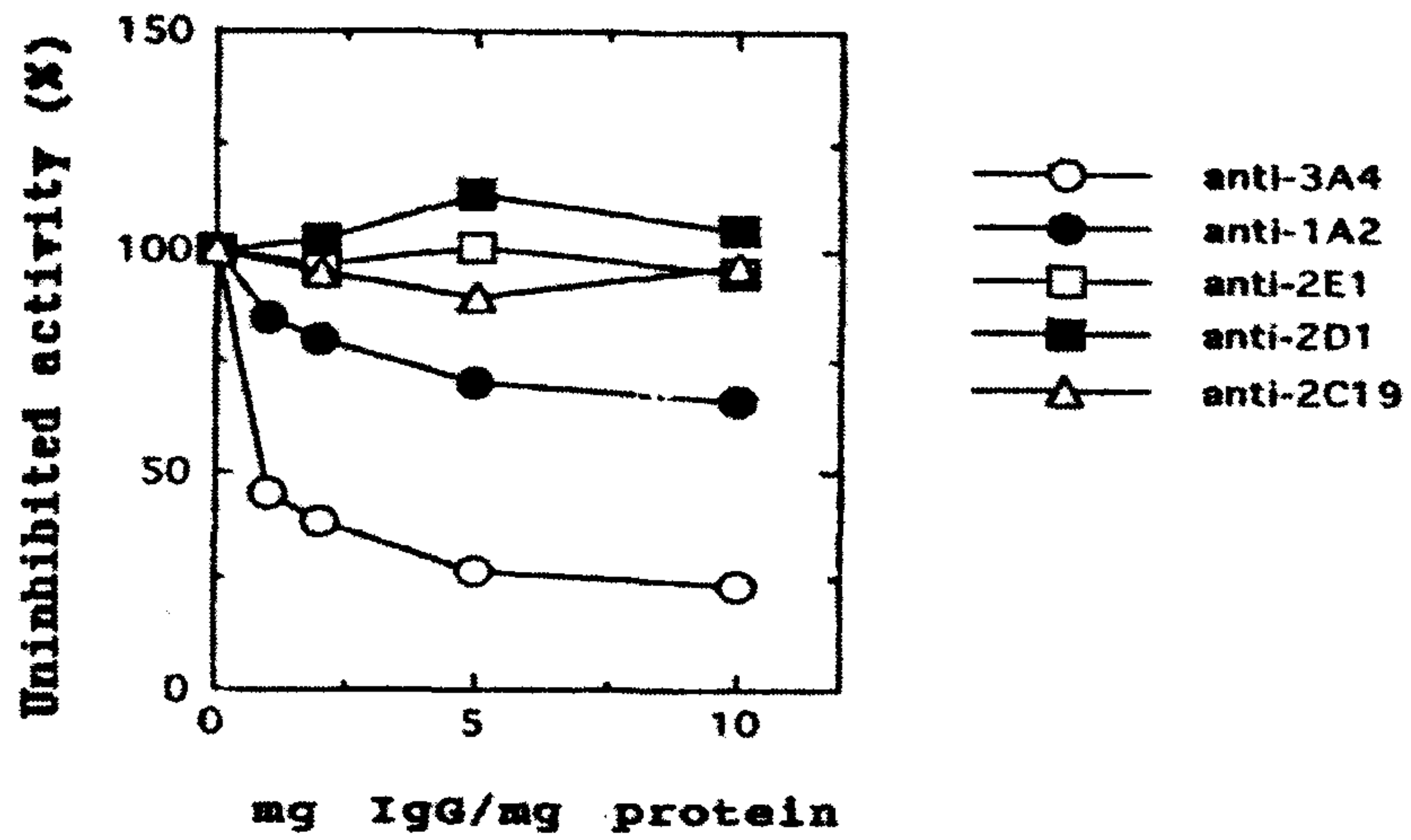


Figure 5. Effect of anti-P450 antibodies on human liver microsomal myristicin oxidation.

Table 1. The in vivo effect of allylbenzene compounds on the rat hepatic P450s

no.	sample (alkenylbenzene derivatives)	% uninhibited P450 activity (involved P450s)			비고
		EROD (P450 1A)	PROD (P450 2B, 2C, 3A)	PNPH (P450 2E1)	
1	untreated	100 ^a	100 ^b	100 ^c	
2	allylbenzene	126 ^d	120	93	
3	isoeugenol	145	130	91	
4	safrole	283	391	160	all P450s
5	estragole	135	137	113	
6	eugenol	122	128	99	
7	anethole	158	148	100	
8	myristicin	555	1031	210	all P450s

^a91 pmol/min/mg protein (turnover rate)

^b30 pmol/min/mg protein (turnover rate)

^c0.74 nmol/min/mg protein (turnover rate)

^dAll values were from triplicate measurements.

Table 2. In vitro effects of allylbenzene derivatives on rat live microsomal P450 activities

sample (alkenylbenzene derivatives)	% uninhibited P450 activity (involved P450s)								
	EROD (P450 1A)			PROD (P450 2B, 2C, 3A)			PNPH (P450 2E1)		
	20 μM	50 μM	100 μM	20 μM	50 μM	100 μM	20 μM	50 μM	100 μM
untreated	100 ^a	100	100	100 ^b	100	100	100 ^c	100	100
allylbenzene	95	98	82	118	97	61	72	71	53
isoeugenol	79	63	40	84	75	60	81	63	44
safrole	92	79	60	33	20	10	23	13	10
estragole	102	86	69	72	61	43	59	56	38
eugenol	85	62	49	48	24	10	79	58	18
anethole	88	84	54	63	43	37	79	87	67
myristicin	64	37	19	78	65	48	51	33	24

^a91 pmol/min/mg protein (turnover rate)

^b30 pmol/min/mg protein (turnover rate)

^c0.74 nmol/min/mg protein (turnover rate)

^dAll values were from duplicate measurements.

Table 3. Purification of P450 enzymes from HL118 microsomes

<i>STEP</i>	<i>PROTEIN</i> (mg)	<i>P450</i>		<i>PURIFICATION</i> <i>YIELD (%)</i>
		<i>TOTAL</i> (nmol)	<i>SPECIFIC CONTENT</i> (nmol/mg of protein)	
Microsomes	4,500	3,000	0.67	100
Solubilized supernatant	3,000	2,000	0.67	67
Octylaminl-Sepharose 4B	200	500	2.5	17
Hydroxyapatite	60	380	6.3	13
DE52	8	90	11.3	3
<i>(purified P450s)</i>		<i>(nmol)</i>		
3A4		50	14	3.5
2C9		10	13	0.8
2E1		10	15	0.7
2A6		5	13	0.4
2D6		5	11	0.5
1A2		10	10	1

^a Based upon total microsomal P450.

Table 4. Catalytic activities of P450 enzymes purified from HL118.

P450	substrate/reaction	Catalytic activity (nmol product/min/nmol P450)
2C9	Tolbutamide hydroxylation	1.20
1A2	B(a)P 3-hydroxylation	0.08
2A6	Coumarin 7-hydroxylation	2.56
3A4	Nifedipine oxidation	2.40
2E1	Chlorzoxazone 6-hydroxylation	1.10
2D6	Debrisoquine hydroxylation	1.40

Table 5. Correlation of rates of myristicin oxidation with other P450 reactions in human liver microsomes.

Enzymatic activities	Correlation coefficient (r^2)
Phenacetin O-deethylation (1A2)	0.513
Coumarin 7-hydroxylation (2A6)	0.083
Tolbutamide hydroxylation (2C9)	0.204
Chlorzoxazone 6-hydroxylation (2E1)	0.324
Nifedipine oxidation (3A4)	0.870

Table 6. Myristicin oxidation (5-allyl-1-methoxy-2,3-dihydroxybenzene formation) by human liver microsomes, purified P450 3A4 and P450 1A2, and purified recombinant P450 3A4 and P450 1A2 expressed in E. coli^a

Sample	Myristicin oxidation
	(pmol product/min/nmol P450) ^b
Liver microsomes HL110	176
Liver microsomes HL127	28
Purified human P450 3A4	13
Purified human P450 1A2	30
E. coli expressed P450 3A4	10
E. coli expressed P450 1A2	37

제 4 장 참고문헌

Guengerich, F.P. in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, (ed Ortiz de Montellano, P.R.) pp. 473-535 (Plenum Press, New York, 1995).

Guengerich, F.P. 1989. Analysis and characterization of enzymes. in *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, A.W., ed) pp 777-813. (Raven Press, New York).

Guengerich, F.P. 1991. Reaction and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.* **266**, 10019-10022.

Guengerich, F.P., Kim, D-H., and Iwasaki, M. 1991. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of several low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 168-179.

Guengerich, F. P., Martin, M. V., Guo, Z. and Chun, Y. J. 1996. Purification of functional recombinant P450s from bacteria. *Methods Enzymol.* **272**, 35-44.

Jeong, H. G. and Yun, C-H. 1995. Induction of rat hepatic cytochrome P450 enzymes by myristicin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 966-971.

Kaminsky, L.S., Fasco. M.J., and Guengerich, F.P. 1981. Production and application of antibodies to rat liver cytochrome P-450. *Methods Enzymol.* **74**, 262-272.

Koop, D.R. and Tierney, D.J. 1990. Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1. *BioEssays* **12**, 429-435.

Larson, J.R., Coon, M.J., and Porter, T.D. 1991. Alcohol-inducible cytochrome P-450 IIE1 lacking the hydrophobic NH₂-terminal segment retains catalytic activity and is membrane-bound when expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 7321-7324.

Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., and Nebert, D.W. 1993. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**, 1-51.

Soucek, P., Martin, M. V., Ueng, Y-F. & Guengerich, F. P. 1995. Identification of a common cytochrome P450 epitope near the conserved heme-binding peptide with antibodies raised against recombinant cytochrome P450 family 2 proteins. *Biochemistry* **34**, 16013-16021.

Yasukochi, Y., and Masters, B.S.S. 1976. Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome C (cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **251**, 5337-5344.

Yun, C-H., Shimada, T., and Guengerich, F.P. 1991. Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. *Mol. Pharmacol.* **40**, 679-685.

Yun, C-H., Shimada, T., and Guengerich, F.P. 1992a. Contributions of human liver cytochrome P-450 enzymes to the N-oxidation of 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline). *Carcinogenesis* **13**, 217-222.

Yun, C-H., Shimada, T., and Guengerich, F.P. 1992b. Roles of human liver cytochrome P-450 2C and 3A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 52, 1868-1874.

<연구실적>

Chul-Ho Yun, Taeho Ahn, and F. Peter Guengerich (1998) Arch. Biochem
Biophys. 356

(in press) Proof-reading reprint 별첨

분산계를 이용한 난용성약물의 가용화기술확립

연구기관

서울대학교 약학대학

한국화학연구소

최 종 보 고 서 요 약

위탁연구 과제명	(국문) 분산계를 이용한 난용성 약물의 가용화 기술 확립 (영문) Solubilization of Poorly Water Soluble Drugs using Disperse Systems
위탁연구기관	서울대학교
연구책임자	(소속) 서울대학교 약학대학 (성명) 김 종 국
연구개발비	금 40,000,000원정(40,000천원)
연구기간	1997. 8. 1. - 1998. 7. 31
총참여연구원	7명/년

° 연구개발 목표 및 내용연구 결과

본 연구에서는 대표적인 난용성 약물3종, 2-Allylthiopyrazine (2-AP), diphenyl dimethyl dicarboxylate (DDB), clonixic acid을 선정하여 유탁액과 같은 분산계를 이용한 가용화 기술을 확립함으로써 약리 및 독성시험등에서 정확한 용량설계가 가능하도록 하고자 하였다. 분산계를 가용화 시스템으로 이용하기 위하여 우선 각 약물의 각종 매질에 대한 용해도등 기초물성을 연구하였으며, 이를 최적의 가용화 시스템을 확립하는 기초 자료로 활용하였다. 2-AP의 경우는 lipid emulsion을 이용하였으며, DDB는 self-emulsifying drug delivery system, clonixic acid는 O/W emulsion을 가용화 시스템으로 이용하였으며, 각각의 경우 용해도와 입자 크기등의 물리화학적 성상을 평가하였고 동물실험을 통해 생체 적용가능성을 평가하였다.

° 연구 결과

새로운 합성물질인 2-AP의 물성을 연구한 결과 2-AP가 매우 지용성이며 휘발성이 있는 불안정한 약물임을 알았으며, 이를 기초로 약물의 보관시 안정성을 확보하는 동시에 주사용, 또는 경구용으로 활용이 가능한 lipid emulsion을 제조하였다. DDB의 경우 기존의 제제가 갖는 불안정성과 매우 낮은 생체이용율을 개선하기 위하여, 경구 투여후 체내에서 자발적으로 유화하는 SEDDS를 이용하여 용해도는 6mg/g 까지 증가시킬 수 있었으며 생체이용율도 약4배 증가시킬 수 있었다. Clonixic acid는 용시 제조하여 투여할 수 있는 O/W emulsion으로 제제화하여 기존의 제제가 가지고 있는 단점인 주사시의 통증울 경감시킬 수 있었으며, 염형태가 아닌 모약물 자체로 제제화할 수 있었다. 상기의 실험을 통하여, 난용성약물의 가용화를 위한 여러 가지 분산계의 설계 및 제조 기술을 확립할 수 있었으며, 이를 이용하여 정확한 용량으로 약물을 실험동물에 투여한 뒤 약물의 체내동태를 평가할 수 있었다.

1. 연구배경

최근 합성 혹은 생명공학적인 기법등 다양한 경로를 통하여 생리활성물질이 개발되어 신약후보물질로 등장하였다. 그러나 많은 경우 이들 신약후보물질들이 물에 대한 용해도가 낮아 약리 및 독성시험시 시험 용량을 증가시켜나가는 데 있어 이후의 임상시험등에서 정확한 용량설정이 어려운 문제점이 있다. 따라서 이와 같은 신약개발과정에서의 문제점을 해결하기 위하여 난용성 약물들을 가용화할 수 있는 시스템 개발이 선행되어야 할 필요성이 대두되었다.

2. 연구목표

본 연구에서는 대표적인 난용성 약물 3종을 선정하여 유탁액과 같은 분산계(disperse system)를 이용한 가용화 기술을 확립함으로써 약리 및 독성시험 등에서 정확한 용량설계가 가능하도록 하고자 한다.

1) 난용성 약물 선정 및 기초물성연구

대표적인 난용성 약물로서 상온에서 액상인 신규화합물질 2-allylthiopyrazine (이하 2-AP)과 상온에서 고체인 biphenyl dimethyl dicarboxylate (이하 DDB), 비스테로이드성 해열 진통 소염제인 clonixic acid를 대상으로 각종 매질에 대한 이들 물질들의 용해도등 기초물성을 연구한다.

2) 분산계 (disperse system)를 이용한 난용성 약물의 가용화

각종 매질에 대한 용해도를 기초로 적절한 오일상, 계면활성제 혹은 보조 계면활성제등을 선정하여 유탁액 혹은 마이크로유탁액과 같은 초미세 분산계를 제조함으로써 난용성 약물을 가용화하고 입자크기, 안정성등과 같은 물리 화학적인 성질을 연구한다.

3) 난용성 약물의 가용화에 따른 생체이용율 개선

난용성 약물을 가용화시켜 동물에 투여한 후 가용화에 의한 약물의 체내동태의 변화를 연구한다.

3. 연구 내용 및 결과

1) 2-AP의 기초물성 연구 및 가용화

pH에 따른 용해도 측정

pH 1 ~ 13의 완충용액에 대한 2-AP의 용해도를 측정한 결과 용해도가 3.7~4.9 mg/ml로서 pH에 따른 용해도의 차이는 보이지 않았다. 2-AP를 증류수에 포화시킬 경우 pH가 4.21이었다.

pH에 따른 안정성

pH 1, 4, 7, 및 10의 완충용액에 2-AP를 0.4 mg/ml이 되도록 녹인 후 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 14 및 30일째에 HPLC법으로 분해되지 않은 2-AP를 정량하였다. 그 결과 pH 1, 4, 7, 10에서 2-AP는 1개월 경과시 화학적인 안정성이 매우 나빴다.

② 지질유탁액을 이용한 가용화

Lipid Emulsion의 제조 및 최적 조성 결정

2-AP, lecithin, oil (soybean oil, Neobee M5[®], 혹은 ethylolate)을 혼합한 후 증류수를 가하여 5 ml이 되도록 하였다. 이 용액을 high shear mixer (Ultra Turrax[®] T25)를 이용하여 4℃, 24000 rpm에서 5분간 균질혼화 (homogenization)하는 과정을 2회 반복하였다. 이를 4℃에서 하루 보관 후 다시 5분간 균질혼화하여 lipid emulsion을 제조하였다. 이와 같이 제조된 각 조성의 lipid emulsion의 입자크기를 DLS (dynamic light scattering)법으로 측정하여 최적의 조성을 결정하였다. 본 연구에서 선정한 최적조성은 2-AP : lecithin : soybean oil : 물의 비가 1 : 4 : 4 : 91이었다.

안정화제의 영향

Lipid emulsion의 안정화제로서 사용되는 cholesterol, linoleic acid, oleic acid를 0.5 %, 1.0 %첨가하여 제조한 lipid emulsion을 4℃에서 6주간 보관하면서 입자크기변화를 측정하여 이들 안정화제가 lipid emulsion의 안정성에 미치는 영향을 살펴보았다. 그러나 안정화제를 첨가한 경우 입자크기가 증가하는 양상을 보여 이후의 실험에서는 안정화제를 사용하지 않았다.

보조계면활성제(co-surfactant)의 영향

Lipid emulsion 제조시 계면활성제로 사용된 lecithin외에 보조계면활성제로서 HCO-60[®]과 poloxamer 188를 첨가하여 4℃에서 6주간 보관하면서 입자크기변화를 측정한 결과 poloxamer 188의 경우는 입자크기가 증가하는 경향을 보였으나, 반면 HCO-60은 비교적 입자크기도 작고 변화정도도 적었다, 그러나 이 들 보조계면활성제를 첨가하지 않은 경우에도 비교적

2-AP는 신규합성된 화합물로서 간보호작용 및 암예방효과가 있는 것으로 최근 보고된 바 있다. 그러나 이 물질은 oil상으로서 물에는 녹지 않아 약리활성연구등에서 많은 어려움이 있었다. 따라서 본 연구에서 이 물질의 기초물성을 조사한 결과, 물에는 난용성인 반면 식물유에는 잘 녹아 이 물질을 지질유타액(lipid emulsion)의 형태로 가용화하고자 2-AP함유 지질유타액을 제조하고 이 지질유타액의 물리화화적인 특성을 연구하였다.

① 기초물성 연구

비점측정

2-AP 약 3 mg을 취하여 DSC(Differential Scanning Calorimetry)를 이용하여 분당 5 °C씩 온도를 올려가며 비점을 측정한 결과 99.05°C로 나타났다.

각종 매질에 대한 용해도 측정

증류수, soybean oil, castor oil, ethyloleate, Neobee[®]M-5에 대한 2-AP의 용해도를 측정한 결과 물에 대해서는 난용성이지만 각종 oil에 대해서는 용해도가 매우 높았다. 즉 2-AP는 지용성약물로서 lipid emulsion으로의 제제화 가능성이 큼을 알 수 있다.

Parts required to solve 2-AP	
water	311.5
soybean oil	1.75
Neobee M5 [®]	2.12
ethnyl oleate	2.19
castor oil	1.73

분배계수측정

2-AP수용액(0.4 mg/ml) 과 1-octanol을 1:1로 혼합하고 24시간 방치한 후 층이 완전히 분리된 다음 수상중의 약물농도를 HPLC법으로 정량하여 두 상간의 분배계수를 구하였다. 그 결과 logP값이 1.94로서 지용성이 매우 큰 약물임을 알 수 있었다.

휘발성 측정

4°C를 제외한 실온, 40°C, 70°C의 온도에서 약물이 휘발됨을 알 수 있었다. 특히 70 °C에서 보관한 경우 12시간 경과시 초기량의 약 80%만이 잔류하였다. 이 결과를 바탕으로 lipid emulsion제제를 제조할 때 ice bath상에서 수행하였다.

입자크기가 크고 작아 보조계면활성제를 첨가할 필요는 없었다.

Lipid emulsion중에서의 2-AP의 화학적인 안정성

Lipid emulsion제제로 하였을 경우 2-AP의 화학적인 안정성을 평가하기 위하여 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 14 및 30일째에 lipid emulsion제제중의 2-AP 함량을 HPLC법으로 측정하였다. 그 결과 수용액에서와는 달리 1개월 후에도 안정하게 유지되어 lipid emulsion으로 하였을 경우 2-AP는 화학적으로 안정하였다.

③ 2-AP 함유한 lipid emulsion의 정맥주사시 2-AP의 체내약물동태 연구

60 mg/kg 용량의 2-AP를 PEG200 40%에 녹인 용액과 lipid emulsion으로 제제화한 것을 rat의 대퇴 동맥에 주사한 뒤, 약물 투여 후 0.167, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12시간에 혈액을 취하였다. 채취 후 즉시 3000rpm으로 원심분리하여 plasma를 취한 뒤 HPLC법으로 혈중의 2-AP를 정량하였다. 각 시간마다 혈중 농도를 비교한 결과 PEG200 40%에 녹였을 경우 2-AP의 혈중 농도가 높음을 알 수 있었다.

정맥투여정후 2-AP의 혈중농도 곡선

그림 1

정맥투여후 2-AP의 pharmacokinetic parameters

Parameters	Lipid Emulsion	Control
t _{1/2} (h)	1.46 ± 0.20 ^a	2.89 ± 0.79
AUC (mg · h/ml)	29.53 ± 2.85 ^a	71.15 ± 17.28
MRT (h)	1.59 ± 0.19 ^a	3.85 ± 0.71
CL (ml/h · kg)	2044.48 ± 194.69 ^{a,b}	875.19 ± 198.57
V _{dss} (ml/kg)	3242.41 ± 252.57	3378.51 ± 968.69

^a : p<0.05 by student T-test

^b : p<0.01 by student T-test

정맥투여후 2-AP의 조직분포(Tissue/Plasma concentration ratio : T/P ratio)

약물 투여 1시간후에 rat을 희생시키고 간, 심장, 신장, 폐 및 비장을 취하고 saline으로 장기를 씻은 후 3배부피의 생리식염수를 가하고 tissue homogenization하였다. 3000rpm으로 15분간 원심분리하고 상등액을 취해 HPLC법으로 2-AP농도를 정량하였다. 혈중에서와는 달리 심장을 제외한 모

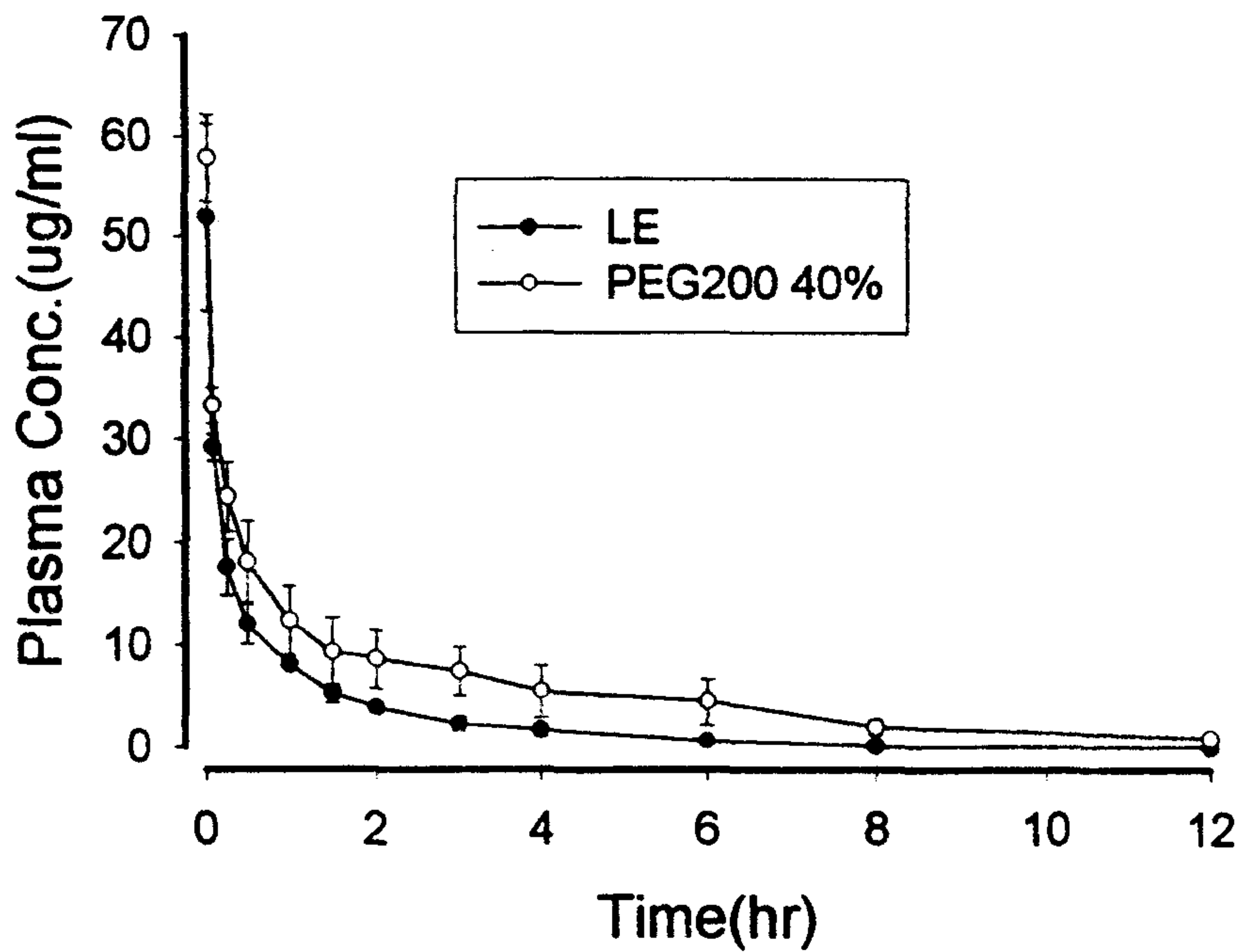


그림1 The plasma concentration-time profiles after intravenous infusion(1 min) of PEG200 40% saline solution and lipid emulsion(LE) system(2-AP(60 mg/kg):soybean oil:lecithin=1:4:4) to rats(n=3). Bar represents the standard deviation.

든 장기에서의 2-AP의 농도가 lipid emulsion으로 제제화한 경우 PEG200 용액에 비해 유의성있게 높았다. (그림 2) 이상의 결과에서 2-AP를 lipid emulsion으로 제제화하면 용액상태보다 혈중에서의 소실은 빠른 반면 조직으로의 이행이 월등히 큼을 알 수 있었다.

2) DDB의 기초물성 연구 및 가용화

DDB는 오미자에서 단리된 유효성분중 하나로 물에 대해 난용성(약 3.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in water at 25 $^{\circ}\text{C}$)이어서 용출율이 낮고 생체이용률이 저조하여 이러한 단점을 개선하고자 자가유화약물송달시스템 (self-emulsifying drug delivery system : SEDDS)을 이용하여 DDB의 가용화와 생체이용율을 개선하고자 하였다.

① DDB의 기초물성연구

각종 오일에 대한 용해도 및 비이온성 계면활성제 10 %를 함유한 미셀형에 대한 DDB의 용해도를 측정하여 SEDDS에 적합한 오일 및 계면활성제 선정의 기초자료로 활용하였다.

각종 오일에 대한 용해도

oil	solubility($\mu\text{g}/\text{ml}$)
castor oil	1.099 \pm 0.004
cottonseed oil	1.123 \pm 0.146
ethyl oleate	0.628 \pm 0.018
Neobee [®] M-5	1.291 \pm 0.014
sesame oil	1.016 \pm 0.062
soybean oil	1.049 \pm 0.093

비이온성계면활성제로 이루어진 미셀에 대한 용해도

surfactant	solubility($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Labrasol [®]	88.40
Cremophor RH [®]	96.87
Tween20	72.57
Tween80	109.7
Tween85	255.9

② SEDDS를 이용한 DDB의 가용화

계면활성제로 Tween80, oil로서는 Neobee[®] M-5, 보조용해제로서 triacetin을 사용하여 SEDDS를 제조하였다. 위장관내에서 안정한 형태로 가

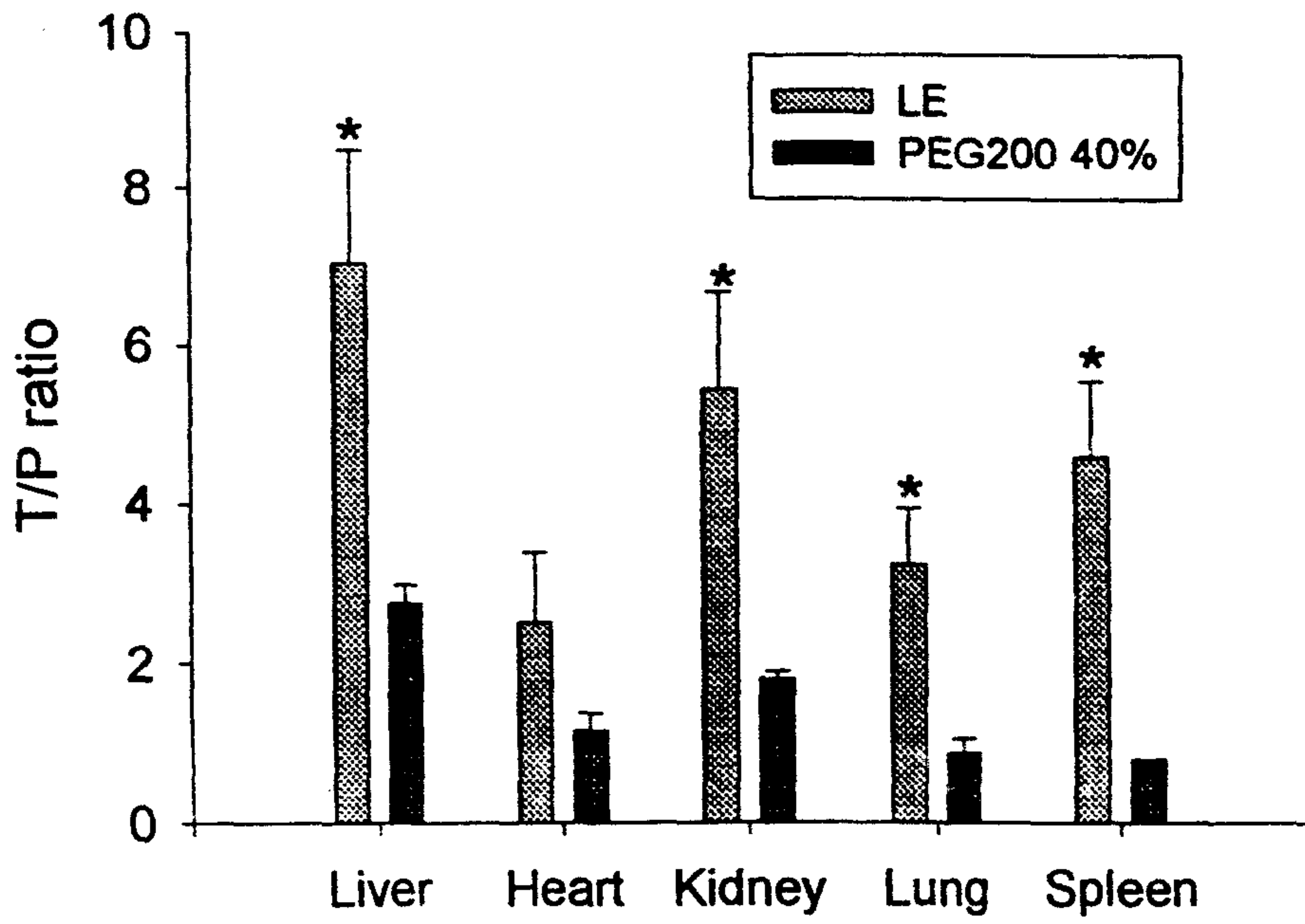


그림2 Tissue/plasma concentration(T/P) ratio of 2-AP at 1 hr after intravenous infusion to rats(n=3). Bar represents the standard deviation.

*: $p < 0.01$ by student T-test

용화시키기 위한 조성을 결정하기 위해 약물로 포화된 Neobee[®] M-5와 Tween80의 조성비를 변화시키면서 제 1액을 가한 후 각 조성의 용해도를 측정하였을 때 계면활성제에 대한 oil의 비가 2:1미만일 때 약물의 용해도가 급격히 감소하였다. 약물의 용해도와 제제의 분산성을 향상시키기 위해 보조용해제로 triacetin을 가함에 따라 약물의 용해도가 증가하였다. 약물로 포화시킨 계면활성제와 오일의 비를 2:1로 고정하고 triacetin을 가한 후 수상을 첨가하였을 때 DDB의 용해도가 점차 증가하였고 35%의 triacetin을 첨가하였을 때에는 물을 가하지 않은 premicroemulsion concentrate에서의 용해도는 g당 10 mg까지 용해되었으며, 수상을 첨가하였을 때에는 6 mg까지 가용화가 가능하였다.

DDB함유 SEDDS 제형의 입자 크기 분포 측정

증류수와 제1액을 각각 가하고 30분 후 $162.80 \pm 50.07\text{nm}$ 와 $200 \pm 10.30\text{nm}$ 의 평균 입자크기 분포를 가짐을 알 수 있었다.

DDB함유 SEDDS 제형의 용출 실험

폴리소르베이트 80과 neobee M-5[®]를 증량비 2:1로 혼합 후 여기에 트리아세틴을 35%를 가하고 이 조성 1g당 DDB를 6mg이 되도록 가해 상온에서 용해시킨 후 제 1액에서 37°C에서 2시간동안 교반하면서 방치시 약물의 침전이 형성되지 않았다. 또한 위 조성을 용출실험 결과 5분후 30%가 용출되었고, 15분 후 약 55%가 용출이 완료되었으며 비교 제제에 비해 용출성이 증가됨을 알 수 있었다.

③ DDB함유 SEDDS제형의 경구 투여 및 정맥 주사 후 약물 체내 동태 평가

위 조성의 SEDDS 제형과 1회 투여용량 7.5mg이 가용화 되어있는 구주제약의 지셀, DDB를 0.5% Ca-CMC에 현탁시킨 조성을 각각 rat에 12mg/kg의 용량으로 경구투여시 시간 경과에 따른 DDB의 혈중농도를 측정한 결과 SEDDS 제형의 AUC값이 유의성 있게 증가하였다. ($p < 0.05$) 또한 SEDDS제형의 DDB를 4 mg/kg의 용량으로 정맥주사한 뒤 체내약물동태를 관찰하였다.

경구투여후 DDB의 혈중농도 곡선

그림 3

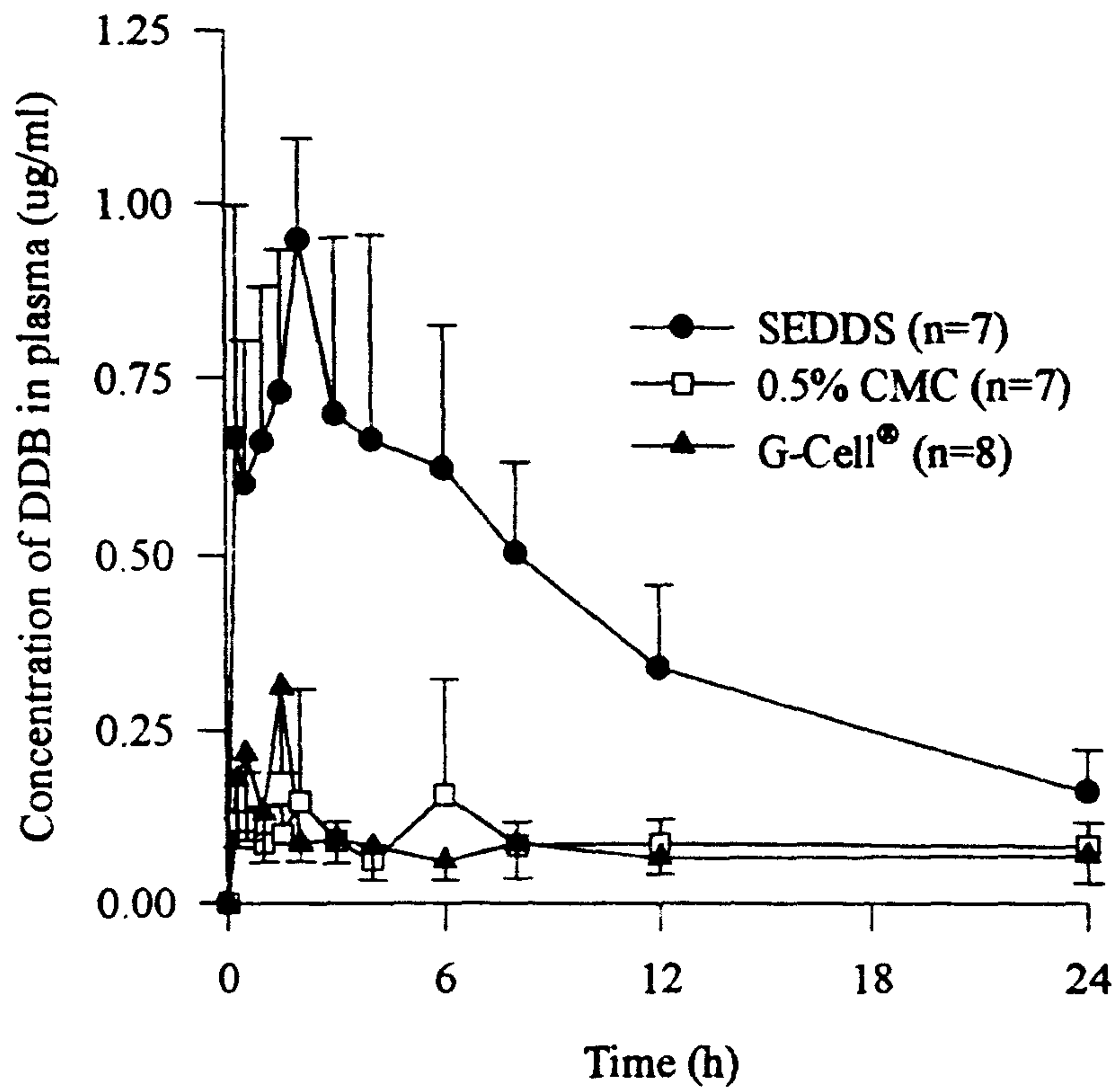


그림3 Plasma concentration-time profiles after oral administration of 12 mg/kg DDB in SEDDS system, 0.5% Ca-CMC suspension and G-Cell[®].

DDB함유 SEDDS의 정맥투여후 DDB의 혈중농도 곡선

그림 4

경구투여 및 정맥 주사후 DDB의 pharmacokinetic parameters

Parameters	Intravenous Administration	Oral Administration		
		SEDDS	G-Cell TM	0.5 % Ca-CMC suspension
C _{max} (µg/ml)		1.55 ± 0.71	0.31 ± 0.60	0.16 ± 0.17
T _{max} (h)		1.83 ± 1.13	1.79 ± 2.78	1.25 ± 1.03
AUC (µg · h/ml)	1.43 ± 0.32	9.83 ± 2.26 ^{a,b}	2.22 ± 0.54	1.96 ± 0.71

^a : p<0.05 by the ANOVA test when compared with G-Cell[®]

^b : p<0.01 by the ANOVA test when compared with 0.5 % Ca-CMC suspension

3) Clonixic acid 의 기초물성 연구 및 가용화

Clonixic acid는 anthranilic acid 유도체로서 비마약성, 비스테로이드성 해열 진통 소염제이다. 경구로 투여할 경우 acetylsalicylic acid보다 약 24배 이상의 효능을 보이며, 탐닉이나 내성이 생기지 않는 장점을 가지고 있다. 그러나 매우 물에 난용성이므로 주사제의 경우 lysine salt를 만든 뒤, PG, PEG 용액에 녹여서 사용하고 있다. 현재의 이용되고 있는 제제는 약물 자체와 용매의 자극성으로 인하여 주사시 심한 통증을 유발하는 등의 부작용을 가지고 있다. 본 연구에서는 W/O emulsion 시스템을 이용하여 clonixic acid를 가용화하고 주사시에 유발되는 통증을 경감시키고자 하였다.

① Clonixic acid의 기초 물성 연구

각종 오일과 계면활성제에 과량의 clonixic acid를 가해 용해도를 측정하여 w/o emulsion에 적합한 오일 및 계면활성제 선정의 기초자료로 활용하였다.

각종 오일에 대한 clonixic acid의 용해도

그림 5

계면활성제에 대한 clonixic acid의 용해도

그림 6

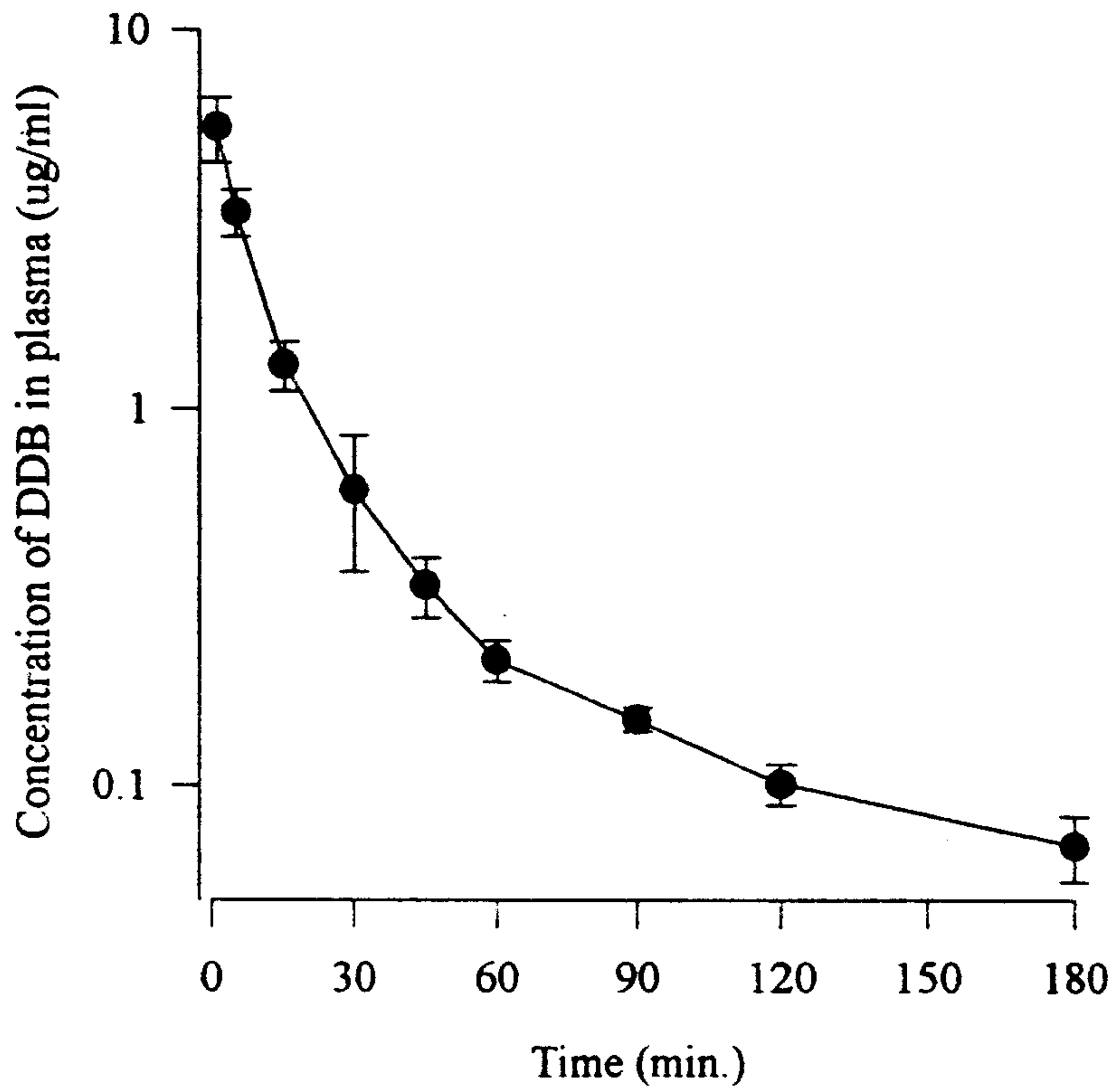


그림4 . Plasma concentration-time profiles after intravenous administration of 4 mg/kg DDB in SEDDS system.

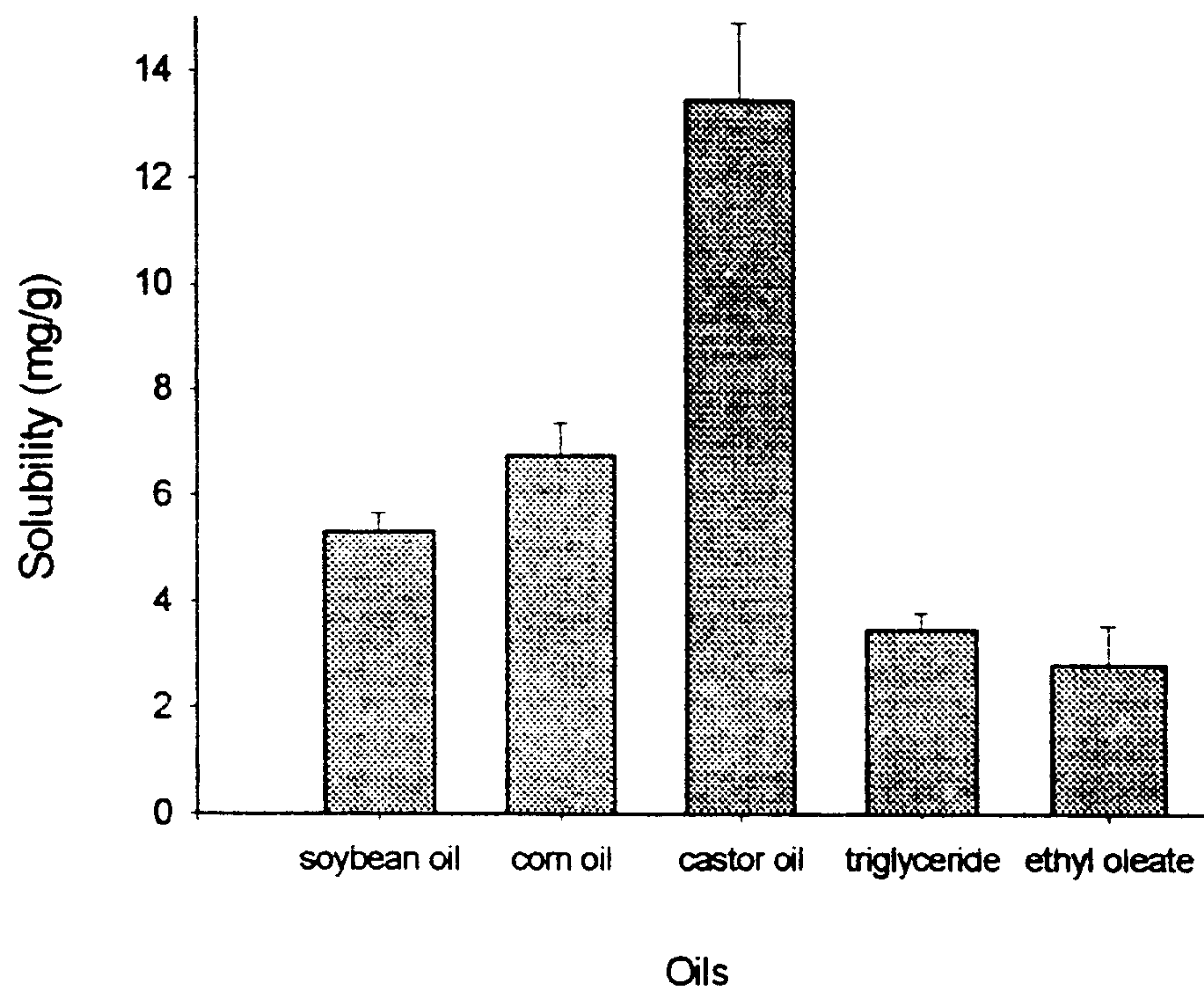


그림5 The solubility of clonixic acid in various oils

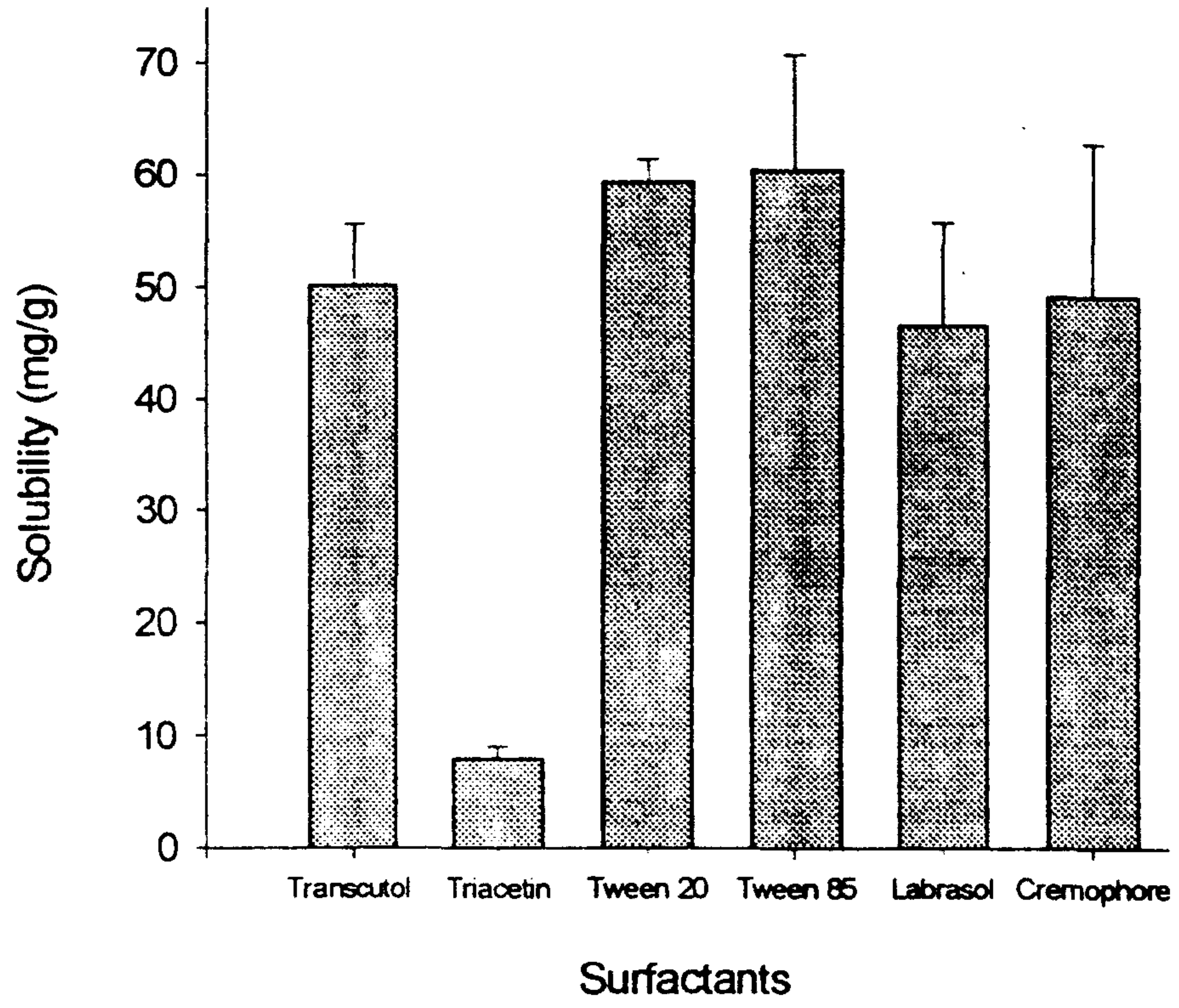


그림6 The solubility of clonixic acid in various surfactants

계면활성제 혼합물에 대한 clonixic acid의 용해도

Tween 20 : Tween 85	HLB value	Solubility (mg/g)
1 : 0	16.7	59.4 ± 2.0
2 : 1	14.8	70.2 ± 1.3
3 : 2	14.4	64.3 ± 5.2
1 : 1	13.9	67.8 ± 3.0
2 : 3	13.3	70.8 ± 8.2
1 : 2	12.9	67.2 ± 8.5
0 : 1	11.0	60.6 ± 10.2

② O/W emulsion을 이용한 clonixic acid의 가용화

오일과 계면활성제 혼합액에 약물을 가하여 충분히 교반한 후 생리식염수를 가하여 상온에서 자발적으로 유화되는 clonixic acid 함유 에멀전을 제조하였다. 계면활성제로 사용한 Tween 20과 Tween 85는 그 조성비를 변화시킴으로써 HLB (친수성-친유성 평형)값을 조절할 수 있었으며 HLB 값이 작아질수록 clonixic acid의 용해도는 증가하였으나 입자크기가 급격히 증가하는 양상을 나타내었다. 적절한 용해도와 입자크기를 가지는 조성으로는 피마자유: 계면활성제 혼합물 (Tween 20 : Tween 85) = 1 : 6 (2:3)이었으며 에멀전 제조 후 clonixic acid는 시간 이 경과함에 따라 침전하였으므로 용시제조의 방법을 선택하였다.

O/W emulsion의 입자크기에 미치는 조성물의 비의 영향

그림 7

계면활성제 혼합물의 조성비가 일정할 때 오일의 함량이 입자 크기에 미치는 영향

그림 8

삼투압 측정

제제의 삼투압은 주사시 통증을 유발하는 주요 원인 중 하나이므로 제조한 clonixic acid O/W emulsion의 삼투압과 기존의 clonixic acid lysinate salt 용액의 삼투압을 측정, 비교하였다. 기존 용액의 경우 원액의 삼투압은 약 1000 mOsmol/kg이었으며, 생리식염수로 약 40배 희석한 경우 약 400 mOsmol/kg

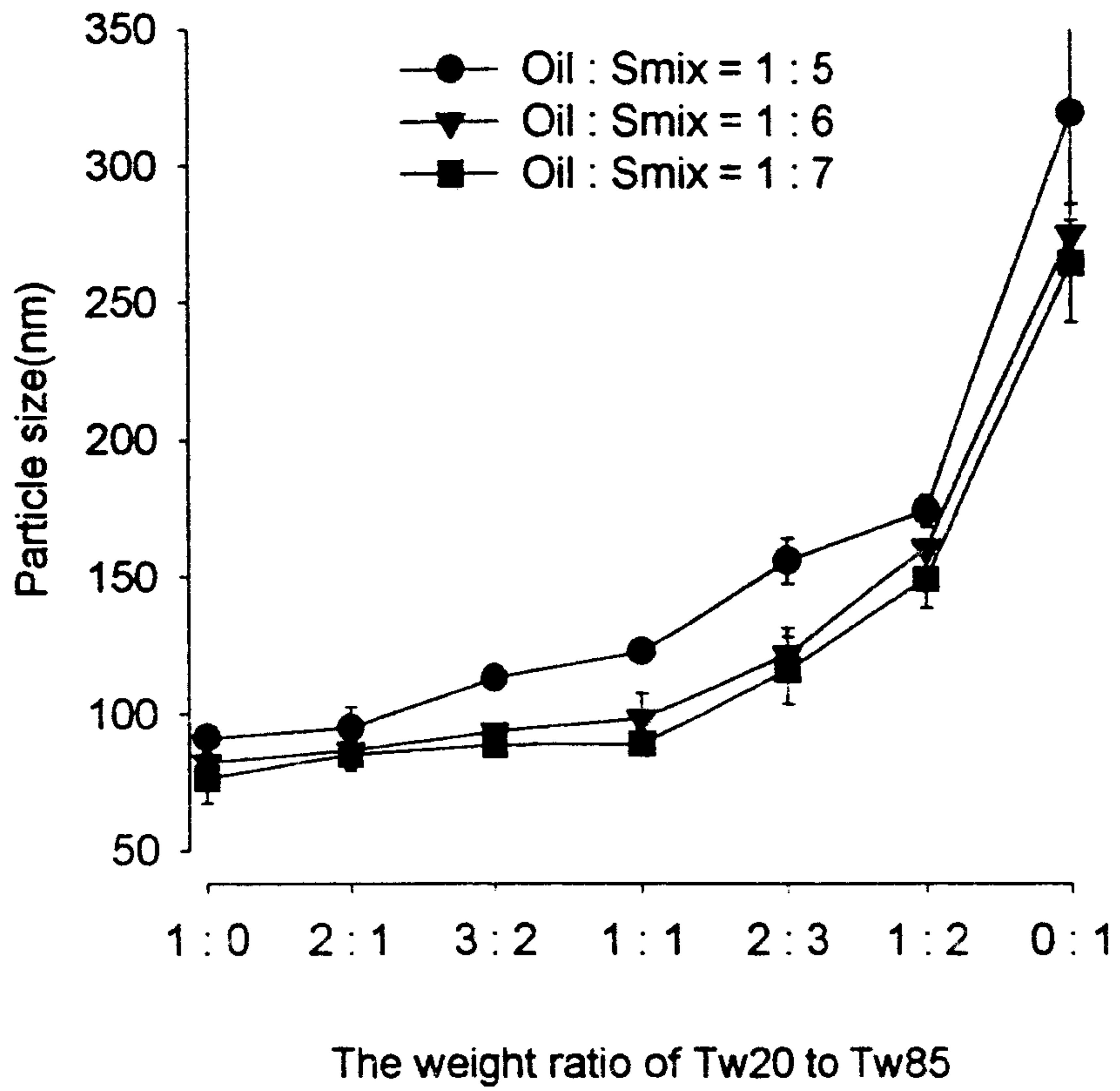


그림7 Effect of the weight ratio of Tween 20 to Tween 85 on the particle size of emulsion systems

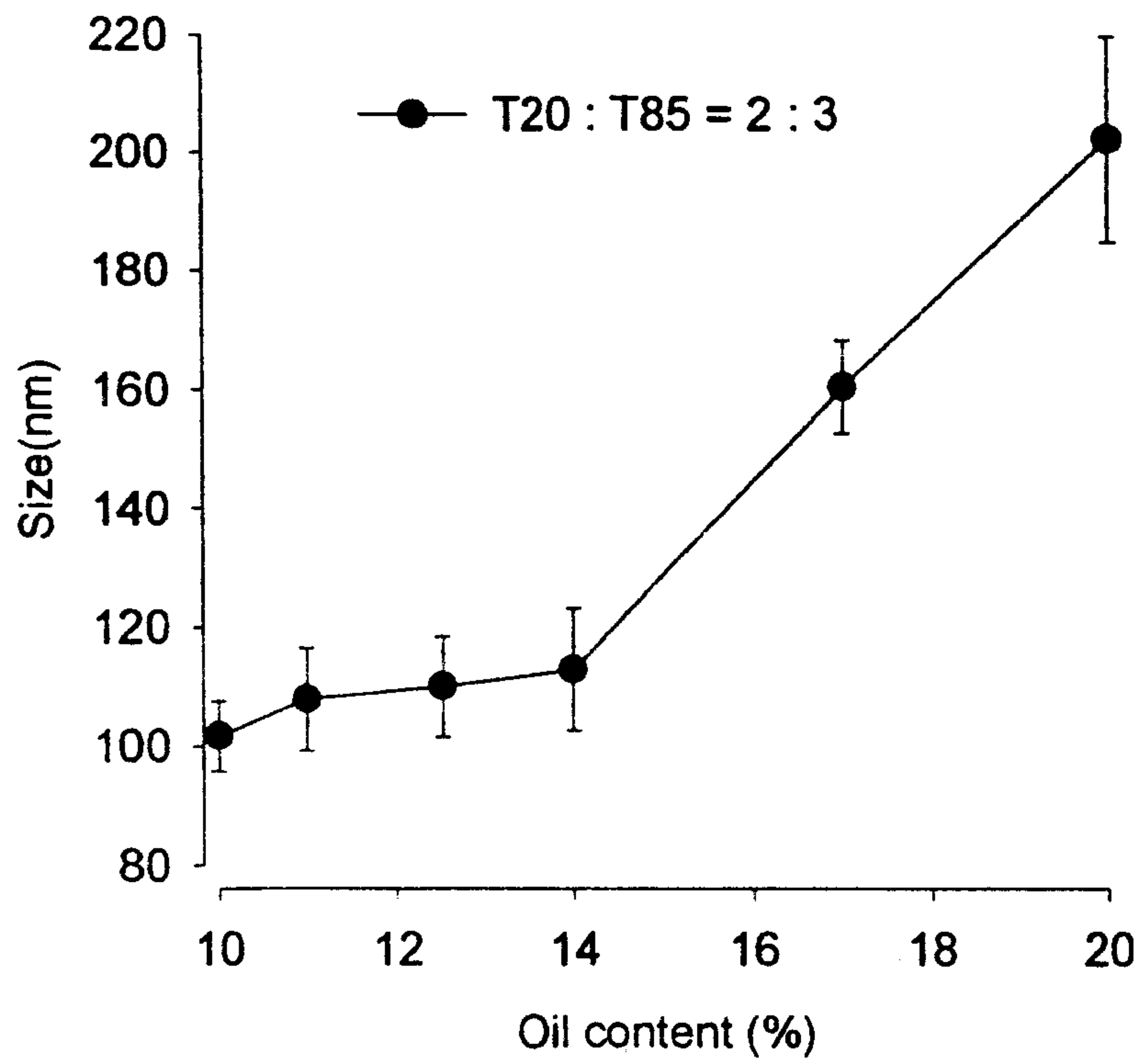


그림8 Effect of the weight ratio of castor oil on the particle size of emulsion systems

정도가 되었다. 반면 clonixic acid를 O/W emulsion으로 제제함으로써 원액의 삼투압도 약 350 mOsmol/kg이었다. 이 결과로 O/W emulsion을 이용하여 clonixic acid를 가용화함으로써 주사시 유발되는 통증을 경감시킬 수 있음을 알 수 있었다.

O/W emulsion에 의한 약물의 자극성 감소 측정

Rat paw-lick method를 이용하여 주사시 유발되는 통증의 정도를 평가하였다. S.D. rat의 발바닥에 시험 제제 0.1ml을 주사한 뒤 15분동안 몇번이나 발바닥을 핥는지 (licking) 세어보았다. 시판제제의 경우 전체 8-10마리 중 60%가 licking하였으나, O/W emulsion의 경우 10%에 불과하였다. 또한 마리당 licking 횟수도 시판제제의 경우 3.75회인데 반해 O/W emulsion은 1회였다. 이로서 자극성이 강한 약물인 clonixic acid를 O/W emulsion으로 가용화하면 약물 자체의 자극성을 경감시킬 수 있으므로 제제의 주사시 통증이 감소될 수 있음을 확인할 수 있었다.

정맥주사 후 clonixic acid의 체내동태 연구

O/W emulsion으로 제제화한 clonixic acid와 시판제제를 10mg/kg 용량으로 rat의 대퇴정맥에 주사한 뒤, 혈액을 취하여 원심분리하였다. 얻어진 plasma 시료내의 clonixic acid를 HPLC법으로 정량한 결과, 두 제제간에 유의성 있는 약물동태의 차이를 볼 수 없었다.

정맥투여후 clonixic acid의 pharmacokinetic parameters

Parameters	O/W Emulsion	Conventional solution
$t_{1/2}$ (h)	2.06 ± 0.32	1.52 ± 0.64
AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	77.3 ± 10.5	63.8 ± 14.2
MRT (h)	1.73 ± 0.19	1.29 ± 0.58
CL ($\text{ml}/\text{h} \cdot \text{kg}$)	131.2 ± 17.4	162.2 ± 33.7
Vdss (ml/kg)	27.5 ± 38.5	196.4 ± 55.3

4. 결 론

이상의 실험 결과들을 바탕으로 3가지 대표적인 난용성 약물의 기초물성을 알아보았으며, 이를 바탕으로 분산계를 이용한 가용화 기술을 확립할 수 있었다. 또한 이들 약물을 가용화한 뒤, 실험 동물에 투여하여 분산계를 이용하여 제

제화한 약물들의 체내동태를 규명할 수 있었다.

신규화합물질이면서 매우 수난용성인 2-AP를 lipid emulsion으로 제제화하는 방법을 확립함으로써 안정성이 뛰어나고 조직이행이 큰 경구 및 주사제제 개발의 가능성을 제시하였다. 또한 물에 자발적으로 분산되며 분산 후 적절한 입자 크기분포를 가지는 SEDDS를 이용하여 DDB를 가용화함으로써, 수상에 서의 약물의 침전을 방지할 수 있었으며, 지속적으로 약효를 나타내어 저용량에서도 증가된 생체이용율을 얻을 수 있었다. Clonixic acid의 경우 피마자유와 Tween 혼합물을 이용하여 단순 간편한 유화과정에 의해 에멀전 시스템을 이용하여 가용화할 수 있었으며, 정맥 투여시 기존제제와 유사한 체내 동태를 나타내면서, 주사시 발생하는 통증을 경감시킬 수 있었다.

본 연구를 통하여 얻어진 여러 가지 분산계를 이용한 난용성 약물의 가용화 기술은 향후 신약개발과정에서 약물의 약리 및 독성시험등 정확한 용량이 필요한 평가 단계 수행시 효과적으로 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

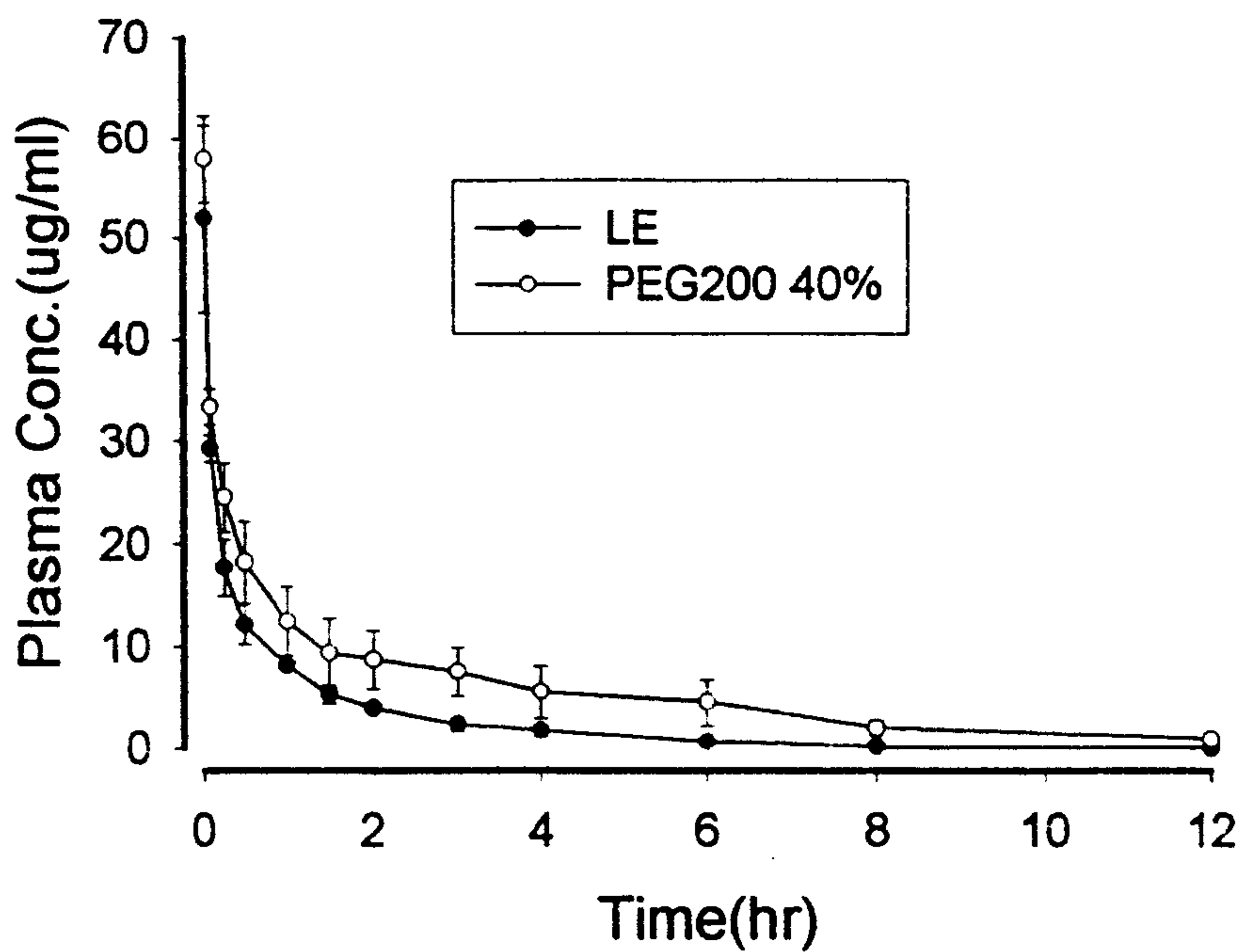


그림1 The plasma concentration-time profiles after intravenous infusion(1 min) of PEG200 40% saline solution and lipid emulsion(LE) system(2-AP(60 mg/kg):soybean oil:lecithin=1:4:4) to rats(n=3). Bar represents the standard deviation.

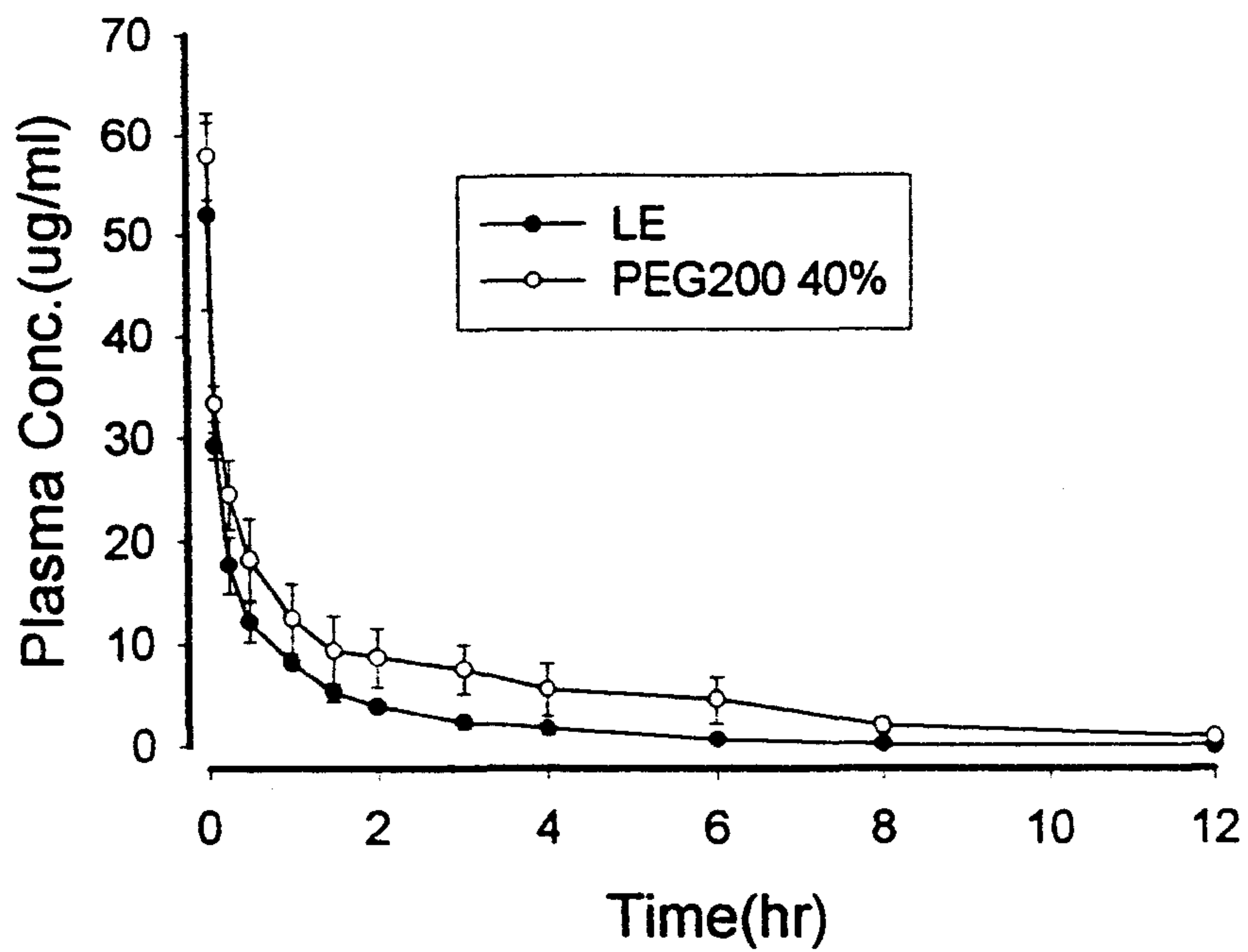


그림1 The plasma concentration-time profiles after intravenous infusion(1 min) of PEG200 40% saline solution and lipid emulsion(LE) system(2-AP(60 mg/kg):soybean oil:lecithin=1:4:4) to rats(n=3). Bar represents the standard deviation.

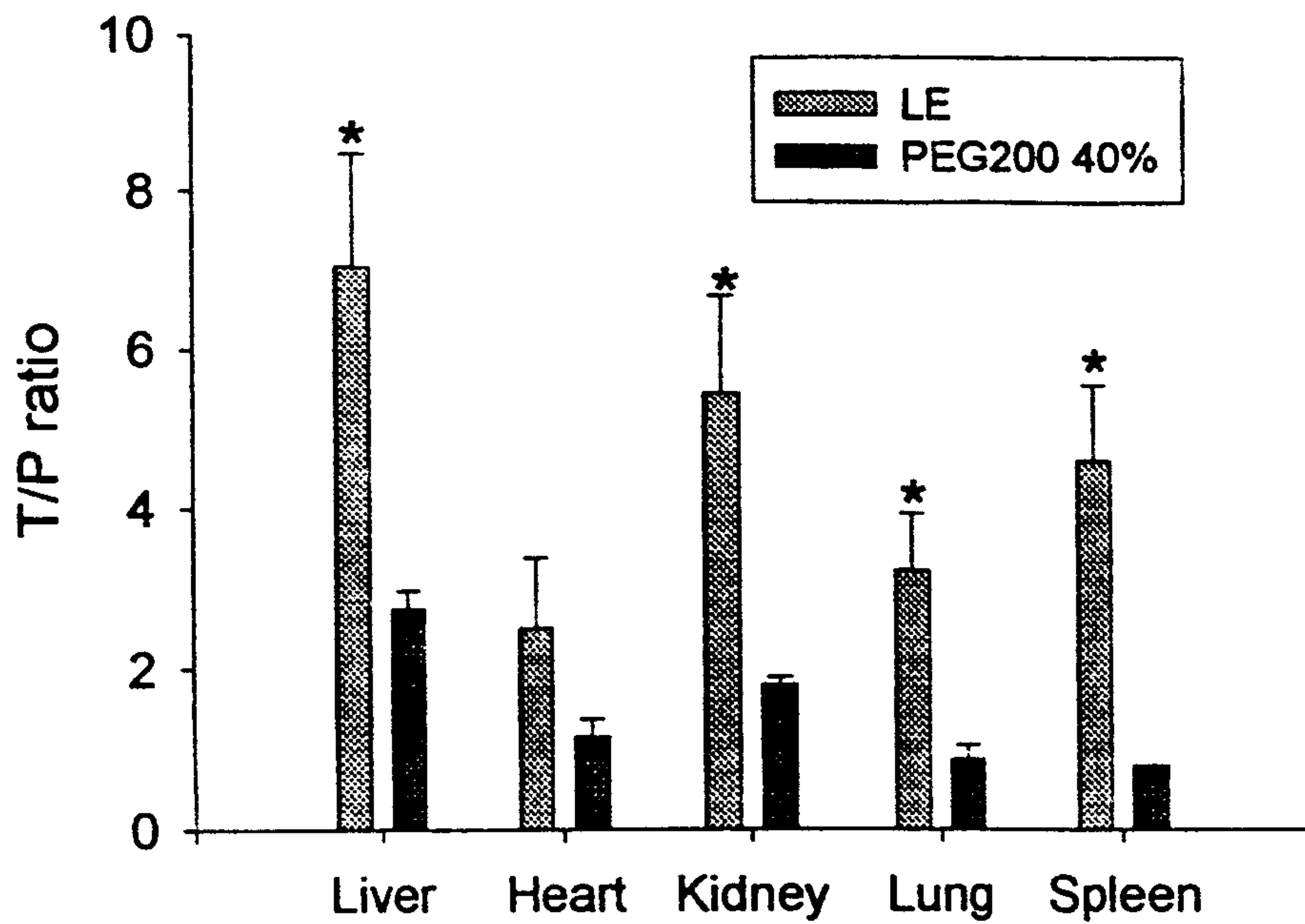


그림2 Tissue/plasma concentration(T/P) ratio of 2-AP at 1 hr after intravenous infusion to rats(n=3). Bar represents the standard deviation.

*: $p < 0.01$ by student T-test

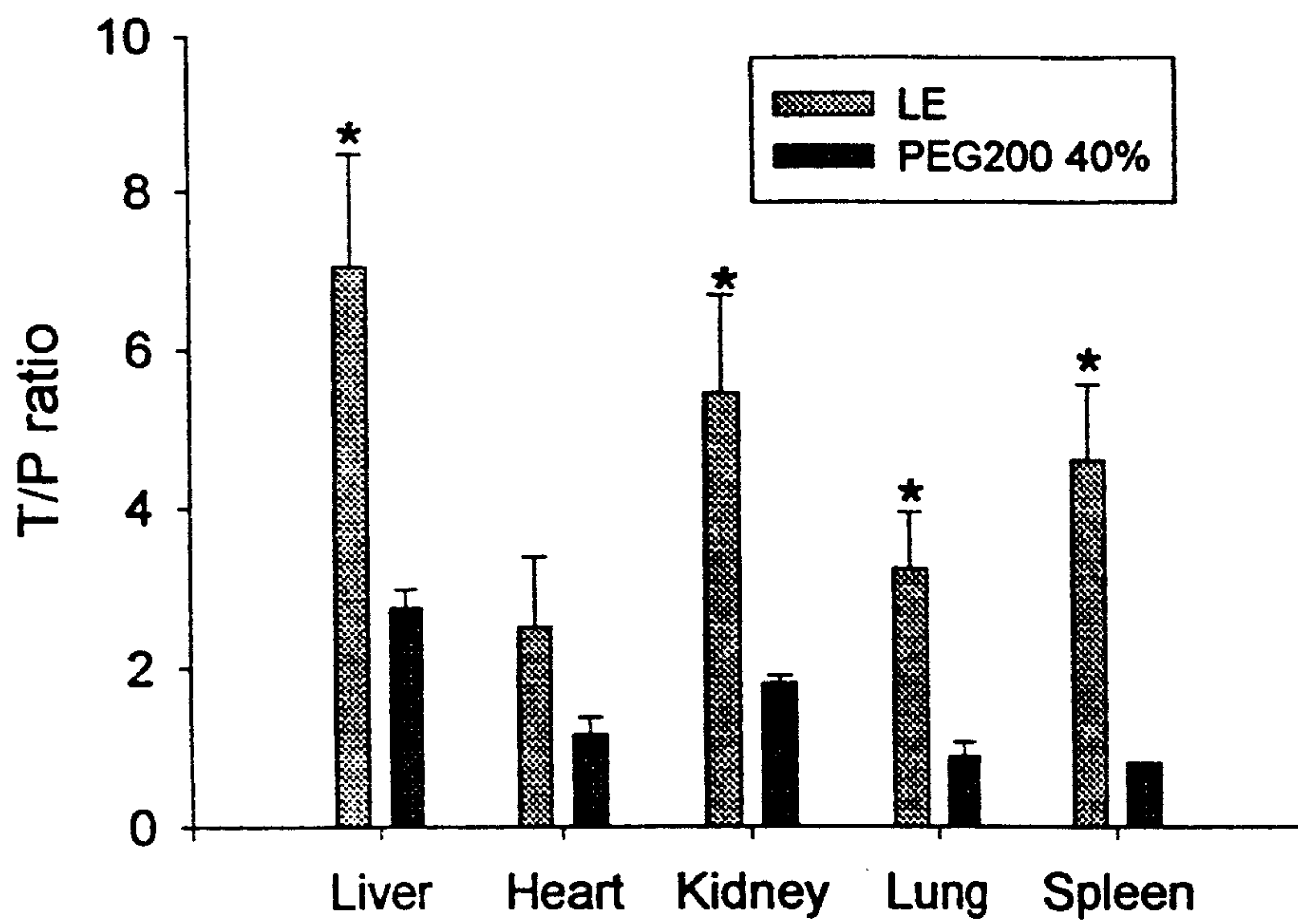


그림2 Tissue/plasma concentration(T/P) ratio of 2-AP at 1 hr after intravenous infusion to rats(n=3). Bar represents the standard deviation.

*: p<0.01 by student T-test

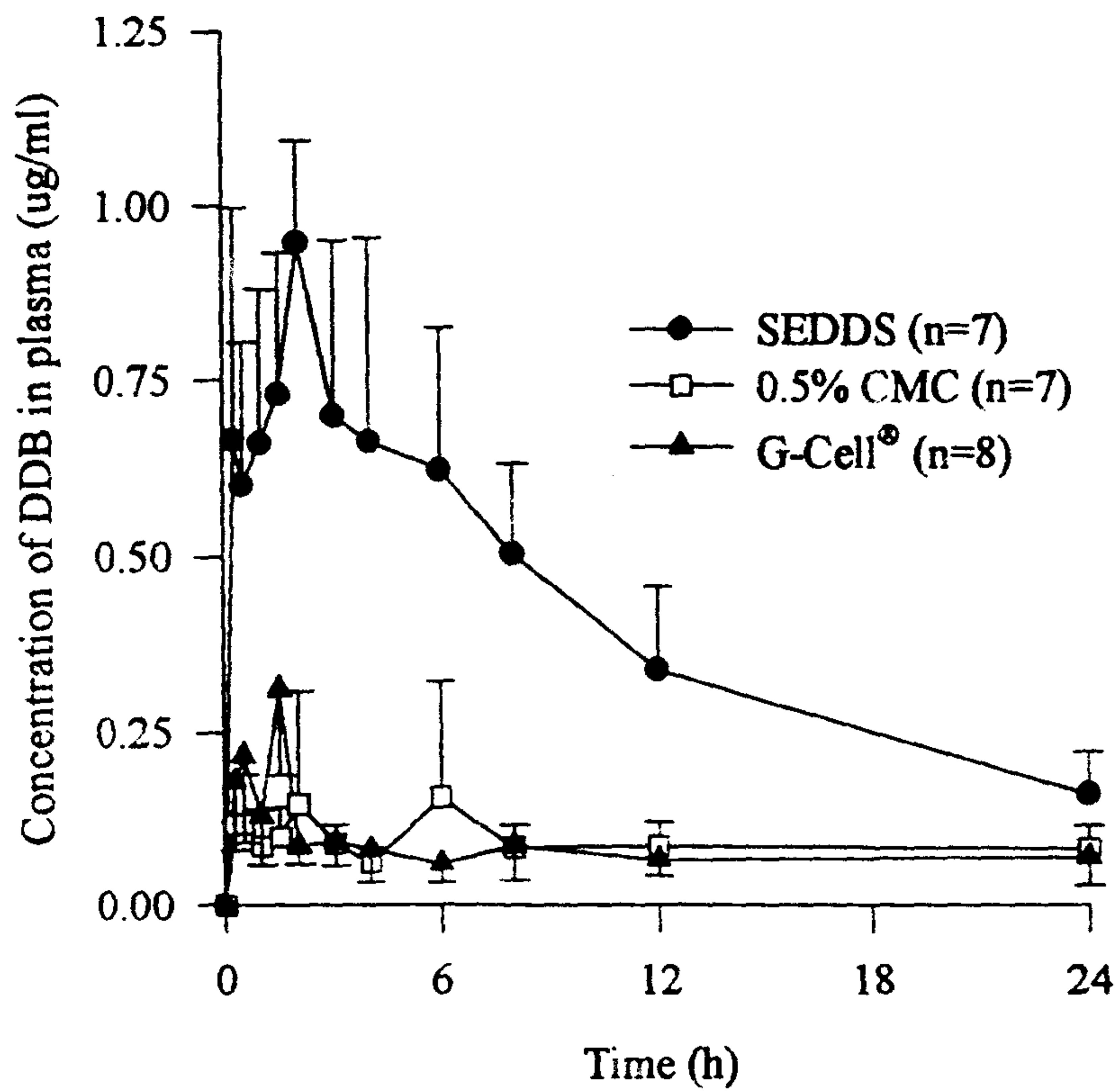


그림3 Plasma concentration-time profiles after oral administration of 12 mg/kg DDB in SEDDS system, 0.5% Ca-CMC suspension and G-Cell[®].

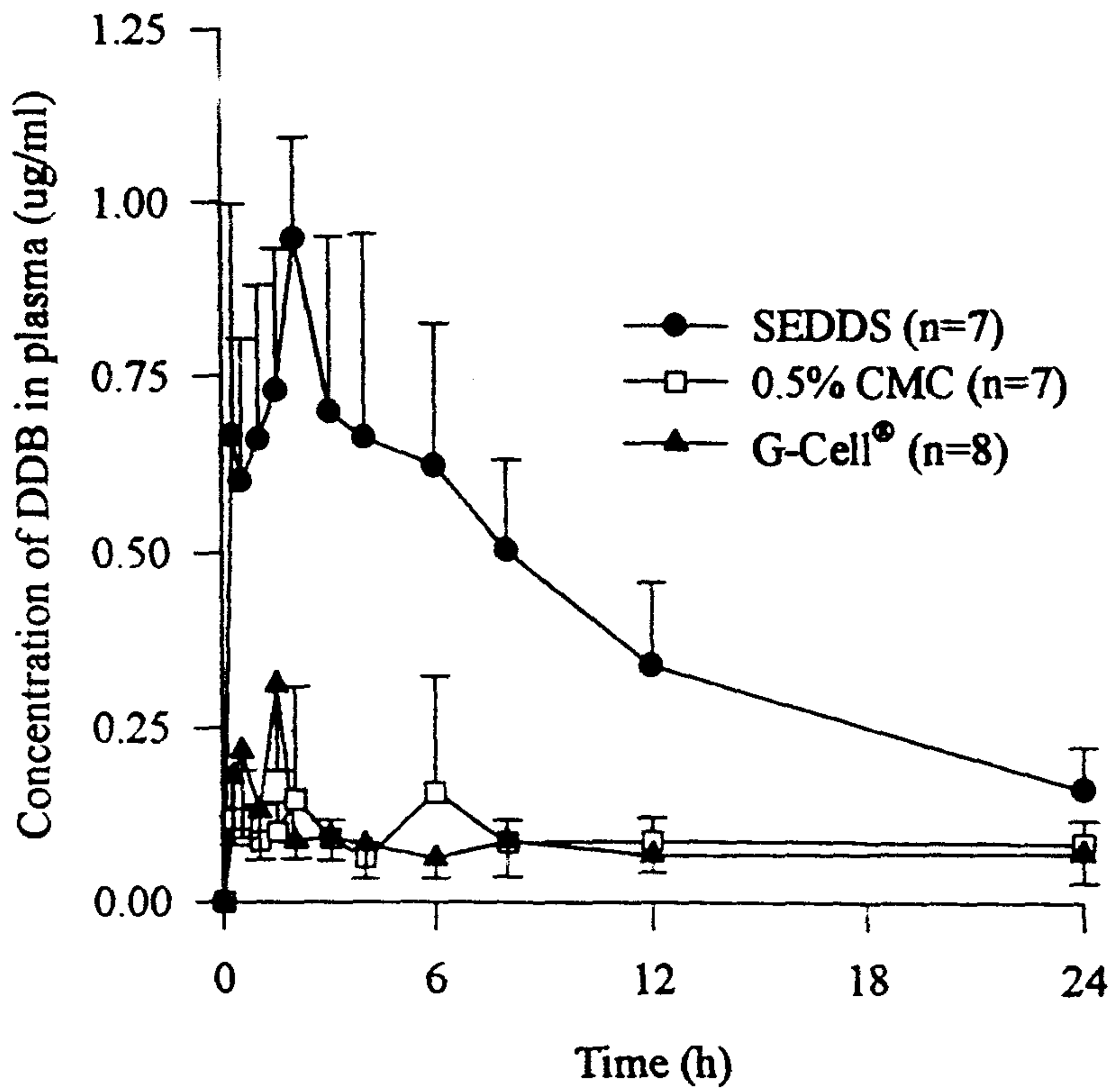


그림3 Plasma concentration-time profiles after oral administration of 12 mg/kg DDB in SEDDS system, 0.5% Ca-CMC suspension and G-Cell[®].

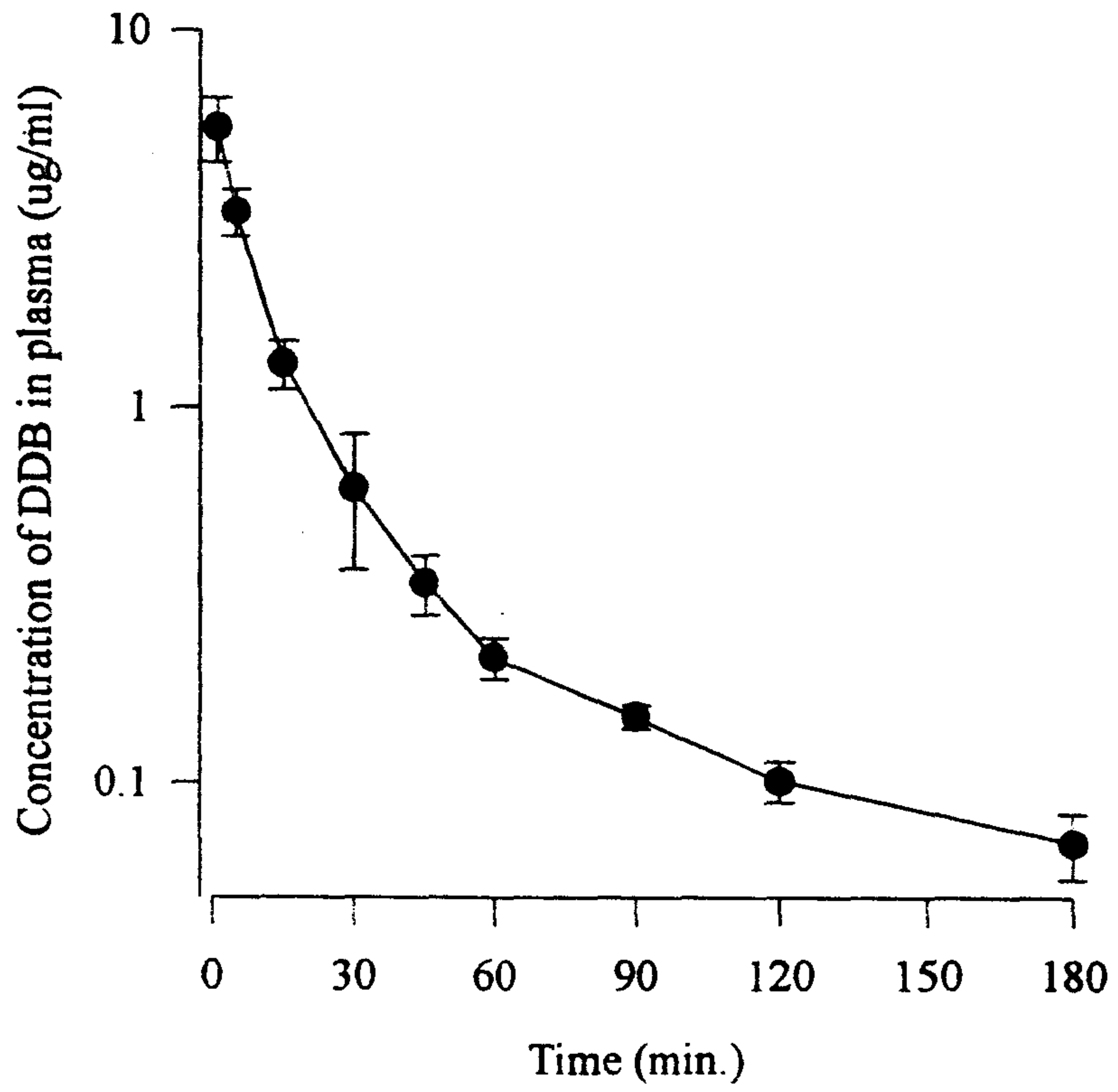


그림4 . Plasma concentration-time profiles after intravenous administration of 4 mg/kg DDB in SEDDS system.

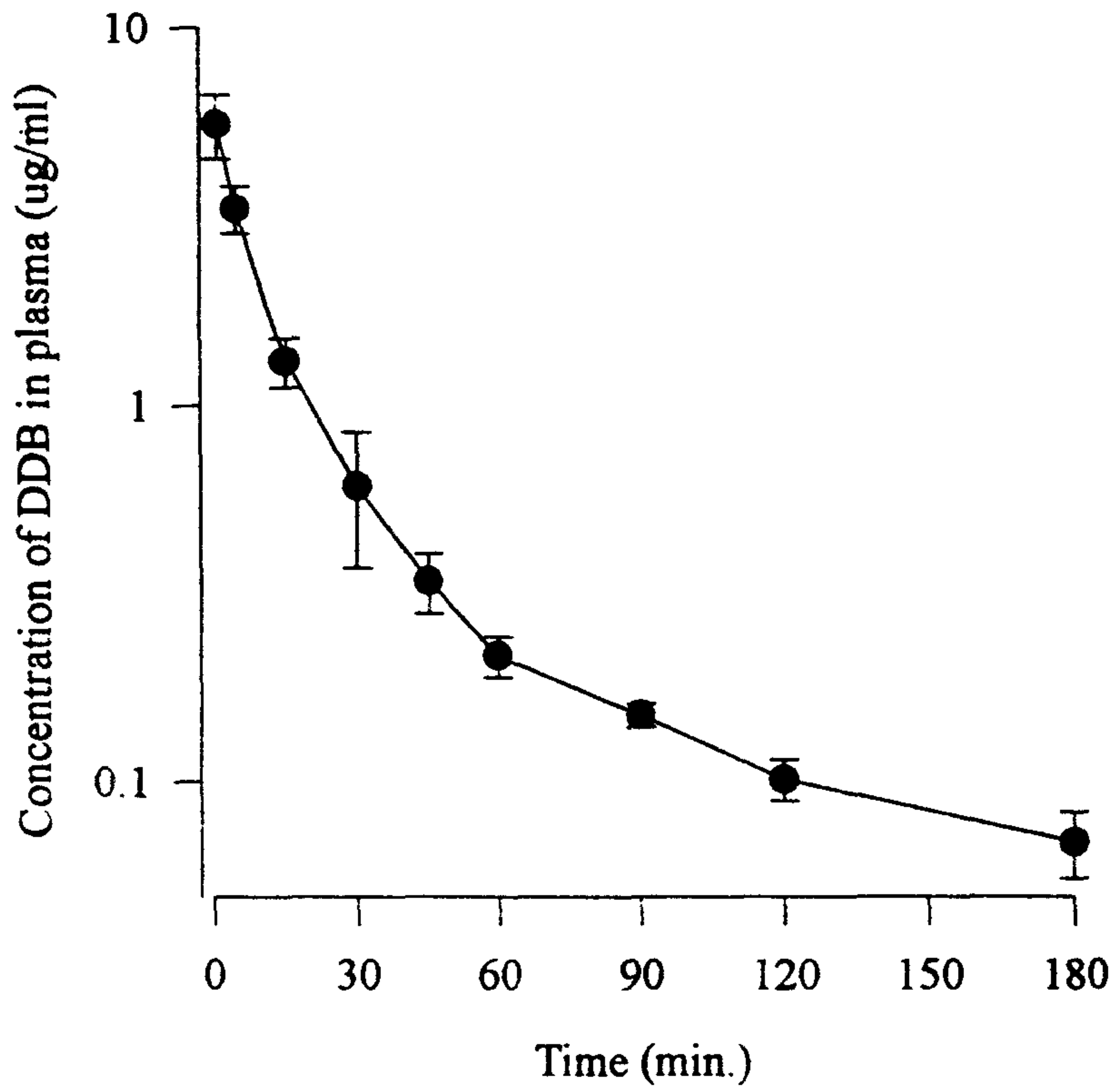


그림4 . Plasma concentration-time profiles after intravenous administration of 4 mg/kg DDB in SEDDS system.

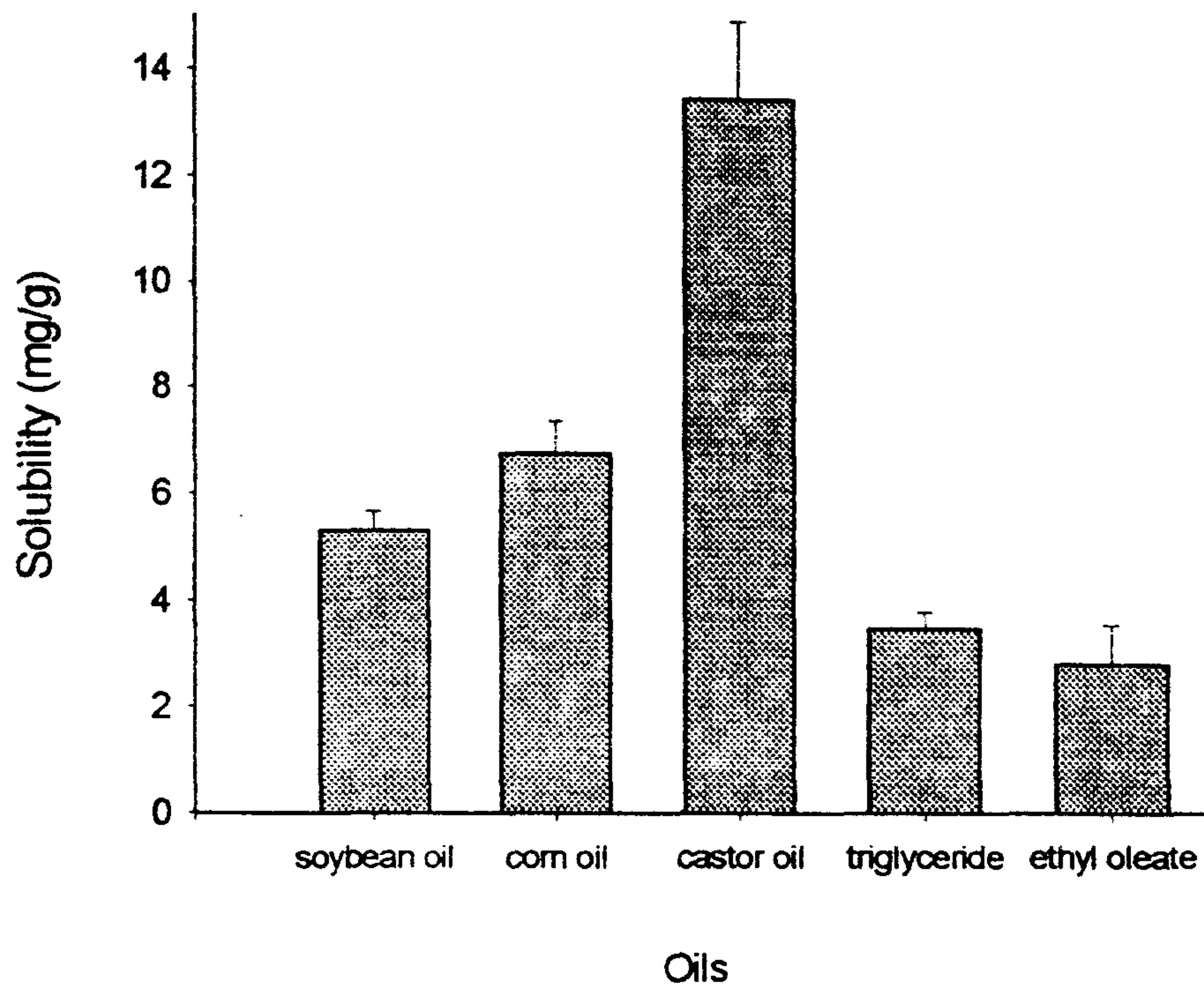


그림5 The solubility of clonixic acid in various oils

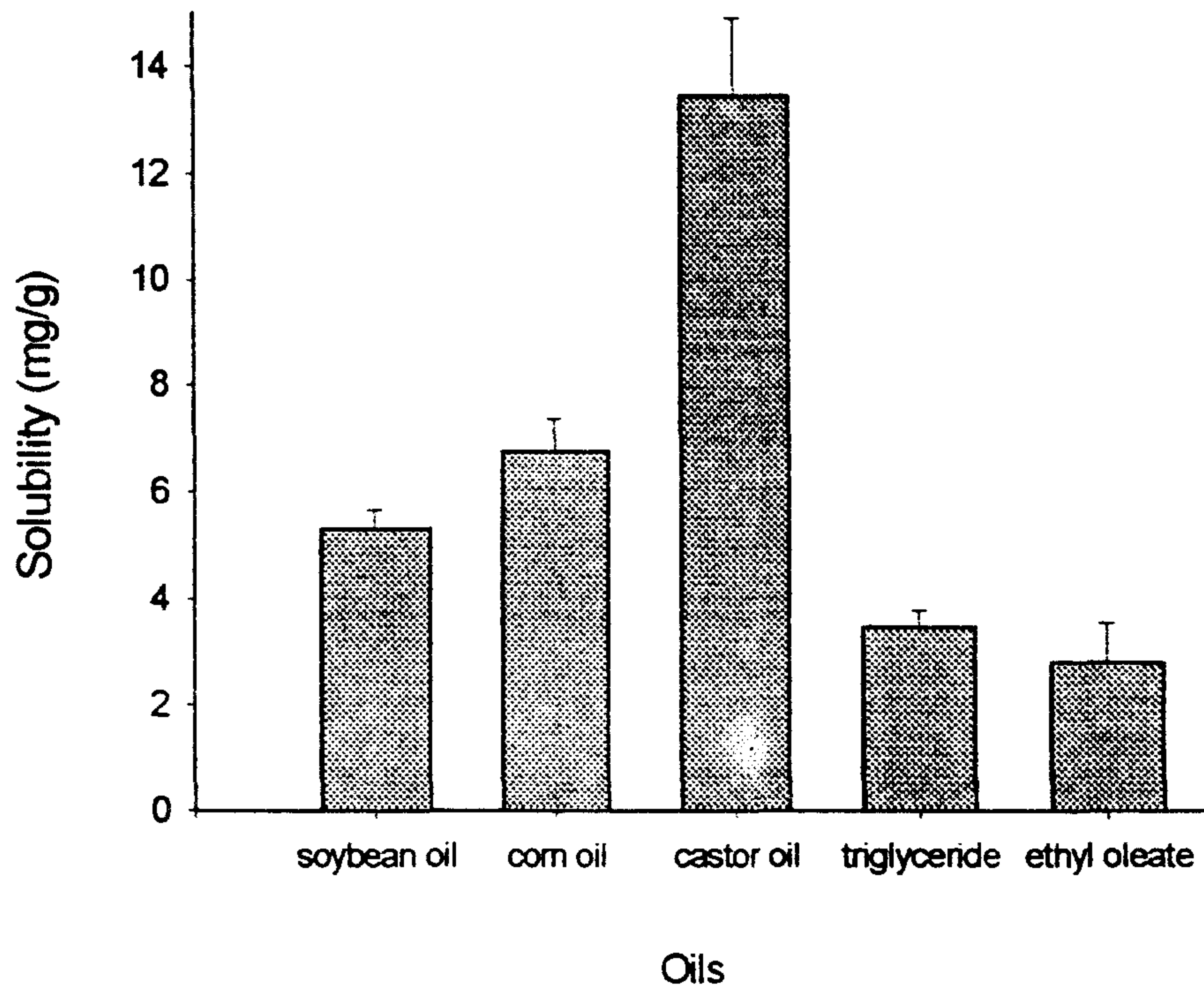


그림5 The solubility of clonixic acid in various oils

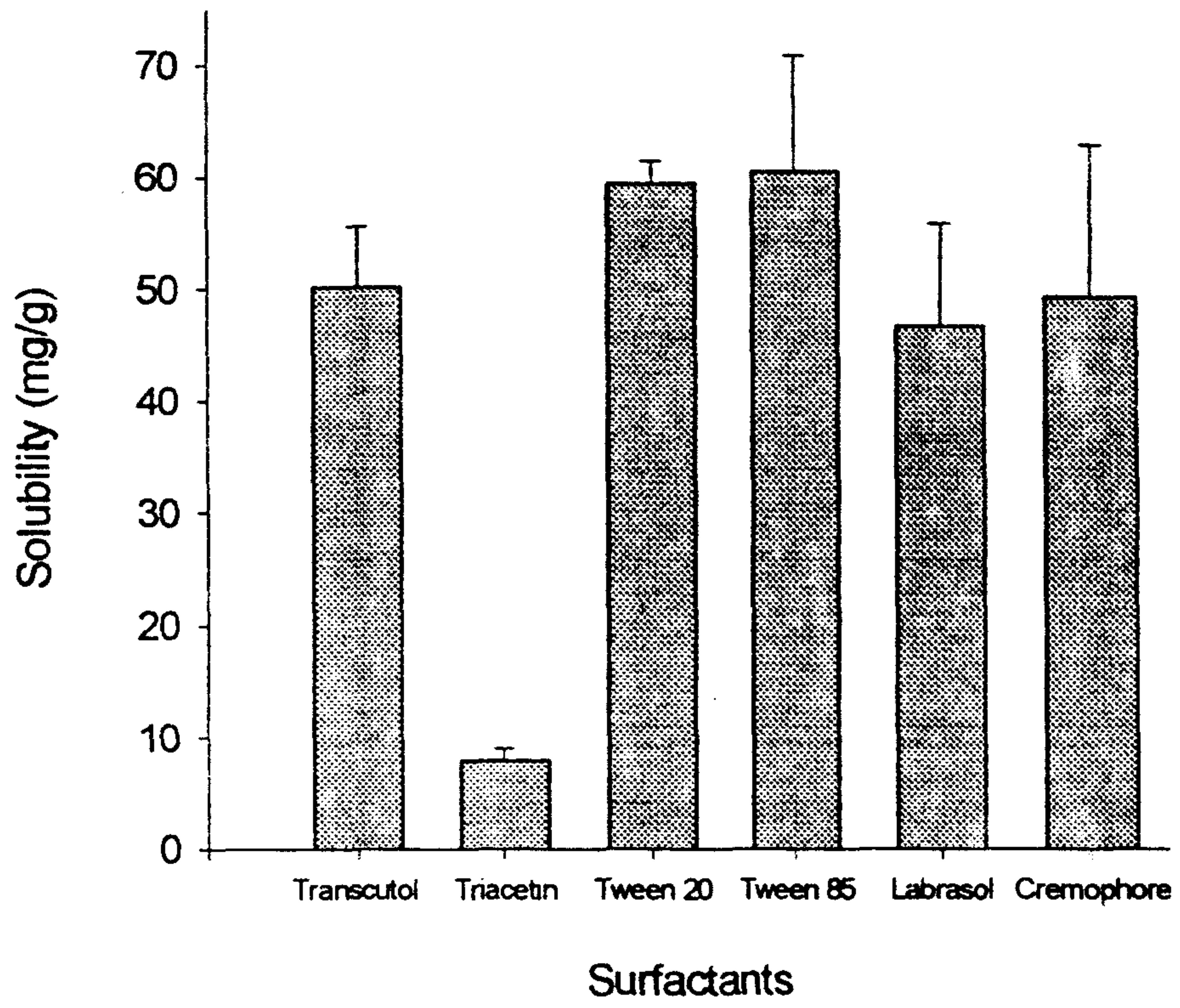


그림6 The solubility of clonixic acid in various surfactants

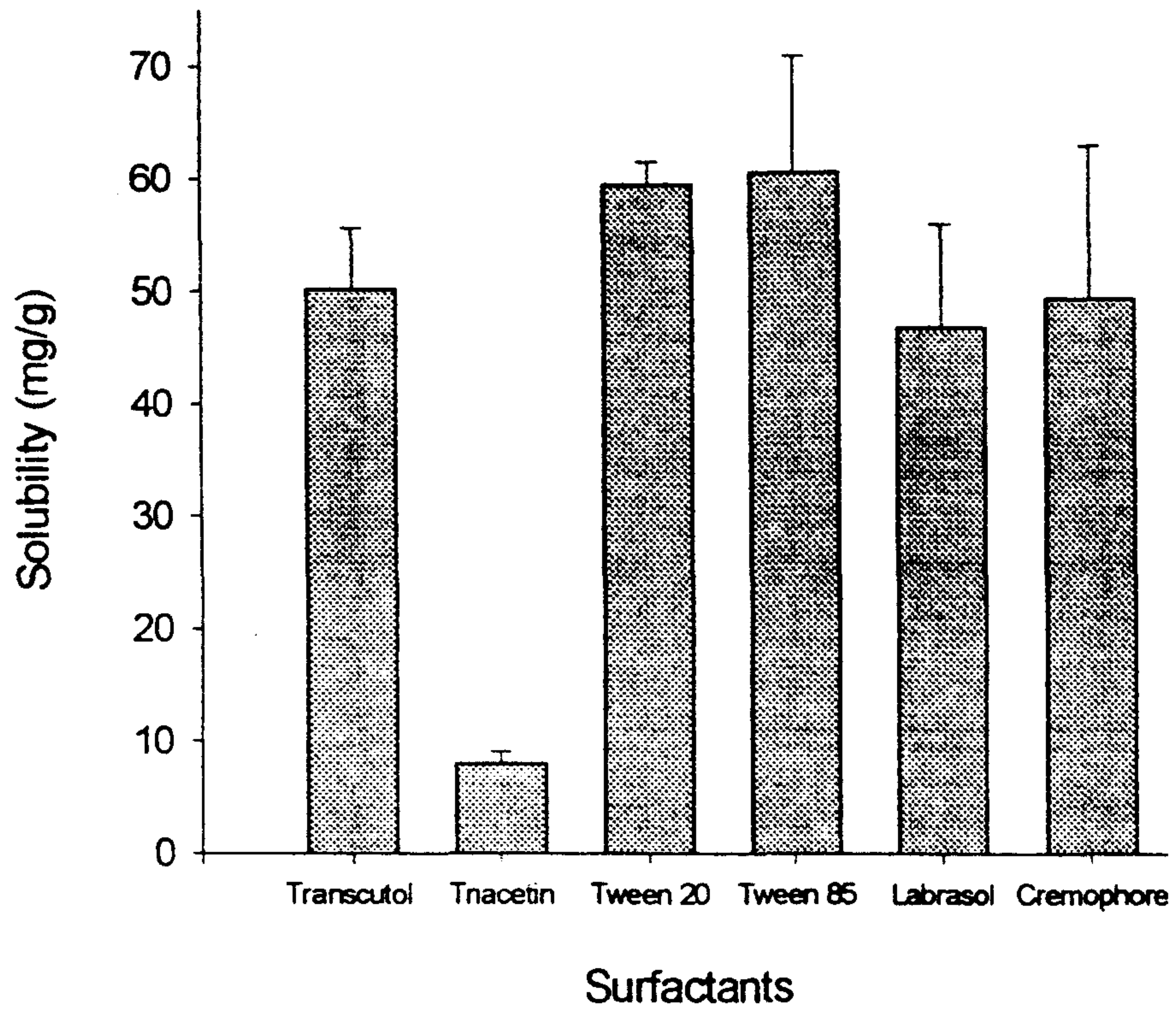


그림6 The solubility of clonixic acid in various surfactants

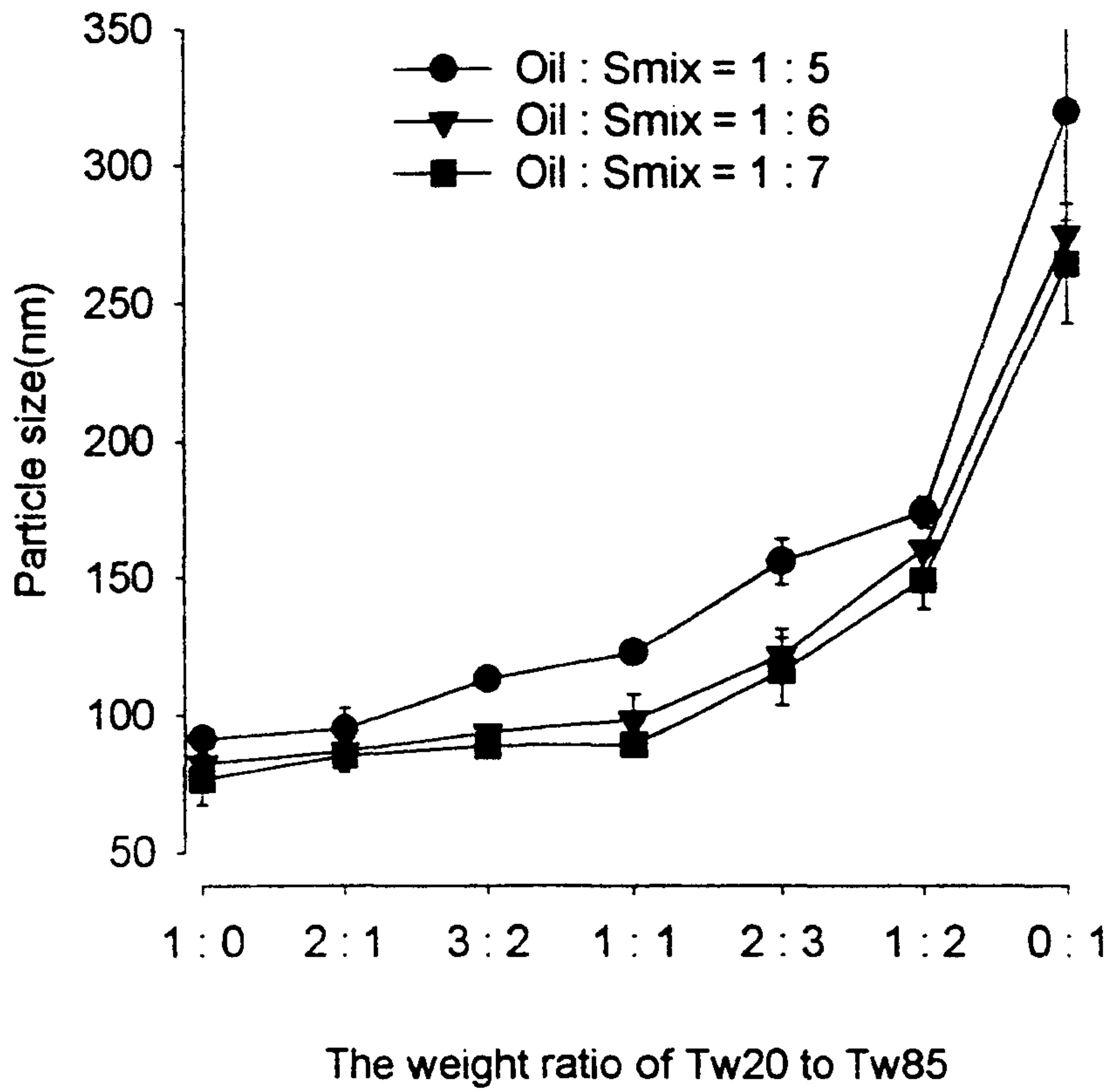


그림7 Effect of the weight ratio of Tween 20 to Tween 85 on the particle size of emulsion systems

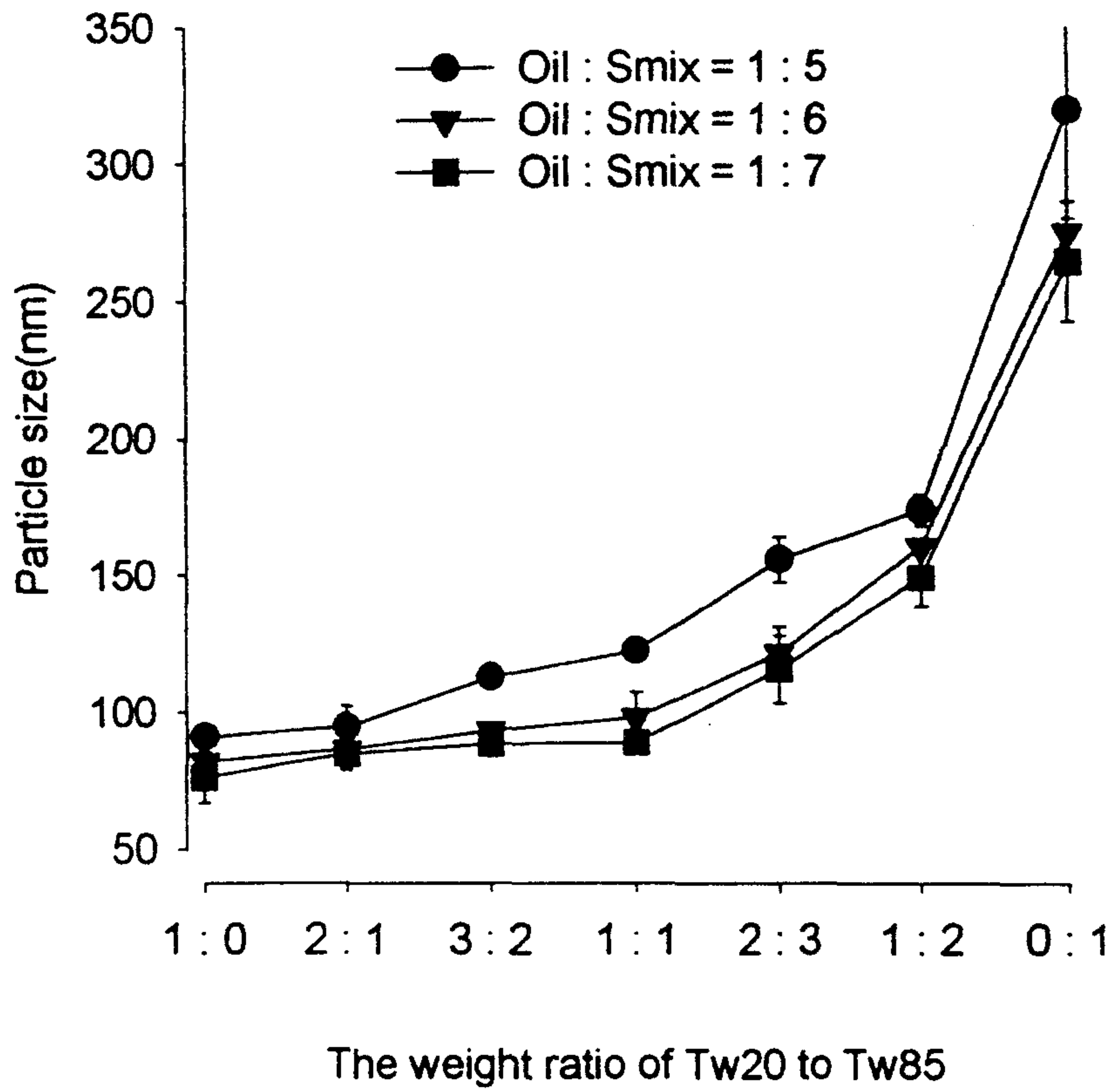


그림7 Effect of the weight ratio of Tween 20 to Tween 85 on the particle size of emulsion systems

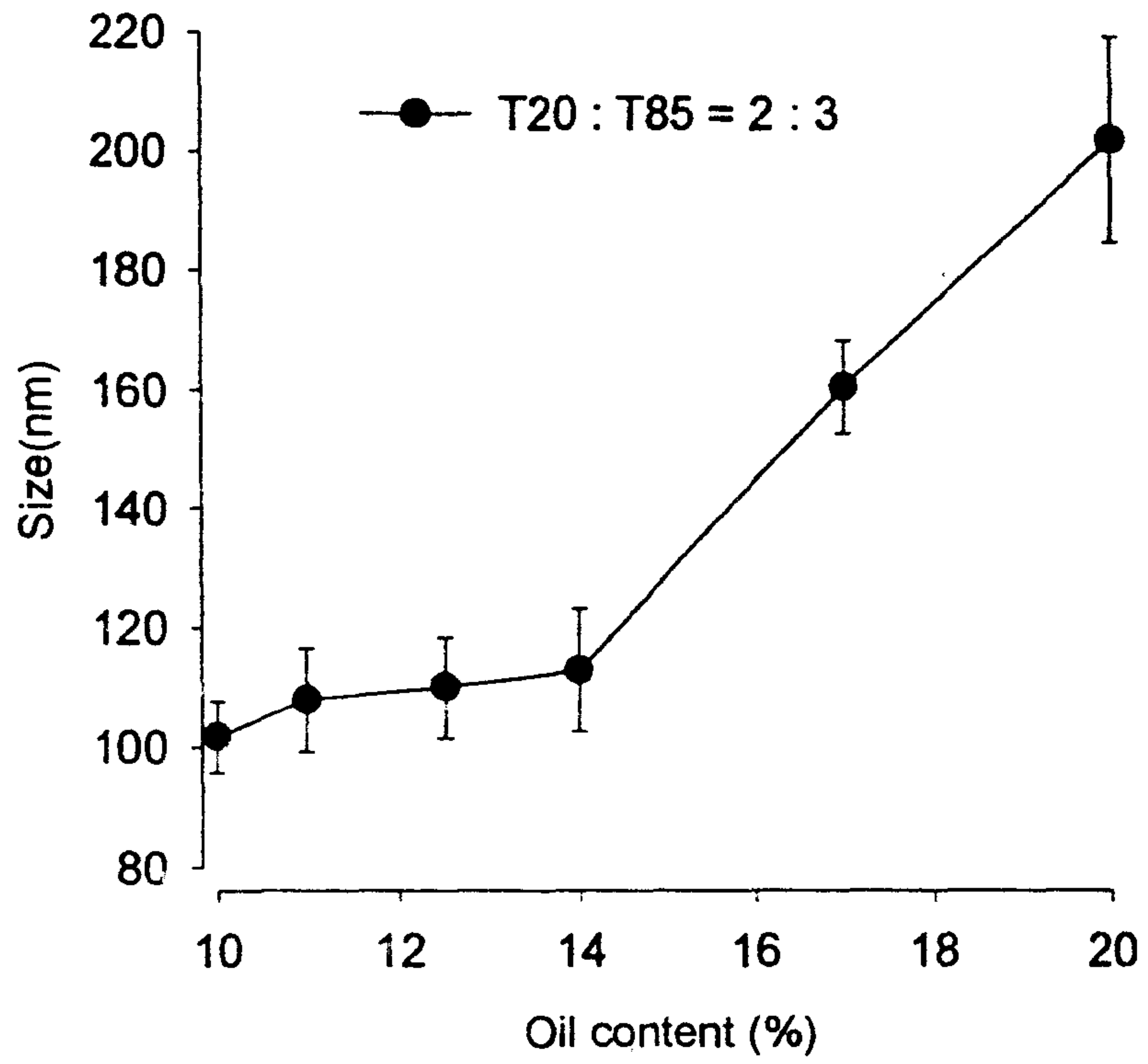


그림8 Effect of the weight ratio of castor oil on the particle size of emulsion systems

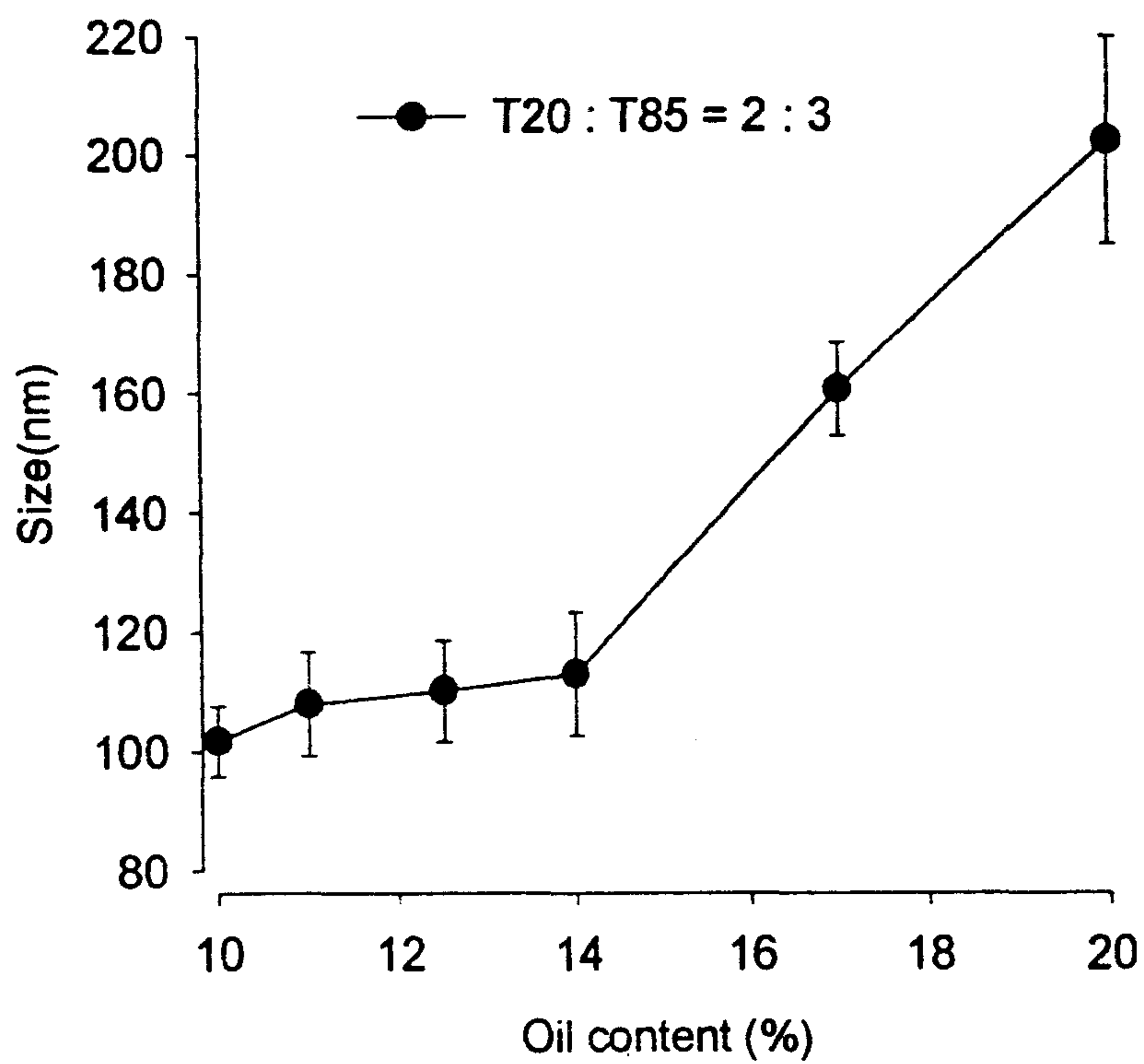


그림8 Effect of the weight ratio of castor oil on the particle size of emulsion systems