

진보된 독성평가방법

한국과학기술연구원 독성연구팀

류 재건

자연에서 유래한 물질이건, 또는 인간이 인간의 필요성에 의해 만들어낸 화학물질이건 궁극적으로 이들의 섭취로 인해 야기될 수 있는 독성을 인간의 입장에서 주의 깊게 살피려는 일환으로 독성학이 태동되었고, 현재는 인간뿐 아니라 자연환경에 미치는 독성까지를 커버하는 커다란 연구 영역으로 자리 매김하고 있다.

우리가 흔히 독성평가의 OECD guideline으로 부르는 OECD guidelines for the testing of chemicals은 선진국들의 독성평가 방법의 체계화 및 객관화를 시켜주는 중요guideline으로서 의약품, 화학물질들의 독성평가에 주요 지침서가 되고 있다. 이와 같은 OECD guideline의 변천흐름과 곧 발간될 최근판의 입수된 Draft document를 중심으로 빠르게 변화되는 독성평가 방법의 흐름을 파악해보고자 한다. OECD guideline의 경우 특히 분자생물학의 발전에 힘입은 분자독성학의 발전에 따라 Genetic Toxicology에서 급속한 변화를 볼 수 있다.

즉, 최근의 OECD guideline에서는 471과 472가 합쳐져 “Bacterial Reverse Mutation Test”로 될 전망이고 473은 “In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test”로 바뀌고 +S-9과 -S-9 처리시의 처리시간, Sampling time 등이 명확해 졌고, 474는 Mammalian erythrocyte Micronucleus Test로 되어 기존의 Bone Marrow 뿐만 아니라 최근의 기법으로 본문의 내용 중에 설명할 Supravital peripheral reticulocyte 방법도 적용 가능하도록 되었다. 그 외에도 475, 476, 483에도 update되고 있는 실정이다.

또한 인간에 적용되는 의약품으로 집약되는 화학물질들에 대해 최근 미국, EU, 일본의 세 축을 중심으로 진행되고 있는 ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)의 논의 사항을 살펴보면 독성평가방법의 흐름을 파악해 볼 수 있다.

현재 새로운 독성평가 방법으로 눈부신 발전을 거듭해오는 주요 topic으로서 cell level에서의 DNA strand breakage를 탐지할 수 있는 Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE assay) 일명 Comet Assay 또 ICH에서 현재의 고전적인 *in vitro* 염색체이상시험을 대체할 목적으로 Harmonization을 하고 있는 Mouse Lymphoma TK gene Assay 등등이 있다. ICH는 미국, EU, 일본이 삼국 (tripartite) 체제로 하여 각 국의 정부와 그 나라 제약회사의 연합체인 제약협회가 중심이 되어 사람에게 사용하는 의약품 개발을 위한 여러 안전성 실험법들에 관한 통일된 guideline을 만들어 신약개발 기간, 비용 등을 절감하고자 하는 의도로 시작되었다. 제1회 ICH 회의는 1991년 11월 벨지움의 브뤼셀에서 약 1200명이 참가하고 EC위원회 부위원장, 일본, 미국의 EC대사 등이 참석한 국제회의로 시작하였다. 그 이후로 제2회 ICH는 1993년 10월 미국 Florida에서 미국의 FDA장관 등이 출석하고 약 1600여명의 관계자들이 참석하여 회의를 가지며 국제적인 Harmonization을 하여왔다. 이와 같은 ICH에 관한 긍정적인 면도 있으나, 몇 가지 간과해서는 안되는 면들 또한 깊이 생각해야 할 것이다. ICH는 미국, EU, 일본의 삼국 (tripartite)을 주축으로 각 나라에서의 정부와 각국의 제약협회 즉 EU에서는 ①European Commission-European Union (EU) ②European Federation of Pharmaceutical Industries Associations (EFPIA)가 참여하고, 일본에서는 ①Ministry of Health and Welfare, Japan (MHW) ②Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) 그리고 미국에서는 ①US Food and Drug Administration (FDA) ②Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA)가 중심이 되고 있고 observer로서는 WHO, EFTA (European Free Trade Area), Canada로 구성되어 있다. 그리고 ICH의 기획입안, 의사 결정에 관한 협의체로 운영위원회를 두어 각 주최자로부터 2명의 위원을 두고 원칙적으로 6개월에 1회씩 열도록 되어 있으며, 나아가 실무적인 Harmonization을 위해 전문가위원회 (Expert Working Group)를 약 25분과로 나누어 각 시험에 관한 guideline을 작성하고 있고 이것도 원칙적으로 6개월에 1회씩 개최하는 것으로 되어 있다. 이 Expert Working Group의 전문가들은 거의 모든 실험법 작성에 깊이 관여하고 있고 그 전문가들은 적어도 그 분야에만 수십 년씩 종사해온 국제적으로도 알아주는 진정한 그 분야의 전문가들이 주축을 이루고 있다.

1995년 Yokohama에서 열린 ICH3의 Safety Symposium에서 주로 발표된 것을 살펴보면 최근의 분자생물학 (Molecular Biology)의 눈부신 진보를 고려하여, 그 결과로서 많은 Biotech 의약품들의 출현을 눈앞에 두고 있는 실정을 감안해서 Safety Studies for Biotechnological Products에 관한 Harmonization 결과가 발표되었고, 생식독성에 관한 Male Fertility Studies in Reproductive Toxicology 그리고 많은 관심이 쏠린 발암성시험 (Carcinogenicity Study)에 관한 Harmonization 특히 Use of Two Rodent Species 즉 두종의 시험 동물 사용에 관한 보고가 있었다. 발암성시험과 관련하여 빼놓을 수 없는 연구과제가 유전독성 (Genetic Toxicity)에 관한 연구방법이라 하겠다. ICH3에서는 일본이 주축이 되어 유전독성에 관한 Standard Battery Test를 구축하고 기존의 고전적인 연구방법에서 탈피하여 Molecular Biology 연구기법을 가미한 연구방법의 일환으로 Mouse Lymphoma Thymidine Kinase (TK) Gene Assay에 대한 Harmonization 연구결과를 일본발암원학회 회장인 Dr. Sofuni가 발표하기도 하였다. 나아가 발암성과 관련된 연구방법으로 Transgenic Animal의 사용도 많이 권장되고 있음을 알 수 있었다. 본인이 여러 번 기회 있을 때마다 언급하여 왔듯이 OECD를 비롯한 여러 독성 guideline에서 고전적인 독성평가기법들은 아주 빠르게, 많은 변화가 있으리라 믿고 있다. 특히 우리 나라의 OECD 가입에 따라 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals도 현재 최신 정보에 의하면 많은 변화가 각 실험법에 대해, 분자독성학의 진보에 따라, 보완 또는 추가되고 있다는 점이다. gene level에서의 독성평가를 위해 새로이 개발된 Transgenic animal이나 cell line의 이용 특히 *lac I* gene을 target으로 개발된 Stratagene의 Big Blue와 *lac Z* gene을 target으로 개발된 Hazelton의 MutaMouse 등은 널리 현재 보급되어 있는 실정이다. 그리고 이와 같은 Transgenic animal과 병행하여 *in vivo* cytogenetic study가 가능하도록 새로이 개발된 *in vivo* micronucleus assay로서 기존의 Bone marrow를 이용하여 도살할 수밖에 없었던 가장 큰 단점을 극복하고 말초혈액만으로 *in vivo* micronucleus assay가 가능하도록 한 Supravital *in vivo* micronucleus assay, 나아가 *in vitro* micronucleus assay로서 *in vitro* cytokinesis blocking micronucleus assay 그리고 염색체이상실험과 병행이 가능한 FISH (fluorescence *in situ* hybridization), PCR을 이용한 PRINS (primed *in situ* hybridization) 등은 분자생물학

(molecular Biology)의 발전과 더불어 앞으로 기존의 고전적인 독성평가방법을 대체할 막강한 tool로서 자리 매김을 하리라 사료되며, 간단히 진보된 독성평가 방법들을 활용하여 본 연구실에서 수행한 연구결과를 중심으로 소개하고자한다.

I . Single Cell Gel Electrophoresis (Comet assay)

A. Introduction

The single cell gel electrophoresis assay or comet assay is a rapid simple , visual and sensitive technique for analysing DNA breakage (single strand breakage,. alkali-labile site) and repair in mammalian cells.

The cells are embedded in agar on microscope slides and lysed with detergent and alkaline and, electrophoresis is carried out at high pH.

While undamaged DNA remains within a brightly fluorescent core, the DNA which contains breaks moves from this core in the direction of the anode forming an image as a comet

B. Principle

A combination of release of supercoiling and alkaline unwinding.

- 1) Cells are permeabilised with detergent.
- 2) Nuclear protein are extracted with high salt.
- 3) The presence of breaks in DNA relaxes supercoiling and the loops.
- 4) Under alkaline conditions, DNA in the open loops denatures and becomes flexible.

C. Potential applications

1) DNA damage and repair studies

It is useful in the biochemical dissection of excision repair of DNA.

1. The analysis of UVC sensitivity in stimulated, unstimulated lymphocyte and *xeroderma pigmentosum*.
2. The analysis of UVC damage in HeLa cell and permeablized Cells

2) Biomonitoring

SCGE can be applied in screening lymphocyte sample from human population for susceptibility to oxidative damages, UV and ionizing radiation -- useful method for detecting resistant of sensitive cells within a heterogenous population.

3) Genotoxicity

The assay not yet been validated against a wide range compounds.

D. Advantages

1. The collection of data at the level of the individual cell
2. small number of cells per sample
3. sensitivity
4. equipment requirements are no greater than other short term test
5. any eukaryotic cells can be used

II . Transgenic systems for *in vivo* mutation analysis

A. Introduction

Transgenic animals & cell lines are powerful tools to elucidate the mechanism of chemical carcinogenesis and mutagenesis, and the role of the specific gene in mutation especially in *in vivo*.

- offers the opportunity to test the mutagenicity of compounds directly onto the cells.
- valuable for short term mutagenicity studies oncogene, and tumor suppressor studies and DNA repair studies.
- provide quantitation information (mutation frequency) as well as qualitative analysis (mutation type) provided from a mutagen.
- In the case of direct acting chemicals, mutational spectrum and MF data *in vitro* is similar to that of *in vivo*.

▶ Big Blue Rat Cell Line

- Rat2 embryonic fibroblast cell line.
- Transfected with the lambda *lacI/aZ* shuttle vector & pSV2Neo by calcium phosphate co-transfection.
- thymidine kinase mutant, G418 resistant.
- The chromosome number is polyploid.

▶ Lambda shuttle vector

- Size is approximately 45Kb.
- Integrated into this cell line at two sites, between 50-70 copies/cell.

- Utility

Transfer a suitable target DNA sequence to a convenient organism for analysis.

Provided in a variety of ways to detect mutation.

- ▶ ***lacI* target gene within lambda shuttle vector**

- Codes for the products of *lacI* repressor protein.

- *lacI*^q point mutation-10 fold increase in expression.

- Advantages

easy to detect color screening on indicator X-gal small size facilitates sequence analysis (1080bp) presence of the extensive historical database highly sensitive to a variety of mutation endpoint

- ▶ **Assay & Detection System**

- *lacI* target gene : code for Lac repressor protein

- Lac repressor : bind the lac operator and block transcription of the *lacZ* reporter gene

- β -galactosidase

produced by α -complementation α LacZ protein from the shuttle vector with ω LacZ protein in the *E.coli* host strain chromosome

***lacI* mutation**

→ no functional Lac repressor protein

→ transcription, translation of *lacZ*

→ β -galactosidase produced

→ cleavage X-gal

→ mutant blue plaques

no *lacI* mutation

→ non-mutant colorless plaques

▶ **Analysis of Mutation**

- Rescue shuttle vector from the Mutant plaque
- Excise the target gene
- Prepare the template by PCR amplification
- Access the mutation by sequence analysis
(mutation type, frequency)
- Type of Mutation : point mutation, deletion, insertion etc.
Average spontaneous mutant frequency : approximately 4.0×10^{-5}

▶ **Determination of Mutant Frequency (MF)**

$$\begin{aligned} \text{Mutant Frequency (MF)} \\ = \text{No. of Blue plaques} / \text{No. of Total plaques} \end{aligned}$$

B. Advantages

- ▶ **Rapid Determination of mutant frequency (MF) & mutational spectra**
- ▶ **Easy Characterization of Mutations by Sequence Analysis**
- ▶ **Easy Mutant Detection**
- ▶ **Induced mutations in the target gene reflect the types of mutations induced in an endogeneous gene**

C. Applications

- ▶ Short-term *in vitro* mutagenesis studies
- ▶ DNA repair studies
- ▶ Various toxicology applications
- ▶ Studies on the of oncogenes
& tumor-supressor genes on mutant frequences
- ▶ Alternatives to *in vivo* carcinogenecity study

III. Supravital *in vivo* Micronucleus Assay using peripheral reticulocytes

- Classical micronucleus assay
 - with bone marrow erythrocytes
 - Giemsa staining method
- New micronucleus assay
 - with peripheral blood reticulocytes
 - Acridine orange supravital staining method *In vivo* Micronucleus Assay

IV. Mouse Lymphoma TK (+/-) Gene Assay

A. Background

- Mouse Lymphoma tk⁺/₋ Assay(Moly) first described by Clive et al 1972 - an *in vitro* assay of detection of gene mutations in cultured mammalian cells
- Selection of tk⁻/₋ mutants in tk⁺/₋ clone (3.7.2c) of long established suspension culture mouse lymphoma cell line L5178Y
- Originally bromodeoxyuridine used as selective agent, improved to use of trifluorothymidine now

	Classical Method	Supravital Method
Source	Bone marrow erythrocytes	Peripheral blood reticulocytes
Animal	Killing	Not killing
Preliminary experiment	Necessary	Unnecessary
Parallel with other study	Impossible	Possible
Sample preparation	Single	Multiple
Staining	Giemsa	Acridine orange
Accuracy	Good	Excellent
Counting	Good	Very fast and easy

B. Advantages of Moly

- Short expression time of 2-3 days for tk (thymidine kinase) mutants compared to 1 week for hprt mutants
- Relatively high mutant frequency so a large number of events can be recorded
- wide range of genetic changes detected
 - ◆ point mutations within tk gene
 - ◆ deletion of entire tk gene
 - ◆ large deletions/loss entire chromosome 11
 - ◆ chromosomal events involving chromosome 11 tk+ allele (visible chromosome rearrangements)
 - ◆ mitotic recombination
- Bimodal distribution according to mutation scale
 - ◆ Large normally growing mutant colonies
 - ◆ Small slow-growing mutant colonies
- Suggested that by recording colony size, Moly may indicate gene mutation and chromosome breakage potential of chemicals

Ames Test	Chromosome aberration	Moly
Positive	Positive	Positive (large and small colony)
Positive	Negative	Positive (large colony)
Negative	Positive	Positive (small colony)

C. Analysis of Results

● Survival or viability

Probable number of clones/well (P)

EW : empty wells, TW : total wells

$$P = -\ln(EW/TW)$$

Plating Efficiency(PE)

$$\begin{aligned} PE &= P/\# \text{ of cells plated per well} \\ &= -\ln(EW/TW)/1.6 \end{aligned}$$

Percentage relative survival (%RS)

$$\%RS = [PE(\text{test})/PE(\text{control})] \times 100$$

● Mutant Frequency(MF)

$$MF = [PE(\text{mutant})/RE(\text{viable})] \times 10^6$$