

생쥐골수세포 미소핵검사에 의한 치료용량 방사성옥소(¹³¹I)의 유전독성 평가

전남대학교 의과대학 핵의학과

범 희 승 · 김 지 열

= Abstract =

Genotoxicity of Therapeutic Dose of ¹³¹I Analyzed by Micronuclei Test in the Mouse Bone Marrow

Hee Seung Bom, M.D. and Ji Yeul Kim, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea

Background : Radioiodine (¹³¹I), a major component of nuclear fallout and a valuable therapeutic agent for thyrotoxicosis and thyroid cancer, has been regarded as a mutagen or a carcinogen without any convincing evidence. To evaluate the genotoxicity of radioiodine (¹³¹I) we performed a micronuclei test in mice bone marrow.

Materials and methods : Mice (ICR strain, 25~30 g) were divided to 4 groups: control, group 1 (0.17 mCi/kg, usual therapeutic dose for thyrotoxicosis), group 2 (1.67 mCi/kg, usual therapeutic dose for thyroid cancer), and group 3 (16.67 mCi/kg, usual accumulated dose causing bone marrow suppression). ¹³¹I was administered intraperitoneally. Ten mice of each group were sacrificed at days 1 and 3. Bone marrow were smeared and stained with May-Grünwald Giemsa method. One thousand polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) were counted under the light microscope, and the number of micronucleated PCEs were recorded.

Results : The frequency of micronuclei in PCE (and NCE in parenthesis) in the control group was 0.25±0.07 (0.23±0.07)% in day 1 and 0.24±0.07 (0.21±0.07)% in day 3. Those in group 1 was 0.27±0.1 (0.23±0.09)% in day 1 and 0.28±0.07 (0.25±0.06)% in day 3. Micronuclei was noted in 0.29±0.08 (0.26±0.09)% in day 1 and 0.31±0.05 (0.29±0.06)% in day 3 in group 2, and in 0.32±0.06 (0.25±0.09)% in day 1 and 0.33±0.08 (0.3±0.06)% in day 3 in group 3. There was no difference in the frequency of micronuclei between each groups (p>0.05).

Conclusion : Radioiodine (¹³¹I) did not cause any genotoxicity in mice bone marrow even at the large dose (16.67 mCi/kg).

Key Words: ¹³¹I, Genotoxicity, Micronucleus test

서 론

핵사고시 가장 문제가 되는 방사성핵종 중의 하나가

*본 연구의 일부는 방사성동위원소 응용물질 연구센터 (장려)의 연구비 보조를 받아서 진행 되었음.

바로 방사성옥소(¹³¹I)이다. 또한, 방사성옥소는 수술이 나 항갑상선 약제에 비해 투약이 간단하면서도 효과가 좋아 갑상선기능항진증의 치료에 널리 쓰이고 있으며, 분화갑상선암의 경우는 원격전이부위의 치료나 수술후 재발된 경우의 치료에 별 대안이 없이 계속 사용될 전망이다.

갑상선암 또는 갑상선기능항진증의 치료를 위해 방사성ヨ소를 투여한 경우 백혈병의 발병이 증가하는지에 대해서는 아직도 논란의 여지가 있다. Brincker 등¹⁾은 갑상선암의 치료를 위해 방사성ヨ소를 투여한 환자군의 2%에서 백혈병이 발생하였다고 보고한 반면, Beierwaltes²⁾는 400명 중 1명 (0.0025%)에서만 백혈병이 발생하였다고 보고하였다. 반면 미국 Public Health Service Cooperative Thyrotoxicosis Follow-up Study Group의 보고³⁾에 의하면 갑상선기능항진증의 치료 목적으로 방사성ヨ소를 투여한 경우에는 백혈병의 발생은 대조군과 차이가 없다고 한다.

따라서 치료를 위해서나 아니면 불의의 핵사고로 인해 인체에 침투될 가능성이 높은 방사성ヨ소가 과연 유전 이상을 얼마나 일으키는지, 유전 이상을 일으킨다면 어느 정도의 양에서 일으키는지 등에 관한 직접적인 자료를 얻어 분석하는 것은 매우 중요한 일이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 생쥐 미소핵검사를 이용하여 치료용량의 방사성ヨ소가 어느 정도의 유전자손상을 가져오는지에 대해 검토하였다.

대상 및 방법

1. 실험군의 설정

생후 6주 전후 (30 g 전후)의 생쥐를 사용하였다.

실험군의 선정은 방사성ヨ소를 투여하지 않고 위장수술만을 시행한 대조군과, 갑상선기능항진증의 치료용량인 10 mCi/60 Kg (0.17 mCi/Kg)을 투여하는 군, 갑상선암의 치료용량인 100 mCi/60 Kg (1.67 mCi/Kg)을 투여하는 군, 그리고 골수억제 등의 부작용 때문에 치료를 중단하게 되는 1000 mCi/Kg (16.67 mCi/Kg)를 투여하는 군으로 나누었다.

2. 방사성ヨ소 (^{131}I)의 투여

생쥐에 별다른 전처치를 하지 않고, 복강내 주사기를 이용하여 방사성ヨ소를 정해진 양만큼 주입하였다. 복강내 투여된 방사성ヨ소의 흡수여부를 확인하기 위하여, 생후 6주 전후 (30 g 전후)의 생쥐 10마리에서 방사성ヨ소 100 mCi를 복강내 투여하고, 감마카메라 (Siemens사 ZLC37 카메라)를 이용하여 60분간 촬영하였다. 복강내 투여된 방사성ヨ소는 빠른 속도로 흡수되며, 주로 위, 갑상선 및 방광에 집적되는 양상을 보였다

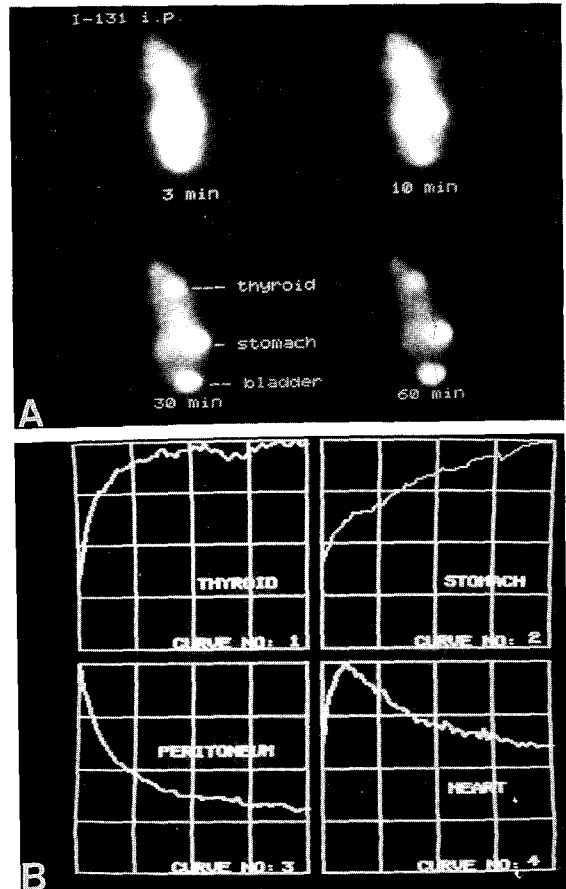


Fig. 1. (A) Photograph of a mouse with intraperitoneally injected ^{131}I (500 Ci). (B) Time activity curves of thyroid, stomach, peritoneum, and heart of the mouse. A rapid absorption of ^{131}I in the peritoneum and a rapid uptake of it in the thyroid gland were demonstrated.

(Fig. 1). 위에는 주사 10분후 주사한 양의 $15.2 \pm 0.4\%$, 60분후 $25.6 \pm 2.7\%$ 가 흡수되었고, 갑상선에는 주사 10분후 $10.8 \pm 0.6\%$, 60분후 $11.2 \pm 0.8\%$ 가 흡수되었다.

3. 미소핵검사 (Micronuclei Test)

방사성ヨ소 투여후 1일 및 3일째 생쥐를 희생시켜 김 등⁴⁾의 방법에 따라 다음의 순서로 검사를 시행하였다.

1) 골수 채취 (Bone marrow sampling)

생쥐를 해부판 위에 고정시킨 후에 양쪽 대퇴골 부위를 절단하여 한쪽 끝에 25 G 주사기바늘을 넣고 밀어내어 슬라이드글라스 위에 골수를 채취하였다.

2) 표본 제작 (Slide Preparation)

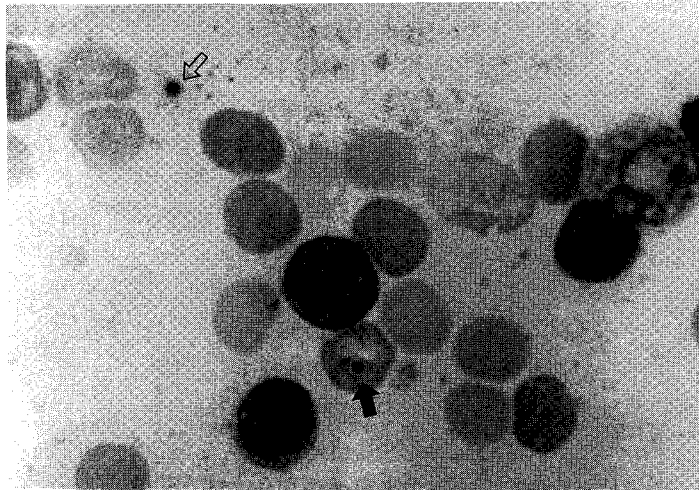


Fig. 2. Photomicrograph of mouse bone marrow cells stained with May Grunwald Giemsa method. Micronuclei in the polychromatic erythrocyte is indicated by a black arrow and that in the normochromatic erythrocyte is indicated by an empty arrow.

골수세포가 놓인 슬라이드글라스 위에 다른 슬라이드글라스를 45° 각도로 세운 다음 적당한 힘으로 도말하여 공기건조 시켰다.

3) 염색(Staining)

표본염색은 May-Grünwald Giemsa 염색용액에 3분간 염색한 후 동량의 원충액을 더하여 섞이게 한 후 3~6분간 둔다. 그런 다음 증류수로 색깔이 분홍색이 될 때까지 세척하여 거즈로 뒷면을 깨끗이 닦은 후 공기건조 시켰다.

4) 현미경 분석(Microscopic Analysis) 및 통계처리

미소핵의 빈도수는 미소핵의 관찰이 쉬운 생쥐 골수세포중 적혈구를 이용하며, 각 슬라이드당 주홍색인 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, 이하 PCE)와 노랑색인 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, 이하 NCE)를 각각 1,000개씩 세어서 그 중 세포질에 미소핵이 나타난 세포수를 백분율(%)로 표시하고, BMDP를 이용한 ANOVA로 통계처리하였다(Fig. 2).

결 과

1. 다염성적혈구(PEC) 내의 미소핵 빈도수

각 슬라이드 당 세포질이 잘 보존된 1,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 미소핵을 가지고 있는 다염성적혈구

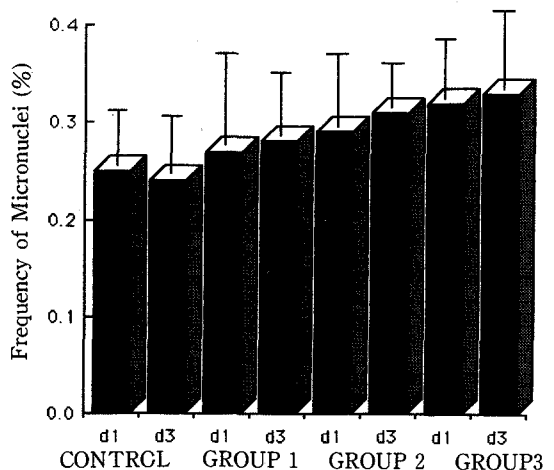


Fig. 3. Frequencies of micronuclei in polychromatic erythrocytes (PCE) of mouse bone marrow. There was no statistically significant difference of frequency between 4 groups. Various doses of ¹³¹I was administered intraperitoneally (control: 0 mCi/Kg, group 1: 0.17 mCi/Kg, group 2: 1.67 mCi/Kg, group 3: 16.67 mCi/Kg). Analysis of micronuclei was performed on 1 (d1) and 3 days (d3) after injection of ¹³¹I.

를 계수한 결과, 대조군의 경우 1일째 0.25±0.07%, 3일째 0.24±0.07%였으며, 치료용량의 방사성요소(¹³¹I)을 투여한 군 중 0.17 mCi/Kg을 투여한 군에서는 1일째 0.

27±0.1%, 3일째 0.28±0.07%, 갑상선 압의 치료용량인 1.67 mCi/Kg을 투여한 군에서는 1일째 0.29±0.08%, 3일째 0.31±0.05%, 16.67 mCi/Kg을 투여하는 군에서는 1일째 0.32±0.06%, 3일째 0.33±0.08%를 보였다. 투여한 방사성옥소의 양이 많을수록 미소핵 빈도수가 증가하는 경향을 보였으나 각 군간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p>0.05) (Fig. 3).

2. 정염성적혈구(NCE) 내의 미소핵 빈도수

정염성적혈구의 경우 대조군에 있어 미소핵의 빈도는 1일째 0.24±0.07%, 3일째 0.21±0.07%, 0.17 mCi/Kg을 투여한 군에서는 1일째 0.23±0.09%, 3일째 0.25±0.06%, 1.67 mCi/Kg을 투여한 군에서는 1일째 0.26±0.09%, 3일째 0.29±0.06%, 그리고 16.67 mCi/Kg을 투여하는 군에서는 1일째 0.25±0.09%, 3일째 0.3±0.06%를 보였다. 다염성적혈구에 비해 미소핵 빈도가 낮았으며, 정염성적혈구의 경우도 역시 투여한 방사성옥소의 양이 많을수록 미소핵 빈도수가 증가하는 경향을 보였으나, 각 군간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p>0.05) (Fig. 4).

고 찰

방사선을 포함한 독성물질이 유전자에 미치는 영향은

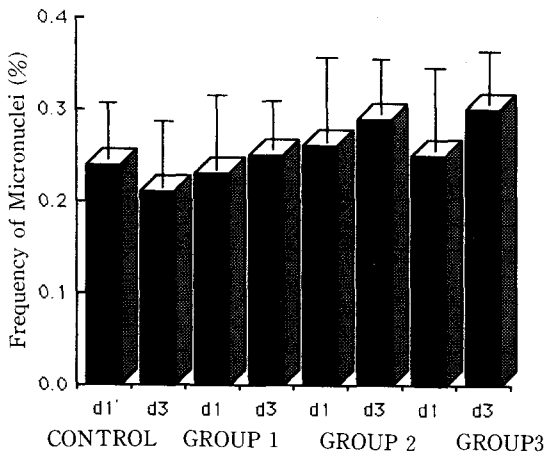


Fig. 4. Frequencies of micronuclei in normochromatic erythrocytes (NCE) of mouse bone marrow. There was no statistically significant difference of frequency between 4 groups. Abbreviations are same to Fig. 1.

크게 대손상(macrolesion)과 소손상(microlesion)으로 나눌 수 있는데, 대손상을 평가하는 방법 중 많이 쓰이는 것 중 하나가 미소핵검사(micronuclei test)이다. 미소핵 검사는 1973년 Ledebur과 Schmid⁵⁾에 의하여 마우스 골수 다염성적혈구에서 처음 시도되었고, Countryman과 Heddle⁶⁾은 말초혈액을 이용하여 세포질이 보존된 상태로 미소핵을 관찰하였으며, 그 후 세포의 종류, 각종 약제의 농도 그리고 처리시간을 각기 달리하는 방법들이 개발되고 있다⁷⁻¹¹⁾.

본 실험에서 행한 골수도말법은 세포유전적독성이 의심되는 물질을 생체내에 투입했을 때 자주 사용되는 방법으로, 생체의 염색체 배양법에 비하여 보다 간편하고 빠른 시일내에 각종 독성물질의 mutagenicity 여부를 관찰할 수 있으며, 특별히 자동화된 시스템이 없어도 실험이 가능하다는 장점이 있다¹²⁻¹⁴⁾.

골수세포를 사용하여 미소핵 검사를 시행하는 동물로는 흰쥐, 생쥐 등 몇몇 동물이 시도되었고, 성별에 관해서도 논란이 많았으나, 수컷 생쥐를 사용하는 것이 바람직하다고 알려져 있다^{15,16)}.

미소핵은 골수, 말초혈액 그리고 체세포 조직 등 분화하는 세포면 어느 세포에서나 관찰할 수 있지만, 그 중 적혈구가 핵이 없으므로 관찰이 용이하여 많이 사용되고 있다. 적혈구는 May-Grünwald Giemsa 염색에 의하여 미성숙적혈구, 즉 다염성적혈구와 성숙한 적혈구, 즉 정염성적혈구로 구분할 수 있는데, 다염성적혈구는 세포질 안에 RNA가 많은 양으로 존재하기 때문에 주홍빛으로 염색이 되며, 정염성적혈구는 다염성적혈구보다는 소량의 RNA가 있으므로 노랑빛으로 염색이 된다.

Countryman과 Heddle⁶⁾은 미소핵의 판정 기준을 첫째, 직경이 원래 핵(main nucleus)의 1/3 이하이고 둘째, 염색상이 원래의 핵과 동일해야 하며 셋째, 세포질 내에 위치해야 한다고 하였고, 골수내 다염성적혈구내 미소핵을 관찰함이 약 24~48시간 전에 투여한 물질에 대한 세포유전적독성을 판정하는데 의의가 있다고 하였다. 본 실험에서는 이를 기준으로 하여 다염성적혈구와 정염성적혈구 둘다 그 직경이 원래 핵의 1/3 이하이며, 염색상이 동일하게 세포질내에 위치한 것을 선정하여 계수하였다.

Adler¹⁷⁾은 정상 대조군에 있어서 다염성적혈구내의 미소핵의 빈도수(micronucleated polychromatic erythrocytes: MPE)가 0.2% MPE/1,000 PCE의 범위

라고 보고하였는데, 본 실험에서 대조군의 경우 다염성 적혈구 내 미소핵의 빈도수가 1일째 $0.25 \pm 0.07\%$, 3일째 $0.24 \pm 0.07\%$ 로서 이들의 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

Heddle¹⁸⁾는 생쥐에 X선을 조사시켜 다염성적혈구에서의 미소핵 빈도수를 연구한 결과, 조사 12시간 후에 3%의 미소핵이 관찰되었고, 24시간 후에는 6%로 관찰 빈도가 높아졌으나, 48시간 이후부터는 점점 감소하였다고 보고하였으며, Timothy 등¹⁹⁾은 흰쥐의 신장세포에 γ 선을 조사시킨 후 미소핵의 유발을 시간별 그리고 선량에 따라 관찰한 결과, 48시간부터 72시간 사이에 12~20%로 가장 많은 미소핵 빈도수를 나타냈고, 조사 선량을 증가시켰을 때 미소핵 빈도수도 높게 나타났다고 보고하였다. 김 등⁴⁾은 마우스에 교질성방사성인(³²P colloid)를 정맥 투여하고, 시간에 따라 미소핵의 발현을 관찰한 결과, 교질성 방사성인의 농도가 19.166 KBq/g 일때는 대조군과 차이가 없었으며, 농도를 191.66 KBq/g, 1916.6 KBq/g으로 증가시켰을 때 미소핵의 빈도수가 증가하는 것으로 보아 교질성 방사성 인을 치료선량의 10배, 100배로 증가시켰을 때 그 농도에 비례하여 세포유전적독성을 일으킬 가능성이 커짐을 알 수가 있었다고 보고하였다. 또한, 정염성적혈구에서 교질성 방사성 인의 양이 1916.6 KBq/g일 때 $0.86 \pm 0.11\%$ 에서 1.95 ± 0.14 로 대조군에 비하여 다소 증가되었는데, 이는 지속적인 방사선을 방출하는 동위원소를 주입함에 따라 다염성적혈구가 정염성적혈구로 성숙되고 이것이 골수에 축적되어 나타난 결과라고 하였다.

본 연구에서는 다량의 방사성옥소(¹³¹I)를 투여하였음에도 대조군에 비하여 유의한 미소핵의 증가는 관찰되지 않았다. 이에 대해서는 몇가지의 가설을 제시할 수 있다. 첫째, 본 연구에 사용된 마우스는 갑상선 기능이 정상적인 상태를 유지하고 있었으므로 투여된 방사성옥소(¹³¹I)가 대부분 정상 갑상선에 섭취되었을 것이다. 따라서 김 등⁴⁾의 교질성방사성인(³²P colloid)과는 달리 골수세포에 미치는 영향은 미미하였으리라 생각할 수 있다. 둘째, 방사성옥소(¹³¹I)는 베타에너지가 상대적으로 약하고 반감기가 상대적으로 짧아 골수세포에 미치는 영향이 본질적으로 작다고 생각할 수도 있다. 이상의 가설에 대해서는 앞으로 실험조건을 바꾸어 계속 추구해 보아야 한다고 사료된다.

본 연구의 결과 정상 상태에서 과량의 방사성옥소(¹³¹I)

I)를 투여한다고 하더라도 골수세포에 대한 영향은 무시할만하므로, 이런 경우 백혈병의 위험은 매우 낮다고 사료되었다.

요 약

연구배경 : 핵사고시 가장 중요한 유출방사성핵종의 하나이며, 갑상선암 및 갑상선 기능항진증 치료에 없어서는 안되는 치료제인 방사성옥소(¹³¹I)는 과량 투여시 백혈병 또는 유전 이상을 나타낼 것으로 추측되고 있으나, 이에 대해서는 아직 논란의 여지가 있다.

방법 : 실험군은 방사성옥소를 투여하지 않고 위장수술만을 시행한 대조군과, 갑상선기능항진증의 치료용량인 10 mCi/60 Kg (0.17 mCi/Kg)을 투여하는 군, 갑상선암의 치료용량인 100 mCi/60 Kg (1.67 mCi/Kg)을 투여하는 군, 그리고 골수억제 등의 부작용 때문에 치료를 중단하게 되는 1000 mCi/60 Kg (16.67 mCi/Kg)를 투여하는 군으로 나누어 실험을 시행하였다. 각 군은 생후 6주 (30g) 전후의 생쥐 10마리로 구성되었으며, 방사성옥소는 부강에 투여하였다. 투여 1일 및 3일 후 생쥐를 희생시켜 골수를 채취하고, 이를 대상으로 미소핵검사를 시행하였다. 미소핵은 골수세포 중 핵이 없는 정염성 및 다염성적혈구에서 관찰하며, 1000개의 세포 중 미소핵이 나타난 세포수를 %로 표시하였다.

결과 : 다염성적혈구(괄호안은 정염성적혈구)에서의 미소핵 발현은 대조군의 경우 1일째 0.25 ± 0.07 (0.23 ± 0.07)%, 3일째 0.24 ± 0.07 (0.21 ± 0.07)%, 치료용량의 방사성옥소를 투여한 군 중 0.17 mCi/Kg을 투여한 군에서는 1일째 0.27 ± 0.1 (0.23 ± 0.09)%, 3일째 0.28 ± 0.07 (0.25 ± 0.06)%, 1.67 mCi/Kg을 투여한 군에서는 1일째 0.29 ± 0.08 (0.26 ± 0.09)%, 3일째 0.31 ± 0.05 (0.29 ± 0.06)%, 16.67 mCi/Kg을 투여하는 군에서는 1일째 0.32 ± 0.06 (0.25 ± 0.09)%, 3일째 0.33 ± 0.08 (0.3 ± 0.06)%를 보였다. 투여한 방사성옥소의 양이 많을수록 미소핵 빈도수가 증가하는 경향을 보였으나, 각 군간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$).

결론 : 임상적으로 치료를 중단하게 되는 1000 mCi/60 Kg (16.67 mCi/Kg)를 투여한 군에서도 생쥐 골수내 미소핵이 발현되지 않는 것으로 보아, 방사성옥소는 비교적 안심하고 치료에 사용할 수 있는 제제로 사료되었다.

감사의 글

미소핵검사를 하는데 도와주신 동신전문대 김재민 교수, 전남의대 신종희 교수 및 전남대병원 핵의학과 최근희 연구원께 감사드립니다.

REFERENCES

- 1) Brinker H, Hansen HS, Andersen AP: *Induction of leukaemia by ¹³¹I treatment of thyroid carcinoma. Br J Cancer* 28:232, 1973
- 2) Beierwaltes WH: *The treatment of hyperthyroidism with iodine-131. Semin Nucl Med* 8:95, 1978
- 3) Saenger EL, Thoma GE, Tompkins EA: *Incidence of leukemia following treatment of hyperthyroidism. Preliminary report of the Cooperative Thyrotoxicosis Therapy Follow-up Study. JAMA* 205:855, 1968
- 4) 김지열, 범희승, 최근희, 김희경, 위인선 : 생쥐골수 세포 미소핵검사에 의한 ³²P-colloid의 유전독성에 관한 연구. *대한핵의학회지* 26:11-15, 1992
- 5) Ledebur MV, Schmid W: *The micronucleus test methodological aspects. Mut Res* 19:109-117, 1973
- 6) Countryman PI, Heddle JA: *The production of micronuclei from chromosome aberrations irradiated cultures of human lymphocytes. Mut Res* 41:321-332, 1976
- 7) Albanese R, Middleton BJ: *The assessment of micronucleated polychromatic erythrocytes in rat bone marrow. Mut Res* 182:323-332, 1987
- 8) Henning UGG, Rudd NL, Hoar DI: *Kinetochore immunofluorescence in micronuclei. Mut Res* 203:405-414, 1988
- 9) Fenech M, Morley AA: *Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mut Res* 147:29-36, 1985
- 10) Degrassi F, Tanzarella C: *Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: A new assay for the detection of aneuploidy. Mut Res* 203:339-345, 1988
- 11) Pascoe SA, Stemp G: *A modified method and staining technique for the in vitro micronucleus test in human lymphocytes using cytochalasin B. Mut Res* 234:253-255, 1990
- 12) Wakata A, Sasaki MS: *Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured chinese hamster cells: Comparison with types and rates of chromosome aberrations. Mut Res* 190:51-57, 1987
- 13) Nito S, Ariyuki F, Okaniwa A: *Spontaneous expulsion of micronuclei by enucleation in the micronucleus assay. Mut Res* 207:185-192, 1988
- 14) Ramalho A, Sunjevaric I, Natarajan AT: *Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of -ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: Comparison of two methods. Mut Res* 207:141-146, 1988
- 15) Henry MS, Lupo S, Szab KT: *Sex difference in sensitivity to cytogenetic effects of ethyl methanesulfonate in mice demonstrated by the micronucleus test. Mut Res* 69:385-387, 1980
- 16) Meyne J, Legator MS: *Sex-related differences in cytogenetic effects of benzene in the bone marrow of swiss mice. Environmental Mutagen* 2:43-50, 1980
- 17) Adler ID: *Cytogenetic tests in mammals In: Venitt S, Parry JM (Ed.) Mutagenicity testing, IRL Press, Oxford, pp 187-306, 1984*
- 18) Heddle JA: *A rapid in vivo test for chromosome damage. Mut Res* 18:187-190, 1973
- 19) Timothy L, Robert D, Gardiner A, Lavin F: *Genotoxicity of analgesis compounds assessed by an in vitro micronucleus assay. Mut Res* 189:299-306, 1987