

## 마우스 말초혈액 망상적혈구를 이용한 Mitomycin C의 소핵생성효과

허문영\*, 류재천\*\*

\*강원대학교 약학대학, \*\*한국과학기술원 도핑컨트롤센터  
(1996. 2. 10 접수)

## The micronucleus formation in peripheral blood of mitomycin C-treated mice using supravital staining with acridine orange

Moon Young Heo\*, Jae-Chun Ryu\*\*

\*College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea  
\*\*Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 130-650, Korea

**ABSTRACT :** In this study, the micronucleus test with peripheral blood using acridine orange coated slides was evaluated in mice treated with mitomycin C(MMC) at doses of 0.5, 1.0 and 1.5 mg/kg body weight. The peripheral bloods were obtained at 0, 24, 48 and 72h after treatment. The frequencies of micronucleated reticulocytes(MNRET) in the MMC-treated groups increased dose-dependently, and showed a peak time at 48h after treatment. We also performed the sex differences of MNRET frequency in 0.5 mg/kg MMC treated group, and we observed no sex differences in this experiment. And we evaluated the usefulness of a direct acting clastogen, N-methyl-N-nitrosourea and a indirect acting clastogen, benzo(a) pyrene as the positive control in this supravital micronucleus test. They also caused a significant increase in MNRET frequencies. These results suggest that the supravital staining micronucleus test using MNRET can be useful tool to evaluate the quantitative and qualitative assessment of genotoxicity *in vivo* compared to classical *in vivo* micronucleus test using bone-marrow cells.

**Keywords :** Micronucleus test, Supravital staining, Micronucleated reticulocyte. Mitomycin C

### 서 론

1975년도에 Schmid<sup>1)</sup>가 처음으로 소핵시험을 제창한 이래 1980년대부터 여러나라와 각종 국제기관에 의해 화학물질등의 안전성평가를 위한 guideline이 제정되면서부터 소핵시험이 변이원성시험의 하나로서 채택되었다. 지금까지 마우스골수를 이용한 소핵시험은 사용동물의 성, 계통, 또는 피검물질의 투여경로, 투여회수등이 다양하게 검토되어 유전독성 지표로서의 비교적 신뢰성이 높은 시험법으로 널리 활용되고 있다. 특히 소핵시험은 *in vivo*수준에서 염색체이상유발성을 추정하는 시험으로서 다양한 핵형을 가진 생물에게 적용가능하

고, 시험에 걸리는 시간이 짧고, 비교적 background가 안정하기 때문에 유전독성시험법에서 중요한 위치를 점하고 있다.

기존의 소핵시험에서 골수세포의 도말표본을 관찰할때 가장 문제가 되고 있는 것은 artifact이다. 특히 랫트골수세포의 도말시 비만세포가 파괴되어 세포질중에 과립이 분산되게 되면 Giemsa염색시 소핵과 유사하게 보이게되어 구별하기 힘들다. 또한 RNA성 과립도 실제 소핵처럼 보인다. 한편 polychromatic erythrocyte와 norchromatic erythrocyte의 Giemsa 염색에 의한 구별도 용이하지않다. 따라서 현행 마우스골수소핵시험을 개선해야할 필요가 커지고 있다.

일본의 Hayashi group<sup>2)</sup>에서는 artifact 를 구별하기 위한 방

법으로서 DNA와 특이적으로 반응하는 acridine orange(AO)형 광염색법을 개발했다. 이 방법으로는 골수세포 대신에 말초혈액도 이용가능하여 망상적혈구(reticulocyte)에 supravital staining을 실시하여 망상적혈구를 적색형광을 발하는 망상구조로 식별하고 동시에 황록색 형광을 발하는 소핵을 검출하는 방법이 개발되었다. 이 방법은 말초혈액의 소량을 사용하기 때문에 동물을 죽이지 않고 경시적으로 채혈하여 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated reticulocyte)를 관찰하는 방법으로서 매우 선택성이 높다. 따라서 이 방법이 최근에 OECD에 채택되어 활용될 전망이므로 우리나라에서도 기반기술을 확보해 놓아야 한다.

이에 본 연구에서는 mitomycin C를 사용하여 *in vivo* supravital micronucleus assay의 시험법확립을 위한 여러가지 시험을 실시한 결과 기존의 골수세포를 이용한 소핵시험보다 여러가지 면에서 활용가치가 높다고 판단되어 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. *in vivo* supravital staining micronucleus 시험법

#### ..1 시험동물

시험동물은 6~8주령의 20~25 g의 ICR마우스를 사용하였으며 온도  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 형광등 명암 12시간간격 교대의 사육환경에서 보통 5마리씩 케이지에 넣어 사육하였다. 사료는 삼양사료의 실험동물용 사료를 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 수돗물도 자유로이 공급하였다.

#### 1.2 시약 및 장치

Mitomycin C, benzo(a)pyrene, N-methyl-N-nitrosourea, corn oil, olive oil은 Sigma사에서 구입하였다. 형광현미경은 Olympus사제 BH-2를 사용하였다.

#### 1.3 검체의 투여

검체의 조제시 용매는 검체가 수용성일 경우는 생리식염수 또는 증류수로 용해시키며, 지용성일 경우에는 corn oil 또는 olive oil을 사용하였다. 검체가 난용성일 경우에는 0.5% 카르복시 메칠셀룰로오즈 나트륨 (CMC)수용액등에 분산시켰다. 투여경로는 일반적으로 복강투여로 하였으며 시험물질의 투여농도는 실험목적에 알맞게 설정하였다. 투여횟수는 1회 투여하며, 1회 투여후 일정시간 후에 마우스 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취하고 표본을 제작하였다. 본 시험에 있어서의 음성대조군은 원칙적으로 용매대조군으로 하고 양성대조물질로

서는 Mitomycin C(MMC)와 같은 기지의 소핵유발물질을 사용하였다. 시험동물의 수는 1군당 최소한 5마리를 원칙으로 하였다.

#### 1.4 혈액채취 및 도말표본 제작법<sup>3)</sup>

Acridine orange(AO) 용액(1 mg/ml) 10 ul을  $70^\circ\text{C}$ 의 slide warmer상의 slide glass위에 균일하게 도포하였다. Acridine orange 로 도포된 slide glass를 공기중에서 건조시키고, 마우스의 꼬리정맥으로부터 주사기를 이용하여 말초혈액을 취한 후, 그중 5 ul를 slide glass에 떨어뜨리고 cover glass 로 덮었다. Cell이 고정될 때까지 약 2시간 정도 방치한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 마우스 1개체당 적색을 띠는 1,000개의 망상적혈구(reticulocyte,RET)를 관찰하여 그 중에서 초록색 형광을 띠는 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated reticulocyte, MNRET)의 갯수를 산출한 것을 소핵생성빈도로 하였다. 이때 관찰한 망상적혈구는 적어도 적색의 형광이 선상으로 보이는 것(III형) 이상을 대상으로 하였다.<sup>4)</sup>

### 2 Acridine Orange 염색후 scoring time에 따른 소핵생성빈도의 변화

MMC 1 mg/kg을 복강주사후 48시간에 마우스의 혈액을 채취하여 AO용액이 코팅된 슬라이드상에 혈액을 떨어뜨린 후 1, 2, 6, 12, 24시간 후에 표본을 관찰하여 표본제작후 scoring time에 따른 소핵생성빈도의 변화를 관찰하였다.

### 3. Mitomycin C에 의한 소핵생성의 경시변화

MMC 1 mg/kg 복강투여 후 각각 24, 48, 54, 60, 66, 72시간 후에 생성된 MNRET의 빈도를 관찰하여 경시변화를 조사하였다.

### 4. Mitomycin C에 의한 소핵생성의 용량반응관계

MMC 0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/kg 복강투여에 따른 소핵생성의 용량반응관계를 24, 48, 72시간에서 관찰하였다.

### 5. 소핵생성에 있어서 실험동물의 sex difference

MMC 0.5 mg/kg 복강투여후 0, 24, 48, 72시간에 있어서 ICR 숫컷과 암컷의 sex difference에 따른 소핵생성빈도의 차이를 관찰하였다. 한편, MMC 0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/kg 복강투여 후 ICR 숫컷과 암컷의 sex difference에 따른 소핵생성빈도의

차이를 관찰하였다.

## 6. 소핵생성에 있어서 vehicle의 영향

본 소핵시험을 이용한 항염색체손상시험모델확립을 위하여 각종 시험물질을 용해시키기 위해 사용되는 여러가지 용매의 사전투여시에 MMC유도 소핵생성에 미치는 영향을 검토하였다. Saline, corn oil 및 olive oil등을 7일간 0.1 ml/25 g 경구투여 후 MMC 1 mg/kg 복강주사하고 48시간 후에 표본을 제작하여 vehicle의 전투여가 MMC유도 소핵생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 7. 모델 발암물질들의 소핵생성

모델발암물질로서 1차 발암물질인 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 40 mg/kg, 2차 발암물질인 benzo(a)pyrene[B(a)p] 150 mg/kg 및 DNA cross-linking agent인 mitomycin C(MMC) 1 mg/kg을 각각 복강주사하여 48시간 후에 채혈하고 표본제작하여 소핵생성빈도를 비교하였다.

# 결 과

## 1. Acridine Orange 염색후 scoring time에 따른 소핵생성빈도의 변화

MMC 1 mg/kg 복강 주사 후 48시간에 마우스 꼬리정맥으로부터 채혈 후 AO coated slide상에서 염색시킨 후 1, 2, 6, 12, 24 시간에 각각 MNRET의 빈도를 관찰한 결과 Table 1과 같았다. 염색후 1시간에는 염색상태가 안정이 덜되어 비교적 관찰하기가 힘들었으나 2시간 이후 부터는 염색상태도 안정화 되었으며 측정치의 재현성도 비교적 양호하였다. 따라서 AO

**Table 1.** Time-response of MNRETs frequencies in different scoring time of supravital stained slides induced by single administration of MMC

Treatment (h) <sup>2</sup>	MNRETs/1,000 RET, <sup>1</sup>		
	Exp 1	Exp 2	mean ± SE
1	12	18	15.0±3.0
2	10	21	15.5±5.5
6	19	15	17.0±2.0
12	15	17	16.0±1.0
24	22	16	19.0±3.0

<sup>1</sup>1,000 RETs were analyzed per each slide.

<sup>2</sup>Peripheral blood was collected 48 h after MMC(1 mg/kg, i. p.) injection.

염색후 2시간 이후 부터 관찰하면 별 문제가 없다고 판단되었으며 slide의 보관은 냉장보관하였다.

## 2. Mitomycin C에 의한 소핵생성의 경시변화

MMC 1 mg/kg 투여 후 각각 24, 48, 54, 60, 66, 72시간 후에 생성된 MNRET의 빈도를 조사한 바 투여후 점차 증가하다가 48시간에 가장 높은 빈도를 나타내었다(Table 2). 그후 점차 감소되어 72시간에는 매우 낮아졌다. 따라서 MMC의 경우 투여후 48시간에 MNRET의 최대생성빈도를 나타내는 물질로 판단되었다.

## 3. Mitomycin C에 의한 소핵생성의 용량-반응관계

MMC 투여에 따른 소핵생성의 용량-반응관계를 24, 48, 72시간에서 관찰하였다. Table 3에 결과를 나타낸 것처럼 각 채취시간에서 0.5, 1.0, 1.5 mg/kg의 용량에 따라 양호한 용량-반응관계를 나타내었다.

## 4. 소핵생성에 있어서의 sex difference

4.1 소핵생성의 경시변화에 있어서의 sex difference MMC 0.5 mg/kg 복강투여후 0, 24, 48, 72시간에 있어서 ICR 숫컷과 암컷의 sex difference에 따른 소핵생성빈도의 차이를 Table 4에 나타내었다. 숫컷과 암컷간의 MNRET생성빈도는 통계학적으로 차이가 나타나지 않았다.

## 4.2 소핵생성의 용량-반응관계에 있어서의 sex difference

MMC 0, 0.5, 1.0, 1.5mg/kg 복강투여후 ICR 숫컷과 암컷의 sex difference에 따른 소핵생성빈도의 차이를 Table 5에 나타

**Table 2.** Time-response of frequencies of MNRETs induced by a single i.p. administration of MMC

Treatment (h) <sup>2</sup>	MNRETs/1,000 RET, <sup>1</sup>					
	individual values					mean ± SE
0	3,	1,	4,	5,	0	2.6±0.9
24	5,	3,	7,	5,	7	5.4±0.8
48	29,	26,	32,	22,	28	27.4±1.7
54	28,	23,	28,	25,	23	25.4±1.1
60	15,	19,	15,	15,	23	17.4±1.6
66	11,	8,	11,	11,	9	10.0±0.6
72	9,	9,	6,	4,	8	7.2±1.0

<sup>1</sup>1,000 RETs were analyzed per each animal. Peripheral blood was collected 0-72 h after MMC injection.

<sup>2</sup>MMC(1 mg/kg, i.p.) was intraperitoneally injected.

내었다. 숫컷과 암컷간의 MNRET생성빈도는 통계학적으로 차이가 나타나지 않았다.

MNU의 경우 40 mg/kg에서 37.4, B(a)p의 경우 150 mg/kg에서 7.4를 나타내었다.

5. 모델 발암물질들의 소핵생성

모델발암물질로서 1차발암물질인 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 40 mg/kg, 2차발암물질인 benzo(a)pyrene[B(a)p] 150 mg/kg 및 DNA cross-linking agent인 mitomycin C(MMC) 1 mg/kg을 각각 복강주사하여 48시간 후에 채혈하고 표본제작하여 소핵생성빈도를 비교한 결과를 Table 6에 나타내었다. 1000 RET당 MNRET빈도가 MMC의 경우 1 mg/kg에서 26.2,

6. 소핵생성에 있어서 vehicle의 영향

Vehicle의 전투여가 MMC유도 소핵생성에 미치는 영향을 Table 7에 나타내었다. 7일간 Saline을 투여했을 때는 MMC유도 소핵생성에 약간의 감소가 있었지만 통계적인 유의성은 없었다. Corn oil과 olive oil을 투여했을 때는 소핵생성의 감소효과가 나타났으며 corn oil의 경우 54시간에서, olive oil의 경우 48시간에서 유의성있는 감소효과가 나타났다.

**Table 3.** The frequencies of MNRETs induced by a single i.p. administration of MMC

Treatment <sup>2</sup> (mg/kg)	MNRETs/1,000 RET, <sup>1</sup>														
	24h						48h						72h		
	ind. val		mean ± SE				ind.val.		mean ± SE				ind.val		mean ± SE
0	4, 5, 4, 4	3	4.0±0.3				5, 3, 5, 3, 1	3.4±0.8				12, 3, 2, 4, 2	4.6±4.2		
0.5	7, 3, 8, 8, 4	4	6.0±2.3				15, 26, 16, 16, 18	18.2±4.5**				7, 3, 3, 8, 3	4.8±2.5		
1.0	4, 8, 12, 9, 12	12	9.0±1.5**				17, 30, 19, 23, 29	23.6±2.6**				10, 7, 10, 8, 9	8.8±0.6		
1.5	15, 14, 13, 16, 15	15	14.6±0.5**				36, 39, 29, 26, 31	32.2±2.4**				6, 7, 10, 16, 12	10.2±1.8		

<sup>1</sup>1,000 RETs were analyzed per each animal.

<sup>2</sup>MMC was intraperitoneally injected. Peripheral blood was collected at 24h, 48h and 72h after MMC injection.

\*,\*\*Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively (Student's t-test)

**Table 4.** Sex difference in the time-response of frequencies of MNRETs induced by a single i.p. administration of MMC

Treatment <sup>2</sup> (h)	MNRETs/1,000 RET, <sup>1</sup>													
	Male							Female						
	individual values				mean ± SE			individual values				mean ± SE		
0	0, 1, 2, 1, 0, 0	0.6±0.3			1, 0, 0, 1, 2, 1	0.8±0.3								
24	0, 1, 3, 1, 1, 2	1.3±0.4			1, 3, 2, 2, 0, 3	1.8±0.4								
48	14, 14, 10, 9, 18, 15	13.3±1.3**			10, 8, 19, 15, -, -	13.0±2.4**								
72	8, 5, 9, 10, 18, 15	10.8±1.3**			6, 4, 3, 7, 9, 13	7.0±1.4**								

<sup>1</sup>1,000 RETs were analyzed per each animal.

<sup>2</sup>MMC(0.5 mg/kg, i.p.) was intraperitoneally injected.

\*\*Significantly different from the control group at p<0.01 (Student's t-test)

**Table 5.** Sex difference in the dose-response of frequencies of MNRETs induced by a single i.p. administration of MMC(1 mg/kg)

Treatment <sup>2</sup> (mg/kg,i.p.)	MNRETs/1,000 RET, <sup>1</sup>													
	Male							Female						
	individual values				mean ± SE			individual values				mean ± SE		
0	2, 0, 2, 1, 0, 1	1.0±0.3			2, 1, 0, 0, 1, 3	1.1±0.4								
0.5	15, 26, 16, 1, 18, -	16.2±0.6**			9, 13, 5, 8, 10, 8	9.6±0.9**								
1.0	18, 22, 20, 21, 18, 22	20.1±0.7**			13, 25, 23, 18, 20, 16	19.1±1.8**								
1.5	28, 22, 26, 21, 24, 24	24.1±1.0**			32, 25, 33, 31, 23, 27	28.5±1.6**								

<sup>1</sup>1,000 RETs were analyzed per each animal.

<sup>2</sup>MMC(0.5 mg/kg, i.p.) was intraperitoneally injected.

\*\*Significantly different from the control group at p<0.01 (Student's t-test)

## 고 찰

지금까지 화학물질의 안전성평가기법 중 유전독성시험법들은 미생물을 이용한 Ames test와 *in vitro* 수준에서의 염색체이상 검출을 위한 chromosome aberration test 및 *in vivo*에서의 염색체 손상을 검출하기 위한 micronucleus test(소핵시험)이 시행되어오고있다. 그동안 *in vivo*수준에서의 micronucleus 시험은 마우스 골수세포(mouse bone-marrow cell)를 이용하여 수행되고 있는데, 주지하다시피 본 시험은 genetic endpoint의 관찰시 소핵이 아닌 artifact의 구별에 곤란한 점이 많아서 시험결과에 의심이 있게 된다. 따라서 이를 극복하기 위한 방법으로 개발된 supravital staining법을 이용한 말초혈액에서의 소핵시험이 OECD guideline document No.474로 추가되어서 활용될 전망이다. 그러므로 국내에서도 화학물질의 안전성평가시 이러한 최신 기반기술을 습득하고 빠른 시일내에 표준화 및 외국의 데이터와 harmonization할 필요가 있다. *in vivo* supravital micronucleus assay는 마우스나 랫트의 말초혈액에 acridine orange(AO)에 초생체염색을 실시하여 망상적혈구(reticulocyte, RET)를 형광현미경하 적색형광을 발하는 망상구조에 의해 식별하고 동시에 황록색형광을 발하는 소핵을 가진

망상적혈구(micronucleated reticulocyte, MNRET)를 검출하는 방법이다. Acridine orange는 DNA를 녹색, RNA는 적색형광을 나타내게하여 소핵과 기타 artifact를 쉽게 구별시켜준다.<sup>2)</sup>

따라서 기존의 골수세포(bone-marrow cell)의 Giemsa염색을 이용하는 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated erythrocyte, MNPCE)를 검출하는 방법보다 훨씬 소핵의 식별이 용이하고 시험법 또한 간편한 편이다. 본 연구에서 AO염색후 최적 형광현미경 관찰시기를 검토한 결과 염색직후 또는 1시간에는 염색상태가 안정되지않아 비교적 관찰하기어려웠으나 2시간 이후부터는 24시간까지 관찰하면 별 문제가 없는 것으로 판단되었다. 그러나 AO염색 슬라이드는 영구적인 보관이 불가능한 문제점이 있으나 냉동고(-20°C)에 보관하거나 메탄올에 고정시키면 장시간 보관이 가능하다고 보고되어 있다.<sup>3)</sup>

MMC에 의한 소핵생성의 경시변화는 48시간에서 가장 높은 빈도를 나타내었다. 일반적으로 골수세포에서는 36시간에서 가장 높은 빈도를 나타내는 것에 비하여 이보다 다소 지연된 48시간에서 가장 높은 빈도를 나타내는 것은 Hara등<sup>6)</sup>의 결과와 동일하였으며 이는 골수세포로부터 말초혈액으로 분화, 성숙되는데 시간이 걸리기 때문이며 대부분의 화학물질들이 말초혈액에서는 48시간에서 가장 높은 빈도를 나타내고 있다. MMC에 의한 소핵생성의 용량-반응관계를 관찰한 결과 24, 48, 72시간에서 모두 양호한 용량-반응관계를 나타내었으며 역시 모든 용량의 48시간에서 가장 빈도가 높았다. 한편, 소핵생성의 경시변화에 있어서 ICR 마우스의 성별에 따른 차이는 거의 나타나지 않았으며 용량반응관계에서도 유의성있는 차이가 나타나지 않았다. 또한, DNA cross-linking agent인 MMC 1 mg/kg, 1차 발암물질인 MNU 40 mg/kg, 또는 2차 발암물질인 B(a)p 150 mg/kg을 복강주사하여 소핵생성빈도를 비교관찰했을 때의 결과도 외국의 Collaborate study group of the micronucleus test(CSGMT)의 자료와 유사하였다.<sup>7)</sup> 또한,

**Table 6.** The clastogenic effect of model carcinogens

Treatment <sup>2</sup> (i.p.)	MNRETS/1,000 RETs <sup>1</sup>					mean ± S.E.
	individual value					
MNU 40 mg/kg	34,	29,	43,	44,	37	37.4 ± 2.80**
B(a)p 150 mg/kg	8,	7,	7,	8,	7	7.4 ± 0.24**
MMC 1 mg/kg	27,	31,	24,	25,	24	26.2 ± 1.32**

<sup>1</sup>1,000 reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETS was scored.

<sup>2</sup>Carcinogen was administered intraperitoneally.

\*\*Significantly different from the control group (1.0 ± 0.3) at p < 0.01 (Student's t-test)

**Table 7.** The vehicle effect on MMC-induced MNRETS

Treatment <sup>2</sup> (MMC 1 mg/kg, i.p.)	MNRETS/1,000 RETs <sup>1</sup>											
	48h					54h						
	ind. val.					mean ± SE						
None	22,	21,	26,	33,	19	24.4 ± 2.5	25,	21,	27,	-, -	2.3 ± 1.8	
Corn oil	22,	14,	21,	21,	-	19.5 ± 1.6	19,	18,	23,	21,	18	19.8 ± 1.0
Saline	26,	18,	26,	22,	22	22.8 ± 1.5	21,	23,	24,	22,	24	22.8 ± 0.6
Olive oil	21,	21,	19,	17,	19	19.4 ± 0.7*	24,	19,	18,	18,	20	19.8 ± 1.1

<sup>1</sup>1,000 RETs were analyzed per each animal. Peripheral blood was collected 48h and 54h after MMC injection.

<sup>2</sup>Vehicle (0.1 ml/25 g, p.o.) was administered orally for 7 days. Immediately after the last dose of vehicle, MMC (1 mg/kg, i.p.) was given.

\*Significantly different from no treatment group at p < 0.05 (Student's t-test)

*in vivo* supravital micronucleus assay를 anticlastogenic effect검정에 활용하기 위해서 anticlastogen의 용매로 자주 사용되는 saline, corn oil 및 olive oil의 7일 사전연속투여에 따른 MMC 유도 소핵생성효과에 미치는 영향을 검토하였다. corn oil과 olive oil투여군에서 각각 54, 48시간에서 다소의 유의성있는 감소가 나타났으나 saline투여군에서는 유의성있는 변화가 나타나지않았다. 따라서 향후 이들 용매를 사용하여 anticlastogenicity를 관찰하고자할 때는 이러한 vehicle effect를 고려하여 음성대조군등을 설정해야한다고 판단되었다. 본 연구에서 MMC를 사용하여 *in vivo* supravital micronucleus assay의 시험법확립을 위한 여러가지 시험을 실시한 결과 기존의 골수세포를 이용한 소핵시험보다 여러가지 면에서 활용가치가 높다고 판단되었다.본 소핵시험법의 장점으로서는 1) 동물을 도살하지않고 경시적변화를 관찰할 수 있으며, 다른 독성실험도 동시에 실시할 수 있다. 2) Type 0(erythroblast), type I, II,III,IV의 RET 및 mature erythrocyte로 적혈구의 성숙도를 구별할 수 있다. 3) 마우스 및 랫트도 사용할 수 있으며 랫트의 비만세포 과립을 구별할 수 있다. 4) 비교적 실험방법이 간단하며 재현성이 높다. 단점으로서는 1)슬라이드를 영구적으로 보관할 수 없다. 2) 자주 관찰대상 슬라이드상에서 양호한 관찰영역을 선택할 필요가 있다. 4) 시험물질에 의한 erythropoiesis의 저해를 평가하는 방법이 다소 어렵다.

결론적으로 마우스를 사용하는 *in vivo* supravital staining micronucleus assay는 화학물질들의 clastogenicity를 평가하는 데 매우 유용하며, 기존의 골수세포를 이용하는 소핵시험법을 대체할 수 있으며, dose-response와 time-response data를 함께 얻을 수 있기 때문에 이 분야의 연구에도 활용가치가 높다고 판단된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 95년도 보건의료기술개발사업연구비로 수행되었음을 밝히며,소핵시험을 위하여 수고해준 강원대학교 약학과 김수희, 서지에 양에게 감사드리는 바이다.

## 참고문헌

- Schmid, W.: The micronucleus test, *Mutation Res.*, **31**: 9-15, 1975.
- Hayashi, M., T. Sofuni, and M. Ishidate Jr.: An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, **120**: 241-247, 1983.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, and M. Ishidate Jr.: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.*, **245**: 245-249, 1990.
- Hayashi, M.: The micronucleus test, Scientist Publisher, Tokyo, pp86.
- Norppa, H., H. Heikanen, and K. Autio : Storage in methanol of smears intended for acridine orange staining, *Mutation Res.*, **308**: 115-116, 1994.
- Hara, M., S. Nakagawa, E. Fujioka, E. Ayukawa, and T. Izushi: Detection of micronuclei in peripheral blood of mitomycin C-treated mice using supravital staining with acridine orange, *Mutation Res.*, **278**: 175-179, 1992.
- The collaborative Study Group for the Micronucleus Test : Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, *Mutation Res.*, **278**: 83-98, 1992.