

염증세포주를 이용한 생체재료 용출물의 체외 생체적합성 평가

신연호¹, 송계용¹, 서민지², 김성민², 박정극², 김동섭³, 박기정³, 허찬희³, 차지훈³, 서영권^{4*}

In vitro Biocompatibility Evaluation of Biomaterial-elution Using Inflammatory Cell Lines

Youn Ho Shin¹, Kye Yong Song¹, Min Ji Seo², Sung Min Kim², Jung Keug Park², Dong Sup Kim³, Ki Jung Park³, Chan Hoi Hur³, Ji Hun Cha³, and Young Kwon Seo^{4*}

접수: 2011년 5월 24일 / 게재승인: 2011년 6월 20일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Various biomaterials have been researched and have been developed for treatment of some disease through transplantation to body. They have been evaluated by *in vitro* cytotoxicity test using some skin-derived cell lines for prediction of their biocompatibility *in vivo*. However, the results of experiments using mesenchymal or epithelial cells could not be considered *in vivo* immune reaction. In this study, we evaluated the biomaterial-elution (elute from high density polyethylene film) using some cell lines (L929, Jurkat, U937) *in vitro*, and then that results were compared with *in vivo* results from guinea pig sensitization test. In sensitization test, saline and elution of syringe could not induce erythema, but only DNCB (hypersensitive chemical) induce erythema at guinea pig sensitization test. In cell experiment, the cytotoxicity results of inflammatory cells (Jurkat; T lymphocyte, U937; monocyte) was

no difference with L929 (fibroblast) in the overall trend. However, inflammatory cell lines were only secreted inflammatory cytokine (TNF- α , INF- γ) in some materials (biomaterial-elution, FAC, DNCB). And the biomaterial-elution did not have toxicity to the cells, but it induced the inflammatory cytokines in inflammatory cell lines only. So, we were predicted inflammatory reaction through the cytokine results of inflammatory cell lines, and it was more correlated with *in vivo* results than cytotoxicity test. Therefore, we suggested that the inflammatory cytokine assay using inflammatory cell lines are more effective method *in vitro* for evaluation of biocompatibility of biomaterials or chemicals.

Keywords: inflammation, biocompatibility, inflammatory cell line, fibroblast, cytokine

¹중앙대학교 병리학교실

¹Department of Pathology, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

²동국대학교 의생명공학과

²Department of Medical Biotechnology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

³한국식품의약품안전청

³Korea Food & Drug Administration, Chungbuk 363-951, Korea

⁴동국대학교 생명과학연구원

⁴Dongguk University Research Institute of Biotechnology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

Tel: +82-2-2260-3365, Fax: +82-2-2260-8534

e-mail: bioseo@dongguk.edu

1. 서론

알레르기 (allergy)는 인체에서 어떤 종류의 물질에 대한 항원항체반응의 표현으로 일어나는 특이적 감작성 과민증 (hypersensitivity)으로 항체의 종류에 따라 I, II, III, IV, V 형 다섯가지로 분류한다 [1-4]. 몇몇 단백질 및 화학물질 등은 알레르기성 접촉성 피부염, 부작용 등을 유발할 수 있으며, 알레르기성 접촉성 피부염은 항체가 거의 관여하지 않고 T 세포를 매개로 하는 지연형 과민반응에 의한 것으로 최근 밝혀졌다 [1,5].

최근 합성 및 천연의 원료를 이용한 화장품, 의약품, 기능

성 식품 등의 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 이들 성분의 피부 감작성 시험 (skin sensitization testing)은 독소의 평가에 채택된 실험동물인 기니아피그 (guinea pig)를 사용하고 있다 [3]. 기니아피그를 이용한 방법으로 특징적이고 폭넓게 사용되는 guinea pig maximisation test와 occluded patch test가 있다 [6,7]. 하지만 이 방법들은 독소 연구에는 잘 적용되고 있지만, 피부 감작성에 대한 세포 및 분자적 반응 기작을 이해하기는 어렵다 [3]. 이것을 보완하여 MEST (mouse ear swelling test), LLNA (murine local lymph node test) 등의 시험방법이 고안됐지만, 역시 인간과는 종이 다른 실험동물에 적용하는 것이다 [8,9]. OECD 지침서에는 피부 감작성시험에 대한 내용이 마련되어 있지만, 최근 세계적으로 실험동물에 대한 생명윤리 측면이 고려되면서부터 지침의 내용이 지속적으로 개선되고 있다 [10,11]. 그리고 지난 2009년 제 7차 유럽연합 화장품에 대한 훈령 (EU Cosmetics Directive)에 따르면 화장품 원료의 잠재적인 감작성 평가에 마우스, 기니아피그 등의 여러 실험동물들을 사용하는 것을 금지하였다. 그래서 많은 연구자들이 실험동물을 이용한 방법을 대체할 수 있는 방법을 개발하고 적용하려는 움직임이 세계적으로 나타나고 있으며, 염증과 관련된 세포들을 이용한 다양한 실험들이 등장하고 있는 추세이다 [12-16].

국내의 감작성시험 지침에 따르면 시험동물모델을 이용하여 의도기 및 원자재의 용출물에 대한 접촉감작성의 잠재성을 측정하기 위한 시험으로 미량의 용해물에 의한 알레르기 또는 감작반응을 평가한다고 명시되어 있다. 이때 지침에 따라 사용되는 시약은 생리식염수, 검액과 혼합하여 쓰이는 FAC (Freund's adjuvant, complete) 용액, 접촉성 피부염 유발물질인 DNCB (3,5-dinitrobenzoyl chloride)가 있다. 그리고 세포독성시험 (cytotoxicity)은 마우스 섬유모세포인 NCTC clone 929 (L929), 인간 섬유모세포인 MRC5 및 WI38, 인간 상피세포인 Vero, 햄스터 섬유모세포인 C-13 중 1개 이상의 세포주를 선택하여 시행하게 되어있다. 하지만 제시된 세포는 피부에서 유래된 불멸화 세포주이기 때문에 그 결과가 피부 감작성시험의 결과와 관련지어 판단하기 어렵다. 즉 피부에서 유래한 세포들로는 생체재료 및 화학물질의 생체 내 (in vivo) 염증반응을 예측할 수 없다는 것이다. 하지만 염증반응에 관여하는 세포들의 경우 염증반응 시 나타나는 다양한 사이토카인 (cytokine)의 양을 분석함으로써 예측이 가능할 것이다. 그리고 최근 유해한 화학물질이나 의약품 확인을 위한 T세포 매개의 생체 외 (in vitro) 분석법들에 대한 개발이 활발히 진행되고 있다 [13]. 따라서 지침에서 제시하고 있는 세포 외에 염증반응과 관련된 염증세포주를 생체적합성 평가를 위한 시험에 포함시켜야 평가하고자 하는 물질의 잠재적인 생체 내 피부 감작 및 염증반응의 가능성을 생체 외에서 유추할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 현재 국내 세포독성시험에 사용되고 있는 세포주인 L929 (섬유모세포)와 사용되지 않고 있는 인간 유래의 염증세포인 Jurkat (T 림프구), U937 (단구)을 평가하고자 하는 물질들을 세포배양액에 처리하여 배양하고, 상기 결과를 기니아피그 피부 감작성시험 결과와 연관지어 상호 비교분석하였다. 실험동물인 기니아피그에 준비된 검액들

(ISO 피부 감작성시험 지침에 제시된 시약들)을 처리하여 피부 감작성시험을 실시하고, 그 부위를 생검하여 조직검사한 후 조직변화 및 염증반응을 분석하였다. 또한 각 세포를 준비된 검액들을 첨가된 세포배양액을 이용하여 배양하였고, 배양이 완료된 후 세포형태 관찰, 세포감소를 측정, 염증관련 사이토카인 분비량 측정을 통해 검액 처리에 따른 변화를 평가하였다. 준비한 검액은 생체재료인 고밀도 폴리에틸렌 필름 (High density polyethylene film) 용출액과, 냉동보존제로 쓰이지만 세포독성이 있는 DMSO (dimethyl sulfoxide) 그리고 동물실험 지침에 제시된 FAC와 DNCB를 사용하였다. 그리고 동물실험과 세포배양 결과를 비교하여 독성 및 염증반응에 대한 생체 외 연관성을 비교분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포배양 및 세포독성 측정

세포독성실험을 위해 사용한 세포는 마우스 유래의 섬유모세포 세포주인 NCTC clone 929 (L929), 인간 유래의 T 림프구 세포주인 Jurkat과 단구 세포주인 U937이다. 모든 세포는 미국세포주은행 (ATCC; American Type Culture Collection)에서 분양받아 실험에 사용하였다.

L929는 부착배양 세포이며 3일마다 계대배양하였다. 배양 배지는 DMEM/10% FBS를 사용하였으며, 배양배지에 5% (v/v) DMSO (Sigma-Aldrich Inc., USA)를 첨가하여 냉동보존하였다. Jurkat과 U937은 부유배양 세포들이며 2-3일마다 계대배양하였다. 배양배지는 두 세포 모두 RPMI-1640/10% FBS (WelGENE Inc., Korea)를 사용하였으며, 배양배지에 5% (v/v) DMSO를 첨가하여 냉동보존하였다.

L929, Jurkat, U937 세포주들을 각 세포의 배양배지를 이용하여 1×10^5 cells/mL의 농도로 6웰 플레이트에 접종하였으며, 각 실험군당 3배수로 진행하였다. 세포접종 후 배양배지에 약 1 cm² 고밀도 폴리에틸렌 필름 (Hatano Research Institute, FDSC, Japan), 3% (v/v) DMSO, 0.1% (v/v) FAC, 0.01 mg/mL 및 0.1 mg/mL DNCB를 각각 처리하여 2일간 배양하였으며, 사용한 시약은 1% FAC (Sigma-Aldrich Inc., USA), DNCB (Sigma-Aldrich Inc., USA)이다. 각 세포주의 배양배지로 배양한 것을 대조군으로 하였다. 세포배양이 완료된 후 자동 세포수 측정기 (Scepter™ & 60 μm Tips, Millipore Corp., USA)를 이용하여 각 세포주의 총 세포수를 측정하였고, 대조군과 비교하여 상대적 세포 변화량을 관측하였다. 이때 L929는 부착배양 세포이므로 0.05% 트립신 (trypsin)을 사용하여 세포를 회수한 후 측정하였다.

2.2. 사이토카인 측정

세포배양이 완료된 후 각 세포주의 배양배지를 회수하여 사이토카인을 측정하였다. Jurkat과 U937은 부유배양 세포이므로 배양액과 세포를 모두 수거하여 원심분리 (800 rpm, 5분)로 세포 및 부유물을 침전시키고 배양배지만을 회수하였다. L929는 배양액만을 수거한 후 원심분리하여 부유물을 침전시켜 배양배지를 회수하였다. 회수한 배양배지는 tumor

necrosis factor- α (TNF- α) EASIA kit (KAC1751, BioSource, Belgium)와 interferon- γ (IFN- γ) ELISA kit (KHC4021, Invitrogen, USA)를 사용하여 분비된 TNF- α 와 IFN- γ 의 양을 측정하였다.

2.3. 피부 감작성시험 및 조직검사

기니아피그 (guinea pig hairless, albino)는 (주)대한바이오링크에서 공급받아서 사용하였다. 감작성시험은 생물학적 안전성 평가 시험에서 제시하는 방법에 따라 진행하였으며, 대조군은 아무런 처치도 하지 않은 것으로 하였다. 생리식염수, 폴리프로필렌 주사기 용출액 (생리식염수를 주사기에 충전한 후 72시간 동안 37°C 인큐베이터에 정치하여 회수한 용액), 1% (g/v) FAC 용액, 0.1% 및 1% DNCB (각 농도 (g/v)로 에탄올에 녹여 제조) 용액을 검액으로 사용하였다.

- ① 피내 유도단계: 기니아피그의 머리와 등 사이의 털을 제모하고 견갑골 내 부위 (intrascapular region)에 준비된 검액을 Fig. 4(A)의 a, b, c와 같이 혼합하고 0.1 mL씩 좌우대칭 (점선기준)으로 피내 주사하였다.
- ② 국소유도단계: 피내유도단계가 완료된 지 7일 후 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate, Biosesang Inc., Korea)를 도포한 뒤 바세린을 추가로 도포하였다. 그리고 24시간 후 피내 주사부위를 덮을 수 있도록 약 8 cm² 크기 (2 cm × 4 cm)의 첩포 (흡수성 거즈)를 이용하여 검액을 개별동물의 견갑골 내 부위에 각각 국소적으로 도포한 뒤 그 부위를 폐쇄드레싱하였다. 약 48시간이 후에 드레싱과 첩포를 제거하였다.
- ③ 유발단계: 국소유도단계후 2주 뒤에 처리하지 않은 부위 (옆구리)를 제모한 후 검액을 각각 국소적으로 적용하고, 폐쇄드레싱하였다. 그리고 24±2시간 후에 드레싱과 첩포를 제거하고 48시간 동안 적용부위를 관찰한 후 생검하였다.
- ④ 조직검사: 생검한 조직을 10%포르말린 (formaline) 용액에 12시간 이상 담가서 고정한 후 파라핀블록을 만들어 조직절편 슬라이드를 제작한 뒤 헤마톡실린-에오신 (hematoxylin and eosin) 염색을 실시하여 조직의 형태 변화 및 염증반응 정도를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 형태 관찰 및 세포독성검사

Fig. 1은 세포주들이 각 배양환경에서 배양되는 모습을 광학 현미경으로 촬영한 결과이다. L929는 부착배양 세포이며, Jurkat과 U937은 부유배양 세포이다. L929의 경우 고밀도 폴리에틸렌 필름 처리 (LB)는 대조군 (LA)과 유사한 세포의 형태와 분포가 관찰되었다. 3% DMSO 처리 (LC)는 세포외 기질의 분비형태가 달라져 상대적으로 대조군에 비하여 상대적으로 세포의 부피가 늘어난 것이 관찰되었다. 그리고 0.1% FAC (LD), 0.01 mg/mL DNCB (LE), 0.1 mg/mL DNCB (LF)의 처리는 대조군에 비해 세포막 (cell membrane)이 매끄럽지 못하고 세포질 (cytoplasm) 내에 공포 (vacuole)가 형성되어 있음이 관찰되었다. Jurkat (JA-JF)과 U937 (UA-UF)의 경우

고밀도 폴리에틸렌 필름 처리 (JB,UB)에서 관찰된 세포의 형태는 대조군 (JA,UA)과 유사하게 관찰되었다. 3% DMSO (JC,UC), 0.1% FAC (JD,UD), 0.01 mg/mL DNCB (JE,UE), 0.1 mg/mL DNCB (JF,UF) 처리는 대조군에 비하여 상대적으로 세포의 수가 감소되어 분포하고 있었으며, 세포의 형태 손상뿐만 아니라 사멸한 세포도 관찰되었다.

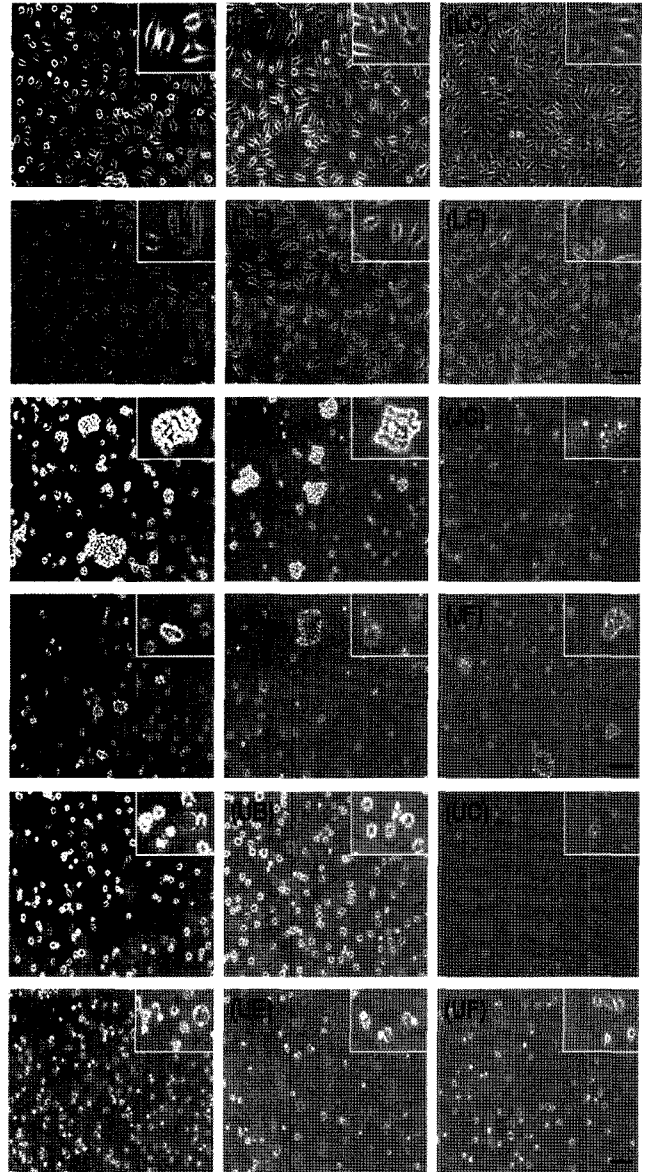


Fig. 1. The morphology of cultured cell lines for 2 days. (LA)-(LF) L929; skin fibroblast cell line, (JA)-(JF) Jurkat; T lymphocyte cell line, (UA)-(UF) U937; monocyte cell line, (A) Control, (B) 1 cm² high density polyethylene film, (C) 3% DMSO, (D) 0.1% FCA, (E) 0.01 mg/mL DNCB, (F) 0.1 mg/mL DNCB (bar = 100 µm).

Fig. 2는 세포배양이 완료된 후 생존하고 있는 세포의 수를 세포수 자동측정기로 측정하여 대조군과 비교하여 상대적인 세포감소율을 나타낸 그래프이다. Table 1은 세포독성등급 기준과 이 기준을 지표로 하여 Fig. 2의 결과를 수치화한 후 세포독성등급을 적용한 결과이다. 모든 세포에서 고밀도

폴리에틸렌 필름 처리는 세포독성이 없는 것 (0등급)으로 나타났다. 0.1% FAC 처리는 L929와 Jurkat에서 약간의 세포독성 (1등급)을 보이나, U937에서는 세포감소율이 약 9%로 기준 (10% 미만)보다 낮아 세포독성이 없는 것 (0등급)으로 나타났다. 3% DMSO의 처리는 L929에서 중간의 세포독성 (2등급)을 보였고, Jurkat과 U937에서는 심한 세포독성 (3등급)을 나타냈다. 0.01 mg/mL 및 0.1 mg/mL DNCB 처리는 모든 세포에서 중간의 세포독성 (2등급)을 보이는 것으로 나타났다. 검액에 대한 각 세포주들의 세포감소율의 경향은 유사한 결과를 보이고 있었다. 하지만 L929는 0.1% FAC를 제외한 다른 조건에서 Jurkat이나 U937에 비해 세포생존율이 상대적으로 높게 나타났다. 또한 DMSO의 처리는 L929 세포보다 Jurkat과 U937에서 심한 독성이 나타나고 있음이 관찰되었다. 반면 DNCB는 모든 세포에서 중간정도의 독성을 보이고 있다. 따라서 노출되는 물질에 따라 기원 (종 및 조직)이 다른 세포들이 반응하는 차이가 존재하는 것으로 나타났다. 또한 피부 감각성시험에서 FAC의 처리는 홍반이나 부종 같은 이상 반응이 외관으로는 보이지 않았지만, 조직검사서 상대적으로 미약한 염증반응을 보인 것과 유사하게 생체 외에서도 대체적으로 약간의 세포독성을 있는 것으로 나타나 생체 내외의 실험결과가 서로 연관성이 있는 것으로 나타났다.

Table 1. Standard of cytotoxicity level and decreasing rate of total cell number

세포독성등급	세포감소율 (대조군 대비)	Interpretation
0	0%	세포독성 없음
1	10%	약간의 세포독성
2	30%	중간정도의 세포독성
3	50%	심한 세포독성

	Film	DMSO	FAC	DNCB1	DNCB2
L929 세포감소율	1%	45%	29%	20%	33%
L929 세포독성등급	0	2	1	1	2
Jurkat 세포감소율	0%	73%	16%	39%	42%
Jurkat 세포독성등급	0	3	1	2	2
U937 세포감소율	2%	65%	9%	36%	43%
U937 세포독성등급	0	3	0	2	2

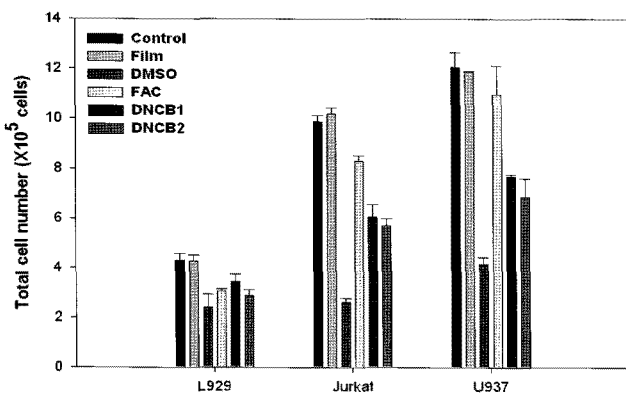


Fig. 2. The cell viability assay. Total cell number was counted after 2 days from initial stage (Control: no treatment, Film: 1 cm² high density polyethylene film, DMSO: 3% DMSO, FAC: 0.1% FCA, DNCB1: 0.01 mg/mL DNCB, DNCB2: 0.1 mg/mL DNCB).

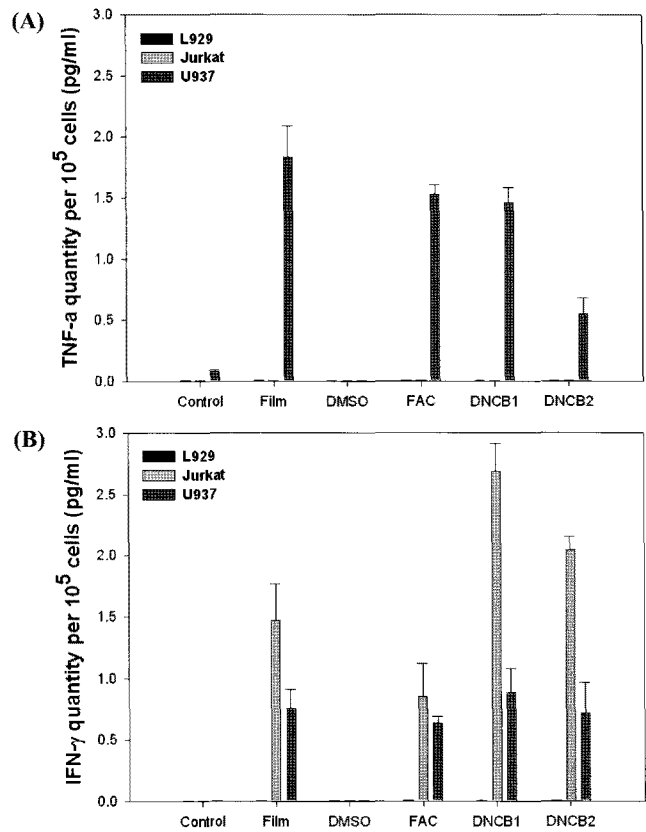


Fig. 3. The inflammatory cytokine assay with culture medium after cell culture for 2 days. (A) tumor necrosis factor alpha (TNF- α), (B) interferon gamma (IFN- γ). (Control: no treatment, Film: 1 cm² high density polyethylene film, DMSO: 3% DMSO, FAC: 0.1% FCA, DNCB1: 0.01 mg/mL DNCB, DNCB2: 0.1 mg/mL DNCB).

3.2. 염증반응 관련 사이토카인 측정

염증반응이 일어나면 활성화된 림프구 (lymphocyte) 및 대식세포 (macrophase)에서 생산 분비되는 TNF (tumor necrosis factor), IFN (interferon), IL (interleukin) 등의 사이토카인이 중요한 역할을 한다. 그래서 본 연구에서는 다양한 사이토카인 중 TNF- α 와 IFN- γ 를 선택하여 분비된 양을 측정하였다. TNF- α 는 주로 활성화된 단구 및 대식세포 등이 분비하며, 암세포를 죽일 뿐만 아니라 정상세포에도 작용하여 대식세포의 세균 살해작용, T세포의 활성화 유도, B세포의 항체생산을 위한 보조인자로서의 작용 등의 다양한 기능을 수행한다. IFN- γ 는 특화된 림프구 등에서 주로 분비되며, 항원인식세포 및 그 사이토카인 등에 의하여 영향을 받는다. 대식세포를 활성화 시키며, 자가면역 및 바이러스의 침입에 대하여 저항하도록 생체 내의 세포들을 자극하는 물질이다. 이와 같은 사이토카인 등이 증가하게 되면 염증부위의 혈관 확장과 혈관 투과성의 증가를 유도하여 Fig. 5 (E,F)와 같이 혈구세포의 증가 및 삼출이 일어난다 [17-19]. 그러므로 세포실험을 통하여 측정할 수 있는 사이토카인의 증가는 생체 내 염증반응을 예측할 수 있을 것으로 판단하였다.

TNF- α 의 분비는 단구나 대식세포에서 이루어지는데, 본 연구에서도 U937세포에서만 측정이 되었다 (Fig. 2(A)). 분비된 TNF- α 의 양은 고밀도 폴리에틸렌 필름, 0.1% FAC,

0.01 mg/mL DNCB, 0.1 mg/mL DNCB 처리군 순으로 나타났다. 반면에 3% DMSO 처리군에서는 측정되지 않았는데, 이러한 결과는 세포감소를 경향과 관련되었을 때 처리물질의 강한 세포독성으로 인한 총세포수의 감소 및 세포손상으로 인하여 기능을 상대적으로 상실했기 때문인 것으로 판단된다.

IFN- γ 의 분비도 염증세포에서 나타나는데, 본 연구에서도 L929에서는 측정되지 않았으며, Jurkat과 U937에서만 측정되었다 (Fig. 2(B)). Jurkat의 경우 0.01 mg/mL DNCB, 0.1 mg/mL DNCB, 고밀도 폴리에틸렌 필름, 0.1% FAC의 순으로 IFN- γ 의 분비량이 높게 나타났다. 그리고 U937에서는 분비된 IFN- γ 의 양이 고밀도 폴리에틸렌 필름, 0.1% FAC, 0.01 mg/mL DNCB, 0.1 mg/mL DNCB에서 유사하게 측정되었다. 이 결과도 처리물질의 강한 세포독성으로 인한 총세포수의 감소 및 세포손상으로 인하여 기능을 상대적으로 상실했기 때문인 것으로 판단된다.

상기 결과로부터 염증세포의 종류에 따라서 분비되는 사이토카인의 종류와 양이 달라지는 것을 관찰할 수 있었으며, 사이토카인이 분비된 네 실험군은 생체 내에서 염증반응을 유발 할 수 있는 것으로 나타났으며, 생체 내 결과에서 FAC, DNCB는 염증반응이 유발되었다. 그리고 폴리에틸렌이 생체 재료로 사용되어 외과적 처치를 통해 생체 내로 이식한 후 조직검사를 통해 이식부위를 관찰했을 때, 이식된 폴리에틸렌 조각 주위로 염증으로 인한 염증세포들의 침윤이 관찰된다는 것이 이미 앞선 연구들에 의해 알려졌다 [20-23]. 본 연구의 결과에서도 생체 내 반응과 마찬가지로 염증반응 관련 인자인 TNF- α 와 IFN- γ 의 분비가 모두 대조군 보다 높게 측정되었다. 그러나 고밀도 폴리에틸렌 필름은 FAC와는 다르게 생체 외 세포배양에서 세포수의 감소가 관찰되지 않았기 때문에 염증유발에 대한 가능성을 생체 외 세포배양을 통한 세포감소를 변화만으로는 알 수 없었다. 그러나 염증세포의 사이토카인 측정을 통해 세포독성이 거의 없는 물질이라 하더라도 생체 내에서 염증반응을 유발할 가능성을 생체 외에서 유추할 수 있었다. 그리고 약간의 세포독성 (1등급)이라도 있는 FAC와 DNCB의 처리는 L929를 제외한 Jurkat과 U937에서 염증관련 인자들이 대조군보다 높게 측정되어 생체 내 실험결과, 세포독성 결과, 사이토카인 측정 결과가 서로 연관성이 있음을 보여주고 있다. 그러므로 현재 생체적합성 평가에 이용되는 L929 세포주 등으로 실시한 세포독성검사만으로는 생체 내 염증반응과 상호 연관성이 부족하다고 판단되며, 염증세포를 통한 세포독성 및 염증관련 인자들의 발현에 대하여 추가적으로 확인한다면 생체 내의 결과에 보다 접근하여 예측할 수 있을 것이며, 이를 통해 동물실험의 전체적인 규모 및 반복되는 횟수를 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

3.3. 감각성시험 및 조직검사

Fig. 4은 실험동물인 기니아피그에 실시한 피부감각성시험의 결과로 육안검사에서 대조군 (B1), 생리식염수 (B2), 주사기 용출액 (B3), 1% FAC (B4)에서는 홍반 (erythema)이나 부종 (edema)이 관찰되지 않았으나, 0.1% DNCB (B5)와 1% DNCB (B6)에서는 홍반 (화살표)이 관찰되었다. 또한 홍반이 관찰된 두 실험군은 이미 피내유도단계 후반에 피내주사

한 부위에 심한 염증반응이 관찰되었다. 이후 피부감각성시험의 유발단계로 염증반응이 유도된 부위를 생검하여 헤마톡실린-에오신 염색을 통해 조직내 변화를 관찰하였다 (Fig. 5). 대조군 (A), 생리식염수 (B), 주사기 용출액 (C) 처리에서는 정상적인 피부의 조직이 관찰되었다. 하지만 0.1% DNCB (E)와 1% DNCB (F)의 처리에서는 극세포증 (acanthosis)으로 인해 표피를 구성하는 세포층이 대조군에 비해 증가했으며, 각화증 (hyperkeratosis)로 인해 피부 각질이 상대적으로 두껍고 단단해져 있었음을 확인할 수 있었다. 그리고 진피층에서 혈관이 확장되고 적혈구의 양이 증가되었으며 (화살표), 조직으로 일부 적혈구들이 삼출된 것도 관찰되었다 (E, F). 1% FAC (D) 처리의 경우 육안검사에서 이상은 관찰되지 않았으나, 조직검사에서는 표피중 및 소량의 적혈구 삼출이 확인되었다. 따라서 피부감각성시험을 통한 평가에서 실험동물의 외관의 육안검사뿐만 아니라 조직검사를 통한 피부조직의 형태변화와 혈구세포 및 염증세포들의 분포 변화도 함께 고려되어야 보다 정확한 평가를 내릴 수 있을 것으로 판단된다.

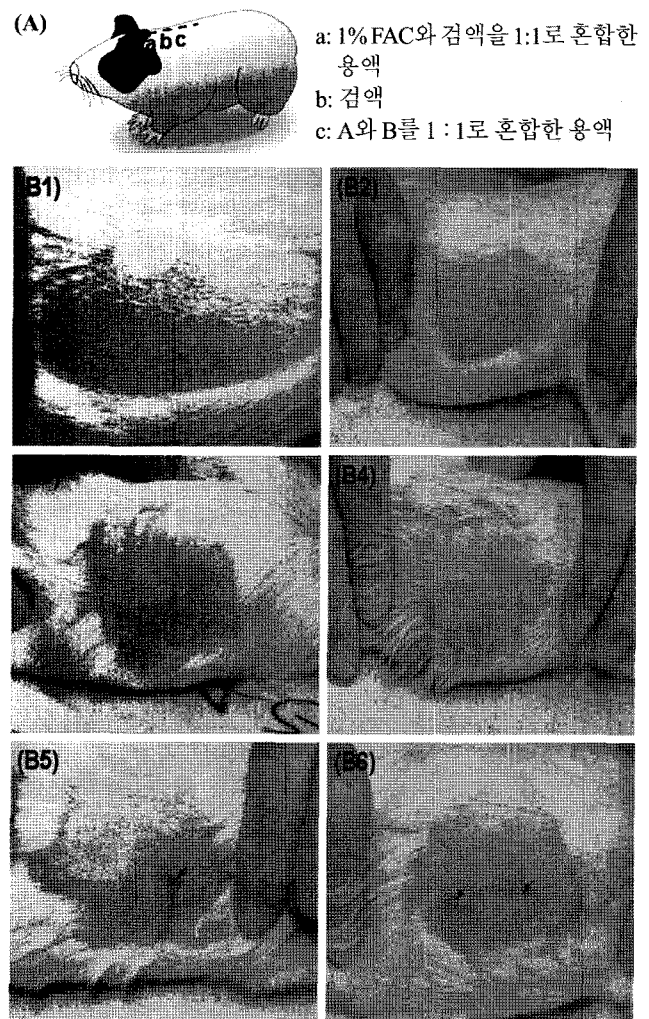


Fig. 4. Skin sensitization test. Description of intradermal inducing state (A) and the results of guinea pig skin sensitization test after 28 days (B). (B1) control, (B2) saline, (B3) elution from syringe, (B4) 1% FAC, (B5) 0.1% DNCB, (B6) 1% DNCB (arrow: erythema).

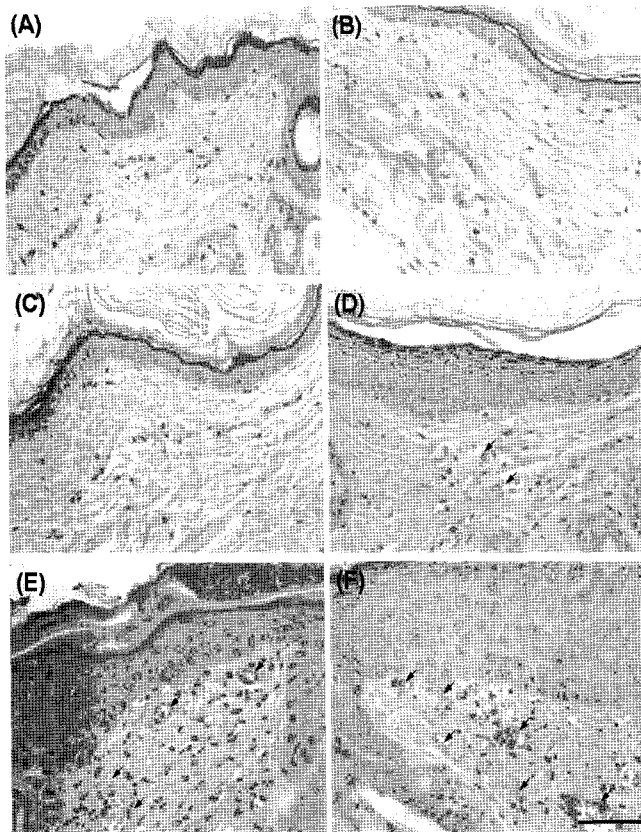


Fig. 5. The immunohistology result of guinea pig skin by hematoxylin and eosin stain. The skin biopsy was implemented after 28 days from intradermal inducing state. Acanthosis (D-F), hyperkeratosis (E,F) and vasodilatation (D-F) were arisen in FAC and DNCB treatment group. (A) control, (B) saline, (C) elution from syringe, (D) 1% FAC, (E) 0.1% DNCB, (F) 1% DNCB (arrow = vasodilatation and red blood cells, bar = 50 μm).

4. 결론

생물학적안전성 평가에 허용되고 있는 다양한 세포주 중 피부 섬유모세포 세포주, 평가에 사용되지 않고 있는 염증세포주를 각각 배양하여 피부 감작성시험 및 세포독성검사와의 연관성을 분석하고, 상기 결과와 사이토카인 분석을 추가로 실시하여 생체 외 실험을 통한 생체 내 결과에 대한 예측 가능성을 확인하고자 하였다. 피부 감작성시험 결과 생리식염수나 주사기 용출액 처리는 육안검사 및 조직검사에서 어떠한 이상증상이나 염증이 관찰되지 않았지만, FAC 처리는 조직 검사에서만 미약한 염증반응이 관찰되었으며, DNCB 처리는 홍반 및 염증반응을 유도하는 것이 관찰되었다. 세포감소율 측정을 통한 세포독성평가에서 섬유모세포인 L929와 염증세포인 Jurkat과 U937의 결과는 전체적으로 유사한 경향을 보였지만, DMSO나 FAC 처리에서 차이를 보여 세포마다 독성물질에 반응하는 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 생체 내에 직접 이식하였을 경우 염증반응을 유발하는 고밀도 폴리에틸렌 필름은 생체 외에서 세포독성이 전혀 나타나지 않았지만, 염증반응과 관련된 사이토카인 (TNF-α, IFN-γ)

이 대조군에 비하여 높게 분비되었음을 염증세포를 통해 확인할 수 있었다. 그러나 섬유모세포는 염증관련 사이토카인을 거의 측정할 수 없어서 생체 내 염증반응을 예측할 수 없었다. 그리고 세포독성평가와 마찬가지로 세포주마다 사이토카인 분비의 경향이 차이를 보이고 있음을 확인할 수 있었다. 결론적으로 섬유모세포 등을 이용한 세포독성평가만으로 생체 외에서 명확하게 생체 내 염증반응을 예측할 수 없었으며, 염증세포주를 이용한 사이토카인 분석을 추가할 경우 예측이 가능한 것으로 나타났다. 따라서 동물복지로 인한 동물실험의 규제가 강화되고 있는 시점에서 생체 외 평가에서 염증세포주를 이용한 염증 관련 사이토카인 분석이 추가된다면 생체 외에서 생체 내 염증반응을 예측할 수 있을 뿐만 아니라 동물실험의 규모도 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다.

감사

이 연구는 식품의약품안전청 용역연구개발과제 “의약품 주입기의 평가가이드라인 개발에 관한 연구 (10172의료기415)”에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

1. Wikipedia, the free encyclopedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/Allergy>.(2011).
2. Kimber, I., J. S. Pichowski, and C. J. Betts, et al. (2001) Alternative approaches to the identification and characterization of chemical allergens. *Toxicol. In Vitro* 15: 307-312.
3. Steiling, W., D. Basketter, and K. Berthold, et al. (2001) Skin sensitisation testing-new perspectives and recommendations. *Food Chem. Toxicol.* 39: 293-301.
4. Kay, A. B. (2000) Overview of ‘allergy and allergic diseases: with a view to the future’. *Br. Med. Bull.* 56: 843-864.
5. Cavani, A., C. Albanesi, and C. Traidl, et al. (2001) Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends Immunol.* 22: 118-120.
6. Buehler, E. V. (1965) Delayed Contact Hypersensitivity in the Guinea Pig. *Arch. Dermatol.* 91: 171-177.
7. Magnusson, B. and A. M. Kligman (1970) *Allergic contact dermatitis in the guinea pig*. Illinois: Charles C. Thomas. Springfield.
8. Gad, S. C., B. J. Dunn, and D. W. Dobbs, et al. (1986) Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84: 93-114.
9. Kimber, I., R. J. Dearman, and E. W. Scholes, et al. (1994) The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology* 93: 13-31.
10. *OECD guideline for testing of chemicals -skin sensitisation*. 1992.
11. Sandøe, P., S. B. Christiansen, and M. C. Appleby (2003) Farm animal welfare: the interaction of ethical questions and animal welfare science. *Animal Welfare* 12: 10.
12. Collins, F. S., G. M. Gray, and J. R. Bucher (2008) Toxicology. Transforming environmental health protection. *Science* 319: 906-907.

13. Martin, S. F., P. R. Esser, and S. Schmucker, et al. (2010) T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of *in vitro* assays. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 4171-4184.
14. Krasteva, M., J. Peguet-Navarro, and C. Moulon, et al. (1996) *In vitro* primary sensitization of hapten-specific T cells by cultured human epidermal Langerhans S. F. Martin et al cells - a screening predictive assay for contact sensitizers. *Clin. Exp. Allergy* 26: 563-570.
15. Rougier, N., G. Redziniak, and D. Mougou, et al. (2000) *In vitro* evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using Langerhans-like dendritic cells and autologous T cells. *Toxicology* 145: 73-82.
16. Moed, H., M. von Blomberg, and D. P. Bruynzeel, et al. (2005) Improved detection of allergen-specific T-cell responses in allergic contact dermatitis through the addition of 'cytokine cocktails'. *Exp. Dermatol.* 14: 634-640.
17. Song, K. Y., M. K. Kim, and J. G. Chi (2007) *Core Pathology*. 2nd ed., pp. 45-69. Korea Medical Book, Korea.
18. Barbara, J. A., X. Van ostade, and A. Lopez (1996) Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol. Cell Biol.* 74: 434-443.
19. Schroder, K., P. J. Hertzog, and T. Ravasi, et al. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-189.
20. Masui, T., S. Sakano, and Y. Hasegawa, et al. (2005) Expression of inflammatory cytokines, RANKL and OPG induced by titanium, cobalt-chromium and polyethylene particles. *Biomaterials* 26: 1695-1702.
21. Bosetti, M., L. Zanardi, and P. Bracco, et al. (2003) *In vitro* evaluation of the inflammatory activity of ultra-high molecular weight polyethylene. *Biomaterials* 24: 1419-1426.
22. Holding, C. A., D. M. Findlay, and R. Stamenkov, et al. (2006) The correlation of RANK, RANKL and TNFalpha expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implants. *Biomaterials* 27: 5212- 5219.
23. Warashina, H., S. Sakano, and S. Kitamura, et al. (2003) Biological reaction to alumina, zirconia, titanium and polyethylene particles implanted onto murine calvaria. *Biomaterials* 24: 3655-3661.