

Microbioassay에 의한 환경독성 평가

성균관대학교 약학부 정 규 혁

1. 서론

환경문제의 접근을 연대별로 살펴보면 1950년대와 그 이전에는 산업화와 더불어 생태 독성문제가 대두되었으나 적합한 평가기법 및 정책의 부족으로 대응이 제한적이었다. 1960년대에 Fish bioassay 기법이 사용되면서 산업유출수 및 유해물질의 측정이 가능하게 되었으며 1970년대에는 60년대의 bioanalytical data 및 정보에 따라 여러 문제를 인식하여 국가별 환경관리 부처 신설과 환경오염방지를 강조하기 시작하였다. 1980년대에 접어들면서 종합적인 생물화학적 생태독성 정책과 유해성 평가체계의 도입이 이루어지고 만성적 환경영향을 다양한 생물체 수준에서 시험하게 되었다. 1990년대에는 비용절감이 되는 microscale toxicity test의 개발과 적용으로 환경 독성평가의 획기적인 발전이 이루어지고 이들 방법이 축소화, 신속화, 자동화의 장점을 지니게 됨으로써 환경모니터링과 환경질의 개선에 유용한 도구로 활용되게 되었다.

이전의 전형적 환경오염 분석은 건강영향을 평가하는 방법으로는 미흡하다는 우려가 증가되고 오염원인으로 의심되는 모든 화학물질을 분석하기에는 고비용이 소요될 뿐만 아니라 신뢰도가 낮다고 지적되고 있다. 환경오염이 증가되고 다양화되면서 실질적 접근의 필요성이 제기되었던 것이다. 또한 화학적 분석법 단일로는 toxicity response와 bioavailability의 복합적 예측이 불가능하다. 따라서 환경오염평가에 small-scale 접근방식의 필요성이 대두되었으며 진보된 분자생물학적 기법의 환경분석에의 적용이 가능하게 되면서 단기간이 소요되는 다양한 bioassay를 우선적으로 screening에 사용하는 것이 비용을 절감하는 방법 중의 하나임이 입증되고 있다. 특히 이러한 생물학적 측정법과 물리화학적 측정법의 총합적 이용이 hazard assessment, environmental quality control 및 monitoring에 필수적 요건이 되고 있다.

Bioassay기법에 의한 환경오염의 monitoring은 분석화학적으로 불특정물질을 포함하여 환경에 존재하는 대부분의 물질에 의한 위해성을 평가할 수 있으며 환경매체 중 수많은 종류의 화학물질 간의 상호 작용 즉 상승 또는 길항효과를 포함한 복합독성을 평가하는 수단이 된다. 또한 환경 중에서 분해되어 생성되는 여러 분해 산물의 독성을 종합적으로 평가할 수도 있다. 특히 microbioassay는 환경오염으로 인한 생체내 각종 반응 중 분자수준의 생화학적 변화를 정량적으로 평가함으로써 조기에 위해성을 탐색할 수 있다. 즉, 세포수준의 유기체에 환경 시료를 노출시켜 특이적인 독성 영향을 평가하는 기법이라고 할 수 있으며 microbiotest, microbioassay, microscale test, second-generation biotest 등으로 불리기도 한다. 생물체가 환경오염물질에 노출되면 초기에는 생물체의 체내 대사에 의하여 오염물질의 대사체가 생성되기 시작하고, 여러 효소계의 변화가 나타나게 되며, 유전 및 세포 독성학적인 변화가 일어나고 병리학적인 변화에 이어서 최종적으로 생물체의 개체, 군집, 다양성의 변화가 나타나게 된다. 최근의 세포배양 생화학적 microbioassay기법에 의한 오염도 평가는 주로 병변이 유발되기 이전의 초기 노출단계를 평가하는 사전예보 및 예방의

의미를 가지게 된다 (Fig. 1. 참조). Microbioassay는 다양한 오염물질의 종류와 노출량 및 독성효과를 정량적으로 평가할 수 있다는 장점으로 인하여 bioanalytical technique으로서 정립되면서 매우 신속히 확대되는 분야가 되고 있다. 특히 이들 방법은 특이적 영향을 측정하는 특징과 더불어 cost-effective environmental program을 제공함으로써 향상된 환경보호 및 보전에 기여하고 있다.

Bioassay에는 whole animal을 이용하는 in vivo실험, 각종 cell line을 이용한 in vitro 실험 및 in vivo와 in vitro의 단점을 보완할 수 있는 어류의 primary culture를 이용한 실험방법이 있다. 현재 whole animal을 이용하는 실험의 경우에는 비용, 시간 및 윤리적인 이유로 지양하는 추세가 높아, in vitro 및 primary culture system을 이용하는 bioassay가 주로 환경오염물질을 탐색하는 기법으로 많이 이용하고자하는 추세이다.

Whole-organism을 이용하여 실험하는 방법에는 Algae, Microalgae, Protozoa, Invertebrates, Teleosts, Amphibian 등이 이용되고 있다. 이러한 방법은 end point로서 mortality, IC50, EC50, LC50, reproduction, genotoxicity, teratogenesis, behavior toxicity, growth rate, respiration 등 노출시킨 물질에 의해 나타나는 각종의 독성발현 현상을 평가방법으로 이용한다. Stress protein, nuclear migration, ATP reduction 등 노출물질에 의해 일어나는 체내 변화를 측정하기도 하며 metal uptake나 nutrient uptake 등 독성물질의 체내 이동을 측정하기도 한다. 현재 Xenopus frog를 이용하여 frog embryo의 teratogenesis를 관찰하는 FETAX assay나 Crustaceans를 이용한 Toxkit assay, Daphtoxkit 등 다양한 방법이 활용되고 있다.

Bacteria를 이용한 bioassay는 중금속, phenol류, PAH, PCB, 농약류 등을 측정하는데 주로 사용된다. 유해물질에 노출될 경우 발광하는 luminescent bacteria를 이용하는 것이 대부분으로 ATP-TOX system, Luminescent bacterial biosensors, Stress responsive luminescent bacteria system, Microtox toxicity test system 등이 있으며 Microtox system이 많이 활용되고 있다. 또한 Microbial exoenzyme activity를 측정하는 방법도 있다.

최근에는 어류나 포유류의 세포를 이용하는 방법이 증가하고 있는데 이들 방법은 유해물질에 노출된 생체영향을 파악할 수도 있는 장점이 있다. MFO inducer를 측정하는 방법은 유해물질을 세포에 노출 시켰을 때 변화되는 cytochrome P-450 등 효소활성을 측정하는 방법으로서 소각재, 유출수, 하천시료, 토양시료 등 다양한 시료에 적용할 수 있다. 주로 PAH나 HAH등이 측정되며 이러한 물질에 민감한 H4IIE(rat), HepG2(human), RTH-149(fish), PLHC-1(fish), RTL-W1(fish) 등의 세포가 이용된다. 또한 rainbow trout의 간세포를 primary culture하여 사용하기도 한다. 내분비계 장애작용을 평가하기 위해 estrogen response를 측정하여 xenoestrogen을 검출 및 정량하는데 사용되는 세포로는 사람의 유방암세포인 MCF-7 (Human), MCF7-BUS(Human), T47D(Human) 및 RTG-2(Fish) 등이 있다. 특히 MCF7-BUS 세포를 이용한 E-screen assay의 경우에는 false positive가 없고 복합작용을 평가할 수 있어 환경시료에 적용하기가 적합하다고 알려져 있다.

농약류는 종류에 따라 특정 효소를 저해하는 작용이 있어 농약류의 검출에는 이들 효소의 활성을 측정하는 방법이 이용되고 있다. Acetylcholinesterase는 유기인계 농약의 측정에 적합하며, acetaldehyde dehydrogenase는 ethenbithiocarbamate와 같은 fungicide를 측정하는데 이용되고 있다. 중금속의 측정에는 urease, β -glucosidase 등의 효소의 활성을 측정하는 microbial enzyme assay가 이용되고 있다. SMP bioassay는 mitochondria fraction의 energy metabolism response를 이용하여 신속하고 효과적으로 농약류, 중금속류, phenol류 등의 오염도를 모니터링할 수 있는 방법으로서 일반적으로 사용되고 있다.

오염되지 않은 환경에서 존재하는 sponge cell은 오염된 환경에 노출되면 stress response로서 heat shock protein 70, ubiquitin protein, protein kinase C 등의 변화가 나타나므로 이를 biomarker로 이용하여 오염도를 측정한다. Genotoxic carcinogen을 측정하는 방법으로는 BF-2, RTG-2등 어류세포에 유전독성 물질을 노출시키면 DNA adduct formation, chromosome aberration, micronucleus formation 등의 변화가 일어나므로 이를 이용하는 방법이 있다. Phagocytic response, leucocyte mitogenic response 등 immune cell function을 측정하여 환경오염을 평가하는 방법도 최근 연구가 이루어지고 있다. 이들 microbioassay는 신속하고 저렴하게 환경독성을 평가할 수 있어 활용성이 증대되고 있으나 보다 보편적으로 활용되기 위해서는 biological preparation을 일정하게 하고 test protocol을 표준화하는 것이 요구되고 있다.

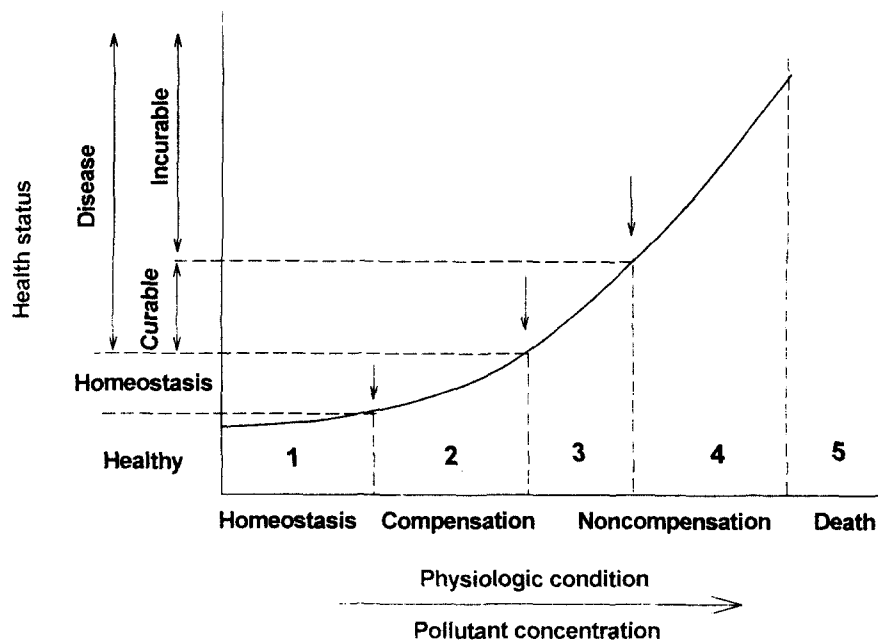


Fig. Relationship between exposure to pollutant, health status, and biomarkers.
(Walker CH, 1998).

1. No effect
2. Stress response, Enzyme induction with detoxifying function (EROD, ECOD, and AHH etc.)
3. Stress protein and Potentially repairable damage (Genetic toxicity, DNA-adducts)
4. Cellular damage (Cytotoxicity, Lysosomal disruption)
5. Clear detrimental effect to population (Death of individuals)

2. 본 론

우리나라는 아직까지 point-source에 의한 오염방지 및 처리율이 매우 낮은 수준으로 각 환경매체는 다양한 화학물질로 오염되어 있을 가능성이 많다. 특히 환경에 방출되고 있는 많은 화학물질들 중 생태계 및 사람의 발암 유도 및 내분비계를 교란시킬 수 있는 물질인 dioxin류, PAH류, PCB류와 xenoestrogen에 대한 관심이 증가하고 있다. 이에 본 연구에서는 이러한 물질들의 조기 탐색 및 예방적 측면에서 이용되고 있는 microbioassay를 환경시료에 적용하여 오염실태 조사 및 원인상관 규명에의 활용성을 제고하였다. 질병이 유발되기 전 단계의 biomarker를 활용하는 방법으로서 효소유도를 marker로 하는 cytochrome P4501A활성(EROD) 측정법과 cell proliferation을 marker로 하는 xenoestrogen 탐색기법을 조사하였으며 또한 질병유발단계의 급성독성과정에 대한 biomarker를 활용하는 방법으로서 세포사망을 marker로 하는 어류세포(BF-2 및 RTG-2 cell line)를 이용한 cytotoxicity test를 조사하였다.

1) Microbioassay를 위한 환경시료의 전처리

환경시료에 있어 전처리 기법은 매우 중요하다. 먼저 원하는 목적의 시료를 얻기 위해서는 다양한 방법이 제시되는데 토양, ash 및 퇴적토와 같은 고체시료에서 PCBs, PAH 및 dioxin류를 추출하기 위한 방법으로는 EPA 8290 method에 준하여 실험하였는데 간단히 설명하면 각 시료를 건조시킨 후 Soxhlet장치를 이용하여 toluene으로 추출하고 basic alumina를 이용한 column chromatography를 통하여 PCBs류(Fraction I)와 PAH 및 dioxin류의 화학물질(Fraction II)을 분리해낸다. 물시료의 경우에는 주로 Amberlite XAD-2 및 XAD-4 resin을 이용한 column chromatography방법을 많이 사용하는데 이 resin의 경우에는 소수성 표면(hydrophobic surface)을 가지고 있어 insoluble organic compounds 즉 chlorinated pesticides 및 polyaromatic hydrocarbon류의 추출을 위해 많이 이용되어 EROD 활성 유도물질 및 xenoestrogen물질을 추출하기에 적합한 resin으로 판단된다. EROD 활성을 유도의 표준물질인 benzo(a)pyrene과 estrogen 활성 측정의 표준물질인 17 β -estradiol을 사용하여 EROD-microbioassay 및 E-screen assay의 회수율 실험을 한 결과 각각 105.5 \pm 9.18% 및 98.24 \pm 5.90%로 전처리 시험법이 적합한 것으로 평가되었다.

2) Microbioassay에 의한 환경시료의 독성평가

1) RTG-2 및 BF-2 cell line을 이용한 세포독성 시험 (Cytotoxicity test)

생태독성을 평가하는 기법으로서의 세포독성 시험은 RTG-2(Rainbow trout cell) 및 BF-2 (Bluegill sunfish fry cell)와 같은 어류세포를 많이 이용하는데 Bols 등(1985)과 Babich 및 Borenfreund(1991)의 연구에 의하면 이러한 in vitro 시험결과와 in vivo 즉 rainbow trout 및 bluegill sunfish fry를 이용한 급성독성시험 결과와의 상관성이 높다고 보고하였다. 현재까지 여러 연구자의 연구결과를 종합해 볼 때 Log octanol/water partition coefficient가 높은 물질의 경우 세포독성을 많이 유발시키며 substituted phenolic, chlorinated toluene, diorganotins, chlorinated benzens, chlorinated anilines 및 naphthoquinone류 등이 있다. Polyaromatic hydrocarbon류의 경우에는 S-9이 존재하는 경우에 그 독성이 증가하는 것으로 보고되어 있다. 중금속의 경우에는 BF-2 cell이 RTG-2 cell보다 더 민감한 것으로 보고되어 있으며 독성을 유발하는 중금속으로는 cadmium, copper, zinc, nickel, lead 등이 알려져 있다.

이러한 세포독성을 환경오염물질에 대한 biomarker로 이용하는 데에 있어서는 매우 고농도에서 이러한 독성이 유발된다는 점에서 환경오염의 질병유발단계를 탐색하는 biomarker로 활용되고 있으며 현재 본 연구실에서 우리나라 하천수를 대상으로 실험한 결과 대체적으로 오염된 수역의 시료에서 세포독성이 매우 높게 유발된다는 점을 볼 때 오염정도를 판정하는데 있어서 급성 독성 자료로써 좋은 biomarker로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

② EROD-microbioassay

EROD-microbioassay는 Ah receptor가 존재하는 cell line을 이용하여 cytochrome P4501A 효소 유도단계를 보는 방법으로 PCDD, PCDF, PCB 및 PAH 등이 Ah receptor 결합함으로써 효소 유도를 일으키는 특성을 이용한 것이다. 현재 이러한 EROD- microbioassay 방법에서 주로 많이 사용하고 있는 세포로는 포유류 세포의 경우에는 H4IIE, Hepa1c1c7, Hep G2가 있으며 어류 세포의 경우에는 RTH-149, PLHC-1 및 RTL-W1 cell이 많이 이용된다. 이들 세포 중 rat hepatoma cell line인 H4IIE는 민감성, 안정성 및 실험실간의 data교류의 신뢰성으로 인하여 일반적으로 사용되고 있는 세포주로 Planar halogenated hydrocarbon류의 경우에 in vivo와의 상관성이 0.9이상으로 높아 in vitro 방법으로써 많이 선호되고 있다. Andersson과 Forlin(1985)의 보고에 의하면 포유류 세포와 어류세포에서의 간 대사능에 대한 상관성이 매우 유사하여 포유류세포를 생태계 영향 조사에 활용할 수도 있다고 한다. 본 연구에서는 H4IIE와 RTH-149에 2,3,7,8- TCDD, 3-MC (3-methylchoranthrene) 및 환경시료를 적용시켜 그 반응성을 비교하고 오염도를 평가한 결과 정량성이 우수하였다.

③ E-SCREEN bioassay

E-screen assay는 사람 유방암세포인 MCF-7세포가 에스트로젠에 의해 성장이 촉진되는 효과를 이용한 세포배양 생화학적 방법으로서 에스트로젠 작용을 지닌 화학물질을 검색하는데 우수하다고 알려져 있다 (Soto 등, 1995; Nagel 등, 1997). 이 방법은 매우 민감하게 단일 및 복합물질을 동시에 신속히 조사할 수 있을 뿐만 아니라 그 효과를 정량적으로 평가할 수 있어 하천 등 환경시료 중에 함유된 내분비계 장애물질을 검출하는데 적합한 것으로 예상된다. 최근에는 MVLN cell과 같이 유전자 재조합기술에 의해 특이성 및 반응성을 증진시킨 cell을 개발하는데 주력하고 있다. 그러나 이러한 세포들은 민감성이 증진된 반면 연구자들간의 반응성의 차이 및 안정성의 문제, agonist 및 antagonist의 구별의 어려움 등의 문제점이 있어 표준화를 위한 더 많은 연구가 요구되고 있다. MCF-7 BUS의 경우에는 주로 사용되었던 MCF-7 cell보다 세포성장이 빠르고 반응성도 높으며, control level이 낮고, 안정성이 높을 뿐만 아니라 천연 또는 합성 progestagen, glucocorticoid 와 mirex, chlordane, heptachlor 등 비에스트로젠 화합물에 의해 영향을 받지 않아 false positive가 나타나지 않으므로 다양한 물질을 함유하고 있는 환경시료 중 에스트로젠 활성 물질의 복합영향을 평가하기에 적합하다고 보고하고 있어 우리나라와 같이 복합적 오염 양상을 띤 환경시료에의 적용이 타당하다고 판단되었다.

3) 정량화 기법

Microbioassay 기법이 적극적으로 활용되기 위해서는 환경시료 중에 존재하는 유해물질에 의해 나타나는 영향을 농도개념으로 정량적으로 평가하는 것이 필요하다. 대표적으로 환경시료의 EROD-microbioassay 및 E-screen assay 결과의 정량화를 시도하였다. 환경시료에 의해 나타난

H4IIE 및 MCF7-BUS cell line의 효소활성 및 세포증식의 반응성을 표준물질인 2,3,7,8-TCDD 및 17 β -estradiol의 양으로 환산한 TEQ 및 EEQ 단위로 구하였다. 정량화 방법을 위해 환산하는 방법은 연구자에 따라 다른데 용량-반응곡선에서 표준물질의 EC50에 대한 ratio, EC25에 대한 ratio 및 직선성의 반응성을 보이는 구간의 용량에서의 계산법 등이 주로 쓰이는 정량법이다.

EROD-microbioassay의 정량법인 생물학적 TEQ(bio-TEQ) 단위는 양성대조군인 2,3,7,8-TCDD와 환경시료의 EROD activity에 대한 용량-반응 결과를 통해 환경중에 존재하는 EROD activity를 유발시키는 다양한 PCBs, PAHs 및 dioxin류의 양을 계산해내는 방법이다. Hanbert 등(1991)과 Schwirzer 등(1998)은 bio-TEQ 계산에 있어 양성대조군 및 시료의 dose-response를 구해 직선성을 보이는 부분을 중심으로 각 dose별로 TEQ를 계산하여 평균내는 방법으로 bio-TEQ를 구했으며, Engwall 등(1999)과 Till 등(1997)은 각각 2,3,7,8-TCDD 및 환경시료에 대해 EC50와 EC25의 ratio 즉 TEQ를 구한 후 각 시료용량으로 보정해준 TEQ를 구하였다. 이와 같이 각 연구자간에 bio-TEQ를 구하는 방식이 다른 이유는 환경시료의 종류와 오염정도에 따라 각각 용량-반응곡선의 shape이 달라져 bio-TEQ값에 영향을 미치기 때문이다. 따라서 microbioassay를 통해 위해성 평가를 정확히 하기 위해서는 이러한 정량적 평가방법에 대한 국제적 표준화 연구가 이루어져야 한다고 보고있다. E-screen assay를 통해 estrogen 활성을 정량화하는 EEQ 단위의 산출도 bio-TEQ의 환산과 방법적으로는 유사하며 양성대조군으로 17 β -estradiol을 사용하게 된다.

3. 결론

기존의 환경기준은 대부분 이화학적 항목으로 구성되어 있다. 예를 들면 수질오염물질의 배출허용기준 등에 제시된 수환경에 대한 오염도 평가는 생물화학적 산소 요구량(Biochemical Oxygen Demand), 화학적 산소 요구량(Chemical Oxygen Demand), 부유물질량(Suspended Solid) 등 이화학적 수질 항목 위주이다. 또한 기기분석학적 평가도 매체 중의 기지의 화학물질을 검출하는데 국한하고 있다. 따라서 이러한 평가항목은 실제 생태 환경에 대한 영향을 반영하는 데에는 미흡한 면이 많다. 그러므로 이를 보완하고자 하는 시도가 다양하게 이루어지고 있는데 microbioassay를 이용한 생물학적 모니터링은 그 대표적인 예이다

BF-2 및 RTG-2를 이용한 세포독성 실험을 하천수 시료에 적용한 결과 오염도 평가에 활용성이 있었으며 특히 대부분의 경우 LC50이 100ml 정도로 세포독성이 강하게 유발되는 것으로 보아 오염이 심각한 우리나라의 환경시료의 평가항목으로서 적합한 것으로 판단되었다.

H4IIE rat hepatoma cell을 이용한 EROD-microbioassay는 환경시료 중의 CYP1A 유도물질 즉, PCB, PAH 및 dioxin류 등을 민감하고 정량적으로 검출하는데 적합하였다. 또한 어류세포와의 비교 결과 외부물질에 대한 반응성이 유사하여 민감도가 좋은 포유류 세포에 의한 실험자료를 생태독성에 대한 자료로서 간접이용이 가능하다고 할 수 있다.

MCF7-BUS cell은 특수하게 clone된 세포주로써 false positive가 나타나지 않으므로 다양한 물질을 함유하고 있는 환경 시료 중 에스트로젠 활성 물질의 복합영향을 평가하기에 적합하다고 알려져 있는데 환경시료에 적용한 결과 활용성이 우수한 것으로 나타났다.

EROD-microbioassay의 결과는 bio-TEQ 단위로, E-screen assay의 결과는 EEQ 단위로 정량적으로 평가함으로써 기존의 환경오염 평가 항목으로는 분석하기 어려운 환경시료의 독성영향을

bioassay에 의해 분석 및 평가할 수 있어 세포배양 생화학적 기법이 유용한 도구가 될 수 있는 것으로 기대되었다.

참 고 문 헌

- Andersson T. and Forlin L.: Many of the features of xenobiotic metabolism in fish appear to be qualitatively similarly to the better known systems in mammals. *Biochemical pharmacology*, 34(9): 1407-1413, 1985.
- Babich H., and Borenfreund E.: Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: A Review. *Toxicology in vitro*, 5, 91-100, 1991
- Bols N.C., Bolinska, S.A., Dixon, D.G., Hodson, P.V., and Kaiser, K.L.E.: The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish. *Aquatic Toxicology*, 6, 147-155, 1985.
- Engwell M., Brunström B., Näf C., and Hjelm K.: Levels of dioxin-like compounds in sewage sludge determined with a bioassay based on EROD induction in chicken embryo liver cultures. *Chemosphere*, 38(10), 2327-2343, 1999.
- Hanberg A., Ståhlberg M., Georgellis A., Cynthia de Wit, and Ahlborg U.G.: Swedish dioxin survey: Evaluation of the H-4-IIE bioassay for screening environmental samples for dioxin-Like enzyme induction. *Pharmacology and Toxicology*, 69, 442-449, 1991
- Nagel S.C., Saal F.S., Thayer K.A., Dhar M.G., Boehler M., and Welshons WV.: Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol, *Environmental Health Perspectives*, 105, 70-76, 1997.
- Schwirzer S.M.G., Hofmaier A.M., Kettrup A., Nerdinger P.E., Schramm K.W., Thoma H., Wegenke M., and Weibel F.J.: Establishment of a sample cleanup procedure and bioassay for determining 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity equivalents of environmental samples, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 77-82, 1998.
- Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N., and Serrano F.O.: The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants, *Environmental Health Perspectives*, 103(Suppl 7), 113-122, 1995.
- Till M., Behnisch P., Hagenmaier H., Bock K.W. and Schrenk D.: Dioxinlike components in incinerator fly ash: A comparison between chemical analysis data and results from a cell culture bioassay, *Environmental Health Perspectives*, 105, 1326-1332, 1997.
- Walker CH: (1998) Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 106(2), 613-620, 1998.