

Cyclophosphamide의 면역독성 검출을 위한 *in vitro* 시험법의 개발

정태천* · Michael P. Holsapple¹ · 차신우 · 하창수 · 한상섭 · 노정구
한국화학연구소 안전성연구부

A Development of Methods for detecting Immunosuppression induced by Cyclophosphamide *in vitro*

Tae Cheon JEONG*, Michael P. Holsapple¹, Shin Woo CHA, Chang Su HA
Sang Seop HAN, and Jung Koo ROH

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical
Technology, P.O. Box 107, Yusung, Taejeon, 305-606, Korea

¹Toxicology Research Laboratory, Dow Chemical Company, Midland, Michigan, U.S.A

(Received October 26, 1994; accepted November 23, 1994)

Abstract—A splenocyte culture system supplemented with liver microsomes was developed to detect immunotoxic chemicals which require metabolic activation using cyclophosphamide as a positive standard. When liver microsomes were added to splenocyte cultures isolated from female B6C3F1 mice, the proliferation of splenocytes by lipopolysaccharide (LPS) was increased and the proliferation by concanavalin A (Con A) was decreased. However, when compared with each corresponding control, cyclophosphamide was successfully activated to metabolites capable of suppressing lymphoproliferative responses. This suppression was clearly dependent upon the amounts of microsomes added and/or the concentration of cyclophosphamide exposed. In these cultures, the proliferation of splenocytes was suppressed when the cells were exposed to cyclophosphamide on the day of culture initiation. On the other hand, microsome was responsible for the increase in LPS mitogenicity and NADPH was responsible for the decrease in Con A mitogenicity. Finally, our present culture system was compared with the hepatocyte-splenocyte coculture system which we had developed earlier. We found that the hepatocyte-splenocyte coculture was better able to activate cyclophosphamide to metabolites capable of suppressing the antibody response to sheep erythrocytes. Although our present culture system was relatively poor to activate cyclophosphamide in cultures for antibody response, it will be useful as a simple screening method to detect suppression of certain *in vitro* immunotoxic parameters like LPS mitogenicity by chemicals which require metabolism.

Keywords □ cyclophosphamide; metabolic activation; immunosuppression, splenocyte cultures; liver microsomes

다양한 종류의 세포들에 의해 기능조절이 이루어지고 있는 복잡한 생체의 면역기구는 바이러스나 박테리아 등 미생물들의 침입으로부터 생체를 보호하는 매우 중요한 생체 방어기구로서, 약물 또는 환경독성물질 등에 의해 그 조절기구나 기능에 이상이 발생하면, 면역능의 저하 또는 항진, 자가면역증상, 또는 알러지 현상을 유발하게 된다(Luster 등, 1988). 미국의 National Toxicology Pro-

gram(NTP)에서는 1970년대 초 미시간주 주민들에게서 polybrominated biphenyl의 오염에 의한 면역독성이 발생한 이래(Bekesi 등, 1973), 면역독성의 중요성을 인식하고 면역독성 시험법의 개발에 힘을 쏟아, 다양한 시험으로 구성된 면역독성 시험에 관한 가이드라인을 제정하였다. 지난 10여년간 이러한 가이드라인에 준하여 현재까지 50여종 이상의 약물 또는 환경독성물질에 대하여 면역독성 여부에 관한 연구가 진행되어 왔으며(Luster 등, 1992), 새로운 면역독성 검출방법의 개발에 관한

* To whom correspondence should be addressed.

연구도 이에 병행하여 국내외에서 진행되어 왔다(Exon 등, 1986; Kim 등, 1987; Smialowicz 등, 1991; Jeong 등, 1992; Kimber 등, 1992; Lang 등, 1993; Pollock 등, 1994).

환경독성물질은 체내에서 일반적으로 cytochrome P-450(P-450) 효소군에 의하여 수용성 물질로 대사된 후 glucuronide, sulfate 또는 아미노산 등에 포함 무독화되어 체외로 배설되지만(Park 등, 1993), cyclophosphamide, dimethylnitrosamine, 2-acetylaminofluorene 등은 P-450에 의하여 전자친화성 대사체로 활성화되어, 세포내 거대분자(DNA, RNA, 단백질 등)와 공유결합하므로써 독성을 나타내고, 그 자체로는 독성이 없는 것으로 알려져 있다. 이러한 procarcinogen들의 면역독성 검출에는 기존의 면역독성 시험으로는 한계가 있는데, 이는 면역계에 관련된 세포들의 P-450 효소 활성도가 극히 미미하여 대사활성화를 시키지 못하기 때문이다(Yang 등, 1986). 이러한 이유에서 독성 발현에 대사활성화가 필요한 물질에 대한 면역독성 평가방법을 개발하기 위하여 많은 연구가 이루어져, 간의 S-9 분획과 microsome 분획, 일차배양 간세포 등 P-450 효소 활성도가 높은 시스템과 비장세포간의 공동배양 시험법들이 개발되었고, 그동안 *in vitro*에서는 면역독성의 검출이 어려웠던 aflatoxin B1, cyclophosphamide, 및 dimethylnitrosamine 등의 독성을 검출할 수 있게 되었다(Holsapple 등, 1984; Yang 등, 1986; Kim 등, 1987; Johnson 등, 1987). 한편, 현재까지 보고된 바 있는 대사활성화 시스템을 이용한 검출방법들은 간의 S-9 또는 microsome 분획을 이용하는 경우 microsome 자체의 독성이 있다는 보고에 준하여(Tucker와 Munson, 1981), 최장 1시간 동안 독성물질을 비장세포 배양에 처리한 후, 이들 독성물질과 분획을 제거하고 비장세포만을 시험목적에 따라 배양하여 왔으며, 일차배양 간세포와의 공동배양 시에도 최대 4시간 동안 배양한 후 비장세포만을 따로 분리한 후 시험에 사용하여 왔다(Kaminski 등, 1993). 따라서, 기존의 방법으로는 대사가 느리거나 분화과정중의 면역세포에 대한 독성을 연구하기에는 어려운 점이 있었다.

본 연구에서는 간의 microsome 분획을 장시간 비장세포와 공동배양하고, 독성물질도 장시간 노출시켜, 면역독성여부를 검출할 수 있는 방법을 개발할 목적으로, P-450 효소에 의해 면역독성물질인 acrolein과 phosphoramid mustard로 쉽게 대사되는 것으로 알려져 있는 강력한 면역억제제인 cyclophosphamide를 표준 독성물질로 사용하여(Clarke와 Waxman, 1988; Kawabata 등, 1990), *in vitro* 면역독성 시험법 중 비교적 많이 이용되고 있는 LPS에 의한 B-림파구의 증식능, Con A에 의한 T-림파구의 증식능, 그리고 macrophage, B-, 및 T-림파구 모두를 필요로 하는 면역 적혈구에 대한 T-세포 의존형 *in vitro* 항체생성 반응 등에 대한 영향을 살펴보았다.

실험방법

실험동물

비장세포의 분리와 간 microsome 분획을 얻기 위하여 6~8 주령의(C57Bl/6×C3H)F1(B6C3F1) 마우스 암컷을 사용하였다. 5~6 주령의 동물을 미국의 국립 암연구소(Frederick, MD)로부터 공급받아 1주일 이상 순화한 후 실험에 사용하였다. 모든 동물은 수령즉시 임의로 마우스용 사육상자에 4 마리씩 체중 측정 후 분리 수용하였고, 사료와 상수도수를 자유로이 섭취하도록 하였다. 동물실은 21~24°C의 온도를 유지하였고, 40~60%의 상대습도를 유지시켰으며, 12시간 주기로 조명을 조절하였다.

사용시약

Cyclophosphamide, NADPH, glucose 6-phosphate(G-6-P), G-6-P dehydrogenase, LPS, Con A 등은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO)에서 구입하였고, 세포배양에 필요한 배지 및 첨가 성분들은 GIBCO(Grand Island, NY)에서 구입하였다. 그리고 면역적혈구(SRBC)는 Colorado Serum(Denver, CO)에서, [methyl-³H]thymidine은 Amersham(UK)에서 각각 구입하였다. 그 밖의 사용 시약들도 시판 특급시약을 사용하였다.

Microsome 분획의 분리(Jeong 등, 1994b)

마우스를 경추탈구한 후 간을 제거하고, 3배량의 냉 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.4)을 가하여 균질화시켰다. 이 액을 4°C에서 10분간 9,000×g로 원심분리하여, S-9 분획을 얻었고, 상등액을 4°C에서 90분간 105,000×g로 재차 원심분리하여 얻은 microsomal pellet에 20% glycerol, 1 mM EDTA, 그리고 1 μM dithiothreitol이 첨가된 0.1 M potassium phosphate 완충액을 가하여 균질화시켰다. 이렇게 얻은 microsome 분획을 1 ml씩 분주하여 -70°C에서 보관하였으며, 분획내의 단백질을 bovine serum albumin을 표준품으로 삼아 Bradford의 방법에 준하여 정량하였다(Bradford, 1976).

비장세포 증식능의 측정(Kim 등, 1992)

B-림파구 증식능을 측정하기 위하여 LPS를 사용하였으며, T-림파구 증식능의 측정을 위하여 Con A를 사용하였다. 마우스를 경추탈구한 다음, 비장을 무균적으로 적출하여, 단일 세포액으로 만들고, RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후, 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit penicillin, 100 μg streptomycin, 및 5×10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol을 함유하는 RPMI 1640 complete 배지에 균질화하고, 세포의 농도를 2×10⁶ 세포/ml이 되도록 조정하였다. 100 μl의 세포액을 96-well 배양접시(Costar)에 분주하고, 시험목적에 맞도록 cyclophosphamide, LPS, Con A, 그리고 microsome 분획을 적절히 조제하여 well 당 총 용량이 200 μl가 되도록 통일시켰다. Cofactor mix의 조성은 RPMI 1640 배지

mL당 NADPH 0.48 mg(0.58 μ mole), glucose 6-phosphate 0.4 mg(1.32 μ mole), G-6-P dehydrogenase 0.33 unit, 그리고 fetal bovine serum 0.1 mL로 구성되었다. 모든 처리가 끝나면, 96-well 배양접시를 스테인레스로 제작된 조직배양용 가스상자(Bellco Biotechnology, Vine Land, NJ)에 넣고, 10% CO₂, 7% O₂, 및 83% N₂ 조성의 혼합가스를 4~5 psi의 압력이 되도록 충전한 다음, 37°C 항온기 내에서 천천히 rocking시키면서 3일간 배양하였다. 세포회수 20시간 전에 [³H]thymidine(1 μ Ci/well)을 처리하였고, 세포회수기(Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA)를 이용하여 회수된 비장세포의 DNA에 함유된 방사능의 양을 scintillation counter(Beckman Instruments, Fullerton, CA)를 이용하여 측정하였다. 비장세포의 증식정도는 DPM/well로 표현하였다.

항체생성 측정을 위한 비장세포의 배양

비장세포 분리 후, 세포농도를 1.25×10^7 세포/mL로 조정하고, 48-well 배양접시에 0.4 mL씩 분주하고, cyclophosphamide(50 μ L), microsome(20 μ L) 및 cofactor(30 μ L) 용액을 0.1 mL로 조절하여 총 0.5 mL이 되도록 맞추었다. 항원으로는 T-임파구 의존형으로 면역독성 시험에 가장 널리 사용되고 있는 면양적혈구(SRBC) 1×10^9 세포/mL를 well당 10 μ L씩 (1×10^7 세포) 가한 후, 배양접시를 비장세포 증식능의 측정시와 동일한 방법으로 조직배양용 가스상자내에서 10% CO₂, 7% O₂, 및 83% N₂ 조성의 가스로 4~5 psi 압력하에서 5일간 배양하였다. 조직배양용 가스상자는 37°C 항온기에서 rocking을 하였다.

일차배양 간세포와 비장세포의 공동배양

먼저 간세포를 B6C3F1 마우스 암컷에서 collagenase 관류방법으로 분리하였다(Jeong 등, 1992). 간세포를 다양한 홀몬이 첨가된 AB 배지에서 24시간 동안 배양한 후(Salocks 등, 1981), 공동배양전에 RPMI 1640 배지로 2회 세척하고, 비장세포와의 공동배양에 사용하였다. 비장세포는 Jeong 등(1994b)의 방법에 따라 분리하여 3.33×10^7 세포/mL로 세포농도를 조정하였고, 0.45 mL의 세포액을 일차배양 간세포가 들어있는 well에 분주하고, 기지 농도의 cyclophosphamide(10 배액) 50 μ L를 처리하였다. 그런 후 37°C CO₂ 항온기에서 4시간 동안 공동배양을 실시하였다. 공동배양이 끝나면 비장세포를 15 mL용 원심분리관으로 옮겨 4°C에서 10분간 200g로 원심분리하여 분리세척하고, 세포농도를 1×10^7 세포/mL로 조절하였다. 이때 세포는 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit penicillin, 100 μ g streptomycin 및 50 μ M 2-mercaptoethanol을 함유하는 RPMI 1640 complete 배지를 사용하여 부유시켰다. 비장세포액을 48-well 배양접시의 각 well에 0.5 mL씩 분주하고 항원인 면양적혈구 1×10^7 세포를 가하고 10% CO₂, 7% O₂ 및 83% N₂ 가스의 조성으로 4~5 psi의 압력하에서 5일간 배양한 다음, 항체생성 세포수(antibody-forming cells; AFCs)를 Holsapple 등(1984)의 방법으로 측정하였다.

In vitro 항체생성능의 측정

먼저 Earle's balanced salt solution(EBSS)에 agar(Difco Lab., Detroit, MI)를 0.5%가 되도록 제조하여 끓여 녹인 후, 47°C의 항온 수조에 넣고 400 μ L를 미리 수조에 준비한 시험관에 분주하였다. 여기에 배양한 비장세포 50 μ L를 가하고, 미리 EBSS로 3회 세척해 놓은 면양적혈구 25 μ L와 기니 픽으로 부터 분리한 보체(GIBCO) 25 μ L를 각각 가하여 고르게 섞은 다음, Petri dish에 200 μ L를 취하고 24×40 mm cover glass로 살짝 덮어 용액이 고루 퍼지도록 하였다. 그런다음, 상온에서 약간 방치하여 agar를 굳히고, Petri dish는 수분을 포화시킨 37°C의 항온기에서 약 3시간 배양시켜 plaque의 형성을 유도하였다. 형성된 plaque의 수효를 각각 측정하고, 비장세포 액내의 세포농도를 Coulter counter로 측정하여, 결과를 antibody-forming cells(AFCs)/10⁶ spleen cells로 환산하여 표현하였다.

통계처리

모든 시험의 결과는 평균값±표준오차로 표시한 후, 대조군에 대비한 유의성의 여부를 SuperANOVA 통계 프로그램(Abacus Concepts Inc., Berkely, CA)을 이용하여 P<0.05 또는 P<0.01 수준에서 Dunnet's t-test를 실시하여 검정하였다. 유의성이 확인된 시험군은 별표(*)로 표시하였다.

실험결과

간 microsome 분획이 LPS 및 Con A에 의한 비장세포 증식능에 미치는 영향

먼저 대사활성화 시스템으로 사용할 microsome 자체의 영향을 알아보기 위하여 microsome과 cofactor(NADPH, glucose 6-phosphate 및 glucose 6-phosphate dehydrogenase의 혼합액)의 영향을 살펴보았다. 100 μ g/mL과 1.0 μ g/mL의 LPS와 Con A를 각각 비장세포 배양액(2×10^5 /well)에 처리하고 72시간 배양한 다음, 세포를 회수하였다. 세포회수 20시간 전에 [³H]thymidine을 1 μ Ci/well의 농도로 처리하여 DNA에 함유된 방사능의 양을 측정하였을 때, LPS mitogenicity는 microsome에 의하여 용량 의존적으로 증가되었으며, cofactor 혼합액은 약간의 감소가 관찰되었고, Con A mitogenicity의 경우에는 microsome에 의해 약간 증가되었고 cofactor 혼합액에 의해 유의성있는 감소를 보여주었다(Fig. 1). 한편 microsome에 의한 비장세포 증식능의 증가가 microsome의 보관에 사용된 완충액의 영향인지를 알아본 결과, 순전히 microsome에 의한 영향임을 밝혔다(결과는 보이지 않았음).

간 microsome 분획을 첨가한 비장세포 배양에서 cyclophosphamide에 의한 LPS 및 Con A mitogenicity 억제

간 microsome 분획을 첨가한 비장세포 배양의 특성을

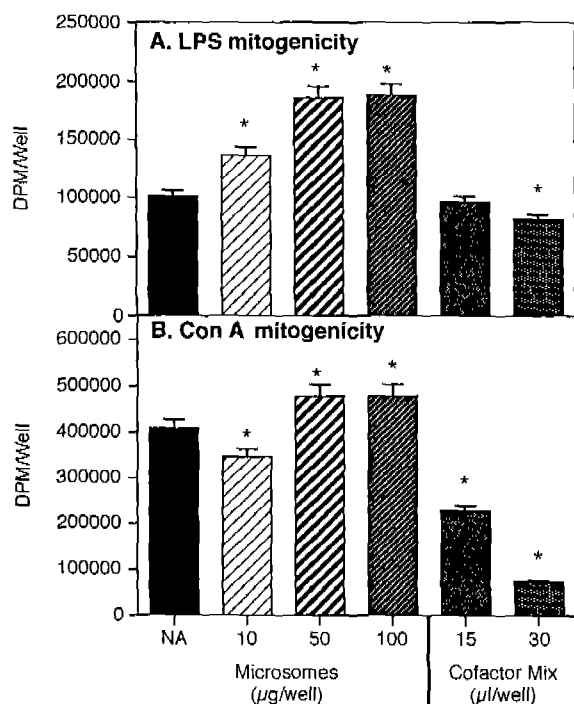


Fig. 1. Effects of microsome and cofactors on LPS and Con A mitogenicity. Splenocytes were isolated from B6C3F1 female mice and 2×10^5 cells were cultured for 72 hr in the presence of microsomes and cofactors. LPS and Con A were treated at the concentration of $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ and $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. The cultures were pulsed with [methyl- ^3H]thymidine for 20 hr before harvesting the cells. Each bar represents the mean DPM \pm S.E. of quadruplicate cultures. An asterisk indicates the value significantly different from the naive (NA) control at $P < 0.05$.

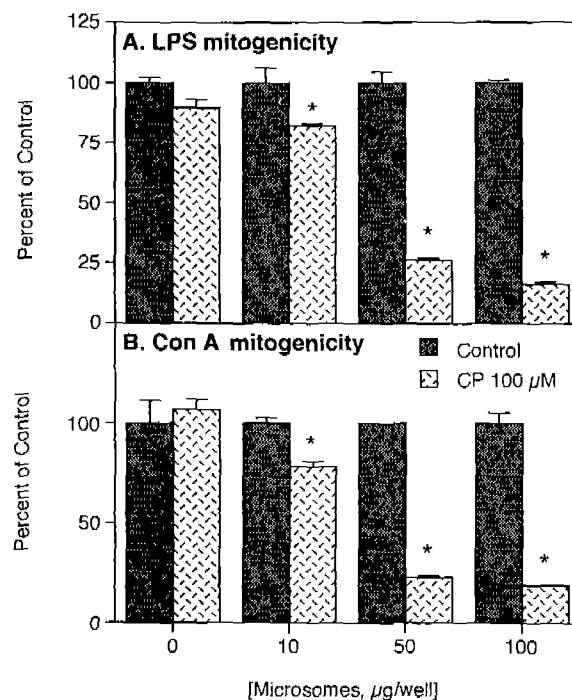


Fig. 2. Effects of microsomes added on cyclophosphamide-induced suppression of LPS and Con A mitogenicity. Splenocytes were cultured for 72 hr in the presence of microsomes, cofactors ($15 \mu\text{l}$), and $100 \mu\text{M}$ cyclophosphamide (CP). $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ and $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS and Con A were used, respectively, to induce the proliferation of splenocytes. The cultures were pulsed with [methyl- ^3H]thymidine for 20 hr before harvesting the cells. The results were recalculated as percent of each control and each bar represents the mean percent \pm S.E. (%) of quadruplicate cultures. An asterisk indicates the value significantly different from the naive control at $P < 0.01$.

알아보기 위하여, microsome과 cyclophosphamide에 대한 용량-반응 관계를 검사하였다. 우선 비장세포액에 $100 \mu\text{M}$ 의 cyclophosphamide와 10, 50, 및 $100 \mu\text{g}/\text{well}$ 의 microsome 분획, 그리고 $15 \mu\text{l}$ 의 cofactor를 첨가하고 LPS 및 Con A mitogenicity를 시험하였는데, Fig. 1에서와 마찬가지로 microsome 분획을 첨가한 시험군에서 비장세포의 증식이 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다(Fig. 2). Fig. 2에는 microsome을 첨가하고 cyclophosphamide를 처리하지 않은 각각의 대조군을 100%로 환산한 결과를 도시하였다. 그 결과, $10 \mu\text{g}/\text{well}$ 의 microsome을 첨가한 시험군부터 cyclophosphamide에 의한 LPS 및 Con A mitogenicity의 억제현상을 명백하게 관찰할 수 있었다.

Fig. 3에서는 microsome 농도를 $50 \mu\text{g}/\text{well}$ 로 고정화한 후, cyclophosphamide의 용량-독성 관계를 알아보았는데, $10 \mu\text{M}$ 의 농도에서부터 유의성있는 LPS 및 Con A mitogenicity의 억제를 나타내었다.

이상의 결과로부터 간 microsome 분획을 직접 비장세포에 가할 경우, LPS 및 Con A mitogenicity를 면역

독성의 지표로 이용하여, 대사를 필요로 하는 면역독성 물질의 검출에 쉽게 사용될 수 있는 가능성을 시사해 주었다.

이어서 cyclophosphamide에 의한 LPS 및 Con A mitogenicity 억제시의 시간-독성 관계를 알아보코자 다음의 시험을 수행하였다. 즉, mitogen과 microsome 분획(10 과 $50 \mu\text{g}/\text{well}$)을 비장세포 배양초기에 가하고, $100 \mu\text{M}$ 의 cyclophosphamide를 0, 1 또는 2일째에 처리한 후 비장세포 증식능을 측정하였다. 그 결과는 cyclophosphamide를 처리하지 않은 각 해당 대조군에 대한 백분율로 표시하였는데, 비장세포 배양초기에 cyclophosphamide를 처리한 경우에만 비장세포 증식의 억제를 관찰할 수 있었고, 24시간 후에 처리할 경우 전혀 영향이 없었다(Fig. 4). 이는 cyclophosphamide가 비장세포의 활성화 초기에만 독성을 발현하던지 또는 microsome 분획의 P-450 효소활성도가 37°C 에서 24시간 동안 배양시 급격히 감소된 결과로써 해석할 수 있다.

한편, Con A mitogenicity의 경우 Fig. 1에서와 같이

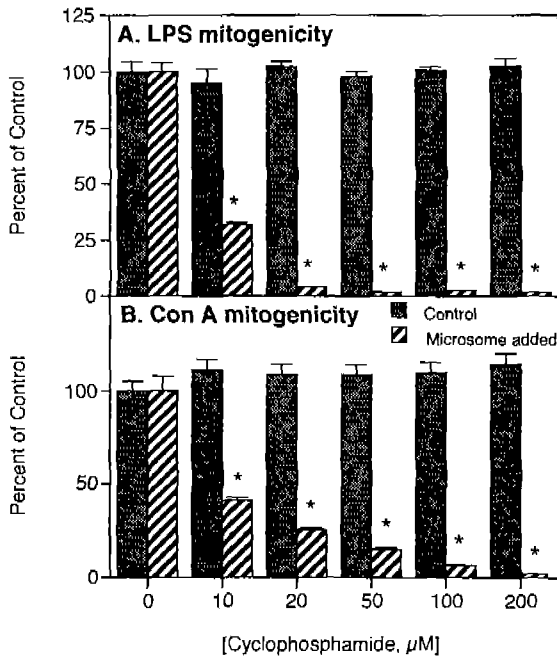


Fig. 3. Effect of cyclophosphamide on LPS and Con A mitogenicity: A dose-response study. Splenocytes were cultured for 72 hr in the presence of microsomes(50 μg/well), cofactors (15 μ), and cyclophosphamide. The cultures were pulsed with [methyl-³H]thymidine for 20 hr before harvesting the cells. The results were recalculated as percent of each control and each bar represents the mean percent + S.E.(%) of quadruplicate cultures. An asterisk indicates the value significantly different from the naive control at P<0.01.

매우 심각하게 cofactor에 의해 감소된 결과를 보였는 바, 그 원인을 알아보려고 cofactor 성분인 NADPH, glucose 6-phosphate, 그리고 glucose 6-phosphate dehydrogenase의 영향을 Fig. 5에서 살펴보았다. 그 결과, NADPH가 Con A mitogenicity의 억제를 보인 주요 성분을 알아 내었다. 따라서, NADPH는 P-450 효소의 활성화에 필수불가결한 요소이므로 Con A mitogenicity의 경우는 이점이 문제점으로 남아있고, 본 시스템에서는 LPS mitogenicity가 Con A mitogenicity보다 좋은 독성 지표로 사료되었다. 그러나, microsome에 의한 LPS mitogenicity의 증가에 대해서도 현재로서는 설명할 수 없으며, 앞으로 좀더 자세한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

간 microsome 첨가 비장세포 배양과 간세포-비장세포 공동배양의 비교: Cyclophosphamide에 의한 *in vitro* 항체생성 반응의 억제

마지막으로 microsome 첨가 비장세포 배양과 간세포-비장세포 공동배양 간의 cyclophosphamide 대사능을 SRBC에 대한 T-임파구 의존형 항체생성 반응의 억제 정도를 측정하여 비교하였다(Fig. 6). 그 결과, 5일간 microsome을 비장세포 배양에 첨가한 경우보다 간세포와의

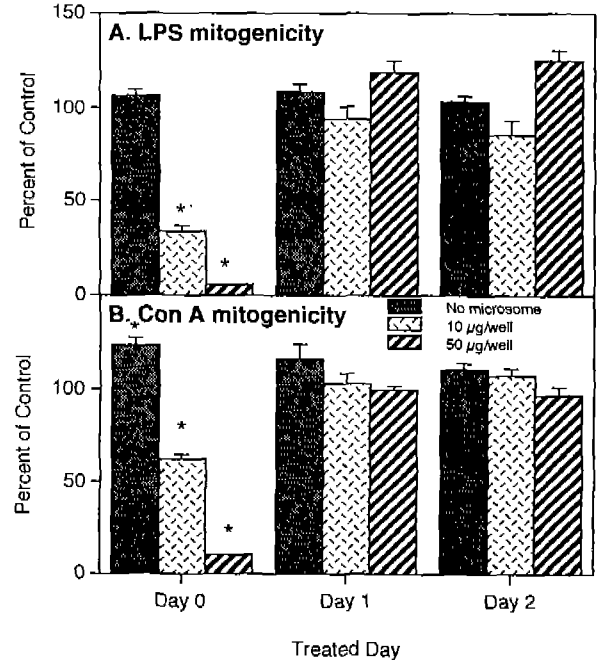


Fig. 4. Time course effect of cyclophosphamide on LPS and Con A mitogenicity in splenocyte cultures supplemented with liver microsomes. Splenocytes were cultured for 72 hr in the presence of microsomes(10 and 50 μg/well). The cells were exposed to 100 μM cyclophosphamide on day 0, 1, and 2, respectively. The cultures were pulsed with [methyl-³H]thymidine for 20 hr before harvesting the cells. The results were expressed as percent of no cyclophosphamide-treated controls and each bar represents the mean percent + S.E.(%) of quadruplicate cultures. An asterisk indicates the value significantly different from the corresponding controls at P<0.01.

4시간 동안의 공동배양이 더 효과적임을 알 수 있었는데, 이는 비록 간세포와의 공동배양이 짧더라도 cyclophosphamide를 대사시킬수 있는 P-450 효소 활성화도가 왕성히 유지되는 반면, 간 microsome의 처리 경우, 효소활성도가 급격히 감소되어 cyclophosphamide의 대사활성화에 어려움이 있었기 때문으로 판단된다. 한편, Fig. 6A의 microsome 첨가 시스템에서는 cofactor 용액이나 microsome 자체가 LPS 및 Con A mitogenicity에서와는 달리 항체생성에 큰 영향을 끼치지 않아, 앞으로 microsome의 P-450 효소 활성화도만 잘 유지시켜 준다면, *in vitro* 항체 생성반응의 측정도 좋은 시험항목이 될 것으로 판단되었다.

고 찰

비장세포를 이용한 면역독성의 검출에 있어, N-methyl N'-nitro nitrosoguanidine, methyl nitrosourea 및 tetrachlorodibenzo-p-dioxin 등은 그 자체로 면역독성을 나타내지만(Dooley 등, 1988; Haggerty와 Holsapple, 1990; Haggerty 등, 1990), dimethylnitrosamine, cyclophos-

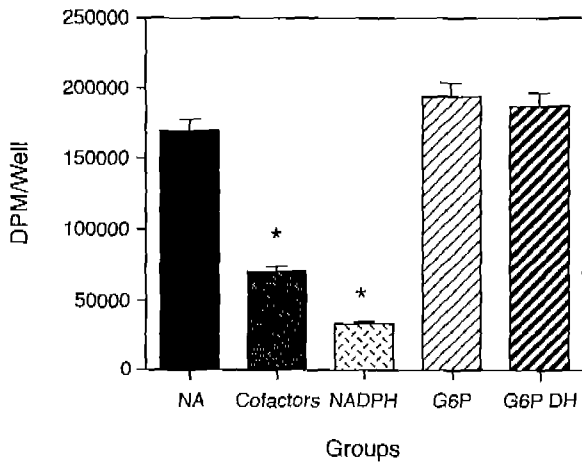


Fig. 5. Effects of components in cofactor mix on Con A mitogenicity. Splenocytes were cultured for 72 hr in the presence of Con A ($1.0 \mu\text{g/ml}$) and each component in the cofactor mix. Since $15 \mu\text{l}$ of the cofactor was used, the final concentrations of NADPH, G-6-P, and G-6-P DH were $43.5 \mu\text{M}$, $99 \mu\text{M}$, and 0.025 unit/ml in the culture media, respectively. The cultures were pulsed with [methyl- ^3H]thymidine for 20 hr before harvesting the cells. Each bar represents the mean DPM + S.E. of quadruplicate cultures. An asterisk indicates the value significantly different from naive (NA) control at $P < 0.01$.

phamide, aflatoxin B1 및 carbon tetrachloride 등은 P-450 효소에 의해 대사를 받아서 생성된 대사체가 면역독성을 나타냄이 이미 보고된 바 있다(Yang 등, 1986; Kim 등, 1987; Kaminski 등, 1990). 그러나, 비장세포 자체는 물질을 대사시킬 수 있는 P-450 효소 활성도가 극히 미미하여 대사활성화가 독성발현에 필요한 독성물질의 경우, *in vitro*에서 그 독성여부를 판별하기가 매우 어렵다(Yang 등, 1986; Kim 등, 1987). 이러한 이유로 최근 10여년간 대사활성화가 필요한 면역독성 물질의 검출을 위한 다양한 *in vivo* 및 *in vitro* 시험이 개발되어 왔다. 대사활성화 시스템으로는 먼저 *in vivo* 실험의 경우, P-450 효소 활성도를 크게 증가시키는 유도제를 사용하거나 또는 P-450 효소 억제제를 시험물질과 병행 투여하거나 전처리하여 시험물질의 면역독성 현상이 증감되는 결과를 가지고 대사과정의 역할을 판단할 수 있다(Jeong 등, 1994a; Jordan 등, 1994). 그러나 현재까지 연구된 바로는, P-450 유도제로는 P-450IIB1 유도제인 phenobarbital 만이 유용하게 사용할 수 있고, P-450IA1/2 유도제인 3-methylcholanthrene이나 P-450IIE1 유도제인 ethanol 등은 그 자체가 면역독성을 유발하여 *in vivo* 실험에는 이용할 수 없는 단점이 있었다(White 등, 1985; Holsapple 등, 1993). 또한 P-450 효소 억제제인 SKF-525A 등도 장기간 투여시 오히려 P-450 효소 활성도를 크게 증가시켜 시험에 이용하기가 어려워(현재 논문 준비중), *in vitro* 실험법의 개발이 많이 이루어져 왔다. 초기에는 간의 S-9 또는 microsome 분획을 일정

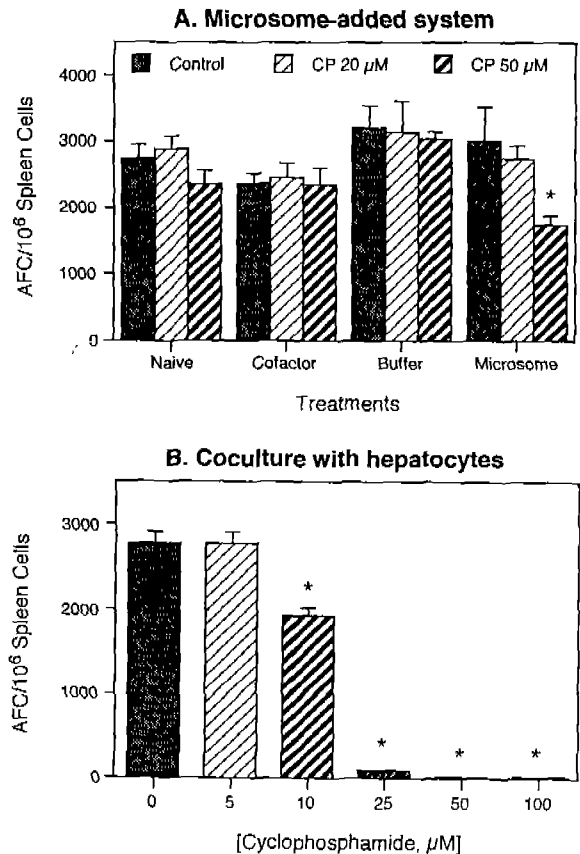


Fig. 6. Comparison of microsome-added system with the coculture of hepatocytes and splenocytes. (A) Splenocytes were cultured for 5 days in the presence of microsomes ($50 \mu\text{g/well}$ in $20 \mu\text{l}$), cofactors ($30 \mu\text{l}$), and cyclophosphamide (CP, $50 \mu\text{l}$). Splenocytes were sensitized with 1×10^7 SRBCs at the initiation of the splenocyte cultures. The antibody-forming cells (AFCs) were enumerated on day 5 using SRBC as an indicator cell. Each bar represents mean AFCs + S.E. of quadruplicate cultures. An asterisk indicates the value significantly different from naive control at $P < 0.05$. (B) Hepatocytes were isolated from female B6C3F1 mice and cultured for 20~24 hr to establish a monolayer. Splenocytes were cocultured with monolayered hepatocytes for 4 hr in the presence of cyclophosphamide. After coincubation, splenocytes were isolated and cultured for 5 days with a sensitization of 1×10^7 SRBCs. Each bar represents mean AFCs + S.E. of quadruplicate cultures. An asterisk indicates the value significantly different from naive control at $P < 0.01$.

시간(1시간 이내) 동안 독성물질과 함께 비장세포 배양에 처리하고 비장세포만을 다시 분리하여, *in vitro* 항체형성 반응이나 기타 다른 면역독성 시험법에 이용하여 왔다(Tucker와 Munson, 1981; Holsapple 등, 1984). 그러나, 비장세포와 microsome 간의 장시간 배양시 microsome 자체가 면역독성을 일으킨다는 보고 이후(Tucker와 Munson, 1981), 단시간 배양 후 비장세포만을 분리하여 실험에 사용해 오고 있는 실정이다. 그러나, 이 시스템의 특성을 자세히 연구하지는 않아 개발의 여지를 남겨놓고

있었다.

한편, 일차배양 간세포는 배양접시 바닥에 밀착하여 성장하는 반면, 비장세포는 부유상태로 배양이 가능하여 이들을 각각 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 간세포는 비장세포에 비해 왕성한 대사력을 소유하고 있어 대사활성화를 매개할 수 있고, 비장세포는 독성물질에 영향을 받는 표적세포로 이용될 수 있어, 간세포와 비장세포 간의 공동배양이 시도되었고, 그 결과가 매우 유의성 있게 나타나 일차배양 간세포-비장세포 공동배양 시험이 대사를 필요로 하는 독성물질의 검출에 유용한 하나의 방법으로 인정되었다(Yang 등, 1986; Kim 등, 1987; Kaminski 등, 1993). 그러나, 이 방법 역시 간세포 분리시 세포의 생존율이 높아야 하며, 이를 위해 숙달된 기술이 필요로하여 좀더 간단한 *in vitro* 면역독성 검출법의 개발이 필요한 실정이다. 또한, 대사과정이 느리거나, 세포분화 후기에 영향을 줄 수 있는 물질의 경우 그 검출이 어려웠다. 따라서 본 연구에서는 이를 극복할 수 있는 시험법 개발의 일환으로 비장세포배양 초기에 간 microsome을 첨가해 주는 배양 방법을 시도하였다.

본 연구를 위하여 대사과정이 면역독성 발현에 필수적인 면역억제제인 cyclophosphamide를 이용하였다. Cyclophosphamide는 P-450IIB1에 의해 주로 대사되어, acrolein과 phosphoramidate mustard로 변환되어 세포내 거대분자들과 결합하여 독성을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Clarke와 Waxman, 1988), 면역독성 시험시에도 양성 대조물질로 그동안 널리 이용되어 왔다(Tucker와 Munson, 1981; Yang 등, 1986; Jeong 등, 1992; Jeong 등, 1994b). 한편, 면역독성의 지표로는 LPS에 의한 B-림파구의 증식능, Con A에 의한 T-림파구의 증식능을 시험하였으며, *in vitro* 항체생성 반응은 macrophage, B-및 T-림파구 등의 세포기능이 모두 필요한 SRBC에 대한 T-세포 의존형 항체반응을 이용하였다(Mosier와 Coppe-lson, 1968; Claman과 Mosier, 1976).

시험 결과, microsome의 첨가에 의해 LPS mitogenicity의 증가 및 Con A mitogenicity의 감소 등(Fig. 1) Tucker와 Munson(1981)이 언급한 면역능 이상이 관찰되었고, LPS mitogenicity의 증가는 microsome 자체에 의해, Con A mitogenicity의 감소는 cofactor중 NADPH에 의해 각각 야기됨을 알아내었다(Fig. 5). 그러나, cyclophosphamide의 면역억제능은 비장세포 배양에 가해준 microsome의 농도에 비례하였으며(Fig. 2), cyclophosphamide의 농도 외에 모든 시험 조건을 동일하게 조절한 후 대조군의 반응을 100%로 환산하여 결과를 계산한 결과, cyclophosphamide의 농도에 비례하는 용량-반응 곡선을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과들은 간 microsome을 첨가한 비장세포 배양방법을 대사활성화가 필요한 면역독성물질의 검출에 사용할 수 있는 매우 간단한 하나의 방법으로 사용될 수 있음을 시사해 주었다. 그리고 cyclophosphamide 처리 시간과 독성간의 관

계를 살펴본 결과, 비장세포 배양초기에 처리하여야만 LPS 및 Con A mitogenicity가 감소될 수 있음을 알 수 있었으며(Fig. 4), 간세포-비장세포 공동배양과의 비교실험에서도 microsome 내 P-450 효소 활성도의 저하가 문제가 됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 이는 cyclophosphamide가 비장세포의 활성화 초기에 주로 독성을 미침과 가해준 microsome 내의 P-450 효소 활성도가 하루 이상 유지되지 못함도 아울러 시사해주는 것으로, 본 배양 방법의 개선이 필요함을 알 수 있다. 현재 일정시간마다 신선한 microsome을 재첨가 해주는 배양방법을 통해 P-450 효소 활성도의 유지를 기하고자 연구하고 있으며, 또한 간 microsome 내의 P-450 효소 활성도를 phenobarbital 등의 유도제를 동물에 전처리하여 극대화시킨 다음, 이를 비장세포 배양에 첨가하여 독성물질의 대사가 더욱 활발히 일어나도록 해서 대사활성화가 면역독성에 미치는 영향에 대하여 연구하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 한국화학연구소 기초연구과제 SR-0094-01에 의해 연구비가 지원되었습니다.

참고문헌

- Bekesi, J. G., Holland, J. F., Anderson, H. A., Fischbein, A. S., Rom, W., Wolff, H. S. and Selikoff, I. J. (1973). Lymphocyte function of Michigan dairymen farmers exposed to polybrominated biphenyls. *Science*. **199**, 1207-1209.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Claman, H. N. and Mosier, D. E. (1976). Cell-cell interaction in antibody production. *Progr. Allergy*. **16**, 40-80.
- Clarke, L. and Waxman, D. J. (1989). Oxidative metabolism of cyclophosphamide: Identification of the hepatic monooxygenase catalysts of drug activation. *Cancer Res.* **49**, 2344-2350.
- Dooley, R. K. and Holsapple, M. P. (1988). Elucidation of cellular targets responsible for tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced suppression of the antibody response. I. Role of the B-lymphocyte. *Immunopharmacol.* **16**, 167-180.
- Exon, J. H., Koller, L. D., Talcott, P. A., O'Reilly, C. A., Henningsen, G. M. (1986). Immunotoxicity testing: An economical multiple-assay approach. *Fund. Appl. Toxicol.* **7**, 387-397.
- Haggerty, H. G. and Holsapple, M. P. (1990). Role of metabolism in dimethylnitrosamine-induced immunosuppression: A review. *Toxicology*. **63**, 1-23.
- Haggerty, H. G., Kim, B. S. and Holsapple, M. P. (1990). Characterization of the effect of direct alkylators on *in vitro* immune responses. *Mutation Res.* **242**, 67-78.
- Holsapple, M. P., Eads, M., Stevens, W. D., Wood, S. C., Kaminski, N. E., Morris, D. L., Poklis, A., Kaminski, E. J. and Jordan, S. D. (1993). Immunosuppression in adult B6C3F1

- mice by chronic exposure to ethanol in a liquid diet. *Immunopharmacol.* **26**, 31-51.
- Holsapple, M. P., Tucker, A. N., McNerney, P. J. and White, K. L., Jr. (1984). Effects of N-nitrosodimethylamine on humoral immunity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **229**, 493-500.
- Jeong, T. C., Yang, K. H. and Holsapple, M. P. (1992). Importance of hepatocyte culture conditions in dimethylnitrosamine-induced suppression of the antibody response in the mixed cultures of murine hepatocytes and splenocytes. *Toxicology.* **72**, 315-327.
- Jeong, T. C., Jordan, S. D., Matulka, R. A., Park, S. S. and Holsapple, M. P. (1994a). Effects of beta-ionone on cytochrome P-450 induction and cocaine-induced immunosuppression. *Toxicologists.* **14**, 954.
- Jeong, T. C., Yang, K. H., Holsapple, M. P. (1994b). Recovery of dimethylnitrosamine-induced immunosuppression by pargyline in the mixed cultures of murine hepatocytes and splenocytes. *Life Sci.* **54**, 605-613.
- Johnson, K. W., Munson, A. E., Kim, D. H. and Holsapple, M. P. (1987). Role of reactive metabolites in the immunosuppression by N-nitrosodimethylamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**, 847-855.
- Jordan, S. D., Jeong, T. C., Matulka, R. A., Stanulis, E. D., Kaminski, E. J. and Holsapple, M. P. (1994). Role of metabolism by esterase and cytochrome P-450 in cocaine-induced immunosuppression. *Toxicologists.* **14**, 1244.
- Kaminski, N. E., Barnes, D., Jordan, S. D. and Holsapple, M. P. (1990). The role of metabolism in carbon tetrachloride-mediated immunosuppression. *In vivo* studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **102**, 9-20.
- Kaminski, N. E., Yang, K. H. and Holsapple, M. P. (1993). Hepatocytes and spleen cell systems. In *Methods in Toxicology*. Vol. 1, *In vitro Biological Systems*. (J. Frazier and C. A. Tyson, Eds.) pp. 279-291. Academic Press, San Diego, CA.
- Kawabata, T. T., Chapman, M. Y., Kim, D. H., Stevens, W. D. and Holsapple, M. P. (1990). Mechanisms of *in vitro* immunosuppression by hepatocyte-generated cyclophosphamide metabolites and 4-hydroperoxy cyclophosphamide. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 927-935.
- Kim, B. S., Jeong, T. C., Choe, S. Y. and Yang, K. H. (1992). Immunosuppressive effects of safrole in BALB/C mice. *Kor. J. Toxicol.* **8**, 191-203.
- Kim, D. H., Yang, K. H., Johnson, K. W. and Holsapple, M. P. (1987). Suppression of *in vitro* antibody responses by dimethylnitrosamine in mixed cultures of mouse splenocytes and mouse primary hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **87**, 32-42.
- Kimber, I., Gerberick, G. F., Loveren, H. V. and House, R. V. (1992). Chemical allergy: molecular mechanisms and practical applications. *Fund. Appl. Toxicol.* **19**, 479-483.
- Lang, D. S., Meier, K. L. and Luster, M. I. (1993). Comparative effects of immunotoxic chemicals on *in vitro* proliferative responses of human and rat lymphocytes. *Fund. Appl. Toxicol.* **21**, 535-545.
- Luster, M. I., Munson, A. E., Thomas, P. T., Holsapple, M. P., Fenters, J. D., White, K. L., Jr., Lauer, L. D., Germolec, D. R., Rosenthal, G. J. and Dean, J. H. (1988). Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fund. Appl. Toxicol.* **10**, 2-19.
- Luster M. I., Portier, C., Pait, D. G., White, K. L., Jr., Gennings, C., Munson, A. E. and Rosenthal, G. J. (1992). Risk assessment in immunotoxicology. I. sensitivity and predictability of immune tests. *Fund. Appl. Toxicol.* **18**, 200-210.
- Mosier, D. E. and Coppelson, L. W. (1968). A three-cell interaction required for the induction of the primary immune response *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 542-547.
- Park, K. S., Seo, K. W., Jeong, T. C., Hwang, S. J. and Kim, H. J. (1993). Effect of hepatotoxicants on the biliary and urinary excretion of acetaminophen and its metabolites in rats. *J. Appl. Pharmacol.* **1**, 50-57.
- Pollock, P. L., Germolec, D. R., Comment, C. E., Rosenthal, G. J., and Luster, M. I. (1994). Development of human lymphocyte-engrafted SCID mice as a model for immunotoxicity assessment. *Fund. Appl. Toxicol.* **22**, 130-138.
- Salocks, C. B., Hsieh, D. P. H. and Byard, J. L., (1981). Butylated hydroxytoluene pretreatment protects against cytotoxicity and reduces covalent binding of aflatoxin B1 in primary hepatocyte cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**, 331-345.
- Smialowicz, R. J., Simmons, J. E., Luebke, R. W. and Allis, J. W. (1991). Immunotoxicologic assessment of subacute exposure of rats to carbon tetrachloride with comparison to hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Fund. Appl. Toxicol.* **17**, 186-196.
- Tucker, A. N. and Munson, A. E. (1981). *In vitro* inhibition of the primary antibody response to sheep erythrocytes by cyclophosphamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**, 617-619.
- Yang, K. H., Kim, B. S., Munson, A. E. and Holsapple, M. P., (1986). Immunosuppression induced by chemicals requiring metabolic activation in mixed cultures of rat hepatocytes and murine splenocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **83**, 420-429.
- White, K. L. Jr., Lysy, H. H. and Holsapple, M. P. (1985). Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: A structure activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacol.* **9**, 155-164.