

◀ 총 설 ▶

담배적용 생체외(*in vitro*) 평가

신한재 · 박철훈

KT&G 중앙연구원
(2008년 6월 3일 접수)

In vitro toxicology test for cigarette mainstream smoke

Han-Jae Shin* and Chul-Hoon Park

KT&G Central Research Institute
(Received June 3, 2008)

1. 서 론

최근에 담배의 품질에 있어서 생물학적 안전성에 관한 사항이 중요시되고 있다. 담배의 안전성 평가에 사용되는 시료는 주로 담배연기응축물(cigarette smoke condensate)이며, *in vitro* 안전성 평가 방법으로는 미생물 또는 포유류 유래 세포주를 이용하는 유전독성 및 세포독성평가 등이 이용된다(DeMarini, 1983; Doolittle 등, 1990; Veltel and Hoheneder, 1996; Bombick 등, 1997).

세포독성과 유전독성 측정법은 빠르고 경제적인 방법이고, 오랜 사용역사를 가지고 있으며, 담배의 양적인 독성을 평가할 수 있는 방법으로서 규제당국에 의해 인정되는 방법일 뿐만 아니라(Health Canada Method), ICH (International Conference on Harmonisation)에 의해 국제적인 지침이 공포된바 있다 (International Conference on Harmonisation Steering Committee, 1995, 1997). 또한 인체 안전성을 평가할 수 있는 표준방법이 CORESTA가 중심이 되어 제정되고 있고 특히 미생물을 이용하는 돌연변이성 및 다양한 세포를 이용하는 세포독성 등의 평가는 표준방법까지 제정

되었다(Andreoli 등, 2003). 한 가지 측정법으로는 모든 물질에 대한 독성 정보를 얻을 수 없으므로 ICH에서는 이들 실험법의 조합을 사용하도록 권고하고 있다.

2. 세포독성 시험

2.1. 서 론

세포독성 평가는 생존기능의 상실이나 실험에 사용된 세포의 특이적인 기능 손상과 관련된 어떤 지표를 측정하느냐에 따라 다양한 방법이 존재한다. 최근 잠재적 위해성 감소 담배제품의 과학적 평가방법에 대한 LSRO(Life Science Research Office) 보고서에서는 lactate dehydrogenase(LDH) assay에 의한 세포독성 평가 방법을 소개한 바 있다. 그러나 보고된 바에 의하면 담배 시료의 경우 단시간 노출 평가 시 LDH assay가 가장 민감한 방법이었으나 3시간 이상 노출 평가 시에는 Neutral red uptake assay가 담배시료의 세포독성 평가 방법으로서 가장 민감한 방법이었다(Putnam 등, 2002; Andreoli 등, 2003). 세포독성은 세포 분열 과정(설치류 세포의 경우 보통 18시간 이상)을

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea (phone: 82-42-866-5542; fax: 82-42-861-1949; e-mail: hshin@ktng.com)

거치면서 촉진, 활발히 나타나는 것이 일반적이고 담배 시료가 색을 띄고 있는 점 등을 고려할 때 Neutral red uptake assay가 담배 시료 평가에 가장 적합한 방법으로 생각된다. 따라서 여기서는 Neutral red uptake assay에 대해 소개하고자 한다.

2.2. 세포독성 측정(NRU assay) 원리

NRU assay는 담배의 세포독성을 평가하는 가장 보편적인 방법으로, 2002년 CORESTA에서 담배 안전성 평가 표준 방법으로 선정되어 inter-lab study가 실시된 바 있으며, 담배 업계에서는 제품 및 시제품, 첨가물 등에 대한 NRU assay 평가 결과를 안전성 입증 자료로 활용하고 있다(Bombick 등, 1998b; Baker 등, 2004). 캐나다의 담배규제법 (Tobacco Act)에서는 2004년 이후 시판되는 모든 담배제품에 대해 NRU 방법에 의한 안전성 평가 결과를 제출하도록 요구하고 있다. Neutral red (3-Amino-7-dimethyl amino-2-methyl phenazine hydrochloride)는 약한 양이온 색소로서 세포에 처리 시 비 이온성 확산(non-ionic diffusion) 이나 음세포작용(pinocytosis)을 통해 쉽게 세포막을 통과하여 세포 내 소기관인 lysosome 기질에 결합, 축적 된다. 따라서 세포막이나 lysosome 막의 손상 또는 변화는 neutral red의 세포 내 흡수 및 결합을 감소시키게 되며, 세포의 손상 정도에 따라 세포에 의해 섭취된 neutral red 양이 다르게 나타난다. 결국 외인성 물질(xenobiotics)에 의해 유발된 세포의 사멸, 손상, 생존 정도를 세포 내 존재하는 neutral red를 측정하여 평가할 수 있게 된다 (2001, ICCAM).

2.3. 세포독성 시험 방법

NRU assay는 크게 세포 배양 및 세포 파종, 물질 처리, neutral red의 처리, 흡광도 측정 과정으로 나눌 수 있다. 담배 시료에 대한 NRU assay에는 BALB/3T3 세포주 및 CHO 세포주가 가장 널리 사용되고 있다. 여러 기관에서 공인된 방법인 만큼 다양한 가이드라인이 존재하지만 대동소이하며 일반적인 실험 방법을 간략하게 Fig. 1에 나타내었다.

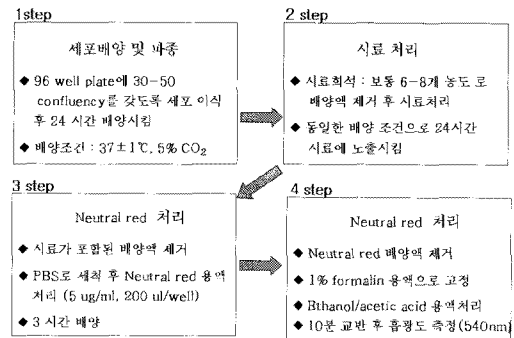


Fig. 1. Neutral red assay를 이용한 세포독성 측정방법

2.4. 세포독성 결과 해석

세포독성 실험 결과는 처리농도-반응 관계에 기초하여 관찰된다. 일반적인 약리학적 또는 독성학적 지표들에 대한 농도-반응 관계를 그림으로 나타내면 직선 보다는 S자 형태(sigmoidal shape)의 곡선을 얻게 된다. 따라서 X축을 로그값으로 변형하여 선형화 한 후 회귀분석을 통해 세포 중 50%가 사멸하는 농도를 구하게 되는데 이 값으로 물질의 독성을 비교 평가하게 된다. 세포 중 50%가 사멸하는 농도는 EC₅₀(Median effective Concentration) 또는 IC₅₀ (Median inhibition Concentration)로 표시하는데, EC₅₀ 값이 작다는 것은 적은 양으로 세포의 50%를 사멸시킬 수 있다는 것을 의미하므로 EC₅₀이 작은 물질일수록 세포에 미치는 독성이 강하다는 것을 의미한다.

3. 유전독성 시험

유전독성(Genotoxicity)이라함은 유전자의 기능을 하는 물질 (예, DNA, 염색체, 유전자)에 직·간접적으로 손상을 주어 형태학·기능적 이상을 일으키는 현상을 말한다(Ames 등, 1975). 유전독성을 변이원성(Mutagenicity)으로 혼용하여 사용되는 경우가 많으나, DNA자체에 손상만 주어도 유전독성으로 표현될 수 있다. 유전독성은 DNA의 염기 또는 염색체에 이상을 초래하는 여부에 따라 microlesion(DNA 염기의 이상)과 macrolesion(염색체의 이상)으로 분류될 수 있다. 이는 다시 질적인

또는 양적인 변화에 따라 세분화될 수 있다 (Ashby 등, 1994; Belinsky 등, 1987).

독성을 일으키는 기작이 매우 다양하므로 시험물질에 대한 정확한 유전독성을 측정하기 위해서는 한 가지 시험이 아니라 몇 가지 유전독성을 battery로 수행해야한다. 담배의 유전독성을 평가하기 위해, 현재 일반적으로 가정 널리 수행하는 2-battery 시험법은 복귀돌연변이 시험(bacteria reverse mutation test)과 *in vitro* 소핵시험 이다 (Andreoli 등, 2003).

3.1. 복귀돌연변이 시험

3.1.1. 서론

특정 아미노산 합성이 저해된 미생물을 이용하여 시험물질에 의해서 아미노산 합성균주로 전환되는지를 확인하는 시험으로서, 사용되는 각각의 균주들은 다양한 변이원성 물질을 탐색하기 위한 각각 다른 유전적 특징을 가지고 있다. 일반적으로 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 등의 5개 균주를 사용하고, 시험물질의 특성에 따라 YG1024 균주를 사용하기도 한다. 소수의 DNA 염기의 치환이나 첨가, 손실 등의 돌연변이를 인지할 수 있는 복귀돌연변이 시험은 유전독성 시험 중 가장 빠르고 간편하면서도 발암성 시험결과와 매우 밀접한 상관 관계를 보이는 시험법으로서, 담배의 유전독성 평가의 첫 단계에서 널리 사용된다(Bombick 등, 1998a).

3.1.2. 복귀돌연변이 시험 원리

돌연변이에는 정상에서 비정상으로 변하는 돌연변이와 비정상에서 정상으로 변하는 돌연변이가 있다. 이중 비정상에서 정상으로 가는 변이를 역돌연변이 혹은 복귀돌연변이라고 한다. 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*) TA100 또는 TA98은 histidine이라는 아미노산을 생합성하는 유전자에 인위적으로 돌연변이를 일으켜 생합성이 불가능하도록 만들어 놓은 균주이다 (정상→비정상). 이 균주를 배양한 것 약 1억 마리와 시험 대상물질(0.1 ml) 등을 2 ml의 용해된 agar(top agar, 미량의 histidine과 biotin 함유)에 넣고 혼합하여 minimal glucose agar plate에 부으면 얼마 후 top

agar(균+시험물질용액)가 굳어진다. 이것을 37°C 배양기에서 2일간 배양하면 돌연변이가 일어난 균이 살아남아 콜로니를 형성한다. 만일 시험 대상물질이 돌연변이 유발물질이라면 1억마리의 균들 중 비정상에서 정상으로 돌연변이를 일으킨 균의 수가 증가하므로, 이들이 증식하여 생성된 균의 덩어리(콜로니, 육안으로 계수 가능한 크기) 수가 증가한다. 따라서 시험물질을 처리하지 않은 배지에서 자연발생적 복귀돌연변이에 대한 상대적 비교를 통해서 시험물질에 의한 복귀돌연변이 능력을 측정할 수 있다.

많은 시험물질의 경우 생체 내에서 대사가 일어난 후에만 변이원성을 가지는 경우가 있다. 하지만 미생물의 경우 포유동물과 같은 대사 능력이 결핍되어 있으므로 대사활성에 의한 변이원성을 알아보기 위해서는 rat의 간에서 추출한 대사활성효소계를 첨가해 주어야 한다. 시험물질의 특성에 따라 대사활성효소계 적용 여부와 상관없이 변이원성을 나타내는 경우도 있지만 특정 조건하에서만 활성을 나타내는 경우도 있다. 따라서, 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험에서는 대사활성 효소계 적용 및 미적용하에서 시험을 수행한다(Kristien and Zeiger, 2000).

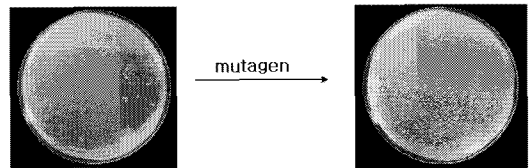


Fig. 2. TA100을 이용한 복귀돌연변이 시험 결과.
 왼쪽: 자발적 복귀돌연변이균;
 오른쪽: sodium azide(1 ug/plate) 처리균

3.1.3. 복귀돌연변이 시험 방법

시험은 direct plate incorporation 방법으로 다음과 같이 실시한다.

- 1) 시험균주를 25 ml의 Nutrient broth액에 접종하여 37°C에서 100 rpm으로 회전하는 항온 배양기에서 약 10시간 배양한다.
- 2) Top agar를 멸균하여 5 ml 용량의 무균 시험관에 2 ml 씩 나누어 냉소 45°C heating block

에 꽃아 놓은 상태를 유지한다.

- 3) 각 농도의 시험물질 용액 0.1 ml, 균배양액 0.1 ml, S-9 mix(혹은 pH 7.4의 sodium-phosphate buffer) 0.5 ml을 45 ℃로 유지된 2 ml의 top agar에 분주해 vortex mixer로 2-3 초간 혼합한다.
- 4) 2)를 minimal glucose agar plate에 부어 고르게 굳힌다.
- 5) Top agar가 응고한 다음 플레이트를 뒤집어 37 ℃ 배양기에서 약 48 시간 배양한 후 복귀돌연변이집락을 계수 한다.

3.1.4. 복귀돌연변이 결과 해석

시험물질을 처리한 플레이트에서 관찰된 복귀돌연변이 집락수가 대사활성계 존재 유·무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다. 항균성(세포독성)은 background lawn이 없어지거나 미세집락의 출현 혹은 집락수가 부형제 대조군에 비해 현저히 감소하는 것으로 판단한다.

시험의 결과표시는, 시험물질의 처리군 각 농도 당의 3 개의 평판으로부터 얻은 집락수의 실측치 및 그들의 평균 ± 표준편차와, 용량상관성이 나타나는 범위에서 구해진 기울기 값을 이용해서 계산된 활성도 값 (Specific activity, 복귀돌연변이 집락수 /img TPM)으로 표시한다. 복귀돌연변이 유발성에 대한 시료들간의 유의적인 차이($p < 0.05$)는 선형회귀분석을 통해서 구해진 각각의 시료들에 대한 활성도 값에 대한 일원분산분석(ANOVA)과, 사후분석으로는 Duncan test를 이용(SPSS 프로그램 사용)하여 검증한다.

3.2. 소핵시험

3.2.1. 서론

In vitro 소핵시험은 염색체의 구조이상과 수적이상 등의 염색체 및 유전체 수준에서 유전독성을 검색할 수 있는 간단하면서도 경제적인 시험법이며(Fenech, 2000; Kürsch-Volders 등, 1997), 복귀 돌연변이 시험법과 함께 널리 사용되고 있다. 화학물질이 DNA 수복능력, 세포분열 시

작용하는 단백질등에 영향을 주거나 유전체 직접 작용하여 생성된 소핵을 가진 세포를 측정하여 유전독성을 평가하는 방법인 소핵 시험은 유전독성 발암물질과 비유전독성 발암물질 모두를 검색할 수 있다(Ashby 등, 1994; Yamasaki 등, 1994). *In vitro* 소핵시험은 세포질분열을 억제하는 cytochalasin B의 처리 유·무에 따라 세포질분열 억제 소핵시험과 일반 소핵시험으로 구분되어진다(French, 1993). 세포질분열억제 소핵시험은 일반 소핵시험에 비해 민감성이 높고, 시험물질에 의한 유전독성을 보다 정확하게 측정할 수 있지만, cytochalasin B 자체가 세포독성이 있으므로 적절한 시험조건을 확립해야 한다는 단점이 있다(Fenech, 2000).

3.2.2. 소핵시험 원리

In vitro 소핵시험은 일반적으로 포유류 유래 배양 세포주를 이용하여 세포내의 소핵 분석을 통해, 시험물질에 의해 유발되는 세포의 염색체 혹은 유사 분열기관에 대한 손상을 검출하는 데 사용된다. 소핵시험의 목적은 세포분열 시 지체되어 남겨진 염색체 조각이나 염색체로 인한 소핵의 형성을 일으키는 유전적 손상 유발물질을 확인하는 것이다. 시험물질에 의해서 손상받은 염색체 조각이 main nucleus 대신 secondary nucleus으로 들어가는데 주핵보다 크기가 훨씬 작아 소핵(micronucleus) 이라고 하고 일반적으로 소핵은 염색체에 이상을 주거나 방추사에 영향을 주는 물질 등에 의해서 유도된다. 소핵의 관찰은 물질에 노출 후 12-24 시간 후에 가능한데 이는 세포가 한번 분열하는데 필요한 시간이다. 하지만 시험물질에 따라 소핵빈도가 최고로 나타나는 시간이 다르기 때문에 일반적으로 시험물질을 처리한 24-27 시간 후 소핵을 측정한다.

3.2.3. 소핵시험방법

In vitro 소핵시험에서 가장 널리 사용되는 Chinese Hamster Ovary cell(CHO)외에 Chinese Hamster Lung V79, BALB/c 3T3 등 시험물질에 따라 다양한 세포주를 사용되고 있지만(Erexson 등, 2001) 여기서는 CHO 세포를 이용한 시험법을

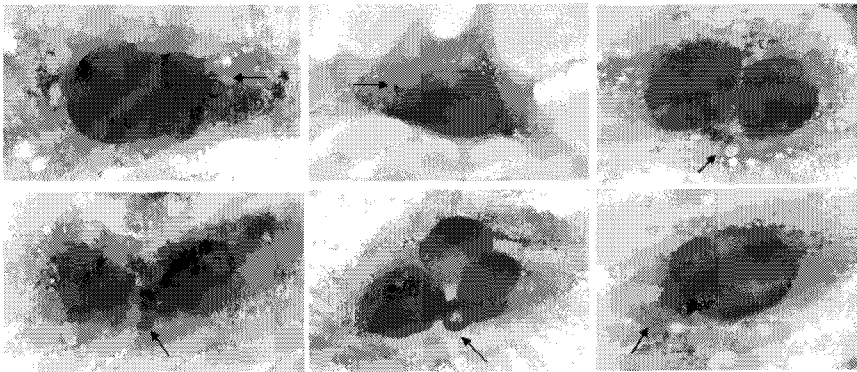


Fig. 3. Giemsa 염색에 의해 나타나는 CHO 세포내 다양한 종류의 소핵들(화살표)

설명하기로 한다. 세포독성 시험에서 결정된 세포 독성 농도(EC₅₀)를 참고하여 4 단계이상의 농도를 세포에 처리해서 다음과 같이 실시한다.

- 1) 25T 세포배양용기에 1×10^4 cells/5 ml이 되도록 세포를 이식한 후 2일간 37°C CO₂ 배양기에서 세포를 배양한다.
- 2) 시험물질을 처리는 단기처리(4시간)와 장기처리(24시간)가 있고 단기처리에는 대사활성계 적용(+S) 혹은 미적용(-S)이 있다.
 4+S : 대사활성계 적용 4시간 처리 후 다시 20시간 배양
 4-S : 대사활성계 미적용 4시간 처리 후 다시 20시간 배양
 24-S : 대사활성계 미적용 24시간 연속 처리
- 3) 세포 수건 후 1×10^5 cells/ml 농도의 세포 현탁액을 만들어 spin cytocentrifuge를 이용해서 세포슬라이드를 제작한다.
- 4) 90 % methanol을 이용해서 세포를 고정시킨 다음 공기건조법으로 검체를 건조시킨 후, 5% Gimsa 용액으로 소핵이 잘 구별되는 적당한 시간(약 30 분 내외) 동안 염색한다.
- 5) 흐르는 물에서 잘 세척한 후 건조시켜 커버글라스와 permount로 봉입하여 검체를 완성한다.
- 6) 양성 대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 대사활성계 미적용시에는 MMC 0.5-2 µg/mL을, 대사활성계 적용시에는 cyclophosphamide 5 µg/mL을 사용한다.

3.2.4. 소핵시험 결과 처리

한 시험 농도당 1000개의 세포를 광학현미경(Nikon microphot FXA, Japan)을 이용하여 ×1000 배율로 판독하여 소핵 세포를 판독한다. 정상핵의 1/3 크기의 핵을 소핵으로 판정했으며, 하나 이상의 소핵을 가지고 있는 세포 모두를 소핵 세포로 계수 하였다.

모든 측정값은 평균값 ± 표준편차로 표시하며 SPSS(version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA를 실시하고 유의한 차이가 인정되는 경우 Dunnet's multiple-range test를 통해서 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 의 수준에서 처리군과의 유의성을 검정한다. 시료의 농도별 소핵세포 생성율에 관한 용량상관성은 선형회귀분석을 통해서 측정할 수도 있다.

4. 담배의 in vitro 독성연구

4.1. 세포독성

담배의 주류연에 대한 세포독성은 일반적으로 TPM(total particulate matter) 및 GVP(gas vapor phase) 분획으로 나누어 평가한다. 다음에서는 각 분획에서 나타나는 세포독성의 특징 및 차이를 살펴보기로 한다.

담배 TPM 분획 시료에는 약 3000여 가지 물질이 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, 여기에는 세포독성 물질 및 무독성 물질들이 혼재되어 있고, 더욱이 이들 물질들은 서로 근접하게 위치하여 상

호작용을 하기 때문에, 세포독성의 정확한 기전을 규명하기는 매우 어렵다. 그럼에도 불구하고 TPM 세포독성 규명에 대한 연구는 꾸준히 진행되고 있다. Préfontaine 등은 잎담배에 포함되어 있는 4종(carbohydrates, Nitrogenous components, the carboxylic acids, phenolic components), 12개 개별 성분을 연소시켜 각각의 TPM을 포집한 후 세포독성을 비교하였다. 그 결과 phenol류(chlorogenic acid 및 lignin)에서 상대적으로 높은 세포독성이 나타났으며(2006), 이러한 페놀류를 담배에 첨가하게 되면 hydrquinone, catechol, phenol 생성이 증가되므로(Torikai 등, 2005), 결국 담배 TPM 세포독성에 phenol류 물질이 깊게 관여하고 있을 것으로 생각된다. 이러한 페놀류 함량에 따른 세포독성의 높은 경향은 담배 원료일에 따른 세포독성 결과에서도 관찰할 수 있는데, 황색종에 비해 volatile phenol은 약 1.5-2배, catechol은 약 2-3배 정도 적은 것으로 알려진 버어리 단엽 켈런의 세포독성은 단위 TPM 당 황색종의 약 50-70 % 수준인 것으로 알려져 있다. 최근 PAH, aromatic amines, heterocyclic amines, phenols의 20여개 개별성분에 대한 TPM 독성 기여율에 대한 연구 결과도 phenol류가 약 10 %정도의 높은 독성 기여율을 나타낸 것으로 보고된 바 있다(Shin 등, 2007).

고체상 성분 이외의 일부 휘발성 물질도 TPM 세포독성에 영향을 줄 가능성이 있다. TPM에서 그 존재가 확인된 formaldehyde나 acrolein 같은 카보닐 화합물 및 HCN이 그 대표적인 경우이다(Nall, 1966; Sakuma 등, 1978). Bombick 등은 황색종 및 버어리의 하위엽보다 상위엽의 단위 TPM 당 세포독성이 증가하는 경향을 가진 것으로 보고한 바 있는데, 주된 원인 중의 하나로 상위엽의 높은 당함량을 지적하였으며, 당의 연소산물인 카보닐 화합물 증가가 TPM 세포독성에 영향을 줄 수 있음을 시사한 바 있다(1998a). 다만, 상·하위엽간의 세포독성이 유의적 차이를 보이지 못하였으며, carbon filter에 의해 일부 가스상 물질을 제거한 경우에도 TPM 세포독성에서는 유의적인 차이를 나타내지 못한 점(Bombick 등, 1997)은 이러한 휘발성 물질들의 TPM 세포독성에 대한 기여율이 높

지 않다는 것을 보여주고 있다. 그러나 주류엔 acetaldehyde 및 acetone의 40%가 고체상 분획에서 발견되었으며(Adam 등, 2006), 연중 알데하이드와 HCN의 반응으로 생길 수 있는 cyanohydrins 같은 부가 생성물 역시 고체상 분획에 존재한다는 최근 보고는(Rickert 등, 2007) TPM 세포독성에 미치는 가스상 휘발성 물질들의 영향이 간과되어서는 안 된다는 것을 의미하며 따라서 이에 대한 지속적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이외에 제품담배 TPM 세포독성에 켈런 돌레, 길이, 공기 회석률 및 미량의 첨가물이 미치는 영향은 거의 없는 것으로 보고된 바 있다(Baker 등, 2004; Roemer 등, 2004).

담배 주류엔에는 puff당 $10^{14}\sim 10^{16}$ alkyl, alkoxy 그리고 peroxy radicals 및 free radical nitric oxide, 알데하이드류 등 높은 반응성을 가진 물질들이 포함되어 있다(Reddy 등, 2002). 이러한 물질들은 세포에 직접적으로 산화적 손상을 줄 뿐만 아니라 세포 내 항산화제를 감소시켜 세포사를 유발할 수 있을 것으로 생각된다. Oxidant scavenger인 N-acetylcysteine 이나 aldehyde scavenger인 aldehyde dehydrogenase에 의해 담배 추출물의 세포독성이 감소했다는 보고는 이러한 oxidant와 알데하이드류가 GVP 세포독성에 많은 영향을 주고 있다는 주장을 뒷받침한다. 특히 켈런담배의 경우, acrolein이 GVP 세포독성의 40-60 %를 차지하며 가장 높은 기여도를 보였다(Tewes 등, 2003; Shin 등, 2007).

앞서 언급한 바와 같이, GVP상에는 반응성이 높고 수명이 짧은(short-lived) 불안정한 물질들이 많이 포함되어 있어 포집 후 독성물질의 소실 및 인공적 부가산물의 생성 우려가 상대적으로 높다. 따라서 가급적 신속하게 세포에 처리하는 것이 필요한데, 보통 1 시간 이내 처리가 권고되고 있다. 이러한 실험 및 시료의 제한, 이에 따른 높은 편차율 때문에 지금까지 GVP 세포독성은 TPM에 비해 보편적으로 담배 독성 평가에 적용되지 못하였다. 그러나 최근 Health Canada에서는 세포독성 자료 제출 항목으로 GVP 세포독성 자료를 포함시키고 있으며, 담배 연기에 의한 산화적 손상이 담배관련 질병 유발의 주요 기전으로 주목받고 있기

때문에 앞으로 이에 대한 연구가 활발히 진행될 것으로 기대된다.

4.2. 유전독성

담배연기에 대한 복귀돌연변이 시험 결과는 1974과 1975년에 처음으로 발표되었다(Kier 등, 1974; Hutton and Hackney, 1975). 담배연기 증고체상 성분으로 되어있는 담배연기 응축물은 frame shift mutation을 측정하는 TA98균주에서 대사활성 효소계 적용시 강력한 돌연변이원성물질인 보고 되었다(Steele 등, 1995). TPM의 돌연변이활성은 잎담배종류 (버어리종 대 황색종), 엽의 위치, 생육시기, 엽의 당과 질소성 성분의 함량 등과 같이 많은 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(DeMarini, 1983). 또한 담배의 흡인저항, 필터종류, 그 밖의 여러 물리성 등에 의해 돌연변이활성이 차이를 나타내고 있다(Sato 등, 1977).

복귀돌연변이 시험은 담배연기를 비롯해서 여러 돌연변이원성물질에 대한 인체 노출을 평가하기 위한 편리하고 정확한 방법으로 사용될 수 있다. 돌연변이원성에 대한 인체 노출을 평가하기 위한 주요 연구들은 뇨 시료를 이용해서 수행한다(Rynard, 1990). 식품 제조시 뇨의 돌연변이활성에 영향을 미치는 것처럼 직업상 노출외에 환경요인 및 음식의 섭취에 따라 뇨의 돌연변이 활성이 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Doolittle 등, 1989a). 연소식 담배와 가열식 담배에 대한 안전성을 비교 하기위해 뇨의 돌연변이성 연구를 보고 하였다 (Doolittle 등, 1989b; Smith 등, 1996)

담배연기 및 담배연기응축물은 in vitro 소핵생성을 증가시킨다. V79를 이용한 소핵시험에서 담배의 가스상 성분과 전연기에 의해 소핵은 현저이 증가하고 있다(Ellard 등, 1991). 다양한 종류의 담배 TPM이 V79 세포의 소핵생성을 유도한다고 보고된 바 있다(Channarayappa and Ong, 1992; Veltel and Hoheneder, 1996; Massey, 2002; Gu 등, 1992). 또한 BALB/c 3T3 세포를 이용시에도 담배연기 응축물이 소핵의 생성을 현저히 증가시킨다고 알려져있다(Moore 등, 2000).

5. 요약

세포독성과 유전독성 측정법은 독성 평가에 있어서 통합요소이며, 잠재적인 생물학적 활성을 측정하는 방법으로서 규제 당국에 의해 인정되는 방법이다. 이들은 빠르고 경제적인 방법이고, 오랜 사용한 역사를 가지고 있으며, 양적인 독성을 평가할 수 있는 방법이다. 담배의 안전성을 평가하기 위해 널리 이용되는 3-battery 시험법은 다음과 같다.

1. 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험
2. 포유류 유래 세포주를 이용한 Neutral red 세포독성
3. 포유류 유래 세포주를 이용한 소핵시험

참고 문헌

- Adam, T., Mitschke, S., Streibel, T., Baker, R. R. and Zimmermann, R. (2006) Quantitative puff-by-puff-resolved characterization of selected toxic compounds in cigarette mainstream smoke. *Chem. Res. Toxicol.* 19(4): 511-20.
- Ames, B. N., Mccann, J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364.
- Andreloi, C., Gigante, D. and Nunziata, A. (2003) A review of *in vitro* methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol. In Vitro* 17: 587-594.
- Ashby, J., Brady, A., Elcombe, C. R., Elliott, B. M., Ishmael, J., Odum, J., Tugwood, J. D., Kettle, S. and Purchase, I. F. (1994) Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis, *Hum. Exp. Toxicol.* 13: S1-S117.
- Baker, R. R., Massey, E. D. and Smith, G.

- (2004) An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 42S: S53-S83.
- Belinsky, S. A., Walker, V. E., Maronpot, R. R., Swenberg, J. A. and Anderson M. W. (1987) Molecular dosimetry of DNA adduct formation and cell toxicity in rat nasal mucosa following exposure to the tobacco specific nitrosamine 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and their relationship to induction of neoplasia. *Cancer Res.* 47: 6058-6065.
- Bombick, D. W., Bombick, B. R., Ayres, P. H., Putnam, K., Avalos, J., Borgerding, M. F. and Doolittle, D. J. (1997) Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smoke condensate from a cigarette containing a novel carbon filter. *Fundam. Appl. Toxicol.* 39(1):11-17.
- Bombick, D. W., Ayres, P. H., Putnam, K., Bombick, B. R. and Doolittle, D. J. (1998a) Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 3. In vitro toxicity of whole smoke. *Food Chem Toxicol.* 36: 191-197.
- Bombick, D. W., Putnam, K., and Doolittle, D. J. (1998b) Comparative cytotoxicity studies of smoke condensation from different types of cigarettes and tobaccos. *Toxicol. In Vitro* 12(3): 241-249.
- Channarayappa, Nath, J. and Ong, T. (1992) Clastogenic and aneuploidogenic effects of cigarette smoke condensate, Mitomycin C and vincristine sulfate. *Mutagenesis* 7(6): 457-460.
- DeMarini, D. M. (2004) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate. *Mutat. Res.* 567: 447-474.
- Doolittle, D. J., Rahn, C. A., Burqer, G. T., Lee, C. K., Reed, B., Riccio, E., Howard, G., Passananti, G. T., Vesell, E. S. and Hayes, A. W. (1989a) Effect of cooking methods on the mutagenicity of food and on urinary mutagenicity of human consumers. *Food Chem Toxicol.* 27: 657-666.
- Doolittle, D. J., Rahn, C. A., Burqer, G. T., Davis, R., deBethizy, J. D., Howard, G., Lee, C. K., McKarns, S. C., Riccio, E., Robinson, J., Reynolds, J. and Hayes, A. W. (1989b) Human urine mutagenicity study comparing cigarettes which burn or only heat tobacco. *Mutat. Res.*, 223, 221-232.
- Doolittle, D. J., Lee, C. K., Ivett, J. L., Mirsalis, J. C., Riccio, E., Rudd, C. J., Burger, G. T. and Hayes A. W. (1990) Comparative studies on the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Environ. Mol. Mutagen.* 15: 93-105.
- Ellard, S., Mohammed, Y., Dogra, S., Wolfel, C., Doehmer, J. and Parry, J. M. (1991) The use of genetically engineered V79 Chinese hamster cultures expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. *Mutagenesis* 6: 461-470.
- Erexson, G. L., Periago, M. V. and Spicer, C. S. (2001) Differential sensitivity of chinese hamster V79 and chinese hamster ovary(CHO) cells in the *in vitro* micronucleus screening assay. *Mutat. Res.* 495: 75-80.
- Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285: 35-44.
- Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.
- Gu, Z. W., Whong, W. Z., Wallace, W. E. and Ong, T. M. (1992) Induction of micronuclei

- in BALB/c 3T3 cells by selected chemicals and complex mixtures. *Mutat. Res.* 279: 217-222.
- Hutton, J. J. and Hackney, C. (1975) Metabolism of Cigarette Smoke Condensates by Human and Rat Homogenates to Form Mutagens Detectable by *Salmonella typhimurium* TA1538. *Cancer Res.* 35, 2461-2468,
- International Conference on Harmonization Steering Committee. (1995) ICH harmonized tripartite guideline. Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals S2A. Available at <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA493.pdf>. Accessed 5-16-2006.
- International Conference on Harmonization Steering Committee. (1997) ICH harmonized tripartite guideline. Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals S2B. Available at <http://ich.org/LOB/media/MEDIA494.pdf>. Accessed 5-16-2006.
- ICCAM. (2001) Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity. NIH publication No: 01-4500. Research Triangle Park, North Carolina, USA.
- INVITTOX (1990) The FRAME modified neutral red uptake cytotoxicity test. The ERGATT/FRAME data bank of in vitro techniques in toxicology, Protocol No. 3a, INVITTOX, Nottingham.
- Kier, L. D., Yamasaki, E. and Ames, B. N. (1974) Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. In: (19th Edn ed.), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71(10): 4159-4163.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P. (1997) The *in vitro* micronucleus test: a multipoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* 392: 19-30.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000) The Ames *Salmonella* /microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455: 29-60.
- Massey, E. D. (2002) Tobacco smoke genotoxicity: an *in vitro* perspective. *Recent Advances in Tobacco Science* 28: 69-103.
- Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M. C., San, R., Shimada, H., Stankowski, L. F. Jr. (2000) Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures workgroup report. *Environ. Mol. Mut.* 35(3): 185-190.
- Nall, J. F. (1966) Complexed cyanide in collected cigarette smoke. Abstrs Vol. 20, 25-26 20th Tobacco Chemists' Research Conference, Winston-Salem, North Carolina, USA.
- Préfontaine, D., Morin, A., Jumarie, C. and Porter, A. (2006) *In vitro* bioactivity of combustion products from 12 tobacco constituents. *Food Chem Toxicol.* 44(5): 724-738.
- Putnam, K. P., Bombick, D. W. and Doolittle, D. J. (2002) Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. in Vitro* 16: 599-607.
- Reddy, S., Finkelstein, E. I., Wong, P. S., Phung, A., Cross, C. E. and van der Vliet, A. (2002) Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. *Free Radical Biol. Med.* 33: 1490-1498.
- Roemer, E., Stabbert, R., Rustemeier, K., Veltel, D. J., Meisgen, T. J., Reininghaus, W., Carchman, R. A., Gaworski, C.L. and Podraza, K. F. (2004) Chemical composition,

- cytotoxicity and mutagenicity of smoke from US commercial and reference cigarettes smoked under two sets of machine smoking conditions. *Toxicol.* 195(1): 31-52.
- Rickert, W. S., Trivedi, A. H., Momin, R. A., Wright, W. G. and Lauterbach, J. H. (2007) Effect of smoking conditions and methods of collection on the mutagenicity and cytotoxicity of cigarette mainstream smoke. *Toxicol Sci.* 96(2): 285-93
- Rynard, S. M. (1990) In biological markers in epidemiology, ed. By B.S. Hulka, T.C. Wilcosky, and J.D. Griffith. New York: oxford University Press, 56-77,
- Sakuma, H., Kusama, M., Shimojima, N. and Sugawara, S. (1978) Gas chromatography analysis of the P-nitrophenylhydrazines of low boiling carbonyl compounds in cigarette smoke. *Tob. Sci.* 22: 158 - 160.
- Sato, S., Seino, Y., Ohka, T., Yahagi, T., Nagao, M., Matsushima, T. and Sugimura, T. (1977) Mutagenicity of smoke condensates from cigarettes, cigars and pipe tobacco. *Cancer Lett.* 3, 1-8,
- Smith, C. J., McKarns, S. C., Davis, R. A., Livingston, S. D., Bombick, B. R., Avalos, J. T., Morgan, W. T. and Doolittle, D. J. (1996) Human urine mutagenicity study comparing cigarettes which burn or primarily heat tobacco. *Mutat. Res.* 361, 1-9,
- Steele, RH, Payne, V. M., Fulp, C. W., Rees, D. C., Lee, C. K. and Doolittle, D. J. (1995) A comparison of the mutagenicity of mainstream cigarette smoke condensates from a representative sample of the U.S. cigarette market with a Kentucky reference cigarette (1R4F) *Mutat. Res.* 342, 179-190.
- Shin, H. J., Sohn, H. O., Park, C. H., Lee, H. S., Min, Y. K. and Hyun, H. C. (2007) Evaluation of the *in vitro* biological activity of selected 35 chemicals. *J. of the Korean Soc. of Tobacco Sci.* 29: 30-40.
- Tewes, F. J., Meisgen, T. J., Veltel, D. J., Roemer, E. and Patskan, G. (2003) Toxicological evaluation of electrically heated cigarette. Part 3: genotoxicity and cytotoxicity of mainstream smoke. *J. Appl. Toxicol.* 23: 341-348.
- Torikai, K., Uwano, Y., Nakamori, T., Tarora, W. and Takahashi, H. (2005) Study on tobacco components involved in the pyrolytic generation of selected smoke constituents. *Food Chem Toxicol.* 43(4): 559-568.
- Veltel, D. and Hoheneder, A. (1996) Characterization of cigarette smoke-induced micronucleic *in vitro*. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48: 548-550.
- Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M., Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R. F., Nguyen-Ba, G., Parooi, S., Rivedal, E., Schiffmann, D., Simons, J. W. and Vasseur, P. (1996) Non-genotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat. Res.* 353: 47-63.