

## 노 들연변이 유발성 시험법 정립

장미\* · 신한재 · 박철훈 · 손형옥 · 현학철

KT&G

(2015년 11월 20일 접수 ; 2015년 12월 11일 수정 ; 2015년 12월 21일 승인)

### Optimization of bacterial urinary mutagenicity test

Mi Jang\*, Han-Jae Shin, Chul-Hoon Park, Hyung-Ok Sohn, Hak-Chul Hyun

KT&G Research Institute

(Received Nov 20, 2015 ; Revised Dec 11, 2015 ; Accepted Dec 21, 2015)

**ABSTRACT:** Urinary mutagenicity is widely recognized as a useful biomarker for the assessment of mutagen exposure level in human. In this study, we optimized the several parameters affecting the activity of urinary mutagenicity using highly sensitive mutation test(microsuspension assay) instead of the conventional Ames test.

First of all, we chose YG1024 as a highly sensitive strain from three strains of *Salmonella typhimurium*(TA98, TA100, YG1024) using representative mutation substances, such as Benzo[a]pyrene, 2-Aminonaphthalene, 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole(MeAaC) and cigarette total particulate matter(TPM). And we established the several kinds of test conditions such as number of bacteria, concentration of metabolic activation system and incubation time for the most sensitive reaction. Also, we optimized efficient pre-treatment method using commercial C18 column. As a results, this method was shown a average of 94 % recovery value and 13 % relative standard deviation. When we compared the urinary mutagenicity between several participants, we confirmed that comparative measurements were possible for different levels of urine mutagenicity.

In conclusion, the optimized highly sensitive mutation test to measure the urinary mutagenicity may be useful in biological monitoring of mutagen exposure level.

**Key words :** Urinary mutagenicity test, Microsuspension assay, YG1024

생체지표는 생체 내에서 측정되는 다양한 생물학적 반응을 가리키는 말로써, 성분이나 대사체 등의 노출량 생체지표(exposure biomarker)와 질환과 관계된 구조적, 기능적 및 임상적 변화를 나타내는 영향 생체지표(effect biomarker)로 분류

된다. 노출량 생체지표는 뇨, 혈액, 타액, 모발 등의 다양한 생체시료로부터 측정될 수 있는데 이중 뇨는 비파괴적인 시료채취가 가능하고 시료 양이 많아 폭넓게 사용된다(Carmella *et al.*, 1997). 미국 담배과학자 협회(Life Science Research

\*연락처 : 34118, 대전광역시 유성구 가정로 30, KT&G연구원

\*Corresponding author : 30, KT&G Research Institute, 30 Gajeong-ro Yuseong-gu, Daejeon 34118, Korea  
(phone: 82-42-866-5552; fax: 82-42-866-5444; e-mail: roscrom@ktng.com)

Office)는 임상 연구에 사용되는 담배 연기 노출 생체지표들 중 연구 자료가 충분하고 신뢰성 있는 평가방법으로 노 돌연변이 유발성 시험(Urinary Mutagenicity)을 권장하였다 (Kara D. Lewis, 2007).

노 돌연변이 유발성 시험은 유전독성 평가 시험법 중 하나인 복귀돌연변이 시험(Ames test)을 응용한 것으로서, 인체 노에 존재하는 모든 돌연변이원성 물질들의 돌연변이성을 포괄적으로 측정하는 방법이다.

복귀돌연변이 시험(Ames test)은 특정 아미노산 합성이 저해된 미생물을 이용하여 돌연변이가 일어나 아미노산 합성 균주로 전환되는 정도를 확인하는 시험으로서, 소수의 DNA 염기치환이나 첨가, 손실 등의 돌연변이를 인지 할 수 있는데 (Kristien Mortelmans and Errol Zeiger, 2000), 다양한 유전독성 시험 중 가장 빠르고 간편하면서도 발암성 시험결과와 밀접한 상관관계를 나타내어 큰 의미가 있다고 할 수 있다(Bombick *et al.*, 1998a). 최근 연구에 따르면 방광암 환자의 노 돌연변이가 정상인에 비해 유의적으로 높게 나타나 노출량 생체지표뿐만 아니라 질환 생체 지표로서 고위험 대상자의 쉽고 빠른 탐색 기법으로도 유용하게 활용될 수 있다

(Mahmoud N El-Rouby *et al.*, 2009).

본 실험에서는 적정균주를 선정하고 전처리 조건을 수정 및 보완함으로써 돌연변이원성물질들에 대한 노출량 생체지표로서 최적의 노 돌연변이 유발성 실험방법을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

Dimethylsulfoxide(DMSO), 2-Aminoanthracene (2AA), Benzo[a]pyrene, 2-Aminonaphthalene, 2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole(MeAc C), Bacto agar, Sodium chloride(NaCl), Glucose, L-histidine/D-biotin는 Sigma-aldrich Company(St Louis, USA) 제품을 사용하였다. Nutrient broth No.2, Glass microfiber filter, Mega bond C18 column(2 g)는 각각 Oxoid, Whatman 그리고

Varian Inc.으로부터 구입하였다. 대사활성효소계(S-9 Mix)에 사용된 S-9(aroclor 1254-induced rat liver)와 cofactor는 각각 Mol-Tox(Boone, NC, USA)와 Wako(Osaka, Japan)에서 구입하였고, 그 밖에 Methanol, Acetonitrile 용매는 Merck (Darmstadt Germany)로부터 구입하였다.

### 노 시료 수집 및 전처리

다양한 환경적, 대사적 요인을 가진 성인남성(총 7명)으로부터 24시간 노를 수집하여 균질하게 잘 섞은 후 실험 전까지 -70 °C 보관하였다.

냉동 노 시료는 실온에서 녹인 후 4 °C, 4000 rpm, 20분간(Union 5KR, 한일) 원심분리하여 상등액을 비이커에 회수한 다음, 10 N Sodium hydroxide solution을 이용하여 pH 7.0으로 적정하였다. Glass microfiber filter(1 µm pore size, GF/B, 47 mm, Whatman)로 여과한 노 시료는 용기에 200 mL씩 담아 Mega bond C18 cartridge(2 g/12 mL, Varian)에 loading 한 후, 10 mL methanol : acetonitrile(1:1) 혼합액을 이용하여 추출하였다. 47 °C 질소 가스를 이용하여 용매를 건조시킨 후 1 mL DMSO로 녹여(농축배수 200배) -20 °C 에 보관하였다.

### 시험균주 및 배지

복귀 돌연변이 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, YG1024 균주들은 Molecular Toxicology Inc.(USA)에서 구입하였다. 균주는 냉동보관 되어있는 시험균주 50 uL를 25 mL의 액체배지(2.5 % Oxoid Nutrient broth No.2)에 접종해 shaking incubator를 이용하여 37 °C에서 약 10시간 배양한 후 사용하였다. 최소배지(minimal agar plate)는 1.5 % Bacto agar와 Vogel-bonner medium E 및 2 % glucose를 함유하도록 만들었고 Top agar는 0.6 % agar와 0.5 % NaCl로 조제하였으며, top agar에는 0.05 mM의 histidine-biotin을 첨가하였다.

### 담배연기 입자상 분획(TPM) 제조

담배연기 입자상 성분(TPM)은 표준담배(Kentucky reference cigarette : 3R4F) 20개피를

자동흡연장치(Heinr Borgwaldt RM20/CS : Germany)를 이용하여 CORESTA 표준흡연조건 (puff volume : 35 mL, puff frequency : 60 sec, puff duration : 2 sec)하에서 연소시키고, 92 mm cambridge filter pad를 이용하여 포집하였다. 적당량의 DMSO를 사용하여 filter pad로부터 TPM을 추출해서, 농도가 10 mg/mL이 되도록 한 후 -70 °C에 보관하면서 시험에 사용하였다.

#### 복귀돌연변이 시험(Microsuspension assay)

복귀돌연변이 시험은 Maron과 Ames(1983)의 방법을 변형한 고감도 Ames test(microsuspension assay) 방법을 사용하였고, 특정성분들에 대한 돌연변이 유발성 검색을 위해서 *Salmonella typhimurium* 균주를 사용하였다.

5 mL 멸균 tube에 시험물질 0.1 mL과 S-9 mix 0.5 mL, 균배양액 0.1 mL을 혼합하여 37 °C에서 40분간 진탕 배양한 다음, 고압증기 멸균한 top agar 2 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3 초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳게 하였다. 음성대조군(부형제)은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조군은 양성대조물질을 같은 방법으로 가하여 실시하였다. Top agar가 굳은 후 플레이트 뚜껑을 닫은 상태에서 플레이트를 뒤집어 37 °C에서 약 48시간 배양 후 집락을 계수하였다.

#### 통계분석

복귀돌연변이 시험 결과는 시료로부터 각 농도군 3개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차와 용량상관성이 나타나는 초기농도 범위에서 구해진 기울기 값을 이용해서 계산된 활성화 값(Specific activity, revertants/mg TPM 또는 revertants/cig.)을 표시하였다. 돌연변이 유발성에 대한 시료들 간의 유의적인 차이(p<0.05)는 SPSS 프로그램의 선형회귀분석을 통해서 구해진 각각의 시료들에 대한 활성화 값에 대한 일원분산분석(ANOVA)과, 사후분석으로는 Duncan test를 이용하여 검증하였다.

개인 간 노 농도 차이에 따른 노 돌연변이 영향

을 최소화하기위해 Creatinine assay kit(R&D system)를 사용하여 노 중 크레아티닌 함량을 분석한 다음 보정하였다.

$$\text{노 돌연변이 유발성} = \frac{\text{A 복귀 집락 활성화도 (number of revertants/mg cratinine)}}{\text{B 크레아티닌 농도}}$$

- A : 선형회귀분석 결과 농축 노 시료 mL당 활성화도(number of revertants/mL)
- B : creatinine 측정값 x 노 농축배수 (mg creatinine/mL)

## 결과 및 고찰

#### 적정 균주 선정

제한된 양의 노 시료로부터 돌연변이성을 측정하기 위해서는 민감도가 높은 균주를 선발해야 하므로 돌연변이 유발 기전에 따라 대표적인 균주 3종, TA98(격자이동 돌연변이형), TA100(염기치환 돌연변이형), YG1024(O-acetyltransferase 과발현 균주)을 선택하여 돌연변이 유발성 민감도를 측정하였다.

대사활성효소계 존재 하에서 대표적인 돌연변이 원성 물질들에 대한 균주별 활성도를 비교하기 위해 Polycyclic aromatic hydrocarbon류 중 B(a)P, Aromatic amine류 중 2-Aminonaphthalene, Heterocyclic amine류 중 MeAaC를 선택하여 담배연기 입자상 성분(TPM)과 함께 돌연변이성을 측정 한 결과, B(a)P를 제외한 모든 물질에서 YG1024 균주의 민감도가 높아 노 돌연변이 유발성 시험 균주로 선정하였다(Fig. 1).

YG1024 균주는 O-acetyltransferase 효소 활성이 과발현된 변형된 TA98의 파생균주로써 노 중 aromatic nitro, amino 및 hydroxylamino 화합물들의 돌연변이성을 효과적으로 검출하는 것으로 알려져 있는데(Pirkko Einisto *et al.*, 1990), 이 실험 결과로 대사활성효소계 존재 하에서 많은 담배연기 성분들이 O-acetyltransferase 효소에 의해 활성화되어 노 돌연변이를 일으킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

노 돌연변이 유발성 시험법 정립

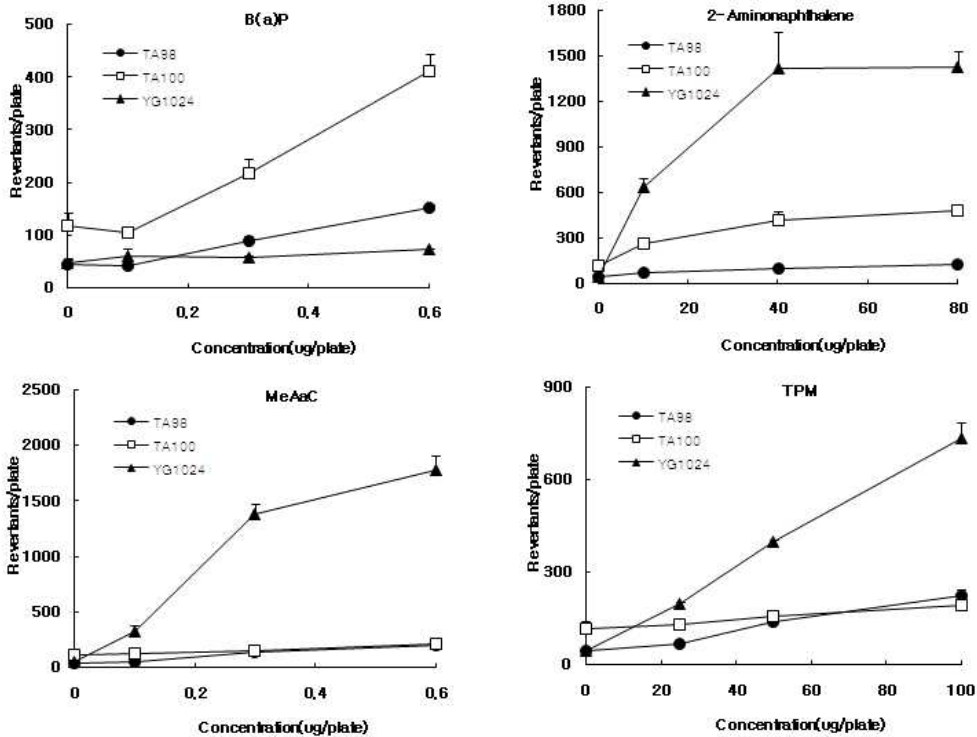


Fig. 1. Comparative mutagenicity of representative mutagens such as B(a)P, 2-aminoanthracene, MeAaC and TPM with tester strains(TA98, TA100, YG1024).  
 ※ Induction factor = 양성대조물질 집락수/자연발생 집락수

Microsuspension Assay 조건정립

Microsuspension assay는 일반적인 돌연변이 유발성 측정법인 Plate incorporation 법과 달리 반응액(균주, 시료 및 대사활성효소계)을 전배양(pre-incubation)한 후 배지에 도달하는 방법(Fig. 2)으로서, 측정 민감도가 높다고 알려져 있다.

본 실험에서는 microsuspension assay시 영향을 줄 수 있는 균주 수, 대사활성효소계 농도, 전배양 시간 등의 적정조건 등을 설정함으로써 최적 반응 조건을 확립하였다(Fig. 3). 균주 수 실험결과,  $4 \times 10^8$ 개 처리시  $2 \times 10^8$ 보다 민감도가 높았으나, 자연발생 집락수가 정상범위(30 - 50/plate)를 벗어나, 적정 개수로  $2 \times 10^8$ 개로 설정하였고, 대사활성효소계 농도는 기존 plate incorporation(19%) 보다 낮은 9%에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

마지막으로 전배양 시간별 시험결과, 활성 차이는 유의하지 않지만, 40분 배양이 가장 높은 활성을 보여 배양 시간을 40분으로 설정하였다.

노 전처리 조건 유효화

노 시료로부터 돌연변이 유발성을 측정하기 위해서는 노에 존재하는 이물질을 제거하고, 미량으로 존재하는 돌연변이성 물질들을 측정 가능 수준으로 농축하기 위한 전처리 단계가 필요하다.

본 실험에서는  $1 \mu\text{m}$  pore size of glass microfiber filter로 여과한 노 시료를 C18 column(Varian Megabond, 2 g)을 이용하여 200배로 농축하였다. C18 column은 상업적인 제품으로서 유기화합물의 분리·정제에 전통적으로 많이 사용되는 XAD-2 resin 보다 측정오차가 작고 정제효율이 높아

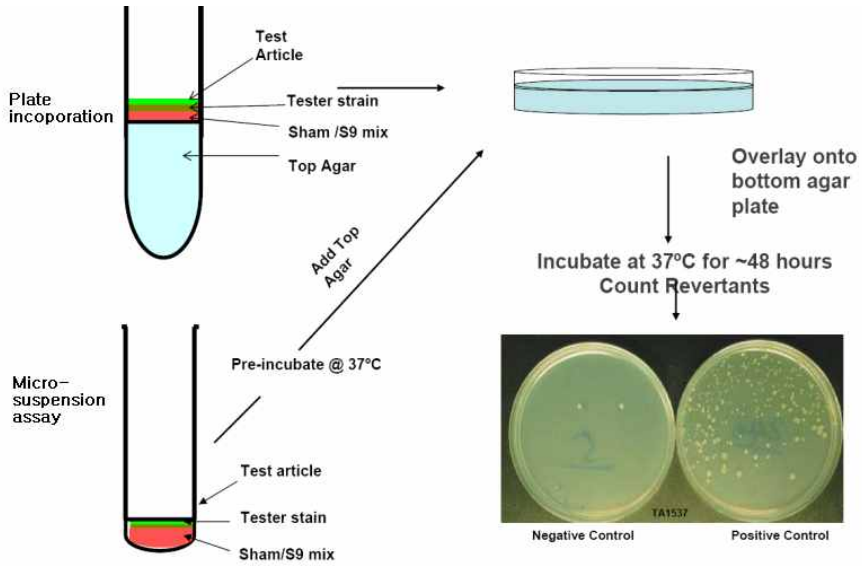


Fig. 2. Comparison of plate incorporation and microsuspension assay.

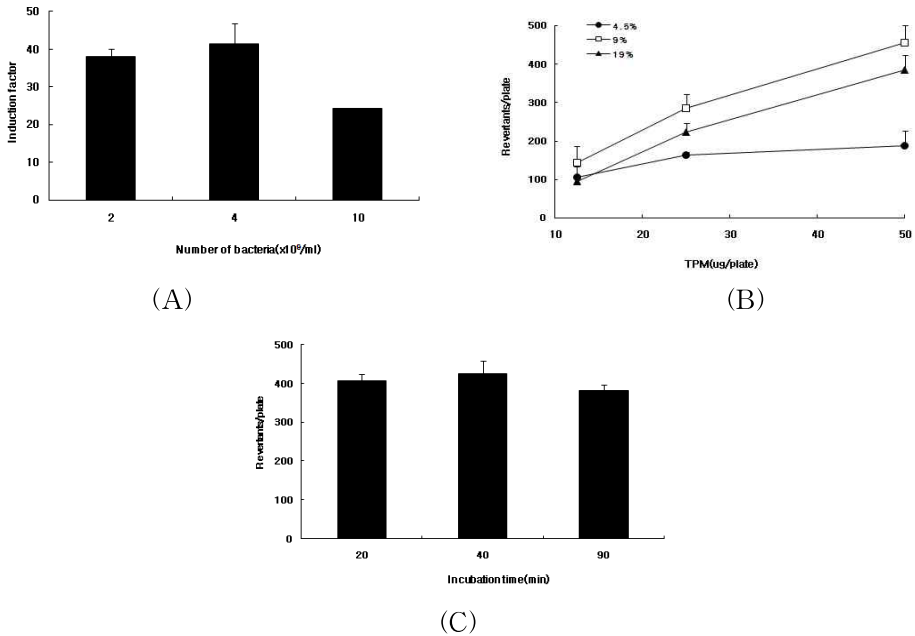


Fig. 3. Optimization of experimental conditions in microsuspension assay. (A) Number of bacteria, (B) Concentration of S-9 mix, (C) Pre-incubation time

microsuspension assay에서 민감도가 높다고 알려져 있으며(Granella M and Clonfero E., 1992) 빠르고 간편하게 사용될 수 있다는 장점이 있다. 전처리 정확성을 비교하기 위해 수행한 세 번의 복귀 돌연변이 실험을 통해, 전처리하지 않은 TPM에 비해 뇨에 TPM을 첨가하여 전처리한 시료가 평균 94 %의 회수율과 13 %의 상대표준편차를 보여 고체상 추출의 정확성을 확인하였다(Fig. 4).

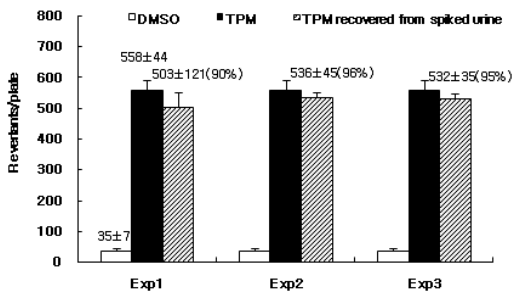


Fig. 4. Recovery data of method.

※ DMSO(음성대조군),  
TPM(전처리하지 않은 TPM 시료),  
TPM recovered spiked urine  
(전처리한 TPM 첨가 뇨 시료)

#### 인체 뇨를 이용한 돌연변이 유발성 비교평가

정립된 전처리 조건을 이용하여 시험 참여자에 대한 뇨 돌연변이 유발성을 측정하였고 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 개인별로 creatinine으로 보정하여 돌연변이성을 비교한 결과, 돌연변이 유발성이 2~35 number of revertants/mg creatinine으

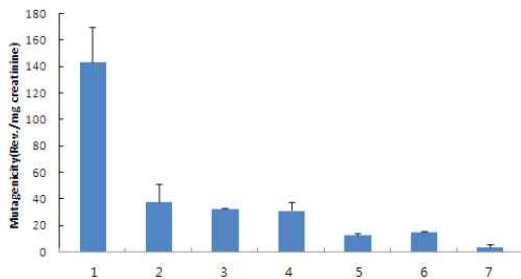


Fig. 5. Comparison of mutagenicity of urine isolated from several participants.

로 다양한 수준의 뇨 돌연변이성에 대한 비교 측정이 가능함을 확인하였다.

뇨 돌연변이 유발성은 개인별 대사능력이나 식습관, 환경 등의 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있으므로 통제된 환경에서 영향을 최소화 하는 것이 중요하다. (Cerna M. and Pastorkova A., 2002) 본 실험의 경우 뇨 돌연변이 유발성 시험법의 유효성을 검증하기 위한 용도로 측정된 결과로써 표본이 작고, 흡연, 식이 및 환경 등을 엄격하게 통제하지 않은 임상 결과이므로, 실제 흡연 임상평가에 활용되기 위해서는 보다 엄격한 통제 조건하에서 연구가 필요하다.

## 결론

뇨 돌연변이 유발성은 인체 내 돌연변이원성 물질들에 대한 노출량을 평가하는 유용한 생체지표이다. 본 연구에서는 일반적인 Ames test 대신 고감도 돌연변이 시험법(microsuspension assay)를 이용하여 뇨 돌연변이 유발성에 영향을 미치는 다양한 인자들을 최적화하였다. 우선 대표적인 돌연변이원성 물질인 Benzo[a]pyrene, 2-Aminonaphthalene, 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole(MeAaC) 그리고 담배연기 고체상 분획(TPM)를 이용하여 세 종류의 *Salmonella typhimurium*(TA98, TA100, YG1024) 균주로부터 가장 민감도가 높은 YG1024를 선정하였다. 그리고 민감도 향상을 위해 균주 수, 대사활성효소계 농도, 전배양 시간 등 시험 조건들을 확립하였다. 또한 C18 컬럼을 활용하여 전처리 과정을 효율화함으로써 90% 이상의 회수율을 확인하였다. 시험 참여자에 대한 뇨 돌연변이 유발성을 비교한 결과, 다양한 수준의 뇨 돌연변이성에 대한 비교 측정이 가능함을 확인하였다.

결론적으로 본 연구에서는 뇨 돌연변이 유발성 측정을 위한 고감도 돌연변이 시험법을 최적화하였고, 돌연변이원성 물질 노출에 대한 생물학적 모니터링에 유용하게 활용될 수 있다.

## 참고 문헌

Ames, B.N., Mccam, J. and Yamasaki, E. (1975)

- Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364
- 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.
- Carmella SG, Borukhova A, Akerkar SA, Hecht SS. (1997). Analysis of human urine for pyridine-n-oxide metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butan one, a tobacco-specific lung carcinogen. *Cancer Epidem. Biomar.* 6: 113-20
- Cerna M. and Pastorkova A. (2002) Bacterial urinary mutagenicity test for monitoring of exposure to genotoxic compounds: a review, *Cent Eur J Health*, Sep:10(3): 124-9
- C. Rossi, P. Poli, A. Buschini, F. Cassoni, F. Magnani, S. Lucertini, S. Tolomei, C. Gerbelli (1995) Occupational genotoxicity assessment by mutagenicity assays, *Toxicol. Lett.*, 77: 289-298
- Edith Yamasaki and Bruce N. Ames (1977) Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(8): 3555-3559
- Granella M. and Clonfero E. (1992) Sensitivity of different bacterial assays in detecting mutagens in urine of humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 268(1): 131-7
- Kara D. Lewis, (2007) The LSRO report on exposure assessment in the evaluation of potential reduced risk tobacco products.
- Kristien Mortelmans and Errol Zeiger (2000) The Ames salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455:29-60
- Mahmoud N El-Rouby, Hanaa Mahmoud Alam El-Din, Abdelbaset A. El-Aaser (2009) Ames test For the Detection of Mutagens in the Urine of Egyptian Cancer Patients, *Egypt. J. Med. Microbio.l*, Vol. 18, No. 4
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215
- Pirkko Einistol, Takehiko Nohrniz, Masahiko Watanabe, Motoi Ishidate Jr, (1990) Sensitivity of Salmonella typhimurium YG1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking, *Mutat. Res.*, 245 : 87-92
- Shun-ichi Azuma1, Satoru Kishino, Seiji Katayama, Yukio Akahori, Hidetsuru Matsushita (1997) Highly sensitive mutation assay for mutagenicity monitoring of indoor air using *Salmonella typhimurium* YG1041 and a microsuspension method. *Mutagenesis.* 12(5): 373-377
- Robert S. U. Baker, Ian Darnton-Hil, Antonio M. Bonin, Andrew Arlauskas, Candida Braithwaite, Michael Wootton,t and A. Stewart Truswell, (1986) Urine Mutagenicity as an Indicator of Exposure to Dietary Mutagens Formed During Cooking of Foods, *Environ. Health Persp.* 67 : 147-152