



DNA 손상지표 코멧시험(Comet assay)을 활용한 3차원 배양세포에서의 유전독성영향연구

OSHRI

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



연구보고서

**DNA 손상지표 코멧시험(Comet assay)을
활용한 3차원 배양세포에서의
유전독성영향연구**

임철홍·신경민

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



요약문

- 연구기간 2021년 01월 ~ 2021년 11월
- 핵심단어 3차원 세포배양, 코멧시험, HepG2
- 연구과제명 DNA 손상지표 코멧시험(Comet assay)를 활용한 3차원 배양세포에서의 유전독성영향연구

1. 연구배경

발암물질의 확인을 위한 가장 중요한 자료는 사람에서의 경험 자료를 제외하면 실험동물을 이용한 발암성시험이다. 그러나 실험동물을 이용한 발암성 시험은 많은 시간과 비용이 소요되어 발암가능성이 높은 화학물질을 우선적으로 적용할 필요가 있다. 현재 발암가능성이 높은 화학물질을 확인하기 위해 유전독성이 주로 활용되고 있으나, 시험의 용이성, 민감도, 특이도 등에서의 한계로 개선된 다양한 새로운 시험방법이 개발되고 있다. 화학물질의 유전자와 염색체에 대한 영향을 간접적으로 확인하는 코멧시험은 기존의 미생물 복귀돌연변이시험과 소핵시험을 대체 또는 보완할 수 있는 시험법으로의 가능성이 높게 평가되고 있으며, 특히 생명윤리가 강화되는 현실에서 동물시험의 대체를 목표로 하는 3차원 세포배양 시스템에서의 적용성이 높은 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 3차원 세포배양 시스템에서의 코멧시험법을 확립하여 발암성평가에 있어 보다 다양한 정보를 제공하고자 하였다.

2. 주요 연구내용

○ 3차원 세포배양

Hang-in drop/저부착성 플레이트 복합 배양법과 저부착성 플레이트 단독 배양법을 검토하여 더 둥근 구형으로 배양되는 Hang-in drop/저부착성 플레이트 복합 배양법을 3차원 세포배양 시스템으로 선택하였다.

○ 코멧시험

CHL/IU와 HepG2 세포를 이용하여 2차원 및 3차원 세포배양 시스템에서 음성대조물질인 d-mannitol, 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate, 대사활성화 양성대조물질인 cyclophosphamide를 사용하여 시험계의 타당성을 검토한 결과 HepG2 세포를 이용한 3차원 배양 시스템이 코멧시험에 가장 적합한 것으로 나타났다.

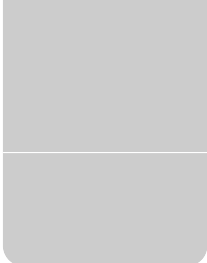
HepG2 세포의 3차원 배양 시스템에서 2-methoxyethanol과 benzalkonium chloride의 코멧시험을 실시한 결과 2-methoxyethanol은 양성, benzalkonium chloride는 음성으로 나타났다.

3. 연구 활용방안

- 발암성시험 후보물질의 선정에 있어 유전독성 및 발암 기전정보를 제공하는 데 활용.
- 연구 성과는 학회 등에 발표

4. 연락처

- 연구책임자 : 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터 소장직대 임철홍
 - ☎ 042) 869-8531
 - E-mail : limch@kosha.or.kr



목 차

I. 서론	3
1. 연구배경	3
2. 연구목적	4
II. 연구방법	7
1. 시험물질	7
2. 세포 및 세포계대	7
3. 3차원 세포배양	8
4. 세포독성시험	8
5. 코멧시험(단세포 전기영동시험)	9
6. 통계처리	10

Ⅲ. 연구결과	13
1. 3차원 세포배양	13
2. 시험조건 확인 시험	15
3. 2-Methoxyethanol 및 benzalkonium chloride의 코멧시험	24
Ⅳ. 고찰	31
참고문헌	39

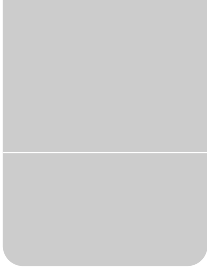


표 목차

〈표 IV-1〉 IARC 발암성 물질 추이	32
-------------------------------	----

그림목차

[그림 III-1] CHL세포의 Hang-in drop 및 저부착성 플레이트 복합 배양결과	13
[그림 III-2] HepG2 세포의 Hang-in drop 및 저부착성 플레이트 복합 배양결과	14
[그림 III-3] HepG2 세포의 저부착성 플레이트 단독 3차원 배양결과	14
[그림 III-4] CHL/IU 세포에서의 양성 및 음성대조물질의 세포독성	15
[그림 III-5] CHL/IU 세포에서의 양성대조물질 및 음성대조물질의 코멧형태	17
[그림 III-6] 2차원 및 3차원 배양 CHL/IU 세포에서 양성 및 음성대조물질의 % Tail DNA	18
[그림 III-7] 2차원 및 3차원 배양 HepG2 세포에서 양성 및 음성대조물질의 세포독성	19
[그림 III-8] HepG2 세포에서의 양성대조물질 및 음성대조물질의 코멧형태	21
[그림 III-9] 2차원 및 3차원 배양 HepG2 세포에서 양성 및 음성대조물질의 % Tail DNA	22
[그림 III-10] HepG2 세포에서의 cyclophosphamide의 S9 처리군 및 비처리군 코멧 형태	23
[그림 III-11] HepG2 세포에서의 cyclophosphamide의 % Tail DNA	24
[그림 III-12] 2-Methoxyethanol 및 benzalkonium chloride의 세포독성	25
[그림 III-13] 2-Methoxyethanol 및 benzalkonium chloride의 코멧 형태	26
[그림 III-14] 2-Methoxyethanol 및 benzalkonium chloride의 % tail DNA	27
[그림 IV-1] 발암물질에 대한 이해의 역사	33

I. 서론

.....

I. 서론

1. 연구배경

산업현장에는 2만 6천 여 종의 화학물질이 사용되는 것으로 추정되는데(유럽연합 등록기준; ECHA 2021), 이 중 많은 화학물질이 유해성을 확인할 충분한 자료 없이 사용되고 있다.

급성독성, 자극성, 과민성 등 화학물질이 일으키는 다른 유해성과 달리 암은 치유가 어렵고 사망에 이를 수 있다는 점에서 특히 중요하게 고려되어 왔다. 국제노동기구(ILO, International Labour Office)에서는 1977년 화학물질로 인한 직업암 예방과 통제 지침서를 통하여 화학물질에 의한 직업암 예방을 강조하는 등 산업보건분야에서도 화학물질에 의한 직업암 예방은 다른 유해성과는 차별적으로 관리되어 왔다(International Labour Office, 1977). 우리나라에서도 발암성이 확인된 화학물질은 금지물질, 허가물질, 특별관리유해물질 등의 지정에 있어 핵심 고려 사항 중 하나로 검토되고 있다.

화학물질로 인한 직업암 예방이 화학물질 관리의 핵심 미션의 하나임에도 불구하고, 발암성 평가 체계는 명확하지 않고 부실하다고 느껴질 때가 많다. 현재 발암성을 확인하기 위한 표준 시험법으로 간주되는 실험동물을 이용한 장기 발암성시험은 400마리 이상의 실험동물을 사용하고 5년 이상의 시험기간이 소요되는 고비용의 시험이기 때문에 모든 화학물질에 대하여 실시할 수 없는 현실적인 문제가 있기 때문이다.

대안으로 오래전부터 유전자 변형동물을 사용하여 시간과 비용을 줄인 시험법을 개발하거나 발암가능성이 높은 물질을 스크리닝하여 동물실험이 필요한 화학물질 수를 감소시키는 노력이 이루어져 왔다. 현재 발암성시험의 스크리닝에 적용되는 유전독성시험은 발암기전과 관련성이 높다. 암의 발생과정을 설명하는 가장 일반적인 방법은 1941년 Berenblum 등이 제시한 개시-

촉진모델(Berenblum 등 1941) 이다. 암의 발생을 돌연변이가 발생하는 개시단계, 돌연변이가 촉진되는 촉진단계, 악성종양이 양성종양으로 변이되는 진행단계로 설명하는 개시-촉진 모델에 의하면 유전자에 영향을 주지 않는 화학물질의 암을 일으킬 가능성은 매우 낮고 따라서 화학물질의 유전독성을 확인하는 것만으로도 발암물질의 상당수를 걸러낼 수 있다는 결론에 도달할 수 있어 보인다. 따라서 발암성시험의 수행여부를 판단하기 전에 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험, 세포를 이용한 염색체이상시험, 실험동물을 이용한 소핵시험 등이 유전독성 확인의 필수절차로 인식되고 있다. 최근에는 기존의 유전독성시험 조합에서 음성인 물질에서 발암물질로 확인되는 화학물질이 증가하고 있어 기존의 유전독성시험 조합의 한계가 제기되고 있지만(Rivm, 2008), 자원의 효율적인 분배차원에서 유전독성은 발암성시험 평가에서 여전히 강력한 지위를 유지하고 있으며, 앞으로도 유지될 것으로 판단된다. 다만, 이제까지 제기되었던 시험의 용이성, 민감도, 특이도 등에서의 한계를 개선한 새로운 시험방법이 기존의 방법을 대체하거나 보완될 것으로 기대되며, 생명윤리적으로 보다 바람직한 시도 또한 활발히 추진될 것으로 예측된다.

3차원 배양세포를 이용한 코멧시험은 동물시험을 대체할 수 있다는 점에서 생명윤리적으로 바람직할 뿐 아니라, 발암예측의 민감도 및 특이도 차원에서도 기존의 유전독성시험법과 비교하여 많은 장점이 보고되고 있어 발암물질의 스크리닝을 위한 대안적 유전독성시험으로 부각되고 있다.

2. 연구목적

이상과 같이 코멧시험은 발암성시험의 스크리닝과 암 진단 등의 장점으로 기존의 유전독성 시험을 대체하거나 보완하는 방법으로 활발히 연구되고 있다. 특히, 동물실험이 대체를 위한 대표적인 시스템인 3차원 세포배양 시스템에서 코멧시험은 가장 우선적으로 검토되는 대안이다. 따라서 본 연구에서는 3차원 세포배양 시스템에서의 코멧시험법을 확립하여 발암성시험 수행을 위한 스크리닝 자료로 활용하고자 하였다.

II. 연구방법

.....

II. 연구방법

1. 시험물질

음성대조물질은 d-Mannitol(Sigma M4125), 양성대조물질은 Ethyl methanesulfonate(Sigma M0880)와 cyclophosphamide monohydrate(Sigma C0768)를 선택하였다. 시험 대상물질로는 2-methoxyethanol (Samchun 000E0399)과 가슴기 살균제 성분으로도 사용된 Benzalkonium Chloride(Sigma 12060)으로 하였다.

2. 세포 및 세포계대

사용한 세포주로는 사람의 간 상피세포에서 유래한 HepG2를 선택하였고, 염색체이상 시험 등에서의 주로 사용되는 CHL/IU를 비교 세포주로 하였다. HepG2는 사람에서 유래하였다는 점 외에도 직접적인 돌연변이물질에 잘 반응하고 종양억제 유전자인 p53 을 가지고 있다는 장점이 있다. HepG2 세포는 바닥면적 75cm² 플라스크(Thermo 156499)에서 계대 배양하였다. 10% Fetal bovine serum(Hyclone SH3008403)과 100 unit/ml의 Penicillin/Streptomycin(CytivaHyclone SV30010)이 함유된 세포배양액(Minimum essential medium(Gibco 11095-080) 10 ml에 HepG2(ATCC HB-8065) 세포 약 1 x 10⁶개를 넣고 1주일 간격으로 계대하였다. 계대는 상층의 배양액을 제거한 후 칼슘/마그네슘이 제거된 인산생리완충액(Phosphate buffered saline, Gibco 10010-23)으로 1회 세척한 후 세포바닥에 부착되어 배양된 세포에 Trypsin-EDTA(Gibco 10010-23) 2ml을 넣고 CO₂ 배양기(Thermo 51030303-TIF)에서 약 5분간 처리하여 세포 간 결합단백질을 분

해시킨 후, 세포배양액 8 ml을 넣고 수 회 피펫팅(배양액을 피펫에 넣고 비우는 조작)하여 단세포화 시킨 후 실시하였다. 단세포화 한 세포는 15 ml 튜브에 넣고 4℃, 1500 rpm에서 10분간 원심한 후(Hanil Combi S14R) 상층액에 남아있는 Trypsin-EDTA를 제거하고 다시 인산생리완충액 5ml로 1회 세척한 후, 신선한 배양액 1 ml를 넣어주었다. 15 ml 튜브에 수득한 세포는 계수하여 바닥면적 75cm² 플라스크에 약 1×10^6 개 넣어 CO₂ 배양기에서 배양을 하고 남은 세포는 시험에 사용하거나 폐기하였다. 세포계대 중간에는 2 ~ 3일 간격으로 Trypsin-EDTA는 처리하지 않고 상층의 배양액을 신선한 바꾸어 주었다. CHL/IU는 계대주기를 주 2회로 하여 HepG2에 준하여 계대 배양하였다.

3. 3차원 세포배양

HepG2 또는 CHL/IU를 1.25×10^5 cells/ml로 조제한 후, 직경 100 mm 배양접시 안에는 배양액을 5 ml 넣고, 뚜껑 안쪽에는 세포액을 20 μ l씩 분주하여(약 55개소) 4일간 거꾸로 배양하였다(Hang-in drop culture). 4일간 hang-in drop 방법으로 배양한 세포는 저부착성 플레이트(96 well plate, Corning 4515)에 옮기고 배양액으로 100 μ l로 채운 후 1주일간 배양하였다. 배양 기간 중에는 2~3일 간격으로 상층 80%의 배지를 신선한 배양액으로 교환하여 스페로이드가 형성되도록 배양하였다. 스페로이드로 배양된 세포는 세포독성시험을 실시하거나 코멧시험에 사용하였다.

4. 세포독성시험

2차원으로 배양된 세포와 3차원 스페로이드로 배양된 세포 모두에서 세포독성시험을 실시하여 2차원으로 배양된 세포에서의 세포독성 시험결과는 코멧시험의 농도결정에 사용하였고, 3차원 스페로이드에서의 세포독성시험은 2

차원으로 배양된 세포와 세포독성을 비교하는데 사용하였다. 2차원 세포배양 시스템에서의 세포독성은 HepG2, CHL/IU 모두 2×10^5 cell/ml로 조제하여 96 well plate(Thermo 167425)에 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣고 24시간 배양한 후 시험물질을 24시간 처리하여 확인하였다. 시험물질 처리가 끝난 세포는 칼슘/마그네슘 제거 인산생리완충액으로 2회 세척한 후 신선한 배양액으로 조제된 CCK-8(R&D CK04-11)을 $110 \mu\text{l}$ (배양액 $100 \mu\text{l}$, CCK8 $10 \mu\text{l}$) 넣고 3시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(Biotek Synergy H1). 세포생존율은 시험물질 처리군의 흡광도 값을 용매대조군의 흡광도 값으로 나눈 값에 100을 곱하여 구하였다.

엑셀 프로그램을 이용하여 대조군과 비교하여 IC₂₀(생존율이 20% 감소하는 농도)을 구하여 코멧시험의 최고농도를 결정하였으며, 세포독성이 낮은 물질(IC₂₀이 10mM 이상인 물질)은 10 mM을 최고농도로 하였다. IC₂₀이 10 mM 이하인 물질은 IC₂₀을 최고농도로 하였다.

3차원 스페로이드로 배양된 세포는 2차원 배양세포에 준하여 세포독성을 실시하였다.

5. 코멧시험(단세포 전기영동시험)

시험물질이 처리된 세포는 Trypin-EDTA를 처리하여 단세포화 한 후 코멧 시험을 실시하였다. 시험물질이 처리된 96 well plate를 칼슘/마그네슘이 제거된 인산생리완충액으로 1회 세척한 후, $50 \mu\text{l}$ 의 Trypsin-EDTA를 처리(2차원 배양세포는 5분, 3차원 스페로이드는 10분)하여 단세포로 만든 세포는 LMAgarose(Trevigen 4250-050-02)와 혼합비율 1:10으로 혼합한 후 Comet slide(Trevigen 4250-050-03)에 $80 \mu\text{l}$ 떨어뜨려 굳힌 후 lysis solution(Trevigen 4250-050-01)에서 4℃, 30분간 방치하여 세포를 용해시켰다. 용해된 세포는 알칼리용액(Sodium hydroxide 0.6g, 200 mM EDTA $250 \mu\text{l}$, deionized water 49.75 ml)에서 20 ~ 60분간 방치하여

DNA를 풀고 변성시킨 후 15 V에서 30분간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 세포는 증류수로 2회 세척하고 70% 에탄올에서 30분간 고정한 후 40℃에서 30분간 건조한 후 SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain(Thermo Fisher S11494)으로 염색하였다. 코멧은 형광이미지분석기(Pannoramic scan 3D Histech NFEC-2015-11-206063)로 % tail DNA 값을 구하여 분석하였다.

6. 통계처리

각 그룹 당 약 100개의 세포를 대상으로 % tail DNA 값을 측정하여 각 값의 중앙값과 상위 25% 및 하위 25% 값으로 표시하였다. 군간의 차이는 크루스칼-왈리스 검증과 만 휘트니 유 검증을 실시하여 구하였고, 단순 선형 회귀분석을 실시하여 경향성을 구하였다.

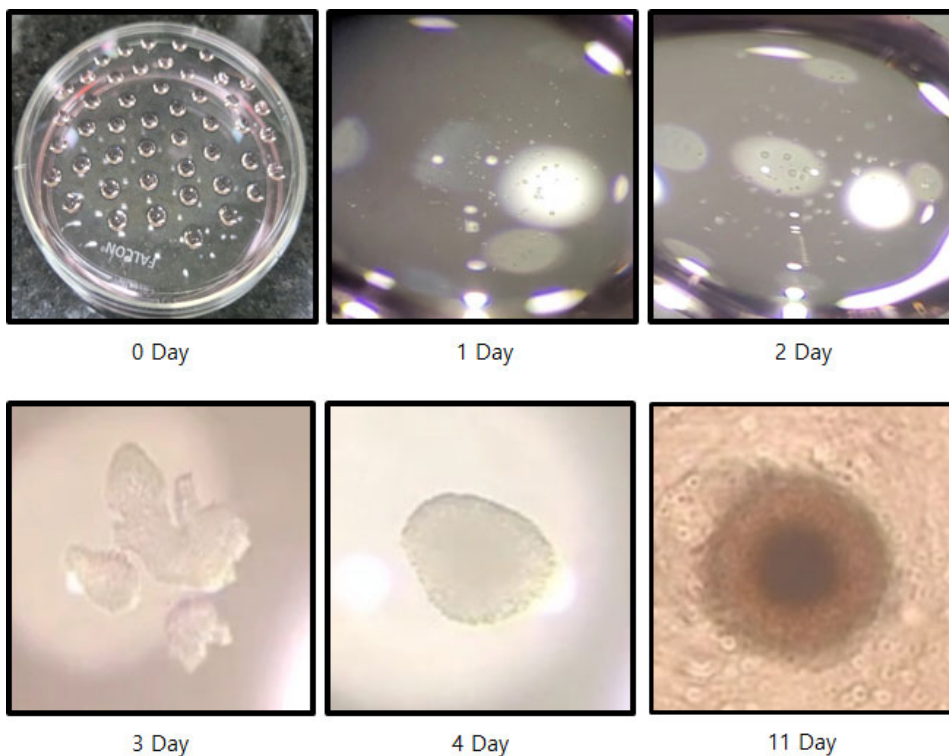
Ⅲ. 연구결과

.....

Ⅲ. 연구결과

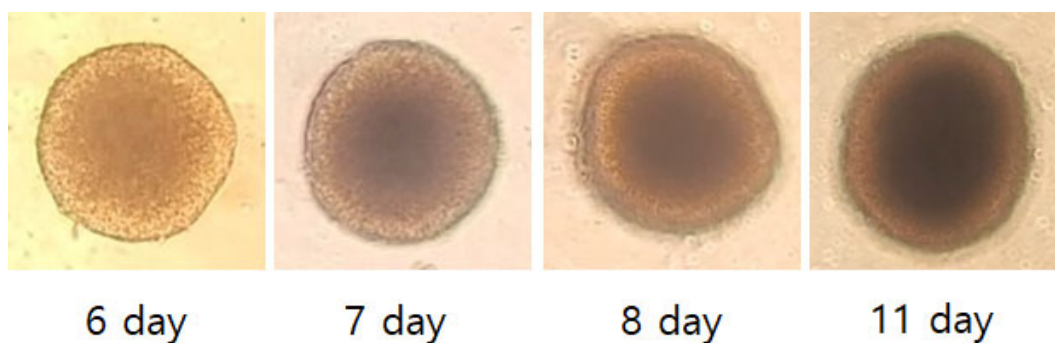
1. 3차원 세포배양

3차원 세포배양 시스템에서 코멧시험을 수행하기 위하여 체외 소핵시험 및 염색체이상 시험에서 자주 사용되는 CHL/IU 세포를 이용하여 3차원 세포배양을 실시한 결과 CHL/IU 세포는 Hang-in drop 방법으로 4일까지 3차원의 세포 덩어리가 형성되었으며, 이것을 저부착성의 96 well 플레이트에 옮겨 7일간 추가 배양하여 둥근 구 형태의 스페로이드를 얻었다(그림 Ⅲ-1).



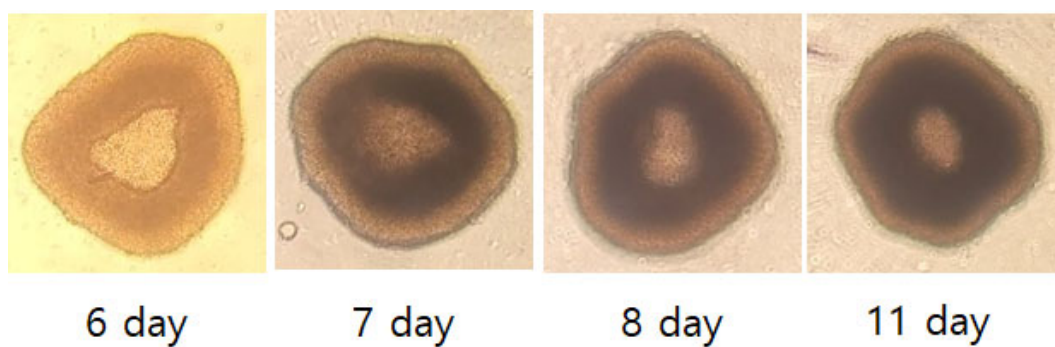
[그림 Ⅲ-1] CHL세포의 Hang-in drop 및 저부착성 플레이트 복합 배양결과

HepG2 세포에서도 Hang-in drop/저부착성 플레이트 복합배양 방법으로 배양 11일차에 구형의 스페로이드 형성을 확인하였다(그림 III-2).



[그림 III-2] HepG2 세포의 Hang-in drop 및 저부착성 플레이트 복합 배양결과

Hang-in drop 과정 없이 저부착성 플레이트에서 직접 배양하면 3차원으로 성장하기는 하였으나, 찌그러진 구 형태를 보여 이 후 시험에서는 hang-in drop/저부착성 플레이트 복합배양 방식으로 3차원 배양세포를 얻었다(그림 III-3).

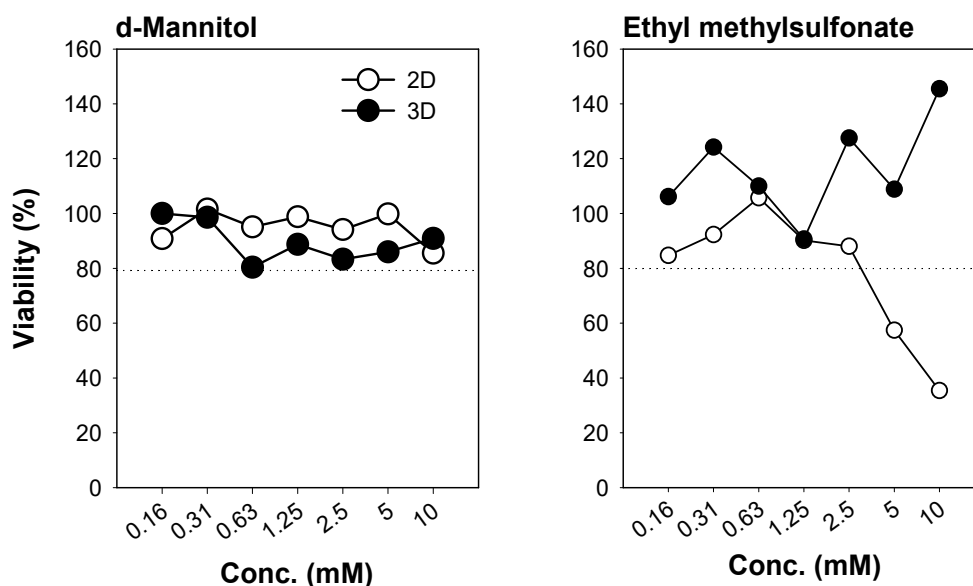


[그림 III-3] HepG2 세포의 저부착성 플레이트 단독 3차원 배양결과

2. 시험조건 확인 시험

CHL/IU 세포를 사용하여 음성대조물질로 d-mannitol을, 양성대조물질로 ethyl methanesulfonate를 코멧시험의 조건시험에 사용하였다.

음성대조물질인 d-mannitol은 10 mM에서 2차원 및 3차원 세포배양 시스템에서 세포독성이 일어나지 않았고, 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate는 2차원 세포배양 시스템, 3차원 세포배양 시스템 각각 IC₂₀(20%의 세포독성을 일으키는 농도)이 3.26 mM과 >10 mM이었다(그림 III-4).



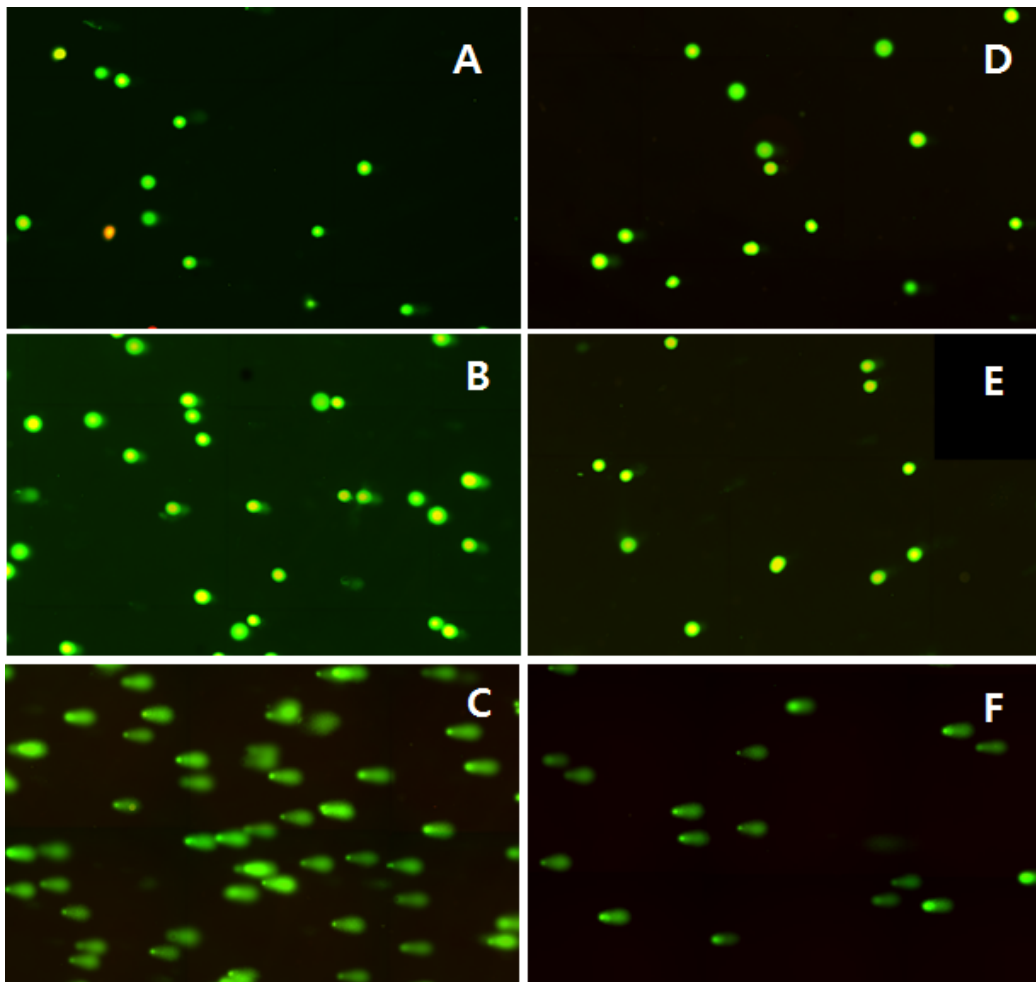
[그림 III-4] CHL/IU 세포에서의 양성 및 음성대조물질의 세포독성

한편 (유전자 손상이 아닌) 세포독성에 의해서도 % tail DNA값이 증가할 수 있는 데, 이를 방지하기 위하여 IC₂₀(생존율이 20% 감소하는 농도) 이하에서 코멧시험 수행이 권장된다. 따라서 음성대조물질인 d-mannitol은 2차원 및 3차원 세포배양 시스템 모두에서 고농도를 10 mM로 하고 중농도, 저

농도는 각각 2.5 mM과 0.3125 mM로 하여 코멧시험을 수행하였다. 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate는 3차원 세포배양 시스템에서는 10 mM에서 세포독성이 나타나지 않았으나 2차원 세포배양 시스템과 3차원 세포배양 시스템에서의 결과를 비교하기 위하여 2차원 세포배양시스템에서의 IC₂₀이 3.26 mM인 것을 고려하여 2차원 세포배양 시스템과 3차원 세포배양 시스템 모두에서 고농도, 중농도, 저농도를 각각 1.25 mM, 0.625 mM, 0.3125 mM로 하여 코멧시험을 수행하였다.

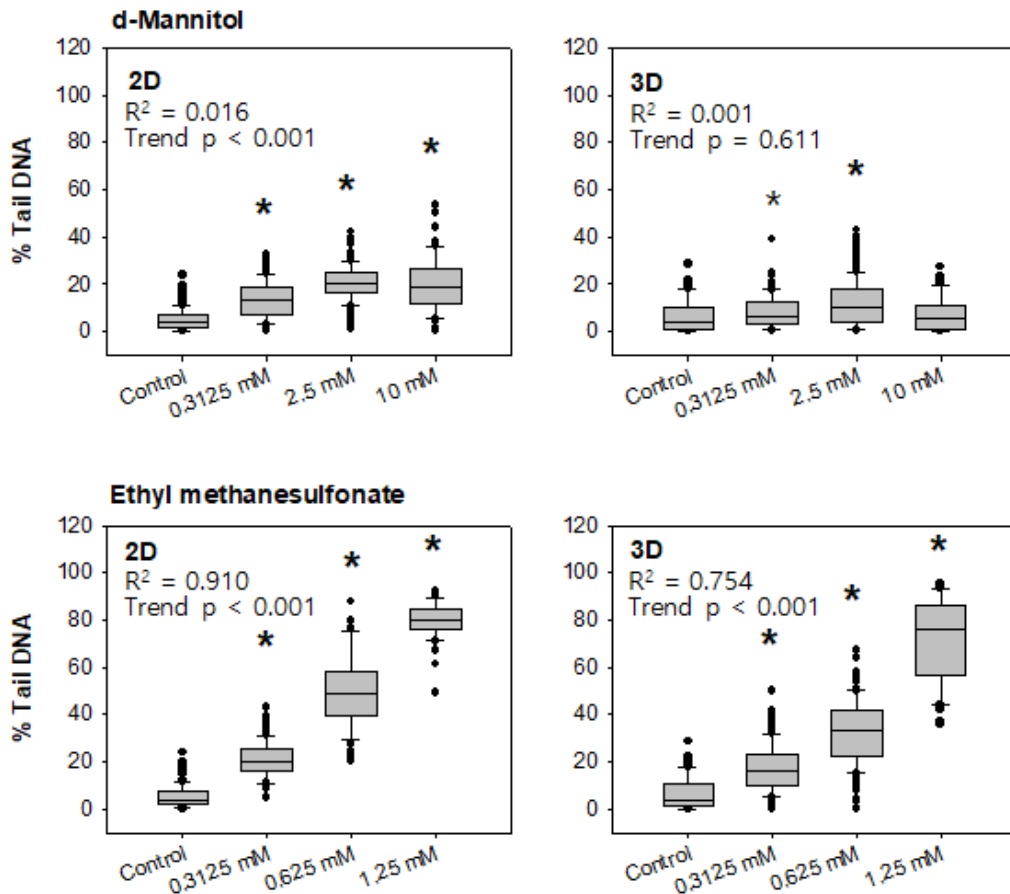
음성대조물질 및 양성대조물질의 코멧 형태는 [그림 III-5]와 같았다. 코멧의 형태는 2차원 및 3차원 배양시스템 모두에서 시험물질이 투여되지 않은 세포에서는 대부분 둥근 머리모양만 관찰되었고(A, D), 음성대조물질인 d-mannitol 10 mM 처리시에도 대부분 둥글고 뚜렷한 머리 모양만 관찰되고 핵성과 같은 꼬리는 거의 관찰되지 않은 것처럼 보였다(B, E). 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate는 1.25 mM 처리시 2차원 및 3차원 배양세포 시스템 모두에서 대부분 작은 둥근 머리모양과 큰 꼬리가 관찰되었다(C, F).

코멧 전용 분석프로그램을 이용하여 % tail DNA를 측정한 결과는 [그림 III-6]에 나타내었다. 2차원 세포배양시스템에서 화학물질을 처리하지 않은 세포의 % tail DNA 중위값은 3.91이었다. 그러나 10 mM의 d-mannitol 처리시 % tail DNA 중위값이 19.1로 시험물질을 처리하지 않은 것과 비교하여 상당히 증가한 것으로 계산되었다. 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate의 % tail DNA 중위값은 79.7로 시험물질을 처리하지 않은 것과 d-mannitol을 처리한 것과 비교하여 매우 높은 값을 보였다. 3차원 배양세포 시스템에서는 화학물질을 처리하지 않은 세포에서 % tail DNA 중위값은 3.69였고, 음성대조물질로 사용한 d-mannitol은 10 mM 처리시 5.44로 2차원 세포배양 시스템에서보다는 d-mannitol의 중위값이 낮았다. 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate의 중위값은 75.7로 시험물질 무처리 및 d-mannitol 처리군과 비교하여 매우 높은 값을 보였다.



[그림 III-5] CHL/IU 세포에서의 양성대조물질 및 음성대조물질의 코멧형태

A~C, picture of comet at 2D culture system. A, No chemical; B, 10 mM of d-mannitol; C, 1.25 mM Ethyl methanesulfonate. D~E, picture of comet at 3D culture system. D, No chemical; E, 10 mM d-mannitol; F, 1.25 mM Ethyl methanesulfonate.



[그림 III-6] 2차원 및 3차원 배양 CHL/IU 세포에서 양성 및 음성대조물질의 % Tail DNA

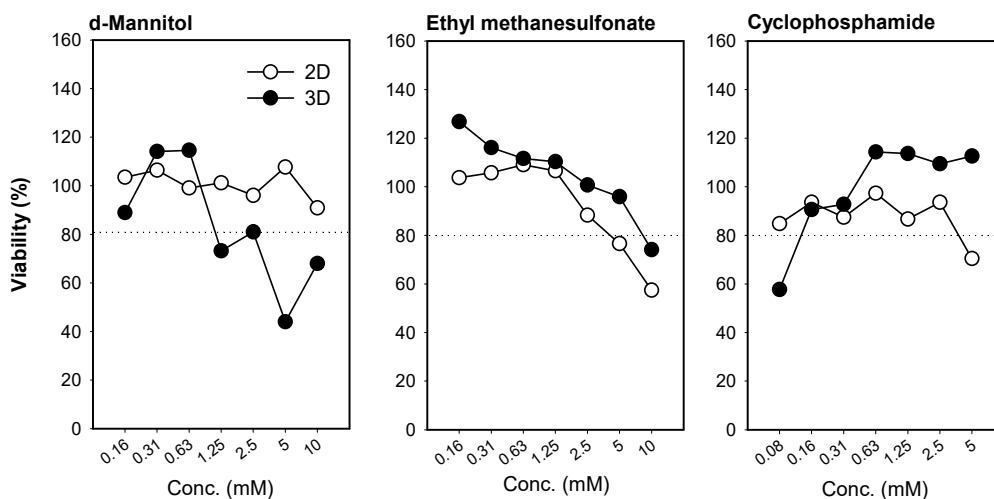
*, $p < 0.05$

통계분석을 실시한 결과, d-mannitol은 2차원 세포배양 시스템에서는 0.3125 mM, 2.5 mM, 10 mM 모두에서 시험물질을 처리하지 않은 것과 유의한 차이를 보였고, 3차원 배양세포 배양시스템에서도 0.3125 mM 및 2.5 mM에서 유의한 차이를 보였다. 그러나 경향 분석을 실시한 결과 2차원 세포배양 시스템에서는 농도 의존적으로 % tail DNA값이 증가하였으나 ($p < 0.001$), 3차원 세포배양 시스템에서는 유의한 차이가 없었다($p = 0.611$). 양성대조물질에서는 2차원 세포배양 시스템, 3차원 세포배양 시스템에서 저

농도, 중농도, 고농도 모두에서 대조군과 유의한 차이가 있었으며, 경향 분석 결과에서도 2차원 세포배양 시스템($p < 0.001$), 3차원 세포배양 시스템($p < 0.001$) 모두 유의한 결과를 보였다.

이상의 결과, 2차원 세포배양 시스템, 3차원 세포배양 시스템 모두 양성대조물질에 대한 적정성이 확인되었다. 그러나 음성대조물질인 d-mannitol에 대해서는 2차원 세포배양 시스템에서는 적정성을 확인하지 못하였다. 3차원 세포배양 시스템에서는 0.3125 mM 및 2.5 mM에서 대조군과 유의한 차이를 보였으나, 10 mM에서 유의한 차이가 나타나지 않았고, 경향 분석 결과에서도 유의하지 않은 결과를 보여 코멧시험의 적정성이 확인된 것으로 판단되었다.

HepG2 세포계에서는 소핵 및 염색체이상시험에서 대사활성 양성대조물질로 사용되는 cyclophosphamide를 추가하여 조건시험의 적정성을 확인하였다.



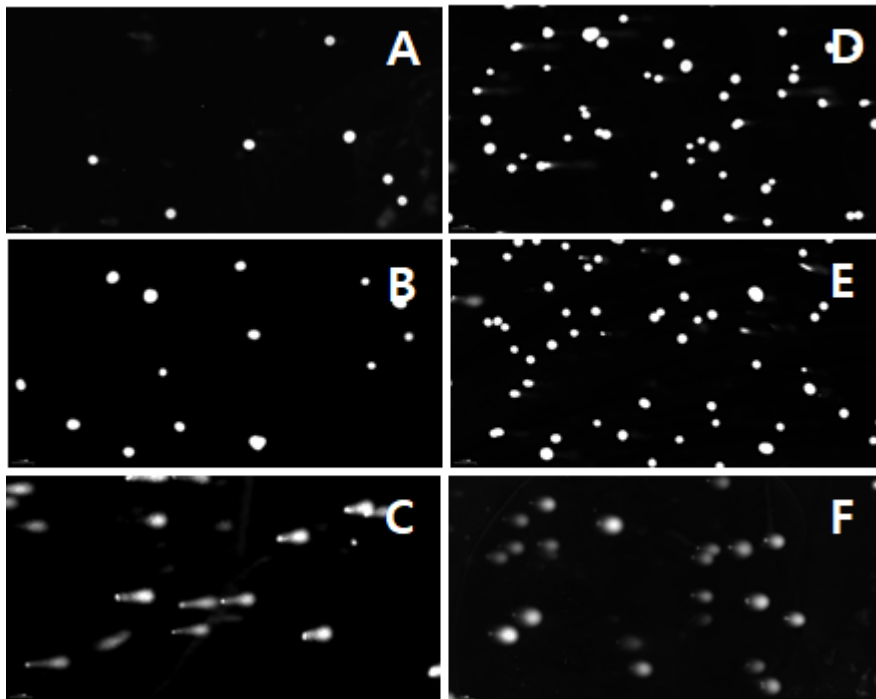
[그림 III-7] 2차원 및 3차원 배양 HepG2 세포에서 양성 및 음성대조물질의 세포독성

세포독성 시험을 수행한 결과, 2차원 세포배양시스템에서 HepG2 세포의 IC20은 음성대조물질인 d-mannitol은 10 mM을 초과하였고, 양성대조물질인 ethyl meththanesulfonate와 cyclophosphamide monohydrate는 각각 4.08 mM과 9.89 mM이었다(그림 III-7).

2차원 세포배양 시스템과 3차원 세포배양 시스템에서 음성대조물질인 d-mannitol의 0, 2.5, 5, 10 mM에서 % tail DNA 중위값은 0.08, 1.25, 0.30, 1.19였고, 3차원 세포배양 시스템에서는 0, 2.5, 10 mM에서 각각 3.83, 0.95, 3.04로 2차원 세포배양 시스템과 3차원 세포배양 시스템 모두에서 d-mannitol에 의한 % tail DNA값의 유의한 차이는 없었다. 경향 분석 결과에서도 모두 유의한 결과는 보이지 않았다(2차원 세포배양 시스템 $p=0.148$; 3차원 세포배양 시스템 $p=0.064$). 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate은 2차원 세포배양 시스템에서 0.625, 1.25, 2.5 mM에서 % tail DNA의 중위값이 각각 38.0, 46.4, 90.5였고, 3차원세포배양 시스템에서는 1, 2, 4 mM에서 % tail DNA 중위값이 각각 95.4, 97.4, 96.1로 모두 대조군과 유의한 차이를 보였다. 경향 분석 결과에서도 2차원 세포배양 시스템, 3차원 세포배양 시스템 모두 유의한 결과를 보였다(그림 III-8, III-9).

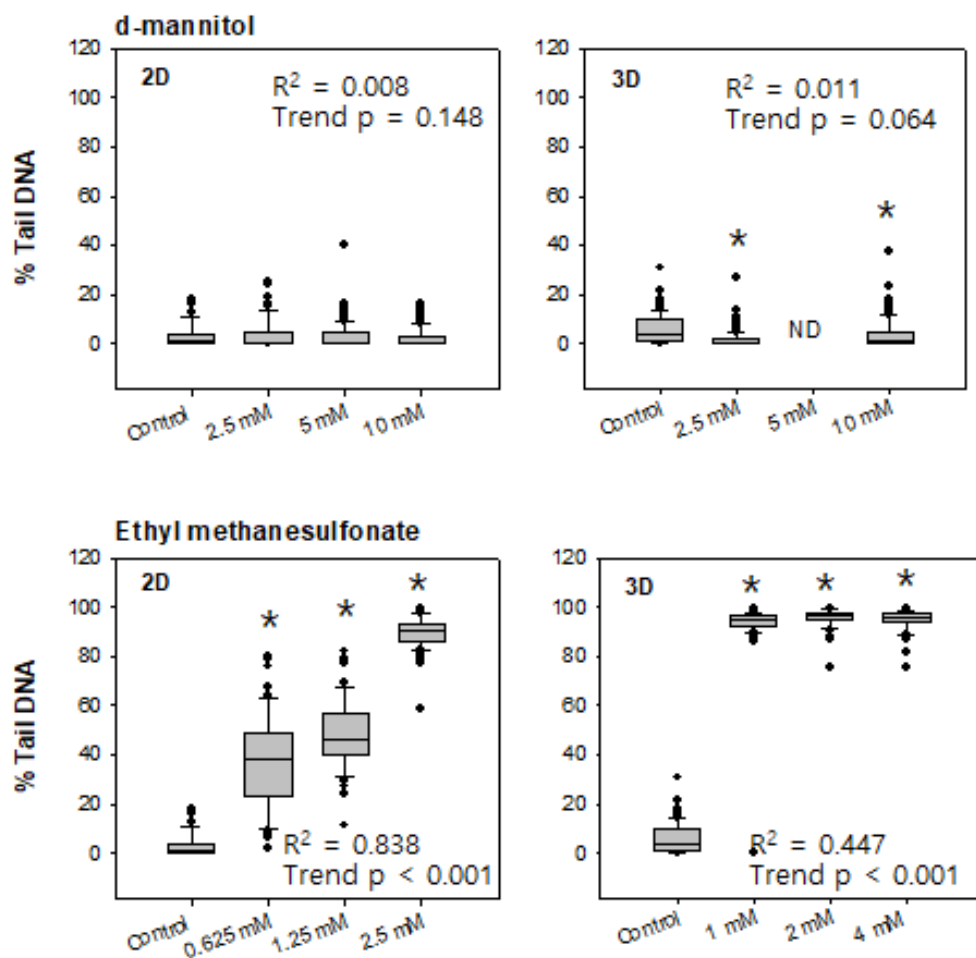
대사활성제에 의한 영향을 확인하기 위하여 사용한 cyclophosphamide는 2차원 세포배양 시스템에서는 S9을 처리하지 않은 경우에도 % tail DNA 중위값이 2.5, 5, 10 mM에서 각각 21.2, 30.4, 32.5로 대조군의 3.83보다 유의하게 높았고, 경향 분석 결과에서도 유의하게 증가하였다. 그러나 3차원 세포배양시스템에서는 S9을 처리하지 않은 것은 % tail DNA 중위값이 2.5, 5 mM에서는 각각 12.49와 11.4로 대조군보다 유의하게 높았으나, 10 mM에서는 2.52로 대조군과 차이가 없었으며, 경향 분석에서도 유의한 차이를 보이지 않아($p=0.996$; 그림 III-8, III-9), 음성으로 판정할 수 있었다.

S9을 처리한 경우에는 2.5, 5, 10 mM에서 각각 % tail DNA 중위값이 11.8, 28.8, 37.8로 각각 대조군보다 유의하게 높았고, 경향 분석결과에서도 유의한 증가가 확인되었다(그림 III-10, III-11).



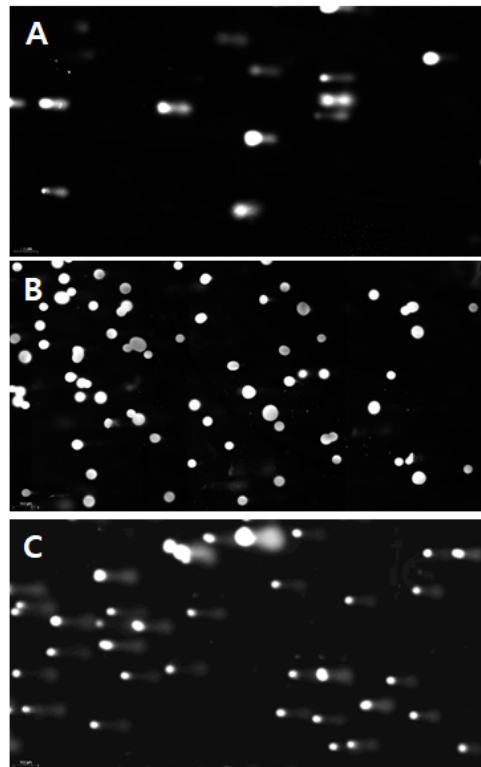
[그림 III-8] HepG2 세포에서의 양성대조물질 및 음성대조물질의 코멧형태

A~C, picture of comet at 2D culture system. A, No chemical; B, 10 mM of d-mannitol; C, 2.5 mM Ethyl methanesulfonate, D~F, picture of comet at 3D culture system. D, No chemical; E, 10 mM d-mannitol; F, 2 mM Ethyl methanesulfonate.



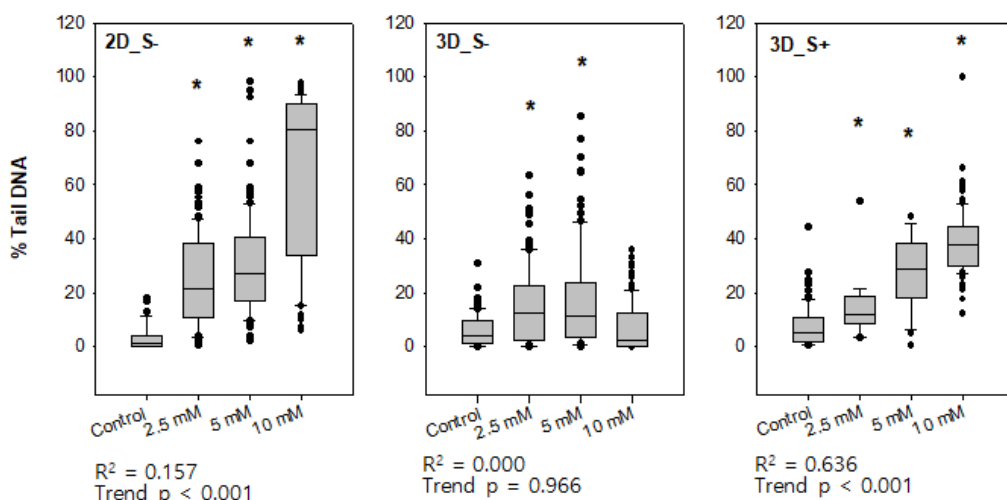
[그림 III-9] 2차원 및 3차원 배양 HepG2 세포에서 양성 및 음성대조물질의 % Tail DNA

*, $p < 0.05$



[그림 III-10] HepG2 세포에서의 cyclophosphamide의 S9 처리군 및 비처리군
코멧 형태

A, No chemical; B, S9-; C, S9+



[그림 III-11] HepG2 세포에서의 cyclophosphamide의 % Tail DNA

*, $p < 0.05$

이상의 결과 HepG2를 사용한 3차원 세포배양 시스템은 음성대조물질인 d-mannitol에서는 코멧시험이 음성이었고, 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate에서는 명확한 양성을 보였으며, 대사활성 양성대조물질인 cyclophosphamide에서는 S-는 음성, S+는 양성으로 코멧시험의 적정성을 위해 필요한 조건을 모두 충족하여, 3차원 세포배양 시스템에서의 코멧시험에 적합한 것으로 판단하였다.

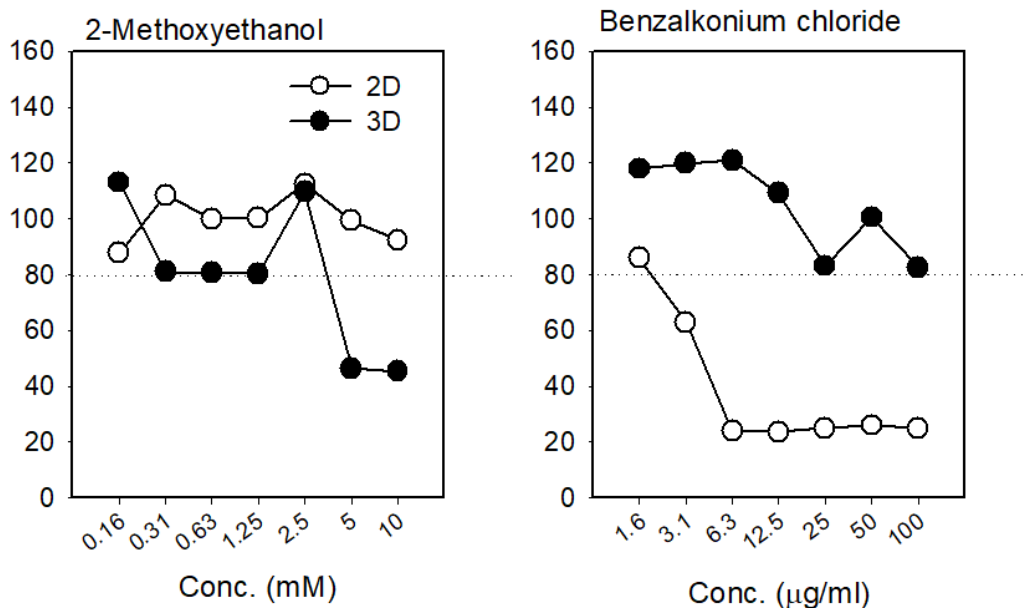
3. 2-Methoxyethanol 및 benzalkonium chloride의 코멧시험

조건시험결과 선택된 HepG2 세포의 3차원 세포배양 시스템에서 2-methoxyethanol과 benzalkonium chloride의 코멧시험을 실시하였다 (그림 III-12, III-13, III-14).

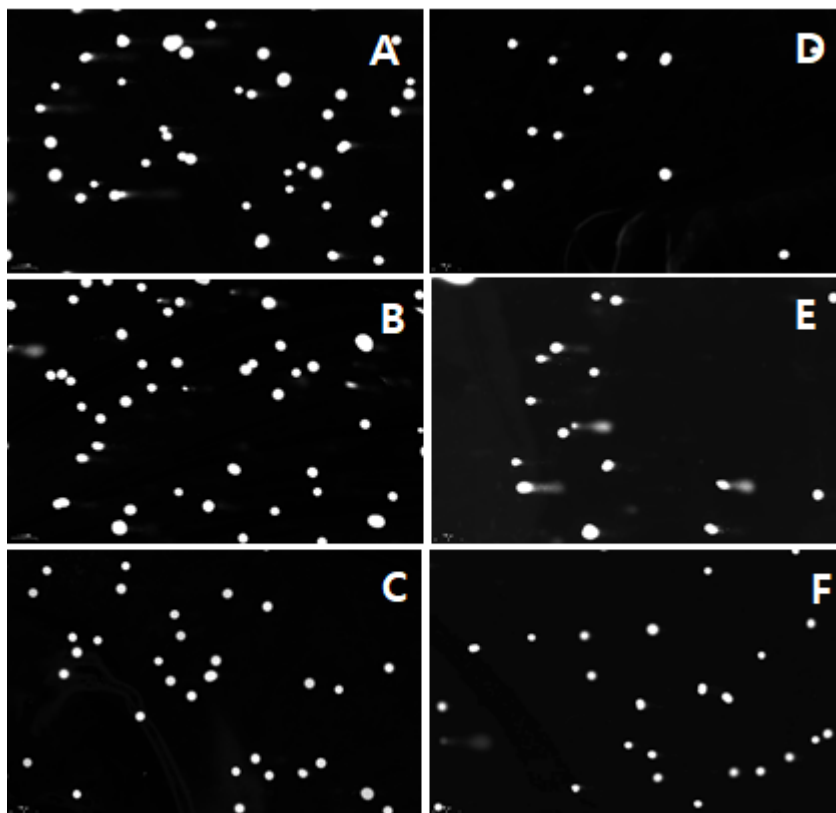
3차원 세포배양 시스템에서 HepG2 세포는 2-Methoxyethanol에 의해 5 mM 및 10 mM에서 세포성장이 억제된 것으로 보였으나, 2차원 세포배양 시

시스템에서의 IC₂₀을 고려하여 시험에서는 10 mM을 최고농도로 하였다. Benzalkonium chloride 또한 3차원 세포배양 시스템에서 IC₂₀이 100 µg/ml이었으나 2차원 세포배양 시스템에서 IC₂₀이 2 µg/ml인 것을 고려하여 코멧시험 농도를 결정하였다(그림 III-12).

코멧시험을 실시한 결과 2-methoxyethanol은 S9을 처리하지 않은 세포에서는 2.5, 5, 10 mM 처리군 모두에서 대조군과 비교하여 통계적으로는 유의한 차이가 있었으나, 대조군보다 % tail DNA 증위값이 낮았고, 경향 분석 결과에서도 유의한 결과가 나타나지 않았다(p=0.092). S9을 처리한 시험군에서는 2.5, 5, 10 mM에서 % tail DNA 증위값이 각각 18.6, 27.5, 24.0으로 대조군의 5.25보다 유의하게 높았고, 경향 분석 결과에서도 유의한 결과를 보였다(p<0.001). Benzalkonium chloride는 S9 무처리군과 S9 처리군 모두에서 대조군과 유의한 차이는 없었다(그림 III-13, III-14).

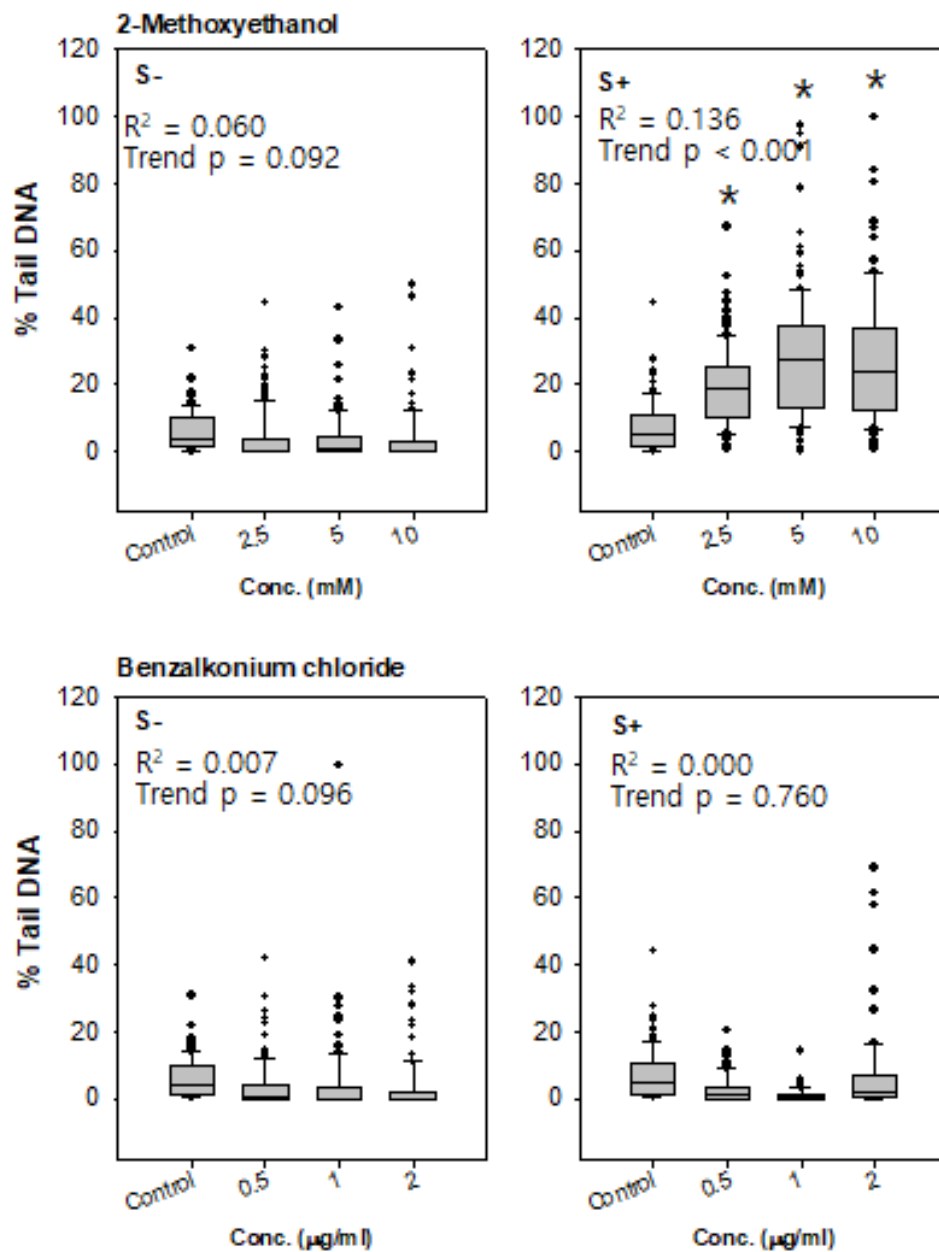


[그림 III-12] 2-Methoxyethanol 및 benzalkonium chloride의 세포독성



[그림 Ⅲ-13] 2-Methoxyethanol 및 benzalkonium chloride의
코멧 형태

A~C, picture of comet at S9-. A, No chemical; B, 10 mM 2-methoxyethanol; C, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BKC. D~F, picture of comet at S9+. D, No chemical; E, 10 mM 2-methoxyethanol; F, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BKC.



[그림 III-14] 2-Methoxyethanol 및 benzalkonium chloride의 % tail DNA

*, $p < 0.05$

IV. 고찰

.....

IV. 고찰

암은 현재의 의학기술로 치유가 거의 불가능한 질환으로 우리나라에서 가장 높은 사망원인을 차지한다(2019년 기준 인구 10만 명 당 158.2명으로 전체 사망의 27.5%). 직업 관련성 암은 전체 암의 4%로 추정되는데(Doll and Peto, 1981), 산업화가 진행된 국가에서는 직업성 질환 중 암이 차지하는 비율이 57%까지 이른다(Takala J 등, 2014).

국제암연구소(IARC, International Agency for Research on Cancer)에서는 현재까지 1,031종의 인자에 대한 발암성 평가결과를 제공하고 있다(표 IV-1). 발암성을 평가는 사람에서의 경험 자료를 가장 우선적으로 사용하지만, 사람에서의 경험 자료가 없는 경우에는 실험동물 등에서의 독성시험결과를 이용하여 추론할 수 밖에 없다. 사람의 경험 다음으로 가장 중요하게 고려되는 자료는 실험동물의 전 생애(랫드의 경우 통상 2년)에 걸쳐 시험물질을 노출시켜 암의 유발여부를 확인하는 2년 장기 발암성시험이다. 대표적으로 1978년 발암성평가를 위해 설립된 미국의 국가독성계획(NTP, National Toxicology Program)과 1982년 설립된 일본의 일본바이오ատ세이연구센터 등에서 발암성시험을 수행하고 있지만, 현재까지 수행된 발암성시험 건수는 국가독성계획의 600여 건, 일본바이오ատ세이연구센터의 60여건을 포함하여 1,000건을 넘지는 않을 것으로 추정된다. 발암성시험을 수행하기 위한 많은 실험동물의 희생(1건 당 400건 이상)과 노랜 시험기간(5년 이상)뿐 아니라, 막대한 비용이 무시될 수 없기 때문이다. 그럼에도 불구하고, 발암물질의 확인은 포기할 수 없는 데, 작업장에서의 노동자를 포함하여 국민의 생명과 건강보호는 소중한 가치이기 때문이다.

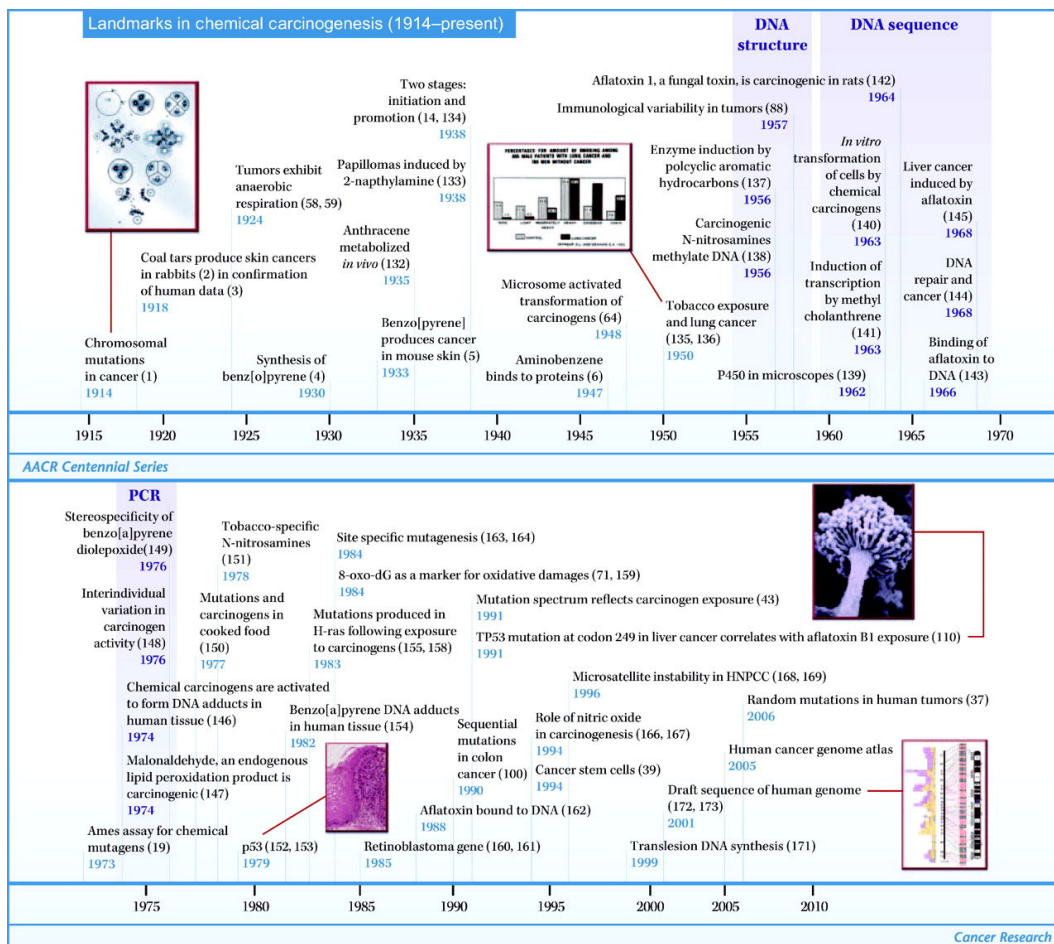
〈표 IV-1〉 IARC 발암성 물질 추이

Year	Classification				Total
	1	2A	2B	3	
1979	18	6	12	18	54
1987	40	32	147	353	572
1990	45	36	170	390	641
2000	70	54	232	474	830
2010	94	64	248	512	918
2021	123	89	319	500	1,031

암의 역사는 고대 이집트까지 거슬러 올라가지만, 화학물질이 암을 일으킨다는 것은 1918년 Yamagiwa와 Ichikawa가 토끼에 콜타르를 노출시켜 굴뚝청소부에서의 음낭암을 재현함으로써 입증되었다.(Loeb LA and Harris CC, 2008).

암과 유전자의 관련성은 1914년 Boveri 등이 암에서 염색체 이상을 확인하여 알려지게 되었다. 현재 일반적으로 인정되는 발암기전은 1941년 Berenblum과 Shubik가 제안한 개시-촉진모델(Berenblum 등 1941)이다. 돌연변이가 일어나는 개시단계, 돌연변이를 유지하고 촉진하는 촉진단계, 양성종양에서 악성종양으로 전환하는 진행단계로 설명되는 발암기전에서 유전독성을 일으키는 화학물질은 개시 및 촉진단계에 관여하여 암을 일으킬 수 있다고 간주된다.

발암물질이 유전자에 영향을 주어 궁극적으로 암을 일으킬 수 있다는 가설은 현재 발암물질평가 전략의 이론적 배경이 되고 있다. 동물실험으로만 발암성을 평가하기에는 자원 분배적 차원에서 부담이 너무 크기 때문이다. 유전독성을 일으키지 않는다면 암을 일으킬 가능성이 낮기 때문에 유전독성을 일으키는 화학물질의 발암성을 우선적으로 확인하는 정책은 타당해 보이며, 새롭게 개발되거나, 사용량이 우려수준에 이르지 못하는 화학물질에 대한 발암성 평가 유예는 적절한 것으로 보인다.



[그림 IV-1] 발암물질에 대한 이해의 역사

An overview of primary examples of events that have generated important insights into carcinogenesis(cited by Loeb LA and Harris CC. at Cancer Res. 2008;68(17): 6863-6872.

사실, 유전독성을 확인하기 것 또한 간단하지 않다. 유전자에 대한 어떤 영향이 유전독성을 대표하는 지 명확하지 않기 때문이다. 현재 유전독성은 유전자(DNA)에 대한 영향과 염색체에 대한 영향을 각각 확인하여 종합적으로 평가하는 전략을 취한다. 유전자에 대한 영향을 확인하는 대표적인 방법은 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험이다. 티미딘키나제 유전자 돌연변이시험과 형질전환 설치류를 이용한 유전자 돌연변이시험 또한 개발되어 있지만, 우리나라

라를 포함하여 대부분의 국가에서는 거의 활용되고 있지 않다(유전자를 변형시킨 세포나 실험동물을 사용하여 시험하는 것은 다른 시험에 비하여 어렵기 때문에 사실상 유럽연합에서만 실질적으로 활용되고 있음). 2021년에는 유전자 변형동물을 사용하지 않는 유전자 돌연변이시험(pig-a 시험)의 초안이 발표되었지만, 현재의 실정에서 유전독성평가 또는 발암물질 스크리닝에 얼마나 활용될 수 있을지는 미지수다. 염색체에 대한 영향을 확인하는 대표적인 방법은 배양세포를 이용한 염색체이상시험이다. 최근에는 실험동물을 이용한 소핵시험 뿐 아니라 배양세포에서의 소핵시험방법도 개발되어 염색체이상 시험을 대체하고 있다. 기계화를 통한 고효율과 표준화를 요구하는 추세에 대응하여 염색체이상시험은 기계화가 어렵고, 결과의 측정에 있어 전문가의 판단에 영향을 많이 받는 단점이 있기 때문에 점점 우선 선택시험에서 멀어져 가는 실정이다.

이러한 추세와 맞물려 유전자에 대한 영향을 확인하는 대안으로 1984년 Ostling 등이 개발한 코멧시험의 위상이 높아지고 있다. 배양세포에서의 코멧시험은 아직 개발이 완료되지 않았으나, 실험동물을 이용한 코멧시험법은 2016년 OECD에서 승인되어 유해성평가에 활용되고 있다. 한편, 생명윤리가 강화됨에 따라 이미 유럽을 중심으로 화장품 및 화장품 원료의 유해성평가를 위한 동물시험이 금지되어 있지만, 유럽化妆품을 제외한 대부분의 화학물질의 유해성 평가체계에서는 유전독성을 평가함에 있어 여전히 실험동물을 사용하는 체내시스템은 필수적이다. 위양성과 위험성의 위험은 상존하기 때문에 사람의 생체 모사수준이 낮은 시험계(예를 들어 미생물 또는 세포)에서 양성이거나 음성이라는 이유만으로 추가적인 평가나 고려 없이 유전독성 또는 발암성시험의 수행여부를 결정하는 것은 위험할 수 있기 때문이다. 이미 1980년대 유전독성평가체계가 일단락되었음에도 불구하고 2021년 현재까지도 이용 가능한 체내 유전자 영향지표 개발이 지속적으로 이루어지고 있는 이유이기도 하다. 이와 맞물려 코멧시험의 중요성 및 활용성은 높아지고 있다. 실험동물의 대안으로 우선 검토되는 3차원 세포 배양시스템에서의 적용이 용

이한 것으로 밝혀지고 있기 때문이다. 이러한 장점으로 현재 3차원 세포 배양 시스템에서 유전자 영향을 확인하는 방법으로 코멧시험이 사실상 대표지표로 확정되었다고 해도 과언이 아니다(Kang SH et al. 2013).

코멧시험과 발암의 관련성에 대한 다양한 연구가 발표되어(Apostolou 등 2014; Anderson 등 1998; Vodicka 등 2019; Gunasekarana 등 2015; Bowman 등 2014; Dorie 등 1999; Wood JP et al. 2015), 코멧시험을 활용하면 발암물질의 스크리닝을 더 효율적으로 수행할 수 있다는 주장도 제기되고 있다. Kirkland 등(2008)은 소핵시험에서 확인되지 않는(음성이거나 모호한 결과) 발암물질 중 유전자 돌연변이시험으로는 50%만 확인할 수 있었으나(50% 양성) 코멧시험은 90% 확인가능하다는 주장까지 하고 있다.

비교적 최근에 개발된 지표인 코멧시험은 2016년 실험동물에서의 시험가이드라인은 승인되었으나(OECD 2016), 역설적으로 배양세포에서의 시험방법은 아직 승인되지 못하고 있다. 시험법 개발에 사용된 TK6 세포주의 민감성과 시험농도의 설정이 문제가 되어 표준화가 완료되지 못했기 때문이다. 그러나 우리나라 식품의약품안전성평가원에서도 2016년 연구를 통하여 HepG2 세포주 등에서 20% 미만의 세포독성을 유발하는 농도에서 유효한 결과가 도출된다는 사실을 확인하는 등 여러 나라, 여러 연구그룹에서 시험법 표준화를 노력하고 있어 조만간 가이드라인이 승인될 것으로 기대된다(이종권 등 2016).

전통적인 2차원 세포배양 시스템에서의 시험법 개발이 난관에 부딪혀 있지만, 이와는 별개로 동물시험 대체방법 개발 차원에서 3차원 배양세포 시스템에서의 코멧시험법 개발 또한 활발히 이루어지고 있다. 시험법은 사람에서의 화학물질 노출경로를 반영하여 경구노출모델, 흡입노출모델, 피부노출모델 각각에서 개발되고 있는데, 피부노출모델과 흡입노출모델을 위해 각각 인공피부(Pfuhler S et al. 2021a, b; Downs TR et al 2021; Reisinger K et al. 2021)와 호흡기 모사세포에서 시험법이 개발되고 있으며, 경구노출모델에 대해서는 사람유래 간세포를 3차원으로 배양하는 방법이 개발되고 있다(Pfuhler S et al. 2020, 2021a, b).

본 연구에서는 경구노출모델에 해당하는 3차원 배양 간세포에서의 코멧시험을 적용하고자 하였다. 흡입독성과 관련된 호흡기 모델은 개발이 늦어지고 있으며, 2차원 배양시스템과의 비교연구가 가능하기 때문이다. 간세포의 3차원 배양세포를 이용한 시험법은 여러 연구자에 의해 시도되고 있다 (Ramaiahgari SC et al 2014; Elje E et al 2019; Mandon M et al 2019; Stampar M et al. 2021). 3차원 스페로이드 제작방법에 있어, Elje E 등(2019)은 hang-in drop 방식으로 1차 배양 한 후 저부착성 플레이트에서 2차 배양하는 방법을 사용하였으며, Stampar M 등(2021)은 3차원 배양 플레이트에서 1차 배양 한 후 회전형 바이오리액트에서 2차 배양하는 방법을 사용하였고 Mandon M 등은 3차원용 배양 플레이트에서 직접 스페로이드를 배양하였다.

본 연구에서는 3차원 세포배양법 적용에 있어 hang-in drop으로 1차 배양 한 후 저부착성 배양 플레이트에서 스페로이드를 완성하는 복합배양 방법과 저부착성 배양 플레이트에서 직접 배양하는 직접배양 방법을 선택하여 검토하였다. 복합배양 방법은 hang-in drop 방법으로 만들어진 스페로이드를 저부착성 배양 플레이트로 옮기는 과정이 복잡하고 세포의 소실 등의 단점이 있을 수 있었으나, 배양 플레이트에 직접 세포를 분주하는 방법보다 더 둥근 구의 형태의 스페로이드가 만들어져 본 연구에서는 hang-in drop/저부착성 플레이트 복합배양 방법을 선택하였다(그림 III-2, 그림 III-3).

한편, 코멧시험은 2차원 배양세포를 이용한 체외시험법 개발과정에서 20% 미만의 세포독성을 일으키는 농도에서 시험이 수행되어야 하는 것을 인지하게 되었다. 세포독성에 의해서도 유전자 손상이 일어날 수 있기 때문에 이상적인 시험조건은 세포독성이 20% 미만으로 일어나고 꼬리가 머리보다 큰 Hedgehog가 20% 미만인 것을 최적이라고 판단된다.

본 연구는 경구노출 모델을 대체하기 위한 3차원 세포배양 시스템에서 우선적으로 검토되는 사람 간 유래의 HepG2 세포에서의 코멧시험 개발 및 시험을 목적으로 하였으며, 비교대상 시스템으로 체외(in vitro) 소핵 시험, 염

색채이상시험 등에서 일반적으로 사용되는 CHL/IU 세포를 선택하였다.

CHL/IU 세포에서 음성대조물질로 d-mannitol, 양성대조물질로 ethyl methanesulfonate를 사용하여 코멧시험의 타당성을 확인 한 결과, 양성대조물질은 2차원 세포배양 시스템과 3차원 세포배양 시스템 모두에서 % tail DNA 중위값이 극적으로 증가하여 시험방법이 타당한 것으로 판단되었다(그림 III-6). 2차원 세포배양 시스템과 3차원 세포배양 시스템 모두에서 대부분 hedge-hog가 나타났으나, 세포독성을 일으키지 않는 농도에서 수행된 시험 결과이며, ethyl methanesulfonate를 양성대조물질로 수행한 대부분의 다른 연구에서도 유사한 경향을 보였기 때문이다(그림 III-5). 그러나 음성대조물질 d-mannitol을 처리한 결과는 CHL/IU를 이용한 코멧시험의 가능성과 한계를 모두 보여주었다. 즉, 2차원 세포배양 시스템에서는 음성대조물질인 d-mannitol에 의해 농도 의존적으로 유의하게 % tail DNA값이 증가하였지만, 3차원 세포배양 시스템에서는 % tail DNA값이 일부 농도에서 유의하게 증가하였으나, 양성으로 판단하는 추가적인 조건인 농도의존성 증가 경향이 나타나지 않았기 때문이다(그림 III-9). 2차원 세포배양 시스템에서는 체외시험에서의 코멧시험의 한계로 지적되어 왔던 음성대조물질에 대한 감수성 문제가 여전하였으나, 3차원 세포배양 시스템은 이러한 문제가 완화되거나 나타나지 않았다고 해석할 수도 있기 때문이다.

HepG2 세포를 이용한 코멧시험의 타당성 검토에서는 체외 소핵시험 및 염색체이상시험에서 대사활성 양성대조물질로 사용되는 cyclophosphamide를 추가하여 시험하였다. HepG2 세포를 이용한 조건 시험에서는 2차원 세포배양 시스템과 3차원 세포배양 시스템 모두에서 d-mannitol에 의한 DNA 손상이 나타나지 않았고, 양성대조물질인 ethyl methanesulfonate 처리 시에도 2차원 세포배양 시스템과 3차원 세포배양 시스템 모두에서 명확한 DNA 손상이 확인되어 시험방법이 타당하다고 판단되었다(그림 III-9).

대사활성 양성대조물질인 cyclophosphamide는 2차원 세포배양 시스템에서는 대사활성제 S9을 처리하지 않은 경우에도 유의하게 DNA에 손상을

일으켰지만, 3차원 세포배양 시스템에서는 S9을 처리하지 않은 경우에는 % tail DNA 값의 유의한 증가 경향은 나타나지 않았으나, S9을 처리한 경우에는 농도 의존적으로 유의하게 증가하여, HepG2 세포의 3차원 세포배양 시스템이 가장 적합한 시험시스템으로 판단하여 2-methoxyethanol과 benzalkonium chloride의 코멧시험을 실시하였다.

2-Methoxyethanol은 산업안전보건연구원에서 발암성시험 후보물질로도 선택된 화학물질로 미생물복귀돌연변이 시험결과는 음성, 체외 염색체이상시험은 양성, 체내 염색체이상시험은 음성, 체외 유전자 돌연변이시험은 음성이며, 체내 코멧시험은 양성으로 보고된 물질이고, benzalkonium chloride는 미생물복귀돌연변이시험, 체외 염색체이상시험, 체외 유전자 돌연변이시험, 체내 소핵시험 모두에서 음성이거나 음성으로 예측된 물질이지만, 사람에서의 폐 손상이 문제가 된 가습기 살균제의 성분으로도 사용된 적이 있어 발암성평가 등의 필요성이 제기되기도 한 물질이다.

HepG2 세포를 이용한 코멧시험 결과 2-methoxyethanol은 3차원 세포배양 시스템에서 대사활성계를 처리하지 않은 시스템에서는 % tail DNA 값이 증가하지 않았으나, 대사활성화계에서는 양성을 보였고 benzalkonium chloride는 대사활성계와 비활성계에서 모두 % tail DNA 값이 증가하지 않았다(그림 III-13, 그림 III-14).

이상의 결과를 바탕으로 본 연구를 통하여 HepG2 세포를 이용한 3차원 세포배양 시스템이 확립되었고 음성대조물질 d-mannitol, 양성대조물질 ethyl methanesulfonate 및 대사활성 양성대조물질 cyclophosphamide를 이용하여 코멧시험의 타당성이 검증되었다. 또한 시험물질로 사용한 2-methoxyethanol이 3차원 세포배양 시스템에서 코멧을 유발하는 것을 확인하였고, benzalkonium chloride는 시험농도에서 대사활성계 및 비활성계 모두에서 음성으로 나타나는 것을 확인하여 발암성 후보물질의 탐색에 있어 코멧시험의 적용 가능성이 확인되었다.

참고문헌

- 이종권, 김태성, 김주환, 교경옥, 이정선, 안일영, 김지영, 전해린, 홍윤희.
2016. In vitro DNA 손상 평가시험법 개발 연구
- Anderson D, Yu TW, McGregor DB. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*. 1998;13(6): 539-555.
- Apostolou P, Toloudi M, Kourtidou E, Mimikakou G, Vlachou I, Chatziioannou M, and Papasotiriou I. Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 2014;21: 14.
- Berenblum I. The mechanism of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. *cancer Res*. 1941;1:807-814.
- Bowman KJ, Al-Moneef MM, Sherwood BT, Colquhoun AJ, Goddard JC et al. Comet assay measures of DNA damage are predictive of bladder cancer cell treatment sensitivity in vitro and outcome in vivo. *Int J Cancer*. 2014;134(5): 1102-11.
- Doll R, Peto R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. *Journal of the National Cancer Institute*. 1981;66(6): 1192-1308.

- Dorie MJ, Kovacs MS, Gabalski EC, Adam M, Le QT, Bloch DA, Pinto HA, Terris DJ, and Brown JM. DNA Damage Measured by the Comet Assay in Head and Neck Cancer Patients Treated with Tirapazamine. *Neoplasia*. 1999;1(5): 461-467.
- Downs TR, Arlt VM, Barnett BC, Posgai R, Pfuhler S. Effect of 2-acetylaminofluorene and its genotoxic metabolites on DNA adduct formation and DNA damage in 3D reconstructed human skin tissue models. *Mutagenesis*. 2021;36(1): 63-74.
- ECHA. <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/registered-substances>. Confirmed on August 19, 2021.
- Elje E, Hesler M, Rundén-Pran E, Mann P, Mariussen E, Wagner S, Dusinska M, Kohl Y. The comet assay applied to HepG2 liver spheroids. *Mutat Res*. 2019;845: 403033.
- Gunasekarana V, Raj GV, and Chand P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(3): GE01-GE05.
- ILO. Occupational safety and health series No. 39. Occupational cancer - prevention and control. 1977.
- Kang SH, Kwon JY, Lee JK, Seo YR. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J Cancer Prev*. 2013;18(4): 277-88.
- Kirkland D, Speit G. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo. *Mutat Res*. 2008;654:114-32.

- Loeb LA and Harris CC. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. *Cancer Res.* 2008;68(17): 6863-6872.
- OECD. In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 2016;489: 1-27.
- Ostling O and Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;123:291-298
- Mandon M, Huet S, Dubreil E, Fessard V, Hégarat LL. Three-dimensional HepaRG spheroids as a liver model to study human genotoxicity in vitro with the single cell gel electrophoresis assay. *Scientific Reports.* 2019;9:10548.
- Pfuhler S, Benthem J, Curren R, Doak SH, Dusinska M, Hayashi M, Heflich RH, Kidd D, Kirkland D, Luan Y, Ouedraogo G, Reisinger K, Sofuni T, Acker F, Yang Y, Corvi R. Use of in vitro 3D tissue models in genotoxicity testing: Strategic fit, validation status and way forward. Report of the working group from the 7th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutat Res Gen Tox En* 2020;503135: 850-851.
- Pfuhler S, Downs TR, Hewitt NJ, Hoffmann S, Mun GC, Ouedraogo G, Roy S, Curren RD, Aardema MJ. Validation of the 3D reconstructed human skin micronucleus (RSMN) assay: an animal-free alternative for following-up positive results from standard in vitro genotoxicity assays. *Mutagenesis.* 2021a;36(1): 1-17.

- Pfuhler S, Pirow R, Downs TR, Haase A, Hewitt N, Luch A, Merkel M, Petrick C, Said A, Schäfer-Korting M and Reisinger K. Validation of the 3D reconstructed human skin Comet assay, an animal-free alternative for following-up positive results from standard in vitro genotoxicity assays. *Mutagenesis*. 2021b;36: 19-35.
- Ramaiahgari SC, Braver MW, Herpers B, Terpstra V, Commandeur JMN, Water B, Price LS. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol*. 2014;88(5): 1083-95.
- Reisinger K, Blatz V, Brinkmann J, Downs TR, Fischer A, Henkler F, Hoffmann S, Krul C, Liebsch M, Luch A, Pirow R, Reus AA, Schulz M, Pfuhle S. Validation of the 3D Skin Comet assay using full thickness skin models: Transferability and reproducibility. *Mutat Res Gen Tox En*. 2018;827: 27-4
- RIVM. Implications of not detecting non-genotoxic carcinogens in the absence of carcinogenicity tests under REACH guidelines. RIVM Report 340700003/2008
- Stampar M, Frandsen HS, Rogowska-Wrzesinska A, Wrzesinski K, Filipič M, Žegura B. Hepatocellular carcinoma (HepG2/C3A) cell-based 3D model for genotoxicity testing of chemicals. *Science of The Total Environment*. 2021;755(2): 143255.
- Takala J, Hämäläinen P, Saarela KL, Yun LY, Manickam K, Jin TW, Heng P, Tjong C, Kheng LG, Lim S, Lin GS. Global Estimates of the Burden of Injury and Illness at Work in 2012. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2014;11(5): 326-337.

- Vodicka P, Vodenkova S, Opattova A, Vodickova L. DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019;843: 95-110.
- Wood JP, Smith AJO, Bowman KJ, Thomas AL, Jones GDD. Comet assay measures of DNA damage as biomarkers of irinotecan response in colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Med*. 2015;4(9): 1309-21.

연구진

연 구 기 관 : **산업안전보건연구원**

연구책임자 : 임철홍 (소장직대, 흡입독성연구센터)

연 구 원 : 신경민 (과장, 병리검사부)

연구기간

2021. 01. 01. ~ 2021. 11. 30.

본 연구보고서의 내용은 연구책임자의 개인적 견해이며,
우리 연구원의 공식견해와 다를 수도 있음을 알려드립니다.

산업안전보건연구원장

**DNA 손상지표 코멧시험(Comet assay)을 활용한 3차원
배양세포에서의 유전독성영향연구
(2021-산업안전보건연구원-844)**

발 행 일 : 2021년 12월 31일

발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 김은아

연구책임자 : 흡입독성연구센터 소장직대 임철홍

발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

주 소 : (44429) 울산광역시 중구 종가로 400

전 화 : 042-869-8531

팩 스 : 042-869-8694

Homepage : <http://oshri.kosha.or.kr>

I S B N : 979-11-92138-31-2