

Pentachlorophenol의 노출에 의한 사람 T-림파구의 *hprt* 유전자에서 돌연변이 빈도

윤병수* · 조명행**¹ · 김인규*** · 박선영*** · 이영순**

*경기대학교 생물학과, **서울대학교 수의과대학, ***한국원자력연구소 방사선생체해석분야

Mutant Frequency at the *hprt* Locus in Human T-Cell Exposed to Pentachlorophenol

ByoungSu Yoon*, MyungHaing Cho**¹, InGyu Kim***, SeonYoung Park*** and YongSoon Lee**

**Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 440-760, Korea*

***College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea*

****Korea Atomic Energy Research Institute, Radiation Biology, Dajon, 305-353, Korea*

(Received February 15, 1997)

(Accepted March 25, 1997)

ABSTRACT: The mutational effects of pentachlorophenol (PCP) on the hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*hprt*) locus in human T-cell were analysed by T-cell clonal assay *in vitro*. Cells were exposed for 24 hours at primary culture to 0~100 ppm (W/V) PCP in dimethyl sulfoxide. Treated cells were allowed at the same time to stimulate by phytohemagglutinin (PHA) and T-cell growth factor (TCGF) and then seeded in medium containing 6-thioguanine to select for *hprt*-negative mutants. We have also defined the optimal condition for the determination of mutant frequency. The parameters investigated include survival counting, first and second subculture for clonal efficiency plating and mutant plating. Under the optimal conditions, mutant frequencies of high dose-treated cells were significantly higher than those of non-treated or low dose cells. The results indicated a clear dose-effect relationship and showed that mutant frequency in 50 ppm PCP treated cell was 4.31×10^{-5} (background, 8.32×10^{-6}). Above data strongly suggest that *hprt* mutation assay can be used as a biomarker for the environmental risk assessment.

Key Words: mutational frequency, pentachlorophenol, *hprt*, T-cell clonal assay, biomarker, environmental risk assessment

I. 서 론

PCP는 현재 대표적인 환경공해물질로 대두되고 있는 화합물로서, 주로 원목의 보존제, 광범위 살충, 살균제 등 다목적으로 사용되고 있다(Hattenman-Frey등, 1989; Hill등, 1989). 임업분야에서만 전세계적으로 약 90,000톤/년이 사용되고 있으며(Seiler, 1991), 제초제, 살충제, 살진균제, 조류 박멸제, 소독제 등으로도 사용되어 왔다(Crosby등, 1981; Cirelli, 1978; CELDS, 1992). PCP는 주로 이를 처리한 목재 또는 폐기물 처리소에서 물 또는 지하수에 용해되어 환경을 오염시키며, 공기중으로도 증발됨으로써 대기환경을 오염시키기도 한다(US DHHS, 1991). PCP는 대부분의 생태계에 독성을 유발시키며, 생태계의 먹이사슬을 통하여

농축될 수 있으며, 특히 수중생물계에 심각한 독성을 유발시키고 있다(IPCS, 1987; US EPA, 1979). PCP는 이러한 광범위한 사용과 그 잔류성으로 인하여 미국에서는 독성 폐기 물질로 지정되었으며 폐기시에도 철저한 감시 및 통제를 받아야 하는 품목으로 고시되어 있다(U.S.EPA, 1991).

PCP에 대한 생식독성실험 결과는 이 물질이 태아독성(fetotoxicity)은 있지만 기형성(teratogenicity)은 없는 것으로, 또한 수컷의 번식능력에는 영향을 주지 않으며, 발암성을 발견하지 못한 것으로 보고되고 있다(Schwetz등, 1978). 한편 PCP의 유전독성에 대해서는 많은 연구가 보고되어 있지는 않으나, Nishimura 등(1982)의 박테리아를 이용한 Ames test 결과는 PCP가 유전자 변이를 야기시킴을 보여 주었고, Casto(1981)는 syrian hamster embryo cell을 PCP로 처리하였더니, SA7의 바이러스성 형질전환 빈도가 용량 대 반응의 형

*To whom correspondence should be addressed.

태로 증가하였다는 것을 보고하였다. 또한 Chinese hamster ovary cell을 이용한 세포유전실험 결과는 PCP가 sister chromatid exchange의 발생빈도를 증가시키는 것으로 밝혀졌다(Galloway 등, 1987).

사람에 대한 PCP의 노출은 주로 오염된 식품, 음료에 인하여, 흡입노출의 경우는 PCP로 전 처리한 목재로 지은 집 또는 작업장에서의 흡입이 주된 요인이 되고 있다. 이는 주로 사람의 지방조직, 모유, 혈액 그리고 요 등에서 탐지되며, Hill 등(1989)은 미국 Arkansas 주에서 197 명의 아동들을 대상으로한 검출실험에서, 모든 아동에서 이 PCP가 검출되었으며, 그 평균농도가 14ppb라고 보고한 바 있다. 또한 목재공장에서 근무한 경력이 있는 사람으로 신경증상을 보이는 16명의 환자에게서 혈중, 뇨중, 뇌척수액을 취하여 PCP의 잔류여부를 측정해 본 결과는 모두 상당수준의 잔류량을 가지고 있음을 보여주고 있었고(Jorens 등, 1991), 목재로 만든 집의 거주자와 일반 주택 거주자에 대한 비교실험에서는 혈중 PCP의 양이 각각 420 ppb : 40 ppb(혈중), 69 ppb : 3.4 ppb(뇨중)으로 보고된 바 있다(Cline 등, 1989).

이러한 사실들은 현재 우리가 우리의 환경에 광범위하게 존재하는 잠재적인 환경독성물질인 PCP에 상당히 노출되어 있다는 것을 의미하며, 그 위험성을 예측하고 평가할 수 있는 방법의 모색이 시급하다고 사료된다. 따라서 본 논문에서는 대표적인 환경독성물질인 PCP를 모델물질로 하여, 이에 대한 적절하고 예민한 biomarker를 개발하여 환경영향성평가의 방법으로 삼고자 하였다. 본 연구는 여러 환경독성물질에 대한 정량적 지표 뿐 아니라, 정성적 지표가 가능한 *hprt* 유전자의 T-cell clonal assay를 PCP에 대한 유전적독성평가의 방법으로 사용한 것이다. 암발생요인들을 분석하기 위한 방법으로 개발된 T-cell *hprt* clonal assay는 (Albertini 등, 1985) 환경독성물질에 대한 biomarker로 이용하려는 실험에 도입되어 이미 여러 독성물질에 대하여 그 가능성을 검증 받은 바 있으며, 또한 근래의 PCR(polymerase chain reaction)기법의 발달은 이 T-cell clonal assay를 한단계 발전시키어, mutant clone을 multiplex PCR, RT(reverse transcriptase)-PCR을 이용한 염기서열결정방법으로 분석하여, 환경돌연변이원에 대한 정성적 분석방법인 mutational spectrum의 작성 등으로 연구가 발전되고 있다(Messing 등, 1989; Nicklas 등, 1990; O'Neill 등, 1990; Tates 등, 1991; Cole 등, 1992; Cochrane 등, 1993).

본 보고에서는 우선 PCP의 유전적 독성에 대한 정량적 지표로써 인간의 T-lymphocyte에서 *hprt* 유전자

의 *in vitro* mutant frequency를 측정하였고, 이러한 *in vitro* system의 일반적 적용을 위한 실험방법상의 합리성을 분석하여 biomarker로서의 가능성을 증명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 및 세포배양배지

실험에 사용된 세포는 39세 한국 남자(Sample A)와 22세의 한국 남자(Sample B)에서 각각 heparin(beef lung heparin, 10 units/ml whole blood)을 사용하여 채혈하고 lymphocyte를 분리하였다. T-cell 배양을 위하여 기본배지로써 RPMI-1640(Sigma R-5382; with L-glutamine)을 사용하였고, 그 외의 기본 시약, 즉, Dulbecco's PBS, HEPES, sodium bicarbonate 등도 주로 Sigma(cell culture grade) 제품을 사용하였다. RPMI 기본배지의 조성은 25 mM HEPES, 1x non-essential amino acid(Sigma, USA), 1 mM pyruvate, 0.05 mM 2-mercaptoethanol이며, 이에 2 g/l의 sodium bicarbonate를 첨가하여 pH 7.2로 조정된 후, 여과 멸균하였다. HL-1 medium은 Ventrex Laboratories사(Portland, ME, USA)의 것을, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(USA)의 제품을 사용하였고, phytohemagglutinin(PHA)은 Wellcome diagnostics사(USA)의 것을 사용하였다. T-cell growth factor(TCGF)는 Collaborative Research사(USA)에서 공급받았으며 그 개략적 제법은 다음과 같았다(Alvarez 등, 1979). 즉 여러 개체에서 수집된 human mononucleus cell(MNC)을 방사선조사(1000 rad)하고 이를 $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml의 농도로 1% FBS, 1 μ g/ml PHA, 2×10^5 feeder cells/ml가 함유된 RPMI 1640 배지에서 40~42시간 배양한 후, 상등액을 모아, filtration을 거쳐, -30°C 에서 보관하였다. Feeder cell은 *hprt*-negative인 WI-L2 lymphoblastoid cells(TK6; W.G.Thilly, MIT, Cambridge, MA, USA)의 변형세포주인 36×4 cell line(*hprt*전체 유전자의 결실; Skopek, T.R., 1978)을 사용하였다. 세포배양에 사용된 모든 기구는 일회용 플라스틱제품으로 Nunc 또는 Falcon제품을 사용하였다.

2. Blood Lymphocyte의 분리

채혈된 25 ml의 혈액을 Histopaque(Sigma, specific gravity=1.077) 25 ml가 담긴 50 ml용 원심분리관의 상층에 넣고, 상온에서 400 g, 30분으로 원심분리하여 중층의 blood lymphocyte를 수거하였다. 이 세포들을

DPBS용액으로 두번 세척한 후(250 g, 10분), 5 ml RPMI 1640 medium에 부유시키고, 그중 0.1 ml를 0.4% trypan blue(10:1)로 염색하여 haematocytometer로 생존세포의 농도를 측정하였다.

3. 1차 배양(primary culture)

분리된 blood lymphocyte는 1차 배양액에 각 실험군당 40×10^6 (1×10^6 cells/ml)되게 나누고, 각기 4개의 50 ml용 culture flask에 10 ml씩 나누었다. 1차 배양액은 RPMI 기본배지에 2 mM L-glutamine, 1x antifungal-antibiotic solution(100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulfate, Sigma; 이상 모두 최종농도)을 넣어 RPMI 1640 완전배지를 만들고, 여기에 다시 20% HL-1 medium, 5% FBS, 1 µg/ml PHA를 첨가하여 1차 배양액(primary culture용)으로 하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ incubator(습도는 100%)에서 36~40시간 배양하였다.

4. PCP mutation

PCP처리는 이를 50 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 각 실험군당 최종농도가 0, 0.1, 1, 5, 10, 15, 25, 50 ppm(w/v)이 되게 하여, 1차배양 시작 12시간 후부터 시작하여 36시간까지 24시간 처리를 받게 하였다.

5. 2차 및 3차배양(subculture)

36~40시간의 일차배양이 완료된 후, cell을 원심분리로 수거하고, 그 일부를 염색, 검경하여 생존율을 측정(survival counting)하였다. 이들은 돌연변이세포의 선택배양에 들어가기에 앞서 2회의 subculture를 수행하였다. 이때 배양액은 RPMI완전배지에 20% HL-1 medium, 5% FBS, 10% TCGF를 포함시키고, 0.125 µg/ml PHA를 첨가시켰다. 배양시작시 세포의 농도는 0.1×10^6 cells/ml이고, 보통 20 ml 단위로 배양하였다. 배양기간은 각 3일이었다. 상기의 실험과는 별도로 배양방법에 따른 생존율 및 돌연변이 빈도의 변화를 보기 위하여 2차 및 3차 배양 전에 각각 세포들을 수거하고 별도의 mutant plating을 수행하였다. 편의상 1차배양 후 mutant plating 한 것을 survival plate, 2차배양 후 plating한 것을 direct plate라 하였다(3차배양 후의 것은 mutant plate임). 이 배양 방법은 다음의 4차배양(mutant plating)의 방법과 동일하게 하였다.

6. 4차배양(mutant plating)

3차배양이 완료된 후, 이 세포들 중 *hprt*유전자의 돌연변이 세포를 선별하기 위하여 6-thioguanine(6-TG)을 사용한 선택배양을 수행하였다. 세포의 농도는 5×10^4 cells/ml로 96 well plate의 1 well에 1×10^4 cells/0.2 ml가 되게 하였다. 이 배양액은 RPMI 완전배지에 20% HL-1 medium, 5% FBS, 10% TCGF를 포함시키고, 0.125 µg/ml PHA를 첨가시켰다. 또한 돌연변이 세포의 선택을 위하여 6-TG를 1 µg/ml로 첨가하였다. Feeder cell은 36×4 cell line(*hprt*-negative)을 이용하였으며, 별도로 9krads (137Cs원, 1100 rads/min)의 감마선에 노출시킨 후 사용하였다. 이 처리는 cell counting이 완료된 후, FBS가 포함되지 않은 RPMI 기본배지에서 수행하였고 처리된 세포는 바로 배양에 사용하였다. Feeder cell의 농도는 1×10^4 cells/well이 되게 하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ incubator(습도는 100%)의 조건에서 10일간(경우에 따라서는 15일) 수행하였으며, *hprt*-negative인 clone forming unit(CFU)의 발생을 관찰하였다.

7. CFU 판정, CE plate 및 Mutation frequency의 계산

CFU는 보통 plating 6일 이후 분열하는 세포의 형태로써 관찰되었다. 이는 보통 10일에 clone의 형태를 확인하여 1차 판정을 하고, 다시 14일에 최종 판정을 하였다. CE plate(clonal efficiency, nonselective plate)는 well당 1, 2 또는 5개의 세포와 1×10^4 cells의 γ -irradiated feeder cell을 넣어 배양한 것으로, 이때의 배양액에 6-TG를 포함하지 아니한 것을 제외하고는 mutant plating배지와 동일하다. Clonal efficiency(CE), mutation frequency(MF)의 계산은 Poisson statistics를 적용하여 다음과 같이 계산하였다(Albertini등, 1985).

Well 당 세포의 수 1×10^4 cells일 경우,

$P(0) = P_0 = \text{Number of negative wells} / \text{total number of wells}$
 $CE = (-\ln P_0 \text{ in nonselective plates}) / (1 \text{ or } 2 \text{ or } 5 \text{ cells/well})$
 $\text{Mutant fraction}(Mf) = (-\ln P_0 \text{ in TG-plates}) / (1 \times 10^4 \text{ cells/well})$
 $\text{Mutant Frequency}(MF) = Mf/CE$

III. 결과 및 고찰

1. PCP에 의한 *in vitro* mutation

Primary culture에서의 PCP에 의한 돌연변이유도는 50 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 그 최종농도가 0,

10, 15, 25, 50, 100 ppm이 되게 실시 하였다. PCP처리를 위한 DMSO첨가는 PCP가 난용성물질이기에 세포독성이 적은 용매로써 사용된 것이며, 본 실험에서는 모든 실험군에서같이 DMSO를 0.05%(V/V of medium)로 사용하였다. 이에 따른 세포독성을 검정하였으며, 이미 여러 실험에서 보고된 바와 같이(O'Neill 등, 1990; Cariello 등, 1992), 본 실험에서도 MF가 DMSO를 첨가하지 않은 *in vivo* 실험에서 9.2×10^6 , DMSO 0.05%를 첨가한 *in vitro* 실험에서 8.3×10^6 으로 측정되어 큰 차이가 없음을 보여 주었다. 이 실험은 sample A를 사용하였으며, 편의상 *in vivo* plate라 명명하였고, CE는 34.8%, Mf는 3.20×10^6 으로 측정되었다. 이 결과에서 *in vitro*의 경우 CE가 약간 낮아진 것으로 나타나 DMSO의 영향이 아닌가 생각되기도 하였으나, 비슷한 MF율을 보인 것에 근거하여 본 실험결과를 오도할 영향은 주지 않을 것으로 판단하였다. 또한 MF가 비교적 높게 나온 것은 이 sample의 제공자가 20년 정도의 흡연경력을 가진 39세임을 감안할 때, Tates 등(1991)실험치와 비교하여 정상적으로 판정하였다.

2. Survival counting

Survival counting의 결과를 보면 PCP는 고농도에서 강력한 세포독성 및 유전독성을 나타냄을 볼 수 있었다. 즉, PCP처리를 한 primary culture 후의 생존세포수 검사는 0 ppm에서 약 80%의 생존율을, 15 ppm 이상 25 ppm까지는 37%~90%의 생존율을 나타냈으나, 50 ppm에서는 40%정도, 또한 100 ppm에서는 10% 이하의 생존율을 보였다(Table 1). 이러한 생존율의 차이는 1차 배양에서는 세포분열이 거의 일어나지 않는다는 사실에 비추어 볼 때(O'Neill 등, 1987) 단지 PCP에 의한 세포독성효과를 반영하는 것으로 생각되며, 제공자의 연령에 기인하는 것으로 사료되는 sample에 따른 PCP독성효과의 유효농도차를 보여주고 있었다. 그러나 두 sample 모두 고농도(100 ppm)에서는 10% 수준의 저조한 생존율을 보인 것이 또한 주목되며, 이로 인하여 본 실험에서는 100 ppm에서의 CE와 MF에서 만족할 결과를 얻지 못하게 하였다. 고농도처리군에 대한 실험상의 문제는 극복되어야 할 과제로서 생존율에 반비례하는 실험세포수의 증가 또는 subculture를 통한 생존세포수의 증가 등으로 해결할 수 있으리라 생각된다. 1차 배양 후의 세포생존율은 우선 세포독성효과에 기인하나, 2차 배양 후의 세포생존율은 세포분열에 따른 유전독성효과를 반영한다고 할 수 있다. 배양시 세포농도를 0.1×10^6 cells/ml로 통일하고 3일간 2차 배양 후의 세포생존율은

Table 1. Survival countings of human T-cells exposed to pentachlorophenol at different steps of culture

Concentrations of treated PCP	Sample	After Primary culture (3 days)	After 2nd culture (6 days)	After 3rd culture (9 days)
0 ppm	A	72.3%	494%	423%
	B	88.0%	890%	510%
15 ppm	A	46.3%	756%	385%
	B	90.8%	1095%	545%
25 ppm	A	37.7%	563%	485%
	B	58.4%	833%	500%
50 ppm	A	37.7%	102%	465%
	B	46.7%	110%	740%
100 ppm	A	6.2%	- ^a	N.D.
	B	11.6%	- ^a	N.D.

*ppm was calculated by μg of pentachlorophenol/ml of primary medium.

*% was calculated by total number of cells before cultivation \times 100/ total number of cells after each cultivation.

*Cell concentration of culture: primary culture (1×10^6 cells/ml), 2nd culture (0.1×10^6 cells/ml), 3rd culture (0.2×10^6 cells/ml). Each volume of primary cultures was A (5.18 ml, respectively), B (5.78 ml, respectively).

a: No cell could be found after cell collection.

0~25 ppm의 처리군이 500% 이상으로, 50 ppm은 100% (증가 없음)으로 나타났으며, 100 ppm에서는 생존세포를 발견할 수 없었다. 이는 1차 배양 후 생존세포수의 검사에서 완만한 용량-반응관계를 보여준 50 ppm의 실험군이 이미 치명적인 유전독성효과를 받았음을 시사하고 있으며, 같은 이유로 100 ppm의 실험군은 모두 사멸하였다고 사료된다. 한편 3차 배양 후의 생존세포수는 실험을 수행한 0~50 ppm의 각 실험군에서 모두 400~700%의 비교적 고른 증가율을 보여주었다. 이는 본 T-cell clonal assay에서 정확한 유전독성효과를 측정하기 위하여 적어도 2번의 증식배양이 필요하며, 이러한 증식배양 없이 바로 선택배양에 들어갈 경우, 즉 전기한 survival plate나 direct plate는 세포사멸에 따른 실험결과의 오해를 야기할 수 있음을 시사하고 있다.

3. Clonal Efficiency(CE)

Survival counting에서 나타난 완만한 용량-반응 관계는 각 처리농도에 따른 CE에서 더욱 확실한 용량-반응관계를 보이고 있어, CE가 *in vivo* mutagenesis의 경우에서와 같이 *in vitro* mutagenesis에서도 총체적인 유전독성을 나타내는 하나의 척도로 사용될 수 있음을 보여주고 있다(Table 2). 그러나 CE는 세포에 따라, 즉 sample의 제공자에 따라 그 측정치가 분명한 차이를 나타내고 있으며(Table 2, A와 B), PCP 처리 후 즉 본 실험에서의 1차 배양 후 어느 단계에서 plating을 하였는

나에 따라 또한 상당한 차이를 보여주고 있다. 이러한 결과는 고농도의 PCP 처리 실험군이 특히 survival plate에서, PCP의 세포독성에 의하여 절대적인 생존세포수의 감소를 가져왔고, 또한 돌연변이에 따른 유전독성에 의하여 클론형성율을 크게 저하시켜, 결국 CE plate(3차배양후)에서 보여준 비교적 안정된 클론형성율보다 낮은 클론형성율을 보였다고 설명될 수 있겠다. 이런 낮은 생존율/클론형성율의 상황에서 바로 mutant plating을 수행하여 *hprt*-negative mutant를 선별하는 방법은 1) *hprt*-negative mutant들 중 다수는 세포의 사멸을 일으키는 중요 유전자의 손상으로 사멸되기에 극히 적은 수의 *hprt*-negative mutant 만을 발견하게 하며, 2) 또한 *hprt*유전자의 손상이 있는 세포라도 배양기간이 짧은 관계로 잔류하고 있는 *hprt*효소에 의하여 6-TG의 선택적 배양을 오도시킬 수 있다는 등의 이유로 바람직하지 않다고 사료된다. 따라서 본 실험에서는 MF를 구할 때 사용되는 CE로써는 3차배양후(2차례의 subculture를 행한 후) plating한 CE-plate에서 구한 CE를 사용하였다.

4. Mutant Frequency(MF)

Mutation fraction(Mf)은 $-ln P_0$ 를 well당 주어진 세포수로 나누어준 것이며, 이를 CE로 보정한 것을 MF로 하였다(O'Neill 등, 1990). 이는 6-TG를 사용하여 *hprt*-negative인 세포를 positive selection한 것으로 concan-

Table 2. Clonal efficiency determined in experiments of pentachlorophenol treated human T-cells at different steps of culture

Concentrations of treated PCP	Sample	Clonal efficiency (CE) from plates of cells		
		After Primary culture (3 days) (survival plate)	After 2nd culture (6 days) (direct plate)	After 3rd culture (9 days) (CE plate)
0 ppm	A	0.367	-	0.206
	B	0.339	0.545	0.374
15 ppm	A	0.260	-	0.184
	B	0.349	0.429	0.478
25 ppm	A	0.127	-	0.202
	B	0.439	0.488	0.409
50 ppm	A	0.060	-	0.255
	B	0.152	0.211	0.202

*ppm was calculated by μg of pentachlorophenol/ml of primary medium.

*CE (Clonal Efficiency) = $-ln P_0/N$; $P_0=P(0)$ =Number of negative wells/total number of wells; N=number of cells per well.

*Each CE was calculated from data determined by 1,2,5 cells/well (No PCP treated), 2, 10, 50 cells/ml (PCP treated) with 1×10^4 γ -irradiated 36×4 cells per well under nonselection conditions.

*Data of unreasonable results were excluded (zero mutants).

avalin A 등의 자극에 따라 세포분열을 계속하게 하여 clone을 형성하게 하였다(Albertini 등, 1985). 일반적으로 6일 이후부터 *hprt*-positive인 세포들이 급속히 쇠퇴됨을 볼 수 있었고, 이로써 *hprt*-negative인 세포들의 분열하는 세포형태를 보다 쉽게 관찰할 수 있었다. 보통 6일에 관찰된 분열하는 세포의 형태는 배양 10일 이후에는 clone의 형태로 관찰되었고 positive well로 판정하였다(Fig. 1). 다량의 plate를 관찰하는 데 있어

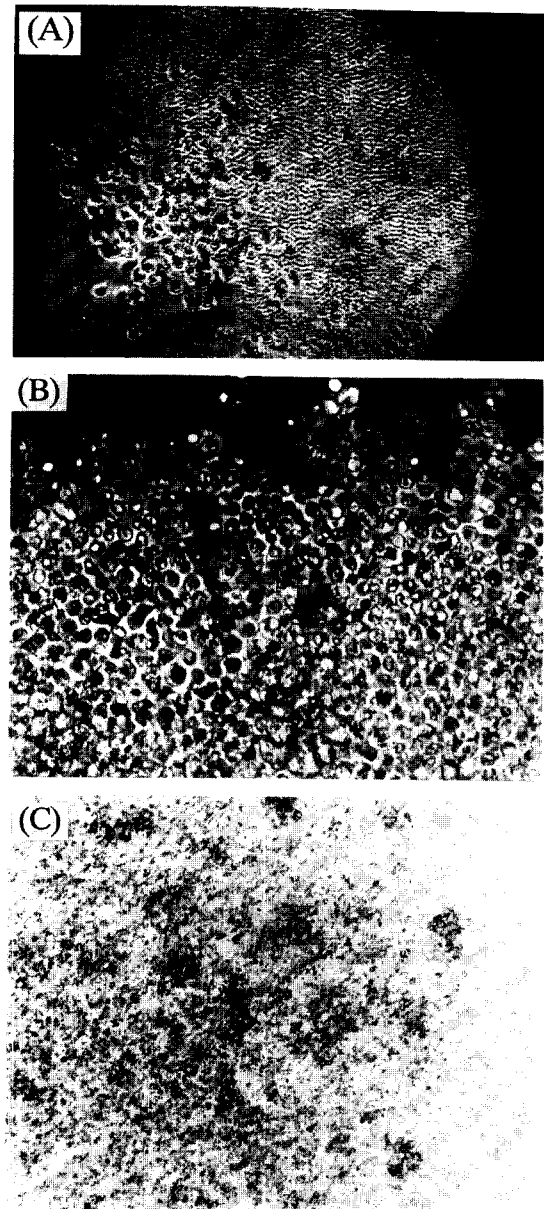


Fig. 1. Photographs of positive and negative well in 96-well plate. Each wells received 1×10^4 feeder cells and 1×10^4 mononuclear cells in the presence of 6-thioguanine. After 6 days (panel A) and 14 days (panel B,C) incubation, photographs were taken at $\times 200$ magnification. Panel A and B show TG-selected colonies and panel C shows negative for colony formation.

round bottom 96 well-plate가 flat bottom 형 보다 매우 간편하였으며 positive/negative 판정이 보다 객관화되는 장점이 있었다. CE의 경우에서 논의한 바와 같이 MF의 측정도 몇 번의 subculture 후에 mutant plating을 행하였는가가 실험결과에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 특히 survival plate(1차배양후에 바로 selective plating)의 경우에는 특히 고농도의 경우에서 매우 적은 수의 mutant가 발견되었고, 이중 일부는 극히 낮은 CE에 의하여 진위가 의심이 갈만한 높은 돌연변이율로 계산되기도 하였다(자료 미제시). 이는 T-cell clonal assay에서 모집단의 수가 작을 때 많이 나타나는 경우이며, 0.1 이하의 낮은 CE에서 계산된 MF는 그 신뢰도를 재고하여야 된다고 사료된다. 한편 direct plate(2차배양후 selective plating)에서의 결과를 보면 CE는 비교적 안정되었으나 발견된 mutant의 수는 예상보다 매우 적은 것으로 나타나, 상기의 이유 등으로 부적절한 실험결과로 해석하게 되었다(Table 3). 이들 결과에 대하여 3차배양후의 선택 배양한 mutant plate는 sample cell에 따라 확실한 정량적 차이와 민감도의 차이를 나타내었으나, PCP 처리농도의 증가에 대하여, 비교적 정확히 증가되는 MF가 측정되어, 전체적으로 확실한 용량-반응관계를 보였다(Table 4). 즉, sample A의 경우 25 ppm 이하의 저농도 처리에 있어서는 매우 완만한 MF의 증가를 나타내다가 50 ppm의 고농도 처리에서는 무처리군의 5배 이상되는 급격한 MF 증가를 보이고 있다. 한편 sample B의 경우는 15 ppm, 25 ppm의 저농도 처리군에서 이미 무처리군의 2배에 달하는 MF의 증가를 나타내고, 50 ppm 고농도의 처리군에서는 역시 무처리군의 약 5배에 달하는 높은 MF의 증가를 보였다. 이는 sample cell의 돌연변이원에 대한 민감도를 반영한 것이라 사료되며, sample 제공자의 연령

Table 3. Measurement of mutant frequency determined in experiments of pentachlorophenol treated human T-lymphocyte from direct plate. Cells were plated after 2nd culture in selective condition

Concentrations of treated PCP	Positive /total	P_0	Mutant fraction	Clonal Efficiency	Mutation Frequency
0 ppm	33/864	0.962	3.89×10^{-6}	0.545	7.14×10^{-6}
15 ppm	40/864	0.954	4.74×10^{-6}	0.429	11.05×10^{-6}
25 ppm	41/864	0.963	4.86×10^{-6}	0.488	9.96×10^{-6}

*CE (Clonal Efficiency) = $-\ln P_0/N$; $P_0=P(0)$ =Number of negative wells/total number of wells; N=number of cells per well.

*Each CE was calculated from data determined by 1, 2, 5 cells/well (No PCP treated), 2, 10, 50 cells/ml (PCP treated) with 1×10^4 γ -irradiated 36×4 cells per well under nonselection conditions.

*Mutant Frequency (MF) = Mf/CE = Mutant fraction/Clonal efficiency; Mutant fraction (Mf) = $(-\ln P_0 \text{ in TG-plates}) / (1 \times 10^4 \text{ cells/well})$

* 1×10^4 mononuclear cells/well used for 6-TG selective conditions (1 $\mu\text{g/ml}$ of medium) with 1×10^4 γ -irradiated 36×4 cells per well.

및 흡연경력에(Tates 등, 1991), 즉 A(39세, 21년의 흡연경력), B(22세), 관련이 있으리라 생각된다. 본 실험과 별도로 실시된 sample cell간의 수차에 걸친 *in vivo* mutant frequency 실험결과도, 본 실험의 무처리군에서 나타난 바와 같이, A와 B는 약 2배의 차이를 보인다(자료 미제시). 또한 본 실험의 결과에서 mutant fraction(Mf)과 mutant Frequency(MF)를 비교하면, 돌연변이의 단순한 발견률을 측정하는 mutant fraction은 sample에 따라 그리고 실험군에 따라 크게 변화되는 CE를 고려 할 때, 돌연변이 빈도를 측정하는데 적절한 수단이 아니며, 다만 그 경향을 반영할 뿐이라는 것이 발견된다. 따라서 CE에 의한 보정 없이 mutant fraction을 mutant frequency로 표현하는 것은 이들 전문용어의 혼돈을 야기시킬 것이라 생각되며, 국문에 있어서도 전자를 "돌연변이 발견율", 후자를 "돌연변이 빈도"로 표현하는 것이 옳다고 사료된다.

T-cell clonal assay를 *in vitro* mutagenesis에 응용하여 특정 돌연변이원에 대한 biomarker로 개발하려는 본 실험의 의도에서, 우선 정확한 mutant frequency를 구할 수 있는 실험방법은 1) 돌연변이 처리 및 1차배양, 2) 2차배양, 3) 3차배양, 4) CE plate 및 mutant plate, 5) CFU판정 및 MF의 계산의 순서로 측정이 진행되어야 할 것이다. 이는 정량적 수단으로 T-cell clonal assay를 이용하려할 때 최선의 결과를 위하여 단축해서는 안되는 과정이라 생각된다.

본 실험의 후속 실험으로 PCP 노출의 정성적 척도를 구하기 위한 PCP mutational spectrum 작성이 현재 진

Table 4. Measurement of mutant frequency determined in experiments of pentachlorophenol treated human T-lymphocyte from regular plate. Cells were plated after 3rd culture in selective condition

Concentrations of treated PCP	Sample	P_0	Mutant fraction	Clonal Efficiency	Mutation Frequency
0 ppm	A	0.983	1.71×10^{-6}	0.206	8.32×10^{-6}
	B	0.983	1.71×10^{-6}	0.374	4.58×10^{-6}
15 ppm	A	0.981	1.92×10^{-6}	0.184	10.48×10^{-6}
	B	0.962	3.87×10^{-6}	0.478	8.10×10^{-6}
25 ppm	A	0.977	2.33×10^{-6}	0.202	11.52×10^{-6}
	B	0.964	3.67×10^{-6}	0.409	8.96×10^{-6}
50 ppm	A	0.896	11.0×10^{-6}	0.255	43.06×10^{-6}
	B	0.955	4.60×10^{-6}	0.202	22.79×10^{-6}

*CE (Clonal Efficiency) = $-\ln P_0/N$; P_0 =number of negative wells/number of total wells; N=number of cells per well.

*Each CE was calculated from data determined by 1,2,5 cells/well (No PCP treated), 2, 10, 50 cells/ml (PCP treated) with 1×10^4 γ -irradiated 36×4 cells per well under nonselection conditions.

*Mutant Frequency (MF) = Mf/CE = Mutant fraction/Clonal efficiency; Mutant fraction (Mf) = $(-\ln P_0 \text{ in TG-plates}) / (1 \times 10^4 \text{ cells/well})$

* 1×10^4 mononuclear cells/well used for 6-TG selective conditions (1 $\mu\text{g/ml}$ of medium) with 1×10^4 γ -irradiated 36×4 cells per well.

행 중이며, 이와 별도로 실험동물에 의한 *in vivo*, *in vitro* 실험에 의하여 생체와 세포간의 반응차이가 보정 되면, 본 실험의 궁극적 목적인 인간에 대한 환경독성 물질(PCP)의 biomonitoring, 즉 인간의 환경에서의 PCP노출정도를 추정 적용하는 것이 점차 가능해 지리라 기대한다.

IV. 감사의 글

본 연구에서 실험상의 문제해결에 많은 도움을 준 미국 Vermont대학교 R.J. Albertini교수와 J.P. O'Neill 교수 그리고 L.M. Sullivan, T. Hunter씨에게도 감사의 말씀을 드립니다. 본 연구는 한국과학재단 목적기초 특정연구과제(94-0402-05-01-3) 연구비로 수행되었으며, 연구비의 지원에 감사드리는 바입니다.

참고문헌

- Albertini, R.J., O'Neill, J.P., Nicklas, J.A., Heintz, N.H. and Kelleher, P.C. (1985): Alterations of the *hprt* gene in human *in vivo*-derived 6-thioguanine resistant T lymphocytes. *Nature*, **316**, 369-371.
- Alvarez, J.M., Silva, A. and de Landazuri, M.O. (1978): Human T-cell growth factor. 1. Optimal conditions for its production. *J. Immunol.*, **123**, 977-983.
- Cariello, N.F., Swenberg, J.A. and Skopek, T.R. (1992): *In vitro* mutational specificity of cisplatin in the human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene. *Cancer Research*, **52**, 2866-2873.
- Casto, B.C. (1981): Effect of chemical carcinogens and mutagens on the transformation of mammalian cells by DNA virus, Gauri, K.K., Ed., "Antiviral chemotherapy: Design of inhibitors of viral functions", New York, NY., Academic Press, 261-278.
- CELDs (1992): Computer-environmental Legislative Data Systems, University of Illinois, Urbana, IL, March, 1992.
- Cirelli, D.P. (1978): Patterns of pentachlorophenol usage in America. - an overview, in Rao, K.R., Ed., "Pentachlorophenol, chemistry, pharmacology and environmental toxicology", New York, NY, Plenum Press, 13-18.
- Cline, R.E., Hill, R.H.J. and Phillips, D.L. (1989): Pentachlorophenol measurements in body fluids of people in long homes and workplace. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 475-481.
- Cochrane, J.E. and Skopek, T.R. (1993): Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1,2,-epoxybutene, 1,2,3,4,-diepoxybutane, and 3,4,-epoxy-1,2-butanediol in cultured human lymphoblasts., *Carcinogenesis*, submitted.
- Cole, J., Arlett, C.F., Norris, P.G., Stephans, G., Waugh, A.P.W., Beare, D.M. and Green, M.H.L. (1992): Elevated *hprt* mutant frequency in circulating T-lymphocytes of Xeroderma pigmentosum patients., *Mutation Research*, **273**, 171-178.
- Crosby, D.G., Beynon, K.I., Greve, P.A., Korte, F., Stilli, G.G. and Vouk, J.W. (1981): Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure. Appl. Chem.* **53**, 1051-1080.
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Coleman, S., Brown, B., Cannon, J., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B.H., Resnick, M.A., Anderson, B. and Zeiger, E.(1987): Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells; Evaluations of 108 chemicals. *Environ. Molecul. Mutagen.* **10** (Suppl.10), 1-175.
- Hattenman-Frey, H.A. and Travis, C.C. (1989): Pentachlorophenol: Environmental partitioning and human exposure. *Arch. of Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 482-489.
- Hill, R.H., Teresa, T., Holler, J.S., Douglas, M.F., Smith, S.J., Needham, L.L. and Binder, S. (1989): Residues of chlorinated phenols and phenoxy acid herbicides in the urine of Arkansas children. *Arch. of Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 469-474.
- IPCS. (1987): International Programm on Chemical Safety; Pentachlorophenol, environmental health criteria. 71. Geneva, World health organization. 1-236.
- Jorens, P.G., Janssens, J.J. and Tichelen, W.I.van. (1991): Pentachlorophenol concentrations in human cerebrospinal fluid. *Neurotoxicol.* **12**, 1-7.
- Messing, K., Ferraris, J., Bradley, W.E.C., Swarty, J. and Seifert, A.M. (1989): Mutant frequency of radiotherapy technicians appears to be associated with recent dose of ionizing radiation., *Health Phy.* **57**, 537-544.
- Nicklas, J.A., Falta, M.T., Hunter, T.C., O'Neill, J.P., Jacobson-Kram, D., Williams, J.R., Albertini, R.J. (1990): Molecular analysis of *in vivo hprt* mutations in human T-lymphocytes. V. Effects of total body irradiation secondary to radioimmunoglobulin therapy (RIT). *Mutagenesis*, **5**, 461-468.
- Nishimura, N., Nishimura, H. and Oshima, H. (1982): Survey on mutagenicity of pesticides by the Sal-

- monella*-Microsome Test. *Aichi Ika Daigaku Igakukai Zasshi*. **10**, 305-312.
- O'Neil, J.P., McGinniss, M.J., Berman, J.K., Sullivan, L.M., Nicklas, J.A. and Albertini, R.J. (1987): Refinement of a T-lymphocyte cloning assay to quantify the in vivo thioquanine-resistant mutant frequency in humans. *Mutagenesis.*, **2**, 87-94.
- O'Neill, J.P., Sullivan, L.M. and Albertini, R.J. (1990): In vitro induction, expression and selection of thioquanine-resistant mutants with human T-lymphocytes. *Mutation Research*. **240**, 135-142.
- Schwetz, B.A., Quast, I.F., Keeler, P.A., Huminston, C.G. and Kociba, R.J. (1978): Results of two-year toxicity and reproduction studies on pentachlorophenol in rats, Rao, K.R., Ed., "Pentachlorophenol, chemistry, pharmacology and environmental toxicology", New York, NY, Plenum Press. 13-18.
- Skopek, T.R. (1978): Isolation of a human lymphoblastoid line heterozygous at the tk locus. *Biochem. Biophysic. Res. Com.* **84**, 411-416.
- Seiler, J.P. (1991): Pentachlorophenol. *Mutation Research*. **257**, 27-47.
- Tates, A.D., Dam, F.J.V., Mossel, H.v., Schoemaker, H., Thijssen, J.C.P., Woldring, V.M., Zwindermann, A.H. and Natarajan, A.T. (1991): Use of the clonal assay for the measurement of frequencies of *HPRT* mutants in T-lymphocytes from five control populations. *Mutation Research*. **253**, 199-213.
- US DHHS. (1991): U.S. Department of Health and Human Services; Toxicological profile of pentachlorophenol.
- US EPA. (1991): U.S. Environmental Protection Agency, Land disposal restrictions, Code of Federal Regulations, 40 CFR 268.
- US EPA. (1979): U.S. Environmental Protection Agency, Reviews of the environmental effects of pollutants; XI. Chlorophenols, HERL, ORD, Cincinnati, OH.