

발생독성대체시험법의 동향

정의배*, 이재환

충북대학교 수의과대학

Trend of alternative developmental toxicity test methods

Eui-Bae Jeung*, Jae-Hwan Lee

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University



배아줄기세포 (Embryonic Stem Cells, ESCs)는 모든 세포, 조직 및 기관으로 발달할 수 있는 잠재력인 만능성 (pluripotency)을 지니고 있으며, 정상적인 핵형을 유지하면서 자가 생성 (self-renewal), 특정항원 발현, 미분화능 유지와 같은 특성을 지니고, 장기간 배양지속, 체외환경에서 배상체 형성, 체내환경에서 기형종 형성 등과 같은 독특한 특성을 보인다. 배아줄기세포를 활용해 세포분화 기초연구, 특정 세포분화연구, 세포치료 및 임상 적용분야 등 다양한 분야들이 발전되었다. Rohwedel등은 마우스 배아줄기세포를 시험관내에서 배양하고, 삼배엽 유도를 위한 배상체 형성과정에서 분화에 이르기까지 각 단계별 유전자변이 (mutagenicity), 세포독성 (cytotoxicity) 및 배아발생학적 독성 (embryotoxicity) 평가 개념을 제시한 바 있다. 특히, 배아줄기세포를 이용한 발생독성물질 스크리닝 시스템은 동물사용과 임상시험 등이 지닌 시간·경제적인 문제를 동시에 해결할 수 있는 새로운 개념의 스크리닝 시스템으로, 최근 주목받는 대체시험법 개발시장에서 우위 선점을 위한 경쟁이 가속화되고 있다.

최근 생명윤리 등의 문제로 동물을 이용한 전임상 시험에 대해 많은 제재가 가해지고 대체시험법에 대한 요구가 높아짐에 따라, 인체에서의 안전성·위해성을

정확하고 체계적으로 평가할 수 있는 동물대체 스크리닝 기술의 필요성이 대두되었다. 이런 상황 속에 배아줄기세포의 만능성과 자가 생성능은 세포의 분화기전에 대한 기초연구, 세포치료의 임상적용, 약물 및 독성물질에 대한 세포독성 평가 등 다양한 활용 가능성을 제공한다. 특히, 배아줄기세포를 이용한 발생독성물질 스크리닝 시스템은 동물의 사용 및 전임상 시험 등의 현안 문제점을 극복할 수 있는 대안으로 주목받고 있다. 발생독성 시험법은 발생독성 물질들의 발생독성을 빠른 시간 내에 정확하게 스크리닝 할 수 있는 독창적이고 획기적인 모델을 필요로 한다. 줄기세포는 신규 바이오 마커 개발 및 약물후보물질에 대한 스크리닝을 통해 신약개발 기간을 획기적으로 단축할 수 있는 중요한 연구 자원이기도 하다. 최근 신약개발 및 화장품 개발에 있어 기존의 실험동물을 이용한 약효독성 평가시험법은 동물실험 윤리 및 생명윤리 등 사회적으로 강한 제재가 가해지고 있어, 전 세계적으로 줄기세포를 이용한 약효·독성평가 대체시스템을 개발하는데 주력하는 이유이다. 뿐만 아니라, 동물을 이용한 임상시험 등이 가진 시간·경제적인 문제를 동시에 해결할 수 있다. 이러한 이유로 줄기세포를 이용한 약리활성 및 독성 평가는 신약 후보물질 발굴 및 화장품 개발에 있어 매우 주요한 공정과정으로 자리매김할 것으로 예상된다. 배아줄기세포 및 만능성 줄기세포를 이용한 약물 및 독성물질에 대한 스크리닝 시스템 확립은 현안 문제점의 해결은 물론이고, 세계적인 원천기술 보유가 가능하다. 의약품 개발 초기, 동물실험에 적용할 정도의 시험물질 양을 확보하기가 어렵기 때문

Received: 19 November 2018

Published online: 30 December 2018

Tel: 043-261-3317

E-mail: ebyeung@chungbuk.ac.kr

에 소량으로도 평가 가능한 줄기세포를 이용한 의약품 안전성 평가 방법의 확립이 매우 절실한 상태이다.

배아 발생독성 시험법은 배아세포 또는 초기 발달단계의 배아에서 환경적 요인 또는 약물의 독성 효과를 분석할 수 있는 기법으로, 현재 배아독성검사법의 대부분이 실험동물을 이용한 방법이며, 초기 배 발생 실험법, 배 태자 발생 실험법, 출생 전후 발생 및 모체 기능 실험법 등이 있다. 발생독성의 경우, US EPA와 OECD의 가이드라인에 따라 임신 및 수유중인 동물에 시험물질을 투여하고 어미와 새끼에 미치는 형태학적·행동학적 이상을 관찰하는 방법이 있다. 이 실험법들은 많은 수의 실험동물을 사용하고 실험 규모가 크다는 경제적인 단점과 실험동물의 희생을 통해 결과를 도출하는 생명 윤리적인 단점을 가지고 있다. 전 세계적으로 실험동물의 사용에 대한 규제가 해마다 강화돼, 기존의 전임상 시험법을 대체할 수 있는 독성 시험기술의 개발이 절실히 요구된다. 최근, 미국 환경청(EPA), 독성연구프로그램(NTP), 국립보건원(NIH)에서는 동물을 이용한 물질 안전성 실험을 단계적으로 폐지하겠다고 발표함에 따라 대체시험법의 개발이 시급하다.

현재 과학적인 증거를 거친 발생독성 대체시험법은 그림1과 같이 AltTox.org에서 다양한 것을 확인 할 수 있다.

Endpoint	Method Name	Test Type ¹	Endorsement of Scientific Validity: Links to ISAC Statements, EURL ECVAM Recommendations, ECVAM Protocols, ECVAM Evaluations, ECVAM Reviews, JCVAM Evaluations, JCVAM Statements	Regulatory Acceptance	Lead Authority	Subsequent Endorsement(s)	International Consensus: Consensus: OECD, ICH3 Yes: Death 15d, 60d, Death GDH	National/ Regional ²

그림 1. 비준 및 승인된 발생독성 대체시험법

현재 발생독성시험법 중 과학적인 증거를 거친 대표적인 동물대체시험법은 배아줄기세포시험법 (embryonic stem cell test, EST), 미세배양 발생독성시험법(micromass embryotoxicity assay), 전배아 발생독성시험법 (whole rat embryotoxicity assay)이 있다.

전배아 배양 (Whole Embryo Culture, WEC) 시험법은 임신한 랫드를 10일째에 희생해 배아를 얻는다. 배아 배양 시, 배양 용기에 랫드의 혈청을 첨가해주고, 각 배양 용기에 독성물질을 첨가한 배지를 넣어

48시간 동안 배양한 뒤, 0, 5, 21, 28, 45 시간에 기관형성 과정에서 중요한 측면인 심장 발달을 포함해 신경관의 폐쇄, 눈과 귀의 발달, 팔과 다리의 발생을 관찰해 평가한다. 배아 발달시기 동안에 외부 물질에 의해 방해받게 되면 일반적으로 발생과 성장이 지연되거나 기관의 원기에 특정한 기형을 일으킨다. 따라서 시험관내에서 배아의 형태 비교를 통해 발생독성 물질이 초기 배아발달에 미치는 영향을 평가할 수 있는 방법이다. 실험동물의 기관형성 초기단계에서 착상후의 배아를 이용해 발생독성물질의 독성을 평가하는 시험법으로, 기관형성에 중요한 시기와 발생과 관련된 종료 시점을 측정하고 평가하기에 적합하다. WEC 시험법은 실험군과 시험물질을 처리하지 않은 대조군을 설정해야 하고, 배아의 상태에 따라서 IC₅₀, IC_{max}, TMS 값을 구해 비교 분석한다. ECVAM의 연구에 따르면 in vitro 와 in vivo 데이터의 상호연관성이 약 80% 일치하는 것으로 평가되었다.

미세배양방법 (Micromass embryotoxicity assay) 방법은 기형을 일으키는 발생독성물질의 평가에 주로 사용하는 방법이다. Umansky (1966)이 chick embryo limb 세포를 이용한 연구방법에 기반을 두고 발전된 것으로, 뼈의 형성 중 증식이나 분화, 세포 간 소통, 세포외 기질과의 상호작용과 같은 연골조직의 발달 과정에서 시험물질이 기형을 유발시키는지 확인을 할 수 있는 간단한 시험법이다. 이 실험은 미분화 지아 (Limb bud)의 간충직세포 (mesenchyme cell) 분화 단계의 연골세포 (chondrocyte)에서 시험물질을 평가하는 방법으로, 먼저 임신한지 14일된 동물 (주로 랫드)을 희생시켜 지아를 얻어낸 후 trypsin 반응을 일으켜 세포를 얻고, 시험물질을 포함한 배지 (실험군)와 시험물질을 포함하지 않은 배지 (대조군)에 세포를 처리해 5일 동안 배양한다. 5일 동안 배양한 후, IC₅₀과 ID₅₀을 산출해 시험물질의 발생독성을 평가하게 된다. ECVAM의 연구에 따르면, 이 방법의 경우 in vitro 와 in vivo 데이터의 상호연관성이 약 70% 일치하는 것으로 나타났다.

EST는 유일하게 동물을 사용하지 않는 방법으로 동물대체시험법으로 가장 각광받고 있다. EST는 1997년 Spielmann 등에 의해 고안되었고, 유럽의 대체시험법 기관인 ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) 주도하에 과학적으로 입증된 시험법이다. 이를 시작으로 다양하게 변형되고, 개선된 EST들이 개발되고 있다.

Hand1-EST 또는 Cmyc1-EST 는 심근세포로의 분화과정에서 Hand1과 Cmyc1 유전자의 발현이 증가하

는 것에 착안한 방법이다. 이 방법은 두 유전자에 대한 프로모터 서열과 luciferase reporter 유전자가 삽입된 형질전환 마우스 배아줄기세포를 이용한다. 정상적인 심근분화 조건에서는 *Hand1* 또는 *Cmya1* 유전자의 발현을 유도하기 위한 전사인자들이 활성화되고, 이들 인자는 *Hand1* 또는 *Cmya1* 유전자의 내재 프로모터나 형질도입된 프로모터 서열에 결합해 유전자의 발현을 유발한다. 이 때, 형질도입된 프로모터 서열 뒤에 자리한 luciferase reporter 유전자가 발현되면서 간접적으로 심근분화 활성을 측정할 수 있게 하는 원리이다. 이 방법은 기존 ECVAM-EST의 분화 10일차에 자발적인 beating 여부를 통해 심근분화를 평가하는 방법 대신 *Hand1* 또는 *Cmya1* 유전자의 발현을 이용한 것으로, 6일이 소요되고 96 well plate를 사용한다는 점에서 시간과 노력을 절약하며, 한 번에 많은 결과를 얻는 고효율적인 방법이다. 하지만, 발생과정 중 *Hand1* 또는 *Cmya1* 유전자는 초기 분화단계에서 발현하는 유전자로 최종 심근분화의 억제를 완벽히 대변하지는 못한다.

FACS-EST 방법은 *Hand1-EST* 또는 *Cmya1-EST*와 달리 후기 심근분화마커인 α -actinin과 myosin heavy chain (MHC)을 발현하는 세포들을 flow cytometry 방법으로 분류하고 그들의 분포로부터 심근분화정도를 평가한다. 해당 방법은 분화 7일차에 flow cytometry로 심근분화정도를 측정하고 미분화 배아줄기세포와 마우스 체세포주 3T3 세포의 cytotoxicity도 7일차에 측정해 시간을 단축한 방법이다. 하지만, 심근분화세포, 미분화세포, 다른 계통분화세포 등으로 분류하기 위해 먼저 세포를 고정하고 immunocytochemistry를 수행한 후, flow cytometry를 진행한다는 측면에서 번거로움이 있고, 고가의 항체와 FACS machine을 사용한다

다는 측면에서 비용적인 부담이 크다.

현재 본 연구실에서 개발하여 검증하고 있는 배상체를 기반으로 한 embryo body test (EBT)는 우선 ECVAM-EST의 기존 틀을 따른다. 미분화세포와 체세포주에서 발생독성물질에 대한 세포독성을 평가함으로써 배아치사 정도를 측정할 수 있고, 배상체 크기 성장억제를 바탕으로 성장지연 정도를 측정할 수 있으며, 발생독성물질에 의한 배상체의 비형성이나 찌그러짐, 깨짐 등 형태적인 관찰을 통해 기형유발에 대한 정보도 얻을 수 있다. 또, 배상체를 통한 발생독성 평가는 분화 3일차에 확인이 가능한 장점이 있다. 그리고 심근분화 과정을 통한 자발적인 beating 여부를 통해 기능적인 손상도 평가할 수 있다. 때로는 심근세포로 분화해서 초기, 후기 심근분화 마커를 모두 발현하더라도 자발적인 beating이 발생하지 않는 경우도 있기에, 심근분화 유도 후, beating 여부의 확인은 정확한 발생독성 평가를 위해 필요한 단계로 사료된다. 하지만, hanging-drop 방식이 다소 번거롭고 beating 여부를 관찰에 있어 시간과 숙련도가 요구된다는 단점이 있다. 이런 단점에도 불구하고 앞서 언급한 EST법들이 발생독성시험법이 갖추어야 할 4가지 요건(기형유발, 성장지연, 배아치사, 기능손상)을 충족시키지 못하는데 반해, EBT는 이들을 충족하고, 인증된 ECVAM-EST에 근거했기에 재현가능성이 확인된 상태이며, 자체 실험실 내 간이 전수가능성 시험에서도 재현성이 확인되었기에 발생독성시험법으로의 과학적인 인증에 있어 유리할 것으로 판단된다. 현재, EBT의 경우, KoCVAM의 검증위원회팀을 통하여 검증 실험을 하고 있다.

앞서 언급한 동물대체시험법 (배아줄기시험법, 미세배양 발생독성시험법, 전배아 발생독성시험법)들은 3R

표 1. 여러 발생독성시험법의 비교

대체 시험법	장 점	단 점	in vivo와 일치성
Whole rat embryotoxicity assay	랫드의 경우, 다태 임신해 적은 동물로 여러 개 배아를 얻고, 이를 안에 결과를 얻을 수 있다.	임신한지 10일된 랫드로부터 배아를 획득하므로 동물의 희생이 불가피하다.	80 %
Micromass-embryotoxicity assay	2~3 마리의 동물로 충분한 세포들을 얻을 수 있고 빠른 시일 안에 결과를 얻을 수 있다.	Primary 세포 배양을 하기 때문에 각 실험마다 새로운 세포를 추출해야 한다.	70 %
Embryonic stem cell test (EST)	동물을 이용하지 않으며, 한 번의 실험에 많은 수의 시험물질을 평가할 수 있다.	발생·분화 상태에서의 독성시험을 위해 각각의 조직 세포로의 분화 유도과정이 필요하다.	78 %
<i>Hand1</i> -EST <i>Cmya1</i> -EST	동물을 이용하지 않고 적은 수의 조작과정과 빠른 시일 내에 발생독성 평가가 가능.	해당 유전자가 심근분화 초기 마커로, 제 기능여부 및 기형유발을 평가할 수 없다.	
FACS-EST	후기 분화 마커를 사용.	심근세포로서 제 기능여부와 기형유발을 평가할 수 없다.	

(Replacement, Reduction, Refinement) 원칙에 근거해 독성평가에 이용되는 동물 수를 최소화하는데 도움을 주나, 동물시험법을 완전히 대체하기는 어렵다. 또, 세 가지 시험법 모두 OECD TG 승인절차 중 첫 번째 단계인 연구개발 단계만 완료한 상태이며, 아직 극복해야 할 여러 요소들이 존재한다. 첫 번째는 모두 동물 유래의 시험법으로, 인간과 종간 차이로 인한 false negative 독성물질들이 존재한다. 예를 들면, 마우스에서는 all-trans retinoic acid만 세포독성을 보이지만, 인간세포에서는 all-trans retinoic acid와 13-cis retinoic acid 모두 세포독성이 관찰된다. 두 번째는 약물 및 독성물질의 대사체에 의한 독성을 충분히 평가하기 어렵다. 세 번째 모체와 태아, 태아의 전체 장기에 대한 총체적인 독성을 판단하기 어렵다. 이는 동물대체 시험법들이 극복해야 할 중대한 문제점들이다.

최근 인간 체세포로부터 유도 만능 줄기세포를 확립하고 이로부터 심근세포, 간세포, 신장세포, 신경세포 등으로 분화를 유도하고 각각의 기관에서 약물 및 독성물질을 스크리닝하고 위해성을 평가하는 시도가 진행되고 있고, 분화과정의 또는 분화된 줄기세포 유래의 세포 및 조직을 함께 배양해서 약물의 대사체에 의한 독성평가는 물론, 다양한 조직에서 독성물질이 미치는 영향을 측정·평가하고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 발생독성시험법에서도 모체와 태아간의 독성물질 교류에 따른 독성을 평가하기 위해, Bewo 세포와 배아줄기세포를 함께 배양하고 Bewo 세포에서 일차적인 대사를 거친 약물이 배아줄기세포의 세포생존력과 분화에 미치는 영향을 평가하기 위한 시

험법도 보고된 바 있다. 현재 연구개발된 발생독성시험법들이 단일의 시험법만으로는 동물을 이용한 시험법을 완전히 대체하기는 아직 시기상조이지만, 독성평가에 이용되는 동물 수의 감소시킬 수 있고, 초기 신약 개발단계에서 소량의 약물로 위해성 평가나 약물 스크리닝에 적용 가능하다는 점에서 시간 단축과 비용 절감이라는 시간·경제적인 이점이 있음은 분명하다. 현재, 대형 제약사와 Biotech사에서 줄기세포를 의약품 탐색에 적용하고 있고 이는 확대되는 추세에 있다.

동물 실험을 부분적으로 또는 완전히 대체하여 사용할 수 있는 검증된 여러 가지 방법이 존재하지만, 현재까지 개발된 시험법의 경우 완벽하지 않다. 따라서 기존의 시험법을 발전시키거나, 새로운 대체 시험법 연구들이 필요하며, 대체 시험법 연구를 위해서 국가기관의 많은 지원이 필요하다. 여러 국제 검증 연구에 의해 입증된 바와 같이 대체 방법은 실험에 필요한 시험 동물의 수를 줄이거나 전체 동물 시험을 대체할 가능성이 있다. *In vitro*, *ex vivo* and *in silico* 방법을 결합하는 시험 전략은 현재 대체 방법이 실패하고 있는 분야에서 성공적일 수 있다. 보다 복잡한 독성 분류를 위한 대체 방법을 개발할 때는 독성 경로와 독성 작용 메커니즘을 조사할 필요가 있으며, 동시에 전통적인 동물 실험의 예측 능력과 사람에서 관찰된 효과와의 일치성을 재검토해야 한다. 이러한 고려 사항은 인체 건강에 미치는 영향을 예측하기 위한 적절하고 신뢰성 있는 대체 방법을 생산하는 능력을 크게 향상시킬 것이다.