



2023년 연구보고서

GST-P를 활용한 화학물질에 의한 전암 병변 조기 탐색 연구

- 간을 중심으로 -

OSHRI

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



연구보고서

GST-P를 활용한 화학물질에 의한 전암 병변 조기 탐색 연구 - 간을 중심으로 -

조은상·김범기

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



요약문

- 연구기간 2023년 01월 ~ 2023년 11월
- 핵심단어 간, 전암 병변, GST-P, 발암성, 스크리닝
- 연구과제명 GST-P를 활용한 화학물질에 의한 전암 병변 조기 탐색 연구
- 간을 중심으로 -

1. 연구배경

- 동물을 이용한 발암성 독성시험은 대규모, 장기간의 시험을 요구하기 때문에 동물 윤리 및 시험의 효율성을 고려하여 화학물질의 발암성을 스크리닝하기 위한 생체 내 시험 등이 지속적으로 연구되고 있다.
- 또한 발암성 시험의 스크리닝을 위해 최신의 발암성 관련 기전 정보 탐색 및 증거가중치 등의 적용을 함께 고려할 필요가 있으며, 이를 위해 발암성 관련 연구사항의 최신화가 필요하다.
- 발암성 관련 연구 중에서 전암성 병변을 확인하는 것은 발암성의 명백한 증거로 인정되고 있으며, 랫의 간에서 유전자 분석 및 면역 염색 등을 통해 Glutathione S-transferase P-form (GST-P)를 확인하는 것이 종양 이전의 전암 병변의 마커로 이용되고 있다.
- 이를 통해 기존의 헤마톡실린 및 에오신 염색을 통해 확인하기 어려운 소규모 또는 초기의 전암 병변에 대해 확인 가능하여, 이번 연구에서 GST-P의 면역조직화학 염색법 적용을 통하여 전암 병변을 파악할 수 있는 실험적 요건을 확립하고, 정량 분석을 실시 및 기존 진단과 비교하여 전암 병변의 조기 파악 가능성을 탐색하고자 하였다.

- 이 연구를 통해 화학물질을 이용한 흡입독성시험에서 확인할 수 있는 전암성 병변을 조기에 탐색 및 발암성 시험의 스크리닝에 적용 가능한 기반을 마련하고자 한다.

2. 주요 연구내용

1) 기존 발암성 독성시험에서 화학물질에 의한 발암성 관련 가이드라인 및 연구 사항 등 최신화

- IARC 모노그래프를 중심으로 문헌 탐색을 통해 발암성 스크리닝을 위해 고려되어야 할 유전적, 비유전적 지표(암 특성)를 탐색하였다.
- 그룹 1~2B의 직업관련 화학물질에 대해 암 특성에 따라 관련 발암관련 기전을 분류한 결과 가장 많은 빈도를 보이는 기전은 유전독성 관련 특성으로 나타났으며, 그 외 세포 증식, 사멸 또는 영양 공급의 변화와 (대사적으로 활성화된) 전자친화성 관련 특성이 확인되었다.

2) 실험동물의 생체 시료를 활용한 흡입독성시험자료의 전암 병변 관련 마커 분석

- 흡입독성연구센터에서 실시한 기존 실험의 시료로 보존된 랫과 마우스의 간 조직을 활용하여 일반 HE 염색을 실시하여 정상조직, 전암 병변 및 종양 조직 등을 살펴보고, 전암 병변 마커(GST-P)와 세포 증식 마커(PCNA)를 이용하여 면역조직화학염색을 실시하였다.
- 마우스의 경우 두 가지 마커 모두 2년 동안 Tetrachloroethylene에 노출해 HE 염색 상 종양 또는 foci/hyperplasia가 확인된 개체의 시료에서 다량 발현이 되었고, 90일간 시험물질을 노출시켰지만 정상으로 확인된 시료에서도 정상 시료보다 많은 양이 발현되었다. 랫의 경우 2

년 사육한 정상동물의 간 시료 중 HE 염색에서 foci/hyperplasia가 확인된 경우 GST-P 양성 foci 형성 개수가 증가하였고, 90일간 Heptan-1-ol에 노출한 간 시료에서 foci는 형성하지 않았으나, 소규모의 양성 발현 부위가 증가하였다. 이를 통해 HE 염색에서 확인하지 못한 초기 전암 병변의 파악 가능성을 확인했다.

3) 화학물질, 의약품 등의 발암성 관련 최신 연구를 고려한 기관 내 발암성 스크리닝 방식의 제고

- 흡입독성 발암성 시험의 효율적 운용을 위해 스크리닝(시험물질의 선정 관련)을 위한 적용 방식을 추가 탐색하였다. 문헌 조사를 통해 유전독성 양성 결과 등의 발암 관련 MOA와 효력을 포함하여 최종 세 가지의 분류를 고려할 것을 제안하였다.

3. 연구 활용방안

- 향후 발암성 스크리닝 연구를 추가해 발암성 확인을 위한 흡입독성시험의 효과적인 물질 선정을 위한 자료로 활용
- 기존 흡입독성시험의 잔여 시료를 이용한 추가 실험을 통해 화학물질에 의한 독성 데이터의 보조적 생산 및 응용

4. 연락처

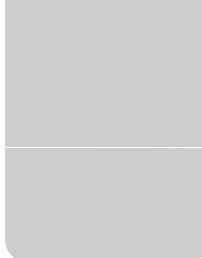
- 연구책임자 : 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터 연구위원 조은상

▪ ☎ 042) 869. 8513

▪ E-mail escho@kosha.or.kr

목 차

I. 서 론	1
1. 발암의 연구	3
2. 간의 발암과 전암 병변의 확인	10
3. 연구 필요성 및 목표	18
II. 연구 방법	19
1. 발암성 스크리닝 관련 최신화 연구 조사	21
2. 생체 시료를 활용한 시험 조건의 확립 및 분석	23
3. 시험대상 화학물질의 스크리닝을 위한 분류	26
III. 연구 결과	27
1. 화학물질 발암원 관련 연구 최신화	29



목 차

2. 생체시료를 활용한 전암병변 탐색 시험 결과	32
3. 발암성 시험 물질의 스크리닝 방식 제고	45
IV. 고 찰	49
1. GST-P의 활용	51
2. 동물 실험과 ESG 경영 노력	54
3. 발암성 동물 실험의 대체 및 기전 연구	55
V. 결 론	59
참고문헌	63
Abstract	75

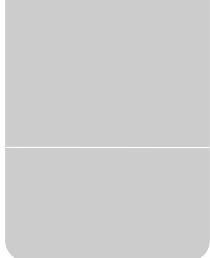


표 목차

〈표 I-1〉 발암원(Carcinogen)의 알려진 특징	7
〈표 I-2〉 IARC 분류의 기준	8
〈표 II-1〉 발암원 분류 시 고려점	22
〈표 II-2〉 시험군 구성 설명	23
〈표 II-3〉 이용 시약 및 항체 상세 정보	25
〈표 III-1〉 직업적으로 사용되는 화학물질의 분류 변경 사항 (IARC monograph 119-130)	30
〈표 III-2〉 MOA 중심으로 분류를 위한 첫번째 범주	46
〈표 III-3〉 노출 경로 별 효력치 적용 예시	47
〈표 III-4〉 발암성 평가를 위한 복합 평가 예시	48

그림목차

[그림 I-1] 암특징(Hallmarks of cancer)의 변화	5
[그림 I-2] 간암 발생 과정의 기전	10
[그림 I-3] 간암 발생과 진행의 조직병리학적 모사	11
[그림 I-4] HCC 연구를 위해 개발된 <i>in vitro</i> 모델	12
[그림 I-5] 간 전암 병변 및 암 병변의 형태(랫, 마우스)	14
[그림 I-6] 화학적으로 유도된 마우스 간암의 형태학적 특징	15
[그림 I-7] 다양한 화학물질에 의한 간 전암 병변(foci 및 nodule)의 GST-P 발현 양상	17
[그림 III-1] 화학물질의 발암 특징에 따른 기전적 증거 분류	31
[그림 III-2] 마우스 간 시료의 HE 일반 염색 대표 이미지	32
[그림 III-3] 마우스 간 시료의 HE 일반 염색 전체 이미지	33
[그림 III-4] 군 별 마우스 간 시료의 면역조직화학염색(GST-P) 결과	34
[그림 III-5] 군 별 마우스 간 시료의 면역조직화학염색(PCNA) 결과	35
[그림 III-6] 마우스 간 시료에서 군 별 마커 발현의 정량 분석	36
[그림 III-7] 랫 간 시료의 HE 일반 염색 대표 이미지	38
[그림 III-8] 랫 간 시료의 HE 일반 염색 전체 이미지	39
[그림 III-9] 군 별 랫 간 시료의 면역조직화학염색(GST-P) 결과	41
[그림 III-10] 군 별 랫 간 시료의 면역조직화학염색(PCNA) 결과	42
[그림 III-11] 랫 간 시료에서 군 별 마커 발현의 정량 분석	44

I. 서론

.....

I. 서 론

1. 발암의 연구

1) 암 연구의 변화

(1) 분자생물학과 암 연구

암(Cancer)에 대한 연구가 시작된 이래 분자생물학의 발전과 함께 암에 대한 연구 방식이 급격하게 진행되어 왔다. 암세포를 이용한 동물모델 실험을 통해 처음 암과 관련된 유전자가 발견된 이후 암 연구는 유전자의 변화에 절대적으로 영향을 받는 것으로 인지되었다(Bishop and Weinberg, 1996). 또한 대부분의 포유류 세포와 동일하게 사람에서의 종양 발생도 정상의 세포가 고도로 분화되는 악성 신생물로 변환하도록 유도되는 유전적 변화를 동반하는 다단계의 과정이라고 알려져 있다(Hanahan and Weinberg, 2000). 그러나 많은 연구에도 불구하고, 암은 정상적인 세포 증식과 항상성의 조절 이상으로 발생하는 복합적 질환이므로 각 장기나 아형(subtype)에 따른 다양성은 방대한 복잡성(complexity)을 지니고 있어 기전 간 연결고리를 확인하기가 쉽지 않다.

(2) 암 특성(Cancer hallmark)의 개념

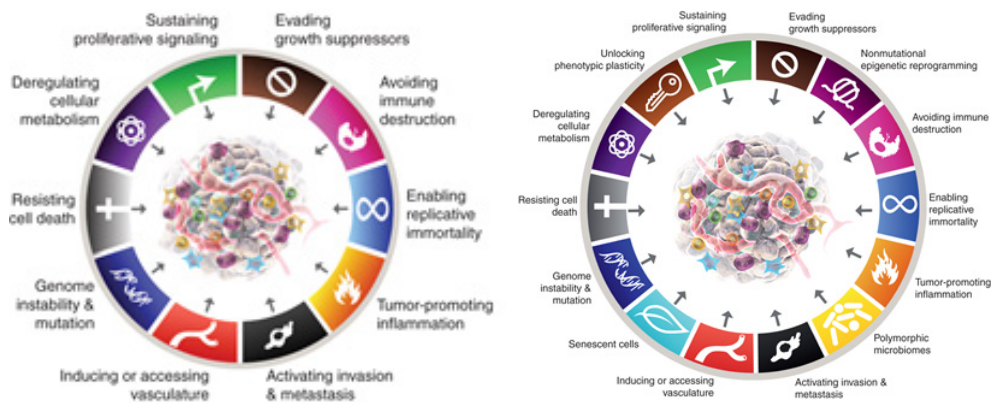
이에 따라 Hanahan 등의 연구자는 암 연구에 대한 복잡성을 인지하고 총괄적으로 암세포로 성장하게 되는 6가지의 필수적인 암특성(Cancer hallmark)을 정의하였다(Hanahan and Weinberg, 2000). 자가성장 가능(self sufficiency in growth signals), 증식억제 이상(Insensitivity to anti-growth signals),

세포 자가사멸의 회피(evasion of programmed cell death), 제한 없는 복제력(limitless replicative potential), 지속적인 혈관신생(sustained angiogenesis), 조직 침습 및 전이(tissue invasion and metastasis)로 대표되는 생체의 생리학적 변화들은 암 방어 기전의 무력화를 뜻한다. 또한 이외 보조적 특성(Enabling characteristics)으로 유전체 불안전성이 알려져 있다(Hanahan and Weinberg, 2000). 신체에서 유전체를 유지관리하기 위해 작동하는 모니터링 및 복구 효소 등의 작용으로 사실상 수명 내 돌연변이가 발생할 가능성은 낮으나, p53 종양 억제 단백질 경로 기능의 이상 등으로 정상적인 DNA 손상 복구 과정(세포주기 정지 또는 세포자멸 유도)에 오류가 생기는 경우 결과적으로 돌연변이 세포의 생성을 허용하게 된다(Lengauer et al., 1998; Levine, 1997).

위의 6가지 변화와 유전체 불안전성에 의해 암이 되는 과정은 다양하고 가변적이다. 특정 종양 유전자 또는 억제 유전자의 돌연변이는 종양 발생 단계 중 초기나 후기 어디에서나 발생할 수 있고, 6가지 특징이 종양의 특정 진행 단계에 발생한다고 설명하기 어렵다. 또한 각 특징은 동일한 유형의 종양이라 하더라도 다를 수 있고 서로 다른 특징에 영향을 미칠 수 있다(Hanahan and Weinberg, 2000). 그럼에도 불구하고, 다양한 분자생물학적 연구를 통해 세포의 성장과 관련된 여러 신호체계가 공유되고, 형성된 암세포와 암 조직을 구성하는 다양한 세포 유형(섬유아세포, 면역세포, 내피세포 등)의 협력 관계가 중요하다는 것이 알려지게 되었다(Hanahan and Weinberg, 2000).

해당 연구자들은 이후로 세포 내 에너지대사의 통제해체(Deregulating cellular energetics) 및 면역세포(T/B 림프구, 대식세포, NK 세포)에 의한 파괴회피(Avoiding immune destruction)를 추가로 발표하였고, 지난 연구에서 소개되었던 유전체의 불안전성과 변이 및 종양 촉진 염색 또한 논의되었다. 또한 다양한 세포 유형에 종양줄기세포(tumor stem cell, CSC)가 추가되어 종양미세환경(tumor microenvironment)의 개념이 정립되었다(Hanahan and Weinberg 2011).

그러나 연구자들은 2022년 새로운 연구를 통해 지난 연구의 개념을 망라하여 새로운 암특성을 제안하였다(그림 I-1). 새로운 네 가지 암특성 및 보조적 특성은 표현형 가소성 해제(Unlocking phenotypic plasticity), 비변이 후생재프로그래밍(Nonmutational epigenetic reprogramming), 다형성 마이크로비옴(Polymorphic microbiomes), 노화세포(Senescent cells)로 정의되었다(Hanahan, 2022).



[그림 I-1] 암특징(Hallmarks of cancer)의 변화

(출처 : Hanahan, 2022)

(3) 발암원(Carcinogen)과 키 매커니즘

국제암연구기관(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서 분류한 Group 1 발암물질은 대부분 25년 전에 검토된 것으로 알려져 있다(Smith et al., 2016). 그러나 이후의 많은 연구들을 통해 기존의 분류된 발암물질들이 다른 장기 또는 별도의 노출 시나리오를 통해 암을 유발한다는 사실이 알려지게 되었다(Cogliano et al. 2011). 또한 IARC는 보고서(100A-F)를 통해 Group 1 발암물질에 대한 새로운 리뷰 및 업데이트를 실시하였다. 해당 업데이트를 통해 암 유해성 결정을 위해 시스템적 방식이 전반적으로 이용되지 않았고, 기존의 발암 물질들이 공통적인 특성을 공유한다는 것이 알려졌다. 많은 사람 발암 물질들은 발암의 각 과정에서 다양한 생물학적 변화를 일으키는 매커니즘을 갖는데, 기존의 발암 과정에 대한 연구들은 initiator, promoter를 특정한 화학물질 자체로 설명해 왔다. 또한 발암의 단계별 발달에서 관찰되는 형태학적 변화가 유전적 변화와 관련 있는 것으로 확인되었다. 그러나 최근 연구되는 암의 특징은 이와 달리 특정 화학물질이나 형태학적 변화에 의한 구별이 아닌, 유전자 발현과 세포 내 신호전달 체계의 변화로 귀결되고 있다(Hanahan and Weinberg, 2011). 화학물질의 특성에 의해 종양 세포와 신생물이 특징이 관련될 수 있지만 이것이 꼭 암을 뜻하는 것은 아니고, 또한 전산독성학 연구에 의하면 암을 유발한다고 알려져 있는 화학물질이 표적 또는 경로를 변경하는 발암 기전을 갖는다는 것이 연구되었다(Kleinstreuer et al. 2013).

최근 IARC에서 개최된 워크숍을 통해 Group 1 발암물질에 의한 암생성 매커니즘들이 논의되었고 현재 알려진 발암물질은 해당 10가지 매커니즘 중 적어도 한 개 이상의 특징을 보인다고 알려지게 되었다(Smith et al., 2016). 또한 IARC 모노그래프를 통해 논의된 몇몇 물질들은 이러한 매커니즘적 분류를 적용하여 작성되었다(Loomis et al., 2015). 아래 표를 통해 논의되었던 발암원의 주요 특징을 정리하였다 <표 I-1>.

〈표 I-1〉 발암원(Carcinogen)의 알려진 특징

특 징	예 시
1. 전자친화성(Electrophilic) 또는 대사적 활성화	• 전자친화적 구조(에폭시드, 퀴논 등) • DNA 및 단백질 부가물을 형성할 수 있는 모화합물이나 대사산물
2. 유전독성	• DNA 자체의 손상, 삽입 • 유전자 돌연변이 • 세포유전학적 변화
3. DNA 복구과정의 변경 또는 유전체 불안전성 유발	• DNA 복제 또는 수리과정의 변경
4. 후생유전적 변화 유발	• DNA 메틸레이션 • 히스톤 변형 • microRNA의 발현
5. 산화적 스트레스 유발	• 산소라디칼 • 산화적 스트레스 • DNA나 지질 등의 고분자에 대한 산화적 손상
6. 만성 염증 유발	• 백혈구 증가 • Myeloperoxidase 활성 • Cytokine 또는 chemokine 생성 변화
7. 면역 억제력	• 면역감시(immunosurveillance)의 감소 • 면역체계기능 장애
8. 수용체 매개 효과의 조절	• 수용체의 비활성화/활성화 • 호르몬 등 내인성 리간드의 변화
9. 불멸화(Immortalization)의 원인	• 노화(senescence) 억제 • 세포 전환(transformation)
10. 세포 증식, 사멸 또는 영양 공급의 변화	• 세포증식 증가 • 세포사멸 감소 • 성장인자 변경 • 세포 복제/주기 조절 관련 에너지/신호경로 변경

* 출처 : Smith et al., 2016

2) 발암원의 분류

IARC, UN(GHS), EU 등 다양한 국제기구에서 발암물질 또는 의심물질에 대해 지속적으로 분류하여 발표하고 있다. 이 중 IARC는 monograph 130 권을 통해 발암 기전적 증거의 적용에 대한 우선적(색칸) 판단법을 아래 표와 같이 별도로 공개하였다(IARC, 2022).

〈표 I-2〉 IARC 분류의 기준

증거의 종류 (Stream of evidence)			증거의 강력함에 기반한 분류
사람 발암성 증거	실험동물 발암성 증거	기전적 증거	
충분(Sufficient)	불필요	불필요	사람에 발암성 있음 (Group 1)
제한적/불충분 (Limited/Inadequate)	충분	강력(b,1) (사람 노출)	
제한적	충분	강력(b,2-3) 제한적/불충분	사람에게 암을 유발할 개연성이 높음 (Group 2A)
불충분	충분	강력(b,2) (사람 세포/조직)	
제한적	덜 충분	강력(b,1-3)	
제한적/불충분	불필요	강력(a) (기전적 분류)	
제한적	덜 충분	제한적/불충분	사람에게 암을 유발할 가능성이 있음 (Group 2B)
불충분	충분	강력(b,3) 제한적/불충분	
불충분	덜 충분	강력(b,1-3)	
제한적	충분	강력(c) (사람에서 작동안함)	
불충분	충분	강력(c) (사람에서 작동안함)	사람에의 발암성을 분류할 수 없음

* 사람에서의 발암이 가장 큰 증거가 됨

** 실험동물에서의 종양 부위가 충분히 사람과 관련이 없다는 근거가 있어야 실험동물에서 종양이 확인되었으나 사람과 관련이 없다는 증거로 인정받을 수 있음.

또한 해당 표에 따른 판단을 위하여 고려해야 할 기전적 증거에 대한 별도의 해설을 표시하였다. 특히 강한(Strong)에 해당하는 효력 및 증거의 강도와 관련하여 다음과 같이 설명하고 있다. “여러 시스템을 이용한 실험의 결과가 일관적이거나, 주요 기전의 억제를 통해 종양이 억제된다는 실험적 증빙이 존재하거나, 한 종류 이상의 포유류에 대한 다양한 끝점 확인 연구가 포함된다. 정량적 구조활성, 사람이 아닌 포유류 세포 실험, 비포유류 실험은 자체로 강력한 증거라 할 수 없지만 여러 종의 다른 시스템을 이용한 일관된 시험 결과는 강력한 증거로 볼 수 있다.”(IARC, 2022)

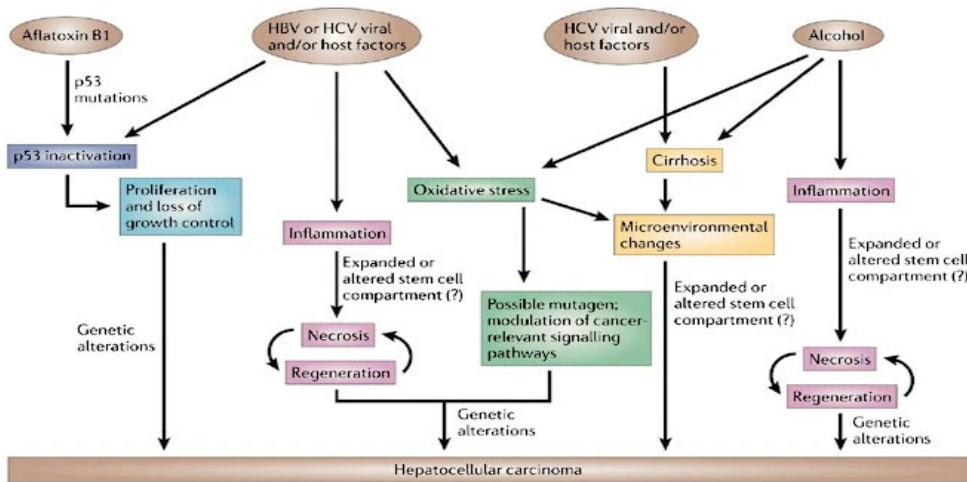
이러한 기전적 분류는 세가지 세부 항목(a~c)으로 다시 분류되는데, 위의 표에서 a로 표기된 부분은 해당 물질이 포함된 정량적 구조활성을 공유하는 화학물질군(class)에서 group 1 또는 2A로 확인된 물질이 존재하는 경우를 말한다. b로 표기된 부분은 발암원의 특징을 확인할 수 있는 강력한 증거들을 말하며, b.1은 인간에게 노출되어 특정 유형의 암으로 나타난 경우, b.2는 인간 유래의 세포/조직 또는 ex vivo로 노출된 사람의 시료에서 발암의 증거가 확인된 경우, b.3은 인간 유래의 세포/조직을 이용하여 실험을 통해 증거를 획득한 경우를 말한다. c로 표기된 부분은 실험동물에서 발암성의 기전이 확인되었지만 사람에서는 작동하지 않는 기전을 포함하는 경우를 말한다(IARC, 2022).

제한적(Limited) 또는 불충분한(Inadequate) 증거에 대한 설명도 함께 수록되어 있는데, 제한적 증거는 연구의 범위, 실험의 종말점, 종차에 대해 좁은 범위의 연구가 이뤄졌을 경우이거나, 동일한 실험 설계에 대한 비일관적인 결과가 존재하는 경우를 말한다. 불충분한 증거는 자료가 거의 없거나, 실험의 설계나 결과의 완성도가 적절하지 않은 경우를 말한다(IARC, 2022).

2. 간의 발암과 전암 병변의 확인

1) 간암의 과정과 전암 병변

사람에서 간의 암종은 바이러스 감염, 지속적인 알콜 섭취 및 만성 염증성 간질환과 밀접하게 연관되어 있다. 특히 만성 염증성 간질환에 의한 상처-치유 반응의 반복을 통해 섬유화 또는 간경변이 유발되는 것으로 알려져 있다 (Farazi and DePinho, 2006). 간의 암종을 유발하는 대표적인 화학물질은 알콜(Alcohol)로, 지속적인 알콜 섭취는 단핵구의 활성화를 통해 염증성 사이토카인의 생성을 유발하고, 내독소의 농도를 증가시켜 간세포의 생존에 영향을 미치는 다양한 케모카인 및 사이토카인을 방출하는 쿠퍼세포를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다(McClain et al., 2002). 이 외 다양한 원인에 의하여 간암이 발생하지만 발생하는 매커니즘은 일반적으로 아래 [그림I-2]를 따르는 것으로 알려져 있다.

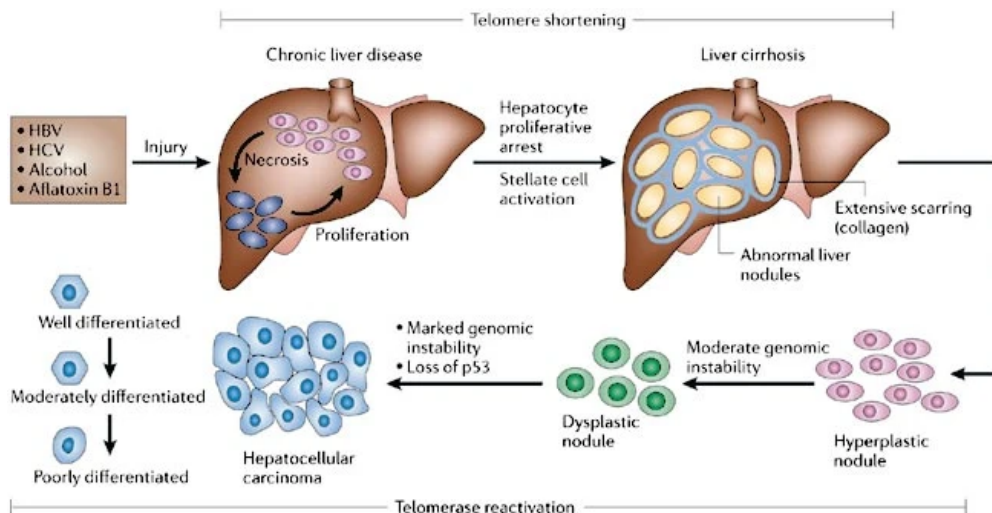


Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

[그림 I-2] 간암 발생 과정의 기전

(출처 : Parazi and DePinho, 2006)

또한 간암 발생의 형태학적 모식에 따르면 지속적인 간세포 손상 및 재생이 반복되며 만성적 간질환을 초래하게 된다. 재생을 위해 형성되는 과형성 결절은 정상적 간세포의 특성을 갖고 있으나 어떠한 원인에 의해 비정상적인 세포 특성(clear cell change, nuclear crowding)을 갖는 악성 이형성 결절로 진행될 수 있으며, 이는 간 지주(trabecular)의 비후로 연결되어 비정상적인 간 구조를 형성하게 된다. 이러한 이형성 결절은 명백하게 간암으로 진화할 수 있고 주변 섬유질 기질 또는 혈관을 침범하여 때때로 전이되기도 한다(Farazi and DePinho, 2006). 사람 간암에서 주요 유전체적/비유전체적 변화는 TP53, Beta-catenini, ErbB 수용체군, MET 및 HGF, p16(INK4a), E-cadherin, cyclooxygenase 2(COX-2)를 포함하는 주요 종양유전자 및 종양 억제유전자의 조절실패를 포함한다(Farazi and DePinho, 2006; Okuda, 2000).



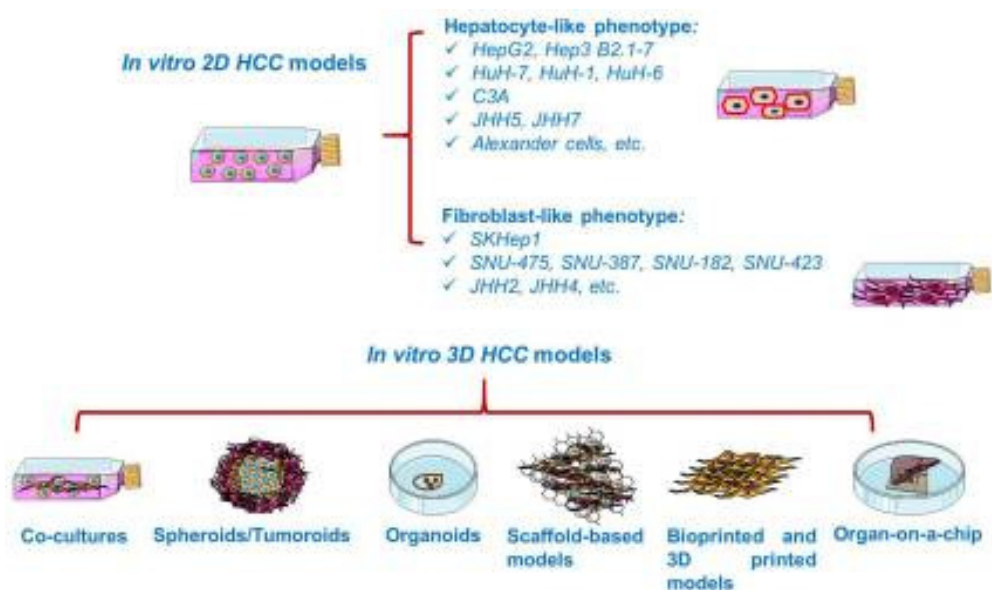
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

[그림 I -3] 간암 발생과 진행의 조직병리학적 모사

(출처 : Farazi and DePinho, 2006)

2) 간암(Hepatocellular carcinoma) 확인을 위한 다양한 모델

In vitro 시험의 경우, 다양한 종류의 사람 및 동물 유래 간암세포주가 이용되고 있다(Blidisel et al., 2021). 기존에 가장 많이 이용되었던 HepG2 세포주를 비롯해 C3A, HepaRG 및 Hepa1-6 세포주 등이 각 세포주의 특징에 따라 이용되고 있다. 최근 3차원-모델(3D-model)이 개발되어 기존 2D-모델에 비해 다양한 생체 내 조건, 진행 프로세스 및 미세 환경 조성 등에서 실제의 암조직과 비슷한 보존력을 가져 다양하게 이용되고 있다. 이러한 3D-모델은 co-culture, 스펜로이드, 오가노이드 등을 포함하며 특징에 따라 다양한 독성 및 약물 효능 연구에 이용되고 있다(Blidisel et al., 2021).



[그림 I-4] HCC 연구를 위해 개발된 *in vitro* 모델

(출처 : Blidisel et al., 2021)

동물을 이용한 In vivo 모델은 대부분 설치류를 이용하여 제작되고 있고, 특히 마우스는 종양 발생 및 성장 과정의 생물학적 이해, 항암과 관련된 치료제의 임상 전 평가 및 간암 발생의 연구를 위해 다양하게 이용되어 왔다(Yim et al., 2020). 이 과정에서 마우스의 종(strain)이 많은 영향을 미치게 되는데 C3H, CBA, DBA/2 마우스 종의 경우 자연적 또는 화학적으로 발생시키는 간암에 민감하게 반응하는 반면, C57/BL6, BALB/c, A/J 등의 마우스 종은 더 저항성을 갖는 것으로 알려져 있다(Maronpot, 2009).

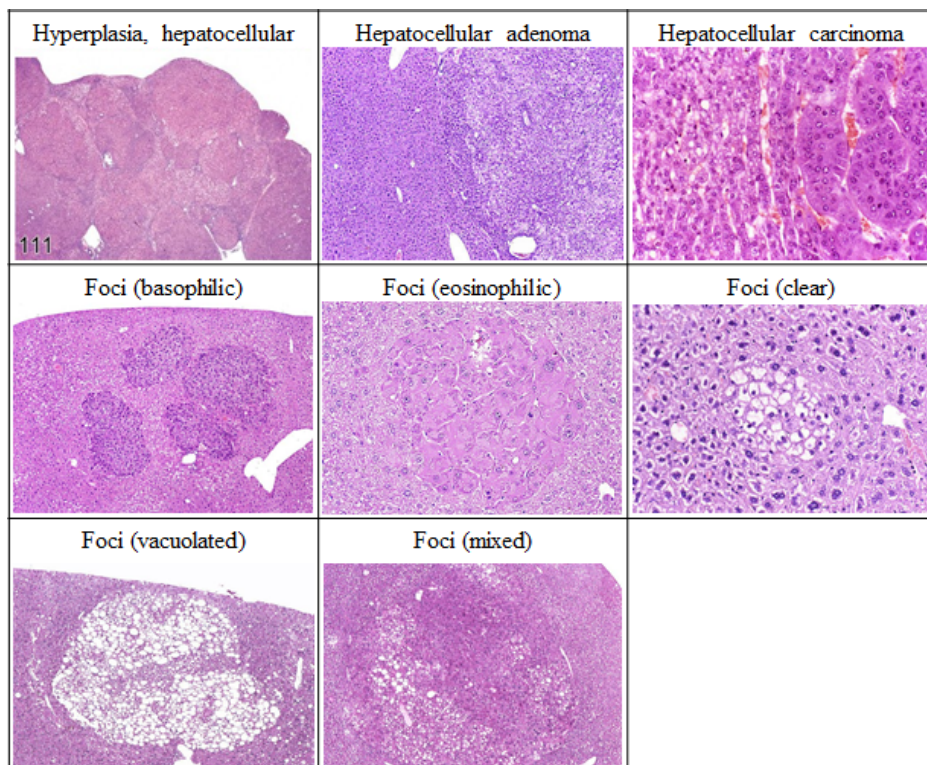
대표적으로 화학물질을 이용하거나 암세포이식(Xenograft model)을 이용한 방법등이 알려져 있는데, 이 중 화학적인 방식은 Diethylmitrosamine, DEN), Aflatoxin, Carbon tetrachloride, Dimethylmitrosamine 및 Thioacetamide를 이용하여 HCC를 유발하며, 암의 유도에 오랜 시간이 걸리지만 오히려 이를 통해 염증성 반응과 섬유조직의 자극을 통한 미세환경 조성이 촉진되는 장점이 있다(Macek Jikova et al., 2019). 또한 각 화학물질의 카테고리에 따라 DNA의 구조적 변경을 유발하는 유전독성형(genotoxic)과 DNA 변화를 유도하는 능력은 없으나 간독성에 이어 간암 형성을 유도하는 프로모터(promotor) 타입으로 분류되기도 한다(Heindryckx et al., 2009).

3) 암과 전암 병변의 단계적 진행과 탐색

(1) 간암 병변의 조직병리학적 특징

사람의 HCC는 이질적(Heterogeneous) 특성을 갖고, 일반적으로 국소적인 비정상/미성숙 간세포의 부위는 1mm를 기준으로 초점(foci) 또는 결절(nodule)로 구별되며, 세부적으로 세포 크기 및 이형성의 정도에 따라 다시 구별된다(Schlageter et al., 2014). 설치류의 HCC는 대체로 사람에서의 형태와 비슷하나 랫의 경우 대체로 지주형(Trabecular) 성장 패턴을 보이며, 대부분 출혈, 괴사, 색소 침착, 혈관확장 및 지방 변성을 동반한다(Toolen et

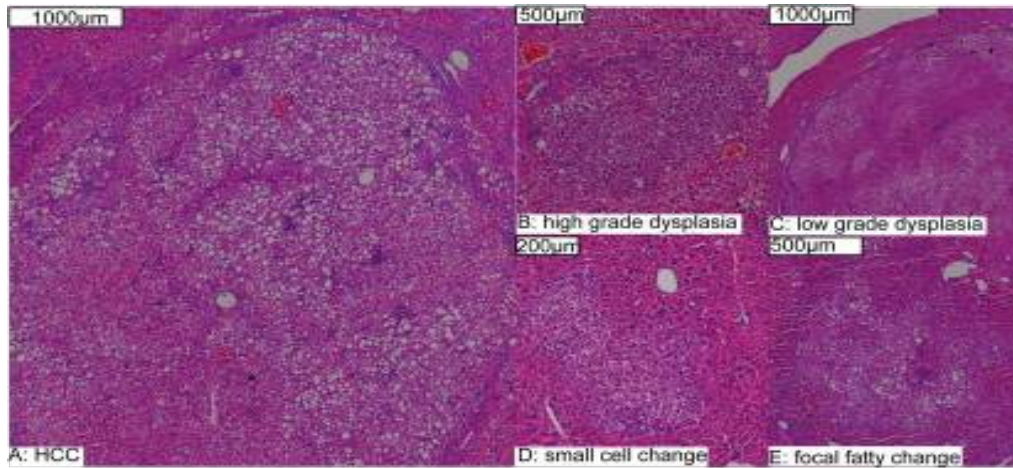
al., 2010). 아래와 같이 비임상 독성시험에서 확인되는 랫 및 마우스의 전암 병변과 암의 형태학적 특징도 잘 알려져 있다.



[그림 I-5] 간 전암 병변 및 암 병변의 형태(랫, 마우스)

(출처 : Thoolen et al., 2010)

또한 설치류의 간암에서 간 지주를 구성하는 형태는 낮은 정도의 악성을 나타내고, 많은 유사분열상과 핵의 이형태, 낭포성 변화 및 괴사 부위에 따라 악성도가 달라지는 것으로 알려져 있다(Becker, 1982; Thoolen et al., 2012). 치료제 연구 목적의 마우스 전암 병변 및 HCC의 형태는 잘 구분되어 있으며, 간암 모델 마우스의 전암 병변과 암의 형태학적 특징도 잘 알려져 있다(Henderson et al., 2018) [그림 I-5]



[그림 I-6] 화학적으로 유도된 마우스 간암의 형태학적 특징

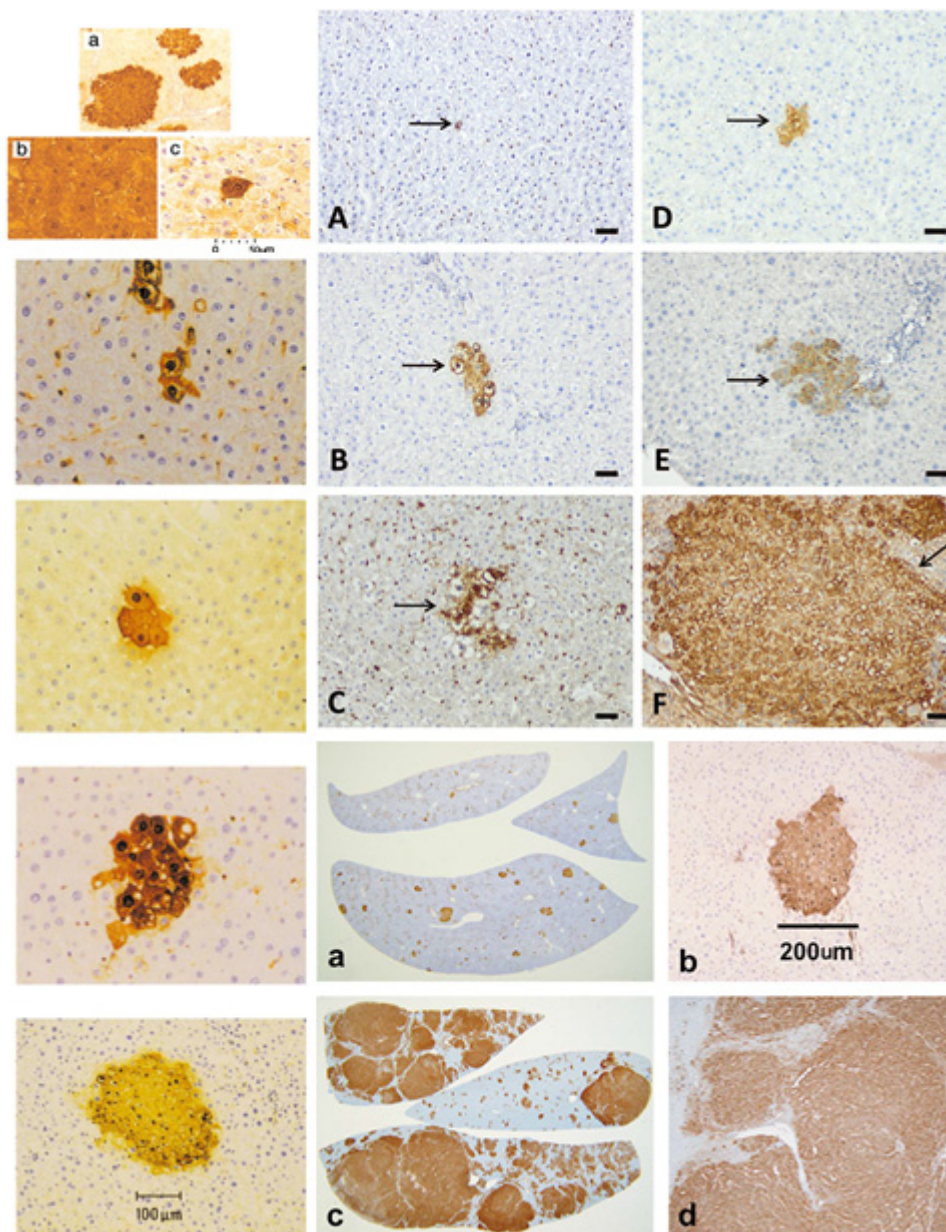
(출처 : Henderson et al., 2018)

(2) 전암 병변의 탐색

전암 병변의 탐색을 위해 연구되고 있는 다양한 효소(enzyme) 또는 이소 효소(isoenzyme) 중 글루타티온 S-전이효소(Glutathione-S-transferase, GST)는 단일단량체 또는 이형단량체로 구성된 효소로, 아미노산 서열의 유사성, 유전자 구조 및 면역 교차 반응에 따라 7개의 서브클래스를 갖는다 (Strange et al., 2000; Morel et al., 2004). 일반적으로 GST는 조절 관련 키나아제(kinase)와 밀접하게 연관되어 세포 증식, 분화 및 죽음에 관여하는 수많은 경로를 조절하여 세포 보호 및 조절 기능을 통해 암세포의 증식 또는 죽음에 중요한 역할을 한다(Vasieva, 2011; Pajaud et al., 2015; Cui et al., 2020). GST의 서브클래스 중 하나인 GST-P는 정상 성체 랫의 간 조직에서 거의 존재하지 않으나, 전암병변 및 종양세포에서 극적으로 증가하여 화학물질을 이용한 중기 발암성 시험에서 중요한 발암 관련 마커로 활용되고 있다(Sato et al., 1984; Marche-Cova et al., 1995; Satoh and Hatayama, 2002; Tsuda et al., 2003; Uda et al., 2006; Tsuda et al., 2010; Qian et al., 2013). 지난 연구들에 의해 다양한 비유전적 또는 유전

적 기전을 갖는 화학물질 또는 수술적 절제에 의해 랫의 간조직에서 단일 세포, 몇 개 또는 몇십개의 세포덩어리(focus~foci) 수준 및 간의 전체 엽에 GST-P가 발현되는 것이 확인되어 연구에 활용되어 왔다. [그림 I-7]

또한 화학물질에 의한 간암 발생 시 epoxide hydrolase, GST 및 UDP-glucuronyltransferase 등 phase II 관련 간효소의 변화를 동반한다고 알려져 있다. 따라서 GST-P는 유영한 전암 병변의 형성을 확인할 수 있는 발암성의 확인 및 발암원 또는 발암원에 의한 변화를 스크리닝 할 수 있는 도구로 이용될 수 있다(Ito et al., 1996; Tsuda et al., 2010).



[그림 I-7] 다양한 화학물질에 의한 간 전암 병변(foci 및 nodule)의 GST-P 발현 양상

(출처 : Marche-Cova et al., 1995; Satoh and Hatayama, 2002; Tsuda et al., 2003; Tsuda et al., 2010; Qian et al., 2013)

3. 연구 필요성 및 목표

1) 연구 필요성

랫 및 마우스 등 동물을 이용한 발암성 독성시험은 장기간의 시험기간을 요구하기 때문에 실험 인력, 시간, 자본 등의 제한 요소가 있다. 이에 화학물질의 발암성을 용이하게 스크리닝하기 위한 생체 내 시험 등이 계속 연구되어 왔고, 그 중 일부 장기에서 전암성 이벤트를 확인하는 것이 발암성의 명백한 증거로 인정되고 있다.

이 중 간에서의 전암 병변 바이오 마커로 glutathione S-transferase P-form (GST-P)이 연구되어 유전자 분석 및 면역 염색 등을 통해 종양 이전 전암 병변 단계를 확인 가능하게 하였으며, 중단기 발암성 시험에서도 활용되고 있다. 또한 기존의 설치류를 이용하는 발암성 독성시험에서 소규모 또는 초기의 전암 병변은 헤마톡실린 및 에오신 염색을 통해 현미경으로 확인이 어려울 수 있으나, GST-P의 발현 여부를 통해 이를 확인할 수 있다.

따라서 GST-P를 적용한 면역 염색을 통하여 화학물질 발암원에 의한 정량적 분석을 실시 및 기존 진단과 비교하여 발암 물질의 조기 파악 가능성을 확인할 필요가 있다.

이 연구를 통해 흡입독성시험에서 확인할 수 있는 화학물질에 의한 간 병변을 조기에 탐색할 수 있도록 기반 마련을 하고자 한다.

2) 연구 목표

흡입독성센터 내 생체 내(in vivo) 독성시험 자료 분석을 통한 간의 전암 병변 조기 발견 가능성 탐색 : 1건

II. 연구 방법

.....

II. 연구 방법

1. 발암성 스크리닝 관련 최신화 연구 조사

1) 사람 발암원의 특징

기존 알려진 문헌 중 사람 발암원의 10가지 특징(Key characteristics, KCs)을 고려하여 IARC 모노그래프에서 논의되었던 발암성 물질 등을 재분석했던 문헌을 중심으로 재분석 기준과 분류 방식을 탐색하였다. 기존 연구를 통해 IARC 100F-118까지 chemical agents and related occupation에 대한 분석이 실시된 바가 있다(Krewski et al., 2019). 이를 참고하여 IARC monograph(119-130)에서 리뷰되었던 직업성 요인을 갖는 화학물질을 추가하여 발암원의 특징에 따라 분류하였다. 또한 발암원인 화학물질을 분류 시 아래의 사항을 고려하여 실시하였다.

〈표 II-1〉 발암원 분류 시 고려점

고려점	설명
1. 발암원 카테고리 판정 자료의 상태	• IARC monograph에서 분류된 발암원 중 재분류 시 카테고리가 변화하는 경우가 있음. • 보편적으로 group 1,2A의 경우 해당 발암원의 특징이 잘 분류되어 있거나, 많은 연구를 통해 문헌이 다량 존재함. • Group 2B, 3의 경우 상대적으로 자료가 빈약하여 판단의 충분한 근거로 부족하다고 판단되는 경우가 빈번하므로 고려 필요.
2. 발암원 카테고리 판정 시 특정 기전 중심 유무	• IARC monograph에서 현재 분류된 카테고리 2A중 tetrabromobisphenol A 등은 분류 시 기전연구 방식에 기반하여 분류 • 최근 발간된 미국독성프로그램(NTP) 리포트에서 Antimony trioxide 및 Haloacetic acid 의 발암성 카테고리 분류 시 기전 중심으로 판단
3. 관련 기전의 복합성 또는 단일성	• 화학물질 발암원은 물질에 따라 단일 기전과 관련되거나 여러 기전에 동시에 관련되기도 함. • Tetrabromobisphenol A은 체내 수용체 조절능을 가지며 그 외 다른 특징과도 관련되어 있음. Ethylene oxide의 경우 유전독성물질로 알려져 있고, TCDD는 단일 수용체 조절, Etoposide는 DNA 리페어 과정 변화시키는 단독 기전으로 알려짐. 발암 유발 바이러스에 의한 경우 세포불멸화 단일 기전이며, 특정 약물의 경우 태생적으로 면역억제 기전을 가짐.
4. 비발암원과의 연관성	• 직접적인 발암 기전이 아니더라도 발암 기전의 일부를 유도하는 비발암원과의 조합에 의하여 발암 기전이 발생할 수 있음
5. 참고자료의 중요도	• 발암원의 카테고리 판단을 위한 문헌 검색 시 여러 기전에 대한 조사 결과가 나올 경우 기전의 우선순위는 존재함. 산화적 손상, 생체 내 만성 염증, 면역 억제, 세포 증식/사멸/영양공급 관련 기전은 보편적으로 중요도를 높게 가져감

참고 : Guyton et al., 2018A/B

2. 생체 시료를 활용한 시험 조건의 확립 및 분석

1) 시험군의 구성

시험군은 단일 성별(수컷)의 정상 및 양성대조군 랫/마우스의 간조직을 시험 기간에 따라 분류한 후 해당 군 별 3~4개체를 확보하여 시험군을 구성하였다.

〈표 II-2〉 시험군 구성 설명

군	노출 물질 (노출농도)	기존 진단 (HE 염색)	시험종/시험기간
MC-2y	없음	정상조직	마우스/1.5년
MT-2y	Tetrachloroethylene (400 ppm)	종양조직	마우스/1.5년
MT-2y-F	Tetrachloroethylene (400 ppm)	foci/hyperplasia	마우스/1.5년
MT-90	Tetrachloroethylene (400 ppm)	정상조직	마우스/90일
RC-2y	없음	정상조직	랫/2년
RC-2y-F	없음	foci/hp	랫/2년
RC-90	없음	정상조직	랫/90일
RT-90A	Diethylbenzene (160 ppm)	정상조직	랫/90일
RT-90B	Heptan-1-ol (90 ppm)	정상조직	랫/90일

2) 일반 조직병리 검사

기존 연구과제에서 실시했던 방법과 동일하게 일반 조직병리 검사를 위한 슬라이드를 제작하였다(조은상 외., 2019). 기존 시험이 종료된 후 파라핀으로 덮어 표면이 보호된 파라핀 블록을 사용하여 유리 슬라이드를 제작하였다. 파라핀 블록의 상태가 양호하지 않은 경우, 10% NBF (Normal buffered formalin)에 보관되어있던 랫 또는 마우스의 간 조직을 이용하여 흡입독성연구센터 내 표준작업지침에 따라 제작하였다. 먼저 수세 후 조직전처리기(Tissue processor, Leica, Germany) 및 포매기(Tissue embedding center, Leica, Germany)를 이용하여 파라핀 블록을 제작하였다. 이후 미세 박절기(Tissue microtome, Leica, Germany)를 이용해 3~4um의 두께로 박절 후 유리 슬라이드에 올려 건조하였다. 건조된 슬라이드는 자동염색봉입기(Automatic stainer, DAKO, Denmark)를 이용하여 Hematoxylin 및 Eosin 염색 및 봉입을 실시하였다.

3) 면역 조직화학 염색을 이용한 마커 확인

기존 연구과제에서 실시했던 방법에 약간의 수정을 하여 면역 조직화학 염색을 위한 슬라이드를 제작하였다(조은상 외., 2019). 면역 조직화학 염색을 위해 5~6um의 두께로 파라핀 블록을 미세 박절 후 유리 슬라이드에 알콜 및 자일렌 대체제를 처리하고 항원 복원(Antigen retrieval)을 실시하였다. 이후 3% 과산화수소 용액을 이용해 내재성 효소를 억제한 후 1차 항체(Anti-GST-P / Anti-PCNA antibody)에 반응 후 ABC complex 방식을 이용하여 2차 항체 및 발색효소(peroxidase substrates)를 사용해 면역염색을 실시하였다(Vectastain ABC kit, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). 또한 1차 항체를 처리하지 않은 음성 대조를 통해 실험이 적절하게 진행되었음을 확인하였다. 면역 조직화학 염색을 위해 이용된 항체 및 시약의 상세 정보는 아래 표로 정리하였다.

〈표 II-3〉 이용 시약 및 항체 상세 정보

시약명	제조사/품번	기타
Anti-GST-Pi	Abcam (ab138491)	1:100-200 dilution
Anti-PCNA antibody	Abcam (ab92552)	1:200-500 dilution
Antigen retrieval buffer	Vector (h-3300)	100x dilution
Vectastain ABC kit	Vector laboratories (PK-6200)	-
DAB substrate kit	Vector laboratories (SK-4105)	-

* 항체 등의 희석은 전용 버퍼 또는 PBS를 이용

4) 이미지 분석과 발현 정량화

염색된 일반염색 및 면역 조직화학 슬라이드에 대해 슬라이드스캐너 (AxiScan Z1, Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 전체슬라이드이미지 (Whole slide image, WSI)를 획득하였다. 면역 조직화학 슬라이드의 분석을 위해 WSI 파일을 그림파일로 변환 후, Image J 프로그램(National Institutes of Health, Maryland, USA)를 이용해 색상의 intensity 및 면적을 정량하였다. 또한 랫의 경우 기존 문헌을 참고하여(Satoh and Hatayama, 2002) 추가적으로 GST-P에 대해 10개 이상의 세포수를 기준으로 foci를 카운트하여 간 조직 면적 대비 분석하여 기존의 이미지 분석과의 차이를 살펴보았다.

데이터는 평균±표준편차로 표시되었다. 발색 정도의 통계학적 분석은 엑셀 프로그램을 이용하여 분산의 동질성을 검정한 후, unpaired t-test 를 실시하여 군간 평균의 차이 유무를 검증하였다.

3. 시험대상 화학물질의 스크리닝을 위한 분류

1) MOA 및 WoE를 고려한 발암성 탐색 방안

화학물질에 있어 발암원 여부의 평가는 현재도 여러 규제에서 일관되게 제시되고 있지 않다. UN의 화학물 분류에서는 인간에서 발암을 유발하는 화학물질에 대해 설치류를 이용한 시험법을 기반으로 하여 화학물질 자체의 특성으로 취급하고 있으나, 그와 함께 사용법, 약동, 종간 차이, 용량 및 MOA를 함께 참고할 것을 제안하고 있다.

따라서 효율적인 스크리닝을 위하여 기존 문헌 및 EU의 CLP criteria guidance 등을 참고하여 설치류를 이용한 장기 시험에 적합하고, 스크리닝이 용이한 방식의 화학물질 분류 또는 범주를 탐색하였다.

Ⅲ. 연구 결과

.....

Ⅲ. 연구 결과

1. 화학물질 발암원 관련 연구 최신화

1) 화학물질 발암원과 주요 메커니즘

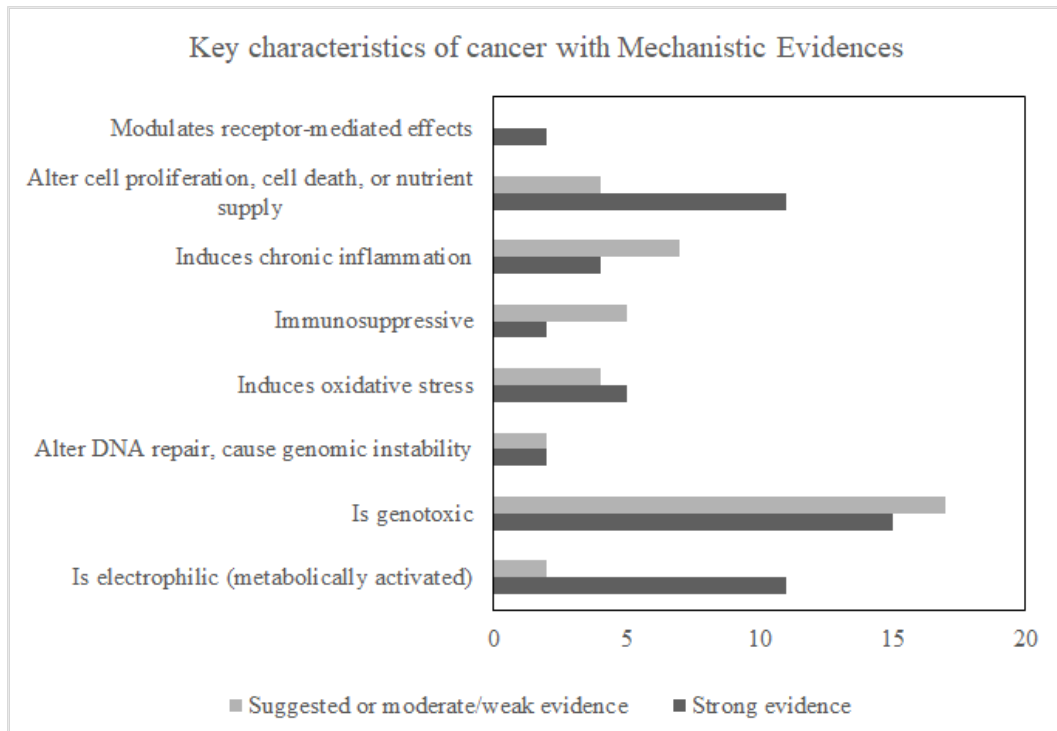
최근 발간된 IARC monograph (Volume 119 ~ 130)를 중심으로 발암원으로 확인 또는 연구되었으며, 직업적으로 사용되는 것이 확인된 화학물질의 분류(Group)를 확인하였다. 해당된 monograph에서 리뷰되었던 발암원 중 화학물질 및 비화학물질을 포함하여 사람에게 암을 유발하는 것으로 확인된 발암원(Group 1)은 Opium 및 Benzene, Group 2A는 1,1,1-Trichloroethane (CAS number 71-55-6)을 포함하여 11개, Group 2B는 Diphenylamine (CAS number 122-39-4)를 포함하여 35개로 확인되었다. 이 중 직업적으로 관련이 있고, 두 번 이상 리뷰되는 과정에서 관련 발암원에 대한 기전적 연구 또는 사람에서의 암과 관련된 증거가 확인되어 카테고리가 변경된 화학물질은 15개로 아래의 표로 정리하였다.

〈표 Ⅲ-1〉 직업적으로 사용되는 화학물질의 분류 변경 사항(IARC monograph 119-130)

CAS number	화학물질명	기존 그룹	변경 그룹	관련 정보
71-55-6	1,1,1,-Trichloroethane	3	2A	Volume 71 and 130
924-42-5	N-Methylolacrylamide	3	2B	Volume 60 and 130
107-02-8	Acrolein	3	2A	Volume 63, 65 and 128
4170-30-3	Crotonaldehyde	3	2B	Volume 63, 65 and 128
62-53-3	Aniline	3	2A	Volume 27 and 127
90-04-0	ortho-Anisidine	2B	2A	Volume 73 and 127
91-23-6	ortho-Nitroanisole	2B	2A	Volume 65 and 127
100-00-5	4-Chloronitrobenzene	3	2B	Volume 65 and 123
88-73-3	2-Chloronitrobenzene	3	2B	Volume 65 and 123
103-11-7	2-Ethylhexyl acrylate	3	2B	Volume 60 and 122
96-33-3	Methyl acrylate	3	2B	Volume 39 and 122
108-78-1	Melamine	3	2B	Volume 73 and 119
110-86-1	Pyridine	3	2B	Volume 77 and 119
57018-52-7	1-tert-Butoxypropan-2-ol	3	2B	Volume 88 and 119
75-35-4	Vinylidene chloride	3	2B	Volume 39, 71 and 119

또한 그룹 1~2B의 각 화학물질 관련 발암관련 메커니즘을 분류한 후, 알려진 유발 기전 중 증거의 강함(strong)으로 표기된 내용을 중심으로 화학물질에서 주요 발암 기전을 도식화 하였다.

분석 결과 강한 연관성을 갖는 기전 중 가장 많은 빈도를 보이는 기전은 유전독성형으로 나타났으며, 그 외 세포 증식, 사멸 또는 영양 공급의 변화와 (대사적으로 활성화된)전자친화성을 갖는지가 빈도수가 높았다. 또한 단순히 기전이 제안되었거나, 중간 또는 약한 관련성을 갖는 기전이 알려진 화학물질의 경우, 마찬가지로 유전독성형이 가장 많은 빈도를 나타내었다.



[그림 III-1] 화학물질의 발암 특징에 따른 기전적 증거 분류

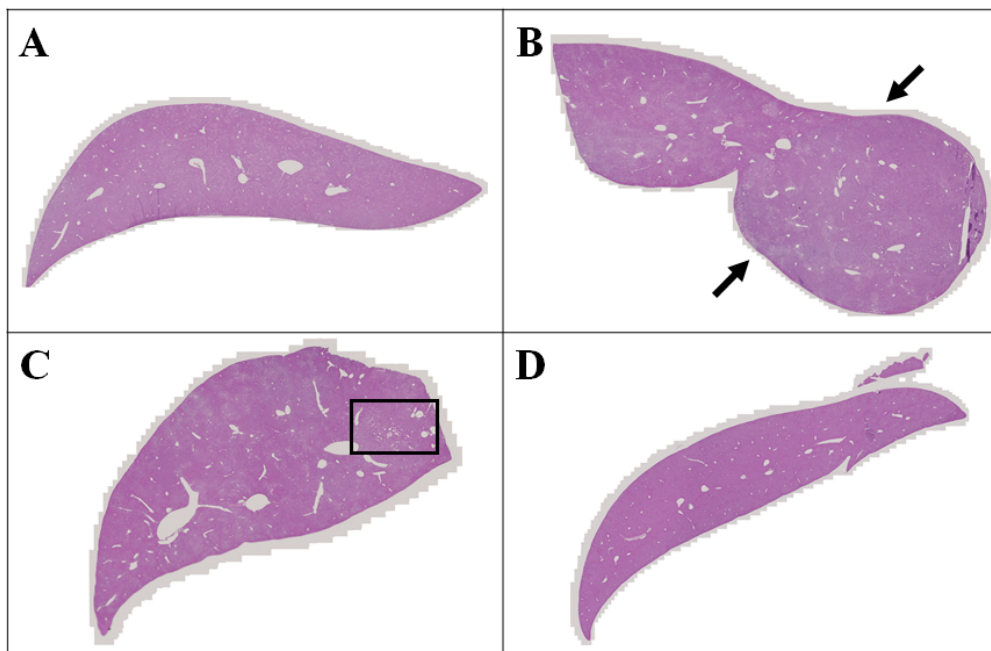
(IARC monograph 119-130)

2. 생체시료를 활용한 전암병변 탐색 시험 결과

1) 마우스 시료를 이용한 시험 결과

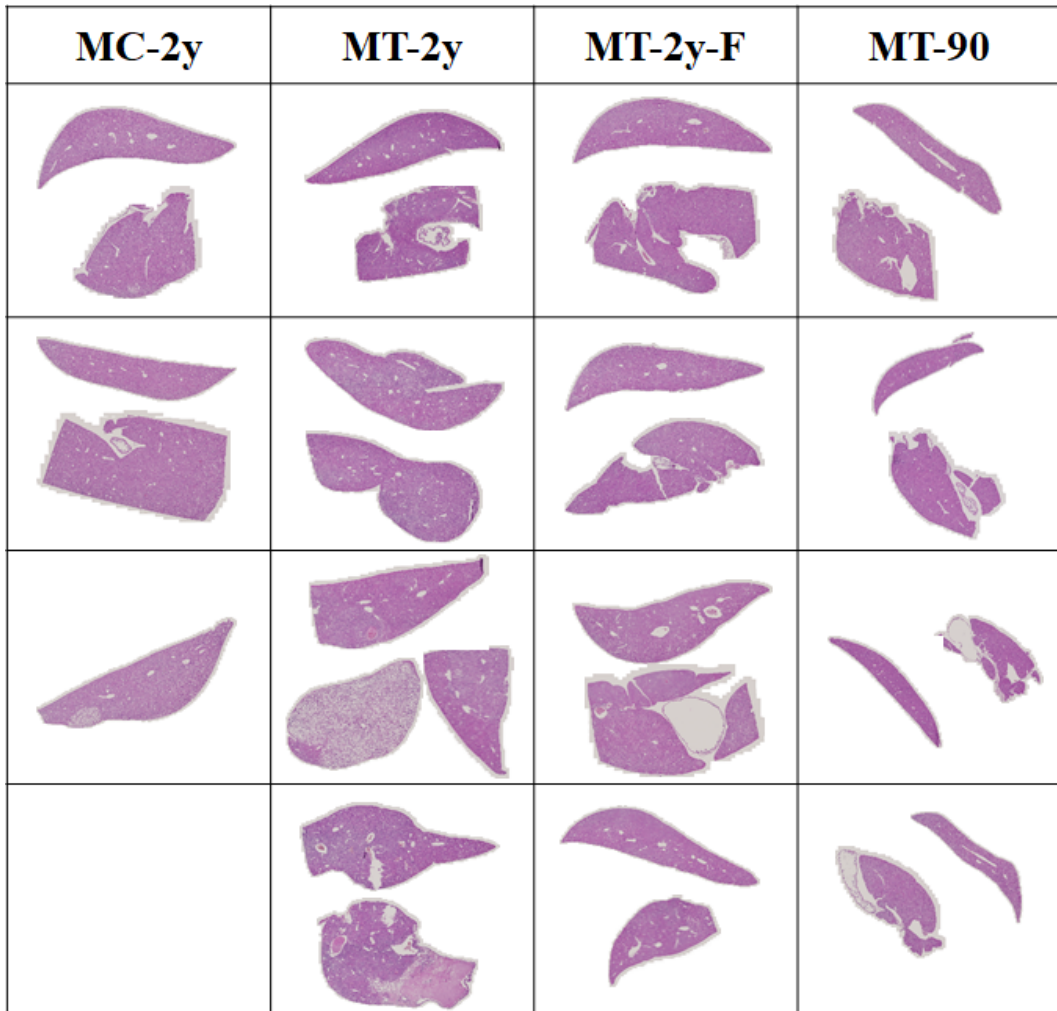
(1) 일반 HE 염색 결과

마우스 간조직의 생체 시료를 미세절편으로 제작하여 일반적으로 이용되는 HE 염색을 실시하였다. 마우스의 군 별 대표 이미지 및 전체 시료 이미지를 [그림 III-1,2]에 나타내었다. 군 별 이미지에서 MT-2y 및 MT-2y-F 군은 종양(화살표) 또는 foci/hyperplasia(네모칸) 로 진단된 부분을 현미경하에 확인 가능하였다.



[그림 III-2] 마우스 간 시료의 HE 일반 염색 대표 이미지

(A: MC-2y, B: MT-2y, C: MT-2y-F, D : MT-90, Hematoxylin and eosin staining, Whole slide imaging)

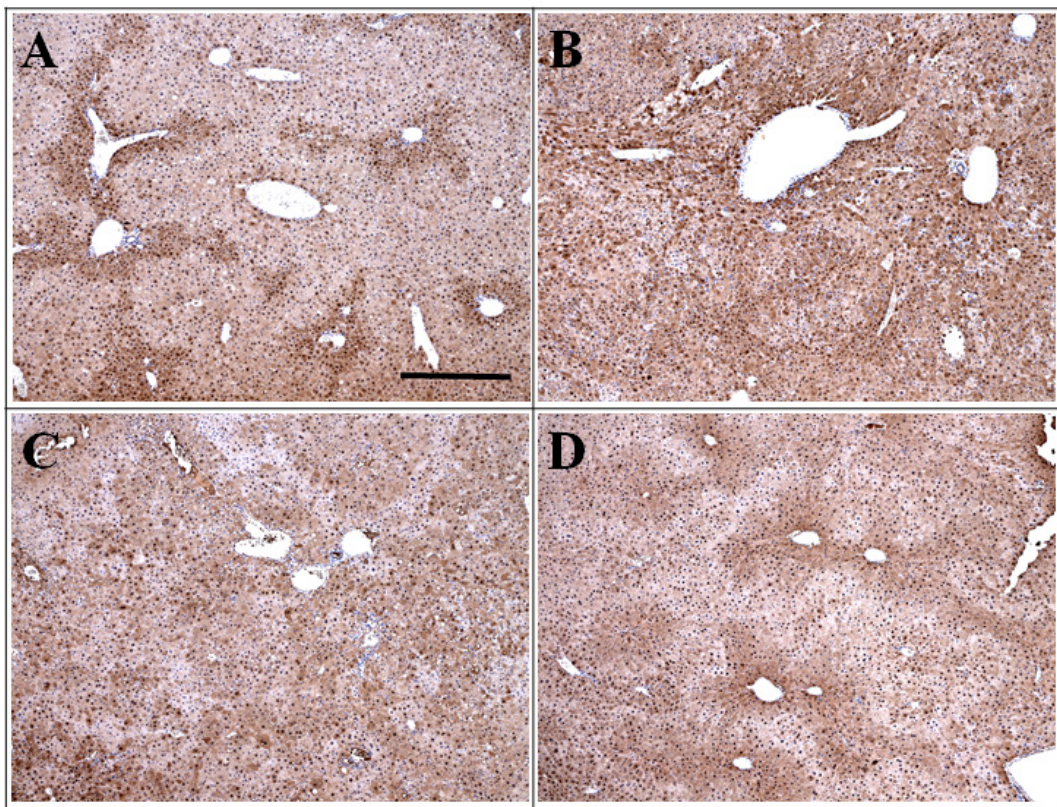


[그림 III-3] 마우스 간 시료의 HE 일반 염색 전체 이미지

(A: MC-2y, B: MT-2y, C: MT-2y-F, D : MT-90, Hematoxylin and eosin staining, Whole slide imaging)

(2) 면역조직화학염색(GST-P)을 이용한 결과

면역조직화학염색을 이용하여 GST-P의 마우스 간시료에서의 발현을 확인하였다. 정상 시료의 경우 혈관과 담관 주변을 중심으로 발현되었으나 종양 또는 foci/hyperplasia가 있는 시료에서는 혈관, 담관뿐 아니라 주변의 간세포에도 무작위로 발현된 모습을 보였다.

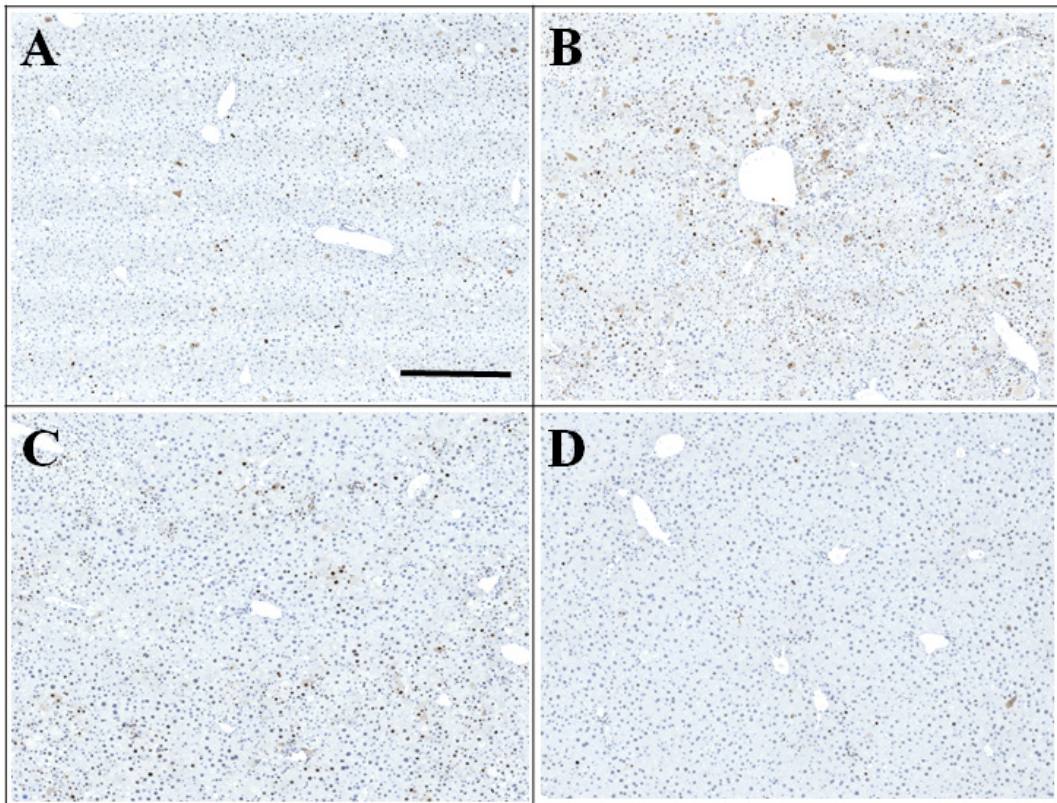


[그림 Ⅲ-4] 군 별 마우스 간 시료의 면역조직화학염색(GST-P) 결과

A: MC-2y, B: MT-2y, C: MT-2Y-F, D : MT-90, Bar=500um

(3) 면역화학염색(PCNA)을 이용한 결과

세포증식마커로 알려져있는 PCNA를 이용하여 마우스 간시료에서의 발현을 확인하였다. 정상 시료의 경우 드물게 세포단위의 발현을 보였으나 종양 시료에서는 종양 부위 뿐만 아니라 일반 부위에서 세포단위의 발현을 나타냈다. 또한 foci/hyperplasia가 있는 시료에서도 여러 곳에서 세포단위의 발현을 나타내었다.

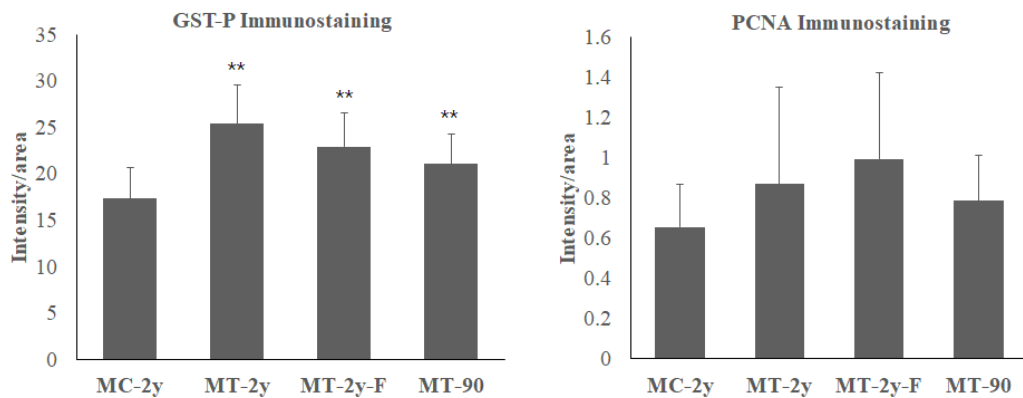


[그림 III-5] 군 별 마우스 간 시료의 면역조직화학염색(PCNA) 결과

A: MC-2y, B: MT-2y, C: MT-2Y-F, D : MT-90, Bar=500um

(4) 면역조직화학염색의 이미지 분석

면역조직화학염색을 이용하여 마우스의 간 시료에서 GST-P 및 PCNA의 발현을 수치화 하였다. GST-P는 일반 HE 염색에서 정상으로 확인된 시료보다 종양 또는 foci/hyperplasia가 존재하는 시험물질(Tetrachloroethylene, TCE) 노출 시료에서 통계적으로 유의하게 발현이 많이 되었고, 90일간 TCE를 투여하였지만 일반 HE염색에서 소견을 보이지 않았던 간 시료에서도 정상 시료보다 많은 양이 발현되었다. PCNA는 통계적 유의성을 보이지 않았지만 정상으로 확인된 시료보다 시험물질에 노출되고 종양 또는 foci/hyperplasia가 존재하거나, 90일 노출 시료에서도 발현이 증가했다.

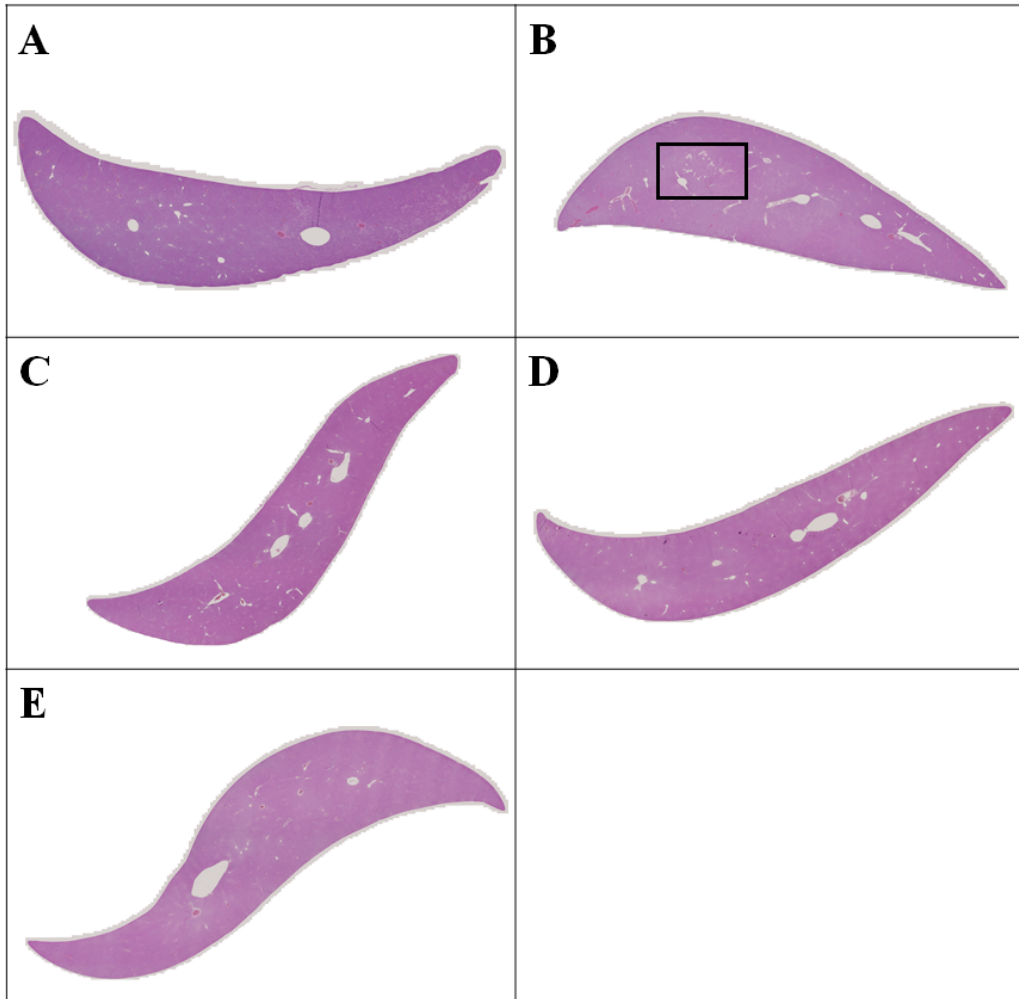


[그림 III-6] 마우스 간 시료에서 군 별 마커 발현의 정량 분석

2) 랫을 이용한 확인 결과

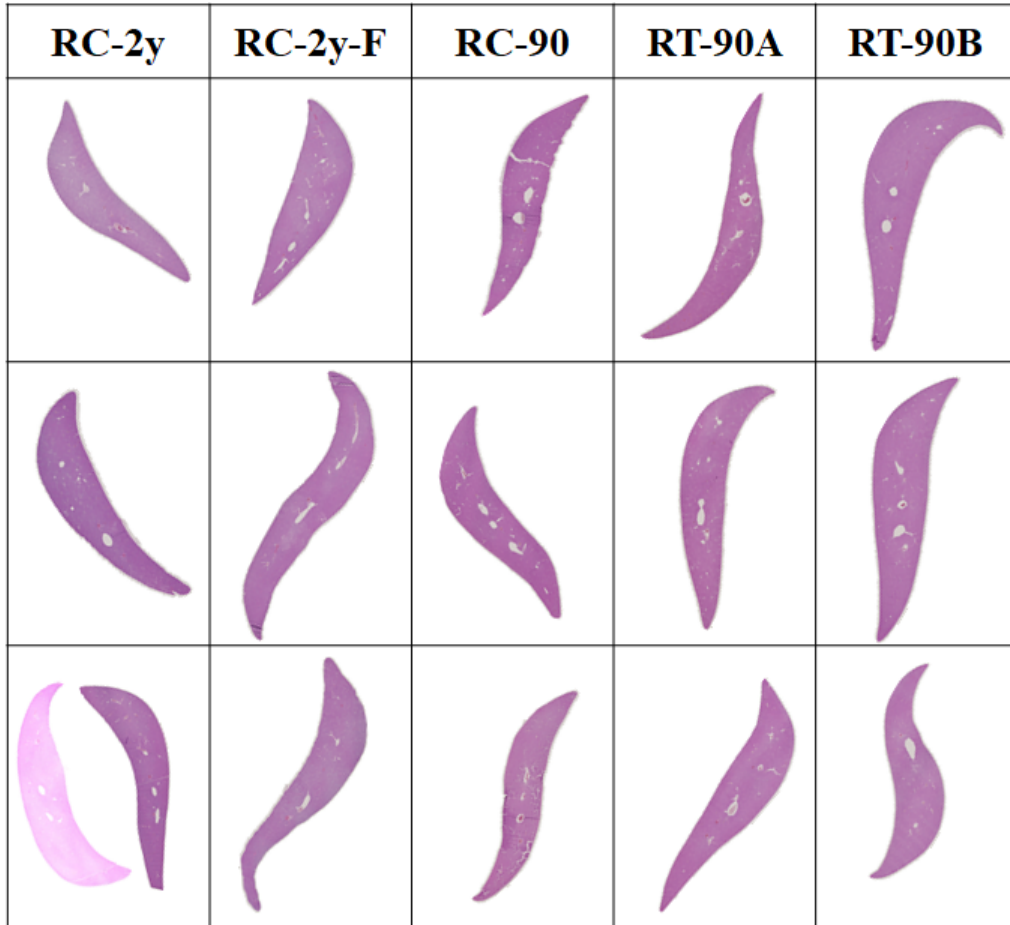
(1) 일반 HE 염색 결과

랫 간조직의 생체 시료를 미세절편으로 제작하여 일반적으로 이용되는 HE 염색을 실시하였다. 랫의 군 별 대표 이미지 및 전체 시료 이미지를 [그림 III-1,2]에 나타내었다. 랫의 경우 군 별 이미지에서 RT-2y-F군은 foci/hyperplasia(네모칸)로 진단된 부분을 현미경하에 확인 가능하였다. 해당 군을 제외한 나머지 RC-2y, RC-90, RT-90A, RT-90B에서는 별다른 병변을 확인하지 못하였다.



[그림 Ⅲ-7] 랫 간 시료의 HE 일반 염색 대표 이미지

(A: RC-2y, B: RC-2y-F, C: RC-90, D : RT-90A, E : RT-90B, Hematoxylin and eosin staining, Whole slide imaging)



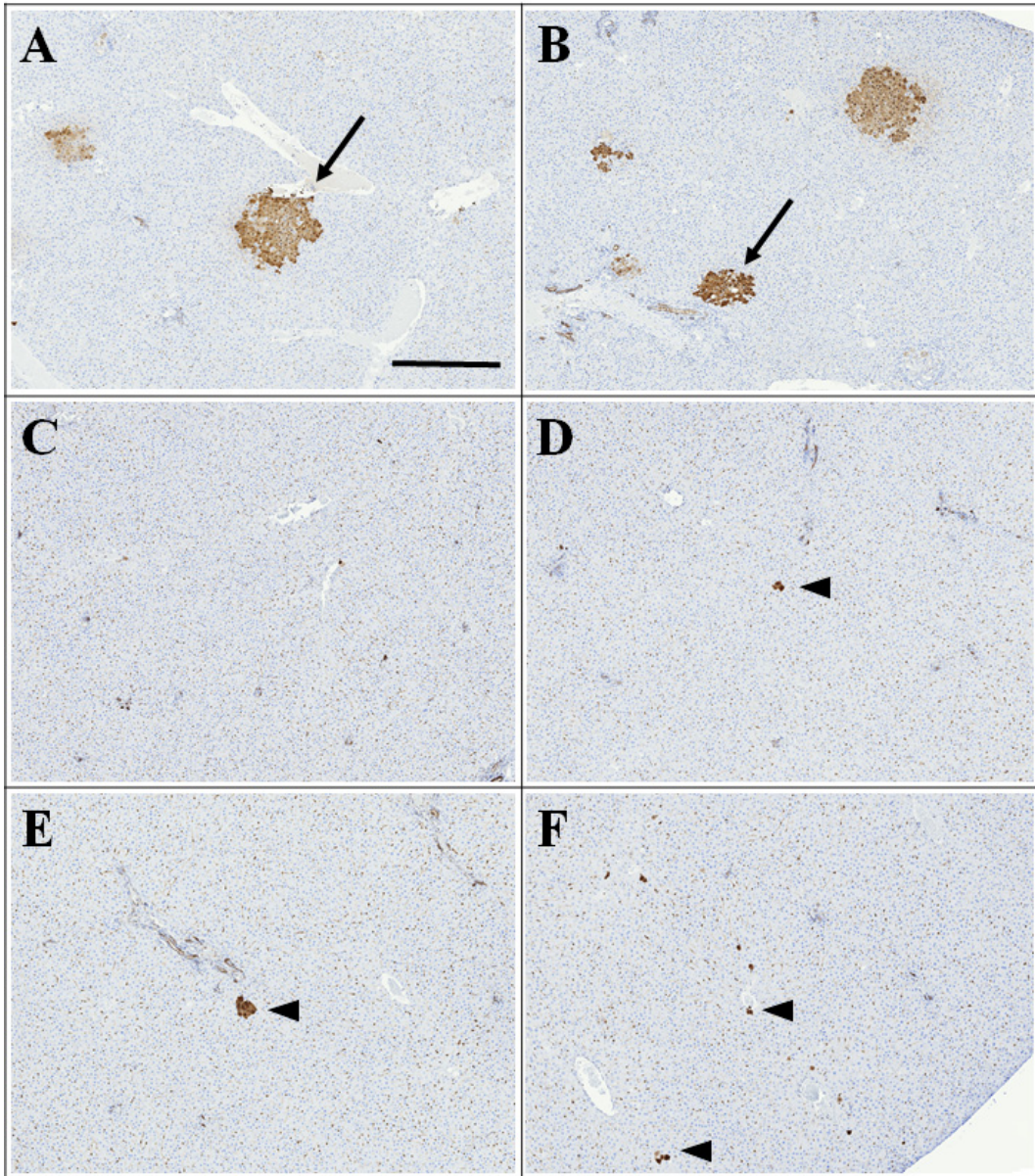
[그림 III-8] 랫 간 시료의 HE 일반 염색 전체 이미지

(A: RC-2y, B: RC-2y-F, C: RC-90, D : RT-90A, E : RT-90B, Hematoxylin and eosin staining, Whole slide imaging)

(2) 면역조직화학염색(GST-P)을 이용한 결과

면역조직화학염색을 이용하여 GST-P의 랫 간 시료에서의 발현을 확인하였다. 과거 연구를 참고하여(Satoh and Hatayama, 2002; Quin et al., 2013) GST-P 양성 foci의 기준을 열 개의 세포 이상으로 정하여 foci를 형성한 시료와 foci를 형성하지 못한 단일~소수 세포 기준의 GST-P 양성 부분을 각각 확인하였다.

아래 그림과 같이 시험 물질 노출 없이 2년 동안 실험을 실시한 시료에서 갈색으로 표현된 GST-P 양성 foci (화살표)가 일부 확인되었고, 이에 비해 90일간 실험을 실시한 시료에서는 양성 foci가 거의 관찰되지 않았으나, foci 기준(10 cells) 이하의 소수 세포(화살표머리)에서 발현이 다수 확인되었다. 또한 마우스와 달리 foci/hyperplasia 병변 부위가 아닌, HE 염색을 통해 정상으로 확인되었던 부위에서 GST-P 양성 foci가 형성된 것을 확인하였다.

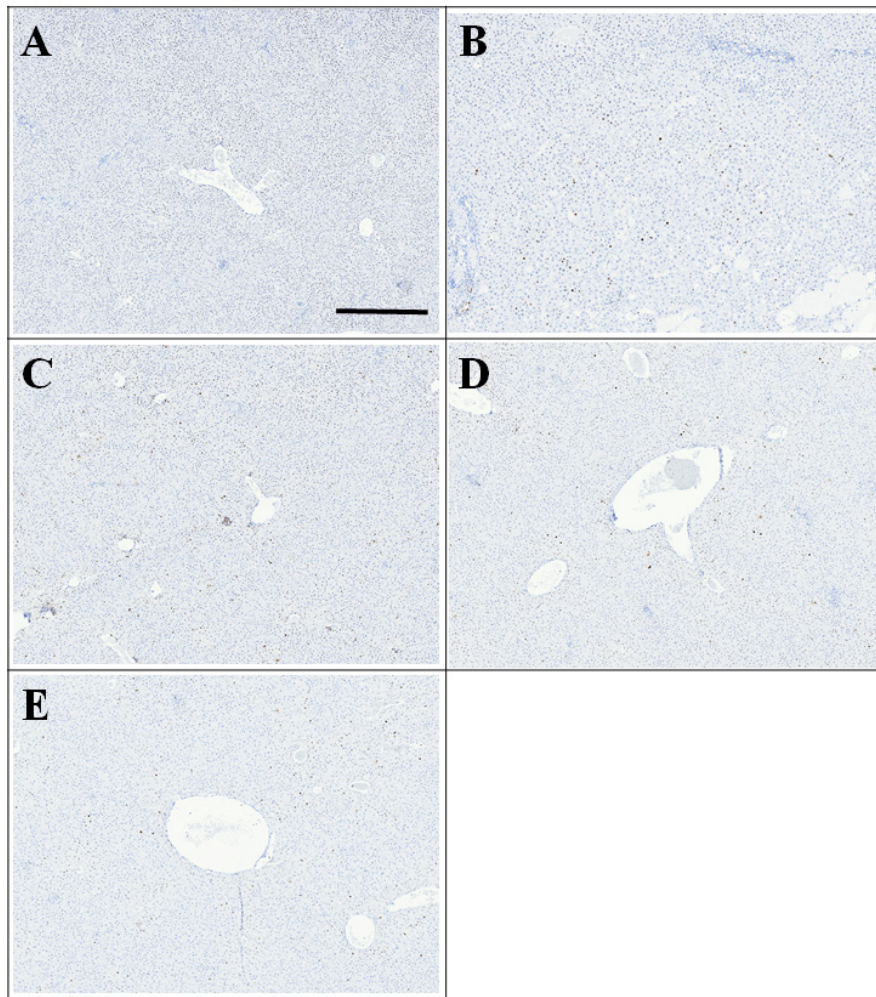


[그림 III-9] 군 별 랫 간 시료의 면역조직화학염색(GST-P) 결과

(A: RC-2y, B: RC-2y-F, C: RC-90, D : RT-90A, E,F : RT-90B, Bar=500um)

(3) 면역화학염색(PCNA)을 이용한 결과

세포증식 마커로 알려져 있는 PCNA를 이용하여 랫 간 시료에서의 발현을 확인하였다. 모든 시료에서 드물게 세포단위의 발현을 보였고, 발현량이 적어 실험 기간의 차이 또는 실험 물질에 따른 변화는 확인되지 않았다.

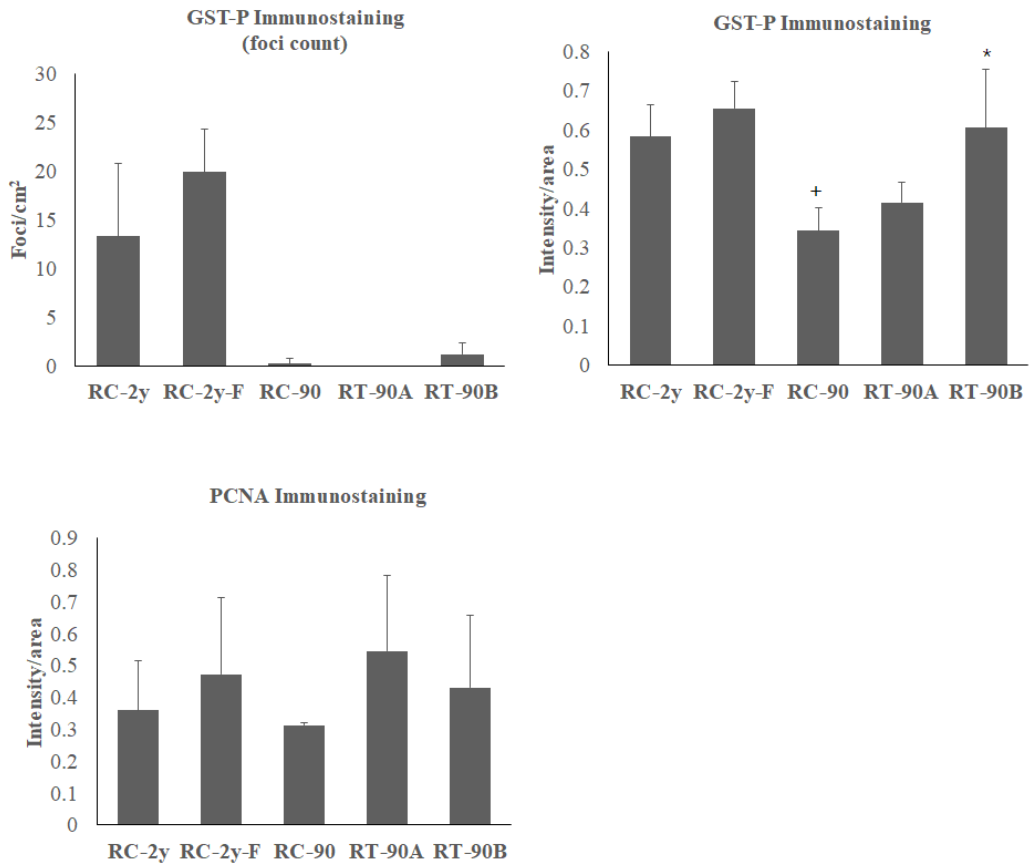


[그림 Ⅲ-10] 군 별 랫 간 시료의 면역조직화학염색(PCNA) 결과

(A: RC-2y, B: RC-2y-F, C: RC-90, D : RT-90A, E : RT-90B, Bar= 500um)

(4) 면역조직화학염색의 이미지 분석 결과

면역조직화학염색을 이용하여 랫의 간 시료에서 양성으로 나타난 GST-P 및 PCNA의 발현을 수치화 하였다. GST-P의 경우 문헌에 따라 일정 개수 이상의 세포가 모여 foci를 형성한 경우 foci를 카운트하여 군별 차이를 확인하였다. 2년 동안 실험을 실시했던 시료는 정상 시료에 비해 foci/hyperplasia가 일반 HE 염색에서 관찰되었던 시료에서 GST-P 양성 foci가 많이 발현되었다. 또한 일정 기준의 세포수를 갖지 못하는 개별 염색 세포 또는 소규모 foci가 90일 실험 시료에서 다수 발견되어 이러한 양성 부위의 군 별 차이를 확인하기 위해 면적 대비 intensity 분석을 실시하였고, 2년 시험 시료에 비해 90일 시험물질 미노출 시료에서 intensity가 감소되었으나, 90일 실험 시료 중 Heptan-1-ol을 노출시켰으나 정상으로 확인되었던 시료에서 GST-P 양성 발현 부위가 증가하였음을 확인하였다. PCNA의 경우 양성 발현이 전체 면적에 비해 적어 군 별 차이를 확인하지 못하였다.



[그림 III-11] 랫 간 시료에서 군 별 마커 발현의 정량 분석

A: MC-2y, B: MT-2y, C: MT-2Y-F, D : MT-90

3. 발암성 시험 물질의 스크리닝 방식 제고

1) 스크리닝을 위한 첫 번째 범주

흡입독성 화학물질의 설치류 실험을 위해 실험물질을 스크리닝 하는 목적은 효율적이거나 시사점이 있어야 한다. 화학물질을 관리하는 목적이 아니기 때문에 해당 화학물질이 발암원인지 아닌지 이분적인 판단은 스크리닝 시점에서는 불가능하다. 따라서 추후의 판단을 위해 최대한 명확한 기전을 제시하는 것이 시험 물질 스크리닝의 효율성이라 할 수 있다.

이를 위하여 Harrison 및 Doe 등의 연구를 참고해 발암에 대한 MOA를 중심으로 3단계로 분류 하였다(Harrison and Doe, 2021; Doe et al., 2022). 아래 표와 같이 화학물질의 발암성을 탐색 시 기술적으로 이뤄져야 할 과정을 정리하였고, 간략하게 일차적으로 타겟 화학물질이 발암 기전에 영향을 미칠 수 있는지를 우선적으로 확인하여야 하며, 이 때 발암 기전 중 어느 단계에 포함되는지 함께 고려해야 한다.

이 범주에서는 직접 또는 간접 영향 여부에 따라 세 가지로 분류하였으며, 독성 영향이 동반되는지도 추후에 고려해야 할 사항이라고 여겨진다.

〈표 III-2〉 MOA 중심으로 분류를 위한 첫번째 범주

분류	Mode of Action	독성 이벤트	설명/예시
1차 (직접) Primary or Direct	종양 형성을 유도하는 돌연변이 (mutation) 유발	독성 여부 무관	• 화학물질 노출에 의해 세포가 신생물로 발달하는 과정을 시작 • 또는 발암 과정의 후기에서 작용하는 유전자의 돌연변이를 증가 • 독성이 없을 수 있음 • 일반적으로 유전독성시험(Battery)에 의해 평가 가능
2차 (간접) Secondary or Indirect	발암 경로 단계를 변경	독성을 동반할 수 있음	• 화학물질 노출에 의해 간접적으로 돌연변이에 영향을 미쳐 발생한 암의 비율을 증가 • 예시: 세포분열 자극에 의한 줄기세포 분열 증가로 수용체 활성화등의 돌연변이 세포 확률 증가, 복구 기전의 억제, 종양 미세환경 변화 • 독성이 중요하지 않음. • in vitro/in vivo 연구를 통한 면역 억제, 세포 증식을 유도하는 내분비 변화, 세포 증식, 조직병리학적 변화에 기반하여 평가 가능 • 유전독성이 없다는 증거가 있을 수 있음
3차 (부수적) Tertiary or Collateral	발암 경로 단계를 변경하는 독성 유발	독성이 있음	• 화학물질 노출에 의해 독성을 유발하여 발생한 암의 비율을 증가 • 예시 : 줄기 세포 분열의 증가 및 재생이 반복되는 경우 등의 선택적 독성을 의미함 • in vitro/ in vivo 연구를 통해 세포 손상 및 교체에 의한 독성 확인하여 평가 가능 • 유전독성이 없다는 증거가 있을 수 있음

* in vitro 결과 또는 고농도의 용량에서 유의미한 in vivo 결과는 증거로 사용하기 부적절함

** 참고 : Doe et al., 2022

2) 효력의 고려

WoE의 결정을 위해 화학물질의 효력(Potency)를 고려하여야 한다. 이를 위해 in vitro 시험의 데이터를 in vivo의 결과로 외삽하는 과정(In vivo concentration and related effects, IVIVE)이 필요하며, 특히 단기의 생체 내 시험을 통한 세포 증식 등의 결과가 확인된다면 선량 반응 곡선을 도출해 낼 수 있다(Doe et al., 2022). Doe 등은 EU CLP 지침(ECHA, 2017)의 동등성 인자(Equivalency factor)를 이용하여 시작점(Point of departure)을 중심으로 효력을 고/중/저 로 분류하였다. 문헌을 탐색하여 발암성에 대한 해당 분류를 위해서는 경구 경로를 중심으로 판단하는 것이 좋다.

〈표 III-3〉 노출 경로 별 효력치 적용 예시

경로	고(High)	중(Medium)	저(Low)
경구 (mg/kg BW)	< 1	1-100	> 100
경피 (mg/kg BW)	< 2	2-200	> 200
흡입(가스) (ppm, v/v)	< 5	5-500	> 500
흡입(증기) (mg/l, m/v)	< 0.2	0.2-20	> 20
흡입(분진) (mg/l, m/v)	< 0.02	0.02-2	> 2

* 시작점은 EU Specific Concentration Limits (EC 2019)을 기반으로 하였음.

** 참고 : Doe et al., 2022

3) 복합 평가

Doe 등의 연구에 따르면 발암에 대한 MOA 및 효력을 포함하여 새로운 3 단계로 분류가 가능하다. A 범주의 물질은 제한적 사용 또는 엄격한 위험 관리를 요구하고, B 범주의 물질은 발암원으로서의 변경이 되지 않도록 관련된 건강 기반 지침을 필요로 하며, C 범주의 물질은 반복투여 시험을 통해 확인되는 특정대상 장기독성에 준한 관리 지침이 필요하다(Doe et al., 2022).

기계적 분류가 어려울 수 있으나 MoA 분류는 간략하게 생체 내 유전독성 양성 결과가 있다면 1차로 포함시키고, 유전독성이 확인되지 않은 화학물질에 대해서 표적장기 독성이 종양과 관련 있다는 증거가 없다면 2차로 포함시킬 수 있다. 효력의 분류시 문헌상 종양의 증가가 명시된 POD를 확인하거나, 종양의 발생과 관련 또는 예측되는 효과 용량 유무가 판단의 기준이 될 수 있다.

해당 연구에 의한 아래 표는 발암성 화학물질의 사용 및 관리를 목적으로 작성되었지만, 이를 참고로 하여 발암성 시험을 위한 스크리닝 시 획득된 참고문헌 등의 자료를 활용하여 선정에 고려할 만하다.

〈표 III-4〉 발암성 평가를 위한 복합 평가 예시

Potency MoA	고(High)	중(Medium)	저(Low)
1차 (직접)	A	A	B
2차 (간접)	A	B	C
3차 (부수적)	B	C	C

** 참고 : Doe et al., 2022

IV. 고 찰

.....

IV. 고찰

1. GST-P의 활용

이전의 연구들에서는 발암물질은 역치가 존재하지 않고, 아주 작은 농도에 서도 변이원성 및 DNA와의 상호작용에 의해 표적 장기 세포에서 비가역적인 유전적 변화를 일으킬 수 있다고 알려져 왔다(Preussmann, 1984; Tomatis et al., 1997). 그러나 이 가설은 현재에 와서 발암물질이 일반적으로 유전독성과 비유전독성의 두 가지 범주로 분류되고, 비유전독성 범주의 물질에서 후성유전학적 방식으로 간접적 영향을 미칠수 있기 때문에 선량 임계치를 가질 수 있다는 연구결과들에 의하여 상충되고 있다. 후자의 경우 선량-반응 곡선의 모양은 저용량일 때 선형을 지니지 않는다는 다양한 비유전독성 물질의 발암성 영향에 대한 임계치 개념을 보고한 많은 연구결과들이 존재한다(Maekawa et al., 1992).

위의 경우들에 대해 다양한 화학물질과 기간의 모델을 이용한 연구에서 GST-P가 활용되고 있다. 1985년 Satoh를 포함한 연구자 그룹은 GST-P를 전암병변을 확인하기 위한 새로운 효소 마커로 소개하였고(Satoh et al., 1984, 1985), Diethylnitrosamine을 비롯하여, 개시자로 알려진 다양한 화학물질을 이용하여 기간별, 물질별 GST-P의 발현 세포 크기 및 형태를 확인 해왔다(Satoh, 2022). 또한 GST-P의 유전자 구조 분석을 통해 간의 nodule 및 HCC에서의 초기 간암 발생 과정에서 enhancer에 의한 GST-P 발현의 기전을 확인하였다(Muramatsu and Sakai, 2006). 그러나, GST-P의 발암 기전 연관에 대해 상반되는 연구 결과들이 존재한다. 과거에는 GST-P가 유전독성적 기전을 갖는 화학물질에 의해 개시단계 전암 병변에서 명백하게 확인된다고 알려져 왔으나, 최근의 다른 연구자들에 의하면 GST-P의 발현은

개시 단계 이후에는 유전적 기전보다 후생유전학적 기전과 관련있다고 알려져 있다(Kopp-Schneider et al., 1998). 가장 최근의 연구에서 GST-P 양성을 보이는 foci 또는 nodule의 형성에 세포 분열의 증거가 확인되지 않았고, 세포의 괴사가 동반된 경우 발암원에 취약하다는 결과가 보고되었다. 이러한 결과는 기존의 알려진대로 전암병변 세포가 종양세포의 전구체라는 것과 일치하지 않고, foci 혹은 nodule에서 종양세포가 유도된다는 것이 최근의 알려진 연구이다(Kojiro, 2004; Satoh, 2022). 위의 연구에 따르면, 만약 개시자 이론(유전적 발암기전)에 따라 foci 또는 nodule에서 유전자 변화를 통해 종양성 세포를 생성한다면, 간세포의 형태변화가 오직 foci 또는 nodule에서만 관찰되어야 하는데 실제와 맞지 않기 때문에 이론적으로 종양성 형태 변화는 비유전성인 것으로 여겨진다고 주장하고 있다(Satoh, 2022). 또한 자극에 의한 간세포(단일 GST-P 양성 세포)가 세포분열 없이 작은 foci나 focus로 확장되면 담관의 증식과 관련되어 괴사세포를 포함하는 nodule이 형성된다고 알려져 있다(Satoh, 2022).

그 밖의 연구에서 동일 물질(Aristolochic acid)을 이용한 중/장기 시험 분석을 통해 GST-P의 간 전암병변 마커 능력을 확인하였다(Liu et al., 2021). 또한 GST-P 양성 foci에서 트랜스페린(Transferrin) 수용체, ceruloplasmin 및 metallothionein-1/2의 변화가 확인되었고, 이는 프로 모터 단계에서 지질과산화 축진을 포함하는 산화스트레스 반응과 관련이 있다는 결과가 있었다(Mizukami et al., 2010). 그 외 F344 랫에 Aflatoxin B1을 투여한 연구에서 투여 용량 및 기간에 따라 GST-P 양성소의 발현이 차이가 있으며, 이는 생화학적 변화를 동반한다고 연구되었다(Qian et al., 2013).

위의 연구들은 랫에서 이뤄졌으나 마우스 모델을 이용한 GST-P의 활용에 대한 연구도 이루어졌다. 마우스에서 확인되는 GST의 형태중 II형의 경우 성체 수컷 마우스에서 주로 발현되며 랫의 GST-P와 면역학적으로 관련있다고 알려져 있다. 마우스의 성별간 연구에서 일반적으로 수컷에서 암컷보다

GST-P가 다량 존재한다고 알려졌고, 테스토스테론을 통해 마우스의 간에서 GST-P의 발현이 조절될 수 있음이 확인되었으나(Hatayama et al., 1986), 그러나 마우스에서의 GST-P를 활용한 간의 전암 병변 분석 연구는 찾아볼 수 없었다.

이번 연구에서 마우스의 경우 간암을 유발하는 것으로 알려진 Tetrachloroethylene을 이용해 90일 또는 1.5년 흡입 노출한 시료를 활용하였다. GST-P의 경우 랫 모델에서의 발현은 잘 알려져 있지만 마우스는 참고 문헌을 통한 사전 정보가 부족하였다. 면역조직화학 염색을 분석한 결과에서 중심 정맥 주변으로 대조군 및 TCE 노출군에서 GST-P의 발현이 확인되었다. 대조군에 비해 노출군에서 다량 발현되었고 노출군의 경우 중심 정맥을 제외한 간 실질 부위에서도 무작위로 발현되었다. 그러나 전암 병변을 확인하기 위한 목적으로 실시하였으나, 발현 정도 및 위치 확인을 통해 전암 병변과의 관련성은 살펴보기 어려웠다. PCNA는 대조군과 비슷한 수준에서 세포 단위로 드물게 발현되어 종양이 확인된 개체라 하더라도 연령 또는 TCE에 의한 세포 분열의 증가는 확인되지 않았다.

랫의 경우 양성 화학물질군 없이 연령에 의한 확인 또는 종양 미확인 화학물질에 의한 영향을 탐색하였다. 2년 동안 흡입 노출한 대조군 시료에서 기존 문헌의 화학물질에 의한 foci 또는 nodule과 같은 형태로 GST-P가 발현되는 모습을 확인하였다. 해당 발현은 HE 염색을 통해 foci 또는 hyperplasia를 확인한 개체군에서 증가하는 양상을 보였으나, 통계적으로 유의미하지 않았다. 90일 시험의 시료에서는 일정 수 이상의 foci 형태로 발현되지 않고 단일 또는 소수의 세포덩어리로 면역염색 된 모습을 확인하였는데, 이러한 소규모의 발현은 90일 시험군 중 Heptan-1-ol 노출군에서 두드러지게 확인되어 전암 병변의 초기 형성을 위한 세포 단위의 변화 가능성을 제안할 수 있다. 그러나 모든 GST-P 양성 foci 또는 nodule이 악성 종양으로 발달하지 않는 경우도 있어(Sato, 2022), GST-P 양성 소견을 전암의 증거로 확정할 수 있는지 추가의 실험이 필요하다. 그러나 이를 감안하더라도 GST-P의 발현 여

부는 추후 시험 물질의 스크리닝을 위한 확인 사항 중의 한 분류로 활용 할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 동물 실험과 ESG 경영 노력

그동안 OECD에 등록된 TG451, TG453 및 TG452에 따라 화학물질 및 의약품 등에 대한 규제 및 안전성 확인을 위해 설치류를 이용한 대규모의 발암성 시험이 이용되어 왔다. 현재까지도 화학물질에 대한 발암의 평가에서 동물을 이용한 장기 생체 내 시험은 여전히 유용하게 사용되고 있지만, 유럽연합에서 REACH가 시행된 이후 사업장 등에서 사용되던 독성이 강한 화학물질에 대한 기준과 보호가 강화됨과 동시에 기존의 화학물질을 대체 또는 우회하기 위한 새로운 화학물질들이 계속해서 등록되고 있다. 또한 기술의 발전과 더불어 화학물질에 의한 작업장 내 노출 방식도 지속적으로 변화하고 있는 상황에서 현존 화학물질 또는 상황에 대한 실험을 실시하는 것은 불가능한 실정이다.

또한 기존에 있어왔던 발암성에 대한 동물을 이용한 시험의 과학적 타당성 및 우려와 별개로, 최근 사회 각 계에 대해 ESG (Environment, Society, Government) 경영이 패러다임화 되고 규제 도입이 논의되고 있다. 이는 2015년 UN에서 발표한 17개의 지속가능한 발전 목표(Sustainable Development goals)와 무관하지 않다. 이에 따라 기존의 3Rs (Replacement, reduction and refinement)을 통해 간접적으로 요구되었던 실험 동물의 환경적, 사회적 영향 등에 대한 새로운 논의가 필요한 실정이다. 대표적으로 미국 FDA는 신약 개발 시 필수적으로 요구하던 동물을 이용한 실험 결과를 더 이상 필요로 하지 않고 이에 따라 제약 회사 등에서 유효성 평가를 위해 사용하는 특수한 목적의 동물 사용을 줄이고, 실험동물의 숫자를 감소시킴과 동시에 대체 시험법 등의 도입을 위해 간접적으로 노력하고 있다(Wadman, 2023).

이러한 패러다임에 맞춰 과학적 증거의 손상 없이 동물 시험의 사용 동물 수를 감소 또는 기간의 단축을 위한 연구들이 지속되고 있고, 앞서 제시한 GST-P를 전암성 병변의 마커로 활용하기 위한 연구도 이러한 노력의 일환으로 볼 수 있다.

3. 발암성 동물 실험의 대체 및 기전 연구

또한 다양한 연구자 그룹에서 기존의 설치류를 이용한 대규모 발암성 시험 대신 간접적으로 발암성의 기전을 확인하여 규제 등에 적용할 수 있는 방법을 연구하고 있다. 최근 지놈 바이오마커를 이용하여 증거가중지 접근을 통해 화학물질, 농약 및 의약품에 대해 기존의 시험법을 대체할 수 있다는 인식이 늘어나고 있다. 이 방식은 단기 설치류 연구를 필요로 하지만, 장기 또는 대규모의 실험 없이 발암에 대한 유전독성 및 비유전독성형 화학물질에 대한 발암 유해성과 발암 유발 수준을 평가할 수 있고, 현재 미국 EPA 및 환경보건원에서 팀단위의 연구를 통해 수행되고 있다고 설명한다(Corton et al., 2022).

또한 화학물질의 관리적 측면에서, 장기 설치류 시험의 사용을 줄이고 체외 및 생체 내 연구를 모두 포함할 수 있는 새로운 접근 방법론(NAM)에 기반한 도구들이 우선적으로 채택되게 되었다(Wolf et al. 2019; Doe et al., 2022). 이러한 방법론적(NAM) 접근에서, 암의 특징(Hanahan and Weinberg 2000, 2011, 2022)에서 시작된 암의 주요 특성(Key Characteristic of cancer) 개념은 현재 발암성을 평가하기 위한 기전적 증거를 식별하기 위해 다양하게 이용되고 있다(Smith et al. 2016; Guyton et al. 2018A/B; Tice et al., 2021). 그러나 발암성 평가를 위한 IATA 구축을 위해 암의 주요 특성을 이용하려고 했던 연구자 그룹은 해당 개념이 암 외의 질병에도 관여되기 때문에 발암에의 특수성이 부족함을 지적했고, 또한 암과 암의 주요 특성의 연관 정도의 수치적 계량이 불명확하기 때문에 지속적으로 다른 정보와의 연계 확인이 필요하다고 말한다(Madia et al, 2021; Jacob et al., 2020).

이번 연구에서 암의 주요 특성에 착안하여 2019년 이후 발행된 IARC monograph를 분석하여 그룹1 및 그룹 2A, 2B로 알려진 작용물질들과 관련된 발암 특징을 조사하였다. 가장 많은 관련성을 갖는 작용은 유전독성형으로 나타났고, 그 외 세포증식 관련 및 전자친화성이 확인되었다. 또한 중간 또는 약한 관련성 및 제안된 관련성에서도 유전독성형(genotoxic)이 가장 많은 연관성을 갖는 것으로 나타났다. 이와 관련, 암의 주요 특성과 관련된 기존의 연구에서 Krewski 등은 IARC monograph의 분석을 통해 사람에게 발암성이 있는 것으로 확인된 Group1에 포함된 86개의 작용물질(agent)를 조사하였다. 해당 연구를 통해 대부분의 그룹 1 작용물질이 다중적 특징을 가지며 (Krewski et al., 2019), 그룹 2B 또는 그룹3의 대다수 작용물질은 하나 이하의 주요 특성이 알려져 있다고 연구했다(Guyton et al., 2018A). 또한 가장 일반적인 주요 특성은 유전독성형으로, 대부분의 발암 작용물질이 해당 특성을 갖고, 심지어 비 유전독성의 기전을 통해 작용하는 바이러스 등의 작용물질조차 만성 염증 및 산화적 스트레스를 통한 2차 이벤트로 세포독성 및 유전자 변이를 보인다고 주장하였다(Krewski et al., 2019). 또한 그룹 1 작용물질을 판단하기 위한 증거 자료의 대부분이 사람 및 동물을 이용한 체내, 체외의 다양한 실험을 통해 획득되었고, 동물과 사람 데이터의 일치성이 유전독성과 관련된 많은 작용물질에서 확인되었다고 말한다(Krewski et al., 2019). 또한 초기의 monograph 분석 연구에 비교해 최근의 그룹 1 작용물질에서 후생유전학적 변화가 자주 확인되었고(Herceg et al., 2013), 이는 기존의 유전독성형 작용물질의 확인에서 제외된 후생유전적 특성이 많이 연구된 결과로 여겨지며, 작용물질에 대한 발암의 판단시 종합적인 독성학적 판단과 증거 자료의 분석이 필요하다고 하였다(Krewski et al., 2019).

최근 발암 관련 연구에서 기전적(mechanistic) 연구가 대다수를 차지하고, 또한 규제적 측면에서도 기전 연구에 기반하여 시험법 등을 개정하고 있다. 그러나 장기 설치류 실험은 일반적으로 최대허용량치(MTDs) 수준에서 수행되며 대부분의 사람 발암성 물질에 반응하고, 대부분의 사람 비발암성물질에

반응하지 않았기 때문에 기능적으로 유효하다는 주장이 있다. 또한 마우스를 이용한 장기 시험이 랫 시험과 중복되어 수행될 필요는 없으나, 기존의 발암성 물질을 판별한 시험의 15%는 마우스를 이용한 시험의 결과를 바탕으로 하기 때문에 규제적 약리 또는 독성학적 측면에서 신중한 접근이 필요하다고 언급되고 있다(Suarez-Torres et al., 2021). 또한 기존의 마우스 장기 생체 내 시험을 대신하여 개량된 Tg rasH2 형질전환 마우스 및 설치류 발암 모델 등은 여전히 혼합물질을 포함한 다양한 화학물질의 발암성 확인을 위해 이용되고 있다(Morton et al., 2002; Chen et al., 2017; Rider et al., 2021).

따라서 장기 동물 실험을 통해 발암성을 확인하기 위해서는 시험 물질 선정에 많은 스크리닝과 자료 조사 연구가 선행되어야 한다. 이를 위해 Doe 등의 연구를 참고하여 발암 관련 MOA 및 효력치를 고려한 분류를 제안하였고(Doe et al., 2022), 흡입독성 센터에서 수행하는 시험 결과에 영향을 미치지 않고 추가적인 발암 관련 데이터를 확보할 수 있는 마커 및 기전을 소개하였다. 이를 기준으로 발암성 시험을 위한 스크리닝 시 획득된 실험 결과 및 참고 문헌 등의 자료를 분류하여 활용하는 방식에 적용할 수 있을 것이다.

V. 결 론

.....

V. 결론

랫 및 마우스 등 동물을 이용한 발암성 독성시험은 장기간의 중단없는 시험을 요구하기 때문에 동물 윤리, 실험 인력, 시간, 자본 등의 제한 요소가 있다. 이에 화학물질의 발암성을 용이하게 스크리닝하기 위한 생체 내 시험 등이 계속 연구되어 왔고, 그 중 일부 장기에서 전암성 병변을 확인하는 것이 발암성의 명백한 증거로 인정되고 있다.

간에서의 전암 병변 탐색을 위한 바이오 마커로 glutathione S-transferase P-form (GST-P)이 연구되어 유전자 분석 및 면역 염색 등을 통해 종양 이전 전암 병변 단계를 확인 가능하게 하였으며, 랫을 이용한 중~단기 발암성 시험에서도 활용되고 있다. GST-P를 적용한 면역 염색을 통하여 화학물질 발암 원에 의한 정량적 분석을 실시 및 발암 물질의 조기 파악 가능성을 확인할 필요가 있으며, 이와 더불어 스크리닝을 위해 최신의 발암성 관련 기전 정보 탐색 및 증거가중치 등의 적용을 함께 고려할 필요가 있다.

먼저 발암원의 특징을 고려하여 IARC monograph(119-130)에서 리뷰되었던 직업성 요인을 갖는 화학물질에 대해 분석하였다. 결과로 강한 연관성을 갖는 기전 중 가장 많은 빈도를 보이는 기전은 유전독성형으로 나타났으며, 그 외 세포 증식, 사멸 또는 영양 공급의 변화와 (대사적으로 활성화된)전자친화성 관련이 빈도수가 높았다. 또한 상대적으로 기전에 대해 약한 증거력으로 알려진 기전도 유전독성형으로 나타났다.

또한 면역조직화학 염색을 통해 GST-P의 초기 발암 병변 탐색 가능성을 실험적으로 탐색하였다. 시험군은 수컷의 대조군 또는 시험물질을 노출한 랫/마우스의 간조직을 시험 기간에 따라 분류한 후 해당 군 별 3~4개체를 확보하여 시험에 이용하였다. 마우스의 정상 시료에서 혈관과 담관 주변을 중심으로 GST-P가 발현되고 종양 또는 foci/hyperplasia가 있는 시료에서 주변의 간세포에도 무작위로 발현된 모습을 보였다. 상대적 비교를 위해 세포증식마

커로 알려져 있는 PCNA의 발현을 확인한 결과 종양 시료 및 foci/hyperplasia가 있는 시료에서 더 많은 세포단위의 발현 및 발현 강도를 나타내었다. 랫의 간 시료에서 2년 동안 실험을 실시한 경우 HE 염색에서 정상으로 확인된 부위에서 GST-P 양성 foci가 다수 확인되었고, 90일간 실험을 실시한 시료에서는 양성 foci가 거의 관찰되지 않았으나, 소규모 세포단위의 발현이 다수 확인되었다. 또한 Heptan-1-ol을 90일간 노출시켰으나 정상으로 확인되었던 시료에서 GST-P 양성 발현 부위가 정상군보다 증가하였음을 확인하였다.

이와 더불어 흡입독성시험을 실시하기 위한 발암성 스크리닝의 방식을 제고하기 위해 발암에 대한 MOA 및 시작점을 고려한 효력을 합산해 3단계로 구분하여 시험 대상 물질 조사를 위해 취합된 실험 결과 및 자료의 분류에 참고할 수 있을 것으로 여겨진다.

위의 연구를 통해 흡입독성 센터에서 수행하는 시험 결과에 영향을 미치지 않고 추가적으로 최신의 발암 관련 데이터를 확보할 수 있는 마커 및 발암 관련 기전을 제안하였다. 그러나 발암성 화학물질에 의한 GST-P의 전암 병변 발현에 대한 별도의 실험이 추가적으로 필요할 것으로 여겨지나, 이번 연구 결과를 바탕으로 발암성 시험을 위한 스크리닝 시 GST-P의 발현 여부를 보조적 데이터로 사용 가능할 것으로 보인다. 또한 발암원의 주요 특성과 시험 대상 물질의 3단계 구분을 고려하여 추후 시험을 위한 자료 분석 시 활용할 수 있을 것으로 예상된다.

참고문헌

조은상 외. 유기용제(1,2-Dichlorobenzene)의 성별간 독성차이 규명 연구.
울산:산업안전보건연구원; 2019. 21-28 p.

Bishop JM, Weinberg RA. Molecular Oncology. New York: Scientific American Inc.:1996.

Becker FF. Morphological classification of mouse liver tumors based on biological characteristics. Cancer Res. 1982;42(10):3918-3923 p.

Blidisel A, Marcovici I, Coricovac D, Hut F, Dehelean CA, Cretu OM. Experimental Models of Hepatocellular Carcinoma-A Preclinical Perspective. Cancers (Basel). 2021;21;13(15):3651 p.

Chen JX, Wang H, Liu A, Zhang L, Reuhl K, Yang CS. From the Cover: PhIP/DSS-Induced Colon Carcinogenesis in CYP1A-Humanized Mice and the Possible Role of Lgr5+ Stem Cells. Toxicol Sci. 2017;155(1):224-233 p.

Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Wild CP. Preventable exposures associated with human cancers. J Natl Cancer Inst. 2011;21;103(24):1827-1839 p.

Corton JC, Mitchell CA, Auerbach S, Bushel P, Ellinger-Ziegelbauer H, Escobar PA, Froetschl R, Harrill AH, Johnson K, Klaunig JE, Pandiri AR, Podtelezhnikov AA, Rager JE, Tanis KQ, van der

Laan JW, Vespa A, Yauk CL, Pettit SD, Sistare FD. A Collaborative Initiative to Establish Genomic Biomarkers for Assessing Tumorigenic Potential to Reduce Reliance on Conventional Rodent Carcinogenicity Studies. *Toxicol Sci.* 2022;28;188(1):4-16 p.

Cui J, Li G, Yin J, Li L, Tan Y, Wei H, Liu B, Deng L, Tang J, Chen Y, Yi L. GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (Review). *Int J Oncol.* 2020;56(4):867-878 p.

Doe JE, Boobis AR, Cohen SM, Dellarco VL, Fenner-Crisp PA, Moretto A, Pastoor TP, Schoeny RS, Seed JG, Wolf DC. A new approach to the classification of carcinogenicity. *Arch Toxicol.* 2022;96(9):2419-2428 p.

European Commission (EC). Guidelines for setting specific concentration limits for carcinogens in Annex I of directive 67/548/EEC. Inclusion of potency considerations. Commission working group on the classification and labelling of dangerous substances. Luxembourg: Office for the Official Publications of the European Communities(ISBN 92-828-7443-5); 2019.

European Chemical Agency (ECHA). Guidance on the application of the CLP criteria guidance to regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures. Helsinki: ECHA; 2017.

Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(9):674-687 p.

- Guyton KZ, Rieswijk L, Wang A, Chiu WA, Smith MT. Key Characteristics Approach to Carcinogenic Hazard Identification. *Chem Res Toxicol*. 2018A;17;31(12):1290-1292 p.
- Guyton KZ, Rusyn I, Chiu WA, Corpet DE, van den Berg M, Ross MK, Christiani DC, Beland FA, Smith MT. Application of the key characteristics of carcinogens in cancer hazard identification. *Carcinogenesis*. 2018B;5;39(4):614-622 p.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;7;100(1):57-70 p.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-674 p.
- Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46 p.
- Harrison DJ, Doe JE. The modification of cancer risk by chemicals. *Toxicol Res (Camb)*. 2021;12;10(4):800-809 p.
- Hatayama I, Satoh K, Sato K. Developmental and hormonal regulation of the major form of hepatic glutathione S-transferase in male mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;30;140(2):581-588 p.
- Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(4):367-386 p.
- Henderson JM, Polak N, Chen J, Roediger B, Weninger W, Kench

- JG, McCaughan GW, Zhang HE, Gorrell MD. Multiple liver insults synergize to accelerate experimental hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2018;6:8(1):10283 p.
- Herceg Z, Lambert MP, van Veldhoven K, Demetriou C, Vineis P, Smith MT, Straif K, Wild CP. Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation. *Carcinogenesis*. 2013;34(9):1955-1967 p.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 130. 1,1,1-Trichloroethane and Four Other Industrial Chemicals. Lyon: IARC: 2022.
- Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Hirose M, Shirai T. Medium-term liver and multi-organ carcinogenesis bioassays for carcinogens and chemopreventive agents. *Exp Toxicol Pathol*. 1996;48(2-3):113-119 p.
- Jacobs MN, Colacci A, Corvi R, Vaccari M, Aguila MC, Corvaro M, Delrue N, Desaulniers D, Ertych N, Jacobs A, Luijten M, Madia F, Nishikawa A, Ogawa K, Ohmori K, Paparella M, Sharma AK, Vasseur P. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Arch Toxicol*. 2020;94(8):2899-2923 p.
- Kleinstreuer NC, Dix DJ, Houck KA, Kavlock RJ, Knudsen TB, Martin MT, Paul KB, Reif DM, Crofton KM, Hamilton K, Hunter R, Shah I, Judson RS. In vitro perturbations of targets in cancer

- hallmark processes predict rodent chemical carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2013;131(1):40-55 p.
- Kojiro M. 'Nodule-in-nodule' appearance in hepatocellular carcinoma: its significance as a morphologic marker of dedifferentiation. *Intervirolgy.* 2004;47(3-5):179-183 p.
- Kopp-Schneider A, Portier C, Bannasch P. A model for hepatocarcinogenesis treating phenotypical changes in focal hepatocellular lesions as epigenetic events. *Math Biosci.* 1998;148(2):181-204 p.
- Krewski D, Bird M, Al-Zoughool M, Birkett N, Billard M, Milton B, Rice JM, Grosse Y, Cogliano VJ, Hill MA, Baan RA, Little J, Zielinski JM. Key characteristics of 86 agents known to cause cancer in humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2019. 22(7-8):244-263.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998;17;396(6712):643-649 p.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;7;88(3):323-331 p.
- Liu YZ, Lu HL, Qi XM, Xing GZ, Wang X, Yu P, Liu L, Yang FF, Ding XL, Zhang ZA, Deng ZP, Gong LK, Ren J. Aristolochic acid I promoted clonal expansion but did not induce hepatocellular carcinoma in adult rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(12):2094-2105 p.
- Loomis D, Guyton K, Grosse Y, El Ghissasi F, Bouvard V,

- Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Mattock H, Straif K; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, IARC, Lyon, France. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncol.* 2015;16(8):891-892 p.
- Macek Jilkova Z, Kurma K, Decaens T. Animal Models of Hepatocellular Carcinoma: The Role of Immune System and Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel).* 2019;2;11(10):1487 p.
- Madia F, Pillo G, Worth A, Corvi R, Prieto P. Integration of data across toxicity endpoints for improved safety assessment of chemicals: the example of carcinogenicity assessment. *Arch Toxicol.* 2021;95(6):1971-1993 p.
- Maekawa A, Onodera H, Ogasawara H, Matsushima Y, Mitsumori K, Hayashi Y. Threshold dose dependence in phenobarbital promotion of rat hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine. *Carcinogenesis.* 1992;13(3):501-503 p.
- Marche-Cova A, Fattel-Fazenda S, Rojas-Ochoa A, Arce-Popoca E, Villa-Trevino S. Follow-up of GST-P during hepatocarcinogenesis with DEN-2AAF in F344 rats. *Arch Med Res.* 1995;26 Spec No:S169-173 p.
- Maronpot RR. Biological Basis of Differential Susceptibility to Hepatocarcinogenesis among Mouse Strains. *J Toxicol Pathol.* 2009;22(1):11-33 p.
- McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S. Monocyte

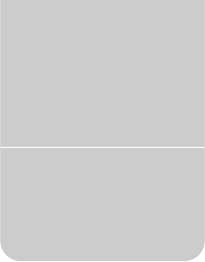
- activation in alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2002;27(1):53-61 p.
- Mizukami S, Ichimura R, Kemmochi S, Taniai E, Shimamoto K, Ohishi T, Takahashi M, Mitsumori K, Shibutani M. Induction of GST-P-positive proliferative lesions facilitating lipid peroxidation with possible involvement of transferrin receptor up-regulation and ceruloplasmin down-regulation from the early stage of liver tumor promotion in rats. *Arch Toxicol*. 2010;84(4):319-331 p.
- Morel F, Rauch C, Petit E, Piton A, Theret N, Coles B, Guillouzo A. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J Biol Chem*. 2004;16;279(16):16246-16253 p.
- Morton D, Alden CL, Roth AJ, Usui T. The Tg rasH2 mouse in cancer hazard identification. *Toxicol Pathol*. 2002;30(1):139-146 p.
- Muramatsu M, Sakai M. Mechanisms of a tumor marker, glutathione transferase P, expression during hepatocarcinogenesis of the rat. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2006;82(9):339-352 p.
- Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2000;32(1 Suppl):225-237 p.
- Pajaud J, Ribault C, Ben Mosbah I, Rauch C, Henderson C, Bellaud P, Aninat C, Loyer P, Morel F, Corlu A. Glutathione transferases P1/P2 regulate the timing of signaling pathway activations and cell cycle progression during mouse liver regeneration. *Cell Death Dis*. 2015;15;6(1):e1598 p.

- Preussmann R. Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. *Naturwissenschaften*. 1984;71(1):25-30 p.
- Qian G, Wang F, Tang L, Massey ME, Mitchell NJ, Su J, Williams JH, Phillips TD, Wang JS. Integrative toxicopathological evaluation of aflatoxin B₁ exposure in F344 rats. *Toxicol Pathol*. 2013;41(8):1093-1105 p.
- Rider CV, McHale CM, Webster TF, Lowe L, Goodson WH 3rd, La Merrill MA, Rice G, Zeise L, Zhang L, Smith MT. Using the Key Characteristics of Carcinogens to Develop Research on Chemical Mixtures and Cancer. *Environ Health Perspect*. 2021;129(3):35003 p.
- Sato K, Kitahara A, Satoh K, Ishikawa T, Tatematsu M, Ito N. The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gan*. 1984;75(3):199-202 p.
- Satoh K, Hatayama I. Anomalous elevation of glutathione S-transferase P-form (GST-P) in the elementary process of epigenetic initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. 2002;23(7):1193-1198 p.
- Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(12):3964-3968 p.

- Satoh K. Biochemical analysis of the initial carcinogenic changes that induce preneoplastic and neoplastic cell populations during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Anal Biochem.* 2022;15;643:114542 p.
- Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;21;20(43):15955-15964 p.
- Smith MT, Guyton KZ, Gibbons CF, Fritz JM, Portier CJ, Rusyn I, DeMarini DM, Caldwell JC, Kavlock RJ, Lambert PF, Hecht SS, Bucher JR, Stewart BW, Baan RA, Coglianò VJ, Straif K. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 2016;124(6):713-721 p.
- Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 2000;15;112-113:357-363 p.
- Suarez-Torres JD, Orozco CA, Ciangherotti CE. The 2-year rodent bioassay in drug and chemical carcinogenicity testing: Performance, utility, and configuration for cancer hazard identification. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2021;110:107070 p.
- Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, Malarkey DE, Kaufmann W, K?ttler K, Deschl U, Nakae D, Gregson R, Vinlove MP, Brix AE, Singh B, Belpoggi F, Ward JM. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol.* 2010;38(7 Suppl):5S-81S p.

- Thoolen B, Ten Kate FJ, van Diest PJ, Malarkey DE, Elmore SA, Maronpot RR. Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions. *J Toxicol Pathol.* 2012;25(3):189-199 p.
- Tice RR, Bassan A, Amberg A, Anger LT, Beal MA, Bellion P, Benigni R, Birmingham J, Brigo A, Bringezu F, Ceriani L, Crooks I, Cross K, Elespuru R, Faulkner DM, Fortin MC, Fowler P, Frericks M, Gerets HHJ, Jahnke GD, Jones DR, Kruhlak NL, Lo Piparo E, Lopez-Belmonte J, Luniwal A, Luu A, Madia F, Manganeli S, Manickam B, Mestres J, Mihalchik-Burhans AL, Neilson L, Pandiri A, Pavan M, Rider CV, Rooney JP, Trejo-Martin A, Watanabe-Sailor KH, White AT, Woolley D, Myatt GJ. In Silico Approaches In Carcinogenicity Hazard Assessment: Current Status and Future Needs. *Comput Toxicol.* 2021;20:100191 p.
- Tomatis L, Huff J, Hertz-Picciotto I, Sandler DP, Bucher J, Boffetta P, Axelson O, Blair A, Taylor J, Stayner L, Barrett JC. Avoided and avoidable risks of cancer. *Carcinogenesis.* 1997;18(1):97-105 p.
- Tsuda H, Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Nakae D, Imaida K, Tatematsu M, Hirose M, Wakabayashi K, Moore MA. Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work. *Toxicol Pathol.* 2003;31(1):80-86 p.

- Tsuda H, Futakuchi M, Fukamachi K, Shirai T, Imaida K, Fukushima S, Tatematsu M, Furukawa F, Tamano S, Ito N. A medium-term, rapid rat bioassay model for the detection of carcinogenic potential of chemicals. *Toxicol Pathol.* 2010;38(1):182-187 p.
- Uda N, Kashimoto N, Sumioka I, Kyo E, Sumi S, Fukushima S. Aged garlic extract inhibits development of putative preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *J Nutr.* 2006;136(3 Suppl):855S-860S p.
- Vasieva O. The many faces of glutathione transferase pi. *Curr Mol Med.* 2011;11(2):129-139 p.
- Wadman M. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science.* 2023;379(6628):127-128 p.
- Wolf DC, Cohen SM, Boobis AR, Dellarco VL, Fenner-Crisp PA, Moretto A, Pastoor TP, Schoeny RS, Seed JG, Doe JE. Chemical carcinogenicity revisited 1: A unified theory of carcinogenicity based on contemporary knowledge. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019;103:86-92 p.



Abstract

A Study on the pre-neoplastic lesions of liver using GST-P identification

Objectives

Carcinogenic toxicity tests using laboratory animals such as rats and mice require long-term tests, so there are restrictions such as animal ethics, manpower, time and goods. For animal ethics and efficient experiments, it is necessary to conduct quantitative analysis by chemical carcinogens through immunostaining applied with GST-P and confirm the possibility of early identification of carcinogens. In addition, it is necessary to consider the application of the recent carcinogenicity-related mechanisms and weights of evidences for screening.

Method

Occupational chemicals reviewed in IARC monographs were analyzed in consideration of the key characteristics of the carcinogen. In addition, the expression of GST-P and PCNA in the liver of rats and mice was experimentally studied through immunohistochemical staining. In addition, mode of action and efficiency were considered to enhance the method of carcinogenic screening for conducting inhaled toxicity studies.

Results

As a result, the most frequent mechanistic evidence with strong relationship were found to be genotoxic, as well as changes in cell proliferation, death, or nutritional supply and metabolic activated electrophilic were indicated high frequency. In 2-year experimental specimen in rats, a number of GST-P positive foci were identified at the normal lesion in HE staining, and in the 90-day specimen, a few positive foci were observed, but a number of positive small cell units were identified. In addition, the GST-P positive expression focus was increased compared to the normal specimen due to exposure to Heptan-1-ol. Also it would be referred to in the classification of experimental results and data collected in three category for screening in investigation of the substance to be tested.

Conclusion

Through the study, markers and carcinogenic mechanistics that can confirm the recent carcinogenic data were proposed. Based on this, it is expected to be used as assistant data when screening for carcinogenicity studies and to analyze data.

Key words

Liver, Pre-neoplastic lesion, GST-P, Carcinogenicity, Screening test

연구진

연구기관 : 산업안전보건연구원

연구책임자 : 조은상 (연구위원, 흡입독성시험부)

연구원 : 김범기 (과장, 흡입독성시험부)

연구기간

2023. 01. 01. ~ 2023. 11. 30.

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

산업안전보건연구원장

GST-P를 활용한 화학물질에 의한 전암 병변 조기 탐색 연구
- 간을 중심으로 -
(2023-산업안전보건연구원-999)

발 행 일 : 2023년 12월 31일

발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 김은아

연구책임자 : 산업화학연구실 연구위원 조은상

발 행 처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

주 소 : (44429) 울산광역시 중구 종가로 400

전 화 : 042-869-8513

팩 스 : 042-869-8691

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

I S B N : 979-11-93642-46-7

공공안심글꼴 : 무료글꼴, 한국출판인회의, Kopub바탕체/돋움체

GST-P를 활용한 화학물질에 의한 전암 병변 조기 탐색 연구

- 간을 중심으로 -

표지

량데뉴 226g(인쇄용지)

내지

네오스타 미색 80g(인쇄용지)
저탄소제품 708kg CO₂ eq./ton

환경보호를 위해
저탄소용지(친환경용지)를
사용하였습니다.

