

인체 각질형성세포 배양모델을 이용한 직업성 유기용제의 독성도 측정에 관한 연구

1994



한국산업안전공단
산업보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 연구 결과를 1994년도 산업보건연구원의 연구사업 중
“인체 각질형성세포 배양모델을 이용한 직업성 유기용제의
독성도 측정에 관한 연구”에 대한 최종 결과 보고서로 제출
합니다.

1994년 12월 31일

제출자 : 산업보건연구원장 문 영 한

연구책임자 : 서울대학교 의과대학
교수 은 희 철

공동연구자 : 산업보건연구원
책임연구원 유 일 재

목 차

- Abstract -	1
I. 서 론	3
II. 연구방법	5
1. 용제 선정	5
2. 연구 방법	5
(1) 정상 인체 각질형성세포의 배양	
(2) 배양한 각질세포의 수종 용제에의 노출	
(3) MTT(tetrazolium-based colorimetric)검사	
(4) Tritiated thymidine을 이용한 각질형성세포의 DNA 합성측정	
(5) Lactic dehydrogenase 유리 측정법	
(6) 통계처리 및 검증	
III. 연구 결과.	10
1. 정상 인체 각질형성세포를 이용한 MTT 검사	10
2. 정상 인체 각질형성세포를 이용한 LDH 검사	10
3. 정상 인체 각질형성세포를 triated thymidine incorporation 검사	10
IV. 고 찰.	17
V. 결 론.	20
VI. 참고 문헌.	21

Measurement of cytotoxicity of occupational organic solvents using normal human keratinocytes culture model

Hee Chul Eun, Jae Hak Yoo, and Il Je Yu*

Department of Dermatology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Industrial Health Research Institute, Incheon, Korea*

Background: As in vivo methods such as animal and human tests have many potential problems, the keratinocyte culture model has previously been used as an in vitro model for testing skin irritancy potency for common skin irritants.

Objective: To determine the skin irritant potency of several solvents, we employed cultured human keratinocytes as an in vitro model.

Methods: We used 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide test(MTT), lactic dehydrogenase(LDH) release test, and tritiated thymidine incorporation test to evaluate the cytotoxicity of solvents.

Results: Dose dependent decreased survival in MTT, increased LDH liberation, and decreased DNA synthesis in thymidine incorporation test

were observed in normal human keratinocytes culture model after exposure of several solvents to cultured human keratinocytes. However, the rank orders of solvents induced cytotoxicity measured by each method were slightly different.

Conclusion: These observations suggested that the cultured human keratinocyte model was useful in evaluating the cytotoxicity of solvents soluble in keratinocyte growth media.

Key Words : Solvent, Keratinocyte Culture Model, MTT method, LDH method, tritiated thymidine incorporation test

I. 서 론

일반 산업장에서 널리 사용되는 용제는 직업성 피부질환의 주요 원인이 되는 물질이며 피부에 자극 피부염을 일으킨다. 자극피부염은 원인 물질이 일정한 시간과 농도로 인체 피부에 접촉되면 거의 모든 사람에서 발생하는 피부염을 말하며 이의 유발 물질에는 산, 알칼리, 용제, 금속염 등 여러 화학 물질 뿐아니라 여러 생활용품 및 피부에 도포하는 약물 등 다양하다. 이러한 자극 피부염은 알레르기성 접촉 피부염에 비하여 발생 빈도는 높으나 기전은 잘 알려져 있지 않고, 특히 용제는 단일 물질도 있으나 많은 경우 복합 물질이므로 새로이 사용되고 끊임없이 추가되는 용제들에 대한 피부의 손상 정도를 예측할 수 있는 다양한 실험 모델의 개발이 요구된다.

현재까지 자극물질의 피부에 대한 반응의 정도를 측정하는 방법으로는 철포시험이 널리 쓰여 왔고, 자극반응의 정도를 보다 객관적으로 정량화 하려는 노력으로 인체 및 동물 시험에 colorimeter, laser doppler flowmetry, 전기 전도율 측정법 및 경피 수분소실 측정법 등의 여러 생물 공학적인 측정 기기를 이용한 방법이 응용되고 있다. 용제에 의한 피부 손상의 정도를 알아 보는 데는 인체 피부를 이용하는 것이 이상적이나 피부에의 독성도 등의 여러 문제로 그 사용이 제한적이었다. 동물을 이용한 모델 역시 인체와의 피부 반응의 차이, 털을 깎는 과정 중의 피부 손상 가능성이나 시험 물질의 접촉 및 고정과 마취의 시행 등의 문제점이 있다.

따라서 최근 여러 약물 및 자극물질의 피부 독성도를 신속하게 측정할 수 있는 모델로 세포 배양 모델이 이용되고 있다. 그 중에서도 정상 인체 각질형성세포는 자극물질이 피부에 접촉할 경우 주 표적이 되는 세포로 다른 계통의 세포를 사용하는 것보다 바람직하다.

본 연구의 목적은 광범위하게 사용되는 용제 중 물에 녹는 수종 용제에

의한 피부 독성도를 인체 각질형성세포 배양모델로 확인하고자 하며 이를 산업장에서 흔히 사용하고 있는 용제의 피부 독성도 측정에 지표로 이용 될수 있는 모델로 활용하고자 함이다.

II. 연구 방법

1. 용제 선정

여러 분야에서 흔히 사용되며 각질형성세포 배양 배지에 녹을 수 있는 용제로 alcohol류인 ethanol(Carlo Erba Co.)과 isopropyl alcohol(이하 I.A.로 줄임, Kodak), ketone류인 acetone(Merck), glycol류인 propylene glycol(이하 P.G.로 줄임, Yakuri Chem.), 기타군에 속하면서 여러 용도로 사용되고 있는 dimethylsulfoxide(이하 DMSO로 줄임, Sigma)를 선정하여 비교하였다.

2. 연구 방법

(1) 정상 인체 각질형성세포의 배양

가. 일차 배양 (Primary culture)

① 정상 피부는 포경 수술에서 얻은 포피를 사용하여 가능한 빠른 시일내에 배양을 시도하였으며, 배양 전까지는 4°C의 Dulbecco's salt용액에 담구어 냉장 보관한다. 지방조직을 가위로 가능한한 잘라버리고, 포피를 소독된 방포 위에 놓고 네 귀퉁이를 포셋으로 잡아 잘 편 후, 면도날로 표피와 진피의 일부분이 포함되도록 포피를 가능한한 얇게 벗긴다.

② 포피 절편을 laminar flow 내에서 solution A 완충액 (30mM HEPES, 10mM glucose, 3mM KCl, 130mM NaCl, 1.0mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0033mM phenol red를 4N NaOH로 pH 7.4로 조정)에 3회 세척한다.

③ 포피 절편을 collagenase가 0.25% 포함된 각질형성세포 배지에 넣고 CO_2 부란기에서 90분간 부란시킨다.

④ 포피 절편을 꺼내 forcep으로 표피와 진피를 분리한 후 진피는 버리고, 표피는 trypsin-EDTA(0.025%-0.01%)용액에 37°C에서 5분간 부란시킨다.

부란 후 trypsin을 비활성화시키기 위해서 10% fetal calf serum을 첨가한다.

⑤ 각질형성세포를 유리시키기 위하여 5ml pipette으로 표피조직을 흡입과 배출을 반복하여 각질형성세포를 유리한다.

⑥ 세포 부유액을 소독한 nylon gauze 위에 부어 거른 후 원심분리 튜브에 담는다. 200G에서 5분간 원심 분리한 후 상층액을 걷어 내고 solution A로 다시 5분간 세척한다.

⑦ 상층액을 걷어 낸 후 각질형성세포 배지(KGM)에 섞어 hemocytometer에서 세포수를 계산한 후 culture flask에 약 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 되게 세포를 접종시킨다. Flask는 세포가 적은 경우는 25cm^2 을 사용하고 많은 경우는 75cm^2 을 사용한다. 각질형성세포 배지는 Clonetics 회사 (U.S.A.)제품을 사용하였으며, 이는 modified MCDB 153배지 성분이 근간이며 추가로 epidermal growth factor(10ng/ml), bovine pituitary extract ($70 \mu\text{g/mg}$), hydrocortisone($0.5 \mu\text{g/ml}$), insulin($5 \mu\text{g/ml}$), 항생제로 penicillin ($100 \mu\text{g/ml}$), streptomycin($100 \mu\text{g/ml}$), fungizone($0.25 \mu\text{g/ml}$)이 함유되어 있다. 배지의 사용시는 추가로 -20°C 에서 29.2mg/ml 으로 얼려 놓은 미량의 glutamine을 첨가한다.

⑧ 세포배지는 2일 후 갈아 주며, 5일 후에 solution A로 1회 세척 후 다시 갈아준다. 그 후는 2일마다 solution A로 1회 세척하고 갈아 주되 세포가 flask 전체의 80% 까지 키운 후 세포를 떼어 냉동시킨다.

나. 세포냉동

① 1차 배양한 flask의 배지를 제거하고 solution A로 1회 세척한 후 0.025% trypsin-0.01% EDTA 용액을 5ml 주입한다. (25cm^2 flask 에는 2ml, 75cm^2 flask에는 5ml).

② 1분 후 trypsin-EDTA 용액 2.5ml을 뽑아내고 CO_2 부란기에 2분간 더 놓아 둔다. 2분 후 flask를 책상위에서 가볍게 움직여 세포가 50%이상 flask

에서 떨어지면 trypsin inhibitor 용액 (1mg/ml)을 5ml 넣고 2ml pipette로 흡입과 배출을 반복한다.

③ 세포 부유액을 solution A로 1회 세척한 후 (200G에서 5분 원심분리) 상층액을 건어낸 세포 침전물을 냉동 배지에 5×10^5 /ml으로 희석한 후 1ml cryovial에 넣는다. 이때 사용한 냉동 배지는 각질형성세포 배지에 DMSO 10%, fetal calf serum 20%를 섞은 배지를 사용한다.

④ 세포를 넣은 cryovial을 스티로폴 상자에 넣어 4°C에서 1시간, -20°C에서 1시간, -70°C에서 3시간 단계적으로 보관한 후 액체 질소로 옮겨 보관한다.

다. 이차 계대배양

① 액체 질소에 보관한 cryovial을 37°C에서 급속히 용해시킨 후 solution A로 1회 세척한다. 세포를 각질형성세포 배지에 희석하여 $2,000/\text{cm}^2$ 정도로 flask에 접종시킨다.

② 2일 후 solution A로 1회 세척한 후 배지를 갈아주며 그 이후는 세포가 flask바닥의 70-80%까지 칠때까지 2일 마다 배지를 갈아 주면서 배양한다.

③ Flask 바닥에 세포가 70-80% 자라면 세포를 떼어낸 후 각질형성세포 배지를 2ml첨가하여 세포 수를 hemocytomter로 계산한 후 실험에 원하는 수만큼 세포를 희석하여 사용한다.

(2) 배양한 각질세포의 수종 용제에의 노출

계대 배양한 인체 각질세포를 96-well 조직배양 plate에 well당 20000개의 세포수로 KGM을 사용하여 final volume이 0.1ml가 되도록 분주한다.

80-100% confluence에 도달하였을 때 KGM을 예비실험에서 설정한 농도로 용제를 첨가한 새로운 KGM으로 대체한다. Plate를 5% CO₂를 포함하는 37°C 부란기로 옮겨서 24시간 동안 둔다.

(3) MTT(tetrazolium-based colorimetric) 검사

각질형성세포의 생존능은 MTT 검사(Mosmann, 1983)로 측정하며 그 방법은 아래와 같다.

가. 각질형성세포 배양(200 μ l/well)에 5mg/ml 농도로 조절된 MTT 용액을 20 μ l 씩 첨가한 후 각질형성세포를 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 에서 배양한다.

나. 각질형성세포 배양 상층액을 suction에 연결된 23 gauge 바늘로 조심스럽게 제거한다.

다. Dimethylsulfoxide 용액 200 μ l를 첨가하고 shaker에서 10분간 흔들어 준다. ELISA reader로 540nm에서의 흡광도를 판독한다. 이상의 MTT 검사를 6회 시행한다.

(4) Tritiated thymidine을 이용한 각질형성세포의 DNA 합성측정

가. 배양 각질형성세포에 1 μ Ci/ml의 ³H-thymidine(specific activity = 20-60Ci/mmol)을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 수증기 포화상태에서 24시간 동안 더 배양한다.

나. Trypsin - EDTA(0.05% - 0.01%) 용액을 well 당 200 μ l씩 처리하여 각질형성세포를 떼어낸다.

다. Cell harvester를 사용하여 세포를 glass-fibre filter에 모으고, 상온에서 filter를 건조시킨다.

라. Filter를 잘라 5ml의 scintillation vial에 넣고, scintillation cocktail를 2ml씩 넣은 후 잘 흔들어 준다.

마. Liquid scintillation counter를 사용하여 각질형성세포에 표지된 ^3H - thymidine 양을 측정한다. 이상의 ^3H -thymidine incorporation검사를 6회 시행한다.

(5) Lactic dehydrogenase 유리 측정법

계대 배양한 인체 각질세포를 96-well 조직배양 plate에 well당 20000개의 세포수로 KGM을 사용하여 final volume이 0.1ml가 되도록 분주한다. 80-100% confluence에 도달하였을 때 KGM을 예비실험에서 설정한 농도의 용제를 첨가한 새로운 KGM으로 대체한다. Plate를 5% CO_2 를 포함하는 37°C 부란기로 옮겨서 24시간 동안 둔 후에 배양 상층액을 0.3ml씩을 취하여 Gilford LDH 측정 kit로 측정하였다. 이상의 LDH 검사를 6회 시행한다.

(6) 통계처리 및 검증

통계 처리 방법은 비모수 검정법인 Wilkoxon signed rank test로 비교 군간의 유의성을 검정하였다. 유의수준은 P-value가 0.05이하로 하였다.

III. 연구 결과

1. 정상 인체 각질형성세포를 이용한 MTT 검사

용제의 농도가 증가 할수록 흡광도가 감소 하는 추세를 보였으나 각 용제의 농도별로 약간의 변화가 있었다. 용제의 농도가 5%일때 각 용제의 독성도의 순서는 DMSO > I.A. > acetone > ethanol > P.G.이었다 (*;p<0.05). (Fig. 1., Table 1. 참고)

2. 정상 인체 각질형성세포를 이용한 LDH 검사

용제의 농도가 증가 할수록 LDH가 증가 하였고 ethanol 처치군에서는 2.5% 보다 5%에서 LDH 측정치가 낮았으나 7.5%에서는 LDH의 급격한 증가가 있었다. 용제의 농도가 5%일때 LDH 측정치의 차이가 가장 컸으며 이때의 독성도 순서는 DMSO > I.A. > acetone > ethanol > P.G. (*;p<0.05)로 MTT 검사에 의한 순서와 일치하였다. 그러나 7.5% acetone과 ethanol 처치군에서는 LDH의 급격한 증가가 있었다. (Fig. 2., Table 2. 참고)

3. 정상 인체 각질형성세포를 이용한 tritiated thymidine incorporation 검사

용제중 P.G. 와 I.A. 은 세포의 활성화에는 별다른 영향을 미치지 않았던 0.1%, DMSO는 1%의 저농도에서 DNA 합성능이 관찰 되지 않았으며 acetone과 ethanol은 2.5%이상의 농도에서는 DNA 합성을 관찰할 수 없었다. 용제의 농도 0.1%일때 각 용제의 DNA 합성능의 저하된 순서는 P.G. > I.A. > ethanol > DMSO > acetone이었다(*;p<0.05). (Fig. 3., Table 3. 참고)

Table 1. Values of optical density of MTT in five concentrations of each solvent.
mean±standard deviation(n=6)

Conc.	solvent				
	Acetone	DMSO	P. G.	Ethanol	I. A.
0.1%	0.818±0.061	1.060±0.246	1.278±0.117	1.272±0.043	0.994±0.175
1%	1.052±0.248	0.676±0.022	1.626±0.183	1.166±0.040	0.867±0.131
2.5%	1.046±0.054	0.885±0.146	1.212±0.120	1.077±0.045	1.204±0.024
5%	1.127±0.214	0.247±0.219	1.446±0.240	1.218±0.060	0.750±0.122
7.5%	0.736±0.067	0.078±0.010	1.137±0.227	0.318±0.140	0.100±0.036
control			1.315±0.042		

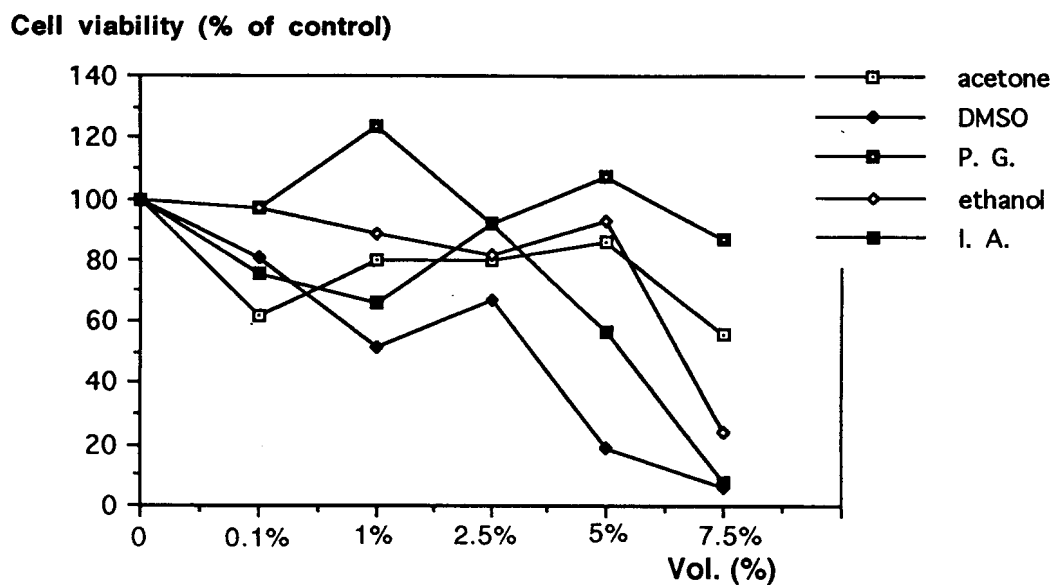


Figure 1. Effect of solvents on the cell viability of cultured human keratinocytes measured by MTT.

Table 2. Values of LDH(IU/L) in five concentrations of each solvent. mean±standard deviation(n=6)

Conc.	solvent				
	Acetone	DMSO	P.G.	Ethanol	I. A.
0.1%	29.333±1.211	28.000±1.673	49.833±3.656	27.167±2.317	30.333±0.816
1%	21.333±2.582	43.667±4.633	46.167±2.994	30.167±2.994	34.000±9.940
2.5%	36.167±1.472	41.000±4.561	58.000±7.874	100.667±14.236	73.833±4.021
5%	147.833±16.893	281.333±7.005	72.500±13.457	86.833±14.497	169.000±12.522
7.5%	304.167±7.885	294.000±6.693	91.833±11.856	305.667±18.468	187.000±14.846
control	26.333±1.366				

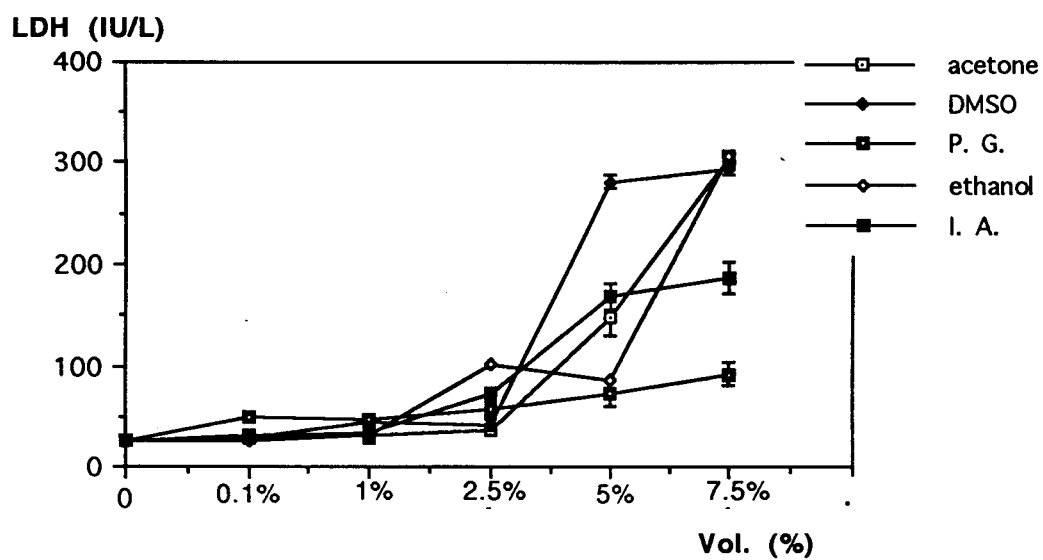


Figure 2. Effect of solvents on the LDH leakage of cultured human keratinocytes.

Table 3. Values of cpm of tritiated thymidine in five concentrations of each solvent. mean±standard deviation(n=6)

Conc.	solvent				
	Acetone	DMSO	P. G.	Ethanol	I. A.
0.1%	66881±12006	34278±34692	1523±631	7899±2192	1848±1154
1%	26504±4752	1534±351	457±169	23972±20727	2486±970
2.5%	360±130	5085±1473	1844±1481	580±231	977±250
5%	122±18	480±338	453±269	2437±392	1418±801
7.5%	101±36	620±471	2057±767	342±317	348±263
control	96098±9532				

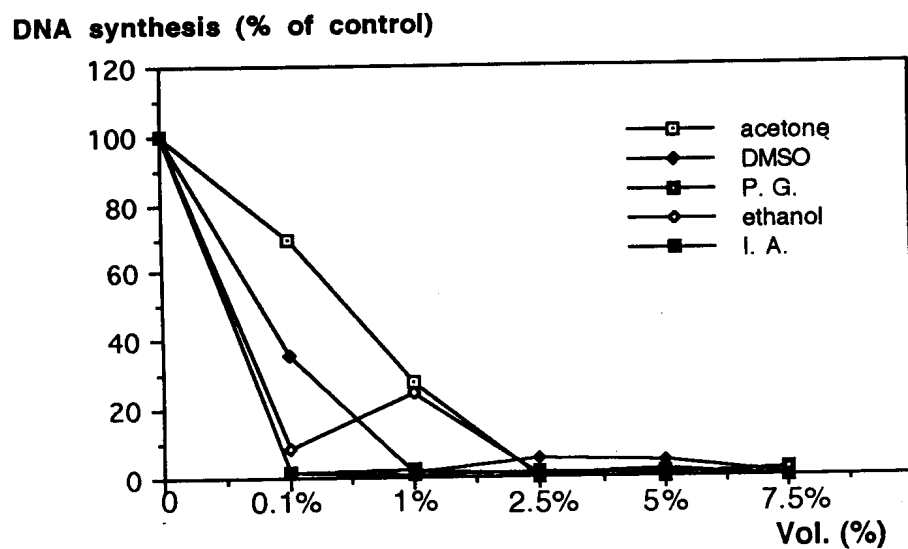


Figure 3. Effect of solvents on the DNA synthesis of cultured human keratinocytes measured by tritiated thymidine incorporation test.

IV. 고 찰

용제는 일반 산업장에서 널리 사용되며 직업성 질환의 많은 부분을 차지하는 직업성 피부질환의 주요 원인이 되는 물질이다. 이러한 용제에 의한 피부 손상은 대부분 자극 피부염(irritant dermatitis)으로 알려져 있으며 다양한 기전에 의하여 발생될 것으로 생각 된다. 하지만 용제는 단일 물질도 있으나 산업장에서 사용하는 많은 용제는 복합 물질이며 그 종류가 대단히 많고 피부에 손상을 일으키는 기전도 다양하므로 새로이 사용되고 끊임없이 추가되는 용제들에 대한 피부손상의 기전을 예측할 수 있는 다양한 실험모델의 개발이 요구된다.

이러한 용제에 의한 피부손상의 정도를 알아보는 데는 인체의 피부에 직접 용제를 적용시킨 후 그 반응을 임상적으로 평가하거나, 여러 생물 공학적인 측정기기를 이용하여 피부 반응의 정도를 객관적으로 정량화하는 방법이 사용되고 있지만 실제적으로 적용하는데에 여러 문제점이 있고 독성이 심한 경우나 복합 용제로 독성도의 예측이 힘든 경우에는 동물 모델이 이용될 수 있다. 하지만 동물 모델의 경우 인체와 생리적인 특성이 다르므로 그 반응이 다를 수 있고 털을 깎거나 제모제의 사용시 발생할 수 있는 피부 손상, 시험 물질의 접촉 방법 및 마취 등의 문제점이 있어 최근에는 세포 배양 모델이 사용되고 있다. 이러한 세포 배양 모델은 화장품이나 약품의 피부 독성도 측정에 종래의 동물 모델과 함께 널리 이용되고 있고 특히 독성도를 신속하게 측정할 수 있는 여러 방법이 제시되고 있다. 세포 배양 모델로는 여러 세포가 이용될 수 있으나 정상 인체 각질형성세포는 자극물질이 피부에 접촉할 경우 주 표적이 되는 세포로 다른 계통의 세포를 사용하는 것보다 바람직하다고 볼 수 있다. 하지만 본 실험에서 사용한 각질형성세포의 배양은 Boyce와 Ham(1983)의 monolayer법을 사용하였는데 이는 미분화된 기저세포층에 해당되

는 세포만을 대상으로 하므로 다양한 기전으로 일어나는 피부자극 반응을 충분히 반영하지 못할 수 있으며 장기간의 배양이 곤란하고 전체적인 피부구조와는 다른 환경이 형성 되는 문제점이 있어 최근에는 섬유 아세포와 각질형성 세포를 따로 배양하여 정상 피부와 비슷한 상황을 재현시킨 부교배양 모델이 개발되었다.

배양된 세포를 이용하여 자극물질에 대한 독성도 검사를 할 경우 일반적으로 일정기간 배양세포에 자극물질을 처리한 후 세포의 형태학적 관찰, 살아있는 세포의 양적 측정, 세포의 성장이나 세포기능의 변화를 알아보는 방법 등이 사용된다. 본 실험에서 사용한 MTT 방법은 Mossman T(1983)이 항암제의 세포독성도 연구에 처음 사용한 방법으로 살아있는 세포의 dehydrogenase에 의하여 황색의 tetrazolium염이 청색의 formazan으로 변한 다음 이를 multiwell spectrophotometer로 측정하므로 많은 양의 검체를 단시간 내에 판독할 수 있는 방법이며 LDH 측정법은 세포막 손상시 유리되는 lactic dehydrogenase의 양을 측정하여 각질형성세포의 손상 정도를 추정하는 방법으로 역시 세포의 활성도를 측정할 수 있는 방법이다. 각질형성세포의 DNA 합성 정도는 tritiated thymidine incorporation 검사로 계측하였다.

본 연구에서는 각질형성세포 배양 배지에 섞일 수 있는 수종 용제를 배양된 정상 인체 각질형성세포에 농도 별로 첨가한 후 세포의 활성도와 DNA 합성능을 측정하였다. 용제 중 DMSO는 MTT 검사와 LDH 검사를 이용한 세포의 활성도 검사에서 가장 독성도가 높았는데 이 결과는 인체와 기니픽의 피부를 이용한 생체 실험의 결과(1993년도 보고서 참조)와 일치하는 소견으로 인체 각질형성세포 배양모델이 용제를 포함한 피부 자극 물질의 독성도 측정에 객관적이고 편리한 실험 모델이 될 수 있음을 시사하는 결과로 생각된다. 정상 인체 각질형성세포를 이용한 MTT 검사와 LDH 검사의 독성도 순서는 7.5% acetone과 ethanol 처치군에서는 LDH의 급격한 증가가 있는 등 농도 별로 약

간의 차이를 보였으나 전반적으로는 일치하는 측정치를 보였다. 하지만 각질 형성세포를 이용한 tritiated thymidine incorporation 검사의 결과는 훨씬 낮은 용제들의 농도에서 DNA 합성이 현저히 감소하여 MTT 검사나 LDH 검사보다 예민한 반응을 보였으며 이들 검사를 이용하여 측정한 각질형성세포에 미치는 용제들의 독성도 순서와도 상이한 결과를 보여 용제들의 세포 활성도에 미치는 영향과 DNA 합성능에 미치는 영향은 다르게 나타났으나 그 기전은 불명이다.

V. 결 론

연구자들은 정상 인체 각질형성세포를 배양하고 여러 분야에서 광범위하게 사용되는 다섯가지의 용제를 농도별로 처리하여 그 반응을 MTT검사, LDH검사 및 tritiated thymidine incorporation검사로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상 인체 각질형성세포의 MTT 검사는 각 용제의 농도가 증가 할수록 흡광도가 감소 하였으며 용제의 농도 5%일때 각 용제의 독성도의 순서는 DMSO > I.A. > acetone > ethanol > P.G.이었다.

2. 정상 인체 각질형성세포의 LDH 검사는 각 용제의 농도가 증가 할수록 LDH가 증가 하였으며 용제의 농도 5%일때 각 용제의 독성도의 순서는 MTT 검사에 의한 순서와 일치하였으나 7.5% acetone과 ethanol 처리군에서는 LDH의 급격한 증가가 있었다.

3. 정상 인체 각질형성세포의 tritiated thymidine incorporation 검사는 각 용제의 농도가 2.5%에 이를 때까지 DNA 합성능이 감소 하였으며 2.5%이상의 농도에서는 모든 용제에서 DNA 합성을 관찰할 수 없었다. 용제의 농도 0.1%일때 각 용제의 DNA 합성능의 저하된 순서는 P.G. > I.A. > ethanol > DMSO > acetone이었다.

이상의 결과에서 MTT검사와 LDH검사는 비교적 일치된 결과를 보였으나 tritiated thymidine incorporation검사에서는 저농도의 용제에서 DNA합성능이 예민하게 저하되었고 용제의 독성도의 순서도 다르게 나타났다. 따라서 MTT, LDH, tritiated thymidine incorporation test는 용제에 의한 피부 자극도 검사에서 모두 유효한 방법으로 생각되나 방법에 따른 물질의 반응에서 다소 차이가 있으므로 적용 및 해석에 주의하여야 하리라 생각된다.

VI. 참고 문헌

Adams RM. Occupational skin disease. New York:Grune & Stratton, Inc, 1984:2-12

Anderson K. Solvent dermatitis. In:Riihimaki V, Ulfarson U, eds. Safety and health of organic solvents:Progress in clinical and biologic research, vol. 220. New York:Alan R. Liss, 1986:133-138

Bandemir B, Wilke B, Hoth I. Investigation of the irritative potency of environmental products in a primary suspension of epidermal cells. Dermatol Mon Schr 1988;174:290-292

Berardesca E, Maibach HI. Bioengineering and the patch test. Contact dermatitis 1988;18:3-9

Bloom E, Maibach HI, Tammi R et al. In vitro models for cutaneous effects of glucocorticoids using human skin skin organ and cell culture. Models Dermatol 1989;4:12-19

Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. J Invest Dermatol 1983;81(Suppl.):33-40S

Duffy PA, Flint TC, Orton TC et al. Initial validation of an in vitro

test for predicting skin irritancy. *Fd Chem Toxic* 1986;24:517-518

Dugard PH, Embery G. The influence of dimethylsulfoxide on the percutaneous migration of potassium butyl[35S] sulfate. *Br J Dermatol* 1969;81:69-74

Eun HC, Chung JH, Jung SY, Cho KH et al. A comparative study of the cytotoxicity of skin irritants on cultured human oral and skin keratinocytes. *Br J Dermatol* 1994;130:24-28

Eun HC, Jung SY. Comparison of irritant potential of shampoos using cultured human epidermal keratinocytes model and patch test reaction measured by laser Doppler flowmetry. *Contact Dermatitis* 1994;30:168-171

Fisher AA. *Contact dermatitis*. 3rd ed. Philadelphia:Lea & Feiger, 1986:34:5-9

Freeman S, Maibach HI. Study of irritant dermatitis produced by repeated patch test with sodium lauryl sulfate and assessed by visual methods, transepidermal water loss, and laser doppler velocimetry. *J Am Acad Dermatol* 1988;19:496:502

Goldberg AM, Frazier JM. Alternatives to animals in toxicity testing. *Scientific American* 1989;261:16-22

Hoa A, Maier K, Dreher RM. Multilayered keratinocyte culture used for in vitro toxicology. Mol Toxicol 1987;1:537-563

Moss DW, Henderson AR, Kachmar JF. Enzymes. In: Textbook of Clinical Chemistry(Tiez NW, ed) Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1987:619

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63

유재학, 은희철, 서대현, 유일재. 비침습적 측정방법을 이용한 수종 용제가 자극 피부염에 미치는 영향. 대한피부과학회지 1994;32:1026-1034

인체 각질형성세포 배양모델을 이용한 직업성
유기용제의 독성도 측정에 관한 연구
(94-5-21)

발 행 일 : 1994. 12
발 행 인 : 문 영 한
발 행 처 : 한국산업안전공단 산업보건연구원
 인천직할시 북구 구산동 34 - 3
 전 화 : (032) 518 - 0861
인 쇄 인 : 김 재 극
인 쇄 처 : 문 원 사

<비 매 품>