

## 담배 주류연의 생물학적 활성에 대한 흡연조건의 영향

신한재\* · 박철훈 · 손형옥 · 이형석 · 유지혜 · 이병찬 · 현학철

KT&G 중앙연구원  
(2008년 6월 2일 접수)

## Effect of smoking conditions on the biological activity of cigarette mainstream smoke

Han-Jae Shin\*, Chul-Hoon Park, Hyung-Ok Sohn, Hyeong-Seok Lee,  
Ji-Hye Yoo, Byeong-Chan Lee and Hak-Chul Hyun

KT&G Central Research Institute  
(Received June 2, 2008)

**ABSTRACT** : The objective of this study was to determine the effect of smoking conditions on the *in vitro* toxicological activity of mainstream smoke. The 2R4F reference cigarette was machine-smoked by International Organization for Standardization(ISO) and Canadian Intense(CI) conditions. Smoke was analysed for chemical composition and *in vitro* toxicity. The cytotoxic potencies of both the total particulate matter(TPM), which were collected in Cambridge filter pad, and gas/vapor phase(GVP), which was bubbled through in phosphate-buffer saline in a gas-washing bottle, were assessed using neutral red up take assay with chinese hamster ovary(CHO) cells. The assessment for genotoxicity of TPMs generated under ISO and CI conditions was determined using *Salmonella* mutagenicity assay and *in vitro* micronucleus assay. When calculated on an equal TPM basis, *in vitro* toxicity of TPM obtained under CI condition was decreased compared to TPM generated under ISO condition. The results of chemical composition analyses revealed that the lower toxicological activity under CI condition than that of ISO condition could be explained by the decreased in the contents of phenols, N-nitrosoamines and aromatic amines of TPM on an equal TPM basis

**Key words** : ISO smoking condition, Canadian intense smoking condition, Total particulate matter, gas-vapor phase(GVP), cytotoxicity, genotoxicity

최근 담배의 품질에 있어서 생물학적 안전성에 관한 사항이 중요시되고 있다. 안전성 평가에 널리 사용되고 있는 *in vitro* 방법은 미생물 또는 동물 세포를 이용하여 세포의 괴사, 돌연변이성 및 염색체 이상 유·무를 확인하는 시험 등으로 수행된다 (Buckton and Evans, 1973; Ames *et al.*, 1975;

Fenech and Morley, 1985; Balls and Clothier, 1992). 세포독성은 약물이 세포에 미치는 기전을 이해하는데 중요할 뿐만 아니라, 염증 반응과 같은 생리학적 과정을 이해하는데 매우 중요하다 (Belinsky *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1990). 세포의 생존능력이나 성장속도의 감소는 세포독성의 증거

\*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

\*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea (phone: 82-42-866-5592; fax: 82-42-866-5542; e-mail: hishin@ktng.com)

이며, 세포의 능동수송, 미토콘드리아의 효소활성, 세포막에 존재하는 효소들의 활성변화 등은 *in vitro* 세포독성을 평가하는 생물학적 지표(endpoint)로서 사용되고 있다(Shirhatti and Krishna, 1990; Sanders *et al.*, 1991). 세포독성은 농도반응곡선을 조사함으로써 세포성장을 50 % 억제하는 농도인 EC<sub>50</sub>를 설정하여 독성정도를 비교할 수 있다.

유전독성을 평가하기 위해 널리 사용되는 *in vitro* 방법으로는 염색체이상을 측정하는 소핵시험(micronucleus test)과 DNA 염기의 이상 여부를 측정하는 복귀돌연변이 시험(bacterial reverse mutation test) 등이 있다. *In vitro* 소핵시험은 염색체의 구조이상과 수적이상 등 염색체 및 유전체 수준에서 유전독성을 검색할 수 있는 간단하면서도 경제적인 시험법으로(Kirsch-Volders *et al.*, 1997; Fenech, 2000) 염색체이상 시험법과 함께 널리 사용되고 있다(Miller *et al.*, 1998). 소핵 시험은 화학물질이 DNA 수복 및 세포분열시 작용하는 단백질 등에 영향을 주거나 또는 유전체에 직접 작용하여 생성된 소핵을 가진 세포를 측정하여 유전독성을 평가하는 방법이며, 유전독성 발암물질과 비유전독성 발암물질 모두를 검색할 수 있다(Ashby *et al.*, 1994; Yamasaki *et al.*, 1994). 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험에서는 *Salmonella typhimurium*의 특정 아미노산 요구 균주들을 이용하여 소수의 DNA 염기의 치환이나 첨가, 손실등의 돌연변이를 인지할 수 있다 (Mortelmans and Errol Zeiger, 2000). 시험에 사용되는 각각의 균주들은 다양한 변이원성물질을 탐색하기 위한 각각 다른 유전적 특징을 가지고 있다. 현재까지 보고된 바에 의하면(Muller and Peter Kasper, 2000; Snyder and Green, 2001), 다양한 유전독성 시험 중 복귀돌연변이 시험에서 변이원성을 나타내는 물질은 인간에서 암을 유발할 가능성이 크기 때문에 특히 *S. typhimurium*에서 시험물질에 대한 변이원성측정은 큰 의미가 있다고 할 수 있다.

담배의 안전성 평가에 널리 사용되는 담배연기응축물(cigarette smoke condensate)의 제조를 위해 자동 흡연장치를 이용해서 FTC(Federal Trade Commission) 또는 ISO(International Organization

for Standardization) 등의 기관에서 정한 표준흡연 조건(puff volume: 35 mL, puff frequency: 60 sec, puff duration: 2 sec)이 이용되고 있다(Peeler, 1996; ISO, 2000a). 그러나 최근에는 담배흡연 행태 연구를 통해서, 보다 강화된 흡연조건으로 담배를 연소시키는것에 대한 논의가 이루어지고 있고, 실제 규제에도 적용하고 있다(Massachusetts General Laws Annotated, 1997).

따라서 본 연구에서는 ISO 표준흡연조건과 강화된 흡연조건인 캐나다 흡연조건(CI)으로 2R4F 표준담배를 연소하여 제조한 TPM, GVP, 그리고 TPM+GVP 시료에 대한 세포독성 및 유전독성을 측정하고 연기성분과의 상관성에 대하여 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

Nutrient Mixture Ham's F-12 medium(Ham's F-12), fetal bovine serum(FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin solution, phosphate-buffered saline(PBS) 등은 GIBCO(Grand Island, NY, USA)제품을 사용하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO), mitomycin C(MMC), sodium dodecyl sulfate(SDS), colchicine, cyclophosphamide, neutral red 등은 Sigma(St, Louis, USA) 제품을 사용하였다. 대사활성제(S-9 mix)는 Moltox(Boone, NC, USA) 제품을 사용하였고, 대사활성제에 사용된 cofactor는 Wako Pure Chem.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 그 외의 유기용매들은 특급시약을 사용하였다.

### 담배연기 입자상 및 가스상 분석의 제조

담배 주류연의 포집을 위해 2R4F 표준담배를 ISO 3402(1999)에 따라 조화 시킨 후, Health Canada official method T-502(2004) 방법에 따라 담배를 연소시켰다. ISO 흡연조건 연소를 위해서, 표준 담배 10개피를 자동흡연장치(Heinrich Borgwaldt RM20/CS ; Germany)를 이용하여 ISO 흡연조건(puff volume: 35 mL, puff frequency: 60 sec, puff duration: 2 sec)하에서 연소시키고(ISO

4387, 2000a), 44 mm Cambridge filter pad를 이용하여 포집하였다. 캐나다 흡연조건 연소는 Health Canada method T-115(puff volume: 55 mL, puff frequency: 30 sec, puff duration: 2 sec, 필터 천공의 완전 막음)에 따라서 수행하였다(Health Canada, 1999a). 적당량의 DMSO를 사용하여 Cambridge filter pad로부터 농도가 10 mg/mL이 되도록 TPM을 추출해서 -70°C에 보관하면서 시험에 사용하였다. 담배연기로부터 가스상 분획(gas/vapor phase, GVP)의 제조를 위해 100 mL gas washing bottle을 사용하였다. 흡연조건에 따라 10 개비(ISO 흡연조건) 또는 3개비(캐나다 흡연조건) 담배시료를 자동흡연장치를 이용하여 연소시킨 후, Cambridge filter pad를 통과한 가스상 성분들을 10 mL의 ice-cold PBS(pH 7.4) 용액이 있는 gas washing bottle에 포집하였다. 최종 GVP의 농도가 10 mg TPM equivalent/mL이 되도록 PBS의 용량을 조정하였다. 이와 같은 방법으로 흡연한 담배연기로부터 제조한 GVP 용액 중 carbonyl 화합물은 Health Canada Official Method T-104 (1999b)에 따라서 분석하였다. TPM+GVP 시료는 TPM/DMSO 분획과 GVP/PBS 분획을 1:1로 희석해서 제조하였다.

#### 화학성분의 분석

담배연기 중 tar, 니코틴 등과 같은 일반연기분석은 ISO 3308(2000b)에 준하여, 2R4F 담배시료를 RM20 흡연 장치를 이용하여 연소시키면서 Cambridge filter pad를 사용하여 TPM을 포집하면서 분석하였다. 연기응축물 중의 니코틴분석은 ISO 10315(2000c)에 준하여 GC 분석을 실시하였다. 담배의 주류연 중 carbonyl 화합물은 Health Canada Official Method T-104(1999a)에 따라서 분석했으며, 휘발성 및 반휘발성 성분 역시 Health Canada Official Method T-116(1999c) 및 T-112(1999d)에 따라 ATD-400이 장착된 HP5890 GC를 이용하여 분석하였다.

#### 세포주 및 세포배양

실험에 사용한 Chinese hamster ovary (CHO-K1) 세포주는 한국세포주은행(KCLB)으로부터

분양받아 사용하였으며, 세포주기는 14±2시간이다. CHO-K1 세포는 10% FBS, 100 U penicillin/mL 와 100 µg streptomycin/mL이 포함된 Ham's F12 배양액을 사용하였다. 배양된 세포는 2~3일마다 0.25% trypsin-0.03% EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다. 세포주의 자연발생적 돌연변이 생성을 최소화하고자 구입 후부터 18번 미만으로 계대 배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 배양은 CO<sub>2</sub> 배양기(VISION, Korea)를 이용하여 포화 습도하에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태로 배양하였다.

#### 세포독성 시험

담배연기로부터 얻은 시험물질의 세포독성은 리소솜에 의한 neutral red 흡수 정도를 측정하는 Neutral red cytotoxicity assay 방법을 사용하였다(Borenfreund and Puerner, 1985). CHO-K1 세포(2×10<sup>4</sup> cells)를 96 well plate(n=6)에 이식해서 24 시간동안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 모든 실험에서 사용되는 대조군은 최고농도의 TPM에 첨가된 1%의 DMSO 또는 GVP에 첨가된 10%의 PBS 처리군으로 하였다. 시험물질의 처리 후 22±2 시간 동안 10% FBS, 100 U penicillin/mL 와 100 µg streptomycin/mL이 포함된 Ham's F12 배양액에서 배양했으며, 세포배양이 끝나면 배양액을 제거한 후 150 µL의 neutral red 용액(40 µg/mL)을 처리하여 37°C에서 배양하였다. 3 시간 경과 후 neutral red 용액을 제거하고, 200 µL의 고정액(0.5% formaldehyde-1% CaCl<sub>2</sub>)으로 세포를 세척하였다. 유기용매 용액(50% ethanol-1% acetic acid) 150 µL을 첨가해서 실온에서 15 분간 neutral red를 추출한 후 microplate reader(BIO-TEK, USA)를 사용해서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다.

#### 시험균주 및 배지

복귀돌연변이 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98 균주는 Molecular Toxicology

Inc.(USA)에서 구입하였다. 균주는 냉동 보관 되어 있는 시험균주 용액 50  $\mu$ L를 25 mL의 액체배지 (2.5% Oxoid Nutrient broth No. 2)에 접종해 shaking incubator를 이용하여 37°C에서 약 10 시간 배양한 후 사용하였다. 최소배지(minimal glucose agar plate)는 1.5% Bacto agar와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유해서 만들었고 Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl로 조제하였으며, top agar에는 0.05 mM의 histidine-biotin을 첨가하였다.

### 복귀돌연변이 시험

복귀돌연변이 시험은 Maron과 Ames(1983)의 방법에 따라 수행하였고, 특정성분들에 대한 돌연변이 유발성 검색을 위해서 *Salmonella typhimurium* 균주를 사용하였다. 시험물질의 처리는 대사활성효소계(S-9 mix)가 적용된 pre-incubation 방법으로 하였다. 5 mL 멸균 tube에 시험물질 0.1 mL과 S-9 mix 0.5 mL을 혼합하여 37°C에서 20분간 진탕 배양한 다음, 균배양액 0.1 mL과 고압증기 멸균한 top agar 2 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3 초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳게 하였다. 부형제균(음성대조균)은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조균은 양성대조물질 용액을 같은 방법으로 가하여 실시하였다. top agar가 굳은 후 플레이트 뚜껑을 닫은 상태에서 플레이트를 뒤집어 37°C에서 약 48 시간 배양 후 집락을 계수하였다.

### 소핵시험

CHO -K1세포( $5 \times 10^4$  cells/5ml)를 25 cm<sup>2</sup> 배양 flask (n=3)에 이식하여 48 시간동안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 모든 실험에서 사용되는 대조군은 최고농도의 TPM에 첨가된 DMSO 처리군으로 하였다. TPM의 처리시간은 대사활성계(S-9 mix) 유·무와 관계없이 3시간 처리 후 새로운 배양액으로 교환하여 21 시간 더 배양하였다. 상등액을 제거한 후 cytopsin을 이용해서 세포들을 슬라이드 클라스에 부착시킨 후 고정액(90% methanol)으로 9분간 고정시킨 다음 공기건조법으로 슬라이드를

제작하여 5% Giemsa 용액으로 30 분간 염색하였다. 양성 대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 대사활성계 미적용시에서는 MMC(0.5  $\mu$ g/mL)을, 대사활성계 적용시에는 cyclophosphamide(5  $\mu$ g/mL)을 사용하였다. 시험 농도당 1,000개의 세포를 광학현미경(Nikon microphot FXA, Japan)을 이용하여  $\times 1,000$  배율에서 소핵세포를 계수하였다. 정상핵의 1/3 크기의 핵을 소핵으로 판정하였으며, 하나이상의 소핵을 가지고 있는 세포를 소핵세포로 계수하였다.

### 통계학적인 방법

시료에 대한 세포독성의 수치는 EC<sub>50</sub> 값으로 표기하였다. EC<sub>50</sub> 값은 대조군에 비하여 50%의 생존율을 나타내는 시료의 농도이며, 용량-반응식을 이용하여 값을 구하였다. 세포독성 결과의 모든 EC<sub>50</sub> 측정값은  $\mu$ g/mL 또는 cig./Liter로 환산해서 표준편차와 함께 표시하였다. SPSS (version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA test를 실시하였다. 사후분석으로는 Duncan test를 통해서  $p < 0.05$ 의 수준에서 각 시험군과의 유의성을 검정하였다. 복귀돌연변이 시험 결과는 시료로부터 각 농도군 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균  $\pm$  표준편차와 용량상관성이 나타나는 초기농도 범위에서 구해진 기울기 값을 이용해서 계산된 활성도 값(Specific activity, revertants/mg TPM 또는 revertants/cig.)을 표시하였다. 돌연변이 유발성에 대한 시료들간의 유의적인 차이 ( $p < 0.05$ )는 선형회귀분석을 통해서 구해진 각각의 시료들에 대한 활성도 값에 대한 일원분산분석(ANOVA)과, 사후분석으로는 Duncan test를 이용하여 검증하였다. 소핵시험의 모든 측정값은 평균값 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, SPSS (version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA test를 실시하였고, 사후검정으로는 Dunnet's multiple-range test를 통해서  $p < 0.05$ 의 수준에서 처리군과의 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 흡연조건에 따른 연기 일반성분 이행량 변화

ISO 흡연조건 및 캐나다 흡연조건으로 연소시 2R4F 표준담배 연기 일반성분의 이행량을 비교하고자 TPM, tar, 및 nicotine 등을 측정하였다. Table 1에서와 같이 캐나다 흡연조건 경우 개피당 TPM, tar, nicotine 및 CO의 이행량이 각각 43.84 mg, 35.14 mg, 1.43 mg 및 34.18 mg으로 ISO 흡연시 보다 2-4배 높았다. 또한 연기성분 중 nicotine/tar 비가 ISO 흡연조건시 8%에서 캐나다 흡연조건 시 4%로 감소하였다. 이와같은 결과는 여러 종류의 담배를 이용한 다양한 흡연조건에의 연기성분 분석 결과, 강화된 흡연조건에서 nicotin/tar 비가 감소한다는 보고(Counts *et al.*, 2005)와 일치하는 것이다.

**흡연조건에 따른 세포독성 변화**

화학물질에 대한 *in vitro* 세포독성은 다양한 방법들에 의해 측정되어지고 있으며, 특히 담배 TPM 시료에 있어서는 neutral red uptake 법이 가장 효과적이라고 알려져 있고, CORESTA에서도 이 방법을 표준방법으로 권장하고 있다(Bombick *et al.*, 2001). 본 연구에서도 CHO-K1 세포를 이용한 neutral red uptake 법을 사용해서 흡연조건에 따른 TPM, GVP 및 TPM-GVP 혼합물(T+G)에 대한 세포독성을 측정, 비교하였다. 담배 주류연의 세포독성에 대한 흡연조건에의 영향을 조사하기 위하여 ISO 흡연조건 및 캐나다 흡연조건으로 권련을 연소시켜 시료를 제조하였다.

Fig. 1 에서와 같이, 2 가지 흡연조건을 통해 제조한 모든 시료를 40-160 ug/ml 처리 시 농도의존적으로 세포 생존율이 감소되었다. 특히 TPM 및 T+G 시료의 경우 ISO 흡연조건에서 세포생존율이 보다 급격하게 감소하였으며, GVP 시료의 경우, 같은 농도 처리시 캐나다 흡연조건에서 세포생

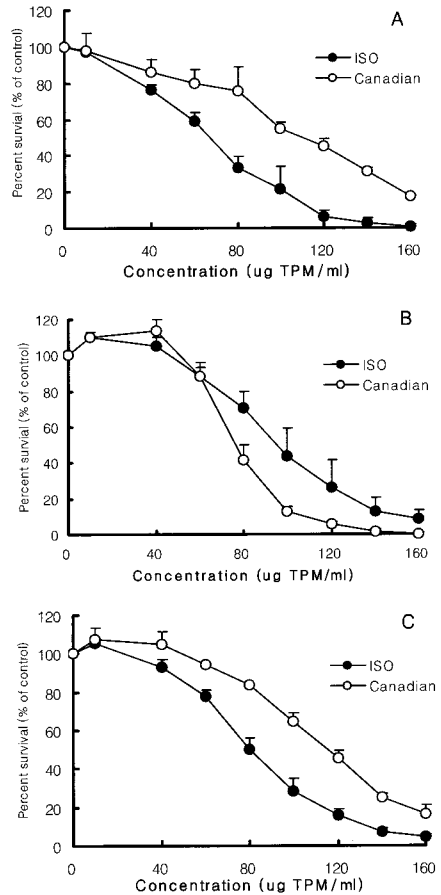


Fig. 1. Cytotoxic response with increasing concentration of TPM(A), GVP(B), and TPM+GVP(C) obtained under ISO and Canadian Intense smoking conditions. CHO-K1 cells were incubated in the presence of various doses of smoke fractions for 24 hr. The cytotoxicity was determined by neutral red uptake assay and calculated as a percentage of the control. Data were expressed as mean±SD.

Table 1. Yields of TPM, puff, tar, nicotine, and CO in mainstream smoke under ISO and Canadian Intense smoking conditions

Smoking condition	Puff (Puff No)	TPM (mg/cig.)	Tar (mg/cig.)	Nicotine (mg/cig.)	CO (mg/cig.)
ISO	8.57	10.71	9.52	0.76	12.55
Canadian	11.46	43.84	35.14	1.43	34.18

존율의 감소율이 증가하였다. 용량-반응식을 이용해서 구해진 ISO 및 캐나다 흡연조건의 TPM 단위 농도 당 EC<sub>50</sub> 값은 각각 51.7±1.3 및 95.7±4.8 ug-TPM/mL 이었고 T+G의 EC<sub>50</sub> 값은 각각 78.4±3.1, 109.6±6.8 ug-TPM/mL 로서 캐나다 흡연조건의 세포독성이 현저하게 낮았다(Table 2). 그러나 ISO 및 캐나다 흡연조건 GVP에 대한 TPM 단위 농도 당 EC<sub>50</sub> 값은 각각 96.1±13.6, 78.7±5.7 ug-TPM/mL로 캐나다 흡연조건에서 세포독성이 다소 높게 나타났다. 이와같은 결과는 다양한 담배를 대상으로 흡연조건에 따른 세포독성을 조사한 결과, TPM은 강화된 흡연조건에서, GVP는 ISO 흡연조건에서 상대적으로 낮은 세포독성을 보인다는 보고와 일치한다(Rickert *et al.*, 2007).

**흡연조건에 따른 복귀돌연변이 활성 변화**

화학물질의 돌연변이 유발성 측정에는 Maron과 Ames(1983) 등의 방법이 널리 사용되고 있다. 지금까지의 연구결과에 따르면 대사활성 효소계(S-9 mix) 처리시 담배 TPM 성분내 대한 돌연변이 활성의 민감도(sensitivity)가 높게 나타나는 것으로 보고되고 있다(Doolittle *et al.*, 1990). 따라서 본 연구에서는 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102를 이용하여 S-9 mix를

첨가한 대사활성법으로 흡연조건에 따른 TPM에 대한 돌연변이 유발성을 조사하였다.

용량설정 시험에서는 Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 모든 균주에서 대사활성 효소계 적용여부와 상관없이 최고농도인 400 ug/plate에 이르기까지 집락 수의 감소는 관찰되지 않았다. 한편, 모든 양성대조군에서는 집락수가 부형제대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다(Data not shown). 흡연조건 별 TPM 시료를 0-400 ug-TPM/plate 농도로 처리 시 TA100 및 TA98, TA1537균주에서는 최고농도군에 이르기까지 용량상관성 있는 집락 수의 증가가 관찰되었다. 특히 frame-shift형 돌연변이 검색 균주인 TA98과 TA1537에서 훨씬 현저하게 집락 수를 증가시켰다. 흡연 조건별 TPM에 대한 집락수의 증가는 ISO 흡연조건 시료의 경우 그 증가정도가 훨씬 현저하였다. 용량-반응 기울기를 이용해서 구해진 ISO 및 캐나다 흡연조건의 TPM 단위 농도 당 TPM에 대한 specific activity는 TA98의 경우 각각 2367±86, 724±59, TA100의 경우 각각 716±45, 184±53 그리고 TA1537의 경우 각각 386±23, 215±15로서 캐나다 흡연조건에서 돌연변이 유발성이 현저하게 낮았다(Table 3). 이와 같은 결과는, 다양한 흡연조건별로 권련연기의 돌연변이 유발성을 비교 조사한 결과, 강화된 흡연조건에서의 TPM 단위 농도 당 돌연변이 유발성이

Table 2. Cytotoxicity of TPM, GVP and TPM+GVP generated under ISO and Canadian Intense smoking conditions

Smoking conditions	Smoke fractions	EC <sub>50</sub> on the calculation basis	
		mg TPM	Cigarette
		mean±SD(ug/mL)	mean±SD(cigarettes/Liter)
ISO	TPM	51.7±1.3	5.24±0.13
	GVP	96.1±13.6	9.74±1.3
	TPM+GVP	78.4±3.1	7.95±0.31
Canadian	TPM	95.7±4.8	2.28±0.11
	GVP	78.7±5.7	1.88±0.1
	TPM+GVP	109.6±6.8	2.62±0.15

Values are the mean of three batches

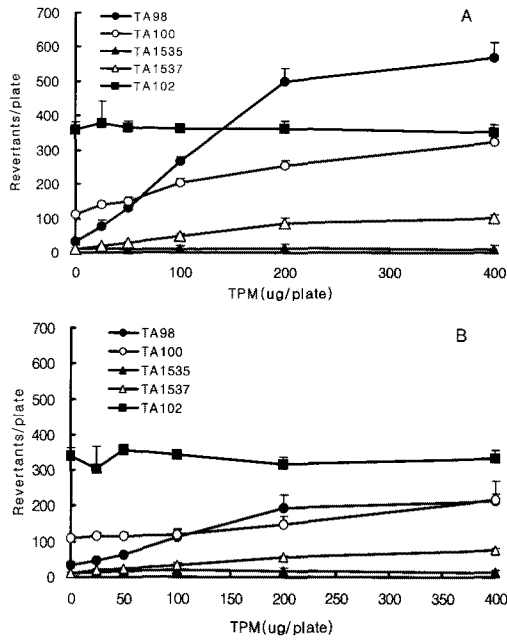


Fig. 2. Dose-response relationship obtained in the *Salmonella*(Ames) assay with TPMs generated under ISO(A) and Canadian Intense(B) smoking conditions in strains TA98, TA100, TA102, TA1535, and TA1537. The *Salmonella typhimurium* strains with an S9 metabolic activation system were utilized to examine the potential of the cigarette smoke condensate to induce mutation. The number of revertant colonies in DMSO-treated (0.1 mL/ plate) group was 35±6. Values are the mean±SD of three TPM batches.

낮다는 보고와 일치한다(Rickert *et al.*, 2007).

**흡연조건에 따른 소핵생성능 변화**

*In vitro* 소핵시험에는 대사활성제를 함께 처리하는 대사활성법과 직접법(대사활성제 미적용) 등이 있다. 본 연구에서는 neutral red 세포독성 측정방법에 의한 독성 결과를 근거로하여, 흡연조건별 TPM 시료에 대한 소핵생성을 비교하기 위하여 대사활성제 적용 및 미적용 두 방법을 수행하였다. 본 연구의 소핵시험에서는 대부분 하나의 핵을 가진 세포에서 소핵이 관찰되었고, 1,000개 세포로부터 소핵 세포를 계수하였다.

예비독성시험에서 결정된 약 50% 이하 세포독성을 가지는 6 단계의 농도(0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 µg/mL)로 TPM을 3시간 처리 한 후(대사활성제 적용 및 미적용) 새로운 배양액으로 세척한 후 21시간 더 배양하여 소핵세포 생성율을 비교한 결과, TPM의 처리농도가 증가함에 따라 소핵세포가 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 대사활성제 미적용 소핵시험에서 TPM 농도 100 ug-TPM/mL 처리시 ISO 및 캐나다 흡연조건의 소핵세포수는 각각 19.5±5.8 그리고 8.5±2.1로서 ISO 흡연조건 TPM의 소핵생성율이 높게 나타났다. 대사활성제 적용 소핵시험에서는 미적용시보다는 소핵세포 생성율이 낮았으나, 2가지 흡연조건별 TPM에 대한 소핵생성 차이는 없었다.

Table 3. Mutagenicity of TPMs obtained under ISO and Canadian Intense smoking conditions in the presence of S9 mix using strains TA 98, TA100, and TA 1537

Smoking conditions	Calculation basis	Mutagenicity (mean ± SD)		
		Tester strains		
		TA98	TA100	TA1537
ISO	Revertants/mg TPM	2,367±86	716±45	386±23
Canadian		724±59	184±53	215±15
ISO	Revertants/cigarette	23,362±848	7,067±444	3,810±227
Canadian		30,306±2,469	7,702±1200	8,999±628

Values are the mean of three batches

담배 주류연의 *in vitro* 생물학적 활성에 대한 흡연조건의 영향

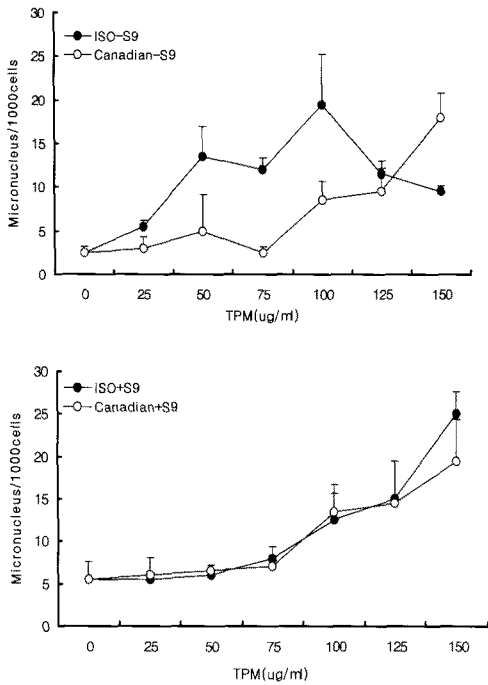


Fig. 3. Effect of TPM obtained under ISO and Canadian Intense smoking conditions on the induction of micronucleus in the presence and absence of S9. Cells were treated with various dose of TPM with or without S9 mix for 3 h and then cells were washed with media and replaced with fresh media. The cells were cultured for a further 21 hr prior to fixation and staining. Data were reported as mean±SD.

흡연조건에 따른 연기 특수 성분 이행량 변화

담배연기의 생물학적 독성은 입자상 및 가스상에 포함되는 여러 가지 화학 성분들과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Hoffmann *et al.*, 2001). 특히 1,3-butadiene, acetaldehyde, benzene, acrylonitrile 그리고 acrolein 등은 세포독성과 정의 상관성이 있다고 알려져 있다(Bombick *et al.*, 1997; Tewes *et al.*, 2003). 또한 aldehyde 화합물과 hydrocarbon 및 alcohol류 등은 담배연기의 세포독성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Curvall *et al.*, 1984). Cooper 등(1954)이 담배연기 성분 중 발암성 물질로서 benzo(a)pyrene을 최

초로 보고한 이후, PAHs 및 aromatic amines 등 다양한 성분들이 DNA 손상 및 adduct 형성에 관련이 있다는 연구결과들도 보고되고 있다(Manabe and Wada, 1990; Phillips, 2002). 또한 단백질의 열분해 과정 중 생성되는 heterocyclic amine류는 *Salmonella* test를 통해서 높은 돌연변이원 성으로 알려져 있다(Manabe and Wada, 1990). 본 연구에서는 흡연조건에 따른 *in vitro* 독성 결과를 이해하기 위해서, 흡연조건별 연기 특수 성분들에 대하여 조사하였다. 2R4F 표준담배를 ISO 흡연조건 및 캐나다

흡연조건으로 연소시킨 후 ammonia, HCN, acetaldehyde 외 7종의 carbonyl 화합물, 1,3-butadiene 외 7종의 volatile 화합물, hydroquinone 외 5종의 phenol 화합물, 4종의 N-nitrosoamines 그리고 4종의 aromatic amine류와 benzo(a)pyrene 이행량을 분석하였다.

Fig. 4 에서는, 각종 연기 특수성분의 함량을 단위 TPM당 값으로 환산하여 ISO 흡연조건을 기준

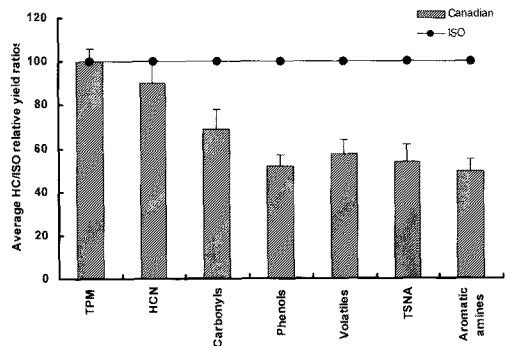


Fig. 4. Relative concentration of compounds of 2R4F under ISO and Canadian Intense smoking conditions. Carbonyls: Formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein, propionaldehyde, MEK, crotonaldehyde, butyraldehyde. Volatiles: 1,3-butadiene, acrylonitrile, isoprene, benzene, toluene, pyridine, quinoline, styrene. TSNA: NNN, NNK, NAT, NAB. Phenols: Resorcinol, phenol, catechol, m,p-cresol, o-cresol, hydroquinone. Aromatic amines; 1-aminoaphthalene, 2-aminoaphthalene, 3-aminobiphenyl, 4-aminobiphenyl, Benzo (a)pyrene.



으로 나타내었다. TPM 성분들에 포함된 aromatic amine 및 phenol 화합물의 함량이 ISO 흡연조건에 비해 캐나다 흡연조건에서 현저히 낮게 나타났다. 이와 같은 결과는 캐나다 흡연조건인 TPM에 대한 낮은 세포독성 및 돌연변이성을 잘 설명하는 것으로 사료된다. GVP에 대한 세포독성은 carbonyl 화합물 등과 같은 가스상 성분들이 PBS에 얼마나 잘 용해되는지 또한 얼마나 지속적으로 함유되어 있는지에 따라서 차이를 나타내는 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구는 담배흡연조건이 담배 주류연의 *in vitro* 생물학적 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해, ISO 표준조건 및 강화된 흡연조건인 캐나다 흡연(CI) 조건으로 2R4F 표준담배를 연소하여 얻은 고체상분획(TPM), 가스상분획(GVP) 및 TPM+GVP 혼합물의 *in vitro* 독성을 조사하였다. 담배연기의 세포독성은 CHO-K1 세포주를 이용한 neutral red uptake법을 사용해서 측정하였고, 유전독성은 염색체이상을 측정하는 소핵시험 그리고 돌연변이성을 측정하는 복귀돌연변이 시험을 실시하였다.

캐나다 흡연조건인 경우 TPM, tar, nicotine 및 CO의 이행량이 각각 43.84 mg/cig., 35.14 mg/cig., 1.43 및 34.18 mg/cig.으로 ISO 흡연시 보다 2-4배 높았다. 담배연기 TPM분획에 대한 *in vitro* 독성을 측정할 결과, TPM 단위 농도 당 세포독성 및 유전독성은 ISO 흡연조건에 비해 캐나다 흡연조건에서 현저히 낮았다. 이와 같은 결과는, TPM 단위 농도 당 TSNA, aromatic amines, 그리고 phenol 화합물 등의 이행량이 ISO 흡연조건에 비해 캐나다 흡연조건에서 현저히 낮게 측정된 결과와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test.

*Mutat. Res.* 31: 347-364.

Ashby, J., Brady, A., Elcombe, R., Elliott, B. M., Ishmael, J., Odum, J., Tugwood, J. D., Kettle, S. and Purchase, I. F. H. (1994) Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis, *Human & Exp. Toxicol.* 13: S1-S117.

Balls, M. and Clothier, R. H. (1992) Cytotoxicity assays for intrinsic toxicity and irritancy. In: Watson, R.R. (Ed), *In Vitro methods of Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 37-52.

Belinsky, S. A., Walker, V. E., Maronpot, R. R., Swenberg, J. A. and Anderson M. W. (1987) Molecular dosimetry of DNA adduct formation and cell toxicity in nasal mucosa following exposure to a specific carcinogen: Relationship to induction of neoplasia. *Cancer Res.* 47: 6058-6065.

Bombick, D. W., Bombick, B. R., Swauger, J. and Doolittle, D. J. (2001) The use of *in vitro* short term tests to evaluate progress toward reducing the toxicity of cigarette smoke. CORESTA Meet. Smoke-Techno Group, Xian: Paper No. ST4.

Bombick, D. W., Bombick, B. R., Ayres, P. H., Putnam, K., Avalos, J., Borgerding, M. F. and Doolittle, D. J. (1997) Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smokecondensate from a cigarette containing a novel carbon filter. *Fund. Appl. Toxicol.* 39: 11-17.

Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119-124.

Buckton, K. E. and Evans, H. J. (1973) Method for the analysis of human chromosome aberration. World Health Organization, Geneva, Switzerland pp.18.

- Chen, Q., Jones, T. W., Brown, P. C. and Steven, J. L. (1990) The mechanism of cysteine conjugate cytotoxicity in renal epithelial cells: Covalent binding leads to thiol depletion and lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 265: 21603-21611.
- Cooper, R. L., Lindsey, A. J. and Wallwe, R. E. (1954) The presence of 3,4-benzopyrene in cigarette smoke. *Chem. Ind.* 46: 14-18.
- Count, M. E., Morton, M. J., Laffoon, S. W. Cox, R. H. and Lipowicz, P. J. (2005) Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three achine-smoking conditions. *Regulatory Toxicol. Pharm.* 41: 185-227.
- Curvall, M., Enzell, C. R. and Pettersson, B. (1984) An evaluation of the utility of four *in vitro* short term tests for predicting the cytotoxicity of individual compounds derived from tobacco smoke. *Cell Biol. Toxicol.* 1: 173-193.
- Doolittle, D. J., Lee, C. K., Ivett, J. L., Mirsalis, J. C., Riccio, E., Rudd, C. J., Burger, G. T. and Hayes A. W. (1990) Comparative studies on the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Enviromental and Molecular Mutagenesis* 15: 93-105.
- Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.
- Fenech, M. and Morley, A. A. (1985) Measurement of micronucleic in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147: 29-36.
- Health Canada (1999a) Determination of selected carbonyls in mainstream tobacco smoke. Tobacco Control Program Health Canada- Official method T-104.
- Health Canada (1999b). Determination of tar, Nicotine and Carbon Monoxide in Mainstream Tobacco Smoke. Official method T-115.
- Health Canada (1999c). Determination of 1,3-butadiene, isoprene, acrylonitrile, bensene, and toluene in mainstream tobacco smoke. Official method T-116.
- Health Canada (1999d). Determination of pyridine, quinoline and styrene in mainstream tobacco smoke. Official method T-112.
- Health Canada (2004). Neutral Red Uptake Assay for Mainstream Tobacco Smoke. Official method T-502.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I. and El-Bayoumy, K. (2001) The less harmful cigarette : a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 767-790.
- ISO Standard 3402, fourth ed., (1999) International Organization for Standardization. Tobacco and tobacco products-atmosphere for conditioning and testing.
- ISO Standard 4387, third ed., (2000a) International Organization for Standardization. Cigarettes-determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine.
- ISO Standard 3308, fourth ed., (2000b) International Organization for Standardization. Routine analytical cigarette smoking machine-definitions and standard conditions.
- ISO Standard ISO 10315, second ed. and Corrgendum I, (2000c) International Organization for Standardization. Cigarettes determination of nicotine in smoke condensates-gas chromatographic method.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and VanHummelen, P. (1997) The *in vitro* micronucleus test : a multipoint assay to detect simutaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* 392: 19-30.
- Manabe, S. and Wada, O. (1990) Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in cigarette smoke condensate and cigarette smoke-polluted indoor air. *Environ. Pollute.* 64:

- 121-132.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Massachusetts General Laws, (1997) Chapter 94, Sect. 307B, 105 Code of Massachusetts Regulations 660.000 et seq.
- Miller, S., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998) Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* micronucleus test. *Mutat. Res.* 410: 81-116.
- Mortelmans, K. and Errol Zeiger, E. (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455: 29-60.
- Muller, L. and Peter Kasper, P. (2000): Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 464: 19-34.
- Peeler, C.L., (1996) Cigarette testing and the Federal Trade Commission: A historical overview. In: The FTC Cigarette Test Method for Determining Tar, Nicotine, and Carbon Monoxide Yields of U.S. Cigarettes; Report of the NCI Expert Committee. Smoking and Tobacco Control Monograph No. 7. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute, Bethesda, MD, NIH Pub. No. 96-4028 (Chapter 1).
- Phillips, D. H. (2002) Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* 23: 1979-2004.
- Rickert, W. S., Trivedi, A. H., Momin, R. A. Wright, W. G. and Lauterbach, J. (2007) Effect of Smoking Conditions and Methods of collection on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Cigarette Mainstream Smoke. *Toxicol. Sci.* 96: 285-293.
- Sanders, C., Swedlund, T. D., Stephens, T. J. and Silber, P. M. (1991) Evaluation of six *in vitro* toxicity studies: Comparison with *in vivo* ocular and dermal irritation potential of prototype cosmetic formulations. *Toxicologist* 11: 282-289.
- Shirhatti, V. and Krishna, G. (1990) A simple and sensitive method for monitoring drug induced cell injury in cultured cells. *Analytical Biochemistry* 147: 410-418.
- Tewes, F. J., Meisgen, T. J., Veltel, D. J., Roemer, E. and Patskan, G. (2003) Toxicological evaluation of electrically heated cigarette. Part 3: genotoxicity and cytotoxicity of mainstream smoke. *J. Appl. Toxicol.* 23: 341-348.
- Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M., Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R. F., Nguyen-Ba, G., Parooi, S., Rivedal, E., Schiffmann, D., Simons, J. W. and Vasseur, P. (1996) Non-genotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a european project. *Mutat. Res.* 353: 47-63.