

14-나

내분비 장애물질에 의해 유도된 생식독성을 이용한 생식독성물질 검출용 키트 및 이를 이용한 검출 방법

내분비 장애물질(EDCs: Endocrine disrupting chemicals 또는 Endocrine disruptors)에 의하여 유도되는 생식독성물질 검출용 마이크로어레이 칩, 이를 포함하는 생식독성물질 검출용 키트



I · 기술소개

❖ 내분비 장애물질에 의해 유도된 생식독성을 이용한 생식독성물질 검출용 키트 및 이를 이용한 검출 방법

1. 기술분야 및 해결과제

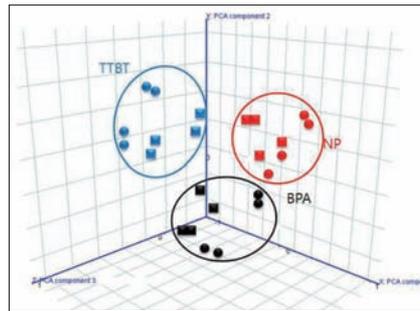
■ 기술분야

- 내분비 장애물질(EDCs: Endocrine disrupting chemicals 또는 Endocrine disruptors)에 의하여 유도되는 생식독성물질 검출용 마이크로어레이 칩, 이를 포함하는 생식독성물질 검출용 키트
 - 내분비 장애물질이란 사람이나 동물의 내분비 호르몬과 유사하게 작용하는 외인성 화학물질로 내분비계의 정상적인 기능을 방해하여 생태계 및 인간의 생식기능저하, 기형, 성장장애, 암 등을 유발하는 물질임¹⁾
- 마이크로어레이 칩을 포함한 생식독성물질 검출 키트를 생식독성물질 시험 및 모니터링에 활용

〈 EndoTox DNA chip 〉



〈 생식독성 시험 · 평가 〉



■ 해결해야할 과제

- (기전연구의 한계) 고전적인 내분비 장애물질 평가는 생화학, 혈액학, 병리학적기법과 같이 표현형을 보고 판정하는 방법으로 이루어지기 때문에 정확한 기전연구가 어려움
- (모니터링의 한계) 내분비 장애물질은 소량으로 장기적으로 환경에 노출되는 경향이 있으며, 장기적으로 축적될 경우 모니터링에 어려움이 있음

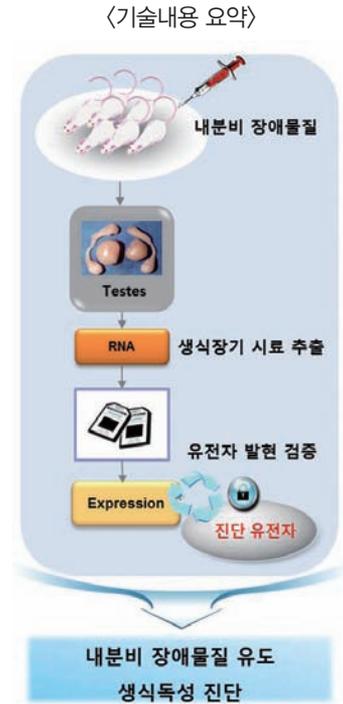
1) 내분비계장애물질에 대한 이해와 미래 연구방향, 대한내분비학회지 제24권 제1호, 2009

- (평가의 한계) 동물실험 위주의 고전 방식으로는 기하급수적으로 증가하고 있는 인체 유해물질 및 신약후보물질의 안전성 및 독성 평가에 한계가 있음

2. 기술의 개요

■ 기술 내용

- 생체외 실험으로 마우스 모델을 이용한 생식독성 및 생체내 실험으로 마우스 유래의 정소 조직의 지지세포(Sertoli cell)를 이용함
- 대표적 내분비 장애물질(비스페놀 A, 노닐페놀, 디에틸stil베스트롤, 테트라부틸틴)을 처리하고 마이크로 어레이 실험을 수행함으로써 내분비 장애물질에 의해 유의적으로 변화하는 유전자 군을 선별함
- 선별된 유전자의 단편을 집적한 마이크로어레이 칩을 제공하고, 다양한 마우스 유래의 생식계 관련 동물 세포주를 이용하여 내분비 장애물질에 노출되었을 때 유전자의 발현변화를 검증함
- 본 기술을 통하여 내분비 장애물질과 같은 인체 유해물질의 독성평가를 마이크로어레이법을 이용하여 유전자 발현분석을 통한 내분비 장애물질 검출법을 제시함
 - 생체내 외 실험을 통해 내분비 장애물질을 처리하고 마이크로 어레이 실험 수행
 - 내분비 장애물질에 의해 유의적으로 변화하는 유전자 군 선별
 - 선별된 유전자의 단편을 집적한 마이크로어레이 칩 제공
 - 마우스 유래의 생식계 관련 동물 세포주를 이용하여 유전자의 발현 변화 검증
 - 마이크로어레이법을 이용하여 유전자 발현분석을 통한 내분비 장애물질 검출법 제시



〈 본 기술의 생식독성 평가 대상 내분비계 장애물질 〉

명 칭	인체에 미치는 영향
비스페놀 A	- 폴리카보네이트나 에폭시수지와 같은 플라스틱 제품의 원료로 사용 - 합성에스트로겐으로 작용하여 정자 수 감소, 생식 계통 기능 방해, 암 유발
노닐페놀	- 가정용 세정제, 섬유유연제, 페인트첨가제, 잉크 바인더 등의 계면활성제로 사용 - 안드로겐의 활성을 방해하여 남성 생식기능 저하, 일부 세포에 작용하여 세포 사멸
디에틸stil베스트롤	- 여성호르몬인 에스트로겐과 같은 작용을 하여 정상적인 에스트로겐의 역할을 교란시킴으로써 생식독성 유발 - 남성 생식독성으로는 생식계 호르몬인 테스토스테론 감소, 정소 조직의 지지세포(Sertoli cell)의 정상적인 발생 이상 유발, 정소 조직의 암 유발
테트라부틸틴	- 유기금속화합물로 플라스틱 첨가제, 산업용 촉매 등으로 사용 - 독성으로 인한 생태계 교란 현상 발견에 따라 점차 사용 금지

■ 기술적용분야

- 진단용 DNA chip(바이오메드랩의 HPV진단, 결핵진단 등), 마크로젠의 염색체이상진단(BAC chip), 지노믹트리의 SARS진단 등
- 칩기반 화학물질 검출용 바이오 센서, 랩온어칩 등

■ 기술응용분야

- 독성유전체학을 기반으로 한 생식독성 평가
- 내분비 장애물질에 대한 생식독성의 연관성 정보를 활용한 생식독성 기전 연구
- 모니터링, screening 등을 통해 위험성을 분류하고 경고 및 규제에 활용 가능

3. 기술의 구성

【 생체내 · 외 시스템을 이용한 화학물질 처리 및 전체 RNA 분리 기술 】

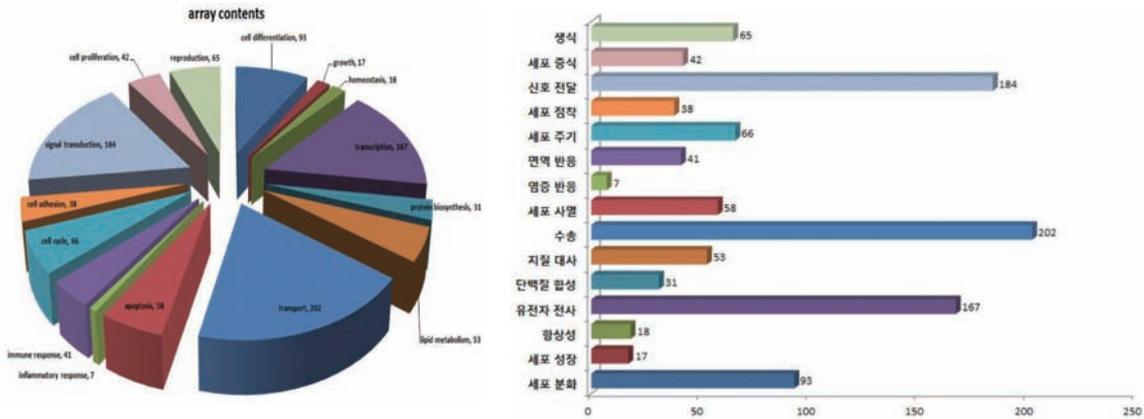
- (1단계 : 생체의 시스템을 이용한 화학물질 처리) 마우스의 TM4 세포를 배양하여 TM4 세포주에서의 세포 독성 실험을 실시하여, 시험 화합물들과 세포독성 사이의 관계를 적정하여 60~70 % 생존율을 보이는 농도를 확인하고 이를 마이크로 어레이 분석에 사용함
- 비스페놀 A(20 mg/ml), 노닐페놀(4 mg/ml), 디에틸스틸베스트롤(6.7 mg/ml)
- (2단계 : 생체내 시스템을 이용한 화학물질 처리) 마우스에 비스페놀 A, 노닐페놀을 투여하여 적절한 정소 조직의 지지세포(Sertoli cell)를 마이크로 어레이 분석에 사용함
- (3단계 : 전체 RNA 분리) 1, 2단계에서 확보한 각 화학물질 처리군 및 대조군 시료를 Trizol 시약을 이용하여 전체 RNA를 분리함

【 마이크로 어레이 기술 】

- (1단계 : 표지된 전체 cRNA 제조) 참조 대조군 및 화학물질 처리 시험군의 전체 RNA를 사용하여 cDNA를 제조 · 증폭한 후, 합성된 cDNA로부터 다시 cRNA를 합성한 후, 알콜 침전형성을 사용하여 혼합 · 정제함
- (2단계 : 혼성화 반응) 12 시간 동안 65 °C 혼성화 오븐에서 혼성화를 수행함
- (3단계 : 형광 이미지 획득) 스캔한 이미지를 분석하여 확보한 유전자 발현 비율 데이터로부터 선행실험(마우스 세포주 및 동물실험) 결과 내분비 장애 물질 특이적 발현 변이 바이오마커(biomarker)²⁾로 판정된 유전자를 선별함

2) DNA, RNA, 대사물질, 단백질 및 단백질 조각(protien fragments) 등에서 유래된 단일 분자 또는 분자들의 패턴을 근거로 한 분자적 정보로서, 생명체 내에서 유전적 또는 후생 유전적 변화의 영향으로 유발된 신체의 변화를 감지할 수 있는 지표

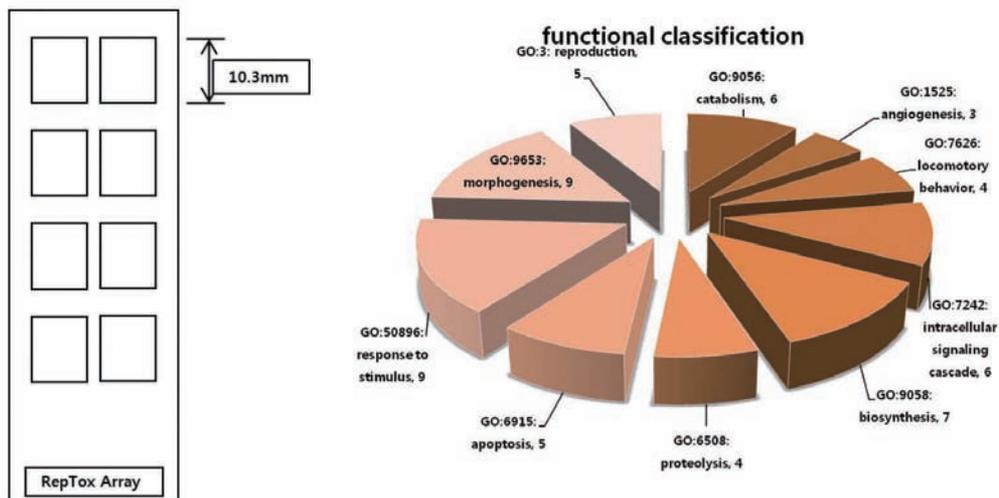
〈 바이오마커로 선정된 유전자들의 기능적 분류 〉



【 생식독성물질 검출용 마이크로어레이 칩의 제조 】

- (1단계 : 마이크로어레이 제조) 선별한 유전자 프로브를 사용하여 마이크로어레이 칩 제조
- (2단계 : 재현성과 신뢰성 검증) 제조된 마이크로어레이 칩을 사용하여 특정 생식독성물질에 노출된 두 가지 세포주 샘플의 발현 유전자 조사를 수행함으로써 재현성 및 분석 가능성 검증

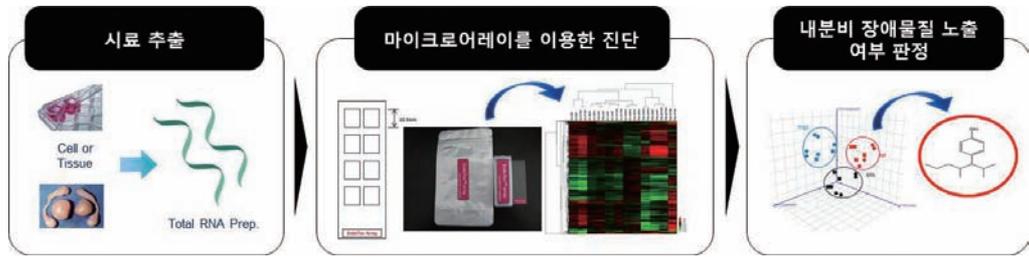
〈 마이크로어레이의 배열 모식도(좌)와 검증실험 결과 바이오마커의 분류(우) 〉



4. 기술의 특징

- 유전자 수준의 최첨단기술의 마이크로어레이 및 생물정보학 기술의 통계적 수치를 이용함으로써, 소량으로 환경계에 노출되어 장기 축적되는 내분비 장애물질을 스크리닝 하는데 있어 질적으로 우수
 - 내분비 장애물질에 대한 gene expression, miRNA 조절, CGH 이상 등을 분석한 통합적인 유전체 정보 확보 및 내분비 장애물질에 대한 생식독성 모니터링 DNA chip은 세계 최초임
 - 내분비 장애물질에 대한 생식계 genome profiling 데이터는 향후 위해성 검증을 위한 기초자료로 활용 가능함

〈 내분비 장애물질 진단 프로세스 〉



- 기존 마이크로어레이칩은 생물체의 전체 유전자를 포함하고 있기 때문에 유전자 발현 분석에 시간과 비용이 많이 소요되는데 반해 본 기술은 내분비 장애물질 특이적 유전자만을 포함한 검출용 키트를 제공

5. 기술의 기대효과

■ 사회적 기대효과

- 내분비 장애물질을 가려낼 수 있는 유용한 생물학적 지표인 바이오마커로 판정된 유전자를 선정하여 내분비 장애물질의 작용기전 파악 및 내분비계 장애 메커니즘 연구에 기여
- 내분비장애물질에 대한 분자수준의 후보 생물지표를 제안함으로써 독성유전체학(toxicogenomics)을 기반으로 한 생식독성 평가 기술 개발 및 실질적인 생물학적 반응에 대한 환경의 특성을 고려한 환경유전체학(ecotoxicogenomics) 연구에 기여
- 내분비 장애물질의 작용기전을 규명하여 내분비 장애물질에 의한 생식기 장애, 정자 운동성 감소, 난소 기능 저하 등 사람에게 미치는 영향과 생태계에 대한 영향을 감소시키는데 기여
 - 내분비 장애물질은 생식기 장애로서 요도밀열림증(hypospadias), 잠복고환증(cryptorchidism), 가성반음양(pseudohermaphroditism) 등의 생식기 발육이상을 유발하고 고환, 전립선 및 유방암 증가 및 남성 정자 운동성 감소의 중요한 원인으로 추정됨³⁾

■ 경제적 기대효과

- 내분비 장애물질에 의한 생식계의 위해성 평가는 최근 DNA칩과 같은 고속화 기술이 개발되어 왔음에도 불구하고 고전적인 독성시험법을 통해서만 이루어져 왔음
- 내분비 장애물질에 대한 생식독성 분석 시 경제적인 부담이 컸으나 본 연구를 통해 개발된 독성유전체 기반 독성평가기법은 향후 독성평가 시간을 단축할 것으로 기대됨

■ 산업적 기대효과

- 보건의료 분야 독성시험 등에서 바이오칩 신규 수요를 창출하여 관련 산업인 바이오칩 시장의 성장에 기여
- 특히 연구 및 진단용 DNA칩 분야 국내 기업의 기술 경쟁력 확보 및 제품 다양화에 기여할 것으로 기대됨

3) 내분비계 장애물질, 대한의사협회지

II · 관련특허

1. 서지사항

NO	발명명칭	출원국가	출원일	출원번호	등록일	등록번호
1	내분비 장애물질에 의해 유도된 생식 독성을 이용한 생식독성물질 검출용 키트 및 이를 이용한 검출 방법	대한민국	2011.02.25	10-2011-0017356	2014.01.15	10-1354023

2. 특허의 요지

발명명칭	내분비 장애물질에 의해 유도된 생식독성을 이용한 생식독성물질 검출용 키트 및 이를 이용한 검출 방법		
출원일자	2011년 02월 25일	출원번호	10-2011-0017356
대표도면		핵심내용	
		<ul style="list-style-type: none"> - 본 발명은 내분비 장애 물질에 의하여 유도되는 생식 독성물질 검출용 마이크로어레이 칩, 이를 포함하는 생식독성물질 검출용 키트 및 이를 이용한 생식독성 물질 검출 방법에 관한 것임 - 동물시험을 위주로 하는 고전적 독성시험만으로는 기하급수적으로 증가하고 있는 내분비 장애물질을 포함하는 인체 유해물질 및 신약후보물질의 안전성 및 독성 평가에 한계가 존재함 - 본 발명은 생체내·외 실험으로 대표적 내분비 장애 물질로 알려진 비스페놀 A, 노닐페놀, 디에틸stil베 스톨을 처리하고 마이크로 어레이 실험을 수행하여, 내분비 장애물질에 의해 유의적으로 변화하는 유전자군을 선별하여, 선별된 유전자의 단편을 집적한 마이크로어레이 칩을 제공함 - 본 발명에 따른 마이크로어레이를 통하여 내분비 장애 물질에 의하여 유도되는 생식독성의 작용 기작을 규명하고, 실질적인 생물학적 반응에 대한 환경의 특성을 고려한 환경 유전체학(ecotoxicogenomics) 연구에 사용할 수 있음 	

Ⅲ·시장성/사업성 분석

1. 시장현황

- (정의) 본 기술이 적용되는 application인 바이오칩은 작은 기판 위에 DNA, 단백질 등 생물의 몸 안에 있는 다양한 성분들을 결합시켜 유전자 결합, 단백질 분포, 반응 양상 등을 분석해 낼 수 있는 생물학적 마이크로칩
- (종류) 형태에 따라 크게 마이크로어레이(Microarray)와 마이크로플루딕스(Microfluidics) 칩으로 구분
 - 본 기술은 DNA Chip, Lap-On-a-Chip 등에 적용 가능

〈 바이오칩의 종류 〉

구 분	특 징	
Microarray Chip	DNA Chip	DNA probe가 내장된 칩
	Protein Chip	효소나 항체/항원 등과 같은 단백질이 사용된 칩
	Cell Chip	동물/식물 세포를 이용한 세포칩
	Neuron Chip	신경세포를 직접 사용한 칩
Microfluidics Chip	Lab-On-a-Chip	시료의 전처리, 생화학반응, 검출, 자료 해석기능을 소형 직적화 한 자동 분석기능을 가지는 칩

* 출처 : 한국보건산업진흥원, 바이오칩 최근 기술이슈 및 시장동향(2005)

- (활용 분야) 보건의료를 비롯, 환경, 정밀화학, 식품/생물공학, 정보/전자 등 다양한 분야에서 활용
 - 본 기술은 바이오칩 기술 응용 분야 중 보건의료 분야(독성시험 등)에 해당

〈 바이오칩 기술의 응용분야 〉

분 야	내 용
보건의료	혈액검사, 유전자분석, 기능적 Genomics, Proteomics, 자가진단, 임상용 진단시약/키트/센서, 동물센서, 실험동물 대체용 독성시험 등
환경	BOD 센서, 수질 및 해양오염 감시, 오염물질 검출 및 분석, 중금속/독성 폐기물 검출, 위험물/생화학무기검출, m-TAS(Total Analysis System), Bioremediation
정밀화학	생리활성 의약품료 개발(항생제/항암제/호르몬제/백신류), 화장품 제조 및 시험, 효소 및 생화학 시약류, 농약제조 및 분석, 조합화학, HTS 시스템
식품/생물공학	식품/안전성검사, 동식물 질병진단, 육류/농산물 품질관리, 생물공정계측 및 제어, 생물생산시스템
정보/전자	가전응용, 개인 식별/보안시스템, 가상현실 시스템, 비디오게임, 후각 인터페이스, 가정 검침, 인공지능망, 신경형 시각칩, 생물전자 소자, 바이오 컴퓨터

* 출처 : ETRI 정보조사분석팀, 전세계 바이오칩 시장동향(2002), 한국과학기술정보연구원, 바이오칩 기술의 경제적 가치평가(2005)에서 재인용

■ 해외 시장동향

- 미국이 전 세계 시장의 절반 가량을 차지하며 미국, 유럽, 일본 등 선진국이 전 세계 시장의 약 90%로 대부분을 차지
- 북미와 유럽에서 바이오칩의 개발을 주도하고 있으며, 주요 기업으로 Affymetrix는 GeneChip 시스템을 제작하여 1996년부터 판매하였으며, BioRobotics는 MicroGrid에 기반한 4가지 마이크로어레이를 제공, Caliper Technologies는 Lab-on-a-chip 기술의 리더로 LabChip 시스템을 개발하여 판매

■ 국내 시장동향

- 1999년부터 시장이 형성되기 시작하였으며 DNA칩이 전체 바이오칩 시장의 약 80%를 차지
- DNA chip 분야 국내 기업은 마크로젠, 디지털지노믹스, 지노책, 지노믹트리, 서린바이오사이언스 등이 있으며, 마크로젠은 진단용 arrayCGH 칩을 생산 및 판매하며, 지노책은 연구/진단용 DNA칩 및 진단 키트를 개발

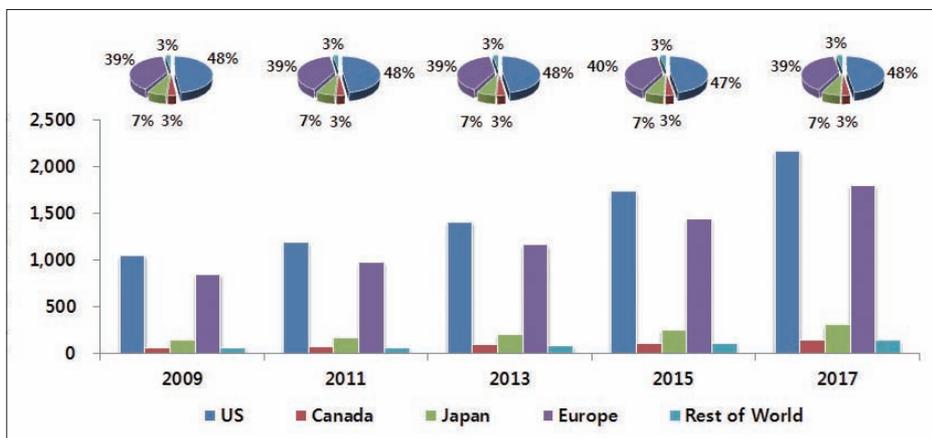
〈 국가별/지역별 바이오칩 시장 전망 〉

(단위 : 백만달러)

국가/지역	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	CAGR
미국	1,053	1,116	1,195	1,293	1,412	1,559	1,740	1,944	2,176	9.50%
유럽	854	913	983	1,067	1,171	1,297	1,450	1,619	1,806	9.81%
일본	150	160	172	187	205	227	255	284	315	9.70%
캐나다	70	74	80	86	95	105	117	130	145	9.42%
기타	59	64	70	78	87	98	112	127	143	11.68%
합계	2,187	2,327	2,500	2,711	2,970	3,286	3,673	4,104	4,584	9.69%

〈 바이오칩 시장 〉

(단위 : 백만달러)



* 출처: 생명공학정책연구센터, 2013년 상반기 BioIndustry 글로벌 산업동향(2013)

2. 시장전망

- 보건의료 분야 바이오칩의 해외 시장은 2014년 943백만 달러에서 2018년 1,443백만 달러, 국내 시장은 2014년 60억원에서 2018년 92억원 규모로 성장할 전망
- 바이오칩은 다양한 분야에서 활용되므로, 전체 바이오칩 시장에서 생식독성 시험 분야를 포함하는 최종 수요자가 보건의료(28.7%)인 시장을 타겟시장으로 선정

〈 바이오칩 최종 수요자별 시장 점유율 〉

구 분	시장 점유율
Healthcare	28.7%
Research	23.4%
Military/Defense	24.8%
Environmental	14.8%
Industrial	6.1%
Other	2.3%
Total	100%

* 출처 : DedalusConsulting, Inc., Biochips & BioMEMS(2005)
한국과학기술정보연구원, 바이오칩 기술의 경제적 가치평가(2005)에서 재인용

〈 국내·외 보건의료 분야 바이오칩 시장규모 〉

(단위 : 백만달러(해외), 억원(국내))

관련 제품	시 장	1차년도 (2014)	2차년도 (2015)	3차년도 (2016)	4차년도 (2017)	5차년도 (2018)
바이오칩 (보건의료)	해 외	943	1,054	1,178	1,316	1,443
	국 내	60	67	75	84	92

* 출처 : 생명공학정책연구센터, 2013년 상반기 BioIndustry 글로벌 산업동향(2013)
대덕특구본부, Biochip 분석 보고서(2006), (주)기술과가치에서 재가공

- 1) 보건의료 분야 시장규모는 전체 바이오칩 시장규모의 28.7%로 가정
- 2) 바이오칩 국내 시장규모(2009년 140억원 규모)는 세계 시장의 0.46%로 가정(2009년 환율 1\$=1,400원 가정)
- 3) 2018년 해외 시장규모, 2014~2018년 국내 시장규모는 CAGR 9.69%(2009~2017년 세계시장 성장률)를 적용하여 산정

3. 사업화를 위한 요구사항

사업화와의 연계성	<ul style="list-style-type: none"> - 내분비 장애물질 검출을 위한 데이터베이스로 활용 가능 - 진단·검출 키트로 제작 시 실용화 제품 수요 예상 - 생식독성물질 종류 다양성을 확보하여 마이크로 어레이의 장점을 살려야 실용성 높을 것으로 판단
사업화를 위한 보완 사항	<ul style="list-style-type: none"> - 대표적 생식독성물질을 추가하여 DNA 마이크로어레이에 적용 필요 - methylation 분석과 같은 후성학적 분석 보완 시 생식독성 평가에 더욱 유용

* 출처 : 안전성평가연구소, '유해물질에 의한 생식계 염색체 이상 판정기술 개발' 최종보고서(2011)

IV·기술개발 과제요약

1. 연구내용

- ▶ in vitro 및 in vivo 시험계를 이용한 내분비 장애물질의 생식독성 평가
- ▶ 다양한 포맷의 microarray (gene expression, aCGH, miRNA)를 이용한 생식독성 관련 genome profiling 데이터 확보
- ▶ 유전자 발현 분석을 통한 생식독성 유발 기전 연구 및 특이적 유전자군 선별
- ▶ 내분비 장애물질에 대한 생식독성 모니터링 DNA chip 제작 및 검증

2. 소요기간 : 2008년 4월 ~ 2011년 2월 (36개월)

3. 소요비용 : 총예산 4.65 억원

2008	2009	2010	2011	2012
1.4 억원	1.6 억원	1.65 억원	-	-

4. 소요인재 : 총인재 17 명 (실제 투입된 총인력)

2008	2009	2010	2011	2012
9명(M/Y)	14명(M/Y)	11명(M/Y)	-	-

5. 과제목표

- ▶ 환경유해물질에 의한 in vitro 및 in vivo 시스템의 유전자 발현 변화 및 염색체 이상에 대한 genome profiling 데이터 구축
- ▶ 생식계 독성관련 유전자를 바탕으로 유해물질에 대한 분자수준의 모니터링 시스템 구축

6. 개발과제

- ▶ 참여기관 : 안전성평가연구소
- ▶ 연구책임자 : 안전성평가연구소 / 본부장 / 윤석주
- ▶ 참여연구자 : 안전성평가연구소 / 선임연구원 / 오정화 (생식독성 유전자 profiling 분석)
안전성평가연구소 / 선임연구원 / 박한진 (생식독성 유전자 profiling 분석)
안전성평가연구소 / 기술원 / 박세묘 (유전자 발현 분석 시험)
안전성평가연구소 / 위촉선임연구원 / 이영숙 (in vitro 생식독성 시험)
안전성평가연구소 / 연구원 / 최미선 (in vitro 생식독성 시험)
안전성평가연구소 / 연구원 / 최진성 (in vitro 생식독성 시험)
안전성평가연구소 / 연수생 / 이은희 (in vivo 생식독성 시험)
안전성평가연구소 / 연수생 / 윤혜진 (in vivo 생식독성 시험)
안전성평가연구소 / 연수생 / 강승준 (in vivo 생식독성 시험)
(주)지노텍 / 이사 / 오문주 (aCGH/miRNA profiling 분석)
(주)지노텍 / 팀장 / 김승준 (aCGH/miRNA profiling 분석)
(주)지노텍 / 연구원 / 김준섭 (aCGH 발현 분석 시험)
(주)지노텍 / 연구원 / 박혜원 (aCGH 발현 분석 시험)
(주)지노텍 / 연구원 / 이승용 (miRNA 발현 분석 시험)
(주)지노텍 / 연구원 / 안유리 (miRNA 발현 분석 시험)
경희대학교 / 교수 / 김양석 (생물정보학 기반 유전체 분석)

V · 기술이전조건

구 분		내 용
기술이전 범위	특허	내분비 장애물질에 의해 유도된 생식독성을 이용한 생식독성물질 검출용 키트 및 이를 이용한 검출 방법(1354023)
	노하우	-
	기술자료	-
	기타	-
	기술지원	-
기술이전 희망조건	이전형태	□ 매각(양도) ■ 전용실시권 ■ 통상실시권
	기술료형태	□ 일시불 □ 경상 ■ 초기+경상 □ 기타 ()
	기술료율	매출액의 3%
연락처	이름	유창원
	e-mail	yoochw@kitox.re.kr
	전화	042-610-8123

