

# 최종보고서 [기관고유연구사업]

과제고유번호	1410550	연구분야 (코드)	X02	지원 프로그램	창의 (일반연구)과제	공개가능여부 (공개, 비공개)	공개
연구사업명	국립암센터 기관고유연구사업						
연구과제명	비근침윤성 방광암 환자를 위한 mitomycin-C 효과 최적화 및 환자 맞춤치료 프로토콜 개발						
과제책임자	성명	서호경	소속	비뇨생식기암연구 과	직위	선임연구원	
세부과제	구분	과제명			과제책임자		
		성명	소속(직위)	전공			
	(1세부)	비근침윤성 방광암 환자를 위한 환자 맞춤형 mitomycin-C 치료 프로토콜 개발	서호경	비뇨생식기암 연구과/선임 연구원	비뇨기과학		
(2세부)	비근침윤성 방광암 환자를 위한 mitomycin-C 투여법의 최적화 연구	정경채	바이오분자 기능연구과 /선임연구원	생화학			
총연구기간	2014년 02월 ~ 2015년 12월 (총 23 개월)	해당단계 참여 연구원 수	총: 5 명 내부: 3 명 외부: 2 명	해당단계 연구개발비	연구비:171,000 천원 민간: 0 천원 계:171,000 천원		
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 5 명 내부: 3 명 외부: 2 명	총 연구개발비	연구비:171,000 천원 민간: 0 천원 계:171,000 천원		
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립암센터	기업부담금		
					소계	현금	현물
	계	2014.02.01.~2015.12.31		171,000			
	제1차	2014.02.01.~2014.12.31	90,000	90,000			
	제2차	2015.01.01.~2015.12.31	81,000	81,000			
제3차	~						
참여기업	참여기업명 :						
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:				연구책임자:		
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)							

2015 년 11 월 04 일

과제책임자 : 서호경 (인)

국립암센터원장 귀하

< 국문 요약문 >

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 최종목표 소변에서 mitomycin-C의 활성을 측정할 수 있는 방법을 개발하고, 방광암 환자에서 환자의 상태에 따라 방광 내 mitomycin-C 약물 주입요법의 효과를 최적화할 수 있는 환자 맞춤형 프로토콜 개발</li> <li>● 연구내용             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 비근침윤성 방광암 환자 중 경요도방광종양절제술 후 방광내 Mitomycin C 투여가 필요한 환자를 대상으로 연구 진행</li> <li>- 방광내 Mitomycin C 투여 전과 2시간 후 소변을 채취하여 pH, creatinine 수치, mitomycin-C 및 mitomycin-C 분해물질과 그 비율을 확인</li> <li>- mitomycin-C와 분해물질의 측정은 기존 방법인 HPLC 분석 방법과 분광학적 방법을 이용하고, 두 분석방법 간의 정확도, 민감도 및 분해능을 비교 검토한다. 환자의 소변 중 pH 및 그 외 인자에 따른 mitomycin-C 및 분해물질과의 상관관계를 분석하고 화학반응을 예측</li> <li>- 환자 소변의 주요 성분 에 따른 mitomycin-C의 분해 정도에 영향을 미치는 인자를 in vitro 상에서 확인하고, 인간 방광암 세포주를 이용하여 mitomycin-C의 분해에 따른 항암효과 차이를 확인</li> <li>- 환자 소변의 주요 성분과 mitomycin-C의 분해 정도의 상관관계 및 그 기전을 규명하여 mitomycin-C 투여 환자에서 효율을 극대화 할 수 있는 방안을 모색</li> </ul> </li> </ul>																
<p>연구개발성과</p>	<p>&lt;정량적 성과&gt;</p> <table border="1" data-bbox="464 1093 1401 1232"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치<sup>1)</sup></th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>1/1</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>13.938/6 (예정)</td> <td>232% (예정)</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>&lt;정성적 성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 환자 소변에서 mitomycin-C와 분해물질 측정하는 방법 개발</li> <li>• 소변의 주요 성분 중 mitomycin-C 분해에 영향을 미치는 인자를 확인하고 화학적 반응을 규명</li> <li>• mitomycin-C 분해와 방광암 재발과의 상관관계를 분석하여 방광내 mitomycin-C 주입 술 후 예후를 예측할 수 있는 데이터베이스 마련</li> <li>• 기존 HPLC 분석 방법 대비 신속, 정확하게 분석하여 즉각적인 예후 예측이 가능하도록 함</li> </ul>					구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)	SCI 논문 편수	1/1	100	IF 합	13.938/6 (예정)	232% (예정)	기타 성과	-	-
구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)															
SCI 논문 편수	1/1	100															
IF 합	13.938/6 (예정)	232% (예정)															
기타 성과	-	-															
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>방광암 치료에 사용하는 MMC의 치료효과를 개선할 수 있는 방안을 도출하여 방광암 환자의 생존율을 증대시키고 신규 치료법과 약물학적 조성물 개발로 이익 창출</p>																
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>마이토마이신-C</p>	<p>방광암</p>	<p>방광내 주입요법</p>	<p>항암제</p>	<p>포준처치법</p>												

< 영문 요약문 >

< **SUMMARY** >

<p>Purpose&amp; Contents</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Final Goal           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Development of a method to determine the active mitomycin-C in the patient' s urine</li> <li>- Development of patient-specific protocols to optimize the effectiveness of intravesical mitomycin-C instillation therapy for bladder cancer patients, depending on the patient's condition</li> </ul> </li> <li>● Research Contents           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Study conducted in patients who is having non-muscle invasive bladder cancer and needing a intravesical mitomycin C instillation treatment after TUR</li> <li>- Patients' urine was collected before and 2 hours after intravesical mitomycin C instillation and the urine pH, creatinine levels, mitomycin-C and mitomycin-C Decomposition was analyzed.</li> <li>- Using the conventional methods of HPLC analysis and new spectroscopic methods for the determination of a decomposition substance mitomycin-C</li> <li>- Analyzing the relationship between degradation ratio of mitomycin C and the urine pH and other factors, and predicting their chemical reaction</li> <li>- Making up a new protocol to maximize the efficacy of intravesical mitomycin C instillation</li> </ul> </li> </ul>				
<p>Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Developed a new method to measure the MMC concentration and degraded products in the patients' urine.</li> <li>• Determined the major components that influence the degradation of mitomycin-C</li> <li>• Established a database to predict the outcome after intravesical mitomycin-C instillation through analyzing the relationship between the degradtion of mitomycin C and the recurrence rate of bladder cancer</li> </ul>				
<p>Expected Contribution</p>	<p>The results of this study will Increase the survival rate of patients with bladder cancer with deriving a way to improve the therapeutic effects of the mitomycin C in bladder cancer treatment</p>				
<p>Keywords</p>	<p>mitomycin-C</p>	<p>bladder cancer</p>	<p>intraveisical instillation</p>	<p>anticancer agent</p>	<p>standard treatment protocol</p>

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	5
2. 국내외 기술개발 현황 .....	7
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	7
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	11
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	13
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	13
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	13
8. 참여연구원 현황 .....	13
9. 기타사항 .....	14
10. 참고문헌 .....	14

<별첨> 자체평가의견서 - 세부과제별 작성

# 1. 연구개발과제의 개요

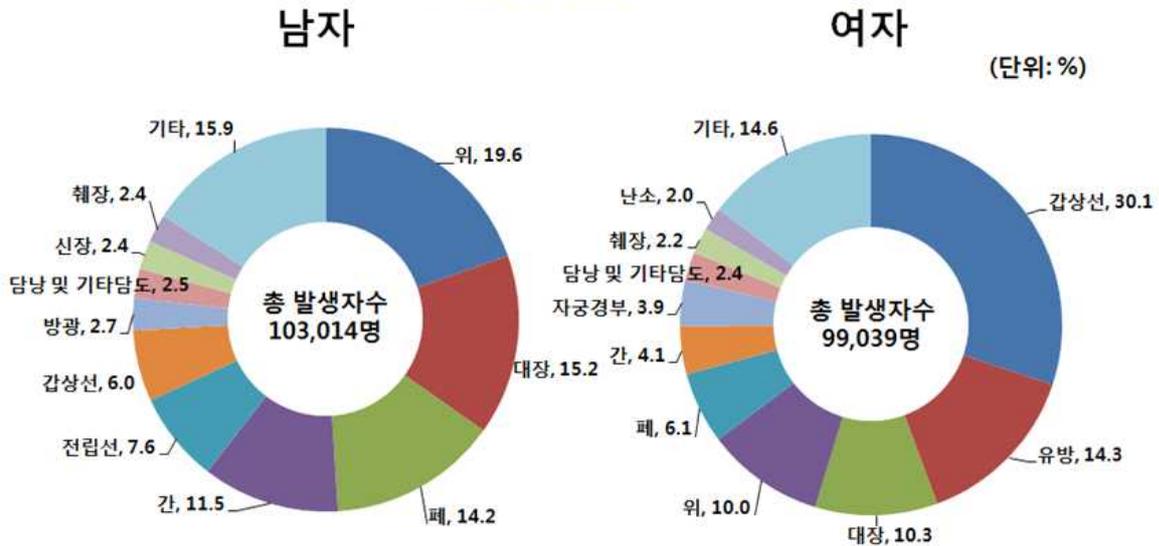
## 1-1. 연구개발 목적

- 환자의 소변에서 mitomycin-C의 활성을 측정할 수 있는 신기술을 개발하고, 환자의 상태에 따라 mitomycin-C의 효과를 최적화할 수 있는 환자 맞춤형 프로토콜 개발
- ✓ 환자 소변에서 mitomycin-C와 분해물질 측정하는 신기술 개발
- ✓ mitomycin-C 투여 환자의 예후에 영향을 주는 성분과 화학반응을 확인
- ✓ 요 중 mitomycin-C의 분해를 막을 수 있는 방안 마련
- ✓ 임상에서 mitomycin-C 투여 방법 최적화 검증

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 방광암은 미국에서 여섯 번째 흔한 암으로 보고되고 있고 국내에서는 전체 암 중 13번째로 흔한 암이고, 남자에서는 7번째로 흔한 암으로 보고됨 (2010년 중앙암 등록본부 자료)

**2010년 방광암 발생자수 3,415 13위**



순위*	한국(2010)	일본(2008) <sup>2)</sup>	미국(2008) <sup>2)</sup>	영국(2008) <sup>2)</sup>
-	모든 암	모든 암	모든 암	모든 암
	320.0	247.3	335.0	280.8
1	위	위	전립선	전립선
	62.3	46.8	83.8	62.1
2	대장	대장	폐	폐
	48.6	41.7	49.5	41.6
3	폐	폐	대장	대장
	46.5	38.7	34.1	36.2
4	간	전립선	방광	방광
	36.0	22.7	21.1	13.0
5	전립선	간	비호지킨 림프종	비호지킨 림프종
	25.3	17.6	16.3	12.0
6	갑상선	식도	피부의 악성흑색종	피부의 악성흑색종
	18.3	10.6	16.3	11.1
7	방광	췌장	신장	식도
	8.7	10.0	16.1	10.0
8	담낭 및 기타담도	방광	백혈병	백혈병
	8.1	8.5	12.1	9.3
9	췌장	비호지킨 림프종	입술, 구강 및 인두	위
	7.9	6.3	7.4	8.0
10	신장	신장	췌장	신장
	7.8	7.5	8.0	9.1

1) 국제 비교를 위해 모든 암에서 피부기타(C44)를 제외한 후 세계표준인구를 이용하여 산출한 연령표준화발생률로 우리나라 2000년 표준인구를 이용하여 산출한 수치와 다름  
2) 국제암연구소에서 과거 암등록자료를 이용하여 추정된 2008년 암발생률(GLOBOCAN 2008, IARC, 2010)  
\* 국제비교를 위해 연령표준화발생률 기준으로 순위 매김

그림 1. 국내 암발병율

- 방광암은 진단 시 약 70-80%는 방광점막이나 점막하층에 국한된 비근침윤성 방광암으로 진단됨
- 비근침윤성 방광암의 치료법은 경요도방광종양절제술로 육안적 종물을 완전 절제하는 것이 가장 중요하나, 70%에서 재발하고 10-15%에서 근침윤성방광암으로 진행되는 것으로 보고됨
- 방광암의 재발과 침윤성 방광암으로 진행을 막기 위해 부가적인 방광 내 약물주입요법이 시행되고 있음
- BCG 방광내 주입요법은 방광암의 재발을 가장 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있으나, 유지요법을 최소 1년 이상 시행해야 하고, 2/3의 환자가 부작용으로 6개월 이내에 치료를 중단하며, 중국에는 30-50%의 환자가 BCG 치료에 실패하고 있음
- Intravesical Chemotherapy는 BCG에 비해 환자가 치료에 tolerable하며, BCG 치료에서 발생할 수 있는 심각한 부작용의 위험이 없고, Intravesical Chemotherapy에 실패하더라도 BCG 치료효과에 영향을 주지 않는 것으로 보고되고 있음
- 그러나 이러한 장점에도 불구하고 Intravesical Chemotherapy가 BCG에 비해 효과가 떨어지므로 치료효과를 향상시키기 위한 많은 연구가 시도되고 있는 상황임
- 대표적인 약제인 mitomycin-C의 경우 방광내 약물의 농도를 높게 유지하는 것이 mitomycin-C의 방광조직 내 침투를 높이는 것으로 보고되고 있고, 적절한 치료 용량에 관한 연구들은 1990년대부터 계속적으로 진행되어 mitomycin-C 40mg을 20ml 증류수에 희석하여 사용하는 것이 부작용을 증가시키지 않으면서 효과를 증가시키는 것으로 보고됨
- 그 외에도 방광 내 약물 농도를 높게 유지하기 위하여 수분섭취 제한, oral desmopression 사용 및 약제 주입 전 방광을 완전히 비우도록 하는 방법 등을 사용하고 있음
- 또한 소변의 pH가 산성화가 될수록 mitomycin-C의 분해(degradation)가 증가하는 것으로 알려져 있으며, 소변을 염기화시키기 위해서 sodium bicarbonate 1.5g을 전날저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 투약하는 방법도 사용해오고 있음
- 최근 일본의 Takahiro등은 소변의 pH가 산성화될수록 mitomycin-C의 분해가 증가되어 방광내 주입

술 효과가 감소된다고 보고하였으며, 그 기준으로 pH 5.5를 제시하였음

- 최근에는 약제의 방광 내 침투를 증가시키기 위하여 자기장이나 열을 이용하는 시도가 있고, 2011년 Lancet Oncology에는 mitomycin-C를 Electromotive drug administration을 시행한 경우와 기존의 passive diffusion을 이용한 방법에 대한 RTC trial이 보고되었으며, 저자들은 unifocal disease, multifocal disease모두에서 EMDA를 이용한 mitomycin-C 군에서 효과적으로 RFS를 향상시켰다고 보고함
- 하지만 이러한 열이나 자기장을 이용하기 위해서는 특별한 장치가 필요로 한다는 문제점이 있음
- mitomycin-C 효과를 최적화하기 위한 현재까지의 노력에도 불구하고 다음과 같이 해결해야 할 문제점들이 남아있음 1) 부작용을 최소화 하면서 효과를 높일 수 있는 적절한 약물농도와 2) mitomycin-C의 희석을 막기 위한 수분섭취를 제한함으로써 발생하는 소변의 산성화와 이로 mitomycin-C의 분해(degradation)의 심화, 3) 소변의 알칼리화에 따른 mitomycin-C의 분해(degradation) 정도 및 4) 효과적인 소변 알칼리화를 위한 bicarbonate의 복용방법 및 용량 등에 관한 프로토콜의 개발

<대내외 연구와의 중복 여부>

확인된 중복 연구 없음

1-3. 연구개발 범위

- 따라서 본 연구에서는 소변에서 mitomycin-C 및 그 분해산물의 농도를 측정하는 방법을 확립하고, 방광내 mitomycin-C 주입요법을 받는 환자에서 경구 sodium bicarbonate를 복용한 경우와 복용하지 않은 경우 요 중 pH, mitomycin-C와 그 분해산물을 비교하여 mitomycin-C의 분해에 영향을 미치는 인자들을 분석하고자 함
- 또한 소변의 알칼리화가 유지된 군과 유지되지 못한 군에서 방광암의 조기 재발과 재발에 영향을 미치는 인자를 평가하고자 함
- 나아가 최종적으로는 환자의 상태에 따라 mitomycin-C의 효과를 극대화시킬 수 있는 방안을 마련하고자 함

## 2. 국내외 기술개발 현황

- 국내에서 소변내 MMC측정을 시도했거나 시행하는 기관은 없으며 본 연구과제가 최초임
- 방광암 치료의 최고 권위 기관인 일본 Keio 대학에서 환자의 요중 pH와 MMC 치료효과의 상관관계를 분석하려는 연구는 있으나 직접적으로 요중 MMC를 측정하여 치료효과와 연관성을 밝힌 사례는 본 연구가 최초임

## 3. 연구수행 내용 및 결과

<상세 내용은 세부과제별 작성>

- 비근침윤성 방광암 환자에서 Mitomycin-C 방광 내 약물주입요법 후 요 중 pH에 따른 Mitomycin-C의 분해 정도 및 그 분해 물질에 대한 연구
- ✓ 방광암 환자 총 26명을 대상으로 방광내 MMC 주입 전 후의 소변을 채취하여 pH, creatinine 수치,

활성 MMC 농도, 소변의 부피를 확인

✓ 연구 평가

- 요 중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 HPLC 및 spectrophotometer 의 두가지 방법을 이용하여 측정하고 비교
- 소변을 염기화 시키기 위해 sodium bicarbonate 1.5g을 전날 저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 복용한 경우와 그렇지 않은 경우 요중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 비교
- mitomycin-C의 분해에 영향을 미치는 인자들을 분석
- 술 후 2년간 3개월 간격으로 방광경검사와 요세포검사를 이용한 추적조사 후 염기화가 효과적으로 이뤄진 군과 이루어지지 못한 군에서 방광암의 조기재발과 재발에 영향을 미치는 인자를 평가

✓ 연구 방법

- 이 연구는 방광내 mitomycin-C 주입요법의 효과를 최적화하기 위해 mitomycin-C 및 그 분해산물을 HPLC 및 spectrophotometer 2가지 방법을 이용하여 측정하고, 소변을 염기화 시키기 위해 sodium bicarbonate 1.5g을 전날 저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 복용한 경우와 그렇지 않은 경우 요 중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 비교
- 술 직전 소변을 채취하여 요 중 pH, Cr 수치를 측정하고, 즉시 4°C에 보관
- 술 후 2시간이 지나 환자의 소변을 채취하여 요 중 pH, Cr 수치를 측정하고, 즉시 4°C에 보관
- 술 전 채취한 소변을 기준 시료로 하고, 술 후 소변에서 mitomycin-C와 분해물의 농도를 HPLC와 spectroscopy를 이용하여 측정

✓ 통계적 방법

- 요중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 HPLC 및 spectrophotometer 의 두가지 방법을 이용하여 측정하고 비교
- 소변을 염기화 시키기 위해 sodium bicarbonate 1.5g을 전날 저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 복용한 경우와 그렇지 않은 경우 요중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 비교
- mitomycin-C의 분해에 영향을 미치는 인자들을 분석
- 술 후 2년간 3개월 간격으로 방광경검사와 요세포검사를 이용한 추적조사 후 염기화가 효과적으로 이뤄진 군과 이루어지지 못한 군에서 방광암의 조기재발과 재발에 영향을 미치는 인자를 평가
- 방광암의 재발에 영향을 미치는 인자를 regression방법으로 보정한 후 소변염기화가 방광암의 재발에 미치는지를 분석

● mitomycin 투여 전 환자 소변의 pH 측정

- MMC 투여 전 채취된 전체 sample 수는 144종이며, 이중 sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않는 환자의 샘플은 73종, 투여한 환자의 sample은 71종
- 이중 극히 낮은 pH라고 판단되는 pH 5.0 이하의 경우는 sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않은 환자에서 단 한 경우만 관찰됨
- sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않은 환자의 평균적인 요중 pH 값은 6.00 이며 표준편차는 0.65 였으며, sodium bicarbonate를 경구 투여한 환자의 평균적인 요중 pH 값은 6.47 이며 표준편차는 0.72였음

● mitomycin 투여 후 환자 소변의 pH 측정

- MMC 투여 후 채취된 전체 sample 수는 143종이며, 이중 sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않는 환자의 샘플은 73종, 투여한 환자의 sample은 70종

- 이 중 MMC 투여 후 MMC의 활성에 큰 영향을 줄거라 예상되는 pH로 판단되는 pH 5.0 이하의 경우는 없었음

- sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않은 환자의 평균적인 요중 pH 값은 6.49 이며 표준편차는 0.62 였으며, sodium bicarbonate를 경구 투여한 환자의 평균적인 요중 pH 값은 7.26 이며 표준편차는 0.44였음

● **MMC 주입 전후 소변의 pH 변화**

- sodium bicarbonate 비투여군에서는 MMC 투여 전 평균 pH  $6.00 \pm 0.65$ 에서 투여 후  $6.49 \pm 0.62$ 로 0.49 상승하였으며, sodium bicarbonate 투여군에서는 MMC 투여 전 평균 pH  $6.47 \pm 0.72$ 에서 투여 후  $7.26 \pm 0.44$ 로 상승하였음

● **sodium bicarbonate 경구 투여 여부에 따른 pH 변화**

- MMC 주입 전 요중 평균 pH는  $6.00 \pm 0.65$ 에서  $6.47 \pm 0.72$ 으로 0.47이 상승하였으며, MMC 주입 후 요중 평균 pH는  $6.49 \pm 0.62$ 에서  $7.26 \pm 0.44$ 로 0.77 상승하는 것을 확인하였음.

● **HPLC를 이용한 환자 소변 중 mitomycin C 농도 측정**

신규 개발한 spectrophotometry 기법을 이용한 mitomycin C의 농도 측정 방법의 유의성 및 정확성을 기존 HPLC 측정 방법과 비교하고 소변 중 mitomycin C의 희석 비율을 확인하고자 LC-MS를 이용하여 mitomycin C의 농도를 측정하였음

- 환자 요중 MMC 농도 측정을 위한 sample 수는 총 143종 이었으며, 평균 MMC 농도는 128.0 ug/mL, 최저 농도는 21.2 ug/mL이고 최고 농도는 496 ug/mL로 확인됨

● **환자 소변의 creatinine 수치 분석**

- 전체 평균 1,427 mg/L 이고, 최저 농도는 260 mg/L, 최고 농도는 4644 mg/L인 것으로 확인 됨.

● **환자 소변 중 활성 MMC의 농도와 각 요소 간의 상관관계 분석**

- MMC 투여 전 pH뿐만 아니라 투여 후 pH, 소변 부피, creatinine 수치에 따른 상관관계를 분석하였으며, 소변의 부피에만 뚜렷한 반비례 관계가 확인되었음

● **spectrophotometry를 이용한 소변 중 MMC 및 분해산물의 농도를 측정하는 방법의 고안**

- 순수 MMC 및 비활성화된 MMC 농도와 최대 흡광도를 보이는  $\lambda_{max}$ 에서 흡광도 간의 상관관계를 이용하여 미지의 MMC의 농도를 측정할 수 있는 수식을 회귀분석을 통해 도출하였으며, 이의 신뢰도는 99.94%로 확인됨

● **소변 중 mitomycin-C의 분해에 영향을 주는 성분 확인과 mitomycin-C의 분해반응 규명**

- 제 1 세부과제의 연구를 통해 얻어진 환자 소변 중 MMC 분해와 상관관계 요인을 in vitro 상에서 시험하여 분해 촉진 여부를 확인하고, 분해 산물에 대해서 화학적 분석을 통해 반응 메커니즘을 확인하였음

- 확인한 화학 반응식을 통해 MMC의 분해 과정을 억제할 수 있는 물질 또는 방법을 고안하였음

● **pH 변화에 따른 mitomycin C의 분해 확인**

- 환자 방광 내 소변 중에서 pH에 따라 mitomycin C의 화학성 상태에 변화가 일어나는지 확인하고자, pH 5.0과 pH 8.0의 용액에서 각각 2시간 동안 incubation을 진행한 mitomycin C를 화학적 상태를 확인한 결과, pH가 낮을 경우 상당량의 mitomycin C가 변형되고 있음을 확인할 수 있었음

● **분해된 mitomycin C의 anti-proliferation 효과 확인**

- fresh한 상태의 mitomycin C와 pH 5.0의 용액에서 2시간 동안 incubation한 mitomycin C 및 24시간 동안 incubation된 완전 분해된 mitomycin C를 방광암 세포 KU19-19에 72시간동안 처리하였음.

- 방광암세포의 cell viability를 확인한 결과, Fresh MMC는 bladder cancer cell에 대한 IC50가

0.1009  $\mu$ M이지만, pH 5.0에서 2시간 incubation된 MMC의 IC50는 2배가 증가한 0.2082  $\mu$ M임. 즉, 동일한 효과를 내기 위해서 MMC의 투여량이 2배가 되어야 함.

- 뿐만 아니라, 완전 분해된 mitomycin C는 방광암 세포의 생존에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었음.

- 이러한 현상은 mitomycin C가 산성의 조건에서 demethoxylation이 진행되고, demethoxylated MMC는 DNA와 결합하지 못해 anti-proliferation 효과가 나타나지 않는 것으로 파악됨.

● **소변 중 mitomycin C의 분해정도를 측정할 수 있는 방법 고안**

- 방광 내 주입 후 분해 전 후의 mitomycin C 농도 측정과 함께 분해된 mitomycin C의 비율 측정이 중요하며, 이 과정에서는 분해 전후 mitomycin C의 측정 흡광도가 서로 겹치지 않아야 함

- 이에 분해 정도를 일정하게 유지하며 spectrophotometry를 이용하여 MMC의 분해 정도에 따라 spectrum이 일정하게 변하는 것을 확인하였음

● **환자 소변에서 mitomycin C의 농도 측정**

- 앞서 확립한 측정 방법을 이용하여 실제 환자 소변에서 mitomycin C의 농도를 측정하였음

-아래 그림에서 보는 바와 같이, mitomycin C의 농도는 환자마다 차이가 있었으며, 환자 간에는 3배 이상의 차이가 나는 경우도 있었음

● **mitomycin C의 분해에 영향을 미치는 요인 확인**

- 소변 중의 주요 성분인 phosphate, urea, creatinine이 mitomycin C의 분해에 영향을 미치는지 확인하는 실험을 진행하였음. urea는 mitomycin C의 분해를 약간 더디게 하는 현상을 보였으나, creatinine은 소변이 약산성일 경우 mitomycin C의 분해를 상당히 촉진시키는 것을 확인할 수 있었음.

● **요중 creatinine 수치 측정**

- 앞의 시험 결과에서 요중 creatinine 수치가 MMC의 비활성화에 영향을 미치는 것으로 확인되어, 실제 환자 샘플에서 상관관계를 분석하고자 creatinine의 농도를 분광학적인 방법으로 측정하였음

● **소변 중 mitomycin C의 분해를 억제할 수 있는 방안 도출**

- 소변의 성분 중에 mitomycin C의 분해를 촉진하는 요인은 소변의 pH와 creatinine의 농도인 것을 확인하였음.

- 소변의 pH와 creatinine의 농도는 각 환자마다 다르게 측정되었고, 이와 무관하게 mitomycin C의 분해를 억제할 수 있는 방안이 필요함

- 여러 가지 방법을 검토 시험하던 중, sodium bicarbonate 용액을 이용하여 mitomycin C를 녹일 경우 mitomycin C의 분해가 억제됨을 확인하였음

● **mitomycin C 방광암 세포 내 투과 정도 분석**

- 임상에서 방광내 MMC 주입 후 2시간을 처치하고 있음. 이러한 처치 시간에 대한 이유는 MMC의 농도가 방광 내에서와 방광암 세포 내에서 평형이 이루어질거라는 예상에 따른 것임

- 이러한 예상이 실제 정확한 기준치이며 비평형에 의한 치료효과 감소가 나타날 수 있는지 확인하기 위해 점막 상피세포를 이용하여 MMC의 투과정도를 확인하였음

- 확인 결과, 예상과는 달리 주입 용액 상의 MMC의 농도는 점막 투과 후 용액 상에서 큰 차이를 보였으며, 실제 점막 투과량은 주입 농도의 수백분의 1 수준인 것으로 확인되었음.

- 이러한 투과 정도 수준에서 MMC가 실제 방광암 세포의 사멸을 효과적으로 유도하는지 확인하기 위해 임상에서 투여 조건과 동일하게 방광암 세포에 MMC를 2시간 처치한 후 방광암 세포의 cell viability를 특정해보았음

- 그 결과, 2시간 동안 MMC의 농도가 요중과 방광암 세포에서 평형이 이루어질 경우에는 100%

세포 사멸에 도달하지만, 실제 점막 투과양으로 환산하여 시험하였을 경우에는 약 20~70%의 방광암 세포가 여전히 생존한 것으로 확인됨

● 연구 결론

- ✓ 항암제의 방광내 주입요법에 의한 방광암 치료는 항암제가 직접적으로 방광암 세포에 노출되는 특수성이 있음. 이에 따라 방광내 항암제의 농도가 치료 효과에 매우 중요한 인자로 판단되며 MMC의 방광내 주입 요법에서 요중 MMC의 농도를 극대화시킬 수 있는 방법이 필요함
- ✓ 본 연구 결과, 타 기관의 연구 예측과는 달리 요중 pH는 MMC의 농도에 큰 영향을 미치지 않으며, MMC의 방광내 주입 과정 중에 생성된 소변의 부피가 매우 큰 영향을 주는 것으로 확인됨. 따라서 현재 임상에서 시도되고 있는 sodium bicarbonate의 경구 투여보다 소변의 양을 줄일 수 있는 방안이 실제 MMC의 치료 효과를 극대화시키는 것에 중요하다고 판단됨
- ✓ MMC의 분해에 영향을 주는 요인은 pH와 creatinine의 농도임
- ✓ pH는 5.5이하에서 영향을 주며 pH 5.0이 되면 50%의 활성만 갖게 됨
- ✓ 낮은 pH가 MMC의 효과 감소의 주요 원인이라면 normal saline 대신 sodium bicarbonate 용액을 사용함으로써 해결할 수 있음
- ✓ 요중 MMC의 농도 측정은 HPLC 방법보다 분광학적 방법이 더 정확9530
- ✓ 함
- ✓ Alkalinization을 시행한다 하더라도 활성 MMC의 농도를 증가시키는 것은 아님 (약 20~30% 차이를 보임)
- ✓ MMC의 치료효과에 영향을 주는 요인은 요중 MMC의 농도 및 종양 조직에 대한 투과도임
- ✓ MMC가 방광 내 주입되어 있는 2시간 동안, 종양 조직으로 얼마만큼 약물이 전달되었는가가 가장 중요할 것으로 판단됨 (사례: Electromotive drug administration이 임상 3상 진행 중)
- ✓ 추후 MMC의 solubility를 높이고 투과도를 증가시킬 수 있는 연구가 반드시 필요함

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

<제1세부과제>

세부연구내용	가중치	달성도	달성내용
비근침윤성 방광암환자 중 방광내 Mitomycin C 투여 환자를 대상으로 방광내 mitomycin-C 주입요법 전과 시술 2시간 후 소변을 채취하여 pH, creatinine, mitomycin-C 및 mitomycin-C 분해물질과 그 비율을 확인	20%	100%	26명의 환자를 대상으로 287종의 sample을 채취하여 MMC 투여 전후의 pH, creatinine, mitomycin-C, 소변 부피를 확인하였음. MMC의 농도는 HPLC 방법을 이용하여 분석하였음
환자의 소변 중 pH 및 그 외 인자에 따른 mitomycin-C 및	30%	100%	287종의 sample을 채취하고 소변 중 MMC의 농도와 pH, creatinine,

분해물질과의 상관관계를 분석			mitomycin-C, 소변 부피 간의 상관관계를 파악하였음. 결과적으로 요중 MMC의 농도에 가장 큰 영향을 주는 것은 소변의 부피로 확인됨
mitomycin-C 주입 환자의 조건에 맞는 맞춤형 처치 프로토콜을 개발	50%	100%	지금까지는 MMC 투여 전 소변의 pH를 상승시키기 위해 sodium bicarbonate를 경구 투여해 왔으나, 이는 요중 MMC의 농도 유지에 기여도가 없는 것으로 파악됨. MMC의 농도 유지를 위해서는 MMC 투여 중 소변의 부피를 줄이는 것이 가장 중요하며 이를 위해 금식 및 수분 섭취 자제를 권고하여야 하며 desmopresin 투여도 효과가 있는 것으로 확인됨

<제2세부과제>

세부연구내용	가중치	달성도	달성내용
소변 중 mitomycin-C 및 분해산물의 농도에 따른 spectrophotometry를 분석하고 미지의 시료에서 mitomycin-C 및 분해산물의 농도를 측정할 수 있는 방법을 고안	20%	100%	분광학적인 방법을 이용하여 mitomycin C의 $\lambda_{max}$ 를 확인하고 요중 mitomycin C의 농도를 측정할 수 있는 수식을 완성하였음
방광 내 MMC 주입 후 2시간이 지나 배출되는 소변을 채취하여 pH, mitomycin-C 및 mitomycin-C 분해물질의 비율을 확인	20%	100%	26명의 환자를 대상으로 287종의 sample을 채취하여 MMC 투여 전후의 pH, creatinine, mitomycin-C, 소변 부피를 확인하였음. MMC의 농도는 분광학적인 방법을 이용하여 분석하였음
mitomycin-C 분해물질의 비율과 환자의 소변 중 주요 성분의 변화 간의 상관관계를 분석하여 MMC의 분해에 영향을 주는 요인을 확인하고, 실제 그 영향정도를 in vitro 상에서 검증	20%	100%	연구 결과, mitomycin C의 분해에 영향을 주는 요인은 요중 pH와 creatinine 농도인 것으로 확인되었으며, pH 5.0의 경우 mitomycin C의 약 50%가 분해되는 것으로 확인됨
방광암세포를 이용하여 소변 중 MMC 분해 촉진 인자의 영향력을 확인	20%	100%	mitomycin C가 낮은 pH에 의해 완전히 degradation되면 암세포의 viability에 전혀 영향을 주지 못하며, 요중 pH가 5.0일 경우에는 mitomycin C 주입 시간인 2시간

<p>환자 소변의 주요 성분과 mitomycin-C의 화학적 반응을 규명하여 mitomycin-C 투여 환자에서 효율을 극대화 할 수 있는 방안을 모색</p>	20%	100%	<p>동에 50%가 분해되어 그 효과가 절반으로 감소하는 것으로 확인 됨          요중 낮은 pH와 creatinine 수치에 의해 mitomycin C가 분해되는 것을 막기 위해서는 현재 임상에서 주입 용액을 normal saline으로 사용하는 것을 sodium bicarbonate로 변경할 필요가 있다고 판단됨</p>
--	-----	------	---

4-2. 관련분야 기여도

- 비근침윤성 방광암의 치료에 있어서 MMC 투여에 따른 표준 프로토콜이 확립되지 않은 것이 현실이지만, 이번 연구 결과를 통해 환자에게 실질적으로 도움이 되는 표준 프로토콜을 작성할 수 있을 것으로 기대됨

5. 연구결과의 활용계획

<p>○ 방광암 환자에서 환자의 상태에 따라 방광 내 mitomycin-C 약물 주입요법의 효과를 최적화할 수 있는 환자 맞춤형 프로토콜 개발</p>
---

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 사항 없음

7. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Relationship between the concentration of mitomycin C and urinary components in non-muscle invasive bladder cancer patients	국립암센터	주저자	영국	13.938	예정	단독사사	SCI

8. 참여연구원 현황

번호	소속기관명	직위	생년월일	전공 및 학위		연구담당 분야
	성명	과학 기술인등록 번호	성별	취득 년도	학위 (전공)	과제참여 기간
	국립암센터 서호경					

9. 기타사항

10. 참고문헌

## II. 제1세부과제

세부과제명 : 비근침윤성 방광암 환자를 위한 환자 맞춤형 mitomycin-C 치료  
프로토콜 개발

세부과제책임자(성명/소속) : 서호경/비뇨생식기암연구과

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	17
2. 국내외 기술개발 현황 .....	22
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	22
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	40
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	40
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	41
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	41
8. 참여연구원 현황 .....	41
9. 기타사항 .....	41
10. 참고문헌 .....	41
<별첨> 자체평가의견서 .....	42

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 환자의 소변에서 mitomycin-C의 활성을 측정할 수 있는 신기술을 개발하고, 환자의 상태에 따라 mitomycin-C의 효과를 최적화할 수 있는 환자 맞춤형 프로토콜 개발
- ✓ 요 중 mitomycin-C 및 분해산물의 농도를 측정하는 신기술의 유의성 검증
- ✓ 요 중 mitomycin-C의 분해를 촉진하는 인자 확인
- ✓ 요중 mitomycin-C의 분해를 억제할 수 있는 신규 치료법의 유효성 검증
- ✓ 환자 맞춤형 mitomycin-C 처치 프로토콜의 확립과 유효성 검증

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 2010년에 발표된 한국중앙암등록본부 자료에 의하면, 방광암은 2008년에 3,230건이 발생하였고, 남자에서 7번째로 흔한 암으로 보고되었음

표 . 국내 2010년 남성 주요 암 발생 현황 (국가암정보센터)

순위	남자				
	암종	발생자수 (명)	분율 (%)	조발생률(명/10만 명)	표준화 발생률* (명/10만명)
	모든암	103,014	100.0	412.4	333.6
	(갑상선암 제외)	(96,783)	-	(387.5)	(312.0)
1	위	20,179	19.6	80.8	64.2
2	대장	15,612	15.2	62.5	49.8
3	폐	14,650	14.2	58.7	47.2
4	간	11,818	11.5	47.3	37.1
5	전립선	7,848	7.6	31.4	25.3
6	갑상선	6,231	6.0	24.9	21.6
7	<b>방광</b>	<b>2,752</b>	<b>2.7</b>	<b>11.0</b>	<b>8.9</b>
8	담낭 및 담도암	2,532	2.5	10.1	8.2
9	신장	2,520	2.4	10.1	8.2
10	췌장	2,505	2.4	10.0	8.0

표 . 국제 남성 주요 암 발생 현황 (국가암정보센터)

* 순위	한국 <sup>1</sup> (2010)		일본 <sup>2</sup> (2008)		미국 <sup>2</sup> (2008)		영국 <sup>2</sup> (2008)	
	암종	유병자수	암종	유병자수	암종	유병자수	암종	유병자수
-	모든 암	320.0	모든 암	247.3	모든 암	335.0	모든 암	280.0
1	위	62.3	위	46.8	전립선	83.8	전립선	62.1
2	대장	48.6	대장	41.7	폐	49.5	폐	41.6
3	폐	46.5	폐	38.7	대장	34.1	대장	36.2
4	간	36	전립선	22.7	<b>방광</b>	<b>21.1</b>	<b>방광</b>	<b>13.0</b>
5	전립선	25.3	간	17.6	비호지킨림프종	16.3	비호지킨림프종	12.0
6	갑상선	18.3	식도	10.6	피부의 악성흑색종	16.3	피부의 악성흑색종	11.1
7	<b>방광</b>	<b>8.7</b>	췌장	10.0	신장	16.1	식도	10.0
8	담낭 및 기타담도	8.1	<b>방광</b>	<b>8.5</b>	백혈병	12.1	백혈병	9.3
9	췌장	7.9	신장	7.5	췌장	8.0	신장	9.1
10	신장	7.8	비호지킨림프종	6.3	입술, 구강 및 인두	7.4	위	8.0

- 방광암은 진단시 약 75%는 비근침윤성(표재성) 방광암으로 진단됨. 이 경우 경요도방광종양절제술을 표준치료법으로 시행하나, 약 70%에서 재발하고, 10-15%에서 근침윤성방광암으로 진행하며, 특히 고위험군(pTa/T1 G3)의 경우 1/3에서 방광암으로 사망
- 방광암의 빈번한 재발은 경요도방광종양절제술 시 관찰하지 못한 종양의 존재, 경요도방광종양절제술 시 종양 세포의 재 착상 혹은 불완전 절제와, field change에 의한 다발성경향에 의한 것으로 알려져 있음

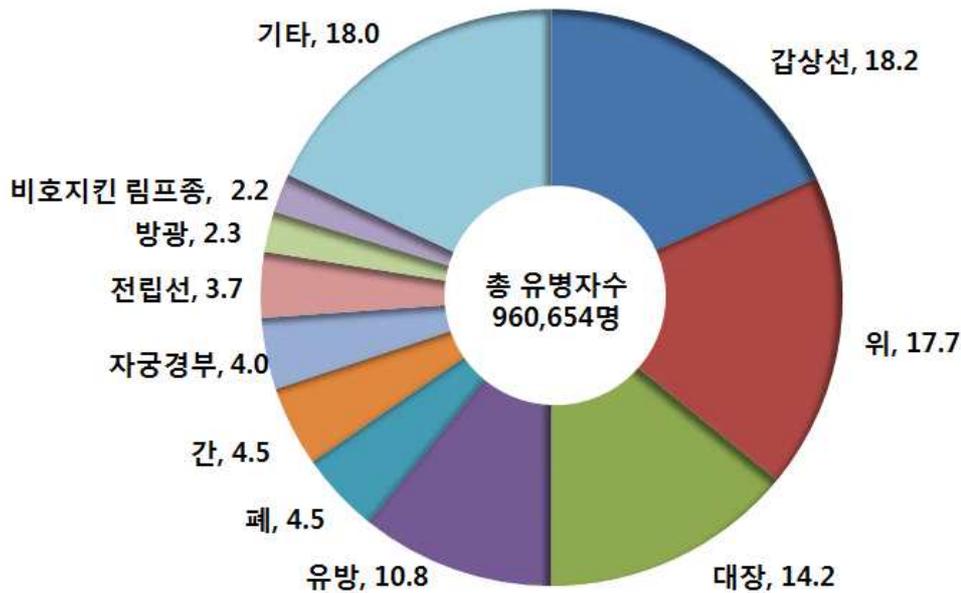


그림 2. 2010년 주요 암종별 유병자 분율 (국가암정보센터)

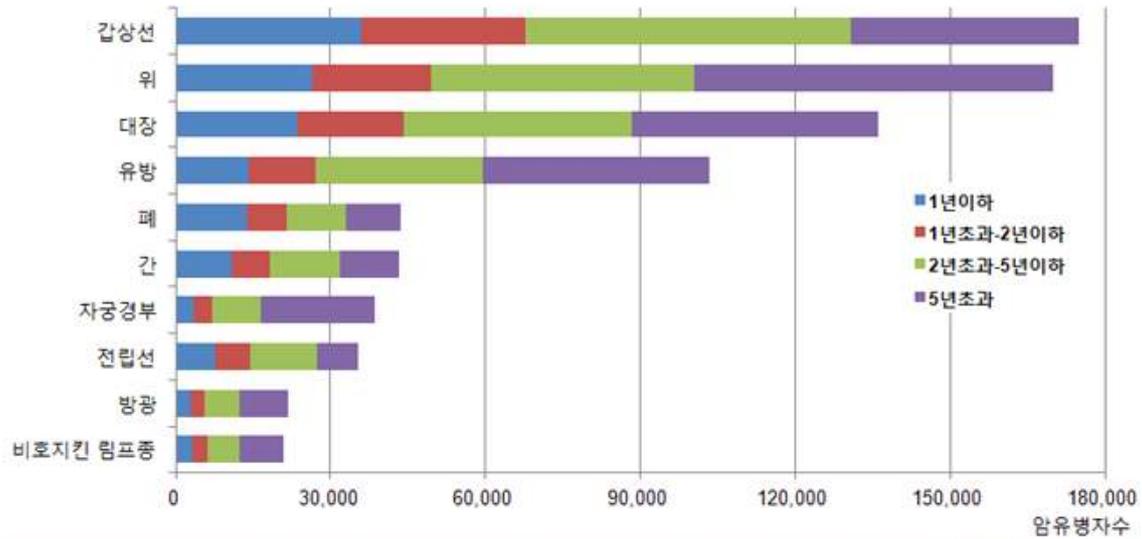


그림 3. 진단 후 경과 기간별 암유병자 수 (2010년, 국가암정보센터)

- 비근침윤성 방광암의 재발과 진행을 억제하기 위해 경요도방광증양절제술 시행 후 부가적으로 항암제 혹은 BCG(결핵균)을 이용한 방광내 약물 주입법을 시행함. 이중 BCG(결핵균)을 이용한 방광내 약물 주입법은 가장 효과적인 약물로 고위험군의 비근침윤성 방광암에서 표준치료로 사용되고 있음.
- BCG 방광내 주입요법은 방광암의 재발을 가장 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있으나, 유지요법을 최소 1년 이상 시행해야 하고, 2/3의 환자가 부작용으로 6개월 이내에 치료를 중단하며, 30%-50%는 BCG 치료에 저항하며 이 경우 근치적방광적술이 표준 치료법으로 시행됨. 그러나 근치적 수술로 인한 합병증의 증가와, 요로전환에 의한 삶의 질의 저하가 동반됨
- Intravesical Chemotherapy는 BCG에 비해 환자가 치료에 tolerable하며, BCG 치료에서 발생할 수 있는 심각한 부작용의 위험이 없고, Intravesical Chemotherapy에 실패하더라도 BCG 치료효과에 영향을 주지 않는 것으로 보고되고 있음
- 이러한 장점에도 불구하고 Intravesical Chemotherapy가 BCG에 비해 효과가 떨어지므로 치료효과를 향상시키기 위한 많은 연구가 시도되고 있는 상황임
- 대표적인 약제인 mitomycin-C의 경우 방광내 약물의 농도를 높게 유지하는 것이 mitomycin-C의 방광조직 내 침투를 높이는 것으로 보고되고 있고, 적절한 치료 용량에 관한 연구들은 1990년대부터 계속적으로 진행되어 mitomycin-C 40mg을 20ml 증류수에 희석하여 사용하는 것이 부작용을 증가시키지 않으면서 효과를 증가시키는 것으로 보고됨

표 1. mitomycin-C의 방광내 주입요법에서 약동력학 증가를 위한 처치법

- Preventing drug dilution
  - Completely emptying the bladder before administering the drug
  - 6-h fasting period previous to each instillation
  - Oral desmopresin 0.2mg 1h before
- Alkalinisation of the urine for MMC
  - Sodium bicarbonate 1.5g po the night before, the morning of, and 30 min before each instillation
- Duration of each instillation
  - 2h seems reasonable
- Increasing bladder wall penetration
  - Electromotive drug administration
  - Local microwave-induced hyperthermia

- 그 외에도 방광 내 약물 농도를 높게 유지하기 위하여 수분섭취 제한, oral desmopresin 사용 및 약제 주입 전 방광을 완전히 비우도록 하는 방법 등을 사용하고 있음
- 또한 소변의 pH가 산성화가 될수록 mitomycin-C의 분해(degradation)가 증가하는 것으로 알려져 있으며, 소변을 염기화시키기 위해서 sodium bicarbonate 1.5g을 전날저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 투약하는 방법도 사용해오고 있음
- 최근 일본의 Takahiro등은 소변의 pH가 산성화될수록 mitomycin-C의 분해가 증가되어 방광내 주입술 효과가 감소된다고 보고하였으며, 그 기준으로 pH 5.5를 제시하였음

표 2. mitomycin-C 주입 중 환자 소변의 pH 분포도

Urinary pH	No. Pts (%)
5.00-5.49	39 (31.5)
5.50-5.99	46 (37.1)
6.00-6.49	25 (20.2)
6.50-6.99	7 (5.6)
7.00	7 (5.6)
Total No.	124

**Avg. pH 5.77**

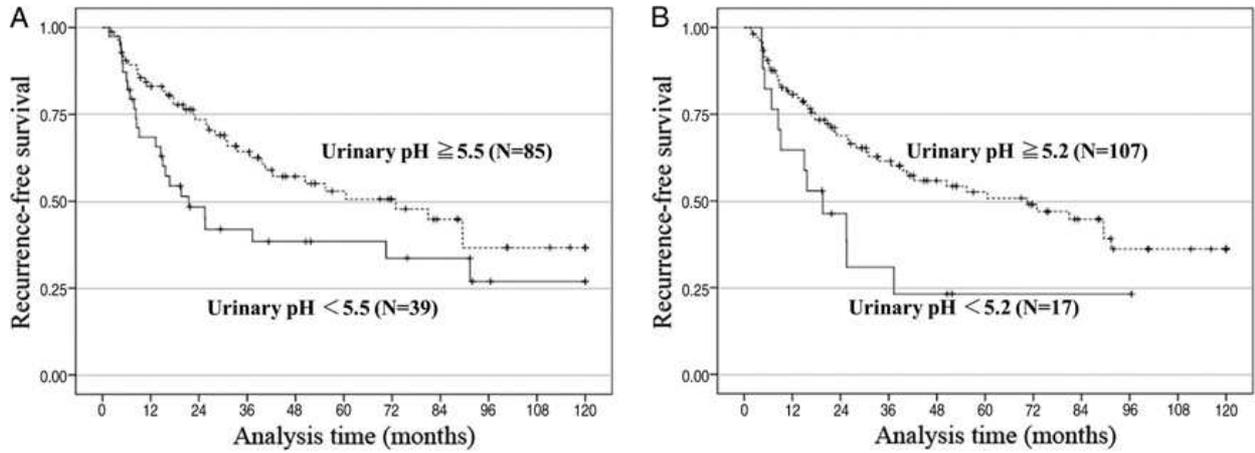


그림 4. 방광내 mitomycin-C 주입요법을 시술받은 환자의 소변 pH와 재발률 간의 상관관계

환자의 소변 중 pH가 낮을수록 특히 5.2 이하의 경우 그 이상의 환자보다 재발률이 현격하게 증가됨이 확인됨

- 최근에는 약제의 방광 내 침투를 증가시키기 위하여 자기장이나 열을 이용하는 시도가 있으며, 2011년 Lancet Oncology에는 mitomycin-C를 Electromotive drug administration을 시행한 경우와 기존의 passive diffusion을 이용한 방법에 대한 RTC trial이 보고되었으며, 저자들은 unifocal disease, multifocal disease모두에서 EMDA를 이용한 mitomycin-C 군에서 효과적으로 RFS를 향상시켰다고 보고함
- 하지만 이러한 열이나 자기장을 이용하기 위해서는 특별한 장치가 필요로 한다는 문제점이 있음
- mitomycin-C 효과를 최적화하기 위한 현재까지의 노력에도 불구하고 다음과 같이 해결해야 할 문제점들이 남아있음 1) 부작용을 최소화 하면서 효과를 높일 수 있는 적절한 약물농도와 2) mitomycin-C의 희석을 막기 위한 수분섭취를 제한함으로써 발생하는 소변의 산성화와 이로 mitomycin-C의 분해(degradation)의 심화, 3) 소변의 알칼리화에 따른 mitomycin-C의 분해(degradation) 정도 및 4) 효과적인 소변 알칼리화를 위한 bicarbonate의 복용방법 및 용량 등에 관한 프로토콜의 개발
- 따라서 본 연구에서는 방광내 mitomycin-C 주입요법을 받는 환자에서 요 중 pH, mitomycin-C와 그 분해산물을 비교하고, 방광 내 mitomycin-C 및 그 분해산물의 농도를 측정하는 방법을 비교하는 프로토콜을 정립하고자함
- 또한 소변의 알칼리화에 영향을 미치는 인자들을 분석하며, 소변의 알칼리화가 유지된 군과 유지되지 못한 군에서 방광암의 조기 재발과 재발에 영향을 미치는 인자를 평가하고자 함
- 나아가 최종적으로는 환자의 상태에 따라 mitomycin-C의 효과를 극대화시킬 수 있는 방안을 마련하고자 함

<대내외 연구와의 중복 여부>

확인된 중복 연구 없음

1-3. 연구개발 범위

- 제2 세부에서 개발한 요 중 mitomycin-C 및 분해산물 측정을 위한 분광학적 방법을 실제 환자 소변에서 검증하고 기존 HPLC 방법 대비 개선 여부를 확인
- 환자 소변의 주요 성분과 mitomycin-C의 분해 정도 및 치료 예후 간의 상관관계를 밝히고 mitomycin-C 투여 후 환자의 예후를 예측할 수 있는 기반자료 마련
- 임상에서 mitomycin-C 투여 방법 최적화 프로토콜 마련하고 이를 검증

## 2. 국내외 기술개발 현황

- 국내에서 소변내 MMC측정을 시도했거나 시행하는 기관은 없으며 본 연구과제가 최초임
- 방광암 치료의 최고 권위 기관인 일본 Keio 대학에서 환자의 요중 pH와 MMC 치료효과의 상관관계를 분석하려는 연구는 있으나 직접적으로 요중 MMC를 측정하여 치료효과와 연관성을 밝힌 사례는 본 연구가 최초임

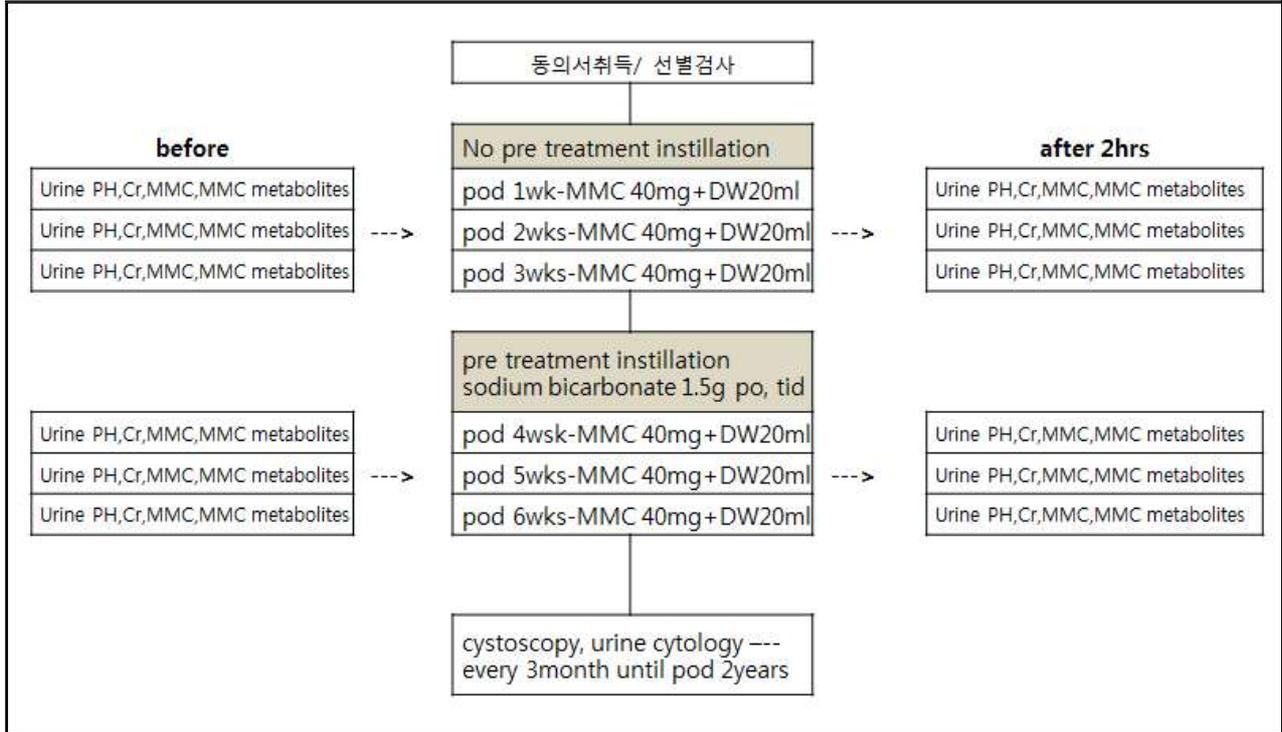
## 3. 연구수행 내용 및 결과

비근침윤성 방광암 환자에서 Mitomycin-C 방광 내 약물주입요법 후 요 중 pH에 따른 Mitomycin-C의 분해 정도 및 그 분해 물질에 대한 연구

- 목표
  - ✓ 요 중 mitomycin-C 및 분해산물 측정을 위한 분광학적 방법을 실제 환자 소변에서 검증하고 기존 HPLC 방법 대비 개선 여부를 확인하여 임상 적용
  - ✓ 환자 소변의 주요 성분과 mitomycin-C의 분해 정도 및 치료 예후 간의 상관관계를 밝히고 mitomycin-C 투여 후 환자의 예후를 예측할 수 있는 기반자료 마련
- 임상연구 디자인
  - Prospective, single center study
  - Cross-over design
  - Comparative study
- 연구대상자
  - Inclusion Criteria
    - 방광암으로 경요도방광종양절제술 시행 후 비근침윤성 방광암으로 진단된 환자 중 mitomycin-C 방광 내 주입요법을 실시하는 환자
    - 동의서에 서명한 환자
  - Exclusion Criteria
    - T1G3
    - CIS가 동반된 환자
    - TaG1, primary, single, 3cm 미만
    - 근침윤성 방광암
    - 경요도방광종양절제술 시행 후 완전절제를 시행하지 못한 경우

- 이전 mitomycin-C 에 과민반응의 병력
- 신경인성 방광
- 최근 3개월 이내 방광 내 약물 주입요법을 받았거나 항암화학요법을 받은 환자

● 연구흐름도



● Patient Recruitment & Registration 연구참여자 모집

방광암으로 경요도방광중양절제술을 시행 후 비근침윤성 방광암으로 진단된 환자 들 가운데, 선정, 제외 기준에 의해 선정되고, 본 임상시험에 대해 충분한 설명을 듣고 자발적으로 동의서에 서명한 환자를 대상으로 한다. 자발적 동의를 위한 설명은 구조화된 동의서 기록양식을 사용하고, 훈련된 연구원에 의해 설명 후 서면 동의를 받음

- 동의서에 서명한 피험자는 통상의 방법에 따라 술후 1-3중에 mitomycin-C 방광내 약물주입요법을 1주 간격으로 6회 시행
- 전반 3주에는 수분섭취를 제한하고, 전처치 없이, mitomycin-C 40mg을 20ml 증류수에 희석하여 사용하고, 약제 주입 전 방광을 완전히 비우도록 처치
- 후반 3주에는 수분섭취를 제한하고, 소변을 염기화 시키기 위해 sodium bicarbonate 1.5g을 전날 저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 복용하도록 함
- mitomycin-C 40mg을 20ml 증류수에 희석하여 사용하고, 약제 주입 전 방광을 완전히 비우도록 함
- mitomycin-C 방광내 약물주입요법을 시행하기 전과 2시간 후에 각각 소변을 받아 요중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 측정하고, 소변을 염기화시키기 위해 sodium bicarbonate 1.5g을 복용한 군과 복용하지 않은 군에서 요중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물과 치료에 동반된 부작용을 비교
- 술후 2년간 3개월 간격으로 방광경검사와 요세포검사를 이용한 추적조사 후 염기화가 효과적으로 이뤄진 군과 이루어지지 못한 군에서 방광암의 조기재발과 재발에 영향을 미치는 인자를 평가

● 연구대상자 표본 크기 산정의 이론적 근거

- 전처치에 따른 소변 내 pH, MMC 및 그 대사산물의 차이를 감지하기 위한 Design에서 각 Parameter를 Setting 하였을 때 Sample Size는 아래와 같이 계산  
(Carry over & period effect가 없다는 가정 하에 paired t-test로 분석)

Alpha (1-sided)	Beta	N
0.025	0.8	18
	0.9	24
0.05	0.8	14
	0.9	19
0.1	0.8	10
	0.9	15

이 중 소변 내 pH를 기준으로 하였을 때 Alpha = 0.05 (2-sided), Power를 90%에서 필요한 환자 수는 24명으로 탈락율 10%를 고려하였을 때 27명을 대상

● 연구 평가

- 요 중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 HPLC 및 spectrophotometer 의 두가지 방법을 이용하여 측정하고 비교
- 소변을 염기화 시키기 위해 sodium bicarbonate 1.5g을 전날 저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 복용한 경우와 그렇지 않은 경우 요중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 비교
- mitomycin-C의 분해에 영향을 미치는 인자들을 분석
- 술 후 2년간 3개월 간격으로 방광경검사와 요세포검사를 이용한 추적조사 후 염기화가 효과적으로 이뤄진 군과 이루어지지 못한 군에서 방광암의 조기재발과 재발에 영향을 미치는 인자를 평가

● 연구 방법

- 이 연구는 방광내 mitomycin-C 주입요법의 효과를 최적화하기 위해 mitomycin-C 및 그 분해산물을 HPLC 및 spectrophotometer 2가지 방법을 이용하여 측정하고, 소변을 염기화 시키기 위해 sodium bicarbonate 1.5g을 전날 저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 복용한 경우와 그렇지 않은 경우 요 중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 비교
- 술 직전 소변을 채취하여 요 중 pH, Cr 수치를 측정하고, 즉시 4°C에 보관
- 술 후 2시간이 지나 환자의 소변을 채취하여 요 중 pH, Cr 수치를 측정하고, 즉시 4°C에 보관
- 술 전 채취한 소변을 기준 시료로 하고, 술 후 소변에서 mitomycin-C와 분해물의 농도를 HPLC와 spectroscopy를 이용하여 측정

● 통계적 방법

- 요중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 HPLC 및 spectrophotometer 의 두가지 방법을 이용하여 측정하고 비교
- 소변을 염기화 시키기 위해 sodium bicarbonate 1.5g을 전날 저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 복용한 경우와 그렇지 않은 경우 요중 pH, Cr, mitomycin-C 및 그 분해산물을 비교
- mitomycin-C의 분해에 영향을 미치는 인자들을 분석
- 술 후 2년간 3개월 간격으로 방광경검사와 요세포검사를 이용한 추적조사 후 염기화가 효과적으로 이뤄진 군과 이루어지지 못한 군에서 방광암의 조기재발과 재발에 영향을 미치는 인자를 평가
- 방광암의 재발에 영향을 미치는 인자를 regression방법으로 보정한 후 소변염기화가 방광암의 재발에 미치는지를 분석

● HPLC를 이용한 요 중 mitomycin-C의 분석

✓ 요 중 Mitomycine C 분석목적

이 시험방법은 방광암 환자에서 mitomycin-C 방광 내 약물주입요법 후 요 중 pH에 따른 mitomycin-C의 분해 정도를 LC-MS/MS로 분석하는 방법임

✓ 시약 및 분석기기

1) 시약

① 표준시약 : mitomycin-C 0.5 mg/ml in methanol(from )을 표준원액으로 표준물질의 순도가 99% 이상을 사용

② 내부표준시약 : mitomycin-C 내부표준시약은 특급이상을 사용하며 표준물질의 순도가 99% 이상을 사용

③ 시약 : 모든 시약은 HPLC 등급 이상을 사용  
Acetonitrile(Avantor), Methylene Chloride (Fisher), formic acid (MERCK), ammonium formate (Sigma), Water(Fisher).

2) 분석기기 및 조건

① 측정장비

- Mass Spectrometry : Triple Quadrupole 5500, AB Sciex
- LC : Agilent 1260 series

② 기기의 분석조건

구 분	조 건
column	Ultrasphere C18 4.6x150 mm 5 um
Scan type	MRM
ion mode	positive
GS1	30
GS2	50
TEM	600
Injection volume	20 ul
Flow rate	0.5 ml/min

■ 요 중 Mitomycine C 분석절차

1) 실험방법

15ml conical tube에 100  $\mu$ l 소변과 1 ug/ml porfiromycin (PFM) (internal standards) 50 $\mu$ l (= 50 ng)을 넣고 DCM 2mL을 넣어 추출한다. 1 ml의 DCM을 취해 50 $^{\circ}$ C에서 20분 농축한다. 500 $\mu$ l 이동상 용액에 녹여 분석

2) 결과처리

전처리 된 시료 20  $\mu$ l을 주입하여 시료의 질량값을 측정하고 검정곡선으로부터 농도를 구한 다음 ug/L 단위로 나타

■ Validation

(1) 직선성 : Mitomycine C 표준용액을 각 단계별로 methanol로 희석하여 1, 5, 20 ng/ml 로 조제한다.

$$\text{mean } y=0.00434x+0.0179 \quad (R^2 = 0.9997)$$

(2) 검출한계 : 20 ng/ml

● 연구수행 내용 및 결과

✓ mitomycin 투여 전 환자 소변의 pH 측정

- mitomycin C의 분해정도는 소변 중 pH에 영향을 많이 받는 것으로 확인됨. 따라서 환자에 mitomycin C 주입 전 일반적인 소변의 pH를 측정하고, mitomycin C의 분해 정도 및 처치 후 예후와 연관성을 확인함.

- 또한 sodium bicarbonate 경구 투여 여부에 따른 요중 pH 변화를 확인할 수 있었음.

w/o NaHCO3 dosing		w/ NaHCO3 dosing	
Sample Name	Initial pH	Sample Name	Initial pH
MMC001-pre-01	5.65	MMC001-pre-04	6.64
MMC001-pre-02	5.80	MMC001-pre-05	7.48
MMC001-pre-03	5.17		
MMC002-pre-01	6.77	MMC002-pre-04	6.81
MMC002-pre-02	5.52	MMC002-pre-05	6.77
MMC002-pre-03	6.10	MMC002-pre-06	6.56
MMC003-pre-01	5.56	MMC003-pre-04	7.61
MMC003-pre-02	5.55	MMC003-pre-05	6.77
MMC003-pre-03	5.93	MMC003-pre-06	6.85
MMC004-pre-01	6.51	MMC004-pre-04	7.14
MMC004-pre-02	5.59	MMC004-pre-05	6.64
MMC004-pre-03	6.02	MMC004-pre-06	6.60
MMC005-pre-01	6.09	MMC005-pre-04	6.47
MMC005-pre-02	6.18	MMC005-pre-05	5.44
MMC005-pre-03	6.06	MMC005-pre-06	5.90
MMC006-pre-01	6.64	MMC006-pre-04	7.49
MMC006-pre-02	5.88	MMC006-pre-05	7.14
MMC006-pre-03	6.10	MMC006-pre-06	7.44
MMC007-pre-01	6.64	MMC007-pre-04	7.01
MMC007-pre-02	6.93	MMC007-pre-05	6.89
MMC007-pre-03	6.47	MMC007-pre-06	7.48
MMC008-pre-01	5.13		
MMC009-pre-01	5.93	MMC009-pre-04	6.83
MMC009-pre-02	5.30	MMC009-pre-05	6.30
MMC009-pre-03	5.30	MMC009-pre-06	6.14
MMC010-pre-01	6.03	MMC010-pre-04	7.53
MMC010-pre-02	6.92	MMC010-pre-05	6.68
MMC010-pre-03	5.80	MMC010-pre-06	7.35
MMC011-pre-01	5.29	MMC011-pre-04	5.51
MMC011-pre-02	4.96	MMC011-pre-05	5.14
MMC011-pre-03	5.26	MMC011-pre-06	5.32
MMC012-pre-01	6.41	MMC012-pre-04	6.31
MMC012-pre-02	5.56	MMC012-pre-05	5.97
MMC012-pre-03	5.47	MMC012-pre-06	6.15
MMC013-pre-01	5.63	MMC013-pre-04	5.93
MMC013-pre-02	5.97	MMC013-pre-05	5.55
MMC013-pre-03	6.01	MMC013-pre-06	6.52

MMC014-pre-01	5.55	MMC014-pre-04	6.81
MMC014-pre-02	5.48	MMC014-pre-05	5.93
MMC014-pre-03	5.63	MMC014-pre-06	5.42
MMC015-pre-01	6.13	MMC015-pre-04	6.61
MMC015-pre-02	5.44	MMC015-pre-05	6.97
MMC015-pre-03	5.81	MMC015-pre-06	6.48
MMC017-pre-01	5.35	MMC017-pre-04	7.35
MMC017-pre-02	7.57	MMC017-pre-05	5.40
MMC017-pre-03	6.74	MMC017-pre-06	5.47
MMC018-pre-01	5.92	MMC018-pre-04	6.43
MMC018-pre-02	7.44	MMC018-pre-05	7.28
MMC018-pre-03	5.74	MMC018-pre-06	5.59
MMC019-pre-01	5.69	MMC019-pre-04	6.23
MMC019-pre-02	7.39	MMC019-pre-05	7.59
MMC019-pre-03	6.67	MMC019-pre-06	7.19
MMC020-pre-01	5.31	MMC020-pre-04	7.13
MMC020-pre-02	5.72	MMC020-pre-05	6.42
MMC020-pre-03	5.48	MMC020-pre-06	6.63
MMC021-pre-01	5.80	MMC021-pre-04	5.86
MMC021-pre-02	5.63	MMC021-pre-05	6.31
MMC021-pre-03	6.92	MMC021-pre-06	6.89
MMC022-pre-01	7.38	MMC022-pre-04	6.23
MMC022-pre-02	5.50	MMC022-pre-05	5.86
MMC022-pre-03	5.06	MMC022-pre-06	6.25
MMC023-pre-01	7.22	MMC023-pre-04	7.24
MMC023-pre-02	6.33	MMC023-pre-05	6.84
MMC023-pre-03	5.76	MMC023-pre-06	6.63
MMC024-pre-01	5.54	MMC024-pre-04	5.10
MMC024-pre-02	5.20	MMC024-pre-05	5.21
MMC024-pre-03	6.12	MMC023-pre-06	5.04
MMC025-pre-01	7.08	MMC025-pre-04	7.50
MMC025-pre-02	7.44	MMC025-pre-05	7.69
MMC025-pre-03	5.55	MMC025-pre-06	6.35
MMC026-pre-01	6.18	MMC026-pre-04	5.83
MMC026-pre-02	6.56	MMC026-pre-05	5.53
MMC026-pre-03	5.58	MMC026-pre-06	5.90

표. mitomycin 투여 전 환자 소변의 pH 측정 결과

- MMC 투여 전 채취된 전체 sample 수는 144종이며, 이중 sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않는 환자의 샘플은 73종, 투여한 환자의 sample은 71종
- 이중 극히 낮은 pH라고 판단되는 pH 5.0 이하의 경우는 sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않은 환자에서 단 한 경우만 관찰됨
- sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않은 환자의 평균적인 요중 pH 값은 6.00 이며 표준편차는 0.65 였으며, sodium bicarbonate를 경구 투여한 환자의 평균적인 요중 pH 값은 6.47 이며 표준편차는 0.72였음
- 이러한 결과는 sodium bicarbonate를 경구 투여할 경우에 요중 pH가 유의하게 높아지는 것을 의미함

	w/o NaHCO3 dosing	w/ NaHCO3 dosing
No. of sample	73	71
pH 5.0 미만	1	0
pH 5.0 이상 5.5 미만	14	9
pH 5.5 이상 6.0 미만	27	12
pH 6.0 이상 7.0 미만	24	32
pH 7.0 이상	7	18
pH 평균	6.00	6.47
pH 표준편차	0.65	0.72

표. mitomycin 투여 전 환자 소변의 pH 분포

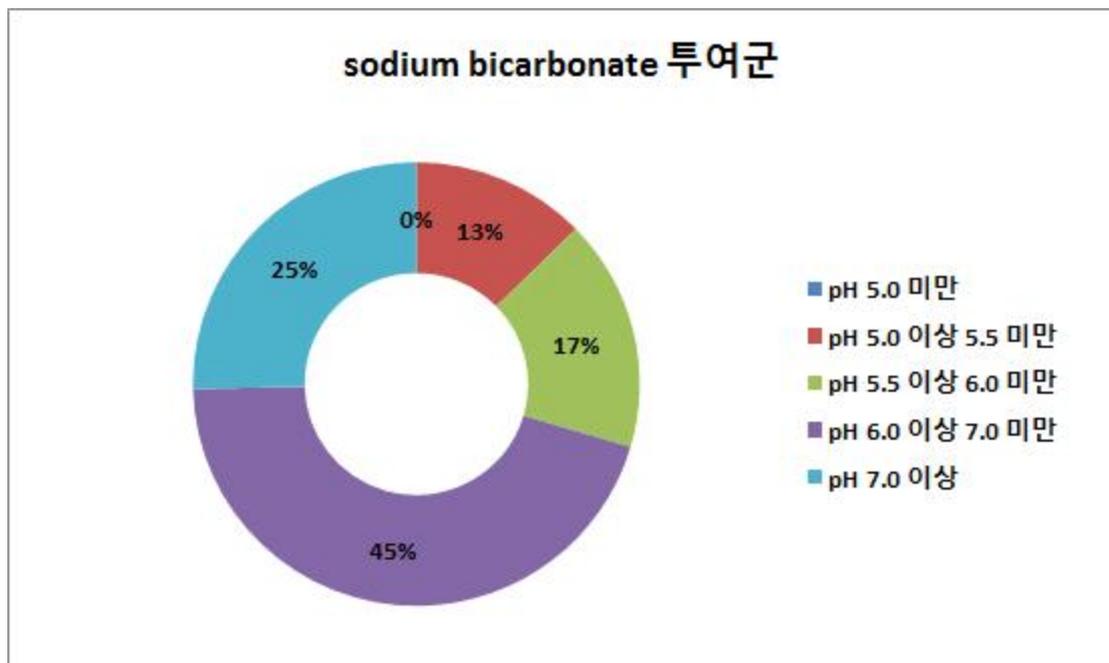
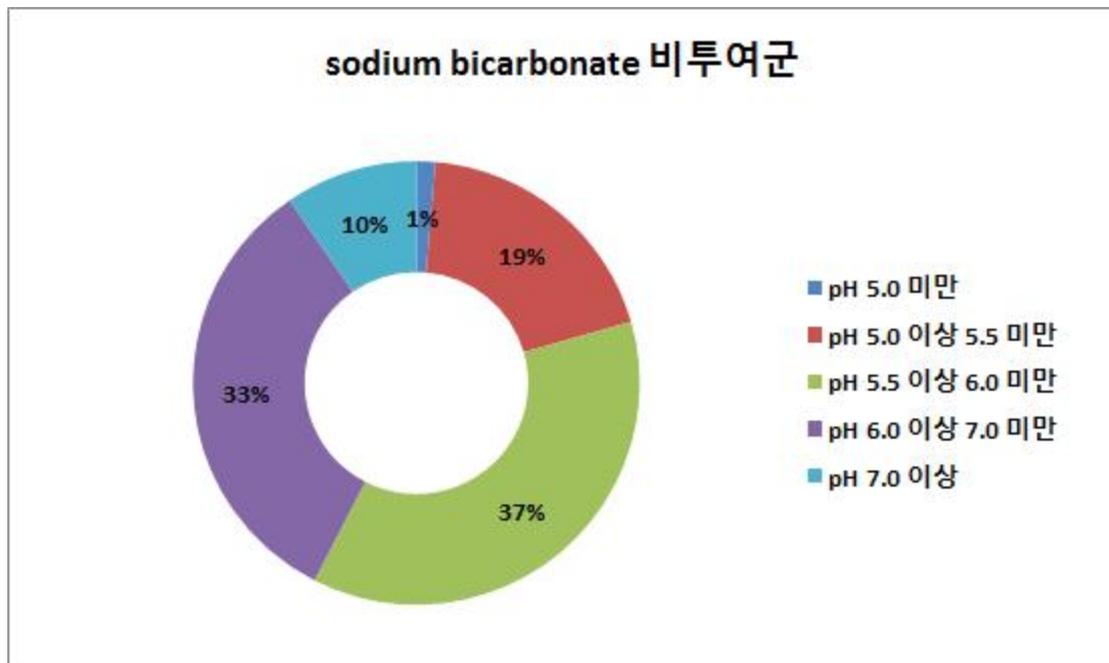


그림. sodium bicarbonate 경구 투여 여부에 따른 MMC 주입 전 pH 분포 비율

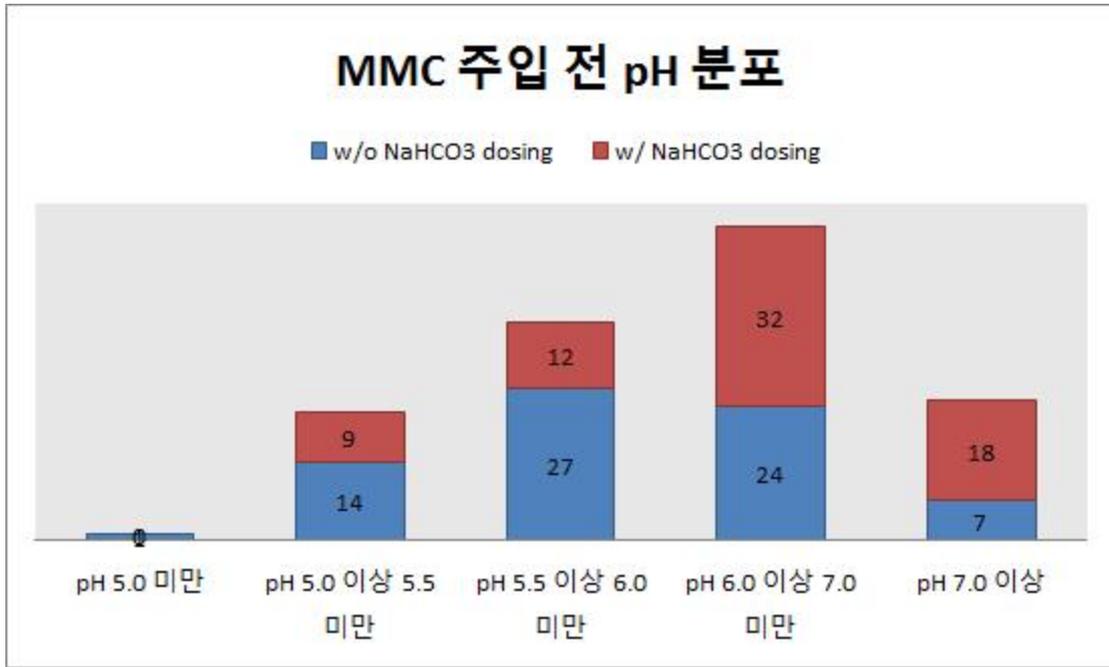


그림. sodium bicarbonate 경구 투여에 따른 MMC 주입 전 pH 변화도

✓ mitomycin 투여 후 환자 소변의 pH 측정

mitomycin C가 방광 내에 주입된 후, 실질적인 치료 과정에서 mitomycin C 용액의 pH를 측정하였음.

w/o NaHCO3 dosing		w/ NaHCO3 dosing	
Sample Name	Initial pH	Sample Name	Initial pH
MMC001-post-01	6.65	MMC001-post-04	7.65
MMC001-post-02	6.85	MMC001-post-05	7.99
MMC001-post-03	6.22		
MMC002-post-01	6.64	MMC002-post-04	7.35
MMC002-post-02	5.76	MMC002-post-05	7.05
MMC002-post-03	6.77	MMC002-post-06	7.33
MMC003-post-01	5.93	MMC003-post-04	7.51
MMC003-post-02	5.84	MMC003-post-05	7.43
MMC003-post-03	6.26	MMC003-post-06	7.52
MMC004-post-01	7.01	MMC004-post-04	7.65
MMC004-post-02	6.6	MMC004-post-05	7.39
MMC004-post-03	6.7	MMC004-post-06	7.6
MMC005-post-01	7.02	MMC005-post-04	7.1
MMC005-post-02	6.99	MMC005-post-05	6.14
MMC005-post-03	6.51	MMC005-post-06	7.35
MMC006-post-01	6.8	MMC006-post-04	7.1
MMC006-post-02	6.37	MMC006-post-05	7.05
MMC006-post-03	6.26	MMC006-post-06	7.01
MMC007-post-01	6.65	MMC007-post-04	7.61
MMC007-post-02	7.29	MMC007-post-05	7.65
MMC007-post-03	6.78	MMC007-post-06	7.69
MMC008-post-01	6.01		

MMC009-post-01	6.1	MMC009-post-04	7.2
MMC009-post-02	5.91	MMC009-post-05	7.73
MMC009-post-03	6.18	MMC009-post-06	7.78
MMC010-post-01	6.79	MMC010-post-04	7.66
MMC010-post-02	6.66	MMC010-post-05	7.43
MMC010-post-03	7.22	MMC010-post-06	7.26
MMC011-post-01	5.82	MMC011-post-04	6.93
MMC011-post-02	5.91	MMC011-post-05	6.9
MMC011-post-03	6.68	MMC011-post-06	6.49
MMC012-post-01	7.39	MMC012-post-04	7.18
MMC012-post-02	7.56	MMC012-post-05	7.05
MMC012-post-03	6.64	MMC012-post-06	7.39
MMC013-post-01	5.48	MMC013-post-04	6.4
MMC013-post-02	6	MMC013-post-05	6.39
MMC013-post-03	5.89	MMC013-post-06	7.13
MMC014-post-01	5.76	MMC014-post-04	7.22
MMC014-post-02	5.46	MMC014-post-05	5.69
MMC014-post-03	5.68	MMC014-post-06	6.07
MMC015-post-01	5.18	MMC015-post-04	7.02
MMC015-post-02	5.76	MMC015-post-05	7.22
MMC015-post-03	6.61	MMC015-post-06	7.52
MMC017-post-01	5.63	MMC017-post-04	7.83
MMC017-post-02	7.74	MMC017-post-05	7.33
MMC017-post-03	7.31	MMC017-post-06	7.82
MMC018-post-01	7.21	MMC018-post-04	7.35
MMC018-post-02	7.36	MMC018-post-05	7.37
MMC018-post-03	7	MMC018-post-06	7.82
MMC019-post-01	6.71	MMC019-post-04	7.18
MMC019-post-02	7.35	MMC019-post-05	7.37
MMC019-post-03	6.42	MMC019-post-06	7.44
MMC020-post-01	6.05	MMC020-post-04	7.86
MMC020-post-02	6.54	MMC020-post-05	7.67
MMC020-post-03	7.17	MMC020-post-06	7.48
MMC021-post-01	5.49	MMC021-post-04	6.54
MMC021-post-02	5.37	MMC021-post-05	7.03
MMC021-post-03	6.54	MMC021-post-06	7.34
MMC022-post-01	7.69	MMC022-post-04	7.45
MMC022-post-02	7.04	MMC022-post-05	7.45
MMC022-post-03	6.42	MMC022-post-06	7.13
MMC023-post-01	7.13	MMC023-post-04	7.5
MMC023-post-02	6.85	MMC023-post-05	7.39
MMC023-post-03	6.39	MMC023-post-06	7.13
MMC024-post-01	6.05	MMC024-post-04	6.98
MMC024-post-02	5.76	MMC024-post-05	7.21
MMC024-post-03	6.92		
MMC025-post-01	6.76	MMC025-post-04	7.71
MMC025-post-02	6.93	MMC025-post-05	7.57
MMC025-post-03	6.68	MMC025-post-06	7.35
MMC026-post-01	7.34	MMC026-post-04	7.26
MMC026-post-02	6.08	MMC026-post-05	6.6

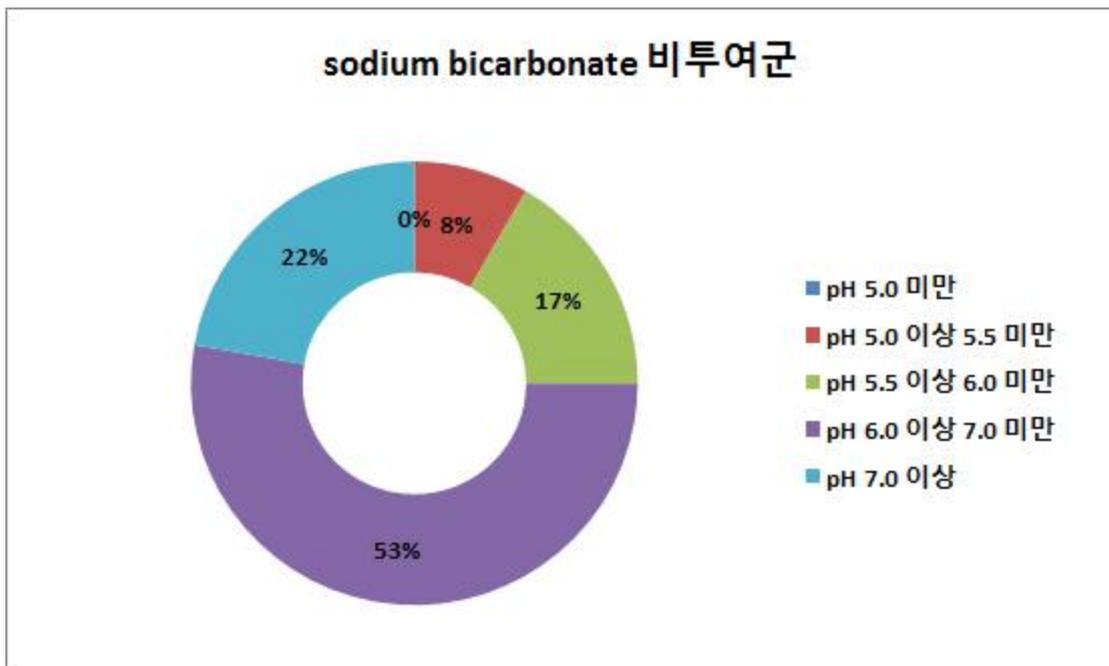
MMC026-post-03	5.48	MMC026-post-06	7.14
----------------	------	----------------	------

표 .mitomycin 투여 후 환자 소변의 pH 측정 결과

- MMC 투여 후 채취된 전체 sample 수는 143종이며, 이중 sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않는 환자의 샘플은 73종, 투여한 환자의 sample은 70종
- 이중 MMC 투여 후 MMC의 활성에 큰 영향을 줄거라 예상되는 pH로 판단되는 pH 5.0 이하의 경우는 없었음
- sodium bicarbonate를 경구 투여하지 않은 환자의 평균적인 요중 pH 값은 6.49 이며 표준편차는 0.62 였으며, sodium bicarbonate를 경구 투여한 환자의 평균적인 요중 pH 값은 7.26 이며 표준편차는 0.44였음
- 이러한 결과는 sodium bicarbonate를 경구 투여할 경우에 요중 pH가 유의하게 높아지는 것을 의미함

	w/o NaHCO3 dosing	w/ NaHCO3 dosing
No. of sample	73	70
pH 5.0 미만	0	0
pH 5.0 이상 5.5 미만	6	0
pH 5.5 이상 6.0 미만	12	1
pH 6.0 이상 7.0 미만	38	10
pH 7.0 이상	16	59
pH 평균	6.49	7.26
pH 표준편차	0.62	0.44

표. mitomycin 투여 후 환자 소변의 pH 분포



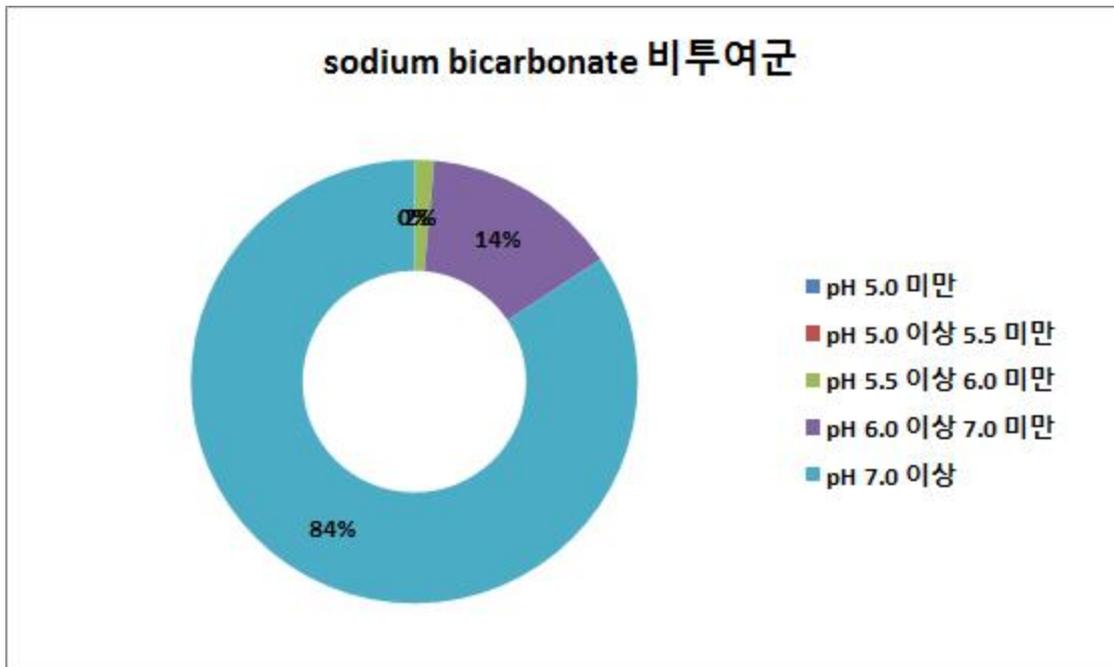


그림. sodium bicarbonate 경구 투여 여부에 따른 MMC 주입 후 pH 분포 비율

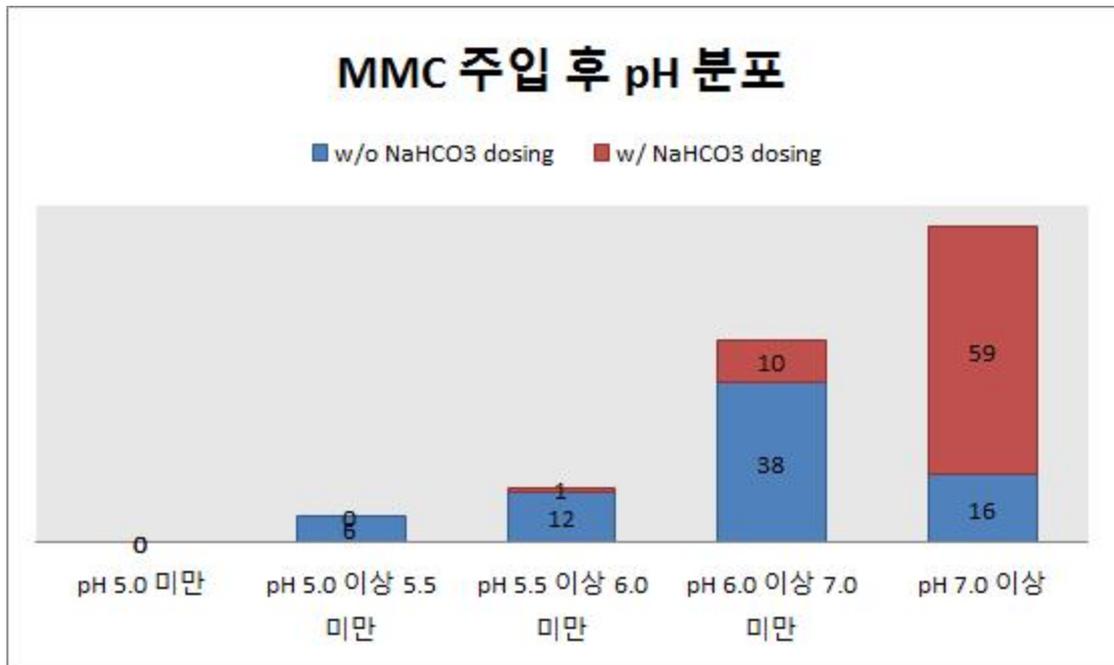


그림. sodium bicarbonate 경구 투여에 따른 MMC 주입 후 pH 변화도

✓ MMC 주입 전후 소변의 pH 변화

- 연구 결과에 따르면, MMC는 산성 조건에서 활성을 상실하는 것으로 알려져 있음. 또한 MMC는 화학구조에서 아민을 포함하고 있어 약한 염기성을 지니는 것으로 알려짐.
- 따라서 MMC의 방광내 주입 과정에서 요중 pH의 변화가 있을 것이라 예상되었으며, 실제 시험 결과에서도 sodium bicarbonate 비투여군에서는 MMC 투여 전 평균 pH  $6.00 \pm 0.65$ 에서 투여 후  $6.49 \pm 0.62$ 로 0.49 상승하였으며, sodium bicarbonate 투여군에서는 MMC 투여 전 평균 pH  $6.47 \pm 0.72$ 에서 투여 후  $7.26 \pm 0.44$ 로 0.79 상승하였음
- 이러한 결과는 MMC 투여 과정 중 pH는 투여 전 pH와 상이할 수 있으며, 정확한 수치는 MMC 투여

후 배출된 요중 pH를 기준으로 해야 함을 의미함 (cf. Keio대학의 연구 결과는 MMC 주입 전 요중 pH를 측정한 수치이며, 본 연구 결과에 따르면 이들의 연구 결과는 신빙성이 약함을 확인)

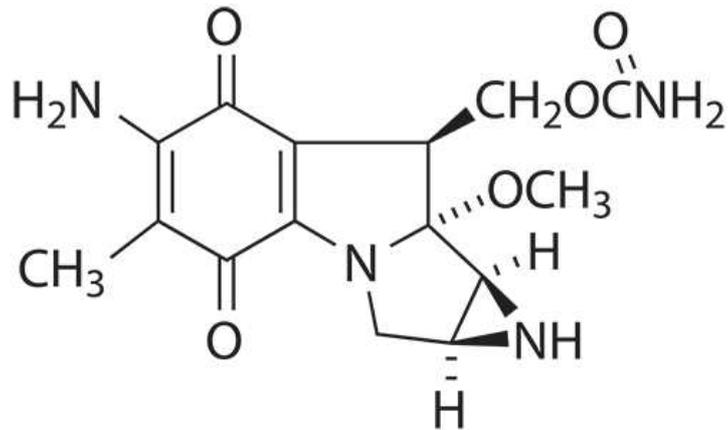


그림. MMC의 화학구조

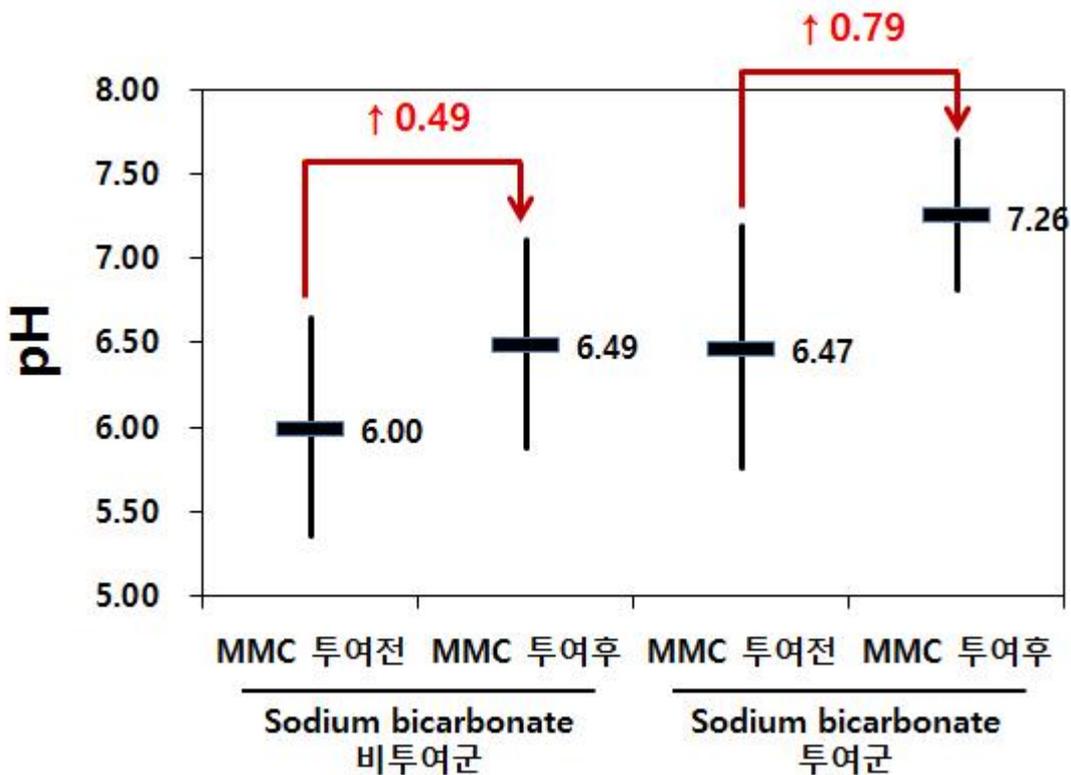


그림. MMC의 투여 전 후 요중 pH 변화

✓ sodium bicarbonate 경구 투여 여부에 따른 pH 변화

- 요중 pH가 MMC의 활성화에 영향을 미친다는 연구 결과에 기인하여 임상에서는 sodium bicarbonate의 경구 투여에 대한 비교 시험이 진행 중임. 본 연구에서는 sodium bicarbonate의 경구 투여가 요중 pH의 변화에 영향을 주는지 확인을 위하여, 경구 투여 유무에 따른 MMC 투입 전과 후의 pH 변화를 확인하였음
- 그 결과, MMC 주입 전 요중 평균 pH는  $6.00 \pm 0.65$ 에서  $6.47 \pm 0.72$ 으로 0.47이 상승하였으며, MMC 주입 후 요중 평균 pH는  $6.49 \pm 0.62$ 에서  $7.26 \pm 0.44$ 로 0.77 상승하는

것을 확인하였음.

- 결과적으로 sodium bicarbonate의 경구 투여는 요중 pH를 유의하게 상승시키는 것으로 확인되었음.

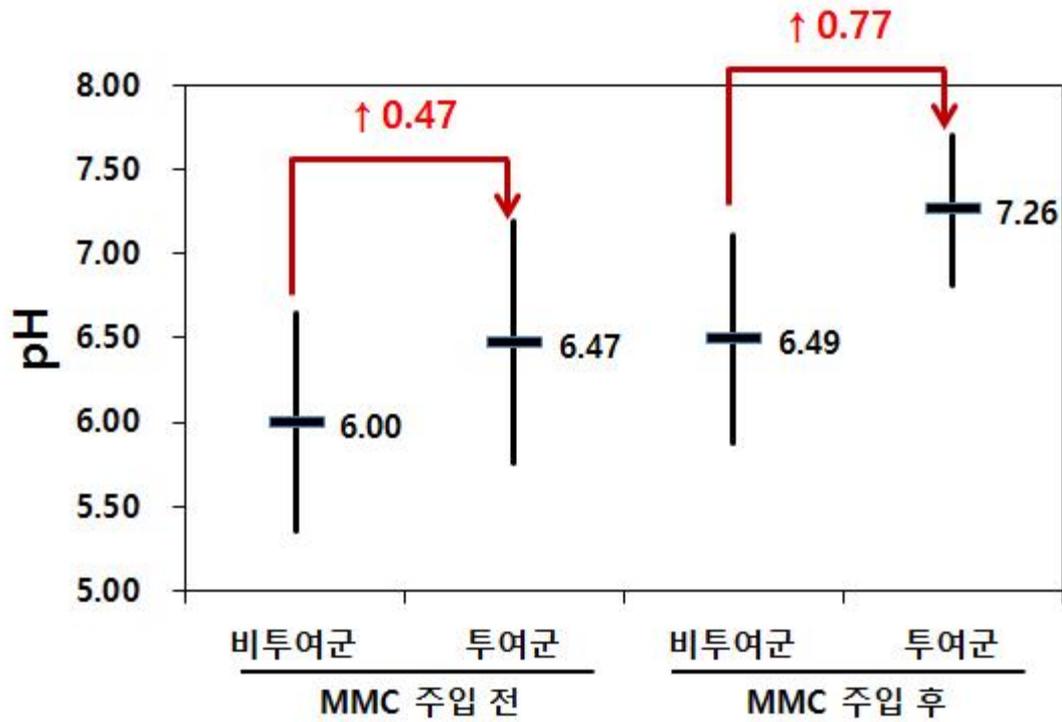


그림. sodium bicarbonate 경구 투여 여부에 따른 pH 변화

● HPLC를 이용한 환자 소변 중 mitomycin C 농도 측정

신규 개발한 spectrophotometry 기법을 이용한 mitomycin C의 농도 측정 방법의 유의성 및 정확성을 기존 HPLC 측정 방법과 비교하고 소변 중 mitomycin C의 희석 비율을 확인하고자 LC-MS를 이용하여 mitomycin C의 농도를 측정하였음

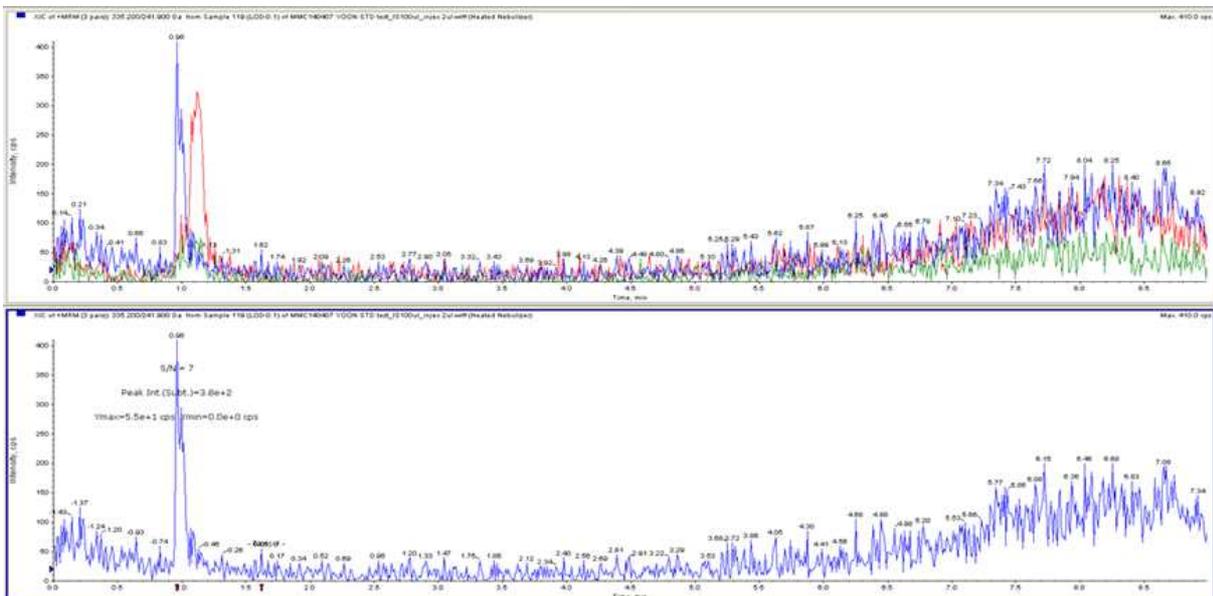


그림. LC-MS를 이용한 환자별 소변 중 mitomycin C 농도 측정

Sample Name	Fresh MMC (ug/nL)		Sample Name	Fresh MMC (ug/nL)
MMC001-post-01	145.2		MMC014-post-01	188.0
MMC001-post-02	107.3		MMC014-post-02	119.2
MMC001-post-03	74.2		MMC014-post-03	169.6
MMC001-post-04	236.4		MMC014-post-04	141.2
MMC001-post-05	184.8		MMC014-post-05	49.2
			MMC014-post-06	94.8
MMC002-post-01	33.4		MMC015-post-01	89.6
MMC002-post-02	364.8		MMC015-post-02	70.8
MMC002-post-03	48.1		MMC015-post-03	74.0
MMC002-post-04	84.7		MMC015-post-04	97.2
MMC002-post-05	55.2		MMC015-post-05	139.2
MMC002-post-06	75.6		MMC015-post-06	95.6
MMC003-post-01	79.0			
MMC003-post-02	66.5			
MMC003-post-03	48.8			
MMC003-post-04	99.1			
MMC003-post-05	96.8			
MMC003-post-06	200.4			
MMC004-post-01	55.6		MMC017-post-01	112.2
MMC004-post-02	32.2		MMC017-post-02	246.0
MMC004-post-03	58.9		MMC017-post-03	182.4
MMC004-post-04	48.2		MMC017-post-04	72.5
MMC004-post-05	21.2		MMC017-post-05	69.1
MMC004-post-06	152.4		MMC017-post-06	178.8
MMC005-post-01	58.4		MMC018-post-01	266.4
MMC005-post-02	79.8		MMC018-post-02	80.5
MMC005-post-03	51.1		MMC018-post-03	153.6
MMC005-post-04	57.2		MMC018-post-04	250.8
MMC005-post-05	23.5		MMC018-post-05	49.0
MMC005-post-06	411.6		MMC018-post-06	172.8
MMC006-post-01	89.5		MMC019-post-01	224.4
MMC006-post-02	261.6		MMC019-post-02	165.6
MMC006-post-03	108.2		MMC019-post-03	115.0
MMC006-post-04	66.7		MMC019-post-04	170.4
MMC006-post-05	70.0		MMC019-post-05	107.5
MMC006-post-06	256.8		MMC019-post-06	157.2
MMC007-post-01	49.4		MMC020-post-01	126.0
MMC007-post-02	37.7		MMC020-post-02	125.9
MMC007-post-03	56.4		MMC020-post-03	93.4
MMC007-post-04	44.0		MMC020-post-04	138.0
MMC007-post-05	78.7		MMC020-post-05	136.8
MMC007-post-06	29.8		MMC020-post-06	62.2
MMC008-post-01	166.0		MMC021-post-01	151.2
			MMC021-post-02	184.8
			MMC021-post-03	154.8
			MMC021-post-04	283.2
			MMC021-post-05	200.4
			MMC021-post-06	188.3
MMC009-post-01	95.2		MMC022-post-01	66.5
MMC009-post-02	127.2		MMC022-post-02	61.8

MMC009-post-03	152.8		MMC022-post-03	163.2
MMC009-post-04	366.4		MMC022-post-04	108.0
MMC009-post-05	496.0		MMC022-post-05	61.9
MMC009-post-06	245.2		MMC022-post-06	61.4
MMC010-post-01	141.2		MMC023-post-01	107.6
MMC010-post-02	192.8		MMC023-post-02	39.0
MMC010-post-03	126.4		MMC023-post-03	88.0
MMC010-post-04	178.4		MMC023-post-04	122.0
MMC010-post-05	88.0		MMC023-post-05	77.2
MMC010-post-06	118.0		MMC023-post-06	68.4
MMC011-post-01	137.2		MMC024-post-01	116.8
MMC011-post-02	176.4		MMC024-post-02	52.0
MMC011-post-03	70.4		MMC024-post-03	74.0
MMC011-post-04	116.0		MMC024-post-04	143.6
MMC011-post-05	203.6		MMC024-post-05	177.6
MMC011-post-06	193.0			
MMC012-post-01	132.4		MMC025-post-01	222.0
MMC012-post-02	139.6		MMC025-post-02	138.8
MMC012-post-03	36.1		MMC025-post-03	259.6
MMC012-post-04	35.7		MMC025-post-04	107.6
MMC012-post-05	27.3		MMC025-post-05	150.8
MMC012-post-06	58.8		MMC025-post-06	158.4
MMC013-post-01	104.4		MMC026-post-01	58.0
MMC013-post-02	46.0		MMC026-post-02	194.4
MMC013-post-03	135.2		MMC026-post-03	182.8
MMC013-post-04	100.5		MMC026-post-04	183.6
MMC013-post-05	132.8		MMC026-post-05	199.6
MMC013-post-06	121.2		MMC026-post-06	247.6

표. HPLC를 이용한 환자 요중 MMC 농도 분석

- 환자 요중 MMC 농도 측정을 위한 sample 수는 총 143종이었으며, 평균 MMC 농도는 128.0 ug/mL, 최저 농도는 21.2 ug/mL이고 최고 농도는 496 ug/mL로 확인됨

✓ 환자 소변의 creatinine 수치 분석

- 제1세부과제의 연구 결과, mitomycin C가 방광 내에 주입되어 있을 때, mitomycin C는 pH뿐만 아니라 creatinine에 의해서도 분해가 촉진되는 것을 확인하였음. 따라서 소변 중 creatinine 수치와 mitomycin C 및 예후의 상관관계를 확인하고자 환자 소변에서 creatinine 농도를 분석하였음.

Sample	Creatinine (mg/L)	Sample	Creatinine (mg/dL)	Sample	Creatinine (mg/L)
MMC001-01	1028	MMC006-01	840	MMC011-01	2540
MMC001-02	1196	MMC006-02	996	MMC011-02	1444
MMC001-03	912	MMC006-03	1188	MMC011-03	3676
MMC001-04	920	MMC006-04	360	MMC011-04	4644
MMC001-05	692	MMC006-05	260	MMC011-05	3628
MMC001-06		MMC006-06	1344	MMC011-06	3712
MMC002-01	276	MMC007-01	956	MMC012-01	1732

MMC002-02	1900	MMC007-02	752	MMC012-02	1368
MMC002-03	1176	MMC007-03	740	MMC012-03	964
MMC002-04	1372	MMC007-04	708	MMC012-04	1224
MMC002-05	488	MMC007-05	756	MMC012-05	1604
MMC002-06	1064	MMC007-06	576	MMC012-06	1112
MMC003-01	1304	MMC008-01	1292	MMC013-01	1556
MMC003-02	932	MMC008-02		MMC013-02	632
MMC003-03	212	MMC008-03		MMC013-03	1352
MMC003-04	1388	MMC008-04		MMC013-04	2515
MMC003-05	2644	MMC008-05		MMC013-05	3748
MMC003-06	1252	MMC008-06		MMC013-06	2896
MMC004-01	596	MMC009-01	732	MMC014-01	1932
MMC004-02	624	MMC009-02	2564	MMC014-02	1548
MMC004-03	776	MMC009-03	3364	MMC014-03	1628
MMC004-04	784	MMC009-04	1868	MMC014-04	1576
MMC004-05	380	MMC009-05	2312	MMC014-05	1700
MMC004-06	1720	MMC009-06	2204	MMC014-06	2288
MMC005-01	1464	MMC010-01	1624	MMC015-01	192
MMC005-02	1368	MMC010-02	1468	MMC015-02	404
MMC005-03	2056	MMC010-03	1704	MMC015-03	340
MMC005-04	1132	MMC010-04	1260	MMC015-04	580
MMC005-05	1096	MMC010-05	1524	MMC015-05	1068
MMC005-06	2016	MMC010-06	1316	MMC015-06	788

- 전체 평균 1,427 mg/L 이고, 최저 농도는 260 mg/L, 최고 농도는 4644 mg/L인 것으로 확인 됨.
- 각 환자별 분석 결과는 다음 그림과 같음

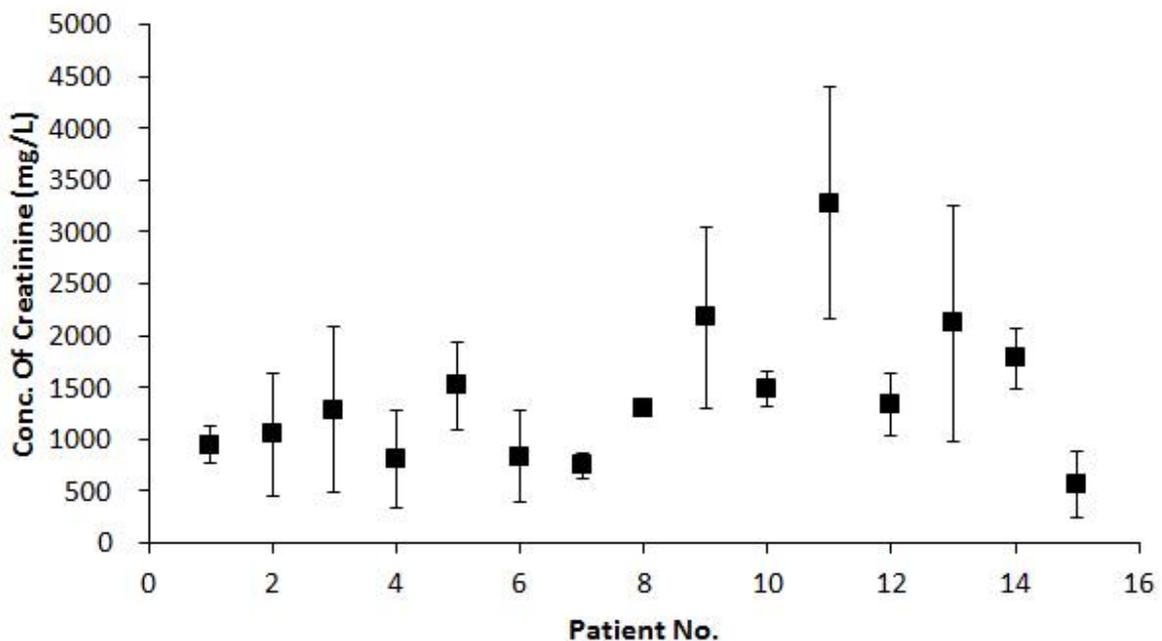


그림 . 환자별 소변 중 creatinine 농도 측정

✓ 환자 소변 중 활성 MMC의 농도와 각 요소 간의 상관관계 분석

- 지금까지 타 기관의 연구 결과에 따르면, pH만이 활성 상태 MMC의 농도에 영향을 주는 주요 요인으로 알려져 있음
- 본 연구팀에서는 MMC 투여 전 pH뿐만 아니라 투여 후 pH, 소변 부피, creatinine 수치에 따른 상관관계를 분석하였음

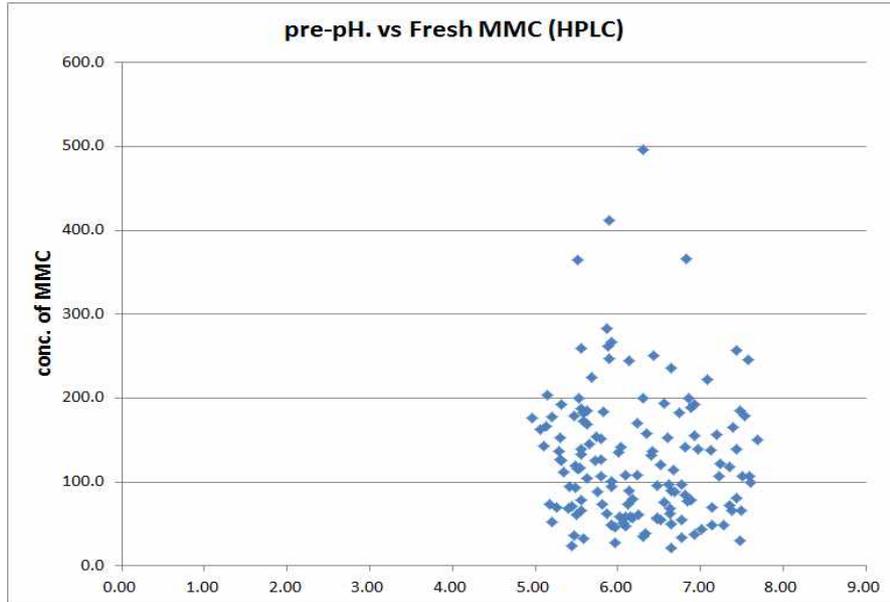


그림. MMC 투여 전 pH와 활성 MMC의 상관관계

- 확인 결과, MMC 투여 전 pH와 활성 MMC의 농도 간에는 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 확인되었음

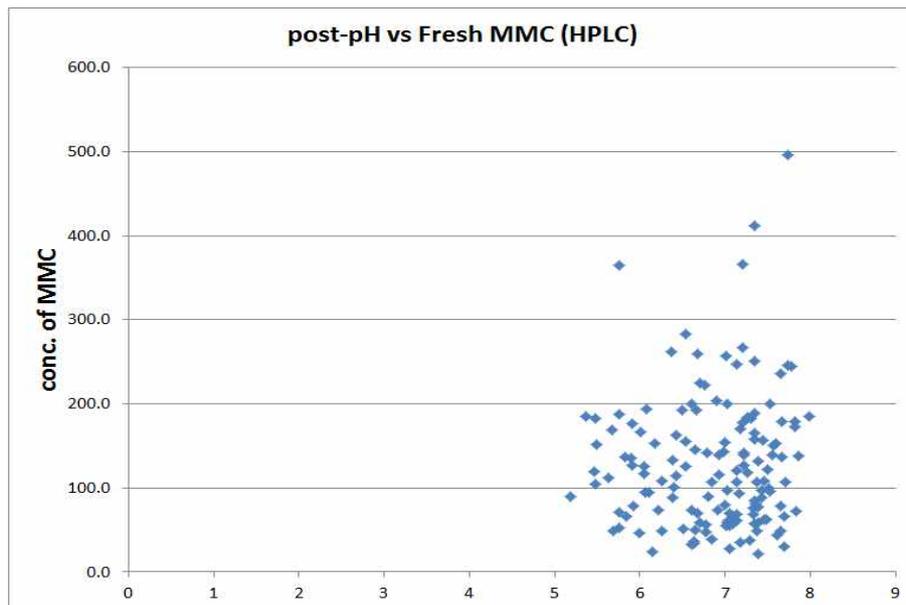


그림. MMC 투여 후 pH와 활성 MMC의 상관관계

- 확인 결과, MMC 투여 후 pH와 활성 MMC의 농도 간에는 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 확인되었음

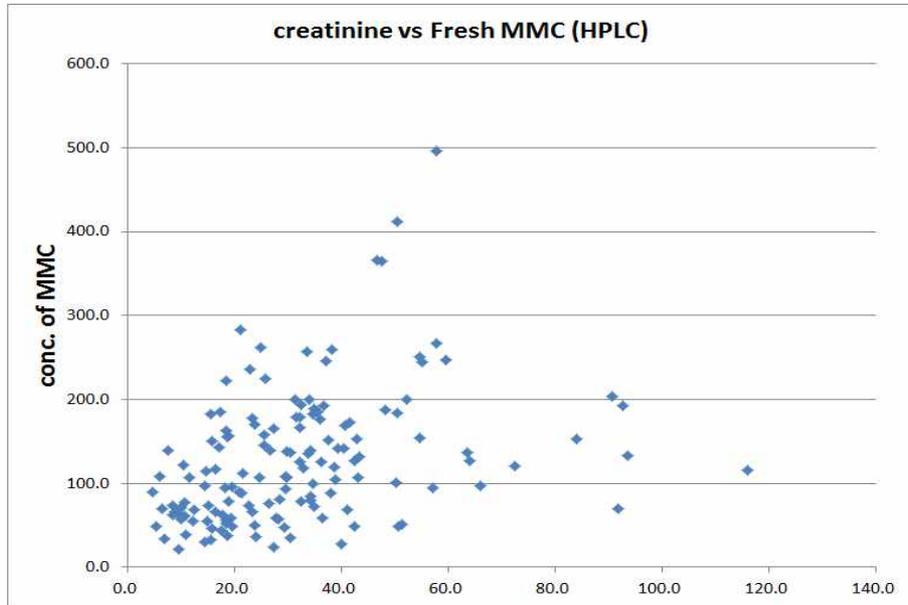


그림. 요중 creatinine 농도와 활성 MMC의 상관관계

- 확인 결과, 요중 creatinine 농도와 활성 MMC의 농도 간에는 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 확인되었음

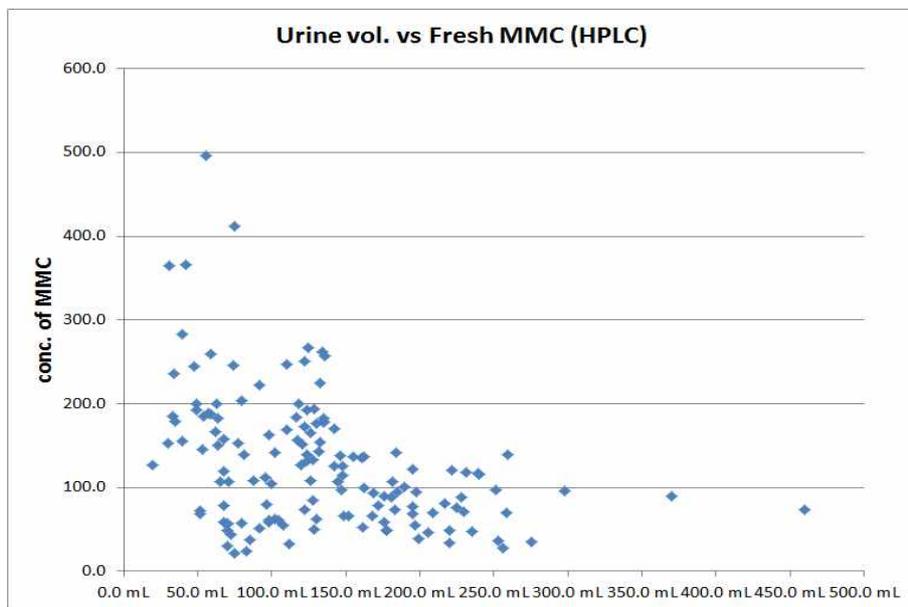


그림. 소변의 부피와 활성 MMC의 상관관계

- 확인 결과, 소변의 부피와 활성 MMC의 농도 간에는 뚜렷한 반비례 상관관계가 있는 것으로 확인되었음

● 연구 결론

항암제의 방광내 주입요법에 의한 방광암 치료는 항암제가 직접적으로 방광암 세포에 노출되는 특수성이 있음. 이에 따라 방광내 항암제의 농도가 치료 효과에 매우 중요한 인자로 판단되며 MMC의 방광내 주입 요법에서 요중 MMC의 농도를 극대화시킬 수 있는 방법이 필요함

본 연구 결과, 타 기관의 연구 예측과는 달리 요중 pH는 MMC의 농도에 큰 영향을 미치지 않으며, MMC의 방광내 주입 과정 중에 생성된 소변의 부피가 매우 큰 영향을 주는 것으로 확인됨. 따라서

현재 임상에서 시도되고 있는 sodium bicarbonate의 경구 투여보다 소변의 양을 줄일 수 있는 방안이 실제 MMC의 치료 효과를 극대화시키는 것에 중요하다고 판단됨

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

##### 4-1. 목표달성도

세부연구내용	가중치	달성도	달성내용
비근침윤성 방광암환자 중 방광내 Mitomycin C 투여 환자를 대상으로 방광내 mitomycin-C 주입요법 전과 시술 2시간 후 소변을 채취하여 pH, creatinine, mitomycin-C 및 mitomycin-C 분해물질과 그 비율을 확인	20%	100%	26명의 환자를 대상으로 287종의 sample을 채취하여 MMC 투여 전후의 pH, creatinine, mitomycin-C, 소변 부피를 확인하였음. MMC의 농도는 HPLC 방법을 이용하여 분석하였음
환자의 소변 중 pH 및 그 외 인자에 따른 mitomycin-C 및 분해물질과의 상관관계를 분석	30%	100%	287종의 sample을 채취하고 소변 중 MMC의 농도와 pH, creatinine, mitomycin-C, 소변 부피 간의 상관관계를 파악하였음. 결과적으로 요중 MMC의 농도에 가장 큰 영향을 주는 것은 소변의 부피로 확인됨
mitomycin-C 주입 환자의 조건에 맞는 맞춤형 처치 프로토콜을 개발	50%	100%	지금까지는 MMC 투여 전 소변의 pH를 상승시키기 위해 sodium bicarbonate를 경구 투여해 왔으나, 이는 요중 MMC의 농도 유지에 기여도가 없는 것으로 파악됨. MMC의 농도 유지를 위해서는 MMC 투여 중 소변의 부피를 줄이는 것이 가장 중요하며 이를 위해 금식 및 수분 섭취 자제를 권고하여야 하며 desmopresin 투여도 효과가 있는 것으로 확인됨

##### 4-2. 관련분야 기여도

- 비근침윤성 방광암의 치료에 있어서 MMC 투여에 따른 표준 프로토콜이 확립되지 않은 것이 현실이지만, 이번 연구 결과를 통해 환자에게 실질적으로 도움이 되는 표준 프로토콜을 작성할 수 있을 것으로 기대됨

#### 5. 연구결과의 활용계획

- 방광암 환자에서 환자의 상태에 따라 방광 내 mitomycin-C 약물 주입요법의 효과를 최적화할 수 있는 환자 맞춤형 프로토콜 개발

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 사항 없음

## 7. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Relationship between the concentration of mitomycin C and urinary components in non-muscle invasive bladder cancer patients	국립암센터	주저자	영국	13.938	예정	단독사사	SCI

## 8. 참여연구원 현황

번호	소속기관명	직위	생년월일	전공 및 학위		연구담당 분야
	성명	과학 기술인등록 번호	성별	취득 년도	학위 (전공)	과제참여 기간
	국립암센터 서호경					

## 9. 기타사항

## 10. 참고문헌

<별첨작성 양식>

[별첨]

## 자체평가의견서

1. 과제 현황

		과제번호		1410551	
사업구분	기관고유연구사업				
연구분야	창의과제 일반연구		과제구분	단위	
사업명	기관고유연구사업			주관	
총괄과제	비근침윤성 방광암 환자를 위한 mitomycin-C 효과 최적화 및 환자 맞춤형 치료 프로토콜 개발		총괄책임자	서호경	
과제명	비근침윤성 방광암 환자를 위한 환자 맞춤형 mitomycin-C 치료 프로토콜 개발		과제유형	응용	
연구기관	국립암센터		연구책임자	서호경	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	연구비	민간	계
	1차년도	2014.02.01.~2014.12.31	45,000	-	45,000
	2차년도	2015.01.01.~2015.12.31	40,000	-	40,000
	3차년도	-	-	-	-
	계	23개월	85,000	-	85,000
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구기관	-		

2. 평가일 : 2015. 11. 04

3. 평가자(과제책임자) :

소속	직위	성명
비뇨생식기암연구과	선임연구원	서호경

4. 평가자(과제책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	서호경
-----	-----

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

연구개발의 목표가 뚜렷하고 실제 방광암 환자의 치료에 기여할 수 있는 내용으로 구성되었음. 문제 해결을 위한 연구 방법이 구체적이고 체계적으로 구성되었으며, 새로운 연구 방법을 창안하고 그 가치를 판단한 점이 우수함

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

현재까지는 환자에서 직접적으로 mitomycin C의 농도를 측정하거나 요중 성분간의 상관관계를 분석한 사례가 없으며, mitomycin C의 항암효과를 근본적으로 향상시키는 방법이 없었음. 이번 연구 결과로 근본적인 문제점을 파악하고 해결책을 제시함으로써 실질적인 방광암 치료효과 상승에 크게 기여하리라 예상됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

전세계적으로 방광암 치료를 위한 mitomycin C의 방광내 주입요법에 대한 표준권고안이 마련되지 않은 상황에서 본 연구 결과를 토대로 과학적 근거를 기반으로 하는 표준 권고안이 마련되리라 예상됨

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

짧은 연구기간과 상대적으로 적은 연구비임에도 불구하고 연구 내용의 범위가 넓고 분명하며 연구목표에 대한 완성도가 높다고 판단됨

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

짧은 연구 기간이라서 아직 논문이 발간된 상태는 아니지만 연구 결과는 세계최고의 비뇨기학술지인 European Urology에 충분히 발간될 수 있으리라 판단하며, 추가적인 연구를 통해 전세계에 영향을 주는 표준권고안을 마련할 수 있을 것으로 판단됨

## II. 연구목표 달성도

세부연구내용	가중치	달성도	달성내용
비근침윤성 방광암환자 중 방광내 Mitomycin C 투여 환자를 대상으로 방광내 mitomycin-C 주입요법 전과 시술 2시간 후 소변을 채취하여 pH, creatinine, mitomycin-C 및 mitomycin-C 분해물질과 그 비율을 확인	20%	100%	26명의 환자를 대상으로 287종의 sample을 채취하여 MMC 투여 전후의 pH, creatinine, mitomycin-C, 소변 부피를 확인하였음. MMC의 농도는 HPLC 방법을 이용하여 분석하였음
환자의 소변 중 pH 및 그 외 인자에 따른 mitomycin-C 및 분해물질과의 상관관계를 분석	30%	100%	287종의 sample을 채취하고 소변 중 MMC의 농도와 pH, creatinine, mitomycin-C, 소변 부피 간의 상관관계를 파악하였음. 결과적으로 요중 MMC의 농도에 가장 큰 영향을 주는 것은 소변의 부피로 확인됨
mitomycin-C 주입 환자의 조건에 맞는 맞춤형 처치 프로토콜을 개발	50%	100%	지금까지는 MMC 투여 전 소변의 pH를 상승시키기 위해 sodium bicarbonate를 경구 투여해 왔으나, 이는 요중 MMC의 농도 유지에 기여도가 없는 것으로 파악됨. MMC의 농도 유지를 위해서는 MMC 투여 중 소변의 부피를 줄이는 것이 가장 중요하며 이를 위해 금식 및 수분 섭취 자제를 권고하여야 하며 desmopresin 투여도 효과가 있는 것으로 확인됨

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 비근침윤성 방광암 환자에서 mitomycin C의 방광 내 주입요법 시행 중 mitomycin C의 분해를 일으키는 요소를 발굴하고, 환자의 소변 분석을 통해 예후를 예측할 수 있는 시스템 구축
- 비근침윤성 방광암 환자에서 mitomycin C의 방광 내 주입요법 시행 중 mitomycin C의 분해를 억제할 수 있는 방안을 제시함으로써 임상에서 치료효과를 극대화하고 환자 생존율 증가에 크게 기여할 것으로 예상함

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

실제 임상에서 방광암 환자의 치료 중 mitomycin C의 이용에 있어서 근본적인 문제점을 확인하고 이를 해결할 수 있는 방안을 제시한 점이 이 연구의 핵심이라 할 수 있음

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구의 결과는 방광암 치료를 위한 mitomycin C의 사용에 있어서 문제점의 원인을 분석하고 해결할 수 있는 방안을 제시한 것임

이와 연계하여 후속연구를 진행하여 실질적인 치료 효과 상승에 대한 연구가 필요하다고 판단됨

## IV. 보안성 검토

해당 사항 없음

## II. 제2세부과제

세부과제명 : 비근침윤성 방광암 환자를 위한 mitomycin-C 투여법의 최적화 연구

세부과제책임자(성명/소속) : 정경채/바이오분자기능연구과

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	48
2. 국내외 기술개발 현황 .....	50
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	51
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	71
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	72
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	72
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	72
8. 참여연구원 현황 .....	73
9. 기타사항 .....	73
10. 참고문헌 .....	73
<별첨> 자체평가의견서 .....	74

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 환자의 소변에서 mitomycin-C의 활성을 측정할 수 있는 신기술을 개발하고, 환자의 상태에 따라 mitomycin-C의 효과를 최적화할 수 있는 환자 맞춤형 프로토콜 개발
- ✓ 소변 중 mitomycin-C 및 분해산물의 농도에 따른 spectrophotometry를 분석하고 미지의 시료에서 mitomycin-C 및 분해산물의 농도를 측정할 수 있는 방법을 고안
- ✓ 소변 중 mitomycin-C의 spectrophotometry 수치에 영향을 줄 수 있는 요인 유무를 확인하여 신규 분석 방법의 정확성을 검증
- ✓ 방광 내 MMC 주입 후 2시간이 지나 배출되는 소변을 채취하여 pH, mitomycin-C 및 mitomycin-C 분해물질의 비율을 확인
- ✓ 새로이 개발한 mitomycin-C와 분해물질의 측정 방법과 기존 HPLC 분석 방법 간의 정확도, 민감도 및 분해능을 비교 검토
- ✓ mitomycin-C 분해물질의 비율과 환자의 소변 중 주요 성분의 변화 간의 상관관계를 분석하여 MMC의 분해에 영향을 주는 요인을 확인하고, 실제 그 영향정도를 in vitro 상에서 검증
- ✓ 방광암세포를 이용하여 소변 중 MMC 분해 촉진 인자의 영향력을 확인
- ✓ 환자 소변의 주요 성분과 mitomycin-C의 화학적 반응을 규명하여 mitomycin-C 투여 환자에서 효율을 극대화 할 수 있는 방안을 모색

## 1-2. 연구개발의 필요성

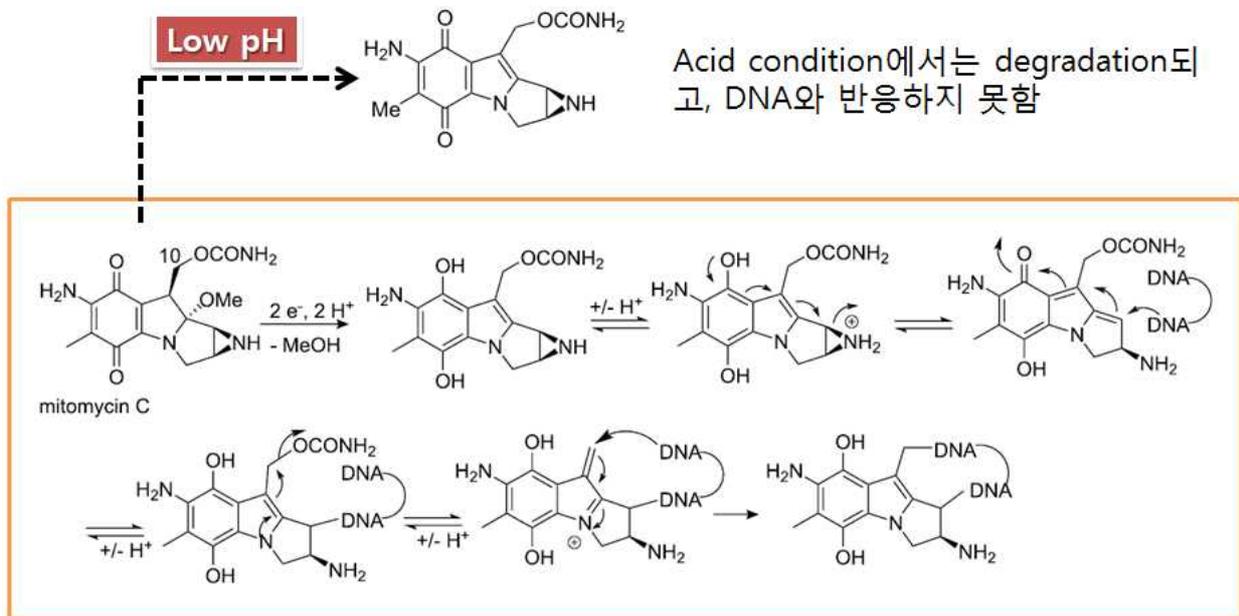
### ● 요 중 mitomycin C의 검출 신기술 개발의 필요성

- 방광암 치료에서 방광내 주입요법에 사용되는 대표적인 약제인 mitomycin-C의 경우 그 효율을 증대시키기 위해 방광내 약물의 농도를 높게 유지하는 것이 mitomycin-C의 방광조직 내 침투를 높이는 것으로 보고되고 있고, 적절한 치료 용량에 관한 연구들은 1990년대부터 계속적으로 진행되고 있는 추세임
- 또한 방광 내 약물 농도를 높게 유지하기 위하여 수분섭취 제한, oral desmopression 사용 및 약제 주입 전 방광을 완전히 비우도록 하는 방법 등을 사용하고 있음
- 최근 연구 결과에 따르면, 소변의 pH가 산성화가 될수록 mitomycin-C의 분해(degradation)가 증가하는 것으로 알려져 있으며, 소변을 염기화시키기 위해서 sodium bicarbonate를 경구 투약하는 방법도 사용하고 있음
- 이러한 노력에도 불구하고 방광내 MMC 주입 후에도 MMC가 분해되어 그 효율이 감소하는 것으로 보고됨
- 실제 방광 내에서 활성을 띠는 MMC의 농도 측정이 환자의 예후를 예측하고 추후 처치를 설계함에 있어 매우 중요함
- 따라서, 방광내 MMC 투여 후 배출되는 소변에서 실제 MMC의 농도 및 분해 정도를 확인할 필요가 있음

### ● Mitomycin C의 항암작용 메커니즘과 분해에 따른 영향

- MMC는 Streptomyces griseus에 의해 분리된 항 양성의 항생물질임

- mitomycin은 A, B, C의 3종으로 분리되며, 그 중 열에 안정된 C가 가장 독성이 낮으며 항종양작용도 강한 것으로 알려짐
- mitomycin 분자 내에는 아지리딘, 우레탄, 아미노퀴논의 3개의 항암작용을 하는 기가 있고 알킬화작용을 함
- 세포에서 환원하여 아지리딘기가 활성화되어 그림 5에서와 같이DNA의 dG, dT 등의 염기와 결합하여 DNA속의 구아닌잔기에 가교형으로 결합하여 DNA polymerization을 저해함
- mitomycin C는 다른 종류의 mitomycin에 비하여 대체로 안정하지만, 산성 조건에서는 demethoxylation이 진행되며, 분해산물은 MMC와 달리 DNA와 화학적으로 결합할 수 없어 항암효과를 나타내지못함
- MMC의 이러한 demethoxylation 과정은 산성 조건뿐만 아니라 여러 가지 물질이 촉매로 작용하여 그 분해를 촉진하는 것으로 확인 됨



MMC의 정상적인 작용: DNA와 화학반응하여 crosslink를 형성하고 replication 억제

그림 5. mitomycin C의 항암작용 메커니즘

MMC는 DNA와 crosslink를 형성하여 DNA의 복제를 억제함으로써 항암효과를 나타냄.

하지만, demethoxylation 과정을 거친 분해 산물은 이러한 crosslink를 형성할 수 없음

- 따라서 소변중 MMC의 분해를 촉진하는 인자를 확인하고 이에 따른 화학 반응을 규명할 필요가 있음
- 소변중 MMC의 분해 촉진인자를 방광내 주입 전 측정함으로써 MMC의 효용성을 예측할 수 있을 것으로 기대됨

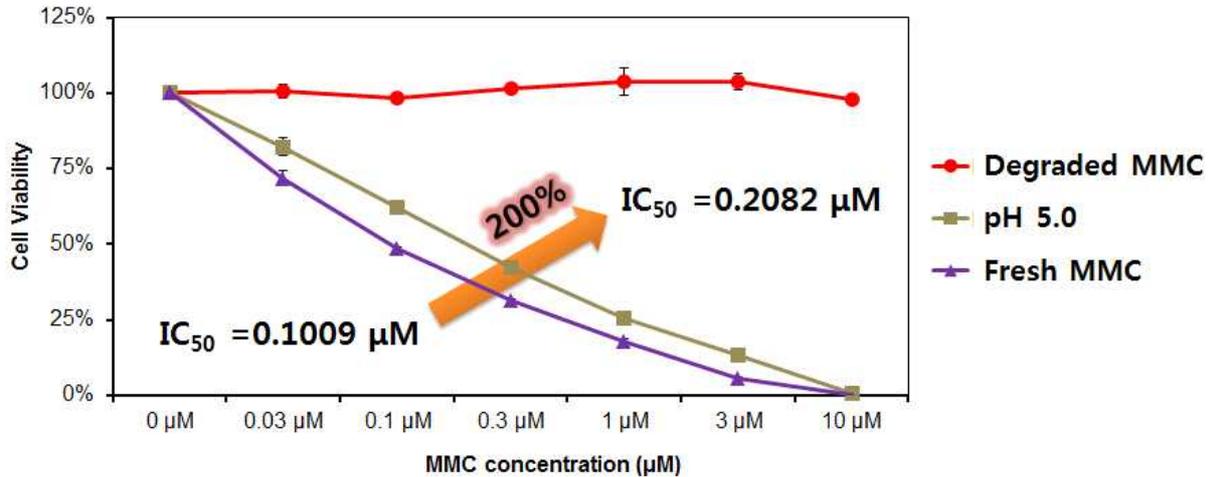


그림 6. 방광암세포를 이용한 MMC 및 분해산물의 항암효과 검증

시험 결과, 순수 MMC에 비하여 낮은 pH에서 2시간 동안 보관된 MMC는 약 2배 정도의 효율 감소를 나타냈으며, demethoxylation된 분해산물은 항암효과가 전혀 없는 것으로 확인되었음

● MMC의 분해 억제 물질 및 방법 고안의 필요성

- 최근 일본의 Takahiro등은 소변의 pH가 산성화될수록 mitomycin-C의 분해가 증가되어 방광내 주입술 효과가 감소된다고 보고하였으며, 그 기준으로 pH 5.5를 제시하기도 하였음
- 소변의 산성화를 방지하기 위해 최근에는 소변을 염기화시키기 위해서 sodium bicarbonate 1.5g을 전날저녁, 아침, 그리고 약물 주입 30분전 3차례 투약하는 방법도 사용해오고 있음
- 그러나, sodium bicarbonate의 투여는 환자 소변 pH에 큰변화를 주지 못하며 예후에도 유의적 차이가 없는 것으로 확인됨
- 이에 따라 최근에는 MMC의 방광 내 침투를 증가시키기 위하여 자기장이나 열을 이용하는 시도가 있음
- 2011년 Lancet Oncology에는 mitomycin-C를 Electromotive drug administration을 시행한 경우와 기존의 passive diffusion을 이용한 방법에 대한 RTC trial이 보고되었으며, 저자들은 unifocal disease, multifocal disease모두에서 EMDA를 이용한 mitomycin-C 군에서 효과적으로 RFS을 향상시켰다고 보고함
- 하지만 이러한 열이나 자기장을 이용하기 위해서는 특별한 장치가 필요로 한다는 문제점이 있음
- 따라서 부작용을 최소화 하면서 효과를 높일 수 있는 적절한 투여 보조제 또는 방법의 고안이 절실히 요구됨

2. 국내외 기술개발 현황

- 국내에서 소변내 MMC측정을 시도했거나 시행하는 기관은 없으며 본 연구과제가 최초임
- 방광암 치료의 최고 권위 기관인 일본 Keio 대학에서 환자의 요중 pH와 MMC 치료효과의 상관관계를 분석하려는 연구는 있으나 직접적으로 요중 MMC를 측정하여 치료효과와 연관성을 밝힌 사례는 본 연구가 최초임

### 3. 연구수행 내용 및 결과

● spectrophotometry를 이용한 소변 중 MMC 및 분해산물의 농도를 측정하는 방법의 고안

- 흡광광도법(spectroscopy)은 광도계(spectrophotometer)를 사용하여 시료의 흡광도 또는 투과도를 측정하는 방법임
- 흡광 광도법은 정도가 높고, 신속하게 정량분석이 가능하기 때문에 폭 넓게 이용되고 있음
- 따라서, 본 과제에서는 분광광도법의 이러한 장점을 이용하여 환자 소변 중 mitomycin-C 및 분해산물의 농도와 비율을 측정할 수 있는 방법을 고안하고자 함
- 연구를 통해 urea, creatinine, phosphate를 포함하는 simulated urine에서 순수 MMC의 spectrophotometry를 분석한 결과, 특정 파장에서 높은 흡광도를 보임
- 뿐만 아니라, simulated urine에서 MMC의 최대 흡광도를 보이는  $\lambda_{max}$ 에서 흡광도는 순수 MMC 농도와 직선형의 상관관계를 나타내는 것으로 확인됨
- 순수 MMC의 농도와 최대 흡광도를 보이는  $\lambda_{max}$ 에서 흡광도 간의 상관관계를 이용하여 미지의 MMC의 농도를 측정할 수 있는 수식을 회귀분석을 통해 도출하였으며, 이의 신뢰도는 99.94%로 확인됨
- 순수 MMC뿐만 아니라, 소변 중에서 MMC가 demethoxylation되어 나오는 분해산물의 농도와 그 비율을 측정하는 방법을 고안하고자 함
- 방광 내에서와 유사한 상황을 연출하기 위해 낮은 pH 조건(pH 5.0)을 simulated urine 상에서 조성한 후, 37°C에서 실시간으로 분석하여 MMC의 분해 여부와 spectrophotometry 방법의 신뢰성을 검증하였음
- 그 결과, MMC의 분해 정도를 즉각적으로 정확하게 측정할 수 있음을 확인하였음

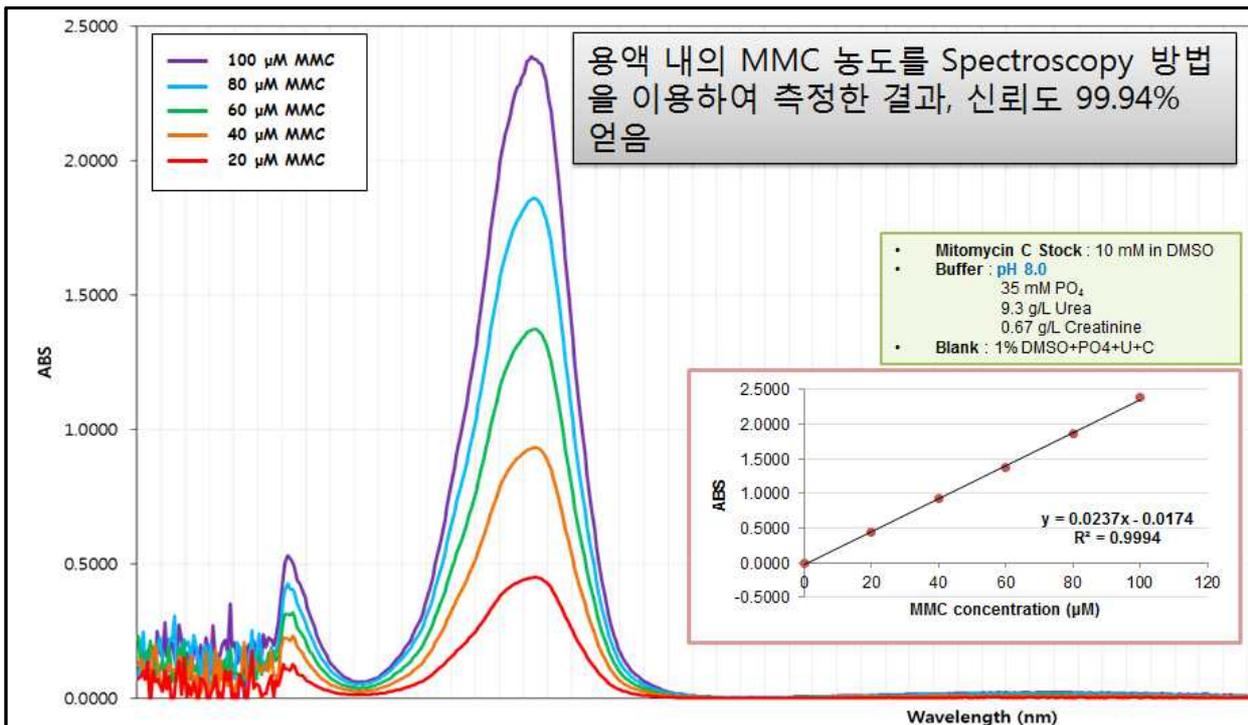


그림. 순수 MMC의 농도에 따른 흡광도

simulated urine에서 순수 MMC의 농도에 따른 흡광도를 측정하여 그 양상을 분석하여 미지의 MMC

농도를 구할 수 있는 수식을 도출함

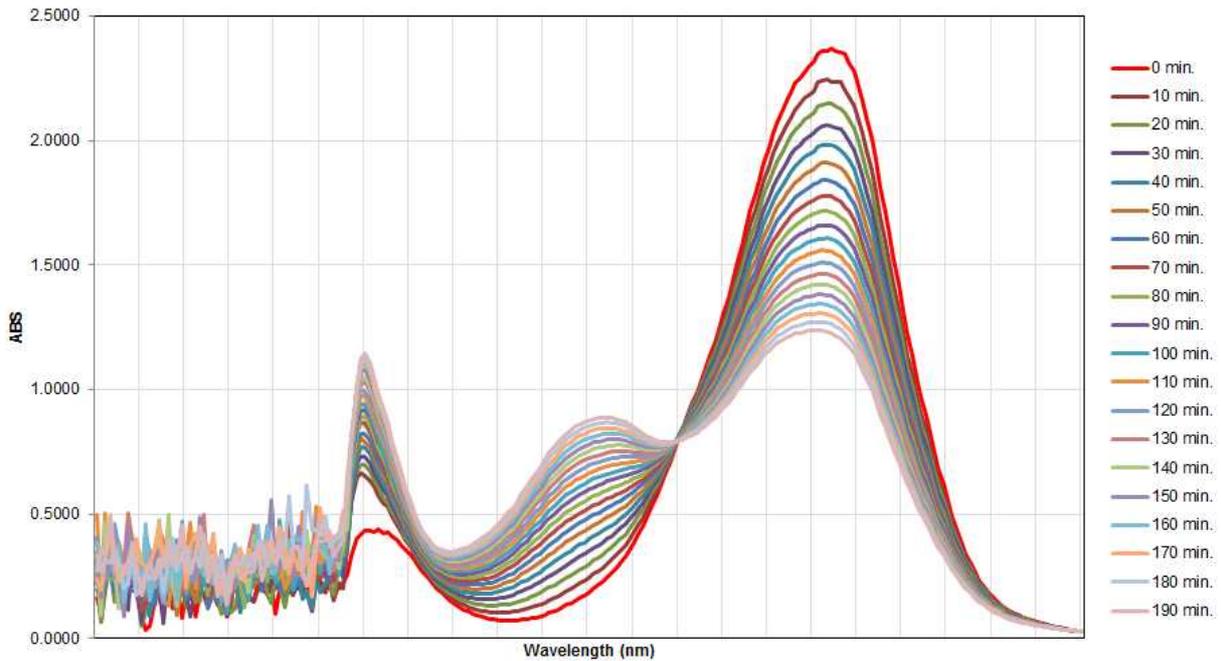


그림. MMC의 분해 과정을 spectrophotometry 방법으로 실시간 측정 결과

- 방광내 MMC 주입 환자의 소변에서 분석함으로써 임상적 적용 방법을 고안함
- 뿐만 아니라, MMC의 흡광도에 영향을 줄 수 있는 요소를 확인하여 사전에 배제하는 방법을 고안함으로써 신규 분석 방법의 정확성을 확보함

● Spectrophotometer를 이용한 소변 Mitomycin C 분석 방법

▪ 분석목적

이 시험방법은 방광암 환자에서 mitomycin C 방광 내 약물주입요법 후 요 중 pH에 따른 mitomycin C의 분해 정도를 spectrophotometer로 분석하는 방법임.

▪ 시약 및 분석기기

1) 시약

- ① 희석용액 : 술 전 후 채취한 소변을 희석하기 위해 pH 7.0으로 조정된 100 mM potassium phosphate buffer를 사용한다.
- ② pH 7.0 100 mM potassium phosphate buffer의 제조: 증류수 900 mL에 1.0 M  $K_2HPO_4$  61.5 mL와 1.0 M  $KH_2PO_4$  38.5 mL를 섞어서 만든다. pH를 확인하고 HCl 용액과 NaOH용액을 이용하여 pH를 7.0으로 조정한다.

2) 분석기기 및 조건

① 측정방비

- spectrophotometer : Thermo Multiskan Go microplate spectrophotometer
- cuvette : HELIMA Quartz SUPRASIL 10 mm cell

② 분석조건

- mode: spectrum scan mode
- wave length range: 280 - 900 nm
- band width step: 1 nm
- scan method: fast
- temperature: 25 °C
- sample array: 3 blank samples + 3 unknown samples

▪ 요 중 Mitomycine C 분석절차

1) 실험방법

- ① 술 전 후 채취한 소변 1.0 mL를 희석용액 4.0 mL에 희석하고 각각 blank solution과 sample solution으로 표기한다.
- ② blank solution 1.0 mL를 cuvette에 넣고 spectrophotometer에서 blank로 측정한다.
- ③ 위의 ② 과정을 2회 더 반복한다.
- ④ sample solution 1.0 mL를 cuvette에 넣고 spectrophotometer에서 unknown으로 측정한다.
- ⑤ 위의 ④ 과정을 2회 더 반복한다.

2) 결과처리

- ① 3회 측정한 blank 측정 수치의 평균을 구하고, unknown의 측정수치에서 뺀다.
- ② unknown - blank 수치에서 mitomycin-C의 농도를 측정하는 기준 파장  $\lambda_1$ , mitomycin-C의 분해물의 농도를 측정하는 기준 파장  $\lambda_2$ , mitomycin-C 및 분해물의 전체 농도를 측정하는 기준 파장  $\lambda_3$ 에서의 absorbance 값을 취한다.
- ③ 정해진 수식에 각각의 수치를 대입하여 mitomycin-C 농도 및 mitomycin-C 분해물의 농도를 계산한다.
- ④ 3회 반복한 결과 값의 평균과 표준편차를 구한다.

● 요 중 mitomycin C의 분석 방법에 따른 정확성 검증 시험

▪ 목적

이 시험방법은 방광암 환자에서 mitomycin C 방광 내 약물주입요법 후 요 중 mitomycin C의 분해 정도를 HPLC와 spectrophotometer로 분석하는 방법의 정확성을 검증하기 위함

▪ 배경 이론

1) 흡광광도법: 광도계(spectrophotometer)를 사용하여 시료의 흡광도 또는 투과도를 측정하는 방법이다. 미리 여러 종류의 농도 표준액에 대해 흡광도 또는 투과도를 측정하여 검량선(standard curve)을 만들어 놓아, 이 검량선으로부터 시료의 농도를 알 수 있다. 광도 정량이라고도 한다. 흡광 광도법은 정도가 높고, 신속하게 정량분석이 가능하기 때문에 폭 넓게 이용된다.

2) 장점

- ① 감도가 높고 미량분석에 적합하다. 예민한 유기 정색 시약이 개발되어 있어 용매추출법과 병용하면 효과적이며 정량 범위는 다르긴 하지만 대체로 0.1~10mg/L 정도이다.
- ② 적당한 정량 조건과 조작을 선택하면 높은 정확도 값을 얻을 수 있다.
- ③ 조작이 비교적 간단하여 단시간 내에 정량이 가능하다.

④ 정색 시약의 선택, 마스킹제 및 추출법 등의 병용에 따라 공존 성분의 방해를 제거할 수 있어 선택성이 좋다.

▪ 시약 및 분석기기

1) 시약

③ 희석용액 : 술 후 채취한 소변을 희석하기 위해 pH 7.0으로 조정된 100 mM potassium phosphate buffer를 사용한다.

④ pH 7.0 100 mM potassium phosphate buffer의 제조: 증류수 900 mL에 1.0 M  $K_2HPO_4$  61.5 mL와 1.0 M  $KH_2PO_4$  38.5 mL를 섞어서 만든다. pH를 확인하고 HCl 용액과 NaOH용액을 이용하여 pH를 7.0으로 조정한다.

⑤ mitomycin-C 표준 용액: mitomycin C 10 mg (Kyowa, Japan)를 5 mL DMSO로 녹인 후, 0.45  $\mu$ m RC filter로 filtration 하여 만든다. mitomycin-C 표준 용액은 분주하여 -80°C에 보관하며 3개월 이내에 사용한다.

2) 분석기기 및 조건

① 측정방비

- spectrophotometer : Thermo Multiskan Go microplate spectrophotometer
- cuvette : HELIMA Quartz SUPRASIL 10 mm cell

② 분석조건

- mode: spectrum scan mode
- wave length range: 280 - 900 nm
- band width step: 1 nm
- scan method: fast
- temperature: 25 °C
- sample array: 3 blank samples + 3 unknown samples

▪ 요 중 Mitomycine C 분석절차

1) 실험방법

① 준비한 2 mg/mL 농도의 mitomycin-C 표준용액과 DMSO를 이용하여 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL 농도의 mitomycin-C 용액을 각각 50  $\mu$ L 씩 준비한다.

② 술 전 채취한 소변 2.0 mL를 희석용액 8.0 mL에 희석하고 microtube에 1 mL 씩 6개를 분주한다.

③ 분주한 희석 용액에 ①에서 준비한 0 ~ 2.0 mg/mL mitomycin-C 용액을 20  $\mu$ L 씩 넣고 섞는다.

④ 준비한 6개의 시료를 각각 1.0 mL 씩 cuvette에 넣고 spectrophotometer로 측정한다. 이때, 0 mg/mL 희석용액을 blank로 설정한다.

⑤ 술 후 채취한 소변 1.0 mL를 희석용액 4.0 mL에 희석하고 microtube에 1 mL를 분주한 후, 20  $\mu$ L의 DMSO를 넣고 섞는다.

⑥ ⑤의 희석용액 1.0 mL를 cuvette에 넣고 spectrophotometer에서 측정한다.

⑦ 위의 ① ~ ⑥ 과정을 2회 더 반복한다.

## 2) 결과처리

- ① 0 ~ 2.0 mg/mL mitomycin-C 표준용액을 20  $\mu$ L 씩 첨가한 시료에서 측정된 흡광도 수치 중에, 파장이 360 ~ 370 nm 중 최대 흡광도를 내는 파장을  $\lambda_{max}$ 라 하고,  $\lambda_{max}$ 에서 측정된 흡광도를 이용하여 회귀분석을 실시한다.
- ② 회귀분석으로 얻은 수식에 술 후 소변으로 준비한 시료의  $\lambda_{max}$ 에서 흡광도를 대입하여 얻은 수치에 100/1020를 곱하여 실제 요 중 mitomycin-C의 농도를 얻는다.
- ③ 반복 실험에서 얻은 수치의 평균과 표준편차를 구하고, HPLC와 spectrophotometry 방법으로 구한 수치와 비교한다.

### ● 소변 중 mitomycin-C의 분해에 영향을 주는 성분 확인과 mitomycin-C의 분해반응 규명

- 기존 연구자들의 연구 결과를 분석한 결과, 환자 소변의 pH가 동일하더라도 MMC 투여에 따른 치료 효과에는 유의한 차이가 발견됨
- 이러한 결과의 원인에는 환자 소변 중에 pH 이외의 분해 촉진 인자가 있을 것으로 예상됨
- 소변에 포함될 수 있는 다양한 성분과 효소 등의 단백질이 포함된 수용액 상에서 MMC의 분해 반응을 관측한 결과, 단순한 pH 완충 용액에 비하여 MMC의 분해 정도가 상당히 진행된 것을 확인하였음
- 이러한 결과는 실제 환자의 소변에도 MMC의 분해를 촉진하는 또다른 요인이 있다는 것을 예상케 함

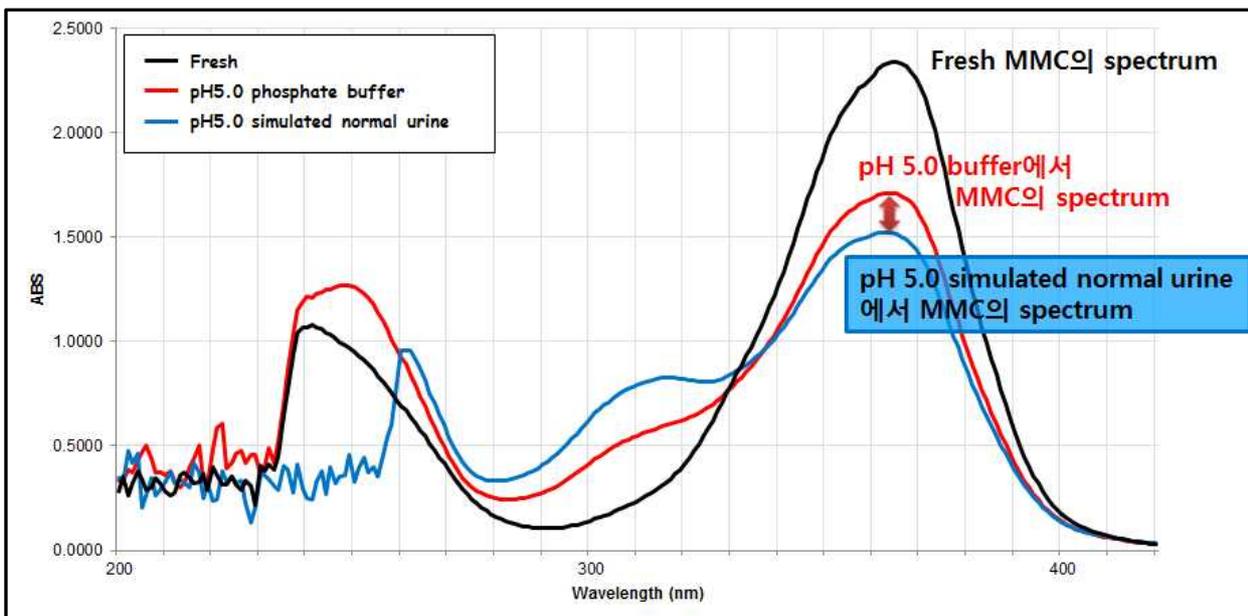


그림. MMC의 분해를 촉진하는 미지의 요인이 있음을 확인

- 제 1 세부과제의 연구를 통해 얻어진 환자 소변 중 MMC 분해와 상관관계 요인을 in vitro 상에서 시험하여 분해 촉진 여부를 확인하고, 분해 산물에 대해서 화학적 분석을 통해 반응 메커니즘을 확인하였음
- 확인한 화학 반응식을 통해 MMC의 분해 과정을 억제할 수 있는 물질 또는 방법을 고안하였음

● pH 변화에 따른 mitomycin C의 분해 확인

- 환자 방광 내 소변 중에서 pH에 따라 mitomycin C의 화학성 상태에 변화가 일어나는지 확인하고자, pH 5.0과 pH 8.0의 용액에서 각각 2시간 동안 incubation을 진행한 mitomycin C를 TLC(thin layer chromatography)에 전개했음.

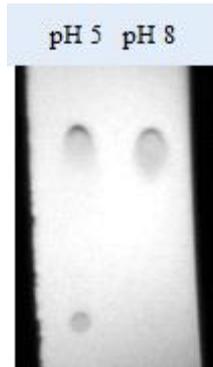


그림. mitomycin C의 분해 정도 확인을 위한 TLC 전개

그림에서 확인할 수 있듯이 pH가 낮을 경우 상당량의 mitomycin C가 변형되고 있음을 확인할 수 있었음.

● 분해된 mitomycin C의 anti-proliferation 효과 확인

- 소변 중 pH에 따라 mitomycin C의 분해정도가 달라지고, 이에 따라 방광암 세포에 대한 anti-proliferation 효과에 차이가 있는지 검증을 진행함
- fresh한 상태의 mitomycin C와 pH 5.0의 용액에서 2시간 동안 incubation한 mitomycin C 및 24시간 동안 incubation된 완전 분해된 mitomycin C를 방광암 세포 KU19-19에 72시간동안 처리하였음.
- 방광암세포의 cell viability를 확인한 결과, Fresh MMC는 bladder cancer cell에 대한 IC50가 0.1009  $\mu\text{M}$ 이지만, pH 5.0에서 2시간 incubation된 MMC의 IC50는 2배가 증가한 0.2082  $\mu\text{M}$ 임. 즉, 동일한 효과를 내기 위해서 MMC의 투여량이 2배가 되어야 함.
- 뿐만 아니라, 완전 분해된 mitomycin C는 방광암 세포의 생존에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었음.

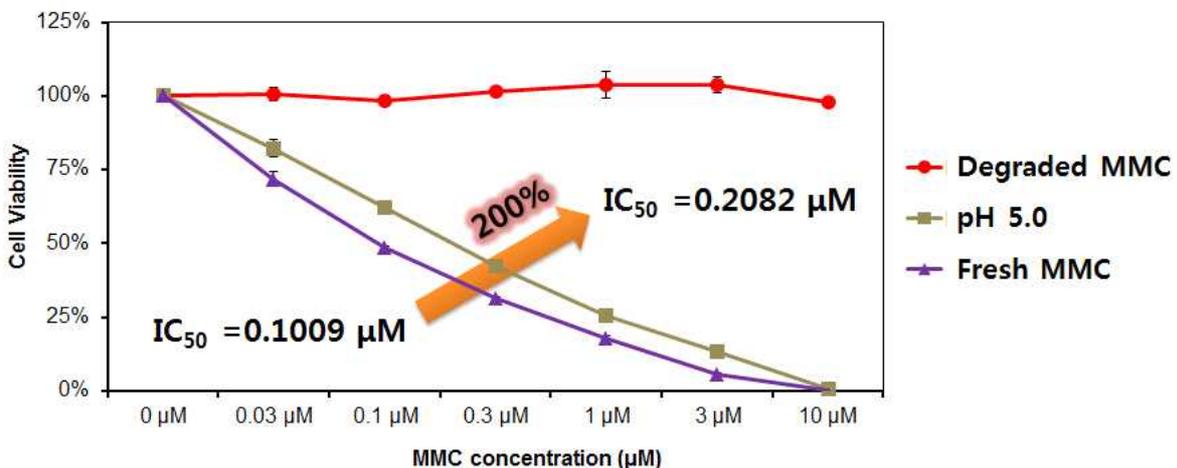


그림. 방광암 세포에서 분해된 mitomycin C의 anti-proliferation 효과 확인

- 이러한 현상은 mitomycin C가 산성의 조건에서 demethoxylation이 진행되고, demethoxylated MMC는 DNA와 결합하지 못해 anti-proliferation 효과가 나타나지 않는 것으로 파악됨.

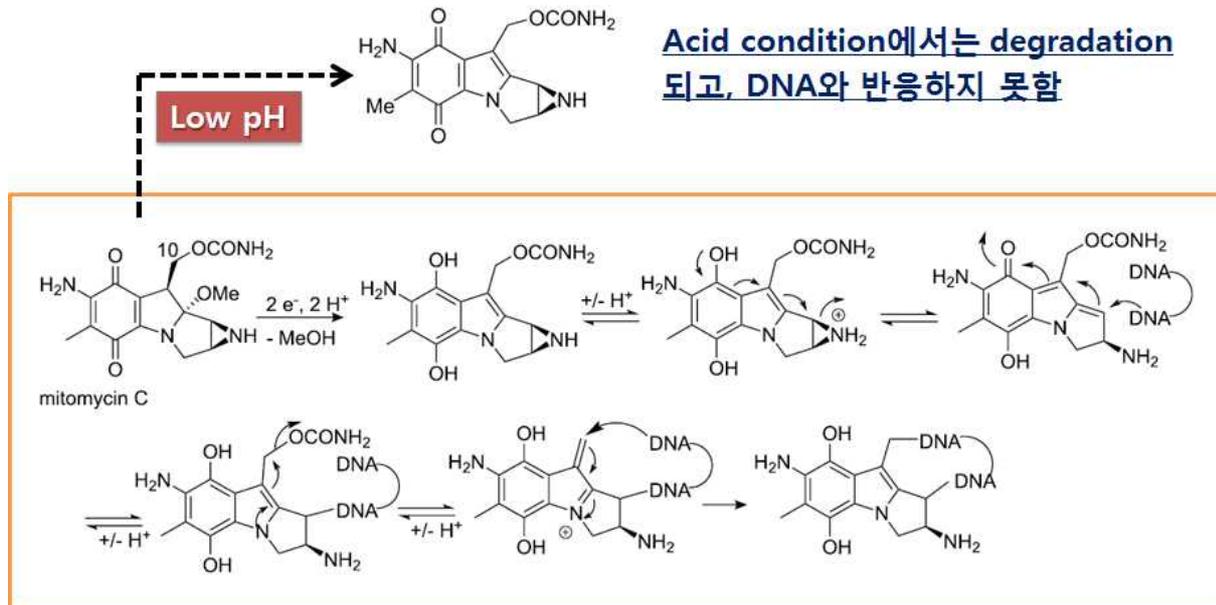
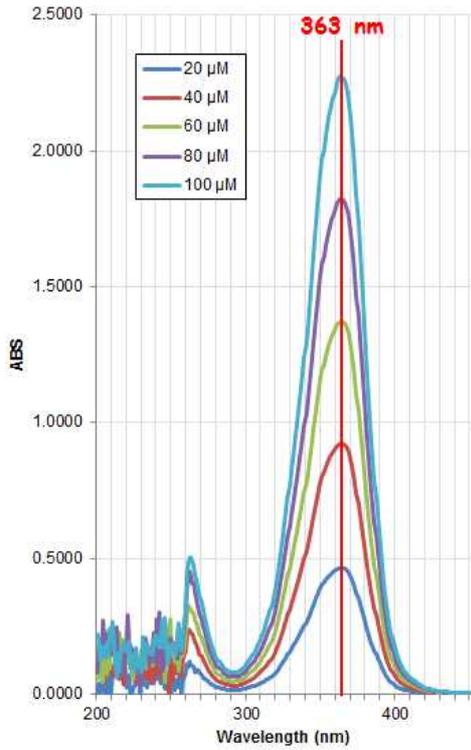


그림. mitomycin C의 작용 메커니즘 및 산성 용액에서 비활성화 반응

● spectrophotometry를 이용한 mitomycin C의 농도 측정 방법

- 환자 방광 내 소변 중에서 mitomycin C의 농도를 즉각적으로 측정하고자 spectrophotometry를 이용하여 흡광도를 분석함
- 다음의 그림에서 볼 수 있듯이 mitomycin C의 농도에 따라 특정 파장에서 흡광도가 특이적으로 증가하고, 이 수치는 농도와 정확하게 비례하는 것을 확인하였음.
- 이 파장의 측정은 simulated urine solution에서도 문제없이 측정되는 것을 확인하였음



- Stock : 10 mM Mitomycin C in DMSO
- Buffer : pH 8.0  
35 mM PO<sub>4</sub>,  
1X Urea/Creatinine (9.3 g/L Urea, 0.67 g/L Creatinine)

	0 μM	20 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM
363 nm	0	0.4639	0.9206	1.3704	1.8197	2.2749

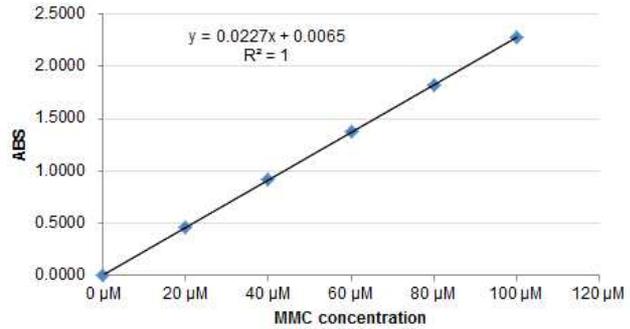


그림. simulated urine에서 mitomycin C의 농도에 따른 흡광도 변화

● 분해된 mitomycin C의 측정방법 고안

- 환자 방광 내 소변 중에서 분해된 mitomycin C의 농도를 즉각적으로 측정하고자 spectrophotometry를 이용하여 흡광도를 분석함
- simulated urine solution에서 분해된 demethoxylated MMC의 농도가 증가할 때, mitomycin C와 다른 파장의 영역에서 특이적으로 흡광도가 증가함을 확인

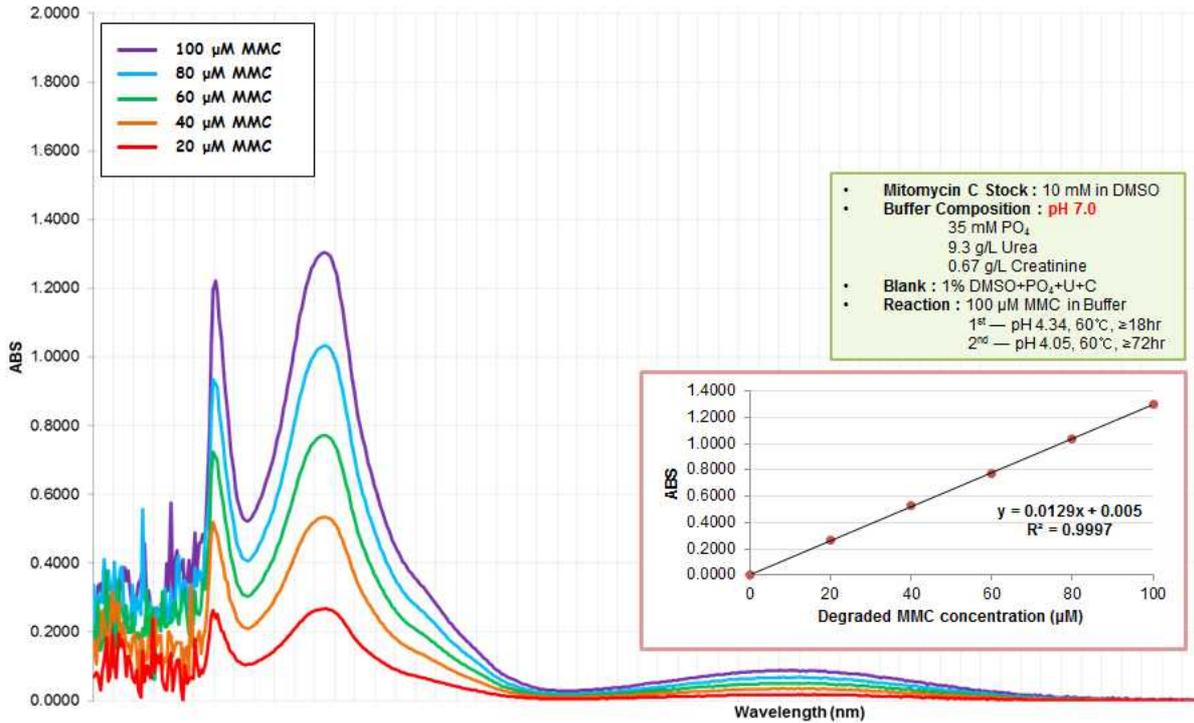


그림. simulated urine에서 분해된 mitomycin C의 농도에 따른 흡광도 변화

● 소변 중 mitomycin C의 분해정도를 측정할 수 있는 방법 고안

- 방광 내 주입 후 분해 전 후의 mitomycin C 농도 측정과 함께 분해된 mitomycin C의 비율 측정이 중요하며, 이 과정에서는 분해 전후 mitomycin C의 측정 흡광도가 서로 겹치지 않아야 함
- 이에 분해 정도를 일정하게 유지하며 spectrophotometry를 이용하여 MMC의 분해 정도에 따라 spectrum이 일정하게 변하는 것을 확인하였음

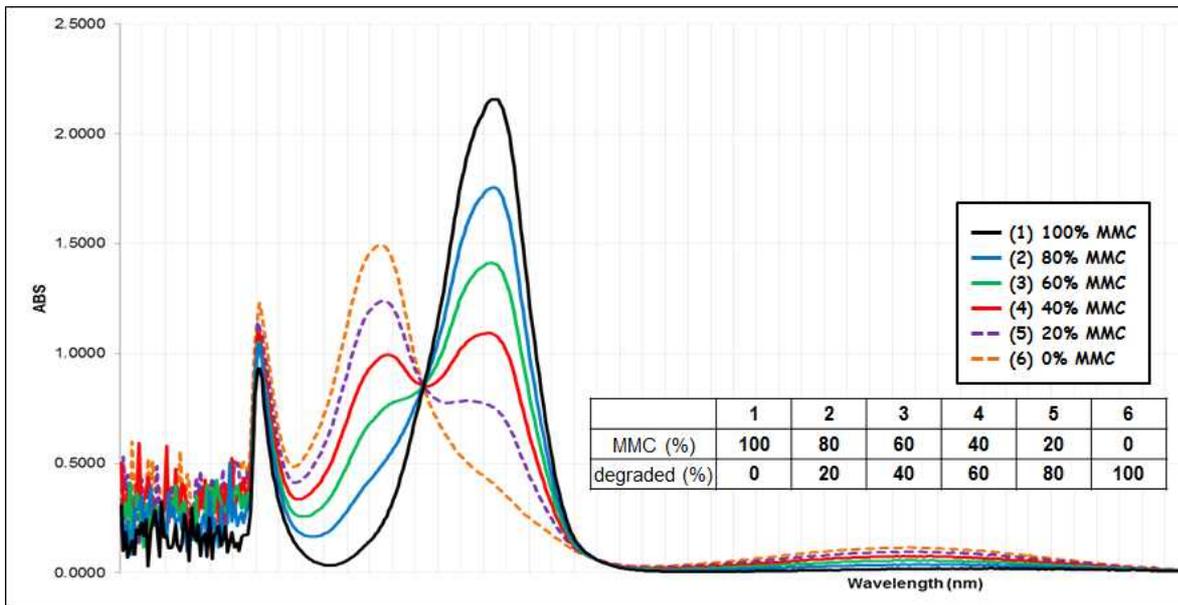


그림 . simulated urine에서 mitomycin C의 분해정도에 따른 흡광도 변화

● 환자 소변에서 mitomycin C의 농도 측정

- 앞서 확립한 측정 방법을 이용하여 실제 환자 소변에서 mitomycin C의 농도를 측정하였음
- 아래 그림에서 보는 바와 같이, mitomycin C의 농도는 환자마다 차이가 있었으며, 환자 간에는 3배 이상의 차이가 나는 경우도 있었음

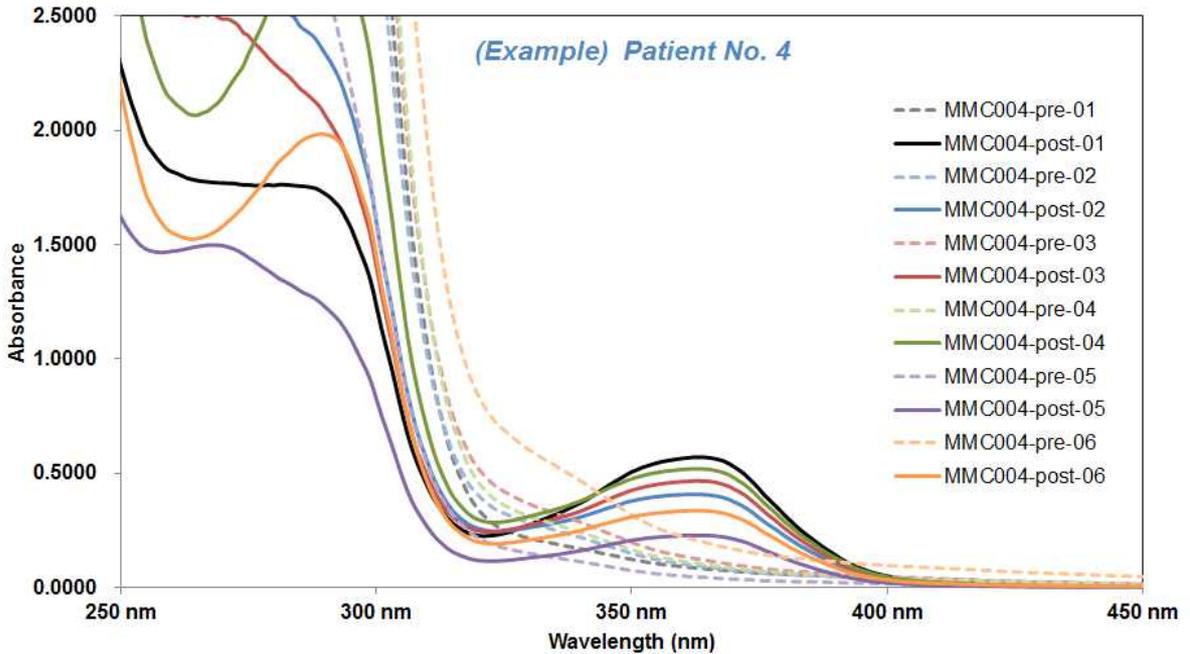


그림. spectrophotometry를 이용한 환자 소변에서 분해된 mitomycin C의 농도 측정

Sample Name	Fresh MMC (ug/nL)		Sample Name	Fresh MMC (ug/nL)	
	평균 측정값	표준편차		평균 측정값	표준편차
MMC001-post-01	215.8	0.5	MMC014-post-01	110.9	0.8
MMC001-post-02	207.7	0.0	MMC014-post-02	75.3	1.0
MMC001-post-03	180.8	0.1	MMC014-post-03	132.4	0.4
MMC001-post-04	429.8	0.9	MMC014-post-04	175.3	0.8
MMC001-post-05	370.1	0.5	MMC014-post-05	79.9	0.5
			MMC014-post-06	46.4	1.4
MMC002-post-01	55.7	0.2	MMC015-post-01	65.7	0.2
MMC002-post-02	748.8	12.5	MMC015-post-02	67.2	0.5
MMC002-post-03	72.4	0.4	MMC015-post-03	42.2	0.5
MMC002-post-04	156.0	0.6	MMC015-post-04	76.9	0.6
MMC002-post-05	130.0	0.0	MMC015-post-05	104.0	0.3
MMC002-post-06	107.9	0.2	MMC015-post-06	90.4	0.3
MMC003-post-01	113.1	0.5			
MMC003-post-02	121.6	0.6			
MMC003-post-03	120.7	0.2			
MMC003-post-04	139.0	1.0			
MMC003-post-05	121.0	2.4			
MMC003-post-06	329.3	0.8			
MMC004-post-01	111.1	0.2	MMC017-post-01	102.5	0.2
MMC004-post-02	71.9	0.5	MMC017-post-02	187.0	0.4
MMC004-post-03	78.4	0.7	MMC017-post-03	177.4	0.2
MMC004-post-04	94.9	0.5	MMC017-post-04	50.5	0.9

MMC004-post-05	41.8	0.2	MMC017-post-05	58.5	1.0
MMC004-post-06	31.0	1.2	MMC017-post-06	180.2	0.4
MMC005-post-01	144.5	0.8	MMC018-post-01	199.5	0.7
MMC005-post-02	143.1	0.4	MMC018-post-02	103.2	0.5
MMC005-post-03	182.1	1.1	MMC018-post-03	146.7	0.6
MMC005-post-04	110.3	0.3	MMC018-post-04	220.0	0.5
MMC005-post-05	161.8	0.3	MMC018-post-05	64.4	0.4
MMC005-post-06	119.0	0.9	MMC018-post-06	207.1	0.4
MMC006-post-01	143.4	0.4	MMC019-post-01	172.2	1.0
MMC006-post-02	30.9	0.8	MMC019-post-02	185.7	0.7
MMC006-post-03	294.8	1.0	MMC019-post-03	132.7	0.1
MMC006-post-04	77.0	0.3	MMC019-post-04	145.9	0.1
MMC006-post-05	81.6	0.2	MMC019-post-05	110.6	0.2
MMC006-post-06	104.1	1.1	MMC019-post-06	218.9	0.2
MMC007-post-01	75.2	0.5	MMC020-post-01	132.8	0.1
MMC007-post-02	73.7	0.5	MMC020-post-02	155.7	0.8
MMC007-post-03	85.7	0.5	MMC020-post-03	153.8	0.5
MMC007-post-04	88.6	0.3	MMC020-post-04	132.7	0.7
MMC007-post-05	147.9	0.4	MMC020-post-05	177.1	0.4
MMC007-post-06	46.5	0.9	MMC020-post-06	45.8	0.7
MMC008-post-01	387.1	0.3	MMC021-post-01	111.2	1.0
			MMC021-post-02	199.6	0.2
			MMC021-post-03	153.8	0.1
			MMC021-post-04	260.1	0.5
			MMC021-post-05	178.8	0.0
			MMC021-post-06	152.4	0.2
MMC009-post-01	80.2	0.2	MMC022-post-01	77.9	0.2
MMC009-post-02	670.6	9.7	MMC022-post-02	64.3	0.1
MMC009-post-03	758.5	19.1	MMC022-post-03	187.9	0.3
MMC009-post-04	628.8	3.6	MMC022-post-04	113.1	0.3
MMC009-post-05	504.4	1.1	MMC022-post-05	75.6	0.1
MMC009-post-06	561.0	4.3	MMC022-post-06	94.9	0.1
MMC010-post-01	103.4	0.6	MMC023-post-01	100.8	0.1
MMC010-post-02	150.4	0.5	MMC023-post-02	58.3	0.1
MMC010-post-03	102.3	0.4	MMC023-post-03	82.3	0.5
MMC010-post-04	96.7	0.5	MMC023-post-04	98.2	0.1
MMC010-post-05	108.0	0.6	MMC023-post-05	87.3	0.1
MMC010-post-06	63.5	0.5	MMC023-post-06	61.6	0.2
MMC011-post-01	109.1	1.5	MMC024-post-01	95.9	0.4
MMC011-post-02	177.7	0.8	MMC024-post-02	23.3	0.7
MMC011-post-03	10.6	1.9	MMC024-post-03	110.9	0.4
MMC011-post-04	1.8	2.7	MMC024-post-04	113.3	0.4
MMC011-post-05	267.0	1.1	MMC024-post-05	175.7	0.4
MMC011-post-06	0.0	0.0			
MMC012-post-01	180.0	0.5	MMC025-post-01	182.6	0.3
MMC012-post-02	217.8	0.4	MMC025-post-02	115.1	0.2
MMC012-post-03	61.3	0.5	MMC025-post-03	231.0	0.7
MMC012-post-04	86.1	0.7	MMC025-post-04	96.3	0.5
MMC012-post-05	65.2	0.2	MMC025-post-05	129.9	0.5
MMC012-post-06	152.5	0.4	MMC025-post-06	108.8	1.4
MMC013-post-01	83.6	2.2	MMC026-post-01	47.7	0.0
MMC013-post-02	101.4	0.2	MMC026-post-02	204.8	0.2
MMC013-post-03	138.7	0.8	MMC026-post-03	147.2	0.3

MMC013-post-04	53.5	1.1	MMC026-post-04	162.0	0.5
MMC013-post-05	180.6	1.2	MMC026-post-05	163.0	0.6
MMC013-post-06	112.6	0.2	MMC026-post-06	229.9	0.5

표. spectrophotometry를 이용한 환자 소변에서 활성 mitomycin C의 농도

● mitomycin C의 분해에 영향을 미치는 요인 확인

- simulated urine의 주요 성분은 phosphate, urea, creatinine으로 이들 성분이 mitomycin C의 분해에 미치는 영향을 확인
- 실험 결과, 낮은 pH 조건에서 creatininedl 존재할 경우에는 mitomycin C의 분해가 훨씬 많이 진행되는 것을 확인
- 실험 조건에서 creatinine의 농도는 670 mg/L 였으며, 제1세부과제의 연구 결과 실제 방광암 환자에서는 이보다 평균 2배 정도의 creatinine 수치가 확인되었고, 일부 환자에서는 4배 이상의 농도가 확인되었음
- 이는 실제 임상에서 mitomycin C의 분해 정도에 소변 중 creatinine의 농도가 매우 큰 영향을 기칠 수 있음을 의미함
- 이에 따라 소변 중 creatinine 수치와 소변 중 mitomycin C의 분해 정도의 상관관계를 분석함

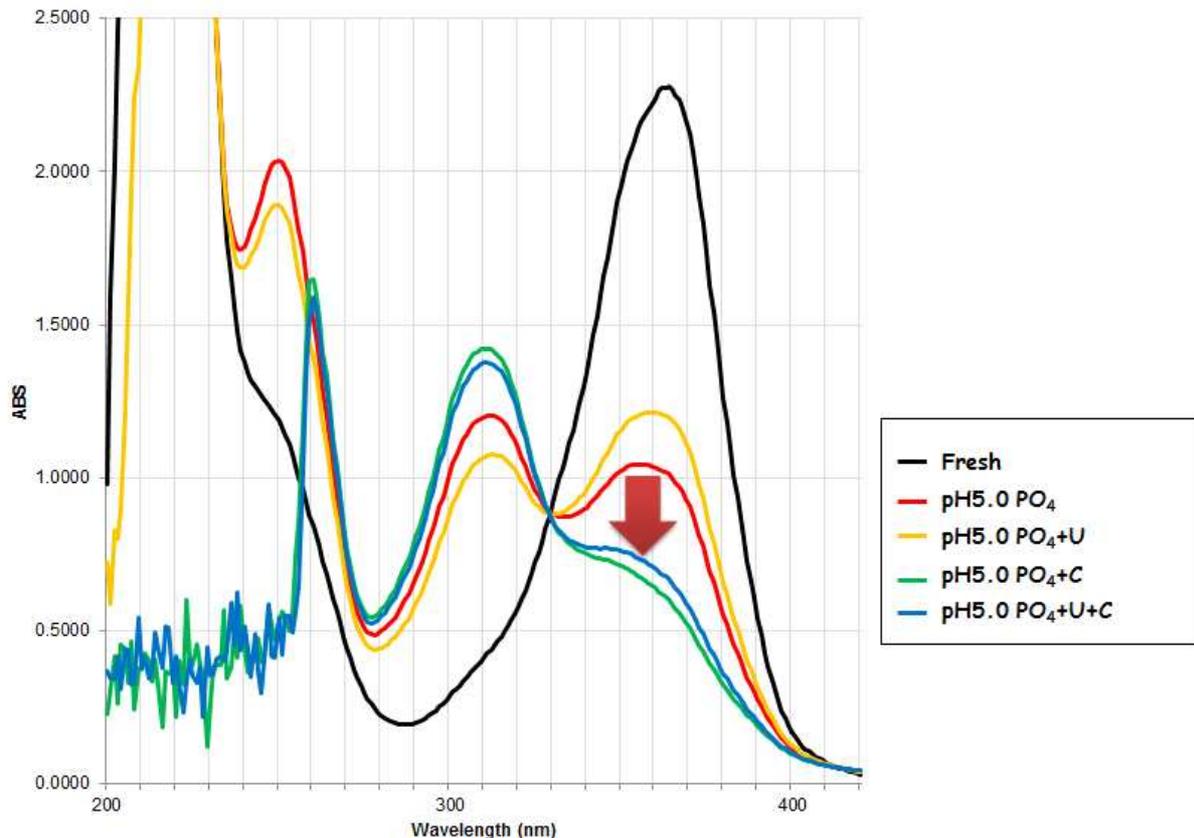


그림 . mitomycin C 분해에 영향을 미치는 소변 중 성분의 확인

- 소변 중의 주요 성분인 phosphate, urea, creatinine이 mitomycin C의 분해에 영향을 미치는지 확인하는 실험을 진행하였음. urea는 mitomycin C의 분해를 약간 더디게 하는 현상을 보였으나, creatinine은 소변이 약산성일 경우 mitomycin C의 분해를 상당히 촉진시키는 것을 확인할 수 있었음.

● 요중 creatinine 수치 측정

- 앞의 시험 결과에서 요중 creatinine 수치가 MMC의 비활성화에 영향을 미치는 것으로 확인되어, 실제 환자 샘플에서 상관관계를 분석하고자 creatinine의 농도를 분광학적인 방법으로 측정하였음

Sample Name	creatinine (ug/dL)		Sample Name	Fresh MMC (ug/dL)	
	평균 측정값	표준편차		평균 측정값	표준편차
MMC001-pre-01	122.0	6.2	MMC014-pre-01	231.2	1.0
MMC001-pre-02	147.3	6.7	MMC014-pre-02	180.5	3.5
MMC001-pre-03	116.8	4.8	MMC014-pre-03	188.8	2.1
MMC001-pre-04	116.3	4.1	MMC014-pre-04	147.6	1.8
MMC001-pre-05	89.8	3.2	MMC014-pre-05	209.3	0.8
			MMC014-pre-06	325.3	0.3
MMC002-pre-01	32.9	0.4	MMC015-pre-01	23.3	0.3
MMC002-pre-02	277.7	0.5	MMC015-pre-02	154.9	1.5
MMC002-pre-03	140.9	3.7	MMC015-pre-03	121.0	1.8
MMC002-pre-04	164.1	5.9	MMC015-pre-04	173.9	1.2
MMC002-pre-05	57.1	0.9	MMC015-pre-05	150.2	0.0
MMC002-pre-06	129.8	7.4	MMC015-pre-06	113.0	2.8
MMC003-pre-01	153.4	3.3			
MMC003-pre-02	110.1	3.2			
MMC003-pre-03	24.1	0.1			
MMC003-pre-04	162.1	2.6			
MMC003-pre-05	328.1	1.2			
MMC003-pre-06	142.7	5.9			
MMC004-pre-01	77.1	4.9	MMC017-pre-01	98.9	5.6
MMC004-pre-02	74.1	1.9	MMC017-pre-02	179.6	2.0
MMC004-pre-03	90.4	2.2	MMC017-pre-03	174.0	1.7
MMC004-pre-04	90.3	2.6	MMC017-pre-04	173.5	0.0
MMC004-pre-05	46.6	1.3	MMC017-pre-05	242.7	0.3
MMC004-pre-06	198.4	6.7	MMC017-pre-06	156.9	2.9
MMC005-pre-01	175.3	4.1	MMC018-pre-01	304.1	7.6
MMC005-pre-02	166.7	2.4	MMC018-pre-02	145.3	6.9
MMC005-pre-03	279.0	0.2	MMC018-pre-03	269.7	1.0
MMC005-pre-04	134.3	2.6	MMC018-pre-04	275.1	0.0
MMC005-pre-05	133.7	0.4	MMC018-pre-05	119.5	3.7
MMC005-pre-06	267.8	0.0	MMC018-pre-06	210.7	7.2
MMC006-pre-01	102.5	3.2	MMC019-pre-01	128.5	1.4
MMC006-pre-02	127.1	4.8	MMC019-pre-02	133.7	0.7
MMC006-pre-03	143.5	3.7	MMC019-pre-03	68.9	0.6
MMC006-pre-04	42.5	3.1	MMC019-pre-04	106.1	0.1
MMC006-pre-05	28.9	0.9	MMC019-pre-05	122.2	1.6
MMC006-pre-06	165.1	6.0	MMC019-pre-06	72.6	0.6
MMC007-pre-01	107.9	3.0	MMC020-pre-01	160.8	6.7
MMC007-pre-02	90.5	3.8	MMC020-pre-02	142.0	5.2
MMC007-pre-03	96.2	2.8	MMC020-pre-03	138.3	0.1
MMC007-pre-04	85.5	3.6	MMC020-pre-04	141.5	0.5

MMC007-pre-05	92.8	3.3	MMC020-pre-05	82.4	0.7
MMC007-pre-06	72.1	2.2	MMC020-pre-06	98.9	0.1
MMC008-pre-01	153.9	3.4	MMC021-pre-01	170.6	1.6
			MMC021-pre-02	160.7	2.7
			MMC021-pre-03	94.1	4.6
			MMC021-pre-04	110.0	0.0
			MMC021-pre-05	167.7	5.1
			MMC021-pre-06	98.1	2.5
MMC009-pre-01	83.4	0.3	MMC022-pre-01		
MMC009-pre-02	310.4	0.1	MMC022-pre-02	47.0	1.7
MMC009-pre-03	387.8	2.9	MMC022-pre-03	87.1	2.6
MMC009-pre-04	235.7	0.3	MMC022-pre-04	31.8	1.4
MMC009-pre-05	309.2	0.3	MMC022-pre-05	60.4	1.7
MMC009-pre-06	274.4	0.7	MMC022-pre-06	18.1	1.0
MMC010-pre-01	170.8	0.1	MMC023-pre-01	48.8	2.1
MMC010-pre-02	167.2	5.9	MMC023-pre-02	46.0	1.8
MMC010-pre-03	188.7	9.6	MMC023-pre-03	98.6	3.7
MMC010-pre-04	151.2	4.4	MMC023-pre-04	56.0	0.4
MMC010-pre-05	184.5	6.7	MMC023-pre-05	59.7	1.9
MMC010-pre-06	156.8	4.9	MMC023-pre-06	59.0	1.7
MMC011-pre-01	287.5	0.7	MMC024-pre-01	74.0	0.4
MMC011-pre-02	0.0	0.0	MMC024-pre-02	87.7	0.0
MMC011-pre-03	472.1	1.9	MMC024-pre-03	72.3	0.8
MMC011-pre-04	569.6	4.3	MMC024-pre-04	83.9	1.4
MMC011-pre-05	431.3	4.3	MMC024-pre-05	108.0	1.0
MMC011-pre-06	307.8	0.6			
MMC012-pre-01	182.5	8.2	MMC025-pre-01	90.1	4.7
MMC012-pre-02	156.7	5.0	MMC025-pre-02	40.1	0.9
MMC012-pre-03	112.0	6.3	MMC025-pre-03	188.3	4.5
MMC012-pre-04	144.8	3.1	MMC025-pre-04	77.4	1.0
MMC012-pre-05	94.0	1.4	MMC025-pre-05	79.7	2.2
MMC012-pre-06	148.4	1.2	MMC025-pre-06	123.9	1.7
MMC013-pre-01	167.7	3.9	MMC026-pre-01	52.1	1.0
MMC013-pre-02	70.7	1.1	MMC026-pre-02	165.9	4.5
MMC013-pre-03	158.8	2.9	MMC026-pre-03	217.5	0.5
MMC013-pre-04	245.3	0.4	MMC026-pre-04	253.4	0.5
MMC013-pre-05	457.6	7.2	MMC026-pre-05	259.5	0.5
MMC013-pre-06	84.1	0.4	MMC026-pre-06	306.4	1.4

표. MMC 투여 전 소변 중 creatinine의 농도 확인

Sample Name	creatinine (ug/dL)		Sample Name	Fresh MMC (ug/dL)	
	평균 측정값	표준편차		평균 측정값	표준편차
MMC001-post-01	59.3	1.2	MMC014-post-01	109.0	1.2
MMC001-post-02	81.7	4.3	MMC014-post-02	59.2	1.5
MMC001-post-03	83.2	0.9	MMC014-post-03	128.3	2.1
MMC001-post-04	44.5	0.0	MMC014-post-04	66.0	2.0
MMC001-post-05	37.7	1.1	MMC014-post-05	95.1	0.9
			MMC014-post-06	60.4	0.3
MMC002-post-01	26.7	0.6	MMC015-post-01	41.4	1.9
MMC002-post-02	84.4	1.6	MMC015-post-02	51.3	1.1
MMC002-post-03	54.9	0.2	MMC015-post-03	29.7	1.8

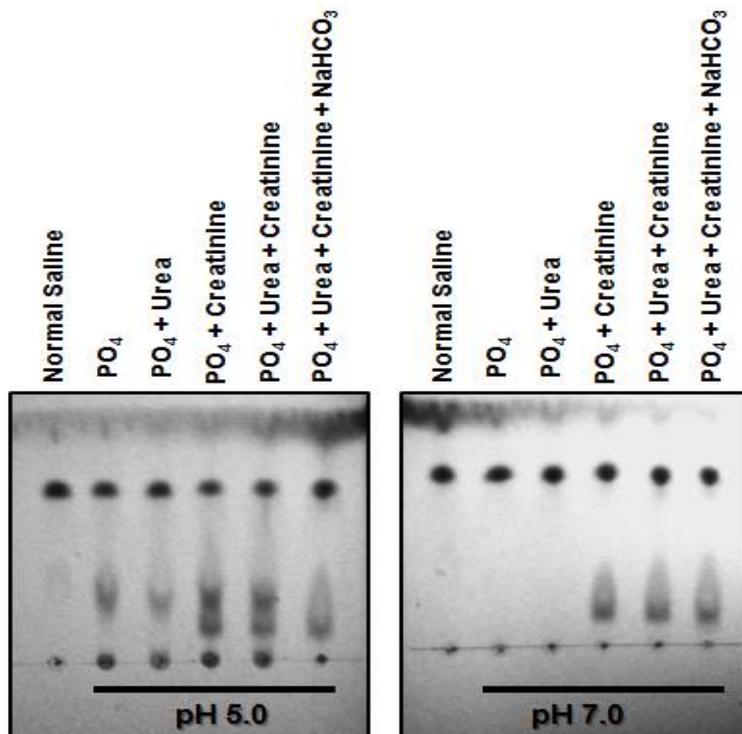
MMC002-post-04	72.0	2.2	MMC015-post-04	55.3	1.1
MMC002-post-05	64.1	2.4	MMC015-post-05	67.3	1.4
MMC002-post-06	48.3	0.9	MMC015-post-06	53.7	0.9
MMC003-post-01	57.4	0.2			
MMC003-post-02	49.5	0.7			
MMC003-post-03	40.5	0.4			
MMC003-post-04	48.1	1.3			
MMC003-post-05	68.4	2.7			
MMC003-post-06	58.8	0.1			
MMC004-post-01	29.1	0.9	MMC017-post-01	54.2	1.2
MMC004-post-02	32.1	0.2	MMC017-post-02	85.7	0.6
MMC004-post-03	28.5	1.5	MMC017-post-03	113.2	0.0
MMC004-post-04	43.8	1.7	MMC017-post-04	40.8	0.4
MMC004-post-05	18.9	1.3	MMC017-post-05	52.8	1.1
MMC004-post-06	33.3	0.0	MMC017-post-06	102.2	0.9
MMC005-post-01	89.3	0.4	MMC018-post-01	106.9	22.0
MMC005-post-02	72.3	4.3	MMC018-post-02	84.5	20.6
MMC005-post-03	119.1	4.4	MMC018-post-03	139.5	6.3
MMC005-post-04	74.0	4.1	MMC018-post-04	131.9	2.0
MMC005-post-05	87.1	4.7	MMC018-post-05	40.8	1.6
MMC005-post-06	90.4	0.9	MMC018-post-06	82.2	0.6
MMC006-post-01	71.1	2.6	MMC019-post-01	88.1	1.2
MMC006-post-02	21.2	0.2	MMC019-post-02	92.5	1.2
MMC006-post-03	46.8	2.2	MMC019-post-03	67.6	0.2
MMC006-post-04	13.2	0.4	MMC019-post-04	85.4	1.4
MMC006-post-05	19.1	1.1	MMC019-post-05	55.1	1.5
MMC006-post-06	39.2	0.8	MMC019-post-06	89.9	4.7
MMC007-post-01	69.6	0.7	MMC020-post-01	113.0	0.4
MMC007-post-02	48.4	0.1	MMC020-post-02	97.1	1.4
MMC007-post-03	57.4	0.8	MMC020-post-03	85.7	2.0
MMC007-post-04	63.3	1.3	MMC020-post-04	67.3	1.2
MMC007-post-05	89.9	0.1	MMC020-post-05	83.5	1.9
MMC007-post-06	36.6	0.1	MMC020-post-06	34.7	2.3
MMC008-post-01	116.4	0.4	MMC021-post-01	89.4	0.1
			MMC021-post-02	114.0	3.8
			MMC021-post-03	77.3	0.7
			MMC021-post-04	137.6	2.8
			MMC021-post-05	107.6	0.2
			MMC021-post-06	62.7	0.1
MMC009-post-01	43.1	1.3	MMC022-post-01		
MMC009-post-02	109.8	2.4	MMC022-post-02	39.7	2.2
MMC009-post-03	113.1	1.0	MMC022-post-03	97.6	1.3
MMC009-post-04	93.0	2.3	MMC022-post-04	60.2	1.0
MMC009-post-05	114.2	2.2	MMC022-post-05	39.3	2.5
MMC009-post-06	90.8	0.6	MMC022-post-06	41.4	2.2
MMC010-post-01	61.6	3.0	MMC023-post-01	44.8	1.8
MMC010-post-02	87.0	0.4	MMC023-post-02	26.5	1.0
MMC010-post-03	116.5	6.0	MMC023-post-03	42.1	0.2
MMC010-post-04	68.7	2.9	MMC023-post-04	44.5	0.3
MMC010-post-05	79.9	3.1	MMC023-post-05	37.0	0.9
MMC010-post-06	42.6	0.2	MMC023-post-06	27.1	0.1
MMC011-post-01	58.9	0.2	MMC024-post-01	32.8	1.3
MMC011-post-02	67.9	0.4	MMC024-post-02	12.2	0.3

MMC011-post-03	53.7	0.4	MMC024-post-03	32.2	0.1
MMC011-post-04	0.0	0.0	MMC024-post-04	41.3	0.5
MMC011-post-05	114.0	0.9	MMC024-post-05	50.2	1.0
MMC011-post-06	62.0	1.0		0.0	0.0
MMC012-post-01	120.5	1.7	MMC025-post-01	51.2	0.4
MMC012-post-02	103.1	5.0	MMC025-post-02	30.2	0.2
MMC012-post-03	42.2	2.8	MMC025-post-03	76.7	0.2
MMC012-post-04	50.6	3.6	MMC025-post-04	31.5	0.3
MMC012-post-05	34.3	1.7	MMC025-post-05	37.4	0.4
MMC012-post-06	80.3	0.8	MMC025-post-06	39.7	0.8
MMC013-post-01	62.4	0.8	MMC026-post-01	15.6	0.4
MMC013-post-02	30.3	0.2	MMC026-post-02	96.3	0.9
MMC013-post-03	65.3	0.7	MMC026-post-03	117.8	0.8
MMC013-post-04	35.6	0.3	MMC026-post-04	80.3	2.5
MMC013-post-05	153.9	2.0	MMC026-post-05	67.0	1.3
MMC013-post-06	44.0	1.5	MMC026-post-06	113.9	1.6

표. MMC 투여 후 소변 중 creatinine의 농도 확인

● 소변 중 mitomycin C의 분해를 억제할 수 있는 방안 도출

- 소변의 성분 중에 mitomycin C의 분해를 촉진하는 요인은 소변의 pH와 creatinine의 농도인 것을 확인하였음.
- 소변의 pH와 creatinine의 농도는 각 환자마다 다르게 측정되었고, 이와 무관하게 mitomycin C의 분해를 억제할 수 있는 방안이 필요함
- 여러 가지 방법을 검토 시험하던 중, sodium bicarbonate 용액을 이용하여 mitomycin C를 녹일 경우 mitomycin C의 분해가 억제됨을 확인하였음



- 시험 농도는 0.87 % sodium bicarbonate 용액으로 simulated urine 상에서 pH가 4.5일 경우에도 mitomycin C의 분해를 억제할 수 있음을 확인하였음

- sodium bicarbonate 용액은 현재 임상에서 5% 및 8.4% 용액이 아시도시스(산중) 및 급성두드러기에 주사액으로 사용되고 있으며, 방광내 주입요법의 임상에 바로 적용할 수 있음을 확인
- 현재 sodium bicarbonate 용액의 적정 농도를 확인 중에 있으며, 이외에도 다양한 분해억제제에 대해서 검토를 진행 중에 있음

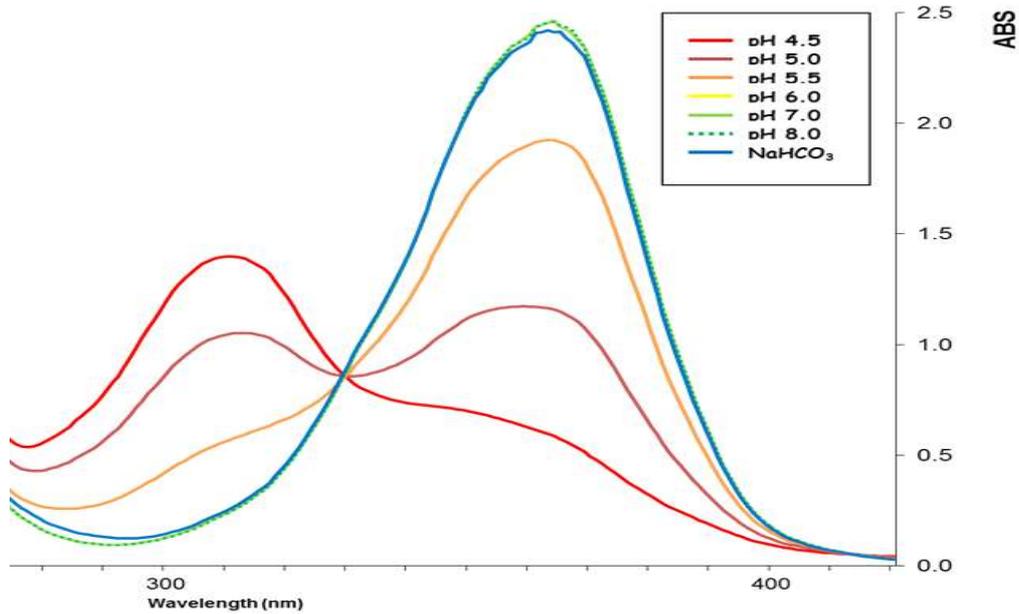


그림 . 소변 중 mitomycin C의 분해를 억제제로서 sodium bicarbonate의 효과 확인

● mitomycin C방광환자에서 농도와 요중 성분 간의 상관관계 분석

- 방광암 환자에서 MMC 주입 전후 요중 주요 성분의 변화와 요중 유효 MMC의 농도 간의 상관관계를 분석하여 MMC 주입요법에서 치료효과를 개선할 수 있는 방안을 고안함
- 분석 결과 요중 pH와 약한 상관관계가 확인되었으며, MMC 주입과정 중 소변의 부피 변화가 MMC의 방광내 농도 유지에 가장 큰 영향을 주는 것으로 확인됨

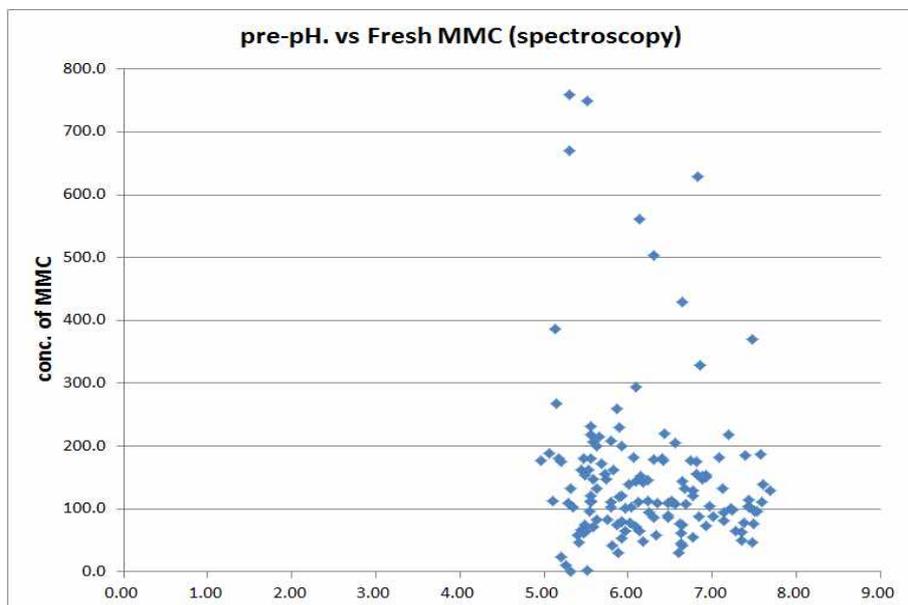


그림. MMC 투여 전 pH와 활성 MMC의 상관관계

- 확인 결과, MMC 투여 전 pH와 활성 MMC의 농도 간에는 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 확인되었음

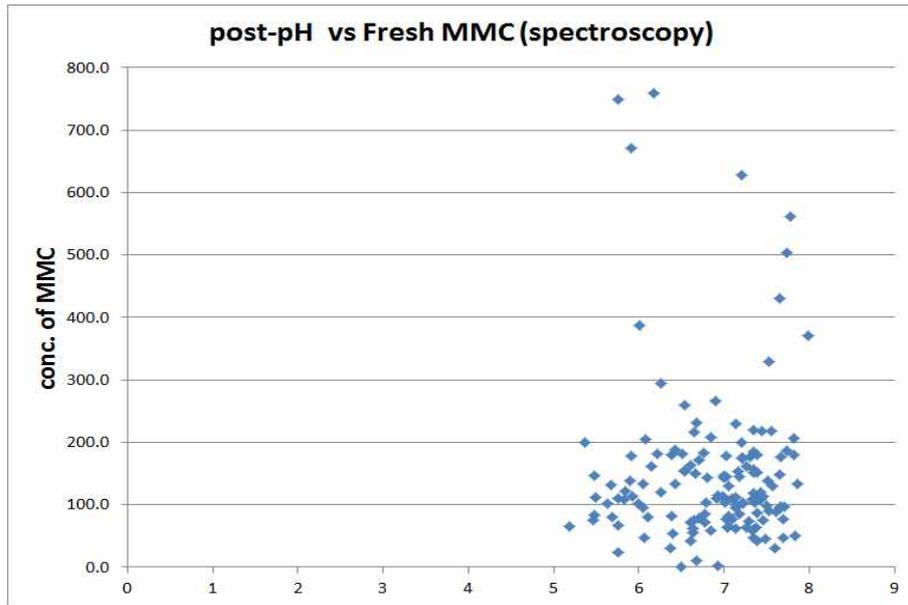


그림. MMC 투여 후 pH와 활성 MMC의 상관관계

- 확인 결과, MMC 투여 후 pH와 활성 MMC의 농도 간에는 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 확인되었음

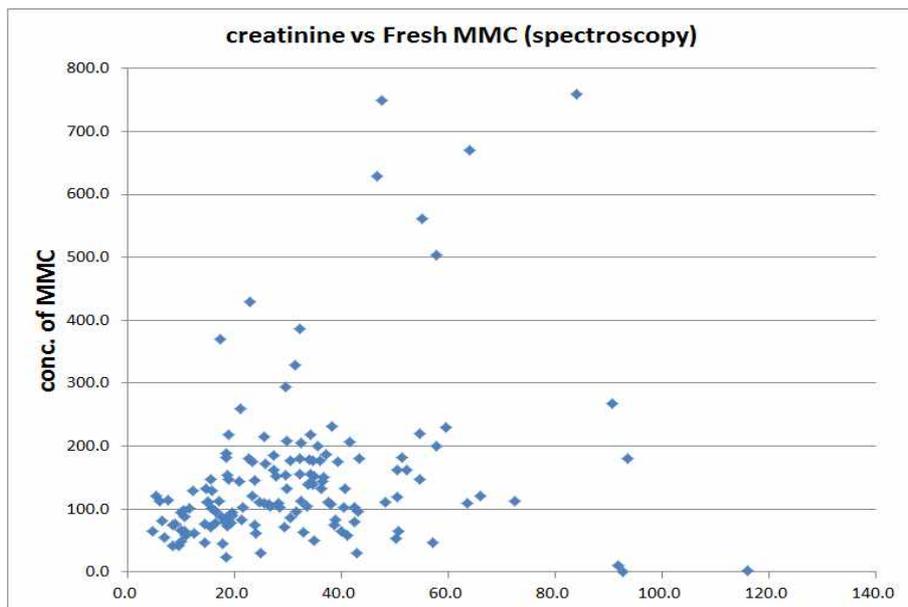


그림. creatinine 농도와 활성 MMC의 상관관계

- 확인 결과, creatinine 농도와 활성 MMC의 농도 간에는 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 확인되었음

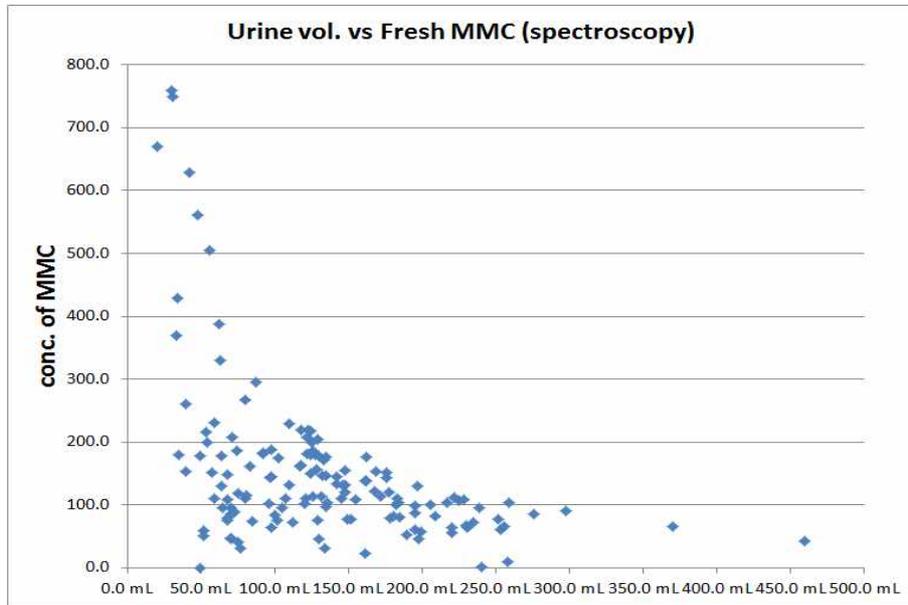


그림. MMC 투여 중 소변 부피와 활성 MMC의 상관관계

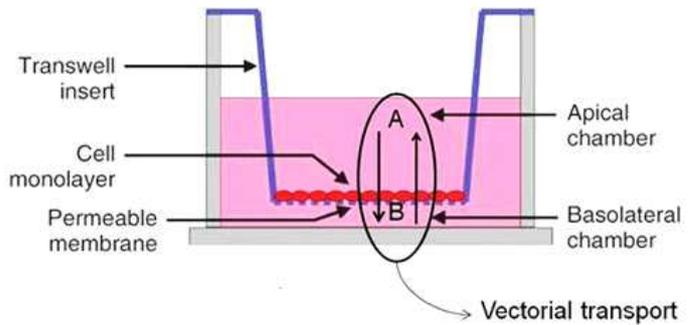
- 확인 결과, MMC 투여 중 소변 부피와 활성 MMC의 농도 간에는 뚜렷한 반비례 상관관계가 있는 것으로 확인되었음

● mitomycin C 방광암 세포 내 투과 정도 분석

- ✓ 임상에서 방광내 MMC 주입 후 2시간을 처치하고 있음. 이러한 처치 시간에 대한 이유는 MMC의 농도가 방광 내에서와 방광암 세포 내에서 평형이 이루어 질거라는 예상에 따른 것임
- ✓ 이러한 예상이 실제 정확한 기준치이며 비평형에 의한 치료효과 감소가 나타날 수 있는지 확인하기 위해 점막 상피세포를 이용하여 MMC의 투과정도를 확인하였음

### Cell permeability test

- 방광 내막과 유사한 kidney epithelial cell을 이용하여 cell monolayer를 형성한 후 MMC의 세포 투과도를 측정함
- 환자의 방광 내 MMC 농도는 1~2 mM로 측정되었고, 이와 유사한 조건으로 실험함



#### 약물 투입 후 1시간

1mM-test01	1mM-test02	1mM-test03
0.351 $\mu$ M	0.347 $\mu$ M	0.250 $\mu$ M
0.04%	0.04%	0.03%

2mM-test01	2mM-test02	2mM-test03
2.743 $\mu$ M	2.383 $\mu$ M	2.645 $\mu$ M
0.15%	0.14%	0.15%

#### 약물 투입 후 2시간

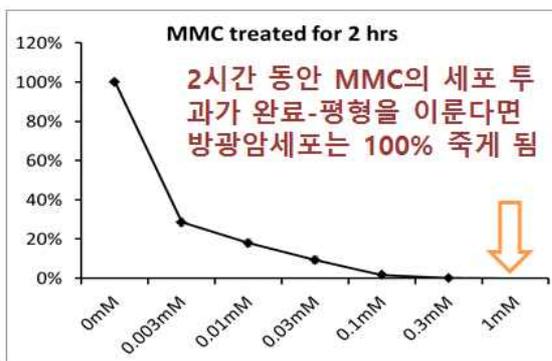
1mM-test01	1mM-test02	1mM-test03
0.234 $\mu$ M	0.429 $\mu$ M	0.172 $\mu$ M
0.03%	0.05%	0.02%

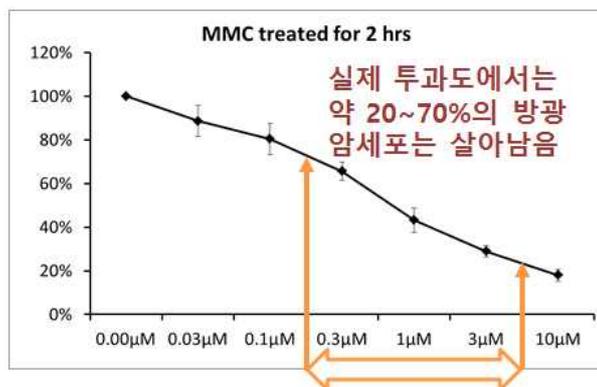
2mM-test01	2mM-test02	2mM-test03
6.339 $\mu$ M	9.189 $\mu$ M	10.302 $\mu$ M
0.31%	0.49%	0.53%

- ✓ 확인 결과, 예상과는 달리 주입 용액 상의 MMC의 농도는 점막 투과 후 용액 상에서 큰 차이를 보였으며, 실제 점막 투과량은 주입 농도의 수백분의 1 수준인 것으로 확인되었음.
- ✓ 이러한 투과 정도 수준에서 MMC가 실제 방광암 세포의 사멸을 효과적으로 유도하는지 확인하기 위해 임상에서 투여 조건과 동일하게 방광암 세포에 MMC를 2시간 처치한 후 방광암 세포의 cell viability를 측정해보았음

방광암 세포 KU19-19에 MMC를 각 농도별로 2시간 동안 처리하였을 때 세포 사멸 정도



MMC 농도	Cell viability
0mM	100%
0.003mM	28%
0.01mM	18%
0.03mM	9%
0.1mM	2%
0.3mM	0%
1mM	0%



MMC 농도	Cell viability
0.00 $\mu$ M	100%
0.03 $\mu$ M	89%
0.1 $\mu$ M	80%
0.3 $\mu$ M	66%
1 $\mu$ M	43%
3 $\mu$ M	29%
10 $\mu$ M	18%

✓ 그 결과, 2시간 동안 MMC의 농도가 요중과 방광암 세포에서 평형이 이루어질 경우에는 100% 세포 사멸에 도달하지만, 실제 점막 투과양으로 환산하여 시험하였을 경우에는 약 20~70%의 방광암 세포가 여전히 생존한 것으로 확인됨

● 연구 결과 요약

MMC의 분해에 영향을 주는 요인은 pH와 creatinine의 농도이다.

pH는 5.5이하에서 영향을 주며 pH 5.0이 되면 50%의 활성만 갖는다.

낮은 pH가 MMC의 효과 감소의 주요 원인이라면 normal saline 대신 sodium bicarbonate 용액을 사용함으로써 해결할 수 있다.

요중 MMC의 농도 측정은 HPLC 방법보다 분광학적 방법이 정확하다.

Alkalinization을 시행한다 하더라도 활성 MMC의 농도를 증가시키는 것은 아니다. (약 20~30% 차이를 보임)

MMC의 치료효과에 영향을 주는 요인은 요중 MMC의 농도 및 종양 조직에 대한 투과도임

MMC가 방광 내 주입되어 있는 2시간 동안, 종양 조직으로 얼마만큼 약물이 전달되었는가가 가장 중요할 것으로 판단됨

사례: Electromotive drug administration이 임상 3상 진행 중

추후 MMC의 solubility를 높이고 투과도를 증가시킬 수 있는 연구가 반드시 필요함

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도			
세부연구내용	가중치	달성도	달성내용
소변 중 mitomycin-C 및 분해산물의 농도에 따른 spectrophotometry를 분석하고 미지의 시료에서 mitomycin-C 및 분해산물의 농도를 측정할 수 있는 방법을 고안	20%	100%	분광학적인 방법을 이용하여 mitomycin C의 $\lambda_{max}$ 를 확인하고 요중 mitomycin C의 농도를 측정할 수 있는 수식을 완성하였음
방광 내 MMC 주입 후 2시간이 지나 배출되는 소변을 채취하여 pH, mitomycin-C 및 mitomycin-C 분해물질의 비율을 확인	20%	100%	26명의 환자를 대상으로 287종의 sample을 채취하여 MMC 투여 전후의 pH, creatinine, mitomycin-C, 소변 부피를 확인하였음. MMC의 농도는 분광학적인 방법을 이용하여 분석하였음
mitomycin-C 분해물질의 비율과 환자의 소변 중 주요 성분의 변화 간의 상관관계를 분석하여 MMC의 분해에 영향을 주는 요인을	20%	100%	연구 결과, mitomycin C의 분해에 영향을 주는 요인은 요중 pH와 creatinine 농도인 것으로 확인되었으며, pH 5.0의 경우

확인하고, 실제 그 영향정도를 in vitro 상에서 검증			mitomycin C의 약 50%가 분해되는 것으로 확인됨
방광암세포를 이용하여 소변 중 MMC 분해 촉진 인자의 영향력을 확인	20%	100%	mitomycin C가 낮은 pH에 의해 완전히 degradation되면 암세포의 viability에 전혀 영향을 주지 못하며, 요중 pH가 5.0일 경우에는 mitomycin C 주입 시간인 2시간 동안에 50%가 분해되어 그 효과가 절반으로 감소하는 것으로 확인 됨
환자 소변의 주요 성분과 mitomycin-C의 화학적 반응을 규명하여 mitomycin-C 투여 환자에서 효율을 극대화 할 수 있는 방안을 모색	20%	100%	요중 낮은 pH와 creatinine 수치에 의해 mitomycin C가 분해되는 것을 막기 위해서는 현재 임상에서 주입 용액을 normal saline으로 사용하는 것을 sodium bicarbonate로 변경할 필요가 있다고 판단됨

4-2. 관련분야 기여도

- 환자 소변에서 mitomycin-C와 분해물질 측정하는 방법 개발
- 소변의 주요 성분과 mitomycin-C 분해의 상관관계를 분석하여 방광내 mitomycin-C 주입 술 후 예후를 예측할 수 있는 데이터베이스 마련
- 기존 HPLC 분석 방법 대비 신속, 정확하게 분석하여 즉각적인 예후 예측이 가능하도록 함

5. 연구결과의 활용계획

- 비근침윤성 방광암 환자에서 mitomycin C의 방광 내 주입요법 시행 중 mitomycin C의 분해를 일으키는 요소를 발굴하고, 환자의 소변 분석을 통해 예후를 예측할 수 있는 시스템 구축
- 비근침윤성 방광암 환자에서 mitomycin C의 방광 내 주입요법 시행 중 mitomycin C의 분해를 억제할 수 있는 방안을 제시함으로써 임상에서 치료효과를 극대화하고 환자 생존율 증가에 크게 기여할 것으로 예상함

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

7. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Relationship between the concentration of mitomycin C and urinary components in non-muscle invasive bladder cancer patients	국립암센 터	주저자	영국	13.938	예정	단독사사	SCI

## 8. 참여연구원 현황

번호	소속기관명	직위	생년월일	전공 및 학위		연구담당 분야
	성명	과학 기술인등록 번호	성별	취득 년도	학위 (전공)	과제참여 기간
1	국립암센터 정경채	선임연구원	1977.06.23	2006	박사 (생화학)	세부과제 책임자 23개월
2	국립암센터 안경옥	과제연구원	1981.03.13	2007	석사 (의생명)	과제연구 23개월

## 9. 기타사항

## 10. 참고문헌

<별첨작성 양식>

[별첨]

## 자체평가의견서

### 1. 과제 현황

		과제번호		1410552	
사업구분	기관고유연구사업				
연구분야	창의과제 일반연구		과제구분	단위	
사업명	기관고유연구사업			주관	
총괄과제	비근침윤성 방광암 환자를 위한 mitomycin-C 효과 최적화 및 환자 맞춤형 치료 프로토콜 개발		총괄책임자	서호경	
과제명	비근침윤성 방광암 환자를 위한 mitomycin-C 투여법의 최적화 연구		과제유형	응용	
연구기관	국립암센터		연구책임자	정경채	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	연구비	민간	계
	1차년도	2014.02.01.~2014.12.31	45,000	-	45,000
	2차년도	2015.01.01.~2015.12.31	41,000	-	41,000
	3차년도	-	-	-	-
	계	23개월	86,000	-	86,000
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구기관	-		

2. 평가일 : 2015. 11. 04

3. 평가자(과제책임자) :

소속	직위	성명
바이오분자기능연구과	선임연구원	정경채

4. 평가자(과제책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	정경채
-----	-----

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

연구개발의 목표가 뚜렷하고 실제 방광암 환자의 치료에 기여할 수 있는 내용으로 구성되었음. 문제 해결을 위한 연구 방법이 구체적이고 체계적으로 구성되었으며, 새로운 연구 방법을 창안하고 그 가치를 판단한 점이 우수함

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

현재까지는 환자에서 직접적으로 mitomycin C의 농도를 측정하거나 요중 성분간의 상관관계를 분석한 사례가 없으며, mitomycin C의 항암효과를 근본적으로 향상시키는 방법이 없었음. 이번 연구 결과로 근본적인 문제점을 파악하고 해결책을 제시함으로써 실질적인 방광암 치료효과 상승에 크게 기여하리라 예상됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

전세계적으로 방광암 치료를 위한 mitomycin C의 방광내 주입요법에 대한 표준권고안이 마련되지 않은 상황에서 본 연구 결과를 토대로 과학적 근거를 기반으로 하는 표준 권고안이 마련되리라 예상됨

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

짧은 연구기간과 상대적으로 적은 연구비임에도 불구하고 연구 내용의 범위가 넓고 분명하며 연구목표에 대한 완성도가 높다고 판단됨

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

짧은 연구 기간이라서 아직 논문이 발간된 상태는 아니지만 연구 결과는 세계최고의 비뇨기학술지인 European Urology에 충분히 발간될 수 있으리라 판단하며, 추가적인 연구를 통해 전세계에 영향을 주는 표준권고안을 마련할 수 있을 것으로 판단됨

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
소변 중 mitomycin-C 및 분해산물의 농도에 따른 spectrophotometry를 분석하고 미지의 시료에서 mitomycin-C 및 분해산물의 농도를 측정할 수 있는 방법을 고안	20%	100%	분광학적인 방법을 이용하여 mitomycin C의 $\lambda_{max}$ 를 확인하고 요중 mitomycin C의 농도를 측정할 수 있는 수식을 완성하였음
방광 내 MMC 주입 후 2시간이 지나 배출되는 소변을 채취하여 pH, mitomycin-C 및 mitomycin-C 분해물질의 비율을 확인	20%	100%	26명의 환자를 대상으로 287종의 sample을 채취하여 MMC 투여 전후의 pH, creatinine, mitomycin-C, 소변 부피를 확인하였음. MMC의 농도는 분광학적인 방법을 이용하여 분석하였음
mitomycin-C 분해물질의 비율과 환자의 소변 중 주요 성분의 변화 간의 상관관계를 분석하여 MMC의 분해에 영향을 주는 요인을 확인하고, 실제 그 영향정도를 in vitro 상에서 검증	20%	100%	연구 결과, mitomycin C의 분해에 영향을 주는 요인은 요중 pH와 creatinine 농도인 것으로 확인되었으며, pH 5.0의 경우 mitomycin C의 약 50%가 분해되는 것으로 확인됨
방광암세포를 이용하여 소변 중 MMC 분해 촉진 인자의 영향력을 확인	20%	100%	mitomycin C가 낮은 pH에 의해 완전히 degradation되면 암세포의 viability에 전혀 영향을 주지 못하며, 요중 pH가 5.0일 경우에는 mitomycin C 주입 시간인 2시간 동안에 50%가 분해되어 그 효과가 절반으로 감소하는 것으로 확인 됨
환자 소변의 주요 성분과 mitomycin-C의 화학적 반응을 규명하여 mitomycin-C 투여 환자에서 효율을 극대화 할 수 있는 방안을 모색	20%	100%	요중 낮은 pH와 creatinine 수치에 의해 mitomycin C가 분해되는 것을 막기 위해서는 현재 임상에서 주입 용액을 normal saline으로 사용하는 것을 sodium bicarbonate로 변경할 필요가 있다고 판단됨
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 비근침윤성 방광암 환자에서 mitomycin C의 방광 내 주입요법 시행 중 mitomycin C의 분해를 일으키는 요소를 발굴하고, 환자의 소변 분석을 통해 예후를 예측할 수 있는 시스템 구축
- 비근침윤성 방광암 환자에서 mitomycin C의 방광 내 주입요법 시행 중 mitomycin C의 분해를 억제할 수 있는 방안을 제시함으로써 임상에서 치료효과를 극대화하고 환자 생존율 증가에 크게 기여할 것으로 예상함

## 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

실제 임상에서 방광암 환자의 치료 중 mitomycin C의 이용에 있어서 근본적인 문제점을 확인하고 이를 해결할 수 있는 방안을 제시한 점이 이 연구의 핵심이라 할 수 있음

## 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구의 결과는 방광암 치료를 위한 mitomycin C의 사용에 있어서 문제점의 원인을 분석하고 해결할 수 있는 방안을 제시한 것임

이와 연계하여 후속연구를 진행하여 실질적인 치료 효과 상승에 대한 연구가 필요하다고 판단됨

## IV. 보안성 검토

해당 사항 없음