

## 새로운 재조합 인 과립구 콜로니 자극인자 DA-3030의 변이원성연구

강경구\* · 최성학 · 김옥진 · 안병옥 · 백남기 · 김계원 · 김원배 · 양중익  
동아제약(주) 연구소

### Mutagenicity Study of DA-3030, A New Recombinant Human G-CSF(rhG-CSF)

Kyung Koo KANG\*, Seong Hak CHOI, Ok Jin KIM, Byoung Ok AHN, Nam Gi BAIK  
Gye Won KIM, Won Bae KIM and Junn Ick YANG

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd., 47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up,  
Yongin-gun, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received October 4, 1994; accepted October 21, 1994)

**Abstract**—The mutagenicity of DA-3030(rhG-CSF) was studied by reverse mutation test, chromosome aberration test and micronucleus test. The reverse mutation test in bacteria was performed using *Salmonella typhimurium* strain TA100, TA98, TA1535 and TA1537 with rhG-CSF in any of the concentrations(150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 and 4.6875  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ), no increase in the number of revertant colonies in each strain was observed, irrespective of treatment with the metabolic activation system(S-9 mix) The chromosome aberration test was carried out using CHL cells, cell line from chinese hamster lung. With 4 doses(75, 37.5, 18.75 and 9.375  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of rhG-/CSF the cells were treated for 24 or 48 hours in the direct method or for 6 hours followed by 18 hour-expression time in the metabolic activation method. Results of the study showed, by the direct method or metabolic activation method, no trend toward increase in the number of aberrant metaphase. The micronucleus test was carried out using ICR mice at the age of 8 weeks. Three doses(862.5, 1725 and 3450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of DA-3030 were administered intraperitoneally with single shot and bone marrow cells were sampled at 24 hours after administration. Neither the number of polychromatic erythrocytes with micronuclei nor the ratio of normochromatic erythrocytes to polychromatic erythrocytes increased significantly in each dose, compared with a vehicle control. These results indicate that rhG-CSF has not mutagenic potential under the conditions.

**Keywords** □ DA-3030, rhG-CSF, reverse mutation test, chromosome aberration test, micronucleus test

DA-3030은 동아제약(주) 연구소에서 유전자재조합기술을 이용하여 대장균에서 발현시킨 분자량 18.8 kd의 유전자재조합 인 과립구 콜로니 자극인자(recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF)로서 항암화학요법 및 방사선조사에 의한 호중구 감소증의 치료, 골수이식후의 과립구 회복촉진 등을 목적으로 개발예정인 물질이다. 본 시험은 DA-3030의 안전성평가의 일환으로 변이원성을 평가할 목적으로 히스티딘 영양 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀

변이시험, 포유류 배양세포인 CHL(chinese hamster lung)를 이용한 염색체이상시험과 설치류를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

#### 실험방법

##### 시험물질

시험물질인 DA-3030은 동아제약(주) 연구소에서 유전자 재조합 방법으로 생산한 rhG-CSF(recombinant human granulocyte colony stimulating factor)로 무색의 액체이며 순도는 98% 이상, Lot No는 CTS-001이었다.

\* To whom correspondence should be addressed.

시험물질의 희석은 시험물질의 전용매체(10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0)를 사용하였다. 양성대조로는 복귀 변이시험에서 sodium azide(Sigma S-2002), 2-aminoflourene(Sigma A-9031), 9-aminoacridine(Sigma A-7295)를, 염색체 이상시험에서는 mitomycin C(sigma M-0503), benzo[a]pyrene(Sigma B-1760)를, 소핵시험에서는 mitomycin C(Sigma)를 증류수나 dimethylsulfoxide(Sigma D8511)로 용해하여 사용하였다. 음성대조는 위의 시험물질 전용매체를 사용하였다.

#### 시험균주 및 사용세포

복귀변이 시험에 사용된 시험균주 *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535와 TA1537은 한국화학연구소로부터 분양받아 형질확인후 계대 배양하여 사용하였다. 시험균주의 배양은 냉동균주를 해동, 0.1 ml을 취해 25 ml의 2.5% Nutrient broth No. 2(Oxoid)에 접종하여 37°C, 120 rpm으로 하여 약 16시간 배양한 후 시험에 사용하였다.

염색체 이상시험에서는 Chinese hamster lung에서 유래한 CHL(JCRB0030)세포를 10% calf serum(Gibco)이 포함된 Eagle's MEM(Gibco) 배양액으로 배양하여 사용하였다.

#### 실험동물 및 사육환경

소핵시험에 사용한 실험동물은 6주령의 ICR 마우스(SPF) 암수 각 50마리로 B&K사(중국)로부터 구입하여 청정사육실내에서 1주이상 예비사육한 후 8주령을 시험에 사용하였다. 시험에 사용시 동물의 체중범위는 암수 각각 23~28 g 및 26~32 g이었다. 시험기간중 동물은 마우스용 사육상자에 암수 구분하여 각각 6마리씩 수용하였으며, 온도 23±2°C, 습도 55±15%, 환기횟수 15~20회/시간, 조명시간 10시간(07:00~17:00)의 조건으로 유지하였다. 음수는 자외선멸균 수도수를 사료는 Purina 실험동물사료(방사선멸균제)를 자유급식하였다.

#### S-9 mix

S-9 mix는 Ames 등의 방법(Ames 등, 1975)에 따라 Aroclor 1254를 효소 유도제로 하여 제조한 Rat liver S-9 products(ORGANON TEKNIKA CORPORATION)와 cofactor I(Oriental 酵母工業株式會社, Lot No.999303, S-9 mix 10 ml/중 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 16.3 mg, KCl 24.6 mg, G-6-P 17.0 mg, NADPH 36.2 mg, NADP 30.5 mg, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 119.6 mg, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 24.7 mg)를 혼합하여 사용하였다. 복귀변이시험에서는 Lot No. 38276인 Rat liver S-9 products가 S-9 mix 1 ml 중 0.1 ml, 염색체이상시험에서는 Lot No 38275인 Rat liver S-9 products가 S-9 mix 1 ml중 0.3 ml이 포함되어 제조하여 사용하였다.

#### 세균을 이용한 복귀변이시험

Maron과 Ames의 방법(Maron과 Ames, 1983)과 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업 지침서(1993)에 의거 S-9 mix를 사용하지 않은 직접법과 S-9 mix를 사

용한 대사활성화법을 실시하였다. Inoue 등의 시험방법(Inoue 등, 1990)을 참조하여 시험시 최고농도를 150 µg/plate로 하고 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875 µg/plate의 6단계 농도를 결정하였다. 복귀변이시험은 고압증기 멸균한 top agar를 45°C로 예열한 멸균 tube(Falcon #2054)에 2 ml씩 분주한 다음 시험물질 용액 100 µl, S-9 mix(대사활성화법) 또는 멸균증류수(직접법) 500 µl, 균배양액 100 µl를 top agar에 충분히 혼합한 후 minimal glucose agar plate에 중층하였다. 모든 시험은 3개의 plate를 사용하였으며, top agar가 굳으면 37°C에서 48시간 배양한 후 콜로니를 계수하였다.

시험물질의 변이원성 판정은 음성대조군에 비해 복귀변이 콜로니의 수가 2배 이상이고 동시에 농도 의존성이 확인되는 경우에 양성으로 판단하였다.

#### 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험

Ando 등(Ando 등, 1988)과 Inoue 등(Inoue 등, 1990)의 방법을 참조하여 75, 37.5, 18.75, 9.375 µg/ml의 시험농도로 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업지침서(1993)에 의거 직접법과 대사활성화법을 실시하였다.

직접법은 직경 60 mm plastic plate(Falcon #3002)에 10<sup>5</sup>개의 세포(배양액 5 ml)를 3일간 CO<sub>2</sub> 배양기(NAPCO; MODEL 5430, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 배양한 후 각 농도의 DA-3030 처리군, 무처리군, 용매대조군 및 양성대조군으로서 mitomycin C 0.05 µg/ml(최종농도)를 각각 처리하여 24시간 또는 48시간 배양하였다.

대사활성화법은 직경 60 mm plastic plate(Falcon #3002)에 10<sup>5</sup>개의 세포(배양액 5 ml)를 3일간 CO<sub>2</sub> 배양기(NAPCO; MODEL 5430, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 배양한 후 각 농도의 DA-3030 처리군, 무처리군, 용매대조군 및 benzo[a]pyrene 20 µg/ml(최종농도)를 처리한 양성대조군에 대하여 S-9 mix 처리(S-9 mix: 배양액=1:4) 및 S-9 mix 무처리하여 6시간 배양하였다. 배양 후 반응액을 제거하고 신선한 배양액과 교환하여 다시 18시간 배양하였다.

직접법 또는 대사활성화법에서 배양 종료 2시간 전에 각 plate에 colcemid 0.2 µg/ml(최종농도)를 처리하였다. 배양 종료 후 0.25% Trypsin-EDTA를 처리하여 수거한 세포현탁액을 원심분리(HITACHI 05PR-22 Refrigerated, 1,000 rpm, 5분)하여 세포를 모으고 37°C로 가온한 0.075 M KCl용액 4 ml를 가하여 항온수조에서 15분간 방치한 다음 0.5 ml의 냉각 고정액(메틸 알콜: 빙초산=3:1)을 가한 후 원심분리하여 수거한 세포에 4 ml의 냉각 고정액을 가하여 원심분리하였다. 동일한 조작을 3회 반복하여 세포를 완전히 고정시키고 3회째에는 원심분리한 후 0.5~1 ml의 고정액을 가하여 적당한 농도의 세포부유액을 만들었다. 냉동보관하였던 슬라이드를 1개씩 꺼내어 고정 세포부유액을 2개소에 1방울씩 떨어뜨리고 상온에서 건조하여 검체를 제작하고, 0.4%(W/V) Giemsa 용액에 30분간 염색하였다.

각 petri-dish당 제작된 검체에서 100개의 분열 중기 상을 배율이 1000배인 현미경하에서 관찰하여 염색체 이상을 가진 세포의 출현율을 구하였다. 이때 염색체 이상은 구조적이상(Structural aberrations : Chromatid gap, Chromatid break, Chromatid exchange, Chromosome gap, Chromosome break, Chromosome exchange)과 수적이상(Numerical aberrations : Polyploid, Endoreduplication)으로 나누어 관찰하였고, 이상의 종류를 1개 이상 가진 세포를 양성 세포 1개로 계수하였고 그 종류를 기록하였다.

염색체이상시험의 판정은 국립보건안전연구원의 독성 시험 표준작업지침서(1993)에 따라 이상세포(gap 포함)의 출현율이 5% 미만을 음성(-), 5% 이상 10% 미만을 양성(±), 10% 이상을 양성(+)으로 하였고 또한 직접법 및 대사활성법의 최종 판정이 양성이고 처리 농도의존성이 있는 경우 염색체 이상에 유의성이 있다고 판정하였다.

#### 설치류를 이용한 소핵시험

본 시험에서 DA-3030의 투여량은 단회투여의 시험결과를 바탕으로 3450 µg/kg을 고용량으로 하고 이하 공비 2로 중용량은 1725 µg/kg, 저용량은 862.5 µg/kg 등 3개 용량으로 설정하였으며, 음성대조군은 매체대조물질 투여군으로, 양성대조군은 mitomycin C 2 mg/kg 투여군으로 설정하였다. 군당 암수 각 6마리의 동물을 사용하였으며 10 ml/kg의 용량을 복강내로 단회 투여하였다. 표본제작시기는 예비시험결과 투여 후 24~72시간에 유의성있는 소핵다염성적혈구의 출현시기가 인정되지 않아 일반적으로 많이 사용되는 시간인 약물투여 후 24시간으로 결정하였다. 표본제작은 약물투여 24시간 후 마우스를 경추탈구로 도살한 다음 대퇴골을 분리하여 양골단을 절단한 후 약 1 ml의 FBS(fetal bovine serum)로 골수를 분리하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 상청액을 버린 후 침전물을 고르게 현탁하여 슬라이드에 도말하였다. 건조된 도말표본은 methanol로 5분간 고정 후 2.5% modified Giemsa 염색액으로 50분간 염색하여 검경하였다.

표본의 관찰은 광학현미경으로 개체당 1000개의 다염성적혈구를 관찰하여 소핵을 갖는 세포의 출현빈도를 구하고 동시에 동일시야에 존재하는 정염성적혈구의 수를 세어 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율을 구하였다.

결과의 통계처리는 DA-3030 및 mitomycin C 투여군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도에 대해서는 Mann-Whitney U 검정법을 이용하여 음성용매투여군과의 통계적 유의성을 조사하였으며, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율은 Student t-test를 이용하여 음성용매투여군과의 통계적 유의성을 검정하였다.

#### 실험결과

**Table 1.** Reversion assay of DA-3030 using *Salmonella typhimurium*

Test strain	Test article	Dose (µg/plate)	Mean of revertants± SD	
			without S-9mix	with S-9mix
TA1535	Untreated	—	18± 2	20± 1
		SA <sup>1)</sup>	687± 70	
	DA-3030	0	19± 2	21± 5
		4.6875	20± 1	23± 7
		9.375	21± 3	23± 3
		18.75	21± 2	22± 2
		37.5	19± 3	20± 3
75	20± 3	23± 5		
150	21± 2	23± 2		
TA153	Untreated	—	14± 4	13± 5
		9AA <sup>2)</sup>	473± 74	
	DA-3030	0	16± 2	12± 3
		4.6875	14± 3	14± 2
		9.375	15± 2	14± 3
		18.75	19± 1	13± 5
		37.5	18± 2	13± 2
75	15± 3	14± 5		
150	16± 2	14± 5		
TA98	Untreated	—	22± 7	35± 11
		2AF <sup>3)</sup>	1	220± 9
	DA-3030	0	25± 11	34± 6
		4.6875	23± 5	34± 4
		9.375	27± 6	34± 6
		18.75	23± 6	32± 1
		37.5	25± 2	36± 11
75	23± 3	34± 8		
150	20± 1	30± 5		
TA100	Untreated	—	84± 6	82± 6
		SA <sup>1)</sup>	1	836± 12
	DA-3030	0	78± 8	81± 8
		4.6875	74± 4	89± 8
		9.375	82± 8	89± 8
		18.75	82± 8	82± 11
		37.5	81± 3	80± 5
75	78± 2	78± 6		
150	83± 6	81± 8		

<sup>1)</sup>SA; Sodium azide. <sup>2)</sup>AA; 9-aminoacridine. <sup>3)</sup>AF; 2-aminofluorene

#### 세균을 이용한 복귀변이 시험

시험물질 처리군(150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875 µg/plate), 무처리군, 음성(용매)대조군 및 양성대조군에 대하여 *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 및 TA1537 4종의 시험균주를 사용하여 직접법과 대사활성화법에 의해 실시한 복귀변이시험 결과를 Table I에 표시하였다. 각 균주의 양성대조군에서는 복귀변이 콜로니의 수가 유의적인 증가를 보인 반면 시험물질인 DA-3030처리 시험군에서는 모두 대사활성화의 유무에 관계 없이 복귀변이 콜로니의 수가 유의적인 증가를 보이지 않았다.

#### 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험

직접법과 대사활성화법에 의한 염색체 이상시험의 결

**Table II.** Chromosome aberration test of DA-3030 by continuous treatment of CHL cells without S-9 mix.

Compounds	Treat. time (hr)	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Aberrant Metaphases	Type of Aberrations(%) <sup>1)</sup>								
				ctg	csg	ctb	csb	ctr	cse	pol	end	
Untreated	24	—	2	2	2	0	0	0	0	0	0	
Untreated	48	—	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
DA-3030	24	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	
		9.375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		18.75	2	2	1	0	0	0	0	0	0	
		37.5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
		75	2	0	1	1	0	0	0	0	0	
	48	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		9.375	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		18.75	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		37.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		75	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
MMC <sup>2)</sup>	24	0.05	38	15	5	13	2	14	2	4	0	
	48	0.05	36	13	4	6	0	18	5	1	0	

<sup>1)</sup>Explanation of abbreviation : ctg; Chromatid Gap, csg; Chromosome Gap,ctb; Chromatid Break, csb; Chromosome Break, ctr; Chromatid Exchange, cse; Chromosome Exchange, pol; Polyploid, end; Endoreduplication. <sup>2)</sup>MMC : Mitomycin C

**Table III.** Chromosome aberration test of DA-3030 by short time<sup>1)</sup> treatment of CHL cells with S-9 mix.

Compounds	S-9 mix	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Aberrant Metaphases	Type of Aberrations(%) <sup>2)</sup>								
				ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end	
Untreated	—	—	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
Untreated	+	—	2	1	0	1	0	0	0	0	0	
DA-3030	—	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
		9.375	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
		18.75	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
		37.5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
		75	2	1	0	1	0	0	0	0	0	
	+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		9.375	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		18.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		37.5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		75	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B[a]P <sup>3)</sup>	—	20	2	1	0	0	0	0	0	1	0	
	+	20	35	8	4	9	2	25	5	2	0	

<sup>1)</sup>Drug treatment; 6 hours, expression time; 18 hours <sup>2)</sup>Explanation of abbreviation: ctg; Chromatid Gap, csg; Chromosome Gap, ctb; Chromatid Break, csb; Chromosome Break, cte; Chromatid Exchange, cse; Chromosome Exchange, pol; Polyploid, end; Endoreduplication. <sup>3)</sup>B[a]P; Benzo[a]pyrene

과는 Table II와 Table III에 표시하였다.

직접법에서의 염색체 이상 세포의 출현율은 mitomycin C(0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 24시간 또는 48시간 처리한 양성대조군에서 각각 38% 및 36% 로 유의적인 증가를 보인 반면 용매처리군과 시험물질인 DA-3030의 처리군 모두에서 음성대조군인 무처리군과 비슷한 5% 미만의 출현율을 보였다. 대사활성화법에 의한 염색체 이상 시험에서도 염색체 이상세포의 출현율은 S-9 mix 존재하의 benzo[a]pyrene(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 처리군의 경우 35%로 유의적인 증가를 보인 반면 용매나 시험물질 처리군 모두에서 S-9 mix에 의한 대사활성화의 유무에 관계없이 무처리군과 비슷한

5% 미만을 나타내었다.

#### 설치류를 이용한 소핵시험

소핵시험의 결과는 Table IV와 같다. 약물투여 24시간후 소핵을 가진 다염성적혈구의 출혈빈도는 DA-3030 투여군에서는 0~3개로 매체대조물질 투여군에서의 0~2개와 비교하여 통계학적 유의성이 인정되지 않았으나, 양성대조군인 mitomycin C 투여군에서는 13~49개로 소핵을 가진 다염성적혈구의 출혈빈도가 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 한편, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서도 DA-3030투여군은 음성대조군에 비하여 유의차가 없었으나, 양성대

**Table IV.** Micronucleus test on mice treated with DA-3030

Compounds	Route	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Samplingtime (hr)	Sex	No.ofanimals	MNPCE/PCE <sup>1)</sup> (Min-Max)	NCE/PCE <sup>2)</sup> (Min-Max)
Vehicle control	i.p.	—	24	M	6	0.08 ± 0.09(0.0-0.2)	1.12 ± 0.12(0.94-1.23)
				F	6	0.10 ± 0.10(0.0-0.2)	1.12 ± 0.13(0.97-1.34)
DA-3030	i.p.	862.5	24	M	6	0.10 ± 0.06(0.0-0.2)	1.10 ± 0.41(0.75-1.86)
				F	6	0.10 ± 0.12(0.0-0.3)	1.23 ± 0.35(0.84-1.65)
		1725	24	M	6	0.08 ± 0.04(0.0-0.1)	1.00 ± 0.10(0.87-1.17)
				F	6	0.12 ± 0.11(0.0-0.3)	1.30 ± 0.37(0.74-1.86)
3450	24	M	6	0.12 ± 0.07(0.0-0.2)	1.42 ± 0.39(0.98-2.11)		
		F	6	0.08 ± 0.07(0.0-0.2)	1.20 ± 0.26(0.90-1.65)		
Mitomycin C	i.p.	2000	24	M	6	3.08 ± 1.00*(1.3-4.1)	1.88 ± 0.61*(1.20-2.98)
				F	6	3.70 ± 1.05*(2.5-4.9)	1.89 ± 0.29*(1.54-2.27)

<sup>1)</sup>The percentage of polychrocytes with micronuclei was calculated from 1000 polychromatic erythrocytes (Mean ± S.D.). <sup>2)</sup>The ratio of normochromatic erythrocytes to polychromatic erythrocytes (Mean ± S.D.). \*: Significantly different from the vehicle control ( $p < 0.05$ )

조군은 음성대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

시험물질인 DA-3030(rhG-CSF)의 변이원성을 복귀변이시험, 염색체 이상시험 및 소핵시험을 이용하여 검토하였다.

Inoue 등(Inoue 등, 1990)은 rhG-CSF의 변이원성시험에서 복귀변이시험은  $73.4 \mu\text{g}/\text{plate}$ , 염색체 이상시험의 경우에는  $36.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 최고농도로 설정하여 시험하였을 때 rhG-CSF가 복귀돌연변이를 유발하지 않았으며, 동시에 CHL세포를 사용한 염색체 이상시험에서도 이상세포 출현빈도의 증가를 나타내지 않는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 Inoue 등(Inoue 등, 1990)의 연구결과를 참조하여 시험농도 설정을 위한 초기독성시험을 실시하였으며, 복귀변이시험에 사용된 균주들에 대하여는  $150 \mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 생육억제효과가 없는 것으로 확인되었고, CHL세포의 경우에도  $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포생육에 대한 영향이 없는 것으로 확인되어 복귀변이시험은  $150 \mu\text{g}/\text{plate}$ , 염색체 이상시험은  $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 최고농도로 설정하여 시험을 실시하였다.

히스티딘 영양 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium*을 사용한 복귀변이 시험에서는 대사활성화의 유무에 관계없이 DA-3030의 처리에 의한 복귀변이 콜로니 수의 증가를 보이지 않았기에 DA-3030은 본 시험계에서  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ 로의 복귀 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

CHL세포를 사용한 염색체 이상시험에서도 직접법과 대사활성화법 모두에서 DA-3030의 처리에 의한 이상세포 출현빈도의 증가를 보이지 않았다.

마우스를 이용한 소핵시험을 862.5, 1725, 3450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 3개용량으로 실시한 결과 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 용량상관성 및 통계학적으로 유의성있는 증가가

관찰되지 않았다. 이와같은 결과는 일반적인 정상범위( $1.67 \pm 1.11$ )와 유사한 결과이며(Hart와 Engberg-Pedersen, 1983), 동계열 의약품인 filgrastim 및 lenograstim에서의 시험결과와도 유사하였다(Inoue 등, 1990; 萩原利行 등, 1989). 다염성적혈구와 정염성적혈구와의 비율에 있어서도 DA-3030을 투여한 모든 시험군에서 용량상관성 및 통계학적 유의성은 인정되지 않았으며, 약 1:1의 정상범위( $0.97 \pm 0.22$ )를 유지하여 DA-3030에 기인한 cytotoxic effect나 proliferative action 가능성은 배제되었다(Venitt와 Parry, 1984). 한편 filgrastim에 대한 소핵시험결과에서는 PCE/NCE가 용량상관성 있는 감소를 나타내었다고 보고되었으며, lenograstim을 이용한 시험에서는 용량상관성 없는 반응을 나타내 DA-3030의 결과와 유사하였다. 양성대조군인 MMC투여군에서는 소핵다염성적혈구의 출현빈도 및 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서 음성대조군과 비교하여 모두 유의성 있는 증가를 보여 세포유전자적 손상이 있는 것으로 관찰되었다.

본 연구의 결과 DA-3030의 복귀변이시험 및 염색체 이상 시험에서 모두 음성의 결과를 나타내었으며 마우스에서 소핵유발작용이 없는 것으로 나타나 DA-3030은 변이원성이 없는 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutation Res.* **31**, 347-364.
- Ando, N., Ishii, S., Abe, S., Emoto, H. and Kagitani Y. (1988). Mutagenicity test of CSF-HU (colony stimulating factor from human urine).-Reverse mutation test and chromosomal aberration test-. *Yakui to Chiryō*. **16**, 1601-1608.
- Hart, J. W., and Engberg Pedersen, H. (1983). Statistics of mouse bone-marrow micronucleus test: counting, distribu-

- tion and evaluation of results. *Mutation research*. **111**, 195-207.
- Inoue, M., Fukuda, T., Horiuchi, K., Mishima, M., Matsuoka, Y., Yano, Y., Fukuda, A. and Sato, T. (1990). Mutagenicity study on recombinant human G-CSF(rG · CSF). *Yakuri to Chiryō*. **18**(Suppl.9), S2405-S2413.
- 萩原利行, 梅澤高志, 渡邊三代子, 内田智子, 官腰昶宏, 平野光一. (1989). KRN 8601 の 變異原性試驗-マウスを用いる小核試驗- . 三共(株) 安全性研究所. Personal communication.
- Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983). Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215.
- Venitt, S., and Parry, J. M. (1984). *Mutagenicity testing-A practical approach*. pp298-306. IRL press England.
- 국립보건안전연구원 (1993). 독성시험 표준작업지침서, p565-654.