

## 6-[(N-4-클로로페닐)아미노-7-클로로-5,8-퀴놀리논]의 *in vivo* 항진균 작용 및 독성 평가

유충규<sup>#</sup> · 김동현\* · 윤여표\*\* · 이병무\*\*\* · 허문영\*\*\*\* · 장성재\*\*\*\*\* · 김효정\*\*\*\*\* · 박윤미  
이화여자대학교 약학대학, \*경희대학교 약학대학, \*\*충북대학교 약학대학, \*\*\*성균관대학교 약학대학,  
\*\*\*\*강원대학교 약학대학, \*\*\*\*\*국립보건안전연구원

(Received June 19, 1995)

### The Evaluation of *in Vivo* Antifungal Activities and Toxicities of 6-[(N-4-Chlorophenyl)amino]-7-Chloro-5,8-Quinolinediones

Chung-Kyu Ryu<sup>#</sup>, Dong-Hyun Kim\*, Yeo-Pyo Yun\*\*, Byung-Mu Lee\*\*\*, Moon-Young Heo\*\*, Seung-Jae Jang\*\*\*\*\*, Hyo-Jung Kim\*\*\*\*\* and Yun-Mi Park

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750,

\* College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701,

\*\* College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763,

\*\*\* College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Kyunggi-Do 440-746,

\*\*\*\* College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701,

\*\*\*\*\* National Institute of Safty Research, Seoul, 122-020, Korea

**Abstract**—6-[(N-4-Chlorophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK20) was tested for antifungal activities, *in vivo*, against *Candida albicans*. RCK20 was compared with ketoconazole and fluconazole in the treatment of systemic infection with *Candida albicans* in normal rats. The therapeutic potential of RCK20 had been assessed by evaluating their activities (survival rate) against systemic infections with in normal mice with *Candida albicans*. RCK20 improved survival rates as well as ketoconazole. RCK20 had ED<sub>50</sub>, 0.25 ± 0.18 mg/kg but ketoconazole and fluconazole had ED<sub>50</sub>, 8.00 ± 0.73, 10 ± 0.43 mg/kg respectively. Activities of RCK20 showed superior to that of ketoconazole and fluconazole. Intraperitoneally administered RCK20 at the ED<sub>50</sub>, 0.25 mg/kg for 7 days and 14 days reduced *Candida albicans* colony count in the kidneys and livers as well as ketoconazole and fluconazole at these ED<sub>50</sub>, 8.00 and 10 mg/kg. Acute oral toxicity studies of RCK20 were carried out in ICR mice of both sexes. These acute oral toxicities of RCK20 were low and LD<sub>50</sub> values were over 2.850 mg/kg in ICR mice. The Genotoxicities of RCK20 had been evaluated. RCK20 was negative in Ames test with *Salmonella typhimurium* (TA98 and TA100). The clastogenicity was tested on the RCK20 with *in vivo* mouse micronucleus assay. RCK20 did not show any clastogenic effect in mouse peripheral blood and was negative in mouse micronucleus assay. These results indicate that RCK20 has no genotoxic potential under these experimental condition.

**Keywords** □ 6-[(N-4-chlorophenyl)-amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione, *in vivo*, *Candida albicans*, antifungal, acute toxicity, Ames test, micronucleus assay

### 서 론

진균은 자연계에 널리 존재하나 사람에게 질병을 일으키는 경우는 소수이다. 진균감염은 근년에 있어서 광범위항생물질 및 면역억제약의 남용에 의해 기회감염

증가로 중요시되고 있다. 가장 흔한 진균 감염원은 우리 몸의 구강, 질, 소화관내 정상 세균총인 *Candida albicans*이다. *C. albicans*는 국소감염증을 유발시켰을 경우 피부, 손톱 감염 외에 구강염이나 질염의 형태로 나타나고, 전신적인 감염을 일으켰을 경우는 fungemia, *Candida*성 폐렴, 수막염등으로 나타나며, 고열, 저혈압, septic shock 같은 증상을 수반하기도 한

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

다. 특히 전신적인 *C. albicans* 감염은 기회감염으로 면역력이 저하된 무력숙주에서 빈번하며, 이는 광범위 항생제, 면역억제제, steroid 제제의 투여로 인해 악화될 수 있고, HIV 감염 같은 세포성 면역을 감소시키는 질환 또한 전신적 Candidiasis 를 악화시킨다.<sup>1-3)</sup>

이런 진균 감염증의 치료를 위해 사용되는 대표적인 항진균제는 amphotericin B, griseofulvin, flucytosine, ketoconazole, fluconazole 등을 들 수 있다.

Amphotericin B의 작용 기전은 진균 세포막의 ergosterol에 결합, 상호작용하여 channel을 형성하고, 이에 의해 막의 투과도를 증가시켜 세포 내용물을 유출, 사멸시킨다. 신장독성 및 두통, 구토, 저혈압 등을 유발시킨다. Griseofulvin은 진균의 polymerized microtubules의 합성을 억제하여 진균의 발육을 저해한다. 두통이나 소화관 장애, 피부 과민반응 등의 부작용이 있고, 최기성을 유발한다. 또한 flucytosine은 진균이 가진 cytosine deaminase에 의해 5-fluorouracil로 되고, 이 5-fluorouracil은 uracil대신 RNA에 들어가 부적절한 fungal RNA를 생성하여 진균의 발육을 저해하며 단독 사용시 내성이 쉽게 획득된다. 부작용으로는 소화관 기능 장애, 두통, 간독성, 골수 위축등이 나타난다.

현재 임상에 많이 사용되는 imidazole계의 대표적인 약물로는 ketoconazole을, triazole계로는 fluconazole을 들 수 있다. 이들 약물은 진균 세포막의 구성 성분인 ergosterol 합성과정 중의 하나인 cytochrome P-450 효소에 의해서 촉매 되는 C<sub>14</sub>-demethyl화 반응의 억제에 기인한다. 이에 의해 일어나는 ergosterol의 결핍에 의해 세포막의 정상적인 기능이 저해되어 항진균 효과가 나타난다. Ketoconazole에 의한 급성 간 장애나 내분비계 이상 등의 부작용이 일어나기도 하여 안정성에 대한 새로운 문제가 대두되고 있다.<sup>1,3)</sup>

이상과 같이 기존 항진균제의 문제점은 장기간 투여로 인한 강한 독성 및 부작용 등이 나타나는 것이다. 또한 내성균이 출현하고, 빠른 대사 배설로 병발부위에 혈중농도 유지가 어렵다. 항진균제의 개발은 일반적인 항생균제의 개발에 비하여 매우 어렵고, 약물 개발의 속도도 늦은 편이었다. 이는 항진균제가 작용할 진균세포가 진핵세포(eukaryote)로 인간세포와 세포적, 생화학적 특성이 매우 비슷하기 때문이며, 실제로 항진균제가 독성이 큰 것도 이 때문이다.<sup>1,2)</sup> 그래서 본 연구자 등은

약제 내성이 없고 독성이 적은 새로운 작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위하여 quinolinedione 유도체를 합성하여 screening한 결과 *in vitro*에서 우수한 항진균작용을 가지고 있으며 작용기전이 기존의 항진균제와는 다르다는 것을 알았다.<sup>4, 8)</sup> Quinolinedione의 항진균, 항말라리아작용은 미토콘드리아의 전자전달계를 저해함에 기인한다.<sup>5, 6)</sup> Quinolinedione은 ubiquinone 구조유사체로 상경적으로 작용하여 미토콘드리아의 Co-Q dependent succinioxidase 전자전달을 저해한다. 구조가 유사한 quinone 유도체는 항진균, 항말라리아 작용이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>5-11)</sup> Quinone 계열물질 중 1,4-naphthoquinone, 5,8-quinolinedione, 5,8-isoquinolinedione 유도체를 합성하여 *in vitro*에서 항진균작용을 검색한 결과 5,8-quinolinedione 유도체가 우수함을 발견하였고,<sup>7, 11)</sup> 그중에 6-[(N-chlorophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK20)이 우수하였다.<sup>7)</sup> 따라서 RCK20이 항진균성 선도 물질로서의 개발 가능성을 연구하기 위해 *in vivo*에서 항진균작용과 안전성을 검색했다. 흰쥐에 *C. albicans*를 전신감염 시킨 후 RCK20을 투여하여 치료율<sup>1, 11)</sup>을 측정하여 ED<sub>50</sub>를 구했다. 그리고 전신 감염에 대한 생명 연장 효과<sup>1, 12, 14)</sup> 등을 ketoconazole, fluconazole과 비교하여 측정했고 안전성을 평가하기 위해 급성경구독성,<sup>16, 21, 29)</sup> *Salmonella*를 이용한 변이원성 시험(Ames test),<sup>15, 17)</sup> *in vivo* 수준에서 생쥐소핵시험<sup>17, 20)</sup>을 행했다.

## 실험 방법

### 항진균 작용측정

**시약** - 6-[(N-chlorophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK20)을 전보<sup>7)</sup>에 보고한 방법대로 합성하여 항진균작용 및 독성 시험에 사용했다.

Mueller-Hinton broth, Sabouraud Agar, BHI (brain heart infusion)는 Difco Co.에서, DMSO는 Tedia Co.에서 구입하였고, 그 밖에 사용된 각종 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. Disposable petridish (87 × 15 mm)는 녹십자제품을 사용하였다.

항진균작용 측정에 사용된 시약과 용매는 모두 사용직전에 증류하였으며 모든 기구는 고온 가압 멸균 처리하여 사용했다.

**기기** - 융점측정: 융점측정기는 Thomas Hoover

Capillary Melting Point Apparatus model을 사용하였다.

IR: IR-spectrum은 KBr pellet으로 만들어서 Perkin-Elmer 1420 spectrometer로 기록하였다.

<sup>1</sup>H-NMR: TMS를 표준물질로 Varian Model T-69A spectrophotometer (80 MHz)로 측정하였다.

Incubator: Vision scientific Co., LTD. 을 사용하여 측정하였다.

Autoclave: Vision scientific Co., LTD. 을 사용하여 측정하였다.

Hemocytometer: W.Germany SUPERIOR, 1/10 DEEP, 1/400 SQMM을 사용하여 측정하였다

**균주 및 동물** - *C. albicans* 균주는 candidiasis를 앓고 있는 경희 의료원 내 환자로부터 분리한 임상 분리 균주이고 실험 동물은 대한 실험동물 센터로부터 구입한 무게 20 g안팎의 수컷 생쥐를 사용하였다. 먹이는 (주)삼양사의 마우스용 사료를 사용하였고 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

**ED<sub>50</sub>치 측정<sup>1, 14)</sup>** - 임상 분리한 *C. albicans*를 0.1 ml의 멸균 생리 식염수에  $2 \times 10^6$  (생쥐를 48시간 내에 치사시키는 농도)의 균이 되도록 현탁한 균액을 125 마리의 생쥐에 꼬리정맥 주사하여 전신 감염을 유발시키고 각 약물당 농도별로 4~6 마리씩 나누어 놓았다. 멸균 증류수와 Tween 20의 혼합액으로 만든 용매에 RCK 20의 농도가 10, 2, 0.5, 0.1, 0.025 mg/kg이 되도록 약물을 제조하여 캔디다의 전신감염 1, 4, 24 시간 후 0.2 ml씩 복강주사하였다. 대조약물로 사용한 ketoconazole은 40, 10, 2, 0.5, 0.1 mg/kg의 농도로 제조하여 같은 방법으로 복강투여하였다. 대조군은 용매 (0.25% Tween을 포함하는 생리식염수)만을 복강주사하고 감염 48시간후의 생존율로 ED<sub>50</sub>치를 측정하였다.

**전신 감염에 대한 활성 평가<sup>12, 14)</sup>** - 임상 분리한 *C. albicans*로 멸균 생리 식염수에  $2 \times 10^1$  /0.1 ml/되게 현탁한 균액을 70마리의 생쥐에 꼬리정맥 주사하여 전신 감염을 유발시키고, 10마리씩 7군으로 나누는 후, 앞의 실험에서 측정된 각 약물의 ED<sub>50</sub> 용량으로 약물을 제조하여 감염 4일 후부터 24시간마다 복강주사 하였다. 약물을 주사한 지 각각 1주일과 10일 되는 마지막 날로부터 3일 후 생쥐를 해부하여 간, 신장을 취해 무게의 3배되게 멸균 생리식염수로 희석, homogenization한 후 Sabouraud dextrose agar배지에 이식하고 2일간 배

양하여 자라나온 colony의 수를 세었다.

**전신감염생쥐에서의 항진균효과<sup>12, 14)</sup>** - 임상 분리한 *C. albicans*로 멸균 생리 식염수에  $2 \times 10^4$  /0.1 ml/되게 현탁한 균액을 49마리의 생쥐에 꼬리정맥 주사하여 전신 감염을 유발시키고 7마리씩 7군으로 나누는 후, ED<sub>50</sub>치 용량으로 제조한 각 약물을 감염 4일 후부터 매일 14일간 복강 주사로 투여하면서 생존율을 평가하였다.

**자료의 통계학적 해석** - ED<sub>50</sub>치는 Probit 법에 의해 계산했다. 기타 통계학적 처리는 Student's-t 검정을 행하고 P<0.05, P<0.01의 수준으로 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였다.

### 급성독성시험

**시험구역** - 시험구역은 성균관대학교 약학대학 GLP room 에서 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF ICR계 마우스를 국립보건안전연구원으로부터 분양 받아 온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 배기 10~18 회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 마우스용 폴리카보네이트 사육상자(220 W × 270 L × 125H mm) 케이지에 6마리씩 넣어 사육하였다. 1주일의 순화사육기간 동안에 일반증상관찰을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 제일상사의 실험동물사료를 구입하여 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음수는 멸균 수돗물을 자유롭게 섭취시켰다.

**군 분리 및 투여용량의 설정** - 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였다. 동물의 개체식별은 사육상자별 tag표시법을 이용하였다. 투여용량의 설정은 예비시험 결과 시험물질이 물에는 난용성으로 함습성이 강하여 용매로는 corn oil를 사용하였다. 또한 다량의 corn oil은 사하 증상을 유발하며 위장관으로 부터 약물의 흡수를 지연시킬 수 있으므로 corn oil의 투여용량을 10 ml/kg 이하로 하였다. 그 결과 본 제제의 투여가능 최대용량은 2,850 mg/10 ml/kg 이며 이것을 최고용량군으로 설정하고, 73 mg/10 ml/kg을 최저용량군으로 하여 일정 공비로 5개 용량군과 대조군을 설정하였다. 시험물질 투여 직전 시험동물의 체중범위는 수컷은 24~25 g, 암컷은 20~21 g 이었고, 주령은 약 8주령이었다.

**시험물질 조제 및 투여** - RCK20을 균일하게 현탁되도록 시험당일 용시조제 하였다. 시험물질 현탁액은

시험군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	시험계(마리)	
			수컷	암컷
최고용량군	2,850	10	6	6
고용량군	1,140	10	6	6
중용량군	456	10	6	6
저용량군	182	10	6	6
최저용량군	73	10	6	6
대조군 <sup>a</sup>	0	10	6	6

# 대조군에는 corn oil를 투여하였다.

경구용 존데를 이용하여 1회 경구투여 하였다. 투여량은 투여직전 체중의 변화에 따라 산출하였다.

**증상관찰** - 모든 시험동물에 대한 임상증상관찰 및 사망동물수는 약물투여직후부터 6시간동안은 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 익일부터 7일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망유무를 관찰하였다.

**체중측정** - 시험에 사용된 모든 시험동물에 대하여 시험물질 투여직전, 투여후 1일, 3일, 7일째에 체중을 측정하였다.

**부검** - 시험종료후 동물의 체중을 측정한 후 ether로 마취하고 설하동맥 및 복부대동맥을 절단하여 치사시킨 다음 외관 및 내부장기의 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다. 또한 의심스러운 이상소견이 관찰된 모든 조직은 현미경적 소견을 관찰하기 위하여 10% 포르말린 용액에 고정시켰다.

**자료의 통계학적 해석** - 통계학적 처리는 Student's-t 검정을 행하고 P<0.05, P<0.01의 수준으로 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였다.

### 변이원성 시험 (Ames test)

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* (유전적 특성 hisD3052, *rfa*,  $\Delta$ *uvrB*, pkM 101), TA100( hisG 46, *rfa*,  $\Delta$ *uvrB*, pkM 101)균주는 한국화학연구소로부터 인수하였다. 변이원성 시험 및 S-9 mix 제조는 Maron & Ames<sup>15)</sup>가 제시한 방법에 따라 행했다.

예비독성시험에서 결정된 용매 DMSO에 대한 최고 용해농도 20 mg/plate를 공비 2로 7단계로 설정하여 평판법으로 실험하였다. 복귀변이 집락의 복귀변이 집락의 수는 2개의 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이 유발성의 판정은 용매대조의 2배 이상의 복귀변이 집락수를 나타내었으며 또한 용량의 의존성을 가지는 경우를 양성으로 하였다. 음성대조물질은 용매인

DMSO를 사용하였고, 양성대조물질로서는 사용한 균주의 유전학적 특성 및 대사활성화법의 적용여부에 따라 2-aminofluorene(AF), sodium azide(SAZ)등을 사용하였다.

### 생쥐 소핵시험(Mouse micronucleus test)

**시험동물** - 시험동물은 6~8주령의 20~25g의 수컷 ICR생쥐를 사용하였으며 온도 20°C, 습도 55.5%, 형광등 명암 12시간 간격 교대의 사육환경에서 5마리씩 케이지에 넣어 사육하였다. 사료는 삼양사료의 시험동물용 사료를 시험동물에 자유로이 공급하였으며, 수돗물도 자유로이 공급하였다.

**검체의 투여** - 검체는 올리브유에 용해시켜 사용하였다. 투여경로는 복강투여로 하였다. 시험물질의 투여농도는 최고용량(500 mg/kg)으로부터 공비 2로 5단계의 농도로 하였다.

따로 음성 (olive oil)대조군을 두었다. 투여 횟수는 1회 투여하였으며, 48 시간 후에 마우스 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취하고 표본을 제작하였다. 양성대조물질로서는 mitomycin C와 같은 기지의 소핵유발물질을 사용하였다. 시험동물의 수는 1군당 5마리를 원칙으로 하였다.

**혈액채취 및 도말표본 제작법** - Acridine orange 용액(1 mg/ml) 10  $\mu$ l을 70°C slide warmer상의 slide glass위에 균일하게 도포 하였다. Acridine orange로 도포된 slide glass를 공기 중에서 건조시키고, 마우스의 꼬리정맥으로부터 주사기를 이용하여 말초혈액을 취한 후, 그중 5 $\mu$ l을 slide glass에 떨어뜨리고 cover glass로 덮었다. Cell이 고정될 때까지 약 1시간 정도 방치한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 마우스 1개체당 적색을 띠는 1,000개의 망상적혈구(reticulocytes, RETs)를 관찰하여 그 중에서 초록색 형광을 띠는 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated reticulocytes, MNRETs)의 개수를 산출한 것을 소핵생성빈도로 하였다. 이때 관찰한 망상적혈구는 적어도 적색의 형광이 선상으로 보이는 것(III형) 이상을 대상으로 하였다.<sup>19)</sup>

**통계학적 평가** - Hyashi등의 방법<sup>20)</sup>에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1, 2단계의 비교자료활용에 의한 검정을 거쳐 3단계에는 음성대조군과 시험물질 투여군과의 소핵적혈구의 생성빈도에 관한 유의차를 Cochran Armitage경향검정을 행하였다(유의수준 p<0.05).

## 결 과

새로운 항진균 작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위해 *in vitro* 항진균작용이 우수한 6-[(N-chloro-phenyl)-amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK20)에 대하여 *in vivo*에서 이용하여 항진균작용을 검색하였다. 현재 임상에 사용되는 ketoconazole 및 fluconazole과 비교하여 치료제로서의 유효성 여부를 알아보았다. 또한 RCK20의 안전성을 검색하기 위해 급성독성, 변이원성 시험, 소핵시험, 염색체이상시험등을 행했다.

### *in vivo* 항진균작용 측정

RCK20을 진균 전신 감염 흰쥐를 *in vivo* 항진균시험한 결과 ED<sub>50</sub>이 0.25 ± 0.18 mg/kg로 대조약물인 ketoconazole의 8.00 ± 0.73 mg/kg보다 우수했다 (Table I). 한편 fluconazole은 10 mg ± 0.43 mg/kg이었다.

전신 감염시킨 생쥐에 대하여 RCK20은 ED<sub>50</sub> 0.25 mg/kg와 fluconazole은 100 mg/kg을 복강투여한 후 간장과 신장에서의 균수를 측정함으로써 이들 화합물의 활성을 측정하였다 (Table II). Table II에서 보는 것처럼

**Table I**—Efficacy of RCK20 against systemic infection with *Candida albicans* in normal Mice

Compound	Mean ED <sub>50</sub> ± SD(≥5) in normal mice (mg/kg)
RCK 20	0.25 ± 0.18
ketoconazole	8.00 ± 0.73
Fluconazole	10.00 ± 0.43

a) Dose range: 0.2, 1.0, 2.0, 10.0, 40.0 mg/kg

b) Post infection: 2 days

**Table II**—Colony counts of *Candia albicans* recovered from kindey and liver of systemic infected Mice

Organ	Agent & Dosage(ED <sub>50</sub> , mg/kg)	Mean log <sub>10</sub> CFU/g of tissue ± S.E.	
		7-Day Rx <sup>a</sup>	14-Day Rx
Liver	Control <sup>b</sup>	3.084 ± 0.100	2.875 ± 0.780
	Fluconazole (10.00)	3.144 ± 0.475	1.653 ± 0.300
	RCK20 (0.25)	2.290 ± 0.520*	2.153 ± 0.400*
Kidney <sup>c</sup>	Control	3.733 ± 0.190	4.888 ± 1.420
	Fluconazole (10.00)	3.380 ± 0.950	3.965 ± 0.411
	RCK20 (0.25)	2.829 ± 0.755*	3.399 ± 0.400**

a) Rx: Drug Treatment

b) Control: saline with 0.25% Tween.

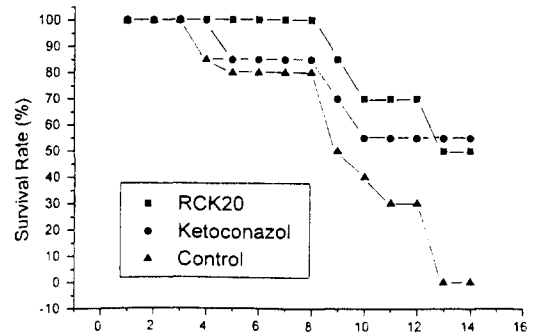
c) Mean for right and left kidneys

\* P<0.05 \*\* P<0.01

럼 RCK20을 투여한 후 7일에 간과 신장에서의 자라나온 균수를 비교한 결과 대조군에 비해서 RCK20은 유의성 있는 균수의 감소를 관찰할 수 있었으며 신장에 비해 간장에서 효과가 우수했다.

약물투여 14일 후에는 fluconazole, RCK20은 모두 대조군에 비해 균수가 유의하게 감소했으며 간에서의 균수의 감소는 fluconazole이 우수했으나 신장에서의 균수의 감소는 RCK20이 우수했다. RCK20은 fluconazole에 비교해서 낮은 농도에서는 비슷한 항진균 효과를 나타냈다

*C. albicans*를 만성 전신감염시킨 생쥐에서의 약물의 생명유지 효과를 측정하였다. *C. albicans*를 만성 전신감염시키고 대조군의 생쥐가 모두 사망될 때까지 유효농도의 약물을 하루에 한번씩 투여하였다. 즉 RCK20은



**Fig. 1**—Survival of *C. albicans* systemically infected mice treated with RCK20 and ketoconazole. Treatment was 4 days begun after infection and continued for a total of 14 days. Mice (7 per group) received intraperitoneally therapy once daily. Data for groups given RCK20 at the ED<sub>50</sub>, 0.25 mg/kg/day and ketoconazole at the ED<sub>50</sub>, 8.00 mg/kg/day. ■, RCK20; ●, Ketoconazole; ▲, Control (saline with 0.25% Tween).

**Table III**—Mortality of male and female ICR mice treated orally with RCK20

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment								Final Mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	2.850	6/6	6/6	6/6	5/6	5/5	5/5	5/5	5/5	1/6
	1.140	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	456	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	182	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	73	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
Female	2.850	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	1.140	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	456	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	182	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	73	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6

**Table IV**—Clinical signs of male and female ICR mice treated orally with RCK20

Sex	Dosage (mg/kg)	Clinical Signs	Hours after treatment						Days after treatment							
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	
Male	2.850	ND*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.140	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	456	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	182	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	73	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	2.850	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.140	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	456	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	182	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	73	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* ND: Not detected

**Table V**—Changes of body weight in ICR mice treated orally with RCK20

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment			
		0	1	3	7
Male	2.850	25.14 ± 1.33(6)	26.66 ± 1.83(6)	27.11 ± 1.15(5)	25.43 ± 1.06(5)
	1.140	25.02 ± 1.58(6)	26.91 ± 1.39(6)	27.41 ± 1.39(6)	29.50 ± 1.61(5)
	456	25.84 ± 2.30(6)	26.33 ± 1.03(6)	27.00 ± 2.00(6)	29.65 ± 1.61(6)
	182	24.98 ± 2.36(6)	26.58 ± 3.01(6)	26.55 ± 2.72(6)	28.91 ± 3.77(6)
	73	24.12 ± 1.69(6)	26.05 ± 2.23(6)	27.01 ± 1.21(6)	28.90 ± 3.24(6)
	0	25.25 ± 1.22(6)	26.66 ± 1.80(6)	32.25 ± 1.57(6)	33.65 ± 1.23(6)
Female	2.850	20.35 ± 1.34(6)	21.26 ± 1.54(6)	24.66 ± 1.02(6)	25.43 ± 1.25(6)
	1.140	20.19 ± 1.34(6)	22.14 ± 0.52(6)	24.38 ± 0.99(6)	25.34 ± 2.51(6)
	456	21.55 ± 1.87(6)	21.98 ± 2.36(6)	23.69 ± 2.45(6)	24.22 ± 3.01(6)
	182	20.11 ± 2.02(6)	21.65 ± 3.22(6)	24.87 ± 2.89(6)	25.66 ± 2.47(6)
	73	20.18 ± 1.75(6)	21.59 ± 2.03(6)	25.07 ± 1.96(6)	26.11 ± 2.47(6)
	0	20.25 ± 1.25(6)	21.33 ± 1.04(6)	24.98 ± 1.21(6)	25.69 ± 1.04(6)

Mean ± SD (n)=number of animals

ED<sub>50</sub> 0.25 mg/kg와 ketoconazole은 8.00 mg/kg을 투여하면서 생존율을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. RCK20의 항균력을 관찰한 결과 기준에 사용되고 있는

ketoconazole에 비교해서 낮은 농도에서는 비슷한 생명 연장 효과를 나타냈다. 따라서 RCK20의 항균력이 ketoconazole에 비교해서 우수하다고 사료된다.

**Table VI**—Summary of test results for RCKs in Ames test with *Salmonella typhimurium*

	TA 98		TA 100	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
RCK 20	-	-	-	-
Control (DMSO)	-	-	-	-
SAZ	*	*	+	*
AF	*	+	*	+

S9(-): without S9 mix; S9(+): with S9 mix.

SAZ: sodium azide; AF: 2-aminofluorene

\*: not tested

**안전성 검색**

*in vivo* 항진균 작용이 우수하고 변이원성시험 결과 안전성이 높은 물질 RCK20에 대해 급성독성시험을 했다.

약 8주령의 마우스에 RCK20을 경구투여한 결과 수컷의 최고용량군 1마리가 투여후 3일에 사망하였다 (Table III). 약물투여후 사망동물을 즉시 부검한 외관상의 소견에서는 별다른 증상을 나타내지는 않았다. 최고용량군에서 약물투여후 RCK20의 마우스에 대한 1회 경구투여 사망 예는 투여용량군에 관계없이 나타났으며, 또한 일반증상에도 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으므로 약물의 독성에 기인한 현상이라고 보기에는 어려워 앞으로 흰쥐에 대한 급성독성 및 아급성시험을 추가로 조사하여야 할 것으로 사료된다. 또한 모든 실험동물에서 투여후 7일까지 약물에 기인한 외관상 임상상태의 변화 및 중독증상은 발견되지 않았다 (Table IV).

체중증정 결과 시험물질 투여군은 수컷, 암컷 모두가 대조군에 비해 별다른 차이를 나타내지 않았다. 단 시험물질 투여군과 대조군에서 약간의 사하증상을 보이는 예가 있었다 (Table V).

RCK20을 투여한 수컷과 암컷의 중간용량군에서 비장의 비정상적인 증대가 관찰되었으나 시험물질에 기인한 원인이라고는 사료되지 않았다.

이상과 같이 RCK20의 마우스에 대한 급성경구독성 시험에서 상기의 일반상태, 체중변화 및 부검 소견 등에는 별다른 독성이 관찰되지 않았으나 앞으로 이들에 대한 아급성 시험 및 흰쥐에 대한 급성독성 시험을 추가로 시행하여야 정확한 독성을 평가할 수 있으리라고 본다.

RCK20에 대해 *Salmonella*를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험 (Ames test)을 행했다. 예비독성시험에서 결정된 용매 DMSO에 대한 최고 용해농도 20 mg/plate

**Table VII**—The clastogenic effects of mitomycin C-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Treatment time (hrs)	MNRETs/100 RETs	
	individual value	mean $\pm$ S.E.
24	9, 7, 10, 8, 8	8.4 $\pm$ 0.51
48	20, 22, 21, 19, 14	19.2 $\pm$ 1.39
72	9, 10, 8, 4, 7	7.6 $\pm$ 1.03

a) MNRET: micronucleated reticulocytes, RET: reticulocytes

b) Mitomycin C (1 mg/kg) was administered to mice intraperitoneally.

**Table VIII**—The effects of RCK 20 induced MNRETs in mouse peripheral blood

Dose(mg/kg, i.p.)	MNRETs/100 RETs	
	individual value	mean $\pm$ S.E.
31.25 mg/kg	1, 2, 0, 1, 2	0.3 $\pm$ 0.25
62.25 mg/kg	2, 1, 0, 1, 2	1.2 $\pm$ 0.37
125 mg/kg	0, 0, 0, 0, 1	0.2 $\pm$ 0.20
250 mg/kg	1, 1, 1, 1, 0	0.8 $\pm$ 0.20
500 mg/kg	1, 1, 1, 0, d	0.8 $\pm$ 0.25

a) d: mouse was dead.

b) Mice were sacrificed after 48 hrs of RCK20 treatment

c) MNRETs/100 RETs of negative control mice treated with olive oil(0.1 ml/25 g, i.p. once) only was 0.8  $\pm$  0.24 after 48 hr treatment

를 공비 2로 7단계로 설정하여 평판법으로 실험하여 Table VI의 결과를 얻었다. 실험결과 RCK20은 대사활성계 존재유무와 관계없이 Ames test에서 음성으로 나타났다 (Table VI).

RCK20에 대해 마우스 소핵시험에 의한 유전독성 실험을 행했다. 양성대조물질로 사용한 mitomycin C의 1 mg/kg(i.p.)에서의 MNRETs생성빈도는 각각의 혈액채취시간에 따라 Table V와 같았다. MMC 투여후 48시간에서 가장 높은 소핵생성빈도를 나타내었으며 1,000 RET당 19.2개 MNRET의 빈도를 나타내었다 (Table VII).

RCK20을 3단계의 용량별로 투여하고 24, 48, 72 시간에 혈액을 채취하여 MNRET생성빈도를 관찰한 결과 용량증가에도 유의성있는 생성빈도의 증가가 없었으며, 혈액채취시간에 따라라도 음성대조군에 비하여 유의성이 있는 차이가 나타나지 않았다. 따라서 MMC투여에서 나타난 최대생성빈도를 나타내는 48시간에 혈액을 채취하여 MNRETs를 관찰하였다 (Table VIII). 5단계의 용량에 걸쳐 실험한 결과 대부분의 용량에서

음성대조군에 비해 유의성 있는 증가가 나타나지 않았다. RCK20은 독성이 거의 없었다(Table VIII).

본 실험에서 RCK20의 투여농도는 예비시험으로 부터 최고투여량을 500 mg/kg으로 결정하였고, 혈액채취시간은 48시간에 생쥐 꼬리정맥으로부터 말초혈액을 채취하여 표본을 만들어 관찰하였다. 소핵을 가진 망상적혈구의 출현빈도에 있어서 양성대조군으로 사용한 mitomycin C는 Hayashi<sup>19, 20)</sup>의 데이터와 유사하였으며 용매대조군(올리브유)에서는 일반적인 음성대조군의 소핵생성빈도를 나타내었다. 이상의 결과로서 RCK20은 생쥐 말초혈액에서의 소핵생성빈도가 증가하지 않는 것으로 보아 골수세포의 분화과정에서 염색체손상을 일으키지 않는 것으로 판단된다.

## 고 찰

새로운 항진균작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위해 quinolinedione유도체중 RCK20의 항진균작용을 검색하였다.

*C. albicans* 감염생쥐를 이용한 ED<sub>50</sub>치 측정 결과 RCK20은 ketoconazole에 비해 낮은 농도에서도 ketoconazole과 동등한 활성을 나타내었다. 아울러 전신감염생쥐의 간장과 신장에서의 캔디다의 회수된 균수를 측정한 결과, 간장에서 대조군에 비해 균수가 감소한 것으로 나타났으나, 신장에서는 유의성이 별로 없었고 생존율 측정 결과 대조군에 비해 50%까지 생명을 연장시킴으로써 항진균 효과를 나타내었다. 이 생명 연장 효과는 AIDS 환자에게서 일어나는 기회성 진균 감염의 치료제로 RCK20을 사용하면 환자의 생명을 어느 정도 연장시킬 수 있을 지 모른다는 가능성을 주었다.

RCK20은 기존의 약물보다 적은 농도에서 우수한 항진균 효과를 나타냄을 알 수 있다. 기존의 약물과는 전혀 다른 활성 기전을 갖고 있기 때문에 앞으로 이 약물의 단독 또는 다른 약물과의 병용 투여로 진균 치료의 상승 효과를 기대해 볼 수 있을 것이다.

RCK20에 대해 급성독성시험을 했다. 현재 항진균제 약물로는 griseofulvin, ketoconazole, itraconazole, fluconazole등이 임상적으로 널리 사용되고 있으며 기타 임상시험중인 항진균제의 종류도 다양하다. 그러나 이들 약물들은 많은 부작용을 수반하며, 장기복용하면 위장장애와 간기능 장애를 유발한다는 문제점들이 있다. Ketoconazole의 흰쥐와 생쥐에 대한 경구 LD<sub>50</sub>은

각각 86 mg/kg, 44 mg/kg으로 보고되어 있으며, itraconazole의 경구 LD<sub>50</sub>치는 생쥐, 흰쥐, 개에서 각각 >320 mg/kg, >320 mg/kg, >200 mg/kg 으로 보고되어 있다.

본 시험에서는 시험물질 RCK20을 ICR계 생쥐에 2,850 mg/kg, 1,140 mg/kg, 456 mg/kg, 182 mg/kg, 73 mg/kg의 5개 투여 용량군과 대조군을 설정하여 1회 투여한 후 급성경구독성을 조사한 결과 외관상의 별다른 이상증상은 보이지 않았다. 이와 같이 RCK20의 생쥐에 대한 급성경구독성시험에서 상기의 일반 증상, 체중변화 및 부검 조건 등에 별다른 독성이 관찰되지 않았고, LD<sub>50</sub>치는 2,850 mg/kg이상으로 평가되었다. 그러므로 기존의 항진균제로 사용되는 물질들에 비해 경구독성은 적은 것으로 사료되나 앞으로 RCK20에 대한 아급성 및 만성독성시험을 추가로 실시하여야 더욱 정확한 안전성평가를 할 수 있으리라고 본다.

RCK20에 대한 급성경구독성시험을 실행하기 위하여 실험동물로 ICR 생쥐를 선택하였다. 이것은 제공된 약물의 양이 너무 적어 시험물질의 양을 고려하였기 때문이다. 또한 RCK20은 물에 난용성이며 corn oil에 현탁하여 경구 투여하였으나 최대투여 가능용량이 2,850 mg/10 ml/kg 으로 일반적인 의약품의 안전성 평가기준에 의한 경구 저독성 용량인 5 g/kg 이상으로까지 약물의 투여 용량을 증가하지 못하였다. 앞으로 약물의 투여용량을 더 증가시켜 흰쥐에 대한 급성경구독성시험을 추가로 실시하여야 정확한 평가를 할 수 있으리라고 사료된다. 또한 투여 경로를 변경하여 급성 및 아급성 시험을 실행하여야 한다.

신약후보물질들은 유전독성을 스크리닝하여 유전적으로 안전한 물질인가를 평가해야 한다. 이때 사용되는 유전독성시험은 *in vitro*에서 Ames test를 이용한 복귀돌연변이시험과, *in vivo*에서 생쥐 소핵시험을 이용한 염색체손상시험등을 실시하게 된다. 이들 시험결과 유전독성이 negative로 나오면 다른 여러 가지 독성시험 결과와 연계하여 안전성이 확보된 신약후보물질을 제시하게 된다.

RCK20에서 유전자 복귀돌연변이 시험 (Ames test)을 행했더니 음성으로 나타났다.

RCK20에 대해 생쥐 소핵시험에 의한 유전독성 시험을 행했다. 양성대조군으로 mitomycin C를 사용하고 음성대조군으로는 용매대조군(올리브유)과 비교하여 RCK20의 생쥐 말초혈액에서의 소핵생성빈도를 측



정한 결과 골수세포의 분화과정에서 염색체손상을 일으키지 않는 것으로 판단된다. RCK20은 Ames test와 생쥐소핵생성시험 등의 유전독성시험의해 안전성이 높은 것으로 평가됐다.

이상과 같이 항진균작용을 검색한 결과 기존의 fluconazole, ketoconazole보다 우수한 항진균 작용을 나타냈다. 또한 RCK20에 대해 급성독성, 변이원성 시험, 소핵시험등 독성시험을 행했다. 유의할 만한 독성은 거의 없었고 안전성은 높았다. RCK20의 항진균력을 보다 많은 균주를 가지고 *in vivo*에서 피부감염 항진균작용을 검색을 하고, 일반 및 특수독성시험, 대사 및 pharmacokinetics을 연구하여 항진균성 신약 후보물질을 창제하는 것이 앞으로의 과제로 사료된다.

## 결 론

1. *C. albicans* 전신감염 흰쥐에 대해 RCK20의 ED<sub>50</sub>을 구한 결과 0.25 ± 0.18 mg/kg로 대조약물인 ketoconazole, fluconazole의 8.00 ± 0.73 mg, 10 mg ± 0.43 mg/kg 보다 낮은 농도에서 동등한 활성을 나타내었다. 전신감염 생쥐에서 *C. albicans*의 회수된 균수를 측정된 결과, 간장에서 대조군에 비해 균수가 감소한 것으로 나타났으나, 신장에서는 유의성이 별로 없었다. 그리고 생존율 측정 결과 대조군에 비해 50%까지 생명을 연장시킴으로써 항진균 효과를 나타내었다. RCK20은 기존의 ketoconazole과 fluconazole 보다 적은 농도에서 동등한 항진균 효과를 나타냈다.

2. RCK 20의 급성경구독성을 평가하기 위하여 ICR계 마우스에 2,850 mg/kg를 투여가능 최대용량으로 경구 투여한 후 7일 동안 사망동물수, 임상증상, 체중변화 및 육안적 해부소견을 관찰하였다. 급성경구독성시험에서 일반 증상, 체중변화 및 부검 소견 등에 유의성있는 다른 독성이 관찰되지 않았으며 LD<sub>50</sub>치는 약 2,850 mg/kg 이상이라고 평가되었다.

3. RCK20에 대해 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100)를 이용한 *in vitro* 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)을 한 결과에서 음성으로 나타났다.

4. RCK20에 대해 *in vivo* 수준에서 소핵시험에 의한 유전독성을 평가하였다. RCK20은 마우스 말초혈액에서의 소핵생성이 나타나지 않아 골수세포의 분화과정에서 염색체손상을 일으키지 않는 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

이 연구는 94년도 보건복지부 신약개발 지원연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) McGinnis M. R. and Rindali, M. G.: Antifungal drug: Lorian, V.(Eds.), *Antibiotics in laboratory medicine* 3rd ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1991, p198.
- 2) Yamaguchi, H.: Antifungal agents-Recent trends in development and progress in research of action mechanism, *日本臨牀*, **49** 220 (1991).
- 3) Sheehan, D. J., Espinel-Ingroff, A., Moor, D. J. and Webb, C. D.: Antifungal susceptibility tests of yeasts: A brief overview, *Clin. Infect. Diseases* **17**(Suppl.2), 494 (1993).
- 4) *Chem. Abstract*, **99**, 88059 (1983); **64**, 11215 (1966); **57**, 3420, 9823, 11160 (1962); **56**, 4740 (1962).
- 5) Porter, T. H., Skelton, F. S. and Folkers, K.: Synthesis of 5,8-quinolinequinones as inhibitors of coenzyme Q as antimalarials. *J. Med. Chem.*, **16**, 1048-1033 (1971).; Bowman, C. M., Porter, T. H., Skelton, F. S. and Folkers, K.: 5,8-Quinolinequinone analogs which inhibit mitochondrial succinoxidase. *J. Med. Chem.*, **14**, 206 (1973).
- 6) Hudson, A. T.: Atovaquone-A novel agent for the treatment of malaria, PCP and toxoplasmosis. Bentley.P.H. and Ponsford.R.(Eds.), *Recent advances in the chemistry of anti-infective agents* Royal society of chemistry, p322 (1992)
- 7) Ryu, C. K. and Kim, H. J.: The synthesis of 6-(N-arylamino)-7-chloro-5,8-quinolinedione derivatives for evaluation of antifungal activities. *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 139 (1994).
- 8) Ryu, C. K. and Kim, D. Y.: The antifungal susceptibility tests of 5,8-quinolinediones against *Candida sp.*, *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 483 (1994).
- 9) Ryu, C. K., Ryu, J. C., Chung, C. Y. and Kim, D. H.: Antimicrobial activities of 1,4-naphthoquinone derivatives. *Yakhak Hoeji* **36**, 110 (1992).

- 10) Ryu, C. K. and Kim, D. H.: The synthesis and antimicrobial activities of some 1,4-naphthoquinones. *Arch. Pharm. Res.* **15**, 263 (1992).
- 11) Ryu, C. K. and Kim, D. H.: The some antimicrobial activities of 1,4-naphthoquinones (III). *Arch. Pharm. Res.* **16**, 161 (1993).
- 12) Fisher, M. A., Lee, P. G. and Tarry W. F.: Fluconazole treatment of Candidiasis in normal and diabetic rats. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **33**, 1042 (1989).
- 13) Viscoli, C. and Terragna, A.: Fluconazole in the Treatment of Candidiasis in Immunocompromised children. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **35**, 365 (1991).
- 14) Sugar, A. M., Salibian, M. and Goldani, L. Z.: Saperconazole therapy of murine disseminated candidiasis: Efficacy and interaction with amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **38**, 371 (1994).
- 15) Maron, D. M. and Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173 (1983).
- 16) 국립보건안전연구원: 예규 제 94-4호: 의약품등의 독성시험 기준. (1994).
- 17) OECD, Data interpretation guides (DIGs) (Provisional), DIG18. *Mutagenicity* p58 (1984).
- 18) WHO/IPCS, Summary report on the evaluation of short-term tests for carcinogens (Collaborative study on in vitro tests). *Environmental Health Criteria.* (1985).
- 19) Hayashi, M.: An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.* **120**, 241 (1983).
- 20) Hayashi, M.: The micronucleus test, p63. Scientist, Tokyo (1991).
- 21) Lorke, D.: A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**, 275 (1983).
- 22) Cho, D. H., Hwang, S. J., Lee, W. Y., Lee, J. Y., Yoon, H. J. and Moon, B. W.: Acute subcutaneous toxicity study of banaron cream in rats. *J. Appl. Pharm.* **2**, 280 (1994).
- 23) Obara, S.: Studies on single-dose toxicity of hydrophobically modified hydropropyl methylcellulose in rats. *J. Toxicol. Sci. Jpn.* **17**, 13 (1992).
- 24) Nakashima, H., Omae, K., Sakai, T., Yamazaki, K. and Sakurai, H.: Acute and subchronic inhalation toxicity of tetraethoxysilane (TEOS) in mice. *Arch. Toxicol.* **68**, 277 (1994).
- 25) Yamashita, K., Nakano, S., Kuwata, M., Yada, H., Irimura, K., Morinaga, H. and Morita, K.: Single dose toxicity studies of suplastat tosilate (IPD-1151T). *J. Toxicol. Sci. Jpn.* **17**, 1 (1992).
- 26) Zbinden, G. and Flury-Roversi, M.: Significance of the LD<sub>50</sub>-test for toxicological evaluation of chemical substances. *Arch. Toxicol.* **47**, 77 (1981).
- 27) Heiberg, J.K. and Svejgaard, E.: Case reports of hepatic toxicity: ketoconazole. *Brit. Med. J.* **283**, 825 (1981).
- 28) Bruce, R. D.: An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fund. Appl. Toxicol.* **5**, 151 (1985).
- 29) KGLP: 보건사회부고시 의약품 안전성 시험관리기준 해설서(1988), 보건사회부고시 제92-96호(1992. 12. 31) 의약품등의 안전성, 유효성 심사에 관한 규정 [별표 5].