

항진균성 6-[(N-Halophenyl)amino]-7-Chloro-5,8-Quinolinedione의 유전독성 평가

유충규* · 허문영¹ · 박윤미 · 윤여표²

이화여자대학교 약학대학, ¹강원대학교 약학대학, ²충북대학교 약학대학

The Evaluation of Genotoxicities of Antifungal 6-[(N-Halophenyl)amino]-7-Chloro-5,8-Quinolinediones

Chung-Kyu RYU*, Moon-Young HEO¹, Yun-Mi PARK and Yeo-Pyo YUN²

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

¹College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701

²College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

(Received June 13, 1995; accepted September 7, 1995)

Abstract—The clastogenecity and mutagenicity of antifungal 6-[(N-halophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK 3, 7, 13, 14, and 15) had been evaluated. *Salmonella typhimurium* reversion assay (Ames test) was used to test the mutagenicity of RCKs. RCK14 was mutagenic in *S. typhimurium*(TA98 and TA100) with and without rat liver microsomal activation. Whereas RCK3, 7, 13 and 15 were negative in Ames test with *Salmonella typhimurium*(TA98 and TA100). The clastogenecity was tested on the RCKs with *in vivo* mouse micronucleus assay. All of RCKs tested did not show any clastogenic effect in mouse peripheral blood. Thus RCKs were not supposed to cause any chromosomal damage termed micronuclei. These results indicate that RCK 3, 7, 13 and 15 have no genotoxic potential under these experimental condition.

Keywords □ 6-[(N-halophenyl)-amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione, antifungal mutagenicity, Ames test, clastogenecity, micronucleus test

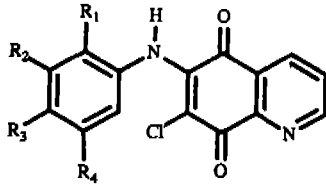
기존 항진균제의 문제점은 장기간 투여로 인한 강한 독성, 부작용 및 내성균등이 나타나는 것이다. 항진균제의 개발은 일반적인 항생균제의 개발에 비하여 매우 어렵고, 약물 개발의 속도도 늦은 편이었다. 이는 항진균제가 작용할 진균세포가 진핵세포(eukaryote)로 인간세포와 특성이 매우 비슷하기 때문이며, 실제로 항진균제가 독성이 큰 것도 이 때문이다(Mcginnis 등, 1991; Yamaguchi, 1991; Sheehan 등, 1993). 현재 임상에서 사용되고 있는 amphotericin B, griseofulvin, flucytosine, ketoconazole, fluconazole 등은 오심, 구토, 발열 등 많은 부작용을 수반하며, 장기 복용하면 위장장애, 신장독성과 간기능 장애를 유발한다는 문제점들이 있다. 급성경구독성에서도 낮은 LD₅₀치를 나타내고 있다. 그러므로 안전성이 확보된 항진균제의 개발은 매우 중요하다(Sheehan 등, 1993). 그래서 본 연구자 등은 독성이 적고 약제 내성이

없는 새로운 작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위하여 quinolinedione-유도체를 합성하여 screening한 결과 우수한 항진균작용이 있음을 알았다(Ryu 등, 1994). 그 중에 6-[(N-halophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione-유도체 (RCKs, Table I)가 우수하였다(Ryu 등, 1994). 본 연구에서는 안전성이 높은 선도 물질로서의 개발 가능성을 연구하기 위해 RCKs의 안전성을 평가하기 위해 유전독성시험을 행했다.

일반적으로 신약의 독성에 관한 자료로서는 급성독성, 아급성독성, 만성독성, 생식독성, 유전독성, 발암성 등의 시험결과를 요구하게 된다(KGLP, 1988). 본 연구에서는 특히 유전독성시험에 관하여 신약후보물질의 안전성을 평가하고자 했다.

DNA의 기본구조는 미생물로부터 포유류에 이르기까지 공통점이 많다. DNA에 손상을 주는 물리적, 화학적 요인은 그 강도에 따라 인간의 건강에 영향을 미치게 된다. 만약 이러한 상해가 동물의 생식세포에서 일어난

* To whom correspondence should be addressed.

Table I. 6-[(N-Halophenyl)amino]-7-Chloro-5,8-Quinolinediones

Compound	[(N-halophenyl)-amino]	R ₁	R ₂	R ₃
RCK 3	(4-fluoro-phenyl)-amino	H	H	F
RCK 7	(4-bromo-phenyl)-amino	H	H	Br
RCK 13	(2,4-dibromo-phenyl)-amino	Br	H	Br
RCK 14	(2,4-dichloro-phenyl)-amino	Cl	H	Cl
RCK 15	(3-chloro-4-methyl-phenyl)-amino	H	Cl	CH ₃

다면 생식을 매개로 하여 자손에게 유전적 결함을 생기게 하며, 동물의 체세포에 동일한 상해가 일어난다면 세포의 암화, 특히 initiation 과정에 밀접하게 관여하게 된다. DNA 상해는 물질에 따라 다양하게 일어난다. 어느 경우에는 DNA의 염기치환(base-substitution)에 의하여, 또 어느 경우에는 nucleotide pair의 결손 또는 첨가에 의해서 유전암호의 해독에 변화를 생기게 한다(frame shift형 변이). 그 동안 이와 같은 DNA 상해를 검출하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 특히 인위적으로 화학물질에 대한 감수성을 높인 *Salmonella*를 이용한 Ames test (Maron 등, 1983)는 DNA 상해를 단시간에 검출할 수 있는 우수한 방법이다. 한편, 결손(deletion), 삽입(insertion), 또는 전좌(translocation) 등 비교적 큰 단위의 DNA 변화는 염색체 수준에서의 검출이 가능하다. 염색체를 관찰하기 위해서는 진핵생물(eukaryote)이 이용되며 보다 사람에 근접한 포유류세포를 사용하는 것이 좋다. OECD의 유전독성에 관한 가이드라인(OECD, 1984)은 화학물질의 변이원성 유무를 알기 위해서는 적어도 두 가지 이상의 유전학적 지표인 유전자 돌연변이(gene mutation)와 염색체이상(chromosomal aberration)에 해당하는 시험법을 적용하는 것이다. WHO/IPCS(국제화학물질안전성계획)에서 기획한 국제협력기구(CSSTT)의 결과에 의하면 화학물질의 발암성 여부를 인정하기 위해서는 Ames test에서의 양성만 가지고는 어렵기 때문에 이것을 보완하기 위해서는 포유류세포를 이용한 염색체 이상시험이 추가되어야 한다고 밝힌 바 있다(WHO/IPCS, 1985). 우리 나라에서도 유전독성평가를 위해서 a) 세균을 이용한 유전자돌연변이시험 b) 설치류를 이용한 소핵시험 c) 포유류의 배양세포를 이용한 염색체 이상시험을 채용하고 있다. 이외에도 필요하다면 여러 가지 변이원성시험을 추가하게 되어 있다. 이에 본 연구에서는 새로운 항진균성 RCKs에 대한 안전성을 보기 위하여 *Salmonella*를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)

을 행했다. 그리고 *in vivo* 수준에서 마우스 소핵시험(Hayashi 등, 1983, 1991; Lorke, 1983)에 의한 유전독성 시험을 행하고 평가하였다.

실험방법

시약

6-[(N-Halophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCKs, Table 1)의 전보(Ryu 등, 1994a)에 보고한 방법대로 합성하여 유전독성 시험에 사용했다. Fetal calf serum을 Gibco에서 Giemsa staining solution은 BDH사에서 구입하였다. Bacto-Difco agar, Vogel-Bonner medium E, Oxoid nutrient broth No.2 Difco Co.에서, L-histidine HCl, biotin, 2-aminofluorene, sodium azide, benzo(a)pyrene, mitomycin C는 Sigma Co.에서, DMSO는 Tedia Co.에서 구입하였고, 그 밖에 사용된 각종 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. Disposable petri dish (87×15 mm)는 녹십자제품을 사용하였다. 용매는 모두 사용직전에 증류하였으며 모든 기구는 고온가압 멸균 처리하여 사용하였다.

기기

용점측정: 용점측정기는 Thomas Hoover Capillary Melting Point Apparatus model을 사용하였으며, 용점은 보정하지 않았다.

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

¹H-NMR: TMS를 표준물질로 Varian Model T-69A spectrometer (80 MHz)로 측정하였다.

*Salmonella*를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험 (Ames test)

시험용 균주

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 균주는 한국화학연구소로부터 인수하였으며 그 유전적 특성은 Table과 같다. 각 균주는 Maron & Ames원저 (Maron 등, 1983)에 제시된 방법에 따라, 본 시험에 앞서 ① histidine 요구성 ② crystal violet 감수성 ③ UV 감수성 ④ ampicillin 또는 tetracycline내성 ⑤ 자발 복귀 변이 빈도 등의 유전독성을 확인하였다. 각 균주는 -70℃의 DMSO 동결 보존으로부터 직접 10 ml의 nutrient broth에 접종하여 37℃에서 16시간 회전식 진탕배양에 의해 시험에 사용할 균 현탁액으로 하였다.

Genetic characteristics of *Salmonella typhimurium* in Ames test

균 주	유전적 특성	참고문헌
<i>Salmonella typhimurium</i>		
TA98	hisD3052, rfa, ΔuvrB, pkM101	Maron & Ames 1983
TA100	hisG46, rfa, ΔuvrB, pkM101	Maron & Ames 1983

배지

Minimal glucose agar medium : 유전독성 검색용의 배지로써 Vogel-Bonner medium E에 1.5% Bacto-Difco agar와 2% glucose를 함유한다. Plate당 용량은 25 ml이며 plate는 선 멸균제품(Corning 100 mm×20 mm)를 사용하였다. Vogel-Bonner medium E(50x)의 liter당 조성은 다음과 같다.

warm distilled water (45°C)	670 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 g
citric acid monohydrate	100 g
K ₂ HPO ₄	500 g
NaH ₂ PO ₄ ·4H ₂ O	176 g

Top agar : 0.6% Difco agar와 0.5% NaCl을 함유한다. 사용에 앞서 microwave oven에서 녹인 후 top agar 100 ml당 5 ml의 1 mM L-histidine HCl/0.5 mM biotin용액을 첨가하여 사용하였다.

Nutrient broth : 시험용 균주의 액체배양에 사용하며 Oxoid nutrient broth No.2를 2.5% 함유한다. 이상 각 배지의 멸균은 고압 증기 멸균(121°C, 15 min)에 의하였다.

S-9 mix의 조제 : *In vitro* 대사활성화를 위하여 S-9 분획을 다음과 같이 조제하여 사용하였다. 국립안전연구원에서 생산 및 사육한 SPF SD계 rat(male, 8주령, 약 200 g)에, corn oil에 희석시킨 Aroclor 1254 (200 mg/ml)를 1회 복강내 투여(500 mg/kg)하여 4일째 경추 탈골에 의하여 도살하였다. 간을 적출하고 간 중량의 3 배량의 냉각한 0.15 M KCl용액에 넣어 균질화하고, 9,000 g에서 10분간 원심분리 후 그 상등액을 S-9분획으로 하였다. 이상의 모든 과정은 고압 증기 멸균한 용액과 초차료를 사용하여 무균적으로 행하였고, 조제한 S-9분획 0.1 ml를 Top agar와 함께 유전독성 검색용 배지에 plating하여 무균성을 확인하였다. S-9 mix의 조성은 다음과 같다.

S-9 mix

보조인자의 조성은 다음과 같다.

8 mM HgCl₂·6H₂O

2.33 mM KCl

5 mM glucose-6-phosphate-di-Na salt

4 mM NADP-di-Na Salt

각각의 보조인자들을 0.05M phosphate buffer(pH 7.4) 1 ml에 녹이고 한곳에 모아 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 1 ml를 가하여 5 ml로 만든 후 S-9 분획 0.5 ml를 가하여 전체를 5.5 ml로 만들어 사용했다. 보조인자는 0.05 M phosphate buffer(in ice, pH 7.4)에 0.45 μm filter로 filtration(멸균)하여 4시간 이내에 사용했다.

예비독성시험

TA100을 사용하여 DMSO를 용매로 S-9 mix를 넣을 때와 안 넣었을 때로 구분하여 최고용해 농도로부터 공비

2의 7단계로 세포독성시험을 실시하여 최적농도를 정했다.

복귀돌연변이 시험

예비독성 시험에서 결정된 최적 농도로 TA98과 TA 100에서 실험하였다. 분주용 한천을 고압증기멸균하고 약 50°C로 냉각시킨 후, 100 ml 한천에 대하여 5 ml의 1.0 mM L-histidine/biotin을 가하여 항온수조내에서 45°C으로 유지했다. S-9mix를 제조하여 고정용량분주기(예 BCL Cat.No 1053~0.5 ml)에 넣어 빙냉 보존했다. 시험물질을 칭량하여 독성시험에 의해 결정된 용량으로 희석했다. 모든 시험조작은 갈색광원이 설치된 클린벤치 내에서 수행했다. 멸균시험관에 균배양액 0.1 ml 및 시험물질(최대 0.1 ml)을 넣었다. 이상의 내용물을 진탕기로 혼합하여 고형배지에 부었다. 사알레 표면에 한천이 고부 전개되도록 평판을 회전시켰다. 연한천이 굳은 후 평판을 뒤집어 37°C에서 48시간 배양했다. 모든 시험은 2매의 평판을 사용했다. 수작업으로 평판상의 집락을 계수 했다. 복귀변이집락의 수는 2매의 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 benzo(α)pyrene, sodium azide(SAZ) 등을 사용하였다.

마우스 소핵시험(Mouse micronucleus test)

시험동물

시험동물은 6~8 주령의 20~25 g의 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, 48시간 후에 마우스 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취하고 표본을 제작하였다. 양성대조물질로서는 mitomycin C을 증류수에 녹여 사용하였다. 시험동물의 수는 1군당 5마리를 원칙으로 하였다.

혈액채취 및 도말 표본 제작법

Acridine orange 용액(1 mg/ml) 10 μl을 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 μl를 slide glass에 떨어뜨리고 cover glass 로 덮었다. Cell이 고정될 때까지 약

1시간 정도 방치한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 마우스 1 개체당 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(Hayashi 등, 1983, 1991; Lorke, 1983).

통계학적 평가

Hyashi 등의 방법 (Hayashi 등, 1983, 1991)에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1,2 단계의 비교자료활용에 의한 검정을 거쳐 3단계에는 음성대조군과 시험물질 투여군과의 소핵적혈구의 생성빈도에 관한 유의차를 Cochran Armitage 경향검정을 행하였다.(유의수준 $p < 0.05$)

Table II. Reversion assay of RCKs using *Salmonella typhimurium*.

Sample	Dose	His ⁺ Pevrants/plate			
		TA98		TA100	
		S-9(-)	S-9(+)	S-9(-)	S-9(+)
RCK3	DMSO	39± 2	42± 3	110± 5	131± 6
	31.25	62± 6	68± 5	100± 8	120± 5
	62.5	73± 3	74± 2	140± 7	220± 10
	125	72± 4	76± 4	185± 9	150± 8
	250	71± 5	75± 3	113± 8	180± 11
RCK7	31.25	50± 5	53± 5	100± 4	120± 8
	62.5	52± 4	61± 4	179± 8	240± 5
	125	51± 3	55± 5	159± 3	163± 7
	250	49± 5	52± 5	100± 3	160± 8
	RCK13	31.25	48± 5	46± 4	140± 12
62.5		65± 10	55± 2	160± 3	135± 3
125		54± 4	48± 4	125± 10	128± 10
250		25± 5	32± 8	17± 4	25± 3
RCK14		31.25	82± 7	83± 5	320± 20
	62.5	84± 6	89± 6	350± 34	290± 5
	125	95± 10	97± 4	450± 35	310± 10
	250	123± 11	132± 9	525± 30	324± 12
	RCK15	31.25	53± 4	55± 4	105± 5
62.5		67± 5	67± 2	156± 2	212± 4
125		55± 6	56± 6	135± 3	154± 9
250		41± 5	43± 5	99± 5	104± 7
SA		0.5	430± 30		1300± 120
B(a)p	2.0	145± 10		380± 15	

SA: Sodium azide, B(a)p: Benzo(a)pyrene, S-9(-): without S-9 mix, S-9(+): with S-9 mix

실험결과

새로운 항진균제를 개발하기 위해, 항진균작용이 우수한 6-[(N-halophenyl)-amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (Table I, RCKs)에 대한 안전성평가의 일환으로 유전독성을 검색하기 위해 현이원성 시험과 소핵시험을 행했다.

유전자 복귀돌연변이 시험 (Ames test)

RCKs에 대해 *Salmonella*를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험 (Ames test)을 행했다. 예비독성시험에서 결정된 용매 DMSO에 대한 최고 용해농도 20 mg/plate를 공비 2로 7단계로 설정하여 평판법으로 시험하여 Table II의 결과를 얻었다. 시험결과 RCK14는 대사활성계 존재유무와 관계없이 돌연변이 유발성을 나타내었다. 그러나 RCK3, RCK7, RCK13, RCK15 등은 음성으로 나타났다.

Mitomycin C 투여에 따른 MNRETs 생성빈도의 경시 변화

Table III. The clastogenic effects of mitomycin C-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Treatment time (hrs)	MNRETs/1000 RETs ^a	
	individual value	mean± S.E.
24	9, 7, 10, 8, 8	8.4± 0.51
48	20, 22, 21, 19, 14	19.2± 1.39
72	9, 10, 8, 4, 7	7.6± 1.03

^aMNRET: micronucleated reticulocytes, RET: reticulocytes Mitomycin c(1 mg/kg) was administered to mice intraperitoneally.

Table IV. The lethal and clastogenic effects of RCK 3-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Treatment	MNRETs/1000 RETs					
	24 h		48 h		72 h	
	ind.val.	mean± S.E.	ind.val.	mean± S.E.	ind.val.	mean± S.E.
Dose (mg/kg, i.p.)						
125.0 mg/kg	1,0,0,1,0	0.4± 0.24	0,1,0,0,d ^a	0.3± 0.25	2,1,1,0,d	1.0± 0.41
250.0 mg/kg	1,2,2,1,1	1.4± 0.24	1,0,d,d,d	0.5± 0.50	2,d,d,d,d	2.0± 0.00
500.0 mg/kg	5,d,1,0,2	2.0± 1.08	1,d,1,d,3	1.7± 1.00	d,d,0,d,1	0.5± 0.50

^ad: Mouse was dead, MNRETs/1000 RETs of negative control mice treated with olive oil (1.0 ml/25 g, i.p. once) only was 0.8 0.24 after 48 hrs treatment.

Table V. The lethal and clastogenic effects of RCK3-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Dose (mg/kg, i.p.)	MNRETs/1000 RETs	
	individual value	mean± S.E.
31.25 mg/kg	0,0,0,1,0	0.2± 0.20
62.25 mg/kg	0,0,0,0,1	0.2± 0.20
125.0 mg/kg	0,1,0,0,d ^a	0.3± 0.25
250.0 mg/kg	1,0,d,d,d	0.5± 0.50
500.0 mg/kg	1,d, ^b - ,d,3	2.0± 1.00

^ad: Mouse was dead ^b-: not tested ^cMice were sacrificed after 48hrs of RCKs treatment

Table VI. The lethal and clastogenic effects of RCK7-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Dose (mg/kg, i.p.)	MNRETs/1000 RETs	
	individual value	mean± S.E.
31.25 mg/kg	0,1,0,0,1	0.4± 0.24
62.25 mg/kg	0,2,0,0,0	0.4± 0.40
125.0 mg/kg	0,0,1,0,d ^a	0.3± 0.25
250.0 mg/kg	2,2,0,1,d	1.3± 0.48
500.0 mg/kg	0,0,d,d,d	0.0± 0.00

^ad: Mouse was dead. Mice were sacrificed after 48hrs of RCKs treatment

Table VII. The lethal and clastogenic effects of RCK13-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Dose (mg/kg, i.p.)	MNRETs/1000 RETs	
	individual value	mean± S.E.
31.25 mg/kg	0,0,1,0,0	0.2± 0.20
62.25 mg/kg	0,1,0,0,1	0.4± 0.24
125.0 mg/kg	0,1,0,d,d ^a	0.3± 0.33
250.0 mg/kg	0,1,0,d,d	0.3± 0.33
500.0 mg/kg	0,d,d,d,d	0.0± 0.00

^ad: Mouse was dead. Mice were sacrificed after 48hrs of RCKs treatment

양성대조물질로 사용한 mitomycin C의 1 mg/kg(i.p.)에서의 MNRETs생성빈도는 각각의 혈액채취시간에 따라 Table III과 같았다. Mitomycin C 투여 후 48시간에서 가장 높은 소핵생성빈도를 나타내었으며 1,000 RET당 19.2개 MNRET의 빈도를 나타내었다.

RCK3 투여에 따른 MNRETs 생성빈도의 경시변화

RCK3을 3단계의 용량별로 투여하고 24, 48, 72 시간에 혈액을 채취하여 MNRET생성빈도를 관찰한 결과 용량 증가에도 유의성있는 생성빈도의 증가가 없었으며, 혈액채취시간에 따라서는 음성대조군에 비하여 유의성이 있는 차이가 나타나지 않았다. 따라서 mitomycin C 투여에서와 같이 일반적으로 최대생성빈도를 나타내는 48 시간에 혈액을 채취하여 MNRETs를 관찰하였다.

Table VIII. The lethal and clastogenic effects of RCK14-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Dose (mg/kg, i.p.)	MNRETs/1000 RETs	
	individual value	mean± S.E.
31.25 mg/kg	2,2,0,1,0	1.0± 0.44
62.25 mg/kg	0,0,1,1,d ^a	0.5± 0.29
125.0 mg/kg	1,0,d,d,d	0.5± 0.50
250.0 mg/kg	0,d,d,d,d	0.0± 0.00
500.0 mg/kg	d,d,d,d,d	-

^ad: Mouse was dead. Mice were sacrificed after 48hrs of RCKs treatment

Table IX. The lethal and clastogenic effects of RCK15-induced MNRETs in mouse peripheral blood

Dose (mg/kg, i.p.)	MNRETs/1000 RETs	
	individual value	mean± S.E.
31.25 mg/kg	0,1,1,0,0	0.4± 0.24
62.25 mg/kg	1,1,0,2,0	0.8± 0.37
125.0 mg/kg	0,0,0,d,d ^a	0.0± 0.00
250.0 mg/kg	2,1,1,d,d	1.3± 0.33
500.0 mg/kg	d,d,d,d,d	-

^ad: Mouse was dead. Mice were sacrificed after 48hrs of RCKs treatment

RCK시험물질들의 소핵생성효과

신합성 RCKs화합물들의 소핵생성효과를 Table III~Table IX에 나타내었다. 5단계의 용량에 걸쳐 시험한 결과, 일부용량에서 사망한 동물이 나타났으나 대부분의 용량에서 음성대조군에 비해 유의성 있는 증가가 나타나지 않았다. 그러나 RCK3 및 RCK7은 독성이 비교적 약했으며 RCK13, RCK14, RCK15 등은 비교적 독성이 강했다.

고 찰

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

Ames test결과 RCK14는 대사활성계 존재유무와 관계없이 돌연변이 유발성을 나타내었고 RCK 3, RCK7, RCK13, RCK15 등은 음성으로 나타났다.

한편, RCKs의 소핵시험결과 대부분의 용량에서 음성대조군에 비해 유의성 있는 증가가 나타나지 않았다. 본 시험에서 RCKs의 투여농도는 치사효과와 같은 급성독

성도 함께 판단하기 위해 최고 투여량을 500 mg/kg으로 결정하였고, 공비 2로서 5단계에 걸친 용량을 투여하여 치사효과와 함께 최대내량이하의 용량에서의 소핵생성 효과를 관찰하였다. 혈액채취시간은 48시간에 마우스 꼬리정맥으로부터 말초혈액을 채취하여 관찰하였다. 소핵을 가진 망상적혈구의 출현빈도에 있어서 양성대조군으로 사용한 mitomycin C는 Hayashi등(1983)의 데이터와 유사하였으며 용매대조군(olive oil)에서는 일반적인 음성대조군의 소핵생성빈도를 나타내었다. 이상의 결과로서 RCK화합물들 중 RCK13, RCK14 및 RCK15 등의 높은 투여용량에서 시험동물이 사망하는 예에서 알 수 있듯이 독성이 나타났으나, 마우스 말초혈액에서의 소핵생성빈도가 증가하지 않는 것으로 보아 골수세포의 분화과정에서 염색체손상은 일으키지 않는 것으로 판단된다.

이상과 같이 RCKs에 대하여 Ames test 와 소핵시험을 실시하여 유전독성을 검색한 결과 Ames test에서 RCK14가 양성으로 나타났으나 소핵시험에서는 모두 음성으로 나타났다.

결론적으로 항진균성 RCK3, 7, 13, 15의 안전성을 유전독성시험 중 Ames test와 *in vivo* 수준에서 마우스 소핵시험을 실시하여 평가했다. RCKs대해 *Salmonella typhimurium*(TA98, TA100)를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험 (Ames test)을 한 결과 RCK3, RCK7, RCK13, RCK15 등은 음성으로 나타났다. RCKs는 생쥐 말초혈액에서의 소핵생성이 나타나지 않는 것으로 보아 골수세포의 분화과정에서 염색체손상을 일으키지 않는 것으로 판단된다. 본 시험대상 RCKs 중 RCK3, RCK7, RCK13, RCK15 등은 Ames test와 생쥐소핵생성시험 등의 유전독성시험의해 안전성이 높은 것으로 평가됐다.

따라서 추후 일반 및 특수독성시험, 대사 및 pharmacokinetics을 연구하여 항진균성 신약 후보물질을 창출하는 것이 앞으로의 과제로 사료된다.

감사의 말씀

이 연구는 94년도 보건복지부 신약개발 지원연구사업

의 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Hayashi, M. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.* **120**, 241-247.
- Hayashi, M. (1991). The micronucleus test, pp63-79, *Scientist*, Tokyo.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**, 275-287.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* **113**, 173-215.
- Mcginnis, M.R. and Rindali, M.G. (1991). Antifungal drug. *Antibiotics in laboratory medicine*, (Lorian, V. Eds., 3rd ed.), pp. 198-256. Williams and Wilkins, Baltimore.
- OECD, (1984). Data interpretation guides (DIGs) (Provisional), DIG18, *Mutagenicity* pp58-60.
- Ryu, C.K. and Kim, H.J. (1994). The synthesis of 6-(N-arylamino)-7-chloro-5,8-quinolinedione derivatives for evaluation of antifungal activities. *Arch. Pharm. Res.* **17**(3), 139-144.
- Ryu, C.K. and Kim, D.Y. (1994). The antifungal susceptibility tests of 5,8-quinolinediones against *Candida* sp., *Arch. Pharm. Res.* **17**(6), 483.
- Sheehan, D.J., Espinel-Ingroff, A., Moor, D.J. and Webb, C.D. (1993). Antifungal susceptibility tests of yeasts: A brief overview. *Clin. Infec. Diseases* **17**(Suppl. 2), 494-500.
- WHO/IPCS, (1985). Summary report on the evaluation of short-term tests for carcinogens(Collaborative study on *in vitro* tests), Environmental Health Criteria.
- Yamaguchi, H. (1991). Antifungal agents-Recent trends in development and progress in research of action mechanism. *日本臨牀*. **49**(9) 220-229.
- KGLP; 보건사회부고시 의약품 안전성 시험관리기준 해설서 (1988); 보건사회부고시 제92-96호(1992. 12. 31) 의약품 등의 안전성, 유효성 심사에 관한 규정 「별표 5」; 국립보건안전연구원 (1994), 예규 제 94-4호; 의약품 등의 독성시험 기준.