

비 마약성 진통제 DA-5018의 변이원성 연구

강경구*, 백남기, 김원배, 양중익
동아제약(주) 연구소

Mutagenicity of DA-5018, a Non-narcotic Analgesic Agent

Kyung Koo KANG*, Nam Gi BAIK, Won Bae KIM and Junnick YANG

Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd.

(Received May 29, 1996; accepted June 23, 1996)

Abstract – DA-5018, a non-narcotic analgesic agent, was examined for mutagenicity in the reverse mutation test on bacteria, chromosomal aberration test on cultured mammalian cells and micronucleus test on mice. The reverse mutation test was performed by a plate incorporation method with or without a metabolic activation system(S9 mix) using *Salmonella typhimurium* strain TA100, TA1535, TA98 and TA1537. DA-5018 did not significantly increase revertant colonies in any of the test strains under any conditions at concentrations ranging from 0.0049 to 1.25 mg/plate, compared with the vehicle control. In the chromosomal aberration test using cultured Chinese Hamster Lung(CHL) cells, DA-5018 did not increase the number of aberrant cells in the presence or absence of S9 mix at concentrations of 0.016 mM/plate to 0.25 mM/plate, compared with the vehicle control. In the micronucleus test, male ICR mice were given DA-5018 intraperitoneally at a dose level of 0.55, 1.10 and 2.20 mg/kg. The incidence of bone marrow micronucleated polychromatic erythrocytes in the DA-5018 treated mice was not significantly different from that of the vehicle control. These results indicate that DA-5018 does not have mutagenic potential under the present test conditions.

Key words □ DA-5018, analgesic, mutagenicity

DA-5018(N-{3-(3,4-Dimethylphenyl)propyl}-4-(2-aminoethoxy)-3-methoxy phenyl acetamide, Fig. 1)은 동아제약(주) 연구소에서 연구중인 capsaicin 유도체로서 postherpetic neuralgia, diabetic neuropathy, arthritis 등을 적응증으로 하여 개발예정인 진통제이다. DA-5018은 현재까지 여러가지 동물실험모델에서 기존의 진통제 보다 우수한 진통효력을 가지며, 의존성이 형성되지 않는 비 마약성일 뿐 아니라 독성에 있어서도 모핵인 capsaicin에 비하여 약한 것으로 평가되고 있다. 한편, DA-5018의 모핵인 capsaicin은 국소도포용 제제로 postherpetic neuralgia, diabetic neuropathy, arthritis, psoriasis 등의 치료제로 사용되고 있으나 투여초기의 강한 자극성 때문에 사용이 제한되고 있는 실정이며(Watson 등, 1993; Tandan 등, 1992; Donofrio, 1991; Deal 등, 1991), 변이원성에 관해서도 서로 상반되는 결과가 알려져 있다. 즉, 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험에서는 대사활성계를 적용한 경우에 일부 세균주에서 변이원성이 있으며(Nagabhusan와 Bhide, 1985; 1986; Toth 등,

1984), 포유류배양세포를 이용한 유전자 돌연변이 시험에서는 변이원성이 있다는 결과(Lawson과 Gannett, 1989)와 오히려 변이원성이 없다는 결과(Nagabhusan과 Bhide, 1985)가 보고되어있다. 또한, 소핵시험의 경우에도 용량에 따라서는 소핵유발능이 있다는 결과가 발표되어 capsaicin의 변이원성은 아직까지 확실하지 않은 것으로 판단된다(Nagabhusan와 Bhide, 1985). 한편, DA-5018은 *Sal. typhimurium* TA98 및 TA100을 이용한 복귀돌연변이시험에서 10 mg/plate 이하 모든 용량군에서 변이원성이 없는 것으로 알려져 있으나(한국화학연구소, 1991), DA-5018도

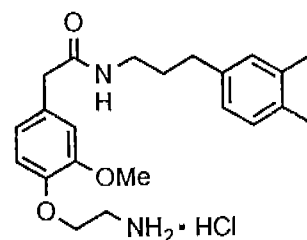


Fig. 1. Chemical structure of DA-5018.

* To whom correspondence should be addressed.

capsaicin 유도체인 점을 고려하면 변이원성에 대한 종합적인 평가가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 시험에서는 DA-5018의 안전성 연구의 일환으로 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류의 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 설치류를 이용한 소핵시험을 실시하여 변이원성을 알아보고자 하였다.

실험방법

시험물질

시험물질인 DA-5018은 본 연구소에서 연구중인 capsaicin 유도체로서, 분자량 407인 백색의 분말로 냉장보관하며 시험에 사용하였다(Lot No. DA-5018-KR002). 시험물질의 용매로는 전용매체인 주사용증류수를 이용하였으며 필요시 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)를 사용하였다. 즉, 복귀돌연변이시험 및 염색체이상시험에서 시험물질의 규정농도는 5-10 mg/plate 및 10 mM/plate로 권장되고 있는데(의약품등의 독성시험기준, 1994), 이와같은 고농도는 DA-5018의 전용매체인 주사용증류수에서는 용해되지 않는 농도이다. 따라서 이 경우에는 DMSO 등의 유기용매를 사용할 수 있다는 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업지침서(1993)에 기준하여 위 2가지 시험에서는 시험물질을 DMSO에 최고농도로 용해한 다음 희석하여 제조하였으며, 소핵시험에서는 주사용증류수에 최고농도로 용해하여 희석한 다음 시험에 사용하였다.

대조물질

양성대조물질로는 복귀돌연변이시험에서는 sodium azide(Sigma), 2-aminofluorene(Sigma), 9-aminoacridine(Sigma), 2-aminoanthracene(Sigma), 2-nitrofluorene(Sigma) 등을, 염색체이상시험에서는 mitomycin C(Sigma), benzo[a]pyrene(Sigma)를 각각 증류수나 DMSO에 용해하여 사용하였으며, 소핵시험에서는 mitomycin C(Sigma)를 증류수에 용해하여 사용하였다. 음성대조물질로는 증류수나 DMSO를 사용하였다.

세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험균주

시험에는 histidine 영양 요구성의 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 4균주를 이용하였다. 각 시험균주는 한국화학연구소에서 분양받아 -70℃에 동결보존한 것으로 histidine 영양 요구성, 자외선감수성, 막변화 rfa 특성, 약제내성인자(R plasmid)의 유무 및 자연복귀변이의 정도 등의 형질을 확인한 다음 시험에 사용하였다.

배지

시험균주의 전배양은 2.5% nutrient broth No.2(Oxoid)를 이용하였다. 최소 glucose 한천평판배지(minimal glucose agar plate)는 bacto-agar(Difco) 1.5%에 Vogel-Bonner medi-

um E(50X)와 glucose(40%)를 각각 2% 및 5%되게 첨가한 것으로 plate당 20ml씩 분주하여 사용하였다. Top agar는 bacto-agar 0.6%, NaCl 0.5% 용액에 0.5 mM L-histidine · HCl/0.5 mM D-biotin 수용액을 10:1의 비율(V/V)로 첨가하여 사용하였다. 그외 본 시험에서 필요한 배지는 Maron과 Ames(1983)의 방법에 준하여 제조하여 사용하였다.

S9 mix

S9 분획은 8-10주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드에서 Aroclor 1254를 효소 유도제로 사용하여 Ames 등(1975)의 방법에 따라 조제하여 시판하는 rat liver S-9 products (Organon Teknika corporation)를 구입하여 사용하였으며, S9 mix용 cofactor는 시판 cofactor(Oriental 酵母工業株式會社)를 구입하여 사용하였다. S9 mix는 cofactor를 9ml의 증류수에 용해한 후 S9 분획 1 ml을 사용직전에 혼합하여 조제하였다.

시험균액

시험균액은 해동한 동결보존균액 0.1 ml을 취해 25 ml의 nutrient broth 배지에 접종하여 차광된 배양기 내에서 37℃, 120 rpm의 조건으로 약 16시간 진탕배양한 후 시험에 사용하였다.

초기독성시험(용량설정시험)

본시험의 용량설정을 위하여 예비 용량설정시험을 *Sal. typhimurium* TA 100을 이용하여 실시하였다. DA-5018 5.0 mg/plate를 최고용량으로 하고 이하 공비 2로 0.0012 mg/plate까지 13개 용량으로 시험한 결과, 5 mg/plate 이하 모든 용량군에서 대조군과 비교하여 복귀변이 colony수의 증가는 관찰되지 않았다. 그러나, DA-5018 2.5 mg/plate까지는 세균의 완전한 생육저해가 관찰되었으며, 1.25 mg/plate에서도 부분적인 생육저해(대조군의 약 1/2정도)가 관찰되었다. 따라서, 본시험에서는 부분적인 생육저해가 나타나는 1.25 mg/plate 부터 공비 2로 0.625, 0.3125, 0.1563, 0.0781, 0.0391, 0.0195, 0.0098 및 0.0049 mg/plate 까지 9개 용량으로 설정하였다.

시험방법

시험은 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업지침서(1993)에 준하여 대사활성계를 적용한 경우와 대사활성계를 적용하지 않은 2가지 경우에 대하여 평판법(direct incorporation method)으로 실시하였다. 즉, 시험물질용액 0.1 ml, S9 mix(비대사활성계의 경우 D.W.) 0.5 ml, 균 배양액 0.1 ml 및 top agar 2 ml을 45℃로 예열한 멸균 tube에 혼합하고 즉시 vortex mix로 2-3초간 진탕한 후 minimal glucose agar plate에 증충하였다. 음성대조군은 DMSO 혹은 증류수(무처리대조군) 0.1 ml을, 양성대조군은 각각의 양성대조물질 용액 0.1 ml을 시험물질 대신 가하여 동일한 방법으로 실시하였다. 증충한 top agar가 굳은 후 37℃에서 48시간 배양한 다음 출현한 복귀변이 colony수를 계측하여

평균과 표준편차를 산출하였으며, 생육저해나 시험물질의 침전여부 등도 관찰하였다. 시험물질 각 용량군당 3개의 plate를 이용하였다. 시험결과와 판정은 관찰된 복귀면이 colony 수의 평균치가 음성대조군에 비하여 2배 이상이거나 용량의존적으로 증가하는 경우에 복귀면이원성이 있는 것으로 판정하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

세포 및 배지

시험에는 chinese hamster lung 유래의 CHL cell(JCRB 0030)을 이용하였다. 세포의 배양은 Eagle's MEM (Gibco) 배지에 FCS(Fetal calf serum, Gibco)를 10%(V/V)되게 첨가한 배지를 사용하여, 37°C, 5% CO₂, 포화수증기 상태의 항온배양기에서 배양하였다.

S9 mix

S9 분획은 8-10주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드에서 Aroclor 1254를 효소 유도제로 사용하여 Ames 등(1975)의 방법에 따라 조제하여 시판하는 rat liver S-9 products (Organon Teknika corporation)를 구입하여 사용하였으며, S9 mix용 cofactor는 시판 cofactor(Oriental 酵母工業株式会社)를 구입하여 사용하였다. S9 mix는 cofactor를 7 ml의 증류수에 용해한 후 S9 분획 3 ml를 사용직전에 혼합하여 조제하였다.

세포독성시험(용량설정시험)

본시험의 용량설정을 위한 예비시험으로 세포독성시험을 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업지침서(1993)에 따라 DA-5018 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625 mM/plate의 8개 용량으로 실시하였다. 즉, 직경 35 mm petri-dish에 1.2×10^4 cell/ml(배양액 2 ml)의 세포를 파종하여 3일간 배양한 후 각 용량군의 시험물질로 처리하여 1일간 배양하였다. 배양 종료후, 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 분산 수거한 다음 trypan blue로 염색하고 hemocytometer를 이용하여 생세포수를 계수하여 시험물질의 세포에 대한 독성발현여부를 관찰하였다. 시험결과, DA-5018 2 및 1 mM/plate에서는 세포가 완전히 치사되었으며, 0.5-0.015625 mM/plate에서는 세포생존율이 각각 1.9%, 49.3%, 58.2%, 67.2%, 78.4% 및 87.2%로 관찰되었다. 따라서 본시험에서는 약 50% 세포증식억제를 보이는 0.25 mM/plate를 최고용량으로 하고 이하 공비 2로 0.125, 0.0625, 0.03125 및 0.015625 mM/plate까지 5개 용량군으로 설정하였다.

시험방법

시험은 국립보건안전연구원의 독성시험 표준작업지침서(1993)에 준하여 대사활성계를 적용하지 않은 직접법과 대사활성계를 적용한 대사활성화법 2가지로 실시하였다.

(1) 직접법

직경 60 mm의 petri-dish에 1.0×10^5 cell/ml(배양액 5 ml)

의 세포를 파종하여 3일간 배양하여 단층세포(monolayer cell)를 만든 후, 각 용량군의 시험물질로 처리하여 24시간 또는 48시간 배양한 다음 세포를 수거하여 염색체 표본을 제작하였다. 이때 세포 수거 2시간전에 colcemid를 최종농도 0.2 µg/ml이 되게 첨가하여 세포분열을 정지시켰다.

(2) 대사활성화법

직접법과 동일하게 배양한 단층세포에 S9 mix 1 ml과 각 용량군의 시험물질이 혼합된 배양액 4 ml로 처리하여 6시간 배양한 다음, 정상 배지로 교환하여 18시간 배양한 후 24시간에 세포를 수거, 염색체 표본을 제작하였다. 이때, 세포수거 2시간전에 직접법에서의 동일하게 colcemid를 처리하였다.

(3) 염색체표본의 제작 및 표본의 관찰

시험물질 처리가 종료된 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 분산 수거한 다음 원심분리(1000 rpm, 5min.)하여 세포를 모았다. 이 세포에 저장액인 0.075 M KCl을 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 methanol:acetic acid(3:1, V/V) 용액으로 고정시켜 원심분리 하였다. 수거된 세포에 다시 냉각 고정액을 가하여 원심분리하는 동일한 조작을 3회 반복하여 세포를 완전히 고정시키고 최종적으로 적당한 밀도의 세포부유액을 만든 다음, 고정된 세포부유액을 slide glass위에 1방울씩 떨어뜨려 상온에서 완전히 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 5% Giemsa액에서 20분간 염색하여 수세 후 광학현미경($\times 1000$)으로 관찰하였다. 표본의 관찰은 슬라이드당 100개의 분열중기상 염색체에 대하여 염색분체 및 염색체의 구조이상(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 양성세포 1개로 계수하여 그 종류와 비율을 구하였다.

(4) 결과판정

이상세포의 출현빈도는 5% 미만일 경우는 음성, 5-10%일 경우는 의양성, 10% 이상일 경우는 양성으로 판정하였으며, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타내는 경우 혹은 음성대조군과 비교하여 이상세포의 출현빈도가 용량의존적으로 증가하는 경우를 변이원성이 있는 것으로 판정하였다.

설치류를 이용한 소핵시험

시험동물

시험에 사용된 동물은 6주령의 음성 ICR계 특정병원체 부재(SPF) 마우스로 70마리를 Charles River Japan사로 부터 공급받아 1주일간의 순화사육을 거친 뒤 7주령의 동물을 사용하였다. 시험에 사용시 동물의 체중범위는 29.2-32.0 g 이었다. 동물의 사육환경은 온도 23±2°C, 습도 55±15%,

조도 150-300Lux, 조명시간 12시간(07:00-19:00)의 통상조건을 유지하였으며, 마우스용 PC 케이지에 6마리씩 수용하였고 사료(마우스용 방사선멸균 고형사료, 제일사료)와 물(자외선 멸균 상수도수)은 자유섭취시켰다.

투여량설정 및 표본채취시간 결정

“의약품 등의 독성시험 기준”(1994)에 따르면 소핵시험에서 시험물질의 투여용량은 LD₅₀의 1/2양을 최고용량으로 하는 것이 권장되고 있으므로 본 시험에서도 DA-5018 투여량 설정을 위한 복강내 단회 투여 예비시험을 군당 5마리의 마우스에 DA-5018 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg/kg의 6개 용량으로 실시하였다. 시험결과, 2 mg/kg 용량군에서부터 특징적인 임상증상(투여직후 운동성증가, 호흡기계 관련증상, 경련 등)이 관찰되었으며, 4 mg/kg 용량군에서부터 폐사가 관찰되었다. 이상의 시험결과로부터 산출한 LD₅₀값은 4.38 mg/kg로 나타나 DA-5018의 투여량은 LD₅₀값의 1/2인 2.2 mg/kg을 고용량군으로 하고 이하 공비 2로 중용량군은 1.1 mg/kg, 저용량군은 0.55 mg/kg으로 설정하였다. 한편, 소핵다염성적혈구 출현의 적합한 시간대를 결정하기 위한 예비시험을 10마리의 마우스에 DA-5018 2.2 mg/kg을 복강으로 단회 투여한 다음 6, 18, 24, 48, 72시간째에 각각 2마리씩을 도살하여 골수를 채취하고 소핵다염성적혈구수를 조사하였다. 시험결과, 소핵다염성적혈구수의 유의한 증가가 관찰되는 시간대는 발견되지 않았다. 이와같은 예비시험의 결과를 토대로 하여 표본의 채취시간은 일반적으로 많이 이용되는 시간대인 시험물질 투여 후 24시간 및 48시간(Salmone 등, 1980)으로 결정하였다.

시험방법

본 시험은 국립보건안전연구원의 “의약품 등의 독성시험 기준”(1994)에 준하여 실시하였다. 시험군의 구성은 Table I과 같다. DA-5018은 2.2 mg/kg을 최고용량군으로 하고 이하 공비 2로 1.1 및 0.55 mg/kg 3개 용량군으로 하였으며, 음성대조군은 주사용증류수 투여군으로, 양성대조군은

Table I. Experimental design for micronucleus test with DA-5018 in mice.

Group	Compound	Dose (mg/kg)	Adm. volume	Route	Sampling time (hr)	No. of animals
1	Vehicle ^a	-	10	i.p.	24	6
					48	6
2		0.55	10	i.p.	24	6
					48	6
3	DA-5018	1.1	10	i.p.	24	6
					48	6
4		2.2	10	i.p.	24	6
					48	6
5	MMC ^b	2.0	10	i.p.	24	6
					48	6

^aDistilled water ^bMitomycin C

MMC 2 mg/kg 투여군으로 설정하였다. 군당 12마리의 동물을 사용하였으며 10 ml/kg의 액량으로 복강내 단회 투여하였다. 표본의 제작은 약물투여 24 및 48시간 후 각군의 반수의 동물을 경추 탈구로 도살한 다음 대퇴골을 분리하여 양골단을 절단하고 약 1 ml의 FBS(fetal bovine serum)로 골수를 분리하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 상층액을 버린 후 침전물은 고르게 현탁하여 슬라이드에 도말하였다. 건조된 도말표본은 methanol로 5분간 고정된 후 2.5% modified Giemsa 염색액(Sigma)으로 50분간 염색하여 광학현미경으로 1000배 배율에서 관찰하였다. 슬라이드당 1000개의 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)를 관찰할때 출현하는 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleous polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 수를 세고 동시에 동일 시야에 존재하는 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 수를 세어 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율을 구하였다.

통계처리

DA-5018 및 MMC 투여군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도에 대해서는 Kastenbaum과 Bowman의 방법(1970)을 이용하여 음성대조군과의 유의성을 검정하였으며, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율은 ANOVA를 실시한 다음 Duncan's multiple range test를 이용하여 음성대조군과의 통계학적 유의성을 검정하였다.

실험결과

세균을 이용하는 복귀돌연변이시험

시험결과는 Table II와 같다. 시험에 사용한 4군주 모두 대사활성계의 유무에 관계없이 복귀변이 colony수는 음성대조군의 colony수와 비슷한 범위를 나타냈으며, 용량의존적으로 증가하거나 음성대조군의 2배 이상의 복귀변이 colony수의 증가를 나타내지 않았다. 그러나, DA-5018 1.25 mg/plate 용량군에서는 군주에 따라 약간의 차이는 있었으나 복귀변이 colony수가 대조군의 약 절반정도로 관찰되어 시험물질에 의한 독성이 있는것으로 관찰되었다. 한편, 양성대조물질은 각 군주에 대하여 2배 이상의 현저한 복귀변이 colony수의 증가를 나타내었다.

포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험

염색체이상시험 결과, DA-5018을 처리한 모든 농도군에서 대사활성계의 유무에 관계없이 염색체의 구조적 이상세포나 배수성 이상세포의 출현율은 5% 미만으로 음성대조군과 비교하여 증가하지 않았다. 그러나 DA-5018 0.25 mM/plate 용량군에서 직접법의 경우에 24 및 48시간 처리 모두에서 염색체표본을 제작할 수 없을 정도로 세포 밀도가 부족하여, DA-5018에 의한 세포독성이 있는 것으로 추정되었다. 한편, 양성대조물질인 MMC(비대사활성화법)의

경우에는 24시간 또는 48시간 처리시 각각 31% 및 71%의 이상세포 출현율을 보여 음성대조군과 비교하여 유의성있는 증가를 나타내었으며(Table III), benzo[a]pyrene(대사활성화법)의 경우에도 32%의 현저한 이상세포의 증가를 나타내었다(Table IV).

설치류를 이용하는 소핵시험

DA-5018의 소핵시험 결과는 Table V에 나타내었다. 약물투여 24시간 후에 관찰한 결과에서, 소핵을 가진 다염성

적혈구의 출현빈도는 DA-5018 투여군에서 0-3개, 음성대조군에서 0-2개로 대조군과 비교하여 통계학적 유의성이 인정되지 않았다. 그러나 양성대조군인 MMC 투여군에서는 14-33개로 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 또한, 약물투여 48시간 후에 관찰한 결과에서도 DA-5018을 투여한 모든 용량군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적 차이가 없었으나, 양성대조군

Table II. Number of colonies per plate in the reverse mutation test of DA-5018 using bacteria.

Test compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants/plate ^a							
		TA 100		TA 1535		TA 98		TA 1537	
		-S9 ^b	+S9 ^c	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Untreated	-	88±6	83±8	22±2	24±4	26±3	32±4	18±5	14±0
DMSO ^d	-	78±5	75±3	20±4	31±3	21±1	29±4	15±2	13±4
	4.88	80±5	80±2	25±2	19±5	22±8	32±3	17±2	15±4
	9.77	74±9	78±8	22±5	22±8	19±3	29±3	15±2	13±1
	19.53	78±8	83±1	27±4	12±4	21±3	36±10	15±4	16±3
DA-5018	39.06	88±6	84±7	21±4	21±4	20±2	33±2	17±3	16±2
	78.13	77±6	82±4	22±4	22±5	20±4	30±3	18±3	14±6
	156.25	74±6	74±15	23±5	22±3	21±2	29±4	14±2	14±2
	312.50	76±6	83±9	23±2	23±5	26±4	35±4	16±3	13±4
	625	49±2	61±3	21±6	19±6	21±4	42±4	6±3	8±1
	1250	18±2	40±8	5±1	9±5	19±4	38±11	1±1	3±3
SA ^e	1	760±22	-	600±8	-	-	-	-	-
2-AA ^f	1(2 ¹)	-	864±31	-	379±7	-	-	-	361±25
2-NF ^g	1	-	-	-	-	215±40	-	-	-
2-AF ^h	1	-	-	-	-	-	222±26	-	-
9-AA ⁱ	50	-	-	-	-	-	-	442±25	-

^aValues are the mean±S.D. of the data from three plates, ^bWithout metabolic activation system, ^cWith metabolic activation system, ^dDimethylsulfoxide, ^eSodium azide, ^f2-aminoanthracene, ^g2-nitrofluorene, ^h2-aminofluorene, ⁱ9-aminoacridine, ^jThis dosage (2 $\mu\text{g}/\text{plate}$) was used only in *Sal. typhimurium* TA 1537.

Table III. Chromosomal aberration test of DA-5018 on CHL cell without S9 mix.

Test Compound	Dose (mM/plate)	Treatment time (hr)	No. of cells observed	No. of cells having aberrant chromosome (%)	Type of aberration ^c							
					ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end
Untreated	-	24	100	1	0	1	0	0	0	0	0	0
DMSO ^a	-	24	100	2	1	0	1	0	1	0	0	0
DA-5018	0.125	24	100	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	0.0625	24	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.03125	24	100	2	0	1	1	0	0	0	0	0
	0.015625	24	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC ^b	0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$	24	100	31	22	4	9	1	11	4	1	0
Untreated	-	48	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DMSO	-	48	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DA-5018	0.125	48	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.0625	48	100	2	2	0	0	0	0	0	0	0
	0.03125	48	100	1	0	0	0	0	0	0	1	0
	0.015625	48	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC	0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$	48	100	71	53	6	36	1	46	4	1	0

^aDimethylsulfoxide, ^bMitomycin C, ^cCtg: Chromatid gap, Ctb: Chromatid break, Cte: Chromatid exchange, Csg: Chromosome gap, Csb: Chromosome break, Cse: Chromosome exchange, Pol: Polyploid, End: Endoreduplication.

Table IV. Chromosomal aberration test of DA-5018 on CHL cell with S9 mix.

Test Compound	Dose (mM/plate)	Treatment time (hr)	No. of cells observed	No. of cells having aberrant chromosome (%)	Type of aberration ^d							
					ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end
Untreated	-	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DMSO ^a	-	6	100	1	0	1	0	0	0	0	0	0
DA-5018	0.25	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.125	6	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	0.0625	6	100	2	2	0	0	0	0	0	0	0
	0.03125	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.015625	6	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	0.015625	6	100	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B[a]P ^b	0.05 µg/ml	6	100	32	11	10	7	6	8	6	2	0
B[a]P ^c	0.05 µg/ml	6	100	2	0	1	1	0	0	0	0	0

^aDimethylsulfoxide, ^bBenzo[a]pyrene, ^cBenzo[a]pyrene without S9 mix, ^dCtg: Chromatid gap, Ctb: Chromatid break, Cte: Chromatid exchange, Csg: Chromosome gap, Csb: Chromosome break, Csc: Chromosome exchange, Pol: Polyploid, End: Endoreduplication.

Table V. Micronucleus test of DA-5018.

Test compound	Dose (mg/kg)	Route	Sampling time (hrs)	No. of animals	MNPCEs/1000 PCEs ^c (Min.-Max.)	NCE/PCE ratio (Min.-Max.)
Vehicle ^a	-	i.p.	24	6	0.83±0.75 ^d (0-2)	0.94±0.11 (0.71-1.03)
DA-5018	0.55	i.p.	24	6	1.16±1.16 (0-3)	1.08±0.11 (0.97-1.28)
	1.10	i.p.	24	6	0.50±0.54 (0-1)	1.35±0.11* (1.18-1.53)
	2.20	i.p.	24	6	1.16±1.16 (0-3)	2.01±0.29* (1.64-2.50)
	2.00	i.p.	24	6	23.16±6.30* (14-33)	1.48±0.27* (1.00-1.81)
Vehicle	-	i.p.	48	6	0.50±0.54 (0-1)	0.89±0.09 (0.75-0.99)
DA-5018	0.55	i.p.	48	6	0.66±0.81 (0-2)	1.11±0.17* (0.86-1.36)
	1.10	i.p.	48	6	0.66±0.51 (0-1)	1.13±0.12 (0.99-1.35)
	2.20	i.p.	48	6	0.83±0.98 (0-2)	2.02±1.02* (1.28-4.05)
MMC	2.00	i.p.	48	6	22.33±4.21* (10-34)	6.73±2.15* (3.74-9.71)

^aDistilled water, ^bmitomycin C, ^cMNPCEs: Micronucleated polychromatic erythrocytes, PCE: Polychromatic erythrocyte, ^d Each value represent mean±S.D.(Minimum-Maximum), *Significantly different from the negative control(p<0.05).

에서는 유의성있는 증가를 나타내었다(p<0.05). 한편, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서는 24 및 48시간에 관찰한 결과 모두에서 DA-5018 투여용량에 비례하여 증가하였는데, 약물투여 24시간째에서는 DA-5018 1.10 mg/kg 이상 용량군에서부터, 약물투여 48시간째에서는 0.55 mg/kg 이상 용량군에서부터 음성대조군과 비교하여 통계학적 유의성이 인정되었다. 양성대조군도 24 및 48시간 모두에서 음성대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다(p<0.05).

고 찰

일반적으로 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험계는 base pair mutation을 검출하는 *Sal. typhimurium* TA100, TA1535와 framshift-type mutation을 검출하는 *Sal. typhimurium* TA98, TA1537로 구성되어 있으며(Yoshiko Nagasawa 등, 1994), 화학물질의 유전자 돌연변이 유발 여부를 검토하는 시험계로 널리 이용되고 있다(Maron과 Ames, 1983). 한편, 약물의 염색체돌연변이를 검출하는 시험계로

는 배양세포를 이용하는 방법과 생체세포를 이용하는 여러 가지 방법이 있으나, 이 중에서 CHL cell을 이용하는 *in vitro* 시험과 설치류를 이용하는 소핵시험 가장 많이 이용되고 있다(朝倉邦造, 1988). CHL cell을 이용하는 염색체이상 시험에서는 화학물질이 염색체에 작용하여 절단 등의 과정을 통하여 염색체의 구조적 혹은 수적이상을 유발하는 것을 직접 검출할수 있는 방법이다. 한편, 소핵시험에서 소핵은 세포분열과정 중 후기에서 분리된 염색체가 딸세포(daughter cell)의 핵내로 들어가지 못하거나 혹은 염색체 분열장치의 이상에 의한 lagging chromosome으로 부터 형성되어, main nucleus가 부족한 적혈구 등의 세포질내에 출현하는 작은 핵모양의 구조물이다(Heddle 등, 1983). 따라서, 골수세포중에 존재하는 소핵다염성적혈구의 출현빈도 검사는 시험물질이 염색체나 세포분열장치에 미치는 세포유전학적손상에 대한 영향을 간접적으로 평가할 수 있는 지표가 되어 Schmid 등이 최초로 mouse model을 이용하여 세포유전학적손상에 대한 지표로 도입한 이래(Venitt와 Parry, 1984), 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험과 함께 수많은 화학물질들의 염색체돌연변이를 검사하는 방법으로 이용되어왔다(Iwakura 등, 1992).

본 시험에서도 DA-5018의 변이원성을 알아보기 위하여 세균을 이용한 복귀돌연변이시험과 CHL cell을 이용한 염색체이상시험 및 설치류를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험은 *Sal. typhimurium* TA 100, 1535, 98 및 1537 4가지 균주를 이용하여 DA-5018의 base pair mutation 혹은 frameshift-type mutation 유발 여부를 검토하였는데 시험결과, DA-5018은 처리한 모든 용량군에서 대사활성계의 유무에 관계없이 4가지 균주 모두에 대하여 His⁻ → His⁺로의 복귀변이를 유발하지 않았다. 또한, CHL cell을 이용하는 염색체 이상시험의 경우에도 직접법(24시간 및 48시간)과 대사활성화법 모두에서 DA-5018 용량에 관계없이 염색체이상을 보인 세포의 출현빈도가 증가하거나 용량의존성을 나타내지 않았으며, 설치류를 이용한 소핵시험에서도 DA-5018은 24시간과 48시간에 제작한 골수도발표본 모두에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도를 증가시키지 않았다. 이와같은 시험결과중 복귀돌연변이시험은 동일물질로 *Sal. typhimurium* TA98 및 TA100에 대하여 실시한 한국화학연구소의 복귀돌연변이시험에서 10 mg/plate 이하 모든 용량군에서 복귀변이원성이 없었다는 결과와 유사한 것이었다(한국화학연구소, 1991). 한편, capsaicin의 경우에는 복귀돌연변이 시험의 경우 0.04 mg/plate 용량에서 대사활성계 적용시 *Sal. typhimurium* TA98, TA100, TA1535에서 변이원성이 있다고 알려져 있으며(Nagabhusan와 Bhide, 1985), 또한 *Sal. typhimurium* TA 98의 경우, 대사활성계를 첨가하면 변이원성이 있으며(Nagabhusan와 Bhide, 1986), 0.25 mg/plate 이상 용량군에

서 용량의존적인 복귀변이원성을 나타낸다고 하였다(Toth 등, 1984). 한편, V79 cell을 이용한 gene mutation 시험에서도 0.04 mg/ml 농도에서 변이원성이 없다는 결과(Nagabhusan과 Bhide, 1985)와 오히려 변이원성이 있다는 결과가 보고되어 있으며(Lawson과 Gannett, 1989), 소핵시험의 경우에도 7.5 mg/kg 투여군에서는 소핵다염성적혈구의 증가가 인정되나 1.8 mg/kg 용량군에서는 소핵다염성적혈구수의 증가는 관찰되지 않는다고 하여(Nagabhusan과 Bhide, 1985), 변이원성은 아직까지 확실하지 않는것으로 판단된다. 한편, Nagabhusan과 Bhide(1985)는 capsaicin의 변이원성은 모핵인 vanillyl moiety 보다는 side chain에 기인한다고 하였다. 따라서, 이상과 같은 본시험 결과와 capsaicin의 변이원성에 관한 참고문헌에 근거하여 판단해 볼 때, 비록 DA-5018이 capsaicin 유도체이지만, capsaicin과는 달리 DA-5018은 세균에서 유전자돌연변이나 포유류 배양 세포 및 설치류에서 염색체돌연변이를 나타내지 않는 변이원성이 없는 물질로 판단된다.

한편, 복귀돌연변이 시험에서는 균주에 따라 다소 차이가 있었으나 DA-5018 1.25 mg/plate 이상 용량군에서 부터, 염색체이상시험에서는 0.25 mM/plate 이상 용량군에서 부터 세포치사효과가 관찰되어 DA-5018이 세균이나 포유류 세포에 대하여 독성작용을 나타내는 것으로 추정되었다. 또한 소핵시험에서도 정염성적혈구와 다염성적혈구의 비율은 약물투여 후 24 및 48시간대 모두에서 DA-5018과 용량상관성을 보이며 유의성있게 증가하였다(p<0.05). 이와 같은 결과는 DA-5018이 골수에 직, 간접적으로 영향을 미쳐 다염성적혈구의 생성을 억제시킴으로써 NCE/PCE의 비율을 증가시킨 것으로 추측할 수 있으며, 소핵시험결과 NCE의 증가를 세포독성작용으로 판단하는 Venitt와 parry (1984)에 근거하면 DA-5018은 소핵시험에서도 세포독성작용을 나타내는 물질로 사료된다. 그러나, 본 연구소에서 실시한 DA-5018의 랫드에 대한 아급성 독성시험 결과(미발표자료 a; b), 면역기계나 조혈기계 관련지표에서 특기할만한 변화가 관찰되지 않았으며, 특히 혈액학적 수치나 골수의 병리조직학적 검사에서도 정상으로 관찰된 점 등에 근거하여 종합적으로 판단해 볼때, 세균, 포유류세포 및 설치류의 골수에 대한 세포독성은 고농도의 DA-5018에 의한 일시적인 영향에 의한것으로 추정되며, DA-5018이 저농도로 사용될 경우에는 문제가 되지 않을것으로 사료된다. 한편, 이와같은 세포독성은 한국화학연구소의 복귀돌연변이 시험 결과 2.0 mg/plate 이상 용량군에서 세포치사효과가 관찰되었다는 결과와 유사하며(한국화학연구소, 1991), 또한 동일계 유사약물인 capsaicin에서도 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험에서는 1.0 mg/plate 이상에서 세균에 대한 독성작용이 나타나며(Toth 등, 1984), 소핵시험에서는 1.8 mg/kg 이상 용량군에서 NCE의 증가를 동반하는 것으로 알

려져 있어(Nagabhusan와 Bhide, 1985), 본 시험결과와 유사하였다.

이상의 시험결과로 부터 DA-5018은 유전자돌연변이를 검출하는 시험계인 복귀돌연변이 시험과 염색체돌연변이를 검출하는 시험계인 염색체이상시험 및 소핵시험에서 모두 음성의 결과를 나타내어 변이원성이 없는물질로 판단된다.

결 론

동아제약(주) 연구소에서 개발중인 비 마약성 진통제 DA-5018의 변이원성시험 결과, DA-5018은 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험에서 대사활성계의 유무에 관계없이 모든 균주에 대하여 His⁻→His⁺로의 복귀변이원성을 나타내지 않았으며, CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서도 대사활성계의 적용에 관계없이 염색체 이상을 유발하지 않았다. 또한 설치류를 이용하는 소핵시험에서도 소핵유발작용이 없는것으로 관찰되어 DA-5018은 변이원성이 없는 물질로 판단된다.

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.
- Deal, C. L., Schnitzer, T. J., Lipstein, E., Stevens, R. M., Levy, M. D., Albert, D. and Renold, F. (1991). Treatment of arthritis with topical capsaicin:double-blind trial. *Clin. Ther.* **13**, 383-395.
- Donofrio, P. (The capsaicin study group). (1991). Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin. A multicenter, double-blind, vehicle-controlled study. *Arch. Intern. Med.* **151**, 2225-2229.
- Heddle, J. A., Mark Hite, Barbara Kirkhart, Kathleen Mavournin, James T. MacGregor, Gordon W. Newell and Michael F. Salamone. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity-A report of the U.S. environmental protection agency gen-c-tox program. *Mutation Res.* **123**, 61-118.
- Iwakura, K., Tamura, H., Yamashita, Y., Sumi, N., Nomura, A. and Ishida, M. (1992). Mutagenicity studies of cadexomer iodine, a drug for treatment of dermal ulcer, and cadexomer, basic polymer. *應用藥理.* **44**(2), 157-165.
- Kastenbaum, M. A. and Bowman, K. O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.* **9**, 527-540.
- Lawson, T. and Gannett, P. (1989). The mutagenicity of capsaicin and dihydrocapsaicin in V79 cells. *Cancer Lett.* **48**, 109-113.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215.
- Nagabhusan M. and Bhide S. V. (1985). Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short-term tests. *Environ. Mutagen.* **7**, 881-888
- Nagabhusan M. and Bhide S. V. (1986). Nonmutagenicity of curcumin and its antimutagenic action versus chili and capsaicin. *Nutr. Cancer.* **8**, 201-210
- Salmone, M., Heddle, J., Stuart, E. and Katz, M. (1980). Towards an improved micronucleus test : Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Res.* **74**, 347-356.
- Tandan, R., Lewis G. A., Krusinski, P. B. and Fries, T. J. (1992). Topical capsaicin in painful diabetic neuropathy. Controlled study with long-term follow-up. *Diabetes Care* **15**, 8-14.
- Toth, B., Rogan, E. and Walker, B. (1984). Tumorigenicity and mutagenicity studies with capsaicin of hot peppers. *Anticancer Research* **4**, 117-120.
- Venitt S. and Parry, J. M. (1984). Mutagenicity testing. A practical approach. IRL press. England. pp.298-306.
- Watson, C. P., Tyler, L. K., Bickers, D. R., Millikan, L. E., Smith, S. and Coleman, E. (1993). A randomized vehicle-controlled trial of topical capsaicin in the treatment of postherpetic neuralgia. *Clin. Ther.* **15**, 510-526.
- Yoshiko Nagasawa, Yoshihisa Miwa, Takayuki Hongyo, Mori Suwagara and Shigeo Kawase. (1994). Mutagenicity study of Mesalazine. *應用藥理.* **48**, 501-509.
- 朝倉邦造. (1988). 化學物質による染色體異常アトラス. 日本環境變異原學會・哺乳動物試驗分科會. 朝倉書店, 東京, 日本.
- 국립보건안전연구원. (1993). 독성시험 표준작업지침서. p 565-654.
- 미발표자료 a. (1995). DA-5018의 랫드에 대한 경구 4주 반복 투여 독성시험.
- 미발표자료 b. (1994). DA-5018의 랫드에서의 피하 2주 반복 독성시험.
- 의약품등의 독성시험기준(1994). 국립보건안전연구원 고시 제94-3호.
- 한국화학연구소. (1991). K-154의 살모넬라균을 이용한 복귀돌연변이 시험(시험번호 : T-282).