

Camptothecin계 항암제 CKD-602의 유전독성평가

하광원[†] · 오혜영 · 허옥순 · 박장환 · 손수정 · 한의식 · 김종원 · 강일현 · 강혁준 · 이상준* · 홍청일* · 김준겸*
 식품의약품안전청 독성연구소 유전독성과
 *종근당 종합연구소
 (1998. 3. 10 접수)

Genotoxicity Studies of An Anticancer Agent of Camptothecin Series, CKD-602

Kwang Won Ha[†], Hye Young Oh, Ok Soon Heo, Chang Hwan Park, Soo Jung Sohn,
 Eui Sik Han, Jong Won Kim, Il Hyun Kang, Hyuck Joon Kang, Sang Jun Lee*,
 Chung Il Hong* and Joon Kyum Kim*

Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and
 Drug Administration, 5 Nokbundong Eunpyunggu, Seoul 122-020, Korea

*Chong Kun Dang Research Institute, 410 Shindorim-Dong Kuro-gu, Seoul 152-070, Korea

ABSTRACT : To evaluate the genotoxicity of CKD-602, an anticancer agent, the *in vitro* reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium*, the Chromosome aberration assay using Chinese hamster lung (CHL) cells and the *in vivo* micronucleus assay using bone marrow cells of ddY mice were performed. In the reverse mutation assay, CKD-602 did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, and TA 1537 strains with and without metabolic activation. In the chromosome aberration test using CHL cells, there was an increased incidence of structural aberrations induced by CKD-602 without metabolic activation during 24 and 48 hours, but CKD-602 did not induce chromosome aberration with metabolic activation. The *in vivo* induction of micronuclei was measured in polychromatic erythrocytes of bone marrow of male ddY mice. At 24 hours after treatment with CKD-602 by i.p. once, there was an increased incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes in bone marrow of ddY male mice.

Key words : CKD-602, Anticancer agent, Reverse mutation assay, Chromosome aberration assay, Micronucleus assay

서 론

중국의 회수나무(*Camptotheca acuminata*)에서 분리된 camptothecin은 고형암에 대하여 강력한 치료효과를 나타내었으나, 독성이 심하여 약으로 개발되지 못하였다. 그러나 1985년 Hsiang 등이 camptothecin이 세포주기 전과정에 골고루 분포하고 있는 topoisomerase I을 억제한다는 작용기전을 밝힘으로써, topoisomerase II를 억제하는 기존 항암제와 다른 항암제로 다시 관심이 고조되었다. 최근 이와같은 작용기전에 근

거하여 많은 camptothecin 유도체가 개발되어 우수한 항암작용과 낮은 독성을 나타내는 물질이 임상시험중이거나 시판을 시작하고 있다. 한편, 새로운 항암제인 CKD-602는 camptothecin 구조에 염기성 아미노 일킬기를 도입하여 용해도 및 독성을 개선하고, *in vivo* 항암효과를 증대시킨 난치성 고형암의 치료제로 개발되었다. 이는 기존 항암제들과 다른 작용기전을 나타냄으로써 기존 항암제들에서 문제가 되어 온 다제내성의 극복 효과가 기대되는 우수한 항암 후보물질이다. 이에 본 연구에서는 새로운 항암제로서, 개발중인 CKD-602의

[†]To whom correspondence should be addressed.

유전독성시험을 실시하였다. 즉, *in vitro* 시험으로 *Salmonella* 균주를 이용한 복귀돌연변이시험과 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 실시하고, *in vivo* 시험으로 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 이상의 시험들을 식품의약품 안전본부 고시 제 96-8호('96. 4. 16) 의약품등의 독성시험 기준에 따라 실시하여 CKD-602의 유전독성을 평가함으로써 생체내 안전성을 확보하고자 한다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

복귀돌연변이시험과 염색체이상시험 및 소핵시험에 사용된 시험물질인 항암제 CKD-602는 종근당 종합 연구소로부터 공급받아 시험에 사용하였다. 항암제 CKD-602(Lot no. JBSCPT 021325, JBS 102520)는 HPLC 분석 결과 순도 95.0% 이상으로 확인된 것을 사용하였다. 항암제 CKD-602는 황색의 분말이며, 복귀돌연변이시험에서는 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 용매로 하여 조제하였으며, 양성대조물질로서는 사용한 균주의 유전학적 특성 및 대사활성화법의 적용 여부에 따라 2-nitrofluorene(2NF), sodiumazide(SAZ), ICR-191, 2-amino-fluorene(2AF)등을 사용하였다. 염색체이상시험에서도 DMSO를 용매로 하여 CKD-602를 용해하여 사용하였으며, 음성대조물질로 용매를 사용하였다. 양성대조물질로는 직접법에서는 mitomycin C(MMC)를, 대사활성화법에서는 benzo(a)pyrene(B(a)P)을 사용하였다. 소핵시험에서는 용매와 음성대조물질로 생리식염수를 사용하였으며, 양성대조물질은 MMC를 사용하였다. 시험에 사용한 fetal bovine serum(FBS), Eagle's minimal essential medium(EMEM), trypsin-EDTA 및 Colcemid는 Gibco(Grand Island, NY, U.S.A)로부터 구입하였으며 기타 시약은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, U.S.A)와 국내 시약 대리점으로부터 구입하였다.

시험계

1) 균주 및 세포주

A. Bacteria

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537주는 미국 캘리포니아대학 B. N. Ames 교수로부터 직접 입수하였다. 각 균주는 Maron and Ames(1983)에 제시된 방법에 따라, 본 시험에 앞서 ① histidine 요구성 ② crystal violet 감수성 ③ UV 감수성 ④ ampicillin 또는 tetracycline 내성 ⑤ 자발 복귀변이빈도 등의 유전적 특성을 확인하였다. 각 균주는 -70°C의 DMSO 동결보존으로부터 직접 10 ml의 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 약 12시간 회전

식 진탕배양에 의하여 시험에 사용할 균 혼탁액으로 하였다. 복귀돌연변이 검색용 배지는 minimal glucose agar medium plate(MGA plate)를 사용하였으며, 그 조성 및 기타 시약은 Maron and Ames(1983)에 따라 조제하였으며, 고압증기멸균 또는 세균여과 filter를 통과시켜 사용하였다.

B. Mammalian cells

사용한 포유동물 세포는 Chinese hamster lung fibroblast (CHL) 세포로 일본 국립위생시험소의 Sofuni 박사로부터 분양 받아 사용하였다. Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다(Ishidate et al., 1977). 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)와 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 Eagle's minimal essential medium(EMEM)을 사용하였으며, 포화 습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 배양기(Dual CO₂ incubator, Shel-lab 1845 TC, U.S.A)에서 배양하였다. 배양된 세포는 2-3일 마다 0.25% trypsin-EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다.

2) 실험동물

식품의약품안전청 청정구역에서 생산된 SPF(특정병원체 부재) 5주령 ddY 계 마우스를 공급받아 온도 23±1°C, 습도 55±5%, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(70 W×240 L×120 H mm)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1~2 주일간의 순화 사육기간 동안 관찰하여 정상적인 건강한 동물만 시험에 사용하였으며, 사료는 신촌사료주식회사의 실험동물사료를 구입하여 고압증기 멸균기에서 121°C, 15분간 멸균한 다음 실험동물에 자유로이 공급하였다. 또한 멸균 정제수를 자유로이 공급하였다.

3) 대사활성계

In vitro 대사활성화를 위하여 Maron and Ames(1983)의 방법에 따라, S-9 분획을 다음과 같이 조제하여 사용하였다. 식품의약품안전청에서 생산 및 사육한 SPF Sprague-Dawley 계 rat(수컷, 7주령, 체중 약 200 g)에 corn oil로 희석시킨 Aroclor 1254(200 mg/ml)를 1회 복강투여(500 mg/kg)한 후 5일째에 간을 적출하였다. 3배 용량의 0.15 M KCl 용액을 넣어 균질화하고 원심분리(9,000 g, 10분)한 후 상동액을 취하여 S-9 분획을 얻었다. 복귀돌연변이시험에서의 S-9 mix의 조성은 S9 fraction 2.0 ml(4%), 0.4 M MgCl₂-1.65 M KCl 1.0 ml, 1 M glucose-6-phosphate 0.25 ml, 0.1 M NADP 2.0 ml, 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 25.0 ml, DW 19.75 ml 이었고, 염색체이상시험에서 사용한 S-9 mix의 조성은 S9 fraction 1.48 ml (30%), MgCl₂-KCl salt solution 0.144 ml, 1 M glucose-6-phosphate 0.018 ml, 0.1 M NADP 0.144 ml, 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.8 ml, DW 1.42 ml이었다.

시험방법

1) *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험
예비독성시험은 TA100 균주를 이용하여 DMSO를 용매로 하여 10 mg/plate를 최고농도로 제조하여 직접법과 S-9 mix를 이용한 대사활성화법을 실시하였다. 예비독성시험결과 10 mg/plate의 농도에서 시험물질에 의한 세포독성을 보이지 않아 본시험에서의 최고농도로 설정하여 공비 2의 6농도로 시험하였다. 시험관(13 mm × 100 mm, glass)에 *S. typhimurium* TA 98, TA100, TA1535, TA1537 각각의 배양균액 0.1 ml, 시험물질 0.1 ml 및 0.2 M phosphate buffer saline(pH 7.4) 0.5 ml(대사활성화법에서는 S-9 mix 0.5 ml)을 넣어 혼합한 후 37°C에서 30분간 전배양을 행하였다. 배양 종료 후 top agar 2 ml을 첨가하여 혼합하고 변이원성 검색용 배지 MGA plate에 중층, 37°C에서 48시간 배양 후 복귀변이 집락의 수를 자동 집락계수기(Artek model 880)와 수동식 집락계수기로 계수하였다. 복귀변이집락의 수는 3배의 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이유발성의 판정은 용매대조의 2배 이상의 복귀변이 집락수를 나타내고 또한 용량 의존성을 가지는 경우를 양성으로 하였다.

2) 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

CKD-602를 DMSO에 녹인 후 세포배양 배지에 10%되게 첨가하여 세포독성시험을 실시하였다. 세포 계대시에 1회용 24 well plate에 1 well당 1×10^4 개의 세포를 파종하여 2일간 배양한 후, 최고투여용량인 배지의 1 mM의 농도로부터, 공비 2로 5단계의 농도를 설정하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 Dulbecco's phosphate buffered saline 0.5 ml로 2회 세척하고 methanol로 10분간 고정하여 5% Giemsa(in phosphate buffer, pH 6.8)로 30분간 염색한 후 현미경으로 관찰하여 50% 세포독성을 보이는 농도를 구하였다.

예비독성시험에서 결정된 50% 세포독성 농도를 최고 농도로 하고, 공비 2로 3단계의 농도를 대사활성 부재 및 존재하에서 24시간과 48시간 시험농도로 하였다. 또한, 용매대조군으로 DMSO 처리군과 기지의 양성대조군을 각각 처리하여 시험하였다. 대사활성 부재하의 시험은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 1×10^5 /ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간과 46시간 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid를 0.2 µg/ml 되도록 처리한 후 2시간 더 배양하여 총 검체 처리시간이 24시간, 48시간이 되도록 하였다. 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 37°C의 저장액(0.075 M KCl) 4 ml에 혼탁 시킨 다음 37°C 수조에 20분간 방치하였다. 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)으로 3회 고정시킨 후 50% 질산 처리하여 냉장보관된 슬라이드에 세포침전액을 떨어뜨려

염색체 표본을 만들고, 공기 건조법으로 슬라이드를 제작하여, 5% Giemsa로 30분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 대사활성 존재하의 시험은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 1×10^5 /ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 S-9 mix(배양액의 20% 비율)와 시험물질 또는 양성대조물질이 포함된 배양액으로 6시간 배양한 후, 보통의 배양액으로 교환하여 18시간, 42시간 더 배양하였다. 세포의 수거 2시간 전에 colcemid를 처리한 후 세포를 수거, 표본을 제작하였다. 양성 대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 대사활성 부재하에서는 MMC 0.1 µg/ml을, 대사활성 존재하에서는 B(a)P 50 µg/ml을 사용하였다.

한 시험 농도당 100개의 세포분열 중기상을 현미경하에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상(structural aberrations)과 수적이상(numerical aberration)으로 분류하고, 구조이상은 gap(chromatid and chromosome gap), ctb(chromatid break), cte(chromatid break), csb(chromosome break), cse(chromosome exchange)으로 구분하여 기록하였다. 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류를 각각 기록하였다. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

3) 마우스를 이용한 소핵시험

순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 20~30 g의 범위에 드는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 5마리씩 배분하였다. 개체의 식별은 색소(파크린산액)에 의한 부위별 피모 염색법과 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 본시험의 투여량 및 표본제작시기의 결정을 위하여 Hayashi *et al.* (1984)의 투망법에 따라 각 군에 수컷 2마리씩을 배정하여 50% 치사량을 구하였으며, 생리식염수 10 ml/kg을 용매대조군으로, MMC 2 mg/kg을 양성대조군으로 설정하였다. CKD-602를 1회 복강투여하고 24시간째에 골수를 채취하여 도말표본을 제작하고 광학현미경하에서 관찰하여 1,000개의 다염성적혈구에서의 소핵 출현 빈도수를 계수하였다. CKD-602는 예비시험의 결과에 따라 본시험에서는 시험물질의 50% 치사량의 1/2 농도를 최고농도로 하고 1회 복강투여 후 24시간째에 소핵을 관찰하였다. 선정된 100 mg/kg/10 ml을 최고 투여량으로 하고 Schmid (1975)의 방법에 따라 골수표본을 제작하였다. 경추탈구로 도실한 동물의 양쪽대퇴골로부터 골수를 0.5 ml의 FBS로 채취한 후 골수세포 혼탁액을 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 적당량의 혼탁액을 슬라이드에 도말하고 공기 중에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 표본을 5% Giemsa-용액(in Gurr R-66, pH 6.8의 1/150

M phosphate buffer)에 30분간 염색하였다. 염색 후 동일 완충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산수용액에 수초간 담근 후 증류수에 수회 세척하고 공기 중에서 건조시켰다.

소핵관찰은 2명의 관찰자에 의해 맹검법으로 검경하였다. 마우스 1마리당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polygonal erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고, 다시 1,000개의 PCE중에서 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated PCE, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포 직경의 1/2로부터 식별 가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유핵 세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다. Hayashi *et al.* (1989)의 방법에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1, 2단계의 비교자료 활용에 의한 검정을 거쳐, 3단계에는 음성대조군과 시험물질 투여군과의 MNPCE의 출현빈도에 관한 유의차는 Cochran Armitage 경향검정법을, PCE의 출현빈도에 관한 유의차는 T-test를 행하였다.

결과 및 고찰

유전물질의 손상으로 야기되는 암에 대한 관심이 높아지면서 유전자 손상을 단기적으로 쉽게 검색할 수 있는 유전독성시험법의 개발이 진행되어 왔으며 *in vitro* 시험인 Ames *et al.* (1975)이 개발한 복귀돌연변이시험 및 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험과 *in vivo* 시험인 동물을 이용한 소핵

시험은 국제적으로 널리 이용하고 있는 대표적인 유전독성 평가법이다. 본 연구에서는 이러한 시험법들을 이용하여 시판되고 있는 기존의 항암제들의 문제점인 용해도 및 독성을 개선하고, 다제내성의 극복과 *in vivo* 항암효과를 증대시키기 위한 목적으로 개발한 새로운 항암제인 CKD-602에 대한 유전독성을 평가하였다.

*S. typhimurium*을 이용한 복귀변이시험에서 CKD-602는 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537등 4종의 시험용균주에서 S-9 mix를 적용하지 않은 직접법의 경우, 전용량 단계에 걸쳐 모든 시험용 균주에서 음성대조와 같은 정도 또는 그 이하의 복귀변이 집락수를 나타내었다. S-9 mix를 이용한 대사활성화법의 경우에도 S-9 mix를 적용하지 않은 직접법과 유사한 결과를 나타내었다. 양성대조화합물은 직접법과 S-9 mix를 첨가한 대사활성화법 모두에서 각각의 시험용 균주에 대하여 복귀변이 집락수를 증가시켜 본 실험이 적정히 행하여졌음을 나타내었다(Table 1). 이상의 결과로 보아 본 시험 조건에 있어서 CKD-602는 돌연변이 유발성을 가지지 않는 것으로 판단된다.

또한 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 예비독성시험을 실시하여 대략의 세포증식 50% 억제 농도를 구하였다. 시험물질인 CKD-602는 예비독성시험을 시행한 결과 24시간 처리했을 때에는 0.25 μM에서 50% 정도의 세포독성을 나타내었고 48시간 처리했을 때에는 0.063 μM에서 50% 이상의 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 CKD-602의 염색체

Table 1. Reverse mutation test of CKD-602 in *S. typhimurium*

Compound ^a	Dose (μg/plate)	S9 Mix	No. of revertant colonies per plate (Mean±S.D.)			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
DMSO		-	24.0±2.6	183.0±6.6	20.0±0.0	8.0±2.0
CKD-602	10000	-	14.3±1.5	161.3±2.1	19.7±5.5	4.7±1.5
	5000	-	20.7±4.7	163.7±17.2	17.3±4.0	11.0±2.0
	2500	-	20.0±1.7	182.3±7.1	18.3±6.0	7.7±2.5
	1300	-	21.0±2.0	174.3±4.2	21.3±4.0	9.3±1.5
	600	-	20.7±4.2	181.7±10.0	20.7±4.7	10.3±2.5
	300	-	20.7±5.0	164.7±8.5	18.7±4.0	8.3±1.5
2NF	10	-	246.0±23.5			
SAZ	1.5	-		1212.0±32.0	863.7±49.7	
ICR-191	1.0	-				471.3±39.3
DMSO		+	24.7±6.1	182.7±2.3	16.0±3.5	11.0±2.0
CKD-602	10000	+	19.0±2.6	201.7±26.6	12.3±1.5	15.0±2.0
	5000	+	20.3±5.0	191.0±11.5	16.7±1.5	11.7±4.0
	2500	+	20.0±4.4	187.3±21.7	16.0±6.6	10.3±3.8
	1300	+	24.0±3.6	184.7±4.2	12.3±2.5	9.0±1.0
	600	+	23.7±3.2	199.7±22.0	12.7±2.5	8.3±3.2
	300	+	26.0±4.6	181.3±9.3	15.3±3.2	9.3±1.5
2AF	10	+	471.0±77.0	901.0±109.3	26.7±3.2	33.0±6.6

^aDMSO, dimethyl sulfoxide; 2NF, 2-nitrofluorene; SAZ, sodium azide.; 2AF, 2-aminofluorene.

이상시험 본시험의 최고농도를 24시간 처리군에서는 0.25 μM, 48시간 처리군에서는 0.05 μM로 하여 공비 2의 4가지 농도로 시험하였다. CKD-602의 염색체이상시험 직접법과 대사

활성화법, 24시간처리의 결과를 Table 2에 나타내었다. CKD-602를 직접법으로 24시간 처리한 군에서는, 전 농도에서 약 17% 이상의 용량 의존적인 염색체이상 유발율의 증가를 나타

Table 2. Chromosome aberration Test of CKD-602 in CHL Cells

Compound ^a	Dose (μM)	S9 mix	Time (hr) ^b	No. of metaphase	No. of aberrationc (mean±S.D.)					No. of normal cells ^d
					gap	ctb	cte	csb	cse	
DMSO				100	2.3±1.3	0.7±0.9				97.0±1.4
CKD-602	0.250			100	14.3±7.0	12.7±7.9	71.3±8.2	0.3±0.5	1.0±0.8	18.3±2.6 ^{†,*}
	0.125			100	9.0±3.6	10.3±8.3	37.0±18.6	0.7±0.9	1.3±1.3	57.3±13.4 ^{†,**}
	0.063	-	24	100	4.0±1.4	2.3±0.5	17.3±6.8		1.0±0.8	79.7±7.0 ^{†,**}
	0.031			100	3.3±2.1	1.0±0.8	2.7±1.3			93.7±2.1 [†]
	MMC	0.1μg/ml		100	19.7±5.4	11.0±2.9	36.7±8.5	1.0±0.8	0.7±0.9	42.7±6.1
DMSO				100	2.3±0.9					97.7±0.9
CKD-602	0.250			100	1.3±1.3	0.3±0.5				98.3±1.3
	0.125			100	2.0±0.8					98.0±0.8
	0.063			100	2.3±1.3					97.7±1.3
	0.031	+	6+18	100	1.3±0.9					98.7±0.9
B(a)P	50 μg/ml			100	6.3±1.3	2.3±0.5	3.0±0.8	0.3±0.5	0.7±0.9	87.7±0.9
DMSO				100	1.3±1.3	0.3±0.5	0.3±0.5			98.0±0.8
CKD-602	0.050			100	13.7±5.3	4.7±2.5	24.7±11.3	0.7±0.5		60.0±5.1 ^{†,*}
	0.025			100	7.3±0.5	2.7±2.1	3.7±2.5	0.3±0.5		86.3±3.9 ^{†,**}
	0.013	-	48	100	5.7±3.1	0.7±0.5	2.0±1.6	0.3±0.5		91.3±4.5 [†]
	0.006			100	3.3±0.5	1.0±0.8	1.3±1.3	0.7±0.9		93.7±1.7 ^{†,**}
	MMC	0.1 μg/ml		100	13.7±1.3	13.7±2.6	59.3±6.6	0.7±0.9	0.3±0.5	29.0±6.2
DMSO				100	1.7±0.5		0.3±0.5			98.0±0.8
CKD-602	0.050			100	2.7±1.7		0.3±0.5			97.0±1.4
	0.025			100	2.0±1.4		0.3±0.5			97.7±1.9
	0.013	+	6+42	100	2.0±0.8	0.3±0.5				97.7±0.9
	0.006			100	2.0±0.8					98.0±0.8
B(a)P	50 μg/ml			100	6.7±1.7	3.0±0.8	1.3±0.9	0.3±0.5	0.7±0.5	88.7±1.3

^aMMC, mitomycin C; B[a]P, benzo[a]pyrene.

^bTreatment time - expression time.

^cgap, chromatid and chromosome gap; ctb, chromosome break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; num, numerical aberration. mean±S.D.; mean±standard deviation (n=3)

[†]p<0.01, Anova test

^{*}p<0.01, t-test

^{**}p<0.05, t-test

Table 3. Micronucleus test of CKD-602 in ddY male mice

Compound ^a	Route	Dose (mg/kg)	No. of mice	Time (hr)	MNPCE ^b (%, Mean±S.D.)	PCE/(PCE+NCE) ^c (%, Mean±S.D.)
S.C.	i.p.		5	24	0.08±0.10	56.1±1.6
CKD-602	i.p.	100	5	24	0.60±0.14*	48.4±2.3
	i.p.	50	5	24	0.27±0.14*	48.2±2.9
	i.p.	25	5	24	0.10±0.13*	57.2±3.5
MMC	i.p.	2	5	24	5.02±0.77	48.9±3.2

^aS.C., solvent control (Saline); MMC, mitomycin C

^bThe number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was calculated from 1000 PCEs per animal.

^cThe percentage of PCE in 1000 erythrocytes per animal. NCE, normochromatric erythrocytes

*P<0.01, Cochran Armitage test

내었으며, 최고농도 0.25 μM에서 $p < 0.01$, 0.125 μM 및 0.063 μM에서 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 염색체이상 유발율의 증가를 나타내었다. S-9 mix를 이용한 대사활성화법에서는 CKD-602를 24시간 처리하였을 때에는 약 3% 미만의 염색체이상 유발율을 나타내어 염색체이상의 유의한 증가를 관찰할 수 없었다. 또한 48시간 처리군에서도 직접법에서는 약 7% 이상의 용량 의존적인 염색체이상 유발율을 나타내었으며, 최고농도 0.05 μM에서 $p < 0.01$, 0.025 μM 및 0.006 μM에서 $p < 0.05$ 의 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 대사활성화법에서는 약 3% 이하의 염색체이상 유발율을 나타내었다. 본 시험조건에서 용매대조군인 DMSO 처리군은 3% 이하의 염색체이상 유발율을 나타내었고, 직접법의 MMC 0.1 μg/ml에서 50% 이상의 높은 염색체이상 유발율을, 대사활성화법의 B(a)P 50 μg/ml에서 10% 이상의 염색체이상 유발율을 나타내어 각각 대조군의 정상 상, 하한 범위의 염색체이상 유발율을 유발하여 시험이 적절하게 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 이들 실험결과로 볼 때, 시험물질인 CKD-602는 S-9 mix에 의한 대사활성화체가 독성을 유발하는 것 보다, 직접적으로 세포에 작용하는 것으로 생각된다. 한편, CKD-602는 24시간 처리한 군에 비해 48시간 시간 처리하였을 때 세포독성을 더 크게 나타내어, 48시간 처리시에는 24시간의 경우보다 5배정도 낮은 농도에서 염색체표본슬라이드 제작이 가능한 점으로 보아, CKD-602는 세포에 직접적으로 작용하여 염색체이상을 유발시키며, 처리시간이 길수록 세포독성효과도 커진다고 사료된다.

한편, Schmid(1975)에 의해 개발된 동물을 이용한 소핵시험은 많은 연구를 통하여 동물의 성, 계통(Sutou, 1986, 1988), 투여경로 차이(Hayashi et al., 1989)에 따른 비교 논문들이 보고되어 있으며, 검체 투여방법, 채취시간에 따른 골수세포의 적혈구 생성에 미치는 영향에 관한 연구가 계속되어 왔다(Vanparrys et al., 1992; Hayashi et al., 1991; Hayashi et al., 1984). 본 연구에서 수행한 ddY 마우스를 이용한 *in vivo* 소핵시험에서 CKD-602는 생리식염수를 용매로 하여 100, 50, 25 mg/kg의 3농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 유의성 있게 염색체이상을 유발하였다($p < 0.01$) (Table 3).

소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도에 있어서 양성대조군 MMC의 경우 약 50개, 용매대조군인 생리식염수에서는 2개 이하의 일반적인 양성 및 음성대조군의 정상 상, 하한 범위(Hayashi et al. 1989)의 소핵 유발율을 나타내어 시험이 적절히 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 이것은 CKD-602가 마우스의 골수적아구세포의 분화과정에서 염색체이상을 유발하

는 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합하여, 본 시험조건에서 CKD-602는 *in vitro* 시험인 *Salmonella* 균주를 이용한 복귀돌연변이시험의 직접법과 대사활성화법 및 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험의 대사활성화법에서는 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단되나, 염색체이상시험의 직접법 및 *in vivo* 시험인 마우스를 이용한 소핵시험에서는 유전독성을 유발하는 것으로 판단되었다.

참고문헌

- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) : Methods for Detecting Carcinogens & Mutagens with the *Salmonella*/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutat. Res.*, **31**: 347-364.
- Hayashi, M., Sofuni T. and Ishidate, Jr. M. (1984) : A pilot experiment for the micronucleus test : The multi-sampling at multi-dose levels method, *Mutat. Res.*, **141**: 165-169.
- Hayashi, M., Sofuni T. and Morita, T. (1991) : Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.*, **252**: 281-287.
- Hayashi, M., Sutou, S., Shimida, H., Sato, S., Sasaki, Y.F. and Wakada, A. (1989) : Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **223**: 329-344.
- Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni T., and Ishidate, Jr. M. (1989) : A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**: 347-356.
- Hsiang, Y.H., Hertberg, R., Hect S. and Liu, L.F. (1985) : Camptothecin induced protein-linked DNA break via mammalian DNA topoisomerase, *I. J. Biol. Chem.* **260**: 14787-14873.
- Ishidate, Jr. M. and Odashima, S. (1977) : Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro*-a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **48**: 337-354.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**: 173-215.
- Schmid, W. (1975) : The micronucleus test, *Mutat. Res.*, **31**: 9-15.
- Sutou, S. (1986) : Sex difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **172**: 151-163.
- Sutou, S. (1988) : Strain difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **204**: 307-316.
- Vanparrys, P., Deknudt, G., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Marsboom, R. (1992) : Sampling times in micronucleus testing, *Mutat. Res.*, **282**: 191-196.