

## DK1002에 대한 급성독성시험 및 유전독성에 관한 연구

류재천\* · 김경란 · 김현주 · 정상운 · 김명국<sup>1</sup> · 박희석<sup>1</sup> · 김용해<sup>2</sup>  
한국과학기술연구원, 독성연구팀, <sup>1</sup>동국제약 주식회사, <sup>2</sup>한국과학기술원

### Acute and Genetic Toxicity Study of DK1002, a Drug Candidate for Analgesics

Jae-Chun Ryu\*, Kyung-Ran Kim, Hyun-Joo Kim, Sang-Oun Jung, Myung-Kuk Kim<sup>1</sup>,  
Hee-Sock Park<sup>1</sup> and Yong-Hae Kim<sup>2</sup>

Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang,  
Seoul, 130-650, Korea

<sup>1</sup>Dong-Kook Pharmaceutical Co. Ltd., 997-8 Daechi-3 Dong Kangnam-Ku, Seoul 135-283, Korea

<sup>2</sup>Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-Dong  
Yusong-Ku, Taejon 305-701, Korea

(Received June 29, 1998)

(Accepted August 22, 1998)

**ABSTRACT** : The acute and genetic toxicity of DK1002 was subjected in this study. DK1002 which is a morphine-like new drug candidate synthesized by Dong-Kook Pharmaceutical Co. Ltd. is now under developing as a analgesics that have better drug efficacy and least addictive property. In acute toxicity study, the 50% lethal doses (LD<sub>50</sub>) of DK1002 were determined as >2000 mg/kg (p.o.), 237.0 mg/kg (i.p.), 57.5 mg/kg (i.v.), and 1266.9 mg/kg (s.c.). And also, to study the genotoxicity of DK1002, we performed bacterial reversion assay with *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, and TA1537, and *in vitro* chromosomal aberration assay with Chinese hamster lung cells in the presence and absence of S-9 metabolic activation system. *In vivo* micronucleus assay using mouse bone marrow cells was also performed. From these results, DK1002 was revealed nonmutagenic potential in *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, and TA1537 both in the absence and presence of metabolic activation system. No clastogenicity of DK1002 was observed in chromosomal aberration assay *in vitro* as well as in micronucleus assay *in vivo*.

**Key Words** : Acute toxicity, *Salmonella typhimurium* reversion assay, *In vitro* Chromosome aberration assay, *In vivo* Micronucleus assay, Analgesics, DK1002

### I. 서 론

아편의 주요 alkaloid 계열성분 중의 하나인 morphine 을 모핵으로 하여 인간의 통증(pain)을 해결하기 위해 많은 합성 진통제들이 개발되어 사용되어 오고 있다. Morphine의 중추신경계에 미치는 주된 효과로서는 진통효과 (analgesia), 환각 (euphoria), 수면 (sedation), 호흡억제 (respiratory depression), 축동 (miosis), 최토 (emesis) 및 진해효과 (antitussive effect) 등이 알려져 있다. 이외에도 소장평활근의 촉진작용이나 위경련 (spasm) 및 변비 (constipation)를 포함하는 장평활근과

관련된 효과도 지니고 있다 (Wasacz, 1981). 그러나 Morphine은 우수한 약효를 지닌 반면에 강한 탐닉작용 과 약물의존성으로 인하여 마약으로 취급되고 있으며, 아편계 진통제의 육체적 의존성 및 남용은 19세기 중엽부터 시작하여 사회적인 문제로 크게 대두되어 오고 있다 (Way *et al.*, 1987). 따라서 최근, 아편계 진통제들의 육체적 의존성 및 남용의 문제를 해결하기 위해, 여러 가지 subtype의 opioid 수용체( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ )의 발견에 힘입어, 보다 좋은 진통효과를 나타내며 동시에 탐닉 성이 적은 morphine 계열의 합성 진통제를 개발하려는 연구들이 시도되어 오고 있다(Wasacz, 1981).

이러한 시도로서 동국제약(주)에서는 morphine의 여러 가지 유도체들을 합성하여 육체적 약물의존성과 탐

\*To whom correspondence should be addressed.

닉성이 적은 우수한 진통제로의 후보물질들을 개발 중에 있다. 본 연구실에서도 이미 축적된 많은 독성 연구 경험(Ryu *et al.*, 1993a, 1993b, 1994, 1996a, 1996b, 1997, 1998)을 바탕으로, 후보물질 중 하나인 DK1001에 대한 급성독성과 유전독성에 대한 전임상 시험결과를 발표(Kim *et al.*, 1998)하였고, 본 연구에서는 같은 계열의 또다른 후보물질인 DK1002에 대한 전임상시험으로서 경구, 복강, 정맥, 그리고 피하에 대한 급성독성 시험과, 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 또한 소핵 시험 등의 유전독성시험을 수행하여 생체 내 안전성 확보를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 급성독성시험

#### 1) 시험동물

SPF (Specific Pathogen Free) 6 주령 ICR계 마우스 (♂)를 대한실험동물센터로부터 구입하여 한국과학기술연구원 동물실험실에서 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~600 Lux의 사육환경하에서 polycarbonate(70 W 240 L 120 H mm) cage에 넣어 사육하였다. 삼양사(주)의 실험동물사료를 구입하여 공급하였으며, 상수는 자유로이 공급하였다. 분양후 1주일간의 순화기간을 거친 후 모든 동물의 체중을 측정,  $30 \pm 2$  g의 범위에 드는 동물을 무작위로 선택하여 배분하였고, 각 실험군의 식별은 cage별 tag 표시법을 이용하였다.

#### 2) 시험물질의 조제 및 용량 설정시험

시험물질인 DK1002는 동국제약(주)으로부터 합성되어 공여되었고, 멸균생리식염수에 용해시켜 시험에 사용하였다. Dietrich Lorke(1983)의 Acute toxicity method를 이용하여 DK1002에 대한 경구(p.o.), 복강내(i.p.), 피하(s.c), 그리고 정맥(i.v.)으로 각각 1회 투여하였을 때의 0%의 치사율을 보이는  $LD_0$ 와 100%의 치사율을 보이는  $LD_{100}$ 을 구하였다.

#### 3) $LD_{50}$ 결정

각 투여경로에 대해 예비실험에서 구한  $LD_0$ 와  $LD_{100}$ 를 포함하여 5용량을 설정하고 각군을 10마리로 하여 1회 투여한 후 14일간 임상증상의 유무, 체중, 사망한 동물수를 기록하여 Litchfield와 Wilcoxon 방법(Litchfield, J., *et al.*, 1949)에 따른 PHARM/PCS software를 이용하여  $LD_{50}$ 을 결정하였다(Tallarida R. J., *et al.*, 1987).

### 2. 복귀돌연변이 시험(Bacterial reversion Ames test)

#### 1) 시험용 균주

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, 그리고 TA1537 균주는 미국 University of California, Berkley의 B.N. Ames 교수로부터 분양받아 한국과학기술연구원에서  $-70^\circ\text{C}$ 의 Deep freezer 내에서 동결보존 중인 것을 사용하였다.

#### 2) 시험물질의 조제 및 농도

시험물질은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 실험을 수행하였다. 본 실험에 앞서서 TA 100 균주를 이용하여 예비세포독성실험을 수행한 결과 S9 대사활성계의 존재와 부재 모두에서  $185 \mu\text{g}/\text{plate}$ 를 본 실험에 최고 적용농도로 하였으며 공비 2로 5단계의 농도를 설정하였다.

#### 3) 시험방법 및 data 분석

국립보건안전연구원 예규(1994)와 OECD guideline for the testing of chemicals(OECD, 1993a)에 준하여 실험하였으며, 비교적 유전독성의 검색감도가 높은 preincubation법으로 수행하였다(Ames *et al.*, 1973). 실험용 균주는 Nutrient broth에 접종하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 약 12~14시간 진탕배양을 한 후, 배양액 0.1 ml, 시험물질의 DMSO 용액 0.1 ml, 0.2 M Sodium phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 ml(대사활성화법에서는 Rat를 사용하여 Maron & Ames(1983)의 방법에 의거하여 제조,  $-70^\circ\text{C}$  Deep freezer에 보관하여 사용하는 S9 mixture 0.5 ml)을 넣어 혼합한 후  $37^\circ\text{C}$  water bath에서 30분간 preincubation을 한 다음 Top agar 2.5 ml를 첨가하고 혼합한 후 minimal glucose agar plate에서 고화시켰다. 그 후  $37^\circ\text{C}$  배양기에서 48시간 배양 후 복귀돌연변이 집락수를 계수하였다. 각 농도당 3매의 plate를 사용하였고, 복귀돌연변이 집락수가 용매대조군에 비해 용량의존성을 보이며 현저한 증가를 보이는 경우 돌연변이유발성이 있다고 판정(Ames *et al.*, 1973)하게 된다.

### 3. 염색체 이상 시험(Chromosome Aberration Assay)

#### 1) 포유동물 배양 세포주

본 실험에서 사용한 Chinese hamster lung(CHL) fibroblast 세포주는 일본국립위생시험소로부터 입수한 뒤 한국과학기술연구원 독성연구팀에서 계대보존 중인 것을 사용하였다. Chromosome number는 25이며, 세포 주기는 12~15시간이다.

## 2) 세포배양

Fetal bovine serum(FBS, Gibco 200-6140) 5%, Antibiotic-Antimycotic(100×, Gibco 600-5240)을 1% 되게 첨가한 Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM, Gibco 410-1100)을 사용하였고 포화습도하에서 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기(Vision Scientific, VI-9011C)에서 배양하였다. 배양된 세포는 3일마다 0.5% Trypsin-EDTA(Gibco 610-3500)액을 이용하여 계대하였다.

## 3) 염색체 이상시험

본시험 용량설정을 위하여 S-9 mixture 존재시(20% v/v)와 부재시 각각에서 5 mg/ml을 최고 농도로 하고 공비 2로 세분한 농도를 이용하여 MTT assay(Mosmann, T., 1983)를 수행하여 증식억제농도(IC<sub>50</sub>)를 구하였다. IC<sub>50</sub>를 최고 농도로 하고 공비 2로 3단계의 농도를 설정하였다. 무처리대조군물질로서는 멸균생리식염수, 양성 대조는 Cyclophosphamide(CP., Sigma, C0768), Mitomycin C(MMC, Sigma, M0503)를 사용하였다. 6시간 검체처리의 경우 대사활성부재 및 존재로 양분하여 배양 세포를 60 mm의 tissue culture dish에 4×10<sup>4</sup> cells/5 ml이 되도록 파종한 후 3일간 배양을 하였다. 배양 후 시험 물질을 함유하는 배양액으로 교환하여 6시간 동안 배양한후 보통의 배양액으로 교환하여 16시간이 경과하면 colcemid(Gibco, 120-0574)를 1 μM이 되도록 처리하여 2시간이 경과 후, 표본을 제작하였다. 6시간 검체 처리시 결과가 음성인 경우 검체 처리 시간을 24시간으로 하여 연속 처리 시험을 한다 (Galloway *et al.*, 1997, OECD, 1993b).

## 4) 표본의 제작

0.05% Trypsin-EDTA로 세포를 모아 원침한 후, 저장액(0.075 M KCl)에 잘 현탁시켜 37°C에서 15분간 방치시켰다. 고정액(methanol : acetic acid=3 : 1. v/v)을 10방울 정도 적하한 후 원침하고 고정액 처리 과정을 2회 더 반복한 후 원침시키고 적당히 현탁을 만들어 slide 위에 세포 현탁액을 적하시켜 건조시킨 후 5% Giemsa 염색액에 10분간 염색시켜 세척 건조하였다.

## 5) 결과의 판정

실험군당 200개의 잘 퍼진 분열중기상을 관찰한 다음 구조 이상의 총 출현 빈도를 JEMS-MMS classification에 따라 구하고 Fisher's Exact Test with Dunnett's adjustment에 의해 통계처리 하였다(David, 1989). 본 연구실의 염색체이상 판정 criteria에서는 gap의 크기

가 염색체두께보다 작은 chromatid gap과 chromosome gap은 포함시키지 않았다.

## 4. Mouse 골수세포를 이용한 *in vivo* 소핵실험(*in vivo* micronucleus Assay)

1) 용량 및 표본제작시기의 결정을 위한 예비실험  
복강 투여에 대한 50% 치사율을 보이는 LD<sub>50</sub>인 237.0 mg/kg의 1/2용량을 최대용량으로 mouse 6마리에 투여하고 24시간 및 48시간에 골수도말표본을 제작, 소핵 출현빈도수가 더 많은 시간을 표본제작시기로 하였다.

### 2) 골수세포 표본의 제작 및 관찰

본실험에서는 1/2 LD<sub>50</sub>인 최대용량을 포함하여 공비 2로 두 용량을 더 설정한 세 용량에 대해, 한 group당 6마리의 마우스로 하여 1회 복강 투여하고, 예비시험에서 결정된 적정시간이 경과 후 마우스를 경추탈골시켜 양쪽 대퇴골로부터 골수를 채취하였다. 골수세포 부유액을 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 적당한 양으로 골수를 고르게 현탁시켜 세척된 슬라이드에 도말하여 공기중에서 건조시켜 메탄올로 고정, 건조시킨 후 1/15 M Sodium Phosphate buffer saline(PBS, pH 6.8)에 4%로 희석시킨 Giemsa(BDH, Gurr R-66) 염색시약에 슬라이드를 30분간 염색하였다. 마우스 1개체 당 1000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 1000개의 다염성적혈구 중에서 소핵을 갖는 다염성적혈구의 출현빈도를 구하였다 (MacGregor *et al.*, 1987).

### 3) 통계학적 평가

소핵시험의 통계처리는 Hayashi 등의 3단계법(1994)을 따랐다. 첫 번째 단계는 본시험의 음성대조군과 양성대조군의 소핵 출현빈도가 기존의 historical background data의 범주 내에 있는지를 확인하였고, 두 번째 단계에서는 chi-square법에 의해 각 시험군을 음성대조군과 비교하여 유의성을 평가하였다(p<0.05). 세 번째 단계에서는 시험군의 용량에 따른 경향성을 평가하기 위한 Cochran-Armitage 경향검정을 이용하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 급성독성시험

수컷 ICR mouse를 이용한 DK1002의 1회 투여에 의

**Table 1.** Mortality of ICR male mice treated with DK1002

Route	Dosage (mg/kg)	No. of mice	Days after treatment														Mortality	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
p.o.	2000	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
i.p.	140	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	189	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	255.15	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7/10
	344.45	10	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9/10
	465	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10/10
i.v.	50	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	57.5	10	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7/10
	66.1	10	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8/10
	76.0	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10/10
	87.5	10	9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10/10
s.c.	1000	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/10
	1300	10	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6/10
	1600	10	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6/10
	2200	10	2	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9/10
	2900	10	2	7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10/10

p.o.: per os, i.p.: intraperitoneal, i.v.: intravenous, s.c.: subcutaneous.

한 경구, 복강, 정맥, 그리고 피하 경로에 따른 급성독성시험을 실시하였다. 우선은 Lorke방법(1983)에 따라 0% 치사율(LD<sub>0</sub>)과 100% 치사율(LD<sub>100</sub>)을 보이는 용량 범위를 구한 후, Litchfield and Wilcoxon 방법에 따라 급성독성 본 실험을 실시하였다. DK1002의 투여 후 14일 동안의 관찰 결과에 따른 각 투여 경로에 의한 치사율은 Table 1과 같았다. DK1002의 투여에 의한 사망 동물은 Table 1에서 볼 수 있듯이 대부분 투여 당일에서 사망하거나 3일 이내에 사망함을 볼 수 있었다. 각각의 결과를 바탕으로 Pharm-PCS의 Litchfield and Wilcoxon method에 따라 통계처리(95% 신뢰한계)를 하였다. 전체 투여군에 대한 50% 치사용량인 LD<sub>50</sub>(50% Lethal dose) 값과 95% 신뢰한계는 경구독성의 경우 2000 mg/kg 이상, 복강내 투여의 경우는 237.0 mg/kg(199.7~281.3 mg/kg), 정맥 내 주사의 경우는 57.5 mg/kg(52.5~62.9 mg/kg), 그리고 피하 주사의 경우는 1266.9 mg/kg(1035.1~1550.7 mg/kg)으로 계산되었다(Table 2).

각 시험군에서 실험동물의 DK1002의 투여에 의한 임상증상과 해부학적 조직의 육안 관찰시 특이한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. DK1002에 대한 급성독성시험 결과, 측정된 LD<sub>50</sub> 값으로 독성의 강도를 비교해 보면 정맥투여, 복강투여, 피하투여, 경구투여의 순

으로 독성이 강한 것으로 나타남을 알 수 있었다.

일반적으로 급성독성시험의 경우 사망예를 관찰할 수 없는 경우에는 최고 용량을 5000 mg/kg까지 투여 용량으로하여 시험을 실시하나 DK1002에 대한 경구 투여시 본실험의 경우 시험물질의 양적인 부족으로 인하여 최고 용량을 2000 mg/kg까지 투여하여도 사망예를 관찰할 수 없어 본 연구에서는 LD<sub>50</sub> 값을 적어도 2000 mg/kg 이상으로 산출하였다.

## 2. *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 복귀돌연변이 실험(Ames test)

DK1002에 대하여 *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, 그리고 TA 1537 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험인 Ames test를 대사활성계의 존재(+S9)와 부재하(-S9)에서 수행하였다.

시험 적용농도 설정을 위하여 *Salmonella typhimurium* TA 100에 대해 5000 µg/plate를 최고 용량으로 하여 공비 2로 저용량을 설정한 후 세포독성을 알아보기 위한 예비시험을 수행하였다. 예비시험 결과, 대사활성계의 존재와 부재하 모두, 370.0 µg/plate 이상의 농도에서는 DK1002의 *Salmonella typhimurium* TA 100 균주에 대한 세포독성으로 인하여 복귀돌연변이체인 bacteria colony를 관찰할 수 없었으며, 185.0 µg/plate 이하의 용량에서 복귀돌연변이체를 관찰할 수 있었다. 따라서, 세포독성시험의 결과 본시험의 DK1002에 대한 적정농도는 185.0 µg/plate을 최고 용량으로 하여 공비 3으로 5단계를 설정한 2.28~185.0 µg/plate로 결정하였다.

**Table 2.** LD<sub>50</sub> values and 95% confidence limits of DK1002 in ICR male mice

Route	LD <sub>50</sub> value (95% confidence limit) (mg/kg)
per os (p.o.)	>2000
intraperitoneal (i.p.)	237.0 (199.7~281.3)
intravenous (i.v.)	57.5 (52.5~62.9)
subcutaneous (s.c.)	1266.9 (1035.1~1550.7)

**Table 3.** *Salmonella typhimurium* reversion assay of DK1002

Compound	Dose (µg/plate)	S-9 mix	His <sup>+</sup> revertants/plate (Mean ± S.D.)			
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537
DMSO		-	13±6	119±8	15±5	29±5
DK1002	2.28	-	19±2	110±4	15±3	10±1
	6.85	-	23±4	113±6	19±3	16±7
	20.56	-	21±3	109±9	16±4	12±1
	61.67	-	19±9	115±1	13±1	17±7
	185.00	-	18±8	51±5	9±1	24±9
SA	1	-	-	510±102	427±117	-
2-NF	0.5	-	477±26	-	-	-
9-AA	40	-	-	-	-	640±16
DMSO		+	6±1	91±8	33±2	7±1
DK1002	2.28	+	6±2	87±6	31±16	6±2
	6.85	+	12±3	99±4	32±4	7±1
	20.56	+	11±1	82±3	31±8	6±1
	61.67	+	9±2	99±7	39±3	8±3
	185.00	+	7±2	96±4	38±10	6±3
2-AA	0.5	+	100±9	-	-	-
2-AA	1	+	-	446±38	-	-
2-AA	2	+	-	-	946±198	178±27

DMSO; Dimethyl sulfoxide, SA; Sodium azide, 2-NF; 2-Nitrofluorene, 9-AA; 9-Aminoacridine, 2-AA; 2-Aminoanthracene.

본시험의 결과를 Table 3에 나타내었다. 시험대상인 *Salmonella typhimurium*의 4균주들에 대한, 대사활성 존재와 부재하에서의 양성 대조군으로는 sodium azide, 2-nitrofluorene, 9-aminoacridine, 2-aminoanthracene 등이 사용되었다. 본시험 결과, *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, 그리고 TA 1537의 모든 균주에 대하여 본시험 적용 농도인 2.28~185.00 µg/plate의 범위에서 대사활성계의 존재와 부재 하 모두에서 용매 대조와 비교하여 유의성있는 복귀변이 집락수의 증가 및 농도 의존성을 보이지 않았다. 따라서 DK1002는 본 시험 조건하에서는 복귀돌연변이를 유발하지않는 것으로 나타났다.

### 3. 염색체 이상시험

DK1002에 대하여 Chinese hamster lung cell line을 이용한 *in vitro* 염색체 이상시험을 대사활성계의 존재 (+S9)와 부재하(-S9)에서 수행하였다. 본시험의 적용 농도 설정을 위한 예비세포독성 실험으로 MTT assay (Mosmann, 1983)를 수행하여, 최고농도로 적용되는 50% 세포성장저해농도(IC<sub>50</sub>)를 결정하였다. 그 결과 S9 mix 존재시는 185 µg/ml으로, S9 mix의 부재시는 83 µg/ml로 IC<sub>50</sub>가 결정되었다. 각각 결정된 IC<sub>50</sub>를 기준으로 공비2의 세농도를 설정하였다.

예비세포독성 시험 결과에 따라 대사활성계의 존재 하에서는 47, 93 그리고 185 µg/ml을, 대사활성계의 부재하에서는 21, 42 그리고 83 µg/ml을 시험적용 농도로 하여 본시험을 수행하였다.

본 시험에 있어서는 대사활성계의 존재와 부재하에서 DK1002의 6시간 처리 시험을 1차적으로 수행하였다. 6시간 처리 시험 결과에 대하여 Fisher's Exact Test with Dunnett's adjustment를 이용한 통계처리 결과, 모든 적용 농도에서 통계학적 유의성 및 용량 의존성을 보이지 않았다.

DK1002의 6시간 처리 시험이 음성의 결과를 나타내었으므로 대사활성 부재하에서의 24시간 연속 처리 시험을 추가적으로 수행하였다. 24시간 연속처리 시험 결과를 동일한 통계처리를 수행하였고, 모든 시험적용 농도에서 통계학적 유의성 및 용량 의존성을 보이지 않았다.

염색체 이상시험을 수행한 결과, DK1002는 본 실험

**Table 4.** Chromosome aberrations induced by DK1002 in Chinese hamster lung fibroblasts

µg/ml	hr.	S-9 Mix	Chromosome aberrations/200 cells										
			Chromatid Type		Chromosome Type		Total aberration (%)	Extra aberrations				nor	
			Br	Ex	Br	Ex		ctg	csg	poly	endo		
DMSO	-	6	+	2	1	0	0	1.5	2	0	0	0	195
CP	10	6	+	15	69	2	0	43	6	0	0	0	108
DK1002	185	6	+	6	1	0	0	3.5	2	1	0	0	190
	93	6	+	2	0	0	0	1	1	0	0	0	197
	47	6	+	2	2	0	0	2	3	0	0	0	193
DMSO	-	6	-	2	0	0	0	1	1	1	5	0	196
MMC	0.1	6	-	17	50	0	0	33.5	6	2	0	0	125
DK1002	83	6	-	2	2	0	0	2	3	0	0	0	193
	42	6	-	4	1	0	1	2.5	2	1	0	0	192
	21	6	-	3	1	0	0	1.5	2	0	0	0	195
DMSO	-	24	-	0	2	1	0	1.5	1	0	0	0	196
MMC	0.1	24	-	25	72	0	0	48.5	4	3	0	0	96
DK1002	83	24	-	5	1	0	0	3	2	0	0	0	192
	42	24	-	3	1	0	0	2	2	0	0	0	194
	21	24	-	2	2	0	0	2	2	0	0	0	194

Br: breakage, Ex: exchange, ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, poly: polyploid, endo: endoreduplicate, nor: normal, DMSO; dimethyl sulfoxide, MMC: mitomycin C, CP: cyclophosphamide.

조건하에서는 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 나타났다(Table 4).

#### 4. 소핵시험

수컷 ICR mouse에 대한 DK1002의 복강 급성독성시험을 수행한 결과, 50% 치사용량인 LD<sub>50</sub>는 237.0 mg/kg으로 결정되었다. 이 용량을 기준으로 수컷 ICR mouse에 대한 소핵시험을 수행하였다. 최고용량은 LD<sub>50</sub>의 1/2 용량인 119 mg/kg으로 하였으며, 공비 2로 60 mg/kg과 30 mg/kg의 용량을 설정하였다.

본 시험의 표본 제작 시간을 결정하기 위한 예비시험으로 DK1002의 최고 적용 용량인 119 mg/kg을 수컷 ICR 마우스에 대해 군당 6마리로 각각 1회 복강주사하여, 24시간과 48시간 경과 후 골수표본을 제작하였다. 24시간과 48시간에서의 소핵 유발능을 비교한 결과 두 군사이의 유의성있는 차이를 보이지않아 본 실험의 표본 제작시기를 24시간으로 결정하였다.

본 실험의 적용농도인 30, 60 그리고 119 mg/kg에 대하여 각각 6마리의 마우스에 DK1002를 1회 복강 주사한 후 24시간이 경과하였을 때 골수를 채취하여 표본을 제작하였다.

제작된 표본의 적혈구를 관찰한 결과, 골수내 미성숙 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비와 소핵을 지니는 다염성적혈구의 출현빈도를 Table 5에 나타내었다. 다염성적혈구 내의 소핵의 출현 빈도를 용매대조군에 대해 통계처리(유의수준 0.05)한 결과, 유의성있는 소핵 유발능을 보이지않았다.

위와 같은 연구 결과, 본시험의 조건하에서 DK1002는 소핵을 유발하지 않음을 알 수 있었다.

이상을 종합해 보면, 본 연구를 통하여, 합성 진통제의 신약 후보물질로 개발중인 DK1002에 대한 전임상시험으로서 급성독성과, Ames test, 염색체이상시험, 그리고 소핵시험의 유전독성시험을 수행한 결과, DK1002는 bacterial system, *in vitro* 염색체이상 시험과 *in vivo* 소

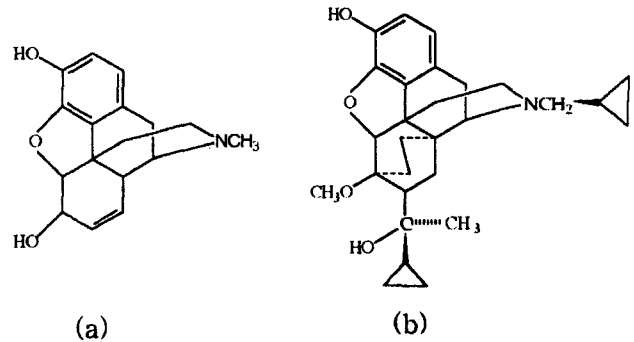


Fig. 1. The chemical structure of morphine (a), and DK1002 (b).

핵시험의 본연구의 조건하에서는 유전독성을 유도하지 않음을 알 수 있었다.

#### 참고문헌

- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F. D. (1973): Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2281-2285.
- David, J. (1989): Analysis of data from *in vitro* cytogenetic assays, Statistical evaluation of mutagenicity test data, Cambridge University press.
- Galloway, M.S., Sofuni, T., Shelby, M.D., Thilagar, A., Kumaroo, V., Kaur, P., Anderson, B., Zeiger, E. and Ishidate, M. Jr. (1997): Multilaboratory comparison of *in vitro* tests for chromosome aberration in CHO and CHL cells tested under the same protocols, *Environ. Mutagens & Carcinogens*, **29(2)**, 189-207.
- Hayashi, M., Hashimoto, S., Sakamoto, Y., Hamada, C., Sofuni, T. and Yoshimura, I. (1994): Statistical analysis of data in mutagenicity assays: Rodent micronucleus assay, *Environ. Health perspect. supp.* **102(1)**, 49-52.
- Kim, K.-R., Kim, H.-J., Jung, S.-O., Kim, K., Park, H.-S., Kim, Y.-H. and Ryu, J.-C. (1998): Acute and genetic toxicity study of DK1001, a drug candidate for analgesics, *J. Toxicol. Pub. Health*, **14(1)**, 111-118.
- Lorke, D. (1983): A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**, 275-287.
- Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949): A simplified method for evaluating dose-effect experiments, *J. Pharmacol Exp. Ther.* **96**, 99-113.
- MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R. and Wild, D. (1987): Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow

Table 5. Micronucleus assay of DK1002 with ICR male mice (i.p.)

Test compound	Dose (mg/kg)	No. of mice	Sampling time (hr)	MNPCE % (Mean±SD)	PCE/PCE+NCE (Mean±SD)
D.W.	*	5	24	0.20±0.08	0.484±0.031
MMC	1	5	24	2.70±0.57	0.443±0.047
DK1002	119	5	24	0.15±0.07	0.495±0.029
	119	5	48	0.15±0.10	0.556±0.051
	60	5	24	0.15±0.08	0.527±0.022
	30	5	24	0.14±0.05	0.529±0.056

MNPCE: Micronucleated Polychromatic Erythrocytes, PCE: Polychromatic Erythrocytes, NCE: Normochromatic Erythrocytes, PCE/PCE+NCE: Polychromatic Erythrocytes/1000 Erythrocytes, MMC: Mitomycin C.

- erythrocytes, *Mutation Res.*, **189**, 103-112.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, **113**, 173-215.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.
- OECD (1993a): "OECD guideline for the testing of chemicals, Documents 471, Genetic toxicology: *Salmonella typhimurium*, Reverse Mutation Assay". Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OECD (1993b): "OECD guideline for the testing of chemicals, Documents 473, Genetic toxicology: *in vitro* mammalian cytogenetic test". Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Ryu, J.-C., Lee, S., Kim, K.-R., Kim, M., Chang, I.-M. and Park, J. (1993a) :A study on the clastogenicity of trichothecene mycotoxins in chinese hamster lung cells. *Korean J. Toxicol.*, **9**, 13-21.
- Ryu, J.-C., Kim, S.-H., Kim, K.-R., Lee, S., Kim, M., Jung, H.-K. and Park, J. (1993b): A study on the antimutagenic effect of cinnamic acid derivatives in *Escherichia coli* PQ 37 (SOS Chromotest) (I). *Environ. Mutagens & Carcinogens*, **13**, 8-17.
- Ryu, J.-C., Lee, S., Kim, K.-R. and Park, J. (1994): Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (I). Chromosomal aberration test on chinese hamster lung cells *in vitro*. *Environ. Mutagens & Carcinogens*, **14**, 138-144.
- Ryu, J.-C., Kim, K.-R., Kim, H.-J., Ryu, E.-K., Lee, S.-Y., Jung, S.-O., Youn, J.-Y., Kim, M.-H. and Kwon, O.-S. (1996a): Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (II). a pyrethroid insecticide, fenpropathrin. *Arch. Pharm. Res.*, **19**, 251-257.
- Ryu, J.-C., Kim, K.-R., Ryu, E.-K., Kim, H.-J., Kwon, O.-S., Song, C.-E., Mar, W. and Chang, I.-M. (1996b): Chromosomal aberration assay of taxol and 10-deacetyl baccatin III in chinese hamster lung cells *in vitro*. *Environ. Mutagens & Carcinogens*, **16**, 6-12.
- Ryu, J.-C., Kim, H.-J., Seo, Y.-R. and Kim, K.-R. (1997): Single cell gel electrophoresis (comet assay) to detect DNA damage and apoptosis in cell level. *Environ. Mutagens & Carcinogens*, **17**, 71-77.
- Ryu, J.-C., Youn, J.-Y., Kim, Cho, K.-H. and Chang, I.-M. (1998): Transgenic mutagenesis assay to elucidate the mechanism of mutation in gene level. *Environ. Mutagens & Carcinogens*, **18**, 15-21.
- Tallarida, R. J., and Murray, R. B. (1987): Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs, Second Ed. with Program Disk, PHARM/PCS Ver. 4.1, Springer-Verlag, New York.
- Wasacz, J. (1981): Natural and synthetic narcotic drugs. *American Scientist* **69**, 318-324.
- Way, W.L., Way, E.L. (1987): Opioid analgesics and antagonists in *Basic and clinical pharmacology* (Katzung, B.G., 3rd Eds.), (Appleton & Lange, USA), pp. 336-349.
- 국립보건안전연구원(1994): 의약품 등의 독성시험 기준, 국립보건안전연구원 고시 94-3호.