

항당뇨물질 (R)-JG-381의 변이원성 시험

오우용 · 주상섭¹ · 박형근¹ · 함광수² · 조장섭² · 이선미*
성균관대학교 약학대학, ¹서울대학교 약학대학, ²(주)태평양제약 중앙연구소

Mutagenicity Study of (R)-JG-381, A New Antidiabetic Agent

Woo-Yong OH, Sang-sup JEW¹, Hyeung-geun PARK¹, Kwang-Su HAM², Jang-Sup CHO² and Sun-Mee LEE*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746,

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742,

²Central Research Institute, Pacific Pharmaceuticals Co., Ltd., Kunpo 435-040, Korea

(Received June 3, 2000; accepted July 30, 2000)

Abstract – (R)-JG-381, a R form of alkylglycidic acid derivative, was examined for mutagenicity in the reverse mutation test on bacteria, chromosomal aberration test on cultured mammalian cells and micronucleus test in mice. In the reverse mutation test on bacteria using *Salmonella typhimurium* strain TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 with or without a metabolic activation system (S9 mix), (R)-JG-381 did not affect the revertant colonies but significantly increased revertant colonies in one test strain, TA98, compared with the vehicle control. In the chromosomal aberration (CA) test using cultured Chinese Hamster Lung fibroblast(CHL) cells, the number of aberrant cells was not increased in the presence or absence of S9 mix at concentration of the (R)-JG-381 0.025 μ l/ml to 0.1 μ l/ml, compared with vehicle control. In the micronucleus (MN) test, micronucleated polychromatic erythrocytes in the (R)-JG-381-treated mice were not different from those of the vehicle-treated mice.

Key words □ (R)-JG-381, Antidiabetic, Mutagenicity, *Salmonella typhimurium* reversion, Chromosomal aberration, Micronucleus

당뇨병은 세계적인 평균 수명의 연장과 식생활의 변화로 그 발생빈도가 꾸준히 증가하고 있는 난치병 중의 하나이다. 당뇨병 치료제로는 인슐린이 가장 이상적이고 효능적이나 그 지속시간이 짧고 경구적으로는 작용을 나타내지 못하므로 주사제로 사용하여야 하는 단점이 있다. 현재까지 사용되고 있는 경구용 혈당강하제로는 설폰요소산계(sulphonylurea) 및 biguanid계 약물이 있다. 설폰요소산계 약물은 췌장섬의 베타세포에서 만들어진 인슐린의 분비를 촉진시켜 혈당강하작용을 나타내나, 간독성 및 저혈당을 야기한다(Karam 등, 1995; Davis와 Granmer, 1996). Biguanid계 약물도 역시 산증(lactic acidosis)을 유발하는 부작용을 가지고 있다(Assan 등, 1976). 따라서 이러한 부작용을 감소시킬 수 있는 다른 기전의 경구용 당뇨치료제 개발이 필요하게 되었다.

당뇨병은 생체내 주 에너지원인 당의 대사 장애가 주요 인이며 당은 생체내 또 다른 에너지원인 지방의 대사와 함께 조절된다. 지방은 지방산의 산화(fatty acid oxidation)를

통해 생체내 에너지원으로 이용된다. 최근 이 지방산의 산화를 억제하여 혈당을 조절할 수 있다는 것이 밝혀졌다(Collier 등, 1993). 한편 Ho 등(1986)은 글리시드산(alkylglycidic acid)유도체를 합성하였고 이들이 흰쥐의 혈당을 낮출 뿐 아니라 생체내 실험에서 지방산 산화를 현저히 억제하며 미토콘드리아 내 지방산 산화에 필요한 요소인 carnitine palmitoyl transferase(CPT) 활성을 억제함을 보고하였다. 즉 지방산 산화의 억제는 CPT활성을 억제함으로써 가능하며, 이는 CTP 억제제가 혈당을 저하시킬 수 있음을 의미한다(Martin 등, 1991). 이러한 기전의 경구용 혈당강하제로 개발이 시도된 대표적인 물질로는 etomoxir(ethyl 2-(6-(4-chlorophenoxy)hexyl)oxirane-2-carboxylate, Byk Gulden, Constance, Germany; Fig. 1)가 있으며(Ra-

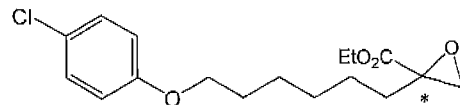


Fig. 1. Chemical structure of etomoxir (Byk Gulden, Constance, Germany). *Chiral center

*To whom correspondence should be addressed.

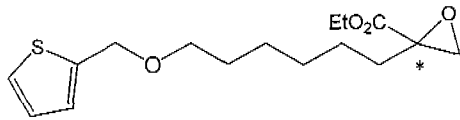


Fig. 2. Chemical structure of JG-381 (C₁₆H₂₄O₄S, M.W. 312). *Chiral center

theiser 등, 1991; Wolf, 1992) 이의 입체이성질체 중 R form이 혈당강하효과가 더 크다고 한다(Agius 등, 1991). 그러나 etomoxir의 경우 심장비대독성이 있는 것으로 확인되었고(Turcani와 Rupp, 1999), 이로 인해 임상과정 중 당뇨치료제로서의 개발이 중단되었다. 이러한 글리시드산계 화합물에 착안하여 이의 여러 유도체들을 합성하였고 그중 혈당강하작용이 있으며 심장비대독성을 나타내지 않는 JG-381(ethyl 2-[6-(2-thienylmethoxy)hexyl]oxirane-2-carboxylate)을 얻게 되었다(Fig. 2). 또한 최근에는 JG-381의 입체이성질체 중 R form을 선택적으로 합성하였고 이가 racemic form보다 우수한 혈당강하작용이 있음을 알아내어 현재 당뇨병치료제로서 개발 중에 있다. 따라서 본 연구실에서는 당뇨병치료제로 개발중인(R)-JG-381의 생체내 안전성을 확보하기 위하여 국립보건안전연구원, 의약품등의 독성시험기준(1994)(국립보건안전연구원 고시 제 94-3호) 및 식품의약품안전청, 의약품등의 독성시험기준(1998) (식품의약품안전청 고시 제 1998-116호)에 따라 변이원성유무를 확인함으로써 유전독성을 평가하고자 하였다.

실험방법

시험물질 및 시약

(R)-JG-381(Lot No. MK00303)은 서울대학교 약학대학 박형근 교수로부터 제공받았으며 약간 미황색을 띠는 투명한 oil상의 액체로서 냉장보관하여 시험에 사용하였다. 시험에 사용한 fetal bovine serum(FBS), Eagle's minimal essential medium(EMEM), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin 및 colcemid는 Gibco(Grand Island, NY, U.S.A.)로부터 구입하였으며 기타시약은 Sigma 사(St. Louis, MO, U.S.A.)시약과 일급시약을 사용하였다. 랫드 간장 S9 분획 및 S9 mix용 cofactor는 Oriental Yeast 사(Japan)에서 구입하여 사용하였다. S9 mix의 조제는 cofactor 용액과 S9 분획을 사용직전에 냉장상태에서 혼합하여 사용하였다.

세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험물질의 조제 및 시약

시험물질인 (R)-JG-381은 메탄올로 2배수 희석하여 평균당 5 µl로 처치하였다. 양성대조물질은 2-nitrofluorene, 9-aminoacridine, 2-aminofluorene, 2-aminoanthracene을 dime-

thylsulfoxide(DMSO)에 용해하여 사용하였으며, sodium azide, mitomycin C(MMC)는 멸균된 3차 증류수에 녹여 사용하였다.

시험균주

시험에는 histidine 영양 요구성의 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537의 5개 균주들을 사용하였다. 각 시험균주는 식품의약품안전청 유전독성과로부터 분양 받은 냉동균주를 해동하여 2.5% nutrient broth배지에 접종하여 차광된 배양기 내에서 37°C, 120 rpm의 조건으로 약 16시간 진탕 배양한 후 시험에 사용하였다.

시험용량설정

본시험의 용량설정을 위하여 예비 용량설정시험을 *Salmonella typhimurium* TA98을 이용하여 실시하였다. (R)-JG-381 5 µl/plate를 최고용량 2.5 µl/plate, 1.25 µl/plate, 0.63 µl/plate, 0.32 µl/plate 0.16 µl/plate까지 6개 용량으로 시험한 결과, 5 µl/plate 이하 모든 용량군에서 세포독성이나 침전물 형성이 나타나지 않았으므로 5 µl/plate 용량을 최고용량군으로 0.32 µl/plate까지 5개 용량군(0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 µg/plate)으로 본시험을 실시하였다.

시험방법

직접법 : 5개 용량별 시험물질용액 0.1 ml, 균배양액 0.1 ml 및 top agar 2 ml을 45°C로 예열한 멸균 tube에 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 혼합한 후 최소영양한천배지에 중층하였다. 음성대조군은 메탄올, DMSO 혹은 증류수(무처리대조군) 5 µl를, 양성대조군은 각각의 양성대조물질을 해당농도로 만들어 그 용액 5 µl를 시험물질 대신 가하여 동일한 방법으로 실시하였다. 중층한 연한천(top agar)이 굳은 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 출현한 복귀돌연변이 집락수를 계측하여 평균과 표준편차를 산출하였다. 본시험은 각 용량군당 3개의 plate를 사용하여 3회 실시하였다.

대사활성법 : 5개 시험물질용액 0.1 ml, S9 mix 0.5 ml, 균배양액 0.1 ml 및 top agar 2 ml을 45°C로 예열한 멸균 tube에 혼합하여 진탕시킨 후 최소영양한천배지에 중층하였다. 이후의 시험방법은 직접법과 동일하게 하였다.

결과의 판정

얻어진 시험결과의 판정은 관찰된 복귀돌연변이 집락수의 평균치가 음성대조군에 비하여 2배 이상이거나 용량의 존적으로 증가하는 경우에 복귀돌연변이원성이 있는 것으로 판정하였다.

포유류 배양세포를 이용한 체외 염색체이상시험

세포 및 배지

Chinese hamster에서 유래한 폐섬유모세포(CHL JCRB0030,

Koyama 등, 1970)를 식품의약품안전청 유전독성과에서 분양받아 계대배양하여 사용하였으며 액체질소에 보관한 세포를 해동하여 일주일 이상 배양 한 후 현미경으로 미생물 오염여부를 확인하고 실험에 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 Eagle MEM배양액(이하 기본배지)을 사용하였다. 세포는 포화수 증기와 이산화탄소 농도 5%를 유지하는 37°C 항온배양기 (NUAIRE IR Autoflow CO₂ Incubator, MN, U.S.A.)에서 세포배양용 플라스크를 사용하여 배양하였다.

시험물질의 조제 및 시약

(R)-JG-381은 tween80(Duksan Chemical Co.)을 용매로 하여 기본배지에 현탁하여 최고농도가 0.1 µl/ml이 되게끔 조제한 다음 기본배지로 2배수 희석하여 0.05 µl/ml 및 0.025 µl/ml을 조제하였다. 양성대조물질로는 직접법에서는 MMC를 멸균중류수로, 대사활성법에서는 benzo[a]pyrene을 해당농도가 되게끔 DMSO에 용해하여 기본배지로 희석하여 사용하였다.

시험용량설정

시험물질의 처리농도를 결정하기 위하여 S9 mix 부재하에 (R)-JG-381의 배양세포에 대한 50% 세포독성농도 (cytotoxicity(%))=[1-시험물질처리군 흡광도/용매처리군 흡광도]를 MTT assay(Mosmann, 1983)를 이용하여 구하였다.

시험방법

직접법 : 50% 세포독성농도인 0.1 µl/ml을 최고 농도로 하고 0.1, 0.05, 0.025 µl/ml의 3단계의 농도를 시험농도로 하였다. 음성대조군인 tween80의 처리는 시험약물의 최고농도에서 함유된 농도인 배지의 0.01%가 되도록 처리하였다. 60 mm petri dish(배양액 5 ml)에 1×10⁵개/ml의 CHL 세포를 파종하여 2일간 배양한 후 각각 시험물질과 양성대조물질인 MMC(0.1 µg/ml)를 함유하는 배양액으로 교환하여 6시간 배양한 후 새로운 기본배지로 교환하여 16시간 동안 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid을 0.2 µM이 되도록 처리하고 2시간동안 더 배양하여 총 배양시간이 24시간이 되게 하였다. 0.25% trypsin-1mM EDTA를 처리하여 수거한 세포현탁액을 37°C의 저장액 (0.075M KCl) 5 ml에 잘 현탁시켜 37°C 항온 수조에 20분간 방치하고, 고정액(Methanol : Acetic acid=3 : 1) 10방울을 가하여 잘 섞은 후 원심분리하여 상층액을 버리고 모은 세포에 고정액 5 ml을 가하여 원심분리하고 같은 방법으로 2회 더 고정시킨 후 고정액을 조금 남겨 세포부유액을 만들어 깨끗한 슬라이드에 도말하고 공기건조하여 슬라이드를 제작하였다. 5% Giemsa염색액으로 30분간 염색한 후 광학현미경(×1000)으로 검경하였다.

대사활성법 : CHL세포를 60 mm petri dish에 1×10⁵개/ml로 파종하여 2일간 배양한 후 각각 S9 mix(배양액의 20%)과 함께 시험물질 또는 양성대조물질인 benzo[a]pyrene

(0.02 mg/ml)을 함유하는 배양액으로 교환하여 6시간동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교환하여 18시간 배양하여 세포 수거 2시간 전에 colcemid을 0.2 µM이 되도록 처리한 후 세포를 수거, 표본 제작을 하였다. 시험물질 처리는 직접법에서와 동일하게 하였다.

결과의 판정 및 통계처리

3회 실시하여 각 petri dish당 제작된 검체에서 100개의 분열 중기상의 세포에서 염색체 이상을 가진 세포의 출현율을 구하였다. 이때 염색체 이상은 구조적이상(structural aberration; chromatid gap, chromatid break, chromatid exchange, chromosome gap, chromosome break, chromosome exchange)을 관찰하여 각 종류별로 그 수를 기록하였다. 구조적이상 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류를 각각 기록한다. 얻어진 시험결과는 평균과 표준편차를 산출하였으며 용매대조군과 시험물질처리군 및 음성대조군과 양성대조군과의 유의차는 χ^2 검정법을 이용하여 검정하였으며 염색체 이상세포의 출현 빈도가 통계적으로 유의성 있게 용량 의존성으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 판정하였다.

설치류 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험

시험물질의 조제 및 시약

(R)-JG-381은 0.5% carboxylmethylcellulose(CMC) 용액에 녹여 사용하였으며, 양성대조물질로 MMC를 멸균 중류수에 용해하여 사용하였다.

시험동물

시험에 사용된 동물은 6주령의 웅성 ICR 마우스로 60마리를 제일상사로부터 공급받아 1주일간의 순화사육을 거친 뒤 7주령의 동물을 사용하였다. 시험에 사용시 동물의 체중범위는 28.5~31.8 g이었다. 동물의 사육환경은 23.2±2°C, 습도 55±15%, 조도 150~300 Lux, 조명시간 12시간의 통상조건을 유지하였으며, 랫드용 폴리카보네이트 케이지에 6마리씩 수용하였고 사료(실험동물용 고형사료, 삼양사)와 물은 자유로이 섭취 시켰다.

시험방법

(R)-JG-381의 투여량은 단회투여의 시험결과를 바탕으로 1700 mg/kg을 최고용량군으로 하고 850 mg/kg 및 425 mg/kg의 3개 용량군으로 하였으며, 음성대조군은 0.5% CMC 투여군으로, 양성대조군은 MMC 2 mg/kg 투여군으로 설정하였다. 군당 12마리의 동물을 사용하였으며 10 mg/kg의 용량으로 시험물질은 경구투여 하였으며 양성대조물질인 MMC는 복강 내 단회 투여하였다. 표본제작시기는 예비시험결과 약물투여 6, 18, 24, 48시간 모두에서 유의성있는 소핵다염성적혈구의 출현시기가 인정되지 않아 일반적으로 많이 사용되는 시기인 약물투여 24시간 및 48시

간으로 결정하였다(Salmone 등, 1980). 표본의 제작은 약 물투여 24 및 48시간 후 각군의 반수의 동물을 경추탈구로 도살한 다음 대퇴골을 분리하여 양쪽 골단 모두를 절단하고 약 1 ml의 FBS로 골수를 분리하여 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 상층액을 버린 후 침전물을 고르게 현탁하여 슬라이드에 도말한 후 건조된 도말표본은 메탄올로 5분간 고정된 후 May-Grünwald-Giemsa 염색법(Gollapudi와 Kamra, 1979)으로 염색한 후 광학현미경($\times 800$, $\times 1000$)으로 검경하였다.

결과의 판정 및 통계처리

마우스 1마리당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고, 다시

1,000개의 PCE중에서 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated PCE, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 얻어진 시험결과는 평균과 표준편차를 산출하였으며 (R)-JG-381 및 MMC투여군의 소핵 다염성적혈구의 출현빈도에 대해서는 음성대조군과의 통계학적 유의성 및 다염성적혈구와 정염성적혈구의 출현빈도에 관한 유의성은 Student's *t*-test로 점정하였다.

실험결과

세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험물질 처리군(0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$), 무처리군, 음성대조군 및 양성대조군에 대하여 *Salmonella*

Table 1. Reverse mutation test of (R)-JG-381 using *Salmonella typhimurium*

Test compound	Dose	Revertants/plate ^a									
		TA 98		TA 100		TA 102		TA 1535		TA 1537	
		-S9 ^b	+S9 ^c	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Control ^d	5	18 ± 4	43 ± 7	154 ± 16	132 ± 10	197 ± 21	301 ± 21	9 ± 1	23 ± 1	7 ± 2	8 ± 3
DMSO ^e	5	18 ± 3	43 ± 6	142 ± 11	103 ± 20	185 ± 26	223 ± 8	10 ± 3	22 ± 9	7 ± 4	7 ± 3
(R)-JG-381 ^f	0.31	2525 ± 315	199 ± 31	155 ± 7	104 ± 19	280 ± 17	239 ± 20	9 ± 5	16 ± 1	8 ± 4	6 ± 3
	0.63	2771 ± 315	243 ± 38	171 ± 10	115 ± 12	277 ± 13	289 ± 22	9 ± 5	14 ± 2	8 ± 0	4 ± 1
	1.25	3143 ± 420	472 ± 56	172 ± 10	109 ± 26	288 ± 13	280 ± 6	15 ± 3	17 ± 3	9 ± 3	6 ± 2
	2.5	5322 ± 535	901 ± 51	180 ± 7	112 ± 10	300 ± 36	290 ± 24	18 ± 5	17 ± 4	10 ± 5	6 ± 3
	5.0	TL ^g	1267 ± 156	197 ± 10	100 ± 16	275 ± 44	310 ± 34	17 ± 8	16 ± 4	10 ± 3	6 ± 4
SA ^h	1			454 ± 61				169 ± 33			
2-AA ⁱ	2				499 ± 71				240 ± 50		102 ± 17
2-NF ^j	1	303 ± 87									
2-AF ^j	1		401 ± 71								
9-AA ^k	50									153 ± 13	
MMC ^l	1					435 ± 31	414 ± 75				

^aValues are the mean \pm S.D. of the data from 9 plates, ^bWithout metabolic activation system, ^cwith metabolic activation system, ^dNegative control($\mu\text{l}/\text{plate}$), ^eDimethylsulfoxide($\mu\text{l}/\text{plate}$), ^f(R)-JG-381($\mu\text{l}/\text{plate}$), ^gSodium azide($\mu\text{l}/\text{plate}$), ^h2-Aminoanthracene($\mu\text{l}/\text{plate}$), ⁱ2-Nitrofluorene($\mu\text{l}/\text{plate}$), ^j2-Aminofluorene($\mu\text{l}/\text{plate}$), ^k9-Amino-acridine($\mu\text{l}/\text{plate}$), ^lMitomycin C($\mu\text{l}/\text{plate}$), TL^g : thin layer

Table II. Chromosome aberration test of (R)-JG-381 in CHL cells without metabolic activation

Compounds	Dose ($\mu\text{l}/\text{ml}$)	TA ² (%)	No. of aberrations(%)						
			ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	
-	-	3 ± 0.0	3 ± 0.6	0 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
Tween 80	1	2 ± 0.6	2 ± 0.0	0 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
(R)-JG-381	0.025	4 ± 0.6	3 ± 0.6	1 ± 1.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	0.05	4 ± 1.0	3 ± 0.6	1 ± 0.0	0 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.6	0 ± 0.6	0 ± 0.0
	0.1	7 ± 1.0	3 ± 1.7	1 ± 0.0	1 ± 0.6	1 ± 0.6	1 ± 0.6	1 ± 0.6	0 ± 0.6
	MMC ³	0.1 ⁴	62 ± 10.1	15 ± 2.6	10 ± 5.1	24 ± 7.0	3 ± 1.5	6 ± 5.5	4 ± 3.6

The value is mean \pm S.D.

(R)-JG-381 treatment time: 6 hrs, expression time: 18 hrs

¹)Explanation of abbreviation: ctg, chromatid gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csg, chromosome gap; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange.

²)TA : Total number of aberrant cell in metaphases.

³)MMC : mytomycin C, ⁴) $\mu\text{g}/\text{ml}$

typhimurium TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 5종의 시험균주들을 사용하여 직접법과 대사활성법에 의해 실시한 (R)-JG-381에 대한 복귀돌연변이시험 결과를 Table I에 나타내었다. 직접법(-S9)과 대사활성법 모두에서 음성대조군은 자발복귀돌연변이 집락 수의 표준범위 내의 집락 수가 관찰되었으며 양성대조군에서는 음성대조군에 비해 2배 이상의 복귀돌연변이 집락 수가 관찰되었다. 직접법(-S9)에서 (R)-JG-381을 처리한 4군주(TA98, TA100, TA1535, TA1537)를 제외하고 TA98 한 균주에서만 음성대조군 복귀돌연변이 집락수에 비해 2배 이상의 복귀돌연변이 집락수 증가를 나타내었다. 대사활성화법(+S9)에 있어서도 (R)-JG-381을 처리한 TA98 한 균주에서만 용량의 존적으로 음성대조군 복귀돌연변이의 집락수에 비해 2배 이상의 복귀돌연변이 집락수 증가를 나타내었다.

포유류 배양세포를 이용한 체외 염색체이상 시험

직접법과 대사활성법에 의한 염색체이상시험의 결과는 Table II와 Table III에 나타내었다. 직접법에서의 염색체 이상 세포의 출현율은 MMC(0.1 µg/ml) 처리군에서 62%로 유의적인 증가를 보인 반면, 음성대조군과 무처리군에서는 5% 미만의 출현율을 보였다. 시험물질인 (R)-JG-381 처리군에서는 무처리군과 음성대조군에 비해 염색체 이상 세포의 출현율이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Table II). 대사활성법에 의한 염색체 이상시험에서는 염색체이상 세포의 출현율은 양성대조물질인 benzo[a]pyrene(20 µg/ml)의 경우 41%로 유의적인 증가를 보였고 무처리군과 음성대조군에서도 S9 mix에 의한 대사활성화의 유무에 관계없이 5% 미만의 출현율을 나타내었으며, 시험물질인 (R)-JG-381 처리군에서 무처리군과 음성대조군에 비해 염색체 이상 세포의 출현율이 증가하는 경

Table IV. Micronucleus test of (R)-JG-381 in mice

Test Compound	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	MNPCE/1000PCE ¹⁾	NCE/PCE ²⁾ ratio
Vehicle		24	1.17 ± 0.94	1.14 ± 0.07
MMC	2	24	8.67 ± 1.61***	1.56 ± 0.12***
(R)-JG-381	425	24	1.20 ± 0.63	1.13 ± 0.04
	850	24	1.13 ± 0.64	1.13 ± 0.05
	1700	24	1.27 ± 0.65	1.13 ± 0.05
Vehicle		48	1.08 ± 0.79	1.14 ± 0.05
MMC	2	48	26.09 ± 4.41***	1.86 ± 0.10***
(R)-JG-381	425	48	1.11 ± 0.60	1.11 ± 0.05
	850	48	1.17 ± 0.58	1.12 ± 0.05
	1700	48	1.20 ± 0.63	1.13 ± 0.06

The values are mean±S.D.

The vehicle is 0.5% CMC.

¹⁾The number of polychromatocytes with micronuclei from 1000 polychromatic erythrocytes (mean±S.D.).

²⁾The ratio of normochromatic erythrocytes to polychromatic erythrocytes (mean±S.D.).

*=p<0.05, **=p<0.01 : Significantly different from vehicle control group.

향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Table III).

설치류 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험

소핵시험결과는 Table IV에 나타내었다. 설치류 조혈세포를 이용한 소핵시험 결과, 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도는 양성대조군인 MMC 투여군에서 약물투여 24시간, 48시간 후 모두 음성대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 증가하였다. 또한 다염성적혈구에 대한 정염성적혈구의 비(NCE/PCE)에 있어서도 음성대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 증가하였다. (R)-JG-381 투여군에서는 약물투여 24시간, 48시간 후 모두에서 소핵을 가진 다염성

Table III. Chromosome aberration test of (R)-JG-381 in CHL cells with metabolic activation

Compounds	S9 mix	Dose (µl/ml)	TA ²⁾ (%)	No. of aberrations(%)					
				ctg	ctb	cte	csg	csb	cse
-	-	-	3 ± 0.6	2 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0
-	+	-	2 ± 1.0	1 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0	1 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0
Tween 80	+	1	1 ± 0.6	1 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0
(R)-JG-381	+	0.025	4 ± 0.6	2 ± 0.0	2 ± 0.6	1 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	+	0.05	5 ± 2.3	3 ± 1.5	1 ± 0.6	1 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	+	0.1	4 ± 0.6	2 ± 0.0	0 ± 0.6	1 ± 1.0	1 ± 0.6	0 ± 0.6	0 ± 0.0
	+	20 ⁴⁾	41 ± 0.0	16 ± 6.7	5 ± 0.6	18 ± 7.5	2 ± 1.7	0 ± 0.6	1 ± 1.2
DMSO ⁵⁾	+	1	2 ± 0.6	2 ± 0.6	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0

The value is mean±S.D.

(R)-JG-381 treatment time: 6 hr, expression time: 18 hrs.

¹⁾Explanation of abbreviation: ctg, chromatid gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csg, chromosome gap; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange.

²⁾TA : Total number of aberrant cell in metaphases.

³⁾B[a]P : benzo[a]pyrene, ⁴⁾µg/ml, ⁵⁾DMSO : dimethylsulfoxide.

적혈구의 출현빈도와 다염성적혈구에 대한 정염성적혈구의 비(NCE/PCE)에 있어서도 음성대조군과 유의성 있는 차이가 없었다.

고 찰

화학물질을 단기간에 손쉽게 검색할 수 있는 유전독성시험법의 개발되어 왔으며 생체의 시험인 Ames 등(1975)이 개발한 복귀돌연변이시험 이래로 Maron와 Ames(1983)이 개발한 복귀돌연변이시험이 널리 이용되고 있다. 또한 화학물질의 염색체 돌연변이시험에는 배양세포를 이용하는 방법과 생체세포를 이용하는 여러 가지 방법이 있으나, 이 중에서 Chinese hamster lung fibroblast(CHL)세포를 이용하는 생체의 시험(朝倉邦造, 1988)과 설치류를 이용하는 소핵시험이 국제적으로 널리 이용하고 있는 대표적인 유전독성시험 평가방법이다. CHL 세포를 이용한 염색체이상시험은 화학물질이 염색체에 작용하여 구조적 또는 숫적 이상을 초래하는 것을 검색할 수 있는 방법이다. 한편 소핵시험은 화학물질이 조혈세포의 세포분열과정에 이상을 초래하여 세포질 내 작은 핵모양의 구조물의 발생(Heddle 등, 1983)을 검사하는 방법, 즉 소핵다염성적혈구의 출현빈도를 검사하여 화학물질의 세포유전학적손상을 간접적으로 측정하는 방법으로 Schmid(1975)이 마우스 모델을 이용한 이래 염색체돌연변이를 검사하는 방법으로 널리 이용되어 오고있다.

본 시험물질인 (R)-JG-381은 경구용 혈당강하제 후보물질로서 현재까지 본 연구실에서 연구한 결과에 따르면 etomoxir의 대표적인 부작용인 심장독성(Turcani와 Rupp, 1999)을 경감시키고 항당뇨효과 또한 우수한 물질이다. 본 연구에서는 (R)-JG-381의 변이원성유무를 확인하기 위하여 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험 및 소핵시험을 실시한 결과 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험의 직접법 및 대사활성법 모두에서 (R)-JG-381을 처리시 TA98 균주를 제외한 4종의 균주(TA100, TA102, TA1535, TA1537)에서는 변이원성이 관찰되지 않았다. CHL 세포를 이용한 염색체 이상시험에서도 (R)-JG-381은 직접법 및 대사활성법 모두에서 무처리군과 음성대조군에 비해 염색체 이상 세포의 출현율이 증가하는 경향만을 나타내었을 뿐 통계적 유의성은 없었다. 설치류 조혈세포를 이용한 소핵시험에 있어서는 (R)-JG-381의 경구투여시 모든 용량군에서 소핵의 출현빈도가 음성대조군에 비해 차이가 없었으므로 (R)-JG-381은 설치류 골수세포에 작용하여 염색체 이상 유발에 영향을 주지 못하는 것으로 사료된다.

이상의 시험 결과를 종합해 볼 때, 경구용 혈당강하제로 개발중인 (R)-JG-381은 세균에 대한 일부 염색체 돌연변이 원성이 관찰되었으나, 포유류 세포를 이용한 염색체이상 및

소핵시험에서의 유전독성에는 영향이 없는 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 1999년도 보건의료기술연구개발사업(HMP-98-D-7-0018)의 지원에 의해 수행되었으며, 본 시험을 수행하는데 기술적인 도움을 주신 식품의약품 안전청 한의식 연구관님께도 감사를 드립니다.

참고문헌

Agius, L., Meredith, E. J. and Sherratt, H. S. (1991). Stereospecificity of the inhibition by etomoxir of fatty acid and cholesterol synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **9**, 1717-1720.

Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens & Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutat. Res.* **32**, 347-364.

Assan, R., Heuclin, C., Girard, J. R. and Attali, J. R. (1976). Lactic acidosis induced by biguanides. *Nouv. Presse. Med.* **31**, 247-249.

Collier, G. R., Traianedes, K., Macaulay, S. L. and O'Dea, K. (1993). Effect of fatty acid oxidation inhibition on glucose metabolism in diabetic rats. *Horm. Metab. Res.* **25**, 9-12.

Davis, S. N. and Granmer, D. K. (1996). Insulin and oral Hypoglycemic Dugs; Glucagon. In *The Pharmacology Basis of Therapeutics* (Hardman, J. G. et al, Ed.), pp. 1487-1517. McGraw-Hill, New York.

Gollapudi, B. and Kamra, O. P. (1979). Application of a simple giemsa-staining method in the micronucleus test. *Mutat. Res.* **64**, 45-46.

Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourmin, K., MacGregor, J. T., Newell G. W. and Salamone, M. F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* **123**, 61-118.

Ho, W., Tutwiler, G. F., Cottrell, S. C., Morgans, D. J., Tarhan, O. and Mohrbacher, R. J. (1986). Alkylglycidic acids: potential new hypoglycemic agents. *J. Med. Chem.* **29**, 2184-2190.

Karam, J. (1995). Pancreatic Hormones &-Antidiabetic Drugs. In *Basic and Clinical Pharmacology* (Katzung, B. G., Ed.), pp. 637-654. Appleton & Lange, Connecticut.

Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T. (1970). A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann.* **61**, 161-167.

Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.

Martin, C., Odeon, M., Cohen, R. and Beylot, M. (1991). Mechanisms of the glucose lowering effect of a carnitine palmitoyl transferase inhibitor in normal and diabetic rats. *Metabolism.* **40**, 420-427.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular

- growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55-63.
- Ratheiser, K., Schneeweiss, B., Waldhausl, W., Fasching, P., Korn, A., Nowotny, P., Rohac, M. and Wolf, H. P. (1991). Inhibition by etomoxir of carnitine palmitoyltransferase I reduces hepatic glucose production and plasma lipids in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* **40**, 1185-1190.
- Salamone, M. F., Heddle, J. A., Stuart, E. and Katz, M. (1980). Towards an improved micronucleus test : Studies on three model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat. Res.* **74**, 347-356.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.* **31**, 9-15.
- Turcani, M. and Rupp, H. (1999). Modification of left ventricular hypertrophy by chronic etomoxir treatment. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 501-507.
- Wolf, H. P. (1992). Possible new therapeutic approach in diabetes mellitus by inhibition of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). *Horm. Metab. Res. Suppl.* **26**, 62-67.
- 국립보건안전연구원(1994). 의약품등의 독성시험기준(국립보건안전연구원 고시 제 94-3호).
- 식품의약품안전청(1998). 의약품등의 독성시험기준(식품의약품안전청 고시 제 1998-116호).
- 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編(JEMS・MSS分科會編). 朝倉書店, 東京, 日本.