

CJ-50005 (A형 간염백신)에 대한 유전독성시험

김종호* · 이은영 · 김달현 · 김현석

제일제당 종합기술원 제약연구소

Mutagenicity Tests on CJ-50005 (Hepatitis A Vaccine)

Jong-Ho Kim*, Eun-Young Lee, Dal-Hyun Kim and Hyun-Seok Kim

R&D Center of Pharmaceuticals, Institute of Science & Technology, Cheil Jedang Corp.

(Received August 12, 2001)

(Accepted September 10, 2001)

ABSTRACT: CJ-50005 is an inactivated whole virus vaccine derived from hepatitis A virus (HM175) grown in human MRC-5 diploid fibroblasts cell culture. In order to evaluate the mutagenic potential of CJ-50005, 3 sets of mutagenicity tests were performed. In the reverse mutation test using *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 and TA102, CJ-50005 did not increase the number of revertants at any concentration tested in this study (2.8, 1.4, 0.7, 0.35 and 0.175 µg/plate). CJ-50005, at concentrations of 2.8, 1.4 and 0.7 µg/ml, did not increase the number of cells having structural or numerical chromosome aberration in cytogenetic test using Chinese Hamster Lung cells. In mouse micronucleus test, no significant increase in the occurrence of micronucleated polychromatic erythrocytes was observed in ICR male and female mice intraperitoneally administered with CJ-50005 at the doses of 25, 12.5 and 6.25 µg/kg. These results indicate that CJ-50005 has no mutagenic potential in these *in vitro* and *in vivo* systems.

Key Words: Reverse mutation, Chromosome aberration, Micronucleus, Hepatitis A virus, CJ-50005

I. 서 론

A형 간염은 A형 간염 바이러스(Hepatitis A virus, HAV)에 의해 오염된 물이나 음식, 또는 사람과 사람 사이에 fecal-oral route로 전염되는 수인성 질환으로 식욕부진, 구역질, 구토, 피로, 무력감, 두통, 관절통, 근육통, 설사, 미열, 황달과 같은 증상을 나타낸다(Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 1996). A형 간염은 28일(15~50일)의 비교적 긴 잠복기를 가지며(Krugman *et al.*, 1970) 증상이 나타나지 않기도 하지만, 지연성 간염, 재발성 간염, 담즙 정체성 간염, 전격성 간염 등의 합병증을 유발하기도 하며 그 치사율은 0.1~2.1%에 이른다. 미국의 경우 매년 발생하는 급성간염의 30%가 HAV에 의한 것으로 보고되고 있다(Alter *et al.*, 1990). 우리나라의 경우 경제성장과 함께 생활환경이 개선되어 A형 간염이 급격히 줄고 있어 현재 20세 이하의 사람 중 90% 이상이 A형 간염에 대한 항체가 없다. 그런데 A형 간염의

증상은 연령에 따라 차이가 있어 어린 시기에 걸리면 가벼운 장염처럼 앓고 지나가지만(Hadler *et al.*, 1980), 성인에서는 대부분의 감염자에게 여러 가지 합병증이 생겨 문제가 커진다(Lender *et al.*, 1985). 따라서 요즘에는 A형 간염 예방접종이 권해지고 있으며 현재 HAVRIX(Inactivated vaccine; Smithkline Beecham Biologicals)와 VAQTA(Inactivated vaccine; Merck & Co., Inc.)가 판매되고 있다.

제일제당(주) 종합기술원에서는 이러한 A형 간염 바이러스의 감염에 의한 급성간염을 예방할 수 있는 효과적인 백신을 국산화하기 위하여, HAV HM175 균주를 미국의 FDA에서도 그 안전성을 인정한 사람 이배체 세포인 MRC-5 세포에서 배양, 정제한 후 포르말린으로 불활화하여 높은 면역원성과 안전성을 갖는 CJ-50005를 개발하였다. 본고에서는 CJ-50005에 대한 안전성시험의 일환으로서 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험, 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 마우스에서의 소핵시험 등의 유전독성시험을 “의약품등의 독성시험 기준”(식품의약품안전청, 1998)에 따라 실시하였다.

*To whom correspondence should be addressed

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험에 사용한 CJ-50005(Lot No. CJHAV-9809)은 제일 제당(주) 종합기술원에서 간염바이러스인 HM175 균주를 MRC-5 세포에서 배양한 후 포르말린으로 약독화하여 생산하였다. 제조된 백신을 PBS에 용해하여 사용하였다.

2. 시약

양성대조물질인 sodium azide(SAZ), 9-aminoacridine hydrochloride(9-AA), mitomycin C(MMC), benzo[a]pyrene(B[a]P) 등은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서, 2-nitrofluorene(2-NF)은 Aldrich Chemical(Milwaukee, WI, USA)에서, 2-aminoanthracene(2-AA)은 Wako Pure Chemical(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

Aroclor 1254는 Supelco(Bellefonte, PA, USA)에서, nutrient broth No. 2는 Oxoid(Basingstoke, Hants., UK)에서, fetal bovine serum 및 colcemid는 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)에서 각각 구입하였다.

3. S-9 mix의 조제

Maron과 Ames(Maron *et al.*, 1983)의 방법에 따라 S9 분획을 얻었다. 체중 약 200 g의 Sprague-Dawley rat에 Aroclor 1254를 500 mg/kg 용량으로 복강내 투여하였다. 투여 5일째에 간을 적출하여 3배 volume의 0.15 M KCl 용액을 넣고 균질화하였다. 원심분리(9,000 g, 10분)한 후 상청액을 취하여 S9 분획을 얻었다. S9 mix의 조성은 다음과 같다 : 10%(v/v) S9, 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glucose-6-phosphate, 4 mM NADP, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4). 단, 염색체이상시험에서는 S9 농도를 30%로 하였다.

4. 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험

Salmonella typhimurium 5 균주(TA1535, TA1537, TA98, TA100, TA102)를 이용하여 Maron과 Ames(Maron *et al.*, 1983)의 방법에 따라 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. CJ-50005의 예상임상용량(0.7 µg/0.5 ml/human)을 고려하여 미생물에 적용할 수 있는 충분히 높은 농도로 농축하여 예비독성시험을 실시한 결과 최대농도인 2.8 µg/plate에서도 *Salmonella typhimurium* TA100의 복귀돌연변이 집락수의 증가 혹은 감소를 보이지 않았으므로, 2.8 µg/plate를 본 시험에서의 최고농도로 설정하였다.

28, 14, 7, 3.5 및 1.75 µg/ml의 시험물질 용액 0.1 ml, 10시간 배양한 시험균 0.1 ml, S9 mix 혹은 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 ml을 37°C에서 20분간 반응시켰다. 여기에 top agar 2 ml을 혼합하여 minimal glucose agar plate에 증층하여 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 집락의 수를 계측하였다. 복귀돌연변이 집락의 수는 plate 3매의 평균치로 나타내었으며, 음성대조군과 비교하여 복귀돌연변이 집락수가 2배 이상을 보이거나 용량상관성이 있는 경우에 양성으로 판정하였다.

5. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

Chinese Hamster Lung(CHL) cell을 이용하여 Dean과 Danford(Dean *et al.*, 1983)의 방법에 따라 in vitro 염색체 이상시험을 실시하였다. 세포는 10% fetal bovine serum이 포함된 Eagle's minimal essential medium(EMEM)을 이용하여 배양(5% CO₂, 포화상태, 37°C)하였다. CJ-50005의 예상임상용량(0.7 µg/0.5 ml/human)을 고려하여 CHL에 적용할 수 있는 충분히 높은 농도로 예비세포독성시험을 실시한 결과 최고농도인 5 µg/ml을 48시간까지 처리하여도 세포성장을 저해하지 않아, 이를 본 시험에서의 최고농도로 설정하였다.

6시간 및 24시간 약물처리를 위해서는 5×10⁴ cells/ml, 48시간 약물처리를 위해서는 1.5×10⁴ cells/ml의 CHL cell 부유액을 직경 10 cm plate에 10 ml씩 각각 분주하였다. 24시간 동안 배양한 후, CJ-50005를 최종농도가 2.8, 1.4 및 0.7 µg/ml 되게끔 세포배양액에 첨가하였다. 대사활성화법의 경우에는 약물과 함께 S9 mix를 처리하고 6시간 후에 신선한 배지로 교환하였다. 직접법 및 대사활성화법 각각 약물처리 개시부터 22시간 혹은 46시간 후에 colcemid를 0.25 µg/ml되게 첨가하고 2시간 더 배양하였다. 0.25% trypsin 처리 및 원심분리(1000 rpm, 5 min)에 의해 cell을 회수한 후, 0.075 M KCl 용액에 현탁하여 상온에서 15분 동안 방치하였다. 미리 냉각된 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1, v/v)으로 현탁 및 원심분리를 3회 반복하여 세포를 완전히 고정시켰다. 최종 원심분리 후 세포를 적당한 농도가 되도록 고정액에 현탁하고, 깨끗한 slide glass에 떨어뜨려 자연건조하였다. 10% Giemsa(in PBS, pH 7.4)에 15분 염색하고 물로 씻어낸 후 건조하였다.

각 농도당 100개의 잘 퍼진 중기염색체를 1,000배의 배율로 검경하여 이상염색체의 출현 여부를 관찰하였다. 구조적 이상은 gap(chromatid and chromosome gap), ctb(chromatid break), cte(chromatid exchange), csb(chromosome break), cse(chromosome exchange)으로 구분하여 그 수를 기록하였다. 숫적이상에 대해서는 4배수체 이상만을 기록하였다. 염색체 이상이 있는 세포의 출현빈도에 대

하여 5% 미만은 음성, 5~10%는 의양성, 그리고 10% 이상은 양성으로 판단하였다.

6. 마우스에서의 소핵시험

SPF ICR 음성 및 자성 마우스를 Charles River Japan (Atsugi, Japan)에서 구입하여 1주일 이상의 검역 기간을 거친 후 7주령이 되었을 때 발육이 정상이고 건강한 동물만을 시험에 사용하였으며, Schmid(Schmid, 1975)의 방법에 의해 시험을 수행하였다. 단회투여독성시험의 결과 rat 및 beagle dog에서 예상임상용량의 1000배를 투여하여도 폐사동물 및 독성징후가 나타나지 않아, 예비시험에서 최고농도로 예상임상용량의 1000배를 선택하였다. 표본제작 시기를 결정하기 위한 예비시험에서 예상임상용량의 약 1,000배인 25 µg/kg을 복강내 투여하였을 때 24, 48 및 72 시간째에서 소핵의 출현이 증가하지 않았으므로, 25 µg/kg을 본 시험에서의 최고농도로 설정하고 24시간째를 소핵 관찰시기로 결정하였다.

CJ-50005를 2.5, 1.25 및 0.625 µg/kg의 3용량으로 단회 복강내 투여하였다(10 ml/kg). 약물 투여후 24시간째에 마우스를 경추탈구에 의하여 도살하여 대퇴골을 분리하였다. 대퇴골 내부를 fetal bovine serum으로 씻어내어 골수 세포 현탁액을 얻었고, 원심분리(microcentrifuge, 1000 rpm, 5 min)하여 상청액을 버렸다. 최종 현탁액의 적당량을 slide glass에 도말하여 실온에서 하루동안 건조하였다. 메탄올에 5분간 고정된 후, 4% Giemsa 용액(in PBS, pH

6.8)에서 25분 동안 염색하였다. 염색액을 흐르는 물로 씻어내고 0.004% citric acid 용액에 잠깐 담그었다 꺼낸 후 다시 물로 씻어 자연건조하였다.

현미경으로 관찰하여 2,000개의 다염성적혈구(PCE, polychromatic erythrocyte)중 MNPCE(micronucleated PCE)의 비율 및 1000개의 적혈구 중 PCE의 비율을 결정하였다. MNPCE 값은 Dunnett t-test에 의하여, PCE의 비율은 Student's t-test에 의하여 음성대조군과의 통계적 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 토의

Salmonella typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100 및 TA102를 이용하여 수행한 복귀돌연변이시험 결과를 Table 1에 표시하였다. CJ-50005는 2.8, 1.4, 0.7, 0.35 및 0.175 µg/plate의 모든 농도에서 대사활성화 여부에 관계없이 복귀돌연변이 colony의 증가를 일으키지 않았다. 반면, 양성대조물질들은 각 시험군주에 대하여 복귀돌연변이 colony를 증가시켰다.

CHL 세포를 이용한 *in vitro* 염색체이상시험 결과는 Table 2에 나타냈다. 대사활성화시, CJ-50005는 2.8, 1.4 및 0.7 µg/ml의 모든 용량에서 이상염색체를 지닌 세포의 출현빈도가 1% 이하로서 그 빈도가 무처리군에 비하여 증가하지 않았으며, 양성대조물질인 benzo[a]pyrene는 17% 이상의 빈도를 나타냈다. 직접법에서도 CJ-50005는 24시간 및 48시간 모두에서 이상염색체를 지닌 세포의 출

Table 1. Reverse mutation test of CJ-50005 in *S. typhimurium*

Compound ^a	Dose (µg/plate)	S9 Mix	No. of revertant colonies per plate (Mean±S.D.)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	TA102
Vehicle	-	17±2	11±2	16±2	105±8	109±7	
	2.8	-	17±3	12±3	15±5	104±7	114±14
	1.4	-	14±4	10±1	16±2	104±8	114±11
CJ-50005	0.7	-	17±4	10±2	19±4	100±5	110±2
	0.35	-	17±4	10±4	13±5	108±3	123±20
	0.175	-	16±2	14±8	18±1	104±8	108±6
SAZ	0.5	-	149±14	NT	NT	351±41	NT
9-AA	50	-	NT ^b	411±38	NT	NT	NT
2-NF	1	-	NT	NT	195±9	NT	NT
MMC	0.5	-	NT	NT	NT	NT	445±5
Vehicle		+	21±2	14±3	24±6	110±6	285±4
	2.8	+	20±2	17±4	23±5	114±4	252±25
	1.4	+	19±4	15±3	21±3	119±6	247±17
CJ-50005	0.7	+	19±3	18±5	21±5	116±1	272±13
	0.35	+	21±2	15±3	21±1	1116±9	285±4
	0.175	+	21±4	11±4	20±4	117±3	245±9
2-AA	0.5	+	NT	NT	231±5	NT	NT
	1	+	NT	NT	NT	436±18	NT
	2	+	184±11	156±15	NT	NT	637±16

^aSAZ, sodium azide; 9-AA, 9-aminoacridine hydrochloride; 2-NF, 2-nitrofluorene; MMC, mitomycin-c; 2-AA, 2-aminoanthracene.

^bNT: not tested.

Table 2. Chromosome aberration test of CJ-50005 in CHL cell

Compound ^a	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	S9 mix	Time (hr) ^b	No. of metaphases analyzed	No. of aberrations ^c						Aberrant cells (%) ^d		
					gap	ctb	cte	csb	cse	num	TA(+g)	TA(-g)	
CJ-50005	0	+	6~18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.7			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.4			100	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	2.8			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B[a]P	20			100	1	6	16	0	0	0	18	17	
CJ-50005	0	-	6~18	100	1	0	1	0	0	0	2	1	0
	0.7			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.4			100	0	0	1	0	0	0	1	1	0
	2.8			100	0	1	0	0	0	0	1	1	0
CJ-50005	0	-	24~0	100	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	0.7			100	0	0	1	0	0	0	1	1	0
	1.4			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.8			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC	0.2			100	3	8	24	0	0	0	23	20	
CJ-50005	0	-	48~0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.7			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.4			100	0	0	1	0	0	0	1	1	0
	2.8			100	1	0	0	0	0	0	1	0	0

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

^bTreatment time - Expression time.

^cgap, chromatid and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; num, numerical aberration.

^dTA(+g), total structural aberration including gap; TA(-g), total structural aberration excluding gap.

Table 3. Micronucleus test of CJ-50005 in mice

Compound	Route	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Sex	No. of animal	MNPCE ^a (%o, Mean \pm SD)	PCE/(PCE+NCE) ^b (%o, Mean \pm SD)
Vehicle ^c	i.p.	0	♂	5	0.30 \pm 0.45	57.6 \pm 8.8
CJ-50005	i.p.	6.25	♂	5	0.20 \pm 0.45	63.1 \pm 8.7
	i.p.	12.5	♂	5	0.10 \pm 0.22	60.6 \pm 7.7
	i.p.	25	♂	5	0.20 \pm 0.27	57.9 \pm 2.5
	i.p.	2000	♂	5	22.1 \pm 12.5*	49.4 \pm 7.8
Vehicle ^c	i.p.	0	♀	5	0.20 \pm 0.45	61.3 \pm 5.0
CJ-50005	i.p.	6.25	♀	5	0.20 \pm 0.27	63.6 \pm 4.8
	i.p.	12.5	♀	5	0.40 \pm 0.65	63.3 \pm 10.4
	i.p.	25	♀	5	0.50 \pm 0.87	63.8 \pm 6.0
	i.p.	2000	♀	5	28.5 \pm 8.3**	53.5 \pm 5.1*
Vehicle ^c	i.p.	0	♂, ♀	10	0.25 \pm 0.42	59.0 \pm 7.3
CJ-50005	i.p.	6.25	♂, ♀	10	0.20 \pm 0.35	62.7 \pm 6.7
	i.p.	12.5	♂, ♀	10	0.25 \pm 0.49	61.6 \pm 9.1
	i.p.	25	♂, ♀	10	0.35 \pm 0.63	59.4 \pm 2.6
	i.p.	2000	♂, ♀	10	24.8 \pm 10.7**	50.8 \pm 6.6*

^aThe permillage (%o) of micronucleated polychromatic erythrocyte (PCE) was calculated from 2000 PCEs per animal.

^bThe percentage of PCE was calculated from 1000 erythrocytes per animal.

^cVehicle (PBS).

*P < 0.05, **P < 0.01 (Significantly different from vehicle control, Dunnett's *t*-test).

*P < 0.05 (Significantly different from vehicle control, Student's *t*-test).

현빈도가 2% 이하였으며, 양성대조물질인 mitomycin C는 20% 이상의 빈도를 나타냈다.

마우스를 이용한 소핵시험에서, CJ-50005는 음성대조군과 비교하여 소핵을 지닌 다염성적혈구(MNPCE)의 유의한 증가를 가져오지 않았으며, 적혈구중 PCE의 비율에 있어서도 유의한 증가 혹은 감소가 관찰되지 않았다(Table

3). 반면, 양성대조물질인 mitomycin C 투여군에서는 MNPCE가 유의하게 증가($p < 0.01$)하였고, PCE의 비율이 유의성 있는 감소($p < 0.05$)를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, CJ-50005는 *in vitro* 시험인 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험 및 배양세포를 이용한 염색체이상시험, *in vivo* 시험인 마우스를 이용한

소해시험에서 변이유발성을 나타내지 않아, 실제 임상에서 사용되어도 안전한 물질로 판단된다.

참고문헌

- Alter, M.J., Hadler, S.C. and Judson, F.N. (1990): Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the united states and association with hepatitis C. *JAMA*, **264**, 2231-2235.
- Dean, B.J. and Danford, N. (1983): Assays for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cells in *Mutagenicity Testing* (Venitt, S. and Parry, J.M.) IRL Press, Oxford, pp. 187-232.
- Hadler, S.C., Webster, H.M., Erben, J.J., Swanson, J.E. and Maynard, J.E. (1980): Hepatitis A in day-care centers; a communitywide assessment. *N. Engl. J. Med.*, **302**, 1222-1227.
- Jae-Ku Kang, Jong-Ho Kim, Dal-Hyun Kim, Sang-Beom Moon, Soo-Ok Kim and Young-Soo Lee (1999): Mutagenicity tests on CJ-50003 (Japanese Encephalitis Vaccine). *J. Toxicol. Pub. Health*, **15**, 235-238.
- Krugman, S. and Giles, J.P. (1970): Viral hepatitis; new light on an old disease. *JAMA*, **212**, 1019-1029.
- Lender, W.M., Lemon, S.M., Kirkpatrick, J.W., Redfield, R.R., Fields, M.L. and Kelley, P.W. (1985): Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infection in adults. *Am. J. Epidemiol.*, **122**, 226-233.
- Maron, D.M. and Ames, B.M. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215.
- Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP, 1999): Prevention of hepatitis A through active or passive immunization. *MMWR*, 48 (No. RR-12), pp. 2-3.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.
- Yong-Ju Chung, Hyun-Seok Kim and Sung-Hee Lee (2000): Immunogenicity of a combined hepatitis A and B vaccine in ICR mice. *Korean J. Immunol.*, **22**, 225-228.
- 강재구, 이성학, 김달현, 이나경, 박완제, 이영수 (1999): CJ-50002 (비브리오 백신)에 대한 변이원성시험. *J. Toxicol. Pub. Health*, **15**, 247-250.
- 식품의약품안전청 (1998): 의약품 등의 독성시험 기준 (식품의약품안전청 고시 제 1998-56호).