

새로운 Anthracycline계 항암제 Hyrubicin ID6105에 대한 유전독성연구

장호송 · 정미숙 · 이홍섭¹ · 유정수¹ · 김태영¹ · 김윤배 · 강종구*

충북대학교 수의과대학, ¹일동제약(주) 중앙연구소

Genotoxicity Tests on Hyrubicin ID6105, a Novel Anthracycline Anticancer Agent

Hu-Song Zhang, Mei-Shu Zheng, Hong Sub Lee¹, Jung Su Ryu¹, Tae Yong Kim¹,
Yun-Bae Kim and Jong-Koo Kang*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
¹Research Laboratories, ILDONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. Yongin 449-910, Korea

(Received November 5, 2002)

(Accepted November 21, 2002)

ABSTRACT : The genotoxic potential of Hyrubicin ID6105, a novel anthracycline anticancer agent, was examined on bacterial mutagenicity, mammalian cell chromosome aberration and mouse micronucleus tests. In mutagenicity (Ames') test, *Salmonella typhimurium* strain TA98, TA100, TA1535 and TA1537, and *Escherichia coli* WP2uvrA⁻ were treated with ID6105 at doses of 312.5, 625, 1,250, 2,500 and 5,000 µg/plate with or without a metabolic activation system (S9 mix). Interestingly, ID6105 significantly enhanced the number of revertant colonies of TA98 strain at all dose levels used, in the presence or absence of S9 mix, without affecting other strains of *S. typhimurium* and *E. coli*. In chromosome aberration test using cultured Chinese hamster lung fibroblasts, ID6105 (1.25, 2.5 and 5 µg/ml) did not increase the number of aberrant cells, compared with vehicle control, in the presence or absence of S9 mix. In addition, ID6105 treatment (2.5, 5 and 10 mg/kg) did not induce micronucleated polychromatic erythrocytes in mice. Taken together, it is suggested that ID6105 might not affect chromosome integrity in mammalian systems in vitro and in vivo, although it may induce frame shift mutation of specific bacterial strain such as *S. typhimurium* TA98.

Key Words : Hyrubicin ID6105, Genotoxicity tests, Mutagenicity, Chromosomal aberration, Micronucleus tests

I. 서 론

Doxorubicin과 daunorubicin으로 대표되는 anthracycline 계 항암제는 급성 백혈병과 여러 고형종양의 치료에 널리

*To whom correspondence should be addressed

List of abbreviations: ID6105(Hyrubicin), [1R-(1 α ,2 β ,4)]-2-ethyl-1,2,3,4,6,11-hexahydro-2,5,7,12-tetrahydroxy-6,11-dioxo-4-[(2,3,6-trideoxy-4-O-[2,6-dideoxy-4-O-[(2R-trans)-5,6-dihydro-6-methyl-5-oxo-3-amino-2H-pyran-2-yl]- α -L-lyxo-hexopyranosyl]-dimethylamino)- α -L-lyxo-hexopyranosyl]oxy]-1-naphthacenecarboxylic acid-methyl ester; Hyrubicin DA-125, (8S, 10S)-8-(3-Aminopropanoyloxy-acetyl)-10-[(2,6-dideoxy-2-fluoro- α -L-talopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-5,12-naphthacene-dione hydrochloride; CHL, Chinese hamster lung fibroblasts; SD, Sprague-Dawley; B[a]P, benzo[a]pyrene; MMC, mitomycin C; DMSO, dimethyl sulfoxide; SA, sodium azide; 2-AA, 2-aminoanthracene; 2-AF, 2-aminofluorene; 9-AA, 9-aminocridine; PCE, polychromatic erythrocyte; MNPCE, micronucleated polychromatic erythrocyte

사용되고 있는 화학요법제중 하나이다. 그러나, 이들 항암제의 임상사용은 장기 투약시 총투여량에 비례하여 나타나는 비가역적인 심각한 심장독성에 의해 사용이 제한되어 왔다(Donehower 등, 1979; Fintel 등, 1985). 따라서, 제약연구자들이 기존의 약제보다 독성을 경감시키고 효력을 높이기 위해 수많은 anthracycline계 유도체를 합성하였는데, 그중에서 epirubicin, esorubicin, idarubicin 그리고 Hyrubicin DA-125 등이 우수한 항암효과와 경미한 심장독성을 갖는 약제로 판명되었다(Chabner와 Myers, 1989; Calabresi와 Chabner, 1991; 백 등, 1993). 특히 일동제약(주)에서 개발된 ID6105는 효능실험에서 우수한 항암활성을 보였는 바, *in vitro* 실험에서는 대조약물인 doxorubicin 보다 10~100배 이상, 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서는 5배 이상의 종양 억제효과와 생존율 상승효과를 나타냈다.

더욱이, doxorubicin 등 현재 사용되고 있는 항암제의 가장 큰 문제점인 독성 역시 현저히 줄어든 결과를 보였으며, 약물에 내성을 가진 P388(leukemia) 암세포주에도 뛰어난 효과가 있는 것으로 나타났다(강 등, 2002). 따라서, 본 연구에서는 ID6105에 대한 유전독성을 검색하기 위하여 세균을 이용한 복귀돌연변이시험, 포유류세포를 이용한 염색체이상시험, 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 “의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청고시 제1999-61호, 1999)”에 준하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질 및 시약

Hyrubicin ID6105는 일동제약(주) 중앙연구소에서 합성한 새로운 anthracycline 유도체로서 구조식은 [1R-(1 α ,2 β ,4)-2-ethyl-1,2,3,4,6,11-hexahydro-2,5,7,12-tetrahydroxy-6,11-dioxo-4-[(2,3,6-trideoxy-4-O-[2,6-dideoxy-4-O-[(2R-trans)-5,6-dihydro-6-methyl-5-oxo-3-amino-2H-pyran-2-yl]- α -L-lyxo-hexopyranosyl]-(dimethyl-amino)- α -L-lyxo-hexopyranosyl]oxy]-1-naphthacenecarboxylic acid-methyl ester($C_{42}H_{52}N_2O_{16}$)이며, Fig. 1과 같은 구조를 가지고 있다. ID6105는 적색분말로, 밀폐용기에 넣어 보관하면서 투여직전 주사용 멸균증류수에 용해하여 사용하였다.

양성물질인 2-aminofluorene(2-AF), sodium azide(SA), 9-aminoacridine hydrochloride(9-AA), 2-aminoanthracene(2-AA), mitomycin C(MMC) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서, benzo[a]pyrene(B[a]P)은 Aldrich Co.(Milwaukee, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 시험에 사용한 fetal bovine serum(FBS), modified Eagle's medium(MEM), trypsin-EDTA, colcemid 및 antibiotic-

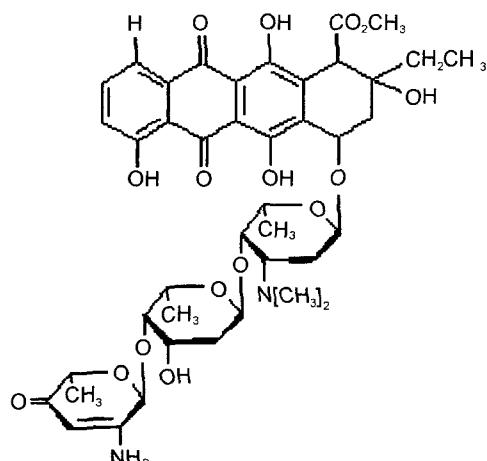


Fig. 1. Chemical structure of Hyrubicin ID6105.

antimycotic 용액은 Gibco Co.(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

대사효소로서 S9 mixture는 Aroclor 1254를 이용해서 효소유도된 Sprague-Dawley 랙트의 간균질액으로부터 유래된 Moltox™ post mitochondrial supernatant(Molecular Toxicology Inc. USA)를 사용하였다. 복귀돌연변이시험을 위한 S9 mix의 조성은 rat liver S9 균질액 5.0 ml(10%), 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, sterile distilled water 16.75 ml이며, 염색체이상시험에서는 S9 균질액의 농도를 5%로 하였다.

2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

1) 시험균주

시험에 사용한 histidine 영양 요구성의 *Salmonella typhimurium* LT2주 유래의 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 tryptophan 영양 요구성 *Escherichia coli* WP2uvrA⁻의 5 균주를 한국화학연구원에서 분양받아 계대유지한 것을 사용하였다.

2) 시험물질의 조제 및 농도

시험물질은 시험당일 멸균증류수에 단계적으로 희석하여 조제하였다. 양성대조물질로 사용한 sodium azide는 멸균증류수에, 2-aminofluorene, 9-aminoacridine 및 2-aminoanthracene는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 조제하였다. 음성대조물질로는 용매인 멸균증류수를 사용하였다. 본 실험에 앞서 TA100 균주를 이용하여 세포독성 유무에 대한 예비실험을 수행한 결과 약물대사와 관련된 S9 대사활성계의 존재시와 부재시 5,000 µg/plate(0.1 ml)까지 균생육의 저해가 관찰되지 않았으므로 이 농도를 최고농도로 설정하여 일정공비(×0.5)로 산정한 5개(312.5, 625, 1,250, 2,500, 5,000 µg/plate)의 용량군을 설정하였다.

3) 시험방법

Ames의 원법(Ames 등, 1975)을 변형한 유전독성의 검색감도가 비교적 높은 preincubation법으로 수행하였다(Maron과 Ames, 1983). 균현탁액 0.1 ml에 설정농도의 시험물질 수용액 0.1 ml 및 인산완충액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) 0.5 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 preincubation 하였다. 반면, 대사활성화에 의해 유전독성을 나타내는 경우에 대비해 인산완충액 대신 S9 mixture(10%, v/v) 0.5 ml을 첨가하였다. 그 후 바로 45°C에서 용해한 top agar 2 ml를 첨가하여 잘 혼합한 후 변이원성 검색용 배지(Vogel-Bonner minimal medium E) 위에 중층하여 37°C에서 2일간 배양한 다음, 복귀돌연변이 colony수를 계

측하였다. 균의 생육저해 및 시험물질의 침전, 분출의 관찰은 육안으로 실시하였다.

4) 결과판정

각 용량 당 3장의 plate를 이용하여 plate 당 복귀돌연변이 colony수의 평균치를 평가대상으로 하였다. 시험물질을 처리한 모든 군에 있어 복귀돌연변이체 수가 음성대조군의 2배 이상이며, 용량-반응관계가 인정되고, 재현성이 있는 세가지 조건을 만족할 경우나 통계학적 유의성을 나타낼 때에 시험물질은 복귀돌연변이 유발가능성이 있는 양성으로 판정하였다. 복귀돌연변이 집락수의 증가에 대해 Dunnett's *t*-test법을 이용하여 통계학적 유의성을 검증하였다.

3. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

1) 포유동물 배양 세포주

본 실험에 사용한 Chinese hamster lung fibroblasts 세포주는 국립독성연구소로부터 분양 받아 계대배양하여 사용하였는 바, 이 세포의 model chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다.

2) 세포배양

액체질소내에 냉동보관중인 세포를 해동하여 7일 이상 배양한 후, 도립현미경으로 미생물오염여부를 확인하고 사용하였다. 배지는 10% fetal bovine serum과 1%의 antibiotic-antimycotic 용액을 함유한 minimal essential medium을 사용하였다. 배양조건은 포화습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 배양기에서 배양하였고, 2~3일마다 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 계대배양하였다.

3) 시험물질의 농도

시험물질의 농도결정을 위하여 예비시험으로서 S9 mixture 존재시와 부재시 11단계의 농도를 이용하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cytotoxicity assay(Mosmann, 1983)를 수행하였는데, 5 µg/ml에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 따라서, 5 µg/ml를 최고농도로 하여 일정공비(×0.5)로 총 3단계의 농도(1.25, 2.5, 5 µg/ml)를 설정하였다. 음성대조물질로는 본 시험물질의 희석액을, 양성대조물질로는 S9 mixture 존재시는 benzo[a]pyrene으로, S9 mixture 부재시는 mitomycin C를 사용하였다.

4) 시험방법

6시간 및 24시간 시험물질 처리를 위해서는 2×10^4

cells/ml의 CHL cells 부유액을 직경 60 mm petri dish에 5 ml씩 각각 분주하였다. 3일간 배양한 후 ID6105를 최종 농도가 1.25, 2.5 및 5 µg/ml이 되게 세포배양액에 첨가하였다. 대사활성화를 위해서는 시험물질과 함께 S9 mixture를 처리하고 6시간 후에 신선한 배지로 교환하였다. 직접 법(Evans 등, 1964; Ishidate와 Odashima, 1977) 및 대사 활성화법의 경우에 각각 시험물질처리 개시부터 22시간 후에 petri dish에 colcemid를 0.25 µg/ml의 농도로 처리하고 2시간동안 더 배양하여 총 검체 처리시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.05% trypsin-EDTA로 처리하여 15 ml 원심분리관에 세포를 모으고 37°C의 저장액(0.075 M KCl) 5 ml에 잘 혼탁시켜 37°C 수조에 20분간 방치하였다. 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)으로 3회 고정시켜 슬라이드 표본을 제작하고 공기중에서 충분히 건조시킨 다음, 5% Giemsa액으로 15분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

5) 결과판정

각 검체 당 100개의 세포분열 중기염색체를 관찰하여 염색체 구조이상과 숫적이상 유무를 관찰하였다. 관찰대상으로 구조이상 유무는 chromatid gap(ctg), chromatid break(ctb), chromatid exchange(cte), chromosome gap(csg), chromosome break(csb), chromosome exchange(cse), 숫적 이상 유무는 배수체(polyploidy) 또는 핵내변화(endoreduplication)를 확인하였다. CHL 세포의 경우, 통상 음성대조군에서 염색체이상을 가진 세포의 출현율은 3%를 초과하는 일이 거의 없어서 시험결과는 평균 출현율이 5%미만인 경우는 음성(-), 5% 이상 10% 미만은 의양성(±)으로, 10% 이상은 양성으로 판정하였다. 염색체이상 빈도에 대한 통계처리는 gap을 포함한 경우와 포함하지 않는 경우의 구조이상을 가진 세포수 및 배수체의 출현수를 각각 산정하였다. 각 군의 100개의 중기분열상중에서 나타나는 염색체이상 빈도를 백분율(%)로 표시하고 Chi-square 검정을 실시하였다. 유의성이 나타날 경우는 Fisher's exact-test를 실시하여 음성대조군과 처리군을 서로 비교하였다.

4. 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험

Specific pathogen-free(SPF) ICR 수컷 마우스를 대한바이오링크(충북 음성)에서 구입하여 1주일 이상의 순화·적응 기간을 거친 후, 8주령이 되었을 때 발육이 정상이고 건강한 동물만을 시험에 사용하였으며, Schmid(1975)의 방법에 의해 시험을 수행하였다.

1) 시험물질의 농도

단회투여독성 예비시험에서 ID6105 주사제를 마우스에

투여 가능한 최대용량인 10 mg/kg을 복강투여해도 사망예가 관찰되지 않아 이 농도를 최고용량으로 설정하고 이 용량을 기준으로 일정공비($\times 0.5$)로 산정한 3개의 용량군(2.5, 5, 10 mg/kg)을 설정하였다.

2) 골수세포의 채취시간 결정

예비시험에서 최고용량 10 mg/kg을 1회 투여한 후 16시간, 24시간 및 48시간에 골수세포를 채취한 결과, 소핵다염성 적혈구의 뚜렷한 증가 시간대가 나타나지 않아 통상적으로 많이 이용되는 24시간을 채취시간으로 결정하였다.

3) 골수세포의 수거 및 도말검체의 제작

예비시험에서 결정된 24시간 경과 후 대퇴골을 적출하여 거즈로 근육질을 깨끗이 제거한 다음, 그 양끝단을 가위로 절단하여 fetal bovine serum이 2 ml씩 충진된 주사기를 이용하여 골수세포를 원심분리용 투브에 수거하였다. 분리된 골수세포를 1,000 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 잘 혼탁시켜 slide glass에 도말·건조하였다. Methanol에 5분간 고정하고 20% Giemsa액(phosphate buffer, pH 6.8로 회색)으로 30분간 염색하였다. 염색액을 흐르는 물로 씻어내고 0.004% citric acid 용액에 잠깐 담그었다 꺼낸 후 다시 물로 씻어 공기중에서 완전히 건조시킨 다음, cover glass로 봉입하여 관찰하였다. 골수세포의 증식억제 지표로서 다염성 적혈구비를 구하고자

1,000개의 총적혈구 중 다염성 적혈구수를 계수하였으며, 각 개체 당 2,000개의 다염성 적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성 적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도를 계수하였다.

4) 결과판정

Hayashi 등(1989)의 방법에 따라 소핵다염성 적혈구의 출현빈도는 Chi-square test에 의하여, 다염성 적혈구의 출현빈도는 Student's t-test에 의하여 음성대조군과의 통계학적 유의성을 검정하였다. 또한, 체중의 변화는 one-way analysis of variance(ANOVA) test를 실시하여 통계학적 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험(Table 1)

복귀돌연변이 시험결과, ID6105 주사제 5개 농도 312.5, 625, 1,250, 2,500 및 5,000 µg/plate(0.1 ml)에 있어, base-pair substitution형인 *S. typhimurium* TA100, TA1535 및 *E. coli* WP2uvrA⁻ 균주에서 대사활성화와 상관없이 colony수에 있어서 모든 농도에서 음성대조군에 비해 상승하지 않아 음성으로 판정되었다. 또한 frame shift형인 TA1537에서도 대사활성화와 관계없이 colony수의 변화가

Table 1. Mutational reversion by Hyrubicin ID6105 of *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvrA⁻ with or without S9 mixture

S9 mix	dose (µg/plate)	No. of revertants/plate (mean±S.D.)				
		base replacement type			frame shift type	
		TA 100	TA1535	WP2 uvrA ⁻	TA 98	TA 1537
-	0 (vehicle)	126.3±9.3	13.0±3.6	5.7±0.6	87.7±9.5	10.0±3.6
	312.5	129.0±3.6	15.0±1.0	5.0±1.0	534.7±16.7**	6.0±2.0
	625	127.0±7.0	16.7±4.9	6.7±2.3	652.0±80.3**	11.3±3.1
	1,250	124.7±8.1	18.0±5.0	5.7±2.9	554.7±42.4**	9.0±1.0
	2,500	129.7±4.0	14.3±2.1	6.7±2.3	526.0±67.7**	12.0±1.0
	5,000	122.0±2.7	19.3±2.1	5.3±1.5	485.0±27.8**	10.3±2.1
+	0 (vehicle)	135.7±3.1	15.7±2.1	5.0±0.0	86.0±14.2	11.3±4.0
	312.5	133.0±4.4	14.0±3.6	6.0±1.0	576.0±12.2**	10.7±2.9
	625	139.3±9.7	15.3±4.2	6.3±1.5	516.3±46.7**	11.3±2.5
	1,250	134.0±3.6	18.0±5.0	6.3±1.5	535.7±31.4**	9.7±3.1
	2,500	139.7±5.1	16.7±4.2	5.7±1.2	616.0±57.2**	9.7±2.1
	5,000	130.7±1.2	18.0±4.0	6.3±2.5	514.0±22.5**	10.3±3.1
Positive control S9	Compound	2-AF	SA	2-AF	2-AF	9-AA
	Dose (µg/plate)	0.01	1	0.01	0.1	80
Mix(-)	No. of colonies/plate	593.3±62.8**	372.0±38.2**	443.3±20.0**	690.3±82.0**	449.0±32.1**
Positive control S9	Compound	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose (µg/plate)	1.0	2.0	10	0.5	2.0
Mix(+)	No. of colonies/plate	576.7±25.2**	353.3±32.6**	445.3±32.3**	645.3±73.0**	438.0±19.1**

Values are mean±S.D.; *Significantly different from vehicle control at $P < 0.01$; SA, sodium azide; 9-AA, 9-aminoacridine; 2-AA, 2-aminoanthracene; 2-AF, 2-aminofluorene; vehicle, D.W.

Table 2. Chromosome aberration by Hyrubicin ID6105 of Chinese hamster lung fibroblasts

Compound ^a	No. of cells scored	Time ^b (hrs)	No. of aberration type ^c							No. of aberrant cells ^d		
			ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end	TA(+g)	TA(-g)
S-9 mix(+)	Vehicle (D.W)	100	6 + 18	0	0	0	0	1	0	0	1	1
				0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ID6105 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.25	6 + 18	1	0	0	0	0	1	0	2	1
				0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B[a]P(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.5	6 + 18	0	0	0	0	1	0	0	1	1
				0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-9 mix(-)	Vehicle (D.W)	100	6 + 18	11	2	0	0	8	8	0	29	16
				9	1	1	2	7	6	0	26	16
	ID6105 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.25	24 + 0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
				0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ID6105 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.5	24 + 0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
				0	0	0	0	1	0	0	1	1
	MMC (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	5	24 + 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MMC : mitomycin C, B[a]P : benzo[a]pyrene. b: Time : treatment time~expression time. c: ctg : chromatid gap, csg : chromosome gap, ctb : chromatid break, csb : chromosome break, cte : chromatid exchange, cse : Chromosome exchange, pol : polyploid, end : endoreduplicate. d: TA(+g) : total structural aberration including gap. TA(-g) : total structural aberration excluding gap.											

인정되지 않았다. 그러나 frame shift형인 TA98에서는 대사활성화시켰을 때나 활성화시키지 않았을 때의 콜로니수가 모든 용량군에서 유의성 있게 상승하여 양성으로 판정되었다.

한편, 양성대조물질로 사용된 2-AF, SA, 9-AA 및 2-AA를 투여한 각 대응하는 균주는 음성대조군에 비하여 복귀돌연변이 colony가 2배 이상 증가하여 뚜렷한 양성반응을 나타냈다. 따라서 ID6105는 *S. typhimurium* TA98 등 일부의 frame shift형 균주에서 돌연변이를 유발할 가능성이 있는 것으로 판명되었다.

2. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험(Table 2)

CHL fibroblasts를 이용한 *in vitro* 염색체이상시험 결과 대사활성화시, ID6105 1.25, 2.5 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 용량에서 이상염색체를 지닌 세포의 출현빈도가 2% 이하로서 그 빈도가 음성대조군에 비하여 증가하지 않았으며, 양성대조물질인 benzo[a]pyrene은 16% 이상의 빈도를 나타냈다. 직접법에서는 ID6105는 6 + 16 및 24 + 0시간 모두에서 이상염색체를 지닌 세포의 출현빈도가 2% 이하였으며 양성대조물질인 mitomycin C는 15% 이상의 빈도를

Table 3. Micronucleus induction by Hyrubicin ID6105 in mice

Compound	dose (mg/kg)	route	sampling time (hr)	No. of animal	PCE/(PCE + NCE) ^a (%. mean±S.D.)	MNPCE ^b /PCE (%. mean±S.D.)
Vehicle (D.W)	0	i.p.	24	6	43.5±2.9	0.08±0.05
ID6105	2	i.p.	24	6	50.3±1.6	0.10±0.06
ID6105	5	i.p.	24	6	48.8±2.1	0.13±0.09
ID6105	10	i.p.	24	6	50.4±3.4	0.10±0.06
MMC	2	i.p.	24	6	50.0±1.5	9.83±0.93**

MMC, mitomycin C.

PCE, polychromatic erythrocyte; NCE, normochromatic erythrocyte.

MNPCE : micronucleated polychromatic erythrocyte.

^aThe percentage of PCE was calculated from 1,000 erythrocytes per animal.^bThe number of micronucleated polychromatic erythrocytes was calculated from 2,000 PCEs per animal.*Significantly different from vehicle control at $P < 0.01$.

나타냈다. 따라서 ID6105는 본 시험조건하에서 대사활성 계의 적용여부에 관계없이 CHL fibroblasts에 대해 염색체의 구조적 혹은 숫자이상에서 유의성 있는 증가를 나타내지 않음으로써 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판명되었다.

3. 마우스를 이용한 소핵시험(Table 3)

음성대조군의 다염성 적혈구 1,000개 당 소핵다염성 적혈구 유발빈도는 0.8개이었으나, ID6105 2.5, 5 및 10 mg/kg 투여군에서는 각각 1.0, 1.3 및 1.0개로 소핵유발 빈도의 유의성 있는 증가가 나타나지 않았다.

그러나 양성대조군인 MMC 투여군에서는 다염성 적혈구 1,000개 당 소핵유발 빈도가 98.3개로 음성대조군에 비하여 크게 증가하였다. 따라서 ID6105는 본 시험조건 하에서는 최대 투여 가능한 10 mg/kg까지 마우스 골수세포에서 소핵형성을 유도하지 않는 것으로 판명되었다.

IV. 고찰 및 결론

일동제약(주)에서 개발한 ID6105에 대한 전임상시험 중 유전독성평가의 일환으로 변이원성시험에 가장 널리 이용되는 *S. typhimurium*과 *E. coli*를 이용한 복귀돌연변이시험, 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험에서는 histidine 영양 요구성의 *S. typhimurium* LT2주 유래의 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 tryptophan 영양 요구성 *E. coli* WP2uvrA-시험균주를 이용하였다. 직접법 및 대사활성법 모두에서 ID6105를 처리했을 때 *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 및 *E. coli* WP2uvrA에서는 변이원성이 관찰되지 않았으나, 흥미롭게도 TA98에서만 대사활성화와 상관없이 모든 투여용량에서 변이가 일어났다. TA100이 histidine G 요구성으로 base-pair substitution에 의해 변이가 일어나는데 비해, TA98 균주는 histidine D 요구성으로 frame shift 변이를 일으킨다는 점과, 같은 frame shift 변이주라 해도 TA1537과는 달리 R factor(PKM 101)에 의해서도 변이가 일어날 수 있다는 점에서 ID6105가 특이적으로 TA98에 대해서만 변이를 일으킴이 확인되었다. CHL fibroblasts를 이용한 염색체이상시험에서 ID6105는 직접법 및 대사활성법 모두에서 염색체이상세포의 출현율에 유의성 있는 변화가 나타나지 않음으로써 포유류세포에서는 유전독성을 나타내지 않는 것으로 판명되었다. 마우스를 이용한 소핵시험에 있어서도 ID6105를 투여 가능한 최대용량까지 복강투여했을 때 소핵다염성 적혈구의 발현율에 영향을 미치지 않음으로써 포유류를 사용한

in vivo 시험에서 역시 유전독성을 유발하지 않음이 입증되었다.

이상의 시험결과로부터 새로운 anthracycline계 항암제인 ID6105는 세균에서 특정유전자에 대한 돌연변이 가능성이 제기되었으나 고등동물인 포유류에서는 *in vitro* 및 *in vivo* 모두에서 염색체이상이나 소핵 유발과 같은 유전독성을 일으키지 않는 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 일동제약(주) (보건복지부 보건의료기술개발사업)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ames, B.M., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*, *Mut. Res.*, **31**, 347-354.
- Calabresi, P. and Chabner, B.A. (1991): Antineoplastic agents in *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics* (8th Ed.). pp. 1209-1263, Pergamon, New York.
- Chabner, B.A. and Myers, C.E. (1989): Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in *Cancer Principles and Practice of Oncology* (3rd Ed.). pp. 349-395, Lippincott, Philadelphia.
- Donehower, R.C., Myers, C.E. and Chabner, B.A. (1979): New development on the mechanisms of action of antineoplastic drugs, *Life Sci.*, **25**, 1-14.
- Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, E. (1964): An air-drying method for meiotic preparations from mammalian tests, *Cytogenetics*, **3**, 289-294.
- Fantel, A.G., Greenway, J.C. and Juchau, M.R. (1985): The embryotoxicity of adriamycin in rat embryos *in vitro*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 155-165.
- 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 testing, *Mut. Res.*, **223**, 329-344.
- Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cell *in vitro* - a screening for chemical carcinogens, *Mut. Res.*, **48**, 337-354.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983): Revised methods for the *Salmonella mutagenicity test*, *Mut. Res.*, **113**, 173-215.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test, *Mut. Res.*, **31**,

9-15.

백남기, 안병옥, 이순복, 김원배, 양중익, 渡邊俊彥(1993): 새로
운 항암성 항생물질 DA-125의 심장독성에 대한 평가, 한국
응용약물학회지, 1, 9-19.

강종구, 정연복, 장호송 (2002): 신규항암제 Hyrubicin 개발
연구, 신기능생물소재기술개발사업 보고서.
식품의약품안전청 (1999): 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약
품안전청고시 제1999-61호, pp. 42-45, pp. 74-76.