

재조합 인과립구 콜로니 자극인자 HM10411의 유전독성 연구

권 정* · 이미가엘 · 홍미영 · 조지희 · 정문구 · 권세창¹ · 이관순¹

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

¹한미약품공업주식회사

Genotoxicity Study of HM10411, Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor

Jung KWON*, Michael LEE, Mi-Young HONG, Ji-Hee CHO, Moon-Koo CHUNG, Se-Chang KWON¹, and Kwan-Soon LEE¹

Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Technology P.O. Box 123, Yu-Seong, Daejeon, 305-606, Korea

¹Central Research Institute, Hanmi Pharm. Co. Ltd., Sungnam, Kyonggi-do 453-400, Korea

(Received November 20, 2002 ; accepted December 6, 2002)

Abstract – Mutagenic potential of HM10411(recombinant human granulocyte colony stimulating factor) was evaluated by bacterial reverse mutation test, *in vitro* chromosome aberration test and *in vivo* micronucleus test. The bacterial reverse mutation test was performed using the histidine auxotroph strains of *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and tryptophan auxotroph strain of *Escherichia coli* WP2 *uvrA*. The negative results of the bacterial reverse mutation test suggest that HM10411 does not induce mutation, in the genome of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* under the conditions used. In addition, it has little clastogenicity either *in vitro* chromosome aberration test or *in vivo* micronucleus test. For *in vitro* chromosomal aberration test, Chinese hamster lung(CHL) cells were exposed to HM10411 of 23, 46 or 92 µg/ml for 6 or 24 hours in the absence and for 6 hours in the presence of metabolic activation system. There was no significant increase in the number of aberrant metaphase in HM10411-treated groups at any dose levels both in the presence and absence of metabolic activation system. The micronucleus test was carried out using specific pathogen free(SPF) 7-week old male ICR mice. The test item, HM10411 was intraperitoneally administered at 1150, 2300 or 4600 µg/kg once a day for 2 consecutive days. There was no significant increase in the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes(PCEs) at any treated groups compared with negative control group. Therefore, these results demonstrate that the test item, HM10411, was not mutagenic under the condition of these studies.

Key words □ HM10411, rhG-CSF, genotoxicity

1. 서 론

최근에는 유전자 재조합기술이 발전하여 대장균이나 동물세포를 이용하여 G-CSF를 대량 발현시킬 수 있게 되어 실제 임상에서 골수 억제성 항암제 치료환자의 감염기회 감소, 골수이식 환자들에게서 골수의 회복촉진, 재생불량성 빈혈환자의 호중구 기능 향상 및 항암제 치료에 의해 야기되는 호중구 감소증의 치료등에 유용하게 사용되고 있다(Nagata, 1995). 이런 경우들에서 G-CSF는 호중구계 과립구의 회복을 촉진하여 호중구 감소증의 기

간을 상당히 감소시키며(Sheridan 등, 1989), 이로 인해 화학요법 이후에 발현될 수 있는 중증의 세균감염증의 기회를 감소시킨다. 또한 G-CSF에 의해 암 치료시 사용되는 항암제들의 투여량을 증가시킬 수 있게 되었다.

HM10411은 최근 한미약품(주) 연구소에서 대장균(*E. coli*)을 발현계로 사용하여 유전자재조합 기술로 생산한 recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) 유도체로써 17번 위치의 아미노산이 치환된 형태이다. 또한 아미노 말단에 부가된 메티오닌이 제거된 형태로써 물리화학적 특성이 기존의 G-CSF 보다 월등하게 향상된 유도체이고, 본 시험에서는 HM10411을 임상에 적용하기 위하여 안전성평가지험의 일환으로 유

*To whom correspondence should be addressed.

전독성시험(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험 및 소핵시험)을 실시하였다.

유전독성시험은 다양한 기작에 의해서 직·간접적으로 유전적 이상을 일으키는 물질을 찾아내기 위한 시험법이다. 하지만, 한가지 시험만으로 모든 유전독성물질을 찾아낼 수는 없으므로 대부분의 국가에서는 3~4가지의 유전독성시험을 함께 수행하기를 권장하고 있다. 가장 대표적인 유전독성법으로는 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험, 소핵시험이 있고 경우에 따라서는 염색체이상시험 대신에 mouse lymphoma assay를 대체하고 있다. 따라서, 본 연구에서 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험을 식품의약품안전청고시(Korea Food and Drug Administration, 1999)에 따라 시험해 본 결과, HM10411은 유전독성이 없음을 규명하였다.

2. 실험방법

시험물질

HM10411(로트번호 000720)은 한미약품공업(주)에서 유전자 재조합 방법으로 생산한 rhG-CSF로서 부형체에 920 µg/ml 농도로 용해된 무색 액체 상태의 물질이며 SDS PAGE 방법으로 수행한 impurity test 결과 순도 99% 이상인 것으로 나타났다. 유전독성시험을 위하여 시험물질은 전용 부형제(한미약품공업(주), 10 mM Na Acetate (pH 4.0), 5% Sorbitol, 0.04% Tween 80)에 희석하여 사용하였다. 복귀돌연변이 시험의 양성대조물질은 대사활성계 미적용시 sodium azide(SA, CAS No. 26628-22-8), 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO, CAS No. 56-57-5) 및 9-aminoacridine(9-AA, CAS No. 90-45-9)을 사용하였고, 대사활성계 적용시 2-aminoanthracene(2-AA, CAS No. 613-13-8)을 사용하였으며 SA는 증류수(중외제약)에, 2-AA, 9-AA 및 4NQO는 DMSO(Aldrich, 로트번호 TU03354PU)에 용해하여 조제하였다. 염색체이상시험에서는 cyclophosphamide · H₂O (CPA, CAS No. 6055-19-2)와 ethylmethanesulfonate (EMS, CAS No. 62-50-0)을 각각 대사활성계 적용시와 미적용시 양성대조물질로 사용하였다. 소핵시험의 양성대조물질로는 전술한 CPA를 주 사용 생리식염수(중외제약)에 용해하여 사용하였다.

시험균주 및 사용세포

복귀돌연변이시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 및 TA1537은 Molecular Toxicology Inc.(Boone, NC)에서 구입하였고, *Escherichia coli* WP2 uvrA 균주는 Dr. M.H.L. Green (University of Sussex, Falmer, Brighton, UK)으로부터 입수하였으며, 모든 균주들은 시험전에 형질확인을 실시한 후 계대배양

중인 것을 사용하였다. 염색체이상시험에서는 식품의약품안전청 산하 국립독성연구소 유전독성과(서울특별시 은평구 녹번동)로부터 분양받은 Chinese hamster 유레 폐섬유아세포(CHL, Koyama 등, 1970)를 사용하였다. 본 세포의 염색체 수는 25, 분열주기는 12~15 시간으로 확인되었으며 액체질소에 보관한 세포는 해동하여 7 일 이상 배양한 후 도립현미경으로 미생물 오염 여부를 확인하고 시험에 사용하였다.

시험동물 및 사육환경

소핵시험에 사용한 수컷 ICR 마우스(특정 병원균 부재(SPF) CrjBgi: CD-1)는 (주)바이오제노믹스(서울시 금천구 가산동)에서 구입하여 입수일로부터 11 일의 검역 및 순화기간 동안 일반증상을 관찰, 건강한 동물만을 선택하고 체중범위에 따른 무작위법으로 균분리를 수행하였다. 시험물질 투여시의 주령은 약 7주령이었으며 이때의 체중범위는 31.0~37.1 g이었다. 시험동물은 순화 및 검역 기간에는 사육상자 당 10 마리 이하, 시험 기간에는 6 마리씩 수용하였으며 온도 23 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12 시간(08:00 점등~20:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 조정된 동물실에서 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(로트번호 001211Q, 제일사료주식회사)를 급여하였고 물은 상수도수를 자외선 살균기로 소독한 후 자유섭취시켰다.

대사활성계

In vitro 시험에서 대사활성계로 사용한 S-9 mix는 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간균질액(Molecular Toxicology Inc., Boone, NC)을 cofactor (Wako pure Chem. Ind. Ltd., Japan)와 혼합하여 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험에서 각각 5% 및 30%로 조제하여 사용하였다.

세균을 이용한 복귀돌연변이시험

복귀돌연변이시험은 Maron and Ames(1983)의 방법에 따라 대사활성계 적용군과 미적용군으로 나누어 direct plate incorporation법으로 실시하였으며, 시험물질은 12, 23, 46, 92 및 184 µg/plate의 5 단계 농도군으로 처리하고 부형제 처리군(음성대조군)과 양성대조군 및 무처리군을 첨가하였다. 각각의 시험균주들은 master plate로부터 25 ml의 액체배지(2.5% Oxoid Nutrient broth No. 2)에 접종해 37°C에서 약 10 시간 전배양하였다. 고압증기멸균한 top agar (0.6% agar, 0.5% NaCl) 2 ml에 시험물질 용액 0.2 ml, S-9 mix (대사활성계 미적용시 pH 7.4 sodium-phosphate buffer) 0.5 ml, 균배양액 0.1 ml을 혼합하고 2~3초간 진탕하여 최소평판배지에 부어 37°C에서

약 48시간 동안 배양한 다음 집락을 계수하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

염색체이상시험은 Ishidate 등(1981) 및 Dean and Danford (1984)의 방법을 응용하여 실시하였다. 각 농도 군당 2개의 25 cm² 플라스크에 2×10⁴ 개의 세포를 3일 동안 배양한 후 대사활성제 적용 및 미적용 하에 각각 23, 46 및 92 µg/ml의 3 단계 농도군과 음성대조군, 양성

대조군 및 무처리군으로 시험물질을 처리하였다. 대사활성제 적용 및 미적용시 6 시간 처리군은 처리개시로부터 약 6 시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5 ml의 CMF D-PBS(Ca⁺⁺ & Mg⁺⁺ free Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세포층을 세척한 후 신선한 배양액 5 ml을 가해 중기세포 수거시까지 계속 배양하였으며, 24시간 처리군의 경우 세척없이 계속 배양하였다. 모든 플라스크에 대하여 처리 종료 2

Table I. Result of bacterial reverse mutation assay with HM10411

Tester strains	Test item	Dose (µg/plate)	Colonies/plate(Mean)[Factor] ^a		
			Without S-9 mix	With S-9 mix	
TA100	Untreated HM10411	-		115±2	
		0	125 ± 5	118±4	
		12	126 ± 6		
		23	128±11 [1.0]	119±14 [1.0]	
		46	121±8 [1.0]	111±3 [1.0]	
		92	109±3 [0.9]	118±10 [0.9]	
		184	115±8 [0.9]	117±5 [0.9]	
		SA	109±8 [0.9]	109±5 [0.9]	
		2-AA	0.4	585±83 [4.6]	607±34 [4.6]
	TA1535	Untreated HM10411	-		17±2
0			19±1	20±1	
		12	20±2		
		23	19±2 [1.0]	16±4 [0.8]	
		46	18±3 [0.9]	19±2 [1.0]	
		92	20±3 [1.0]	17±2 [0.9]	
		184	18±4 [0.9]	17±4 [0.9]	
		SA	0.5	17±3 [0.9]	13±2 [0.7]
		2-AA	2	416±3 [20.8]	472±34 [23.6]
TA98		Untreated HM10411	-		30±2
	0		21±4	31±2	
		12	21±1		
		23	23±3 [1.1]	27±3 [0.9]	
		46	21±3 [1.0]	29±2 [0.9]	
		92	22±1 [1.0]	27±1 [0.9]	
		184	22±2 [1.0]	27±5 [0.9]	
		4NQO	0.5	20±2 [1.0]	28±1 [0.9]
		2-AA	0.4	303±27 [14.4]	447±30 [14.4]
	TA1537	Untreated HM10411	-		18±3
0			14 ±1	17±4	
		12	14±3		
		23	15±4 [1.0]	16±3 [0.9]	
		46	14±2 [0.9]	16±2 [0.9]	
		92	15±4 [1.0]	15±1 [0.9]	
		184	13±3 [0.9]	14±2 [0.9]	
		9-AA	50	13±3 [0.9]	15±2 [0.9]
		2-AA	2	257±15 [4.6]	539±23 [31.7]
<i>E. coli</i> WP2 uvrA		Untreated HM10411	-		9±1
	0		10±1	11±1	
		12	8±1		
		23	8±1 [1.0]	10±2 [0.9]	
		46	10±2 [1.3]	11±1 [1.0]	
		92	7±1 [0.9]	9±1 [0.8]	
		184	7±3 [0.9]	7±3 [0.6]	
		4NQO	0.5	7±2 [0.9]	9±2 [0.8]
		2-AA	4	106±4 [13.3]	498±43 [45.3]

^aNo. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate Abbreviation: SA: Sodium azide; 2-AA: 2-Aminoanthracene; 4NQO: 4-Nitroquinoline-1-oxide; 9-AA: 9-Aminoacridine.

시간 전에 최종농도 1 μM 의 colchicine 용액을 처리하고 시험물질 처리부터 24시간이 지나면 플라스크를 가볍게 쳐서 중기세포를 분리, 수거하였다. 수거한 중기세포를 저장액(75 mM KCl) 및 고정액(메틸알콜:빙초산 = 3 : 1 v/v)으로 처리하고 플라스크당 2 매의 검체를 공기건조법으로 제작한 다음 5% Giemsa 염색액(Sigma Diagnostics, St. Louis, MO)으로 염색하였다. 각 검체에서 100 개의 중기상을 1000 배의 배율로 관찰하여 염색체 이상을 계수하고 이상을 가진 중기상(이상중기상)의 빈도 및 염색체 이상의 수는 gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 병기하였다. 이상중기상의 빈도에 대한 통계처리는 gap을 제외한 숫자만을 대상으로 실시하였고, 음성대조군과 처리군의 비교에는 χ^2 -test 및 Fisher's exact test를 실시하였으며 이들 검정에서 P<0.05인 경우에는 용량상관성 여부를 알아보기 위해 Cochran-Armitage trend test를 적용하

였다. 음성대조군과 양성대조군의 비교를 위해서는 Fisher's exact test를 사용하였다.

마우스를 이용한 소핵시험

투여 직전에 측정된 체중에 따라 5 ml/kg으로 투여 액량을 산출하고 시험물질 1150, 2300 및 4600 mg/kg의 용량군으로 군당 6 마리의 동물에 1일 1회 2일간 복강내 투여하였다. 양성대조물질은 시험물질 투여 마지막 날에 복강내 투여하였다. 최종 투여로부터 약 24 시간 후에 각 동물에서 적출한 대퇴골로부터 Schmid (1975)의 방법에 따라 개체당 2매의 도말 검체를 제작하고 메탄올로 5 분간 고정하였다. 고정 및 건조가 끝난 검체는 May-Grunwald 염색액(Sigma Diagnostics, St. Louis, MO)과 Giemsa 염색액으로 염색하여 1000 배의 배율하에서 각 검체당 2000개의 다염성적혈구(PCE)에서 소핵을 계수하

Table II. Result of chromosome aberration test of HM10411

Tcst item	Dose (μg/ml)	S-9 mix	Treatment Time ^a (hrs.)	Number of Aberrant Metaphases	Number of Total Aberrations	Number of findings/200 metaphases						
						Gap	Chromosome type		Chromatid type		Other	PP+ER
							DEL.	EXC.	DEL.	EXC.		
Untreated	-	+	6-18	1/0 ^b	1/0	1	0	0	0	0	0	2+0
HM10411	0	+	6-18	2/1	2/1	1	0	1	0	0	0	0+0
	23	+	6-18	1/0	1/0	1	0	0	0	0	0	0+0
	46	+	6-18	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	1+0
	92	+	6-18	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0+0
	CPA ¹⁾	12	+	6-18	64/61**	105/96	9	1	1	11	83	0
Untreated	-	-	6-18	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	2+0
HM10411	0	-	6-18	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	1+0
	23	-	6-18	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	2+0
	46	-	6-18	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0+0
	92	-	6-18	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0+0
	EMS ²⁾	1000	-	6-18	59/57**	77/75	2	0	2	4	66	3
Untreated	-	-	24-0	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	1+0
HM10411	0	-	24-0	1/1	1/0	1	0	0	0	0	0	0+0
	23	-	24-0	1/1	1/0	0	0	1	0	0	0	1+0
	46	-	24-0	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0+0
	92	-	24-0	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0+0
	EMS	800	-	24-0	51/51**	61/61	0	0	0	4	57	0

**Significantly different from the control at P<0.01, Fishers exact test ^aTreatment time-recovery time, ^bGaps included/excluded, Abbreviation: DEL: Deletion; EXC: Exchange; PP: Polyploid; ER: Endoreduplication; CPA: Cyclophosphamide; EMS: Ethylmethanesulfonate.

Table III. Micronucleus test of HM10411 in male ICR mice

Chemical Treated	Dose (μg/kg)	No. of Animal	MNPCE ^a /2000 PCE's (Mean±S.D.)	PCE/(PCE+NCE) (Mean±S.D.)
Vehicle	0	6	1.67±1.21	0.49±0.10
HM10411	1150	6	0.67±0.52	0.44±0.06
	2300	6	0.50±0.55	0.41±0.07
	4600	6	0.50±0.55	0.41±0.10
	CPA	70	6	70.50±12.55** ^b

** Significantly different from the control at P<0.01, ^aMNPCE: PCE with one or more micronuclei, ^bMann-Whitney's U-test, ^cStudent's t-test, Abbreviation: PCE: Polychromatic erythrocyte; NCE: Normochromatic erythrocyte CPA: Cyclophosphamide · H₂O.

고 500개의 적혈구 중 다염성적혈구의 비율(PCE/[PCE+NCE])을 산출하였다. 소핵 유발 빈도에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군들과의 비교에는 Kruskal-Wallis' H-test를 실시한 후 유의한 경우 Dunnett's test를 실시하였고, 여기서 유의한 경우에는 용량 상관성을 확인하기 위하여 Cochran-Armitage trend test를 실시하였다. 음성대조군과 양성대조군의 비교에는 Mann-Whitney's U-test를 적용하였다. PCE/(PCE+NCE) 비율에 있어서 음성대조군과 시험물질 투여군의 비교를 위해서는 각 개체로부터 얻은 비율의 root arcsin값을 위해 변수변환한 다음 ANOVA test를 실시, 유의한 경우 다중비교법인 Dunnett's test를 실시하였다. 음성대조군과 양성대조군의 비교에는 Student's t-test를 이용하였다.

3. 실험결과

세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험에 사용한 모든 균주의 경우 대사활성계 적용 여부와 관계없이 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 무처리군이나 음성대조군과 비교하여 복귀돌연변이 집락 수의 증가가 관찰되지 않았으며 독성에 의한 집락 수의 감소경향이나 미세집락 등도 관찰되지 않았다(Table I). 반면 양성대조군에서는 음성대조군에 비해 현저한 집락 수의 증가가 관찰되었다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

대사활성계 적용 및 미적용시에 염색체이상 증기상의 출현율을 Table II에 표시하였다. 이상증기상의 빈도에 대한 통계처리는 gap을 제외한 숫자만을 대상으로 Richardson 등(1989)의 방법을 참고하여 실시하였다. CPA 및 EMS를 처리한 양성대조군에서 염색체이상 증기상의 빈도가 유의적인 증가($P<0.01$)를 보인 반면 모든 시험물질 처리군에서는 0.5% 이하의 빈도를 나타내어 무처리군 및 음성대조군과 유사한 경향을 보였다. 또한 모든 시험물질 처리군에서 염색체의 숫적이상의 지표인 [polyploid+endoreduplication] 빈도의 증가도 관찰되지 않았다.

마우스를 이용한 소핵시험

개체당 2000개의 다염성적혈구에서 관찰된 소핵 다염성적혈구의 빈도를 Table III에 나타내었다. 시험물질 투여군의 소핵 빈도에 대하여 음성대조군과의 차이를 조사한 결과, 어느 투여군에서도 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다. 한편 양성대조군인 CPA 처리군에서는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 소핵의 증가가 나타났다($P<0.01$). 세포독성의 지표인

PCE/(PCE+NCE) 비율도 모든 시험물질 처리군에서 음성대조군과 비교했을 때 유의한 증가를 보이지 않았으며 양성대조군의 경우에만 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 감소를 나타내었다.

4. 고 찰

본 시험은 한미약품공업(주)에서 유전자 재조합 방법으로 생산한 rhG-CSF의 유전독성 여부를 알아보기 위한 시험으로 시험물질에 대한 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험 및 소핵시험을 실시하였다. 본 시험에 사용한 처리 최고농도는 시험물질 원액의 농도에 따른 처리가능한 최고농도로 예비시험을 실시하여 결정하였다. 예비시험 결과, 복귀돌연변이시험에 사용된 균주들에 대하여 184 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 치사효과나 생육억제효과가 없는 것으로 나타났고, CHL 세포에 있어서도 92 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 음성대조군에 대한 상대세포수의 감소경향이 관찰되지 않았으며 마우스에 복강투여하였을 때에 4600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서 사망동물이나 체중감소 등의 증상이 관찰되지 않았으므로 복귀돌연변이시험의 경우 184 $\mu\text{g}/\text{plate}$, 염색체이상시험의 경우 92 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 소핵시험의 경우에는 4600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 최고농도로 설정하여 시험을 실시하였다. 각 시험은 식품의약품안전청 고시 '의약품등의독성시험기준'(1999)에 명시된 시험방법에 따라 실시하였으며, 식품의약품안전청 고시 '비임상시험관리기준' 및 'OECD Principles of Good Laboratory Practice'에 준하여 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소에서 수행하였다. 본 시험에서는 일반적으로 사용되는 부형제 즉, 증류수나 DMSO 등이 아닌 본 시험물질의 전용 부형제에 희석하여 시험물질을 처리하였으므로, 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험의 경우에는 음성대조군인 부형제 처리군 이외에 무처리군을 첨가하여 시험을 실시하였다. 복귀돌연변이시험에 사용한 5개 균주의 생균수는 흡광도에 의한 측정 결과 $0.1\sim 3.1\times 10^9/\text{ml}$ (*Salmonella typhimurium*) 및 $6.7\times 10^9/\text{ml}$ (*E. coli*)로 적정 수준이었다. 염색체이상시험에서는 증기세포 수거후 coulter counter를 사용하여 세포수를 계수하였을 때 음성대조군이나 무처리군과 비교하여 시험물질 처리군에서 세포수의 감소경향이 관찰되지 않아 시험물질에 의한 세포생장저해는 없는 것으로 판단되었다. 또한 소핵시험에서 세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 모든 시험물질 투여군에서 평균 0.41 이상이었고 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으며 골수 채취일에 측정된 체중을 비교하였을 때에도 투여군간의 체중 차이는 없는 것으로 판단되어 시험물질 처리에 의한 독성이 없는 것으로 나타났다.

본 시험의 결과 대사활성계 적용 여부에 관계없이 시

험물질 처리에 의한 복귀돌연변이 집락 수의 증가나 염색체이상 증기상의 증가가 관찰되지 않았으며 소핵시험에서도 소핵 다염성적혈구의 증가 경향은 관찰되지 않았으므로 HM10411은 유전독성을 유발하지 않는 물질인 것으로 사료된다.

감사의 글

“본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(01-PJ1-PG4-01PT02-0005)”.

참고문헌

- Bauduer, F. (1998). G-CSF: a very efficient in chronic autoimmune neutropenia. A brief review of the literature. *Hematol. Cell Ther.*, 40(5), 189-191.
- Dcan, B.J. and Danford, N. (1984). Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In *Mutagenicity testing-a practical approach* (S. Venitt and J.M. Parry eds.), pp. 187-232. IRL Press Limited, P.O.Box 1, Eynsham, Oxford OX8 1JJ, England.
- Heddle, J.A., Stuart, E. and Salamone, M.F. (1984). The bone marrow micronucleus test. In *Handbook of mutagenicity test procedures, 2nd edition* (edited by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel), pp. 441-457. Elsevier Science Publishers BV.
- Hubel, K., Dale, D.C., Engert, A. and Liles, W.C. (2000). Use of G-CSF for granulocyte transfusion therapy. *Cytokines Cell Mol. Ther.*, 6, 89-95.
- Ishidate, M. Jr., Sofuni, T. and Yoshikawa, K. (1981). Chromosomal aberration tests *in vitro* as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *GANN Monograph on Cancer Res.*, 27, 95-107.
- JEMS-MMS (1988). *Atlas of chromosome aberration by chemicals*. Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group, Tokyo, Japan.
- Korea Food and Drug Administration (1999). *Testing Guidelines for Safety Evaluation of Drugs (Notification No. 1999-61)* issued by the Korea Food and Drug Administration on December 22, 1999.
- Korea Food and Drug Administration (2000). *Good Laboratory Practice Regulations for Non-clinical Laboratory Studies (Notification No. 2000-63)* issued by the Korea Food and Drug Administration on December 12, 2000.
- Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T. (1970). A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *GANN*, 61, 161-167.
- Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical analysis on *in vivo* cytogenetic assays. In *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. (Kirkland, D. J. ed.), pp. 184-232. Cambridge University Press, Cambridge, U. K.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173-215.
- Nagata, S. (1995). Granulocyte colony stimulating factor in *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 95/1, Peptide Growth Factors and Their Receptors I* (Sporn, M.B. and Roberts, A.B. Ed.), pp. 699-722. Springer-Verlag., New York.
- OECD (1997). *OECD Principles of Good Laboratory Practice*.
- Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of data from *in vitro* cytogenetics assays. In *Statistical evaluation of mutagenicity test data* (Kirkland, D.J. Ed.), pp. 141-154. Cambridge University Press, Cambridge, U.K..
- SAS Institute (1989). *SAS/STAT User's Guide*. Version 6, 4th ed., Vol. 1, Cary, NC., USA.
- SAS Institute (1989). *SAS/STAT User's Guide*, Version 6, 4th ed., Vol. 2, Cary, NC., USA.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31, 9-15.
- Sheridan, W.P., Wolf, M., Lusk, J., Layton, J. , Souza, L., Morstyn, G., Dodds, A., Maher, D., Green, M.M. and Fox, R.H. (1989). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet.*, 2, 891-5.