

돼지 췌장 유래 엘라스타제의 돌연변이원성 시험

조영우, 백남기, 안병옥, 이상득, 박충일, 김원배, 양중익

동아제약 주식회사 연구소

(1990. 7. 15 접수)

돼지 췌장 유래 엘라스타제의 돌연변이원성을 알아보기 위하여 포유동물 세포를 이용한 돌연변이 시험과 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 엘라스타제에 의하여 CHO-K₁-BH₄ cell이 6-thioguanine에 대해 내성을 가지게 되는 변이의 빈도를 조사하였다. 시험결과 엘라스타제의 농도 증가 (0-30mg/ml)에 따른 변이빈도의 증가가 관찰되지 않았으며, 변이빈도도 음성대조군 변이빈도 치의 2배 이상을 보이지 않았다. 마우스를 이용한 소핵시험에서는 엘라스타제를 1250, 2500 그리고 5000mg/kg의 용량으로 마우스에 1회 경구 투여 하였으며 양성대조군과 음성대조군에는 각각 mitomycin C 2mg/kg, 10 skim milk 20ml/kg을 각각 복강내와 경구로 투여하였다. 시험결과 엘라스타제 투여군의 소핵 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 증가하지 않았다.

위의 결과로 보아 엘라스타제는 이 시험계들에서 돌연변이원성이 없는 것으로 사려된다.

서론

엘라스타제는 엘라스틴을 특이적으로 분해하는 효소로서 소의 췌장에서 처음 발견된 이래 (Balo와 Banga, 1949), 랫트 대동맥에서의 항동맥 경화 작용 (Katsunuma 등, 1983), 지질대사 개선작용 (Koide와 Suzuki, 1985)과 혈압강하효과 (Iwatsuki 등, 1983) 등이 있는 것으로 알려져 있다. 엘라스타제의 돌연변이유발성에 관한 보고는 없었으며, 본 연구에서는 안전성시험의 일환으로서 돌연변이유발성시험을 수행하였다. 본 보고에서는 포유동물 배양세포를 이용하는 돌연변이시험 (CHO/HGPR T assay)과 설치류를 이용하는 소핵시험 (micronucleus test)을 실시하여 얻은 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시험 약물

엘라스타제는 돼지 췌장으로부터 유안 분획, diafiltration, 그리고 결정화하여 정제한 백색-담갈색의 분말로서 150E.U/mg의 것을 사용하였다.

돌연변이시험시 엘라스타제는 세포를 처리하기 직전에 Ham's F12 media (Gibco)에 녹인 뒤 무균 여과하여 사용하였으며, 처리시의 최종농도는 0.3, 1, 3, 10, 30mg/ml이었다. 대조물질로는 N-nitrosomethylamine (DMN, Sigma)을 Ham's F12로 희석하여 50mg/ml을 stock solution으로 사용하였다. 소핵시험시 엘라스타제는 10% skim milk용액에 현탁하여 사용하였으며, 대조물질로는 mitomycin C를 생리식염수에 녹여 사용하였다.

2. 세포 배양

돌연변이시험에 사용된 세포주는 CHO-K₁-BH₄ cells (Chinese hamster ovary cells, clone K1, subclone BH4)로 화학연구소로부터 입수하였다. Ham's F12 medium에 dialyzed fetal calf serum (Hazleton)을 5%되게 첨가한 배양액 (F12FCM5)을 기본배지로 사용하여, 5% CO₂를 공급하면서 37 °C에서 배양하였다. 돌연변이시험을 수행하기 전에, 배양중 HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase)가 결여된 세포들은 hypoxanthine, aminopterin, thymidine(HAT)이 포함된 배지에서 배양하여 미리 제거하였다 (Littlefield, 1964). 세포회수시에는 0.05% trypsin (Gibco)을 사용하여 회수하였다.

3. 시험 동물

7주령의 SPF ICR 마우스 암수 각 70마리를 Charles River Japan에서 분양받아 청정 사육실내에서 1주간 검역 및 예비사육하였다. 이 중 시험에 사용한 동물은 체중범위 암수 각각 23-28, 30-35g의 외견상 건강한 마우스 암수 각 60마리 총 120마리였다. 시험기간중 20개의 마우스용 사육상자 (stainless 재, 222×325×130mm)에 암수 구분하여 각각 6마리씩 수용 사육하였으며, 온도 23±3°C, 습도 60±10% 범위를 유지시켰다. 조명은 오전 7시에 점등하여 오후 7시에 소등하였으며, 사료 (오리엔탈 효모, 마우스용 펠렛)와 자외선 멸균 식수를 자유섭취시켰다.

4. 돌연변이시험 (CHO/HGPRT assay)

CHO/HGPRT assay는 O'Neill 등 (1977b)와 Hsie 등 (1981)의 방법을 참조하였다. 각 플라스크 (25-cm²)마다 CHO-K₁-BH₄ cells을 5×10⁵ cells/5ml이 되게 plating하여 20시간 배양한 후, 배지를 제거하고 saline G (O'Neill와 Hsie, 1979) 5ml로 2회 세척하였다. 마지막 세척후 각 농도군의 엘라스타제 용액 4ml과 S-9 mixture (O'Neill 등, 1977b) 1ml씩을 각각의 플라스크에 가해주고 5시간 배양하면서 cells을 처리하였다. 배지를 회수하고 saline G 5ml씩으로 회수된 배지중의 CHO cells과 플라스크를 각각 3회씩 세척하고 회수된 CHO cells에 F12FCM5 5ml을 가하여 cells을 현탁시켜 각각의 플라스크에 넣어주고 19시간 배양하였다. 이 때 양성대조로는 Ham's F12 medium 4ml, S-9 mixture 1ml과 DMN 50μl (최종 농도, 0.5mg/ml)을 넣고 처리하였으며, 음성대조는 S-9 mixture를 넣어준 것과 S-9 mixture 대신 Ham's F12 medium 1ml을 넣어준 것으로 하였다.

초기세포생존률 (initial cell survivals)을 구하기 위하여 각 배양세포를 회수하여 3개의 60-mm plates에 200 cells/5ml씩 각각 plating하였다. 7일간 배양하여 ethanol로 고정시키고 Giemsa염색하여 자란 colony 수를 세었다.

돌연변이유발률 측정하기 위해서, 각 농도의 약물로 처리하고 19시간 배양한 CHO cells을 각각 100-mm plates에 계대하여 준 다음 2일간 배양하고 2일 간격으로 2회 더 계대하여 주고 2일간 다시 배양하였다. 배양후 cells을 회수하여 1×10⁵ cells/ml이 되게 HX F12FCM5 (hypoxanthine-free F12FCM5)로 희석하여 이중 2ml씩을 selection medium (6-thioguanine (Sigma), 12.5μM + HX⁻ F12FCM5) 8ml가 미리 첨가된 5개의 100-mm plates에 각각 넣어 주었다 (≤1×10 cells). 나머지 cells은 saline G로 100배 희석하여 이중 0.2ml씩을 HX⁻ F12FCM5, 5ml가 첨가된 3개의 60-mm plates에 넣어주었다 (cloning efficiency plates). 모두 7일동안 배양하여 고정화시키고 염색하여 colony 수를 세었다.

5. 소핵시험

엘라스타제는 마우스에서의 1회 경구 급성독성시험에서 반수치사량이 5g/kg이상인 것으로 나타났으므로 5g/kg을 고용량으로 하고 이하 공비 2로 중용량은 2.5g/kg, 저용량은 1.25g/kg으로 하였다. 표본 채취 시간의 결정은 예비시험 결과 소핵 다염성 적혈구의 출현빈도를 뚜렷이 증가시키는 시간대가 발견되지 않았으므로 일반적으로 많이 이용되는 시간 대 (Salamone 등, 1980)인 투여후 24시간과 48시간으로 하였다. 엘라스타제는 투여시 10% skim milk용액에 현탁하여 20ml/kg의 투

여액량을 강제 경구투여하였다. 음성대조군에는 10% skim milk 용액을 경구 투여하였으며, 양성대조군에는 mitomycin C 2mg/kg을 멸균 생리식염수에 녹여 10ml/kg의 액량을 복강 내 투여하였다. 투여 후 24시간과 48시간에 각 군의 동물 반수를 경추탈구시켜 도살한 후 양측 대퇴골을 분리하여 fetal bovine serum (Gibco) 0.8-1.0 ml로 골수를 씻어내어 1000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 버린 후 침전물을 고르게 현탁하여 슬라이드에 도말하였다. 건조된 도말표본은 methanol로 5분간 고정된 후 2.5%의 Modified Giemsa염색액 (Sigma)으로 50분간 염색하여 검경하였다. 표본의 관찰은 동물 개체당 1000개의 다염성 적혈구를 관찰하여 소핵을 갖는 세포의 출현빈도를 구하고 또한 동일 시야에 있는 정염성 적혈구의 수를 세어 다염성 적혈구와 정염성 적혈구의 비율을 구하였다.

6. 변이빈도의 계산 및 통계학적 처리

변이빈도 (mutation frequency)는, 총 mutant colony 수 (5개 plates에서의 colony수의 합)를 plating된 세포수로 나누어준 값에 cloning efficiency (plate 3개의 평균)을 보정하여 TG' mutants / 10^6 clonable cells로 나타내었다 (Hsie 등, 1975).

다염성 적혈구와 정염성 적혈구의 비율은 Bartlett test를 하여 등분산일 경우 분산분석과 Scheffe's test를 하였으며 부등분산일 경우 Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA와 Scheffe's test를 하여 구간 유의차를 검정하였다. 소핵을 갖는 다염성 적혈구의 출현빈도는 Chi-square 검정 (Amphlett과 Delow, 1984)을 이용하여 구간 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 돌연변이시험 (CHO/HGPRT assay)

예비시험 결과, 엘라스타제는 30mg/ml의 농도에서도 세포독성을 나타내지 않았다. 시험계의 용해한계농도인 30mg/ml을 최고농도로 하여 5단계의 농도로 처리한 CHO/HGPRT assay의 결과를 Table 1에 나타내었다. 양성대조물질로써의 DMN을 0.5mg/ml의 농도로 처리한 결과

Table 1. Measurement of mutation induction by elastase in CHO/HGPRT assay

Compound	Treatment conc. (mg/ml)	Percent relative survival	Mutation frequency ($\times 10^{-6}$)
Elastase	0	100.0	7.4
	0.3	89.5	8.8
	1	97.1	7.8
	3	88.9	12.1
	10	96.9	8.0
	30	94.8	9.9
DMN	0.5	39.4	80.7

Results presented are the average of two experiments

음성대조군에 비하여 변이빈도가 증가되었으나, 엘라스타제로 처리한 경우에는 변이빈도의 증가가 나타나지 않았다. 또한 엘라스타제의 농도증가에 따른 변이빈도의 증가도 관찰되지 않았다. 따라서 엘라스타제는 상기 농도에서 변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

2. 소핵시험

시험성적은 Table 2에 나타내었다. 엘라스타제의 변이원성 시험의 일환으로 Schmid의 방법 (Schmid, 1975)에 따라 ICR계 마우스를 이용하여 소핵시험을 실시한 결과 소핵을 가진 다염성

Table 2. Micronucleus test of Elastase

Agent	Dose (mg/kg)	Sex	Sampling Time (hr)	No. of Mice Tested	No. of PCE/Mouse	MNPCE %		NCES / PCES
						Mean ± S.D.	Min./Max.	Mean±S.D.
10% Skim Milk	20ml/kg	M	24	6	1000	0.15 ± 0.11	0.0/0.3	0.80 ± 0.17
		F	24	6	1000	0.13 ± 0.10	0.0/0.3	1.13 ± 0.25
		M	48	6	1000	0.23 ± 0.12	0.1/0.4	0.87 ± 0.10
		F	48	6	1000	0.23 ± 0.14	0.1/0.4	0.93 ± 0.28
Elastase	1250	M	24	6	1000	0.20 ± 0.11	0.1/0.3	1.12 ± 0.43
		F	24	6	1000	0.08 ± 0.12	0.0/0.3	1.26 ± 0.21
		M	48	6	1000	0.12 ± 0.13	0.0/0.3	0.97 ± 0.21
		F	48	6	1000	0.22 ± 0.12	0.1/0.4	1.24 ± 0.28
	2500	M	24	6	1000	0.18 ± 0.16	0.0/0.4	1.04 ± 0.25
		F	24	6	1000	0.08 ± 0.04	0.0/0.1	1.39 ± 0.22
		M	48	6	1000	0.15 ± 0.11	0.0/0.3	1.02 ± 0.21
		F	48	6	1000	0.32 ± 0.10	0.2/0.4	0.96 ± 0.21
5000	M	24	6	1000	0.12 ± 0.10	0.0/0.3	1.25 ± 0.32	
	F	24	6	1000	0.08 ± 0.12	0.0/0.3	1.12 ± 0.42	
	M	48	6	1000	0.15 ± 0.15	0.0/0.4	0.98 ± 0.30	
	F	48	6	1000	0.18 ± 0.18	0.0/0.5	0.87 ± 0.29	
MMC	2	M	24	6	1000	6.13 ± 5.11**	0.2/14.6	3.74 ± 1.53**
		F	24	6	1000	5.08 ± 1.11**	4.2/7.2	2.23 ± 1.42
		M	48	6	1000	4.87 ± 1.96**	2.9/8.5	15.02 ± 7.63**
		F	48	6	1000	3.47 ± 0.87**	2.4/4.7	14.39 ± 3.00**

MNPCE % : Micronucleated polychromatic erythrocytes/1000 Polychromatic erythrocytes

NCES/PCES : Normochromatic erythrocytes/Polychromatic erythrocytes

MMC : Mitomycin C

M, F : Male, Female

** : Significantly different from the control ($P < 0.01$).

적혈구의 출현빈도에 있어서 약물 투여후 24시간과 48시간에 엘라스타제 투여군과 음성대조군 간에는 유의한 차가 없었으나 양성대조군은 음성대조군에 비하여 유의성($P < 0.01$)있게 증가하였다.

한편 정염성 적혈구와 다염성 적혈구의 비율도 약물 투여후 24시간과 48시간에 엘라스타제 투여군과 음성대조군과는 유의한 차가 없었으나 양성대조군과 음성대조군 간에는 약물 투여후 24시간에 도달한 양성대조군의 암놈의 경우를 제외하고 모두 유의한 차 ($P < 0.01$)가 있었다. 그리고 양성대조군에서 MMC 투여후 48시간에 도달한 경우 24시간 후에 도달한 경우보다 정염성 적혈구와 다염성 적혈구의 비율이 현저히 증가했는데 이것은 MMC투여 후 골수의 파괴가 진행되면서 48시간 후에는 다염성 적혈구의 생성이 심하게 억제되었기 때문인 것으로 생각된다. 위의 결과로 보아 엘라스타제는 마우스에서 소핵유발작용이 없으며 골수에 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Amphlett, G.E. and G.F. Delow, (1984): Statistical analysis of the micronucleus test. *Mutation Research* 128: 161-166.
2. Balo, J. and I. Banga, (1949): Elastase and elastase-inhibitor. *Nature* 164: 491.
3. Hsie, A.W., P.A. Brimer, T.J. Mitchell and D.G. Gosslee, (1975): The dose-response relationship for ethylmethanesulfonate-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Somatic Cell Genet.* 1: 247-261.
4. Hsie, A.W., D.A. Casciano, D.B. Couch, D.F. Krahn, J.P. O'Neill and B.L. Whitfield, (1981): The use of Chinese hamster ovary cells to quantify specific locus mutation and to determine mutagenicity of chemicals. A report of the Gene-Tox program. *Mutation Research* 86: 193-214.
5. Iwatsuki, K., F. Iijima and S. Chiba, (1983): Reduction of blood pressure vascular collagen in the spontaneously hypertensive rat by elastase, *Arch Intl Pharmacodyn Ther.* 263: 63-73.
6. Katsunuma, H., T. Ebihara, K. Shimizu, T. Iwamoto and M. Kiyokawa, (1983): Anti-atherosclerotic action of elastase with special reference to its effect on elastic fibers. *Age Ageing* 12: 183-194.
7. Koide, A. and S. Suzuki, (1985): Enhancement of lipoprotein lipase activity in rabbit plasma by porcine pancreatic elastase. *Jap. J. Atherosclerosis* 12: 1529-1533.
8. Littlefield, J.W., (1964): Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* 145: 709-710.
9. O'Neill, J.P., P.A. Brimer, R. Machanoff, G.P. Hirsch and A.W. Hsie (1977a): A quantitative assay of mutation induction at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system): Development and definition of the system. *Mutation Research* 45: 91-101.
10. O'Neill, J.P., D.B. Couch, R. Machanoff, J.R. San Sebastian, P.A. Brimer and A.W. Hsie (1977b): A quantitative assay of mutation induction at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system): Utilization with a variety of mutagenic agents. *Mutation Research* 45: 103-109.

11. O'Neill, J.P. and A.W. Hsie (1979): Phenotype expression time of mutagen-induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system). *Mutation Research* 59: 109-118.
12. Salamone, J. Heddle, E. Stuart and M. Katz, (1980): Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Research* 74: 347-356.
13. Schmid, W., (1975): The micronucleus test. *Mutation Research* 31: 9-15.

Mutagenicity Test of Porcine Pancreatic Elastase

**Yeong-Woo Jo, Nam-Gi Baik, Byoung-Ok Ahn, Sang-Deuk Lee,
Choong-II Bak, Won-Bae Kim and Joong-Ik Yang**

*Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd.
47-5 Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-gun, Kyunggi-do, 449-900, Korea*

Porcine pancreatic elastase was tested for mutagenicity in *in vitro* and *in vivo* systems, i.e. CHO/HGPRT assay and micronucleus test. The frequency of elastase-induced mutations to 6-thioguanine resistance in CHO-K₁-BH₄ cells was studied at 0-30 mg/ml concentrations of elastase. The mutation frequency didn't increase in proportion with increasing elastase concentration. And at any concentration, mutation frequency greater than two times the negative control was not produced. In the micronucleus test using mice, Elastase was administered orally as single doses of 1250, 2500 and 5000 mg/kg. As a negative control, 10% skim milk was administered orally at 20 ml/kg once. The incidence of bone marrow micronucleated polychromatic erythrocytes in the elastase-treated groups did not show any significant difference from that of the negative control group.

These results indicate that elastase is not mutagenic in these test systems.