

## CJ-50001 (rG-CSF)에 대한 변이원성시험

강재구 · 백남진 · 김달현\* · 하석훈 · 김제학 · 김현수  
제일제당 종합연구소

### Mutagenicity Test on CJ-50001 (rG-CSF)

Jae Ku Kang, Nam-Jin Baek, Dal Hyun Kim\*, Suk Hoon Ha,  
Je Hak Kim and Hyun Su Kim

R&D Center, Cheil Jedang Corp., 522-1 Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si,  
Kyonggi-Do 467-810, Korea  
(Received June 30, 1997)  
(Accepted August 7, 1997)

**ABSTRACT** : In order to evaluate the mutagenic potential of CJ-50001 (recombinant human granulocyte-colony stimulating factor), 3 sets of mutagenicity tests were performed. In the reverse mutation test using *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98 and TA100, CJ-50001 did not increase the number of revertant at any of the concentration tested in this study (500, 250, 125, 62.5 and 31.3  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ). CJ-50001, at the doses of 200, 100 and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 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 mice intraperitoneally administered with CJ-50001 at the doses of 5, 2.5 and 1.25 mg/kg. These results indicate that CJ-50001 has no mutagenic potential in these in vitro and in vivo systems.

**Key Words** : Reverse mutation, Chromosome aberration, Micronucleus, rG-CSF, CJ-50001

## I. 서 론

G-CSF(granulocyte-colony stimulating factor)는 단구/대식구, 섬유아세포, 성세포 및 내피세포에 의해 만들어져서 골수내에서 호중구 생산과 호중구 전구세포의 증식, 분화, 그리고 마지막 단계에서의 활성화(탐식능 향상, respiratory burst와 관련된 세포내 대사과정 야기, 항체의존성 세포독성 등)를 특이적으로 향상시키는 조절 인자의 일종이다(Nagata, 1994). 인간의 G-CSF는 유전자 재조합기술을 이용하여 대장균 혹은 동물 세포로부터 대량 발현시킬 수 있게 되었고(Souza 등, 1986; Nagata 등, 1986), 이것에 의해 임상 적용이 실용화됨에 따라 골수이식 환자들에서 골수의 회복 촉진, 골수억제성 항암제 치료 환자의 감염 기회 감소, 재생불량성 빈혈 환자의 호중구 기능 향상, 그리고 약물에 의해 야기되는 호중구감소증 치료 등에 사용되고

있다.

제일제당(주) 종합연구소에서는 대장균을 발현계로 사용한 유전자재조합기술로 recombinant granulocyte-colony stimulating factor(rG-CSF)를 생산하였다. 이에 대한 안전성시험의 일환으로서 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험, 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 마우스에서의 소핵시험 등의 변이원성 시험을 "의약품 등의 독성시험 기준" (1994)에 따라 실시하였으며, 그 결과를 본고에 발표하게 되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질의 조제 및 농도

제일제당 종합연구소에서 대장균을 이용하여 생산한 CJ-50001(Lot No. CS961025)를 10 mM acetic acid buffer(pH 4.0, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tween 80, 5% mannitol)에 희석하여 사용하였다.

\*To whom all correspondence should be addressed.

## 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, Missouri, USA)에서, 2-nitrofluorene(2-NF)은 Aldrich Chemical(Milwaukee, Wisconsin, USA)에서, 2-aminoanthracene(2-AA)은 Wako Pure Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

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

## 3. S-9 mix의 조제

Maron과 Ames(1983)의 방법에 따라 S9 분획을 얻었다. 체중 약 200g의 Sprague-Dawley rat에 Aroclor 1254를 500 mg/kg 용량으로 복강내 투여하였다. 5일째에 간을 적출하여 3배 volume의 0.15 M KCl 용액을 넣고 균질화하였다. 원심분리(9,000 g, 10 분)한 후 상청액을 취하여 S9 분획을 얻었다. S9 mix의 조성은 다음과 같다 : 10%(v/v) S9, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 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* 4 균주(TA1535, TA1537, TA98, TA100)를 이용하여 Maron 및 Ames(1983)의 방법에 따라 복귀돌연변이시험을 실시하였다. 예비독성 시험결과 500 µg/plate의 농도에서 *Salmonella typhimurium* TA100의 복귀돌연변이 집락수의 증가 혹은 감소를 보이지 않았으므로, 500 µg/plate를 본시험에서의 최고농도로 설정하였다.

5,000, 2,500, 1,250, 625 및 313 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 ml를 37°C에서 20분간 반응시켰다. 여기에 top agar 2 ml를 혼합하여 minimal glucose agar plate에 중층하였다. 37°C에서 48시간 배양후 복귀돌연변이 집락의 수를 계측하였다. 복귀변이 집락의 수는 plate 3매의 평균치로 나타내었으며, 음성대조군과 비교하여 복귀변이 집락수가 2배

이상을 보이거나 용량상관성이 있는 경우에 양성으로 판정하였다.

## 5. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

Chinese Hamster Lung(CHL) cell을 이용하여 Dean 및 Danford(1984)의 방법에 따라 *in vitro* 염색체이상시험을 실시하였다. 세포는 10% fetal bovine serum이 포함된 Eagle's minimal essential medium(EMEM)을 이용하여 배양(5% CO<sub>2</sub>, 포화습도, 37°C)하였다. CJ-50001 200 µg/ml을 48시간까지 처리하더라도 세포성장을 저해하지 않았으므로, 이를 본시험에서의 최고농도로 설정하였다.

6시간 및 24시간 약물처리를 위해서는  $2 \times 10^4$  cells/ml, 48시간 약물처리를 위해서는  $0.7 \times 10^4$  cells/ml의 CHL cell 부유액을 직경 10 cm plate에 10 ml씩 각각 분주하였다. 48시간동안 배양한 후, CJ-50001을 최종 농도가 200, 100 및 50 µg/ml 되게끔 세포배양액에 첨가하였다. 대사활성화법의 경우에는 약물과 함께 S9 mix를 처리하고 6시간후에 신선한 배지로 교환하였다. 직접법 및 대사활성화법 모두의 경우에, 약물처리 개시부터 22시간 혹은 46시간 후에 colcemid를 0.25 µg/ml되게 첨가하고 2시간 더 배양하였다. 0.25% trypsin 처리 및 원심분리(1,000 rpm, 5 min)에 의해 cell을 회수한후, 0.075 M KCl 용액에 현탁하여 37°C에 15분동안 방치하였다. 미리 냉각된 고정액(methanol:acetic acid=3:1, v/v)으로 현탁 및 원심분리를 3회 반복하여 세포를 완전히 고정시켰다. 최종 원심분리후 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. 염색체이상이 있는 세포의 출현빈도가 5% 미만을 음성, 5% 이상 10% 미만을 의양성, 10% 이상을 양성으로 판정하였다.

## 6. 마우스에서의 소핵시험

SPF ICR 웅성 마우스를 Charles River Japan에서 구

입하여 1주일 이상의 예비순화기간을 거친후 7-9주령이 되었을 때 사용하였으며, Schmid(1975)의 방법에 의해 시험을 수행하였다. 예비시험에서 임상용량의 약 1,000배인 5 mg/kg을 복강내 투여하였을때 24, 48 및 72시간째에서 소핵의 출현이 증가하지 않았으므로, 5 mg/kg을 본시험에서의 최고농도로 설정하고 24시간째를 소핵관찰시기로 결정하였다.

CJ-50001을 5, 2.5 및 1.25 mg/kg의 3 용량으로 단회 복강내 투여하였다. 양성대조군에는 Mitomycin 2 mg/kg을, 음성대조군에는 용매를 각각 복강내 투여하였다 (10 ml/kg). 약물 투여후 24시간째에 마우스를 경추탈구에 의하여 도살하여 대퇴골을 분리하였다. 대퇴골내부를 fetal bovine serum으로 씻어내어 골수세포 현탁액을 얻었고, 원심분리(microcentrifuge, 1,000 rpm, 5 min)하여 상청액을 버렸다. 최종의 현탁액 적당량을 slide glass에 도말하여 실온에서 하루동안 건조하였다. 메탄올에 5분간 고정된 후, 4% Giemsa 용액(in PBS, pH 6.8)에서 25분동안 염색하였다. 염색액을 흐르는 물로 씻어내고 0.004% citric acid 용액에 잠깐 담그었다 꺼낸 후 다시 물로 씻어 자연건조하였다.

현미경으로 관찰하여 1,000개의 다염성적혈구(PCE, polychromatic erythrocyte)중 MNPCE(micronucleated PCE)의 비율 및 500개의 적혈구중 PCE의 비율을 결정하였다. MNPCE 값은 Dunnett t-test에 의하여, PCE의 비율은 Student's t-test에 의하여 음성대조군과의 통계적 유의성을 검정하였다.

### III. 결과 및 고찰

*Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98 및 TA100을 이용하여 수행한 복귀돌연변이시험결과를 Table 1에 표시하였다. CJ-50001은 500, 250, 125, 62.5 및 31.3 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 나타났다. 대사활성화시, CJ-50001은 200, 100 및 50 µg/ml의 모든 용량에서 이상염색체를 지닌 세포의 출현빈도가 4% 이하로서 그 빈도가 무처리군에 비하여 증가하지 않았으며, 양성대조물질인 benzo[a]pyrene은 20% 이상의 빈도를 나타냈다. 직접법에서도 CJ-50001은 24시간 및 48시간 모두에서 이상염색체를 지닌 세포의 출현빈도가 3% 이하였으며, 양성대조물질은 mitomycin C는 30% 이상의 빈도를 나타냈다.

마우스를 이용한 소핵시험에서, CJ-50001은 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( $p < 0.01$ )를 보였다.

이상의 결과를 종합하여, CJ-50001은 미생물을 이용

**Table 1.** Reverse mutation test of CJ-50001 in *S. typhimurium*

Compound <sup>a</sup>	Dose (µg/plate)	S9 Mix	No. of revertant colonies per plate (Mean±S.D.)			
			TA1535	TA1537	TA98	TA100
Vehicle		-	21±3	20±6	35±5	185±5
CJ-50001	500	-	17±5	20±6	36±5	178±12
	250	-	16±3	19±2	38±4	209±12
	125	-	18±4	24±3	39±0	183±2
	62.5	-	18±5	18±9	38±5	200±9
	31.3	-	23±5	24±9	38±11	195±27
SAZ	0.5	-	388±17	NT	NT	564±52
9-AA	50	-	NT <sup>b</sup>	325±63	NT	NT
2-NF	1	-	NT	NT	405±31	NT
Vehicle		+	19±6	20±4	36±8	229±26
CJ-50001	500	+	17±1	21±5	39±4	201±5
	250	+	14±3	25±7	54±8	198±16
	125	+	15±2	26±5	45±5	198±8
	62.5	+	14±6	25±1	45±6	196±12
	31.3	+	16±3	26±8	44±2	178±26
2-AA	0.5	+	NT	NT	1099±9	NT
	1	+	NT	NT	NT	2138±731
	2	+	306±9	624±59	NT	NT

<sup>a</sup> SAZ, sodium azide; 9-AA, 9-aminoacridine hydrochloride; 2-NF, 2-nitrofluorene; 2-AA, 2-aminoanthracene. <sup>b</sup> NT, not tested.

**Table 2.** Chromosome aberration test of CJ-50001 in CHL cell

Compound <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	S9 mix	Time (hr) <sup>b</sup>	No. of metaphases analyzed	No. of aberration <sup>c</sup>					No. of aberrant cells <sup>d</sup>		
					gap	ctb	cte	csb	cse	num	TA(+g)	TA(-g)
CJ-50001	0			72	0	0	0	0	0	0	0	0
	50			81	1	0	0	0	0	0	1	0
	100	+	6-18	100	4	0	0	0	0	0	2	0
	200			100	3	0	1	0	1	0	4	1
B[a]P	20			100	3	3	16	2	3	0	23	20
CJ-50001	0			100	1	0	0	0	0	0	1	0
	50	-	6-18	100	1	0	0	0	0	0	1	0
	100			100	2	0	0	0	0	0	2	0
	200			100	1	0	0	0	0	0	1	0
CJ-50001	0					100	0	0	1	0	0	1
	50			100	0	0	0	0	1	0	1	1
	100	-	24-0	100	1	1	0	0	1	0	3	2
	200			100	2	0	0	1	0	0	2	1
MMC	0.2			100	4	8	55	1	2	0	36	32
CJ-50001	0			100	0	0	0	0	1	0	1	1
	50	-	48-0	100	1	0	0	0	0	1	1	0
	100			91	0	0	1	0	0	0	1	1
	200			100	2	0	1	0	0	0	2	1

<sup>a</sup> MMC, mitomycin C; B[a]P, benzo[a]pyrene.

<sup>b</sup> Treatment time – Expression time.

<sup>c</sup> gap, chromatid and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; num, numerical aberration.

<sup>d</sup> TA(+g), total structural aberration including gap; TA(-g), total structural aberration excluding gap.

**Table 3.** Micronucleus test of CJ-50001 in mice

Compound	Route	Dose (mg/kg)	No. of animal	MNPCE <sup>a</sup> (% , Mean ± SD)	PCE/(PCE+NCE) <sup>b</sup> (% , Mean ± SD)
Vehicle <sup>c</sup>	i.p.	0	6	1.67 ± 0.82	47.4 ± 8.7
CJ-50001	i.p.	1.25	6	0.67 ± 0.82	39.1 ± 7.6
	i.p.	2.5	6	1.00 ± 1.26	42.9 ± 5.1
	i.p.	5	6	1.00 ± 1.10	42.2 ± 7.4
	Mitomycin C	i.p.	2	6	61 ± 27*

<sup>a</sup> The number of micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) was calculated from 1000 PCEs per animal.

<sup>b</sup> The percentage of PCE in 500 erythrocytes per animal.

<sup>c</sup> 10 mM Acetic acid (pH 4.0, 40 µg/ml Tween 80, 5% mannitol).

\* Statistically significant from vehicle control (P<0.01, Dunnett *t*-test).

\* Statistically significant from vehicle control (P<0.01, Student's *t*-test).

한 복귀돌연변이시험 및 배양세포를 이용한 염색체이상시험 등의 *in vitro* 시험, 마우스를 이용한 *in vivo* 소핵시험 모두에서 변이원성이 없는 것으로 판정하였다.

### 참고문헌

국립보건안전연구원 (1994) : 의약품 등의 독성시험 기준 (국립보건안전연구원 고시 제 94-3호)

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. Eds.), (IRL

Press, Oxford), p. 187-232.

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

Nagata, S. (1994) : Granulocyte colony stimulating factor and its receptor in *The Cytokine Handbook* (Thompson, A. Ed.), (Academic Press, London), p. 371-385.

Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, Masayoshi, Nomura, H. and Yamazaki, T. (1986) : The chromosomal gene structure and two mRNAs for human gran-

- ulocyte-colony stimulating factor. *EMBO J.*, **5**(3), 575-581.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.
- Souza, L.M., Boone, T.C., Gabilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M.A.S., Mertelsmann, R. and Welte, K. (1986): Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, **232**, 61-65.