

LB20304a의 광독성시험

김배환¹, 이상구¹, 윤병일²

¹LG화학 기술연구원 바이오텍연구소

²서울대학교 수의과대학 병리학교실

Phototoxicity studies of LB20304a

Bae-Hwan Kim¹, Sang-Koo Lee¹ and Byong-Ill Yoon²

¹Biotech Research Institute, LG Chemical Research Park,

²Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University,

Abstract. The phototoxic potentials of LB20304a, a new quinolone compound being developed by LG Chemical Ltd., and reference compounds (Ciprofloxacin; CPMX, Enoxacin; ENX and Lomefloxacin; LFLX) were compared in a murine model. In addition, photostability of these compounds was studied after irradiation with long-wave UV light (UVA, 0, 0.3, 1 or 3 Joule/cm²). When hairless mice (9 to 11 weeks old, 19~26 g) were orally administered with different dose levels of test compounds and exposed to UVA (40 J/cm²), inflammatory reactions were observed in a dose dependent manner. Among the compounds tested, LB20304a demonstrated the least phototoxic effects and showed no inflammatory lesions at a dose level of 100 mg/kg (Low dose). ENX and LFLX demonstrated much greater phototoxic reactions, while CPMX showed similar or slightly greater phototoxic reactions, compared to LB20304a. Similar to the in-vivo results, the solutions of LB20304a and CPMX irradiated with UVA demonstrated reduced spectral changes compared to those of ENX and LFLX. In conclusion, these data suggest that phototoxic potencies of the quinolones tested were; LFLX > ENX > CPMX ≥ LB20304a. No phototoxic dose of LB20304a in mice was 100 mg/kg.

Key words: Hairless mice; in-vivo, in-vitro photostability; LB20304a; Phototoxicity; Quinolone; UVA

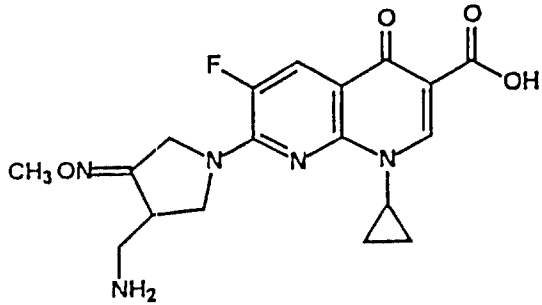
서 론

퀴놀론 항생제는 1960년대에 nalidixic acid가 처음 개발되어 요로감염증등의 그람 음성균에 주로 사용된 이래 많은 발전을 거듭하고 있다. 이 초기의 구세대 퀴놀론 항생제는 항균범위도 좁으며 독성학적으로도 문제점이 많이 지적되어 이를 보완하기 위해 퀴놀론 구조의 R6 위치에 fluorine atom을 도입한 신세대 퀴놀론 항생제인 6-fluorinated quinolone이 개발되게 되었다.¹ 이 새로운 fluoroquinolone들은 기존 항생제인 penicillin계, cephalosporin계, tetracycline계 및 microlid계등의 기존 항생제에 비해 항균범위와 효능, 약물동력학, 독성학적 성질등에서 많은 잇점이 있어, 구세대 퀴놀론 항생제나 다른 항생물질에 비해 큰 발전을 보여 왔다. 현재 임상에서 사용되는 fluoroquinolone에는 norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin, pefloxacin등이 있으며, 그외에 많은 물질들이 개발과정에 있다.²

동물실험 및 임상실험에서 퀴놀론 항생제는 종종 부작

용 및 독성이 보고되고 있는데, 지금까지 알려진 주요 부작용(side-effect)으로는 phototoxicity, arthropathy, nephrotoxicity, central nervous system(CNS) effect, ocular toxicity, impairment of spermatogenesis, metabolic drug interactions, cardiovascular effects, possible mutagenicity, gastrointestinal adverse reactions 등이 있다.^{3,5} 이중 phototoxicity는, 초기 퀴놀론 항생제인 pefloxacin, nalidixic acid등에서 주요 임상부작용으로 보고된 이래 ofloxacin, norfloxacin, enoxacin, ciprofloxacin 등의 최근 퀴놀론항생제에서도 미약하지만 광독성이 인정되고 있다.^{1,3,6}

이에 본 실험에서는 LG화학 바이오텍 연구소에서 개발한 새로운 퀴놀론 항생제인 LB20304a (Text-Fig. 1)의 광독성여부를 관찰하기 위하여, 기존의 퀴놀론 항생제인 ciprofloxacin, enoxacin, lomefloxacin등을 대조 약물로 선정하여 in vivo 및 in vitro 방법으로 실험을 실시하였다.



Text-Fig. 1. Chemical structure of LB20304a

재료 및 방법

시험물질

LG화학 바이오텍 연구소에서 새로이 개발한 신세대 퀴놀론 항생제인 LB20304a를 시험물질로 사용하였다. 대조물질로는 Ciprofloxacin(CPFX)(BORAL QUIMICA, S.A, Espana), Enoxacin(ENX)(Sigma Chemical Co.) 및 Lomefloxacin(LFLX) (Shionogi Pharmaceutical Co. Japan)를 사용하였으며, 용매로는 Corn oil(Sigma)를 사용하였다.

in vivo 실험⁷

9-11 주령의 암컷 hairless 마우스를 LG화학 바이오텍 연구소 동물생산실로부터 공급받아, 건강한 동물 66마리를 실험에 사용하였다. 실험기간중 사육실 환경조건은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 환기횟수 12-15회/hr, 조명 12 hr(08:00-20:00), 조

도 150-300lux를 유지시켰고, 사료와 음수는 자유급식시켰다. 투여군 구성은, LB20304a와 CPFX는 400, 200, 100 mg/kg의 3개 용량군을, ENX와 LFLX는 200, 100 mg/kg의 2개 용량군을 두었으며, 이들 물질은 용매인 corn oil에 부유시켜 군당 6마리씩 경구로 10ml/kg으로 투여하였다. 음성대조군으로는 용매인 corn oil만을 투여하였다. 약물 투여 후 마우스는, 광독성장치(Ultra irradiation system, BIOTRONIC, VILBER LOURMAT, France)를 이용하여 UVA(320-380 nm)로 최종 에너지가 40 J/cm^2 이 되도록 조사시켰다. 그 후 광독성 지표로서 귀의 발적 및 피부상태를 30분, 24, 48 및 72시간 후에 관찰하여 점수화하여 비교하였다. (0, normal; 1, very slight erythema; 2, well-defined erythema; 3, moderate to severe erythema; 4, severe erythema to slight eschar formation) 그외 실험 전 기간동안 임상증상 및 피부상태등의 이상 유무도 매일 관찰하였다. 모든 동물은 투여 72시간 후에 안락사 시킨후, 귀 및 피부를 잘라내어 10% 중성 포르말린에 고정하여 병리조직학적 검사를 실시하였다.

in vitro instability 실험⁸

시험물질을 약간의 0.025N sodium hydroxide 용액에 녹인 후, 주사용 증류수를 첨가하여 최종농도가 $20 \mu\text{g/ml}$ 가 되도록 만들었다. 이 용액 40ml을 50ml-beaker에 넣은후 magnetic bar로 저어 주면서, 광독성장치내에서 UVA로 각각 0.3, 1 및 3 J/cm^2 가 되도록 조사하였다. 각 조사된 용액은 UV spectrophotometer를 이용하여, UV 흡광도의 변화를 관찰하였다.

Table 1. Design of experiment and induction of inflammatory reaction in the ears of hairless-mice

Quinolone	Dose (mg/kg)	No. of Mice irradiated	Result at time after irradiation																				Death					
			30min					24hr					48hr					72hr										
			0 ^{a)}	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4						
Control	0	6	6 ^{b)}	0	0	0	0	0 ^{c)}	6	0	0	0	0	0 ^{c)}	6	0	0	0	0	0 ^{c)}	6	0	0	0	0	0 ^{c)}	0	
LB20304a	100	6	5	1	0	0	0	0.17	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
LB20304a	200	6	1	3	2	0	0	1.17	4	2	0	0	0	0.33	5	1	0	0	0	0.17	4	2	0	0	0	0	0.33	0
LB20304a	400	6	0	1	5	0	0	1.83	0	3	3	0	0	1.50	1	3	2	0	0	1.17	1	3	2	0	0	1.17	0	
CPLX	100	6	4	2	0	0	0	0.33	5	1	0	0	0	0.17	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
CPLX	200	6	1	3	2	0	0	1.17	2	3	1	0	0	0.83	4	2	0	0	0	0.33	4	2	0	0	0	0.33	0	
CPLX	400	6	0	0	5	1	0	2.17	0	4	2	0	0	1.33	1	4	1	0	0	1.00	1	3	2	0	0	1.17	0	
ENX	100	6	0	0	6	0	0	2.00	0	4	2	0	0	1.33	1	4	1	0	0	1.00	1	4	1	0	0	1.00	0	
ENX	200	6	0	0	4	2	0	2.33	0	0	5	1	0	1.83	0	1	4	1	0	2.00	0	3	3	0	0	1.50	0	
LFLX	100	6	0	0	6	0	0	2.00	0	0	4	2	0	2.33	0	0	6	0	0	2.00	0	2	4	0	0	1.67	0	
LFLX	200	6	0	0	5	1	0	1.83	0	0	4	2	0	2.33	0	0	5	1	0	1.83	0	0	4	1	1	2.50	0	

^{a)}; Grade of ear redness - 0, Normal; 1, very slight erythema; 2, Well-defined erythema; 3, Moderate-to-severe; 4, Severe-slight eschar formation

^{b)}; Number of mice with ear redness

^{c)}; Mean scores of ear redness

Table 2. Design of experiment and induction of irritation reaction in the skin of hairless-mice

Quinolone	Dose (mg/kg)	No. of Mice irradiated	Result at time after irradiation																				Death					
			30min					24hr					48hr					72hr										
			0 ^{a)}	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4						
Control	0	6	6 ^{b)}	0	0	0	0	0 ^{c)}	6	0	0	0	0	0 ^{c)}	6	0	0	0	0	0 ^{c)}	6	0	0	0	0	0 ^{c)}	0	
LB20304a	100	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
LB20304a	200	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0.33	0	
LB20304a	400	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0.67	0	
CPLX	100	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0.17	0	
CPLX	200	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0.50	1	4	1	0	0	1.00	0	
CPLX	400	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	2	1	3	0	2.17	0	1	1	3	1	2.67	0	
ENX	100	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0.17	0	0	5	1	0	2.17	0	
ENX	200	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	2.00	0	0	3	2	1	2.67	0	
LFLX	100	6	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	2.00	0	2	1	3	0	2.17	0	
LFLX	200	6	6	0	0	0	0	0	3	1	2	0	0	0.83	0	0	4	2	0	2.33	0	0	2	4	0	2.67	0	

^{a)}; Grade of skin irritation - 0, Normal; 1, very slight eschar; 2, Well-defined eschar; 3, Severe eschar & slight scar; 4, Severe scar

^{b)}; Number of mice with induction of skin irritation

^{c)}; Mean scores of skin irritation

Table 3. Histopathological findings in the ear sections of hairless-mice

Quinolone	Dose (mg/kg)	No. of Examined Ears	Cell Infiltration					Edema					Necrosis/ Epithelia	
			-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++		
Control	0	12	11	1	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0
LB20304a	100	12	11	1	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0
LB20304a	200	12	10	2	0	0	0	9	2	1	0	0	0	0
LB20304a	400	12	8	3	1	0	0	11	0	0	1	0	0	0
CPLX	100	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0
CPLX	200	12	10	1	1	0	0	11	1	0	0	0	0	0
CPLX	400	12	5	1	2	3	1	5	4	2	1	0	0	2
ENX	100	12	5	1	4	2	0	5	3	4	0	0	0	2
ENX	200	12	0	0	0	9	3	0	0	0	9	3	0	9
LFLX	100	12	0	0	2	7	3	0	0	0	4	8	0	11
LFLX	200	12	0	0	6	3	3	0	0	2	6	4	0	10

-; Negative, ±; Very slight, +; Slight, ++; Mild, +++; Moderate

결 과

in vivo 실험

임상증상 (Table 1, 2). 실험 전기간 동안 모든동물에 있어 사망동물은 관찰되지 않았다. 광독성 지표로서 관

찰한 귀 발적정도에 있어서는, 용매인 corn oil을 투여한 음성대조군을 제외한 대부분의 군에서, UVA조사 30분 후에 가장 심한 발적현상을 보였다. 시험물질별 발적정도는 LFLX 및 ENX 투여군에서 가장 심한 반응이 관찰되었고, LB20304a 와 CPF의 경우에는 약한 반응이

Table 4. Histopathological findings in the skin sections of hairless-mice

Quinolone	Dose (mg/kg)	No. of Examined Ears	Cell Infiltration						Edema					Necrosis/ Epithelia
			-	±	+	++	+++	++++	-	±	+	++	+++	
Control	0	6	3	2	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
LB20304a	100	6	2	1	3	0	0	0	6	0	0	0	0	0
LB20304a	200	6	0	0	2	3	1	0	3	0	2	1	0	0
LB20304a	400	6	0	1	1	3	1	0	3	2	0	1	0	4
CPLX	100	6	1	2	1	2	0	0	5	1	0	0	0	0
CPLX	200	6	0	0	1	2	3	0	3	1	2	0	0	2
CPLX	400	6	0	0	0	3	2	1	6	0	0	0	0	5
ENX	100	6	0	0	0	1	2	3	4	0	2	0	0	6
ENX	200	6	0	0	0	1	5	0	4	0	2	0	0	6
LFLX	100	6	0	0	0	1	5	0	1	0	5	0	0	5
LFLX	200	6	0	0	1	2	3	0	0	0	5	1	0	6

-; Negative, ±; Very slight, +; Slight, ++; Mild, +++; Moderate, ++++; Severe

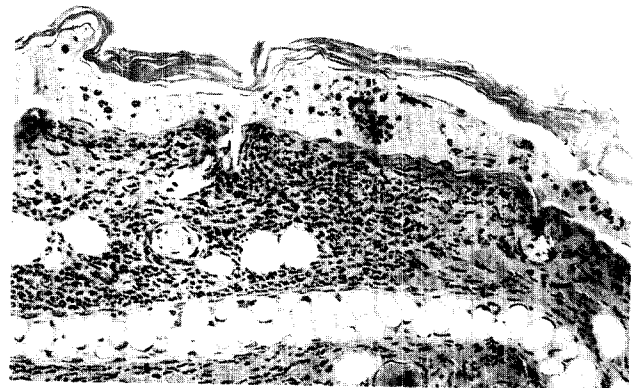
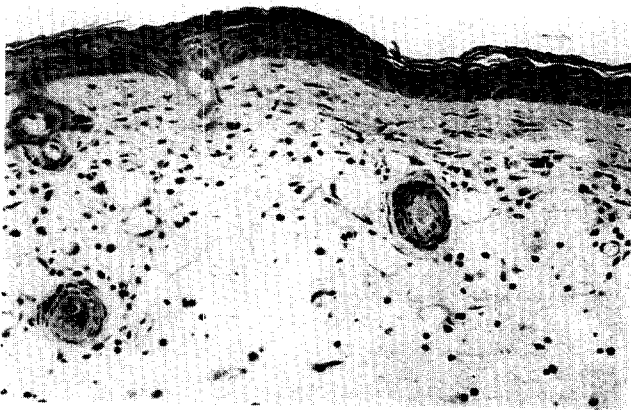
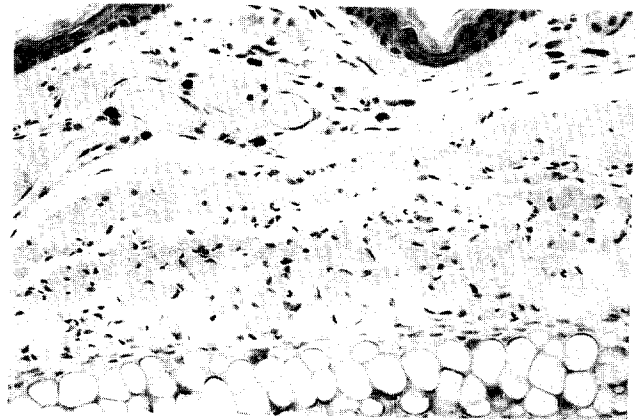
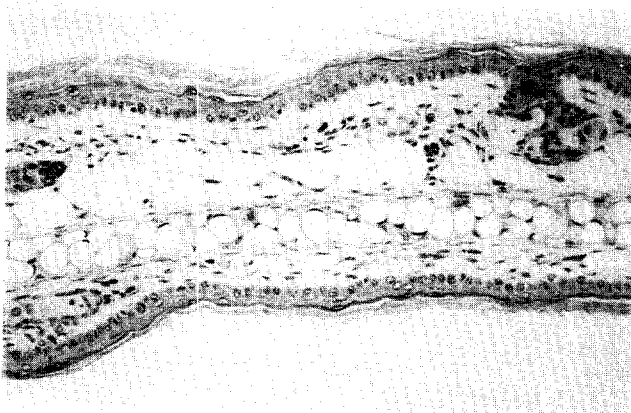


Fig. 1. Histopathological findings of ear in the control animal. No specific changes are observed. (H & E x85).

Fig. 2. Slight cell infiltration with mild degree of edema were observed in the dermis of the ear treated with LB20304a(400 mg/kg)(H & E x85).

Fig. 3. Cell infiltration with moderate degree of edema were seen in the ear treated with Enoxacin(200 mg/kg)(H & E x85).

Fig. 4. Moderate cell infiltration and mild edema were seen in the ear treated with Lomefloxacin(200 mg/kg)(H & E x85).

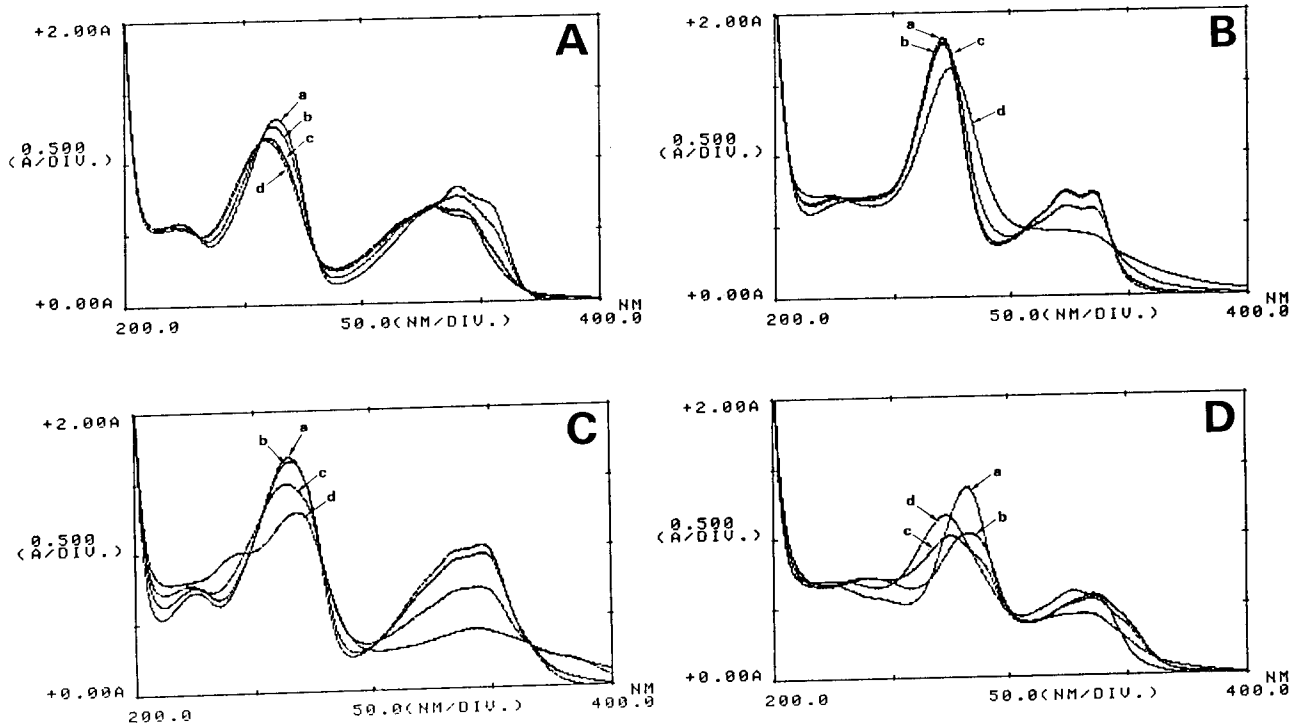


Fig. 5. The changes of UV absorption after UVA irradiation. A:LB20304a, B:Ciprofloxacin, C:Enoxacin D:Lomefloxacin (The Solutions were irradiated with 0J(a), 0.3J(b), 1J(c) and 3J(d) of UVA per cm^2)

관찰되었으며, 용매투여군에서는 발적현상이 관찰되지 않았다. 피부의 발적소견은 시간이 지남에 따라 모든 군에서 감소하는 경향을 보였으며, LB20304a와 CPFX의 100mg/kg 투여군의 경우에는 24시간 및 48시간 후에 정상으로 회복되었다. 또한 이런 발적현상은 각 시험물 질별로 용량상관성 있는 결과를 나타내었다.

그리고 주요 임상증상으로, Hairless 마우스 등부분의 피부에 가피 및 상처가 관찰되었는데, UVA 조사초기에는 모든 동물이 정상소견을 보였으나 시간이 지남에 따라 점점 가피가 생기기 시작하여, ENX과 LFLX 투여군에서는 가피의 탈락과 진피의 손상에 의한 상처로 까지 발전하였다. 이 증상도 역시 용량상관성이 있었으며, LB20304a의 경우도 실험종료시까지 미약하나 가피의 형성이 관찰되었다.

병리조직검사소견.

7 (Table 3, Fig. 1-4): LB20304a의 경우 100mg/kg 투여군에서는 아무런 병변이 관찰되지 않았으며, 200mg/kg 투여군에서는 미약한 부종소견이 1/12레에서 관찰되었고, 400mg/kg 투여군에서도 미약한 염증반응과 약간의 부종소견이 각각 1/12레씩 관찰되었다. 피부손상에 있어서도 ENX이나 LFLX에서 관찰되었던 상피세포의 괴사, 염증반응 및 괴양소견은 전혀 관찰되지 않았다.

CPFX의 경우 100mg/kg 투여군에서는 아무 병변이 없었으며, 200mg/kg 투여군에서는 1/12레에서만 미약한 세포침윤소견이 관찰되었고, 400mg/kg 투여군에서는 6/12레에서 염증반응이, 3/12레에서 부종소견이 관찰되었다. 피부상피세포의 괴사소견은 400mg/kg 투여군에서만 2/12레에서 관찰되었다.

ENX 100mg/kg 투여군의 경우는 6/12레에서 호중구침윤이 관찰되었으며, 4/12레에서 부종이 관찰되었고, ENX 200mg/kg 및 LFLX의 100, 200mg/kg 투여군의 경우는 모든 동물에서 호중구침윤과 부종이 관찰되었다.

피부상피세포의 괴사소견의 경우는 ENX의 100 및 200mg/kg 투여군의 경우에 각각 2/12레, 9/12레에서 관찰되었으며, LFLX의 100, 200mg/kg 투여군의 경우는 가장 심한 손상을 보여 각각 11/12, 10/12에서 관찰되었다.

피부(Table 4): 등쪽 피부의 조직검사결과, 병변의 정도는 귀의 병변과 양상이 일치하며, LB20304a의 경우도 염증 및 부종소견이 많은 레에서 관찰되고 있었다.

in vitro instability 실험

LB20304a 및 다른 퀴놀론항생제들의 용액을 UVA로 조사시켰을 때 UVA의 흡광범위는 모두 변화됨이 관찰되었다(Fig. 5). 그러나 흡광범위 변화와 흡광점들의 변이 정도를 서로 비교해 보았을 때, ENX와 LFLX가 LB20304a

와 CPFX보다 심한 변화를 일으키는 것이 관찰되었다.

또한 UVA로 조사시킨 이들 시험물질의 수용액을 형광 detector를 이용한 HPLC로 정량분석하여, 조사시키기 전의 수용액내의 시험물질에 대한 각 수용액내의 시험물질량을 비율로 나타내었을때, 그 원래약물의 파괴정도는 LFLX > ENX > CPFX ≥ LB20304a 순으로 나타났다 (Fig. 5).

고 찰

일반적으로 퀴놀론 항생제들은 빛에 민감하여, UVA 나 그외 자연광에 의해 파괴되어 다른 대사물로 변형되어진다고 알려져 있다.⁹ 즉 퀴놀론유도의 광독성반응은, 피부내에 분포된 약물의 대사체가 광에너지를 흡수하여 생체내에서 화학반응을 일으킴으로써 유도된다고 할 수 있다. 물론 광독성반응의 기전에 대해서는 여러 방법으로 설명될 수 있으나,⁹ 아직도 이견이 많은 상태이며, 더 많은 연구가 되어져야 한다고 생각된다.

본 실험에서도, LB20304a의 빛에 대한 민감성 및 광독성여부를 기존의 fluoroquinolone 항생제인 CPFX, ENX 및 LFLX와 비교하여, 마우스를 이용한 *in vivo* model 및 *in vitro* photostability 실험으로 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

in vivo 실험결과, 광독성 지표로서 귀의 발적 및 피부상태를 관찰하였을때, LB20304a와 CPFX는 미약한 증상을 보였으며, ENX과 LFLX는 낮은 농도에서도 심한 증상을 보였다. 그 양상은 UVA 조사 30분 후에 가장 심했고 점점 갈수록 약해졌으며, 각 시험물질별로는 용량상관성 있는 결과를 보였다. 실험 종료 후 조직병리검사에서 같은 양상의 결과가 관찰되었다.

in vitro instability 실험을 통한 UVA에 의한 민감도 실험결과에서도, 흡광범위의 변화에서 ENX과 LFLX는 심한 변화를 보였으나, LB20304a와 CPFX는 약한변화를 보여 *in vivo* 결과와 일치하였다.

이상의 결과를 종합해 볼때, 본 실험에 쓰인 항생제들의 광독성 정도는 LFLX > ENX > CPFX ≥

LB20304a라고 정의할 수 있는데, 이로써 LB20304a는 광독성이 약하다고 알려진 CPFX와 비교시도 거의 같거나 다소 약한 정도의 광독성을 가진 물질이라 생각되어진다. 또한 LB20304a의 광독성 관련 무해용량은 100 mg/kg이하로 추측된다.

참고문헌

- 1 Takayama S, Hirohashi M, et al. Toxicity of quinolone antimicroagents. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 45:1-5, 1995.
- 2 Christ W, Lehnert T, et al. Specific toxicologic aspects of the Quinolones. *Reviews of infectious disease*, 10(Suppl 1):s141-s146, 1988.
- 3 Christ W, Lehnert T. Toxicity of the Quinolones. In: *New Generation of Quinolone*, ed. Siporin C, Heifetz CL, et al., pp 165-187, Marcel Dekker Inc., New York, 1990.
- 4 Mayer DG. Overview of Toxicological studies. *Drugs* 34(Suppl 1):150-153, 1987.
- 5 Norrby SR. Side-effects of quinolones: Comparisons between quinolones and other antibiotics, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 378-383, 1991.
- 6 Hooper DC, Wolfson JS. Adverse effects. In: *Quinolone Antimicrobial Agents*, ed. Hooper DC, Wolfson JS, 2nd ed., pp 489-512. American Society for Microbiology, Washington DC 20005, 1993.
- 7 Marutani K, Matsumoto M, et al. Reduced Phototoxicity of a Fluoroquinolone Antibacterial Agent with a Methoxy Group at the 8 Position in Mice Irradiated with Long-Wavelength UV Light. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(10):2217-2223, 1993.
- 8 Matsumoto M, Kojima K, et al. Photostability and Biological Activity of Fluoroquinolones Substituted at the 8 Position after UV Irradiation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36(8):1715-1719, 1992.
- 9 Wagai N, Tawara K. Possible direct role of reactive oxygens in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. *Arch Toxicol* 66:392-397, 1992.