

신규 방사성 항암제 DW-166HC의 소핵시험

문은이 · 이 진 · 이원용 · 최청하 · 이덕근* · 유제만 · 정용호 · 윤성준 · 박경배¹

동화약품공업(주) 중앙연구소, ¹한국원자력연구소

Micronucleus Test of DW-166HC, a Novel Radiopharmaceutical Anticancer Agent

Eun Yi MOON, Jin LEE, Won Yong LEE, Chung Ha CHOI, Dug Keun LEE*,
Jei Man RYU, Yong Ho CHUNG, Sung June YOON and Kyung Bae PARK¹

Research Laboratories of Dong-Wha Pharm. Ind. Co. Ltd., 189, Anyang-dong,
Anyang City, Kyunggi-do, Korea 430-010

¹Korea Atomic Energy Research Institute, 150 Dugjin-dong, Yusung-gu, Daejeon City, Korea 305-353

(Received May 16, 1997; accepted July 22, 1997)

Abstract – DW-166HC (¹⁶⁶Holmium (¹⁶⁶Ho)-Chitosan complex) is a new radiopharmaceutical anticancer agent with a broad anti-tumorigenic spectrum, especially against human hepatic cancer. DW-166HC was evaluated for the appearance of micronucleus in polychromatic erythrocytes (PCEs) of mouse bone marrow cells after subcutaneous and intravenous single administration. Bone marrow cells were prepared at 24 hr and 48 hr after DW-166HC-I (¹⁶⁶Ho-Chitosan complex : cold compound) administration and at 24 hr, 72 hr and 2 weeks after DW-166HC (¹⁶⁶Ho-Chitosan complex : hot compound) administration. The results showed there was no statistically significant increase of the numbers of PCEs with micronucleus in all DW-166HC-I administered groups compared with a negative control group but there was statistically significant increase of the numbers of PCEs with micronucleus at 24 hr and 72 hr in all DW-166HC administered groups, which was recovered after 2 weeks from the drug administration. The results also showed the ratio of normochromatic erythrocytes (NCEs) to PCEs of all DW-166HC-I administered groups was not significantly different from that of a negative control group but there was significant difference of this ratio at 24hr and 72 hr in all DW-166HC administered groups compared with that of negative group, which was also recovered after two weeks from the drug administration. These results suggested that DW-166HC-I may not cause any chromosomal damage but DW-166HC has *in vivo* mutagenic potential because of its radioactivity.

Keywords □ DW-166HC, DW-166HC-I, PCE, NCE, micronucleus

암은 인간의 생명을 위협하는 가장 커다란 요인들 중의 하나이다. 암을 제거하는 방법으로는 수술, 방사선 요법 및 항암제의 사용등 여러 가지가 있는데, 이들 방법으로는 인간의 암을 완전히 정복하지 못하고 있다. 이 중 현재 사용하고 있는 항암제들은 부작용이 커서 이의 해결이 시급한 문제이다.

DW-166HC는 방사선을 이용하여 암세포를 죽이는 방사성의약품으로서 고힐암에 직접 주사하여 치료 효과를 나타내는 특징을 가지고 있는데 특히 간암에 대하여 효과가 클 것으로 기대되고 있다. DW-166HC는 ¹⁶⁶Holmium (¹⁶⁶Ho)이 접도가 큰 고분자 물질인 chitosan과 결합하여 킵플렉스를 형성하고 있는데 고힐암에 투여시에 방사성 물질의 확산을

최소화하면서 ¹⁶⁶Ho의 베타선에 의해 암세포를 사멸시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 DW-166HC의 ¹⁶⁶Ho은 반감기가 26.8시간으로서 방사성의 효과가 매우 빠르게 소실되므로 방사성물질에 노출될 때 일반적으로 예상할 수 있는 부작용을 최소화할 수 있다는 장점을 가지고 있다. ¹⁶⁶Ho과 유사한 성질을 가지며 직접 인체에 적용할 수 있는 방사성물질로는 ³²P와 ⁸⁹Sr 및 ¹⁸⁶Re이 있는데 이들은 암세포가 골격계로 전이될 때 사용된다고 알려져 있고 (Maxon 등, 1988), ¹⁵³Sm은 골격계로 전이되어 통증을 호소하는 환자에 적용할 수 있다고 알려져 있다(Bayouth 등, 1994).

본 연구는 DW-166HC의 독성실험의 일부로서 방사성을 갖지 않은 DW-166HC-I과 방사성을 갖는 DW-166HC를 실제 예상되는 임상용량 보다 가혹한 조건으로 투여하여,

* To whom correspondence should be addressed.

투여경로에 따른 *in vivo* 유전 독성을 알아 보고자 생쥐를 이용한 소핵실험을 실시하였다.

실험방법

실험동물 및 시약

청정구역(Charles Liver, Japan)에서 생산된 SPF(특정병원체 부재) 7주령 수컷 ICR 생쥐를 공급받아(Charlse River, Japan) 온도 23±1℃, 습도 55±5% 배기 10-18회/시간, 형광등 명암 12시간 간격교대, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자에 6마리씩 넣어 1주일간 순화 사육 후에 실험에 사용하였다. 순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정하여, 평균체중(g)±20%의 범위에 드는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 6마리씩 배분하였다.

사료는 삼양사료의 실험동물용 사료를 자유급식하였고, 음료수로는 수도물을 자유로이 공급하였다. 사용한 시약은 특별한 언급이 없는한 미국 Sigma사의 제품을 사용하였다. 염색시약인 May-Gruenwald 및 Giemsa는 영국의 BDH사의 제품을 사용하였으며, FBS는 미국의 GIBCO사에서 구입하여 사용하였다.

실험물질의 조제 및 투여

실험물질인 DW-166HC-I은 동화약품공업(주)의 중앙연구소에서 제조한 순도 97.6%, Lot No는 CR-9607이었는데 ¹⁶⁵Ho와 chitosan을 혼합, 조제하여 킴플렉스를 만들었다. ¹⁶⁵Holmium (¹⁶⁵Ho(NO₃)₃·5H₂O, Aldrich, U.S.A.) 일정량을 2 ml의 주사용 증류수(중외제약(주))에 녹인 후 chitosan(동연연구소에서 동결건조하여 제조한 백색의 가루 또는 덩어리로서 ascorbic acid 함유)에 첨가하여 ¹⁶⁵Ho와 chitosan의 킴플렉스를 만들었으며(¹⁶⁵Ho:chitosan=3:4), 다시 주사용 증류수를 가하여 총액이 5 ml (정맥투여) 또는 40 ml (피하투여)이 되도록 희석하여 투여하였다. DW-166HC는 한국 원자력연구소로부터 ¹⁶⁶Ho를 공급 받아 당 연구소에서 제조한 chitosan과 킴플렉스를 만들어(¹⁶⁵Ho:chitosan=3:4) 사용하였다.

DW-166HC-I의 투여량은 정맥 투여시의 경우 예비시험을 통하여 사망예가 발견되지 않는 5 mg/kg을 최고농도로 하고 2단계씩 희석한 농도인 2.5 mg/kg과 1.25 mg/kg의 3개 농도로 설정하였다. 피하 투여시의 경우 예비시험을 통하여 사망예가 나타나지 않는 225 mg/kg을 최고농도로 하고 2단계씩 희석한 농도인 112.5 mg/kg과 56.25 mg/kg의 3개 농도로 설정하였다. DW-166HC의 투여량은 예상 용량의 2배인 1 mCi/kg로하여 정맥 주사하였다. 1 mCi는 ¹⁶⁵Ho(NO₃)₃·5H₂O로 환산하면 0.51 mg에 해당되는 양이다. 실험물질은 투여직전에 소정의 양을 주사용 증류수에 현탁하여 사용하였다. 양성대조물질로는 cyclophosphamide를 70 mg/kg으로 복강투여 하였다. 음성대조물질은 실험물질의 조제에 사용한 주사용 증류수로 하였고, Ho과 킴플렉스

를 이루는 chitosan을 대조물질로 하였다. 각 농도의 실험물질용액과 음성대조물질은 5 ml/kg의 용량으로 1회 정맥투여 하였으며 피하투여의 경우는 40 ml/kg의 용량으로 1회 투여하였다. 양성대조물질은 5 ml/kg의 용량으로 1회 복강투여 하였다.

골수세포 표본의 제작

각 농도의 DW-166HC-I은 정맥 또는 피하로 투여하고 각각 24시간과 48시간후에, DW-166HC는 정맥투여 후 24시간, 72시간 및 2주후에 Schmid (1976)의 방법에 따라 골수표본을 제작하였다. 경추탈골에 의해 도살한 동물의 대퇴골을 분리하여 양골단을 절단한 후 약 2 ml의 FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO)에 1 ml용량의 1회용 주사기 (23 gauge)를 이용하여 골수세포를 부유시켜 잘 현탁시킨 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 침전된 골수세포를 파스퇴르 피펫으로 소량의 혈청에 고르게 현탁시켜 청결한 슬라이드에 도말하고 공기중에 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 각각의 동물에 대하여 슬라이드는 2개씩 만들었다.

건조가 끝난 표본을 Schimid (1975, 1976)의 방법에 따라 다음과 같이 염색하였다. 원액의 May-Gruenwald (BDH)액에 3분간 염색하고 증류수로 세척한 후 1:1 희석된 May-Gruenwald액에 다시 2분간 염색하였다. 표본을 다시 증류수로 세척한 후 1:6으로 희석된 Giemsa (BDH)액에서 10분간 염색하여 증류수에 수회 세척하고 공기중에서 충분히 건조시켰다.

골수도말표본의 관찰

관찰은 광학현미경으로 2명의 관찰자에 의해 맹검법으로 검경하였다. 생쥐 개체당 200개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocytes, PCEs)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocytes, NCEs)의 비를 구하고 다시 1000개의 다염성적혈구 중에서 소핵을 갖는 다염성적혈구의 생성빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유헤세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

통계학적 평가

결과의 통계처리는 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W법에 따라 행하였다. DW-166HC과 DW-¹⁶⁶H-I 및 Cyclophosphamide투여군의 다염성적혈구중의 소핵생성빈도에 대하여 음성대조군인 주사용증류수 투여군 또는 chitosan을 투여한 군과의 통계학적인 유의성을 조사하였으며, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율(NCE/PCE+NCE)의 경우에도 같은 방법으로 통계학적 유의성을 검정하였다(유의수준 p<0.05).

실험결과

DW-166HC가 체내에 정맥 및 피하 투여되었을때 *in*

Table I. Micronucleus test of DW-166HC-I (^{165}Ho -chitosan complex:cold compound) with ICR male mouse medicated by i.v.

Test Compound	Dose ^a (mg/kg)	Number of Animals	Sampling Time (hour)	MNPCE (%) ^b	Ratio of NCE/PCE+NCE ^c
Distilled Water		6	24	0.050±0.055	0.363±0.087
Chitosan	6.67	6	24	0.060±0.089	0.542±0.120*
DW-166HC-I	5	6	24	0.033±0.082	0.392±0.065
	2.5	6	24	0.067±0.082	0.455±0.093
	1.25	6	24	0.067±0.082	0.438±0.046
Cyclophosphamide	70	6	24	2.833±1.637*	0.673±0.088*

Bone marrow cells were prepared at 24 hr after single intravenous injection. ^aDose: Doses of DW-166HC-I were expressed as the amount of Ho (NO_3)₃.5H₂O. ^bMNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes/1,000 polychromatic erythrocytes (Mean±SD). ^cNCE/PCE+NCE: normochromatic erythrocytes/200 erythrocytes (Mean±SD). *significantly different from distilled water (p<0.05).

vivo 유전독성을 나타내는지 소핵실험을 통하여 알아보았다. 소핵실험결과는 Table I, II 및 III에 나타내었다.

DW-166HC-I을 정맥 투여하고 24시간 후에 골수세포를 취하여 관찰한 결과, 음성대조군에 대한 실험물질 투여군의 소핵 생성 빈도는 통계학적으로 유의한 변화를 보이지 않았다(Table I). 음성대조군이 0.050±0.055%의 소핵 생성 빈도를 보였는데 DW-166HC-I의 투여군중 최고용량투여군에서도 0.033±0.082%의 소핵 생성 빈도를 보여 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다. 2.5 및 1.25 mg/kg 투여군에서도 소핵 생성 빈도는 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 즉, DW-166HC-I은 본 실험조건하에서 정맥 투여시에 소핵생성을 증가시키지 않는 것으로 사료된다. 또 chitosan만을 투여한 군이 0.060±0.089%의 소핵생성 빈도를 보였는데 이것을 DW-166HC-I을 투여한 군과 비교하였을 때도 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다.

DW-166HC-I를 피하 투여하고 48시간 후에 골수세포를 취하여 관찰한 결과에서도 음성대조군에 대한 실험물질 투여군의 소핵 생성 빈도는 통계학적으로 유의한 변화를 보이지 않았다(Table II). 음성대조군이 0.050±0.084%의 소핵 생성 빈도를 보였는데 DW-166HC-I의 투여군중 최고용량 투여군에서도 0.033±0.084%의 소핵 생성 빈도를 보여 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다. 112.5 및 56.25

mg/kg 투여군에서도 소핵 생성 빈도는 통계학적으로 유의한 증가는 보이지 않았다. 즉, DW-166HC-I은 본 실험조건하에서 피하투여시에 소핵생성을 증가시키지 않는 것으로 사료된다. 또 chitosan만을 투여한 군이 0.150±0.105%의 소핵생성 빈도를 보였는데 이것을 DW-166HC-I을 투여한 군과 비교하였을 때도 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다.

DW-166HC를 정맥 투여하고 각각 24시간 72시간 및 2주후에 골수세포를 취하여 관찰한 결과 음성대조군에 대한 실험물질 투여군의 소핵 생성 빈도는 24시간과 72시간에 통계학적으로 유의한 변화를 보였으나 2주후에는 회복되어 소핵 생성 빈도는 통계학적으로 유의한 변화를 보이지 않았다(Table III). 24시간후에 골수를 취한 경우 음성대조군이 0.233±0.234%의 소핵 생성 빈도를 보였는데 DW-166HC의 투여군에서는 0.433±0.463%의 소핵 생성 빈도를 보여 통계학적인 유의성을 나타내었으며, 또 chitosan만을 투여한 군의 소핵 생성 빈도는 0.033±0.082%로 나타났는데, 이것을 DW-166HC 투여군과 비교하였을 때도 통계학적인 유의성을 나타내었다. 72시간후에 골수를 취한 경우 음성대조군이 0.067±0.103%의 소핵 생성 빈도를 보였는데 DW-166HC의 투여군에서는 0.900±0.374%의 소핵 생성 빈도를 보여 역시 통계학적인 유의성을 나타내었

Table II. Micronucleus test of DW-166HC-I (^{165}Ho -chitosan complex:cold compound) with ICR male mouse medicated by s.c.

Test Compound	Dose ^a (mg/kg)	Number of Animals	Sampling Time (hour)	MNPCE (%) ^b	Ratio of NCE/PCE+NCE ^c
Distilled Water		6	48	0.050±0.084	0.507±0.128
Chitosan	300	6	48	0.150±0.105	0.490±0.068
DW-166HC-I	225	6	48	0.033±0.084	0.530±0.069
	112.5	6	48	0.050±0.084	0.483±0.066
	56.25	6	48	0.050±0.084	0.440±0.138
Cyclophosphamide	70	6	48	2.850±0.973*	0.767±0.057*

Bone marrow cells were prepared at 48 hr after single subcutaneous administration. ^aDose: Doses of DW-166HC-I were expressed as the amount of $^{165}\text{Ho}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. ^bMNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes/1,000 polychromatic erythrocytes (Mean±SD). ^cNCE/PCE+NCE: normochromatic erythrocytes/200 erythrocytes (Mean±SD). *significantly different from distilled water (p<0.05).

Table III. Micronucleus test of DW-166HC (¹⁶⁶Ho-chitosan complex:hot compound) with ICR male mouse medicated by i.v.

Test Compound	Dose (mCi/kg)	Number of Animals	Sampling Time (days)	MNPCE (%) ^a	Ratio of NCEs/PCEs+NCEs ^b
Satellite ^c	0	9	1	0.233±0.234	0.378±0.054
Chitosan ^d	0	9	1	0.033±0.082	0.471±0.088
DW-166HC	1	9	1	0.433±0.463* ^(#)	0.440±0.019*
Satellite	0	9	3	0.067±0.103	0.521±0.070
Chitosan	0	9	3	0.067±0.103	0.506±0.060
DW-166HC	1	9	3	0.900±0.374* ^(#)	0.375±0.119*
Satellite	0	9	14	0.200±0.179	0.471±0.032
Chitosan	0	9	14	0.133±0.163	0.465±0.054
DW-166HC	1	9	14	0.067±0.103	0.542±0.047

Bone marrow cells were prepared at 1, 3, and 14 days after single intravenous injection. ^aMNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes/1,000 polychromatic erythrocytes (Mean±SD). ^bNCEs/PCEs+NCEs: normochromatic erythrocytes/200 erythrocytes (Mean±SD). ^cSatellite: Animals were not treated with anything. ^dChitosan: Animals were intravenously injected with 0.68 mg/kg chitosan solution. *significantly different from satellite group (p<0.05). [#]significantly different from chitosan injected group (p<0.05).

으며, 또 chitosan만을 투여한 군의 소핵 생성 빈도는 0.067±0.103%로 나타났는데, 이것을 DW-166HC 투여군과 비교하였을 때도 통계학적인 유의성을 나타내었다. 2주후에 골수를 취한 경우 음성대조군이 0.200±0.179%의 소핵 생성 빈도를 보였는데 DW-166HC의 투여군에서는 0.133±0.163%의 소핵 생성 빈도를 보여 통계학적인 유의성을 나타내지 않았으며, 또 chitosan만을 투여한 군의 소핵 생성 빈도는 0.133±0.163%로 나타났는데, 이것을 DW-166HC 투여군과 비교하였을 때도 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다.

반면, cyclophosphamide (70 mg/10 ml/kg, i.p.)투여군에서는 Table I과 II에서 알 수 있듯이 2.833±1.637%와 2.850±0.973%의 소핵을 갖는 다염성적혈구가 관찰되었으며 음성대조군과 비교할때 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이로써 DW-166HC의 소핵실험이 정상적으로 진행되었음을 알 수 있었다.

한편, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서도 DW-166HC-I을 정맥 및 피하 투여군의 모든 농도에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았고, Table II에서 chitosan만을 투여한 군과 DW-166HC-I을 투여한 군과 비교하였을때도 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다. 그러나, Table I에서 chitosan만을 정맥투여한 군은 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율이 음성대조군에 비하여 통계학적인 유의성을 나타냈는데, chitosan을 ¹⁶⁶Ho과 킴플렉스를 만들어 투여할 때와는 달리 단독으로 정맥 투여하면 독성이 있는 것으로 사료된다. Table III의 DW-166HC 투여군에서는 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율이 음성대조군에 비하여 24시간과 72시간에 통계학적으로 유의성있게 변화한 반면 2주후에는 통계학적으로 유의한 변화를 보이지 않았다.

양성대조군의 경우에는 다염성 적혈구와 정염성적혈구

의 비율이 통계학적으로 유의성있게 증가한 결과를 보였다 (Table I, II).

고찰

새로운 항암제인 DW-166HC는 방사성동위원소를 포함하는 것으로서 방출되는 강력한 베타선을 이용하여 암세포를 제거할 수 있다. Turner 등 (1994)은 ¹⁶⁶Ho 투여시에 전신 분포를 줄이는 방법을 보고하였는데 본 연구에서 사용한 chitosan도 ¹⁶⁶Ho과 킴플렉스를 만들어 고형암 등에 투여하면 방사성물질인 ¹⁶⁶Ho의 확산이 최소화됨을 알 수 있었다.

본 연구에서는 방사성 동위원소는 포함하지 않으나 조성이 동일한 DW-166HC-I의 투여경로에 따른 유전독성과 방사성 동위원소인 ¹⁶⁶Ho을 갖는 DW-166HC를 정맥으로 투여한 경우의 유전독성을 알아보기 위하여 생쥐 소핵실험을 행하였다.

DW-166HC-I의 투여용량은 정맥투여시는 5 mg/kg을 최고투여량으로 결정하였으며, 골수채취는 투여후 24시간째에 동물을 도살하여 도말표본을 만들었는데 이것은 예비 실험에 따른 것이다(데이터를 따로 기재하지 않았다). 5 mg/kg는 24시간이내에 사망예가 관찰되지 않는 최고용량이었다. 피하투여시는 225 mg/kg을 최고투여량으로 결정하였으며, 골수채취는 투여후 48시간째에 동물을 도살하여 도말표본을 만들었는데 이것도 예비 실험에따른 것이다(데이터를 따로 기재하지 않았다). 225 mg/kg는 48시간이내에 사망예가 관찰되지 않는 최고용량 이었고, DW-166HC-I을 피하투여 하였을 때 48시간에 약물의 흡수가 가장 많이 일어났는데 이는 chitosan의 점도 때문인 것으로 생각되었다. DW-166HC의 투여용량은 예상 임상 용량의 2배인 1 mCi/kg로 하였는데 그 이유는 다음과 같다. 인체가 방사성 에너지에 노출되었을 때 최대한의 안전을 고려하여 DW-166

HC의 예상 임상 투여용량을 설정하였는데, 성인(60 kg)을 기준으로 하였을 때 30 mCi이었다. 따라서 본 연구에서 방사성 동위원소의 안전성을 점검하기 위하여 예상 임상 투여용량의 2배 용량인 1 mCi를 시험용량으로 하여도 충분한 양이라고 생각되었다. 또 Table III에서 알 수 있는 것과 같이 DW-166HC의 방사성 동위원소에 의한 영향을 충분히 관찰할 수 있었으므로 단일 용량으로 시험하여도 무방한 것으로 사료된다. 사용한 1 mCi는 $^{165}\text{Ho}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 환산하면 0.51 mg/kg에 해당하는 양이며 이때 chitosan은 0.68 mg을 함유하고 있었다. 방사성 동위원소인 ^{166}Ho 의 영향을 알아 보기 위하여 시간경과에 따라 조직표본을 만들어 검정한 예비시험의 결과에 따라(데이터를 따로 기재하지 않았다) 24시간, 72시간 및 2주째에 골수를 채취하여 도말 표본을 만들어 DW-166HC의 소핵생성 유발에 대한 영향을 알아보았다.

결과에서 본 바와 같이 DW-166HC-I를 정맥투여한 경우에 다염성 적혈구의 소핵생성빈도는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성있게 증가하지 않았다(Table I). DW-166HC-I을 피하투여한 경우에도 다염성 적혈구의 소핵생성빈도는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하지 않았다(Table II). DW-166HC를 정맥투여한 경우 다염성 적혈구의 소핵생성빈도는 24시간과 72시간에 통계학적으로 유의성을 보인 반면, 2주후에는 유의성을 보이지 않아서 앞의 결과가 회복된 것으로 생각되었다. 또 음성대조군과 함께 Ho와 킴플렉스를 형성하는 chitosan을 ^{165}Ho 와 ^{166}Ho 의 효과를 알아보기 위한 대조군으로 설정하였는데 chitosan만을 투여한 경우는 Table I, II, III의 결과에서 알 수 있듯이 모든 시간에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 소핵생성 빈도를 나타내지 않았다. 또 DW-166HC-I을 투여한 경우의 소핵생성 빈도를 chitosan만을 투여한 경우와 비교하였을 때는 통계학적인 유의성을 나타내지 않았는데, DW-166HC를 투여한 경우의 소핵생성 빈도를 chitosan만을 투여한 경우와 비교하였을 때는 24시간과 72시간에 소핵생성이 통계학적으로 유의하게 증가하며 2주후에는 회복되어 유의성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 DW-166HC를 구성하고 있는 ^{165}Ho 이나 chitosan 자체 및 ^{165}Ho -chitosan의 킴플렉스는 유전독성을 일으키지 않으며 ^{166}Ho 이 가지고 있는 방사성에 의하여 염색체에 이상을 나타내는 것이라고 사료된다. 이는 일반적으로 방사성이 염색체에 손상을 준다는 보고들과도 일치하는 것이며(Bender와 Gooch, 1962), 방사성 동위원소인 ^{166}Ho 에 의한 염색체의 손상이 가역적으로 회복 가능한 점은 본 약물의 장점이라고 할 수 있을 것이다. 모든 경우에 용매대조군(주사용 증류수)은 음성대조군의 일반적인 소핵생성율을 나타내었는데, DW-166HC-I을 투여한 경우와 DW-166HC를 투여한 경우의 음성대조군의 소핵생성율이

크게 다른 이유는 시험할때 마다 사용하는 동물과 염색액의 Lot NO가 다르기 때문에 나타나는 실험오차라 생각되며 모두 Hart와 Engberg-Peterson(1983)이 제시한 소핵생성의 정상범위(1.67 ± 1.11)에 있음을 알 수 있었다. 이와같은 결과로부터 DW-166HC를 정맥으로 투여하였을 경우 2주후에 염색체 손상이 가역적으로 회복되거나 투여 초기에 염색체의 손상이 일어나므로 DW-166HC는 유전독성을 일으키는 것으로 판단되며, DW-166HC-I는 정맥 및 피하로 투여되었을때 골수세포의 분화과정에서 염색체 손상을 일으키지 않는것으로 사료된다.

다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서도 DW-166HC-I를 투여한 모든 실험군에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰할 수 없었으나 DW-166HC를 투여한 경우 24시간과 72시간에 통계학적인 유의성이 관찰되었는데, 이는 DW-166HC가 골수세포의 발달단계에 대하여 독성을 나타내는 것으로 사료된다. 이와 같은 효과가 2주후에는 유의성을 보이지 않아서 소핵생성에 대한 결과와 같이 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율도 가역적으로 회복된 것으로 사료된다. 이러한 사실로부터 DW-166HC는 정맥투여 2주후에 회복은 되지만 투여후 24시간과 72시간째의 결과로부터 세포독성과 세포분화의 저해를 일으키는 것으로 판단되며, DW-166HC와 조성이 동일하나 방사성을 갖지 않은 DW-166HC-I은 세포독성유발이나 세포분화의 저해는 일으키지 않음을 알 수 있었다.

한편, 음성대조군과 함께 Ho와 킴플렉스를 형성하는 chitosan을 ^{165}Ho 와 ^{166}Ho 의 효과를 알아보기 위한 대조군으로 설정하여, DW-166HC-I을 피하 투여한 경우와 DW-166HC를 정맥 투여한 경우의 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율을 chitosan만을 투여한 경우와 비교하였을 때, 두 경우 모두 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다. 이때 사용한 chitosan의 농도는 Ho-chitosan 킴플렉스의 최고 투여농도중에 포함된 chitosan의 양으로 하였으며, 각각 DW-166HC-I을 정맥투여한 경우는 6.67 mg/kg, DW-166HC-I을 피하투여한 경우는 300 mg/kg, DW-166HC를 정맥투여한 경우는 0.68 mg/kg 이었다. Table III에서 chitosan을 정맥투여한 경우 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성을 보이지 않은 반면, Table I에서 chitosan을 정맥 투여한 경우 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가함을 보였다. 이는 chitosan을 ^{165}Ho 과 킴플렉스로 투여할 때와는 달리 단독으로 정맥 투여하면 독성이 있는 것으로 사료되며, Table III의 결과와 다른 것은 앞에서 언급한 것과 같이 chitosan의 농도가 현저히 다르기 때문이다. 실제 chitosan을 농도에 따라 정맥으로 투여하면 치사율이 다르게 나타나는 것을 알 수 있었는데(데이터를 따로 기재하지 않았다) chitosan의 점도가 증가하여

혈행을 방해하기 때문인 것으로 생각되었다. 그러나 Table II에서와 같이 chitosan을 피하투여한 경우는 음성대조군에 비하여 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율이 통계학적인 유의성을 보이지 않으므로 독성을 보이지 않는 것으로 사료된다. 이는 chitosan의 점도가 매우 커서 피하투여한 부위로부터의 확산이 쉽지 않기 때문인 것으로 생각된다. 위와 같은 chitosan의 성질을 이용하여 ¹⁶⁶Ho와 킴플렉스를 만들어 고형암에 투여하면 투여부위로부터의 확산을 최소화 하면서 ¹⁶⁶Ho으로부터 방출되는 베타선에 의해 주변의 암세포를 사멸시킬 수 있게되는 것이 방사성 의약품인 DW-166HC의 장점이라고 설명할 수 있다.

양성대조군인 cyclophosphamide투여군에서 소핵생성빈도는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였으며, 소핵을 갖는 다염성적혈구의 생성빈도에 있어서도 Hayashi등(1983)의 참고데이터와 유사하였다. 또, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율도 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였으므로 cyclophosphamide가 세포의 유전자에 대하여 독성이 있다는 이전의 연구자들의 결과와도 일치하는 것이며(Dellarco 등, 1985; Dellarco와 Prival, 1989), DW-166HC의 유전독성을 알아 보기 위한 소핵실험이 정상적으로 진행되었음을 알 수 있었다.

결론적으로, DW-166HC의 정맥투여시 *in vivo* 유전독성을 생쥐소핵 실험을 통하여 평가해 본 결과, 24시간과 72시간에 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰되었고, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서도 24시간과 72시간에 통계학적으로 유의성 있는 변화를 보였으나, 2주후에는 소핵생성빈도와 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율 모두 통계학적인 유의성을 보이지 않아 초기의 결과가 회복되는 것으로 사료된다. 한편, DW-166HC-I의 정맥 및 피하투여시 *in vivo* 유전독성을 생쥐소핵 실험을 통하여 평가해 본 결과, 모든 용량군에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았고, 다염성적혈구와 정염성적혈구의 비율에 있어서도 통계학적으로 유의성있는 변화를 보이지 않았다. 이로서 DW-166HC는 방사성 동위원소인 ¹⁶⁶Ho에 의하여 소핵의 생성을 증가시키는 유전독성을 나타내지만 ¹⁶⁶Ho이 방사성을 갖기전의 원소인 ¹⁶⁵Ho와 chitosan 및 ¹⁶⁵Ho-chitosan 킴플렉스(DW-166HC-I)의 물질 자체는 유전독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

Bayouth, J. E., Macey, D. J., Kasi, L. P. and Fossella, F. V.

(1994). Dosimetry and toxicity of Samarium-153-EDTMP administered for bone pain due to skeletal metastases. *J. Nucl.Med.*, **35**, 63-69.

Bender, M. A. and Gooch, P. C. (1962). Types and rates of x-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated *in vitro*. *Proc.NatlAcad.Sci. USA*, **48**, 522-532.

Dellarco, V. L. and Prival, M. J. (1989). Mutagenicity of nitro compounds in Salmonella typhimurium in the presence of flavin mononucleotide in a preincubation assay. *Environ. Mol. Mutagen* **13**, 116-127.

Dellarco, V. L., Voytek, P. E. and Hollaender, A. (1985). Aneuploidy: Etiology and Mechanisms, Plenum Press, New York.

Hart, J. W. and Engberg Pedersen, H. (1983). Statistics of mouse bone-marrow micronucleus test: counting, distribution and evaluation of results. *Mutation Res.* **111**, 195-207.

Hayashi, M. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.* **120**, 241-247.

Holden, H. E., Barrett, J. F., Huntington, C. M., Muchlbauer, P. A. and Wahrenburg, M. G. (1989). Genetic profile of a nalidixic acid analog: a model for the mechanism of sister chromatid exchange induction. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **13**, 238-252.

Mayer, D. G. (1987). Overview of toxicological studies. *Drugs* **34**(Suppl. 1), 150-153.

Maxon, H. R., Deutsch, E. A., Thomas, S. R., Libson, K., Lukes, S. J., Williams, C. C. and Ali, S. (1988). Re-186(Sn) HEDP for treatment of multiple metastatic foci in bone: Human biodistribution and dosimetric studies. *Radiology*, **166**, 501-507.

Schimada, H., Yutaka, E., Kurasawa, Y. and Arauchi, T. (1984). Mutagenicity studies of DL-8280, a new antibacterial drug. *Chemotherapy(Tokyo)* **32**(Suppl. 1), 1162-1170.

Schimid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Res.* **31**, 9-15.

Schimid, W. (1976). The micronucleus test for cytogenetic analysis, in: Chemical Mutagens: Principle Methods for their Detection (Hollaender, A. ed.), pp. 31-53, Plenum, New York.

Salamone, M. F., Heddle, J. A., Stuart, E. and Katz, M. (1980). Towards an improved micronucleus test: Studies on three model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Res.* **74**, 347-356.

Turner, J. H., Claringbold, P. G., Klemp, P. F. B., Cameron, P. J., Martinade, A. A., Glancy, R. J., Norman, P. E., Hetherington, E. L., Najdovski, L. and Lambrecht, R. M. (1994). ¹⁶⁶Ho-microsphere liver radiotherapy: a preclinical SPECT dosimetry study in the pig. *Nucl. Med. Comm.* **15**, 545-553.

국립보건안전연구원 (1994). 의약품등의 독성시험 기준, 국립보건 안전 연구원 고시 94-3호.