

세파계 항생제, YH1226의 유전독성 평가

하광원[†] · 오혜영 · 박장환 · 허옥순 · 손수정 · 한의식 · 김명희 · 강희일*

식품의약품안전청 독성연구소 유전독성과

*유한양행 중앙연구소

(1998. 3. 16 접수)

Genetic Toxicity Studies of YH1226, a Cephalosporin Antibiotic

Kwang Won Ha[†], Hye Young Oh, Chang Hwan Park, Ok Soon Heo, Soo Jung Sohn,
Eui Sik Han, Myung Hee Kim and Heui Il Kang*

Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and
Drug Administration, 5 Nokbundong Eunpyunggu, Seoul 122-020, Korea

*Yuhan Research Center, 27-3 Dangeongdong, Kunpo-Si Kyunggido 435-030, Korea

ABSTRACT : The results of chromosome aberration test in mammalian cells in culture (Chinese hamster lung fibroblast cells) showed no induction of structural and numerical aberrations by YH1226, a cephalosporin antibiotic regardless of metabolic activation, while positive control group (mitomycin C and benzo(a)pyrene) showed structural chromosome aberrations of 25% and 10%, respectively. The *in vivo* induction of micronuclei was measured in polychromatic erythrocytes in bone marrow of male ddY mouse given YH1226 at 500, 250, 125 mg/kg by *i.p.* once. After 24 hours, animals were sacrificed and evaluated for the incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes in whole erythrocytes. Although a positive response for induction of micronuclei in animals treated with mitomycin C demonstrated the sensitivity of the test system for detection of a chemical clastogen, YH1226 did not induce micronuclei in bone marrow of ddY male mice

Key words : YH1226, Cephalosporin antibiotic, Chromosome aberration, Micronucleus, Genetic toxicity

서 론

1945년 이탈리아의 사루지니아섬 해안근처의 토양으로부터 분리한 *Cephalosporium*속의 곰팡이가 새로운 penicillin을 생산한다고 발견된 이래 새로운 항생물질이 세계적으로 많이 사용되고 있다. 세파계 항생제는 현재 그람양성균, 그람음성균, 녹농균에 항균활성이 있는 제품개발이 이루어지고 있다. 본 연구의 시험물질인 세파계 항생제, YH1226은 보다 강한 항균활성을 가지며 비교적 독성도 적은 것으로 평가되며 새로운 세파계 항생제로서의 신약개발 가능성을 보여주고 있다. 이에 본 연구에서는 새롭게 개발중인 세파계 항생제의 유전독성시험을 실시하였다. 즉, *in vitro* 시험으로 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 실시하고, *in vivo* 시험으로 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 이상의 시험들을 식품의약

품안전본부 고시 제96-8호 ('96. 4. 16) 의약품등의 독성시험 기준에 따라 실시하여 세파계 항생제, YH1226의 유전독성을 평가함으로써 생체내 안전성을 확보하고자 한다

재료 및 방법

시험물질 및 시약

염색체이상시험 및 소핵시험에 사용된 시험물질인 세파계 항생제, YH1226(Lot. 1255-13)은 유한양행으로부터 공급받았다. YH1226은 황색의 부정형의 분말이며, 염색체이상시험에서는 DMSO를 용매로 용해하여 사용하였으며, 음성대조물질로는 용매를 사용하였다. 양성대조물질로는 직접법에서는 mitomycin C(MMC)를, 대사활성화법에서는 benzo(a)pyrene (B(a)P)을 사용하였다. 소핵시험에서는 용매와 음성대조물질

[†]To whom correspondence should be addressed.

로 14.2 w/v% L-arginine-생리식염수액을 사용하였으며, 양성 대조물질은 MMC를 주사용 증류수에 용해시켜 사용하였다. 시험에 사용한 fetal bovine serum (FBS), Eagle's minimal essential medium(EMEM), trypsin-EDTA 및 Colcemid는 Gibco (Grand Island, NY, U.S.A)로부터 구입하였으며 기타 시약은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, U.S.A)와 국내 시약 대리점으로부터 구입하였다.

시험계

1) 세포주

사용한 포유동물 세포는 Chinese hamster lung fibroblast (CHL) 세포로 일본 국립위생시험소의 Sofuni 박사로부터 분양 받아 사용하였다. Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다(Ishidate *et al.*, 1977). 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 Eagle's minimal essential medium (EMEM)을 사용하였으며, 포화 습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 배양기 (Dual CO₂ incubator, Shel-lab 1845 TC, U.S.A)에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일 마다 0.25% trypsin-EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다.

2) 실험동물

식품의약품안전청의 청정구역에서 생산된 SPF (특정병원체 부재) 5주령 ddY계 마우스를 공급받아 온도 23±1°C, 습도 55±5%, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(70 W×240 L×120 H mm)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1~2 주일간의 순화 사육기간 동안 관찰하여 정상적인 건강한 동물만 시험에 사용하였으며, 사료는 신촌사료주식회사의 실험동물사료를 구입하여 고압증기 멸균기에서 121°C, 15분간 멸균한 다음 실험동물에 자유로이 공급하였다. 또한 멸균 정제수를 자유로이 공급하였다.

3) 대사활성계

In vitro 대사활성화를 위하여 Maron and Ames(1983)의 방법에 따라, S-9 분획을 다음과 같이 조제하여 사용하였다. 식품의약품안전청에서 생산 및 사육한 SPF Sprague-Dawley계 rat(수컷, 7주령, 체중 약 200 g)에 corn oil로 희석시킨 Aroclor 1254(200 mg/ml)를 1회 복강투여 (500 mg/kg)한 후 5일째 간을 적출하였다. 3배 용량의 0.15 M KCl 용액을 넣어 균질화하고 원심분리(9,000 g, 10분)한 후 상등액을 취하여 S-9 분획을 얻었다. 염색체이상시험에서 사용한 S-9 mix의 조성은 S9 fraction 1.5 ml(30%), MgCl₂-KCl salt solution 0.5 ml, 1 M glucose-6-phosphate 0.25 ml, 0.1 M NADP 0.2 ml, 0.1 M HEPES buffer, pH 7.55 0.2 ml, DW 2.35 ml이었다.

시험방법

1) 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

YH1226을 DMSO에 녹인 후 세포배양 배지에 10% 되도록 첨가하여 세포독성시험을 실시하였다. 세포 계대시에 1회용 24 well plate에 1 well당 1×10⁴개의 세포를 파종하여 2일간 배양한 후, 최고투여용량인 배지의 0.5% (v/v)의 농도로부터, 공비 2로 5단계의 농도를 설정하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 Dulbecco's phosphate buffered saline 0.5 ml로 2회 세척하고 methanol로 10분간 고정하여 5% Giemsa(in phosphate buffer, pH 6.8)로 30분간 염색한 후 현미경으로 관찰하여 50% 세포독성을 보이는 농도를 구하였다.

예비독성시험에서 결정된 50% 세포독성 농도를 최고 농도로 하고, 공비 2로 3단계의 농도를 시험농도로 하였다. 또한, 용매대조군과 기지의 양성대조군을 두었으며, 대사활성 부재 및 존재하에서 24시간 처리하여 시험하였다. 대사활성 부재하의 시험은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 5×10⁴/ml 되도록 파종하여 2일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid를 0.2 µg/ml 되도록 처리한 후 2시간 더 배양하여 총 검체 처리 시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 37°C의 저장액(0.075 M KCl) 4 ml에 현탁 시킨 후 37°C 수조에 20분간 방치하고, 고정액(methanol:acetic acid=3:1)으로 3회 고정시킨 후 공기 건조법으로 슬라이드를 제작하여, 5% Giemsa로 30분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 대사활성 존재하의 시험은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 5×10⁴/ml 되도록 파종하여 2일간 배양한 후, 각각 S-9 mix(배양액의 20% 비율)와 시험물질 또는 양성대조물질이 포함된 배양액으로 6시간 배양한 후, 보통의 배양액으로 교환하여 18시간 더 배양하였다. 세포의 수거 2시간 전에 colcemid를 처리한 후 세포를 수거, 표본을 제작하였다. 양성대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 대사활성 부재하에서는 MMC 0.1 µg/ml을, 대사활성 존재하에서는 B(a)P 20 µg/ml을 사용하였다. 이 시험은 3회 반복시험하였다.

한 시험 농도당 100개의 세포분열 증기상을 현미경하에서 관독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상(structural aberrations)과 숫적이상(numerical aberration)으로 분류하고, 구조이상은 gap(chromatid and chromosome gap), ctb(chromatid break), cte(chromatid break), csb(chromosome break), cse(chromosome exchange)으로 구분하였으며, 숫적이상은 4배수체 이상만을 기록하였다. 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류를 각각 기록하였다. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에

서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

2) 마우스를 이용한 소핵시험

순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 20~30 g의 범위에 드는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 5마리씩 배분하였다. 개체의 식별은 색소(피크린산 액)에 의한 부위별 피모 염색법과 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 본시험의 투여량 및 표본제작시기의 결정을 위하여 Hayashi *et al.* (1984)의 투양법에 따라 각 군에 암, 수 각 2마리씩을 배정하여 50% 치사량을 구하였으며, L-arginine-saline 10 ml/kg을 용매대조군으로, MMC 2 mg/kg을 양성대조군으로 설정하였다. YH 1226을 1회 및 2회 복강투여 후 24, 30, 48시간째에 골수를 채취하여 도말 표본을 제작하고 광학현미경하에서 관찰하여 1,000개의 다염성 적혈구에서의 소핵 출현 빈도수를 계수하여 치사한 동물이 없고 소핵의 출현빈도수가 가장 많은 투여량을 최고 투여량 및 표본제작시기로 하였다. YH1226은 예비시험의 결과에 따라 선정된 500 mg/kg/10 ml을 최고 투여량으로 하고 공비 2의 3농도를 1회 복강투여 후 24시간째에 Schmid (1975)의 방법에 따라 골수표본을 제작하였다. 경추탈구로 도살한 동물의 양쪽대퇴골로부터 골수를 0.5 ml의 FBS로 채취한 후 골수세포 현탁액을 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 적당량의 현탁액을 슬라이드에 도말하고 공기 중에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 표본을 5% Giemsa용액(in Gurr R-66, pH 6.8의 1/150 M phosphate buffer)에 30분간 염색하였다. 염색 후 동일 원충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산수용액에 수초간 담근 후 증류수에 수회 세척하고 공기 중에서 건조시켰다.

소핵관찰은 2명의 관찰자에 의해 맹검법으로 검경하였다.

마우스 1마리당 1,000개의 적혈구에서 다염성 적혈구(poly-chromatic erythrocyte, PCE)와 정염성 적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고, 다시 1,000개의 PCE중에서 소핵을 가진 다염성 적혈구(micronucleated PCE, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별 가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유핵세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다. Hayashi *et al.* (1989)의 방법에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1, 2단계의 비교자료 활용에 의한 검정을 거쳐, 3단계에는 음성대조군과 시험물질 투여군과의 MNPCE의 출현빈도에 관한 유의차는 Cochran Armitage 경향검정법을, PCE의 출현빈도에 관한 유의차는 T-test를 행하였다.

결과 및 고찰

유전물질의 손상으로 나타나는 발암에 대한 관심이 높아지면서 돌연변이 및 발암물질을 단계적으로 쉽게 검색할 수 있는 유전독성시험법의 개발이 진행되어 왔으며 *in vitro* 시험인 Ames *et al.* (1975)이 개발한 복귀돌연변이시험 및 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험과 *in vivo* 시험인 동물을 이용한 소핵시험은 국제적으로 널리 이용하고 있는 대표적인 유전독성시험 평가법이다. 본 연구에서는 이러한 시험법들을 이용하여 보다 강한 항균 활성을 가지며 비교적 독성도 적은 것으로 평가되며 새로운 세포계 항생제로서의 신약개발 가능성을 보여주고 있는 세포계 항생제, YH1226에 대한 유전독성을 평가하였다.

CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 예비독성시험을

Table 1. Chromosome aberration test of YH1226 in CHL Cells

Compound ^a	Dose (µg/ml)	S9 mix	Time (hr) ^b	No. of metaphase (mean ± SD)	No. of aberration ^c (mean ± SD)					No. of normal cells (mean ± SD)
					gap	ctb	cte	csb	cse	
S.C.				100 ± 0 ^d	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.4				99.3 ± 0.4
YH1226	380			100 ± 0						100.0 ± 0.0
	190	-	24	100 ± 0	0.7 ± 0.4					99.3 ± 0.4
	95			100 ± 0	0.3 ± 0.4					99.7 ± 0.4
MMC	0.1			100 ± 0	2.3 ± 1.1	4.3 ± 2.5	16.3 ± 4.3	0.7 ± 0.8	1.0 ± 1.2	75.3 ± 8.3
S.C.				100 ± 0	0.3 ± 0.4					99.7 ± 0.4
YH1226	380			100 ± 0	1.0 ± 0.0					99.0 ± 0.0
	190	+	6+18	100 ± 0	0.3 ± 0.4					99.7 ± 0.4
	95			100 ± 0	0.3 ± 0.4		1.0 ± 0.7			98.7 ± 1.1
B(a)P	20			100 ± 0	4.7 ± 2.3	2.0 ± 0.7	2.7 ± 0.4	1.0 ± 0.0	0.3 ± 0.4	89.7 ± 1.8

^aS.C., solvent control (DMSO); MMC, mitomycin C; B(a)P, benzo(a)pyrene.

^bTreatment time-expression time.

^cgap, chromatid and chromosome gap; ctb, chromosome break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; num, numerical aberration.

^dmean ± standard deviation (n=3)

Table 2. Micronucleus test of YH1226 in ddY male mice

Compound ^a	Route	Dose (mg/kg)	No. of mice	Time (hr)	MNPCE ^b (% , Mean ± S.D.)	PCE/(PCE+NCE) ^c (% , Mean ± S.D.)
S.C.	i.p.		5	24	0.10 ± 0.12	46.0 ± 5.0
YH1226	i.p.	500	5	24	0.16 ± 0.09	45.0 ± 5.0
	i.p.	250	5	24	0.08 ± 0.08	46.0 ± 5.0
	i.p.	125	5	24	0.14 ± 0.06	42.0 ± 4.0
	i.p.	2	5	24	7.12 ± 0.72*	47.0 ± 6.0

^aS.C., solvent control (14.2 w/v% L-arginine in normal saline); MMC, mitomycin C

^bThe number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was calculated from 1000 PCEs per animal.

^cThe percentage of PCE in 1000 erythrocytes per animal. NCE, normochromatic erythrocytes

*Statistically significant from solvent control ($p < 0.05$, T-test)

실시하여 대략의 세포증식 50% 억제 농도를 구하였다. 시험 물질인 YH1226은 예비독성시험을 시행한 결과 380 µg/ml에서 50% 정도의 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 YH1226의 염색체이상시험 본시험 농도를 380, 190, 95 µg/ml로 하여 본시험을 수행하였으며 염색체이상시험 직접법과 대사활성화법, 24시간처리의 결과를 Table 1에 나타내었다. YH1226에 대한 대사활성 부재 및 존재하의 염색체이상시험 결과 모든 농도에서 염색체이상을 나타내는 세포의 수가 통계학적 (Student T-test)으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하지 않은 것으로 보아 시험물질에 의한 염색체이상 유발작용은 없는 것으로 사료된다.

한편, Schmid(1975)에 의해 개발된 동물을 이용한 소핵시험은 많은 연구를 통하여 동물의 성, 계통(Sutou, 1986), 투여경로 차이(Hayashi *et al.*, 1989)에 따른 비교논문들이 보고되어 있으며, 검체 투여방법, 채취시간에 따른 골수세포의 적혈구 생성에 미치는 영향에 관한 연구가 계속되어 왔다(Vanparys *et al.*, 1992; Hayashi *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1984). 본 연구에서 수행한 ddY 마우스를 이용한 *in vivo* 소핵시험에서 YH1226은 전 용량단계에 걸쳐 소핵을 가진 다염성 적혈구의 출현이 거의 관찰되지 않았다(Table 2). 전체 적혈구에 대한 PCE의 비율에서는 전 용량단계에서 대조군에 비하여 차이가 없었다. 양성대조군은 Hayashi등(1989)의 참고 data의 상, 하한의 범위 내에 들었으며, 용매대조군에서는 일반적인 음성대조군의 소핵유발율을 나타내었다. 시험물질인 YH1226은 투여 후 동물에서 육안적인 어떠한 독성의 징후도 나타나지 않았으며, 소핵의 출현빈도는 전 농도군에서 용매대조군과 같이 거의 나타나지 않았다. 이것은 YH1226이 마우스의 골수적아구 세포의 분화과정에서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합하여, 본 시험조건중 YH1226은 *in vitro* 시험인 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 *in vivo* 시험인 마우스를 이용한 소핵시험에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발과제의 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드리는 바입니다.

참고문헌

- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) : Methods for Detecting Carcinogens & Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutat. Res.*, **31**: 347-364.
- Hayashi, M., Sofuni T. and Ishidate, Jr. M. (1984) : A pilot experiment for the micronucleus test : The multi-sampling at multi-dose levels method, *Mutat. Res.*, **141**: 165-169.
- Hayashi, M., Sofuni T. and Morita, T. (1991) : Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.*, **252**: 281-287.
- Hayashi, M., Sutou, S., Shimida, H., Sato, S., Sasaki, Y.F. and Wakada, A. (1989) : Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **223**: 329-344.
- Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni T., and Ishidate, Jr. M. (1989) : A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen*, **13**: 347-356.
- Ishidate, jr. M. and Odashima, S. (1977) : Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro*-a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **48**: 337-354.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**: 173-215.
- Schmid, W. (1975) : The micronucleus test, *Mutat. Res.*, **31**: 9-15.
- Sutou, S. (1986) : Sex difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **172**: 151-163.
- Sutou, S. (1988) : Strain difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **204**: 307-316.
- Vanparys, P., Deknudt, G., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Marsboom, R. (1992) : Sampling times in micronucleus testing, *Mutat. Res.*, **282**: 191-196.