

YH1715계열 항진균제의 유전독성평가

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

식품의약품안전청 독성연구소 유전독성과

*유한양행 중앙연구소

(1998. 3. 16 접수)

Genetic Toxicity Study of YH1715 Series, Antifungal Agents

Kwang Won Ha[†], Hye Young Oh, Chang Hwan Park, Ok Soon Heo, Soo Jung Sohn,

Eui Sik Han, Jong Young Lee, So Hee Kim and Hee 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 Dangjeongdong, Kunpo-Si Kyungido 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 antifungal agents of YH1715 series regardless of metabolic activation. While positive control group (mitomycin C and benzo(a)pyrene) showed structural chromosome aberrations of 37% and 23%, respectively. The *in vivo* induction of micronuclei was measured in polychromatic erythrocytes in bone marrow of male ddY mouse given YH1715R and YH1729R at 1, 0.5, 0.25 g/kg by p.o. once. After 24 hours, animals were sacrificed and evaluated 40 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, YH1715R did not induce micronuclei in bone marrow of ddY male mice but induced cytotoxicity to bone marrow cells at the highest concentration (1 g/kg, $p < 0.05$), and YH1729R induced micronuclei in bone marrow of ddY male mice dose dependently ($p < 0.05$) but did not induce cytotoxicity to bone marrow cells.

Key words : YH1715R, YH1729R, Antifungal agent, Chromosome aberration, Micronucleus, Genetic toxicity

서 론

“진균 감염에 의한 질환발현율은 국내, 외적으로 꾸준히 증가하고 있으며, 그에 따른 인식이나 진단의 개선에 많은 관심이 집중되고 있다. 최근에는 종양이나 장기이식, 당뇨병 그리고 노령인구의 증가와 같이 숙주의 방어기구에 전체적인 결함이 발생하여 진균의 기회감염에 대한 감수성이 높아져 이러한 질환을 치료할 수 있는 항진균제 개발의 필요성이 강조되어 왔다. 본 연구의 시험물질인 YH1715계열 항진균제는 현재까지 알려진 대표적인 항진균제인 fluconazole,

itraconazole 보다 강한 항진균 활성을 가지며 비교적 독성도 적은 것으로 평가되며 면역부전 환자에 대한 진균감염의 임상적 증가와 함께 세계 의약품 시장에서 거대품목으로 성장하고 있는 아울계 항진균제로서의 신약개발 가능성을 보여주고 있다. 이에 본 연구에서는 새롭게 개발중인 YH1715계열 항진균제의 유전독성시험을 실시하였다. 즉, *in vitro* 시험으로 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 실시하고, *in vivo* 시험으로 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 이상의 시험들을 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호('96. 4. 16) 의약품등의 독성시험 기준에 따라 실시하여 YH1715계열

[†]To whom correspondence should be addressed.

항진균제의 유전독성을 평가함으로써 생체내 안전성을 확보하고자 한다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

염색체이상시험 및 소핵시험에 사용된 시험물질인 YH1715계열 항진균제는 유한양행으로부터 공급받았다. YH1715계열 항진균제는 백색의 YH1715R(Lot. 1286-16)과 황색의 YH1729R(Lot. 1270-26)로 부정형의 분말이며, 염색체이상 시험에서는 DMSO를 용매로 하여 YH1715R과 YH1729R을 용해하여 사용하였으며, 음성대조물질로는 용매를 사용하였다. 양성대조물질로는 직접법에서는 mitomycin C(MMC)를, 대사활성화법에서는 benzo(a)pyrene(B(a)P)을 사용하였다. 소핵시험에서는 용매와 음성대조물질로 polyethylene glycol(PEG) 200을 사용하였으며, 양성대조물질은 MMC를 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(특정병원체부재) 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 멸균한다

음 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-Dawley 계 rat(수컷, 7주령, 체중 약 200 g)에 corn oil로 희석시킨 Aroclor 1254(200 mg/ml)를 1회 복강투여(500 mg/kg)한 후 5일째에 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

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

YH1715R과 YH1729R을 DMSO에 녹인 후 세포배양 배지에 10% 되도록 첨가하여 세포독성시험을 실시하였다. 세포재시에 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 1×10⁵/ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질 등을 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 혼탁 시킨 후 37°C 수조에 20분간 방치하고, 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)으로 3회 고정시킨 후 공기건조법으로 슬라이드를 제작하여, 5% Giemsa로 30분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 대사활성 존재하의 시험은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 1×10⁵/ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 S-9 mix(배양액의 20% 비율)과

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.

한 시험 농도당 100개의 세포분열 중기상을 현미경하에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상(structural aberrations)과 숫자이상(numerical aberration)으로 분류하고, 구조이상은 gap(chromodatid and chromosome gap), ctb(chromatid break), cte(chromatid break), csb(chromosome break), cse(chromosome exchange)으로 구분하였으며, 숫자이상은 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 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

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 투망법에 따라 각 군에 암, 수 각 2마리씩을 배정하여 50% 치사량을 구하였으며, PEG 10 ml/kg을 용매대조군으로, MMC 2 mg/kg을 양성대조군으로 설정하였다. YH1715R과 YH1729R을 1회 경구투여 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. YH1715R과 YH1729R은 예비시험의 결과에 따라 50% 치사량의 1/2 농도를 최고농도로 하고 공비 2의 3농도를 1회 경구투여 후 24시간째에 소핵을 관찰하였다. 선정된 1 g/kg/10 ml을 최고 투여량으로 하고 Schmid(1975)의 방법에 따라 골수표본을 제작하였다. 경추탈구로 도살한 동물의 양쪽대퇴골로부터 골수를 0.5 ml의 FBS로 채취한 후 골수세포 혼탁액을 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상동액을 제거한 후 적당량의 혼탁액을 슬라이드에 도말하고 공기 중에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 표본을 5% Giemsa-용액(in Gurr R-66, pH 6.8의 1/150 M phosphate buffer)에 30분간 염색하였다. 염색 후 동일 완충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산수용액에 수초간 담

근 후 증류수에 수회 세척하고 공기 중에서 건조시켰다.

소핵관찰은 2명의 관찰자에 의해 맹검법으로 검정하였다. 마우스 1마리당 1,000개의 적혈구에서 다염성 적혈구(polichromatic erythrocyte, PCE)와 정염성 적혈구(normalochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고, 다시 1,000개의 PCE중에서 소핵을 가진 다염성 적혈구(micronucleated PCE, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포 직경의 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 유의자는 Cochran Armitage 경향검정법을, PCE의 출현빈도에 관한 유의자는 T-test를 행하였다.

결과 및 고찰

유전물질의 손상으로 나타나는 발암에 대한 관심이 높아지면서 돌연변이 및 발암물질을 단기적으로 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 현재까지 알려진 대표적인 항진균제인 fluconazole, itraconazole 보다 강한 항진균 활성을 가지며 비교적 독성도 적은 것으로 평가되며 면역부전 환자에 대한 진균감염의 임상적 증가와 함께 세계 의약품 시장에서 거대품목으로 성장하고 있는 아졸계 항진균제로서의 신약개발 가능성을 보여주고 있는 YH1715계열 항진균제(YH1715R과 YH1729R)에 대한 유전독성을 평가하였다.

CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 예비독성시험을 실시하여 대량의 세포증식 50% 억제 농도를 구하였다. 시험물질인 YH1715R은 예비독성시험을 시행한 결과 100 µg/ml에서 50% 정도의 세포독성을 나타냄을 확인하였고 YH1729R은 30 µg/ml에서 50% 정도의 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 YH1715R의 염색체이상시험 본시험 농도를 100, 50, 25 µg/ml로 하였고 YH1729R은 30, 15, 7.5 µg/ml로 하여 본시험을 수행하였다. YH1715R과 YH1729R의 염색체이상시험 직접법과 대사활성화법, 24시간처리의 결과를 Table 1에 나타내었다. YH1715R과 YH1729R에 대한 대사활성 부재 및 존재하의 염색체이상시험 결과 모든 농도에서 염색체이상을 나타내는 세포의 수가 통계학적(Student T-test)으로 유의성 있게

Table 1. Chromosome aberration test of YH1715R and YH1729R in CHL Cells

Compound ^a	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S9 mix	Time (hr) ^b	No. of metaphase (mean \pm SD)	No. of aberration ^c (mean \pm SD)					No. of normal cells (mean \pm SD)
					gap	ctb	cte	csb	cse	
YH1715R	S.C.			100						100
	100			100	1		1			98
	50			100						100
	25	—	24	100	1				1	99
YH1729R	30			100						99
	15			100						99
	7.5			100						100
	MMC	0.1		100	7	3	25		3	100
YH1715R	S.C.			100	1					99
	100			100	1					99
	50			100						100
	25	+	6+18	100						100
YH1729R	30			100	1				1	98
	15			100	1					99
	7.5			100					1	99
B(a)P	20			100	5	3	10	1	5	77

^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.

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(Vanparrys *et al.*, 1992; Hayashi *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1984). 본 연구에서 수행한 ddY 마우스를 이용한 *in vivo* 소핵시험에서

YH1715R은 전 용량단계에 걸쳐 소핵을 가진 다염성 적혈구의 출현이 거의 관찰되지 않았으나 YH1729R은 농도 의존적으로 소핵을 가진 다염성 적혈구의 출현이 관찰되어($p < 0.05$) ddY계 마우스 골수세포의 분화과정에서 염색체이상을 유발하는 것으로 판단되었다(Table 2). 전체 적혈구에 대한 PCE의 비율에서는 YH1729R의 경우는 전 용량단계에서 대조군에 비하여 차이가 없었으나 YH1715R의 투여 최고농도인 1 g/kg에서 PCE의 발현비율이 감소하여($p < 0.05$) 세포독성이 있는 것으로 관찰되었다. 양성대조군은 Hayashi *et al.* (1989)의 참고

Table 2. Micronucleus test of YH1715R and YH1729R in ddY male mice

Compound ^a	Route	Dose (mg/kg)	No. of mice	Time (hr)	MNPCE ^b (%, Mean \pm S.D.)	PCE/(PCE+NCE) ^c (%, Mean \pm S.D.)
YH1715R	p.o.		5	24	0.28 \pm 0.21	52.0 \pm 6.0
	p.o.	1000	5	24	0.10 \pm 0.08	29.0 \pm 8.0*
	p.o.	500	5	24	0.22 \pm 0.08	42.0 \pm 11.0
	p.o.	250	5	24	0.22 \pm 0.13	45.0 \pm 7.0
YH1729R	p.o.	1000	5	24	0.68 \pm 0.15**	51.0 \pm 3.0
	p.o.	500	5	24	0.53 \pm 0.06**	54.0 \pm 1.0
	p.o.	250	5	24	0.43 \pm 0.21**	55.0 \pm 6.0
MMC	i.p.	2	5	24	7.02 \pm 1.66*	52.0 \pm 3.0

^aS.C., solvent control (polyethylene glycol); 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, normochromatric erythrocytes*Statistically significant from solvent control ($p < 0.05$, T-test)**Statistically significant from solvent control ($p < 0.05$, Cochran Armitage Method)

data의 상, 하한의 범위 내에 들었으며, 용매대조군에서는 일 반적인 음성대조군의 소핵유발율을 나타내었다. 이상의 결과를 종합하여, 본 시험조건 중 YH1715R과 YH1729R은 *in vitro* 시험인 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서는 유전독성을 유발하지 않으나 *in vivo* 시험인 마우스를 이용한 소핵시험에서 YH1715R은 고농도(1 g/kg)에서 세포독성을 나타내고 YH1729R은 소핵을 유발하는 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.
- Vanparrys, P., Deknudt, G., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Marsboom, R. (1992) : Sampling times in micronucleus testing, *Mutat. Res.*, **282**: 191-196.