

고혈압 치료제 SKP-450의 유전독성평가

하광원[†] · 오혜영 · 박장환 · 허옥순 · 손수정 · 한의식 · 류근호* · 조용백*

식품의약품안전청 독성연구소 유전독성과

*SK 케미칼 중앙연구소

(1998. 3. 21 접수)

Genotoxicity Studies of an Antihypertensive Agent, SKP-450

Kwang Won Ha[†], Hye Young Oh, Chang Hwan Park, Ok Soon Heo,
Soo Jung Sohn, Eui Sik Han, Keun Ho Ryu* and Yong-Baik Cho*

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

*Life Science Division, Corporate R&D Center, SK Chemicals, 600 Jungjadong Changangu,
Suwon-si, Kyungkido 440-745, Korea

ABSTRACT : To evaluate the genotoxicity of SKP-450, an antihypertensive agent, the *in vitro* reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium*, the chromosome aberration assay using Chinese hamster lung (CHL) cells and the *in vivo* micronucleus assay using bone marrow cells of ddY mice were performed. In the Reverse mutation test, SKP-450 did not induced mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, and TA 1537 with and without metabolic activation. In the chromosome aberration assay using CHL cells, there was no increased incidence of structural and numerical aberrations with and without metabolic activation. The *in vivo* induction of micronuclei was measured in polychromatic erythrocytes of bone marrow of male ddY mice at 30 hours after treatment with SKP-450 by p.o once. The results showed no increased incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes in bone marrow of ddY male mice treated with skp-450.

Key words : SKP-450, Antihypertensive agent, Reverse mutation assay, Chromosome aberration assay, Micronucleus assay

서 론

현재까지 알려진 대부분의 고혈압치료제, 특히 베타-차단의 작용기전에 근거한 고혈압치료제는 장기간의 사용에 따라 콜레스테롤이 심각하게 증가하는 부작용이 있다. 이는 고혈압환자가 일반적으로 고지혈증을 갖기 쉬운 병리학적 문제에 더욱 심각한 문제를 제기하고 있다. 그러나 새로운 고혈압치료제인 SKP-450은 미황색 결정 또는 결정성 분말로서 기존 고혈압치료제의 부작용을 경감시키기 위하여 개발한 신물질이다. 즉, potassium channel activation을 통한 평활근의 이완으로 혈압강하효과, 심기능 보호효과 및 콜레스테롤 저해효과를 주요 기능으로 하는 물질인 benzo(a)pyrene계 유도체이다

(Kwak et al., 1995). 이에 본 연구에서는 고혈압치료제로 개발 중인 SKP-450의 유전독성시험을 실시하였다. 즉, *in vitro* 시험으로 *Salmonella* 균주를 이용한 복귀돌연변이시험과 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 SKP-450의 유전독성을 평가함으로써 생체내 안전성을 확보하고자 한다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

[†]To whom correspondence should be addressed.

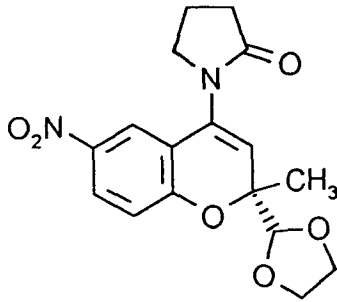


Fig. 1. Structure of the (-)-(2R)-2-([1,3]dioxolan-2-yl)-2-methyl-4-4-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-6-nitro-2H-1-benzopyran.

복귀돌연변이시험과 염색체이상시험 및 소핵시험에 사용된 시험물질인 SKP-450은 benzo(a)pyrene 유도체로 시험물질의 화학식은 (-)-(2R)- 2-([1,3]dioxolan-2-yl)-2-methyl-4-4-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-6-nitro-2H-1-benzopyran이다(Figure 1).

복귀돌연변이시험에서 SKP-450을 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용매로 하여 조제하였으며, 양성대조물질로서는 사용한 균주의 유전학적 특성 및 대사활성화법의 적용 여부에 따라 2-nitrofluorene (2NF), sodiumazide (SAZ), ICR-191, 2-aminofluorene (2AF)등을 사용하였다. 염색체이상시험에서는 DMSO를 용매로 하여 SKP-450을 용해하여 사용하였으며, 음성대조물질로 용매를 사용하였다. 양성대조물질로는 직접법에서는 mitomycin C (MMC)를, 대사활성화법에서는 benzo (a)pyrene (B(a)P)을 사용하였다. 소핵시험에서는 용매와 음성대조물질로 polyethylene glycol (PEG)를 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) 균주 및 세포주

A. Bacteria

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA 1535, TA1537주는 미국 캘리포니아대학 B. N. Ames 교수로부터 직접 입수하였다. 각 균주는 Maron and Ames (1983)에 제시된 방법에 따라, 본 시험에 앞서 ① histidine 요구성 ② crystal violet 감수성 ③ UV 감수성 ④ ampicillin 또는 tetracycline 내성 ⑤ 자발 복귀변이빈도 등의 유전적 특성을 확인하였다. 각 균주는 -70°C의 DMSO 동결보존으로부터 직접 10 ml의 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 약 12시간 회전

식 진탕 배양에 의하여 시험에 사용할 균 현탁액으로 하였다. 복귀돌연변이 검색용 배지는 minimal glucose agar medium plate (MGA plate)를 사용하였으며, 그 조성 및 기타 시액은 Maron and Ames (1983)에 따라 조제하였으며, 고압증기멸균 또는 세균여과지를 통과시켜 사용하였다.

B. Mammalian cells

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-EDTA 용액을 이용하여 계대 유지하였다.

2) 실험동물

식품의약품안전청 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 보호소를 혼합하여 사용하였다. *Salmonella typhimurium* 및 CHL 세포에 대한 S-9 mix의 조성은 다음과 같다. 복귀돌연변이시험에서의 S-9 mix의 조성은 S9 fraction 2.0 ml (4%), 0.4 M MgCl₂-1.65 M KCl 1.0 ml, 1 M glucose-6-phosphate 0.25 ml, 0.1 M NADP 2.0 ml, 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 25.0 ml, DW 19.75 ml이었고, 염색체 이상시험에서의 S-9 mix의 조성은 S9 fraction 1.5 ml (30%), MgCl₂-KCl salt solution 1.0 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) *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험 예비독성시험은 TA100 균주를 이용하여 DMSO를 용매로

하여 10 mg/plate를 최고농도로 제조하여 직접법과 S-9 mix를 이용한 대사활성법을 실시하였다. 예비독성시험결과 10 mg/plate의 농도에서 시험물질에 의한 세포독성을 보이지 않아 본 시험에서의 최고농도로 설정하였다. 시험관 (13 mm×100 mm, glass)에 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 각각의 배양균액 0.1 ml, 시험물질 0.1 ml 및 0.2 M phosphate buffer saline (pH 7.4) 0.5 ml (대사활성법에서는 S-9 mix 0.5 ml)을 넣어 혼합한 후 37°C에서 30분간 preincubation을 행하였다. 배양 종료후 top agar 2 ml을 첨가하여 혼합하고 변이원성 검색용 배지 MGA plate에 증충, 37°C에서 48시간 배양 후 복귀변이 집락의 수를 자동 집락계수기 (Artek model 880)와 수동식 집락계수기로 계수하였다. 복귀변이 집락의 수는 3매의 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이유발성의 판정은 용매 대조의 2배 이상의 복귀변이 집락수를 나타내고 또한 용량의 존성을 가지는 경우를 양성으로 하였다.

2) 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

SKP-450을 DMSO에 녹인 후 세포배양 배지에 10%되게 첨가하여 세포독성시험을 실시하였다. 세포 계대시에 1회용 24 well plate에 1 well당 1×10^4 개의 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 4단계의 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 5×10^4 /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 처리시간이 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 5×10^4 /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 배양하였

다. 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 증기상을 현미경하에서 판독하여 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 용량 단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

3) 마우스를 이용한 소핵시험

순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 20~30 g의 범위에 드는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 5마리씩 배분하였다. 개체의 식별은 색소(피크린산염)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 ml/kg을 양성대조군으로 설정하였다. kr-30450를 1회 경구 투여시는 24, 30, 48시간에, 2회 경구투여시는 24, 48, 72시간에 골수를 채취하여 도말표본을 제작하고 광학현미경하에서 관찰하여 1,000개의 다염성적혈구에서의 소핵출현 빈도수를 계수하여 치사한 동물이 없고 소핵의 출현빈도수가 가장 많은 투여량을 최고 투여량 및 표본제작시기로 하였다. SKP-450은 예비시험의 결과에 따라 투여회수, 도살시간에 따른 소핵유발능의 차이가 없어 본시험에서는 시험물질의 50% 치사량의 1/2 농도를 최고농도로 하고 1회 경구투여 후 30시간체에 소핵을 관찰하였다. 선정된 5 mg/kg/10 ml을 최고투여량으로 하고 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 6.8)의 1/150 M phosphate buffer)에 30분간 염색하였다. 염색 후 동일 완충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산수용액에 수초간 담근 후 증류수에 수회 세척하고 공기 중에서 건조시

켰다.

소핵관찰은 2명의 관찰자에 의해 맹검법으로 검경하였다. 마우스 1마리당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구 (polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고, 다시 1,000개의 PCE 중에서 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated PCE, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포 직경의 1/2로부터 식별가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유헤세포의 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 야기되는 암에 대한 관심이 높아지면서 유전자 손상을 단기적으로 쉽게 검색할 수 있는 유전독성 시험법의 개발이 진행되어 왔으며 *in vitro* 시험인 Ames *et al.* (1975)이 개발한 복귀돌연변이시험 및 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험과 *in vivo* 시험인 동물을 이용한 소핵 시험은 국제적으로 널리 이용하고 있는 대표적인 유전독성 평

가법이다. 본 연구에서는 이러한 시험법들을 이용하여 사용되고 있는 기존의 고혈압치료제의 문제점중의 하나인 콜레스테롤이 심각하게 증가하는 부작용을 해결하기 위한 목적으로 개발한 새로운 고혈압치료제인 SKP-450에 대한 유전독성을 평가하였다.

*S. typhimurium*을 이용한 복귀변이시험에서 SKP-450은 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537등 4종의 시험용균주에서 S-9 mix를 적용하지 않은 직접법의 경우, 전용량 단계에 걸쳐 모든 시험용 균주에서 음성대조와 같은 정도 또는 그 이하의 복귀변이 집락수를 나타내었다. S-9 mix를 이용한 대사활성화법의 경우에도 S-9 mix를 적용하지 않은 직접법과 유사한 결과를 나타내었다. 양성대조화합물은 직접법과 S-9 mix를 첨가한 대사활성화법 모두에서 각각의 시험용 균주에 대하여 복귀변이 집락수를 증가시켜 본 실험이 적정히 행하여졌음을 나타내었다 (Table 1). 이상의 결과로 보아 본 시험 조건에 있어서 SKP-450은 돌연변이 유발성을 가지지 않는 것으로 판단된다.

또한 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 예비독성시험을 실시하여 대략의 세포증식 50% 억제 농도를 구하였다. 시험물질인 SKP-450은 예비독성시험을 시행한 결과 500 µg/ml에서 50% 정도의 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 SKP-450의 염색체이상시험 본시험 농도를 500, 250, 125 µg/ml로 하였다. SKP-450의 염색체이상시험 직접법과 대사활성

Table 1. Reverse mutation test of SKP-450 in *S. typhimurium*

Compound ^a	Dose (µg/plate)	S9 Mix	No. of revertant colonies per plate (Mean ± S.D.)			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
DMSO		—	25.0 ± 2.3	174.0 ± 6.4	14.0 ± 2.5	9.0 ± 1.2
		—		186.3 ± 8.1	17.0 ± 5.5	12.0 ± 2.1
	5000	—	27.0 ± 2.7	166.0 ± 8.0	15.0 ± 4.5	11.0 ± 2.1
	2500	—	26.0 ± 4.0	185.0 ± 10.3	16.0 ± 3.5	10.0 ± 1.5
	1000	—	26.0 ± 3.5	188.0 ± 14.3	14.0 ± 2.5	8.0 ± 1.0
	500	—	20.0 ± 5.0	172.0 ± 10.7	12.0 ± 1.5	8.0 ± 0.6
	250	—	23.0 ± 3.1	171.0 ± 16.4	12.0 ± 3.1	9.0 ± 1.0
2NF	10	—	351.0 ± 9.3			
	1.5	—		657.0 ± 30.5	541.0 ± 6.0	
ICR-191	1.0	—				1685.0 ± 87.1
DMSO		+	24.0 ± 1.5	163.0 ± 10.2	14.0 ± 3.5	10.0 ± 2.3
SKP-450	10000	+	33.0 ± 1.5	184.0 ± 16.2	23.0 ± 2.5	13.0 ± 4.6
		+	33.0 ± 3.5	151.0 ± 4.6	13.0 ± 0.6	10.0 ± 1.5
		+	33.0 ± 5.0	157.0 ± 4.5	17.0 ± 2.1	12.0 ± 2.1
		+	26.0 ± 3.5	178.0 ± 13.5	20.0 ± 4.0	8.0 ± 1.5
		+	27.0 ± 1.0	171.0 ± 8.6	13.0 ± 1.2	10.0 ± 3.5
		+	23.0 ± 1.0	174.0 ± 8.5	17.0 ± 6.5	7.0 ± 3.0
2AF	10	+	1406.0 ± 86.7	967.0 ± 22.7	30.0 ± 1.2	39.0 ± 4.5

^aDMSO, dimethyl sulfoxide; 2NF, 2-nitrofluorene; SAZ, sodium azide.; 2AF, 2-aminofluorene.

Table 2. Chromosome aberration test of SKP-450 in CHL Cells

Compound ^a	Dose (µg/ml)	S9 mix	Time (hr) ^b	No. of metaphase	No. of aberration ^c						No. of normal
					gap	ctb	cte	csb	cse	num	
S.C.				100±0 ^d	1.0±0.7	0.3±0.4					98.7±0.4
SKP-450	500			100±0	0.3±0.4						99.7±0.4
	250	-	24	100±0	0.3±0.4	0.3±0.4					99.3±0.4
	125			100±0							100.0±0.0
MMC	0.1			100±0	4.7±0.1	2.3±0.4	17.3±3.5	0.7±0.8	1.7±1.1		75.0±3.7
S.C.				100±0	0.3±0.4						99.7±0.4
SKP-450	500			100±0	0.7±0.8						99.3±0.8
	250	+	6+18	100±0	0.3±0.4						99.3±0.8
	125			100±0	0.3±0.4		0.3±0.4				99.7±0.4
B(a)P	20			100±0	4.0±0.7	1.7±0.4	2.3±0.4	1.3±0.4	0.3±0.4		90.3±0.8

^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=2)

화법, 24시간처리의 결과를 Table 2에 나타내었다. SKP-450에 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), 투여 경로 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 SKP-450은 전 용량단계에 걸쳐 소핵을 가진 다염성

적혈구의 출현이 거의 관찰되지 않았다 (Table 3). 전체 적혈구에 대한 PCE의 비율에서는 전 용량단계에서 대조군에 비하여 차이가 없었다. 양성대조군은 Hayashi *et al.* (1989)의 참고 data의 상, 하한의 범위 내에 들었으며, 용매대조군에서는 일반적인 음성대조군의 소핵유발율을 나타내었다. 시험물질인 SKP-450은 투여 후 동물에서 육안적인 어떠한 독성의 징후도 나타나지 않았으며, 소핵의 출현빈도는 전 농도군에서 용매대조군과 같이 거의 나타나지 않았다. 이것은 SKP-450이 마우스의 골수적아구세포의 분화과정에서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합하여, 본 시험조건 중 SKP-450은 *in vitro* 시험인 *Salmonella* 균주를 이용한 복귀 돌연변이시험과 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 *in vivo* 시험인 마우스를 이용한 소핵시험에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

Table 3. Micronucleus test of SKP-450 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.	p.o.		5	30	0.18±0.11	49.0±3.0
SKP-450	p.o.	5	5	30	0.20±0.16	46.0±5.0
	p.o.	2.5	5	30	0.16±0.09	49.0±2.0
	p.o.	1.25	5	30	0.22±0.11	48.0±4.0
	i.p.	2	5	30	6.84±1.31*	46.0±7.0

^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, normochromatic erythrocytes

*Statistically significant from solvent control (P<0.01, T-test)

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.