



비특이 면역증강제 BARODON®에 대한 유전독성시험

서민수 · 조성대 · 안남식 · 정지원 · 양세란 · 박준석 · 박기수 · 홍인선 · 조은혜 · Nguyen Ba Tiep · 이영순 · 강경선
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Mutagenicity Studies on Nonspecific Immunostimulator BARODON®

Min-Su Seo, Sung-Dae Cho, Nam-Shik Ahn, Ji-Won Jung, Se-Ran Yang, Joon-Suk Park, Ki-Su Park,
In-Sun Hong, Eun-Hye Jo, Nguyen Ba Tiep, Yong-Soon Lee and Kyung-Sun Kang

Department of Veterinary Public Health,
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received May 8, 2003; Accepted June 5, 2003

ABSTRACT. A nonspecific immunostimulator BARODON® was tested for mutagenicity using Ames Salmonella tester strains TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537 with or without metabolic activation (S9 mix). None of the fresh species showed mutagenicity. In the reverse mutation test using *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537 did not increase the number of revertants at all doses tested (5, 2.5 or 1.25 mg/ml). Chromosome aberration test was carried out in Chinese hamster lung (CHL) cell line. The cells were treated with BARODON® (1, 0.5 or 0.25 mg/ml), while positive control group was treated with Mitomycin C (0.1 mg/ml). The results show that there is no statistically significant difference between positive control and treatment groups. In mouse micronucleus test, there was significant increase in the ratio of micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) in the high dose group (10% BARODON®), while there is no significance between control and low (2.5% BARODON®) or middle (5% BARODON®) dose groups. Taken together, this results suggest that below 5% BARODON® might not have mutagenic potential *in vitro* and *vivo* systems.

Keywords: Mutagenicity, Ames test, Chromosome aberration, Micronucleus, BARODON®, Immunostimulator.

서 론

최근 축산업이 집단사육 형태로 대규모화 되어감에 따라 운영과 관리면에서는 효율성이 높아졌지만 이에따라 질병 원인체에 노출될 가능성과 질병전파의 위험성 또한 높아져 이를 예방치료하기 위한 약제의 집중적인 사용이 증가하고 있다(Anadon과 Martinez-Larranage, 1999). 그러나 이러한 치료약제의 사용은 포괄적인 질병방어 보다는 제한된 특정질병의 원인체에 대해서만 소기의 성과를 기대할 수 있었고 병원성이 높은 미생물의 감염시에는 그나마 기대에도 미치지 못하는 결과를 초래하였다

(Bonneau와 Laarveld, 1999). 따라서 최근 학계에서는 축산과 동물생체에 치명적인 악영향을 미치는 질병에 대한 예방제 및 치료제의 대체물질 개발에 대한 연구가 필요하다 주장하고 있다. 특히 면역증강제에 대한 집중적인 연구에 높은 관심을 기울이고 있는데, 그 가운데 생체 면역을 종합적으로 증강시킴으로써 백신 접종효과의 증진을 가져오거나, 야외에서 침입하는 질병 원인체에 대한 생체방어능 향진을 유도하는 비특이 면역증강제(nonspecific immunostimulator; NIS)의 개발이 시급하다(Berg, 1998; Terance 등, 1998). 왜냐하면 과거의 양돈질병은 감염시 빠르게 회복되는 편이었으나 현재는 새로운 바이러스가 등장하고 복합화되어 면역형성기간이 오래 걸리며 이 결과 회복기간 중에 2차 세균감염에 따른 추가 피해를 입고 있기 때문이다.

BARODON®(바로돈 S.F(주), Korea)은 규소, 칼슘, 나

Correspondence to: Kyung-Sun Kang, or Yong-Soon Lee,
Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary
Medicine, Seoul National University San 56-1, Shillim-9 dong,
Kwanak-ku, Seoul 151-742, Korea
E-mail: kangpub@snu.ac.kr or leeys@snu.ac.kr

트름, 유기탄소 화합물 및 은등을 혼합하여 액상 이온화시킨 물질로서 체내의 면역세포들 특히 T임파구들을 자극, 증가시켜 직접적인 세포성면역 증진에 작용하여 비특이적으로 돼지면역세포를 증강한다고 알려져 있다(Park 등, 1998; Yoo 등, 2002). BARODON®을 직접 사료에 넣어 투여하거나 미강(米糠; 쌀겨) 등에 발효시켜 가축에게 급여함으로써 돼지유행성 설사에 매우 효과적인 예방효과를 확인한 바 있으며(unpublished data), 높은 폐사율로 인해 양계산업에 막대한 손실을 가져오는 가금티푸스에도 효과적으로 작용함이 확인되었다(unpublished data).

따라서 본 연구에서는 바로돈 S.F(주)에서 개발한 BARODON®의 유전독성 시험 즉, 복귀돌연변이 시험, 소핵시험, 염색체 이상시험을 식품의약품안전청 고시(1999. 12. 12)의 의약품 등의 독성시험기준 제 1999-61호에 준하여 유전독성시험을 실시함으로써 BARODON®의 임상 시험을 위한 안전성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

본 시험에 사용된 시험물질은 바로돈 S.F(주)에서 공급 받은 음이온 알칼리 복합광물질 용액을 사용하였다. 물질은 연한 갈색이며 사용기간동안 실온에서 보관하였다. 양성대조물질인 sodium azide(NaN_3), 2-aminofluorene(2-AF), 6-chloro-9-[3-(2-chloroethylamino)propyl-amino]-2-methoxy-acridine(ICR191) 및 mitomycin C는 Sigma Co.에서 구입하였다.

복귀돌연변이 시험

균주: 식품의약품안전청 산하 국립독성연구원 유전독성과에서 분양받아 본 실험실에서 보관 중인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 TA102 균주를 이용하여 복귀돌연변이시험을 실시하였다.

시험물질 및 대조물질: 시험물질은 바로돈 S.F(주)에서 공급받은 BARODON®을 사용하였다. 최고용량은 예비시험의 결과로부터 세포독성을 나타내지 않고 시험법에 명시된 5 mg/plate 이하의 농도인 BARODON® 원액 5 mg/plate를 최고용량군으로 하였으며 공비로 중간용량군(BARODON® 원액 2.5 mg/plate), 저용량군(BARODON® 원액 1.25 mg/plate)의 3개군을 설정하였다. 용매대조군(negative control)으로는 0.9% saline를 사용하였으며, 양성대조물질로는 TA98 균주 및 TA102 균주에서 2-AF (10.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$), TA100, TA1535 균주에서 NaN_3 (1.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$), TA1537 균주에서 ICR191 (1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$)를 사용하였다. 또한 각 용량마다 3매의 plates를 사용하였다.

복귀돌연변이 시험: *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537 균주를 master plate에 계대 접종하였다. 접종된 master plate를 20시간 배양한 후 균주를 nutrient broth에 넣고 37°C rotatory incubator에서 배양하였다. 시험 시작 전 top agar를 38°C water bath에 넣고 autoclave한 10 ml 시험관에 2 ml씩 분주하여 각각의 시험관에 균액 0.1 ml와 각 단계의 시료를 넣어 vortex mixer로 잘 혼합한 다음 최소 영양배지에 접종하였으며, S9 첨가배지의 경우 S9을 cofactor와 1 : 9의 비율로 섞어 0.5 ml씩 첨가한 다음 vortex mixer로 혼합하여 접종하였다. S9 mixture는 그 활성이 불과 몇 초 밖에 유지되지 않으므로 균주를 먼저 가한 후 S9을 첨가하였으며, S9 mixture를 가하고 plate 상에 고루 퍼지게 하기까지의 시간이 20초가 넘지 않도록 주의하였다. 이 plate를 실온에서 30 분 방치한 다음 37°C incubator에서 48시간 배양하였다. Colony는 colony counter 위에서 background lawn 보다 큰 colony를 계산하였으며, 복귀돌연변이 시험의 결과 판정은 복귀돌연변이 colony 수가 용량 의존적으로 증가하고 그 수가 음성대조군의 2 배 이상이거나 통계학적 유의성을 나타낼 때 양성으로 판정하게 되며 이를 판단하기 위하여 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537 모두에서 음성대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 $P < 0.05$ 로 *t*-test를 실시하였다.

염색체 이상시험

세포 및 배양조건: 시험세포주는 본 실험실에서 보관 중이었던 chinese hamster lung(CHL) 세포주를 사용하였으며 이는 염색체 이상시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 풍부하기 때문에 사용하였다. 5% fetal bovine serum(FBS, Gibco)를 함유한 eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)을 사용하여 배양하였다.

시험물질 및 대조물질: 예비시험인 세포독성시험을 통하여 IC_{50} 을 구하여 시험물질의 처치농도는 그 이하인 BARODON® 원액 1 mg/ml을 시험물질의 최고투여농도로 하고, 공비로 희석하여 중간용량군은 BARODON® 원액 0.5 mg/ml으로, 저용량군은 BARODON® 원액 0.25 mg/ml으로 3단계의 시험물질 투여농도군을 두었다. 양성대조군으로는 mitomycin C(0.1 mg/ml)를 사용하였으며 각 농도에 따른 시험군은 0.9% saline으로 용해하여 제조하였다.

염색체 이상시험: 각 시험군당 2개의 세포배양용 60 mm dish를 준비하고 각 dish에 1×10^5 개의 세포를 seeding한 후 2일간 배양하고, 시험물질, 용매 및 양성대조물질을 처리한 후 37°C humidified CO_2 incubator에

서 48시간 동안 배양하였다. 세포를 수거 2시간 전에 colcemid를 최종농도 0.2 µg/ml이 되게 처리하여 수거후 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 0.075 M KCl 첨가후 37°C waterbath에 15분간 처리하였고, waterbath 처리 후 원심분리하여 상층액을 제거한 후 고정액을 다시 가한 후 흔들어서 cells을 부유시켰으며 이 과정을 2회 반복하였다. 마지막 원심 분리 후 0.5 ml 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)을 첨가하여 cell suspension을 만들어 slide glass를 MtOH에 담귀 냉동 보관 했던 것을 1개씩 꺼내 MtOH를 신속히 제거한 다음 피펫을 이용해 60~80 cm 높이에서 고정세포부유액을 2~3개에 1방울씩 떨어뜨려 상온에서 고정하였다. 한 플라스크 당 양호한 슬라이드 2개씩 완전히 건조하여 Giemsa staining하여 광학현미경하에서 관찰하였다(Ishidate와 Odashima, 1977; Ivett 등, 1989).

결과의 판정은 실험군 당 100개의 분열중기상을 관찰한 후 염색체이상을 가진 세포의 출현율을 계산하여 대조군과 비교하여 유의성이 있고, 용량의존성이 있는 경우 또는 하나 이상의 용량단계에서 유의적이고, 재현성이 인정되는 경우를 양성으로 판정하였으며, $P < 0.05$ 수준으로 chi-square test에 의해 통계처리 하였다(Chung 등, 2002; Kim 등, 1996).

소핵시험

실험동물 및 사육환경: 실험동물은 특정병원체 부재 (specific pathogen free, SPF) ICR계 마우스를 한림실험동물(주)으로부터 분양받아 군당 암·수 각 5마리씩 사용하였다. 실험동물은 약 1주일간 본 대학의 사육실에 순화 적응시킨후 건강한 동물을 선택하여 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 배기 10~12회, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간동안 실험동물용 케이지에 5마리씩 넣어 시험하였으며, 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 투여량을 적은 tag를 붙였다. 사료는 퓨리나(주)에서 공급하는 실험동물용 고형사료를 음수는 상수도수를 자유섭취시켰다. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체 식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다.

시험물질 및 대조물질: 대조군은 시험물질의 용매로 사용된 0.9% saline을 사용하였고, 시험군으로는 고용량군(10% [v/v] BARODON® 원액), 중간용량군(5% BARODON® 원액) 및 저용량군(2.5% BARODON® 원액)

을 설정하였으며, 양성대조물질은 mitomycin C(Sigma Co., USA)를 체중 kg당 0.25 mg이 되도록 0.9% saline에 용해하여 사용하였다. 시험물질 투여용량은 체중 kg당 20 ml의 용량이 되도록 복강내 단회투여하였고 음성대조물질의 경우도 시험물질과 동량으로 투여하였다.

소핵시험: 예비실험에서 양성대조물질인 mitomycin C 투여 후의 골수세포 수거시간은 시험물질의 최고용량을 1회 투여한 후 6시간, 12시간, 18시간, 24시간에 소핵을 계수하여 소핵이 최대로 나오는 시간인 18시간으로 하였다. 골수세포의 수거는 대퇴골로부터 골수를 0.5 ml fetal bovine serum으로 관류시킨 다음 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 침전된 골수를 부유시킨 후 슬라이드에 도말, Giemsa액(pH 6.8)으로 염색하였다(Ishidate와 Odashima, 1977; Ivett 등, 1989). 현미경 1,000배의 배율하에서 2,000개의 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 비율 및 적혈구 중 다염성적혈구의 비율을 결정하였다. 소핵다염성적혈구 값 및 다염성적혈구의 비율은 $P < 0.05$ 수준으로 chi-square test에 의하여 대조군과의 통계적 유의성을 검정하였다(Kang 등, 2002). 소핵이상의 판단은 용량 의존적으로 소핵 다염성적혈구수가 증가하였을 때를 소핵 유발성이 있다고 하고 총 적혈구 중 다염성 적혈구비가 30% 이하로 되었을 때를 조혈기능 억제 등의 세포독성이 있다고 판정하였다(Altman, 1993; Hayashi, 1989; Kondo, 1993; Salamore, 1980; Schmid 등, 1975).

결 과

복귀돌연변이 시험

시험 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 및 TA1537에 대한 모든 용량단계에서 복귀변이 colony수는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의성을 보이지 않았으며, 용량 의존적인 반응을 나타내지 않았다. 또한 S9 첨가의 경우에 있어서도 S9 부재와 마찬가지로 유의적인 변화 및 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다. 반면 양성대조물질인 sodium azide, 2-aminofluorene, 9-aminoacridine의 복귀 돌연변이 빈도는 S9 존재와 부재 모두 복귀돌연변이 집락수가 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 1).

염색체 이상시험

각 시험용량군의 염색체이상세포의 출현빈도는 시험물질 처리군(고용량 : 4.2±2.39%, 중간용량 : 2.4±0.89%, 저용량 : 2.4±2.51%) 모두 대조군(3.0±1.41%)과 유의

Table 1. Reverse mutation test of BARODON® in *S. typhimurium*

Group	S9 mix	No. of revertant per plate (Mean±S.D.)				
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA102
High (5 mg/plate)	-	19.00±4.36	135.00±6.93	11.00±1.00	6.33±0.58	226.67±8.33
Mid (2.5 mg/plate)	-	13.67±3.51	127.00±12.17	12.00±2.00	7.67±1.15	238.00±23.43
Low (1.25 mg/plate)	-	14.67±1.53	127.33±5.51	12.67±2.52	8.00±1.73	226.67±8.33
2-AF (10.0 mg/plate)	-	162.00±11.14*	NT ^a	NT	NT	722.33±15.31*
NaN3 (1.5 mg/plate)	-	NT	719.33±18.15*	570.00±24.88*	NT	NT
ICR191 (1.0 mg/plate)	-	NT	NT	NT	844.00±13.00*	NT
High (5 mg/plate))	+	30.00±3.00	172.67±11.50	17.00±2.00	11.00±2.65	245.00±6.08
Mid (2.5 mg/plate)	+	46.00±2.65	171.33±14.19	20.67±4.16	16.00±2.65	268.00±33.78
Low (1.25 mg/plate)	+	44.67±3.79	164.33±12.66	19.67±1.53	13.00±2.65	240.00±7.21
2-AF (10.0 mg/plate)	+	364.00±8.54*	NT	NT	NT	866.33±11.59*
NaN3 (1.5 mg/plate)	+	NT	623.33±11.59*	278.00±6.24*	NT	NT
ICR191 (1.0 mg/plate)	+	NT	NT	NT	225.33±11.02*	NT

^a, not tested.

*, Significantly different from negative control ($P<0.05$).

Table 2. Effect of BARODON® on chromosome aberration induced in Chinese hamster lung cells

Group	Total no. of examined metaphases	No. of metaphases with different types of chromosomal aberrations						Frequency of cells with total aberration (%)
		Choromatid			Chromosome			
		Gap	Break	Exchange	Gap	Break	Exchange	
Negative control	500	4	8	0	2	0	1	3.00±1.41
High (5 mg/ml)	500	7	9	1	3	1	0	4.20±2.39
Mid (2.5 mg/ml)	500	5	5	0	1	1	0	2.40±0.89
Low (1.25 mg/ml)	500	5	4	1	0	1	0	2.40±2.51
Mitomycin C (0.1 mg/ml)	500	84	68	10	5	16	7	37.60±3.65*

*, Significantly different from negative control ($P<0.05$).

한 변화가 관찰되지 않았다(Table 2). 그러나 대조군과 비교하여 양성대조군 mitomycin C(37.6±3.65%)에서는 유의적인 증가를 나타내었다.

소핵 시험

수컷 마우스에서 소핵다염성적혈구수와 총적혈구대비 다염성적혈구수의 계수결과 대조군에서의 다염성적혈구 2,000개당 소핵다염성적혈구의 관찰빈도는 0.44±0.19% 이고 시험물질투여군에서 고용량군, 중간용량군, 저용량군이 각각 1.14±0.25%, 0.77±0.20%, 0.27±0.19%로서, 통계적 유의성을 검증한 결과 대조군에 비교하여 고용량

군에서 통계적 유의성이 나타났으나, 중간용량군과 저용량군에서는 통계학적으로 유의성 있는 변화를 볼 수 없었다. 또한 총 적혈구대비 다염성 적혈구의 관찰빈도는 대조군에서는 49.96±1.92%, 고용량군에서는 49.44±1.92%, 중간용량군에서는 48.24±4.38%, 저용량군에서는 49.84±3.80%으로 대조군에 비해 전 시험용량군에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(Table 3).

암컷 마우스에서는 대조군에서의 다염성적혈구 2,000개당 소핵다염성적혈구의 관찰빈도는 0.48±0.18%이고 시험물질투여군에서는 고용량군, 중간용량군, 저용량군이 각각 1.31±0.51%, 0.82±0.20%, 0.24±0.17%로서,

Table 3. *In vivo* micronucleus test in ICR male mice treated with BARODON®

Group	Route	No. of animal	No. of MNPCE	PCE
			(%, Mean±SD/2,000 PCE)	(%, Mean±SD/500 Erythrocyte)
Negative control	intraperitoneal	5	0.44±0.19	49.96±1.92
High	intraperitoneal	5	1.14±0.25*	49.44±5.14
Mid	intraperitoneal	5	0.77±0.20	48.24±4.38
Low	intraperitoneal	5	0.27±0.19	49.84±3.80
Mitomycin C (0.25 mg/kg)	intraperitoneal	5	3.10±0.93*	49.28±2.63

*, Significantly different from negative control ($P<0.05$).

Table 4. *In vivo* micronucleus test in ICR female mice treated with BARODON®

Group	Route	No. of animal	No. of MNPCE (%, Mean±SD/2,000 PCE)	PCE (%, Mean±SD/500 Erythrocyte)
Negative control	intraperitoneal	5	0.48±0.18	50.72±2.93
High	intraperitoneal	5	1.31±0.51*	48.24±4.45
Mid	intraperitoneal	5	0.82±0.20	49.08±1.78
Low	intraperitoneal	5	0.24±0.17	46.40±2.23
Mitomycin C (0.25 mg/kg)	intraperitoneal	5	2.14±0.47*	48.96±5.37

*, Significantly different from negative control ($P<0.05$).

통계적인 유의성을 검증한 결과 대조군에 비교하여 고용량군에서 통계적 유의성이 나타났으나, 중간용량군과 저용량군에서는 통계학적으로 유의성 있는 변화를 볼 수 없었다. 또한 총 적혈구대비 다염성 적혈구의 관찰빈도는 대조군에서는 50.72±2.93%, 고용량군에서는 48.24±4.45%, 중간용량군에서는 49.08±1.78%, 저용량군에서는 46.40±2.23%으로 대조군에 비해 전 시험용량군에서 유의차가 관찰되지 않았다(Table 4).

고찰 및 결론

체내에서 면역세포를 증가시켜 비특이적으로 면역력을 증강시켜주는 BARODON®에 대한 전임상시험중 유전독성 평가의 일환으로 변이원성시험에서 사용되는 *Sallmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험, CHL cells을 이용한 염색체 이상시험 및 마우스 골수세포에서의 소핵 시험등을 실시하여 변이원성을 평가하였다.

복귀돌연변이 시험인 Ames test에서는 모든 균주에서 대조군과 비교하여 시험용량군사이에 돌연변이 유발성이 관찰되지 않은 반면 각 양성대조물질에서는 대조군과 비교하여 유의적인 균주의 증가가 관찰됨으로써 시험물질인 BARODON®은 돌연변이 유발능을 가지지 않는 것으로 평가 되었다.

염색체 이상시험에서는 BARODON®을 대상으로 염색체 이상세포의 출현빈도를 대조군과 비교한 결과 모든군에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 양성대조군과 대조군의 통계적인 비교에서는 통계적 유의성을 관찰할 수 있었으므로 시험의 신빙성을 더하여 주었다. 따라서 바로돈 S.F(주)에서 공급한 BARODON®은 본 시험 조건하에서 어떠한 염색체 이상도 유발하지 않는 것으로 사료된다.

마지막으로 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서는 BARODON®을 사용하여 골수세포 억제지표로 소핵다염성적혈구 및 다염성적혈구의 비율의 통계적 유의성을 검증한 결과 소핵다염성 적혈구에서 대조군과 비교하여 전 개체의 고용량군에서 통계적인 유의성이 나타났다. 그러나 암·수 마우스 모두의 중간용량군과 저용량군에서는 대

조군과 비교하여 통계적인 유의성을 관찰할 수 없었다. 또한 양성대조군(mitomycin C)과 대조군에서 통계적으로 비교하여 암·수 마우스 모두에서 뚜렷한 통계적인 유의성을 나타내었고 적혈구의 비율을 대조군과 시험용량군인 고용량군, 중간용량군, 저용량군과 비교한 결과 어떠한 통계적 유의성도 관찰 할 수 없었다.

바로돈 S.F(주)에서 공급한 BARODON®에 대한 전임상 시험으로서 복귀돌연변이 시험, 염색체이상 시험, 그리고 소핵시험의 유전독성시험을 수행한 결과 복귀돌연변이 시험과 염색체 이상 시험에서 시험용량군에서 대조군과 비교하여 어떠한 유의성도 관찰 되지 않았다. 그러나 소핵 시험에서는 소핵다염성적혈구 값이 대조군과 비교하여 고용량군에서 암·수 마우스 모두 통계적인 유의성이 관찰 되었다. 고용량군의 소핵다염성적혈구 수치가 양성대조군인 mitomycin C의 수치의 40% 이하에 달하는 것으로 보아 낮은 정도이긴 하지만 BARODON®의 10% 이상을 사용시 소핵의 출현을 동반하는 유전독성이 있다고 사료 된다. 그러나, 임상예정용량은 BARODON® 원액 0.1% 이고 미강에서 발효시켜 사용시 최고 임상예정용량이 3% 임을 감안할 때 실제 BARODON®의 임상예정용량에서는 유전독성은 없는 것으로 판단된다(Yoo 등, 2002). 이상의 실험에서 BARODON®은 사용용량 범위에서 유전자에 변화를 주지 않아 임상농도로 사용시에는 유전독성을 유발 하지 않을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Altman, D.G. (1993): Comparing groups-categorical data : Practical stastics for Medical Research, Chapman & Hall, London, pp. 229-276.
- Anadon, A. and Martinez-Larranage, M.R. (1999): Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products; regulatory aspects. *Livest. Prod. Sci.*, **59**, 183-198.
- Berg, R.D. (1998): Probiotics, prebiotics or conbiotics. *Trends Microbiol.*, **6**, 89-92.
- Bonneau, M. and Laarveld, B. (1999): Biotechnology in animal nutrition, physiology and health. *Livest. Prod. Sci.*, **59**, 223-241.
- Chung, Y.S., Hong, E.K., Kim, S.G., Ahn, E.T., Lee, K.Y. and

- Kang, J.K. (2002): Genotoxicity studies of the complex of acriflavine and guanosine. *Environ. Mutagens Carcinogens*, **21**, 106-111.
- Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni T. and Ishdate, M. Jr. (1989): A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 347-356.
- Ishidate, M. Jr. 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.
- Ivett, J.L., Brown, B.M., Rodgers, C., Anderson, B.E., Resnick, M.A. and Zeiger, E. (1989): Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro*, IV. Results with 15 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, **14**, 165-187.
- Kang, M.J., Kim, M.Y., Park, M.K., Kim, B.T., Ahn, K.K., Choi, Y.S., Moon, B.S. and Lee, J.W. (2002): Study on local irritation in rabbits and micronucleus test in mice with YHB216, *J. Toxicol. Pub. Health*, **18**, 79-85.
- Kim, H.S., Kwack, S.J., Chun, S.A., Lim, S.Y., Ahn, Y., Kim, W.B., Kim, B.M., Ahn, B.O., Suh, D.S. and Lee, B.M. (1996): Genotoxic evaluation of recombinant human erythropoietin (rHu-EPO) in short-term assays. *Environ. Mutagens Carcinogens*, **16**, 103-108.
- Kondo, K. (1993): Mutagenicity studies of S-1108, a new estertupe oral cephem anticlotic (IV): Micronucleus test in mouse bone-marrow cells. *Iyakuhi Kenkyu*, **24**, 18-20.
- Park, Y.H., Woo, H.J., Rhee, J.C., Han, J.H., Choi, S.I., Yoo, B.W. and Kim, K.Y. (1998): Enhancement of host immune responses by addition of nonspecific immunostimulator (BARODON[®]) in animal feed. *Seoul Univ. J. Vet.*, **23**, 37-46.
- Salamore, M. (1980): Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat. Res.*, **74**, 347-356.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.
- Terance, H., Alan, L. and David, W. (1998): New drug targets in inflammation and immunomodulation. *D.D.T.*, **3**, 516-521.
- Yoo, B.W., Choi, S.I., Kim, S.H., Yang, S.J., Koo, H.C., Kwon, N.H., Seo, S.H., Park, B.K., Yoo, H.S. and Park, Y.H. (2002): Immunostimulatory effects of an anionic alkali mineral complex solution (BARODON[®]) on porcine lymphocytes, *J. Swine Health Prod.*, **10**, 265-272.