



게르마늄 복합물인 STB-HO-BM에 대한 유전독성에 관한 연구

송시환¹ · 정연권² · 홍동호³

¹(주)켄온 전임상 연구소, ²(주)서봉바이오테크, ³(주)녹십자 개발본부

Genotoxicity Studies of STB-HO-BM, a Germanium Complex

Si Whan Song¹, Winston Jung² and Dong Ho Hong³

¹Preclinical Research Center, ChemOn Inc., Gyeonggi-do 449-826

²SeoBong Biobestech Co., Seoul 137-857

³Green Cross Coporation, 303 Bojeong-dong, Giheung-gu, Yongin 446-770, Korea

Received February 17, 2006; Accepted April 1, 2006

ABSTRACT. We have investigated the genotoxicity of STB-HO-BM using *in vitro* and *in vivo* system such as Ames reverse mutation test, chromosomal aberration test and micronucleus test. In Ames reverse mutation test, STB-HO-BM treatment at the dose range up to 5,000 ug/plate did not induce mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 and in *Escherichia coli* WP2 uvrA with and without metabolic activation. Any significant aberration wasn't observed in chinese hamster lung (CHL) fibroblast cells treated with STB-HO-BM at the concentration of 12.5, 2.5, 5 mg/ml both in the absense and presence of metabolic activation system. In mouse micronucleus test, no significant increase in the occurrence of micronucleated polychromatic erythrocytes was observed in ICR male mice orally administered with STB-HO-BM at the doses of 0.5, 1.0, 2.0 g/kg. These results indicate that STB-HO-BM has no mutagenic potential under the condition in this study.

Keywords: STB-HO-BM, Genotoxicity, Reverse mutation, Chromosome aberration, Micronucleus.

서 론

게르마늄의 의학적 효능이 처음 발견된 것은 1930년 프랑스와 스페인의 국경지방인 Lourdes의 샘물이 여러 가지 질병치료에 큰 효과가 있다는 보고서가 발표된 이후 계속된 샘물의 성분분석 결과 게르마늄의 함량이 매우 높다는 사실이 알려지면서 부터이다. 그후 체내에 잔류하지 않고 약리작용을 할 수 있는 유기게르마늄에 대한 연구가 활발히 진행되어 인삼, 마늘, 영지, 명일엽 등과 같은 보

양, 강장의 작용이 있는 약초에 비교적 많은 양의 유기 게르마늄이 함유되어 있다는 것이 밝혀졌고, 유기게르마늄을 암, 간염, 류마티스 관절염, 피부질환, 노화등과 같은 난치성 성인병 치료에 이용하려는 연구가 계속되고 있다.

현재 게르마늄으로 알려진 물질은 산화 게르마늄과 게르마늄(Ge-132)으로 알려져 있으며, 그 중에서 게르마늄(Ge-132)의 역사를 보면 일본의 석탄공학 박사인 아사이가즈히코는 게르마늄 연구소를 설립하여 30년 동안 연구 끝에 유기게르마늄 제1호인 칼보키시 에틸 게르마늄, $(\text{GeCH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{O}_3$, 합성에 성공하였으며, 수용성 게르마늄을 만들어 먹을 수 있는 게르마늄으로 생체에 적용하였다. 유기게르마늄을 Ge-132로 명명하였으며, Ge-132로 세계적으로 통용되었다. 합성 성공 후 무해무독하면서 난치병에 대한 효과를 입증하였다. 현재 세계적인 대학병원 및 연구소에서 생체응용에 대한 연구가 활발하며, 항암효과, 돌연변이억제, 세포활성화, 항바이러스효과, 면역강화작용, 인터페론증가, 해열진통효과, 중금속해독작

Correspondence to: Dong Ho Hong, Green Cross Coporation, 303 Bojeong-dong, Giheung-gu, Yongin 446-770, Korea
E-mail: hongdong@greencross.com

List of abbreviations: SA, sodium azide; MMC, mitomycin C; 9-AA, 9-aminoacridine; 2-NF, 2-nitrofluorene; 2-AA, 2-aminoanthracene; CPA, Cyclophosphamide·H₂O; DP, diploid; PP, poliploid; ER, endoreduplication; MTD, Maximum Tolerance Dose; PCE, Polychromatic erythrocyte; MNPCE, Micronucleated Plochromatic erythrocyte.

용 등 많은 연구논문이 발표되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 게르마늄을 포함한 복합물인 STB-HO-BM은 비만치료제 후보물질로서 본 시험물질의 안전성을 평가하고자 하였다. STB-HO-BM은 (주)서봉바이오베스텍에서 의뢰한 물질로서 안전성 평가의 일환으로 독성을 질적·양적으로 평가하고자 유전독성시험을 “의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청고시 제1999-61호, 1999)”에 준하여 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

본 시험에 사용한 게르마늄 복합물(STB-HO-BM)은 게르마늄을 함유한 광물에서 화학적 처리와 나노화 기술에 의해 처리된 물질로서 (주)서봉바이오 베스텍에서 제공 받아 사용하였다. STB-HO-BM은 5000 mesh 정도로 나노화된 물질로서 밀폐용기에 넣어 냉장 보관하였고, 투여직전 0.5% CMC에 용해시킨 후 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

Salmonella typhimurium 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험

시험용 균주. 염기쌍치환형(base-pair substitution type) 돌연변이 검색을 위하여는 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 및 *E. coli* WP2 *uvrA*를, frame-shift형 돌연변이 검색을 위하여는 TA98과 TA1537 등 모두 5개 균주를 사용하였다. *Salmonella* 4개 균주는 Molecular Toxicology Inc.(111 Gibraltar avenue, Annapolis, MD21401, USA)에서 시판하는 것을, *E. coli* WP2 *uvrA* 균주는 Dr. M.H.L. Green(University of Sussex, Falmer, Brighton, UK)이 제공한 것을 사용하였다. 위 5개 균주들은 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소(대전광역시 유성구 장동 100)를 경유하여 분양받은 것이며 모든 균주는 (주)켄온 전입상연구센터에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용하였다.

시험균주들은 각각 master plate로부터 20 ml의 액체 배지(2.5% Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator(37°C, 200 rpm)에서 약 10시간 전배양하였으며, 전배양을 마친 균주는 시험에 사용할 때까지 실온보관하였다. 최소배지(minimal glucose agar plate)는 1.5% Bacto agar(Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 것을 페트리디쉬(Falcon #1029)에 25 ml씩 분주해 사용하였으며, 대장균(*E. coli*)을 이용한 시험에는 위와 동일한 최소배지에 0.1% tryptophan액을 0.25 ml/l로 첨가한 것을 사용하였다. Top agar

는 0.6% agar와 0.5% NaCl의 조성으로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 top agar에만 0.05 mM의 histidine-biotin을 첨가하였다.

균주의 보관 및 형질 확인. 배양한 균배양액 1 ml당 DMSO 90 l를 가하여 냉동보관용 바이알에 채워 액체질소 내에 냉동보관하였으며, 형질이 확인된 균주의 master plate를 제작하여 시험에 사용하였다. 균주 유전자형 확인을 위해 *Salmonella typhimurium* TA 균주들의 경우는 histidine 요구성 여부, *uvrB* mutation 유지 여부, R-factor 유지 여부, *rfa* 돌연변이의 유지 여부 및 spontaneous revertant의 수 등을 검사하였고, *E. coli* WP2 *uvrA* 균주에서는 tryptophan 요구성 여부, *uvrA* mutation 유지 여부 및 spontaneous revertant의 수등을 Maron and Ames(1983)에 준하여 확인하였다.

시험물질 및 대조물질. 대사활성계의 S-9 mix는 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간을 사용하였으며, 단백질 함량은 44.4 mg/ml을 사용하였다. S-9 mix의 조성은 8 mol MgCl₂ · 6H₂O, 33 mol KCl, 5 mol G-6-P, 4 mol NADPH, 4 mol NADH, 100 mol sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 50 μl S-9로 하였으며, 조제한 S-9 mix는 얼음에 채워 사용하였다. S-9 mix는 0.5 ml/plate로 처리하였으며, 이의 활성은 2-AA의 돌연변이 유발로 확인하였다.

시험물질 적량을 최종적으로 50 mg/ml의 농도가 되도록 부형제에 현탁하였다. 조제된 최고농도 시험물질을 동일한 부형제로 공비 3으로 단계 희석하여 각 농도의 용액을 조제하였다. 부형제는 멸균증류수를 사용하였다. 양성 대조물질 중 sodium azide(SA, Sigma), mitomycin C(MMC, Sigma)는 3차 증류수에, 9-aminoacridine(9-AA, Sigma), 2-nitrofluorene(2-NF, Aldrich), 2-aminoanthracene(2-AA, Sigma)는 DMSO에 용해하여 사용하였다. 각각의 균주에 대한 양성대조물질은 Table 1에 표시하였다. 시험물질 및 양성대조물질에 대한 무균처리는 0.45 μm syringe filter를 사용하였다.

복귀돌연변이시험. 시험은 Ames방법(Ames *et al.*, 1975; Maron *et al.*, 1983, Kristien *et al.*, 2000)을 참고하여 그에 준하여 비교적 감도가 높은 preincubation법으로 수행하였다. -80°C의 DMSO에 동결보존한 각 균주를 해동시켜 nutrient broth(Becton Dickinson)에 접종한 후 37°C에서 10시간 동안 180회/분의 속도로 진탕배양하였다. 각 균주의 배양액 0.1 ml, 인산완충액(0.2 M phosphate buffer, pH 7.4) 0.5 ml를 첨가하여 혼합한 후 37°C 수조에서 30분간 preincubation을 하였다. 이때 대사활성화법에서는 인산완충액 대신 rat의 S-9 혼합액(10% v/v, Oriental Yeast Co. Ltd) 0.5 ml를 첨가하였

Table 1. Reverse mutation test of STB-HO-BM in *Salmonella typhimurium*

Strain	Chemical		Colonies/plate [factor] ^{a)}				
	positive control	($\mu\text{g}/\text{plate}$)	with S-9 mix	index	without S-9 mix	index	
TA100	STB-HO-BM	0	161 \pm 12	1.0	148 \pm 8	1.0	
		62	172 \pm 9	1.1	145 \pm 23	1.0	
		185	164 \pm 19	1.0	140 \pm 15	0.9	
		556	156 \pm 8	1.0	132 \pm 19	0.9	
		1667	164 \pm 19	1.0	146 \pm 22	1.0	
		5000	166 \pm 13	1.0	149 \pm 16	1.0	
	2-AA	0.5	1119 \pm 21	7.0	-	-	
	SA	0.5	-	441 \pm 72	3.0	-	
	TA1535	STB-HO-BM	0	16 \pm 3	1.0	14 \pm 1	1.0
			62	14 \pm 2	0.9	15 \pm 5	1.1
185			12 \pm 3	0.8	14 \pm 4	1.0	
556			20 \pm 3	1.3	18 \pm 1	1.3	
1667			16 \pm 5	1.0	12 \pm 1	0.9	
5000			12 \pm 1	0.8	17 \pm 2	1.2	
2-AA		2	210 \pm 5	13.1	-	-	
SA		0.5	-	-	252 \pm 15	18.0	
TA98		STB-HO-BM	0	32 \pm 8	1.0	20 \pm 3	1.0
			62	28 \pm 6	0.9	22 \pm 2	1.1
	185		32 \pm 7	1.0	22 \pm 3	1.1	
	556		31 \pm 4	1.0	23 \pm 7	1.2	
	1667		33 \pm 9	1.0	24 \pm 6	1.2	
	5000		30 \pm 3	0.9	19 \pm 3	1.0	
	2-AA	0.5	1039 \pm 69	32.5	-	-	
	4NQO	0.5	-	-	233 \pm 30	11.7	
	TA1537	STB-HO-BM	0	18 \pm 2	1.0	16 \pm 6	1.0
			62	15 \pm 3	0.8	14 \pm 3	0.9
185			15 \pm 1	0.8	13 \pm 5	0.8	
556			20 \pm 5	1.1	15 \pm 3	0.9	
1667			17 \pm 3	0.9	14 \pm 5	0.9	
5000			13 \pm 1	0.7	12 \pm 3	0.8	
2-AA		1	395 \pm 8	21.9	-	-	
9-AA		50	-	-	353 \pm 54	22.1	
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>		STB-HO-BM	0	26 \pm 2	1.0	15 \pm 3	1.0
			62	23 \pm 6	0.9	15 \pm 4	1.0
	185		25 \pm 3	1.0	18 \pm 2	1.2	
	556		25 \pm 2	1.0	14 \pm 4	0.9	
	1667		22 \pm 4	0.8	19 \pm 3	1.3	
	5000		22 \pm 3	0.8	19 \pm 3	1.3	
	2-AA	2	75 \pm 7	2.9	-	-	
	4NQO	0.5	-	-	102 \pm 7	6.8	

^{a)}No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate.

9-AA; 9-Aminoacridine; 4NQO: 4-Nitroquinoline N-oxide; 2-AA: 2-Aminoanthracene; SA: Sodium azide; -: not tested.

다. 그 후 top agar 2.0 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 minimal glucose agar plate에 중층하여 37°C에서 48시간 배양 후 복귀변이 콜로니 수를 계수하였다. 균의 생육저해 및 시험물질의 침전, 분출의 관찰은 실제 현미경을 이용하여 40배의 배율로 모든 플레이트를 관찰하였고, 각 용량당 3개의 플레이트를 사용하였다. 시험물질을 처리한 모든 균에서 복귀변이 집락수가 음성대조에 비하여 2배 이상 증

가하고, 용량의존성을 보이며 현저한 증가를 보이는 경우 양성으로 판단하였고, 음성대조군과 각 용량군 사이의 유의성을 Kruskal-Wallis test를 이용하여 검정하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시험용 세포주. American Type Culture Collection (ATCC #CRL-1935 CHL/1U)로부터 분양받은 Chinese

hamster lung cell(CHL, Koyama *et al.*, 1970)을 (주)켄온 전임상연구센터에서 계대배양한 것을 시험에 사용하였다. 세포는 액체질소내에 냉동보관하였으며, 세포를 해동하여 7일 이상 배양한 후 독립현미경으로 미생물 오염 여부를 확인하고, 증식속도 및 핵형 등을 확인한 후 시험에 사용하였다. 배양액은 Minimum Essential Medium(Gibco-BRL #41500-034)에 sodium bicarbonate(NaHCO_3 2,200 mg), L-glutamine(292 mg), 항생제로 penicillin streptomycin(Gibco-BRL #15140-122)을 첨가하여 멸균증류수로 총 액량을 1,000 ml로 조정한 것을 공경 0.2~0.22 m의 membrane filter로 여과 후 FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco-BRL #16000-044) 100 ml를 첨가하여 사용하였다. 세포는 5% 이산화탄소와 포화 수증기를 함유한 37°C 항온배양기(Forma 311 및 3111)에서 세포 배양용 플라스크(배양면적 75 cm², Falcon)를 사용하여 배양하였으며 2~3일 마다 0.1% 트립신액으로 세포를 분리하여 계대배양하였다. 충분한 수의 세포를 트립신으로 분리한 다음 Coulter counter model Z2(Beckman Coulter)로 ml 당 세포 수를 구하였다. 이를 근거로 배양면적 25 cm² 플라스크당 6×10⁴개의 세포를 5 ml의 배양액에 파종, 약 3일간 배양한 후 시험물질을 처리하였다.

시험물질 및 대조물질. 시험물질 처리 농도는 세포 증식 50% 억제를 기준으로 결정하였으며, 시험물질 농도 1250, 2500 및 5000 g/ml(+S, 6 시간 처리), 50, 100 및 200 g/ml(-S, 6 시간 처리), 37.5, 75 및 150 g/ml(-S, 24시간 처리)와 음성대조군 및 양성대조군으로 시험군을 설정하여 처리한 후 염색체이상을 계수하였다. 시험물질의 처리농도를 정하기 위한 세포독성시험방법중 Neutral red test를 S9 혼합액(10% v/v, Oriental Yeast Co. Ltd.) 존재하와 부재하에서 실시하여 처리 최고농도인 5 mg/ml에서 독성이 나타나지 않아 이를 본시험의 최고농도로 설정하였다. 최고농도를 포함하여 일정한 공비(1/2)로 희석하여 3단계의 시험물질처리군 및 양성대조군, 용매대조군으로 시험군을 구성하여 용량마다 2개의 플라스크를 사용하였다. 직접법의 양성대조물질인 Mitomycin C(MMC)는 3차 증류수에, 대사활성법에 사용되는 Cyclophosphamide·H₂O(CPA)는 DMSO에 용해하여 최종농도가 각각 0.3 ug/ml, 5 ug/ml가 되도록 사용하였다.

염색체이상시험. 25 cm² 플라스크당 1×10⁵ 세포를 5 ml의 배양액으로 파종하여 약 3일간 배양한 후, 간접적인 대사활성효소계 적용 처리군의 경우 신선한 배양액 4 ml, 시험물질액 0.5 ml 및 S-9 mix 0.5 ml을 분주, 합계 5 ml이 되도록 처리하였으며, 직접적인 대사활성효소계 미적용 처리군의 경우 신선한 배양액 4.5 ml, 시험물질 0.5 ml

을 분주하여 합계 5 ml이 되도록 각각 처리하였다. 시험물질은 간접법에서는 6시간, 직접법은 6시간 및 24시간 동안 적용하였고, 6시간 동안 시험물질을 적용하는 경우 처리종료 시각에 처리액을 제거하고 신선한 배양액으로 교환하여 18시간 더 배양하였다. 모든 플라스크에 대해 분열중기세포 수거 2시간 전에 colcemid를 최종농도 0.2 ug/ml가 되도록 처리하고, 시험물질 처리 개시 후 24시간에 분열중기세포를 수거하였다. 수거한 분열중기세포를 저장액(0.75 M KCl)으로 37°C 수욕상에서 15분간 처리 후 냉각된 고정액(메틸알코올 : 빙초산=3 : 1 v/v)으로 3회 고정시킨후 염색체 표본을 만들고 5% Giemsa 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 각 농도군당 200개의 중기상으로부터 결과를 해석하고, 결과해석을 위해 구조이상과 숫적 이상으로 나누어 계수하였다(Ishdate *et al.*, 1977; Ivett *et al.*, 1989).

구조적 이상은 염색체(chromosome) 이상과 염색분체(chromatid) 이상에 대해 각각을 결손형(deletion), 교환형(exchange)으로 분류계수하였고, 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 gap을 포함한 경우와 제외된 경우를 병기하였다. 숫적 이상은 동원체에 따라 diploid(DP, 23-36 동원체), poliploid(PP, 37 ≤ 동원체) 및 핵내배화(ER, endoreduplication)로 분류, 그 수를 기록하였다. 염색체 이상을 가진 분열중기상의 빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다. 음성대조군과 처리군의 비교는 Chi-square test 및 Fisher's exact test를 사용하였고, $P < 0.05$ 인 경우에는 용량상관성 여부를 판단하기 위해 Cochran-Armitage trend test를 적용하였다. 음성대조군과 양성대조군의 비교는 Fisher's exact test를 사용하였다. 판정은 시험물질 처리군에 있어서 염색체이상을 가진 중기상의 빈도가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다.

마우스 골수 세포를 이용한 소핵시험

실험동물. 6주령 수컷 ICR 마우스는 샘타코 바이오코리아(경기도 오산시 서량동 77-1)에서 입수한 후 1주일간의 검역과 순화, 사육기간을 거쳐 건강한 동물 암·수 각각 10마리씩을 선발하여 실험에 사용하였다. 순화 및 시험 전 기간동안 동물은 온도 23 ± 3°C, 상대습도 50 ± 15%, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12 hrs, 조도 150~300 lux로 설정된 (주)켄온의 전임상연구소 실험동물실에 수용하였으며, 사료는 실험동물용 고형사료(플라스 인터내셔널, Harlan Co. Ltd)를, 물은 지하수를 자외선 살균기

및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유섭취 시켰다.

시험물질 및 대조물질. 투여용량 결정을 위하여 예비시험을 실시하였다. 전술한 '의약품등의 독성시험기준'에 따라 본시험의 투여 최고용량은 더 높은 용량이 치사를 예상하게 하는 독성의 징후를 나타내는 용량으로 하기로 하고, 예비시험에서 우선 시험물질 0, 125, 250, 500, 1000, 2000 mg/kg(암수 각각 군당 4마리)의 용량을 설정하여 1일 1회 2일간 경구투여하여 투여일 포함 4일간 관찰하였다. 결과, 모든 시험군에서 시험물질 투여로 인한 이상증상은 관찰되지 않았으며, 성별 차이 또한 관찰되지 않았다. 위 결과를 근거로, 본시험에는 수컷을 사용하였고, 투여 최고용량은 예비시험시 최고용량인 2000 mg/kg을 2회 투여로 결정하였다. 부검시기는 수컷 투여시 일반적으로 채택되는 최종투여 후 24시간으로 결정하고 공비를 2로 하여 다음 표와 같이 시험군을 구성하였다. 마우스 체중 kg당 10 ml의 부피가 되도록 현탁하여 사용하였다. 부형제는 멸균증류수를 사용하였다. 양성대조물질인 CPA(Cyclophosphamide · H₂O, Sigma)는 3차 증류수에 녹여 마우스 체중 kg당 70 mg/10 ml의 용량으로 제조하여 사용하였다.

소핵시험. 시험은 Schmid 방법(Schmid *et al.*, 1975; Gopala *et al.*, 2000)에 따라 실시하였다. 최고농도를 포함하여 일정한 공비(1/2)로 희석하여 3단계의 시험물질투여군 및 음성대조군과 양성대조군을 두어 군당 5마리로 시험하였다. 음성대조군에는 부형제만을 투여하였다. 시험물질의 시간요소에 따른 영향을 고려하여 음성대조군과 시험물질투여군은 1일 1회, 3일간 경구투여한 후 24시간 경과 후에 검체를 제작하였고, 양성대조군은 복강내로 단회투여 후 24시간 경과시 검체를 제작하였다. 대퇴골 내부를 FBS로 씻어 골수세포 현탁액을 얻어내었고, 원심분리(1000 rpm, 5 min)하여 상청액을 버린 후 최종 현탁액을 슬라이드글라스에 도말하여 실온건조한 후 메탄올에서 5분 고정하여 Giemsa 염색을 하였다. 각 개체마다 3배씩 슬라이드를 제작하여 1000배의 광학현미경(BX 40, Olympus, Japan)으로 관찰하였고, 소핵의 계수는 각 개체당 2000개의 다염성 적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)에 대해서 소핵의 유무를 검색하여 1000개의 PCE에 대한 소핵다염성적혈구(Micronucleated Polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 소핵 이상의 판정은 소핵다염성적혈구의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응이 나타날 경우를 소핵유발성이 있다고 하고 총 적혈구 중 다염성 적혈구비가 30% 이하로 되었을 때를 조절기능 억제등의 세포독성이 있다고 판정하였다.

결 과

복귀돌연변이 유발효과

살모넬라 4개 균주의 경우 대사활성계 적용 및 비적용시 공히 시험물질 농도의 증가에 따른 집락 수의 증가는 나타나지 않았으며, 항균성 또한 나타나지 않았다.

E. coli WP2 uvrA의 경우에도 대사활성계 적용 및 비적용시 공히 시험물질 농도의 증가에 따른 집락 수의 증가는 나타나지 않았으며, 항균성 또한 나타나지 않았다. 한편 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 집락수가 증가하였다(Table 1).

염색체이상시험

대사활성효소계 적용군. 이상중기상(gap 제외)은 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 ug/ml 처리군 모두 관찰되지 않았다. 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다.

시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화도 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 관찰되지 않았다. 한편 양성대조군에서는 이상중기상(gap 제외)의 빈도(26.5)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다($P < 0.01$)(Table 2).

대사활성효소계 비적용군. 6시간 처리군에서 이상중기상(gap 제외)의 빈도는 음성대조군, 50, 100 및 200 ug/ml 처리군 모두 관찰되지 않았고, 음성대조군에 비해 증가를 나타내지 않았다. 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도에서도 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 0.5 이하로 음성대조군에 비해 증가를 보이지 않았다. 양성대조군에서는 이상중기상(gap 제외)의 빈도(30.5)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다($P < 0.01$).

24시간 처리군에서 이상중기상(gap 제외)의 빈도는 음성대조군, 37.5, 75 및 150 g/ml 처리군 모두 0.0 이었으며, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 증가를 나타내지 않았다. 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도에서도 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 관찰되지 않았으며, 음성대조군에 비해 증가를 보이지 않았다. 양성대조군에서는 이상중기상(gap 제외)의 빈도(31.0)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다($P < 0.01$)(Table 2).

소핵시험

소핵 유발빈도 및 세포독성. 개체 당 2000개의 PCE에서 관찰된 소핵을 가진 PCE(MNPCE)의 빈도는 1회 투여량 기준으로 음성대조군, 500 mg/kg 투여군, 1000 mg/kg 투여군, 2000 mg/kg 투여군 및 양성대조군의 순으로

Table 2. Chromosome aberration test of STB-HO-BM in CHL cells

Dose of Test Item (µg/ml)	Treatment Schedule (hours) ^{a)}	without (-) or with (+) S-9 mix	Number of Aberrant Metaphases ^{b)}	Number of Total Aberrations ^{c)}	Number of findings/100 metaphases							
					Gap	Chromosome type		Chromatid type		Other	PP+ER	
						DEL	EXC	DEL	EXC			
0			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
1250	6-18	+	2/0	2/0	2	0	0	0	0	0	0	0+0
2500			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
5000			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
CPA 10			30/30	55/52	3	0	0	23	29	0	0+0	
0			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
50	6-18	-	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
1000			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
200			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
EMS 800			22/21	34/33	1	0	0	8	25	0	0+0	
Trial I												
0			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
75	24-00	-	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
150			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
300			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
EMS 600			52/50	93/86	7	0	0	30	56	0	0+0	
Trial II												
0			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
37.5	24-00	-	0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
75			0/0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0+0
150			2/1	2/1	1	0	0	0	1	0	0+0	
EMS 600			31/29	46/43	3	0	0	14	29	0	0+0	

^{a)}Treatment time-recovery time.

^{b)}Gaps included/excluded, 100 metaphases per culture.

^{c)}Gaps included/excluded, means of duplicate cultures, 100 metaphases were examined per culture.

EXC: Exchange; PP: Polyploid; ER: Endoreduplication; CPA: Cyclophosphamide monohydrate; EMS: Ethylmethanesulfonate.

평균 0.67, 0.33, 0.00, 0.00 및 82.83이었다. 시험물질 투여군의 소핵 유발 빈도에 대하여 음성대조군과의 차이를 조사한 결과 시험물질 최고용량 투여군에서 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다. 한편 양성대조군에서는 소핵 빈도에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다($P < 0.01$).

세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은

순서로 평균 0.39, 0.39, 0.42, 0.36 및 0.23으로 시험물질 투여군에서는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타나지 않았으나, 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다 (Table 3)($P < 0.01$).

일반증상. 모든 시험군에서 부검 당일까지 사망한 동물은 없었으며, 시험물질 투여로 인한 특별한 육안적 이

Table 3. Micronucleus test in mice orally treated with STB-HO-BM

Compound	Dose (mg/kg)	Frequency	Route	Animals per dose	MNPCE/2000 PCE (Mean ± S.D.)	PCE/(PCE+NCE) (Mean ± S.D.)
Vehicle	0	2	po	6	0.67 ± 0.82	0.39 ± 0.06
STB-HO-BM	500	2	po	6	0.33 ± 0.52	0.39 ± 0.09
STB-HO-BM	1000	2	po	6	0.00 ± 0.00	0.42 ± 0.10
STB-HO-BM	2000	2	po	6	0.00 ± 0.00	0.36 ± 0.04
CPA	70	1	po	6	82.83 ± 23.18**	0.23 ± 0.06**

Each value represents mean ± SD.

Vehicle: Sterilized distilled water.

**Significantly different from the vehicle control group at $P < 0.01$.

Abbreviations: PCE, Polychromatic erythrocyte; NCE, Normochromatic erythrocyte; MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte; CPA, Cyclophosphamide-H₂O (Positive control item).

상소견도 관찰되지 않았으며 각 군간의 체중을 비교한 결과 시험물질을 투여한 모든군에서 통계학적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다.

고찰 및 결론

본 연구에서는 (주)서봉바이오페스텍의 STB-HO-BM에 대한 안전성 평가의 일환으로 발현될 수 있는 독성을 질적·양적으로 평가하기 위하여 일련의 유전독성시험을 식품의약품 안전청고시 제1999-61호 "의약품 등의 독성시험기준(1999년 12월 22일 제정)"에 준하여 실시하였다.

복귀돌연변이의 경우 STB-HO-BM의 유전독성 평가를 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개 균주와 대장균 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 *uvrA*를 이용하여 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 시험물질은 멸균증류수에 현탁하여 처리하였으며, 대사활성계 적용(+S) 및 비적용(-S) 하에 5단계의 농도군과 음성 및 양성대조군으로 시험군을 구성하여 본 시험을 실시하였다. 시험물질 조제시 시험물질 자체의 특성으로 혼탁이 생성되었으나 처리시 특이한 점은 관찰되지 않았으며, 시험물질 최고농도 및 S-9 mix의 무균성을 확인하기 위한 플레이트에서 미생물 오염으로 인한 집락은 나타나지 않았다. 시험에 사용한 5개 균주의 생균 수는 파장 600 nm에서 흡광도 측정 결과 $0.8 \sim 4.3 \times 10^9$ CFU/ml이었다. 모든 균주에 시험물질을 처리한 5개 농도군에서 집락 계수가 가능하였고, 최고농도에서 항균성은 관찰되지 않았으며, 최고농도에 이르기까지 집락 수는 음성대조군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았다.

염색체이상시험의 경우 염색체 유발성 여부를 확인하기 위하여 Chinese hamster lung 세포(CHL)를 이용하여 대사활성계(S-9 mix) 적용(+S) 및 비적용(-S)하에 염색체 이상시험을 수행하였다. 시험물질은 배양액에 현탁하여 처리하였다. 시험물질 조제 및 처리시 시험물질 자체의 특성으로 혼탁이 생성되었으나 다른 특이사항은 관찰되지 않았다. 염색체이상을 계수한 결과, 대사활성계(S-9 mix) 적용(+S, 6시간) 및 비적용(-S, 6 및 24시간)시 시험물질 처리 최고농도에 이르기까지 염색체이상을 가진 중기상의 출현은 전혀 관찰되지 않았다.

소핵시험의 경우 시험물질 STB-HO-BM의 유전독성을 평가하고자 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 약 8 주령의 수컷 마우스에 시험물질을 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg의 용량으로 1일 1회 2일간 경구투

여하고, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다. 본시험에 적용한 용량범위 내에서 개체 당 2000개의 PCE를 대상으로 소핵을 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다. 세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 평균 0.36 이상이었고, 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 감소는 나타나지 않았다. 또한 시험물질 투여로 인한 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며, 체중변화에 있어서도 통계학적으로 유의한 증가나 감소는 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합할 때, 시험물질 STB-HO-BM은 본 시험조건 하에 사용한 시험균주에 대하여 복귀돌연변이, CHL 세포에 염색체이상 및 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않아 유전독성 물질이 아닌 것으로 간주 되었다.

감사의 글

본 연구는 (주)서봉바이오페스텍의 용역사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Jerrold H. Zar (1999): Biostatistical Analysis. 4th ed. Prentice hall, New Jersey.
- Wolford, S.T., Schroer, R.A. and Gohs, F.X. (1986): Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J. Tox. Env. Health*, **18**, 161-188.
- 강부현, 김용범, 이현숙, 김영희, 임완중, 하창수 (2004): Sprague-Dawley(SD) 랫드를 이용한 2주와 4주 반복투여 독성시험에 대한 혈액, 혈액생화학 및 장기중량 기초자료 *The Korean Journal of Laboratory Animal Science*, **20**, 134-140.
- Greaves, P. (2000): Histopathology of preclinical toxicity studies; Interpretation and relevance in drug evaluation. Elsevier.
- Boorman, G.A., Eustis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, C.A., Jr. and Mackenzie, W.F. (1990): Pathology of the Fischer Rat. Academic Press, Inc.
- Farrar, P.L. (1997): Diagnostic Exercise: Interstitial Pneumonia in Viral and Mycoplasmal Antibody-Free Sprague Dawley Rats. ACLAD NEWSLETTER (American Committee on Laboratory Animal Diseases), Fall Vol. 18, No. 1.
- 손우찬 (2004): 안전성 평가의 평가 기법 및 최신동향 조사(한국과학기술정보연구원)8)의약품등의 독성시험기준: 식품의약품 안전청고시 제1999-61호(1999년 12월 22일).