

HMC05의 경구투여 소핵시험 및 복귀돌연변이 시험

신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Micronucleus Test in Bone Marrow Cells and Bacterial Reverse Mutation Assay of HMC05

Heung-Mook Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : We investigated genetic toxicity of HMC05 using the Micronucleus Test in bone marrow cells of mice and Bacterial Reverse Mutation Assay in plate incorporation method according to OECD Guidelines and KFDA Guidelines.

Methods : 1. Micronucleus test: The male rats were divided into 5 groups, respectively; G(1), treated with distilled water; G(2), treated with 1250mg/kg HMC05; G(3), treated with 2500mg/kg HMC05, G(4), treated with 5,000mg/kg HMC05; G(5), treated with Cyclophosphamide · H₂O. Sterilized distilled water and HMC05 were administered for two consecutive days. Cyclophosphamide · H₂O was administered once on the day of 2nd administration.

2. Bacterial Reverse Mutation Assay: Experimental groups were divided into two groups: with S-9mix(+S) or without S-9mix(-S). Each group treated with sterilized distilled water only, HMC05(62, 185, 556, 1,667, 5,000 μ g/plate) and, positive vehicles(Sodium azide, 2-Aminoanthracene, 4-Nitroquinoline N-oxide, ICR 191), respectively.

Results : HMC05 did not show any changes in the number of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCE) among 200 polychromatic erythrocytes compare to negative control. However, there were significant ($p < 0.01$) increase with CPA in MNPCE. In Bacterial Reverse Mutation Assay, no significant increases in the number of revertant colonies compared to (삭제) negative control were detected in all concentrations of HMC05.

Conclusions : These results indicate that HMC05 did not show any genotoxicity against in Micronucleus test and Bacterial Reverse Mutation Assay.

Key words : HMC05, Genetic toxicity, Micronucleus Test, Bacterial Reverse Mutation Assay, micronucleated polychromatic erythrocytes, revertant colonies.

*교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학
· E-mail : heungmuk@dongguk.ac.kr · Tel : 054-770-2372 · Fax : 054-742-5441
· 접수 : 2010년 4월 19일 · 수정 : 2010년 6월 19일 · 채택 : 2010년 6월 22일

서론

천연물 한의약제제의 개발에 있어서 유전독성의 연구는 제제의 안전성 평가를 위한 중요한 부분이다. 한방치료기술연구개발사업(B030007, B050042) 프로젝트의 일환으로 개발된 HMC05는 고혈압과 동맥경화의 예방 및 치료를 목표로 개발된 복합제제이다.

HMC05의 실험적 연구로는 혈관이완¹⁾, 동맥경화반감소²⁾의 효능이 보고되었으며, hesperidin, coptisine, palmatine 및 berberine의 지표 성분을 설정하였다³⁾. 한편 단회경구투여 독성시험에서 개략치사량(ALD)이 한계량인 2,000mg/kg을 상회함을 확인하였으며⁴⁾, 식품의약품안전청고시 제2005-60호(2005년 10월 21일) '의약품 등의 독성시험기준'⁵⁾ 및 식품의약품안전청고시 제2005-79호(2005년 12월 21일) '비임상시험관리기준'⁶⁾에 의한 4주 반복 경구투여 독성시험에서 HMC05에 의한 특이적 변화 역시 관찰되지 않았다. 또 후속 연구로서 식품의약품안전청고시 제2009-19호(2009년 05월 1일) '비임상시험 관리기준'⁹⁾ 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice(1997)¹⁰⁾에 따라 실시한 대사활성계 적용 및 비적용하에서 배양한 포유동물세포인

Chinese Hamster Lung(CHL) 세포의 유전독성 시험에서 HMC05에 의한 염색체 이상은 발견되지 않았다.¹¹⁾

본 연구는 HMC05의 유전독성 평가를 위하여 세균에서의 복귀돌연변이 유발성 여부와 ICR 마우스 골수세포를 이용하여 소핵 유발성 여부를 관찰하여 유한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시험물질

본 연구의 시험물질인 HMC05 (半夏 1.5 : 白朮 2 : 天麻 1 : 陳皮 1 : 茯苓 1.5 : 山楂 1.5 : 豨薟 1.5 : 黃連 1.5 ; Table 1)는 (주) Bioland (충남, 한국)에 의뢰하여 제조하였다. 100℃에서 1시간 30분 전탕한 후 추출액을 여과지 (1µm)로 여과하고 진공농축기 (진공도 60-70 cmHg)로 감압 농축하여 멸균 탱크(100℃)에서 1시간 가열하고 1일간 방치한 후 다시 1시간 가열하여 연조엑스를 실험에 사용하였다. 건조함량은 51.5%로 나타났다.

Table 1. Composition Ratio of HMC05

Pharmaceutical name	Scientific name	Ratio
半夏	<i>Pinelliae ternate</i> Ten, Ex Breitenb	1.5
白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz	2
天麻	<i>Gastrodia elata</i> Blume	1
陳皮	<i>Citrus unshiu</i> Marcow	1
茯苓	<i>Poria cocos</i> Wolf	1.5
山楂	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge var. <i>typica</i> C.K. Schneider	1.5
豨薟	<i>Siegesbeckia pubescens</i> Makino	1.5
黃連	<i>Coptidis japonica</i> Makino	1.5

2) 시험계

(1) 실험동물

경구투여 소핵시험은 수컷 7주령(29.98g~32.75g) ICR 계통 SPF(특정병원균 부재) 마우스 (HsdKoat:ICR(CD-1®))를 (주)켄온 전임상연구센터의 동물사육실에서 일정한 조건(온도 23±3℃, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12hr/12hr dark/light cycle, 조도 150~300 Lux) 하에서 1주일 동안 적응시킨 후 사용하였다. 실험기간 동안 고형사료(Harlan Co. Ltd, USA, TEKLADCERTIFIEDGLOBAL18%PROTEINR

ODENTDIET, 2918C)와 자외선 살균기 및 미세여과 장치로 소독한 물을 자유롭게 섭취토록 하였다. 본 시험은 (주)켄온의 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다.

(2) 시험균주 및 배지

복귀돌연변이 시험을 위한 균주는 염기쌍 치환형 (base-pair substitution type) 돌연변이 검색을 위하여 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 및 *E. coli* WP2 uvrA를, frame-shift형 돌연변이 검색을 위하여 TA98과 TA1537 등 모두 5개의 균주는

Molecular toxicology Inc.(P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)에서 구입 후 (주)켄온 전 임상연구센터에서 형질확인 후 계대 배양하고, 파장 600nm에서의 흡광도 기준으로 생균수 측정 결과 0.64~4.70 x 10⁹CFU/ml인 것을 시험에 사용하였다.

균주들은 각각 master plate로부터 20ml의 액체배지(2.5% Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator(37°C, 200rpm)에서 12~14시간 전배양하였으며, 전배양을 마친 균주는 시험에 사용할 때까지 냉장 보관하였다. 최소배지(minimal glucose agar plate)는 1.5% Bacto agar(Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 것을 페트리디쉬에 25ml씩 분주한 것을 사용하였으며, 대장균(*E. coli*)을 이용한 시험에는 위와 동일한 최소배지에 0.1% tryptophan액을 0.25ml/L로 첨가한 것을 사용하였다. Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl의 조성으로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 top agar에만 0.05mM의 histidine-biotin을 첨가하였다.

배양한 균배양액은 1ml당 DMSO(Sigma-Aldrich Inc. D-2650) 90 μ l를 가하여 냉동 vial에 채워 Deep freezer 내에 냉동 보관하였으며, 형질이 확인된 균주의 master plate를 제작하여 시험에 사용하였다. 또 균주 유전자 형질확인을 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 수 등을 Maron and Ames의 방법¹²⁾에 준하여 확인하였다.

(3) 대사활성계의 조성 및 사용

복귀돌연변이 시험을 위한 대사활성계 S-9 mix 1ml 중의 조성은 8 μ mol MgCl₂·6H₂O, 33 μ mol KCl, 5 μ mol G-6-P, 4 μ mol NADPH, 4 μ mol NADH, 100 μ mol sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간을 기원으로 하는 50 μ l S-9으로 하였으며, 조제한 S-9 mix는 얼음에 채워 사용하였다. S-9 mix는 0.5ml/plate로 처리하였으며, 이의 활성은 2-Aminoanthracene의 돌연변이 유발로 확인하였다.

2. 방법

1) 시험군의 구성

소핵시험에서의 동물의 군 분리는 순화기간 중 건

강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하고, 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배하여 멸균주사용수(G212F21, 대한약품공업주식회사) 투여 음성대조군(G1), 1,250(G2), 2,500(G3) 및 5,000(G4)mg/kg/day의 HMC05 투여 시험군, cyclophosphamide·H₂O(CPA, Sigma-Aldrich Co) 투여 양성대조군(G5)으로 구분하고 각 군당 6마리씩 사용하였다(Table 1).

복귀돌연변이 시험은 대사활성계 적용 및 비적용하에 예비시험을 통하여 모든 균주에 대해 62, 185, 556, 1,667, 5,000 μ g/plate의 HMC05를 투여한 5단계의 실험군과 음성대조군 및 양성대조군으로 구성하였다.

2) 시험물질의 조제

시험물질 HMC05는 순도에 보정하여 조제에 사용하였다. 먼저 시험물질은 멸균주사용수(G212F21, 대한약품공업주식회사)에 현탁한 후 단계별 희석 및 조제하였다. 경구투여 소핵시험을 위한 양성 대조물질은 투여 직전에 멸균주사용수에 용해하여 조제하였다.

복귀돌연변이 시험에 사용된 양성 대조물질은 Sodium azide(SA, Sigma-Aldrich Co)는 멸균주사용수에 용해하였으며, 2-Aminoanthracene(2-AA, Sigma-Aldrich Co), 4-Nitroquinoline N-oxide(4NQO, Sigma-Aldrich Co) 및 ICR 191(ICR-191, Sigma-Aldrich Co)은 DMSO (Sigma-Aldrich Co, 99.9%)에 용해하여 조제하였다.

3) 시험물질의 처리

시험물질 HMC05는 동물을 경배부 피부고정법으로 고정하고 20ml/kg/day를 1일 1회, 2일간 경구 투여하였고, 양성대조물질 CPA는 '의약품등의 독성시험기준' (제 2005-60호, 10월 21일)에 따른 경로로 10ml/kg/day를 시험물질의 2회 차 투여일에 소독용 알코올을 이용하여 투여할 부위를 소독한 후 26G 주사침을 이용하여 복강에 투여하였다(Table 1).

복귀돌연변이 시험에서의 시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 하였다. 즉 고압증기 멸균한 top agar를 dry bath에서 45°C로 예열한 tube에 2ml씩 분주한 다음 시험물질 용액 0.1ml, S-9mix(또는 대사활성계 비적용 시에는 pH7.4의 sodium-phosphate buffer) 0.5ml, 균배양액 0.1ml을 top agar에 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2~3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 균게 하였다. 음성대조군은 시험물질 용액 대신 멸균주사용

수를, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 0.1ml씩 처리하였다. 시험물질 HMC05의 처리는 모든 군주에 대해 대사활성계 적용 및 비적용 시 62, 185, 556, 1,667, 5,000 μ g/plate의 5단계 농도를 투여하였다.

시험물질 및 S-9 mix의 무균성 확인을 위해 시험

물질 최고 농도액 0.1ml와 S-9 mix 0.5ml를 각각 2ml의 top agar에 혼합하여 평판을 제작하였다. 처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37 $^{\circ}$ C에서 약 48시간 배양 후 복귀돌연변이 집락수를 계수하였다.

Table 2. Animal Groups and Administrations.

Group	Number of animal	Volume of dosing (ml/kg/day)	Article dose (mg/kg/day)	Number of dosing
G1	6	20	0	2
G2	6	20	1,250	2
G3	6	20	2,500	2
G4	6	20	5,000	2
G5	6	10	70	1

Sterilized distilled water and HMC05 were administered for two consecutive days. Cyclophosphamide \cdot H₂O was administered once on the day of 2nd administration.

4) 골수 채취 및 검체제작

골수 검체제작은 최종 투여로부터 24시간 후에 Schmid¹³⁾의 방법에 따라 골수세포를 수거하여 개체 당 2매의 검체를 제작하였다. 골수세포는 각 동물로부터 적출한 대퇴골을 23G 주사침을 사용하여 3ml의 Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco-BRL)으로 골수를 씻어내려 현탁한 다음 1,000rpm으로 5분간 원심분리하여 얻었다. 상등액을 제거한 후 침전된 골수세포를 slide glass에 도말, 실온에서 충분히 건조하고, methanol에 5분간 세포를 고정하였다. 고정 및 건조가 끝난 검체는 May-Grunwald 염색액 원액에 3분, May-Grunwald 염색액과 증류수를 1:1로 희석한 희석액에 2분, Giemsa 염색액(5% in PBS, pH 6.8)에 10분간 염색하여 검체를 제작하였다.

5) 관찰 및 검사 항목

(1) 일반증상 및 체중

시험물질 투여일 및 검체 제작시 1일 1회 사망동물 및 육안적 이상 징후의 발생 여부를 관찰하여 개체별로 기록하였다.

(2) 소핵의 계수

소핵의 빈도를 산출하기 위해 동물 당 2,000개의 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE) 중 나타나는 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 수를 1,000배의 배율로 소핵 유발성과 세포독성을 평가하

였다. 계수시 세포직경의 1/5~1/20의 크기로 주변 유희세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형 내지 타원형 소체를 소핵으로 계수하였다. 소핵 출현빈도는 개체 당 2,000개의 PCE에서 관찰되는 MNPCE 수의 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 소핵의 유무에 상관없이 합계 500개 이상의 PCE 및 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)를 계수하여 PCE/(PCE+NCE) 비율, 즉 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율을 산출해 세포독성의 지표로 하였다.

(3) 돌연변이 집락수의 계수

돌연변이 집락수(집락수)는 각 평판의 기본성장균층(background lawn)의 형성 여부를 검사하였으며 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였다. 무균성 확인을 위한 평판에서는 미생물의 오염으로 인한 집락생성 유무를 확인하였다. 판정은 대사활성계 존재 유무에 관계없이 최소 1개 군주에서 평판 당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 집락수의 용량 상관성 및 음성대조군에 비해 증가하는 정도 또한 고려하였다.

항균성은 기본성장균층이 없어지거나 없어질 때 혹은 집락수가 음성대조군에 비해 현저히 감소하는 것으로 판단하였다. 집락수의 '현저한 감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로 본 시험에서는 편의상 집락수가 음성대조군에서 나타난 집락수 평균치의 50% 이하로 감소한 경우를 항균성으로 판단하였다.

6) 통계처리 및 판정

소핵유발 빈도와 세포독성의 지표가 되는 PCE/(PCE+NCE)에서 대조군과 시험물질 투여군의 비교는 비모수 방법인 Kruskal-Wallis' H-test를 실시하고 다중 비교 검정하였다. 대조군과 양성대조물질투여군의 비교는 Mann-Whitney U test를 실시하였다.¹⁴⁾ PCE/(PCE+NCE) 및 체중에 대하여 대조군과 시험물질 투여군은 ANOVA test를 실시하고 다중 비교 검정하였다. 대조군과 양성대조물질투여군의 비교는 독립표본 T 검정을 실시하였다.

결과의 판정은 생존한 동물의 총 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율이 모두 0.1 이상일 때 시험은 유효한 것으로 간주하였으며, 투여군에서의 MNPCE의 빈도가 대조군과 비교하여 용량 상관성 있게 증가하거나 통계학적으로 $P < 0.05$ 인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.¹⁵⁾

복귀돌연변이 시험의 결과는 각 농도군 당 3개의 평판으로부터 얻은 집락수의 평균 \pm S.D. 및 음성대조군에 대한 증가 배수로 나타내었으며, 집락 수의 실측치도 아울러 나타내었다.

결 과

1. 소핵유발시험

1) 소핵 유발빈도 및 세포독성

개체 당 2,000개의 PCE에서 관찰된 소핵을 가진 PCE(MNPCE) 빈도는 음성대조군, 시험물질 1,250mg/kg/day 투여군, 2,500mg/kg/day 투여군, 5,000mg/kg/day 투여군 및 양성대조군의 순으로 평균 1.00, 0.83, 0.17, 2.33 및 95.67이었다. 시험물질 투여군의 소핵 빈도에 대하여 음성대조군과의 차이를 조사한 결과, 시험물질을 투여한 모든 군에서 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다. 한편 소핵 빈도에서 양성대조군은 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다($P < 0.01$).

세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은 순서로 평균 0.35, 0.36, 0.31, 0.30, 0.26으로 5,000mg/kg/day 투여군($P < 0.01$)에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다. 양성대조군($P < 0.01$)에서도 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다(Table 2).

Table 3. Micronucleus Test of HMC05 in Male ICR Mice

Group	Dose (mg/kg/day)	Number of Dosing	MNPCE/2,000 PCE (Mean \pm SD)	PCE/(PCE+NCE)
G1	0	2	1.00 \pm 0.63	0.35 \pm 0.01
G2	1,250	2	0.83 \pm 0.75	0.36 \pm 0.01
G3	2,500	2	0.17 \pm 0.41	0.31 \pm 0.02
G4	5,000	2	2.33 \pm 2.07	0.30 \pm 0.01**
G5	70	1	95.67 \pm 7.17**	0.26 \pm 0.02**

Sterilized distilled water and test article were administered for two consecutive days. Cyclophosphamide \cdot H₂O was administered once on the day of 2nd administration. G1 : Sterilized distilled water. G2~G4 : HMC05. G5 : Cyclophosphamide \cdot H₂O. PCE : Polychromatic erythrocyte. NCE : Normochromatic erythrocyte. MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte. **Significantly different from the vehicle control group at $P < 0.01$.

2) 일반증상

모든 생존동물에서 시험물질 투여로 인한 특별한 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다.

3) 체중변화

각 군간의 체중을 비교한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다(Table 3).

Table 4. Body Weights of Male ICR Mice

Groups	Dose (mg/kg/day)	No. of Dosing	Body weights (g) at the time of		
			1st Admin.	2nd Admin.	Sacrifice
G1	0	2	34.19 \pm 1.34	34.34 \pm 1.28	33.91 \pm 1.04
G2	1,250	2	33.86 \pm 1.20	34.46 \pm 1.30	34.02 \pm 1.22
G3	2,500	2	34.08 \pm 1.79	35.64 \pm 2.06	34.57 \pm 1.74
G4	5,000	2	34.12 \pm 0.97	34.53 \pm 1.70	34.71 \pm 1.18
G5	70	1	34.25 \pm 1.09	34.46 \pm 1.41	34.70 \pm 1.55

Data are Mean \pm S.D.

2. 복귀돌연변이 유발

Salmonella typhimurium의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주는 대사활성계 적용 및 비적용 시 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 항

균성 또한 나타나지 않았다. E. coli WP2 uvrA도 대사활성계 적용 및 비적용 시 모두 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 항균성 또한 나타나지 않았다. 한편 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 집락수가 현저히 증가하였다(Table 4).

Table 5. Result of Bacterial Reverse Mutation Assay with HMC05.

Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate [factor] ^{a)}	
			With S-9 mix	Without S-9 mix
TA100	HMC05	0	118 \pm 7	174 \pm 8
		62	129 \pm 6 [1.1]	161 \pm 8 [0.9]
		185	155 \pm 12 [1.3]	165 \pm 6 [1.0]
		556	145 \pm 6 [1.2]	174 \pm 9 [1.0]
		1,667	134 \pm 8 [1.1]	201 \pm 8 [1.2]
		5,000	147 \pm 5 [1.2]	171 \pm 5 [1.0]
TA1535	HMC05	0	14 \pm 2	17 \pm 3
		62	10 \pm 2 [0.7]	14 \pm 3 [0.9]
		185	12 \pm 2 [0.9]	16 \pm 3 [1.0]
		556	13 \pm 3 [0.9]	18 \pm 4 [1.1]
		1,667	15 \pm 2 [1.1]	19 \pm 1 [1.1]
		5,000	9 \pm 1 [0.6]	16 \pm 1 [1.0]
TA98	HMC05	0	39 \pm 2	24 \pm 4
		62	39 \pm 4 [1.0]	25 \pm 2 [1.1]
		185	35 \pm 3 [0.9]	22 \pm 2 [0.9]
		556	39 \pm 4 [1.0]	25 \pm 3 [1.0]
		1,667	39 \pm 2 [1.0]	19 \pm 1 [0.8]
		5,000	41 \pm 4 [1.0]	26 \pm 1 [1.1]
TA1537	HMC05	0	14 \pm 1	9 \pm 1
		62	15 \pm 1 [1.1]	12 \pm 2 [1.3]
		185	15 \pm 3 [1.1]	9 \pm 2 [0.9]
		556	19 \pm 1 [1.4]	8 \pm 1 [0.9]
		1,667	16 \pm 2 [1.1]	13 \pm 1 [1.4]
		5,000	15 \pm 3 [1.0]	13 \pm 2 [1.4]
<i>E. coli</i> WP2 uvrA	HMC05	0	19 \pm 2	18 \pm 2
		62	22 \pm 3 [1.1]	20 \pm 2 [1.1]
		185	23 \pm 2 [1.2]	16 \pm 2 [0.9]
		556	21 \pm 1 [1.1]	17 \pm 3 [1.0]
		1,667	24 \pm 3 [1.3]	23 \pm 2 [1.3]
		5,000	23 \pm 2 [1.2]	16 \pm 2 [0.9]
Positive controls				
TA100	2-AA	0.5	849 \pm 45 [7.2]	
TA1535	2-AA	2	230 \pm 15 [16.5]	
TA98	2-AA	0.5	404 \pm 18 [10.3]	25 \pm 1 [1.1]
TA1537	2-AA	1	224 \pm 16 [16.0]	
WP2 uvrA	2-AA	2	82 \pm 7 [4.3]	
TA100	SA	0.5		671 \pm 13 [3.9]
TA1535	SA	0.5		348 \pm 33 [20.9]
TA98	4NQO	0.5		376 \pm 58 [15.7]
TA1537	ICR-191	0.5		374 \pm 10 [40.1]
WP2 uvrA	4NQO	0.5		175 \pm 8 [9.7]

^{a)}Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate. 2-AA : 2-Aminoanthracene. SA : Sodium azide. 4NQO : 4-Nitroquinoline N-oxide. ICR-191 : Acridine Mutagen ICR 191.

고찰 및 결론

HMC05는 半夏, 白朮, 天麻, 陳皮, 茯苓, 山楂, 豨薟, 黃連으로 조성된 한의약 제제로 고혈압과 동맥경화의 예방 및 치료를 목표로 개발된 복합제제(특허제 10-0577674호/ 10-0787174호)이다. 본 제제의 실험적 연구로는 혈관확장을 통한 항 고혈압 효능¹⁾, NF- κ B 발현의 억제를 통한 항 동맥경화 효능²⁾, 혈관 내피세포에서의 항염증효능²⁾은 물론 제제의 표준화 연구를 위한 지표성분으로 hesperidin, coptisine, palmatine 및 berberine을 동정³⁾하였다.

또한 HMC05의 한의약 제제의 상용화를 위한 안전성 연구로 식품의약품 안전청 고시 ‘의약품 등의 독성시험 기준’ (제 2005-60호)에 근거하여 HMC05의 흰쥐에서의 단회 및 4주 경구투여 독성시험^{5,8)}은 물론 유전독성에 대한 자료를 확보하기 위한 시험의 일환으로 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상에서 염색체이상을 유발하지 않음을 보고하였다.³⁾

유전독성에 대한 시험법은 CHL 세포를 이용한 염색체이상 시험 외에 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험과 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험의 세가지가 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 따라서 본 시험에서는 시험물질 HMC05의 유전독성을 마우스 골수세포에 있어서 소핵 유발성 여부와 시험과 세균에서의 복귀돌연변이 유발성 여부를 지표로 검색하였다.

먼저 경구투여 소핵시험을 위한 투여량 설정 (Annex 2)은 예비시험에서 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day의 용량으로 암수 각 3 마리에 1일 1회, 2일간 경구 투여하고 투여일 포함 4일간 관찰한 결과 특별한 육안적 이상소견이 관찰되지 않아 멸균주사용수를 투여하는 음성대조군을 설정하고, 5,000mg/kg/day를 본시험의 고용량군으로 설정하여 공비를 2로 아래의 1,250, 2,500mg/kg/day의 용량으로 1일 1회, 2일간 마우스에 경구투여하고, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵과 세포독성을 관찰하였다. 적용한 용량범위 내에서 개체 당 2,000개의 PCE를 대상으로 소핵을 계수한 결과, 시험물질 HMC05는 투여한 모든 군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 없었다. 그러나 CPA를 처리한 양성대조군에서도 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다(P<0.01).

세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 1,250과 2,500mg/kg/day의 투여군에서 통계적으로 유의한 감소가 나타나지 않았으나, 5,000mg/kg/day 투여군(P<0.01)과 CPA를 처리한 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나

타나 골수세포에서 세포독성을 나타내었다. 한편 시험물질 투여로 인한 일반증상에서 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며, 체중변화에 있어서도 각 군간의 체중을 비교한 결과 모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다. 따라서 시험물질 HMC05는 식품의약품 안전청 고시 제 2005-60 “의약품등의 독성시험기준”에 명시된 마우스 최대 투여용량인 2,000mg/kg/day의 범위 내에서 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 생각된다.

한편 HMC05의 Salmonella typhimurium의 히스 티딘 요구성 균주인 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 대장균 Escherichia coli의 트립토판 요구성 균주인 WP2 uvrA를 이용하여 대사활성계 적용(+S) 및 비적용(-S)하에 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 농도 결정을 위한 예비시험에서 시험물질 1.6, 8, 40, 200, 1,000, 2,500, 5,000 μ g/plate와 음성 및 양성대조군으로 시험군을 구성하여 시험한 결과 집락수의 증가 및 감소가 관찰되지 않았다. 위 결과를 근거로 하여 시험물질 HMC05는 모든 균주에 대해 대사활성계 적용 및 비적용 시 62, 185, 556, 1,667, 5,000 μ g/plate의 5단계 농도를 설정하였다. 시험 결과, 시험물질 최고농도 및 S-9 mix의 무균성을 확인하기 위한 플레이트에서 미생물 오염으로 인한 복귀돌연변이 집락은 나타나지 않았다. 동시에 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 현저한 집락수의 증가를 보였으나, 시험물질 투여군에서는 최고 농도에 이르기까지 음성대조군에 비해 집락수의 유의한 증가가 나타나지 않았다. 따라서 본 시험 조건에서 HMC05는 복귀돌연변이를 일으키지 않는 것으로 확인되었다.

이상의 마우스 골수세포에서의 소핵시험과 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험을 통하여 시험물질 HMC05는 유전독성을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약연구개발사업 (B080031) 및 동국대학교 학술지원사업비의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. Moon KJ, Jang HO, Kim GW, Shin HM. Signaling mechanism on the vascular

- relaxation of HMC05. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2008 ; 22(2) : 315-320.
2. Kim KM, Choi JY, Yoo SE, Park MY, Lee BS, Ko YH, et al. HMC05, Herbal Extract, Inhibits NF- κ B Expression in Lipopolysaccharide Treated Macrophages and Reduces Atherosclerotic Lesions in Cholesterol Fed Mice. Journal of Ethnopharmacology. 2007 ; 114 : 316-324.
 3. Lee JS, Park SY, Thapa D, Kim AR, Shin HM, Kim JA. HMC05, Herbal Formula, Inhibits TNF- α -induced Inflammatory Response in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2009 ; Sep 7(in publish).
 4. Kim SH, Choi EJ, Lee KY, Sung SH, Shin HM. Simultaneous determination of alkaloids and flavonoids in HMC05 preparation by HPLC-DAD. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. (삭제) 2008 ; 31 : 2917-2926.
 5. 신흥목. HMC05의 흰쥐를 이용한 단회경구투여 독성시험. 동의생리병리학회지. 2008 ; 22(6) : 1562-1565.
 6. Korea Food and Drug Administration: The Standards of Toxicity Study for Medicinal Products, Notification No. 2005-60. 2005.
 7. Korea Food and Drug Administration: Good Laboratory Practice Regulation For Nonclinical Laboratory Studies, Notification No.2005-79. 2005.
 8. 신흥목. HMC05의 Sprague-Dawley 흰쥐를 이용한 4주 반복 경구투여 DRF 독성시험. 대한한약학회지. 2009 ; 30(5) : 102-114.
 9. Korea Food and Drug Administration: Good Laboratory Practice, Notification No. 2009 ; 2009-19.
 10. OECD. OECD Principles on Good Laboratory Practice. 1997.
 11. 신흥목. HMC05의 배양 Chinese Hamster Lung 세포를 이용한 염색체이상 시험. 대한본초학회지. 2010 ; 25(1) : 1-7.
 12. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res. 1983 ; 113 : 173-215.
 13. Schmid W. The micronucleus test. Mutat Res. 1975 ; 31 : 9-15.
 14. Lovell DP, Anderson DR, Albanese GE, Amphlett G, Clare R., Ferguson M et al. Statistical analysis on in vivo cytogenetic assays. In: Statistical evaluation of mutagenicity test data (Kirkland DJ, ed), Cambridge, Cambridge University Press. 1989 ; 184-232.
 15. Heddle JA, Stuart E, Salamone MF. The bone marrow micronucleus test. In: Handbook of mutagenicity test procedures, 2nd edition (edited by Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C), Elsevier Science Publishers BV. 1984 : 441-457.
 16. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, TG 473. In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. 1997.
 17. OECD. OECD guidelines TG 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 1997.