

# Chinese Hamster Lung 세포를 이용한 염색체이상 시험을 이용한 CP약침의 유전독성평가

황지혜 · 정 철<sup>1</sup> · 구자승<sup>2\*</sup>

가천대학교 한의과대학 침구의학과, 1: 남상천한의원, 2: 보광한의원

## Evaluation of Genotoxicity of CP Pharmacopuncture Using an *In Vitro* Chromosome Aberration Test in Chinese Hamster Lung Cell

Ji Hye Hwang, Chul Jung<sup>1</sup>, Jaseung Ku<sup>2\*</sup>

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University,  
1: Namsangcheon Korean Medical Clinic, 2: Bogwang Korean Medicine Clinic

This study was designed to assess the toxicity of capsaicin-containing (CP) pharmacopuncture using an in vitro chromosomal aberrations in Chinese hamster lung (CHL/IU) cells. In order to determine the high dose level in the main study of this study, a dose range finding study was conducted first. The high dose was selected at 10.0% of CP pharmacopuncture extract, and then diluted sequentially to produce lower dose levels of 5.00, 2.50, 1.25, 0.625 and 0.313% by applying a geometric ratio of 2. As a result, the cytotoxicity and precipitation of the CP pharmacopuncture as a test substance were not evident at any dose level during short-time treatment with and without metabolic activation and continuous treatment without metabolic activation. Therefore, the dose levels for this study were chosen as 10.0, 5.0, and 2.5%, and the treatment volume was 1.3 mL. In addition, negative and positive controls were set. In main study, the frequency of cells with chromosome aberrations in CP treated groups was less than 5% in short-time treatment with and without metabolic activation and continuous treatment without metabolic activation. In addition, there was no statistically significant difference when compared to the negative control group. The frequency of cells with structural chromosomal aberrations in the positive control group was more than 10% compared to the negative control group, and it increased statistically significantly. In conclusion, under the conditions of this study, CP pharmacopuncture did not show the possibility of causing chromosome aberrations.

keywords : Chromosome Aberration Test, Pharmacopuncture, Safety, CP, Capsaicin, Toxicity

### 서 론

현재 한의 임상에서 많은 종류의 약침제제들이 사용되고 있으며, 새로운 약침제제들이 문헌적 근거 및 임상적 경험을 근거로 하여 활발하게 개발되고 있다. 면역약침은 부작용이 거의 없으며, 신속하고 정확한 효과로 동통(疼痛) 치료에 탁월하고, 면역 증강을 통해 난치병 치료에 사용 가능하다는 장점을 가지고 있어, 실제 한의 임상에서 거의 모든 분야의 질병에 활용되고 있다<sup>1,2)</sup>. 최근 개발된 면역약침 중의 하나인 캡사이신 (capsaicin, CP) 성분을 함유한 CP약침은, 급성 및 만성 염증, 그리고 통증 치료에 대표적으로 사용되는 V약침<sup>1,2)</sup>에 신경병증성 통증<sup>3-5)</sup>, 외음전정부통증 증후군<sup>6)</sup>, 암<sup>7,8)</sup> 등에 효능이 보고된 캡사이신 성분을 함유한 고추를 추가한 약침으로, 신경병성 통증, 근육경결통증, 비증 등을 치료하기 위해

개발되었다.

한약재 및 한약제제는 천연물 의약품으로, 오랫동안 축적되어 온 임상 경험을 통해 그 안전성과 효능이 입증되었다고 할 수 있지만, 일부 연구에서는 한약의 부작용과 안전성 문제가 보고되었다<sup>9,10)</sup>. 따라서 한약 및 한약제제의 독성평가를 통한 안전성 검증은 매우 중요하다고 볼 수 있다. 약침제제의 경우, 한약재를 이용한 약침액을 사용하기에, 새로 개발된 약침제제들과 약침치료기술에 대한 유효성 및 안전성에 대한 비임상 및 임상 시험 결과들을 바탕으로, 임상 활용에 대한 과학적 근거를 마련하는 것이 중요하다.

CP약침은 V약침을 기반으로 하고 있다. 사향, 우황, 웅담을 주성분으로 하는 V약침은 오랜 임상경험 뿐 아니라, 독성 평가 및 효능 연구, 그리고 임상 보고 등이 이미 확인된 바 있다<sup>11-14)</sup>. 하지만 CP 약침을 한의 임상에서의 보다 적극적 사용을 위해서는 다양

\* Corresponding author

Jaseung Ku, Bogwang Korean Medicine Clinic, Seoul 05334, Republic of Korea

E-mail : elfnlove@gmail.com Tel : +82-2-479-1275

Received : 2020/09/26 Revised : 2020/12/12 Accepted : 2020/12/15

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2020.12.34.6.355>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr> & <http://jppkm.org>

한 임상 및 실험적 방법을 통한 효능 및 안전성 평가가 필요하다. 현재까지 임상 보고로는 하지 감각저하 환자 1례에 대한 증례보고 1건<sup>15)</sup>, 급성기 허리 및 고관절 통증 환자 3례에 대한 증례보고 1건<sup>16)</sup> 등의 2편의 증례보고 밖에 없으며, 독성검사 중 단일용량 독성 평가<sup>17)</sup>와 세균을 이용한 복귀돌연변이시험<sup>18)</sup> 만 보고되었다. 보다 안전한 약침제제로 인정받기 위해 여러 가지 독성평가 자료가 요구되기 때문에, CP 약침의 안정성에 대한 과학적인 근거 확보를 위한 추가적 독성평가로 본 연구에서는 유전독성평가항목 중 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험에 해당하는 Chinese Hamster Lung 세포를 이용한 염색체이상 시험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시험물질

현재 임상에서 조제되어 사용되고 있는 CP약침의 경우, 고추 (11 mg/ml), 사향 (0.1 mg/ml), 웅담 (0.075 mg/ml), 우황 (0.05 mg/ml), 황백 (10 mg/ml), 황금 (10 mg/ml), 산두근 (10 mg/ml), 백두옹 (10 mg/ml), 목향 (5 mg/ml)의 비율로 혼합된 56.225 mg/ml 농도의 약침액이다. 본 실험에서는 KGMP에 준하는 시설을 갖춘 남상천원외탕전실(용인, 한국)에서 임상에서 사용되고 있는 갈색 투명 액체인 CP약침을 제공을 받아서 본 실험에 사용하였다. CP약침액의 제조과정은 다음과 같은 과정을 거친다. 먼저, 사향, 웅담, 우황을 50% 주정알코올에 넣은 후, 65°C, 24시간 동안 중탕 추출하고 진공압 농축기를 사용하여 45°C에서 알코올을 제거한다. 그 외의 원료들은 주사용정제수와 함께 저온진공추출기를 사용하여 증류 후 증류액을 회수하였다. 추출물들을 혼합하여 주사용 정제수로 희석하여 여과한 후, 정제식염을 첨가하고 pH 적정을 마친 약침액을 Clean booth 반입 후 자동충진기에서 일정용량(2 mL/vial)씩 충전, 실링 및 습식 멸균을 하였다.

#### 2) 음성대조물질 및 양성대조물질

음성대조물질은 본 시험의 부형제인 생리식염주사액이 사용되었고, 양성대조물질은 Sigma-Aldrich, Co., (USA)로부터 구입한 Mitomycin C (MMC, Lot No. MKBZ9075V)과 Benzo[a]pyrene (B[a]P, Lot No. SLBV8459)이 사용되었다. MMC는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Lot No.: K49393831, Merck, Germany)를 가하여 vortex mixer로 교반하여 용해시켜 10 µg/mL의 stock solution을 조제하였다. B[a]P는 필요량 칭량 후, Dimethyl sulfoxide (DMSO, Lot No.: K49393831)를 가하여 vortex mixer로 교반하여 용해시킨 후에 2,000 µg/mL 농도의 stock solution을 조제하였다. 조제된 각각의 양성대조물질은 튜브에 분주 후, 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C, OPR-DFU-657CEV, Operon, Republic of Korea)에 동결 보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

#### 3) 세포주 및 배지

시험에 사용될 세포주로는, 높은 검출감도 때문에 염색체이상 시험에 많이 사용되고 있고 가이드라인에서 추천하고 있는 CHL/IU 세포주를 선택하였다. CHL/IU 세포는 2011년 11월 24일에 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입

하여, 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)이 포함된 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Lonza Walkersville Inc., USA)를 75cm<sup>2</sup> 플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기 (MCO-20AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다. Hoechst Stain Kit (MP Biomedicals, Japan)를 사용하여 CHL/IU 세포의 마이코플라스마 오염 유무를 확인하였고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (Sigma-Aldrich, Co., USA)을 가하여 세포를 배양플라스크 바닥으로부터 분리하였다. 세포현탁액을 튜브로 옮겨 담은 후에 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하고나서, 상등액 제거를 하였다. 1×10<sup>6</sup>cells/mL가 되도록 FBS 첨가 후, DMSO를 첨가하여 최종농도가 10%가 되도록 한 후, 동결 보존용 튜브에 분주하였다. 하루 동안 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에서 방치 후, 액체질소탱크로 옮겨 사용시까지 보관하였다.

시험에 사용할 배지는 EMEM에 최종농도 10%가 되도록 비활성화된 FBS를 첨가하고, 10,000 units/mL의 penicillin G sodium과 10,000 µg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Gibco, USA)을 100:1의 비율로 첨가하였다. 조제하고 나서 사용할 때까지 냉장보관 (2 ~ 8°C) 하였다.

#### 4) 배양방법

계대배양은 동결보관된 세포를 37°C로 설정된 항온수조에서 해동하여, 10% FBS가 포함된 EMEM 배지가 있는 50 mL 튜브에 넣은 후에, 5분간 1,000 rpm에서 원심분리를 하였다. 상등액을 제거하고 나서, 10% FBS 포함 EMEM 배지에 세포를 현탁시키고, 세포현탁액을 75 cm<sup>2</sup> 플라스크에 옮긴 후, 배양기에서 배양하였다 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). 세포가 배양플라스크 바닥면적의 70 ~ 80% 이상 생육할 때 세포형태를 관찰하였으며, 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (Gibco, USA) 처리 후 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 50 mL 튜브에 넣은 세포현탁액을 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액 제거 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 세포를 현탁시켰으며, 75 cm<sup>2</sup> 플라스크에 옮겨진 세포현탁액을 배양기에서 배양하였다 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

전배양은 염색체이상시험에 세포 계대수가 13 이내인 세포를 사용하였으며, 대수증식기의 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액 처리 후 배양플라스크 바닥에서 세포분리를 하였으며, 이후 50 mL 튜브에 넣어 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 상등액 제거 후, 10% FBS 포함 EMEM 배지에 현탁시키고 나서, 혈구계수판을 이용한 세포수 계수를 통해 5×10<sup>4</sup>cells/mL 세포현탁액을 만들어서, 용량설정시험용은 6 well 플레이트 (2 mL/well, Nunc, Denmark), 본시험용은 60 mm 플레이트 (5 mL/plate, BD, USA)와 6 well 플레이트 (2 mL/well)에 분주하여 배양기에서 하루동안 배양하였으며 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), 각 플레이트에 식별번호를 기입하였다.

#### 5) 대사활성계 S9 mix의 조제

S9과 Cofactor C를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기한 내에 사용하였다. S9 mix 조성은 총 액량 1 mL 기준 S9은 0.3 mL, Cofactor C의 경우 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.1 mL (5 µmol), 330

mmol/L KCl 0.1 mL (33 μmol), 50 mmol/L Glucose-6-phosphate 0.1 mL (5 μmol), 40 mmol/L NADP 0.1 mL (4 μmol), 20 mmol/L HEPES 완충액 (pH 7.2) 0.2 mL (4 μmol), 정제수 0.1 mL 등으로 조성되었다. S9 mix는 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결 보관된 S9 (Lot No.: 18070604)과 Cofactor C (Lot No.: C18070404)를 해동하여 2:4.7의 비율로 혼합하여 조제하였다.

2. 용량설정

용량설정시험의 최고용량은 액상시료인 약침액의 특수성을 고려하여, 약침 원액을 이용하여, 시험에 투여할 수 있게 희석한 10.0% 약침액 (5622.5 μg/mL)을 용량설정시험의 최고용량으로 설정하였고, 이것은 OECD guideline19)에서 5,000 μg/mL을 최고용량으로 추천하는 것과 거의 비슷한 농도였다. 최고용량을 10.0%로 하여, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 5.00, 2.50, 1.25, 0.625 및 0.313%의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다. 전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하 등의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 1 well을 사용하였다. 계열별로 Table 1과 같이 조제하여 처리하였다. 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하의 경우, 시험물질을 6시간 동안 처리 후에, 플레이트 안쪽을 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS, Lonza Walkersville Inc., USA)으로 세정하고, 신선한 배양액을 가하여 18시간 추가 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 경우, 시험물질을 24시간 동안 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법에 있어서, 모두 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질의 침전은 시험물질 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

시험물질 처리 후, 음성대조군 및 시험물질 최고용량군의 pH 및 삼투압을 측정하였다. 그 결과, 시험물질 최고용량군에서 pH 및 삼투압이 음성대조군과 비교하여 각각 1.0 및 50 mOsm/kg 이상 변화하지 않았다. 또한, pH 변화로 인한 배지의 색 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 최고용량군 이외의 시험물질군은 pH 및 삼투압을 측정하지 않았다.

Relative Population Doubling (RPD)의 산출에 있어서, 용량 설정시험의 전배양시, Satellite대조군으로 세포독성 확인용 well 플레이트 (1 well)를 제작하고, Satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료 후에 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수하여 RPD를 구하였다.  $RPD (\%) = (\text{No. of population doublings in treated cultures}) / (\text{No. of population doublings in control cultures}) \times 100$ ,  $\text{Population doubling} = [\log (\text{Post-treatment cell number} / \text{Initial cell number})] / \log 2$

용량설정 시험의 결과 (Table 1), 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 그리고 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 모든 용량에 있어서 시험물질에 의한 세포독성 및 침전은 관찰되지 않았기에, 10.0%를 본시험의 최고용량으로 하고, 공비 2를 적용하여 이하 용량들은 5.00 및 2.50%로 시험물질군을 설정하였다. 또

한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

Table 1. Results of the Dose Range Finding Study

Test substance	Dose (%)	S9 mix	Trt-Rec time (hr)	Relative Population Doubling (%)	
Normal saline injection	0	-	6-18	100	
	0.313	-	6-18	98.6	
	0.625	-	6-18	99.5	
	1.25	-	6-18	99.1	
	2.50	-	6-18	98.6	
	5.00	-	6-18	94.2	
CP	10.0	-	6-18	94.2	
	Normal saline injection	0	+	6-18	100
		0.313	+	6-18	97.0
		0.625	+	6-18	97.0
		1.25	+	6-18	98.0
		2.50	+	6-18	98.0
5.00		+	6-18	91.8	
CP	10.0	+	6-18	90.2	
	Normal saline injection	0	-	24-0	100
		0.313	-	24-0	98.2
		0.625	-	24-0	98.6
		1.25	-	24-0	98.6
		2.50	-	24-0	95.4
5.00		-	24-0	94.9	
CP	10.0	-	24-0	94.9	

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

3. 시험물질 처리 및 검체 제작

전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다. 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하의 경우, 시험물질을 6시간 동안 처리 후, D-PBS로 플레이트 안쪽을 세정하고, 신선한 배양액을 가하여 18시간 추가 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 경우, 시험물질을 24시간 연속 처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법에 있어서 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였고, 시험물질의 침전은 시험물질 처리시, 처리종료시 및 배양종료시 (Colcemid 처리전)에 각 용량별로 관찰하였다. 용량설정시험에서 시험물질 처리 후, 시험물질 최고용량군의 pH 및 삼투압이 음성대조군과 비교하여 각각 1.0 및 50 mOsm/kg 이상 변화하지 않았기 때문에 본시험에서는 pH 및 삼투압을 측정하지 않았다. RPD의 산출은 용량설정시험과 동일한 방법으로 실시하였으며, 각 용량당 1 well을 사용하였다. Satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료 후에 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수하여 RPD를 구하였다.

검체제작의 경우, 배양종료 2시간 전, Colcemid 용액 (Gibco, USA)을 최종농도가 0.2 μg/mL가 되도록 첨가하여 증기에서 세포분열을 정지시켰다. 배양이 종료된 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (Gibco, USA) 처리 후 세포를 플레이트 바닥에서 떼어내고 나서, 5분간 1,000 rpm 에서 원심분리 (FLETA 5, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Korea)하였다. 상등액을 제거하고 37°C에서 보존한 0.075 mol/L KCl 수용액 5 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 처리한 후, 냉각고정액 (methanol:acetic acid = 3:1) 1 mL

를 첨가하고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거했다. 이후 5 mL 냉각고정액 첨가 후, 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 고정하였고, 이러한 고정작업을 1회 반복하였다. 소량의 냉각고정액에 세포를 부유시킨 후, 검체 슬라이드를 제작하였다. 건조 후, 슬라이드글라스에 코드번호를 기입하고, 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하고, 초순수로 세척 및 건조한 후, 봉입제 (Entellan@new,Merck,Germany)로 봉입하였다.

4. 검체 관찰

검체 슬라이드 관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다. 각 처리법 모두 염색체 관찰의 대상용량을 용량당 300개 이상의 분열중기상이 관찰 가능한 3용량으로 설정하였다. 현미경 (600배 배율, BX51, Olympus, Japan)으로 각 용량당 300개의 분열중기상을 관찰하였다. 염색체이상은 구조이상, 수적이상 및 기타로 구분하였다. 구조이상에 대해서는 염색분체절단 (chromatid break, ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange, cte), 염색체절단 (chromosome break, csb), 염색체교환 (chromosome exchange, cse), 염색분체갭 (chromatid gap, ctg), 염색체갭

(chromosome gap, csg) 및 단편화 (fragmentation, frg)를 관찰하였다. 1개의 분열중기상에 다수의 gap 및 절단 등이 포함된 것은 단편화로 기록하였다. Gap은 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위로 정의하였다. 또한, 수적이상에 대해서는 배수체 (polyploidy, pol) 및 핵내배화 (endoreduplication, end)를 관찰하였다. 이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하였다. Gap에 대해서는 gap이 관찰되는 세포를 포함 또는 미포함하는 이상세포를 구분하여 기록하였다. 기타 (other)는 구조이상 및 수적이상에 포함되지 않는 이상으로 종류와 수를 기록하였다.

5. 시험의 성립조건, 결과 판정 및 통계처리

시험의 성립조건은 첫째, 음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있을 것, 둘째, 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 있을 것, 셋째, 대조군 및 시

Table 2. Results of the Chromosome Aberration Test of CP pharmacopuncture

Test substance	Dose (%)	RPD (%)	S9 mix	Trt-Rec time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations								Number of cells with numerical aberrations			Others <sup>a)</sup>			
						ctb	csb	cte	cse	frg	gap		total (%)		end	pol		total (%)		
											ctg	csg	gap-	gap+						
Normal saline injection	0	100	-	6-18	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
					150	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.3)	1 (0.3)
CP	2.50	98.2	-	6-18	150	0	0	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	0	0
	5.00	97.7	-	6-18	150	0	0	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	0	0
10.0	95.8	-	6-18	150	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
				150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC	0.1	59.3		6-18	150	9	0	24	0	0	2	0	52**	53	0	0	0	0	0	
					150	4	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal saline injection	0	100	+	6-18	150	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.3)	1 (0.3)
CP	2.50	96.1	+	6-18	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	5.00	91.1	+	6-18	150	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.0	89.0	+	6-18	150	1	0	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0		
				150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B[a]P	20	51.3	+	6-18	150	4	0	31	0	0	1	0	61**	62	0	0	0	0	0	
					150	5	0	27	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal saline injection	0	100	-	24-0	150	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	1	0		
					150	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.3)	1 (0.3)
CP	2.50	96.9	-	24-0	150	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	0	0
	5.00	96.4	-	24-0	150	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0		
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.3)	1 (0.3)
10.0	94.6	-	24-0	150	1	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	0	0	0
MMC	0.1	52.5	-	24-0	150	12	0	43	0	0	1	0	104**	106	0	0	0	0		
					150	15	0	48	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aberration: ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, frg: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy, MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene, RPD: Relative Population Doubling, Trt-Rec time: Treatment-Recovery times, gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap. a): Others were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations. Significant difference from negative control by Fisher's exact test: \*\*p<0.01

험물질군의 한 용량당 분열증기상이 300개 이상 관찰될 것, 넷째, 시험물질군에서 판독 가능한 용량이 3단계 이상일 것 등의 4가지 조건을 모두 만족하는 경우 성립하는 것으로 하였다.

결과의 판정은 염색체이상을 가진 세포 (gap 미포함)의 출현빈도에 대하여 첫째, 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 하나 이상의 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가할 것, 둘째, 증가에 따른 용량의존성이 있을 것, 셋째, 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군의 historical control data의 관리범위 이상으로 증가할 것 등의 3가지 조건을 모두 만족하는 경우 양성으로 하였다.

통계처리에 있어서, SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., USA)를 사용하여 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도에 대한 통계해석을 실시했으며, 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도 (gap 미포함)에 대해서 Fisher's exact test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차를 검정하였다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ).

## 결 과

### 1. RPD 측정

단시간처리법의 대사활성화 비존재하의 0, 2.50, 5.00 및 10.0%의 용량에서 각각 100, 98.2, 97.7 및 95.8%, 존재하의 0, 2.50, 5.00 및 10.0%의 용량에서 각각 100, 96.1, 91.1 및 89.0%, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 0, 2.50, 5.00 및 10.0%의 용량에서 각각 100, 96.9, 96.4 및 94.6%였다 (Table 2).

### 2. 시험물질의 침전

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 2.50, 5.00 및 10.0%의 모든 용량에서 관찰되지 않았다 (Table 2).

### 3. 염색체 이상 출현 빈도

단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 또한 각 처리계열에 대한 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다 ( $p < 0.01$ ) (Table 2).

### 4. 시험의 성립

음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data (Table 3)의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있었다. 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다. 또한, 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열증기상이 300개 이상 관찰되었으며, 판독 가능한 용량이 3단계 이상 확보되었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건 하에서

실시된 것이 확인되었다.

Table 3. Historical Control Data

Historical control values of structural aberrations								
Group	S9 mix	Trt-Rec time (hr)	N	Structural aberration cells excluding gap (%) (Mean ± S.D.)	Range (%)		95% control limit <sup>d</sup> [Structural aberration cells/300 cells]	
					MIN	MAX	MIN	MAX
Negative	-	6-18	44	0.288 ± 0.364	0	1.01*	0	<3
	+	6-18	44	0.311 ± 0.390	0	1.09*	0	<3
	-	24-0	42	0.246 ± 0.361	0	0.8*	0	<3
Positive	-	6-18 <sup>a)</sup>	39	23.44 ± 5.667	11.09*	35.78*		
	+	6-18 <sup>b)</sup>	39	24.64 ± 4.922	12.13*	37.15*		
	-	24-0 <sup>a)</sup>	37	35.37 ± 6.862	19.09*	51.65*		

  

Historical control values of numerical aberrations								
Group	S9 mix	Trt-Rec time (hr)	N	Numerical aberration cells (%) (Mean ± S.D.)	Range (%)		95% control limit <sup>d</sup> [Numerical aberration cells/300 cells]	
					MIN	MAX	MIN	MAX
Negative	-	6-18	44	0.174 ± 0.292	0	0.83*	0	<2
	+	6-18	44	0.167 ± 0.264	0	0.97*	0	<2
	-	24-0	42	0.262 ± 0.290	0	1.13*	0	<2

Negative control: Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone. Trt-Rec time: Treatment-Recovery times. a) Mitomycin C (0.1 µg/mL), b) Benzo[a]pyrene (20 µg/mL), c) Poisson-based 95% control limits of the historical negative control data. N: The total number of chromosome aberration test. The above historical control values were obtained from the data pooled from Jul. 15, 2013 to May 22, 2017. \* The range was calculated by the control limit of X derived from X-R-Rs value.

## 고 찰

한약재 및 한약제제의 비임상 독성 평가는 한약재 및 한약제제의 안전성을 입증하는 기본적인 연구라 할 수 있다. 식품의약품안전처는 한약제제의 임상시험 승인을 위해서 유효성에 대한 비임상 시험자료 외에도 유전독성, 단회투여 또는 반복투여 독성 등의 안전성 관련 비임상 시험 자료들도 기본적인 자료로 요구하고 있다<sup>20,21)</sup>. 다양한 약침제제들이 개발되고 있는 실정에서, 새로 개발되는 약침제제에 대한 안전성 평가에 있어서 독성 평가는 필수라고 할 수 있다.

약침요법은 ‘수침요법(水鍼療法)’ 또는 ‘혈위주사요법(穴位注射療法)’이라고도 하며, 한의학에서의 가장 대표적 치료법인 침치료와 약물치료를 결합한 신침요법으로<sup>1,2)</sup>, 국내에서 근골격계 질환에 대하여 약침요법이 많이 사용되고 있다<sup>22)</sup>. 캡사이신은 고추에 함유된 매운 맛을 내는 alkylamide 성분으로, transient receptor potential vanilloid1 (TRPV1) 이온통로에 주요한 작용을 나타내고, 진통효과와 관련하여, capsaicin이 말초 및 중추의 구심성 뉴런에 대한 원심성 작용을 통하여 각종 신경전달물질 유리함으로써 초기흥분작용과 잇따른 탈감작 작용 등의 국소적 생리작용을 나타내며, capsaicin에 의한 신경독성 및 탈감작을 통해 각종 자극에 대한 진통효과 및 감각기능 회복이 기대될 수 있다<sup>23)</sup>고 보고된 바 있으며, 흰쥐의 급성 염좌에 대한 capsaicin 단일성분 약침의 세로토닌 활성화를 통한 진통효과에 대하여 보고된 바도 있다<sup>24)</sup>. 2019년부터 임상에서 사용되기 시작한 CP약침은 캡사이신 성분을 활용

함으로써, 신경포착증, 신경 감각 이상 등을 포함한 신경병성 통증, 근육경결통증 및 비증 등을 치료하기 위해 개발된 면역약침이다<sup>15-18)</sup>. 본 연구에서는 CP약침액의 안전성 평가를 위해서 유전독성 평가 방법 중 하나인 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung cell line)를 이용한 염색체이상시험을 식품의약품 안전처로부터 GLP 독성시험기관 인증을 받은 ㈜바이오톡스텍에 의뢰하여 실시한 결과를 보고하고자 한다.

현재 임상에서 사용되고 있는 56.225 mg/ml 농도의 CP약침은 CP약침추출원액을 100분의 1로 희석한 것이다. 본 실험에서는 액상시료인 약침액의 특수성을 고려하여, 약침 원액을 이용하여, 시험에 투여할 수 있게 희석한 10.0% 약침액을 용량설정시험의 최고용량으로 설정하였다. 그리고 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 5.00, 2.50, 1.25, 0.625 및 0.313%로 설정하였다. 시험 결과, 단 시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하의 모든 용량, 그리고 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 모든 용량에서 세포독성 및 시험물질의 침전이 관찰되지 않았다.

용량설정시험 결과를 바탕으로 본시험의 용량은 10.0, 5.0, 및 2.5%로 결정하였으며, 음성대조군은 본 연구에서 부형제로 사용된 생리식염수주사액을 처치하였고, 양성대조군에는 MMC 0.1 µg/mL을 처치하였다. 본시험의 결과, 모든 용량의 CP 약침액 처치 실험군에서 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도와 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 나타났으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

본 시험에서 염색체이상출현빈도가 각 처리계열의 음성대조군에서는 5% 미만이었고, 양성대조군에서는 10% 이상으로 관찰되었으며, 통계학적으로도 음성대조군과 비교하여 양성대조군에서 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그리고 CP 약침액 처치군의 3용량에서 200개의 분열중기상이 관찰 가능하였으며, 세포의 오염도 없었다. 따라서 본 독성시험은 시험 성립된 조건에서 실시된 것으로 확인되었다.

## 결 론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 CP 약침액의 염색체이상 유발성은 음성으로 판단되었다. 따라서 CP 약침은 염색체 이상을 유발하지 않는 안전한 약침제제로 평가될 수 있지만, 이 결과만으로 안전성이 확보되었다고 결론내기에는 한계가 있다. 비록 이전 연구들에서 단일용량 독성평가<sup>17)</sup>와 세균을 이용한 복귀돌연변이시험<sup>18)</sup> 등에서도 안전성을 확인하였지만, 안전성 및 효능 관련 근거를 보다 명확하게 확보하기 위해서는 다른 종류의 독성 평가들 및 인체에 대한 안전성 연구 및 다양한 임상 연구 등이 필요할 것으로 생각된다.

## Acknowledgments

This work was supported by from the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the

Korean government (no.: NRF- 2017R1C1B5076224)

## References

1. Korean Acupuncture and Moxibustion Society. Acupuncture Medicine. Seoul (Korea): Hanmi Medical Publishing Co.; 2020. [in Korean].
2. Jung C, Jung JH, Lee MS. A clinical study of immune pharmacopunctureology. Chungnam (Korea): Kyungrak medical publishing co.; 2011. p. 127-33. [in Korean].
3. Tandan R, Lewis GA, Krusinski PB, Badger GB, Fries TJ. Topical capsaicin in painful diabetic neuropathy: controlled study with long-term follow-up. Diabetes care. 1992;15(1):8-14.
4. Pawar SS, Bharude NV, Sonone SS, Deshmukh RS, Raut AK, Umkar AR. Chilles as food, spice, and medicine: A perspective. Int J Pharm Biol Sci 2011;1:311-8.
5. Drake HF. Justins, Randomised double-blind study of topical capsaicin for treatment of post-herpetic neuralgia. Pain 1990;5:S58.
6. Steinberg AC, Oyama IA, Rejba AE, Kellogg-Spadt S, Whitmore KE. Capsaicin for the treatment of vulvar vestibulitis. American journal of obstetrics and gynecology. 2005;192(5):1549-53.
7. Zhang J, Nagasaki M, Tanaka Y, Morikawa S. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. Leukemia research. 2003;27(3):275-83.
8. Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, et al. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. Cancer research. 2004;64(3):1071-8.
9. Kim EJ, Chen Y, Huang JQ, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Poon J et al. Evidence-based toxicity evaluation and scheduling of Chinese herbal medicines. J Ethnopharmacol 2013;146:40-61.
10. Teschke R, Wolff A, Frenzel C, Schulze J. Review article: Herbal hepatotoxicity--an update on traditional Chinese medicine preparations. Aliment Pharmacol Ther 2014;40:32-50.
11. Kim HJ. In Vitro Chromosome Aberration Test of V-YAKCHIM in Chinese Hamster Lung Cell. J Korea Immuno-Yakchim Soc 2013;2(2):19-27.
12. Jung C. In vivo Micronucleus test of V-YAKCHIM in ICR Mice. J Korea Immuno-Yakchim Soc 2013;2(2):5-10.
13. Lee MS, Jung C. Comparative Studies on the Biological Activity of V and A Yakchim. J Korea Immuno-Yak

- chim Soc 2015;4(2):37-45.
14. Cho S, Jung C, Kim K, Ko S, Jung H, Park J. A Case Study of Acute Appendicitis Improved by Pharmacopuncture Treatment. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2019;40(2):208-19.
  15. Chung YJ, Lee HJ, Lee YK, Lee JH, Gong HM, Jun SA et al. Case Report of Hypoesthesia of Lower Limb with Additional CP Pharmacopuncture. *J Physiol Pathol Korean Med* 2019;33:158-62. [in Korean].
  16. Jeong J, Hwang JH. Korean Medicine Treatment Including Capsaicin-containing (CP) Pharmacopuncture for Acute Low Back and Hip Pain: A Case Report of 3 Patients. *Korean Journal of Acupuncture*. 2020;37(3):191-7.
  17. Hwang JH, Ku J, Jung C. Evaluation of the Single-Dose Toxicity of Capsaicin Containing Pharmacopuncture in Rats. *J Acupunct Res*. 2020;37(3):167-72.
  18. Hwang JH, Ku J, Jung C. Bacterial Reverse Mutation Test of CP pharmacopuncture. *J Korean Med*. 2020;41(3):55-68. [in Korean].
  19. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Principles of Good Laboratory Practice. OECD ENV/MC/CHEM(98)17. 1997.
  20. Korea Food and Drug Administration (KFDA) [Internet]. Good Laboratory Practice (GLP). KFDA: 2017. Available from: <http://www.law.go.kr/admRulInfoP.do?admRulSeq=2100000086689>.
  21. Korea Food and Drug Administration (KFDA). Toxicity test standard of drugs.
  22. Lee YJ, Shin JS, Lee J, Kim MR, Park KB, Lee HD et al. Usage report of pharmacopuncture in musculoskeletal patients visiting Korean medicine hospitals and clinics in Korea. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:292.
  23. Jeong LS, Jo TS, Moon CH, Shin HS. Neurotoxic Desensitizing Effect of Capsaicin on Peripheral Sensory Nerve Endings in Guinea Pig Bronchi. *Yakhak Hoeji*. 1997;41(1):139-46.
  24. Park SY, Choi YY, Jeon IS, Koo ST, Kim KS, Sohn IC, et al. Capsaicin pharmacopuncture modulates ankle sprain induced pain in rats. *Korean Journal of Acupunct*. 2006;23(2):113-23.