

ChondroT의 유전독성 연구

김선길* · 김주일* · 김지훈* · 윤찬석* · 정지원* · 나창수† · 김선종*
동신대학교 한의과대학 한방재활의학과교실*, 동신대학교 한의과대학 경락경혈학회†

Genotoxicity Study of ChondroT

Sun-Gil Kim, K.M.D.*, Joo Il Kim, K.M.D.*, Ji-Hoon Kim, K.M.D.*, Chan Suk Yoon, K.M.D.*,
Ji-Won Jeong, K.M.D.*, Chang-Su Na, K.M.D.†, Seon-Jong Kim, K.M.D.*

Departments of Korean Medicine Rehabilitation*, Meridian and Acupoint†, College of Korean Medicine, Dongshin University

RECEIVED September 15, 2020
ACCEPTED September 21, 2020

CORRESPONDING TO

Seon-Jong Kim, Department of
Korean Medicine Rehabilitation,
Mokpo Oriental Hospital of Dongshin
University, 313 Baengnyeong-daero,
Mokpo 58665, Korea

TEL (061) 280-7905
FAX (061) 280-7788
E-mail mofoster@hanmail.net

Copyright © 2021 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives This study was performed to observe the genotoxic effect of the ChondroT.

Methods To evaluate the genotoxicity of ChondroT, an experiment of bacterial reverse mutation test, *in vitro* mammalian chromosomal aberration test and mammalian erythrocyte micronucleus test in mouse was conducted.

Results TA98, TA100 and TA1537 strains in the absence of metabolic activation system (S9 mix), the number of revertant colonies being greater than 2-fold of the respective negative control value. Both in -S9 mix and +S9 mix, the frequencies of aberration cells with structural aberration and numerical aberrations of chromosome were less than 5%. There was no increase of polychromatic erythrocyte with one or more micronuclei at any dose of test substance compared to the negative control group ($p < 0.05$).

Conclusions In TA98, TA100 and TA1537 strains in the absence of metabolic activation system (S9 mix), the number of revertant colonies was greater than 2-fold of the respective negative control value, showing positive results. ChondroT was considered to be non-clastogenic to Chinese hamster lung (CHL/IU) cells under the present experimental condition. and ChondroT was determined not to induce an increased frequency of micronuclei in the bone marrow cells of male ICR mice under the present experimental condition. (**J Korean Med Rehabil 2021;31(1):59-79**)

Key words ChondroT, Mutagenicity tests, Chromosome aberrations, Micronucleus tests

서론»»»»

유전독성시험은 시험물질이 유전자 또는 염색체에 미치는 상해작용을 평가하는 시험을 말하며, 신약개발 과정에서 독성에 따른 후보물질 선별작업에 필수적으로 수행하는 시험 항목으로서 잠재적인 발암성 또는 돌연변이 유발물질을 검출하기 위한 시험이다¹⁻³). 임상에 사용 중인 한약제제라 하더라도 다른 처방과의 조합이

나 가감을 통해 그 독성이 증감하는 사례가 보고되고 있기에⁴), 복합처방으로 사용되는 한약제제에 대한 독성 시험 및 안전성 연구의 필요성이 증대하고 있다⁵). 의약품 개발에 있어 유전독성시험은 특정 화학물질 노출이 염색체 혹은 유전자 수준에 손상을 가해 형태적 변화나 기능 이상을 초래하는지 평가하는 것으로, 세균성 복귀 돌연변이 시험과 소핵시험에 의한 시험관 내 유전독성 평가를 우선 시행하도록 권장한다⁶). 시험관 내 유전독성

시험 결과가 긍정적인 경우 그 결과가 생체 내에서 동일하게 적용하는지 평가하기 위해 생체 내 시험(in vivo)인 포유류 적혈구 소핵시험, 형질전환 쥐 시험법 및 해성 시험 등이 수행된다⁷⁾.

ChondroT는 청강의감에 수록된 강활제통음⁸⁾ 처방에서 강활, 당귀, 금은화, 위령선, 황백을 bio-informatics 기법⁹⁾을 활용하여 선별한 뒤 해당 약재를 6:4:4:4:3 비율로 혼합하여 만든 물 추출물이다. 선행된 연구에서 ChondroT는 강활제통음에 비해 관절염 치료 효과가 우수하였고¹⁰⁾, adjuvant로 유도된 염증성 관절염 동물모델에서 관절염에 대한 유효성이 검증되었으며¹¹⁾ collagenase로 유발된 골관절염 모델에서 염증성 사이토카인 생성을 억제하고 이질통에 대한 회피반응을 감소시키는 것이 확인되었다^{12,13)}. 또한 monosodium-Iodoacetate (MIA)로 발생한 관절염 동물 시험에서 염증성 사이토카인(interleukin [IL]-6, IL- β , tumor necrosis factor- α)의 생성을 억제하였고, 하지부종(paw edema)을 감소시켰으며, 조직학적 검사에서 연골을 보호하는 효과가 있었다¹⁴⁾. Collagen과 thrombin으로 활성화된 혈소판에 대한 항응고 효과가 보고되었고¹⁵⁾, 신장의 mouse urate transporter 1 활성도와 xanthine oxidase 활성도를 조절하여 혈중 요산 수치 감소를 통해 통풍을 억제하였으며¹⁶⁾, 과골세포의 형성에 관여하는 nuclear factor-kappa B와 microtubule-associated protein kinases의 생성을 억제하여 골다공증을 예방하는 효과도 보고되었다¹⁷⁾.

ChondroT에 대한 독성평가는 단회 경구투여 독성시험을 통해 최고용량이 2,000 mg/kg을 상회하는 것이 보고되었고¹⁸⁾, 4주 반복 경구투여 용량결정시험을 통해 최고용량이 2,000 mg/kg 이상임이 확인되었으며¹⁸⁾, 13주 반복 독성연구 결과 2,000 mg/kg/day의 무독성량(no-observed adverse effect level)을 확인하였다¹⁹⁾.

이에 이전 13주 반복 독성연구에 이어 ChondroT의

유전독성 안전성 확보를 위해 Good Laboratory Practice (GLP) 인증기관인 한국화학시험연구원에서 진행한 박테리아를 이용하는 복귀 돌연변이 시험, 포유류 배양세포를 이용하는 염색체 이상 시험, 포유류 골수세포를 이용하는 소핵시험을 통해 유전독성 연구를 진행하여 유의한 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 ChondroT는 (주)정우신약(서울, 한국)에서 공급받아 사용하였으며, 처방구성은 Table I과 같다. ChondroT는 금은화 중 chlorogenic acid로서 1.7 mg 이상, 당귀 중 총 decursin 및 decursinol angelate의 총 합 0.85 mg 이상, 황백 중 berberine chloride로서 1.15 mg 이상의 지표성분을 함유하는 갈색의 건조엑스(3.4→1)로 시험물질 품질 평가를 통해 Lot number 901 ((주)정우제약, 아산, 한국)를 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 박테리아를 이용한 복귀 돌연변이 실험

(1) 음성 대조 물질

시험물질을 200 mg/mL 멸균증류수에 10분 동안 vortex 용해하였고, 혼합했을 때에 발열, 발포, 변색이 없음을 확인하였다. 멸균증류수는 대한약품공업(주)(서울, 한국)의 제품을 사용하였고 상온(1~30°C)에서 보관하였다.

(2) 양성 대조 물질

식품의약품안전처 고시 2017년-제71호에서 추천되는

Table I. Composition of ChondroT and the Used Parts of 5 Individual Herbs

Scientific name	Latin name	Family	Used part	Source	Rate
<i>Ostericum koreanum Maximowicz</i>	<i>Osterici Radix</i>	<i>Umbelliferae</i>	Root	Korea	6
<i>Angelica gigas Nakai</i>	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	<i>Umbelliferae</i>	Root	Korea	4
<i>Lonicera japonica Thunberg</i>	<i>Lonicerae Folium</i>	<i>Caprifoliaceae</i>	Root	China	4
<i>Clematis manshurica Ruprecht</i>	<i>Clematidis Radix</i>	<i>Ranunculaceae</i>	Leaf	China	4
<i>Phellodendrom amurense Ruprecht</i>	<i>Phellodendri Cortex</i>	<i>Rutaceae</i>	Tree bark	China	3

furylfuramide, sodium azide, 2-aminoanthracene, 9-aminoacridine, benzopyrene을 사용하였다. Furylfuramide는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) 제품을 사용했으며 상온(1~30°C)에서 보관하였다. Sodium azide, 2-aminoanthracene, 9-aminoacridine, benzopyrene는 모두 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며 모두 상온(1~30°C)에서 보관하였다.

(3) 실험 균주

*Salmonella typhimurium*에는 TA100, TA1535, TA98, TA1537를 *Escherichia coli*에는 WP2uvrA를 Molecular Toxicology, Inc. (Boone, NC, USA)에서 공급받아 사용하였다. Nutrient broth 배지 중에서 10시간, 37°C 전배양을 실시한 0.8 mL 균 현탁액에 0.07 mL의 비율로 dimethylsulfoxide (DMSO; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)를 혼합 조성하였다. 분주량을 0.5 mL로 동결하여 -65°C 이하에서 보관하였다.

(4) 배지

① Nutrient broth 조제

증류수 100 mL에 2.5 g의 비율로 Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid Ltd., Hampshire, UK)를 더해 용해한 뒤 121°C에서 15분간 고압증기멸균하여 냉장 보관하였다.

② Top agar 조제

연한천에 다음의 수용액을 각각 사용 직전에 10%로 첨가하였다.

연한천은 증류수 100 mL에 0.6 g의 비율로 Bacto-agar (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 및 0.5 g의 NaCl (Sigma-Aldrich Co.)을 합하고, 이것을 15분간 121°C에서 고압증기멸균하여 (55±5)°C에 조제했다.

살모넬라균은 0.5 mmol/L D-biotin · L-histidine 혼합 수용액을 사용 직전에 10% 농도로 연한천에 첨가하였다. 대장균은 0.5 mmol/L L-tryptophan 수용액을 사용 직전에 10% 농도로 연한천에 첨가하였다.

Top agar는 사용 직전에 조제되었으며, (55±5)°C으로 보존하였다. 2019년 5월 27일과 2019년 6월 10일에 자체 조제하였다.

(5) S9 mix (대사활성계)

S9는 수컷 Sprague Dawley (SD) rat에 500 mg/kg 농도의 Aroclor1254를 단회 복강 투여하여 효소를 유도한 후 5일째에 간으로부터 조제되었다. 동결건조된 S9 1

vial에 멸균증류수 2.1 mL을 첨가하여 현탁하였다.

Cofactor mix는 제조원 Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo Japan)의 Cofactor-I에 멸균증류수 9.5 mL를 넣어 용해한 후 pore size 0.45 µm의 membrane filter로 여과한 것으로, 사용 시 조제하였다.

S9 mix는 Cofactor mix 9.5 mL당 S9 0.5 mL의 비율을 추가하여 사용 시 조제하였으며 냉장 상태를 유지하였다.

(6) 농도 결정 실험

가이드라인에 따라 시험균주 TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA를 최고 농도 5,000 µg/plate, 공비 √10으로 50, 150, 500, 1,500, 5,000 (µg/plate)로 구별하여 농도를 설정하였다.

농도결정시험 결과, 대사활성계 미적용(-S9 mix)의 TA100 및 TA1537 균주에서 콜로니의 증가양상이 확인되었으며, 이 결과는 대사활성계 미적용(-S9 mix)의 TA100 및 TA1537 균주에서 콜로니 수의 농도상관성(농도의존적 증가양상)을 판단하기 힘든 농도이기 때문에 재현성 및 농도상관성을 확인하기 위하여 최고농도를 10,000 µg/plate로 설정하고 공차 2,000 µg/plate 및 공비 2를 적용하여 1,000, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000, 10,000 (µg/plate)로 구별하여 농도를 재설정하였다.

(7) 실험 방법

실험은 pre-incubation method를 이용하였으며, 대사활성계 미적용(-S9 mix)과 대사활성계 적용(+S9 mix) 환경에서 실시하였다.

- ① 각 농도에 대해 멸균한 시험관에 음성대조물질, 시험물질 용액 및 양성대조물질 용액을 0.1 mL 첨가하였다.
- ② 대사활성계 미적용(-S9 mix)의 경우, 0.1 mol/L sodium-phosphate buffer (pH 7.4)를 0.5 mL 넣어 혼합한 뒤 0.1 mL 균 현탁액을 추가하였다.
- ③ 대사활성계 적용(+S9 mix)의 경우, 0.5 mL의 S9 mix를 넣어 혼합한 뒤 0.1 mL 균 현탁액을 추가하였다.
- ④ 이 혼합액을 20분간 37°C에서 진탕(진탕 횟수: 120 회/분)하여 배양하였다(pre-incubation).
- ⑤ Pre-incubation 후 이 혼합액에 2 mL의 top agar를 넣어 minimal glucose agar plate 위에 중층하였다.
- ⑥ 중층한 top agar가 응고된 후 (48±2)시간 37°C에

서 배양하였다.

(8) 판단 기준

콜로니 계수는 육안으로 이뤄졌으며, 최소 1개 균주에서 평판 당 복귀돌연변이 콜로니 수가 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판단했으며, 콜로니 수의 음성대조군 대비 증가 여부 및 농도 상관성을 고려하였다.

(9) 결과의 집계

균의 생육저해는 (48±2)시간 배양 후 현미경으로 관찰하였으며, 침전 및 석출은 (48±2)시간 배양 후 육안으로 관찰하였다. 양성대조, 음성대조 및 시험물질의 각 처리에 대해 계수한 콜로니 수의 평균값 및 표준편차를 산출하였으며, 평균값 및 표준편차는 소수점 이하에서 반올림하였다.

2) 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 실험

(1) 음성 대조 물질

시험물질을 200 mg/mL 멸균증류수에 10분 동안 vortex 용해하였고, 혼합했을 때에 발열, 발포, 변색이 없음을 확인하였다. 멸균증류수는 대한약품공업(주)의 제품을 사용하였고 상온(1~30°C)에서 보관하였다.

(2) 양성 대조 물질

2 mg/vial 함량의 mitomycin C, 98.0% 순도의 cyclophosphamide monohydrate (CPA)을 사용하였다. 모두 Sigma-Aldrich Co. 제품을 사용하였으며 모두 냉장환경(2~8°C)에서 보관하였다.

(3) 실험 세포

American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 입수한 CHL/IU (Female, Chinese Hamster Lung 유래)를 사용하였다. DMSO를 10% (v/v)의 비율로 첨가한 배지에 세포를 부유시켜 약 1 mL씩 분주하였으며, 액체질소 보존용기에 옮겨 동결 보존하였다. 보존된 동결 세포는 시험 기간 중 해동 및 배양하여 사용되었으며, 다른 시험과 공통으로 사용하였다.

입수 후 동결 보존한 세포에 해동 후 시험에 사용하기 전에 염색체모드(2n)는 25, 배가시간이 15.9시간, mycoplasma의 음성 상태를 확인하였다.

(4) Minimum essential medium (MEM) 배지

MEM 배지 및 MEM은 사전 혹은 시험 개시 후에 구입, 조제하였으며 다른 시험과 공통으로 사용하였다.

MEM에 heat-inactivated fetal bovine serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 10% (v/v), penicillin streptomycin (Gibco) 1% 비율로 첨가하였다.

(5) S9 mix (대사활성계)

S9은 SD rat (수컷)에 Aroclor1254를 500 mg/kg의 농도로 복강 내 단회 투여하여 효소를 유도한 뒤 5일째에 간으로부터 조제하였다. 멸균증류수 2.1 mL와 동결건조된 S9 1 vial을 혼합하여 현탁하였다.

Cofactor mix는 제조원 Oriental Yeast Co.의 Cofactor-I에 멸균증류수 7 mL를 넣어 용해한 후 pore size 0.45 µm의 membrane filter로 여과한 것을 Cofactor mix한 것으로 사용 시 조제하였다. S9 mix는 Cofactor mix 4.9 mL당 S9 2.1 mL의 비율로 추가하여 S9 mix로 하였다. S9 mix는 사용 시 조제하고 사용할 때까지 냉장 보존(2~8°C)하였다.

(6) 농도 결정 실험

단기간처리법(-S9 mix, +S9 mix)과 연속처리법(24시간 처리)으로 조건을 나눠서 실험하였다. 가이드라인에서 규정하고 있는 최고 농도 5,000 µg/plate로 하여 313, 625, 1,250, 2,500, 5,000 (µg/plate)로 구별하여 설정하였다. 농도결정시험 결과, 생세포 수의 급격한 감소로 인하여 본 실험의 최고농도 설정에 어려움이 있어 -S9 mix와 24시간 처리는 1,100, 1,200, 1,250, 1,300, 1,400 (µg/plate)으로 농도를 구별하였다. 또한 +S9 mix는 2,000, 2,250, 2,500, 2,750, 3,000으로 농도를 구별하였다. 농도결정시험 결과를 토대로 relative increase in cell counts (RICC) 55를 넘는 농도를 각 처리조건에서 최고농도로 하여 -S9 mix는 300, 600, 1,200, 1,250, 1,300 (µg/plate)의 농도로 구별하고, +S9 mix는 600, 1,200, 2,400, 2,500, 2,600 (µg/plate)의 농도로 구별하여 실험하였다.

(7) 표본 제작

Colcemid를 최종농도 0.2 µg/mL이 되도록 각 culture flask에 첨가하여 처리종료 2시간 전에 분열중기세포를 축적하였다. 처리 종료 후 세포 표면을 phosphate buffered saline (-)로 세정하고, 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid로 처리(37°C, 5분)하여 세포를 박리하였다. 원심관에서 세포부유액을 회수해 원심분리(5분간, 1,000 rpm; 이하 동일)하여 세포를 모았으며, 상등액을 제거한 후 각 원심관에 0.075 mol/L 농도의 KCL 용액 4 mL을 넣고 저장처리(15분, 37°C)한 뒤, 0.5 mL의 냉각한 고

정액(메탄올:빙초산 혼합액[3:1, v/v])을 첨가하여 혼합한 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 여기에 4 mL의 고정액을 혼합한 후에 원심분리하여 상등액을 제거하는 과정을 재차 실시한 후 적당량의 고정액으로 세포를 부유시킨 뒤 slide tray 위에 둔 slide glass에 2-3 개소에 떨어뜨려 건조시켜 culture flask당 2매 이상의 표본을 제작하였다.

(8) 판단 기준

① 구조이상

염색분체형질단, 염색분체형교환, 염색체형질단, 염색체형교환(이동원체, 환상염색체 등), 단편화를 구조 이상으로 판단하였다.

② Gap

염색분체의 폭보다 염색분체로 보여지는 비염색 부분의 폭이 좁은 것을 gap으로 판단하였다. 구조 이상에는 포함하지 않았으며, 다른 이상과 구별해 기록하였다.

③ 수적 이상

동원체수가 35 이상의 배수성 세포, 핵내배가 세포의 수적 이상으로 판단하였다.

④ 염색체 이상세포

염색체 구조 이상을 1개 이상 가지는 세포 또는 염색체 수적 이상을 가지는 세포를 염색체 이상세포로 판정하였다. 이 때, 관찰 가능한 분열 중기 세포는 culture flask 당 150개(농도 당 300개)의 세포를 채용 데이터로 선정하였다.

3) 포유류 골수세포를 이용한 소핵 실험

본 시험은 동물보호법[시행 2018-09-21][법률 제15502호(2018-03-20, 일부개정)] 및 실험동물에 관한 법률[시행 2019-03-25][법률 제16075호(2018-12-24, 일부개정)]에 근거하여 시행되었으며, (재)한국화학융합 시험연구원 화순의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: IAC2019-1142).

(1) 음성 대조 물질 선정

시험물질을 200 mg/mL 멸균증류수에 10분 동안 vortex 용해하였고, 혼합했을 때에 발열, 발포, 변색이 없음을 확인하였다. 멸균증류수는 대한약품공업(주)의 제품을 사용하였고 상온(1~30°C)에서 보관하였다.

(2) 양성 대조 물질 선정

제조원 Sigma-Aldrich Co.의 CPA를 사용하였으며 냉

장조건(2~8°C)에서 보관하였다.

(3) 실험동물

① 시험계

(주)오리엔트 바이오(성남, 한국)에서 공급받은 CD1 계통의 ICR mouse를 사용하였다. 용량결정 실험 도입 시에는 체중 22.57~25.72 g의 6주령 암컷과 체중 26.91~30.60 g의 6주령 수컷을 18마리 사용하였다. 또한 용량결정 실험 투여 시에는 체중 27.79~30.43 g의 7주령 암컷과 체중 34.61~36.98 g의 6주령 수컷을 15마리 사용하였다.

본 실험 도입 시에는 체중 27.03~30.14 g의 6주령 수컷을 28마리 사용하였다. 또한 본 실험의 투여 시에는 체중 33.39~36.59 g의 7주령 수컷을 25마리 사용하였다.

② 사육환경

Stainless steel cage (180W×300D×140H) mm에 평균 온도 (21.6~22.4)°C, 상대습도 (53.7~56.7)%, 광조건 12 시간(08:00~20:00) 암조건 12시간(20:00~08:00), 조도 (150~300) Lux의 조명주기, 환기횟수(10~20)회/h의 사육환경을 유지하였으며, 음수는 R/O수, 사료는 방사선 멸균된 Rodent Diet 20 5053 (Labdiet, St. Louis, MO, USA)를 자유 섭취시켰다.

(4) 투여

투여 전 약 3~4시간 절식시킨 실험동물에 경구 투여용 sonde를 이용하여 시험물질을 위 내에 강제 투여하였다. 양성대조물질은 시험물질 2회차 투여일에 복강내 투여하였다. 24시간 간격으로 2회 강제 경구 투여하였다.

① 용량 설정 실험

Table II와 같이 군당 3마리의 마우스를 암컷과 수컷으로 구별하여 시험물질 투여군 4군 및 음성대조군 1군의 총 5군으로 실험하였다.

② 본 실험

용량설정시험 결과, 암컷 및 수컷 간의 시험물질에 대한 감수성 차이는 확인되지 않았고, 최고 농도인 2,000 mg/kg · B.W./day군에서도 사망 사례가 없었으므로 본 시험에서는 수컷 마우스에 최고 농도를 2,000 mg/kg · B.W./day로 하여 Table III과 같이 투여하였다.

(5) 관찰항목

일반증상관찰 투여 당일과 부검 당일 1회 이상 관찰하였다. 표준작업지침서 방법에 따라 체중측정 실험동

Table II Capacity Setting Test in ICR Mice (Group Summary)

Sex	Group	Dose	Times	Route	Numbers of animals
Male	G1	Negative control	2	Oral	3 (1101-1103)
	G2	500 mg/kg · B.W./day	2	Oral	3 (1201-1203)
	G3	1,000 mg/kg · B.W./day	2	Oral	3 (1301-1303)
	G4	1,500 mg/kg · B.W./day	2	Oral	3 (1401-1403)
	G5	2,000 mg/kg · B.W./day	2	Oral	3 (1501-1503)
Female	G6	Negative Control	2	Oral	3 (2101-2103)
	G7	500 mg/kg · B.W./day	2	Oral	3 (2201-2203)
	G8	1,000 mg/kg · B.W./day	2	Oral	3 (2301-2303)
	G9	1,500 mg/kg · B.W./day	2	Oral	3 (2401-2403)
	G10	2,000 mg/kg · B.W./day	2	Oral	3 (2501-2503)

Table III Capacity Setting Test in ICR Mice (Group Summary)

Division	Dose (mg/kg · B.W./day)	Concentration (mg/mL)	Volume (mL/kg once)	Times	Route	Numbers of animals
Negative control	0	0	10	2	Oral	5 (1101-1105)
	500	50	10	2	Oral	5 (1201-1205)
Test substance	1,000	100	10	2	Oral	5 (1301-1305)
	2,000	200	10	2	Oral	5 (1401-1405)
Positive control	70	7	10	1	Intraperitoneal	5 (1501-1505)

물 도입 시, 군 분리 전, 투여 전 및 부검 전에 개별 체중을 측정하였다.

(6) 소핵의 판정기준

① 다염성 적혈구의 구별

관찰 시야에서 핵이 없이 적색 형광을 보이는 것으로 하였다.

② 정염성 적혈구의 구별

관찰 시야에서 형광을 전혀 나타내지 않고 음영으로만 구분되며 다염성 적혈구 크기인 것으로 하였다.

③ 소핵의 판정기준

크기는 제일 작은 것은 식별이 가능한 것으로, 제일 큰 것은 적혈구 직경의 1/2까지로 하였다. 형태는 주로 원형이나 기타 반원형, 도너츠형 등의 형태의 것을 포함시켰다. 색깔은 근접한 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광을 띠는 것으로 하였다.

(7) 자료의 통계처리

통계 처리는 SPSS program (Ver. 19; IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 실시하였다. 소핵유발빈도에 있

어 음성대조군과 시험물질 투여군 간의 비교는 Kruskal-Wallis' H-test 통계법을 사용하였다. 소핵유발빈도에 있어서 음성대조군과 양성대조군 간의 비교는 Mann-Whitney's U-test를 사용하였으며, 전체적혈구 중 다염성 적혈구의 비율(polychromatic erythrocyte [PCE]/[PCE+normochromatic erythrocyt {NCE}])에서 음성대조군과 시험물질 투여군 간의 비교(양성대조군 포함)는 one-way analysis of variance (ANOVA) test와 Dunnett's test를 사용하였다. 전체적혈구 중 다염성 적혈구의 비율[(PCE/(PCE+NCE))]에 있어서 음성대조군과 양성대조군의 비교는 Student's t-test를 사용하였고, 체중에 있어 부검 시 각 개체의 체중에 대해서는 Dunnett's test와 ANOVA test를 실시하여 부검 시 군간 차이를 조사하였다.

결과»»»»

1. 박테리아를 이용한 복귀 돌연변이 실험

1) 농도 결정 실험

대사활성계 미적용(-S9 mix)의 TA98 및 TA1537 균주에서 2배 이상 콜로니의 증가양상이 확인되었고 TA100 균주에서 1.8배의 콜로니 증가양상이 확인되었다. 생육저해는 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 대사활성계 적용(+S9 mix) 모두에서 확인되지 않았으며, 시험물질의 석출도 대사활성계 적용 유무에 관계없이 모든 농도에서 확인되지 않았다(Tables IV, V).

2) 본 실험

대사활성계 미적용(-S9 mix)의 TA100 및 TA1537 균주에서 콜로니의 증가양상이 확인되었다. 생육저해는 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 대사활성계 적용(+S9 mix) 모두에서 확인되지 않았으며, 시험물질의 석출도 대사활성계 적용 유무에 관계없이 모든 농도에서 확인되지 않았다(Tables VI, VII).

3) 무균 실험

농도결정시험에서 S9 mix 및 최고농도의 시험물질 조제액은 세균과 곰팡이의 오염이 관찰되지 않았고, 본 시험에서도 S9 mix 및 최고농도의 시험물질 조제액은 세균과 곰팡이의 오염이 관찰되지 않았다.

2. 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 실험

1) 농도 결정 실험

시험물질 처리 개시 시에 시험물질에 침전이 없음을 확인하였다.

시험물질의 세포독성은 농도의존적으로 증가하였다. 세포독성 지표인 상대세포수 증가(RICC) (55±5)%는 -S9 mix에서는 1,218.92 µg/mL, +S9 mix에서는 2,522.53 µg/mL, 24시간 처리에서는 1,234.04 µg/mL이었다(Tables VIII, IX).

2) 염색체 이상 실험(단시간처리법)

시험물질 처리 개시 시에 시험물질의 침전은 확인되지 않았다.

표본관찰 결과, -S9 mix 처리군의 0, 300, 600, 1,200, 1,250 및 1,300 µg/mL 농도에서 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.3 및 0.0%로 관찰되었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다. 그리고 +S9 mix의 0, 600, 1,200, 2,400, 2,500 및 2,600 µg/mL에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.3 및 0.3%로 관찰되었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다.

각 처리조건의 음성대조군에서 수적이상세포 및 구조이상세포의 출현빈도는 5% 미만으로 확인되었고, 양성대조군에서 구조이상세포의 출현빈도는 10% 이상으로 확인되었다(Tables X, XI).

3) 염색체 이상 실험(24시간 처리법)

시험물질 처리 개시 시에 시험물질의 침전은 확인되지 않았다.

표본관찰 결과, 0, 300, 600, 1,200, 1,250 및 1,300 µg/mL에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.3, 0.0, 0.0, 0.3 및 0.0%로 관찰되었고 염색체수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다. 음성대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5% 미만으로 확인되었고, 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10% 이상으로 확인되었다(Table XII).

3. 포유류 골수세포를 이용한 소핵 실험

1) 용량 설정 실험

용량설정시험 결과, 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 확인되지 않았다. 암컷과 수컷 간의 감수성의 차이가 확인되지 않았으므로 일반적으로 감수성이 뛰어나다고 알려져 있는 수컷 마우스를 본 시험의 시험동물로 사용하였다. 용량설정시험 결과를 토대로 본 시험에서 최고농도는 2,000 mg/kg · B.W./day로 설정하였다(Table XIII).

2) 본 실험

(1) 체중

모든 투여군에서 음성대조군 대비 통계학적 유의성

Table IV. Result of Concentration Range-Finding Test (Group Summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose (µg/plate)	Colonies/plate (Mean±S.D.) [Factor]*	
			Without S9 mix	With S9 mix
TA98	Negative control	0	27±3	32±5
	Test solution	50	25±4 [0.9]	34±5 [1.1]
		150	25±4 [0.9]	34±2 [1.1]
		500	23±3 [0.9]	31±2 [1.0]
		1,500	27±3 [1.0]	31±2 [1.0]
		5,000	77±8 [2.9]	30±2 [0.9]
TA100	Negative control	0	117±6	132±2
	Test solution	50	119±5 [1.0]	130±4 [1.0]
		150	116±6 [1.0]	140±1 [1.1]
		500	118±2 [1.0]	135±7 [1.0]
		1,500	116±5 [1.0]	133±2 [1.0]
		5,000	205±33 [1.8]	136±2 [1.0]
TA1535	Negative control	0	11±3	10±1
	Test solution	50	10±3 [0.9]	11±3 [1.0]
		150	9±2 [0.9]	9±2 [0.8]
		500	10±3 [1.0]	12±2 [1.2]
		1,500	11±2 [1.0]	10±0 [1.0]
		5,000	12±2 [1.2]	11±3 [1.1]
TA1537	Negative control	0	9±2	11±2
	Test solution	50	11±1 [1.2]	11±2 [1.0]
		150	11±3 [1.1]	11±1 [1.0]
		500	11±2 [1.2]	11±2 [1.0]
		1,500	11±1 [1.2]	11±1 [1.0]
		5,000	24±4 [2.6]	11±1 [1.1]
WP2uvr A	Negative control	0	47±5	63±4
	Test solution	50	49±3 [1.0]	60±3 [1.0]
		150	45±4 [0.9]	57±3 [0.9]
		500	45±1 [1.0]	62±3 [1.0]
		1,500	45±3 [1.0]	62±5 [1.0]
		5,000	47±2 [1.0]	55±3 [0.9]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	507±13 [23.0]	
TA100	AF-2	0.01	457±4 [4.1]	
TA1535	NaN ₃	0.5	367±8 [34.4]	
TA1537	9-AA	40.0	270±12 [27.0]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	388±5 [8.3]	
TA98	B(a)P	2.5		275±6 [8.3]
TA100	B(a)P	2.5		1,106±48 [8.2]
TA1535	2-AA	2.0		183±5 [17.7]
TA1537	2-AA	2.0		201±7 [17.7]
WP2uvrA	2-AA	10.0		368±3.5 [6.7]

S.D.: standard deviation, AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, B(a)P: benzo(a)pyrene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

*No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate.

Table V. Result of Concentration Range-Finding Test (Individual Summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate (Plate A, B and C)*					
			Without S9 mix			With S9 mix		
TA98	Negative control	0	29	24	28	32	27	36
	Test solution	50	29	22	25	37	37	29
		150	28	21	27	32	36	35
		500	24	26	20	32	29	32
		1,500	24	26	30	30	30	34
		5,000	79	69	84	31	27	31
TA100	Negative control	0	123	112	115	131	130	134
	Test solution	50	116	117	125	141	139	141
		150	111	122	115	141	139	141
		500	116	119	120	138	127	141
		1,500	112	122	115	132	132	136
		5,000	194	179	243	136	137	134
TA1535	Negative control	0	9	9	14	11	10	10
	Test solution	50	8	8	13	13	12	7
		150	11	8	9	7	10	9
		500	12	7	12	11	14	11
		1,500	13	11	9	10	10	10
		5,000	14	10	13	8	12	14
TA1537	Negative control	0	8	8	12	9	13	10
	Test solution	50	12	10	11	13	9	11
		150	8	10	14	12	10	10
		500	10	13	11	12	12	8
		1,500	11	10	12	10	10	12
		5,000	21	28	23	11	11	12
WP2uvrA	Negative control	0	42	48	52	58	64	66
	Test solution	50	46	52	49	63	61	57
		150	41	44	49	53	59	58
		500	46	45	44	65	62	59
		1,500	42	45	48	63	66	57
		5,000	46	49	47	52	57	56
Positive controls								
TA98	AF-2	0.1	516	508	482			
TA100	AF-2	0.01	467	458	453			
TA1535	NaN_3	0.5	367	374	359			
TA1537	9-AA	40.0	280	272	269			
WP2uvrA	AF-2	0.01	395	379	382			
TA98	B(a)P	2.5				285	290	272
TA100	B(a)P	2.5				952	897	1,012
TA1535	2-AA	2.0				186	194	192
TA1537	2-AA	2.0				208	204	192
WP2uvrA	2-AA	10.0				384	370	369

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN_3 : sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, B(a)P: benzo(a)pyrene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

*No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate.

Table VI. Result of Main Test (Group Summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose (µg/plate)	Colonies/plate (Mean±S.D.) [Factor]*	
			Without S9 mix	With S9 mix
TA98	Negative control	0	22±3	33±4
	Test solution	1,000	27±1 [1.2]	33±4 [1.0]
		2,000	22±1 [1.0]	33±3 [1.0]
		4,000	24±2 [1.1]	36±2 [1.1]
		6,000	34±8 [1.6]	36±3 [1.1]
		8,000	39±9 [1.8]	33±4 [1.0]
		10,000	46±3 [2.1]	32±3 [1.0]
TA100	Negative control	0	112±6	136±6
	Test solution	1,000	121±3 [1.1]	134±3 [1.0]
		2,000	151±21 [1.3]	135±5 [1.0]
		4,000	205±11 [1.8]	133±4 [1.0]
		6,000	226±15 [2.0]	133±5 [1.0]
		8,000	266±47 [2.4]	134±4 [1.0]
		10,000	367±31 [3.3]	134±3 [1.0]
TA1535	Negative control	0	11±1	10±4
	Test solution	1,000	9±2 [0.9]	11±3 [1.1]
		2,000	10±2 [0.9]	12±2 [1.1]
		4,000	11±2 [1.0]	11±1 [1.1]
		6,000	12±2 [1.2]	10±2 [1.0]
		8,000	13±2 [1.2]	11±2 [1.1]
		10,000	11±3 [1.0]	10±2 [0.9]
TA1537	Negative control	0	10±2	11±2
	Test solution	1,000	10±2 [1.0]	11±2 [0.9]
		2,000	10±0 [1.0]	10±3 [0.9]
		4,000	10±1 [1.0]	13±2 [1.1]
		6,000	22±3 [2.2]	11±2 [0.9]
		8,000	33±2 [3.3]	10±3 [0.9]
		10,000	42±7 [4.2]	9±3 [0.8]
WP2uvrA	Negative control	0	47±5	55±3
	Test solution	1,000	46±2 [1.0]	56±3 [1.0]
		2,000	45±4 [1.0]	58±4 [1.1]
		4,000	45±5 [1.0]	54±4 [1.0]
		6,000	47±1 [1.0]	56±3 [1.0]
		8,000	46±3 [1.0]	54±3 [1.0]
		10,000	47±4 [1.0]	55±4 [1.0]
TA98	AF-2	0.1	507±13 [23.0]	
TA100	AF-2	0.01	457±4 [4.1]	
TA1535	NaN ₃	0.5	367±8 [34.4]	
TA1537	9-AA	40.0	270±12 [27.0]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	388±5 [8.3]	

Table VI. Continued

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate (Mean \pm S.D.) [Factor]*	
			Without S9 mix	With S9 mix
TA98	B(a)P	2.5		275 \pm 6 [8.3]
TA100	B(a)P	2.5		1,106 \pm 48 [8.2]
TA1535	2-AA	2.0		183 \pm 5 [17.7]
TA1537	2-AA	2.0		201 \pm 7 [17.7]
WP2uvrA	2-AA	10.0		368 \pm 3.5 [6.7]

S.D.: standard deviation, AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, B(a)P: benzo(a)pyrene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

*No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate.

Table VII. Result of Main Test (Individual Summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate (Plate A, B and C)*					
			Without S9 mix			With S9 mix		
TA98	Negative control	0	21	20	25	38	32	30
	Test solution	1,000	28	28	26	29	36	34
		2,000	22	22	23	37	32	31
		4,000	22	24	25	35	34	38
		6,000	26	41	36	36	39	33
		8,000	33	34	49	30	32	38
		10,000	47	49	43	35	30	31
TA100	Negative control	0	118	107	111	135	142	130
	Test solution	1,000	125	120	119	131	137	134
		2,000	158	167	127	135	139	130
		4,000	204	216	194	129	136	134
		6,000	216	243	219	128	138	133
		8,000	220	314	265	130	135	138
		10,000	402	354	345	131	137	135
TA1535	Negative control	0	12	10	10	10	14	7
	Test solution	1,000	11	10	7	8	12	13
		2,000	10	12	8	11	14	10
		4,000	9	12	11	12	12	10
		6,000	14	11	12	8	12	11
		8,000	11	13	14	10	14	10
		10,000	7	13	12	8	9	12
TA1537	Negative control	0	8	10	12	11	10	13
	Test solution	1,000	12	11	8	12	12	8
		2,000	10	10	10	7	12	10
		4,000	10	10	9	13	11	14
		6,000	19	21	25	9	12	11
		8,000	33	35	32	13	10	8
		10,000	49	36	40	12	7	9

Table VII Continued

Tester strain	Chemical treated	Dose (µg/plate)	Colonies/plate (Plate A, B and C)*					
			Without S9 mix			With S9 mix		
WP2uvrA	Negative control	0	48	42	51	58	52	54
	Test solution	1,000	46	44	47	55	53	59
		2,000	44	50	42	54	58	62
		4,000	42	43	51	52	58	51
		6,000	48	47	47	55	59	54
		8,000	43	49	45	53	52	58
		10,000	44	46	52	51	58	55
Positive controls								
TA98	AF-2	0.1	519	494	508			
TA100	AF-2	0.01	457	460	453			
TA1535	NaN ₃	0.5	367	374	359			
TA1537	9-AA	40.0	284	262	264			
WP2uvrA	AF-2	0.01	392	383	390			
TA98	B(a)P	2.5				282	273	270
TA100	B(a)P	2.5				1,143	1,052	1,124
TA1535	2-AA	2.0				179	183	188
TA1537	2-AA	2.0				195	199	208
WP2uvrA	2-AA	10.0				368	371	364

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, B(a)P: Benzo(a)pyrene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

*No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate.

Table VIII Results of Concentration Range Finding Test I

Concentration (µg/mL)	Short-term treatment test		Continuous treatment test
	Without S9 mix (%)	With S9 mix (%)	24 hours exposure
0	100.00	100.0	100.00
313	90.33	87.17	108.95
625	83.25	87.53	102.77
1,250	49.08	90.61	53.85
2,500	1.78	49.87	0
5,000	0	31.44	0

을 가진 체중변화는 관찰되지 않았다(Tables XIV, XV).

(2) 일반 증상

본 시험의 시험군 중 사망동물은 관찰되지 않았다(Tables XVI, XVII).

(3) 소핵 출현빈도 및 총적혈구 비율

4,000개 이상의 다염성 적혈구를 부검하여 관찰한 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의

출현빈도는 (0.12±0.02)%이었으며, 500 mg/kg · B.W./day 투여군의 소핵출현빈도는 (0.08±0.02)%, 1,000 mg/kg · B.W./day 투여군의 빈도는 (0.09±0.01)%, 2,000 mg/kg · B.W./day 투여군의 빈도는 (0.10±0.03)%, 양성대조군의 빈도는 (6.40±0.40)%를 나타내었다. 시험물질을 투여한 각 군에서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 발생빈도는 음성대조군 대비 증가하지 않았으며, 통계적

Table IX. Results of Concentration Range Finding Test II

Concentration (µg/mL)	Short-term treatment test				Continuous treatment test	
	Without S9 mix (%)	Concentration (µg/mL)	With S9 mix (%)	Concentration (µg/mL)	24 hours exposure	
0	100.00	0	100.0	0	100.00	
1,100	84.54	2,000	64.53	1,100	65.64	
1,200	69.29	2,250	76.09	1,200	62.35	
1,250	51.41	2,500	56.73	1,250	51.84	
1,300	46.12	2,750	40.23	1,300	51.47	
1,400	44.61	3,000	21.26	1,400	52.48	
RICC ₅₅	1,218.92 µg/mL	RICC ₅₅	2,522.53 µg/mL	RICC ₅₅	1,234.04 µg/mL	

RICC: relative increase in cell counts.

Table X. Result of Chromosomal Aberration Test (Short-Term Treatment Test, -S9 Mix)

Treatment recovery period (h)	S9 mix	Concentration (µg/mL)	Number of observed	Number of structural aberrations (Frequencies %)					Total (cells %)	g	Cell growth index (%)	Number of numerical aberrations (Frequencies %)			Total (cells %)	
				ctb	cte	csb	cse	other				Number of observed	Polyploids	Endo		
6-18	-	Negative control (SDW)	150	0	0	0	0	0	0	0	100.8	150	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	99.2	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100.0	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	300	150	0	0	0	0	0	0	0	100.6	150	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	90.7	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	95.7	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	600	150	0	0	0	0	0	0	0	84.9	150	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	83.4	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	84.2	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	1,200	150	0	0	0	0	0	0	0	53.5	150	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	51.9	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	52.7	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	1,250	150	0	0	0	0	0	0	0	47.7	150	0	0	0	
			150	0	1	0	0	0	1	0	50.3	150	0	0	0	
			300	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0	49.0	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	-	1,300	150	0	0	0	0	0	0	0	37.0	150	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	43.4	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	40.2	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	Positive control (MMC 0.1)	150	5	26	1	2	0	34	0	150	0	0	0		
			150	4	27	2	2	0	35	1	150	0	0	0		
			300	9 (3.0)	53 (17.7)	3 (1.0)	4 (1.3)	0 (0.0)	69 (23.0)	1	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., g: gap, Endo: endoreduplication, -: without metabolic activation, SDW: sterile distilled water, MMC: mitomycin C.

으로 유의한 차이 또한 없었다. 반면 양성대조군의 소핵출현빈도는 음성대조군에 비해 현저한 증가를 보였으며, 통계학적으로 유의한 수준이었다($p < 0.05$).

세포독성의 지표인 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 위와 같은

순서로 평균 (49.68 ± 1.49)%, (51.31 ± 0.71)%, (50.46 ± 1.18)%, (50.92 ± 1.01)% 및 (42.58 ± 1.39)%이었으며, 모든 투여군에서 음성대조군 대비 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 한편 양성대조군의 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 음

Table XI. Result of Chromosomal Aberration Test (Short-Term Treatment Test, +S9 Mix)

Treatment recovery period (h)	S9 mix	Concentration (µg/mL)	Number of observed	Number of structural aberrations (Frequencies %)					Total (cells %)	g	Cell growth index (%)	Number of numerical aberrations (Frequencies %)			Total (cells %)
				ctb	cte	csb	cse	other				Number of observed	Polyploids	Endo	
6-18	+	Negative control (SDW)	150	0	0	0	0	0	0	1	97.3	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	102.8	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	100.0	300	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	600	150	0	0	0	0	0	0	0	88.6	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	113.0	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100.8	300	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1,200	150	0	0	0	0	0	0	0	118.9	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	94.1	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	106.5	300	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	2,400	150	0	0	0	0	0	0	0	77.2	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	76.4	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	76.8	300	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	2,500	150	0	1	0	0	0	1	0	66.2	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	56.0	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0	0	61.1	300	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	2,600	150	0	1	0	0	0	1	0	57.6	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	55.6	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0	0	56.6	300	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	Positive control (CPA 5)	150	2	27	1	3	0	33	0		150	0	0	0
			150	3	25	4	0	0	32	0		150	0	0	0
			300	5 (1.7)	52 (17.3)	5 (1.7)	3 (1.0)	0 (0.0)	65 (21.7)	0		300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., g: gap, Endo: endoreduplication, +: with metabolic activation, SDW: sterile distilled water, CPA: cyclophosphamide monohydrate.

Table XII. Result of Chromosomal Aberration Test (Continuous Treatment Test, -S9 Mix)

Treatment recovery period (h)	S9 mix	Concentration (µg/mL)	Number of observed	Number of structural aberrations (Frequencies %)					Total (cells %)	g	Cell growth index (%)	Number of numerical aberrations (Frequencies %)			Total (cells %)
				ctb	cte	csb	cse	other				Number of observed	Polyploids	Endo	
24-0	-	Negative control (SDW)	150	0	0	0	0	0	0	1	105.0	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	95.0	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	100.0	300	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	300	150	0	0	0	0	0	0	0	88.3	150	0	0	0
			150	0	1	0	0	0	1	0	90.5	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0	0	89.4	300	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	600	150	0	0	0	0	0	0	0	83.5	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	96.1	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	89.8	300	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	1,200	150	0	0	0	0	0	0	0	53.4	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	60.1	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	56.7	300	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	1,250	150	0	0	0	0	0	0	0	50.1	150	0	0	0
			150	1	0	0	0	0	1	0	56.7	150	0	0	0
			300	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0	0	53.4	300	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	1,300	150	0	0	0	0	0	0	0	43.4	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	53.4	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0	0	48.4	300	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	Positive control (MMC 0.05)	150	3	29	1	1	0	34	0		150	0	0	0
			150	2	27	2	1	0	32	0		150	0	0	0
			300	5 (1.7)	56 (18.7)	3 (1.0)	2 (0.7)	0 (0.0)	66 (22.0)	0		300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., g: gap, Endo: endoreduplication, -: without metabolic activation, SDW: sterile distilled water, MMC: mitomycin C.

Table XIII. Clinical Signs and Mortalities (Group Summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Mortality (dead/total)
Male	Negative control (SDW)	0	0 % (0/3)*
	Test substance	500	0 % (0/3)
	Test substance	1,000	0 % (0/3)
	Test substance	1,500	0 % (0/3)
	Positive control (CPA)	2,000	0 % (0/3)
Female	Negative control (SDW)	0	0 % (0/3)*
	Test substance	500	0 % (0/3)
	Test substance	1,000	0 % (0/3)
	Test substance	1,500	0 % (0/3)
	Positive control (CPA)	2,000	0 % (0/3)

SDW: sterile distilled water, CPA: cyclophosphamide monohydrate.

*No. of dead animals/No. of tested animals

Table XIV. Body Weight of Animals (Group Summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Body weights (mean±S.D.; g) at the time of administration (No. of animal)		
			1st	2nd	Sacrifice (No. of animal)
Male	Negative control (SDW)	0	34.92±0.57 (5)	34.93±0.74 (5)	34.84±0.76 (5)
	Test substance	500	35.09±1.23 (5)	34.24±1.35 (5)	34.09±1.20 (5)
	Test substance	1,000	34.81±0.83 (5)	34.61±0.85 (5)	34.21±0.52 (5)
	Test substance	2,000	35.19±0.93 (5)	34.98±1.08 (5)	34.46±1.25 (5)
	Positive control (CPA)	70	35.25±0.55 (5)	35.22±0.76 (5)	34.94±0.48 (5)

S.D.: standard deviation, SDW: sterile distilled water, CPA: cyclophosphamide monohydrate.

성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타났다($p < 0.05$)(Tables XVIII, XIX).

고찰 및 결론»»»»

최근 국제적으로 의약품 개발 시 임상 및 비임상시험에 대한 새로운 방법 및 데이터들이 제시되고 있으며, 보다 혁신적인 신약 개발을 가속화하기 위하여 의약품 국제조화회의(International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH)에서는 2009년 비임상시험에 대한 가이드라인을 개정 발표하였다²⁰⁾. 이에 따라 의약품 개발은 동물과 사람에서 유효성과 안전성 정보를 평가하는 단계적 과정이라는 일반 원칙이 적용되므로²¹⁾,

의약품의 안전성을 확인하기 위하여 일반독성시험, 면역독성시험, 생식발생독성시험, 유전독성시험 등 다양한 독성평가가 진행되어야 한다²²⁾.

이 중 유전독성이란 세포 또는 개체수준에서 돌연변이(mutation)를 유발하는 성질을 가리키는 개념에서 현재는 세포유전물질(DNA)에 상해성을 나타내는 성질(genotoxicity)을 포함하는 광범위한 의미로 이용되고 있으며³⁾, 의약품 등의 유전독성시험은 ICH, 경제협력 개발기구(Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD) 및 식품의약품안전청 고시 제 2017년-제71호의 가이드라인에 따라 크게 3가지로 구별되어 수행되고 있다^{1,2)}. 첫 번째, 유전자 돌연변이(gene mutation)를 지표로 하는 것²³⁾ 두 번째, 염색체이상(chromosomal aberration)을 지표로 하는 것²⁴⁾ 그리고 세 번째, DNA에 대한 상해성 또는 수복성(DNA damage

Table XV. Body Weight of Animals (Individual Data, Male)

Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Animal No.	Body weights (g) at the time of Adimistration (No. of animal)		
			1st	2nd	Sacrifice (No. of animal)
Negative control (SDW)	0	1101	35.20	35.12	34.01
		1102	34.30	33.70	34.05
		1103	34.64	34.87	35.28
		1104	34.70	35.38	35.17
		1105	35.75	35.57	35.67
Test substance	500	1201	35.74	35.13	34.37
		1202	33.39	33.09	32.62
		1203	35.30	34.62	34.63
		1204	36.59	35.77	35.64
		1205	34.44	32.59	33.20
Test substance	1,000	1301	35.49	35.63	34.37
		1302	33.84	34.36	34.69
		1303	34.94	34.68	34.31
		1304	35.70	35.04	34.38
		1305	34.06	33.34	33.32
Test substance	2,000	1401	34.89	35.60	34.29
		1402	36.23	36.60	36.62
		1403	35.41	34.12	33.71
		1404	33.78	34.37	34.16
		1405	35.66	34.22	33.51
Positive control (CPA)	70	1501	34.34	33.94	34.51
		1502	35.52	35.18	34.61
		1503	35.13	35.50	34.76
		1504	35.71	35.91	35.69
		1505	35.55	35.57	35.13

SDW: sterile distilled water, CPA: cyclophosphamide monohydrate.

Table XVI. Clinical Signs and Mortalities (Group Summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Clinical signs	Mortality (dead / total)
Male	Negative control (SDW)	0	N	0% (0/5)*
	Test substance	500	N	0% (0/5)
	Test substance	1,000	N	0% (0/5)
	Test substance	2,000	N	0% (0/5)
	Positive control (CPA)	70	N	0% (0/5)

SDW: sterile distilled water, N: normal, CPA: cyclophosphamide monohydrate.

*No. of dead animals/No. of tested animals.

또는 repair)을 지표로 하는 것이 그것이다^{1,21,25)}.
 박테리아를 이용한 복귀돌연변이실험(Ames test, bac-

terial reverse mutation test)은 Salmonella Typhimurium
 LT2 strain에서 유래된 히스티딘 요구성 돌연변이주를

Table XVII. Clinical Signs and Mortalities (Individual Data, Male)

Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Animal No.	Clinical signs
Negative control (SDW)	0	1101	Normal
		1102	Normal
		1103	Normal
		1104	Normal
		1105	Normal
Test substance	500	1201	Normal
		1202	Normal
		1203	Normal
		1204	Normal
		1205	Normal
Test substance	1,000	1301	Normal
		1302	Normal
		1303	Normal
		1304	Normal
		1305	Normal
Test substance	2,000	1401	Normal
		1402	Normal
		1403	Normal
		1404	Normal
		1405	Normal
Positive control (CPA)	70	1501	Normal
		1502	Normal
		1503	Normal
		1504	Normal
		1505	Normal

SDW: sterile distilled water, CPA: cyclophosphamide monohydrate.

활용하여 복귀 돌연변이를 검출하는 시험법이다²³). 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험(in vitro chromosomal aberration assay)은 포유동물 세포를 배양한 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 활용하여 대사활성계 적용 상태 및 비적용 상태에서 염색체형과 염색체분형의 교환(exchange) 및 절단(deletion)이 확인되는 염색체 이상의 계수를 통한 염색체 수나 구조의 변화를 보이는 중기상의 출현 빈도를 조사하여 염색체 이상 유발성 여부를 판정하는 연구이다²⁴). 또한 마우스를 이용한 소핵시험(in vivo micronucleus assay)은 동물의 말초혈액 또는 골수세포를 사용하여 최종적인 유전독성을 판정하는 실험으로 소핵을 가진 다염성 적혈구의 증가 여부를 통해 시험물질에 의한 염색체 이상 유무를 평가하는 방법이다²⁵).

박테리아를 이용한 ChondroT의 복귀돌연변이시험은 히스티딘 요구성인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1537, TA98, TA1535와 트립토판 요구성 *Escherichia coli* WP2uvrA (pKM101) 균주를 사용하였다. 농도결정 시험의 결과, 대사활성계 미적용(-S9 mix)의 TA98 및 TA1537 균주에서 2배 이상의 콜로니의 증가양상이 확인되었고, TA100 균주에서 1.8배의 콜로니 증가양상이 확인되었다. 생육저해는 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 대사활성계 적용(+S9 mix) 모두에서 확인되지 않았으며, 시험물질의 석출도 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 대사활성계 적용(+S9 mix) 모두에서 확인되지 않았다. 본 시험에서는 대사활성계 미적용(-S9 mix)의 TA100 및 TA1537 균주에서 콜로니 수의 농도상관성(농도의존적 증가양상) 및 재현성을 더 정확하게 판단하기 위하여 최고농도를 10,000 µg/plate, 공차 2,000 µg/plate 및 공

Table XVIII. Micronucleus Test in ICR Mice (Group Summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	No. of animal	MNPCE/4000PCEs (Mean±S.D., %)	PCE/(PCE+NCE) (Mean±S.D., %)
Male	Negative control (SDW)	0	5	0.12±0.02	49.68±1.49
	Test substance	500	5	0.08±0.02	51.31±0.71
	Test substance	1,000	5	0.09±0.01	50.46±1.18
	Test substance	2,000	5	0.10±0.03	50.92±1.01
	Positive control (CPA)	70	5	6.40±0.40*	42.58±1.39*

MNPCE: PCE with one or more micronuclei, PCE: polychromatic erythrocyte, S.D.: standard deviation, NCE: normochromatic erythrocyte, SDW: sterile distilled water, CPA: cyclophosphamide monohydrate.

*Significant difference as compared with control (p<0.05).

Table XIX. Micronucleus Test in ICR Mice (Individual Data, Male)

Chemical treated	Dose (mg/kg · B.W./day)	Animal No.	PCE's	MNPCE	Frequency of MNPCE (%)	No. of PCE / NCE	PCE/(PCE+NCE)
Negative control (SDW)	0	1101	4,000	5	0.13	279 / 283	49.64
		1102	4,000	4	0.10	289 / 264	52.26
		1103	4,000	6	0.15	277 / 289	48.94
		1104	4,000	5	0.13	284 / 296	48.97
		1105	4,000	4	0.10	273 / 289	48.58
Test substance	500	1201	4,000	3	0.08	288 / 285	50.26
		1202	4,000	2	0.05	275 / 253	52.08
		1203	4,000	3	0.08	284 / 267	51.54
		1204	4,000	4	0.10	285 / 274	50.98
		1205	4,000	4	0.10	277 / 259	51.68
Test substance	1,000	1301	4,000	3	0.08	279 / 267	51.10
		1302	4,000	3	0.08	288 / 295	49.40
		1303	4,000	4	0.10	279 / 261	51.67
		1304	4,000	4	0.10	268 / 279	48.99
		1305	4,000	4	0.10	274 / 262	51.12
Test substance	2,000	1401	4,000	5	0.13	287 / 278	50.80
		1402	4,000	5	0.13	281 / 264	51.56
		1403	4,000	3	0.08	275 / 281	49.46
		1404	4,000	3	0.08	295 / 287	50.69
		1405	4,000	3	0.08	295 / 271	52.12
Positive control (CPA)	70	1501	4,000	251	6.28	249 / 316	44.07
		1502	4,000	279	6.98	213 / 308	40.88
		1503	4,000	249	6.23	231 / 309	42.78
		1504	4,000	237	5.93	225 / 318	41.44
		1505	4,000	263	6.58	251 / 323	43.73

PCE: polychromatic erythrocyte, MNPCE: PCE with one or more micronuclei, NCE: normochromatic erythrocyte, SDW: sterile distilled water, CPA: cyclophosphamide monohydrate.

비 2를 적용하여 농도 1,000, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000, 10,000(µg/plate)로 실험을 진행하였으며, 그 결과 대사활성계 미적용(-S9 mix)의 TA100 및 TA1537 균주에서 콜로니의 증가양상이 확인되었다. 생육저해는 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 대사활성계 적용(+S9 mix) 모두에서 확인되지 않았으며, 시험물질의 석출도 대사활성계 미적용(-S9 mix) 및 대사활성계 적용(+S9 mix) 모두에서 확인되지 않았다. 시험에서 생육저해는 4 농도 이상에서 관찰되지 않았으며, 5 농도 이상에서 평가가 가능했다.

복귀돌연변이시험에 사용된 TA1535와 TA100은 염기쌍 치환 돌연변이 물질인 hisG46을 포함하고 있어

point mutation을 평가에 사용되는 지표로서²⁶⁾ TA1535에서 복귀돌연변이의 절대 증가는 TA100에서 절대 증가를 초래하는 유사성을 가지고 있다^{27,28)}. 이 두 물질의 차이점은 TA100은 pKM101를 포함하고 있어 복귀돌연변이에 더 민감하게 작용하는 것이며, TA1535는 TA100과 달리 특정 3가지 화학물질(acetaldehyde oxime, 6-mercaptopurine, and 1,3-butadiene)에 더 민감하게 반응한다는 것이다^{29,30)}. 또한 시험에 사용된 TA98균주는 frame-shift mutation을 평가하는 지표로 알데히드기를 가진 유기체가 디클로로메틸 유기체(dichloromethyl group)로 교체될 때 민감하게 반응하는 특징이 있다³¹⁾. ChondroT의 경우 대사활성계 미적용 상태에서 TA100과 TA1535

균주를 이용한 복귀돌연변이실험의 결과가 반대로 나왔으며, 발생한 복귀돌연변이 콜로니 수 또한 음성대조군에 비해 약 2배 수준에 불과하였다. 또한 대사활성계 적용 상태의 모든 균주가 복귀돌연변이 발생에 음성 반응을 보였으므로 추가 시험을 통해 복귀돌연변이 변이원성 보유여부를 판단해야 할 것으로 생각한다.

포유류배양세포를 이용한 ChondroT의 염색체 이상 시험은 CHL에서 유래된 배양세포를 통해 진행되었다. 농도결정시험에서 시험물질의 세포독성은 농도의 존적으로 증가하였다. 세포독성 지표인 상대세포수 증가(RICC) (55±5)%는 -S9 mix에서는 1,218.92 µg/mL, +S9 mix에서는 2,522.53 µg/mL, 24시간 처리에서는 1,234.04 µg/mL이었다. 단시간 처리법을 통한 염색체 이상시험에서 -S9 mix 처리군의 0, 300, 600, 1,200, 1,250 및 1,300 µg/mL 농도에서 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.3 및 0.0%로 관찰되었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다. 또한 +S9 mix의 0, 600, 1,200, 2,400, 2,500 및 2,600 µg/mL에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.3 및 0.3%로 관찰되었으며, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다. 24시간 처리를 통한 염색체이상시험에서 -S9 mix 처리군의 0, 300, 600, 1,200, 1,250 및 1,300 µg/mL 농도에서 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.3, 0.0, 0.0, 0.3 및 0.0%로 관찰되었고 염색체수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0, 0.0, 0.0 및 0.0%로 관찰되었다.

음성대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5% 미만으로 확인되었고, 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10% 이상으로 확인되었다. -S9 mix 처리군과 +S9 mix 처리군 모두 염색체구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도가 단시간처리법, 연속처리법에서 5% 미만이었으므로 본 시험조건 하에서 ChondroT는 CHL/IU세포에 대하여 염색체이상을 유발하지 않는 것이 확인되었다.

포유류 골수세포에 대한 ChondroT의 소핵 유발성 시험은 ICR 마우스를 통해 진행하였다. 본 시험 결과 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 체중 차이가 관찰되지 않았고, 사망동물 또한 관찰되지 않았다. 개체 당 4,000개 이상의 다염성적혈구를 부

검하여 관찰한 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 (0.12±0.02)%이었으며, 500 mg/kg · B.W./day 투여군의 소핵출현빈도는 (0.08±0.02)%, 1,000 mg/kg · B.W./day 투여군의 빈도는 (0.09±0.01)%, 2,000 mg/kg · B.W./day 투여군의 빈도는 (0.10±0.03)%, 양성대조군의 빈도는 (6.40±0.40)%를 나타내었다. 시험물질을 투여한 각 군에서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 증가되는 경향이 없었으며, 통계적으로 유의한 차이 또한 없었다. 세포독성의 지표인 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 음성대조군, 500, 1,000, 2,000 mg/kg · B.W./day, 양성대조군의 순서로 평균 (49.68±1.49)%, (51.31±0.71)%, (50.46±1.18)%, (50.92±1.01)% 및 (42.58±1.39)%이었으며 모든 투여군에서 음성대조군 대비 통계학적으로 유의한 차이가 없었으므로, 본 시험조건 하에서 ChondroT는 수컷 ICR 마우스 골수세포에 대해 소핵을 유발하지 않는 것이 확인되었다.

이상의 결과에서 ChondroT는 In vitro 복귀돌연변이시험 중 대사활성계 미적용(-S9 mix)의 TA98 및 TA1537 균주에서 콜로니의 증가 양상이 확인되었으나, 대사활성계 적용(+S9 mix)의 환경에서 콜로니 증가가 없었고, 포유류 배양세포에서 염색체 이상을 유발하지 않았으며, 포유류 골수세포에 대해 소핵 유발이 없었다. 이는 시험물질 또는 그 대사활성물질이 골수에까지 도달하지 않았을 가능성이 높고^{21,23,32}, ChondroT 구성 약재의 히스티딘 전구 물질 함유로 인한 히스티딘 유래의 TA98, TA1537 균주 콜로니 증가 양상이 의심되므로 향후 ChondroT의 복귀돌연변이 양성 소견에 대해서는 독성 시험기준 해설서 가이드라인에 따라 코멧시험, 다중독성평가 등의^{23,32} 추가연구가 필요할 것으로 생각한다.

References»»»»

1. Ministry of Food and Drug Safety. Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2017-71, Partially Amended and Enforced on Aug 30. [Internet] 2017 [cited 2019 Jan 24]. Available from: URL:https://mfds.go.kr/eng/brd/m_18/view.do?seq=71459&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1.

2. Kim JH, Ahn IY, Noh JY, Park SE, Yi JS, Koh KY, Shon SJ, Lee JK. Recent trend of international guidelines for genotoxicity testing. *The Korean Society of Food, Drug and Cosmetic Regulatory Sciences*. 2016; 11(2):201-9.
3. Hwang SY, Lee JR, Kim SC, Jee SY. A study on genotoxicity test of Hyeong-gae-yeon-gyo-tang extract. *Kor J Herbology*. 2017;22(4):287-300.
4. Akiba K, Onodera K, Kisara K, Fujikura H. Interaction of d-pseudoephedrine with water soluble extracts of Platycodi Radix on acute toxicity. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1979;75:201-6.
5. Lee JE, Nam SY, Yun YW, Lee BJ, Kim DJ. Four-week repeated-dose toxicity study on Pinellia Extract. *Korean J Lab Anim Sci*. 2003;19(3):127-41.
6. Ha AW, Kang HJ, Kim SL, Kim MH, Kim WK. Genotoxicity studies on Corn silk extract containing high Maysin. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2017;46(9): 1045-52.
7. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J*. 2011;9(9). DOI:10.2903/j.efsa.2011.2379.
8. Kim YH, Lee JH. *CheongKangEuiGam*. Seoul:Seongbosa. 2001:315.
9. Choi W, Choi CH, Kim YR, Kim SJ, Na CS, Lee H. HerDing: herb recommendation system to treat diseases using genes and chemicals. *Database*. 2016. DOI:10.1093/database/baw011.
10. Park JU, Kim SJ, Na CS, Choi CH, Seo CS, Son JK, Kang BY, Kim YR. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of ChondroT, a new complex herbal medication. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16:213. DOI:10.1186/s12906-016-1211-0.
11. Kim WI, Park SB, Choi CH, Kim YR, Park IK, Seo CS, Youn DH, Shin W, Lee YM, Choi DH, Kim MR, Lee HJ, Kim SJ, Na CS. Evaluation of anti-inflammatory potential of the new Ganghwaljetongyeum on adjuvant-induced inflammatory arthritis in rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2016;1-10. DOI:10.1155/2016/1230294.
12. Won JY, Jung JW, Na CS, Kim SJ. Analgesic effects of ChondroT in collagenase-induced osteoarthritis rat model. *J Korean Med Rehabil*. 2016;26(3):17-30. DOI:10.18325/jkmr.2016.26.3.17.
13. Jung JW, Bae KJ, Kim SG, Kwak DW, Moon YJ, Choi CH, Kim YR, Na CS, Kim SJ. Anti-osteoarthritic effects of ChondroT in a rat model of collagenase-induced osteoarthritis. *BioMed Central*. 2018;18(1):131.
14. Bae KJ, Jeong JW, Choi CH, Won JY, Kim TG, Kim YR, Na CS, Kim SJ. Antiosteoarthritic effects of ChondroT in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;1-11. DOI:10.1155/2018/8565132.
15. Kim SG, Jeong JW, Lim YH, Kim JH, Na CS, Kim SJ. A study on the anti-condensing effect of ChondroT components. *J Korean Med Rehabil*. 2018;28(2):47-60. DOI:10.18325/jkmr.2018.28.2.47.
16. Oh DR, Kim JR, Choi CY, Choi CH, Na CS, Kang BY, Kim SJ, Kim YR. Effects of ChondroT on potassium oxonate-induced hyperuricemic mice: down-regulation of xanthine oxidase and urate transporter 1. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19(1). DOI:10.1186/s12906-018-2415-2.
17. Guo RH, Kim SJ, Choi CH, Na CS, Kang BY, Kim YR. Inhibitory effects of ChondroT and its constituent herbs on RANKL-induced osteoclastogenesis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19(1): 319. DOI:10.1186/s12906-019-2737-8.
18. Lim YH, Jeong JW, Kim SG, Kim JH, Kim SJ. DRF and single dose oral toxicity study of ChondroT in rat. *J Korean Med Rehabil*. 2018;28(2):61-72. DOI:10.18325/jkmr.2018.28.2.61.
19. Jeong JW, Bae KJ, Kim JH, Choi CH, Na CS, Park MK, Kim YR, Seo CS, Kim SJ. A 13-week repeated oral dose toxicity study of ChondroT in Sprague-Dawley rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19:367. DOI:10.1186/s12906-019-2773-4.
20. Abraham J. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. In: Tietje C, Brouder A, eds. *Handbook of transnational economic governance regimes*. Brill Nijhoff Epub. 2010. DOI:10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897.
21. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. *Guideline: Good Laboratory Practice for Medicine*. 2015:2.
22. Eskes C, Whelan M. *Validating alternative methods for toxicity testing*. New York, NY:Springer Science+Business Media. 2016.
23. OECD. *OECD guideline testing of chemicals No. 471 Bacterial Reverse Mutation Test*. 2001.
24. OECD. *OECD guideline testing of chemicals No. 473 in vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*. 2001.
25. OECD. *OECD guideline testing of chemicals No. 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. 2001.
26. Maron DE, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*. 1983;113:173-215.
27. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*.

- 1975;31(6):347-63.
28. Bae JS, Harold S, Freeman HS. Evaluation of New Metallized direct dyes for mutagenicity using the Salmonella Mammalian mutagenicity assay. *Fibers and Polymers*. 2005;6(3):235-43.
 29. Prival MJ, Zeiger E. Chemicals mutagenic in Salmonella Typhimurium strain TA1535 but not in TA100. *Mutation Research*. 1998;412(3):251-60. DOI:10.1016/s1383-5718(97)00196-4.
 30. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*. 1983;113:173-215.
 31. Robert F, Goto S, Tanabe K, Morita M. Genotoxic activity of chlorinated butenoic acids in Salmonella Typhimurium strains TA98, TA100 and TA104. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998;417(1):31-7. DOI:10.1016/S1383-5718(98)00092-8.
 32. Ministry of Food and Drug Safety. Guidebook: Test standards for toxicity of medicines, etc. [Internet] 2013 [cited 2017 May 31]. Available from: URL:https://mfds.go.kr/brd/m_210/view.do?seq=12255&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=101.