J. Fd Hyg. Safety 11(4), 299 - 306(1996)

6-[(N-2,4-디브로모페닐)아미노]-7-클로로-5,8-퀴놀린디온의 항진균작용 및 안전성 평가

유충규† · 김동현* · 윤여표** · 허문영*** · 권상미 · 정성희

*이화여자대학교 약학대학, *경희대학교 약학대학, **충북대학교 약학대학, ***강원대학교 약학대학*

Evaluation of Antifungal Activities and Safeties of 6-[(N-2,4-Dibromophenyl)amino]-7-Chloro-5,8-Quinolinedione

Chung-Kyu Ryu†, Dong-Hyun Kim*, Yeo-Pyo Yun, Moon-Young Heo*** Sang-Mee Kwon and Sung-Hee Jung**

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750,
**College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701,*
***College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763 and*
****College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

ABSTRACT : 6-[(N-3,4-Dibromophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione(RCK13) was tested for antifungal activities. The MIC values were determined by the two-fold dilution method. The therapeutic potential of RCK13 had been assessed in comparison with ketoconazole and fluconazole against systemic infections with *Candida albicans* in normal mice. RCK13 had ED_{50}, 0.80±0.21 mg/kg but ketoconazole had ED_{50}, 8.00±0.73 mg/kg respectively. And administered RCK13 at the ED_{50} for 14 days improved survival rates as well as ketoconazole. Acute oral toxicity studies of RCK13 were carried out in ICR mice of both sexes. These acute oral toxicities of RCK13 were low and LD_{50} values were over 2,850 mg/kg in ICR mice. The genotoxicities of RCK 13 had been evaluated. RCK13 was negative in Ames test with *Salmonella typhimurium* and chromosomal aberration test in CHL cells. The clastogenicity was tested on the RCK13 with *in vivo* mouse micronucleus assay. RCK13 did not show any clastogenic effect in mouse peripheral blood and was negative in mouse micronucleus assay. These results indicate that RCK13 has no genotoxic potential under these experimental conditions.

Key words □ 6-[(N-2,4-Dibromophenyl)-amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione, antifungal, acute toxicity, chromosomal aberration test, Ames test, micronucleus assay

식품보존제, 화학요법제, 농약등으로 사용할 수 있는 새로운 작용 기전의 항진균제를 개발하기 위하여 quinone 물질을 합성하여 screening한 결과 quinolinedione유도체가 우수한 항진균작용을 가지며 작용기전이 기존의 항진균제와 다르다는 것을 알았다.[1,2] 특히 6-[(N-halophenyl) amino]-7-halo-5,8-quinolinedione(RCKs)이 우수한 항진균작용을 보여주었다.[2] 본 연구자는 RCKs유도체 중 일부의 항진균작용 및 유전독성을 시험한 결과 항진균작용도 우수하고 안전성도 높은 것으로 평가되었다.[3-6] 그래서 RCKs유도체의 항진균성 선도 물질로서의 개발 가능성을 계속 연구하기 위해 6-[(N-2,4-dibromophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione (RCK13, Fig. 1)의 항진균작용 및 안전성을 시험하였다. 항균력은 two-fold dilution method에 의해 MIC를 측정하였다. 또한 생쥐에 *C. albicans*를 전신감염 시킨 후 RCK13을 투여하여 치료율[7,8]을 측정하여 ED_{50}을 구했고, 전신감염에 대한 생명 연장 효과[7,8]를 ketoconazole과 비교하여 측정했다. 그리고 RCK13에 대한 안전성을 평가하기 위해 급성경구 독성,[9,10] Ames test,[11,12] 염색체 이상시험,[13-15] *in vivo* 소핵시험[15,16]을 행했다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

실험 방법

항진균 작용측정

(1) 시약

RCK13을 전보[2]에 보고한 방법대로 합성하여 항진균작용 시험에 사용했다. Mueller-Hinton broth, Sabouraud Agar, BHI(brain heart infusion)는 Difco Co.(USA)에서, DMSO는 Tedia Co.(Japan)에서 구입하였고, 그 밖에 사용된 각종 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

(2) 전보[2]에 보고한 방법에 따라 two-fold dilution method에 의해 MIC를 측정하였다.

사용한 균주는 *C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, A. niger, T. mentagrophytes*이었다. 대조 물질은 fluconazole과 ketoconazole를 사용하였다(Table 1).

(3) 균주 및 동물

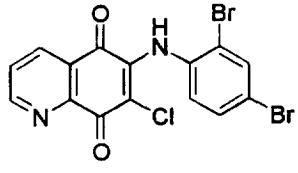
*C. albicans*균주는 경희 의료원내 환자로부터 분리한 임상 분리 균주이고, 실험 동물은 대한 실험 동물 센터로부터 구입한 무게 20 g안팎의 수컷 생쥐를 사용하였다.

(4) ED_{50}치 측정[3,8]

전보[3,5]에 보고한 방법에 따라 RCK13의 농도가 10, 2, 0.5, 0.1, 0.025 mg/kg가 되도록 약물을 제조하여 *C. albicans*의 전신감염 1, 4, 24 시간 후 0.2 m*l*씩 복강 주사하였다. 대조약물로 사용한 ketoconazole 및 fluconazole은 각각 40, 10, 2, 0.5, 0.1 mg/kg의 농도로 제조하여 같은 방법으로 복강 주사하였다. 대조군은 용매(0.25% Tween)을 포함하는 생리식염수만을 복강 주사하고 감염 48시간 후의 생존율로 ED_{50}치를 측정하였다. ED_{50}치는 Probit 법에 의해 계산했다(Table 2).

(5) 전신감염 생쥐에서의 항진균효과[8]

전보[3,5]에 보고한 방법에 따라 전신감염 생쥐에서의 항진균효과를 측정하였다(Fig. 2).



RCK13

Fig. 1. Chemical structure.

급성독성시험[9,10]

전보[3]에 보고한 방법에 따라 SPF ICR계 생쥐를 사육하여, 군 분리 및 투여용량의 설정, 시험물질 조제, 투여, 증상관찰, 체중측정, 부검 및 통계 처리하였다(Table 3, 4, 5).

변이원성 시험[11,12] (Ames test)

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98(유전적 특성 hisD3052, *rfa*, Δ*uvr*B, pkM101), TA100(hisG46, *rfa*,

Table 2. Efficacy of RCK13 against systemic infection with *Candida albicans* in normal mice

Compound	Mean $ED_{50}\pm SD(n\geq 5)$ in normal mice (mg/kg)
RCK13	0.80±0.21
Ketoconazole	8.00±0.73
Fluconazole	10.00±0.43

1) Dose range; RCK13 0.025, 0.1, 0.5, 2.0, 10.0 mg/kg; ketoconazole and fluconazole 0.2, 1.0, 2.0, 10.0, 40.0 mg/kg

2) Drugs were administered intraperitoneally at 1, 4 and 24 hrs postinfection.

3) ED_{50} at 2 days postinfection

Table 1. *In vitro* antifungal activities of Efficacy of RCK13

Comp.	MIC (μg/m*l*)					
	C. albicans	*C. glabrata*	*C. krusei*	*C. parapsilosis*	*A. niger*	*T. mentagrophytes*
RCK13	6.3	6.3	16.0	25.0	3.2	3.2
Fluc	25.0	25.0	25.0	12.5	25.0	25.0
Keto	12.5	12.5	12.5	12.5	25.0	12.5

a) Abbreviation : Fluc; fluconazole, Keto; ketoconazole

b) MIC values were read after 3 days for *Candida* and *Aspergillus* sp., and 7 days for *Trychophyton* in 30°C.

c) Culture media tested was Sabouraud dextrose agar.

d) Fungi tested ; *Candida albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 749, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Aspergillus niger* KCTC 1231, *Trichophyton mentagrophytes* KCTC 6085.

Δ*uvr*B, pkM101)균주는 한국화학연구소로부터 인수하였다. 변이원성 시험 및 S-9 mix 제조는 Maron & Ames[13]법에 따라 전보[11]에서 보고한 방법과 동일하게 행했다. 음성대조물질은 용매인 DMSO를 사용하였고, 양성대조물질로서는 사용한 균주의 유전학적 특성 및 대사활성화법의 적용 여부에 따라 2-aminofluorene(AF), sodium azide(SAZ) 등을 사용하였다(Table 6).

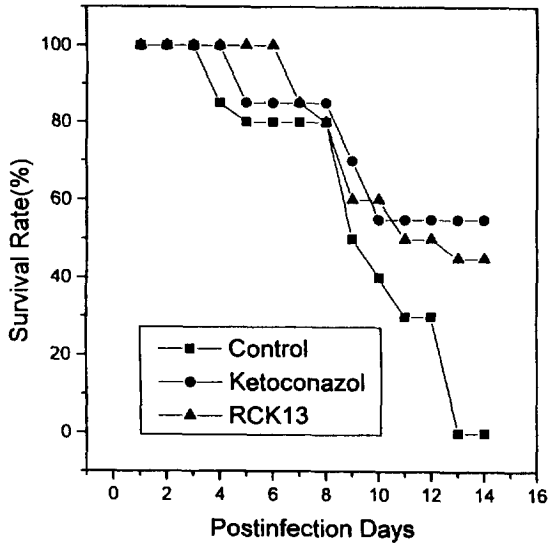


Fig. 2. Survival of *C. albicans* systemically infected mice treated with RCK13 and ketoconazole.
Treatment was begun from 4 days after infection and continued for a total of 14 days. Mice (6 per group) received intravenous therapy once daily. Data for groups given RCK13 at the ED_{50} (0.80 mg/kg/day) and ketoconazole at the ED_{50} (8.00 mg/kg/day). ▲, RCK13 : ●, Ketoconazole : ■, Control(saline with 0.25% Tween 20).

염색체 이상시험[13]

in vitro 항진균작용이 우수한 RCK13에 대해 염색체 이상시험을 했다(Table 7).

(1) 시험물질의 조제 및 농도

시험물질은 투여 직전에 조제하여 사용하였고, 음성대조물질은 용매인 DMSO를 배지용량당 0.5%를 초과하지 않는 범위에서 사용하였으며, 양성대조물질은 mitomycin C (MMC ; Sigma, M-0503)를 사용하였다.

(2) 사용세포 및 배양방법

사용한 포유동물 세포는 Chinese Hamster Lung fibroblast(CHL)로 국립보건안전연구원에서 분양 받아 사용하였다. Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다.[19,21] 배양액은 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco, USA)과 1% Antibiotic-Antimycotic용액(100×용액, Gibco)을 포함한 Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM, Gibco, USA)을 사용하여, 포화습도하에서 5% CO_2를 공급하는 37°C의 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 3~5일 간격으로 0.05% trypsin-EDTA(Gibco, USA) 용액을 이용하여 계대 유지하였다.

(3) 세포독성시험[14]

배양세포의 50% 증식억제농도(IC_{50})를 구하였다. 세포 계대시에 1회용 24 well plate에 1 well당 1×10^4개의 세포를

Table 3. Mortality of male and female ICR mice treated orally with RCK13

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment								Final Mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	2,850	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	5/5	5/5	5/5	1/6
	1,140	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	1/6
	456	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	182	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	73	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
Female	2,850	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	1,140	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	456	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	182	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	73	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
	0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6

Table 4. Clinical signs of male and female ICR mice treated orally with RCK13

Sex	Dosage (mg/kg)	Clinical Signs	Hours after treatment						Days after treatment						
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
Male	2,850	ND[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,140	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	456	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	182	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	73	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	2,850	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,140	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	456	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	182	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	73	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) ND : Not detected

b) - : No clinical signs

Table 5. Changes of body weight in ICR mice treated orally with RCK13

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment			
		0	1	3	7
		Mean±SD (n) (g)			
Male	2,850	26.37±1.78(6)	27.40±1.67(6)	31.45±1.40(6)	31.94±1.23(5)
	1,140	26.12±1.42(6)	27.33±1.86(6)	31.33±1.32(6)	31.26±2.14(5)
	456	26.11±1.23(6)	26.26±2.05(6)	31.66±2.38(6)	31.76±2.06(6)
	182	26.06±1.72(6)	27.10±1.76(6)	31.75±1.96(6)	32.12±1.87(6)
	73	25.14±0.81(6)	26.66±1.80(6)	32.25±1.57(6)	33.65±1.23(6)
	0	25.01±0.89(6)	25.41±1.24(6)	30.83±0.98(6)	33.65±1.19(6)
Female	2,850	20.15±1.14(6)	22.14±1.02(6)	24.83±1.70(6)	24.48±1.30(6)
	1,140	20.29±1.28(6)	21.73±2.01(6)	24.33±2.46(6)	24.74±2.56(6)
	456	21.79±1.20(6)	21.40±1.05(6)	25.25±1.78(6)	25.10±1.91(6)
	182	21.44±1.05(6)	21.67±1.12(6)	24.91±1.24(6)	25.13±1.07(6)
	73	20.73±1.22(6)	21.34±0.91(6)	25.00±1.18(6)	25.73±1.20(6)
	0	20.26±1.02(6)	21.37±1.11(6)	24.98±1.21(6)	25.69±1.04(6)

파종하여 2일간 배양한 후, 한 농도당 2개의 well을 할당하고 시험물질을 DMSO로 희석하여 최고용량을 50 μg/ml로 하여 공비 2로 10단계의 농도를 설정하였다. 11번째 well은 용매 대조군으로 DMSO를 처리하였다. 37°C 항온수조에서 가온한 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS) 0.5 ml로 2회 세척한 후, MeOH로 10분간 고정하고 5% Giemsa (in phosphate buffer pH6.8)로 15분간 염색한 후 현미경으로 관찰하여 50% 세포독성을 보이는 농도를 구하였다.

(4) 염색체이상시험

세포독성시험에서 결정된 IC_{50}를 최고 농도로 하고, 공비 2로 3단계의 농도를 시험농도로 하였다. 또한, 음성대조군과 양성대조군을 두었다. CHL 세포를 60 mm의 petri dish에 1×10^5/5 ml가 되도록 파종하고 3일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간 동안 배양하였다. 각 petri dish에 Colcemid (Gibco, USA)를 1 μM이 되도록 처리한 후, 2시간 동안 더

배양하여 총 검체 처리시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.05% trypsin-EDTA로 15 ml 원심분리관에 세포를 모은 다음 37°C의 저장액(0.075M KCl) 10 ml에 잘 현탁시킨 후 37°C수조에 15분간 방치하고, 고정액(MeOH: AcOH=3: 1)으로 3회 고정시킨 후 공기건조법으로 slide를 제작하여, 5% Giemsa로 30분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 양성대조군으로는 MMC(0.2 μg/ml)를 사용하였다.

(5) 결과의 판정

한 시험농도당 100개의 세포분열중기상을 현미경하에서 관독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상(structural aberration)과 수적이상(numerical aberration)으로 분류하고, 구조이상의 관찰대상은 chromatid & chromosome gap(gap), normal(nor), chromatid breakage(ctb), chromatid exchange(cte), chromosome breakage(csb), chromosome exchange(cse)로 구분했다. 이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류를 각각 기록하였다. CHL 세포의 경우 통상 음성대조군에서 염색체이상을 가진 세포의 출현율이 3%를 초과하지 않았다. 그러므로 이상세포의 평균 출현율이 5% 미만을 음성 (-), 5%이상 10% 미만을 의양성 (±), 10% 이상을

Table 6. Reversion assay of RCK13 using *Salmonella typhimurium*

Sample	Dose (μg/plate)	S-9[a]	HIS+ revertants/plate			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
Control	DMSO	+	65±3	173± 5	19±2	17±1
RCK13						
	220.0	+	82±5	250± 4	20±6	16±3
	74.0	+	85±6	290± 7	22±4	18±2
	24.7	+	55±8	241±10	17±4	14±3
	8.2	+	60±4	243±12	17±2	15±2
	2.7	+	65±3	240±10	19±5	15±3
	220.0	-	70±8	236± 8	17±3	15±3
	74.0	-	79±6	275±12	23±5	19±2
	24.7	-	71±4	233± 9	21±3	16±1
	8.2	-	68±7	240±10	18±5	14±3
	2.7	-	64±6	230±12	17±4	15±2
SA	0.5	-		1250±35		450±20
B(α)p	2.0	+	190±10			
9-AA	50.0	-			250±14	

a) S-9(-) : without S-9 mix ; S-9(+) : with S-9 mix

b) SA(Sodium azide) and B(α)p [Benzo(α)pyrene] were used as positive controls for the corresponding strains

Table 8. The clastogenic effects of RCK13 - induced MNRETs in mouse peripheral blood

Treatment[c]	MNRETs/1000 RETs[a,b]					
	individual value					Mean±S.E.
MMC[d]						
1 mg/kg	20,	22,	21,	19,	14	19.2±1.39
RCK13						
31.25 mg/kg	0,	0,	1,	1,	0	0.4±0.21
62.25 mg/kg	0,	4,	0,	0,	2	1.2±0.80
125 mg/kg	0,	0,	1,	1,	1	0.6±0.24
250 mg/kg	0,	1,	0,	2,	2	0.9±0.31
500 mg/kg	2,	0,	0,	0,	1	0.6±0.40

a) MNRET : micronucleated reticulocytes, RET : reticulocyte

b) MNRETs/1000 RETs of negative control mice treated with olive oil (1.0 ml/25 g, intraperitoneally once) only was 0.8±0.24 after 48hrs treatment

c) MMC(1 mg/kg) and RCK13 were administered to mice intraperitoneally

d) MMC was used as positive control

e) Mice were sacrificed after 48hrs of RCK13 treatment

Table 7. Chromosome aberration test of RCK13 with CHL cells

Compound	Dose (μg/ml)	Treatment time (hrs)	Frequencies of aberrant cells						Cells scored
			gap[a]	ctb	cte	csb	cse	nor	
DMSO			2	0	0	0	0	98	100
RCK13	3.91	24	2	0	0	0	1	98	100
	1.95	24	3	0	0	0	0	97	100
	0.98	24	3	0	0	0	0	97	100
MMC[b]	0.20	24	14	11	10	6	25	35	100

a) gap : chromatid & chromosome gap; ctb : chromatid breakage; cte : chromatid exchange; csb : chromosome breakage; cse : chromosome exchange; nor: normal

b) MMC(Mitomycin C) was used as positive control

양성 (+)으로 판정했다.

생쥐 소핵시험(Mouse micronucleus test)

전보[3,4]에 보고한 방법에 따라 6~8주령의 20~25 g의 수컷 ICR생쥐를 사육하여, 군 분리 및 투여용량의 설정, 시험물질 조제, 투여, 혈액 채취, 도말표본 제작 및 통계 처리[15,16] 하였다. 양성 대조 물질은 MMC를 사용하였다(Table 8).

실험결과 및 고찰

항진균작용

새로운 작용 기전을 갖는 항진균제를 개발하기 위해 RCK13에 대하여 항진균작용을 검색하였다. *C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, A. niger, T. mentagrophytes*균주에 대하여 two-fold dilution method에 의해 측정한 MIC는 대조 물질인 fluconazole과 ketoconazole보다 우수하였다(Table 1). 그리고 현재 임상에 사용되는 ketoconazole과 비교하여 치료제로서의 유효성 여부를 알아보았다. RCK13을 진균 전신 감염 생쥐에 *in vivo* 항진균시험한 결과 ED_{50}가 0.80±0.21 mg/kg으로 대조약물인 ketoconazole의 8.00±0.73 mg/kg보다 우수하였다(Table 2). *C. albicans*를 만성 전신 감염시킨 생쥐에서의 약물의 생명유지 효과를 측정하였다. *C. albicans*를 만성 전신 감염시키고 대조군의 생쥐가 모두 사망할 때까지 유효농도의 약물을 하루에 한번씩 투여하였다. 즉 RCK13은 ED_{50} 0.80 mg/kg와 ketoconazole은 8.00 mg/kg를 투여하면서 생존율을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. RCK13(0.80 mg/kg)의 생존연장율 측정 결과 대조군에 비해 기존의 ketoconazole (8.00 mg/kg)보다 적은 농도에서 유사한 생명을 연장시킴으로써 항진균 효과를 나타내었다. 이러한 생명연장 효과는 AIDS 환자에게서 일어나는 기회성 진균 감염의 치료제로 RCK13을 사용하면 환자의 생명을 어느 정도 연장시킬 수 있을 가능성을 보여주는 것이다. 이상과 같이 RCK13의 항진균작용을 검색한 결과 기존의 fluconazole, ketoconazole보다 우수한 항진균 작용을 나타냈다.

안전성 검색

RCK13에 대해 급성독성시험을 했다. 약 8주령의 생쥐에 RCK13을 경구 투여한 결과 수컷의 최고용량군 1마리가 투여 후 3일에 사망하였다(Table 3). 사망한 동물을 부검한 외관상의 소견에서는 별다른 증상을 나타내지는 않았다. 최고용량군(2850 mg/kg)에서 약물투여 후 RCK13의 생쥐에 대한 1회 경구투여 사망 예는 456 mg/kg 용량군에서도 나타나서 투여용량군에 관계없이 나타나는 것으로 추정되며, 또한 일반 증상에도 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으므로 약물의 독성에 기인한 현상이라고 보기에는 어려워 앞으로 흰쥐에 대한 급성독성 및 아급성독성시험을 추가로 조사하여야 할 것으로 사료된다. 또한 모든 실험동물에서 투여 후 7일까지 약물에 기인한 외관상 임상상태의 변화 및 중독증상은 발견되지 않았다(Table 4).

체중측정 결과 시험물질 투여군은 수컷, 암컷 모두가 대조군에 비해 별다른 차이를 나타내지 않았다. 단 시험물질 투여군과 대조군에서 약간의 사하증상을 보이는 예가 있었다(Table 5). 이상과 같이 RCK13의 생쥐에 대한 급성경구독성시험에서 상기의 일반상태, 체중변화 및 부검 소견 등에는 별다른 독성이 관찰되지 않았으나 앞으로 이들에 대한 아급성 시험 및 흰쥐에 대한 급성독성 시험을 추가로 시행하여야 정확한 독성을 평가할 수 있으리라고 본다.

RCK13에 대해 *Salmonella*를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)을 행했다. 예비독성시험에서 결정된 용매 DMSO에 대한 최고 용해농도 20 mg/plate를 공비 2로 7단계로 설정하여 평판법으로 시험하여 Table 6의 결과를 얻었다. 시험결과 RCK13은 대사활성계 존재 유무와 관계없이 Ames test에서 음성으로 나타났다(Table 6).

RCK13의 염색체이상시험 결과를 각각 Table 6에 나타내었다. 세포독성시험에서 결정된 최고농도인 3.91 μg/ml로부터 공비 2로 3단계의 농도에서 시험한 결과, RCK13에서는 모든 시험농도에서 3% 이하의 염색체이상 빈도를 나타내므로 음성으로 확인되었다. 용매 대조군에서는 약 3%이하의 염색체이상 빈도를 보였고, 양성대조군에서도 염색체이상 유발물질에 의하여 50%이상의 염색체이상을 유발하여 본 시험이 적합하게 실시되었음을 보여주었다. 세포독성시험 및 본시험에서 시험물질의 처리시간은 24시간으로 하였다. 이 시험의 결과, RCK13은 같은 농도에서 염색체이상을 3% 이하로 유발하므로 음성을 나타내서 유전 독성중 염색체이상 유발성은 없는 것으로 생각된다.

RCK13에 대해 생쥐 소핵시험에 의한 유전독성 시험을 행했다. 양성대조물질로 사용한 MMC의 1 mg/kg(i.p.)에서의 MNRETs생성빈도는 투여 후 48시간에서 가장 높은 소핵생성 빈도를 나타낸다.[15,16] 따라서 MMC투여에서 나타난 최대생성 빈도를 나타내는 48시간에 혈액을 채취하여 MNRETs를 관찰하였다. 본 시험에서 RCK13의 투여농도는 예비시험으로부터 최고투여량을 500 mg/kg로 결정하였고, 혈액채취 시간은 48시간에 생쥐 꼬리정맥으로부터 말초혈액을 채취하여 표본을 만들어 관찰하였다. 소핵을 가진 망상적혈구의 출현빈도에 있어서 양성대조군으로 사용한 MMC는 Hayashi 등[15,16]의 데이터와 유사하였으며 용매대조군(올리브유)에서는 일반적인 음성대조군의 소핵생성 빈도를 나타내었다

(Table 8). 5단계의 용량에 걸쳐 시험한 결과 대부분의 용량에서 음성대조군에 비해 유의성있는 증가가 나타나지 않았다. 이상의 결과로서 RCK13은 생쥐 말초혈액에서의 소핵생성빈도가 증가하지 않는 것으로 보아 골수세포의 분화과정에서 염색체손상을 일으키지 않는 것으로 판단된다.

감사의 말씀

이 연구는 95년도 보건복지부 신약개발 지원연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드립니다.

국문 초록

6-[(N-3,4-Dibromophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione(RCK13)의 항진균작용과 안전성을 평가하기 위해 항진균작용시험, 급성독성시험, 변이원성 시험, 소핵시험, 염색체이상시험을 행했다. *C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, A. niger, T. mentagrophytes*에 대하여 측정한 MIC는 대조 물질 fluconazole과 ketoconazole보다 우수하였다. *C. albicans* 전신감염 생쥐에 대해 RCK13의 ED_{50}을 구한 결과 0.80±0.21 mg/kg로 대조약물인 ketoconazole, fluconazole의 8.00±0.73 mg, 10.00 mg±0.43 mg/kg보다 우수한 결과를 보여 주었다. 그리고 RCK13(0.80 mg/kg)는 기존의 ketoconazole(8.00 mg/kg)보다 적은 농도에서 생존율 측정 결과 유사한 항진균 효과를 나타냈다. RCK13의 급성경구독성을 평가하기 위하여 ICR계 생쥐에 2,850 mg/kg를 투여가능 최대용량으로 경구 투여한 후 7일 동안 급성경구독성시험에서 일반 증상, 체중변화 및 부검 소견 등에 유의성있는 다른 독성이 관찰되지 않았으며 LD_{50}치는 약 2,850 mg/kg 이상이라고 평가되었다. RCK13에 대해 *Salmonella typhimurium*(TA98, TA100)을 이용한 *in vitro* 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)을 한 결과에서 음성으로 나타났다. RCK13에 대해 CHL에 대해 염색체이상시험 결과는 음성인 것으로 판단된다. RCK13에 대해 *in vivo* 수준에서 생쥐소핵시험에 의한 유전독성을 평가하였다. RCK13은 생쥐 말초혈액에서의 소핵생성이 나타나지 않아 골수세포의 분화과정에서 염색체손상을 일으키지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bowman, C. M., Porter, T. H., Skelton, F. S. and Folkers, K.: 5,8-Quinolinequinone analogs which inhibit mitochondrial succinoxidase. *J. Med. Chem.* **14**, 206-209 (1973).
2. Ryu, C. K. and Kim, H. J.: The synthesis of 6-(N-arylamino)-7-chloro-5,8-quinolinedione derivatives for evaluation of antifungal activities. *Arch. Pharm. Res.* **17**, 139-144 (1994).
3. Ryu, C. K., Kim, D. H. Yun, Y. P., Heo, M. Y., Lee, B. M., Jang, S. J., Kim, H. J. and Park, Y. M.: The evaluation of *in vivo* antifungal activities and toxicities of 6-[(N-4-chlorophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinediones. *Yakhak Hoeji* **39**, 417-426 (1995).
4. Ryu, C. K., Heo, M. Y., Park, Y. M. and Yun, Y. P. ; The evaluation of genotoxicities of antifungal 6-[(N-halophenyl)amino]-7-chloro-5,8-quinolinediones. *J. Appl. Pharm.* **3**, 182-187 (1995).
5. Park, Y. M., Kim, H. J., Kim, D. H., Lee. I. K. and Ryu, C. K.: The evaluation of *in vivo* antifungal activities of 6-[(N-4-fluoro)amino]-7-chloro-5,8-quinolinediones. *Yakhak Hoeji* **40**, 4-9 (1996).
6. Ryu, C. K., Kim, D. H., Lee. I. K. and Kim, S. J.: 6-[(N-2,3-dichloro)amino]-7-chloro-5,8-quinolinedione treatment of candidiasis in normal mice. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 197-200 (1996).
7. Fisher, M. A., Lee, P. G. and Tarry W. F.: Fluconazole treatment of candidiasis in normal and diabetic rats. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **33**, 1042-1045 (1989).
8. Sugar A. M., Salibian, M. and Goldani, L. Z.: Saperconazole therapy of murine disseminated candidiasis: Efficacy and interaction with amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **38**, 371-373 (1994).
9. Lorke, D. : A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**, 275-287 (1983).
10. Zbinden, G. and Flury-Roversi, M. : Significance of the LD_{50}-test for toxicological evaluation of chemical substances. *Arch. Toxicol.* **47**, 77-99 (1981).
11. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215 (1983).

12. OECD, Data interpretation guides (DIGs) (Provisional). DIG18, *Mutagenicity*, pp58-60 (1984).
13. D. K. Gulati, P. S. Sabharwaland and M. D. Shelby : Tests for the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary(CHO) cells. *Progress in Mutation Research* **5**, 413-426 (1985).
14. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Method* **65**, 55-63 (1983)
15. Hay, R. J., Caputo, J. and Macy, M. L. : ATCC quality control methods for cell lines. 2nd ed. *American Type Culture Collection* (1992).
16. Hayashi, M. : An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.* **120**, 241-247 (1983).
17. Hayashi, M. : The micronucleus test. pp63-79, *Scientist* Tokyo (1991).