

Original Article

세균을 이용한 CP 약침의 복귀돌연변이 시험

황지혜¹, 구자승², 정철^{3*}

¹가천대학교 한의과대학 침구의학과, ²보광한의원, ³남상천한의원

Bacterial Reverse Mutation Test of CP pharmacopuncture

Ji Hye Hwang¹, Jaseung Ku², Chul Jung^{3*}

¹Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University
²Bogwang korean medical clinic, ³Namsangcheon Korean Medicine Clinic

Objectives: This study aimed to evaluate the toxicity of CP pharmacopuncture using bacterial reverse mutation test. **Methods:** To determine the mutagenic potential of CP pharmacopuncture, histidine requiring *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and tryptophan requiring *Escherichia coli* (WP2uvrA, pKM101) strains were used. The negative (normal saline solution) and positive (Sodium azide, 2-Nitrofluorene, 2-Aminoanthracene, 9-Aminoacridine, and 4-Nitroquinoline N-oxide) control groups were used. To determine the dose levels of the main study, a dose range-finding study was conducted.

Results: As a results of the dose range-finding study, the growth inhibition by CP pharmacopuncture was not evident at any dose levels in the absence and presence of metabolic activation. As a results of the main study, the mean number of revertant colonies was less than twice when compared to the negative control values at all dose levels of the CP pharmacopuncture in the presence and absence of metabolic activation, showing no dose-related increase. In the positive control group, the number of revertant colonies was markedly increased by more than twice when compared to the negative control group.

Conclusion: According to the results of this study, CP pharmacopuncture did not show any signs of mutagenic potential.

Key Words : CP pharmacopuncture, capsaicin, toxicity, bacterial reverse mutation test, acupuncture

서론

약침요법은 남상천이 1965년 약업신문에 “경락주입치료”라는 글을 발표하고 1967년 경락 1,2권을 저술함으로써 보급되기 시작하였다¹⁻³⁾. 특히 면역약침(경락약침)은 부작용이 거의 없고, 동통 치료에 탁월한 장점이 있으며, 인체 내부 장기와 모든 조직 및 기관을 임의로 움직일 수 있게 하고, 면역을 증강시

켜 난치병에 대처할 수 있게 하는 우수한 한의 치료 방법으로 알려져 있다¹⁾. 실제 한의 임상에서 면역약침은 거의 모든 분야의 질환에 활용되고 있으며, 특히 근골격계 질환 환자의 급만성 염증 및 동통 치료에 대하여 대표적인 기제(氣劑) 약침액인 V를 비롯하여 OK, TA 약침 등이 사용되고 있다²⁾.

CP약침은 캡사이신 성분을 활용하여 신경포착증, 신경 감각 이상 등의 신경병성 통증 및 근육경결통

• Received : 11 June 2020 • Revised : 29 July 2020 • Accepted : 10 August 2020
• Correspondence to : Chul Jung
Namsangcheon Korean Medicine Clinic, Seoul 06656, Republic of Korea
Email : jcnu2000@hanmail.net

증, 비증 등을 치료하기 위하여 개발된 면역약침으로, V약침에 고추를 추가하여 총 9가지 약물을 주성분으로 한다. 캡사이신은 고추에 함유되어 있는 alkylamide 성분으로 매운 맛을 내며, Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) cation channels에 주요 작용을 나타낸다⁴⁾. 신경병증성 통증⁵⁻⁷⁾, 비뇨기계 질환^{8,9)}, 비만^{10,11)}, 외음전정부통증 증후군¹²⁾, 압¹³⁻¹⁵⁾, 피부 질환¹⁶⁻¹⁸⁾ 등에 효능이 보고되어 왔다.

비록 CP 약침액이 오랜 임상경험과 함께 이미 독성 평가와 효능 연구 및 임상 보고 등을 통하여 안전성이 확인된 V약침¹⁹⁻²³⁾을 기반으로 하고 있지만, 아직 하지 감각저하 환자에 대한 증례 보고 1건²⁴⁾, 단일용량 독성평가²⁵⁾ 외에 CP 약침의 효능과 안전성에 대하여 체계적이고 과학적인 임상 연구나 실험 연구가 수행된 바가 없기 때문에, CP 약침의 효능 및 안전성에 대해 의문이 제기될 수 있다. 또한 한약 및 한약제제의 부작용과 안전성에 대한 우려가 여러 논문에서 제기되어 왔기에²⁶⁻²⁷⁾, 한약 및 한약제제의 안전성 확보는 가장 중요한 연구 중 하나라고 볼 수 있다.

따라서 본 연구는 CP 약침의 안전성에 대한 과학적 근거 확보를 위하여, GLP 독성시험 기관인 (주)바이오톡스텍 (충북, 한국)에 의뢰하여(시험번호: B18664) <비임상시험 관리기준>²⁸⁾, <Good Laboratory Practice Regulation for Non-Clinical Laboratory Studies of Drug>²⁹⁾, <OECD Principles of Good Laboratory Practice>³⁰⁾ 등을 준수하고, 식품의약품안전처 고시 <의약품 등의 독성시험 기준>³¹⁾에 따라 CP약침액의 복귀돌연변이 시험을 실시하여, CP 약침액의 안전성에 대한 근거가 확보됨에 따라 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시험물질: 실험에 사용된 CP약침(45.45 mg/ml)

은 사향(0.1 mg/ml), 옹담(0.075 mg/ml), 우황(0.05 mg/ml), 황금(10 mg/ml), 황백(10 mg/ml), 백두옹(10 mg/ml), 산두근(10 mg/ml), 목향(5 mg/ml), 고추(0.005 mg/ml)의 비율로 혼합된 갈색 투명 액체로, KGMP에 준하는 시설을 갖춘 남상천원외탕전실(용인, 한국)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 제조과정은 다음과 같다. 먼저, 사향 옹담 우황은 50% 주정알코올에 넣고 65 °C, 24시간 동안 중탕 추출한 이후 진공감압 농축기를 사용하여 45 °C에서 알코올 제거를 하였고, 다음으로 그 외 원료들은 주사용정제수와 함께 저온진공추출기를 사용하여 증류한 후에 증류액을 회수하였다. 추출된 것들을 혼합하여 완성된 추출물을 주사용 정제수로 희석하여 Whatman No.2 filter paper, 5µm, 0.45µm, 0.2µm Cellulose acetate filter로 순차적으로 여과한 후, 여과된 약침액에 정제식염(99.9%) 0.9%(w/v)을 첨가하고 약침액의 pH를 적정하였다.

2) 음성대조물질: 음성대조물질로는 생리식염주사액(Lot No. 17166, JW Pharmaceutical Co., Ltd., Korea)을 사용하였다.

3) 양성대조 물질: 양성대조물질로는 Sigma-Aldrich, Co., (USA)로부터 Sodium azide (SA, Lot No. MKBX7529V), 2-Nitrofluorene (2-NF, Lot No. S43858V), 2-Aminoanthracene (2-AA, Lot No. STBD3302V), 9-Aminoacridine (9-AA, Lot No. BCBR5712V), 4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO, Lot No. WXBC1554V)를 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시험 균주 및 배지

(1) 균주

본 실험에서는 Molecular Toxicology, Inc. (MOLTOXTM, Inc., U.S.A.)에서 구입한 Salmonella typhimurium TA98, Salmonella typhimurium TA100,

Salmonella typhimurium TA1535, *Salmonella typhimurium* TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA (pKM101)를 사용하였다. 이 균주들은 가이드라인에서 추천되고 있는 균주로서, 변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용되고 있기 때문에 선택되었다. 입수된 시험균주들은 각각의 nutrient broth 배지에 접종하여 8시간 동안 진탕배양 (37°C, 130 rpm, BS-31, JEIO TECH. CO., LTD., 한국) 후, 시험균주들 각각의 유전자형, 자발복귀변이 콜로니수, 양성대조물질에 대한 감수성 등의 특성을 확인하였다. 이후 균주 현탁액과 DMSO를 1:0.09의 비율로 혼합하여 동결 보관용 튜브에 분주하고 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하였다.

시험에 사용시, 동결 보관된 각 균주를 실온 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고, 진탕배양 (37°C, 130 rpm)하는 전배양 단계를 거친 후, 각 균주의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer (측정파장 660 nm, V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 측정하고, 균수가 1×10⁹ cells/mL 이상인 것을 확인한 후, 시험에 사용하였다.

2) 배지

(1) Nutrient broth 배지

Nutrient broth (BD, U.S.A.)를 칭량한 후에, 소량의 초순수를 넣고 stirrer로 교반하여 용해시켰다. 초순수로 최종농도가 0.8%가 되도록 조제한 후에, 고압증기 멸균하였다.

(2) 최소 glucose 한천평판배지

Bacto agar(BD, USA)를 15 g에 초순수 800 mL를 첨가하여 조제한 후 고압증기 멸균하였다. 멸균 후에, Vogel-Bonner salts 10배 농축액(MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 구연산 1.829 g, K₂HPO₄ 10 g, NaNH₄HPO₄·4H₂O 3.58 g, 초순수 100 mL) 100 mL와 20% glucose (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan) 100

mL를 첨가하여 총 액량이 1 L가 되게 조제하고 플레이트에 분주하여 실온에서 굳혔다.

(3) Top agar

염화나트륨 및 bacto agar (BD, USA)를 칭량한 후, 초순수를 넣어 각각 0.5 및 0.6%가 되도록 조제한 후, 고압증기 멸균하였다. 멸균 후에, 살모넬라균 주용 top agar는 0.5 mM L-Histidine/D-Biotin 혼합액 (Sigma-Aldrich, USA)을, 대장균용 top agar는 0.5 mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, USA)을 10:1의 비율로 혼합하여 제조하였다.

3) 대사활성계의 조제

S9과 Cofactor C를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입한 후, 초저온 냉동고(-80~-60°C)에 보관하였으며, 유효기간 내에 사용하였다. S9은 phenobarbital(30 mg/kg 1회 1일째, 60 mg/kg 3회 2~4일째 복강주사) 및 5,6-benzoflavone(80 mg/kg 1회 3일째 복강주사)로 유도한 7주령 수컷 Sprague-Dawley rat의 간을 사용하였다.

S-9 mix는 1 mL의 조성을 MgCl₂·6H₂O(8 μmol), KCl(33 μmol), Glucose-6-phosphate(5 μmol), NADPH(4 μmol), NADH(4μmol), Sodium phosphate buffer(100 μmol, pH7.4), 정제수 0.275 mL, 및 S9 0.1 mL로 구성하였으며, 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결 보관된 S9 (Lot No.: 18041301 (용량설정시험), 18051102 (본시험)과 Cofactor A (Lot No.: A18041001 (용량설정시험), A18050802 (본시험))를 해동하여 1:9의 비율로 혼합하여 제조하였다.

4) 시험물질 및 양성대조물질 조제

(1) 시험물질

부형제 검토를 실시한 결과, 생리식염주사액(Lot No. 17166)에 용해되었기 때문에 생리식염주사액을 부형제로 선택하였다. 시험물질의 조제는 시험물질

처리일에 실시하였다. 최고용량은 시험물질 그대로를 사용하였으며, 시험물질을 희석하는 경우에는 필요량의 시험물질을 취하여 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 용해시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 부형제로 단계희석하여 조제하였다.

(2) 양성대조물질의 조제

각 균주에 대한 양성대조물질의 용량은 (주)바이오톡스텍(청원군, 한국)의 historical control data에 기초하여 설정하였다. Sodium azide(SA)는 주사용수 (Lot No.: 17006, JW Pharmaceutical Co., Ltd., Korea)에, 2-Nitrofluorene(2-NF), 9-Aminoacridine, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide(9-AA), 4-NQO 및 2-Aminoanthracene(2-AA)는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Lot No.: K49393831, Merck, Germany)에 조제하고, 조제된 양성대조물질은 초저온냉동고 (-80~-60°C, OPR-DFU-657CEV, Operon, Republic of Korea)에 동결 보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

5) 시험 방법

(1) 용량설정시험

본 시험의 용량 설정을 위하여, 용량설정시험을 실시하였으며, 용량설정시험의 최고용량은 시험물질 그대로 (100%)를 처리하는 것으로 하여, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 50.0, 25.0, 12.5 및 6.25%의 시험물질균을 설정하였다. 음성대조균 및 양성대조균을 설정하였으며, 용량설정시험은 본시험과 동일한 방법 및 조건으로 각 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

(2) 본시험

본시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였으며, 대사활성화 비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다. 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하여 2회 실시하였으

며, 각각의 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조균, 양성대조균 및 S9 mix 존재유무를 식별한 번호를 기입하였다.

대사활성화 비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 100 µL를 각 튜브에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 각 균주 현탁액 100 µL를 넣은 후, 20분간 진탕배양 (37°C, 90 rpm)하였다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 2 mL씩 넣어 vortexing 하고, 최소 glucose 한천평판 배지에 증충하여 실온에서 굳혔다.

대사활성화 존재하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 대신에 S9 mix 500 µL를 넣었다. 그 외의 처리는 동일하게 실시하였다.

배양법 및 배양시간의 경우, Top agar가 굳은 후, 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기 (DK-LI020-P, Daiki scientific Co., LTD., Korea)에서 48시간 동안 배양하였다.

잡균에 의한 오염 유무를 확인을 위해, 최고 용량의 시험물질 100 µL, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 S9 mix 500 µL를 튜브에 각각 넣고, 20분간 진탕배양 (37°C, 90 rpm)하였다. 진탕이 종료된 후, top agar를 넣어 vortexing하고, nutrient broth 한천평판배지에 증충하여 실온에서 굳혔다. Top agar가 굳은 후에 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간동안 배양한 후에 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

확인시험은 유전자돌연변이 유발성에 있어, 본시험의 결과에서 재현성이 확보되지 않은 경우와 생육 저해가 확인되지 않은 용량이 4단계 이상 확보되지 않은 경우에 해당하지 않았기에, 실시하지 않았다.

6) 관찰 및 계측

(1) 시험물질의 침전의 관찰

시험물질의 처리시 및 복귀변이콜로니수 계측시에

시험물질의 침전을 육안으로 관찰하고 기록하였다.

(2) 복귀변이콜로니수의 계측

배양이 종료된 후, 복귀변이콜로니수는 자동콜로니 계측기 (ProtoCOL3, SYNBIOISIS, UK)로 자동 계측하였으며, 자동계측이 정확하지 않다고 판단되는 경우에는 육안계수를 실시하였다.

(3) Background lawn의 관찰

생육저해 유무를 확인하기 위하여, 복귀변이콜로니수 계측시, 실체현미경 (45배 배율, SZ61, Olympus, Japan)으로 background lawn의 형성유무를 확인하였다. 생육저해의 판정기준은 음성대조군과 비교하여 복귀변이콜로니수가 현저히 감소하거나, background lawn이 없어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

7) 시험의 성립조건 및 결과의 판정

이 시험에서의 성립조건은 음성 및 양성대조군에서의 평균 복귀변이콜로니수가 historical control data의 범위 내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상이고, 또한 오염이 없어야만 한다고 설정하였다.

본 연구에서의 결과 판정은 1개 이상의 균주에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있어야만 한다고 규정하였다. 결과 평가에 있어서, 복귀변이콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고, 평균치 및 표준편차를 구하였으며, 통계분석은 실시하지 않았다.

결 과

1. 용량설정시험

용량설정시험의 결과, 시험물질인 CP 약침액에 의한 생육저해 및 침전은 대사활성화 비존재하 및 존

재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다. 따라서, CP 약침액 그대로를 본시험의 최고용량 (100%)으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 50.0, 25.0, 12.5 및 6.25%의 시험물질균을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

2. 본 시험 (복귀변이콜로니수의 관찰)

본 시험에서 CP 약침액군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배를 초과하지 않았다. 반면, 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.(Table 1, 4) 그리고, CP 약침액에 의한 생육저해 및 침전은 대사활성화 비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data 범위 내에 속하였고(Table 3), 각 균주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다. 또한, 잠균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다.

고찰 및 결론

식품의약품안전처는 한약(생약)제제의 임상시험 승인을 위한 기본 자료에 있어서, 유효성을 비롯한 약리작용에 대한 비임상 시험자료 외에 단회투여 독성 또는 반복투여 독성, 유전독성, 생식발생독성 등의 독성에 대한 비임상 시험자료들 또한 요구하고 있다^{28,31,32}. 현재 다양한 종류의 약침제제들이 한의 임상에서 사용되고 있고, 여러 문헌들 및 임상적 경험을 근거로 하여 많은 수의 약침제제 개발이 이루어지고 있다. 따라서 이러한 약침제제들 및 약침치료 기술에 대한 과학적 근거 마련을 위하여 유효성과 안전성과 관련된 비임상 및 임상 시험 결과들이 반

드시 필요할 것이다.
 의약품등의 독성시험기준^{31,32}에서 정한 3가지 표
 준유전독성시험법 중 복귀돌연변이시험은 ① TA98,

② TA100, ③ TA1535, ④ TA1537 또는 TA97, 또는
 TA97a, ⑤ TA102 또는 E. coli(WP2uvrA pKM101)
 중 최소 5개 이상의 균주에서 실시해야 하고, 용량

Table 1. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Absence of Metabolic Activation (1st and 2nd Main Studies)

Strain	Test substance	Dose (%)	1 st Main study			2 nd Main study		
			Individual revertant colony counts	Mean	S.D.	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Normal saline injection	0	20 , 20 , 21	20	1	21 , 24 , 24	23	2
		6.25	20 , 17 , 18	18	2	22 , 23 , 23	23	1
	CP	12.5	19 , 17 , 22	19	3	21 , 25 , 22	23	2
		25.0	17 , 18 , 18	18	1	23 , 19 , 22	21	2
		50.0	20 , 19 , 17	19	2	19 , 22 , 24	22	3
		100	18 , 16 , 18	17	1	21 , 21 , 21	21	0
2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	731 , 737 , 732	733	3	720 , 726 , 716	721	5	
TA100	Normal saline injection	0	102 , 101 , 96	100	3	101 , 97 , 98	99	2
		6.25	93 , 99 , 96	96	3	100 , 103 , 109	104	5
	CP	12.5	91 , 100 , 99	97	5	108 , 98 , 100	102	5
		25.0	92 , 98 , 90	93	4	100 , 109 , 112	107	6
		50.0	102 , 96 , 92	97	5	101 , 118 , 115	111	9
		100	99 , 95 , 95	96	2	100 , 102 , 100	101	1
Sodiumazide (SA)	1.5	723 , 738 , 745	735	11	708 , 720 , 723	717	8	
TA1535	Normal saline injection	0	16 , 15 , 15	15	1	13 , 16 , 16	15	2
		6.25	16 , 14 , 17	16	2	18 , 14 , 16	16	2
	CP	12.5	16 , 14 , 15	15	1	16 , 19 , 16	17	2
		25.0	16 , 14 , 13	14	2	13 , 14 , 17	15	2
		50.0	15 , 17 , 14	15	2	16 , 14 , 12	14	2
		100	16 , 16 , 14	15	1	17 , 14 , 15	15	2
Sodiumazide (SA)	1.5	579 , 600 , 572	584	15	585 , 585 , 603	591	10	
TA1537	Normal saline injection	0	10 , 10 , 9	10	1	10 , 10 , 9	10	1
		6.25	10 , 10 , 13	11	2	11 , 10 , 10	10	1
	CP	12.5	13 , 13 , 10	12	2	10 , 12 , 13	12	2
		25.0	14 , 12 , 11	12	2	14 , 11 , 11	12	2
		50.0	9 , 12 , 9	10	2	10 , 8 , 10	9	1
		100	12 , 11 , 12	12	1	9 , 9 , 11	10	1
9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	610 , 583 , 591	595	14	579 , 587 , 588	585	5	
WP2uvrA (pKM101)	Normal saline injection	0	94 , 99 , 101	98	4	106 , 96 , 99	100	5
		6.25	94 , 96 , 95	95	1	114 , 106 , 104	108	5
	CP	12.5	94 , 96 , 89	93	4	103 , 98 , 105	102	4
		25.0	104 , 100 , 103	102	2	101 , 115 , 99	105	9
		50.0	89 , 88 , 95	91	4	109 , 96 , 114	106	9
		100	89 , 94 , 92	92	3	109 , 119 , 108	112	6
4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	0.1	417 , 410 , 414	414	4	543 , 552 , 540	545	6	

S.D.: Standard Deviation

단계 설정은 5단계 이상으로 매 용량마다 3배 이상의 플레이트를 사용해야 한다. 이 연구에서는 CP 약침액의 안전성을 평가하기 위해, 히스티딘 요구성인

살모넬라균(*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*) WP2uvrA pKM101를 사용하여

Table 2. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence of Metabolic Activation (1st and 2nd Main Studies)

Strain	Test substance	Dose (%)	1 st Main study			2 nd Main study		
			Individual revertant colony counts	Mean	S.D.	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	CP	0	36 , 37 , 37	37	1	35 , 36 , 36	36	1
		6.25	33 , 36 , 32	34	2	35 , 35 , 37	36	1
		12.5	36 , 34 , 35	35	1	28 , 29 , 32	30	2
		25.0	33 , 33 , 31	32	1	32 , 30 , 28	30	2
		50.0	34 , 37 , 35	35	2	33 , 30 , 33	32	2
		100	37 , 34 , 36	36	2	33 , 30 , 33	32	2
	2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	381 , 370 , 387	379	9	386 , 394 , 398	393	6
TA100	CP	0	106 , 110 , 100	105	5	110 , 115 , 107	111	4
		6.25	113 , 111 , 110	111	2	126 , 124 , 116	122	5
		12.5	109 , 101 , 107	106	4	124 , 135 , 129	129	6
		25.0	111 , 110 , 118	113	4	123 , 128 , 119	123	5
		50.0	102 , 105 , 101	103	2	129 , 125 , 123	126	3
		100	99 , 94 , 100	98	3	127 , 127 , 122	125	3
	2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	919 , 945 , 960	941	21	942 , 951 , 963	952	11
TA1535	CP	0	13 , 11 , 13	12	1	14 , 14 , 12	13	1
		6.25	13 , 13 , 13	13	0	13 , 15 , 14	14	1
		12.5	11 , 12 , 12	12	1	13 , 14 , 12	13	1
		25.0	15 , 13 , 12	13	2	13 , 17 , 14	15	2
		50.0	16 , 13 , 16	15	2	14 , 13 , 12	13	1
		100	16 , 11 , 12	13	3	12 , 14 , 15	14	2
	2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	175 , 185 , 184	181	6	174 , 183 , 176	178	5
TA1537	CP	0	18 , 20 , 19	19	1	22 , 22 , 21	22	1
		6.25	21 , 18 , 22	20	2	25 , 23 , 22	23	2
		12.5	17 , 20 , 16	18	2	24 , 22 , 20	22	2
		25.0	16 , 16 , 18	17	1	20 , 21 , 25	22	3
		50.0	20 , 18 , 18	19	1	20 , 17 , 19	19	2
		100	19 , 20 , 22	20	2	22 , 19 , 18	20	2
	2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	229 , 231 , 231	230	1	249 , 241 , 242	244	4
WP2uvrA (pKM101)	CP	0	131 , 123 , 128	127	4	140 , 132 , 138	137	4
		6.25	122 , 140 , 135	132	9	136 , 138 , 142	139	3
		12.5	131 , 136 , 144	137	7	139 , 133 , 142	138	5
		25.0	133 , 135 , 134	134	1	142 , 140 , 138	140	2
		50.0	131 , 133 , 133	132	1	131 , 139 , 134	135	4
		100	132 , 134 , 129	132	3	145 , 150 , 147	147	3
	2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	360 , 361 , 359	360	1	447 , 449 , 454	450	4

S.D.: Standard Deviation

상기 조건에서 유전독성평가방법 중 하나인 복귀돌연변이시험을 실시하였다.

본 시험에 앞서 실시한 용량설정시험 결과를 토대

로 하여, 본 시험에서 최고용량을 시험물질 그대로인 100%로 하여, 이하 공비 2로 50.0, 25.0, 12.5 및 6.25% 등의 4가지 용량의 CP약침 처리군을 설정하

Table 3. Historical Control Data

Historical negative control values of revertant colonies						
Strain	S9 mix	N	Mean	± S.D.	Range	
					Lower	Upper
TA100	-	101	86.2	± 10.5	59.0	113.5
	+	101	96.8	± 11.6	69.2	124.5
TA1535	-	100	10.9	± 1.8	5.6	16.2
	+	100	10.2	± 1.6	5.8	14.6
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	100	123.5	± 16.0	81.5	165.5
	+	100	156.3	± 17.3	113.6	199.0
TA98	-	101	18.5	± 2.9	10.3	26.6
	+	101	27.4	± 3.6	16.9	37.9
TA1537	-	100	7.8	± 1.1	4.7	10.9
	+	100	14.7	± 2.4	7.2	22.1

Historical positive control values of revertant colonies								
Strain	S9 mix	Positive control	Dose (µg/plate)	N	Mean	± S.D.	Range	
							Lower	Upper
TA100	-	SA	1.5	101	621.1	± 49.5	487.2	755.0
	+	2-AA	2.0	93	744.7	± 155.2	462.0	1,027.5
TA1535	-	SA	1.5	101	496.1	± 39.1	387.2	605.1
	+	2-AA	3.0	100	137.6	± 21.0	88.7	186.6
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	4-NQO	0.1	86	679.2	± 124.9	327.2	1,031.2
	+	2-AA	2.0	100	499.4	± 52.7	348.1	650.6
TA98	-	2-NF	5.0	101	554.6	± 78.6	359.1	750.1
	+	2-AA	1.0	93	392.3	± 52.3	275.3	509.4
TA1537	-	9-AA	80.0	101	408.1	± 127.6	201.0	615.1
	+	2-AA	3.0	92	186.7	± 28.1	121.4	252.0

Negative control: Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, Tetrahydrofuran, Normal saline injection, etc.

SA: Sodium azide

2-AA: 2-Aminoanthracene

4-NQO: 4-Nitroquinoline N-oxide

2-NF: 2-Nitrofluorene

9-AA: 9-Aminoacridine

N: The total number of bacterial reverse mutation test

S.D.: Standard Deviation

The above historical control values were obtained from the data pooled from Dec. 10, 2015 to May 18, 2017 (4-NQO).

The above historical control values were obtained from the data pooled from Nov. 19, 2015 to May 18, 2017.

The range was calculated by the control limit of X derived from $\bar{X}-\bar{R}-R_s$ value.

였으며, CP 약침액이 용해되는 것이 확인된 생리식 염주사액을 음성대조물질로 사용하였다. 또한 양성 대조군의 경우 일반적으로 사용되고 있는 SA, 2-NF, 2-AA, 9-AA, 4-NQO 를 본 시험에서도 양성대조군으로 사용하였다³²⁾.

본시험 결과, 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였지만, CP 약침액에 의한 복귀변이콜로니수가 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 음성대조군의 2배를 초과하지 않았음이 관찰되었으며, CP 약침액에 의한 생육저해 및 침전은 대사활성화 비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다. 의약품등의 독성시험 기준³¹⁾에서는 대사활성화 비존재하 및 존재하에서 최소 1개의 균주에서 플레이트 당 복귀변이콜로니수가 1개 이상의 농도에서 재현성이 있는 증가가 관찰될 때 양성으로 판정하기 때문에, 본 연구결과는 음성으로 판정된다.

본 연구에 있어서, 용량설정시험 및 본시험의 결과에서 재현성이 확보되었고 생육저해가 확인되지 않은 시험물질의 용량이 4용량 이상이 확보되었으며, 잡균에 의한 오염도가 확인되지 않았기 때문에, 본 연구는 적절하게 실시되었으며 결과에 대한 신뢰성도 확보되었다고 평가된다. 또한 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치는 historical control data 범위 내에 속하였기에 본 시험은 정확하게 실시된 것으로 평가되었다.

이상의 결과로부터, *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537)과 *Escherichia coli*(WP2uvrA(pKM101)) 등의 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험에서 CP 약침은 본 시험 조건 하에서 사용한 시험균주들의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 물질로 판단되었으며, 이전의 단일용량 독성평가²⁵⁾ 결과와 함께 CP 약침의 안전성에 대한 근거를 일부 확보하였다고 판단된다. 하지만, 의약품 등의 허가

등을 목적으로 할 경우 유전독성의 잠재성에 대하여 포괄적 평가가 요구되며, 임상에서의 보다 안전한 사용을 위한 더 많은 과학적 근거 확보가 필요하기에, 본 연구 이외에 추가적으로 다른 종류의 표준유전독성시험법 관련 연구들이 수행되어야 할 것이다.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgment

This work was supported by from the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (MSIT) (No. NRF- 2017R1C1B5076224).

References

1. Jung C, Jung JH, Lee MS. A clinical study of immune pharmacopuncturology. Kyungrak medical publishing co. Chungnam 2011 : 127-33.
2. Nam SC. Immune Pharmacopuncturology. Kyungrak medical publishing co. Chungnam, 2009.
3. Korean Acupuncture & Moxibustion Society. Hanmi Medical Publishing Co., Seoul, 2020.
4. Ramírez-Barrantes R, Córdova C, Gatica S, Rodriguez B, Lozano C, Marchant I, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 expression mediates capsaicin-induced cell death. *Frontiers in physiology*. 2018;9:682.
5. 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.
6. Drake HF. Justins, Randomised double-blind study of topical capsaicin for treatment of post-herpetic neuralgia. *Pain* 1990;5:S58.
 7. Bernstein JE, Parish LC, Rapaport M, Rosenbaum MM, Roenigk Jr HH. Effects of topically applied capsaicin on moderate and severe psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1986;15(3): 504-507.
 8. Maggi CA, Barbanti G, Santicioli P, Beneforti P, Misuri D, Meli A, Turini D. Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturition reflex in humans. *The Journal of urology*. 1989;142(1):150-154.
 9. Silva C, Rio ME, Cruz F. Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical resiniferatoxin, a capsaicin analog: long-term results for the treatment of detrusor hyperreflexia. *European urology*. 2000;38(4): 444-452.
 10. McCarty MF, DiNicolantonio JJ, O'keefe JH. Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health. *Open Heart*. 2015;2(1):e000262.
 11. Westerterp-Plantenga MS, Smeets A, Lejeune MPG. Sensory and gastrointestinal satiety effects of capsaicin on food intake. *Int. J. Obes*. 2005;29(6):682-688.
 12. 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):1549-1553.
 13. Zhang J, Nagasaki M, Tanaka Y, Morikawa S. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia research*. 2003;27(3): 275-283.
 14. 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):1071-1078.
 15. Hail Jr N, Lotan R. Examining the role of mitochondrial respiration in vanilloid-induced apoptosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;94(17):1281-1292.
 16. Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR. Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain*. 1999;81(1-2):135-145.
 17. Ständer S, Luger T, Metzger D. Treatment of prurigo nodularis with topical capsaicin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;44(3):471-478.
 18. Ehsani AH, Toosi S, Seirafi H, Akhyani M, Hosseini M, Azadi R, et al. Capsaicin vs. clobetasol for the treatment of localized alopecia areata. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009;23(12):1451-1453.
 19. Kim HJ, Gwan R, Han JW, Jung C. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of V Yakchim. *J Korea Immuno-Yakchim Soc* 2013;2(1):1-8.
 20. 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.
21. Jung C. In vivo Micronucleus test of V-YAKCHIM in ICR Mice. J Korea Immuno-Yakchim Soc 2013;2(2):5-10.
 22. Lee MS, Jung C. Comparative Studies on the Biological Activity of V and A Yakchim. J Korea Immuno-Yakchim Soc 2015;4(2):37-45.
 23. 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):208-219.
 24. 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. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2019;33(2): 158-162.
 25. Hwang JH, Ku J, Jung C. Evaluation of the Single-Dose Toxicity of Capsaicin Containing Pharmacopuncture in Rats. Journal of Acupuncture Research. 2020;37(3):167-172.
 26. Teschke R, Wolff A, Frenzel C, Schulze J. Review article: Herbal hepatotoxicity—an update on traditional Chinese medicine preparations. Aliment Pharmacol Ther. 2014;40(1):32-50.
 27. Kim EJ, Chen Y, Huang JQ, Li KM, Razmovski -Naumovski V, Poon J, Chan K, Roufogalis BD, McLachlan AJ, Mo SL, Yang D, Yao M, Liu Z, Liu J, Li GQ. Evidence-based toxicity evaluation and scheduling of Chinese herbal medicines. J Ethnopharmacol. 2013; 146(1):40-61.
 28. Korea Food and Drug Administration (KFDA). Good Laboratory Practice (GLP), 2017. <http://www.law.go.kr/admRulInfoP.do?admRulSeq=2100000086689>.
 29. China Food and Drug Administration (CFDA). Good Laboratory Practice for Non-Clinical Laboratory Studies of Drug: Notification No. 34. 2017.
 30. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Principles of Good Laboratory Practice. OECD ENV/MC/CHEM (98)17. 1997.
 31. Korea Food and Drug Administration (KFDA). Toxicity test standard of drugs. 2017.
 32. National Institute of food and drug safety evaluation. Explanation of toxicity test standard of drugs. 2012.

ORCID

황지혜 <https://orcid.org/0000-0002-6304-1972>
 구자승 <https://orcid.org/0000-0003-4365-5587>
 정 철 <https://orcid.org/0000-0002-2522-5279>