

Nitrofurantoin, Nitroimidazole 및 Nitrothiazole 유도체들의 *Salmonella*/Microsome System에 대한 돌연변이 유발성

변우현 · 현형환 · 이세영

(한국원자력연구소 · 분자생물학실)

Mutagenicity of Nitrofurantoin, Nitroimidazole and Nitrothiazole Derivatives on *Salmonella*/Microsome System

Byeon, Woo-Hyeon, Hyung Hwan Hyun, and Se Yong Lee

(Division of Molecular Biology, Korea Atomic Energy Research Institute)

Abstract

Using Ames' *Salmonella*/microsome system, mutagenicity of antitrichomonal nitrofurantoin, nitroimidazole, and nitrothiazole derivatives was examined. Nitrofurantoin, nitrofurantoin, furazolidone, metronidazole, nimorazole, ornidazole, and aminotriazole showed potent mutagenicity on TA100 strain which is a base substitute mutant and contains R-factor plasmid pKM 101 without microsomal enzyme activation. In addition, nitrofurantoin, furazolidone, metronidazole, and ornidazole also induced frameshift mutation in TA98 strain.

緒 論

環境汚染性 돌연변이誘發物質의 검출은 최근 널리 보편화되어 있는 돌연변이유발성-癌유발성의 상관관계 (Ames 등, 1973; McCann 등, 1975; McCann 등, 1976)로 말미암아 더욱 중시되고 있으며 인류가 앞으로부터 벗어나기 위한 방법으로는 이런 突然變異 유발성인 환경오염성 물질과의 접촉을 피하는 것이 지금까지 개발된 가장 확실한 방법중의 하나로 믿어지고 있다.

微生物을 이용한 돌연변이誘發性檢出方法은 다른 system을 사용한 돌연변이검출방법에 비해 여러 利點을 가지고 있기 때문에 여러 학자에 의해 천거되고 있다 (Bridges, 1976; De Serre 등, 1976; Ames 등, 1975). *E. coli*의 tryptophane auxotroph를 이용한 Green 등의 방법 (1976), *Bacillus subtilis*의 rec assay를 사용한 방법 (Shirazu

등, 1976) 및 *Salmonella typhimurium*의 histidine auxotroph를 이용한 방법 (Ames 등, 1975) 등이 微生物을 사용하는 방법의 主流를 이루고 있는데 각각은 다른 system의 장점을 서로가 완전히 포함하고 있지 못하기 때문에 共存하고 있는 실정이다.

그러나, 그중에서 가장 널리 쓰이고 있는, 다른 방법의 檢出範圍를 많이 포함하고 있는 방법이 *Salmonella* system이다. 이는 이 방법이 일찍 開發되어 突然變異 유발성을 연구하는 여러 실험실과 學者들에 의해 여러 각도에서 補完되어 왔기 때문이며, 따라서 여러 공인 기구에 의해 천거되고 있는 것이다.

이 *Salmonella* system은 유발 돌연변이의 種類를 이미 確立되어 있는 base substitute mutant와 frameshift mutant의 response에 따라 구별할 수 있을 뿐 아니라 다소간 정량적인 실험을 수행할 수 있는 등의 長점을 갖고 있는 것이다.

著者들은 抗原虫 및 抗真菌제로 사용되고 있는 nitrofurantoin 및 nitroimidazole 계열의 化合物에 대한 돌연변이 유발성을 Ames의 *Salmonella*/microsome system에 의해 실험했다. Nitrofurantoin 및 nitroimidazole 계열의 化合物들은 일반적으로 그 맹독성에 비해 人體에 미치는 해가 적은 것으로 알려져져 食品添加 防腐劑, 항원충제 및 항진균제 등으로 널리 사용되어 오고 있는데, 최근 이들의 돌연변이 유발성이나 癌유발성에 대한 보고가 점차 많이 발표되고 있다.

이들 化合物에 대한 연구는 食品添加防腐劑로 廣範하게 사용되던 AF-2(2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide)의 *E. coli*에 대한 돌연변이 유발성이 Kada등 (1973)에 의해 발표되었고, 이어 Yahagi 등에 의해 AF-2와 유사한 nitrofurantoin誘導體 27種에 대한 突然變異 誘發性이 일차적으로 *E. coli* rec mutant와 *Salmonella typhimurium* TA 1535 series를 사용하여(1974), 같은 시료를 *S. typhimurium* TA 1535와 TA 100을 사용하여 2차적으로(1976) 각각 발표하고 있다. 이들의 1차 실험중 rec mutant를 사용한 實驗에서 2종을 제외한 25種이 陽性을 나타냈으나 *S. typhimurium* TA 1535 series를 사용한 경우는 모두 陰性을 보여 주고 있었다. 1976년에 발표한 논문에서는 R-factor plasmid를 가진 *S. typhimurium* TA 100을 사용하고 있는데 여기서는 27種 모두가 강한 돌연변이 誘發性을 보여주는 것으로 나타나 있다.

Nitrofurantoin 유도체들에 대한 다른 報告들은 *E. coli* system에서 AF-2의 돌연변이 유발성에 대한 Kondo와 Ichikawa-ryo의 보고(1973), 抗真菌 및 抗原虫 nitrofurantoin 유도체들인 nitrofurantoin, nitrofurazone, furazolidone, nitrofurylacrylamide, furyl-furamide, furpyrinol 및 furamizole의 7種에 대한 Tonomura와 Sasaki의 染色體異常 및 DNA損傷 연구 보고(1973)등이 있는데 전자(前者)의 논문에서는 AF-2(furyl-furamide)의 *E. coli*에 대한 돌연변이

유발성이, 後者의 논문에서는 furamizol, nitrofurylacrylamide, furpyrinol 및 furyl-furamide의 染色體異常 誘發등이 보고되고 있다.

Nitrofurantoin 유도체와 類似한 構造를 가지고 있으면서 毒性이 덜 강한 nitroimidazole 유도체들에 대한 보고로는 Voogd 등에 의한 metronidazole, nimorazole 및 ronidazole의 微生物 *Klebsiella*, *E. coli* 및 *Citrobacter* system들에 대한 돌연변이 유발성(1974), *Salmonella* system에서의 metronidazole체내 代謝物의 돌연변이 誘發성에 대한 보고(Legator등, 1976), 人體 尿中에 존재하는 metronidazole 대사물의 *Salmonella typhimurium* TA 100에 대한 돌연변이 유발성(Speck등, 1976), metronidazole 類似體들의 구조와 돌연변이 유발성 관계(Rosenkranz 등, 1976)등이 발표되고 있다.

本實驗에서 사용되었던 국내사용 7種 nitrofurantoin 및 nitroimidazole 유도체중 지금까지 보고에 나타났던 것은 nitrofurantoin, furazolidone, metronidazole 및 nimorazole의 4種이었고 nifuratel ornidazole 및 aminotrozole의 3種은 未報告된 것들이었다.

材料 및 方法

1. 菌主, 방법 및 S-9 mix :

사용된 菌主는 Ames로부터 분양받은 *Salmonella typhimurium*의 histidine auxotroph로서 이들의 遺傳의 形質과 배양 및 試料 처리 방법은 이미 발표한 바와 동일하였으며(변동, 1975; 변동, 1976) S-9 mix 제조를 위한 liver enzyme induction은 Aroclor 1254를 사용하였다.

2. 試料

수집된 試料 7種은 시중에서 판매되고 있는 抗真菌 및 抗原虫製劑 중 單一주성분만으로 된 것을 구입, 사용하였다. 이들의 化學名은 표 1과 같다.

시료로 사용된 수집 의약품은 nitrofurantoin 제제로서 동서약품의 나이트론, nifuratel 제제는 한일약품의 맥미터, furazo-

Table 1. Chemical name of trichomonacides

Common name	Chemical name
Nitrofurantoin	1-(5-Nitro-2-furfurylideneamino)hydantoin
Nifuratel	5-[(Methylthio)methyl]-3-[(5-nitrofurfurylidene)amino]-2-oxazolidinone
Furazolidone	3-(5-Nitrofurfurylideneamino)-2-oxazolidinone
Metronidazole	2-Methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol
Nimorazole	4-[2-(5-Nitroimidazole-1-yl)ethyl]-morpholine
Ornidazole	α -(Chloromethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol
Aminitrozole	N-(5-Nitro-2-thiazolyl)acetamide

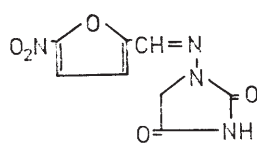
lidone은 국영약품의 조제용 단일 제제를, metronidazole은 성원약품의 조제용 단일 제제를, nimorazole은 삼성제약의 낙소진을, ornidazole은 종근당의 tiberol을, aminitrozole은 광일약품의 tricho-O 질정을 각각 사용했다.

수집된 7종중 nitrofurantoin, nifuratel 및 furazolidone의 3종은 nitrofuran 유도체이며 metronidazole nimorazole 및 orni-

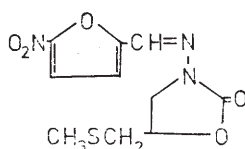
dazole의 3종은 nitroimidazole 유도체, 또 aminitrozole은 nitrothiazole 유도체였다.

結果 및 考察

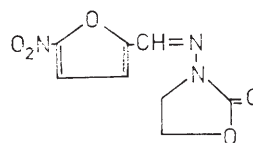
突然變異 誘發性 검사를 위한 예비독성검사에서 定해진 plate당 最高處理濃度는 Table 2 와 같다. 最高處理濃度는 시료와 같이 plate上에 接種된 菌의 total viability가 현저하게 줄어들지 않는 範圍로 잡았다.



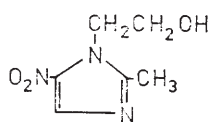
NITROFURANTOIN



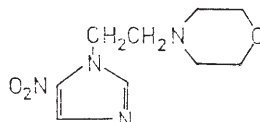
NIFURATEL



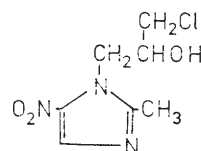
FURAZOLIDONE



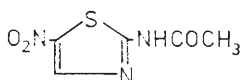
METRONIDAZOLE



NIMORAZOLE



ORNIDAZOLE



AMINITROZOLE

Fig. 1 Chemical structure of mutagenic trichomonacides

Table 2. Maximum concentration of tested compound per plate

Compound	Amount per plate	Solvent used
Nitrofurantoin	1 μ g	DMSO
Nifuratel	1 μ g	"
Furazolidone	0.1 μ g	"
Metronidazole	1mg	"
Nimorazole	500 μ g	"
Ornidazole	50 μ g	"
Aminitrozole	50 μ g	"

여기서 얻어진 最高處理濃度로 各 菌株에 대한 突然變異 誘發性이 實驗되었는데 그 結果는 Table 3에서 처럼 各 시료가 모두 TA100에 대해 강한 돌연변이 유발성을 나타내고 있다. Plasmid를 가진 frameshift mutant인 TA98에 대해서도 nifuratel, furazolidone, metronidazole 및 ornidazole의 4種이 突然變異 誘發性을 나타냈으며 TA100과 꼭 같은 base substitute mutant이나 pKM101 plasmid를 갖지 않는 TA1535菌株에 대해서 돌연변이 유발성을 나타낸 것은 metronidazole, nimorazole, ornidazole의 3種이었다. 抗原虫 제제로 가장 많이 사용되고 있는 metronidazole의 경우는 이미 外國

의 여러 學者들에 의해 많은 突然變異 誘發性 보고가 있어 왔으며 (Legator 등, 1976; Rosenkranz 등 1976; Speck 등, 1976; Voogd 등, 1974) 本 實驗에서도 使用菌株 4 중중 3 중에 대해 양성을 보이고 있다. 한편 이와 類似한 구조를 가지고 있는 ornidazole에 대해서는 外國의 보고는 아직 없으나 本 實驗結果 으히려 metronidazole보다 강력한 돌연변이 유발성을 나타내고 있다. Table 3의 定性實驗에서 陽性을 나타낸 化合物들은 이들이 dose에 따른 response가 있는가를 確認하여 돌연변이 유발성을 確定하였는데 그 結果는 Table 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12와 같다. 모두가 TA100을 使用한 實

Table 3. Mutagenicity of trichomonacides on TA1535, TA100, TA1538 and TA98 with and without microsomal enzyme activation

Compd.	Strain s-9		TA1535		TA100		TA1538		TA98	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Nitrofurantoin	-	-	++++ ^a	++++	-	-	-	-	-	-
Nifuratel	-	-	++++	++++	-	-	++ ^c	++	++	++
Furazolidone	-	-	++++	++++	-	-	+ ^d	+	+	+
Metronidazole	++	++	++++	++++	-	-	+	+	+	+
Nimorazole	+	+	++++	++++	-	-	-	-	-	-
Ornidazole	+++ ^b	++	++++	++++	-	-	++	++	++	++
Aminitrozole	-	-	++++	++++	-	-	-	-	-	-

^a++++, ^b+++ , ^c++ , and ^d+ means formation of over 500, 500 to 300, 300 to 100, and 100 to 0 mutant colonies per plate, respectively, after spontaneous revertants were subtracted.

驗에서 最高處理濃度 以下の 농도에서 dose 질로 確定할 수 있었다.
 에 따라 一定한 돌연변이 菌體의 증가현상 Fig. 1은 突然變異 誘發性이 實驗된 7
 을 보여주고 있기 때문에 돌연변이 유발물 중 化合物의 化學構造式이며 Fig. 2는

Table 4. Dose response of nitrofurantoin on TA100(number of revertant per plate)

Compd. \ Amount/plate	0.2 μ g	0.4 μ g	0.6 μ g	0.8 μ g	1.0 μ g
Nitrofurantoin on TA100	187	357	477	820	1092

Table 5. Dose response of nifuratel on TA100(number of revertant per plate)

Compd. \ Amount/plate	0.1 μ g	0.2 μ g	0.3 μ g	0.4 μ g	0.5 μ g
Nifuratel on TA100	252	532	889	1191	1519

Table 6. Dose response of nifuratel on TA98(number of revertant per plate)

Compd. \ Amount/plate	0.2 μ g	0.4 μ g	0.6 μ g	0.8 μ g	1.0 μ g
Nifuratel on TA98	31	105	148	186	186

Table 7. Dose response of furazolidon on TA100 and TA98(number of revertant per plate)

Compd. \ Amount/plate	0.02 μ g	0.04 μ g	0.06 μ g	0.08 μ g	0.1 μ g
Furazolidon on TA100	158	388	564	755	1033
on TA98	6	13	34	55	75

Table 8. Dose response of metronidazole on TA100(number of revertant per plate)

Compd. \ Amount/plate	40 μ g	80 μ g	120 μ g	160 μ g	200 μ g
Metronidazole on TA100	200	380	562	776	1111

Table 9. Dose response of metronidazole on TA98(number of revertant per plate)

Compd. \ Amount/plate	200 μ g	400 μ g	600 μ g	800 μ g	1mg
Metronidazole on TA98	13	39	61	106	139

Table 10. Dose response of nimorazole on TA100(number of revertant per plate)

Compd. \ Amount/plate	100 μ g	200 μ g	300 μ g	400 μ g	500 μ g
Nimorazole on TA100	120	307	493	902	1105

Table 11. Dose response of ornidazole on TA100 with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate)

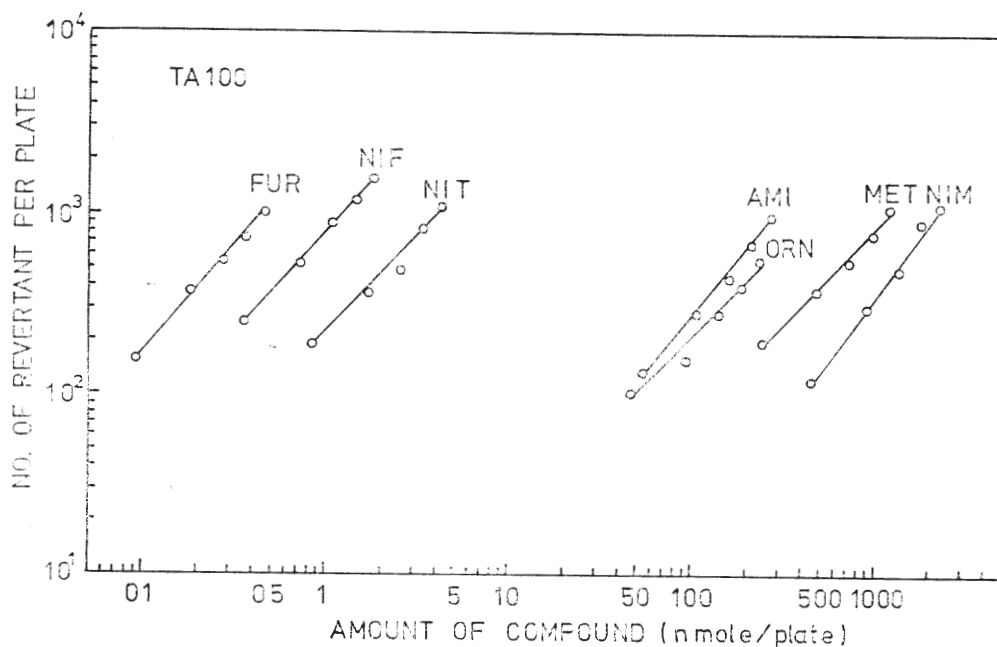
Compd.	Amount/plate	10 μ g	20 μ g	30 μ g	40 μ g	50 μ g
Ornidazole on TA100	(s-9 +)	118	313	363	542	518
	(s-9 -)	103	160	287	401	563

Table 12. Dose response of aminitroazole on TA100(number of revertant per plate)

Compd.	Amount/plate	10 μ g	20 μ g	30 μ g	40 μ g	50 μ g
Aminitroazole on TA100		134	296	457	717	1013

plate당 處理된 化合物의 무게를 n mole로 환산하여 各 試料의 突然變異 誘發程度를 비교한 그림이다. 여기서는 nitrofurantoin, nifuratel, furazolidone의 nitrofuran 誘導體와 metronidazole, nimorazole 및 ornidazole의 nitroimidazole 誘導體의 돌연변이 유발정도가 크게 나누어지는 것을 볼 수 있는데, plate당 100~1000의 revertant

colony가 나타나는 정도의 농도가 nitrofurantoin의 경우는 0.1~5nmole 사이에 分布하는 한편 nitroimidazole의 경우는 같은 정도의 돌연변이 유발능을 나타내는 농도가 50~1000 nmole 사이에 分布하고 있다. 한편 nitrothiazole 誘導體인 aminitroazole의 경우에는 nitroimidazole보다 약간 높은 율을 보여주고 있다.

**Fig. 2** Dose response of mutagenic trichomonacides

Salmonella strain들중 TA100이 가장 감수성이 높은 것으로 추천되고 있는데 이는 여기導入된 R-factor plasmid인 pKM101이 어떤 특수한 酵素 system을 가지고 있어서 突然變異 誘發物質에 대해 더욱 예민한 것으로 믿어지는데 실제로 plasmid가導入되지 않은, 細菌自體의 酵素 system

만을 가진 TA1535나 TA1538 菌株에 直接 突然變異 誘發性을 갖는 化合物이 보다 위험도가 높은 化合物이라고 생각되며 이런 관점에서 metronidazole, nimorazole, ornidazole의 세가지에 대해서는 더욱 각별한 주의가 요구되는 것이다.

摘 要

Nitrofurantoin, nitroimidazole 및 nitrothiadazole 유도체들에 대한 돌연변이 유발성 검사를 Ames의 *Salmonella*/microsome system을 사용하여 실험했다. 수집되었던 7종 nitrofurantoin, nifuratel, furazolidone, metronidazole, nimorazole, ornidazole 및 aminitroazole이 모두 pKM101을 갖고 있는 base substitute mutant인 TA100에 대해 강력한 돌연변이 유발성을 나타냈으며 같은 균주들 중 nifuratel, furazolidone, metronidazole, 및 ornidazole의 4종은 frameshift mutation을 나타냈고 또 metronidazole, nimorazole 및 ornidazole의 3종은 별도로 pKM101 plasmid가 없는 base substitute-mutant인 TA1535에 대해 돌연변이 유발성이 있었다.

引 用 文 獻

1. Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee, 1973. Carcinogens are Mutagens; A simple test system combining liver homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8, 2281-2285.
2. Ames, B.N., J. McCann, and E. Yamasaki, 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31, 347-364.
3. Bridges, B.A., 1976. Short term screening tests for carcinogens. *Nature* 261, 195-200.
4. 변우현, 백상기, 이세영, 1975. Phenylenediamine과 그 유도체들의 돌연변이 유발성(제 1보). *한국미생물학회지* 13, 51-58.
5. 변우현, 현형환, 이세영, 1976. *Salmonella*/microsomal enzyme activation system에서의 농약의 돌연변이 유발성. *한국미생물학회지* 14, 123-134.
6. De Serres, F. J., 1976. Prospects for a revolution in the methods of toxicological evaluation. *Mutation Res.* 38, 165-176.
7. Green, M.H. L. and W. J. Muriel, 1976. Mutagen testing using *trp*⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res.* 38, 3-32.
8. Kada, T., 1973. *Escherichia coli* mutagenicity of Furfurylformamide. *Japan. J. Genetics* 48, 301-305.
9. Kondo, S., and H. Ichikawa-ryo, 1973. Testing and classification of mutagenicity of furfurylformamide in *Escherichia coli*. *Japan. J. Genetics* 48, 295-300.
10. Legator, M.S., T.H. Connor, and M. Stoeckel, 1976. Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of humans and mice. *Science* 188, 1118-1119.
11. McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki, and B. N. Ames, 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 5135-5139.
12. McCann, J., and B.N. Ames, 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 950-954.
13. Rosenkranz, M. S., W. T. Speck, and J. E. Stambaugh, 1976. Mutagenicity of metronidazole: Structure-activity relationships. *Mutation Res.* 38, 203-206.
14. Shirazu, Y., M. Moriya, K. Kato, A. Fu-

- ruhashi, and T. Kada, 1976. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutation Res.* **40**, 19—30.
15. Speck, W.T., A. B. Stein, and H. S. Rosenkranz, 1976. Mutagenicity of metronidazole: Presence of several active metabolites in human urine. *J. of Natl. Cancer Inst.* **56**, 283—284.
16. Tonomura, A., and M. S. Sasaki, 1973. Chromosome aberrations and DNA repair synthesis in cultured cells exposed to nitrofurans. *Japan. J. Genetics* **48**, 291—294.
17. Voogd, C. E., J. J. van der Stel, and J. J. J. A. A. Jacobs, 1974. The mutagenic action of nitroimidazoles. I. Metronidazole, nimorazole, dimetridazole, and ronidazole. *Mutation Res.* **20**, 483—490.
18. Yahagi, T., M. Naga., K. Hara, T. Matsushima, T. Sugimura, and G. T. Bryan, 1974. Relationships between carcinogenic and mutagenic or DNA-modifying effects of nitrofur derivatives, including 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, a food additive. *Cancer Res.* **34**, 2266—2273.
19. Yahagi, T., T. Matsushima, M. Nagao, Y. Seino, T. Sugimura, and G. T. Bryan, 1976. Mutagenicities of nitrofur derivatives on a bacterial tester strain with an R factor plasmid. *Mutation Res.* **40**, 9—14.