

## INFLUENCE OF LOW OR HIGH ENDOTOXIN- SUSCEPTIBLE RABBIT ON PYROGEN TEST

Beom-Jun Lee, Yong-Soon Lee  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
Suwon 440-744, Korea

**ABSTRACT:** This study was carried out to investigate whether the use of the high endotoxin-sensitive or the low endotoxin-sensitive rabbits (New Zealand White strain) are more suited for the pyrogen test regulated by the Korean Pharmacopeia and United State Pharmacopeia. The results obtained were as follows.

1. The febrile responses were increased according to increased endotoxin doses used (i.e., 0.1, 1, 5, 10 ng/ml/kg) and the febrile responses reached to its maximum between 90mins and 120 mins after the intravenous injection of endotoxin.

2. Cefazolin sodium (50 mg/ml/kg) showed 0.6, 0.7, 0.6°C of temperature increase in the high endotoxin-sensitive rabbits, but only 0.1, 0.1, 0°C of temperature increase were demonstrated in the low endotoxin-sensitive rabbits. According to the K.P. regulation, it was pyrogen-positive(reject) when the high endotoxin-sensitive rabbits were used, but it was pyrogen-negative (release) when the low endotoxin-sensitive rabbits were employed.

3. Chloramphenicol sodium succinate (150 mg/ml/kg) showed 0.5, 0.5, 0.5°C of temperature increase in the high endotoxin-sensitive rabbits, but 0, 0.2 0.2°C of temperature increase was demonstrated in the low endotoxin-sensitive rabbits. By the K.P. regulation, it would require a retest if the high endotoxin-sensitive rabbits were used, but the drug would be pyrogen-negative(release) if the low endotoxin-sensitive rabbits were employed.

In reviewing above results, the high endotoxin-sensitive rabbits must be selected for the general pyrogen tests. The use of more sensitive rabbit strain will give high confidence to the test data and it will also increase the safety for materials to be injected to human.

### 서 론

사람이나 동물에 있어서 발열반응을 일으키는 물질로는 endotoxin, chemicals, particulated

materials 등이 있으며, 이러한 발열반응으로 인하여 고열, 임파구의 이동, 보체고정, histamine 유리, 혈관투과성의 변경 등을 야기시킨다(Wolff, 1973; Cooper와 Marbert, 1976). 이중 endotoxin은 gram negative bacteria의 세포막에 있는 lipopolysaccharide complex로서(Westphal, 1975) 열에 안정하고 쉽게 파괴되지 않으며 통상적 방법으로는 잘 여과되지 않는다(Seibert, 1923). 이러한 endotoxin은 정상적인 사람의 gastrointestinal tract 및 피부로 투여 시 발열반응을 나타내지 않으나 정맥주사나 상처조직을 통하여 혈액내에 유입시에는 위험을 초래하게 된다(Bennett와 Cluff, 1957).

Keene 등(1961)에 의하면 endotoxin의 발열 자극의 역치는 사람, 고양이, 말, 토끼에서 유사하나 과량 투여시 토끼보다 사람에서 더욱 많은 열을 발생시키며 독성이 강하다고 하였고 Greisman 등(1969)과 Wolff(1973)은 순수 정제된 endotoxin 1-10 ng/kg이 사람에게 있어서 발열을 일으킨다고 하였다. 이러한 endotoxin은 정맥주사 후 30분 내지 120분 사이에 발열반응을 일으키며 여러시간 오한을 지속시킨다고 한다(Keene 등, 1961). 한편 endotoxin의 연속적 투여는 체내 발열반응을 둔화시키나 여러 주 휴식 후에는 다시 정상으로 돌아오는데 이것은 endotoxin에 대한 tolerance에 기인되며 세망내피계의 활성화에 따라 차이를 가지게 된다(Bennett와 Beeson, 1953).

이러한 endotoxin과 같은 발열성 물질은 주사용 의약품에서 안전성에 대한 많은 문제를 제기하고 있는데 안전성에 대한 평가방법으로 rabbit pyrogen test가 개발되었으며(Seibert, 1923), 1942년 미국약전(USP)에 처음으로 이 시험방법이 규정되어 rabbit에 대한 pseudomonas endotoxin의 pyrogenic effect에 그 기준을 두었다(Varney, 1962). 이러한 rabbit pyrogen test는 실험동물인 토끼에 따라 시험결과에 커다란 영향을 미치게 된다.

따라서 본 실험에서는 대한약전, 미국약전, 항생물질제재기준에 따라 endotoxin에 감수성이 높은 토끼와 감수성이 낮은 토끼를 사용하여 주사제인 cefazolin sodium 및 chloramphenicol sodium succinate을 투여한 후 온도상승을 계산하여 그 결과에 대한 영향을 비교하고자 이 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

종근당(주) 동물실험실에서 퓨리나 펠릿사료 및 수도물을 자유 급여시켜 사육한 체중 1.8-2.0 kg되는 60마리의 건강한 albino 토끼(New Zealand White)를 사용하였으며 사육 및 실험기간의 사육실 환경은 온도  $20 \pm 24^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$ , 조명 12:12시간(오전 7:00~오후 7:00) 주기로 유지시켰다.

### 2. 시험물질 및 기구

Endotoxin 시험용액은 *Escherichia coli*에서 추출한 endotoxin(Control Standard Endotoxin(CSE) Strain 055:B5, Mallinckrodt Co.)을 Limulus Amebocyte Lysate Test(LAL Test)에 합격한 pyrogen-free water에 순차적으로 녹여 m/당 0.1, 1, 5, 10 ng이 되게 하였다. Cefazolin sodium 용액은 LAL Test에 합격한 물에 m/당 50 mg, chloramphenicol sodium succinate 용액은 m/당 150 mg되게 조제하였다. 또한 시험에 사용된 모든 초자기구,

주사기, 주사바늘은 250°C 건열멸균기에서 60분간 멸균하였다. 온도측정은 thermo probe가 연결된 자동온도측정계인 pyrogen-tester type APT 75(Ellab Co.)을 사용하였다.

### 3. 방 법

Endotoxin 감수성 시험 : 시험 3일전에 6시간 동안 시험시와 같이 고정틀에서 자세를 순화시킨 다음 시험 하루전에 절식시켜 시험 당일 직장내에 thermo probe를 70 mm 정도 삽입하고 기계를 작동시킨 후 3시간 동안 12분 간격으로 온도를 조사하여 체온의 범위가 38.0~39.8°C 이내에서 온도변화의 절대차가 0.2°C 이하인 토끼만을 선별하였다. 이들중 endotoxin 농도별로 각 12마리를 배정하여 체중 kg당 1m/을 귀정맥내로 천천히 주사하여 15분 간격으로 온도변화를 12회 기록하여 물질 투여전 온도를 대조체온으로 하여 최고 체온과의 차를 온도상승으로 계산하였다.

Cefazolin sodium과 chloramphenicol sodium succinate의 시험 : Endotoxin 5ng/m//kg을 주사하여 감수성 시험을 마친 토끼중에서 0.6°C 이상의 온도상승을 나타낸 토끼를 감수성이 높은 토끼로 하고 0.6°C 미만인 토끼를 감수성이 낮은 토끼로 하여 각각의 시험물질에 12마리씩 (높은 감수성 토끼(6) : 낮은 감수성 토끼(6)) 총 24마리에 sham test를 하여 이중 온도변화가 0.2°C 이하인 토끼를 각 물질 당 6마리씩(3 : 3) 총 12마리를 선정하여 귀정맥으로 천천히 체중 kg당 1m/을 주사한 다음 endotoxin 감수성 시험에서와 같이 온도상승을 계산하여 대한약전의 규정에 따라 판정하였다.

## 결 과

### 1. Endotoxin 농도에 따른 온도변화

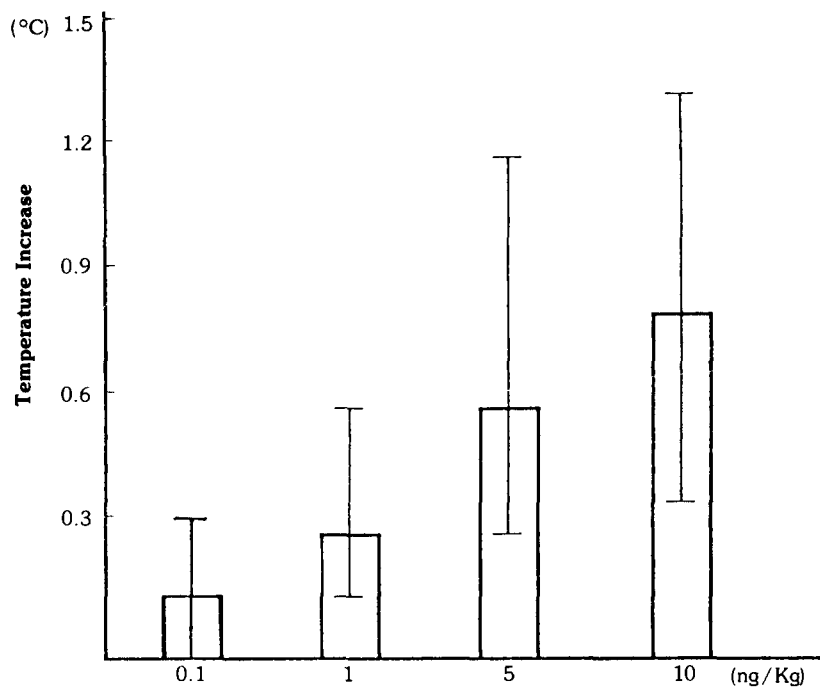
Fig.1에서와 같이 endotoxin 0.1ng/m//kg을 투여한 군에서는  $0.16 \pm 0.10$ , 1ng/m//kg을 투여한 군에서는  $0.28 \pm 0.15$ , 5ng/m//kg을 투여한 군에서는  $0.62 \pm 0.30$ , 10ng/m//kg을 투여한 군에서는  $0.81 \pm 0.31$ 의 온도상승을 나타내어 endotoxin 농도가 증가함에 따라 온도상승이 증가됨을 보였다.

### 2. 각 endotoxin 농도에 있어서 시간에 따른 온도변화

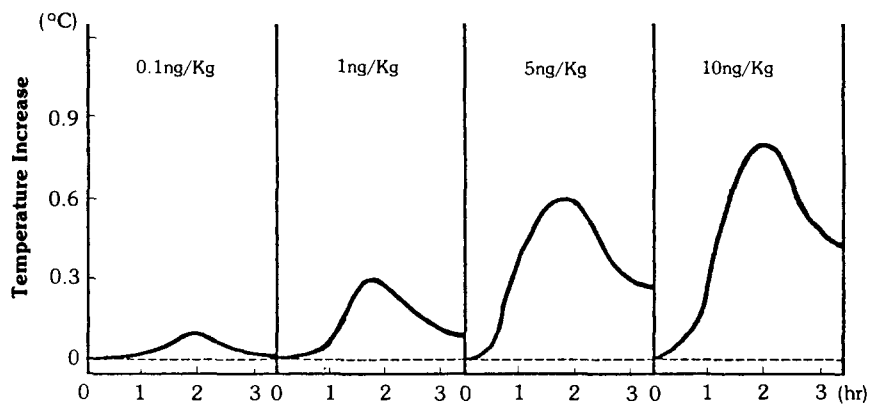
Fig.2에서와 같이 모든 투여군에서 endotoxin 투여 후 60분과 120분 사이에 가장 높은 온도상승을 나타냈으며 이후 감소하는 추세를 보였고 회복의 정도는 endotoxin 농도가 증가함에 따라 느리게 나타났다.

### 3. Cefazolin sodium 투여후의 온도변화

Table 1에서와 같이 endotoxin에 대해 감수성이 높은 토끼(0.7, 0.9, 1.3)에 있어서 cefazolin sodium 50mg/m//kg 투여 후 대조체온과 최고 체온과의 차는 0.6, 0.7, 0.6(총 1.9)의 온도상승을 나타내어 발열성 물질 양성으로 주사제로서는 부적합하다고 판정되었다. 그러나 Table 2와 같이 endotoxin에 대해 감수성이 낮은 토끼(0.2, 0.4, 0.3)에 있어서는 0.1, 0.



**Fig. 1** The temperature increase of rabbits administered intravenously with 0.1, 1, 5, 10 ng of endotoxin per kilogram of body weight.



**Fig. 2.** The febrile responses of rabbits administered intravenously with 0.1, 1, 5, 10ng of endotoxin per kilogram of body weight.

**Table 1.** The temperature increase of high sensitive rabbits administered intravenously with cefazolin sodium 50mg per kilogram of body weight.

Test Solution	Temperature Increase(°C)			
	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3	T-T.I.
Endotoxin (5ng/Kg)	0.7	0.9	1.3	2.9
Cefazolin sodium	0.6	0.7	0.6	1.9

T-T.I.: total temperature increase

1, 0(총 0.2)의 온도상승을 나타내어 발열성 물질 음성으로 주사제로서 적합하다는 판정이 되었다.

#### 4. Chloramphenicol sodium succinate 투여후의 온도변화

Table 3에서와 같이 endotoxin에 대해 감수성이 높은 토끼(0.8, 0.7, 1.1)에서 chloramphenicol sodium succinate 150 mg/m//kg 투여후 0.5, 0.5, 0.5(총 1.5)의 온도상승을 나타내어 재시험으로 판정되었으며, 반면 Table 4에서와 같이 endotoxin에 대해 감수성이 낮은 토끼(0, 0.3, 0)에서는 0, 0.2, 0.2의 온도상승을 나타내어 발열성 물질 음성으로 주사제로서 적합하다고 판정되었다.

**Table 2.** The temperature increase of low sensitive rabbits administered intravenously with cefazolin sodium 50 mg per kilogram of body weight

Test Solution	Temperature Increase(°C)			T-T.I.
	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3	
Endotoxin (5ng/Kg)	0.2	0.4	0.3	0.9
Cefazolin sodium	0.1	0.1	0	0.2

T-T.I.: total temperature increase

**Table 3.** The temperature increase of high sensitive rabbits administered intravenously with chloramphenicol sodium succinate 150 mg per kilogram of body weight

Test Solution	Temperature Increase(°C)			T-T.I.
	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3	
Endotoxin (5ng/Kg)	0.8	0.7	1.1	2.6
Chloramphenicol sodium succinate	0.5	0.5	0.5	1.5

T-T.I.: total temperature increase

**Table 4.** The temperature increase of low sensitive rabbits administered intravenously with chloramphenicol sodium succinate 150mg per kilogram of body weight

Test Solution	Temperature Increase(°C)			T-T.I.
	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3	
Endotoxin (5ng/Kg)	0	0.3	0	0.3
Chloramphenicol sodium succinate	0	0.2	0.2	0.4

T-T.I.: total temperature increase

## 고 찰

Endotoxin의 농도를 증가시켰을 때 온도상승이 농도에 비례하였는데 Keene 등(1961)은 사람 및 토끼에 있어서 endotoxin의 농도를 30 ng/kg과 200 ng/kg을 투여하였을 때 농도에 따라 현저한 온도상승이 있었다고 보고하였으며, Favorite와 Morgan(1942)은 *Salmonella typhosa*로부터 정제한 endotoxin 0.1  $\mu$ m을 사람에게 주사시 현저하게 체온상승을 일으켰다고 하였다. 또한 1955년 Landy와 Johnson은 *Salmonella typhosa* 0901로부터 분리한 endotoxin은 토끼에서는 2 ng으로 체온상승을 가져왔으며 사람에게서는 10~40 ng으로 발열을 일으킨다고 하였다. *Escherichia coli*에서 추출한 endotoxin 1 ng/ml/kg을 토끼에 투여시 발열을 일으키지 않는다고 하며 10 ng 이상/ml/kg은 일정한 정도의 온도상승을 나타낸다고 한다(Hochstein 등, 1973).

Pyrogen에 대한 감수성은 사람, 토끼에서 높고 개나 침팬지에서 낮으며 시간에 따른 온도변화는 Keene 등(1961)의 결과와 일치하였다. 이러한 시간에 따른 온도의 변화는 endotoxin의 량이 증가하면 할수록 회복시간이 늦어진다고 한다(Bennett와 Beeson, 1950).

대한약전에 의하면 3마리의 토끼를 사용한 발열성 물질 시험에서 대조체온에 비해 최고 체온이 0.6°C 이상의 토끼가 2두 이상이면 발열성 물질 양성으로 주사제로서 부적합하다고 하며 0.6°C 이상의 토끼가 1두 혹은 3두의 체온상승의 합계가 1.4°C를 초과하면 재시험으로 판정된다. 또한 미국약전에는 3마리의 토끼중 1마리도 0.6°C 이상의 체온상승이 없거나 3두의 체온상승 합계가 1.4°C를 초과하지 않을 때 발열성 물질 음성이라 하며 1마리 이상이 0.6°C 이상의 온도상승을 보였을 때 혹은 3마리의 온도상승합이 1.4°C를 초과할 때 5마리를 가지고 다시 시험하여 앞의 3마리를 포함하여 8마리의 토끼중 4마리 이상이 0.6°C 이상이거나 8마리의 체온상승합이 3.7°C를 초과할 때 발열성 물질 양성이라 한다(US Pharmacopeia National Forumulary, 1985). 본 실험에서의 결과는 같은 시험물질에 대하여 토끼의 발열성 물질의 감수성에 따라 그 판정이 상이하게 다르며 이러한 감수성은 토끼의 유전적 형질 및 species에 따라 많은 차이를 보인다.

따라서 rabbit pyrogen test에서 주사제 의약품의 안전성을 높이고 시험결과에 대한 신뢰성을 높이기 위해 endotoxin에 대해 감수성 있는 토끼의 선택이 무엇보다도 필요하다고 사료된다.

## Endotoxin에 대해 감수성이 높은 토끼 및 낮은 토끼가 발열성시험에 미치는 영향

이범준·이영순

서울대학교 수의과대학

**요약** : New Zealand White strain의 토끼를 가지고 대한약전 및 미국약전에 따라 발열성 물질시험을 하였다.

1. endotoxin 0.1, 1, 5, 10 ng/ml/kg을 주사시 농도에 따라 체온상승이 증가하였고 대체로 시간에 따른 열반응은 주사후 60분 내지 120분 내에 최고체온을 나타내었다.

2. cefazolin sodium 50 mg/ml/kg 주사시 endotoxin에 감수성이 높은 토끼에서는 0.6, 0.7, 0.6의 체온상승으로 부적, 감수성이 낮은 토끼에서는 0.1, 0.1, 0의 체온상승을 나타내어 적합으로 판정되었다.

3. chloramphenicol sodium succinate 150 mg/ml/kg 주사시 endotoxin에 대해 감수성이 높은 토끼에서 0.5, 0.5, 0.5의 체온상승으로 재시험, 감수성이 낮은 토끼에서 0, 0.2, 0.2의 체온상승으로 적합이라고 판정되었다.

위의 결과로 rabbit pyrogen test로 주사제의 발열성을 검정할 때는 endotoxin에 대한 감수성이 있는 토끼를 선정하는 것이 매우 중요하게 생각된다.

### 참고문헌

1. Bennette, I.L. and Beeson, P.B. (1950); The properties and biologic effects of bacterial pyrogens, *Medicine*, 29: 365-400.
2. Bennette, I.L. and Beeson, P.B. (1953); Studies on the pathogenesis of fever 1. The effect of injection of extracts and suspension of uninfected rabbit tissue upon the body temperature of normal rabbits, *J. Exp. Med.*, 98: 477-492.
3. Bennette, I.L. and Cluff, L.E. (1957); Bacterial pyrogens. *Pharmacol. Rev.*, 9: 427-475.
4. Cooper, J.F., Levin, J., and Wagner, H.N. (1971); Quantitative comparison of *in vitro* and *in vivo* methods for the detection of endotoxin, *J. Lab. Clin. Med.*, 78: 138-148.
5. Favorite, G.O. and Morgan, H.R. (1942); Effects produced by intravenous injection in man of toxic antigenic material derived from *Ebethela typhosa*: clinical, hematological, chemical and serological studies, *J. Clin. Invest.* 21: 589-599.
6. Greisman, S.E. and Hornick, R.B. (1969); Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131: 1154-1158.
7. Hochstein, H.D., Elin, R.J. and Cooper, J.F. (1973); Further developments of limulus amebocyte lysate test, *Bull. Parenteral Drug Assoc.*, 27: 139-148.
8. Keene, W.R., Silberman, H.R. and Landy, M. (1961); Observation on the pyrogenic response and its application to the bioassay of endotoxin, *J. Clin. Invest.*, 40: 295-301.
9. Landy, M. and Johnson, A.G. (1955); Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. IV. Endotoxic properties of the purified antigen (21937), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90: 57-62.
10. Pharmacopeia of the United States of America (1985); pyrogen test, pp. 1181-1182, the United States Pharmacopeial convention, Inc., Washington.
11. Seibert, F.B. (1923); Fever-producing substance found in some distilled water, *Am. J. Physiol.*, 67: 90-104.
12. Varney, R.F. (1962); The intruders-pyrogens, *Bull. Parent. Drug Assoc.*, 16: 6.

13. Westphal, O. (1975); Bacterial endotoxins, *Int. Arch. Allergy appl. Immun.*, 49: 1.
14. Wolff, S.M. (1973); Biological effects of bacterial endotoxin in man, *J. Infect. Dis.*, 12 (suppl): s259.
15. 대한공정서협회 : 대한약전. pp.1154-1155, 세문사, 서울.