

천연형 인성장호르몬 DA-3002의 단회 및 13주 반복투여독성연구

김옥진* · 강경구 · 안병옥 · 백남기 · 이순복 · 김원배 · 양종익
동아제약(주) 연구소

Single and 13-week Repeated Dose Toxicity Study of DA-3002, An Authentic Recombinant Human Growth Hormone

Ok Jin KIM, Kyoung Koo KANG, Byoung Ok AHN, Nam Gi BAIK,
Soon Bok LEE, Won Bae KIM and Junn Ick YANG

Research Laboratories, Dong-A Pharm, Co., Ltd., 47-5, Sanggal-ri,
Kiheung-up, Yongin-gun, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received July 26, 1994; accepted August 17, 1994)

Abstract—This study was conducted to examine DA-3002, a biosynthetic human growth hormone, for its acute and subacute toxicities in mice and rats. The drug was administered subcutaneously and orally at a dose level of 1.0, 3.0, 8.9, 26.7 or 80.0 IU/kg once for single dose toxicity and given subcutaneously at a dose level of 0.34, 1.7 or 8.4 IU/kg daily for 13 weeks to investigate repeated dose toxicity. In the acute toxicity study, doses up to 80 IU/kg had no adverse effect on the behavior or body weight gain. Pathological examinations revealed no abnormal changes which could be attributed to toxic effect of DA-3002. In the subacute toxicity study, the growth hormone was tolerated well in both mice and rats. No drug related deaths occurred and all animals appeared to be normal throughout the dosing period. Increases in body weight gain, food utilisation and absolute organ weights were observed in the rats in the high dose group. Mild changes in the blood chemical parameters were also seen in the treated groups. Histopathologically, however, no abnormal changes were observed in any organ. The changes noted during the treatment periods presumably represent exaggerated pharmacological effects of the growth hormone, and no observed adverse effect level (NOAEL) was considered to be more than 8.4 IU/kg/day.

Keywords □ DA-3002, recombinant human growth hormone, single and repeated dose toxicity, mouse, rat.

DA-3002는 동아제약(주) 연구소에서 유전자재조합기술을 사용하여 생산된 천연형 인성장호르몬(rhGH)으로서 사람에서의 인성장호르몬과 동일한 아미노산배열로 구성되어 있다. 인성장호르몬은 뇌하수체전엽에서 분비되는 191개의 아미노산으로 구성된 펩타이드호르몬의 일종으로 간세포표면 수용체와 결합하여 IGF-1의 분비를 자극시켜 골, 연골 등의 성장을 촉진시키며, 또한 근육의 지방분해촉진 및 단백질합성촉진 등의 대사작용을 나타낸다(Beck 등, 1957). 1958년 Raben이 성장호르몬이 결핍된 소아에서 hGH의 성장촉진효과를 보고한 이래 사체의 뇌하수체에서 추출한 호르몬은 성장호르몬결핍성

왜소증의 치료제로 사용되었으나 공급부족과 다른 이물질의 혼입과 같은 오염문제 및 장기투약한 일부환아에서 Creutzfeldt-Jakob 증후군에 의한 사망이 보고되면서 1985년 이후 거의 모든 국가에서 사용이 중지되었다(Preece, 1986). 1970년대 후반이래로 유전공학의 계속된 발전은 methionyl-hGH(somatrem)의 합성과 대량생산을 가능케 하였으며(Goeddel 등, 1979), 1981년 이후 임상에 널리 사용되고 있다(Kaplan 등, 1986). Somatrem의 풍부한 임상사용경험에 의해 많은 학자들은 somatrem이 특별한 부작용없이 뇌하수체유래의 인성장호르몬과 동등한 약효를 나타낸다고 보고하였다(Kaplan 등, 1986; Flodh, 1987; Milner 등, 1987). 그러나 천연형과의 구조적 차이에 기인하여 성장반응의 둔화와 관련될 수 있는

* To whom correspondence should be addressed.

항체발현에 대한 보고가 종종 발표되면서(Tyllstöm 등, 1986; Milner 등, 1987) 현재는 천연형 rhGH(somatropin)의 사용이 점차 증가되고 있는 추세이다. 본 연구에서는 천연형 rhGH인 DA-3002에 대한 안전성평가의 일환으로 설치류에 단회 및 반복투여시 발현될 수 있는 독성을 평가하고자 하였다.

실험방법

본 시험은 의약품 등의 독성시험기준(국립보건안전연구원, 1988)에 준하여 실시되었다.

시험물질

시험물질인 DA-3002는 본 연구소 생물공학연구실에서 공급받아 사용하였으며, 표준역가 4 IU/vial인 백색괴상 동결건조품으로 Lot No.는 TS-9304이며, 순도는 99% 이상이였다. 투여전에 DA-3002는 증류수로 4 IU/ml되게 녹인 후 각 시험의 투여용량에 맞게 매체대조물질인 glycine phosphate buffer용액으로 희석하여 사용하였다. 대조군에는 매체대조물질을 투여하였다.

시험동물 및 사육환경

본 연구에는 ICR(CD-1)계 마우스와 SD계 랫드로서 특정병원체부재(SPF) 동물을 사용하였다. 모든 동물은 4주령에 중국 B & K사로부터 구입하여 1주 이상 검역 및 순화사육을 거쳐 외견상 건강한 동물을 시험에 사용하였다. 시험은 동아제약(주) 연구소 SPF동물 사육구역내에서 실시하였으며, 마우스는 폴리카보네이트제 사육상자에, 랫드는 스테인레스철제 사육상자에 각각 분리수용하였다. 시험기간 중 온도 21~25°C, 습도 40~70%, 시간당 16~18회 환기, 12시간(7:00~19:00) 조명 등의 사육환경을 자동으로 조절, 유지하였다. 사료(Purina, 방사선멸균제)와 음수(자외선멸균수도수)는 도살전 뇨검사시기를 제외하고는 자유섭취시켰으며, 깔개는 베타칩(Northeastern Products Corp.)을 고압증기멸균하여 사용하고 주 1회 교환하였다.

단회투여 독성시험

단회투여 독성시험에서는 마우스와 랫드 2종에 대해 경구 및 피하의 2개 경로로 시험을 실시하였다. 투여량 설정은 동계열 의약품의 급성자료를 참고로 하여 임상 예정용량의 1200배인 80 IU/kg을 최고용량군으로 하고 이하 공비 3으로 감소시켜 1, 3, 8.9, 26.7, 80.0 IU/kg 등 총 5단계 용량으로 설정하였으며, 대조군에는 glycine phosphate buffer를 투여하였다. 각 군의 동물수는 암수 각 5마리로 하였다. 경구투여시험에서는 마우스 및 랫드용 존데를 사용하여 각 용량군에 맞게 5 ml/kg의 액량으로 단회 투여하였으며, 피하투여 시험에서는 5 ml/kg의 액량을 배부 피하에 단회 투여하였다. 투여 후 경구투여시험에서는 14일간, 피하투여 시험에서는 7일간 일반상태, 체중변화를 관찰하고 부검을 실시하였으며, 육안적 병변이 인정된 경우 병리조직학적검사를 실시

하였다. 일반증상관찰시 투여당일은 투여전 1회 및 투여 후 8시간까지 수차례, 투여 익일부터 6일 및 13일까지는 매일 2회(오전, 오후) 관찰하여 이상이 있을 경우 소정 양식에 기록하였다.

13주 반복투여 독성시험

반복투여시험에서의 투여기간은 13주로 하였으며, 마우스와 랫드 2종에 대해 예정임상경로인 피하투여시험을 실시하였다. DA-3002의 투여량은 임상예정용량의 5, 25 및 125배인 0.3, 1.7 및 8.4 IU/kg을 각각 저, 중, 고용량군 등 3개 용량군으로 설정하였고, 매체인 glycine phosphate buffer를 대조군으로 하였다. 마우스를 이용한 시험에서는 선발된 암수 각 72마리를 군간 체중이 고르게 군당 18마리씩 4개군으로 분리하였으며, 투여 후 4주에 각 군의 암수 각 6마리를 도살하여 혈액검사와 뇨검사를 실시하고 남은 동물들은 투여종료시인 13주에 도살하여 혈액검사, 뇨검사 및 병리학적 검사를 실시하였다. 랫드를 이용한 시험에서는 선발된 암수 각 60마리를 각 군당 15마리씩 총 4개군으로 분리하여 투여 후 4주 및 13주에 각 군당 5마리 및 10마리를 도살하여 마우스시험에서와 동일한 검사를 실시하였다. 투여개시시 마우스의 평균 체중은 수컷 23~27 g, 암컷 22~25 g 정도였으며, 랫드는 수컷 130~160 g, 암컷 110~140 g 정도였다. 시험기간을 통해 각 동물의 폐사 및 일반상태는 매일 오전 중에 관찰하여 소정의 양식지에 기록하였다. 시험기간 중 체중은 주 1회 투여개시전에 실시하였으며, 사료 및 음수량은 주 1회 측정하였다. 사료 및 음수소비량은 사육상자별로 측정하였으며, 랫드 마리당 1일 소비량으로 표시하였다. 모든 동물에 대해 투여개시전, 투여종료직전에 모든 동물의 좌우안에 대해 안검사용 검안경으로 각막, 결막 및 홍채 등의 이상유무를 관찰하였다. 중간도살 및 최종도살시 ethyl ether로 마취한 동물의 복대동맥에서 혈액을 채취하였고, 채취한 혈액은 EDTA와 구연산나트륨 등 항응고제를 사용하여 각각 혈액학적 검사 및 혈액응고시간(prothrombin time, PT) 측정을 실시하였으며, 잔여혈액은 응고시킨 후 혈청을 분리, 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 혈액학적 검사에서는 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 혈색소(Hb), 혈소판(PLT), 헤마토크리치(Ht), 평균혈구용적(MCV), 평균혈구혈색소량(MCH), 평균혈구혈색소농도(MCHC) 등에 대해 혈구자동측정기(Minos vet, Minos)를 이용하여 측정하였으며, 혈액을 슬라이드에 도말하여 Giemsa염색 후 광학현미경으로 혈구의 형태를 관찰하고 백혈구 백분율을 측정하였다. 또한 PT는 자동응고시간측정기(Automated Coagulation Laboratory, Instrumentation laboratory)를 이용하여 측정하였다. 각 동물로부터 채취한 혈액은 1500 rpm×15분의 조건으로 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 혈액자동분석기(Spectrum, Abbott)를 이용하여 alanine transaminase(ALT, Transamination-LDH법), aspartate transaminase(AST, Transamination-MDH-LDH법), albumin

(ALB, BromCresol Green법), alkaline phosphatase(ALP, pNPP hydrolysis법), total bilirubin(Evelyn-Malloy법), glucose(Hexokinase법), total protein(Biuret법), calcium (O-cresolphthalein법), urea(BUN, Urease법), sodium (Electrode법), chloride(Electrode법), potassium(Electrode법), phosphorus(Molybdate법) 등에 대해 검사를 실시하였다. 노검사 및 골수검사를 위해 투여 4주 종료 후에 마우스는 각 군의 암수 각 6마리, 랫드는 암수 5마리를 각각 마우스 및 랫드용 metabolic cage에 한마리씩 분리수용하여 약 16시간 채뇨하였다. 또한 투여종료시인 13주에도 각 군의 암수 각 10마리 이상을 동일한 방법으로 16시간 채뇨하였다. 채취한 뇨에 대해서 외관과 뇨량을 관찰한 후 뇨검사용시험지(multistix, Ames)를 사용하여 pH, 단백(protein), urobilinogen, bilirubin, 포도당(glucose), 키톤체(ketone body), 잠혈(blood), 침사(sediment)에 관해 검사하였다. 평가는 뇨검사용 시험지의 평가표를 이용하여 잠혈, bilirubin, 단백 등의 항목은 평가표에 의해 평점하였으며, urobilinogen은 <2, 2, 4, 8 Ehrlich units/dL을 각각 -, +, ++, +++ 등으로, 키톤체는 <5, 5-15, 40, 80, 160 mg/dL을 각각 -, ±, +, ++, +++ 등으로, 포도당은 <100, 100, 250, 500, 1000 mg/dL을 각각 -, ±, +, ++, +++ 등으로 평점하였다. 골수검사를 위해 투여종료 후 부검한 각 동물의 흉골을 절제하여 10% 중성 포르마린액에 10일 이상 고정하였으며, 고정한 표본을 다시 탈회용액(10% formic acid in 10% formalin)에 넣어 탈회시켰다. 탈회한 표본 중 대조군과 고용량군에 대해 병리조직학적 검사를 실시하였다. 투여종료 후 모든 동물을 ethyl ether로 마취시켜, 외관의 이상유무를 관찰하고 채혈 후 방혈치사시켰다. 각 동물에 대해 부검을 실시하여 체강과 각 실질장기에 대해 육안적 검사를 하였다. 각각의 병변을 관찰, 기록한 후 뇌, 심장, 폐장, 비장, 간장, 신장, 부신, 흉선, 고환, 난소 등을 주위조직과 분리하여 각 장기의 절대중량을 측정하였으며, 체중에 대한 상대중량도 산출하였다. 또한 중량을 측정한 장기와 갑상선, 흉골, 위, 소장, 대장, 장간막임파절, 식도, 기관 등의 장기를 10% 중성 포르마린용액에 1주 이상 고정시킨 다음 통상적인 방법을 거쳐 조직절편을 제작하였으며, hematoxylin-eosin염색을 한 후 광학현미경 병리조직학적 검사를 실시하였다. 병리조직학적 검사는 대조군과 고용량군에 대해 실시하였으며, 고용량군에서 이상이 발견된 경우 무영향량을 얻기위해 중간 및 저용량으로 검사를 확대하였다.

통계학적 분석

단회투여 독성시험에서 반수치사량을 구할 경우 DA-TOX(동아 데이터베이스시스템)을 이용하여 Probit법에 의해 산출하였으며, 그 외 본 시험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적 분석은 Bartlett test로 분산검정을 실시하여 등분산일 경우 일원배치 분산분석법, 부등분산일

경우 Kruskal-Wallis법으로 유의성검정을 하였다. 일원배치 분산분석법에서 유의한 경우 Scheffe법을, Kruskal-Wallis법으로 유의성이 인정되는 경우에는 Distribution-free multiple comparison법에 의해 대조군과 각 투여군간의 다중비교를 실시하였다. 분산검정의 통계처리는 SAS(Statistical Analysis System) 통계 프로그램을 이용하였다.

실험결과

단회투여 독성시험

폐사율 및 반수치사량

시험기간 중 대조군 및 전체투여군의 암수 모든 동물군에서 사망에는 발견되지 않았다. 마우스 및 랫드에서 경구 및 피하로 단회투여시 DA-3002의 반수치사량은 모두 80 IU/kg을 넘는 것으로 나타났다.

일반증상

시험기간 중 대조군 및 모든 용량군의 암수동물에서 약물의 영향으로 판단되는 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다.

체중변화

마우스에서의 경구투여시험결과 3.0 IU/kg 투여군의 수컷의 3일째 평균체중이 대조군에 비해 유의하게 높았으며, 랫드를 이용한 경구투여시험에서 수컷의 고용량군인 26.7 IU/kg 투여군이 투여 후 7일과 14일에, 최고용량군인 80.0 IU/kg 투여군은 투여 후 14일에 각각 대조군에 비해 유의한 체중증가억제를 나타내었다. 그 외의 시험군에서는 시험기간 중 약물의 영향으로 인정될 만한 유의한 변화는 없었다(Table I).

부검소견

약물투여 후 7일 및 14일에 실시한 부검결과 각 군의 암수 각 동물에서 시험물질의 영향으로 판단되는 육안적 병변은 없었다. 육안적 병변이 관찰되지 않았으므로 병리조직학적 검사는 실시하지 않았다.

13주 반복투여 독성시험

임상증상

투여기간 중 마우스시험에서 고용량군(8.4 IU/kg) 암컷에서 투여 11일에 1예와 28일에 1예가 각각 폐사되었으며 수컷 대조군에서 투여 45일에 1예 폐사예가 관찰되었다. 랫드를 이용한 시험에서는 관찰기간 중 폐사동물이 나타나지 않았다. 투여기간 중 관찰된 일반증상으로는 조모(rough hair coat), 주사부위 핥음(licking or scratching the injection site), 랫드에서의 비공주위의 암적색착색 등의 증상이 대조군을 포함하여 각용량군에서 불규칙하게 소수예씩 관찰되었다.

체중변화

투여기간 중 각 시험군에 따른 랫드의 평균체중변화는 Fig. 1, 2와 같다. 수컷에서는 고용량군에서 투여 후 약 4주부터 대조군에 비해 서서히 평균체중의 증가를 나타

Table I. Group mean body weights in acute toxicity study of DA-3002 in mice and rats

Animal species	Route of administration	Group Sex	Day	A 1 Control ^c	A 2 1.0 ^b	A 3 3.0	A 4 8.9	A 5 26.7	A 6 80.0
Mice	p.o.	Male	0	26.5±1.2	26.5±1.8	29.6±1.2	27.2±2.0	27.9±1.3	27.4±0.5
			3	28.7±0.9	28.9±1.7	31.4±0.9 ^c	29.8±1.2	30.4±1.1	29.2±0.8
			7	31.7±1.0	31.8±1.6	34.3±0.8	32.3±0.7	32.9±1.0	31.3±1.8
			14	34.2±1.3	34.2±1.3	36.8±0.8	35.0±1.0	31.3±1.8	33.2±2.2
		Female	0	25.0±1.8	25.7±1.6	26.1±2.0	25.0±1.0	25.3±1.7	24.9±1.4
			3	26.5±1.7	26.3±1.3	27.0±2.2	26.6±1.5	26.0±1.6	26.8±1.9
	s.c.	Male	0	29.1±0.5	28.8±9.2	29.5±1.5	29.1±0.6	28.0±1.9	29.7±2.2
			3	30.8±1.9	30.1±2.4	31.4±1.7	30.3±0.8	29.8±1.9	30.4±2.6
			7	31.4±2.3	30.5±2.8	32.6±1.7	30.9±1.2	31.3±2.0	31.3±2.2
		Female	0	27.9±1.7	26.5±1.3	27.2±1.6	27.6±1.5	27.7±1.3	27.5±1.4
			3	27.9±2.7	26.5±1.5	27.6±2.5	27.2±1.8	27.9±1.1	28.2±2.1
			7	28.3±3.0	27.3±1.7	27.9±2.6	27.7±1.4	28.4±1.0	28.6±2.1
Rats	p.o.	Male	0	146.9±7.3	154.8±9.2	150.1±15.4	148.8±12.1	138.1±11.7	150.3±9.2
			3	196.5±13.1	200.5±8.1	186.5±5.3	192.8±9.0	180.7±16.1	195.7±9.5
			7	228.1±13.9	233.2±7.2	216.0±5.9	220.6±11.3	206.7±18.4 ^c	222.9±6.8
			14	287.6±14.4	287.6±6.4	268.4±7.8	266.4±16.2	253.8±18.8 ^c	253.0±8.0 ^c
		Female	0	124.1±6.8	122.5±3.9	128.6±6.7	124.4±11.8	120.4±6.2	119.7±6.0
			3	158.3±8.1	156.5±5.7	151.0±8.8	160.1±13.4	155.4±11.5	153.0±8.0
	s.c.	Male	0	180.4±14.1	180.0±10.6	193.8±11.2	173.0±12.5	185.3±14.5	186.3±12.0
			3	202.9±16.5	204.6±16.8	215.4±11.1	196.0±13.9	209.1±18.0	216.4±15.1
			7	214.6±8.8	228.0±17.1	238.2±12.4	218.8±16.4	236.8±18.3	239.6±15.7
		Female	0	158.0±5.8	154.8±3.0	156.2±11.6	155.9±8.1	154.5±5.0	153.3±10.9
			3	167.9±6.7	164.8±3.5	170.4±12.1	165.1±8.2	162.5±8.5	166.4±11.8
			7	178.8±9.2	174.8±3.4	177.6±12.4	173.0±7.2	169.4±8.8	174.0±9.6

Each value represents mean±S.D., ^a; Glycine phosphate buffer, ^b; DA-3002 (IU/kg), ^c; Significantly different from control (p<0.05).

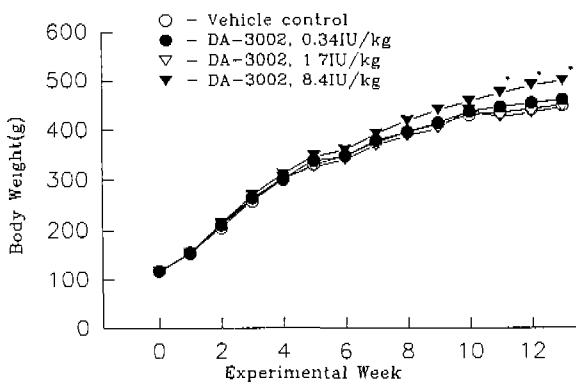


Fig. 1. Body weight changes in male rats treated subcutaneously with DA-3002 for 13 weeks.

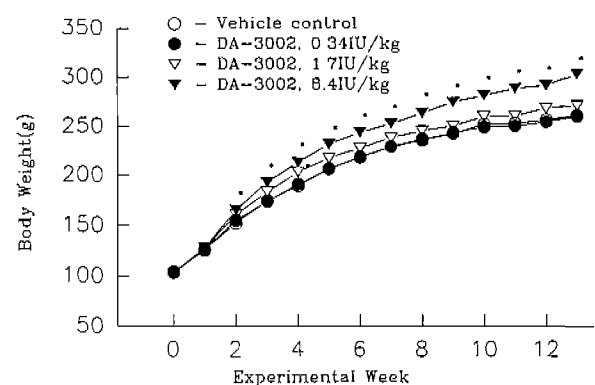


Fig. 2. Body weight changes in female rats treated subcutaneously with DA-3002 for 13 weeks.

내었으며, 투여 후 11주 이후에는 대조군에 비해 유의한 체중증가를 나타내었다(p<0.05). 암컷에서도 고용량군에

서 투여 후 2주부터 관찰종료시까지 대조군에 비해 유의한 체중증가가 관찰되었다(p<0.05). 마우스를 이용한

시험에서도 이와 유사한 결과를 얻었다. 즉 수컷 및 암컷 마우스에서 시험기간 중 모든 DA-3002 투여군이 대조군과 유사하거나 약간 높은 평균체중을 나타내었으며, 암수 공히 고용량군(8.4 IU/kg)에서는 투여개시 후 2~4 주부터 대조군에 비해 유의한 체중증가를 나타내었다. 그 외에 각 구간 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

사료섭취량과 음수량의 변화

시험기간 중 각 군의 사료섭취량측정결과 랫드에서 투여 후 2주부터 암수동물 모두에서 대조군에 비해 고용량군에서 섭취량의 증가양상을 나타내었으나 투여 후 5주의 암컷 고용량군에서의 유의한 증가외에(p<0.05) 통계적 유의성은 관찰되지 않았다(Table II, III). 마우스 시험에서는 각 구간 사료섭취량의 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 음수량측정결과에서도 시험물질에 의한 영향으로 볼 수 있는 음수량의 변화는 나타나지 않았다.

안과학적 검사

4주 중간도살군 및 13주 투여군의 암수 동물에서 안과학적 이상소견이 관찰되지 않았다.

노검사성적

투여 4주 및 13주에 실시한 노검사 결과 랫드의 각 용량군에서 용량의존적으로 뇨량의 증가가 관찰되었으나 유의성은 없었으며, 뇨 pH의 증가경향을 볼 수 있었다(Table IV, V). 또한 4주 투여군의 DA-3002 투여동물과의 13주 투여군의 대조군 및 약물투여동물에서 관찰된 침사에 대한 현미경검사결과 주된 침사성분은 인산암모늄 및 인산마그네슘 결정인 것으로 나타났다. 투여 4주 및 13주에 대조군을 포함 전 용량군에서 뇨단백의 증가가 관찰되었으며 투여 13주에는 중, 고용량의 암수동물에서 뇨단백의 증가경향을 나타내었다. 마우스를 이용한 시험에서는 투여 4주에 암컷의 고용량군에서 뇨침사의 증가경향을 나타내었고, 13주 투여군에 있어서는 암컷 고용량군에서 뇨단백이 증가되었으며, 수컷 고용량군에서 뇨침사의 증가가 관찰되었다.

혈액학적 검사

4주 중간도살 동물과 13주 최종도살동물에서의 혈액

Table II. Food consumption of male rats during subcutaneous administration of DA-3002 daily for 13 weeks (grams/day)

Week	Dose(IU/kg)	0	0.34	1.7	8.4
1		21.8±0.8	20.2±1.9	20.9±2.0	19.3±5.5
2		23.2±2.4	24.5±1.6	25.4±1.5	25.5±1.5
3		23.5±2.7	25.9±2.5	23.4±3.0	27.6±3.2
4		22.0±7.8	26.2±2.4	26.1±2.4	28.3±2.9
5		24.6±2.1	27.4±4.3	24.1±2.4	27.3±1.4
6		29.6±0.6	28.7±3.1	30.8±3.2	31.2±2.0
7		26.8±1.6	30.2±5.3	28.2±2.3	29.9±1.7
8		26.9±2.1	30.8±5.7	27.6±1.4	31.1±1.4
9		23.6±2.1	25.9±5.5	25.1±2.8	28.5±1.9
10		25.8±2.4	30.6±4.4	27.5±1.7	30.9±2.2
11		21.8±6.6	24.0±5.1	26.7±3.7	27.3±2.5
12		28.1±2.5	27.3±2.4	27.5±2.8	31.8±2.7
13		27.2±2.1	26.6±3.7	25.1±2.7	30.4±2.7

Each value represents mean±S.D.

Table III. Food consumption of female rats during subcutaneous administration of DA-3002 daily for 13 weeks (grams/day)

Week	Dose(IU/kg)	0	0.34	1.7	8.4
1		16.5±1.5	16.3±2.3	17.8±1.0	17.7±1.4
2		16.4±2.6	17.9±1.2	16.8±2.3	19.2±1.0
3		17.7±1.5	17.5±1.9	17.3±2.7	15.3±3.5
4		16.1±2.6	17.9±2.0	19.0±2.0	18.3±3.6
5		17.3±0.5	18.4±0.7	19.2±2.3	22.0±2.6 ^a
6		16.4±2.2	17.9±1.9	20.8±4.4	20.3±3.0
7		18.6±2.3	20.1±1.4	18.6±1.7	19.8±0.9
8		19.0±2.2	19.1±1.6	20.4±2.9	21.3±2.0
9		17.9±2.8	19.0±2.1	18.0±4.3	20.2±1.3
10		19.3±3.9	20.4±2.9	20.7±1.5	20.9±1.4
11		16.4±1.5	16.4±3.2	15.6±3.8	18.7±2.0
12		18.4±1.7	19.4±2.0	20.5±2.6	21.3±4.3
13		18.7±2.7	19.6±1.6	19.2±1.9	20.1±6.6

Each value represents mean±S.D.

^a; Significantly different from control (p<0.05).

Table IV. Results of the urinalysis in rats given DA-3002 subcutaneously once a day for 4 weeks

Dose (IU/kg)	Sex	n	Vol.	pH					Prot.			Glu.	Blood	Ketone	Bil.	Urobil.	Sediment ^a				
				6	6.5	7	7.5	8	-	+	++						-	-	-	-	±
0	M	5	4.54±1.0	5	0	0	0	0	2	3	0	5	5	5	0	5	5	5	0	0	0
0.34		5	5.22±2.3	1	4	0	0	0	4	1	0	5	5	5	0	5	5	2	0	3	0
1.7		5	5.76±0.8	2	3	0	0	0	5	0	0	5	5	4	1	5	5	1	0	3	1
8.4		5	6.38±2.1	3	1	0	0	1	4	1	0	5	5	5	0	5	5	2	0	2	1
0	F	5	5.34±0.9	3	2	0	0	0	3	2	0	5	5	5	0	5	5	4	0	1	0
0.34		5	6.04±1.4	2	2	0	1	0	3	2	0	5	5	5	0	5	5	2	0	2	1
1.7		5	6.66±2.5	2	1	1	0	1	5	0	0	5	5	5	0	5	5	3	0	1	2
8.4		5	6.94±2.3	0	3	1	1	0	4	1	0	5	5	5	0	5	5	1	0	3	1

^a; Microscopic examination revealed the crystals of ammonium and magnesium phosphate.

Table V. Results of the urinalysis in rats given DA-3002 subcutaneously once a day for 13 weeks

Dose (IU/kg)	Sex	n	Vol.	pH					Prot.			Glu.	Blood	Ketone		Bil.	Urobil.	Sediment ^a			
				6	6.5	7	7.5	8	-	+	++	-	-	-	±	-	-	-	±	+	++
0	M	10	8.92±1.7	1	2	2	1	4	9	1	0	10	10	7	3	10	10	2	1	7	0
0.34		10	9.36±2.2	1	4	2	0	3	9	1	0	10	10	10	0	10	10	7	0	3	0
1.7		10	8.60±1.8	4	3	1	0	2	8	2	0	10	10	10	0	10	10	5	0	5	0
8.4		10	13.46±2.5	1	4	3	0	1	6	4	0	10	10	10	0	10	10	2	0	8	0
0	F	10	3.71±1.0	1	1	2	1	5	9	1	0	10	10	10	0	10	10	3	0	6	1
0.34		10	3.30±0.9	2	1	3	0	4	8	2	0	10	10	9	1	10	10	0	0	7	3
1.7		10	4.33±1.1	3	1	4	0	2	4	6	0	10	10	10	0	10	10	2	0	4	4
8.4		10	4.28±1.0	2	3	4	0	1	4	6	0	10	10	10	0	10	10	1	0	3	6

^a; Microscopic examination revealed the crystals of ammonium and magnesium phosphate.

Table VI. Hematologic changes in male rats following DA-3002 treatment for 4 weeks (Mean±S.D.)

Doses IU/kg/day	Control 0	0.34	DA-3002 1.7	8.4
No. of animals	5	5	5	5
WBC (10 ³ /mm ³)	7.36±3.73	9.22±2.02	7.82±1.00	6.34±2.39
RBC (10 ⁶ /mm ³)	7.48±0.26	7.28±0.39	7.34±0.36	7.58±0.20
HB (g/dl)	14.94±0.43	14.56±1.00	14.54±0.79	15.54±0.90
HCT (%)	44.64±1.76	42.32±2.50	42.46±2.21	45.22±2.06
MCV (μ ³)	59.80±0.76	8.20±1.72	58.00±1.55	59.60±1.50
MCH (pg)	19.92±0.33	19.94±0.87	19.78±0.62	20.42±0.65
MCHC (g/dl)	33.46±0.46	33.46±0.46	34.18±0.34	20.42±0.65
PLT (10 ³ /mm ³)	657.80±97.44	645.40±26.48	562.00±116.41	683.60±67.99

Table VII. Hematologic changes in female rats following DA-3002 treatment for 4 weeks (Mean±S.D.)

Doses IU/kg/day	Control 0	0.34	DA-3002 1.7	8.4
No. of animals	5	5	5	5
WBC (10 ³ /mm ³)	7.68±1.46	7.70±3.43	5.90±1.72	5.92±2.44
RBC (10 ⁶ /mm ³)	7.55±0.34	7.42±0.80	7.71±0.34	7.33±0.49
HB (g/dl)	15.48±0.71	14.76±1.55	15.60±0.67	15.14±0.84
HCT (%)	44.40±2.04	42.54±3.90	44.38±1.39	43.24±2.31
MCV (μ ³)	58.80±1.17	57.20±1.94	57.20±1.94	59.20±1.47
MCH (pg)	20.46±0.47	19.86±0.82	20.16±0.41	20.62±0.39
MCHC (g/dl)	34.82±0.63	34.60±0.71	35.08±0.71	34.98±0.66
PLT (10 ³ /mm ³)	635.40±107.24	532.60±138.34	617.40±67.71	550.20±209.53

학적 검사결과 약물의 영향으로 보이는 특징적인 변화는 인정되지 않았다. 랫드시험에서의 혈액검사결과는 Table VI~IX와 같다. 4주 중간도살군에서는 각 군간 유의성 있는 혈액학 측정치의 변화는 없었다. 13주 최종투여군에서는 수컷의 경우 저용량군에서 헤마토크리트치의 유의성있는(p<0.05) 증가를 보였으나 용량상관성은 관찰되지 않았으며 4주 및 13주의 혈액응고시간(PT) 측정 결과에서도 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

마우스시험에서의 혈액학적 검사결과 4주 중간도살군

암컷의 중간용량군에서 MCV 감소, 고용량군에서 MCHC 증가가 나타났으나(p<0.05) 용량상관성은 없었다. 또한 13주 최종투여군에서는 암컷 중간용량군의 HB 증가(p<0.05) 외에 대조군과 비교할 때 통계학적으로 유의성있는 혈액학적 측정치의 변화는 관찰되지 않았으며 혈액응고 시간(PT) 측정결과에서도 매체대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

혈청생화학적 검사

랫드시험에서 4주 중간도살동물과 13주 최종도살동물에서의 혈액생화학적 검사결과는 Table X~XIII과 같다.

Table VIII. Hematologic changes in male rats following DA-3002 treatment for 13 weeks (Mean± S. D.)

Doses IU/kg/day	Control		DA-3002	
	0	0.34	1.7	8.4
No. of animals	10	10	10	10
WBC (10 ³ /mm ³)	3.52± 1.11	5.88± 1.49	6.02± 3.21	4.88± 1.69
% Lympho.	87.5± 4.2	87.8± 3.8	87.0± 1.7	88.9± 1.5
Mono.	1.1± 0.9	1.0± 0.8	1.1± 0.8	1.0± 0.6
Baso.	0.2± 0.6	0.2± 0.4	0.2± 0.4	0
Eosino.	0.6± 0.5	0.3± 0.4	0.6± 0.8	0.4± 0.5
Neutro.	10.6± 2.9	10.7± 3.0	11.1± 1.5	9.7± 0.8
RBC (10 ⁶ /mm ³)	8.56± 0.28	8.64± 0.72	8.83± 0.41	8.85± 0.35
HB (g/dl)	15.88± 1.50	16.35± 0.46	16.19± 0.78	16.20± 0.75
HCT (%)	45.39± 1.44	48.21± 1.45 ^a	47.55± 1.98	47.06± 1.83
MCV (μ ³)	53.10± 1.45	54.20± 0.75	54.00± 1.73	53.30± 1.35
MCH (pg)	18.56± 1.51	18.38± 0.34	18.28± 0.73	18.27± 0.56
MCHC (g/dl)	34.90± 2.83	33.87± 0.44	33.99± 0.55	34.38± 0.46
PLT (10 ³ /mm ³)	508.10± 41.03	509.40± 64.55	523.10± 56.55	577.60± 48.46

^a; Significantly different from the control (p<0.05).

Table IX. Hematologic changes in female rats following DA-3002 treatment for 13 weeks (Mean± S. D.)

Doses IU/kg/day	Control		DA-3002	
	0	0.34	1.7	8.4
No. of animals	10	10	10	10
WBC (10 ³ /mm ³)	4.04± 2.17	3.38± 1.50	3.55± 0.89	4.60± 1.38
% Lympho.	87.3± 3.8	87.1± 2.6	87.6± 3.0	90.1± 4.0
Mono.	0.4± 0.5	1.3± 0.6	0.9± 0.7	0.2± 0.4
Baso.	0.6± 0.7	0.1± 0.3	0.1± 0.3	0.4± 0.7
Eosino.	0.2± 0.4	0.3± 0.4	0.2± 0.4	0.3± 0.5
Neutro.	11.5± 3.9	11.2± 2.6	11.2± 3.0	9.0± 3.6
RBC (10 ⁶ /mm ³)	7.86± 0.32	7.73± 0.39	7.93± 0.45	7.89± 0.25
HB (g/dl)	14.82± 0.67	14.31± 0.44	14.23± 0.27	13.58± 2.99
HCT (%)	43.91± 1.87	42.88± 1.34	42.99± 2.05	43.22± 1.98
MCV (μ ³)	55.90± 1.58	55.60± 1.36	54.20± 1.08	54.80± 1.60
MCH (pg)	18.82± 0.66	18.47± 0.51	17.93± 0.89	18.43± 0.59
MCHC (g/dl)	33.69± 0.44	33.35± 0.28	33.10± 1.27	33.68± 0.38
PLT (10 ³ /mm ³)	496.60± 31.90	531.80± 34.57	528.00± 108.97	565.00± 73.81

4주 중간도살군의 경우 암컷 동물에 있어서는 매체대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 변화를 나타내는 측정항목은 없었으나 수컷 동물에 있어서는 모든 약물투여군에서 bilirubin의 유의성있는 감소가 나타났다(p<0.05). 13주 최종도살동물에서는 수컷 고용량군에서 glucose치의 유의성있는 증가가 나타났으나(p<0.05) 암컷 저용량군에서는 glucose의 유의성있는 감소를 나타내었다(p<0.05). 또한, 고용량군에서 chloride 및 sodium의 유의성있는 증가가 나타났다(p<0.05). 한편 마우스시험에서는 4주 중간도살군의 경우 암컷동물에 있어서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 측정항목은 없었으나 수컷동물에 있어서는 중간용량군에서 calcium과 phosphorus가 유의성 있게 증가하였으며(p<0.05), 고용량군에서는 BUN의 감소 및 phosphorus의 증가가 나타

났다. 이중 phosphorus는 암수 모두에서 통계학적 유의성은 없었으나 용량상관성있는 증가경향을 보였다. 13주 최종도살동물에서는 암컷 저용량군에서 ALP 및 BUN의 유의성있는 감소와 중간용량군의 creatinine 및 phosphorus의 유의성있는 감소가 나타났으며(p<0.05), 이중 creatinine 및 phosphorus는 용량상관성이 있는 변화를 보여 DA-3002에 의한 영향으로 생각되었다. 또한 수컷의 저용량군에서 BUN, 중간용량군에서 creatinine, BUN 및 phosphorus의 유의성있는 감소와 나타났으며, 고용량군에서는 creatinine, BUN 및 phosphorus의 유의성있는 감소와 glucose의 유의성있는 증가가 나타났다.

병리학적 검사

부검소견 : 랫드시험의 13주 최종도살군의 부검결과 대조군의 암수 각 1예, 저용량군의 수컷 1예, 중용량군의

Table X. Blood biochemistry in male rats given DA-3002 subcutaneously for 4 weeks

Doses (IU/kg/day)	Control		DA-3002	
	0	0.34	1.7	8.4
No. of animals	10	10	10	10
ALB (G/DL)	1.15± 0.03	1.06± 0.11	1.11± 0.06	1.09± 0.12
ALP (IU/L)	214.0± 67.6	214.0± 43.4	214.8± 48.0	203.4± 57.3
ALT (IU/L)	31.4± 7.5	38.7± 13.6	26.2± 8.3	33.2± 10.0
AST (IU/L)	135.6± 20.5	128.2± 9.4	106.8± 20.6	128.6± 20.9
Bilirubin (mg/DL)	0.37± 0.07	0.25± 0.02 ^a	0.23± 0.04 ^a	0.23± 0.03 ^a
BUN (mg/DL)	28.3± 4.34	22.7± 4.42	22.5± 2.87	20.54± 2.67
Cholester. (mg/DL)	70.0± 3.33	85.7± 11.04	61.4± 8.36	60.5± 10.22
Creatinine (mg/DL)	0.42± 0.08	0.47± 0.07	0.40± 0.05	0.42± 0.07
Glucose (mg/DL)	105.7± 12.5	96.5± 15.8	124.8± 25.1	86.4± 20.9
Protein (G/DL)	6.12± 0.14	6.30± 0.19	6.06± 0.10	5.94± 0.31
Calcium (mg/DL)	8.52± 0.43	8.25± 0.27	8.30± 0.17	8.38± 0.33
Chloride (mEq/L)	115.6± 3.50	113.0± 1.10	113.2± 1.94	111.8± 2.56
Potassium (mEq/L)	4.62± 0.26	4.50± 0.19	4.36± 0.19	4.40± 0.22
Sodium (mEq/L)	151.4± 6.25	149.6± 2.65	148.8± 1.17	150.0± 2.65
Phosphorus (mg/DL)	7.59± 0.62	8.21± 0.52	7.50± 0.48	8.52± 0.71

Each value represents mean± S.D.

^a; significantly different from the control (p<0.05).

Table XI. Blood biochemistry in female rats given DA-3002 subcutaneously for 4 weeks

Doses (IU/kg/day)	Control		DA-3002	
	0	0.34	1.7	8.4
No. of animals	10	10	10	10
ALB (G/DL)	1.18± 0.07	1.10± 0.07	1.17± 0.10	1.19± 0.07
ALP (IU/L)	111.2± 23.1	109.0± 12.9	141.1± 30.5	130.4± 24.8
ALT (IU/L)	18.6± 6.0	34.4± 30.4	22.4± 9.8	26.8± 6.6
AST (IU/L)	85.0± 8.9	122.6± 57.5	112.1± 20.8	114.7± 19.5
Bilirubin (mg/DL)	0.19± 0.04	0.23± 0.10	0.23± 0.08	0.24± 0.08
BUN (mg/DL)	31.4± 6.5	30.2± 4.9	26.3± 5.5	26.5± 4.1
Cholester. (mg/DL)	68.7± 6.1	75.7± 11.6	55.1± 10.8	74.9± 14.7
Creatinine (mg/DL)	0.54± 0.06	0.59± 0.06	0.56± 0.19	0.50± 0.10
Glucose (mg/DL)	98.0± 12.2	106.5± 13.5	79.0± 22.1	97.6± 7.4
Protein (G/DL)	6.24± 0.30	6.61± 0.36	6.27± 0.21	6.27± 0.23
Calcium (mg/DL)	8.64± 0.27	8.79± 0.37	8.73± 0.27	8.54± 0.31
Chloride (mEq/L)	118.8± 1.8	120.0± 1.4	120.0± 1.4	120.4± 2.1
Potassium (mEq/L)	4.22± 0.13	4.32± 0.30	4.86± 0.86	4.68± 0.65
Sodium (mEq/L)	154.0± 2.4	156.8± 1.7	156.8± 2.5	154.80± 2.59
Phosphorus (mg/DL)	7.35± 0.65	6.68± 0.63	9.14± 3.80	7.78± 0.85

Each value represents mean± S.D.

수컷 1예에서 각각 주사부위의 국소적 피하출혈소견이 관찰되었으며, 저용량의 수컷 1예에서는 좌측 전부에 정도의 국소탈모가 인정되었다. 중, 고용량의 수컷 각 1예에서는 흉선의 충혈이 관찰되었으며, 중용량의 암컷 1예에서는 비장의 경도 중창이 관찰되었다. 마우스시험의 도중폐사한 동물을 부검한 결과 심한 사후변화와 자가 용해로 충분한 병리학적 검사를 실시할 수 없었으나 고용량의 암컷 1예와 대조군의 수컷 1예에서는 폐장표면에 직경 1~2 mm 정도의 국소출혈반점이 산재되어 있었다.

그 외에는 전형적 사후변화소견만 관찰되었을 뿐 특이한 변화는 인정되지 않았다. 4주 중간도살군과 13주 최종도살시에도 특이한 소견이 관찰되지는 않았으며, 간혹 대조군과 투여군을 포함하여 전 시험군의 일부 동물에서 주사부위의 발적이 관찰되었다.

장기중량 : 랫드시험의 13주 최종도살동물에서 수컷 고용량군의 뇌는 매체대조군과 비교하여 절대중량의 유의성있는 증가를 나타내었으나(p<0.05) 상대중량에서는 유의성이 없는 것으로 나타났으며, 부신은 약물투여군

Table XII. Blood biochemistry in male rats after s.c. administration of DA-3002 for 13 weeks

Doses (IU/kg/day)	Control		DA-3002	
	0	0.34	1.7	8.4
No. of animals	10	10	10	10
ALB (G/DL)	0.86± 0.15	0.82± 0.12	0.97± 0.16	0.79± 0.17
ALP (IU/L)	104.5± 30.9	82.64± 27.02	99.9± 40.9	110.7± 39.3
ALT (IU/L)	87.7± 59.2	103.3± 114.2	153.0± 145.1	77.3± 32.6
AST (IU/L)	271.1± 79.4	309.4± 212.5	322.8± 153.8	182.0± 57.1
Bilirubin (mg/DL)	0.24± 0.06	0.24± 0.05	0.40± 0.34	0.21± 0.03
BUN (mg/DL)	20.50± 3.38	20.42± 4.56	21.24± 2.93	24.08± 3.62
Cholester. (mg/DL)	63.09± 7.56	69.28± 9.80	83.95± 24.88	60.98± 15.90
Creatinine (mg/DL)	0.78± 0.17	0.70± 0.22	0.67± 0.15	0.66± 0.09
Glucose (mg/DL)	61.6± 8.0	79.11± 23.89	82.9± 15.9	92.7± 25.4 ^a
Protein (G/DL)	6.17± 0.35	5.89± 0.37	6.29± 0.53	5.97± 0.31
Calcium (mg/DL)	9.58± 1.08	9.05± 0.68	9.27± 1.57	9.03± 0.70
Chloride (mEq/L)	103.1± 3.1	104.8± 1.99	105.3± 4.2	104.7± 4.0
Potassium (mEq/L)	3.98± 0.24	4.24± 0.57	4.60± 0.72	4.33± 1.05
Sodium (mEq/L)	135.1± 3.5	137.2± 3.70	136.4± 6.4	135.1± 4.8
Phosphorus (mg/DL)	6.62± 0.90	12.50± 1.07	6.14± 1.09	6.19± 0.54

Each value represents mean± S.D.

^a; Significantly different from the control (p<0.05).

Table XIII. Blood biochemistry in female rats after s.c. administration of DA-3002 for 13 weeks

Doses (IU/kg/day)	Control		DA-3002	
	0	0.34	1.7	8.4
No. of animals	10	10	10	10
ALB (G/DL)	0.95± 0.15	1.21± 0.25 ^a	1.10± 0.15	1.09± 0.18
ALP (IU/L)	63.8± 15.3	54.2± 21.0	61.6± 20.6	63.5± 27.9
ALT (IU/L)	34.4± 7.9	34.9± 12.0	37.6± 12.8	33.2± 10.0
AST (IU/L)	102.1± 11.2	142.9± 40.9 ^a	120.4± 21.3	108.5± 127.0
Bilirubin (mg/DL)	0.26± 0.04	0.30± 0.05	0.27± 0.03	0.23± 0.07
BUN (mg/DL)	23.1± 3.3	30.2± 7.3	30.1± 3.7	26.7± 3.0 ^a
Cholester. (mg/DL)	60.8± 11.4	54.3± 13.9	62.1± 15.8	62.7± 15.0
Creatinine (mg/DL)	0.61± 0.11	0.55± 0.10	0.64± 0.09	0.73± 0.10
Glucose (mg/DL)	117.0± 15.0	74.4± 18.6 ^a	100.6± 18.5	106.3± 16.4
Protein (G/DL)	6.49± 0.31	6.90± 0.44	6.72± 0.24	6.57± 0.48
Calcium (mg/DL)	9.57± 0.24	9.78± 0.18	9.74± 0.26	9.79± 0.38
Chloride (mEq/L)	113.5± 2.0	115.3± 2.8	116.7± 1.6	120.2± 3.3 ^a
Potassium (mEq/L)	3.75± 0.22	3.95± 0.28	3.93± 0.28	4.33± 1.05
Sodium (mEq/L)	144.7± 2.7	147.3± 4.0	148.5± 2.3	153.0± 4.5 ^a
Phosphorus (mg/DL)	4.87± 0.89	5.92± 1.12	5.47± 0.77	5.96± 0.82

Each value represents mean± S.D.

^a; Significantly different from the control (p<0.05).

모두에서 절대장기의 유의성있는 증가를 나타냈으나(p<0.05) 상대중량에서는 중간용량군에서만 유의성있는 증가를 나타냈다(p<0.05, Table XIV, XV). 마우스시험에서는 13주 최종도살동물에서 고용량군(8.4 IU/kg)의 암수 모두에서 간의 절대중량이 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성 있는 증가를 나타냈으나(p<0.05) 상대중량에서는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 상대중량에 있어서는 고용량군 중 수컷에서 신장, 심장 및 뇌에서 유

의성있는 감소가 나타났으며(p<0.05), 암컷에서는 뇌만 유의성있는 감소를 나타냈다(p<0.05). 이중 뇌는 암수 모두에서 용량상관성을 갖고 감소하는 경향을 나타냈다.

병리조직학적 검사: 랫드시험의 투여종류 후 실시한 각 동물의 병리조직학적 검사소견은 Table XVI과 같다. 검사결과 간장에서는 간세포의 정도종창 및 원형세포의 국소적 침윤 등의 소견이 대조군과 고용량군의 소수에서 관찰되었으며, 비장의 담철세포증(hemosiderosis)과

Table XIV. Absolute organ weights of the rats treated with DA-3002 for 13 weeks

Sex	Organs—Dose (IU/kg)	0	0.34	1.7	8.4
Male	Brain (g)	1.895± 0.085	1.922± 0.151	1.936± 0.135	2.055± 0.067 ^a
	Thymus (mg)	0.416± 0.156	0.383± 0.107	0.321± 0.083	0.410± 0.101
	Heart (g)	1.280± 0.093	1.336± 0.190	1.268± 0.193	1.386± 0.116
	Lung (g)	1.456± 0.195	1.486± 0.130	1.442± 0.136	1.632± 0.259
	Liver (g)	10.65± 1.011	10.95± 1.827	10.50± 1.278	12.52± 1.015
	Kidney (g)	2.768± 0.256	2.827± 0.403	2.757± 0.301	3.183± 0.310
	Spleen (g)	0.893± 0.150	0.976± 0.130	1.036± 0.210	1.200± 0.286 ^a
	Adrenal gl. (mg)	0.040± 0.006	0.063± 0.016 ^a	0.062± 0.013 ^a	0.067± 0.018
Testes (g)	3.232± 0.198	3.394± 0.453	3.221± 0.427	3.375± 0.331	
Female	Brain (g)	1.859± 0.091	1.850± 0.112	1.841± 0.073	1.869± 0.104
	Thymus (mg)	0.267± 0.052	0.255± 0.039	0.301± 0.093	0.315± 0.060
	Heart (g)	0.851± 0.046	0.858± 0.039	0.887± 0.066	0.896± 0.088
	Lung (g)	1.083± 0.097	1.023± 0.071	1.139± 0.133	1.172± 0.114
	Liver (g)	6.633± 0.906	6.832± 0.506	7.197± 0.583	7.586± 0.864
	Kidney (g)	1.805± 0.206	1.751± 0.102	1.841± 0.105	1.939± 0.161
	Spleen (g)	0.697± 0.193	0.710± 0.143	0.712± 0.134	0.696± 0.145
	Adrenal gl. (mg)	0.064± 0.012	0.068± 0.05	0.065± 0.006	0.067± 0.008
Ovary (g)	0.103± 0.009	0.100± 0.017	0.102± 0.022	0.105± 0.015	

Each value represents mean± S. D.

^a; Significantly different from the control (p<0.05).

Table XV. Relative organ weights (%) of the rats treated with DA-3002 for 13 weeks

Sex	Organs—Dose (IU/kg)	0	0.34	1.7	8.4
Male	Brain	0.424± 0.035	0.422± 0.054	0.438± 0.037	0.413± 0.024
	Thymus	0.092± 0.029	0.083± 0.020	0.072± 0.015	0.082± 0.019
	Heart	0.286± 0.019	0.290± 0.026	0.284± 0.024	0.278± 0.018
	Lung	0.324± 0.036	0.324± 0.023	0.325± 0.027	0.327± 0.049
	Liver	2.369± 0.105	2.375± 0.233	2.360± 0.172	2.512± 0.183
	Kidney	0.618± 0.060	0.614± 0.050	0.621± 0.041	0.638± 0.052
	Spleen	0.199± 0.032	0.214± 0.037	0.234± 0.051	0.241± 0.058
	Adrenal gl.	0.009± 0.001	0.014± 0.003	0.014± 0.003 ^a	0.013± 0.004
Testes	0.721± 0.033	0.738± 0.061	0.725± 0.076	0.677± 0.065	
Female	Brain	0.714± 0.041	0.711± 0.031	0.683± 0.060	0.624± 0.068
	Thymus	0.103± 0.023	0.098± 0.013	0.110± 0.031	0.104± 0.012
	Heart	0.328± 0.026	0.330± 0.013	0.329± 0.039	0.298± 0.031
	Lung	0.417± 0.050	0.393± 0.020	0.422± 0.055	0.390± 0.045
	Liver	2.538± 0.274	2.672± 0.164	2.657± 0.168	2.514± 0.219
	Kidney	0.690± 0.046	0.674± 0.037	0.681± 0.042	0.644± 0.045
	Spleen	0.268± 0.073	0.273± 0.053	0.263± 0.049	0.232± 0.050
	Adrenal gl.	0.025± 0.004	0.026± 0.002	0.024± 0.003	0.022± 0.003
Ovary	0.039± 0.003	0.038± 0.006	0.037± 0.007	0.035± 0.007	

Each value represents mean± S. D.

^a; Significantly different from the control (p<0.05).

신장의 충혈소견 역시 대조군과 고용량군의 일부예에서 관찰되었다. 그 외에 대조군에 비해 고용량군에서 약물의 영향으로 판단되는 유의한 변화가 관찰되지 않아 저, 중용량에 대한 조직학적 검사는 실시하지 않았다. 마우스 시험에서 도중폐사동물의 경우 이미 조직의 자가용해가 상당히 진행된 상태이어서 정확한 병리조직학적 검

사가 곤란했으나 폐장의 충, 출혈과 신장의 피질 및 수질 접합부위의 출혈소견이 고용량의 암컷 1예와 대조군의 수컷 1예에서 관찰되었다. 투여종료 후 실시한 대조군 및 고용량군에 대한 병리조직학적 검사결과 일부동물에서 경도의 간세포종창, 그리고 신장의 충혈 등이 관찰되었으나 이러한 변화는 대조군 및 고용량군에서 공통

Table XVI. Histopathological findings in rats treated with DA-3002 for 13 weeks

Microscopic findings	Dose (IU/kg)	0		8.4	
	Sex	M	F	M	F
Liver					
hepatocyte swelling		1/10	0/10	0/10	1/10
focal round cell infiltration		0/10	2/10	1/10	0/10
Spleen					
mild hemosiderosis		1/10	3/10	3/10	2/10
Kidney					
congestion		2/10	2/10	2/10	1/10

적으로 관찰되었다.

고 찰

DA-3002는 동아제약(주) 연구소에서 유전자 재조합기술을 이용하여 생산한 천연형 인성장호르몬이다. 성장호르몬은 골, 연골의 성장촉진작용 뿐아니라 지방분해 및 단백질합성촉진 등의 대사작용을 나타내어 성장호르몬 결핍성 왜소증, Turner증후군 및 소아에서의 만성신부전증에 의한 왜소증 등에 사용될 뿐만 아니라 최근에는 불임, 골다공증, 화상치료 등에까지 그 적응증의 확대에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Beck 등, 1957; Goodman 등, 1986; Rhoades와 Pflanzler, 1989; Hutton 등, 1993). 본 연구에서는 DA-3002를 동물에 단회 및 반복투여시 발현가능한 독성을 평가하고자 마우스와 랫드를 이용하여 단회 및 13주 반복투여독성시험을 실시하였다. 단회투여독성시험결과 마우스와 랫드에 대한 경구 및 피하투여시 DA-3002는 최고용량군인 80 IU/kg까지도 약물의 영향으로 판단되는 독성증상이 발현되지 않았으며, 폐사에도 없어 마우스와 랫드에 단회 경구 및 피하투여시 DA-3002의 반수치사량은 80 IU/kg 이상으로 나타났다. 이는 마우스와 랫드에 DA-3002를 예정임상사용량의 1200배까지 투여해도 독성이 발현되지 않음을 의미한다. 13주 반복투여시험에서 DA-3002투여군은 시험기간 중 용량상관성을 나타내며 체중증가를 보였다. 인성장호르몬을 랫드에 장기투여시 나타나는 체중증가는 투약중지 후의 회복기동안 점차 소실되며, 아마도 이는 랫드에서의 인성장호르몬의 항이뇨효과에 기인한다고 볼 수 있다(Jørgensen, 1987; Jørgensen 등, 1988). 본 시험에서도 암수 모두 투여 2주 및 4주부터 체중증가가 인정되었으나 이와 뇨량과의 상관성을 검토한 결과 오히려 DA-3002투여군에서 대조군에 비해 뇨량증가 경향을 나타내어 단순한 항이뇨기전외에 다른 기전이 관여될 것으로 생각되었다.

마우스시험에서는 시험기간 중 약물과 관련된 임상증상은 발현되지 않았으나, 암컷 고용량군에서 2레 그리고 수컷 대조군 1레의 동물이 폐사하였다. 폐사동물에 대한 부검결과 고용량의 암컷 1레와 대조군의 수컷 1레에서

각각 폐장의 출혈소견이 관찰되었을 뿐 그 외에 약물의 영향으로 볼 수 있는 변화가 인정되지 않았으며, 폐장의 출혈소견도 생존동물의 최종도살시 모든 약물투여군에서 전혀 관찰되지 않은 것으로 보아 시험물질의 영향보다는 환경이나 보정, 투여시의 물리적인 자극 등에 의한 결과라고 생각되었다.

인성장호르몬의 반복투여시 빠른 성장에 수반된 적혈구수의 유의한 증가가 보고되었으나(Jørgensen 등, 1988) 본 시험에서는 혈액학적검사에서 약물의 영향으로 생각되는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

혈액화학검사결과 혈중 glucose의 농도는 수컷 마우스와 랫드의 최종도살군에서 유의성있는 증가가 인정되었으며, 저, 중용량군에서도 유의성은 없었지만 용량상관성있는 증가를 보였는데, 이는 DA-3002가 간의 당신생(gluconeogenesis) 작용을 촉진하여 혈당치를 증가시킨 결과라고 추정되었다(Rhoades와 Pflanzler, 1989). 그러나 암컷 랫드의 최종도살시 DA-3002투여군에서는 용량반응성없는 glucose치의 감소가 관찰되었다. Jørgensen 등 (1988)은 인성장호르몬의 90일간 반복투여한 암컷 랫드에서 혈중 glucose의 농도저하가 나타났으며, 30일간 반복투여한 원숭이에서는 암수 모두에서 용량상관성 있게 증가를 나타내었다고 보고하였다. 이러한 면에서 성장호르몬의 당신생과 혈중 glucose치에 미치는 작용이 동물종과 성별에 의해 일부 영향을 받는 것으로 생각되었다. 그 외에 혈중 phosphorus 농도는 암수마우스 모두 중간도살시 증가가 인정되다가 투여말기에는 감소하는 경향을 나타내었는데, 랫드시험에서는 이러한 변화가 관찰되지 않았으며, calcium의 경우는 랫드의 4주 중간도살시에 수컷 고용량군에서만 유의한 증가가 관찰되었다. 인성장호르몬에 의한 phosphours 및 calcium이온 농도의 변화는 종종 관찰되는 변화이나 그 의의에 대해서는 자세히 논의되지 않고있다(Murad와 Haynes, 1985). 한편, 신장독성의 지표로 볼 수 있는 BUN치의 감소는 DA-3002를 투여한 마우스와 랫드 모두에서 관찰되었는데 임상적 의의를 찾기는 곤란하였다.

부검 후 실시한 장기중량의 측정결과 수컷 랫드에서 뇌 및 부신의 절대중량 증가가 인정되었으나 상대중량에서 유의성이 없는 것으로 나타나 이미 보고된 바와

같이 개체의 빠른 성장에 수반된 결과라고 생각되었다 (Jørgensen 등, 1988). 마우스시험에서는 암수 모두 고용량군에서 간장의 절대중량증가가 인정되었는데 이는 조혈장기의 활성증가에 일부 기인한 것으로 설명이 가능하지만(Jørgensen 등, 1988), 비장, 골수 등의 조혈장기와 혈액학적 수치의 유의성있는 변화가 없는 것으로 미루어 조혈기능촉진효과만으로 완전한 설명은 곤란하며, IGF-1 합성을 위한 간기능촉진에 의한 영향도 반영되었을 것으로 사료되었다.

인성장호르몬에 의한 유선비후와 자궁 및 질내막세포의 증생이 원숭이에서 보고되었으나(Jørgensen 등, 1988) 본 시험에서 육안 및 병리조직검사결과 이와 같은 변화는 관찰할 수 없었다. 반복투여 독성시험에서 병리조직학적 검사를 실시한 결과 마우스와 랫드의 일부동물에서 간장세포의 혼탁종창 및 국소적 염증세포침윤, 비장의 hemosiderin 침착소견, 신장의 출혈 등 일부 조직학적 변화가 관찰되었으나 이러한 변화는 고용량군 뿐만 아니라 대조군에서도 고르게 일부 동물에서 관찰된 것으로 미루어 시험물질 투여에 따른 특이적인 병변은 아닌 것으로 생각되었다.

이상의 결과를 종합하면 마우스와 랫드에 경구 및 피하로 단회투여시 DA-3002의 반수치사량은 80.0 IU/kg 이상이며, 13주 반복투여시 투약과 관련하여 체중증가, 혈중 glucose치의 증가, 일부 장기의 절대 및 상대중량의 변화와 혈청생화학치의 변화 등이 관찰되었으나 이러한 변화는 병리조직학적 변화를 수반하지 않는 성장호르몬의 약리학적 작용에 기인한 결과로 판단되어 본 시험계에서 DA-3002는 고용량군인 8.4 IU/kg/day 투여군에서도 독성변화를 나타내지 않는 것으로 사료되었다.

참고문헌

- Beck, J. C. McGany, E. E., Dyrenfurth, I. and Venning, E. H. (1957). Metabolic effects of human and monkey growth hormone in man. *Science* **125**, 884-885.
- Flodh, H. (1987). Update on the clinical use and experience of Somatorm (somatrem). *Acta Paediatrica Scandinavica* **337** (suppl), 130-133.
- Goeddel, D. V., Heynecker, H. L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R. and Seeburg, P. H. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* **281**, 544-548.
- Goodman, H. M., Grichting, G. and Coiro, V. (1986). "Human Growth Hormone." Pleum Publ., p. 499.
- Hutton, I., Lloyd, I., Fenton, H., Leathers, M. and Jones, S. (1993). *Pharmaproject* **14**, a702-a703. PJB Publication Ltd., UK.
- Jørgensen, K. D. (1987). Comparison of the pharmacological properties of pituitary and biosynthetic human growth hormone. Demonstration of antinatriuretic/antidiuretic and barbital sleep effects of human growth hormone in rats. *Acta endocrinology* **114**(1), 124-131.
- Jørgensen, K. D., Sevendsen, O., Greenough, R. J., Kallesen, T., Goburdhun, R., Skydgaard, K., Finch, J., Dinesen, B. and Nilsson, P. (1988). Biosynthetic human growth hormone: subacute toxicity studies in rats and monkeys. *Pharmacology and Toxicology* **62**, 329-333.
- Kaplan, S. L., Underwood, L. E., August, G. P., Bell J. J., Bletthen, S. L., Blizzard, R. M., Brown, D. R., Folney, T. P., Hintz, R. L., Hopewood, N. J., Johansen, A., Kirkland, R. T., Plotnick, L. P., Rosenfeld, R. G. and Van Wyk, J. J. (1986). Clinical studies with recombinant-DNA-derived methionyl human growth hormone in growth hormone deficient children. *Lancet* **i**, 697-700.
- Milner, R. D. G., Barnes, N. D., Buckler, J. M. H., Carsen, D. J., Hadden, D. R., Hughes, I. A., Johnston, D. I., Parkin, M. J., Price, D. A., Rayner, P. H. W., Savage, D. C. L., Savage, M. O., Smith, C. S. and Swift, P. G. F. (1987). United Kingdom multicenter clinical trial of somatrem. *Archives of Disease in Children* **62**, 776-779.
- Murad, F. and R. C. Haynes Jr. (1985). Adenohypophyseal hormones and related substances. In *The pharmacological basis of therapeutics* (7th Ed.), pp. 1366-1372. New York.
- Preece, M. A. (1986). Creutzfeld-Jakob disease: Implications for growth hormone deficient children. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **107**, 220-239.
- Raben, M. (1958). Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **18**, 901-903.
- Rhoades and Pflanzler (1989). The pituitary gland. In *Human physiology*, pp. 411-417. Saunders college publisher, USA.
- Tylström, J., Karlen, B. and Guilbaud, O. (1986). Somatorm (somatrem): immunological aspects. In *Immunological aspects of Human Growth Hormone* (R. D. G. Milner and H. Flodh Ed.), pp. 19-31. Medical Education Services, Oxford.
- Wilson, D. M. and Rosenfeld, R. G. (1987). Treatment of short stature and delayed adolescence. *Pediatr. Clin. North Am.* **34**, 865.
- 의약품 등의 특성시험기준 (1988). 국립보건안전원 예규 제 10 호.