

Beagle dog에서 DA-3030(G-CSF)의 정맥내 4주간 반복투여 독성

이영순 · 조재진 · 남기환 · 서광원

강성근 · 박재학* · 김원배**

서울대학교 수의과대학 공중보건학 교실, *실험동물의학교실, **동아제약(주) 연구소

Four-Week Intravenous Toxicity of DA-3030 (G-CSF) in Beagle Dogs

Yong Soon LEE, Jae Jin CHO, Ki Hoan NAM, Kwang-Won SEO
Sung Keun KANG, Jae Hak PARK, Won Bae KIM

Department of Public Health

*Department of Laboratory Animal Medicine College of Veterinary Medicine

**Research Laboratories Dong-A pharm. Co, Ltd

(Received October 1, 1994; accepted October 31, 1994)

Abstract—This study was performed to determine the toxic effect of DA-3030(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) in beagle dogs. DA-3030(G-CSF) was injected intravenously at doses of 115 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 11.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and 1.15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ seven days per week for 28 days. After completion of the treatments, the dog were necropsied. The number of dead animal was zero in all groups. No specific clinical sign was found, either. In hematological results, WBC was significantly increased dose-dependently in treated groups. In histopathological findings, megakaryocyte and rubricyte were found in the liver and spleen at the dose of 115 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. Therefore, we could find the extramedullary hematopoiesis was increased. Megakaryocyte and rubricyte were increased in bone marrow, too. In conclusion, those signs were estimated the pharmacological effect of DA-3030(G-CSF). According to the results, non toxic dose of DA-3030(G-CSF) was higher than 115 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$

Keywords □ DA-3030, granulocyte colony stimulating factor, beagle dog, 4-week toxicity, intravenously

Neutropenia는 암의 화학치료 요법시 감염, 질병을, 사망율을 증가시키는 중요한 요소이다. 화학치료요법으로 인한 myelosuppression을 회복시키거나 막아주는 agent는 매우 유용하게 이용될 수 있다(Pizzo와 Young, 1985). 최근 과립구와 대식구의 증식을 조정하는 granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF)가 유전자 재조합 단백질로 동정되었다. 이 G-CSF는 정상골수에서는 순수한 과립구 콜로니에 대한 선택적 자극효과와 백혈병 세포에서는 분화를 촉진하는 작용을 가지고 있다(Souza 등, 1986; Wong 등, 1985; Kawasaki 등, 1985; Yang 등, 1986).

이 hematopoietic glycoprotein은 nonhuman primate

과 환자에서 백혈구수를 증가시켰다(Donahue 등, 1986, Mayer 등, 1987; Groopman 등 1987; Welte 등, 1987a). 더구나 원숭이에 cyclophosphamide(Welte 등, 1987a), bisulfan(Welte 등, 1987b) 또는 전신 방사선 치료 실험시 neutropenia를 일으키는데 G-CSF 투여로 neutropenia 시간을 줄였다(Gillo 등, 1987).

또한 유방암 치료를 위한 항암제 복합투여는 leukopenia를 일으켜 연속 처치를 지연시킨다(Stemberg, 1985). 이때 G-CSF 처치는 leukopenia를 일으키는 시간을 경감시키는 효과를 나타내었다(Gabrilove, 1989).

이 외에도 항암제 및 방사선 조사에 의한 골수독성의 경감, 골수 이식후의 과립구 회복촉진 등에 우수한 효과를 나타내어 최근 많은 연구가 진행되고 있는 것으로 알려져 있다.

*To whom correspondence should be addressed.

이에 본 연구는 최근 동아제약에서 개발한 과립구 콜로니 형성자극인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)인 DA-3030에 대하여 beagle dog에 1개월 정맥내 반복투여시 독성을 평가하기 위하여 실시하였다.

실험방법

본 시험은 의약품 등의 독성시험 기준(국립보건안전연구원, 1988)에 준하여 실시하였다.

시험물질

시험물질인 DA-3030은 동아제약(주) 생물공학연구소에서 생산한 무색의 액상물질로 순도는 98% 이상, Lot No는 CTS-001이었으며, 대조물질은 매체대조물질(10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0)을 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

6개월령의 암컷 8마리, 수컷 8마리 비글 개(beagle dog)를 B&K(중국)사로부터 구입하여 1주일간 실험실에 순화시켰다. 이 실험용 비글개는 Bodetellar ParaInFl(nasal), Canine Parvo modified live(4회 접종), Oral Papilloma killed(2회), Distemper Modified live, HEPA, LEPTO, PARAINF, Rabies killed virus에 대한 백신접종을 완료한 개이다. 개체식별은 사육상자별 tag 표시법을 이용하였고 개 실험용 케이지(750×800×900 mm)에 1마리씩 사육하였다. 사료는 개용 고품사료(퓨리나 코리아)를 음수는 상수도수를 자유섭취시켰다.

시험물질 조제와 투여방법

시험기간 중 시험물질 및 매체대조물질은 모두 4℃에 냉장보관하였으며, 시험개시 1시간 전에 매체로 희석하여 사용하였다. 투여경로는 임상투여 예상경로인 정맥내(요골쪽 피부정맥, cephalic vein)로 1일 1회 주7회 4주간 투여하였다.

시험군의 구성

암수 각각 8마리를 나누어 매체대조물질 투여군을 음성대조군으로 두었으며, 최고용량을 임상용량(1.33~1.67 µg/kg/day)의 10배 정도인 115 µg/kg/day로 하고 공비×0.1로 중간용량 투여군은 11.5 µg/kg/day, 저용량 투여군은 1.15 µg/kg/day으로 설정하였다.

시험방법 및 관찰항목

투여직전 각 동물을 체중을 기준으로 무작위 군 분리를 한 다음 혈액을 채취하였다. 요골쪽 피부정맥으로 26 G butterfly scalp를 이용하여 1일 1회 주 7회 4주간 투여하였다. 임상관찰은 1일 1회 매일 실시하였으며, 관찰방법은 일반임상증상(anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, auria, fecal change)과 그 정도 등을 기록하였다. 채혈은 투여직전, 2주째, 부검직전 목동맥에서 총3회 실시하였다. 체중은 주2회 측정하였고, 사료 및 음수량은 주1회 측정하였다. 안검사는 부검 직전에 검사하였다. 뇨검사는 모든 동물에 대하여 1회 채뇨한 후,

그 뇨에 대하여 외관과 뇨량을 관찰한 다음 즉시 뇨검사용 시험지(Ames사의 N-multistic)를 사용하여 pH, 단백(protein), keton, urobilinogen, bilirubin, 포도당(glucose) 및 잠혈(ocult blood)을 측정하였다.

혈액학적 및 혈청 생화학적 검사

일반 혈액학적 검사는 요골쪽 피부정맥을 통하여 채혈하여 적혈구수(RBC), 총백혈구수(WBC), 호산구(eosinophil), 호중구(banded neutrophil), 다핵중성구(seg. neutrophil), 임파구(lymphocyte), 총단백질(total protein), 피브리노젠(fibrinogen), PCV, 헤모글로빈(hemoglobin) 등을 검사하였다.

혈청 생화학적 검사는 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고한 후 원심분리(3,000 rpm, 30 min)하여 얻은 혈청에 대해서 alanin transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), alkaline phosphatase(ALP), 총 콜레스테롤(total cholesterol), 총단백(total protein), bilirubin, 혈액노소질소(BUN), creatinine, albumin, inositol phosphate, triglycerol, chloride 등을 혈액화학분석기(550 Express, CIBA-CORNING)를 이용하여 측정하였다.

부검 및 육안검사

시험종료 후 전 생존동물에 대하여 체격, 영양상태, 피모, 가시점막 및 피부에 대한 외부검사를 실시한 다음, 마취 후 목동맥을 절단하여 방혈, 치사시켰다. 박피 후 피하 및 유선에 대한 검사를 실시하였고, 천경 임파절을 떼어낸 다음 활편을 검사하였다.

전지 및 후지를 분리해 낸 다음 액와 및 슬와 림프절, 고관절 이상 유무, 활액낭, 근육, 골수, 연골판 말초신경 및 지방조직 검사를 실시하였다.

복강을 열어 복수여부 검사, 장기의 위치, 대·소망막, 장간막, 비장, 췌장, 간, 담낭, 담낭액, 신장, 부신, 방광, 생식기, 장간막 임파절, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장 및 직장을 분리 검사하였다.

흉강을 열어 흉수여부, 횡경막, 심낭액, 심장, 폐, 폐문, 임파절, 기관 및 기관지, 대동맥, 식도를 분리하여 검사하였다.

두경부를 분리하여 뇌 척수액, 혀, 구강내부, 치아상태, 인후두, 편도선, 타액선 및 림프절, 안구, 갑상선, 뇌 및 뇌하수체를 분리 검사하였다.

장기중량 및 크기측정

전 시험동물에 대하여 간장, 신장(좌우), 비장, 심장, 부신(좌우), 뇌, 갑상선, 난소(좌우), 고환(좌우), 췌장, 뇌하수체 등의 체중에 대한 상대장기 중량 및 크기를 측정하였다.

병리조직 검사

전 시험동물에 대하여 ketamine 5 mg/kg로 마취한 다음 목동맥에 카테터를 삽입하여 충분한 방혈을 시켰다. 장기중량 측정이 끝난 모든 장기를 10% 중성 포르말린액에 고정시켰다. 2주간 이상의 충분한 고정을 거친 모든

장기조직은 파라핀 포매기(Fisher, Histomatic Tissue Processor, 166A)에 포매하여 마이크로톰(AO Rotary Microtome)으로 5 μm 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 하여 관찰하였다.

대퇴골은 buffered formic acid를 이용하여 탈회시킨 다음 포매하여 절편을 만들고 염색하여 관찰하였으며, 관찰부위는 연골판 하부의 골수를 관찰하였다.

실험결과

고용량군(115 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$), 중간용량군(11.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$), 저용량군(1.15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 및 매체대조군투여 전기간동안 시험물질 투여 때문으로 여겨지는 임상증상을 관찰하지 못하였으며, 사망 동물도 없었으며(Tabel I), 체중(Table II), 사료 및 음수섭취량 변화 역시 관찰하지 못하였다.

또한 부검 전 일, 시험 전군에서 실시한 안검사결과

특이한 이상을 관찰할 수 없었으며, 노검사소견 역시 대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 이상을 나타내지 않았다.

혈액학적 및 혈청 생화학적 검사 소견

Table I. Mortality of male and female beagle dogs

Sex	Groups	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Weeks				Mortality
			1	2	3	4	
Male	C	0	0	0	0	0	0/2
	T1	1.15	0	0	0	0	0/2
	T2	11.5	0	0	0	0	0/2
	T3	115	0	0	0	0	0/2
Female	C	0	0	0	0	0	0/2
	T1	1.15	0	0	0	0	0/2
	T2	11.5	0	0	0	0	0/2
	T3	115	0	0	0	0	0/2

C, Vehicle control group; T, Treatment group.

Table II. Body weight changes of female and male beagle dogs

(unit : kg)

Day/Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Female				Male			
	Control 0	T1 1.15	T2 11.5	T3 115	Control 0	T1 1.15	T2 11.5	T3 115
0	7.4 \pm 2.30(2) ^a	7.2 \pm 0.80(2)	7.3 \pm 0.70(2)	7.5 \pm 0.05(2)	10.4 \pm 1.90(2)	10.4 \pm 1.05(2)	10.4 \pm 0.40(2)	10.4 \pm 0.35(2)
4	9.6 \pm 1.93(2)	7.2 \pm 0.70(2)	7.8 \pm 1.05(2)	8.0 \pm 0.05(2)	10.4 \pm 0.45(2)	10.8 \pm 1.65(2)	11.0 \pm 0.40(2)	10.4 \pm 0.40(2)
8	9.8 \pm 1.15(2)	7.3 \pm 0.70(2)	7.4 \pm 0.60(2)	8.0 \pm 0.05(2)	10.7 \pm 0.00(2)	11.2 \pm 0.15(2)	11.0 \pm 0.50(2)	8.0 \pm 0.35(2)
11	10.0 \pm 0.40(2)	7.0 \pm 0.55(2)	7.8 \pm 0.75(2)	8.1 \pm 0.15(2)	10.6 \pm 2.15(2)	11.1 \pm 0.45(2)	10.6 \pm 0.40(2)	10.3 \pm 0.50(2)
14	10.1 \pm 0.35(2)	7.4 \pm 0.15(2)	7.6 \pm 0.65(2)	8.1 \pm 0.10(2)	10.5 \pm 2.25(2)	11.2 \pm 0.15(2)	10.6 \pm 0.40(2)	10.3 \pm 0.50(2)
18	9.9 \pm 0.15(2)	7.0 \pm 0.50(2)	7.5 \pm 0.50(2)	7.7 \pm 0.55(2)	10.5 \pm 2.00(2)	11.8 \pm 0.25(2)	10.9 \pm 0.90(2)	10.4 \pm 0.45(2)
21	9.2 \pm 0.30(2)	7.3 \pm 0.45(2)	7.6 \pm 0.65(2)	7.7 \pm 0.10(2)	10.9 \pm 1.40(2)	11.7 \pm 0.45(2)	10.8 \pm 0.95(2)	10.5 \pm 0.40(2)
24	9.8 \pm 0.45(2)	7.3 \pm 0.30(2)	7.7 \pm 0.55(2)	7.9 \pm 0.20(2)	11.0 \pm 2.10(2)	11.0 \pm 0.00(2)	10.9 \pm 0.65(2)	10.4 \pm 0.35(2)
28	9.4 \pm 0.50(2)	6.6 \pm 0.40(2)	6.8 \pm 0.70(2)	7.3 \pm 0.20(2)	11.6 \pm 1.75(2)	11.2 \pm 0.15(2)	10.2 \pm 0.90(2)	10.5 \pm 0.85(2)

Values are expressed as mean S.D. ^a, No. of animal examined.

Table III. Serum biochemical values of female beagle dogs in the 1st blood collection

Groups	Control				T1				T2				T3			
	0		1.15		1.15		11.5		11.5		11.5		115			
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal	2		2		2		2		2		2		2			
ALT	29.70 \pm 0.10		219.10 \pm 0.10		28.80 \pm 3.50		24.85 \pm 4.05									
AST	26.65 \pm 3.15		28.25 \pm 3.15		30.15 \pm 4.55		22.85 \pm 1.85									
ALP	88.50 \pm 73.00		121.00 \pm 73.00		54.00 \pm 10.00		71.00 \pm 31.00									
Albumin	3.05 \pm 0.00		3.40 \pm 0.00		3.20 \pm 0.10		3.15 \pm 0.35									
BUN	12.90 \pm 0.60		15.60 \pm 0.60		14.50 \pm 7.50		18.95 \pm 6.85									
IPhos	4.73 \pm 1.69		7.07 \pm 1.69		5.72 \pm 1.65		6.62 \pm 0.70									
Totoal protein	6.80 \pm 0.25		7.55 \pm 0.25		6.90 \pm 0.10		7.20 \pm 0.60									
Chloride	115.00 \pm 2.00		119.00 \pm 2.00		114.00 \pm 2.00		116.00 \pm 1.00									
CK	126.00 \pm 65.00		163.00 \pm 65.00		215.00 \pm 80.00		139.00 \pm 1.00									
Cholesterol	183.00 \pm 42.50		173.50 \pm 42.50		127.00 \pm 12.00		164.50 \pm 28.50									
Triglycerol	71.50 \pm 1.50		55.50 \pm 1.50		43.50 \pm 1.50		56.00 \pm 11.00									
Creatinine	0.50 \pm 0.00		0.50 \pm 0.00		0.45 \pm 0.15		0.60 \pm 0.10									

ALT, Alanine Transaminase; AST, Asparatate Transminase; ALP, Alkaline Phosphatase; BUN, Blood Urea Nitrogen, IPhos, Inositol phosphate; Ck, Creatinin Kinase Each value is mean \pm S.D.

Table IV. Serum biochemical values of male beagle dogs in the 1st blood collection

Groups	Control		T1		T2		T3	
	0		1.15		11.5		115	
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No.of Animal	2		2		2		2	
ALT	28.65±	6.55	25.75±	6.65	37.85±	8.45	34.45±	5.75
AST	22.00±	4.30	22.55±	5.55	24.45±	5.95	20.05±	0.45
ALP	63.00±	3.00	76.00±	8.00	71.00±	6.00	47.50±	8.50
Albumin	3.05±	0.35	2.90±	0.60	3.20±	0.10	3.05±	0.25
BUN	28.05±	7.75	18.55±	7.75	23.90±	2.30	24.90±	2.80
IPhos	5.48±	0.29	4.84±	1.06	6.07±	1.30	5.65±	1.35
Total protein	7.50±	0.20	7.90±	0.90	7.15±	0.25	7.05±	0.25
Chloride	109.50±	3.50	118.00±	6.00	114.50±	0.50	114.50±	1.50
CK	119.00±	21.00	120.50±	7.50	153.00±	67.00	90.50±	4.50
Cholesterol	124.50±	19.50	134.50±	3.50	148.50±	5.50	127.50±	16.50
Triglycerol	33.50±	2.50	39.00±	8.00	38.50±	8.50	27.50±	4.50
Creatinine	0.70±	0.10	0.70±	0.30	0.70±	0.10	0.70±	0.10

ALT, Alanine Transaminase; AST, Asparatate Transminase; ALP, Alkaline Phosphatase; BUN, Blood Urea Nitrogen, IPhos, Inositol phosphate; Ck, Creatinin Kinase Each value is mean±S.D.

Table V. Serum biochemical values of female beagle dogs in the 2nd blood collection

Groups	Control		T1		T2		T3	
	0		1.15		11.5		115	
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No.of Animal	2		2		2		2	
ALT	6.30±	0.10	26.05±	1.65	23.85±	2.45	23.45±	0.75
AST	17.20±	3.15	19.70±	2.50	22.85±	1.15	18.60±	0.30
ALP	56.00±	73.00	106.50±	69.50	58.00±	19.00	57.50±	6.50
Albumine	3.35±	0.00	3.20±	0.30	3.20±	0.30	3.00±	0.10
BUN	26.55±	0.60	19.70±	2.00	8.90±	2.40	24.80±	4.90
IPhos	3.63±	1.69	7.26±	0.57	5.95±	1.08	7.58±	0.79
Total protein	8.20±	0.25	7.20±	0.60	7.55±	0.25	7.20±	0.20
Chlloride	113.00±	2.00	115.00±	2.50	117.00±	2.00	116.00±	4.00
CK	74.00±	65.00	115.00±	51.00	117.00		57.00±	14.00
Cholesterol	215.00±	42.50	174.50±	58.00	134.00		174.00±	12.00
Triglycerol	72.00±	1.50	77.00±	11.00	49.00		42.00±	10.00
Creatinine	0.70±	0.00	0.45±	0.05	0.40		0.55±	0.05

ALT, Alanine Transaminase; AST, Asparatate Transminase; ALP, Alkaline Phosphatase; BUN, Blood Urea Nitrogen, IPhos, Inositol phosphate; Ck, Creatinin Kinase Each value is mean±S.D.

Table VI. Serum biochemical values of male beagle dogs in the 2nd blood collection

Groups	Control		T1		T2		T3	
	0		1.15		11.5		115	
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No.of Animal	2		2		2		2	
ALT	33.40±	2.25	23.45±	2.45	14.20±	3.15	22.25±	0.85
AST	17.40±	1.65	16.65±	1.45	16.65±	1.45	18.50±	1.50
/ALP	62.00±	21.60	86.50±	25.50	86.50±	25.50	44.00±	5.00
Albumin	3.30±	0.20	3.10±	0.50	3.70		3.00±	0.10
BUN	30.20±	3.20	24.40±	4.20	21.20±	0.20	27.65±	2.65
IPhos	6.98±	2.10	6.88±	1.79	5.99		5.73±	1.26
Total protein	7.10±	0.40	8.50±	0.30	8.20±	0.40	7.30±	0.20
Cl ⁻	113.00±	3.00	116.00±	6.00	129.00		115.50±	1.50
CK	92.00±	12.30	77.50±	13.50	102.00		50.00±	11.00
Cholesterol	134.00±	2.50	144.00±	3.00	213.00		171.00±	10.00
Triglycerol	29.00±	13.70	55.00±	0.00	75.00±	43.00	25.00±	13.00
Creatinine	0.80±	0.10	0.70±	0.20	0.70±	0.20	0.70±	0.00

ALT, Alanine Transaminase; AST, Asparatate Transminase; ALP, Alkaline Phosphatase; BUN, Blood Urea Nitrogen, IPhos, Inositol phosphate; Ck, Creatinin Kinase Each value is mean±S.D.

Table VII. Serum biochemical values of female beagle dogs in the 3rd blood collection

Groups	Control		T1		T2		T3	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal	
	0	2	1.15	2	11.5	2	115	2
ALT	33.90±	0.70	29.20±	4.20	21.70±	0.70	23.90±	1.10
AST	17.90±	1.70	21.10±	2.40	22.40±	1.70	22.75±	4.55
ALP	53.00±	8.00	80.50±	28.50	58.00±	8.00	35.00±	4.00
Albumin	3.10±	0.05	3.30±	0.20	2.85±	0.05	3.10±	0.30
BUN	43.10±	3.50	20.95±	1.35	19.00±	3.50	43.95±	0.25
IPhos	5.74±	0.52	6.04±	1.21	6.09±	0.52	5.26±	1.13
Total protein	7.60±	0.45	8.05±	0.05	7.05±	0.45	7.30±	0.20
Chloride	116.00±	1.00	117.50±	0.50	112.00±	1.00	119.00±	2.00
CK	74.00±	66.00	91.50±	31.50	176.00±	66.00	146.00±	70.00
Cholesterol	141.00±	4.00	134.50±	4.50	158.00±	4.00	160.00±	4.00
Triglycerol	25.00±	0.50	18.00±	4.00	13.50±	0.50	—	—
Creatinine	0.70±	0.05	0.80±	0.10	0.75±	0.05	1.00±	0.10

ALT, Alanine Transaminase; AST, Aspartate Transaminase; ALP, Alkaline Phosphatase; BUN, Blood Urea Nitrogen, IPhos, Inositol phosphate; Ck, Creatinin Kinase Each value is mean±S.D.

Table VIII. Serum biochemical values of male beagle dogs in the 3rd blood collection

Groups	Control		T1		T2		T3	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal	
	0	2	1.15	2	11.5	2	115	2
ALT	24.65±	1.60	27.15±	3.35	26.25±	2.35	29.95±	3.05
AST	18.50±	1.20	31.75±	0.35	21.60±	2.60	25.50±	7.20
ALP	47.50±	15.50	110.50±	71.50	46.00±	1.00	60.50±	22.50
Albumin	3.30±	0.10	3.60±	0.10	3.15±	0.10	2.75±	0.25
BUN	25.15±	0.65	30.75±	2.65	21.15±	3.35	33.45±	20.35
IPhos	6.21±	0.38	6.91±	0.40	6.69±	0.99	8.07±	2.52
Total protein	8.00±	0.60	8.40±	0.40	7.70±	0.20	7.05±	0.65
Chloride	17.5±	4.50	124.00±	4.00	112.50±	3.50	117.00±	3.00
CK	64.50±	2.50	199.00±	24.00	121.00±	36.00	96.00±	34.00
Cholesterol	210.0±	2.00	207.50±	65.50	137.50±	5.50	195.00±	62.00
Triglycerol	27.50±	9.50	41.50±	1.50	16.50±	4.50	30.00±	2.00
Creatinine	0.80±	0.00	0.65±	0.05	0.70±	0.30	0.60±	0.10

ALT, Alanine Transaminase; AST, Aspartate Transaminase; ALP, Alkaline Phosphatase; BUN, Blood Urea Nitrogen, IPhos, Inositol phosphate; Ck, Creatinin Kinase Each value is mean±S.D.

Table IX. Hematological values of female beagle dogs in the 1st blood collection

Groups	Control		T1		T2		T3	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal		Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) parameter—No. of Animal	
	0	2	1.15	2	11.5	2	115	2
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	673.00±	3.35	623.50±	35.50	620.50±	10.50	539.50±	102.5
WBC ($\times 50/\mu\text{l}$)	252.00±	0.35	221.50±	4.50	238.50±	26.50	294.50±	23.50
Eosinophil (%)	14.00±	71.50	3.50±	0.50	12.50±	6.50	5.50±	0.50
Banded neutrophil (%)	1.50±	0.10	2.00±	1.60	1.00		3.00±	2.00
Segmented neutrophil (%)	62.00±	2.65	68.50±	4.50	59.00±	7.00	58.50±	8.50
Lymphocyte (%)	23.00±	0.40	27.00±	3.00	24.50±	4.50	24.00	
Total protein (g/dl)	5.80±	0.40	6.35±	0.55	6.00		6.10±	0.20
Fibrin (mg/dl)	200.00±	4.00	350.00±	150.00	100.00		200.00	
PCV (%)	38.00±	24.00	35.00±	2.00	34.50±	2.50	36.50±	1.50
Hemoglobin (g/dl)	0.40±	65.50	0.39±	0.03	0.40±	0.06	0.34±	0.07

RBC, Red Blood Cell; WBC, White Blood Cell; PCV, Packed Cell Volume

실험 0일째 혈액 채취한 혈액학 및 혈청 생화학적 검사 소견은 모두 정상치를 나타내었다(Tables III, IV, IX, X). 실험 14일째 혈액 채취한 혈액학 및 혈청 생화학적 검사

소견은 WBC가 암컷, 수컷 모두에서 용량 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다(Tables V, VI, XI, XII). 다른 검사 항목들은 대조군과 비교하여 보았을 때 정상범위

Table X. Hematological values of male beagle dogs in the 1st blood collection

Groups	Control	T1	T2	T3
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	1.15	11.5	115
parameter—No.of Animal	2	2	2	2
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	578.00 \pm 28.00	561.00 \pm 55.00	631.00 \pm 77.00	601.00 \pm 5.00
WBC ($\times 50/\mu\text{l}$)	297.00 \pm 4.20	276.00 \pm 9.00	209.50 \pm 19.50	259.00 \pm 51.00
Eosinophil (%)	5.00 \pm 4.00	4.50 \pm 2.50	9.50 \pm 4.50	7.00 \pm 5.00
Banded neutrophil (%)	—	2.50 \pm 1.50	11.00	2.50 \pm 1.50
Segmented neutrophil (%)	64.00 \pm 4.00	64.00 \pm 5.00	55.00 \pm 2.00	60.50 \pm 3.50
Lymphocyte (%)	26.50 \pm 2.50	25.00 \pm 0.00	24.00 \pm 1.00	26.50 \pm 1.50
Total protein (g/dl)	6.45 \pm 0.15	6.35 \pm 0.15	6.00 \pm 0.30	4.55 \pm 1.35
Fibrin (mg/dl)	200.00 \pm 0.00	400.00 \pm 200.00	150.00 \pm 50.00	200.00 \pm 50.00
PCV (%)	40.00 \pm 2.00	39.00 \pm 6.50	38.50 \pm 4.50	36.50 \pm 0.50
Hemoglobin (g/dl)	0.37 \pm 0.06	0.39 \pm 0.09	0.43 \pm 0.02	0.37 \pm 0.02

RBC, Red Blood Cell; WBC, White Blood Cell; PCV, Packed Cell Volume, Each values are mean \pm S.D.

Table XI. Hematological values of female beagle dogs in the 2nd blood collection

Groups	Control	T1	T2	T3
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	1.15	11.5	115
parameter—No.of Animal	2	2	2	2
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	780.00 \pm 55.00	696.50 \pm 70.50	672.00 \pm 69.00	848.50 \pm 7.50
WBC ($\times 50/\mu\text{l}$)	226.00 \pm 9.00	400.50 \pm 16.50	608.00 \pm 9.00	1852.50 \pm 454.50
Eosinophil (%)	1.00 \pm 2.50	6.00 \pm 1.00	4.00	3.00
Banded neutrophil (%)	9.00 \pm 1.50	6.00 \pm 2.00	2.00	6.00
Segmented neutrophil (%)	49.00 \pm 5.00	71.50 \pm 0.50	73.50 \pm 0.50	63.50 \pm 2.50
Lymphocyte (%)	38.00 \pm 0.00	16.00 \pm 3.00	23.00 \pm 0.00	24.50 \pm 2.50
Total protein (g/dl)	7.20 \pm 0.15	6.95 \pm 0.15	6.65 \pm 0.15	6.45 \pm 0.05
Fibrin (mg/dl)	100.00 \pm 200.00	200.00	200.00	250.00 \pm 50.00
PCV (%)	40.00 \pm 6.50	39.50 \pm 3.50	35.50 \pm 0.50	36.00 \pm 1.00
Hemoglobin (g/dl)	0.43 \pm 0.09	0.42 \pm 0.04	0.40 \pm 0.01	0.38 \pm 0.03

RBC, Red Blood Cell; WBC, White Blood Cell; PCV, Packed Cell Volume, Each values are mean \pm S.D.

Table XII. Hematological values of male beagle dogs in the 2nd blood collection

Groups	Control	T1	T2	T3
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	1.15	11.5	115
parameter—No.of Animal	2	2	2	2
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	704.00 \pm 30.00	762.00 \pm 146.00	607.00 \pm 77.00	502.00 \pm 65.00
WBC ($\times 50/\mu\text{l}$)	241.00 \pm 0.00	594.50 \pm 125.50	827.00 \pm 156.00	1239.50 \pm 201.50
Eosinophil (%)	12.00 \pm 1.50	1.50 \pm 0.50	3.00 \pm 2.00	1.50 \pm 0.50
Banded neutrophil (%)	5.00 \pm 0.00	10.50 \pm 9.50	9.50 \pm 0.50	8.50 \pm 1.50
Segmented neutrophil (%)	57.50 \pm 0.50	64.50 \pm 1.50	69.00 \pm 3.50	66.50 \pm 10.50
Lymphocyte (%)	27.00 \pm 2.00	22.50 \pm 8.50	18.50 \pm 1.50	23.50 \pm 8.50
Total protein (g/dl)	6.70 \pm 0.30	6.50 \pm 0.20	6.20 \pm 0.00	6.25 \pm 0.05
Fibrin (mg/dl)	200.00 \pm 100.00	350.00 \pm 50.00	350.00 \pm 50.00	250.00 \pm 50.00
PCV (%)	48.00 \pm 6.00	44.50 \pm 12.50	36.50 \pm 5.00	29.00 \pm 2.00
Hemoglobin (g/dl)	0.39 \pm 0.02	0.39 \pm 0.01	0.39 \pm 0.03	0.33 \pm 0.03

RBC, Red Blood Cell; WBC, White Blood Cell; PCV, Packed Cell Volume, Each values are mean \pm S.D.

Table XIII. Hematological values of female beagle dogs in the 3rd blood collection

Groups	Control		T1		T2		T3		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	parameter—No.of Animal	0	2	1.15	2	11.5	2	115
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	635.00 \pm	55.00	804.00 \pm	69.00	795.00 \pm	135.00	478.00 \pm	121.00	
WBC ($\times 50/\mu\text{l}$)	226.00 \pm	9.00	344.50 \pm	40.50	588.50 \pm	70.50	766.50 \pm	599.50	
Eosinophil (%)	2.00 \pm	2.50	11.00 \pm	4.00	3.00 \pm	1.00	3.50 \pm	2.50	
Banded neutrophil (%)	7.00 \pm	1.50	5.50 \pm	3.50	13.00 \pm	10.00	6.00 \pm	2.00	
Segemented neutrophil (%)	77.00 \pm	5.00	58.50 \pm	4.50	72.50 \pm	14.50	71.00 \pm	16.00	
Lymphocyte (%)	21.00 \pm	0.00	22.00 \pm	2.00	11.00 \pm	3.00	19.00 \pm	11.50	
Total protein (g/dl)	6.90 \pm	0.15	6.60 \pm	0.30	6.70 \pm	0.30	6.15 \pm	0.15	
Fibrin (mg/dl)	200.00 \pm	100.00	150.00 \pm	50.00	250.00 \pm	50.00	550.00 \pm	150.00	
PCV (%)	41.00 \pm	6.50	38.00 \pm	1.00	43.00 \pm	3.00	31.50 \pm	0.50	
Hemoglobin (g/dl)	0.33 \pm	0.09	0.36 \pm	0.00	0.35 \pm	0.02	0.33 \pm	0.00	

RBC, Red Blood Cell; WBC, White Blood Cell; PCV, Packed Cell Volume, Each values are mean \pm S.D.

Table XIV. Hematological values of male beagle dogs in the 3rd blood collection

Groups	Control		T1		T2		T3		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	parameter—No.of Animal	0	2	1.15	2	11.5	2	115
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	1123.00 \pm	8.50	681.50 \pm	107.50	702.00 \pm	16.00	453.00 \pm	132.00	
WBC ($\times 50/\mu\text{l}$)	222.00 \pm	5.00	321.50 \pm	18.50	413.00 \pm	33.00	962.50 \pm	349.50	
Eosinophil (%)	2.00 \pm	0.50	4.50 \pm	1.50	1.00 \pm	0.00	4.00 \pm	0.00	
Banded neutrophil (%)	9.50 \pm	0.50	5.50 \pm	2.50	6.50 \pm	0.50	15.00 \pm	1.00	
Segemented neutrophil (%)	56.50 \pm	4.00	66.50 \pm	5.50	73.50 \pm	2.50	58.50 \pm	6.50	
Lymphocyte (%)	32.50 \pm	3.50	26.50 \pm	6.50	18.50 \pm	2.50	23.50 \pm	6.50	
Total protein (g/dl)	7.10 \pm	0.10	7.00 \pm	0.10	6.60 \pm	0.10	6.75 \pm	0.65	
Fibrin (mg/dl)	250.00 \pm	50.00	250.00 \pm	50.00	250.00 \pm	50.00	300.00 \pm	100.00	
PCV (%)	38.00 \pm	1.00	48.00 \pm	7.00	37.00 \pm	3.00	37.00 \pm	6.00	
Hemoglobin (g/dl)	0.38 \pm	0.01	0.32 \pm	0.02	0.38 \pm	0.02	0.28 \pm	0.06	

RBC, Red Blood Cell; WBC, White Blood Cell; PCV, Packed Cell Volume, Each values are mean \pm S.D.

내에 있었다. 부검 직전에 실시한 혈액학 및 혈청 생화학적 검사 결과 WBC가 압컷, 수컷 모두에서 용량 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다(Tables VII, VIII, XIII, XIV). 역시 다른 검사 항목들은 대조군과 비교하여 보았을 때 정상범위내에 있었다.

부검소견

대조군을 포함한 전용량군에 있어서 영양상태는 양호하였으며, 털의 상태도 좋았다. 부검소견으로서는, 림프절의 혈액흡수, 폐문 림프절에 있어서 탄분 침착 등이 보였으며 이러한 소견은 용량군에 관계없이 산발적으로 관찰되었다. 대퇴골 골수는 시험 전군에서 모두 적색 골수를 보였다.

체중에 대한 각 장기의 상대중량

부검시 채취한 주요 장기를 적출하여 무게를 달아 체중에 대한 각 장기의 상대중량을 구한 결과 모든 처치군은 대조군에 비해 유의한 변화를 보이지 않았다.

병리조직 검사 소견

간장은 대조군에서 Kupffer cell에 의한 황색색소의 탐식이 관찰되었으며(Fig. 1), 고용량군에서 megakaryocytes가 소수 관찰되었다(Fig. 2).

비장은 대조군 모두 백비수가 발달하였으며 수질부에는 reticuloendothelial system과 림파구로 구성되어 있었으며 세포밀도가 정상적인 수준이었다. 소수의 megakaryocytes가 2예 관찰되었다(Fig. 3). 저용량군에서는 중등도 골수의 조혈이 2예, 경도 골수의 조혈이 2예 관찰되었으며 경도의 hemosiderin 침착도 관찰되었다(Fig. 4). 골수의 조혈을 나타내는 비장의 적비수내에 megakaryocytes와 적아구가 다소 관찰되었다. 중간 용량 투여군에 있어서는 골수의 조혈이 경도 1예, 중등도 3예가 관찰되었으며(Fig. 5) 경도의 hemosiderin 침착도 3예 관찰되었다. 고용량 투여군에서는 골수의 조혈이 중등도 1예, 고도가 3예 관찰되었다. 고도의 골수의 조혈에서 관찰된 비장은 적비수에서 세포의 밀도가 고도로 증가하였으며 증가한 세포들은 핵과 세포질이 농밀한 적아

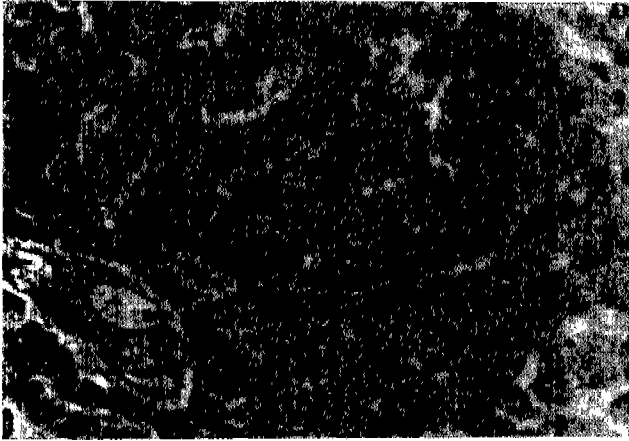


Fig. 1. The liver of beagle dog treated with vehicle. H&E, $\times 400$.

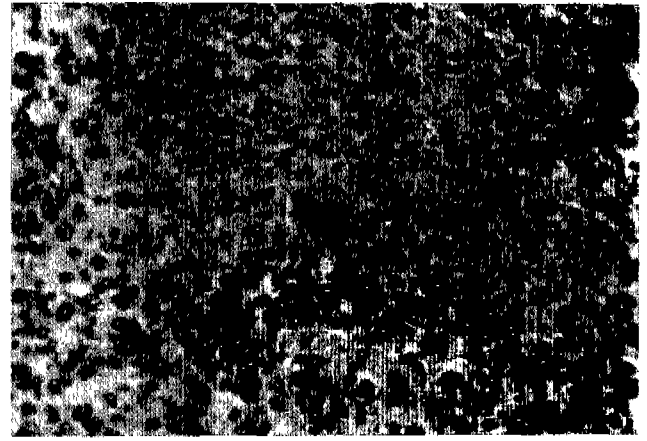


Fig. 3. The spleen of beagle dog treated with vehicle. Megakaryocyte was observed. H&E, $\times 100$.

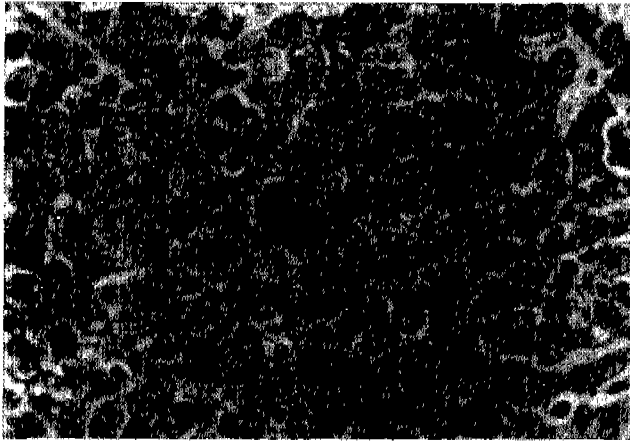


Fig. 2. The liver of beagle dog treated with DA-3030(G-CSF) $115 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. Megakaryocyte, were observed(arrow head). H&E, $\times 400$.

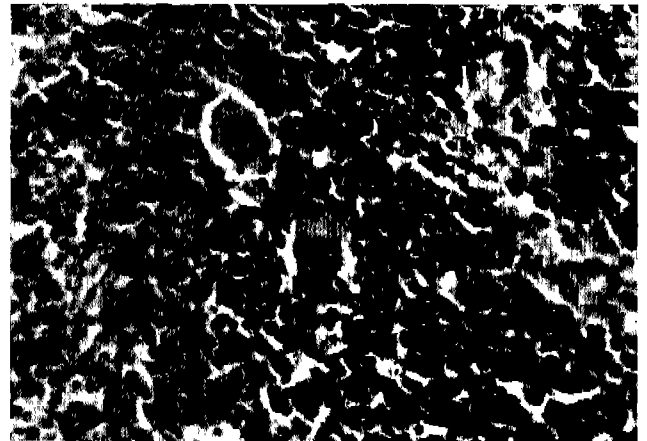


Fig. 4. The spleen of beagle dog treated with DA-3030(G-CSF) $115 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. Megakaryocyte, hemosiderin deposit (small arrow head), normoblast were observed(small opened arrow head). H&E, $\times 100$.

구들과 다핵 또는 거대핵을 갖으며 호산성의 풍부한 세포질을 갖는 megakaryocytes로 이루어져 있었다(Fig. 6a, 6b). 백비수는 경도 위축된 상을 보이고 있었다. hemosiderin은 전례에서 경도 관찰되었다.

골수는 대조군에서는 정상적인 골수 구성세포와 지방이 혼재하고 있었다(Fig. 7). 저용량군에서는 골수의 구성세포의 밀도가 대조군보다 높았으며(Fig. 8), 이러한 결과는 중간용량(Fig. 9) 및 고용량군(Fig. 10)에 있어서 뚜렷한 차이를 나타내었다. 고용량군에서 골수의 구성세포의 밀도가 고도로 증가하여 세포사이의 부분이 거의 관찰되지 않았으며, 구성세포중에는 megakaryocytes와 적아구가 고도로 증가하고 있었다. 지방과립도 대조군에 비하여 감소하고 있었다. 골아세포는 정상 범위에서 관찰되었으며, 파골세포는 거의 관찰되지 않았다.

신장은 대조군을 포함한 전례에서 수질부의 세뇨관내에 calcium 침착이 관찰되었다.



Fig. 5. The spleen of beagle dog treated with DA-3030(G-CSF) $115 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. Megakaryocyte, (arrow haad) and normoblast(opened arrow head) were observed. H&E, $\times 100$.

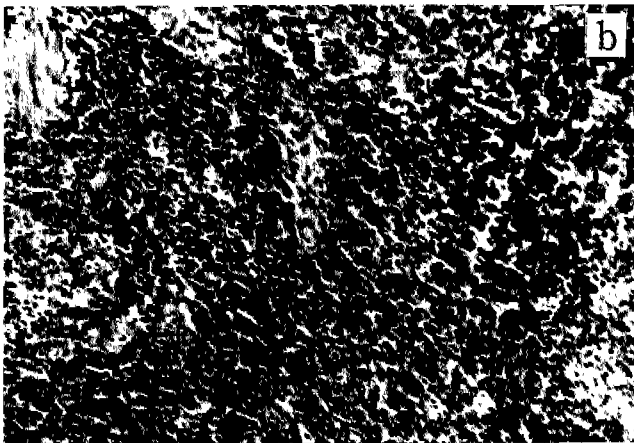
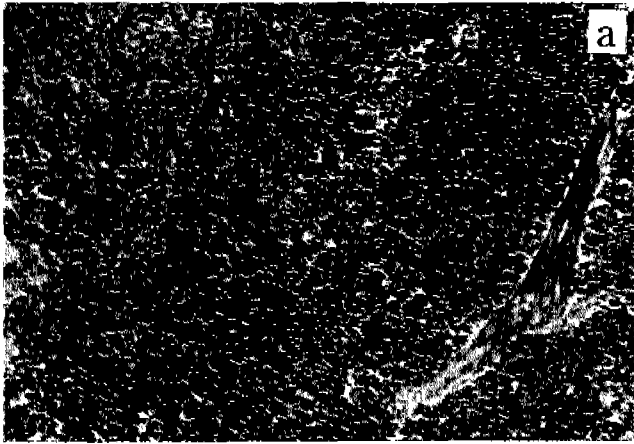


Fig. 6. (a) The spleen of beagle dog treated with DA-3030(G-CSF) 115 µg/kg/day. Highly increased normoblast, megakaryocytes were observed. H&E, ×100. (b) Highly magnification of Fig. 6a. H&E, ×400.

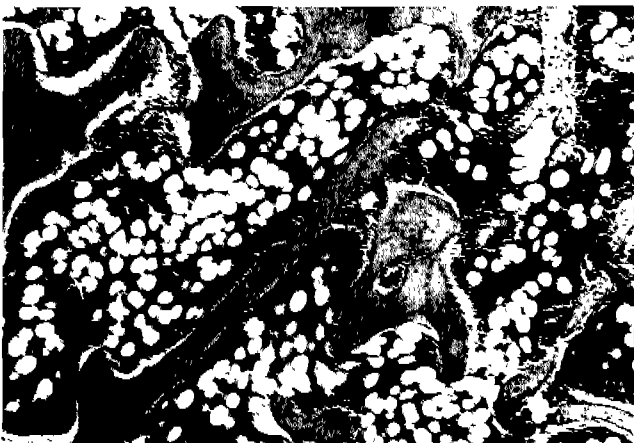


Fig. 7. The bone marrow of beagle dog treated with vehicle. H&E, ×400.

폐는 살처분시 영향으로 전례가 호기의 상을 보이고 있었다. 용량군과 관계없이 기관, 기관지 림과절에서는 탄분침착이 관찰되었다.

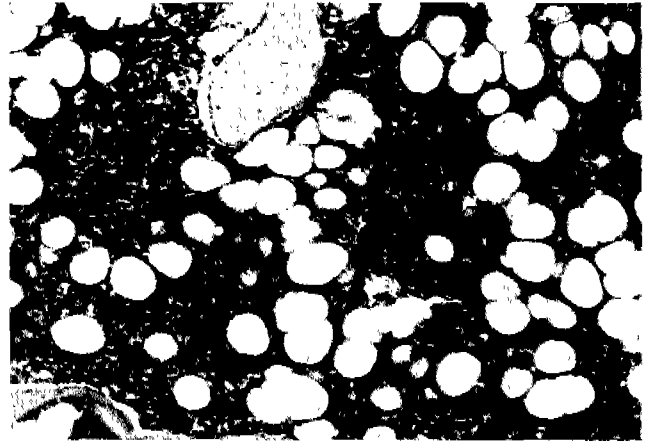


Fig. 8. The bone marrow of beagle dog treated with DA-3030(G-CSF) 1.15 µg/kg/day. Bone marrow cells were increased and mild hematopoiesis were observed. H&E, ×100.

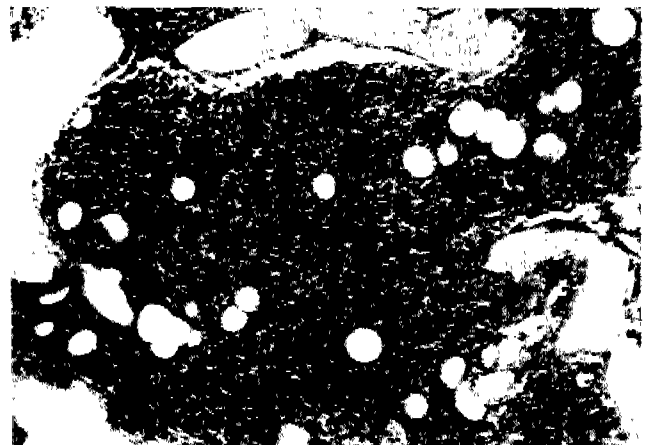


Fig. 9. The bone marrow of beagle dog treated with DA-3030(G-CSF) 1.15 µg/kg/day. The lipid droplet was decreased, and normoblast colony(arrow head), polynuclear megakaryocyte were increased. H&E, ×100.

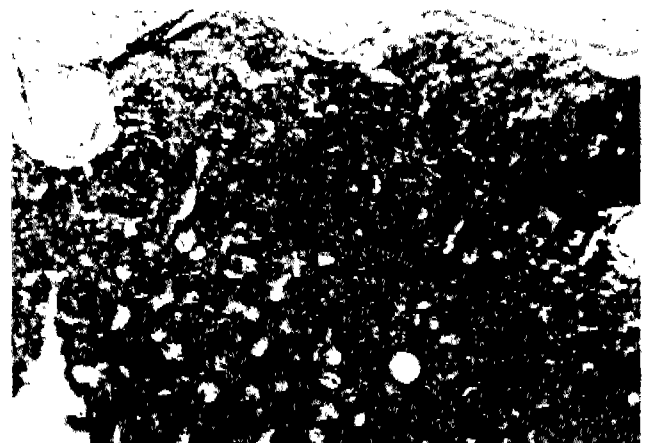


Fig. 10. The bone marrow of beagle dog treated with DA-3030(G-CSF) 115 µg/kg/day. The lipid droplet was disappeared and normoblast colony, polynuclear megakaryocyte were highly increased. H&E, 100.

림프절에서 육안적으로 관찰되었던 혈액흡수는 혈액의 수질부 저류로 확인되었다. 그 이외의 심장, 위, 소장, 대장, 생식기, 췌장, 타액선, 부신, 갑상선, 부갑상선, 뇌, 근육, 말초신경, 방광, 담낭 등의 장기에서는 특이한 병변을 관찰할 수 없었다.

고 찰

본 시험은 동아제약(주)에서 개발중인 DA-3030(G-CSF)를 임상투여 예상경로인 정맥내로 1일 1회 주7회 28일 연속투여 후 부검을 실시하였다. 대조군 및 모든 투여군에서 시험기간중 사망한 동물은 없었으며, 시험물질의 독성이라고 여겨지는 체중변화, 사료, 음수섭취량 및 일반적인 임상증상을 나타내지 않았다. 안검사 및 뇨검사 소견에서 유의할 만한 이상을 관찰하지 못했다.

혈액학 및 혈청 생화학적 검사에서 WBC가 용량의존적으로 증가하였다. 이러한 WBC의 증가는 epinephrine 또는 corticosteroid에 대한 반응으로 생리적으로 증가하는 경우와 pyelonephritis, bacterial infection, hematopoietic 또는 hepatic neoplasia 같은 상태에서 나타날 수 있다(Hayes, 1989). 본 시험에서는 epinephrine이나 corticosteroid 등을 사용하지 않았고 조직학적 결과에서 bacterial infection 등의 병적인 상태를 보이지 않았으므로 이는 시험약제인 DA-3030(G-CSF)의 약리작용에 의한 것으로 사료된다.

더우기 병리조직학적 검사결과 고용량 투여군의 1예에서 간에 megakaryocyte가 나타나고 비장은 고용량군에서는 고도로, 저용량군에서는 경도로 megakaryocyte 및 적아구가 출현하여 골수의 조혈이 용량의존성으로 증가하고 있음을 알 수 있었다.

골수에서도 고용량군에서는 구성세포의 밀도가 고도로 증가하며 세포 사이의 구분이 힘들었고 megakaryocytes와 적아구가 고도로 증가하는 등 조혈기능이 왕성하게 일어나고 있음을 알 수 있었다.

그 외의 모든 장기에서는 특이한 병변을 관찰할 수 없었다.

위의 결과를 종합하여 보면 DA-3030(G-CSF)을 1일 1회, 주7회, 28일간 115 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 11.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 1.15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 을 정맥내로 투여한 결과 최대내성용량은 최고용량인 115 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 이상인 것으로 사료되며, DA-3030(G-CSF)의 약리작용인 조혈기능 향상효과와 WBC의 증가 이외의 독성은 나타내지 않았다.

참고문헌

Donahue, R. E., Wang, E. A., Stone, D. K. (1986). Stimulation

Med. **317**, 593-8.

Gabrilove, J. L., Jakubowski, A., Scher, H., Sternberg, C., Wong, G., Grous, J., Yagoda, A., Fain, K., Moore, M. A. S., Clarkson, B., Oettgen, H. F., Alton, K., Welte, K. and Souza, L. (1988). Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. *New Eng. J. of Med.* **318**, 1414-1422.

Gillo, A. P., Bonilla, M. A., Potter, G. P., et al. (1987). Effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on hematopoietic reconstitution after autologous bone marrow transplantation in primates. *Transplant Proc.* **6** (Suppl 7), 153-6.

Groopman, J. E., Mitsuyasu, R. T., DeLeo, M. G., Oette, D. H., Golde, D. W. (1987). Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myelopoiesis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J.*

Hayes, A. W. (1989). Principles and Methods of Toxicology. 2nd Ed, pp502, Raven Press, New York.

Kawasaki, E. S., Lander, M. B., Wang, A. M., et al. (1985). Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor(CSF-1). *Science*, **230**, 291-6.

Mayer, P., Lam, C., Obenus, H., Liehl, E., Besemer, J. (1987). Recombinant Human GM-CSF induces leukocytosis and activates peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in nonhuman primates. *Blood*, **70**, 206-13.

Pizzo, P. A., Young, R. D. (1985). Infections in the cancer patient. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer: principles and practice of oncology. 2nd ed. Philadelphia: J. B., Lippincott, 1936-98.

Souza, L. M., Boone, T. C., Gabrilove, J., et al. (1986). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukmal and leukmic myeloid cells. *Science*, **232**, 61-5.

Stemberg, C. N., Yagoda, A., Scher, H., et al. (1985). Preliminary results of M-VAc(methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional carcinoma of urothelium. *J. Urol.* **133**, 403-7.

Welte, K., Bonila, M. A., Gillio, A. P., et al. (1987). In vivo effects of recombinant human G-CSF in therapy induced neutropenias in primates. *Exp Hematol*, **15**, 72(abstract).

Welte, K., Bonila, M. A., Gillio, A. P., et al. (1987). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide-treated primates. *J. Exp Med.* **165**, 941-8.

Wong, G. G., Witek, J. S., Temple, P. A., et al. (1985). Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science*. **228**, 810-5.

Yang, Y. C., Ciarletta, A. B., Temple, P. A., et al. (1986). Human IL-3(multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell*, **47**, 3-10.

of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature*, **321**, 872-5.