

토끼에 대한 천연형인성장호르몬 DA-3002의 국소자극성

김옥진* · 안병옥 · 이순복 · 김원배 · 양중익

동아제약(주) 연구소

Local Irritation of DA-3002, an Authentic Recombinant Human Growth Hormone, in Rabbits

Ok Jin KIM*, Byoung Ok AHN, Soon Bok LEE,
Won Bae KIM and Junnick YANG

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

(Received January, 25, 1995; accepted February 28, 1995)

Abstract—The local irritation studies of DA-3002, an authentic recombinant human growth hormone (rhGH), were carried out in rabbits after the following treatment ; application into the conjunctival sac of the eye (single), single subcutaneous and intramuscular injection, 7-day repeated subcutaneous and intramuscular injection. The results obtained were as follows. In the result of ocular irritation test, 0.16% solution of DA-3002 could be considered as a non-irritating material. In single subcutaneous and intramuscular irritation test, the irritancy of 0.16% DA-3002 solution was not so much different from that of saline. The local irritation of DA-3002 by 7-day repeated injection was negligible and similar to that of saline by both subcutaneous and intramuscular routes. These results suggest that DA-3002 has no irritating activity when injected through subcutaneous or intramuscular route for clinical practice as 0.16% solution.

Keywords □ DA-3002, recombinant human growth hormone, toxicity, local irritation

토끼에 대한 천연형인성장호르몬 DA-3002의 국소 자극성

DA-3002는 동아제약(주)연구소에서 유전자재조합법으로 생산한 인성장호르몬(recombinant human growth hormone, rhGH)으로서 뇌하수체 기능저하에 의한 왜소증(hypopituitary dwarfism)에 적용하기 위하여 개발 예정인 물질이다. 뇌하수체 전엽에서 분비되는 성장호르몬(hGH)은 간세포 표면의 수용체와 결합하여 인슐린 유사성장인자(insulin-like growth factor-I, IGF-I)의 합성 및 분비를 촉진시키고 분비된 IGF-I은 직접적으로 세포의 단백질합성을 증가시키며 골격근세포와 연골세포에 특이적으로 반응하여 세포성장과 분열을 촉진하고 성장효과를 나타낸다(Martini, 1989). 성장기의 hGH결핍은 골성장의 둔화로 인한 왜소증을 유발하나 근래에 유전자재조합기술의 발전으로 rhGH의 대량생산이 가능하게

되어 임상에서 많은 환아들이 치료를 받을 수 있게 되었다. 또한 최근에는 유전적왜소증, 체질성성장지연, Turner증후군, 연골무형성증(achondroplasia) 등의 hGH결핍에 의하지 않은 성장장애 환아에게도 그 적응증을 확대하여 시험하고 있다(Gertner 등, 1984; Schaff-Blass 등, 1984). 이러한 소아에서의 성장호르몬 치료에 대한 이론적인 근거는 왜소증을 가진 아동이 정상아동에 비해 성장호르몬의 분비가 적을 것이라는 가정에 기초를 두고 있으며 실제로 이러한 환아들에서 단기간의 관찰이기는 하지만 치료 첫 1년동안에는 치료전에 비해 현저한 성장증가를 보였다는 보고가 증가하고 있다(Cara 등, 1990; Stahke, 1984). DA-3002는 발현체인 대장균(*E.coli*)에서 유래된 N말단의 메치오닌기를 제거하여 천연형 인성장호르몬과 동일한 아미노산배열을 가지고 있다. 임상적용시 DA-3002는 피하 또는 근육주사로 1년 이상의 장기간 반복투여하는 것으로 예정되어 있으므로 반복투여에 의한 적용부위의 자극성을 검토해야할 것으로 예상되었다. 본 연구에서는 DA-3002에 대한 안전성평가의

* To whom correspondence should be addressed.

일환으로 임상적용시 국소자극성을 검토하고자 토끼를 이용하여 안점막자극시험과 피하 및 근육내로 단회 및 7일연속투여에 의한 국소자극시험을 실시하였다.

실험방법

시험물질 시험에 사용된 DA-3002(Lot No. TS-9402)는 동아제약(주)연구소 생물공학실에서 공급받아 사용하였으며 시료상태는 백색괴상동결건조품으로 순도는 SDS-PAGE법에 의한 분석으로 95%이상이었으며 역가는 면역측정검사항으로 측정시 4 IU/vial이었다. 시험물질은 냉장차광으로 보관하였으며 사용시 주사용멸균증류수를 사용하여 임상예정농도인 0.16%(4 IU/ml)로 시험물질을 용시회석하여 사용하였다. 양성대조에 사용된 acetic acid는 純正化學株式會社(Lot no. OC5024)로부터 구입하여 사용하였다.

시험동물

시험에 사용된 동물은 2.0~3.0 kg의 웅성 New Zealand White계 토끼 50마리를 연암축산으로 부터 공급받아 1주일간의 순화사육을 거친뒤 건강한 동물 45마리를 사용하였다. 사육환경은 온도 22±3°C, 습도 55±10%, 조명시간 12시간(05:00~17:00)의 통상조건을 유지하였으며, 토끼용 스테인레스 케이지에 1마리씩 수용하였고 사료(토끼용사료, Purina)와 물(수도수)은 자유섭취시켰다.

안점막자극시험

1주일간의 순화사육기간을 거쳐 시험개시 24시간전 육안 및 검안경(Mini miroflex2, Heine)을 이용하여 안구, 각막손상의 이상유무를 확인 후 양안이 정상인 토끼 9마리를 선택하여 시험에 사용하였다. 임상사용예정농도인 DA-3002 0.16%액을 각각의 왼쪽 안구에 0.1 ml씩 점안 후 1군의 3마리는 20~30초 후 생리식염수를 사용하여 1분간 세척하고 오른쪽 눈을 비쳐치 대조군으로 사용하였다. 2군의 6마리는 DA-3002를 왼쪽 안구에 적용 후 세척하지 않고 관찰하며 오른쪽 눈을 비쳐치 대조군으로 사용하였다. 적용 후 3시간, 1, 2, 3, 4 및 7일에 관찰하고 평가는 국립보건안전연구원 "의약품 등의 독성시험기준"(1994년)의 안구병변의 등급표에 준하여 실시하고 이에 따른 평점을 산출 후 그 결과에 대한 자

극성의 정도판정은 국립보건안전연구원 "독성시험 표준작업지침서"(1993)의 안점막자극표에 의해 물질의 자극도를 구분하였다.

단회투여에 의한 국소자극시험

본 시험은 일본 후생성 "주사제의 국소자극성에 관한 시험법안"(厚生省資料, 1979)에 준하여 실시하였다. 순화사육을 거쳐 선별된 건강한 토끼 18마리의 후지외측 대퇴부를 투여 1일 전 제모하고 유성펜을 이용하여 주사할 부위를 표시하였다. 투여는 1회용 인슐린주사기(28 G 1/2 inch)를 사용하였고 균구성은 Table I과 같으며, 각 군마다 6마리의 토끼를 사용하였다. 1군에는 우측후지에 DA-3002 0.16%(4 IU/ml)액을, 좌측후지에는 생리식염수를 각각 1 ml씩 피하로 단회투여하였다. 2군에는 동량의 동일한 약물들을 좌우 후지의 외측광근(vastus lateralis musculus)내로 단회 근육주사하였다. 3군에는 양성대조를 위하여 6.0%의 acetic acid를 우측후지에 피하로, 좌측후지에는 근육내로 단회투여하였다.

7일연속투여에 의한 국소자극시험

순화사육을 거쳐 선별된 건강한 토끼 18마리의 후지외측대퇴부를 투여 1일 전 제모하고 유성펜을 이용하여 주사할 부위를 표시하였고 투여는 1회용 인슐린주사기(28 G 1/2 inch)를 사용하였다. 균구성은 Table II와 같으며, 각 군에는 각각 6마리의 토끼를 사용하였다. 1군에는 우측후지에 DA-3002 0.16%(4 IU/ml)액을, 좌측후지에는 생리식염수를 각각 0.5 ml씩 피하로 7일간 반복 투여하였다. 2군에는 동량의 동일한 약물들을 좌우 후지의 외측광근내로 7일간 반복하여 근육주사 하였다. 3군에는 양성대조를 위하여 0.75%의 acetic acid를 우측후지에 피하로, 좌측후지에는 근육내로 동일기간 동량을 주사하였다.

피하 및 근육자극시험의 평가방법

시험종료시까지 연일 임상증상을 관찰하였다. 투여종료 후 2일 및 7일에 각 군의 3마리씩을 각각 부검하여 주사부위의 병변을 관찰하고 digital caliper를 사용하여 병변의 장경과 단경을 측정하여 이들의 곱으로 병변의 면적을 산출하였다. 주사부위의 피하 및 근육을 10% 중성포르말린용액에 24시간 이상 고정하고 병리표본작성을 위한 통상과정을 거쳐 병리조직학적검사를 실시하

Table I. Experimental design for local irritation test by single injection with DA-3002.

Group	Substance	Site of inject.	Route of inject.	No. of animal.
1	DA-3002 (0.16%)	right	s.c.	6
	saline	left		
2	DA-3002 (0.16%)	right	i.m.	6
	saline	left		
3	6.0% Acetic acid	right	s.c.	6
	6.0% Acetic acid	left	i.m.	

Table II. Experimental design for local irritation test by repeated injection of DA-3002 for 7 days.

Group	Substance	Site of inject.	Route of inject.	No. of animal.
1	DA-3002 (0.16%)	right	s.c.	6
	saline	left		
2	DA-3002 (0.16%)	right	i.m.	6
	saline	left		
3	0.75% Aetic acid	right	s.c.	6
	0.75% Aetic acid	left	i.m.	

였다. 이상의 결과를 종합하여 saline과 acetic acid에 의하여 형성된 병변의 크기 및 색조, 병리조직학적 검사결과와 비교하여 자극도를 평가하였다.

통계학적 검사

피부병변측정치를 rank transformation한 후 Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA를 실시하고 유의차가 인정되었을 경우에 변환된 rank를 이용하여 Distribution free multiple comparison을 실시하여 군간 유의차를 검정하였다(Gad 등, 1989).

실험결과

안점막자극시험

일반증상 : 관찰기간중 세척군과 비세척군을 포함하여 DA-3002를 투약한 모든 동물에서 유의한 임상증상이 관찰되지 않았다.

투여부위 관찰 : DA-3002의 임상사용농도 0.16%(W/V)액을 결막낭내 투약한 후 3시간, 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일에 각막손상, 홍채의 충혈이나 빛에 대한 반응과 안검점막, 안구결막 등의 혈관상태, 결막의 부종 및 배출물의 유무 등을 관찰한 결과, 세척군과 비세척군 모두에서 시험기간동안 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table III, IV). 이상의 관찰에 의하여 0.16%의 DA-3002용

Table III. Eye irritation scores of irrigation group treated with DA-3002.

Time ^a	Animal No.	Cornea	Iris	Conjunctiva	Total score	M.O.I ^b	A.O.I ^c
3 hrs	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day-1	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day-2	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day-3	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day-4	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		
Day-7	1	0	0	0	0 ^d	0	
	2	0	0	0	0 ^d		
	3	0	0	0	0 ^d		

^aTime after topical application ^bMean ocular irritation index; Total score in each observation time/tested animals ^cAcute ocular irritation index; Max among M.O.I ^dDay-7 I.O.I(individual ocular index)

액은 세척 및 비세척시 모두 A.O.I(acute ocular irritation index)와 48시간이후의 M.O.I(mean ocular irritation index)가 0으로 무자극(non-irritating)물질에 해당되었다.

단회투여에 의한 국소자극성

임상증상 : 시험기간동안 약물과 관련한 임상증상이나 폐사에는 관찰할 수 없었으며, 생리식염수 근육내투여시 1마리의 개체에서 주사직후 가벼운 출혈이 있었다. 그

Table IV. Eye irritation scores of non-irrigation group treated with DA-3002.

Time ^a	Animal No.	Cornea	Iris	Conjunctiva	Total score	M.O.I ^b	A.O.I ^c
3hrs	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day-1	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day-2	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day-3	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day-4	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0		
	7	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0		
Day-7	4	0	0	0	0 ^d	0	
	5	0	0	0	0 ^d		
	6	0	0	0	0 ^d		
	7	0	0	0	0 ^d		
	8	0	0	0	0 ^d		

^aTime after topical application ^bMean ocular irritation index; Total score in each observation time/tested animals ^cAcute ocular irritation index; Max among M.O.I ^dDay-7 I.O.I(individual ocular index)

외에 시험기간중 약물의 영향으로 보이는 변화는 관찰되지 않았다.

육안소견 : DA-3002의 단회투여에 의한 육안소견은 Table V와 같다. 생리식염수의 피하주사와 근육주사에 의하여 투여 2일째 각각 한 개체에서 적색반점이 관찰되었으나 그외의 DA-3002 피하 및 근육주사군의 다른 개체에서는 투여 후 2일 및 7일에 유의한 변화가 인정되지 않았다. 양성대조를 위하여 6.0% acetic acid투여시 피하주사 2일째 3마리 모두에서 피하적의 암적색 반점을 관찰할 수 있었으며, 그 크기는 평균 566.7 mm²이었고 개체에 따라 정도의 차이는 있으나 피부케양을 관찰할 수 있었다. 투여 후 7일째 또한 3마리 모두에서 2일째와 유사한 피하적의 암적색반점이 관찰되었으며 그 크기는 평균 1016.7 mm²로 증가되었다. Acetic acid의 근육주사 부위에서는 투여 2일 및 7일째 모두 회백색바탕에 암적색출무늬를 가진 반점이 관찰되었으며 그 크기는 2일째 평균 383.3 mm²이었으나 7일째 1200.0 mm²으로 증가하였다. 피하 및 근육주사시 6.0% acetic acid 투여에

의한 병변의 크기는 생리식염수에 의한 것과 비교하여 통계학적으로 유의성이 인정되었다.

병리조직학적 소견 : 병리조직학적 검사결과는 Table VI, VII와 같다. 피하주사에 의한 국소자극성시험결과 투여후 2일째 육안소견으로 적색반점이 관찰된 생리식염수투여군의 한 개체에서 피하적에 미약한 혈구의 유출이 관찰되었으나 그 외에 생리식염수나 DA-3002의 투여에 의하여 특기할 만한 변화가 관찰되지 않았으며 투여 7일후에는 모든 개체에서 유의한 변화가 인정되지 않았다. 반면 acetic acid투여군은 투여 2일 및 7일째 표피(cutaneous layer)의 각화상피층의 괴사 및 탈락에 의한 케양병소가 형성되었고, 피하적(subcutaneous layer)에 수중성변화와 염증세포의 침윤 및 대식구에 의한 탐식상의 소견과 국소적으로 출혈을 동반한 괴사소견을 관찰할 수 있었으며 인근조직에서는 신생혈관을 포함한 육아조직의 형성을 관찰할 수 있었다. 또한 피하적에 인접한 근육층의 일부 근육조직에서는 섬유화에 의한 막형성이 관찰되었다.

Table V. Macroscopic findings of the injection sites at 2 and 7 days after single administration of DA-3002.

Route of inject.	Compound	Animal No.	Day 2		Day 7	
			Size (mm ²)	Color	Size (mm ²)	Color
s.c	Saline	1	0	—	0	—
		2	0	—	0	—
		3	4	Red spot	0	—
		Mean±SD	1.3±1.9		0±0	
	DA-3002	1	0	—	0	—
		2	0	—	0	—
		3	0	—	0	—
		Mean±SD	0±0		0±0	
	6.0% Acetic acid	1	500	Red spot	1750	Red spot
		2	600	Red spot	900	Red spot
		3	600	Red spot	400	Red spot
		Mean±SD	566.7±47.1 ^a		1016.7±557.3 ^a	
i.m	Saline	1	6	Red spot	0	—
		2	0	—	0	—
		3	0	—	0	—
		Mean±SD	2.0±2.8		0±0	
	DA-3002	1	0	—	0	—
		2	0	—	0	—
		3	0	—	0	—
		Mean±SD	0±0		0±0	
	6.0% Acetic acid	1	200	Grey spot with red streak	1500	Grey spot with red streak
		2	200	Grey spot with red streak	1200	Grey spot with red streak
		3	750	Grey spot with red streak	900	Grey spot with red streak
		Mean±SD	383.3±259.3 ^a		1200.0±244.9 ^a	

^aSignificantly different from saline control (p<0.05)

Table VI. Histopathological findings of the skin after single subcutaneous injection of DA-3002.

Necropsy day	Day 2									Day 7								
	Saline			DA-3002			6.0% AA			Saline			DA-3002			6.0% AA		
Compound	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Animal No.																		
Cutaneous layer																		
Ulcer	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	+
Subcutaneous layer																		
Edema	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	++	+	+
Cell infilt.	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	+	++	+
Focal hemorrhage	-	-	±	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	+
Focal necrosis	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	+
Granulation	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	+
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	+	++	±	-	-	-	-	-	-	+++	++	++
Muscular layer																		
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	-	-	++	+	+

Grade: -, No changes; ±, Very slight, +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

Table VII. Microscopic findings of vastus lateralis m. after single intramuscular injection of DA-3002.

Necropsy day	Day 2									Day 7								
	Saline			DA-3002			6.0% AA			Saline			DA-3002			6.0% AA		
Compound	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Animal No.																		
Muscle fiber																		
Degeneration	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Necrosis	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Phagocytosis	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	++
Calcification	-	-	-	-	-	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	++
Interstitium																		
Edema	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Cell infilt.	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+	++
Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Granulation	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	+

Grade: -, No changes; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

근육주사에 의한 국소자극성시험결과 생리식염수 및 DA-3002투여에 의하여 투여 2일 및 7일째 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다. 6.0% acetic acid투여군에서는 근섬유의 변성 및 피사와 대식구에 의한 탐식상이 관찰되었으며 간질조직의 수종성변화와 대식구위주의 염증세포 침윤 및 출혈소견이 관찰되었다. 병변부위주위에서는 육아조직의 형성과 섬유화가 관찰되기도 하였다.

7일연속투여에 의한 국소자극성

임상증상 : 시험기간동안 유의한 임상증상이나 폐사에는 관찰할 수 없었으며, 투여 2일에 DA-3002 근육투여시 1마리의 개체에서 주사직후 가벼운 출혈이 있었다. 투여 3일 이후 acetic acid 피하 및 근육투여시 간혹 주사직후 경미한 출혈이 관찰되었으나, 그외에 시험기간중 약물의 영향으로 보이는 변화는 관찰되지 않았다.

육안소견 : DA-3002의 7일연속투여에 의한 육안소견은

Table VIII과 같다. 생리식염수와 DA-3002의 피하주사 종료 후 2일째 각각 두 개체의 주사부위 피하직에 국소적인 적색반점이 관찰되었으나 이 후 7일째에는 어떤 개체에서도 유의한 변화가 인정되지 않았으며, 동일 약물들의 근육주사에 의해서는 투여종료 후 2일 및 7일째 어느 개체에서도 특이한 병변을 관찰할 수 없었다. 양성대조로 0.75% acetic acid투여시 투여 종료 후 2일에 3마리 모두에서 피하직의 암적색 반점을 관찰할 수 있었으며, 그 크기는 평균 200.0 mm²이었고 개체에 따라 정도의 차이는 있지만 피부깨양과 인접근막에 황색막성 물질(yellow membranous material)의 부착을 볼 수 있었다. 투여종료 후 7일째 또한 3마리 모두에서 2일째와 유사한 피하직의 암적색반점이 관찰되었으며 그 크기는 평균 633.3 mm²으로 증가되었다. Acetic acid의 근육주사에 의하여는 투여종료 후 2일 및 7일째 모두에서 주

Table VIII. Macroscopic findings of the injection sites at 2 and 7 days after 7-day repeated administration of DA-3002.

Route of inject.	Compound	Animal No.	Day 2			Day 7				
			Size (mm ²)			Color	Size (mm ²)			Color
s.c	Saline	1	0			—	0			—
		2	100			Red spot	0			—
		3	30			Red spot	0			—
		Mean±SD	43.3±41.9				0±0			
	DA-3002	1	80			Red spot	0			—
		2	40			Red spot	0			—
		3	0			—	0			—
		Mean±SD	40.0±32.7				0±0			
	0.75%	1	100			Red spot	300			Red spot
2		400			Red spot	100			Red spot	
3		100			Red spot	1200			Red spot	
Mean±SD		200.0±141.4 ^a				633.3±402.8 ^a				
i.m	Saline	1	0			—	0			—
		2	0			—	0			—
		3	0			—	0			—
		Mean±SD	0±0				0±0			
	DA-3002	1	0			—	0			—
		2	0			—	0			—
		3	0			—	0			—
		Mean±SD	0±0				0±0			
	0.75% Acetic acid	1	600			Grey spot with red streak	100			Grey spot with red streak
		2	100			Grey spot with red streak	100			Grey spot with red streak
		3	100			Grey spot with red streak	200			Grey spot with red streak
		Mean±SD	266.7±235.7 ^a				133.3±47.1 ^a			

^aSignificantly different from saline control (p<0.05)

Table IX. Histopathological findings of the skin after 7-day repeated subcutaneous injection of DA-3002.

Necropsy day	Day 2									Day 7								
	Saline			DA-3002			0.75% AA			Saline			DA-3002			0.75% AA		
Animal No.	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Cutaneous layer																		
Ulcer	—	—	—	—	—	—	++	+	+	—	—	—	—	—	—	+	++	++
Subcutaneous layer																		
Edema	—	—	—	—	—	—	+	++	+	—	—	—	—	—	—	+	+	++
Cell infiltr.	—	—	—	—	—	—	+	+	++	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Focal hemorrhage	—	±	±	±	±	—	++	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	++
Focal necrosis	—	—	—	—	—	—	++	+	++	—	—	—	—	—	—	+	+	++
Granulation	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	++	++
Fibrosis	—	—	—	—	—	—	++	++	+	—	—	—	—	—	—	++	++	+++
Muscular layer																		
Fibrosis	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	++	++

Grade: —, No changes; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

사부위 근육에 회백색바탕에 암적색줄무늬를 가진 반점 이 관찰되었으며 그 크기는 2일째 평균 266.7 mm²이였

으나 7일째 133.3 mm²으로 감소하였다. 피하 및 근육주 사시 0.75% acetic acid투여에 의한 병변의 크기는 생

Table X. Microscopic findings of vastus lateralis m. after 7-day repeated intramuscular injection of DA-3002.

Necropsy day	Day 2									Day 7								
	Saline			DA-3002			0.75% AA			Saline			DA-3002			0.75% AA		
Compound	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Animal No.	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Muscle fiber																		
Degeneration	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Necrosis	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Phagocytosis	-	-	-	-	-	-	++	+	++	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Calcification	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+++	++	++
Interstitium																		
Edema	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Cell infiltr.	-	-	-	-	-	-	++	+	++	-	-	-	-	-	-	++	++	+
Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	++	+	++									
Granulation	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	++	+
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	+++

Grade: -, No changes; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe

리식염수에 의한 것과 비교하여 통계학적으로 유의성이 인정되었다.

병리조직학적 소견: 병리조직학적 검사결과는 Table IX, X과 같다. 피하주사에 의한 국소자극성시험결과 투여 종료 후 2일째 육안소견으로 적색반점이 관찰된 생리식염수와 DA-3002투여군에서 각각 두 개체에서 피하직에 미약한 혈구의 유출이 관찰되었으나 그 외에 특기할 만한 변화가 관찰되지 않았으며 투여 7일 후에는 모든 개체에서 유의한 변화가 인정되지 않았다(Fig. 1). 반면 acetic acid투여군은 단회투여시험에서와 유사한 소견을 관찰할 수 있었으며 단회투여시험에 비하여 피하직의 섬유화가 두드러진 것이 특징이었다(Fig. 2).

7일연속 근육주사에 의한 시험결과 생리식염수 및 DA-3002투여에 의하여 투여 종료 후 2일 및 7일째 어떠한 병리조직학적인 소견을 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 반면 0.75% acetic acid투여군에서는 근섬유의 변성 및 괴사와 만성염증세포의 침윤을 관찰하였고 단회투여시험에 비하여 섬유화(fibrosis)가 두드러진 것이 특징이었다(Fig. 4).

고 찰

천연형 재조합 인성장호르몬인 DA-3002는 전임상시험으로 급성 및 아급성시험에서 임상사용량의 1200배 수준에서도 유의한 독성변화는 없는 것으로 보고되었다(Kim 등, 1994). 현재까지 rhGH에 의한 부작용은 국소 반응으로 세포침윤, 두드러기, 동통, 농양, 지방괴사 등의 발생보고와 전신반응으로 혈관신경성부종, 대퇴골 골단 증 등의 발생보고가 있으나 그 증상이 경미하고 약물과 관련한 확실한 증거는 아직 없으며 임상에서 거의 문제가 되지 않는 것으로 보고되고 있다(Lim, 1993). 인성장호르몬은 191개의 아미노산으로 구성된 펩타이드호르몬으로서 분자량이 크며 투여시 비경구적인 경로를 선택하

여야 한다. 과거에 rhGH는 근육주사로 투여되어 왔으나 최근의 연구에 따르면 피하주사의 경우도 근육주사와 마찬가지로 효과적이고 안전하기 때문에 보호자나 환자가 가정에서 투여가 가능한 피하주사의 경우가 많이 이용되며 주사바늘과 주사기 사이의 dead space를 줄이기 위해 insulin주사기를 많이 사용하고 있다(Wilson 등, 1987). 약물의 피하 또는 근육주사에 의한 국소적인 반응으로는 통증, 염증반응, 화농 및 괴사 등을 들 수 있으며 이런 반응들은 일부 특수한 목적을 갖는 치료영역의 약물들에서 대체약물이 없는 경우에 불가피하게 무시될 수 있는 요소일 수도 있으나 개발중인 약물의 제형을 피하 또는 근육주사제로 개발할 수 없게 하는 중요한 요소로 작용할 수도 있다(Paget 등, 1957). 물질의 안전성평가의 한 항목으로 국소자극성시험은 임상에서 실제 적용시 발현 가능한 자극성을 예측하고자 이루어지며 흔히 안점막시험과 피부도포법이 많이 사용되고 있으나, DA-3002는 임상사용시 피하 또는 근육주사로 1년 이상의 장기간 반복투여에 의하여 사용될 예정이므로 반복투여 자극성에 대하여 충분한 안전성이 확보되어야 할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 DA-3002의 우발적인 점막 접촉에 의한 자극성평가를 위하여 안점막자극시험을 실시하였고 실제 임상에 가까운 시험계를 사용하고자 피부도포법 대신에 DA-3002의 임상사용예정농도인 0.16% 액을 임상예정경로인 피하와 근육내로 단회 및 7일반복 투여시험계를 이용하여 평가하고자 하였다. 또한 피하 및 근육자극시험에서 투여액량이 0.25 ml 이하이면 약물의 국소반응 정도가 축소되어 평가될 수 있고 2 ml 이상이면 약물이 주변 결재적으로 유출되어 관찰이 어렵다(Shintani 등, 1967)는 보고에 따라 본 시험에서 단회투여시험에 1 ml을, 7일연속투여시 0.5 ml을 투여액량으로 설정하였다. 안점막 자극시험결과, DA-3002의 임상사용 농도 0.16%액은 세척 및 비세척시 모두 무자극물질로

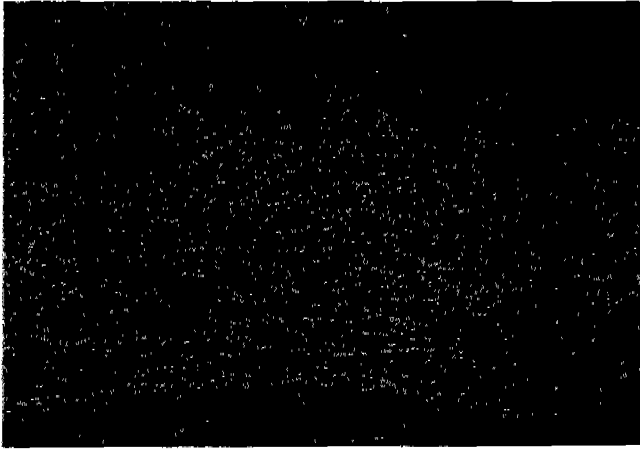


Fig. 1. A micrograph of the skin showing normal architecture, 2 days after 7-day repeated s.c. injection with DA-3002. (HE, $\times 40$)



Fig. 2. A micrograph of the skin showing focal necrosis and fibrosis in the subcutaneous layer. 2 days after 7-day repeated s.c. injection with 0.75% acetic acid. (HE, $\times 40$)

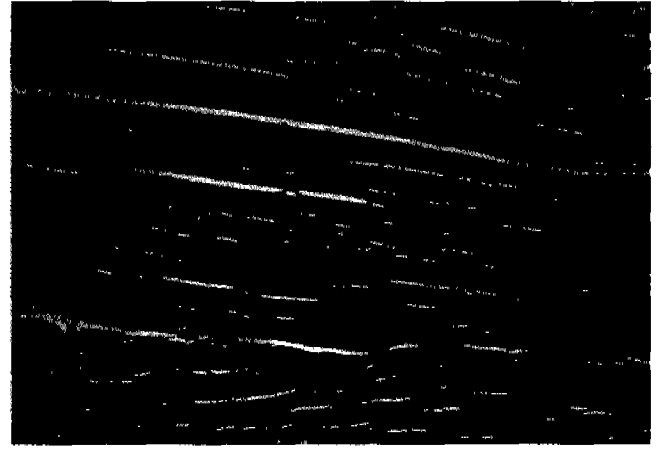


Fig. 3. A micrograph of the muscle, 2 days after 7-day repeated i.m. injection with DA-3002. No marked change. (HE, $\times 40$)

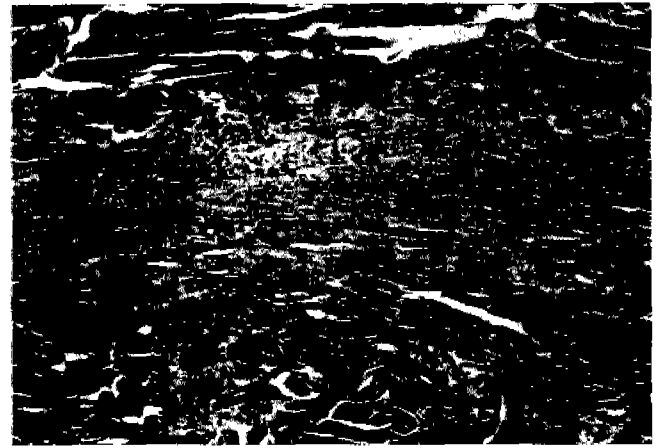


Fig. 4. A micrograph of the muscle showing degeneration of fibers, granulation and cell infiltration, 2 days after 7-day repeated i.m. injection with 0.75% acetic acid. (HE, $\times 40$)

분류되었다. 피하투여 자극시험 결과 생리식염수와 DA-3002의 단회 및 7일 연속투여에 의하여 몇몇 개체에서 주사후 2일에 투여부위의 적색반점이 관찰되었는데 이는 주사시 출혈이 관찰된 개체들이었으며, 약물의 영향이 아닌 주사시 피하직의 혈관과열에 기인한 것으로 판단되었다. 생리식염수와 DA-3002을 근육내로 단회 및 7일 연속투여한 동물에서는 투여후 2일과 7일에 육안 및 조직학적 검사에서 어떠한 변화도 관찰되지 않아 DA-3002의 근육내 투여시 자극정도는 거의 무자극한 것으로 사료되었다. 이상의 결과로 천연형 재조합 인성장호르몬인 DA-3002를 예정임상사용농도인 0.16%의 용액으로 사용하여 피하 및 근육내로 투여할 경우 발현가능한 자극성은 생리식염수와 동등한 정도이며 임상사용시 거의 문제가 되지 않을 것으로 판단되었다.

참고문헌

- Cara, J.F. and Johanson, A.J. (1990). Growth hormone for short stature not due to classic growth hormone deficiency. *Pediatr. Clin. North. Am.* 37, 1229-1254.
- Gad, S.C and Weil, C.S. (1989) Statistics for toxicologists. In *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, A. W., Ed), pp453-454. Raven pss, New York.
- Gertner, J. M., Gernil, M., Gianfredi, S. P., Hintz, R. L., Rosenfeld, R. G., Tamborlane, W. V. and Wilson, D. M. (1984). Prospective clinical trial of human growth hormone in short children without growth hormone deficiency. *J. Pediatr.* 104, 172-176.
- Kim, O. J., Kang, K. K., Ahn, B. O., Baik, N. G., Lee, S. B., Kim, W. B. and Yang, J. I. (1994). Single and 13-week repeated dose toxicity of DA-3002, an authentic recombinant

- human growth hormone. *J. Appl. Pharmacol.* **2**, 161-172.
- Lim, Y. T. (1993). Diagnosis and treatment of short stature. *J. of Pusan Ped. Assoc.* **6**, 30-35.
- Martini, F. (1989). Growth hormone. In *Fundamentals of anatomy and physiology* pp. 477, Prentice Hall International, New Jersey.
- Paget, G. E. and Scott, H. M. (1957). A comparison of the local effects of various intramuscular injections in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 427-433.
- Schaff-Blass, E., Burstein, S. and Rosenfeld, R. L. (1984). Advance in diagnosis and treatment of short stature, with special reference to the role of growth hormone. *J. Pediatr.* **104**, 801-803.
- Shintani, S., Yamazaki, M., Nakamura, M. and Nakayama, I. (1967). A new method to determine the irritation of drugs after intramuscular injection in rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **11**, 293-301.
- Stahke, N. (1984). Human growth hormone treatment in short children without growth hormone deficiency. *N. Eng. J. Med.* **104**, 801-803.
- Wilson, D. M., Baker, B., Hints R. L., Rosenfeld R. G. (1987). Subcutaneous versus intramuscular growth hormone therapy: growth and acute somatomedin response. *Pediatr.* **76**, 361-364.
- 厚生省資料 (1979). 注射劑の局所障害性に関する試験法(案). 醫藥ジャーナル **15**, 447-449.
- 독성시험 표준작업지침서 (1993). 국립보건안전연구원.
- 의약품 등의 독성시험기준 (1994). 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호.