

랫트에 있어서 신델라 겔 (송아지의 제단백혈액추출물: 황산 마이크로노마이신=20:1 혼합물)의 피하급성독성시험

남석우¹ · 서동완¹ · 안성훈¹ · 장만식² · 최완수² · 김규봉²
우태욱² · 한정환¹ · 홍성렬³ · 이향우¹

¹성균관대학교 약학대학, ²영진약품공업(주) 중앙연구소

³성균관대학교 유전공학과

Acute Subcutaneous Toxicity Study of Syndella Gel, Topical Drug Containing Deproteinised Dialysate of Calf's Blood and Micronomicin Sulfate in Rats

Suk Woo NAM¹, Dong Wan SEO¹, Sung Hoon AHN¹, Man Sik CHANG²,
Wahn Soo CHOI², Kyu Bong KIM², Tae Wook WOO²,
Jeung Whan HAN¹, Sung Youl HONG³ and Hyang Woo LEE¹

¹College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

²Central Research and Development Laboratories, Youngjin Pharmaceutical Co., Ltd., Kyunggi-Do 445-850, Korea

³Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received November 15, 1996; accepted December 12, 1996)

Abstract - Single subcutaneous administration to S.D rats of both sexes was performed to investigate the acute toxicity of Syndella gel, a new topical drug containing deproteinised dialysate of calf's blood and micronomicin sulfate. LD₅₀ values for S.D rats were 23,047 mg/kg for male and 23,725 mg/kg for female. The death occurred within 24 hours after administration at doses over 19,200 mg/kg. The main cause of death seemed to be respiratory disturbance by acute shock. Major general symptoms induced by injection subcutaneously with Syndella gel were underactivity, decreased respiratory rate, salivation, tremor and loss of consciousness. No significant body weight changes and gross findings of internal organs in treatment groups in comparison with those of control groups was observed at any dose levels in Syndella gel.

Keywords □ Syndella gel, topical drug, single subcutaneous administration, LD₅₀.

물질특허의 도입에 따라 새로운 신물질의 개발은 제약업계 뿐만 아니라 국가적으로도 매우 시급하고 중요한 과제이다. 또한, 신물질의 개발에는 많은 노력, 비용과 시간이 소요되며 축적된 고도의 기술등이 요구된다. 많은 국내 제약회사에서 신물질 개발에 많은 노력을 기울이고 있으나 이런 어려움 때문에 한계에 부딪치고 있다. 이러한 상황에서 생리활성 작용이 있는 개개의 성분을 배합하여 새로운 신약을 개발한다는 것은 이에 따른 많은 시간과 경비를 절감할 수 있으며 안전성에 대한 문제에 있어서도 이미 검증 받은 자료가 있으므로 어느정도 확보될 수 있을 것으로 사료된다.

현재 신물질의 단일성분에 대한 독성시험등은 국내외적으로 많은 연구가 이루어져 있다(Glotzer 등, 1970; Gray와 Kidd, 1963; Jaeger 등, 1965; Hera 등, 1983). 그러나, 복합제제는 개개성분의 약리작용과 독성작용이 다르기 때문에 이들 복합제제에 대한 독성작용의 발현 양태는 복잡할 것으로 예상되며, 따라서 이들 복합제제에 대한 안전성을 평가하는 것은 신약개발의 차원에서 중요한 의미를 갖는다고 하겠다.

신델라 겔은 화상, 욕창, 외상의 육아형성 촉진 및 염증성 피부질환 치료를 목적으로하는 송아지의 제단백 혈액 추출물과 황산 마이크로노마이신의 피부외용 복합제제이다. 본 실험에서는 신델라 겔의 안전성 평가의 일환으로 암수 랫트를 이용하여 1회 피하투여 하였을때 나타나는 급성독

* To whom correspondence should be addressed.

성을 관찰하고자 하며, 사망률 산출과 부검을 시행하여 신델라 겔에 대한 안전성을 평가하고자 한다.

실험방법

본 시험은 의약품 안전성시험 관리기준(KGLP, 1991)에 의거하여 작성된 표준작업지침서, 의약품등의 독성시험 기준(식품의약품 안전본부 고시 96-8) 및 의약품등의 안전성·유효성 심사에 관한 규정(보건 복지부고시 제 1994-46호, 복합제중 외용제)에서 정하는 요건에 적합하게 계획하여 실시하였다(Lorke, 1983).

시험물질

영진약품공업주식회사에서 제조한 시험물질(신델라 겔)은 투명한 겔체로서 송아지의 제단백혈액 추출물:황산 미크로노마이신=20:1의 혼합물로 구성된 제제이며, 시험물질의 주성분인 송아지의 제단백혈액 추출물은 발육 최성기에 이른 어린소에 특수 스트레스를 가하여 망내계를 부활시킨 후 혈액을 채취하여 단백을 완전히 제거시킨 추출물로 이액 1 ml 건조시 활성성분 40-44 mg의 순도를 나타냈다.

시험계 및 사육환경

시험구역은 성균관대학교 약학대학 GLP (Good Laboratory Practice) room이며, 청정구역에서 생산된 SPF (특정 병원체 부재) S.D계 랫트를 B & K Universal (United Kingdom)으로부터 분양 받아 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 배기 10-18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(280W×400L×170H mm)에 3마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화 사육기간동안에 증상 관찰등을 시행하여 시험에 사용하였다. 사료는 제일상사의 실험동물용 멸균 사료를 구입하여 실험동물에 자유롭게 공급하였으며, 음수는 멸균수돗물을 자유롭게 섭취시켰다.

군분리 및 투여용량의 결정

순화기간중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중(200~250 g)에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군분리를 실시하였다. 동물의 개체 식별은 사육 상자별 tag 표시법을 이용하였다. 투여용량의 설정은 예비 실험결과를 토대로 하여 본 제제의 투여가능

최대용량인 33,200 mg/kg를 최고용량군으로 하여 일정공비(1.2)로 5개 용량군과 대조군으로 하였다. 시험물질을 투여하기 직전 시험동물의 체중 범위는 수컷 230~270 g 및 암컷 230~260 g 이었고, 주령은 약 9주령 이었다.

시험물질 조제 및 투여

신델라 겔의 주성분인 송아지 제단백혈액추출물:황산 미크로노마이신의 비율이 20:1이 되도록 황산 미크로노마이신을 송아지 제단백혈액 추출물에 녹여 용시 조제하였다. 시험물질은 1회용 주사기를 이용하여 33 ml/kg으로 1회 피하투여 하였다. 투여량은 투여직전 체중의 변화에 따라 산출하였다.

증상관찰, 체중측정 및 부검

모든 시험동물에 대한 상태를 투여 일에는 투여후 6시간 동안 매 시간마다 관찰하였으며 투여 익일부터 7일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독 증상 및 사망유무를 관찰하였다. 체중 측정은 시험에 사용된 모든 시험동물에 대하여 시험물질 투여직전, 투여후 1일, 3일, 7일째에 체중을 측정하였다.

시험 종료후 동물을 에테르로 마취하고 설하동맥 및 복부 대동맥을 절단하여 치사 시킨 다음 외관 및 내부장기 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

자료의 통계학적 해석

통계학적 처리는 ANOVA 검정에 의해 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 의 수준으로 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였고, LD_{50} 치는 Pharmacological calculating system (ver 4.1:Springer-Verlag, N.Y., 1986)을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의해 95% 신뢰한계 내에서 결정하였다.

실험결과

LD_{50} 치 및 임상증상

약 9주령 랫트에 신델라 겔의 주성분인 송아지 제단백혈액추출물과 황산미크로노마이신 복합물을 1회 피하투여한 결과, 최고용량투여군(33,200 mg/kg)에서는 수컷 모두 (6마리)와 암컷 5마리, 고용량 투여군(27,600 mg/kg)에서는 수컷 5마리와 암컷 모두, 중용량 투여군(23,100 mg/kg)에서는 암수 각각 3마리가 사망하였으며 저용량 투여군(19,200 mg/kg)에서는 암수 각각 1마리씩 사망하였다(Table I). 이것으로부터 피하투여시 LD_{50} 는 95% 신뢰한계에서 수컷이 23,047 mg/kg, 암컷이 23,725 mg/kg으로 산출되었다.

사망개체의 경우 투여후 약 20분 후부터 활동과 호흡수가 현저히 감소하였으며 24시간내에 사망하였다. 일부 생존 개체에서도 활동성과 호흡수의 감소, 유연, 진전 및 의식소실 등이 관찰되었으나 점진적으로 회복하여 투여 1일 후에는 정상 상태에 도달하였다(Table II).

체중변화

시험군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	시험계(마리)	
			수컷	암컷
최고용량군	33,200	33	6	6
고용량군	27,600	33	6	6
중용량군	23,100	33	6	6
저용량군	19,200	33	6	6
최저용량군	16,000	33	6	6
대조군*	0	33	6	6

*대조군에는 생리 식염수를 투여하였다.

Table I. Mortality of Sprague-Dawley rats subcutaneously treated with Syndella gel

Sex	Dosage (mg/kg)	No. of rats	Days after treatment								Final Mortality	LD ₅₀ (mg/kg)	
			0	1	2	3	4	5	6	7			
Male	33,200	6	6 ^a	6	6	6	6	6	6	6	6	6/6	23,047.1 (19,205.7-27,656.8 ^b)
	27,600	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5/6	
	23,100	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3/6	
	19,200	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/6	
	16,000	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/6	
	0	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/6	
Female	33,200	6	6 ^a	6	6	6	6	6	6	6	6	6/6	23,725.6 (20,546.9-27,396.1)
	27,600	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5/6	
	23,100	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3/6	
	19,200	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/6	
	16,000	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/6	
	0	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/6	

^aNumber of dead animals. ^b95% Confidence limit.

Table II. Clinical signs of Sprague-Dawley rats subcutaneously treated with Syndella gel

Sex	Dosage (mg/kg)	Clinical signs ^a	Hours after treatment						Days after treatment							
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	
Male	33,200	LC	-	5	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DR	6	6	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DM	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SA	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		IR	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27,600	LC	2	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DR	5	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DM	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SA	-	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23,100	LC	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DR	4	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DM	4	4	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SA	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19,200	DR	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DM	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16,000	DR	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Female	33,200	LC	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		DR	6	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		DM	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		SA	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		TR	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	27,600	LC	-	4	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		DR	-	4	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		DM	3	4	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		SA	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		TR	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	23,100	LC	-	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		DR	5	5	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		DM	5	5	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	19,200	DR	4	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		DM	4	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16,000	DR	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

^aND: Not detected, LC: loss of consciousness, DR: decreased respiratory rate, DM: decreased activity, SA: salivation, TR: tremor, IR: increased irritability.

Table III. Changes of body weight in Sprague-Dawley rats subcutaneously treated with Syndella gel

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment			
		0	1	3	7
Male	33,200	248.8±10.0 ^a (6) ^b	-	-	-
	27,600	249.3±14.2 (6)	274.0± 0.0 (1)	274.0± 0.0 (1)	278.0± 0.0 (1)
	23,100	247.3±10.5 (6)	246.3± 7.0 (3)	275.0± 7.6 (3)	280.0± 3.0 (3)
	19,200	255.3± 9.3 (6)	264.6± 6.1 (5)	265.6± 3.8 (5)	272.0± 5.8 (5)
	16,000	250.5±15.9 (6)	257.7±18.7 (6)	247.8±12.7 (6)	254.3±10.7 (6)
	0	253.5±14.0 (6)	247.2±15.2 (6)	244.5±15.6 (6)	253.2±14.9 (6)
Female	33,200	243.8±11.2 (6)	254.0± 0.0 (1)	255.0± 0.0 (1)	260.0± 0.0 (1)
	27,600	243.8± 8.7 (6)	-	-	-
	23,100	244.0± 9.9 (6)	248.3±11.8 (3)	246.0±14.9 (3)	256.3±15.4 (3)
	19,200	240.2±15.0 (6)	249.0±16.0 (5)	246.4±16.8 (5)	249.8±12.1 (5)
	16,000	246.7±16.4 (6)	254.3±15.0 (6)	252.5±21.7 (6)	258.8±18.5 (6)
	0	240.3±18.0 (6)	242.3±18.7 (6)	242.8±18.4 (6)	251.3±21.4 (6)

^aMean±S.D. (unit: g). ^bThe numbers in parentheses represent number of living animals.

대조군과 시험물질 투여군 모두 투여후 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하는 경향을 보였으나 수컷 및 암컷에서 전체 투여기간중 각 군간의 유의성 있는 체중의 변화는 인정되지 않았다(Table III).

육안적 해부소견

신델라 겔을 투여군 및 대조군의 육안적 해부결과, 약물 투여에 기인한 어떠한 이상도 발견할수 없는 것으로 보아 시험동물의 치사는 시험물질 투여에 따른 급성쇼크에 의한 호흡마비로 추정된다.

고 찰

신델라 겔은 화상, 외상 및 염증성 피부질환에 대한 치료를 목적으로 개발된 송아지의 제단백혈액 추출물과 황산 마이크로노마이신의 혼합성분이다. 아직까지 신복합제에 대한 독성시험은 일반화되어 있지 않으나 앞으로는 여러 복합제제화된 신약의 개발이 진행되리라 예상된다. 본 시험물질의 주성분인 송아지의 제단백혈액 추출물의 랫트, 마우스에 대한 급성정맥독성은 LD₅₀>64 ml/kg이며, 급성경구독성은 LD₅₀>40 ml/kg이고, 마이크로노마이신의 랫트 급성정맥독성은 LD₅₀=110 ml/kg이지만(Jaeger 등, 1965; Hera 등, 1983), 신 복합제제에서 동일한 독성과 약리작용을 나타낸다고 확신하기는 힘들다(Chung 등, 1994). 따라서, 이 복합제 신약들의 독성시험이 매우 중요하다고 사료된다.

본 시험에서는 피부질환에 대한 치료제로 개발한 시험물질 신델라 겔의 S.D계 랫트에 대한 급성 피하독성을 평가하기 위해 식품의약품 안전본부 고시 96-8호 "의약품등의 독성시험기준"에 준하여 랫트에 있어서 신델라 겔은 33,200 mg/kg를 최고용량군으로하고 공비를 1.2로 하여 최저용량군 16,000 mg/kg등 5개를 투여군과 생리 식염수를 대조물질로하여 1회 피하주사한 급성독성 시험결과 시험물

질에 기인한 일반증세는 없었으며 체중도 대조군에 비해 유의성 있는 변화가 없었다. 부검소견 역시 별다른 독성이 관찰되지 않았으며, 급성독성시험의 중요한 지표중의 하나인 LD₅₀도 23,047 mg/kg 이상으로 저독성이라 생각되지만 향후 경피독성시험 및 점막 자극시험등이 시행되어야 정확한 안전성 평가를 할 수 있을 것이라 생각된다.

감사의 말씀

이 연구는 1994년도 과학기술처 중간핵심기술개발사업의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Chung, K. J., Chang, M. S., Chun, J. O., Chun, J. K., Kim, S. C., Choi, W. S. and Lee, H. W. (1994). Evaluation of topical drug containing solcoseryl and micronomicin on surgical wound in mice. *J. Applied Pharmacol.* **2**, 23-27.

Glutzer, D. J., Goodman, W. S. and Geronimus, L. H. (1970). Topical antibiotic prophylaxis of wound infection. *Arch. Surg.* **100**, 589-593.

Gray, F. J. and Kidd, E. E. (1963). Topical chemotherapy in prevention of wound infection. *Surgery* **54**, 891-899.

Hera, T., Harada, S., Ikenaga, T. and Deguch, T. (1983). Safety evaluation of micronomicin IV. *Jan. J. Antibiotics.* **36**, 3204.

Jaeger, K. H., Leybold, K., Mittenzwei, H., Staudinger, H. and Waldstatten, L. (1965). The augmentative effect of a blood extract on cellular respiration. *Arzneim. Forsch.* **15**, 750-754.

Lorke, D. (1983). A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**, 275-287.

KFDA (1996). Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use, No 96-8 Korea.

보건복지부: 의약품 등의 안전성 유효성 심사에 관한 규정, 보건복지부 고시 제 1994-46호 (1994. 9. 22).