

## 마우스에서의 DW-166HC (Holmium-165-chitosan)에 대한 급성독성

이원용 · 이진 · 문은이 · 남순철 · 이덕근\* · 윤성준

동화약품공업(주) 중앙연구소

### Acute Toxicity of DW-166HC (Holmium-165-chitosan) in Mice

Won Yong LEE, Jin LEE, Eun Yi MOON, Soon Chul NAM,  
Dug Keun LEE\*, Sung June YOON

Central Research Laboratories, Dong Wha Pharm. Ind. Co., Ltd.,  
Anyang Dong 189, Anyang City, Kyunggi Do, 430-010, Korea

(Received December 1, 1996; accepted March 19, 1997)

**Abstract** – DW-166HC (<sup>166</sup>Holmium-chitosan) is a complex of <sup>166</sup>Ho,  $\beta$ - and  $\gamma$ -ray emitter, and chitosan, a polymer of glucosamine, with radiotherapeutic potential. The current study was performed to determine the acute toxicities of <sup>165</sup>Ho-chitosan in mice by two different routes of administration. The both sex mice were given a single intravenous bolus injection of <sup>165</sup>Ho-chitosan complex at doses of 12, 10, 6, 5 and 4 mg/kg or subcutaneous administration at doses of 600, 500, 400 and 300 mg/kg. Chitosan was dosed to control animals as 16 and 800 mg/kg, intravenously and subcutaneously, respectively. The doses of <sup>165</sup>Ho-chitosan complex were expressed as <sup>165</sup>holmium nitrate pentahydrate and the ratio of <sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O to chitosan was 3/4. Severe convulsion and respiratory failure were followed by death within 10 min after intravenous dosing. Transient unilateral hindlimb hypokinesias were found in two mice of 5 mg/kg dosing group during the study period. No abnormalities were observed during the necropsy of survived animals in intravenous dosing group. Only one male animal was found dead in 500 mg/kg subcutaneously dosed group. Alopecia with or without cutaneous ulcer were found in most mice including control animals. During necropsy, omental adhesion was observed in all dose ranges and enlarged spleen was found in several animals including control group. It is suggested that the acute intravenous LD<sub>50</sub>s for male and female mice were 4.90 and 6.03 mg/kg, respectively. The lowest lethal dose in male was 500 mg/kg by subcutaneous administration.

**Keywords** □ DW 166HC, holmium, acute toxicity, LD50, mouse, radiotherapy

방사선치료 방법의 하나인 방사성물질을 체내에 직접 투여하여 암세포의 괴사를 유도하는 방법은 전신 또는 투여 부위에 체외에서 방사선을 조사 할 경우보다 방사선에 의한 영향을 줄일 수 있다. 많은 방사성 동위원소들이 치료 또는 진단의 목적으로 체내에 투여되어 사용되고 있다. 특히 방사능의 반감기가 짧은 원소들이 치료에 유용하게 사용되는데 이 중 희토류 원소의 하나인 <sup>165</sup>Ho를 <sup>166</sup>Ho로 만들었을 때  $\beta$ 선과  $\gamma$ 선이 동시에 발생하며 동종의 원소인 <sup>153</sup>Sm 보다 조직 투과도와 선의 에너지가 높아 좀 더 큰 조직에 대하여 영향을 줄 수 있다(Turner 등, 1994). 또한 <sup>166</sup>Ho은 신체 중 골격에 대한 친화성이 높아(Durbin 등, 1956; Haley 등, 1966) 골수이식 전에 기존의 골수를 파괴하는데 이용되고 있다(Apelbaum 등, 1992). 최근에는 <sup>166</sup>Ho

을 이용하여 간의 전이암에 대한 치료방법에 대하여 연구가 되고 있는데 Ho의 뼈에 대한 친화성으로 인한 부작용을 막기 위하여 간문맥 또는 간동맥에 미립자(microsphere) 제형의 <sup>166</sup>Ho를 투여하여 전신으로 분포되는 것을 줄이는 방법이 연구되고 있다(Turner 등 1994).

Chitosan은 갑각류 및 곤충의 외피 또는 균사체의 세포벽에 존재하는 chitin으로부터 합성되는 물질로 pH가 낮은 곳에서 용해도가 높으며(LeHoux 등, 1993), pH 6.0 이상에서 침전되는 것으로 알려져 있다. 따라서 <sup>166</sup>Ho과 chitosan의 복합체는 직접 간암세포에 투여시 효과를 나타내며 또한 투여부위에서의 침전으로 전신분포를 줄여 방사선에 의한 전신피해를 감소시킬 수 있는 새로운 방사선제제이다.

본 연구는 DW-166HC (<sup>166</sup>Ho-chitosan)의 독성을 평가하기 위하여 우선 비방사성 물질인 <sup>165</sup>Ho-chitosan의 전신분포시 발생하는 독성에 대한 평가를 위하여 시행되었으며, 특

\* To whom correspondence should be addressed.

히 방사능 자체에 의한 독성과 본 시험물질의 화학적인 성질에 의한 독성의 차이점을 구분하기 위하여 방사능을 띠지 않은 <sup>165</sup>Ho를 이용하여 마우스에서의 1회 투여시 나타나는 치사율 및 독성증상 등의 안전성 자료를 얻기 위하여 실행하였다.

**실험방법**

본 연구는 국립보건안전연구원 고시 94-3호(1994년 4월 14일) '의약품등의 독성시험 기준'에 준하여 시행하였다.

**실험동물 및 사육조건**

총 110마리의 SPF 암컷 및 수컷 CD-1 마우스(6wks, Charles River, Japan)를 입수한 즉시 무작위로 추출하여 각 용량별 5마리씩으로 나누어 유지하였다. 동물은 환경에 약 1주간 순화시킨 후 사용하였으며 투여직전의 연령은 약 7주령이었다. 사육실은 온도 약 22-24℃, 습도 50-65%, 명암주기는 12시간으로 유지시켰다. 순화기간 및 실험기간동안 멸균사료(PicoLab Rodent Diet 20, PMI Feeds, Inc., U.S.A.)와 정제수를 자유섭취하도록 하였으며, 동물의 식별은 꼬리에 색칠을 하여 구분하였다.

**시험물질**

DW-166HC (비방사성물질)의 조제는 holmium [<sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O, Aldrich, U.S.A.]을 주사용 증류수[중외제약(주)] 2 mL에 일정량을 녹인 후 이 용액을 chitosan vial(동결건조된 chitosan, ascorbic acid 함유, 동화약품 중앙연구소 제제연구실 조제)에 첨가하여 holmium과 chitosan의 complex를 만들었으며 (holmium:chitosan=3:4), 다시 주사용 증류수를 첨가하여 총액이 5 mL (정맥투여) 또는 40 mL (피하투여)이 되도록 희석하여 투여하였다. 대조군의 동물은 DW-166HC와 같은 방법으로 조제하였으나 holmium은 첨가하지 않았다.

**군분리 및 투여**

정맥투여의 경우 암수 각 30마리(총 60마리)의 암수 마우스를 각 5마리씩으로 나누어 DW-166HC를 <sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O를 기준으로 환산하였을 때 정맥투여의 경우 12, 10, 6, 5, 4 mg/kg이었으며, 피하투여의 경우 암수 각 25마리(총 50마리)의 마우스를 5마리씩 600, 500, 400, 300 mg/kg의 용량으로, 대조군에는 최고용량의 chitosan 함유량(정맥투여 16 mg/kg; 피하투여 800 mg/kg)과 같은 양을 투여하였다. 피하투여의 최고용량은 본 시험물질의 최대 투여가능 용량이었다.

**임상증상관찰 및 사망례**

투여당일(Day 0)에는 투여 후 6시간동안 약 4회 관찰하였으며, 투여 후 1일부터 실험종료일(Day 14)까지는 매일 오전과 오후 각 1회씩 임상증상 및 사망례를 관찰하였다. 단, 주말의 경우는 오전 1회만 관찰하였다.

**체중측정**

체중의 측정은 순화기간동안 1회 실시하였으며, 투여당일(Day 0)에는 투여 직전, 그리고 투여 후 1, 3, 7, 14일(정맥투여) 또는 1, 2, 3(500, 400 mg/kg 투여군은 4일), 7, 14일에 측정하여 체중을 기록하였다.

**부검**

투여에 의하여 사망한 동물은 발견 즉시 부검을 실시하였으나, 발견 후 부검을 할 수 없는 경우에는 발견 즉시 냉장보관 후 부검하였다. 부검은 사망 후 최대 6시간 이내에 실시하였으며, 실험 종료시까지 생존한 개체는 경추탈골을 하여 안락사를 유도한 다음 실시하였다. 부검은 외관, 복강, 흉강장기의 순서를 따라 육안으로 관찰하였다.

**통계처리**

체중의 변화는 Levene's test를 이용하여 자료의 분산성을 검정한 다음 one-way ANOVA 검정으로 투여 전, 투여 당일의 체중에 대한 비교를 하였다. LD<sub>50</sub>의 계산은 Probit 방법(Finney, 1971)으로 계산하였으며, 투여용량은 log<sub>10</sub>으로 변환하여 계산하였고, 암수 각각의 사망례에 대하여 이 투여였다. 통계처리는 SPSS for Windows (Release 6.1.2, U.S.A.)를 사용하여 분석하였다.

**결 과**

**사망률**

시험물질의 정맥투여에 의한 사망례는 투여 직 후 10분 이내에 관찰되었으나(Table I), 그 이후에는 관찰되지 않았다.

DW-166HC(비방사성 물질)의 피하투여에 의한 사망례(Table II)는 투여 후 1일(Day 1)에 500 mg/kg 투여군에서 1례가 관찰되었다.

**임상증상**

시험물질의 정맥투여 후 관찰된 임상증상으로는 투여 직후 대부분의 동물에서 운동성 감소와 입모 등이 관찰 되었으나 대조물질 투여군의 동물에서도 이와 같은 증상이 관찰되었다. 사망한 동물의 경우 시험물질 투여 직후 모두 경

**Table I.** Mortality<sup>a</sup> of CD-1 mice after a single intravenous administration of <sup>165</sup>Ho-chitosan

Sex	Dose (mg/kg) <sup>b</sup>					
	0	12	10	6	5	4
Male	0/5 <sup>c</sup>	5/5	4/5	5/5	3/5	1/5
Female	0/5	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5
Total	0/10	10/10	9/10	8/10	4/10	1/10

<sup>a</sup>Animals were dead within 10 min after dosing and no dead animals were found thereafter; <sup>b</sup>Doses are expressed as the amount of <sup>165</sup>HO(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O; <sup>c</sup>Death incidences/the number of animals per group.

**Table II.** Mortality<sup>a</sup> of CD-1 mice after a single subcutaneous administration of <sup>165</sup>Ho-chitosan

Sex	Dose <sup>b</sup> (mg/kg)	Days after dosing								Total
		0 <sup>c</sup>	1	2	...	12	13	14		
Male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	500	0	1	0	0	0	0	0	0	1/5
	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

<sup>a</sup>Death incidences/the number of animals per group; <sup>b</sup>Doses are expressed as the amount of <sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O; <sup>c</sup>Day of dosing.

**Table III.** Clinical signs of male CD-1 mice after a single subcutaneous administration of <sup>165</sup>Ho-chitosan<sup>a</sup>

Clinical signs	Dose <sup>b</sup> (mg/kg)	Days after dosing														
		0 <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Rough hair coat	0	-	5	-	-	5	4	4	4	-	-	-	5	5	5	5
	600	-	5	5	5	5	5	4	3	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	4	4	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	5	5	5	2	4	-	-	-	-	5	-	-	-	-
	300	-	5	5	5	5	3	5	5	1	-	-	5	2	1	1
Alopecia (injected area)	0	-	-	-	2	3	3	3	4	5	5	5	5	5	5	4
	600	-	-	-	2	3	4	4	5	5	5	5	5	4	3	3
	500	-	-	2	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	2	2
	400	-	-	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	300	-	-	-	1	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Cutaneous ulcer (the site of injection)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	500	-	4	4	4	3	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3	3	3	3
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inflated back (injected area)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
Decreased motor activity	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Incidents per 5 mice; <sup>b</sup>Doses are expressed as the amount of <sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O; <sup>c</sup>Day of dosing; <sup>d</sup>One animal was found dead on Day 1 (n=4).

런과 호흡곤란을 나타내며 투여 후 10분 이내에 사망하였다. 투여 후 약 3일까지 대조물질 투여 동물 및 시험물질 투여 동물에서 간헐적인 입모가 관찰되었다. 5 mg/kg 투여 군에서는 암수 각각 1마리에서 뒷다리에서 편측성으로 lameness가 관찰되었으며 수컷의 경우 투여 후 4일에만 관찰되었으나 5일 이후에는 관찰되지 않았다. 암컷의 경우 투

여 후 2일부터 11일까지 관찰되었으며 12일부터는 나타나지 않았다.

또한 DW-166HC (비방사성 물질) 및 대조물질의 피하투여에 의한 것으로 보이는 임상증상으로는 피모의 거칠어짐, 투여부위의 탈모가 암수 모두에서 관찰되었다(Table III, IV). 또한 투여부위의 피부에 궤양이 수컷 600, 500,

**Table IV.** Clinical signs of female CD-1 mice after a single subcutaneous administration of <sup>165</sup>Ho-chitosan<sup>a</sup>

Clinical signs	Dose <sup>b</sup> (mg/kg)	Days after dosing														
		0 <sup>c</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Rough hair coat	0	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	600	-	5	-	-	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	300	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alopecia (injected area)	0	-	-	-	3	3	3	5	5	5	5	5	5	4	4	4
	600	-	-	-	3	4	4	4	3	5	4	5	5	4	4	4
	500	-	-	2	3	5	5	5	5	4	5	5	5	4	4	4
	400	-	-	2	5	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	4
	300	-	-	-	3	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Cutaneous ulcer (the site of injection)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	1
	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	1	1	1	2
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Inflated back (injected area)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
Decreased motor activity	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Incidents per 5 mice; <sup>b</sup>Doses are expressed as the amount of <sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O; <sup>c</sup>Day of dosing.

**Table V.** Body weights (g)<sup>a</sup> of CD-1 mice after a single intravenous administration of <sup>165</sup>Ho-chitosan

Dose <sup>b</sup> (mg/kg)	Days after dosing				
	0 <sup>c</sup>	1	3	7	14
Male					
0	36.0±2.00 (5)	33.8±1.30 (5)	35.6±1.34 (5)	37.8±1.30 (5)	41.6±2.07 (5)
12	35.6±2.61 (5)	(0)	(0)	(0)	(0)
10	36.2±0.45 (5)	35.0 (1)	35.0 (1)	36.0 (1)	37.0 (1)
6	36.4±1.14 (5)	(0)	(0)	(0)	(0)
5	35.8±1.64 (5)	34.5±0.71 (2)	35.5±0.71 (2)	37.0±0.00 (2)	38.0±1.41 (2)
4	36.2±1.92 (5)	35.5±1.73 (4)	37.0±2.16 (4)	38.0±2.94 (4)	40.0±3.37 (4)
Female					
0	27.2±1.10 (5)	26.0±0.71 (5)	27.4±1.14 (5)	27.6±1.14 (5)	29.2±2.39 (5)
12	26.8±2.28 (5)	(0)	(0)	(0)	(0)
10	27.2±1.48 (5)	(0)	(0)	(0)	(0)
6	29.4±1.95 (5)	28.0±1.41 (2)	28.0±1.41 (2)	29.0±0.00 (2)	29.5±2.12 (2)
5	27.8±1.92 (5)	26.5±1.91 (4)	27.3±2.06 (4)	27.5±2.08 (4)	27.8±1.71 (4)
4	27.4±1.14 (5)	27.4±1.14 (5)	27.4±1.14 (5)	28.6±1.14 (5)	29.4±2.30 (5)

<sup>a</sup>Values are expressed as mean±S.D. and numbers in the parentheses represent the number of animals; <sup>b</sup>Doses are expressed as the amount of <sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O; <sup>c</sup>day of dosing.

400 mg/kg 투여군에서, 암컷의 시험물질투여군 및 대조물 질 투여군 모두에서 관찰되었으나 용량의 증가에 따른 변화는 나타나지 않았으며 시간이 지남에 따라 회복되는 것

이 관찰되었다. 또한 투여 후 13일 이후 수컷 600 mg/kg 투여군 및 300 mg/kg 투여군에서, 암컷은 투여 후 12일 이후 600, 400, 300 mg/kg 투여군의 동물에서 투여부위가 용기

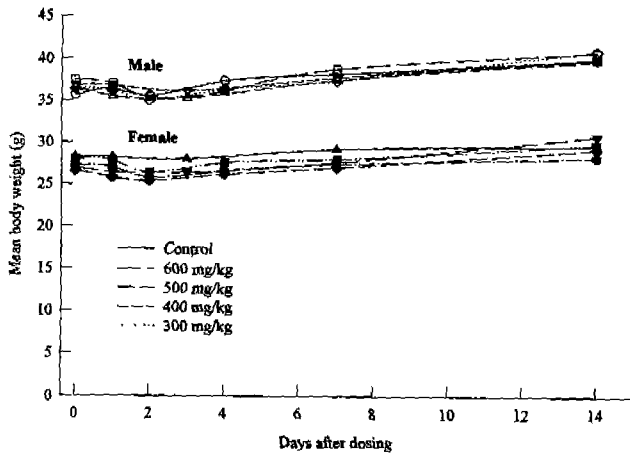


Fig. 1. Body weights of CD-1 mice after a single subcutaneous administration of <sup>165</sup>Ho-chitosan. Opened and filled symbols represent, male and female, respectively.

되는 것이 관찰되었다. 투여 후 1일에 수컷 400 mg/kg 투여군의 운동성 감소가 관찰되었으나 곧 소실되었다.

**체중변화**

시험물질 투여군 및 대조군 모두 정맥투여 후 1일째 (Day 1)에 체중의 감소가 나타났으나 곧 회복되었다 (Table V). 피하투여 실험에서는 시험물질 투여군 및 대조군 모두 투여 후 2일째에 체중의 감소가 나타났으나 곧 회복되었다 (Fig. 1).

**부검소견**

시험물질의 정맥투여 직 후 사망한 개체의 육안적 부검소견으로는 허파의 충혈이 관찰되었으며 이는 사망직전의 호흡곤란과 관련이 있는 것으로 보인다. 그러나 시험종료 후 부검한 동물에서는 시험물질 투여에 의한 것으로 보이는 병변은 관찰되지 않았다.

DW-166HC의 피하투여 후 사망한 개체의 육안적 부검소견으로는 허파의 충혈이 관찰되었으나 기타 다른 장기에서는 육안적인 이상소견이 관찰되지 않았다 (Table VI). 시험기간 종료 후 부검한 개체의 소견은 대조군을 포함한 모든 동물의 투여부위의 피하조직내에 흡수되지 않은 시험물질이 남아있었으며, 투여부위가 용기된 개체의 경우 시험물질 및 많은 삼출물이 저류하였다. 또한 장간막 유착이 암수 시험물질투여군 모두에서 관찰되었고, 비장의 종대가 수컷의 시험물질 투여군 (400, 300 mg/kg)과 암컷 대조군 및 시험물질 투여군 (600, 500, 400 mg/kg)에서 관찰되었다. 투여부위의 피부궤양은 수컷 600, 500 mg/kg 투여군 및 암컷 대조군, 모든 용량투여군에서 관찰되었다.

**반수치사량(LD<sub>50</sub>)**

DW-166HC (비방사성물질)를 마우스에 정맥투여에 의한 반수치사량(LD<sub>50</sub>) 및 신뢰한계(95%)는 <sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O의 양으로 환산할 때 수컷은 4.90(1.57-8.09)mg/kg, 암컷 6.03

Table VI. Necropsy findings<sup>a</sup> in CD-1 mice after a single subcutaneous administration of <sup>165</sup>Ho-chitosan

Findings	Dose <sup>b</sup> (mg/kg)	Sever			Total
		Slight	Moderate	Marked	
Male					
Omental adhesion	0	-	-	-	0/5
	600	-	-	4	4/5
	500	-	-	4	4/5
	400	-	-	5	5/5
	300	-	-	5	5/5
Enlarged spleen	0	-	-	-	0/5
	600	-	-	-	0/5
	500	-	-	-	0/5
	400	1	-	-	1/5
	300	-	1	-	1/5
Cutaneous ulcer	0	-	-	-	0/5
	600	1	-	-	1/5
	500	-	-	1	1/5
	400	-	-	-	0/5
	300	-	-	-	0/5
Congesion of liver and lung	0	-	-	-	0/5
	600	-	-	-	0/5
	500	-	-	1	1/5
	400	-	-	-	0/5
	300	-	-	-	0/5
Female					
Omental adhesion	0	-	-	-	0/5
	600	-	-	5	5/5
	500	-	-	5	5/5
	400	-	-	5	5/5
	300	-	-	5	5/5
Enlarged spleen	0	-	-	1	1/5
	600	1	-	-	1/5
	500	-	1	-	1/5
	400	1	-	-	1/5
	300	-	-	-	0/5
Cutaneous ulcer	0	1	-	1	2/5
	600	-	-	1	1/5
	500	-	1	-	1/5
	400	-	-	1	1/5
	300	-	1	-	1/5

<sup>a</sup>Incidences; <sup>b</sup>Doses are expressed as the amount of <sup>165</sup>Ho(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O.

(3.05-14.10)mg/kg으로 나타났다. 본 시험물질의 피하투여의 경우 LD<sub>50</sub> 및 신뢰한계(95%)는 구할 수 없었으며, 최소치사량은 500 mg/kg이었다.

**고 찰**

마우스에 <sup>165</sup>Ho-chitosan을 1회 정맥투여한 후 발생한 사망례는 사망직전 관찰된 호흡곤란, 경련 등의 증상으로 볼

때 호흡기, 순환기 또는 중추신경장애에 따른 것으로 보인다. 이는 <sup>165</sup>holmium 단독 투여에 의하여 12 mg/kg 이상의 용량에서도 사망하지 않았으며(Bruce 등, 1963) LD<sub>50</sub>는 약 30-60 mg/kg으로 추정된다(Bruce 등, 1963). 본 시험에서 사용한 chitosan단독 투여군에서도 사망례 및 위와 같은 임상증상이 발생하지 않았다. 따라서 이러한 사망직전의 임상증상은 Ho과 chitosan의 복합체에 의한 영향으로 보인다. 5 mg/kg 투여용량군에서 나타난 후지의 lameness의 원인에 대하여는 알려진 바 없으며 이에 대한 연구가 좀 더 이루어져야 할 것이다.

<sup>165</sup>Holmium-chitosan을 피하투여 하였을 때 관찰된 투여 부위의 피부궤양 및 투여부위의 용기는 대조군에서도 관찰되었으며 이는 chitosan의 높은 점성과 피하조직내에서의 비흡수성으로 인하여 혈류장애에 의하여 발생한 것으로 추정된다. 500 mg/kg 용량군에서 발생한 1례의 폐사는 최고 용량 투여군인 600 mg/kg 및 기타 저용량 투여군에서는 관찰되지 않았으며 용량에 따른 사망률이 나타나지 않았다. 본 시험에서 관찰된 사망례는 예비시험에서도 같은 결과가 나타났으며 특정용량에서만 발생한 사망례에 대한 원인에 대하여 좀 더 연구가 이루어져야 할 것이다. 시험종료 후 부검한 개체에서 관찰된 복강내의 장관막 유착이 시험물질 투여군에서만 관찰되었으나 원인은 알 수 없었다. 또한 비장의 종대가 수컷 시험물질 투여군 및 암컷 대조물질 투여군, 시험물질 투여군에서 관찰되었으나 용량의존성은 나타나지 않았으며, 이러한 영향은 chitosan을 정맥투여하였을 경우 투여 후 1일에 관찰되었고 조직병리학적 검사결과 white pulp의 종대가 관찰되었다(미발표). Marcinkiewicz등(1991)은 chitosan을 복강투여 하였을때 비장의 종대를 관찰하였다. 이러한 비장의 종대 및 입파구대의 증생은 methyl cellulose나 polyvinyl alcohol 등과 같은 고분자물질을 투여 할 때 나타나는 것으로 알려져 있다(Greaves, 1990). 따라서 본 시험에서 나타난 비장의 종대는 고분자물질인 chitosan 투여에 의한 영향으로 보인다. Chitosan은 *in vitro*와 *in vivo*상에서 면역촉진 효과가 있는 것으로 알려져 있으나(Marcinkiewicz 등, 1991; Nishimura 등, 1984) 이 연구에서 사용된 holmium과의 상호작용에 의한 독성의 변화에 대하여는 좀 더 연구가 필요하다.

이상의 결과에 따르면 DW-166HC를 마우스에 정맥투여 하였을때 LD<sub>50</sub>는 <sup>165</sup>holmium nitrate pentahydrate 5.41 mg/kg로 추정되며 이때의 chitosan 용량은 7.21 mg/kg이었다.

DW-166HC를 피하투여하였을 때의 최소치사량은 <sup>165</sup>Holmium nitrate pentahydrate 500 mg/kg로 추정되며 이때의 chitosan 용량은 666.7 mg/kg이었으나 본 실험조건에서 LD<sub>50</sub>는 구할 수 없었다.

### 참고문헌

Appelbaum, F. R., Brown, P. A., Sandmaier, B. M., Storb, R., Fisher, D. R., Shulman, H. M., Graham, T. C., Schuening, F. G., Deeg, H. J., Bianco, J. A., Ketring, A. R. and Kaplan, D. (1992). Specific marrow ablation before marrow transplantation using an aminophosphonic acid conjugate 166Ho-EDTMP. *Blood* **80**, 1608-1613.

Bruce, D. W., Hietbrink, B. E., and DuBois, K. P. (1963). The acute mammalian toxicity of rare earth nitrates and oxides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **5**, 750-759.

Durbin, P. W., Williams, M. H., Gee, M., Newman, R. H., and Hamilton, J. G. (1956). Metabolism of the lanthanons in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**, 78-85.

Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge.

Greaves, P. (1990). *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies*, pp. 77-142, Elsevier, Amsterdam.

Haley, T. J., Koste, L., Komesu, N., Efros, M. and Upham, H. C. (1966). Pharmacology and toxicology of dysprosium, holmium, and erbium chlorides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **8**, 37-43.

LeHoux, J. and Grondin, F. (1993). Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology* **132**, 1078-1084.

Marcinkiewicz, J., Polewska, A. and Knapczyk, J. (1991). Immunoadjuvant properties of chitosan. *Archivum Immunol. Therap.* **39**, 127-132.

Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S., and Azuma, I. (1984). Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* **2**, 93-99.

Turner, J. H., Claringbold, P. G., Klemp, P. F. B., Cameron, P. J., Martindale, A. A., Glancy, R. J., Norman, P. E., Hetherington, E. L., Najdovski, L. and Lambrecht, R. M. (1994). 166Ho-microsphere liver radiotherapy: a preclinical SPECT dosimetry study in the pig. *Nucl. Med. Comm.* **15**, 545-553.

Turner, J. H., Martindale, A. A., Sorby, P., Hetherington, E. L., Fleay, R. F., Hoffman, R. F. and Glaringbold, P. G. (1989). Samarium-153 EDTMP therapy of disseminated skeletal metastasis. *Eur. J. Nucl. Med.* **15**, 784-795.

국립보건안전연구원 (1994). 의약품등의 독성시험 기준, 국립보건안전연구원 고시 94-3호.