

호중구 감소증을 유도한 마우스에서의 유전자 재조합 인과립구 콜로니자극인자의 효과

조명행^{1,*} · 유아선¹ · 방명주¹ · 광형일¹ · 심하정¹ · 강관엽² · 최승진²
정경환² · 박두홍² · 안길환³

¹서울대학교 수의과대학, ²(재)목암생명공학연구소, ³선문대

Effects of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor(rhG-CSF) on Cyclophosphamide-induced Neutropenic Mice

Myung-Haing CHO^{1,*}, Ah-Sun YU¹, Ming-Zhu FANG¹, Hyung-II KWAK¹, Ha-Jung SUNG¹,
Koan-Yeob KANG², Seung-Jin CHOI², Kyung-Hwan JUNG², Doo-Hong PARK² and Gil-Hwan AHN³

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University

²Mogam Biotechnology Research Institute, ³Sun-Moon University

(Received April 1, 1998; accepted May 20, 1998)

Abstract – Administration of 3 type KGCs [recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF)] to mice with cyclophosphamide (CPA)-induced neutropenia for 4 consecutive days from the day after the CPA dosing (100 mg/kg) resulted in a dose dependent increase in the peripheral blood neutrophil count 6 hours after the final KGC injection. Within the KGC dose range of 0.1 to 40 μ g per mouse per day, there was a sigmoidal relationship between the logarithm of the dose and the peripheral blood neutrophil count (relative value for neutrophil count of the basal dose) in the treated mice. The sigmoidal relationship of test KGC preparations shows that there is a saturation point in terms of efficacy. Compared with effect of KGC-Orange, Green, and Blue, KGC-Orange recovers neutrophils more effectively than the others do.

Keywords □ granulocyte stimulating factor, neutropenia

혈액을 구성하는 혈구 즉, 적혈구(erythrocyte), 과립구(granulocyte), 단핵구(monocyte), 혈소판(platelet) 그리고 림프구(lymphocyte)는 모두 한 가지 세포, 즉 다능조혈성 혈통세포(pluripotent hematopoietic stem cell)로부터 유래되는 것으로 알려져 있다(Spangude, 1991). Stem cell은 최소한 3가지의 수임혈통세포(committed stem cell)로 분화되어 적혈구계 거핵세포 생산라인(erythroid megakaryocytic pathway), 호산구계 생산라인(eosinophilic pathway)으로 재차 분화되며 이런 수임혈통세포들은 실험실적으로 배양을 하면 분화된 분자 세포끼리 접촉을 형성하기 때문에 집단형성단위(colony forming unit; CFU)로 불려지기도 한다. 각각의 수임혈통세포들은 또 다시 분화되어 여러 가지 종류의 혈구로 분화되어 생명의 유지에 필요한 중요한 작용을 수행하는 것이다. 하지만 골수의 장애나 백혈병, 암 등으로 인하여 이와 같은 stem cell로부터 필요한 혈구로의 재생이 중단되거나 저해를

받으면 예기치 않은 각종의 부작용에 직면하게 된다(Kuwabara와 Kobayashi, 1996). 즉, 백혈병이나 재생불능성빈혈 등의 경우 혈통세포 자체가 손상을 받기 때문에 집단형성능력 즉 CFU의 형성능력이 소실되게 되며 따라서 이런 능력의 향상 증진을 도모할 필요가 생기게 되었다. 생체내에서 이러한 기능을 발휘하는 성장인자를 colony stimulating factor (CSF)라 부르며 크게 multi-CSF(interleukin 3) (Yang 등, 1986), granulocyte-macrophage-CSF(GM-CSF) (Wang 등, 1985), granulocyte-CSF(G-CSF) (Nagata 등, 1986), 그리고 macrophage-CSF(M-CSF) (Kawasaki 등, 1985)의 4가지로 구분을 한다. 특히 항암화학요법 중 빈번히 관찰되는 골수 억제제 항암제의 비특이적인 세포독성에 기인하는 것으로 분화 및 증식이 활발한 과립구-대식세포 생산라인에도 부차적인 세포 독성을 나타내어 호중구의 감소증을 유발하고, 이로 인한 생체면역기능의 저하로 인하여 예기치 않은 심각한 2차 감염을 야기시키기 때문에 항암요법의 실시에 가장 문제가 되는 부작용중의 하나로 인식되고 있다(Gabrilov 등, 1988).

* To whom correspondence should be addressed.

본 연구의 연구대상인 KGC는 (재)목암생명공학연구소에서 유전자 재조합방법으로 대장균에서 발현하여 생산한 새로운 유전자 재조합 인과립구 콜로니자극인자(recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, rhG-CSF)로서 앞에서 언급한 4가지 수임혈통세포종 과립구-대식세포 생산 라인을 자극시킴으로써 호중구의 생산을 촉진하는 역할을 한다. 그러므로 본 연구에서는 3가지 형태의 rhG-CSF인 KGC-Orange, Green 및 Blue의 효력을 항암제인 cyclophosphamide(CPA)를 이용하여 호중구 감소증을 유발시킨 C57BL/6N 마우스에 투여하여 검증하고자 실시하였다.

방 법

실험동물

본 실험에 사용할 C57BL/6N 마우스는 일본의 Cler Japan Inc.로부터 6주령의 수컷동물을 구입하여 실험개시전 1주일간 새로운 환경 즉 본 실험실의 무균 barrier(명진기계)에 적응시키며 무균적으로 7주령까지 사육시킨 후 건강한 개체만을 골라 사용한다.

실험물질

시험에 사용된 시험물질 KGC-Orange, Green, Blue는 300 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{vial}$ 형태의 맑고 투명한 액상으로 (주)녹십자로부터 공급받아 사용하였다. CPA(Sigma, USA)는 pH 5.0~6.0의 주사용 증류수에 녹여 사용하였다.

약물투여, 채혈 및 호중구수 측정

시험물질을 용매에 원하는 농도로 희석하여 하루에 마리당 0.2 ml 씩을 투여하고 약물 투여 6시간 후에 안와정맥총으로부터 채혈하여 총백혈구수(leukocyte counts) 및 호중구를 측정한다. 채혈한 혈액은 EDTA(10 mg/10 ml blood) 처리를 한 용기에 현탁시킨 후 총백혈구수를 측정한다. 별도의 혈액을 취해 혈액도말 표본을 제작하고 Giemsa 염색법으로 염색한 후 현미경하에서 각 혈구들을 계수하고 아래의 비율에 의하여 호중구수를 산출한다(양, 1997).

총백혈구수(cells/ μl)=측정한 백혈구수 \times 50

호중구 비율(%)=호중구수/100개 혈구(도말 슬라이드 글라스에서) \times 100

호중구수(Number/ mm^3)=총백혈구 \times 호중구 비율($\%$) \times 1/100

통계학적 처리

실험군간 각 측정치에 대한 유의성은 ANOVA-SAS program을 이용하여 검정하였다.

실험 방법

KGC 효력 실험

각각의 마우스를 군당 7~9주령 수컷 5마리 이상씩 용매

대조군과 CPA투여군(100 mg/kg, i.p.) 그리고 KGC 처치군으로 나누었으며 KGC 처치군 각 군에 KGC-Orange, Green과 Blue를 3가지 용량(0.2, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$)으로 희석하여 마리당 0.2 ml씩 피하 주사한다. 각 물질의 투여 6시간후 안와정맥총에서 채혈하였으며 마지막 투여 30시간 후에 역시 안와정맥총에서 채혈한 후 백혈구수 및 호중구의 수를 측정하였다.

호중구 회복 실험

각각의 마우스를 CPA처치군과 용매 대조군으로 나누고 군당 7~9주령 수컷 5마리 이상의 마우스에 용매 대조군은 항암제인 CPA를 투여하지 않고, CPA 처치군은 CPA를 100 mg/kg의 용량으로 1회 복강내에 투여한 다음, 투여 24시간후부터 4번 연속하여 24시간 간격으로 4일간 시험물질을 3가지 용량(0.2, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$)으로 희석하여 마리당 0.2 ml씩 피하 주사하였다.

CPA 처치전 날(0일) mouse 체중을 측정하고 오후 6시에 안와정맥에서 채혈하여 혈구수를 측정하였으며 다음 날 정오 12시에 CPA를 복강내로 투여한 후 24시간 뒤에 각 시험물질에 대한 3가지 용량을 투여하고 6시간 후 안와정맥에서 채혈하였다. 이를 1일로 하여 3일째까지 반복하여 실험하였으며 4일째는 정오에 투여하고 30시간후인 다음 날 오후 6시에 안와정맥에서 채혈한 후 백혈구수 및 호중구의 수를 측정하였다.

rhG-CSF 용량반응 실험

군당 7-9주령 수컷 5마리 이상의 마우스에 항암제인 CPA를 100 mg/kg의 용량으로 1회 복강내에 투여하였다. CPA투여 24시간후부터 매 24시간마다 4일간 3가지 시험물질을 0.2 ml당 0.005 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 부터 2배수로 40 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 까지 투여(0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$)하고 최종 투여 6시간후 말초혈액을 채취하여 총백혈구수 및 호중구의 수를 측정하였으며, 용매대조군에는 control vehicle을 이용해 동일한 방법으로 실시하였다.

결 과

KGC 효력 실험

시험물질자체가 지니고 있을 수 있는 잠재적 효력을 검증하고자 실시한 실험 결과 KGC-Orange(Fig. 1), KGC-Green(Fig. 2), KGC-Blue(Fig. 3) 모두 용량 의존적으로 대조군 및 CPA 처치군에 비하여 호중구의 숫자는 증가시켰으나 투여 5일째는 오히려 약간 감소하는 양상을 나타내었다. KGC-Orange, Green, Blue간의 군간 효력의 뚜렷한 차이는 발견할 수 없었으며 모든 군이 유사한 능력으로 호중구를 회복시키는 효력을 지니고 있음을 알 수 있었다.

호중구 회복 실험

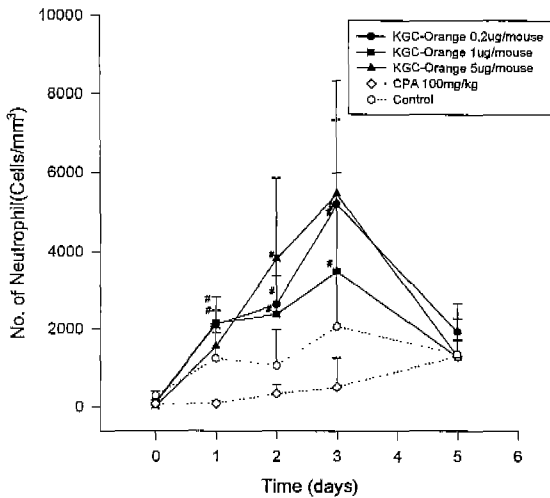


Fig. 1. Change of neutrophils by KGC-Orange on C57BL/6N mice treated with 3 different doses subcutaneously. CPA mice received single intraperitoneal injection of CPA (100 mg/kg) on day 0 and control mice received vehicle solvent. Blood samples were obtained 6 hours after each injection and 30 hours after the injection on day 4. Each point represents the mean of 5 mice with the SD indicated by error bars. *: P<0.005, #: P<0.01 as compared with the control mice.

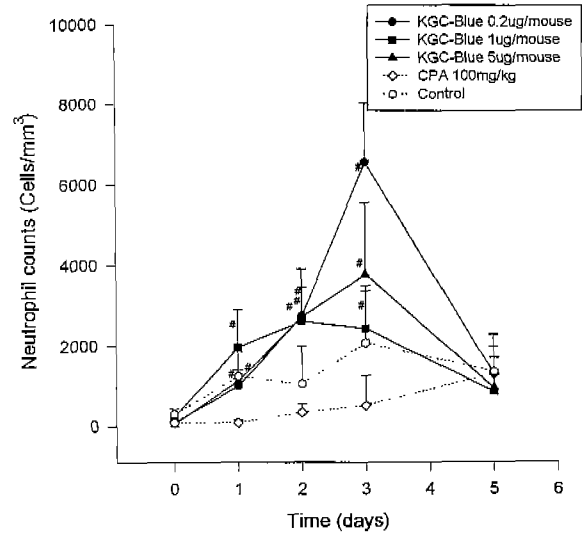


Fig. 3. Change of neutrophils by KGC-Blue on C57BL/6N mice treated with 3 different doses subcutaneously. CPA mice received single intraperitoneal injection of CPA (100 mg/kg) on day 0 and control mice received vehicle solvent. Blood samples were obtained 6 hours after each injection and 30 hours after the injection on day 4. Each point represents the mean of 5 mice with the SD indicated by error bars. *: P<0.005, #: P<0.01 as compared with the control mice.

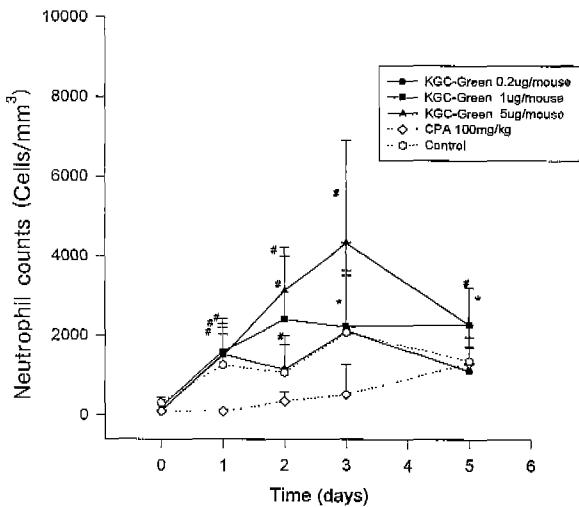


Fig. 2. Change of neutrophils by KGC-Green on C57BL/6N mice treated with 3 different doses subcutaneously. CPA mice received single intraperitoneal injection of CPA (100 mg/kg) on day 0 and control mice received vehicle solvent. Blood samples were obtained 6 hours after each injection and 30 hours after the injection on day 4. Each point represents the mean of 5 mice with the SD indicated by error bars. *: P<0.005, #: P<0.01 as compared with the control mice.

CPA 처치후 KGC를 투여한 군의 호중구수는 CPA를 단독으로 처리한 대조군과 비교하여 볼 경우 현저하게 호중구수를 증가시키는 양상을 나타내었다. CPA 처치후 KGC 군을 처리한 후 시험물질의 효과를 보면 2일째까지는 별다른 증가추세를 보이지 않다가 3일째부터 약간 증가하다가

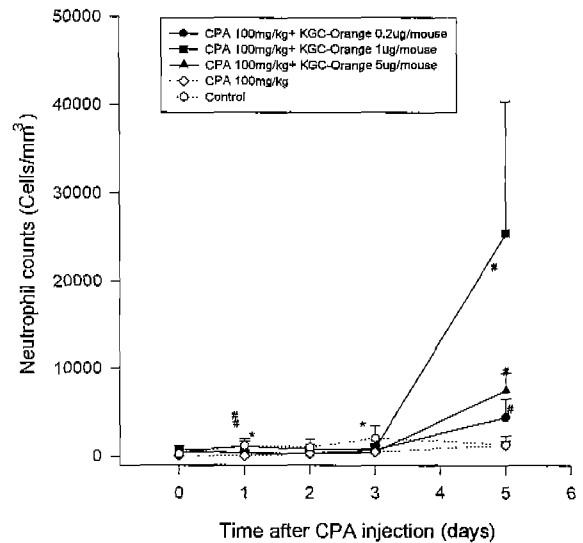


Fig. 4. Recovery from CPA-induced neutropenia. Mice received single intraperitoneal injection of CPA (100 mg/kg) on day 0. Beginning 24 hours later, mice were injected subcutaneously daily for 4 days. Blood samples were obtained 6 hours after each injection and 30 hours after the injection on day 4. Each point represents the mean of 5 mice with the SD indicated by error bars. *: P<0.005, #: P<0.01 as compared with the control mice.

CPA 투여 5일째에 급격히 증가함을 보인다. 본 실험에 의하면 KGC-Orange(Fig. 4)가 KGC-Blue(Fig. 6)와 KGC-Green(Fig. 5)보다 우수한 효력을 지니고 있음을 알 수 있었다.

Fig. 4의 KGC-Orange 처치군에서 보면 3일째까지 용량에 대한 차이를 나타내지 않았으나 5일째에 현격한 증가추세를 나타내었는데 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 를 투여한 호중구의 수가 25,000 개 수준으로 다른 KGC군과는 달리, 보다 효과적으로 증가

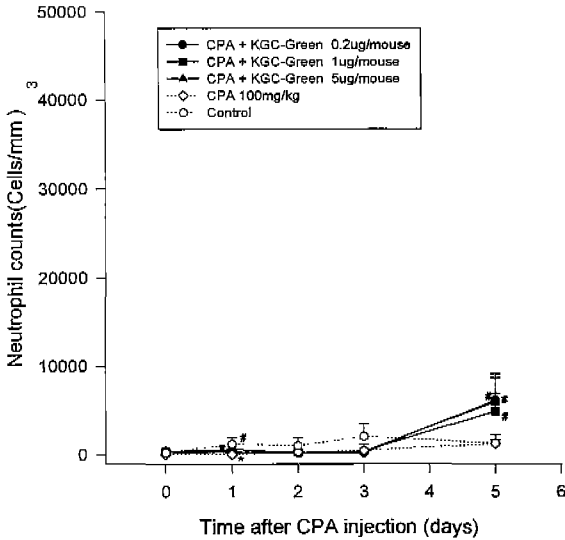


Fig. 5. Recovery from CPA-induced neutropenia. Mice received single intraperitoneal injection of CPA (100 mg/kg) on day 0. Beginning 24 hours later, mice were injected subcutaneously daily for 4 days. Blood samples were obtained 6 hours after each injection and 30 hours after the injection on day 4. Each point represents the mean of 5 mice with the SD indicated by error bars. *: $P < 0.005$, #: $P < 0.01$ as compared with the control mice.

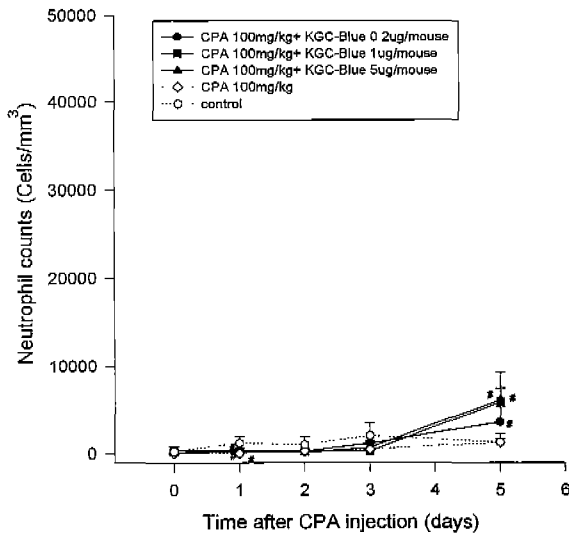


Fig. 6. Recovery from CPA-induced neutropenia. Mice received single intraperitoneal injection of CPA (100 mg/kg) on day 0. Beginning 24 hours later, mice were injected subcutaneously daily for 4 days. Blood samples were obtained 6 hours after each injection and 30 hours after the injection on day 4. Each point represents the mean of 5 mice with the SD indicated by error bars. *: $P < 0.005$, #: $P < 0.01$ as compared with the control mice.

되었음을 알 수 있다. KGC-Green(Fig. 5)에서는 2일째 약간 증가하다가 3일째 다시 감소하며 5일째에서 호중구를 현저하게 회복 증가시킬 수 관찰할 수 있었다 KGC-Blue(Fig. 6). 또한 Green군과 유사한 반응을 보여 3일째부터 효과를 나타내었으며 특히 5일째에 완전하게 회복되는 양상을 보였다. 그러나 세 군의 회복되는 양상을 동시에 비교해 보면 KGC-orange가 다른 두군에 비하여 호중구를 가장 많이 증가시켰음을 알 수 있다.

용량반응 실험

KGC-Orange, Green, Blue 처치군 모두 용량 의존적 반응을 보였다. 하지만 그 양상이 약간씩 차이를 알 수 있는데 KGC-Orange(Fig. 7)는 약 0.16 μg 에서 5.0 μg 까지 직선상의 증가추세를 나타내었으나 약 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 에서 포화상태를 나타내었음을 알 수 있었다. KGC-Green(Fig. 8)은 Orange군과는 다르게 0.32 μg 부터 2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 까지 양호한 직선상을 나타내었고 약 5.0 μg 에서 포화된 양상을 나타내었다. KGC-Blue(Fig. 8)는 Orange, Green과는 다르게 직선상이 늦게 나타나 약 1.25 μg 에서 5.0 μg 까지 직선상을 나타내었으며 약 10 μg 에서 역시 포화되는 경향을 나타내었다. 시험물질 각각을 최저용량인 0.005 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ 의 호중구수를 1.0으로 하여 모든 수치를 상대적으로 구하였다. 호중구의 최저수치와 최고수치를 비교하여 용량에 따라 증가율을 보았다. KGC-Orange는 약 11.8배, KGC-Green은 12.7배, KGC-Blue는 11.1 배로 KGC-Green이 저용량에 비하여 호중구수 증가율이 제일 높고 다음으로 Orange, Blue 순임을 알 수 있었다. 하지만 그림 8에서 나타난 바와 같이 KGC-Orange 군이 가장 넓은 범위 내에서(0.16~5.0 μg) 직선상의 양호한 증가양상을 보였으며 이는 KGC-Green(0.64~2.5 μg)과 KGC-Blue(1.25~5.0

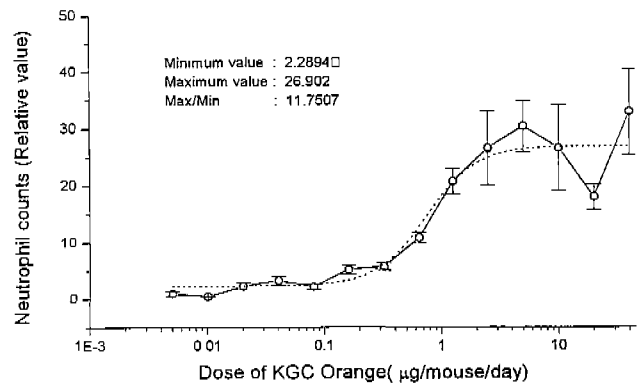


Fig. 7. Dose-related rise in peripheral blood neutrophils in CPA-treated mice. CPA-induced neutropenic mice were given various doses of KGC-Orange for 4 consecutive days from the day after exposure to CPA. Blood samples were obtained 6 hours after the last dose of KGC-Orange. Each point represents the relative value, the mean of five mice divided to the mean of 0.005 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$, with the SD indicated by error bars. Short dash indicates regression curve by sigmoidal fitting.

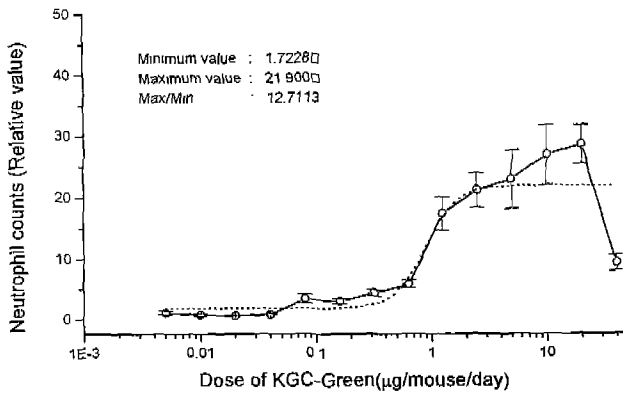


Fig. 8. Dose-related rise in peripheral blood neutrophils in CPA-treated mice. CPA-induced neutopenic mice were given various doses of KGC-Green for 4 consecutive days from the day after exposure to CPA. Blood samples were obtained 6 hours after the last dose of KGC-Green. Each point represents the relative value, the mean of five mice divided to the mean of 0.005 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$, with the SD indicated by error bars. Short dash indicates regression curve by sigmoidal fitting.

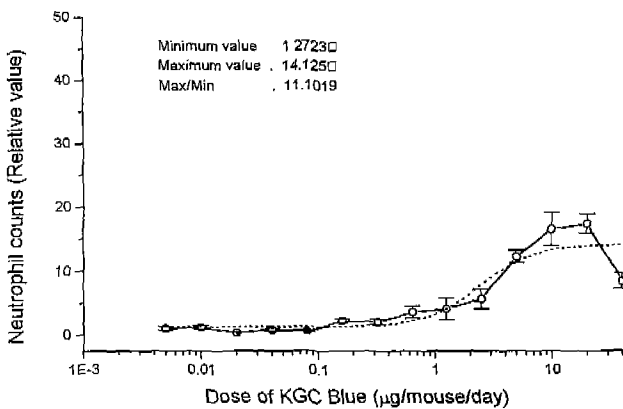


Fig. 9. Dose-related rise in peripheral blood neutrophils in CPA-treated mice. CPA-induced neutopenic mice were given various doses of KGC-Blue for 4 consecutive days from the day after exposure to CPA. Blood samples were obtained 6 hours after the last dose of KGC-Blue. Each point represents the relative value, the mean of five mice divided to the mean of 0.005 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$, with the SD indicated by error bars. Short dash indicates regression curve by sigmoidal fitting.

μg 군에 비하여 보다 뛰어난 용량반응을 나타냄을 알 수 있었다. 호중구의 증가율과 직선상의 용량반응관계를 종합하여 볼 때 KGC-Orange 군이 다른군에 비하여 보다 우수한 효과를 지니고 있음을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 유전자 재조합 인과립구 콜로니자극인자인 KGC-Orange, Green, Blue의 *in vivo*에서의 효과를 CPA를 투여하여 호중구감소증을 유발시킨 마우스를 이용하여 비교

관찰하였다. 본 연구에서 사용한 C57BL/6N mouse는 실험 결과 3일째까지 호중구수의 증가추세를 보이지 않았고, 약물투여 24시간 후 호중구수가 정상으로 유지되는 것을 이용하여 마지막 채혈의 시간을 약물 효과가 사라진 후 호중구 수치가 회복되었는지를 확인할 수 있는 30시간후로 잡았다(Tanaka 등, 1989). 그 결과로 투여 5일째 호중구수가 현저히 증가함을 볼 수 있었다. 본 실험결과 나타난 각 KGC의 특징적인 생물학적 효과는 투여후 수시간 내에 말초혈액의 호중구수를 증가시켰다는 점이며 따라서 chemotherapy나 radiotherapy 시 부작용에 의하여 발생하는 호중구 감소증시 호중구 회복을 빠른 시일 내에 효과적으로 증진시키기 위해 사용될 수 있는 가능성을 나타내었다. 즉, 본 연구 시험대상인 3가지 시험군 즉 KGC-Orange, Green, Blue에 대한 효과를 관찰하기 위하여 각각의 호중구 회복능과 용량과의 반응을 관찰한 결과 KGC-Orange는 효율적인 호중구 회복을 특히 다른 두 군에 비하여 상대적으로 우수한 회복 양상을 보였으나, 중간용량에서 특이하게 이상수치를 보였다(Fig. 4). 이 수치는 정상 수치 약 7,000 범위를 벗어난 것으로 아마도 염증반응으로 유추된다. 하지만 이런 비정상이라 할 수 있는 중간 용량을 뺀 나머지의 호중구수를 비교하여 보아도 KGC-Orange가 KGC-Green과 Blue보다 우수한 회복증가능력이 있음을 알 수 있다. 용량 반응에서는 최저용량에 대한 상대적인 수치로 그래프를 그려 저용량에 비하여 얼마만큼 호중구수를 증가시키는가를 보았다. 용량에 따른 증가율은 KGC-Orange와 Green이 11.7과 12.7로 KGC-Blue, 11.1보다 높게 나왔음을 보여주고 있다(Fig. 7, 8, 9). 상대적 수치를 이용하여 최고 수치를 비교하였을 때에도 역시 KGC-Orange가 가장 높은 수치를 보여준다. 용량반응실험에서는 단순한 호중구의 수치만을 가지고 시험물질의 효과를 확인하기보다는 최저용량의 호중구수치를 1.0으로 잡은 상대값을 가지고 결과를 분석하는 것이 더욱 더 효력을 신뢰성있게 비교 점정할 수 있는 방법으로 사료된다. 또한 직선상의 용량반응을 나타내는 구간을 비교한 바 역시 KGC-Orange가 제일 넓은 범위에서 직선상의 증가추세를 나타냄으로서 세가지중 가장 우수한 것으로 밝혀졌다. 이상의 결과를 종합하건대 세가지 rhG-CSF를 비교한 본 실험에서는 KGC-Orange가 호중구 회복 효과가 높았으며 용량 반응에서는 가장 높은 수치를 나타내고 최저치와 최고치로 비교하여 본 증가율에서도 높은 수치를 보여주고 있다. 이러한 결과를 바탕으로 항암제등 여러 약물치료후의 후유증으로 오는 호중구 감소에 대한 치료제로서 보다 효과적인 약물 개발을 위한 노력이 기대되는 바이다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 수의과대학 부설 수의과학연구소의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Gabrilvoe, J. L., Jakubowski, A., Scher, H., Sternberg, C., Wong, G., Grous, J., Yagoda, A., Fain, K., Moore, MAS, Clarkson, B., Osilgen, HF, Alton, K., Welte, K., Souza, L. (1988). Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1414.
- Hattori, K., Takahashi, M., Tamura, M., Oheda, M., Ohsawa, N. and Ono, M. (1990). Quantitative *in vivo* assay of human granulocyte colony-stimulating factor using cyclophosphamide-induced neutropenic mice. *Blood*, **75**(8), 1228.
- Tanaka, H., Okada, Y., Kawagishi, M. and Tokiwa, T. (1989). *J. Pharm. Exp. Ther.*, **251**, 1199.
- Kawasaki, E. S., Ladner, M. B., Wang, A. M., Arsdall, J. V., Warren, M. K., Cayne, M. Y., Schweickart, D. L., Lee, M., Wilson, K. J., Boosman, A., Stanley, E. R., Ralph, P., Mark, D. F. (1985). Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor, *Science*, **230**, 291.
- Kuwabara, T., Kobayashi and Sugiyama, Y. (1996). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, *Drug Metab. Rev.*, **28**(4), 625.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H., Yamazaki, T. (1986). The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor, *EMBO J.*, **5**, 575.
- Yang, Y. C., Ciarletta, A. B., Temple, P. A., Chung, M. P., Kovacic, S., Witek-Giannotti, J. S., Leary, A. C., Kritz, R., Donahue, R. E., Wong, G. G., Clark, S. C. (1986). Human IL-3(multi-CSF); Identification by expression, cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3, *Cell*, **47**, 3.
- Wong, G. G., Witek, J. S., Temple, P. A., Wilkens, K. M., Leary, A. C., Laxenberg, D. P., Jones, S. S., Brown, E. C., Key, R. M., Orr, E. C., Clark, S. C. (1985). Human GM-CSF; Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins, *Science*, **228**, 810.
- 양일석. (1997). 제 2장 혈액, 수의생리학 실험, 23-59.