

DWP-311의 랫드에 대한 아급성경구독성시험

김형식 · 곽승준 · 천선아 · 한하수 · 박현선 · 안미영 · 배기환¹ · 이병무*

성균관대학교 약학대학, 충남대학교 약학대학¹

Subacute Oral Toxicity of DWP-311 in Sprague-Dawley Rats

Hyung Sik KIM, Seung Jun KWACK, Sun Ah CHUN, Ha Su HAN, Hyun Sun PARK,
Mi Young AHN, Ki Hwan BAE and Byung Mu LEE*

Division of Toxicology, School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Kyunggi-Do,
Suwon 440-746, Korea

¹College of pharmacy, Chungnam University, Taejeon City, Chungchungnamdo

(Received June 5, 1998; accepted August 25, 1998)

Abstract – The subacute oral toxicity study of DWP-311 was carried out in Sprague-Dawley rats of both sexes. We daily examined clinical signs, body weights, hematological and biochemical parameters, and histopathological examinations for 30 days after administration of DWP-311 with different dose levels (0, 0.04, 0.2, and 1.0 g/kg). There were no clinical signs and pathological changes compared with control group except slight decreases in spontaneous motor activities and locomotions at high dose group of DWP-311. Body weights were not significantly changed in animals treated with DWP-311. In histopathological examinations, there were 2 cases of pneumonia in control group for one male and one female, but it was not directly related to DWP-311. These results indicate that subacute oral toxicities of DWP-311 were low and the no-observed adverse effect level (NOAEL) was considered to be 1.0 g/kg in rats.

Keywords □ DWP-311, subacute toxicity, NOAEL

본 시험은 보건복지부 신약개발의 일환으로서 실시된 치주질환 치료제의 개발을 위해 대추와 후박으로부터 분리, 정제된 성분인 DWP-311에 대하여 그 안전성을 시험하기 위한 목적으로 실시하였다. 본 시험물질인 DWP-311의 랫드에 대한 급성경구독성을 평가한 결과 최대투여가능용량인 6,250 mg/kg에서도 사망예가 전혀 없었으며 기타 독성학적 이상증상도 발현되지 않았다(Kwack 등, 1998). 이와 같은 결과에 기초하여 본 시험에서는 DWP-311에 대한 1개월간의 아급성경구독성을 평가 하였다.

물질특허 도입에 따라 새로운 신물질의 개발은 제약업체 뿐만 아니라 국가적으로도 매우 시급하고 중요한 과제이다. 또한 신약 개발에는 많은 경비와 시간이 소요되며 축적된 기술 등이 요구된다고 할수 있다. 이러한 상황에서 활성작용이 있는 한약제제를 배합하여 새로운 신약을 개발한다는 것은 이에 따른 많은 시간과 경비를 절감할 수 있고 안전성에 대한 문제도 어느 정도 확보될 수 있어서 앞으로 이

에 대한 많은 연구가 있으리라고 사료된다. 현재 신물질의 단일성분에 대한 독성시험등은 국내외적으로 많은 연구가 이루어져 있다(Kim 등, 1996; Kwack 등, 1996). 그러나 복합제제는 개개성분의 약리작용과 독성작용이 다르기 때문에 이들 복합제제에 대한 안전성을 평가한다는것은 우리나라의 신약개발차원에서 앞으로 매우 중요한 의미를 갖는다고 하겠다.

실험방법

시험물질

본 시험물질은 대추와 후박(대추:후박, 10:1)에서 분리한 갈색의 겔형태인 물질이다. 본 시험에 사용된 시험물질은 대웅제약(주)에서 제공받아 시험당일 용시 조제하였다.

시험계 및 사육환경

시험구역은 성균관대학교 약학대학내 청정실험동물실에서 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF(특정병원체 부재) Charles River SD계 랫드를 우정과학(주)으로부터 분양

* To whom correspondence should be addressed.

받아 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 배기 10~18회/hr, 형광 등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(280 W×400 L×170 H mm)케이지에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화사육 기간 동안 일반증상 등을 관찰하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 제일상사의 실험동물용사료를 구입하여 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음수는 멸균수도물을 자유롭게 섭취시켰다.

군분리 및 투여용량의 설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였다. 동물의 개체식별은 사육상자별 tag표시법을 이용하였다(National Institute of Safety Research (1994)). 투여용량의 설정은 급성독성시험의 결과를 토대로 하여 1.0, 0.2, 0.04 g/kg 및 용매대조군과 무처리대조군을 설정하였다. 시험물질을 투여하기 직전 시험동물의 체중범위는 수컷 215 ± 10 g 및 암컷 160 ± 10 g이었고, 주령은 약 8주령이었다.

시험물질 조제 및 투여

DWP-311은 물에는 난용성으로 수용액 상태로 투여하기에는 매우 곤란하여 37°C 의 수욕상에서 2% CMC-Na용액에 균일하게 현탁하여 매일 투여직전에 용시 조제하였다. 시험물질은 1회용 주사기를 이용하여 10 ml/kg으로 1회 경구투여하였다. 투여량은 투여직전 체중의 변화에 따라 산출하였다.

관찰항목

임상증상관찰 및 안구검사

임상증상관찰은 모든 시험동물에 대한 상태를 매일 1회 오전 10시에 관찰하고, 시험물질 투여후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 매일 주의하여 관찰하였다. 또한 안구검사는 투여 마지막 주에 검안경을 이용한 간이적인 방법으로 실시하였다.

체중 및 사료섭취량 및 물섭취량

시험에 사용된 모든 시험동물에 대하여 시험기간중 매일 체중을 측정하였으며 또한 시험물질 투여전 및 부검시 체중을 각각 측정 기록하였다. 사료섭취량 및 물섭취량은 주 3회 측정하였다. 사료섭취량은 각 사육상자별로 1일 1회 공급한 사료량에서 남은 잔량을 감하여 측정하였으며, 물섭취량은 물 공급시마다 최초공급량에서 줄어든 분량을 계측하고, 다시 새로운 물을 물병에 채우는 작업을 매일 실시하며, 각 사육상자별 소모된 물의 양을 측정하였다.

혈액학적 검사

부검전 1일간 절식시킨 후, ether로 마취시켜 복부 대동맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 항응고제로 EDTA 2K가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 white blood cell(WBC), red blood cell(RBC), hemog-

lobin(Hgb), hematocrit(Hct), mean corpuscular hemoglobin concentration(MCHC), platelet(PLT) 및 lymphocytes 등을 측정하였다.

혈액생화학적 검사

복부대동맥에서 채혈한 혈액중 일부를 혈액학적 검사로 이용하고 나머지 혈액은 4°C 냉장보관한 후 원심분리하여 자동생화학검사기(Express 550)를 이용하여 측정하였다. alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(ALP), lactate dehydrogenase(LDH) 등은 반응온도에 따라 검사결과가 달라질 수 있으므로 이 측정은 30°C 를 기준으로 하여 측정하였다.

뇨검사

부검 전일 채뇨하여 비중, pH, Protein, Glucose, Ketone 체, Bilirubin, 잠혈, Nitrite 및 Urobilinogen을 검사하기 위하여 뇨 시험지(MULTISTIX, AMES)에 뇨를 침적시켜 측정하였다.

부검소견

모든 시험군의 생존동물에 대하여 시험물질 투여 개시일로부터 4주후에 부검을 실시하였다. 부검전에 체중을 측정하고 ether 마취하여 복부 대동맥으로부터 채혈한 후, 방혈 치사 시킨 후 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

장기중량측정

모든 시험군의 전 동물에 대하여 신장, 간장, 비장, 심장, 폐장, 부신, 위, 고환, 난소의 중량을 측정하였다.

병리조직 검사

전 동물에 대하여 다음의 장기를 10% 중성 포르말린으로 고정시켰다. 고정장기는 다음과 같다. 신장, 비장, 간장, 심장, 부신, 위, 고환, 난소 등 병변이 있는 장기의 경우 대조군 및 최고용량군에서는 상기 장기를 전체에 대해서 실행하고, 저용량군 및 중간용량군에서는 육안적 부검소견이 인정되는 장기에 대해 병리조직 검사를 시행하였다.

통계학적 분석

체중측정, 사료섭취량 및 물섭취량의 유의성 검정은 Student's t-test을 사용하였으며, 일반병리 및 조직병리 부분의 자료는 Dunnett's test에 의해 실시하였다(Lorke, 1983).

실험결과

임상증상 및 사망예

시험기간중 암, 수 모두 시험물질 투여에 의한 사망동물은 없었다(Table I). 종합적인 임상증상관찰 결과는 Table II에 나타내었다. 시험물질투여군 및 용매대조군에서 암, 수 모두 투여 개시후 1일에 약간의 연변이 관찰되었으나 1주후부터는 점차 회복되었다. 모든 동물에서 시험물질 투여후 자발적인 운동 및 호흡률의 증가 등과 같은 특이증상은 관찰되지 않았으며 최종투여일에 실시한 안구검사에서

Table I. Mortality of Sprague-Dawley rats orally administered with DWP-311 for 30 days

Sex	Dosage (g/kg B.W.)	Days						Weeks				Final Mortality		
		0	1	2	3	4	5	6	1	2	3		4	
Male	CON(-)	0/10 ^a	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	CON(+)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.04	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	CON(-)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	CON(+)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.04	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

CON(-): Not treated. CON(+): Treated with 2% CMC solution. ^aValues show the animal numbers per total 10 animals.

Table II. Clinical signs of Sprague-Dawley rats orally administered with DWP-311 for 30 days

Sex	Dosage (g/kg B.W.)	Animal numbers with clinical sign										
		(Days)						(Weeks)				
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	
Male	CON(-)	0/10 ^a	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	CON(+)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.04	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10
Female	CON(-)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	CON(+)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.04	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	0.2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1.0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

CON(-): Not treated. CON(+): Treated with 2% CMC solution. ^aValues show the animal numbers per total 10 animals.

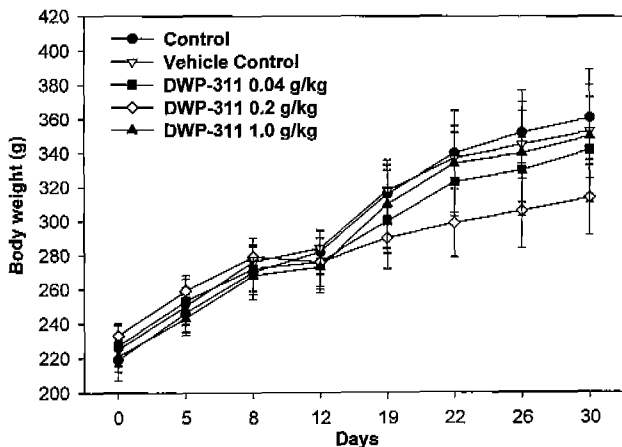


Fig. 1. Body weight changes in Sprague-Dawley male rats orally administered with DWP-311 for 30 days.

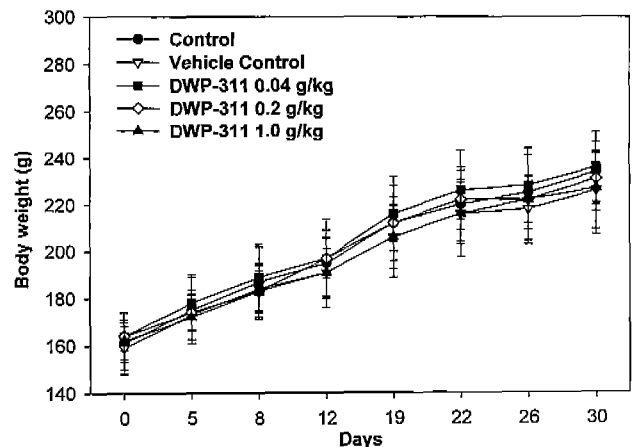


Fig. 2. Body weight changes in Sprague-Dawley female rats orally administered with DWP-311 for 30 days.

도 특이한 안구부위의 이상소견은 관찰되지 않았다.
체중측정결과

시험물질 투여군 및 대조군들의 체중측정결과는 Fig. 1
 과 2에 나타내었다. 수컷의 중간용량군 및 저용량군에서 음

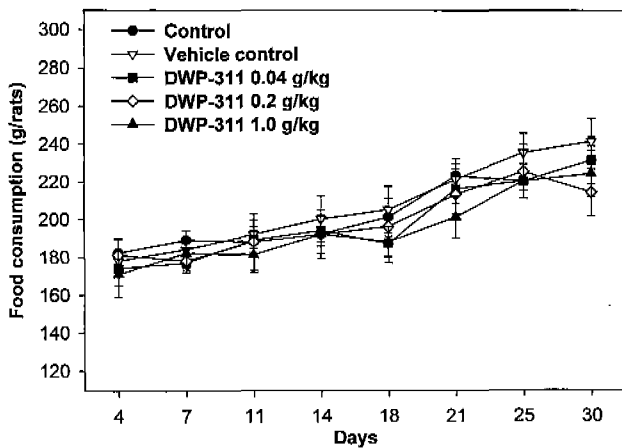


Fig. 3. Food consumption of Sprague-Dawley male rats orally administered with DWP-311 for 30 days.

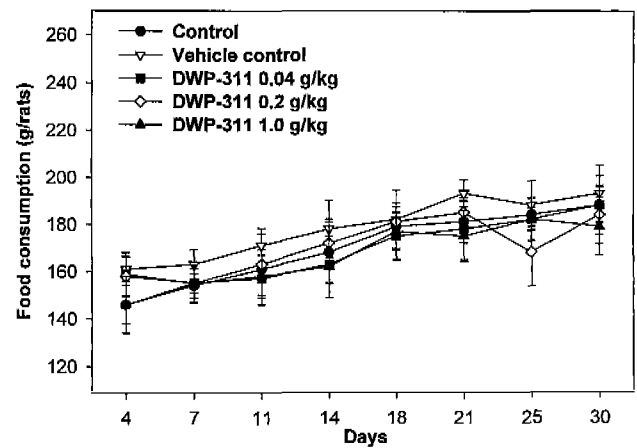


Fig. 4. Food consumption of Sprague-Dawley female rats orally administered with DWP-311 for 30 days.

성대조군에 비해 체중의 증가율이 약간 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 반면에 암컷의 모든 투여군에서는 전체 투여기간중 대조군에 비해 유의한 체중변화는 인정되지 않았다.

사료섭취량 및 물섭취량

시험물질 투여군 및 대조군들의 사료섭취량의 측정결과는 Fig. 3, 4와 같다. 사료섭취량은 암컷의 고용량 투여군에

서 투여 개시후 11일부터 감소하기 시작하여 30일간 감소하는 경향을 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다. 물섭취량은 암,수 모든 시험군에서 음성대조군과 거의 유사하였다.

혈액학적 검사

WBC값의 범위가 대조군에서는 10.20~20.15의 범위내이었다. 시험물질을 투여한 수컷 고용량군에서 12.94로 음성대조군에 비해 약간 감소하였으나 모두 정상적인 범위내

Table III. Hematological findings of Sprague-Dawley rats orally administered with DWP-311 for 30 days

Dosage (g/kg B.W.)	Item	Unit	CON(-)	CON(+)	0.04	0.2	1.0
Male	WBC	($10^3/\text{mm}^3$)	14.72±4.29	16.37±5.28	15.44±3.30	13.48±1.95	12.94±2.97
	RBC	($10^3/\text{mm}^3$)	8.43±1.47	7.23±0.40	6.80±0.48	6.99±0.41	7.40±0.43
	Hgb	(g/dl)	17.30±2.62	14.30±0.56	15.28±1.92	13.93±0.83	14.86±0.87
	Hct	(%)	47.55±7.88	39.01±2.10	41.43±5.83	38.98±2.20	41.42±2.13
	MCV	(fl)	56.45±1.47	55.72±2.01	55.79±1.38	55.05±1.29	55.10±1.45
	MCH	(pg)	20.51±0.73	20.22±0.57	20.25±0.55	20.52±0.53	20.10±0.47
	MCHC	(g/dl)	36.55±0.76	35.80±1.26	36.25±1.01	36.63±0.58	36.37±0.42
	PLT	($10^3/\text{mm}^3$)	952.8±122.9	974.5±160.1	944.9±254.8	1010.7±175.9	874.1±207.4
	Lymphocyte	(%)	65.72±5.44	63.74±8.76	67.91±5.22	64.78±5.17	68.40±3.89
	Lymphocyte	($10^3/\text{mm}^3$)	9.76±5.44	12.45±3.17	10.71±2.65	8.80±1.49	9.15±2.58
Female	WBC	($10^3/\text{mm}^3$)	15.88±14.28	13.46±4.62	12.30±4.90	13.80±6.04	13.19±6.29
	RBC	($10^3/\text{mm}^3$)	7.30±1.51	7.67±1.10	7.98±2.25	7.98±2.28	7.88±2.33
	Hgb	(g/dl)	15.21±2.79	15.84±2.15	16.26±4.55	16.84±4.78	17.08±4.56
	Hct	(%)	41.34±8.65	43.42±5.96	44.92±12.71	45.71±13.62	45.94±13.00
	MCV	(fl)	56.28±5.78	56.65±1.69	56.30±1.40	56.24±1.36	57.90±4.14
	MCH	(pg)	22.21±0.19	20.67±0.76	20.40±1.71	21.06±1.34	22.54±1.67
	MCHC	(g/dl)	39.80±5.35	36.83±0.69	36.31±2.29	37.25±2.67	38.82±3.71
	PLT	($10^3/\text{mm}^3$)	614.2±81.7	783.5±152.8	539.4±303.1	685.7±395.6	716.2±418.7
	Lymphocyte	(%)	75.20±4.11	73.15±4.94	69.32±10.92	67.41±7.76	63.75±7.09
	Lymphocyte	($10^3/\text{mm}^3$)	11.76±2.95	9.84±3.48	8.32±3.04	9.21±3.90	8.09±3.54

CON(-): Not treated. CON(+): Treated with 2% CMC solution. Each value represents mean±S.D.

속하였다. 또한 RBC치는 수컷의 중간용량군과 저용량군에서 음성대조군에 비해 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 수컷의 고용량군 및 중간용량군에서 Hgb 감소 및 Hct치의 저하가 인정되었으나 이들의 변화는 어느것이나 극히 경도이었으며 시험물질에 의한 영향이라고 인정되지는 않았고, 모두 정상 범위에 속하였다. 반면에 암컷의 Hgb, Hct, MCV 등은 모두 대조군과 시험물질 투여군간에 유의성 있는 변화는 없었다(Table III).

혈액생화학적 검사

시험물질 투여에 의한 혈액생화학적 소견은 Table IV와 같다. 수컷의 중간용량군 및 고용량투여군에서 음성대조군에 비해 AST 및 ALT의 증가가 있었으나, 이는 정상적인 표준 수치내의 범위에 근접하기 때문에 시험물질에 의한 영향이라고 간주되지는 않았다. ALP는 수컷의 모든 투여

군에서 대조군에 비해 용량의존적으로 점차 증가하였으며, 암컷에서는 중간용량군에서만 약간 증가를 나타내었다. 또한 LDH는 수컷의 중간용량군 및 암컷의 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. Cholesterol은 수컷의 저용량군에서 대조군에 비해 약간 증가하였으며, BUN은 수컷의 고용량군에서 TG는 수컷의 고용량군 및 암컷의 중간용량과 고용량군에서 각각 약간 증가하였으나 이들의 변화는 모두 정상적인 지표내에 속하여 약물에 의한 영향이라고는 인정되지 않았다.

총 bilirubin은 수컷의 중간용량군에서 약간 증가하였으며 기타 Na, K, Cl 등 기타의 모든 항목들은 대조군과 거의 유사한 경향을 나타내었으며 또한 용량에 비의존적이고, 정상적 표준범위내의 값과 유사하여 시험물질의 독성에 의한 변화로는 인정되지 않았다.

Table IV. Biochemical serum values of Sprague-Dawley rats orally administered with DWP-311 for 30 days

Dosage (g/kg B.W.)	Item	Unit	CON(-)	CON(+)	0.04	0.2	1.0
Male	Total protein	g/dL	6.5±0.3	6.8±0.2	6.7±0.3	7.1±0.3	6.8±0.4
	Albumin	g/dL	3.2±0.1	3.1±0.1	3.2±0.1	3.1±0.2	3.3±0.1
	AST	IU/L	82.3±7.7	83.4±28.1	87.4±13.5	99.6±18.2	92.2±25.4
	ALT	IU/L	39.5±4.7	43.1±8.8	38.9±5.2	43.3±5.0	44.2±5.3
	LDH	IU/L	295.6±137.6	316.9±121.6	348.8±204.6	470.3±171.4	394.1±154.6
	ALP	IU/L	160.4±30.8	168.7±31.0	170.4±44.7	204.6±57.2	209.1±48.2
	Glucose	mg/dL	194.6±23.6	168.5±18.7	185.6±16.3	184.3±33.5	178.8±17.9
	Cholesterol	mg/dL	47.2±6.6	41.9±5.4	58.2±9.1	50.3±8.2	45.1±8.5
	Bilirubin	mg/dL	0.53±0.07	0.46±0.09	0.47±0.08	0.66±0.18	0.52±0.09
	BUN	mg/dL	13.3±3.9	13.6±1.5	13.9±1.3.1	13.6±1.5	14.2±1.7
	Creatine	mg/dL	0.30±0.04	0.33±0.08	0.24±0.05	0.23±0.05	0.29±0.03
	Triglyceride	mg/dL	80.2±24.1	77.8±12.4	71.1±28.4.1	73.7±38.2	95.8±46.1
	K	nmol/L	3.4±1.0	4.2±0.3	4.4±0.2	4.5±0.4	4.6±0.3
	Na	nmol/L	140.6±1.2	140.4±1.2	140.4±1.5	140.3±0.9	140.7±2.9
	Cl	nmol/L	104.1±3.2	107.5±2.8	105.2±1.2	106.4±2.2	105.4±2.5
	Female	Total protein	g/dL	7.5±0.3	7.1±0.3	7.0±0.2	7.3±0.3
Albumin		g/dL	3.6±0.2	3.4±0.1	3.5±0.1	3.7±0.2	3.6±0.2
AST		IU/L	92.9±10.2	86.7±15.3	100.5±12.6	85.8±8.0	93.8±14.7
ALT		IU/L	45.9±10.2	39.7±7.3	42.4±5.5	36.7±3.2	46.4±9.9
LDH		IU/L	277.6±143.2	173.7±38.2	349.8±157.4	361.2±160.2	367.4±163.1
ALP		IU/L	193.8±90.6	127.2±46.3	180.5±63.1	128.3±26.3	244.2±17.3
Glucose		mg/dL	187.3±12.2	180.6±14.7	186.2±18.8	131.1±17.6	177.8±22.2
Cholesterol		mg/dL	45.4±3.7	44.5±4.5	44.2±6.0	47.1±9.2	47.6±7.1
Bilirubin		mg/dL	0.51±0.07	0.47±0.09	0.47±0.09	0.54±0.05	0.46±0.07
BUN		mg/dL	18.9±2.0	16.9±1.3	16.7±3.6	17.6±1.4	17.9±2.1
Creatine		mg/dL	0.37±0.13	0.34±0.05	0.33±0.05	0.33±0.05	0.34±0.05
Triglyceride		mg/dL	73.4±30.8	61.3±42.7	76.3±43.8	97.6±18.0	81.2±26.4
K		mg/dL	4.54±0.35	4.03±0.24	3.87±0.57	4.19±0.27	3.97±0.30
Na		nmol/L	151.9±3.4	139.8±1.5	138.7±1.5	137.5±1.4	138.8±3.4
Cl		nmol/L	105.6±2.8	103.9±1.7	105.6±2.1	105.3±2.8	102.9±9.9

CON(-): Not treated. CON(+): Treated with 2% CMC solution. Each value represents mean ± S.D.

Table V. Urinalysis of Sprague-Dawley rats orally administered with DWP-311 for 30 days

Sex	Dosage (g/kg B.W.)	Male					Female				
		CON(-)	CON(+)	0.04	0.2	1.0	CON(-)	CON(+)	0.04	0.2	1.0
	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Gravity	1.010	2	3	3	4	4	3	3	3	1	3
	1.015	3	2	2	1	1	1	2	2	4	1
	1.020	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	1.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	6.0	4	0	0	1	0	0	0	1	1	0
	6.5	1	4	4	4	4	4	4	3	3	4
	7.0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protein	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	25 mg/dl	4	4	4	5	0	4	4	3	0	2
	50	1	1	1	0	3	1	1	2	4	3
	75	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Glucose	normal	5	4	4	4	5	5	4	5	5	5
	50 mg/dl	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
	100 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	-	4	1	1	5	4	4	1	4	5	4
	5 mg/dl	0	4	4	0	1	1	4	1	0	1
	10 mg/dl	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen	normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Occult Blood	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CON(-): Not treated. CON(+): Treated with 2% CMC solution.

Table VI. Histopathological findings of Sprague-Dawley rats orally administered with DWP-311 for 30 days

Dosage (g/kg B.W.)	Organs	Incidence					Dosage (g/kg B.W.)	Organs	Incidence				
		CON(-)	CON(+)	0.04	0.2	1.0			CON(-)	CON(+)	0.04	0.2	1.0
Male	Adrenal gland R.	0	0	0	0	0	Female	Adrenal gland R.	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	0		L	0	0	0	0	0
	Kidney R.	0	0	0	0	0		Kidney R.	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	0		L	0	0	0	0	0
	Heart	0	0	0	0	0		Heart	0	0	0	0	0
	Liver	0	0	0	0	0		Liver	0	0	0	0	0
	Lung hemorrhage	0	0	0	0	0		Lung hemorrhage	0	0	0	0	0
	Spleen	0	0	0	0	0		Spleen	0	0	0	0	0
	Testis R.	0	0	0	0	0		Testis R.	0	0	0	0	0
	L.	0	0	0	0	0		L.	0	0	0	0	0
	Stomach	0	0	0	0	0		Stomach	0	0	0	0	0
	Pancreas	0	0	0	0	0		Pancreas	0	0	0	0	0
	Thymus	0	0	0	0	0		Thymus	0	0	0	0	0

CON(-): Not treated. CON(+): Treated with 2% CMC solution.

노검사

암수 모두 대조군과 시험물질 투여군간에 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Table V). 모든 시험물질 투여군과 대조군에서 뇨의 색도는 정상이었으며, pH는 5.5~7.4의 범위에 속하였다. 또한 glucose는 암컷의 중간용량군에서 2예가 50 mg/dl 이상이고 기타 다른 시험군에서는 모두 정상범위에 속하였다. 뇨중 protein함량은 암컷의 저용량군 1예에서 100 mg/L이었으며, 기타는 50~75 mg/L로서 정상적인 수치로 나타났다.

육안적 부검소견

시험물질투여에 의한 육안적 해부 소견은 Table VI과 같다. 위 내용물의 저류에 따른 소화관의 확장은 모든 시험동물에서 나타나지 않았다. 폐장의 부분적 출혈반점이 수컷 및 암컷의 용매대조군에서 각각 1예, 암컷 고용량군에서 각각 1예가 관찰되었다. 폐장의 부분적 출혈반점은 환경에

기인한 원인이라고 사료되며 무시될 수 있는 소견으로 인정되었다.

장기중량의 변화

장기중량변화에서는 수컷의 고용량군에서 간장의 중량이 유의성있게 감소하였을 뿐 모든 투여군에서 시험물질 투여에 의한 변화는 인정되지 않았다(Table VII).

병리조직학적 소견

용매대조군에서 폐의 부분적 출혈반점이 암·수 각각 1예에서 나타났으며, 약물투여군에서는 병리소견에 아무런 이상이 없었다. 또한 시험물질 투여군에서도 간소엽의 구조가 정상이었으며 문맥의 섬유화도 관찰되지 않았다. 또한 문맥주위 손상도 관찰되지 않아 이 약물에 의한 만성독성이나, 괴사성 염증 그리고 진행성 손상을 없다고 사료된다(Table VIII). 기타 모든 장기에서도 시험물질투여에 의한 변화라고 인정되는 병리조직소견은 없었다.

Table VII. Organ weight of Sprague-Dawley rats orally administered with DWP-311 for 30 days

Dosage (g/kg B.W.)	Organs	Unit:g					
		CON(-)	CON(+)	0.04	0.2	1.0	
Male	Adernal gland	R.	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
		L.	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
	Kidney	R.	1.13±0.34	1.09±0.15	1.20±0.18	1.12±0.06	1.06±0.06
		L.	1.24±0.11	1.08±0.13	1.20±0.18	1.23±0.08	1.06±0.05
	Heart	1.09±0.09	0.99±0.13	1.09±0.17	1.06±0.10	1.04±0.05	
	Liver	13.30±1.04	10.50±2.65	13.80±2.43	12.80±0.98	8.45±0.67*	
	Lung	1.49±0.12	1.59±0.29	1.40±0.19	1.46±0.12	1.80±0.24	
	Spleen	0.91±0.12	0.87±0.22	0.90±0.22	1.01±0.36	0.96±0.47	
	Testis	R.	1.60±0.07	1.56±0.09	1.50±0.17	1.47±0.18	1.66±0.08
		L.	1.60±0.07	1.55±0.15	1.50±0.14	1.46±0.16	1.65±0.12
	Stomach	1.80±0.26	1.60±0.29	1.80±0.21	1.67±0.12	1.70±0.53	
	Pancreas	0.65±0.15	0.66±0.12	0.71±0.21	0.70±0.14	0.73±0.16	
	Thymus	0.25±0.02	0.25±0.03	0.21±0.02	0.24±0.03	0.20±0.03	
	Brain	2.04±0.04	2.07±0.06	2.11±0.15	2.18±0.16	2.11±0.21	
	Female	Adernal gland	R.	0.02±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
L.			0.02±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
Kidney		R.	0.80±0.06	0.82±0.08	0.82±0.13	0.89±0.34	0.81±0.06
		L.	0.80±0.06	0.80±0.08	0.88±0.07	0.88±0.25	0.82±0.06
Heart		0.80±0.06	0.74±0.06	0.81±0.07	0.81±0.11	0.77±0.07	
Liver		9.66±0.12	9.04±0.83	10.11±0.79	9.70±1.23	10.00±0.45	
Lung		0.98±0.27	1.06±0.09	1.15±0.13	1.07±0.10	1.04±0.09	
Spleen		0.70±0.08	0.64±0.10	0.70±0.13	0.74±0.15	0.55±0.07	
Ovary		R.	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01
		L.	0.05±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01
Stomach		1.25±0.11	1.30±0.15	1.20±0.08	1.11±0.08	1.23±0.12	
Pancreas		0.58±0.32	0.55±0.12	0.54±0.10	0.52±0.09	0.53±0.07	
Thymus		0.25±0.03	0.25±0.02	0.20±0.01	0.22±0.03	0.24±0.06	
Brain		2.03±0.03	2.04±0.04	2.04±0.05	1.91±0.06	1.91±0.06	

CON(-): Not treated. CON(+): Treated with 2% CMC solution. Each value represents mean±S.D.
Statistically different from control (*P <0.05)

Table VIII. Incidence of neoplastic microscopic findings in Sprague-Dawley rats orally administered with DWP-311 for 30 days

Sex Dosage (g/kg B.W.) No. of animals	Male				Female			
	CON(-)	CON(+)	0.2	1.0	CON(-)	CON(+)	0.2	1.0
	10	10	10	10	10	10	10	10
Kidney								
Chronic nephritis	0	0	0	0	0	0	0	0
Pyelonephritis	0	0	0	0	0	0	0	0
Calcification in renal tubuli	0	1	0	0	0	1	0	0
Pyelitis	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver								
Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung								
Pneumonia	0	1	0	0	0	2	0	0
Spleen								
Testis	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach	0	0	0	0	0	0	0	0
Pancreas	0	0	0	0	0	0	0	0
Thymus								
Agonal hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphocytic necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0

CON(-): Not treated. CON(+): Treated with 2% CMC solution.

고 찰

시험물질 DWP-311은 치주질환에 대한 치료를 목적으로 개발된 대추와 후박으로부터 각각 분리하여 혼합한 성분이다. 아직까지 신 복합제제에 대한 독성시험은 일반화되어 있지 않으나 앞으로는 여러 복합제제화된 신물질의 개발이 활발하게 진행되리라 보며 그에 따라 이들 복합제제의 독성시험이 매우 중요하다고 생각된다. 본 시험에서는 치주질환 치료제로 개발된 시험물질인 DWP-311의 랫드에 대한 1개월 아급성경구독성을 보기 위해 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호의약품등의 독성시험기준(National Institute of Safety Research, 1994)에 준하여 시험한 결과 시험물질에 기인한 일반증상 및 혈액학적, 혈액생화학적 이상소견은 없었으며 기타항목에서도 약물에 의한 이상소견은 없는 것으로 인정되었다. 다만 시험물질 및 용매대조군에서 약간의 연변이 관찰되었으나 이것은 고농도의 CMC투여에 의한 것으로 볼 수 있다(Nakano 등, 1992; Nakashima 등, 1994). 혈액학적 소견에서 RBC치는 수컷의 고용량군과 음성대조군에서 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 수컷의 고용량군에서 Hgb량 증가 및 Hct치의 저하가 인정되었으나 이들 변화는 모두 대조군에 비해 유의성있는 차이를 나타내지 않았으므로 시험물질에 의한 영향이라고 인정되지는 않았으며, 또한 모두 정상 범위에 속하였다. 이와 같이 혈액학적 소견에서도 약물에 기인한다고 생각되는 이상소

견은 보이지 않았다. 또한 혈액생화학적 소견에서는 수컷의 중간용량군 및 고용량투여군에서 음성대조군에 비해 AST 및 ALT의 증가가 있었으나, 이는 정상적인 표준 수치 내의 범위에 근접하기 때문에 시험물질에 의한 영향이라고는 간주되지는 않았다. ALP는 수컷의 모든 투여군과 양성대조군에서 음성대조군에 비해 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다. LDH, cholesterol, BUN 및 TG의 변화는 모두 정상적인 지표내에 속하여 약물에 의한 직접적인 영향이라고는 인정되는 소견은 보이지 않았다. 시험종료후 실시한 육안적 부검소견에서는 위 내용물의 저류에 따른 소화관의 확장 등은 모든 시험동물에서 나타나지 않았다. 폐장의 부분적 출혈반점을 수반하는 동물이 용매대조군과 음성대조군에서 각각 1~2예 관찰되었다. 이것은 환경에 기인한 원인이라고 사료되며 무시될 수 있는 소견으로 인정되었다(Aburada 등, 1983; Cho 등, 1993a; Cho 등, 1993b; Kwack 등, 1996).

이상과 같이 DWP-311의 랫드에 대한 아급성경구독성시험에서 상기의 일반증상, 체중변화 및 부검소견 등에 별다른 독성이 관찰되지 않았으며 임상검사항목 등에서도 경도한 영향이 있었지만 병리조직학적검사 등에서 명확한 장기독성을 나타내는 소견은 없었고, 시험물질을 투여한 모든 군에서도 독성학적으로 중요한 변화라고 사료되는 소견은 없었다. 따라서 본 시험조건에서의 무해용량은 1.0 g/kg이상으로 인정되었다.

참고문헌

- Aburada, M., Ichio, Y., Sakai, H., Hosoya, E., Inoue, H., Kojima, K. and Enomoto, M. (1983). Subacute Toxicity Test of "SENPUKUKATAISHASEKI-TO" (TK-601) in rats. *應用藥理*, **26**, 151-166.
- Cho, D. H., Hwang, S. J., Lee, W. Y., Lee, J. Y., Yoon, H. J. and Moon, B. W. (1993a). Acute subcutaneous toxicity study of banaron cream in rats. *J. Appl. Pharmacol.* **2**, 280-283.
- Cho, D. H., Hwang, S. J., Lee, W. Y., Lee, J. Y., Yoon, H. J. and Moon, B. W. (1993b). Acute oral toxicity studies of WHS-1 and WHS-2 in rats. *J. Appl. Pharmacol.* **2**, 275-279.
- Kim, H. S., Lee, S. K., Kim, K. B., Kwack, S. J., Ahn, M. Y., Choi, B. C. and Lee, B. M. (1996). Acute oral toxicity of KDRD-002 in rats. *J. Appl. Pharmacol.* **4**, 310-313.
- Kwack, S. J., Kim, H. S., Chun, S. A., Lim, S. Y., Park, H. S., Han, H. S., Hong, C. Y., Ahn, M. Y. and Lee, B. M. (1998). Acute subcutaneous Toxicity of DWP-311 in Rats. *Kor. J. Toxicol.* (In press).
- Kwack, S. J., Kim, H. S., Lim, S. Y., Chun, S. A., Park, H. S., Hong, C. Y., Han, H. S., Choi, B. C. and Lee, B. M. (1996). Subacute oral toxicity of KDRD-010 in rats. *J. Appl. Pharmacol.* **4**, 314-322.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**, 275.
- Nakano, S., Hayashi, T., Irimura, K., Maruden, A., Nakagawa, K. and Morita, K.-I. (1992). A thirteen-week oral repeated dose toxicity study of suplastat tosilate (IPD-1151T) in rats. *J. Toxicol. Sci. Jpn.* **17**, 11-38.
- Nakashima, H., Omae, K., Sakai, T., Yamazaki, K. and Sakurai, H. (1994). Acute and subchronic inhalation toxicity of tetraethoxysilane (TEOS) in mice. *Arch. Toxicol.* **68**, 277.
- National Institute of Safety Research (1994). Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use, No. 94-3 Korea.