

## 랫드에 대한 DWP-311의 급성피하독성시험

곽승준 · 김형식 · 천선아 · 임소영 · 박현선 · 한하수 · 홍채영 · 안미영 · 이병무\*  
성균관대학교 약학대학 독성학교실

### Acute Subcutaneous Toxicity of DWP-311 in Rats

Seung Jun Kwack, Hyung Sik Kim, Sun Ah Chun, So Young Lim, Hyun Sun Park,  
Ha Su Han, Chae Young Hong, Mi Young Ahn and Byung Mu Lee\*

Division of Toxicology, School of Pharmacy, SungKyunKwan University,  
Kyunggi-Do, Suwon 440-746, Korea  
(Received May 23, 1998)  
(Accepted July 27, 1998)

**ABSTRACT** : The acute toxicity of DWP-311 was investigated in Sprague-Dawley rats. DWP-311 was subcutaneously administrated at dose levels of 595, 1,070, 1,930, 3,470, and 6,250 mg/kg. In this study, we daily examined numbers of deaths, clinical signs, body weights, and pathological examinations for 7 days after administration of DWP-311. The results indicate that DWP-311 did not show any toxic effect in rats and the oral LD<sub>50</sub> value was over 6,250 mg/kg in Sprague-Dawley rats.

**Key Words** : Acute toxicity, DWP-311, LD<sub>50</sub> value, Pathological examinations

#### I. 서 론

본 시험은 보건복지부 신약개발의 일환으로서 치주 질환 치료제로 개발된 대추와 후박으로부터 분리, 정제한 DWP-311에 대하여 그 안전성을 시험하기 위한 목적으로 7일간 급성피하독성을 평가하기 위하여 실시하였다. 물질특허 도입에 따라 새로운 신물질의 개발은 제약업계 뿐만 아니라 국가적으로도 매우 시급하고 중요한 과제이다. 또한 신약의 개발에는 많은 노력과 비용과 시간이 소요되며 축적된 기술 등이 요구된다고 할 수 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 이에 대한 많은 연구가 있으리라고 기대된다. 현재 신물질의 단일성분에 대한 독성시험 등은 국내·외에서 많은 연구가 이루어져 있다. 그러나 복합제제는 개개 성분의 약리작용과 독성작용이 다르기 때문에 이들 복합제제에 대한 안전성을 평가한다는 것은 우리나라의 신약개발차원에서 앞으로 매우 중요한 의미를 갖는다고 하겠다.

#### II. 실험재료 및 방법

##### 1. 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.

##### 2. 시험계 및 사육환경

시험구역은 성균관대학교 약학대학내 청정실험동물실에서 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF(특정 병원체 부재) SD계 랫드를 명진무역주식회사로부터 분양 받아 온도 23±1°C, 습도 55±5%, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 랫드용 폴리카보네이트 사육상자(220 W×270 L×125 H mm) 케이지에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1주일의 순화사육기간 동안에 일반증상 관찰을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 제일상사의 실험동물사료를 구입하여 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음수는 멸균수도물을 자유롭게 섭취시켰다.

\*To whom correspondence should be addressed.

### 3. 구분리 및 투여용량의 설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 구분리를 실시하였다. 동물의 개체식별은 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 투여용량의 설정은 예비시험 결과를 토대로 하여 정하였다. 그 결과 본체제의 투여가능 최대용량은 6,250 mg/kg이며 이것을 최고용량군으로 설정하고, 595 mg/kg을 최저용량군으로 하여 일정 공비로 5개 용량군과 대조군을 설정하였다. 시험물질 투여 직전 시험동물의 체중범위는 수컷은 180~190 g, 암컷은 160~170 g이었고, 주령은 약 8주령이었다.

### 4. 시험물질 조제 및 투여

시험물질인 DWP-311은 0.5% CMC에 균일하게 현탁되도록 시험당일 용시조제하였다. 시험물질은 1회용 주사기를 이용하여 10 ml/kg으로 1회 피하투여하였다. 투여량은 투여직전 체중의 변화에 따라 산출하였다 (Lorke, 1983; Bruce, 1985).

### 5. 관찰항목

#### 1) 임상증상관찰 및 사망동물수

모든 시험동물에 대한 임상증상관찰 및 사망동물수는 약물투여직후부터 6시간 동안은 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 익일부터 7일까지는 1일 1회로 동물의 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망 유, 무를 관찰하였다(Kim 등, 1996; Zbinden and Flury-Roversi, 1981).

#### 2) 체중측정

시험에 사용된 모든 시험동물에 대하여 시험물질 투여직전, 투여후 1일, 3일, 7일에 체중을 측정하였다.

#### 3) 부검

시험종료 후 동물의 체중을 측정한 후 ether로 마취하고 설하동맥 및 복부대동맥을 절단하여 치사시킨 다음 외관 및 내부장기의 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다. 또한 의심스러운 이상소견이 관찰된 모든 조직은 현미경적 소견을 관찰하기 위하여 10% 포르말린 용액에 고정시켰다(Kwack 등, 1996).

### 6. 자료의 통계학적 해석

통계학적 처리는 Student's-t 검정을 행하였으며, P<0.05, P<0.01의 수준으로 대조군과 시험물질투여군을 비교하였다.

## III. 결 과

### 1. 사망동물에 및 임상증상

약 8주령의 Sprague-Dawley계 랫드에 시험물질을 투여한 결과 시험종료일까지 모든 시험동물에서 사망에는 없었으며 외관상의 이상소견도 나타나지 않았다 (Table 1). 또한 시험물질 투여후 대조군에 비해 특이적으로 외견상의 일반증상의 변화도 없었다. 다만 최고용량군에서 1~2예가 약간의 탈모증상을 나타내었다 (Table 2).

### 2. 체중측정결과

Table 1. Mortality of Sprague-Dawley rats subcutaneously treated with DWP-311

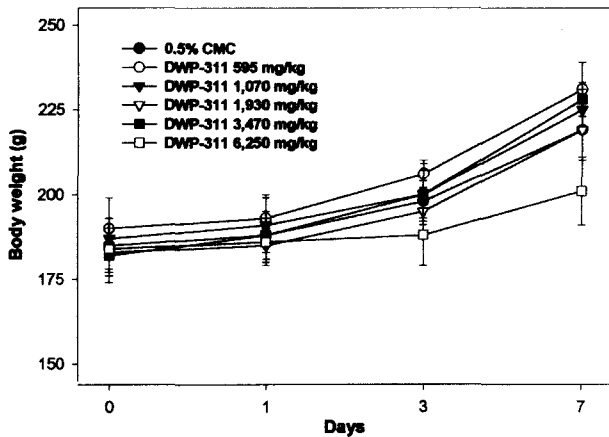
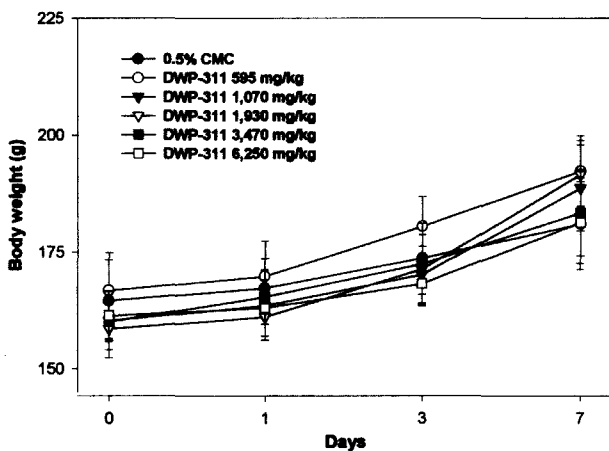
Sex	Dosage (mg/kg)	Hours						Days						Mortality
		Start	1	6	12	18	24	2	3	4	5	6		
Male	Control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	6,250	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	3,470	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1,930	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
	1,070	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
	595	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	Control	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
	6,250	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
	3,470	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
	1,930	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
	1,070	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
	595	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

Control: Treated with 0.5% CMC.

**Table 2.** Clinical signs of Sprague-Dawley rats subcutaneously treated with DWP-311

Sex	Dosage (mg/kg)	Animal numbers with clinical sign											
		Hours					Days						
		2	4	8	16	24	2	3	4	5	6	7	
Male	Control	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6,250	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3,470	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,930	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,070	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	595	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	Control	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6,250	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3,470	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,930	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,070	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	595	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Control: Treated with 0.5% CMC, ND: No. clinical signs.

**Fig. 1.** Body weight changes of Sprague-Dawley male rats subcutaneously treated with DWP-311.**Fig. 2.** Body weight changes of Sprague-Dawley female rats subcutaneously treated with DWP-311.

체중측정 결과 시험물질 투여한 후 7일 동안 관찰하였을 때 암, 수 모두 대조군에 비해 유의성 있는 차이

를 보인 체중변화는 인정되지 않았으며 시험물질 투여군간에도 체중의 변화에 유의한 차이는 없었다 (Fig. 1, 2).

### 3. 육안적 해부소견

DWP-311를 투여한 수컷과 암컷의 고용량군 1예에서 폐의 부분적 출혈과 울혈이 있었으며 간의 퇴색이 관찰되었다. 그러나 이러한 현상은 다른 투여군에서는 나타나지 않았으며 약물의 농도에 비존적으로 나타난 현상으로 시험물질에 기인한 원인으로서는 판정되지 않았다 (Table 3).

## IV. 고 찰

시험물질 DWP-311를 Sprague-Dawley계 랫드에게 6,250 mg/kg을 최고용량으로 한 후 일정공비로 5개 용량군을 설정하여 1회 피하투여한 후 그 안전성을 평가하였다 (National Institute of Safety Research, 1994; Obara, 1992). 시험물질의 최대투여가능용량인 6,250 mg/kg에서 암, 수 모두 사망에는 없었으며 그 이하의 투여용량군에서도 사망에는 없었다. 시험물질 투여 후 나타내는 외관상의 이상증상도 보이지 않았다. 체중의 변화에서는 시험물질투여군과 대조군간의 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다. 육안적 해부소견으로는 암컷의 고용량군 1예에서 간의 퇴색이 관찰되었다. 이것은 약물에 의한 영향으로 평가되지 않았다. 또한 암컷의 고용량군에서 폐의 부분적 출혈 반점이 있었으나 이들은 모두 시험물질에 기인한 원인이 아니라 동물실험에서 일반적으로 관찰될 수 있는 환경에 기인한 원

**Table 3.** Incidence of microscopic findings in Sprague-Dawley rats orally treated with DWP-311

Dosage (mg/kg)	Sex	Male					Female						
		Control	6,250	3,470	1,930	1,070	595	Control	6,250	3,470	1,930	1,070	595
<b>Kidney</b>													
	Chronic nephritis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Calcification in renal tubuli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Liver</b>													
	Vasculitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>b</sup>	0
	Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Lung</b>													
	Pneumonia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	Foamy cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Spleen</b>													
	Hemosiderosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Testis</b>													
	Testis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Stomach</b>													
	Stomach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Pancreas</b>													
	Pancreas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Thymus</b>													
	Agonal hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lymphocytic necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Control: Treated with 0.5% CMC, <sup>b</sup>No. of animals.

인으로 무시할 수 있는 소견으로 사료된다(Yamashita 등, 1992; Cho 등, 1993a; Cho 등, 1993b). 이상과 같이 DWP-311의 랫드에 대한 급성피하독성시험에서 상기의 일반상태, 체중변화 및 부검소견 등에는 별다른 독성이 관찰되지 않았으며 최대투여가능용량인 6,250 mg/kg에서도 사망예가 없었다. 따라서 DWP-311의 랫드에 대한 경구 LD<sub>50</sub>치는 최대투여가능용량인 6,250 mg/kg 이상으로 평가되었다.

### 참고문헌

- Bruce, R.D. (1985): An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fund. Appl. Toxicol.*, **5**, 151-157.
- 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., Kwack, S.J., Chun, S.A., Lim, S.Y., Park, H.S., Hong, C.Y., Kim, W.B., Ahn, B.O. and Lee, B.M. (1996): Subacute intravenous study of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) in rats. *Korean J. Toxicol.*, **12**, 309-318.
- Kwack, S.J., Kim, H.S., Chun, S.A., Lim, S.Y., Park, H.S., Hong, C.Y., Choi, B.C. and Lee, B.M. (1996): Acute oral toxicity of KDRD-010 in rats. *Korean J. Toxicol.*, **12**, 319-322.
- Lorke, D. (1983): A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.*, **54**, 275.
- National Institute of Safety Research (1994): Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use, No. 94-3 Korea.
- Obara, S. (1992): Studies on single-dose toxicity of hydrophobically modified hydropropyl methylcellulose in rats. *J. Toxicol. Sci. Jpn.*, **17**, 13.
- Yamashita, K., Nakano, S., Kuwata, M., Yada, H., Irimura, K., Morinaga, H. and Morita, K. (1992): Single dose toxicity studies of suplastast tosilate (IPD-1151T). *J. Toxicol. Sci. Jpn.*, **17**, 1-9.
- Zbinden, G. and Flury-Roversi, M. (1981): Significance of the LD<sub>50</sub> test for toxicological evaluation of chemical substance. *Arch. Toxicol.*, **47**, 77-99.