

랫드에서 Alginase의 급성 및 4주간 정맥 내 반복투여 독성시험에 관한 연구

임종희 · 남정석 · 제정환 · 이광훈 · 이학모 · 이원우 · 이병희 · 정지윤 · 박재학** · 이영순*
서울대학교 수의과대학 공중보건학실, **실험동물의학교실

A Study for Acute and Four-week Intravenous Toxicity of Alginase in Rats

Jong-Hee Ihm, Jeong-Seok Nam, Jeong-Hwan Che, Guang-Xun Li, Hak-Mo Lee, Won-Woo Lee, Beung-Hi Yi, Ji-Youn Jung, Jae-Hak Park** and Yong-Soon Lee*

Department of Public Health and **Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received July 14, 1998)

(Accepted September 1, 1998)

ABSTRACT : Alginase® (Arginine esterase) is one of the snake venoms which is mainly consisted of arginine esterase and acts as a thrombus-forming inhibitor/thrombus-lysin. These present studies were performed to investigate the acute and subacute toxicity of the Alginase® in rats. In acute toxicity study, rats were single administered intravenously with dosages of 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 U/kg B.W. and examined the number of death, clinical sign, body weight and pathological change for 7 days after administration of Alginase®. At maximum dose level (10 U/kg B.W.), Alginase® induced symptoms of shock with cyanosis and dyspnea. But these symptoms disappeared after 30~50 minutes and we could not find any other toxic effect in rats. Therefore, LD₅₀ Value of Alginase was over 10 U/kg B.W. in rats. In four-week intravenous toxicity study of Alginase®, rats were administered intravenously seven days per week for 28 days, with dosages of 0, 0.0125, 0.125 and 1.25 U/kg B.W./day, respectively. Alginase® did not caused any death and showed any clinical signs in rats. No significant Alginase®-related changes were found in feed uptake, water consumption, hematology, serum biochemistry, urinalysis, ocular examination, organ weight and histopathological examination. From the results, Alginase® seems not to have any toxic effect in rats when it were given daily intravenous injections below the dosage 1.25 U/kg B.W./day for four weeks.

Key Words : Alginase®, Acute Toxicity, Four-Week Intravenous Toxicity

I. 서 론

뱀의 유독(venomous or poisonous)분비물은 혈액독소, 혈구응집소, 신경독소, 백혈구독소 또는 내피독소 등을 함유하고 있으며 그 구성성분은 주로 polypeptide와 enzymes 등을 포함한 단백질로 구성되어 있다(Zeller, 1948). 이 중 arginine esterase를 주요 성분으로 하는 Alginase®는 noncholinesterase중 하나로 혈중 fibrinogen을 저하시켜 fibrin의 생성을 억제하고 plasminogen activation factor를 증가시켜 혈전 형성 방지와 혈전 용해 작용을 나타낸다고 보고되어 있다(Lee, 1979). 따라서, 본 시험에서는 Alginase®의 안전성평가의 일환으로

랫드에서의 급성 및 4주간 정맥 내 반복투여 독성시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

뱀독(Venom of Agkistrodon halys pallas)으로부터 Arginine esterase 활성을 나타내는 분획을 정제한 후 주사제 제조법에 따라 멸균, 동결건조된 상태로 새한 제약(주)으로부터 제공받은 시험물질을 주사용 멸균 생리식염수((주) 중외제약)에 희석하여 사용하였다.

2. 실험동물

*To whom correspondence should be addressed.

실험동물로는 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 서울대학교 실험동물 사육장에서 구입하여 약 1주간 순화시킨 후 그 기간중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물을 급성독성시험의 경우에는 암수 각각 25마리씩을, 4주간 정맥 내 반복투여 독성시험에서는 암·수 각각 랫드 40마리씩을 실험에 사용하였다. 실험기간중 사육실 환경조건은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$ 로 하였으며, 조명시간은 오전 7시부터 오후 7시까지, 조도는 150~200 Lux로 하였다. 랫드는 랫드용 polycarbonate 상자($26 \times 42 \times 18$ cm, 명진기계제작)에 수용하여 사료와 음수를 자유급여하였다.

3. 시험군의 구성·투여농도 및 용량

급성독성시험에서는 암·수 각 군당 5마리씩 5단계 군을 설정하였으며 각각 0.001 U/kg, 0.01 U/kg, 0.1 U/kg, 1 U/kg 및 10 U/kg B.W.의 용량단계를 나누어 꼬리정맥으로 일회 투여하였고, 그 결과와 임상예정용량(0.0125 U/kg)을 기준으로 4주간 정맥 내 반복투여 독성시험에서는 0.0125 U/kg/day, 0.125 U/kg/day 및 1.25 U/kg/day로 3개 투여용량군을 설정하였으며 매체물질로 주사용 생리식염수((주)중외제약)를 투여하는 음성대조군을 두었고, 임상에서의 투여경로와 동일하게 투여하기 위하여 꼬리정맥을 통해 주 7회 4주간 투여하였다.

4. 관찰항목

급성독성시험에 있어서, 임상증상은 투여 후 6시간은 매시간 관찰하였으며 그 후 7일간은 1일 1회 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다. 체중 측정은 투여 개시일, 투여 후 4일 그리고 부검시에 측정하였으며 시험 중 폐사동물은 그때마다 부검을 실시하였다. 시험종료시 생존동물은 에테르 흡입마취시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였고 육안적으로 이상이 장기와 조직은 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

4주간 정맥 내 반복투여 독성시험에 있어서는 매일 일반증상을 관찰하였고, 주 2회 체중, 음수 및 사료섭취량을 측정하였다. 모든 동물에 대하여 투여기간 중 1회 안검사 및 뇨검사를 실시하였고, 부검시 복대동맥으로 채혈하여 혈액학적 및 혈청 생화학적 검사를 실시하였다. 또한, 모든 동물에 대하여 장기중량을 측정하고 체중에 대한 상대장기 중량비를 구하였다. 모든 장기는 10% 중성 포르말린액에 고정시키고, 알코올 탈

수화과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 3~5 μm 조직절편을 만들고 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

5. 통계학적 방법

LD_{50} 은 Litchfield and Wilcoxon법을 이용하여 산출하였고, 그 외 측정치의 통계학적 분석은 SAS (Statistical Analysis System)를 이용하여 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 $p < 0.05$ 로 Dunnet's t-test를 이용하여 비교하였다. 비모수인 경우는 분산에 대하여 Kruskal-Wallis nonparametric analysis 후 유의한 경우 Wilcoxon-Mann-Whitney rank-sum test, Nemenye-Kruskal-Wallis multiple comparisons를 실시하였다. 병리조직학적으로 관찰된 병변의 발생빈도는 χ^2 (Chi-square) 검정을 하였다.

III. 결과 및 고찰

1) 임상증상

급성독성시험에서는 10 U/kg B.W.을 투여한 암·수 모두에서 사지말단을 위주로 한 청색증 및 호흡곤란의 shock 증상을 나타내었으나 30~50분이 경과한 후에는 모두 증상이 회복되었다. 그 외 다른 투여군에서는 어떠한 임상증상도 나타내지 않았다(data not shown). 1983년 Russell 등에 의하면 임상 및 비임상시험시, 투여 용량, 개체의 종류 및 연령에 따라 독성의 차이가 다양하고 대부분의 경우 어느 정도의 shock나 hypotension 증상을 나타낸다고 한다.

그러나, 4주간 정맥내 반복투여 독성시험에서는 0.0125 U/kg/day, 0.125 U/kg/day 및 1.25 U/kg/day의 투여군에서 전 기간동안 시험물질 투여 때문으로 여겨지는 임상증상을 관찰하지 못하였다(data not shown).

2) 사망률

급성 및 4주간 정맥내 반복투여 독성시험 모두에서 시험기간 중 사망 동물은 관찰되지 않았다(data not shown).

3) 체중변화(Table 1)

4주간 정맥 내 반복투여시 투여군 모두에서 유의할 만한 체중 변화를 나타내지 않았다.

4) 사료 및 음수섭취량 변화(Tables 2 and 3)

Table 1. Body weights of rats intravenously treated with alginase[®] once a day for 28 days (unit: g)

	Dose (U/kg)	(days)									
		0	3	8	11	15	18	22	25	28	
Male	0	344.6±37.8 ^a	379.8±29.6	394.2±34.4	388.0±36.2	413.7±41.2	413.3±41.6	424.8±43.8	441.8±43.8	441.0±43.9	
	0.0125	323.7±48.7	363.0±39.0	392.1±39.4	386.8±42.7	412.0±40.6	412.2±42.1	417.2±37.3	433.3±41.9	431.6±41.7	
	0.125	350.8±36.0	374.7±39.6	397.9±42.8	401.6±41.2	412.6±40.4	411.7±40.0	417.0±40.1	442.2±45.1	431.6±51.0	
	1.25	342.4±27.3	378.5±27.9	401.5±28.6	408.5±31.1	418.9±31.8	417.9±29.4	431.8±30.2	442.3±30.6	442.3±30.6	
Female	0	247.4±15.4	258.5±21.1	269.7±22.0	273.9±19.6	278.8±23.3	275.0±21.1	282.3±23.1	289.6±21.7	285.0±20.9	
	0.0125	234.4±10.0	248.5±10.7	287.5±91.7	260.7±10.1	297.8±98.2	263.8±11.8	270.3±13.4	275.8±21.8	275.8±21.8	
	0.125	243.7±24.0	256.4±22.2	263.5±24.4	268.5±25.1	270.0±25.8	267.7±25.1	270.5±25.6	272.2±21.0	272.2±21.0	
	1.25	241.8±30.0	263.5±30.4	268.7±30.7	268.9±31.7	273.1±32.2	269.4±27.6	271.9±28.1	282.0±28.9	278.9±29.2	

^a, Values were expressed mean±S.D.

Table 2. Food consumption of rats intravenously treated with alginase once a day for 28 days. (unit: g)

	Dose (U/kg)	(days)									
		0	3	8	11	15	18	22	25	28	
Male	0	25.12±2.23 ^a	27.00±2.83	31.50±4.95	31.00±7.07	29.50±7.78	28.50±2.12	28.50±2.12	24.50±2.12	32.50±3.54	
	0.0125	20.05±6.18	21.50±9.19	38.50±4.95	34.00±5.66	39.50±16.2	25.00±1.41	15.50±12.0	26.50±3.54	29.50±0.70	
	0.125	34.25±19.3	45.50±19.0	29.00±2.83	27.50±2.12	23.50±2.12	24.00±1.41	23.50±2.12	8.50±4.95*	35.00±5.66	
	1.25	28.10±11.0	17.00±4.24	29.50±2.12	28.50±7.78	26.50±0.70	22.50±3.53	35.00±16.9	25.50±16.9	26.00±7.07	
Female	0	21.45±1.90	18.50±0.70	24.00±1.41	22.00±0.00	22.50±3.54	20.50±24.7	27.50±24.7	18.00±1.41	22.50±0.70	
	0.0125	19.46±3.78	20.50±7.78	21.50±2.12	24.00±2.83	36.00±25.4	19.50±0.71	18.50±2.12	19.00±2.82	21.50±0.70	
	0.125	18.26±2.33	17.00±2.83	20.00±0.00	19.50±0.70	17.50±0.70	16.50±0.71	15.50±2.12	15.50±0.70	24.50±0.70	
	1.25	21.05±3.14	15.00±4.24	38.00±24.0	17.50±4.95	19.00±1.41	16.50±0.71	16.50±0.70	19.50±0.70	23.00±0.00	

^a, Values were expressed mean±S.D.

*, Significantly different from control group (p<0.05).

Table 3. Water consumption of rats intravenously treated with alginase once a day for 28 days(unit: ml)

	Dose (U/kg)	(days)									
		0	3	8	11	15	18	22	25	28	
Male	0	55.62±3.58 ^a	47.00±9.90	45.00±1.41	65.50±2.12	60.50±12.0	53.00±1.41	46.50±3.53	45.50±6.36	41.50±3.53	
	0.0125	52.36±2.74	58.00±2.83	54.00±1.41	71.00±1.41	58.00±15.5	56.00±9.90	51.00±18.3	50.00±5.66	38.50±3.53	
	0.125	48.55±5.34	49.00±4.24	44.50±6.36	36.50±6.36*	50.50±6.36	42.50±2.12	41.50±3.53	51.50±12.0	46.00±8.48	
	1.25	54.74±3.57	55.00±1.41	53.00±0.00	54.50±7.78	55.00±2.83	52.00±2.82	58.50±4.95	46.00±7.07	39.50±2.12	
Female	0	45.20±3.29	52.00±8.48	40.50±4.95	82.50±19.0	41.00±7.07	57.00±42.4	37.00±2.82	53.50±26.1	34.50±4.95	
	0.0125	44.81±5.59	52.50±4.95	35.50±0.70	63.00±1.41	42.50±2.12	62.50±28.9	35.50±4.95	38.50±3.53	62.00±28.2	
	0.125	45.56±4.91	48.00±2.83	45.00±1.41	60.50±4.95	47.00±15.5	44.00±8.48	35.50±7.77	41.50±2.12	39.50±3.53	
	1.25	49.41±3.24	48.00±2.83	45.00±1.41	60.50±4.95	47.00±15.5	44.00±8.48	35.50±7.77	41.50±2.12	39.50±3.53	

^a, Values were expressed mean±S.D.

*, Significantly different from control group (p<0.05).

수컷의 25일째 사료섭취량에 있어서 대조군(24.50±2.12 g)에 비하여 0.125 U/kg 투여군(8.50±4.95 g)에서 유의적인 감소를 보였으며, 수컷의 11일째 음수섭취량에 있어서 대조군(65.50±2.12 ml)에 대하여 0.125 U/kg 투여군(36.50±6.36 ml)에서 유의적인 감소를 보였다. 그러나, 산발적인 변화이고 용량의존적인 변화는 관찰되지 않았다.

5) 뇨검사 소견(Table 4)

대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 이상을 나

타내지 않았다.

6) 안검사

대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 이상을 나타내지 않았다(data not shown).

7) Prothrombin time (PT), Partial thromboplastin time (PTT) (Table 5)

대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 이상을 나타내지 않았다.

Table 4. Urinalysis of rats intravenously treated with alginase once a day for 28 days

Parameter	\Sex \Dose (U/kg/day) \No. of animal	Male				Female			
		0 5	0.0125 5	0.125 5	1.25 5	0 5	0.0125 5	0.125 5	1.25 5
Nitrite	-	5	5	5	5	5	5	5	5
Urobilinogen (Ehrlich unit/dl)	0.1	5	5	5	5	5	5	5	5
Protein (mg/dl)	-	4	4	3	2	2	4	4	3
	±	0	1	2	2	3	1	1	2
	30	1	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	0	0	0
pH	6	1	1	1	1	1	0	0	1
	6.5	1	1	0	1	2	0	0	0
	7	0	1	2	2	1	1	1	2
	7.5	0	0	1	1	1	1	3	1
	8	2	2	1	0	0	3	1	1
	8.5	1	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	5	5	5	5	5	5	5	5
Gravity	1.010	2	1	2	1	1	2	2	1
	1.015	1	0	1	0	0	1	0	0
	1.020	1	0	1	1	2	0	1	3
	1.025	0	2	1	1	0	0	0	0
	1.030	1	2	0	2	2	2	2	1
Ketone body (mg/dl)	-	4	5	5	5	5	5	5	5
	±(5)	1	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	5	5	5	5	5	5	5	5
Glucose (g/dl)	-	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 5. Prothrombin time and thromboplastin time of rats intravenously treated with alginase once a day for 28 days (unit: second)

Sex		\Dose (U/kg/day)	0	0.0125	0.125	1.25
Male	PT	Mean S.D.	15.80±2.39	16.00±1.63	16.80±3.52	15.20±2.44
	PTT	Mean S.D.	23.80±5.71	23.90±6.10	20.60±5.83	20.80±3.73
Female	PT	Mean S.D.	17.20±2.39	16.70±2.21	16.80±1.81	16.60±2.01
	PTT	Mean S.D.	24.40±3.63	25.50±4.65	24.60±4.60	22.70±2.98

PT, Prothrombin time; PTT, Partial thromboplastin time.

8) 혈액학적 및 혈청 생화학적 검사 소견(Tables 6 and 7)

혈액학적 검사에 있어서 수컷의 hematocrit치는 대조군(47.17±3.07%)에 비하여 0.0125 U/kg 투여군(39.43±13.17%)과 1.25 U/kg 투여군(44.32±1.15%)에서 유의성있게 감소하였으며 MCV치도 대조군(62.48±1.56 fL)에 비하여 0.0125 U/kg 투여군(58.83±1.66 fL)과 1.25 U/kg 투여군(60.38±0.94 fL)에서 유의성 있게 감소하였다. 그리고 MCHC치는 대조군(29.83±0.91 g/dl)에 비하여 0.0125 U/kg 투여군(31.08±0.52 g/dl)과 1.25 U/kg 투여군(30.85±0.39 g/dl)에서 유의성 있는 증가를 나타내었다. Lymphocyte의 경우 대조군(11.09±1.99×10³/μl)에 비하여 0.0125 U/kg 투여군(8.08±3.19×10³/μl)과 0.125 U/kg 투여군(7.76±2.39×10³/μl)에서 유의적 감소를 나타내었으며, platelet치는 대조군(848.00±97.15×10³/μl)에 비하여 1.25 U/kg 투여군

(984.44±95.45×10³/μl)에서 유의성있는 증가를 나타내었다. 암컷에서는 MCH치가 대조군(18.37±0.52 pg)에 비하여 1.25 U/kg 투여군(19.25±0.36 pg)에서 유의성 있는 증가를 나타내었고 MCHC치는 대조군(29.68±0.87 g/dl)에 비하여 0.0125 U/kg 투여군(30.87±0.45 g/dl), 0.125 U/kg 투여군(31.66±1.04 g/dl), 1.25 U/kg 투여군(31.02±0.57 g/dl)에서 모두 유의적 증가를 나타내었다. 또한, neutrophil은 대조군(1.24±0.37×10³/μl)에 대하여 0.0125 U/kg 투여군(1.92±0.53×10³/μl)에서 유의성 있는 증가를 나타내었다.

혈청 생화학적 검사에 있어, 수컷의 경우 ALP치는 대조군(211.55±50.17 u/l)에 비하여 1.25 U/kg 투여군(158.90±37.59 u/l)에서 유의성 있는 감소를 나타내었고 Albumin치는 대조군(3.14±0.23 g/dl)에 비하여 0.125 U/kg 투여군(3.37±0.10 g/dl)과 1.25 U/kg 투여군(3.50±0.18 g/dl)에서 유의성 있는 증가를 나타내었다. 암컷의

Table 6. Hematological values of rats after intravenously treated with alginase once a day for 28 days

Parameter	\Sex \Dose (U/kg/day)	Male			
		0	0.0125	0.125	1.25
Neutrophil ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		2.22±0.88 ^a	2.26±1.00	1.91±0.31	2.50±0.54
Lymphocyte ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		11.09±1.99	8.08±3.19*	7.76±2.39*	9.33±1.69
Monocyte ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.40±0.14	0.35±0.17	0.28±0.14	0.32±0.15
Eosinophil ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.12±0.07	0.17±0.13	0.13±0.06	0.23±0.10
Basophil ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.07±0.03	0.07±0.04	0.04±0.01	0.06±0.02
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		14.16±2.90	11.04±4.36	10.32±2.53	12.69±2.32
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)		7.54±0.46	6.68±2.19	10.06±8.06	7.34±0.27
HGB (g/dl)		14.05±0.64	12.20±4.03	13.72±0.37	13.66±0.40
HCT (%)		47.17±3.07	39.43±13.17*	46.05±1.58	44.32±1.15*
MCV (fL)		62.48±1.56	58.83±1.66*	61.15±1.33	60.38±0.94*
MCH (pg)		18.64±0.68	18.31±0.42	18.21±0.23	18.65±0.45
MCHC (g/dl)		29.83±0.91	31.08±0.52*	29.70±0.41	30.85±0.39*
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		848.00±97.15	712.50±313.56	906.80±45.44	948.44±95.45*

Parameter	\Sex \Dose (U/kg/day)	Female			
		0	0.0125	0.125	1.25
Neutrophil ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		1.24±0.37	1.92±0.53*	1.33±0.52	1.80±0.51
Lymphocyte ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		6.14±0.88	7.54±2.15	6.19±2.22	7.81±2.62
Monocyte ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.25±0.09	0.24±0.09	0.22±0.10	0.27±0.13
Eosinophil ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		0.15±0.05	0.11±0.06	0.11±0.06	0.11±0.03
Basophil (%)		0.14±0.10	0.13±0.12	0.08±0.07	0.04±0.02
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		7.97±1.34	10.04±2.68	8.03±0.04	10.20±3.22
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)		6.26±2.08	6.96±0.52	6.95±0.25	6.70±0.28
HGB (g/dl)		12.91±0.93	13.06±0.83	13.18±0.46	12.88±0.36
HCT (%)		38.80±13.06	42.33±2.44	41.65±1.82	41.60±1.61
MCV (fL)		61.76±2.17	60.85±1.46	59.85±1.09	62.05±0.90
MCH (pg)		18.37±0.52	18.78±0.48	18.94±0.66	19.25±0.36*
MCHC (g/dl)		29.68±0.87	30.87±0.45*	31.66±1.04*	31.02±0.57*
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		820.87±269.03	905.80±96.53	975.44±78.21	966.33±71.03

^a, Values were expressed mean±S.D. *, Significantly different from control group (p<0.05). WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT, platelet.

Table 7. Serum biochemical values of rats intravenously treated with alginase once a day for 28 days

Parameter	\Sex \Dose (U/kg/day)	Male			
		0	0.0125	0.125	1.25
ALT (u/l)		47.77±10.07 ^a	43.03±7.52	44.84±4.04	40.96±4.14
AST (u/l)		102.56±15.03	113.66±22.54	122.06±23.39	105.14±22.88
CHOL (mg/dl)		51.33±4.66	53.22±7.61	53.20±9.11	53.10±8.71
GLU (mg/dl)		200.66±60.21	187.00±26.33	195.00±25.90	164.00±16.45
TB (mg/dl)		0.09±0.01	0.11±0.03	0.11±0.02	0.11±0.01
TP (g/dl)		7.13±0.34	7.11±0.36	7.14±0.32	7.27±0.32
TG (mg/dl)		95.11±30.73	95.88±40.58	75.30±24.00	70.40±26.77
ALP (u/l)		211.55±50.17	198.44±16.95	234.10±58.55	158.90±37.59*
Cl (meq/dl)		122.22±2.04	114.55±2.92	114.00±1.82	113.50±2.12
CPK (u/l)		341.22±141.4	851.77±813.70	557.80±215.27	503.00±456.19
BUN (mg/dl)		20.68±1.96	19.63±2.35	20.10±1.74	19.77±2.14
Ca (mg/dl)		10.51±0.53	10.22±0.44	10.15±0.37	10.35±0.29
Albumin (g/dl)		3.14±0.23	3.04±0.16	3.37±0.10*	3.50±0.18*

Parameter	\Sex \Dose (U/kg/day)	Female			
		0	0.0125	0.125	1.25
ALT (u/l)		48.31±8.35	38.22±7.10*	47.16±8.09	47.56±10.56
AST (u/l)		104.13±16.13	89.87±26.45	106.92±21.72	89.74±16.16
CHOL (mg/dl)		62.11±10.11	53.60±6.96	52.20±6.35	58.10±8.98
GLU (mg/dl)		186.33±33.63	169.20±17.66	166.10±8.97	175.30±12.43
TB (mg/dl)		0.10±0.03	0.09±0.02	0.12±0.02	0.11±0.03
TP (g/dl)		7.70±0.19	7.37±0.42	7.36±0.25	7.96±0.38
TG (mg/dl)		76.44±66.96	37.40±8.15	49.70±11.47	65.40±36.49
ALP (u/l)		38.77±65.55	126.60±50.59*	142.40±63.11*	116.40±36.49*
Cl (meq/dl)		106.00±4.18	99.20±34.19	108.10±3.38	109.10±1.66
CPK (u/l)		313.77±127.12	298.80±129.53	460.50±126.07*	217.10±123.71
BUN (mg/dl)		21.63±1.60	19.73±3.11	21.04±2.26	21.22±1.95
Ca (mg/dl)		10.10±0.00	9.68±0.31	9.64±0.40	9.67±3.23
Albumin (g/dl)		3.75±0.25	3.43±0.22	3.45±0.19	3.91±0.43

^a, Values were expressed as mean±S.D. *, Significantly different from control group (p<0.05). ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; CHOL, Total cholesterol; GLU, glucose; TB, total bilirubin; TP, total protein; TG, triglyceride; ALP, alkaline phosphatase; Cl, Chloride; CREAT, creatinine phosphokinase; BUN, blood urea nitrogen.

경우, ALT치는 대조군(48.31 ± 8.35 u/l)에 비하여 0.0125 U/kg 투여군(38.22 ± 7.10 u/l)에서 유의적 감소를 나타내었고 ALP치는 대조군(38.77 ± 65.55 u/l)에 비하여 0.0125 U/kg 투여군(126.60 ± 50.59 u/l)과 0.125 U/kg 투여군(142.40 ± 63.11 u/l), 1.25 U/kg 투여군(116.40 ± 36.49 u/l)에서 유의성 있는 증가를 나타내었다. Creatinine phosphokinase은 대조군(313.77 ± 127.12 u/l)에 비하여 0.125 U/kg 투여군(460.50 ± 126.07 u/l)에서 유의적 증가를 나타내었다.

혈액학적 및 혈청생화학적 검사결과, 몇몇 항목에서 유의적인 증감을 나타내었으나, 대부분의 변화가 정상 범위에서 나타났고 용량의존적이지 않은점 그리고 조직병리학적 변화와 비교할 때 시험물질에 의한 직접적인 영향은 아닌 것으로 판단된다.

9) 절대장기무게 및 체중에 대한 각 장기의 상대중량비(Tables 8 and 9)

절대장기무게에 있어, 수컷에서는 좌측 Salivary gland에서 대조군(0.47 ± 0.09 g)에 대하여, 0.0125 U/kg 투여군(0.59 ± 0.14 g)에서 유의성 있는 증가를 나타

내었다. Lung에서는 대조군(2.91 ± 0.50 g)에 대하여 0.0125 U/kg 투여군(2.42 ± 0.52 g), 0.125 U/kg 투여군(2.38 ± 0.44 g) 및 1.25 U/kg 투여군(2.44 ± 0.36 g) 모두에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. 그리고 상대 중량비의 경우, 수컷의 좌측 Salivary gland에서도 대조군($0.11 \pm 0.02\%$)에 대하여, 0.0125 U/kg 투여군($0.14 \pm 0.03\%$)에서 유의성 있는 증가를 나타내었고 Lung에서도 대조군($0.66 \pm 0.09\%$)에 대하여 0.0125 U/kg 투여군($0.56 \pm 0.09\%$), 0.125 U/kg 투여군($0.56 \pm 0.09\%$) 및 1.25 U/kg 투여군($0.55 \pm 0.06\%$) 모두에서 유의성 있는 감소를 나타내었다. 그러나, 두 장기의 조직병리학적 관찰 결과 모두 정상 소견을 나타내었다.

10) 병리조직검사 소견

수컷의 경우 고용량군 중 2마리의 비장에서 extramedullary hemopoiesis가 있었고 그 외의 장기에서는 대조군 및 모든 투여군에서 특이할 만한 조직 병리학적 소견은 인지되지 않았다. 그리고 암컷 고용량투여군 중 2마리의 간장에서는 focal lymphocyte infiltration이 인지 되었으나 그 외의 대조군 및 투여군에서 특이

Table 8. Absolute organ weights of rats intravenously treated with alginate once a day for 28 days

(unit: g)

Variable	\Sex \Dose (U/kg/day)	Male			
		0	0.0125	0.125	1.25
Body Weight (g)		441.05 ± 43.96^a	431.49 ± 41.78	424.26 ± 45.16	442.33 ± 30.64
Heart		1.54 ± 0.14	1.55 ± 0.24	1.48 ± 0.13	1.43 ± 0.12
Liver		16.74 ± 1.93	15.25 ± 1.23	15.37 ± 1.56	14.52 ± 1.71
Spleen		0.91 ± 0.13	0.85 ± 0.11	0.82 ± 0.13	0.89 ± 0.11
Brain		2.19 ± 0.11	2.12 ± 0.17	2.09 ± 0.11	2.11 ± 0.09
Adrenal gland	Left	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	Right	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Salivary gland	Left	0.47 ± 0.09	$0.59 \pm 0.14^*$	0.46 ± 0.09	0.38 ± 0.10
	Right	0.42 ± 0.05	0.50 ± 0.08	0.45 ± 0.10	0.38 ± 0.09
Lung		2.91 ± 0.50	$2.42 \pm 0.52^*$	$2.38 \pm 0.44^*$	$2.44 \pm 0.36^*$
Kidney	Left	1.66 ± 0.17	1.14 ± 0.18	1.51 ± 0.14	1.47 ± 0.15
	Right	1.69 ± 0.18	1.55 ± 0.20	1.50 ± 0.09	1.54 ± 0.11
testis	Left	1.51 ± 0.18	1.57 ± 0.12	1.63 ± 0.14	1.56 ± 0.14
	Right	1.55 ± 0.10	1.57 ± 0.14	1.64 ± 0.15	1.55 ± 0.11
Variable	\Sex \Dose (U/kg/day)	Female			
		0	0.0125	0.125	1.25
Body Weight (g)		285.02 ± 20.90	275.86 ± 21.83	272.25 ± 21.06	278.91 ± 29.25
Heart		1.15 ± 0.14	1.04 ± 0.09	1.09 ± 0.14	1.03 ± 0.11
Liver		12.12 ± 1.52	10.82 ± 0.86	10.85 ± 1.36	12.20 ± 1.67
Spleen		0.72 ± 0.10	0.72 ± 0.11	0.71 ± 0.18	0.71 ± 0.08
Brain		1.60 ± 0.51	1.50 ± 0.52	1.40 ± 0.52	1.20 ± 0.42
Adrenal gland	Left	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	Right	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Salivary gland	Left	0.55 ± 0.12	0.34 ± 0.06	0.33 ± 0.06	0.28 ± 0.06
	Right	0.35 ± 0.12	0.30 ± 0.09	0.33 ± 0.10	0.25 ± 0.04
Lung		1.86 ± 0.18	1.82 ± 0.28	1.97 ± 0.59	1.84 ± 0.21
Kidney	Left	1.16 ± 0.20	1.02 ± 0.10	1.04 ± 0.15	1.02 ± 0.13
	Right	1.15 ± 0.20	1.01 ± 0.11	1.03 ± 0.10	1.08 ± 0.11
Ovary	Left	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02
	Right	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02

^a, Values were expressed as mean \pm S.D.

*, Significantly different from control group ($p < 0.05$).

Table 9. Relative organ weights of rats intravenously treated with alginase once a day for 28 days

(unit: %)

Variable	\Sex (Dose (U/kg/day))	Male			
		0	0.0125	0.125	1.25
Heart		0.35±0.02 ^a	0.36±0.07	0.35±0.05	0.32±0.03
Liver		3.79±0.14	3.56±0.37	3.66±0.55	3.28±0.31
Spleen		0.21±0.03	0.20±0.03	0.19±0.02	0.20±0.02
Brain		0.50±0.04	0.49±0.04	0.50±0.07	0.48±0.03
Adrenal gland	Left	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
	Right	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
Thymus gland		0.13±0.04	0.16±0.06	0.10±0.01	0.14±0.03
Salivary gland	Left	0.11±0.02	0.14±0.03*	0.11±0.03	0.09±0.02
	Right	0.10±0.01	0.12±0.03	0.11±0.03	0.09±0.02
Lung		0.66±0.09	0.56±0.09*	0.56±0.09*	0.55±0.06*
Kidney	Left	0.38±0.03	0.36±0.05	0.36±0.04	0.33±0.02
	Right	0.38±0.04	0.36±0.05	0.36±0.04	0.35±0.02
Testis	Left	0.35±0.02	0.37±0.04	0.39±0.03	0.35±0.03
	Right	0.35±0.03	0.37±0.05	0.39±0.03	0.35±0.03

Variable	\Sex (Dose (U/kg/day))	Female			
		0	0.0125	0.125	1.25
Heart		0.40±0.05	0.38±0.03	0.40±0.05	0.37±0.01
Liver		4.25±0.33	3.93±0.23	3.99±0.47	4.37±0.40
Spleen		0.25±0.03	0.27±0.04	0.26±0.06	0.26±0.03
Brain		0.70±0.05	0.71±0.06	0.72±0.08	0.69±0.06
Adrenal gland	Left	0.02±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
	Right	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Thymus gland		0.15±0.02	0.19±0.04	0.17±0.04	0.16±0.05
Salivary gland	Left	0.12±0.04	0.12±0.02	0.12±0.03	0.10±0.02
	Right	0.12±0.02	0.11±0.03	0.12±0.03	0.09±0.02
Lung		0.65±0.05	0.66±0.11	0.73±0.23	0.66±0.05
Kidney	Left	0.40±0.05	0.37±0.04	0.38±0.05	0.37±0.03
	Right	0.40±0.05	0.37±0.04	0.38±0.03	0.39±0.02
Ovary	Left	0.30±0.00	0.03±0.01	0.03±0.00	0.02±0.00
	Right	0.03±0.01	0.03±0.00	0.03±0.01	0.02±0.01

^a, Values were expressed as mean ± S.D.

*, Significantly different from control group (p<0.05).

할 만한 조직 병리학적 소견은 인지되지 않았다. 이러한 결과는 일부 개체의 장기에 국한된 개체특이성에 기인된 반응으로 사료되고 시험물질에 의한 직접적인 반응은 아닌 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 랫드에서 Alginase®의 LD₅₀는 10 U/kg 이상이며, 1.25 U/kg 용량으로 4주간 정맥 내 반복투여시에도 아무런 독성을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Lee, C.-Y. (1979): Snake Venoms. New York: Springer-Verlag.
- Russell, F.E. (1996): Toxic effects of animal toxins pp. 801-809.
- Saunders, P.R., Russell, F.E. (1976): Animal Toxins (Pergamon Press, Oxford), p. 269.
- Wolford, S.T., Schroer, R.A., Gohs, F.X., Gallo, P.P., Brodeck, M., Falk, H.B. and Ruhren, R. (1986): Reference range data base for serum chemistry and hematology Values in laboratory animals. *J. Toxicol. Environm. Health*, **18**, pp. 161-168.
- Zeller, E.A. (1948): Enzymes of snake venomes and their biological significance, in Nord FF (ed): *Advances in Enzymology*. New York: Interscience, vol 8, p. 459.
- 이귀녕, 이종순(1993): 임상 병리 파일(의학 문화사), pp. 171-172, 229-282.
- 田嶋嘉雄. (1989): Biological Reference Data Book on Experimental Animals pp. 103-106, 159-166.
- 식품의약품안전본부(1996): 의약품 등의 독성시험 기준(식품의약품안전본부 고시 제96-8호).