

## 랫드 혈청의 저장기간에 따른 혈액생화학치 변화

손화영 · 이현숙 · 김영희 · 김용범 · 김일환 · 하창수 · 강부현

한국화학연구소 스크리닝 · 안전성연구센터

### Effects of Storing Time on the Values of the Clinical Biochemistry in Sprague-Dawley(SD) Rats

Son Hwa-Young, Lee Hyun-Sook, Kim Young-Hee, Kim Yong-Beom

Kim Il-Hwan, Ha Chang-Su and Kang Boo-Hyon

Screening & Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology

**Abstract :** The present study was undertaken to compare the variation on serum biochemical values by storage in the rats. Sera were prepared from 30 Sprague-Dawley rats of each sex. 5 aliquots from each serum were placed in a -80°C freezer with the exception of 1 aliquot which was analyzed immediately. The analysis was performed on the following months; 1, 2, 3, 6, and 12 months after freezing. The parameters measured were aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), blood urea nitrogen(BUN) creatinine(CRE), glucose(GLU), total cholesterol(TCHO), triglyceride (TG), total protein(TP), albumin(ALB), total bilirubin(TBIL), calcium(Ca<sup>++</sup>), inorganic phosphorus(IP), creatine kinase (CK), phospholipid(PL), albumin-globulin ratio(A/G), sodium(Na<sup>+</sup>), potassium(K<sup>+</sup>), and chloride(Cl<sup>-</sup>). The statistical analysis with Repeated Measures ANOVA, did not show statistical significance in the parameters of AST, ALT, BUN, TG, CK, A/G, Na<sup>+</sup> of 1 month frozen sera, in those of AST, TG, CK, K<sup>+</sup> of 2 month frozen sera, in those of AST, ALT, BUN, CRE, TCHO, TP, TBIL, CK, PL, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> of 3 month frozen sera, in those of Cl<sup>-</sup> of 6 month frozen sera, and in those of ALT, TG, ALB of 12 month frozen sera in male SD rats. On the other hand, it did not show statistical significance in the parameters of AST, ALT, ALP, BUN, GLU, TCHO, TG, TBIL, CK, PL, A/G, Na<sup>+</sup> of 1 month frozen sera, in those of AST, TCHO of 2 month frozen sera, in those of AST, BUN, CRE, TCHO, TP, TBIL, CK, PL of 3 month frozen sera, in those of TCHO, IP, PL of 6 month frozen sera, and in those of ALB of 12 month frozen sera in female SD rats. On the basis of the results, although there are some statistical variations in the biochemical values of the sera, it is suggested that if sera are analysed at the same time before 12 months storage in a -80°C freezer, the storing time does not affect the biochemical evaluation of the sera in SD rats.

**Key words :** SD rats, serum chemistry, storage

## 서 론

새로 개발된 화학물질이나 농약, 의약품 후보물질 등에 대한 비임상시험의 수행에 있어 혈액생화학 검사는 필수적으로 요구되고 있다. 혈액생화학적 검사는 형태학적 변화와 함께 시험물질의 독성결과를 판정하는데 매우 중요하다. 시험물질투여에 따라 나타나는 독성을 검사하기 위해 형태학적 변화와 기능적 변화를 관찰할 수 있는데, 혈액생화학적 변화는 기능적 변화를 나타내는 지표로서 형태학적 변화에 선행하여 나타나므로 독성시험에 있어 혈액생화학적 검사의 의의는 크다고 할 수 있다.<sup>1</sup>

일반적으로 혈액생화학 성분은 동물종, 채혈부위, 채혈시각, 혈청의 회석방법, 온도 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받는다. 또한 같은 시료라도 분석하는 실험실에 따라 다르며, 특히 저장온도 및 저장기간에 영향을 많이 받는다.<sup>2-6</sup> 따라서 혈액생화학검사는 혈청을 얻은 즉시 검사하는 것이 중요하다.

그러나 다양한 검사가 요구되는 경우, 수일 이내에 모든 검사를 실시하는 것이 곤란할 수 있으며, 또한 기술적, 경제적, 시간적인 문제 등에 따라 혈청의 저장이 필요하게 된다. 따라서 장기간의 저장에 따른 혈청성분의 변화정도는 검사결과를 정확히 평가하는데 있어 매우 중요하다. 그러나 장기간 냉동보관에 따른 혈액생화학적 성분 변화에 관한 연구는 거의 수행되어 있지 않다. 따라서 본 실험은 본 연구소에서 주로 사용되는 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 이용하여 혈청을 장기간 냉동 보관하면서 경시적으로 혈액생화학성분의 변화를 관찰하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

한국화학연구소 스크리닝·안전성연구센터의 준차폐시설내에

서 사육된 SD 랫드 암수 각 30마리씩 총 60마리를 4주에 입수하여 1주의 순화를 거친 후 공시하였다.

### 사육환경

랫드는 철망사육상자(410 mm×220 mm×200 mm)에 2-3마리씩 배치하였고, 온도는 23±3°C, 상대습도는 55±10%, 환기 횟수는 시간당 10-20회, 조도는 150~300 Lux에서 12시간 조명하는 조건에서 사육하였다.

**Table 1.** Abbreviation, unit and analytical methods of the items

Items	Unit	Methods
AST (Aspartate aminotransferase)	IU/l	UV-Rate
ALT (Alanine aminotransferase)	IU/l	UV-Rate
ALP (Alkaline phosphatase)	IU/l	P-NPP
BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dl	Urease-UV
CRE (Creatinine)	mg/dl	Jaffe
GLU (Glucose)	mg/dl	Enzyme
TCHO (Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme
TG (Triglyceride)	mg/dl	Enzyme
TP (Total protein)	g/dl	Biuret
ALB (Albumin)	g/dl	BCG
TBIL (Total bilirubin)	mg/dl	Enzyme
Ca (Calcium)	mg/dl	OCPC
IP (Inorganic phosphorus)	mg/dl	UV
CK (Creatine kinase)	IU/l	UV
PL (Phospholipid)	mg/dl	Enzyme
A/G (Albumin-globulin ratio)	ratio	ALB/(TP-ALB)
Na <sup>+</sup> (Sodium)	mmol/l	Flame photometer
K <sup>+</sup> (Potassium)	mmol/l	Flame photometer
Cl <sup>-</sup> (Chloride)	mmol/l	Coulometric titration

**Table 2.** Summary of serum biochemical analysis data of male rats

Item	N	0 day	1 month	2 month	3 month	6 month	12 month
AST	30	112.2±39.90	110.9±38.60	111.0±38.88	112.4±39.33	117.4±41.23**	117.3±40.91**
ALT	30	44.4±18.09	45.7±18.53	46.4±18.90**	45.9±18.84	47.3±19.23**	47.7±19.12
ALP	30	257.5±45.73	274.9±50.808**	273.4±51.04**	275.4±51.67**	277.2±50.92**	268.7±48.78*
BUN	30	18.3±1.83	18.4±1.82	19.2±1.85**	18.2±1.74	18.8±1.86**	18.8±1.76**
CRE	30	0.54±0.111	0.60±0.092*	0.61±0.076**	0.56±0.062	0.61±0.071*	0.64±0.092**
GLU	30	142.5±21.16	149.4±21.11**	155.5±22.03**	146.4±21.53**	152.3±21.82**	158.6±23.87**
TCHO	30	99.1±20.02	103.1±21.81**	102.5±22.97*	99.4±20.76	102.1±21.57**	107.9±21.71**
TG	30	111.5±51.36	116.1±53.24	107.6±50.32	101.4±47.20**	101.4±46.82**	108.6±50.17
TP	30	6.46±0.306	6.69±0.279**	6.89±0.297**	6.4±20.291	6.61±0.282**	6.83±0.292**
ALB	30	4.32±0.107	4.47±0.108**	4.38±0.109**	4.12±0.103**	4.14±0.093**	4.30±0.108
TBIL	30	0.09±0.018	0.09±0.018*	0.10±0.019**	0.09±0.020	0.11±0.020**	0.11±0.019**
Ca	30	10.32±0.397	10.87±0.379**	9.88±0.368**	9.21±0.368**	9.25±0.358**	9.71±0.369**
IP	30	6.93±0.638	7.19±0.638**	7.32±0.678**	6.81±0.612**	6.87±0.643**	7.26±0.680**
CK	30	244.8±77.56	245.0±69.16	244.7±69.03	245.6±79.00	237.1±76.42**	280.1±86.99**
PL	30	154.6±20.71	162.3±22.06**	165.1±22.48**	154.3±21.33	157.1±21.43**	159.7±35.45**
A/G	30	2.04±0.226	2.02±0.174	0.76±0.161**	1.80±0.163**	1.69±0.149**	1.71±0.143**
Na <sup>+</sup>	30	134.4±1.42	134.2±1.33	132.3±2.47**	134.3±1.20	130.7±1.68**	-
K <sup>+</sup>	30	4.71±0.694	4.75±0.672**	4.74±0.818	4.75±0.659	4.61±0.662**	-
Cl <sup>-</sup>	30	102.6±1.96	98.3±1.81**	96.2±1.41**	96.2±1.43	95.4±1.54	-

Each value represents mean ± S.D.

\*Significant difference from 0 day(P<0.05).

\*\*Significant difference from 0 day(P<0.01).

### 사료와 음수

사료는 실험동물용 분말사료(제일사료주식회사)를 방사선 멸균(2.0 Mrad)하여 자유섭취하게 하였다. 음수는 수도물을 여과한 후 자외선유수멸균기(Dynamics, M600, USA)로 멸균하여 자유섭취하게 하였다.

### 혈액채취 및 혈액생화학적 검사

랫드를 채혈 전 약 12시간 절식시킨 후 에테르로 마취하여 한국화학연구소 스크리닝-안전성 연구센터의 표준작업수순(SOP: Standard Operating Procedure)에 따라 후대정맥에서 채혈하였다. 채취한 혈액은 혈액생화학적 검사를 위해 혈청분리관(polyethylene tube)을 사용하였고 채혈 후 30분 이내에 3000 rpm으로 10분간 원심분리하였다.

### 검사 및 분석방법

측정기기의 정도관리를 위하여 시판용 정도관리용혈청(日本製藥株式會社, 東京, 日本)을 이용하여 normal측정치와 abnormal 측정치에 대해 각각 3회 반복 측정한 후 제시된 각 성분의 정상치와 비교하여 이상이 있는 경우 이를 보정한 다음 검사하였다.

혈청을 5개로 나누어 deep freezer(-80°C)에 보관하였으며 이들을 실험당일(0주), 1, 2, 3, 6 및 12개월 후에 검사하였다.

혈청은 Chemistry analyzer(Shimadzu CL-7200)로 측정하였고, Na<sup>+</sup>와 K<sup>+</sup>는 전해질자동분석장치(IL943 flame photometer, Instrumentation Lab.), Cl<sup>-</sup>은 Chlorometer(C-200AP, Jookoo)를 이용하여 측정하였다. 혈액생화학적 검사의 방법과 단위는 Table 1과 같다.

**측정자료의 분석**

측정된 자료는 자료처리용 프로그램인 LABCAT(Innovative Programming Associates, Inc.)에 자동으로 저장되었으며, 저장된 자료는 SAS(SAS Institute, Inc., Cary, N.C.) 통계처리용 프로그램으로 평균치와 표준편차를 구하였다. 또한 0주군과 각각의 저장기간군간에 대해서 반복측정 자료의 분산 분석법(Repeated Measures ANOVA)<sup>37</sup>을 실시하여 기간별 유의성을 검정하였다.

**결 과**

혈액생화학적 분석에 따른 통계학적 결과는 Table 2와 Table 3과 같다.

수컷에서 1개월에 유의성이 나타난 항목은 ALP, CRE, GLU, TCHO, TP, ALB, TBIL, Ca<sup>++</sup>, IP, PL, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>이었다. 2개월에 유의성이 나타난 항목은 ALT, ALP, BUN, CRE, GLU, TCHO, TP, ALB, TBIL, Ca<sup>++</sup>, IP, PL, A/G, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>이었고, 3개월에 유의성이 나타난 항목은 ALP, GLU, TG, ALB, Ca<sup>++</sup>, IP, A/G이었다. 6개월에는 Cl<sup>-</sup>을 제외한 전 항목에서 유의성이 나타났으며, 12개월에 유의성이 나타난 항목은 AST, ALP, BUN, CRE, GLU, TCHO, TP, TBIL, Ca<sup>++</sup>, IP, CK, PL, A/G이었다.

암컷에서 1개월에 유의성이 나타난 항목은 CRE, TP, ALB, Ca<sup>++</sup>, IP, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>이었다. 2개월에 유의성이 나타난 항목은 ALT, ALP, BUN, CRE, GLU, TG, TP, ALB, TBIL, Ca<sup>++</sup>, IP, CK, PL, A/G, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>이었고, 3개월에 유의성이 나타난 항목은 ALT, ALP, GLU, TG, ALB, Ca<sup>++</sup>, IP, A/G, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>이었다. 6개월에 유의성이 나타난 항목은 AST, ALT, ALP,

BUN, CRE, GLU, TG, TP, ALB, TBIL, Ca<sup>++</sup>, CK, A/G, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>이었으며, 12개월에는 ALB을 제외한 전 항목에서 유의성이 나타났다.

**고 찰**

약물이나 화학물질의 독성시험에 있어 혈액생화학적 검사는 필수검사항목으로 시험물질의 독성을 판단하는데 중요한 바탕이 된다.<sup>1,7</sup> 독성시험에서 공시된 동물의 혈액생화학적 기초 자료의 확립은 시험자가 독성시험 결과를 판단하는데 많은 도움을 제공한다. 혈액생화학검사에서 산출된 자료는 품종, 식이 및 주령,<sup>8</sup> 성별, 사육환경, 마취방법, 절식, 채혈시각,<sup>9</sup> 채혈부위 및 채혈방법<sup>10~12</sup> pH,<sup>13</sup> 온도,<sup>14~17</sup> 측정기기,<sup>18</sup> 혈청의 회석방법,<sup>19,20</sup> 응고시간,<sup>5,21</sup> 용혈,<sup>22</sup> 혈청의 보관방법,<sup>23</sup> 보관기간<sup>24,25</sup> 등의 여러가지 요인에 의해 민감하게 영향을 받는다.<sup>2,26</sup> 혈액생화학적 검사를 적절하게 수행하기 위해서는 산출된 자료에 영향을 주는 모든 요인을 일정하게 유지하여 변화의 폭을 최소화하는 것이 바람직하다.

본 시험은 SD 랫드의 혈청을 장기간 -80°C에 보관하여 저장기간에 따른 혈액생화학적 변화유무를 동정하고자 실시하였다. 저장기간과 저장온도가 혈청 성분에 미치는 영향에 대한 보고로 Nakaji 등<sup>2</sup>은 마우스와 랫드의 혈청을 6주 동안 4°C, -80°C 그리고 동결건조 후 -80°C에서 보관한 후 혈액생화학적 검사를 실시한 결과, 각각의 3가지 조건 모두에서 CK는 극히 불안정하였으며, BUN, TG은 매우 불안정하였고, TCHO, ALT, lactic dehydrogenase(LDH), Ca<sup>++</sup>은 미약하나 불안정한 것으로 나타났다. 또한 AST, GLU, CHE, LAP, TP, ALB, ALP, PL은

**Table 3.** Summary of serum biochemical analysis data of female rats

Item	N	Oday	1 month	2 month	3 month	6 month	12 month
AST	30	89.4 ± 15.90	89.7 ± 16.18	89.21 ± 6.08	89.7 ± 16.24	93.1 ± 16.71**	92.9 ± 17.01**
ALT	30	37.8 ± 9.30	38.9 ± 9.71	39.3 ± 9.57**	38.9 ± 9.66**	39.9 ± 9.83**	40.4 ± 9.81**
ALP	30	110.9 ± 29.79	118.6 ± 31.77	116.6 ± 31.09**	163.7 ± 258.02**	118.3 ± 31.22**	113.6 ± 30.10**
BUN	30	16.1 ± 2.30	16.5 ± 2.42	17.1 ± 2.53**	15.9 ± 2.42	16.7 ± 2.40**	16.4 ± 2.37**
CRE	30	0.55 ± 0.077	0.60 ± 0.069**	0.61 ± 0.074**	0.57 ± 0.073	0.59 ± 0.060**	0.60 ± 0.089**
GLU	30	147.0 ± 16.95	154.1 ± 17.15	159.2 ± 17.97**	151.1 ± 17.60**	156.6 ± 16.97**	161.6 ± 18.50**
TCHO	30	94.7 ± 23.46	99.9 ± 24.11	93.9 ± 25.32	95.3 ± 23.01	91.8 ± 23.89	102.5 ± 23.56**
TG	30	140.9 ± 75.94	148.7 ± 80.04	138.1 ± 74.91**	129.9 ± 70.54**	128.4 ± 68.61**	137.3 ± 73.90**
TP	30	6.86 ± 0.362	7.18 ± 0.350**	7.28 ± 0.393**	6.82 ± 0.339	6.99 ± 0.346**	7.24 ± 0.319**
ALB	30	4.89 ± 0.220	5.08 ± 0.224**	4.96 ± 0.210**	4.68 ± 0.203**	4.67 ± 0.195**	4.87 ± 0.212
TBIL	30	0.09 ± 0.022	0.09 ± 0.023	0.10 ± 0.026**	0.09 ± 0.023	0.11 ± 0.023**	0.10 ± 0.028*
Ca	30	10.51 ± 0.431	11.15 ± 0.453**	10.09 ± 0.398**	9.39 ± 0.382**	9.39 ± 0.385**	9.89 ± 0.408**
IP	30	5.89 ± 0.800	6.21 ± 0.884**	6.23 ± 0.865**	5.83 ± 0.825*	5.85 ± 0.838	6.25 ± 0.871**
CK	30	205.8 ± 91.70	213.7 ± 96.03	213.1 ± 95.82**	207.7 ± 93.36	201.0 ± 89.97**	239.3 ± 106.37**
PL	30	205.7 ± 37.42	213.1 ± 35.79	216.0 ± 36.67**	204.5 ± 35.43	206.4 ± 36.53	192.5 ± 32.00**
A/G	30	2.50 ± 0.207	2.44 ± 0.220	2.15 ± 0.212**	2.21 ± 0.186**	2.02 ± 0.142**	2.06 ± 0.140**
Na <sup>+</sup>	30	132.4 ± 1.74	32.4 ± 1.69	127.8 ± 1.61**	133.7 ± 1.62*	128.8 ± 1.28**	-
K <sup>+</sup>	30	4.08 ± 0.704	4.14 ± 0.643**	3.95 ± 0.630**	4.20 ± 0.639**	4.03 ± 0.645**	-
Cl <sup>-</sup>	30	102.8 ± 1.99	98.4 ± 2.07**	96.8 ± 2.11**	96.3 ± 1.82**	94.4 ± 2.10**	-

Each value is Mean ± SD.

\*Significant difference from 0 day(P<0.05).

\*\*Significant difference from 0 day(P<0.01).

안정하였다. CK가 불안정하게 나타나는 것은 온도와 빛에 영향을 받기 때문으로 보고되어 있다<sup>4</sup>. Hirata 등<sup>3</sup>은 개, 원숭이, 랫드의 혈청을 4°C, -20°C, -80°C에서 보관한 후 혈액생화학적 검사를 측정당일(1일), 2일, 3일, 4일, 1주일, 2주일, 1개월, 3개월, 6개월 그리고 12개월에 실시한 결과, -20°C와 -80°C에서는 대부분의 검사 항목이 6개월 또는 12개월 동안 안정함을 보인 반면 4°C에서는 단지 2주까지만 안정하였다. 검사항목 중 AST, ALT, LDH, ALP, CRE은 -20°C에서 비교적 초기에 현저한 변화가 인정되므로 장기간 보존시에는 -80°C로 저장하는 것이 좋다고 보고하였다. Ezigbo와 Storey<sup>4</sup>는 랫드의 혈청을 실온, 4°C, -20°C 및 -80°C에서 보관하며 LDH,  $\alpha$ -hydroxy butyrate dehydrogenase( $\alpha$ -HBDH), AST, ALT, CK을 28일까지 검사한 결과 -20°C와 -80°C에서는 보관기간이 경과함에 따라 검사항목들의 혈액생화학수치가 점진적으로 감소된 반면, 실온 및 4°C에서는 이들이 24시간 이내에 급격히 감소하였다. 또한 모든 보관조건에서 AST와 ALT가  $\alpha$ -HBDH, LDH, CK에 비해 상대적으로 안정함을 보였다고 보고하였다. Carothers 등<sup>27</sup>은 IP를 측정시 혈청을 4°C에 보관하고 8시간 이내에 검사할 것을 권장하였고, Ono 등<sup>28</sup>은 IP가 4°C에서 48시간까지 안정하였으나 23°C에서는 8시간 이내에 활성이 감소한다고 보고하였다. 이러한 IP의 감소는 세포내 glucose의 phosphorylation 과정시 IP가 소모되어 나타난다고 하였다. 그러나 24시간 이후에는 IP가 현저하게 증가하였는데 이는 저장기간의 연장에 따라 acid-soluble organic phosphate metabolites로부터 IP의 방출이 증가하기 때문이라고 하였다.

본 시험은 랫드의 혈청을 -80°C에 보관하며 0, 1, 2, 3, 6 및 12개월에 혈액생화학적 검사를 실시한 후 이들의 저장기간에 따른 통계학적 유의성을 검사한 것으로 분석결과 대부분의 검사항목들은 수컷과 암컷 모두에서 1개월과 2개월 이내에 통계학적으로 유의성 있는 변화를 나타냈다. 수컷에서는 1개월에 ALP, CRE, GLU, TCHO, TP, ALB, TBIL, Ca<sup>++</sup>, IP, PL, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, 2개월에서는 1개월에 유의성을 나타낸 항목이외에 ALT, BUN, A/G, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>이 유의성을 나타내었고, 암컷에서는 1개월에 CRE, TP, ALB, Ca<sup>++</sup>, IP, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, 2개월에서는 1개월에 유의성을 나타낸 항목이외에 ALT, ALP, BUN, GLU, TG, TBIL, CK, PL, A/G, Na<sup>+</sup>이 유의성을 나타내었다. 그 외에 수컷에서 AST는 6개월, TCHO는 12개월부터 유의성을 나타내었고 암컷에서 AST와 CK는 6개월, TG는 3개월부터 유의성을 나타내었다. 그러나 저장기간에 따라 모든 검사항목은 유의성에 있어 차이를 보이고 있으며 또한 혈액생화학적 수치가 0일 측정치에 비해 불규칙한 증감을 나타내고 있다. 이러한 결과는 이전의 보고<sup>2,4</sup>와 다소 상이하며 암컷과 수컷에서 모든 검사항목이 매우 불규칙한 경향을 나타내고 있다.

저장기간에 따른 혈액생화학적 수치는 측정시 여러 요인들이 작용하기 때문에 몇몇 연구자들은 혈액생화학적 검사성적의 분석에 있어 일반적인 통계처리 방법에 대한 문제점을 보

고하였고<sup>29-32</sup> 일부 논문에서는 통계학적 방법을 이용하지 않고 혈액생화학적 수치의 변화정도를 백분율로 표시하여 결과의 유의성을 증명하기도 하였다.<sup>2</sup> 본시험에서는 하나의 개체로부터 여러개의 자료를 측정하는 반복측정 자료의 분산분석법(Repeated Measures ANOVA)<sup>37</sup>을 사용하였다. 시험결과 암컷과 수컷의 모든 검사항목에 대해 통계학적 유의성을 나타내었다. 그러나 이러한 유의성은 저장기간에 따라 일정한 변화 양상을 나타내지 않고 있으며 변화가 인정된 모든 항목의 혈액생화학적 수치는 정상범위 이내였다.<sup>33-35</sup> 이와 관련하여 Rossing과 Foster<sup>36</sup>는 24시간 냉장 보관한 시료의 분석에서 paired t-test를 실시한 결과 일부 항목에서 통계학적으로 유의성이 있었으나, 임상학적 측면에서 고려해 볼 경우, CO<sub>2</sub>에서만 유의성이 인정된다고 하여 평가방법에 따라 차이가 있다고 하였다. 따라서 본 시험에서 관찰된 변화의 정도는 임상학적 측면에서 고려해 볼 때 큰 문제가 없는 것으로 판단된다.

본시험 결과, 독성시험에서 혈액생화학치의 변화는 혈청을 -80°C이하에 보관하는 경우 저장기간에 따른 차이보다는 분석시각이 중요하다. 즉, 동일한 시험의 분석은 저장기간을 동일하게 하여 같은 시각에 분석하는 것이 바람직하다고 생각된다. 따라서 독성시험에서 랫드의 혈청을 -80°C에서 12개월까지 보관한 후 같은 시각에 분석을 실시한다면 시험물질에 의한 혈액생화학적 변화를 판정하는데 있어서 그 결과에 영향을 줄 정도로 혈액생화학성분의 변화를 초래하지는 않을 것으로 생각된다. 그러나 혈청성분의 보다 정확한 측정값을 얻기 위해서는 혈청을 분리한 후 빠른 시일 내에 검사하는 것이 바람직하다.

## 참고문헌

1. Travlos GS, Morris RW, et al. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology* **107**(1): 17-29, 1996.
2. Nakaji Y, Suzuki S, et al. 實驗動物の血清生化學値 I. マウスおよびラットの血清成分の安定性, 衛生試験所報告, **97**:141-147, 1979.
3. Hirata M, Nomura G, et al. Stability of serum components in monkey, dog, and rat. *Exp Anim* **28**(3):401-404, 1979.
4. Ezigbo JC and Storey DM. Effect of storage at various temperatures on the activity of cotton rat serum enzymes. *Indian J Exp Biol* **18**:96-97, 1980.
5. Laessing RH, Indriksons AA, et al. Changes in serum chemical values as a result of prolonged contact with clot. *Am J Clin Pathol* **66**:598-604, 1976.
6. Haider T and Foss OP. The analytical variation and mean difference of serum lipid values in duplicate samples subjected to different times of storage. *Scand J Clin Lab Invest.* **43**(5): 439-443, 1983.
7. Stogdale L. Correlation of changes in blood chemistry with pathological changes in the animal's body; serum nutrients and proteins. *J S Afr Vet Assoc* **52**(1):57-63, 1981.

8. Matsuzawa T, Nomura M, et al. Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. Working group II, Nonclinical safety evaluation subcommittee of the Japan pharmaceutical manufacturers association. *J Vet Med Sci* **55**(3):351-362, 1993.
9. Minematsu S, Waranabe M, et al. Diurnal variations in blood chemical items in Sprague-Dawley rats. *Exp Anim* **44**(3): 223-32, 1995.
10. Neptun DA, Smith CN, et al. Effect of sampling site and collection method on variations in baseline clinical pathology parameters in Fischer-344 rats. 1. Clinical chemistry. *Fundam Appl Toxicol* **5**(6):1180-85, 1985.
11. Besch EL and Chou BJ. Physiological responses to blood collection methods in rats. *Proc Soc Exp Bio Med* **138**:1019-1021, 1971.
12. Friedel R, Trautschold I, Gartner K, Helle-Feldmann M, Gaudsuhn D. Effects of blood sampling on enzyme activities in the serum of laboratory animals. *Z Klin Chem Klin Biochem* **12**(5):229, 1974.
13. Borrebaek B. Effects of enzyme and substrate concentration, temperature and pH. *Tidsskr Nor Laegeforen* **90**(2):171-5, 1970.
14. Duggan PF. Activities of enzymes in plasma should be measured at 37 degrees C. *Clin Chem* **25**(3):348-52, 1979.
15. Hafkenschied JC, Kohler BE. Effects of temperature on measurement of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in commercial control sera. *Clin Chem* **32**(1 Pt 1):184-5, 1986a.
16. Hafkenschied JC, Kohler BE. Temperature-conversion factors for four enzymes in commercial control sera. *Clin Chem* **32**(8):1616, 1986b.
17. Heerspink W, Hafkenschied JC, Siepel H, van der Ven-Jongekryg J, Dijt CC. Temperature-converting factors for enzymes; Comparison of methods. *Enzyme* **25**(5):333-41, 1980.
18. Matsuzawa T, Hayashi Y, et al. A survey of the values of clinical chemistry parameters obtained for a common rat blood sample in ninety-eight Japanese laboratories. *J Toxicol Sci* **22**(1):25-44, 1997.
19. Fendley TW, Frings CS. Inactivated serum vs saline as a diluent in some serum enzyme assays. *Clin Chem* **21**(1):154-5, 1975.
20. Fendley TW, Hochholzer JM, Frings CS. Effect of various diluents on the activity of several enzymes present in serum. *Clin Chem* **19**(9):1079-80, 1973.
21. Friedel R, Mattenheimer H. Release of metabolic enzymes from platelets during blood clotting of man, dog, rabbit and rat. *Clin Chim Acta* **30**(1):37-46, 1970.
22. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Biochem* **24**(2):127-139, 1986.
23. Michie DD, Booth RW, Conley M, McGuire HJ. The effect of quick freezing on the preservation of selected serum enzyme activities. *Am J Clin Pathol* **52**(3):329-34, 1969.
24. Skiba W, Bednarski W. Effect of temperature and storage time on the activity of some serum enzymes. *Wiad Lek* **27**(7):649-55, 1974.
25. Kubasik NP, Ricotta M, et al. Effect of duration and temperature of storage on serum analyte stability; examination of 14 selected radioimmunoassay procedures. *Clin Chem* **28**(1): 164-5, 1982.
26. Winstein S and Gordesky SE. transportation of specimens. In: Selected methods of clinical chemistry, Vol. 9. Faulkner WR, Ed. Washington, D.C., AACC, pp. 11-15, 1982.
27. Carothers JE, Kurtz NM, et al. Error introduced by specimen handling before determination of inorganic phosphate concentration in plasma and serum. *Clin Chem* **22**:1909, 1976.
28. Ono T, Kitaguchi K et al, Serum-constituents analyses; Effect of duration and temperature of storage of clotted blood. *Clin Chem* **27**(1):35-38, 1981.
29. Bayard SP. Another look at the statistical analysis of changes during storage of serum specimens. *Health Lab Sci* **11**(1):45-9, 1974.
30. Haeckel R. Statistical problems in comparative clinical chemistry analysis methods. *J Clin Chem Clin Biochem* **22**(3):265 - 70, 1984.
31. Haeckel R and Passing H. Statistical problems in comparative clinical chemistry analysis. Report of the workshop conference of the German Society for Clinical Chemistry, 12~13 January 1984, Bremen. *J Clin Chem Clin Biochem* **22**(3):265-70, 1985.
32. Kringler RO. Statistical procedures. In; Tietz textbook of clinical chemistry. Burtis CA, and Ashwood ER ed. W.B. Saunders Company, pp. 384-453, 1994.
33. 강부현, 손화영 등, Ktc; Sprague-Dawley 랫드의 혈액학·혈액생화학치의 자료분석. *한국실험동물학회지* **11**(2):141-145, 1995.
34. Caisey JD and King DJ. Clinical chemical values for some common laboratory animals. *Clin Chem* **26**(13):1877-1879, 1980.
35. Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, et al. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Tox Env Health* **18**:161-188, 1986.
36. Rossing RG, and Foster DM. The stability of clinical chemistry specimens during refrigerated storage for 24 hours. *Am J Clin Pathol* **73**(1):91-95, 1980.
37. 박용규, 송혜양. 반복측정 자료의 분산분석법(Repeated Measures ANOVA). 초판, pp. 21-40. 자유아카데미, 서울, 한국, 1991.