

임신토끼에 있어서 새로운 Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor(YHB6211)의 배·태자 발생독성평가

황재식 · 장호송 · 정은용 · 이수해 · 신지순 · 서동석 · 신장우 ·
안경규¹ · 최연식¹ · 남상윤 · 김대중 · 강종구*
충북대학교 수의과대학, ¹(주)유한양행 중앙연구소

Developmental Toxicity Study in the Embryos/Fetuses with a Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (YHB6211) in Pregnant Rabbits

Zai Zhi HUANG, Hu Song ZHANG, Eun Yong JUNG, Su Hae LEE, Ji Soon SIN, Dong Suk SEO,
Jang Woo SIN, Kyoung Kyu AHN¹, Yeon Shik CHOI¹, Sang-Yoon NAM,
Dae Joong KIM and Jong Koo KANG*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 48 Gaeshin-dong, Cheongju 361-763, Korea;
¹Yuhan Research Institute, Heungduk-gu, Gunpo 435-715, Korea

(Received November 10, 2001; accepted December 19, 2001)

Abstract – YHB6211, a newly developed recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, was administered at dose levels of 0, 3, 15, and 75 µg/kg/day intravenously to the pregnant New Zealand White rabbits (20 rabbits per group) during the organogenetic period, days 6 to 18 of gestation. All dams were subjected to Caesarian section on day 28 of gestation and their fetuses were examined for external, visceral, and skeletal abnormalities. No abnormalities in clinical signs, body weight changes, gross findings, mortality, and external appearance were found in all dams and fetuses exposed to 0, 3, and 15 µg/kg/day of YHB6211. However, in the group treated with 75 µg/kg/day of YHB6211, maternal body and uterine weights, fetal body weights and length, and the number of live fetuses were significantly decreased and further fetal mortality was remarkably increased. It is suggested that YHB6211 may have no side effect up to the dose level of 15 µg/kg/day, and there would be no teratogenicity for fetuses of rabbits up to 75 µg/kg/day even if it may have some toxic effects over 75 µg/kg/day for dams and fetuses of rabbits.

Key words □ Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (YHB6211), pregnant rabbit, teratogenicity

Granulocyte Colony-Stimulating Factor(G-CSF)는 골수의 과립백혈구 전구세포(precursor cell)와 줄기세포(stem cell)의 증식과 분화를 촉진하며(Metcalf와 Nicola, 1983; Nicola 등, 1983), 과립백혈구의 성숙단계에서의 기능활성화(탐식기능향상, Respiratory burst와 관련된 세포대사 촉진, 항체의존성세포독성 등)를 특이적으로 자극하는 당단백질성 조혈인자로 알려져 왔다(Nagata, 1994). 이 rhG-CSF(recombinant human granulocyte colony stimulating factor)는 방사선 치료에 의한 과립백혈구감소증, 재생불량성빈혈, 골수이형성증후군, 후천성 면역결핍증(AIDS) 등에 치료효과(Souza 등, 1986)가 있으며, 화학요법치중인 암환자에서 호중성백혈구감소 기간을 줄임

과 동시에 극심한 감염예방에 효과가 있다고 알려져 왔다(Morstyn 등, 1988). 또한 rhG-CSF는 항암치료에 의한 골수독성, 만성호중구감소증과 백혈병 후기에 나타나는 호중성백혈구감소증 치료(Lieschke와 Burges, 1992a, b) 외에 식도절제 수술을 받은 식도암 환자의 전염성 합병증 감소에도 사용되었다(Hübel 등, 2000). 또한 rhG-CSF는 자연감염된 C형간염 환자의 말초혈액 단핵세포를 이용한 *in vitro* 시험에서 항바이러스 작용이 있는 것으로 보고되어 있다(Julio 등, 1996). 한편 rhG-CSF는 재생불량성빈혈에 독성이 없고 효과가 있는 것으로 알려져 왔으나(Kojima 등, 1991), 최근 재생불량성 빈혈과 선천성 호중성백혈구감소증 환자에 장기적인 rhG-CSF의 치료는 오히려 골수발육불량성증후군(myelodysplastic syndrome), 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia)의 위험성을 증가시

*To whom correspondence should be addressed.

킬 수 있다는 보고도 있다(Imashuku 등, 1995; Smith 등, 1995).

상기와 같이 다양한 효과를 가진 Colony-Stimulating Factor(CSF)의 대량생산을 위하여 많은 노력을 하였으나, 1980년 중반까지도 자연상태의 소량의 CSF만이 추출할 수 있었다(Metcalf, 1984). 이후 유전자재조합기술과 유전자클로닝 기법의 진보에 따라 인간 G-CSF(hG-CSF)가 정제되고(Welte 등, 1985), hG-CSF의 cDNA를 클로닝하여 박테리아와 포유류동물의 세포에서 대량발현에 성공(Nagata 등, 1986) 함에 따라 rhG-CSF의 대량생산이 가능하게 되었다(Hideji 등, 1997).

이에 본 연구에서는 (주)유한양행에서 유전자 재조합기술을 이용하여 개발한 rhG-CSF(YHB6211)의 차세대에 대한 최적 형성 유무를 검토하기 위하여, 임신한 토끼의 배자착상에서 경구개가 폐쇄되는 시기까지 시험물질을 투여함으로써 배·태자 발생에 미치는 영향을 조사하여 사람에서의 안전성 확보를 위한 기초자료로서 활용하고자 “의약품 등의 독성시험기준”(식품의약품안전청고시 제1999-61호)에 준하여 수행하였다.

시험방법

시험물질

시험에 사용한 YHB6211(Lot No. GF-980Cl, M.W.: 18,799)은 (주)유한양행으로부터 수령하여 냉장 보관하였다. Tween 80(0.004%), D-mannitol(5%)을 첨가한 10 mM sodium acetate 희석액을 부형물질로 사용하였으며, 시험시 각 시험군의 투여물질은 (주)유한양행에서 투여농도별로 미리 조제한 시험물질과 희석액을 그대로 사용하였다.

시험동물 및 사육환경

본 시험에 사용된 New Zealand White (NZW)계 토끼는 연암원예축산대학(충남 천안)에서 번식·생산한 토끼를 사용하였다. 4~5개월령으로 체중이 3~4 kg되는 미경산 암컷 토끼를 자연교배시킨 그 다음날 입수하여 4~5일간 검역 및 순화과정을 거친 다음 일반상태를 관찰하여 건강한 동물만을 선택하여 본 시험에 사용하였다.

본 시험은 온도 $20 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 10~12회/hr, 조명시간 12 hr(07:00~19:00) 및 조도가 150~300 lux로 설정된 사육실에서 실시하였다. 시험동물은 순화 및 시험기간중 토끼용 스테인레스 사육상자(380W×490L×300H mm)에 각각 1마리씩 수용하였으며, 사료는 토끼·기니피그용 고품사료((주)에그리브랜드 퓨리나코리아, 펄텍)를, 음수는 상수도수를 자유섭취 시켰다.

시험군의 구성 및 투여방법

배·태자발생시험을 위하여 자연교배가 확인된 동물에

대하여 무작위로 군 당 20 마리씩(제왕절개시 임신확인) 선 발하였으며, YHB6211 3개 용량군 및 대조군 총 4군으로 설정하였다. 투여는 임상적용경로에 따라 정맥(귓바퀴정맥) 내 투여를 실시하였으며, 태자착상부터 경구개가 폐쇄되는 시기(임신 6일~18일)까지 매일 측정된 체중을 바탕으로 투여량을 산출하여 1일 1회 총 13일간 투여하였다.

투여량의 설정

rhG-CSF의 통상적인 임상용량이 2~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 인 것을 근거로 하여 저용량투여군은 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 설정하고 중용량 및 고용량투여군은 각각 15와 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 설정하였으며, 대조군은 sodium acetate 희석액만을 투여하였다. 모든 투여군의 투여액량은 1 ml/kg으로 설정하였다.

일반증상 관찰

교배시킨 날부터 부검시까지 매일 1회 일반증상, 유산, 조산, 난산 및 폐사 등의 이상유무를 관찰하였다.

체중 및 사료섭취량 측정

모체동물에 대하여 임신 0일, 6~18일, 24일 및 28일째에 각각 체중을 측정하였으며, 사료섭취량 역시 체중측정일에 사료를 급여한 후 다음날 잔량을 측정하였다. 단, 임신 28일째에는 제왕절개로 인하여 임신 27일째에 사료를 급여한 후 다음날 잔량을 측정하였다.

제왕절개

모든 시험동물은 임신 28일째(분만 2일전)에 pentobarbital sodium(Nembutal; 대일본제약, 일본)으로 마취한 후 제왕절개하여 자궁과 난소를 적출한 다음 임신황체수, 착상수, 흡수태자수, 사망태자수 및 생존태자수를 조사하여 착상율 및 태자사망율을 산출하였으며, 생존태자의 체중, 신장 및 태반무게를 측정하였다. 또한 태반조직만 있을 경우에는 초기흡수로, 태반과 태아조직이 모두 관찰될 경우에는 후기흡수로 분류하여 조사하였다. 그리고 왼쪽 자궁각의 난소쪽에서 각 태자를 채취하여 골격 및 내장검사에 사용하였다.

모체동물의 부검

모든 시험동물은 임신 28일째에 제왕절개한 후 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대하여 육안검사를 실시하였으며, 난소, 자궁, 심장, 흉선, 폐장, 간장, 비장, 신장 및 부신의 무게를 측정하였다.

태자의 형태학적 검사

생존태자에 대한 측정이 끝난 후 외표 이상유무를 관찰하였다. 그리고 전체 태자의 절반(짝수번호)을 절개하여 내부 장기 이상유무를 검사하였으며, 이때 태자의 성별을 식별

하여 성비를 산출하였다. 나머지 절반(홀수번호) 태자는 95% 에틸알코올에 1주간 고정된 후 변화시킨 Inouye방법(1976)에 따라 Alcian blue와 Alizarin red S의 이중염색법으로 골격표본을 제작하여 골격이상의 유무 및 골화상태에 대하여 검사하였다.

통계학적 분석

본 시험에서 얻어진 모체동물의 각종 자료와 태자의 형태학적 검사를 제외한 모든 자료는 일원배치분산분석(one-way ANOVA)과 Dunnett's t-test를 이용하여 대조군과 각 투여용량군 사이의 유의성 검정을 실시하였으며, 생존태자의 외형, 내부장기 및 골격의 형태학적 검사 자료는 각 시험군에 대한 발생빈도로 정리하였다.

결과 및 고찰

일반증상

시험 전 기간 동안 모든 시험물질 투여군과 대조군의 임신모체동물에서 특이한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 사망 및 폐사동물 역시 관찰되지 않았다.

체중변화

임신동물의 체중측정결과, 임신 6~14일에 시험물질투여군과 대조군은 거의 비슷한 수준으로 체중이 감소하였으나 각 군간에 유의한 체중차이는 인정되지 않았으며, 이후 15일부터는 다시 증가하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 임신 6일째부터 매일 실시한 체중측정, 보정 및 정맥투여에 의한 스트레스가 주요원인으로 사료된다. 임신 28일째에 실시한 체중측정결과, 대조군, YHB6211 3 및 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 투여군의 체중증가량은 임신 0 일째와 비교하여 낮은(평균 6.5%) 수준이었으나, 체중이 가장 낮았을 때와 비교시엔 체중증가

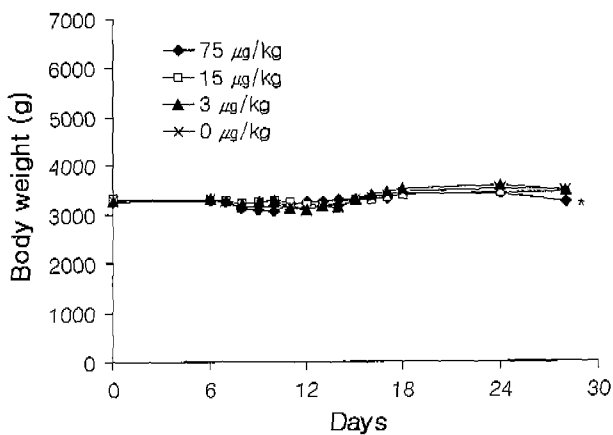


Fig. 1. Mean food consumptions in pregnant rabbits injected intravenously with YHB6211.

량이 각각 12.2%, 13.1% 및 9.8%로 정상 임신 NZW 토끼의 증체량(약 13%)과 비슷하였다(김 등, 2001). 특히 28일째 YHB6211 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 투여군의 체중은 대조군에 비해 유의($P < 0.05$)하게 낮았는데 이것은 임신후기에 사망태자 증가로 인한 자궁무게의 감소에 의한 것으로 사료된다.

사료섭취량의 변화

임신기간동안의 사료섭취량은 임신 0일째와 비교하여 전반적으로 낮은 경향을 나타냈다(Fig. 2). 임신 6~18일 사이에 일일 섭취량이 불규칙하게 나타났으나 시험물질 투여군과 대조군 사이에 통계학적인 유의성은 없었다. 임신기간 중 임신 6~10일의 사료섭취량이 가장 낮았는데 이것은 임신 6일부터 나타난 체중감소와 일치하며 체중측정, 보정 및 투여에 의한 스트레스 때문인 것으로 판단된다. 이러한 결과들은 김 등(2001)의 보고와도 일치하는 것이다.

부검소견 및 장기무게의 변화

임신 28일째에 실시한 부검 결과, 시험물질 투여와 관련된 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다. 그러나 장기무게 측정결과, YHB6211 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 투여군의 절대 및 체중에 대한 상대자궁무게가 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며($P < 0.01$), 이것은 배자흡수, 사망태자수의 증가 및 생존태자수의 감소에 기인하는 것으로 사료된다. 그 밖의 기타 장기무게에서 시험물질 투여와 관련한 변화는 관찰되지 않았다.

제왕절개 검사결과

제왕절개 검사에서 황체수, 착상수 및 착상율은 시험물질 투여와 관련하여 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table II). 그러나 YHB6211 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 투여군에서 생존태자의 체중이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며, 75 $\mu\text{g}/$

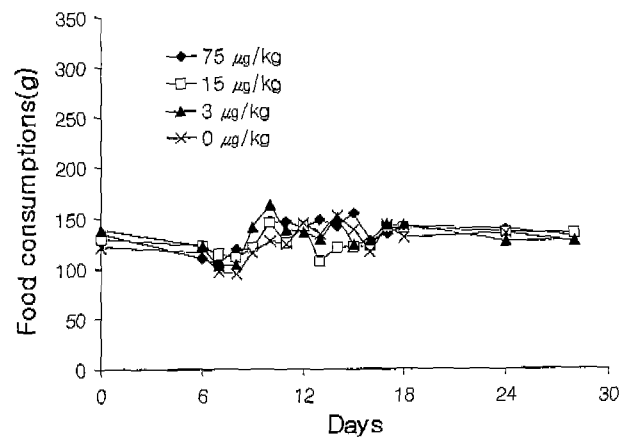


Fig. 2. Mean body weight changes in pregnant rabbits injected intravenously with YHB6211.

Table I. Absolute and relative organ weights on day 28 of gestation

Dose	0 µg/kg	3 µg/kg	15 µg/kg	75 µg/kg
Ovary (g)	0.50 ± 0.13	0.51 ± 0.12	0.49 ± 0.12	0.46 ± 0.12
per body wt.(g%)	0.014 ± 0.004	0.014 ± 0.003	0.014 ± 0.003	0.014 ± 0.003
Uterus (g)	378.51 ± 19.7	393.1 ± 84.1	401.3 ± 127.6	253.8 ± 143.2**
per body wt.(g%)	10.78 ± 3.41	11.01 ± 1.95	11.30 ± 3.19	7.43 ± 4.10**
Thymus (g)	2.42 ± 0.63	2.20 ± 0.82	2.28 ± 0.84	2.12 ± 0.56
per body wt.(g%)	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02
Heart (g)	7.03 ± 0.80	7.12 ± 0.75	6.95 ± 0.89	6.73 ± 0.67
per body wt.(g%)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02
Liver (g)	83.45 ± 9.66	85.99 ± 9.77	77.18 ± 15.31	85.12 ± 12.33
per body wt.(g%)	2.40 ± 0.28	2.42 ± 0.27	2.22 ± 0.28	2.58 ± 0.31
Spleen (g)	1.62 ± 0.47	1.78 ± 0.53	1.58 ± 0.43	1.97 ± 0.83
per body wt.(g%)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.03
Kidneys (g)	8.81 ± 1.16	8.80 ± 0.80	8.21 ± 1.04	9.11 ± 1.17
per body wt.(g%)	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.05
Adrenal glands (g)	0.18 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.19 ± 0.05	30.20 ± 0.04
per body wt.(g/%)	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.002	0.006 ± 0.002

Value are means ± S.D. of 20 rabbits.

wt.: Weights

**Significantly different from the control value (P<0.01).

Table II. Mean uterine implantation and fetal data on day 28 of gestation

Dose	Control	3 µg/kg	15 µg/kg	75 µg/kg
Pregnant animals	20	20	20	20
Corpora lutea	10.10 ± 1.71	10.40 ± 2.60	10.65 ± 1.87	10.60 ± 2.56
Implantation	8.30 ± 1.56	8.55 ± 2.31	9.45 ± 1.85	9.05 ± 2.35
Implantation rate ^{a)}	83.86 ± 16.38	83.25 ± 15.61	89.47 ± 14.16	86.07 ± 12.38
Resorption : Early	10	3	15	39
Late	5	7	4	26
Dead fetuses	1	1	5	12
Total Fetal death (resorptions+dead fetuses)	16	11	24	77
Fetal mortality ^{b)}	10.20 ± 23.64	5.80 ± 9.26	12.11 ± 23.34	45.12 ± 36.54**
Live fetuses : Total	150	160	165	104
Live fetuses per litter	7.50 ± 2.44	8.00 ± 2.15	8.25 ± 2.71	5.20 ± 3.89*
Male/Female (ratio)	72/78 (0.92)	82/78 (1.05)	82/83 (0.99)	45/59 (0.76)
Body weights(g): Male	34.47 ± 5.31	33.39 ± 5.38	32.35 ± 4.81*	26.25 ± 4.73**
Female	33.56 ± 4.33	32.80 ± 5.71	31.48 ± 4.92**	25.74 ± 5.44**
Body length (cm)	8.65 ± 0.61	8.69 ± 0.58	8.67 ± 0.52	8.00 ± 0.67**
Placental weight (g)	3.59 ± 0.81	3.33 ± 0.86**	3.43 ± 0.94	3.35 ± 1.02*

Values are Mean ± S.D. of 20 rabbits

^{a)}(No. of implantations/No. of corpora lutea) × 100.

^{b)}(No. of fetal death/No. of implantations) × 100.

*Significantly different from the control value (P<0.05).

**Significantly different from the control value (P<0.01).

kg/day 투여군에서는 재흡수수, 사망태자수 및 태자사망율이 통계학적으로 유의하게 증가하였으며(P<0.01), 동복태자수(P<0.05), 암·수 태자의 체중 및 신장도 현저하게 감소하였다(P<0.01). YHB6211 15 µg/kg/day 투여군에서 암·수 태자의 체중이 대조군에 비해 통계학적으로는 유의하게

감소하였지만 본 연구실 기존의 결과(강 등, 1996)와 비슷하였다. 또한 YHB6211 15와 75 µg/kg/day 투여군의 태반 무게가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으나 큰 차이는 없었으며, 특히 75 µg/kg/day 투여군의 태반무게 표준편차가 큰 것은 태자의 재흡수수 및 사망태자수가 증가한 결과

Table III. External and visceral examination of fetuses

Dose	Control	3 /kg	15 /kg	75 /kg
Pregnant animals	20	20	20	20
External alterations: Fetuses examined	150	160	165	104
Abnormalities incidence (%)	1.3	2.5	1.2	3.8
Cleft palate	1	1	2	4
Synpodia	0	1	0	0
Limb hyperflexion	1	0	0	0
Ectrodactylia	0	1	0	0
Short tail	0	1	0	0
Visceral alterations: Fetuses examined	75	81	82	53
Malformations incidence (%)	6.7	8.6	2.4	9.4
Enlarged ventricular chamber	1	2	1	2
Dilated renal pelves	4	5	1	3
Skeletal alterations: Fetuses examined	75	79	83	51
Malformations incidence (%)	5.3	3.8	3.6	2.0
Detached rib	1	0	0	0
Misshapen rib	0	1	0	0
Sternebrae asymmetry	2	2	3	1
Misshapen caudal vertebrae	1	0	0	0
Supernumerary 13 th rib (%)	62.7	65.8	54.2	58.8
Ossification centers: Sternebrae	5.8 ± 0.4	5.7 ± 0.4	5.7 ± 0.5	5.8 ± 0.5
Sacral and caudal vertebrae	19.5 ± 0.6	19.5 ± 0.5	19.5 ± 0.5	19.6 ± 0.6
Metacarpals in both forelimbs	9.9 ± 0.3	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
1 st phalanges in both forelimbs	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
2 nd phalanges in both forelimbs	6.6 ± 1.1	6.8 ± 1.3	6.7 ± 1.4	6.8 ± 1.1
3 rd phalanges in both forelimbs	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	9.9 ± 0.4
Metatarsals in both hindlimbs	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0
1 st phalanges in both hindlimbs	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0
2 nd phalanges in both hindlimbs	7.8 ± 0.6	7.9 ± 0.4	7.7 ± 0.7	7.7 ± 0.7
3 rd phalanges in both hindlimbs	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0

와 일치하였다. 태자의 체중과 태반무게는 실험실이나 동물의 공급원에 따라 다소 차이가 있는 것으로 알려져 있다(平澤和男·竹入修仁, 1981; 강종구 등, 1996; 김종춘 등, 2001; 이영순 등, 1997). 태자의 성비에서는 YHB6211 투여군과 대조군 사이에 유의한 차이가 인정되지 않았다. 이상의 검사항목에서 YHB6211 3 µg/kg/day 투여군 및 YHB6211 15 µg/kg/day 투여군은 대조군에 비하여 특별한 차이가 관찰되지 않았으며, 김 등(2001)이 보고한 기초자료와 유사하였다. 그러나, YHB6211 75 µg/kg/day 투여군은 황체수, 착상수 및 착상율을 제외한 모든 제왕절개 검사항목에서 대조군에 비하여 현저한 차이를 나타냈다. 특히 태자사망율은 대조군에 비해 34.9% 증가하였고, 평균산자수는 30.7%, 태자체중은 23.5%, 태자신장은 7.5% 감소되었다. 이상의 결과로 보면 YHB6211 75 µg/kg 투여는 임신 토끼에서 배·태자의 사망을 초래하며, 생존태자의 성장과 발육에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

태자의 형태학적 검사소견

태자의 형태학적 검사결과를 Table III에 제시하였다. 태자의 외형검사서 대조군은 구개열(cleft palate) 1례, 사지만곡(limbs hyperflexion; Fig. 3A) 1례가 관찰되어 정상적으로 1.3%의 기형율(deformity rate)을 나타냈으며, YHB6211 3 µg/kg/day 투여군은 구개열 1례, 후지융합증(symypodia; Fig. 3B) 1례, 발결손증(ectrodactylia) 1례와 짧은 꼬리(short tail) 1례가 관찰되어 2.5%의 기형율을 보였다. 또한, YHB6211 15 µg/kg/day 투여군과 YHB6211 75 µg/kg/day 투여군에서는 구개열이 각각 2례와 4례가 관찰되어 1.2%와 3.8%의 기형율을 나타냈다.

태자의 내부장기검사결과 대조군에서는 심실확대(enlarged ventricular chamber) 1례, 신장갈대기 확장(dilated renal pelvis) 4례가 관찰되어 6.7%의 변이율(variations)을 보였으며, YHB6211 3 µg/kg/day 투여군은 심실확대 2례와 신우확장 5례로써 변이율 8.6%, YHB6211 15 µg/kg/day 투여

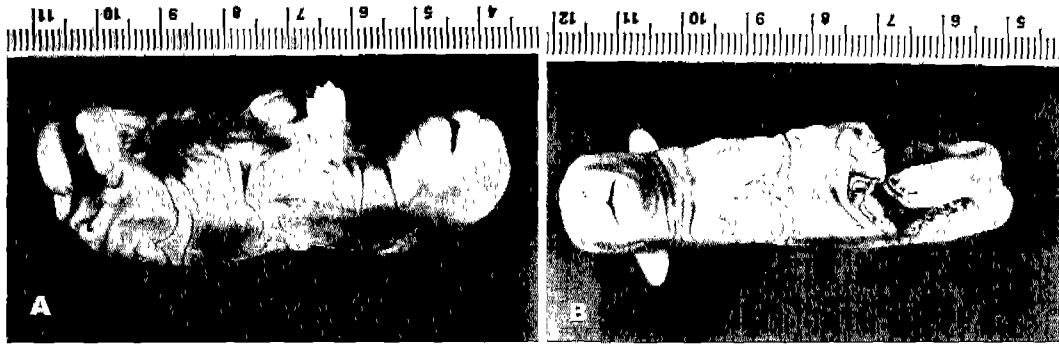


Fig. 3. External alterations in fetuses from pregnant rabbits injected intravenously with YHB6211. A: Limb hyperflexion in the control, B: Symphysis in YHB6211 3 µg/kg/day group.

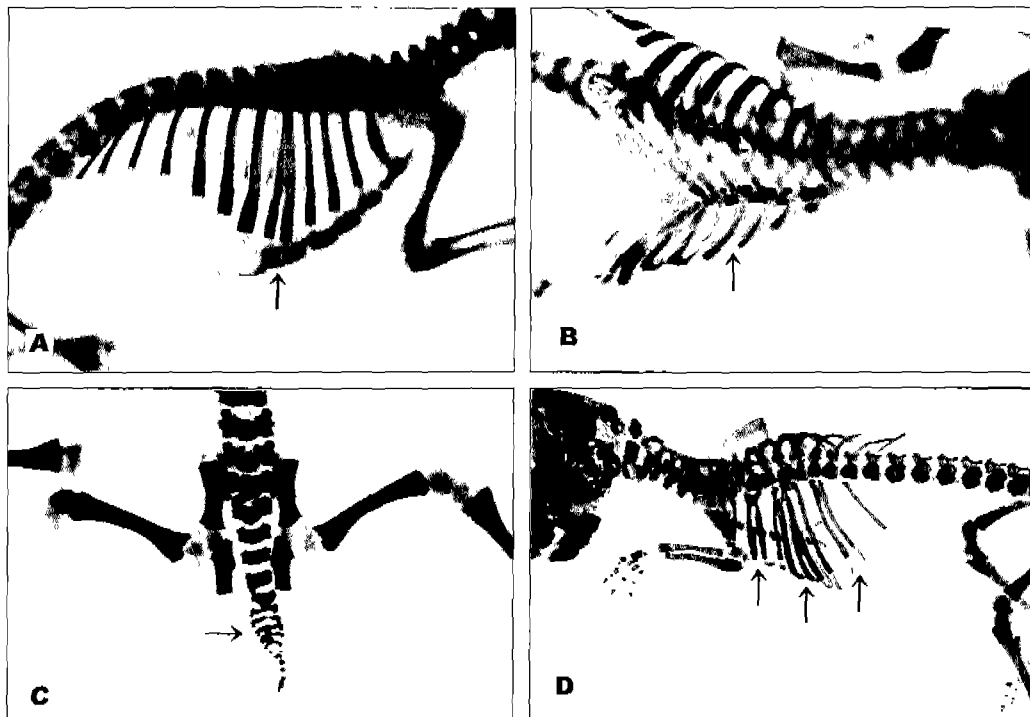


Fig. 4. Skeletal alterations in fetuses from pregnant rabbits injected intravenously with YHB6211. A: Detached rib in the control, B: Sternal asymmetry in the control, C: Misshapen caudal vertebrae in the control, D: Misshapen rib in YHB6211 3 µg/kg/day group.

군은 심실확대 1례와 신우확장 1례로써 변이율 2.4%, YHB6211 75 µg/kg/day 투여군은 심실확대 2례와 신우확장 3례로써 변이율 9.4%를 보였다.

태자의 골격검사에 있어서 대조군에서는 늑골분지(detached rib; Fig. 4) 1례, 흉골비대칭(sternbrae asymmetry; Fig. 4) 2례와 꼬리뼈기형(misshapen caudal vertebrae; Fig. 4) 1례가 관찰되어 기형율 5.3%를 보였으며, YHB6211 3 µg/kg/day 투여군에서는 늑골기형(misshapen rib, Fig. 4) 1례와 흉골비대칭 2례가 관찰되어 기형율이 3.8%, YHB6211 15 µg/kg/day 투여군과 YHB6211 75 µg/kg/day 투여군에서는 흉골비대칭이 각각 3례와 1례가 관찰되어 기형율이 3.6%와 2.0%로 나타났다. 그리고 제13늑골

(supernumerary 13th rib)의 발생빈도는 각 시험군에서 54.2%~65.8% 사이에 나타나 큰 차이를 보이지 않았으며, 태자의 골격발육을 평가할 수 있는 흉골수, 천골과 꼬리뼈수, 사지말단뼈의 숫자에서도 각 시험군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

태자의 외형검사, 내부장기검사 및 골격검사에 있어서 모든 시험군의 이상(기형율과 변이율)빈도는 다양하게 나타났으나, 큰 차이는 인정되지 않았다. 이 3가지 검사에서의 이상발생빈도를 종합하면 대조군, YHB6211 3, 15 및 75 µg/kg/day 투여군에서 각각 13.3%, 14.9%, 7.2% 및 14.2%의 발생율을 나타냈으며 YHB6211 15 µg/kg/day 투여군에서 가장 낮은 발생율을 보였다. 이상의 결과를 보면 YHB6211

75 µg/kg/day 투여에서도 태자의 형태학적 변화는 유발되지 않는 것으로 사료된다.

결 론

이상의 결과를 종합해 보면 YHB6211은 New Zealand White 토끼의 기관형성기에 정맥으로 투여하였을 때, 3과 15 µg/kg/day 투여용량에서는 모체나 태자의 발육 및 기형 발생에 영향을 미치지 않으며, 75 µg/kg/day 투여용량에서는 모체체중의 감소, 태자의 사망률증가 및 발육지연을 초래하지만 태자의 기형은 유발하지 않는 것으로 판단된다.

감사의 말씀

이 연구에 사용된 Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor(YHB6211)를 제공하여 준 (주)유한양행에 감사사를 드립니다.

참고문헌

- Hideji, T., Yoshihiro, T., Kyoko, S., Yuji Y., Kenji, O. and Katsuhiko, A. (1997). Three types of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor have equivalent biological activities in monkeys. *Cytokine* **9**, 360-369.
- Hüel, K., Mansmann, G., Schäfer, H., Oberhäuser, F., Diehl, V. and Engert, A. (2000). Increase of anti-inflammatory cytokines in patients with esophageal cancer after perioperative treatment with G-CSF. *Cytokine* **12**, 1797-1800.
- Imashuku, S., Hibi, S., Kataoka-Morimoto, Y., Yoshihara T., Ikushima, S., Morioka, Y. and Todo, S. (1995). Myelodysplasia and acute myeloid leukaemia in cases of aplastic anaemia and congenital neutropenia following G-CSF administration. *Br. J. Haematol.* **89**, 188-190.
- Inouye, M. (1976). Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S. *Cong. Anom.* **16**, 171-173.
- Julio, M., Sonia, N., Juan, A. Q. and Vicente, C. (1996). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor reduces hepatitis C virus replication in mononuclear cells from chronic hepatitis C patients. *Cytokine* **8**, 313-317.
- Kojima, S., Fukuda, M., Miyajima, Y., Matsuyama, T. and Horibe, K. (1991). Treatment of aplastic anemia in children with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **77**, 937-941.
- Lieschke, G. J. and Burgess, A. W. (1992a). Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* **327**, 28-35.
- Lieschke, G. J. and Burgess, A. W. (1992b). Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* **327**, 99-106.
- Metcalf, D. (1984). *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors.* Amsterdam: Elsevier.
- Metcalf, D. and Nicola, N. A. (1983). Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. *J. Cell. Physiol.* **116**, 198-206.
- Morstyn, G., Campbell, L., Souza, L. M., Alton, N. K., Keech, J., Green, M., Sheridan, W. and Metcalf, D. (1988). Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet* **26**, 667-672.
- Nicola, N. A., Metcalf, D., Matsumoto, M. and Mohnson, G. R. (1983). Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: Identification as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J. Biol. Chem.* **258**, 9017-9023.
- Nagata, S. (1994). Granulocyte colony stimulating factor and its receptor. In *the Cytokine Handbook*, 2nd ed., Thompson, A., Academic Press, London. pp. 371-385.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Maziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. and Ono, M. (1986). Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* **319**, 415-418.
- Souza, L. M., Boone, T. C., Gabrilove, J., Lai, P. H., Zsebo, K. M., Murdock, D. C., Chazin, V. R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K. K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M. A. S., Mertelsmann, R. and Welte, K. (1986). Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* **232**, 61-65.
- Smith, O. P., Reeves, B. R., Kempski, H. M. and Evans, J. P. (1995). Kostmann's disease, recombinant HuG-CSF, monosomy 7 and MDS/AML. *Br. J. Haematol.* **91**, 150-153.
- Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gabrilove, J., Levi, E., Mertelsmann, R. and Moore, M. A. S. (1985). Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1526-1530.
- 平澤和男・竹入修仁 (1981). SPF ウサギ (KBL:JW) のノーマルデータの紹介. *実験動物技術* **16**, 103-109.
- 강종구, 박학수, 이해영, 남춘자, 유영경, 조영만, 유제원, 이종성 (1996). UTI의 생식독성연구: 토끼에 대한 최기형성 시험. *한국실험동물학회지* **12**, 275-280.
- 김종춘, 배주현, 김일환, 정문구, 한상섭 (2001). New Zealand White 토끼의 발생독성학적 기초자료연구. *한국실험동물학회지* **17**, 47-58.
- 식품의약품안전청 (1999). “의약품 등의 독성시험기준”, 식품의약품안전청고시 제1999-61호.
- 이영순, 강경선, 신동진, 김형욱, 조재진, 김배환 (1997). 토끼에서 LBD-009의 최기형성시험. *한국실험동물학회지* **13**, 101-103.