

유전자 재조합 Human Factor VIII(GC- γ AHF)의 안전성에 관한 연구

김민영¹ · 손장원¹ · 신민기¹ · 배미옥¹ · 김현우¹ · 최진혁¹ · 김준성¹ · 문서현¹ · 김정현¹
이소라¹ · 변종환² · 변태호² · 김정현² · 조명행^{1*}
¹서울대학교 수의과대학 독성학교실, ²(주)녹십자

Safety Evaluation of Recombinant Human Factor VIII(GC- γ AHF)

Min Young Kim¹, Jang Won Son¹, Min Ki Shin¹, Mi Ok Bae¹, Hyun Woo Kim¹,
Jin Hyuk Choi¹, Joon Seong Kim¹, Seo Hyun Moon¹, Jung Hyun Kim¹, Sora Lee¹,
Jong Hwan Byun², Tae Ho Byun², Jeong Heon Kim² and Myung Haing Cho^{1*}

¹Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

²Korea Green Cross Pharmaceutical Company

(Received February 20, 2002)

(Accepted march 14, 2002)

ABSTRACT : This study was conducted to evaluate the safety of a recombinant human factor VIII (GC- γ AHF) manufactured by Korea Green Cross Company with different technology according to the Regulation of Korean Food and Drug Administration (1998. 12. 3). In acute toxicity test, both genders of Sprague-Dawley rats and Beagle dogs were administered intravenously with GC- γ AHF of three doses (3,125, 625 and 125 IU/kg), and single dose of 3,125 IU/kg, respectively. No dead animal and abnormal autopsy findings were found in control and GC- γ AHF treated group. Therefore, the 50% lethal dose (LD₅₀) of GC- γ AHF was considered to be higher than 3,125 IU/kg in rats and dogs. In the four weeks repeated intravenous toxicity study, GC- γ AHF was administrated intravenously to both genders of rats and dogs with 3 doses (500, 150, 50 IU/kg). There were neither dead animals nor significant changes of body weights during the experimental period. In addition, no significant GC- γ AHF related changes were found in clinical sign, urinalysis and other finding. Statistically changes were observed in hematological, biochemical and organ weight parameters of treated groups; however, these changes were not dose dependent. No histopathological lesions were observed in both control and treated animals. Above data suggest that no observed adverse effect level of test materials in rats and dogs might be over 500 IU/kg/day in this study. In ocular irritation test, any injury on iris, conjunctiva and cornea in rabbits were not observed. The acute ocular irritation index (A.O.I.), mean ocular irritation index (M.O.I.) and Day-7 individual ocular irritation index (I.O.I.) of GC- γ AHF were 0. In the primary skin irritation test, the primary irritation index (P.I.I.) of GC- γ AHF were 0. Therefore, the GC- γ AHF is considered not to have the primary skin and eye toxicity in rabbits. In active systemic anaphylaxis (ASA) test, GC- γ AHF and GC- γ AHF emulsified with Freund's complete adjuvant (FCA) did not induce any symptom of anaphylactic shock in guinea pigs. In passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test, after sensitization with antisera of GC- γ AHF sensitized mice, blue spots were observed on the hypodermis of back of rats, but diameter of each spot was smaller than 5 mm in each test groups except the positive control group. Based on the results of this study, GC- γ AHF is not considered to have any antigenic potential. In conclusion, at levels of up to 500 IU/kg, GC- γ AHF did not produce treatment-related toxicity under the conditions of these acute-, four week repeated-toxicity, primary skin and eye toxicity, and antigenicity test.

Key Words : GC- γ AHF, Recombinant human factor VIII, Acute and repeated toxicity, Ocular irritation, Primary skin irritation, Active systemic anaphylaxis, Passive cutaneous anaphylaxis

*To whom correspondence should be addressed

I. 서 론

혈우병 A(hemophilia A)는 주로 남자아이들에게 나타나는 특이적인 유전질환으로 100,000 명당 10~20명에게 나타나는데, 이 상대적으로 높은 발생빈도는 factor VIII 유전자의 돌연변이에 기인한다. 또한 혈우병 A의 높은 빈도는 X-염색체상의 factor VIII 유전자의 위치상의 결과로 야기되는 상염색체상의 응고 장애와 비유되기도 한다. 즉, 한 유전자는 다른 유전자에게 영향을 끼치고 그 결과 남성에서 질병상태를 유발한다는 것이다(Jane 등, 1984).

하지만 아직까지 이 혈우병 A는 그 근본적인 원인 치료가 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 지금까지 혈우병 A의 치료는 factor VIII 단백질의 정맥주사에 의존하고 있으며, 상용화된 factor VIII 제제는 주로 인체의 혈장에서 추출한 것으로 이는 AIDS 바이러스 및 B형 혹은 C형 간염 바이러스 등의 감염과 같은 위험성을 내포하고 있고, 치료를 받고 있는 혈우병 A 환자의 약 12%에서는 제조과정 중에 발생한 변형단백질에 대한 항체가 형성되어 factor VIII의 효과가 없어질 뿐만 아니라 순도가 낮고 factor VIII의 활성도가 불안정하기 때문에 장기보존에 어려움이 있어 왔다(Donogh 등, 1988; Joyce 등, 1996). 따라서 factor VIII cDNA를 viral promotor를 이용한 벡터에 삽입시켜 CHO cell이나 BHK cell 등을 이용하여 생산되고 있다. 하지만 최근 (주)녹십자 연구소에서는 위에서 언급한 여러 문제를 해결함과 동시에 높은 효율성을 지닌 recombinant human factor VIII인 GC- γ AHF를 유전공학적 방법에 의하여 생산하였다. 즉, factor VIII의 heavy chain과 light chain을 서로 다른 발현 벡터를 이용하여 발현시키고, 발현된 factor VIII의 안정화와 발현양에 영향을 주는 von Willebrand Factor(vWF)의 발현 벡터까지 도입하여 한 세포주에서 활성을 가지는 factor VIII과 vWF를 동시에 발현시킴으로써 안정화된 GC- γ AHF를 생산하게 된 것이다. 따라서 본 연구에서는 (주)녹십자가 새로 개발한 GC- γ AHF의 독성유무를 규명하기 위하여 식품의약품안전청고시 의약품 등의 독성시험기준 제 1998-116호(1998. 12. 3)에 준하여 단회 및 반복투여독성, 국소독성, 항원성을 평가하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질은 (주)녹십자에서 GC- γ AHF(recombinant human factor VIII)를 제공받아 사용하였다. GC- γ AHF은 유백색의 분말제재로서 기밀용기에 포장하여 냉장 보관하였고, 각 시험개시 전 무균작업대 내에서 혼합하여 0.2 μ m 필터(Millipore, USA)로 여과시켜 각 농도별로 원액을 만들어

사용하였다. 단회 및 반복투여독성시험에서는 녹십자(주)에서 제공받은 상기의 시험물질을 투여직전 각 바이알에 표시된 양만큼 주사용 멸균생리식염수로 용시제조하여 사용하였으며, 투여직전에 측정된 체중에 따라 시험물질의 투여량을 산출하여 각 시험동물에 정맥 투여하였다. 안구 및 피부자극시험에서는 투여직전 각 vial에 표시된 양만큼 멸균생리식염수로 용해한 후 제모된 피부와 안점막에 투여하였으며 대조군에는 동량의 멸균생리식염수를 투여하였다. 항원성시험에서 양성대조물질로는 난알부민(ovalbumin, Sigma, USA)을 멸균생리식염수에 용해한 후 면역보조제와 동량씩 혼합하여 사용하였으며, 음성대조군으로는 용매인 멸균생리식염수를 사용하였다. 면역보조제로는 Freund's complete adjuvant(FCA, Gibco, USA)를 사용하였다.

2. 시험동물 및 사육조건

단회 및 반복투여에 사용한 시험동물은 SPF(특정병원체부재) Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 (주)한림실험동물에서 구입하여 약 1주일간 순화적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 배기 10~12 회, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 플라카보네이트 사육상자(260 W \times 420 L \times 180 H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 물과 사료는 자유로이 공급하였다. 또한, 암·수 각각 5개월령된 비글개(Marshall Farms, USA)를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 실험실에 약 2개월간 순화시킨 후 그 기간 중에 일반증상을 관찰하여 건강한 동물을 선택하여 랫드사육과 동일한 환경조건으로 전 시험기간 동안 철망 케이지(60 \times 40 \times 45 cm)에 1마리씩 넣어 시험하였으며, 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 투여량을 적은 tag를 붙였다. 사료는 개 사육용 고품사료를, 음수는 상수도수를 자유 섭취시켰다.

안구 및 피부자극시험에서는 5~6주령(2.0~3.0 kg)의 New Zealand White 수컷 토끼로서 비성호흡, 설사, 귀 진드기 감염 등의 유무를 확인한 후 (주)한림실험동물에서 구입하여 사용하였다. 모든 동물은 입수후 약 1주일간 동물실에서 순화시키면서 일반상태를 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 사육실은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기회수 12~13회/hr, 12시간 명암주기, 조도 150~280 Lux 조건하에 유지하였으며, 순화기간 및 시험기간 중에 토끼는 3단 사육상자에 배열된 스테인레스 스틸 사육케이지(42 \times 50 \times 31 cm)에 1마리씩 수용하였다. 토끼의 순화기간 및 시험기간 중에는 실험동물용 고품사료를 섭취시켰으며, 음수는 상수도수를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

항원성시험에서는 4주령의 Hartley계 웅성 기니픽, 6주령의 Balb/c계 웅성 마우스, 5주령의 웅성 Sprague-Dawley 계 랫드를 (주)한림실험동물에서 구입하여 사용하였다. 모든 실험동물은 본 실험실의 사육실 조건하에서 일주일 동안 순화시킨 후 사용하였고, 시험기간동안 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 광주기 12 hr, 조도 300~500 Lux로 유지하였으며, 폴리카보네이트 사육상자에 넣어 사육하였다. 사료와 음수는 자유로이 공급하였으며, 시험군의 편성은 체중을 지표로 한 무작위 추출법에 의해 실시하였다. 모든 실험동물의 사용은 미국 NIH 안내지침(NIH publication No. 86-23, revised 1985)에 따른 서울대학교의 실험동물 관리지침에 따라 실시하였다.

3. 단회투여독성시험

랫드를 이용한 단회투여독성시험의 경우, 각 군은 암수 각 5마리씩 10마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 사람임상용량 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 3단계의 등비용량으로 고용량군(3,125 IU/kg), 중용량군(625 IU/kg) 및 저용량군(125 IU/kg)으로 대조군은 무처리 대조군으로 하여 1회 정맥투여하였고, 1주간 관찰하였다. 비글개를 이용한 단회투여독성시험의 경우, 각 군당 비글개 암수 각 3마리씩 6마리로 구성하였으며, 시험물질인 GC- γ AHF 투여용량은 랫드에서의 단회투여독성시험 최고 용량인 3,125 IU/kg을 비글개 암수 1마리씩 1회 정맥투여하고 1주간 관찰하는 예비실험을 실시한 결과, 폐사가 관찰되지 않아 이를 고용량군으로 설정하였으며, 대조군은 무처리 대조군으로 하여 임상예정경로로 1회 정맥투여하고 2주간 관찰하였다. 정맥투여는 23 G3/4" 스킴프베인셋트(녹십자)를 이용하여 전완정맥에 투여당일의 체중을 기준으로 투여량을 결정한 후 투여하였다. 모든 실험동물에 대한 임상증상은 투여당일에는 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간, 투여 1일부터 7일까지는 1일 1회 이상씩 일정시간에 관찰하여 7일 동안 운동성, 외관, 자율신경증상, 중독 증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다. 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여당일(0일), 5일, 10일 및 부검시에 체중을 측정하였다. 시험중 폐사동물은 그때마다 부검을 실시하였고, 시험 종료시 생존동물은 에테르 마취로 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 육안적 이상장기와 조직은 10% 중성포르말린에 고정하였다. 시험물질에 대한 LD₅₀는 Litchfield & Wilcoxon법으로 산출하며, 그 외 본 실험에서 얻어진 체중 등의 자료에 대한 통계학적 분석은 Student's t-test 및 Dunett test를 이용하여 대조군과의 균간 유의성을 검정하였다.

4. 반복투여독성시험

랫드를 이용한 4주간 반복투여시험의 경우, 각 군은 암수 각 10마리씩 20마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 예상임상용량(5 IU/kg)의 100, 10, 1 배수인 고용량군(500 IU/kg), 중용량군(150 IU/kg) 및 저용량군(50 IU/kg)으로 하였고, 대조군은 무처리 대조군으로 하여 1일 1회, 주 7회, 4주간 정맥투여하였다. 비글개를 이용한 4주간 반복투여시험에서는 각 군을 암수 각 3마리씩 6마리로 구성하였고, 비글개에서는 예비실험 결과 GC- γ AHF의 실제 최소임상용량(100 IU/kg)의 5배인 500 IU/kg/day에서 투여 후 아무런 증상이 나타나지 않은 바, 이 용량을 최고용량으로 하고 공비 $\times 0.1$ 로 중용량군(50 IU/kg) 및 저용량군(5 IU/kg)의 3개 용량을 설정하였으며, 대조군은 무처리 대조군으로 하여 주 7회 4주간 정맥 투여하였다. 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 일정시간에 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망발현유무를 관찰하였고 시험동물의 체중 측정, 시험물질 투여전, 부검당일 및 시험기간 중 주 2회 측정하였다. 사료섭취량 및 물섭취량은 사육상자별로 당일 급여 및 급수 총량과 익일 잔량을 시험개시 후 4주간 매주 2회씩 측정하였다. 시험에 사용된 모든 실험동물 즉, 총 80수의 Sprague Dawley계 랫드와 총 24수의 비글개를 4주간 시험물질 투여후에 부검을 실시하였다. 부검 하루 전에 절식시키고 부검직전에 체중을 측정하였으며, ether 마취하에 방혈치사한 후 모든 장기에 대하여 육안소견을 관찰하였다. 또한 시험물질 투여 후 부검한 전 동물에 대하여 뇌, 뇌하수체, 악하선, 갑상선, 흉선, 폐, 심장, 간, 췌장, 비장, 신장, 부신, 전립선, 정소 및 난소의 중량을 측정하였다. 부검전 1일간 절식시킨 후 부검시에 ether로 마취시켜 복부대동맥에서 채혈하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액은 EDTA로 항응고처리하고 자동혈구계산기(HI system, Technicon Co. Ltd., USA)을 이용하여 혈소판수(PLT, platelet), 백혈구수(WBC, white blood cell count), 적혈구수(RBC, red blood cell count), 혈색소량(HGB, hemoglobin concentration), 적혈구용적(HCT, hematocrit), 평균적혈구용적(MCV, mean corpuscular volume), 평균적혈구혈색소량(MCH, mean corpuscular hemoglobin), 평균적혈구혈색소농도(MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), 혈액응고시간(PT, prothrombin time; PTT, partial prothrombin time) 등을 측정하였다. 혈액 생화학적 검사는 혈액을 냉장고에 2시간 정도 보관한 후 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 자동 혈청 생화학분석기(Express 550, Thermo electric corporation, USA)를 이용하여 혈청 내 총단백(TPOT, total protein), 알부민(ALB, albumin), 총빌리루빈(TBILI, total bilirubin), 트랜스아미나제(AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase),

알카리포스파타제(ALP, alkaline phosphatase), 콜레스테롤(CHOL, cholesterol), 포도당(GLU, glucose), 트리글리세라이드(TRIGLY, triglyceride), 중성인(NP, neutral lipid), 크레아티닌(CREAT, creatinine), 요소질소(BUN, blood urea nitrogen), 칼륨(K, potassium), 칼슘(Ca, calcium), 인(P, phosphorus), 염소(Cl, chloride), 글로부린(GB, globulin), A/G 비(A/G ratio) 등을 측정하였다. 또한 ALT, ALP 등은 반응온도에 따라 검사결과가 달라질 수 있으므로 30°C를 기준으로 하여 측정하였다. 또한 부검한 전 동물에 대하여 다음의 장기를 10% 중성포르말린으로 고정시켜 대조군 및 최고 용량군에서는 심장, 간장, 비장, 신장, 부신, 정소, 난소, 뇌, 뇌하수체, 흉선 및 전립선 등 병변이 있는 장기를 전례에 대해서 병리학적 검사를 실시하고 저용량군 및 중간용량군에서는 육안적 부검소견이 인정되는 장기에 대해 병리조직검사를 시행하였다. 노검사는 부검전일체뇨하여 pH, RBC, protein, glucose, ketone체, urobilinogen, specific gravity를 검사하기 위해 노 검사용 시험지(MULTISTIX, AMES사 U.S.A.)에 뇨를 침적시켜 측정하였다. 투여기간 전 및 투여기간 중 1회 각 군 모두에 대하여 안과학적 검사를 실시하였다. 검사는 육안 및 점안경으로 실시하고 전안부, 중간투광체 및 안저의 각각에 대하여 실시하였다. 본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SPSS(Statistical Package for Social Sciences)를 이용하여 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군사이의 유의수준 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 로 Student's t-test 또는 Dunnet test를 이용하여 실시하였다.

5. 피부 및 안점막 자극시험

피부자극시험에서는 1주일간의 순화사육기간을 거쳐 선발된 건강한 토끼 6마리를 선발하여 사용하였다. 시험물질의 적용 24시간 전에 동물용 전기 제모기로 토끼의 등부위를 제모하고, 피부에 손상이 가지 않게 면도를 실시하여 처치구획과 대조구획으로 나누고 각각을 비찰과부위와 찰과피부로 나누어 모두 4부분을 설정하였다. 찰과피부는 면도날을 이용하여 출혈하지 않는 범위내에서 표피만을 찰과하였다. 검체를 처치하기 위해 수술용 테잎인 Microfoam (3 M, USA)의 폭을 0.5 cm로 하며 2.5 cm×2.5 cm 크기의 지지체(mold)를 만들고 그 중앙에 가아제(2.5 cm×2.5 cm, 3겹)를 고정시켰다. 시료의 조제는 GC- γ AHF를 멸균생리식염수에 용해하여 검체로 하였으며, 검체(50 IU/ml)를 첩포용 밴드가아제에 0.5 ml를 취하여 토끼등 피부의 처치구획에 접착하였다. 시험물질을 적용한 후 피부와 밀접해 있는 시험물질을 유지하고 증발을 막기 위해서 토끼의 투여부위는 가아제와 비자극성 테이프로 싸서 안전하게 하였

다. 검체는 24시간 동안 1회 적용하였으며, 대조구획에는 시험물질을 가하지 않고 동시에 동일한 방법으로 실시하였다. 종료시 잔유물질은 생리식염수를 탈지면에 적시어 잘 닦아내었다. 시험물질 제거 후 약 60분에 각 시험물질을 Draize 기법에 따라 홍반과 부종의 정도를 기록하였다(Draize 등, 1959; Marzulli and Maibach, 1975). 피부 반응의 평가는 식품의약품안전청 고시 제 1998-116호(1998. 12. 3) “의약품등의 독성시험기준”에 준하여 평가하였으며, 이에 따라 시험물질 투여후 24, 및 72시간의 평점을 산출하여 그 결과에 대한 자극성의 판정은 일차자극지수(Primary Irritation Index, P.I.I.)에 기초하여 시험물질의 자극도를 구분하였다.

안점막자극시험에서는 1주일간의 순화사육기간을 거쳐 선발된 건강한 토끼를 시험개시 24시간 전에 그 양안을 검사하여 각막의 손상여부를 검사한 후 이상이 관찰되지 않은 9마리의 동물을 선발하여 사용하였다. 시험에 사용한 GC- γ AHF는 50 IU/ml로서, 각각의 왼쪽 안구의 결막낭에 0.1 ml씩 점안한 후 제 1군의 3마리에 대해서는 점적후 약 30초 경과시 무균생리식염수로 1분간 세안하여 시험물질을 제거하였다. 오른쪽안구는 비치치 대조로 하였다. 또 제 2군의 6마리는 점적후 세척하지 않고 관찰하였으며 오른쪽 눈은 비치치 대조군으로 사용하였다. 시험물질 적용 후 3시간, 1, 2, 3, 4 및 7일째에 관찰을 실시하였고 평가는 식품의약품안전청 고시 제 1998-116호(1998. 12. 3) “의약품등의 독성시험기준”의 안구병변의 등급표에 준해 실시하여 이에 따른 평점을 산출한 후 그 결과에 대한 자극성의 정도판정은 국립보건안전연구원 “독성시험표준작업 지침서(1993년)”의 안점막자극도에 의해 물질의 자극도를 평가하였다.

6. 항원성시험

아나필락시스 쇼크반응시험(ASA, Active Systemic Anaphylaxis test)에서는 5주령의 Hartley계 웅성 기니픽을 사용하였다. 시험물질의 용량설정은 500 IU/animal을 고용량군으로 설정하였고, 50 IU/animal을 저용량군으로 설정하였다. 음성대조물질로는 멸균생리식염수를 사용하였고, 양성대조물질로는 ovalbumin을 동량의 Freund's complete adjuvant(FCA)와 혼합한 후 사용하였으며, 투여용량은 2 mg/animal으로 하였다. 시험물질과 ovalbumin은 모두 멸균생리식염수에 녹여 사용하였다. GC- γ AHF 단독 투여군에서는 1주일에 3회씩 총 9회 피하에 주사하였으며, FCA 혼합투여군에 경우에는 1주일에 1회씩 총 3회 피하에 주사하였다. 최종감작 2주 후에 야기항원을 정맥내에 투여한 후 60분 동안 전신의 증상을 관찰하여 아나필락시스 증상을 판정하였다.

수동 피부 아나필락시스 반응시험(PCA, Passive Cutaneous Anaphylaxis test)에서는 20~30 g의 7주령 Balb/c계 마우스를 저용량(50 IU/animal), 고용량군(500 IU/animal)으로 나누어 감작시켰다. GC- γ AHF 단독 투여군에서는 1주일에 3회씩 총 9회 피하주사 하였으며, FCA 혼합 투여군의 경우에는 1주일에 1회씩 총 3회 피하주사 하였다. 최종 투여 2주일 후에 마우스 안와정맥총에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 제모기 이용하여 SD계 수컷 랫드의 등 부위 털을 가능한 한 넓게 제거한 후 등의 좌우 부위를 미리 marker로 표시한 다음 PBS로 8배부터 6단계 희석한 대조군과 시험군의 마우스 항혈청 50 μ l를 각 표시 부위에 피내주사하였다(needle: 26 1/2G, syringe: 1 ml). 항혈청을 피내주사한 시점으로부터 24시간 후에 야기항원을 2% Evans blue와 동량으로 혼합하여 랫드의 미정맥에 주사하였다. 30분 후 경추탈골에 의해 랫드를 도살하고, 항혈청 주사부위에 나타나는 청색반점을 관찰하였다. 청색반점의 장경과 단경의 평균치가 5 mm 이상이면 양성으로 하고, 양성을 나타내는 가장 마지막 혈청 희석액의 희석배수를 그 항혈청의 항체가로 결정하였다.

III. 결 과

1. 단회투여독성시험

랫드 및 비글개를 이용한 모든 투여 용량군에서 시험기

간동안 사망한 동물은 없었으며, 어떠한 임상증상도 나타나지 않았고 시험종료 후 실시한 육안적 병변 검사에도 특이할만한 부검소견이 관찰되지 않았다. 시험물질의 일부 투여군에서 약간의 유의성 있는 체중변화가 관찰되었으나, 전체적으로 시험물질의 영향이라 판단되며 용량 의존적인 체중변화를 관찰할 수 없었다(data not shown).

2. 반복투여독성시험

랫드 및 비글개를 이용한 모든 투여용량군에서 시험기 간동안 사망한 동물은 없었으며, 시험물질에 의한 독성으로 인정되는 증상도 나타나지 않았다. 또한 암수의 모든 투여용량군에서 대조군과 비교하여 유의성있는 체중, 사료 및 수분 섭취량 변화도 관찰되지 않았다(data not shown).

랫드를 이용한 반복투여독성시험에서 각 군의 혈액생화학적 검사에 대한 측정결과는 다음과 같다. 수컷랫드의 고용량군에서 ALP, CHOL, CREAT과 BUN, 중용량군에서 ALP, 저용량군에서 CI이 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였으며, 암컷랫드의 전용량군에서 ALB, 중용량군에서 AST, 고용량군과 중용량군에서 ALP, 전용량군에서 NP, 중용량군과 저용량군에서 A/G ratio가 유의성있게 증가하거나 감소하였다(Table 1). 비글개를 이용한 반복투여 독성시험에서, 부검시의 혈액생화학적 검사에 대한 측정결과는 수컷 대조군(2.87 \pm 0.06)과 비교하여 중용량 투여군(2.58 \pm 0.08)에서 ALB 수치가, 암컷 대조군(8.23 \pm 0.68)과

Table 1. Serum biochemical value of rats intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (IU/kg)	0	500	150	50	0	500	150	50
No. of animal		10	10	10	10	10	10	10	10
Items									
TPROT (g/dl)	7.55 \pm 0.27	7.52 \pm 0.33	7.41 \pm 0.38	7.41 \pm 0.19	7.63 \pm 0.37	7.36 \pm 0.32	7.87 \pm 0.54	7.96 \pm 1.60	
ALB (g/dl)	3.35 \pm 0.13	3.36 \pm 0.35	3.28 \pm 0.09	3.29 \pm 0.22	3.90 \pm 0.15	3.57 \pm 0.25**	3.54 \pm 0.29**	3.51 \pm 0.25**	
TBILI (mg/dl)	0.37 \pm 0.11	0.42 \pm 0.06	0.39 \pm 0.09	0.43 \pm 0.09	0.38 \pm 0.04	0.41 \pm 0.06	0.38 \pm 0.09	0.39 \pm 0.10	
AST (U/l)	246.68 \pm 51.67	227.79 \pm 39.70	223.69 \pm 18.94	224.44 \pm 63.36	191.20 \pm 26.69	190.70 \pm 19.87	228.85 \pm 36.33*	210.80 \pm 31.84	
ALT (U/l)	95.61 \pm 15.81	95.79 \pm 16.90	84.00 \pm 6.29	90.33 \pm 32.08	87.90 \pm 25.68	81.50 \pm 14.88	73.30 \pm 10.22	68.20 \pm 25.47	
ALP (U/l)	412.03 \pm 38.90	522.56 \pm 64.91**	357.33 \pm 71.51*	432.44 \pm 76.42	149.20 \pm 32.85	234.58 \pm 62.91**	185.40 \pm 13.95**	170.50 \pm 41.95	
CHOL (mg/dl)	54.50 \pm 12.96	65.68 \pm 8.94*	55.77 \pm 6.70	55.00 \pm 11.66	71.90 \pm 15.47	66.70 \pm 7.15	60.75 \pm 9.73	72.20 \pm 23.10	
TRIGLY (mg/dl)	66.06 \pm 10.35	72.75 \pm 9.82	58.45 \pm 14.05	64.71 \pm 10.85	29.77 \pm 0.90	31.11 \pm 2.54	32.28 \pm 5.74	32.58 \pm 4.60	
GLU (mg/dl)	121.60 \pm 13.58	108.28 \pm 20.23	108.10 \pm 14.11	126.97 \pm 26.38	116.62 \pm 12.01	112.63 \pm 24.12	110.50 \pm 17.32	117.11 \pm 22.72	
NP (mg/dl)	43.24 \pm 16.48	49.45 \pm 14.43	42.51 \pm 9.63	45.44 \pm 27.73	46.70 \pm 25.56	27.66 \pm 8.83*	22.15 \pm 7.17**	21.30 \pm 7.70**	
CREAT (mg/dl)	1.06 \pm 0.19	1.26 \pm 0.13*	1.08 \pm 0.11	1.04 \pm 0.13	1.13 \pm 0.14	1.12 \pm 0.15	1.12 \pm 0.17	1.14 \pm 0.14	
BUN (mg/dl)	18.55 \pm 3.13	21.56 \pm 2.95*	18.26 \pm 1.99	17.78 \pm 2.20	19.50 \pm 2.80	19.48 \pm 2.21	19.45 \pm 3.09	20.00 \pm 2.21	
K (mmol/l)	4.93 \pm 0.09	4.89 \pm 0.33	4.97 \pm 0.09	4.96 \pm 0.12	4.88 \pm 0.18	4.80 \pm 0.43	4.86 \pm 0.14	4.96 \pm 0.11	
Ca (mg/dl)	11.16 \pm 0.64	11.17 \pm 0.32	11.19 \pm 0.54	11.49 \pm 1.26	10.82 \pm 0.58	10.92 \pm 0.42	11.06 \pm 0.27	11.16 \pm 0.64	
P (mg/dl)	5.19 \pm 0.17	5.01 \pm 0.11	5.10 \pm 0.16	5.32 \pm 0.33	5.12 \pm 0.24	5.11 \pm 0.10	5.12 \pm 0.10	5.16 \pm 0.24	
Cl (mmol/l)	107.46 \pm 1.07	108.00 \pm 0.94	107.64 \pm 0.94	108.78 \pm 1.03*	108.10 \pm 0.88	108.14 \pm 1.20	107.45 \pm 0.44	108.30 \pm 1.06	
GB (mg/dl)	4.22 \pm 0.26	4.16 \pm 0.57	4.09 \pm 0.38	3.70 \pm 1.23	3.76 \pm 0.31	3.84 \pm 0.38	3.77 \pm 0.32	3.70 \pm 0.64	
A/G ratio	0.80 \pm 0.07	0.81 \pm 0.18	0.81 \pm 0.06	0.78 \pm 0.08	1.12 \pm 0.23	0.97 \pm 0.11	0.55 \pm 0.44**	0.84 \pm 0.15**	

Data are means \pm standard deviation, * Significantly different from control at p < 0.05, ** Significantly different from control at p < 0.01.

Table 2. Serum biochemical value of beagle dogs before intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (IU/kg)	0	500	50	5	0	500	50	5
No. of animal	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Items									
TPROT (g/dl)	5.87±0.85	5.20±0.46	5.53±0.29	5.67±0.60	6.13±0.85	5.90±0.17	5.57±0.60	5.60±0.35	
ALB (g/dl)	2.83±0.12	2.67±0.15	2.87±0.06	2.87±0.06	3.00±0.20	3.03±0.06	2.90±0.17	2.83±0.15	
TBILI (mg/dl)	0.47±0.21	0.47±0.06	0.33±0.06	0.50±0.17	0.43±0.06	0.53±0.23	0.27±0.06	0.43±0.23	
AST (u/l)	44.00±4.00	54.33±13.80	49.33±3.21	48.33±4.93	48.67±7.02	43.33±13.65	41.67±3.79	42.00±3.46	
ALT (u/l)	37.00±6.08	38.33±6.03	41.33±1.53	41.33±3.21	42.67±3.79	31.67±4.73	38.67±5.03	41.33±7.02	
ALP (u/l)	289.67±44.09	214.67±102.50	320.33±145.73	292.67±212.53	369.67±130.18	177.00±52.60	301.67±163.46	178.67±71.16	
GLU (mg/ml)	65.00±0.00	66.00±1.73	65.33±0.58	65.00±0.00	65.00±0.00	65.00±0.00	67.67±2.52	60.00±8.66	
CHOL (mg/dl)	173.33±50.08	152.00±42.00	142.67±52.81	164.33±40.67	163.33±55.52	191.33±21.36	140.33±6.81	141.33±18.01	
TRIGLY (mg/dl)	49.67±21.59	45.00±4.58	38.67±15.04	39.67±6.11	49.33±7.77	47.33±6.03	40.33±4.62	34.33±7.02	
BUN (mg/dl)	9.20±1.35	11.00±3.56	7.30±0.36	9.73±1.88	11.73±2.74	9.27±0.80	8.97±1.33	10.83±3.21	
CREAT (mg/dl)	0.60±0.10	0.67±0.21	0.60±0.10	0.50±0.00	0.60±0.00	0.60±0.10	0.60±0.10	0.63±0.15	
K (mmol/l)	4.27±0.12	4.30±0.10	4.33±0.32	4.47±0.23	4.27±0.06	4.33±0.32	4.27±0.15	4.13±0.15	
Cl (mmol/l)	104.00±1.73	103.00±1.73	104.33±1.53	104.00±3.00	104.00±2.00	105.33±2.08	102.67±1.15	105.33±2.89	
Ca (mg/dl)	10.07±0.61	8.93±0.57	10.00±0.35	10.67±1.29	10.67±0.81	10.30±0.70	9.50±0.82	9.73±0.47	
P (mg/dl)	5.77±0.47	5.30±1.47	5.50±0.17	6.13±0.67	3.89±2.54	5.43±0.55	5.00±0.46	5.07±0.72	
A/G ratio	0.96±0.21	1.22±0.17	1.46±0.26	1.04±0.18	1.01±0.14	1.06±0.02	1.11±0.13	1.02±0.04	

Data are means±standard deviation, * Significantly different from control at $p < 0.05$, ** Significantly different from control at $p < 0.01$.

Table 3. Serum biochemical value of beagle dogs after intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (IU/kg)	0	500	50	5	0	500	50	5
No. of animal	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Items									
TPROT (g/dl)	5.80±0.53	5.50±0.17	6.00±0.53	5.87±0.55	5.63±0.42	5.97±0.25	5.57±0.25	6.23±0.32	
ALB (g/dl)	2.87±0.06	2.73±0.06	2.58±0.08*	2.77±0.15	2.77±0.12	2.77±0.15	2.07±1.10	2.73±0.06	
TBILI (mg/dl)	0.47±0.12	0.37±0.15	0.37±0.21	0.47±0.15	0.43±0.12	0.43±0.12	0.40±0.10	0.47±0.15	
AST (u/l)	47.00±6.24	56.33±13.05	50.67±4.51	50.00±12.53	55.00±1.00	41.67±9.29	42.33±6.11	49.67±2.52	
ALT (u/l)	41.00±5.57	38.00±6.00	35.67±3.06	40.33±4.93	41.33±3.79	33.67±4.73	41.33±11.59	37.00±6.24	
ALP (u/l)	309.67±49.74	226.33±122.13	337.67±139.25	303.33±242.86	373.33±133.36	132.67±38.85	277.67±153.83	213.67±91.57	
GLU (mg/ml)	75.33±10.07	74.33±8.33	72.00±6.08	76.00±2.65	67.33±3.21	62.33±24.01	81.67±11.55	68.00±5.20	
CHOL (mg/dl)	142.33±31.97	140.67±17.90	15.067±24.11	164.67±24.11	151.33±43.66	152.67±12.01	143.33±11.24	149.33±19.35	
TRIGLY (mg/dl)	52.00±12.29	53.33±19.14	45.33±12.22	46.00±3.46	53.33±22.50	56.67±1.15	52.33±5.51	64.67±23.80	
BUN (mg/dl)	10.03±2.41	10.13±3.56	9.07±0.15	10.20±0.72	8.57±1.40	8.97±2.11	9.60±1.32	9.17±2.06	
CREAT (mg/dl)	0.73±0.06	0.73±0.15	0.60±0.10	0.73±0.06	0.70±0.00	0.73±0.06	0.70±0.00	0.70±0.00	
K (mmol/l)	4.17±0.15	4.27±0.31	4.37±0.24	4.23±0.32	4.30±0.26	74.20±0.17	4.30±0.10	4.37±0.21	
Cl (mmol/l)	104.00±1.00	1020.33±2.08	103.33±1.15	102.33±2.08	102.67±3.06	102.33±0.58	103.00±1.00	103.00±1.00	
Ca (mg/dl)	7.83±0.29	7.27±0.49	7.50±0.50	6.97±0.46	8.23±0.68	6.53±0.81*	7.27±0.68	6.87±0.42	
P (mg/dl)	6.14±0.06	5.63±1.20	6.20±0.82	5.83±1.15	6.50±1.11	54.67±0.06	6.07±0.78	5.10±1.35	
A/G ratio	1.00±0.17	0.87±0.15	0.80±0.10	0.90±0.10	0.97±0.06	0.87±0.15	0.67±0.40	0.77±0.06	

Data are means±standard deviation, * Significantly different from control at $p < 0.05$, ** Significantly different from control at $p < 0.01$.

비교하여 고용량 투여군(6.53±0.81)에서 Ca 수치가 유의성 있게 감소하였다(Table 3). 이외 나머지 항목에서는 대조군에 비해 유의할 만한 변화를 관찰하지 못하였다(Tables 2, 3).

랫드를 이용한 반복투여독성시험의 경우 대조군과 투여군간의 유의성 있는 변화를 보인 혈액학적 검사항목은 다음과 같다. 수컷랫드에서는 중용량군과 고용량군에서 RBC,

중용량군과 고용량군에서 MCV, 고용량군에서 MCH, 중용량군과 고용량군에서 MCHC가 유의성있게 증가하거나 감소하였다. 또한 암컷랫드에서는 중용량군과 고용량군에서 WBC, 중용량군과 고용량군에서 RBC, 고용량군에서 HGB, 중용량군과 고용량군에서 HCT, 전용량군에서 MCV, 전용량군에서 MCH, 중용량군과 고용량군에서 MCHC가

Table 4. Hematological findings of rats intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (IU/kg)	0	500	150	50	0	500	150	50
No. of animal	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Items									
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	47.88 \pm 25.86	40.69 \pm 16.27	36.72 \pm 20.78	56.16 \pm 23.27	40.07 \pm 15.85	45.90 \pm 14.86	43.44 \pm 17.35	42.34 \pm 21.62	
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	11.87 \pm 3.42	14.97 \pm 2.75	13.41 \pm 4.76	15.55 \pm 7.95	8.04 \pm 2.71	13.34 \pm 1.75**	13.66 \pm 3.60**	8.78 \pm 2.39	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7.55 \pm 0.93	6.66 \pm 0.36*	5.90 \pm 2.03*	7.91 \pm 0.63	7.25 \pm 0.35	5.27 \pm 1.56**	6.57 \pm 0.83**	7.73 \pm 0.70	
HGB (g/dl)	13.78 \pm 1.87	13.69 \pm 0.72	12.86 \pm 2.73	14.61 \pm 0.79	13.55 \pm 0.69	10.93 \pm 3.16*	13.15 \pm 1.71	13.98 \pm 1.12	
HCT (%)	42.77 \pm 5.11	40.02 \pm 3.07	41.71 \pm 29.16	44.48 \pm 4.63	42.18 \pm 2.07	29.35 \pm 8.60**	34.45 \pm 3.99**	43.49 \pm 3.56	
MCV (fl)	56.52 \pm 2.46	53.78 \pm 1.55**	51.90 \pm 2.02**	55.83 \pm 2.28	57.53 \pm 1.30	50.76 \pm 9.53**	53.76 \pm 1.53**	56.02 \pm 1.59*	
MCH (pg)	18.29 \pm 1.78	20.30 \pm 0.32**	19.47 \pm 0.94	18.58 \pm 1.54	18.58 \pm 0.64	20.21 \pm 0.36**	20.72 \pm 0.90**	18.01 \pm 0.55*	
MCHC (g/dl)	32.36 \pm 2.15	37.89 \pm 0.81**	38.30 \pm 1.57**	33.26 \pm 3.23	32.54 \pm 0.88	37.65 \pm 0.86**	37.62 \pm 1.36**	32.15 \pm 0.57	

Data are means \pm standard deviation, * Significantly different from control at $p < 0.05$, ** Significantly different from control at $p < 0.01$.

Table 5. Hematological findings of beagle dogs before intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (IU/kg)	0	500	50	5	0	500	50	5
No. of animal	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Items									
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	10.30 \pm 2.63	10.77 \pm 2.94	12.90 \pm 1.40	10.77 \pm 1.85	10.57 \pm 3.09	10.20 \pm 3.20	11.17 \pm 1.86	10.77 \pm 1.60	
RBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6.48 \pm 0.88	5.89 \pm 0.44	5.38 \pm 0.40	5.99 \pm 0.81	6.63 \pm 0.82	6.55 \pm 0.11	6.07 \pm 1.66	6.01 \pm 0.90	
HGB (g/dl)	14.73 \pm 2.11	13.63 \pm 0.74	12.60 \pm 0.80	14.07 \pm 1.26	15.30 \pm 1.54	15.17 \pm 0.51	14.30 \pm 2.96	13.17 \pm 1.59	
HCT (%)	40.90 \pm 6.36	39.53 \pm 2.79	36.03 \pm 2.60	40.17 \pm 1.95	44.30 \pm 3.30	43.63 \pm 1.19	40.50 \pm 9.79	37.50 \pm 3.56	
MCV (fl)	62.97 \pm 2.34	67.17 \pm 3.25	67.03 \pm 1.81	67.50 \pm 5.75	67.07 \pm 3.36	66.53 \pm 1.32	67.10 \pm 2.07	62.80 \pm 3.38	
MCH (pg)	22.73 \pm 1.12	23.17 \pm 1.19	23.47 \pm 0.72	23.60 \pm 1.11	23.13 \pm 1.01	23.13 \pm 0.57	23.83 \pm 1.51	22.00 \pm 0.82	
MCHC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	36.10 \pm 0.95	34.50 \pm 0.60	35.03 \pm 0.29	35.07 \pm 1.46	34.50 \pm 1.18	34.80 \pm 0.17	35.53 \pm 1.40	35.07 \pm 0.83	
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	370.83 \pm 10.43	370.73 \pm 11.64	300.80 \pm 10.52	420.47 \pm 6.21	520.83 \pm 26.29	320.87 \pm 9.77	300.37 \pm 5.36	360.03 \pm 4.30	

Data are means \pm standard deviation, * Significantly different from control at $p < 0.05$, ** Significantly different from control at $p < 0.01$.

Table 6. Hematological findings of beagle dogs after intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (IU/kg)	0	500	50	5	0	500	50	5
No. of animal	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Items									
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	10.37 \pm 1.16	11.80 \pm 1.99	14.80 \pm 3.06	8.97 \pm 1.27	10.73 \pm 4.76	12.77 \pm 5.01	13.87 \pm 3.13	11.53 \pm 1.27	
RBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6.08 \pm 0.54	5.59 \pm 0.38	5.24 \pm 0.17*	5.52 \pm 0.19	6.07 \pm 1.03	6.71 \pm 0.24	5.21 \pm 0.19	6.21 \pm 0.95	
HGB (g/dl)	13.33 \pm 1.00	12.80 \pm 1.49	12.07 \pm 0.92	12.97 \pm 0.25	13.67 \pm 1.78	14.93 \pm 0.55	12.33 \pm 0.55	13.80 \pm 1.87	
HCT (%)	38.90 \pm 2.26	36.43 \pm 4.38	34.80 \pm 2.35	37.97 \pm 1.32	40.03 \pm 6.08	45.87 \pm 2.01	34.77 \pm 0.21	41.33 \pm 2.72	
MCV (fl)	61.83 \pm 2.87	65.00 \pm 3.34	65.40 \pm 2.19	68.83 \pm 0.81*	66.17 \pm 3.76	65.43 \pm 4.05	66.80 \pm 2.55	67.10 \pm 5.97	
MCH (pg)	21.67 \pm 0.85	22.87 \pm 1.19	22.60 \pm 0.96	23.47 \pm 0.58	22.60 \pm 1.00	21.87 \pm 0.45	24.40 \pm 0.56	22.27 \pm 0.96	
MCHC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	35.03 \pm 0.87	35.13 \pm 1.20	34.53 \pm 0.29	34.17 \pm 1.07	34.20 \pm 1.13	33.00 \pm 0.69	35.50 \pm 1.45	33.30 \pm 2.34	
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	330.43 \pm 5.90	260.53 \pm 9.53	270.00 \pm 6.98	300.20 \pm 6.87	340.17 \pm 3.81	260.27 \pm 5.68	310.03 \pm 4.21	310.07 \pm 12.96	

Data are means \pm standard deviation, * Significantly different from control at $p < 0.05$, ** Significantly different from control at $p < 0.01$.

유의성있게 증가하거나 감소하였다. 그러나 모두 산발적으로 나타났고, 용량의존성을 보이지 않았다(Table 4). 비글개를 이용한 반복투여독성시험 종료 후, 부검시의 혈액학적 검사소견에서는 RBC에 있어서 수컷대조군(6.08 \pm 0.54)과 비교하여 중용량군(5.24 \pm 0.17)에서 유의한 감소

를 보였으며, MCV는 수컷대조군(60.83 \pm 2.87)과 비교하여 저용량군(68.83 \pm 0.81)에서 유의성있게 증가하였다. 이외 나머지 항목에서는 대조군에 비해 유의할만한 변화를 관찰하지 못하였다(Tables 5, 6).

각 군의 장기에 대한 절대중량과 상대중량을 측정된 결

Table 7. Absolute and relative organ weights of rats intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Items	Sex		Male				Female			
	Dose (IU/kg)		0	500	150	50	0	500	150	50
	No. of animal		10	10	10	10	10	10	10	10
Heart (gm)	1.05±0.16	1.00±0.08	1.02±0.05	1.02±0.08	0.70±0.23	0.75±0.09	0.80±0.14	0.73±0.05		
Rel. wt (%b.w)	0.377±0.060	0.377±0.041	0.357±0.028	0.365±0.031	0.298±0.103	0.318±0.045	0.364±0.060	0.324±0.028		
Liver (gm)	9.11±1.65	8.89±0.60	8.95±0.34	8.90±0.17	5.96±1.57	6.27±1.21	6.39±0.97	6.79±1.71		
Rel. wt (%b.w)	3.266±0.552	3.354±0.318	3.151±0.250	3.200±0.257	2.527±0.723	2.682±0.584	2.903±0.380	3.005±0.775		
Spleen (gm)	0.58±0.31	0.76±0.26	0.58±0.07	0.69±0.22	0.45±0.12	0.59±0.19	0.56±0.16	0.51±0.11		
Rel. wt (%b.w)	0.207±0.100	0.289±0.123	0.206±0.035	0.250±0.082	0.192±0.050	0.253±0.081	0.254±0.065	0.225±0.054		
Kidney (L)(gm)	1.06±0.07	1.00±0.19	1.08±0.02	1.04±0.11	0.72±0.10	0.73±0.14	0.77±0.08	0.78±0.14		
Rel. wt (%b.w)	0.385±0.052	0.390±0.076	0.380±0.033	0.372±0.039	0.305±0.057	0.312±0.069	0.352±0.040	0.347±0.062		
Kidney (R)(gm)	0.98±0.35	1.07±0.04	1.09±0.02	0.93±0.32	0.73±0.12	0.75±0.07	0.76±0.09	0.78±0.11		
Rel. wt (%b.w)	0.354±0.125	0.404±0.046	0.383±0.035	0.337±0.119	0.310±0.063	0.320±0.038	0.346±0.046	0.343±0.050		
Adrenal (L)(gm)	0.24±0.04	0.34±0.40	0.21±0.06	0.16±0.10	0.26±0.09	0.20±0.22	0.20±0.11	0.23±0.08		
Rel. wt (%b.w)	0.085±0.012	0.091±0.121	0.075±0.023	0.056±0.035	0.109±0.038	0.079±0.084	0.093±0.053	0.101±0.037		
Adrenal (R)(gm)	0.20±0.06	0.14±0.09	0.19±0.06	0.15±0.08	0.25±0.02	0.15±0.12*	0.12±0.11**	0.14±0.12*		
Rel. wt (%b.w)	0.073±0.024	0.053±0.037	0.067±0.020	0.053±0.030	0.105±0.010	0.059±0.045*	0.059±0.056*	0.063±0.055*		
Prostate (gm)	0.65±0.05	0.64±0.59	0.69±0.08	0.60±0.11	0.54±0.04	0.49±0.08	0.52±0.02	0.53±0.02		
Rel. wt (%b.w)	0.236±0.031	0.263±0.208	0.244±0.026	0.214±0.044	0.229±0.032	0.211±0.044	0.237±0.025	0.233±0.018		
Testis (L)(gm)	2.06±0.54	1.82±0.45	2.09±0.22	1.84±0.43						
Rel. wt (%b.w)	0.740±0.197	0.690±0.192	0.736±0.083	0.658±0.150						
Testis (R)(gm)	2.01±0.40	1.85±0.38	2.06±0.22	1.83±0.40						
Rel. wt (%b.w)	0.730±0.185	0.703±0.174	0.725±0.083	0.654±0.140						
Ovary (L)(gm)					0.04±0.01	0.03±0.01	0.04±0.02	0.05±0.03		
Rel. wt (%b.w)					0.015±0.004	0.014±0.003	0.019±0.007	0.020±0.012		
Ovary (R)(gm)					0.04±0.01	0.04±0.01	0.07±0.08	0.05±0.03		
Rel. wt (%b.w)					0.016±0.005	0.016±0.004	0.031±0.037	0.020±0.013		
Brain (gm)	1.82±0.14	1.80±0.30	1.79±0.05	1.78±0.22	1.76±0.15	1.75±0.09	1.72±0.17	1.92±0.14*		
Rel. wt (%b.w)	0.659±0.098	0.676±0.114	0.632±0.060	0.639±0.079	0.744±0.084	0.746±0.062	0.790±0.119	0.849±0.080*		
Pituitary gland (gm)	0.07±0.01	0.08±0.00	0.08±0.00	0.08±0.00	0.07±0.00	0.07±0.01	0.07±0.00	0.07±0.01		
Rel. wt (%b.w)	0.025±0.003	0.030±0.003	0.026±0.003	0.028±0.002	0.030±0.002	0.031±0.005	0.031±0.004	0.033±0.002		
Thymus (gm)	0.13±0.02	0.20±0.13	0.15±0.07	0.21±0.14	0.13±0.07	0.25±0.14	0.21±0.12	0.28±0.19*		
Rel. wt (%b.w)	0.046±0.012	0.075±0.041	0.052±0.027	0.077±0.055	0.056±0.031	0.109±0.067	0.094±0.052	0.124±0.083*		

* Significantly different from control at $p < 0.05$, ** Significantly different from control at $p < 0.01$, S.D. : Standard deviation.

과는 다음과 같다. 랫드를 이용한 반복투여독성시험의 경우, 수컷랫드에서는 전군에 걸쳐 대조군에 비해 유의성을 보인 항목이 관찰되지 않았으나, 암컷랫드에서 전용량군의 우측부신 및 저용량군에서 뇌와 흉선의 절대 및 상대 장기중량 측정치가 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다 (Table 7). 비글개를 이용한 반복투여독성시험의 경우, 수컷 대조군(59.013 ± 3.302)과 비교하여 전 용량군(71.257 ± 1.231 , 63.247 ± 0.543 , 74.610 ± 0.721)에서 뇌의 절대장기중량 측정치가 유의하게 증가하였다. 이외에는 절대장기중량 및 체중에 대한 각 장기의 상대중량비에서 어떠한 변화도 관찰하지 못하였다 (Table 8).

PT, PTT 측정검사, 뇨검사, 안과학적 검사 및 육안적 부검소견 검사결과에서는 모든 시험동물 암수의 전 투여용량군에서 대조군에 비해 유의할만한 변화 및 이상소견이 관찰되지 않았다 (data not shown). 또한 병리학적 검사결과에서도 시험동물인 랫드와 비글개 암수의 전 투여용량

군에서 대조군에 비해 유의할만한 변화 및 이상소견이 관찰되지 않았다 (Tables 9, 10).

3. 피부 및 안점막 자극시험

GC- γ AHF에 대한 피부자극성을 확인하기 위하여 토끼의 노출된 찰과/비찰과 피부에 50 IU/ml의 농도로 0.5 ml 투여하였으나 시험물질 투여에 의한 것으로 생각되는 어떠한 피부반응소견도 관찰되지 않았다 (Table 11).

안점막 자극시험에서 50 IU/ml GC- γ AHF을 인구에 0.1 ml 투약한 후 3시간, 1, 2, 3, 4, 및 7일에 각막손상, 홍채의 충혈이나 빛에 대한 반응과 안검점막, 안구결막 등의 혈관상태, 결막의 부종 및 배출물의 유무 등을 관찰한 결과, 세척군과 비세척군 모두에서는 대조군에 비해 유의한 변화가 관찰되지 않았으며, M.O.I., I.O.I. 및 A.O.I. 평점이 모두 0점으로 무자극(non-irritancy) 물질인 것으로 나

Table 8. Absolute and relative organ weights of beagle dogs intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Items	Sex															
	Male						Female									
	Dose (IU/kg)		50		5		Dose (IU/kg)		50		5					
	0	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3				
	No. of animal		50		5		0		50		5					
Brain (gm)	59.013 \pm 3.302	71.257 \pm 1.231**	63.247 \pm 0.543*	74.610 \pm 0.721**	65.840 \pm 1.021	62.530 \pm 0.585	59.737 \pm 1.559	69.290 \pm 2.357	0.666 \pm 0.043	0.888 \pm 0.215	0.715 \pm 0.032	0.778 \pm 0.042	0.877 \pm 0.068	0.836 \pm 0.131	0.818 \pm 0.083	0.923 \pm 0.050
Rel. wt (%b.w)	0.666 \pm 0.043	0.888 \pm 0.215	0.715 \pm 0.032	0.778 \pm 0.042	0.877 \pm 0.068	0.836 \pm 0.131	0.818 \pm 0.083	0.923 \pm 0.050	4.193 \pm 0.594	4.100 \pm 0.674	4.143 \pm 0.256	4.165 \pm 0.544	3.790 \pm 0.382	3.987 \pm 0.307	3.830 \pm 0.492	4.383 \pm 0.085
Submandi. gland (L)(gm)	0.047 \pm 0.008	0.050 \pm 0.003	0.053 \pm 0.002	0.044 \pm 0.008	0.050 \pm 0.004	0.044 \pm 0.008	0.050 \pm 0.004	0.058 \pm 0.005	0.047 \pm 0.007	0.050 \pm 0.004	0.044 \pm 0.008	0.044 \pm 0.008	0.050 \pm 0.004	0.053 \pm 0.006	0.052 \pm 0.006	0.058 \pm 0.005
Rel. wt (%b.w)	4.163 \pm 0.497	4.130 \pm 0.728	4.210 \pm 0.173	4.115 \pm 0.445	3.973 \pm 0.142	3.787 \pm 0.481	3.947 \pm 0.229	4.487 \pm 0.349	0.047 \pm 0.007	0.053 \pm 0.003	0.054 \pm 0.004	0.043 \pm 0.007	0.053 \pm 0.003	0.050 \pm 0.004	0.054 \pm 0.004	0.060 \pm 0.002
Submandi. gland (R)(gm)	0.047 \pm 0.007	0.050 \pm 0.002	0.054 \pm 0.004	0.043 \pm 0.007	0.053 \pm 0.003	0.050 \pm 0.004	0.043 \pm 0.007	0.060 \pm 0.002	0.047 \pm 0.007	0.053 \pm 0.003	0.054 \pm 0.004	0.043 \pm 0.007	0.053 \pm 0.003	0.050 \pm 0.004	0.054 \pm 0.004	0.060 \pm 0.002
Rel. wt (%b.w)	0.440 \pm 0.106	0.337 \pm 0.114	0.380 \pm 0.017	0.540 \pm 0.057	0.427 \pm 0.084	0.433 \pm 0.057	0.370 \pm 0.056	0.403 \pm 0.086	0.440 \pm 0.106	0.337 \pm 0.114	0.380 \pm 0.017	0.540 \pm 0.057	0.427 \pm 0.084	0.433 \pm 0.057	0.370 \pm 0.056	0.403 \pm 0.086
Thyroid gland (L)(gm)	0.005 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001	0.005 \pm 0.002	0.005 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.002	0.005 \pm 0.002	0.005 \pm 0.002
Rel. wt (%b.w)	0.413 \pm 0.110	0.290 \pm 0.026	0.437 \pm 0.132	0.470 \pm 0.085	0.353 \pm 0.042	0.390 \pm 0.026	0.410 \pm 0.070	0.383 \pm 0.061	0.413 \pm 0.110	0.290 \pm 0.026	0.437 \pm 0.132	0.470 \pm 0.085	0.353 \pm 0.042	0.390 \pm 0.026	0.410 \pm 0.070	0.383 \pm 0.061
Thyroid gland (R)(gm)	0.005 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	0.006 \pm 0.002	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.000	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001
Rel. wt (%b.w)	18.667 \pm 10.693	15.667 \pm 10.97	16.333 \pm 8.021	14.000 \pm 9.899	12.333 \pm 9.018	14.667 \pm 4.509	11.333 \pm 7.506	16.333 \pm 4.726	18.667 \pm 10.693	15.667 \pm 10.97	16.333 \pm 8.021	14.000 \pm 9.899	12.333 \pm 9.018	14.667 \pm 4.509	11.333 \pm 7.506	16.333 \pm 4.726
Thymus (gm)	0.208 \pm 0.113	0.185 \pm 0.105	0.211 \pm 0.107	0.148 \pm 0.110	0.163 \pm 0.123	0.190 \pm 0.034	0.006 \pm 0.001	0.220 \pm 0.078	0.208 \pm 0.113	0.185 \pm 0.105	0.211 \pm 0.107	0.148 \pm 0.110	0.163 \pm 0.123	0.190 \pm 0.034	0.006 \pm 0.001	0.220 \pm 0.078
Rel. wt (%b.w)	201.667 \pm 40.501	172.333 \pm 26.312	169.333 \pm 35.218	198.000 \pm 22.627	193.000 \pm 11.358	157.000 \pm 21.703	191.667 \pm 67.352	177.333 \pm 33.561	201.667 \pm 40.501	172.333 \pm 26.312	169.333 \pm 35.218	198.000 \pm 22.627	193.000 \pm 11.358	157.000 \pm 21.703	191.667 \pm 67.352	177.333 \pm 33.561
Lung (gm)	2.263 \pm 0.331	2.095 \pm 0.157	2.180 \pm 0.450	2.070 \pm 0.327	2.572 \pm 0.271	2.092 \pm 0.397	0.148 \pm 0.078	2.372 \pm 0.526	2.263 \pm 0.331	2.095 \pm 0.157	2.180 \pm 0.450	2.070 \pm 0.327	2.572 \pm 0.271	2.092 \pm 0.397	0.148 \pm 0.078	2.372 \pm 0.526
Rel. wt (%b.w)	74.000 \pm 7.000	75.333 \pm 17.954	70.000 \pm 14.177	78.500 \pm 9.192	65.000 \pm 14.422	74.333 \pm 5.859	59.000 \pm 4.583	70.000 \pm 7.000	74.000 \pm 7.000	75.333 \pm 17.954	70.000 \pm 14.177	78.500 \pm 9.192	65.000 \pm 14.422	74.333 \pm 5.859	59.000 \pm 4.583	70.000 \pm 7.000
Heart (gm)	0.833 \pm 0.036	0.905 \pm 0.092	0.907 \pm 0.218	0.816 \pm 0.060	0.859 \pm 0.154	1.000 \pm 0.221	2.653 \pm 1.129	0.937 \pm 0.159	0.833 \pm 0.036	0.905 \pm 0.092	0.907 \pm 0.218	0.816 \pm 0.060	0.859 \pm 0.154	1.000 \pm 0.221	2.653 \pm 1.129	0.937 \pm 0.159
Rel. wt (%b.w)	485.000 \pm 81.406	473.667 \pm 117.717	462.667 \pm 52.624	530.000 \pm 56.569	451.667 \pm 98.739	438.000 \pm 64.257	408.667 \pm 54.262	455.333 \pm 23.029	485.000 \pm 81.406	473.667 \pm 117.717	462.667 \pm 52.624	530.000 \pm 56.569	451.667 \pm 98.739	438.000 \pm 64.257	408.667 \pm 54.262	455.333 \pm 23.029
Liver (gm)	5.495 \pm 1.093	5.761 \pm 1.108	5.952 \pm 0.529	5.513 \pm 0.346	5.961 \pm 0.937	5.769 \pm 0.128	0.808 \pm 0.100	6.078 \pm 0.671	5.495 \pm 1.093	5.761 \pm 1.108	5.952 \pm 0.529	5.513 \pm 0.346	5.961 \pm 0.937	5.769 \pm 0.128	0.808 \pm 0.100	6.078 \pm 0.671
Rel. wt (%b.w)	27.000 \pm 3.000	0.338 \pm 0.098	0.330 \pm 0.045	0.293 \pm 0.042	0.324 \pm 0.013	0.341 \pm 0.088	5.555 \pm 0.366	21.667 \pm 3.055	27.000 \pm 3.000	0.338 \pm 0.098	0.330 \pm 0.045	0.293 \pm 0.042	0.324 \pm 0.013	0.341 \pm 0.088	5.555 \pm 0.366	21.667 \pm 3.055
Pancreas (gm)	0.306 \pm 0.047	0.306 \pm 0.047	0.251 \pm 0.096	0.293 \pm 0.042	0.324 \pm 0.013	0.341 \pm 0.088	5.555 \pm 0.366	21.667 \pm 3.055	0.306 \pm 0.047	0.306 \pm 0.047	0.251 \pm 0.096	0.293 \pm 0.042	0.324 \pm 0.013	0.341 \pm 0.088	5.555 \pm 0.366	21.667 \pm 3.055
Rel. wt (%b.w)	30.333 \pm 1.528	28.667 \pm 11.676	26.000 \pm 5.000	26.500 \pm 2.121	24.333 \pm 3.786	29.000 \pm 4.000	28.667 \pm 4.726	24.000 \pm 6.083	30.333 \pm 1.528	28.667 \pm 11.676	26.000 \pm 5.000	26.500 \pm 2.121	24.333 \pm 3.786	29.000 \pm 4.000	28.667 \pm 4.726	24.000 \pm 6.083
Spleen (gm)	0.343 \pm 0.027	0.338 \pm 0.098	0.337 \pm 0.076	0.276 \pm 0.010	0.322 \pm 0.040	0.384 \pm 0.050	0.329 \pm 0.063	0.323 \pm 0.100	0.343 \pm 0.027	0.338 \pm 0.098	0.337 \pm 0.076	0.276 \pm 0.010	0.322 \pm 0.040	0.384 \pm 0.050	0.329 \pm 0.063	0.323 \pm 0.100
Rel. wt (%b.w)	30.000 \pm 2.646	25.667 \pm 5.508	25.000 \pm 2.646	31.000 \pm 4.243	26.000 \pm 2.000	26.667 \pm 4.041	23.000 \pm 1.000	31.000 \pm 7.550	30.000 \pm 2.646	25.667 \pm 5.508	25.000 \pm 2.646	31.000 \pm 4.243	26.000 \pm 2.000	26.667 \pm 4.041	23.000 \pm 1.000	31.000 \pm 7.550
Kidney (L)(gm)	0.339 \pm 0.030	0.313 \pm 0.057	0.323 \pm 0.047	0.324 \pm 0.059	0.345 \pm 0.011	0.351 \pm 0.004	0.399 \pm 0.115	0.419 \pm 0.139	0.339 \pm 0.030	0.313 \pm 0.057	0.323 \pm 0.047	0.324 \pm 0.059	0.345 \pm 0.011	0.351 \pm 0.004	0.399 \pm 0.115	0.419 \pm 0.139
Rel. wt (%b.w)	33.000 \pm 2.646	27.000 \pm 6.245	26.333 \pm 2.517	30.000 \pm 0.000	26.667 \pm 3.215	26.333 \pm 4.041	24.667 \pm 3.215	27.000 \pm 1.732	33.000 \pm 2.646	27.000 \pm 6.245	26.333 \pm 2.517	30.000 \pm 0.000	26.667 \pm 3.215	26.333 \pm 4.041	24.667 \pm 3.215	27.000 \pm 1.732
Kidney (R)(gm)	0.374 \pm 0.073	0.330 \pm 0.072	0.340 \pm 0.047	0.313 \pm 0.014	0.354 \pm 0.032	0.347 \pm 0.017	0.317 \pm 0.054	0.361 \pm 0.048	0.374 \pm 0.073	0.330 \pm 0.072	0.340 \pm 0.047	0.313 \pm 0.014	0.354 \pm 0.032	0.347 \pm 0.017	0.317 \pm 0.054	0.361 \pm 0.048
Rel. wt (%b.w)	0.537 \pm 0.060	0.543 \pm 0.117	0.423 \pm 0.121	0.545 \pm 0.049	0.510 \pm 0.080	0.480 \pm 0.075	0.400 \pm 0.053	0.503 \pm 0.100	0.537 \pm 0.060	0.543 \pm 0.117	0.423 \pm 0.121	0.545 \pm 0.049	0.510 \pm 0.080	0.480 \pm 0.075	0.400 \pm 0.053	0.503 \pm 0.100
Adrenal gland (L)(gm)	0.006 \pm 0.000	0.007 \pm 0.001	0.005 \pm 0.002	0.006 \pm 0.000	0.007 \pm 0.001	0.006 \pm 0.002	0.007 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002	0.006 \pm 0.000	0.007 \pm 0.001	0.005 \pm 0.002	0.006 \pm 0.000	0.007 \pm 0.001	0.006 \pm 0.002	0.007 \pm 0.002	0.007 \pm 0.002
Rel. wt (%b.w)	0.543 \pm 0.032	0.517 \pm 0.150	0.470 \pm 0.046	0.515 \pm 0.035	0.470 \pm 0.062	0.523 \pm 0.068	0.513 \pm 0.038	0.500 \pm 0.115	0.543 \pm 0.032	0.517 \pm 0.150	0.470 \pm 0.046	0.515 \pm 0.035	0.470 \pm 0.062	0.523 \pm 0.068	0.513 \pm 0.038	0.500 \pm 0.115
Adrenal gland (R)(gm)	0.006 \pm 0.000	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.000	0.005 \pm 0.000	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002	0.006 \pm 0.000	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.000	0.005 \pm 0.000	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002
Rel. wt (%b.w)	2.890 \pm 1.650	1.277 \pm 0.413	1.317 \pm 0.494	2.895 \pm 2.991	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002	2.890 \pm 1.650	1.277 \pm 0.413	1.317 \pm 0.494	2.895 \pm 2.991	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002	0.006 \pm 0.001	0.007 \pm 0.002
Testis (L)(gm)	0.033 \pm 0.020	0.015 \pm 0.002	0.017 \pm 0.006	0.029 \pm 0.030	0.017 \pm 0.006</											

Table 9. Histopathologic incidence of rats intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Items	Incidence of gross findings								
	Male				Female				
	Dosage (mg/kg)	0	500	50	5	0	500	50	5
No. of animal	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Adrenal gland (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Brain	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Pituitary gland	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Heart	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Liver	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Kidney (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Spleen	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Testis (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Prostate	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Ovary (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Thymus	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.

n.f. : no finding.

타났다(Table 12).

6. 항원성시험

기니피크를 사용하여 실시한 아나필락시스 쇼크반응시험의 결과는 Table 13과 같다. 양성 대조물질인 ovalbumin을 면역보조제와 혼합하여 감작한 군에서는 심한 아나필락시스 반응을 보이다가 까리 모두 사망하였다. 그러나, 시험물질인 GC- γ AHF 투여군에서는 저용량군, 고용량군, 고용량 + 면역보조제군 모두에서 매우 경미한 증상 이외에 특이적인 양성반응을 나타내지 않았다.

아나필락시스와 관련이 있는 IgE가 생성되었는지의 여부를 판정하기 위하여 수동 피부 아나필락시스 시험을 실시하였다. 각 항혈청을 희석하여 피내주사하고 항원과 Evans blue 혼합용액을 정맥주사한 결과는 Table 14와 같다. GC- γ AHF 저용량, 고용량 및 고용량 혼합투여군 모두에서 음성의 결과를 나타내었다. 반면 양성대조군인 ovalbumin 투여군에서는 모두 양성반응을 나타내었으며, PCA 항체가 32배(1마리), 64배(3마리) 및 128배(3마리)로 나

Table 11. Result of skin irritation test treated with GC- γ AHF

Clinical sign Test material	Rash and Crust				Edema			
	24 h		72 h		24 h		72 h	
	Scratched	Non-scratched	Scratched	Non-scratched	Scratched	Non-scratched	Scratched	Non-scratched
Green-Gene 1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	00	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 10. Histopathologic incidence of beagle dogs intravenously treated with GC- γ AHF for 4 weeks

Items	Incidence of gross findings								
	Male				Female				
	Dosage (mg/kg)	0	500	50	5	0	500	50	5
No. of animal	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Brain	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Submandi gland (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Thyroid gland (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Thymus	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Lung	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Heart	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Liver	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Pancreas	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Spleen	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Kidney (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Adrenal gland (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Testis (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Ovary (L, R)	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.

n.f. : no finding.

타났다. 음성대조군에서는 모두 음성반응이 나타났다.

IV. 고찰 및 결론

(주) 녹십자에서 혈우병 치료제로 개발된 GG- γ AHF에 대하여 비글개에 대한 1회 정맥내 단회 및 4주간 반복투여 독성시험, 피부 및 안점막 자극시험, 그리고 항원성시험을 식품의약품안전청 고시 제 1998-116호(1998. 12. 3.) “의약품 등의 독성시험기준”에 준하여 실시하였다.

랫드 및 비글개를 이용한 단회투여 독성시험에서 각각 고용량군(3,125 IU/kg), 중용량군(625 IU/kg) 및 저용량군(125 IU/kg) 또는 고용량군(3,125 IU/kg)을 시험군으로 하여 2주일간 관찰한 결과, 시험물질 투여후 사망개체는 관찰되지 않았으며 전 개체에서 시험물질로 인한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다. 약간의 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성있는 체중변화가 관찰되었으나 이는 일시적으로 나타난 것으로 보아 시험물질의 영향 때문은 아닌

Table 12. Results of ocular irritation test treated with GC- γ AHF

Group	Animal No.	Tissue	Time after application						A.O.I. ^c	
			3 hrs	day 1	day 2	day 3	day 4	day 7		
Irrigation	1	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
	2	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
	3	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
	M.O.I. ^a			0	0	0	0	0	0	
	Day-7 I.O.I. ^b			0						
	Non-irrigation	4	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
			Iris	0	0	0	0	0	0	0
			Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0
		5	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
Iris			0	0	0	0	0	0	0	
Conjunctiva			0	0	0	0	0	0	0	
6		Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
7		Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
8		Cornea	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0	
9	Cornea	0	0	0	0	0	0	0		
	Iris	0	0	0	0	0	0	0		
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		
M.O.I. ^a			0	0	0	0	0	0		
Day-7 I.O.I. ^b			0							

^aMean Ocular irritation Index; ^bIndividual Ocular irritation Index; ^cAcute Ocular irritation Index.

Table 13. Results of active systemic anaphylaxis test in guinea pigs sensitized with GC- γ AHF

Dose (per animal)		No. of animal	Severity of anaphylaxis					Positive ratio
Sensitization (sc)	Challenge (iv)		-	\pm	+	++	+++	
50 IU (GC- γ AHF)	500 IU (GC- γ AHF)	7	7					0/7
500 IU (GC- γ AHF)	500 IU (GC- γ AHF)	7	6	1				0/7
500 IU (GC- γ AHF + FCA)	500 IU (GC- γ HF)	7	6	1				0/7
2 mg (OVA + FCA)	10 mg (OVA)	7					7	7/7
2 ml (Vehicle)	500 IU (GC- γ AHF)	7	7					0/7

것으로 생각되어진다. 그리고 모든 생존개체에 대한 부검 소견에서도 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 변화도 관찰되지 않았다. 따라서 이 시험물질의 LD₅₀은 랫드와 비글개에서 정맥투여 최고용량인 3,125 IU/kg 이상일 것으로 사료된다.

또한 랫드와 비글개에서 GC- γ AHF의 4주간 정맥내 반

복투여에 대한 독성을 조사하기 위하여 500 IU/kg/day을 최고용량으로 정하여 공비 $\times 0.1$ 로 중간용량 50 IU/kg/day, 저용량 5 IU/kg/day을 1일 1회, 주 7회, 4주간 연속 투여하여 얻은 결과는 다음과 같다. 시험기간중 사망동물은 없었으며 전 투여용량군에서 별다른 임상증상이 관찰되지 않았다. 체중변화, 음수 및 사료 섭취 변화량 역시 대조군

Table 14. Results of the heterologous passive cutaneous anaphylaxis test of GC- γ AHF

Sensitized antigen (50 μ l, id)	Challenged antigen (1 ml, iv)/animal	No. of animal	No. of mice at the indicated PCA titer						Positive ratio
			Negative	8	16	32	64	128	
Mouse anti-GC- γ AHF	GC- γ AHF (500 IU/animal)	7	7						0/7
Mouse anti-GC- γ AHF	GC- γ AHF (500 IU/animal)	7	7						0/7
Mouse anti-GC- γ AHF + FCA	GC- γ AHF (500 IU/animal)	7	7						0/7
Mouse anti-OVA + FCA	OVA (10 mg/animal)	7	0			1	3	3	7/7
Mouse anti-Vehicle	GC- γ AHF (500 IU/animal)	7	7						0/7

과 비교하여 암·수 전 용량군에서 유의차가 관찰되지 않았다. 뇨검사 및 안과학적 검사에서는 아무런 이상을 발견하지 못하였으며, 부검시의 혈청생화학적 검사 및 혈액학적 검사소견에서 대조군과 비교하여 각 실험동물들의 투여군 측정치가 대조군과 비교하여 유의하게 변화함이 나타났으나 모두 기준치 범위에 머물러 약물에 의한 영향은 아니라 사료된다. 그리고 혈액응고시간 측정결과 대조군에 비해 어떠한 변화도 관찰되지 않았으며, 부검시의 절대상기중량 및 체중에 대한 상대장기 중량을 측정한 결과 대조군에 비해 일부 장기중량이 유의하게 변화함을 나타내었으나 이는 산발적으로 나타났고 그 수치가 용량 의존적이지 못한 점으로 보아 시험물질의 영향으로 인한 결과는 아니라 사료된다. 병리조직학적 검사결과 대조군과 비교하여 약물투여로 인한 개체의 전 장기에서 아무런 이상을 발견하지 못하였다. 따라서 본 실험에서 사용된 GC- γ AHF의 최대 무독성량(무해용량)은 랫드와 비글개에서 최고 500 IU/kg 이상일 것으로 추정된다.

안점막자극시험의 경우에는 안점막에 GC- γ AHF 50 IU/ml 농도로 0.1 ml를, 피부자극시험의 경우에는 찰과/비찰과 부위에 0.5 ml를 투여하여 관찰한 결과, 두 부위에서 시험물질의 투여에 의해 나타날 수 있는 임상증상이 전혀 관찰되지 않았다. 또한 GC- γ AHF의 안점막 자극시험에서는 세척군과 비세척군 모두에서 평균 0점의 결과를 보여 무자극(non-irritancy) 범주에 해당되어 안전한 물질로 사료된다.

아나필락시스 쇼크반응시험결과 GC- γ AHF 저용량, 고용량, 고용량 혼합투여군의 모든 개체에서도 매우 경미한 증상 외에 아나필락시스와 관련된 특이적인 임상증상을 나타내지 않았으며, 마우스와 랫드를 이용한 이종 수동 피부 아나필락시스 쇼크반응시험에서도 역시 저용량, 고용량, 고용량 혼합군의 마우스로부터 얻은 항혈청을 단계희석하여 랫드의 배부에 각각 피내 감각한 후 항원과 Evans blue 혼합용액을 주입시 어떤 군에서도 유의한 청색반점을 관찰할 수 없었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 GC- γ AHF은 항원성 시험에서 보여지는 것처럼 특이한 IgE를 형성하지 않고 아나필락시스 쇼크반응을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

또한 이미 실시한 복귀돌연변이, 염색체이상 및 소핵시

험결과, GC- γ AHF는 어떠한 유전독성도 유발하지 않는 것으로 나타났다(Shin 등, 2000).

결론적으로 본 실험조건하에서 상기의 결과들로 미루어 보아 GC- γ AHF는 500 IU/kg 이상의 농도수준에서 어떠한 독성도 나타내지 않는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 수의과대학 부설 수의과학연구소의 연구비 지원 및 두뇌한국 21 사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Draize, J.H. (1959); Dermal toxicity. In Appraisal of Safety of Chemicals in Foods, Drug and Cosmetics. *Staff of the Division of Pharmacology, Food and Drug Administration.*
- Donogh, P.O., Alan, R.G., Keri, M.T. and Gordon, A.V. (1988): Factor VIII-bypassing activity of bovine tissue factor using the canine hemophilic model, *J. Clin. Invest.*, **82**, 206-211.
- Jane, G., William, I.W. Therese, M.G., Karen, L.W., Ellson, Y.C., Dennis, H.E. and Gardon, A.V. (1984): Characterization of the human factor VIII gene, *Nature*, **312**, 326-330.
- Joyce, M., Gary, O., Kit, G., Karen, T., Vojtech, L. and Gloria, M. (1996): Pharmacokinetics and Interspecies Scaling of Recombinant Human Factor VIII, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **136**, 75-78.
- Marzulli, F.N. and Maibach, H.I. (1975); The rabbit as a model for evaluating skin irritants; A comparison of results obtained on animals and man using repeated skin exposures, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **13**, 533-540.
- Shin, M.K., Kim, B.S., Mar, W., Fang, M.Z., Son, J.W., Kim, M.Y., Kwak, H.I., Bae, M.O., Byun, T.H., Park, S.Y., Chun, B.H., Byun, J.H., Ahn, K.H., Lee, B.J. and Cho, M.H. (2000): Mutagenicity of Recombinant Antihemophilic Factor VIII (GC- γ AHF), *Arzneimittel-Forschung*, **50**, 316-321.
- 의약품 등의 독성시험기준: 식품안전청 고시 제 1998-116호 (1998. 12. 3).