Local Irritation Test of HM10411 (rhG-CSF) in Rabbits

Shin Woo Cha*, Junghee Han, Choong Yong Kim, Jeong Eun Suh, Jong Choon Kim and Se Chang Kown

Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yu-Seong, Daejeon, 305-606, Korea

1Department of Pharmacology and Toxicology College of Veterinary Medicine,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

2Central Research Institute, Hanni Pharm. Co. Ltd., Sungnam, Kyonggi-do 453-400, Korea

(Received September 3, 2002 ; accepted September 26, 2002)

Abstract – The local irritation study (skin and ocular irritation tests) of HM10411, a rhG-CSF (recombinant human granulocyte-colony stimulating factor) was carried out in New Zealand White rabbits. HM10411 was applied to the bare skin at a dose of 2.5 mg/rabbit (5.0 mg/ml, 0.5 ml) and to the conjunctival sac of eye at a dose of 0.5 mg/rabbit (5.0 mg/ml, 0.1 ml), respectively. In this study, there were no clinical signs which were related to HM10411 compared with those of control group. From above results, HM10411 has not any irritating activity to skin and eye in rabbits.

Key words: HM10411, rhG-CSF, Local irritation, Rabbit

재료 및 방법

시험물질

한미약품 (주) 중앙연구소에서 생산된 HM10411을 본 실험에 사용하였다.

무엇점인 20 mM sodium phosphate로 용해하여 동결조심 시킨 HM10411을 부여전에 밸균생태시험용으로 용해하여 부여하였다. rhG-CSF의 양성에 영 영도인 250 μg/ml의 20배에 해당하는 5.0 mg/ml을 피부자극시험의 경우 0.5 ml마리씩 적용하였다.
시험동물 및 사육환경

시험에 사용된 New Zealand White rabbit는 주로 경용
과학에서 구성하여 8일간의 순화 및 경력기간을 거쳐 발
육이 정상이고 건강한 동물만을 사용하여 시험을 수행하
였다. 피부자극시험의 경우, 연 동물에 대해 제모를 실시
한 후 피부에 이상이 없는 동물들을 선택하였으며, 안정적
자극시험의 경우에는 시기에 24시간 간 육안 및 경관
(I-O-H, Niestz instrument, Japan)을 이용하여 양안이 정상
인 티크를 삽입하여 시험에 사용하였다.

사육실은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15% 완기획수
10-20회/hr, 조도 150-300 Lux의 조건하에 유지되었다.
토끼의 점검, 순화 및 시험기간동안, 사료는 토끼용 고형
사료 (유리나코리아 주식회사)를, 그리고 음수는 대전광
역시 상수도수를 자유섭취시켰다.

시험군 및 적용방법
1) 피부자극시험

본 시험에는 총 6마리를 사용하였으며, 시험개시 시점
에서 체중범위는 2.2-2.4 kg이었다. 시험물질 도포 24시
간 전 및 시험물질도포 직전에 제모기를 사용하여 시험
제의 둔 부위를 계제하였다. 시험물질 도포 직전에 등
부위 좌우측에 정상피부 (비참파피부) 2개소와 슬라이드
플러스 (slide glass)로 각질층만 벗겨진 손상피부 (참파
피부) 2개소 각각 2.5×2.5 cm 정도의 크기로 할당하였으
며, 그 배치는 Fig. 1과 같다.

예상 임상 사항동도의 20배에 해당하는 5.0 mg/ml
본 시험에서의 부여농도로 설정하였으며, 시험물질 및
부형물질은 염급운동, 도포체온은 의약품 등의 독성시
험 기준에 의거하여 0.5ml로 설정하였다. 좌측 정상피부
와 참파피부에는 부형제를, 우측 정상피부와 참파피부
에는 시험물질을 각각 1회 도포한 후, 가려움을 얻고 시
험물질의 반응을 관찰하기 위해 고형제의 비닐공을 달고 반장
고로 고정한 다음, 부작용의 이상을 방지하기 위하여 보
호대를 사용하였다. 시험물질 도포 후 24시간간에 반장
고, 비닐 및 가려움을 제거하고 도포부위를 증류수로 세
척한 후, 흉범과 가려의 형성여부 및 부종영상여부를 관
찰하였으며, 또한 72시간간에도 관찰하였다. 외부부작용
결과는 의약품들의 독성시험 기준에서 정한 피부반응의
평가표에 따라 판정하였다. 24시간과 72시간제의 흉범과
가려의 형성 여부와 부종의 형성 여부에 대한 평균을
구하고, 이를 8개 평균을 합한 4로 나눈 값을 피부자극
저수 (Primary Irritation Index, PII)로 하여 Table 1에
따라 그 정도를 구분하였다 (Draize 등, 1944; Patrick
마이바, 1994).

2) 안정자극시험

본 시험에서는 9마리를 사용하였으며, 시험개시 시점
에서 체중범위는 2.2-2.4 kg이었다. 피부자극시험에서와
마찬가지로 이상 임상 사항동도의 20배에 해당하는
5.0 mg/ml 본 시험에서의 부여농도로 설정하였으며, 점
안액량은 시험물질 및 부형물질이 염급으로 의약품들
의 독성시험 기준에 따라 0.1ml로 설정하였다. 좌측 안
구에는 대조부위로서 부형제를, 우측 안구는 두어부위
로서 시험물질을 각각 1회 도포한 지역을 얻었다. 측안
2호 후, 귀 단 3마리는 미안 무균시험용수 20ml로 양
쪽 눈을 1분간 세안하였으며, 나머지 6마리는 세안하지
 않았다.

시험물질을 정안한 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 좌측 안경
막을 대조로 하여 각막의 혼탁 및 혼탁된 각막의 범위,
홍채의 반응, 결막의 발赤, 부종 및 비출혈 유무를 육안
적 또는 검안경으로 판찰하였다. 안경막 자극은 외
약품 등의 독성시험 기준에서 정한 안구병변의 등급표
에 따라 산출하였다. 각 항목의 점수를 합하여 측정을 구합
으며, 그 측정을 마리수로 나눈 값을 평균안구저수
(mean ocular irritation index, M.O.I)로 하였다. 평균

<table>
<thead>
<tr>
<th>Table 1. Evaluation of skin reactions</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>A. Erythema and Eschar Formation</td>
</tr>
<tr>
<td>Very slight erythema (barely perceptible)</td>
</tr>
<tr>
<td>Well defined erythema</td>
</tr>
<tr>
<td>Moderate to severe erythema</td>
</tr>
<tr>
<td>Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)</td>
</tr>
<tr>
<td>Total possible erythema score</td>
</tr>
<tr>
<td>B. Edema Formation</td>
</tr>
<tr>
<td>Very slight edema (barely perceptible)</td>
</tr>
<tr>
<td>Slight edema (edges of area well defined by definite raising)</td>
</tr>
<tr>
<td>Moderate edema (area raised approximately 1 mm)</td>
</tr>
<tr>
<td>Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)</td>
</tr>
<tr>
<td>Total possible edema score</td>
</tr>
<tr>
<td>Total possible score for primary irritation</td>
</tr>
<tr>
<td>Primary irritation index (PII): P.I.I.&lt;2 mild irritant</td>
</tr>
<tr>
<td>2S.P.I.I.&lt;5 moderate irritant</td>
</tr>
<tr>
<td>5S.P.I.I. severely irritant</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Fig. 1. Experimental region to rabbit back skin.
①: test site (non-abraded)
②: test site (abraded)
③: control site (non-abraded)
④: control site (abraded)
Table 2. Scale of weighted scores for grading the severity of ocular lesions

I. Cornea

A. Opacity-Degree of Density (area which is most dense is taken for reading)
- Scattered or diffuse area-details of iris clearly visible: 1
- Easily discernible translucent areas, details of iris slightly obscured: 2
- Opalescent areas: no details of iris visible, size of pupil barely discernible: 3
- Opaque, iris invisible: 4

B. Area of Cornea Involved
- One quarter (or less) but not zero: 1
- Greater than one quarter—less than one-half: 3
- Greater than one half—less than three quarters: 3
- Greater than three quarters up to whole area: 4

Score equals A×B×5
Total maximum=80

II. Iris

A. Values
- Folds above normal, congestion, swelling, circumcorneal injection (any one or all of these or combination of any thereof), iris still reacting to light (sluggish reaction is positive): 1
- No reaction to light, hemorrhage, gross destruction (any one or all of these): 2

Score equals A×5
Total possible maximum=10

III. Conjunctivae

A. Redness (refers to palpebral conjunctivae only) Vessels definitely injected above normal: 1
- More diffuse deeper crimson red individual vessels not easily discernible: 2
- Diffuse beefy red: 3

B. Chemosis
- Any swelling above normal (includes nictitating membrane): 1
- Obvious swelling with partial eversion of lids: 2
- Swelling with lids about half closed: 3
- Swelling with lids about half closed to completely closed: 4

C. Discharge
- Any amount different from normal (does not include small amounts observed in inner canthus of normal animals): 1
- Discharge with moistening of the lids and hairs just adjacent to the lids: 2
- Discharge with moistening of the lids and considerable area around the eye: 3

Score (A+B+C)×2
Total maximum=20
The maximum total score is the sum of all scores obtained for the cornea, iris and conjunctivae.

Draize et al. (1944).

Table 3. Results of skin reaction

<table>
<thead>
<tr>
<th>Sites</th>
<th>Control site</th>
<th>Test site</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Change</td>
<td>Erythema &amp; Eschar</td>
<td>Edema</td>
</tr>
<tr>
<td>Phases (hours)</td>
<td>Intact</td>
<td>Abraded</td>
</tr>
<tr>
<td>Animal No.</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>1</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>2</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>Mean Score</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>ΣMean Score</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>Total</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>P.I.I. b)</td>
<td>0</td>
<td>0</td>
</tr>
</tbody>
</table>

a)Time after topical application
b)P.I.I. (primary irritation index) = total/4
안구자극지수 중 최고값을 균성안구자극지수 (acute ocular irritation index, A.O.I.)로 하였다. 이 결과를 바탕으로 Table 2에 따라 시험물질의 안정유 자극 정도를 평가하였다 (Ballantyne, 1993; Draize 등, 1944).

결과

피부 및 안점막 반응 판찰결과는 Table 3 및 4와 같다.

토끼의 피부에 시험물질 HM10411 0.5% 용액을 0.5 ml씩 도포한 후 24시간 및 72시간이 경과한 시점에서, 시험물질 투여에 의한 것으로 생각되는 어떠한 피부반응 소견도 관찰되지 않았다.

토끼의 안구에 시험물질 HM10411 0.5% 용액 0.1 ml씩 정안한 결과, 1, 2, 3, 4 및 7일째 각각, 홍채 및 겉막에 있어서 시험물질의 투여에 의한 것으로 생각되는 어떠한 안점막 자극 소견도 관찰할 수 없었다.

고찰 및 결론

HM10411은 헌미약품 (주) 중앙연구소에서 유명한 재조합 기술을 이용하여 대장균에서 발현시켜 얻은 rhG-CSF로, 항암화학요법 및 방사선 조사에 의한 호중구 감소증의 치료, 골수이식후의 과립지화복출중작용을 유도적으로 개발된 조혈모세기이다.

HM10411에 대한 국소자극성을 평가하기 위하여 0.5%의 농도로 New Zealand White 토끼의 피부에 1회 도포하고, 안구에 1회 정안한 후 피부자극성 및 안점막 자극성은 관찰하였다. 피부반응 판찰 결과, 토끼의 피부에 시험물질 및 부품물질을 도포한 후 24시간 및 72시간이 경과하였을 때, 경상 및 손상피부 모두에서 피부반응은 전히 관찰되지 않았으며 피부자극지수 (P.L.I.)의 산출결과는 '0'이었다. 안구에 시험물질을 정안한 후 1, 2, 3, 4 및 7일째에 안과학적인 검사를 실시한 결과, 모든 기관의 각막, 홍채 및 겉막에서 시험물질의 투여에 관란된 소견은 전혀 관찰되지 않았으며, 균성안구자극지수 (M.O.I) 및 균성안구자극지수 (A.O.I)는 모두 '0'이었다. 이러한 결과들은 기존의 rhG-CSF 체계에 대한 국소독성시험 결과들과 동일하였다 (Kim 등, 1994; Kim 등, 1997; Choi 등, 1999).

이상의 결과에서 HM 10411은 임상 사용농도의 20배에 해당하는 0.5% 용액에서 피부 및 안점막에 대한 자극이 없는 비자극성 물질로 사료된다.

참고문헌


Choi, Y.S., Ahn, K.K., Juhn, J.H., Lee, J.S., Moon, B.S. and


