

## 재조합 인 과립구 콜로니 자극인자 DA-3030의 랫드에 대한 4주 정맥내 반복투여 독성연구

강경구\* · 김옥진 · 안병욱 · 백남기 · 이순복 · 김원배 · 양중익  
동아제약(주) 연구소

### Four-week Intravenous Toxicity Study of DA-3030, a Recombinant Human G-CSF, in Rats

Kyung Koo KANG\*, Ok Jin KIM, Byoung Ok AHN, Nam Gi BAIK  
Soon Bok LEE, Won Bae KIM and Junn Ick YANG

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co. Ltd.,  
47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-gun, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received October 4, 1994; accepted October 21, 1994)

**Abstract**—This study was conducted to evaluate the repeated dose toxicity of DA-3030, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor(rhG-CSF), in rats. DA-3030 was administered intravenously once a day for 4 weeks to 20 males and 20 females per group at doses of 0(control), 115 and 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , and to 15 males and 15 females per group at doses of 1.15 and 11.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . After the administration period, 5 males and 5 females per group in the 0, 115 and 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  groups were placed on withdrawal for 2 weeks. Throughout the study, all the rats survived. The administration of DA-3030 induced, a marked increase in the number of peripheral neutrophils, elevation of serum alkaline phosphatase activity, and splenomegaly in the rats of both sexes receiving 115 or 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Histopathologic examination revealed extramedullary granulopoiesis in spleen and liver, and increase in the number of activated macrophages in spleen in rats of both sexes in 115 and 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  groups, and increased M/E ratio in 11.5, 115 and 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  groups. Most of the changes produced by DA-3030 were thought to be attributable to exaggerated pharmacological effect of the drug, and subsided or disappeared after the recovery period. Under the present condition, no effect dose of DA-3030 is estimated at 1.15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ .

**Keywords** □ DA-3030, rhG-CSF, repeated dose toxicity, rat

DA-3030은 동아제약(주) 연구소에서 개발예정인 과립구 콜로니 형성 자극인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)로 유전공학기법을 이용하여 *E. coli*에서 발현시킨 물질이다. G-CSF는 강한 과립구형성 증가작용을 가져 과립구감소증의 치료, 항암제 및 방사선 조사에 의한 골수독성의 경감, 골수이식 후의 과립구 회복촉진 등에 우수한 효과를 나타내어 최근에 많은 연구가 진행되고 있다. 본 시험은 안전성평가의 일환으로 DA-3030을 랫드에 정맥내로 4주간 반복투여하였을 때 발현가능한 독성증상 및 그 회복성을 평가하기 위하여 실시하였다.

#### 실험방법

본 시험은 의약품등의 독성시험기준(국립보건안전연구원, 1988)에 준하여 실시하였다.

#### 시험물질

시험물질인 DA-3030은 동아제약(주) 생물공학연구실에서 생산한 무색의 액상물질로 순도는 99% 이상, Lot No.는 CTS-001이었으며, 대조물질은 매체대조물질(10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0)을 사용하였다. 시험기간중 시험물질 및 대조물질 모두 냉장보관하였으며, 시험당일 각 투여군의 농도에 맞게 매체로 희석하여 사용하였다.

\*To whom correspondence should be addressed.

### 시험동물 및 사육환경

5주령의 SPF Sprague-Dawley계 랫드 암수 각 90마리를 B&K사(중국)로 부터 구입하여 1주일간 청정구역 내에서 검역 및 순화사육한 다음 6주령의 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 검역순화사육기간 및 시험기간중 동물은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 15\%$ , 환기횟수 15~20회/시간, 조명시간 10시간(07:00~19:00)의 조건으로 유지하였다. 동물의 수용은 랫드용 스테인레스제 사육상자(W222×D235×H180 mm)에 순화검역기간에는 케이지당 5마리씩, 시험기간 중에는 3마리씩 각각 암수 분리하여 수용하였다. 사료는 랫드용 고품사료(purina) 방사선멸균품을, 음수는 자외선멸균 수도수를 자유접취시켰다.

### 투여량의 설정

DA-3030의 투여량은 추정임상사용량( $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )의 약 230배에 해당하는  $1150 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 을 최고용량으로 하고 이하 공비 0.1로 115, 11.5 및  $1.15 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 으로 설정하였으며, 대조군은 매체대조물질 투여군으로 설정하였다. 투여용량은 대조군을 포함하여 모두  $1 \text{ ml}/\text{kg}$ 으로 하였다.

### 시험군의 구성

시험군의 구성은 Table I과 같다. 검역 및 순화사육 후 건강한 동물을 선발하여 각 군간 체중의 평균치가 균일하게 균분리하여, DA-3030 4개 투여군과 매체대조물질 투여군인 대조군을 포함하여 모두 5개군으로 구성하였다. 각 투여군의 사용동물수는 대조군 및 DA-3030 115,  $1150 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  투여군은 반복투여 독성시험용 15마리 및 회복시험용 5마리로 암수 각각 20마리씩으로 구성하였으며, DA-3030 1.15 및  $11.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  투여군은 반복투여독성 시험용 15마리로 암수 각각 15마리씩으로 구성하였다.

### 투여방법, 투여기간 및 휴약기간

투여경로는 임상적용경로 중의 하나인 정맥내 투여로 랫드의 미정맥내로 1일 1회 4주간(28일) 반복투여하였다. 각 개체의 투여용량은 주1회 측정하는 체중치로 산출하였으며, 4주간의 투여종료 후 대조군 및 DA-3030 115,  $1150 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  투여군의 암수 각 5마리에 대하여 2주간의 휴약기간을 두어 회복시험을 실시하였다.

### 검사항목

#### 폐사율 및 일반상태

투여기간 중에는 매일 투여직전 각 개체의 사망유무와 일반상태를 관찰하였으며, 회복기간 중에는 1일 1회 사망유무와 일반증상을 관찰하였다.

#### 체중, 사료량 및 음수량

투여기간 및 회복기간 동안 전군에 대하여 매주 1회씩 체중, 사료소비량 및 음수소비량을 측정하였다. 사료와 음수소비량은 케이지별로 측정하여 마리당 1일 평균소비량을 산출하였다.

#### 안과학적검사

**Table I.** Experimental design for toxicity study of DA-3030 administered intravenously to rats once a day for 4 weeks

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )	No. of animals sacrificed			
		At the end of dosage period		At the end of recovery period	
		Male	Female	Male	Female
Control	—	10(5)	10(5)	5	5
DA-3030	1.15	10(5)	10(5)	0	0
	11.5	10(5)	10(5)	0	0
	115	10(5)	10(5)	5	5
	1150	10(5)	10(5)	5	5

The numbers in parentheses indicate the number of animals used 2-week interim sacrifice.

투여개시 전과 투여개시 후 2주 및 4주에 모든 동물에 대하여 안검사용 검안경을 이용하여 좌우안의 각막 및 홍채 등의 이상유무를 관찰하였다.

#### 혈액학적검사

투여개시 2주에 각 군 5마리, 투여종료 후 각 군 10마리 및 회복기간 종료 후 회복군 전예에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액은 ether 마취한 동물의 복대 동맥으로부터 채취하여 EDTA와 구연산나트륨 등의 항응고제를 이용하여 각각 혈액학적검사와 혈액응고시간(prothrombin time, PT) 측정에 이용하였다. 혈액학적 검사에서는 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 혈색소(Hb), 헤마토크리트치(Ht), 평균혈구용적(MCV), 평균혈구혈색소량(MCH), 평균혈구혈색소농도(MCHC) 등에 대하여 혈구자동측정기(Minos Vet, Minos)를 이용하여 측정하였으며, PT는 자동응고시간측정기(Automated Coagulation Laboratory, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 측정하였다. 한편, 백혈구분율을 조사하기 위하여 혈액을 슬라이드에 도말하여 건조시킨 후 0.5% Modified Giemsa 염색액으로 50분간 염색하여 광학현미경으로 혈구의 형태를 관찰하고 백혈구 백분율을 구하였다.

#### 혈청생화학학적검사

혈액학적검사를 위하여 채취한 혈액의 잔여혈액을 응고시킨 후 혈청을 분리하여 혈청생화학학적검사를 실시하였다. 혈청생화학학적검사는 혈액자동분석기(Spectrum, Abbott)를 이용하여 alanine transferase(ALT, Transamination-LDH법), aspartate transaminase(AST, Transamination-MDH-LDH법), albumin(Brom Cresol Green 법), alkaline phosphatase(ALP, pNPP hydrolysis법), total bilirubin(Evelyn-Malloy법), glucose(Hexokinase법), total protein(Biuret법), urea(BUN, Urease법), cholesterol(효소법), creatinine(Jaffe법), Na(Electrode법), Cl(Electrode법), K(Electrode법) 등을 측정하였다.

#### 노검사 및 골수검사

투여 제 2주에 각 군의 암수 각 5마리를 랫드용 meta-

bollic cage에 한마리씩 분리수용하여 검사전일 오후 4시부터 16시간 채뇨하였다. 투여기간 종료시인 4주에는 각 군의 암수 각 10마리를, 회복기간 종료시는 대조군, 115, 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 군의 암수 각 5마리를 동일한 방법으로 채뇨하였다. 채취한 뇨에 대해서 외관과 뇨량을 관찰한 후 뇨검사용시험지(multistix, Ames)를 사용하여 pH, 단백(protein), urobilinogen, bilirubin, 포도당(glucose), 키톤체(ketone body), 잠혈(blood), 침사에 관하여 검사하였다. 평가는 뇨검사용시험지의 평가표에 의해 평점하였으며, urobilinogen은 <2, 2, 4, 8 Ehrlich units/dL을 각각 -, +, ++, +++ 등으로, 키톤체는 <5, 5~15, 40, 80, 160 mg/dL을 각각 -,  $\pm$ , +, ++, +++ 등으로, 포도당은 <100, 100, 250, 500, 1000 mg/dL을 각각 -,  $\pm$ , +, ++, +++ 등으로 평점하였다. 골수검사를 위해 투여종료 후 부검한 각 동물의 흉골을 절제하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 고정한 표본을 다시 탈회용액(10% formic acid in 10% formalin)에 넣어 탈회시켰다. 탈회한 표본중 대조군과 고용량군에 대하여 병리조직학적 검사를 실시하였으며 검사결과 고용량에서 병변이 인정되면 중용량군까지 동일방법으로 표본을 제작하여 검사하였다.

#### 부검 및 장기중량측정

투여 2주와 투여기간 및 회복기간 종료후 각 군의 동물을 ether로 마취시켜 외관의 이상유무를 육안적으로 관찰하고 채혈을 실시하였다. 채혈후 방혈치사시킨 동물에 대해 부검을 실시하여 체강과 각 실질장기에 대해 육안적 검사를 하였다. 각각의 병변을 관찰, 기록한 후 뇌, 심장, 폐장, 비장, 간장, 신장, 부신, 흉선, 고환, 난소 등을 주위조직과 분리하여 각 장기의 절대중량을 측정하였으며, 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

#### 병리조직학적소견

중량을 측정한 장기와 흉골, 위, 소장, 대장, 장간막임

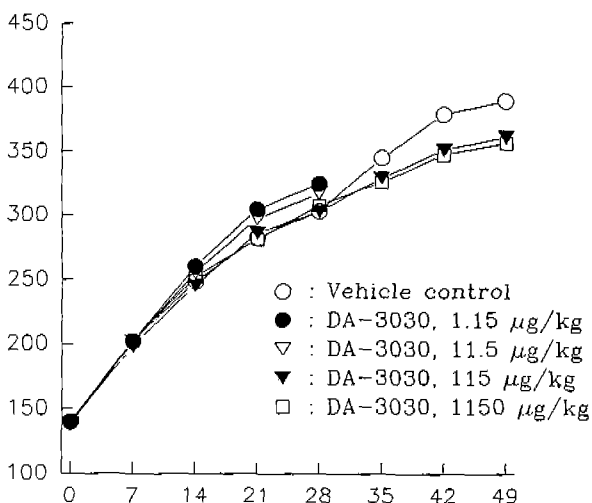


Fig. 1. Body weight changes in male rats administered I.V. with DA-3030 or vehicle.

파절 등의 장기를 10% 중성포르말린에 1주 이상 고정시킨다음 통상적인 방법을 거쳐 조직절편을 제작하였으며, hematoxylin-eosin염색을 한 후 광학현미경으로 병리조직학적 검사를 실시하였다. 병리조직학적 검사는 대조군과 고용량군에 대하여 실시하였으며, 고용량군에서 이상을 나타내는 장기에 대해서는 다른 용량군에 대해서도 병리조직학적 검사를 실시하였다.

#### 통계학적분석

본 시험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적 분석은 Bartlett test로 분산검정을 실시하여 등분산일 경우 일원배치 분산분석법으로, 부등분산일 경우 Kruskal-Wallis법으로 유의성검정을 하였다. 일원배치 분산분석법에서 유의한 경우 Scheffe법을, Kruskal-Wallis법에서 유의성이 인정되는 경우에는 distribution-free multiple comparison법에 의해 대조군과 각 투여군간의 다중비교를 실시하였다. 분산검정외의 통계처리는 SAS(Statistical Analysis System) 통계프로그램을 이용하였다.

## 실험결과

#### 폐사율 및 일반증상

투여기간과 회복기간중 폐사에는 나타나지 않았다.

일반증상으로는 연변, 복부 피로 더러움 등의 증상이 소수에서 관찰되었으나 이는 대조군을 포함하여 고르게 나타났으며 용량상관성을 보이지도 않아 약물투여와 관련된 변화로는 볼 수 없었다. 그외 투약과 관련한 유의한 변화는 인정되지 않았다.

#### 체중변화, 사료섭취량 및 음수량

DA-3030을 투여한 각 군의 암수 모든 동물에서 투약기간과 회복기간중 대조군과 비교하여 유의성있는 체중증가는 인정되지 않았으며, 사료섭취량 및 음수량에 있어서도 대조군에 비해 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

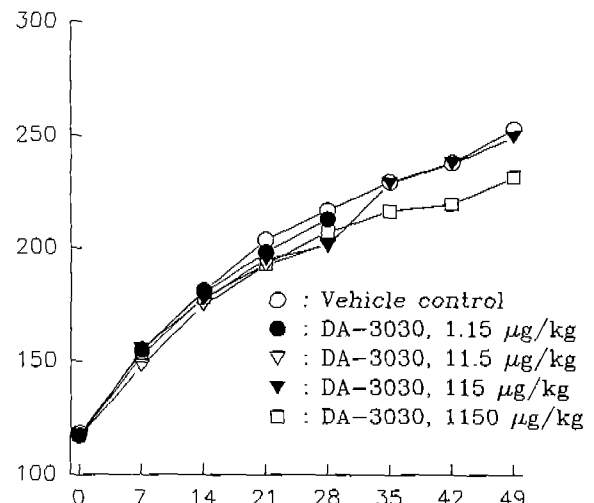


Fig. 2. Body weight changes in female rats administered I.V. with DA-3030 or vehicle.

**Table II.** Food consumption (g/day/animal) of rats intravenously administered with DA-3030

Sex	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	No. of animals	Days of administration					
			7	14	21	28	35 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>
Male	Control	20	23.7 $\pm$ 2.0	23.8 $\pm$ 2.6	22.1 $\pm$ 3.7	24.7 $\pm$ 6.7	27.2 $\pm$ 4.5	26.6 $\pm$ 4.4
	1.15	15	23.7 $\pm$ 2.6	24.6 $\pm$ 0.7	25.9 $\pm$ 2.4	23.5 $\pm$ 2.1		
	11.5	15	24.1 $\pm$ 1.2	25.4 $\pm$ 1.8	23.7 $\pm$ 4.0	24.9 $\pm$ 1.6		
	115	20	24.5 $\pm$ 3.6	23.1 $\pm$ 1.4	25.1 $\pm$ 2.2	25.2 $\pm$ 1.5	27.6 $\pm$ 0.1	25.7 $\pm$ 0.9
	1150	20	23.7 $\pm$ 1.8	23.6 $\pm$ 2.2	23.5 $\pm$ 4.1	23.1 $\pm$ 6.8	27.8 $\pm$ 1.1	30.1 $\pm$ 3.4
Female	Control	20	18.0 $\pm$ 1.7	17.6 $\pm$ 2.6	18.5 $\pm$ 2.2	17.2 $\pm$ 1.4	24.1 $\pm$ 2.0	22.5 $\pm$ 3.5
	1.15	15	18.7 $\pm$ 1.7	17.0 $\pm$ 2.5	17.3 $\pm$ 2.8	19.1 $\pm$ 1.3		
	11.5	15	18.5 $\pm$ 3.2	18.2 $\pm$ 1.8	19.2 $\pm$ 0.9	18.9 $\pm$ 1.0		
	115	20	18.4 $\pm$ 3.5	19.3 $\pm$ 1.7	19.3 $\pm$ 2.3	18.3 $\pm$ 2.3	26.5 $\pm$ 0.7	26.3 $\pm$ 1.8
	1150	20	19.3 $\pm$ 1.7	18.2 $\pm$ 0.8	18.7 $\pm$ 4.0	18.7 $\pm$ 1.3	23.7 $\pm$ 3.7	22.9 $\pm$ 0.6

Each value represents the mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>; Recovery period

**Table III.** Water consumption (ml/day/animal) of rats intravenously administered with DA-3030

Sex	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	No. of animals	Days of administration					
			7	14	21	28	35 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>
Male	Control	20	29.9 $\pm$ 5.9	23.0 $\pm$ 6.7	26.3 $\pm$ 11.3	40.0 $\pm$ 3.3	22.1 $\pm$ 6.5	23.4 $\pm$ 11.8
	1.15	15	29.0 $\pm$ 3.3	29.2 $\pm$ 3.2	41.1 $\pm$ 10.0	26.7 $\pm$ 8.7		
	11.5	15	29.6 $\pm$ 4.2	25.8 $\pm$ 5.6	37.8 $\pm$ 23.4	29.4 $\pm$ 5.4		
	115	20	28.3 $\pm$ 5.3	25.0 $\pm$ 7.5	34.3 $\pm$ 10.1	42.3 $\pm$ 7.0	35.0 $\pm$ 7.1	31.3 $\pm$ 1.8
	1150	20	25.0 $\pm$ 8.0	29.5 $\pm$ 6.8	29.0 $\pm$ 6.9	36.7 $\pm$ 16.3	35.0 $\pm$ 7.1	31.3 $\pm$ 5.3
Female	Control	20	19.8 $\pm$ 6.8	21.8 $\pm$ 10.5	28.7 $\pm$ 14.0	26.3 $\pm$ 6.5	30.9 $\pm$ 1.2	33.4 $\pm$ 2.3
	1.15	15	20.7 $\pm$ 5.8	22.8 $\pm$ 6.1	16.4 $\pm$ 10.5	37.2 $\pm$ 9.5		
	11.5	15	22.3 $\pm$ 6.7	17.0 $\pm$ 6.7	34.3 $\pm$ 11.8	32.2 $\pm$ 6.3		
	115	20	23.1 $\pm$ 8.2	18.6 $\pm$ 6.3	30.0 $\pm$ 5.5	28.7 $\pm$ 15.9	50.4 $\pm$ 10.0	40.1 $\pm$ 5.9
	1150	20	27.0 $\pm$ 10.3	23.8 $\pm$ 9.1	24.3 $\pm$ 10.3	33.7 $\pm$ 10.0	41.3 $\pm$ 1.8	35.9 $\pm$ 5.9

Each value represents the mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>; Recovery period

(Fig. 1, 2, Table II, III).

#### 안과학적검사

투여개시 2주와 4주에 실시한 안과학적검사결과 모든 투여군에서 시험물질의 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다.

#### 혈액학적검사

혈액학적검사결과는 Table IV, V와 같다. 2주 중간도살 동물의 혈액학적검사결과 암수 모두 백혈구수의 용량의존적 증가가 인정되었으나, 통계학적 유의성은 없었다. 백혈구백분율에 있어서는 암수 모두 용량의존적인 호중구비율의 상승과 림프구비율의 상대적 감소가 관찰되었으며, 이 중 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서는 통계학적 유의차가 인정되었다( $p < 0.05$ ). 4주 최종도살 검사결과 백혈구수는 암수 모두 용량의존적으로 증가하였으며 수컷 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서만 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ ). 또 백혈구비율에 있어서는 암수 각각 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  및 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서 림프구비율의 감소 및 호중구비율의 유의성있는 증가가 인정되었다( $p < 0.05$ ). 그

외 유의성있는 변화로는 수컷 115, 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 군에서 혈소판수의 감소가 관찰되었으며, 기타 각 군에서 특이적인 변화는 없었다. 한편, 회복기간종료시에 실시한 혈액학적검사결과 투약기간중에 나타난 모든 변화는 소실되어 각 구간 유의한 차이가 인정되지 않았다.

#### 혈청생화학학적검사

투약 2주에 실시한 중간도살검사 결과 alkaline phosphatase는 암수 모두에서 용량상관성있는 증가를 보였으나 유의성은 인정되지 않았다. 투약기간종료 후의 검사결과에서 alkaline phosphatase는 암수 모두 용량의존적으로 통계학적 유의성있는 증가를 보였으며( $p < 0.05$ ), 그외 약물의 영향으로 판단되는 특기할 만한 변화는 관찰되지 않았다(Table VI). 한편 이와 같은 변화는 회복기간 종료 후 실시한 혈청생화학학적검사 결과에서는 소실되었다.

#### 노검사

투약 2주 및 4주와 회복기간 종료 후 실시한 노검사 결과 약물투여와 관련하여 대조군과 유의성 있는 변화는

**Table IV.** Hematology summary of male rats intravenously administered with DA-3030 for 4 weeks

Day	Dose (µg/kg)	n	WBC (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	Lymph. (%)	Mono. (%)	Baso. (%)	Eosin. (%)	Neut. (%)	RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	HB (g/dl)	HCT (%)	MCV (µ <sup>3</sup> )	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	PT (sec)
14	Control	5	8.0±2.9	93.0±2.3	0.6±0.5	0±0	0.2±0.4	6.2±1.8	6.8±0.3	14.8±0.6	41.2±1.3	61.0±1.6	21.8±0.8	35.8±0.5	832.0±152.1	12.2±1.5
	1.15	5	8.7±5.0	91.0±3.9	0.2±0.4	0±0	0.2±0.4	8.6±3.4	6.8±0.4	14.4±0.8	40.3±2.2	59.6±1.7	21.3±0.5	35.8±0.1	661.6±281.5	12.4±0.8
	11.5	5	9.2±5.0	91.2±2.2	1.0±1.4	0±0	0.8±0.5	6.5±2.4	6.7±0.4	14.2±0.7	39.8±2.3	59.2±2.2	21.1±1.0	35.7±0.9	768.0±87.1	12.4±0.4
	115	5	12.1±1.6	81.8±5.2	0.4±0.9	0±0	0.8±1.1	17.0±3.8*	5.9±1.8	13.0±4.0	35.9±10.9	61.0±1.0	21.9±0.9	36.0±0.9	707.4±139.7	12.3±1.0
	1150	5	16.9±7.0	54.6±9.3*	0.2±0.4	0.2±0.4	0.4±0.9	44.6±10.1*	6.7±0.5	14.6±1.0	40.3±2.2	59.8±1.9	21.8±0.7	36.2±0.8	610.8±238.7	12.2±0.8
28	Control	10	6.0±3.0	87.4±2.8	0.9±1.0	0.3±0.5	0.3±0.5	11.1±3.4	7.2±0.4	14.7±1.1	41.0±2.8	57.0±1.3	20.4±0.6	35.9±0.6	686.5±90.7	11.7±0.6
	1.15	10	8.4±5.2	89.8±3.8	0.3±0.5	1.0±1.2	0.6±0.7	8.3±3.0	7.0±0.4	14.7±0.9	40.2±2.2	57.9±1.2	21.0±0.6	36.4±0.5	651.7±77.9	11.4±0.4
	11.5	10	9.4±5.1	92.5±2.0	0.1±0.3	0.4±0.7	0.3±0.5	6.7±1.8	7.1±0.2	14.8±0.7	40.1±1.7	56.5±2.2	20.8±0.9	36.7±0.4	612.2±54.9	11.6±0.3
	115	10	14.5±2.6*	78.0±9.7	0.1±0.3	0.2±0.4	0.4±0.7	21.3±9.3*	7.0±0.3	13.7±1.7	40.3±1.9	57.2±1.8	19.4±2.8	33.9±4.6	553.7±121.5*	12.2±1.2
	1150	10	19.5±8.2*	55.3±10.1*	0.2±0.4	0.1±0.3	0.3±0.7	44.1±9.8*	7.1±0.5	14.0±0.8	41.7±2.1	58.5±1.6	19.6±0.6	33.6±0.4	516.9±97.6*	11.6±0.5
42	Control	5	9.7±5.2	-	-	-	-	-	7.3±0.4	13.4±0.4	39.2±0.9	53.6±1.5	18.2±0.7	34.0±0.5	657.2±78.5	11.2±0.2
	115	5	7.6±4.3	-	-	-	-	-	7.4±0.4	13.8±0.2	40.8±0.9	55.6±0.9	18.6±0.4	33.7±0.5	760.0±100.8	11.8±0.5
	1150	5	8.2±4.0	-	-	-	-	-	7.4±0.1	13.9±0.2	41.1±0.3	55.6±1.3	18.6±0.4	33.7±0.5	760.0±100.8	11.8±0.5

Each value represents the mean ± S.D. \*; Significantly different from the control(p<0.05), -; Not tested

**Table V.** Hematology summary of female rats intravenously administered with DA-3030 for 4 weeks

Day	Dose (µg/kg)	n	WBC (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	Lymph. (%)	Mono. (%)	Baso. (%)	Eosin. (%)	Neut. (%)	RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	HB (g/dl)	HCT (%)	MCV (µ <sup>3</sup> )	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	PT (sec)
14	Control	4	7.2±1.1	91.5±2.4	0.3±0.5	0±0	1.3±1.5	7.0±2.4	7.3±0.3	15.4±0.6	42.1±1.0	58.0±0.8	21.1±0.7	36.5±0.8	754.3±113.2	11.4±0.3
	1.15	5	6.3±1.3	93.6±2.7	0.8±0.8	0±0	1.2±0.8	4.4±1.9	7.0±0.5	14.7±0.8	40.4±2.0	57.2±2.6	20.9±1.0	36.4±0.7	581.0±260.1	14.1±5.7
	11.5	5	6.8±2.7	90.6±2.7	1.4±1.7	0.2±0.4	1.6±2.3	6.2±4.5	6.9±0.5	14.7±1.0	40.4±2.4	58.8±1.8	21.4±0.7	36.5±0.5	730.0±98.0	11.5±0.3
	115	5	11.5±7.6	87.2±4.8	0.2±0.4	0.4±0.5	0.8±0.8	11.4±4.5	6.8±0.4	14.5±0.7	39.9±1.5	58.8±2.3	21.3±0.9	36.2±0.7	769.8±169.7	11.6±0.6
	1150	5	11.6±2.8	72.8±11.7*	0.4±0.9	0.6±0.9	0±0	26.2±10.8*	6.9±0.3	14.9±0.7	40.9±1.8	59.6±1.7	21.6±0.7	36.3±0.2	694.0±315.6	12.5±2.6
28	Control	10	9.1±2.8	89.7±1.7	0.4±0.7	0.2±0.4	0.1±0.3	9.6±1.5	6.4±0.4	12.3±0.6	36.9±1.3	57.8±1.8	19.2±0.7	33.2±0.5	428.1±192.0	11.7±0.8
	1.15	10	5.0±4.4	92.3±3.5	0±0	0.5±0.9	0.6±0.7	7.0±2.7	7.3±0.9	13.4±1.5	40.0±4.4	56.1±0.9	18.4±0.5	33.4±0.6	510.1±238.5	12.0±0.6
	11.5	10	7.3±3.9	93.0±3.2	0.6±0.9	0.4±0.5	0.6±0.9	5.4±2.6	7.2±0.6	13.6±0.7	40.2±2.5	56.0±1.5	18.9±0.9	33.8±0.8	591.6±201.8	12.3±0.3
	115	10	11.1±3.6	86.8±6.0	0.2±0.4	0±0	0.4±0.5	12.7±5.8	7.1±0.4	13.7±1.0	40.8±2.4	57.3±1.6	19.2±0.7	33.6±0.8	577.9±88.6	12.0±0.5
	1150	10	12.3±2.1	71.7±5.3*	0.5±0.8	0±0	0.3±0.5	27.5±5.6*	7.1±0.3	13.5±0.5	39.9±1.7	55.9±1.5	18.8±0.7	33.7±0.4	720.9±92.7	11.8±0.4
42	Control	5	12.4±3.7	-	-	-	-	-	7.1±0.6	13.7±0.6	40.1±2.0	56.8±1.9	17.4±3.9	34.2±0.4	641.8±49.0	10.9±0.2
	115	5	13.9±3.6	-	-	-	-	-	7.3±0.3	13.6±0.6	40.2±1.2	54.8±0.8	18.5±0.3	33.9±0.7	651.2±50.2	11.3±0.3
	1150	5	9.1±0.9	-	-	-	-	-	7.7±0.4	14.5±0.7	42.3±2.0	55.0±1.4	18.9±0.5	34.3±0.6	646.4±80.0	11.5±0.7

Each value represents the mean ± S.D. \*; Significantly different from the control(p<0.05), -; Not tested

Table VI. Blood biochemistry summary of rats intravenously administered with DA-3030 for 4 weeks

Day	Sex	Dose (µg/kg)	n	Albumin (g/dl)	ALP (IU/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Bilir. (mg/dl)	Cholestrol (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Protein (g/dl)	Creat. (mg/dl)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
14	Control	5	1.1±0.1	335.6±64.0	24.1±12.8	112.8±43.5	0.2±0.1	80.0±5.8	16.2±2.2	88.0±30.0	5.7±0.3	0.3±0.1	142.9±2.1	4.8±0.8	104.3±2.3	
		1.15	5	1.2±0.2	292.5±62.1	28.2±4.1	118.2±27.3	0.2±0.1	71.3±12.9	17.7±2.2	91.7±19.0	6.0±0.4	0.4±0.1	141.6±1.9	4.4±0.2	103.8±1.3
		11.5	5	1.1±0.2	339.3±60.5	25.8±12.0	129.0±8.4	0.2±0.1	73.0±14.1	19.4±2.4	83.3±8.9	5.6±0.4	0.4±0.0	140.6±2.1	4.5±0.4	101.4±1.9
		115	5	1.1±0.2	490.8±61.2	26.7±7.2	149.1±62.7	0.2±0.1	80.0±2.4	21.6±4.3	60.7±16.7	6.1±0.2	0.4±0.0	143.6±1.5	5.2±1.3	102.2±1.2
	Control	5	1.1±0.1	749.8±62.5	25.4±5.4	120.6±16.3	0.1±0.0	63.4±3.3	21.5±1.0	99.7±27.2	5.5±0.3	0.4±0.0	141.8±3.1	4.2±0.5	105.2±2.8	
		Control	4	1.3±0.2	295.5±92.2	24.7±1.7	114.5±16.0	0.2±0.0	77.1±3.4	18.6±1.6	81.3±9.6	6.0±0.4	0.4±0.1	143.5±2.0	3.8±0.3	104.1±1.5
		1.15	4	1.2±0.2	256.8±63.0	21.9±3.3	105.9±13.0	0.1±0.0	71.3±12.6	22.8±1.0	79.2±8.6	5.6±0.6	0.4±0.1	143.8±1.0	3.7±0.8	105.3±2.9
		11.5	4	1.3±0.1	259.9±57.4	29.8±5.8	111.9±11.6	0.1±0.0	92.4±9.8	20.2±2.1	78.4±13.2	5.9±0.3	0.4±0.0	143.8±2.4	3.9±0.3	105.3±1.5
	F	115	4	1.1±0.1	276.0±44.2	20.9±8.9	109.2±15.0	0.1±0.0	76.4±13.4	21.3±3.8	90.2±7.2	5.7±0.4	0.4±0.1	140.6±1.1	4.0±0.3	103.9±1.0
		1150	5	1.1±0.0	456.9±94.6	20.0±3.1	93.5±11.0	0.2±0.1	84.9±7.9	24.0±2.1	93.1±14.7	5.5±0.2	0.4±0.1	140.0±2.2	4.2±0.2	103.3±1.0
		Control	10	1.2±0.1	231.2±42.1	35.4±5.2	100.2±12.8	0.2±0.1	58.5±11.9	20.2±3.6	117.2±22.1	6.1±0.4	0.4±0.1	144.4±1.8	4.8±0.5	108.1±1.3
		1.15	10	1.2±0.1	250.7±56.4	40.6±8.3	134.4±25.3	0.3±0.1	64.1±11.3	21.6±1.7	91.6±22.8	5.9±0.7	0.3±0.1	144.4±1.1	5.0±0.4	108.2±0.9
	M	11.5	10	1.2±0.2	258.5±59.5	49.7±17.9	127.5±23.3	0.1±0.1	65.9±11.0	21.0±3.0	97.3±14.3	6.3±0.4	0.4±0.1	145.4±0.9	4.3±0.3	108.5±2.1
		115	10	1.2±0.1	481.3±93.7*	35.7±6.5	123.2±28.7	0.2±0.1	52.3±10.5	21.8±3.9	88.2±14.1	6.4±0.2	0.4±0.1	145.7±1.1	4.3±0.4	109.4±1.0
		1150	10	1.2±0.1	756.1±94.8*	31.2±12.3	104.4±28.3	0.2±0.1	54.5±10.9	21.3±3.5	99.9±29.2	6.4±0.4	0.4±0.0	146.7±1.6	4.5±0.5	108.2±2.1
		Control	10	1.4±0.1	169.7±56.8	36.0±8.4	169.3±32.3	0.3±0.1	73.9±12.3	21.6±3.1	102.5±14.9	6.7±0.4	0.4±0.0	143.8±2.0	4.5±0.2	103.8±1.2
F	1.15	6	1.4±0.1	181.8±27.9	26.1±7.3	111.2±17.1	0.3±0.1	54.6±9.1	23.9±3.7	101.5±10.9	6.3±0.3	0.4±0.1	144.1±1.5	4.2±0.2	105.4±3.3	
	11.5	9	1.4±0.1	182.6±60.3	26.7±8.1	143.7±10.0	0.4±0.1	66.9±24.0	22.9±4.4	86.4±14.7	6.7±0.4	0.4±0.1	151.6±6.3	4.5±0.8	110.3±6.3	
	115	8	1.2±0.2	226.4±47.5	28.3±8.8	159.2±35.6	0.4±0.1	76.3±14.5	26.2±7.1	94.3±14.3	6.6±0.3	0.4±0.1	154.7±5.8	5.3±1.1	112.3±2.8	
	1150	10	1.1±0.2	416.7±94.5*	16.2±4.4	126.2±23.3	0.4±0.2	75.5±14.2	23.5±4.7	83.8±11.8	6.3±0.3	0.4±0.1	151.5±2.9	4.9±0.4	112.3±2.3	
42	Control	5	1.2±0.1	191.2±49.2	45.4±8.9	157.0±22.0	0.3±0.2	58.2±8.8	21.5±1.6	97.0±10.5	6.3±0.2	0.5±0.1	147.8±1.2	6.3±0.5	104.6±1.3	
	1.15	5	1.2±0.0	236.2±50.5	38.2±3.5	132.1±15.8	0.2±0.0	57.5±8.6	18.5±1.4	100.8±10.3	6.0±0.4	0.5±0.1	148.2±1.0	6.3±1.0	106.1±1.4	
	1150	5	1.2±0.1	210.5±42.4	44.9±5.7	122.1±7.3	0.2±0.0	56.8±6.5	21.4±3.1	106.7±6.7	6.1±0.4	0.5±0.0	148.6±1.7	6.4±0.3	106.9±1.8	
	Control	5	1.3±0.2	155.5±99.5	42.3±12.9	169.4±30.7	0.3±0.1	58.6±8.6	21.6±2.6	89.8±13.4	6.9±0.2	0.5±0.0	151.8±1.5	4.0±0.2	107.1±1.5	
F	115	4	1.3±0.1	186.2±35.5	39.2±9.1	165.0±24.0	0.2±0.0	50.9±7.0	22.3±2.3	79.2±15.3	6.9±0.4	0.5±0.0	151.4±2.4	4.3±0.2	106.9±1.6	
	1150	5	1.5±0.2	157.8±42.8	30.5±6.7	133.0±12.0	0.3±0.1	50.5±3.9	24.1±2.4	93.1±16.1	6.7±0.1	0.5±0.1	152.1±1.5	4.0±0.5	108.2±2.9	

Each value represents the mean ± S.D.

\*, Significantly different from the control(p<0.05)

—; Not tested



Table X. Absolute organ weight of rats intravenously administered with DA-3030 for 4 weeks

Day	Sex	Dose (μg/kg)	No. of animals	Brain (g)	Lung (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Thymus (mg)	Adrenal gland(mg)	Testes(g)/ Ovaries(g)	
28	Male	Control	10	1.89±0.07	1.19±0.12	1.00±0.15	8.15±1.09	2.11±0.23	0.86±0.29	0.52±0.08	0.05±0.01	2.80±0.17	
		1.15	10	1.95±0.11	1.35±0.10	1.13±0.13	9.32±1.39	2.37±0.24	1.31±0.44	0.67±0.13	0.05±0.01	3.03±0.29	
		11.5	10	1.93±0.13	1.39±0.13*	1.11±0.23	9.69±1.40	2.35±0.29	1.67±0.53*	0.63±0.12	0.06±0.01	3.07±0.29	
		115	10	1.92±0.09	1.41±0.19*	1.04±0.14	8.78±0.90	2.28±0.19	1.64±0.47*	0.58±0.16	0.09±0.12	3.00±0.33	
	Female	1150	10	1.94±0.11	1.44±0.11*	1.05±0.14	9.18±1.22	2.38±0.37	1.85±0.42*	0.62±0.13	0.05±0.01	3.19±0.34	
		Control	10	1.86±0.06	1.19±0.10	0.82±0.09	7.25±0.65	1.72±0.14	0.59±0.24	0.52±0.08	0.07±0.01	0.14±0.06	
	42	Male	1.15	10	1.77±0.21	1.05±0.19	0.79±0.06	6.28±0.77	1.58±0.14	0.70±0.26	0.53±0.09	0.07±0.01	0.11±0.02
			11.5	10	1.76±0.04	1.05±0.09	0.77±0.09	6.58±0.83	1.56±0.15	0.67±0.19	0.50±0.06	0.06±0.01	0.10±0.01
			115	10	1.79±0.13	1.12±0.10	0.74±0.12	6.77±0.83	1.59±0.11	0.88±0.32*	0.49±0.15	0.06±0.01	0.11±0.02
		Female	1150	10	1.72±0.11	1.07±0.11	0.77±0.09	6.51±0.57	1.55±0.17	0.80±0.13*	0.50±0.10	0.06±0.01	0.13±0.02
Control			5	1.95±0.10	1.43±0.09	1.22±0.10	10.04±1.53	2.59±0.46	1.11±0.52	0.51±0.05	0.04±0.01	3.31±0.33	
115			5	1.96±0.14	1.36±0.13	1.09±0.17	9.10±1.53	2.42±0.24	1.01±0.27	0.47±0.12	0.04±0.01	2.96±0.21	
42	Male	1150	5	1.92±0.07	1.28±0.17	1.07±0.08	9.02±0.82	2.20±0.27	1.25±0.24	0.41±0.05	0.05±0.00	2.96±0.21	
		Control	5	1.88±0.03	1.17±0.12	0.83±0.05	7.44±0.81	1.77±0.15	1.09±0.37	0.42±0.07	0.07±0.02	0.12±0.02	
		115	5	1.81±0.08	1.14±0.10	0.76±0.09	6.74±0.96	1.72±0.24	0.85±0.28	0.38±0.10	0.07±0.01	0.13±0.03	
	Female	1150	5	1.79±0.15	1.13±0.08	0.78±0.13	6.36±0.99	1.56±0.27	0.70±0.19	0.40±0.09	0.07±0.01	0.12±0.02	
		Control	5	1.95±0.10	1.43±0.09	1.22±0.10	10.04±1.53	2.59±0.46	1.11±0.52	0.51±0.05	0.04±0.01	3.31±0.33	
		115	5	1.96±0.14	1.36±0.13	1.09±0.17	9.10±1.53	2.42±0.24	1.01±0.27	0.47±0.12	0.04±0.01	2.96±0.21	

Each value represents the mean±S.D. \*; Significantly different from the control(p<0.05).

Table XI. Relative organ weight of rats intravenously administered with DA-3030 for 4 weeks

Day	Sex	Dose (μg/kg)	No. of animals	Brain (g)	Lung (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Thymus (mg)	Adrenal gland(mg)	Testes(g)/ Ovaries(g)	
28	Male	Control	10	0.70±0.05	0.44±0.03	0.37±0.04	2.97±0.22	0.77±0.04	0.32±0.10	0.19±0.02	0.02±0.00	1.03±0.06	
		1.15	10	0.66±0.05	0.45±0.03	0.38±0.05	3.11±0.27	0.79±0.05	0.43±0.13	0.22±0.04	0.02±0.00	1.02±0.11	
		11.5	10	0.67±0.06	0.48±0.05	0.38±0.04	3.32±0.30	0.80±0.06	0.58±0.20*	0.21±0.02	0.02±0.00	1.06±0.14	
		115	10	0.69±0.04	0.50±0.06*	0.37±0.04	3.13±0.25	0.81±0.05	0.59±0.16*	0.21±0.05	0.03±0.05	1.07±0.11	
	Female	1150	10	0.68±0.05	0.50±0.04*	0.36±0.02	3.19±0.26	0.82±0.06	0.65±0.14*	0.21±0.03	0.02±0.00	1.11±0.05	
		Control	10	0.93±0.06	0.59±0.05	0.41±0.05	3.60±0.20	0.85±0.06	0.35±0.10	0.26±0.04	0.04±0.00	0.07±0.03	
	42	Male	1.15	10	0.90±0.11	0.53±0.08	0.40±0.03	3.28±0.33	0.80±0.05	0.36±0.12	0.27±0.04	0.03±0.00	0.06±0.01
			11.5	10	0.95±0.04	0.56±0.03	0.41±0.05	3.37±0.36	0.78±0.05	0.36±0.10	0.27±0.03	0.03±0.01	0.06±0.01
			115	10	0.98±0.08	0.62±0.05	0.40±0.05	3.29±0.34	0.87±0.06	0.48±0.16*	0.27±0.07	0.03±0.01	0.06±0.01
		Female	1150	10	0.90±0.10	0.56±0.03	0.40±0.03	3.28±0.14	0.81±0.04	0.41±0.05*	0.26±0.03	0.03±0.00	0.07±0.01
Control			5	0.54±0.03	0.40±0.01	0.34±0.02	2.78±0.29	0.72±0.09	0.30±0.13	0.14±0.01	0.01±0.00	0.92±0.05	
115			5	0.59±0.04	0.41±0.06	0.32±0.02	2.73±0.13	0.73±0.05	0.31±0.10	0.14±0.02	0.01±0.00	0.81±0.15	
42	Male	1150	5	0.59±0.03	0.04±0.07	0.33±0.01	2.76±0.18	0.67±0.04	0.44±0.12	0.14±0.01	0.01±0.00	0.91±0.11	
		Control	5	0.85±0.03	0.52±0.04	0.37±0.03	3.33±0.24	0.79±0.04	0.48±0.14	0.19±0.02	0.03±0.01	0.06±0.01	
		115	5	0.75±0.27	0.52±0.04	0.35±0.04	3.08±0.43	0.79±0.12	0.39±0.12	0.17±0.03	0.03±0.01	0.06±0.01	
	Female	1150	5	0.89±0.13	0.50±0.03	0.39±0.07	3.12±0.57	0.78±0.14	0.35±0.11	0.20±0.04	0.04±0.01	0.06±0.01	
		Control	5	0.85±0.03	0.52±0.04	0.37±0.03	3.33±0.24	0.79±0.04	0.48±0.14	0.19±0.02	0.03±0.01	0.06±0.01	
		115	5	0.75±0.27	0.52±0.04	0.35±0.04	3.08±0.43	0.79±0.12	0.39±0.12	0.17±0.03	0.03±0.01	0.06±0.01	

Each value represents the mean±S.D. \*; Significantly different from the control(p<0.05).



**Table XII.** Histopathological findings of male rats intravenously administered with DA-3030 for 4 weeks

Organ Findings	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) No. of Animal Grade	Vehicle			1.15			11.5			115.0			1150				
		-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Liver																		
Increased granulopoiesis		10	0	0	10	0	0	10	0	0	7	2	1	0	0	0	5	5
Spleen																		
Increased granulopoiesis and neutrophilic infiltration		10	0	0	10	0	0	10	0	0	3	6	1	0	0	2	6	2
Activation of macrophages		10	0	0	10	0	0	10	0	0	5	5	0	0	2	7	1	0
Increased erythropoiesis		10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	0	2	8	0	0
Bone marrow																		
Increased granulopoiesis		10	0	0	10	0	0	6	4	0	1	2	6	1	0	0	2	8

Grade: -, No. lesion, +; Slight, ++; Moderate, +++; Marked lesion

**Table XIII.** Histopathological findings of female rats intravenously administered with DA-3030 for 4 weeks

Organ Findings	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) No. of Animal Grade	Vehicle			1.15			11.5			115.0			1150				
		-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Liver																		
Increased granulopoiesis		10	0	0	10	0	0	10	0	0	3	6	1	0	0	1	6	3
Spleen																		
Increased granulopoiesis		10	0	0	10	0	0	10	0	0	4	5	1	0	0	7	7	3
Activation of macrophages		10	0	0	10	0	0	10	0	0	8	2	0	0	3	3	4	0
Increased erythropoiesis		10	0	0	10	0	0	10	0	0	9	1	0	0	3	6	1	0
Bone marrow																		
Increased granulopoiesis		10	0	0	10	0	0	8	2	0	1	4	5	0	0	0	3	7

Grade: -, No. lesion, +; Slight, ++; Moderate, +++; Marked lesion

**Table XIV.** Histopathological findings of rats at the end of 2-week recovery period after DA-3030 treatment

Organ Findings	Sex Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) No. of Animal Grade	Male						Female											
		Vehicle			115.0			Vehicle			115.0			1150					
		-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++			
Liver																			
Increased granulopoiesis		5	0	0	5	0	0	2	3	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
Spleen																			
Increased granulopoiesis		5	0	0	5	0	0	4	1	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
Activation of macrophages		5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
Increased erythropoiesis		5	0	0	5	0	0	4	1	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
Bone marrow																			
Increased granulopoiesis		5	0	0	5	0	0	4	1	0	5	0	0	5	0	0	4	1	0

Grade: -, No. lesion, +; Slight, ++; Moderate, +++; Marked lesion

에서 각각 3예 및 6예에서, 암컷의 경우 115 및 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군에서 각 2예 및 3예에서 비장중량이 관찰되었다. 그 외의 동물에서는 약물의 영향으로 생각되는 유의한 변화가 관찰되지 않았으며, 회복기간종료 후 실시한 부검에서 각 군간 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

#### 장기중량

4주 최종도살에서 수컷 11.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 용량군에서 폐장과 비장의 절대중량과 상대중량이 유의성있는 증가

를 보였으며, 암컷에서는 115, 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군의 비장의 절대중량 및 상대중량이 유의성있는 증가를 보였다 ( $p < 0.05$ ). 회복기간 종료 후 측정된 장기중량에서는 모두 대조군과 비교하여 유의성이 인정되지 않았다(Table X, XI).

#### 병리조직학적 검사

약물투여종료후 실시한 병리조직학적 검사결과는 Table XII, XIII과 같다. 간장에서는 문맥부에 유약한 과

림구세포의 증식성 집락이 DA-3030 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서 용량 상관성있게 관찰되었다. 비장은 유약한 과립구계 세포의 증식성 집락으로 판단되는 골수의 과립구생성(extramedullary granulopoiesis) 소견과 국소적으로 호중구의 침윤상이 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군의 경우 중등도로, 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군의 경우 전예에서 현저하게 관찰되었다. 그외, 백적수 경계부위에 공포세포들을 특징으로 하는 대식세포의 활성화소견과 조혈세포의 집락으로 관찰되는 골수의 조혈(extramedullary hematopoiesis) 소견이 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서 개체에 따라 정도의 차이를 보이며 관찰되었다. 골수는 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서 과립구계 세포증식에 의한 세포밀도의 증가를 용량상관성있게 관찰할 수 있었으며, 그외 장기에 대한 검사결과 유의한 병리조직학적 소견은 관찰되지 않았다. 한편, 2주간 회복기간종료 후 실시한 병리조직학적 검사결과 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군의 수컷 3예 및 1예에서 각각 간장 및 비장의 미약한 과립구계 세포증식이 인정되었으며, 암수 각 1예에서 골수의 미약한 과립구계 세포증식이 관찰되었다(Table XIV).

## 고 찰

DA-3030은 동아제약(주) 연구소 생물공학연구실에서 유전자재조합기술을 이용하여 대장균에서 발현시킨 분자량 18.8 Kd의 rhG-CSF로 항암화학요법 및 방사선 조사에 의한 호중구감소증의 치료, 골수이식후의 과립구 회복촉진 등을 목적으로 개발예정인 물질이다. 본 시험에서는 DA-3030의 안전성평가의 일환으로 랫드에 115~1150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 의 용량을 정맥내로 4주간 반복투여시 발현가능한 독성학적 변화를 관찰하고, 대조군, 115 및 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 군의 일부동물은 2주간 휴약하여 그 회복상을 검토하였다. 시험결과 DA-3030의 영향으로 판단되는 변화로는 백혈구수의 증가, 림프구비율의 감소 및 호중구 비율의 증가, 혈청 alkaline phosphatase의 증가, 비장종대, 비장과 간장의 과립구형성증가, 비장의 탐식세포활성증가, 골수의 과립구형성증가 등이 인정되었으며, 이와 같은 변화는 용량상관성을 갖으며 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서 특징적으로 나타났다.

G-CSF는 골수의 과립구전구세포에 작용하여 생성을 자극하고 호중구의 분화, 증식을 촉진시키며 말초혈액중에 호중구의 숫적 증가를 유발하는 것으로 알려져 있다(淺野茂隆, 1986). 본 시험에서 관찰된 골수조직의 과립구계 세포증식에 기인한 세포밀도의 증가와 호중구를 중심으로 한 백혈구수의 증가는 암수 모두에서 용량의 존적으로 나타났으며, 이와 같은 결과는 DA-3030이 동물중에 관계없이 랫드에 대해서도 동계열의 유사약물과 비슷한 약리작용을 나타낸 것으로 판단된다(Kumiko 등, 1990). 한편, G-CSF에 의해 혈중으로 동원된 호중구는 비장과 폐장에 비교적 용이하게 포획, 침윤되는 것으로

보고되어 있는데(Yuzuri 등, 1991), 본 시험에서도 비장에서 호중구의 국소적 침윤상이 관찰되었으며 이와 같은 결과는 골수의 유약과립구계세포증식상(extramedullary granulopoiesis), 골수의조혈(extramedullary hematopoiesis) 등의 소견과 더불어 비장종대나 비장의 절대 및 상대중량 증가와 상관성이 있을 것으로 사료되었다. 그러나 폐장은 수컷에서만 상대중량증가가 관찰되었으며 조직학적으로는 특이할만한 변화가 인정되지 않아 위의 설명과는 차이가 있는 결과를 나타내었다. 혈액학적검사결과 수컷 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서 관찰된 혈소판수의 정도 감소는 Metcalf의 보고(Metcalf, 1988)에서처럼 G-CSF의 과립구계조혈기능의 향진에 따른 적아구계 및 megakaryocyte계의 상대적 억제와 관련이 있는 것으로 생각된다. 혈액생화학적 검사에서는 특징적인 alkaline phosphatase의 증가가 암수동물 모두에게 용량의존적으로 인정되었는데, Bronchud 등(Bronchud 등, 1987)은 임상시험결과 호중구의 증가와 연관된 혈청 alkaline phosphatase치 상승을 보고하였으며, Yuo 등(Yuo 등, 1987)은 *in vitro*에서 호중구를 rhG-CSF로 처리하여 alkaline phosphatase의 유의한 상승을 관찰하여 본 시험에서의 결과도 호중구수의 증가에 의한 이차적인 변화로 사료된다. 병리학적 검사결과에서는 비장과 골수를 제외한 모든 장기에 독성학적으로 유의한 기질적 변화는 인정되지 않았으며, 비장의 골수의 유약과립구계세포증식상(extramedullary granulopoiesis)과 골수의조혈(extramedullary hematopoiesis)소견 및 골수의 과립구계 세포의 증식에 의한 세포밀도의 증가가 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서 특징적으로 관찰되었다. 이상에서 관찰된 DA-3030의 과립구증식효과와 관련된 모든 변화는 2주간의 회복기간중 비교적 신속하게 회복되었다. G-CSF의 투여중지후 신속한 회복은 G-CSF의 체내동태와 과립구의 혈중반감기와 상관이 있는 것으로 사료되는데, 동일계약물인 marograstim의 경우 3 mg/kg의 용량을 원숭이에 단회투여하면 말초혈액중 호중구수는 투여후 1일에 최고수준에 도달하고 이후 3일 이내에 급속히 감소하여 marograstim의 작용은 2~3일간의 일시적인 것이며, 랫드에 정맥내 투여시 marograstim의 반감기는 1.38시간이고 투여후 72시간에 뇨중으로 약 78% 분변으로 약 3%가 배설되며, 혈중 호중구의 반감기는 약 6.6시간정도라는 보고(Athens 등, 1986)와 비교하여 볼때 DA-3030도 동계열의 의약품과 유사한 체내동태를 보이는 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 DA-3030의 약리학적 작용에 기인한 변화로는 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군에서 호중구수의 증가, 혈청 alkaline phosphatase의 증가, 비장종대, 비장의 절대 및 상대중량증가, 비장과 간장의 과립구형성증가(extramedullary granulopoiesis), 비장의 대식세포 활성화증가 등을 들 수 있었으며, 115  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상 투여군의 골수조직에서 과립구형성증가 소견이 인정되어 본 시험조건하

에서 DA-3030의 무영향량은 1.15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 인 것으로 나타났다.

### 참고문헌

- Athens, J. W., Haab, O. P., Mauer, A. M., Ashenbrucker, H., Cartwright, G. E. and Wintrobe, M. M. (1986). Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turn over rate in normal subjects. *J. Clin. Invest.* **40**, 989-995.
- Bronchud, M. H., Scarffe, J. H., Thatcher, N., Crowther, D., Souza, L. M., Alton, N. K., Testa, N. G. and Dexter, T. M. (1987). Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **56**, 809-813.
- Kumiko, M., Noriko, N., Tetsuro, S., Morio, K., Shigeyuki, K., Shizuhiko, Y. and Shigeo, S. (1990). Four week intravenous toxicity study of recombinant human G-CSF(rG-CSF) in rats. *Yakuri to Chiryō* **18**(suppl.), 97-128.
- Metcalf, D. (1988), "The colony stimulating factors. Their control of white cells and likely clinical applications." Schering corporation, U.S.A.
- Yuo, A., Kitagawa, S., Okabe, T., Urabe, A., Komatsu, Y., Itoh, S. and Takaku, F. (1987). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor repairs the abnormalities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndrome and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **70**, 404-411.
- Yuzuri, K., Jiro, I., Mitsuo, Y., Teruko, T., Youji, S., Takuji, H. and Takashi, D. (1991). Repeated dose toxicity of Marograstim(KW-2228): Intravenous administration to rats for 13 weeks. *應用藥理* **42**, 67-99.
- 淺野茂隆. (1986). 純化ヒト 顆粒球 エロニ-刺戟因子(G-CSF)の作用. *實驗科學* **4**, 908-911.