응용약물학회지, The Journal of Applied Pharmacology 4, 138-147(1996)

Recombinant Human Epidermal Growth Factor (DWP401)의 마우스를 이용한 피하투여 아급성독성시험

송시환, 강부현, 신천철, 김희연, 강진석[1], 심점순[1], 한상섭, 노정구,
한국화학연구소 안전성연구센터, (주)대웅제약 중앙연구소[1]

A 13 Week Subcutaneous Toxicity Study of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (DWP401) in Mice

Si Whan SONG, Boo Hyon KANG, Chun Chul SHIN, Hee Yeun KIM, Jin Seok KANG[1], Jeom Soon SHIM[1], Sang Seop HAN and Jeong Koo RHO

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology P.O box 107, Taejeon 305-606, Korea
[1]Dae Woong Pharmaceutical Co. Ltd., R&D Cener Sangdaeweon-dong, Joongweon-ku, Sungnam-city Kyunggi-do, Korea

(Received March 20, 1996; accepted June 17, 1996)

Abstract – DWP401, a recombinant human epidermal growth factor, was subcutaneously administered to ICR mice at the dose levels of 0, 0.04, 0.2 and 1.0 mg/kg/day (15rats/sex/group) in order to evaluate the subchronic toxicity. General observations, examinations for food and water consumption, ophthalmoscopy and urinalysis were carried out during the study. For the complete gross and microscopic examinations, 10 mice/sex/group were sacrificed at the ends of the dosing period, and the remaining animals were sacrificed with a 5 week recovery period. Examinations for hematology and blood biochemistry were also carried out at the time of recovery period.

Based on the results, it was thought that the target tissue or organs were mesothelial cell, injection site, spleen, adrenal gland, ovary and transitional epithelial cell of urinary tract, and no observed toxic level of DWP401 was 0.04 mg/kg while definite toxic dose level might be 0.2 mg/kg.

Keywords □ DWP401, recombinant human epidermal growth factor (rhEGF), subchronic toxicity, subcutaneous, mouse

Epidermal growth factor(EGF)는 외배엽 및 중배엽에서 기원하는 다양한 상피세포의 강력한 세포분열 촉진인자로서 신체의 체액중에 널리 분포하고 특히 뇨와 모유등에 고농도로 존재한다고 알려져 있다(Carpenter, 1985). EGF는 Fig. 1에 나타내었 듯이 53 개의 아미노산 잔기를 가진 single polypeptide임이 밝혀졌고 이어서 마우스 EGF(mEGF)의 1차 구조와 생리적인 작용에 필수적인 역할을 하는 3 개의 intramolecular disulfide bonds의 위치가 밝혀졌다(Taylor등, 1972; Savage등, 1972; Savage등, 1973). 사람에게도 EGF가 존재하는데 Gregory(1975)는 임산부의 뇨중에서 추출된 gastric antisecretory hormone인 urogastrone이 human EGF(hEGF)와 동일한 것임을 증명하였고 그 구조를 밝혔다. 이 물질의 의약품으로서의 용도는, 뇨에서 분리한 천연형의 EGF가 안과용으로 시판되고 있으며 최근에는 EGF의 유전자 서열이 밝혀지고 유전자 재조합기술이 발달함에 따라 미생물에서 다량으로 발현시켜 왔고 세계적으로 여러 회사에서 다양한 목적으로 개발하고 있다(Capenter와 Cohen, 1990; Schultz등, 1991).

DWP401은 (주)대웅제약에서 인간의 EGF 유전자를 대장균의 유전자에 재조합하여 발현시켜서 정제한 것으로서, 각막 및 상처 치료용 등으로 개발중에 있다. 이번 연구는 DWP401을 마우스에 13 주간 반복 피하투여하여 나타나는 독성의 정도를 평가하기 위하여 실시하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

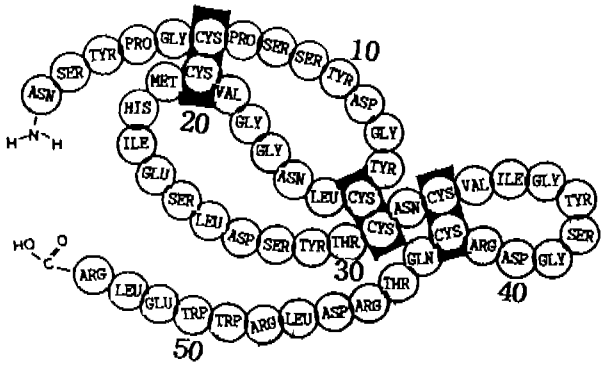

Fig. 1. The amino acid sequence of EGF with placement of disulfide bonds.

실험방법

시험물질

본 시험은 (주)대웅제약에서 대장균을 이용한 유전공학적인 방법으로 합성한 DWP401(Lot No. 401PU007)을 이용하였다. 시험에 사용한 DWP401은 순도가 98% 이상으로 측정되었고, 투여할 시험물질은 phosphate buffered saline (PBS) 에 희석하여 투여하였다.

실험동물

실험동물은 특정병원체부재 ICR 마우스(한국화학연구소 안전성연구부 실험동물 육종실) 암수 각각 60 마리씩 사용하였다. 사육조건은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/시간, 조명 150~300 Lux 및 조명시간 12시간/일을 유지하였고 스테인레스제망사육상자(175W×240L×145H mm)당 5 마리로 사육하였다. 4 주령에 입수한 모든 동물은 사육실내에서 1 주일간 순화시킨 후 5 주령의 건강한 동물을 시험에 사용하였다.

사료는 실험동물용 고형사료(제일사료 주식회사)를 방사선(2.0 Mrad) 멸균하여 자유급여 하였고 물은 상수도수를 미세여과를 거친 후 자외선 유수 살균기를 이용하여 소독한 후 자유급여하였다.

적정 투여량의 설정과 시험군의 구성

시험군은 본 시험에 앞서 실시한 예비시험과 본 시험물질의 특성을 고려하여 추정임상예정용량의 1000배인 1 mg/kg/day 투여군을 최고 용량군으로 하고 공비 5로 하여 중간 용량을 0.2 mg/kg/day, 저용량군을 0.04 mg/kg/day로 설정하였으며 PBS를 투여하는 대조군을 두었다. 각군의 동물은 암수 각각 15 마리씩 배치하였다.

투여방법 및 투여기간

물의 경배부 피하로 26G의 주사바늘과 1 ml 주사통을 이용하였다. 투여기간은 13 주간 1회/일, 6회/주로 반복투여하였고 투여 액량은 5 ml/kg/day로 하였다. 13주간의 투여 종료후 5 주간의 회복기간을 두는 회복군을 설정하였다.

관찰 및 검사항목 :

일반증상 및 사망동물의 관찰

시험기간 중, 매일 시험물질 투여 전 및 투여 후에 증상을 관찰하였다.

체중측정

모든 동물에 대하여 투여개시 직전에 1회 및 그 후에는 주 1회 체중을 측정하였다.

사료 및 물섭취량 측정

사육상자별로 주 1회, 사료 및 물의 정량을 급여하고 익일 잔량을 측정하여 섭취량을 측정 하여 개체별 평균 사료 및 물의 섭취량을 산출하였다.

안검사

모든 군에 대하여 투여 개시전 및 투여 종료 최종주에 각각 10 마리씩과 회복군의 전 례에 대하여 눈의 외관을 육안적 및 검안경을 이용하여 검사하였다.

뇨검사

모든 군에 대하여 투여 최종주에 각 군별 10 마리의 동물과 회복군의 전례에 대하여 3 시간 이내의 신선뇨를 채취하여 뇨비중, pH, 뇨단백, 뇨당, 케톤체, 잠혈, 빌리루빈, 유로빌리노겐 및 질산염을 뇨시험지(Multistix, Ames)와 뇨자동분석장치(Clinitek-100, Ames)를 이용하여 검사하였다.

혈액학적검사

모든 동물에 대하여 부검전 하룻밤 절식시킨 후, ether 마취하에 개복하여 후대 정맥에서 채혈 후 EDTA-2K 처리로 응고를 방지한 혈액을 이용하여 검사하였다. 검사는 혈구자동계측 장치(T-540 coulter counter)를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 헤마토크리트치(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소 농도(MCHC), 혈소판수(PLT)를 측정하였고 혈액도말표본을 만들어 백혈구감별계산(differential leucocyte count) 및 망적혈구수(reticulocyte count)를 측정하였다.

혈액생화학적검사

위에서 채혈한 혈액을 15 분간 방치하여 응고시킨 후 3000rpm 으로 10 분간 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하여 자동혈청생화학분석장치(JCA VX-100, Jeol Co.)를 이용하여 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase(ALP), creatine phosphokinase (CPK), 혈당(GLU), 총단백(TP), albumin(ALB), albumin/globulin ratio(A/G ratio), 혈중뇨소질소(BUN), creatinine (CRE), triacylglyceride(TG), phospholipid(PL), total cholesterol(TCHO), total bilirubin(TBIL), calcium(Ca) 및 inorganic phosphate(IP)를 측정하였고 Chlor Meter(C-200AP, Jook)를 이용하여 chloride(Cl)를, 전해 질자동분석장치(IL 943 flame photometer, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 sodium(Na)과 potassium(K)을 측정하였다.

부검소견 관찰 및 장기중량의 측정

투여 최종일 까지 생존한 모든 동물들을 ether 마취후 채혈을 실시하고 복대동맥을 절단하여 방혈 치사시킨후 부검을 실시하였다. 부검시에 간장, 신장, 비장, 폐장, 부신, 갑상선, 뇌, 정소, 난소, 흉선, 뇌하수체 및 자궁의 중량을 측정하였다.

병리조직학적검사

장기중량의 측정장기와 육안적 병변부위, 피부(유선), 저정낭, 전립선, 방광, 정소상체, 비장, 췌장, 장임파절, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 타액선, 식도, 대동맥, 기관, 좌골신 경, 골격근, 대퇴골, 흉척수, 안구 및 하드리안선을 적출하여 10%중성 포르말린액 또는 Davison's액에 고정한 후 포매 박절하여 H&E 염색을 실시하여 검경하였다.

통계학적 방법 :

얻어진 자료에대한 통계학적인 분석은 다중비교 검사법을 실시하였다. 검사항목중 체중, 사료섭취량, 물섭취량, 뇨량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적검사 및 장기중량에 대하여는 일원배치 분산 분석을 유의수준 α=0.05 혹은 α=0.01로 검정하였다. 일원배치분산분석의 검정결과가 $p<0.05$인 경우 Dunnett's T test 또는 Scheffe's test를 이용하여 군간 유의차를 조사하였다. 뇨량을 제외한 뇨검사 항목에 대하여는 순위화한 데이타를 이용한 비모수적인 방법인 Kruskal-Wallis test를 실시하고, $p<0.05$인 경우 Scheffe's test를 이용하여 군간 유의차를 조사하였다. 일반증상, 부검소견 및 병리조직학적 소견은 백분율로 표시하고 필요에 따라 Fisher's exact test를 이용하여 군간 유의차를 조사하였다. 검정의 위험율은 5% 및 1%로 정하였다.

실험결과

사망동물 및 일반증상

사망동물 및 일반증상은 Table I에서 나타내었다. 시험물질 투여에의한 사망은 1 mg/kg 투여군에서 수컷의 경우 투여 후 56일부터 89일 사이에 4례에서, 암컷의 경우 투여 후 72일 부터 90일 사이에 4 례에서 관찰되었다. 0.2 mg/kg 투여군의 수컷 1례는 투여후 74 일에 빈사처리 되었다.

Table I. Summary of clinical finding frequencies of male and female mice treated with DWP401 for 13 weeks.

GROUP:	CONTROL	T1	T2	T3
OBSERVATION DOSE: (mg/kg)	0	0.04	0.20	1.00
MALE				
MAIN PERIOD				N=15
Found dead	0	0	0	4
Sacrificed moribund	0	0	1	0
Decreased locomo. activity	0	0	0	7
Dark materials around eye	0	0	0	1
Dyspnea	0	0	0	5
Edema of limbs	0	0	0	12
Hair loss	0	0	0	2
Lacrimation	0	0	0	1
Piloerection	0	0	4	12
Ptosis	0	0	1	1
RECOVERY PERIOD				
Edema of limbs	0	0	0	
FEMALE				
MAIN PERIOD				N=3~5
Found dead	0	0	0	3
Sacrificed moribund	0	0	0	1
Anemia	0	0	0	1
Decreased respiratory rate	0	0	0	1
Decreased locomo. activity	0	0	0	4
Dyspnea	0	0	0	2
Edema of limbs	0	0	0	13
Hair loss	0	1	0	1
Lacrimation	0	0	0	1
Piloerection	0	0	0	10
RECOVERY PERIOD				N=5~2
Edema of limbs	0	0	0	2
Hair loss	0	0	0	2
Piloerection	0	0	0	2

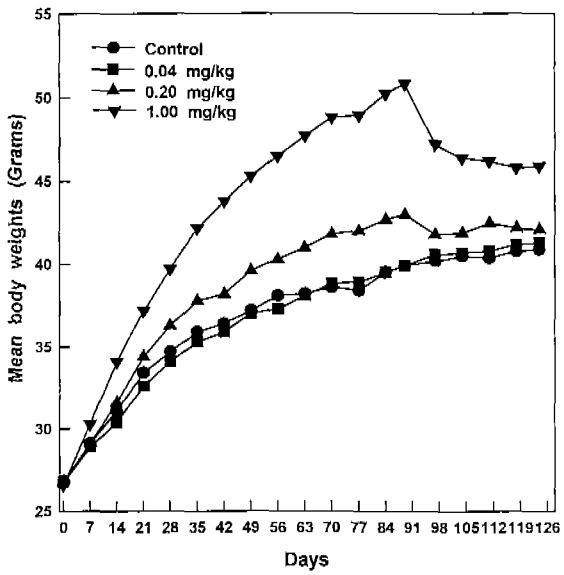

Fig. 2. Mean body weight changes of male mice treated with DWP401 for 13 weeks.

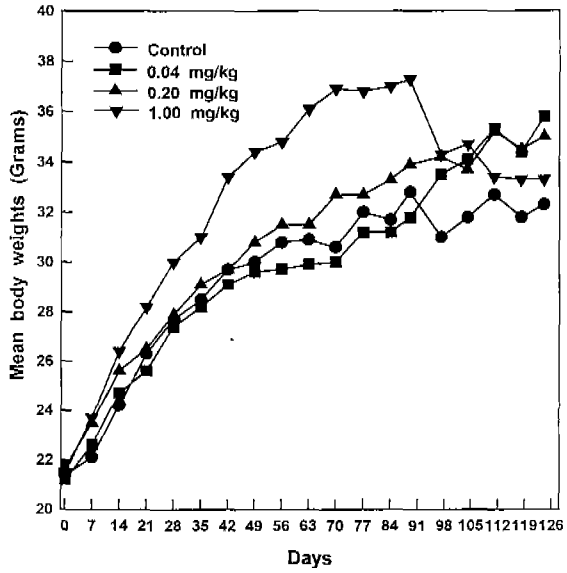

Fig. 3. Mean body weight changes of female mice treated with DWP401 for 13 weeks.

Table II. Hematological values of male and female mice treated with DWP401 for 13 weeks.

TESTS:	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RET.COUNT
UNITS:	$\times 1000$	$\times 10^6$	g/dl	%	fl	pg	g/dl	$\times 10^6$	$\times 10^{-3}$
MALE (N=8~10)									
CONTROL : 0 (mg/kg)									
MEAN	2.10	9.41	14.0	44.7	47.5	14.9	31.3	1459	25.4
SD	1.373	0.214	0.62	1.73	1.21	0.53	0.34	119.3	4.69
T1 : 0.04 (mg/kg)									
MEAN	1.93	8.85	13.4	42.6	48.2	15.1	31.3	1485	26.1
SD	0.719	0.619	0.88	1.60	1.60	0.49	0.50	219.0	6.33
T2 : 0.20 (mg/kg)									
MEAN	1.95	9.02	13.5	43.5	48.2	15.0	31.1	1445	33.4
SD	0.883	0.604	0.99	3.06	1.20	0.47	0.36	309.9	8.96
T3 : 1.00 (mg/kg)									
MEAN	2.66	8.77[a]	13.6	43.5	49.6[b]	15.5[a]	31.3	1658	26.5
SD	1.683	0.339	0.75	2.07	0.57	0.57	0.29	206.7	9.40
FEMALE (N=8~10)									
CONTROL : 0 (mg/kg)									
MEAN	2.58	9.56	14.5	46.3	48.5	15.2	31.2	1328	28.0
SD	1.023	0.673	0.62	2.05	1.99	0.68	0.24	201.3	9.82
T1 : 0.04 (mg/kg)									
MEAN	2.39	9.83	14.9	47.3	48.1	15.1	31.4	1308	29.8
SD	1.795	0.459	0.52	2.09	0.94	0.38	0.33	80.0	13.10
T2 : 0.20 (mg/kg)									
MEAN	1.98	9.59	14.6	47.0	49.1	15.3	31.2	1476	24.5
SD	0.664	0.545	0.46	1.17	2.15	0.86	0.49	163.2	15.34
T3 : 1.00 (mg/kg)									
MEAN	2.19	9.50	14.3	46.6	49.1	15.0	30.6[a]	1578[b]	21.3
SD	1.111	0.728	1.04	3.25	1.09	0.55	0.69	178.5	13.32

Analysis of variance using DUNNETT's Procedure, [a]Significantly different from control value ($p<0.05$), [b]Significantly different from control value ($p<0.01$).

일반 증상으로는 1 mg/kg 투여군에서 투여 직후의 활동력감소, 호흡곤란 및 입모가 관찰되었고, 눈주위의 암적색 응고물과 사지 말단부위의 비대가 지속적으로 관찰되었다. 0.2 mg/kg 투여군에서는 수컷에서 입모가 관찰되었다.

체중변화

체중변화는 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 1 mg/kg 투여군의 경우 수컷에서는 투여 후 14 일부터 암컷의 경우 투여 7 일부터 통계학적 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 0.2 mg/kg 투여군에서는 투여 후반기에 가서 암수 모두 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다.

회복군에서는 대조군에 비해 1 mg/kg 투여군에서 증가하는 경향이 관찰되었다.

사료 및 물 섭취량

사료섭취량에서는 암수 모두 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 물섭취량은 수컷의 경우 1 mg/kg 투여군과 0.2 mg/kg 투여군에서 투여 43 일 이후에 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 암컷의 경우 1 mg/kg 투여군과 0.2 mg/kg 투여군에서 산발적으로 증가하는 경향이 관찰되었다. 회복군에서는 아무런 이상이 관찰되지 않았다.

안검사 및 뇨검사

안검사 및 뇨검사에는 암수 모두 시험물질 투여에 의한 증상은 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사

혈액학적 검사 결과는 Table II에 나타내었다. 회복군에서는 1 mg/kg 투여군의 백혈구수가 수컷에서 증가하는 경향을, 암컷의 경우 통계학적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다.

혈액생화학적 결과

혈액생화학적인 결과는 Table III에 나타내었다. 회복군에서는 1 mg/kg 투여군에서 BUN과 GLU가 수컷에서는 증가하는 경향으로 암컷에서는 통계학적 유의성 있는 증가가 관찰되었다.

부검소견

Table III. Serum biochemical values of male and female mice treated with DWP401 for 13 weeks.

TESTS:	ALT	AST	ALP	BUN	ALB	TP	CPK	K	Cl
UNITS:	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dl	g/dl	g/dl	IU/L	mmol/l	mmol/l
MALE									
CONTROL : 0 (mg/kg)									
MEAN	65.67	23.70	116.43	25.40	4.40	7.07	170.23	6.29	115.9
SD	27.263	9.292	22.735	6.966	0.209	0.035	229.370	1.086	2.66
T1 : 0.04 (mg/kg)									
MEAN	92.63	50.11	143.62	26.11	4.58	7.21	167.08	5.62	115.5
SD	57.317	74.959	55.215	6.955	0.266	0.420	92.790	1.354	2.19
T2 : 0.20 (mg/kg)									
MEAN	62.47	30.14	99.39	27.93	4.92[b]	7.87[b]	129.44	6.88	116.3
SD	21.513	13.446	59.325	10.664	0.107	0.436	125.915	1.858	2.57
T3 : 1.00 (mg/kg)									
MEAN	40.74	20.24	63.29[a)]	25.64	4.59	7.24	88.49	5.95	119.1[a)]
SD	5.856	5.812	17.857	7.960	0.282	0.548	76.199	1.529	3.04
FEMALE									
CONTROL : 0 (mg/kg)									
MEAN	80.51	26.76	199.25	19.93	4.49	6.98	271.63	4.33	116.7
SD	17.611	8.584	38.219	3.581	0.163	0.315	181.280	0.213	2.04
T1 : 0.04 (mg/kg)									
MEAN	78.27	21.10	185.25	21.71	4.65	7.12	383.30	4.57	118.2
SD	18.542	5.898	35.384	4.988	0.172	0.338	333.278	0.265	2.22
T2 : 0.20 (mg/kg)									
MEAN	63.28[a]	16.72[b]	146.84[b]	21.45	4.92[b]	7.52[b]	512.32	4.77[b]	119.0
SD	12.314	2.762	42.189	3.203	0.227	0.401	418.592	0.378	2.34
T3 : 1.00 (mg/kg)									
MEAN	47.01[b]	16.28[b]	100.48[b]	26.60	4.93[b]	7.50[a]	461.81	4.84[b]	117.2
SD	11.171	3.243	28.294	8.180	0.079	0.489	395.923	0.268	6.89

Analysis of variance using DUNNETT's Procedure, [a]Significantly different from control value ($p<0.05$), [b]Significantly different from control value ($p<0.01$).

사망동물에서 관찰된 부검소견은 수컷의 경우 혈흉(hemothorax)이 3 례, 흉선의 위축(atrophy)이 2 례, 신장, 비장 및 간장의 창백함간장의 종대와 암적색조, 소화관의 팽대가 각각 1례에서 관찰되었다. 암컷에서는 혈흉이 4례, 흉선의 위축, 폐장의 암적색조, 비장의 종대, 낭포성 난소, 피부의 부종(edema), 복강내출혈(hemoperitoneum) 및 장간막의 비후(thickening)가 각각 1 례 관찰되었다. 13주 계획도살군에서는 수컷 1 mg/kg 투여군에서 장기의 유착(adhision), 복강내출혈이 1 례에서 관찰되었고 암컷 1 mg/kg 투여군에서 신장과 복막의 유착이 2 례, 난소와 복막의 유착이 3 례, 암적색복수가 2 례, 피부의 비후가 2 례, 복수(ascites), 흉수(hydrothorax), 혈흉, 장간막비후, 흉선의 위축이 각각 1 례에서 관찰되었다.

장기중량

절대및 상대 장기중량의 결과를 Table IV에 나타내었다. 회복군에서는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.

병리조직학적 소견

본 시험의 매체투여 대조군과 1 mg/kg투여군의 모든 장기와 0.2 mg/kg 투여군과 0.04 mg/kg 투여군의 소견이 관찰된 장기와 신장, 비장, 간장, 난소, 자궁, 질, 방광 골수로 부터 병리조직 표본을 만들어 광학현미경하에서 관찰한 결과 간장의 소엽중심성 간장세포비대다. 한편 혈흉 및 복수는 Ocpatocellular hypertrophy), 비장의 골수외 조혈(extramedullary hematopoiesis)이 대조군을 포함한 모든 투여군에서

Table IV. Absolute organ weights of male and female mice treated with DWP401 for 13 weeks.

GROUP:	CONTROL	T1	T2	T3
DOSE: (mg/kg)	0	0.04	0.20	1.00
MALE				
ADRENAL GLAND-RIGHT (mg)				
MEAN	0.00223	0.00236	0.00245	0.00318[b]
SD	0.000504	0.000542	0.000428	0.000796
LIVER (G)				
MEAN	1.426	1.514	1.864[b]	2.047[b]
SD	0.0927	0.1572	0.2122	0.1672
SPLEEN (G)				
MEAN	0.077	0.075	0.096[a]	0.118[b]
SD	0.0188	0.0099	0.0136	0.0204
FEMALE				
ADRENAL GLAND-LEFT (G)				
MEAN	0.00440	0.00420	0.00440	0.00544[b)]
SD	0.000516	0.000422	0.000516	0.000527
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)				
MEAN	0.00390	0.00330	0.00410	0.00489[b)]
SD	0.000738	0.000823	0.000568	0.000601
LIVER (G)				
MEAN	1.150	1.091	1.176	1.423[b)]
SD	0.1290	0.1414	0.0938	0.2854
SPLEEN (G)				
MEAN	0.094	0.085	0.100	0.129[b)]
SD	0.0160	0.0170	0.0257	0.0147
OVARY-LEET (G)				
MEAN	0.01010	0.01040	0.01250	0.01678[b)]
SD	0.003281	0.001430	0.003567	0.001481
OVARY-RIGHT (G)				
MEAN	0.01140	0.01170	0.01390	0.01822[b)]
SD	0.003273	0.001947	0.004999	0.002635
THYROID-RIGHT (G)				
MEAN	0.00200	0.00180	0.00240	0.00322[b)]
SD	0.000667	0.000632	0.000516	0.000833

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure, [a]Significantly different from control group ($p<0.05$). [b]Significantly different from control group ($p<0.01$).

관찰되었으나 0.2 mg/kg 이상의 투여군에서 높은 빈도로 관찰되었다. 한편 0.2 mg/kg 이상의 투여군에서는 방광과 신장의 요로상피증생(hyperplasia of transitional cells)과 비장, 간장, 심장, 결장, 췌장, 부신 및 장간막의 중피에 나타난 중피세포 증생(hyperplasia of mesothelial cells) 또는 중피하섬유조직증식(submesothelial fibrosis), 난소의 백체수 증가(increased number of corpus albicans), 자궁과 질점막 상피세포의 증생(hyperplasia of the uterine and vaginal epithelium), 부신의 피막하세포증생(subcapsular cell hyperplasia) 및 투여부 피하직의 만성활성염증(chronic active inflammation)이 관찰되었다. 한편 사망동물에서 관찰된 림프조직의 림프구수 감소도 시험물질의 투여에 의한 변화로 사료되었다. 이러한 증상들은 간장의 소엽중심성세포비대와 비장의 골수외 조혈을 제외하고는 모두 0.2 mg/kg과 1 mg/kg 투여군에서 용량상관성 있게 관찰되었다. 회복군에서는 위의 증상들이 다소 회복되어 관찰되었다.

고찰 및 결론

본 연구는 DWP401에 대한 전임상시험으로 13주간 피하투여하여 아급성독성을 평가하기 위하여 실시하였다. DWP401은 유전자 재조합 기법으로 만들어진 epidermal growth factor로서, 다양한 상피세포의 강력한 세포성장인자로 알려져 있다. EGF는 in vivo에서 각막상피세포의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있으며(Savage and Cohen, 1973; Frati 등, 1972; Ho 등, 1974), 최근에는 여러 세포의 apotosis를 지연시킨다는 연구결과가 나오고 있다(Luciano 등, 1994; Tilly 등, 1992). 한편 Gregory(1975)는 위산 분비를 억제하는 urogastrone이 hEGF와 생리, 화학적으로 동일한 물질임을 증명하여 hEGF가 위산분비를 억제하는 것을 밝혔다.

본시험에서 사용한 시험물질은 생체내에 존재하는 물질로서 극미량으로도 효과가 나타나며 추정임상예정용량이

Table V-1. Histopathological findings of male mice treated with DWP401 for 13 weeks.

GROUP (does; mg/kg)		CONTROL		T1 (0.04)		T2 (0.2)		T3 (1.0)	
NUMBER of ANIMALS:		10		10		10		8	
		#	%	#	%	#	%	#	%
KIDNEY	# EX	10		10		10		8	
Hyperplasia, Transitional Cell, Pelvis		0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	38.0
Protein Cast		0	0.0	2	20.0	0	0.0	0	0.0
Infiltration, LC, Interstitium		0	0.0	1	10.0	2	20.0	0	0.0
SPLEEN	# EX	10		10		10		8	
Hyperplasia, Mesothelial Cell, Peritoneum		0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	38.0
Extramedullary Hematopoiesis		0	0.0	0	0.0	8	80.0	8	100.0
Congestion		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	13.0
LIVER	# EX	10		10		10		8	
Chronic Inflammation		1	10.0	0	0.0	0	0.0	1	13.0
Hepatocellular Hypertrophy, Centrilobule		3	30.0	7	70.0	10	100.0	8	100.0
Hyperplasia, Mesothelial Cell, Peritoneum		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	13.0
HEART	# EX	10		0		0		8	
Hyperplasia, Mesothelial Cell, Peritoneum		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	13.0
STOMACH	# EX	10		0		0		8	
Hyperplasia, Mesothelial Cell, Peritoneum		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	13.0
Autolysis		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	13.0
URINARY BLADDER	# EX	10		10		10		8	
Hyperplasia, Transitional Cell		0	0.0	0	0.0	1	10.0	0	0.0
Eosinophilic Material, Lumen		0	30.0	0	50.0	5	50.0	0	0.0
SKIN	# EX	10		0		0		8	
Chronic Active Inflammation, Inj. Site		0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	50.0
ADRENAL	# EX	10		0		0		8	
Subcapsular Cell Hyperplasia		0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	25.0
Accessory adrenal		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	13.0
Hyperpasia, Cortical Cell		0	10.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Thoracic Wall	# EX	0		0		0		2	
Chronic Inflammation		0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	100.0
Foot Sole	# EX	0		0		0		2	
Chronic Active Ulcerative Inf.		0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	100.0

Table V-2. Histopathological findings of male mice treated with DWP401 for 13 weeks.

GROUP (does; mg/kg)		CONTROL		T1 (0.04)		T2 (0.2)		T3 (1.0)	
NUMBER of ANIMALS:		10		10		10		9	
KIDNEY	# EX	10		10		10		9	
Cortical Cyst		2	20.0	2	20.0	3	30.0	1	11.0
Protein Cast		2	20.0	2	30.0	1	10.0	0	0.0
Infiltration, LC, Interstitium		2	10.0	2	20.0	0	0.0	1	11.0
SPLEEN	# EX	10		10		10		9	
Extramedullary Hematopoiesis		4	40.0	4	40.0	9	90.0	9	100.0
Submesothelial Fibrosis		0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	33.0
LIVER	# EX	10		10		10		9	
Chronic Inflammation		4	40.0	0	0.0	2	20.0	0	0.0
Heptocellular Hypertrophy, Centrilobule		2	20.0	3	30.0	9	90.0	8	89.0
HEART	# EX	10		0		0		9	
Hyperplasia, Mesothelial Cell, Peritoneum		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	11.0
OVARY	# EX	10		10		10		9	
Increased Number of Corpus Albicans		0	0.0	0	0.0	0	10.0	4	44.0
Increased Number of Follicle		0	0.0	0	0.0	2	20.0	2	22.0
Decreased Number of Coprus Luteum		0	10.0	0	0.0	1	10.0	0	0.0
Hyperplasia, Interstitial Cell		0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	56.0
VAGINA	# EX	10		10		10		9	
Hyperplasia, Stratum Basale		0	0.0	0	0.0	0	10.0	2	22.0
Hyperplasia, Stratum Spinosum		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	11.0
Hyperkeratosis		0	0.0	0	0.0	0	20.0	0	0.0
Aggregates, Neutrophils, Lumen		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	11.0
URINARY BLADDER	# EX	10		10		10		9	
Hyperplasia, Transitional Cell		0	0.0	0	0.0	0	0.0	6	67.0
SKIN	# EX	10		0		0		9	
Chronic Active Inflammation, Inj. Site		1	10.0	0	0.0	0	0.0	6	67.0
ADRENAL	# EX	10		0		0		9	
Subcapsular Cell Hyperplasia		3	20.0	0	0.0	0	0.0	6	67.0
Accessory Adrenal		3	30.0	0	0.0	0	0.0	1	11.0
Submesothelial Fibrosis		0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	22.0
Chronic Inflammation, Medulla		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	11.0

1 μg으로 매우 낮다(김 등, 1994). 따라서 실제 투여된 량은 최고용량군의 경우 1 mg/kg이었지만 임상예정용량의 약 1000배가 되는 양이었다. 일반적으로 생물학적인 제제의 아급성시험과 같은 장기간 반복투여 실험에서의 최고용량을 임상예정용량의 100~1000배 사이로 설정하여 실험을 수행하고 있는 바, 본 시험에서의 최고 용량은 투여 가능한 최대량이었다. 한편 본 시험물질에 대한 급성독성시험들에서 어떠한 이상 증상도 관찰되지 않아 본 시험물질의 급성독성은 없는 것으로 보고되었다(김 등, 1994; 오 등, 1994).

본 시험의 최고용량군에서 사망은 갑자기 발생하였고 혈흉과 복수등의 체액의 이상이 관찰된 것으로 보아 심맥관계의 이상에 의한 shock 사망으로 추정되었다. 이는 平野耕平 등(1992)이 EGF의 만성독성시험에서 사망동물의 복수등의 증상을 보고한 것과 일치되는 결과로 사료된다. 한편 수컷 0.2 mg/kg 투여군에서 관찰된 빈사동물은 일반증상에서 갑작스러운 선회운동, 안검하수 및 활동력감소가 관찰되었고 부검소견에서는 1 mg/kg 투여군과 일치되는 소견이 관찰되지 않아, 1 mg/kg 투여군에서 관찰된 것과는 다른 개체차이 등의 원인에 의한 것이라고 사료되었다.

시험물질의 투여에 의해 관찰된 일반 증상은 1 mg/kg 투여군에서 관찰된 사지말단의 비후와 투여 직후에 0.2 mg/kg 이상의 투여군에서 관찰된 활동력감소 및 입모였다. 사지말단의 비후는 병리조직소견에서 관찰된 발바닥의 만성활성 염증 및 유극세포 증생을 동반하고 있었으며 시험물질의 투여 중지 후에도 계속 관찰되어 만성적인 변화라고 판단되었다. 입모와 활동력감소는 시험물질의 투여 직후에만 관찰되어 시험물질의 투여와 직접 관련된 변화로 판단되었다. 1 mg/kg 투여군에서 관찰된 체중의 증가 또한 시험물질의 투여에 의한 변화로 사료되었고 이는 본 시험물질이 생체에 미치는 생리적 작용에 의한 변화로 사료된다.

혈액학적검사에서 관찰된 용혈성 빈혈은 그 정도는 경미하였지만 비장의 골수외 조혈기능의 항진과 연관시켜 볼 때 시험물질의 투여와 관련된 소견으로 사료된다. 혈액생화학검사에서 0.2 mg/kg 이상의 투여군에서 관찰된 alan-

Fig. 4. A mocroscopic picture of spleen from a male control mice. Normal structure. Bar=100 μm.

Fig. 5. A microscpic picture of spleen from a male mice treated with 1.0 mg/kg DWP401. Increased extramedullary hematopoiesis and hyperplasia of submesothelial cell. Br=100 μm.

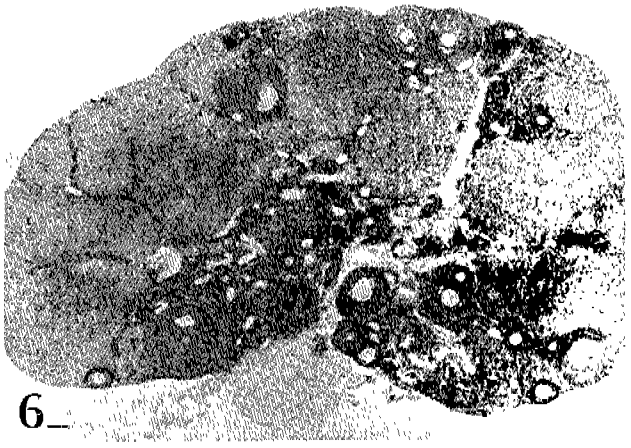

Fig. 6. A microscopic picture of ovary from a female control mice. Normal structure. Bar=100 μm.

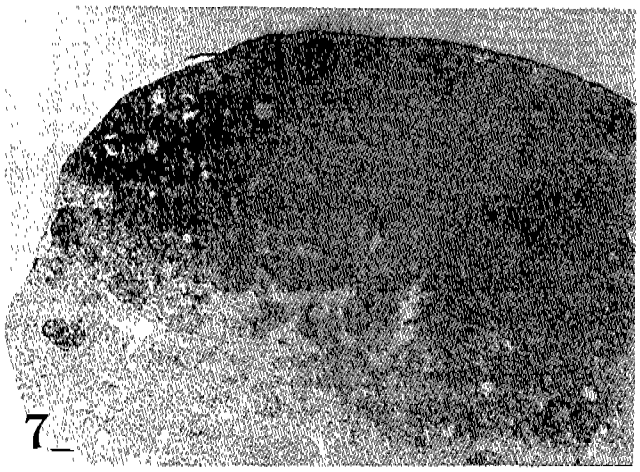

Fig. 7. A microscopic picture of ovary from a female mice treated with 1.0 mg/kg DWP401. Increased number of corpus albicans. Bar=100 μm.

Fig. 8. A microscopic picture of urinary bladder from a female control mice. Normal structure. Bar=100 μm.

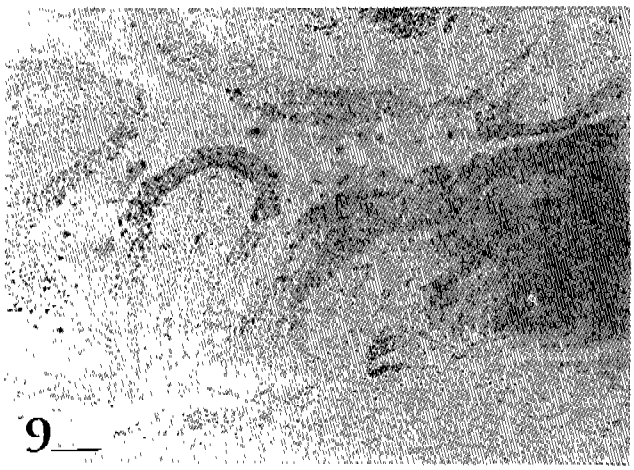

Fig. 9. A microscopic picture of urinary bladder from a female mice treated with 1.0 mg/kg DWP401. Hyperplasia of transitional epithelial cells. Bar=100 μm.

ine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 및 alkaine phosphatase(ALP)의 감소는 독성학적인 의미는 크지 않지만 용량상관성이 있으며 그 변화의 정도가 커 시험물질의 투여에 의한 것으로 사료되었으며 그 원인은 밝힐 수는 없었다. 한편 혈청중의 알부민과 단백량이 0.2 mg/kg 이상의 투여군에서 증가하였는데 이는 시험물질이 polypeptide 호르몬이기 때문에 관찰된 결과로 사료된다. 혈액생화학적인검사에서 1 mg/kg 군에서 관찰된 수컷의 chloride(Cl)의 증가와 0.2 mg/kg 이상의 암컷에서 관찰된 potassium(K)의 증가에 대하여는 본 시험만으로 고찰이 어려웠다.

부검소견에서 관찰된 복강장기들의 유착 소견은 복강 및 흉강 장기의 중피하세포증생 또는 중피 세포의 섬유소화와 관련이 있는 것으로서 시험물질의 고유한 작용에 의해 나타난 변화로 판단된다. 한편 혈흉 및 복수는 Ohmura 등(1990)이 보고한 바가 있는데, 이들은 그 원인에 대하여 혈관의 투과성 증가 또는 neovascularization에 의한 것으로 추정하였다. 한편 Harris 등(1988)은 EGF가 랫트의 사구체 전후의 동맥 수축을 유발한다고 보고하였고, Berk 등(1985)은 대동맥을 수축시킨다고 보고하였던 바 복수가 이러한 맥관계의 수축과 관련되어 나타나는 증상일 가능성도 있다고 판단된다. 장기중량에서 관찰된 간장, 비장, 부신 및 난소의 중량 증가는 용량상관성이 있고 병리조직학적 소견에서의 증상을 볼 때 시험물질의 투여에 의한 것으로 판단된다. 한편 암컷 우측의 갑상선의 중량증가는 용량상관성이 없고 편측성으로 관찰된 것으로 보아 우발적인 것으로 사료된다.

병리조직소견에서 관찰된 소엽중심성 간세포비대는 이물질에 대한 생체의 정상적인 적응성 반응으로 전형적인 가역적인 변화로서 용량상관성이 있어 시험물질의 투여와 관련된 변화로 사료된다. 수컷의 신우와 암컷의 방광에서 관찰 된 요로상피세포 증생은 최고용량군에서만 관찰된 변화로서 다량의 시험물질 또는 그 대사물이 뇨로 배설되면서 일으킨 변화로 시험물질의 고유한 작용에 의한 것으로 사료된다. 0.2 mg/kg 이상의 투여군에서 관찰된 난소의 황체 또는 백체수의 증가는 난소의 중량증가와 함께 용량상관성이 있고 대조군에서는 관찰되지 않은 시험물질의 투여에 의한 변화로 사료된다. 투여부위의 만성활성 염증은 암컷 대조군의 1 례에서 관찰된 것을 제외하고는 암수 모두 최고용량군에서 높은 빈도로 관찰되어 시험물질의 투여에 의한 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 본 시험에서의 DWP401의 표적장기 또는 조직은 중피세포, 투여부위, 비장, 부신, 난소, 및 신우와 방광의 이행상피세포로 사료되고, 무해용량은 0.04 mg/kg이였고, 확실중독량은 0.2 mg/kg이라고 추정된다.

참고문헌

Berk, B. C., Brock, T. A., Webb, R. C., Taubman, M. B., Atkinson, W. J., Gimbrone, M. A. Jr., and Alexander R. W. (1985). Epidermal growth factor, a vascular smooth muscle mitogen, induces rat aortic contraction. *J. Clin. Invest.* **75**, 1083-1086

Carpenter G. (1985). Epidermal growth factor: Biology and receptor metabolism. J. Cell *Sci. Suppl.*, **3** : 1-9.

Carpenter G. and Cohen, S. (1990). Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 7709-7712.

Frati, L., Daniele, S., Delogu, A. and Covelli, I. (1972). Slective binding of the epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells of the cornea. *Exp. Eye Res.* **14**, 135-141

Gregory, H. (1975). Isolation and strudture of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* **257**, 325-327.

Harris, R. C., Hoover, R. L., Jacobson, H. R., and Badr, K. F. (1988). Evidencc for glomerular action of epidermal growth factor in the rat. *J. Clin. Invest.* **82**, 1028-1039

Ho, P. C., Davis, W. H., Elliott, J. H. and Cohen, S. (1974). Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest. ophthalmol.* **13**, 804-809

Luciano, A. M., Pappalardo, A., Ray, C., and Peluso, J. J. (1994). Epidermal growth factor inhibits large granulosa cell apotosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the distribution of intracellular free calcium. *Bio. Reprod.* **51**(4), 646-654

Ohmura, E., Tsushima, T., Kamiya, Y., Okada, N., Shizume, K. and Demura, H. (1990). Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in duce ascitic fluid in mice. *Cancer Res.* **50**, ISS16, 4915-4917.

Savage, C. R.,Jr and Cohen, S. (1973). Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp. Eye Res.* **15**, 361-366.

Schultz G., Rotatory D. S. and Clark W. (1991). EGF and TGF- in Healing and Repair. *J. Cell. Biochem.*, **45** 346-352.

Tilly, J. L., Billing, H., Kowalski, K. I. and Hsueh, A. J. (1992). Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor supress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granuloza cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocrino.* **6**, 1942-1950.

김효정, 서경원, 오미현, 선우유신, 유영효, 문병우 (1994). Recombinant Human Epidermal Growth Factor, DWP 401에 대한 마우스에서의 급성독성. 응용약물학회지. **2**, 77-81

오미현, 서경원, 선우유신, 이경민, 심점순, 김효정 (1994). Recombinant Human Epidermal Growth factor, DWP 401의 랫드에서의 급성독성. *Journal of Food Hygine and Safety.* **9**, 31-36.

平野耕平, 召妻党侍, 渡 泰, 齊藤成人, 小田切 大平, 人江大祐 (1992). 12-month repeated dose toxicity study with one-month recovery study of human urinary epidermal growth factor MG 111 in rats. 藥理と治療. **20** supplement, 75-105.