

CJ-50001 (rG-CSF)의 Rabbit에서의 국소자극성

김종호 · 임동문 · 김달현* · 정종상 · 김제학 · 김현수
제일제당 종합연구소

Study on Local Irritation of CJ-50001 (rG-CSF) in Rabbits

Jong Ho Kim, Dong Moon Lim, Dal Hyun Kim*, Jong Sang Chung,
Je Hak Kim and Hyun Su Kim

R&D Center, Cheil Jedang Corp., 522-1 Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si,
Kyonggi-Do 467-810, Korea
(Received June 30, 1997)
(Accepted August 7, 1997)

ABSTRACT : The local irritation study (skin & ocular irritation tests) of CJ-50001, a rG-CSF (recombinant granulocyte-colony stimulating factor) was performed in Japanese White rabbits. CJ-50001 was administered at a dose of 150 μ g/rabbit (300 μ g/ml, 0.5 ml) to the bare skin and at a dose of 30 μ g/rabbit (300 μ g/ml, 0.1 ml) to the conjunctival sac of the eye, respectively. In these experiments, there were no clinical signs which were related to CJ-50001 compared with control group. In conclusion, CJ-50001 doesn't have any irritating activity to skin and eye as 0.03% solution.

Key Words : Local irritation, rG-CSF, Rabbit, CJ-50001

I. 서 론

G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)는 단구/대식구, 섬유아세포, 성세포 및 내피세포에 의해 만들어져서 골수내에서 호중구 전구세포의 증식, 분화, 그리고 마지막 단계에서의 활성화(탐식능 향상, respiratory burst와 관련된 세포내 대사과정 야기, 항체 의존성 세포독성 등)를 특이적으로 향상시키는 조혈 인자의 일종이다 (Nagata, 1994). 이들 세포에서의 G-CSF 분비는 혈액내 호중구 농도의 변동과 염증반응 매개인자들에 의해 유도되는 세포자극에 의해 영향을 받는다. G-CSF는 과립구 조혈 세포들의 혈류로의 이동을 촉진하여 순환계의 호중구 수준을 일정하게 유지하도록 해주고 순환 호중구의 침윤도 일으킨다. 또한 여러 병원체에 대항하여 호중구의 화학주성과 탐식작용, bactericidal/fungicidal activity를 향상시키며 호중구의 apoptosis를 늦추는 것으로도 알려져있다. 최근에는 유전자 재조합기술이 발전하여 대장균이나 동물 세포를 이용하여 대량 발현시킬 수 있게 되었고, 이것에 의해서 임상 적용이 실용화됨에 따라 여러 종류의 암에 대한 화학요법시 G-CSF를 투여함으

로서 백혈구 감소증에 의한 감염을 감소시킬 수 있음이 보고 되고 있다(Morstyn 등, 1988). 현재 G-CSF는 자가 골수이식 환자들에서 골수의 회복을 촉진하기 위해, 골수억제성 항암제로 치료를 받는 환자들에게서 감염의 기회를 감소시키기 위해, 재생불량성 빈혈 환자에서 호중구 기능을 향상시키기 위해, 그리고 약물에 의해 야기되는 호중구감소증을 치료하기 위해 사용되고 있다 (Nagata, 1995). 이런 경우들에서 G-CSF는 호중구계 과립구의 회복을 촉진하여 호중구감소증의 기간을 상당히 감소시키며(Sheridan 등., 1989), 이에 의해 화학요법 이후에 나타날 수 있는 중증의 세균/진균 감염증의 기회를 감소시킨다. 그리고 G-CSF에 의해 암 치료시 사용되는 항암제들의 투여량을 증가시킬 수 있게 되었다. 제일제당(주) 종합연구소에서는 대장균(*E. coli*)을 발현계로 사용한 유전자 재조합기술로 생산한 recombinant Granulocyte-Colony Stimulating Factor (rG-CSF)를 임상에 적용하기 위하여 안전성시험의 일환으로 rabbit에서의 국소자극성에 대한 연구를 수행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시험물질

*To whom all correspondence should be addressed.

시험에 사용한 CJ-50001(recombinant G-CSF)은 제 일제당(주) 종합연구소에서 대장균(*E. coli*)을 이용하여 생산하였고, 물질안정제로 Tween 80(0.048 mg/1.2 ml)을 첨가한 acetate buffer(acetic acid 10 mM, pH 4.0)를 사용하여 rG-CSF를 임상사용농도인 0.03% (300 µg/ml)로 용해하여 제모된 피부와 안점막에 투여 하였으며 대조군에는 동량의 acetate buffer(vehicle)를 투여하였다.

2. 실험동물

시험에 사용한 일본 백색종 토끼는 삼육실험동물센터에서 구입하여 1주일 동안의 순화 및 검역기간을 거쳐 발육이 정상이고 건강한 동물만을 사용하여 시험을 수행하였다. 안점막자극시험의 경우에는 시험개시 24시간전 육안 및 검안경(Vantage, KEELER Ltd., Berkshire, UK)을 이용하여 안구, 각막손상의 이상유무를 확인한 후 양안이 정상인 토끼를 선택하여 시험에 사용하였다. 시험개시일의 동물은 11주령이었다. 사육실은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 12-13회/hr, 조도 150-300 Lux 조건하에 유지하였다. Rabbit의 검역기간 및 시험기간중에는 실험동물용 고품사료를 섭취시켰으며, 음수는 수도물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

3. 시험군 및 투여방법

피부자극성시험에서는 시험군으로 CJ-50001 투여군과 음성대조군인 vehicle 투여군을 설정하였으며, 투여액은 0.5 ml로 하였다. Clipper(THRIVE Animal Clipper Model 900, 大東電機工業株式會社, Japan)로 제모하여 토끼의 등에 2.5 cm×2.5 cm의 찰과피부 2개 부위와 비찰과피부 2개 부위를 만들고, 오른쪽의 찰과/비찰과 피부에 CJ-50001 또는 vehicle을 0.5 ml/씩 도포하였고 왼쪽의 찰과/비찰과 피부는 무처치 대조군으로 사용하

Table 2. Rating of eye mucosa irritability

Rating	Range of mean score ^a
Non-irritating	0.0 to 0.5
Practically non-irritating	>0.5 to 2.5
Minimally irritating	>2.5 to 15.0
Mildly irritating	>15.0 to 25.0
Moderately irritating	>25.0 to 50.0
Severely irritating	>50.0 to 80.0
Extremely irritating	>80.0 to 110.0

^a Sum of total score/No. of animal

였다. 시험물질의 증발을 막기 위하여 반응성과 침투성이 없는 재질로 덮고 반창고로 고정하였다. 찰과시에는 주사기 바늘을 이용하여 X자 형태로 피부에 자극을 주었다. 시험물질 도포후 홍반과 가피형성, 부종형성(Table 1)에 대해 24시간째와 72시간째에 관찰하였다.

안점막자극시험에서는 시험군으로 CJ-50001 투여후 세척군과 비세척군, 음성대조군인 vehicle 투여후 비세척군을 설정하였으며, 0.1 ml의 액량으로 vehicle 또는 CJ-50001을 토끼의 왼쪽눈에 점안하였다. CJ-50001 투여후 세척군의 경우에는 왼쪽 눈에 CJ-50001를 점안하고 30초후 20 ml의 생리식염수를 이용하여 1분간 세척한 이후 오른쪽 비처치 대조군과 비교 관찰하였고, 비세척군의 경우에는 왼쪽 눈에 점안한 후 세척하지 않고서 오른쪽 눈과 비교하여 관찰하였다. 시험물질 투여 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 관찰하여 국립보건안전연구원 "의약품등의 독성시험 기준" (1994년)의 안구병변 등급표에 의한 평가를 실시하였고, 이에 따른 평점을 산출한 후 평점의 범위 (Table 2)에 의해 자극성 정도를 판정하였다.

III. 결 과

1. 피부자극성

CJ-50001에 대한 피부자극성을 확인하기 위하여 일 본백색종 토끼의 노출된 찰과/비찰과 피부에 150 µg/

Table 1. Evaluation of the skin response

Rash and Crust	Rating	Edema	Rating
· No rash	0	· No edema	0
· Minimal rash (육안으로 겨우 식별함)	1	· Minimal edema (육안으로 겨우 식별함)	1
· Mild rash	2	· Mild edema	2
· Severe rash	3	(뚜렷이 부어올라 변연부가 완전히 구별됨)	3
· Extreme rash (홍당무색의 발적)	4	· Moderate edema	4
and mild crust		(약 1 mm 정도 부어오른 경우)	
		· Severe edema	
		(1 mm이상 부어오르고 노출부위	
		밖까지 확장됨)	

Table 3. Result of skin irritation test treated with CJ-50001

Group	Clinical sign	Rash and crust				Edema			
		24 h		72 h		24 h		72 h	
		Scratched	Non-scratched	Scratched	Non-scratched	Scratched	Non-scratched	Scratched	Non-scratched
CJ-50001	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	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Vehicle	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	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0

rabbit의 용량으로 투여하였으나, 시험물질 투여에 의한 것으로 생각되는 어떠한 피부반응 소견도 관찰되지 않았다(Table 3). 따라서 CJ-50001은 토끼의 피부에 대한 자극성이 없는 것으로 사료된다.

2. 안점막자극성

CJ-50001에 대한 안점막자극성 시험을 일본 백색종 토끼의 안점막에 0.1 ml를 적용하여 실시한 결과, 시험물질 투여에 의한 것으로 생각되는 어떠한 안점막 자극 소견도 관찰할 수 없었다(Table 4). 따라서 CJ-50001은 토끼의 안점막에 대한 자극이 없는 것으로 사료된다.

Table 4. Result of ocular irritation test treated with CJ-50001

Group	Animal No.	Tissue	Time after application (day)					Total Score	Mean Score
			1	2	3	4	7		
CJ-50001 irrigation	1	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	2	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	3	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
CJ-50001 non-irrigation	1	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	2	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	3	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	4	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	5	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	

Table 4. Contined.

Group	Animal No.	Tissue	Time after application (day)					Total Score	Mean Score
			1	2	3	4	7		
CJ-50001 non-irrigation	6	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	1	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	2	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
Vehicle non-irrigation	3	Cornea	0	0	0	0	0	0	0
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	4	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
	5	Cornea	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	
6	Cornea	0	0	0	0	0	0		
	Iris	0	0	0	0	0	0		
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0		

IV. 고 찰

참고문헌

CJ-50001은 제일제당(주) 종합연구소에서 유전자 재조합기술을 이용해 대장균에서 발현시켜 얻은 rG-CSF로, 항암화학요법 및 방사선 조사에 의한 호중구 감소증의 치료, 골수이식후의 과립구 회복촉진 등을 목적으로 개발중인 물질이다.

CJ-50001에 대한 국소자극성시험을 Japanese White rabbit에서 임상사용농도인 0.03% 용액을 이용하여 실시하였다. 피부자극성시험의 경우에는 찰과/비찰과 피부에 0.5 ml/을, 안점막자극시험의 경우에는 안점막에 0.1 ml/을 투여하여 관찰한 결과, 두 실험에서 시험물질의 투여에 의해 나타날 수 있는 임상증상이 전혀 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 볼때 시험물질인 CJ-50001은 임상 사용농도인 0.03% 용액에서 Japanese White rabbit에 어떠한 자극성도 나타내지 않는 것으로 사료된다.

동아제약의 rG-CSF 제제인 DA-3030의 안점막자극 시험에서는 0.03% 용액 적용후 세척군과 비세척군에서 각각 평균 0점 및 0.3점의 결과를 보여 모두 무자극(non-irritancy) 범주에 해당하였다(Kim 등., 1994). CJ-50001은 세척군과 비세척군 모두에서 평균 0점의 결과를 보였으므로, DA-3030과 비슷하거나 보다 안전한 물질로 사료된다.

Kim, O.J., Ahn, B.Y., Lee, S.B., Kim, W.B. and Yang, J. (1994): Studies on local irritation of DA-3030, a new granulocyte colony stimulating factor. *J. Applied Pharmacol.*, **2**(3), 247-255.

Morstyn, G., Souza, L.M., Keech, J., Sheridan, W., Campbell, L., Alton, N.K., Green, M. and Metcalf, D. (1988): Effect of granulocyte-colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet*, **1**, 667.

Nagata, S. (1994): Granulocyte colony stimulating factor and its receptor in *The Cytokine Handbook* (Thompson, A. Ed.), (Academic Press, New York), p 371-385.

Nagata, S. (1995): Granulocyte-colony stimulating factor in *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 95/1. Peptide Growth Factors and Their Receptors I* (Sporn, M.B. and Roberts, A.B. Ed.), (Springer-Verlag., New York), p 699-722.

Sheridan, W.P., Wolf, M., Lusk, J., Layton, J.E., Souza, L., Morstyn, G., Dodds, A., Maher, D., Green, M.D. and Fox, R.M. (1989): Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet*, **2**, 891-895.

국립보건안전연구원 (1994): 의약품등의 독성시험 기준, 국립보건안전연구원 고시 94-3호.