

DWP305 (Ursodeoxycholic acid : Silymarin : Fursulthiamine : Riboflavin tetrabutryate)의 경구 투여에 의한 랫드에서의 급성 및 아급성 독성 연구

남석우 · 박승희 · 유세근 · 서동완 · 김형식 · 이병무

심점순¹ · 유영호¹ · 박명환¹ · 이항우*

성균관대학교 약학대학 약학연구소 · ¹(주)대웅제약 중앙 연구소

Acute and Subacute Toxicity of DWP305 (Ursodeoxycholic acid : Silymarin : Fursulthiamine : Riboflavin tetrabutryate) in Rats

Suk Woo NAM, Seung Hee PARK, Se Geun YU, Dong Wan SEO, Hyung Sik KIM, Jeom Soon SHIM¹, Young Hyo YU¹, Myung Hwan PARK¹

Byung Mu LEE and Hyang Woo LEE*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea, ¹R&D Center, Daewoong Pharm. Co., Ltd., 223-23 Sangdaewon-dong, Joongwongu, Sungnam, Kyonggi-Do, 462-120, Korea

(Received September 9, 1994; accepted October 10, 1994)

Abstract—The acute toxicity of DWP305 (Ursodeoxycholic acid : Silymarin : Fursulthiamine : Riboflavin tetrabutryate=1 : 1 : 0.1 : 0.05) was evaluated in both sexes of Sprague-Dawley rats, 6 weeks old by the oral route of administration. DWP305 was not considered to induce any toxic effect on the rats in mortalities, clinical findings, body weights and gross findings. It is suggested that LD₅₀ value in rats would be above 5 g/kg in the oral administration. Subacute toxicity of DWP305 was examined in Sprague-Dawley rats. Four groups of rats were administered orally at doses of 0, 0.32, 0.8, and 2.0 g/kg/day of DWP305 for one month. Any significant toxic clinical symptom was not observed in the treated rats during the experimental period. Macroscopic examination on the organs of tested animals showed no abnormal findings. On autopsy, no significant changes were found in organs examined. Maximum tolerated dose of DWP305 for the rat was estimated to be above 2 g/kg in this study.

Keywords □ ursodeoxycholic acid, silymarin, fursulthiamine, riboflavin tetrabutryate, acute toxicity, subacute toxicity

간장 질환의 원인은 매우 다양한 것으로 알려져 있으며, 병인학적으로 볼 때 바이러스에 기인된 간 질환, 약물(독성 물질) 중독에 기인된 간 질환, 담도 기능 부전에 의한 간 질환등으로 분류할 수 있으며, 현재까지 이같은 간 질환의 치료 목적으로 적합한 치료제가 없는 것이 현실이다.

UDCA(ursodeoxycholic acid)는 간장 치료 목적으로 단독 및 비타민제와의 복합 처방으로 널리 사용되고 있으며, UDCA의 대표적인 약리 작용은 간질환치료에 중

요한 영향을 미치는 간 혈류 증가 작용(Ward 등, 1984), 미세 담도를 통한 노폐물 배설 작용(Roslyn 등, 1989), 이담 작용(Kitani 등, 1982), 지방의 흡수 촉진 작용(Lanzini, 1988) 등이 밝혀져 있다. 또한, 천연 생약 *Carduus marianus* 표준 추출 엑스인 실리마린은 약효 활성 물질로 알려져있는 flavonolignane계통의 실리빈, 실리디아닌 및 실리크리스틴 등이 함유되어 있으며, 간 세포 재생 효과(Magliulo 등, 1979), 과산화 지질 생성 억제 효과(Valenzuela 등, 1985) 및 간 세포 보호 작용(Tyutyukova 등, 1981) 등이 있다고 밝혀져, 간 질환에 관련된 치료 약물로서 광범위하게 사용 되고 있다. 이 실리마

*To whom correspondence should be addressed.

린은 단독 및 비타민제 혹은 담즙산 성분과의 복합 제제로써 간질환 치료 목적으로 사용되고 있다.

본 DWP305의 조성은 간장 질환 치료 목적으로 오랜 동안 널리 사용되어 온 UDCA, 실리마린을 약효 발현의 주 성분으로 하고 있다. 이 두 약물의 약리 작용은 서로 상이하므로 간질환 치료 목적으로 두 성분을 배합할 경우 두 약물간의 상호 작용에 의한 독성 발현이 배제될 수 있다면, 치료 효과가 상승된 복합 제제로서의 약물 개발 타당성이 기대된다. 치료 효과 측면에서 볼때 이 두 성분의 배합은 간 기능 회복 작용이 각 성분의 단독 투여시 보다 상승 되어 효율적인 치료 효과를 나타낼것으로 생각된다. 예를들면 간 세포 내에서 실리마린에 의한 간 세포 재생효과가 발휘되고, 다른 한편으로는 UDCA에 의한 미세 담도를 통해 노폐물의 배설을 촉진시켜 간 기능의 회복은 상승 작용을 발휘할 수 있다고 판단된다. 또한, DWP305의 보조 성분으로 간내 생화학 반응의 촉매 역할을 하는 활성형 비타민인 푸르실치아민, 리보플라빈 테트라부틸산염을 첨가하여 상기 두 약물(UDCA, 실리마린)의 작용을 강화하고자 하였다. 기술한 바와 같이 DWP305는 UDCA, 실리마린, 푸르실치아민, 테트라부틸르산리보플라빈으로 구성된 처방으로서, 개개 성분들은 단독 및 복합 성분으로 널리 사용되어 그 안전성 및 유효성이 확보된 약물들이다. 그러므로 본 실험은 DWP 305의 복합 처방에 대하여 약물 상호 작용에 의한 독성 유무를 파악코자 DWP305를 랫드에 경구 투여하였을 때 나타나는 급성 및 아급성 독성을 관찰하여 그 안전성을 평가하고자 하였다.

실험 방법

본실험은 의약품등의 독성 시험기준(국립 보건 안전원, 1988)에 준하여 실시하였다.

시험 물질

(주)대웅 제약 중앙 연구소로부터 수령하여 시험에 사용한 시험 물질인 DWP305는 합습성을 가지는 황색의 가루로 Ursodeoxycholic acid : Silymarin : Fursulthiamine : Riboflavin tetrabutryate=1 : 1 : 0.1 : 0.05의 혼합물로 된 제제이다.

시험 동물 및 사육 환경

시험구역은 성균관대학교 약학연구소 GLP(Good Laboratory Practice)room에서 실시하였으며, B&K Universal(England)에서 생산된 SPF(특정병원체 부재)SD계 랫드를 받아 온도 23±1℃, 습도 55±5%, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 사육하였으며, 1주일간의 순화사후후 실험에 사용하였다. 사료는 삼양사료 주식회사의 실험동물사료를 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음수는 멸균수 도물을 자유롭게 섭취시켰다.

시험방법

군분리 및 투여용량의 설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였다(Lorke, 1983; Yamashita 등, 1992; Suzeke 등, 1983; 국립 보건 안전 연구원, 1988). 동물의 개체식별은 사육상자별 tag표시법을 이용하였다.

급성 독성 시험의 경우 투여용량의 설정은 예비실험 결과를 토대로 하여 본 제제의 투여가능 최대용량인 5 g/kg를 최고용량군으로 하여 일정 공비로 5개 용량군과 대조군으로 아래와 같이 실험하였다. 시험동물의 체중 범위는 수컷 160 g~180 g 및 암컷 130~150 g이었고, 주령은 약 6주령이었다.

시험군	투여용량 (g/kg)	투여액량 (ml/kg)	시험계(마리)	
			수컷	암컷
최고용량군	5.00	20	5	5
고용량군	2.50	20	5	5
중용량군	1.25	20	5	5
저용량군	0.63	20	5	5
최저용량군	0.31	20	5	5
대조군#	0.00	20	5	5

#대조군에는 2% CMC 용액만을 투여하였다.

아급성 독성 시험의 경우 투여용량의 설정은 예비실험 결과를 토대로 공비 2.5배로하여 최고용량군 2.0 g/kg, 중간용량군 0.8 g/kg 및 저용량군 0.32 g/kg으로한 3단계 등비용량을 설정하고 각 시험군마다 시험계를 아래와 같이 설정하였다.

시험군	투여용량 (g/kg)	투여액량 (ml/kg)	시험계(마리)	
			수컷	암컷
최고용량군	2.00	10	11	12
중간용량군	0.80	10	12	12
저용량군	0.32	10	12	12
대조군(2% CMC 용액)	0	10	11	12
무처치군	0	10	10	12

시험물질을 투여하기 직전 시험동물의 체중범위는 수컷 110~140 g 및 암컷 110~140 g이었고, 주령은 약 5주령이었다.

시험물질의 조제 및 투여

DWP305를 2% CMC 용액에 균일하게 현탁되도록 시험당일에 용시제조 하였다. 시험물질의 투여는 랫드용 존데를 이용하여 급성 독성 시험의 경우 1회, 아급성 독성 시험의 경우 1일 1회(주 5회)씩 4주간 경구투여 하였다. 투여용량은 투여직전 체중에 따라 산출하였다.

검사 항목

급성 독성 시험

증상관찰

모든 시험동물에 대한 상태는 투여일에는 투여후 6시

간동안 매 시간마다 관찰하였으며 투여일로부터 7일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망발현 유무를 관찰하였다.

체중측정

시험에 사용된 모든 시험동물에 대하여 시험물질 투여직전, 투여후 1일, 3일, 6일째에 체중을 측정하였다.

부검

시험종료후 동물을 ether로 마취하고 복부대동맥을 절단하여 치사시킨 다음 외관 및 내부장기 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다. 부검직전 체중을 측정하였다.

아급성 독성 시험

임상 증상 관찰 및 안구 검사

임상증상관찰은 모든 시험동물에 대한 상태를 매일 1회 오전 10시에 관찰하고, 시험물질 투여후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 매일 주의하여 관찰하였다. 또한 안구검사는 투여 마지막 주에 otoscope를 이용한 간이적인 방법으로 실시하였다.

체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

체중은 시험에 사용된 모든 시험동물에 대하여 시험기간중 매주 2~3회 측정하였으며 또한 시험물질 투여전 및 부검시 체중을 각각 측정 하였다. 사료섭취량 및 물섭취량은 주 2~3회 측정하였다. 사료섭취량은 각 사육상자별로 1일 1회 공급한 사료량에서 남은 잔량을 감하여 측정하였으며, 물섭취량은 각 사육상자별 소모된 물의 양을 측정하였다.

혈액학적 검사

부검전 1일간 절식시킨 후, ether로 마취시켜 복부대동맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 항응고제로 EDTA 2 K가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 파라미터, 즉 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), Hct(Hematocrit), PCV(packed cell volume), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration) 등을 측정하였다.

혈액생화학적 검사

복부대동맥에서 채혈한 혈액중 일부를 혈액학적 검사로 이용하고 나머지 혈액은 4℃ 냉장보관한 후 원심분리(3000 rpm, 10 min)하여 혈청을 얻어 자동생화학검사기(DIMENSION®: Dupont)를 이용하여 ALB(albumin), GOT(Glutamin-oxaloacetic transaminase), GPT(Glutamic-pyruvic transaminase, BUN(blood urea nitrogen), CHOL(cholesterol), GLU(glucose), TBILI(total bilirubin), TP(total protein), TRIG(triglyceride), ALP(alkaline phosphatase), CREAT(creatinine), Cl(chlorine), Na(sodium), K(potassium) 등을 측정하였다. GPT, ALP, CK(G-6-PDH), LDH 등은 30℃ 를 기준으로 하여 측정하였다.

뇨검사

부검 전일 채뇨하여 비중, pH, Protein, Glucose, Ke-

tone체, Bilirubin, 잠혈, Nitrite 및 Urobilinogen을 검사하기 위하여 뇨 시험지(MULTISTIX, AMES)에 뇨를 침적시켜 측정하였다.

부검 및 장기 중량 측정

모든 시험군의 생존동물에 대하여 시험물질 투여 개시일로 부터 4주후에 부검을 실시하였다. 부검전에 체중을 측정하고 ether 마취하에 복부 대동맥으로부터 채혈한 후, 방혈치사 시킨 후 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 모든 시험군의 전동물에 대하여 신장, 간장, 비장, 심장, 폐장, 부신, 뇌, 고환, 난소 및 육안적 병변 부위를 적출하였다.

모든 시험군의 전 동물에 대하여 신장, 간장, 비장, 심장, 폐장, 부신, 뇌, 고환, 난소의 중량을 측정하였다.

병리조직학적 검사

전 동물에 대하여 다음의 장기를 10% 중성 포르말린으로 고정시켜 병리 조직 검사를 실시하였다. 신장, 비장, 간장, 심장, 부신, 뇌, 고환, 난소등 병변이 있는 장기의 경우 대조군 및 최고용량군에서는 전례에 대해서 실행하고, 저용량군 및 중간용량군에서는 육안적 부검소견이 인정되는 장기에 한해 병리조직 검사를 시행하였다.

통계학적 분석

체중측정, 사료섭취량 및 물섭취량의 유의성 검정은 Student's t-test를 사용하였으며, 일반병리 및 조직병리 부분의 자료는 Dunnett's test로 실시하였다.

실험 결과

급성독성시험

폐사율 및 반수치사량 : DWP 305를 6주령 랫드에 1회 경구투여한 결과 대조군 및 전체 시험물질 투여군의 암수 모든 동물군에서 사망에는 발견되지 않아 DWP305 단회 경구투여시 반수치사량(LD₅₀)이 암수 모두 5,000 mg/kg 이상으로 나왔다 (Table I).

일반증상 : DWP 305를 6주령 랫드에 1회 경구투여한 결과 대조군 및 모든 투여군의 암수 동물에서 시험물질에 기인된 이상소견은 발견되지 않았다(Table II).

체중측정 : DWP 305 전투여군의 암수 동물의 체중증가는 대조군에 비하여 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

부검소견 : DWP 305 경구투여후 14일에 실시한 부검결과, 폐장의 부분적 출혈반점이 수컷의 저용량군에서 각각 1례, 암컷 저용량군에서 각각 1례 관찰되었다(Table III).

아급성독성시험

일반증상 및 안구검사 : DWP 305 4주간 암수 랫드에 반복투여한 결과 전 시험기간중 사망동물은 관찰되지 않았고(Table IV), 대조군 및 시험물질 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 특이한 임상증상은 관찰되지않았다 (Table V). 또한 시험물질 투여 최종일에 실시한 안구 검사에서도 이상소견은 관찰되지 않았다.

체중 변화 : 시험물질 투여군 및 대조군들의 체중 측정

Table I. Survivals in Sprague-Dawley rats orally treated with single dosage of DWP305

Sex	Dosage (g/kg)	Days after treatment								Final Mortality	
		0	1	2	3	4	5	6	7		
Male	5.00	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	2.50	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	1.25	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	0.63	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	0.31	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	0.00	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
Female	5.00	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	2.50	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	1.25	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	0.63	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	0.31	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
	0.00	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5

Table II. Clinical signs in Sprague-Dawley rats orally treated with single dosage of DWP305

Sex	Dosage (g/kg)	Clinical Signs	Hours after treatment						Days after treatment						
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7
Male	5.00	ND*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	2.50	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	1.25	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	0.63	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	0.31	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	0.00	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Female	5.00	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	2.50	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	1.25	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	0.63	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	0.31	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	0.00	ND	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

*ND: Not detected.

Table III. Gross findings in organs of Sprague-Dawley rats treated orally with single dosage of DWP305

Sex	Organ	(g/kg)	Male						Female					
			0.00	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00	0.00	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00
	No of rats		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Adrenal Gland L.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Brain		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Heart		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Liver		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kidney L.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lung Hemorrhage		0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Spleen		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Testis L.		0	0	0	0	0	0						
	R.		0	0	0	0	0	0						
	Ovary							0	0	0	0	0	0	0
	Stomach		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0, normal; 1, number of animals with abnormalities.

Table IV. Mortality in rats orally treated with DWP305 for a month

Sex	Dosage (g/kg)	Weeks					Final Mortality
		start	1	2	3	4	
Male	2.000	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
	0.800	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	0.320	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	CON(+) ¹	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
	CON(-) ²	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	2.000	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	0.800	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	0.320	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	CON(+)	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	CON(-)	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12

¹CON(+): Treated with 2% CMC solution, ²CON(-): Not treated.

Table V. Clinical signs in rats orally treated with DWP305 for a month

Sex	Dosage (g/kg)	Animal numbers with clinical signs				
		start	1	2	3	4(week)
Male	2.000	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
	0.800	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	0.320	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	CON(+) ¹	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
	CON(-) ²	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	2.000	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	0.800	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	0.320	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	CON(+)	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	CON(-)	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12

1/10 means no clinical signs were observed in 10 animals treated with DWP305, ¹CON(+): Treated with 2% CMC solution, ²CON(-): Not treated.

결과는 Table VI에 나타내었다. 전 시험기간동안 암수 모든 동물에서 체중의 증가량 및 각 주별 체중에서 대조군에 비하여 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

사료섭취량과 음수량의 변화: 시험물질 투여군의 사료 섭취량과 음수량은 대조군과 같은 정도로 나와 시험물질에 의한 영향으로 볼 수 있는 사료 섭취량과 음수량의 변화는 나타나지 않았다.

혈액학적 검사: 암수컷 모든 동물에서 시험물질 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다(Table VII-1, VII-2).

혈액생화학적 검사: 시험물질을 투여한 수컷 고용량군(2.0 g/kg)에서 대조군에 비하여 GPT의 유의성(P<0.05)있는 감소를 보였으며, ALP의 유의성 있는 증가를 보였다. 한편, 시험물질을 투여한 암컷 용량군에서는 시험 항목 모두에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화는 없었다(Table VIII).

노검사 성적: 암수 모두 대조군과 시험물질 투여군간에

유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Table IX).

병리학적 검사

육안적 부검소견: 시험 물질 최종 투여후 부검시 또는 각 장기 적출시 육안적인 병변사항은 관찰되지 않았다(Table X).

장기중량: 암수 모두 모든 투여 군에서 시험물질 투여에 의한 변화는 인정되지 않았다.

병리조직학적 검사: 간소엽의 구조가 정상이며 간소엽 및 문맥의 섬유화도 관찰되지 않았다. 또한 문맥주위 손상도 관찰되지 않아 이 약물에 의한 만성독성이나, 괴사성 염증 그리고 진행성 손상도 없다고 판단되었다. 담즙울체, 철 침착, lipofucin 침착, 지방병변도 관찰되지 않았다. 다만 일부 간조직의 국소 괴사(focal necrosis) 등이 보였지만 그 정도는 미약하였다. 기타 장기에서도 시험 물질 투여에 의한 변화는 인정되지 않았다(Table XI).

결 론

1. 시험물질 DWP305를 SD계 랫드에 5 g/kg, 2.5 g/kg, 1.25 g/kg, 0.63 g/kg, 0.31 g/kg을 투여용량군으로 하여 1회 경구투여하여 급성독성시험을 실시하였으며, 일반증상, 체중변화 및 부검소견등에 별다른 독성이 관찰되지 않았고, LD₅₀치는 5 g/kg이상이었다.

2. 시험물질 DWP305를 SD계 랫드에 시험물질 투여군으로 2 g/kg, 0.8 g/kg, 0.32 g/kg, 용매대조군(2% CMC 용액), 무처치군등 5개군으로 하여 1개월간 주 5회 경구투여한 후 일반증상, 체중변화, 물, 사료섭취량 변화, 혈액 및 혈액생화학적 검사(노 검사 포함), 병리조직학적 검사등을 실시하였는데, 특이한 독성병변은 관찰되지 않았으며, 본 시험조건에서 수컷의 경우 무해용량은 0.8 g/kg, 최대내성용량은 2.0 g/kg 이상, 암컷의 경우 무해용량이 2.0 g/kg이상이었다.

Table VI. Body weights in rats orally treated with DWP305 for a month

Sex	Dosage (g/kg)		Doys						
			0	5	8	12	19	22	26
Male	2.000	Mean	129.5	163.1	178.1	199.7	221.8	242.1	251.3
		SD ¹	15.18	20.71	20.70	26.66	32.04	31.42	29.89
	0.800	Mean	127.6	155.9	179.0	189.4	215.4	241.0	242.6
		SD	12.82	14.50	15.94	20.45	18.90	24.66	26.34
	0.320	Mean	127.6	162.1	181.2	191.9	212.1	238.0	240.0
		SD	11.87	12.42	12.28	13.12	20.54	26.08	7.92
	CON (+) ²	Mean	125.5	162.0	188.7	207.6	227.2	255.2	257.3
		SD	8.51	9.84	17.49	20.21	23.70	25.46	26.88
	CON (-) ³	Mean	127.2	162.2	187.7	206.8	222.6	254.5	260.3
		SD	9.18	14.47	11.50	18.37	15.98	15.53	26.86
Female	2.000	Mean	126.1	147.4	157.9	157.8	173.2	191.4	198.5
		SD	10.12	13.09	14.04	18.94	17.54	19.93	19.57
	0.800	Mean	130.6	153.1	166.0	175.3	187.3	200.7	207.2
		SD	11.93	13.22	14.50	14.59	15.29	17.50	17.87
	0.320	Mean	124.1	150.9	166.1	178.8	186.6	201.8	206.2
		SD	7.92	11.16	11.62	11.52	12.00	12.72	11.58
	CON (+) ²	Mean	124.2	150.5	161.7	173.3	180.0	192.3	197.4
		SD	10.33	11.76	13.20	15.52	15.83	16.53	16.67
	CON (-) ³	Mean	126.7	159.5	167.8	177.1	178.7	194.7	200.9
		SD	9.98	13.89	6.88	7.89	11.11	11.50	14.07

Each group of 10 animals was treated with DWP305 and all animals survived during the period of experiment ¹SD: Standard deviation, ²CON (+): Treated with 2% CMC solution, ³CON (-): Not treated.

Table VII-1. Hematological findings in rats orally treated with DWP305 for a month

Item	Sex	Dosage (g/kg)	Male				
			CON (-) ¹	CON (+) ²	0.320	0.800	2.000
WBC		(10 ³ /mm ³)	12.0±5.2	17.7±5.1	19.1±3.5	14.2±2.5	16.8±5.6
RBC		(10 ⁶ /mm ³)	7.09±0.47	7.22±0.33	7.34±0.32	7.15±0.28	7.11±0.39
HGB		(g/dl)	14.2±0.8	14.4±0.5	14.5±0.6	14.0±0.6	14.2±0.6
HCT		(%)	42.6±2.8	43.1±1.6	43.1±1.6	42.4±1.5	42.8±1.7
MCV		(fl)	60.1±1.8	59.8±1.5	58.7±1.5	59.3±1.5	60.3±1.6
MCH		(pg)	19.9±1.8	20.0±0.6	19.7±0.6	19.5±0.6	20.0±0.7
MCHC		(g/dl)	33.2±0.8	33.5±0.7	33.6±0.4	33.0±0.5	33.2±0.4
PLT		(10 ³ /mm ³)	556±238	610±117	549±78	674±214	671±127
Lymphocyte %		(%)	88.6±4.5	88.4±4.4	85.7±3.8	89.1±2.1	87.0±2.9
Lymphocyte		(10 ³ /mm ³)	10.7±5.0	15.8±5.0	16.4±2.9	12.7±2.3	14.7±5.1

Results are the mean±SD (n=5~10), ¹Control (-): Not treated, ²Control (+): Treated with 2% CMC solution.

Table VII-2. Hematological findings in rats orally treated with DWP305 for a month

Item	Sex	Dosage (g/kg)	Male				
			CON (-) ¹	CON (+) ²	0.320	0.800	2.000
WBC		(10 ³ /mm ³)	12.4±3.3	14.4±4.4	16.9±3.1	18.0±2.4	17.6±2.2
RBC		(10 ⁶ /mm ³)	6.96±0.56	6.83±0.17	7.21±0.20	7.06±0.56	6.99±0.45
HGB		(g/dl)	14.2±0.9	13.7±0.3	14.4±0.6	14.1±1.0	13.9±0.7
HCT		(%)	42.3±3.3	41.0±0.9	42.9±1.0	42.0±2.9	42.2±2.2
MCV		(fl)	60.7±1.9	59.8±1.2	59.9±1.3	60.4±2.0	60.3±1.6
MCH		(pg)	20.5±0.8	20.1±0.4	19.8±0.5	19.9±0.8	19.9±0.6
MCHC		(g/dl)	33.7±0.9	33.4±0.6	33.0±0.5	33.0±0.4	33.0±0.3
PLT		(10 ³ /mm ³)	629±205	620±110	646±77	629±135	599±105
Lymphocyte %		(%)	88.8±3.9	87.8±1.6	85.6±5.5	87.2±3.6	87.9±3.6
Lymphocyte		(10 ³ /mm ³)	11.0±3.1	13.6±2.7	14.5±3.0	16.2±2.5	16.1±2.6

Results are the mean±SD (n=5~10), ¹Control (-): Not treated, ²Control (+): Treated with 2% CMC solution.

Table VIII. Biochemical serum values in rats orally treated with DWP305 for a month

Item	Dosage (g/kg)	Sex									
		Male			Female						
		CON(-) ¹	CON(+) ²	0.320	0.800	2.000	CON(-) ¹	CON(+) ²	0.320	0.800	2.000
ALB	(g/dl)	1.43±0.08	1.52±0.13	1.26±0.09	1.53±0.06	1.46±0.08	1.64±0.14	1.62±0.15	1.63±0.11	1.60±0.11	1.54±0.22
GOT	(U/l)	107.4±19.3	111.7±21.8	102.5±31.4	114.8±19.4	117.9±13.7	109.4±22.1	106.4±10.8	96.2±13.8	114.0±22.3	123.0±25.8
GPT	(U/l)	58.6±15.2	67.2±4.4	69.4±14.2	62.3±8.5	55.9*±3.3	52.0±10.0	58.1±14.2	47.0±8.3	59.7±13.8	63.5±16.8
BUN	(mg/dl)	14.67±2.4	19.3±1.9	14.3±1.5	23.3±5.3	22.0±3.8	15.0±1.6	18.1±2.0	15.2±3.6	17.7±2.5	20.0±3.5
CHOL	(mg/dl)	63.1±10.7	72.1±11.0	66.2±9.9	71.5±12.6	63.8±9.3	68.2±11.1	60.6±8.7	63.2±8.4	69.2±14.8	70.8±13.9
GUL	(mg/dl)	176.1±35.8	188.7±15.7	179.5±29.4	184.5±12.0	184.6±15.4	169.2±16.3	168.4±15.9	176.2±28.2	176.4±23.2	156.0±52.38
TBIL	(mg/dl)	0.17±0.03	0.19±0.01	0.18±0.01	0.19±0.02	0.17±0.03	0.18±0.02	0.21±0.03	0.19±0.04	0.19±0.02	0.19±0.03
TP	(g/dl)	6.4±0.2	6.9±0.2	7.0±0.3	6.8±0.1	7.0±0.3	7.0±0.3	7.0±0.2	7.2±0.3	7.1±0.2	6.5±2.0
Cl	(mmol/l)	104.2±3.3	107.4±1.1	104.9±1.1	106.8±2.3	105.5±2.9	106.9±4.1	103.8±1.6	106.1±2.3	105.6±2.2	103.4±9.2
ALP	(U/l)	255.6±46.6	274.30±16.3	310.9±70.5	265.8±54.3	318.8*±25.6	147.2±31.1	205.9±59.4	169.7±48.7	164.1±41.8	179.3±41.9
CREAT	(mg/dl)	0.27±0.10	0.34±0.05	0.37±0.10	0.43±0.08	0.41±0.07	0.36±0.08	0.43±0.05	0.37±0.05	0.45±0.07	0.44±0.07
Na	(mmol/l)	143.4±6.1	145.0±4.8	142.5±2.2	146.9±1.6	147.6±3.4	146.6±3.4	145.3±7.3	143.1±1.6	146.2±2.1	144.6±12.1
K	(mmol/l)	4.9±0.4	4.8±0.6	4.5±0.3	4.7±0.4	4.7±0.4	4.8±0.5	4.3±0.3	4.4±0.5	4.5±0.5	4.5±0.6
LDH	(U/l)	465.8±215.2	299.7±166.7	265.6±127.9	543.3±312.6	538.4±274.7	438.0±206.1	389.5±153.8	294.6±87.6	443.1±184.1	398.9±181.79
TRIG	(mg/dl)	98.5±44.0	119.2±40.4	104.4±1.6	111.3±31.5	112.3*±32.1	57.2±29.7	58.9±27.4	65.1±21.3	60.6±21.0	61.9±30.4

Results are the means±SD (n=8~12), Statistical significance *p<0.05, ¹CON(-): Not treated, ²CON(+): Treated with 2% CMC solution.

Table IX. Urinalysis in rats orally treated with DWP305 for a month

Sex	Dosage (g/kg)	Male					Female					
		CON(-) ¹	CON(+) ²	2.000	0.800	0.320	CON(-)	CON(+)	2.000	0.800	0.320	
No. of animals		10	11	11	12	12	12	12	12	12	12	
pH	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7	5	5	4	5	5	5	5	4	5	5	
	8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Protein	0	5	5	4	4	5	4	5	5	4	5
		0.3 g/l	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
1 g/l		0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	
5 g/l		0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	
Glucose	normal	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	
	50 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	100 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ketone	1,000 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-	4	1	5	1	4	5	1	5	1	4	
	+/-	0	4	0	0	0	0	4	0	4	0	
	+	1	0	0	4	1	0	0	0	0	1	
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Urobilinogen	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Occult Blood	12 mg/dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	
	+/-	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

¹CON(-): Not treated, ²CON(+): Treated with 2% CMC solution.

고 찰

시험물질 DWP305를 랫드에 경구 투여하였을때의 급성 및 아급성 독성을 검토하였다. DWP305를 SD계 랫드에 5 g/kg, 2.5 g/kg, 1.25 g/kg, 0.63 g/kg, 0.31 g/kg을 투여용량군으로 하여 1회 경구투여하여 급성독성을 조사하였다. 그 결과 투여용량군 모두에서 사망동물은 없었으며, 별다른 이상증상도 보이지 않았고 체중측정결과 시험물질 투여에 의한 유의성있는 변화는 없었다. 육안적 해부소견으로는 수컷 저용량군 1례, 암컷 저용량군에서 각각 1례가 폐에서의 미세한 부분적 출혈이 관찰되었으나, 이것은 시험물질에 기인한 원인이 아니라 동물실험

에서 일반적으로 관찰될 수 있는 환경에 기인한 원인으로 사료된다. DWP305의 랫드에 대한 급성경구독성시험에서 일반증상, 체중변화 및 부검소견등에서 시험약물에 기인한 이상소견은 관찰되지 않았고, LD₅₀치도 5 g/kg이상으로 나왔다. DWP305의 조성성분의 랫드에 대한 급성경구독성 LD₅₀치가 UDCA는 5 g/kg이상(細野 仁一등, 1975), silymarin은 20 g/kg(unpublished data), riboflavin tetrabutylate는 7.5 g/kg이상(藥業時報社, 1989)으로 보고되었고, 각 성분을 일정 조성비로 배합한 DWP305도 급성독성이 없는 것으로 나타났다.

DWP305의 아급성 경구독성을 조사하기 위해 SD계 랫드를 최고용량군 2.0 g/kg, 중간용량군 0.8 g/kg 및 저

Table X. Histopathological findings in rats orally treated with DWP305 for a month

Organ	Sex Dosage (g/kg)	Male					Female				
		CON(-) ¹	CON(+) ²	2.000	0.800	0.320	CON(-)	CON(+)	2.000	0.800	0.320
No. of rats		10	11	11	12	12	12	12	12	12	12
Adrenal Gland L.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brain		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney L.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung Hemorrhage		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testis L.		0	0	0	0	0					
	R.	0	0	0	0	0					
Ovary							0	0	0	0	0
Thymus		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹CON(-): Not treated, ²CON(+): Treated with 2% CMC solution.

Table XI. Incidence neoplastic findings in rats orally treated with DWP305 for a month

Organ	Sex Dosage (g/kg)	Male					Female				
		CON(-) ¹	CON(+) ²	2.000	0.800	0.320	CON(-)	CON(+)	2.000	0.800	0.320
No. of rats		10	11	11	12	12	12	12	12	12	12
Adrenal Gland L.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brain		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interstitial Pneumonia		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Calcification											
Spleen		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testis L.		0	0	0	0	0					
	R.	0	0	0	0	0					
Ovary							0	0	0	0	0
Thyroid Gland		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inflammation & Fibrosis											
Stomach		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹CON(-): Not treated, ²CON(+): Treated with 2% CMC solution.

용량군 0.32 g/kg, 용매대조군(2% CMC 용액) 및 무처치군으로 구분하여, 1개월 동안 주 5회 경구투여한 후 아급성독성시험을 하였다. 일반증상(안구검사 포함), 체중 증가율, 사료섭취량 및 물섭취량 변화, 혈액 및 혈액 생화학적 검사(노 검사 포함), 병리조직학적 검사를 통하여 수컷의 고용량군(2.0 g/kg)에서 대조군에 비해 GPT 감소($p < 0.05$), ALP 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다. GPT

감소현상은 DWP305가 UDCA 및 silymarin이 함유된 간장약으로서 간보호작용과 관련있는 것으로 보이고 ALP증가는 UDCA를 5주간 연속투여한 결과, 수컷 랫드에서 유의성은 없으나 증가 경향이 있었던 결과와 유사한 결과로 생각된다(高橋 日出彦 등, 1975).

본시험 결과로 랫드에 1개월간 DWP305를 경구투여한 결과 수컷의 무해 용량이 0.8 g/kg, 최대 내성 용량이 2.0

g/kg로 추정되며, 암컷의 경우 검사 항목 모두에서 시험 물질에 의한 변화는 관찰되지 않았으므로 무해 용량이 2.0 g/kg 이상으로 추정 된다.

참고문헌

- Kitani, K. and Kanai, S. (1982). Effect of ursodeoxycholic acid on the bile flow in the rat. *Life Sci.* **31**, 1973-1985.
- Lanzini, A. and Northfield, T. C. (1988). Effect of ursodeoxycholic acid on biliary lipid coupling and on cholesterol absorption during fasting and eating in objects with cholesterol gallstones. *Gastroenterology* **95**, 408-416.
- Magliulo, E., Scevola, D. and Carosi, G.P. (1979). Investigation on the actions of silybin on regenerating rat liver. *Drug Res.* **29**, 1024-1028.
- Roslyn J. J., Abedin, M. Z., Strichartz, S. D., Abdou, M. S. and Palant, C. E. (1989). Regulation of gallbladder ion transport: role of bile lipids. *Surgery* **105**, 207-212.
- Tyutyukova, N., Tuneva, S., Gorantcheva, U., Tanev, G., Zhivkov, V. Chelibonova-Lorer, H. and Bozhkov, S. (1981). Hepatoprotective effect of silymarin on liver of D-galactosamine treated rats. *Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* **3**, 71-77.
- Valenzuela, A., Lagos, C., Schmidt, K. and Videla, L. A. (1985). Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem. pharmacol.* **34**, 2209-2212.
- Ward, A., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M., and Avery, G. S. (1984). Ursodesoxycholic acid: A review of its pharmacological properties and therapeutic defficacy. *Drugs* **27**, 95-131.
- 국립보건안전연구원 (1988). 예규 제 10호; 의약품등의 특성 시험 기준.
- 高橋 日出彦, 戸塚 和男, 宮下 武美, 薄井 啓子, 宮本 甲生 (1975). Wistar 系ラットに對する Ursodeoxychol酸 經口投與による亞急性毒性について. *基礎と臨床*, **9**, 3167-3181.
- 細野 仁一, 岩崎 守男 (1975). Ursodeoxycholic acid의 라ット, 마우스에 對する 急性毒性試驗 および 溶血性試驗, *基礎と臨床*, **9**, 3159-3166.
- 藥業時報社 (1989). 日本醫藥品集, 治療藥 1285-1286.