

## 새로운 과립구 콜로니 자극인자(rhG-CSF) DA-3030의 국소자극성에 관한 연구

김옥진\* · 안병옥 · 이순복 · 김원배 · 양중익  
동아제약(주) 연구소

### Studies on Local Irritation of DA-3030, a new granulocyte colony stimulating factor

Ok Jin KIM\*, Byoung Ok AHN, Soon Bok LEE,  
Won Bae KIM and Junnick YANG

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

(Received September 14, 1994; accepted September 30, 1994)

**Abstract**—As a series of safety studies of DA-3030, a new rhG-CSF, its local irritancy was examined in the rabbits after the following treatment; application into the conjunctival sac of the eye(single), subcutaneous injection(single), intramuscular injection(single), and intravenous injection(8-day repeated). In addition, paravenous irritation of DA-3030 was investigated in mice. The results obtained were as follows. 1. In the result of ocular irritation test, 0.03% solution of DA-3030 could be considered as a non-irritating material. 2. The local irritation of DA-3030 by an injection of 0.5 ml of its solution subcutaneously or intramuscularly was negligible and not so much different from that of saline. 3. In the vascular irritancy test, macro- and microscopic observations revealed that the irritating activity of DA-3030 in blood vessels was not different from that of saline when they were injected once a day into vein retroauricularis of rabbits for 8 days. 4. The paravenous administration of DA-3030 did not induce any abnormal changes at injection sites except mild swelling in 1 mouse at 3 hours after injection which was thought to be due to slow absorption. The above-mentioned results suggest that DA-3030 has no irritating activity when injected through intravenous or subcutaneous route for clinical practice as 0.03% solution.

**Keywords** □ DA-3030, recombinant human granulocyte-colony stimulating factor(rhG-CSF), toxicity, local irritation, rabbit, mouse

DA-3030은 동아제약(주) 연구소에서 대장균발현계를 이용하여 생산한 유전자재조합 인과립구 콜로니 자극인자(recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF)로서 과립구 감소증의 예방 및 치료를 목적으로 개발예정인 물질이다.

과립구는 골수간세포 유래의 과립구 전구세포(CFU-G)의 분화, 증식 및 성장에 의해 생성되며 약 6시간의 짧은 반감기를 가지고 혈중을 순환하며 식작용과 면역체형성으로 생체를 감염으로부터 방어하는 중요한 역할을 하고 있다. 항암화학요법의 경우 비특이적인 세포독성에 기

인하여 골수중 전구세포손상과 이로 인한 호중구수의 감소와 반감기단축이 야기되며, 이는 다시 고열과 치명적인 세균성 감염으로 진행될 위험이 큰 것으로 알려져 있다(O'reilly와 Gamelli, 1988). 현재까지 이에 대한 예방 및 치료법으로는 2차 감염예방 목적의 항생제투여와 격리 등의 보존적 치료가 주로 이용되었으나(Pizzo 등, 1986) 최근에는 조혈촉진인자로 알려진 일부 당단백효르폰이 백혈구의 분화, 증식 및 기능활성을 촉진시키는 것으로 나타났으며, 그 중 G-CSF와 GM-CSF는 이미 임상에 사용되고 있다. 항암화학요법에 의한 백혈구감소증의 예방 및 치료목적 외에 G-CSF는 골수적출 및 자가골수이식수술, 방사선요법, 골수이형성증, 선천성 및

\* To whom correspondence should be addressed.

특발성 호중구 감소증에 대한 보조요법으로 시험적용되고 있으며, 그 효과가 입증되고 있다(Bronchud 등, 1989; Crawford 등, 1991; Gabrilove 등, 1988).

본 연구에서는 DA-3030의 임상적용시 국소자극성을 검토하고자 토끼를 이용한 안점막자극시험, 피하 및 근육주사시 국소자극성시험과 혈관장해시험을 실시하고 마우스에서 혈관주위모델을 이용하여 피부자극성시험을 실시하였다.

## 실험방법

### 실험동물

안점막자극시험, 피하 및 근육자극성시험과 혈관장해성시험을 위하여 2.0~3.0 kg의 웅성 New Zealand White계 토끼를 연암축산으로부터 구입하여 본 시험에 사용하였으며, 혈관주위모델에 의한 피부자극성시험을 위하여는 5주령의 웅성 ICR계 마우스를 B & K(China)로부터 공급받아 사용하였다. 시험개시 전 1주일간 순화사육을 하였으며, 시험기간 중 사육환경은 통상적인 조건(온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $60 \pm 10\%$ )을 유지하였고 사료와 물은 자유섭취시켰다.

### 시험물질

시험물질인 DA-3030(Lot No. CTS-001)은 동아제약(주) 연구소 생물공학연구실에서 공급받아 사용하였으며, HPLC분석 결과 순도는 98% 이상이었다. 냉장보관된 3.0 mg/2 ml/vial의 무색액상인 시험물질을 용매를 사용하여 임상사용농도인 0.3 mg/ml(0.03%)로 희석하여 투여하였다.

용매의 조성으로 1 liter당 acetic acid 0.49 ml, sodium acetate 0.123 g, tween 80 0.04 ml, mannitol 50 g이 포함되어 있으며, pH는 4.0이었다.

### 안점막자극시험

1주일간의 순화사육기간을 거쳐 시험개시 24시간 전 육안 및 검안경(Heine, mini miroflex2)을 이용하여 안구, 각막손상의 이상유무를 확인 후 양안이 정상인 토끼 9마리를 선택하여 시험에 사용하였다. DA-3030 적용 후 세척군과 비세척군에 각각 3마리 및 6마리를 각각 사용하였다. DA-3030의 임상사용농도 0.03%를 0.1 ml씩

왼쪽 안구에 점안 후 I군은 20~30초 후 생리식염수를 사용하여 1분간 세척하고 오른쪽 눈을 비쳐치 대조군으로 사용하였다. II군은 DA-3030을 왼쪽 안구에 적용 후 세척하지 않고 관찰하며 오른쪽 눈을 비쳐치 대조군으로 사용하였다. 약물의 적용 후 3시간, 1, 2, 3, 4 및 7일에 관찰하고 평가는 국립보건안전연구원 "의약품 등의 독성시험기준"(1988년)의 안구병변의 등급표에 준하여 실시하고 이에 따른 평점을 산출 후 그 결과에 대한 자극성의 정도판정은 아래와 같은 평점의 범위에 의해 물질의 자극도를 구분하였다.

### 피하 및 근육자극성시험

본 시험은 일본 후생성 "주사제의 국소자극성에 관한 시험법안"(厚生省資料, 1979)에 준하여 실시하였다. 순화사육을 거쳐 선별된 건강한 토끼 18마리의 후지외측 대퇴부를 투여 1일 전 제모하고 유성펜을 이용하여 주사할 일정부위를 표시한 후 I군에는 피하자극성시험을 위하여 우측후지에 DA-3030 0.03%(0.3 mg/ml)액을, 음성대조를 위하여 좌측후지에는 생리식염수를 각각 0.5 ml씩 피하주사하였다. II군에는 근육자극성시험을 위하여 우측후지에 DA-3030 0.03%(0.3 mg/ml)액을, 음성대조를 위하여 좌측후지에는 생리식염수를 각각 0.5 ml씩 근육주사하였다. III군에는 양성대조를 위하여 6.0%의 acetic acid용액을 우측후지에 피하로, 좌측후지에는 근육내로 주사하였다. 투여 2일 후 각 군의 3마리를 부검하여 후지 주사부위의 병변을 관찰하고 digital caliper를 사용하여 병변의 장, 단경을 측정하고 병변면적을 기록하였다. 피하투여군에서는 주사부위 피하의 병변의 장, 단경의 끝을 병변면적으로 하였으며 근육내 투여동물에서는 주사부위의 근육을 종으로 절개하여 병변의 크기를 같은 방법으로 산출하였다. 또한 주사부위의 피하 및 근육을 10% 중성 포르말린에 고정하고 통상적인 조직처리를 한 후 H & E 염색을 실시하여 병리조직학적 검사를 실시하였다. 투여 후 7일에 동일 요령으로 나머지 개체의 병변을 관찰하고 생리식염수와 6.0% acetic acid의 병변과 비교하여 자극성을 평가하였다.

### 혈관장해성시험

투여 3일전 12마리의 토끼 좌우 외측이개를 electric clipper(Oster)를 사용하여 제모하고 府川 등(1975)의 방법에 따라 우측이개정맥은 정주법으로, 좌측이개정맥에는 저류법을 사용하여 I군은 생리식염수를, II군에는 DA-3030 0.03%액을 투여하고 III군에는 0.75% acetic acid를, IV군에는 5% sulfobromophthalein sodium(bromsulphalein, BSP)을 투여하였다. 정주법은 0.4 ml/min 유속으로 1 ml를 투여하였고, 저류법은 3 cm 양측단을 유성 펜으로 표시하고 심장반대측을 hair pin으로 고정된 후 hamilton syringe(夏目)로 약물을 0.025 ml 혈관내 주사하고 주사침은 그대로 둔 상태에서 심장측을 hair pin으로 고정된 후 나머지 0.025 ml를 주사한 상태에서 3분간 저류하였다. 동일요령으로 8일간 혈관내 반복투여하며 연일 관

Rating	Range of mean score*
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

\* Mean score is taken from the observation time which has the highest mean score.

찰하여 혈전형성과 염증상태를 점수제로 평가하였다. 혈전형성은 혈전길이에 따라 0 mm; -, 1~4 mm; +, 5~14 mm; ++, >15 mm; +++ 등과 같이 구분하였으며, 염증상태는 무변화; -, 정도(폭 3 cm 이하); +, 중등도(이개 1/3까지); ++, 강도(이개 1/2 이상); +++ 등과 같이 구분하였다. 심한 혈전의 형성으로 투여가 곤란한 경우에는 투여를 중단하고 병리조직학적검사를 위한 부검을 실시하였고 그 외의 경우에는 투여 8일째 관찰 종료 후 모든 개체를 부검하여 집중부위를 10% 중성 포르말린에 고정하고 통상적인 방법으로 병리조직학적검사를 실시하였다.

**혈관주위모델에 의한 피부자극성시험**

1주일간의 순화사육을 거쳐 선별된 50마리 마우스를 10마리씩 군을 분리한 후 I군에는 생리식염수를, II군에는 매체대조물질을, III군에는 DA-3030 0.03%액을, IV군에는 0.75% acetic acid를, V군에는 6.0% acetic acid를 마우스의 미정맥주위에 단회투여하였다(perivascular injection). 투여시 액량은 0.05 mL로 인슐린주사기(28-G, 1/2 inch)를 사용하여 Balsari 등(1989)의 방법으로 실시하였다. 투여 후 3시간, 1일, 3일, 7일에 각군의 모든 동물의 주사부위 병변을 관찰하여 아래의 기준에 의해 점수제로 평가하였으며, 투여 후 7일에 대조군을 포함한 모든 군을 도살하여 주사부위의 병리조직학적검사를 실시하였다.

- 0 : no gross lesion(NGL)
- 1 : erythematous, swelling, induration, but no necrotic change
- 2 : erythematous, swelling, mild necrosis and/or severe induration,
- 3 : obvious necrosis, but no deformity of tail
- 4 : severe necrosis and eschar formation and/or deformity of tail

**통계학적 검사**

Non-parametric ANOVA를 실시하여 유의차가 인정되었을 경우에 distribution-free multiple comparison을 실시하여 군간 유의차를 검정하였다. 피부병변 측정치의 각 군간 유의성 검정은 분산 분석과 t-test로 실시하였다.

**실험결과**

**안점막자극시험**

**일반증상**

관찰기간 중 세척군과 비세척군을 포함하여 DA-3030을 투약한 모든 동물에서 유의한 임상증상이 관찰되지 않았다.

**투여부위 관찰**

DA-3030의 임상사용농도 0.03%(W/V)액을 결막낭내 투약한 후 3시간, 1일, 2일, 3일, 4일 및 7일에 각막손상, 홍채의 충혈이나 빛에 대한 반응과 안검점막, 안구결막 등의 혈관상태, 결막의 부종 및 배출물의 유무 등을 관

찰한 결과 비세척군의 한 개체가 적용 후 3시간에 결막의 가벼운 발적이 인정되었으나 이후 정상으로 회복되었고, 그 외 세척군과 비세척군 모두에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table I, Fig. 1). 이상의 관찰에 의한 평점에 의하여 산출된 DA-3030 임상사용농도 0.03%액은 세척시 평균 0점 및 비세척시 0.3점으로 모두 무자극(non-irritancy) 범주에 해당되었다.

**피하 및 근육주사에 의한 국소자극성시험**

임상증상 시험기간동안 약물과 관련한 임상증상이나 폐사에는 관찰할 수 없었으며, 생리식염수와 DA-3030 피하 투여시 각각 1마리씩의 개체에서 투여직후 주사부위에 가벼운 출혈이 있었다. 그 외에 시험기간 중 약물의 영향으로 보이는 변화는 관찰되지 않았다.

**육안소견**

주사에 의한 국소자극성의 육안소견은 Table II와 같다. 생리식염수와 DA-3030의 피하주사 후 2일째 각각 한 개체의 주사부위 피하직에 국소적인 적색반점이 관찰되었으나 이 후 7일째에는 어떤 개체에서도 유의한 변화가 인정되지 않았으며, 동일 약물들의 근육주사에 의해서는 투여 후 2일 및 7일째 어느 개체에서도 특이한 병변을 관찰할 수 없었다. 6.0% acetic acid투여시 피하주사 2일째 3마리 모두에서 피하직의 암적색 반점을 관찰할 수 있었으며, 그 크기는 평균 716.7 mm<sup>2</sup>이었다. 투여 후 7일째 또한 3마리 모두에서 피부의 비후와 피하직에 투명한 액상 삼출물이 관찰되었고 2일째와 유사한 암적색 반점이 존재하였으나 그 크기는 평균 206.7 mm<sup>2</sup>으로 감소되었다. Acetic acid의 근육주사에 의하여는 투여 2일 및 7일째 모두에서 주사부위 근육에 암적색바탕에 회백색 줄무늬를 가진 반점이나 회백색 바탕에 암적색 줄무늬를 가진 반점이 관찰되었으며 그 크기는 2일째 평균 176.0 mm<sup>2</sup>이었으나 7일째 402.7 mm<sup>2</sup>으로 증가하였다(Fig. 2).

**병리조직학적 소견**

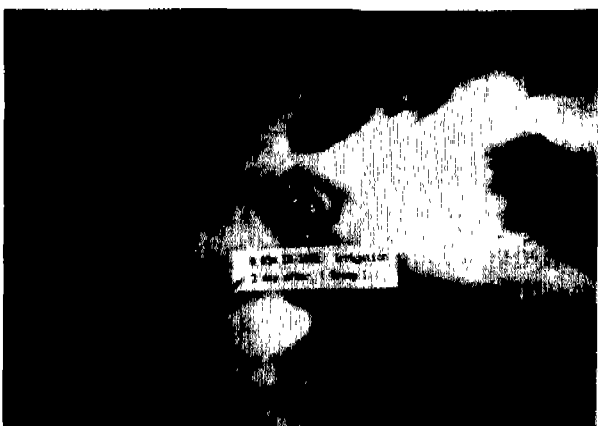
병리조직학적 검사결과는 Table III, IV와 같다. 피하주사에 의한 국소자극성시험 결과 생리식염수와 DA-3030 투여군은 투여 2일째 육안소견으로 적색반점이 관찰된 각각의 한 개체에서 피하직에 미약한 혈구의 유출이 관찰되었으나 그 외에 특이할만한 변화가 관찰되지 않았으며 투여 7일 후에는 모든 개체에서 유의한 변화가 인정되지 않았다. 반면 acetic acid 투여군은 투여 2일 및 7일째 표피(cutaneous layer) 및 피하직(subcutaneous layer)에 수종성 변화와 염증세포의 침윤 및 대식구에 의한 탐식상의 소견과 일부 부위의 출혈을 동반한 괴사소견을 관찰할 수 있었으며 다른 부위에서는 신생혈관을 포함한 육아조직의 형성과 석회침착소를 관찰할 수 있었다. 또한 피하직에 인접한 근육층의 일부 근육조직에서는 변성 및 괴사와 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 근육주사에 의한 국소자극성시험 결과 생리식염수 및 DA-3030투여에 의하여 투여 2일 및 7일째 어떠한 병리조직학적인 소견도 관찰할 수

**Table I.** Results of ocular irritation test treated with DA-3030

Group	Animal No.	Tissue	Time after application							Total <sup>a</sup> Score	Mean <sup>b</sup> Score
			3 hrs	1 day	2 day	3 day	4 day	7 day			
DA-3030 Irrigation	1	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		
	2	Cornea	0	0	0	0	0	0	0		
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		
	3	Cornea	0	0	0	0	0	0	0		
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		
DA-3030 Non irrigation	4	Cornea	0	0	0	0	0	0	0	0.3	
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		
	5	Cornea	0	0	0	0	0	0	0		
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	2	0	0	0	0	0	2		
	6	Cornea	0	0	0	0	0	0	0		
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		
	7	Cornea	0	0	0	0	0	0	0		
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		
	8	Cornea	0	0	0	0	0	0	0		
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		
	9	Cornea	0	0	0	0	0	0	0		
		Iris	0	0	0	0	0	0	0		
		Conjunctiva	0	0	0	0	0	0	0		

<sup>a</sup>: The total score is taken from the observation time which has the highest score.

<sup>b</sup>: Sum of total score/No. of animal



**Fig. 1.** Eye of a rabbit treated with a single instillation of 0.03% solution of DA-3030. No abnormal changes noted.

없었다. 6.0% acetic acid 투여군에서는 근섬유의 변성 및 피사와 대식구에 의한 탐식상 및 석회침착소가 관찰되었

으며 간질조직의 수증성변화와 대식구 위주의 염증세포 침윤 및 출혈소견이 관찰되었다. 병변부위 주위에서는 육아조직의 형성과 섬유화가 관찰되기도 하였다(Fig. 3).

#### 혈관장해성시험

##### 육안소견

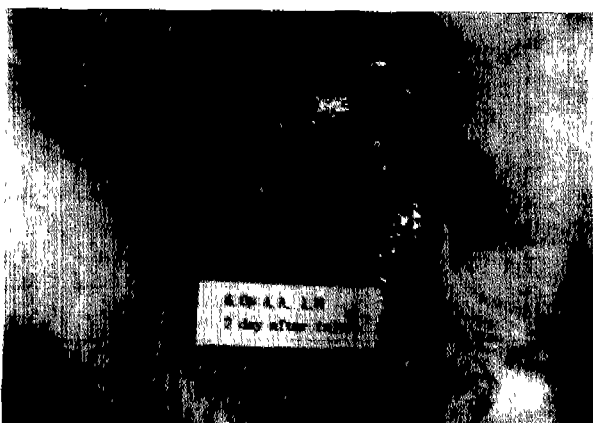
시험물질을 저류법과 정주법으로 8일간 혈관내 반복 투여하였을 때 혈관자극성의 육안소견은 Table V와 같다. 좌측이개정맥에 실시한 저류법에서는 생리식염수와 DA-3030투여군의 어느 개체에서도 혈전형성과 염증이 유발되지 않았으나 0.75% acetic acid 투여군에서는 투여 5일째 전에에서 1~4 mm의 혈전형성과 경도의 염증소견이 관찰되었으며, 8일째 투여종료시에는 5~14 mm의 혈전형성과 중등도의 염증이 유발되었다. 5.0% BSP투여군에서는 투여 3일째 부터 전에에서 심한 혈전형성과 염증소견이 관찰되었다(Fig. 4).

우측이개정맥에 실시한 정주법에서도 투여 8일째에 생리식염수 투여군의 한 개체에서 미약한 염증소견을

**Table II.** Macroscopic changes of the injection sites 2 & 7 days after single injection

Route of injection	Compound	Animal No.	Day 2		Day7	
			Size (mm <sup>2</sup> )	Color	Size (mm <sup>2</sup> )	Color
S.C	Saline	1	0	—	0	—
		2	48	Red spot	0	—
		3	0	—	0	—
	Mean± SD		16.0± 22.6		0	—
	DA-3030	1	0	—	0	—
		2	20	Red spot	0	—
		3	0	—	0	—
	Mean± SD		6.7± 9.4		0	
	6.0% Acetic acid	1	900	Dark red spot	210	Dark red spot
		2	450	Dark red spot	210	Dark red spot
3		800	Dark red spot	200	Dark red spot	
Mean± SD			716.7± 192.9 <sup>a</sup>		202.7± 4.7 <sup>a</sup>	
I.M	Saline	1	0	—	0	—
		2	0	—	0	—
		3	0	—	0	—
	Mean± SD		0		0	
	DA-3030	1	0	—	0	—
		2	0	—	0	—
		3	0	—	0	—
	Mean± SD		0		0	
	6.0% Acetic acid	1	144	Grey focus with dark red streak	308	Grey focus with dark red streak
		2	120	Dark red focus with grey streak	500	Grey focus with dark red streak
		3	264	Dark red focus with grey streak	400	Grey focus with dark red streak
		Mean± SD		176.0± 63.0 <sup>a</sup>		402.7± 78.4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Significantly different from saline control (P<0.05)



**Fig. 2.** A photograph of i.m. injection site of 6.0% acetic acid. White discoloration and consolidative changes were seen.

제외하고는 그 외에 생리식염수와 DA-3030투여군에서는 혈전형성과 염증이 유발되지 않았다. 0.75% acetic acid 투여군에서는 투여 6일째 전에에서 15 mm 이상의 심한

혈전과 중등도의 염증유발로 투여를 중단하였고, 5.0% BSP투여군에서는 투여 4일째에 전에에서 심한 혈전형성과 염증소견이 관찰되었으며 투여를 계속할 수 없게 되어 투여개시 후 5일에 부검을 실시하였다.

**병리조직학적소견**

주사부위에 대한 병리조직학적 검사결과는 Table VI과 같으며 생리식염수투여군의 한 개체에서 정주법주사부위의 경미한 출혈소견과 염증세포의 침윤이 관찰되었으나 그 외의 동물과 DA-3030투여군의 모든 개체는 정주법과 저류법주사부위의 조직에서 유의한 변화가 인정되지 않았다. 0.75% acetic acid용액과 5.0% BSP용액의 정주법투여군에서는 각각 3예 모두 혈관내피세포의 탈락 및 혈관벽괴사, 혈전형성, 혈관주위조직의 부종, 출혈, 및 염증세포침윤 등 중등도 이상의 병변이 관찰되었으며, 일부 예에서 중등도 이상의 혈관주위조직의 국소적 괴사, 육아조직형성 등의 소견도 관찰되었다. 이들 양성대조물질의 저류법투여동물에서도 이와 유사한 정도의 조직 변화가 관찰되었다.

**Table III.** Histopathological findings of the skin after single subcutaneous injection of DA-3030

Necropsy day	Day 2									Day 7								
	Saline			DA-3030			6.0% AA			Saline			DA-3030			6.0% AA		
Compound	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Cutaneous layer</b>																		
Edema	-	-	-	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-	+	++	++
Cell infiltration	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	++	++
Activated phagocytosis	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Focal hemorrhage	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	++	++
Focal necrosis	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	+	++	++
Granulation	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Calcification	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-
<b>Subcutaneous layer</b>																		
Edema	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Infiltration of round cells	-	-	-	-	-	-	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Activated phagocytosis	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	+
Degeneration and necrosis of muscular layer	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	+++
Hemorrhage	-	±	-	-	±	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	+++
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Calcification	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

- : No changes, ± : Very slight, + : Slight, ++ : Moderate, +++ : Severe

**Table IV.** Microscopic findings of muscles after single intramuscular administration of DA-3030

Necropsy day	Day 2									Day 7								
	Saline			DA-3030			6.0% AA			Saline			DA-3030			6.0% AA		
Compound	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Muscle fiber</b>																		
Degeneration	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	++	++
Necrosis	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	++	+
Phagocytosis	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Calcification	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Interstitium</b>																		
Edema	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Infiltration of round cells	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Granulation	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+

- : No changes, + : Slight, ++ : Moderate, +++ : Severe

**혈관주위모델에 의한 국소자극성시험**

**육안소견**

시험기간 중 관찰된 주사부위의 국소병변 평점은 Fig. 5과 같이 도식화될 수 있다. 투여후 3시간에 생리식염수와 DA-3030을 투여한 각 1마리에서 주사부위의 경도 종창이 인정되었으나 투여 후 4시간에는 모두 정상으로

회복되어 이후 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 양성 대조물질인 acetic acid 0.75%액을 투여한 개체들은 주사 후 국소병변이 진행되어 3일후에는 주사부위의 홍반, 종창, 경변 등의 소견을 관찰할 수 있었고, 7일에는 개체에 따라 경도의 국소적 괴사소견이 관찰되었다. Acetic acid 6.0%액을 투여한 개체들은 주사 후 3일에 주사부

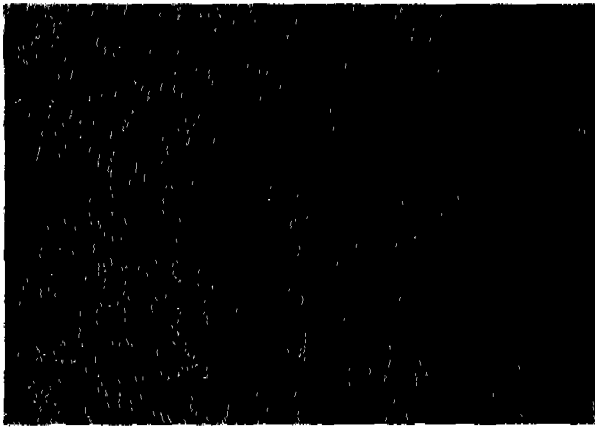


Fig. 3. Muscle of a rabbit at 7 days after a single i.m. injection of 6.0% acetic acid. Degeneration of muscle fibers, slight inflammatory cell infiltration and granulation in the interstitium are observed.



Fig. 4. Tissue around vein retroauricularis of a rabbit after 4-day repeated intravenous administration of 5.0% of BSP. Severely organized thrombus and necrosis of venous wall are seen.

Table V. Macroscopic changes of the auricles of rabbits treated i.v. with various compounds

Compound	Animal No.	Type of injection	Thrombogenesis (days)								Inflammation (days)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	
Saline	1	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
		Retention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Retention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Retention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DA-3030 (0.03%)	1	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Retention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Retention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	Infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Retention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA <sup>a</sup> (0.75%)	1	Infusion	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+	++	+++	+++
		Retention	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	-	-	-	+	+	++	++
	2	Infusion	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
		Retention	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	-	-	-	+	+	++	+++
	3	Infusion	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
		Retention	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	-	-	-	+	+	++	++
BSP <sup>b</sup> (5.0%)	1	Infusion	-	+	+++	+++	+++	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	-	+	+++	+++	+++ (SA <sup>c</sup> )	
		Retention	-	-	++	+++	+++	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	-	+	+++	+++	+++ (SA <sup>c</sup> )	
	2	Infusion	-	+	++	+++	+++	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	-	+	+++	+++	+++ (SA <sup>c</sup> )	
		Retention	-	-	+	++	+++	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	-	+	+++	+++	+++ (SA <sup>c</sup> )	
	3	Infusion	-	+	++	+++	+++	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	-	+	+++	+++	+++ (SA <sup>c</sup> )	
		Retention	-	-	+	++	+++	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	(SA <sup>c</sup> )	-	+	+++	+++	+++ (SA <sup>c</sup> )	

<sup>a</sup> : acetic acid <sup>b</sup> : bromsulphalein(sulphobromophthalein) <sup>c</sup> : sacrifice

위의 암적색 괴사소가 관찰되었으며 개체에 따라 궤양 병소와 꼬리의 변형(deformity)이 인정되었고 주사 후 7일에는 이러한 병변이 더욱 진행되어 보다 심한 괴사 및 궤양병소가 관찰되었다.

**병리조직학적소견**

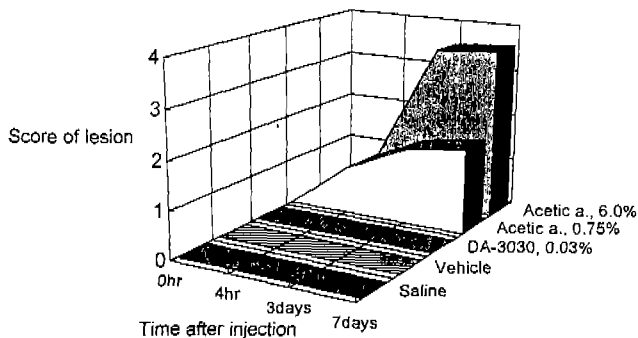
주사 후 7일에 실시한 병리조직학적 검사결과, 생리 식염수와 용매 및 DA-3030을 투여한 제 1, 2, 3시험군

에서는 특기할 만한 변화가 인정되지 않았다. Acetic acid 0.75%액을 투여한 개체들에서는 외피의 유극세포증식에 의한 비후와 일부에서는 괴사에 의한 궤양의 형성 및 호중구의 침윤에 의한 화농소형성 등이 관찰되었다. 피하 결체조직은 수종성 변화와 신생육아조직의 형성 및 일부 섬유화소견이 인정되었고, 근섬유는 국소적으로 위축과 변성소견을 나타내었다. Acetic acid 6.0%액을 투여한

**Table VI.** Microscopic findings around the ear vein of rabbits treated with various compounds for 8 days

Type of inject.	Compound Sample No.	Saline			DA-3030			AA <sup>a</sup>			BSP <sup>b</sup>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Infusion method</b>													
<b>Venous wall</b>													
Desquamation of endothelial cells		-	-	-	-	-	-	+++	++	++	+++	+	+++
Necrosis		-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	++	+	+++
<b>Lumen</b>													
Thrombus		-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	+++
<b>Perivascular area</b>													
Edema		±	-	-	-	-	-	+	+++	+++	++	++	++
Cell infiltration		±	-	-	-	-	±	++	++	++	++	++	++
Hemorrhage		+	-	-	-	-	-	+	++	++	+	+	++
Necrosis		-	-	-	-	-	-	+	++	++	+	+	++
Granulation		-	-	-	-	-	-	++	+	+	++	++	++
<b>Retention method</b>													
<b>Venous wall</b>													
Desquamation of endothelial cells		-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+++	++
Necrosis		-	-	-	-	-	-	++	++	+++	++	+++	++
<b>Lumen</b>													
Thrombus		-	-	-	-	-	-	+	+	+++	++	++	++
<b>Perivascular area</b>													
Edema		±	-	±	-	-	±	++	++	+++	++	++	++
Cell infiltration		-	-	-	-	-	-	±	++	+	++	++	++
Hemorrhage		-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	++	+
Necrosis		-	-	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+
Granulation		-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++

<sup>a</sup> : 0.75% acetic acid <sup>b</sup> : 5.0% bromsulphalein(sulphobromophthalein) - : No change, ± : Very slight, + : Slight, ++ : Moderate, +++ : Severe



**Fig. 5.** Kinetics of skin lesions induced in CD-1 mice by perivascular injection of various controls and 0.03% solution of DA-3030.

**고 찰**

본 연구에서는 새로운 과립구 콜로니 자극인자인 DA-3030의 국소적용시 자극성유발정도를 여러 동물시험계를 이용하여 평가하고자 하였다. 토끼를 이용한 안점막 자극시험 결과에서 임상사용농도인 0.03%의 DA-3030용액은 비세척군에서 최대 안점막자극 평점이 0.3으로 나타나 각막, 공막, 결막 및 안점에 무자극한 물질로 판단되었다. 피하 단회투여 자극성시험에서 생리식염수와 DA-3030 투여군의 각각 한 개체에서 주사후 2일에 투여부위의 적색반점이 관찰되었는데 이는 주사시 출혈이 관찰된 개체들이었으며, 약물의 영향이 아닌 주사시 피하직의 혈관파열에 기인한 것으로 판단되었다. 생리식염수와 DA-3030을 근육내로 단회투여한 동물에서는 투여후 2일과 7일에 육안적 및 조직학적 검사에서 어떠한 변화도 관찰되지 않아 DA-3030의 피하 및 근육내 투여시 자극 정도는 생리식염수와 동등한 것으로 사료되었다.

일반적으로 G-CSF의 임상사용시 정맥내와 피하투여 경로가 이용되고 있다. 주사제의 정맥내 주사에 의한 혈전증, 정맥염 및 정맥주위염 등의 의료사고에 대해서는

개체들은 보다 심한 변화를 나타내었는데 외피층의 상당부분이 괴사되었고 화농소가 넓게 분포하며 피하 결제직에는 대식구(macrophage)위주의 염증세포침윤 및 육아조직형성이 관찰되었다. 일부 동물에서는 섬유화소견이 관찰되었으며 근육섬유는 보다 심한 변성 및 괴사로 형태의 소실도 관찰되었다.



많은 보고가 되어 있으며 이는 실제 임상에서 자주 접하게 되는 문제라고 할 수 있다(赤石英 등, 1974). 그러므로 정맥내 투여가 예상되는 주사제에 대한 혈관장해성과 혈관외누출(extravasation)에 의한 혈관주위조직에의 자극도에 대한 평가는 전임상개발과정 중에 필히 검토되어야 할 항목이다. 본 연구에서는 府川 등에 의한 방법으로 DA-3030의 혈관장해성을 검토한 결과 양성대조물질인 acetic acid와 BSP는 투여후 3~5일 부터 심한 염증과 혈전형성을 일으킨 것에 비해 DA-3030은 정주법과 저류법 모두에서 약물의 영향으로 보이는 국소병변을 야기시키지 않았다. 한편 혈관주위주사에 의한 자극성시험결과에서 투여후 3시간에 생리식염수 투여군의 1예와 DA-3030투여군의 1예에서 각각 주사부위의 경도종창이 인정되었으나 이는 주사액의 흡수 지연에 의한 국소종창으로 판단되었으며 투여후 4시간 부터는 모두 정상으로 회복되었다. 투여후 7일에 실시한 조직학적 검사결과 음성대조군과 DA-3030투여군의 모든 동물에서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

이상의 결과에 의하면 새로운 과립구 콜로니 자극인자인 DA-3030은 예정임상사용농도인 0.03%의 용액으로 사용할 경우 발현가능한 자극성은 생리식염수와 동등한 정도인 것으로 판단되었다.

### 참고문헌

- Balsari, A., Lombardo, N. and Ghione, M. (1989). Skin and perivascular toxicity induced experimentally by doxorubicin. *J. Chemother.* **1**, 324-329.
- Bronchud, M. H., Howell, A., Crowther, D., Hopwood, P., Souza, L. and Dexter, T. M. (1989). The use of granulocyte colony-stimulating factor to increase the intensity of treatment with doxorubicin in patients with advanced breast and ovarian cancer. *Br. J. Cancer.* **60**, 121-125.
- Crawford, J., Ozer, H., Stoller, R., Johnson, D., Lyman, G., Tabbars, I., Kris, M., Gradishar, W., Yahanda, A., Vincent, M., Stewart, M. and Glaspy, J. (1991). Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **325**, 164.
- Gabrilove, J. L., Jakubowski, A., Scher, H., Sternberg, C., Wong, G., Grous, J., Yagoda, A., Fain, K., Moore, M. A. S., Clarkson, B., Oettgen, H. F., Alton, K., Welte, K. and Souza, L. (1988). Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional cell carcinoma of the urothelium. *N. Engl. J. Med.* **318**, 1414.
- O'reilly, M. and Gamelli, R. L. (1988). Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor improves hematopoietic recovery after 5-fluorouracil. *J. Sur. Res.* **45**, 104-111.
- Pizzo, P. A., Hathorn, J. W., Hiemenz, J., Browne, M., Commers, J., Cotton, D., Gress, J., Longo, D., Marshall, D., McKnight, J., Rubin, M., Skelton, J., Thaler, M. and Wesley, R. (1986). A randomized trial comparing ceftazidime alone with combination antibiotic therapy in cancer patients with fever and neutropenia. *N. Engl. J. Med.* **315**, 552.
- 국립보건안전연구원 (1988). 의약품 등의 독성시험기준, 국립보건안전연구원 예규 제10호.
- 府川和永, 伊藤義彦, 三崎則幸, 野村聡子 (1975). 靜脈注射による血全性靜脈炎に實驗的研究, *日藥理紙* **71**, 307-313.
- 赤石英, 押田茂美, 高橋由美子 (1974). 藥劑に關する醫療事故について, *月刊藥事* **16**(6), 901-909.
- 厚生省資料 (1979). 注射劑の局所障害性に關す試驗法(案). *醫藥ジャーナル* **15**, 447-449.