

Guinea pig 및 mouse에 있어서 인형 과립구 콜로니 자극인자 DA-3030의 항원성

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

Antigenicity of DA-3030, a Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor, in Guinea Pigs and Mice

Nam Gi BAIK*, Kyung Koo KANG, Soon Bok LEE
Won Bae KIM and Junn Ick YANG

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

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

Abstract—This study was conducted to investigate antigenic potential of DA-3030, a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, in guinea pigs and mice. In the active systemic anaphylaxis test, the guinea pigs sensitized with 1.25 or 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$ of DA-3030 alone did not show any anaphylactic reaction. In the homologous passive cutaneous anaphylaxis reaction, anti-DA-3030 antibody was not detected in guinea pigs sensitized with 1.25 or 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$ of DA-3030 alone. On the other hand, the guinea pigs sensitized with 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$ of DA-3030 incorporated in Freund's complete adjuvant(FCA) or 1 mg/head of ovalbumin incorporated in FCA showed anaphylactic reaction. Anti-DA-3030 antibody was also detected in those guinea pigs. In immunodiffusion test using the sera sensitized with DA-3030 incorporated in FCA, precipitating antibodies were detected only in the sera sensitized with DA-3030 or DA-3030 incorporated in FCA showed. In 24-hour heterologous PCA reaction with sera of C57BL/6 mice immunized with 1.25 or 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$ of DA-3030 alone, none of the sera showed positive reaction. But sera of the animals immunized with 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$ of DA-3030 incorporated in aluminum hydroxide gel(Alum) or 5 $\mu\text{g}/\text{head}$ of ovalbumin incorporated in alum showed positive PCA reaction. DA-3030 did not cause anaphylactic shock or passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and mice when given alone although DA-3030 incorporated in FCA or Alum induced anaphylactic shock and passive cutaneous anaphylaxis. From these results, it may be concluded the DA-3030 does not induce systemic allergic reaction when administered alone in its clinical use.

Keywords □ DA-3030, granulocyte-colony stimulating factor, antigenicity, guinea pig, mouse

과립구 콜로니 자극인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)는 정상골수에서는 순수한 과립구 콜로니에 대한 선택적 자극효과와 백혈병 세포에서는 과립구 분화를 촉진하는 작용을 가지고 있다. G-CSF는 1983년 처음으로 마우스의 폐장으로부터 분리되었으며(Nicola 등, 1983), 인형 과립구 콜로니 자극인자(human granulocyte-colony stimulating factor)는 분자량이 18-22 kd이며 1986년 Souza 등에 의해 cDNA cloning 되었다(Souza 등, 1986). 현재는 대장균 및 동물세포를 이

용한 유전자 재조합 G-CSF가 대량 생산되고 있으며 항암화학요법후 백혈구 감소증, 골수이식 그리고 재생 불량성 빈혈 등에 의한 호중구감소증 등에 사용되고 있다(Lieschke 등, 1992). DA-3030은 동아제약 연구소에서 유전자 재조합 기술을 응용하여 대장균에서 생산한 재조합 인형 과립구 콜로니 자극인자(recombinant human granulocyte-colony stimulating factor)이며 분자량은 18,800 dalton이다.

본 시험에서는 DA-3030의 항원성을 평가하기 위하여 guinea pig과 mouse를 이용하여 능동성 전신성 아나필락시스(active systemic anaphylaxis)쇼크와 수동 피부

* To whom correspondence should be addressed.

아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis) 반응 시험을 실시하였다.

실험방법

사용약물

시험물질로서 동아제약연구소에서 생산한 DA-3030 (Lot CTS-001)을 사용하였고 양성대조로는 ovalbumin (OVA)(Lot 100H0872, Sigma)을 사용하였다. Adjuvant로는 Freund's complete adjuvant(FCA)(Control 3231, Difco)와 aluminum hydroxide gel(Lot 09112, Serva)을 사용하였다. 그외 Evans blue(Lot 31H0562, Sigma), 주사용 생리식염수(Lot AAX4BF, 중외제약) 그리고 vehicle (10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0) 등을 사용하였다.

사용동물

C57BL/6계 수컷 마우스(사용시 체중 20~25 g, 8주령), Sprague-Dawley계 랫드(사용시 체중 400~450, 14주령) 그리고 Hartley계 guinea pig(사용시 체중 330~360 g, 5주령)을 중국 B&K사로부터 구입하여 1주이상 검역 및 예비사육 후에 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 동물사육은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 45~65%, 그리고 조명시간(조명 8:00~20:00)으로 설정된 사육실에서 마우스와 랫드에는 마우스용 사료(제일제당)를 guinea pig에는 guinea pig용 고형사료(Oriental Yeast Co. Ltd.)를 그리고 물은 상수도수를 자유롭게 섭취시키며 실시하였다.

시험군 구성

시험군의 구성은 Table I, II와 같다.

시험방법

감작항원 및 유발항원 조제

감작항원의 용량은 DA-3030의 추정 임상사용량인 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 동량인 1.25 $\mu\text{g}/\text{head}$ 와 그에 10배량인 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$ 로 하였으며 감작항원의 조제는 guinea pig 감작시 DA-3030 원액(1.5 mg/ml)을 DA-3030의 희석용매를 이용하여 1.25 또는 12.5 $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$ 이 되도록 조제하였으며 DA-3030+FCA 혼합 감작항원은 DA-3030을 DA-3030의 희석용매를 이용하여 12.5 $\mu\text{g}/0.25\text{ ml}$ 이 되도록 희석시킨 후 이 용액을 동량의 FCA와 혼합하여 조제하였다. Ovalbumin 감작항원은 ovalbumin을 saline에 용해시킨 후 동량의 FCA를 혼합하여 조제하였다. Mouse를 감작시 감작항원의 조제는 guinea pig를 감작시와 모두 동일하게 조제하였으나 면역보조제로 alum을 사용하였다.

유발항원의 조제는 DA-3030을 DA-3030의 희석용매를 이용하여 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, ovalbumin은 saline에 용해시켜 5 mg/ml이 되도록 조제하였다.

Guinea pig을 이용한 시험

1)능동 전신성 아나필락시스(Active Systemic Anaphylaxis)

군당 6마리의 guinea pig(체중 200~250 g)에 1군에는 DA-3030의 희석용액, 2군에는 DA-3030 1.25 $\mu\text{g}/\text{head}$, 3군에는 DA-3030 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$, 4군에는 DA-3030 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$ 와 Freund's complete adjuvant(FCA)의 동량 혼합액 그리고 5군에는 ovalbumin과 FCA 동량혼합액 1 mg/head의 감작항원을 주 1회씩 3주간 피하로 개체당 0.5 ml을 5개소에 분할 투여하여 감작시키고 3주후에 유발항원을 정맥내 투여하여 ASA 반응을 관찰하였다. 증상은 유발항원 주사후 2시간동안 다음의 기준에 따라 관찰하였다.

Table I. Experimental design for active systemic anaphylaxis test of DA-3030 in guinea pigs

Group	No. of animal	Sensitizing antigen	Route of sensitization	Challenging antigen
1	2	vehicle ^a	S.C.	vehicle
	2			DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$
	2			OVA ^b , 5 mg/head
2	6	DA-3030, 1.25 $\mu\text{g}/\text{head}$	S.C.	DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$
3	6	DA-3030, 1.25 $\mu\text{g}/\text{head}$	S.C.	DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$
4	6	DA-3030(12.2 $\mu\text{g}/\text{head}$ + FCA ^c ,	S.C.	DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$
5	6	OVA(1 mg/head) + FCA	S.C.	OVA, 5 mg/head

^avehicle(10mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, PH 4.0), ^bovalbumin, ^cFreund's complete adjuvant

Table II. Mouse-Rat passive cutaneous anaphylaxis reaction

Group	No. of animal	Sensitizing antigen	Route of sensitization	Challenging antigen
1	6	vehicle ^a	S.C.	DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$
2	6	DA-3030, 1.25 $\mu\text{g}/\text{head}$	S.C.	DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$
3	6	DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$	S.C.	DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$
4	6	DA-3030(12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$) + Alum ^b	I.P.	DA-3030, 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$
5	6	OVA ^c (5 $\mu\text{g}/\text{head}$) + Alum	I.P.	OVA, 5 mg/head

^aVehicle(10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, PH4.0) ^baluminum hydroxide gel, ^covalbumin

Grade 0: 무증상, 불안

I: 전신떨림, 코비비기, 재채기, 기침

II: 배뇨, 호흡곤란, 도약, 돌진

III: 혈떡임, 몸부림, 경련

IV: 폐사

2)수동 피부 아나필락시스(Passive Cutaneous Anaphylaxis in guinea pigs)

최종 감각후 17일째에 ASA에서 감각시킨 guinea pig의 심장으로부터 ether 마취하에 2 ml의 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 이하 PCA반응은 Ovary(1958)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 분리한 혈청을 생리식염수로 2배계단 희석하여 4배에서 2048배까지 희석한 후 무처리 guinea pig의 피내에 각각 0.1 ml씩 주사하였다. 혈청주사 4시간후에 각각의 유발항원과 1% Evans blue액을 혼합한 것을 1 ml씩 정맥내 투여하고 30분 후에 방혈치사시켜 피부내측에 유출된 Evans blue반점을 확인하였다. 반점이 직경 5 mm 이상인 것을 양성으로 하여 양성을 나타낸 최대희석배수를 항체가로 하였다.

3) 면역확산시험(Immunodiffusion)

ASA시험에서 감각시킨 guinea pig으로부터 채취한 혈청을 이용하여 실시하였다. Agarose를 Tris-barbiturate buffer에 1%로 용해시켜 GelBond film(84×94 mm) 위에 gel화 시켰다. 천공기를 이용하여 well을 뚫은 뒤 각각의 well에 항혈청과 항원액을 넣고 48시간 동안 반응시켰다.

기니픽에서 얻은 혈청은 원액을 사용하였으며 DA-3030 1250, 125, 12.5, 5.0, 2.5, 1.25 µg/ml의 용액을 항원액으로 OVA 1000, 500, 250, 125, 62.5 및 31.3 µg/ml의 생리식염수 용액을 양성대조로 사용하였다.

마우스-랫드 PCA반응(Mouse-rat PCA reaction)

각군 6마리의 음성 C57BL/6 마우스에 1군에는 DA-3030의 희석용매, 2군에는 DA-3030 1.25 µg/head, 3군에는 DA-3030 12.5 µg/head를 각각의 군에 주 3회씩 3주간 총 9회 피하로 투여하였으며, 4군에는 DA-3030 12.5 µg/head와 aluminum hydroxide gel(Alum)의 동량 혼합액 그리고 5군에는 ovalbumin 5 µg/head와 alum 동량 혼합액을 주 1회씩 3주간 복강내로 투여하였다. 최종감작후 1과 2주후에 각군반수의 동물에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 SD rat를 이용하여 PCA시험을 실시하였다. 랫드 PCA는 荻田과 水鳥(1977)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 마우스 혈청을 생리식염수로 2배 계단 희석하여 4~2048로 희석된 마우스 희석혈청 0.1 ml을 랫드의 등부위 피내에 주사하고 24시간 후에 각각의 유발항원과 1% Evans blue 혼합용액 1 ml을 랫드의 미정맥내로 투여하였다. 그리고 30분 후에 랫드를 방혈치사시켜 Evans blue spot을 확인하고 직경 5 mm 이상인 경우를 양성으로 판정하여 양성을 나타낸 최대희석배수를 항체가로 하였다.

Table III. Results of active systemic anaphylaxis in the sensitized guinea pigs

Treatment	Route	Challenging antigen	Numger of animals	Severity ^a				
				0	I	II	III	IV
Vehicle ^b 0.5 ml/head	S.C.	Vehicle 1.0 ml/head	2	2	0	0	0	0
		DA-3030 12.5 µg/head	2	2	0	0	0	
		OVA 5 mg/head	2	2	0	0	0	
DA-3030 1.25 µg/head	S.C.	DA-3030 12.5 µg/head	6	6	0	0	0	
DA-3030 12.5 µg/head	S.C.	DA-3030 12.5 µg/head	6	6	0	0	0	
DA-3030(12.5 µg/head)+FCA	S.C.	DA-3030 12.5 µg/head	6	0	1	3	2	0
OVA ^c (1 mg/head)+FCA ^d	S.C.	OVA 5 mg/head	6	0	0	2	3	1

^a(O)normal, restless; (I)above symptoms plus trembling, rubbing nose, sneezing, coughing; (II)above symptoms plus urination, respiratory depress, jumping, rushing; (III)above symptoms gasping, writhing, convulsion; (IV)above symptoms plus death, ^bVehicle(10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0), ^covalbumin, ^dFreund's complete adjuvant

Table IV. Results of passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs

Treatment	Route	Challenging antigen	Numger of sera	Response	
				- ^b	+ ^c
Vehicle ^a 0.5 ml/head	S.C.	DA-3030 12.5 µg/head	6	6	0
DA-3030 1.25 µg/head	S.C.	DA-3030 12.5 µg/head	6	6	0
DA-3030 12.5 µg/head	S.C.	DA-3030 12.5 µg/head	6	6	0
DA-3030(12.5 µg/head)+FCA ^b	S.C.	DA-3030 12.5 µg/head	6	0	6(2 ⁶ ~2 ⁸) ^d
OVA ^c (1 mg/head)+FCA	S.C.	OVA 5 mg/head	6	0	6(2 ⁷ ~2 ¹¹)

^aVehicle(10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0), ^bFreund's complete adjuvant, ^cnegative at 4-fold dilution, ^dPCA titer

실험결과

능동 전신성 아나필락시스(Active Systemic Anaphylaxis in guinea pigs)

능동 전신성 아나필락시스 반응의 결과는 Table III에 나타냈다. DA-3030을 추정임상사용량과 추정임상사용량의 10배량 단독으로 또는 추정임상사용량과 Freund's complete adjuvant를 혼합하여 guinea pig을 감각시킨후 DA-3030의 임상용량의 10배량(12.5 µg/head)으로 아나필락시스 쇼크를 유발한 결과 DA-3030만으로 감각시킨 군에서는 모두 음성반응을 나타냈으나 면역보조제인 FCA와 혼합 투여한 군에서는 grade 1, 2, 3의 ASA 양성반응이 나타났다. 양성대조로 사용한 ovalbumin 투여군에서는 전동물에서 grade 2, 3, 4의 아나필락시스 쇼크 반응이 나타났다.

수동 피부 아나필락시스(Passive Cutaneous Anaphylaxis reaction in guinea pigs)

Guinea pig 동종 PCA반응의 결과는 Table IV에 나타냈다. 이는 guinea pig 아나필락시스 쇼크반응에서 사용한 동물로부터 혈청을 얻어서 실시한 결과이며 DA-3030의 단독 감각 군에서는 전 동물이 음성반응을 나타냈으나 DA-3030과 면역보조제인 FCA와의 혼합 감각 군에서는 PCA항체가 64~512의 양성반응이 나타났으며 양성대조군인 ovalbumin 투여군에서는 전동물이 PCA항체가 128~2048의 양성반응을 나타냈다.

면역확산 시험(Immunodiffusion)

면역확산시험의 결과는 Table V에 나타냈다. 용매 또는 DA-3030 단독투여군의 혈청에서는 모두 음성반응이 나타났으나 DA-3030/FCA 투여군과 ovalbumin/FCA 투여군의 혈청에서는 모두 양성반응이 나타났다.

Table V. Results of immunodiffusion using the sera sensitized with DA-3030

Sensitizine antigen	Number	Conc. of DA-3030 (µ-g/ml)						Conc. of OVA (µg/ml)					
		1250	125	12.5	5.0	2.5	1.25	1000	500	250	125	62.5	31.3
Vehicle ^{a)}	1	-	-	-	-	-	-						
	2	-	-	-	-	-	-						
	3	-	-	-	-	-	-	NT ^{a)}	NT	NT	NT	NT	NT
	4	-	-	-	-	-	-						
	5	-	-	-	-	-	-						
	6	-	-	-	-	-	-						
DA-3030, 1.25 µg/head	7	-	-	-	-	-	-						
	8	-	-	-	-	-	-						
	9	-	-	-	-	-	-						
	10	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	11	-	-	-	-	-	-						
	12	-	-	-	-	-	-						
DA-3030, 12.5 µg/head	13	-	-	-	-	-	-						
	14	-	-	-	-	-	-						
	15	-	-	-	-	-	-						
	16	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	17	-	-	-	-	-	-						
	18	-	-	-	-	-	-						
DA-3030, 12.5 µg/head + FCA ^{b)}	19	-	+	+	+	-	-						
	20	-	+	+	-	-	-						
	21	+	+	+	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	22	+	+	+	-	-	-						
	23	-	+	+	+	-	-						
	24	-	+	+	+	-	-						
OVA ^{c)} , 1 mg/head + FCA	25							+	+	+	+	+	+
	26							-	-	+	+	+	-
	27							+	+	+	+	+	+
	28	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	+	+	+	+	+
	29							-	-	+	+	+	-
	30							+	+	+	+	+	+

^{a)}Vehicle (10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0), ^{b)}Freund's ^{c)}ovalbumin, ^{d)}not tested

Table VI. Results of passive cutaneous anaphylaxis in rats using the mouse sera sensitized with DA-3030 or OVA

Sensitizing antigen	Serum Sampling time	Number of mouse antiserum	Challenging antigen	
			DA-3030 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$	OVA 5 mg/kg
Vehicle ^a 0.1 ml/head	1 week after the last sensitization	1	4> ^d	4>
		2	4>	4>
		3	4>	4>
	2 weeks after the last sensitization	4	4>	4>
		5	4>	4>
		6	4>	4>
DA-3030 1.25 $\mu\text{g}/\text{head}$	1 week after the last sensitization	1	4>	NT ^e
		2	4>	NT
		3	4>	NT
	2 weeks after the last sensitization	4	4>	NT
		5	4>	NT
		6	4>	NT
DA-3030 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$	1 week after the last sensitization	1	4>	NT
		2	4>	NT
		3	4>	NT
	2 weeks after the last sensitization	4	4>	NT
		5	4>	NT
		6	4>	NT
DA-3030 (12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$) + Alum ^b	1 week after the last sensitization	1	32	NT
		2	32	NT
		3	16	NT
	2 weeks after the last sensitization	4	16	NT
		5	8	NT
		6	4>	NT
OVA ^c (5 $\mu\text{g}/\text{head}$) + Alum	1 week after the last sensitization	1	NT	256
		2	NT	128
		3	NT	128
	2 weeks after the last sensitization	4	NT	64
		5	NT	64
		6	NT	64

^aVehicle (10 mM sodium acetate, 5% mannitol, 0.004% tween 80, pH 4.0), ^baluminum hydroxide gel ^covalbumin, ^dnegative at 4-fold dilution, ^enot tested

마우스-랫드 PCA반응(Mouse-Rat Passive Cutaneous Anaphylaxis reaction)

마우스-랫드 PCA반응의 결과는 Table V에 나타났다. 용매투여대조군과 DA-3030 단독 투여군의 모든 동물에서는 PCA 항체가 4이하의 음성반응을 나타냈으나 DA-3030과 면역보조제인 alum과의 혼합투여군에서는 5마리 동물에서 PCA항체가 8~32의 양성반응이 나타났다. 양성대조군인 ovalbumin 투여군에서는 전동물이 PCA 항체가 64~256의 양성반응을 나타냈다.

고 찰

DA-3030은 유전자 재조합기술을 응용하여 대장균에서 생산한 분자량 18,800 dalton의 인형 과립구콜로니 자극인자이다. 이러한 대장균을 이용해 발현된 인형 과립구 콜로니 자극인자는 posttranslational modification이 일어나지 않아 천연형과 다르므로(Tsuchiya 등, 1986) DA-

3030을 guinea pig와 mouse에 투여할 경우 항체가 형성될 가능성이 높다.

본 시험에서는 DA-3030의 면역독성중 항원성을 평가하기 위하여 guinea pig와 mouse를 이용하여 제1형 과민반응의 일종인 능동 전신성 아나필락시스 쇼크 반응 및 세포친화성의 IgE type 항체의 형성 유무를 확인하기 위한 수동 피부 아나필락시스 반응을 실시하였다.

Guinea pig를 이용한 능동 전신성 아나필락시스(ASA) 쇼크 반응과 수동 아나필락시스(PCA) 반응에서 DA-3030을 추정임상사용량의 10배량인 12.5 $\mu\text{g}/\text{head}$ 의 용량으로 시험물질 단독으로 감작시는 어느 동물에서도 아나필락시스 쇼크반응은 나타나지 않았으며 면역보조제인 Freund's complete adjuvant(FCA)와 혼합하여 피하로 감작시켰을 경우에만 grade 1~3의 ASA양성반응을 나타냈다. 또한 같은 guinea pig에서 채취한 혈청을 이용하여 실시한 PCA 반응에서도 면역보조제인 FCA와 혼합 투여한 군에서만 양성반응이 나타났고 그외 DA-3030만

을 단독 투여한 군에서는 모두 음성반응을 나타내 ASA 반응 결과와 일치했다. 반면 양성대조로 사용한 ovalbumin 투여군에서는 ASA 반응에서 전 동물이 grade 2에서 grade 4의 쇼크증상을 나타냈으며 같은 동물의 혈청을 이용한 PCA반응에서는 PCA titer $2^7 \sim 2^{11}$ 의 PCA 양성반응을 나타냈다. ASA 시험에서 감각시킨 동물에서 얻은 혈청을 이용한 면역확산시험의 경우에도 guinea pig PCA 시험에서와 같이 DA-3030을 면역보조제인 FCA와 병용 투여한 군에서만 양성반응이 나타났으며 DA-3030 단독 투여군에서는 모두 음성을 나타냈다. 또한 C57BL/6 마우스를 DA-3030의 추정임상사용량과 추정임상사용량의 10배량 단독으로 감각시킨후 혈청을 채취하여 rat에서 PCA반응을 실시한 결과 전 동물에서 PCA titer 4 이하의 음성반응이 나타났다. 그리고 DA-3030을 추정임상사용량의 10배량과 면역보조제인 alum을 혼합하여 투여한 후 혈청을 채취하여 실시한 PCA반응에서는 5마리의 동물이 PCA 항체가 8~32의 양성반응을 나타냈다. 양성대조군인 ovalbumin+alum 투여군에서는 전 동물이 PCA titer $2^6 \sim 2^8$ 의 양성반응을 나타냈다. 이러한 DA-3030의 항원성 시험결과는 유전자 재조합 기술에 의해 생산된 또다른 인형 과립구 콜로니 자극인자인 filgrastim (長谷川 隆 司, 1987)과 lenograstim(Inoue 등, 1990)의 항원성시험결과 각각의 물질과 면역보조제인 FCA 또는 alum과의 혼합감작에 의해서 일부 개체에서 아나필락시스 쇼크와 PCA 양성반응이 나타났으며 시험물질 자체만을 투여하였을 경우 위의 두물질 모두가 아나필락시스 쇼크 및 PCA 반응에서 음성을 나타낸 결과와 일치하는 결과였다.

본 DA-3030의 항원성 시험결과와 DA-3030이 인형 과립구 콜로니 자극인자인 점을 고려하여 판단하면 임상에서 DA-3030 자체만을 투여할 경우 아나필락시스 쇼크 등의 면역독성이 나타날 가능성은 희박할 것으로

예측된다.

참고문헌

- Inoue, M., Marutani, K., Kojima, Y. and Koizumi, T. (1990). Antigenicity test on recombinant human G-CSF(rG-CSF) *Yakuri to Chiryō*. **18**, Suppl. 221-234.
- Lieschke, G. J. and Burgess, A. W. (1992). Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(1), (2). *N. Engl. J. Med.* **327**, 28-35, 99-106.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oheda, M., Nomura, H. and Yamazaki, T. (1986). The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony stimulating factor *EMBO J.* **5**, 575-581.
- Nicola N. A., Metcalf, D., Matsumoto, M. and Johnson, G. R. (1983). Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony stimulating factor. *J. Biol. Chem.* **258**, 9017-9023.
- Ovary, Z. (1958). Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interactions. *Prog. Allergy* **5**, 459-508.
- Souza, L. M., Boone, T. C., Gabrilove, J., Lai, P. H., Lse bo, K. M., Muradock, D. C., Chazin, V. R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K. K., Barendt, J., platzer, E., Moore, M. A. S., Mertelsmann, R. and Welte, K. (1986). Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* **232**, 61-65.
- Tsuchiya, M., Asano, M., Kaziro, Y. and Nagata, S. (1986). Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**, 7633-7637.
- 長谷川 隆 司 (1987). KRN8601의抗原性試驗(personal communication)
- 荻田忠厚, 水島 裕 (1977). 藥物の抗原性の検討-とくにIgE 形抗体産生検討のための動物モデルについて. *醫藥のあゆみ*. **100**(11), 812-814.