

## Guamerin의 단회투여독성 및 항원성 평가

김민영<sup>1</sup> · 손장원<sup>1</sup> · 배미옥<sup>1</sup> · 김정현<sup>1</sup> · 신민기<sup>1</sup> · 방명주<sup>1</sup> · 김경연<sup>2</sup>  
최승진<sup>2</sup> · 정경환<sup>2</sup> · 조명행<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 수의과대학 독성학교실  
<sup>2</sup>(재)목암생명공학연구소

### Acute Toxicity and Antigenicity of Guamerin

Min-Young Kim<sup>1</sup>, Jang-Won Son<sup>1</sup>, Mi-Ok Bae<sup>1</sup>, Jung-Hyon Kim<sup>1</sup>, Min-Ki Shin<sup>1</sup>  
Ming-Zu Fang<sup>1</sup>, Kyeong-Yeon Kim<sup>2</sup>, Seung-Jin Choi<sup>2</sup>  
Kyung-Hwan Jung<sup>2</sup> and Myung-Haing Cho<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
<sup>2</sup>Mogam Biotechnology Research Institute  
(Received February 12, 2000)  
(Accepted March 22, 2000)

**ABSTRACT** : This study was carried out to evaluate the acute intravenous toxicity and antigenicity of Guamerin, newly developed by Mogam Biotechnology Research Institute (MBRI). In acute intravenous toxicity test. ICR mice were administered intravenously with single dose of 1,000 mg/kg, and body weights and clinical signs were observed for 14 days. No dead animal, clinical signs, body weight change and abnormal autopsy findings were found in control and Guamerin treated group. Therefore, the 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) of Guamerin for ICR mice was more than 1,000 mg/kg on intravenous route for male and female. And the antigenic potential of Guamerin was examined by active systemic anaphylaxis (ASA) and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) tests. In the ASA test, low and high doses (10 and 100 µg/animal, respectively) of Guamerin were administered subcutaneously to guinea pigs for 9 times in 3 weeks. All experimental groups showed negative responses whereas the positive control group given ovalbumin plus Freund's complete adjuvant (FCA) showed severe anaphylactic responses. PCA test using rats with mice anti-serum against Guamerin, low and high doses (10 and 100 µg/animal, respectively) of Guamerin were administered to mice for 9 times in 3 weeks. The anti-serum against Guamerin was administered intradermally at the back of rats. however, any positive responses were not detected in the experimental groups. These results strongly indicate that Guamerin does not induce IgE production and is not a PCA reaction inducer under these experimental conditions.

**Key Words** : Guamerin, Acute toxicity, Antigenicity, Active systemic anaphylaxis (ASA), Passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

### I. 서 론

Human leukocyte elastase는 탄력섬유(elastic fiber)나 교원섬유(collagen)와 같은 중요한 연결조직을 감성(減成)시키는 serine proteinase이며, 원형질의 아주르그립(azurophil granules)에 저장되어 있으며 세포가 과사조직과 접하거나 미생물이 식세포의 작용을 받을 때 조직내로 분비된다. 이것이 염증부위에서 통제되어지지 않은 채 유리되면

비특이적인 단백질 분해를 유발할 수 있으며, 전선(乾癱)이나 기종(氣腫)같은 만성질병과 연관된 소모 과정을 촉진시킬 수 있다. 또한 대부분의 경우 human leukocyte elastase의 기능적 활성은 저해제의 존재 유무에 따라 조절될 수 있는데, 이 저해제는 만성 염증질병에 대한 치료제로 사용될 수 있다.

Guamerin은 사람의 백혈구와 돼지 췌장의 elastase 특이 저해제로, 이미 우리 나라에 서식하고있는 거머리인 H. nipponia로부터 정제되어 완전한 아미노산 순서가 검증되었고, 다른 단백질분해효소에 대한 특이성이 조사된 바 있

\*To whom correspondence should be addressed

다(Jung 등, 1995; Kim 등, 1996). 또한 랫드 모델에서 Guamerin에 의한 체장염의 소멸 효과도 밝혀져 관심의 대상이 되어지는 물질이다(Song 등, 1999).

본 시험에서는 (재)목암생명공학연구소에서 신약후보물질로 새로 개발중인 Guamerin에 대한 안전성시험의 일환으로, 백신의 단회투여독성 및 항원성 존재 여부를 ICR 마우스, 기니픽 및 마우스랫드 모델에서 확인하기 위하여, 식품의약품 안전청 고시 제 1999-61호 '의약품 등의 독성 시험기준'(1999.12.22)에 준하여 단회투여독성 및 항원성 시험 중 능동 전신성 아나필락시스 반응시험(active systemic anaphylaxis test, ASA test)과 수동 피부 아나필락시스 반응시험(passive cutaneous anaphylaxis test, PCA test)을 실시하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 시험물질

시험물질은 (재)목암연구소에서 백색분말형태로 10% 2-propanol/water를 final solvent로 하여 동결 건조된 상태로 제공된 물질을 멸균 생리식염수(중외제약)에 현탁하여 각 실험에 사용하였다. 항원성 시험에서 양성대조물질로는 ovalbumin(Sigma, USA)을 멸균 생리식염수에 용해한 후, 면역보조제와 동량씩 혼합하여 사용하였으며, 음성대조군으로는 용매인 멸균 생리식염수를 사용하였다. 면역보조제로는 Freund's complete adjuvant(Gibco, USA)를 사용하였다.

### 2. 실험동물 및 사육조건

단회투여독성시험에서는 17~24 g의 SPF(특정병원체 무재) ICR계 마우스를, 항원성 시험에서는 200~350 g의 Hartley계 수컷 기니픽, 20~30 g의 Balb/c계 수컷 마우스, 250~270 g의 수컷 Sprague Dawley계 랫드를 서울대학교 실험동물사육장에서 구입하여 약 1주일간 순화적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 배기 10~12회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간동안 폴리카보네이트 사육상자에 넣어 시험하였다. 순화 및 시험기간 중에는 실험동물용 고형사료를 신춘사료(주)로부터 구입하여 섭취시켰으며, 음수는 수돗물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

### 3. 단회투여독성시험

#### 1) 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을

측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 구간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 각 군은 암수 각 5마리씩 10마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 1,000 mg/kg의 용량 군으로 설정하였으며, 대조군은 무처치 대조군으로 하여 1회 정맥투여하였다.

#### 2) 투여약액의 조제 및 투여방법

시험물질은 시험당일 종류수를 이용하여 시험군에 맞는 농도로 희석한 후 1 ml 주사기를 이용하여 마우스의 미정맥에 주사하였다. 투여용량의 설정은 정맥투여 직전의 체중을 측정하여 산정하였다.

#### 3) 관찰 항목

##### 가. 일반증상관찰

모든 시험동물에 대한 임상증상은 투여당일에는 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간, 투여 1일부터 14일까지는 1일 1회 이상씩 일정시간에 관찰하여 14일동안 일반상태의 변화, 중독증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

##### 나. 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여 당일(0일), 4일, 7일, 12일, 14일째에 체중을 측정하였다.

##### 다. 부검

시험종료 후 생존체는 부검전에 체중을 측정하고 ether 마취하에 방혈치사시킨 다음 외관 및 내부장기 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

##### 라. 통계학적 분석

통계학적 처리는 ANOVA(one way analysis of variance)를 이용하였으며 P<0.05, P<0.01의 수준으로 대조군과의 구간 유의성을 검정하였다.

### 4. 항원성시험

#### 1) 능동전신성 아나필락시스 반응시험

감작에 이용된 Guamerin의 용량설정 및 투여 일정은 Table 1과 같다. 군당 7마리의 기니픽에 1군은 Guamerin을 10 µg/animal, 2군은 Guamerin을 100 µg/animal로 3군은 Guamerin 100 µg/animal+FCA로 4군은 ovalbumin 2 mg/animal+FCA로, 5군은 vehicle로 단독투여군에서는 1주일에 3회씩 총 9회, 혼합군의 경우에는 1주일에 1회씩 총 3회 피하투여를 실시하였다. 시험물질은 모두 멸균생리

**Table 1.** Sensitization of guinea pigs used in the acute systemic anaphylaxis test

Group	Substance	Dose	Times	No. of animals	Route
I	Guamerin	10 µg/animal	9 <sup>a</sup>	7	s.c
II	Guamerin	100 µg/animal	9 <sup>a</sup>	7	s.c
III	Guamerin+FCA <sup>c</sup>	100 µg/animal	3 <sup>b</sup>	7	s.c.
IV	OVA <sup>d</sup> +FCA	2 mg/animal	3 <sup>b</sup>	7	s.c.
V	Vehicle	1 ml/animal	9 <sup>a</sup>	7	s.c.

<sup>a</sup>three times per week.  
<sup>b</sup>once per week for 3 weeks.  
<sup>c</sup>Freund's complete adjuvant  
<sup>d</sup>ovalbumin.

**Table 2.** Criteria for the acute systemic anaphylaxis test

1. Restlessness	
2. Piloerection	
3. Tremor	
4. Rubbing or licking nose	
5. Sneezing	
6. Coughing	
7. Hyperpnea	
8. Urination	
9. Evacuation	
10. Lacrimation	
11. Dyspnea	
12. Rhonchus	
13. Cyanosis	
14. Staggering gait	
15. Jumping	
16. Gasping and writhing	
17. Convulsion	
18. Side position	
19. Cheyne-Stokes respiration	
20. Death	
Evaluation	[-] Asymptomatic [±] Mild: 1~4 [+] Moderate: 1~10 [++] Severe: 1~19 [+++] Death

식염수에 녹여 사용하였고, 최종감작 2주 후에 야기항원 (Guamerin 100 µg/animal 또는 ovalbumin 10 mg/animal) 을 뒷발 정맥(tarsal vein)내에 투여하였다. 야기 후 30분 동안 전신의 증상을 관찰하여 아나필락시스 쇼크유무를 확인하였으며 시험결과는 Table 2의 판정기준에 따라 평가하였다.

2) 수동 피부 아나필락시스 반응시험

감작에 사용된 Guamerin의 용량 및 군 설정은 능동 정 신성 아나필락시스 쇼크 반응시험의 경우와 마찬가지로 군 당 7마리의 수컷 Balb/c계 마우스에 1군은 Guamerin을 10 µg/animal, 2군은 Guamerin을 100 µg/animal로 3군은

**Table 3.** Sensitization of mice used in the passive cutaneous anaphylaxis test

Group	Substance	Dose	Times	No. of animals	Route
I	Guamerin	10 µg/animal	9 <sup>a</sup>	7	s.c.
II	Guamerin	100 µg/animal	9 <sup>a</sup>	7	s.c.
III	Guamerin+FCA <sup>c</sup>	100 µg/animal	3 <sup>b</sup>	7	s.c.
IV	OVA <sup>d</sup> +FCA	0.2 mg/animal	3 <sup>b</sup>	7	s.c.
V	Vehicle	0.2 ml/animal	9 <sup>a</sup>	7	s.c.

<sup>a</sup>three times per week.  
<sup>b</sup>once per week for 3 weeks  
<sup>c</sup>Freund's complete adjuvant.  
<sup>d</sup>ovalbumin

Guamerin 100 µg/animal+FCA로 4군은 ovalbumin 0.2 mg/animal+FCA로, 5군은 vehicle로 단독투여군에서는 1 주일에 3회씩 총 9회, 혼합군의 경우에는 1 주일에 1회씩 총 3회 피하투여를 실시하였다. 실험군, 감작량 및 감작회 수, 감작경로는 Table 3에 수록된 바와 같으며 최종투여 2 주일 후에 마우스 안와정맥총에서 혈액을 채취하여 혈청 을 분리하였다. 클리퍼를 이용하여 랫드의 등 부위 털을 가능한 한 넓게 제거한 후 등의 좌우 부위를 미리 적색 매 직으로 표시한 다음 멸균생리식염수로 8배부터 6단계 희 석한 마우스 항혈청 100 µl를 26 1/2 G의 1 ml 주사기를 이용하여 각 표시 부위에 피내 주사하였다.

항혈청을 피내 주사한 시점으로부터 24시간 후에 야기 항원을 1% Evans blue와 동량으로 혼합하여 rat의 미정맥 에 1 ml씩 주사하였다. 야기항원을 랫드 미정맥내에 주사 한 뒤 30분 후에 경추 탈골하여 랫드를 도살하고, 피부를 박리하여 항혈청 주사부위에 나타나는 청색반점을 관찰하 였다. 청색반점의 직경이 5 mm 이상을 양성으로 하고 양 성이 나타내는 항혈청의 최대희석배율을 그 항혈청의 PCA 항체가로 결정하였다.

III. 결 과

1. 단회투여독성시험

1) 사망동물 및 임상증상의 관찰  
 투여용량군에서 시험기간동안 사망한 동물은 없었으며 (Table 4), 어떠한 임상증상도 나타나지 않았다(Table 5).

2) 체중변화

암수의 투여용량군에서 대조군과 비교하여 유의성있는 체중변화가 관찰되지 않았다(Table 6).

3) 육안적 부검소견

대조군과 투여용량군에서 사망개체는 없었으며, 생존개체

**Table 4.** Mortality of the mice intravenously treated with Guamerin

Sex	Dose (mg/kg)	No. of mice	Hours after administration						Days after administration														Final mortality				
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
Male	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

**Table 5.** Clinical signs of the mice intravenously treated with Guamerin

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical signs	Days after administration																						
			Start	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14								
Male	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NAD: No abnormalities detected.

**Table 6.** Body weights of the mice intravenously treated with Guamerin

Sex	Dose (mg/kg)	No. of mice	Days after administration					
			0	4	7	12	14	
Male	Control	5	Mean	23.40	24.40	27.20	28.20	28.20
			S.D.	3.21	2.51	1.30	1.10	0.84
	1,000	5	Mean	23.60	26.00	27.80	28.00	28.00
			S.D.	0.89	2.12	1.92	1.58	2.24
Female	Control	5	Mean	17.80	23.40	25.60	25.20	25.40
			S.D.	2.59	1.82	2.30	1.48	0.89
	1,000	5	Mean	17.80	25.00	25.80	25.60	25.80
			S.D.	0.84	0.71	1.48	0.89	1.10

\*Significantly different from control at p<0.05. \*\* Significantly different from control at p<0.01. S.D.: Standard deviation.

에서도 특이할만한 부검소견이 관찰되지 않았다(Table 7).

**2. 항원성시험**

1) 능동 전신성 아나필락시스 반응시험

기니픽에서 능동 전신성 아나필락시스 반응시험의 결과는 Table 8과 같다. Guamerin을 10 µg/animal과 100 µg/animal로 단독 감작한 군 및 100 µg/animal을 면역보조제와 혼합하여 감작한 군에서는 혼합감작군의 2마리만이 의양성을 보였고 나머지 군에서는 특이한 아나필락시스 증상이 관찰되지 않았다. 양성대조물질인 ovalbumin을 면역보조제와 혼합하여 감작한 경우에는 모든 동물에서 심한 아나필락시스 반응이 관찰되었다.

2) 수동 피부 아나필락시스 반응시험

마우스 항혈청에 대한 수동 피부 아나필락시스 시험 결

**Table 7.** Gross findings of the mice intravenously treated with Guamerin

Items	Incidence of gross findings				
	Male		Female		
	Dose (mg/kg)	Control	1,000	Control	1,000
	No. of mice	5	5	5	5
Adrenal gland					
NGF		5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Braun					
NGF		5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Heart					
NGF		5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Liver					
NGF		5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Kidney					
NGF		5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Spleen					
NGF		5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Testus					
NGF		5 (100%)	5 (100%)		
Ovary					
NGF				5 (100%)	5 (100%)
Thymus					
NGF		5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)

NGF: No gross finding, ( ) Percent of no gross finding.

과는 Table 9와 같다. Guamerin을 단독 또는 면역보조제와 혼합하여 감작한 모든 군의 혈청은 항체가가 8 미만으로서 PCA 반응을 전혀 관찰할 수 없었으나. 양성대조물질인 ovalbumin을 감작한 군의 혈청은 1마리가 8배, 4마리가 16배 그리고 9마리가 32배의 PCA 항체가를 보였다.

**Table 8.** Results of active systemic anaphylaxis test of Guamerin in guinea pigs

Group	Sensitization	Challenge	No. of animals	Severity of anaphylaxis					Positive ratio
				-	±	+	++	+++	
I	Guamerin (10 µg/animal)	Guamerin (100 µg/animal)	7	-	-	-	-	-	0/7
II	Guamerin (100 µg/animal)	Guamerin (100 µg/animal)	7	-	-	-	-	-	0/7
III	Guamerin+FCA <sup>a</sup> (100 µg/animal)	Guamerin (100 µg/animal)	7	-	2	-	-	-	2/7
IV	OVA <sup>b</sup> +FCA (0.2 mg/animal)	OVA (10 mg/animal)	7	-	-	-	-	7	7/7
V	Vehicle (0.1 ml/animal)	Guamerin (100 µg/animal)	7	-	-	-	-	-	0/7

<sup>a</sup>Freund's complete adjuvant<sup>b</sup>ovalbumin.**Table 9.** Results of passive cutaneous anaphylaxis test of Guamerin in mouse-rat model

Group	Sensitization of mice	Challenge in rats	No. of mice	No. of rats	Dilution of antisera from sensitized mice						Positive ratio	
					negative	8	16	32	64	128		256
I	Guamerin (10 µg/animal)	Guamerin (10 µg/animal)	7	14	-	-	-	-	-	-	-	0/14
II	Guamerin (100 µg/animal)	Guamerin (100 µg/animal)	7	14	-	-	-	-	-	-	-	0/14
III	Guamerin+FCA <sup>a</sup> (100 µg/animal)	Guamerin (100 µg/animal)	7	14	-	-	-	-	-	-	-	0/14
IV	OVA <sup>b</sup> +FCA (0.2 mg/animal)	OVA (10 mg/animal)	7	14	-	1	4	9	-	-	-	14/14
V	Vehicle (0.2 ml/animal)	Guamerin (100 µg/animal)	7	14	-	-	-	-	-	-	-	0/14

<sup>a</sup>Freund's complete adjuvant, <sup>b</sup>ovalbumin.

#### IV. 고 찰

본 연구는 (재)목암생명공학연구소가 신약후보물질로 개발 중인 Guamerin에 대한 안전성 평가의 일환으로 식품의약품 안전청 고시 제 1999-61호(1999. 12. 22.) “의약품 등의 독성시험기준”에 준하여 단회투여독성 및 항원성 시험을 실시하였다.

정맥 단회투여독성을 시험하기 위해 ICR계 암수 마우스에 1,000 mg/kg의 투여용량을 단회 정맥투여한 후에 2주 동안 관찰하였다. 본 시험에서 투여기간동안의 사망동물은 없었고, 일반적인 임상증상 및 부검소견에 있어 시험물질 투여로 인한 이상변화는 관찰되지 않았다. 따라서 Guamerin의 정맥투여에 의한 LD<sub>50</sub>치는 1,000 mg/kg 이상일 것으로 추정된다.

또한 Guamerin에 대한 항원성을 기니픽, 마우스 그리고 랫드에서 실시한 결과, 기니픽을 이용한 ASA test에서 시험용량인 저용량(10 µg/animal)과 고용량(100 µg/animal)을 단독으로 감작하거나 면역보조제인 FCA와 혼합감작 시 anaphylaxis 반응을 보이지 않았다. 또한 마우스에 Guamerin을 감작시켜 얻은 항혈청을 이용하여 랫드에서 PCA test를 한 결과, Guamerin은 아나필락시스반응을 일으키지 않아 아나필락시스 반응에 관여하는 IgE 항체 생성에 대한 항원으로 작용하지 않음을 보여주었다.

결론적으로 Guamerin은 임상시험에서 항원성으로 인한

부작용을 일으킬 가능성이 희박하며 인체에 투여시 특이한 아나필락시스 반응을 유발하지 않을 것으로 추정된다.

#### 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 수의과대학 부설 수의과학연구소의 연구비 지원 및 두뇌 한국21 사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Kim, D.R., Hong, S.J., Kim, J.S., Song, M.K. and Kang, K.W. (1996): Guamerin-derived synthetic inhibitors against elastase and subtilisin, *Protein and Peptide Letters*, **3**, 301-308.
- Jung, H.I., Kim, S.I., Ha, K.S., Joe, C.O. and Kang, K.W. (1995): Isolation and Characterization of guamerin, a new human leukocyte elastase inhibitor from *Hirudo nipponia*, *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 13879-13884.
- Song, M., Zaninovic, Kim, D., Gukovskaya, I., Gukovskaya, A., Kang, K. and Pandol, S. (1999): Amelioration of rat cerulein pancreatitis by guamerin-derived peptide, a novel elastase inhibitor, *Pancreas*, **18**, 231-239.
- 의약품 등의 독성시험 기준: 식품의약품 안전청 고시 제 1999-61호(1999. 12. 22)