

비특이 면역증강제 BARODON[®]의 항원성시험

조은혜, 조성대, 안남식, 정지원, 양세란, 박준석, 박기수,
홍인선, 서민수, Nguyen Ba Tiep, 이영순, 강경선*
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실
(게재승인: 2003년 6월 2일)

Antigenicity Study of Nonspecific Immunostimulator BARODON[®]

Eun-hye Jo, Sung-dae Cho, Nam-shik Ahn, Ji-won Jung, Se-ran Yang, Joon-suk Park,
Ki-su Park, In-sun Hong, Min-su Seo, Nguyen Ba Tiep, Yong-soon Lee, and Kyung-sun Kang*

Department of Veterinary Public Health College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Accepted: June 2, 2003)

Abstract: The antigenicity of nonspecific immunostimulator BARODON[®], a newly developed drug, was investigated by tests for passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and active systemic anaphylaxis (ASA) in mice and guinea pigs. In ASA test using guinea pigs, there were no significant clinical symptoms in all individuals of low(0.3%) and high(3%) dose of both groups treated with only BARODON[®] and cotreated with BARODON[®] and adjuvant group. In PCA test, blue spots of Evan's were observed from 2⁶ to 2¹⁰ in homologous group and from 2²~2⁵ dilution rate in heterologous group of BSA treated positive control group. However, intradermal sensitization with antiserum obtained from low (0.3%) and high (3%) dose of BARODON[®] only treatment group and treated-with-adjuvant group, followed by intravenous injection of respective antigen and Evan's blue mixture (1:1) showed no blue spot observed.

In conclusion, BARODON[®], as showed in ASA and PCA test, did not cause anaphylactic shock when treated 3 and 10 times higher than clinically intended dose, nor induce IgE, so that might not have antigenic properties in mice and guinea pigs.

Key words: passive cutaneous anaphylaxis (PCA), active systemic anaphylaxis (ASA), guinea pig, C57BL/6 mouse, BARODON[®]

서 론

약물에 대한 과민반응(allergy)은 치료약제에 대한 체내의 부작용(adverse reaction)의 한 종류로서 IgE항체의 관여로 일어나는 I형 과민반응, IgG, IgM 항체의 관여로 일어나는 II형 및 III형 과민반응, 임파구관여의 IV형 과민반응 등이 개별적으로 또는 몇가지 복합하여 관여한다고 알려져 있다 [3]. 항원성 시험을 실시할 경우, 특히

사람에게서 중증의 전신성 아나필락시에 관여한다고 알려진 IgE형 항체 생성과 검출을 주요 지표로 행하는 것이 적절한 방법이며 I형 과민반응 검출방법이 많이 이용되어 왔다 [6].

BARODON[®]은 Si, Ag, Na, K 등의 이온이 함유된 미네랄 복합물로 체내의 면역세포들 특히 T림파구들을 자극, 증가시킴으로써 직접적인 세포성면역 증진에 작용하여 비특이적으로 돼지면역세포를 증강시킨다고 알

*Corresponding author: Kyung-sun Kang

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Shillim-9 dong, San 56-1, Kwanak-Ku, Seoul, 151-742, Korea

Tel: +82-2-880-1246, Fax: +82-2-876-7610, E-mail: kangpub@snu.ac.kr

려져 있다 [8, 10]. 또한 BARODON[®]의 예상임상용량은 원액 BARODON[®]의 0.1%이고 예상임상투여경로는 사람의 경우 피부외용의 스프레이식 경로와 돼지의 경우 BARODON[®]을 미강(米糠, 쌀겨)에 발효시켜 사료에 첨가하여 섭취하는 경로가 있다. 따라서 BARODON[®]의 항원성시험을 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호(1999. 12. 22.) “의약품등의 독성시험기준”에 따라 기니피클을 이용한 Active Systemic Anaphylaxis (ASA)와 마우스랫드를 이용한 Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 등의 시험을 통하여 안전성 평가의 일환인 항원성시험을 실시하였다.

실험재료 및 방법

시험 물질

본 실험에 사용된 시험물질은 (주)바로드론 SF (경기도 안성, 한국)에서 공급한 음이온 알칼리 복합광물질 용액을 사용하였다. 물질은 연한 갈색이며 사용기간동안 실온에서 보관하였다.

시험동물 및 사육환경

실험동물은 한림실험동물(주) (경기도 화성, 한국)에서 Hartley guinea pig 수컷 7주령, C57BL/6 mouse 수컷 5주령, Sprague Dawley (SD) rat 수컷 6주령을 구입하여 1주간 순화시킨 후 시험에 사용하였으며, mouse는 10마리로 배치, guinea pig와 rat의 경우 5마리씩 배치하여 폴리 카보네이트 사육상자에서 사육하였다. 사육실은 실험동물 사육 환경조건 비교(KGLP) 정상적인 환경조건인 온도 22±3℃, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10-12회/hr, 명암주기 12시간, 조도 150-200 lux로 유지하였다. 순화기간 및 시험기간 중에는 실험동물용 고행사료(푸리나코리아(주))를 섭취시켰으며, 기니피클의 경우에는 비타민의 공급을 위해 양배추를 사료와 동시에 자유 급여하였고, 음수는 상수도를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

시험동물의 군분리는 SAS(Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., NC, USA)를 이용하여 p<0.05 수준에서 분리하였으며 시험물질을 처치 전에 체중을 측정하여 군간 체중 차이가 없도록 무작위법으로 군분리를 실시하였다. 랫드와 마우스의 식별은 꼬리에 유성매직으로 표시하였고 기니피클의 식별은 피모색소법을 사용하였다. 사육상자별 태그표시법을 이용하였고 사용 동물실의 입구에는 시험번호, 표제, 동물실, 시험기간, 시험책임자명을 기재한 표지판을 부착하였다.

투여용량의 설정

시험물질의 임상예정용량인 BARODON[®] 0.1%의 3

배를 저용량군으로 설정하였고, 저용량의 10배 용량을 고용량군으로 설정하였다. 모든 시험물질은 0.9% 염화나트륨 첨가 생리식염수 (크린투액, (주)중의제약)를 이용하여 희석하였으며, 음성대조군은 같은 부피의 용매를 사용하였다. 양성대조군은 Bovine Serum Albumin (BSA)을 같은 생리식염수에 용해하여 사용하였다.

항원성 시험

1. 기니피클을 이용한 active systemic anaphylaxis (ASA) 시험

1) 시험군의 구성

기니피클을 각 군당 5마리씩 6군으로 나누어 음성대조군(제 1군)에는 시험물질을 희석하는데 사용하는 용매인 0.9% 생리식염수를, 양성대조군(제 2군)에는 이중단백인 Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma)을 사용하였다. BARODON[®] 단독투여 저용량군(제 3군)은 시험물질이 미강에서 발효되어 사용될 때 예상임상용량의 3배이므로 이를 적용하였으며, 단독투여 고용량군(제 4군)은 저용량의 10배를 적용하였다. BARODON[®] 면역보조제 혼합투여 저용량군(제 5군)은 면역보조제를 혼합한 후의 최종용량이 예상임상용량의 3배가 되도록 적용하였으며, BARODON[®] 면역보조제 혼합투여 고용량군(제 6군)은 면역보조제를 혼합한 후의 최종용량이 저용량의 10배가 되도록 적용하였다.

2) 시험물질의 감각투여

음성대조군인 용매(제 1군), BARODON[®] 단독투여 저용량군(제 3군) 및 단독투여 고용량군(제 4군)은 주 3회, 3주간 총 9회 피하로 반복 감각 투여하였고, 양성대조군인 BSA(제 2군), BARODON[®] 면역보조제 혼합투여 저용량군(제 5군)과 BARODON[®] 면역보조제 혼합투여 고용량군(제 6군)은 2주 간격으로 총 3회 피하로 반복 감각 투여하였다 [1].

면역보조제는 첫 번째 감각 투여 시는 Complete Freund's Adjuvant(CFA, Sigma)를 사용하였으며, 두번째 및 세번째의 감각에는 Incomplete Freund's Adjuvant(IFA, Sigma)를 각 시험물질과 동량혼합하여 사용하였다 [9].

3) 시험물질의 야기투여

최종감각투여 후 제 10일과 20일에 각 시험물질(야기항원)을 귀정맥내 투여하여 아나필락시스 쇼크증상의 발현 유무를 관찰하였다. 야기항원량은 감각에 이용된 투여용량 중 고용량을 적용하였다.

2. 기니피클을 이용한 homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 시험

1) 기니피클을 이용한 항혈청 생산

Active Systemic Anaphylaxis 시험에서 감각시킨 기니피클로부터 최종감작 1주 후 채혈하고 실온에서 3시간 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 얻었다. 분리한 혈청은 다음 시험시까지 -20℃에서 보관하여 두었다.

2) 항혈청의 감작투여

개체별로 분리된 혈청을 생리식염수로 공비 2배로 10단계 희석한 후 군당 3마리씩 기니피클 배부에 일정한 간격으로 표시한 지름 1cm 원형의 부위당 100 μ l씩 피내투여 하였다.

3) 시험물질의 야기

피내투여 24시간 후, 야기항원과 Evan's blue(5mg/마리) 혼합액 (1:1)을 귀정맥내로 투여하였고, 30분 경과 후 기니피클을 안락사시켜 배부 피부를 절취하여 뒷면으로부터 청색반점을 확인하였다.

3. 마우스 랫드를 이용한 heterologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 시험

1) 마우스를 이용한 항혈청 생산

C57BL/6 마우스를 각 군당 5마리씩 6군으로 나누어 음성대조군(제 1군)에는 시험물질을 희석하는데 사용하는 용매인 0.9% 생리식염수를, 양성대조군(제 2군)에는 이중단백인 Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma)을 사용하였다. BARODON[®] 단독투여 저용량군(제 3군)은 시험물질 예상임상용량의 3배를 적용하며, 단독투여 고용량군(제 4군)은 저용량의 10배를 적용하였다. BARODON[®] 면역보조제 혼합투여 저용량군(제 5군)은 면역보조제를 혼합한 후의 최종용량이 예상임상용량의 3배가 되도록 적용하며, BARODON[®] 면역보조제 혼합투여 고용량군(제 6군)은 면역보조제를 혼합한 후의 최종용량이 저용량의 10배가 되도록 적용하였다.

2) 시험물질의 감작투여

음성대조군인 생리식염수 투여군(제 1군), BARODON[®] 단독투여 저용량군(제 3군) 및 단독투여 고용량군(제 4군)은 주 3회, 3주간 총 9회 피하로 반복 감작 투여하고, 양성대조군인 BSA(제 2군), BARODON[®] 면역보조제 혼합투여 저용량군(제 5군)과 BARODON[®] 면역보조제 혼합투여 고용량군(제 6군)은 2주 간격으로 총 3회 피하로 반복 감작 투여하였다. 면역보조제는 첫 번째 감작 투여 시는 Complete Freund's Adjuvant(CFA, Sigma)

를 사용하며, 두번째 및 세번째의 감작에는 Incomplete Freund's Adjuvant (IFA, Sigma)를 각 시험물질과 동량 혼합하여 사용하였다 [4].

최종감작 투여 후 10일 후에 부검하여 복대정맥에서 전혈채취하고 실온에서 3시간 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 얻었다. 분리한 혈청은 시험에 사용할 때까지 -20℃에서 보관하여 두었다.

3) 항혈청의 감작투여

마우스로부터 분리된 항혈청을 생리식염수로 공비 2배로 10단계 희석하여 이 희석액을 군당 2마리씩 랫드의 배부에 일정한 간격으로 표시한 지름 1cm 원형의 부위당 100 μ l씩 피내투여하였다.

4) 시험물질의 야기

피내투여 24시간 후, 야기항원과 Evan's blue(5mg/마리) 혼합액 (1:1)을 각각 꼬리정맥 내로 주사한 다음 30분 경과 후에 시험 랫드 각 개체를 경추탈골 또는 마취하에 치사시켜 배부 피부를 절취하여 뒷면으로부터 청색반점을 확인하였다.

관찰자료의 해석 및 평가

1. Active systemic anaphylaxis (ASA)

아나필라시스는 종합적으로 쇼크정도에 따라 음성[-]은 아무런 임상증상이 관찰되지 않을 때, 경증[±]은 불안, 기도, 진전, 코를 문지르거나 핏몸의 증상이 나타날 때, 중등도[+]는 재채기, 기침, 호흡촉진, 배뇨, 배변, 유루의 증상이 보일 때, 중증[++]은 호흡곤란, 짝 짝거리는 소리, 청색증, 보행불안, 도약, 핏몸거리고 몸부림침, 경련, 황와, Cheyne-Stokes 호흡의 증상이 나타날 때, 그리고 사망시[+++]로 판정하였다 [11].

2. Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA)

주사부위에 출현한 청색반점의 생성여부를 관찰하여 청색반점의 직경((장경+단경)/2)이 5mm 이상이면 양성으로 간주하고, 양성을 나타내는 가장 마지막 혈청희석액의 희석 배수(최대 희석 배수)를 그 혈청의 최종 역가(항체가)로 정하여 아나필라시스와 관련이 있는 IgE가 생성되었던 것으로 판정하였다 [7, 11].

결 과

Active systemic anaphylaxis

전신 능동 아나필라시스 쇼크의 반응 유무를 평가하기 위해 각군당 5마리의 기니피클에 감작투여한 후 최종

감작 10일째와 20일째에 귀정맥(ear vein)으로 야기투여하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

양성대조군인 BSA 투여군에서는 첫번째 야기투여시 불안, 기모, 진전, 코를 문지르거나 핥음, 재채기, 기침, 호흡촉진, 청색증, 경련, 황와 등중증의 아나필라시스 쇼크를 보였고 두 번째 야기투여시에도 아나필라시스

쇼크를 나타내었으며 1마리가 폐사하였다. 그러나, 음성대조군과 BARODON[®] 투여군인 단독투여군, 면역보조제 혼합투여군의 저용량 (0.3% BARODON[®])투여군과 고용량 (3% BARODON[®])투여군에서는 첫번째 야기시와 두번째 야기시 아나필라시스 쇼크로 보이는 어떠한 증상도 관찰되지 않았다 (Table 1과 2).

Table 1. Active systemic anaphylaxis symptoms of each groups of male guinea pigs after first challenge with BARODON[®]

Group	1		2		3		4		5		6	
Sensitization	Saline		BSA + Adjuvant		BARODON [®] (L)		BARODON [®] (H)		BARODON [®] (L) + Adjuvant		BARODON [®] (H) + Adjuvant	
Challenge	Saline		BSA		BARODON [®] (H)		BARODON [®] (H)		BARODON [®] (H)		BARODON [®] (H)	
No. of Animals	5		5		5		5		5		5	
No. of Challenge Treatment	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Symptoms	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+
Restlessness	0*	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Sneezing	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Coughing	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyperpnea	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Side position	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Cheyne-Stokes respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Evaluation of the intensity	-		++		-		-		-		-	

L, low dose treatment (0.3% BARODON[®]); H, high dose treatment (3% BARODON[®]);

*No. of reacted animals; BSA, Bovine Serum Albumin (12 mg/0.1 ml/animal);

Adjuvant, Complete Freund's Adjuvant or Incomplete Freund's Adjuvant;

-, normal; ±, mild; +, moderate; ++, severe; +++, death.

Table 2. Active systemic anaphylaxis symptoms of each groups of male guinea pigs after second challenge with BARODON[®]

Group	1		2		3		4		5		6	
Sensitization	Saline		BSA + Adjuvant		BARODON [®] (L) + Adjuvant		BARODON [®] (H) + Adjuvant		BARODON [®] (L) + Adjuvant		BARODON [®] (H) + Adjuvant	
Challenge	Saline		BSA		BARODON [®] (H)		BARODON [®] (H)		BARODON [®] (H)		BARODON [®] (H)	
No. of Animals	5		5		5		5		5		5	
No. of Challenge Treatment	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Symptoms	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+
Restlessness	0*	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Sneezing	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Coughing	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyperpnea	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Urination	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Side position	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Cheyne-Stokes respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Death	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Evaluation of the intensity	-		+++		-		-		-		-	

L, low dose treatment (0.3% BARODON[®]); H, high dose treatment (3% BARODON[®])

*No. of reacted animals; BSA, Bovine Serum Albumin (12 mg/0.1 ml/animal)

Adjuvant, Complete Freund's Adjuvant or Incomplete Freund's Adjuvant

-, normal; ±, mild; +, moderate; ++, severe; +++, death.

Passive cutaneous anaphylaxis

아나필라시스와 관련있는 IgE가 생성되는지를 판정하기 위해 PCA 시험을 실시하였다. 각 항혈청을 회석하여 피내주사하고 항원과 Evan's Blue 혼합용액을 정맥야기주사한 결과, 양성대조군인 BSA 투여군(120 mg/ml/animal)의 경우 개체에 따라 Homologous군은 2⁶~2¹⁰

배, Heterologous군은 2²~2⁵배 회석배율까지 5mm 이상 크기의 청색반점을 나타내었으나, 음성대조군과 BARODON[®] 투여군인 단독투여군, 면역보조제 혼합투여군의 저용량(0.3% BARODON[®])투여군과 고용량(3% BARODON[®])투여군에서는 유의할 만한 청색반점을 관찰할 수 없었다 (Table 3과 4).

Table 3. Passive cutaneous anaphyaxis test of BARODON[®] in guinea pigs with sera of sensitized guinea pigs

Sensitized antiserum (0.1ml, id ¹)	Challenged Antigen (1ml, iv ²)	Mark of animal	Dilution of antisera in sensitized mice											
			Guinea pig	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰
Guinea pig Anti-MC	0.5% MC	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guinea pig Anti-BSA	BSA	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Evans blue	6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Guinea pig Anti- BARODON [®] (L)	BARODON [®] (H)	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guinea pig Anti- BARODON [®] (H)	BARODON [®] (H)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guinea pig Anti- BARODON [®] (L)+ adjuvant	BARODON [®] (H)	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guinea pig Anti- BARODON [®] (H)+ adjuvant	BARODON [®] (H)	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[—] less than 5mm of PCA titer, [±]: approximately equal 5 mm of PCA titer, [+]: more 5 mm of PCA titer
L, low dose treatment (0.3% BARODON[®]); H, high dose treatment (3% BARODON[®]); ¹id, intradermal injection; ²iv, intravenous injection; BSA, Bovine Serum Albumin (120 mg/1 ml/animal); EB, Evan's blue (5mg/animal); Adjuvant, Complete Freund's Adjuvant or Incomplete Freund's Adjuvant.

Table 4. Passive cutaneous anaphyaxis test of BARODON[®] in rats with sera of sensitized mice

Sensitized antiserum (0.1ml, id ¹)	Challenged Antigen (1ml, iv ²)	Mark of animal	Dilution of antisera in sensitized mice											
			Guinea pig	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰
Mouse Anti-MC	0.5% MC	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mouse Anti- BSA	BSA	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mouse Anti- BARODON [®] (L)	BARODON [®] (H)	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mouse Anti- BARODON [®] (H)	BARODON [®] (H)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mouse Anti- BARODON [®] (L)+ adjuvant	BARODON [®] (H)	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mouse Anti- BARODON [®] (H)+ adjuvant	BARODON [®] (H)	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Evans blue	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[—]: less than 5 mm of PCA titer, [±]: approximately equal 5 mm of PCA titer, [+]: more 5 mm of PCA titer
L, low dose treatment (0.3% BARODON[®]); H, high dose treatment (3% BARODON[®]); ¹id, intradermal injection; ²iv, intravenous injection; BSA, Bovine Serum Albumin (120 mg/1 ml/animal); EB, Evan's blue (5 mg/animal); Adjuvant, Complete Freund's Adjuvant or Incomplete Freund's Adjuvant.

고 찰

BARODON[®]은 비특이적으로 돼지면역세포를 증강시켜 직접 사료에 넣어 투여하거나 미강(米糠, 쌀겨) 등에 발효시켜 가축에게 급여함으로써 돼지유행성 설사에 매우 효과적인 예방효과를 확인한 바 있으며(농림부 연구 보고서, 1999, 미발표자료), 높은 폐사율로 인해 양계산업에 막대한 손실을 가져오는 가금티푸스에도 효과적으로 작용함이 확인되었다(수의과학연구소 시험결과보고서, 1996, 미발표자료). 그리고 BARODON[®]은 이와같이 수의 학적으로도 활용도가 높지만 그 외 아토피와 알러지성 피부에 세정 시 지방 및 단백질의 이온분해를 통해 피부를 청결하게 해주며 온열현상으로 활력을 주는 동시에 피부 깊숙이 잔류한 병원성세균 및 바이러스성 노폐물을 제거한다고 알려져 있다 [2]. 이에 따라 본 BARODON[®]의 항원성 시험에서는 예상임상용량의 3배를 저용량군으로 설정하고 이 저용량의 10배를 고용량군으로 설정하였으며 단독투여군과 면역보조제 혼합투여군을 두었다. 음성대조군은 같은 부피의 용매를 사용하며, 양성대조군은 Bovine Serum Albumin(BSA)을 사용하였다. 기니피를 이용한 ASA 시험에서 최종감작투여후 10일과 20일째의 두 번의 야기시험 결과, 음성대조군과 시험군 모든 개체에서 아나필라시스와 관련된 특이적인 임상증상을 나타내지 않았다. 그러나, 양성대조군인 BSA 투여군에서는 첫번째 야기투여시 다섯 마리에서 불안, 진전, 재채기, 코를 문지르거나 핏을 증상을 보였고, 그 중, 4마리의 개체에서 기침, 경련, 황와의 증상을 나타내었고, 다섯 마리 중, 세 마리의 개체에서 호흡축진, 청색증의 증상을 보였다. 두 번째 야기투여시 또한 다섯 마리에서 불안, 진전, 코를 문지르거나 핏을, 재채기, 기침의 증상을 보였고, 그 중, 4마리의 개체에서 경련, 황와의 증상을, 다섯 마리 중, 세 마리의 개체에서 호흡축진, 청색증의 증상을 보이고 1마리가 폐사하여 심한 아나필라시스 쇼크를 나타내었다.

기니피과 랫드를 이용한 PCA 시험에서는 음성대조군과 BARODON[®] 투여군의 모든 개체에서 유의한 청색반점을 관찰할 수 없었으나 양성대조군인 BSA에 대한 항혈청의 경우 기니피에서는 2⁸~2¹⁰배 희석단계까지 양성을 나타내었고, 랫드에서는 2²~2⁵배 희석단계까지 양성을 나타내었다. 따라서, BARODON[®]은 예상임상용량의 3배인 0.3% BARODON[®]과 30배인 3% BARODON[®]에서 아나필라시스 쇼크를 일으키지 않고, 조직 친화성 면역 글로불린인 IgE를 생성하지 않아 임상에서 사용될 BARODON[®]은 항원성이 없어 안전하다고 판단된다.

생활환경의 변화와 삶의 질 향상으로 인하여 많은 면역증강제가 개발되고 있고 해마다 그 시장도 커지고

있어 이러한 제품의 항원성시험을 비롯한 국소자극성 시험, 유전독성시험 등 기초적인 독성시험의 자료가 절실히 요구된다. 실제 BARODON[®]의 경우 국소자극성 시험 결과 음성의 결과를 관찰할 수 있었고 [5], 유전독성 시험의 경우 BARODON[®]의 임상예정용량에서 어떠한 유전독성이 있다고 사료되지 않았다(미발표 자료).

따라서 이번 시험은 많은 용도로 사용되고 있고 특히, 축산업계에서 사료의 첨가제로 널리 사용되고 있는 BARODON[®]의 이번 항원성시험 결과를 이미 발표된 다른 시험결과와 더불어 사용시 안전성에 기인할 것이라 예상된다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청 (1999): 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호.
2. Aida T., Ishikawa N. and Shinkai K. Sex differences in immune responses to cephalothin in guinea pigs, *J. Toxicol. Sci.* 1998, **23**, 87-91.
3. Choi, S. I., B.B.ST center, Uses and Advantages of nonspecific immunostimulator (BARODON[®]), 1996.
4. Coombs, R. R. A., P. G. H. and Gell. *Clinical aspect of immunology* 575, Black-well Scientific Publication, Oxford. 1968.
5. Inoue S., Morioka H. and Satoh R. T. Antigenicity study of cefiprome sulfate, *J. Toxicol. Sci.* 1990, **3**, 129-145.
6. Jo, E. H., Cho, S. D. and Ahn, N. S. Eye Irritation, Skin Irritation and Skin Sensitization Tests for Nonspecific Immunostimulator BARODON[®] *J. Toxicol. Sci.*, 2003, **19**, 39-44.
7. Kim, S. H., Baik, N. G. and Ahn, B. O. Antigenicity Test of Pocrine Pancreatic Elastase, *Environ. Mut. & Carcinogens*, 1990, **10**, 113-118.
8. Kang, K. S. and Lee, Y. S. Antigenicity Test of PDT-Hepa in Guinea Pigs and Rabbits, *Environ. Mut. & Carcinogens*. 1991, **11**, 141-147.
9. Park, Y. H., Woo, H. J. and Rhee, J. C. Enhancement of host immune responses by addition of nonspecific immunostimulator (BARODON[®]) in animal feed, *Seoul Univ. J. Vet.*, 1998, **23**(2).
10. Takahashi K. and Arai Y. Antigenicity of suloctidil, *J. Toxicol. Sci.*, 1983, **8**(3), 231-242.
11. Yoo, B. W., Choi, S. I. and Kim, S. H. Immunostimulatory effects of an anionic alkali mineral complex solution (BARODON[®]) on porcine lymphocytes, *J. Swine Health and Production*. 2002, **10**, 265-272.