Kor. J. Food Hygiene 6(3, 4), 171-177(1991)

토끼에게 소성장 홀몬-서방형 제형(BST-SR)의 피부 및 안점막 자극에 관한 연구

강경선 · 최경철 · 신동진 · 김형욱 · 조재진 · 이영순

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Skin and Eye Irritation Test of Bovine Somatotrophine-sustained Release (BST-SR) in Rabbits

Kyung-Sun Kang, Kyung-Chul Choi, Dong-Jin Shin, Hyoung-Ook Kim, Jae-Jin Cho and Yong-Soon Lee

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT – **According to the Established Regulations of National Institute of Safety Research, the skin-irritation test of BST-SR (Lucky Ltd.) was performed for seven days in New Zealand White Rabbits. During treatment periods no significant clinical symptom was observed. Significant changes such as erythema, scar tissue and edema were not shown on the applicating sites. According to Primary Irritation Index of Draize, skin irritation rate was assessed as "Zero".**

The eye irritation of BST-SR (Lucky Ltd.) was examined in nine New Zealand White rabbits, based on the Established Regulation of National Institute of Safety Research. 0.1 ml of test material was dropped on right eye, and after 20~30 seconds, three rabbits' eyes were cleaned with warm saline for 1 minute. Other six rabbits' eyes were left uncleaned. The untreated left eyes were negative control. The lesions of cornea, iris and conjuntiva were assessed by the Grade table (from the Regulation of National Institute of Safety Research), and it is concluded that BST-SR has no eye-irritation.

Keywords□**Bovine Somatotrophine-sustained release (BST-SR), Eye-irritation, Skin-irritation, Rabbit**

본 시험의 시험법은 국립보건안전연구원 예규 제10호(1988), 의약품 등의 독성시험 기준에 준하여 피부반응을 평가, 판정하였다(Draize and Calvery, 1944; Code of Federal Regulation 1985; 국립보건안전연구원 1988). 한편, 안구의 손상은 화학물질과의 직접적인 접촉으로 인한 국소적 형태 또는 약품, 식품오염물질의 섭취 등의 경로를 통해 전신적 형태의 일환으로 나타날 수 있다. 많은 화학물질이 안구손상을 일으킨다고 보고되어 있으며(Grant, 1974. Henkes and Canta, 1973. Meier-Ruge, 1973. Roeig et al., 1964), 새로운 물질이 제조공정시의 작업자, 최종소비자에 노출되기 전에 안구손상 가능성여부를 시험하는 것은 매우 중요한 일이다. 또한, 위험물질이 눈에 들어갔을 때의 일차적인 치료는 눈을 씻어내는 것이다. 실험에 있어서 검체적용 후 세정시 안점막자극경감 효과를 보기 위해서는 일반적으로 검체적용 20~30초 후에 플라스틱병에 담긴 물을 짜내는 방법으로 부드럽게 1분가량 계속적으로 안구전체에 관류를 일으켜 주는 것이다. 검체적용 후 1분 이내에 세척할 경우 눈의 자극을 줄일 수 있으나 수분이 지나면 안구의 손상은 즉각적으로

Received for publication 21 Jan., 1992
Reprint request: Dr. Y. S. Lee at the above address

일어나게 된다(Ping Kwong(Peter) Chan and A. Wallace Hayes. 1989).

한편, 피부자극시험의 경우 관찰시일 및 간격에 대해서는 Draize test의 경우는 24시간 간격으로 검체노출 7일간 피부를 관찰하는 것으로 되어 있으며(Draize et al., 1944), Federation Hazards Substances Act(FHSA)는 24, 48, 72시간의 간격을(FHSA, 1979), OECD는 1, 24, 48, 72시간의 간격을(OECD, 1981), National Academy of Sciences (NAS)는 1, 3, 7, 14, 21일의 관찰시일 및 시간간격을 제시하고 있어서 각각의 지침에 따라 규정이 다르다. 요컨대, 검체에 의해 나타나는 피부변화의 정도와 지속시간을 관찰하는 것이 중요하며 여러가지 검체의 다양한 성상에 따라 피부변화의 시작이나 회복에 걸리는 시간이 달라지므로 단정적으로 쉽게 예견하기는 어렵다.

따라서 본 시험은 유전자 재조합기법으로 미생물을 이용하여 만든 소성장홀몬(BST-SR 제형, Lucky Ltd.)에 대한 토끼에서 피부 및 안점막 자극 여부를 밝혀 BST-SR이 실제 임상에 적용할 수 있는지의 여부를 확인하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물－1) 피부자극시험 : 실험에서 사용한 토끼는 3～4개월령(2.0～2.5 kg) 뉴질랜드 백색종의 토끼 수컷 8마리를 삼육실험동물 연구소에서 분양받아 그 중 6마리를 사용하였다. 실험실은 온도 17± 5℃, 상대습도 50± 10%, 환기회수 13～18회/hr, 조명시간 오전 7시～오후 2시, 조도 150～300 Lux를 유지하였다. 순화, 검역, 투여 및 관찰 기간중 토끼용 3단 사육상자대에 배열된 스테인레스 케이지(420 mm W×500 mm D×310 mm H, 명진기계 제작)에 각 1마리씩 넣어 실시하였다. 사료는 토끼용 고형사료((주) 퓨리나 사료)를 사용하였고 음수는 상수도수를 자유로이 급여하였다.

2) 안점막자극시험 : 규정에 따라 토끼(New Zealand White Rabbit)를 이용하였다. 4개월령 전후로 체중은 2.0～2.8 kg의 것을 사용하였고 snuffles와 ear mite의 감염, Coccidium 감염여부, 피모이상 유무 및 설사 흔적 등을 조사한 후 건강한 토끼만을 입수하여 시험에 사용하였으며, 동물을 입수한 후

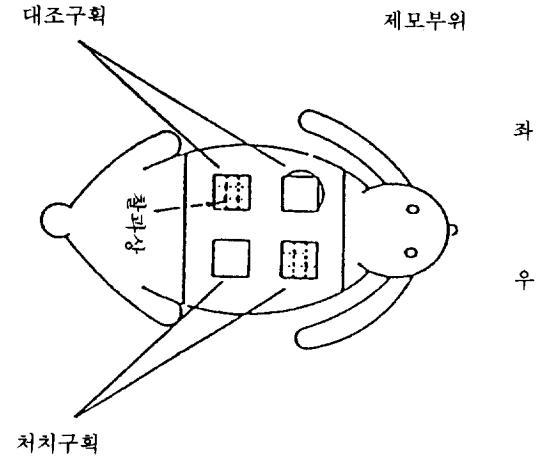

Fig. 1. 시험구획 설정.

약 1주일간 검역 및 순화기간을 거쳐 시험을 시행하였다.

순화 및 시험기간동안의 환경조건은 온도 17± 3℃, 상대습도 40± 10%, 환기회수 10～12회/hr, 조명(오전 7시～오후 7시), 조도 150～200 Lux로 설정하였으며, 순화기간 및 시험기간 중에 토끼는 3단 사육상자 대에 배열된 스테인레스 스틸 사육케이지(420 W×500D×310×Hmm, 명진기계 제작)에 2마리씩 수용하였다. 사육케이지에는 시험번호, 동물번호 등을 기입한 Tag를 붙였다.

사료는 토끼용 고형사료(퓨리나 주식회사)를 자유급식시켰고, 음수는 상수도수를 자유 섭취시켰다.

시험물질－(주) 럭키에서 공급받은 소성장홀몬(BST-SR)을 이용하였다.

시험방법－1)피부자극시험 : 수컷 6마리를 이용하여 각 동물의 경배부에 약 2.5×2.4 cm 정도의 크기로 척추를 중심으로 좌우 2구획씩 설정하여 좌측구획은 무처치 대조구획으로 하고, 우측에는 시험물질을 도포하는 처치구획으로 한다. 시험물질 적용 약 24시간전에 털을 깍고 찰과피부 2개소와 비찰과 피부 2개소로 모두 4개소로 모두 4개소를 처치구획 및 대조구획으로 구분하였다(Fig. 1).

찰과상은 hypoderm needle tip으로 긁거나, Berkely scarifier와 같은 기구를 사용한다(Haley and Hunziger, 1974). 투여방법은 BST-SR을 동물 1마리당 원액 1 ml(0.5 ml/site)씩 투여부위에 1회 도포하였으며, 무처치 대조구획에는 멸균생리식염수를

도포하였다. 도포 후 적용부는 증발을 막기 위하여 가아제로 덮고 비자극성 테이프로 잘 고정하였다. 24시간 유지한 후 생리식염수로 도포부위를 가볍게 닦아내었다.

2) 안점막자극시험 : 시험물질 투여 24시간 전에 안검사를 실시하여 안구손상 및 각막의 손상유무를 확인하여 손상이 없는 토끼 9마리를 선정하여 시험물질 0.1 ml을 모든 9마리의 토끼 오른쪽 눈의 하안검(lower eyelid)을 안구로부터 멀리 당기어 cup을 형성시킨 후 안점막에 점적하여 투여하고, 그중 3마리는 20~30초 후에 미온생리식염수로 약 1분간 조심스럽게 세정해주고, 나머지 6마리는 세정하지 않았다. 검체를 투여하지 않은 왼쪽눈은 대조로 하였다.

관찰 및 검사항목－1) 피부자극시험 : 시험물질 투여 후 일주일간 매일 외관, 사료 및 음수 소비상태와 임상증상 등에 대하여 관찰하였고, 투여시 및 적용 후 7일째(부검직전)에 각각 측정하였다.

부검은 적용 후 7일째에 전신마취제(티오펜탈소디움, 중외제약)를 이정맥을 통해 주입하여 안락사를 시킨 후 부검하여 육안적으로 이상유무를 관찰하였다.

피부반응의 평가 및 자극성의 판정은 "의약품 등의 독성시험기준"을 이용하여 판정하였다. 또한 찰과상에 대한 자극성의 정도 판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 P. I. I.(Primary Irritation Index)의 산출방법에 따랐다(Code of Federal Regulation, 1985; Draize, et al., 1944).

P.I.I. of Draize

정 도(P.I.I.*)	자극부분
<2	Mild irritating
2~5	Moderate irritating
>5	Severe irritating

* P.I.I.: Primary Irritation Index

2) 안점막자극시험

(1) 일반증상 : 시험물질을 투여후 안구병변이 정상으로 회복될 무렵까지 안구병변 관찰시 동물의 일반상태의 변화 및 사망발현 유무를 관찰한다.

(2) 투여부위 관찰 : 시험물질 투여 후 1, 2, 3, 4, 7일에 세정군 및 비세정군 모두의 안구를 검사하여 투여하지 않은 다른쪽 눈을 대조로 하여 각막, 홍채, 결막에 대한 안구병변의 평점을 다음의 안구병변의 등급표(국립보건안전연구원 예규 제 10호)에 따라 산출하였다.

Table 1. Mortality and clinical signs

Sex	No. of animal examined	Clinical signs	Mortality
Male	6	NAD*	0/6

* NAD: No abnormalities detected.

Table 2. Mortality and clinical signs

Sex	Animal No.	Clinical sign							
		0	1	2	3	4	5	6	7(day)
Male	1	–	–	–	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–	–	–	–
	3	–	–	–	–	–	–	–	–
	4	–	–	–	–	–	–	–	–
	5	–	–	–	–	–	–	–	–
	6	–	–	–	–	–	–	–	–

–: normal

Table 3. Body weight changes after applying bovine somatotrophine-sustained release (BST-SR) during seven days (unit: g)

Sex	Animal No.	Day of application		Changes
		0 day	7 day	
Male	1	2250	2300	50
	2	2050	2150	100
	3	2150	2200	50
	4	2050	2150	100
	5	2050	2100	50
	6	2100	2150	50

결 과

피부자극시험－1) 폐사율 : 시험 전기간을 통하여 토끼에서 폐사동물은 관찰되지 않았다(Table 1).

2) 임상증상 : 시험 전기간을 통하여 토끼에서 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다(Table 2).

3) 체중변화 : 모든 토끼에게 적용 후 7일째의 체중은 적용개시일의 체중과 비교하여 평균 약 70g의 체중증가를 보였는데, 이것은 일반적인 토끼의 체중

안구 병변의 등급표

(1) 각막

(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)

- 화농이나 혼탁이 없음 ····· 0
- 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있음(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨 ····· 1
- 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함 ····· 2
- 진주색깔을 나타냄. 홍채의 말단이 관찰 안됨. 동공의 크기가 가까스로 관찰됨 ····· 3
- 각막이 불투명, 혼탁때문에 홍채가 관찰 안됨 ····· 4

(B) 혼탁된 각막의 범위

- 1/4 이하(그러나 0은 아니다) ····· 1
- 1/4 이상 1/2 미만 ····· 2
- 1/2 이상 3/4 미만 ····· 3
- 3/4 이상 1 까지 ····· 4

점수 A×B×5

최대치=80

(2) 홍채

(A) 반응치

- 정상 ····· 0
- 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막주위에 중등도의 충혈, 이상과 같은 단독 혹은 혼입. 홍채는 빛에 대해 반응함(둔함 반응은 양성) ····· 1
- 빛에 대해 반응 없음. 충혈, 대부분 파괴(이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부) ····· 2

점수 A×5

최대치=10

(3) 결막

(A) 발적(안검결막, 안구결막에 한함. 결막, 홍채 제외)

- 혈관은 정상 ····· 0
- 몇몇 혈관은 명확히 충혈 ····· 1
- 넓은 심홍색 색조, 각각의 혈관은 쉽게 관찰안됨 ····· 2
- 엷은 선홍색 ····· 3

(B) 결막부종

- 부풀지 않음 ····· 0
- 정상보다 약간 종창(순막 포함) ····· 1
- 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창 ····· 2
- 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 종창 ····· 3
- 눈이 반이상 잠길 정도의 종창 ····· 4

(C) 배출물

- 배출물 없음 ····· 0
- 약간의 배출물(정상동물의 내부 눈꼬리에 관찰되는 작은 양 제외) ····· 1
- 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물 ····· 2
- 눈주위의 정상부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물 ····· 3

점수 (A+B+C)×2

최대치=20

Table 4. Results of skin reaction

Sites		Control site										Test site									
Change		Erythema & Eschar					Edema					Erythema & Eschar					Edema				
Phage		1	24	48	72	168	1	24	48	72	168	1	24	48	72	168	1	24	48	72	168
Ani. No	Sec																				
1	male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total Score		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean Score		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P.I.I.*		0										0									

* P.I.I.: Primary Irritation Index, Sum of Mean Score/5

Table 5. Autopsy findings of individual rabbit after applying BST-SR

Sex	Animal No.	Findings
Male	1	NAD*
	2	NAD
	3	NAD
	4	NAD
	5	NAD
	6	NAD

* NAD: No abnormalities detected

Table 6. Autopsy findings of rabbits after applying BST-SR

Sex	No. of animal examined	Clinical signs
Male	6	NAD*

* NAD: No abnormalities detected.

증가이며 시험물질과 관련하여 체중의 증가 또는 감소와 같은 변화는 인정되지 않았다(Table 3).

4) 도포부위의 관찰 : 적용부위의 관찰은 전동물에서 시험물질 적용 후 1, 24, 48, 72시간 및 7일째에 각각 실시한 결과, 홍반, 부종 및 가피형성은 전혀 관찰되지 않았다. 생리식염수를 투여한 무처치 대조구획에서에서의 피부 반응의 결과는 전동물에서 특이적인 변화가 인정되지 않았다(Table 4, 5).

5) 해부병리 소견 : 본 시험에서 사용된 전 동물을 시험물질의 적용종료 후 7일째에 부검한 결과, 시험물질의 투여에 의한다고 생각되어지는 어떠한 병변도 관찰되지 않았다(Table 6).

안점막자극시험 – 안점막자극실험에서 검체 투여 후 1, 2, 3, 4, 7일에 일반 증상은 관찰할 수 없었으며, Table 7는 각막, 홍채, 결막에 대한 안구병변의 등급을 점수로 표시한 것이다. 투여 1일 후에 토끼 No. 3과 8에서 결막의 충혈이 나타났으나, 그 이후 7일까지 아무런 증상을 관찰할 수 없었으며 대조인 다른쪽 눈에 비하여 이상을 관찰할 수 없었다.

고 찰

유전자 재조합기술을 이용하여 미생물에서 생합성해낸 (주)럭키의 BST-SR의 피부 1차 자극성실험을 6마리의 수컷 토끼를 이용해 국립보건안전연구원 예규 제 10호(1988. 10. 29) "의약품 등의 독성시험"에 준하여 1 ml/rabbit(0.5 ml/site)로 경피적용하여 본 결과 일반증상, 체중변화, 부검소견에서는 본 시험물질에 의해 기인된 것으로 생각되는 특이 병변은 관찰되지 않았으며, 홍반 및 가피, 부종 등의 피부 자극 반응 또한 나타나지 않았다.

이상과 같은 피부반응의 결과를 평가하기 위하여

Table 7. Eye irritation test-Newzealand white rabbits

Group	Rabbit No.	Sex	Tissue	Scores	days					Total Score
					1	2	3	4	7	
1	1	M	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	0	0	0	0	0	0/20
	2	M	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	0	0	0	0	0	0/20
	3	F	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	(1+0+0)×2=2	0	0	0	0	2/20
2	4	M	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	0	0	0	0	0	0/20
	5	M	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	0	0	0	0	0	0/20
	6	F	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	0	0	0	0	0	0/20
	7	M	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	0	0	0	0	0	0/20
	8	M	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	(1+0+0)×2=2	0	0	0	0	0/20
	9	F	Cornea	A×B×5	0	0	0	0	0	0/80
			Iris	A×5	0	0	0	0	0	0/10
			Conjunctiva	(A+B+C)×2	0	0	0	0	0	0/20

Table 3에서와 같이 피부 1차 자극율(P.I.I.)을 산출한 결과(Draize, et al., 1944) "0"으로서 피부에 대한 자극이 전혀 없는 것으로 나타나 본 시험물질에 기인되는 BST-SR의 피부 1차 자극에 대한 안정성은 높은 것으로 사료되어 진다.

본 시험의 결과 BST-SR가 토끼에서 피부 및 안점막에 자극을 주지 않는 것으로 생각되어 진다.

국문요약

New Zealand White에 대한 피부 자극성 시험을 6마리의 수컷 토끼를 이용하여 7일간의 피부 1차 자극성 실험을 국립보건안전연구원 예규에 따라 실시하였으며, 전 동물에서 시험 전 기간을 통해 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 임상증상, 체중변화 및 부검소견 등이 관찰되지 않았다. 그리고 시험물질 도포부위의 홍반과 가피형성 및 부종 등의 자극성은 인정되지 않았으며, Draize의 P. I. I.(Primary Irritation Index)의 산출에 의한 피부 1차 자극율은 "0"으로 평가되었다.

Zealand White Rabbit에서 BST-SR에 대한 안점막 자극 시험을 국립보건 안전연구원 예규에 따라 토끼 9마리를 가지고 시험하였다. 검체를 모든 토끼의 오른쪽 눈에 0.1 ml을 투여하고 3마리의 토끼는 20~30초후에 미온수로 1분간 세척해 주고 나머지 6마리의 토끼는 그대로 두어 각막, 홍채, 결막에 각각 나타나는 병변을 등급표에 따라 계산해 보았으나, 안점막에 대해서 무자극물로 판단되었다.

따라서 BST-SR는 토끼의 안점막 및 피부에 자극성이 없는 것으로 생각되어진다.

참 고 문 헌

1. Blumberf, B. S., Alter, H. J. and Visnich, S.: A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA*, **191**(7), 541 (1965).
2. Code of Federal Regulation.: Office of the Federal Registrar, National Archives of records Service. General Serveces Administration Title 16, parts, 1500, 40-1500, 42 (1985).
3. Draize, J. H., Woodard, G. and Calvery, H. O.: Methods for the study of irrtation and toxicity of substancesapplied topicaly to the skin and mucous membrane. *J. Parmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390 (1944).
4. Haley, T. and Hunziger, J.: Instrument for producing standardized skin abrasions. *J. Pharm. Sci.*, 103-106 (1974).
5. Hayes, A. W.: Principles and Methods of Toxicology, 2nd ed: 397-398 (1989).
6. 국립보건안전연구원: 국립보건안전연구원 예규 제10호(의약품 등의 독성시험기준), pp. 907-908 (1988).
7. 白須泰彦, 吐山豊秋：新毒性試驗法. Realize Inc., pp. 352-374 (1988).
8. FHSA: Regulations under the Federal Hazardous Substance Act. Chapter II. Title 16. Code of Fedral Regulations(1979).
9. Grant, W. M.: Toxicology of the Eye. 2nd ed. Charles C. Thomson, Springfield, IL. (1974).
10. Henkes, H. and Canta, L. R.: Drug-induced disorders of the eye. In: Excepta Medica, Vol. 14: Proceedings of the European Society for the Study of Drug Toxicity, edited by W. A. M. Duncan, pp. 146-153. Elsevier/North-Holland, NY.
11. Meier-Ruge, W.: Eye toxicity, In: Excepta Medica, Vol. 14: Proceedings of the European Society for the Study of Drug Toxicity, edited by W. A. M. Ducan, pp. 133-145. Elsevier/North-Holland, NY.
12. OECD: OECD guidelines for testing of chemicals. OECD, Paris (1981).
13. Ping Kwong (Peter) Chan and A. Wallace Hayes: Principles and Methods for Acute Toxicity and Eye Irritancy In: Principles and Methods of Toxicology.(Editor, A. Wallace Hayes.). Raven Press. NY (1989).
14. Roeig, D. L., Hasegawa, A. I., Harris, G. J., et al.: Occurrence of corneal opacities in rats after acute administration of 1-alpha-acetylmethadol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 155-163 (1980).