



Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague-Dawley Rats from Pre-clinical Toxicity Studies

Zhong-Ze Han, Hong-De Xu, Kwang-Ho Kim, Tae-Hwan Ahn, Jin-Sook Bae, Ji-Young Lee, Ki-Hyun Gil, Joo-Young Lee, Su-Jung Woo, Hyun-Jung Yoo, Hyun-Kul Lee, Kap-Ho Kim, Chan-Koo Park, Hu-Song Zhang and Si-Whan Song*

Preclinical Research Center, ChemOn Inc., Yongin, Korea

The purpose of this paper is to provide reference data related to the body weight, food & water consumptions, urinalysis, hematology and serum biochemistry parameters and absolute & relative organ weights obtained from control Sprague-Dawley rats, used in the 4-week and 13-week repeated-dose toxicity studies conducted in our laboratory between 2005 and 2008. The mean, standard deviation, minimum and maximum range values for hematology and serum biochemistry parameters, data of absolute & relative organ weights, and the difference between sexes and study duration of week 4 versus 13 week are presented. The studies were conducted according to "the standards of Toxicity Study for Medicinal Products" (2005) and The KFDA Notification No. 2000-63 'Good Laboratory Practice (GLP)' (2000) issued by KFDA. These data could be used as reference material of Sprague-Dawley rats by conducting the studies to evaluate the toxicological profile of pre-clinical toxicity studies.

Key words: Hematology, reference data, Sprague-Dawley rat, pre-clinical toxicity studies.

Received 16 February 2010; Revised version received 17 May 2010; Accepted 10 June 2010

현재 생명과학의 발전과 더불어 의학, 생물학 등 기초 과학분야에서 실험동물을 이용한 실험들이 많이 진행되고 있으며, 다양한 종류의 실험동물들이 과학연구분야에서 없어서는 안 될 중요한 생물소재로 활용되고 있다. 신물질개발과정에 약효검정을 위한 시험과 안전성 평가를 위한 비임상시험에서 시험결과의 재현성과 정확성 및 신뢰성을 확보하기 위하여 유전학적 및 미생물학적으로 엄격히 제어된 양질의 실험동물이 필요할 뿐만 아니라, 사용되는 실험동물 중에 대한 생물학적 기초자료의 확보도 매우 중요하다(Yamada, 1989; Alemán et al., 1998; Kitagaki et al., 2005; Petterino and Argentino-Storino, 2006; Ando et al., 2008). 특히, 독성시험에서 시험물질에 대한 독성학적인 평가를 위해서는 무영향량(No-Observed-Effect Level, NOEL) 또는 무독성량(No-Observed-Adverse-Effect Level, NOAEL)의 범위를 확립하는 것이 매우 중요한데 이것은 대조군과 시험물질 처리군에서 얻은 시험결과에 대한 비교 분석을 통하여 가능하다. 따라서 동물실험에

있어서 대조군의 시험결과는 그 시험을 해석하는데 있어 매우 중요한 자료로 된다(Leonard and Ruben, 1986; Wolford et al., 1986; Roe, 1991; Matsuzawa et al., 1995; Alemán et al., 2000).

현재 외국에서만 아니라 국내의 일부 GLP 기관에서도 자체적으로 축적한 실험동물의 생물학적 기초자료들을 확보하여 독성시험평가에 매우 유용하게 활용하고 있다(Song et al., 1990; Kang et al., 1995; Kang et al., 2004).

본 연구는 당 연구소(주)캠온 전임상연구센터, 경기도 용인시에서 2005년부터 2008년 사이에 수행했던 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주와 13주 반복 경구투여 독성시험 중 매체대조군으로 멸균주사용수만을 경구투여한 랫드의 체중, 사료 및 물 소비량, 요검사, 혈액학, 혈액생화학, 장기중량에 대한 기초자료를 종합하여 SD 계통 랫드의 생물학적 기초데이터 및 비임상시험에서의 효율적인 독성시험평가에 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

본 연구는 한국 식품의약품안전청(KFDA)의 "의약품등의독성시험기준"(식품의약품안전청고시 제2005-60호, 2005)과 "비임상시험관리기준"(식품의약품안전청고시 제 2005-79호, 2005)에 준하여 수행하였다. 또한, 본 시험은 (주)캠온의 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다.

*Corresponding author: Si-Whan Song, Preclinical Research Center, ChemOn Inc., 334 Jeil-ri, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 449-826, Korea
Tel: +82-31-329-9977
Fax: +82-31-329-9901
E-mail: swansong@chemon.co.kr

재료 및 방법

실험동물

본 시험에서 사용한 실험동물은 코아텍(경기도 평택시)으로부터 구입한 특정병원균 부재 Sprague-Dawley 랫드 (Hsd: Sprague Dawley[®]SD[®]TM)로 2005년부터 2008년 사이에 당 연구소에서 수행한 4주와 13주 반복 경구투여 독성시험에서 용매대조군의 기초자료를 이용하였다. 매체 대조물질로는 멸균수사용수를 경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 매일 1회 강제적으로 경구투여 하였고, 투여액량은 5-20 mL/kg/day (10 mL/kg/day 위주)였다. 사용된 동물의 투여 개시 시의 주령은 4주 및 13주 시험 모두 6주령이었다. 또한, 4주 시험의 투여 개시 시 체중은 수컷은 157.46-202.88 g, 암컷은 123.08-164.49 g, 13주 시험의 투여 개시 시의 체중은 수컷은 162.37-213.81 g, 암컷은 125.57-163.59 g이었다.

사육환경

동물은 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10-20회/hr, 조명 12시간 주기, 조도 150-300 Lux로 설정되어 있는 KGLP 인증기관인 (주)캠온 전임상연구센터 실험동물실에 수용하였으며, 4주 반복경구투여 독성시험의 동물은 스테인레스제 망 사육상자(W 215×L 355×H 200 mm)에, 13주 반복경구투여 독성시험의 동물은 적량의 깔짚을 담은 폴리카보네이트 사육상자(235 W×380 L×175 H mm)에 3마리 이하/사육상자로 사육하였다.

사료는 방사선 조사로 멸균된 실험동물용 고품사료 (Harlan Co. Ltd., USA. TEKLAD CERTIFIED GLOBAL 18% PROTEIN RODENT DIET, 2918C)를 플라스틱내셔널로부터 공급받아 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

체중

체중은 투여개시일 및 시험기간 중 주 1회, 그리고 부검일에 절식 후의 체중을 측정하였다.

사료 소비량

사료 소비량은 투여 개시일과 시험기간 중 주 1회 실시하였고, 그 방법은 사료를 정량급여한 후, 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하였으며, 마리당 평균 소비량(g/rat/day)으로 산출하였다.

물 소비량

물 소비량은 사료 소비량 측정과 같은 주기로 실시하였고, 물을 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하였으며, 마리당 평균 소비량(g

rat/day)으로 산출하였다.

요검사

요검사용 Multistix 10SG 시험지(Bayer Corp., Elkhart, IN, USA)와 요자동분석장치(CliniTek 100, Bayer Corp., Elkhart, IN, USA)를 이용하여 요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 요비중(specific gravity), 잠혈(occult blood), pH, 단백질(protein), 유로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite) 및 백혈구(leukocyte)에 관하여 검사하였다.

혈액학적 검사

모든 동물은 채혈전 16시간 이상 절식시킨 후, 에테르 마취하에 개복하여 후대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA-2K가 들어 있는 CBC 채혈병에 취한 후 혈구자동계측장치(ADVIA 2120, SIEMENS, USA or Cell dyn 3700, Abbot, USA)를 이용하여 백혈구수(white blood cell count, WBC), 적혈구수(red blood cell count, RBC), 혈색소량(hemoglobin), 적혈구백분율(hematocrit), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판수(platelet), 백혈구 백분율[호중구(neutrophil), 호산구(eosinophil), 호염기구(basophil), 림프구(lymphocyte), 단핵구(monocyte)]를 측정하였다. 혈액응고시간 검사는 부검일에 prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (APTT)를 혈액응고시간 검사장치(ACL 100, Instrumentation Laboratory, USA or CA-50, Sysmex, Japan)를 이용하여 측정하였다. 혈액응고시간 검사용 항응고제는 3.2% sodium citrate 용액을 사용하였다. 측정항목의 약어와 단위 및 측정방법은 Table 1에 나타내었다.

혈액생화학적 검사

후대정맥으로부터 채혈한 혈액을 실온에 약 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리(3000 rpm, 10분간)하여 얻은 혈청에 대하여 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, total cholesterol (TC), total protein (TP), creatine phosphokinase (CPK), albumin, total bilirubin (TB), albumin/globulin (A/G) ratio, triglyceride, inorganic phosphorus (IP) 및 Ca⁺⁺의 함량은 자동생화학분석기(AU400, Olympus, Japan)를 이용하여 측정하였고 Na⁺, K⁺, Cl⁻은 전해질자동분석장치(644, Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer, Ciba-coming, Medfield, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정항목의 약어와 단위 및 측정방법은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Parameters, units and methods of analysis used in hematological and serum chemistry examinations

Parameters (abbreviation)	Units	Methods
White blood cell count (WBC)	10 ³ /μL	Laser optical flowcytometry or electric resistance method*
Red blood cell count (RBC)	10 ⁶ /μL	Laser optical flowcytometry or electric resistance method*
Hemoglobin concentration (HGB)	g/dL	Cyanmethemoglobin method*
Hematocrit	%	Calculated from RBC and MCV
Mean corpuscular volume (MCV)	fL	Histogram or electric resistance method*
Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	pg	Calculated from HGB and RBC
Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	g/dL	Calculated from HGB, RBC and MCV
Red cell distribution width (RDW)	%	Histogram*
Hemoglobin concentration distribution width (HDW)	g/dL	Histogram*
Platelet	10 ³ /μL	Laser optical flowcytometry or electric resistance method*
Mean platelet volume (MPV)	fL	Histogram*
prothrombin time (PT)	sec	Nephelometric analysis [#]
Activated partial thromboplastin time (APTT)	sec	Nephelometric analysis [#]
Neutrophil	%	Peroxidase cytometric flowcytometry or scatter photocoagulation method*
Lymphocyte	%	Peroxidase cytometric flowcytometry or scatter photocoagulation method*
Monocyte	%	Peroxidase cytometric flowcytometry or scatter photocoagulation method*
Eosinophil	%	Peroxidase cytometric flowcytometry or scatter photocoagulation method*
Basophil	%	Peroxidase cytometric flowcytometry or scatter photocoagulation method*
Large unstained cells (LUC)	%	Noise-Lymph Histogram*
Aspartate aminotransferase (AST)	U/L	IFCC method [§]
Alanine aminotransferase (ALT)	U/L	IFCC method [§]
Alkaline phosphatase (ALP)	U/L	P-NPP method [§]
Blood urea nitrogen (BUN)	mg/dL	Urease-UV method [§]
Creatinine	mg/dL	Jaffe method [§]
Glucose	mg/dL	UV method [§]
Total cholesterol (TC)	mg/dL	Enzyme method [§]
Total protein (TP)	g/dL	Biuret method [§]
Creatine phosphokinase (CPK)	U/L	UV-Rate method [§]
Albumin	g/dL	BCG method [§]
Albumin/Globulin (A/G) ratio	ratio	Calculated from PRO, ALB
Total bilirubin (TB)	mg/dL	Evelyn-Malloy method [§]
Triglyceride	mg/dL	Enzyme method [§]
Inorganic phosphorus (IP)	mg/dL	UV method [§]
Calcium ion (Ca ⁺⁺)	mg/dL	O-CPC method [§]
Sodium ion (Na ⁺)	mmol/L	Electrode method [§]
Potassium ion (K ⁺)	mmol/L	Electrode method [§]
Chloride ion (Cl ⁻)	mmol/L	Electrode method [§]

*ADVIA 2120 (Simens, USA) or Cell dyn 3700 (Abbot, USA); & AU400 (Olympus, Japan); [#]CA-50 (Sysmex, Japan) or ACL 100 (Instrumentation Laboratory, Spain); [§]644 Na/K/Cl Analyzer (Simens, USA).

부검 전 체중 및 장기중량 측정

부검 시 동물의 주령은 4주 시험은 10주령, 13주 시험은 19주령이었다. 모든 동물은 16시간 이상 절식시킨 후 부검직전의 체중을 측정하였다. 장기중량 측정은 혈액 검사를 위한 채혈이 끝난 동물에 대하여 후대동맥을 절단하여 방혈 치사 시킨 후 실시하였다. 뇌, 뇌하수체, 갑상샘, 가슴샘, 폐, 심장, 간장, 비장, 신장, 부신, 전립샘,

고환, 부고환, 난소, 자궁을 적출하여 전자저울(BP221S and CP153, Sartorius AG, Germany)로 중량을 측정하였으며(양측성 장기는 양측 장기를 각각 측정), 중량측정 장치에 대하여 부검 시 체중에 대한 상대중량을 산출하였다. 모든 절차는 (주켄은 전임상연구센터의 표준작업수순 (Standard Operating Procedures, SOPs)에 준하여 실시하였다.

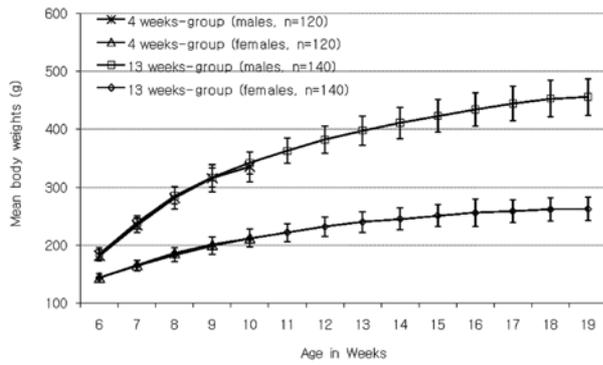


Figure 1. Reference data of mean body weights from 4- and 13-week toxicity studies in male and female Sprague-Dawley rats

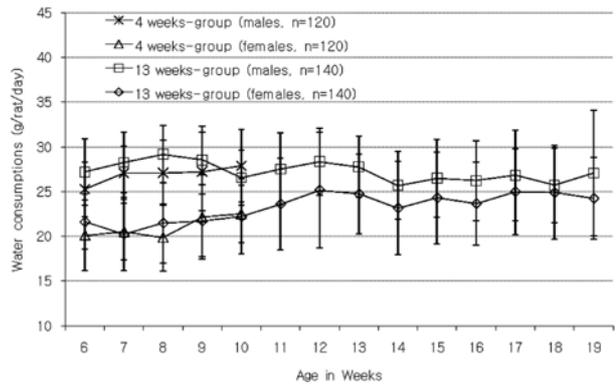


Figure 3. Reference data of water consumption from 4- and 13-week toxicity studies in male and female Sprague-Dawley rats

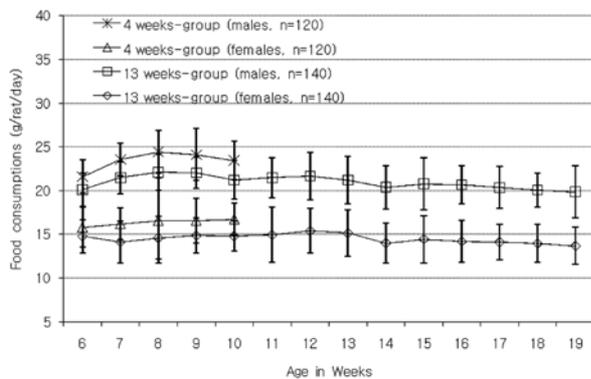


Figure 2. Reference data of food consumption from 4- and 13-week toxicity studies in male and female Sprague-Dawley rats

통계학적 분석

통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 10.1을 이용하였다. 4주 및 13주 반복 경구 투여 독성시험의 혈액학 및 혈액생화학적 검사에 대하여 성별 및 주령간에 각각 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였고, 체중, 사료 및 물 소비량, 장기중량에 대해서는 별도의 통계처리를 하지 않고 경향파악만 실시하였다. 요검사 결과에 대해서는 척도변환을 실시한 후, Wilcoxon-Mann-Whitney rank-sum test를 적용하여 유의성을 확인하였다. 모든 시험결과는 99% 신뢰구간($\alpha=0.01$)에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중

체중변화는 Figure 1에 나타내었다. 4주간의 동일 성간의 체중변화를 관찰한 결과, 암수 모두에서 특기할만한 차이는 확인되지 않았다.

사료 소비량

사료 소비량은 Figure 2에 나타내었다. 4주간의 동일 성

간의 사료 소비량 변화를 관찰한 결과, 마리당 1일 평균 사료 소비량이 4주 시험의 암수 모두 13주 시험에 비하여 평균 약 2 g 높게 관찰되었다($P<0.01$). 13주 시험의 마리당 1일 평균 사료 소비량은 시험 전 기간 동안 수컷은 19.86-22.09 g, 암컷은 13.67-15.41 g을 나타내었다.

물 소비량

물 소비량은 Figure 3에 나타내었다. 4주간의 동일 성간의 물 소비량 변화를 관찰한 결과, 암수 모두에서 특기할 만한 차이는 관찰되지 않았다. 13주 시험의 마리당 1 일 평균 물 소비량은 시험 전 기간 동안 수컷은 25.68-29.18 g, 암컷은 20.27-25.17 g을 나타내었다.

요검사

요검사 결과는 Table 2에 나타내었다. 4주 및 13주 시험의 동일 주령 암수간의 요검사 결과, 4주 시험에서는 케톤체, 단백질, 백혈구, 13주 시험에서는 케톤체, 단백질, 백혈구, 잠혈, pH가 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($P<0.01$). 4주 및 13주 시험의 동일 성간의 요검사 비교 결과, 수컷에서는 요비중, 잠혈 및 pH, 암컷에서는 케톤체와 요비중이 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($P<0.01$).

혈액학적 검사

혈액학적 검사 결과는 Table 3에 나타내었다. 4주 및 13주 시험의 동일 주령 암수간의 혈액학적 검사 결과, 4주 시험에서는 RBC, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCHC, WBC 및 eosinophil, 13주 시험에서는 RBC, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, RDW, HDW, WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, platelet 및 APTT가 암수간에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($P<0.01$).

4주 및 13주 시험의 동일 성간의 혈액학적 검사 결과, 수컷에서는 RBC, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH,

Table 2. Reference data of urinalysis from 4- and 13-week toxicity studies in male and female Sprague-Dawley rats

Parameters	Result	Grade	4 weeks-group		13 weeks-group	
			Males	Females	Males	Females
Glucose (mg/dL)	Negative	0	56	60	58	63
	100 (Trace)	1	4	0	7	2
Bilirubin	Negative	0	55	59	64	65
	Small	1	5	1	1	0
Ketone body (mg/dL)	Negative	0	29	47	43	65
	5 (Trace)	1	23	12	17	0
	15	2	7	1	5	0
	40	3	1	0*	0	0 ^{#s}
Specific gravity	≤1.005	0	0	3	6	15
	1.0100	1	6	3	9	11
	1.0150	2	2	9	18	12
	1.0200	3	10	8	15	18
	1.0250	4	12	15	11	8
	≥1.030	5	30	22	6*	1 ^s
pH	5.5	0	0	2	0	0
	6.0	1	0	8	0	0
	6.5	2	2	4	0	1
	7.0	3	9	3	0	7
	7.5	4	11	13	5	13
	8.0	5	26	20	43	33
	8.5	6	12	9	15	11
	≥9.0	7	0	1	2*	0 [#]
Protein (mg/dL)	Negative	0	3	26	0	37
	15 (Trace)	1	4	5	2	8
	30	2	10	10	7	9
	100	3	25	7	34	9
	≥300	4	18	12*	22	2 [#]
Urobilinogen (Ehrlich unit/dL)	0.1	0	60	60	65	65
Nitrite	Negative	0	58	60	65	65
	Positive	1	2	0	0	0
Occult blood	Negative	0	53	54	29	60
	Trace	1	2	4	14	3
	Small	2	5	1	21	1
	Moderate	3	0	0	1	0
	Large	4	0	1	0*	1 [#]
Leukocyte	Negative	0	9	41	3	33
	Trace	1	5	14	3	18
	Small	2	22	4	26	10
	Moderate	3	22	1	29	4
	Large	4	2	0*	4	0 [#]
Number of animals			60	65	60	65

*: $P < 0.01$, vs. 4 weeks male group; ^s: $P < 0.01$, vs. 4 weeks female group; [#]: $P < 0.01$, vs. 13 weeks male group.

WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, platelet, PT 및 APTT, 암컷에서는 WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, platelet, PT 및 APTT가 동일 성간에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($P < 0.01$).

혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사 결과는 Table 4에 나타내었다. 4주 및 13주 시험의 동일 주령 암수간의 혈액생화학적 검사 결과, 4주 시험에서는 ALT, ALP, TB, TP, A/G ratio, glucose, TC, triglyceride, BUN, IP, Ca⁺⁺, Na⁺, K⁺ 및

Table 3. Reference data of hematology from 4- and 13 week toxicity studies in male and female Sprague-Dawley rats

Parameters	4 weeks-group			13 weeks-group		
	N	Mean±SD	Range	N	Mean±SD	Range
Males						
RBC (10 ⁶ /μL)	105	7.97±0.43	6.7-9.0	129	8.79±0.39*	7.8-9.9
Hemoglobin (g/dL)	105	15.29±0.82	13.6-17.7	129	15.69±0.65*	13.9-17.3
Hematocrit (%)	105	44.95±3.44	37.9-52.2	129	46.19±3.53*	38.9-55.2
MCV (fL)	105	56.34±2.58	51.8-63.6	129	52.51±2.99*	46.5-60.0
MCH (pg)	105	19.18±0.59	17.9-20.9	129	17.85±0.64*	16.3-20.2
MCHC (g/dL)	105	34.09±1.39	30.6-36.8	129	34.10±2.15	29.4-38.3
RDW (%)	70	11.90±2.29	9.7-16.5	79	12.07±0.35	11.4-13.0
HDW (g/dL)	50	2.32±0.13	2.0-2.6	79	2.35±0.18	1.8-2.8
WBC (10 ³ /μL)	105	10.35±2.45	4.9-16.3	129	9.19±2.35*	4.8-20.1
Neutrophil (%)	105	11.48±3.71	4.7-23.3	129	21.85±8.60*	8.1-44.6
Lymphocyte (%)	105	82.69±4.42	71.1-89.4	129	71.57±8.97*	44.8-86.5
Monocyte (%)	105	2.94±1.29	0.2-8.0	129	3.49±1.46*	0.21-10.0
Eosinophil (%)	105	0.82±0.35	0.2-2.2	129	1.33±0.50*	0.30-3.25
Basophil (%)	105	1.59±1.40	0.1-5.1	129	1.16±1.32	0.0-5.0
LUC (%)	50	1.01±0.33	0.5-1.9	79	0.96±0.44	0.3-2.3
Platelet (10 ³ /μL)	105	1050.77±179.18	784-1500	129	971.45±126.77*	735-1418
MPV (fL)	70	6.12±0.98	5.2-12.2	70	6.28±0.86	5.0-8.5
PT (sec)	30	10.75±3.04	7.6-15.5	128	13.38±3.63*	8.1-18.3
APTT (sec)	30	16.52±2.20	7.9-20.1	128	18.19±1.27*	15.2-20.9
Females						
RBC (10 ⁶ /μL)	104	7.72±0.45*	6.7-9.8	129	7.79±0.43 [#]	6.69-8.92
Hemoglobin (g/ dL)	104	14.66±0.83*	12.5-17.8	129	14.59±0.65 [#]	13.1-17.0
Hematocrit (%)	104	42.50±2.91*	35.5-54.4	129	42.60±3.26 [#]	36.9-51.8
MCV (fL)	104	55.06±2.34*	51.4-63.1	129	54.66±3.06 [#]	48.4-63.8
MCH (pg)	104	19.01±0.72	17.3-21.3	129	18.76±0.82 [#]	16.7-21.8
MCHC (g/dL)	104	34.58±1.22*	30.7-37.1	129	34.38±2.09	30.1-39.7
RDW (%)	70	11.30±2.05	9.4-15.2	79	10.98±0.43 [#]	10.0-12.2
HDW (g/dL)	50	2.26±0.16	1.8-2.6	79	2.25±0.20 [#]	1.8-2.7
WBC (10 ³ /μL)	104	6.47±1.93*	3.0-12.0	129	5.55±1.78 ^{#s}	3.0-14.3
Neutrophil (%)	104	12.11±5.96	4.9-54.1	129	14.62±6.69 ^{#s}	4.9-58.1
Lymphocyte (%)	104	81.94±6.74	33.3-91.5	129	79.02±6.85 ^{#s}	37.6-89.7
Monocyte (%)	104	2.84±1.29	0.1-7.5	129	2.94±1.03 ^{#s}	0.8-6.1
Eosinophil (%)	104	1.20±0.49*	0.5-3.5	129	1.83±1.14 ^{#s}	0.3-10.0
Basophil (%)	104	1.50±1.44	0.0-5.2	129	0.99±1.13 ^s	0.0-3.5
LUC (%)	50	0.92±0.34	0.4-1.8	79	0.96±0.49	0.4-2.5
Platelet (10 ³ /μL)	104	1088.21±137.58	815-1397	129	1015.43±140.67 ^{#s}	674-1373
MPV (fL)	70	6.13±1.01	5.1-8.1	70	6.52±1.13	5.2-10.2
PT (sec)	29	10.95±3.79	7.3-17.0	128	13.49±4.12 ^s	7.7-19.5
APTT (sec)	29	15.51±2.32	10.5-19.5	128	17.18±1.51 ^{#s}	13.8-21.0

WBC: white blood cell count, RBC: red blood cell count, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration. RDW: Red cell distribution width, HDW: Hemoglobin concentration distribution width, LUC: large unstained cells, PT: prothrombin time, APTT: Activated partial thromboplastin time.

*: $P < 0.01$, vs. 4 weeks male group; ^s: $P < 0.01$, vs. 4 weeks female group; [#]: $P < 0.01$, vs. 13 weeks male group.

Cl⁻, 13주 시험에서는 ALT, ALP, TB, TP, A/G ratio, glucose, triglyceride, BUN, creatinine, IP, K⁺ 및 Cl⁻이 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($P < 0.01$).

4주 및 13주 시험의 동일 성간의 혈액생화학적 검사 결과, 수컷에서는 ALT, ALP, TP, albumin, A/G ratio, TC, creatine, IP 및 K⁺, 암컷에서는 ALT, ALP, TP, A/G ratio,

TC, triglyceride, BUN, creatinine, IP, Na⁺, K⁺ 및 Cl⁻이 동일 성간에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.01$).

장기중량

장기의 절대 및 상대중량에 대한 결과는 Table 5(수컷)

Table 4. Reference data of blood biochemistry from 4- and 13 week toxicity studies in male and female Sprague-Dawley rats

Parameters	4 weeks-group			13 weeks-group		
	N	Mean±SD	Range	N	Mean±SD	Range
Males						
AST (IU/L)	105	98.25±25.95	63.9-228.8	129	101.09±22.10	64.1-168.1
ALT (IU/L)	105	39.81±9.33	26.5-101.4	129	45.50±9.19*	30.8-73.4
ALP (IU/L)	105	149.27±30.47	91.0-250.1	129	91.64±19.92*	58.4-180.4
TB (mg/dL)	70	0.18±0.03	0.14-0.28	129	0.20±0.03	0.07-0.29
Glucose (mg/dL)	105	127.94±17.92	86.9-209.2	129	131.02±15.56	95.4-188.4
TC (mg/dL)	105	95.55±17.15	44.0-139.0	129	108.65±18.72*	72.0-206.0
Triglyceride (mg/dL)	105	47.40±13.56	11.3-85.0	129	50.20±14.71	23.0-110.6
TP (g/dL)	70	6.00±0.24	5.22-6.71	129	6.50±0.52*	5.68-9.25
Albumin (g/dL)	105	3.25±0.23	2.69-3.86	129	3.15±0.21*	2.83-4.05
A/G ratio	105	1.19±0.18	0.93-1.72	129	0.95±0.07*	0.73-1.15
CPK (IU/L)	50	280.93±164.38	88.0-909.2	129	238.28±131.30	48.0-715.3
BUN (mg/dL)	105	17.35±2.51	11.8-25.4	129	16.97±2.78	12.1-26.1
Creatinine (mg/dL)	105	0.49±0.04	0.36-0.60	129	0.55±0.07*	0.25-0.83
IP (mg/dL)	105	8.78±0.70	7.5-10.8	129	7.36±1.09*	5.6-10.3
Ca ⁺⁺ (mg/dL)	105	10.05±0.45	9.0-11.3	129	9.85±1.26	5.8-14.2
Na ⁺ (mmol/L)	94	144.24±1.57	141.0-149.0	129	144.19±3.56	129.0-155.0
K ⁺ (mmol/L)	94	4.70±0.36	3.81-6.48	129	4.51±0.38*	3.96-7.87
Cl ⁻ (mmol/L)	94	107.51±1.44	103.0-110.0	129	107.57±2.59	97.0-116.0
Females						
AST (IU/L)	105	96.19±17.98	67.3-166.0	129	100.02±20.65	67.5-179.9
ALT (IU/L)	105	31.57±4.94*	19.2-48.7	129	33.43±5.13 ^{#s}	22.4-47.1
ALP (IU/L)	105	103.43±26.47*	59.0-196.0	129	63.81±17.71 ^{#s}	30.1-116.0
TB (mg/dL)	70	0.21±0.07*	0.12-0.84	129	0.22±0.04 [#]	0.15-0.35
Glucose (mg/dL)	105	110.25±11.26*	84.3-142.4	129	110.42±12.24 [#]	80.5-149.4
TC (mg/dL)	105	87.19±16.76*	32.2-126.0	129	102.82±20.84 ^s	51.0-155.0
Triglyceride (mg/dL)	105	33.36±11.36*	4.9-63.0	129	37.95±7.92 ^{#s}	20.2-58.0
TP (g/dL)	70	5.83±0.30*	4.97-7.30	129	6.20±0.33 ^{#s}	5.35-7.06
Albumin (g/dL)	105	3.28±0.28	2.69-4.27	129	3.21±0.18	2.73-3.68
A/G ratio	105	1.31±0.24*	0.96-1.97	129	1.08±0.08 ^{#s}	0.92-1.32
CPK (IU/L)	50	259.48±156.59	49.0-782.0	129	264.90±185.99	44.0-1316.6
BUN (mg/dL)	105	18.99±3.08*	11.7-28.4	129	17.99±2.59 ^{#s}	11.7-26.4
Creatinine (mg/dL)	105	0.51±0.07	0.29-0.63	129	0.61±0.07 ^{#s}	0.35-0.79
IP (mg/dL)	105	7.95±0.78*	6.2-10.0	129	6.67±1.27 ^{#s}	4.1-10.4
Ca ⁺⁺ (mg/dL)	105	9.68±0.51*	7.8-11.1	129	9.52±1.00	4.6-11.0
Na ⁺ (mmol/L)	95	143.26±1.83*	139.0-148.0	128	144.08±2.66 ^s	134.0-154.0
K ⁺ (mmol/L)	95	4.53±0.31*	3.97-5.70	128	4.27±0.46 ^{#s}	3.59-7.89
Cl ⁻ (mmol/L)	95	108.29±1.85*	104.0-113.0	128	109.09±2.39 ^{#s}	101.0-116.0

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, TB: total bilirubin, TP: total protein, A/G: albumin/globulin, CPK: creatine phosphokinase, TC: total cholesterol, BUN: blood urea nitrogen, IP: inorganic phosphorus.

*: $P < 0.01$, vs. 4 weeks male group; ^s: $P < 0.01$, vs. 4 weeks female group; [#]: $P < 0.01$, vs. 13 weeks male group.

및 Table 6(암컷)에 나타내었다. 4주 및 13주 시험의 동일 주령 암수간의 장기중량 비교 결과, 4주 시험의 경우, 뇌, 가슴샘, 심장, 폐, 비장, 간장 및 부신의 절대 및 상대중량, 신장의 절대중량과 뇌하수체의 상대중량, 13주 시험의 경우, 뇌, 뇌하수체, 갑상샘, 가슴샘, 심장, 폐, 비장, 간장 및 부신의 절대 및 상대중량과 신장의 절대중량이 암수간에 차이를 나타내었다.

4주 및 13주 시험의 동일 성간의 장기중량 비교 결과, 수컷은 뇌, 가슴샘, 심장, 폐, 비장, 간장, 신장, 부신, 고

환 및 부고환의 절대 및 상대중량과 전립샘의 절대중량, 암컷은 뇌, 뇌하수체, 가슴샘, 심장, 폐, 비장, 간장, 신장 및 부신의 절대 및 상대중량, 자궁의 절대중량과 난소의 상대중량이 동일 성간에 차이를 나타내었다.

고 찰

본 시험은 일반독성시험에서 자주 수행되고 있는 4주 및 13주 반복 경구투여 독성시험에서 멸균주사용수만을

Table 5. Reference data of absolute and relative organ weights from 4- and 13 week toxicity studies in male Sprague-Dawley rats

Organs	Males					
	4 weeks-group			13 weeks-group		
	N	Mean±SD	Range	N	Mean±SD	Range
Body weights (g) ^{a)}	105	312.21±23.74	267.13-399.36	129	435.09±30.59	326.71-508.72
Brain (g)	75	1.8405±0.0854	1.6717-2.0621	129	1.9855±0.1440	1.7500-3.3610
(%)	75	0.5854±0.0393	0.5118-0.6829	129	0.4582±0.0443	0.3979-0.8360
Pituitary gland (g)	70	0.0119±0.0117	0.0082-0.1080	129	0.0122±0.0017	0.0084-0.0212
(%)	70	0.0038±0.0038	0.0021-0.0345	129	0.0028±0.0004	0.0018-0.0049
Thyroid gland-left+right (g)	40	0.0164±0.0032	0.0092-0.0224	50	0.0191±0.0066	0.0121-0.0497
(%)	40	0.0052±0.0009	0.0034-0.0074	50	0.0045±0.0015	0.0028-0.0083
Thyroid gland-left (g)	40	0.0081±0.0020	0.0051-0.0131	50	0.0098±0.0059	0.0050-0.0379
(%)	40	0.0026±0.0006	0.0018-0.0042	50	0.0023±0.0013	0.0012-0.0083
Thyroid gland-right (g)	40	0.0083±0.0020	0.0035-0.0128	50	0.0093±0.0019	0.0061-0.0149
(%)	40	0.0026±0.0005	0.0013-0.0041	50	0.0022±0.0005	0.0014-0.0034
Heart (g)	105	1.1035±0.1144	0.9046-1.8449	129	1.3930±0.1128	1.0750-1.6520
(%)	105	0.3537±0.0278	0.2976-0.5414	129	0.3206±0.0210	0.2739-0.3729
Lung (g)	105	1.4373±0.1210	1.1755-1.7220	129	1.7809±0.1970	1.4345-3.1306
(%)	105	0.4614±0.0352	0.3701-0.5612	129	0.4099±0.0401	0.3341-0.6859
Thymus (g)	105	0.4884±0.0961	0.3430-1.0030	129	0.2908±0.0582	0.0330-0.4990
(%)	105	0.1564±0.0265	0.1021-0.2512	129	0.0670±0.0137	0.0088-0.1110
Spleen (g)	105	0.7227±0.0906	0.4866-1.0124	129	0.8068±0.1238	0.5252-1.4780
(%)	105	0.2317±0.0249	0.1822-0.3250	129	0.1856±0.0271	0.1239-0.3536
Liver (g)	105	9.2262±0.9352	7.1168-12.2383	129	10.8939±1.0637	8.1270-13.433
(%)	105	2.9542±0.1853	2.5341-3.4428	129	2.5025±0.1520	2.1591-2.9796
Kidney-left+right (g)	105	2.1533±0.2037	1.6745-2.6934	129	2.5850±0.2403	1.9486-3.1480
(%)	105	0.6899±0.0441	0.6137-0.8163	129	0.5946±0.0429	0.4971-0.7199
Kidney-left (g)	105	1.0696±0.1025	0.8109-1.3637	129	1.2844±0.1189	0.9572-1.5370
(%)	105	0.3427±0.0223	0.3036-0.4035	129	0.2955±0.0220	0.2464-0.3553
Kidney-right (g)	105	1.0837±0.1065	0.8476-1.3865	129	1.3006±0.1289	0.9590-1.6320
(%)	105	0.3472±0.0242	0.3001-0.4128	129	0.2991±0.0231	0.2102-0.3646
Adrenal gland-left+right (g)	105	0.0501±0.0063	0.0296-0.0703	129	0.0534±0.0074	0.0383-0.0825
(%)	105	0.0161±0.0020	0.0107-0.0223	129	0.0123±0.0017	0.0094-0.0186
Adrenal gland-left (g)	105	0.0255±0.0033	0.0174-0.0360	129	0.0271±0.0040	0.0183-0.0400
(%)	105	0.0082±0.0011	0.0060-0.0114	129	0.0063±0.0009	0.0041-0.0090
Adrenal gland-right (g)	105	0.0246±0.0034	0.0218-0.0255	129	0.0262±0.0039	0.0187-0.0425
(%)	105	0.0079±0.0011	0.0044-0.0109	129	0.0060±0.0009	0.0045-0.0096
Testis-left+right (g)	55	3.6020±0.2814	2.7044-4.2000	129	4.0187±0.2417	3.5420-4.6611
(%)	55	1.1596±0.1198	0.7640-1.3940	129	0.9266±0.0666	0.7710-1.1236
Testis-left (g)	55	1.8053±0.1509	1.0359-2.1050	129	2.0051±0.1173	1.7740-2.3020
(%)	55	0.5814±0.0641	0.3200-0.7025	129	0.4624±0.0328	0.3871-0.5669
Testis-right (g)	55	1.7966±0.1600	0.8609-2.1010	129	2.0136±0.1316	1.7440-2.3652
(%)	55	0.5782±0.0637	0.3009-0.6915	129	0.4643±0.0352	0.3809-0.5678
Epididymis-left+right (g)	54	0.9270±0.0556	0.7855-1.0796	109	1.3653±0.0998	1.1470-1.8270
(%)	54	0.2987±0.0252	0.2428-0.3587	109	0.3136±0.0263	0.2628-0.4154
Epididymis-left (g)	54	0.4613±0.0312	0.3825-0.5567	109	0.6790±0.0509	0.5767-0.9000
(%)	54	0.1487±0.0140	0.1182-0.1850	109	0.1559±0.0135	0.1300-0.2046
Epididymis-right (g)	55	0.4665±0.0303	0.3990-0.5401	109	0.6863±0.0574	0.5530-0.9270
(%)	55	0.1503±0.0126	0.1211-0.1745	109	0.1576±0.0145	0.1276-0.2108
Prostate (g)	95	0.4094±0.0959	0.1946-0.6760	129	0.5704±0.1438	0.1380-0.9310
(%)	95	0.1313±0.0316	0.0639-0.2131	129	0.1312±0.0320	0.0285-0.2087

a)The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

Table 6. Reference data of absolute and relative organ weights from 4- and 13 week toxicity studies in female Sprague-Dawley rats

Organs	Females					
	4 weeks-group			13 weeks-group		
	N	Mean±SD	Range	N	Mean±SD	Range
Body weights (g) ^{a)}	105	198.33±17.06	155.16-246.76	130	249.12±19.92	199.47-330.00
Brain (g)	75	1.6986±0.0915	1.3810-1.9511	130	1.7976±0.0804	1.4667-2.1750
(%)	75	0.8553±0.0661	0.7077-1.0348	130	0.7254±0.0576	0.5433-0.8858
Pituitary gland (g)	70	0.0117±0.0019	0.0077-0.0167	130	0.0132±0.0021	0.0092-0.0291
(%)	70	0.0059±0.0009	0.0042-0.0082	130	0.0053±0.0007	0.0037-0.0100
Thyroid gland-left+right (g)	40	0.0146±0.0037	0.0086-0.0261	50	0.0156±0.0024	0.0101-0.0242
(%)	40	0.0073±0.0022	0.0045-0.0155	50	0.0063±0.0011	0.0045-0.0102
Thyroid gland-left (g)	40	0.0072±0.0020	0.0038-0.0127	50	0.0078±0.0015	0.0041-0.0122
(%)	40	0.0036±0.0012	0.0020-0.0073	50	0.0032±0.0007	0.0018-0.0051
Thyroid gland-right (g)	40	0.0074±0.0021	0.0044-0.0138	50	0.0078±0.0016	0.0038-0.0120
(%)	40	0.0037±0.0011	0.0021-0.0082	50	0.0032±0.0006	0.0015-0.0051
Heart (g)	105	0.7762±0.0831	0.6176-1.1928	130	0.8823±0.0732	0.7267-1.1060
(%)	105	0.3919±0.0314	0.3310-0.5352	130	0.3550±0.0257	0.2747-0.4444
Lung (g)	105	1.1598±0.1130	0.8950-1.7510	130	1.3569±0.1121	1.1050-1.6790
(%)	105	0.5866±0.0520	0.4514-0.7679	130	0.5459±0.0390	0.4587-0.6645
Thymus (g)	105	0.3362±0.0718	0.1870-0.6166	130	0.2277±0.1187	0.1330-1.4640
(%)	105	0.1691±0.0296	0.0932-0.2569	130	0.0915±0.0467	0.0530-0.5810
Spleen (g)	105	0.5453±0.0798	0.3912-0.8468	130	0.5871±0.0755	0.3990-0.8500
(%)	105	0.2750±0.0318	0.1971-0.3799	130	0.2357±0.0243	0.1797-0.3049
Liver (g)	105	5.5126±0.6933	4.1260-7.6414	130	5.9782±0.6327	4.6418-7.6460
(%)	105	2.7742±0.1762	2.4255-3.4580	130	2.4016±0.1924	2.0235-3.0236
Kidney-left+right (g)	105	1.3841±0.1490	1.1390-1.9965	130	1.4808±0.1226	1.1870-1.8560
(%)	105	0.6983±0.0467	0.5854-0.8488	130	0.5953±0.0357	0.4919-0.6853
Kidney-left (g)	105	0.6844±0.0726	0.5610-0.9770	130	0.7396±0.0694	0.5900-1.0760
(%)	105	0.3453±0.0234	0.2844-0.4096	130	0.2972±0.0202	0.2335-0.3493
Kidney-right (g)	105	0.6997±0.0802	0.5700-1.0195	130	0.7413±0.0618	0.5880-0.9040
(%)	105	0.3530±0.0263	0.2991-0.4392	130	0.2981±0.0197	0.2532-0.3446
Adrenal gland-left+right (g)	105	0.0623±0.0068	0.0490-0.0866	130	0.0600±0.0077	0.0418-0.0881
(%)	105	0.0316±0.0036	0.0117-0.0216	130	0.0241±0.0028	0.0165-0.0308
Adrenal gland-left (g)	105	0.0316±0.0037	0.0230-0.0465	130	0.0309±0.0048	0.0202-0.0511
(%)	105	0.0160±0.0019	0.0117-0.0216	130	0.0124±0.0017	0.0080-0.0176
Adrenal gland-right (g)	105	0.0307±0.0035	0.0232-0.0401	130	0.0291±0.0036	0.0208-0.0372
(%)	105	0.0155±0.0018	0.0107-0.0204	130	0.0117±0.0014	0.0085-0.0146
Ovary-left+right (g)	105	0.0895±0.0147	0.0578-0.1278	130	0.0888±0.0172	0.0526-0.1511
(%)	105	0.0452±0.0068	0.0305-0.0655	130	0.0356±0.0061	0.0208-0.0556
Ovary-left (g)	105	0.0451±0.0090	0.0262-0.0693	130	0.0443±0.0099	0.0214-0.0725
(%)	105	0.0228±0.0044	0.0139-0.0335	130	0.0178±0.0036	0.0080-0.0305
Ovary-right (g)	105	0.0444±0.0078	0.0284-0.0661	130	0.0444±0.0095	0.0259-0.0820
(%)	105	0.0224±0.0035	0.0143-0.0320	130	0.0178±0.0035	0.0102-0.0266
Uterus (g)	80	0.5025±0.2344	0.2140-1.4945	90	0.6348±0.3087	0.3250-1.6083
(%)	80	0.2524±0.1166	0.1135-0.7970	90	0.2573±0.1308	0.1226-0.6888

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

경구투여한 매체대조군의 기초자료를 종합하였다.

4주 및 13주 시험에서 4주 시험기간(생 후 6-10주령)의 체중 및 물 소비량을 측정된 결과, 동일 성간에 큰 차이를 보이지 않았으나 사료 소비량에서는 4주 시험의 암수에서 13주 시험에 비하여 1일 평균 사료 소비량이 약 2 g 높게 나타났다. 이는 본 시험에서 4주 시험에서는 스테인레스제 망 사육상자를 사용하였고, 13주 시험

에서는 적량의 깔짚을 담은 폴리카보네이트 사육상자를 사용함에 따른 사육조건의 차이에 기인한 것으로 스테인레스제 망 사육상자의 경우, 랫드가 사료를 섭취하는 과정에 흘린 사료가 바닥 밑으로 떨어져 다시 먹을 수 없는 반면, 폴리카보네이트 사육상자는 바닥위에 흘린 사료를 다시 먹을 수 있으므로 인하여 발생하는 사료 손실량의 차이, 또는 스테인레스제 망 사육상자의 경우, 깔짚이

담겨져 있는 폴리카보네이트 사육상자에 비하여 상대적으로 보온성이 떨어져 발생하는 에너지 대사의 차이로 인하여 발생하는 사료 소비량의 차이 등이 종합적으로 작용하였을 것으로 사료되었으며, 체중변화에서 4주 및 13주 시험간에 큰 차이가 없는 것으로 미루어 볼 때 사육상자의 차이가 시험결과에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 판단하였다. 한편, Sauer 등(2006)은 스테인레스제 망 사육상자와 폴리카보네이트 사육상자에 랫드를 4주간 사육한 후의 체중, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사 및 간에서의 cytochrome P450 효소를 측정할 결과, 사육상자에 의한 차이는 없는 것으로 보고하였다.

노의 생화학적 검사 결과, 요단백, 백혈구 및 케톤체가 4주 및 13주 시험의 수컷에서 암컷에 비하여 높게 검출되어 동일 주령의 성별간에 차이를 나타내었고, pH는 4주 시험의 암수에서 13주 시험에 비하여 낮은 반면, 요비중은 높게 나타나 주령간에 차이를 나타내어 타 연구기관의 기초자료와 대체적으로 유사한 결과를 보였다(Song et al., 1990 and 1992). 본 시험에서 요단백의 경우, 매 체대조군임에도 불구하고 30 mg/dL 이상이 4주 및 13주 시험의 암컷에서 각각 48.3% 및 30.8%, 수컷에서 각각 88.3% 및 96.9% 검출되어 암수 모두 비교적 높은 비율을 나타내었으며, 수컷에서 암컷에 비하여 더 높게 나타났다. 요단백은 일반적으로 동물에서 신장 장애와는 무관하게 정상적인 생리적 상태에서도 미량으로 검출되며, 랫드나 개에서 그 경향이 더 강한 것으로 알려져 있다. 랫드에서 자연발생적인 신장질환으로 높은 생리적 수준의 단백뇨가 발생하며, 수컷이 암컷에 비하여 그 영향을 더 크게 받는 것으로 다수의 논문들에서 보고되어 있다(Snell, 1967; Bolton et al., 1976; Alt et al., 1980; Verhagen et al., 2000; Kohn and Clifford, 2002; Baylis, 2005; Loria et al., 2007). 특히, 격렬한 운동이나 스트레스에 의해서도 단백뇨가 관찰되는 경우(Tanimoto, 1988)가 있으므로 병적인 단백뇨와의 감별에 주의하여야 한다. 기타 요당, 빌리루빈, 유로빌리노겐, 아질산염은 4주 및 13주 시험의 암수 모두에서 대부분이 음성(negative) 또는 미량(trace)으로 검출되어 성별 또는 주령에 따른 영향을 크게 받지 않는 것으로 나타났다.

독성시험에서 혈액학 및 혈액생화학 검사는 실험동물을 이용한 시험물질의 안전성평가에 있어 매우 중요한 기초자료로 이용되고 있으며, 개체의 환경적(종, 계통, 성별, 연령, 사료, 사육환경, 생활리듬, 동물취급 등) 혹은 유전적 특징에 따라 많은 변화를 나타낸다(Roe, 1993; Matsuzawa et al., 1995; Sharp et al., 2003; Gonder and Laber, 2007). 따라서 측정된 결과가 정상범위의 수치인지를 판정하기 위하여 정상동물의 검사결과를 가능한 많이 확보할 필요가 있다. 본 시험의 경우, 혈액 및 혈액생화학적 검사 결과, 4주 및 13주 시험의 성별 또는

주령간에 통계학적으로 유의한 변화들이 관찰되었다. 보다 어린 동물은 성숙된 동물에 비하여 미성숙한 장기 또는 조직구조를 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Williams and Weirburger, 1991). 본 시험에서 관찰된 성별 및 주령간의 RBC관련 지표(hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH 등)들의 차이는 연령 및 성별에 따른 산소 요구량과 관련이 있는 것으로 사료되었다(Seki et al., 1981; Petterino and Argentino-Storino, 2006). 또한, WBC 및 lymphocyte는 13주 시험에서 4주 시험에 비하여 통계학적으로 유의한 감소를, neutrophil, monocyte 및 eosinophil은 증가를 나타내었는데 이러한 동물의 연령과 관련되는 WBC 관련 수치들의 변화는 실험동물의 주령에 따른 면역감시시스템 및 면역기능의 발달과 관련이 큰 것으로 사료되었다(Petterino and Argentino-Storino, 2006). 한편, Kang 등(1995)의 연구결과에서는 WBC가 13주 시험의 매 체대조군에서 4주 시험에 비하여 수컷에서는 낮은 수치를, 암컷에서는 높은 수치를 나타내어 암수간에 차이를 보였다. WBC관련 수치들은 동물 중, 성별 및 연령에 따라 차이를 나타내고, 같은 동물이라도 채혈 시간 및 채혈 위치에 따라 다른 변화를 보이며, 분석기기의 종류에 따라서도 서로 다르게 측정될 수 있는 것으로 알려져 있다(Bounous et al., 1995; Lipman and Perkins, 2002).

PLT는 혈액응고에 의해 그 수가 급격히 떨어지고 측정기기에 의한 변화도 나타나므로 PLT 측정은 PT 및 APTT와 연결되어 검토되어야 한다고 생각된다(Dodds, 1980; Weingand et al., 1992). 본 시험에서는 13주 시험의 암수 모두에서 4주 시험에 비하여 PLT는 감소를, PT 및 APTT는 증가를 나타내어 주령에 따른 변화를 보였다. Wolford 등(1987)도 랫드에서 PLT는 동일 성별간에는 비슷한 수치를 보였으나 주령의 증가에 따라 암컷이 수컷에 비하여 낮은 경향을 보이는 것으로 보고하였다.

혈액생화학적 검사 결과, 주로 뼈의 성장과 밀접한 관련이 있는 ALP의 수치가 성별 및 주령에 따라 큰 차이를 나타내었는데, 암수 모두에서 13주 시험의 랫드에서 4주 시험에 비하여 크게 감소하였고, 동일 주령의 랫드에서는 암컷에서 수컷에 비하여 보다 낮은 수치를 나타내어 다른 저자들의 보고와 일치한 결과를 나타내었다(Wolford et al., 1986; Loeb and Carakostas, 1992; Alemán et al., 1998).

본 시험에서 IP 수치 또한 암수 모두 13주 시험의 랫드에서 4주 시험에 비하여 감소하였고, 동일 주령의 랫드에서는 암컷에서 수컷에 비하여 보다 낮은 수치를 나타내어 동물의 성별 및 주령과 관련이 있는 것으로 확인되었다.

간장과 관련되는 효소의 활성은 동물의 연령, 성별, 사료 또는 깔짚 등 기타 환경인자의 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Uchida et al., 1990; Braun et al., 1993; Loeb et al., 1996; Kaneko, 1997; Gonder and Laber,

2007). 본 시험에서는 ALT, TP, TC, triglyceride는 13주 시험에서 4주 시험에 비하여 높은 수치를, albumin 및 A/G ratio는 낮은 수치를 나타내어 연령에 따른 변화를 보였다. Petterino와 Argentino-Storino(2006)의 SD 랫드를 이용한 4주와 13주 반복 독성시험에서의 매체대조군의 혈액생화학적 검사 결과에서는 AST, ALT, TP가 13주 시험에서 4주 시험에 비하여 높은 수치를, albumin, A/G ratio 및 triglyceride는 낮은 수치를, TC는 비슷한 수치를 나타내어 AST, triglyceride, TC를 제외한 기타 측정항목에서 본 시험의 결과와 대체적으로 비슷한 경향을 나타내었다. 한편, 국내 다른 연구기관(Kang et al., 1995)의 시험결과에서는 AST, glucose, TC, TP, triglyceride, albumin이 13주 시험에서 4주 시험에 비하여 높은 수치를 나타내어 glucose, albumin 및 A/G ratio가 본 시험과 상이한 결과를 나타내었는데 이와 같은 결과는 실험동물의 환경적, 유전적 배경의 차이에 기인했을 것으로 사료되었다.

실험동물의 신장기능의 평가를 위하여 가장 광범위하게 사용되고 있는 항목은 혈 중 BUN과 creatinine의 수준이다. 특히, 혈 중 creatinine은 신외적요인에 의한 영향을 적게 받기에 일반적으로 nephropathy을 보이는 질환에서 요소질소에 비하여 보다 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Bauk and Stefkovic, 1986; Ragan and Weller, 1999). 실제로 마우스와 랫드를 이용한 여러 시험에서 연령과 관련되는 변화들이 신장 장애와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되어 있다(Owen and Haywood, 1986; Abrass, 2000). 본 시험에서도 혈 중 creatinine이 13주 시험의 암수에서 4주 시험에 비하여 모두 높게 나타나 주령에 따른 변화를 나타내었다.

장기중량 측정에서 갑상샘, 가슴샘 및 일부 생식관련 장기를 제외한 대부분 장기의 절대중량은 암수 모두 주령 및 체중의 증가에 따라 증가하고, 상대중량은 감소하는 경향을 보였는데, 이는 연령의 증가에 따른 지방축적 및 체중증가와 관련이 있는 것으로 사료되었다(Stevens and Gallo, 1989; Iwata et al., 1993; Alemán et al., 1998). 한편, 면역관련 장기인 가슴샘의 절대 및 상대중량은 주령의 증가에 따라 모두 감소하는 것으로 나타났는데 Song 등(1990)의 SD 랫드의 주령에 따른 기초 연구에서도 가슴샘의 중량이 5 주령에서 가장 무거웠고 그 후 주령의 증가에 따라 감소하는 것으로 보고되어 있으며, 이는 연령의 증가에 따른 가슴샘의 기능퇴화에 의한 것으로 사료되었다(Elcūman and Akay, 1998; Elmore, 2006). 기타 갑상샘이나 뇌하수체 및 일부 생식장기의 절대 및 상대중량은 상대적으로 다른 장기에 비하여 체중 및 주령의 변화에 따른 영향을 적게 받는 것으로 관찰되었다.

실험동물을 이용한 안전성평가시험을 수행함에 있어서 중요한 것 중의 하나는 실험에 사용된 동물이 정상적 상

태에서 어떤 특성을 갖고 있는가에 대한 기초자료의 확립으로 실험결과를 해석하는데 있어서 필수적인 요소중의 하나이다. 동물실험에 있어서 검사되는 여러 생물학적 결과들은 사용하는 동물의 종, 주령 및 성별 등에 따라 다양할 수 있고, 사육환경, 동물의 취급상태, 시험방법 및 측정방법 등에 따라라도 다를 수 있다(Wolford et al., 1986; Yamada et al., 1989; Braun et al., 1993; Kang et al., 1995; Petterino and Argentino-Storino, 2006). 그러므로 시험기관에 적합한 자체적으로 축적된 기초자료의 확보는 시험물질의 독성학적 변화를 정확히 평가하는데 매우 중요하다.

본 기초자료는 본 연구소에서 수행하는 일반독성시험의 자료 해석에 유용한 참고자료로 사용될 뿐만 아니라 Sprague-Dawley 랫드의 생물학적 특성자료로도 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

참고문헌

- Abrass, C.K. (2000) The nature of chronic progressive nephropathy in aging rats. *Adv. Ren. Replace. Ther.* 7(1), 4-10.
- Alemán, C.L., Más, R.M., Rodeiro, I., Noa, M., Hernández, C., Menéndez, R. and Gámez, R. (1998) Reference database of the main physiological parameters in Sprague Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab. Anim.* 32(4), 457-66.
- Alemán, C.L., Noa, M., Más, R., Rodeiro, I., Mesa, R., Menéndez, R., Gámez, R. and Hernández, C. (2000) Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratory animals. *Lab. Anim.* 34(4), 379-385.
- Alt, J.M., Deerberg, F., Hackbarth, H.J. and Stolte, H. (1980) The study of urinary protein excretion in male rats as compared with human proteinuria. *Contrib. Nephrol.* 19, 1979-1987.
- Ando, R., Nakamura, A., Nagatani, M., Yamakawa, S., Ohira, T., Takagi, M., Matsushima, K., Aoki, A., Fujita, Y. and Tamura, K. (2008) Comparison of Past and Recent Historical Control Data in Relation to Spontaneous Tumors During Carcinogenicity Testing in Fischer 344 Rats. *J. Toxicol. Pathol.* 21, 53-60.
- Bauk, L. and Stefkovic, G. (1986) Searching the records for clues about kidney disease in guineapigs. *Vet. Med.* 81, 1127-1130.
- Baylis, C. (2005) Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. *Exp. Gerontol.* 40(4), 271-278.
- Bolton, W.K., Benton, F.R., Maclay, J.G. and Sturgill, B.C. (1976) Spontaneous glomerular sclerosis in aging Sprague-Dawley rats. I. Lesions associated with mesangial IgM deposits. *Am. J. Pathol.* 85(2), 277-302.
- Bounous, D., Bourdeaux, M.K. and Hoskins, J.D. (1995) *Hematology of normal dogs and cats and responses to diseases.* pp. 337 - 353, WB Saunders Co, Philadelphia.
- Braun, J.P., Aktas, M., Lefebvre, H., Rico, A.G. and Toutain, P.L. (1993) Clinical enzymology for the assessment of organ damage: interspecific differences. *Comp. Haematol. Int.* 3, 27 - 32.
- Dodds, W.J. (1980) *Hemostasis and coagulation.* pp. 671-718, Academic Press, New York.
- Elcūman, E.A. and Akay, M.T. (1998) Age-Dependent Immunolocalization of Fibronectin and Histological Changes in the Thymus of Rats. *Vet. Res. Comm.* 22(8), 525-532.
- Elmore, S.A. (2006) Enhanced Histopathology of the Thymus. *Toxicol. Pathol.* 34(5), 656-665.

- Gonder, J.C. and Laber, K. (2007) A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR J.* 48(1), 29-36.
- Iwata, H., Hagiwara, T., Katoh, M., Yamamoto, S., Yamakawa, S., Shiga, A., Hirouchi, Y., Kobayashi, K., Inoue, H. and Enomoto, M. (1993) Historical control data of organ weight and gross findings in F344/DuCrj rats and B6C3F1 mice. *Jikken Dobutsu* 42(3), 383-396.
- Kaneko, J.J. (1997) *Serum proteins and the dysproteinemias*. pp. 117-138, Academic Press, London, New York.
- Kang, B.H., Kim, Y.B., Lee, H.S., Kim, Y.H., Im, W.J. and Ha, H.S. (2004) Background Data on Hematology, Blood Biochemistry and Organ Weights for 2 Weeks and 4 Weeks Repeated-Dose Toxicity Studies Using Sprague-Dawley (SD) Rats. *Korean J. of Lab. Anim. Sci.* 20(2), 134-140.
- Kang, B.H., Son, H.Y., Ha, C.S., Lee, H.S. and Song, S.W. (1995) Reference values of hematology and serum chemistry in Ktc: Sprague-Dawley rats. *Korean J. of Lab. Anim. Sci.* 11(2), 141-145.
- Kitagaki, M., Yamaguchi, M., Nakamura, M., Sakurada, K., Suwa, T. and Sasa, H. (2005) Age-related changes in haematology and serum chemistry of Weiser-Maples guineapigs (*Cavia porcellus*). *Lab. Anim.* 39(3), 321-330.
- Kohn, D.F. and Clifford, C.B. (2002) *Laboratory animal medicine*. pp. 121-165, Academic Press, Amsterdam.
- Leonard, R. and Ruben, Z. (1986) Hematology reference values for peripheral blood of laboratory rats. *Lab. Anim. Sci.* 36(3), 277-281.
- Lipman, N.S. and Perkins, S.E. (2002) *Laboratory animal medicine*, pp. 1143-1184, Academic Press, Amsterdam.
- Loeb, W.F. and Carakostas, M.C. (1992) *Pathobiology of the Aging Rat*. pp. 7-13, ILSI Press, Washington.
- Loeb, W.F., Das, S.R., Harbour, L.S., Turturro, A., Bucci, T.J. and Clifford, C.B. (1996) *Pathobiology of the Aging Mouse*. pp. 3-20, ILSI Press, Washington.
- Loria, A., Reverte, V., Salazar, F., Saez, F., Llinas, M.T. and Salazar, F.J. (2007) Sex and age differences of renal function in rats with reduced Ang II activity during the nephrogenic period. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 293(2), 506-510.
- Matsuzawa, T., Nomura, M., Yonezawa, H. and Unno, T. (1995) Selection of appropriate parameters, use of a quality control concept, and suitable statistical analyses for clinical pathology examination of animals in toxicity studies: results of a current survey by the Japanese Pharmaceutical Manufacturers Association. *Comp. Haematol. Int.* 5, 196-200.
- Owen, R.A. and Haywood, R. (1986) Age-related variations in renal structure and function in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Pathol.* 14, 158-167.
- Petterino, C. and Argentino-Storino, A. (2006) Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57(3), 213-219.
- Ragan, H.A. and Weller, R.E. (1999) *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*, 2nd ed., pp. 519-548, Taylor & Francis Inc, Philadelphia.
- Roe, F.J.C. (1991) *Biological Effects of Dietary Restriction*. pp 287-304, Springer-Verlag, Berlin.
- Roe, F.J.C. (1993) *Experimental Toxicology*. pp. 28, Surrey, Bibra.
- Sauer, M.B., Dulac, H., Clark, S., Moffitt, K.M., Price, J., Dambach, D., Mosher, H., Bounous, D. and Keller, L. (2006) Clinical pathology laboratory values of rats housed in wire-bottom cages compared with those of rats housed in solid-bottom cages. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 45(1), 30-35.
- Seki, M., Hirashima, K., Kobayashi, K. (1981) *Hematology of experimental animals*. pp. 334-335, Soft Science, Inc., Tokyo.
- Sharp, J., Zammit, T., Azar, T., Lawson, D. (2003) Stress-like responses to common procedures in individually and group-housed female rats. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 42(1), 9-18.
- Snell, K.C. (1967) *Pathology of laboratory rats and mice*. pp. 104-145, Blackwell, Oxford.
- Song, C.W., Hwang, H.S. and Han, S.S. (1990) Studies on the Basic data of Ktc:SD Rats with Age-Body weight, Hematology, Serum Chemistry and Urinalysis. *Korean J. of Lab. Anim. Sci.* 6(1), 33-43.
- Song, C.W., Hwang, H.S. and Han, S.S. (1992) Studies on the Basic data of Ktc:Wistar Rats with Age-Body weight, Organ Weight, Hematology, Serum Chemistry and Urinalysis. *Korean J. of Lab. Anim. Sci.* 8(1), 13-22.
- Stevens, K.R. and Gallo, M.A. (1989) *Principles and Methods of Toxicology*. 3rd ed., pp. 237-250. Raven Press, New York.
- Tanimoto, Y. (1988) *Laboratory animals [in Japanese]* pp. 91, Soft Science, Inc., Tokyo, Japan.
- Uchida, K., Chikai, T., Takase, H., Nomura, Y., Seo, S., Nakao, H., and Takeuchi, N. (1990) Age-Related Changes of Bile Acid Metabolism in Rats. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 10(1), 37-48.
- Verhagen, A.M., Attia, D.M., Koomans, H.A. and Joles, J.A. (2000) Male gender increases sensitivity to proteinuria induced by mild NOS inhibition in rats: role of sex hormones. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 279(4), 664-670.
- Weingand, K.W., Bloom, J., Carakostas, M., Hall, R., Helfrich, M., Latimer, K., Levine, B., Neptun, D., Rebar, A., Stitzel, K. and Troup, C. (1992) Clinical pathology testing recommendations for nonclinical toxicity and safety studies. *Toxicol. Pathol.* 20, 539-543.
- Williams, G.M. and Weirburger, J.H. (1991) *Chemical carcinogenesis*. pp. 127-200, Pergamon Press, New York.
- Wolford, S.T., Schroer, R.A., Gohs, F.X., Gallo, P.P., Brodeck, M., Falk, H.B. and Ruhren, F.R. (1986) Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J. Toxicol. Environ. Health* 18(2), 161-188.
- Wolford, S.T., Schorer, R.A., Gallo, P.P., Gohs, F.X., Brodeck, M., Falk, H.B. and Ruhren, F.R. (1987) Age-related changes in serum chemistry and hematology values in normal Sprague-Dawley rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 8(1), 80-88.
- Yamada, J. (1989) *Biochemical Reference Data Book on Experimental Animals*. Soft Science, Inc. Tokyo, Japan.