

보툴리눔 A형 독소의
희석제에 따른 역가 비교 실험

연세대학교 대학원

치 의 학 과

함 종 욱

보툴리눔 A형 독소의
희석제에 따른 역가 비교 실험

지도교수 최 종 훈

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2012년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

함 종 욱

함종욱의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2012년 12월 일

감사의 글

대학원에 입학한 후 학위 논문 주제에 대해 고민해오다가 2012년 어느 봄날 평소 관심이 많았던 보툴리눔 독소에 대한 실험을 하고 싶어서 지도교수이신 최종훈 교수님을 찾아뵈었습니다.

2005년에 보툴리눔 A형 독소 제품을 비교하는 동물실험을 해 본 경험이 있었기 때문에 가벼운 마음으로 시작을 해보겠다고 말씀을 드렸는데, 막상 실험을 진행하는 과정이 쉽지가 않았습니다. 실험 동물에 대한 복지와 윤리가 강화되어 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아야 했고 교육도 받았습니니다. 7년전과는 실험 환경이 많이 달라져서 당황스러웠지만 다행히도 지도교수님께서 적극적으로 도와주셔서 생각보다 일찍 사전승인을 받을 수 있었고 힘든 고비때마다 따뜻한 격려와 가르침으로 저를 이끌어주셔서 무사히 기한 내에 논문을 완성할 수 있었습니다. 최종훈 교수님께 진심으로 감사를 드리며 바쁜 와중에도 세심한 지도와 배려로 논문심사를 해주신 김성택 교수님과 권정승 교수님께도 감사드립니다.

아울러 실험을 도와주신 치과대학 동물실험실의 김형관 선생님과 논문을 제출하기까지 수고를 해준 홍정훈 전공의께도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

늘 따뜻한 마음으로 응원해 준 가족들과 친구들에게도 감사드리며 마지막으로 저의 연구에 참여한 실험동물들의 고귀한 희생을 잊지 않겠습니다. 감사합니다.

2012년 12월

저자 씀

차 례

차 례.....	i
그림 차례.....	ii
표 차례.....	iii
국문요약.....	iv
I. 서론.....	1
II. 연구 대상 및 방법.....	4
III. 실험결과.....	8
IV. 총괄 및 고찰.....	13
V. 결론.....	17
참고문헌.....	18
영문초록(Abstract).....	20

그림 차례

그림 1. 대조군에서의 결과를 이용한 LD_{50} 계산.....	11
그림 2. 실험군에서의 결과를 이용한 LD_{50} 계산.....	12

표 차례

표 1. 텍스트로스 주사 유무에 따른 Botox [®] 주사 후의 치사율 비교... 6
표 2-1. 대조군에서의 주사 용량 별 사망한 마우스 수와 치사율 9
표 2-2. 대조군에서의 LD ₅₀ 계산을 위한 결과 값 변환..... 9
표 3. 퍼센트 치사율의 probit 전환표 (Finney' s table) 9
표 4-1. 실험군에서의 주사 용량 별 사망한 마우스 수와 치사율 ... 10
표 4-2. 실험군에서의 LD ₅₀ 계산을 위한 결과 값 변환..... 10
표 5. 대조군과 실험군에서 사용된 희석액을 마우스에 주사한 결과 ... 10

국문요약

보툴리눔 A형 독소의

희석제에 따른 역가 비교 실험

목적: 텍스트로스 용액을 사용해서 보툴리눔 A형 독소를 희석을 했을 때와 0.9% 생리식염수로 희석을 했을 때의 역가를 동일한 조건에서 서로 비교해 봄으로써 희석 과정에서의 역가 소실을 줄일 수 있는 지 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법: 마우스를 두 군으로 나누어 대조군은 0.9% 생리식염수로 보톡스를 희석하고 실험군은 10% 텍스트로스 용액으로 보톡스를 희석하였다. 각 용량 당 사용한 마우스의 수는 10마리이고 복강 주사 후 72시간이 경과한 시점에서 사망한 쥐의 수를 확인하여 용량에 따른 치사율을 알아내고 이 값을 이용해서 대조군과 실험군의 LD_{50} 을 구한 후 서로 비교하였다.

결과: 실험군에서의 대략적인 LD_{50} 값은 약 0.131ml(1.31U) 이었고 대조군의 LD_{50} 값은 0.107ml(1.07U) 정도일 것으로 추정되며 역가 보존율이 대조군에서는 76.3%이며 실험군에서는 93.5%이 된다.

결론: 실험 결과 생리식염수로 희석한 대조군에 비해 텍스트로스 용액으로 희석한 실험군에서 희석 직후 역가가 소실되지 않고 잘 보존되는 것으로 나타났다.

핵심되는 말: 보툴리눔 A형 독소, 희석, 역가, 마우스

보툴리눔 A형 독소의 희석제에 따른 역가 비교 실험

함 종 욱

연세대학교 치과대학 구강내과학교실

<지도교수 최 종 훈>

I. 서론

보툴리눔 독소(botulinum toxin)는 Clostridium botulinum이라는 세균이 방출하는 단백질의 일종으로 시냅스 전 신경 말단에 비가역적으로 부착하여 신경 접합부에 아세틸콜린(acetylcholine)의 분비를 억제함으로써 근육의 수축을 차단하여 이차적으로 근육의 이완 효과를 얻을 수 있어 근긴장과 관련된 여러 질환의 치료에 적용이 되어 왔다.

보툴리눔 독소는 면역학적 특징에 의해 8가지의 아형(serotype)으로 분류되고 (A, B, C1, C2, D, E, F, G), 이 중에서 A형이 가장 효능(efficacy)이 강하다고 보고되고 있다. 1920년대에 보툴리눔 A형 독소가

처음으로 분리되었으며, 1949년 보툴리눔 A형 독소가 신경전달 물질을 차단한다는 것이 증명이 되었다. 임상적으로는 1970년대에 원숭이의 사시 치료에 보툴리눔 A형 독소가 사용되었고, 1981년에 처음으로 사람의 사시 치료에 적용이 되었다 (Scott, 1981).

보툴리눔 A형 독소는 동결 건조된 상태로 판매가 되며, 임상에서 적용을 하기 위해서는 반드시 희석을 해야 한다. 제조사에서는 0.9% 생리식염수 (saline) 희석 후 4시간 이내에 사용할 것을 권고하고 있다. 시간이 경과하면서 독소의 역가(potency)가 감소하여 기대하는 효과를 얻을 수 없기 때문이다.

보툴리눔 독소를 희석하는 경우 시간의 경과 뿐 아니라 희석 과정에서도 역가가 소실될 가능성이 있는데, 희석제(diluent)의 종류에 따라서도 독소의 역가가 감소되는 것으로 알려져 있다. Mclellan 등 (1996)은 마우스의 LD₅₀을 이용하여 독소의 역가를 평가하였을 때, 생리식염수로 희석한 경우에 0.2% 젤라틴(gelatin)을 함유한 완충액으로 희석을 한 경우에 비해 2배 가까운 역가의 소실이 나타났음을 보고하였다 (Mclellan 등, 1996). 또한, Schantz와 Johnson (1992)은 매우 낮은 농도로 보툴리눔 독소를 희석하는 경우 독소의 안정성(stability) 감소가 나타나는데 젤라틴이나 알부민(albumin)을 함유하고 있는 희석 완충액에 의해 이를 방지할 수 있다고 보고하였다.

시판되고 있는 분말 상태의 보툴리눔 독소 제품에서 대부분 보툴리눔 독소의 안정화제로 gelatin이나 albumin이 미량 사용되고 있으며 임상에서

0.9% 생리식염수로 희석해서 환자에 적용했을 때는 안전성에 문제가 없이 널리 사용이 되고 있다. 그러나 희석 과정에서 발생하는 역가 감소를 피할 목적으로 0.9% 생리식염수 대신 gelatin 용액이나 albumin 용액을 사용해서 보툴리눔 A 독소를 희석할 경우에는 gelatin과 albumin은 동물성 단백질이므로 면역 반응에 의한 항체 형성, 바이러스의 교차 감염, 알러지 반응 등 인체에 예상치 못한 여러 가지 문제들을 일으킬 수 있는 가능성이 있기 때문에 gelatin이나 albumin을 함유하고 있는 희석 완충액을 사용해서 희석 과정에서 발생하는 역가 소실을 막는 방법이 충분히 안전하다고 볼 수 없다(Goodnough와 Johnson, 1992). 따라서 희석 과정에서 역가의 소실을 피할 수 있으면서 인체에도 안전한 희석 용액에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 사람에게 안전하게 주사되는 수액제로 흔히 쓰이는 텍스트로스 용액을 사용해서 보툴리눔 A형 독소를 희석을 했을 때와 0.9% 생리식염수로 희석을 했을 때의 역가를 동일한 조건에서 서로 비교해 봄으로써 희석 과정에서의 역가 소실을 줄일 수 있는 지 알아보고자 하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 재료

1) 실험 동물

본 연구에서는 체중 18~22g의 자성 ICR 마우스(G-Bio Com. Guacheon, Kyung-gi-Do, Korea) 7~8주령 암컷을 사용했다. 모든 동물 실험은 실험에 사용하기 전에 적어도 5일 동안의 적응 기간을 가졌다. 실험 동물은 연세임상연구센터에 의한 관리를 따랐으며 연세의료원 동물실험윤리위원회 승인(2012-0068)을 받은 후 시행하였다.

2) 실험 재료

보툴리눔 A 형 독소는 안정화제로 사람혈청알부민 0.5mg을 포함하고 있는 Botox[®](Allergan Inc. Ireland) 100units(U)을 희석하여 사용하였다. 희석제는 실험군의 경우 20% 텍스트로스 주사 용액(Huons Com. Korea)을 주사용수(Huons Com. Korea)를 이용하여 10% 텍스트로스 용액으로 희석하여 사용하였고, 대조군에서는 0.9% 생리식염수(Dai Han Pharm. Com. Korea)를 이용하였다. 주사기는 정밀한 계측이 가능한 0.5ml 인슐린 주사기(Omnican 50[®]. B-Braun, Germany)를 이용하였다.

2. 연구 방법

1) 실험군 및 대조군 설정:

Botox®의 희석과 주사는 동일한 1인의 실험자에 의해 시행되었다.

실험군의 경우 100U Botox®를 10% 텍스트로스 용액 10ml로 희석하여 0.075ml(0.75U), 0.08ml(0.80U), 0.1ml(1.0U), 0.125ml(1.25U), 0.15ml(1.5U)를 각각 10마리의 마우스의 좌측 하방 복강에 주사하였다.

대조군은 100U Botox®를 0.9% 생리식염수 10ml로 희석하여 0.1ml(1.0U), 0.15ml(1.5U), 0.18ml(1.8U), 0.20ml(2.0U)를 각각 10마리의 마우스에 실험군과 동일한 방법으로 주사하였고 Botox® 용액과 동일한 양의 10% 텍스트로스 용액을 추가로 복강 주사하였다.

0.9% 생리식염수로 희석한 보툴리눔 독소 용액 0.15ml(1.5U)와 0.2ml(2.0U)를 각각 10마리의 마우스에 복강 주사한 예비 실험에서, 보툴리눔 독소 주사액과 동일한 양의 10% 텍스트로스 용액을 추가적으로 복강 주사한 군과 그렇지 않은 군을 비교하였을 때, 10% 텍스트로스 용액 0.15ml 추가 주사하였을 경우 치사율이 90%에서 60%로 현저히 감소하였으나, 0.2ml 추가 주사하였을 경우 100%에서 90%로 약간 감소되는 결과를 보였다 (표1). 따라서 20g 체중의 마우스에서는 텍스트로스가 에너지원으로 작용하여 적은 용량의 텍스트로스으로도 치사율을 감소시키는 작용을 할 가능성이 확인되었으므로, 대조군의 경우 보툴리눔 독소 용액을 복강 주사한

후 보툴리눔 독소 용액과 동일한 양의 10% 텍스트로스 용액을 추가로 주사해 실험군과 조건을 동일하게 하였다.

또한 사용한 희석제 자체의 치사 작용 유무와 실험 환경의 적절성을 확인하기 위해 생리식염수 0.2ml와 10% 텍스트로스 용액 0.2ml를 각각 10마리의 마우스에 주사하였다.

표1. 텍스트로스 주사 유무에 따른 Botox[®] 주사 후의 치사율 비교

0.9% 생리식염수로 희석한 Botox [®] 의 주사용량	동량의 10% 텍스트로스 용액을 주사하지 않은 마우스의 72시간 후 치사율 (n=10)	동량의 10% 텍스트로스 용액을 주사한 마우스의 72시간 후 치사율(n=10)
0.15ml (1.5U)	90%	60%
0.2ml (2.0U)	100%	90%

2) 보툴리눔 A형 독소의 역가 평가

희석제로 희석하였을 때 역가가 소실되지 않았다고 가정한다면 Botox[®]를 각각 10ml 용액으로 희석을 하였으므로 0.1ml는 1unit에 해당이 된다. 1unit은 1 mouse unit으로서 20g 중량 쥐의 50% 치사율(LD₅₀)의 역가를 의미한다.

실험군과 대조군의 실제 LD₅₀(approximate LD₅₀) 구하여 보툴리눔 A형 독소의 역가를 비교 평가하기 위해서, 복강 주사 72시간 후 사망한 마우스의 수를 확인하고 기록한 후 치사율(사망한 마우스의 % 비율 : 사망한 마

우스/전체 마우스 $\times 100$)을 구하고 Miller와 Tainer의 방법을 이용하여 LD_{50} 를 계산하였다. (Muhammad, 1944)

Ⅲ. 실험 결과

대조군에서는 용량별로 10마리씩 모두 40마리의 마우스를 사용하였고, 0.1ml(1.0U)를 주사하였을 때 72시간 후의 치사율이 20%였으며 0.18ml(1.8U)을 주사하였을 때는 90%의 치사율을 보였다 (표 2-1). probit 분석을 위해 X축에 해당하는 log-doses 값을 구하고 치사율을 probit으로 전환을 하여 Y축의 값을 구했다 (표 2-2). 치사율을 probit으로 전환하는 것은 퍼센트 치사율의 probit 전환표를 이용하였다 (표 3). (Finney, 1952)

실험군에서는 용량별로 10마리씩 모두 50마리의 마우스를 사용하였고 0.1ml(1.0U)를 주사했을 때 치사율은 60%로 대조군에 비해 높은 역가를 보였다 (표 4-1). 실험군에서 0.075ml(0.75U) 용량일 때 치사율이 0%인데, 이것을 probit으로 전환하기 위해서는 수정이 필요하며 공식 $100(0.25/n)$ 에 용량 당 개체 수(n)에 10을 대입하면 $100(0.25/10)=2.5$ 가 된다 (표 4-2) (Ghosh, 1984). 대조군과 실험군의 결과를 회귀분석 했을 때 직선의 기울기와 Y절편 값 그리고 회귀식에 대한 p-value가 0.05 미만이므로 두 군의 실험 결과가 95% 신뢰 수준에서 통계적으로 유의함을 확인할 수 있었다.

대조군과 실험군에 사용된 용액들을 마우스에 주사를 했을 때 모두 치사량이 0%로 나타나 실험 환경에 문제가 없었으며, 생리식염수와 텍스트로스 용액이 치사 작용이 없으므로 실험 결과에 영향을 주지 않았음을 확인하였다 (표 5). LD₅₀ 계산은 Miller and Tainer의 방법을 적용하였으며, Y축의 값이 5일 때의 X축의 값을 찾아 anti-log 하였다 (Muhammad, 1944).

실험군에서의 대략적인 LD₅₀ 값은 약 0.131ml(1.31U) 이었고 대조군의 LD₅₀ 값은 0.107ml(1.07U) 정도일 것으로 추정된다.

표 2-1. 대조군에서의 주사 용량 별 사망한 마우스 수와 치사율

보툴리눔 독소 용액 주사 용량	72시간 후 사망한 마우스의 수	치사율(%)
0.1ml (1.0U)	2	20
0.15ml (1.5U)	6	60
0.18 (1.8U)	9	90
0.2ml (2.0U)	9	90

표 2-2. 대조군에서의 LD₅₀ 계산을 위한 결과 값 변환

Dose (U)	Log dose	% Dead	Probits
1.0	0	20	4.16
1.5	0.1761	60	5.25
1.8	0.2553	90	6.28
2.0	0.303	90	6.28

표 3. 퍼센트 치사율의 probit 전환표 (Finney's table)

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

*치사율이 47% 일때 probit 값은 4.92가 되며 0%와 100%의 probit은 존재하지 않는다.(Finney 1952)

표 4-1. 실험군에서의 주사 용량 별 사망한 마우스 수와 치사율

보툴리눔 독소 용액 주사 용량	72시간 후 사망한 마우스의 수	치사율(%)
0.075ml (0.75U)	0	0
0.08ml (0.8U)	2	20
0.1ml (1.0U)	6	60
0.125ml (1.25U)	8	80
0.15ml (1.5U)	8	80

표 4-2. 실험군에서의 LD₅₀ 계산을 위한 결과 값 변환

Dose (units)	Log dose	% Dead	*Corrected %	Probits
0.75	-0.1249	0	2.5	3.04
0.8	-0.0969	20	20	4.16
1.0	0	60	60	5.26
1.25	0.0969	80	80	5.84
1.5	0.1761	80	80	5.84

* **Corrected % Formula** for 0 and 100% mortality

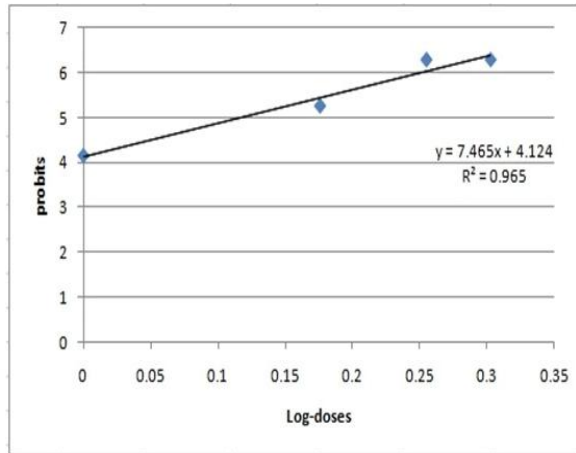
For 0% dead: $100(0.25/n)$

For 100% dead: $100(n-0.25/n)$

표 5. 대조군과 실험군에서 사용된 희석액을 마우스에 주사한 결과.

사용한 주사액	72시간 후 사망한 마우스의 수 (n=10)	치사율(%)
0.9% saline 0.2ml	0	0
10% dextrose 0.2ml	0	0

Log dose	Probits
0	4.16
0.1761	5.25
0.2553	6.28
0.303	6.28



회귀분석 통계량							
다중 상관계수	0.982419						
결정계수	0.965147						
조정된 결정계수	0.947721						
표준 오차	0.231295						
관측수	4						
분산 분석							
	자유도	제곱합	제곱 평균	F 비	유의한 F		
회귀	1	2.962905	2.962905	55.38402	0.017581		
잔차	2	0.106995	0.053497				
계	3	3.0699					
		계수	표준 오차	t 통계량	P-값	하위 95%	상위 95%
Y 절편		4.124342	0.217476	18.9646	0.002769	3.188619	5.060065
X 1		7.465456	1.003146	7.442044	0.017581	3.149268	11.78164

$$Y=5, 5=7.465X+4.124$$

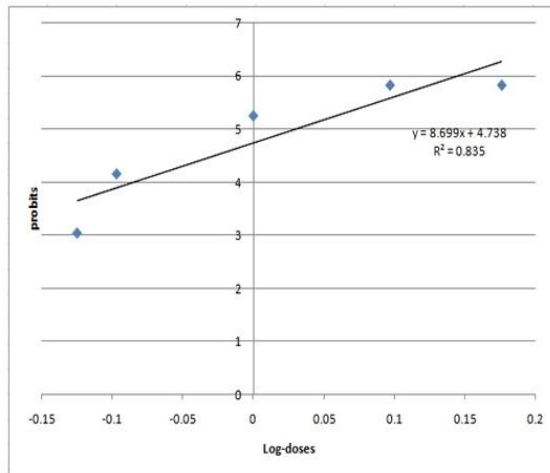
$$X=0.1173$$

$$LD50=antiLog 0.1173$$

$$=1.31units$$

그림 1. 대조군에서의 결과를 이용한 LD₅₀ 계산. 회귀식 $Y=7.465X+4.124$ 에서 Y가 5일 때의 X값을 구한 후 anti-LogX (Y=5)를 계산해서 얻어진 값이며 1.31U이다.

Log dose	Probits
-0.1249	3.04
-0.0969	4.16
0	5.26
0.0969	5.84
0.1761	5.84



회귀분석 통계량						
다중 상관계수	0.914742					
결정계수	0.836754					
조정된 결정계수	0.782338					
표준 오차	0.565148					
관측수	5					
분산 분석						
	자유도	제곱합	제곱 평균	F 비	유의한 F	
회귀	1	4.911342	4.911342	15.37713	0.029499	
잔차	3	0.958178	0.319393			
계	4	5.86952				
	계수	표준 오차	t 통계량	P-값	하위 95%	상위 95%
Y 절편	4.736897	0.253761	18.66674	0.000336	3.929315	5.544479
X 1	8.701438	2.21898	3.921369	0.029499	1.639654	15.76322

$$Y=5, 5=8.699X + 4.738$$

$$X=0.03$$

$$LD50 = \text{antiLog } 0.03$$

$$= 1.07\text{units}$$

그림 2. 실험군에서의 결과를 이용한 LD₅₀ 계산. 회귀식 Y=8.699X+4.738에서 Y가 5일 때의 X값을 구한 후 anti-LogX (Y=5)를 계산해서 얻어진 값으로 1.07U이다.

IV. 총괄 및 고찰

보툴리눔 독소를 희석한 후 보관 과정에서 역가가 시간 경과에 따라 감소한다는 것은 많은 연구가 이루어져서 잘 알려져 있으나 (Garcia와 Fulton, 1996; Gartlan과 Hoffman, 1993; Sloop 등, 1997), 실제로는 희석 과정에서도 역가가 크게 소실되는 것으로 보고된 바 있다 (McIellan 등, 1996). 보툴리눔 A형 독소 희석에 사용되는 0.9% 생리식염수는 단백질을 안정화(stabilization)하는 작용이 없기 때문에 나타나는 현상인데, 제조사에서 안정화제로 사용하는 알부민이나 젤라틴은 단백질 성분으로 분말 상태에서의 역가 유지를 위해 사용을 하는 것이며 0.9% 생리식염수로 희석을 한 후에는 알부민이나 젤라틴의 농도도 감소하게 되어 용액 상태에서의 안정화 작용이 분말상태일 때와 비교해서 상대적으로 감소하게 된다.

이에 본 연구에서는 두 가지 종류의 용액을 사용해서 Botox[®]를 희석한 후 그 역가를 마우스의 치사율을 이용하여 평가함으로써 희석 용액의 종류에 따라 역가가 달라질 수 있는 지 알아보고자 하였다.

윤 등 (2005)은 두 종류의 보툴리눔 A형 독소를 생리식염수로 희석한 후 시간 경과에 따른 역가를 평가하였는데 마우스 1마리 당 1unit을 사용했을 때 72시간 경과 후의 치사율이 모두 0%인 결과를 보여 희석 과정에서도 역가가 크게 감소함을 확인할 수 있었고 2units을 사용했을 때 LD₅₀에

가까운 결과를 얻을 수 있음을 보고한 바 있다. 제조사의 설명서에는 희석 과정에서 거품이 일어나거나 유사한 세찬 동요가 일어나면 변성되어 보툴리눔 A형 독소의 역가가 감소한다고 하였으나, 강하게 희석한 경우와 조심스럽게 희석한 경우를 비교했을 때 임상적인 치료 효과에는 차이가 없다는 연구들이 보고된 바 있다 (Nadia와 Evan, 2008; Trindade 등, 2003). 그러나 LD₅₀을 비교한 것은 아니므로 본 연구에서는 실험군과 대조군 모두 동일한 방법으로 조심스럽게 희석을 하여 물리적인 충격에 의한 역가 차이가 나타나지 않도록 하였으며 희석액의 독소 안정화 능력에 따른 역가 유지 효과만을 비교하였다.

LD₅₀를 계산하여 비교한 결과 보툴리눔 A형 독소를 0.9% 생리식염수로 희석하여 주사한 대조군과 10% 텍스트로스 용액으로 희석하여 주사한 실험군의 LD₅₀은 각각 1.31 units과 1.07 units 이므로 실험군이 대조군에 비해 약 1.22배 정도 보툴리눔 독소를 안정화하는 작용이 강한 것으로 추정된다. 제품의 희석하기 전의 역가가 100units 이라고 가정하면 대조군의 희석 후의 1 vial의 역가는 76.3units(100÷1.31)이고 실험군에서는 93.5units(100÷1.07)이 된다고 할 수 있다. 즉 역가 보존율이 대조군에서는 76.3%이며 실험군에서는 93.5%이 된다. 실험군에서 역가가 잘 보존된 것은 당류의 일종인 텍스트로스가 단백질을 고정하는 작용이 있기 때문인 것으로 생각되며 텍스트로스의 농도에 따라 고정 효과는 달라질 가능성이 있다 (Wang, 2000). 또한 10% 텍스트로스 용액이 생리식염수에 비해 독소에 대한 안정화 작용이 강하므로 보툴리눔 A형

독소를 희석한 후 시간이 경과함에 따라 나타나는 역가의 감소도 줄일 수 있을 것으로 예상되며 차후 이것을 확인하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

일반적으로 보툴리눔 독소의 활성 측정을 위한 주된 방법으로 마우스 LD₅₀의 사용이 높은 정확성을 보이는 신뢰성 있는 방법이라고 보고되었지만 (Pearce 등, 1994), 많은 수의 마우스를 희생시켜야 하는 가혹한 방법이기 때문에 이를 대체하는 방법들이 연구되고 있다 (Straughan, 2006).

1959년 영국의 생물학자인 Russell과 Burch는 저서 'The principles of humane experimental technique'을 통해 동물실험윤리의 원칙으로 3Rs (Replacement, Refinement and Reduction)을 소개했으며 현재 보툴리눔 독소를 동물에 사용하는 실험에서도 이 원칙이 적용되고 있다. 본 연구에서도 실험에 사용하는 마우스의 수를 가능한 최소화하여 Reduction 원칙에 따르려고 노력을 하였다. 3Rs 원칙에 부합되는 방법으로는 mouse flaccid paralysis assay(mouse abdominal ptosis assay), hind limb paralysis assay, endopeptidase assay, compound muscle action potential(CMAP) assay 등이 있다(Cichon 등, 1995; Ekong 등, 1997; Sesardic 등, 1996).

마우스의 치사율은 전신적인 효과이므로 실제 국소적인 치료 효과와 같다고 볼 수는 없다. 예를 들면 Dysport®의 경우 실제 근육에서의 Botox®와 동등한 치료 효과를 얻기 위해서는 3~4배의 역가를 사용해야 하므로 마우스의 LD₅₀만으로 인체에서의 치료 효과를 예측하는 것은

적절하지 않다. 본 연구에서 대조군과 실험군에 1unit을 주사하였을 때 치사율이 각각 20%와 60%였으므로 이것만 보고 실험군의 치료 효과가 대조군에 비해 3배일 것이라고 추정할 수는 없으며 두 군 간의 LD₅₀ 값이 22% 정도 차이가 났다고 해서 실제 국소 근육에서의 치료 효과도 22% 차이를 나타낼 것이라고 단정할 수는 없다. 또한 복강 주사로 투여된 텍스트로스가 전신적인 에너지원으로 작용하여 치사율 감소에 영향을 미칠 수 있으며, 복강 주사 시 나타날 수 있는 각 개체의 반응차이도 배제할 수 없으므로 국소적인 효과를 확인할 수 있는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 실험은 희석제의 종류에 따라 보툴리눔 A 형 독소의 국소 효과가 달라질 수 있음을 확인하기 위한 기본적인 선행 연구이며, 국소 부위에서의 치료 효과를 정확하게 비교 평가하기 위해서는 CMAP assay, mouse flaccid paralysis assay, 또는 Kim 등 (2008)의 연구에서 근육에 보툴리눔 독소를 주사한 후 조직학적 소견을 비교 관찰했던 방법 등을 이용한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 두 종류의 용액으로 보툴리눔 A 형 독소를 각각 희석한 후 그 역가를 마우스의 치사율을 이용하여 평가를 하고 각각의 LD₅₀을 구함으로써 두 용액 간의 희석 과정에서의 역가 유지 능력(stabilizing effect)을 비교하였다. 실험 결과 생리식염수로 희석한 대조군에 비해 텍스트로스 용액으로 희석한 실험군에서 희석 직후 역가가 소실되지 않고 잘 보존되는 것으로 나타났다. 본 연구는 보툴리눔 A형 독소의 제조회사에서 추천하는 0.9% 식염수 희석법의 단점을 개선할 수 있는 가능성을 제시한 연구로써 이를 기반으로 향후 실제 치료 효과 정도를 비교하는 연구가 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

Cichon Jr, J. V., McCaffrey, T. V., Litchy, W. J. & Knops, J. L. (1995). The effect of botulinum toxin type A injection on compound muscle action potential in an in vivo rat model. *Laryngosc*, 105, 144-148.

Ekong, T. A. N., Feavers, I. & Sesardic, D. (1997). Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for Clostridium botulinum type A endopeptidase activity. *Microbiol*, 143, 3337-3347.

Finney, D. J.(1952). *Probit analysis*. Cambridge, England, Cambridge University ess.

Gartlan, M. G. & Hoffman, H. T. (1993). Crystalline preparation of botulinum toxin type A (Botox) : Degradation in potency with storage. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 108, 135-140.

Ghosh, M. N. (1984). *In Statistical Analysis, Fundamentals of Experimental Pharmacology*, 2nd ed, Scientific Book Agency Calcutta pp. 187-9.

Goodnough, M. C. & Johnson, E. A. (1992). Stabilization of botulinum toxin type A during lyophilization. *Appl Environ Microbiol*, 58, 3426-3428.

Garcia, A. & Fulton, J. E. (1996). Cosmetic denervation of the muscles of facial expression with botulinum toxin: A dose-response study. *Dermatol Surg*, 22, 39-43.

Kim, J. Y., Kim, S. T., Cho, S. W., Jung, H. S., Park, K. T. & Son, H.K. (2008). Growth effects of botulinum toxin type A injected into masseter muscle on a developing rat mandible. *Oral Dis*, 14, 626-632.

- McLellan, K., Das, R. E., Ekong, T. A. & Sesardic, D. (1996). Therapeutic botulinum type A toxin: Factors affecting potency. *Toxicon*, 34, 975-985
- Muhammad, A. R. (2009). Calculation of LD₅₀ values from the method of Miller and Tainter, 1944. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 21, 184-185.
- Nadia, A. K. & Evan, H. B. (2008). Botox: shaken, not stirred. *Ophthal Plast Reconstr Surg*, 24, 10-12.
- Pearce, L. B., Borodic, G. E., First, E. R. & MacCallum, R. D. (1994). Measurement of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay. *Toxicol Appl Pharmacol*, 128, 69-77.
- Schantz, E. J. & Johnson, E. A. (1992). Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev*, 56, 80-99.
- Scott, A. B. (1981). Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 79, 734-770.
- Sesardic, D., McLellan, K., Ekong, T. A. N. & Das, R. G. (1996). Refinement and validation of an alternative bioassay for potency testing of therapeutic botulinum type A toxin. *Pharmacol Toxicol*, 78, 283-288.
- Sloop, R. R., Cole, B. A. & Escutin, R. O. (1997). Reconstituted botulinum toxin type A does not lose potency in humans if it is refrozen or refrigerated for 2 weeks before use. *Neurology*, 28, 249-253.
- Sloop, R. R., Cole, B. A. & Escutin, R. O. (1997). Reconstituted botulinum toxin type A does not lose potency in humans if it is refrozen or refrigerated for 2 weeks before use. *Neurology*, 28, 249-253.

Trindade De Almeida, A. R., Kadunc, B. V., Di Chiacchio, N. & Neto, D. R. (2003). Foam during reconstitution does not affect the potency of botulinum toxin type A. *Dermatol Surg*, 29, 530–531, discussion 532.

Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 203, 1–60.

Yun, J. H., Ham, J. W., Park, J. E. & Kim, C. K. (2005). Experimental study on the potency-maintaining periods of reconstituted botulinum type A toxin. *J Kor Dent Assoc*, 43, 119–125.

영문초록(Abstract)

Comparison of the potency according to the reconstituting material of botulinum toxin type A.

Jong Wook Ham

Department of Dental Science,

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by professor Jong -Hoon Choi, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

Objective: The aim of study is how to reduce the loss of potency in process diluting botulinum toxin type A by comparing the titer of the solutions diluted with Dextrose and diluted with 0.9% saline solution under the same conditions.

Materials and Methods: Mouse divided into two groups, the control group using botulinum toxin type A diluted with 0.9% saline and the experimental group using botulinum toxin type A diluted with 10% dextrose solution. Each dose injected to ten mice and after 72 hours from intraperitoneal injection, at the point, counting the number of dead mice to confirm the mortality by dose, LD₅₀ of each group were compared.

Results: The value of LD₅₀ in the experimental group is approximately 0.131ml (1.31U) and the value of LD₅₀ in the control group is approximately 0.107ml (1.07U). Potency

preservation rate of the experimental group is estimated to 76.3% and that of the control group is estimated to 93.5%.

Conclusion: Compared to the control group with dilution of saline, the titer of botulinum toxin type A is preserved immediately after dilution in the experimental group with dilution of dextrose.

Keywords : Botulinum toxin type A, dilution, potency, mouse