

2016 독성학 전문교육과정 요약

- 2016 독성학 전문교육과정
 - Key links
 - Session I 2016-08-22
 - 독성학 개론 및 발현기전 !!!!
 - 면역독성 !
 - 독성시험과 통계 !!
 - 독성병리 !!
 - 비임상시험결과의 임상시험 연계 !!!!
 - Session II 2016-08-23
 - 오믹스 기반을 이용한 독성평가 !
 - 독성동태 및 대사 !!!
 - 유전독성 및 발암성 !!
 - 신경독성 !
 - 식품의 위해도 평가 !
 - 생식발생독성 !

2016 독성학 전문교육과정

- author: 한성필
- date: 2016-08-22 ~ 2016-08-23
- venue: 숙명여자대학교 백주년기념관 2층 컨벤션 센터

Key links

- 한국독성학회
- Benchmarks in Toxicology
- ICH guideline
- 의약품의 임상시험 수행과 품목허가를 위한 비임상시험가이드라인
- 생물의약품 비임상시험 가이드라인(2014)

Session I 2016-08-22

독성학 개론 및 발현기전 !!!!

- 홍진태: 충북대학교
- 독성학에 많은 분야가 있다. (규제독성학 : 가습기살균제)
- Toxin vs Toxicant man-made
- Toxicity, Hazard(상태), Safety(risk의 반대 개념), Risk(probability), Risk Assessment
- Idiosyncratic reaction, delayed toxicity(중국에서 온 조류, 잔류성 농약 먹고 우리나라 와서 독성)
- 화학적 상호작용 - Additive, synergistic, potentiation, antagonism
- **용량-반응관계** - 유해성 평가에서 중요한 factor - Dose-response - sigmoid 하게 나타난다. 그룹별로 나타난걸 Quantal이라고 한다.
 - 직선형으로 표현할 수도 있다.
 - 기울기도 봐야 한다. B는 다루기가 힘든 약 (Steep) LD50는 값을 지라도 주의해야 한다.
- 효력Potency vs 효능efficacy
 - Morphine / aspirin
- Therapeutic index - LD_{50}/ED_{50}
- Margin of safety - LD_{1}/ED_{99}
- Margin of exposure = exposure level / TD_{10}
- Subchronic / chronic dose response - Liver necrosis - LOAEL
NOAEL(No observed AE level)
 - ADI, RfD, TDI 만성 노출에 대한 허용치를 결정하는 전형적인 시발점
 - Benchmark dose (모델링을 사용해서 결정)
- threshold
- 독성 영향 인자
 - selective
 - 생체내 전환
 - malathion : 사람 vs 곤충(곤충에만 축적)
 - 빈도, 농도, 용량, 부위, 경로, 시각(chronopharmacology)-마우스 KCN 치사율에 대한 circadian susceptibility(심박동 낮고 안정화된 아침에 투약)
 - 내인성 인자: 종, 성별, 연령, 체중/신체구성
- 동물 독성 연구 - 동물에서의 노출과 영향을 연구
 - TCDD에 노출된 rat의 종양 발생
- 독성 시험의 유형 - 단회, 반복 투여 독성 시험, 유전 독성, 면역 독성, 발암성 시험, 국소 독성 시험, 메커니즘 연구, OMICS 활용 독성
- Mechanism of Toxicity
 - Delivery, Reaction, Toxicity, Repair
- Exposure of Toxic chemicals -> Ultimate toxicant + Target molecule
- Type of Ultimate toxicants and their sources

- 대사체가 xenobiotic toxicant
- Reactive oxygen or nitrogen species as ultimate toxicants
- **Endogenous compounds as ultimate toxicants (lipid - peroxidation, Bilirubin)**
- Distribution (Specialized transport - ochratoxin, MPTP into DA neuron)
- Accumulation (Away from the target - MDR)
- Excretion vs reabsorption
 - Excretion (volatile, non-volatile)
 - reabsorption (tubular fluid reabsorption, carrier in kidney, intestinal lumen) - 우리 몸에선 약산, 약알칼리, 중성의 약물 - PH가 중요하다. PKA
 - salicylic acid (알칼리에서 reabs 감소), morphine(산성에서 reabs 감소)
- Toxication vs detoxication
 - electrophiles : nonionic, cationic
 - nucleophiles : amygdalin → cyanide
 - free radical formation
 - Xenobiotics → super oxide
 - P450 reductase PQ, DR, NF 전자를 하나 받아서 reduct한 효소로 바뀌게 산소와 반응해서 free radical 만들게 된다. reduce된다. (전자빠지면서) reactant가 된다.
 - Endogenous sources of O₂
 - One electron oxidation by peroxidases or P450
 - superoxide anion radical toxication
 - Detoxication of free radical
 - SOD, Catalase, GPX, HO(ineffective), ONOO⁻ : free radical scavenge
- Reaction (반응 - ultimate toxicants-target)
 - Target molecule(DNA, ptn, memb lipid, coenzyme)
 - Types of reactions
 - Non-covalent : hydrogen, memb receptor, PKC, acridine
 - Covalent
 - hydrogen abstract :
 - R-SH → RS^{*}
 - CH₃ → CH₂^{*}, DNA → C4 radical, lipid - lipid peroxidation
 - effects of toxicants on targets
 - dysfunction of target (mimicking endogenous ligands, morphine(opiate receptor), protein function impairment)
 - destruction of targets

- cellular dysfunction
 - TK, GPCR, Hormone receptor
 - excitable cell dysfunction - alternation of signal
 - cocaine (adrenergic vasoconstriction)
- Toxic alternation
 - Mechanism of apoptosis + ATP depletion, Ca increase, overpopulation of ROS(PARP increase - DNA injury))
 - Protein repair(ubi, autophagy)

면역독성 !

- 최경철: 충북대학교
- Introduction to WBC
- Introduction to lymphoid organs
- Sentinal cells - MQ, DC, Mast cells
- Structure of LN - B cell은 cortex에 존재함. Ag 만나 proliferation -> class switching (항체를 만든다, cortex에서)
- Structure of spleen - Red pulp (RBC), white pulp(WBC)
- Hypersensitivity reactions (과민반응) - I, II, III(혈관염), IV
- Quiz:
 1. Acquired immunity - B cells
 2. BCR -> antibody
 3. Helper T -> CD4
 4. major 2차면역기관 - A,E
- ICH.org - E2B, CTD, MedDra
- ICH S6 guideline - TDAR, phenotyping 등을 해야 한다.
- S8 guideline (immunotoxicology studies) - STS (standard toxicology study) -> factors to consider in the eval of potential immunotoxicity
- Hapten (low MW, unpredictable, immunogenecity)
- Introduction to antibody
- Type II, III - no standard, non-clinical test (Coombs test)
- murine LLNA (local LN assay) - thymidine -> DNA 합성시 incorporation - beta counter로 잴 수 있다.
- Quiz:
 1. 면역독성 카테고리 포함 안되는것? - Abnormal APC (IS, IG, HS, AI)
 2. 면역조직 아닌거? - Thyroid gl.
 3. Type IV 과민증 (Buehler , maximization, optimization) 아닌것은?
 4. Passive cutaneous anaphyl, maxi test - 동물은? guinea pig
 5. Autoimmunity 비이상적인 현상

6. ImmunoSuppression 아닌 것은? myelosupp, 면역 기관 위축,
serum globulin증가(wrong!), 감염증가

독성시험과 통계 !!

- 이영주: 경희대학교
- 기술통계, 추측통계
- 대표값 + 산포도
- 산술평균 - 극단치에 영향을 많이 받음, 명목변수, 순위변수에는 부적합(예-암1기, 2기), skewed distribution에는 부적합
- 기하평균 - 분포가 한쪽으로 치우쳐 로그변환하여 사용하는 경우(Cmax), 곱셈으로 계산하는 값의 평균 (AUC)
- 대부분의 경우는 SD가 옳다. 산포성 SD. 통계처리시 SE. 추측통계시.
 - triplicate를 세번이상 하는 경우는 SE써도 된다.
- 추측통계
 - 모수 - 모집단을 대표.
 - 신뢰구간 point estimate 99%CI -> 더 넓어진다. (90% CI에 비해)
- 통계적 가설검증 (귀무가설을 기각)
- 검정통계량 - 가설의 옳고 그름을 판단. - 계산.
- $t_{\alpha/2} = 3.182$ 이상이면 H_0 (귀무가설) 기각영역
- Decision Tree
- 서열척도(ordinal scale) - 비모수적 Spearman, MW U test, Kruskal-Wallis

독성병리 !!

- 김용범: 안전성평가연구소
- 같은 동물인데도 병리가 다를 수 있다. (정상이 다를 수 있어.)
- 시험물질 관련 조직변화를 표로 작성하여 소견의 중요성을 판단
- periportal vacuolation. Artifact. inadequate artifact.
- 부검 : 가장 중요함.
- gross 소견 기술: 출혈보다 discoloration. 표준화 통일화
- 장기중량 측정.
- 표준화된 방식으로 작성(잘라야 함.) 같은 조직은 일관성 있게.
- 독성병리학자. 표준화된 표로 정리할 수 있는 능력.
- 대조군의 중요성 강조. 수컷 대조군- 수컷 고용량 - 저용량 순서로 한다.
- 현미경 진단.
 - STP. ESTP. BSTP. JSTP. 표준화를 위한 기관들.
 - 위치. - necrosis, neuron, hippocampus, brain
 - 분포 - 국소, 다소성, 미만성.

- 병변 등급 - 주관적일 수 있다
- Apoptosis- 세포막 손상 없다. necrosis - 광범위 세포막 손상 -> 염증
- 병적과정 - 혈행 장애.
- 치유 및 수복 - 재생, 반흔(섬유화)
- 적응 기전 : 위축, 비대, 과형성, 화생.
- 종양: 세포조절 안됨.
- Peer review
- 아급성 혹은 만성 설치류 독성 시험. 암수 대저군 1마리(25%) 임의 5마리 고농도 (10%) : 모든 슬라이드 동료 검토
- Pathology working group. PWG. 병리전문가 패널. - 검토는 어떻게 수행? 각자의 의견을 투표. 의견이 틀릴때는 조율. 최종적으로 다수에 의해.

비임상시험결과의 임상시험 연계 !!!!

- 반복투여가 중요함. (NOAEL) - 대조군 대비 부작용이 유의하게 증가하지 않는 최고용량. 생물학적 유의성이 중요. (통계적 유의성이 없더라도)
- FDA pregnancy categories, IARC Carcinogens classification (group 1, 2, 3, 4)
- 반복투여 독성 시험 NOAEL을 잘 잡잡기 위해 4번의 기회가 있다.
- 단기(4주)~ pivotal.
- 단기에서 독성을 잘 봐야함. 충분히 높은 용량으로 시작한 뒤에 낮춰가는 쪽으로 해야 함. 그 반대는 참 힘들것.
- Safety margin = NOAEL에서의 exposure / MRHD에서의 exposure
 - exposure가 중요하다.
- 비임상시험의 적용
 - 누구를 대상으로? 최초 투여 용량은 어떻게 결정하는가? 용량 얼마씩 증량
 - 이런 질문이 비임상시험에서 나오게 된다.
- Phase 1a (FIH) 임상시험대상자 (환자 vs 건강인?)
 - 비임상시험 결과 -> Seriousness? measurable? -> if no, 환자관련 의약품. If yes, 건강한 시험대상자
- Clinical starting dose 설정법
- NOAEL/PAD based approach - estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials (2005-07)
 - 초기 임상개시 가능 최고 용량 (MRSD)
 1. 각 동물 종의 NOAEL결정
 2. HED 계산
 3. 가장 적당한 동물종 선정
 4. safety factor 적용
 5. MRSD의 산정
 6. PAD고려하여 선정.

- Human equivalent dose (HED) calculation
 - 사람 용량으로 외삽하는 가장 적합한 방법을 사용하여 HED 산출. (체표면적에 따라서) mg/kg을 mg/m²으로 변경해 준다.
 - km mouse 3 rat 6 monkey 12 dog 20 human 37
 - h:Donkey:Monkey(rabbit):Rat:mouse = 1:2:3:6:12(mg/kg) = 동일 mg/m²
 - mouse 120mg/kg * 3/37 = human 10mg/kg, rat 60mg/kg = human 10mg/kg
- Most appropriate species selection
 - 적당한 종을 사용하라. 잘 모를때는 더 민감한 동물 써라. HED가 더 낮은 동물을 선택하면 된다.
- safety factor application - 좀 낮춰서 투약하자.
 - Default safety factor = 10
- MRSD 산정(Maximum recommended starting dose)
- Quiz : rat 4주 반복 독성 시험에서의 NOAEL 60mg/kg. Rat는 appropriate, safety factor = 10.
 - 60mg/kg rat km = 6, human 36, 나누면 1mg/kg이 된다. 60kg라고 보면 60mg으로 하면 된다.
 - HED = 60mg/kg * 6/37 = human 10mg/kg
 - MRSD = HED / SF = 10/10 = 1mg/kg = 60mg
- PAD (Pharmacologically active dose, PAD) 고려.
 - PAD = 3mg/kg일때 임상 초회 용량 30으로 할 수 있다.
- MABEL Guideline
 - TGN1412 (CD28-Super Mab)
 - HED 16 mg/kg , safety factor 160
 - 원숭이 NOAEL = 50mg/kg (BSA based HED = 16mg/kg)
 - 원숭이 PAD = 2.5 - 25 mg/kg 원숭이 PAD-HED = 0.8 ~ 8 mg/kg , starting dose = 0.1mg/kg
 - 사고 이후의 주장들 1. 5ug/kg 2. 3ug/kg으로 해야한다. 3. receptor occupancy - antagonist는 90% receptor occupancy가 적합. agonist는 10% receptor occupancy면 충분함. 이를 위해서는 1ug/kg면 충분함.
 - MABEL 아마도 사람에게서 약효가 나타날 용량. Minimal anticipated biological effect level)
 - 2007-06 새로운 가이드라인 제정됨.
 - animal in vitro -> allometric equation 산출 - animal in vivo
 - human in vitro -> 적용 . human MABEL 산출
- PK-guided approach - dose대신 전신 노출(systemic exposure) 이용하여 동물 결과를 외삽(extrapolation)
 - SD (starting dose) = AUC * CL_h

- NOAEL 비글에서 AUC 20ug*hr/mL 예상되는 제거율은 $CL_h = 15L/hr$
효력의 차이는 0.1 EC50/EC50
- 건강인 아닌 악성 종양 환자에서의 starting dose
 - 항암제에서.. 주료.
 - ICH S9
 - 57개의 임상시험을 다 분석했다. 여기서 나온 공식으로 계산.
- 임상-비임상 밀접한 관련.
 - 개별 임상시험의 특성
- NOAEL/PAD based approach
- $MRSD = NOAEL * (km_{animal}/km_{human})/SF$

Session II 2016-08-23

오믹스 기반을 이용한 독성평가 !

- 최진희 서울시립대학교
- systems toxicology - science+engineering+computing **Multi-omics technology**
- biological model 만들어.
- in silico - combination - 더 넓은 독성 개념을 얻을 수 있어
- 개발의 platform으로 사용할 수 있음.
- Exposure -> molecular -> cellular -> organ responses -> organism responses -> population responses
- Integration is the key.
- New regulation (i.e. REACH), TOX21, TOX CAST
- adverse outcome pathway
- [Benchmarks in Toxicology](#)

독성동태 및 대사 !!!

- speaker: 신소영(원광대 약학대학)
- Efficacy 의약품의 효능 - 약물활성(Activity, A), 감수성(Sensitivity, S), 약물농도(Concentration, C)
- 약물의 조직에서 농도대신 약물농도에 혈중 약물 농도 변화로 효능을 기술가능. (가정)
- ADME
- toxicokinetics - 정의 : 약효를 기대하지 않는 농약이나 일반 화학물질의 체내 동태
 - ICH 가이드라인

- 독성시험기준 정의 : 독성시험 수행시 시험물질의 전신노출도 평가하기 위해 약물동태학적 자료를 산출하는 시험.
- Model
 - 가장 간단한 모델만 사용할 것임
 - 대부분의 약물은 one compartment model로 설명이 됨.
 - Compartment model, PBPK model
 - zero- and first-order elimination
- CL
 - rate of elimination / concentration = $dX/dt / C_p$ - 약물이 혈중에서 소실되는 속도를 혈중 약물 농도로 나누어준 값 =
 - CL is dose divided by AUC
- F
 - 약물 또는 그 활성대사체가 제제로부터 전신 순환혈로 흡수되는 속도와 양의 비율
 - IV는 F=1
- 비선형성
 - 흡수 riboflavin(transporter GI 포화)
 - 높은 농도에서는 모든 효소가 포화되어 0차반응에 가까워짐
 - 낮은 혈중 농도에서는 1차반응에 가까워짐.
- Michaelis-Menten
 - 소실속도 = $-dC/dt = V_{max}C/K_m + C$
 - 약물농도가 K_m 보다 훨씬 클때 $-dC/dt = V_{max}$
 - 훨씬 작을때 $-dC/dt = V_{max} * C/K_m$
 - 선형동태구간/비선형동태구간

유전독성 및 발암성 !!

- speaker: 김지영(안전성평가연구소) fnkim@kitox.re.kr
- 3 primary test battery (OECD)
 - 화장품에 대한 독성자료 (유럽)는 안받고 있다. 화장품, 유럽은 염색체 빼고 해야함.
- ICH
- Aim of genetic toxicology testing
 - Genotoxicity, mutagenicity
- Forward mutation(broader mutagen identification)
- Backward mutation(reversion) - more restricted and accurate
- TG490
 - in vitro genetic toxicology test
 - mouse lymphoma assay

- TK6 assay로 불리기도 한다.
- Chromosomal aberration
 - 수적 이상
 - 구조적 이상
 - pre-S : chromosome aberration vs post-S : chromatid aberration
- In vivo genetic toxicology tests
 - Tests for primary DNA damage(3 battery에는 안들어가.)
 - Fast, single-strand breaks(SSB) and/or alkali-labile sites(ALS)
 - Liver and stomach were used. (가장 중요한 장기)
- Sens and spec
 - MN, CA, MLA는 specificity가 낮다. (S9 처리해서 phase I은 많이 하지만 phase II(detoxification)를 구현할 수 있는 in vitro시험은 없기 때문에 specificity 낮음)
- 발암성 시험
 - detection of potential to induce neoplastic lesions
 - 요구되지 않는 경우 - 악성종양치료제, 3년 이내 생존
- “예전거로 해주세요.”
 - 개정된 시험이 더 고비용이기 때문에 요청하는 경우가 많다.
 - 그러나 그렇게 하면 안된다.

신경독성 !

- 위명복: 강원대학교
- 산화적 손상에 대한 신경계 취약성
 - 항산화방어기전 중등도 낮음(catalase, GPx, vit-E)
 - tight junction 단백질감소, MMP 간접활성
 - microglia에 의한 ROS 및 cytokine 생산.
- 신경손상 형태
 - neuronopathy -> gliosis (methyl mercury, Tins, MPTP(heroin))
 - myelionopathy
- TG: 설치류 신경독성평가, 발달 신경독성평가
- Neurotoxicity screening battery
 - Tier 1 - FOB, locomotor, GFAP ELISA, histopathology
 - Tier 2
- 비동물대체법(non-animal alternative methods)
 - 세포를 가지고 하는 것이다.
 - 대체한계성 - 모든 것을 대체할 수 없다.
- Stroke, parkinson, SCI, etc..

- CNS injury marker - BBB(Evan's), microglia(OX-42), etc..

식품의 위해도 평가 !

- 최시내 케이앤에이컨설팅
- 체내로 유입되는 양이 중요함
- 급성 섭취 노출량 예측
 - 잔류량이 composite 분석 결과에 해당.
- 노출 평가
- 용량-반응 관계 규명
 - extrapolation : high-dose -> low-dose
 - 기본 원칙 : threshold approach, non-threshold approach
 - Non threshold -> extrapolation
 - cancer potency = Q1star = upper bound
 - Threshold approach - NOAEL
 - NOAEL을 활용한 RfD의 유도
 - NOAEL or LOAEL / UF x MF ; UF = uncertainty factor
- Risk characterization
 - Threshold
 - Hazard quotient = [exposure level] / [reference dose]
 - exposure와 reference dose는 동일한 노출 기간에 근거

생식발생독성 !

- 김종춘: 전남대학교
- segment I, II, III (KFDA, ICH)
 1. Fertility and early embryonic development study
 2. Embryo-fetal development study
 3. Peri- and postnatal development study
- Segment I
 - Stage I ~ XIV - 56일 걸린다.
 - 같은 stage끼리 비교해야 함.
- Segment II
 - 기형변이
 - teratogenesis
 - 600kda 이하의 분자량이어야 태반 통과.
 - 연골 + 경골의 염색
- Segment III
 - 한배새끼관찰, F1 성장, 행동, 생식기능시험
- Key point

- 생식발생 위해성 급증
- 시험법
- 실험동물 종과 계통 선택
- 결과의 해석
- 종류와 특성 및 작용 기전
- 3Rs principle