

항혈전제 아스파라톤의 생식독성연구 : 랫드 초기형성시험

정문구* · 이상준 · 김종춘 · 송시환

한국화학연구소 안전성연구부

Reproductive Toxicity Study of Aspalatone, A New Antithrombotic Agent: Teratogenicity Study in Rats

Moon Koo CHUNG*, Sang Joon LEE, Jong Choon KIM and Si Whan SONG

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical
Technology, P.O. Box 107, Yusung, Daejeon 305-600, Korea

(Received June 9, 1998; accepted June 25, 1998)

Abstract – Aspalatone, a new antithrombotic agent, was administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats during the organogenetic period at dose levels of 0, 20, 100 and 500 mg/kg/day. All dams were subjected to caesarean section on day 20 of pregnancy. Effects of test substance on dams and embryonic development of F1 fetuses were examined. There were treatment-related decreases in body weight and food consumption in the 500 mg/kg group. There was an increase in the spleen weight in the 100 and 500 mg/kg groups. Developmental toxicity was evident as decreased fetal body weights and increased fetal malformations in the 500 mg/kg group. External and skeletal malformations of fetuses occurred at an incidence of 1 and 8.2%, respectively. In addition, there was a delay in ossification of sternbrae and sacrocaudal vertebrae in the 500 mg/kg group. The results show that the no observed adverse effect dose level (NOAEL) for maternal toxicity was 20 mg/kg/day and for developmental toxicity was 100 mg/kg/day.

Keywords □ aspalatone, antithrombotic, teratogenicity study, rat

아스피린(aspirin, acetylsalicylic acid)은 prostaglandin 생합성에 관여하는 주요 효소인 prostaglandin H synthetase의 Ser530 잔기를 특이적으로 acetylation하여 prostaglandin H synthetase의 cyclooxygenase 활성을 비가역적으로 저해하여 항혈전, 소염, 해열 및 진통의 약효를 나타낸다고 한다(Roth와 Majerus, 1975; Pedersen과 Fitzgerald, 1984; Livio 등, 1989; Patrono, 1989). 특히 사람의 경우 저용량(100-300 mg daily)을 경구 복용하면 thromboxane A₂의 생성을 선택적으로 저해하며, 이는 presystemic(portal) circulation으로 흡수된 aspirin이 혈소판의 cyclooxygenase를 선택적으로 저해하기 때문이라고 한다(Rainsford, 1977; de Gaetano 등, 1985).

아스피린이 저용량에서 뛰어난 항혈전 효과를 보이는 것은 여러 임상시험을 통하여 입증되고 있으나, 위출혈 및 위궤양을 일으키는 부작용으로 인하여 임상에서의 폭넓은 사용이 제한되고 있다(O'Grady와 Moncado, 1978; Kauffman, 1989).

아스파라톤은 아스피린의 단점을 극복하고자 부광약품(주) 연구소(서울특별시 동작구 대방동 398-1)에서 개발한 항혈전제로서 아스피린과 고려 홍삼의 항산화 활성 성분인 maltol을 축합한 물질로서 위궤양 등의 부작용이 적으며 항혈전 효과는 아스피린과 동등함이 여러 동물실험을 통하여 밝혀진 바 있다(Han 등, 1994).

한편 아스피린의 초기형효과는 랫드(Warkany와 Takacs, 1959), 마우스(Trasler, 1965; Larsson과 Eriksson, 1966), 햄스터(Lapointe와 Harvey, 1964) 및 원숭이(Wilson, 1971)에서 확인되어 보고된 바 있으며, 원숭이는 랫드보다 훨씬 덜 민감하다고 한다(Wilson, 1972). 그리고 아스피린은 임신부에게 가장 빈번하게 처방되는 약물에 속하는데 인간에 있어서는 기형유발성이 확인되지 않았다고 한다(Slone 등, 1976).

본 연구는 신약후보물질의 생식독성학적 스크리닝(reproductive-toxicological screening)의 일환으로서 항혈전제인 아스파라톤이 임신랫드의 배아 및 태자에 있어서 기형, 치사 및 발육지연을 유발하는지를 조사하기 위하여 실시하였다. 본 시험은 의약품 등의 독성시험기준(국립보건안전원,

* To whom correspondence should be addressed.

1994)에 준하여 실시하였다.

실험방법

시험물질

본 시험에는 (주)부광약품 연구소에서 합성한 아스파라톤(Lot No. EX-511)이 사용되었다. 아스파라톤은 항혈전제로서 Acetylsalicylic acid와 maltol이 ester화된 물질이고 분자량은 각각 180 및 108이며 불수용성의 백색입자성 분말로서 순도는 99% 이상이었다. 아스파라톤은 10 ml/kg의 투여액량으로 0.5% CMC(carboxy methyl cellulose)에 용해시켜 조제한 후 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

실험동물은 한국화학연구소 안전성연구부 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100)로 부터 입수한 Sprague-Dawley 랫드(SPF)를 사용하였다. 9주령의 수컷 100마리와 암컷 200마리를 입수한 후 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 1:2로 교배시켜 질구의 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하였으며 교미확인된 암컷 100마리를 시험에 사용하였다.

본 시험은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 13~18회/hr., 조명시간 12시간(오전 9시~오후 9시), 조도 200~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시되었다. 시험기간 중 사료는 실험동물용 고품사료[제일사료(주)]를 방사선조사(2.0 Mrad)멸균하여, 그리고 물은 상수도수를 자외선 유수살균기로 소독시킨 후 자유섭취시켰다.

투여량의 설정과 시험군의 구성

200, 300, 400, 500 및 600 mg/kg의 5개 용량으로 예비시험을 실시한 결과, 600 mg/kg 투여군에서는 매우 높은 흡수율(61.3%)이, 그리고 500 mg/kg 투여군에서는 모동물의 체중증가 역제가 나타났으나 그 밖의 투여군에서는 이상소견이 관찰되지 않았다. 이를 기초로 500 mg/kg을 고용량으로 정하고 공비 5로 중용량 및 저용량을 100 및 20 mg/kg으로 설정하였으며 그 외에 매체(0.5% CMC)대조군을 두었다. 시험군의 구성은 Table I과 같다.

투여방법 및 투여기간

경구투여용 존데가 장착된 주사관을 이용하여 시험물질을 강제경구 투여하였으며 기관형성기(임신 6일부터 임신

16일까지)동안 1일 1회 오전중에 반복투여하였다. 투여액량은 임신 6일, 9일 및 13일의 체중을 기준으로 산출하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상관찰

시험기간중 1일 1회 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망 유무에 관해서 관찰하였고 투여기간중에는 투여전후 1일 2회 관찰하였다.

체중 및 사료섭취량 측정

각 군의 전 어미동물에 대하여 임신 0, 6, 9, 13, 16 및 20 일째에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 모든 동물에 대하여 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다(단, 임신 20일째에는 제왕절개로 인하여 임신 19일째에 사료급여후 익일 잔량을 측정하였음).

부검

각 군의 모든 임신동물들을 임신 20일째에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 이 때 간장, 신장, 비장, 심장, 뇌, 부신 및 난소의 중량을 측정하였다.

제왕절개

각 군의 모든 암컷동물들을 임신 20일째에 제왕절개하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수배자(태자)수, 사망태자수, 생존태자의 성별 및 개체별 체중 등을 조사하였다.

태자의 외표검사

생존태자를 자궁에서 적출한 후 즉시 외표이상의 유무에 대하여 관찰하고 왼쪽 자궁각의 난소측에서 번호를 매겨 흡수번호는 골격검사에 그리고 짝수번호는 내장검사에 사용하였다.

골격검사

각 배당 생존태자를 5% 포르말린에 고정된 후 변형된 Dawson법(Dawson, 1926)에 따라 골격표본을 제작한 후 골격이상 유무 및 골화상태에 대하여 검사하였다.

내부장기검사

각 배당 생존태자를 Bouin액에 고정된 후, 두부 및 복부는 Wilson법(Wilson, 1965), 흉부는 Nishimura법(Nishimura, 1974)에 의하여 내부장기 이상유무를 검사하였다.

통계학적 분석

얻어진 시험자료에 대한 통계분석은 SAS 프로그램(SAS institute Inc., Ver. 6.04)을 이용하였으며, 체중, 사료섭취량 및 장기중량은 일원배치분산분석(ANOVA)과 Dunnett 다중 비교검정을, 빈도수를 나타내는 시험자료는 Kruskal-Wallis (H) 검정과 Dunnett 다중비교검정법, 태자의 성비는 χ^2 검정법으로 각각 대조군과 유의차검정을 실시하였다. 태자에 대한 시험자료는 성비를 제외하고 한배에서 나온 태자들의 평균체중, 빈도수(황체수, 흡수배자수, 사망태자수)를 이용하여 통계분석하였고, 출생자에 대한 시험자료는 모동물 단위로 정리하여 분석하였다. 전체적으로 검정의 유의수준

Table 1. Experimental design for teratogenicity study of Aspalatone in rats

Group	Dose (mg/kg/day)	Volume (ml/kg)	No. of animals
Control	0	10	25
Aspalatone	20	10	25
	100	10	25
	500	10	25

은 1% 혹은 5%에서 검사하였다.

실험결과

모동물에 미치는 영향

일반증상

모동물의 임신기간동안 100 mg/kg 투여군에서 눈주위 암적색 분비물(dark material around eye)이 1례 관찰되었을 뿐 매체대조군과 그 밖의 투여군에서는 이상증상이 관찰되지 않았다. 상기소견은 투여시의 투여보정에 의한 물리적 자극이나 기타 원인에 의한 스트레스에 기인한 소견으로서 시험물질에 의한 변화는 아니라고 사료되었다.

체중

모동물의 임신기간동안 500 mg/kg 투여군에서 임신 9일째부터 임신말기까지의 체중이 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데 이는 시험물질에 의한 변화로 인정되었다(Fig. 1).

사료섭취량

모동물의 임신기간동안의 사료섭취량은 500 mg/kg 투여군에서 임신 7일째부터 임신 17일째까지의 사료섭취량이 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데 이는 시험물질에 의한 변화로 판단되었다(Fig. 2).

부검소견

모동물의 임신 20일째 부검시 20 mg/kg 투여군에서는 뇌수종(hydrocephalus) 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 우측 신장의 신우확장(pyelectasia)이 각각 1례씩 관찰되었고 500 mg/kg 투여군에서는 간장의 백색병소(foci)와 백색 소결절

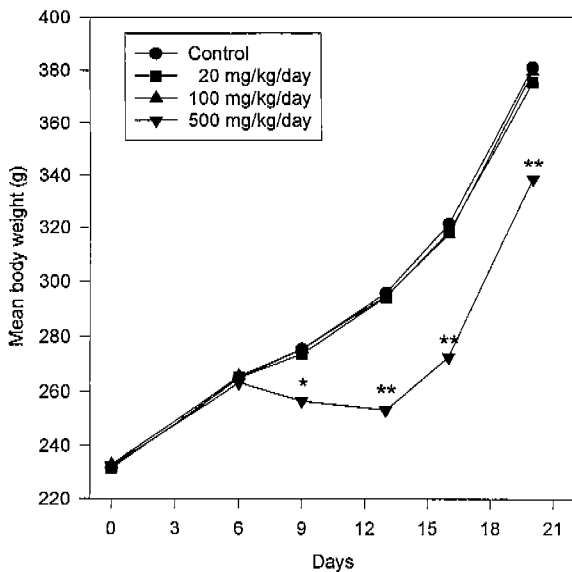


Fig. 1. Changes in body weights of dams treated with Asparatone during the organogenetic period. *P<0.05, **P<0.01.

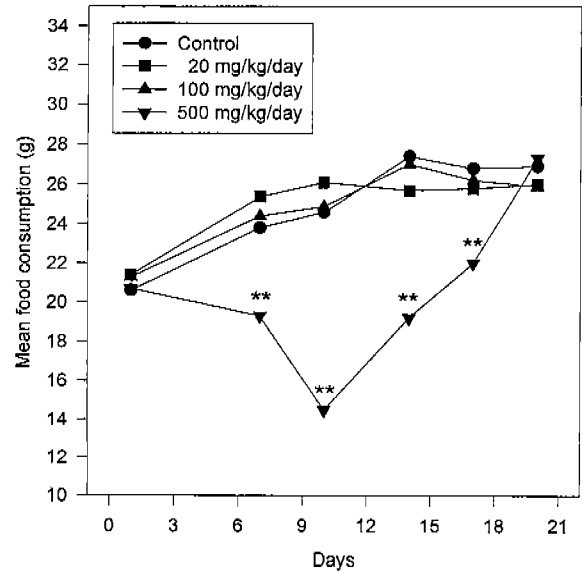


Fig. 2. Changes in food consumption of dams treated with Asparatone during the organogenetic period. **P<0.01.

(nodules)이 각각 1례씩 관찰되었다. 상기소견중 20 mg/kg 투여군에서 나타난 뇌수종과 100 mg/kg 투여군에서 관찰된 신우확장은 SD 랫트에 있어서 자연발생적으로 나타나는 소견으로서 시험물질의 영향은 아니었고 500 mg/kg 투여군에서 나타난 간장의 변화도 병리조직소견이 없어서 단정하기는 어려우나 시험물질과는 무관한 자연발생적 소견으로 사료되었다.

장기중량

모동물의 임신 20일째 부검시 측정된 주요장기의 절대중량에 있어서 100 mg/kg 및 500 mg/kg 투여군에서는 비장중량의 통계학적 유의성있는 증가가 그리고 500 mg/kg 투여군에서는 심장중량의 통계학적 유의한 감소가 관찰되었다. 한편 상대중량에 있어서 100 mg/kg 투여군에서는 비장이 그리고 500 mg/kg 투여군에서는 뇌, 간장, 비장, 좌우측 신장 및 우측 난소가 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 증가를 나타냈다. 상기소견중 500 mg/kg 투여군에서 관찰된 심장의 절대중량 감소는 체중감소에 따른 소견으로 판단되었고 뇌, 간장, 신장 및 우측난소의 상대중량 증가는 체중감소에 따른 상대적 증가로 판단되었다. 다만 100 및 500 mg/kg 투여군에서의 비장중량의 증가는 시험물질에 의한 변화로 인정되었다(Table II).

태자에 미치는 영향

제왕절개성적

임신 20일째 제왕절개시 조사된 황체수, 착상수, 흡수배자수, 사망태자수, 산자수 및 성비에 있어서 매체대조군과 각 투여군간의 유의차는 인정되지 않았다. 생존태자의 체중은 500 mg/kg 투여군에서 암수 모두 매체대조군에 비해

Table II. Organ weights of dams treated with Aspalatone during the organogenetic period

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of animals	23	23	24	21
Body weight (g)	380.8±28.4	375.4±19.9	379.2±22.0	338.5±34.6
Brain (g)	1.835±0.084	1.864±0.086	1.868±0.100	1.802±0.080
% Body weight	0.484±0.038	0.498±0.033	0.494±0.032	0.537±0.056**
Adrenal gland-left (g)	0.034±0.007	0.033±0.005	0.032±0.006	0.033±0.007
% Body weight	0.009±0.002	0.009±0.002	0.008±0.002	0.010±0.002
Adrenal gland-right (g)	0.031±0.005	0.031±0.004	0.028±0.005	0.030±0.006
% Body weight	0.008±0.001	0.008±0.001	0.007±0.001	0.009±0.002
Liver (g)	15.838±1.133	16.103±1.396	16.057±1.595	16.458±1.899
% Body weight	4.167±0.244	4.289±0.287	4.234±0.337	4.868±0.342**
Spleen (g)	0.583±0.084	0.613±0.075	0.654±0.081*	0.723±0.104**
% Body weight	0.156±0.023	0.163±0.019	0.172±0.019*	0.214±0.029**
Kidney-left (g)	1.031±0.106	1.033±0.099	1.030±0.087	1.087±0.128
% Body weight	0.271±0.026	0.276±0.027	0.272±0.021	0.322±0.029**
Kidney-right (g)	1.038±0.098	1.062±0.101	1.062±0.138	1.126±0.120
% Body weight	0.273±0.026	0.283±0.028	0.280±0.032	0.334±0.028**
Heart (g)	0.924±0.105	0.951±0.089	0.925±0.092	0.828±0.065**
% Body weight	0.243±0.026	0.253±0.020	0.244±0.021	0.246±0.023
Ovary-left (g)	0.060±0.016	0.056±0.014	0.058±0.008	0.060±0.011
% Body weight	0.016±0.004	0.015±0.003	0.015±0.002	0.018±0.004
Ovary-right (g)	0.056±0.014	0.061±0.009	0.061±0.012	0.058±0.011
% Body weight	0.015±0.004	0.016±0.002	0.016±0.003	0.017±0.003*

Values are Mean±S.D. * and ** indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels compared with the control group.

통계학적으로 유의성 있는 감소를 나타냈는데, 이는 시험 물질에 의한 영향으로 판단되었다. 태자의 외표소견은 매체대조군에서 무미(acaudate)가 1례 관찰되었고 100 mg/kg 투여군에서 흔적미(vestigial tail)가 3례 관찰되었다. 또한 500 mg/kg 투여군에서는 뇌척수막탈출(meningocele)이 2례 그리고 이분척추(spina bifida), 복벽파열(gastroschisis), 뇌탈출증(exencephaly) 및 만곡족(club foot)의 복합기형이 1례 관찰되었다(Table III). 상기소견중 100 mg/kg 투여군에서 관찰된 흔적미는 랫드에 있어서 흔히 관찰되는 소견으로서 자연발생적 소견으로 판단되었고 500 mg/kg 투여군에서 나타난 소견들은 시험물질의 투여에 기인한 소견으로 인정되었다.

내부장기검사

임신 20일째 적출한 태자의 내부장기검사시 20 mg/kg 투여군에서 기형에 속하는 외측뇌실 및 제 3뇌실의 확장(dilatation of the lateral and 3rd ventricle)이 1례 관찰되었는데 발현율이 낮고 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향으로 인정되지 않았다. 또한 매체대조군에서 20, 100 및 500 mg/kg 투여군의 순으로 신우확장(dilatation of the renal pelvis)은 4, 1, 1 및 3례씩 그리고 요관확장(dilatation of the ureter)은 11, 5, 6 및 7례씩 관찰되었는데 이들은 용량상관성이 없었으며 자연발생적으로도 관찰되는 소견들로

써(Morita 등, 1987) 시험물질에 의한 변화는 아니라고 사료된다(Table IV).

골격검사

랫드태자의 골격소견은 신체의 기능장애 유발여부, 골화 정도 등에 따라서 기형(malformation), 변이(variation) 및 골화지연(retardation)으로 구분된다. 임신 20일째 적출한 태자의 골격검사시 매체대조군에서는 흉추추체이분(bicentric thoracic vertebral body), 아령형 흉추추체(dumbbell-shaped thoracic vertebral body), 아령형 요추추체(dumbbell-shaped lumbar vertebral body) 및 이분흉골분절(cleaved sternbrae) [골화지연]이 22례(13.3%) 관찰되었다. 20 mg/kg 투여군에서는 말늑골단소(shortened 13th rib) [기형]가 1례 그리고 흉추추체이분, 아령형흉추추체, 이분흉골분절 및 후두상골의 골화지연 [골화지연]이 12례(7.0%) 나타났다. 100 mg/kg 투여군에서는 말늑골단소 [기형]가 5례(2.9%), 천추의 요추화(lumbarization of sacral vertebrae) 및 요늑(14th rib) [변이]이 2례(1.1%) 그리고 흉추추체이분, 편측성흉추추체(thoracic hemivertebra), 아령형흉추추체, 이분흉골분절, 후두상골의 골화지연 [골화지연]이 6례(3.4%) 관찰되었다. 500 mg/kg 투여군에서는 늑골유착(fused ribs), 경추추궁유착(fused cervical vertebral arches), 요추추궁유착(fused lumbar vertebral arches), 두정간골의 결손(absence of os in-

Table III. Caesarean section data of dams treated with Aspalatone during the organogenetic period

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of pregnant animals	23	23	24	21
Corpora lutea (Mean±S.D.)	16.4±2.71	16.3±1.89	16.8±1.59	16.5±3.25
Implantations (Mean±S.D.)	15.2±3.37	15.3±2.34	15.6±1.06	15.4±3.67
% to corpora lutea (Mean±S.D.)	92.1±12.49	93.6±6.90	93.4±6.29	91.8±13.07
Fetal deaths (resorptions+dead fetuses)	24	27	27	20
Resorptions				
Total	24	26	27	20
Early	23	24	27	19
Late	1	2	0	1
Dead fetuses	0	1	0	0
Live fetuses				
Male/Female	158/167	174/150	171/176	147/157
Litter size (Mean±S.D.)	14.1±3.42	14.1±2.57	14.5±1.86	14.5±3.41
% to implantation (Mean±S.D.)	93.0±7.87	92.2±7.70	92.6±8.50	94.3±6.94
Sex Ratio (Male/Female)	0.95	1.16	0.97	0.94
Body weight of live fetuses				
Male (Mean±S.D.)	3.3±0.29	3.3±0.19	3.4±0.14	2.7±0.31**
Female (Mean±S.D.)	3.2±0.21	3.2±0.20	3.2±0.15	2.6±0.32**
No. of fetuses with external anomalies (%)	1(0.3)	0	3(0.9)	3(1.0)
Acaudate	1	0	0	0
Vestigial tail	0	0	3	0
Spina bifida;gastroschisis; exencephaly;club foot	0	0	0	1
Meningocele	0	0	0	2

* and ** indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels when compared with the control group.

Table IV. Visceral findings in fetuses from dams treated with Aspalatone during the organogenetic period

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of fetuses examined	158	155	167	148
No. of fetuses with malformations (%)	0	1(0.7)	0	0
Dilatation of the lateral and 3rd ventricle	0	1	0	0
No. of fetuses with variations(%)	15(9.5)	6(3.9)	7(4.2)	10(6.8)
Dilatation of the renal pelvis	4	1	1	3
Dilatation of the ureter	11	5	6	7

terparietale), 말늑골결손(absence of 13th rib), 흉추추체결손(absence of thoracic vertebral body), 흉추추궁결손(absence of thoracic vertebral arch), 요추추체결손(absence of lumbar vertebral body), 요추추궁결손(absence of lumbar vertebral arch), 요추결손(absence of lumbar vertebrae), 제 2 천추추체결손(absence of 2nd sacral vertebral body), 천미추결손(absence of sacral and caudal vertebrae), 좌골 및 치골결손(absence of os ischii and os pubis) [기형]이 13례(8.2%), 천추의 요추화, 요늑, 제 15번 늑골(15th rib)[변이]이 22례(13.

9%) 그리고 흉추추체이분, 요추추체이분, 편측성흉추추체, 편측성요추추체, 이령형흉추추체, 이령형요추추체, 천문확장(enlarged fontanelle), 후두상골의 골화지연 및 두정간골의 불완전골화 [골화지연]가 40례(25.3%) 발견되었다. 이중 500 mg/kg 투여군에서 나타난 기형, 변이 및 골화지연의 발현율은 매체대조군에 비해 현저히 높아서 시험물질에 의한 영향으로 인정되었다. 그리고 흉골 및 천미추의 골화진행도는 500 mg/kg 투여군에서 매체대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈다(Table V).

Table V. Skeletal findings in fetuses from dams treated with Aspalatone during the organogenetic period

Dose (mg/kg)	0	20	100	500
No. of fetuses examined	166	172	175	158
No. of fetuses with malformations (%)	0	1(0.6) ^d	4(2.3) ^b	13(8.2) ^c
No. of fetuses with variations (%)	0	0	2(1.1) ^d	22(13.9) ^{c**}
No. of fetuses with retardations (%)	22(13.3) ^f	12(7.0) ^g	6(3.4) ^h	40(25.3) ⁱ
No. of ossification centers				
Sternebrae	4.4±0.45	4.5±0.60	4.5±0.49	3.7±1.21**
Metacarpals in both forelimbs	6.2±1.46	6.4±0.46	6.5±0.46	5.8±0.72
First & 2nd phalanges in both forelimbs	0	0	0	0
Metatarsals in both hindlimbs	7.6±1.66	8.0	8.0±0.07	7.5±0.91
First & 2nd phalanges in both hindlimbs	0	0	0	0
Cervical vertebrae	0	0	0	0
Sacral and caudal vertebrae	7.3±0.47	7.2±0.27	7.2±0.44	6.3±1.42**

^aShortened 13th rib. ^bShortened 13th rib. ^cFused ribs, fused cervical vertebral arches, fused lumbar vertebral arches, absence of os interparietale, absence of 13th rib, absence of thoracic vertebral body, absence of thoracic vertebral arch, absence of lumbar vertebral body, absence of lumbar vertebral arch, absence of lumbar vertebrae, absence of 2nd sacral vertebral body, absence of sacral & caudal vertebrae, absence of os ischii and os pubis, absence of os pubis, absence of os ischii. ^dLumbarization of sacral vertebrae, 14th rib. ^eLumbarization of sacral vertebrae, 14th rib, 15th rib. ^fBicentric thoracic vertebral body, dumbbell-shaped thoracic vertebral body, dumbbell-shaped lumbar vertebral body, cleaved sternbrae. ^gBicentric thoracic vertebral body, dumbbell-shaped thoracic vertebral body, cleaved sternbrae, delayed ossification of os supraoccipitale. ^hBicentric thoracic vertebral body, thoracic hemivertebra, dumbbell-shaped thoracic vertebral body, cleaved sternbrae, delayed ossification of os supraoccipitale. ⁱBicentric thoracic vertebral body, bicentric lumbar vertebral body, thoracic hemivertebra, lumbar hemivertebra, dumbbell-shaped thoracic vertebral body, dumbbell-shaped lumbar vertebral body, enlarged fontanelle, delayed ossification of os supraoccipitale, incomplete ossification of os interparietale. * and ** indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels when compared with the control group.

고 찰

아스피라톤은 (주)부광약품 연구소에서 개발중인 항혈전제로서 acetylsalicylic acid와 maltol이 ester화된 물질이다. 아스피린과 약리효과가 유사하고 아스피린의 부작용인 위 자극성 출혈 및 궤양 등 side effect를 현저히 낮춘 이러한 아스피라톤을 0, 20, 100 및 500 mg/kg의 용량으로 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 임신 6일부터 16일까지 경구투여하여 모동물 및 태자에 미치는 영향을 조사하였다.

모동물의 체중 및 사료섭취량에 있어서 500 mg/kg 투여군에서 임신 7일째부터 임신 17일째까지 나타난 사료섭취량의 감소는 투여 스트레스도 다소 작용했을지 모르나 시험물질에 의해 야기된 식욕부진증(anorexia), 대사장애, 소화장애 등의 결과로서 이로 인해 500 mg/kg 투여군의 임신 9일째부터 임신말기까지의 체중이 감소한 것으로 판단된다.

100 및 500 mg/kg 투여군에서 나타난 비장중량의 증가는 아스피라톤의 랫트 아급성 독성시험(송, 1995)에서도 관찰된 소견으로서 골수의 조혈의 항진과 유관하며 시험물질이 조혈기계에 독성영향을 주어 비장에 2차적인 보상효과를 나타냄을 알 수 있었다.

모동물의 제왕절개시 500 mg/kg 투여군에서 관찰된 암수 생존태자의 체중감소는 시험물질에 의한 태자의 발육지연효과(growth retardation effect)로서 설명할 수 있다.

Warkany와 Tackacs(1959)은 랫트에게 항혈전제인 아스피린을 임신 9일에서 11일까지 고용량으로 연속투여한 후 두개척추개열(craniorachischisis), 뇌탈출증, 뇌수종(hydrocephaly), 안면개열(facial cleft), 안기형, 복벽파열, 척추 및 늑골의 이상 등 여러가지의 기형들을 관찰할 수 있었다고 한다. 그 밖에도 일련의 최기형성 연구를 통하여 아스피린이 임신랫트에 있어서 태자기형을 유발한다는 사실이 다수 보고된 바 있다(Palmer, 1972; Wilson 등, 1977; Corby, 1978; Tanigawa, 1979; Wickramaratne, 1988).

아스피린과 maltol이 혼합된 아스피라톤에 대한 기형발현성을 조사한 본 연구에서도 상기한 연구자들의 보고와 같이 다양한 종류의 태자기형이 관찰되었는데, 500 mg/kg 투여군에서 뇌척수막탈출, 이분척추, 복벽파열, 뇌탈출증 및 만곡족 등의 외포기형과 늑골유착, 경추 및 요추추궁유착, 두정간골, 말늑골, 흉추추체, 흉추추궁, 요추추체, 요추추궁, 요추, 제 2천추추체, 천미추, 좌골 및 치골의 결손 등의 골격기형이 발견되었다.

랫드에 있어서 아스피린의 투여에 따른 최기형성의 발현기작을 살펴보면 salicylate가 임신랫드의 배자(embryo)에 직접적으로 작용하여 나타난 결과인지 아니면 모독성(maternal toxicity)에 따른 간접적인 결과인지는 많은 연구자들에 의해 의문이 제기되어 왔다(Goldman과 Yakovac, 1964). Koshakji와 Schuler(1973)는 아스피린의 최기형 효과는 아

스피린의 가수분해산물인 salicylic acid에 기인된 것이라고 보고하였고, McGarrity 등(1978)과 Greenaway 등(1982)은 전배자배양(whole embryo culture)을 이용한 *in vitro* 시험에서 salicylate가 랫드배자에 직접적으로 작용하여 최기형을 유발하며 모체인자와는 비의존적임을 증명한 바 있다.

낮은 빈도의 변이는 보통 시험물질과 무관하게 자연발생적으로 나타날 수 있지만, 그 발현율이 현저히 높거나 용량 상관성있게 나타날 경우 시험물질에 기인한 독성효과로 간주된다. 500 mg/kg 투여군의 경우 천추의 요추화, 요늑 및 제 15번 늑골과 같은 변이가 높은 발현율(13.9%)로 나타남으로써 아스파라톤은 변이유도물질임을 알 수 있었다.

골화지연은 태자의 체중감소와 마찬가지로 시험물질에 기인한 태자의 자궁내 발육지연효과(intrauterine growth retardation effect)로서 평가되는데 500 mg/kg 투여군에서는 흉추 및 요추추체이분, 편측성 흉추 및 요추추체, 아령형 흉추 및 요추추체, 천문확장, 후두상골의 골화지연 및 두정간골의 불완전골화와 같은 골화지연이 높은 빈도(25.3%)로 관찰되어 아스파라톤은 태자의 발육지연을 유발하는 것으로 사료되었다. 또한 골화진행도에 있어서는 500 mg/kg 투여군에서 흉골 및 천미추의 골화점수의 감소가 관찰되었는데 이는 500 mg/kg 투여군에서 나타난 태자체중의 감소와 상관된 소견으로 사료되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼때 본 최기형성시험에 의한 아스파라톤의 무해용량(no observed effect level)은 모동물에 있어서 20 mg/kg 그리고 태자에 있어서 100 mg/kg 이라고 사료된다.

감사의 말씀

시험물질 아스파라톤을 제공해주신 (주)부광약품과 본시험을 수행하는데 기술적인 도움을 주신 최규갑, 양병철 씨 그리고 통계처리 및 자료정리를 맡아주신 황선구 씨께 감사사를 드립니다.

참고문헌

Corby, D. G. (1978). Aspirin in pregnancy: Maternal and fetal effects. *Pediatrics* **62** (suppl), 930-937.
 Dawson, A. B. (1926). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin red S. *Stain. Technol.* **1**, 123-124.
 de Gaetano, G., Cerletti, C., Dejana, E. and Latini, R. (1985). Pharmacology of platelet inhibition in humans in implications of salicylate-aspirin interaction. *Circulation* **72**, 1185.
 Goldman, S. A. and Yakovac, W. C. (1964). Salicylate intoxication and congenital anomalies. *Arch. Environ. Health* **8**, 648-656.
 Greenaway, J. C., Shepard, T. H., Fantel, A. G. and Juchau, M. R. (1982). Sodium salicylate teratogenicity *in vitro*.

Teratology **26**, 167-171.
 Han, B. H., Suh, D. Y., Yang, H. O., Park, Y. H., Kang, Y. H. and Kim, Y. C. (1994). Synthesis and antiplatelet effects of the new antithrombotic agent aspalatone with low ulcerogenicity. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **44**, 1122-1126.
 Kauffman, G. (1989). aspirin-induced gastric mucosal injury: Lessons learned from animal models. *Gastroenterology* **96**, 606.
 Koshakji, R. P. and Schuler, A. R. (1973). Biochemical mechanisms of salicylate teratology in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 407-416.
 Laponte, R. and Harvey, E. B. (1964). Salicylamide-induced anomalies in hamster embryos. *J. Exp. Zool.* **156**, 197-200.
 Larsson, K. S. and Erickson, M. (1966). Salicylamide-induced fetal death and malformations in two mouse strains. *Acta. Paediatr. Scand.* **55**, 569-576.
 Livio, M., Benigni, A., Zoja, C., Begnis, R., Morelli, C., Rossini, M., Garattini, S. and Remuzzi, G. (1989). Differential inhibition by aspirin of platelet thromboxane and renal prostaglandins in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**, 334-341.
 McGarrity, C., Samani, N. J. and Beck, F. (1978). The *in vivo* and *in vitro* action of sodium salicylate on rat embryos. *J. Anat.* **127**, 646.
 Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Kagegawa, Y., Miyamoto, M. and Watanabe, T. (1987). Spontaneous malformations in laboratory animals: Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbit and mice. *Cong. Anom.* **27**, 147-206.
 Nishimura, K. (1974). A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.* **14**(1), 23-40.
 O'Gray, J. and Moncada, S. (1978). Aspirin: a paradoxical effect on bleeding time. *Lancet* **2**, 780.
 Palmer, A. K. (1972). Sporadic malformation in laboratory animals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **27**, 48.
 Patrono, C. (1989). aspirin and human platelets: from clinical trials to acetylation of cyclooxygenase and back. *TIPS* **10**, 453.
 Pedersen, A. K. and Fitzgerald, G. A. (1984). Dose-related kinetics of aspirin: presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *New Engl. J. Med.* **311**, 1206-1211.
 Rainsford, K. D. (1977). Aspirin and gastric ulceration: light and electron microscopic observations in a model of aspirin plus stress-induced ulcerogenesis. *Br. J. Exp. Pathol.* **58**, 215-219.
 Roth, G. J. and Majerus, P. W. (1975). The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. *J. Clin. Invest.* **56**, 624.
 Slone, D., Heinonen, O. and Kaufmann, D. (1976). Aspirin and congenital malformations. *Lancet* **1**, 1373.
 Tanigawa, H., Otori, R., Tanaka, H., Yoshida, J. and Kosazuma, T. (1979). Reproduction study of 4-ethoxy-2-methyl-5-morpholino-3 (2H)-pyridazinone (M73101) in rats (II). Administration of M73101 during the period of major organogenesis. *J. Toxicol. Sci.* **4**(2), 175-200.
 Trasler, D. G. (1965). Aspirin-induced cleft lip and other malformations in mice. *Lancet* **1**, 606.
 Warkany, J. and Takacs, E. (1959). Experimental production

- of congenital malformations in rats by salicylate poisoning. *Am. J. Pathol.* **35**, 315-331.
- Wickramaratne, G. A. (1988). The postnatal fate of supernumerary ribs in rat teratogenicity studies. *J. Appl. Toxicol.* **8**(2), 91-94.
- Wilson, J. G. (1971). Use of rhesus monkeys in teratological studies. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* **30**, 104-109.
- Wilson, J. G. (1965). Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals In *Teratology; Principles and Techniques* (Wilson J. G. and Warkany J., eds), p. 262-277. The university of Chicago press, Chicago and London.
- Wilson, J. G. (1972). Abnormalities of intrauterine development in non-human primates. *Acta Endocrinol.* **166**, 261-292.
- Wilson, J. G., Ritter, E. J., Scott, W. J. and Fradkin, R. (1977). Comparative distribution and embryotoxicity of acetylsalicylic acid in pregnant rats and rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**, 67-78.
- 국립보건안전연구원 (1994). 의약품등의 독성시험기준, 국립보건안전연구원 예규 제 94-3호.
- 송시환 (1995). Aspalatone의 태드에 있어서 4주간 반복경구 투여 아급성독성시험 (S-445), 한국화학연구소 안전성연구센터 p. 1-268.