

새로운 안트라사이클린계 항암제 DA-125의 랫드 및 마우스에서의 정맥투여 급성 독성시험

신천철* · 송시환 · 서정은 · 강부현 · 김원배¹ · 한상섭
한국화학연구소 안전성연구센터, ¹동아제약주식회사 중앙연구소

Single Dose Intravenous Toxicity Study of A New Anthracycline Anticancer Agent (DA-125) in Rats and Mice

Chun-Chul SHIN*, Si-Whan SONG, Jeong-Eun SUH, Boo-Hyon KANG,
Won-Bae KIM¹ and Sang-Seop HAN

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P. O. Box 107, Yusung, Taejeon, Korea

¹Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd., 47-5, Sanggal-Ri, Kiheung-Up,
Yongin-Gun, Kyunggi-Do, 449-900, Korea

(Received December 16, 1999; accepted February 1, 2000)

Abstract – This Study was conducted to assess the single dose toxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats and mice. The Drug was administered once intravenously to both sexes of rats and mice. Then followed a 14-day period of observation. The LD₅₀ Values (95% confidence limit) were estimated to be 60.9 mg/kg (57.5~64.3 mg/kg) for male rats and 60.2 mg/kg (56.2~64.5 mg/kg) for female rats, and 85.8 mg/kg (81.0~90.9 mg/kg) for male mice and 84.5 mg/kg (78.2~91.9 mg/kg) for female mice. Both sexes of rats and mice given the drug revealed the clinical sign of decreased locomotor activity, emaciation, hair loss, reddish brown urine, salivation, and watery diarrhea. In addition, body weight from the next day to the 7th day tended to be decreased slightly in rats and mice treated with DA-125. Death occurred from the next day after administration to the 12th day. Macroscopically, congestion of gastrointestinal organ, lung, and adrenal glands were found in both sexes on the dead rats and mice. Histopathological examination of dead rats manifested atrophy of spleen, hypoplasia of bone marrow, hypoplasia and necrosis of lymphocyte in thymus, atrophy of villi in small intestine (duodenum, jejunum, and ileum), hyperplasia of granular epithelium in small intestine, degeneration of germinal epithelium in testis, degeneration of tubular epithelium in kidney, and vacuolation and myolysis of myocardium in heart. Histopathological examination of dead mice revealed hypoplasia of spleen and mesenteric lymph node, local necrosis of liver, atrophy of villi in small intestine, hyperplasia of glandular epithelium in small and large intestine, degeneration of tubular in kidney, degeneration of germinal cells in testis, and slight vacuolar degeneration of myocardium in heart.

Keywords □ DA-125, antitumor, antibiotic, acute toxicity, rat, mice

Anthracycline계 항종양성 항생물질은 DNA에 직접 작용하여 주형 활성을 잃게 하는 항생물질로서 주로 gram 양성 세균에 강한 항균활성을 나타내나 제암활성을 가진 것이 많고 독성이 강한 것으로 알려져 왔다(Calabresi and Chabner, 1991). 이중에 포함되는 adriamycin 그룹은 특히 제암활성이 강하고 항암범위도 광범위한 점에서 흥미로와 현재 위암이나 폐암 혹은 백혈병 등의 치료에 사용되나 심

장독성이 강하고 골수 및 면역계에 대한 부작용이 강한 것이 결점이었다(Geidel 등, 1991; Hoagland, 1984; Carter, 1975; Lefark 등, 1973). 이에 따라 급변 동아제약(주)연구소(경기도 용인군 기흥읍 상갈리 47-5)에서는 항암효과를 더욱 증대시키고 심장독성을 줄이기 위하여 adriamycin 유도체의 일종인 DA-125를 새로이 개발(백남기 등, 1993)함으로써, 본 시험은 합성된 DA-125에 대한 암수 랫드 및 마우스의 급성독성을 파악하기 위하여 시도되었고, 또한 급성독성의 발현장기에 대한 병리조직학적 검사도 실시하였

*To whom correspondence should be addressed.

다. 본 시험은 의약품 등의 독성시험기준(국립보건안전연구원, 1988)에 준하여 수행되었다.

실험방법

시험물질

시험물질인 DA-125는 동아제약(주)연구소의 합성연구실로부터 공급받아 사용하였으며, 화학식은 7-0-(2,6-dideoxy-2-fluoro- α -talopyranosyl)-adriamycinone-14- β -alaninate HCl 인 적색분말로서 Lot. 번호는 DA-125-11이며 순도는 98.7% 이었다. 주사시 DA-125는 각 투여농도에 맞게 측정하여, 0.02M pH 3.5 citrate buffer를 용매로 이용하여 주사용제를 1회 만들어 사용하였다. 그리고 매체대조군은 용매인 0.02M pH 3.5 citrate buffer의 원액을 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

실험동물은 Sprague-Dawley(SD)계 랫드 및 마우스(공급원 : 한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물육종실)를 수송용 사육상자에 든 채로 air lock에서 상자의 외면을 70% 이소프로필 알코올로 5분간 분무 소독, 살균한 후 청정 구역의 동물실로 반입하여 1주간 검역 및 순화 기간을 거쳐 사용하였으며 사용동물의 주령등은 다음과 같았다. 랫드 및 마우스의 경우, 암수동물의 구입시 주령은 4주령이었고 구입시 암수동물의 마리수는 각각 8마리씩이었으며, 투여개시시의 주령은 5주령이었고, 투여시 사용암수동물의 마리수는 각각 70마리씩이었다.

본 시험은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간 (오전 7시~오후 7시), 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 시험기간중, 동물실의 온습도는 자동온습도측정기에 의하여 매시간 측정되었으며, 환기횟수 및 조도 등의 환경 조건은 정기적(월 1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

순화기간 및 시험기간중에는 스테인레스제 방사육상자(랫드, 220W×410L×200H mm; 마우스, 175W×240L×

145H mm)당 5마리씩 넣어 사용하였다.

사료는 실험동물용 고품 사료(제일사료 주식회사 : 대전광역시 대덕구 대화동 40-36)를 방사선(2.0 Mrad) 멸균하여 자유섭취시켰다. 또한 사료급여전에 본 연구소 분석실에서 오염물질 확인시험을 실시한 바, 시험에 영향을 미칠 요인이 발견되지 않았다.

물은 상수도를 자외선살균기로 소독시킨 후 자유섭취시켰다. 물에 대하여는 섭이전에 미리 대전광역시 보건환경연구원(대전광역시 유성 구성동 21-1)에 일반 수질검사를 의뢰한 바, 시험에 영향을 미치는 오염물질은 발견되지 않았다.

투여량의 설정과 시험군의 구성

SD 랫드의 경우, vehicle(0.02M citrate buffer) control 이 포함된, 15.0, 22.6, 33.8, 50.6 및 75.9 mg/kg의 DA-125 농도당 암수 각각 2마리씩 투여한 예비시험을 실시한 바, 암수동물이 50.6 mg/kg 투여군 이하에서는 모두 생존하였고, 75.9 mg/kg 투여군 이상에서는 모두 치사하였다. 이상의 실험결과에 따라, 본 시험의 투여 농도는 44.4 mg/kg을 최저 투여 농도로 하여 공비를 1.14로써 매체대조군(vehicle control)을 포함하여 단계적인 6 농도(44.4, 50.6, 57.7, 65.8, 75.0 및 85.5 mg/kg 투여군)를 결정하였다.

ICR 마우스의 경우에는 vehicle(0.02M citrate buffer) control이 포함된, 32, 45, 63, 89 및 126 mg/kg의 DA-125 농도당 암수 각각 2마리씩 투여한 예비시험을 실시한 바, 암컷 및 수컷동물은 63 mg/kg 투여군 이하에서는 모두 생존하였고, 89 mg/kg 투여군 이상에서는 모두 치사하였다. 이상의 실험결과에 따라, 본 시험의 투여 농도는 54.8 mg/kg을 최저 투여농도로 하여 공비를 1.15로써 매체대조군(vehicle control)을 포함하여 단계적인 6 농도(54.8, 63.0, 72.5, 83.3, 95.8 및 110.2 mg/kg 투여군)를 결정하였다.

시험군의 구성은 Table I와 같다.

순화기간중 건강하다고 판정된 동물의 모두를 체중측정하여 평균값 및 표준편차(SD)를 구하고, 평균값 ±2 SD 범위 외의 체중을 가진 랫드와 마우스는 우선 군분리에서 제외시켰다. 그리고 이 체중을 근거로 시험계를 랫드는 체

Table I. Experimental design for single intravenous administration of DA-125 in rats and mice

Group	No. of animals		Volume (ml/kg)	Dose (mg/kg)	
	Male	Female		Rats	Mice
Vehicle control	10	10	10	0	0
Group I	10	10	10	44.4	54.8
Group II	10	10	10	50.6	63.0
Group III	10	10	10	57.7	72.5
Group IV	10	10	10	65.8	83.3
Group V	10	10	10	75.0	95.8
Group VI	10	10	10	85.5	110.2

중 5g 간격으로, 마우스는 체중 2g 간격으로 구분시켜 두었다. 그리고 암수 각각의 평균체중에 가까운 개체를 암수 각각 70 마리씩을 선택하였다. 5g 및 2g 간격으로 구분되어 선택된 암수 각 70마리를 각 군에 균등히 들어가도록 난수를 이용한 무작위법을 이용하여 분배하였다.

투여방법 및 투여기간

고정기로 고정된 동물의 미정맥에 정맥내 투여용 주사침(랫드 : 25G, 마우스 : 26~27G)을 이용하여 조제시험물질을 투여하였다. 각 마리당 투여속도는 랫드의 경우 1.0 ml/min.이하, 마우스의 경우에는 2.0 ml/min.이하 이었다.

임상에서 예상되는 경로로서 정맥내 투여경로를 선택하였고, 투여당일 오전에 개체별로 1회 투여하였다. 투여직전의 체중을 기준으로 하여 투여액량을 계산하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상 및 사망의 관찰

투여당일을 투여후 1시간에서 6시간까지 매시간마다, 투여익일부터 14일까지는 매일 1회 이상씩 일반증상의 발현과 변화 및 사망의 유무를 관찰하였다.

체중변화

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시전과 투여후, 1, 3, 7 및 14일에 체중을 측정하였다.

부검 및 병리조직학적 검사

모든 생존동물을 ether 마취로 치사시켜 육안적으로 내부 장기를 검사하였고, 도중 사망동물에 대해서도 같은 방법으로 검사하였다. 최고용량군의 암수동물은 내부장기가 신선하여 병리조직학 검사가 가능한 조직을 대상으로 심장,

비장, 장관, 간, 생식기등에 관하여 병리조직학적검사를 실시하였다.

통계학적 방법

LD₅₀ 값의 산출은 미국 컴퓨터 소프트웨어사인 Labcat사의 Probit법 프로그램을 이용하였다.

실험결과

사망을 및 LD₅₀값

랫드

시험기간중 암수동물의 사망을 및 LD₅₀값은 Table II와 같다. 85.5 mg/kg 투여군의 수컷동물은 투여후 1일부터 7일사이에, 암컷동물은 투여후 6일에서 8일사이에 각각 100%(10례)의 사망동물이 관찰되었다. 75.0 mg/kg 투여군의 수컷동물은 투여후 3일부터 8일사이에 암컷동물은 투여후 6일부터 8일사이에 각각 100%(10례)의 사망을 보였다. 65.8 mg/kg 투여군의 수컷동물은 투여후 7일에서 12일사이에 각각 80%(8례) 사망율이 관찰되었다. 57.5 mg/kg 투여군의 수컷동물은 투여후 7일부터 10일사이에 30%(3례), 암컷동물은 투여후 10일째에 10%(1례)의 사망율이 관찰되었다. 그밖에 50.6 mg/kg 투여군 및 44.4 mg/kg 투여군에서는 암컷동물만 10%(1례)의 사망을 나타내었다. 위의 사망율로서, LD₅₀값 및 95% 신뢰구간은 수컷동물의 경우 60.9 mg/kg(57.5~64.3 mg/kg)이었으며, 암컷동물은 60.2 mg/kg(56.2~64.5 mg/kg)이었다.

마우스

시험기간중 암수동물의 사망을 및 LD₅₀값은 Table III 과 같다. 110.2 mg/kg 투여군의 수컷 및 암컷동물은

Table II. Mortality and LD₅₀ values in male and female rats after single intravenous administration of DA-125

Sex	Dose (mg/kg)	No. of dead animals/ No. of dosed animals	Days after dosing														LD ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limit)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	0	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60.9 (57.5~64.3)
	44.4	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	50.6	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	57.7	3/10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	
	65.8	8/10	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	0	1	0	
	75.0	10/10	0	0	0	1	0	0	2	2	5	0	0	0	0	0	0	
	85.5	10/10	0	1	1	0	0	2	5	1	0	0	0	0	0	0	0	
Female	0	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60.2 (56.2~64.5)
	44.4	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	50.6	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	57.7	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	65.8	8/10	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	1	0	1	0	0	
	75.0	10/10	0	0	0	0	0	0	1	6	3	0	0	0	0	0	0	
	85.5	10/10	0	0	0	0	0	0	2	6	2	0	0	0	0	0	0	

Figures indicate number of dead rats.

Table III. Mortality and LD₅₀ values in male and female mice after single intravenous administration of DA-125

Sex	Dose (mg/kg)	No. of dead animals/ No. of dosed animals	Days after dosing														LD ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limit)	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	0	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85.8 (81.0~90.9)
	54.8	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	63.0	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	72.5	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	83.3	4/10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	
	95.8	9/10	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1	2	0	0	
	110.2	10/10	0	0	0	0	0	0	0	3	5	1	1	0	0	0	0	
Female	0	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84.5 (78.2~91.9)
	54.8	0/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	63.0	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	72.5	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	83.3	4/10	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	
	95.8	9/10	0	0	0	0	0	0	0	3	4	1	1	0	0	0	0	
	110.2	9/10	0	0	0	0	0	0	1	5	2	1	0	0	0	0	0	

Figures indicate number of dead rats.

투여후 6일부터 9일 사이에 각각 100%(10례) 및 90%(9례)의 사망율을 나타내었다. 95.8 mg/kg 투여군의 수컷동물은 투여후 7일부터 11일 사이에 90%(9례), 암컷동물은 투여후 6일부터 9일 사이에 90%(9례)의 사망률을 보였으며 83.3 mg/kg 투여군의 수컷동물은 투여후 7일부터 9일 사이에 40%(4례), 암컷동물은 투여후 7일째에 40%(4례)의 사망률을 나타내었다. 그밖에 72.5 mg/kg 투여군 및 63.0 mg/kg 투여군에서는 암컷동물에서만 투여후 7~8일 사이에 각각 10%(1례)의 사망률을 보였다. 위의 사망률로써, LD₅₀값 및 95% 신뢰구간은 수컷동물의 경우 85.8 mg/kg(81.0~90.9 mg/kg)이었으며, 암컷동물은 84.5 mg/kg(78.2~91.9 mg/kg)이었다.

일반증상

랫드

시험한 결과 나타난 일반증상은, 매체대조군을 제외한 투여군에서 활동력감소(decreased locomotor activity), 허약(emaciation), 입모(piloerection), 적갈색뇨(reddish brown urine), 진흙양변(muddy stool), 수양성 설사(watery diarrhea), 탈모(hair loss; alopecia), 유연(salivation), 안구주위 암적 색응고물(dark material around eyes; chromodacryorrhea) 및 비강적색분비물(dark material around nose) 증상으로써, 고농도 투여군을 중심으로 그 증상의 빈도와 정도가 심한 동물은 도중 사망하였다.

활동력감소는 초기 증상으로서 매체대조군을 제외한 모든 투여군의 암수동물에서 관찰되기 시작하여 도중 사망한 동물에서는 사망이 관찰될 때까지, 생존동물에서 투여후 4일째의 허약을 동반하여 관찰되었다. 입모는 모든 투여군의 암수동물에서 투여후 3일부터 관찰되기 시작하여 관찰

기간 동안 지속적으로 관찰되었다. 적갈색뇨는 50.6 mg/kg 투여군 이상의 암수동물에서 투여당일부터 투여의일에 걸쳐 관찰되었다. 진흙양변은 매체대조군을 제외한 모든 투여군의 암수동물에서 투여의일부터 투여후 3일에 걸쳐 나타났으며, 최저투여군인 44.4 mg/kg 투여군을 제외한 50.6 mg/kg 투여군 이상의 암수동물에서 4일 이후부터는 수양성설사로 나타나 증상이 심한 동물은 사망하였고, 나머지 생존동물은 투여후 10일 쯤까지 지속되었으나 투여후 11일째는 회복이 되었다. 탈모는 매체대조군을 제외한 모든 투여군의 암수동물에서 투여후 4일째부터 관찰되기 시작하였다. 비강적색분비물은 매체대조군을 제외한 모든 투여군의 암수동물에서 투여의일부터 관찰되어 사망동물은 사망시까지, 생존동물에서는 투여후 9일째까지 나타났으며, 투여후 10일 이후에는 어떤 투여군의 생존동물에서도 이 증상은 관찰되지 않았다. 유연은 수컷동물의 경우 50.6 mg/kg 투여군 이상에서 투여후 4일부터 투여후 12일까지 산발적으로 관찰되었으며, 암컷동물의 경우는 모든 투여군에서 투여후 5일 이후부터 지속적으로 관찰되었다. 안구주위 암적 색응고물저류는 수컷동물의 경우 매체대조군을 제외한 모든 투여군에서, 암컷동물의 경우 매체대조군, 44.4 mg/kg 투여군과 65.8 mg/kg 투여군을 제외한 투여군에서 투여의일부터 산발적으로 관찰되었다. 또한 안검하수 및 호흡감소 등이 투여군의 암수동물에서 관찰기간중에 산발적으로 나타났다.

마우스

시험한 결과 나타난 일반증상은 활동력감소, 허약, 입모, 탈모, 안검하수(ptosis), 적갈색뇨, 및 수양성 설사로써 발현 시간 및 강도는 용량상관성을 보여주었으며, 다만 고농도

Table IV. Body weights in male rats after single intravenous administration of DA-125

DOSE (mg/kg)	BODY WEIGHT(G)					
	DAY0	DAY1	DAY3	DAY7	DAY14	
0	MEAN	131.1	139.5	153.8	173.7	241.6
	SD	8.7	9.5	10.0	13.9	18.6
	N	10	10	10	10	10
44.4	MEAN	131.2	126.1	123.1	130.8	175.3
	SD	5.7	8.0	9.3	10.9	15.8
	N	10	10	10	10	10
50.6	MEAN	132.3	126.3	120.9	114.8	156.9
	SD	7.6	7.9	7.0	7.8	11.7
	N	10	10	10	10	10
57.7	MEAN	131.9	126.1	119.1	105.1	154.9
	SD	7.2	7.9	8.9	15.3	13.6
	N	10	10	10	9	7
65.8	MEAN	130.9	124.4	116.9	94.3	149.8
	SD	6.3	6.3	5.5	10.1	22.0
	N	10	10	10	8	2
75.0	MEAN	129.2	124.5	113.3	92.0	--
	SD	6.7	7.8	8.7	7.1	--
	N	10	10	9	5	--
85.5	MEAN	130.2	124.4	113.6	--	---
	SD	6.5	7.0	7.8	--	--
	N	10	9	8	--	--

-- Data unavailable.

투여군을 중심으로 그 정도가 심한 동물은 도중 사망하였다. 그러나 생존동물에 있어서 위의 증상들은 투여후 12일째는 회복되는 경향을 보였다.

체중변화

랫드

시험기간중 암수동물의 체중변화는 Table IV 및 V와 같다. 매체대조군을 제외한 모든 투여군의 수컷동물의 체중은 투여후 1일째부터 투여후 7일째까지 체중 증가억제를 보였고, 투여후 14일째까지 생존한 모든 투여군의 동물들의 체중은 투여 당일의 체중에 비하여 증가된 회복의 경향을 나타내었다.

매체대조군을 제외한 모든 투여군의 암컷동물의 체중은 투여후 1일째부터 투여후 7일째까지 체중 증가억제를 보였고, 44.4 mg/kg 투여군의 생존동물의 체중은 투여후 14일째에 투여당일의 체중에 비하여 증가된 경향을 나타낸 반면, 50.6 mg/kg 투여군의 9례의 생존동물중 2례, 57.7 mg/kg 투여군의 9례의 생존동물중 3례 및 65.8 mg/kg 투여군의 2례의 생존동물중 1례는 투여당일의 체중을

Table V. Body weights in female rats after single intravenous administration of DA-125

DOSE (mg/kg)	BODY WEIGHT(G)					
	DAY0	DAY1	DAY3	DAY7	DAY14	
0	MEAN	112.1	116.5	128.2	145.4	171.6
	SD	6.4	6.7	7.2	8.7	9.7
	N	10	10	10	10	10
44.4	MEAN	111.2	108.5	102.4	107.7	149.2
	SD	6.5	5.3	12.4	20.6	17.1
	N	10	10	10	10	9
50.6	MEAN	113.7	109.0	100.6	97.8	135.8
	SD	5.4	7.4	8.4	15.8	16.8
	N	10	10	10	0	9
57.7	MEAN	108.2	102.8	95.9	85.7	112.5
	SD	5.5	6.8	8.9	9.3	23.9
	N	10	10	10	10	9
65.8	MEAN	108.1	104.9	98.1	78.1	106.8
	SD	6.6	5.9	4.8	6.0	9.7
	N	10	10	10	7	2
75.0	MEAN	108.1	103.6	95.8	72.7	--
	SD	6.3	6.7	8.1	4.5	--
	N	10	10	10	3	--
85.5	MEAN	107.1	104.0	96.6	75.9	--
	SD	5.4	7.2	6.4	7.6	--
	N	10	10	10	2	--

--Data unavailable.

회복하지 못하였다.

마우스

시험기간중 암수동물의 체중변화는 Table VI 및 VII과 같다. 매체대조군을 제외한 모든 투여군의 수컷동물의 체중은 투여후 1일째부터 투여후 7일째까지 체중증가억제를 보였고, 투여후 14일째까지 생존한 모든 투여군의 동물들의 체중은 투여당일의 체중에 비하여 증가된 회복의 경향을 나타내었다.

매체대조군을 제외한 모든 투여군의 암컷동물의 체중은 투여후 1일째부터 투여후 7일째까지 체중증가억제를 보였고, 54.8 mg/kg 투여군과 63.0 mg/kg 투여군의 생존동물의 체중은 투여후 14일째에 투여당일의 체중에 비하여 증가된 경향을 나타낸 반면, 72.5 mg/kg 투여군 이상의 생존동물은 투여후 14일째에도 투여당일의 체중을 회복하지는 못했다.

부검소견

랫드

시험물질에 기인한 육안적 부검소견은 저농도 투여군을 중심으로 한 계획도살 동물에서 신장의 백색낭포(white

Table VI. Body weights in male mice after single intravenous administration of DA-125

DOSE (mg/kg)	BODY WEIGHT(G)					
		DAY0	DAY1	DAY3	DAY7	DAY14
0	MEAN	26.9	27.3	27.3	29.1	30.8
	SD	1.6	1.7	1.6	1.5	1.5
	N	10	10	10	10	10
54.8	MEAN	26.7	26.3	25.4	25.6	29.0
	SD	2.1	2.3	2.1	2.5	2.1
	N	10	10	10	10	10
63.0	MEAN	26.7	26.5	25.3	21.9	28.9
	SD	1.8	1.8	1.8	2.5	2.2
	N	10	10	10	10	10
72.5	MEAN	26.7	26.4	24.8	18.8	27.8
	SD	1.9	2.0	1.9	2.0	2.2
	N	10	10	10	10	10
83.3	MEAN	26.0	26.1	24.0	17.5	26.9
	SD	1.8	2.0	1.8	1.6	1.7
	N	10	10	10	9	6
95.8	MEAN	27.0	26.7	24.4	17.0	27.7
	SD	2.0	1.9	2.3	1.9	--
	N	10	10	10	8	1
110.2	MEAN	26.4	25.8	23.7	17.6	--
	SD	1.6	1.5	1.7	1.5	--
	N	10	10	10	5	--

--Data unavailable.

Table VII. Body weights in female mice after single intravenous administration of DA-125

DOSE (mg/kg)	BODY WEIGHT(G)					
		DAY0	DAY1	DAY3	DAY7	DAY14
0	MEAN	21.6	21.9	21.8	22.7	24.4
	SD	1.1	0.9	1.2	1.2	1.8
	N	10	10	10	10	10
54.8	MEAN	21.4	21.2	20.1	20.8	23.2
	SD	1.5	1.4	1.4	1.4	1.5
	N	10	10	10	10	10
63.0	MEAN	21.1	20.8	19.4	16.4	22.0
	SD	1.0	1.3	1.3	2.6	1.4
	N	10	10	10	10	9
72.5	MEAN	21.8	21.8	20.0	15.1	21.5
	SD	1.5	1.9	1.8	2.0	2.6
	N	10	10	10	9	9
83.3	MEAN	21.7	21.4	19.1	14.6	20.7
	SD	0.9	1.0	1.0	1.2	1.9
	N	10	10	10	6	6
95.8	MEAN	21.6	21.4	18.8	13.6	19.0
	SD	1.6	1.6	1.2	0.9	--
	N	10	10	10	3	1
110.2	MEAN	21.4	21.3	18.7	13.1	18.0
	SD	1.1	1.0	1.0	0.7	--
	N	10	10	10	4	1

--Data unavailable.

cyst)가 3례, 폐의 연황색반점(yellowish spot)이 2례 등 미미한 이상소견만 관찰되었으나, 고농도 투여군을 중심으로 한 도중사망동물의 경우는 심장, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 타액선, 비장, 흉선, 장간막임파절, 신장, 방광, 정소, 정소상체, 난소, 부신, 폐 및 기관지에서 출혈(dark red)과 출혈(hemorrhage) 등의 이상소견이 관찰되었다.

마우스

계획도살 동물에서의 육안적 부검소견의 경우, 시험물질에 의한 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다. 도중사망동물의 경우는 주로 간장, 담낭, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 폐, 부신에서 출혈(congestion)과 출혈성반점(hemorrhagic spot)의 부검이상소견이 관찰되었다.

병리조직학적 소견

랫드

암수동물의 85.5 mg/kg 투여군에서의 병리조직학적 소견은 Table VII과 같다. 암수동물의 조직에서 관찰된 소견들 중 현저한 변화로서는 비장(spleen)의 심한 위축(atrophy)과 임파구 소멸(hypoplasia of lymphocyte), 골수(bone marrow)의 심한 소멸, 흉선(thymus)의 임파구 소멸

또는 괴사(necrosis), 소장(십이지장과 공장 및 회장) 용모상피(villi)의 심한 위축과 소장 선상피(granular epithelium)의 증생(hyperplasia), 정세관상피의 변성과 정자세포의 수적 감소, 신장 세뇨관상피의 심한 변성(degeneration)변화와 심근세포(myocard)의 공포변성(vacuolation) 또는 심근용해(myolysis)이었다. 골수에서는 백혈구와 적혈구계통의 세포들과 거핵구들이 모두 소멸되었고, 단지 세망세포들만이 영성하게 남아 있었으며, sinusoid내에는 성숙적혈구들이 출만해 있었다. 비장은 모든 혈구들이 거의 소멸되어 심한 위축을 보였고, 기질을 형성하고 있는 세망세포들만이 남아 있었다. 흉선은 상당수의 임파구가 소멸되거나 괴사를 나타내고 있었다. 소장의 용모는 괴사 또는 자가용해로 인해 거의 모두 위축되었거나 소멸되었고, 괴사세포의 흔적이 점막의 표면이나 선의 내강이 남아 있는 경우도 있었다. 소장 선상피의 경우는 용모와는 달리 상피세포의 증생을 보이고 있었다. 대장에서도 소장의 경우보다는 그 정도가 약했지만 비슷한 변화를 나타내었다.

신장세뇨관세포는 피질과 피질-수질 경계부에 세포질의 공포변성과 핵의 농축을 특징으로 하는 심한 세포변성을 나타내었다. 심한 경우는 급성 괴사에 이르는 변화를 보이

Table VIII. Histopathological findings in male and female rats after single intravenous administration of DA-125

GROUT: 85.5 mg/kg SEX :	MALE	FEMALE
Liver		
Necrosis/centrilobular	2/6 ^{a)}	3/8
Heart		
Vacuolation & myolysis/myocard	7/7	10/10
Stomach		
Hemorrhage/forestomach	1/6	1/8
Necrosis/mucosa of forestomach	1/6	1/8
Hemorrhage/mucosa	1/6	2/8
Duodenum		
Hyperplasia of glanular epithelium	4/5	8/8
Atrophy of villi	5/5	8/8
Necrosis of mucosa	5/5	7/8
Hemorrhage/mucosa	2/5	1/8
Jejunum		
Hyperplasia of glanular epithelium	2/3	1/1
Atrophy of villi	2/3	0/1
Necrosis of mucosa	3/3	1/1
Ileum		
Hyperplasia of glanular epithelium	2/2	2/2
Atrophy of villi	2/2	1/2
Necrosis of mucosa	2/2	1/2
Cecum		
Hemorrhage of mucosa	1/3	0/2
Necrosis of mucosa	2/3	2/2
Colon		
Necrosis of mucosa	1/3	3/3

^{a)} No. of the abnormal/No. of the observed.(REPORT CONTINUED)

기도 했다. 이러한 변화들은 자가용해가 일부 겹쳐져서 해석이 어려운 경우도 있었다. 정소의 경우, 많은 정세관 내에서는 정모세포의 수적 증가, 일부 정세관상피의 변성, 정자세포의 수적인 감소 등이 관찰되었다. 정소상체의 관강 내에서는 정상적으로 관찰되어야 할 정자세포가 거의 관찰되지 않았다. 심근세포 내에서는 미약하나마 공포변성 내지 심근용해를 보이고 있었다.

마우스

암수동물의 고농도 투여군에서의 병리조직학적 소견은 Table IX와 같다.

110.2 mg/kg 투여군의 암수 사망동물을 중심으로 육안적 이상소견이 관찰된 장기들을 고정하여 조직표본을 제작한 뒤 광학 현미경으로 관찰한 바, 가장 현저한 병변으로는 비장과 임파절의 임파구세포의 심한 형성부전증(hypoplasia), 간장의 국소괴사(locally extensive necrosis), 1례에 있어서의 간장의 복합적 농양(multiple abscesses), 소장 위용모상피조직의 위축과 괴사를 동반한 신상피조직의 증등도 과형성(moderate hyperplasia)이었다. 그 밖의 관찰된

Table VIII. Continued

GROUT: 85.5 mg/kg SEX :	MALE	FEMALE
Testis		
Degeneration of germinal epithelium	8/9	--
Hyperplasia of spermatocyte	8/9	--
Hypoplasia of spermatids	9/9	--
Congestion	2/9	--
Epididymis		
Oligospermia	4/4	--
Kidney		
Degeneration of tubular epithelium	8/8	10/10
Adrenal gland		
Congestion	0/7	4/9
Hemorrhage	0/7	2/9
Lung		
Congestion	4/8	7/10
Bone marrow		
Congestion	6/7	8/9
Hypoplasia	7/7	9/9
Thymus		
Hypoplasia of lymphocyte	3/4	--
Necrosis of lymphocyte	4/4	--
Congestion	3/4	--
Hemorrhage	2/4	--
Spleen		
Atrophy	8/8	9/9
Hypoplasia of lymphocyte	8/8	9/9
Ovary		
Congestion	--	1/8

-- Not evaluated data.

시험물질의 변화로서는 정소의 생식상피조직에 나타난 정도의 퇴행변성(degeneration)과 정소상체내의 정충감소증(oligospermia)이었다. 또한 심장에서는 심근의 공포변성(vacuolation), 심근의 용해(myolysis)가 관찰되었고, 신장에서는 세뇨관 변성이 관찰되었다.

고찰 및 결론

새로운 Anthracycline계 항종양성 항생물질인 DA-125를 SD 랫드 및 ICR 마우스를 이용하여 시험한 결과, 암수동물에서 나타난 제반 일반증상을 살펴보면, 활동력감소, 안검하수, 입모와 유연 등이 관찰되어 이는 화학물질이 생체 내에 자극을 줄 때 나타나는 증상(Chan 등, 1982)으로서 본 시험물질도 이와 같은 양상을 나타냈다고 사료되었다. 아울러 투여당일부터 투여의일에 걸쳐 모든 투여군에서 적갈색뇨가 관찰됨에 따라 이는 투여초기에 신장에 의한 시험물질의 배설에 의한 것으로 추측되었으며 이러한 경향에 따라 신장내 세뇨관 상피세포의 변성이 초래되었다고 생각

Table IX. Histopathological findings in male and female mice after single intravenous administration of DA-125

GROUP: 110.2 mg/kg SEX :	Male	Female
Heart		
Vacuolar degeneration of myocardium	1/2 ^{a)}	2/2
Mineralization of myocardium	0/2	1/2
Kidney		
Tubular degeneration	6/6	4/4
Spleen		
Atrophy and hypoplasia of lymphoid cells	2/2	4/4
Small Intestine		
Atrophy of villi	6/6	3/4
Hyperplasia of glandular epithelium	6/6	4/4
Necrosis of mucosa	3/6	4/4
Large Intestine		
Hyperplasia of glandular epithelium	1/3	1/4
Liver		
Fatty change	1/4	1/6
Necrosis	2/4	3/6
Abscess	--	1/6
Adrenal gland	0/5	0/4
Pancreas	0/5	0/2
Stomach	0/5	0/4
Cerebrum	0/1	0/2
Cerebellum	0/1	0/2
Lung	--	0/1
Testis / Epididymis		
Degeneration of germinal cells	2/2	--
Oligospermia	2/2	--
Prostate gland	0/1	--
Vesicular gland	0/1	--
Mesenteric lymph node		
Hypoplasia of lymphoid cells	2/2	--

--Not evaluated data.

^{a)}No. of the abnormal/No. of the observed.

되었다. 또한 탈모가 관찰됨으로써 5주령 랫드 및 마우스의 왕성한 피모대사 과정에 시험물질이 영향을 주었다고 사료되었다.

체중의 측정 결과, 랫드와 마우스의 모든 투여군의 암수 동물에서 확인된 투여후 1 일째부터 투여후 7 일째 체중의 증가억제는 일반증상의 활동력 감소와 허약을 뒷받침 해 주는 결과임을 알 수 있었다.

육안적 부검소견은 랫드의 경우, 고농도군의 도중사망동물에서 관찰된 위장관계를 중심으로 한 충혈은 음모 및 상피세포의 변성과 괴사 및 소멸의 결과로써 나타난 것으로 판명되었고, 이로써 투여초기부터 섭취한 사료를 원활히 소화, 흡수하지 못하여 수양성 설사가 나타난 것으로 사료된다. 이는 adriamycin계통의 항암제에서 주로 나타나는 위

장관 장애(Calabresi and Chabner,1991)와 유사한 증상으로 본 시험물질의 투여에 위해서도 나타났다고 생각되었다. 마우스의 경우, 고농도군의 도중사망동물에서 관찰된 위장관계의 충혈은 거의 전신성으로 나타나고 있으며, 이는 국소적인 병변에 의해 더 강하게 나타날 수도 있겠지만 시험물질에 의한 전신성 변화로 사료되었다.

또한 랫드의 병리조직소견적 소견을 중심으로 시험물질의 독성작용을 살펴보면, 골수와 비장 및 흉선에서 관찰된 혈구세포의 소멸과 정소나 정소상체내에서 관찰된 정자세포의 감소는 본 시험의 시험물질이 왕성하게 분열하는 세포들에 작용(Kim 등, 1999)하여 이 세포들을 분열 억제 또는 괴사시켰음을 추측케 하여 주었다. 한편 부분적으로 미약하게나마 괴사를 나타내기는 했지만 수적으로 증가된 정모세포나 소장의 선상피들은 시험물질의 투여로 인한 독성작용이 약해지면서 이 세포들의 분열이 촉진된 것으로 생각되었다. 이상의 상반된 변화는 조혈기관이 정소나 소장보다 시험물질에 더 민감하게 반응하였음을 제시해 주었다. 한편, 암수의 사망동물에서 용량상관성 없이 나타난 폐 충혈은 병리조직학적검사를 토대로 하여 고려해 보면, 폐사시 호흡곤란에 의한 부작용으로 나타난 충혈로도 의심되어졌다. 또한 최고농도군인 85.5 mg/kg투여군의 동물에서 심장장기의 병리조직학적 관찰에서 심장의 형태적 변화가 곧잘 간과하기 쉬운 정도의 무척 미약한 변화로 나타나 차후 아급성독성시험시 충분한 예의 심장에 대한 병리조직학적 검사의 이행은 물론이고, 기능적 독성변화를 측정기 위한 중동물을 이용한 심전도 검사도 병행되어 실시해야 할 필요성(Combs and Acosta, 1990; Lenza 등, 1989; Von Hoff 등, 1982; Olson and Capen, 1977; Cargill 등, 1974)은 있다고 생각된다.

마우스의 병리조직소견을 바탕으로 전반적으로 고찰해 볼 때 간장의 국소괴사, 신장세뇨관상피의 세포변성, 장관용모상피의 괴사와 선상피의 과형성, 정소상피세포의 변성 변화 및 정세포의 퇴행변성과 정소상체내의 정충감소 등의 변화들은 주로 세포분열이 왕성한 조직들에 시험물질이 일차적으로 독성작용을 일으키고 있음을 시사해 주었다. 또한 육안적으로 이상소견이 관찰 안된 임파 및 조혈기 계통인 비장과 임파절에도 세포의 소멸이 관찰되어, 시험물질은 세포분열이 왕성한 조직에 세포독성물질(cytotoxin)으로 작용하고 있음을 거듭 시사해 주었다. 한편, 마우스의 암수 사망동물에서 용량상관성 없이 나타난 폐충혈은 이번에 병리조직검사를 하지 않아 단정적으로 판단할 수 없지만, 경험상 폐사직전 호흡곤란에 의한 부작용으로 나타난 충혈로써, 시험물질의 투여와는 상관이 없는 것으로 짐작되었다. 그리고 투여군의 암수동물에서 내부장기의 전반적 자가분해작용이 많이 관찰된 것은 시험물질에 의한 사망이 하루 중 주로 야간에 일어난 것으로 판명되었다. 또한 An-

thracycline 계통의 대표적 독성인 심독성(Olson 등, 1981; Bertazolli 등, 1979; Doroshow 등, 1979)은 그 정도가 미약하게 관찰되었지만 심근의 공포변성과 아울러서 근대 근대 심근의 용해가 관찰되었다. 이번에 새로운 anthracycline계 제암제 DA-125는 일차적으로 급성백혈병 등의 항암효과를 증대시키고 심장독성을 줄이기 위하여 개발된 것으로서, 본 시험에서는 110.2 mg/kg투여군의 동물에서 심장장기의 병리조직학적 관찰 결과 심장의 형태적 변화가 눈에 띄게 심한 변화로 관찰되지 않아, 차후 아급성독성시험시 충분한 예의 심장에 대한 병리조직학적 검사의 이행은 물론이고, 기능적 독성변화를 측정기 위한 중동물용 이 용한 심전도 검사도 병행되어 실시해야 할 필요성은 있다고 생각된다.

이상의 독성증상의 결과, 랫드에 있어서 본 시험물질은 주로 신진대사가 활발한 조직의 세포를 괴사시키는 세포독성 물질로 작용했음을 알 수 있었고, 림프 및 조혈기관이 가장 민감한 target organ인 것으로 생각되었으며, LD₅₀값 및 95% 신뢰구간은 수컷동물의 경우 60.9 mg/kg(57.5~64.3 mg/kg)이었으며, 암컷동물은 60.2 mg/kg(56.2~64.5 mg/kg)이었다. 마우스에 있어서 본 시험물질은 주로 신진대사가 활발한 소화기 계통과 조혈기계통 등에 독성을 나타내었고, LD₅₀값 및 95% 신뢰구간은 수컷동물의 경우 85.8 mg/kg(81.0~90.9 mg/kg)이었으며, 암컷동물은 84.5 mg/kg(78.2~91.9 mg/kg)이었다.

감사의 말씀

본 시험을 수행하는데 기술적인 도움을 주신 한국화학연구원 안전성연구센터 일반독성팀원 그리고 동아제약(주) 연구소 관련 연구원께 감사사를 드립니다.

참고문헌

- Bertazolli, C., Belini, O., Magrini, U. and Tosana, M.G. (1979). Quantitative experimental evaluation of adriamycin cardiotoxicity in the mouse. *Cancer Treatment Reports* **63**, 1877-1883.
- Calabresi, P. and Chabner, B.A. (1991). Antineoplastic agents. In *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, and P. Taylor, 8th Eds., Volume II), pp. 1241-1244, Pergamon, New York.
- Cargill, C., Bachmann, E. and Zbinden, G. (1974). Effects of daunomycin and anthramycin on electrocardiogram and mitochondrial metabolism of the rat heart. *Journal of the National Cancer Institute* **53**, 481-486.
- Carter, S.K. (1975). Adriamycin-A Review. *Journal of the National Cancer Institute* **55**, 1265-1274.
- Chan, P.K., O'Hara, G.P. and Hayes, A.W. (1982). Principles and methods for acute and subchronic toxicity. In *Principles and Methods of Toxicity*. (A.W. Hayes Ed.), pp. 1-60, Raven, New York.
- Combs, A.B. and Acosta, D. (1990). Toxic mechanisms of the heart: A review. *Toxicologic Pathology* **18**, 583-596.
- Doroshow, J.D., Locker, G.Y. and Myers, E. (1979). Experimental animal models of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer Treatment Reports* **63**, 855-860.
- Geidel, S., Carn, M., Gravinghoff, L., Hausdorf, G., Morf, G., Bielack, S., Knop, J. and Winkler, K. (1991). Cardiomyopathy after osteosarcoma treatment: a contribution to the cardiotoxicity of adriamycin. *Klin. Padiatr.* **203**, 257-261.
- Hoagland, H.C. (1984). Hematologic complication of cancer chemotherapy. In *Toxicity of Chemotherapy* (M.C. Perry and J. W. Yarbro, Eds.), pp.433-445, Grune and Stratton, New York.
- Kim, J.C., Kim, K.H., and Chung, M.K. (1999). Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent in rats. *Reproductive Toxicology* **13**, 391, 397.
- Lefark, A.E., Pttha, J., Rosenheim, S. and Gottlieb, J. (1973). A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* **32**, 302-314.
- Lenza, E., Rozza, A., Favalli, L., Monti, E., Poggi, P. and Villani, F. (1989). The rat model in the comparative evaluation of anthracyclines cardiotoxicity. *Tumori* **75**, 533-536.
- Olson, H.M. and Capen, C.C. (1977). Subacute cardiotoxicity of adriamycin in the rat-biochemical and ultrastructural investigations, *Lab. Invest.* **37**, 386-394.
- Olson, R.D., Boerth, R.D., Gerber, J.G. and Nies, A.S. (1981). Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: Evidence for oxidative stress. *Life Sci.* **29**, 1393-1401.
- Salmon, S.E. (1991). Malignant disorders. In *Current Medical Diagnosis and Treatment* (S.A. Schroeder, M.A. Krupp, L. M. Tierney, Jr., S.J. Mcphee, Ed.), pp. 36-52. Appleton & Lange, Connecticut.
- Von Hoff, D.D., Rozenzweig, M. and Piccart, M. (1982). The cardiotoxicity of anticancer agents. *Seminars Oncol.* **9**, 23-33.
- 국립보건안전연구원 (1988). 의약품 등의 독성시험기준. 국립보건안전연구원, 예규 제 10호.
- 백남기, 안병욱, 이순복, 김원배, 양중익, Watanabe, T. (1993). 새로운 항암성 항생물질 DA-125의 심장독성에 대한 평가. *응용약물학회지* **7**(3), 9-19.