

Ethylenethiourea의 임신랫트에 있어서 기관형성기 투여시험

1. 기형발생과 양수내의 아미노산 및 단백질 함량에 미치는 영향

김 성 훈* · 허 린 수
한국화학연구소*, 경북대학교 수의과대학
(1991. 5. 6 접수)

Administration of ethylenethiourea during organogenesis periods in pregnant rats.

1. Effects on teratogenic effects, amino acids and protein concentrations in amniotic fluids

Sung-hoon Kim*, Rhin-soo Huh

Department of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

*Korea Research Institute of Chemical Technology**

(Received May 6, 1991)

Abstract: This study was carried out to investigate the amino acid and protein concentrations in amniotic fluid and the potency of the teratogenic effect of ethylenethiourea(2-imidazolidinethione, ETU) in the fetuses due to different dose amounts of this compound.

The S.P.F. Sprague-Dawley female rats(10 weeks) were used in this study and these animals were divided into four groups; control group(25pregnant female rats), group I (dosed ETU from day 7 to day 17 of gestation at 10mg/kg/day), group II (dosed ETU from day 7 to day 17 of gestation at 30mg/kg/day), group III (dosed ETU from day 7 to day 17 of gestation at 50mg/kg/day). 250mg/100ml ETU in group I, 750mg/100ml ETU in group II and 1,250 mg/100ml ETU in group III were administered 4ml/kg B.W by oral route.

The results obtained were summarized as follows;

1. The anomalies of the external examination were meningocele in the head, kinky tail, club-foot and sharp tail. (Meningocele, in group III, significantly increased from control value at $p < 0.001$).
2. The skeletal variations and delayed ossification were Lumbar ribs, asymmetric sternbrae, asymmetric 13th rib and delayed ossification of skull. Asymmetric sternbrae (group III) was significantly increased from control value at $p < 0.05$ and delayed ossification of skull (group II and III) were significantly increased from control value at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.
3. The internal soft tissue anomalies were hydroencephaly of 3th lateral ventricle, dilatation of ureter, dilatation of renal pelvis and cleft palate. (Hydroencephaly, 28.1% in group I, 88.3% in group II and 100% in group III).

4. Protein values in amniotic fluids are not significantly decreased in 10mg/kg group but significantly ($p < 0.05$) decreased in 30mg/kg group and 50mg/kg group from control group.
5. In the levels of amino acid in amniotic fluids, the levels of glutamic acid, iso-leucine, leucine, tyrosine and phenylalanine of 10mg/kg group are significantly decreased from control group. In 50mg/kg group, except for glycine, valine and methionine, all amino acid levels are significantly ($p < 0.05$) decreased from control group.

Key words: Ethylenethiourea, pregnant rat, amniotic fluid, amino acid protein

서 론

농작물과 장식용 식물에 살균제로써 널리 사용되는 ethylenethiourea (2-imidazolidinethione, ETU)는 ethylenebisdithiocarbamate 살균제의 분해산물로써 알려져 있으며¹ 산업에서는 합성고무 등의 탄성중합체에 유황처리 및 전기도금함을 청소하기 위한 촉진제 그리고 여러가지 반응에서의 중간매개체로써 유용하게 사용되고 있다². 그러나 Daston 등²은 임신 10 일령의 S.D 랫트 태자를 40~200 μ g/ml ethylenethiourea의 존재 하에서 48 시간동안 배양시켰다. 그 결과 ethylenethiourea의 함량이 증가할수록 성장의 억제, crown-rump의 길이, 단백질과 DNA 함량 등의 저하되었으며 기형율도 증가를 나타내었다고 보고하였다.

또한 마우스의 dominant lethal 시험에서 ethylenethiourea 150mg/kg과 sodium nitrite 50mg/kg을 동시에 투여하였을 때는 효과가 나타났으나 각각의 약제는 효과가 나타나지 않았다고 보고하였다³. 또한 기형독성시험에서도 ethylenethiourea와 sodium nitrite를 동시에 투여하였을 때 기형발생율이 높아진다고 하였다⁴.

한편 Gak 등⁵의 보고에 의하면 ethylenethiourea를 수컷과 암컷 mice에 60mg/kg, 120mg/kg을 각각 투여한 결과 일차적으로 갑상선의 악성종양을 일으키는 발암물질로 작용하였으나 hamster에서는 간에 독작용을 하나 발암물질은 아니라고 보고하고 있다.

또한 Graham과 Hansen⁶의 보고에 의하면 랫트에 ethylenethiourea를 투여한 결과 현저한 체중감소가 있었으며 갑상선의 무게가 증가하였고 현저한 갑상선 증생이 나타났다고 보고하였다. 그 외의 여러학자들^{7,8,9}도 ethylenethiourea는 랫트에서 발암유발효과가 있다고 보고하고 있다.

모체에 ethylenethiourea를 투여하여 태자의 기형발생 및 독성 영향을 조사하는 기형독성 시험을 실시한 결과 Wistar-Imamichi 랫트 및 syrian golden hamster에서 모두 기형유발 효과가 나타났으며 랫트에서는 태자의 두부에 수막류(meningocele), 소하악증(micro-

nathia), kinky tail 및 여러가지 골격기형이 나타났으며 hamster에서는 구개열, kinky tail, 앞발의 핏지증(oligodactylia) 및 늑골과 척추에서 골격이상이가 나타났으나 마우스에서는 태자에 기형이 관찰되지 않았다고 보고하였다¹⁰. 이와같이 임신기간중 기관 형성기간 동안 ethylenethiourea를 투여한 임신동물의 태자에서 기형이 출현하여 기형유발효과가 있다고 보고 되고 있다^{2,7,11-15}.

한편, Pettit 및 Allen¹⁶은 무뇌증을 가진 태자의 양수내의 유리아미노산 농도는 대조군의 양수 또는 이분척추의 기형을 가진 태자양수의 아미노산 농도보다 높다고 하였으며 이분척추에서는 대조군보다 serine 혹은 threonine은 높았으며 isoleucine, leucine, valine은 낮았다고 보고하였다.

본 연구에서는 임신랫트의 기관형성기간동안 ethylenethiourea를 위내에 강제경구투여 하여 임신 20일째 제왕절개수술에 의해 강제분탄된 태자의 외부기형, 골격기형 및 내부장기 기형을 조사하여 여러학자들의 보고에서와 같이 ethylenethiourea가 기형을 유발시키는 물질인지를 확인하는 한편 골격 및 기관형성 지연과 기형이 유발될 경우에는 단백질형성에 영향이 있을 것으로 추측하여 양수내 단백질의 함량변화를 관찰하였으며 또한 단백질을 구성하고 있는 아미노산의 함량과 그 조성의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 약제 : 실험에 사용된 약제로는 ethylenethiourea (2-imidazolidinethione, 이하 ETU라 함)로써 백색무취 미세분말(Wako pure Chemical Industries, LTD)이다.

2. 실험동물 및 사육환경 : 실험동물은 일본(Clea Co.)에서 SPF 랫트(sprague-Dawley)를 수입하여 한국화학연구소 SPF 사육실에서 생산한 F2로써 9주령인 것을 1주일간 clean room에서 순화 및 검역을 실시한 후 실험에 사용하였다.

사육환경은 순화 및 검역기간 동안은 polycarbonate cage(26×42×18cm)에 5마리씩 사육하였으며 교배기간 동안은 교배용 wire cage(21×35×18cm)에 암수 각각

1마리씩 동거시켰으며 임신된 후에는 polycarbonate cage(26×42×18cm)에 1마리씩 사육하였다. 사육실의 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 이였으며 습도는 $50\pm 5\%$ 이었다. 1일 조명시간은 오전 8시부터 오후 8시까지 12시간이었으며 인공조명을 사용하였다.

사료(J. 사료)는 wire cage에 사육 시킬때 및 사료 섭취량 측정기간 동안은 고탄사료를 분말화하여 사용하였으며 기타 사육 및 실험기간 동안은 고탄사료를 사용하지 않고 물과 함께 무제한 급여하였다.

3. 실험계획 및 수행 : 순화 및 검역기간을 거친 실험 동물 랫트를 교배용 wire cage 하단에 깔판을 깔고 압수 1마리씩 동거시켰다. 이 때 수컷은 성 경험이 있는 건강한 동물이었으며 암컷은 성 경험이 없는 성 성숙동물로써 질 도말에서 발정 전(phase I)기간 이었을 때 수컷과 동거시켰으며 임신일은 동거 다음날 암컷 랫트의 질 도말에서 정충이 확인된 날 및 vaginal plug이 확인된 날을 임신 0일로 하였다.

상기의 방법으로 임신이 확인된 암컷 랫트를 군당 25마리씩으로 하여 5마리씩 5반복으로 완전 임의배치법에 따라 4개 군으로 나누어 ETU의 용량이 0(대조군), 10(I군), 30(II군) 및 50mg/kg/day(III군)가 되도록 조제된 약제를 임신 7일에서 부터 임신 17일까지 기관형성기간 동안 매일 오전중에 경구용 zonde를 통해 위내에 직접 투여를 실시하였다.

임상증상 및 사망 여부는 매일 관찰하였으며 체중은 3일 단위로 측정하고 사료 및 음수량의 측정은 기관형성전기(임신 0일~임신 7일), 기관형성초기(임신 7일~임신 12일), 기관형성말기(임신 12일~임신 17일) 및 기관형성후기(임신 17일~분만전)로 나누어 측정하였다.

임신 21일째, 태자의 골격기형검사, 내부장기기형검사, 양수의 단백질을 구성하고 있는 아미노산 및 단백질 함량 등을 검사하기 위하여 각 군당 모체의 21마리는 가벼운 ether 마취 후 자궁적출 수술에 의해 양수를 채취한 다음 태자를 적출하여 태자의 체중, 태자의 암수 마리수, 모체의 임신황체수 재흡수의 수, 사망 태자수 및 태반무게 등을 조사하였다.

상기검사를 마친 후 태자의 외부기형검사를 한 다음 1/2은 골격검사를 위해 사용되었으며 나머지 1/2은 내부장기기검사를 위해 Bouin 용액에 고정 시켰다. 골격검사 및 내부장기기검사에 있어서 태자의 선별방법은 좌측자궁과 상부에서부터 흡수번제의 태자는 골격검사에 좌측번제의 태자는 내부장기 검사에 사용하였다. 골격검사를 위한 태자의 골격표본제작은 Inouye 방법¹⁷과 Kimmel 및 Trammell의 방법¹⁸을 약간 변형하여 실시

하였다.

한편 태자의 내부장기 기형조사를 위하여 Bouin 용액에 고정된 태자를 두부 및 하복부는 Wilson의 방법¹⁹을 인용하였으며 흉부는 Nishimura의 방법²⁰에 따라 실시하였다.

임신 21일째 자궁적출 수술시 채취된 양수에 대해서 단백질의 정량은 Whichselbaum의 방법²¹을 인용하여 Hitachi Model 250 double beam spectrophotometer로 측정하였다. 또한 단백질을 구성하는 아미노산의 함량 및 조성은 waters 제품 아미노산 자동분석기기로써 분석하였다.

4. 통계학적 분석 : 체중의 변화는 Duncan multiple range 검정을 실시하였으며 그 외의 모든 결과는 student t-검정을 실시하였다.

결 과

1. 체중의 변화 : 임신 6일까지는 대조군과 투여군이 공히 체중증가를 나타내었으나 임신 9일에서부터는 대조군에 비하여 모든 투여군에서 체중증가가 인정되었지만 유의적인 차이는 없었고 III군에서는 대조군에 비하여 유의성($p<0.01$)이 있었다.

임신 12일에서도 제 III군에서 대조군에 비하여 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 나타내었다.

임신 15일에서는 I군 및 II군은 대조군과 유사한 증체량을 나타내었으나 III군은 여전히 유의성($p<0.01$) 있는 차이를 나타내었다. 임신 18일과 임신 21일에서도 I군과 II군은 대조군에 비해 유의성이 인정되지 않았으나 III군은 체중증가가 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다.

2. 사료 및 수분섭취량 측정 : 사료섭취량은 대조군에서 임신기간중 평균량이 $26.47\pm 1.715\text{g/day/rat}$ 로 나타났으며 투여군에서도 대조군과 유사한 섭취량을 나타내어서 유의성이 인정되지 않았다.

수분섭취량도 대조군에서는 평균섭취량이 $45.68\pm 3.905\text{ml/day/rat}$ 로 나타났으며 투여군은 대조군에 비하여 5% 수준에서 유의성이 인정되지 않았다.

3. 생존태자수 및 성비, 태자의 평균체중, 사망태자수, 재흡수수, 임신황체수 및 태반 무게 : 태자의 평균체중은 대조군에서 수컷이 $5.73\pm 0.428\text{g}$ 이었으며, 암컷은 $5.28\pm 0.261\text{g}$ 이었다. I군에서 수컷태자의 평균체중은 $5.52\pm 0.300\text{g}$ 으로써 유의성($p<0.001$)있는 감소를 나타내었으며 암컷태자에서도 $5.18\pm 0.280\text{g}$ 으로써 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소되었다. 또 II군 및 III군에서는 암수 공히 대조군에 비하여 낮았다($p<0.001$). 재흡수수는 대조군이 0.38, I군이 0.62, II군이

Table 1. Mean food and water consumptions in rats

		gestation 0~7day	gestation 7~12day	gestation 12~17day	gestation 17~21day
Food consumption (g/day/rat)	Control	24.99	24.97	27.92	27.98
	10mg/kg	25.05	23.14	27.02	27.92
	30mg/kg	24.93	23.20	27.10	27.84
	50mg/kg	25.18	22.74	27.25	27.79
Water consumption (ml/day/rat)	Control	42.02	43.74	45.93	51.02
	10mg/kg	41.96	43.97	44.65	50.81
	30mg/kg	42.10	43.90	46.11	50.76
	50mg/kg	42.00	43.90	46.51	49.95

Table 2. Cesarean section data on dams treated orally with ethylenethiourea

		Control	10mg/kg	30mg/kg	50mg/kg
No. of dams		21	21	21	21
Mean No. of live fetuses(%)	M	4.57(47.3)	4.90(50.2)	4.62(48.0)	4.62(51.1)
	F	5.10(52.7)	4.86(49.8)	5.00(52.0)	4.43(48.9)
	M/F	0.90	1.01	0.92	1.04
Mean body weight of fetuses(g, M±SD)	M	5.73±0.428	5.52±0.300***	5.08±0.391***	4.75±0.318***
	F	5.28±0.261	5.18±0.280**	4.76±0.351***	4.35±0.359***
Total dead fetuses		0	0	0	0
Mean No. of resorption		0.38	0.62	0.71	0.95
Abortion		0	0	0	0
Mean No. of corpus leutum	R	7.19±1.750	7.33±1.426	6.86±2.220	6.67±1.713
	L	7.38±1.717	6.90±1.300*	6.81±2.337***	7.14±2.081***
Mean weight of placenta(mg, M±SD)	M	518.9±76.60	496.5±74.38	479.5±61.78	476.8±82.00
	F	496.9±86.16	474.8±67.90*	453.1±77.78***	448.4±76.29***

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$

** : Significantly different from control value at $p < 0.01$

*** : Significantly different from control value at $p < 0.001$

0.71 및 Ⅲ군이 0.95로써 ETU의 투여량이 증가함에 따라 재흡수 수가 증가를 나타내었으나 유의성은 5% 수준에서 인정되지 않았다.

또한 임신황체수에 있어서도 대조군에서 좌우측 난소의 임신황체 수는 평균 14.57개 이었으며 I군, Ⅱ군 및 Ⅲ군에서는 각각 14.23개, 13.67개 및 13.81개로 대조군과의 5% 수준에서 유의차는 없었다. 그러나 태반의 무게는 대조군에 비하여 I군($p < 0.05$), Ⅱ군($p < 0.001$), Ⅲ군($p < 0.001$)에서 암수 공히 유의성있는 감소를 나타내었다.

4. 태자의 외부기형검사 : 대조군에서는 외부기형이 나타나지 않았으나 I군에서는 kinky tail은 2.9%의

유의성($p < 0.01$)이 있었으며, Ⅱ군 및 Ⅲ군에서도 14.3% 및 41.1%로써 고도의 유의적($p < 0.001$)인 기형현상이 나타났다. 수뇌류는 대조군과 I군에서는 나타나지 않았으나 Ⅱ군 및 Ⅲ군에서는 15.2% 및 48.4%로 유의성($p < 0.01$ 및 $p < 0.001$) 있는 높은 기형율을 나타내었다. club foot은 대조군 및 I군에서는 나타나지 않았다. 그러나 Ⅱ군에서는 1.9%의 기형율을 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았으며 Ⅲ군에서는 14.7%의 기형율을 나타내었다($p < 0.01$). 그러나 sharp tail은 대조군, I군 및 Ⅱ군에서는 나타나지 않았으며 Ⅲ군에서도 4.2%의 출현율은 보였으나 5% 수준에서 유의성은 인정되지 않았다.

Table 3. Amino acid values of protein in amniotic fluids of dams were treated with ethylenethiourea (mg/ml)

	Control	10mg/kg	30mg/kg	50mg/kg
Aspartic acid	0.38±0.05	0.31±0.02	0.36±0.02	0.25±0.01*
Threonine	0.24±0.03	0.20±0.01	0.25±0.00	0.17±0.02*
Serine	0.23±0.03	0.18±0.00	0.23±0.01	0.16±0.01*
Glutamic acid	0.75±0.05	0.64±0.04*	0.77±0.02	0.50±0.10*
Proline	0.24±0.03	0.21±0.00	0.24±0.01	0.17±0.02*
Glycine	0.16±0.02	0.14±0.01	0.17±0.00	0.13±0.01
Alanine	0.34±0.05	0.28±0.01	0.33±0.01	0.22±0.02*
Cystine	—	—	—	—
Valine	0.28±0.06	0.20±0.01	0.26±0.00	0.19±0.00
Methionine	0.07±0.02	0.06±0.00	0.07±0.01	0.05±0.02
Iso-leucine	0.16±0.02	0.13±0.00*	0.16±0.00	0.11±0.01*
Leucine	0.39±0.04	0.31±0.01*	0.39±0.01	0.26±0.03**
Tyrosine	0.20±0.02	0.15±0.00*	0.17±0.01	0.13±0.02*
Phenylalanine	0.27±0.02	0.20±0.01**	0.25±0.00	0.18±0.03**
Histidine HCl	—	—	—	—
Tryptophan	—	—	—	—
Lysine HCl	0.63±0.05	0.55±0.01	0.58±0.02	0.42±0.06**
Arginine	0.17±0.02	0.17±0.02	0.18±0.00	0.11±0.03

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$

** : Significantly different from control value at $p < 0.01$

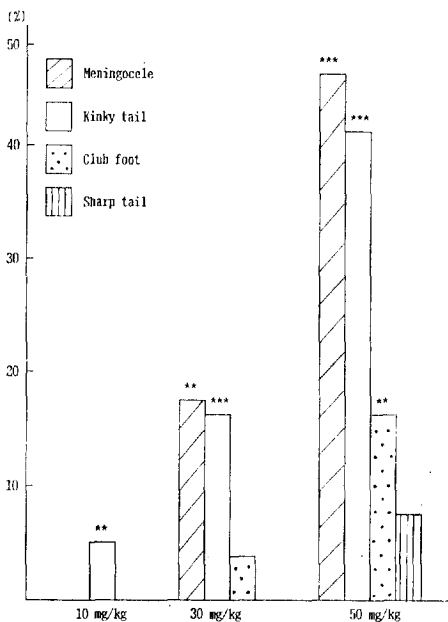


Fig 1. External examination of offspring from rats treated orally with ethylenethiourea during organogenesis

5. 양수내의 단백질을 구성하는 아미노산 함량 : I 군에서는 대조군에 비하여 전반적으로 각 아미노산의 함량은 감소경향을 나타내었으나 유의성 ($p < 0.05$) 있는 감소를 나타낸 것은 glutamic acid, iso-leucine, leucine, tyrosine 및 phenylalanine 등이며 II 군에서는 전반적으로 감소현상을 나타내었으나 5% 수준에서 유의성은 인정되지 않았다. 한편 III 군에서는 대조군에 비하여 아미노산 함량이 모두 감소를 나타내었으며 glycine, valine 및 methionine만이 유의성이 인정되지 않았을 뿐 그 외 아미노산들은 유의성 ($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다.

고 찰

본 연구에서는 기형유발물질로 알려진 ETU를 투여하였을 때 나타나는 기형의 종류 및 정도를 확인하며 기형이 유발되었을 때, 기관형성기에 투여된 ETU가 DNA 등에 영향을 미쳐서 단백질 합성에 영향을 주게 되므로 단백질 및 아미노산의 함량에 영향을 미칠 것으로 생각하여 본 연구를 수행하였다.

임신기간중 체중의 변화는 임신 6일까지 대조군과 투여군이 공히 체중증가를 나타내었으며 임신 9일부터는 투여군이 대조군에 비하여 체중감소가 나타나기 시

작하였다. 임신 18일과 임신 21일에 I군 및 II군에서는 대조군에 비하여 유의성이 인정되지 않았으나 III군에서는 유의성($p < 0.01$) 있는 체중감소를 나타내었다. Khera의 보고^{12,22}에 의하면, 약제에 의한 모체독성의 증상은 체중의 감소, 약리 및 독성학적 이상행동, 유산 및 사망등으로 확인할 수 있다고 하였다. 즉, 약제의 투여가 임신 7일에서부터 시작되었으므로 임신 9일부터 투여군에서 대조군에 비하여 체중감소가 있는 것으로 보아 약제에 의한 모체독성이 나타나기 시작한 것으로 생각된다.

임신말기에 자궁적출수술에 의해 분만된 생존태자의 체중은 암수 공히 대조군에 비하여 투여군에서 유의성($p < 0.01$) 있는 감소현상을 나타내었다.

또한 태반의 무게에서도 대조군에 비하여 투여군에서 유의성($p < 0.05$) 있는 감소현상을 나타내었다. 이는 임신기간중 투여군에서 대조군에 비하여 체중감소를 나타낸 것은 태자의 체중 및 태반의 무게와 비례적인 관계를 나타내고 있다.

임신 21일째 자궁적출수술에 의해 분만된 태자의 외부형태 관찰을 실시한 결과 대조군에서는 외부적으로 관찰된 기형은 나타나지 않았으나 I군에서 kinky tail (2.9%) 만이 나타났으며 ($p < 0.01$), II군에서는 kinky tail이 41.1% 수막류가 48.4%, 만곡족은 14.7% 및 sharp tail은 4.2%의 기형율을 나타내었다.

Teramoto 등¹⁰의 보고에 의하면 임신된 Wistar-Imamichi 랫트에서 기관형성기동안 ETU를 30mg/kg군에서는 수막류가 나타나지 않았으나 short 혹은 kinky tail이 태자 104마리 중에서 79%가 나타났으며, III군에서는 검사한 태자 93마리 중 81%가 수막류를 나타내었으며 소화약증이 29%, short 혹은 kinky tail이 100%, 펴지증(oligodactylia)이 10%, 지지과다증(polydactyly)이 3%로써 나타났다고 보고하였다. 이는 본 연구에서 나타난 수막류 및 kinky tail의 기형율에서 다소 빈도수에 차이를 나타내고 있는 것은 랫트의 종에 따른 차이로 사료되며 주된 외부기형이라는 측면에서는 잘 일치되고 있으며 그 외의 학자들^{7,11,13}도 수막류 및 kinky tail이 출현한다고 보고하고 있다.

자궁적출수술에 의하여 분만된 태자의 반수는 Bouin 용액에 고정 시킨후 내부 장기기형을 조사한 결과 표 3에서 보는바와 같이 주된 기형이라 생각되는 수뇌류는 대조군에서는 나타나지 않았으나 I군에서 28.1%, II군에서 88.3%, III군에서는 100%의 기형을 나타내었다. 또한 요관확장은 I군, II군 및 III군에서 각각 8.3%, 7.4% 및 7.9%로 나타났으며 신우확장은 2.1%, 3.2% 및 2.2%로 나타났다. 구개열은 대조군에서 1.1%

및 I군에서 1.0%로 나타났으나 II군 및 III군에서는 출현하지 않았다.

Teramoto 등¹⁰의 보고에서도 제 4 뇌실 확장의 기형율이 III군에서 100%로 나타나 본 연구에서의 기형율과 잘 일치되고 있으며 신수종은 76%, 신장발육 부전(renal agenesis)은 15%등으로 나타났으며, 기타 여러 학자들^{7,11,13}도 ETU를 투여한 임신랫트의 내부장기 기형검사서 수뇌류가 출현하여 태자의 중추신경계에 기형독성 영향을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서 대조군 및 I군에서 나타난 구개열은 검사태자 94마리 및 96마리 중에서 각각 1마리씩 출현한 것은 ETU의 독성영향에 의한 것이 아니라 자연발생적인 것이라 생각된다.

한편, 자궁적출수술에 의해 분만된 태자중 내부장기 검사용 태자를 제외한 나머지 태자는 골격표본을 제작한 후 골격기형검사를 수행한 결과 골격기형은 대조군을 포함한 모든 군에서 나타나지 않았으나 골격변이현상은 대조군에서 요늑골(lumbar rib)의 출현율이 11.0%이었으나 I군 및 II군에서는 각각 22.9%로써 유의성($p < 0.05$)있는 증가를 나타내었다.

Kimmel과 Wilson²³의 보고에 의하면 제 14번 늑골의 출현은 기형을 유발시키는 잠재력의 지표로 간주되어진다고 하였으며 또한 골격지연 현상도 동반된다고 하였다. 이 골격지연현상은 DNA 분자내의 nucleotide 조성의 변화에 따른 기형이라 생각된다. 본 실험에서 나타난 아미노산과 단백질의 감소 현상은 골격형성 지연을 뒷받침 하는 것 같다.

Wickramaratne 등^{24,25}의 보고에서 제 14번 늑골은 태자의 형태이상이라기 보다 태아독성이 있는 것으로 간주 되어져야 한다고 주장하고 있으며 제 14번 늑골은 출생 후 60일 경에는 0%로 감소한다고 보고하였다²⁴. 이와같이 ETU는 기형효과 혹은 태아독성 효과가 있는 것으로 생각된다.

두개골의 골화지연현상은 II군 및 III군에서 13.0% 및 45.5%로 나타난 것은 외부기형검사에서 나타난 수막류의 기형발생율과 잘 일치되고 있는 것으로 볼때 두개골의 골화지연현상으로 인하여 수막류가 나타난 것이라 생각된다.

양수의 단백질 함량을 측정된 결과 대조군의 4.59±0.46mg/dl에 비하여 II군 및 III군에서 양수단백질의 함량이 3.79±0.33mg/dl 및 3.67±0.50mg/dl로써 유의성있는 감소를 나타낸 것은 두가지 측면에서 추측할 수 있다.

첫째로는 ETU의 영향에 의하여 손상된 DNA가 단백질 합성에 관여한 결과 단백질 함량의 감소가 나타

날 수 있는 것과 둘째로는 아미노산이 단백질 합성할 때 관여하는 어떤 효소계에 영향을 주어 이들이 이화작용 및 단백질 합성을 차단하는 결과에 기인하는 것으로 생각된다.

한편 양수내의 단백질내 아미노산 함량변화는 대조군에 비하여 I군에서 glutamic acid, iso-leucine, leucine, tyrosine 및 phenylalanine 등이 유의성 있는 감소($p < 0.05$)를 나타내었으며 III군에서는 glycine, valine, arginine 및 methionine을 제외한 모든 아미노산에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

Pettit 및 Allen²⁰ 등은 양수의 유리아미노산 농도가 무뇌증을 가진 태자의 양수보다 대조군 및 이분척추의 기형을 가진 태자의 양수에서 taurine과 cystine을 제외한 모든 유리아미노산 함량이 증가하였으며 이분척추의 기형을 가진 태자의 양수내 아미노산에서는 대조군에 비하여 serine 및 threonine 이 증가하였으며 iso-leucine, leucine 및 valine은 반대로 감소하였다고 보고하였다. 한편 Kumar 등²⁶의 보고에 의하면 신경관 기형을 가진 태자의 양수내의 유리아미노산 농도는 taurine을 제외하고 모두 증가하였다고 하였다.

이들이 보고한 무뇌증, 이분척추 및 신경관 기형에서 유리 아미노산농도 만큼 단백질 함량이 감소되었음을 말해주는 것으로 본 연구에서의 결과와 잘 일치되고 있음을 볼 수 있었다.

또한 III군에서 serine, threonine, lysine 및 proline 등(hydroxy 아미노산)이 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내는데 이들 아미노산은 당단백질을 형성하는 주된 아미노산으로 알려져 있으며²⁷ 이 당단백질은 type I collagen의 일종으로써 골격형성에 관여하게되므로 이들 아미노산의 부족으로 인한 당단백질의 감소가 두개골의 골화 지연현상을 촉진시킨 것으로 사료된다.

고로 ETU는 아미노산의 이화작용과 단백질 합성에 관여하는 효소계에 영향을 미치는 것으로 추측된다

요 약

본 연구는 Ethylenethiourea의 기형발생과 양수단백질을 구성하고 있는 아미노산 및 단백질 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10주령의 S.P.F Sprague-Dawley계 랫트를 이용하여 대조군, I군(10mg/kg/day), II군(30mg/kg/day) 및 III군(50mg/kg/day)으로 나누어 각군 모두 임신 7일부터 임신 17일까지 11일간 투여하여 임신 21일째 각군 21마리씩 자궁적출수술에 얻어낸 태자의 외부기형검사, 골격기형검사 및 내부장기 기형검사를 실시하였으며 자궁적출수술시에

채집된 양수에 대해서는 아미노산 및 단백질 함량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 태자의 외부기형검사서 수막류, kinky tail, club foot 및 sharp tail 등이 출현하였으며 수막류이 있으며 III군의 기형율이 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다.

2. 태자의 골격기형검사서 14번 늑골의 출현, 비대칭성 흉골, 비대칭성 13번 늑골 및 두개골의 골화지연현상이 나타났으며 III군에서 비대칭성 흉골의 출현은 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었으며 두개골의 골화지연현상은 II군 및 III군에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$ 및 $p < 0.01$) 있는 증가를 나타내었다.

3. 태자의 내부장기기형검사에서는 제 3뇌실의 수막류, 요관확장, 신우확장 및 구개열등이 나타났으며 수막류는 모든군에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다. 요관확장도 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다.

4. 양수내의 단백질 함량은 대조군에 비하여 I군에서는 유의성이 인정되지 않았으나 II군 및 III군에서는 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다.

5. 양수내의 단백질을 구성하고 있는 아미노산 함량을 측정한 결과 I군에서는 glutamic acid, iso-leucine, leucine, tyrosine 및 phenylalanine 등이 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었으며 III군에서는 glycine, valine 및 methionine을 제외한 아미노산에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Czeglédi-Janko, G.: 1967, Determination of the degradation products of ethylenbis-(dithio carbamate) by thin layer chromatography and some investigations of their decomposition in Vitro. *J Chromatog.* 31:89~95.
2. Daston, G.P., Ebron, M.T., Carver, B. and Stefanadis, J.G.: 1987, In Vitro teratogenicity of ethylenethiourea in the rat. *Teratology*, 35: 239~245.
3. Teramoto, S., Shingu, A. and Shirasu, Y.: 1978, Induction of dominantlethal mutations after administration of ethylenethiourea in combination with nitrite or of N-nitroso-ethylenethiourea in mice. *Mutation Research*, 56:335~340.
4. Teramoto, S., Saito, R. and Shirasu, Y.: 1980,

- Teratogenic effects of combined administration of ethylenethiourea and nitrite in mice. *Teratology*, 21:71~78.
5. Gak, J.C., Graillot, C. and Truhout, R.: 1976, Differences in hamster and rat sensitivity towards the effects of long-term administration of ethylenethiourea. *Eur. J. Toxicol. Environ. Hyg.* 9(5):303~312.
 6. Graham, S.L., and Hansen, W.H.: 1972, Effects of short-term administration of ethylenethiourea upon thyroid function of the rat. *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 7:19~25.
 7. Lu, M.H. and Staples, R.E.: 1978, Teratogenicity of ethylenethiourea and thyroid function in the rat. *Teratology*. 17:171~178.
 8. Philippe, Q., Christine, D.B. and Maurice, H.: 1985, The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutation Research*, 147(3): 79~95.
 9. Ulland, B.M., Weisburger, J.H., Weisburger, E.K., Rice, J.M. and Cypher, R.: 1972, Thyroid cancer in rats from ethylenethiourea intake. *J. Natl. Cancer. Ins.* 49:583~584.
 10. Teramoto, S., Shingu, A., Kaneda, M. and Saito, R.: 1978, Teratogenicity studies with Ethylenethiourea in Rats Mice and hamsters. *Cong. Anom.* 18:1~17.
 11. Khera, K.S.: 1973, Ethylenethiourea teratogenicity study in rats and rabbits. *Teratology*, 7: 243~252.
 12. Khera, K.S.: 1984, Maternal toxicity-A possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology*, 29:411~416.
 13. Ruddick, J.A. and Khera, K.S.: 1975, Pattern of anomalies following single oral doses of ethylenethiourea to pregnant rats. *Teratology*. 12:277~282.
 14. Ruddick, J.A., Newsome, W.H. and Nash, L.: 1976, Correlation of teratogenicity and molecular structure Ethylenethiourea and related compounds. *Teratology*, 13:263~266.
 15. Teramoto, S., Harada, T. and Kaneda, M.: 1978, Effects of ethylenethiourea upon developing brain and limb buds in the rat. *Cong. Anom.* 18: 241~249.
 16. Pettit, B.R. and Allen, J.T.: 1979, Amino acids in amniotic fluid and the antenatal prediction of spina bifida and anencephaly. *Amino Acid Anal.* [Symp.] pp.363~369.
 17. Inouye, M.: 1976, Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and Arizarin red S. *Cong. Anom.* 16:171~173.
 18. Kimmel, C.A., and Trammell, C.: 1981, A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technology*, 56(5):271~273.
 19. Wilson, J.G.: *Teratology-Principles and Techniques* (Eds. Wilson, J. G. and Warkany, J.) *Univ. Chicago Press.* (1965) pp. 262~277.
 20. Nishimura, K.: 1974, A microdissection method for detecting thoracic visceral malformation in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.*, 14(1):23~40.
 21. Sonnenwirth, A. and Jarett, L.: Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. *The C. V. Mosby Company*, (1980) 1~1206.
 22. Khera, K.S.: 1985, Maternal toxicity: A possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformation of rodent-rabbit species. *Teratology*, 31:129~153.
 23. Kimmel, C.A. and Wilson, J.G.: 1973, Skeletal deviations in rats: Malformations or variations. *Teratology*, 8:309~315.
 24. Wickramaratne, G.A. deS et al.: 1985, Prenatal and Post-natal changes in the incidence of 'extra-ribs' in rat teratology studies. *Teratology*, 32:36A.
 25. Wickramaratne, G.A., deS., Killick, M.E., and Appleby, H.J.: 1986, Supernumerary ribs: A transient developmental defect in the rat. The sixth international congress of pesticide chemistry. *I.U.P.A.C.*: 8B~04.
 26. Kumar, S., Foreman, J.R. and Rathi, M.: 1980, Amniotic fluid and maternal serum amino acid levels in malformations of fetal cranial nerve system. *Neurochem. Res.* 5(4):453~458.
 27. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.W.: *Harper's Biochemistry*, 21st Ed. *Appleton and Lange.* (1988) pp.253~317,