

## 복합항생제 SM-101(설박탐 · 메탐피실린)의 생식독성연구: 랫트 최기형시험

정문구\* · 김종춘 · 한상섭  
한국화학연구소 안전성연구부

## Reproductive Toxicity Study of SM-101(sulbactam · metampicillin): Teratogenicity Study in Rats

Moon Koo CHUNG\*, Jong Choon KIM and Sang Seop HAN  
Korea Research Institute of Chemical Technology, Toxicology Research Center,  
P.O. Box 107, Yusung, Daejeon, Korea

(Received February 23, 1996; accepted February 29, 1996)

**Abstract** - A new composite antibiotic, SM-101(sulbactam · metampicillin), was at dose levels of 0, 375, 750 and 1500 mg/kg/day administered intravenously to pregnant Sprague-Dawley rats during the organogenetic period. Two-third of dams per group were subjected to caesarean section on day 20 of pregnancy and the remaining 10 dams per group were allowed to deliver. Effects of test substance on dams, embryonal development of F1 fetuses, as well as growth, behaviour and mating performance of F1 offspring were examined. In dams, two deaths occurred at 375 and 1500 mg/kg, respectively. The decrease in the weight of adrenal glands of the 1500 mg/kg group was observed. The prolongation of pregnancy period was found at 1500 mg/kg. F1 fetuses showed no changes related to the treatment of SM-101. In F1 offspring, the increase in spleen weight was seen at all doses treated. No treatment-related abnormalities were observed in each treated group in terms of development, behaviour and reproductive performance. In F2 fetuses, no drug-induced abnormalities occurred at all doses. The results show that the no-effect dose levels (NOELs) for dams and F1 offspring are under 375 mg/kg/day and NOELs for F1/F2 fetuses are over 1500 mg/kg/day.

**Key words** □ SM-101(sulbactam · metampicillin), composite antibiotic, teratogenicity study, rat

SM-101은 삼성 제약공업(주) 연구소(서울특별시 성동구 모진동 199-6)에서 개발한 복합항생제로서 sulbactam natrium(설박탐 나트륨)과 metampicillin natrium(메탐피실린 나트륨)이 1:2의 비율로 배합된 물질이다.

Sulbactam(SBT)은 penicillin 내성균주에서 생산하는  $\beta$ -lactamase의 비가역적인 저해제로서(English 등, 1978), Neisseria gonorrhoeae와 Acinetobacter calcoaceticus 등에 대해서 뛰어난 항균력을 갖고 있는 penicillin 기본핵의 유도체이다. SBT를  $\beta$ -lactam계 항생제와 병용하면 병용한 항생제의  $\beta$ -lactamase에 의한 분해를 방지해서 내성균에 대한 항균력이 증가된다(Retsema 등, 1980/1986). 현재 SBT와 ampicillin(AP)을 역가비 1:2로 혼합한 주사제가 널리 사용되고 있다.

Metampicillin(MAP)은 AP와 formaldehyde의 축합반응

로 생성된 반합성 penicillin으로서 AP와 동등한 항균효과를 가지고 있다(Retsema 등, 1986). MAP는 비경구투여시 담즙으로의 배설이 크기 때문에 담석증 등의 수술후에 사용되고 있다(Sutherland 등, 1972; Brogard 등, 1976; Pinget 등, 1976; Brogard 등, 1985). MAP는 AP로 가수분해되기 쉬운데 MAP의 가수분해속도는 pH에 영향을 받는다고 한다(Shimooka, 1988). MAP와 SBT의 동시투여도 AP와 SBT의 동시투여처럼 MAP의 치료효과를 향상시킬 수 있다.

한편  $\beta$ -lactam계 항생제인 AP는 임신랫트와 인간에 있어서 기형을 유발하지 않는다고 한다(Friedman 등, 1980; Shepard, 1989).

본 연구는 신약후보물질의 생식독성학적 스크리닝(reproductive-toxicological screening)의 일환으로서 복합항생제인 SM-101이 임신랫트의 배아 및 태자에 있어서 기형, 치사, 발육지연 및 기능장애를 유발하는지를 조사하기 위하여 실시하였다. 본 시험은 의약품 등의 독성시험기준(국

\* To whom correspondence should be addressed.

립보건안전원, 1988)과 일본독성시험기준(Yakugyo Jiho Co, 1984)에 준하여 실시하였다.

## 실험방법

### 시험물질

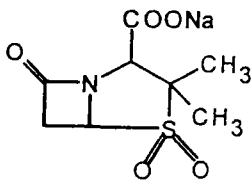
본 시험에는 (주)삼성제약공업에서 합성한 SM-101(Lot No. SM-101-002)이 사용되었다. SM-101(Fig. 1)은 복합항생제로서 설박탐 나트륨(sulbactam sodium)과 메탐피실린 나트륨(metampicillin sodium)이 1:2의 비율로 배합된 물질이고 분자량은 각각 255 및 383이며 적색분말로서 순도는 95% 이상이었다. SM-101은 희석비율이 낮을 경우 삼투압이 매우 높아지므로 10 ml/kg의 투여액량으로 생리식염수에 용해시켜 조제한 후 사용하였다.

### 실험동물 및 사육환경

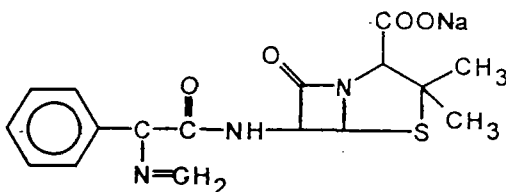
실험동물은 한국화학연구소 안전성연구부 실험동물육종실(대전직할시 유성구 장동 100)로부터 입수한 Sprague-Dawley 랫트(SPF)를 사용하였다. 9주령의 수컷 150마리와 암컷 300마리를 입수한 후 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 1:2로 교배시켜 질구의 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하였으며 임신확인된 암컷 160마리를 시험에 사용하였다.

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 상수도를 자외선 유수살균기로 소독시킨 후 자유섭취시켰다.

### 투여량의 설정과 시험군의 구성



Sulbactam Sodium



Metampicillin Sodium

Fig. 1. Chemical structure of sulbactam sodium and metampicillin sodium.

500, 1000, 1500 및 2000 mg/kg의 4개 용량으로 예비시험을 실시한 결과, 2000 mg/kg군에서는 모동물의 사망(50%)과 배아흡수율의 증가(23.9%)가 관찰되었으나, 그 밖의 군에서는 어떠한 특이소견도 나타나지 않았다. 이를 기초로 1500 mg/kg을 고용량으로 정하고 공비 2로 중용량 및 저용량을 750, 375 mg/kg으로 설정하였으며 그 외에 매체대조군을 두었다. 시험군의 구성은 Table I과 같다.

### 투여방법 및 투여기간

동물의 미정맥내로 25~26 G의 주사기를 이용하여 분당 2 ml의 속도로 기관형성기(임신 7일부터 임신 17일까지)동안 1일 1회 오전중에 연속투여하였다. 투여액량은 임신 7일, 10일 및 14일의 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, 7, 10, 14, 17 및 20일째에 체중을 측정하였고 자연분만군에 속한 어미동물은 포육 0, 7, 14 및 21일째에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 모든 동물에 대하여 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다(단, 임신 20일째에는 제왕절개로 인하여 임신 19일째에 사료급여후 익일 잔량을 측정하였고, 포육 21일째에는 부검으로 인하여 포육 20일째에 급여후 잔량을 측정함).

#### 부검

각 군당 2/3의 임신동물은 임신 20일째에 그리고 자연분만군에 속한 동물(각 군당 1/3)은 포육 21일째에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 임신 20일째의 부검동물에 대해서는 간장, 신장, 비장, 심장, 뇌, 부신 및 난소의 중량을 측정하였다.

#### 제왕절개

각 군당 2/3의 암컷동물들을 임신 20일째 제왕절개하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수배아(태자)수, 사망태자수, 생존태자의 성별, 생존태자의 개체별 체중 등을 조사하였다.

#### 태자의 외표검사

Table I. Experimental design for teratogenicity study of SM-101 in rats

Group	Dose (mg/kg/day)	Volume (ml/kg)	No. of animals
control	0	10	40
SM-101	375	10	40
	750	10	40
	1500	10	40

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(Wilson과 Warkany, 1972), 흉부는 Nishimura법(Nishimura, 1974)에 의하여 내부장기 이상유무를 검사하였다.

#### 차세대동물의 검사

각 군당 1/3의 동물을 자연분만시켜 얻은 F1 동물을 생후 4일째에 각 어미동물에 대하여 암수 각각 4마리씩 되게 조정(1배당 신생자수가 8마리가 안될 때에는 조정하지 않았슴)하고 각 시험군에 암수 각각 1마리씩 속하도록 이유부검, 성장시험, 행동시험, 생식시험등 4개의 시험군으로 나누어 시험을 실시하였다. 이 때 조정후 남은 F1동물에 대해서는 골격 또는 내부장기검사를 실시하였다. 각 분만동물에 대하여 출산일에 생존 및 사망자수, 성비, 생존자의 외표기형 발현유무등을 조사하였고, 포육기간동안의 생존율을 조사하였다. 이유부검군의 동물들은 생후 21일째에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 성장시험군의 동물들은 생후 0일째부터 10주째까지 주 1회씩 체중을 측정하였고 발육분화상태[이개개전(3), 피모발생(9), 절치봉출(11), 안검개열(15), 정소하강(23), 질개구(33)]를 관찰하였으며 10주째에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다(○는 관찰일령을 나타냄). 행동시험군의 동물에 대해서는 정향반사(10), 부주지성(13), 견인력(17), 동공반사(22), 청각반사(22), 회전봉(24), open field(47), 수미로(62) 등의 행동학습기능시험을 실시하였다(○는 실시일령을 나타냄). 생식시험군의 암수동물들은 10주령 이후에 동일군내의 동물끼리 형매교배를 피하여 동거시킨 후 교미율, 수태율 및 임신율을 산출하였고 교미확인 암컷 동물에 대해서는 임신 0, 7, 14 및 20일째에 체중을 측정하였다. 모동물들은 임신 20일째에 제왕절개하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수배아(태자)수, 사망태자수, 생존태자의 개체별 체중, 외표이상 등을 조사하였다.

#### 통계학적 분석

얻어진 시험자료에 대한 통계분석은 SAS 프로그램(SAS institute Inc., Ver. 6.04)을 이용하였으며, 체중 사료섭취량 및 장기중량은 일원배치분산분석(ANOVA)과 Dunnett 다중비교검정을, 빈도수를 나타내는 시험자료는

Kruskal-Wallis(H) 검정과 Dunnett 다중비교검정법, 태자의 성비와 출생자의 기억력검사는  $X^2$  검정법으로 각각 대조군 과유의차검정을 실시하였다. 태자에 대한 시험자료는 성비를 제외하고 한배에서 나온 태자들의 평균체중,빈도수(황체수, 흡수배아수, 사망태자수)를 이용하여 통계분석하였고, 출생자에 대한 시험자료는 모동물 단위로 정리하여 분석하였다. 전체적으로 검정의 유의수준은 1% 혹은 5%에서 검사하였다.

## 실험결과

### 모동물에 미치는 영향

#### 일반증상

모동물의 임신기간동안 375, 750 및 1500 mg/kg군에서 연변(soft faeces)이 각각 15, 34 및 34례씩 나타났고 1500 mg/kg군에서는 입모(piloerection), 빈호흡(gasping), 보행실조(ataxia) 및 설사(diarrhea)가 각각 6, 5, 4 및 1례씩 관찰되었는데, 이는 시험물질의 영향으로 인정되었다. 사망동물은 임신기간동안 375 mg/kg군과 1500 mg/kg군에서 각각 2례씩 발견되었는데, 이중 모동물의 분만관찰시 375 mg/kg군에서 1례 관찰된 난산과 그에 따른 모동물의 사망은 허약 또는 산도(birth canal)가 열리지 않아 야기된 것으로 추정되었다. 그리고 나머지 사망례는 시험물질의 투여에 기인한 소견으로 판단되었다. 포육기간 동안에는 대조군을 포함한 모든 투여군에서 어떠한 특이증상도 관찰되지 않았다.

#### 체중

모동물의 임신 및 포육기간 동안의 체중에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다.

#### 사료섭취량

모동물의 사료섭취량은 375 mg/kg군에서는 임신 8일 및 15일째 그리고 1500 mg/kg군에서는 임신 8, 11, 15 및 18일째에 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데, 이는 투여 스트레스 등에 기인한 소견으로서 시험물질의 영향은 아니라고 판단되었다. 그리고 포육기간 동안에는 모든 투여군에서 정상적인 사료섭취가 관찰되었다.

#### 부검소견

모동물의 임신 20일째 부검시 대조군에서는 신우확장(pelvis dilatation)이 2례 관찰되었고, 375 mg/kg군에서는 위출혈, 십이지장내의 암적색 물질 및 질 파열이 각각 1례씩 발견되었다. 그리고 1500 mg/kg군에서는 적갈색 포말성 액체로 채워진 암적색 폐가 2례, 신우확장, 액외부 및 서혜부 피하의 반점(spots in the axillary and inguinal regions), 흉수 및 맹장내의 녹갈색 물질이 각각 1례씩 관찰되었다. 상기 소견들중에서 1500 mg/kg군에서 1례 관찰된 신우확장은 대조군에서도 나타났는데 SD 랫트에서 일반적으로 관찰되는 소견이었고, 375 mg/kg군 및 1500 mg/kg군에서 발견된

위 출혈, 질 파열, 흉수 등의 소견들은 사망동물에게서만 나타난 특이한 장기변화들이었다. 또한 자연분만군에 속한 모동물의 부검시에는 모든 군에서 어떠한 특이 소견도 관찰되지 않았다.

#### 절대 및 상대장기중량

모동물의 임신 20일째 부검시 측정된 주요장기의 절대중량에 있어서 375 mg/kg군과 750 mg/kg군의 간장과 750 mg/kg군의 심장은 통계학적으로 유의성있는 감소를 그리고 1500 mg/kg군의 부신은 유의성있는 증가를 나타냈다. 한편 상대장기중량에 있어서는 모든 투여군의 간장 및 심장 중량감소와 1500 mg/kg군의 부신의 중량증가가 관찰되었다(Table II). 상기 소견들중에서 375 및 750 mg/kg군의 간장중량과 750 mg/kg군의 심장중량의 감소는 용량상관성이 결핍되어 시험물질에 의한 영향으로 판단되지 않았고 반면에 1500 mg/kg군의 부신중량 증가는 시험물질에 의한 변화로 인정되었다.

#### 태자(F1)에 미치는 영향

##### 제왕절개성적

제왕절개시 조사된 황체수, 착상수, 흡수배아수, 사망태자수, 산자수와 암수태자의 체중은 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성을 나타내지 않았다. 성비는 750 mg/kg군에서 대조군에 비해 유의성있는 감소를 나타냈는데, 용량상관성이 결핍되어 시험물질에 의한 변화로는 판단되지 않았다. 태자의 외표소견은 375 mg/kg군에서 흔적미(vestigial tail)가 그리고 1500 mg/kg군에서 단미(short tail)가 각각 1례씩 관찰되었는데, 발현율이 낮아서 시험물질에 의한 영향으로 인정되지 않았다(Table III).

##### 내부장기검사

임신 20일째에 적출한 태자의 내부장기검사시 750 mg/kg군에서는 구개열(cleft palate)과 소안증(microphthalmia)의 복합기형이 1례 관찰되었고, 1500 mg/kg군에서는 외측

뇌실확장(dilatation of the lateral ventricle)과 복합기형[좌측 심실확장 및 동맥궁의 전위(right-slided arcus aortae)]이 각각 1례씩 발견되었다(Table IV). 상기 소견들은 자연발생기형으로 단정하기는 어려우나 발현율이 낮아서 시험물질에 기인한 소견으로는 판단되지 않았다. 그리고 1500 mg/kg군에서 흉선개열이 1례 나타났고 대조군에서 375, 750 및 1500 mg/kg군의 순으로 흉선의 경부잔류(thymic remnant in the neck)는 각각 2, 1, 5 및 3례씩, 신우확장(dilatation of the renal pelvis)은 각각 2, 1, 0 및 0례씩, 그리고 요관확장(dilatation of the ureter)은 9, 9, 6 및 11례씩 관찰되었는데, 이들은 자연발생적인 소견들으로써(Morita 등, 1987) 시험물질에 의한 변화는 아니었다. 또한 포육 4일째 조정후 남은 랫트의 내부장기검사시 모든 군에서 어떠한 이상소견도 나타나지 않았다.

##### 골격검사

랫트태자의 골격소견은 신체의 기능장애 유발여부, 골화 정도 등에 따라서 기형(malformation), 변이(variation) 및 골화지연(retardation)으로 구분된다. 임신 20일째에 적출한 태자의 골격검사시 대조군에서는 말늑골단소(shortened 13th rib)[기형]가 3례(1.7%), 요늑(14th rib), 파상형늑골(wavy ribs) 및 비대칭 흉골분절(asymmetric sternbrae)[변이]이 5례(2.8%) 그리고 흉추추체의 이분(bicentric thoracic vertebral body) 및 아령형 흉추추체(dumbbell-shaped thoracic vertebral body)[골화지연]가 14례(8%) 관찰되었다. 375 mg/kg군에서는 말늑골단소[기형]가 2례(1.1%), 요늑[변이]이 1례(0.5%) 그리고 천문확장(enlarged fontanelle), 흉골분절의 이분(cleaved sternbrae), 흉추추체의 이분, 아령형 흉추추체 및 아령형 요추추체(dumbbell-shaped lumbar vertebral body)[골화지연]가 13례(7.0%) 나타났다. 750 mg/kg군에서는 말늑골단소[기형]가 1례(0.6%), 요늑 및 파상형늑골[변이]이 3례(1.7%) 그리고 흉추추체의 이분 및 아령형

**Table II.** Relative organ weights of dams treated with SM-101.

Dose (mg/kg)	0	375	750	1500
No. of animals	25	25	24	23
Body weight	376.2 ± 27.4	377.5 ± 27.4	378.6 ± 23.8	377.4 ± 23.4
<b>% Body weight</b>				
Brain	0.510 ± 0.044	0.503 ± 0.034	0.505 ± 0.031	0.514 ± 0.030
Adrenal gland-left	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.002**
Adrenal gland-right	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.002	0.010 ± 0.001**
Liver	4.148 ± 0.214	3.841 ± 0.229**	3.799 ± 0.237**	3.953 ± 0.233*
Spleen	0.156 ± 0.016	0.173 ± 0.057	0.162 ± 0.018	0.167 ± 0.025
Kidney-left	0.276 ± 0.031	0.278 ± 0.024	0.281 ± 0.024	0.285 ± 0.020
Kidney-right	0.286 ± 0.030	0.285 ± 0.022	0.288 ± 0.024	0.294 ± 0.026
Heart	0.246 ± 0.030	0.230 ± 0.020*	0.227 ± 0.014**	0.230 ± 0.015*
Ovary-left	0.014 ± 0.003	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.003
Ovary-right	0.015 ± 0.003	0.016 ± 0.003	0.015 ± 0.004	0.015 ± 0.003

Values are Mean ± S. D.(g) \*\*\* indicate significant difference at p<0.05 and p<0.01 levels when compared with the control group.

**Table III.** Caesarean section data of dams treated with SM-101.

Dose (mg/kg)	0	375	750	1500
No. of pregnant animals	25	25	24	23
Corpora lutea (Mean±S.D.)	15.84 ± 2.64	16.56 ± 1.80	16.88 ± 2.07	15.91 ± 1.68
Implantations (Mean±S.D.)	14.36 ± 3.29	15.28 ± 2.25	14.92 ± 2.39	14.48 ± 2.09
% to corpora lutea (Mean±S.D.)	89.81 ± 16.46	92.16 ± 9.11	88.47 ± 11.42	90.74 ± 7.07
Fetal deaths (resorptions+dead fetuses)	21	23	15	18
Resorptions				
Total	19	22	15	18
Early	18	21	15	18
Late	1	1	0	0
Dead fetuses	2	1	0	0
Live fetuses				
Male/Female	195/143	184/175	160/183	168/147
Litter size (Mean±S.D.)	13.52 ± 3.34	14.36 ± 2.08	14.29 ± 2.54	13.70 ± 1.99
% to implantation (Mean±S.D.)	94.42 ± 7.33	94.24 ± 6.01	95.51 ± 4.90	94.89 ± 7.30
Sex Ratio (male/female)	1.36	1.05	0.87**	1.14
No. of fetuses with external anomalies (%)	0	1 (0.3) <sup>a</sup>	0	1 (0.3) <sup>b</sup>
Body weight of live fetuses				
Male (Mean±S.D.)	3.22 ± 0.39	3.24 ± 0.47	3.11 ± 0.41	3.22 ± 0.38
Female (Mean±S.D.)	3.04 ± 0.35	3.09 ± 0.41	3.00 ± 0.33	3.10 ± 0.39

<sup>a</sup>Vestigial tail, <sup>b</sup>Short tail.

**Table IV.** Visceral findings in fetuses from dams treated with SM-101.

Dose (mg/kg)	0	375	750	1500
No. of dams	24	25	24	23
No. of fetuses examined (Mean±S.D.)	162 (6.8±1.1)	174 (7.0±1.0)	164 (6.8±1.3)	151 (6.6±1.0)
No. of fetuses with malformations (%)	0	0	1 (0.6) <sup>a</sup>	2 (1.3) <sup>b</sup>
No. of fetuses with variations (%)	12 (7.4)	9 (5.2)	11 (6.7)	14 (9.3)
Split thymus	0	0	0	1
Thymic remnant in the neck	2	1	5	3
Dilatation of the renal pelvis	2	1	0	0
Dilatation of the ureter	9	9	6	11

<sup>a</sup>Cleft palate, microphthalmia, <sup>b</sup>Dilatation of the lateral ventricle, enlarged left ventricle, right-slided arcus aortae

흉추추체[골화지연]가 10례(5.6%) 관찰되었다. 또한 1500 mg/kg군에서는 말늑골단소[기형]가 9례(5.5%), 요늑 및 파상형늑골[변이]이 3례(1.8%) 그리고 흉골분절의 이분, 흉추추체의 이분 및 아령형 흉추추체[골화지연]가 11례(6.7%) 발견되었다(Table V).

상기한 소견들중에서 모든 군에서 소수례씩 관찰된 말늑골단소는 경기형(minor anomaly)에 속하는 소견으로서 모독성(maternal toxicity)의 결과로 나타날 수도 있으나, 본 시험에서는 자연발생적으로 나타난 것으로 판단되었다. 변이 및 골화지연의 발현율은 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의차를 나타내지 않았다. 그리고 흉골, 중수골, 중족골, 전후지의 기절골 및 천미추의 골화진행도에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다. 또한 생후 4일째 조정후 남은 F1동물의 골격검사시 대조군에서는 요늑, 흉골의 추가골화점(additional ossification center of the

sternebrae) 및 요추의 천추화(sacralization of the lumbar vertebra)[변이]가 8례(20.5%) 그리고 흉추추체의 이분 및 아령형 흉추추체[골화지연]가 1례(2.6%) 관찰되었다. 375 mg/kg군에서는 말늑골단소[기형]가 2례(6.5%) 그리고 흉골의 추가골화점 및 요추의 천추화[변이]가 3례(9.7%) 발견되었다. 또한 750 mg/kg군에서는 요늑 및 흉골의 추가골화점[변이]이 3례(10%) 나타났고, 1500 mg/kg군에서는 요늑[변이]이 2례(5.7%) 관찰되었다.

상기한 소견들중에서 375 mg/kg군에서 2례 나타난 말늑골단소는 용량상관성이 결핍되어 시험물질과는 무관한 소견으로 판단되었고, 변이발현율은 대조군에서 모든 투여군보다 높게 나타나 시험물질의 영향은 인정되지 않았다. 또한 흉골, 중수골, 중족골, 전후지의 기절골 및 천미추의 골화진행도는 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의차를 나타내지 않았다.

**Table V.** Skeletal findings in fetuses from dams treated with SM-101

Dose (mg/kg)	0	375	750	1500
No. of dams	25	25	12	23
No. of fetuses examined (Mean±S.D.)	176 (7.0±1.7)	185 (7.4±1.1)	179 (7.5±1.3)	164 (7.1±1.0)
No. of fetuses with malformations (%)	3 (1.7)	2 (1.1)	1 (0.6)	9 (5.5)
Shortened 13th rib	3	2	1	9
No. of fetuses with variations (%)	5 (2.8)	1 (0.5)	3 (1.7)	3 (1.8)
14th rib (lumbar)	1	1	2	2
Asymmetric sternebrae	2	0	0	0
Wavy ribs	3	0	1	1
No. of fetuses with retardations (%)	14 (8.0)	13 (7.0)	10 (5.6)	11 (6.7)
Enlarged fontanelle	0	1	0	0
Cleaved sternebrae	0	1	0	1
Bicentric thoracic vertebral body	4	4	5	2
Dumbbell-shaped thoracic vertebral body	12	10	5	8
Dumbbell-shaped lumbar vertebral body	0	2	0	0
No. of ossification centers				
Sternebrae	4.3±0.5	4.4±0.6	4.5±1.0	4.5±0.5
Metacarpals in both forelimbs	6.2±0.4	6.3±0.6	6.1±0.5	6.2±0.4
1st phalanges in both forelimbs	0.1±0.5	0.2±0.9	0.2±0.9	0.3±1.2
Metatarsals in both hindlimbs	7.9±0.4	7.9±0.1	7.8±0.3	8.0±0.2
1st phalanges in both hindlimbs	0	0.4±2.0	0	0
Sacral and caudal vertebrae	7.2±0.7	7.0±0.7	6.9±0.6	7.1±0.7

**Table VI.** Reproductive and littering findings of dams treated with SM-101.

Dose (mg/kg)	0	375	750	1500
No. of dams	10	9	10	10
No. of implantations (Mean±S.D.)	17.1±1.0	16.4±1.2	15.3±4.3	16.0±2.1
No. of perinatal deaths	1	6	2	2
% to implantation (Mean±S.D.)	0.6±1.9	3.9±5.9	1.3±2.8	1.4±3.2
No. of live young at birth				
Male	73	68	66	78
Female	81	68	70	66
Total	154	136	136	144
Mean±S.D	15.4±1.5	15.1±1.8	13.6±4.0	14.4±2.8
% to implantation (Mean±S.D.)	90.0±7.0	91.8±6.4	89.7±9.5	89.3±8.40
No. of neonates with external anomalies (%)	0	1(0.7) <sup>1</sup>	1(0.7) <sup>2</sup>	0
Pregnancy period (day; Mean±S.D)	21.7±0.3	21.8±0.4	21.8±0.3	22.1±0.2*
Viability index (%) <sup>a</sup>	99.3	95.8	98.6	98.2
Lactation index (%) <sup>b</sup>	100	100	100	100
Delivery index <sup>c</sup>	10/10	9/10	10/10	10/10

<sup>1</sup>Vestigial tail, <sup>2</sup>Short tail, <sup>a</sup>(No. of live offspring at day 4/No. of live offspring at birth)×100, <sup>b</sup>(No. of live offspring at day 21/No. of live offspring after litter size control)×100, <sup>c</sup>No. of dams with live newborns/No. of pregnant dams

### 차세대 동물(F1)에 미치는 영향

#### 출산시 소견 및 포육기간중의 생존율

모동물의 착상수, 출생시의 사산자수 및 생존자수 그리고 F1동물의 생존율에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다(Table VI). 모동물의 임신기간은 1500 mg/kg군에서 대조군에 비해 유의성있게 증가하였는데, 이는 시험물질의 영향으로 판단되었다. 375 mg/kg군의 1례에서는 난산과 그에 따른 모동물의 사망이 관찰되었는

데 시험물질과 무관한 분만사고로 판단되었다. 그리고 출생일의 생존자 관찰시 375 mg/kg군에서는 흔적미가 그리고 750 mg/kg군에서는 단미가 각각 1례씩 발견되었는데, 발현율이 낮고 용량상관성이 결핍되어 시험물질에 의한 변화로 인정되지 않았다.

#### 부검소견(이유부검군)

이유부검군에 속한 F1 암수동물의 생후 21일째 부검시 모든 군에서 어떠한 특이소견도 관찰되지 않았다.

**분화상태(성장시험군)**

성장시험군에 속한 F1 암수동물의 형태분화(이개개전, 피모발생, 절치봉출, 안검개열, 정소하강 및 질개구)의 관찰 시 분화상태는 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성을 나타내지 않았다.

**행동기능검사**

행동시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 정향반사기능시험, 부주지성시험, 견인력시험, 동공반사시험, 청각반사시험 및 회전봉시험을 실시한 바, 합격율에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다.

**Open field test**

행동시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 open field test를 실시한 결과, 수컷동물의 경우 750 mg/kg군에서 동물이 이동한 정방향의 수가 유의성있게 증가하였는데 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향으로 판단되지 않았다.

**수미로시험**

행동시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 수미로시험을 실시한 결과, 학습시험(1~6회), 기억력시험 및 역학습시험(1~6회)의 합격율에 있어서 암수 모두 대조군과 각 투여군간의 유의차는 인정되지 않았다.

**일반증상(성장시험군)**

성장시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 출생시부터 생후 10주째까지 일반증상 관찰을 실시한 바, 암수 공히 모든 투여군에서 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

**체중(성장시험군)**

성장시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 생후 0일부터 10주째까지 체중을 측정된 결과, 암수 공히 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

**부검소견(성장시험군)**

성장시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 10주째에 부검을 실시한 바, 수컷동물의 경우 대조군에서는 비장, 위 및 췌

장의 전위(situs inversus)와 좌측 신장의 신우확장이 각각 1례씩 관찰되었고, 375 mg/kg군에서는 우측 신장의 신우확장이 2례, 암적색 간장, 정소, 정소 상체, 전립선, 정낭선 및 간장의 위축이 각각 1례씩 발견되었다. 750 mg/kg군에서는 신우확장이 1례 나타났고, 1500 mg/kg군에서는 좌측 부신의 적색반점(red spot)이 1례 관찰되었다. 암컷동물에 있어서는 750 mg/kg군과 1500 mg/kg군에서 신우확장이 각각 1례씩 발견되었다.

상기 소견중 375 mg/kg군에서 각각 1례씩 관찰된 간장, 정소 및 정소상체의 위축과 암적색 간장은 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향으로 인정되지 않았다. 또한 375 mg/kg군과 750 mg/kg군에서 나타난 신우확장과 1500 mg/kg군에서 발견된 좌측 부신의 적색반점은 SD랫 트에 있어서 자연발생적으로 나타나는 소견들로서 시험물질에 의한 변화는 아니었다.

**장기중량(성장시험군)**

성장시험군의 부검시 장기중량을 측정된 결과, 암수 모두 375, 750 및 1500 mg/kg군에서 신장의 절대 및 상대장기중량이 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈는데(Table VII, VIII), 이는 시험물질의 투여에 기인한 소견으로 인정되었다.

**교배성적**

생식시험군에 속한 F1 암수동물을 10주령 이후에 교배시켰을때, 교미율, 수태율 및 임신율에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다.

**체중(생식시험군)**

F1 암컷동물의 임신기간 동안의 체중은 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성을 나타내지 않았다.

**부검소견(생식시험군)**

F1 동물의 부검시 암컷동물의 경우 1500 mg/kg군에서 횡격막탈장(diaphragmatic hernia)이 1례 관찰되었고, 수컷

**Table VII.** Relative organ weights of F1 male rats from dams treated with SM-101.

Dose (mg/kg)	0	375	750	1500
No. of animals	10	9	10	10
Body weight	412.2 ± 14.7	421.1 ± 61.0	418.3 ± 31.7	416.0 ± 32.7
<b>% Body weight</b>				
Brain	0.478 ± 0.016	0.482 ± 0.090	0.486 ± 0.031	0.484 ± 0.044
Adrenal gland-right	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001
Adrenal gland-left	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Liver	4.009 ± 0.243	4.485 ± 0.742	4.153 ± 0.447	4.499 ± 0.406
Spleen	0.173 ± 0.026	0.184 ± 0.024	0.185 ± 0.019	0.178 ± 0.026
Kidney-left	0.323 ± 0.016	0.386 ± 0.041**	0.383 ± 0.021**	0.393 ± 0.029**
Kidney-right	0.332 ± 0.019	0.412 ± 0.052**	0.392 ± 0.024**	0.406 ± 0.025**
Heart	0.297 ± 0.020	0.309 ± 0.035	0.305 ± 0.023	0.295 ± 0.027
Testis-left	0.392 ± 0.020	0.347 ± 0.072	0.389 ± 0.029	0.379 ± 0.037
Testis-right	0.393 ± 0.028	0.363 ± 0.069	0.388 ± 0.034	0.375 ± 0.037

Values are Mean ± S. D.(g) \*\*\*indicate significant difference at p<0.05 and p<0.01 levels when compared with the control group.

**Table VIII.** Relative organ weights of F1 female rats from dams treated with SM-101.

Dose (mg/kg)	0	375	750	1500
No. of animals	10	9	10	10
Body weight	232.4 ± 22.0	231.8 ± 19.2	230.2 ± 20.3	233.2 ± 15.8
% Body weight				0.779 ± 0.051
Brain	0.794 ± 0.070	0.791 ± 0.064	0.806 ± 0.086	0.015 ± 0.002
Adrenal gland-left	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.015 ± 0.003
Adrenal gland-right	0.014 ± 0.002	0.013 ± 0.003	0.013 ± 0.003	3.902 ± 0.305
Liver	3.615 ± 0.212	4.034 ± 0.249	3.788 ± 0.480	0.200 ± 0.023
Spleen	0.202 ± 0.022	0.208 ± 0.027	0.204 ± 0.043	0.420 ± 0.040**
Kidney-left	0.346 ± 0.022	0.420 ± 0.026**	0.414 ± 0.057**	0.445 ± 0.051**
Kidney-right	0.353 ± 0.022	0.446 ± 0.036**	0.423 ± 0.058**	0.350 ± 0.023
Heart	0.334 ± 0.011	0.346 ± 0.038	0.322 ± 0.044	0.018 ± 0.005
Ovary-left	0.020 ± 0.004	0.019 ± 0.003	0.017 ± 0.005	0.020 ± 0.004
Ovary-right	0.020 ± 0.002	0.020 ± 0.004	0.018 ± 0.003	

Values are Mean ± S. D.(g) \*\*\*indicate significant difference at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  levels when compared with the control group.

동물에 있어서는 모든 군에서 어떠한 특이 소견도 발견되지 않았다. 상기한 암컷 1500 mg/kg군의 소견은 자연발생적인 소견으로 시험물질에 의한 변화는 아니었다.

## F2 태자에 미치는 영향

### 제왕절개성적(생식시험군)

F1 모동물의 제왕절개시 조사된 흡수배아수, 사망태아수, 성비 및 생존태아의 체중에 있어서 각 투여군과 대조군 간의 유의차는 인정되지 않았다. 황체수와 산자수는 375 mg/kg군에서 그리고 착상수는 375 및 750 mg/kg군에서 대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타냈는데, 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향으로 판단되지 않았다.

태자의 외표소견은 대조군에서 부종(edema)이 1례 관찰되었고, 1500 mg/kg군에서는 무안증(aposopia)과 반구형두부(dome-shaped head)의 복합 기형이 1례 발견되었는데, 그 발현율이 낮아서 시험물질에 기인한 소견으로 인정되지 않았다.

## 고 찰

SM-101은 삼성제약에서 개발한  $\beta$ -lactam계 항생제로서 설박탐 나트륨과 메탐피실린 나트륨이 1 : 2의 비율로 배합된 복합물질이다. 이러한 SM-101을 0, 375, 750 및 1500 mg/kg의 용량으로 Sprague-Dawley계통의 랫트에 임신 7일부터 임신 17일까지 정맥투여하여 모동물, 태자 및 차세대 동물에 미치는 영향을 조사하였다.

모든 투여군에서 관찰된 연변은 고용량군으로 갈수록 그 발생예와 정도가 증가하였는데, 이는 설박탐 암피실린 등과 같은 복합항생제의 투여시 야기되는 장내세균의 불균형에 기인한 일반적인 증상으로서(中田 등, 1982; Nabata 등, 1988), 본 시험물질에 의한 특이적인 독성증상으로는 사료되지 않았다.

1500 mg/kg군에서 소수예로 나타난 빈호흡, 보행실조, 설사, 입모 등의 소견들은 시험물질의 투여에 기인한 쇼크 또는 독성증상으로서 가역적인 변화들이었다. 반면에 375 mg/kg군과 1500 mg/kg군에서 각각 1 및 2례씩 발견된 사망례는 이들 개체들이 타동물들보다 복합항생체인 SM-101에 특히 민감하게 반응하므로써 쇼크사한 것으로 판단된다. 역시 1500 mg/kg군에서 관찰된 부신중량의 증가는 생체이물(xenobiotic)인 시험물질에 대한 생체반응의 결과로서 세포의 증생 또는 비대가 나타난 것으로 사료된다.

제왕절개, 내부장기 및 골격검사에 있어서 시험물질의 투여에 기인한 것으로 판단되는 어떠한 소견도 관찰되지 않아 SM-101이 착상후의 태자발생에 간섭(interference)하지 않음을 알 수 있었다. 그런데 Takai 등(1977)도 역시 반합성 페니실린계 항생물질로서 ampicillin의 유도체인 piperacillin을 랫트에 기관형성기동안 250, 500 및 1000 mg/kg의 용량으로 연속피하투여한 후 어떠한 기형도 관찰할 수 없었다고 한다. 그 밖에도 일련의 최기형성연구를 통해 penicillin 계통의 항생제가 임신랫트에 있어서 태자기형을 유발하지 않는다는 사실이 보고된 바 있다(Fritz, 1978; Froberg, 1978; 中田 등, 1982; Clark 등, 1985).

1500 mg/kg군에서 나타난 모동물의 임신기간의 연장은 시험물질의 투여에 따른 모동물의 호르몬 분비장애, 허약 등에 기인한 소견으로 추정된다.

성장시험군에 속한 F1 동물의 장기중량 측정시 모든 투여군에서 관찰된 신장중량의 증가는 모동물의 태반을 통과한 SM-101 또는 대사물질(ampicillin 등)이 F1 태자의 후신(metanephros)에 작용하여 차세대동물에 표출된 소견으로 사료되며 추후 병리조직검사 등을 통해 그 원인을 규명할 수 있을것으로 사료된다.

차세대동물의 검사에 있어서 행동학습기능, 성장시험군의 형태분화, 생식시험군의 교배성적 등이 모든 투여군에



서 대조군의 결과와 차이를 나타내지 않아 본 시험물질이 F1 동물의 성장 및 기능발달에 영향을 주지 않는 것으로 사료되었다. 또한 생식시험군에 속한 F1 암컷동물의 제왕절개와 포육 4일째 조정후 남은 F1 랫트의 골격 및 내부장기 검사에 있어서는 어떠한 시험물질의 영향도 인정되지 않았다.

SM-101의 임상예정용량은 125 mg/kg/day로 추정된다. 그런데 임상예정용량의 3배인 375 mg/kg군에서도 모동물의 사망(6%)과 F1동물의 신장중량 증가가 관찰되어 본 시험물질의 일반독성학적 역치(threshold)는 임상예정용량에 근접함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 최기형시험에 의한 SM-101의 무해용량(no observed effect level)은 모동물과 차세대동물에 있어서 375 mg/kg 미만, 그리고 F1/F2 태자에 있어서는 1500 mg/kg 이상이라고 사료된다.

### 감사의 말씀

시험물질 SM-101을 제공해 주신 (주)삼성제약공업과 본 시험을 수행하는데 기술적인 도움을 주신 최규갑, 이상준 씨 그리고 통계처리 및 자료정리를 맡아주신 김정란 양께 감사사를 드립니다.

### 참고문헌

- Brogard, J. M., Pinget, M., Adloff, M., Dorner, M. and Lavillaureix, J. (1976). Experimental and clinical pharmacology of metampicillin in the biliary tract. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**, 363-371.
- Brogard, J. M., Pinget, M., Dorner, M. and Blickle, J. F. (1985). Biliary elimination of  $\beta$ -lactam antibiotics by the isolated perfused rabbit liver. *Liver* **5**, 147-155.
- Clark, R. L., Robertson, R. T., MacDonald J. S. and Bokelman, D. L. (1985). Imipenem/Cilastatin sodium (MK-0787/MK-0791): Teratological study in rats. *Chemotherapy* **33**, 227-240.
- Dawson, A. B. (1926). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Stain Technol.* **1**, 123-124.
- English, A. R., Retsema, J. A., Girard, A. E., Lynch, J. E. and Barth, W. E. (1978). CP-45899, a  $\beta$ -lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of  $\beta$ -lactams: initial bacteriological characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 414-419.
- Friedman, C. L., Huneke, A. L., Kim, M. H. and Powell, J. (1980). The effect of ampicillin on oral contraceptive effectiveness. *Obstet. Gynecol.* **5**, 33-37.
- Fritz, H. (1978). Antibiotische Wirkung und teratogene Eigenschaften. In: Embryotoxikologische Probleme in der Arzneimittelforschung, Schnieders, B. et al. eds, Dietrich Reimer Verlag. pp. 141-144.
- Frohberg, V. H. (1978). Kanzerogenese, Teratogenese, Mutagenese: Beziehung zwischen tierexperimentellen und klinischen Befunden. *Arzneimitt. Forsch.* **28**, 1984-2001.
- 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, rabbits and mice. *Cong. Anom.* **27**, 147-206.
- Nabata, H., Iijima, M., Yamada, S., Munchasu, S., Suzuki, M., Tachibana, M. and Ishiko, J. (1988). Acute, subacute, chronic toxicity and general pharmacological studies of sulbactam ampicillin. *Chemotherapy* **36**, 58-65.
- Nishimura, K. (1974). A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.* **14**(1), 23-40.
- Pinget, M., Brogard, J. M., Dauchel, J. and Lavillaureix, J. (1976). Biliary excretion of ampicillin, metampicillin and carbenicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **2**, 195-201.
- Retsema, J. A., English, A. R. and Girard, A. E. (1980). CP-45899 in combination with penicillin or ampicillin against penicillin-resistant *Staphylococcus*, *Haemophilus influenzae* and *Bacteroids*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 615-622.
- Retsema, J. A., English, A. R., Girard, A. E., Lynch, J. E., Anderson, M., Brennan, L., Cimochowski, C., Faiella, J., Norcia, W. and Sawyer, P. (1986). Sulbactam/ampicillin: *In vitro* spectrum, potency and activity in models of acute infection. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 9528-9534.
- Shepard, T. H. (1989). Catalog of teratogenic agents. The Johns Hopkins university press, 6th edition. pp. 47.
- Shimooka, K., Ito, M., Matsumoto, K., Niimi, H., Matsunaga, T. and Kawasaki, K. (1988). Sensitive high-performance liquid chromatographicamperometric and microbiological assays for determining sulbactam in serum. *Chemother.* **36**, 81-89.
- Sutherland, R., Elson, S. and Croydon, E. A. P. (1972). Metampicillin: Antibacterial activity, absorption and excretion in man. *Chemotherapy* **17**, 145-160.
- Takai, A., Yoneda, T., Nakada, H., Nakamura, S. and Inaba, J. (1977). Toxicity tests of T-1220(VII): Teratological study in rats. *Chemotherapy* **25**, 928-933.
- Wilson, J. G. and Warkany, J. (1972). Teratology, Principles and Techniques. The university of Chicago press. pp. 1-277.
- Yakugyo Jiho Co. (1984). Toxicity Test Guideline: Collection of notifications related to the pharmaceutical affairs law (IV), Japan.
- 국립보건안전원(1988). 의약품등의 독성시험기준, 국립보건안전연구원, 예규 제 10호.
- 中田弘子, 中村昌三, 小前憲久, 瀧本陽子, 高井明 (1982). T-1982の毒性試験 (第 5報). ラットにおける生殖試験. *Chemotherapy* **30**, 319-343.