

마우스에서 아세트아미노펜의 급성간독성과 독물동태학

서경원* · 류정상 · 김효정
식품의약품안전본부, 독성부
서울시 은평구 녹번동 5번지 122-020

Acute Hepatotoxicity and Toxicokinetics of Acetaminophen in Mice

Kyung Won Seo*, Jung Sang Ryou and Hyo Jung Kim
Department of Toxicology, Korea Food and Drug Administration,
5 Nokbundong, Eunpyunggu, Seoul 122-020, Korea
(Received August 24, 1997)
(Accepted September 10, 1997)

ABSTRACT : As the development of a pharmaceutical product is a dynamic process which involves continuous feed-back between non-clinical and clinical studies, the integration of pharmacokinetics into toxicity testing became increasingly important in recent years. Toxicokinetic measurements in the toxicity studies is considered to be an important scientific approach in the interpretation of the toxicology findings and the promotion of rational study design development. Primarily this research project was conducted to determine the systemic exposure achieved in acute toxicity test and its relationship to dose level and the time course of the toxicity study. Acute hepatotoxicity study and its relevant toxicokinetic study in mice were performed using acetaminophen (AA) as a model compound. The correlation between acute hepatotoxicity indices and toxicokinetic parameters following intraperitoneally administration of various dosages of AA in mice was evaluated and discussed minutely in the text. Based on these studies, single-dose toxicity testing of AA including kinetic studies was evaluated in ICR mice for 7 days and interpreted in the text. Our results from the integration of toxicokinetic monitoring into single-dose toxicity study enable to elucidate the relation of the exposure achieved in toxicity study to toxicological findings and assist in the selection of appropriate dose levels for use in repeated-dose toxicity or later studies.

Key Words : Acetaminophen, Acute hepatotoxicity, Toxicokinetics

I. 서 론

독물동태학이란 치료효과를 나타내는 용량보다 고용량에서 약물의 흡수, 분포, 대사와 배설을 다루는 약동력학의 한 분야이다. 독물동태학의 평가는 일반적으로 관찰된 독성을 이해하고 전신 노출의 정도를 평가하기 위하여 약물의 안전성 시험이 수행 중인 동물에 행해진다. 고용량을 투여하여도 독성을 나타내지 않는 약물의 경우, 독물동태학은 노출의 기간과 정도를 검증하는 수단으로도 사용된다.

독성시험의 중요한 목적은 약물의 잠재적인 부작용

을 찾아내는 것이며, 따라서, 실험동물이 독성시험에서 사용되는 고용량에서 독성을 나타내도록 규정하고 있다. 그러나 임상적용량의 수배의 고용량에서도 독성이 거의 또는 전혀 나타나지 않은 약물도 많으며, 독성을 나타내는 약물의 잠재성을 밝혀도 인체 사용량에서의 안전성을 예견할 수 없는 경우도 많다. 따라서 독성시험의 필수적인 목적은 무작용량을 결정하는 것이다. 약물의 대사와 약물동력학에 있어 상당한 중간 차이가 존재하기 때문에, 약물의 전신 노출의 비교 평가를 통하여 사람에서의 안전한 용량을 예견할 수 있다. 독물동태학은 약물이 독성을 나타내는 용량에서 독물동태학적 지표들을 이용하여 동물로부터 얻어진 정보를 외삽하여 인체에서의 안전성을 예측가능하게 한다. 또한

*To whom correspondence should be addressed

독물동태학은 다음 단계의 전임상시험으로 진행되는 과정에서 투여용량, 투여간격, 동물종 등을 결정하는데 유용한 정보를 제공 할 수 있다.

본 연구의 첫번째 목적은, 약물에 의한 독성과 혈중 농도로부터 얻어진 독물동태학 지표 사이의 비교 평가를 통하여 상관관계를 규명하고자 하는 것이다. 본 시험에서는 소염진통제와 해열제로 광범위하게 사용되는 아세트아미노펜을 대상 약물로 선정하였다. 아세트아미노펜(AA)을 과량 섭취하면 사람을 포함한 일부 종에서 심각한 간손상이 초래되며, 죽음에 이르게 된다(Boyd와 Berczky, 1966; Prescott 등, 1971; Mitchell 등, 1973). 아세트아미노펜에 의한 독성은 cytochrome P-450 효소 반응에 의해 생성되는 비교적 소량의 대사체인 N-acetyl-p-benzoquinoneimine에 의한다고 알려져 있다(Dahlin 등, 1984). 이 electrophilic 대사체는 간조직중의 여러 nucleophile, 특히 글루타치온과 공유결합한다(Rosen 등, 1984). 고용량의 AA를 투여하게 되면 글루타치온이 고갈되고, 활성 대사체들은 macromolecule과 같은 중요분자와 결합하며 독성을 나타내게 된다(Mitchell 등, 1973). 본 시험에서는 대표적인 부작용이 간독성인 아세트아미노펜을 모델화합물로 하여, 독성과 혈중 농도를 이용한 독물동태학적 지표를 비교함으로써 그 상관성을 보고자 하였다.

독물동태학은 전임상시험의 여러단계에서 수행되고 있으며, 특히 반복투여독성시험과 생식독성시험 등에서 투여용량 등 여러 인자를 결정하는데 있어 중요한 역할을 한다. 따라서 본 시험의 두번째 목적은, 급성독성시험을 실시중인 동물에 대하여 실험 기간중 각 용량별로 혈중 농도의 변화를 모니터 함으로써, 급성독성시험의 지표와 혈중 농도의 관계를 규명하고자 하였다. 또한 투여용량과 혈중농도의 상관성을 평가하여, 반복투여시험에서의 투여용량과 투여간격의 선정에 유용한 정보를 얻고, 독성시험에서의 독물동태학 접목을 시도하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 재료

아세트아미노펜, sorbitol dehydrogenase assay kit와 alanine aminotransferase assay kit는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며 그외 물질들은 시약급으로 사용하였다.

2. 실험동물

실험동물은 식품의약품안전본부의 청정구역에서 생산된 5 주령의 SPF ICR계 마우스를 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육 상자(200W×260L×130H mm) 케이지에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화사육 기간동안에 일반 상태를 관찰하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 신촌사료주식회사의 실험동물사료를 구입하여 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음수는 상수도를 자유롭게 섭취시켰다.

3. 급성 간독성 시험

AA는 75, 150, 300, 600 및 1200 mg/kg의 용량으로 복강투여 하였다. AA 투여후 24시간에 심장으로부터 혈액을 채취하여 혈청 중 sorbitol dehydrogenase (SDH)와 alanine aminotransferase(ALT)의 활성을 측정하였다. 조직병리 검사를 위하여 간을 적출하고, 2~3 mm의 두께로 삭정하여 10% 완충 포르말린으로 고정하였다. 고정된 조직은 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매하였고, 박절된 조직은 hematoxylin & eosin 염색 후 검경하였다.

4. 독물동태학 실험

1) Animal preparation and dosing procedure

마우스를 normal saline에 녹인 sodium pentobarbital (10 mg/ml)를 50 mg/kg 용량으로 복강주사하여 마취시켰다. AA는 normal saline에 녹여 75, 150, 300, 600 및 1200 mg/kg의 용량으로 복강투여 하였다. AA는 고농도에서 물에 녹지 않으므로 투여 직전에 중탕 가열하여 용해시켜 사용하였다.

2) Blood sampling and AA analysis

AA가 투여된 마우스로부터의 혈액은 23gauge 주사기를 이용하여 꼬리 동맥의 선단으로부터 순차적으로 동맥을 puncture하여 채취하였다. 혈액 채취는 5~30분 간격으로 2시간동안 8차례 실시하였다. 모든 처리군의 각 마우스로부터 10 μl 의 혈액을 취하여 헤파린으로 처리된 microcentrifuge tube에 보관하였다. 채취한 혈액 중 AA는 reverse-phase high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 Howie 등의 방법(Howie 등, 1977)으로 분석하였다. AA 및 대사체들은 C₁₈- μ Bondapak reverse-phase column (30 cm×3.9 mm, Waters Associates, Boston, MA)을 이용하여 분리하였

으며, 분석 column을 보호하기 위해 μ Corasil(Waters)로 채워진 보호 column을 이용하였다. 이동상으로 물:메탄올:초산(v:v:v=900:80:8)의 용액을 사용하여 1.5 ml/min의 속도로 유출시켰다. 채취된 혈액으로부터 단백질을 제거하기 위해 메탄올로 5~10배 희석하여 원심분리한 후 상등액을 HPLC 분석시료로 사용하였다. 시료는 Waters 710B Satellite WISP automatic injector를 이용하여 10 μ l를 injection 하였다. 유출된 AA 및 대사체들은 Waters model 440 absorbance detector를 이용하여 254 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 분석된 peak의 면적을 토대로 AA 표준곡선(0.5~10 nmol)으로부터 AA의 혈중 농도를 계산하였다.

3) Model selection and calculation of toxicokinetic parameters

AA의 시간에 따른 혈중 농도의 toxicokinetic parameter는 RSTRIP computer program (Version 5.01, Micro-Math Inc., 1991)을 사용하여 계산하였다. 각 데이터의 최적 모델은 RSTRIP에 내장되어있는 Akaike Information Criterion의 수정판인 Model Selection Criterion에 의해 선정되었다. AA의 시간에 따른 혈중 농도는 다음 방정식을 따르며 반감기는 Lam 등의 방법(Lam 등, 1985)으로 조화평균과 표준편차를 구하였다.

$$C = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\lambda_i t}$$

A_i 는 1 phase의 y 축의 절편이며 λ_i 는 1 phase의 분포 속도상수이다. 다음의 toxicokinetic parameters를 AA의 혈중 농도 대 시간간의 데이터를 토대로 계산하였다.

$$CL_T = \text{dose} / \int_0^{\infty} C dt$$

여기서 CL_T 은 total body clearance이며, $\int C dt$ 는 혈중 농도 대 시간 곡선하 면적(AUC)이다.

$$t_{1/2} = 0.693 / \lambda_n$$

여기서 $t_{1/2}$ 은 AA의 elimination half life이다.

5. 급성독성 시험

순화기간중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하여 5개의 투여군과 대조군을 두었다. AA를 75, 150, 300, 600 및 1200 mg/kg의 용량으로 복강투여하고 대조군에는 생리식염수

를 투여하였다. 투여후 10분과 90분 및 24시간에 꼬리동맥으로부터 혈액을 채취하고 AA 분석을 위하여 헤파린으로 처리된 microcentrifuge tube에 보관하였다. 임상증상 관찰은 모든 실험동물에 대하여, 투여당일은 투여후 6시간 동안 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 다음날 부터 7 일까지는 매일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망 발현의 유무를 관찰하였다. AA 투여군과 대조군의 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여일, 투여후 1일, 3일 및 6일째에 체중을 측정하였으며, 7일째에 모든 동물을 CO₂로 가볍게 마취하고 설하동맥 및 복대동맥을 절단하여 치사시킨 다음 외관 및 내부장기 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

6. 통계처리

본 시험에서 얻어진 시험결과에 대한 통계학적인 분석은 Bartlett's test로 분산검정을 실시하여, 등분산일 경우 one way analysis of variance(ANOVA) 검정을 실시하였으며, ANOVA 검정에서 유의한 경우에는 Scheffe법으로 대조군과 각 투여군간에 다중비교를 실시하였다. LD₅₀치와 그 95% 신뢰 한계는 Pharmacologic Calculation System (Ver.4.1: Springer-Verlag, NY, 1986)을 이용하여 Litchfield -Wilcoxon 법에 의하여 산출하였다.

III. 결 과

1. 급성 간독성 시험

아세트아미노펜을 투여후 24시간에 측정된 혈청 중 SDH와 ALT 활성치를 Table 1에 나타내었다(Table 1). 아세트아미노펜을 75와 150 mg/kg의 용량으로 처리한 군에서는 대조군에 비하여 유의성있는 SDH의 활성변화가 관찰되지 않았다. AA를 300 mg/kg와 600 mg/kg

Table 1. Effect of acetaminophen on serum enzyme activities^a

Dose(mg/kg)	Enzyme Activity	
	SDH activity(U/l)	ALT activity(U/l)
Control	35.3±2.7	4.4±2.9
75	36.3±3.9	15.8±7.8
150	35.6±2.6	4.3±1.7
300	1361.2±850.9*	492.8±238.2*
600	4470.7±159.4*	1193.6±334.1*

^a Values are expressed as means±S.E. of five mice.

*Significantly different from control group at p<0.05.

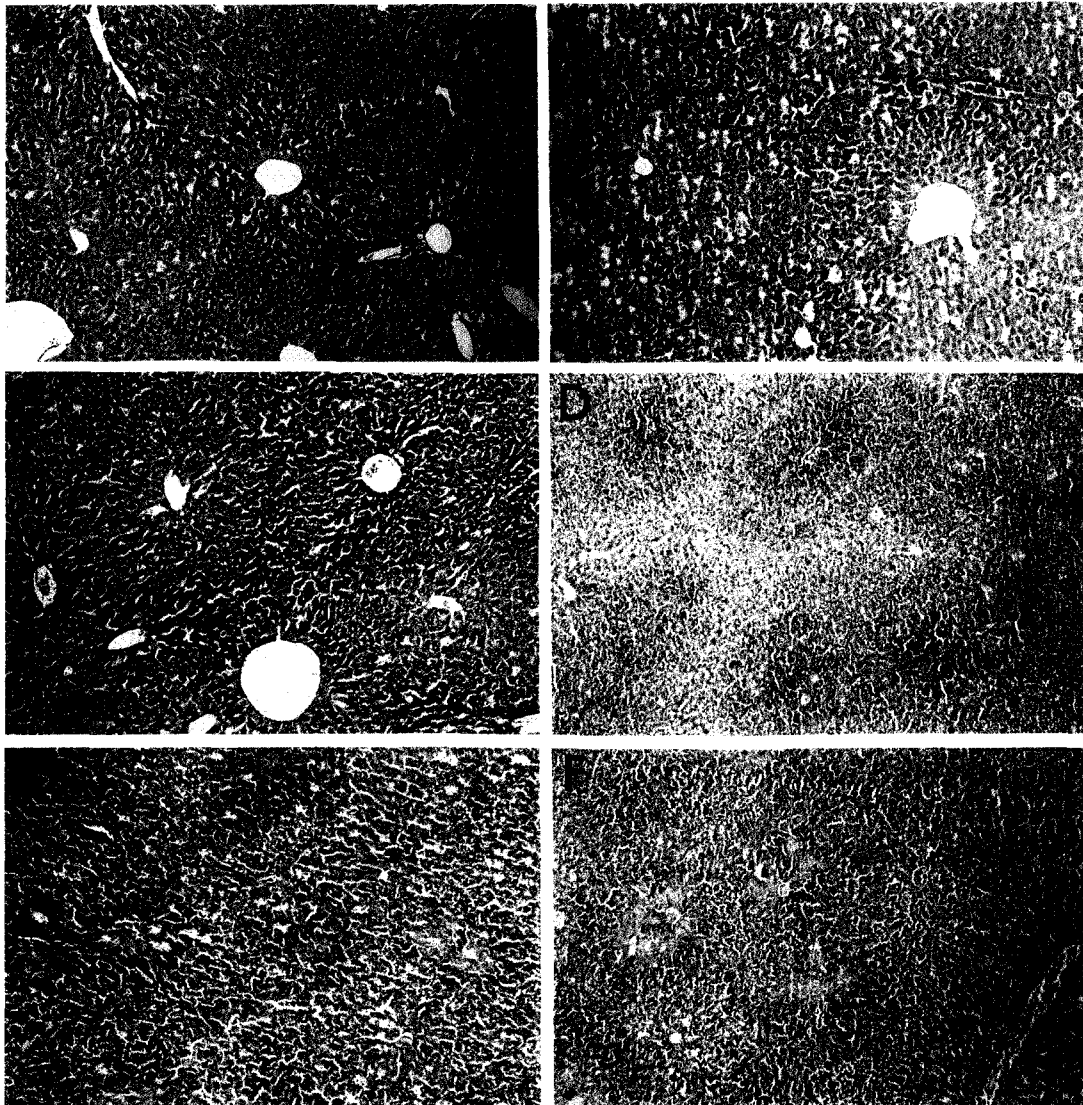


Fig. 1. (A) Portion of a liver lobule from a control mouse. Note the normal appearance of the hepatic parenchyma and sinusoids surrounding the central vein. H&E, $\times 100$. (B)(C) Liver lobule from a mouse sacrificed 24hr after receiving 75 mg acetaminophen(AA)/kg(B) or 150 mg AA/kg(C) ip. Change is limited to slight swelling of hepatocytes near the central vein. H&E, $\times 100$. (D)(E)(F) Liver lobule from a mouse sacrificed 24hr after receiving 300(D), 600(E) or 1200(F)mg/kg ip. Severe necrosis and congestion of sinusoids are more prominent in the centrilobular area with an increase in administered amount.

을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 현저한 SDH의 활성증가가 나타났다. ALT의 활성도 SDH의 활성 변화와 유사한 경향을 나타내어, AA 150 mg/kg까지는 통계학적으로 유의성이 있는 변화가 없었으며, 300 mg/kg와 600 mg/kg 투여시에는 용량의존적으로 유의성 있는 활성증가가 관찰되었다. AA 1200 mg/kg 투여군은 투여후 24시간 안에 모두 사망하였다.

AA를 투여한 마우스의 간조직에 대한 조직병리검사 현미경 사진이 Fig. 1에 나타나있다. 사진 A는 대조군 마우스의 간조직 사진으로 정상적인 소견을 보여주고 있다. 사진 B와 C는 각각 75와 150 mg/kg의 용량

을 투여한 마우스의 간조직으로서 central vein 주변의 간세포들이 약간의 swelling을 나타내었다. 사진 D, E와 F는 AA를 각각 300, 600, 1200 mg/kg의 용량으로 투여한 마우스의 간조직으로서 centrilobular 주변의 sinusoid에 심각한 괴사(necrosis)와 충혈(congestion)이 관찰되었으며, 이러한 소견은 용량의존적으로 증가하였다.

2. 독물동태학 실험

아세트아미노펜을 투여후 2시간 동안의 시간에 따른

혈중 농도 변화와 이로부터 산출한 독물동태학 지표들을 Fig. 2와 3, Table 2에 나타내었다(Fig. 2, 3, Table 2). AUC는 AA의 용량이 증가함에 따라 증가하였으

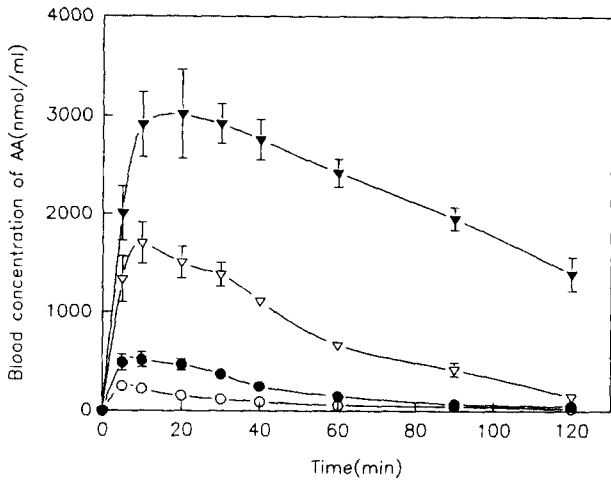


Fig. 2. Blood AA concentration versus time profiles in mice following administration of various dosages of AA. Symbols represent the means \pm S.E. of five mice. \circ : 75 mg/kg, \bullet : 150 mg/kg, ∇ : 300 mg/kg, \blacktriangledown : 600 mg/kg.

며, 300 mg/kg 투여군에서부터 현저한 증가를 보였다. 투여용량이 75 mg/kg에서 150 mg/kg까지는 2배의 용량증가에 비례하여 AUC가 증가하였는데, 300 mg/kg 투여군에서의 AUC 값은 150 mg/kg 투여군의 4배로, 600 mg/kg 투여군의 AUC 값은 300 mg/kg 투여군 값의 4배로 증가하여 AUC 값은 용량의 증가를 훨씬 초과하여 증가하였다(Fig. 4).

투여 후 최고 혈중농도(Cmax)도 AA의 용량에 의존적으로 증가하였는데, 300 mg/kg 투여군까지는 AA의 용량과 linear한 관계를 나타냈으며, 600 mg/kg에서는 그 증가의 폭이 둔화되었다. 최고 혈중농도에 도달하는 시간(Tmax)도 AA의 용량이 300 mg/kg까지는 차이를 보이지 않았으나, 600 mg/kg 투여군에서는 다른 용량군의 2배 정도로 증가하였다. 생체내 반감기($t_{1/2}$)도 300 mg/kg 용량까지는 20분과 30분 사이로 차이가 보이지 않았으나, 600 mg/kg 투여군에서는 79분으로 증가하여 Tmax의 변화와 유사한 경향을 나타내었다. Total body clearance는 AA 용량증가에 따라 감소하였는데 다른 지표에 비하여 AA의 용량과 뚜렷한 반비례 관계를 나타내었다(Table 2).

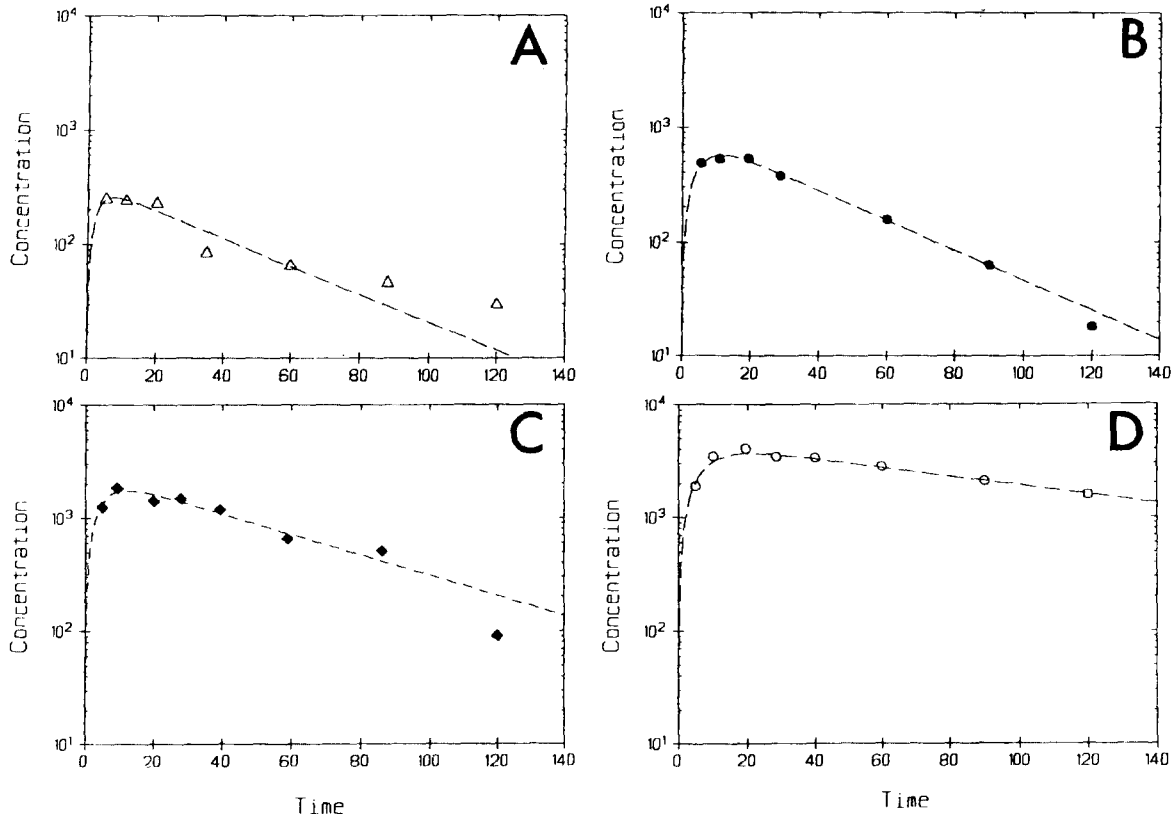


Fig. 3. Blood AA concentration-versus-time profiles in mice following ip administration of various dosages of AA. Arterial blood concentration of AA were measured at 5- to 30-min intervals for 2hr. Symbols show the representative experimental data of each treatment group and solid lines indicate data fitted to poly exponential equations by the RSTRIP computer program. (A) : 75 mg/kg, (B) : 150 mg/kg, (C) : 300 mg/kg, (D) : 600 mg/kg

Table 2. Toxicokinetic parameters following intraperitoneal administration of acetaminophen^a

Dose	AUC	Cmax	Tmax	t _{1/2} ^b	CL
mg/kg	μmol.min/ml	μmol/ml	min	min	ml/min/kg
75	11.0 ± 0.4 ³	0.3 ± 0.03 ³	7.1 ± 1.8 ²	26.3 ± 4.0 ²	45.4 ± 1.7 ³
150	24.6 ± 1.3 ³	0.5 ± 0.07 ³	9.7 ± 0.8 ²	32.8 ± 10.1 ²	40.8 ± 2.1 ³
300	105.3 ± 5.6 ²	2.0 ± 0.3 ²	11.4 ± 3.2 ²	30.6 ± 2.0 ²	19.1 ± 1.1 ²
600	439.7 ± 45.6 ¹	3.0 ± 0.2 ¹	22.6 ± 3.5 ¹	79.0 ± 12.5 ¹	9.5 ± 1.3 ¹

^a Values are expressed as means ± S.E. of four to five mice.

^b Harmonic mean half-lives, SE estimated by a jackknife technique(Lam *et al.*, 1985).

¹⁻³ Means which are not significantly different at P<0.05 are followed by the same number.

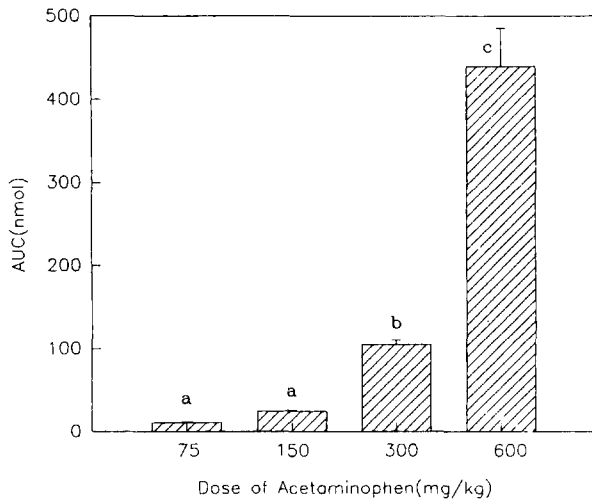


Fig. 4. Area under curves(AUC) of AA in mice treated ip with various dosages of AA. Bars represent means ± S.E. of five mice. Bars representing values that are not significantly different(p>0.05) are marked with the same letter.

3. 간독성과 독물동태학 지표의 상관성 평가

아세트아미노펜에 의한 간독성과 독물동태학 지표 사이의 상관관계를 평가한 결과가 Table 3에 나타나 있다(Table 3). 간독성의 지표로 선정한 혈청 SDH의 활성과 독물동태학 지표사이의 linear regression에 의한 coefficient of correlation을 구한 결과, AUC가 r=

Table 3. Linear regression analysis of relationship between enzyme activities and pharmacokinetic parameters^a

Pharmacokinetic Parameters	Coefficient of Correlation(r) ^b with Enzyme Activities	
	SDH	ALT
AUC	0.99	0.95
Cmax	0.89	0.95
Tmax	0.97	0.93
t _{1/2}	0.91	0.84
CL	0.82	0.89

^a Regression analysis hypothesized a straight-line probabilistic model.

^b The Pearson product moment coefficient of correlation.

0.99로서 가장 좋은 상관성을 나타낸 지표였다. 그 다음으로는 Tmax가 좋은 상관성을 보였으며(r=0.97), total body clearance와 SDH 활성간의 상관관계수가 가장 낮았다. ALT의 활성과 toxicokinetic 지표사이의 상관성 평가에서도 AUC가 가장 좋은 상관관계를 보였으며, Cmax도 r=0.95로 좋은 상관도를 보였다.

4. 급성독성시험

아세트아미노펜을 75, 150, 300, 600 및 1200 mg/kg의 용량으로 1회 복강투여하여 급성독성시험을 실시한 결과, 150 mg/kg까지는 사망동물이 없었으며, 300 mg/kg에서 1례, 600 mg/kg에서 3례와 최고용량군인 1200 mg/kg 투여군에서는 전례가 사망하였다(Fig. 5). 사망은 아세트아미노펜 투여후 24시간내에 관찰되었으며 이로부터 Litchfield-Wilcoxon 법에 따라 산출한 LD₅₀치(95% 신뢰한계)는 465.8 mg/kg(280.1 mg/kg~774.8 mg/kg)으로 산출되었다. 임상증상 관찰결과, 모든 투여동물에서 투여 후 1일째에 입모가 관찰되었으며, 300 mg/kg 이상의 투여군에서는 투여 후 6시간부터 활동성

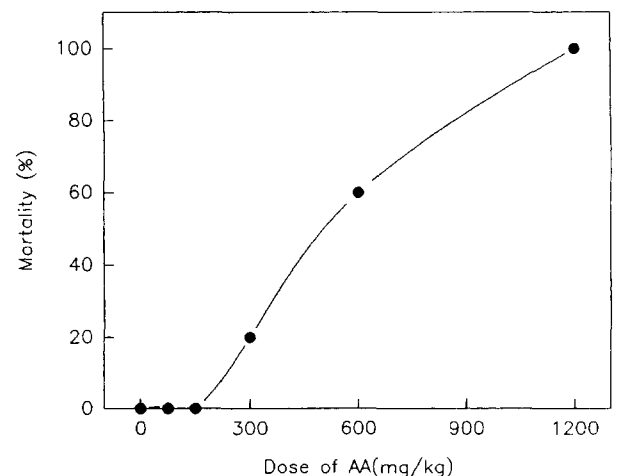


Fig. 5. Mortality of mice treated intraperitoneally with AA. Each point represents death percentage in groups of five mice.

Table 4. Clinical signs in mice treated intraperitoneally with acetaminophen^a

Dose (g/kg)	Clinical Signs	Hours					Days After Treatment					
		1	2	...	5	6	1	2	3	4	5	6
1200	A	-	-	...	-	5	-	-	-	-	-	-
600	A	-	-	...	-	5	2	2	2	2	2	2
	E	-	-	...	-	-	2	2	2	2	2	2
	P	-	-	...	-	-	2	2	2	2	2	2
300	A	-	-	...	-	5	4	-	-	-	-	-
	P	-	-	...	-	-	4	4	4	-	-	-
150	P	-	-	...	-	-	5	4	4	-	-	-
75	P	-	-	...	-	-	4	3	3	-	-	-
0	-	-	-	...	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Values are expressed as animal numbers. A : Decreased motor Activity, E : Edema of face, P : Piloerection, ... : No abnormality detected

Table 5. Body weights in mice treated intraperitoneally with acetaminophen^a

Dose(mg/kg)	Days after treatment			
	0	1	3	6
1,200 (n) ^b	36.7±3.8 (5)	-	-	-
600 (n)	36.0±2.4 (5)	29.1±1.3 (2)	25.9±0.6 (2)*	26.6±0.6 (2)*
300 (n)	35.1±1.8 (5)	34.9±1.5 (4)	36.6±1.7 (4)	36.7±1.6 (4)
150 (n)	34.8±2.1 (5)	34.7±1.8 (5)	35.8±1.8 (5)	36.1±1.5 (5)
75 (n)	35.5±1.2 (5)	35.2±1.8 (5)	36.7±1.0 (5)	37.1±1.1 (5)
0 (n)	34.6±1.8 (5)	35.4±0.7 (5)	36.3±1.1 (5)	36.7±1.0 (5)

^a Values are expressed as means±S.E..

^b The number of tested animals are expressed in parentheses.

*Significantly different from control group at p<0.05.

Table 6. Gross findings of mice treated intraperitoneally with acetaminophen^a

Dose(mg/kg)	1200		600		300		150		75		0	
	TK	FD	TK	FD	TK	FD	TK	FD	TK	FD	TK	FD
No. of Animals	0	5	2	3	4	1	5	0	5	0	5	0
NAD	0		0		3		5		5		5	
Necrosis of Liver	5		5		2		0		0		0	

^a Values represent animal numbers, TK : Terminal killed, FD : Found dead, NAD : No abnormality detected

감소가 나타났고, 이러한 증상은 용량의존적으로 그 정도가 증가하였다(Table 4). 600 mg/kg 투여군의 생존 개체에서는 투여후 1일째부터 안면부종이 관찰되었으며, 300 mg/kg 이하 용량의 투여군에서 관찰된 활동성 감소는 투여 2일째부터 회복된 반면, 600 mg/kg 투여군에서는 활동성 감소가 시험 전기간동안 지속되었다.

체중측정 결과, 300 mg/kg 용량까지는 대조군과 유의성있는 체중변화가 관찰되지 않았으나, 600 mg/kg 투여군에서는 투여 1일째부터 대조군에 비하여 뚜렷한 체중 증가 억제가 시험 전기간에 걸쳐 관찰되었다(Table 5). 부검결과 AA 1200과 600 mg/kg 투여군의 전례와 300 mg/kg 투여군의 사망개체 1례, 생존개체 1례에서 간의 괴사가 육안적으로 관찰되었으며, 그외의 개체에서는 별다른 육안적 이상소견이 보이지 않았다(Table 6).

아세트아미노펜 투여후 10분, 90분과 24시간에 꼬리

동맥으로부터 채혈하여 혈액중 AA를 분석한 결과가 Table 7에 나타나 있다(Table 7). 투여후 10분에 채취한 혈중 AA의 농도는 투여용량과 정비례로 뚜렷한 증가

Table 7. Blood concentrations of acetaminophen versus sampling times in mice after ip administration^a

Dose (mg/kg)	Blood Concentration of Acetaminophen(μmol/ml)		
	Time after administration of acetaminophen		
	10 min	90 min	24 hrs
75	0.2±0.02 ⁴	0.032±0.006 ³	0
150	0.6±0.02 ⁴	0.062±0.005 ³	0
300	1.2±0.2 ³	0.2±0.05 ³	0
600	2.5±0.2 ²	1.7±0.4 ²	0
1200	4.7±0.3 ¹	4.7±0.2 ¹	-

^a Values are expressed as means±S.E. of tested mice.

¹⁻³ Means which are not significantly different at p<0.05 are followed by the same number.

를 보였다. 투여후 90분에 채취한 혈액에서는 300 mg/kg 용량까지는 AA가 혈액중에서 대부분 소실되어 소량만이 검출되었으며, 600 mg/kg 투여군에서는 10분대 농도의 68%로 감소하였다. 1200 mg/kg 투여군에서는 10분대의 농도와 90분대의 농도에 차이가 없었으며, 투여후 24시간에 채취한 혈액에서는 전 투여군에서 AA가 검출되지 않았다.

IV. 고 찰

본 시험의 첫 번째 목적은 독성과 독물동태학 지표의 상관관계를 보고자 하는 것이었다. 본 실험에서 선택한 아세트아미노펜은 광범위하게 사용되는 해열진통제로서 사람을 포함한 일부 종에서 주로 간독성을 유발한다고 알려져 있다. Pharmacokinetic 실험은 주로 랫드와 토끼에 동맥을 cannulation하여 수행하고 있으나, 아세트아미노펜이 랫드에서는 독성을 쉽게 유발하지 않는 것으로 알려져 있어 실험동물로 마우스를 선택하였다(Davies 등, 1974; Siegers 등, 1978).

아세트아미노펜의 투여용량은 LD₅₀치가 425~575 mg/kg 라는 보고(Slattery와 Levy, 1977)를 참조하여 75, 150, 300, 600 및 1200 mg/kg으로 설정하였다. 아세트아미노펜의 간독성시험결과, 300 mg/kg 투여군에서부터 혈청중 SDH와 ALT의 활성이 크게 증가하여 간독성이 유발되었음을 확인하였다. 조직병리검사 결과에서도 75와 150 mg/kg 투여군에서는 별다른 이상이 관찰되지 않았으며, 300 mg/kg 투여군에서부터 centrolobular vein 주변으로 간의 괴사와 출혈이 용량의존적으로 관찰되어 간독성이 유발되었음을 확인하였으며, 이는 효소 활성 측정 결과와 일치하는 것이었다.

Pharmacokinetic 실험결과, AUC, 최고혈중농도와 전신 clearance는 75와 150 mg/kg에서는 유의성있는 차이를 보이지 않았으며, 300 mg/kg부터 유의성있는 차이를 보여 상기 parameter들이 유사한 경향을 나타내었다. AUC와 C_{max}의 투여용량과의 상관성을 보았을 때 non-linear kinetics를 나타냈으며, 전신 clearance는 용량과 뚜렷한 상관관계를 보여주었다. 최고 혈중농도 도달시간(T_{max})과 생체내 반감기(t_{1/2})는 300 mg/kg 투여군까지는 유의성있는 변화를 보이지 않았으며, 600 mg/kg 투여군에서만 뚜렷한 증가를 나타내었다.

간독성 지표로 측정된 혈청중 SDH와 ALT 활성과 toxicokinetic parameter 사이의 linear regression에 의한 상관계수를 산출한 결과, 모든 parameter가 좋은 상관성을 보였으며, 특히 AUC 지표가 가장 높은 상관도를 나타내었다.

Table 1에서 나타난 바와 같이 아세트아미노펜에 의한 간독성은 300 mg/kg 투여군에서부터 나타났다. Pharmacokinetic parameter 중 AUC 값이 용량 증가에 따라 가장 민감하게 변화하였으며 독성 지표와 가장 높은 상관성을 보였는데, AUC의 값이 300 mg/kg 투여군부터 현저하게 그 값이 증가하였기 때문에 독성의 발현과 가장 상관성이 높게 나타난 것으로 생각되었다. AUC 값의 증가는 투여된 약물이 혈중에 잔류한다는 것을 의미한다. 따라서 본 시험에서 150 mg/kg 투여군까지는 아세트아미노펜의 독성유발물질로 알려진 활성대사체 *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine가 생성되어도 glutathione 포함에 의하여 충분히 무독화될 수 있으나, 300 mg/kg 투여군부터는 AA가 혈액에 많은 양이 잔류하면서 다량의 활성대사체를 생성하고, 이를 무독화시킬 수 있는 glutathione이 고갈되어 독성이 일어나고 있음을 추정할 수 있으며, 이러한 사실을 AUC 값의 증가가 반영하고 있음을 알 수 있다. T_{max}와 t_{1/2}은 600 mg/kg 투여군에서만 그 값이 2배로 증가하여, 이 값들은 투여용량에 크게 영향받지 않는 것으로 생각되었다.

아세트아미노펜의 복강투여에 의한 급성독성시험결과, LD₅₀ 치가 465.8 mg/kg로 산출되었으며, 이 값은 보고된 LD₅₀ 치인 425~575 mg/kg와 일치하였다. 아세트아미노펜의 투여에 의한 주된 임상증상은 입모와 활동성 감소였으며, 600 mg/kg 투여군에서 안면부종이 관찰되었다. 체중 측정결과에서는 600 mg/kg 투여군에서만 대조군과 유의성있는 체중증가 역제가 시험 전 기간에 걸쳐 관찰되었다. 부검결과, 300 mg/kg 투여군에서부터 간괴사가 육안적으로 관찰되었고 빈도는 용량의존적으로 증가하여 조직병리 검사 결과와 일치하였으며, 이로부터 아세트아미노펜의 독성 표적장기는 간이며 주로 괴사가 유발됨을 확인하였다.

본 시험의 두 번째 목적인 급성독성시험에서의 독물동태학 이용을 위하여 급성독성시험을 실시중인 마우스에서 아세트아미노펜의 혈중농도를 측정하였다. 독성시험기간중 채혈 시간은 아세트아미노펜의 독물동태학 실험결과에 기초하여 설정하였다. 첫번째 sampling 시간은 독물동태학 실험결과에서 산출된 각 용량군 T_{max}의 개략적인 평균인 10분으로 선택하였다. 두 번째 sampling 시간은 300 mg/kg 투여군까지는 혈중에서 약물이 거의 소실되고, 600 mg/kg 투여군에서는 개략적인 생체내 반감기가 되는 90분으로 선정하였다. 마지막 sampling 시간은 모든 투여군에서 약물이 혈액중으로부터 모두 소실되는 것으로 생각되는 24시간으로 하였다. 아세트아미노펜 투여 10분 후 혈액중 AA 분석 결과, 투여용량과 정비례로 혈중 농도가 증가하

였으며, toxicokinetic 실험에서 산출한 Cmax 값과 거의 일치하였다. 아세트아미노펜 투여후 90분에 채혈한 혈액분석 결과, 혈액중 AA의 농도는 150 mg/kg 투여군까지는 10분대의 10%, 300 mg/kg 투여군과 600 mg/kg 투여군에서는 각각 10분대의 20%와 70%로 감소하였으며, 1200 mg/kg 투여군에서는 10분대와 차이가 보이지 않았다. 이러한 결과는 투여용량이 증가함에 따라 약물의 혈중 소실능이 감소있음을 의미하며, toxicokinetic parameter 중 투여용량이 증가함에 따라 감소하였던 total body clearance의 결과와 일치하는 것이다. 아세트아미노펜을 투여한 후 24시간후에 채취한 혈액에서는 600 mg/kg 투여군까지 혈액중 아세트아미노펜이 검출되지 않아 약물이 전부 소실되었음을 추측할 수 있었다. 이러한 결과로부터 아세트아미노펜 75~1200 mg/kg까지는 투여용량의 증가에 따라 최고 혈중 농도가 증가하며, 혈액중 약물 소실능은 감소하고 있음을 알 수 있다. 또한 투여 24시간 후에는 약물이 혈액으로부터 모두 소실되므로, 반복투여 시험의 실시에 있어 투여 간격을 24시간으로 하면 체내 축적이 일어나지 않으리라 추정할 수 있다.

본 실험결과를 종합하여 보면, 아세트아미노펜의 간독성 지표인 혈청중 효소 활성과 toxicokinetic parameter인 AUC 및 Cmax가 좋은 상관관계를 나타냈으며, 급성독성시험 기간중 혈중농도를 모니터함으로써, 약물의 투여용량에 따른 혈중농도 변화를 통하여 약물의 체내동태를 파악하고, 반복투여시험에서의 용량설정등에 유용한 정보를 얻을 수 있으리라 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 연구비로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드리는 바입니다.

참고문헌

- Boyd, E. M. and Berezky, G. M. (1966) : Liver necrosis form paracetamol. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **26**, 606-614.
- Dahlin, D. C., Miwa, G. T., Lu, A. Y. H. and Nelson, S. D. (1984) : N-acetyl-p-benzoquinoneimine: A cytochrome P-450 mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1327-1331.
- Davies, D. D., Potter, W. Z., Jollow, D. J. and Mitchell, J. R. (1974) : Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sci.* **14**, 2099-2199.
- Howie, D., Adriaenssens, P. and Prescott, L. F. (1977) : Paracetamol metabolism following overdose: Application of high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Pharmacol.* **29**, 235-237.
- Lam, F. C., Hung, C. T. and Perrier, D. G. (1985) : Estimation of variance for harmonic mean half-lives. *J. Pharm. Sci.* **74**, 229-231.
- Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Davis, D. C., Gillette, J. R. and Brodie, B. B. (1973) : Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**, 211-217.
- Prescott, L. F., Wright, N., Roscoe, P. and Brown, S. S. (1971) : Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. *Lancet.* **1**, 519-522.
- Rosen, G. M., Rauckman, E. J., Ellington, S. P., Dahlin, D. C., Christie, J. L. and Nelson, S. D. (1984) : Reduction and glutathione conjugation reactions of N-acetyl-p-benzoquinoneimine and two dimethylated analogues. *Mol. Pharmacol.* **25**, 151-157.
- Siegers, C. P., Strubelt, O. and Schult, A. (1978) : Relations between hepatotoxicity and pharmacokinetics of paracetamol in rats and mice. *Pharmacology(Basel)* **16**, 273-278.
- Slattery, J. T. and Levy, G. (1977) : Reduction of acetaminophen toxicity by sodium sulfate in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **18**, 167-170.