大韓獸醫學會誌(1997) 第37卷 第2號
Korean J Vet Res(1997) 37(2) : 425~438

# 비글견에 있어서 새로운 안트라싸이클린계 항암제 DA-125의 정소독성연구

김종춘 · 차신우 · 송시환 · 정문구

한국화학연구소 안전성연구센터
(1996년 8월 19일 접수)

# Testicular toxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in beagle dogs

Jong-choon Kim, Shin-woo Cha, Si-whan Song, Moon-koo Chung

*Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,*
P.O. Box 107, Yu-Sung, Taejeon 305-606, Korea
(Received Aug 19, 1996)

**Abstract** : To assess the testicular toxicity induced by DA-125, a new anthracycline anticancer agent, the test substance was intraveneously administered to male beagle dogs at dose levels of 0, 0.0023, 0.0375, 0.15, and 0.6 mg/kg/day, 6 days a week for 26 weeks.

At 0.6 mg/kg/day, 1 out of 3 dogs had died on day 42 of treatment and the other dogs were sacrificed on days 46 and 122 of treatment due to the increasingly severe clinical condition. Clinical signs considered to be related to treatment were included anorexia, vomiting, salivation, decreased activity, mucous and/or dark faeces, diarrhea, and swelling, abscess and/or ulceration of injection sites. Suppression in body weight gain, reduction in food intake, decreases in testicular weight and size, and hemorrhage of epididymis were also observed in male dogs. Microscopically, severe degenerative changes such as atrophy of seminiferous tubules, loss of germ cells, degeneration of germ cells, vacuolization of Sertoli cells, and hyperplasia of Leydig cells were observed in all dogs. Azoospermia in epididymal tubules, atrophy of epithelia in the cauda epididymis, and prostate atrophy were also found.

At 0.15 mg/kg/day, anorexia, vomiting, salivation, diarrhea, and swelling of injection sites were observed. In addition, suppression in body weight gain and decreases in testicular weight and size were found in male dogs. Atrophy of seminiferous tubules, decrease of germ cells, degeneration, exfoliation and retention of germ cells, vacuolization of Sertoli cells, and hyperplasia of Leydig cells were observed by histopathological examination. Azoospermia in epididymal tubules and prostate atrophy were also found.

Address reprint requests to Dr. Jong-choon Kim, Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107. Yusung, Taejeon 305-606, Republic of Korea.

At 0.0375 mg/kg/day, there were no clinical signs considered to be indicative of a reaction to treatment, but testicular size was significantly reduced. Microscopically, decreases in the number of spermatogonia and epidydimal speramtozoa were found.

There were no evidences of general or testicular toxicity at 0.0023 mg/kg/day.

These results indicate that DA-125 produces significant and persistent damage to the spermatogenic compartments of the testes in male beagle dogs.

Key words : DA-125, anticancer agent, testicular toxicity, beable dogs.

## 서 론

안트라사이클린계 항생제인 doxorubicin은 고형종양 및 혈액종양에 대해 우수한 항암효과를 나타내기 때문에 가장 널리 사용되고 있는 암화학요법제중의 하나로서 상품명인 adriamycin으로 잘 알려져 있다[1]. Adriamycin은 *Streptomyces peucetius var. caesius*로부터 추출된 것으로서[2], DNA에 결합하거나 주형(template)기능을 방해함으로서 DNA 복제(replication), 전사(transcription) 및 전위(translocation) 과정을 저지한다고 하는데[3], 이로 인하여 DNA, RNA 및 단백질의 합성을 억제하여 세포치사활성(cytocidal activity)을 나타내며, 변이원성(mutagenicity)과 발암성(carcinogenicity) 및 최기형성(teratogenicity)을 나타내고[4-6], 생식세포에서는 염색체이상(chromosome aberration)을 유발한다고 한다[7]. 또한 대부분의 안트라사이클린계 항암제와 마찬가지로 반복투여시 약제내성과 심근증(cardiomyopathy) 유발 등의 만성 심장독성이 임상적으로 큰 문제점이 되고 있다.

약제내성과 만성 심장독성을 개선하고 항암효과를 향상시키기 위해 epirubicin, esorubicin 및 idarubicin 등의 새로운 안트라사이클린계 유도체들이 많이 개발되었으나 아직도 만족할 만한 수준에는 이르지 못하고 있는 실정이다[8].

DA-125는 현재 동아제약(주) 연구소에서 개발중에 있는 불소를 함유한 새로운 adriamycin 유도체이며 M1의 C14 위치에 β-alanine이 결합된 수용성 전구물질(prodrug)인데 기존의 adriamycin에 비하여 항암효과가 뛰어나고 수용성 및 안정성이 우수하며 만성 심장독성과 조혈기독성 및 국소자극성 등의 부작용을 개선한 안트라사이클린계 항암제이다[9-11].

악성종양의 치료에 효과가 뛰어난 많은 암 화학요법제들은 투약시 강한 세포독성으로 인하여 세포분열이 왕성하게 일어나는 모낭(hair follicles), 위장관(gastrointestinal tract) 및 골수(bone marrow) 등의 여러 조직에 심각한 부작용을 초래하기도 한다. 생식기관의 손상 또한 흔히 관찰되는 것으로서 일시적 또는 영구적인 무정자증(azoospermia)을 유발하기도 하는데[12], 이는 생명에 직결되는 절박한 문제가 아니어서 항암제가 유발하는 다른 부작용들에 비해 상대적으로 덜 중요시되어온 것이 사실이다. 그러나 어떠한 물질도 생식기관을 표적으로 하는 화학물질만큼 종의 번식에 영향을 미치는 것은 없으며 특히 생식연령에 해당되는 사람들에서의 생식선과 그 기능의 손상은 매우 심각한 문제임에 틀림없다.

남성 생식기에 독성을 나타내는 항암제로서는 actinomycin D, adriamycin, bleomycin, daunomycin, mitomycin C 등이 있다. 그중 안트라사이클린계 항암제인 adriamycin은 DNA 작용물질(DNA-intercalating agent)로서 여러 종의 실험동물에서 정소독성에 관한 연구결과가 보고된 바 있는데 마우스에서는 정조세포(spermatogonia)에 세포독성을 나타내고 줄기세포(stem cell)를 사멸시키며[13] 또한 세정관의 위축(tubular atrophy)과 체세포(somatic cell) 및 생식세포(germinal cell)에 유전독성을 일으키고[14,15], 우성치사돌연변이 (dominant lethal mutation)를 야기한다고 한다[16]. 랫트에서는 정소와 정낭선의 중량감소와 정조세포의 소실에 따른 정자발생피세포(germinal epithelium)의 소실을 유발하며[17,18], 정소내에 투여할 경우 세포분열 중기(metaphase) Ⅰ과 Ⅱ에서 1차 및 2차 정모세포(spermatocyte)들이 급속히 사멸한다고 한다[19]. 토끼에서는 정모세포에서 비주기성 DNA합성(unscheduled DNA synthesis)을 야기하고 정조세포의 DNA 합성을 억제하여 정자수의 감소를 유발하며[3], 비글견에서도 세정관의 변성과

전립선의 위축을 일으킨다고 한다.[20]

Adriamycin과 동일계 유도체인 DA-125는 adriamycin과 마찬가지로 DNA에 작용하여 개열을 유발하고 이로 인하여 세포치사활성을 나타내는데 이러한 특징적인 작용기전으로 미루어 볼 때 DA-125도 adriamycin과 유사한 정소독성을 나타낼 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 새로운 안트라사이클린계 항암제인 DA-125를 비글견에게 26주간 반복투여하였을 때 수컷의 생식기에 미치는 영향을 규명해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

**시험물질** : 본 시험에는 동아제약에서 합성한 DA-125(Lot No. DA-125-039, 순도 961 μg/mg)를 사용하였다. DA-125의 구조식은 7-O-(2,6-dideoxy-2-fluoro-α-talopyranosyl)-adriamycinone-14-β-alaniate HCl이고, 분자량은 670이며 적색분말로서 주사시 1mM lactic acid(in saline, pH 4.0)용액에 용해시켜 사용하였다.

**시험동물 및 사육환경** : 본 시험에는 4개월령의 수컷 비글견을 CSK Research Park Inc.(Nagano, Japan)로부터 구입하여 2개월간 순화 사육하면서 임상증상, 혈액검사, 뇨검사, 안검사 및 심전도 검사를 실시하여 건강하다고 판단된 동물 15마리를 선택하여 사용하였다. 이때 체중은 9.4~10.3kg이었으며, 동물의 식별은 이개부 내측의 tattoo 번호와 사육상자 전면에 부착한 개체식별카드로 하였다.

동물은 스테인레스 철망사육상자(700W×700L×800H mm)에 개체별로 수용하여 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 인공조명 12시간(오전 7시~오후 7시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 시험기간중 사료는 견용 고형사료(Certified Dog Chow TM#5002, Purina Mills, Inc., St. Louis, Mo, USA)를 일일 300g씩 그리고 멸균수도수는 일일 1300g씩을 제한급여하였다.

**투여용량의 설정과 시험군의 구성** : 투여용량의 설정은 영국 Huntingdon Research Center에서 실시한 비글견의 4주 및 13주간 반복투여 아급성독성시험(미발표자료)의 결과를 토대로 하여 26주간 반복투여시 명백한 독성을 나타낼 것으로 추정되는 0.6 mg/kg/day를 최고용량으로 하여 공비 4로서 0.15 및 0.0375 mg/kg/day의 고용량 및 중용량군을 두었고, 저용량군은 공비 16으로서 0.0023 mg/kg/day로 설정하였으며, 그 외에 매체대조군을 두어 5개의 시험군으로 구성하였다.

**시험물질의 조제 및 투여** : 시험물질은 각각의 용량으로 pH 4.0의 1 mM lactic acid 용액에 용해시킨 다음 0.2 μm filter로 여과하여 조제하였다. 약물의 투여는 27 게이지의 주사기를 이용하여 체중 kg당 0.1 ml의 액량으로 요측 피정맥에 1일 1회씩 주 6회로 26주간 오전중에 반복투여하였으며, 대조군에는 용매를 같은 방법으로 투여하였다.

**일반증상관찰** : 시험기간중 매일 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 대하여 관찰하였다.

**체중측정** : 각 군의 전 동물에 대하여 투여 개시전부터 13주째까지는 매주 1회씩 이후 시험종료시까지는 4주에 1회씩 체중을 측정하였다.

**사료 및 물 섭취량측정** : 각 군의 전 동물에 대하여 체중측정일에 300g의 사료와 1300g의 물을 정량급여한 후 익일에 잔량을 측정하여 섭취량을 계산하였다.

**정소의 크기 측정** : 각 군의 전 동물에 대하여 투여개시전과 투여후 13주째 및 26주째에 1회씩 정소의 크기를 측정하였다. 정소의 길이(length, L)와 폭(breadth, B)을 vernier callipers로 측정한 후 다음과 같은 식으로 종단면적(cross sectional area, A)를 구하였다.

$$A = \frac{\pi LB}{4}$$

**부 검** : 각 군의 생존동물에 대하여 투여 26주째에 pentotal sodium을 정맥투여하여 마취를 실시한 다음 액와동맥 절단으로 방혈치사시켜 부검하였고 정소, 정소상체, 정낭선, 전립선 등의 생식기관에 대하여 육안적인 관찰을 하였으며 정소와 정소상체 및 전립선을 떼어내어 병리조직학적인 검사를 위해 고정액에 고정하였다. 좌우의 정소는 고정을 하기전에 습장기의 중량을 측정하였으며, 부검시의 체중을 이용하여 체중에 대한 상대장기중량을 계산하였다. 한편 시험도중에 관찰된 폐사동물과 빈사동물도 상기와 같은 방법으로 부검을 실시하였다.

**병리조직학적 검사** : Bouin's 용액에 고정한 정소와 10% 중성 포르말린에 고정한 정소상체 및 전립선 조직을 paraffin 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin 염색을 한 후 광학현미경으로 검경하였다.

**통계학적 분석** : 통계분석은 조사시점별 각 검사항목에 대하여 다중비교법을 실시하였다. 각 군당 동물수가 3마리로 표본수가 작기 때문에 정규분포를 가정하고 검

정하는 모수적 방법보다는 분포에 무관한 비모수적 방법을 선택하여 전검사항목에 대해 실시하였다. 전항목에 대하여 Kruskal-Wallis test를 행하고 유의성이 인정될 경우 대조군과 처치군의 비교를 위하여 Dunnett's test 및 Scheffe's test를 실시하였다. 모든 통계해석에서 유의수준으로 $p < 0.05$와 $p < 0.01$을 이용하였다.

## 결 과

**일반증상** : 시험기간중 일반증상을 관찰한 결과는 Table 1과 같다. 대조군에서는 구토와 설사가 1례씩 관찰되었고, 0.0023 mg/kg군에서는 구토가 2례 나타났으며, 0.0375 mg/kg군에서는 식욕부진과 구토가 각각 1례 관찰되었다. 0.15 mg/kg군에서는 구토가 3례, 식욕부진과 설사 및 투여부위의 종창이 2례씩 그리고 타액분비과다가 1례 관찰되었으며, 0.6 mg/kg군에서는 식욕부진과 활동성 감소가 3례씩, 구토와 타액분비과다, 혈변 및 투여부위의 종창이 2례씩, 보행실조와 점액성 변, 점액성 혈변, 복부의 농양, 우측 전지의 농양, 좌측 전지 무릎의 궤양 및 좌측전지의 궤양이 각각 1례 관찰되었다. 또한 투여 42일째에는 1마리가 폐사하였고, 투여 46일째와 122일째에는 1마리씩이 빈사처리되어 절박도살한 후 부검하였다.

Table 1. Clinical signs in male dogs treated with DA-125 for 26 weeks

| Parameter | Treatment(mg/kg) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.0023 | 0.0375 | 0.15 | 0.6 |
| No. of animals | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Apperance and condition | | | | | |
| Anorexia | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Vomiting | 1 | 2 | 1 | 3 | 2 |
| Salivation | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Moribundity | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Death | | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Behavior/activity | | | | | |
| Decreased locomoter activity | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Ataxic gait | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Excretion | | | | | |
| Bloody stool | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Musocus stool | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Mucous and bloody stool | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Diarrhea | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Body surface | | | | | |
| Abscess on the abdomen | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Abscess on the right fore-leg | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Ulceration on the left hind knee | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Ulceration on the left hind-leg | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Swelling on the injection site | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |

**체 중** : Table 2에 나타낸 바와 같이 0.0023 mg/kg군에서는 전시험기간동안 대조군과 유사한 체중변화를 나타냈으나 0.0375, 0.15 및 0.6 mg/kg군에서는 17주째의 체중이 대조군에 비하여 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다.

**사료 및 물 섭취량** : 사료 섭취량은 0.6 mg/kg군에서 투여 6주 및 12주째에 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈으나 그 외의 시험군에서는 어떠한 유의차도 없었으며, 물 섭취량은 모든 군에서 정상적인 섭취량을 나타내었다.

**정소의 크기** : 투여전과 투여후 13주째 및 26주째에 정소의 길이와 폭을 측정한 결과와 정소의 종단면적을 계산한 결과는 Table 3에 나타나 있다. 0.0023 mg/kg군에서는 모든 결과들이 대조군과 유사하게 나타났으나, 0.0375 mg/kg군에서는 26주째에 좌우측 정소의 길이가 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였고, 이로 인하여 좌측 정소의 종단면적이 유의성 있게 감소하였다. 0.15 mg/kg군에서는 13주 및 26주째에 그리고 0.6 mg/kg군에서는 13주째에 좌우측 정소의 길이와 폭의 감소로 인하여 좌우측 정소의 종단면적이 대조군에 비해 각각 유의성 있게 감소하였다.

**부검소견** : Table 4에서 보는 바와 같이 투여 26주째에 생존동물을 부검한 결과 0.15 mg/kg군의 모든 수컷동물에서 정소의 위축이 관찰되었으나 다른 시험군의 동물에서는 약물투여에 의한 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. 0.6 mg/kg군에서 시험도중 폐사 또는 빈사처리된 동물의 부검결과 흉선의 위축, 위, 십이지장, 맹장, 직장, 방광, 폐장, 심장, 흉선 및 장간막 임파절의 충혈과 출혈이 관찰되었고, 위장관에서 점막의 위축과 점액의 과잉생산이 인정되었으며, 생식기에서는 정소의 위축과 전립선의 출혈이 관찰되었다.

**절대 및 상대 장기중량** : 부검시 적출한 정소의 중량을 측정한 결과 0.15 및 0.6 mg/kg군에서의 절대 및 상대 장기중량이 대조군에 비해 각각 유의성 있게 감소하였으나 그 외의 투여군에서는 대조군과 유사한 결과를 나타내었다(Table 4).

Table 2. Changes in body weights of male dogs treated with DA-125 for 26 weeks

| Period | Treatment(mg/kg) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.0023 | 0.0375 | 0.15 | 0.6 |
| week 1 | 9767±458.5 | 9716±226.8 | 9790±125.7 | 9548±223.9 | 9627±148.4 |
| week 2 | 9786±426.5 | 9730±397.8 | 9673±425.2 | 9752±198.7 | 9756±71.1 |
| week 3 | 10315±466.0 | 10247±400.8 | 10095±464.1 | 10245±194.7 | 10107±148.5 |
| week 4 | 10388±459.9 | 10170±565.8 | 10296±267.3 | 10313±112.5 | 10121±148.2 |
| week 5 | 10576±358.2 | 10484±435.7 | 10407±304.4 | 10467±114.0 | 10246±325.9 |
| week 6 | 10847±508.7 | 10655±397.2 | 10646± 251.3 | 10639±218.1 | 9656±1034.3 |
| week 7 | 11013±416.4 | 10782±4887.7 | 10734±417.5 | 10791± 92.7 | 10299±1122.2 |
| week 8 | 11942±631.1 | 11614±737.1 | 11511±442.5 | 11509± 70.9 | 11873 |
| week 9 | 11665±581.4 | 11314±631.4 | 11106±1127.9 | 11077±443.0 | 11598 |
| week 10 | 11771±657.2 | 11243±673.9 | 11463±713.9 | 11426±123.0 | 11751 |
| week 11 | 12256±610.5 | 11723±749.0 | 11914±710.9 | 11755±56.2 | 12355 |
| week 12 | 12240±614.5 | 11807±564.3 | 11786±785.6 | 11742±167.1 | 12116 |
| week 13 | 12685±663.2 | 12074±743.2 | 12142±903.6 | 11970±123.5 | 12156 |
| week 17 | 14041±626.8 | 13559±588.6 | 12368±803.1 * | 12269±301.6 * | 11898 * |
| week 21 | 13797±598.8 | 13067±743.5 | 12993±1318.4 | 12680±398.4 | — |
| week 26 | 13966±802.3 | 13345±639.2 | 13108±1405.3 | 12552±456.5 | — |

Values are mean±S.D.(g)

* indicates significant difference at $p < 0.05$ level when compared with the control group

Table 3. Testicular measurements in male dogs treated with DA-125

| Parameter | | Treatment(mg/kg) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 0.0023 | 0.0375 | 0.15 | 0.6 |
| Pre-treatment | | | | | | |
| No. of animals | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Length (mm): | Left | 21.3±2.52 | 20.7±1.53 | 19.3±4.16 | 21.0±1.00 | 21.0±3.61 |
| | Right | 20.0±3.46 | 20.0±1.00 | 19.7±4.04 | 21.0±2.65 | 22.0±3.00 |
| Breadth (mm): | Left | 12.3±1.53 | 12.0±0.00 | 13.0±1.53 | 12.7±0.58 | 12.7±1.53 |
| | Right | 12.0±1.00 | 12.7±1.53 | 13.3±2.31 | 12.7±0.58 | 13.3±0.58 |
| Area ($mm^2$): | Left | 208.7±50.9 | 197.3±14.2 | 206.0±68.7 | 209.0±19.0 | 210.7±56.0 |
| | Right | 190.3±47.9 | 199.7±33.7 | 210.7±80.3 | 210.0±35.0 | 231.3±40.9 |
| | Sum | 399.0±95.8 | 397.0±39.7 | 416.7±148.9 | 419.0±53.9 | 442.0±94.1 |
| 13-week treatment | | | | | | |
| No. of animals | | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 |
| Length (mm): | Left | 32.3±0.58 | 32.0±2.65 | 30.3±0.00 | 25.0±2.65 ** | 24.0 * |
| | Right | 30.7±1.53 | 31.7±1.53 | 30.3±1.53 | 24.7±0.58 ** | 23.0 ** |
| Breadth (mm): | Left | 20.0±2.00 | 20.0±2.00 | 19.3±1.53 | 14.7±1.53 * | 13.0 ** |
| | Right | 20.7±0.58 | 19.7±1.53 | 19.3±0.58 | 14.7±0.58 ** | 13.0 ** |
| Area ($mm^2$): | Left | 507.7±51.3 | 505.0±89.2 | 455.3±35.6 | 290.3±56.8 ** | 245.0 * |
| | Right | 498.3±37.6 | 490.3±61.0 | 461.3±38.9 | 284.7±17.9 ** | 235.0 ** |
| | Sum | 1006.0±85.4 | 995.3±86.9 | 916.7±69.7 | 575.0±74.7 ** | 480.0 ** |
| 26-week treatment | | | | | | |
| No. of animals | | 3 | 3 | 3 | 3 | — |
| Length (mm): | Left | 37.0±1.00 | 35.0±1.00 | 32.7±1.53 ** | 26.7±1.15 ** | — |
| | Right | 35.7±0.58 | 34.3±1.15 | 33.0±1.00 * | 26.7±1.53 ** | — |
| Breadth (mm): | Left | 22.3±0.58 | 20.7±0.58 | 20.00±1.73 | 14.3±1.15 ** | — |
| | Right | 22.0±1.00 | 20.3±1.53 | 19.7±1.53 | 14.0±1.00 ** | — |
| Area ($mm^2$): | Left | 649.0±24.0 | 568.3±30.9 | 513.3±53.8 ** | 300.3±32.9 ** | — |
| | Right | 616.3±30.8 | 549.0±56.3 | 510.3±47.4 | 294.0±37.6 ** | — |
| | Sum | 1265.3±60.7 | 1117.3±86.9 | 1023.7±93.04 * | 594.3±70.4 ** | — |

Values are mean±S.D.

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

TAble 4. Macroscopic findings and organ weights in male dogs treated with DA-125

| Parameter | Treatment(mg/kg) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.0023 | 0.0375 | 0.15 | 0.6 |
| Macroscopic findings | | | | | |
| No. of animals | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Testes | | | | | |
| Atrophy | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| Epididymis | | | | | |
| Hemorrhage | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Organ weights | | | | | |
| No. of animals | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Body weights (g) | 13975±804 | 13356±634 | 13117±1414 | 12560±450 | 9547±1627 |
| Testes (g) | 18.8±2.4 | 15.8±3.9 | 14.8±2.7 | 6.7±1.5** | 5.18±0.9** |
| per B.W. (g%) | 1.3±0.1 | 1.2±0.2 | 1.1±0.1 | 0.5±0.1** | 0.5±0.1** |

Values are mean±S.D.

** indicates significant difference at $p < 0.01$ level when compared with the control group.

TAble 5. Histopathological findings in male dogs treated with DA-125 for 26 weeks

| | | Treatment(mg/kg) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | | | | 0.0023 | | | | 0.0375 | | | | 0.15 | | | | 0.6 | | | |
| Parameter | Grade* | − | + | ++ | +++ | − | + | ++ | +++ | − | + | ++ | +++ | − | + | ++ | +++ | − | + | ++ | +++ |
| No. of animals | | 3 | | | | 3 | | | | 3 | | | | 3 | | | | 3 | | | |
| Testis | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Decreased number of spermatogonia | | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Decreased number of spermatocyte | | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Decreased number of spermatids | | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Decreased number of spermatozoa | | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Multinuclear giant cells | | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Degeneration of germ cells | | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Vacuolization of Sertoli cells | | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Atrophy of seminiferous tubule | | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Hyperplasia of Leydig cells | | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| Epididymis | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Decrease of sperm in ducts | | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Atrophy of epithelium | | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| Prostate gland | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Atrophy of glands | | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Atrophy of epithelium | | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |

* : Grades are as folloes: −, no change: +, slight: ++, moderate: +++, severe.

자세포는 핵의 염색질 변연화(chromatin margination)를 나타내거나 세포간교(cytoplasmic bridge)로 연결된 합포체(syncytial group)들의 융합으로 다핵거대세포를 형성하기도 한다[23,25]. 본 시험의 0.15 mg/kg군에서도 변성된 정조세포와 정모세포는 거의 관찰되지 않았으나 정자세포는 변성, 탈락 및 정체 등의 소견을 나타내었으며 정자세포유래의 다핵거대세포들도 소수 출현하였다.

곡세정관에서 정세포들의 소실은 세정관의 직경과 정소의 크기 및 중량의 감소원인이 되는데 본 시험에서도 0.15 mg/kg군과 0.6 mg/kg군에서 정세포들의 감소 및 소실이 관찰되었으며 이로 인하여 정소의 크기와 중량이 감소하였고 세정관의 위축이 나타난 것으로 판단된다.

지지세포에서 관찰되는 가장 일반적인 형태학적인 변화는 세포질내의 공포형성으로서 광학현미경적으로 관찰되는 비교적 큰 형태의 공포는 변성 또는 괴사된 정세포들을 탐식하는 과정중에 발생하는 세포질의 확장이 탐식후에도 남아 있어서 관찰되는 것이라 한다[25]. 본 시험에서도 0.15 mg/kg군과 0.6 mg/kg군에서 지지세포의 공포형성이 관찰되었으며 이는 시험물질의 투여에 따른 정세포들의 괴사가 지지세포들의 공포화를 야기한 것으로 판단된다.

Creasy와 Foster[25]에 따르면 간질조직의 증가는 세정관 손상에 따른 일반적 속발증의 하나로서 간질조직의 비대(hypertrophy), 과형성(hyperplasia) 또는 곡세정관의 위축에 따르는 상대적 증가 등으로 나타난다고 하며, 그 원인에 대해서는 확실히 밝혀진 바가 없다고 한다. 본 시험의 0.15 mg/kg군과 0.6 mg/kg군에서도 간질조직의 과형성과 곡세정관의 위축에 의한 상대적 증가가 인정되었다.

0.15 mg/kg군과 0.6 mg/kg군에서 관찰된 무정자증은 시험물질의 투여에 의해 정소내의 정세포들이 변성, 괴사, 탈락함으로써 유발된 것으로서 정소상체의 관강내에는 정자가 극히 소수이거나 전혀 관찰되지 않은 것으로 수태능력을 완전히 상실한 것으로 판단된다.

정 등[26]이 실시한 DA-125의 랫드 수태능력시험에서는 0.03, 0.1 및 0.3 mg/kg/day의 용량으로 8주간 연속투여한 결과 고용량인 0.3 mg/kg 투여군에서 1g 정자당 정자세포수와 1일 정자생성율의 감소가 관찰되었으나 수태능력의 장해는 유발되지 않았다고 한다. 그런데 비글견을 이용한 본 시험에서는 0.15 mg/kg 용량에서도 무정자증이 관찰되어 수태능력을 완전히 상실한 것으로 인정되는데, 이러한 상이한 결과는 시험법의 차이로 인한 여러 가지의 원인이 있겠지만 동물종의 차이에 따른 감수성의 문제가 가장 큰 원인인 것으로 사료된다. 반면 0.0375 mg/kg투여군에서 나타난 정자감소증은 그 정도가 미약한 것으로 보아 수태능력에는 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

동물의 수컷들은 정상적인 수태와 새끼수를 보장하는 정자수의 10배에서 1000배 정도를 1회에 사정하며[27], 랫트의 경우 정상정자수의 90% 감소에 의해서도 수태율이 저하되지 않는다고 한다[28]. 반면 사람의 경우에는 사출액당 정자수가 정상적인 수정에 필요한 정자수의 2배 이내로서 상당히 적고 또한 전진운동성을 나타내면서 형태학적으로도 정상적인 정자의 비율이 동물들에 비해 낮기 때문에 약 60%의 정자수 감소로도 수태장애가 유발된다고 한다[29,30]. Kreuser *et al* [31]에 따르면 adriamycin은 심장독성 등의 부작용으로 인한 제한되는 용량을 남성에게 투여할 때 남성에 있어서 무정자증이나 정자감소증을 유발하지 않으나 정자무력증(asthenospermia)과 수태율 감소의 원인이 된다고 하며, 다른 세포독성물질과 혼용시에는 불임이나 정세포손상 등의 정소독성이 상승작용(synergism)을 나타낸다고 하는데[32,33] 본 시험에 사용된 DA-125도 사람에게 투약할 경우 adriamycin과 유사한 정소독성을 나타낼 것으로 추정된다.

## 결 론

새로운 anthracycline계 항암성 항생물질인 DA-125를 수컷 비글견에서 0, 0.0023, 0.0375, 0.15 및 0.6 mg/kg/day의 용량으로 26주간 정맥내에 반복투여하여 생식기에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 0.6 mg/kg 투여군에서는 식욕부진과 구토, 타액분비과다, 활동성 감소, 혈변 또는 점액성 혈변, 설사, 투여부위의 종창, 궤양 및 농양 등이 관찰되었으며, 체중증가의 억제와 사료 섭취량의 감소, 정소중량과 크기의 감소 및 정소상체의 출혈 등이 나타났다. 투여 42일째에는 시험물질의 투여에 따른 중독증상으로 인하여 1마리가 사망하였고, 투여 46일과 122일째에는 1마리씩 빈사처리되었다. 병리조직학적으로는 정소에서 곡세정관의 위축과 생식세포들의 결손 및 변성, 지지세포의 공포형성, 간질세포의 과형성이 관찰되었고 정소상체에서의 무정자

증과 전립선의 위축 등이 나타났다.

2. 0.15 mg/kg 투여군에서는 식욕부진과 구토, 타액분비과다, 설사, 투여부위에 종창 등이 관찰되었으며, 체중증가 억제와 정소중량 및 크기의 감소가 나타났다. 광학현미경적으로는 정소에서 곡세정관의 위축과 생식세포들의 감소, 탈락 및 정체, 지지세포의 공포형성, 간질세포의 과형성 등이 관찰되었고 정소상체에서의 정자감소증과 전립선의 위축 등이 나타났다.

3. 00375 mg/kg 투여군에서는 시험물질의 투여에 관련된 일반독성학적인 영향은 관찰되지 않았으나 병리조직학적으로는 정소에서 정조세포의 감소가 관찰되었고, 정소상체서는 정자감소증이 관찰되었다.

4. 0023 mg/kg 투여군에서는 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

이상의 결과와 같이 DA-125를 수컷 비글견에서 반복투여하면 정소의 중량과 크기가 감소하고 곡세정관의 위축이 유발되며 특히 정소의 정자발생구획에 영구적 손상을 유발하여 정자발생장해가 초래되는 것으로 사료된다.

## Legends for figures

Fig 1. Testis from a control rat, showing the normal appearance. H-E stain, x 200.

Fig 2. Epididymis from a control rat, showing no abnormalities. H-E stain, x 200.

Fig 3. Testis from a rat treated with 0.0023 mg/kg/day of DA-125 for 26 weeks, showing atrophy of seminiferous tubules and loss of germ cells. H-E stain, x 200.

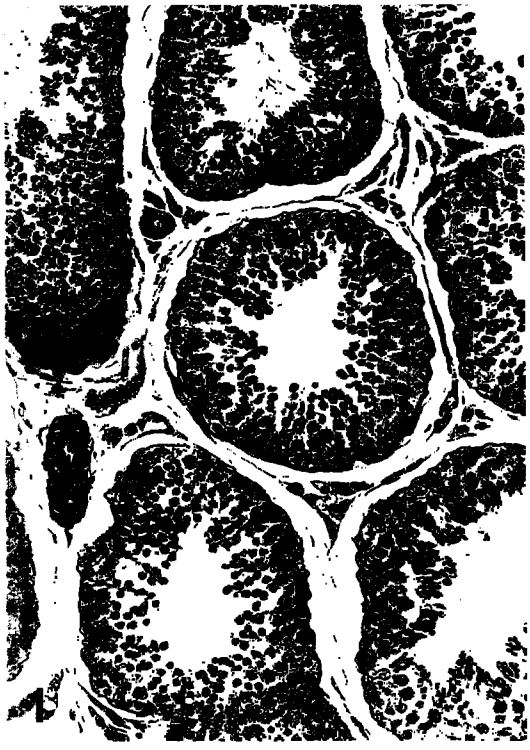
Fig 4. Testis from a rat treated with 0.0375 mg/kg/day of DA-125 for 26 weeks, showing decrease of spermatogonia in seminiferous tubles. H-E stain, x 200.

Fig 5. Epididymis from a rat treated with 0.0375 mg/kg/day of DA-125 for 26 weeks, showing oligozoospermia in epididymal tubles. H-E stain, x 200.

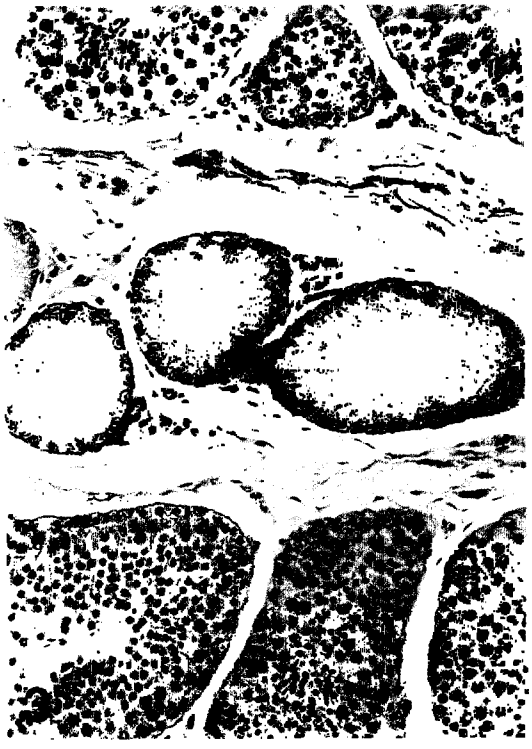
Fig 6 Testis from a rat treated with 0.15 mg/kg/day of DA-125 for 26 weeks, showing atrophy of semiinferous tubles, decrease of germ cells, vacuolization of Sertoli cells, and hyperplasia of Leydig cells. H-E stain, x 200.

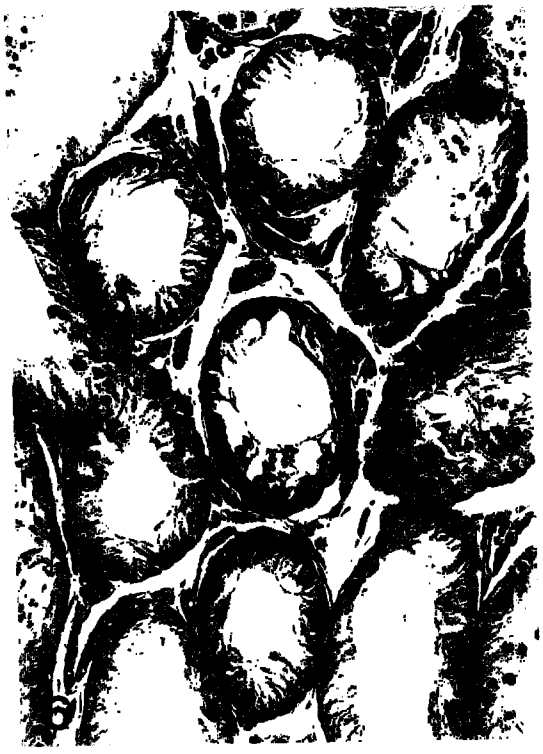
Fig 7. Testis from a rat treated with 0.6 mg/kg/day of DA-125 for 26 weeks, showing atrophy of seminiferous tubles, loss of germ cells, and hyperplasia of Leydig cells. H-E stain, x 200.

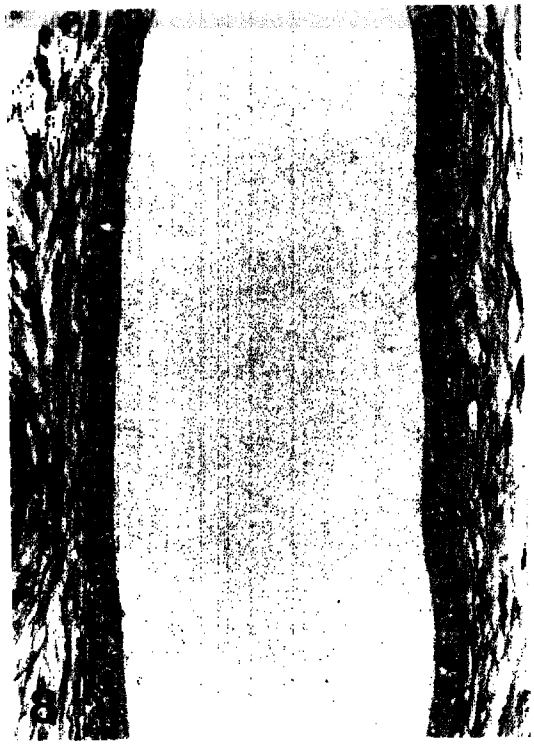
Fig 8. Epididymis from a rat treated with 0.6 mg/kg/day of DA-125 for 26 weeks, showing azoospermia and atrophy of epithelia in the cauda epidydimis. H-E stain, x 200.



2







## 참 고 문 헌


1. Blum RH, Carter SK. Adriamycin—a new anticancer drug with clinical activity. *Am Intem Med,* 80: 249-259, 1974.
2. Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B.: Adriamycin (NSV-123127), a new antibiotic with anti-tumor activity. *Cancer Chemother Rep,* 53: 33-37, 1969.
3. Schmid B, Zbinden G. Unscheduled DNA synthesis in male rabbit germ cells induced by methylmethance sulfonate, cyclophosphamide and adriamycin. *Arch Toxicol.* 2:503-507, 1979.
4. Benetict WF, Baker MS, Haround L, *et al.* Mutagenicity of Cancer chemotherapeutic agents in Salmonella/microsome test. *Cancer Res,* 37: 2209-2213, 1977.
5. Thomson DJ. Molello JA, Strebing RT, *et al.* Teratogenicity of adriamycin and daunomycin in the rat and rabbit. *Teratology,* 17: 151-158, 1978.
6. Thomson DJ. Agthe C, Bartech H, *et al.* (1978) : Evaluation of the carcinogenicity of chemicals: a review of the monograph program of the International Agency for Research on Cancer(1971-1977). *Cencer Res,* 38: 877-885, 1978.
7. William WA, Hsu TC. The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutat Res.* 79: 351-361, 1980.
8. Calabresi P, Chabner BA, Antineoplastic agents in *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics,* 8th ed, pergamon press. New York: 1209-1263, 1991.
9. 김원배, 박정배, 안병옥 등. 새로운 Anthracycline계 항암제 DA-125의 *in vitro* 세포독성 및 마우스 백혈병에 대한 항종양 효과, 대한암학회 초록집, 19: 47, 1993.
10. 백남기, 안병옥, 이순복 등. 새로운 항암성 항생물질 DA-125의 심장독성에 대한 평가. 응용약물학회지, 1: 9-19, 1993.
11. 안병옥, 백남기, 이순복 등. DA-125의 국소자극성. 응용약물학회지, 1: 20-25, 1993.
12. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, *et al.* An evaluation of human sperm as indicators of chemically induced alterations of spermatogenic function: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutat Res,* 115: 73-148, 1983.
13. Lu CC, Meistrich ML, Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res,* 39: 3375-3582, 1979.
14. Au WW, Hsu TC. The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutat Res,* 79: 351-361, 1980.
15. Hacker-Klom UB, Meistrich ML, Gohde W. Effect of doxorubicin and 4-epi-doxorubicin on mouse spermatogenesis. *Mutat Res,*, 160: 39-46, 1986.
16. Meistrich ML, Goldstein LS, Wyrobek AJ. Long-term infertility and dominant lethal mutations in male mice treated with adriamycin. *Mutat Res,* 152: 543-565, 1985.
17. Ward, JA, Bardin CW, Knight M, *et al,* Delayed effects of doxorubicin on spermatogenesis and endocrine function in rats. *Reprod Toxicol,* 2: 117-126, 1988.
18. Matsui H, Toyoda K, Shinoda K, *et al,* Quantitative histopathological study on the adriamycin testicular toxicity in rats. *Bulletin of the National Institute of Health Sciences*(Japan), 111: 39-46, 1993.
19. Parvinen LM, Parvinen M. Biochemical studies of the rat seminiferous epithelial wave: DNA and RNA synthesis and effects of adriamycin. *Ann Biol Anim Biochem Biophys,* 18: 585-594, 1978.
20. Gralla EJ, Eleischmann RW, Luthra YK, *et al.* The dosing schedule dependent toxicities of adriamycin in beagle dogs and rhesus monkeys. *Toxicology,* 13: 263-273, 1979.
21. 백남기, 안병옥, 이순복 등. 새로운 Anthracycline계 항암성 항생물질 DA-125의 랫드에 대한 용량설정시험(DRF)과 13주 아급성 독성시험. 응용약물학회지, 2: 190-205, 1993.
22. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, *et al.* adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science,* 197: 165-167, 1977.

23. Boorman GA, Chapin RE, Mitsumori K. Testis and epididymis in Boorman, G.A. eds *Pathology of the Fischer Rats. Reference and Atlas.* Academic press, San Diego: 405-418, 1990.
24. Takahashi M, Matsui H. Mechanisms of testicular toxicity. *J Toxicol Pathol,* 6: 161-174, 1993.
25. Creasy DM, Foster PDM, Male reproductive system in Haschek WM and Rousseaux CG eds *Handbook of Toxicologic Pathology.* Academic press, San Diego: 829-889, 1991.
26. 정문구, 김종춘, 김원배 등. 새로운 안트라사이클린계 항암제 DA-125의 생식독성연구: (Ⅱ) 랫크 수태능력시험, 응용약물학회지, 2: 94-102, 1994.
27. Amann RP. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ Health Perspect,* 70: 149-158, 1986.
28. Aafjes JH, Vels JM, Schenck E, Fertility of rats with artificial oligozoospermia. *J Reprod Fertil,* 58: 345-351, 1980.
29. Smith KD, Evaluation of sperm counts in 2543 men requesting vasectomy. *Andrologia,* 10: 362-368, 1978.
30. David GP, Jouannet P, martin-Boyee A, *et al.* Sperm counts in fertile and infertile men. *Fertil Steril,* 31: 453-455, 1979.
31. Kreuser ED, Harsch U, Hetzel WD, *et al.* Chronic gonadal toxicity in patients with testicular cancer after chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol,* 22: 289-294, 1986.
32. Da Cunha MF, Meistrich ML, Reid HL, *et al.* Active sperm production after cancer therapy with doxorubicin (Adriamycin). *J Urol.* 130: 927-930, 1983.
33. Bajpai, PK, Anderson, KJ, Chemotherapeutic agents and male reproduction in Lobl, TJ and Hafez, ESE, eds *Male fertility and its regulation.* MTP press. Lancaster. 13-24, 1985.