

Diazepam이 랫드 태아의 발육에 미치는 영향

김창진 · 김용준 · 유일정

전북대학교 수의과대학
(1999년 4월 16일 접수)

Effects of diazepam on fetal development in rats

Chang-jin Kim, Yong-jun Kim, Il-jeoung Yu

*Department of Obstetrics, College of Veterinary Medicine,
Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea*

(Received Apr 16, 1999)

Abstract : To investigate the effect of diazepam on fetal development in pregnant rats, this experiment was performed in eighty Sprague-Dawley female rats which were 8 weeks old and grouped into two according to different diazepam treatment period during 5-9 days of gestation and 10-14 days of gestation. Both experimental groups were included by saline treated groups (control) and diazepam-treated groups (6mg, 12mg and 24mg), respectively. Diazepam was injected to pregnant rats subcutaneously, which were sacrificed on 20 days of gestation and mean litter size, fetal body weight, fetal crown-rump length (CRL) and pathological findings were examined.

1. Concerning mean litter size, diazepam-treated groups showed lower mean litter size than control in both 5-9 days and 10-14 days of gestation groups ($p < 0.05$) without difference according to dosage of diazepam and day of gestation.

2. Concerning fetal body weight, diazepam-treated groups during 5-9 days of gestation showed lower fetal body weight than control and the other treated group during 10-14 days ($p < 0.01$) without difference according to dosage of diazepam. Diazepam-treated group during 10-14 days of gestation showed no difference among experimented groups.

3. Concerning fetal crown-rump length (CRL), diazepam-treated groups during 5-9 days of gestation showed shorter CRL than control and the other treated group during 10-14 days of gestation ($p < 0.01$) without difference according to dosage of diazepam.

4. Reduction of mean litter size, fetal body weight and CRL was shown from when treated by the dosage of 6mg/kg of diazepam.

5. Maternal mortality according to dosage of the 20mg/kg of diazepam were 30% and 20% in the treated group during 5-9 days and 10-14 days of gestation, respectively.

These results indicated that diazepam treatment in pregnant rats caused considerable reduction

of mean litter size, fetal body weight and fetal crown-rump length when treated during 5-9 days of gestation.

Key words : gestation, mean litter size, fetal body weight, fetal crown-rump length.

서 론

Diazepam은 진정제로서 널리 사용되고 있으며 또한 근이완작용, 항경련 작용 및 전마취작용이 있는 것으로 알려져 있다¹⁻³. 특히 diazepam은 진정작용, 근이완작용 및 항경련작용의 효과가 우수하여 임신한 사람 및 동물에도 사용되고 있다. 그러나 diazepam은 성분의 입자가 작아 태반통과가 가능하므로 모체 뿐 아니라 태아에서 단시간내에 진통·진정 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다⁴⁻⁶. 이와같이 diazepam이 태아에 미치는 영향과 관련하여 Spielmann *et al*⁷은 mouse에서 착상전 기간 (preimplantation period)에 diazepam을 사용하였을 때 태아의 발육부진 증후와 태아흡수율(resorption rate)이 증가되었다고 보고하였으며 Katz⁸는 임신한 rat에 diazepam을 투여한 후 태아의 기형여부를 관찰한 결과, 구개선반의 상승(palatal shelf elevation)이 지연되고 앓은키(crown rump length)는 감소가 되는 것을 보고하였다. 또한 Shah *et al*⁹은 임신 8일, 10일과 11일령의 hamster에 diazepam을 경구투여한 후 태아에서 구개열(cleft palate), 뇌 노출기형(exencephaly)과 같은 기형이 관찰되었다고 보고하였다. 이와같이 diazepam으로 인한 태아독성에 대한 관심은 높으나 대부분의 연구에서 임신일령에 관계없이 diazepam의 태아에 미치는 영향을 관찰하였으므로 본 실험에서는 rat에서 초기 기관형성기(early organogenesis)인 임신 5~9일령과 기관형성기(organogenesis)인 임신 10~14일령 군으로 임신한 rat를 구분하고 각 임신일령군에서 서로 다른 용량의 diazepam을 임신 rat에 투여한 후 태아산자수, 태아앓은키, 태아몸무게 및 병리적 소견을 조사하여 diazepam이 태아에 미치는 부작용 및 태아성장에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험동물 :

1) Female rat : 본 실험에 사용된 female rat(Sprague-Dawley)는 8주령의 발정기 상태인 80두를 사용하였다. 실험 rat의 체중은 220g 이상이였다. Female rat의 발정기 상태 검사는 Christie의 질도말 방법¹⁰에 준하여 실시하였는 바 그 방법은 saline을 묻힌 멸균된 cotton swab를 이용하여 질 점액을 채취한 후 슬라이드에 도말하고 Giemsa 염색후 광학현미경 400배 시야에서 질상피세포를 관찰하였다. 질도말 검사에 의한 발정기 판정은 각화세포가 90% 이상일 때를 기준으로 하였다.

2) Male rat : 교배를 하기 위해 사용된 male rat(Sprague-Dawley)는 10주령의 체중 300g 이상인 20두를 사용하였다.

교배 및 임신확인 : 교배는 오후에 male rat가 들어있는 cage에 발정기 상태로 판정된 female rat를 1:2의 비율로 넣어둔 후 그 다음날 female rat를 다른 cage로 옮겼다. 임신확인은 교배후 다음날 질도말 검사에 의해서 정자의 존재여부에 따라 정자가 관찰된 female rat를 실험에 사용하였으며 정자가 확인된 날을 임신 1일령으로 간주하였다.

실험군의 설정 : 임신일령에 따른 diazepam(상진, 한국)의 투여시기는 Table 1과 같이 2개의 군으로 구별하였으며 각 임신일령 군마다 diazepam 투여용량에 따라 대조군을 포함하여 4개 군으로 구분하였다.

실험조사내용 :

1) 산자수 : 임신일령과 용량변화에 따른 태아 산자수의 변화를 관찰하기 위하여 diazepam 처리후 20일령에 female rat를 희생시켜 각 실험군별로 산자수를 관찰하였다.

2) 태아의 체중 : 임신일령과 diazepam 투여량에 따른 체중의 변화를 관찰하기 위하여 diazepam 처리후 임신 20일령에 female rat를 희생시켜 각 실험군별로 태아의 체중을 측정하였다.

3) 태아의 앓은키 : 임신일령과 diazepam 투여량에 따른 태아의 앓은키를 관찰하기 위하여 diazepam 처리후 임신 20일령에 female rat를 희생시켜 각 실험군별로 태

아의 앓은키를 측정하였다.

4) 병리소견 : Diazepam 처리군과 대조군에서 태아의 병리적 소견을 육안 및 실체현미경하에서 관찰하여 비교하였다.

통계분석 : 본 실험에서 얻은 결과는 실험요인수에 따라 T검정 또는 Anova 처리를 하였으며 Anova 처리시 유의한 결과는 Duncam 다중비교를 수행하였다.

Table 1. Administration* of diazepam to pregnant rats

Gestation period (days)	No. of pregnant rats	Dosage(mg/kg)
Control** 5~9	10	
	9	6
	9	12
	9	24
Control** 10~14	10	
	10	6
	9	12
	9	24

* : Diazepam was injected subcutaneously.

** : Control, pregnant rats were injected with 1 ml of saline.

결 과

임신한 rat에 diazepam을 투여한 후 임신 20일령에 회생하여 임신일령군별 diazepam 처리군과 대조군간에 태아의 산자수를 비교한 결과는 Table 2와 같다.

임신 5~9일령군에서 diazepam 투여량에 따른 6mg군, 12mg군 및 24mg군의 산자수는 각각 12.30두, 12.20두 및 12.14두로서 대조군의 14.50두에 비하여 낮은 산자수를 나타내었고($p < 0.05$), diazepam 처리군에서 투여용량에 따른 차이는 없었다. 임신 10~14일령군에서 diazepam 투여량에 따른 6mg군, 12mg군 및 24mg군의 산자수는 12.60두, 12.50두 및 12.25두로서 대조군의 14.50두에 비해 낮은 산자수를 나타내었고($p < 0.05$), 임신일령과 diazepam 처리군에서 투여용량에 따른 차이는 인정되지 않았다.

Diazepam 투여후 태아체중을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

임신 5~9일령군에서 diazepam 투여량에 따른 6mg군, 12mg군 및 24mg군의 태아체중은 각각 1.05g, 1.04g 및 1.04g으로서 대조군의 2.25g에 비해 낮은 태아체중을 나타내었고($p < 0.01$), diazepam 처리군에서 투여용량에 따른 차이는 없었다. 임신 10~14일령군에서 diazepam 투여량

Table 2. Mean litter size following treatment with diazepam to pregnant rats (Means \pm SD)

Gestation days	No. of experimental rats	Experimental groups			
		Control(n = 10,10)	Dosage of diazepam(mg/kg)		
			6(n = 9,10)	12(n = 9,9)	24(n = 9,9)
5~9	37	14.50 \pm 1.17 ^A	12.30 \pm 0.48 ^B	12.20 \pm 0.42 ^B	12.14 \pm 0.69 ^B
10~14	38	14.50 \pm 0.94 ^A	12.60 \pm 0.51 ^B	12.50 \pm 0.85 ^B	12.25 \pm 0.46 ^B

A,B : Different superscripts denote significant differences within rows($p < 0.05$).

Table 3. Fetal body weight following treatment with diazepam to pregnant rats (Means \pm SD)

Gestation days	No. of experimental rats	Experimental groups			
		Control	Dosage of diazepam(mg/kg)		
			6	12	24
5~9	37	2.25 \pm 0.03 ^{A,a}	1.05 \pm 0.11 ^{B,b}	1.04 \pm 0.11 ^{B,b}	1.04 \pm 0.10 ^{B,b}
10~14	38	2.26 \pm 0.02 ^{A,a}	2.24 \pm 0.01 ^{A,a}	2.24 \pm 0.02 ^{A,a}	2.22 \pm 0.01 ^{A,a}

A,B : Different superscripts denote significant differences within rows($p < 0.01$).

a,b : Different superscripts denote significant difference within columns($p < 0.01$).

Table 4. Fetal crown-rump length following treatment with diazepam to pregnant rats

(Means±SD, cm)

Gestation days	No. of experimental rats	Experimental groups			
		Control	Dosage of diazepam(mg/kg)		
			6	12	24
5-9	37	3.02±0.04 ^{A,a}	2.32±0.08 ^{B,b}	2.32±0.07 ^{B,b}	2.31±0.04 ^{B,b}
10-14	38	3.03±0.03 ^{A,a}	3.02±0.05 ^{A,a}	3.00±0.41 ^{A,a}	3.00±0.03 ^{A,a}

A,B : Different superscripts denote significant differences within rows(p < 0.01).
 a,b: Different superscripts denote significant difference within columns(p < 0.01).

에 따른 6mg군, 12mg군 및 24mg군의 태아체중은 각각 2.24g, 2.24g 및 2.22g으로서 대조군의 2.26g과 diazepam 처리군간에 차이는 없었다. 임신일령에 따른 비교에서는 5-9일령의 diazepam 처리군은 10-14일의 diazepam 처리군보다 낮은 태아체중을 나타내었다(p < 0.01).

Diazepam 투여후 태아의 앞은키를 조사한 결과는 Table 4와 같다.

임신 5-9일령군에서 diazepam 투여량에 따른 6mg군, 12mg군 및 24mg군의 태아 앞은키는 각각 2.32cm, 2.32cm 및 2.31cm로서 대조군의 3.02cm 보다 작은 앞은키를 나타내었으며(p < 0.01), diazepam 처리군에서 투여용량에 따른 차이는 없었다. 임신 10-14일령군에서 diazepam 투여량에 따른 6mg군, 12mg군 및 24mg군의 태아의 앞은키는 각각 3.02cm, 3.00cm 및 3.00cm으로서 대조군의 3.03cm과 diazepam 처리군간에 유의성 있는 차이는 없었다. 임신일령에 따른 비교에서 5-9일령의 diazepam 처리군은 10-14일령의 diazepam 처리군보다 작은 앞은키를 나타내었다(p < 0.01).

또한 임신 10-14일령의 diazepam 처리군에서 태아의 흡수가 관찰되었으며(Fig 1), 임신 5-9일령의 diazepam 처리군 모두에서 태아의 일부 충혈이 관찰되었다(Fig 2-4). 아울러 Diazepam 투여용량에 따른 모체의 치사율은 임신 5-9일령의 24mg군, 10-14일령의 24mg군에서 각각 30%, 20%를 나타내었다.

고 찰

임신된 rat의 초기 기관형성기(임신 5-9일)와 기관형성기(임신 10-14일) 동안에 diazepam을 투여할 경우 산자수, 태아 체중 및 태아 앞은키는 diazepam을 투여하지 않은 대조군에 비하여 감소하였으며 초기 기관형성기에

충혈과 기관형성기에 태아흡수의 병리적 소견이 관찰되었다. 본 연구결과는 1975년 Miller와 Becker¹¹가 mouse를 이용한 연구에서 diazepam의 경구투여시에 태아의 흡수, 태아 체중의 감소 및 선천적 구개열 등을 관찰하였다고 한 보고와 유사한 결과로 생각되며 diazepam이 rat에서 기관형성기의 태아에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 diazepam 투여용량에 따른 산자수의 변화는 관찰할 수 없었는데 Tarlok *et al*¹²은 hamster에서 고농도의 diazepam을 복강투여하여 산자수가 현저히 감소하였다고 보고하였으나 본 실험에서는 6mg/kg부터 24 mg/kg까지 투여용량에 따른 차이가 인정되지 않아 이보다 저농도 또는 고농도의 용량투여에 대한 연구가 더 수행되어야 할 것으로 본다. Miller와 Becker¹¹는 mouse를 이용한 diazepam의 태아독성 실험에서 태아체중의 감소를 보고하였으며 본 실험에서도 태아 체중은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 본 실험에서 diazepam이 투여된 rat의 태아를 육안 및 실체현미경하에서 관찰하였으나 특이한 기형상태를 확인할 수 없었다. 이것은 Beall¹³이 사람 치료용량의 100배 수준으로 diazepam을 경구투여한 후 rat 태아의 기형을 유발하는 효과를 관찰하고자 시도하였으나 특이한 기형적 변화를 관찰할 수 없었다고 한 결과와 유사한 것으로 생각된다.

한편 본 실험에서 사용된 diazepam 용량이 기형유발에는 적은 양이었을 가능성도 있을 것으로 보인다. 또한 Katz⁸는 발생 초기단계에 diazepam을 rat에 투여한 결과, 용량증가에 따라 태아 앞은키의 감소를 보고하였는데 본 연구에서는 임신 5-9일령에서 대조군에 비해 diazepam 처리군의 태아 앞은키가 현저히 감소되었으나 diazepam 투여용량에 따른 태아의 앞은키 변화를 관찰할 수 없어 Katz⁸의 결과와 차이가 있었다. 그러므로 이에 관련된 보다 많은 연구가 더 수행되어야 할 것으로

보인다. 본 실험에서 diazepam 처리군에서는 모체일부의 폐사가 나타났는데 이에 대한 연구보고를 접할 수 없어 비교하기는 어려우나 대조군에서 모체의 폐사가 없었던 점과 임신 5~9일령 및 10~14일령에서 diazepam 최고용량인 24mg 투여군에서만 폐사가 일어난 점으로 보아 diazepam이 임신한 모체에서도 독성을 일으킬 수 있는 것으로 추측된다. 또한 임신 5~9일령의 diazepam 처리군에서는 용량에 관계없이 일부 태아의 충혈이 관찰되었는데 그 원인을 규명하기 어려우나 이것이 태아의 산자수 감소와 관계가 있을 것으로 추측된다. 본 실험에서 임신 5~9일령의 diazepam 처리군이 10~14일령의 diazepam 처리군보다 투여용량 각각에서 태아체중 및 태아 앓은키가 각각 더 감소된 사실과 임신 5~9일령에서 태아 충혈이 관찰된 사실로 볼 때 diazepam은 rat의 초기 기관형성기로 알려진 임신 5~9일령의 태아에 더 해로운 영향을 미치는 것으로 판단된다. 이상의 결과와 다른 연구자들의 보고에서와 같이 diazepam은 설치류 및 사람에서 임신초기의 태아에 해로운 영향을 미치는 것으로 보아 가축에서는 모체와 태아의 태반구조상 그 결합구조가 매우 밀접한 개 또는 토끼¹⁰⁾의 임신중 태아 기관형성기에 diazepam을 투여시 태아손실 등 여러가지 부작용을 일으킬 수 있는 가능성이 있을 것으로 보여 임신한 동물에서 특히 임신초기에 사용할 때 많은 주의를 기울여야 할 것으로 생각된다.

결 론

Diazepam이 임신 rat에서 임신시기와 diazepam 투여용량에 따라 태아발육에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 8주령의 female Sprague-Dawley rats 80두를 이용하여 임신시기별로 5~9일령군과 10~14일령 처리군으로 구분하여 각 군마다 saline 투여군(대조군)과 diazepam 처리군으

로서 Kg당 6mg군, 12mg군 및 24mg군으로 구분하여 각각 피하주사한 후 임신 20일령에 희생하여 산자수, 태아체중, 태아 앓은키(CR Length)와 그 밖에 외관상 병변을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Diazepam 투여후 산자수는 임신 5~9일령 및 10~14일령 처리군 모두에서 diazepam 처리군은 대조군 보다 각각 낮은 산자수를 나타내었으며($p < 0.05$) 또한 diazepam 투여용량에 따른 차이는 각각 인정되지 않았다. 임신일령간의 차이도 인정되지 않았다.

2. Diazepam 투여후 태아체중은 임신 5~9일령에서 모든 diazepam 처리군은 대조군과 10~14일령 처리군보다 낮은 태아체중을 나타내었으나($p < 0.01$) diazepam 투여용량에 따른 차이는 없었다. 임신 10~14일령 처리군에서는 실험군간 차이가 없었다.

3. Diazepam 투여후 태아 앓은키는 임신 5~9일령의 모든 diazepam 처리군이 대조군 및 임신 10~14일령 처리군보다 작은 앓은키를 나타내었으나($p < 0.01$) 투여용량에 따른 차이는 없었다.

4. Rat 태아산자수, 태아체중 및 태아 앓은키의 감소는 diazepam을 6mg/kg 사용시부터 나타났다.

5. Diazepam 투여용량에 따른 모체의 치사율은 임신 5~9일령의 24mg군, 10~14일령의 24mg군에서 각각 30%, 20%를 나타내었으며 임신 5~9일령의 diazepam 처리군 모두에서 각각 태아 일부의 충혈이 관찰되었다.

이상의 결과 diazepam이 임신한 rat에 투여될 때 rat 태아의 산자수, 태아 체중, 태아 앓은키의 감소가 나타남을 알 수 있었으며 임신 5~9일령의 diazepam 처리군에서 10~14일령의 diazepam 처리군보다 현저한 태아체중의 감소, 태아 앓은키의 감소 및 태아충혈 등이 유발됨으로써 임신 10~14일령에 비해 diazepam이 태아발육에 미치는 영향이 더 나쁜 것으로 판단된다.

Legends of figures

Fig 1. Resorption site(arrow) of a fetus in the uterus on 20 days of gestation following diazepam treatment during 10~14 days of the gestation.

Fig 2. Comparison of fetal size between control and diazepam treated groups and pathological finding : Considerably shorter fetal size than control and hemorrhagic patch in the fetuses treated with diazepam during 5~9 days of gestation.

Fig 3. Comparison of pathological finding between control and diazepam-treated groups(6mg) injected during 5~9 days of gestation : Hemorrhagic patch in the abdominal region (arrow).

Fig 4. Comparison of another pathological finding between control and diazepam-treated groups(12mg) injected during 5~9 days of gestation : See hemorrhagic patch on the head region (arrow).

참 고 문 헌

1. Bepko F, Lowe E, Waxman B. Relief of the emotional factor in labor with parenterally administered diazepam. *Obstet Gynecol*, 26:6-10, 1965.
2. Charles BC, Donald EF, William MH. Diazepam AHFS Drug Information 90. The American society hospital pharmacists Inc, Bethesda, MD:1259-1260, 1990.
3. Donald CP. Veterinary drug handbook. *Pharma Vet Publishing*, MN:68-71, 1991.
4. Barlow SM, Knight AF, Sullivan FM. Diazepam-induced cleft palate in the mouse, *Teratology*, 21:149-155, 1980.
5. Erkkola R, Kangas L, Pekkarinen A. The transfer of diazepam across the placenta during labour. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 52:167-170, 1973.
6. Saxen I, Saxen L. Association between maternal intake of diazepam and oral clefts. *Lancet*, 2:498, 1975.
7. Spielman H, Kruger C, Tenschert B, et al. Studies on the embryotoxic risk of drug treatment during the pre-implantation period in the mouse. *Arzneimittelforschung*, 36(2):219-223, 1986.
8. Katz RA. Effect of diazepam on the embryonic development of the palate in the rat. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 8(2):155-166, 1988.
9. Shah RM, Donaldson D, Burdett D. Teratogenic effects of diazepam in the hamster. *Can J Pharmacol*, 57: 556-561, 1997.
10. Christie DW, Bailey JB. Classification of cell types in vaginal smears during the canine estrous cycle. *Br Vet J*, 128:301-309, 1972.
11. Miller RP, Becker BA. Teratogenicity of oral diazepam and diphenylhydantoin in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 32:53-61, 1975.
12. Tarlok SG, Mulkiat SG, William FG. Comparative study of the teratogenic effects of chlordiazepoxide and diazepam in the fetal hamster. *Life Sciences*, 29:2141-2147, 1981.
13. Beall JR. Study of the teratogenic potential of diazepam and SCH 12041. *Can Med Assoc J*, 106:1061, 1972.
14. Roberts SJ. Veterinary obstetrics and genital diseases. David and Charles Inc, North Pomfret, Vermont:44-48, 1986.