

랫드에서 표준 및 사료제한 시험에 의한 fluoroquinolone 항균제 DW-116의 발생독성평가

김종춘* · 윤효인¹ · 이희복 · 한상섭 · 정문구

한국화학연구원 안전성연구센터
¹충남대학교 수의과대학 수의학과

Developmental Toxicity Evaluation of the New Fluoroquinolone Antibacterial DW-116 by Conventional and Pair-feeding Studies in Rats

Jong-Choon Kim*, Hyo-In Yun¹, Hee-Bok Lee, Sang-Seop Han and Moon-Koo Chung

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea,
¹Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University,
Yuseong, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

We have recently demonstrated that the fluoroquinolone antibacterial DW-116 caused a significant developmental toxicity in rats. The present study was conducted to determine whether the developmental toxicity induced by DW-116 treatment was the result of malnutrition from reduced food intake or the direct effects of test chemical on conceptuses. The test chemical was administered by gavage to pregnant rats from gestational days 6 through 16 at dose levels of 0 and 500 mg/kg/day. A pair-feeding study was also performed in which the pregnant rats received the same amount of diet consumed by the DW-116-treated pregnant rats. All dams were subjected to caesarean section on day 20 of gestation and their fetuses were examined for external, visceral, and skeletal abnormalities. In the treatment group, the maternal toxicities included increased abnormal clinical signs, decreased maternal body weight, suppressed body weight gain during treatment and posttreatment periods, and reduced food intake. The significant developmental toxicities included increased fetal deaths, decreased live fetuses, reduced fetal body weight and placental weight, increased incidence of fetal abnormalities, and increased fetal ossification delay. In the pair-fed group, however, slight maternal toxicities including decreased body weight and suppressed body weight gain during treatment period were observed in comparison with the control group, and minimal developmental toxicities including reduced fetal and placental weights and increased fetal ossification delay were found. The number of fetal deaths and live fetuses, and the incidences of malformed fetuses and litters with affected fetuses were comparable to the control values. Based on the results, it could be concluded that the developmental toxicity observed in the treatment group is attributable to the direct effects of DW-116 treatment, but not to the maternal malnutrition from reduced food consumption during pregnancy.

Key words – Quinolone antibacterial, embryotoxicity, teratogenicity, food restriction, rat

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 042-860-7454, Fax : 042-860-7488
E-mail : jongckim@kriect.re.kr

서 론

퀴놀론 항균제는 그람음성균의 감염증 치료에 가장 유용한 합성항균제 중의 하나로서 약 40여년의 치료 역사를 가지고 있다[1,2]. 이 약물은 1962년에 항말라리아제인 클로로퀸을 합성하는 과정에서 증류물로부터 분리한 1,8-Naphthyridine 유도체인 nalidixic acid가 그 효사이며[3], 1984년에 미국 식품의약품안전청으로부터 시판허가를 받은 불소화된 퀴놀론 norfloxacin의 개발 이후 그 가치를 인정받게 되었다[4]. Fluoroquinolone 항균제는 광범위한 항균범위, 우수한 항균활성, 긴 반감기, 우수한 생체이용률 등 여러 가지의 유용한 특성들을 가지고 있기 때문에 임상에서 그 사용량이 급격히 증가하고 있고, 또한 새로운 유도체들의 개발이 활발하게 진행되고 있다. 퀴놀론 제제의 항균기전은 DNA의 전사(transcription), 재조합(recombination) 및 복제(replication) 과정에 필수효소인 세균의 DNA gyrase (위상이성질화효소 II)를 억제함으로써 증식을 억제하게 된다[5,6].

DW-116은 동화약품공업 (주) 중앙연구소에서 합성한 새로운 fluoroquinolone 항균제로서, *in vitro* 시험에서 전반적인 항균력은 ciprofloxacin, ofloxacin 및 sparfloxacin에 비해 동등 또는 다소 열세하였지만 *in vivo* 시험에서는 이들 항균제와 유사한 활성을, 그리고 rufloxacin에 비해서는 1-2배 강한 항균활성을 보였다고 한다[7,8]. Rufloxacin의 경우 *in vitro*에서 역시 약한 활성을 나타내지만 생체내에서는 우수한 약동력학적 특성과 강력한 항균활성 및 면역계의 자극효과를 가지고 있는 우수한 항균제로 알려져 있다[9]. DW-116의 약물동태 시험결과 마우스에서 최고혈중농도(C_{max})와 반감기는 rufloxacin보다 2배 높은 수치를 보였고, 곡선하면적(AUC)수치도 3배 이상의 차이를 나타냈다[10]. 또한 랫드에서도 rufloxacin에 비해 빠른 흡수와 2배 높은 C_{max} 를 나타냈고, 곡선하면적, 반감기 및 뇨중배설은 비슷한 양상을 보였으며[11,12], 사람에서도 우수한 약동력학적 특성을 나타냈다고 한다[13].

Fluoroquinolone 항균제는 다른 항균제들과 마찬가지로 위장관독성, 광독성, 신경독성 및 관절병 증 등 여러 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다[1,14-16]. 생식독성의 경우 랫드 및 토끼에서 모독성과 발생독성을 유발하는 것으로 알려져 있으며[17-21], 본 연구실에서도 최근에 fluoroquin-

olone 항균제 DW-116이 임신랫드에서 모독성과 발생독성을 유발한다는 연구결과를 발표한 바 있다[22,23]. 그러나, DW-116의 투여에 의해 유발된 발생독성은 모동물의 체중과 사료섭취량이 현저하게 감소된 모독성 용량에서만 관찰되었기 때문에 관찰된 발생독성이 시험물질에 의한 직접적인 영향인지 아니면 모독성에 의한 2차적인 영향인지는 명확히 구분할 수가 없었다. 일반적으로, 표준화된 발생독성 시험에서는 모독성과 발생독성이 동시에 관찰될 경우 이들의 명확한 상관관계와 원인을 밝히는 것은 매우 어려우며[24], 이를 확인하기 위해서는 추가시험이 요구된다.

본 시험은 이전 시험[23]에서 fluoroquinolone 항균제 DW-116의 투여에 의해 유발된 발생독성이 DW-116의 투여에 의한 직접적인 효과인지 아니면 모동물의 사료섭취량 감소에 의한 영양결핍에 기인된 것인지를 구명하기 위하여 식품의약품안전청의 비임상시험관리기준(KGLP, 2000) 및 OECD의 Good Laboratory Practice(GLP, 1997)에 준하여 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

한국화학연구원 안전성연구센터의 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100번지)에서 입수한 특정병원체부재 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 10주령의 암·수동물을 입수한 후 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 암·수동물을 2:1로 교배시켰다. 익일 절도말에서 정자가 확인된 동물을 교미동물로 판정하였고, 이 날을 임신 0일로 산정하였다.

사육환경

본 시험은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 10~20회/hr., 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 교배기간 중에는 스테인레스제 방사육상자(210W×350L×180H mm)에 암수 2:1로 수용하였고, 교미가 확인된 동물은 폴리카보네이트 사육상자(260W×420L×180H mm)에 개체별로 수용하였다. 시험기간중 사료는 방사선조사(25 kGy)로 멸균한 실험동물용 고형사료[제일사료(주), 대전광역시 대덕구 대화동 40-36]를, 그리고 물은 자외선 유수살균기로 소독한

상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 시험은 미국 실험동물관리인증협회(American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)로부터 인증된 시설에서 수행되었고, 모든 시험방법은 기관내 동물관리 사용위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에 의해 검토되었다.

시험군의 구성

36마리의 고미확인동물을 부형제대조군(0 mg/kg), 사료제한군(pair-fed) 및 시험물질 투여군(500 mg/kg)으로 구성된 3개군에 군당 12마리씩 체중범위에 따라 무작위로 배정하였다. 사료제한급여군의 모동물은 시험물질 투여군에서 섭취한 사료량과 유사한 양의 사료를 급여하였다. 즉, 임신 0일에서 5일까지는 자유섭취시켰고, 6일에서 13일까지는 모체당 일일 15 g씩, 14일에서 18일까지는 20 g씩, 그리고 임신 19일에는 24 g씩을 급여하였다.

시험물질의 조제 및 투여

DW-116은 동화약품공업 (주) 중앙연구소로부터 공급받아 0.5% CMC (carboxymethylcellulose) 용액에 현탁하여 사용하였으며, 화학구조는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 시험물질 투여군에 대한 투여용량은 이전 시험[23]에서 모독성 및 발생독성용량으로 확인된 500 mg/kg을 사용하였고, 임신 6일에서 16일까지 1일 1회씩 오전중에 반복 경구 투여하였다. 부형제대조군 및 사료제한군은 부형제인 0.5% CMC만을 투여하였다. 각 시험군의 투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 하여 kg당 10 ml로 산출하였다.

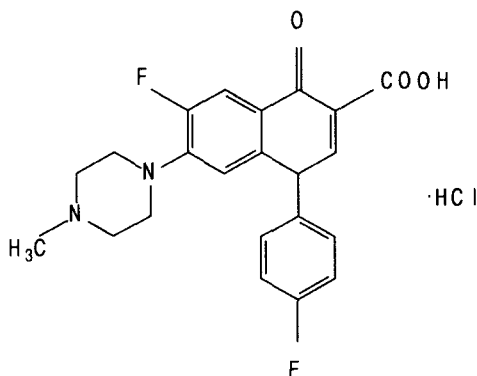


Fig. 1. Chemical structure of DW-116.

일반증상관찰

시험기간중 1일 1회씩 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 관해서 관찰하였고, 투여기간 중에는 투여전후로 1일 2회씩 관찰하였다.

체중 및 사료섭취량 측정

각 모동물에 대하여 임신 0, 6, 9, 13, 16 및 20일째에 체중을 측정하였고, 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하여 개체별 일일 사료섭취량을 산출하였다. 단, 임신 20일째에는 제왕절개로 인하여 임신 19일째에 사료급여 후 익일 잔량을 측정하였다.

부검 및 제왕절개

각 모동물들을 임신 20일째에 CO₂ 마취하에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 임신자궁과 난소를 적출한 다음 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수배자수, 사망태자수 등을 조사하였다. 흡수배자의 경우 태반조직만 보일 경우 초기흡수로 하였고, 태반 및 태자의 근조직이 관찰될 경우에는 후기흡수로 분류하였다. 배자가 착상초기에 흡수 또는 사망하여 착상부위를 관찰하기 어려운 경우에는 착상부위를 명확히 구분하기 위해 2% sodium hydroxide 용액에서 1시간 동안 침적한 다음 황색 또는 황갈색의 착상흔을 계수하였다[25]. 생존태자와 태반은 개체별로 중량을 측정하였고, 태자의 성별을 확인하였다.

태자의 형태학적 검사

생존태자를 자궁에서 적출한 후 구개열(cleft palate)을 포함한 외표이상의 유무에 대하여 관찰하였고, 왼쪽 자궁각의 난소축에서 번호를 매겨 흡수번호는 골격검사에 그리고 착수번호는 내장검사에 제공하였다. 골격검사는 각 배당 생존태자를 5% 중성완충포르말린액에 고정한 다음 변형된 Dawson법[26]에 따라 골격표본을 제작하여 실시하였다. 내부장기검사는 각 배당 생존태자를 Bouin액에 고정한 다음 두부 및 복부는 Wilson법[27], 흉부는 Nishimura법[28]에 따라 수행하였다. 태자의 외표과 내부장기 및 골격검사에서 관찰된 형태학적 이상은 기형(malformation), 변이(variation) 또는 발육지연(retardation)으로 분류하였으며, 이상소견에 대한 용어는 Wise 등[29]의 용어통일안을 기준으로 하여 표기하였다.

통계학적 분석

시험결과는 가능한한 평균값과 표준편차로 표기하였다. 통계학적 분석은 SAS 프로그램을 이용하여 분석하였고, 비교단위는 모동물 또는 동복자(litter)로 하였다. 모동물의 체중과 사료섭취량, 태자체중 등의 모수적 자료는 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 한 다음 유의성이 인정된 항목에 대해서 Student's t-test로 각 시험군간의 유의차를 조사하였다. 황체수와 착상수, 생존 및 사망태자수, 착상전 및 착상후 배사손실율 등의 비모수적 자료는 Kruskal-Wallis ANOVA를 한 다음 유의성이 인정된 항목에 대해서는 Mann-Whitney U test로 각 군간의 유의차를 분석하였다. 기형을 가진 태자와 기형태자를 가진 동복자 등의 빈도수를 나타내는 자료는 chi-square test를 하였고, 필요시 Fisher's exact probability test로 각 시험군간의 유의차를 조사하였다. 각 항목의 통계학적 유의수준은 5%에서 검정하였다.

결 과

모동물에 대한 영향

시험기간중 시험물질의 투여에 기인된 사망동물은 모든

시험군에서 관찰되지 않았다. 일반증상을 관찰한 결과, 500 mg/kg의 DW-116을 투여한 시험물질 투여군에서 유연(salivation), 허약(emaciation), 진정(sedation), 식욕부진(anorexia), 연변(soft stool), 적색유루(reddish tear) 등의 독성소견이 투여기간중에 관찰되었으며, 그 외의 시험군에서는 어떠한 이상소견도 나타나지 않았다.

임신기간중 모동물의 체중을 측정한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 시험물질 투여군에서는 임신 13, 16 및 20 일째의 체중이 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 투여기간 동안의 증체량도 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 투여후 기간 동안의 증체량은 부형제대조군과 사료제한군에 비해 각각 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 사료제한군의 경우 임신 16일 및 20일째의 체중과 투여기간 동안의 증체량이 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였으며, 투여군의 결과에 비해서는 통계학적으로 유의성있게 증가하였다.

모동물의 사료섭취량은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 시험물질 투여군에서 임신 7, 10, 14 및 17일째의 섭취량이 부형제대조군의 섭취량에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 한편, 사료제한군의 모동물들은 급여한 모든 사

Table 1. Changes in body weight of dams treated with DW-116 during gestational days(GD) 6 through 16

Parameters	Group		
	Control	Pair-fed	500 mg/kg
Number of pregnant animals	11	9	12
Body weight (g)			
GD 0	232.8 ± 9.9 ^a	232.2 ± 13.0	232.5 ± 12.2
GD 6	268.2 ± 13.9	267.2 ± 14.1	268.2 ± 14.4
GD 9	278.9 ± 13.0	268.2 ± 15.0	268.9 ± 17.6
GD 13	299.8 ± 12.8	286.4 ± 14.9	281.3 ± 23.2 [*]
GD 16	326.3 ± 13.1	300.4 ± 16.0 [*]	292.6 ± 25.4 [*]
GD 20	384.9 ± 17.2	349.7 ± 21.1 [*]	317.3 ± 30.6 ^{*†}
Body weight gain (g)			
GD 0- 6 (pretreatment period)	35.4 ± 8.1	35.0 ± 9.3	35.7 ± 4.2
GD 6-16 (treatment period)	58.1 ± 5.4	33.1 ± 9.3 [*]	24.4 ± 18.1 [*]
GD 16-20 (posttreatment period)	58.7 ± 9.4	49.4 ± 11.2	24.7 ± 13.1 ^{*†}

^aValues are presented means ± SD for all pregnant animals.

^{*}Significantly different from the control group.

[†]Significantly different from the pair-fed group.

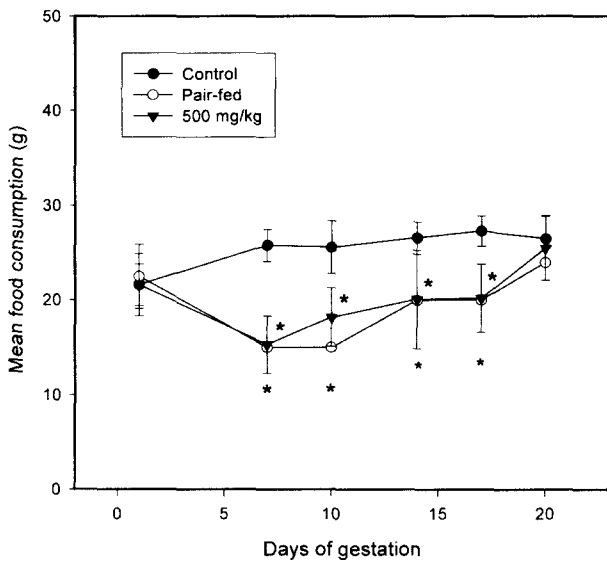


Fig. 2. Changes in food consumption of dams treated with DW-116.

Each value represents the mean and standard deviation.
*Significantly different from the control group.

료를 섭취하였으며, 투여개시일부터 제왕절개일까지 사료 섭취량은 부형제대조군의 66.8%로서 정상 사료섭취량의 약 33%가 제한급여되었다.

태자에 대한 영향

임신 20일째에 모동물들 제왕절개하여 얻은 생식소견은 Table 2에 요약하였다. 각 시험군의 임신율은 부형제대조군, 사료제한군 및 시험물질 투여군의 순으로 92%, 75% 및 100%로 나타나 각 시험군간에 다소의 차이가 인정되었으나 랫드의 착상은 시험물질을 투여하거나 사료급여를 제한하기전인 임신 5-6일째에 일어나기 때문에 우발적인 소견으로 판단된다. 제왕절개시 착상된 모든 배자가 사망한 모동물은 시험물질 투여군에서 3례가 관찰되었고, 그 외의 시험군에서는 나타나지 않았다. 임신황체수와 착상수는 모든 시험군에서 유사한 결과를 보여 주었다. 시험물질 투여군의 경우, 배자흡수와 태자사망의 증가로 인하여 부형제대조군 및 사료제한군에 비하여 각각 유의성있는 태자사망수의 증가가 관찰되었고, 이로 인하여 유의성있는 동복자수의 감소가 관찰되었다. 또한, 생존태자와 태반의 중량은 부형제대조군 및 사료제한군에 비해 각각 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 사료제한군의 경우, 생존태자의 체중과 태반중량이 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였다.

생존태자의 외표검사 결과는 Table 3에서 보는 바와 같

Table 2. Caesarean section data of pregnant rats treated with DW-116 during gestational days 6 through 16

Parameters	Group		
	Control	Pair-fed	500 mg/kg
Females mated	12	12	12
Females pregnant	11	9	12
Females totally resorbed	0	0	3
Corpora lutea	17.0 ± 1.61 ^a	17.1 ± 2.26	17.0 ± 1.91
Implantations	16.4 ± 1.57	15.6 ± 4.39	16.0 ± 2.04
Fetal deaths	1.40 ± 1.69	1.80 ± 1.10	10.0 ± 5.69 [†]
Resorptions: Early	1.40 ± 1.69	1.80 ± 1.10	5.60 ± 4.58 [†]
Late	0	0	3.20 ± 2.95 [†]
Dead fetuses	0	0	1.30 ± 1.48 [†]
Live fetuses	15.0 ± 2.32	13.8 ± 4.60	6.00 ± 5.26 [†]
Fetal body weight (g)			
Male	3.18 ± 0.23	2.93 ± 0.27 [*]	1.94 ± 0.17 [†]
Female	3.09 ± 0.20	2.73 ± 0.23 [*]	1.68 ± 0.21 [†]
Placental weight (g)	0.56 ± 0.07	0.45 ± 0.07 [*]	0.18 ± 0.03 [†]

^aValues are presented means ± SD for all pregnant animals.

*Significantly different from the control group.

[†]Significantly different from the pair-fed group.

Table 3. External alterations in fetuses from pregnant rats treated with DW-116 during gestational days 6 through 16

Parameters	Group		
	Control	Pair-fed	500 mg/kg
Fetuses examined	165	124	72
Litters examined	11	9	9
Fetuses with malformations (%) ^a	1 (0.60)	0	12 ^{*,†} (16.7)
Litters affected (%) ^b	1 (9.09)	0	7 ^{*,†} (77.8)
Anasarca	0	0	9
Cleft palate	0	0	4
Lordosis	0	0	2
Thread-like tail	1	0	0

^aA single fetus may be represented more than once in listing individual defects.

^bIncludes litters with one or more affected fetuses.

*Significantly different from the control group.

†Significantly different from the pair-fed group.

이 시험물질 투여군에서 기형태자수와 기형을 가진 동복자수가 부형제대조군 및 사료제한군에 비해 각각 통계학적으로

로 유의성있게 증가하였으며, 사료제한군에서는 어떠한 외표이상도 관찰되지 않았다.

태자의 내부장기 기형 및 변이의 발현빈도 및 형태는 Table 4에 나타내었다. 내부장기기형을 가진 태자수와 기형태자를 가진 동복자수는 시험물질 투여군에서의 결과가 부형제대조군 및 사료제한군에 비해 각각 통계학적으로 유의성있게 증가하였다. 반면, 내부장기변이의 경우 신우확장(dilated renal pelvis), 요관확장(dilated ureter) 및 흉선형태이상(misshapen thymus)이 모든 시험군에서 산발적으로 관찰되었으며, 각 시험군간에 유의차는 인정되지 않았다.

생존태자의 골격표본을 관찰한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. 시험물질 투여군의 경우, 흉추추체결손(absent thoracic centrum), 흉추추궁융착(fused thoracic arch), 늑골융착(fused rib) 등의 골격기형이 다소 높은 빈도로 관찰되었으나 부형제대조군 및 사료제한군의 결과와 통계학적 유의차는 인정되지 않았다. 반면, 경늑(cervical rib), 단요늑(short supernumerary rib), 편축성 흉추추체(hemicentric thoracic centrum), 흉골분절의 형태이상(misshapen sternebra), 요추추궁의 형태이상(misshapen lumbar arch) 등의

Table 4. Visceral alterations in fetuses from pregnant rats treated with DW-116 during gestational days 6 through 16

Parameters	Group		
	Control	Pair-fed	500 mg/kg
Fetuses examined	80	61	34
Litters examined	11	9	9
Fetuses with malformations (%) ^a	0	0	16 ^{*,†} (47.1)
Litters affected (%) ^b	0	0	8 ^{*,†} (88.9)
Dilated cerebral ventricle	0	0	14
Anophthalmia	0	0	2
Micrphthalia	0	0	1
Hypoplasia of lung	0	0	10
Dilated aortic arch	0	0	2
Enlarged ventricle	0	0	2
Muscular ventricular septum defect	0	0	4
Fetuses with variations (%) ^a	16 (20.0)	9 (14.3)	7 (20.6)
Litters affected (%) ^b	8 (72.7)	5 (55.6)	6 (66.7)
Misshapen thymus	11	0	3
Dilated renal pelvis	0	0	2
Dilated ureter	6	9	6

^aA single fetus may be represented more than once in listing individual defects.

^bIncludes litters with one or more affected fetuses.

*Significantly different from the control group.

†Significantly different from the pair-fed group.

Table 5. Skeletal alterations and ossification degree in fetuses from pregnant rats treated with DW-116 during gestational days 6 through 16

Parameters	Group		
	Control	Pair-fed	500 mg/kg
Fetuses examined	85	63	38
Litters examined	11	9	9
Fetuses with malformations (%) ^a	0	0	3 (7.9)
Litters affected (%) ^b	0	0	3 (33.3)
Absent thoracic centrum	0	0	2
Fused thoracic arch	0	0	1
Fused rib	0	0	1
Fetuses with variations (%) ^a	2 (2.35)	5 (7.94)	24 ^{*,†} (63.2)
Litters affected (%) ^b	1 (9.09)	3 (33.3)	9 ^{*,†} (100)
Short 13th rib	2	5	0
Cervical rib	0	0	16
Short supernumerary rib	0	0	4
Hemicentric thoracic centrum	0	0	9
Misshapen sternebra	0	0	6
Misshapen lumbar arch	0	0	1
Fetuses with retardations (%) ^a	6 (7.05)	27 [*] (42.9)	36 [*] (94.7)
Litters affected (%) ^b	4 (36.4)	8 (88.9)	9 [*] (100)
Enlarged fontanel	0	0	6
Incomplete ossification of supraoccipital	0	0	2
Unossified sternebra	0	0	6
Bipartite ossification of sternebra	0	0	7
Bipartite ossification of thoracic centrum	0	2	13
Bipartite ossification of lumbar centrum	0	0	0
Dumbbell ossification of thoracic centrum	5	23	35
Dumbbell ossification of lumbar centrum	0	1	0
Incomplete ossification of pubis	1	1	23
Number of ossification centers (mean ± SD)			
Sternebra	4.08 ± 0.48	3.56 ± 0.65	1.40 ± 0.67 ^{*,†}
Metacarpals in both forelimbs	6.63 ± 0.60	5.99 ± 0.21 [*]	5.89 ± 0.21 [*]
Metatarsals in both hindlimbs	7.86 ± 0.19	7.44 ± 0.54	5.73 ± 0.71 ^{*,†}
Sacral and caudal vertebra	6.89 ± 0.46	5.78 ± 1.00 [*]	3.24 ± 0.58 ^{*,†}

^aA single fetus may be represented more than once in listing individual defects.

^bIncludes litters with one or more affected fetuses.

^{*}Significantly different from the control group.

[†]Significantly different from the pair-fed group.

골격변이소견은 부형제대조군 및 사료제한군에 비해 각각 통계학적으로 유의성있게 증가하였다. 천문확장(enlarged fontanel)과 상후두골의 불완전골화(incomplete ossification of supraoccipital), 흉골분절의 무골화(unossified sternebra), 이분흉골분절(bipartite ossification of sternebra), 이분 흉

추추체(bipartite ossification of thoracic centrum), 이분 요추추체(bipartite ossification of lumbar centrum), 아령형 흉추추체(dumbbell ossification of thoracic centrum), 아령형 요추추체(dumbbell ossification of lumbar centrum), 치골의 불완전골화(incomplete ossification of pubis) 등의 골

화지연소견은 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 증가하였다. 주요골격부위의 골화점수에 있어서 흉골분절과 완전골(metacarpals), 부전골(metatarsals) 및 천·미추(sacral and caudal vertebra)의 수는 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 흉골분절과 부전골 및 천·미추의 수는 사료제한군의 결과에 비해서도 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 사료제한군의 경우, 골격기형과 변이의 발생율은 부형제대조군과 통계학적 유의차가 인정되지 않았다. 반면, 골화지연을 나타낸 태자수는 부형제대조군의 결과에 비해 유의성있게 증가하였고, 완전골과 천·미추의 골화점수는 유의성있게 감소하였다.

고 찰

본 시험결과는 랫드태자의 기관형성기 동안 DW-116을 500 mg/kg 용량으로 반복 경구투여하면 모독성과 현저한 발생독성을 유발하고, 임신랫드에서 33%의 사료제한급여는 경미한 모독성과 발생독성을 유발하지만 모동물 및 배자에 심각한 부작용은 유발하지 않는다는 것을 나타낸다.

시험물질 투여군에서 관찰된 일반증상과 모동물의 체중 감소, 투여 및 투여후기간의 체중증가 억제 및 사료섭취량의 감소는 시험물질의 투여에 기인된 모독성 소견으로서 이전 시험[23]의 결과와 일치한다. 제왕절개시 투여군에서 관찰된 태자사망수의 증가와 생존태자수, 태자체중 및 태반중량의 감소, 그리고 형태학적 검사에서 관찰된 생존태자의 기형을 증가 및 골화지연은 시험물질의 투여에 기인된 발생독성의 지표이다. 상기 소견중 태자체중과 태반중량의 감소 및 골화지연의 증가는 자궁내 발육지연효과(intrauterine growth retardation effects)로, 생존태자의 기형을 증가는 최기형성효과(teratogenic effects)로, 그리고 사망태자수의 증가는 배자사망효과(embryolethal effects)로 분류할 수 있다. 일반적으로, 발생독성물질을 임신 랫드에 투여하면 저독성 용량에서는 태자의 발육지연을 유발하지만 투여용량이 증가할수록 태자의 형태학적 이상이 증가하거나 궁극적으로는 배·태자의 사망과 같은 심한 형태의 발생독성으로 독성발현이 전이되게 된다. 본 시험의 투여군에서 관찰된 다양한 형태의 발생독성 소견은 DW-116이 500 mg/kg 용량에서 발생중인 랫드 배·태자에 심각한

발생독성을 야기한다는 것을 나타낸다. 반면, 사료제한군에서는 일반증상 관찰시 전 시험기간중 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았으며, 모동물의 체중감소와 투여기간의 체중증가 억제가 관찰되었지만 시험물질 투여군의 결과에 비해서는 유의성있게 증가한 것으로 나타났다. 발생독성의 경우에도 태자의 체중감소와 태반중량 감소, 태자의 골화지연 등의 경미한 발육지연소견만이 인정되었으며, 이들 소견 역시 시험물질 투여군의 결과에 비해서는 현저하게 미약한 것으로 나타났다. 상기 결과는 시험물질 투여군에서 관찰된 모독성 및 발생독성은 사료섭취량의 감소에 의해 유발되었다기 보다는 시험물질의 투여에 기인된 직접적인 독성영향이라는 것을 나타낸다.

발생독성이 모독성의 존재하에서 관찰될 경우 배자에 대한 시험물질의 직접효과인지 아니면 모독성에 의한 간접효과인지를 구분하는 것은 매우 어렵다. Khera[30]의 연구보고에 따르면, 다양한 화학적 및 물리적 원인에 의해 유발된 모독성은 반드시 기형태자의 발현증가와 배자흡수 및 태자사망의 증가원인이 된다고 하였다. 또한, 실험동물에서 임신기간중 사료섭취량의 감소에 의해 유발된 모독성은 심각한 발생독성의 원인이 된다는 많은 연구보고가 있다[31-33]. 반면, Kavlock 등[34]과 Chernoff 등[35]은 모체의 체중감소와 사망을 나타내는 심한 모독성도 반드시 그에 상응하는 발생독성을 나타내는 것은 아니라고 하였으며, Ahokas 등[36]은 임신 전 기간동안 정상 사료섭취량의 50%를 제한급여하여도 생존태자의 감소는 관찰되지 않는다고 하였다. 따라서, 발생독성시험에 있어서 임신중 모독성과 발생독성간의 상관관계는 여전히 중요한 논쟁거리로 남아 있다[37]. Fluoroquinolone 항균제의 경우, ofloxacin[17], lomefloxacin[18], fleroxacin[19], levofloxacin[20] 및 prulifloxacin[21]을 임신 랫드나 토끼에 투여하면 체중 및 사료섭취량의 감소와 같은 모독성과 태자의 체중감소, 발육지연 및 골격변이 등의 발생독성을 유발한다고 한다. 상기한 변화는 임신동물들이 장내 정상세균총의 불균형을 암시하는 연변과 맹장확장 등을 나타냈기 때문에 사료섭취량의 감소에 의한 영양불량이 주요 원인인 것으로 추정되었다[15]. 본 시험의 사료제한군에서는 사료급여량을 시험물질 투여군과 유사하게 제한하였음에도 불구하고 경미한 발생독성소견만 인정된 것으로 보아 시험물질 투여군에서 관찰된 현저한 발생독성은 사료섭취량의 감소에 의한 것이 아

니라 시험물질의 투여에 기인된 직접적인 독성소견으로 사료된다. 그러나, 사료섭취량의 감소에 의해 유발된 경미한 발생독성이 시험물질의 투여에 기인된 발생독성에 추가 또는 상승작용을 나타냈는지에 대해서는 밝혀낼 수가 없었다.

결론적으로 임신랫드에 있어서 사료제한급여는 경미한 모독성과 발생독성을 유발하지만 태자의 사망과 기형유발 등의 심각한 발생독성은 유발하지 않았다. 따라서, 본 시험의 시험물질 투여군에서 관찰된 발생독성은 DW-116의 투여에 의한 직접적인 독성영향이며, 사료섭취량의 감소에 의한 모체의 체중감소 또는 영양결핍에 기인된 소견은 아닌 것으로 판단된다.

요 약

임신랫드에서 fluoroquinolone 항균제 DW-116에 의해 유발된 발생독성이 모동물의 사료섭취량 감소에 의한 영양결핍이 주요 원인인지 아니면 DW-116이 배·태자에 직접적으로 작용하여 유발된 것인지를 조사하고자 시험물질을 랫드에 임신 6일에서 16일까지 0 및 500 mg/kg 용량으로 반복 경구투여하였다. 사료제한군은 시험물질 투여군의 모동물이 섭취한 동일한 양의 사료를 제한급여하였다. 모든 모동물을 임신 20일째에 제왕절개하였고, 모독성 및 발생독성을 평가하였다. 시험물질 투여군에서는 독성증상과 체중의 감소, 투여 및 투여후 기간의 체중증가 억제, 사료섭취량의 감소를 포함하는 모독성이 부형제대조군 및 사료제한군에 비해 현저하게 증가하였다. 또한, 태자사망의 증가, 생존태자의 감소, 태자체중과 태반중량의 감소, 태자기형의 증가 및 골화지연을 포함하는 발생독성도 현저하게 증가하였다. 반면, 사료제한군에서는 모체 및 태자에서 경미한 독성소견만 인정되었고, 태자사망이나 태자기형 등의 심각한 발생독성은 관찰되지 않았다. 결론적으로 시험물질 투여군에서 관찰된 발생독성은 사료섭취량의 감소에 의한 모체의 영양결핍에 기인된 것이 아니라 DW-116의 투여에 기인된 직접효과인 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Hooper, D. C. and J. S. Wolfson. 1991. Fluoroquinolone antibacterial agents. *New Engl. J. Med.* **324**,

384-394.
 2. Neu, H. C. 1992. Quinolone antimicrobial agents. *Annu. Rev. Med.* **43**, 465-486.
 3. Leshner, G. Y., E. D. Forelich, M. D. Gruet, J. H. Bailey and R. P. Brundage. 1962. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* **5**, 1063-1068.
 4. Bertino, J. Jr. and D. Fish. 2000. The safety of the fluoroquinolone. *Clin. Ther.* **22**, 798-817.
 5. Gootz, T. D. and K. E. Brighty. 1998. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials, pp. 29-80, *In Andriole, V. T. (ed.) The Quinolones (2nd ed)*, Academic Press Inc., San Diego.
 6. Walker, R. C. 1999. The fluoroquinolones. *Mayo Clin. Proc.* **74**, 1030-1037.
 7. Choi, K. H., J. S. Hong, S. K. Kim, S. J. Yoon and E. C. Choi. 1997. *In-vitro* and *in-vivo* activities of DW-116, a new fluoroquinolone. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**, 509-514.
 8. Hwang, Y. H., K. O. Han, J. Lee, H. B. Yang, Y. H. Chung, S. J. Yoon and D. K. Lee. 1997. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of DW-116, a new quinolone antibiotic. *J. Appl. Pharmacol.* **5**, 187-193.
 9. Cuffini, A. M., V. Tullio, A. Allocco, G. Paizis, C. De Leo and N. A. Carlone. 1994. Effect of rifloxacin upon non-specific immune defences: *in-vitro*, *ex-vivo* and *in-vivo* results. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**, 545-553.
 10. Lee, D. K. 1995. Pharmacokinetic study of a new quinolone, DW-116. *Drugs* **49**, 323-325.
 11. Park, Y. H., B. H. Jung, B. C. Chung, J. Park and C. Mitoma. 1997. Metabolic disposition of the new fluoroquinolone antibacterial agent DW116 in rats. *Drug Metabol. Disposit.* **25**, 1101-1103.
 12. Yu, I. L., S. J. Chung, M. H. Lee and C. K. Shim. 1997. Pharmacokinetics of 1-(5-fluoro-2-pyridyl)-6-fluoro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-1,4-dihydro-4-oxoquinolone-3-carboxylic acid hydrochloride (DW-116), a new quinolone antibiotic in rats. *J. Pharmacol. Sci.* **86**, 550-553.
 13. Meyerhoff, C., C. Dilger, S. J. Yoon, Y. H. Chung, D. K. Lee, C. W. Lee, J. M. Ryu, M. S. Choi, G. Pabst and C. Reh. 1998. Safety, tolerability and pharmacokinetics of the new long-acting quinolone DW-116 after single and multiple dosing in healthy subjects. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 349-361.
 14. Shimada, J. and S. Hori. 1992. Adverse effects of

- fluoroquinolones. *Prog. Drug. Res.* **38**, 133-143.
15. Takayama, S., M. Hirohashi, M. Kato and H. Shimada. 1995. Toxicity of quinolone antimicrobial agents. *J. Toxicol. Environ. Health* **45**, 1-45.
 16. Stahlmann, R. and H. Lode. 1999. Toxicity of quinolones. *Drugs* **58(Suppl. 2)**, 37-42.
 17. Takayama, S., T. Watanabe, Y. Akiyama, K. Ohura, S. Harada, K. Matsubashi, K. Mochida and N. Yamashita. 1986. Reproductive toxicity of ofloxacin. *Arzneim. Forsch.* **36**, 1244-1248.
 18. Umemura, T., H. Sasa, T. Lizuka and T. Yanagita. 1988. Teratological study of oral administration of NY-198 in rabbits. *Chemotherapy* **36(S-2)**, 391-410.
 19. Suzuki, T., S. Ishikawa, Y. Ogawa, T. Takahashi and Y. Abe. 1990. Teratological study of feroxacin in rabbits. *Chemotherapy* **38(S-2)**, 272-279.
 20. Watanabe, T., K. Fujikawa, S. Harada, K. Ohura, T. Sasaki and S. Takayama. 1992. Reproductive toxicity of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin in rats and rabbits. *Arzneim. Forsch.* **421**, 374-377.
 21. Morinaga, T., S. Fujii, S. Furukawa, M. Kikumori, K. Yasuhira, Y. Shindo, M. Watanabe and N. Sumi. 1996. Reproductive and developmental toxicity studies of prulifloxacin (NM441) (3): a teratogenicity study in rabbits by oral administration. *J. Toxicol. Sci.* **21(Suppl. I)**, 207-217.
 22. Chung, M. K., J. C. Kim and K. H. Lim. 1999. Developmental toxicity of DW-116, a new fluoroquinolone antibacterial agent, in rats. *J. Toxicol. Public. Health*, **15**, 495-501.
 23. Kim, J. C., H. I. Yun, H. C. Shin, S. S. Han and M. K. Chung. 2000. Embryo lethality and teratogenicity of a new fluoroquinolone antibacterial DW-116 in rats. *Arch. Toxicol.* **74**, 120-124.
 24. Kim, J. C., H. C. Shin, S. W. Cha, W. S. Koh, M. K. Chung and S. S. Han. 2001. Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. *Life Sci.* **69**, 2611-2625.
 25. Yamada, T., K. Ohsawa and H. Ohno. 1988. The usefulness of alkaline solutions for clearing the uterus and staining implantation sites in rats. *Exp. Ani.* **37**, 325-331.
 26. Dawson, A. B. 1926. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Stain. Technol.* **1**, 123-124.
 27. Wilson, J. G. 1965. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals, pp. 262-277, In Wilson, J. G. and J. Warkany (eds.), *Teratology. Principles and Techniques*, University of Chicago Press, Chicago and London.
 28. Nishimura, K. A. 1974. Microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.* **14**, 23-40.
 29. Wise, L. D., S. L. Beck, D. Beltrame, B. K. Beyer, I. Chahoud, R. L. Clark, R. Clark, A. M. Druga, M. H. Feuston, P. Guittin, S. M. Henwood, C. A. Kimmel, P. Lindstrom, A. K. Palmer, J. A. Petrere, H. M. Solomon, M. Yasuda and R. G. York. 1997. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (Version 1). *Teratology* **55**, 249-292.
 30. Khera, K. S. 1987. Maternal toxicity in human and animals: effects on fetal development and criteria for detection. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **7**, 287-295.
 31. Matsuzawa, T., M. Nakata, I. Goto and M. Tsushima. 1981. Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. *Toxicology* **22**, 255-259.
 32. Nakane, K. and Y. Kameyama. 1983. Effect of maternal fasting on the manifestation of cleft lip in CL/Fr mice. *Cong. Anom.* **23**, 207-210.
 33. Ikemi, N., J. Imada, T. Goto, H. Shimazu and M. Yasuda. 1993. Effects of food restriction on the fetal development during major organogenesis in rats. *Cong. Anom.* **33**, 363-377.
 34. Kavlock, R. J., N. Chernoff and E. H. Rogers. 1985. The effect of acute maternal toxicity on fetal development in the mouse. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **5**, 3-13.
 35. Chernoff, N., J. M. Rogers and R. J. Kavlock. 1989. An overview of maternal toxicity and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. *Toxicology* **59**, 111-125.
 36. Ahokas, R. A., E. B. Lahaye, G. D. Anderson and J. Lipshitz. 1981. Effect of maternal dietary restriction on fetal growth and placental transfer of α -amino isobutyric acid in rats. *J. Nutr.* **111**, 2052-2058.
 37. Chahoud, I., A. Ligensa, L. Dietzel and A. S. Faqi. 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod. Toxicol.* **13**, 375-381.

(Received June 27, 2001; Accepted August 14, 2001)