

재조합 인간상피세포 성장인자 (rhEGF, DWP401) 가 랫드의 수태능, 태자와 신생자 발달 및 모체기능에 미치는 영향

박귀례[#] · 한순영 · 신재호 · 이유미* · 김판기** · 장성재

국립독성연구소, 독성부, *부산대학, **용인대학

(Received February, 29 2001; Revised March 26, 2001)

Fertility and Reproductive & Developmental Toxicity Study on Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rhEGF, DWP401) in Rats

Kui Lea Park[#], Soon-Young Han, Jae-Ho Shin, Yoo Mie Lee*,
Pan Gyi Kim** and Seung Jae Jang

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Seoul, 122-704, Korea
¹Pusan National University, ²Yongin University

Abstract – This study was conducted to investigate for its effects on reproductive and developmental toxicity of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) in Sprague-Dawley rats. Male rats were administered rhEGF at doses of 1, 10, 100, and 1000 µg/kg/day, respectively, by subcutaneous injection from 63 days before and throughout to mating period until the day before sacrifice. Female rats were administered rhEGF at the same doses from 14 days before mating to day 20 of gestation or to day 21 of lactation. We examined the male and female fertility indices and maternal toxicity of F0 parental animals. Also, we examined the external, visceral, or skeletal malformation of fetuses, growth and development, behavior, and/or reproductive performance of F1 animals. At the highest dose (1,000 µg/kg), the mean body weights of F0 animals were significantly increased in males and females at 3 or 2 weeks after treatment, respectively. No clinical signs and food intakes were observed at any time during the experimental period by rhEGF treatment. In autopsy examination, the relative and absolute liver weights significantly increased in both sexes of 1,000 µg/kg. At the highest dose (1,000 µg/kg), there was a statistically significant increase of pregnancy period and the number of dead fetuses. Moreover, significant increase of mean fetal body weight and decrease of number of live fetuses, which related to the difficult delivery were observed in highest dose group. In F1 examination, no adverse effects on external, visceral, and skeletal malformation, physical and functional development, behavior, or reproductive ability of F1 animals were observed in any group. Also, there was no significant difference between control and treated groups in copulation or fertility indices of F1 animals. These results indicate that rhEGF had no adverse effect on fertility and reproductive ability of Sprague-Dawley rats.

Keywords □ rhEGF (DWP401), fertility, growth, development, reproductive toxicity, rats.

Epidermal growth factor(EGF)의 존재는 1960년 Stanley Cohen¹⁾ nerve growth factor에 대한 연구 중 마우스의 submaxillary gland 추출물의 한 분획이

신경 성장촉진인자와는 다른 활성이 있다는 것을 확인하였다. 이를 신생자에게 투여했을 때, 개안(eye opening) 및 치아맹출(teeth eruption)²⁾ 조기에 일어남을 보고한 바 있다.¹⁾ 그후 Cohen²⁾은 눈꺼풀과 앞니의 발달을 촉진하는 효과는 조직학적으로 상피세포의 증식을 의미하며, 이에 수반하여 각질화 현상이 전

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1788 (팩스) 02-380-1791

반적으로 증가하기 때문이며, 이 내피성장과 케라틴화를 촉진하는 성분을 분리하여 EGF라 명명하였다.

EGF는 53개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 약 6,200 dalton, single polypeptide으로서 당쇄수식이 없으며 6개의 cysteine residue는 각기 3개의 intramolecular disulfide bond를 형성하여 compact한 구조를 가지고 있었다고 보고하였다.^{3,4)}

인체 내에도 역시 EGF가 존재하는데, hEGF의 체내 합성부위는 분명하게 밝혀져 있지 않으나 주로 Brunner's gland와 submaxillary gland일 것으로 추정되고 있으며, 사람의 체액 중에 널리 분포되어 있다. 특히 침, 젖샘, 전립선액과 정액, 뇌, 눈물, 혈소판 등에 존재하며 혈액에는 상대적으로 낮은 농도로, 뇌에는 비교적 고농도로 존재하고, 가장 고농도로 존재하는 곳은 산모의 초유다.⁵⁾

현재까지 발표된 EGF의 다양한 생리작용을 나타내는 기전의 전 과정은 명백히 밝혀지지 않았으나, 세포 표면에 존재하는 EGF receptor를 통하여 신호 전달되는 것은 이미 밝혀졌다.⁶⁾ 이렇게 전달된 신호는 세포 내부의 단백질을 활성화시켜 대사 및 생리변화를 일으켜 세포의 성장 및 증식을 유발하는 것으로 알려졌다.⁷⁾

보고에 의하면 안과영역에서는 각막절제, 각막이식, 백내장수술 후 각막세포 촉진효과가 인정되어 왔고,⁸⁾ 외상과 감염에 의해 일어나는 각막손상, 각막궤양에서도 상처부위의 신속한 정상화 효과도 인정되었다. 또한 난치성 피부궤양(당뇨병성 궤양, 정맥류성 궤양, 육창 등) 등의 치료에 효과가 있으며 조직의 복구와 유지 등 분열유발물질임이 밝혀졌다.⁹⁾ 위장관에 대해서는 위산의 분비를 억제하고 위궤양 유발물질에 의한 조직 손상에 대해 위 십이지장 점막을 보호하는 작용을 하며 위장관 세포의 증식을 촉진하여 위장관 궤양을 치료하는 작용이 있다.¹⁰⁾ 따라서 EGF는 상처조직의 치유를 목적으로 하는 국소적용 제제나 위산분비억제를 목적으로 하는 제제로 개발될 가능성도 있다.

EGF는 생체 내에 미량 존재하므로 1983년 이후 hEGF를 미생물에서 발현 천연 hEGF와 유전자재조합 기법으로 합성된 EGF가 물리화학적 · 생물학적으로 동등함이 증명되었다.¹¹⁾ 본 실험에 사용된 DWP401은 유전자재조합기술을 이용하여 백터(pTE105)로 *E. coli*에 클로닝시킴으로서 DWP401(rhEGF)를 대량 생산하였으며 DWP401은 사람의 EGF와 아미노산 서열이

완전히 동일한 구조를 가지고 있다. 본 실험에서는 신약개발을 목적으로 유전자재조합기술로 개발된 DWP401이 암수 랫드의 수태에 미치는 영향 및 전반적인 생식발생에 대하여 어떤 독성이 나타나는지를 연구하였다.

실험방법

시험물질 및 실험동물 – 시험물질인 DWP 401은(주) 대웅제약에서 제공받아 -70°C 냉동고에 보관하였다가 사용시 생리식염주사액으로 희석하여 사용하였다. 실험동물은 식품의약품안전청에서 번식 사용한 동물로 수컷은 4주령, 암컷은 8주 이상 된 SPF SD랫드를 사용하였다. 사육실은 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%, 환기회수 15회/hr, 조명은 07:00~19:00로 유지하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(신촌사료)를, 물은 수도물을 자유롭게 섭취토록 하였다.

투여용량결정 – 투여용량을 결정하기 위해 반복투여 독성시험 결과를 참조하여 예비실험에서 0, 1, 10, 100, 1000, 2000 µg/kg을 피하주사 한 결과, 2000 µg/kg 투여군에서 임신기간 연장되고 분만이상을 유발하였다. 따라서 본 실험에서는 각 군 동물 수는 22~25마리, 투여용량은 0, 1, 10, 100, 1000 µg/kg 5개군으로 하였다. 시험은 식품의약품안전본부 고시 제96-8호(의약품등의 독성시험법기준: 96. 4. 16)의 생식독성시험기준¹²⁾ 따라 수컷은 교배 63일 전부터 투여하기 시작하여 임신 확인 후 부검 전날까지, 암컷은 교배 14일 전부터 투여하여 임신 확인 후 제왕절개군은 임신 20일까지, 분만군은 분만 후 21일까지 매일 투여하였다. 개체별 용량은 1주일에 1~2회 측정하여 최근에 측정된 체중을 근거로 용량을 계산하여 매일 1 ml/kg 단위로 26G주사기를 이용하여 1일 1회 경배부에 피하주사하였다.

F₀수컷에 대한 영향 – 동물의 일반상태, 중독증상 및 사망유무 등을 관찰하였다. 교배 63일 전부터 교배 시작일까지 1주일 간격으로 체중과 사료섭취량을 측정하였다. 체중 측정일에 일정량의 사료를 급여하고 다음 체중 측정일에 사료잔량을 측정하였고 전회의 사료급여량에서 잔량을 빼어 산출하였다. 교배가 끝난 수컷은 적당한 시기에 부검을 실시하여 육안으로 장기의 이상유무를 관찰한 후, 부고환 두부를 절개하여 정자를 채취하여 정자 수 및 운동성 등을 광학현미경으로 관찰하였다. 최소 한 배자의 아비도 되지 못한 수컷은 도살하여

정자형성능 검색을 위해 고환과 부고환을 떼어내 중성 포르말린에 고정하여 병리조직학적 검사를 하였다.

F₀암컷에 대한 영향 – 동물의 일반상태, 중독증상 및 사망유무 등을 관찰하였다. 분만 전후에는 분만유무 및 분만중의 이상유무를 관찰하였다. 교배 전 14, 7일, 교 배시작일, 임신 0, 4, 7, 10, 14, 17, 20일째 체중을 측정 하였으며, 분만군의 경우 분만일, 분만 후 4, 7, 14, 21 일에 체중을 측정하였다. 체중 측정일에 일정량의 사료를 급여하고 다음 체중 측정일에 사료잔량을 측정하였다. 63일 이상 투여한 수컷동물과 같은 군 같은 번호의 2주 이상 투여한 상태 암컷과 1:1로 합사시켜 암컷의 질전(copulatory plug)이 확인되거나 질 내에 정자가 확인된 동물을 교배가 허용된 동물로 하였으며, 그 날을 임신 0일로 하였다. 동일 군을 암·수 같은 번호로 교배시켜 10일간 교미가 확인되지 않으면 암컷은 이미 전에 동일군에서 성공적으로 교미가 확인된 다른 수컷과 10일간 교배를 시켰다. 2차 교배에도 교미가 확인되지 않으면 부검하여 임신여부 및 이상여부를 확인하였다.

교배율과 임신율은 다음과 같이 구하였다.

- 교배율(%)=(교배 성립 암컷수/교배에 사용된 암컷수)×100
- 임신율(%)=(임신 확인 암컷수/교배 성립 암컷수)×100

제왕절개군의 관찰 – 임신 20일째 각군 임신동물의 약1/2를 부검하여 임신자궁의 무게를 측정하였고, 황체수, 착상수, 흡수태자수, 생존태자수, 사망태자수, 생존태자의 성별, 생존태자의 개체별 체중 및 태반무게 등을 측정하였다. 착상율, 임신율 및 성비를 구하고, 모체 내부장기의 육안적 병리검사를 시행하였다. 모체의 장기에 미치는 영향을 파악하기 위해 간장, 신장, 부신, 폐장, 흉선, 비장, 심장 및 난소를 적출하여 생리식염수로 세척하여 혈액 및 물기를 제거한 다음 무게를 측정하였다. 분만 후 21일째 분만모체는 개복하여 자궁을 떼어내 착상흔을 세었고, 육안으로 모체의 장기에 미치는 영향을 파악하기 위해 간장, 신장, 부신, 폐장, 흉선, 비장, 심장 및 난소를 적출하여 생리식염수로 세척하여 혈액 및 물기를 제거한 다음 무게를 측정하였다. 이상이 인정된 장기는 필요한 경우 10% 중성포르말린에 고정하여 병리 조직학적 검사를 실시하였다.

태자의 형태학적 검사

외표이상검사 – 생존태자를 자궁에서 적출한 다음 외형이상의 유무를 관찰하였다. 오른쪽 자궁각의 난소측부터 태자의 1/2은 입체현미경하에서 내부장기를 검사

하고, 골격검사를 위해 피부를 벗겨 95% 에칠팔콜에 고정하였고, 나머지 1/2은 두부기형검사를 위해 두부만 떼어 Bouin액에 고정하였다.

골격검사 – 외표검사 후 95% 에칠팔콜에 고정한 태자는 Alizarin red S와 Alcian blue로 2중 염색한 다음 Inouye법¹³⁾에 따라 골격이상 유무 및 골화정도를 검사하였다.

내장검사 – 생존태자를 자궁에서 적출하여 입체현미경하에서 태자내부의 순환기계, 소화기계, 생식기계의 전 장기의 내장이상 유무에 관해서 검사하고,¹⁵⁾ Bouin 액에 고정시킨 두부는 Wilson방법¹⁴⁾에 따라 두부내장검사를 실시하였다.

분만군의 관찰 – 분만일의 관찰은 유선에 수유 흔적이 확인되면 분만완료로 판정하였다. 오후 5시까지 분만을 완료한 모체는 당일 분만으로 하였고 이를 분만 0일로 산정하였다.

출산율 및 분만율은 다음과 같이 산출하였다.

- 출산율(%)=(생존자 출산 암컷수/임신 암컷수)×100
- 분만율(%)=(출산자수/착상수)×100

분만 후 21일째 분만모체는 개복하여 자궁을 떼어내 착상흔을 세었고, 육안으로 모체의 장기에 미치는 영향을 파악하기 위해 간장, 신장, 부신, 폐장, 흉선, 비장, 심장 및 난소를 적출하여 생리식염수로 세척하여 혈액 및 물기를 제거한 다음 무게를 측정하였다. 분만 후 21일 이전에 태자가 모두 사망한 모체와 임신 26일까지 분만하지 않은 모체에 대하여는 적당한 시기에 모체를 부검하여 착상흔을 확인하였다. 이상이 인정된 장기는 필요한 경우 10% 중성포르말린에 고정하여 병리조직학적 검사를 실시하였다.

출산자에 대한 영향 – 출산일에 출산자 수를 셈하고 생사여부, 성별 및 외형이상의 유무를 관찰하고 무게를 측정하였다.

생후 4일까지의 생존율과 이유율은 다음과 같이 산찰하였다.

- 생후 4일 까지의 생존율(%)=(조정전의 생존자수/생존출산자수)×100
- 이유율(%)=(출산후 21일의 생존자수/생존 4일 조정직후 생존자수)×100

생후 0, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 63, 70일에 체중을

측정하였다. 생후 4일에 모체 당 새끼수를 8수로 하였으며 원칙적으로 암·수 동수로 하였다. 생후 21일에는 모체 당 암·수 각 4수로 재조정하였다.

발육분화 및 반사기능 검사 – 모든 생존 차산자를 검사하였다.

이개개진 – 생후 4일령에 측두 피부로부터 양쪽 귓바퀴가 모두 떨어져 있으면 양성으로 하였다.

절치맹출 – 생후 7일령에 아랫니(절치)가 보이는 것을 양성으로 하였다.

안검개열 – 생후 14일부터 양쪽 눈을 모두 떴으면 양성으로 하였다.

정소하강 – 생후 27일부터 정소가 하강되어 음낭이 형성되었는지 관찰하여 양쪽이 모두 하강한 것을 양성으로 하였다.

질개구 – 생후 33일부터 질 부위가 열려지는지 여부를 평가하여 질구가 완전히 열렸으면 양성으로 하였다.

정향반사 – 생후 9일령에 차산자의 등 부위를 평면에 닿게 뉘어 5초 내에 일어나 사지가 표면에 닿으면 양성으로 기록하였다. 5초 이내에 일어나지 않으면 연속 2회 추가실험하며 시간을 기재하였다.

부주지성 – 생후 14일령에 경사각 30°의 판상에 출산자의 머리부위를 아래쪽으로 향하도록 놓고, 180° 회전할 때까지의 시간을 측정하였다. 15초 이내에 완료하면 양성으로 하였다. 60초까지 측정하였으며, 60초 이내에 180° 회전하지 못하면 60초 이상으로 기록하였다. 60초 초과동물은 2~3분 후 동일 조건으로 다시 시행하였다.

동공반사 – 생후 35일령에 암실에서 적응시킨 후, 좌·우 눈에 안과용 후레쉬를 각각 비추어 양 눈의 동공수축이 모두 확인된 것을 양성으로 하였다.

감각, 운동, 정동성, 학습기능검사 – 모체 당 암·수 각 1수씩 실험하였다.

청각검사 – 생후 28일령에 무작위로 선발된 암·수 각 1마리 쪽을 청각기능측정기(Startle responder, Columbus Instrument)를 이용하여 주파수 20 KHz, 음압 100 dB의 순음에 폭로시켰을 때 양쪽 귓바퀴가 움직이면 양성으로 하였다.

자발운동량검사 – 생후 35일령에 3분간 자유롭게 운동하게 하여 총 이동거리를 자발운동량측정기(Optovarimax, Columbus Instrument)로 측정하였다. 간접조명 하에서 실시하였으며, 총 이동거리를 cm로 기록하였다.

핫 플레이트 검사 – 생후 35일령에 55°C가 유지되는 핫 플레이트에 동물을 올려놓고 25 cm 높이의 울타리 외부로 탈출하기 위해 밸바닥이 플레이트에서 떨어질 때까지의 소요시간을 측정하여 30초 이하는 양성으로 하였다.

수동회피반응 검사 – 생후 42일령에 수동회피반응검사기(Reflex-16/32 system, Columbus Instrument)로 측정하였다. 방음된 차폐시설 내의 조명 하에서 실시하였다. 시험시작 20초 후 램프가 10초간 켜지고, 약 50 dB의 소리가 10초간 계속되며, 이후 전기자극(약 3 mA)이 5초간 주어진다. 이때 동물이 피하는 시간을 측정하였으며, 계속 10회 실시하여 평균을 구하였다.

수미로 검사 – 생후 70일령에 수온을 조절한 수미로(Water T-maze)에 동물을 1일 3회 적응시켰다. 다음 날부터 1일 3회, 3일간 계속 수미로 시험을 실시하여 목표지점까지의 도달시간을 측정하여 평균 도달시간을 산출하였다.

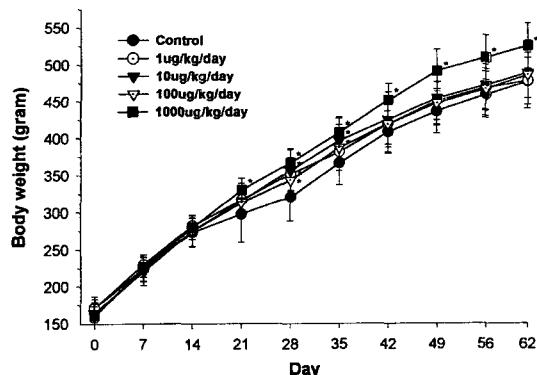
생식능 검사 – 수컷의 수정능 검사 및 암컷의 수태능 검사는 70일령 이후에 모체 당 암·수 각 1수씩 실시하였다. 형매 교배를 피하면서 교미확인, 임신확인, 임신유지기능 검사등을 수행하였다. 암컷과의 교미를 위해 3주간 교배에 사용되었던 수컷은 교미가 모두 완료된 후 부검하여 병리 해부학적 검사를 시행하였다.

임신 중 F1에 관한 검사 – 임신 0, 7, 14, 20일에 체중을 측정하였다. 임신 20일에 개복하여 총 자궁무게를 측정 후 횡체수, 착상수, 착상흔, 흡수수, 생존태자수, 사망태자수를 확인하였다. 또한 F1모체의 주요 장기의 이상유무를 관찰하였다. 생존태자의 외표이상검사를 실시하였다.

통계처리법 – 각 시험자료의 특성에 따라 일원배치 분산분석 및 Duncan 또는 Scheffe test, Kruskal-Wallis 및 Mann-Whitney U test, 또는 chis-square test를 실시하였다. 모든 통계처리는 5%의 통계적 유의수준에서 검정하였으며 통계 프로그램으로는 SPSS for windows(Release 6.0, 1993) 또는 PHARM/PCS (Version 4, 1986)을 사용하였다.

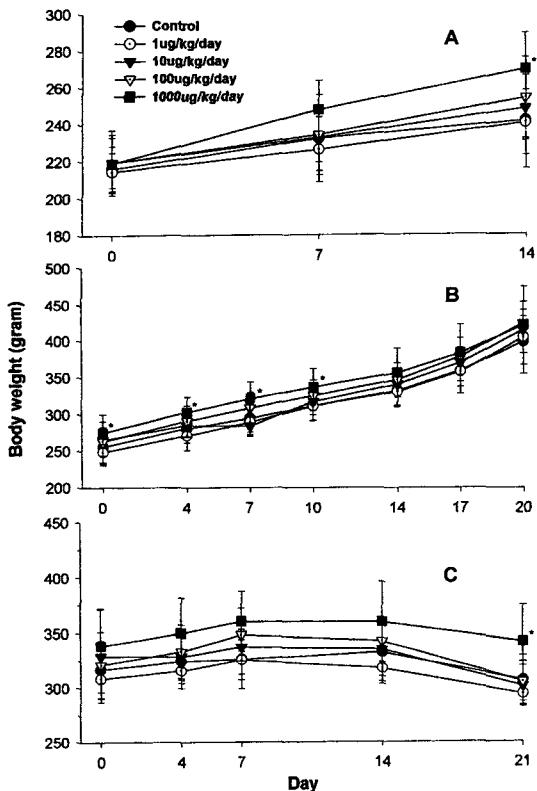
실험결과 및 고찰

교배전 수컷 투여에 미치는 영향 – 투여약물에 의한 것으로 판단되는 임상증상은 발견되지 않았다. 수컷동물의 체중변화는 Fig. 1과 같다. 약물투여 3주 후부터



*Statistically different from control group ($p < 0.05$)

Fig. 1 – Body weight changes of F0 males treated with DWP401 for 63 days before mating.



*Statistically different from control group ($p < 0.05$)

Fig. 2 – Body weight changes of F0 dams treated with DWP401 during premating (A), gestational (B) and lactational (C) period.

최고용량투여군에서 통계적으로 유의성있게 체중이 증가하였다. 약물투여에 의한 사료 섭취량의 변화는 관찰되지 않았다. 다만, 5주째 최고용량투여군의 사료섭

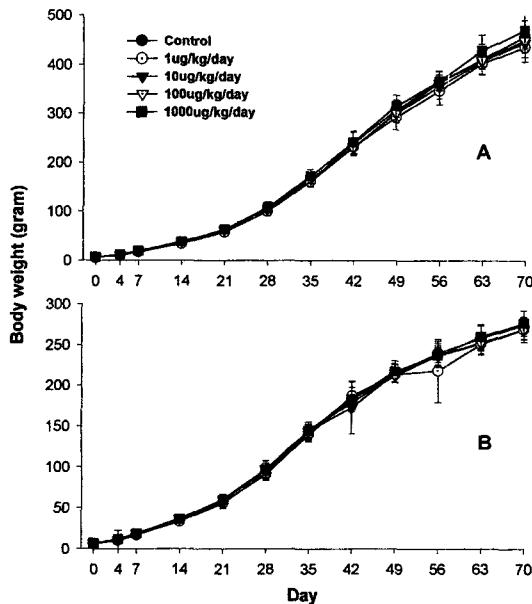


Fig. 3 – Body weight changes of F1 males (A) and females (B) obtained from dams treated with DWP401 from premating to weaning.

취량이 증가하는 경향을 보였으나 지속되는 현상은 아니었다.

암컷 투여에 미치는 영향 – 투여약물과 관련된 것으로 판단되는 임상증상은 발견되지 않았다. 교배전 투여기간, 임신기간 및 수유기간 중 측정한 체중의 변화는 Fig. 2와 같다. 약물투여 1주 후부터 최고용량투여군에서 체중이 증가하는 경향을 보였고 2주 후에는 통계적으로 유의하였으며 임신기간 전반기까지 지속되었다. 수유모체의 체중증가는 분만 후 1주일까지는 통계적으로 유의성있게 증가하였으나 그 후 증가율이 감소하여 회복되었다. 사료섭취량의 경우 최고용량투여군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다.

최고용량 투여군에서 수컷 부체와 암컷 모체의 체중증가는 내장의 무게 특히 간장의 절대적인 무게 증가와도 연관이 있으리라 사려된다(Table III 참조).

F1 암·수의 체중변화 – 생후 0일부터 10주까지 암·수 F1체중의 변화는 대조군과 비교시 유의성이 없었다(Fig. 3).

교배 및 임신에 미치는 영향 – 수컷과 암컷의 수태에 미치는 영향은 Table I과 같다. 투여약물 DWP401 1, 10 및 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 군에서는 모든 수컷동물이 상대 암컷배우자와 교배시작 후 첫 10일 내에 교미에 성공하

Table I – Effect of DWP401 on the fertility of F0 rats

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Male			Female		
	No. of mated	Copulation index (%)	Fertility index (%)	No. of mated	Copulation index (%)	Pregnancy index (%)
0	20	19/20 (95)	16/19 (84)	20	20/20 (100)	17/20 (85)
1	23	23/23 (100)	21/23 (91)	23	23/23 (100)	21/23 (91)
10	24	24/24 (100)	21/24 (88)	24	24/24 (100)	21/24 (88)
100	25	24/25 (96)	22/24 (92)	25	24/25 (96)	22/24 (92)
1000	25	25/25 (100)	20/25 (80)	25	25/25 (100)	20/25 (80)

였으나, 대조군 1수와 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 군의 수컷 각 1수와 교배가 이루어지지 않아 동일군중 교미에 성공한 수컷과 2차 교배시킨 결과, 대조군의 암컷은 교미를 허용하였으나, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 군의 암컷은 2차 교배에도 실패하였다.

교배가 성립된 수컷은 임신 확인 10일 후에 부검하여 내부장기의 이상을 관찰한 결과 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군의 1수에서 간좌엽 하단부가 위축되어 있었고 변연부에 좁쌀크기의 흰점이 관찰되었다. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군 1수의 좌측고환은 위축되었고 밀랑밀랑하였으며, 위축된 좌측고환은 무정자증이었으나 상대 암컷은 임신이 확인되었다. 이외에는 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다. 모든 수컷의 부고환의 피부를 절개하여 정자를 채취하여 정자수, 운동성 등을 광학현미경으로 관찰한 결과 대조군 1수에서 운동성이 낮게 나타났으나 상대 암컷은 임신이 확인되었다. 나머지 수컷은 정자수, 형태 및 운동성에 이상이 없었다. 교배가 성립 안된 수컷 2마리는 부검하여 내부장기의 이상유무를 관찰하였으나, 고환 및 부고환 등의 생식기를 포함한 기타 장기에서

육안적 이상이 관찰되지 않았다.

암컷의 경우 교배시작 후 제1회 발정주기 4일 이내 90%이상이 질전 또는 질내에서 정자가 발견되었다. 2회의 발정주기인 9일 이내에는 대조군 1마리를 제외한 모든 암컷에서 교미가 확인되었다. 1차 교배기간 10일내에 임신 0일을 확인하지 못한 동물이 3수(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군: 1수, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군: 2수), 2차 교배기간에 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군 1수는 교배가 확인되지 않았다. 약물의 투여용량이 증가할수록 교미하기까지의 기간이 약간 길어지는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 교미가 확인된 암컷 중 대조군 3수, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군 2수, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군 3수, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군 2수 및 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군 5수가 비임신모체로 판명되어 교미확인 26일에 부검하였다. 부검한 결과, 난소 및 자궁에서 착상흔 또는 흡수흔이 관찰되지 않았으며, 내부장기에 육안적 이상을 관찰한 결과 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서 비장이 종대 및 체장이 갈색으로 변색되어 있음을 관찰할 수 있었다. 최고용량투여군에서 다른 투여군에 비해 비임신모체가 증가하는 경향을 보

Table II – Reproductive performance of caesarean-sectioned dams (F0) treated with DWP401 during premating to gestational period

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	No. of dams	No. of corpora lutea	No. of implantations	Resorption			No. of live fetuses	M/F ratio	Weight (g) of			
				Early	Late	Total			Gravid uterus	Male	Female	Placenta
0	7	20.9 ± 3.53	15.9 ± 2.34	2	0	2	15.6 ± 2.64	48/61(0.79)	88.7 ± 14.13	3.59 ± 0.339	3.57 ± 0.300	0.60 ± 0.599
1	10	21.9 ± 5.34	16.9 ± 1.97	7	0	7	16.3 ± 2.16	84/79(1.06)	93.8 ± 12.26	3.77 ± 0.331	3.75 ± 0.205	0.52 ± 0.046
10	11	18.9 ± 3.53	15.0 ± 2.49	10	1	11	14.0 ± 2.83	67/87(0.77)	80.0 ± 17.85	3.72 ± 0.438	3.61 ± 0.354	0.64 ± 0.137
100	11	19.5 ± 3.93	16.5 ± 2.16	8	0	8	15.7 ± 1.85	73/100(0.73)	93.3 ± 9.97	3.85 ± 0.393	4.05 ± 0.914	0.58 ± 0.079
1000	7	19.9 ± 1.86	17.1 ± 3.44	5	4*	9*	16.9 ± 3.53	46/62(0.74)	92.72 ± 3.75	3.92 ± 0.163	3.65 ± 0.343	0.65 ± 0.098

*Statistically different from control group ($P < 0.05$)

Table III – Reproductive performance of delivery dams (F0) treated with DWP401 during premating to lactating period

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	No of dams	Duration of gestation	Implantation traces	No. of litter	Delivery rate (%)	No. of stillborns	M/F ratio
0	10	21.9 \pm 0.32	16.3 \pm 1.42	14.8 \pm 2.15	90.8	2	80/98 (1.18)
1	11	21.8 \pm 0.60	16.0 \pm 2.90	13.8 \pm 3.87	86.4	6	67/85 (0.79)
10	10	22.1 \pm 0.32	15.6 \pm 1.43	14.3 \pm 3.09	91.7	1	69/75 (0.92)
100	11	21.9 \pm 0.30	16.5 \pm 2.25	15.3 \pm 2.53	92.3	4	86/82 (1.05)
1000	13	22.4 \pm 0.50*	14.5 \pm 4.70	11.1 \pm 5.30*	76.2*	28*	68/76 (0.89)

*Statistically different from control group ($P < 0.05$)

였으나 약물에 의한 영향 여부는 확인되지 않았다.

임신지수에 미치는 영향 – 제왕절개군의 경우 임신 20일째 임신 랫드를 경추탈골시켜 부검한 결과는 Table II와 같다. 모체의 황체수, 임신율, 생존태자수, 태반, 자궁 및 생존태자 무게는 대조군과 비교시 유의성을 보이지 않았다. 착상수는 투여용량에 따라 증가하는 경향을 보였고, 이는 약물에 의한 자궁내벽의 증식에 의한 것으로 생각되어진다.¹⁶⁾ 후기흡수율은 최고 용량투여군에서 유의성 있게 증가하였다. 총 자궁무게는 투여용량에 따라 증가하는 경향을 보였으나 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군은 다른군에 비해 작았고, 이는 생존태자수가 적은것에 기인하는 것으로 생각되어진다. 최고 용량투여군에서 태반융합 1예가 관찰되었는데 융합태반에 연결되어 있는 태자 1마리는 전신수종으로 죽어있었으며 1수는 왜소태자였다.

분만군의 수유 21일 후 부검한 결과는 Table III와 같다. 최고 용량투여군에서 통계적으로 유의성 있게 분만율, 생존태자수는 감소하였으며 임신기간은 연장되었다. 사산자수는 증가하였고 한배당 새끼수 및 생존

태자수도 감소하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 군에서 1수는 조산하였으나, 이는 투여약물의 영향과는 무관한 것으로 생각되어진다. 임신기간의 지연이 최고용량군에서 일어났으며, 7수의 모체에서 분만후 출산자의 사망이 관찰되었다. 특히, 2마리의 모체는 분만직후 사망태자와 생존태자를 확인하여 사망태자를 제거하였으나 다음 관찰시에는 살아있었던 태자도 관찰할 수 없었다. 이는 모체가 새끼를 잡아먹은 것으로 생각되며(cannibalism), 또 다른 모체의 경우 새끼를 잡아먹고 있는 것이 직접 관찰되었다. 이는 분만지연으로 모체내 태자체중이 증가하고, 태자체중 증가로 인한 난산과 난산으로 인한 사산자수의 증가와 생존태자수 감소, 과체중 태자의 난산으로 인한 고통으로 인한 cannibalism으로 해석된다. 반복투여독성시험의 결과 자궁내막상피의 증생, 난소 내에 비정상적으로 많은 황체수가 내포되어 있어, 황체를 형성하고 황체 융해를 억제하는 작용에 EGF가 관여하고 있는 것으로 보고하고 있으며, 또한 혈청 Ca의 농도증가는 부갑상선 호르몬과 Vit D와의 연관성을 감안하면 분만기간의 지연은 갑상선과 부갑상선의

Table IV – External and visceral alterations of the fetus obtained from dams (F0) treated with DWP401 during premating to gestational period

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	1	10	100	1000
No. of dams	7	10	11	11	7
No. of examined fetuses	53	78	75	85	54
No. of abnormal fetuses	0	2	2	2	2
Hernia	0	1	0	0	0
Dwarf	0	0	1	1	1
Abnormal heart	0	1	0	0	0
Abberant artery	0	0	0	1	0
Thymus atrophy	0	0	1	0	0
Edema	0	0	0	0	1
Fused placenta	0	0	0	0	1
Dilatation of ureter	1	7	12	24*	8

*Statistically different from control group ($P < 0.05$)

기능항진등 호르몬의 생체기능이상에 의한 것으로 추정된다.¹⁶⁾

제왕절개군의 태자 기형발생에 미치는 영향 – 외형기형과 내장기형을 관찰한 결과는 Table IV과 같다. 외형기형 관찰 결과 1 µg/kg 투여군에서 제대탈장(hernia) 1례가 관찰되었으며 10 µg/kg 이상 투여군에서 왜소태자가 1수씩 발견되었고, 1000 µg/kg 투여군에서 부종태자가 1마리 관찰되었다. 내장기형검사 결과 1 µg/kg 투여군에서 심장이상(abnormal heart) 1수, 10 µg/kg 투여군에서 흉선위축(thymus atrophy), 왜소태자(dwarf) 각 1마리, 100 µg/kg 투여군에서 혈관계이상(abberant artery), 왜소태자 각 1수가 관찰되었으며, 1000 µg/kg 투여군에서 태반융합이 나타났는데 태자 1수는 전신부종, 1수는 왜소태자였다. 이들 기형은 통계적인 유의성이 없었으며 자연발생 수준이었다. 뇨관확장(dilatation of ureter)은 대조군에서 1수, 1 µg/kg 투여군에서 7수, 10 µg/kg 투여군에서 12수, 100 µg/kg 투여군에서 24수, 1000 µg/kg 투여군에서 8수가 관찰되었다. 이는 통계적인 유의성이 있었다. 그 원인은 약물에 의한 것으로 사료된다. 반복투여 독성시험의 결과 요로상피의 증생(urothelial hyperplasia)이 투여군 모두에서 나타났고, 용량상관성이 인정되며, 회복군의 경우도 변화의 정도는 경감되었으나 완전히 소실

되지 않아 시험물질로 인한 변화로 추정된다는 보고¹⁶⁾ 와도 일치하는 결과다. 따라서 모체투여시 약물이 혈액을 통해 태반을 통하여 자궁내의 태자의 모체내의 배설기능에 의해 오줌속에 모든 물질에 직접, 고농도로 접촉될수 있어 변화를 야기할수 있는 물질이 태자의 오줌속에 있다면 다른장기보다 쉽게 변화를 야기할 수 있어 요로상피의 증식으로 인한 요로확장으로 생각된다.¹⁶⁾

골격의 기형 및 골화정도를 관찰한 결과는 Table V와 같다. 관찰 결과 흉추, 요추, 흉골에서 여러변이(dumb-bell, butter fly, bipartite, asymmetry, hemivertebrae)와 골화지연이 관찰되었고 대조군과 비슷한 정도로 나타났다. 혼적늑골(rudimentacy)이 1예도 자연발생 수준이었다. 기형은 관찰되지 않았다.

수컷 및 암컷 모체의 장기증량에 미치는 영향 – 수컷을 부검하여 각 장기의 육안적 이상을 관찰하고 장기증량을 측정한 후 상대 장기증량을 산출한 결과는 Table VI과 같다. 간장의 무게는 투여용량에 따라 증가하는 경향을 보였고 최고용량 투여군에서는 통계적인 유의성이 있었다. 기타 장기인 심장, 비장, 흉선, 신장, 부신, 고환의 상대 장기증량은 유의성이 없었다.

임신 20일에 모체를 제왕절개하여 모체의 흉장, 복강의 내부장기의 육안적이상을 검사한 결과 특이한 소

Table V – Axial skeletal alterations of fetuses obtained from dams (F0) treated with DWP401 during premating to gestational period

Dose (µg/kg/day)	0	1	10	100	1000
No. of dams examined	7	10	11	11	7
No. of fetuses examined	55	73	76	81	52
No. of fetuses with anomaly/variation	46	55	65	64	50
Thoracic vertebrae					
dumb-bell	39	82	93	86	66
butterfly	2	8	4	7	11
bipartite	25	27	46	33	45
asymmetry	1	2	2	4	1
hemivertebrae	1	7	2	0	8
Sternebrae					
dumb-bell	2	4	0	2	1
hemisternebrae	7	8	11	1	3
asymmetry	4	9	9	11	8
Lumbar vertebrae					
dumb-bell	0	2	1	0	1
dumb-bell/asymmetry	0	2	0	0	0
bipartite	0	0	1	0	2
Ribs					
rudimentary	0	0	0	0	0

Table VI – Relative organ weight of male rats (F0) treated with DWP401 during premating to mating period (Unit: %)

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Thymus	Kidney		Adrenal gland		Testis	
						Lt	Rt	Lt	Rt	Lt	Rt
0	3.40 ± 0.220	0.31 ± 0.035	0.17 ± 0.022	0.41 ± 0.056	0.075 ± 0.0213	0.35 ± 0.037	0.36 ± 0.031	0.006 ± 0.0019	0.007 ± 0.0042	0.35 ± 0.023	0.34 ± 0.026
1	3.57 ± 0.433	0.32 ± 0.045	0.18 ± 0.021	0.49 $\pm 0.063^*$	0.087 ± 0.0179	0.38 ± 0.041	0.39 ± 0.039	0.006 ± 0.0024	0.006 ± 0.0021	0.35 ± 0.050	0.34 ± 0.045
10	3.39 ± 0.369	0.33 ± 0.040	0.19 ± 0.096	0.45 $\pm 0.058^*$	0.088 ± 0.0195	0.36 ± 0.035	0.36 ± 0.039	0.005 ± 0.0023	0.005 ± 0.0023	0.33 ± 0.046	0.33 ± 0.028
100	3.67 ± 0.415	0.33 ± 0.030	0.18 ± 0.018	0.41 ± 0.040	0.075 ± 0.0175	0.36 ± 0.034	0.36 ± 0.030	0.005 ± 0.0017	0.005 ± 0.0014	0.32 ± 0.025	0.34 ± 0.063
1000	3.61 $\pm 0.364^*$	0.31 ± 0.031	0.19 ± 0.019	0.40 ± 0.035	0.072 ± 0.0186	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.027	0.006 ± 0.0016	0.006 ± 0.0019	0.32 ± 0.023	0.33 ± 0.023

*Statistically different from control group ($P < 0.05$)

Table VII – Relative organ weight of dams (F0) treated with DWP401 during premating to gestational period (Caesarean section group) (Unit: %)

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Thymus	Kidney		Adrenal gland		Ovary	
						Lt	Rt	Lt	Rt	Lt	Rt
0	3.96 ± 0.113	0.25 ± 0.034	0.25 ± 0.023	0.40 ± 0.039	0.06 ± 0.022	0.25 ± 0.018	0.24 ± 0.021	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.004	0.02 ± 0.006	0.02 ± 0.005
1	3.7 ± 0.262	0.25 ± 0.024	0.21 ± 0.028	0.44 ± 0.134	0.07 ± 0.017	0.23 ± 0.021	0.23 ± 0.021	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.006	0.02 ± 0.006
10	3.90 ± 0.317	0.25 ± 0.015	0.24 ± 0.046	0.41 ± 0.031	0.08 ± 0.026	0.25 ± 0.025	0.25 ± 0.022	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.002	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.004
100	3.98 ± 0.314	0.24 ± 0.013	0.23 ± 0.020	0.40 ± 0.039	0.08 ± 0.045	0.26 ± 0.021	0.26 ± 0.021	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.004	0.02 ± 0.006	0.02 ± 0.005
1000	3.99 ± 0.163	0.23 ± 0.019	0.23 ± 0.027	0.42 ± 0.126	0.07 ± 0.009	0.24 ± 0.020	0.23 ± 0.011	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.008

Table VIII – Relative organ weight of dams (F0) treated with DWP401 during premating to lactating period (Delivery group) (Unit: %)

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Thymus	Kidney		Adrenal gland	
						Lt	Rt	Lt	Rt
0	4.57 ± 0.415	0.35 ± 0.042	0.19 ± 0.022	0.56 ± 0.141	0.06 ± 0.038	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.022	0.1 ± 0.002	0.01 ± 0.002
1	4.73 ± 0.249	0.40 $\pm 0.069^*$	0.20 ± 0.03	0.66 ± 0.223	0.07 ± 0.034	0.34 ± 0.014	0.34 ± 0.018	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.003
10	4.28 ± 0.525	0.35 ± 0.038	0.20 ± 0.037	0.53 ± 0.079	0.07 ± 0.033	0.34 ± 0.052	0.35 ± 0.035	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.004
100	4.53 ± 0.353	0.34 ± 0.039	0.22 ± 0.047	0.54 ± 0.103	0.06 ± 0.034	0.35 ± 0.039	0.36 ± 0.032	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.004
1000	4.81 ± 0.48	0.34 ± 0.058	0.20 ± 0.031	0.53 ± 0.143	0.10 ± 0.09	0.33 ± 0.028	0.33 ± 0.027	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.004

*Statistically different from control group ($P < 0.05$)

견이 관찰되지 않았으며, 태자의 이상과 임신지수를 구하고 모체의 장기 중 간장, 신장, 비장, 심장, 흉선, 폐장, 난소 및 부신의 상대중량을 산출한 결과 대조군과 비교시 통계적인 유의성이 없었다(Table VII).

이유후 F1(차산자)를 격리시키고 모체를 부검하여 자궁 및 난소를 관찰하고 각 내부장기의 이상을 관찰한 후 무게를 측정하여 상대중량을 산출하여 얻은 결과는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군의 심장무게를 제외한 기타 장기

Table IX – Physical development of F1 rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period (Unit: Number of pups)

Dose ($\mu\text{g/kg/day}$)	Ear detachment			Incisor eruption			Eye opening			Testis descend- ing	Vagina opening
	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total		
0	80/80 (100)	66/66 (100)	146/146 (100)	39/39 (100)	40/40 (100)	79/79 (100)	38/39 (97)	40/40 (100)	78/79 (99)	39/39 (100)	37/40 (93)
1	64/66 (97)	74/83* (89)	138/147* (94)	43/43 (100)	48/48 (100)	91/91 (100)	38/42 (90)	42/43 (98)	69/85 (94)	41/41 (100)	40/41 (98)
10	64/69* (93)	77/81 (95)	141/150* (94)	46/46 (100)	48/48 (100)	94/94 (100)	47/47 (100)	47/47 (100)	94/94 (100)	45/45 (100)	43/46 (93)
100	65/65 (100)	60/60 (100)	125/125 (100)	32/32 (100)	32/32 (100)	64/64 (100)	31/32 (97)	32/32 (100)	63/64 (98)	32/32 (100)	30/32 (94)
1000	56/56 (100)	60/60 (100)	116/116 (100)	34/34 (100)	39/39 (100)	73/73 (100)	34/34 (100)	38/39 (97)	72/73 (99)	33/33 (100)	34/34 (100)

(): % of pups

*Statistically different from control group ($P < 0.05$)

Table X – Reflex test of F1 rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period (Unit: Number of pups)

Dose ($\mu\text{g/kg/day}$)	0	1	10	100	1000
Below 5.0 sec/Over 5.0 sec					
Surface righting reflex	Male	39/2	41/2	38/7	40/1
	Female	40/6	38/6	40/6	40/6
	Total	79/8	79/8	78/13	80/7
Below 15.0 sec/Over 15.0 sec					
Negative geotaxis	Male	39/0	43/0	38/0	36/2
	Female	40/0	42/0	40/0	36/1
	Total	79/0	85/0	78/0	72/3
Positive/Negative					
Acoustic reflex	Male	10/0	11/0	10/0	9/0
	Female	10/0	11/0	10/0	9/0
	Total	20/0	22/0	20/0	18/0
Positive/Negative					
Iris reflex	Male	10/0	11/0	10/0	9/0
	Female	10/0	11/0	10/0	9/0
	Total	20/0	22/0	20/0	18/0
					20/0

는 큰 변화가 관찰되지 않았다(Table VIII).

태자의 신체 발육에 미친 영향 – 신체발육에 관한 실험으로 이개개전 절치맹출, 안검개열, 정소하강, 질개구에 대한 실험을 한 결과는 Table IX과 같다.

이개개전 검사결과는 대조군, 100 $\mu\text{g/kg}$ 이상 투여군의 새끼는 100% 양성을 보였으나 1 $\mu\text{g/kg}$, 10 $\mu\text{g/kg}$ 투여군 새끼는 약 94% 양성반응을 보였고 이는 통계적으로 유의성이 있었다. 생후 5일령에는 음성반응을 보인 새끼가 모두 양성반응을 보였다. 절치맹출 검사 결과는 모든군에서 100%의 양성을 보였다. 안검개열 검사 결과는 전투여군에서 94% 양성을 보였

으며 생후 16일에는 모두 양성반응을 보였다. 정소하강 검사 결과는 모든군에서 100%의 양성을 보였다. 질개구 검사 결과는 전투여군에서 93% 양성을 보였으며 생후 35일째 모두 양성반응을 보였다.

태자의 반사기능에 미치는 영향 – 출산자수를 조정한 다음 모든 출산자에 대해 정향반사 및 부주지성, 동공반사 및 청각검사를 실시한 결과는 Table X와 같다. 정향반사 및 부주지성실험은 대조군과 비교시 통계적인 유의성은 없었으며, 청각검사 및 동공반사시험은 대조군을 포함한 모든군에서 100%의 양성을 보였다.

태자의 감각, 운동, 정동성, 학습기능에 미치는 영향

Table XI – Effect of DWP401 on the locomotor activity of F1 rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)		0	1	10	100	1000
Male	No. of animals	10	11	10	9	10
	Distance traveled (inch)	4854.71 ± 2827.95	4106.95 ± 2700.74	2805.36 ± 1920.38	5368.93 ± 1929.58	5054.71 ± 2126.75
	Resting time (sec)	452.20 ± 215.82	539.00 ± 264.72	650.80 ± 210.07	399.67 ± 141.84	451.40 ± 143.59
Female	No. of animals	10	11	10	9	10
	Distance traveled (inch)	5553.57 ± 2388.89	4450.14 ± 2029.24	4047.32 ± 2179.25	5707.12 ± 1571.82	4355.30 ± 2082.05
	Resting time (sec)	400.90 ± 221.10	468.64 ± 178.17	537.90 ± 196.66	755.67 ± 1260.98	480.10 ± 189.14

Table XII – Water filled simple t-maze test of F1 rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period
(Unit: sec)

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)		0	1	10	100	1000
Male	No. of rats	10	11	10	9	10
	Right	25.10 ± 30.130	26.01 ± 14.835	29.08 ± 17.026	18.19 ± 9.906	18.56 ± 11.439
	Memory	21.75 ± 11.470	28.06 ± 20.783	17.19 ± 10.652	23.08 ± 11.769	21.53 ± 12.265
Female	Reverse	20.85 ± 11.538	26.45 ± 12.574	18.17 ± 13.214	16.45 ± 43.531	14.84 ± 10.823
	No. of rats	10	11	10	9	10
	Right	20.85 ± 16.821	14.05 ± 8.025	15.64 ± 7.505	12.68 ± 4.558	14.12 ± 7.996
	Memory	16.13 ± 8.190	12.06 ± 3.914	30.53 ± 36.815	16.44 ± 8.269	13.69 ± 6.261
	Reverse	19.65 ± 10.135	27.46 ± 15.290	14.33 ± 9.139	10.61 ± 3.694	15.46 ± 15.492

– 자발운동량 검사시 총 이동거리 및 수미로시험을 실시하여 목표지점까지의 도달시간을 측정하여 평균 도달시간은 각 투약군에 있어 대조군과 비교할 때 유의한 차이를 보이지 않았다(Table XI, Table XII). 핫플레이트시험에서 최고용량투여군 차산자 1마리를 제외하고는 모두 양성이었다(Table XIII). 수동회피반응 검사로 빛, 소리 및 전기자극을 피하는 시간을 측정하였을 때 각 투약군에 있어 대조군과 비교할 때 유의한 차이를 보이지 않았다(Table XIV, Table XV).

출산자의 생식능에 미치는 영향 – 수정능, 수태능검사 결과는 Table XVI와 같다. 1차 및 2차에 걸친 교배결과 교배율은 100%이었으며, 교배후 수컷부검소견을 종합하면 수컷 수태능에 미치는 약물의 영향은 인정되지 않았다. 교배가 확인된 F1 암컷은 임신 20일에 부검한 결과 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군 1수 및 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Table XIII – Hot plate test of F1 rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period
(Unit: Number of pups)

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	1	10	100	1000
Male	10/0 ¹⁾	11/0	10/0	9/0	10/0
Female	10/0	11/0	10/0	9/0	9/1
Total	20/0	22/0	20/0	18/0	19/1

¹⁾below 30 sec/over 30 sec

투여군 1수가 비임신으로 확인되었다. 생식능시험군에 속한 F1 암수동물을 10주령 이후에 교배시켰을 때 약물에 의한 임신유지, 교배율 및 임신율에 미치는 영향은 인정되지 않았다. 임신 20일에 부검하여 F1 모체 장기에 대해 육안적검사와 임신지수를 산출하였다. 각 장기에 대해 육안적검사 결과 최고용량투여군 F1 모

Table XIV – Passive avoidance test of F1 male rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	1	10	100	1000
No. of animals	8	11	10	9	10
Average (sec)					
from start	147.8 \pm 38.92	137.7 \pm 48.58	138.3 \pm 59.55	143.2 \pm 58.06	106.9 \pm 65.16
from light	38.80 \pm 14.71	37.01 \pm 18.22	41.66 \pm 21.82	30.18 \pm 16.77	36.40 \pm 21.68
from sound	11.84 \pm 6.56	10.83 \pm 6.64	15.54 \pm 7.39	8.72 \pm 5.87	14.39 \pm 6.78
from shock	4.82 \pm 4.46	2.53 \pm 1.82	4.90 \pm 3.08	2.30 \pm 3.05	5.24 \pm 2.71
No. of performance per ten trials					
Pre-stimulation transfer	4.8 \pm 2.4	3.7 \pm 2.5	3.4 \pm 2.3	4.7 \pm 2.6	2.0 \pm 2.2
Avoidances	1.6 \pm 1.6	1.7 \pm 1.2	1.0 \pm 1.0	2.2 \pm 2.4	0.9 \pm 1.2
Escapes	1.6 \pm 0.9	1.4 \pm 0.8	2.0 \pm 0.7	1.0 \pm 0.9	1.7 \pm 1.1
No. transfers	1.4 \pm 2.4	2.8 \pm 2.7	3.3 \pm 3.2	1.8 \pm 2.7	4.1 \pm 3.4
Late transfers	0.6 \pm 0.9	0.4 \pm 0.7	0.2 \pm 0.4	0.3 \pm 0.7	0.3 \pm 0.5

Table XV – Passive avoidance test of F1 female rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0	1	10	100	1000
No. of animals	8	11	10	9	9
Average (sec)					
from start	128.6 \pm 57.87	140.8 \pm 40.33	164.3 \pm 45.32	156.3 \pm 50.80	120.0 \pm 57.59
from light	35.87 \pm 20.23	37.34 \pm 16.56	41.71 \pm 18.56	44.88 \pm 23.12	31.63 \pm 12.26
from sound	12.44 \pm 8.19	11.31 \pm 6.31	13.32 \pm 7.69	15.26 \pm 8.11	12.51 \pm 5.92
from shock	3.53 \pm 3.22	3.22 \pm 3.05	3.15 \pm 2.28	3.59 \pm 2.24	5.05 \pm 3.51
No. of performance per ten trials					
Pre-stimulation transfer	3.5 \pm 2.1	3.9 \pm 2.6	4.1 \pm 2.6	3.6 \pm 2.4	3.3 \pm 3.6
Avoidances	1.1 \pm 1.2	1.9 \pm 1.0	1.7 \pm 1.4	1.6 \pm 1.1	1.1 \pm 1.4
Escapes	1.6 \pm 1.1	1.4 \pm 0.7	1.9 \pm 1.1	2.0 \pm 1.3	1.4 \pm 0.7
No. transfers	3.0 \pm 2.6	2.6 \pm 2.4	1.3 \pm 1.5	2.4 \pm 2.4	3.7 \pm 3.8
Late transfers	0.8 \pm 1.2	0.2 \pm 0.4	0.7 \pm 0.8	0.3 \pm 0.5	0.4 \pm 0.5

Table XVI – Effect of DWP401 on the fertility of F1 rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Male			Female		
	No. of mated	Copulation index (%)	Fertility index (%)	No. of mated	Copulation index (%)	Pregnant index (%)
0	10	10/10 (100)	10/10 (100)	10	10/10 (100)	10/10 (100)
1	11	11/11 (100)	11/11 (100)	11	11/11 (100)	11/11 (100)
10	10	10/10 (100)	10/10 (100)	10	10/10 (100)	9/10 (90)
100	9	9/9 (100)	9/9 (100)	9	9/9 (100)	8/9 (89)
1000	10	10/10 (100)	10/10 (100)	10	10/10 (100)	10/10 (100)

체 1수의 우측 하부 피하부에 탄력이 있는 황색의 mass($3 \times 2 \text{ cm}^3$ 정도) 이외에는 특이소견이 관찰되지 않았다. F1 모동물의 제왕절개시 황체수, 착상수, 흡수

수, 사망태자수, 생존태자수, 착상율, 성비, 생존태자의 체중을 측정한 결과는 Table XVII와 같다. 황체수, 착상수, 흡수수, 사망태자수, 생존태자수, 착상율, 성비,

Table XVII – Reproductive performance of F1 dams obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period

Dose ($\mu\text{g/kg/day}$)	No of dams	No. of cor- pora lutea	No. of implanta- tion	Implanta- tion rate (%)	Resorption			No. of live fetus	Preg- nancy rate (%)	M/F ratio	Weight of fetus
					Early	Late	Total				
0	9	19.14 ± 4.100	15.00 ± 2.345	78.4	7	1	8	14.11 ± 2.368	94.1	73/54 (1.35)	3.52 ± 0.241
1	11	20.55 ± 3.588	15.55 ± 3.417	75.7	13	0	13	14.90 ± 2.283	89.5	82/71 (1.15)	3.70 ± 0.182
10	9	19.00 ± 4.472	14.44 ± 1.236	76.0	9	2	11	12.88 ± 2.532	91.5	61/58 (1.05)	3.57 ± 0.254
100	8	21.63 ± 4.069	16.00 ± 2.000	74.0	4	0	4	15.43 ± 1.902	95.3	62/60 (1.03)	3.61 ± 0.170
1000	8	20.25 ± 4.496	17.00 ± 2.236	84.0	6	0	6	16.14 ± 1.865	93.4	67/60 (1.12)	3.85 ± 0.650

Table XVIII – Relative organ weight of F1 female rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period

Dose ($\mu\text{g/kg/day}$)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Thymus	Kidney		Adrenal gland		Ovary	
						Rt	Lt	Rt	Lt	Rt	Lt
0	3.54 ± 0.319	0.25 ± 0.023	0.19 ± 0.030	0.42 ± 0.048	0.09 ± 0.036	0.24 ± 0.030	0.24 ± 0.023	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.005
1	3.47 ± 0.282	0.27 ± 0.024	0.18 ± 0.030	0.44 ± 0.034	0.08 ± 0.023	0.23 ± 0.012	0.23 ± 0.015	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.008
10	3.47 ± 0.282	0.26 ± 0.020	0.19 ± 0.056	0.42 ± 0.045	0.09 ± 0.036	0.24 ± 0.021	0.24 ± 0.029	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.007	0.02 ± 0.006
100	3.37 ± 0.308	0.24 ± 0.037	0.17 ± 0.035	0.40 ± 0.062	0.09 ± 0.036	0.23 ± 0.022	0.23 ± 0.019	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.004	0.02 ± 0.006	0.02 ± 0.006
1000	3.58 ± 0.415	0.26 ± 0.038	0.18 ± 0.040	0.42 ± 0.051	0.08 ± 0.023	0.23 ± 0.030	0.23 ± 0.024	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.004	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.004

Table XIX – Relative organ weight of F1 male rats obtained from dams treated with DWP401 during premating to lactating period

Dose ($\mu\text{g/kg/day}$)	Liver	Heart	Spleen	Lung	Thymus	Kidney		Adrenal gland		Testis	
						Rt	Lt	Rt	Lt	Rt	Lt
0	3.36 ± 0.27	0.35 ± 0.034	0.17 ± 0.023	0.46 ± 0.106	0.08 ± 0.032	0.31 ± 0.035	0.30 ± 0.035	0.004 ± 0.006	0.005 ± 0.0017	0.34 ± 0.036	0.34 ± 0.036
1	3.83 $\pm 0.19^*$	0.31 ± 0.039	0.17 ± 0.011	0.43 ± 0.065	0.08 ± 0.030	0.33 ± 0.032	0.34 $\pm 0.033^*$	0.005 ± 0.0020	0.005 ± 0.0019	0.33 ± 0.024	0.32 ± 0.028
10	3.69 $\pm 0.351^*$	0.31 ± 0.040	0.17 ± 0.012	0.45 ± 0.073	0.08 ± 0.021	0.34 $\pm 0.033^*$	0.34 $\pm 0.026^*$	0.005 ± 0.0021	0.005 ± 0.0022	0.33 ± 0.029	0.34 ± 0.025
100	3.48 ± 0.32	0.30 ± 0.034	0.16 ± 0.013	0.48 ± 0.113	0.08 ± 0.020	0.33 ± 0.029	0.32 ± 0.019	0.01 ± 0.0015	0.01 ± 0.0017	0.34 ± 0.032	0.34 ± 0.021
1000	3.73 $\pm 0.29^*$	0.32 ± 0.040	0.17 ± 0.015	0.45 ± 0.97	0.01 ± 0.050	0.33 ± 0.028	0.33 $\pm 0.027^*$	0.006 ± 0.0025	0.006 ± 0.0026	0.32 ± 0.022	0.31 ± 0.018

*Statistically different from control group ($P < 0.05$)

생존태자의 체중은 약간 증가하는 경향을 보였으나 대조군에 비해 유의성은 없었다. F1 임신 암컷동물 부검 시 측정한 각 장기의 상대무게는 Table XVIII과 같다.

F2 태자의 외표이상 – 대조군을 포함한 전 투여군에

서 외형이상이 발견되지 않았다. 임신 20일째에 F1모체를 부검하여 외형이상을 관찰한 결과는 대조군에서 왜소태반 1개, 왜소태자 3수, 1 $\mu\text{g/kg}$ 투여군에서 후기 사망 1수, 왜소태자 1수, 10 $\mu\text{g/kg}$ 투여군은 왜소태자

4수와 꼬리없는 태자(acudate) 1수가 관찰되었으며, 100 µg/kg투여군에서는 후기사망 1수와 왜소태자 1수가 1000 µg/kg투여군은 왜소태자 1수와 꼬리없는 태자 1수가 관찰되었다.

F1 수컷의 교배후 부검 – F1 수컷 부체를 임신확인 후 적당한 시기에 부검하여 전 장기를 육안으로 관찰한 결과 10 µg/kg투여군 1수의 복강내에서 조직이 치밀하고 딱딱한 황색의 mass($3 \times 1 \text{ cm}^3$ 정도)를 발견하였다. 100 µg/kg투여군 1수의 우측 신장 신우내에 맑은 수액이 차 있었다. F1 수컷동물 부검시 측정한 각 장기의 상대무게는 Table XIX와 같다.

결 론

DWP401을 SD 랫드에 수컷은 교배 전 63일전부터 투여하기 시작하여 교배 확인 후 도살되기 전날까지, 암컷은 교배 전 14일전부터 투여하기 시작하여 임신 확인 후 제왕절개군은 임신 20일째까지, 분만군은 분만후 21일째까지 전 시험기간 동안 매일 피하 주사하여 수태능, 태자와 신생자 발달 및 모체기능에 미치는 영향에 관한 시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 모체 및 부체에 있어서 일반증상, 체중 및 사료 섭취량: 최고용량투여군(1000 µg/kg/day)에서 체중증가율이 수컷의 경우 약물투여 3주 후부터, 암컷의 경우는 투여 2주 후부터 유의성 있게 증가하였다. 일반증상, 사료섭취량은 약물투여에 의한 영향은 없었다.
2. 모체 및 부체의 부검결과: 최고용량투여군에서 간장의 상대무게가 유의성있게 증가하였다.
3. 모체의 교배, 임신, 분만, 수유에 미치는 영향: 최고용량투여군에서 임신기간이 통계적으로 유의성 있게 길어졌다. 약물투여에 의한 교배 임신, 수유에 미치는 영향은 확인되지 않았다.
4. 출산자에 미치는 영향: 최고용량투여군에서 분만율 저하, 생존태자수 감소, 사산자수가 증가하였으며 새끼를 잡아먹는 현상이 관찰되었다.
5. 태자의 외형기형, 내장기형, 골격기형에 미치는 영향: 제왕절개군의 태자관찰에서 외형, 내장 및 골격기형에 미치는 영향은 인정되지 않았으며, 분만군에서 외형이상 및 F1의 신체발육, 행동발달에 미치는 영향도 관찰되지 않았다.
6. 차산자의 생식능에 미치는 영향: 수컷의 수정능검사 및 암컷의 수태능검사, 임신유지에 미치는 영향 및

F2 태자의 외형이상에도 영향이 없었다.

결론적으로 재조합인간상피세포성장인자(rhEGF, DWP401)는 수태능, 태자와 신생자 발달 및 모체기능에 미치는 영향에 관한 시험에서 호르몬의 생체기능이 상에 의한 분만지연으로 태자의 체중증가에 의한 난산, 난산으로 인한 사산자수의 증가, 생존태자 수 감소, cannibalism과 태자의 요로상피의 증식으로 인한 뇨관확장 이외의 태자의 기형 및 차산자의 생식 능에 미치는 영향에 관한 시험에서 생식발생독성을 발견되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 신약개발지원사업으로 수행되었습니다.

문 헌

- 1) Cohen, S. Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelip opening in the newborn animal. *J. Biol Chem.* **237**, 1555 (1962).
- 2) Cohen, S. Elliott G. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J. Invest. Dermatol.* **40**, 1 (1963).
- 3) Gregory, H. and Preston, B. M.: The primary structure of human urogastron Int. *Peptide Proteins Res.* **9**, 107 (1977).
- 4) Makino, K., Morimoto M., Nishi M., Sakamoto S., Tamura A., Inooka H., Akasaka K.: protein nuclear magnetic resonance study on the solution conformation of human epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8741 (1987).
- 5) Uchihashi M., Hirata Y., Fujita T., Matsukura S.: Age-related decrease of urinary excretion of human epidermal growth factor (HEGF). *Izata et al life science.* **31**, 679 (1982).
- 6) Carpenter, G. and Cohen, S. Epidermal growth factor. *J. biol. Chem.* **265**, 7709 (1990).
- 7) Carpenter, G. and Wahl, M. I. in peptide growth factors and their receptors. Sporn, M. and Roberts, A.B. eds. Springer-Verlag, Berlin, 69 (1990).
- 8) Reim, M., Busse S., Leber M., Schulz C : Effect of

- epidermal growth factor in severe experimental alkli burns, *Ophthalmic Res.* **20**, 327 (1988).
- 9) Franklin, T. J. Gregory H, Morris W. P : Acceleration of wound healing by recombinant human urogestrone (epidermal growth factor): *J. Lab. Clin. Med.* **108**, 103 (1986).
- 10) Konturek, S. J., Dembinski, A. Warzecha, Z. Brzozowski, T. Gregory, H : Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats, *Gastroenterology* **94**, 1300 (1988).
- 11) Read, L. C. Summer, L. Gale, S. M. George-Nascimento, C. Ballard, F. J. Wallace, J. C : Properties of synthetic-gene recombinant human epidermal growth factor: comparison with the natural growth factor from human urine and milk, *J. endocrinol.* **109**, 245 (1986).
- 12) 식품의약품안전본부 고시 제96-8호(의약품등의) 독성시험법기준 : 96. 4. 16.
- 13) Inouye, M. : Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S. *Cong. Anom.*, **16**, 171 (1976).
- 14) Wilson, J. G. and Warkany, J. : Teratology, Principles and techniques. The university of Chicago press. 1 (1972).
- 15) Nishimura, K. : A microdissection method for detecting thoracic visceral malformation in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.*, **14**, 23 (1974).
- 16) 송시환, 강부현, 신천철, 김희연, 강진석, 심점순, 한상섭, 노정구, Recombinant Human Epidermal Growth Factor (DWP401)의 마우스를 이용한 피하투여 아급성독성시험. 응용약물학회지, **4**, 138 (1996).