

Sprague-Dawley 랫드를 이용한 발생독성시험의 기초자료연구

김종춘* · 이상준 · 배진숙 · 박종일 · 김용범 · 정문구
한국화학연구원 안전성연구센터 생식독성실

Historical Control Data for Developmental Toxicity Study in Sprague-Dawley Rats

Jong-Choon Kim*, Sang-Joon Lee, Jin-Sook Bae, Jong-Il Park,
Yong-Beom Kim and Moon-Koo Chung

Reproductive Toxicology Division, Toxicology Research Center, Korea Research Institute of
Chemical Technology, P.O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea
(Received May 9, 2001)
(Accepted June 4, 2001)

ABSTRACT : The background control data were compiled from rat developmental toxicity studies conducted at Toxicology Research Center, KRICT during the 1993~1999 period. These data were assembled in order to provide background information for the maternal and fetal data collected in 13 developmental toxicity studies using Sprague-Dawley rats. A total of 325 mated females were used in these studies during the seven-year period and overall pregnancy rate of these females was 93.8%. The present background control data included body weights, food consumption, hematological values, and organ weights of pregnant females, caesarean section data, and fetal examination data. These data can be used not only as a historical database for the meaningful interpretation of data from reproductive and developmental toxicity studies, but also as a contribution to biological characterization of Sprague-Dawley rats.

Key Words : Background control data, Teratogenicity study, Maternal and fetal indices, Rodent

I. 서 론

1960년대 초에 유럽에서 발생한 탈리도마이드(thalidomide) 복용에 따른 기형아분만과 최근 들어 세계적으로 문제되고 있는 환경오염물질에 의한 내분비 관련질환의 증가는 화학물질에 대한 안전성평가의 중요성을 일깨워 주는 대표적인 사건들이다(Speirs, 1962; Sonnenschein과 Soto, 1998). 화학물질의 노출에 의한 위해성은 사람뿐만 아니라 생태계 전반에 많은 부작용을 야기하고 있는 현실을 감안해 볼 때 과학적이고도 적절한 안전성 평가는 매우 시급하고도 중요한 연구과제라고 할 수 있겠다. 화학물질의 안전성 평가시험에서는 질병적, 유전적 및 환경적으로 엄격히 제어된 양질의 실험동물을 사용하여 시험하여야 하고, 또한 시험물질에 의해 나타나는 독성학적 변화를 신뢰성있게 평가하기 위해서는 각 실험실마다 사용하는 동물종 및 계통에 대한 기초자료를 확보하는 것이 필수적

인 과제라 할 수 있다. 생식독성(reproductive toxicology) 시험의 경우 체중이나, 사료섭취량, 장기중량, 임신황체수, 착상수, 흡수배지수, 생존태자의 수와 체중 및 형태학적 변화 등의 생물학적 특성치들은 동물의 주령이나 계통, 온도, 습도, 조명, 사육상자의 크기, 사료, 물, 동물의 취급상태, 시험방법이나 관찰방법 또는 측정방법 등에 따라 많은 변동이 있을 수 있다. 뿐만 아니라 동일한 동물 종 및 계통과 동일한 주령의 실험동물을 이용한 시험에서도 각 실험실마다 시험결과에 다소의 차이가 발견되는데, 이러한 변이(variations)를 실험실간 차이(inter-laboratory differences)라고 한다. 따라서 독성시험에서 얻어지는 시험결과의 의미 있는 해석을 위해서는 이러한 실험실간 또는 시험간의 변이를 이해하고 시험결과를 직접적으로 비교할 수 있는 historical control data의 확보가 매우 중요하며, 이로 인하여 국내외의 많은 연구기관에서는 각 시험들의 기초자료를 확보하고자 많은 노력을 하고 있다.

랫드는 번식능력이 우수하고 세대기간이 짧으며 시험기초자료가 풍부하기 때문에 의약품, 농약, 식품첨가제, 의료

*To whom correspondence should be addressed

용구, 산업화학물질 등 신물질의 안전성 평가시 가장 많이 이용되고 있는 실험동물이다(Baker 등, 1979; Harkness와 Wagner, 1995). CrI:CD®(SD) 랫드는 1950년대에 Charles River Laboratories(CRL)에서 확립된 교잡혈통으로서 현재 약 10여개 국가의 여러 생산시설에서 활발하게 생산되고 있다. 본 연구실에서는 Charles River Japan, Inc.으로부터 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 입수하여 당 연구소의 실험동물육종실에서 번식·육종시킨 특정병원체부재(specific pathogen free, SPF) 동물을 생식독성시험에 사용하고 있다. 본 연구실에서는 이미 지난 1992년에 랫드 발생독성시험에 대한 기초자료(김 등, 1992)를 보고한 바 있으나 그 때의 조사항목은 현재의 가이드라인과 많은 차이점이 있고 또한 표본수가 너무 적은 단점이 있어서 보다 세부적이고 광범위한 기초자료를 확보할 필요성이 제기되어 왔다.

본 연구는 랫드를 이용한 배·태자 발생독성시험의 기초자료를 확보하고자 수행하였으며, 본 연구실에서 지난 7년간 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 수행한 발생독성시험의 대조군 결과중 임신동물의 체중, 사료섭취량, 혈액학적 및 장기중량, 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 사망태자수, 흡수배자수, 생존태자의 성별과 체중 및 태반중량 그리고 생존태자의 형태학적 검사결과를 종합하였다. 상기 시험들은 식품의약품안전청의 의약품등의 독성시험기준과 식품약품안전청의 비임상시험에 대한 GLP(Good Laboratory Practice) 기준에 준하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

한국화학연구원 안전성연구센터의 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100번지)에서 입수한 특정병원체부재 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 9주령의 암수동물을 입수한 후 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 암수동물을 2:1로 교배시켰다. 익일 질도말에서 정자가 확인된 동물을 교미동물로 판정하였고, 이 날을 임신 0일로 산정하였다.

2. 사육환경

상기 시험들은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 환기 횟수 10~20회/hr., 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 교배기간중에는 스테인레스제 방사육상자(210 W×350 L×180 H mm)에 암수 2:1로 수용하였고, 교미가 확인된 동물은 폴리카보네이트 사육상자(260 W×420 L×180 H mm)에 개체별로 수용하였다. 시험기간중 사료는 방사선 조사

(25 kGy)로 멸균한 실험동물용 고품사료[제일사료(주), 대전광역시 대덕구 대화동 40-36]를, 그리고 물은 자외선 유수살균기로 소독한 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 상기 시험들은 미국 실험동물관리인증협회(AAALAC, American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care)로부터 인증된 시설에서 수행하였고, 모든 시험방법은 기관내 동물관리사용위원회(IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 검토되었다.

3. 일반증상관찰

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

4. 체중측정

각 어미동물에 대하여 임신 0, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 및 20일째에 체중을 측정하였다.

5. 사료섭취량 측정

각 어미동물에 대하여 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다. 단, 임신 20일째에는 제왕절개로 인하여 임신 19일째에 사료급여 후 익일 잔량을 측정하였다.

6. 혈액학적 검사

혈액학적 검사를 위해 24마리의 임신동물들을 두 군으로 나눈 다음 한 군은 임신 0, 6, 12, 18일째에, 다른 한 군은 임신 3, 9, 15 및 21일째에 반복 채혈하였으며, 채혈 전에 절식은 실시하지 않았다. 마취를 하지 않은 상태의 임신동물에서 14시에서 15시 사이에 needle catheter를 이용하여 미정맥으로부터 EDTA-2K가 처리된 CBC bottle(녹십자공업)에 약 0.5 ml의 혈액을 직접 채집하였다. 채혈 후 20분 이내에 자동혈구계측장치(Coulter Counter Electronics, USA)를 사용하여 백혈구수(white blood cell), 적혈구수(red blood cell), 혈소판수(platelet), 혈색소농도(hemoglobin concentration), 적혈구 용적(hematocrit), 평균 적혈구용적(mean corpuscular volume), 평균 적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin) 및 평균 적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration)를 측정하였다. 백혈구 감별계산은 도말표본을 만들어서 Wright 염색을 한 다음 광학현미경하에서 표본당 200개의 백혈구를 관찰하여 얻은 백분율을 이용하여 혈액 리터당 백혈구수로 환산하였다.

7. 부검 및 장기중량측정

각 임신동물들을 임신 20일째에 CO₂ 마취하에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 이 때 뇌, 심장, 간장, 비장, 신장, 부신 및 난소의 습중량을 측정하였고, 부검시 체중에 대한 상대장기중량을 계산하였다.

8. 제왕절개

각 암컷동물들을 임신 20일째에 제왕절개하여 자궁과 난소를 적출한 다음 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수배자수, 사망태자수, 생존태자수 등을 조사하였다. 흡수 생존태자의 항문-성기간 거리(anogenital distance)는 caliper를 이용하여 항문과 생식유두간의 거리를 측정하였다. 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 (Yamada 등, 1985). 생존태자와 태반은 개체별로 중량을 측정하였고, 태자의 성별을 확인하였다.

9. 태자의 형태학적 검사

생존태자를 자궁에서 적출한 후 구개열(cleft palate)을 포함한 외표이상의 유무에 대하여 관찰하였고 왼쪽 자궁 각의 난소측에서 번호를 매겨 흡수번호는 골격검사에 그리고 짝수번호는 내장검사에 제공하였다. 골격검사는 각 배당 생존태자를 5% 포르말린에 고정한 다음 변형된 Dawson법(Dawson, 1926)에 따라 골격표본을 제작하여 실시하였다. 내부장기검사는 각 배당 생존태자를 Bouin액에 고정한 다음 두부 및 복부는 Wilson법(Wilson, 1965), 흉부는 Nishimura법(Nishimura, 1974)에 따라 수행하였다. 태자의 외형과 내부장기 및 골격검사이 형태학적 이상은 기형(malformation), 변이(variation) 또는 발육지연(retardation)으로 분류하였으며, 이상소견에 대한 용어는 Wise 등(1997)의 용어통일안을 기준으로 하여 표기하였다.

10. 시험자료의 정리

모동물의 체중, 사료섭취량, 장기중량, 임신율, 임신황체수, 착상수, 흡수율, 태자사망률, 생존태자의 성비 및 체중에 대한 결과는 각 시험에서 얻어진 결과의 평균치로 표기하였고, 임신기간중의 혈액학치 변화는 평균±표준편차

로 정리한 다음 일원배치분산분석과 Dunnett 다중비교법으로 통계분석하였다. 생존태자의 수와 외표, 내부장기 및 골격의 형태학적 이상은 각 시험에서 얻어진 총 태자수에 대한 빈도수로 정리하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 체중

임신기간중의 체중변화는 Table 1에 요약해 놓았다. 모동물의 체중은 임신의 진행에 따라 점진적으로 증가하였고, 임신 전기간 동안 평균 141.2 g이 증가한 것으로 나타났다. 임신기간중 일삼분기(first trimester)의 체중은 임신 0일째의 체중에 비해 약 15%가 증가하였고, 이삼분기(second trimester)의 체중은 임신 0일째에 비해 약 21%가 증가하였다. 반면 삼삼분기(third trimester)의 체중은 임신 0일째의 체중에 비해 약 60%가 증가하였고, 임신기간 동안 전체 증체량의 약 54%가 삼삼분기에 증가하였다. 상기한 삼삼분기의 급격한 체중증가는 태자(fetus)와 태반(placenta)의 급격한 성장 및 양수의 증가 등이 주요원인인 것으로 판단된다. 임신전반기 동안의 배자(embryo)는 영양분의 저장과 그들 신체의 필수성분들을 구성하는데 있어서 모체로부터 요구하는 것은 그리 많지 않다. O'Fraherty(1992)의 보고에 따르면 모체의 체중은 착상 (implantation) 시기부터 급격히 증가하지만 반면에 임신자궁(gravid uterus)의 중량은 임신 말기에서야 급격히 증가한다고 한다.

2. 사료섭취량

임신기간중의 사료섭취량은 Table 2에서 보는 바와 같

Table 1. Changes of body weight during normal pregnancy in Sprague-Dawley rats

Periods	n	Value (range)
GD 0	305	236.0±18.7 (229.3-246.5)
GD 6	237	266.8±16.6 (257.4-277.1)
GD 7	68	272.2±21.3 (263.8-281.2)
GD 9	165	275.9±17.6 (267.4-286.1)
GD 10	68	282.1±19.4 (273.5-290.7)
GD 12	72	293.7±19.0 (281.2-305.1)
GD 13	165	295.7±15.6 (289.9-297.9)
GD 14	68	301.4±21.5 (293.8-312.6)
GD 15	72	309.9±16.9 (297.2-323.9)
GD 16	142	318.9±17.4 (313.0-322.2)
GD 17	68	330.1±25.5 (315.4-340.9)
GD 20	305	377.2±27.0 (358.5-403.3)
Body weight gain (g) ^a	305	141.2±14.3 (119.2-179.8)

Values are presented mean±SD (g); n, no. of dams examined; GD, gestational day.

^aBody weight gain = body weight on gestational day 20 - body weight on gestational day 0.

Table 2. Changes of food consumption during normal pregnancy in Sprague-Dawley rats

Periods	n	Value (range)
GD 1	305	20.2±3.46 (16.4-21.6)
GD 7	237	24.8±3.68 (21.7-30.4)
GD 8	68	22.1±5.10 (21.9-22.3)
GD 10	165	23.5±3.08 (19.7-26.2)
GD 11	68	23.1±3.43 (22.6-23.5)
GD 13	72	25.5±3.97 (22.6-23.5)
GD 14	165	26.1±3.98 (23.8-29.6)
GD 15	68	24.8±6.86 (23.9-25.6)
GD 16	72	26.2±3.54 (23.3-25.5)
GD 17	142	25.7±3.18 (24.0-27.2)
GD 18	68	25.5±3.59 (25.4-25.5)
GD 20	305	25.5±3.62 (24.2-29.2)

Values are presented mean±SD (g); n, no. of dams examined; GD, gestational day.

다. 명백하게 시간의존적인 섭취량의 변화는 인정되지 않았지만 임신의 진행에 따라 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 태자의 성장에 따라 사료요구량이 점차 증가함으로써 나타난 결과로 사료된다.

3. 혈액학치

Table 3의 자료에서 보는 바와 같이 적혈구수, 헤모글로빈 농도 및 적혈구 용적은 임신 6~21일째의 결과가 임신

0일째의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였으며, 이들 수치들은 임신기간중 점진적으로 감소하여 임신 18일 또는 21일째에 최저치를 나타내었다. 임신의 진행에 따라 관찰된 적혈구수, 헤모글로빈 농도 및 적혈구 용적의 점진적 감소는 다른 연구자들(Papworth와 Clubb, 1995)의 연구결과와 일치하는 것으로서 모체에서의 혈장량(plasma volume)의 점진적인 증가에 기인된 것으로 판단되며, 이는 모체에서 흔히 나타나는 생리적 빈혈(physiological anemia)의 주요 원인으로 잘 알려져 있다(Baylis 등, 1980). 평균 적혈구용적의 경우 임신 9, 15, 18 및 21일째의 수치가 임신 0일째의 수치에 비해 유의성있게 증가하였는데, 이는 총 혈액량의 증가에 동반된 적혈구수의 증가에 따라 미성숙 적혈구수가 증가함으로 나타난 결과로 사료된다. 사람의 경우 임신 삼삼분기에 평균 적혈구용적이 최고치에 도달한다고 한다(Lurie, 1993). 반면 평균 적혈구혈색소와 평균 적혈구혈색소농도는 임신 전 기간동안 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다. 혈소판수의 경우 통계학적으로 유의성있는 변화는 인정되지 않았으나 임신의 진행에 따라 점진적으로 증가하여 임신 21일째에 최고치를 나타내었는데, 임신중의 혈소판수의 점진적인 증가는 Jackson 등(1992)의 연구결과와 일치한다. Table 4에서 나타난 바와 같이 총 백혈구수는 이삼분기까지 약간 증가하였다가 임신 15일째부터 꾸준히 감소하여 임신 21일째에는 임신 0일째의 수치에 비해 유의성있게 감소하였다. 백

Table 3. Changes of hematology values during normal pregnancy in Sprague-Dawley rats

Periods	n	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	PLT
GD 0	12	7.62±0.48	15.40±0.73	44.10±2.58	57.87±0.83	20.21±0.36	34.92±0.43	784.2±174
GD 3	12	7.49±0.33	15.40±0.67	43.40±1.52	57.94±0.88	20.56±0.98	35.48±1.21	794.5±116
GD 6	12	7.13±0.25*	14.40±0.42*	41.70±1.32*	58.49±1.11	20.20±0.48	34.53±0.65	820.4±159
GD 9	12	6.90±0.45*	13.80±1.46*	41.20±2.79*	59.71±1.06*	20.00±1.42	33.50±2.16	792.4±178
GD 12	12	6.78±0.23*	13.80±0.52*	39.90±1.20*	58.85±0.90	20.35±0.59	34.59±1.08	855.0±121
GD 15	12	6.76±0.32*	14.00±0.52*	40.30±1.84*	59.62±1.08*	20.71±0.47	34.74±0.67	915.8±116
GD 18	12	6.20±0.36*	12.80±1.06*	37.20±2.54*	60.00±1.00*	20.65±0.70	34.41±0.93	820.5±192
GD 21	12	5.59±0.28*	11.50±0.66*	33.80±1.98*	60.47±0.95*	20.57±0.38	34.02±0.63	936.2±160

Values are presented mean±SD; n, no. of dams examined; RBC, red blood cells ($\times 10^{12}/l$); Hb, haemoglobin (g/dl); Hct, haematocrit (%); MCV, mean corpuscular volume (fl); MCH, mean corpuscular haemoglobin (pg); MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration (g/dl); PLT, platelets ($\times 10^9/l$). * indicates significant difference at $p < 0.05$ level compared with the value of gestational day (GD) 0.

Table 4. Changes of total leukocyte and differential leukocyte counts during normal pregnancy in Sprague-Dawley rats

Periods	n	Leukocyte	Lymphocyte	Neutrophil	Eosinophil	Basophil	Monocyte
GD 0	12	16.50±4.21	14.44±4.01	1.93±0.85	0.09±0.15	0.00±0.00	0.01±0.05
GD 3	12	16.34±3.97	14.57±3.68	1.69±0.84	0.08±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00
GD 6	12	18.86±5.48	16.82±5.02	1.97±0.95	0.07±0.11	0.00±0.00	0.00±0.00
GD 9	12	16.45±3.53	14.61±2.80	1.76±0.91	0.08±0.11	0.00±0.00	0.00±0.00
GD 12	12	18.33±2.82	14.10±1.96	4.18±1.77*	0.05±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00
GD 15	12	16.16±3.10	12.76±2.37	3.33±1.04*	0.07±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00
GD 18	12	15.68±3.84	12.16±3.09	3.52±1.40*	0.01±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00
GD 21	12	12.32±2.62*	9.28±2.26*	2.97±0.94	0.07±0.07	0.00±0.00	0.00±0.00

Values are presented mean±SD ($\times 10^9/l$), n: no. of dams examined. * indicates significant difference at $p < 0.05$ level compared with the value of gestational day (GD) 0.

혈구감별계산 결과 림프구수(lymphocytes)는 임신 6일째에 최고치로 증가하였다가 점진적으로 감소하여 임신 21일째에는 임신 0일째의 결과에 비해 유의성있게 감소하였다. 호중구수(neutrophils)는 임신 12일째에 최고치를 나타낸 후 꾸준히 감소하였다. 임신 이삼분기까지 관찰된 총 백혈구수의 증가는 림프구 또는 림프구와 호중구 수의 증가에 기인된 것이었으며, 이러한 결과는 Papworth와 Clubb (1995)의 연구에서도 밝혀진 바 있다. 임신 말기에 관찰된 백혈구수의 유의성있는 감소는 림프구수의 감소에 기인된 것으로서 혈장량의 급격한 증가에 따른 상대적인 감소로 사료된다. 상기한 임신동물의 혈액학적 변화는 본 연구실에서 비임신동물의 혈액학치와 비교하여 보고한 연구결과 (Kim 등, 2000a) 중의 일부분을 정리한 것이다.

4. 장기중량

임신 20일째의 부검시 모동물에서 얻어진 주요장기의 절대 및 상대장기중량은 Table 5에 나타내었다. 임신동물에서 얻어진 절대장기중량은 송 등(1990)이 보고한 비임신동물의 장기중량 결과와 비교할 때 뇌, 심장, 간장, 비장, 신장 및 난소의 중량은 다소 증가하였고, 부신의 중량은 뚜렷한 차이가 인정되지 않았다. 임신모체가 정상적인 임신상태를 유지하기 위해서는 모체생리에 광범위한 조절 (adjustment)을 야기하게 되며 이로 인하여 여러 가지 특징적인 생리적 변화를 나타낸다는 것은 매우 잘 알려져 있다 (Branch, 1992; Stock와 Metcalfe, 1994). 상기한 임신동물

Table 5. Absolute and relative organ weights of normal pregnant Sprague-Dawley rats on gestational day 20

Parameters	n	Value (range)
Brain (g)	262	1.870±0.082 (1.830-1.920)
per body weight (%)		0.500±0.039 (0.460-0.530)
Heart (g)	305	0.943±0.098 (0.869-1.024)
per body weight (%)		0.251±0.027 (0.231-0.272)
Liver (g)	305	15.88±1.268 (14.50-17.68)
per body weight (%)		4.220±0.252 (4.050-4.390)
Spleen (g)	305	0.636±0.083 (0.581-0.703)
per body weight (%)		0.169±0.020 (0.154-0.186)
Kidney-left (g)	305	1.038±0.104 (0.976-1.121)
per body weight (%)		0.277±0.030 (0.260-0.298)
Kidney-right (g)	305	1.064±0.109 (1.002-1.129)
per body weight (%)		0.284±0.031 (0.266-0.297)
Adrenal gland-left (g)	305	0.035±0.005 (0.031-0.038)
per body weight (%)		0.009±0.001 (0.009-0.010)
Adrenal gland-right (g)	305	0.032±0.005 (0.029-0.036)
per body weight (%)		0.008±0.002 (0.008-0.010)
Ovary-left (g)	305	0.057±0.013 (0.052-0.062)
per body weight (%)		0.015±0.003 (0.014-0.017)
Ovary-right (g)	305	0.058±0.012 (0.054-0.063)
per body weight (%)		0.015±0.003 (0.014-0.017)

Values are presented mean±SD; n, no. of dams examined.

Table 6. Caesarean section data of normal pregnant Sprague-Dawley rats on gestational day 20

Parameters	n	Value (range)
Mated females	325	25.0±0.00 (25.0-25.0)
Females with live fetuses	305	23.5±1.39 (21.0-25.0)
Pregnancy rate	305	93.8±5.57 (84.0-100.0)
Corpora lutea	305	16.2±2.42 (14.8-17.7)
Implantations	305	14.6±3.23 (12.4-16.3)
Fetal deaths	305	0.98±0.35 (0.43-1.68)
Resorptions: Early	305	0.93±0.34 (0.43-1.68)
Late	305	0.03±0.06 (0.00-0.22)
Dead fetuses	305	0.01±0.02 (0.00-0.08)
Live fetuses per litter	305	13.6±3.18 (11.0-15.1)
Male/Female	305	2018/2125
Sex ratio (male/female)	305	0.95±0.16 (0.72-1.36)
Fetal body weight (g): Male	305	3.31±0.34 (3.17-3.75)
Female	305	3.17±0.32 (3.04-3.57)
Placental weight (g)	65	0.53±0.07 (0.50-0.55)
Anogenital distance (mm): Male	20	4.75±0.31 (4.10-5.20)
Female	20	1.89±0.14 (1.72-2.24)

Values are presented mean±SD; n, no. dams examined.

물의 절대장기중량 증가는 임신으로 인한 모체생리변화의 한 결과인 것으로 사료된다.

5. 제왕절개성적

임신 20일째의 제왕절개시 얻어진 성적은 Table 6에 요약하였다. 시험에 사용된 325마리의 교배동물중 305마리가 임신에 성공하여 93.8%의 임신율을 나타내었으며, 임신황체수와 착상수, 태자사망수 및 동복자수는 각각 16.2, 14.6, 0.98 및 13.6으로 나타났다. 상기 결과는 이전 연구의 기초데이터와 매우 유사한 결과였다 (MARTA, 1997; Tyl과 Marr, 1997). 생존태자의 성비(수컷태자/암컷태자)는 0.95로서 암컷태자수가 수컷태자수에 비해 약간 많았으며, 이 결과 또한 이전에 보고된 기초데이터와 매우 유사하였다 (MARTA, 1997; Tyl과 Marr, 1997). 생존태자의 평균체중은 수컷이 3.31 g이었고 암컷이 3.17 g이었는데, 이 결과는 이전 발표자료의 결과와 비교할 때 다소 낮은 수치였으나 정상치 범위내의 결과였다 (MARTA, 1997; Tyl과 Marr, 1997). 생존태자의 평균체중은 각 실험실마다 흔히 많은 차이를 보이고 있는데, 이는 사육환경이나 사료 조성 성분의 차이에 의해 유발되는 모체생리의 변화가 주요원인인 것으로 사료된다. 태자와 태반 중량의 경우 동복자수의 크기에 따라서 큰 차이가 인정되었는데, 예를 들면 동복자수가 3 이하인 경우의 평균 태자 및 태반 중량은 동복자수가 18 이상인 경우의 결과들에 비해 각각 50% 이상 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 태자 및 태반의 중량은 동복자수의 수에 의해 매우 의존적으로 차이가 있다는 것을 나타낸다.

Table 7. External alterations in fetuses from normal pregnant Sprague-Dawley rats on gestational day 20

Parameters	Incidence (% range)
Litters examined	305
Fetuses examined	4164
Litters with abnormalities	16 (0.00-16.0)
Fetus with abnormalities ^a	17 (0.00-1.37)
Exophthalmos	1 (0.00-0.29)
Agnathia	1 (0.00-0.29)
Open eye	1 (0.00-0.29)
Protruding tongue	1 (0.00-0.29)
Cleft palate	1 (0.00-0.34)
Cleft lip	1 (0.00-0.34)
Gastroschisis	3 (0.00-0.34)
Hemorrhage	1 (0.00-0.34)
Acaudate	4 (0.00-0.62)
Thread-like tail	4 (0.00-0.53)
Kinked tail	1 (0.00-0.56)

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

6. 태자의 형태학적 검사성적

임신 20일째에 제왕절개하여 얻은 태자의 형태학적 관찰시 나타난 구조적 변화(structural deviations)는 생존을 포함한 유해성(harmfulness), 자연발생빈도(spontaneous frequency) 및 가역성(reversibility)의 여부에 따라 기형, 변이 및 발육지연으로 구분하였다(Tyl과 Marr, 1997; Chahoud 등, 1999). 태자의 외표기형은 전체 태자중 0.41%의 태자에서 관찰되었다(Table 7). 내부장기에서는 0.1%의 태자에서 기형이 관찰되었고, 9.0%의 태자에서 변이가 인정되었다(Table 8). 골격검사 결과 2.4%의 태자에서 기형이 관찰되었고 3.1%의 태자에서 변이가 인정되었으며, 골화지연은 전체 태자중 16.8%의 태자에서 관찰되었다(Table 9). 이 결과들은 다른 연구자들(Morita 등, 1987; Manson과 Kang, 1989; MARTA, 1997; Nakasuka 등, 1997)이 보고

Table 8. Visceral alterations in fetuses from normal pregnant Sprague-Dawley rats on gestational day 20

Parameters	Incidence (%range)
Litters examined	305
Fetuses examined	2006
Litters with malformations	2 (0.00-4.55)
Fetuses with malformations	2 (0.00-0.66)
Small lung	1 (0.00-4.55)
Small kidney	1 (0.00-0.60)
Litters with variations	98 (0.00-60.9)
Fetuses with variations ^a	181 (1.40-20.2)
Misshapen thymus	54 (0.00-11.5)
Dilated renal pelvis	37 (0.00-7.74)
Dilated ureter	104 (0.00-12.0)

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

Table 9. Skeletal alterations in fetuses from normal pregnant Sprague-Dawley rats on gestational day 20

Parameters	Incidence (%range)
Litters examined	305
Fetuses examined	2158
Litters with malformations	39 (0.00-27.3)
Fetuses with malformations ^a	51 (0.00-5.92)
Craniofenestria	1 (0.00-0.75)
Absent premaxilla	1 (0.00-0.60)
Small mandible	1 (0.00-0.60)
Small nasal	1 (0.00-0.60)
Fused cervical arch	1 (0.00-0.66)
Absent lumbar centrum	2 (0.00-0.75)
Absent sacral vertebra	2 (0.00-0.66)
Absent caudal vertebra	2 (0.00-0.66)
Absent pubis	1 (0.00-0.60)
Absent 13th rib	1 (0.00-0.60)
Fused rib	1 (0.00-0.75)
Branched rib	1 (0.00-0.60)
Discontinuous rib	2 (0.00-1.29)
Short 13th rib	41 (0.00-4.92)
Litters with variations	45 (0.00-32.0)
Fetuses with variations ^a	67 (0.00-6.58)
Misshapen sternebra	13 (0.00-1.32)
Cervical rib	10 (0.00-2.63)
Wavy rib	10 (0.00-1.55)
Full supernumerary rib	5 (0.00-1.09)
Short supernumerary rib	21 (0.00-4.14)
Misshapen lumbar arch	12 (0.00-2.23)
Litters with retardations	156 (30.4-84.0)
Fetuses with retardations ^a	363 (4.97-36.9)
Enlarged fontanel	3 (0.00-0.65)
Incomplete ossification of interparietal	4 (0.00-1.29)
Incomplete ossification of supraoccipital	3 (0.00-0.66)
Hemicentric thoracic centrum	1 (0.00-0.60)
Bipartite ossification of thoracic centrum	27 (0.00-3.29)
Dumbbell ossification of thoracic centrum	318 (4.42-36.3)
Dumbbell ossification of lumbar centrum	8 (0.00-2.23)
Incomplete ossification of sacral arch	1 (0.00-0.55)
Bipartite ossification of sternebra	4 (0.00-1.94)
Dumbbell ossification of sternebra	4 (0.00-1.03)
Incomplete ossification of pubis	13 (0.00-3.28)

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

한 기초자료의 결과치와 매우 유사한 빈도를 나타내었다. 태자의 골화점수를 관찰한 결과는 Table 10에 요약하였다.

상기한 기초자료 항목중 태반중량은 최근 들어서 발생 독성시험의 검사항목으로 추가되었기 때문에 다른 항목에 비해 표본수가 상대적으로 적었다. 임신동물의 혈액화치는 현재 각국의 규제기관에서 신규 화학물질의 등록자료로 요구하지 않고 있으며(ICH, 1994; OECD, 1995; U.S. EPA, 1996; KFDA, 1998), 또한 본 연구실에서 수행하는 발생독성시험에서도 일반적으로 측정하지 않는 검사항목이지만(Chung 등, 1998), 모독성(maternal toxicity)의 평가시 중요한 비교자료로 사용될 수 있기 때문에 본 기초

Table 10. Ossification centers in fetuses from normal pregnant Sprague-Dawley rats on gestational day 20

Parameters	Value (range)
Litters examined	305
Fetuses examined	2158
Cervical vertebra	0.01±0.03 (0.00-0.10)
Sternebra	4.44±0.63 (4.10-4.80)
Metacarpals in both fore limbs	6.36±0.83 (5.80-7.10)
First and 2nd phalanges in both fore limbs	0.18±0.51 (0.00-1.70)
Third phalanges in both fore limbs	0.22±0.34 (0.00-2.60)
Metatarsals in both hind limbs	7.77±0.76 (7.60-8.00)
First and 2nd phalanges in both hind limbs	0.05±0.11 (0.00-0.60)
Third phalanges in both hind limbs	0.18±0.27 (0.00-2.40)
Sacral and caudal vertebra	7.23±0.73 (6.90-7.60)

Values are presented mean±SD.

자료에 추가하였다. 태자의 항문-성기간 길이는 최근에 미국 환경청(U.S. Environmental Protection Agency)의 생식독성시험 가이드라인에 추가된 검사항목으로서, 내분비 활성물질들이 이 결과에 변화를 유발한다는 것은 많은 연구 보고서에서 잘 나타나 있다(Gallavan 등, 1999). 본 연구실의 경우 대부분의 생식독성 시험에서 항문-성기간 길이를 측정하지는 않지만(Kim 등, 2000b) 시험물질이 내분비관련 물질로 예상되는 경우에 한하여 검사항목으로 추가하여 측정하고 있다.

결론적으로 본 기초자료는 생식 및 발생독성 시험에서 얻어지는 자료의 의미있는 해석을 위한 비교자료로서 뿐만 아니라 Sprague-Dawley 랫드의 생물학적 특성자료로서도 유용하게 사용될 것으로 생각된다. 또한 앞으로 본 기초자료에 더 많은 생식독성 관련 항목과 보다 많은 자료가 추가된다면 매우 가치있는 논문이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부에서 주관하는 산업기반기술개발사업의 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Baker, H.J., Lindsey, J.R. and Weisbroth, S.H. (1979): *The Laboratory Rats (Vol II). Research Applications*, Academic Press, New York, pp. 1-435.

Baylis, C. (1980): Glomerular filtration rate and plasma volume in the pregnant rat, *J. Physiol.*, **305**, 49P-50P.

Branch, D.W. (1992): Physiologic adaptations of pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **28**, 120-122.

Chahoud, I., Buschmann, J., Clark, R., Druga, A. and Falke, H., et al. (1999): Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation,

Reprod. Toxicol., **13**, 77-82.

Chung, M.K., Kim, J.C. and Roh, J.K. (1998): Embryotoxic effects of SKI 2053R, a new potential anticancer agent, in rats, *Reprod. Toxicol.*, **12**, 375-381.

Dawson, A.B. (1926): A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S, *Stain Technol.*, **1**, 123-124.

Gallavan, R.H., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F. and Reynolds, V.L. (1999): Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights, *Reprod. Toxicol.*, **13**, 383-390.

Harkness, J.E. and Wagner, J.E. (1995): *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents* (4th edition), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1-372.

ICH (International Conference on Harmonization) (1994): Guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products, Fed. Regist. 59(183), 48746-48752, SEP 22.

Jackson, C.W., Steward, S.A., Ashmun, R.A. and McDonald, T.P. (1992): Megakaryocytopoiesis and platelet production are stimulated during late pregnancy and early postpartum in the rat, *Blood*, **79**, 1672-1678.

Lurie, S. (1993): Changes in age distribution of erythrocytes during pregnancy: a longitudinal study, *Gynecol. Obstet. Invest.*, **36**, 141-144.

KFDA (Korea Food and Drug Administration) (1998): Guidelines for Toxicity Studies of Drugs, Notification No. 1998-116, Seoul, Korea.

Kim, J.C., Yun, H.I., Lim, K.H., Suh, J.E. and Chung, M.K. (2000a): Haematological values during normal pregnancy in Sprague-Dawley rats, *Comp. Haematol. Int.*, **10**, 74-79.

Kim, J.C., Yun, H.I., Shin, H.C., Han, S.S. and Chung, M.K. (2000b): Embryo lethality and teratogenicity of a new fluoroquinolone antibacterial DW-116 in rats, *Arch. Toxicol.*, **74**, 120-124.

Manson, J.M. and Kang, Y.J. (1989): Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology in *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, W. ed.), Raven Press, New York, pp. 311-359.

MARTA (Middle Atlantic Reproduction Teratology Association) (1997): Appendix B: Historical Control Data in *Handbook of Developmental Toxicology* (Hood, R.D. ed.), CRC Press, New York, pp. 716-724.

Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Kasegawa, Y., Miyamoto, M. and Watanabe, T. (1987): Spontaneous malformations in laboratory animals: frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, **27**, 147-206.

Nakasuka, T., Horimoto, M., Ito, M., Matsubara, Y., Akaike, M. and Ariyuki, F. (1997): Japan pharmaceutical

- manufactures association (JPMA) survey on background control data of developmental and reproductive toxicity studies in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, **37**, 47-138.
- Nishimura, K.A (1974): Microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses, *Cong. Anom.*, **14**, 23-40.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (1995): OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Guideline 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, Paris, France.
- O'Flaherty, E.J., Scott, W., Schreiner, C. and Beliles, R.P. (1992): A physiologically based kinetic model of rat and mouse gestation: disposition of a weak acid, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 245-256.
- Papworth, T.A. and Clubb, S.K. (1995): Clinical pathology in the female rat during the pre- and postnatal period, *Comp. Haematol. Int.*, **5**, 13-24.
- Speirs, A.L. (1962): Thalidomide and congenital abnormalities, *Lancet*, **1**, 303-305.
- Sonnenschein, C. and Soto, A.M. (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **65**, 143-150.
- Stock, M.K. and Metcalfe, J. (1994): Maternal Physiology During Gestation in *The Physiology of Reproduction* (Vol II) (Knobil, E. and Neill, J.D. eds.), Raven Press, New York, pp. 947-983.
- Tyl, R.W. and Marr, M.C. (1997): Developmental Toxicity Testing-Methodology in *Handbook of Developmental Toxicology* (Hood, R.D. ed.), CRC Press, New York, pp. 175-225.
- U.S. EPA (Environmental Protection Agency) (1996): Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.3700, Prenatal developmental toxicity study, Public Draft, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Wilson, J.G. (1965): Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals in *Teratology. Principles and Techniques* (Wilson J.G. and Warkany J. eds.) University of Chicago Press, Chicago and London. pp. 262-277.
- Wise, L.D., Beck, S.L., Beltrame, D., Beyer, B.K. and Chahoud, I., *et al.* (1997): Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1), *Teratology*, **55**, 249-292.
- Yamada, T., Hara, M., Ohba, Y., Inoue, T. and Ohno, H. (1985): Studies on implantation traces in rats. II. Staining of cleared uteri, formation and distribution of implantation traces, *Exp. Ani.*, **34**, 249-260.
- 김성훈, 정문구, 한상섭, 노정구 (1992): Ktc: SD 랫드의 생식 독성학적 기초자료연구, 한국실험동물학회지, **8**, 67-72.
- 송창우, 황화선, 한상섭 (1990): Ktc: SD 랫드의 주령에 따른 기초연구. 1. 체중변화, 혈액, 혈액생화학적 변화 및 노분석, 한국실험동물학회지, **6**, 33-43.