J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 21, No. 1, pp. 23-29 (2005)

Official Journal of
Korean Society of Toxicology
Available online at http://www.toxmut.or.kr

새로운 관절염 치료제 CONP01의 생식독성연구: 랫드 배 · 태자 발생시험

이정숙 · 홍동호 · 김광호 · 장호송 · 길기현 · 한명규 · 양현주 · 배진숙 · 김남두 · 송시환
(주)켐온 전임상 연구센터

Reproductive Toxicity Study of CONP01, a New Antiarthritic Agent: Developmental Study in Rats

June-Suk Lee, Dong Ho Hong, Kwang-Ho Kim, Hu-Song Zhang, Gi Hyun Gil, Myong Kyu Han, Hyun Ju Yang, Jin-Sook Bae, Nam Du Kim and Si Whan Song
Preclinical Research Center, Chemon Inc., Gyeonggi-do 449-826, South Korea

Received December 16, 2004; Accepted March 4, 2005

ABSTRACT. A developmental study of CONP01, a new antiarthritic agent, was conducted in Sprague-Dawley rats. Dosage of CONP01 0, 111, 333, and 1000 mg/kg/day were administered to dams orally from day 6 to day 16 of gestation. Two-third of dams per group were subjected to caesarean section on day day 20 of pregnancy for examination of their fetuses, and the remaining one-third of dams per group were allowed to deliver naturally for postnatal examination of their offspring. There was no change in the dams body weights, food consumptions, specific clinical sings and gross findings. There was significant decrease only in the absolute and relative weights of right ovary in 111 mg/kg treatment group, when compared with the vehicle control, whereas other organ weights were not changed. Moreover, no increase in the frequencies of external, visceral and skeletal malformation of fetuses were observed in the treated groups. These results suggest that the oral NOAEL (no observed adverse effect level) of CONP01 may be over 1,000 mg/kg in dams and fetuses of rats.

Keywords: CONP01, Antiarthritic agent, Developmental study, Rat

서 론

류머티즘 관절염은 일종의 자가면역질환으로서, 환경오염, 유전적 요인 등으로 인해 아이들의 저항력이 약해지면서 최근 어린이 환자도 급증하고 있다(Adorini, 2004). 관절염은 노인성 질환으로 가장 많은 빈도를 보이는 질환으로써 외국의 경우 전 인구의 20% 이상이 질환을 앓고 있고, 그 중 10% 이상이 심각한 노동력 손실을 보이고 있다(전 등, 2003). 관절염의 발생은 일단 면역체계가 혼란을 일으키면 관절 부위에서 염증을 일으켜 연골과 뼈를 파괴해 활동장애를 일으키며, 이를 방치하면 아예 걷지 못하게 되거나 최악의 경우 죽음에 이르기도 한다(안과 김, 2003). 면역증강제를 투여하여 체내의 면역을 증강시킴으로서 치료효과를 증가시키는 방법도 관절염 치료법 중의 하나이다(Dalal *et al.*, 1990; Nissinen *et al.*, 2004; Child *et al.*, 2004).

관절에 일어날 수 있는 흔한 질환으로는 골관절염과 류마티스 관절염 및 다발성 관절염이 있다. 골관절염은 동통과 경직으로 인해 중년기 이후 만성적인 무능력의 가장 흔한 원인이며 기본적인 병리학적 과정은 염증성인 류마티스 관절염과 달리 변성성이다(Govan *et al.*, 1991). 일반적으로 류마티스라 하면 류마티스 관절염을 의미하며, 이러한 질환은 관절을 중심으로 전신에 분포되어 있는 결합조직에 대한 질환으로 발병원인의 규명이 어려운 난치성 질환으로 알려져 있다. 만성 류마티스 관절염의 발병률은 인종 및 지리적 위치에는 차이가 없으나 여자가 남자보다 발병률이 높으며 특히 35세에서 45세 사이에 발병률이 가장 높으나 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소된다.

Correspondence to: Si Whan Song, Preclinical Research Center, Chemon Inc., 334 Jaeil-ri, Yangji-myeon, Yongin-si, Gyeonggi-do 449-826, Korea
E-mail: swansong@chemon.co.kr

List of abbreviations: SD, Sprague-Dawley

류마티스성 관절염에서 결합조직의 변화는 모세혈관의 손상 및 활세포의 증식으로 시작되며 이때 결합조직 안쪽으로 림파구의 침윤이 생기면서 섬유모세포 및 대식세포들이 증가하고 림파구와 단핵구의 세포성 면역반응이 강하게 일어난다. 림파구와 단핵구에서 분비되는 각종인자들은 다핵형호중구를 유주시키고 단책구와 섬유모세포를 더욱 활성화시켜 염증반응을 심화시킨다. 활성화된 단핵구는 탐식작용이 증가되고 염증반응의 매개체인 프로스타글란딘, prostaglandin, plasminogen activator, collagenase, lysosomal enzyme등을 분비하여 관절부위의 조직을 파괴시킨다. 관절염을 유발하는 사이토카인에는 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF-α), granulocyte/macrophage colony stimulating factor, interlekin-6(IL-6) 등이 대식구나 섬유아세포에서 생산되어 면역반응의 촉발에 관여한다.

CONP01은 감초, 노나무, 골담초, 우슬, 오가피의 혼합물에 대한(이 등, 1999) 물추출물과 찹쌀을 누룩으로부터 분리된 균주 및 주모의 혼합물을 가한 후 발효시켜 얻은 것이다. 이 물질의 면역작용은 TNF-α, IL-1 및 IL-6의 생성을 억제함으로서 관절염과 같은 만성염증 질환에 예방 및 치료제로서의 효능을 나타낸다고 한다(김과 홍, 2002).

따라서 본 연구에서는 (주)켐온 및 명주가에서 공동개발한 CONP01에 대한 안전성 평가의 일환으로 반복투여시 나타날 수 있는 독성(홍 등, 2004)을 질적·양적으로 평가하고자 랫드에 대한 최기형 독성시험을 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청, 1999)에 준하여 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질

본 시험에 사용한 CONP01의 조제는 다음과 같이 행하였다. 감초, 우슬, 골담초, 노나무 및 오가피의 열수추출물을 만들고 이 추출물과 찹쌀 및 누룩 또는 누룩으로부터 분리된 균주 및 주모의 혼합물을 가하고, 발효시켜 약술을 제조하였다. 이렇게 조제된 약술을 알코올을 증발시킨 후 동결건조하여 얻은 고형성분을 CONP01로 명명하였고, 밀폐용기에 넣어 냉장 보관하였다. 투여직전 주사용 멸균증류수에 용해시킨 후 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

샘타코 바이오코리아(경기도 오산시 서랑동)로부터 9주령의 Sprague-Dawley(SD)계 랫드(SPF)를 사용하였다. 9주령의 수컷 50마리와 암컷 100마리를 입수한 후 1 주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 1 : 2로 교배시켜 질구의 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하였으며 교미확인된 암컷 100마리를 시험에 사용하였다. 순화 및 시험 전 기간동안 동물은 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12 hrs, 조도 150~300 lux로 설정된 (주)켐온의 전임상연구소 실험동물실에 수용하였으며, 시험기간 중 사료는 실험동물용 고형사료(Harlan, 미국)를 자유 급이하였고, 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

투여용량 설정 및 시험군의 구성

랫드에서 CONP01에 대한 4주 반복투여 독성시험에서 최고용량인 2000 mg/kg에서 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 경구투여 한계량으로 사용하고 있는 1,000 mg/kg을 최고용량군으로 설정하였고, 공비를 3으로하여 2개의 군(111 및 333 mg/kg)을 추가하여 총 3군으로 용량을 설정하였다.

시험군은 선발된 암컷은 100마리의 동물을 사용하였고, 수컷은 50마리의 동물을 군간 체중이 고르게 3개의 용량군과 1개의 대조군으로 하여 군당 암?수 각각 25마리씩 배치하였다. 평균체중은 수컷은 288.23±8.1 g, 암컷은 214.9±9.2 g 범위였다. 시험군의 구성은 Table 1과 같다.

투여방법 및 투여기간

투여경로는 인체 적용경로가 경구이므로 강제 경구투여하였다. 투여기간은 시험물질을 1일 1회로 임신 6일째부터 임신 16일째까지 11일간 투여하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상 및 사망동물의 관찰. 시험기간 1일 1회 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 관해서 관찰하였고 투여기간 중에는 투여전후 2일 2회 관찰하였다.

체중변화 및 사료섭취량 측정. 각군의 어미동물에 대하여 임신 0, 6, 9, 13, 16 및 20일째에 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 모든 동물에 대하여 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다(단, 임신 20일째에는 제왕절개로 인하여 임신 19일째에 사료급여 후 익일 잔량을 측정하였음).

교배. 교배는 교배개시일 오후에 암수동거시켜 행하였

Table 1. Experimental design for teratogenicity study of CONP01 in rats

Group	Dose (mg/kg/day)	Volume (ml/kg)	Number of animals
Control	0	10	23
CONP01	111	10	25
	333	10	25
	1,000	10	22

다. 동거교배는 암수 2 : 1로 행하였고, 임신한 동물이 각 군에 25마리가 선발될때까지 실시하였다.

임신성립의 확인. 교배기간 중 매일 사육상자 아래 및 질내의 질전의 유무 혹은 질도말내의 정자의 유무를 조사하여 교미된 것을 확인하였다. 이렇게 교미가 성립된날을 임신 0일로 하여 체중을 측정한 후 군분리를 실시하였다.

수컷 동물의 부검. 교배 종료 후에 동물을 한꺼번에 절박 도살하였다.

부검소견의 관찰. 각 군의 모든 임신동물들을 임신 20일째에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다.

장기중량의 측정. 모든 부검동물에 대하여 신장, 부신, 난소, 간장, 비장, 심장 및 폐에 대하여 장기의 중량을 측정하였다.

제왕절개. 각 군의 모든 암컷 동물들을 임신 20일째에 제왕절개하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수배자(태자)수, 사망태자수, 생존태자의 성별 및 개체별 체중등을 조사하였다.

태자의 외표검사. 생존태자를 자궁에서 적출한 후 즉시 외표이상의 유무에 대하여 관찰하고 왼쪽 자궁각의 난소측에서 번호를 매겨 홀수 번호는 골격검사에, 그리고 짝수번호는 내장검사에 사용하였다.

골격 검사. 각 배당 생존태자를 5% 포르말린에 고정한 후 변형된 Dawson법(Dawson, 1926)에 따라 골격표본을 제작한 후 골격이상 유무 및 골화상태에 대하여 검사하였다.

내부장기검사. 각 배당 생존태자를 Bouin액에 고정한 후, 두부 및 복부는 Wilson법(Wilson, 1965), 흉부는 Nishimura법(Nishimura, 1974)에 의하여 내부장기 이상유무를 검사하였다.

통계학적 방법

얻어진 시험자료에 대한 통계분석은 얻어진 자료에 대한 부형제 대조군과 시험물질 투여군간의 비교는 일반적으로 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non-parametric multiple comparison procedures)를 사용하였다. 관심검사항목에 대하여 용량상관성이 유의한지 알아보기 위해서는 회귀분석(regression analysis) 혹은 기타 모델링 기법을 실시하였다. 발생율의 표기는 일반적으로 백분율로 나타내며 필요한 경우 Fisher's exact test로서 통계학적인 유의성을 검사하였다. 태자에 대한 시험자료는 한배에서 나온 태자들의 평균 체중, 빈도수(황체수, 흡수 배아수, 사망 태자수)를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 이러한 모든 통계학적인 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 10.1을 이용하였다. 체중을 측정한 데이터의 분석은 증체량 계산을 하여 분석하였다. 증체량은 투여후 측정된체중과 투여전 체중의 차이로 계산하였다. 시험물질 투여전에 각 군별로 체중의 차이가 없는지를 확인하고, 시험물질을 투여하면서의 그 효과가 어떻게 나타나는 가를 알아보기 위하여 증체량을 계산하였다.

체중, 사료섭취량, 장기중량, 태자중량 및 태반중량은 첫단계로 정규성검정인 Kolmogorov-Smirnov 검정을 실시하였다. 정규성을 만족하지 않는 경우에는 비모수적인 검정방법을 사용하였다. 두 번째 단계로 정규성을 만족하는 경우에 등분산성을 검정하는 Bartlett 검정을 실시하였다. 세 번째 단계로 모수적인 다중비교(multiple comparison) 혹은 비모수적인 다중비교를 실시하였다. Dunnett's t-test를 사용하였다. 통계학적인 유의성은 1% 또는 5%에서 검사하였다.

결 과

일반증상 관찰

시험물질의 투여와 관련된 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다. 단, 투여 12일째 111 mg/kg 투여군 1례에서 설사(diarrhea)가 일시적으로 관찰되었으나 곧바로 회복하였다(Table 2).

체중 및 사료섭취량의 변화

체중 및 사료섭취량의 변화에서 시험물질 투여와 관련된 유의성은 관찰되지 않았다(Table 3, Table 4).

부검 소견

관찰된 변화로는 부형제 투여군에서는 폐에서 암적색반점(Dark red spots)이 3례, 흑색 반점(Black spots)이 2례 및 적색 반점(Red spots)이 1례에서 관찰되었고 간과 횡격막의 유착(Adhesion)이 1례에서 관찰되었다. 111 mg/kg 투여군에서는 폐에서 암적색 반점이 2례, 흑색반점이 3례, 회갈색 융기성 반점의 산재(Diffused grayish brown

Table 2. Mortality and clinical signs in rats treated orally with CONP01 for 20 days

Items	Dose (mg/kg B.W)	Final mortality	Clinical signs
Groups	0	23/23	-
	111	25/25	-
	333	25/25	-
	1,000	22/22	-

Values are expressed as the number of dead animal/total number of animals.
-: no clinical signs.

Table 3. Change of body weight in rats treated orally with CONP01 for 20 days

Day (Gestation)	Dose (mg/kg/day)			
	0	111	333	1000
0	239.7 ± 9.47	242.3 ± 11.70	240.3 ± 9.15	242.7 ± 9.46
6	272.3 ± 14.85	273.3 ± 12.37	273.1 ± 12.65	275.8 ± 10.76
9	282.7 ± 14.07	282.3 ± 12.92	283.2 ± 14.05	285.1 ± 11.95
13	303.7 ± 18.44	303.4 ± 15.34	303.7 ± 14.98	307.2 ± 13.86
16	327.47 ± 20.02	325.1 ± 16.21	325.4 ± 17.47	331.2 ± 17.23
20	388.8 ± 27.03	386.6 ± 29.93	388.1 ± 30.26	395.0 ± 33.17
N	23	25	25	22

Data are mean ± S.D. N is number of animals.

Table 4. Change of food consumption weight in rats treated orally with CONP01 for 20 days

Day (Gestation)	Dose (mg/kg/day)			
	0	111	333	1,000
0	21.37 ± 6.11	18.65 ± 4.59	24.38 ± 13.90	19.80 ± 3.10
6	19.46 ± 2.94	19.34 ± 2.75	19.04 ± 2.82	18.63 ± 4.06
9	19.51 ± 2.70	19.94 ± 2.24	19.92 ± 2.73	20.64 ± 2.12
13	21.03 ± 2.45	20.49 ± 2.17	20.90 ± 2.65	21.57 ± 2.10
16	33.49 ± 13.26	32.16 ± 12.75	32.63 ± 12.34	32.13 ± 11.26
20	22.64 ± 3.18	22.72 ± 3.37	21.84 ± 5.73	23.44 ± 3.30
N	23	25	25	22

Data are mean ± S.D. N is number of animals.

Table 5. Histopathological changes of dams treated with CONP01 during the organogenetic period

Organs	Dose (mg/kg/day)			
	0	111	333	1,000
Lung				
Normal	17/23	17/25	17/25	16/22
Dark red spots	3/23	2/25	2/25	0/22
Black spots	2/23	3/25	2/25	2/22
Red spots	1/23	0/25	1/25	1/22
Diffused grayish brown protuberance	0/23	1/25	1/25	1/22
Whitish brown spots	0/23	1/25	0/25	0/22
Grayish white discoloration	0/23	1/25	0/25	0/22
Dark brown spots	0/23	1/25	0/25	0/22
White spots	0/23	0/25	1/25	0/22
Diffused pale grayish brown protuberance	0/23	0/25	1/25	0/22
Grayish white spots	0/23	0/25	0/25	1/22
Brown spots	0/23	0/25	0/25	1/22
Liver				
Normal	22/23	25/25	25/25	22/22
Adhesion (diaphragm)	1/23	0/25	0/25	0/22

protuberance), 백갈색 반점(Whitish brown spots), 회백색 변색(Grayish white discoloration) 및 암갈색 반점(Dark brown spots)이 각 1례씩 관찰되었다. 333 mg/kg 투여군에서는 폐에서 암적색 반점과 흑색 반점이 각 2례, 적색 반점, 회갈색 융기성 반점의 산재, 백색 반점 및 연한 회갈색 융기성 반점의 산재(Diffused pale grayish brown protuberabce)가 각 1례씩 관찰되었다. 1,000 mg/kg 투여군에서는 폐에서 흑색 반점이 2례, 적색 반점, 회갈색 융기성 반점의 산재, 회백색 반점(Grayish white spots) 및 갈색 반점(Brown spots)이 각 1례씩 관찰되었다(Table 5).

절대 및 상대 장기중량의 변화

장기중량에서는 111 mg/kg 투여군에서 우측 난소의 절대적($p<0.01$) 및 상대적 중량($p<0.01$)의 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Table 6).

Table 6. Organ weight of dams treated with CONP01 during the organogenetic period

Absolute weight (g) Relative weight (%)	0 mg/kg/day	111 mg/kg/day	333 mg/kg/day	1,000 mg/kg/day
Number of animals	23	25	25	22
Body weight (g)	380.7 ± 38.3	386.6 ± 29.9	388.1 ± 30.3	381.4 ± 50.2
Kidney-left (g)	0.818 ± 0.086	0.828 ± 0.083	0.849 ± 0.077	0.852 ± 0.069
% Body weight	0.211 ± 0.018	0.216 ± 0.030	0.219 ± 0.023	0.217 ± 0.023
Kidney-right (g)	0.818 ± 0.069	0.842 ± 0.083	0.841 ± 0.090	0.860 ± 0.081
% Body weight	0.211 ± 0.016	0.219 ± 0.027	0.218 ± 0.025	0.219 ± 0.028
Adrenal gland-left (g)	0.032 ± 0.005	0.031 ± 0.006	0.0340 ± 0.006	0.0326 ± 0.007
% Body weight	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.002	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.002
Adrenal gland-right (g)	0.031 ± 0.005	0.031 ± 0.006	0.032 ± 0.006	0.032 ± 0.007
% Body weight	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.002
Ovary-left (g)	0.061 ± 0.022	0.064 ± 0.017	0.063 ± 0.012	0.062 ± 0.014
% Body weight	0.016 ± 0.006	0.017 ± 0.005	0.016 ± 0.003	0.016 ± 0.004
Ovary-right (g)	0.071 ± 0.013	0.057 ± 0.014**	0.068 ± 0.013	0.071 ± 0.011
% Body weight	0.018 ± 0.004	0.015 ± 0.004**	0.018 ± 0.003	0.018 ± 0.003
Liver (g)	14.80 ± 1.26	14.21 ± 3.13	14.92 ± 1.61	15.34 ± 1.80
% Body weight	3.81 ± 0.21	3.69 ± 0.77	3.85 ± 0.25	3.88 ± 0.23
Spleen (g)	0.976 ± 0.130	1.506 ± 3.013	0.928 ± 0.153	0.947 ± 0.163
% Body weight	0.251 ± 0.026	0.384 ± 0.744	0.239 ± 0.033	0.240 ± 0.034
Heart (g)	0.919 ± 0.106	0.930 ± 0.084	0.924 ± 0.067	0.921 ± 0.057
% Body weight	0.237 ± 0.024	0.241 ± 0.024	0.239 ± 0.019	0.235 ± 0.031
Lung (g)	1.419 ± 0.203	1.373 ± 0.105	1.382 ± 0.115	1.425 ± 0.110
% Body weight	0.366 ± 0.054	0.358 ± 0.047	0.357 ± 0.030	0.363 ± 0.033

Values are Mean ± SD.
**; Significantly different from control group at $p<0.01$ levels.

Table 7. Caesarean section data of dams treated with CONP01 during the organogenetic period

Dose (mg/kg/day)	0	111	333	1,000
No. of pregnant animals	23	25	25	22
Corpora lutea (Mean ± SD)	14.91 ± 2.043	15.76 ± 3.515	15.52 ± 2.600	15.41 ± 2.612
Implantations (Mean ± SD)	13.65 ± 3.099	13.72 ± 4.468	13.68 ± 4.120	13.55 ± 4.426
% to corpora lutea (Mean ± SD)	90.86 ± 14.011	86.11 ± 22.791	87.22 ± 21.107	86.48 ± 25.463
Fetal deaths (Resorptions+Dead)	12	16	11	17
Resorptions				
Total	12	15	11	17
Early	10	13	6	16
Late	2	2	5	1
Dead fetuses	0	1	0	0
Live fetuses				
Male/Female	151/151	162/165	158/178	131/150
Litter size (mean ± SD)	13.13 ± 3.079	13.08 ± 4.462	13.24 ± 3.919	12.77 ± 4.093
% to implantation (Mean ± SD)	96.03 ± 5.640	91.89 ± 19.738	97.13 ± 4.493	95.05 ± 5.356
Sex ratio (male/female)	1.00	0.98	0.91	0.87
External anomalies of fetuses	0	3	2	0
Dwarf	0	1	1	0
Adhesion of placenta	0	2	0	0
Acawdate	0	0	1	0
Body weight of alive fetuses				
Male (Mean ± SD)	4.13 ± 0.291	3.89 ± 0.877	4.00 ± 0.351	4.02 ± 1.003
Female (Mean ± SD)	3.85 ± 0.224	3.84 ± 0.367	3.81 ± 0.356	4.01 ± 0.438
Weight of placenta				
Male (Mean ± SD)	0.56 ± 0.073	0.51 ± 0.123	0.55 ± 0.058	0.57 ± 0.151
Female (Mean ± SD)	0.54 ± 0.062	0.55 ± 0.096	0.54 ± 0.066	0.60 ± 0.126

제왕절개 성적

제왕절개시 조사한 황체수, 착상수, 황체에 대한 착상 비율에서 유의성은 관찰되지 않았다. 사망태자, 생존태자 수 및 착상률에서 유의성은 관찰되지 않았다. 생존태자의 외표소견, 생존태자의 체중, 성비 및 태반의 중량에 있어서도 유의성은 관찰되지 않았다(Table 7).

Table 8. Visceral findings in fetuses from dams treated per oral with CONP01 during the organogenetic period

Dose (mg/kg/day)	0	111	333	1,000
No. of dams	23	25	25	22
No. of live fetuses examined	146	158	160	134
(Mean ± SD)	6.35 ± 1.641	6.58 ± 1.840	6.40 ± 2.000	6.38 ± 1.532
No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
No. of fetuses with variations	45	46	44	45
Head				
Palate	0	0	0	0
Ear	0	0	0	0
Dilated cerebral ventricle	0	0	0	0
Eye	0	0	0	0
Nasal cavity	0	0	0	0
Thorax				
Diaphragm	0	0	0	0
Thymic remnant in the neck	21	27	17	19
Lung	0	0	0	0
Vessels	0	0	0	0
Ventricular septum defect	0	0	0	0
Abdomen				
Dilated renal pelvis	4	3	5	4
Dilated ureter	18	14	21	19
Convoluted ureter	2	2	1	3
Gonad	0	0	0	0

Table 9. Skeletal findings in fetuses from dams treated per oral with CONP01 during the organogenetic period

Dose (mg/kg/day)	0	111	333	1,000
No.of dams	23	25	25	22
Live fetuses examine	149	169	171	147
(Mean ± SD)	6.77 ± 1.510	7.04 ± 1.805	6.84 ± 1.951	6.68 ± 2.102
No. of fetuses with malformations	0	0	0	0
No. of fetuses with variation	12	20	17	17
Misshapen lumbar arch	2	0	3	1
Cervical rib (R)	4	4	2	2
Cervical rib (L)	1	3	1	4
Cervical rib (both)	0	1	0	1
Short 13th rib (R)	1	1	1	2
Short 13th rib (L)	1	3	3	2
Short 13th rib (both)	0	3	2	1
Short supernumerary rib (R)	1	0	1	2
Short supernumerary rib (L)	1	3	2	2
Short supernumerary rib (both)	1	2	2	0
No. of fetuses with retardations	28	26	27	35
Bipartite ossification of thoracic centrum	9	6	8	6
Dumbbell ossification of thoracic centrum	19	20	19	29
No. of ossification centers (Mean°æS.D.)				
No. of ossification sternum	5.84 ± 0.240	5.84 ± 0.225	5.77 ± 0.314	5.87 ± 0.216
No. of metacarpals in both forelimbs	7.70 ± 0.411	7.71 ± 0.407	7.54 ± 0.581	7.66 ± 0.486
No. of first phalanges in both forelimbs	2.59 ± 1.189	2.97 ± 0.830	2.50 ± 1.155	3.04 ± 1.535
No. of metatarsals in both forelimbs	8.02 ± 0.107	8.00 ± 0.000	8.01 ± 0.028	8.09 ± 0.426
No. of first phalanges in both hind limbs	0.05 ± 0.243	0.00 ± 0.000	0.00 ± 0.000	0.29 ± 1.371
No. of cervical vertebra	0.30 ± 0.321	0.19 ± 0.239	0.28 ± 0.373	0.20 ± 0.196
No. of sacral and caudal vertebra	7.94 ± 0.435	7.98 ± 0.392	8.03 ± 0.524	8.15 ± 0.656

내부장기 검사

임신 20일째에 부검한 태자의 내부장기 검사에서 시험물질의 투여와 관련된 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 8).

골격검사

임신 20일째에 적출한 태자의 골격검사에서 시험물질의 투여와 관련된 기형, 변이 및 발육지연의 유의성은 관찰되지 않았다(Table 9).

고찰 및 결론

본 연구에서는 (주)켐온에서 새롭게 개발한 한방약술의 동결건조물인 CONP01에 대한 안전성 평가의 일환으로 반복투여시 발현될 수 있는 독성을 질적·양적으로 평가하기 위하여 생식독성연구중 최기형시험을 식품의약품 안전청고시 제1999-61호 "의약품 등의 독성시험기준(1999년 12월 22일 제정)"에 준하여 실시하였다.

암수 공히 매체 대조군과 시험물질을 각각 0, 111, 333 및 1000 mg/kg의 용량으로 임신 6일째부터 임신 16일까지 경구투여 하여 모동물과 태자에 미치는 영향을 조사하였다.

본 시험에서 시험물질의 투여와 관련된 모체에서의 일반증상, 체중변화 및 사료 섭취량에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 장기중량에서 관찰된 111 mg/kg 투여군에서의 우측난소의 상대적 및 절대적 중량의 유의성 있는 감소는 용량상관성이 없이 관찰된 변화로 모동물의 제왕절개 성적에서의 유의성은 관찰되지 않은 것으로 보아 본 시험물질과 관련된 독성과는 무관한 것으로 사료된다. 부검소견에서 관찰된 폐의 변화는 용량상관성 없이 전 시험군에서 관찰되었으며 동일 주령 동일종의 동물에서 본 시험 이외의 다른 시험 및 무처치 동물에서도 간혹 발견되는 소견이었다. 이는 SPF구역에서 8~12주령의 SD 랫드에서 원인불명의 간질성 폐렴(Patricia, 1997)의 빈도가 높다는 보고와 일치하는 것으로 본 시험물질에 의한 변화는 아닌 것으로 사료된다. 모 동물의 제왕절개시 조사된 황체수, 착상수, 생존 태자수, 태반의 중량 및 생존 태자의 체중과 성비에 있어서 시험물질의 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다. 태자의 내장 및 골격검사에서도 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 임신랫드의 배태자 발생에 있어서 CONP01의 반복 경구투여는 1000 mg/kg의 용량까지는 아무런 유의성도 관찰되지 않았다. 따라서, CONP01의 모체 및 태자에서의 무독성량(no observed adverse effect level)은 1000 mg/kg 이상인 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발사업(01-PJ2-PG4-J201PT01-006)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Adorini, L (2004): Antigen-based immunointervention in human autoimmune diseases. *Trends Biotechnol.*, **22**, 547-549.

Childs, S.G. (2004): Reactive arthritis. Immune-mediated synovitis or joint infection. *Orthop Nurs.*, **23**, 267-273.

Dalal, N., Roman, S. and Levinson, A.I. (1990): *In vitro* secretion of human IgM rheumatoid factor. Evidence for distinct rheumatoid factor populations in health and disease. *Arthritis Rheum.*, **33**, 1340-1346.

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

Govan, A.D.T., Macfarlane, P.S. and Callander, R. (1991): Pathology Illustrated 3rd ed, 811-821, Churchill Livingstone, London.

Nissinen, R., Leirisalo-Repo, M., Nieminen, A.M., Halme, L., Farkkila, M., Palosuo, T. and Vaarala, O. (2004): Immune activation in the small intestine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, **63**, 1327-1330.

Nishimura, K. (1974): A microdissection method for detecting thoracic viseral malformations in mouse and rat fetuses. *Con. Anom.*, **14**, 23-40.

Patrica, L.F. (1997): Diagnostic: Interstitial Pneumonia in viral and Mycoplasmal Antibody-Free Sprague Dawley Rats. ACLDA NEWSLETTER (American Committee on Laboratory Animal Diseases), Fall Vol 18. No. 1.

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.), pp. 262-277. The university of Chicago press, Chicago and London.

김형민, 홍승헌 (2002): 염증성 질환의 예방 또는 치료용 생약 추출물 및 그 제조 방법. 대한민국특허청 출원번호 PCT/KR02/00862.

식품의약품안전청 (1999): 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청고시 제1999-61호 (1999.12.22).

안형중, 김갑성 (2003): 생쥐에서 녹용약침액이 자가항원제시형 Cathepsin S 활성의 저해와 류마티스 관절염 억제에 미치는 효과. 대한침구학회지, **20**, 104-116.

이승덕, 김갑성 (1999): 우슬 및 봉독약침이 생쥐의 LPS 유발관절염의 세포성면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지, **16**, 287-315.

전정호, 이해정, 김명희, 신재신 (2003): 퇴행성관절염 노인환자의 우울과 삶의 질 예측요인. 성인간호학회지, **15**, 650-659.

홍동호, 장호송, 김광호, 길기현, 김재민, 한명규, 배진숙, 김남두, 이현걸, 이정숙, 이선경, 박찬구, 송시환 (2004): 랫드에서 CONP01에 대한 4주 반복투여 독성연구. 한국독성학회지, **29**, 349-357.