

## 엘라스타제의 토끼에 대한 최기형시험

안병옥, 백남기, 이순복, 김원배, 양중익, \*이영순, \*임윤규

동아제약 주식회사 연구소 \*서울대학교 수의과 대학

(1990. 7. 15 접수)

본 최기형시험은 엘라스타제가 임신토끼와 태자에 미치는 영향을 조사할 목적으로 수행되었다. 시험은 임신된 New Zealand White 종의 토끼를 2개의 대조군 (제 1, 제 2대조군)과 3개의 투여군 (제 1, 제 2, 제 3투여군)으로 나누어 실시되었다. 제 1, 제 2, 제 3투여군에는 각각 엘라스타제 1, 2, 12, 120mg/kg을 임신 6일부터 18일까지 연일 경구투여하였으며, 같은 기간동안 제 1대조군과 제 2대조군에는 각각 10% skim milk수용액과 ethylene thiourea 40mg/kg을 경구투여하였다. 임신 29일에 모든 모동물을 도살하여 모체와 태자를 검색하였다.

시험기간중 제 2대조군에서는 사료섭취량이 유의성있게 감소되었다 ( $p < 0.01$ ). 시험결과 황체수, 착상수, 생존태자수, 태자의 성비, 태자 및 태반중량에 있어서 각 군간 유의성있는 변화가 관찰되지 않았으며 태자의 외형검사, 에부장기 및 골격 검사에서도 군간 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 본 시험에서 채택한 엘라스타제의 용량은 토끼에 있어서 최기형 유발능이 없는 것으로 판단된다.

## 서 론

Elastase는 특이적으로 elastin을 분해하는 효소로서 소의 신선한 췌장에서 처음으로 발견된 이래 (Balo와 Banga, 1949) 광범위한 지질 대사 개선작용을 가지며 (村野등, 1986), 실험적 동맥경화증의 병변부에 선택적으로 작용하여 지방이나 calcium의 침착을 억제하며 collagen의 이상증식을 억제하여 동맥경화증의 예방 및 개선효과를 지니고 있는 것으로 알려져있다 (長谷川과 竹内, 1984).

Elastase는 1975년 일본 Eisai사에 의해 엘라스침이라는 상품명으로 개발되었으며 그 적용중으로는 동맥경화증, 고혈압, 당뇨병 및 고지혈증에 동반하는 혈청지질이상 등이 있다. 이와 같이 elastase에 대해 많은 연구가 이루어지고 있으나 생식독성에 관한 연구는 극히 희소한 실정이다. 본 연구는 토끼에서의 elastase의 최기형 유발능을 조사할 목적으로 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험물질

시험물질인 elastase는 동아제약 주식회사 연구소 생물공학연구실에서 공급받아 시험에 사용하였다. 시험물질은 분자량 26,000, 역가 150ELu/mg인 담갈색 분말로서 시험기간중 차광 방습하여 냉장

보관하였으며 투여시 위산에 의해 불활성화되는 것을 방지하기 위하여 10% skim milk 용액에 현탁하여 사용하였다 (中村과 石川, 1971).

## 2. 시험동물

성성숙에 도달한 New Zealand White 종의 토끼를 연암축산 전문대학 양토장에서 교배시켜 교미가 확인된 날을 임신 0일로 하여 당일 입하시켜 총 90마리를 시험에 사용하였다. 시험기간중 1개의 토끼용 사육상자 (stainless제, 45×50×30cm, 명진기계)에 1마리씩 수용 사용하였으며 사육실 환경은 온도 23±3°C, 습도 60±10% 범위였고, 조명은 오전 7시에 점등하여 오후 7시에 소등하는 인공조명으로 하였다. 사료 (양토용 펠렛, 한일사료)와 물 (수도물)은 자유섭취시켰다. 오물의 수거는 1일 2회 수동세척으로 하였다.

## 3. 시험군 구성 및 약물투여

시험은 2개 대조군과 3개의 처치군으로 나누어 시행하였다. 대조군은 제 1대조군 (C1)과 제 2대조군 (C2)으로 나누었으며, 처치군은 제 1처치군 (T1), 제 2처치군 (T2) 그리고 제 3처치군 (T3)으로 나누었다. 실험동물은 한 군당 18마리씩 체중분포를 고르게 배치하였다.

약물투여기간은 전 군 모두 임신 6일에서 18일까지 연일투여하였으며 제 1대조군에는 시험물질 투여시 현탁액인 10% skim milk 용액을, 제 2대조군에는 기형유발물질로 알려진 ethylene thiourea 40mg/kg을 음수에 녹여 투여하였으며 제 1, 제 2, 제 3처치군에는 각각 elastase의 3단계 용량 (1.2, 12, 120mg/kg/day)을 투여하였다. 투여액은 체중 kg당 5ml로 하였으며 투여는 토끼 경구투여용 카테터 (No. 10)를 이용하여 강제 경구투여하였다.

## 4. 관찰

시험기간중 일반증상의 관찰은 모든 동물에 대해 1일 2회 실시하였으며 체중 및 사료 섭취량은 임신 0 및 5~29일에 측정하였다. 임신 29일에 모든 모동물은 펜토바비탈-나트륨 50mg/kg을 이개정맥으로 투여하여 마취시킨 후 개복하여 복대동맥을 절단, 방혈치사시켰다. 모동물에 대해 부검을 실시하여 실질장기의 육안적 병변을 관찰 기록한 후 난소와 자궁을 적출하여 황체수, 착상수, 흡수배수, 태자의 사망유무 및 외형상의 기형 등을 관찰하고 생존태자의 체중과 태반중량을 측정하였다. 생존태자의 성별은 항문과 외음부의 거리로 구분하였으며 모체당 태자의 약 반수는 복강내로 Bouin's solution 1~2ml를 주사한 후 Bouin's solution에 10일 이상 고정시켜 두부는 Wilson법 (Wilson, 1965), 흉부 및 복부는 니시무라법 (西村, 1974)에 의해 내부기관의 형태학적 이상유무를 관찰하였다. 나머지 반수는 박피하여 내부장기와 근육 등을 제거한 후 alcian blue-alizarin red S 이중염색 (Simons와 Vanhorn, 1971)을 하여 골격의 형태학적 이상유무를 검색하였다.

## 5. 통계학적 처리

시험결과 얻어진 자료중 평균치와 표준편차에 대해서는 one-way ANOVA와 t-test를, 발현빈도에 대해서는 Chisquare test를 이용하여 각 항목 공히 95% ( $p < 0.05$ )와 99% ( $p < 0.01$ ) 수준에서 유의성을 검정하였다.

# 결 과

## 1. 모체의 체중 및 사료섭취량의 변화

시험기간동안 모체에 있어서 특기할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 대조군과 처치군을 포함한 모든군의 1~2마리에서 체모의 부분적인 탈모 현상이 발견되었다.

체중의 변화는 Fig. 1에서와 같다. 약물투여개시후 모든 군에서 일시적인 체중의 감소를 보인 후 다시 서서히 증가되는 경향을 보였으나 제 2대조군에서는 투여개시시의 체중으로 회복되

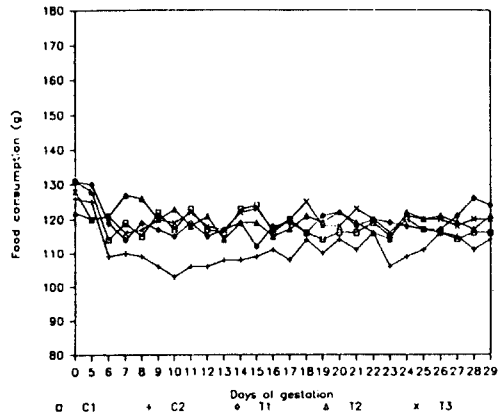
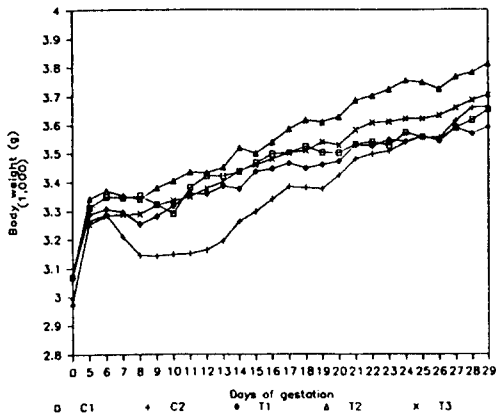


Fig. 1. Body weight changes in treated female rabbits

Fig. 1. Body weight changes in treated female rabbits.

Fig. 2. Food consumption in treated female rabbits.

Table 1. Effects of elastase on fetuses from rabbits treated orally with elastase from day 6 to day 18 of pregnancy

Group	C1 group	C2 group	T1 group	T2 group	T3 group
No. of dams	12	12	12	13	12
No. of corpora lutea (mean±S.D.)	104 (8.67±1.43)	110 (9.17±1.67)	102 (8.50±1.76)	133 (10.23±1.67)	102 (8.50±1.89)
No. of implantations (mean±S.D.)	94 (7.83±2.64)	96 (8.00±2.27)	85 (7.17±2.03)	125 (9.26±2.62)	87 (7.25±2.31)
Implantation rate(%)	90.4	87.3	83.3	94.0	85.3
No. of resorbed and dead fetuses	4	5	5	9	3
No. of live fetuses (mean±S.D.)	90 (7.50±2.63)	90 (7.50±1.98)	81 (6.75±2.24)	116 (8.92±3.02)	84 (7.00±2.45)
Sex ratio*	1.00	1.17	1.25	0.97	1.10
Fetal weight mean±S.D.(g)	43.84±8.82	44.84±8.29	41.60±9.12	43.96±9.51	43.95±9.19
Placental weight mean±S.D.(g)	3.74±1.00	3.62±0.95	3.32±0.98	3.29±0.99	3.61±1.01

\* : Sex ratio represents number of male fetuses/number of female fetuses

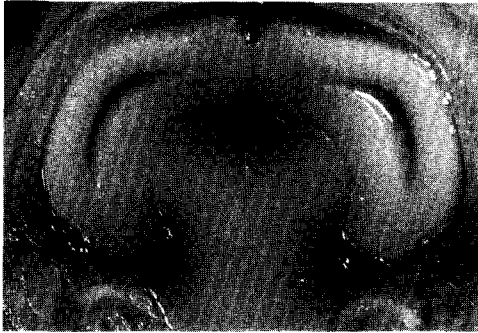


Fig. 3. Dilatation of lateral ventricle observed in a rabbit fetus from a dam treated orally with elastase 12 mg/kg from day 6 to day 18 of pregnancy.

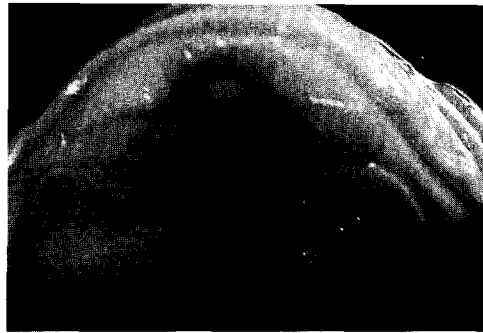


Fig. 4. Pelvic dilatation of the kidney observed in a rabbit fetus from a dam treated orally with elastase 12 mg/kg from day 6 to day 18 of pregnancy.

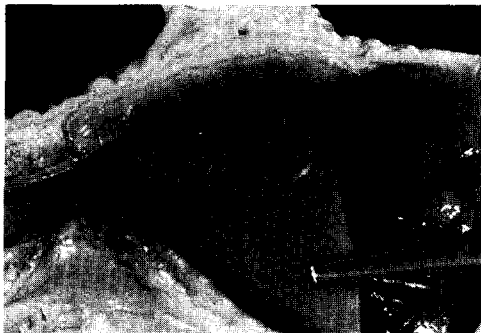


Fig. 5. Abnormal lobation of the lung observed in a rabbit fetus from a dam treated orally with elastase 1.2 mg/kg from day 6 to day 18 of pregnancy.



Fig. 6. Thymic remnant in the neck observed in a rabbit fetus from a dam treated orally with 10% solution of skim milk from day 6 to day 18 of pregnancy. Note elongated thymic tissue (arrow).

는 시기가 다른 군들에 비해 3~4일 늦게 나타났다.

사료섭취량의 변화는 Fig. 2와 같다. 시험기간동안 각 군 모두 비교적 고른 사료섭취량을 보였으나 제 2대조군은 1일 평균사료섭취량이 다른 군들에 비해 유의성있게 낮았다 ( $p < 0.01$ ).

## 2. 모체 및 태자에 대한 관찰

부검시 각 군 모체의 실질장기에서는 특기할 만한 육안적 병변이 관찰되지 않았다. 황체수와

**Table 2. External and visceral examination in fetuses from rabbits treated orally with elastase from day 6 to day 18 of pregnancy**

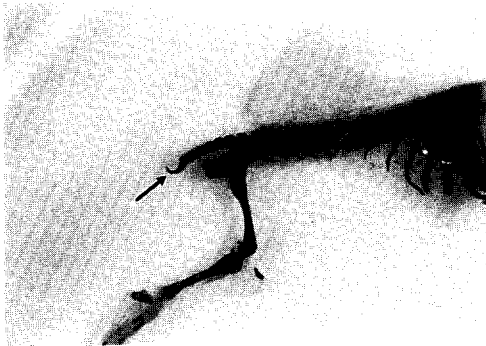
Group	C1 group	C2 group	T1 group	T2 group	T3 group
<b>External malformation</b>					
No. of fetuses examined (litters)	90 (12)	90 (12)	81 (12)	116 (13)	84 (12)
No. of litters with malformed fetuses	1	0	0	1	0
No. of fetuses with external malformation (%)	1 (0.01)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.01)	0 (0.00)
Short tail	1	0	0	1	0
<b>Visceral abnormality</b>					
No. of fetuses examined (litters)	53 (12)	53 (12)	50 (12)	72 (13)	51 (12)
No. of litters with abnormal fetuses	3	2	2	3	1
No. of fetuses with visceral abnormality (%)	3 (5.66)	2 (3.77)	2 (4.00)	3 (4.17)	1 (1.96)
Dilatation of lateral ventricle	0	0	0	1	1
Thymic remnant in the neck	2	1	1	0	0
Pelvic dilatation of kidney	1	0	0	1	0
Asymmetry of nasal turbinate	0	0	1	0	0
Abnormal lobation of the lung	0	0	1	0	0
Hypoplasia of submandibular gland	0	1	0	0	0
Dilatation of ureter	0	0	0	1	0

착상수는 Table 1에서와 같이 제 1대조군에 비해 제 2처치군과 제 2대조군에서 증가된 경향을 나타내었으나 유의성은 발견되지 않았다. 또한 착상율, 흡수 또는 사망태자수, 평균생존태자수 및 성비에에서도 군간 유의성은 인정되지 않았다.

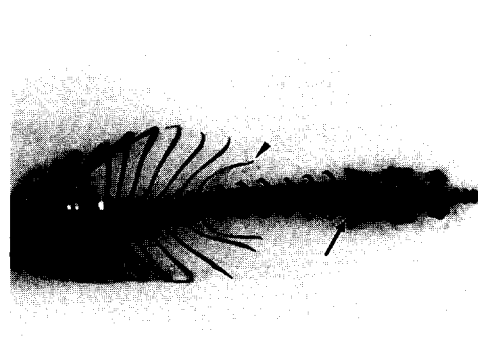
태자의 체중은 Table 1에서와 같이 다른 군에 비해 제 1처치군에서 다소 낮게 나타났으나 통계학적 유의성이 없었으며, 태반중량에서도 군간 유의성은 인정되지 않았다.

**Table 3. Skeletal examination (abnormality and variation) of fetuses from rabbits treated orally with elastase from day 6 to day 18 of pregnancy**

Group	C1 group	C2 group	T1 group	T2 group	T3 group
No. of fetuses examined	37	37	31	44	33
Skeletal abnormality					
No. of abnormal fetuses (%)	1 (2.70)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (2.27)	0 (0.00)
Short tail	1	0	0	1	0
Skeletal variation					
No. of fetuses with skeletal variations (%)	12 (32.4)	15 (40.5)	13 (41.9)	20 (45.5)	10 (30.3)
13 ribs	12	15	13	19	10
8 lumbar vertebrae	1	2	3	1	2



**Fi. 7.** Short tail observed in a rabbit fetus from a dam treated orally with 10% solution of skim milk from day 6 to day 18 of pregnancy. Showing reduced number of coccygeal vertebrae (arrow).



**Fig. 8.** Thirteenth ribs (lumbar ribs, arrow head) and eighth lumbar vertebrae observed in a rabbit fetus from a dam treated orally with ethylene thiourea 40 mg/kg from day 6 to day 18 of pregnancy. Note transverse process (arrow) of first sacral vertebrae.

### 3. 태자의 내부기관 검사

생존태자의 외형검사시 제 1대조군과 제 2처치군에서 각각 1에씩 단미증 (short tail)이 발견되었으며 다른 태자에서는 외형이상 발견되지 않았다. 외형 및 내부기관의 형태학적 검사결과는 Table 2와 같다.

발견된 내부기관이상은 측뇌실 확장 (Fig. 3), 신우확장 (Fig. 4), 폐엽이상 (Fig. 5), 흉선의 경부잔존 (Fig. 6), 악하신 형성부전 및 요관의 부분적 확장 등이었으나 기형발현빈도의 구간 유의성은 인정되지 않았다.

### 4. 태자의 골격 검사

태자 골격의 형태학적 검사결과는 Table 3과 같다.

외형검사시 발견된 단미증 (Fig. 7)외의 골격이상은 발견되지 않았으며 골격변이로는 제 13 늑골과 제 8요추 (Fig. 8)가 관찰되었다. 골격변이는 제 1대조군에 비해 제 2처치군, 제 1처치군, 제 2대조군 순으로 높은 발현율을 보였으나 통계학적 유의성은 인정되지 않았다.

## 고 찰

시험기간중 일부 모체에서의 부분적 탈모증상은 임신중기 이후에 발견되었으며 대조군과 처치군 모두에서 고르게 관찰할 수 있었던 점으로 미루어 이는 약물에 의한 영향이 아니라 임신에 의한 영향으로 생각되었다. 모체의 체중변화에서 임신 6일 이후의 일시적인 체중감소는 약물투여개시에 따른 결과로 여겨지며 다른 군에 비해 제 2대조군에서 체중감소가 현저히 나타난 것은 ethylene thiourea 투여개시후 사료섭취량이 유의성있게 ( $p < 0.01$ ) 감소된 결과에 의한 것으로 사료된다.

태자의 외형, 내부기관 및 골격 검사결과, 강력한 기형유발물질로 알려진 ethylene thiourea를 40mg/kg/day로 투여한 제 2대조군에서 최기형이 유발되지 않은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 ethylene thiourea가 랫트 (Khera, 1973)와 햄스터 (Teramoto 등, 1978)에서는 최기형이 쉽게 유발되나 토끼에서는 잘 나타나지 않는다는 보고 (Khera, 1973)와 일치되는 결과이다.

대조군과 elastase투여군을 포함한 어떤 군에서도 유의성있게 최기형이 유발되지 않은 것으로 보아 본 시험에서 채택한 elastase의 용량은 토끼의 최기형시험에서 최기형유발능이 없는 것으로 판단된다.

## REFERENCES

1. 西村耕一(1974): 마우스および 랫트 胎子の 胸部内臟奇形觀察の ための 顯微解剖法, 先天異常 14(1): 23-40.
2. 長谷川元治, 竹内光吉(1984): A biophysical study of antisclerotic agents—longterm effect of elastase as measured by aortic pulse wave velocity method, 日本老年醫學會雜誌 21: 115-123.
3. 村野俊一, 白井厚治, 田丸淳一(1986): Effect of elastase on lipid accumulation in rabbit aorta fed on high cholesterol diet, 動脈硬化 14: 565-571.

4. 中村治雄, 石川昌子(1971): コレステロール代謝に及ぼす エラスターゼの作用, 日本老年醫學會雜誌 8: 225-232.
5. Balo, J. and I. Banga, (1949): Elastase and elastase-inhibitor, *Nature* 164: 491-494.
6. Khera, K.S., (1973): Ethylene thiourea: Teratogenicity study in rats and rabbits, *Teratology* 7: 243-252.
7. Simons, E.V. and J.R. Vanhorn, (1971): A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos. adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide, *Acta Morphol. Neerl. Scand.* 8: 281-292.
8. Teramoto, S., A. Shingu, M. Kaneda, and R. Saito, (1978): Teratogenicity studies with ethylene thiourea in rats, mice and hamsters, *Congenital Anomalies* 18: 11-17.
9. Wilson, J.G. (1965): Methods for administering agent and detecting malformations in experimental animals in *Teratology: Principles and Techniques* (Wilson, J.G. and J. Warkany Eds.), (Univ. of Chicago Press, Chicago), pp. 262-277.

### Teratogenicity Study of Elastase in Rabbits

**Byoung-Ok Ahn, Nam-Gi Baik, Soon-Bok Lee, Won-Bae Kim,  
Joong-Ik Yang, \*Yong-Soon Lee, \*Yoon-Kyu Lim**

*Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd.,  
47-5 Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-kun, Kyunggi-do 449-900, Korea  
\*College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

A teratogenicity study was conducted in rabbits to determine the effects of elastase on dams and their fetuses. Pregnant New Zealand White rabbits were divided into two control groups (C1, C2) and three treatment groups (T1, T2, T3). Elastase was dosed orally to female at 1.2, 12, 120 mg/kg/day (T1, T2, T3) from day 6 through day 18 of pregnancy. During the same period of gestation, C1 and C2 groups were given orally 10% solution of skim milk and aqueous solution of ethylene thiourea at dose of 40 mg/kg/day, respectively. Dams were sacrificed on day 29 to examine the effects of elastase on the fetuses.

Pregnant rabbits receiving 40 mg/kg/day of ethylene thiourea showed significant decrease in food consumption ( $p < 0.01$ ). Number of corpora lutea, implantations and live fetuses, sex ratio, fetal and placental weights were checked, and no significant differences were found in any groups. External, visceral and skeletal abnormalities were examined, and no significant changes were observed. From above results, dosage of 1.2, 12, and 120 mg/kg/day of elastase to pregnant rabbits showed no teratogenic potentials.