

화학물질의 생식독성 평가에 있어서 고려해야 할 요소

정문구

한국화학연구소 안전성연구센터

FACTORS TO BE CONSIDERED WHEN EVALUATION PRENATAL TOXICITY OF CHEMICALS

M.K. Chung

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of
Chemical Toxicology Daejeon 302-343, Korea

ABSTRACT: 실험동물을 이용한 생식독성시험 결과를 기초로 하여 화학물질의 인체내 최기형성 발현 잠재력을 추정하는 질적인 독성평가 (qualitative risk assesment)는 비교적 용이하다. 그러나 인체에 실제로 적용할 수 있는 생식 독성 평가를 위해서는 양적인 독성평가 (quantitative risk assesment)가 요구되는데 여러가지 기본원칙의 불일치성과 검색기술등의 부족으로 아직 학문적인 평가가 어려운 실정이다. 따라서 본 seminar에서는 양적인 독성평가의 문제점에 대한 세계적 연구추세를 소개하는 일례로서, 독일 베를린 자유대 독성학 연구소에서 다년간 수행된, 약제의 동물실험결과를 토대로 최기형 효과에 대한 평가시 고려해야 할 제반요소와 원칙에 대해 다음과 같이 소개하고자 한다.

Key words: 발생학적 차이점(Variability in prenatal development), 약역학적 차이점(Differences in pharmacokinetics), 투여용량의 상관성(Dose-response relationship), 최기형 효과(Teratogenic effect)의 평가

서 론

화학물질의 생식독성효과는 치사(mortality), 발육지연(growth retardation), 최기형성(teratogenicity) 등으로 표현되는데 치사와 발육지연은 비특정장애요소(모체독성 등)에 의해 발생하는데 비해 최기형성은 세포 또는 형태분화 과정에서의 특이한 간섭작용에 의해 발현한다. 그런데 형태적 변화를 나타내는 최기형 효과의 평가는 종의 특이성(species-specificity), 자연발생 기형, 변이(structural variations) 또는 경형태이상(minor abnormalities)과 중형태이상(gross-structural abnormalities)의 구분이 어려운 점 등이 문제다.

상기한 종의 특이성, 즉 화학물질에 대한 종간의 양적, 질적독성효과의 차이는 태자세포 및 조직의 유전적 차이와 민감성의 차이에 기인한 것으로 일반적으로 받아들여지고 있다. 그러나 종의 특이성의 주요 요인은 약역학(pharmacokinetics)의 차이로 인식되고 있고 생식독성 시험에 있어서는 종간의 개체 발생의 차이,

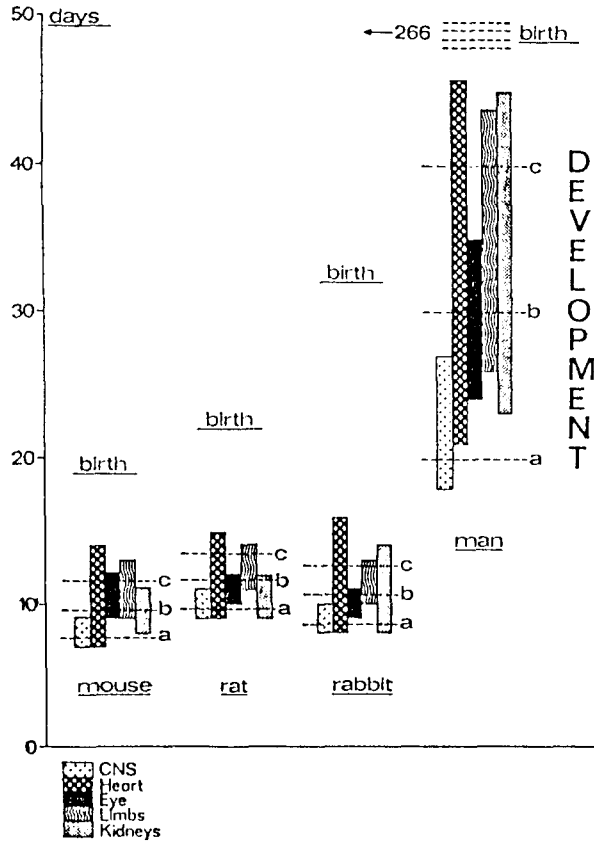


Fig. 1. Schematic presentation of the pattern of organogenesis in different species.

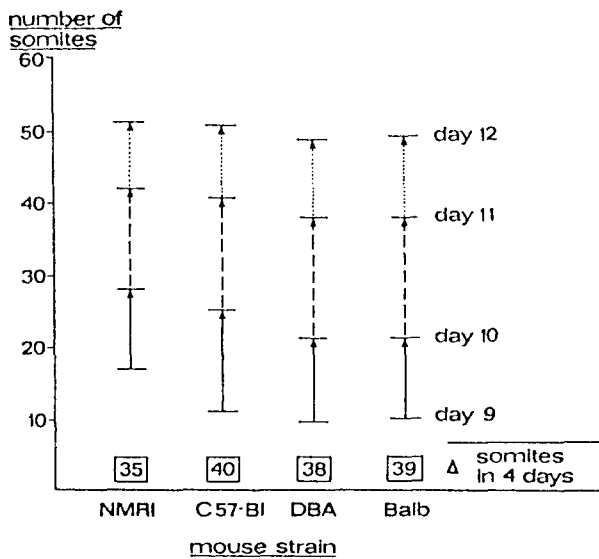


Fig. 2. Speed of development in different mouse strains.

즉 약동학(pharmacodynamics)의 차이로 상황은 더욱 복잡해진다.

화학물질의 양적인 독성평가(quantitative risk assessment)에 있어서 특히 동물실험 결과를 기초로 인간에게 적용할 수 있는 NOEL(no observed effect level)의 범위를 확립하는 일은 독성학에 있어서 가장 중요한 과제중의 하나로 생각된다. 따라서 생식독성 효과의 양적평가가 고려해야 할 제반요소와 원칙중에서 상기한 종의 특이성의 주요 요인이 되는 발생학적 차이점과 약역학의 차이점 그리고 투여용량 상관성 및 최기형 효과의 평가에 대해서 알아보려고 한다.

발생학적 차이점

개체발생은 종(species)간에, 모동물간(inter-litter variation)에 그리고 태자간(intra-litter variation)에 발생양식, 발생속도 그리고 임신기간 등에 있어서 차이를 나타낸다(Neubert *et al.*, 1985). 그림 1은 종간의 장기분화과정의 차이를 나타내고 있는데 기형유발 물질의 단위 투여시 나타나는 독성반응 및 기형양식의

Table 1. Rough comparison of the length of developmental periods in human

Development period	Days of gestation		Duration of period
	Rat	Man	Man/rat
Implantation	5-6	6-10	< 2x
Neural plate→closure of neuropores	9-11(3d)	18-27(10d)	3x
Heart tubes fuse→truncal septum completed	9-15(7d)	21-46(26d)	4x
Optical vesicle present→lens separated	10-12(3d)	24-35(12d)	4x
Forelimb bud visible→cartilagenous toes	11-14(4d)	26-44(19d)	5x
Pronephri formed→metanephri established	9-12(4d)	23-45(23d)	6x
"Embryonic period"	6-16(11d)	17-58(42d)	7x
"Fetal period"	17-22(6d)	59-266(208d)	35x
Gestational period	22	266	12x

Table 2. Example of the inter-and intra-litter variability of a developmental stage (pairs of somites) in NMRI mice

Litter No.	Number of somite pairs																Litter size	
	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
1												4			3		(7)	
2									3	1	1	2					(7)	
3							1	1		1		4	2	1			(10)	
4									2		4	4	1	1			(12)	
5								2	1		3	1	2		2	1	(12)	
6								1		1	1	4	4		1		1	(13)
7									1	1	3	1	4	2	1		(13)	
8			1						1	1	3	3	2	1			(13)	
9	1							1	1	5	4	1	1				(14)	
10											2	4	2	3	3		(14)	
Percental distribution	1		1		1	1	4	7	10	11	18	22	12	9	2	1%		
												40%						
												63					(n = 15)	

Somites were counted on day 11 of gestation.

차이는 이로써 설명할 수 있다. 또한 기형유발물질이 시점 (b)에 작용할 때에만 모든 종에 있어서 동일한 최기형효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

그림 2는 계통(strain)간의 발생속도의 차이를 보여주는데 극히 짧은시간 동안만 작용하는 기형유발 물질을 투여할 때에는 계통간의 독성반응의 차이가 나타날 수 있음을 시사해 주고 있다.

표 1에서 보는 바와 같이 인간의 기관형성기는 설치류보다 훨씬 길기때문에 설치류에 있어서 일회 투여로 기형유발이 가능한 약제라도 인체에서는 수회 투여가 필요함을 나타내고 있다.

상기한 약동학적 변수(개체의 발생양식, 발생속도, 임신기간등)의 차이는 종의 특이성(species-specificity)에 대한 주요한 요인들중의 하나에 속한다. 모동물간의 독성효과의 차이(inter-litter variation)는 주로 약역학의 차이에 기인한 것으로 인식되고 있는 반면 태자간의 약제에 대한 민감성이 차이(intra-litter variation)는 혈액공급이나 유전적 차이등으로 설명된다. 표 2는 NMRI mice에 있어서 모동물간의 그리고 태자간의 발생단계의 차이를 나타내고 있는데 다산동물에 있어서 intra-litter variation은 inter-litter variation 보다 더욱 심하다는 사실을 알 수 있다. 그런데 이와같은 결과는 내친종 쥐(inbred mice)에도 동일하게 나타났다.

모동물간에 그리고 태자간에 개체발생 및 독성반응의 차이는 종의 차이를 포함해서 생식독성 시험에 있어서 화학물질의 양적인 독성평가를 어렵게하는 요인이 된다.

약역학의 차이점

생식독성 평가시의 약역학 데이터의 중요성에 대해서는 비교적 잘 알려져 있지만 종간의 약역학적 차이는 아직 충분히 밝혀지지 않고 있다. 생식독성 검사에 있어서 주된 약역학적 검토항목은 다음과 같다.

- 1) 태자(배)에서의 약물농도 및 역학조사
- 2) 배나 태자조직의 대사활성 능력의 평가(종간의 차이를 고려)
- 3) 투여방법과 투여경로의 선택, 실험동물에서의 약역학적 데이터의 인체 외삽
- 4) 투여량 및 시간에 따른 동물과 인체에서의 혈중 또는 조직등에서의 약물의 농도비교

주된 실험동물로서의 설치류와 인체와의 가장 큰 차이중의 하나는 태자의 약물대사 능력으로서 태자 간조직(liver microsomes)에 존재하는 이물질 분해효소인 Monooxygenase의 활성화에 대한 차이점이다. 출생 직후에야 활성을 나타내는 설치류의 간조직과는 대조적으로 인간을 포함한 영장류의 간조직은 약물과 같은 외부물질에 대해 태아발생기초에 상당한 정도로 분해할 수 있는 능력을 보인다(Nau *et al.*, 1978). 따라서 설치류는 인체상황에 적합한 동물 모델이 아닐지도 모른다.

동물실험 결과에 기초한 양적 독성평가지 제기되는 또하나의 문제점은 표 3에서 보는 것과 같이 약의 반감기가 흔히 설치류에 있어서 인간에 비해 현저하게 짧다는 사실이다.

그림 3에서 보는바와 같이 랫트에 1일 1회 Chloramphenicol을 투여할 경우 임상치료시 인체에서 보여주는 결과와는 상이하게 최고 투여용량에서도 극히 짧은 약효 지속시간을 나타내고 있다.

Table 3. Comparison of half-lives of drugs in several animal species and human(Nau *et al.*, 1983)

Drug	Half-life (h)					
	Mouse	Rat	Rabbit	Dog	Monkey	Man
Valproic acid	0.8	1~4		1~4	0.7	8~16
Primidone	1~3					3~17
Phenobarbital	3~4					50~150
Diazepam	1.1	1	3	8		20~50
Hexobarbital	0.3	2	1	4		3~7
Phenylbutazone		6	3	2~6	8	72
Oxyphenylbutazone		6	3	0.5~6	8	72
Antipyrine		1		1~2	1~2	12

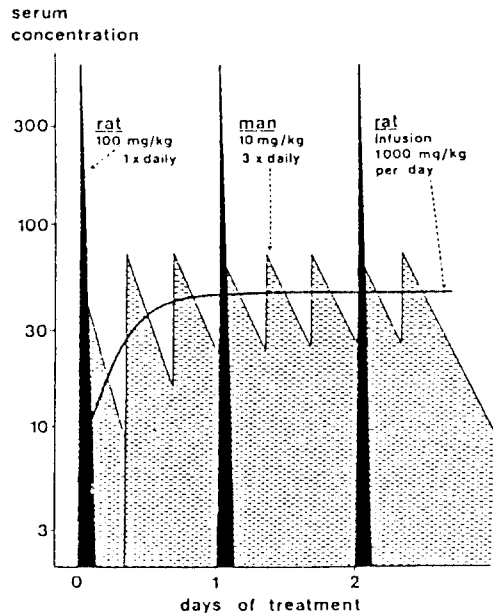


Fig. 3. Comparison of the pharmacokinetics in rats under experimental conditions with that in human. Example of data based on studies with Chloramphenicol (Oerter *et al.*, 1975).

5간의 약역학적 차이에 기인된 이러한 문제점들을 극복하기 위한 방법을 다음과 같이 제시해 본다.

- 1) 통상적 1일 1회 공시약제의 투여에서 1일 여러차례 투여하는 방법
- 2) 약제의 연속 정맥 투여법(Oerter *et al.*, 1975)
- 3) 약제의 지속적 투여기구인 osmotic mini-pump를 이용한 투여법 (Nau *et al.*, 1981)
- 4) 약제의 연속 피하투여법(Chung *et al.*, unpublished)

이러한 방법이 적절히 응용된다면 인체의 실제 상황에 근접할 수 있는 약역학적 데이터를 생식독성시험에서 얻을 수 있다고 판단된다. 화학물질의 생식 독성시험 실시전에 종간의 반감기의 차이를 충분히 고려함으로써 동일실험의 반복을 피할 수 있고 양적인 독성평가의 신뢰도는 높아질 것이다.

투여용량 상관성

생식독성 효과중 최기형성, 치사 그리고 발육지연은 각각 구분해서 평가해야 하는데 그 이유는 발생 기전이 각각 다르기 때문에 상이한 용량상관성을 나타내기 때문이다(그림 4, Neubert *et al.*, 1980).

그런데 생식독성 시험에서 태자사망율(치사율)이 50% 이상일 때에는 독성효과의 전이 및 생존태자수의 부족으로 최기형 효과의 투여용량 상관성은 표현이 불가능하다. 한편 NMRI 마우스에 있어서 약제에 의한 태자발육지연의 효과적인 평가를 위한 검사항목으로는 미추(tail vertebrae)의 골화진행도가 가장 적합하다(Chung, 1989).

독성실험 결과의 재현성을 조사하기 위해 Hydroxyurea를 이용한 최기형 시험을 4년후 반복해서 실시하였을 때 동일한 실험조건하에서 최기형 효과의 재현은 가능했으나 그림 5에서 보는 바와같이 각각의 용량상관성의 경사도는 완전히 일치하지는 않았다.

생식독성 시험에 있어서 투여량과 독성효과와의 상관성을 표현하기 위해서 주로 이용되는 방법은 전체 태자수를 계산의 기초로 하는 probit analysis이다. 그러나 모동물간의 약역학적 차이때문에 동복자(litter)를 통계단위로 사용하자는 주장도 있다(Staples *et al.*, 1974). Hydroxyurea를 이용한 최기형 시험의 경우

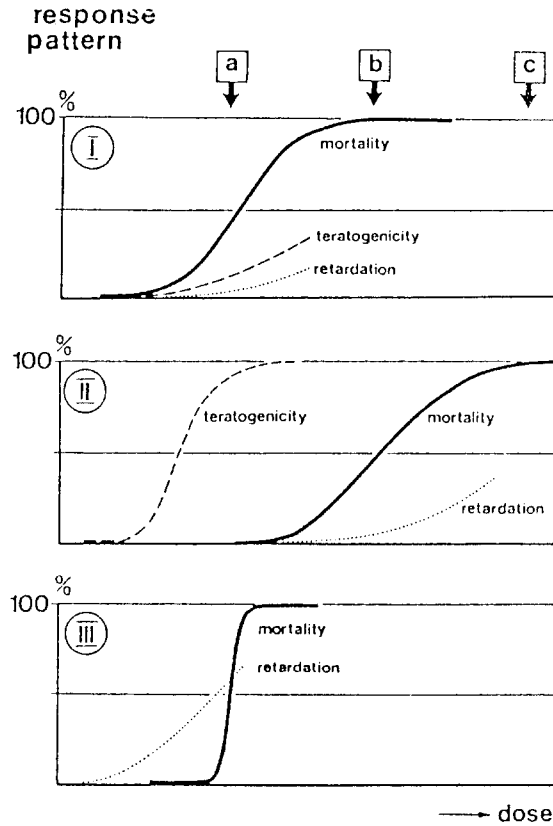


Fig. 4. Hypothetical response pattern of an embryotoxic action.

통계단위(total fetuses or litter)에 관계없이 두개의 회귀직선은 거의 비슷하게 나타났다(그림 5, 6). 주된 차이점으로는 “per-litter approach”의 경우 회귀직선의 신뢰한계와 투여용량의 표준편차가 현저히 크다. 현재 동복자(litter)간의 차이와 산자수(litter size)를 고려한 새로운 모델이 개발되고 있다.

Platzek *et al.* (1982)은 Ethylmethanesulfonate의 최기형 효과(dose-effect)를 생화학적 변화, 즉 o-guanine의 알킬화와 상관시켰다. 이로써 용량상관곡선이 독성효과를 양적으로 표현하는 중요한 수단이라는 사실은 더욱 명백해 진다.

최기형 효과의 평가

Cyclophosphamide를 이용한 최기형 시험에서 Jusko (1972)는 NOEL의 범위를 정할 수 없었고 아직도 약제에 따라서는 NOEL의 확립이 불가능하다는 주장도 있다. 오늘날 동물실험 결과를 기초로 어떤 화학물질에 대해 인간을 위한 양적 독성평가를 실시하는 두가지 절차가 있다.

- 1) NOEL의 확립과 1일 섭취허용량을 제시하는 안전계수의 사용
- 2) 실험적으로 조사불가능한 투여용량까지 외삽기 위한 수학적 모델의 사용

최기형 시험에서는 발암성 시험을 제외한 다른 독성시험에서와 마찬가지로 상기 1)의 방법이 주로 사용되고 있다.

결론적으로 화학물질에 대한 최기형 효과의 올바른 약적평가는 종의 특이성을 고려한 실험동물의 선택과 NOEL의 확립, 약역학적 데이터의 고려 및 안전계수(약 10~30)의 사용으로 가능해진다.

종의 특이성(species-specificity)은 생식독성학에 있어서 가장 중요한 문제중의 하나에 속하지만 아직 까지 충분하게 주의력이 집중되고 있지 않다. 세포 및 형태분화를 포함한 개체발생기전과 종간의 약역학적

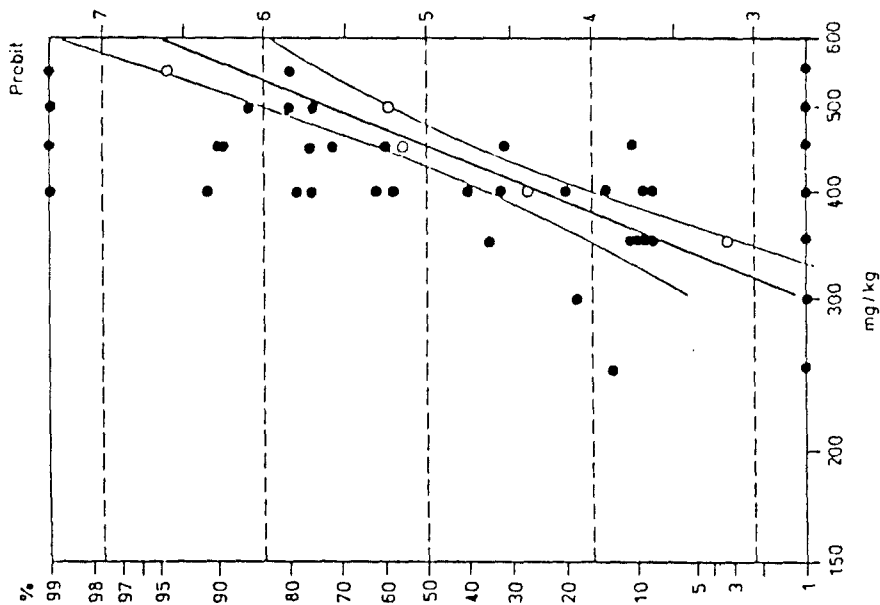


Fig. 6. Plot of the dose-response relationship for tail abnormalities following *i.p.* treatment with hydroxyurea on day 11 p.c. ("per-litter approach").

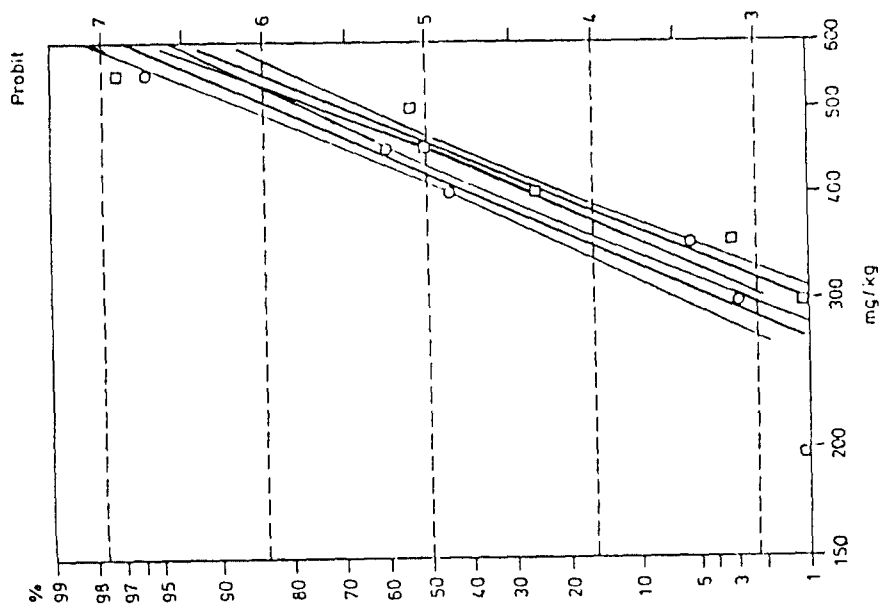


Fig. 5. Comparison of two dose-response curves from two studies on the teratogenicity of hydroxyurea (*i.p.* treatment on day 11 p.c.) in Wistar rats (tail abnormalities, probit analysis, "per-fetus approach").

차이 그리고 아울러 약제의 독성작용기전, 생식독성학적 일반원칙 및 검색방법 등에 대해 심도있는 연구조사가 실시된다면 생식독성 시험에 있어서 양적인 독성평가의 신뢰성은 더욱 높아질 것이다.

참고문헌

- Becker, B.A. (1974): The statistics of teratology, *Teratology*, **9**, 261-262.
- Chung, M.K. (1989): Zusammenhang zwischen fetengewicht und ossifikation bei dem Maeuseauszuchtstamm Han:NMRI an Tag 18 der Schwangerschaft, (Dissertation), Freie Universitaet Berlin.
- Jusko, W.J. (1972): Pharmacodynamic principles in chemical teratology: dose-effect relationships, *J. Pharmacol Exp. Ther.*, **183**, 469-480.
- Kalter, H. (1974): Choice of the number of sampling units in teratology, *Teratology*, **9**, 257-258.
- Nau, H. and Neubert, D. (1978): Development of drug-metabolizing monooxygenase systems in various mammalian species including man. Its significance for transplacental toxicity, in *Role of Pharmacokinetics in Prenatal and Perinatal Toxicology* (Neubert D., Merker, H.J., Nau, H., Langman, J. (Eds.), Thieme, Stuttgart), p. 13-44.
- Nau, H., Zierer, R., Spielmann, H., Neubert, D. and Gansau, Ch. (1981): A new model for embryotoxicity testing: Teratogenicity and pharmaokinetics of valproic acid follwing constant-rate administration in the mouse using human therapeutic drug and metabolite concentratins, *Life Sci.*, **29**, 2803-2814.
- Nau, H. (1983): The role of delivery systems in toxicology and drug development, *Pharmacy Internationa*, p. 228-231.
- Neubert, D. (1978): Bedeutung pharmakokinetischer Parameter fuer die Teratologie. in *Embryotoxikologische Probleme der Arzneimittelforschung*, AMI-Berichte 1/78. Schnieders B., Stille G., Grosdanoff P. (Eds.) Reimer, Berlin) p. 83-88.
- Neubert, D. and Barrach, H-J. (1977): Organotropic effects and dose-response relationships in teratology, in *Methods in Prenatal Toxicology* (Neubert D., Merker, H.-J. and Kwasigroch, TE. (Eds.) Thime, Stuttgart), p. 405-412.
- Neubert, D., Barrach, H.-J. and Merker, H.-J. (1980): Drug-induced damage to the embryo or fetus (Molecular and multilateral approach to prenatal toxicology) in *Current Topics in Pathology* (Grundmann E. (Ed), Springer, Berlin Heidelberg New York) Vol. 69, p. 241-331.
- Neubert, D. and Chahoud, I. (1985): Significance of species and strain differences in pre-and perinatal toxicology, *Acta Histochem.* **31**, 23-35.
- Neubert, D., Merker, H.-J., Nau, H. and Langman, J. (Eds) (1978): Role of Pharmacokinetics in Prenatal and Perinatal Toxicology, 3rd Symp. on Prenatal Development, Berlin. Thieme. Sturragrt.
- Oerter, D. and Bass, R. (1975): Embryonic development and mitochondrial function. 1. Effects of chloramphenicol infusion on the synthesis of cytochrome oxidase and DNA in rat embryos during late organogenesis, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **290**, 175-189.
- Platzek, T., Bochert, G., Schneider, W. and Neubert, D. (1982): Embryotoxicity

induced by alkylating agents: 1. Ethylmethanesulfonate as a teratogen in mice. A model for dose-response relationships of alkylating agents, *Arch. Toxicol.*, **51**, 1-25.

Staples, R.E. and Haseman, J.K. (1974): Selection of appropriate experimental units in teratology, *Teratology*, **9**, 259-260.