

랫드에서 *cis*-Malonato[(4*R*,5*R*)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl
-1,3-dioxolane]platinum(II)(SKI 2053R)의
아급성독성시험에 관한 연구

김형욱 · 강경선 · 신동진 · 조재진 · 김배환 · 서광원 · 남기환 · 이영순

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

**SUBACUTE TOXICITY OF
cis-MALONATO[(4*R*,5*R*)-4,5-BIS(AMINOMETHYL)
-2-ISOPROPYL-1,3-DIOXOLANE]PLATINUM(II)
(SKI 2053R) IN RATS**

Hyoung-Ook Kim, Kyung-Sun Kang, Dong-Jin Shin, Jae-Jin Cho, Bae-Hwan Kim,
Kwang-Won Seo, Ki-Hoan Nam, Yong-Soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

(Received November 12, 1992)

(Accepted December 29, 1992)

ABSTRACT: This study was performed to determine the toxic effects of graded dose levels of SKI 2053R after repeated administration. Three groups of Sprague-Dawley rats (10 M and 10 F per group) were given a total of 25 i.v. injections of SKI 2053R (1.50, 3.75, 9.38 mg/kg/day). In order to compare the toxic effects of SKI 2053R with those of cisplatin, one group of Sprague-Dawley rats (10 M and 10 F per group) were given a total of 25 i.v. injections of cisplatin (1.70 mg/kg/day). The dosing schedule was divided into five courses of 5 consecutive days with 16-day dose-free intervals between each course. No drug-related toxicity occurred in low dose level group (1.50 mg/kg/day) of SKI 2053R. From the results of hematological examination, peripheral WBC counts, RBC counts and hemoglobin of high dose level group (9.38 mg/kg/day) of SKI 2053R were significantly lower than those of no-treated group. Other toxicities including reduced final body weight, proteinuria and hematuria were observed in high dose level group of SKI 2053R. But, no change was detected in serum biochemical values of SKI 2053R treated groups. All of the rats in cisplatin treated group were died between 3 and 13 weeks, while rats treated with SKI 2053R survived to the end except one rat of middle dose level group

(3.75 mg/kg/day). In histopathological examinations, rats that received cisplatin manifested severe tubular damage in kidney and hemosiderosis in spleen, but no critical pathological lesion was observed in rats of other groups. Considering the results of this study, it was concluded that non-toxic dose of SKI 2053R in this treatment schedule was estimated to be 3.75 mg/kg/day and the maximum tolerated dose was to be higher than 9.38 mg/kg/day. The toxic profiles of SKI 2053R were different from those of cisplatin, and its toxicity was considerably lower than that of cisplatin.

Key Words: cis-Malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]platinum(II)(SKI2053R), Subacute toxicity, Rats.

서 론

Cisplatin(*cis*-dichlorodiammineplatinum(II) or CDDP)은 백금이온과 두개의 chloride ion, 2개의 amine group이 결합된 화합물이다. 1970년대에 항암제로서 확립된 이후로(Rosenberg 등, 1969) 난소 및 정소의 종양을 비롯하여 다양한 암의 치료제로 사용되어 왔다. 특히 기존의 암치료제로는 효과를 보지 못했던 암에도 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 그러나 cisplatin은 매우 심한 심장독성을 나타내며, 이러한 독성기전은 신장 세뇨관상피의 수분 및 전해질 수송을 직접적으로 방해하기 때문이라고 보고되었으며(Field 등, 1989), 임상적으로 나타나는 기타의 부작용으로는 오심, 구토, 과민반응, 골수 및 말초신경독성등이 알려져 있다(Jenkins 등, 1991). Cisplatin이 나타내는 세포독성은 선택적인 DNA 합성억제에 의한 것이며 DNA strand의 내부 혹은 그 사이로 교차연결을 이루기 때문이다(Jenkins 등, 1991).

Cisplatin은 심각한 독성에도 불구하고 비교적 좋은 항암효과를 발휘하기 때문에 *cis*-1,1-di(aminomethyl)cyclohexaneplatinum(II), *cis*-diammine-1,1-cyclobutane-dicarboxylateplatinum(II), *cis*-dichloro, *trans*-dihydroxy-bis-isopropylamineplatinum(IV)와 같이 유사한 구조를 가지는 다양한 화합물들이 항암효과를 유지하면서 독성을 감소시킬 목적으로 개발되었다(Lelieveld 등, 1984). 국내에서도 (주)선경인더스트리에 의하여 백금화합물이 개발되어 효과적인 항암작용을 나타내는 것으로 판단되어 국립보건안전연구원 예규 제 10 호 “의약품 등의 독성 시험에 관한 지침”에 따라서 (주)선경인더스트리에서 개발된 항암물질 SKI 2053R의 임상시험에 앞서 랫드에서 아급성독성시험을 실시하였다.

재료 및 방법

시험물질

(주)선경인더스트리가 개발한 platinum 유도체 항암체인 *cis*-malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]platinum(II)(SKI 2053R, NSC D644591)를 이용하였으며, 양성대조물질로는 *cis*-dichlorodiammineplatinum(II) (Aldrich Chem Co.)를 사용하였다.

실험동물

서울대학교 실험동물사육장에서 3주령의 암수 랫드(Sprague Dawley) 140마리를 공급받아

약 1주일동안 실험실에서 순환시키며 임상증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다. 각 군에 배치되는 동물은 평균체중이 수컷 190~191 g, 암컷 168~169 g으로 고르게 분포되도록 군을 분리하였다. 개체식별은 피모색소(피크린산)로 마킹하였고 랫드용 폴리카보네이트 케이지 (26×42×18 cm, 명진기계)당 3마리씩 수용하였다.

사육환경

온, 습도 범위는 각각 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%이었으며, 환기회수는 10~12회/hr, 명암 cycle 형광등 조명(07:00 점등~19:00 소등), 조도는 150~300 lux로 조정하여 시험 전 기간동안 일정하게 유지하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(제일사료)를 자유 섭취시켰으며, 음수는 상수도수를 자유 섭취시켰다.

시험물질 조제와 투여방법

시험의뢰자측이 조제하여 공급한 분말의 시료를 투여당일에 생리식염수에 녹여 조제한 후 0.22 μm membrane filter (Millipore, USA)를 이용하여 무균적으로 여과한 후 정맥내로 투여하였으며, 투여횟수는 5일 연속 투여하고 16일 휴식시키는 투여방법을 각 5회 반복하였다. 본 시험의 투여 방법이 국립보건안전연구원 예규와 달리 투여된 이유는 본 시험물질이 항암제로서 계속적으로 투여할 수 없기 때문에 사람에서의 임상투여 schedule에 준하여서 투여하였기 때문이다. 이러한 투여방법은 미국 NCI의 항암물질의 전임상단계에서, 개에서 독성을 평가하는데 사용되는 protocol의 일환이므로 이를 참조하였다(David 등, 1973).

또한 SKI 2053R의 투여량은 랫드에서의 급성독성시험에서 복강투여시 얻어진 LD₅₀값(약 204.50 mg/kg/day)을 기준으로, 최고용량투여군의 총투여량(234.38 mg/kg/day)이 LD₅₀값과 근사치가 되도록 공비 2.5배로 하여 3개 용량군을 설정하고, cisplatin 양성대조군은 cisplatin 연속 투여 자료(Leonard 등, 1971)를 바탕으로 총투여량이 42.50 mg/kg이 되도록 설정하였다.

시험군의 구성

시험군은 무처리 음성대조군(T1), 저용량투여군(T2), 중간용량투여군(T3), 고용량투여군(T4), 양성대조군(cisplatin, T5)의 5개군을 두었으며 암,수 각각 10마리의 동물로 구성하였다. 각군의 투여량은 저용량투여군은 SKI 2053R 1.50 mg/kg/day, 중간용량투여군은 SKI 2053R 3.75 mg/kg/day, 고용량투여군은 SKI 2053R 9.38 mg/kg/day, 양성대조군은 cisplatin 1.70 mg/kg/day으로 설정하였다.

시험 항목

시험 기간중에 1일 1회 일반증상을 관찰하여 일반 임상증상의 종류와 그 정도 등을 기록하였다. 사료 섭취량 측정은 주 1회씩 3개월간 사육상자별로 급여총량과 잔량을 측정하여 한마리당 섭취량을 계산하였으며, 음수 섭취량은 주 1회씩 3개월간 사육상자별로 급여총량과 잔량을 측정하여 한마리당 섭취량을 계산하였다. 모든 동물에 대하여 시험종료시까지 매주 1회 측정하였다.

투여전에 전 동물에 대하여 안검사를 실시하고, 투여 최종주에 각 군을 비교하여 검사하였다. 모든 동물에 대하여 투여 최종주에 대사 케이지에 24시간 넣어서 채뇨한 후 외관과 뇨량을 관찰한 다음 뇨검사용 시험지(Ames Co. N-multistix)를 사용하여 pH, protein, nitrite, urobilinogen, bilirubin, glucose 및 blood를 측정하였다.

일반 혈액학적 검사는 에테르 마취 후 복대정맥을 통하여 채혈하여 적혈구수(RBC), 백혈구수(WBC), 헤마토크리트치(Hct), 헤모글로빈(Hgb), 평균적혈구용적(MCV), 혈소판수(PLT) 등을 Coulter counter S-plus IV(Coulter)를 이용하여 측정하였으며, 혈청생화학적 검사는 채취한

혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하여 응고 후 원심분리(3,000 rpm, 15 min)해서 얻은 혈청에 대해서 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), alkaline phosphatase (ALP), 총콜레스테롤(total cholesterol), 중성지방(triglyceride), 혈당(blood glucose), 총단백(total protein), bilirubin, 혈액요소질소(BUN), creatinine, albumin, Na 및 K 등을 자동분석기(RA-XT, Technicon)를 이용하여 측정하였다.

시험기간 중 폐사동물이나 빈사동물 및 시험종료 후 모든 생존동물에 대하여 ether로 흡입 마취시킨 후에 방혈, 치사시켜 육안적으로 장기를 검사하였고, 모든 실험동물에 대하여 간장, 신장(좌, 우), 비장, 심장, 폐장, 부신(좌, 우), 뇌, 갑상선, 난소(좌, 우), 고환(좌, 우)의 중량을 측정하여 체중에 대한 상대비를 계산하였다.

병리조직 검사를 위하여 실험동물 모두에 대하여 충분한 방혈을 시킨 후, 장기중량측정이 끝난 모든 장기를 10% 중성 포르말린액에 2주일 이상 충분히 고정하고, 모든 장기조직은 자동조직처리기(Fisher, Histomatic Tissue Processor, 166A)를 거쳐 파라핀 포매기(Reichert-Jung, Tissue Embedding Center)로 포매하여 Microtome(AO, Rotary Microtome)으로 두께 4 μ m 절편을 만들어 hematoxylin & eosin 염색을 하여 관찰하였다.

통계학적 분석

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 GLM(general linear model)을 실시하여 유의차가 있는 F값이 관찰되는 검사항목은 각 용량군과 대조군간의 유의성을 검정하기 위하여 Dunnett's t-test를 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다. 또한, 병리조직학적으로 관찰된 병변의 분석은 χ^2 (Chi-square) 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

임상증상 및 폐사율

SKI 2053R의 모든 용량 투여군에서 아무런 임상증상을 관찰할 수 없으며 (Table 1, 2), 폐사 및 빈사동물이 시험 전기간을 통하여 중간용량의 1 예를 제외하고는 관찰되지 않았다. 그러나 cisplatin을 투여한 양성대조군에서는 투여 후 3주째부터 폐사하는 동물이 관찰되었으며 시험 13주에는 모든 동물이 폐사하였다(Figure 1, 2).

체중변화

Figure 3, 4에 매주 측정된 각 군의 체중변화를 나타내었다. 양성대조물질인 cisplatin을 투여한 군의 체중은 모든 개체가 폐사할 때까지 SKI 2053R 투여군에 비해 뚜렷하게 낮았으며, SKI 2053R 투여군 간의 체중은 유사한 양상을 나타내었으나, 최종 부검시 암컷 랫드 고용량군이 대조군에 비하여 유의한 체중감소를 나타내었다($p < 0.05$).

사료섭취량 및 음수섭취량 변화

양성대조군은 현저한 사료섭취량의 감소를 보였으나 SKI 2053R 투여군 암수 모두에서는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이를 관찰하지 못하였다(Figure 5, 6). 음수소비량 역시 양성대조군은 현저한 감소를 보였으나 SKI 2053R 투여군 암수 모두에서는 유의한 차이를 관찰하지 못하였다(Figure 7, 8).

안검사

모든 시험군을 대상으로 시험 개시전과 시험 종료 직전에 안검사를 실시하였으며, 암수 모

Table 1. Clinical findings of male SD rats

Periods	Group	T1	T2	T3	T4	T5
	Dose(mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38	1.70
No. of animal observed		10	10	10	10	10
1st injection course		ND	ND	ND	ND	ND
1st dose free course		ND	ND	ND	ND	dirty skin
No. of animal observed		10	10	9	10	9
2nd injection course		ND	ND	ND	ND	dwarfish, depress
2nd dose free course		ND	ND	ND	ND	death, anorexia
No. of animal observed		10	10	9	10	7
3rd injection course		ND	ND	ND	ND	emaciation, glow slowly
3rd dose free course		ND	ND	ND	ND	dwarfish, death
No. of animal observed		10	10	9	10	4
4th injection course		ND	ND	ND	ND	death, anemic sign
4th dose free course		ND	ND	ND	ND	dwarfish, diarrhea, death
No. of animal observed		10	10	9	10	0
5th injection course		ND	ND	ND	ND	—
5th dose free course		ND	ND	ND	ND	—

ND: No detectable clinical sign

Table 2. Clinical findings of female SD rats

Periods	Group	T1	T2	T3	T4	T5
	Dose(mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38	1.70
No. of animal observed		10	10	10	10	10
1st injection course		ND	ND	ND	ND	ND
1st dose free course		ND	ND	ND	ND	B.W. decrease
No. of animal observed		10	10	10	10	10
2nd injection course		ND	ND	ND	ND	anorexia, depress
2nd dose free course		ND	ND	ND	ND	dwarfish, motionless
No. of animal observed		10	10	10	10	4
3rd injection course		ND	ND	ND	ND	dwarfish, diarrhea
3rd dose free course		ND	ND	ND	ND	dirty skin, death
No. of animal observed		10	10	10	10	2
4th injection course		ND	ND	ND	ND	anemic sign, depress
4th dose free course		ND	ND	ND	ND	dwarfish, diarrhea, death
No. of animal observed		10	10	10	10	0
5th injection course		ND	ND	ND	ND	—
5th dose free course		ND	ND	ND	ND	—

ND: No detectable clinical sign

두에서 대조군과 SKI 2053R 투여군을 비교한 결과, 시험군에서 아무런 이상을 발견할 수 없었다. 양성대조군은 시험종료 이전에 모든 동물이 폐사하여 검사하지 못하였다.

노검사

노검사 결과, SKI 2053R의 수컷 시험군에서 잠혈의 빈도가 투여용량이 높아질수록 용량의 존적으로 빈발하는 경향을 보였으며 많은 개체에서 단백뇨가 검출되었다(Table 3).

암컷 시험군에서도 역시 잠혈의 빈도가 시험군에서 높게 나타났으며 단백뇨는 투여용량이 증가함에 따라 용량의존적으로 검출빈도 및 검출량이 증가하였다. 고용량 투여군에서 bilirubin의 농도가 다소 높았으나 용량의존적 경향은 관찰할 수 없었다(Table 4).

양성대조군은 시험종료 이전에 모든 동물이 폐사하여 검사하지 못하였다.

혈액학적 검사

수컷 고용량군에서는 대조군에 비하여 백혈구, 혈소판치가 유의한 낮은 수치를 나타내었으며 중간용량 및 고용량군에서 MCV치는 음성대조군에 비하여 유의성 있게 높게($p < 0.05$) 관찰되었으나 정상범위를 벗어나는 값은 아니었다. 또한 중간용량군 및 저용량군에서는 주목할만한 변화를 관찰하지 못하였다(Table 5). 양성대조군은 시험종료 이전에 모든 동물이 폐사하여 검

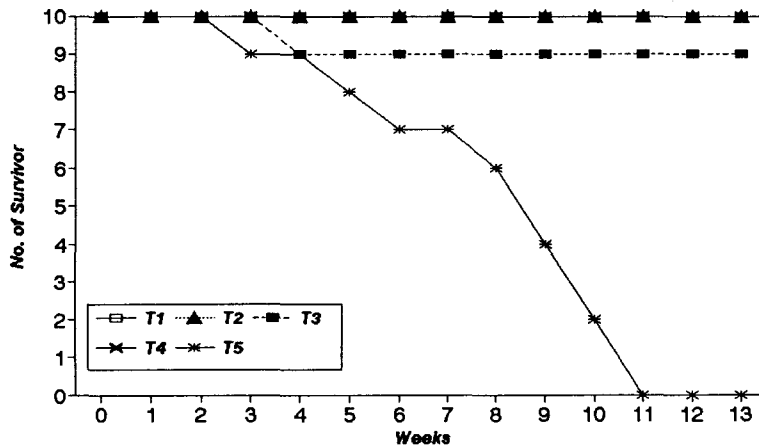


Figure 1. Mortality of male rats.

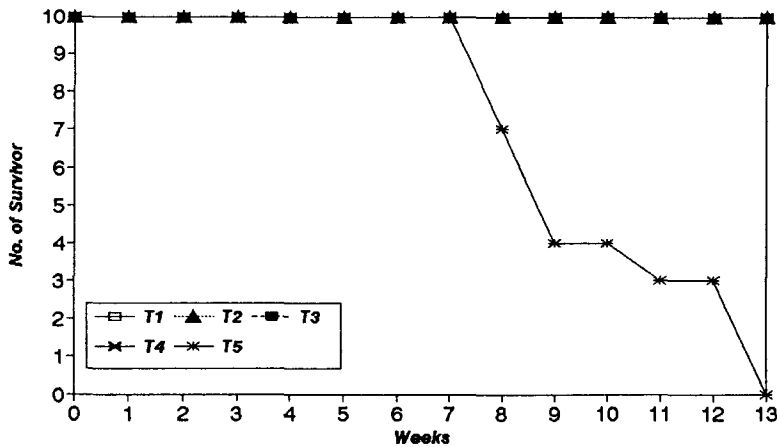


Figure 2. Mortality of female rats.

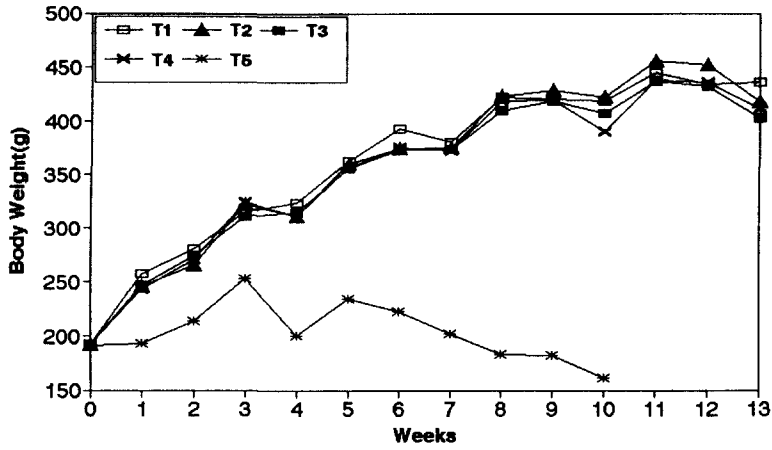


Figure 3. Body weight changes of male rats.

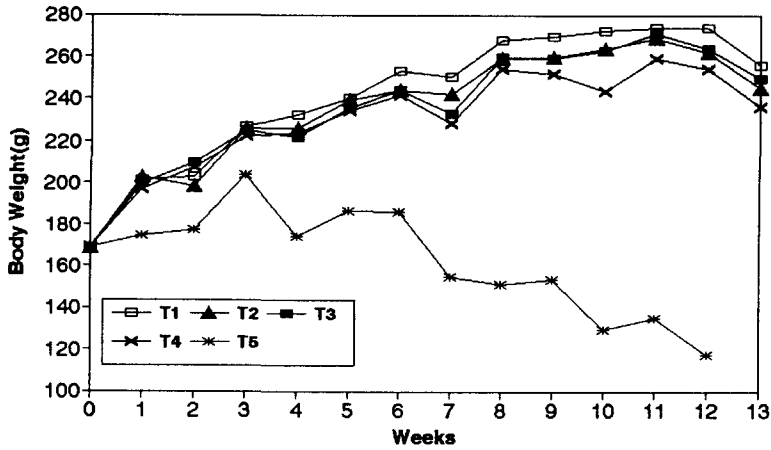


Figure 4. Body weight changes of female rats.

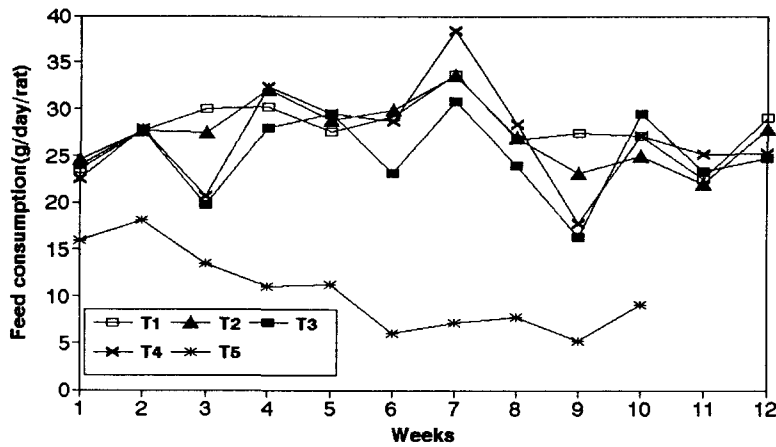


Figure 5. Feed consumption changes of male rats.

Table 3. Urinalysis of male SD rats

Parameters	Detection level	Group(Dose, mg/kg/day)			
		T1(0)	T2(1.50)	T3(3.75)	T4(9.38)
Urobilinogen (Ehrlich unit/dl)	normal	10	9	9	8
	1.0	0	1	0	2
	2.0	0	0	0	0
Nitrite	-	10	10	9	9
	+	0	0	0	1
Blood	normal	6	4	3	0
	± (no hemolysis)	3	6	3	2
	± (hemolysis)	1	0	3	3
	+	0	0	0	3
	++	0	0	0	2
	+++	0	0	0	0
Bilirubin	-	5	3	1	8
	+	5	2	2	2
	++	0	5	6	0
	+++	0	0	0	0
Ketone body (mg/dl)	-	6	5	4	7
	± 5	4	5	5	2
	+15	0	0	0	0
	++40	0	0	0	1
Glucose (g/dl)	-	10	9	9	10
	± 0.1	0	1	0	0
	+0.25	0	0	0	0
Protein (mg/dl)	-	2	0	0	0
	±	3	1	0	4
	+30	3	5	3	0
	++100	2	4	4	4
	+++300	0	0	2	2
pH	5.0	0	0	0	0
	6.0	0	1	0	2
	6.5	8	4	6	4
	7.0	1	4	3	4
	7.5	1	1	0	0
	8.0	0	0	0	0
	8.5	0	0	0	0
Specific gravity	1.005	0	0	1	1
	1.010	0	2	0	1
	1.015	3	1	4	0
	1.020	2	1	2	2
	1.025	2	4	2	2
	1.030	3	2	0	4

사하지 못하였다.

암컷에서는 고용량군에서 대조군에 비하여 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈, Hct 치가 유의한 낮은 수치를 나타내었고, MCV치는 유의하게 높게 관찰되었으나($p < 0.05$) 정상범위를 벗어나는 값은

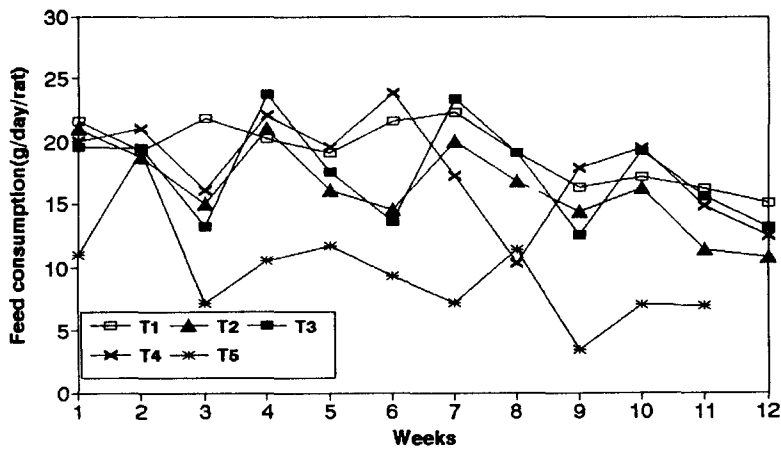


Figure 6. Feed consumption changes of female rats.

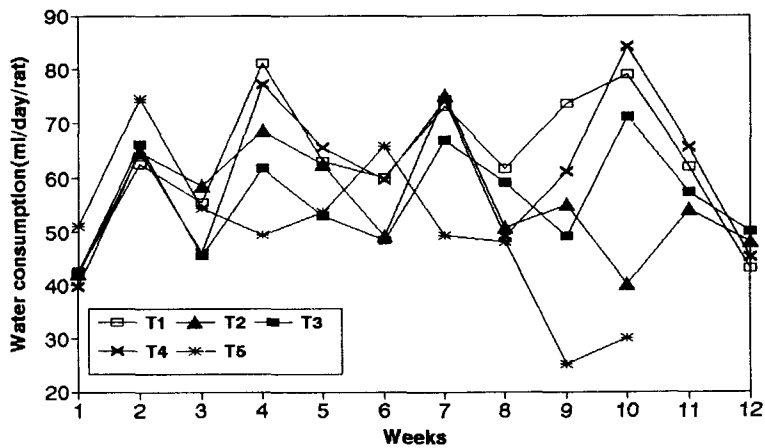


Figure 7. Water consumption changes of male rats.

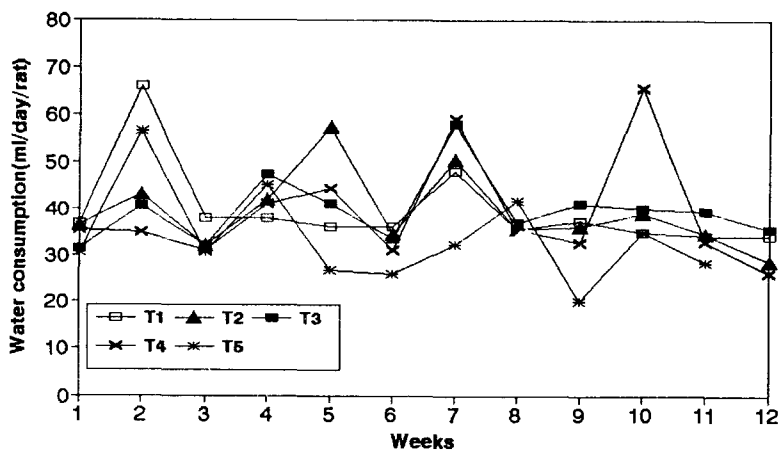


Figure 8. Water consumption changes of female rats.

Table 4. Urinalysis of female SD rats

Parameters	Detection level	Group(Dose, mg/kg/day)			
		T1(0)	T2(1.50)	T3(3.75)	T4(9.38)
Urobilinogen (Ehrlich unit/dl)	normal	10	8	9	8
	1.0	0	2	1	2
	2.0	0	0	0	0
Nitrite	-	10	10	10	9
	+	0	0	0	1
Blood	normal	9	6	5	4
	± (no hemolysis)	1	1	2	5
	± (hemolysis)	0	3	2	0
	+	0	0	1	0
	++	0	0	0	1
Bilirubin	+++	0	0	0	0
	-	9	4	3	3
	+	1	5	5	4
	++	0	1	2	3
	+++	0	0	0	0
Ketone body (mg/dl)	-	10	9	10	9
	± 5	0	1	0	1
	+15	0	0	0	0
	++40	0	0	0	0
Glucose (g/dl)	-	10	10	9	9
	± 0.1	0	0	1	1
	+0.25	0	0	0	0
Protein (mg/dl)	-	5	6	1	0
	±	2	3	3	1
	+30	2	1	4	5
	++100	1	0	2	4
	+++300	0	0	0	0
pH	5.0	0	0	3	0
	6.0	2	4	2	2
	6.5	6	2	5	4
	7.0	0	4	0	4
	7.5	2	0	0	0
	8.0	0	0	0	0
Specific gravity	1.005	0	0	0	1
	1.010	2	0	0	1
	1.015	0	0	0	0
	1.020	1	3	3	2
	1.025	1	4	4	2
	1.030	6	3	3	4

아니었다. 중간용량군에서는 대조군에 비해 적혈구와 헤모글로빈치가 유의하게 낮게 관찰되었으며 MCV는 유의하게 높았으나($p < 0.05$), 역시 정상범위를 벗어나는 값은 아니었다. 저용량군에서는 대조군에 비해 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Table 6). 양성대조군은 시험종료 이전에 모든 동물이 폐사하여 검사하지 못하였다.

Table 5. Hematological values of male SD rats

Group	T1	T2	T3	T4
Dose (mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38
No. of animal	10	10	9	10
WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)	9.72 \pm 2.79	15.79 \pm 2.65 ^a	8.56 \pm 1.34	3.92 \pm 1.02 ^a
RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.57 \pm 0.32	8.07 \pm 1.50	7.67 \pm 0.35	6.54 \pm 0.74
Hgb(g/dl)	15.45 \pm 0.59	16.19 \pm 1.74	15.58 \pm 0.54	13.61 \pm 2.05
Hct(%)	44.02 \pm 1.28	42.69 \pm 8.28	41.30 \pm 1.73	37.25 \pm 4.31
MCV(fl)	51.28 \pm 1.64	52.76 \pm 1.50	53.81 \pm 1.28 ^a	56.75 \pm 1.80 ^a
MCH(pg)	18.01 \pm 1.07	20.76 \pm 4.93	20.33 \pm 0.78	20.69 \pm 1.07
MCHC(%)	34.75 \pm 1.27	39.30 \pm 9.30	37.74 \pm 0.86	36.42 \pm 1.47
RDW*	13.13 \pm 0.77	14.51 \pm 1.03	14.80 \pm 0.75 ^a	16.10 \pm 1.18 ^a
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	805 \pm 100	901 \pm 84	800 \pm 72	221 \pm 120 ^a

Data were presented as mean \pm S.D.

a: Significantly different from T1 group (p<0.05)

$$\text{*RDW(Red cell distribution width)} = \frac{\text{standard deviation}}{\text{mean MCV}} \times 100$$

Table 6. Hematological values of female SD rats

Group	T1	T2	T3	T4
Dose (mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38
No. of animal	10	10	10	10
WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)	8.96 \pm 3.03	6.79 \pm 3.09	6.66 \pm 1.31	3.17 \pm 0.86 ^a
RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7.75 \pm 0.61	7.26 \pm 0.72	6.96 \pm 0.39 ^a	5.20 \pm 0.91 ^a
Hgb(g/dl)	16.03 \pm 0.56	14.64 \pm 1.24	13.91 \pm 1.17 ^a	10.74 \pm 1.84 ^a
Hct(%)	41.94 \pm 3.20	39.98 \pm 3.14	38.87 \pm 2.22	30.00 \pm 4.93 ^a
MCV(fl)	54.12 \pm 0.97	55.06 \pm 1.56	55.82 \pm 1.53 ^a	57.70 \pm 1.41 ^a
MCH(pg)	20.81 \pm 2.03	20.15 \pm 0.72	20.01 \pm 1.26	20.66 \pm 0.81
MCHC(%)	38.14 \pm 3.57	36.55 \pm 1.15	35.78 \pm 1.93	35.76 \pm 0.90
RDW*	13.16 \pm 0.40	13.49 \pm 0.85	13.62 \pm 0.39	14.03 \pm 0.89
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	918 \pm 94	842 \pm 49	903 \pm 106	ND

Data were presented as mean \pm S.D.

a: Significantly different from T1 group (p<0.05)

ND: not detected

$$\text{*RDW(Red cell distribution width)} = \frac{\text{standard deviation}}{\text{mean MCV}} \times 100$$

부검소견

양성대조군을 제외한 모든 SKI 2053R 시험군에서 부검시 육안적으로는 어떠한 병변도 관찰할 수 없었다.

장기중량

수컷의 고용량 투여군에서 음성대조군에 비하여 간장의 상대중량이 유의하게 증가하였다(p<0.05, Table 7).

Table 7. Relative organ weights(%)* of male SD rats

Group	T1	T2	T3	T4
Dose (mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38
Organ				
Liver(%)	2.25± 0.18	2.42± 0.15	2.38± 0.19	3.31± 0.38 ^a
Spleen(%)	0.16± 0.02	0.14± 0.02	0.15± 0.01	0.13± 0.02
Kidney Left(%)	0.33± 0.04	0.32± 0.02	0.31± 0.01	0.32± 0.04
Kidney Right(%)	0.31± 0.02	0.33± 0.02	0.31± 0.01	0.33± 0.03
Heart(%)	0.31± 0.03	0.32± 0.03	0.32± 0.03	0.32± 0.01
Lung(%)	0.56± 0.08	0.59± 0.09	0.59± 0.04	0.47± 0.10
Thymus(%)	0.09± 0.11	0.06± 0.008	0.05± 0.02	0.05± 0.05
Adrenal Left(%)	0.007± 0.002	0.008± 0.002	0.006± 0.001	0.03± 0.08
Adrenal Right(%)	0.007± 0.002	0.006± 0.002	0.007± 0.002	0.006± 0.001
Brain(%)	0.48± 0.05	0.51± 0.03	0.54± 0.04	0.52± 0.04
Pituitary gland($\times 10^{-3}$ %)	2.30± 0.50	2.49± 0.32	2.37± 0.46	2.76± 0.27
Testis Left(%)	0.28± 0.13	0.39± 0.03	0.42± 0.04	0.38± 0.02
Testis Right(%)	0.34± 0.09	0.40± 0.04	0.42± 0.05	0.37± 0.02
Pancreas(%)	0.27± 0.10	0.20± 0.06	0.22± 0.07	0.20± 0.04

a: Significantly different from T1 group ($p < 0.05$)

*: Relative organ weight: (organ weight/body weight) $\times 100$ (%)

Table 8. Relative organ weights(%)* of female SD rats

Group	T1	T2	T3	T4
Dose (mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38
Organ				
Liver(%)	2.39± 0.09	2.38± 0.16	2.50± 0.23	3.05± 0.46 ^a
Spleen(%)	0.20± 0.02	0.23± 0.02	0.20± 0.02	0.19± 0.02
Kidney Left(%)	0.31± 0.02	0.32± 0.02	0.32± 0.02	0.35± 0.04
Kidney Right(%)	0.33± 0.02	0.32± 0.02	0.34± 0.03	0.37± 0.03
Heart(%)	0.36± 0.04	0.37± 0.03	0.37± 0.03	0.37± 0.03
Lung(%)	0.78± 0.02	0.81± 0.11	0.81± 0.14	0.67± 0.09
Thymus(%)	0.11± 0.01	0.10± 0.02	0.16± 0.26	0.03± 0.01
Adrenal Left(%)	0.01± 0.001	0.01± 0.002	0.01± 0.003	0.01± 0.003
Adrenal Right(%)	0.01± 0.003	0.01± 0.001	0.01± 0.003	0.01± 0.002
Brain(%)	0.76± 0.05	0.82± 0.03	0.77± 0.04	0.82± 0.07
Pituitary gland($\times 10^{-3}$ %)	4.60± 0.66	4.75± 0.33	4.25± 0.55	5.02± 0.80
Ovary Left(%)	0.01± 0.006	0.02± 0.004	0.02± 0.003	0.02± 0.006
Ovary Right(%)	0.02± 0.008	0.02± 0.003	0.02± 0.004	0.02± 0.008
Pancreas(%)	0.25± 0.08	0.27± 0.05	0.28± 0.04	0.23± 0.06

a: Significantly different from T1 group ($p < 0.05$)

*: Relative organ weight: (organ weight/body weight) $\times 100$ (%)

암컷 역시 고용량 투여군에서 음성대조군에 비하여 간장의 상대중량이 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$, Table 8).

혈청 생화학치 검사

수컷 고용량 투여군에서 total protein이 음성대조군에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

양성대조군은 시험종료 이전에 모든 동물이 폐사하여 검사하지 못하였다(Table 9).

암컷 고용량 투여군에서 음성대조군에 비해 total protein의 유의한 감소($p<0.05$), glucose는 유의한 증가($p<0.05$)를 보였으나 모두 정상범위에 속하는 값이었다(Table 10). 양성대조군은 시험종료 이전에 모든 동물이 폐사하여 검사하지 못하였다.

Table 9. Serum biochemical values of male SD rats

Group	T1	T2	T3	T4
Dose (mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38
No. of animal	10	10	9	10
ALT (u/l)	58.88± 7.04	43.44± 8.87	45.28± 12.21	49.38± 18.80
AST (u/l)	180.38± 17.16	187.89± 28.78	146.85± 29.18	99.75± 18.12
Total cholesterol	74.25± 11.05	74.22± 21.22	78.57± 13.36	67.25± 8.013
Bilirubin(mg/dl)	0.40± 0.10	0.40± 0.07	0.41± 0.06	0.40± 0.34
Total protein(g/dl)	7.18± 0.27	7.59± 0.71	6.99± 0.21	5.98± 0.42 ^a
Triglyceride	82.12± 11.92	80.00± 17.77	70.14± 21.55	96.88± 23.42
Glucose	101.88± 13.94	68.78± 19.09	89.71± 27.47	183.75± 33.17
ALP	102.88± 13.94	81.89± 21.05	69.57± 12.42	66.75± 7.74
Creatinine	0.93± 0.07	1.04± 0.05	0.87± 0.09	0.84± 0.11
BUN	19.75± 2.76	22.78± 1.98	16.86± 1.77	16.63± 3.74
Albumin	3.36± 0.22	3.53± 0.38	3.28± 0.19	2.92± 0.25
Na	156.94± 12.30	148.61± 4.28	144.28± 5.77	141.06± 5.39
K(mEq/l)	5.44± 1.10	6.26± 1.72	4.95± 0.95	4.32± 0.52

Data were presented as mean± S.D.

^a: Significantly different from T1 group ($p<0.05$)

ND: not detected

Table 10. Serum biochemical values of female SD rats

Group	T1	T2	T3	T4
Dose (mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38
No. of animal	10	10	10	10
ALT (u/l)	61.44± 38.60	39.62± 6.98	40.50± 6.09	38.33± 8.61
AST (u/l)	153.22± 57.14	157.62± 20.40	129.50± 22.82	78.89± 32.44
Total cholesterol	92.33± 20.23	76.11± 14.20	83.00± 13.27	64.77± 14.37 ^a
Bilirubin(mg/dl)	0.38± 0.14	0.43± 0.13	0.53± 0.11	0.29± 0.17
Total protein(g/dl)	7.71± 0.38	8.07± 0.62	7.59± 0.49	6.01± 2.29 ^a
Triglyceride	88.44± 25.10	74.11± 17.74	82.70± 15.74	77.63± 45.39
Glucose	80.77± 17.06	65.88± 26.64	83.00± 26.64	153.77± 34.62 ^a
ALP	41.78± 12.93	48.66± 24.02	47.20± 15.69	59.66± 42.64
Creatinine	0.94± 0.15	0.96± 0.05	0.95± 0.07	0.84± 0.09
BUN	17.66± 2.23	20.89± 3.72	20.40± 1.43	14.10± 6.31
Albumin	3.96± 0.13	3.87± 0.27	3.81± 0.29	4.62± 3.15
Na	148.22± 1.09	146.66± 5.38	148.35± 1.76	130.80± 47.67
K(mEq/l)	4.35± 0.46	5.29± 1.22	5.06± 0.57	19.91± 48.22

Data were presented as mean± S.D.

^a: Significantly different from T1 group ($p<0.05$)

ND: not detected

조직병리학적 검사

시험 기간중 폐사한 동물 및 시험종료시의 모든 동물에 대한 전장기 조직을 현미경으로 검사하였다. SKI 2053R 투여군 중 고용량군(9.38 mg/kg/day)과 양성대조물질인 cisplatin 투여군의 신장과 비장 이외에서는 음성대조군과 비교하여 특이할 만한 병리학적 소견이 관찰되지 않았다(Table 11, 12).

Cisplatin 투여군은 모든 동물이 시험종료 이전에 폐사하였고 두드러진 병변은 신장에서 관찰되었다. 폐사시기에 관계없이 모든 동물에서 세뇨관에 균질한 무정형의 요원주(homogenous, amorphous urinary cast)가 차 있었으며, 이것은 단백뇨가 있었음을 유추할 수 있는 증거이다.

Table 11. Histopathological findings of male SD rats

Group	T1	T2	T3	T4	T5
Dose(mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38	1.70
No. of animal	10	10	10	10	10
Kidney	10	10	10	10	10
Tubular Degeneration	0	0	1	0	7
Urinary Cast	0	0	0	0	8
Interstitial Nephritis	1	0	0	2	2
Fibrogenesis	0	0	0	0	9
Spleen	10	10	10	10	10
Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	1	1
Hemosiderosis	0	0	0	3	8
Follicular hyperplasia	0	0	0	0	0
Liver	10	10	10	10	10
Congestion	0	0	0	1	2
Lym. Infiltration	0	0	0	0	0
Vacuolation	0	0	0	0	1
Bile duct hyperplasia	0	0	0	0	0
Heart	10	10	10	10	10
Congestion	0	0	0	0	0
Lung	10	10	10	10	10
Edema(Alveolar wall)	0	0	0	0	0
Pneumonia	0	0	0	0	0
Congestion	0	0	0	0	1
Adrenal gland	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10
Cerebrum	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10
Cerebellum	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10
Testis	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10
Pituitary gland	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10

Table 12. Histopathological findings of female SD rats

Group	T1	T2	T3	T4	T5
Dose(mg/kg/day)	0	1.50	3.75	9.38	1.70
No. of animal	10	10	10	10	10
Kidney	10	10	10	10	10
Tubular Degeneration	0	0	0	1	6
Urinary Cast	0	0	0	0	8
Interstitial Nephritis	0	0	0	0	1
Fibrogenesis	0	0	0	0	7
Spleen	10	10	10	10	10
Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	1
Hemosiderosis	0	0	0	5	9
Follicular hyperplasia	0	0	0	0	0
Liver	10	10	10	10	10
Congestion	0	0	0	0	0
Lym. Infiltration	0	0	0	0	0
Vacuolation	0	0	0	0	0
Bile duct hyperplasia	0	0	0	0	0
Heart	10	10	10	10	10
Congestion	0	0	0	0	0
Lung	10	10	10	10	10
Edema(Alveolar wall)	0	0	0	0	0
Pneumonia	0	0	0	0	0
Congestion	0	0	0	0	0
Adrenal gland	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10
Cerebrum	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10
Cerebellum	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10
Ovary	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10
Pituitary gland	10	10	10	10	10
Normal	10	10	10	10	10

신장의 피질과 수질 연결부를 중심으로 cystic hyperplasia가 뚜렷하였고(Figure 9). 세뇨관 상피세포는 괴사 및 공포형성 등 심한 degeneration을 나타내었다(Figure 10).

SKI 2053R 투여군 가운데 고용량투여군(9.38 mg/kg/day)에서는 tubular degeneration 이외에는 특이한 신장병변을 관찰할 수 없었다. 간질성 신염을 보이는 소수의 동물이 관찰되었으나(Figure 11) 이러한 병변은 SKI 2053R 투여에 의한 병변으로 보기는 어려우며 SD 랫드에서 자연적으로 발생하는 병변으로 생각된다.

Cisplatin 투여군의 비장은 다소 위축되어 있었으며 적수에서는 광범위한 hemosiderosis가 관찰되었으며, 이것은 적혈구의 파괴로 인한 병변으로 보인다.

SKI 2053R 투여군 가운데 고용량 투여군(9.38 mg/kg/day)에서 이와 유사한 양상의 hemosiderin 침착을 관찰할 수 있었으며(Figure 12), 적혈구수가 감소된 암컷에서 병변의 빈도가 높았다.

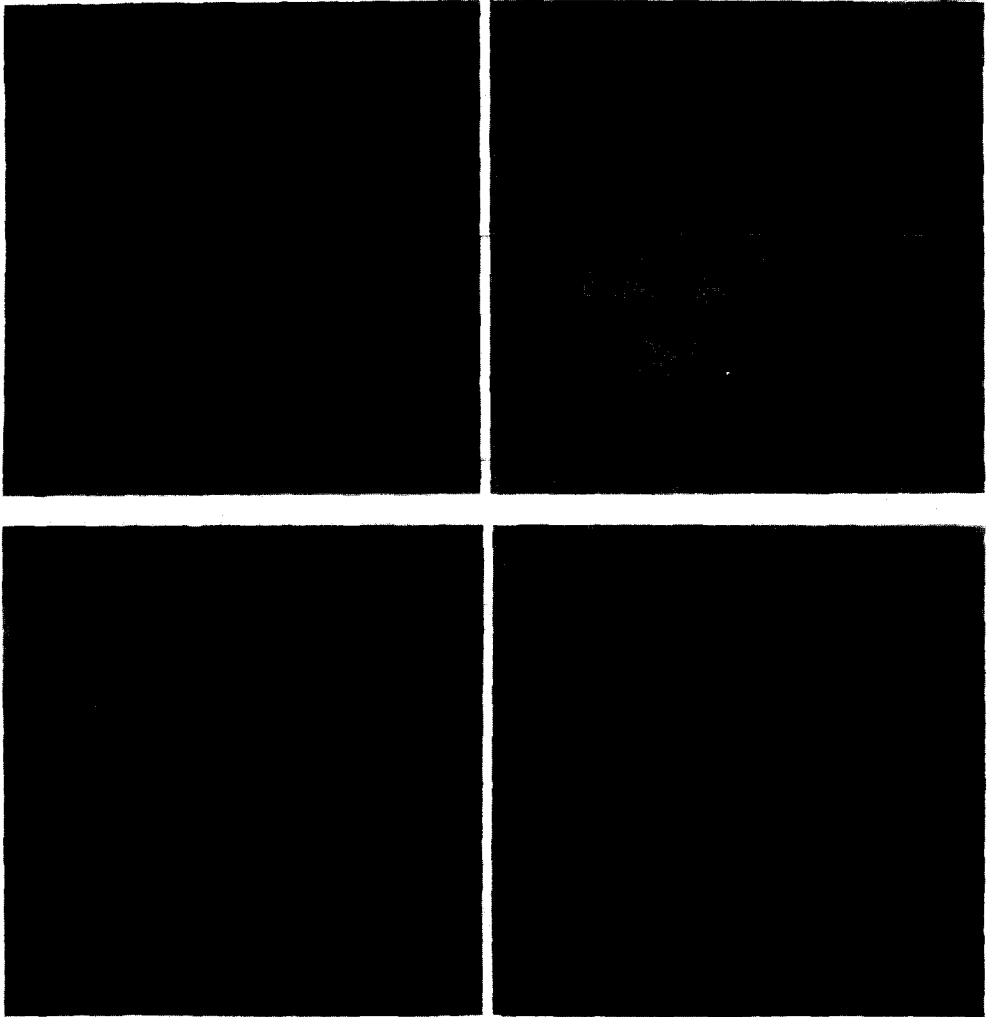


Figure 9. A kidney of a rat given cisplatin (1.70 mg/kg/day) intravenously. Cystic hyperplasia was observed in cortico-medullary junction. H & E stain. $\times 100$.

Figure 10. A kidney of a rat given cisplatin (1.70 mg/kg/day) intravenously. Tubular necrosis and degeneration were observed in cortex. H & E stain. $\times 100$.

Figure 11. A kidney of a rat given SKI 2053R (9.38 mg/kg/day) intravenously. Focal interstitial nephritis was observed. H & E stain. $\times 100$.

Figure 12. A spleen of a rat given SKI 2053R (9.38 mg/kg/day) intravenously. Hemosiderosis was observed in red pulp. H & E stain. $\times 40$.

결 론

랫드에서 SKI 2053R에 대한 아급성독성을 cisplatin과 비교하여 조사한 결과, SKI 2053R은 cisplatin에 비하여 낮은 독성을 나타내는 것으로 사료된다.

Cisplatin 투여군의 경우 사료 및 음수 섭취량이 현저하게 감소하였고 따라서 체중 역시 감소하였고, 시험개시 3주째부터 폐사하는 동물이 관찰되어 시험 종료 이전에 모든 동물이 폐

사하였다. 폐사한 동물의 장기조직을 조직병리학적으로 검사한 결과, 신장에 심한 독성을 나타내었고 비장 역시 병변이 관찰되었다.

SKI 2053R 투여군의 경우 중간용량군에서 1마리의 폐사를 제외하고는 모든 동물이 시험 종료시까지 한마리도 폐사하지 않았고 임상증상도 나타내지 않았다. 중간용량군에서 폐사한 동물은 시험개시 약 3주 후에 폐사하였는데, 불현성 감염이 투여 스트레스로 인해 발증해서 폐사한 것으로 사료된다. 안검사에서는 SKI 2053R 시험군에서 아무런 이상을 발견하지 못하였으나, 노검사시 단백뇨, 잠혈, bilirubin 등이 다수의 개체에서 검출되었다. 혈액학적 검사 결과, 고용량투여군에서는 암수 모두 백혈구수의 유의한 감소를 보여($p < 0.05$) 골수독성이 있는 것으로 보이며, 수컷의 최고용량군에서는 혈소판의 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$). 암컷의 최고용량과 중간용량처치군에서 적혈구수의 유의한 감소가 관찰되었는데($p < 0.05$) 이는 여러 개체의 비장조직 관독소견에서 나타난 hemosiderosis로 보아 적혈구의 파괴에 의한 것으로 사료된다. 또한, 적출한 장기의 상대중량을 측정한 결과, SKI 2053R 투여군 가운데 고용량군은 암수 공히 음성대조군에 비하여 간장의 상대중량이 증가하였으므로 미약하나마 간장독성을 나타내는 것으로 사료된다. 병리조직검사 결과, 신장에서의 tubular degeneration과 비장에서의 hemosiderosis가 뚜렷하게 나타났다.

이상과 같이 랫드에서 나타난 SKI 2053R의 아급성독성을 종합하여 볼 때, SKI 2053R의 무해용량은 3.75 mg/kg/day, 최대 내성용량은 약 9.38 mg/kg/day 이상인 것으로 추정되며, SKI 2053R 9.38 mg/kg/day을 투여한 최고용량군은 양성대조물질인 cisplatin 1.70 mg/kg/day을 투여한 군과 비교할 때 약 5배 이상의 용량에서도 낮은 독성을 나타내는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- David, J.P., David, M.Y., Ruth, D.D., David, A.C., Elton, R.H., Robert, L.D. and Anthony, M.G. (1973): Procedures for preclinical toxicology evaluation of cancer chemotherapeutic agents: Protocols of the laboratory of toxicology, Cancer Chemotherapy Reports part 3, **3**, 1-30.
- Field, M.J., Boston, T.E., Seow, F. Györy, A.Z. and Cockayne, D.J.H. (1989): Acute cisplatin nephrotoxicity in rat, evidence for impaired entry of sodium into proximal tubule cells. *Pflügers Arch*, **414**, 647-650.
- Jenkins, W.L. (1991): Chemotherapeutic agents affecting host cellular functions: antineoplastics and immunomodulators. In *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*, (G.C. Brunder, D.M. Pugh, R.J. Bywater and W.L. Jenkins, (5th eds.), Bailliere Tindall, Great Britain) pp. 392-411.
- Lelieveld, P. et al. (1984): Preclinical studies on toxicity, antitumour activity and pharmacokinetics of cisplatin and three recently developed derivatives. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **20**, 1087-1104.
- Leonard, B.J., Eccleston, E., Jonnes, D., Todd, P. and Walpote, A. (1971): Antileukemic and nephrotoxic properties of platinum compounds. *Nature*, **234**, 43.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Trasko, J.E. and Mansour, V.H. (1969): Platinum compounds, a new class of potent anti-tumor agents. *Nature*, **222**, 385.
- 국립보건안전연구원 예규 제 10 호, “의약품 등의 독성시험에 관한 지침” (1988).