

DA-1131/betamipron의 랫드에 대한 4주반복 정맥투여 독성시험

김동환 · 조 현 · 강경구 · 백남기 · 김원배*
동아제약(주) 연구소

A Four-Week Intravenous Toxicity Study of DA-1131/betamipron in Rats

Dong Hwan KIM, Hyeon CHO, Kyung Koo KANG,
Nam Gi BAIK and Won Bae KIM*

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd.,
47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-si, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received March 23, 1998; accepted May 29, 1998)

Abstract – This study was conducted to evaluate the repeated dose toxicity of DA-1131/betamipron, newly developed carbapenem antibiotic, in rats. DA-1131/ betamipron was administered intravenously once a day for 4 weeks to 10 males and 10 females per group at the doses of 0(control), 40, 160 and 640 mg/kg. Throughout the study period, all rats survived. The administration of DA-1131/betamipron induced soft stool or diarrhea in rats of both sexes receiving 160 or 640 mg/kg. The water consumption was increased with a statistical significance in 640 mg/kg during observation period. At the end of administration, hematological and serum biochemical examination showed no toxicological changes in DA-1131/betamipron treated groups compared with control group. Histopathologic examination revealed inflammatory cell infiltration, tubular dilatation and focal necrosis of kidney in two males and three females in 640 mg/kg. On the basis of these results, the no-observed-adverse-effect-level of DA-1131/betamipron was estimated to be 40 mg/kg under the present test condition.

Keywords □ DA-1131, betamipron(BP), subacute toxicity, rat

DA-1131은 동아제약(주)연구소에서 개발예정인 카바페넴계 항생물질로 현재까지의 연구결과 광범위한 항균력을 보이며 안전성에서 우수한 것으로 평가되는 물질이다. 일반적인 베타락탐계 항생물질은 신경독성, 신장독성, 과민반응 등의 부작용을 가지는 것으로 알려져 있으며(Williams 등, 1988; Norrby, 1986; Cojocel 등, 1988), 특히 신장독성은 이들 항생물질의 대표적인 독성작용으로 신장내 기질 수송체를 선택적으로 acylation시켜 불활화 시킴으로써 미토콘드리아의 손상과 oxidative change에 의한 것으로 알려져 있다(Tune, 1990; Tune과 Hsu, 1990^a; Tune과 Hsu, 1990^b). 이러한 신장독성을 억제하기 위한 다양한 연구가 이루어져 왔다(김 등, 1994^a; 김 등, 1994^b; 김 등, 1994^c). 그 결과 panipenem과 같이 투여하여 panipenem의 신장독성을 억제하는 물질로 사용되는 유기음이온 수송저해제인 betamipron이 DA-1131

에 의해 유발된 신독성을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였으며, 그 배합비율을 1:1로 하였을 때 그 효과가 가장 크다는 것을 알 수 있었다(김 등, 1998). Betamipron(BP; N-bezoyl- β -alanine)은 신피질에서의 능동적 유기음이온 수송을 억제하는 acyl amino acid의 일종으로 신장에 선택적으로 작용하여 베타락탐계 항생물질의 조직내 저류를 억제시키는 물질이다(Naganuma 등, 1991^a). 동일계 유기음이온 수송저해제인 probenecid는 전신투여시 강한 독성으로 인해 통풍 치료약물로서만 사용되는 것에 비해 betamipron은 전신투여시에도 안전하게 사용할 수 있는 약물로 알려져 있으며(Naganuma 등, 1991a), panipenem과 병용하여 투여하였을 때 panipenem에 의해 유발되는 신독성은 효과적으로 억제하지만 panipenem이 가지는 살균작용에는 영향을 주지 않는 물질로 알려져 있다(Naganuma 등, 1991^b).

본 실험은 DA-1131과 betamipron의 합제에 대한 안전성 평가의 일환으로 랫드에 대한 정맥내 4주 반복투여 독성실험을 실시하였다.

* To whom correspondence should be addressed.

실험방법

시험물질

시험에 사용한 DA-1131 및 BP는 동아제약(주)연구소에서 생산한 것으로 사용직전에 1N NaOH solution에 녹여서 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

4주령의 SPF Sprague-Dawley계 랫드 암수 각 45마리를 Charles River Japan사에서 구입하여 2주간 청정구역내에서 검역 및 순화사육한 다음 6주령의 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 검역 순화사육기간 및 시험기간중 동물은 온도 23±2℃, 습도 55±15%, 환기횟수 15-20회/시간, 조도 150-300 Lux, 조명시간 12시간(07:00-19:00)의 조건을 유지하였다. 동물의 수용은 랫드용 폴리카보네이트제 사육상자를 사용하여 순화검역기간에는 사육상자당 5마리씩을, 시험기간중에는 2마리씩을 각각 암수 분리하여 수용하였다. 사료는 랫드용 고형사료(2.0 M rad 방사선멸균품, 제일사료)를, 음수는 자외선멸균 수도수를 자유섭취시켰다.

투여용량의 설정 및 투여방법

DA-1131과 BP를 1:1로 혼합하여 시험물질을 조제하였으며 정맥투여를 위한 용해도실험에서 용해 가능한 최고농도인 체중 kg당 640 mg/640 mg(DA-1131:BP)을 최고용량으로 설정하고 각각 공비4로 160 mg/160 mg, 40 mg/40 mg 등의 중용량과 저용량을 설정하고 매체용액만을 투여한 음성대조군을 두었다. 투여경로는 임상적용경로인 정맥투여로 미정맥을 통해 1일 1회 4주간(28일) 반복투여 하였다. 각 개체의 투여량은 kg당 5 ml로 주 2회 측정하는 체중치로 산출하였다. 시험방법은 '의약품 등의 독성시험기준'(식품의약품안전본부, 1996)에 준하여 실시하였다.

시험군의 구성

시험군의 구성은 Table I과 같다. 검역 및 순화사육 후 건강한 동물을 선발하여 체중을 측정한 후 전체평균에서 2 S.D.를 넘는 동물은 제외시키고 나머지 동물을 이용하여 무작위법으로 군분리를 실시하였으며 군분리 후 체중의 군간 유의차가 인정될 경우에는 유의차가 없을 때까지 반복하여 균일하게 군분리하였다. 각 투여군의 사용동물수는 대조군을 포함하여 모두 암수 각각 10마리씩으로 구성하였다.

Table I. Experimental design for 4-week intravenous toxicity study of DA-1131/betamipron in rats

Groups	DA-1131 (mg/kg)	Betamipron (mg/kg)	No. of animals	
			Male	Female
vehicle control	0	0	10	10
low dose	40	40	10	10
middle dose	160	160	10	10
high dose	640	640	10	10

검사항목

폐사율 및 임상증상

투여개시일에는 매시간 마다 관찰하였고 투여 익일부터 투여종료일까지 1일 2회, 오전과 오후에 각 개체의 사망유무와 일반상태를 관찰하였다.

체중, 사료섭취량 및 음수섭취량

투여기간동안 전군에 대하여 매주 2회씩 체중, 사료섭취량 및 음수섭취량을 측정하였다. 사료와 음수섭취량은 케이지별로 측정하여 마리당 1일 평균소비량을 산출하였다.

안검사

투여종료 후 모든 동물에 대하여 안검사용 검안경을 이용하여 좌우안의 각막 및 홍채 등의 이상유무를 관찰하였다.

혈액학적 검사

투여종료 후 각군의 동물 전례에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액은 ether 마취한 동물의 복대동맥으로부터 채취하여 EDTA와 구연산나트륨 등의 항응고제를 이용하여 각각 혈액학적검사와 혈액응고시간의 측정에 이용하였다. 혈액학적검사에서는 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(Hb), 헤마토크리트치(Hct), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT) 등에 대하여 혈구자동측정기(Minos Vet, Minos)를 이용하여 측정하였으며, 혈액응고시간 측정은 자동응고시간측정기(Automated Coagulation Laboratory, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(APTT)을 측정하였다. 한편, 백혈구백분율을 조사하기 위하여 혈액을 슬라이드에 도말하여 건조시킨 후 0.5% Modified Giemsa 염색액으로 50분간 염색하여 광학현미경으로 400배의 배율에서 혈구의 형태를 관찰하고 백혈구감별계수를 실시하여 백분율을 구하였다.

혈청생화학적 검사

혈액학적검사를 위하여 채취한 혈액의 잔여혈액을 응고시킨 후 혈청을 분리하여 혈청생화학적검사를 실시하였다. 혈청생화학적 검사는 혈액자동분석기(Spectrum, Abbott)를 이용하여 alanine transferase(ALT), aspartate transaminase(AST), total bilirubin(TB), urea nitrogen(BUN), cholesterol, triglyceride, alkaline phosphatase(ALP), calcium, glucose, total protein(TP), inorganic phosphorus(IP), creatinine, albumin 등을 측정하고 자동이온측정기(Lytening system 30, Baxter Diagnostic Inc.)를 이용하여 sodium, potassium, chloride를 측정하였다.

뇨검사

투여종료 후 랫드용 metabolic cage에 한마리씩 분리수용하여 검사전일 오후 4시부터 16시간 동안 채뇨하였다. 채취한뇨에 대해서 외관, 침사, 뇨량 등을 관찰한 후 뇨분석기(Clinitek 100, Ames)를 사용하여 glucose, bilirubin, ketone body, 비중, pH, protein, urobilinogen, nitrate, 잠혈, 백혈구 등

에 관하여 검사하였다. 노침사가 인정된 개체에 대하여는 시료를 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 남은 여액과 침전물을 잘 씻고 slide glass에 한 방울 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 검체를 준비하고 광학현미경을 이용하여 400배의 시야에서 노침사의 결정형태를 관찰하였다.

부검 및 장기중량측정

투여종료 후 각 군의 동물을 ether로 마취시켜 외관의 이상유무를 육안적으로 관찰하고 채혈을 실시하였다. 채혈후 방혈치사시킨 동물에 대해 부검을 실시하여 체강과 각 실질장기에 대해 육안적 검사를 하였다. 각각의 병변을 관찰, 기록한 후 뇌, 뇌하수체, 갑상선, 흉선, 심장, 폐장, 간장, 비장, 신장, 부신, 고환(난소), 정낭(자궁), 전립선 등을 주위조직과 분리하여 각 장기의 절대중량을 측정하였으며, 상대중량은 각 개체의 체중에 대한 비율의 1,000배로 산출하였다.

병리조직학적검사

중량을 측정된 장기들과 위, 소장, 대장, 장간막임파절, 방광, 안구, 타액선, 질(vagina) 등의 장기를 10% 중성포르말린에 1주이상 고정시킨 다음 통상적인 방법을 거쳐 조직절편을 제작하였으며, 골 및 골수검사를 위해 각 동물의 흉골을 절제하여 10% 중성포르말린에 1주이상 고정시키고 다시 탈회용액(10% formic acid in 10% formalin)에 2주이상 넣어 탈회시킨 후 통상적인 방법으로 조직절편을 제작하였다. 제작된 조직절편은 hematoxylin-eosin염색을 한 후 광학현미경으로 병리조직학적 검사를 대조군과 고용량군에 대하여 실시하였으며, 고용량군에서 이상을 나타내는 장기와 육안병변이 인정된 장기에 대해서는 다른 용량군에 대해서도 병리조직학적 검사를 실시하였다.

통계학적 분석

본 시험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적 분석은 다중비교 검사법을 사용하였다. 검사항목중 체중, 사료섭취량, 음수섭취량, 뇨량, 뇨 pH, 뇨 비중, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 절대, 상대장기중량에 대하여는 일원배치분산분석을 유의수준 $\alpha=0.05$ 로 검증하였다. 일원배치분산분석의 검증결과가 $p<0.05$ 인 경우는 군들간에 유의한 차이가 있으므로 대조군과 처치군의 다중비교법인 Dunett's test를 실시하여 군간의 유의차를 조사하였다. 노검사항목중 뇨량과 비중을 제외한 나머지 항목에 대해서는 순위화한 data를 이용한 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis test를 실시하고 $p<0.05$ 인 경우는 Dunett's test를 실시하여 군간의 유의차를 조사하였다. 부검소견 및 병리조직학적 소견은 양성반응을 나타낸 동물수로 표시하였고 필요에 따라 Fisher exact test 등을 이용하여 군간의 유의차를 조사하였다($\alpha=0.05$).

결 과

폐사율 및 일반증상

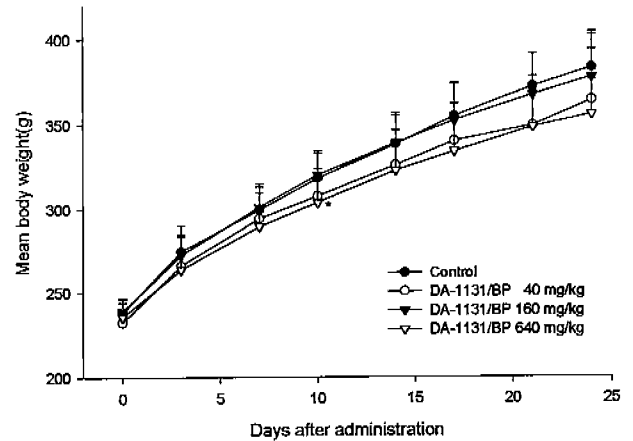


Fig. 1. Body weight changes in male rats intravenously administered with DA-1131/BP for 4 weeks. *Significantly different from the control ($p<0.05$).

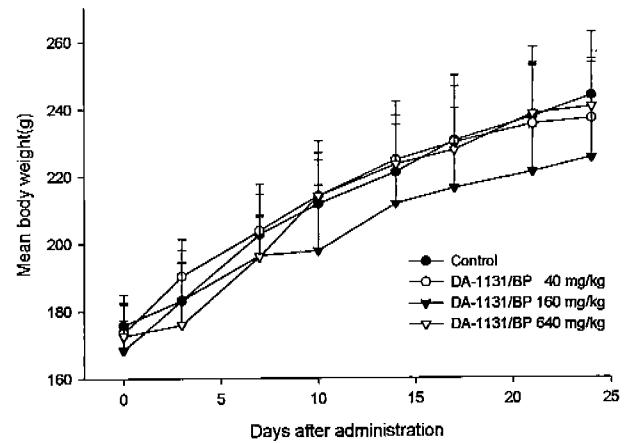


Fig. 2. Body weight changes in female rats intravenously administered with DA-1131/BP for 4 weeks.

투여기간중 폐사에는 나타나지 않았으며 일반증상관찰에서는 투여 2일 이내에 160 mg/kg 투여군과 640 mg/kg 투여군에서 암수 모두 용량의존적으로 설사 및 연변소견이 관찰되었다. 160 mg/kg 투여군에서는 투여 2주 이후부터 증상이 완화되어 투여 3주 후에는 증상은 소멸되었으나 640 mg/kg 투여군에서는 투여 종료시까지 연변증상은 계속되었다. 이외 투약과 관련된 것으로 보이는 증상은 관찰되지 않았다.

체중변화, 사료섭취량 및 음수섭취량

체중은 수컷 고농도투여군에서 투여 10일째 대조군에 비해 유의성있는 감소가 나타났으나 이외에는 각 군의 암수 모든 동물에서 투약기간중 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1, 2). 전 실험 기간을 통하여 암수 전군에서 사료섭취량의 변화는 인정되지 않았다(Table II). 음수섭취량은 전 실험기간을 통하여 암수 모두 농도의존적인 증가를 나타내었으며, 4군에서는 유의성이 인정되었다(Table III).

안검사

Table II. Food consumption in rats intravenously administered with DA-1131/betamipron (g/day/head)

Sex	Male				Female				
	Dose (mg/kg)	Control	40	160	640	control	40	160	640
DAY3		24.0±2.2	25.2±1.6	24.0±3.2	23.0±1.9	15.6±2.7	17.8±2.4	15.8±2.0	15.0±1.9
DAY7		25.6±1.1	25.8±1.6	26.2±1.6	23.6±2.5	17.4±1.1	17.8±3.8	15.2±2.8	17.0±2.1
DAY10		24.4±0.9	23.4±2.2	26.2±2.6	23.4±0.9	15.0±1.9	15.4±3.5	14.8±2.2	15.8±1.6
DAY14		25.4±1.5	24.4±1.9	25.0±3.2	22.6±6.2	18.8±1.9	16.6±3.0	18.4±1.8	19.4±1.5
DAY17		25.0±1.6	25.2±2.6	25.8±2.5	23.6±5.7	17.8±1.9	16.0±1.9	14.2±2.2*	16.8±1.5
DAY21		24.4±2.3	20.8±3.4	23.2±1.3	24.0±0.7	16.4±1.7	16.4±0.9	15.4±0.9	17.8±0.8
DAY24		25.6±0.9	25.4±2.6	26.2±1.1	24.4±1.8	18.2±2.4	16.4±3.6	15.4±2.4	16.4±4.4

Each value represents the mean±S.D. *Significantly different from the control (p<0.05).

Table III. Water consumption in rats intravenously administered with DA-1131/betamipron (ml/day/head)

Sex	Male				Female				
	Dose (mg/kg)	Control	40	160	640	Control	40	160	640
DAY3		36.6±4.3	39.6±6.2	46.4±4.1*	52.0±4.7*	26.8±2.2	31.0±6.3	30.0±4.2	36.6±11.4
DAY7		41.2±8.5	40.8±2.5	45.6±6.5	54.2±9.1*	26.8±1.5	30.6±6.1	33.8±5.0	40.4±8.2*
DAY10		35.0±3.7	37.8±3.1	40.4±4.3	51.0±8.2*	26.0±4.4	28.8±6.8	33.6±2.9	40.8±9.3*
DAY14		40.2±5.8	40.0±3.8	42.8±8.4	45.6±14.5	27.0±2.3	31.4±8.2	35.0±2.9	41.4±7.4*
DAY17		37.6±6.5	36.2±3.6	41.0±8.2	49.2±4.7*	27.0±4.0	30.2±5.2	32.2±7.7	40.6±7.1*
DAY21		37.0±5.2	39.0±6.6	38.8±3.5	50.2±3.4*	26.8±3.8	32.4±7.5	31.4±4.0	37.6±4.4*
DAY24		31.8±4.6	35.2±6.1	39.4±6.1	45.0±6.2*	23.8±5.1	28.8±4.0	28.2±7.6	37.4±14.6

Each value represents the mean±S.D. *Significantly different from the control (p<0.05).

Table IV. Hematological parameters in rats intravenously administered with DA-1131/betamipron for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (mg/kg)	Control	40	160	640	control	40	160	640
WBC (10 ³ /μl)		10.48±2.12	8.47±2.87	8.74±2.45	12.70±3.41	7.15±2.25	8.86±2.22	7.83±2.07	10.53±2.73*
Lymphocyte (%)		81.8±3.5	84.5±4.2	85.4±4.8	84.4±6.3	86.6±2.7	84.4±2.0	85.1±5.0	87.6±4.4
Neutrophil (%)		14.1±2.1	12.9±4.3	11.8±4.1	14.3±6.4	11.2±1.8	12.0±2.3	12.0±5.4	10.7±4.7
Monocyte (%)		2.3±1.5	1.6±1.0	1.4±1.1	0.9±0.9	3.4±3.3	2.6±3.1	2.3±2.5	1.7±2.4
Eosinophil (%)		2.1±1.9	1.5±1.2	1.5±0.9	0.4±0.5*	1.1±1.0	2.5±1.6*	1.9±1.3	1.0±0.8
Basophil (%)		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
RBC (10 ⁶ /μl)		7.30±0.29	7.42±0.32	7.31±1.09	7.86±0.31	7.33±0.23	7.27±0.34	6.96±0.21*	7.40±0.28
Hb (g/dl)		15.61±0.38	15.86±0.59	15.30±2.24	16.79±0.57	15.81±0.66	15.62±0.74	15.14±0.28*	16.02±0.65
Hct (%)		35.18±1.03	35.72±1.26	34.58±4.66	37.49±1.27	35.17±1.53	34.84±1.71	33.22±0.62*	34.99±1.32
MCV (fL)		48.20±1.14	48.10±0.99	47.60±1.96	47.70±1.06	47.90±0.99	47.90±0.74	47.70±0.95	47.20±0.92
MCH (pg)		21.37±0.76	21.36±0.78	20.90±0.83	21.35±0.58	21.51±0.66	21.44±0.66	21.70±0.66	21.59±0.36
MCHC (g/dl)		44.33±0.87	44.36±1.16	44.12±1.06	44.72±0.37	44.94±1.06	44.79±1.02	45.51±0.90	45.72±0.81
PLT (10 ³ /μl)		229±41	228±8	233±20	225±15	267±22	253±34	254±15	261±22
PT (sec)		11.32±0.24	11.48±0.35	11.23±0.67	11.15±0.23	11.02±0.30	11.18±0.28	11.04±0.28	11.24±0.26
APTT (sec)		22.54±1.92	22.70±2.45	20.13±2.32	21.12±2.22	19.26±1.29	19.00±1.38	18.48±1.96	17.89±1.13

Each value represents the mean±S.D. *Significantly different from the control (p<0.05).

투여종료후 실시한 인과학적검사결과 모든 투여군에서 시험물질의 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다.

혈액학적검사

DA-1131/BP를 4주간 투여한 후의 혈액학적 검사결과 Table IV와 같다. WBC값은 암컷 고용량군에서 유의성있

는 증가를 나타내었으며, Eosinophil은 수컷 고용량군에서 감소하였고, 암컷 저용량군에서는 증가하였다. RBC, Hb, Hct 등은 암컷 중용량군에서 유의성있는 감소가 나타났다 (p<0.05). 이외 다른 모든 항목에서 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

Table V. Blood biochemistry summary in rats intravenously administered with DA-1131/betamipron for 4 weeks

Dose (mg/kg)	Male				Female			
	Control	40	160	640	Control	40	160	640
ALT (IU/l)	28.84±4.88	29.58±6.37	30.43±14.98	29.88±2.57	20.14±7.08	26.29±8.79	30.38±10.46*	30.68±6.76*
AST (IU/l)	140.61±17.14	147.86±23.82	121.47±28.11	100.94±6.31*	103.22±15.33	117.82±22.65	133.95±28.36*	114.83±21.44
Albumine (g/dl)	4.71±0.25	4.69±0.21	4.61±0.15	4.66±0.19	5.16±0.38	4.80±0.35	5.00±0.35	4.97±0.27
ALP (IU/l)	139.32±32.20	154.99±35.15	160.47±30.45	159.10±15.87	102.15±26.62	91.37±16.49	100.27±34.93	110.54±28.05
BUN (mg/dl)	12.37±1.77	16.15±4.29*	14.60±2.29	12.33±1.34	18.35±3.32	17.14±4.25	19.36±3.80	20.73±5.09
Cholesterol (mg/dl)	55.58±8.21	50.77±8.48	54.79±10.69	49.57±7.78	83.87±12.38	65.67±13.47*	76.18±16.05	63.32±9.32*
Creatinine (mg/dl)	0.68±0.06	0.62±0.12	0.54±0.10*	0.50±0.06*	0.69±0.10	0.64±0.12	0.62±0.09	0.56±0.10
Glucose (mg/dl)	99.31±19.91	114.22±14.03	132.00±26.74*	112.99±19.52	105.59±13.24	106.38±18.01	117.01±35.37	107.60±24.28
TB (mg/dl)	0.27±0.07	0.20±0.06	0.28±0.12	0.35±0.22	0.25±0.11	0.19±0.05	0.30±0.16	0.21±0.09
TP (g/dl)	6.08±0.24	5.99±0.31	6.04±0.16	6.11±0.20	6.42±0.43	6.01±0.30	6.29±0.40	6.24±0.25
Triglyceride (mg/dl)	107.49±19.75	89.74±13.67*	92.21±15.43	77.90±13.87*	70.48±7.62	57.99±8.93*	65.06±9.06	56.49±10.90*
IP (mg/dl)	9.68±0.56	9.35±0.79	9.76±1.11	9.18±0.63	8.10±1.20	8.59±1.16	8.97±1.47	9.49±1.07
Ca (mg/dl)	10.14±0.39	10.02±0.38	11.68±1.79*	13.40±0.31*	10.11±0.65	9.95±0.42	10.39±0.74	10.74±0.48
Na (mEq/L)	150.71±1.57	151.21±0.93	149.53±1.20	151.55±1.68	150.66±1.45	150.11±1.79	149.86±0.99	150.49±1.42
K (mEq/L)	4.16±0.28	4.03±0.23	4.58±1.31	4.06±0.20	4.53±1.30	4.47±1.08	4.51±1.22	5.08±1.22
Cl (mEq/L)	98.31±1.07	99.28±2.21	96.96±1.29	97.13±1.96	99.87±1.89	98.20±1.32	97.43±2.49*	96.32±2.20*

Each value represents the mean±S.D. *Significantly different from the control (p<0.05).

Table VI. Urinary analysis in rats intravenously administered with DA-1131/betamipron for 4 weeks

Dose (mg/kg)	Male				Female			
	Control (10)	40(10)	160(10)	640(10)	Control (10)	40(10)	160(10)	640(10)
Volume (ml)	7.95±1.19	8.50±2.07	8.80±2.82	5.15±1.62*	5.45±1.76	6.30±1.21	6.10±1.84	5.35±1.87
pH	7.10±0.46	7.00±0.53	7.35±0.71	6.65±0.85	6.55±0.16	6.75±0.54	6.75±0.49	6.30±0.26
Specific gravity	1.027±0.003	1.026±0.002	1.026±0.002	1.027±0.003	1.027±0.003	1.028±0.003	1.027±0.003	1.030±0.002
Sediment	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)
Bilirubin	-(10)	-(9),+(1)	-(9),+(1)	-(3),+(7)*	-(10)	-(10)	-(10)	-(9),+(1)
Glucose	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)
Ketone body	±(1),+(9)	+(8),2+(2)	±(2),+(8)	±(1),+(6),2+(3)	-(2),±(8)	-(3),±(7)	-(8),±(2)	-(1),±(9)
Nitrate	-(7),+(3)	-(9),+(1)	-(10)	-(8),+(2)	-(5),+(5)	-(3),+(7)	-(7),+(3)	-(9),+(1)
Oculta blood	-(9),±(1)	-(7),±(1),+(2)	-(10)	-(7),±(1),+(1),2+	-(9),±(1)	-(10)	-(9),2+(1)	-(7),+(1),2+(2)
Protein	+(7),2+(3)	+(10)	+(8),2+(2)	+(3),2+(7)	±(3),+(7)	-(1),±(6),+(3)	±(6),+(4)	±(6),+(4)
UBa(EU/dl)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)	0.1(10)
WBC	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(10)	-(9),±(1)	-(9),±(1)

Volume and specific gravity values represent the mean±S.D. -: grade 0(negative); ±: grade 1; +: grade 2; 2+: grade 3; 3+: grade 4; a; Urobilinubin. *Significantly different from the control (p<0.05).

Table VII. Absolute organ weight in rats intravenously administered with DA-1131/betamipron for 4 weeks (unit=g)

Sex	Male				Female			
	Control	40	160	640	Control	40	160	640
body weight	368.2±22.2	346.5±26.6	359.8±25.0	334.0±24.8*	234.1±17.4	227.0±15.7	217.1±11.9	226.5±14.0
brain	2.053±0.073	2.034±0.096	2.062±0.085	1.982±0.079	1.950±0.066	1.923±0.055	1.940±0.103	1.869±0.169
pituitary gland	0.012±0.001	0.012±0.002	0.020±0.023	0.012±0.003	0.015±0.003	0.015±0.002	0.014±0.002	0.014±0.003
thyroid gland	0.026±0.003	0.018±0.013	0.023±0.008	0.025±0.003	0.018±0.004	0.017±0.003	0.011±0.003	0.010±0.002
thymus	0.563±0.076	0.496±0.098	0.553±0.111	0.505±0.126	0.488±0.061	0.603±0.074*	0.482±0.101	0.501±0.100
heart	1.288±0.093	0.995±0.460	1.196±0.097	1.212±0.082	0.872±0.083	0.829±0.070	0.768±0.065	0.869±0.170
lung	1.486±0.137	1.441±0.155	1.754±1.009	1.449±0.103	1.253±0.117	1.286±0.149	1.220±0.170	1.346±0.116
liver	10.866±1.093	10.540±1.005	10.847±0.927	9.400±0.854*	7.362±0.883	6.961±0.518	6.887±0.629	7.089±0.770
spleen	0.742±0.054	0.712±0.046	0.814±0.081	0.786±0.110	0.514±0.056	0.554±0.065	0.519±0.082	0.675±0.074
kidney	2.789±0.239	2.627±0.299	2.472±0.610	2.563±0.144	1.764±0.459	1.754±0.221	1.713±0.209	1.864±0.177
adrenal gland	0.074±0.027	0.075±0.017	0.112±0.104	0.072±0.011	0.085±0.012	0.082±0.012	0.084±0.015	0.083±0.012
testis/ovary	3.064±0.169	3.062±0.250	3.042±0.220	3.148±0.292	0.147±0.028	0.131±0.023	0.129±0.028	0.132±0.026
seminal V/vagina	1.296±0.381	1.171±0.373	1.267±0.436	0.805±0.214*	0.476±0.083	0.478±0.125	0.491±0.104	0.445±0.092
prostate gland	0.759±0.349	0.573±0.134	0.633±0.124	0.602±0.103				

Each value represents the mean±S.D. *Significantly different from the control (p<0.05).

Table VIII. Relative organ weight in rats intravenously administered with DA-1131/betamipron for 4 weeks (unit=%×10)

Sex	Male				Female			
	Control	40	160	640	Control	40	160	640
brain	5.59±0.29	5.89±0.41	5.76±0.48	5.96±0.51	8.37±0.62	8.50±0.59	8.95±0.54	8.27±0.84
pituitary gland	0.03±0.00	0.03±0.01	0.06±0.06	0.04±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01
thyroid gland	0.07±0.01	0.05±0.04	0.06±0.02	0.07±0.01	0.08±0.02	0.08±0.01	0.05±0.02*	0.04±0.01*
thymus	1.54±0.27	1.42±0.22	1.54±0.28	1.50±0.31	2.09±0.23	2.67±0.35*	2.22±0.45	2.22±0.47
heart	3.51±0.31	2.84±1.28	3.32±0.15	3.64±0.27	3.73±0.24	3.66±0.33	3.54±0.28	3.83±0.61
lung	4.04±0.32	4.15±0.25	5.00±3.34	4.36±0.42	5.35±0.32	5.69±0.73	5.62±0.76	5.95±0.44
liver	29.49±2.10	30.43±1.98	30.19±2.27	28.15±1.46	31.39±2.27	30.70±1.70	31.71±2.26	31.31±2.83
spleen	2.02±0.19	2.06±0.12	2.27±0.18*	2.36±0.29*	2.20±0.25	2.44±0.24	2.39±0.36	2.98±0.28*
kidney	7.58±0.61	7.56±0.44	6.93±1.76	7.70±0.52	7.48±1.74	7.71±0.64	7.88±0.76	8.24±0.77
adrenal gland	0.20±0.07	0.22±0.05	0.31±0.29	0.22±0.04	0.36±0.04	0.36±0.05	0.39±0.06	0.37±0.05
testis/ovary	8.33±0.38	8.87±0.82	8.46±0.47	9.47±1.09*	0.63±0.12	0.58±0.10	0.59±0.12	0.58±0.10
seminal V/vagina	3.53±1.04	3.38±1.01	3.48±1.06	2.40±0.56*	2.06±0.46	2.10±0.51	2.26±0.45	1.98±0.50
prostate gland	2.07±0.97	1.66±0.40	1.76±0.30	1.80±0.25				

Each value represents the mean±S.D. *Significantly different from the control (p<0.05).

혈청생화학적검사

DA-1131/BP를 4주간 투여한 후의 혈청생화학적검사결과는 Table V와 같다. ALT값은 암컷 중용량 및 고용량에서 유의성있는 증가를 나타내었으며 AST값은 수컷 고용량군에서 유의성있는 감소와 암컷 중용량군에서 유의성있는 증가가 나타났다. BUN은 수컷 저용량군에서 유의성있는 증가가 나타났고 cholesterol치는 암컷 저용량과 고용량군에서 감소하였다. 혈중 creatinine을 측정된 결과 수컷의 중용량과 고용량군에서 대조군에 비해 유의성있는 감소가 나타났으며, glucose치는 수컷의 중용량군에서만 증가하였다. Triglyceride치는 암수 모두 저용량과 고용량군에서 유의성있는 감소를 나타내었다. 혈중칼슘의 양은 수컷의 중용량 및 고용량군에서 유의성있는 증가를 나타내었으며 Cl의 양은 암컷의 중용량과 고용량군에서 유의성있는 감소를 나타내었다. 이외의 다른 관찰항목에서는 특이한 변화가 관찰되지 않았다.

뇨검사

투약종료후 실시한 뇨검사 결과(Table VI) 수컷 고용량군에서 뇨량의 유의성있는 감소와 bilirubin량의 증가가 나타났다. 이외의 다른 관찰항목에서는 특이한 변화가 관찰되지 않았다.

병리학적 검사

부검조건

부검시 DA-1131/BP를 투여한 동물에서 맹장 및 회장의 팽대와 수양성 내용물이 용량의존적으로 증가되어 나타났으며 그 외의 다른 장기에서는 약물의 영향으로 생각되는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

장기중량

부검 후 장기중량을 측정된 결과 암컷의 중용량과 고용량군에서 갑상선 상대중량의 유의성있는 감소가 나타났다. 흉선의 경우는 암컷의 저용량군에서 절대 및 상대중량 모두 증가하였으며, 간의 절대중량은 수컷의 고용량군에서 유의성있는 감소가 나타났다. 비장의 중량을 측정된 결과 수컷의 중농도 및 고농도군과 암컷 고농도군에서 상대중량의 유의성있는 증가가 인정되었고 수컷의 정낭중량은 고농도군에서 절대 및 상대중량이 모두 감소하였으며, 고환은 고농도군의 상대중량이 증가하였다($p < 0.05$). 그외 각 군의 암수 모든 동물에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 변화는 인정되지 않았다(Table VII, VIII).

병리조직학적조건

병리조직학적 검사결과(Table IX) 간에서 공포변성과 동

Table XI. Histological findings in rats treated with DA-1131/betamipron for 4 weeks

Organs and Findings	Group	DA-1131/betamipron (mg/kg)							
		0 (control)		40		160		640	
		Sex	M	F	M	F	M	F	M
Brain		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Eye		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Lung		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Trachea		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Thyroid gland		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Salivary gland		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Heart		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Thymus		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Liver		(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Vacuolar degeneration		0	0	1	0	1	0	1	1
Sinusoid dissociation		1	1	0	2	1	2	0	1
Gastrointestinal tract		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Spleen		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10

Table XI. Continued.

Organs and Findings	Group	DA-1131/betamipron (mg/kg)							
		0 (control)		40		160		640	
		Sex	M	F	M	F	M	F	M
Kidney		(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Focal degeneration		2	2	0	0	1	1	2	1
Tubular necrosis		0	0	0	0	0	0	1	0
Mononuclear cell infiltration		0	0	0	0	1	1	2	1
Dilatation		0	0	0	0	0	0	1	3
Adrenal gland		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Bone marrow (Sternum)		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Urinary bladder		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Within normal limits		10	10	0	0	0	0	10	10
Testis		(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)	-
Within normal limits		10	-	0	-	0	-	10	-
Seminal gland		(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)	-
Within normal limits		10	-	0	-	0	-	10	-
Prostate		(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)	-
Within normal limits		10	-	0	-	0	-	10	-
Ovary		-	(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)
Within normal limits		-	10	-	0	-	0	-	10
Uterus		-	(10)	-	(0)	-	(0)	-	(10)
Within normal limits		-	10	-	0	-	0	-	10

M: male, F: female, Code: ()=Number of animals examined.

양혈관의 dissociation이 각군에서 1~2레씩 관찰되었으며 신장에서는 염증세포침윤 소견이 중용량에서 암수 각 1레씩, 고용량에서는 수컷 2레 암컷 1레씩이 관찰되었으며 수질의 dilatation이 고농도군의 수컷 1레와 암컷 3레에서 나타났다. 피질에 focal necrosis는 고농도군 1레에서만 관찰되었다. 그외 다른 장기에서는 매체대조군과 비교하여 특이한 병변은 관찰되지 않았다.

고찰 및 결론

본 실험은 동아제약(주)연구소에서 개발예정인 카바페넴계 항생물질인 DA-1131과 유기음이온 수송저해제인 betamipron의 합제에 대한 반복투여 독성을 평가하기 위하여 랫드에 DA-1131과 betamipron을 각각 640, 160, 40 mg/kg 씩 동량으로 혼합하여 4주간 정맥투여한 것이다. 실험중 폐사한 동물은 없었으며, 실험기간중 임상증상으로는 연변 및 설사소견이 160 mg/kg 투여군과 640 mg/kg 투여군에서 농도의존적으로 나타났다. 음수섭취량은 증가하였으나 실험종료일에 측정된 뇨량은 감소하거나 변화하지 않았고 부검시 DA-1131/BP를 투여한 동물에서 맹장 및 회장의 팽대와 수양성내용물이 출현한 것 등은 모두 설사 및 연변에 의

한 속발성변화로 보인다. DA-1131과 동일한 베타락탐계 항생물질인 panipenem과 betamipron을 1:1로 90일간 병용 투여한 Manabe 등(1991)의 실험에서도 이러한 연변이나 설사의 소견이 관찰되었다. 이러한 소견은 항생물질을 과량으로 투여한 실험동물에서 대부분 관찰되는 소견으로 투여된 항생물질중 일부가 담즙으로 배설되어 장관내 정상세균총의 붕괴를 유발하여 나타나는 현상으로 사료된다. 사료섭취량은 특이한 변화를 보이지 않았으며 안검사에서 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 혈액학적검사결과에서 나타난 WBC값의 증가는 암컷에서만 나타났으며 정상범위내의 변화로 약물에 의한 변화로 생각되지는 않았다. Eosinophil은 수컷고용량군에서 감소, 암컷저용량군에서 증가소견을 각각 나타내어 약물에 의한 변화는 아닌 것으로 생각된다. 또한 암컷 중용량군에서 RBC, Hb, Hct 등이 감소되었으나 용량의존성을 나타내지 않고 정상범위내의 변화로 임상적 의의는 없는 것으로 사료된다. DA-1131/betamipron을 4주간 정맥투여한 후 검사한 혈청생화학치들중 수종의 항목에서 통계학적으로 유의한 변화가 관찰되었으나 대부분 임상적 의의가 없는 정상범위내의 변화였으며(Baker 등 1979) 암수결과가 상반되거나 용량상관성도 보이지 않아 약물의 투여와 연관된 독성학적 변화로 보기는 어려웠다.

노검사 결과 수컷 고용량군에서 노량의 유의성있는 감소와 bilirubin량의 증가가 나타났다. 이것은 설사나 연변으로 인하여 노량이 감소하였고 이로 인하여 노종의 bilirubin의 농도가 증가한 것으로 생각된다. 장기중량에서는 절대 및 상대중량 모두에서 유의성있는 변화를 보이거나 독성학적 의의를 가지는 변화는 관찰되지 않았다. 병리조직학적 검사에서 나타난 간의 변화는 대조군을 포함한 모든 군에서 출현한 것으로 보아 약물에 의한 변화가 아닌 incidental lesion으로 생각된다. 그러나 신장의 조직학적 검사에서는 고농도군에서 수질부의 dilatation과 신피질의 focal necrosis가 1-3례 출현한 것으로 보아 640 mg/kg이상에서는 일부 동물에서 신장에 대한 독성이 있는 것으로 생각된다.

Manabe 등(1991)이 보고에 의하면 베타락탐계 항생물질인 panipenem/betamipron을 90일간 랫드에 정맥투여하였을 때 신경증상이나 serum alkaline phosphatase의 activity감소 등과 같은 부작용이 일부 관찰되었으나 본 실험에서는 이러한 부작용은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 동아제약(주)에서 생산한 DA-1131은 유기음이온 수송저해제인 betamipron동량을 혼합하여 랫드에 4주간 정맥투여할 경우 640 mg/kg의 용량에서는 설사 및 연변 등의 소화기증상과 신장의 독성이 일부 관찰되었으며 160 mg/kg투여군에서도 소화기 증상은 투여 2주까지 계속되었다. 그러나 DA-1131/betamipron을 40 mg/kg의 용량으로 4주간 정맥투여한 군에서는 특이한 부작용을 나타내지 않아 무해용량(No-Observed-Adverse-Effect-Level)은 40 mg/kg인 것으로 추정된다.

참고문헌

- Baker, H. J., Lindsey, J. R. and Weisbroth, S. H. (1979) The laboratory rat; volume I Biology and Disease. In *Hematology and Clinical Biology*(Ringler, D.H. and Dabich, L. Ed.) pp. 105-121.
- Cojocel, C., G ttsche, U., T lle, K. L. and Baumann, K. (1988) Nephrotoxic potential of first-, second-, third-generation cephalosporins. *Arch Toxicol.* **62**, 458-464.
- Manabe, S., Kimura, K., Matsumoto, E., Yamoto, T., Matsunuma, N. and Masuda, H. (1991) Subacute toxicological study in rats treated intravenously with panipenem/betamipron for 90 days. *Chemother.* **39**(S-3). 157-165.
- Naganuma, H., Tokiwa, H., Hurouchi, Y., Kawahara, Y., Fukushige, J. I., Fukami, M., Hirota, K., Muramatsu, S., Takahagi, H., Inui, K. I., Tanigawara, Y., Yasuhara, M., Hori, R. and Kuwahara, S. (1991^a) Nephroprotective effect and its mechanism of betamipron(1) -Relationships of renal transport. *Chemother.* **39**(S-3). 166-177.
- Naganuma, H., Tokiwa, H., Hurouchi, Y., Kawahara, Y., Inui, K. I., Tanigawara, Y., Yasuhara, M., Hori, R. and Kuwahara, S. (1991^b) Nephroprotective effect and its mechanism of betamipron(2) -Relationships of renal excretion. *Chemother.* **39**(S-3). 178-189.
- Norby, S. R. (1986) Adverse reactions and interaction with newer cephalosporin and cephamycin antibiotics. *Med. Toxicol.* **1**, 32-46.
- Tune, B. M. (1990) Mechanism of nephrotoxicity of beta-lactam antibiotics. *Contrib. Nephrol.* **83**, 202-207.
- Tune, B. M. and Hsu, C. Y. (1990^a) The renal mitochondrial toxicity of beta-lactam antibiotics: In vitro effects of cephaloglycine and imipenem. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1**, 815-821.
- Tune, B. M. and Hsu, C. Y. (1990^b) Mechanism of beta-lactam antibiotic nephrotoxicity. *Toxicol. Letters.* **53**, 81-86.
- Williams, P. D., Dennett, D. B. and Comereski, C. R. (1988) Animal model for evaluating the convulsive liability of β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**(5), 758-760.
- 의약품 등의 독성시험기준(1996). 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호.
- 김동환, 강경구. (1998). Da-1131에 의해 유발되는 토끼신장 독성에 대한 CS-443(betamipron)의 효과. 미발표자료, 동아제약연구소 사내보고서 No. F-R-970021.
- 김옥진, 안병옥, 김순희, 김원배, 양중익. (1994^a). 카바페넴 항생제 DA-1131의 랫드에서의 정맥내 2주 반복투여독성시험. 미발표자료, 동아제약연구소 사내보고서 No. 940025.
- 김옥진, 안병옥, 김순희, 김원배, 양중익. (1994^b). 토끼에서의 DA-1131의 신장독성시험(V). Taurine 유도체 3종의 예방 효과. 미발표자료, 동아제약연구소 사내보고서 No. 940032.
- 김옥진, 안병옥, 김순희, 김원배, 양중익. (1994^c). DA-1131의 신장독성비교시험(II). 미발표자료, 동아제약연구소 사내보고서 No. 940019.