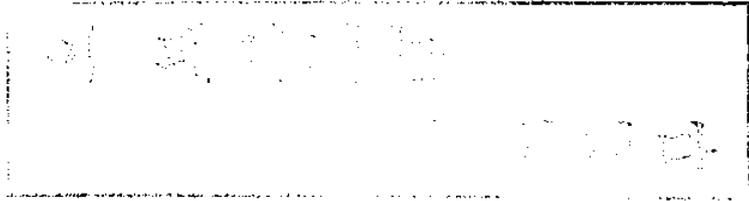


DA-125 항종양 치료제 개발연구

Research on the Development of DA-125, An Antitumor Agent

연구 기관
한국신약개발연구조합



제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “DA-125 항종양치료제” 과제의 연차보고서로 제출합니다.

1994년 8월 31일

주관연구기관명 : 한국신약개발연구조합

총괄연구책임자 : 양 중 익

참 여 기 업 명 : 동아제약주식회사

연 구 원 : 김원배 김순희 이상득

박정배 손미원 안병옥

백남기 심현주 이용두

위탁연구기관명 : 서울대학교 약학대학

위탁연구책임자 : 이 명 결

연 구 원 : 윤은정 이희주 박정미

위탁연구기관명 : 한국화학연구소 안전성연구센터

위탁연구책임자 : 정 분 구

연 구 원 : 하창수 김형진 김은주

신천철 김성훈 이현결

박종일 장원철 송시환
차신우 김정란 최규갑
유승룡 김종춘 이상준
김희연 김갑호 마진열
서정은 이현숙 배주현
안종수 양병철 허정두
김희영 최희순 최재문
김영호 홍미영

위탁연구기관명 : 서울대학교 의과대학

위탁연구책임자 : 박재갑

연구원 : 현진원

위탁연구기관명 : 연세대학교 의과대학 연세암센터

위탁연구책임자 : 노재경

연구원 : 김주향 강현철 임호영

이경호 이해란 조재용

라선영

요 약 문

Ⅰ. 제 목

DA-125 항종양치료제 개발연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

새로운 항종양 치료제 DA-125는 *in vitro*세포독성 및 *in vivo* 항암력이 안트라 사이클린계 항암성 항생물질중 가장 널리 사용되고 있는 아드리아마이신(독소루비신) 보다 우수하다고 보고된 유망한 신약 후보물질중의 하나이다. 본과제의 1차년도에서는 임상시험을 위한 유효성, 안전성 연구를 실시하였으며, 산업화를 위한 경제적 합성공정을 확립하였다. 2차년도 연구의 목표는 전임상 연구결과를 기초로 제 1상 임상 시험을 실시하고 후속 임상시험의 진행에 필요한 임상투여법의 개발, 병태모델에서의 ADME, 장기독성시험 및 독소루비신 내성 인체암 세포주에 대한 효력시험을 실시하는 데 있다. 국내의 신약개발이 초기단계에 있음을 고려할 때, DA-125의 임상연구 및 후기 비임상연구는 기술기반의 구축에 매우 중요하며, DA-125가 성공적으로 개발될 경우 임상적으로나 경제적으로 매우 중요한 항암제가 될 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

이 연구는 DA-125 항종양치료제 개발연구(임상투여법 개발연구)와 4개 위탁연구로 구성되어 있으며 각 부분의 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

1. DA-125 항종양치료제 개발연구

임상사용에 적절한 투여방법을 설정하고 반복투여시의 축적성에 의한 영향을 평가하기 위하여 다음 연구를 실시하였다.

- 1) Infusion 시간에 따른 DA-125의 약동력학의 차이
- 2) Infusion 시간에 따른 DA-125의 골수분포의 차이
- 3) Infusion 시간에 따른 DA-125의 조혈기독성의 차이
- 4) 단회 및 7일 연속투여시 DA-125의 약동력학, 조직분포 및 담즙배설

2. DA-125의 항종양 치료제 ADME 연구

암환자에서 빈번한 질병상태에서의 DA-125의 약동력학적 변화를 평가하기 위하여 다음 연구를 실시하였다.

- 1) Lewis Lung Carcinoma를 피하이식한 BDF1 mouse 및 정상 BDF1 mouse에서의 DA-125의 약동력학, 조직분포 및 담즙배설
- 2) 저단백 식이로 유도된 영양결핍 rat에서의 DA-125의 약동력학
- 3) 선천성고혈압 rat 및 DOCA-salt로 유도된 고혈압 rat에서의 DA-125의 약동력학

3. DA-125 항종양치료제 장기독성 연구

DA-125의 장기투여시의 독성 및 생식에 대한 영향을 평가하기 위하여 다음 연구를 실시하였다.

- 1) Rabbit에서의 최기형성시험
- 2) Rat에서의 주산수유기시험
- 3) Rat에서의 13주 아급성독성시험(6개월 만성독성시험의 용량결정시험)

- 4) Rat에서의 6개월 만성독성시험 ('94 계속)
- 5) Dog에서의 6개월 만성독성시험 ('94 계속)

4. DA-125 항종양치료제 효력연구

국내 암환자로부터 분리, 수립한 독소루비신내성 인체암세포주들에 대한 DA-125의 in vitro 세포독성을 MTT법으로 측정하여 독소루비신과 비교평가하였다.

5. DA-125 항종양치료제 제 1상 임상시험

진행암환자를 대상으로 약물의 안전성 및 부작용을 평가하고 최대내량(Maximum Tolerated Dose, MTD) 및 제2상 임상시험에서의 권장사용량(Recommended Dose)을 결정하며, 약물동태(Pharmacokinetics)를 규명하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. DA-125 항종양치료제 개발연구

DA-125 10mg/kg을 토끼에 1분, 1시간, 4시간, 8시간 정맥내 정속주입하였을 때, M1의 최고혈장농도는 infusion시간이 길어짐에 따라 감소하였다. 8시간 infusion시의 M1의 골수중 최고농도는 1분 infusion시의 약 절반으로 감소되었다. 그러나 infusion시간에 따라 혈장 및 골수중 M1의 AUC는 크게 변하지 않았다. DA-125 10, 20, 30 mg/kg을 1분 및 8시간동안 랫드에 정속 투여하였을 때 백혈구수 변동 및 체중 변화는 두군사이 유의하지 않았다. M1의 골수중 AUC가 정속주입 속도에 따라 변화가 크지 않으므로 DA-125의 골수독성이 정속주입 속도에 따라 변하지 않은 것으로 생각

된다.

DA-125, 4mg/kg을 랫드에 단회 및 7일간 반복적으로 정맥에 투여하였을 때, 2 - 3 point를 제외한 M1, M2, M3, M4의 혈장농도 두군간에 유의적인 차이가 없었으며, 뇨 및 담즙중 배설량도 유의한 차이를 보이지 않았다. 그리고 대사체들의 조직 분포도 단회 및 7일 연속투여시 유의한 차이가 나타나지 않았다.

2. DA-125의 항종양 치료제 ADME 연구

16주령의 선천성 고혈압 rat(SHR) 및 DOCA-salt 유도 고혈압 rat에서는 16주령의 대조군에 비하여 M2 및 M4의 혈장농도 및 AUC가 유의적으로 증가되었으며, 6주령의 SHR과 6주령의 대조군간에는 유의적인 차이가 없었다. 위의 결과는 DA-125에서 M2 및 M4로의 대사가 고혈압 자체에 기인하는 것임을 나타내므로 고혈압환자에서는 DA-125용량의 수정이 고려되어야 한다.

Protein-calorie malnutrition(PCM) rat 및 SD rat에 DA-125 20 mg/kg을 정맥 투여시 M1 - M4의 혈장농도 및 약동력학 정수는 대조군에 비해 유의적 차이가 없었다. 따라서 PCM 환자에서의 DA-125 용량은 수정을 고려할 필요가 없다고 판단된다.

Lewis lung carcinoma를 피하이식한 EDF1 mouse에서의 DA-125 25mg/kg을 정맥 투여시 M1 - M4의 혈중농도는 대조군에 비해 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 약동력학 정수도 유사하였다. 암이식 BDF1 mouse에서는 대조군에 비해 폐에서의 M1 농도와 AUC_t (8940 vs 962 ug min/g)가 크게, 간에서의 AUC_t(3840 vs 962 ug min/g)가 작게 나타났으며 다른 조직에서는 동등하였다. 24시간 뇨로 배설된 M1 - M4중에서는 M2가 주대사체였으며, DA-125로 환산 배설량은 암이식군과 대조군에서 각각 8.36%, 10.7%였다. 암조직중에서의 M1 농도는 투여직후 최고농도(3.75 ug/g)에 도달하였으며, 매우 서서히 감소하여 24시간까지 저의 일정하게 유지되었다. 이는 M1이 피하이

식된 Lewis lung carcinoma에 매우 높은 친화력이 있음을 시사한다.

3. DA-125 항증양치료제 장기독성 연구

DA-125에 대한 독성평가연구의 일환으로 Sprague-Dawley계 rat를 이용한 주산기 및 수유기시험과 New Zealand White계 토끼를 이용한 최기형성시험을 실시하였다. 또한 rat에서의 6개월 만성독성시험의 용량결정시험으로 3개월 아급성독성시험을 완료하고 rat 및 dog에서의 6개월 만성독성시험을 실시중이다.

DA-125 0.04, 0.2 및 1 mg/kg을 SD rat에 임신 17일부터 포육 21일까지 정맥내 투여하여 모동물의 분만 및 수유 그리고 차세대동물의 성장 및 기능발달에 미치는 영향을 조사하였다. 시험결과 DA-125의 무해용량은 모동물과 차세대동물에서 0.2 mg/kg 그리고 조정후 남은 F1 랫드와 F2 태자에서 1 mg/kg 이상인 것으로 사료된다.

DA-125 0.2, 0.6 및 1.8 mg/kg을 New Zealand계 토끼에 기관형성기(임신 6일부터 18일)동안 정맥투여한 후 임신 28일에 제왕절개하여 시험물질이 모동물 및 태자발생에 미치는 영향을 조사하였다. 시험결과 DA-125의 무해용량은 모동물 및 태자에 있어서 모두 0.6 mg/kg 이하인 것으로 사료된다.

3개월 DRF시험으로 설정된 DA-125의 랫드에서의 6개월 만성독성용량은 0.032, 0.125, 0.5, 2.0 mg/kg이었다.

4. DA-125 항증양치료제 효력연구

DA-125는 SNU-1/DOX250, SNU-16/DOX250등의 독소루비신 내성 위암세포주에 대하여 독소루비신보다 각각 64배, 28배 강한 세포독성을 보였으며, SNU-C4/DOX1000, SNU-C2A/DOX등의 독소루비신 내성 대장암 세포주에 대하여 DA-125는 독소루비신보다

67배 이상 강한 세포독성을 나타내었다.

5. DA-125 항종양치료제 제1상 임상시험

본 연구는 비무작위 개방 제1상 임상연구로 실시하였다. 대상환자는 진행고형암으로 병리진단된 후 안트라사이클린 항암제를 제외한 비교적 골수억제가 심한 항암화학요법을 받은 환자로서 ECOG 수행상태가 0-2이고 적절한 간, 신기능이 확인된 환자를 선택하였다. DA-125는 정맥주사하였으며, Murine LD₅₀의 10%인 20 mg/m²을 starting dose로 하여 Modified Fibonacci Method에 근거하여 증량하였다. 부작용은 WHO 독성기준에 따라 분류하였고, DA-125의 약동력학을 규명하기 위하여 약물 투여 직전부터 투여후 96시간까지 혈장농도 및 뇨중배설을 측정하였다.

DA-125 20 mg/m² 3예에서는 특기할만한 부작용이 관찰되지 않았으며, 40 mg/m² 3예중 2예에서 WHO grade I의 식욕부진과 구토, WHO grade, I II 각각 1예씩의 Neutropenia가 관찰되었으나 WHO grade III 이상의 부작용은 없었다. 60 mg/m²을 투여한 환자 1예에서는 투여후 5시간에 Occasional PVC와 저혈압(70/50 mmHg)이 관찰되었으나 자각증상은 없었으며 약 20분후 자연회복되었고 다른 중증의 부작용은 관찰되지 않았다. 항종양효과는 20 mg/m²에서부터 모두 안정성 병변(stable disease)이 관찰되었다.

DA-125는 아드리아마이신의 상용용량(60-75 mg/m²)까지는 모든 예에서 중대한 부작용 없이 잘 견디는 것으로 관찰되었으며, 고용량에서의 결과는 해외 라이선싱과 관련하여 기밀사항으로 유지하고 있다.

Summary

I. Subject

Development research of DA-125, An Antitumor Agent

II. Objectives and Importance of the Project

DA-125, a new antitumor agent, is one of promising candidates reported to have superior *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* activity to adriamycin which is most widely used among anthracycline anticancer antibiotics. In the first year(1993) of this project the efficacy and safety studies for the clinical trial were performed and a commercially available synthetic process for industrialization was established.

The purpose of this year's research is to conduct a phase I clinical trial on the basis of preclinical studies and to perform the studies required for following clinical studies including establishment of dosing schedule appropriate to clinical use, ADME studies in various diseased animal models, long-term toxicity studies and studies on *in vitro* cytotoxicity of DA-125 against doxorubicin-resistant human cancer cell lines.

The preclinical and clinical studies are very important to establish the technological basis for new drug development, since the domestic new drug R&D is still in early stage. DA-125 is expected to be a very important drug clinically and economically, if it can be developed successfully.

III. Scope and Contents of the Research

This project, development research of DA-125, an antitumor agent, consists of establishment of dosing schedule appropriate to clinical use and four contract researches. The scope and contents of each research are as follows :

1. Development Research of DA-125, An Antitumor Agent

The following studies was performed to establish a dosing schedule appropriate to clinical use of DA-125 and to evaluate accumulation effect of DA-125 when administered repeatedly.

- 1) Differences in pharmacokinetics of DA-125 at various infusion time in rabbits
- 2) Differences in distribution of DA-125 to bone marrow at various infusion time in rabbits
- 3) Comparison of myelotoxicity between intravenous bolus injection group and log-term intravenous infusion group in rabbits
- 4) Pharmacokinetics, tissue distribution and biliary excretion of DA-125

after single or 7 consecutive day intravenous administration of DA-125, 4 mg/kg to rats

2. Studies on ADME of DA-125, An Antitumor Agent

The following studies were performed to identify some possible changes in pharmacokinetics and/or tissue distribution of DA-125 in various diseased states frequently seen in cancer patients.

- 1) Pharmacokinetics and tissue distribution of DA-125 in subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma-bearing and normal BDF1 mice
- 2) Pharmacokinetics of DA-125 in malnutrition rats induced by low protein-calorie
- 3) Pharmacokinetics of DA-125 in spontaneously hypertensive rats(SHRs) and DOCA-salt induced hypertensive rats

3. Studies on Long-Term Toxicity of DA-125, An Antitumor Agent

The following studies were performed to evaluate the repeated dose toxicity of DA-125 and effects on reproduction.

- 1) Teratogenicity in rabbits
- 2) Peri- and Postnatal toxicity in rats
- 3) 3-month subchronic toxicity in rats(A dose ranging finding(DRF) study of 6-month chronic toxicity study)
- 4) 6-month chronic toxicity in rats(being continued 1994)
- 5) 6-month chronic toxicity in dogs(being continued 1994)

4. Studies on *In Vitro* Cytotoxicity of DA-125, An Antitumor Agent

In vitro cytotoxicity of DA-125 was evaluated and compared with that of doxorubicin against doxorubicin-resistant human cancer cell lines isolated and established from domestic cancer patients using MTT assay.

5. Phase I Clinical Study of DA-125, An Antitumor Agent

This study was performed to evaluate safety and side effects of DA-125 and to define the MTD(Maximum Tolerated Dose) and RCD(Recommended Dose) for phase II trial in advanced cancer patients. At the same time, pharmacokinetics of DA-125 was studied.

IV. Results and Recommendation for Application

1. Development Research of DA-125, An Antitumor Agent

The peak plasma concentration of M1 after intravenous infusion of DA-125(10 mg/kg) to rabbits for 1 min, 1hr, 4hr, or 8hr was decreased in proportion to increase of infusion time. The peak bone marrow concentration of M1 in 8hr infused group decreased to half of that in 1 min infused group. But AUCs of M1 in plasma or bone marrow did not changed greatly in different infusion times. The changes in WBC or body weight after infusion of DA-125(10,20,30 mg/kg) to rabbits for 1 min or 8 hr were not significant. It seems that the myelotoxicity of DA-125 in

different infusion times did not changed because of small changes in the AUCs of M1 in bone marrow.

When DA-125(4 mg/kg) was intravenously administered to rats singly or for 7 days, there was no statistically significant changes in the plasma concentration of M1, M2, M3, and M4 except 2 or 3 points, in biliary/urinary excretion or in tissue distribution of metabolites between single-treated and 7 day-treated group.

2. Studies on ADME of DA-125, An Antitumor Agent

The plasma concentrations of M2 and M4 and resultant AUCs increased significantly in SHRs and DOCA-salt induced hypertensive rats than in their control rats and the increased metabolism of DA-125 to M2 and M4 was due to the hypertension itself. The modification of the dose of DA-125 in hypertension patients should be considered.

The plasma concentrations and pharmacokinetic parameters of M1 - M4 in protein-calorie malnutrition(PCM) rats were not significantly different from those in normal rats. It seemed that the modification of DA-125 doses in PCM patients could not be considered.

The mean plasma concentrations and the amount excreted in urine of each M1 - M4 were not significantly different between subcutaneously implanted Tumor(Lewis lung carcinoma)-bearing BDF1 mice(TBM) and normal BDF1 mice, and hence similar pharmacokinetic parameters of M1 - M4 were

also obtained. The amount of M1 in the lung was significantly larger in TBM than the control mice, and vice versa in the liver. However, the corresponding values for other tissues were comparable between TBM and the control. The amount of the tumor mass reached a mean C_{max} of 3.75 ug/g immediately after intravenous administration of DA-125, 25 mg/kg, to TBM, and then declined very slowly to an amount that remained almost "constant" for up to 24 hour. This suggest that M1 has high affinity to the subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma.

3. Studies on Long-Term Toxicity of DA-125, An Antitumor Agent

As a part of toxicological evaluation of DA-125, peri- and postnatal study in Sprague-Dawley rats and teratogenicity study in New Zealand White rabbits were conducted. Also, 3 month subchronic toxicity study was performed as a dose range finding(DRF) study of 6 month chronic toxicity study. At present, 6 month chronic toxicity studies in rats and dogs are in progress.

DA-125, 0.04, 0.2 and 1 mg/kg was administered intravenously to pregnant and subsequently delivered Sprague-Dawley rats from day 17 of gestation through day 21 of lactation. Effects of the the drug on dams, growth and functional development of offsprings were examined. The results obtained suggest that no-effect levels(NOELs) of DA-125 are 0.2 mg/kg for dams and F1 offsprings and over 1 mg/kg for F1/F2 fetuses.

DA-125, 0.2, 0.6 and 1.8 mg/kg was administered intravenously to pregnant New Zealand White rabbits during the organogenetic period. The

dams were subjected to Caesarean section on day 28 of pregnancy. Effects of the drug on dams and development of fetuses were examined. The results suggest that the no-effect levels (NOELs) of DA-125 are 0.6 mg/kg for dams and fetuses.

The dosage levels for 6 month chronic toxicity study in rats obtained from the results of 3 month dose range finding study were 0.031, 0.125, 0.5 and 2 mg/kg.

4. Studies on *In Vitro* Cytotoxicity of DA-125, An Antitumor Agent

The *in vitro* cytotoxicity of DA-125 for SNU-1/DOX250 and SNU-15/DOX250 (doxorubicin-resistant human stomach cancer cell lines) was 64-fold and 28-fold stronger than that of doxorubicin, respectively. The *in vitro* cytotoxicity of DA-125 for SNU-C4/DOX1000 and SNU-C2A/DOX1000 (doxorubicin-resistant human colon cancer cell lines) was over 67-fold stronger than that of doxorubicin.

5. Phase I clinical study of DA-125

A single arm open non-randomized phase I clinical study was carried in advanced cancer patients who received chemotherapies except anthracyclines and had normal hepatic and renal functions. DA-125 was administered via intravenous injection and its starting dose was 20 mg/m², 10% of murine LD₁₀, and it is increased on behalf of Modified Fibonacci Method. For each dose, 3 patients were enrolled, and if there

were no side effects greater than WHO grade III, the next dose was administered. Pharmacokinetic parameters of metabolites of DA-125 were also calculated.

There was no noteworthy side effects at the dose of 20 mg/m². Two patients treated with the dose of 40 mg/m² showed anorexia, nausea, vomiting(WHO grade I) and neutropenia(one WHO grade I + one WHO grade II). We noticed one patient with occasional PVC's and hypotension(70/50 mmHg) without any subjective symptoms, 5 hour after injection at the dose of 60 mg/m², but 20 minutes later these signs were disappeared spontaneously. From the dose of 20 mg/m², stable diseases were observed in many cases.

The results of the present study demonstrated that DA-125 was more tolerable to advanced cancer patients than doxorubicin.

* Results at higher doses are secret because of LICENCING STRATAGE at present.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction /25

Chapter 2. Experimental Methods/29

Chapter 3. Results and Discussions/39

Chapter 4. Conclusions /47

Chapter 5. References /51

Chapter 6. Contract Research Reports /77

I. Study on the ADME of DA-125, An Antitumor Agent /79

: M.G.Lee,

College of Pharmacy, Seoul National University

II. Study on the Long-Term Toxicity of DA-125,

An Antitumor Agent /137

: M.G.Chung

Center for Safety Research, KRICT

III. Study on the In vitro Cytotoxicity of DA-125,

An Antitumor Agent /303

: J.G.Park

College of Medicine, Seoul National University

IV. Phase I Clinical Study of DA-125, An Antitumor Agent/321

: J.K.Roh

Yonsei Cancer Center, College of Medicine,

Yonsei University

Chapter 7. Plan for Future Research /387

목 차

제 1 장 서론	25
제 2 장 연구추진방법(실험방법)	29
제 3 장 연구결과 및 고찰	39
제 4 장 결론	47
제 5 장 참고문헌	51
제 6 장 위탁연구보고서	77
I. DA-125항종양치료제의 ADME 연구	79
연구책임자 : 서울대학교 약학대학 이 명 걸	
II. DA-125항종양치료제의 장기독성연구	137
연구책임자 : 한국화학연구소 안전성연구부 정 문 구	
III. DA-125항종양치료제의 효력연구	303
연구책임자 : 서울대학교 의과대학 박 재 갑	
IV. DA-125항종양치료제의 제1상 임상연구	321
연구책임자 : 연세대학교 의과대학 연세암센터 노 재 경	
제 7 장 향후 연구계획	387

이 책의 저자
김영희

DA-125 항종양 치료제 개발연구

Research on the Development of DA-125, An
Antitumor Agent

임상투여법 연구

Study on the Dosing Schedule of DA-125

연구기관

동아제약(주) 연구소

이 페이지는

여러 읽니다

요 약 문

DA-125의 적절한 투여방법을 설정하기 위하여 토끼에서 정맥내 투여속도에 따른 골수에서의 약물노출량 변화 및 조혈기 독성 차이를 비교하고, 랫드에서 7일간 반복투여시의 축적성을 평가하였다. DA-125, 10 mg/kg을 1 분, 1 시간, 4 시간 및 8 시간동안에 토끼에 정속 투여한 후의 M1의 최고 혈장 농도는 26.1 ± 14.2 , 1.43 ± 0.255 , 0.333 ± 0.0749 및 0.147 ± 0.0319 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ 는 1.33 ± 0.411 , 1.49 ± 0.182 , 1.07 ± 0.613 , 1.00 ± 0.0867 $\mu\text{g hr/ml}$ 이었다. 골수중 최고농도는 1분 투여군에서의 $11.3 \mu\text{g/ml}$ 에 비하여 8 시간 정속투여군에서는 $6.09 \mu\text{g/ml}$ 로 약 1/2정도로 감소하였으며 골수의 농도-시간 곡선하 면적은 26.2% 감소하였다. DA-125, 10, 20, 30 mg/kg을 1 분 및 8 시간동안 정속 투여한 후 15일간의 백혈구수 변동 및 체중 변화를 비교한 결과 두군간에 유의적인 차이는 없었다. 이상의 결과로 볼 때 DA-125를 투여시, 투여시간이 길어지면 활성대사체 M1의 혈중농도 peak level은 투여시간에 반비례하여 낮아지지만, M1의 순환혈로부터 골수로의 이행이 느려 골수중 최고농도의 차이는 혈중농도의 차이보다 적게 나타나고 골수에서의 차이가 크지 않기 때문에 조혈기독성에서는 유의적인 차이를 나타내지 못하였다.

DA-125, 4mg/kg을 랫드에 단회 및 7일간 반복하여 정맥내 투여하였을 때 M1, M2, M3, M4의 혈장농도는 2-3 point를 제외하고는 통계적 유의차가 없었으며, 뇨 및 담즙중 배설량도 유의한 차이를 나타내지 않았다. 조직중에서는 반복투여시 골수, 흉선 및 혈구에서 M2농도가, 대장 및 위에서는 M4농도가 유의성 있는 증가를 나타내었으나, 대부분의 조직에서는 단회 및 반복투여군간에 조직농도의 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 DA-125는 랫드에 7일간 반복투여시에도 축적이 거의 없거나 매우 적다고 판단되었다.



제1장 서론

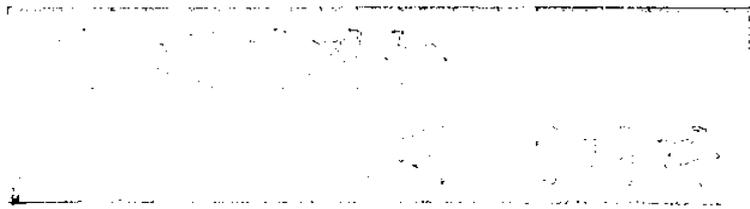
이 피아지는
이런 임니다

제 1 장 서 론

DA-125는 불소를 함유한 새로운 아드리아마이신유도체, (8s, 10s)-8-(3-aminopyranoyloxyacetyl)-10-[(2,6-dideoxy-2-fluoro- α -L-talopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxyl-1-methoxy-5,12-naphthacenedione로서 동아제약 연구소에서 최초로 합성되었다. DA-125는 M1의 C 14 위치에 β -alanine 이 결합된 수용성 prodrug으로 in vivo 및 in vitro에서 adriamycin보다 향상된 cytotoxic activity를 보이고, 심장독성과 조혈기독성은 adriamycin보다 적게 나타났다. DA-125의 mouse, rat(Yoon et al. 1994) 및 dog(Lee et al. 1994)에서의 Pharmacokinetics, tissue distribution 및 excretion에 대하여는 이미 보고하였으며, 현재 DA-125는 임상시험이 진행중에 있다. 한편 adriamycin은 10-96 시간에 걸쳐 정맥내 정속투여할 경우 adriamycin의 peak plasma level을 낮게 유지함으로써 축적성이 있는 심장에서의 독성을 감소시킬 수 있다고 보고되었으며 (Benjamin et al 1983), 심장에서의 adriamycin의 소실속도는 plasma에서보다 매우 느리다는 것이 밝혀짐으로써 plasma peak level과 축적성이 있는 장기의 노출량 및 독성간에 관계가 있음이 시사되었다.

본 연구에서는 DA-125의 용량제한인자 (Dose Limiting Factor)인 조혈기 독성을 감소시킬수 있는 투여방법을 개발할 목적으로 DA-125의 투여속도를 달리 하면서 혈중농도 및 골수중 농도를 측정하고 조혈기 독성을 비교평가하였다. 또한 DA-125, 4 mg/kg을 S.D. rat에 단회 및 7일간 반복투여하고 혈중 농도, 혈장반감기, 담즙배설 및 조직농도의 차이 유무를 통계적 방법으로 해석하여 반복 투여시 축적성을 평가하고자 하였다.

제2장 연구 추진 방법



제 2 장 연구추진방법

제 1 절 시약 및 재료

DA-125, M1, M2, M3 및 M4는 동아제약 연구소에서 합성한 것을 사용하였으며, fluorescein (HPLC 정량의 internal standard)와 β -glucuronidase (Helix pomatia, Type HP-2, β -glucuronidase activity : 97400 units/ml, sulfatase activity : 1000-5000 units/ml)은 Sigma Chemical Co. 에서 구입하였고, 일반시약 및 용매는 Guaranteed reagent grade나 HPLC grade를 사용하였다. 토끼는 Newzealand White종으로 체중 2.0 - 3.0 kg의 웅성토끼를, 랫드는 Charles River Japan 에서 구입하여 동아제약 SPF 동물실에서 1주일간 순화사육한 체중 260 - 320 g의 웅성 랫드를 사용하였다. HPLC system은 Model 7125 injector(Rheodyne Inc., Cotati, CA), Model 9600 pump(Eldex), guard column(reversed phase column, Hichrom), analytical column(8×10 cm, Water RCM, Water Assoc., Milford, MA), fluorescence detector(Fluor LC304, ex. 488 nm em. 556 nm, Linear) 및 D-2500 integrator(Hitachi)로 구성하였다.

제 2 절 동물 실험

1. 투여 속도에 따른 혈중농도 profile 측정

체중 2.0-3.0 kg 토끼를 pentobarbital sodium 10 mg/kg을 귀정맥으로 투여하여 마취시킨 후 경동맥과 경정맥을 silastic tube로 cannulation하여 고정틀에 고정하였다. 토끼가 마취에서 완전히 깨어난 후 Group I은 DA-125,

10 mg/kg을 1분간에 걸쳐 서서히 주입하고 약물 투여 후 1, 5, 15, 30 분, 1, 2, 4, 6, 8 시간에 채혈하여 (2.0 ml) 즉시 원심분리 한 후 혈장 1.0 ml을 HPLC 분석전까지 -20℃ 에서 냉동보관하였다. 투여 8시간 까지의 뇨를 포집하여 뇨량을 정확히 측정하고 일정량을 HPLC 분석시까지 -20℃ 에서 냉동보관하였다. Group II는 DA-125, 10 mg/kg을 1 시간에 걸쳐 정속투여하면서 투여개시 후 5, 15, 30 분, 1 시간, 투여 완료 후 5, 15, 30분, 1, 2, 4, 6, 8 시간에, Group III 는 DA-125, 10 mg/kg을 4 시간에 걸쳐 정속투여하면서 투여개시 후 1, 2, 3, 4 시간, 투여 완료 후 5, 15, 30분, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 시간에, Group IV는 DA-125, 10 mg/kg을 8 시간에 걸쳐 정속투여하면서 투여개시 후 1, 3, 5, 7, 8 시간, 투여 완료 후 5, 15, 30분, 1, 2, 4, 6, 8 시간에 채혈하여 Group I 과 동일한 방법으로 처리하였다.

2. 투여 속도에 따른 조직농도 profile 측정

약물투여방법은 ' 1. 투여 속도에 따른 혈중농도 profile 측정' 에서와 같다. Group I은 투여 후 15, 30분, 1, 2, 4, 8 시간에 방혈치사시킨 후 대퇴골을 적출하여 골수를 채취하였으며, 심장 및 비장을 적출하여 wet weight를 측정한 후 일정부위 약 1 g을 채취하였다. 채취한 시료는 4배량의 0.1N HCl을 가하여 homogenize (Ultra Turrax T25) 하였다. 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액 1.0 ml를 취하여 정량시까지 -20℃ 에서 냉동보관하였다. Group II는 투여개시 후 5, 30 분, 1 시간, 투여완료 후 15, 30분, 1, 2, 4, 8 시간에, Group III는 투여개시 후 1, 4 시간, 투여완료 후 1, 2, 4, 8 시간에, Group IV는 투여개시 후 1, 3, 5, 7, 8 시간, 투여완료 후 1, 2, 4, 8 시간에 방혈치사시킨 후 Group I 과 동일하게 처리하였다.

3. 투여속도에 따른 조혈기독성 평가

체중 2.0 kg 내외의 토끼의 경정맥에 '1. 투여 속도에 따른 혈중농도 profile 측정' 에서와 동일한 방법으로 cannulation한 후 DA-125, 10, 20 및 30 mg/kg을 1 분 및 8 시간 정속 주입하였다. 약물 투여전 및 투여후 15 일까지 매일 heparin처리한 주사기로 이개 동맥에서 약 0.5 ml의 전혈을 채취하여 자동혈구 측정장치를 사용하여 백혈구 수를 측정하였으며 동시에 체중 변화를 관찰하였다.

4. 반복투여시 ADME 평가

가. 혈중농도 및 뇨중배설의 측정

단회투여시험

DA-125, 4.0 mg/kg을 1 mM lactic acid / saline에 녹여 1 ml/kg을 랫드 미정맥내 투여하였다. 투여후 1, 5, 15, 30분 및 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 시간에 랫드를 ether 마취하고, heparin 처리한 syringe를 사용하여 복대동맥으로부터 전혈 5 ml를 채취하였다. 각 sampling 시간마다 5마리를 사용하고 1분 및 5분 sampling군은 고정틀에 고정된 상태에서 투여하였다. 채취한 혈액은 채혈즉시 원심분리하고 각각 2개씩의 sample tube에 혈장 1ml씩을 취하여 HPLC 분석시까지 -20℃에 냉동보관하였다. 뇨중배설을 측정하기 위해서는 24시간 sampling군을 약물투여후 metabolic cage에 넣고, ice bath에 담긴 채뇨관에 0-8, 8-24 시간 사이의 자연뇨를 포집하여 뇨량을 측정하고 HPLC 분석시까지 -20℃에 냉동보관하였다.

반복투여시험

DA-125, 4.0 mg/kg을 1 mM lactic acid / saline에 녹여 랫드 미정맥내 6

일간 연속투여하고 7일째에 단회투여시험과 같은 방법으로 투여 및 sampling하여 HPLC 분석시까지 -20℃에 냉동보관하였다.

나. 담즙배설의 측정

단회투여시험

랫드를 ether 마취한 후 개복하여 담관에 polyethylene catheter를 삽입한 후 봉합하였다. 마취에서 완전히 회복된 후, DA-125, 4.0 mg/kg을 1 mM lactic acid / saline에 4.0 mg/ml 농도로 녹여 미정맥내 투여하였다. 투여 후 0-1, 1-2, 2-4, 4-8, 8-24 시간 사이의 담즙을 포집하여 담즙량을 측정한 후 HPLC 분석시까지 -20℃에 냉동보관하였다. 또한 시험관에 conjugate형태로 배설되는 대사체의 양을 측정하기 위하여 담즙 0.1 ml를 취하여 0.2M acetate buffer로 10배 희석하고 β -glucuronidase 0.1 ml를 가하여 37℃에서 2시간동안 incubation한 후 시료에 0.25N HCl 0.5 ml를 가하여 효소반응을 중지시키고 sample 처리, HPLC 분석하여 포합체로 배설되는 대사체의 양과 M1, M2, M3, M4 이외의 대사체를 확인하였다.

반복투여시험

DA-125, 4.0 mg/kg을 1 mM lactic acid / saline에 4.0 mg/ml 농도로 녹여 미정맥내 6일간 연속투여하고 7일째에 단회투여시험과 같은 방법으로 투여 및 sampling HPLC 분석시까지 -20℃에 냉동보관하였다.

다. 조직분포의 측정

단회투여시험

DA-125, 4.0 mg/kg을 1 mM lactic acid / saline에 4.0 mg/ml 농도로 녹여 미정맥내 투여하였다. 투여후 5, 15, 30분 및 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 시간에

랫드를 ether 마취하고, heparin 처리한 syringe를 사용하여 복대동맥으로부터 전혈 5 ml를 채취하여 '혈중농도 및 뇨중배설의 측정'에서와 동일한 방법으로 처리하였다. 혈액을 채취한 후 랫드를 즉시 실혈치사시키고, 심장, 간, 신장, 폐, 위, 소장, 대장, 비장, 흉선 및 골수를 적출하였다. 각 sampling 시간마다 5마리를 사용하였으며, 적출한 각 장기는 wet weight를 측정한 후 일정부위 약 1g 씩을 절취하여 4배량의 0.1N HCl을 가하고 homogenize한 후 원심분리하여 상층액 1ml를 취하여 HPLC 분석시까지 -20℃에 냉동보관하였다.

반복투여시험

DA-125, 4.0 mg/kg을 1 mM lactic acid / saline에 4.0 mg/ml 농도로 녹여 미정맥내 6일간 연속투여하고 7일째에 단회투여시험과 같은 방법으로 투여 및 sampling하여 HPLC 분석시까지 -20℃에 냉동보관하였다.

제 3 절 HPLC Assay

생체시료내의 M1-M4의 농도는 본 실험실에서 확립한 HPLC 정량 방법(Shim et al., 1994)에 따라 정량하였다. 혈장중 농도는 혈장 1.0 ml에 1.0 ml의 0.1N HCl, 0.5 ml internal standard(fluorescein 1 μ g/ml) 및 0.5 ml methanol을 가한 다음 10 ml의 ethyl acetate을 가하여 2.5분동안 vortex-mixing하고 centrifugation한 후 상등액 8 ml를 취하여 질소가스기류하에서 완전히 건조하였다. 담즙 및 뇨는 시료 0.1 ml에 0.1 N-HCl 0.1 ml, internal standard 용액 (fluorescein 3 μ g/ml DW) 0.1 ml, methanol 0.1 ml 및 ethyl acetate 1 ml를 가하고 진탕하여 추출한 후, organic phase 0.9 ml를 취하여 질소가스기류하에서 건조하였다. 조직시료의 정량은 homogenize한 상등액 1.0 ml에 0.1 N-HCl 0.5 ml, internal standard 용액 (fluorescein 1 μ g/ml

DW) 0.5 ml, methanol 0.5 ml 및 ethyl acetate 10 ml를 가하고 진탕하여 추출한 후, organic phase 8 ml를 취하여 질소기류하에서 건조하였다. 질소기류하에 건조시킨 혈장, 담즙, 뇨 및 조직시료의 잔사에 200 μ l의 Britton-Robinson buffer:methanol (1 : 2, v/v)을 가하고, vortex, sonication 하여 용해한 후 centrifugation한 상등액 100 μ l를 HPLC system에 injection하였다. HPLC 분석조건은 아래와 같다.

- Guard column(reversed phase column, Hichrom)
- Analytical column(8x10 cm, Water RCM, Water Assoc., Milford, MA),
- Mobile phase: 1% acetic acid:methanol:isopropyl alcohol(70:10:20)
- Detector(Fluor LC304, ex. 488 nm em. 556 nm, Linear)
- Flow rate 1.5 ml/min

제 4 절 약동력학적 분석

시간 0 에서 무한대까지의 혈중농도곡선하 면적(AUC)은 trapezoidal rule extrapolation method에 의하여 구하였다. 이방법은 혈중농도가 감소하는 동안에는 logarithmic trapezoidal rule을, 증가하는 동안에는 linear trapezoidal rule을 사용한다. 마지막 data로부터 무한대까지의 면적은 마지막 농도를 속도 상수로 나누어 계산하였다.

The time-averaged total body clearance (CL), area under the first moment of th plasma concentration-time curve (AUMC), mean residence time (MRT), apparent volume of distribution at steady state (V_{ss})는 다음 식에 의하여 구하였다.:

$$CL = \frac{Dose}{AUC}$$

$$AUMC = \int_0^{\infty} C_p \times t \, dt$$

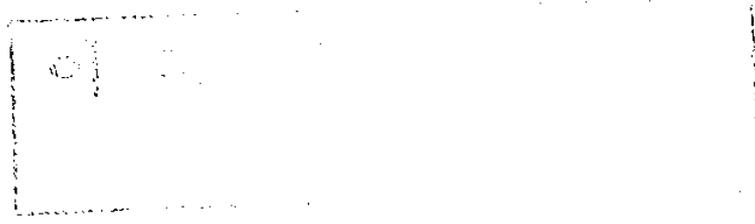
$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

$$V_{ss} = CL \times MRT$$

Terminal half life ($t_{1/2}$)와 CL 및 V_{ss} 의 평균은 조화평균을 이용하여 구하였다.

제 5 절 통계 처리

unpaired data의 평균간에 t-test를 사용하여 통계처리하였으며, 유의수준 $p < 0.05$ 으로 판단하였다.



제3장 결과 및 고찰

이 페이지를

이런 의미로

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 투여속도에 따른 혈중농도 profile 측정

DA-125는 mouse, rat, dog 및 human plasma중에서 신속히 M1으로 가수분해되며(in vitro degradation half life는 각각 1.97, 1.72, 0.54 및 0.54분). 또한 DA-125를 1mM lactic acid/saline 또는 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 Sprague-Dawley rat에 20 mg/kg 정맥투여한 경우 M1의 pharmacokinetic parameter는 M1 20 mg/kg 동등량을 DMSO에 녹여 투여하였을 경우의 pharmacokinetic parameter에 비해 유의적 차이를 나타내지않으므로, DA-125는 투여후 즉시 M1으로 가수분해되어 M1을 직접 투여했을 경우와 동일한 약동력학적 거동을 나타낸다고 보고되었다. 그러므로 본 실험에서는 DA-125를 rat에 정맥투여한 후 M1의 pharmacokinetic parameter를 구하였으며, DA-125 투여량을 M1으로 분자량 환산하여 계산에 사용하였다.

DA-125, 10 mg/kg을 토끼에 1 분, 1 시간, 4 시간 및 8 시간에 걸쳐 정속 투여한 후의 M1의 plasma concentration-time profile을 Table 1 및 Fig. 1에 나타내었다. 또한 이에 상응하는 pharmacokinetic parameter는 Table 3에 나타내었다. 최고 혈장중 농도는 1 분, 1 시간, 4 시간, 8 시간 정속투여함에 따라서 각각 26.1 ± 14.2 , 1.43 ± 0.255 , 0.333 ± 0.0749 및 0.147 ± 0.0319 $\mu\text{g/ml}$ 로 1 시간, 4 시간 및 8 시간 투여군에서는 투여속도에 반비례하여 감소하였다. 혈장중 AUC_(0-∞)는 1 분, 1 시간, 4 시간, 8 시간에서 각각 1.33 ± 0.411 , 1.49 ± 0.182 , 1.07 ± 0.613 , 1.00 ± 0.0867 $\mu\text{g hr/ml}$ 로 투여속도에 따른 혈장중농도 AUC의 유의성있는 차이는 나타나지않았다. DA-125, 10 mg/kg을 1 분, 1 시간, 4 시간 및 8 시간에 걸쳐 정속 투여한 후의 M2의 plasma concentration-time profile을 Table 2 및 Fig. 2에 나타내

었다. 또한 이에 상응하는 pharmacokinetic parameters는 Table 3에 나타내었다. M2의 terminal phase에서의 반감기는 1 분, 1 시간, 4 시간, 8 시간 정속투여시에 각각 3.36 ± 1.48 , 2.81 ± 0.587 , 2.63 ± 0.462 및 3.04 ± 0.452 hour로 유의적차이를 나타내지않았으나, $AUC_{(0-\infty)}$ 는 각각 2.56 ± 0.554 , 1.44 ± 0.321 , 1.53 ± 0.433 , 1.61 ± 0.0451 $\mu\text{g hr/ml}$ 로 1 시간, 4 시간 및 8 시간 정속투여군에서는 1분투여군에 비해 유의적인 감소를 나타내었다. M2는 항암력은 거의 나타내지않으나 M1과 유사한 정도의 독성을 나타내는 대사체이므로 1 - 8 시간 정속투여에 의해 M2의 AUC가 감소하는 것은 DA-125의 독성을 경감시킬수 있는 방법의 하나로 평가되었다. 그러나 1분, 1시간, 4시간 및 8 시간 정속투여군에서 8 시간까지의 뇨중 배설은 투여량의 9.88 ± 3.84 , 11.7 ± 9.74 , 9.72 ± 1.81 , $13.8 \pm 8.21\%$ 가 각각 M2의 형태로 회수되었으며, 군간에 유의차는 없었다(Fig. 3).

제 2 절 투여속도에 따른 조직농도 profile 측정

DA-125, 10 mg/kg을 1 분, 1 시간, 4 시간 및 8 시간 에 걸쳐 정속 투여한 후의 M1 및 M2 의 골수중 농도를 Table 4 및 Fig. 4 에 나타내었다. 또한 각각의 AUA_t 값을 Table 4 에 함께 나타내었다. 1분간 투여군에서의 골수 조직중 최고 농도는 $11.3 \mu\text{g/g}$ (1분 투여후 30분) 으로 8시간 정속투여군의 $6.09 \mu\text{g/g}$ (8 시간 투여완료후 2 시간)에 비하여 46.1% 감소하였으며 조직농도 곡선하 면적(AUA_t)은 36.9 ug hr/ml 로 1분 투여군의 50.0 ug hr/ml 에 비하여 26.2% 감소하였다. 1 시간 및 4 시간 정속투여시에는 골수 조직중 최고 농도가 각각 $12.5 \mu\text{g/g}$ 및 $8.49 \mu\text{g/g}$, 조직농도 곡선하면적은 각각 70.7 및 57 ug hr/ml 로, 1시간 투여시에는 1분 투여시보다 오히려 M1의 농도가 증가하였으

며, 4시간 정속투여시에는 최고농도는 감소하였으나 AUA_t는 1분과 차이가 없었다. 혈장중 M1 농도는 정속 투여시간에 따라 현저하게 감소한 반면 골수중 M1 농도는 큰 변화를 나타내지않았다. 정속 투여시간에 따른 심장 및 비장중 M1 농도를 Fig. 5 에 나타내었다. 심장에서는 최고농도가 1 분, 1 시간, 4 시간 및 8 시간투여군에서 각각 10.5, 12.9, 6.33, 4.21 µg/g이었으며, 1분 투여군을 제외하고는 모두 투여완료시에 최고농도를 나타내었다. 비장에서는 최고농도는 1 분, 1 시간, 4 시간 및 8 시간에 각각 32, 27.7, 15.3, 7.29 µg/g이었으며, 역시 1분 투여시를 제외하고는 모두 투여완료시에 최고농도를 나타내었다. 비장중 M1 최고농도는 심장에 비해 전반적으로 2-3배 높은 반면, 투여완료후 8 시간에서의 조직중농도는 비장이 10배이상 심장보다 높게 정량되므로 비장에서의 M1이 심장에서보다 서서히 소실됨을 알수 있었다.

제 3 절 투여속도에 따른 조혈기독성평가

‘제 2 절 투여방법에 따른 조직 농도측정’에서의 투여속도에 따른 골수에 서의 AUC차이가 골수억제에 기인하는 조혈기독성에 미치는 영향을 평가하기위 하여 1 분 및 8 시간 정속투여군에서의 조혈기독성을 비교하였다. DA-125, 10 mg/kg을 1 분 및 8 시간 에 걸쳐 정속 투여한 후 15일간의 말초혈액 백혈구수 및 체중의 변화를 Fig. 6-1 에 나타내었다. 말초혈액 백혈구수는 1 분 및 8 시간 투여군에서 각각 약물투여전 5300 ± 1862, 5660 ± 2619에서 투여후 3 일에 3900 ± 1560, 4040 ± 1939 로 감소되었으며, 5일 후에는 rebound에 의해 증가 (12060 ± 6205, 8950 ± 3906)하였으나 투여속도에 따른 유의차는 없었다.

DA-125, 20 mg/kg을 1 분 및 8 시간 에 걸쳐 정속 투여한 후 15일간의 백혈구수 변동 및 체중 변화를 Fig. 6-2 에 나타내었다. 10 mg/kg투여군과 마

찬가지로 1 분 및 8 시간 정속주입시 각각 약물투여전 9075 ± 1721 , 7900 ± 827 에서 투여후 3일에 최저치 (1540 ± 334 , 1300 ± 339)를 나타내었으며, 8 시간 정속주입 경우에 1분간 주입경우보다 빠른 recovery를 보여주었으나 통계적 유의성은 없었다. 두군 모두 투여 6일까지는 체중증가가 억제되었으며, 이후 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. DA-125, 30 mg/kg을 1 분 및 8 시간에 걸쳐 정속 투여한 경우에는 1분 투여시 투여 3일째에 백혈구수가 525 ± 150 로 감소하면서 전례 (5/5) 폐사하였으며, 8 시간 정속투여시에도 투여 3일째에 백혈구수가 775 ± 275 이하로 감소하면서 80% (4/5)가 폐사하였다. 이상의 결과를 종합할때 DA-125는 투여속도에 따라(1분 및 8 시간 정속투여) 골수에서의 M1 AUC는 약 30 % 차이를 나타내었으나 조혈기독성에 있어서는 유의적인 차이를 나타내지못하였다. 이는 M1의 순환혈로부터 골수로의 이행속도가 느리기 때문에 (1분간 투여시 골수중 최고농도 도달시간은 30분) 정맥투여 속도의 조절에 의하여 골수중 최고농도를 현저히 낮출수 없었기 때문인것으로 생각된다.

제 4 절 반복투여시 ADME 평가

1. 혈중농도 및 뇨중배설

DA-125, 4mg/kg을 랫드에 단회 및 반복으로 정맥투여한 후 M1, M2 및 M4의 plasma concentration-time profile을 Fig. 7에 M1의 pharmacokinetic parameter를 Table 5 에 각각 나타내었다. 단회 및 반복투여시 M1의 혈장농도는 polyexponential하게 감소하였으며, 30분과 8시간을 제외하고는 12시간까지 반복투여에 의한 유의적인 혈장농도 차이를 나타내지 않았다. 단회 및 반복투여시 M1의 pharmacokinetic parameter중 $t_{1/2}$ (3.51 vs 3.01 hr), AUC (0.94 vs 1.15 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$), CL (3562 vs 2922 ml/hr)는 매우 유사하였으나 AUMC,

MRT, Vdss 등은 각각 2.95 vs 2.18 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$, 3.14 vs 1.91 hr, 11200 vs 5570 ml/kg 으로 나타났다.

M2의 혈장농도는 5분, 15분, 2시간을 제외하고는 24시간까지 유의적인 차이를 나타내지 않았고 $t_{1/2}$ (6.15 vs 7.34 hr)와 AUC (0.656 vs 0.699 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)도 유사한 값을 나타내었으며, M4의 혈장농도도 1분, 5분을 제외하고는 8시간까지 유의적인 차이를 나타내지 않았고 $t_{1/2}$ (3.33 vs 4.02 hr)와 AUC (0.0804 vs 0.109 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)도 큰 차이를 나타내지는 않았다. M3는 단회 및 반복투여시 모두 1분과 5분에서만 검출되었으므로 큰 의미를 갖지 못하나 역시 유의적 차이는 없었다.

단회 및 반복투여시 0-8, 8-24 시간 사이에 뇨중으로 배설된 대사체의 양을 Fig. 8에 나타내었다. 단회 및 반복투여후 24시간동안 뇨중으로 배설된 대사체의 양은 M1 0.325 ± 1.70 vs 3.58 ± 2.32 %, M2 12.4 ± 4.83 vs 20.1 ± 5.43 %로 유의적 차이를 나타내지 않았으며, M3, M4는 검출되지 않았다.

2. 담즙배설

DA-125 4mg/kg을 랫드에 단회 및 반복 정맥투여한 후 대사체의담즙중 누적 배설량을 Fig. 8에 나타내었다. DA-125는 랫드에 정맥주사시 단회 및 반복투여시 모두 주로 M2로 배설되었으며, M3는 전혀 검출되지 않았고 M4도 검출한계에 가까운 극소량이 검출되거나 검출되지 않았다. 투여후 24시간까지 담즙중으로 배설된 대사체의 양은 M1 4.84 ± 1.70 vs 3.58 ± 2.32 %, M2 27.9 ± 7.26 vs 22.5 ± 11.8 %로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 반복투여시 분비된 담즙량이 단회투여시에 비하여 적었으며, 이것이 반복투여시 대사체의 담즙중 배설에 영향을 주었는지는 분명하지 않았다. 단회 투여 담즙을 β -glucuronidase로 처리하였을 경우 M1 및 M2의 양은 효소처리전보다 각각 2.8배, 1.3배 정도 증가한 것으로 나타났고 M3 및 M4는 효소처리전에는 거의 검출되지않는데 반해 효소처리 후에는 24시간동안 배설된 환산 누적 배설량이 각각 0.51%, 0.95%로

나타났다. 또한 M1-M4이외의 형광을 가진 unknown metabolite들이 주로 포함체로 배설되고 있음을 확인할 수 있었다. (Fig. 9)

3. 조직분포

DA-125를 4mg/kg 단회 및 반복투여시 M1, M2, M3 및 M4의 평균 조직량-시간 곡선 및 조직량-시간 곡선하 면적(AUC_t)을 Fig. 10-1 - 10-6 에 나타내었다. 골수 및 흉선, 혈구에서 M2 농도가, 대장 및 위에서는 M4 농도가 유의성있는 증가를 나타내었으나, 대부분의 조직에서는 단회와 반복간에 농도차이를 나타내지 않았다. 조직과 혈장중 농도의 비 (T/P ratio)는 혈류량이 많은 조직 (폐, 심장, 신장, 간)에서는 시간에 관계없이 일정한 반면, 골수, 비장, 흉선 등의 조직에서는 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 혈장중에서 M1은 12시간에 검출된 대사체들중의 39%를 차지하였으나, 혈구및 신장, 간을 제외한 나머지 조직에서는 80% 이상이 M1의 형태로 존재하였다. 이는 M1의 대사및 이동이 혈장과 조직간에 차이가 있음을 나타내는데 Vdss 값 (11200 ml/kg)을 통해서도 알 수 있듯이 조직의 M1에 대한 친화력은 매우 큰 것으로 생각된다.

제4장 결 론

이 때의 기준

이러 일니다

제 4 장 결 론

DA-125의 용량제한인자 (Dose Limiting Factor)인 조혈기 독성을 감소시킬 수 있는 투여방법을 개발할 목적으로 DA-125의 투여속도를 달리하여 혈중농도 및 골수중 농도를 측정하고 조혈기 독성을 비교평가한 결과 DA-125, 동일량 (10 mg/kg)의 정속 투여시간이 길어지면 혈중농도 peak level은 투여시간에 반비례하여 낮아졌지만 (M1의 최고 혈장 농도는 1 분, 1 시간, 4 시간, 8 시간 정속주입함에 따라서 각각 26.1 ± 14.2 , 1.43 ± 0.255 , 0.333 ± 0.0749 및 0.147 ± 0.0319 $\mu\text{g/ml}$), 골수중 농도의 peak level은 혈장중에서와 같은 큰 차이가 나타나지 않았으며, 이는 1분간투여시 M1의 순환혈에서 골수로의 이행속도가 느리기때문에 (최고농도 도달시간 30 분) 1분간 투여시 M1의 골수중 최고농도가 높지않게 나타나는데 기인한 것으로 추측되었다. 따라서 조혈기독성에 있어서도 유의적인 차이를 나타내지 못하여 투여속도에 의하여는 조혈기 독성을 감소시킬수 없었다.

DA-125 4mg/kg을 랫드에 단회 및 7일간 반복하여 정맥내 투여하였을 때 M1, M2, M3 및 M4의 혈장농도는 2-3 point를 제외하고는 통계적 유의차가 없었으며, 뇨 및 담즙중 배설량도 유의한 차이를 나타내지 않았다. 조직중에서는 반복투여시 골수 및 흉선, 혈구에서 M2 초기농도가, 대장 및 위에서는 M4농도가 유의성있는 증가를 나타내었으나, 대부분의 조직에서는 단회 및 반복투여군간에 조직농도의 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 DA-125는 랫드에 7일간 반복투여시에도 축적이 거의 없거나 매우 적다고 판단되었다.



제5장 참 고 문 헌

이 문헌은
국립중앙도서관
에 기증된 자료입니다

제 5 장 참고문헌

1. *Iigo M, Nishikata K-i, Nakajima Y, Kadosawa H, Nakajima S* 1990 Therapeutic activity and Tissue distribution of ME-2303, a new anthracycline containing fluorine, and its metabolites in mice bearing hepatic metastases of Lewis lung Carcinoma. *Intr. Cancer Drugs* 1:77
2. *Omoto S, Kondo S, Fukatsu S, Takeuchi T, Umezawa S* 1988 Biological properties of ME-2303(FAD-104), a new anthracycline. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 14:435
3. *Shim HJ, Lee ED, Lee SD, Kim WB, Lee MG* 1992 HPLC assay and stability test of DA-125, a water soluble prodrug of FT-ADM. The 41st Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, Abstract, p 167, Oct. 24, Dae-jeon, Korea.
4. *Choi YM, Kim SH, Lee MG* 1991 Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of furosemide in rats. *J. Pharm. Sci.* 80: 638.
5. *Chiou WL* 1978 Critical evaluation of potential error in pharmacokinetic studies using the linear trapezoidal rule method for the calculation of the area under the plasma level-time curve. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 6:539

6. *Chiou WL* 1979 New calculation method for mean apparent drug values of distribution and application to rationale dosage regimen. *J. Pharm. Sci.* 68:1067

7. *Lee MG, Chen ML, Huang SM, Chiou WL* 1981 Pharmacokinetics of drugs in drugs in blood I: Unusual distribution of gentamicin. *Biopharm. Drug Disp.* 2:89

8. *Lee MG, Lui CY, Chen ML, Chiou WL* 1984 Pharmacokinetics in blood IV: Unusual distribution, storage effect and metabolism of Methotrexate. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 22:530

9. *Shim HJ, Lee ED, Yoon EJ, Lee SD, Kim WB, Yang J and Lee MG,* Simultaneous determination of DA-125 and its metabolites, M1, M2, M3 and M4 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography B*, 656 (1994) 407-414

10. *Shim HJ, Lee ED, Yoon EJ, Lee SD, Kim WB, Yang J and Lee MG,* Pharmacokinetics of FT-ADM after intravenous administration of DA-125, a prodrug of FT-ADM, or FT-ADM to rats. A new adriamycin analog containing fluorine. *Int. J. Pharm.* 103, 147-154

11. *Yoon EJ, Lee ED, Shim HJ, Lee SD, Kim WB, Yang J and Lee MG,* Pharmacokinetics of FT-ADM after intravenous administration of DA-125, a prodrug of FT-ADM to dogs. A new adriamycin analog containing fluorine. *Int. J. Pharm.* 109 (1994) 181-187

Table I. Plasma concentration of MI after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg to rabbits.

Time	1 min infusion.	1 hr infusion	4 hr infusion.	8 hr infusion.
-7 hr				0.143 (0.0589)
-5 hr				0.147 (0.0319)
-3 hr			0.296 (0.0400)	0.144 (0.0361)
-2 hr			0.286 (0.0451)	
-1 hr			0.299 (0.0391)	0.137 (0.0564)
-55 min		1.26 (0.149)		
-45 min		1.42 (0.183)		
-30 min		1.43 (0.255)		
0 min		1.17 (0.253)		
1 min	26.1 (14.2)		0.333 (0.0749)	0.0263 (0.0278)
5 min	1.70 (0.501)	0.146 (0.0168)	0.0696 (0.0254)	0.0175 (0.0123)
15 min	0.374 (0.224)	0.0923 (0.0136)	0.0393 (0.00734)	0.0119 (0.00475)
30 min	0.165 (0.0332)	0.0665 (0.00453)	0.0318 (0.00735)	0.0121 (0.00619)
1 hr	0.101 (0.0316)	0.0461 (0.00626)	0.0190 (0.00534)	UD
1.5 hr			0.0149 (0.00548)	
2 hr	0.0544 (0.0208)	0.0279 (0.00555)	0.0136 (0.00186)	UD
3 hr			0.00973 (0.00300)	
4 hr	0.0301 (0.0266)	0.0138 (0.00303)	0.00877 (0.00334)	UD
6 hr	0.0140 (0.00535)	UD	UD	UD
8 hr	UD	UD	UD	UD

* UD : Under detection limit

* () : Standard deviation

Table 2. Plasma concentrations of M2 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg to rabbits.

Time	1 min infusion.	1 hr infusion	4 hr infusion.	8 hr infusion.
-7 hr				0.0631 (0.0143)
-5 hr				0.141 (0.0500)
-3 hr			0.118 (0.0459)	0.214 (0.0763)
-2 hr			0.153 (0.0669)	
-1 hr			0.243 (0.0741)	0.179 (0.0267)
-55 min		0.0404 (0.00853)		
-45 min		0.110 (0.0159)		
-30 min		0.253 (0.0333)		
0 min		0.421 (0.0406)	0.257 (0.0682)	0.144 (0.0201)
1 min	1.02 (0.477)			
5 min	0.806 (0.169)	0.379 (0.0519)	0.254 (0.0778)	0.144 (0.0230)
15 min	0.656 (0.194)	0.326 (0.0482)	0.235 (0.0201)	0.145 (0.0398)
30 min	0.527 (0.103)	0.266 (0.0388)	0.201 (0.0457)	0.113 (0.00821)
1 hr	0.398 (0.0768)	0.205 (0.0192)	0.168 (0.0460)	0.0954 (0.00632)
1.5 hr			0.146 (0.0511)	
2 hr	0.301 (0.0504)	0.169 (0.0344)	0.129 (0.0299)	0.0757 (0.00755)
3 hr			0.0915 (0.0319)	
4 hr	0.211 (0.0442)	0.114 (0.0316)	0.0825 (0.0238)	0.0481 (0.00904)
6 hr	0.140 (0.0307)	0.0503 (0.00382)	0.0657 (0.0254)	0.0247
8 hr	0.0862 (0.0377)	0.0335 (0.00708)		0.0188

* UD : Under detection limit

* () : Standard deviation

Table 3. Pharmacokinetic parameters of M1 and M2 after 1 min, 1 hr, 4 hr and 8 hr intravenous infusion of DA-125, 10 mg/kg to rabbits.

parameters	1 min infusion.	1 hr infusion	4 hr infusion.	8 hr infusion.
M1				
t _{1/2}	1.79 ± 0.359	1.69 ± 0.527	2.05 ± 0.613	0.421 ± 0.356
AUC	1.33 ± 0.411	1.49 ± 0.182	1.07 ± 0.186	1.00 ± 0.0867
AUMC	0.891 ± 0.348	1.34 ± 0.180	2.89 ± 0.612	4.30 ± 0.313
MRT	0.715 ± 0.308	0.903 ± 0.157	2.68 ± 0.148	4.28 ± 0.070
CL	6294 ± 2813	5573 ± 684	7823 ± 1632	8298 ± 705
V _{dss}	3784 ± 4123	4872 ± 1422	21095 ± 4141	35653 ± 3614
M2				
t _{1/2}	3.36 ± 1.48	2.81 ± 0.587	2.63 ± 0.462	3.04 ± 0.452
AUC	2.56 ± 0.554	1.44 ± 0.321	1.53 ± 0.433	1.61 ± 0.0451

* t_{1/2} : hr AUC : µg hr/ml AUMC : µg hr²/ml
MRT : hr CL : ml/hr kg V_{dss} : ml/kg

Table 4. Bone marrow concentrations of M1 and M2 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg to rabbits.

Time	1 min infusion.		1 hr infusion		4 hr infusion.		8 hr infusion.	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
-7 hr							0.415	0.0804
-5 hr							1.81	0.691
-3 hr					1.57	0.466	4.76	1.49
-1 hr							4.21	1.73
-45 min			2.03	0.216				
-30 min			7.29	1.22				
0 min			9.13	2.51			8.49	2.86
15 min	8.25	1.44	12.5	2.71				
30 min	11.3	2.60	12.5	3.02				
1 hr	8.26	2.76	8.51	2.95	8.03	2.66		
2 hr	9.81	3.84	12.2	5.19	6.84	2.79	6.09	3.81
4 hr	5.03	3.42	7.67	3.95	5.95	2.82	1.76	0.844
8 hr	4.12	2.76	5.08	2.07			1.23	0.668

* UD : Under detection limit

* () : Standard deviation

Table 5. Pharmacokinetic parameters of M1, M2 and M4 after single and 7-day repeated intravenous administration of DA-125 4mg/kg/day to rats.

Pharmacokinetic	Single Adm.	Repeated Adm.
M1		
$t_{1/2}$ (hr)	3.51	3.01
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)	0.94	1.15
CL (ml/kr)	3562	2922
AUMC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$)	2.95	2.18
MRT (hr)	3.14	1.91
Vdss (ml/kg)	11200	5570
M2		
$t_{1/2}$ (hr)	6.15	7.34
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)	0.656	0.699
M4		
$t_{1/2}$ (hr)	3.33	4.02
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)	0.0804	0.109

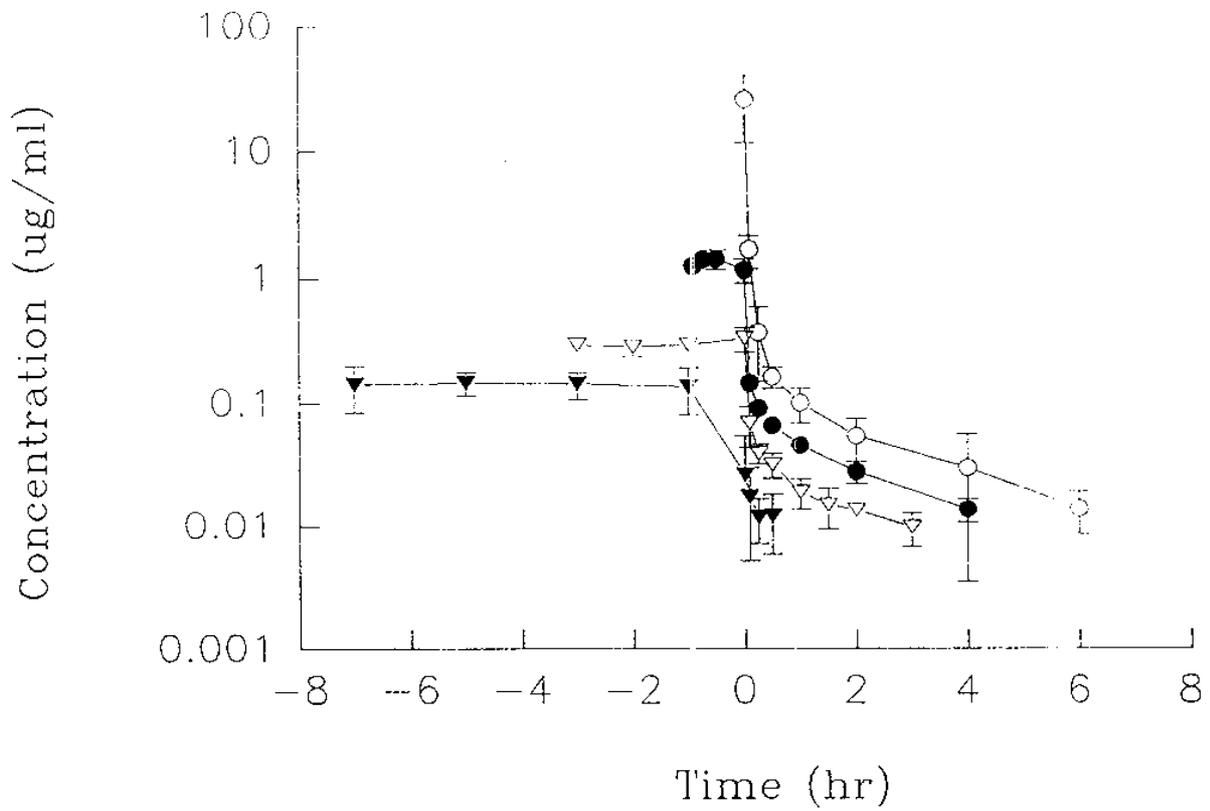


Fig. 1. Plasma concentrations of M1 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg to rabbits. Open circle (○), closed circle (●), open triangle (▽), closed triangle (▼) represent 1 min, 1 hr, 4 hr and 8 hr infusion, respectively.

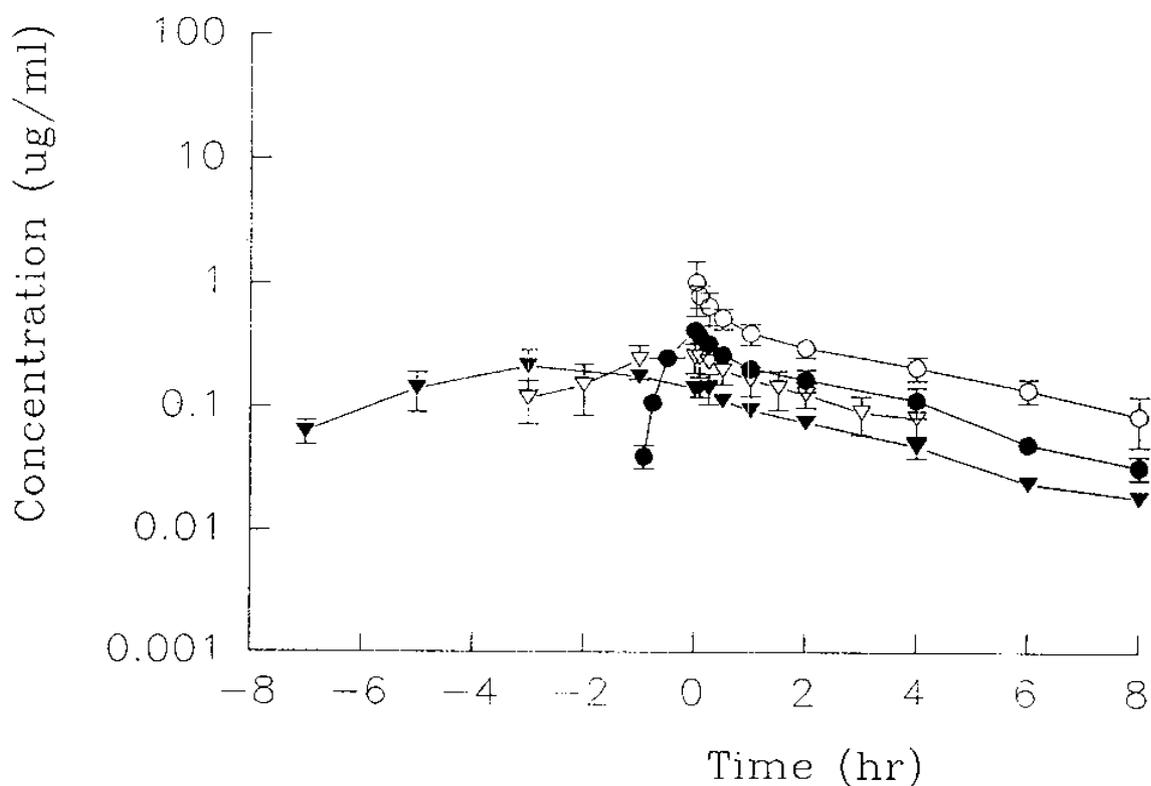


Fig. 2. Plasma concentrations of M2 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg to rabbits. Open circle(○), closed circle (●), open triangle (▽), closed triangle (▼) represent 1 min, 1 hr, 4 hr and 8 hr infusion, respectively.

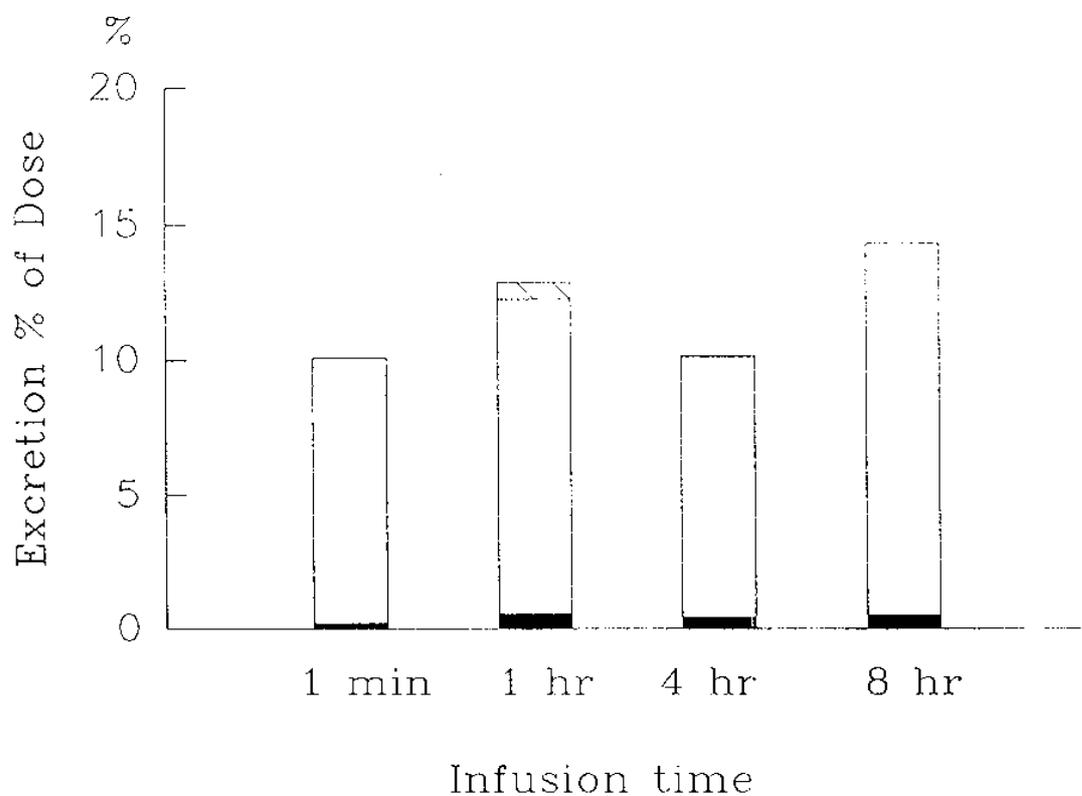


Fig. 3 The percentages of Dose excreted in 8 hr urine as M1 (■), M2(□) and M4(▨) after 1 min, 1 hr, 4 hr and 8 hr intravenous infusion of DA-125, 10 mg/kg to rabbits.

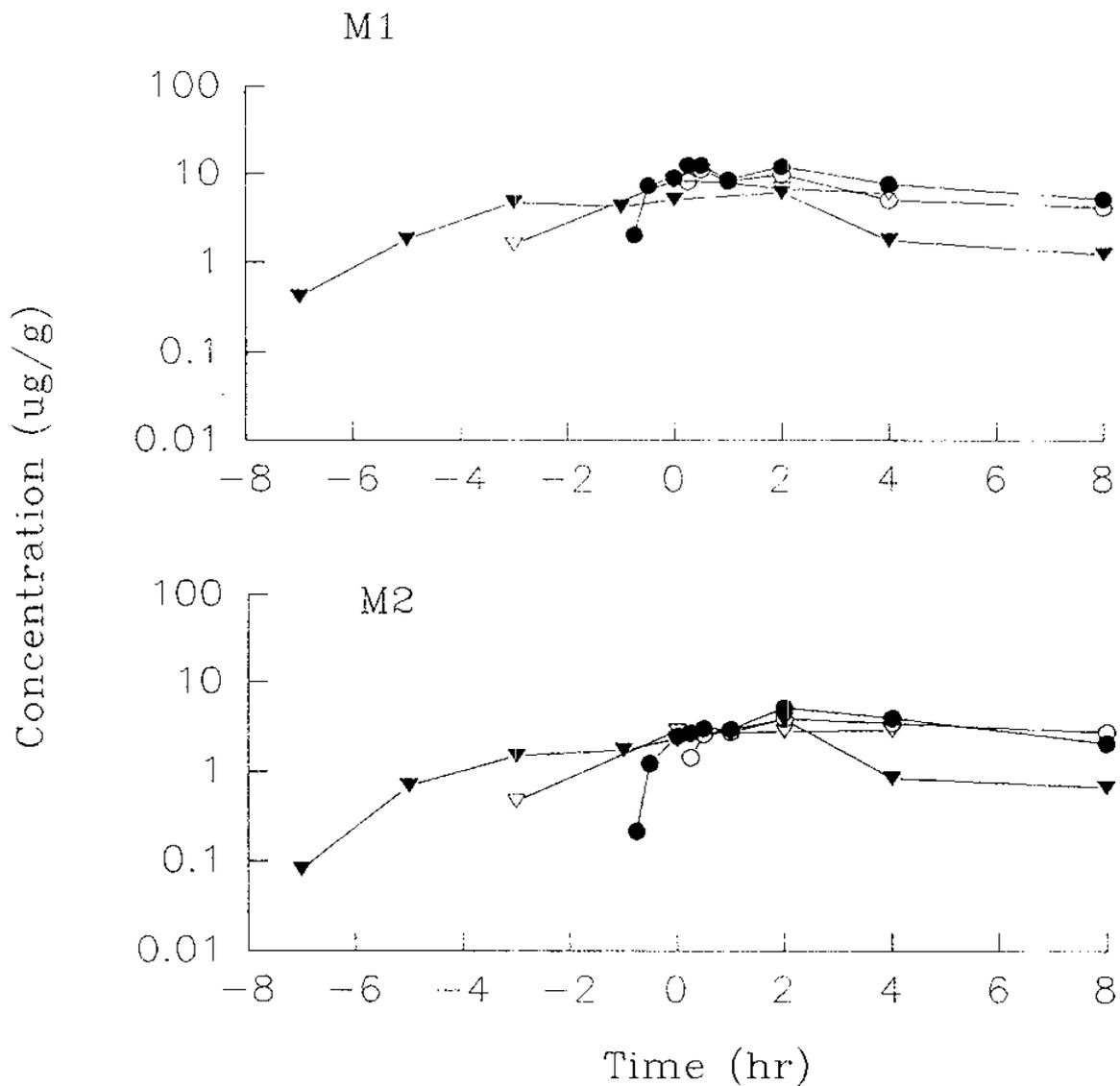


Fig 4. Bone marrow concentration-time profiles of M1 and M2 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg to rabbits. Open circle (\circ), closed circle (\bullet), open triangle (∇) and closed triangle (\blacktriangledown) represent 1 min, 1 hr, 4 hr and 8 hr infusion, respectively.

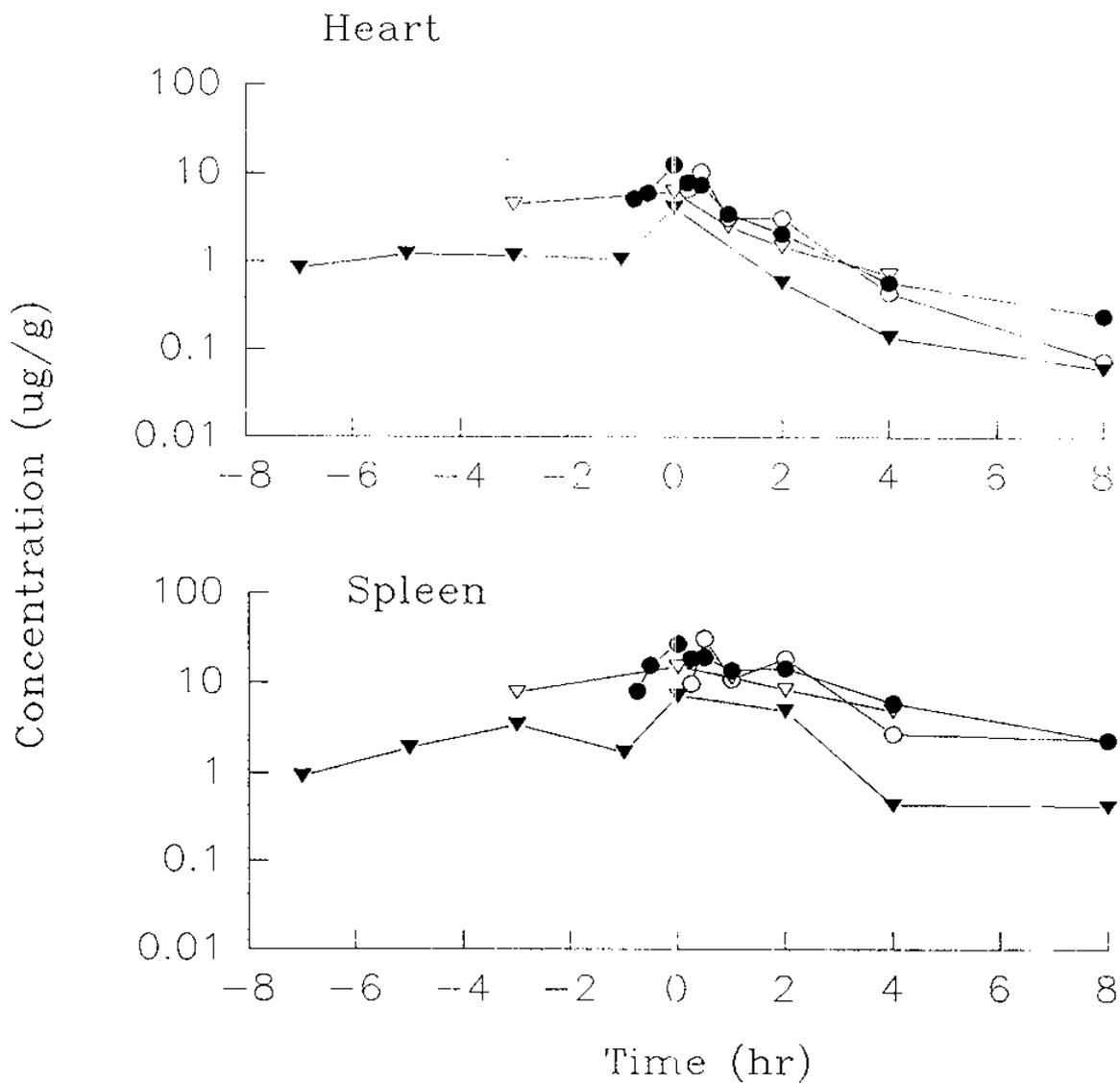


Fig 5. Heart and spleen concentration-time profiles of M1 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg to rabbits. Open circle (○), closed circle (●), open triangle (▽) and closed triangle (▼) represent 1 min, 1 hr, 4 hr and 8 hr infusion, respectively.

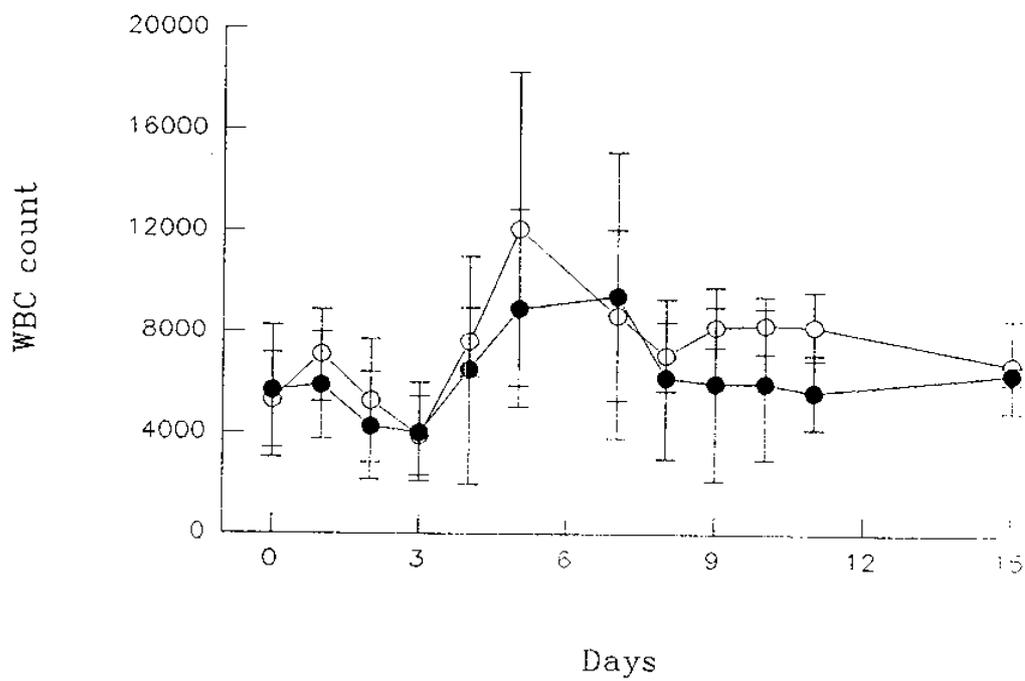
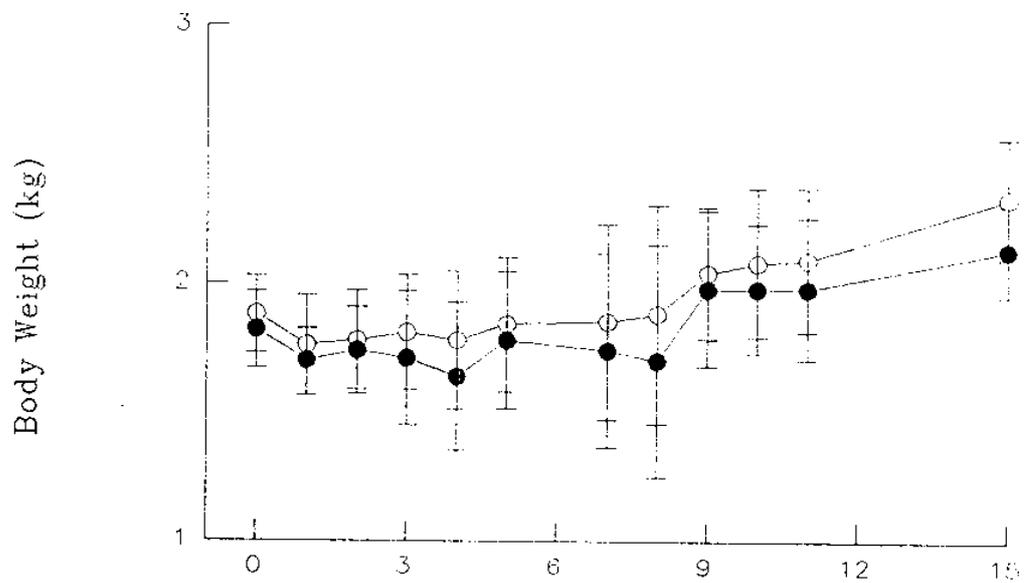


Fig. 6-1. Body weight change and WBC counting after 1 min (○) and 8 hr (●) intravenous infusion of DA-125, 10 mg/kg to rabbits.

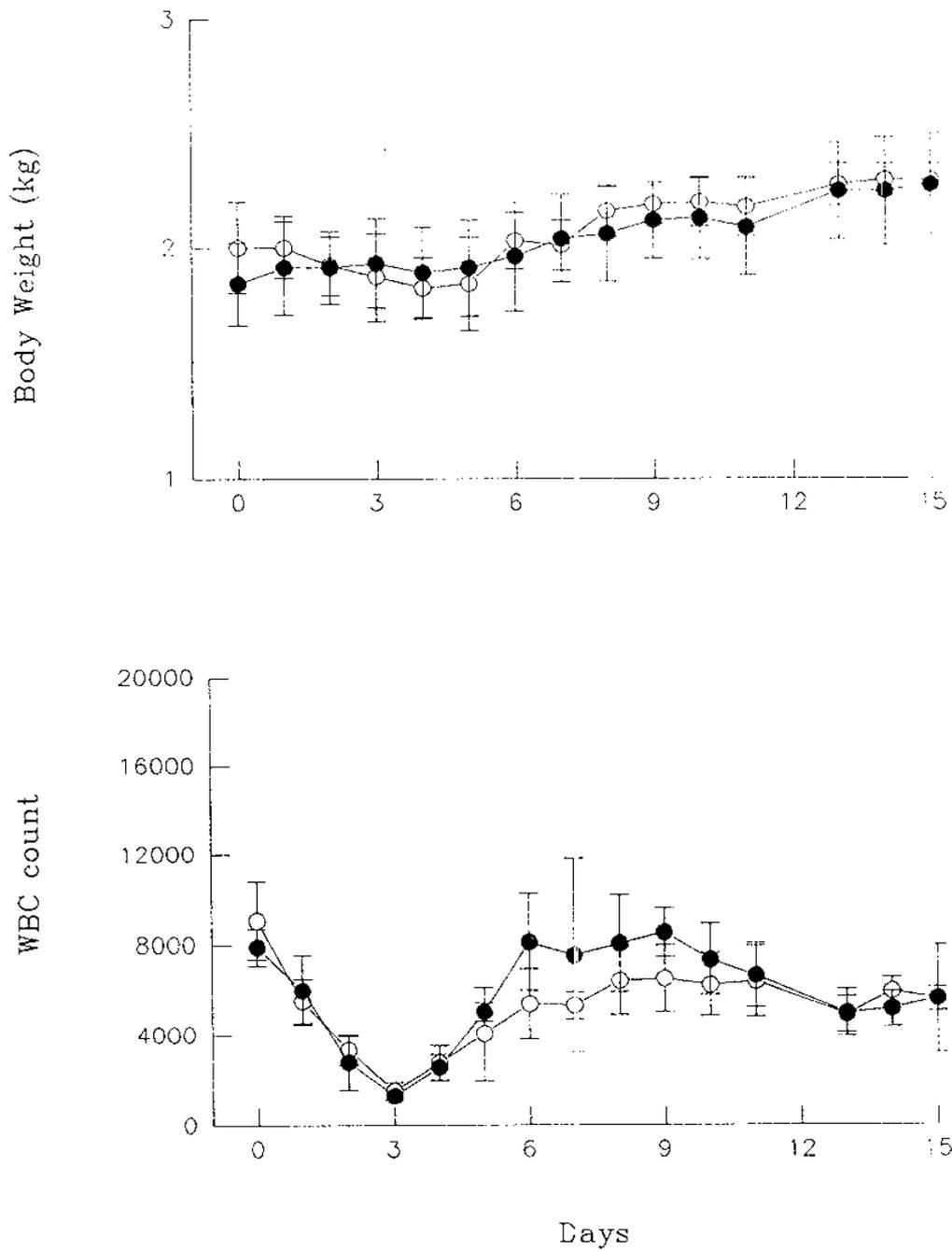


Fig. 6-2. Body weight change and WBC counting after 1min (○) and 8 hr (●) intravenous infusion of DA-125, 20 mg/kg to rabbits.

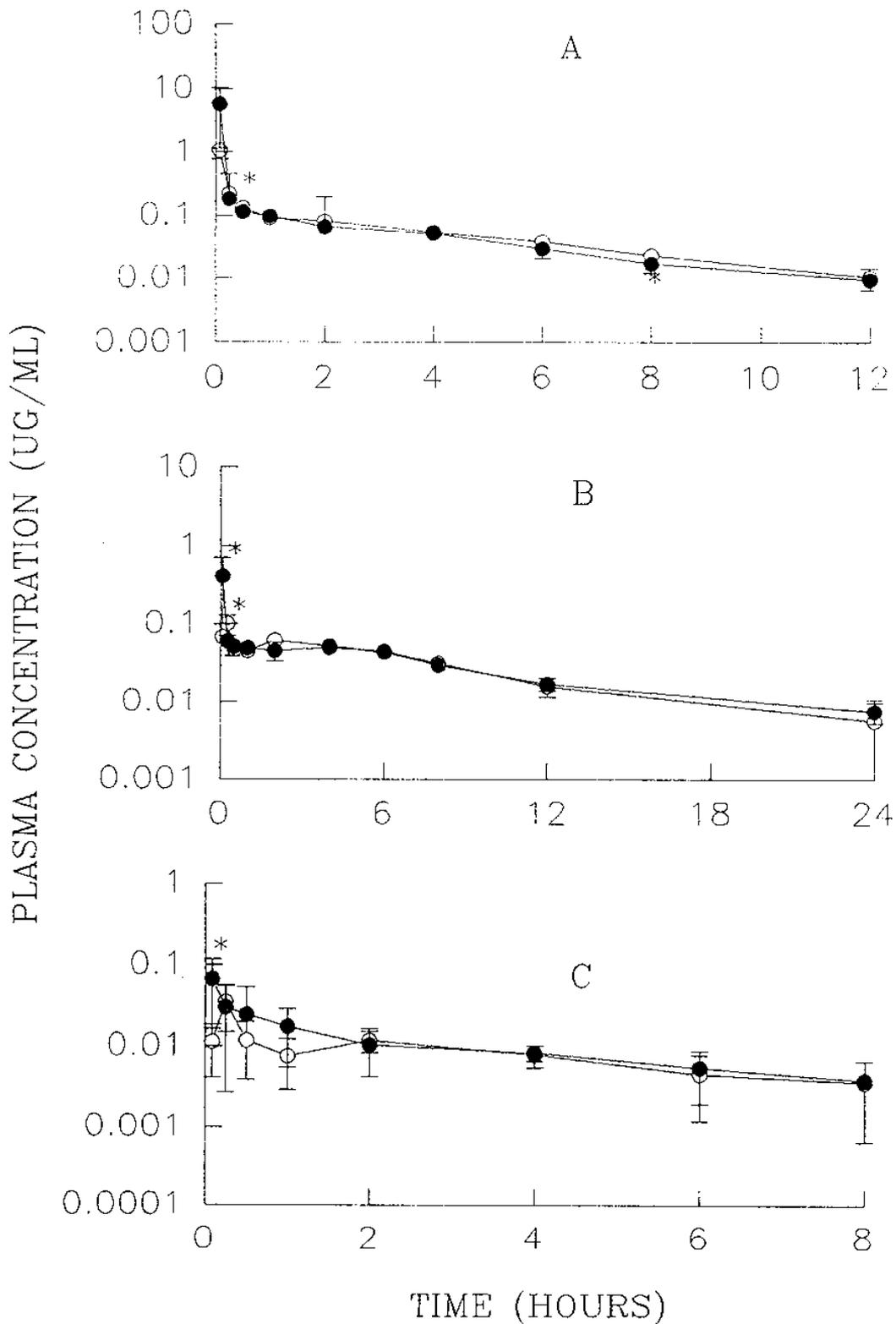


Fig. 7. Mean plasma concentration-time profiles of M1 (A), M2 (B) and M4 (C) after single (\circ) and multiple (\bullet) intravenous administration of DA-125, 4 mg/kg to rats. Bars represent standard deviation. *: $P < 0.05$

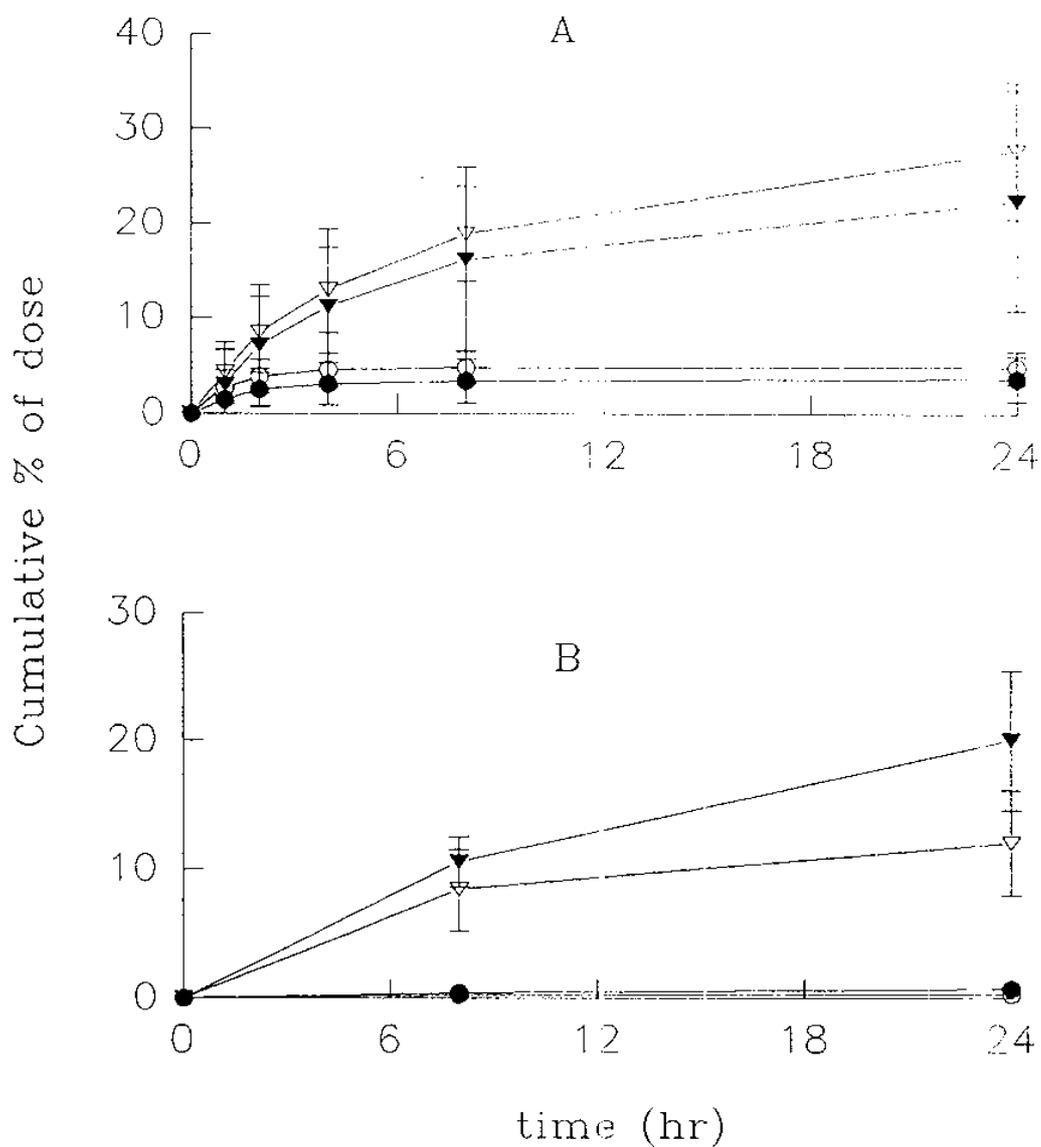


Fig. 8. Mean cumulative percentages of intravenous dose excreted in 24 h bile (A) and urine (B) as M1 (circle) and M2 (triangle) when expressed in terms of DA-125 after single (open symbol) and multiple (closed symbol) intravenous administration of DA-125, 4 mg/kg to rats.

TIME (MINUTES)

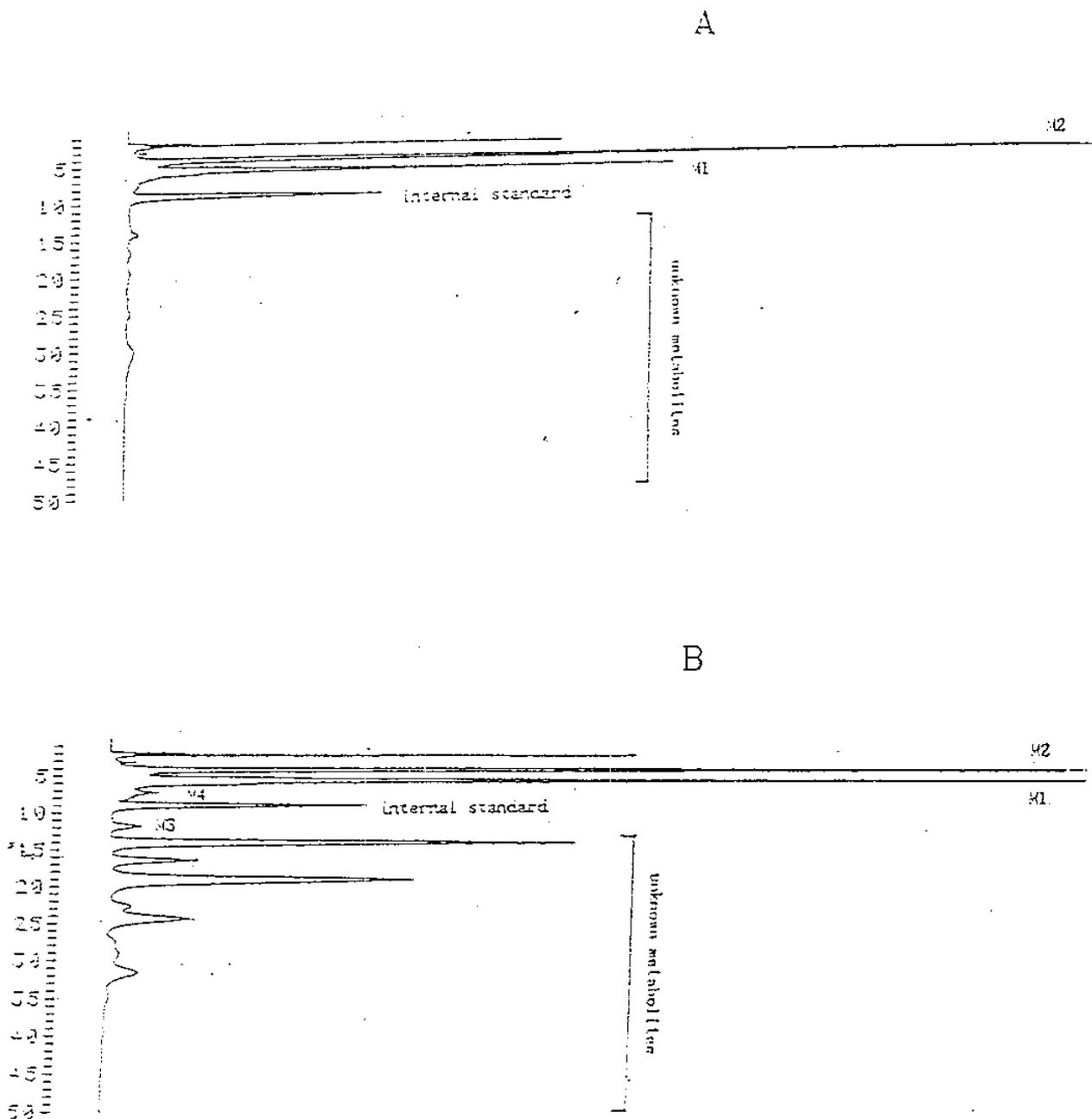
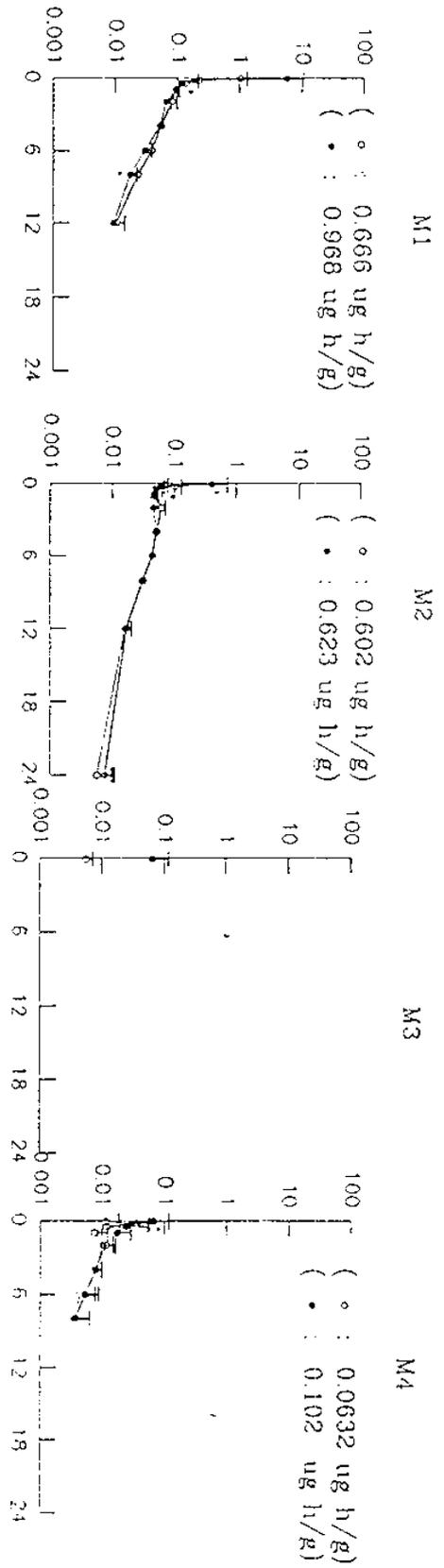


Fig. 9. HPLC chromatogram of M1-M4, internal standard and unknown metabolites before (A) and after (B) incubation of rat bile sample with glucuronidase after intravenous administration of DA-125, 4 mg/kg to rats.

Fig. 10-1

Plasma



Blood cells

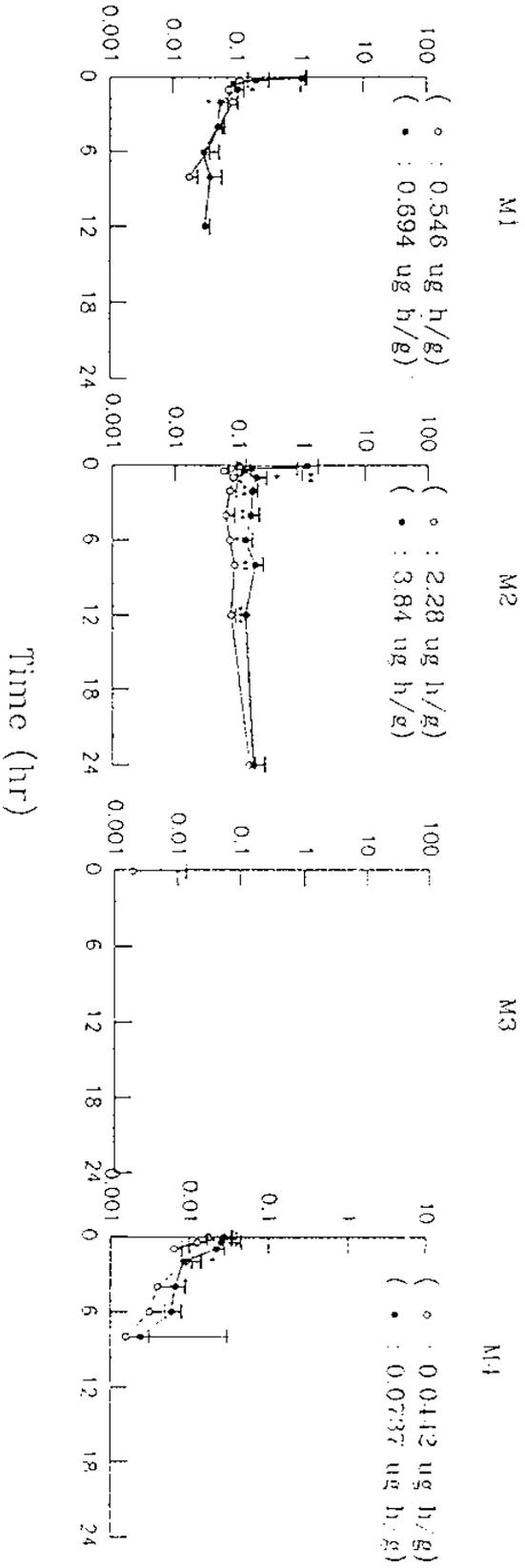


Fig. 10-2 Large intestine

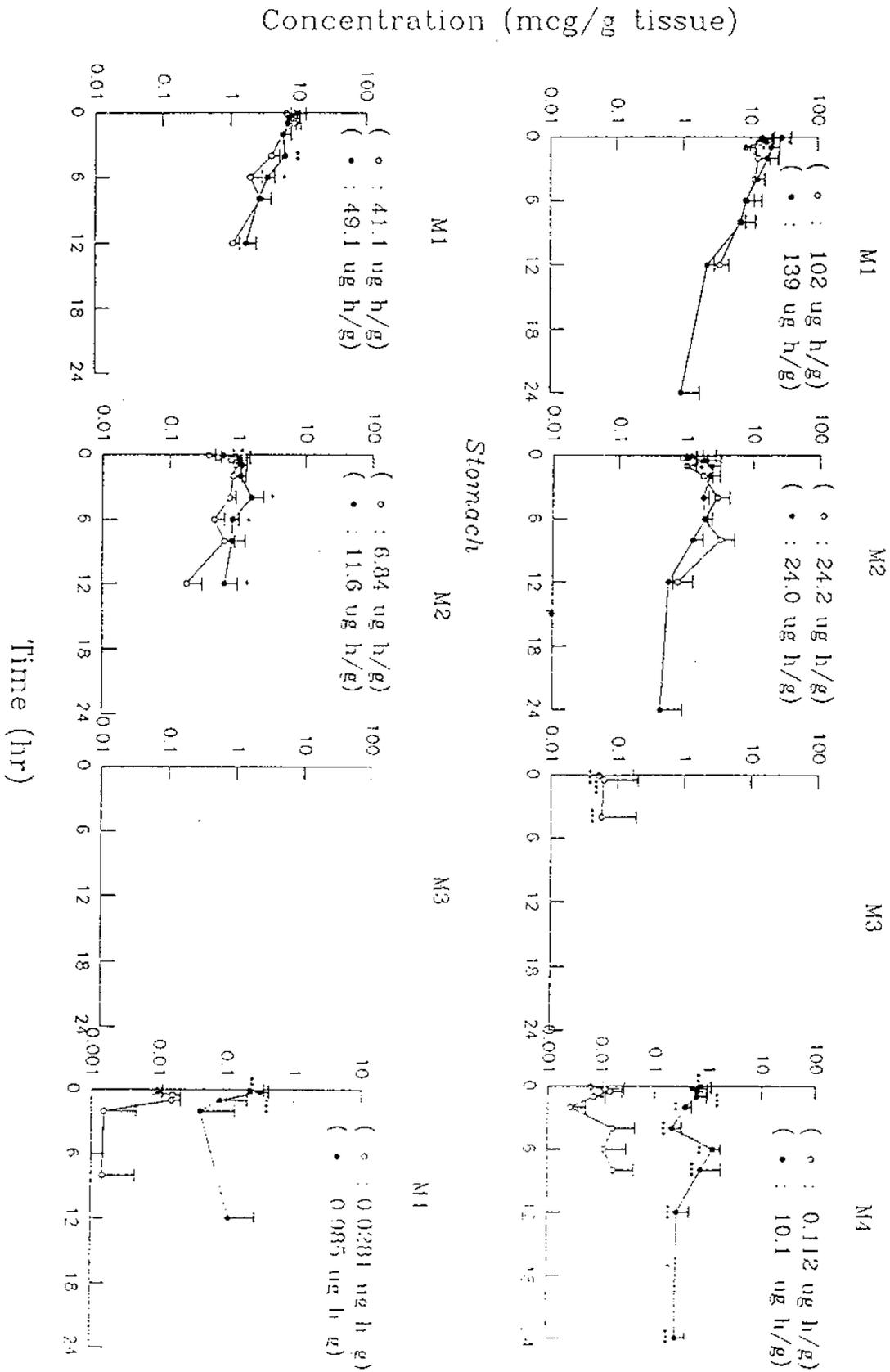
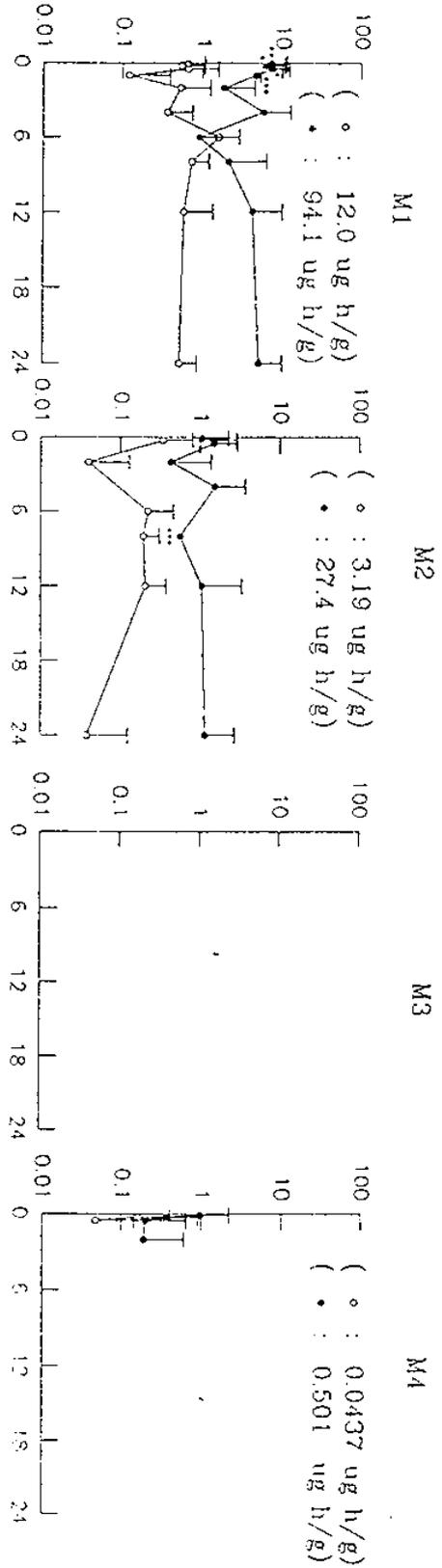


Fig. 10-3

Thymus



M1

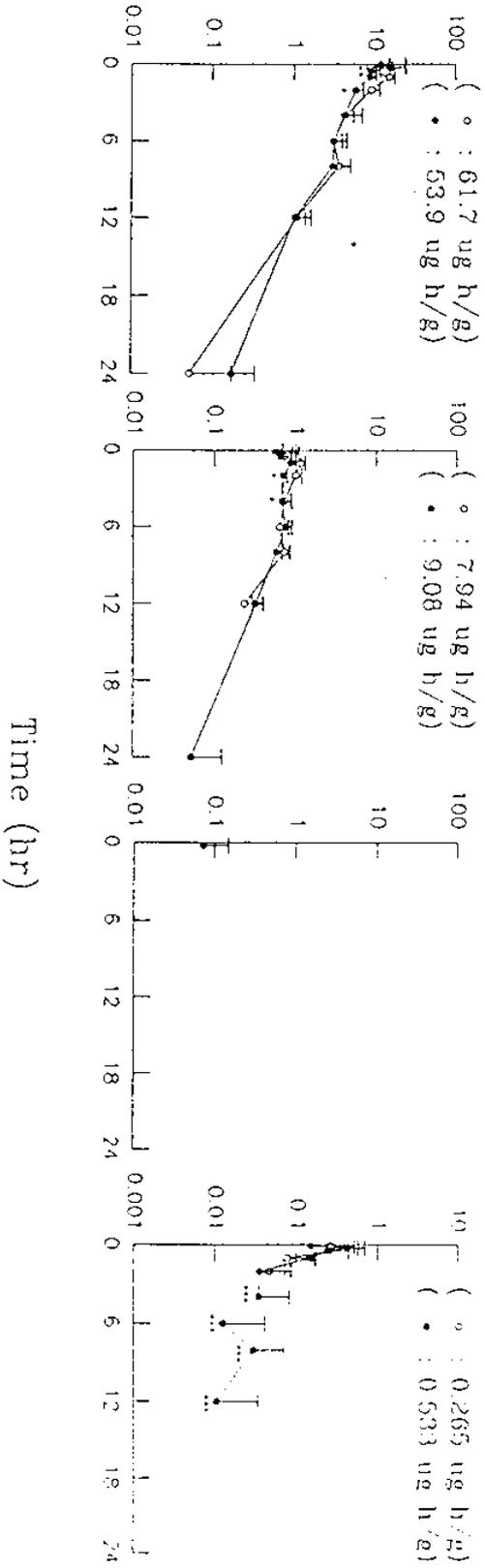
Lung

M2

M3

M4

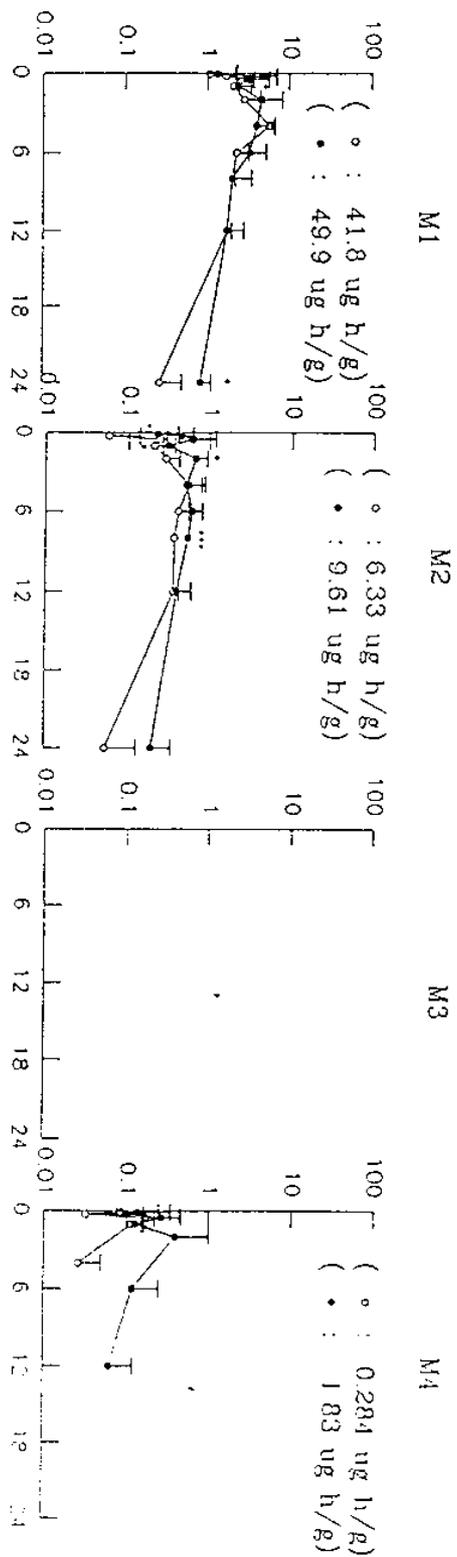
Concentration (mcg/g tissue)



Time (hr)

Fig. 10-4

Spleen



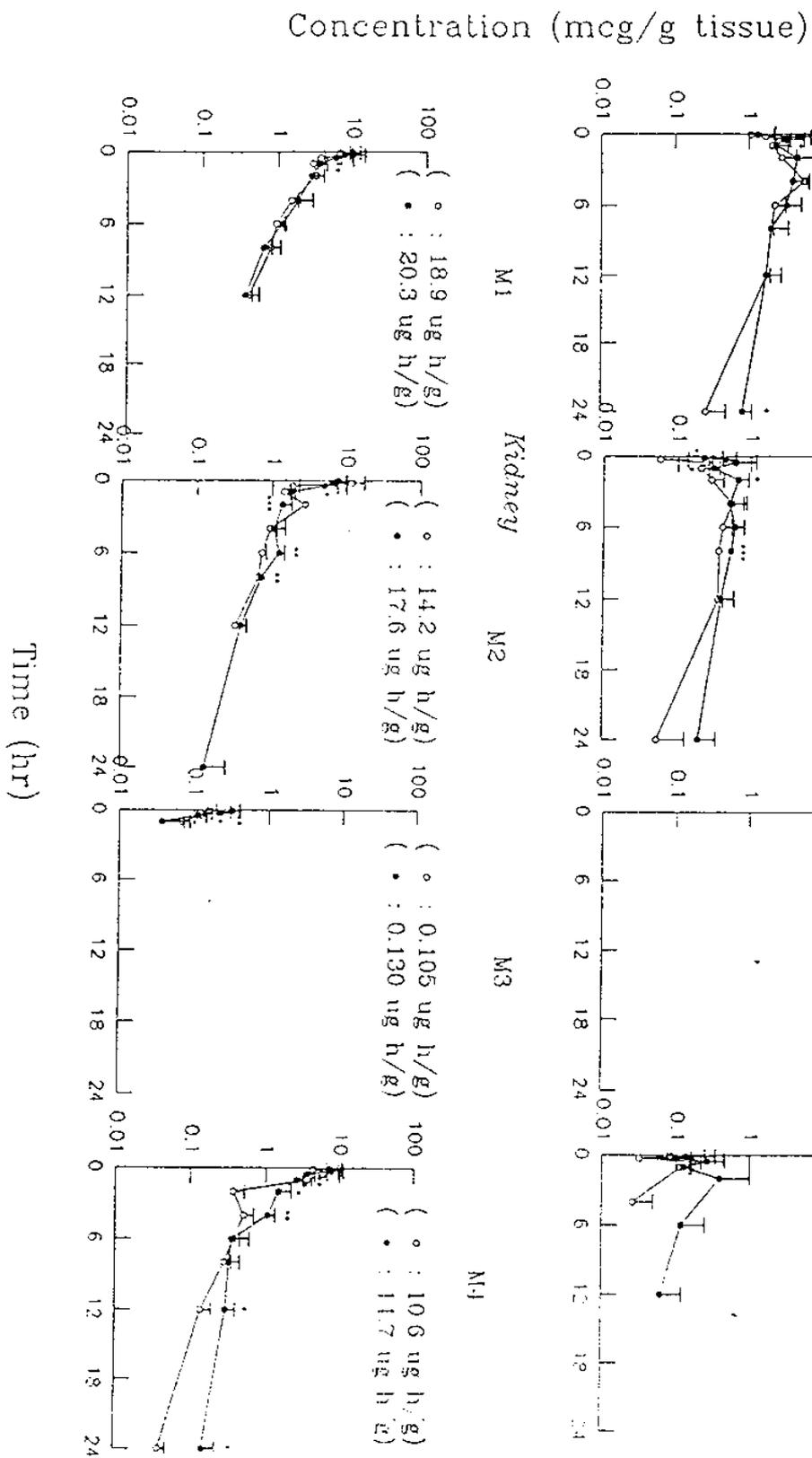
M1

Kidney

M2

M3

M4



Time (hr)

Fig. 10-5

Small intestine

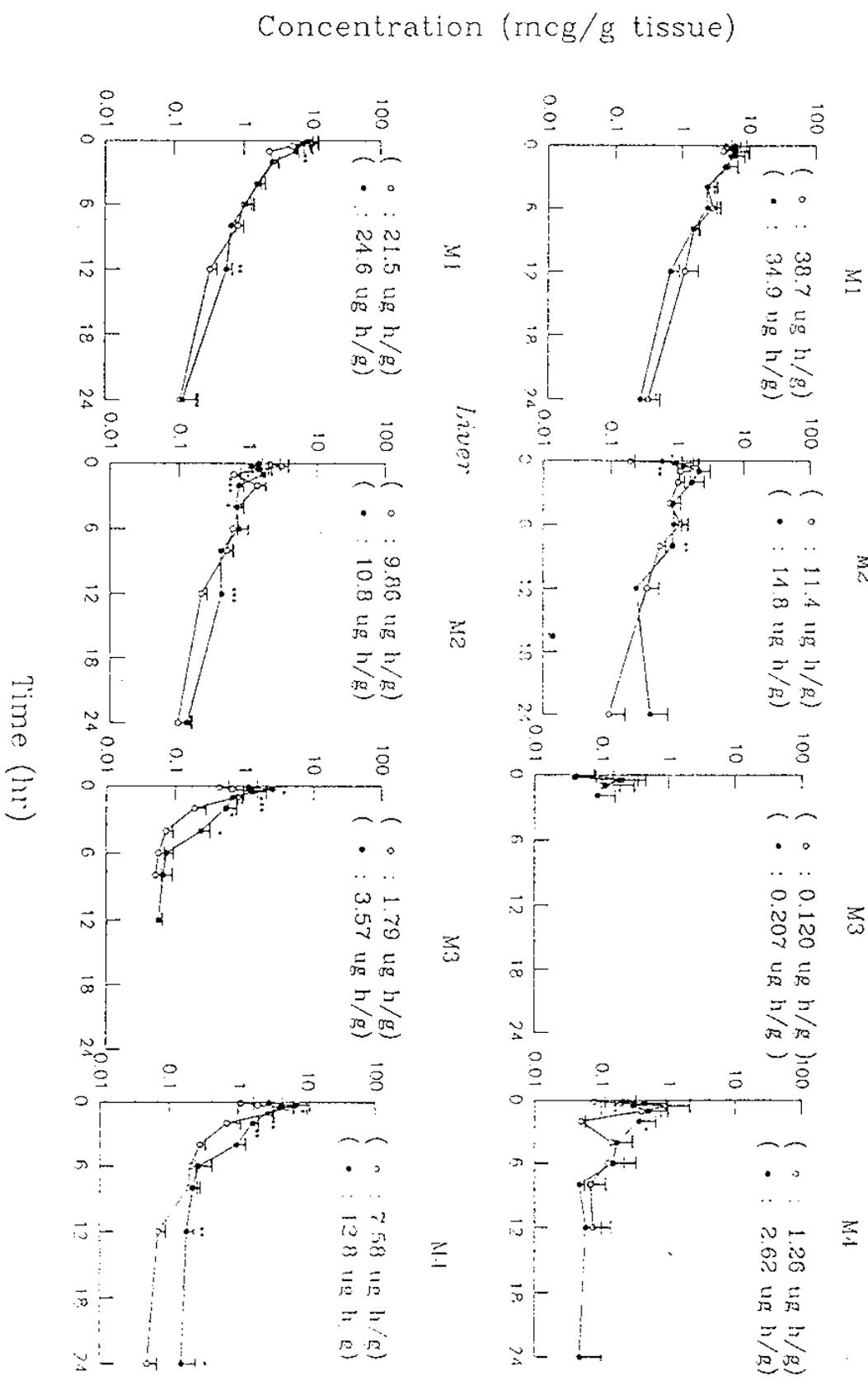
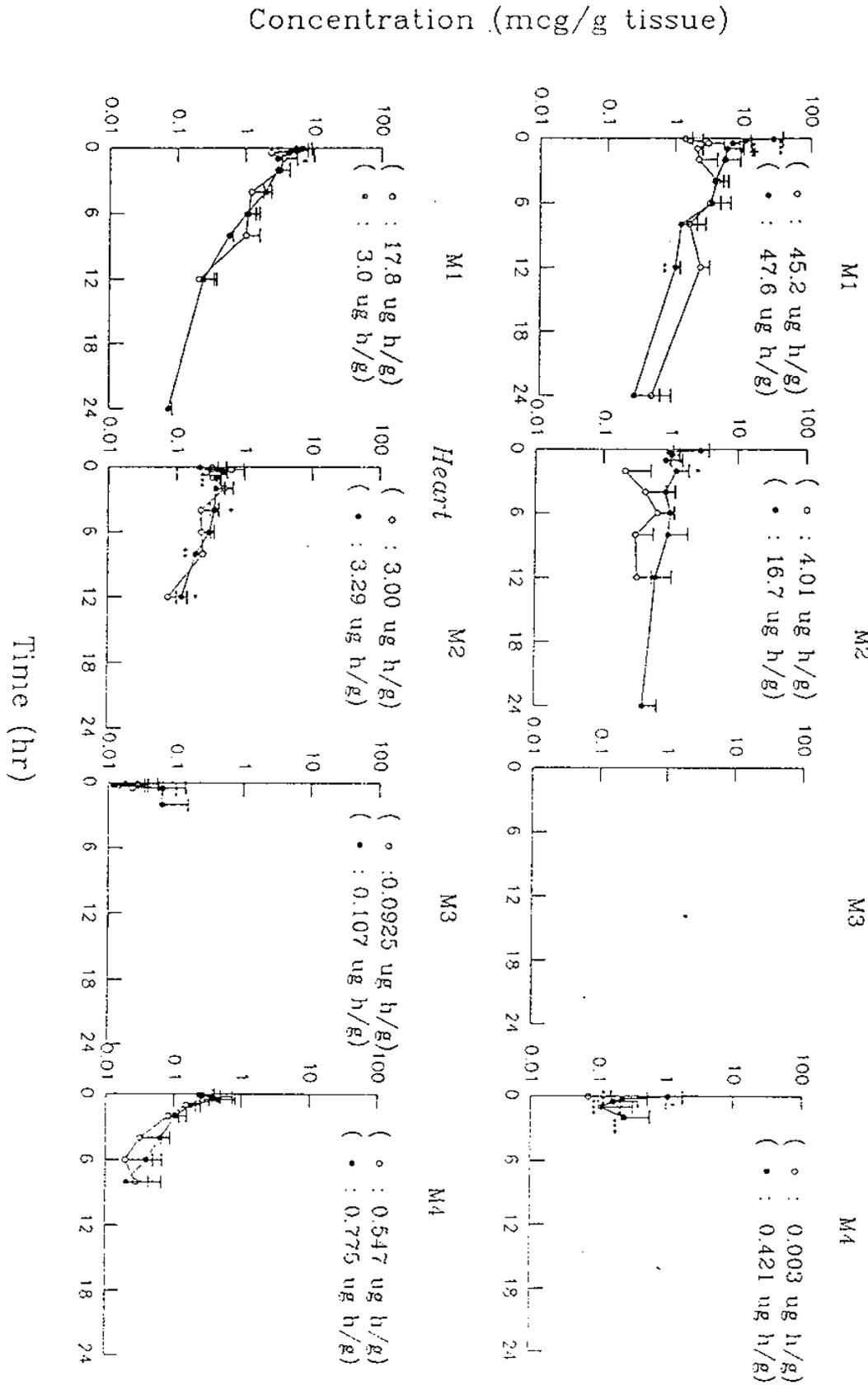


Fig. 10-6

Bone Marrow





제6장 위탁 연구보고서

I. DA-125 항종양치료제의 ADME 연구

연구책임자 : 서울대학교 약학대학 이 명 걸

II. DA-125 항종양치료제의 장기독성연구

연구책임자 : 한국화학연구소 안전성연구부 정 문 구

III. DA-125 항종양치료제의 효력연구

연구책임자 : 서울대학교 의과대학 박 재 갑

IV. DA-125 항종양치료제의 제1상 임상연구

연구책임자 : 연세대학교 의과대학 연세암센터 노 재 경

이 공적기록
은 공적기록

위탁과제보고서 I

과제명 : DA-125 항종양치료제 ADME특성연구
(질환모델에서의 ADME연구)

위탁 연구 기관 : 서울대학교 약학대학

위탁연구책임자 : 이 명 결

연 구 원 : 윤은정, 이희주, 박정미

이 책의 저자
김영희

Abstract

Pharmacokinetics of M1 - M4 were measured after intravenous (iv) administration of DA-125 (a new anthracycline derivative), 20 mg/kg to 6 and 16 weeks of Spontaneously hypertensive rats (SHRs, an animal model for human primary hypertensive) and its control Kyoto-Wistar rats, and deoxycorticosterone acetate-salt-induced Sprague Dawley rats (DOCA-salt rats, an animal model for human secondary hypertension) and its control Sprague Dawley rats. The plasma concentrations of M2 and M4 and resultant their AUCs increased significantly in SHRs of 16 weeks of age and DOCA-salt rats of 16 weeks of age than in their control rats. However, the values were not significantly different between SHRs and Kyoto-Wistar rats of 6 weeks of age. Above data indicates that the increased metabolism of DA-125 to M2 and M4 in SHRs and DOCA-salt rats of 16 weeks of age was due to the hypertension itself, and not due to heredity of SHRs. The modification of dose of DA-125 in hypertension patients should be considered.

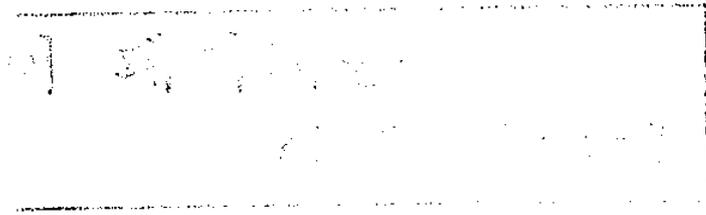
The influence of dietary protein deficiency on the pharmacokinetics of M1 - M4 was investigated after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to male Sprague-Dawley rats fed on a 23% (control) or a 5% (protein - calorie malnutrition, PCM) protein diet ad lib. for 4 weeks. The plasma concentrations and pharmacokinetic parameters of M1 - M4 were not significantly different between two groups of rats. It seemed that the modification of DA-125 doses in PCM patients could not be considered.

The pharmacokinetics and tissue distribution of M1 - M4 were compared

after intravenous (i.v.) administration of DA-125, 25 mg kg⁻¹, to BDF1 mice (n=5 at each sampling time) and subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma-bearing BDF1 mice (n=10 at each sampling time). The mean plasma concentrations of each M1 - M4 were not significantly different between the two groups of mice, and hence similar pharmacokinetic parameters of M1 - M4 were also obtained. The amount of M1 in the lung was significantly larger in the tumor-bearing mice than the control mice, and this resulted in a greater AUA_t (3940 vs 18600 µg min/g), and vice versa in the liver (3840 vs 962 µg min/g). However, the corresponding values for other tissues were comparable between the control and tumor-bearing mice. The amount of M1 was greatest in the lung for up to 2 h in the tumor-bearing mice. M2 was the predominant metabolite among M1 - M4 excreted in 24 h urine for both groups of mice: 8.36 and 10.7% of i.v. dose were excreted in 24 h urine as M2 (expressed in terms of DA-125) for the control and tumor-bearing mice, respectively. The amount of M1 in the tumor mass reached a mean C_{max} of 3.75 µg/g immediately after i.v. administration of DA-125 to the tumor-bearing mice, and then declined very slowly to an amount that remained almost 'constant' for up to 24 h. This suggested that M1 has high affinity to the subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma.

Contents

Chapter 1. Introduction -----	85
Chapter 2. Experimental method-----	87
Section 1. Materials -----	87
Section 2. Animal studies-----	88
1. Hypertensive rats-----	88
2. Protein-calorie malnutrition rats -----	89
3. Lewis-lung carcinoma bearing mice-----	91
Section 3. HPLC Assay-----	92
Section 4. Pharmacokinetic analysis-----	92
Section 5. Statiscal analysis-----	94
Chapter 3. Results and discussion -----	95
Section 1. Hypertensive rats-----	95
Section 2. Protein-calorie malnutrition rats -----	96
Section 3. Lewis-lung carcinoma bearing mice-----	98
Chapter 4. References -----	103



Chapter 1. Introduction

New fluorine containing adriamycin (ADM) analogs have been synthesized to increase antineoplastic activity and decrease cardiotoxicity of ADM. For example, Research Lab. of Dong-A Pharmaceutical Company (Yongin, Korea) has recently developed DA-125 (β -alanine derivative of M1), a water-soluble prodrug of M1, and is currently being evaluated in phase I clinical trials. In the preceding papers, HPLC analysis of DA-125 and its metabolites, M1, M2, M3 and M4 in plasma and urine¹, stability in plasma, blood partitioning and pharmacokinetics of DA-125 or M1 in rats², pharmacokinetics of DA-125 in beagle dogs³, and nonlinear metabolism of DA-125 in rats had been reported. M1 was metabolized to M2 and M3, and both M2 and M3 were further metabolized to M4 in mice, rats, and dogs. M1 was only active metabolite among M1 - M4 and has a high affinity for lung in mice, rats and dogs after intravenous (iv) administration of DA-125.

The purpose of this study is to report the pharmacokinetics of M1 - M4 after intravenous (iv) administration of DA-125 to SHR of 16 weeks of age, following chronic exposure to the hypertension¹⁵ and to age-matched control normotensive Kyoto-Wistar rats. A similar study in DOCA-salt rats of 16 weeks of age and age-matched control Sprague-Dawley (SD) rats was also performed in order to investigate whether some differences in pharmacokinetics of DA-125 between SHRs and normotensive Kyo-Wistar rats of 16 weeks of age are caused by either heredity of SHRs and the hypertensive state itself. Furthermore, the pharmacokinetics of DA-125 were also reported after i.v. administration to SHRs of 6 weeks of age,

corresponding to the early phase of development of the hypertension at which time blood pressure remains in the normotensive range¹⁵, and age-matched control Kyoto-Wistar rats. And the present investigation was undertaken to evaluate the metabolism and excretion of DA-125 in a rat model of PCM after iv administration of DA-125 to rats. The purpose of this study is to compare the pharmacokinetics and tissue distribution of M1 - M4 after i.v. administration of DA-125, 25 mg kg⁻¹, to subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma-bearing BDF1 mice and its control, BDF1 mice.

Chapter 2. Experimental method

Section 1. Chemicals

DA-125, M1, M2, M3 and M4 were kindly donated by Research Lab. of Dong-A Pharmaceutical Company, and fluorescein, the internal standard in HPLC assay, was a product of Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Other chemicals were of reagent grade or HPLC grade, and were used without further purification. SHR and Kyoto-Wistar rats of both 5 and 15 weeks, and SD rats of 12 weeks of age were purchased from Charles River Company (Atsugi, Japan). At Male Sprague-Dawley rats of 6 weeks of age (weighing between 120 and 180g at the beginning of the study) were purchased from Charles River Company (Atsugi, Japan). The animals were assigned randomly to one of the two diets containing 23% (control) or 5% (PCM) protein^{24,25}. Both diets were isocaloric and kindly manufactured by Research Lab. of Dong-A Pharmaceutical Company. All rats were provided with food and water ad lib., and fed on the corresponding diets for a 4-week period. Food intake and body weight were recorded at least once a week to assess the influence of the low-protein diet. Female BDF1 (C57BL/6 x DBA/2) mice of 6 weeks of age (weighing 17 - 24g) were purchased from Charles River Company (Atsugi, Japan). Animals were maintained on laboratory chow (Sam Yang Company, Seoul, Korea) and water ad libitum.

Section 2. Animal studies

1. Hypertensive rats

16 weeks of age, systolic blood pressure of SHRs and Kyoto-Wistar rats was measured using tail cuff plethysmography (Narco-trace 40, NBS, Houston, TX). The SHRs having systolic blood pressure higher than 170 mmHg were employed for the study. The Kyoto-Wistar rats having systolic blood pressure lower than 120 mmHg were employed for the study. At 6 weeks of age, the SHRs and Kyoto-Wistar rats having systolic blood pressure lower than 110 mmHg were employed for the study. The SD rats were randomly divided into two groups, DOCA-salt rats and control rats. DOCA-salt rats were given subcutaneous injection of 12.5 mg/kg body weight of DOCA (5 mg/ml) dissolved in cotton seed oil every three days and 1% NaCl as drinking water ad libitum from 12 to 16 weeks of age. Systolic blood pressure was similarly determined at 16 weeks of age. The DOCA-salt rats and the control SD rats having systolic blood pressure higher than 150 mmHg and lower than 110 mmHg, respectively, were employed for the study. On the early morning at the end of 6 or 16 weeks (after overnight fasting with drinking water ad libitum), the carotid artery and the jugular vein were catheterized with polyethylene tubing (Clay Adams, Parsippany, NJ) under light ether anesthesia. Both cannulas were exteriorized to the dorsal side of the neck, where each cannula terminated with long Silastic tubing (Dow Corning, Midland, MI). The Silastic tubings were covered with wire to allow free movement of the

rat. Each rat was housed in a rat metabolic cage (Daejong Scientific, Seoul, Korea) and allowed to recover from anaesthesia for 4-5 h before study. They were not restrained at any time during the study. DA-125 (dissolved in 1 mM lactic acid of pH 4.0 / 0.9% NaCl injectable solution), 20 mg/kg, was administered by iv infusion in 1 min via the jugular vein (the total injection volume was approximately 1.5 ml) of SHR_s (n=7), Kyoto-Wistar rats (n=9), DOCA-salt rats (n=8), and SD rats (n=13) of 16 weeks of age. Blood samples (0.12 ml) were collected via the carotid artery before (to serve as a control) and 1 (at the end of infusion), 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, and 600 min after i.v. administration of DA-125. Heparinized 0.9% NaCl injectable solution (15 units/ml), 0.25 ml, was used to flush the cannula after each blood sampling. Blood was centrifuged immediately to minimize the "Blood storage effect" of the plasma concentrations of M1 - M4 and 0.1 ml of plasma was stored at -20°C until HPLC analysis of M1 - M4¹. At 24 h, a large volume of blood was collected through the carotid artery and the rat was sacrificed by cervical dislocation. At the same time, the metabolic cage was rinsed with 20 ml of distilled water. The rinsings were combined with the urine, and the urinary bladder was cut and washed into the combined urine. After measuring the exact volume of the combined urine, an aliquot of the combined 24 h urine was collected and frozen prior to the HPLC analysis of M1 - M4.

2. Protein-calorie malnutrition rats

In the early morning at the end of 4 weeks of control and PCM diets

(after overnight fasting with free access to water), the carotid artery and the jugular vein were catheterized with polyethylene tubing (Clay Adams, Parsippany, NJ) under light ether anaesthesia. Both cannulas were exteriorized to the dorsal side of the neck where each cannula terminated with long silastic tubing (Dow Corning Company, Midland, MI). The silastic tubings were covered with wire to allow free movement of the rat. Each rat was housed individually in a rat metabolic cage (Daejong Scientific company, Seoul, Korea) and allowed to recover from anaesthesia for 4-5 hr. They were not restrained at any time during the study.

DA-125 (dissolved in 1 mM lactated acid of pH 4.0/normal saline, 20 mg/kg) was administered by iv injection in 1 min via the jugular vein (total injection volume was approximately 0.5 ml) of control (n=8) and PCM (n=9) rats. Blood samples (0.12 ml) were collected at 0 (to serve as a control), 1 (at the end of infusion), 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 300, 360, 480 and 600 min after iv administration. Heparinized normal saline (15 units/ml), 0.25 ml, was used to flush the cannula to prevent blood from clotting after each blood sampling. Blood samples were centrifuged immediately to minimize any "blood storage effect" of the plasma concentrations of M1-M4, and 0.1 ml of plasma was kept at -20°C prior to the analysis of M1-M4. At the end of 24 hr after the dose, as much blood as possible was collected through the carotid artery and each rat was sacrificed by cervical dislocation. The metabolic cage was rinsed with 20 ml of distilled water at the end of 24 hr. The rinsings were combined with the 24 hr urine, and the urinary bladder was excised and washed in the combined urine. The exact volume of the combined urine were measured. An aliquot of the combined 24-hr urine was frozen prior to the analysis of M1-M4.

3. Lewis-lung carcinoma bearing mice

Lewis lung carcinoma obtained from National Cancer Institute, National Institute of Health (Bethesda, MD, U.S.A.) was maintained as a solid tumor in C57BL/6 mice by biweekly subcutaneous implantation of the tumor fragments ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$). For the pharmacokinetic studies, the tumor fragments were transplanted subcutaneously into the flanks of 7-week-old BDF1 mice. DA-125 was administered on days 8 or 9 after tumor implantation. DA-125 (dissolved in 1 mM lactic acid/0.9% NaCl injectable solution), 25 mg/kg (10 ml/kg), was administered via the tail vein of BDF1 mice ($n=5$ at each sampling time) and subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma-bearing BDF1 mice ($n=10$ at each sampling time). At 2, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 and 1440 min after i.v. injection, as much blood as possible was collected from the orbital plexus into heparinized tube, and each mouse was sacrificed by cervical dislocation. Heart, liver, lung, kidney, stomach, small intestine, large intestine, spleen, thymus, and tumor mass (in tumor-bearing BDF1 mice) were excised and washed with cold 0.9% NaCl injectable solution to eliminate any blood remaining in the tissues. Each tissue's total weight was measured after blotting with paper tissue, and was homogenized with 4-volume of 0.1 N HCl using tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, GmbH & Company, IKA-Labortechnik, Staufen, Germany). After centrifuging at 9000g for 10 min, two 1 ml of the supernatant were stored in the freezer prior to the HPLC analysis of M1 - M4. Blood samples were centrifuged immediately to minimize the possible blood storage effect of the plasma

concentrations of M1 - M4, and plasma and blood cells were separately collected. 0.1 N HCl 1 ml, methanol 1 ml and ethyl acetate 8 ml were added to 1 ml of plasma and 0.1 N HCl 1 ml, distilled water 1 ml, methanol 1 ml and ethyl acetate 8 ml were added to 1 ml of blood cells. At the end of 24h, metabolic cage was rinsed with 20 ml of distilled water and the rinsings were combined to urine. After measuring the exact volume of the combined urine, two 0.1 ml of combined urine were stored in the freezer prior to the HPLC analysis of M1 - M4.

Section 3. HPLC assay

The HPLC system consisted of a Model 7125 injector (Reodyne, Cotati, CA, USA), a Model 9600 ternary gradient pump (Eldex, San Carlos, CA, USA), a guard column (RP-18-10C5, 10x5 mm ID., 10 μ m, Hichrom, Reading, UK), a reversed-phase column (10 cm x8 mm I.d., 4 μ m, Waters RCM, Milford, MA, USA), a fluorescence detector (Linear fluor LC304, Linear, Reno, NE, USA) set at excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 556 nm, and an integrator (D-2500, Hitachi, Tokyo, Japan). The mobile phase was 1% acetic acid-isopropyl alcohol-methanol (70:20:10, v/v) and the flow rate was 1.5 ml/min .

Section 4. Pharmacokinetic analysis

The area under the plasma concentration - time curve from time zero to time infinity (AUC) was calculated by the trapezoidal rule -extrapolation

method: this method employed the logarithmic trapezoidal rule, recommended by Chiou for calculation of area during the declining plasma - level phase, and the linear trapezoidal rule for the rising plasma - level phase. The area from the last data point to time infinity was estimated by dividing the last concentration by the terminal rate constant. Standard methods were used to calculate the following pharmacokinetic parameters after iv administration: the time - averaged total plasma clearance (CL_p), area under the first moment of the plasma concentration - time curve (AUMC), mean residence time (MRT), apparent volume of distribution at steady state (V_{ss}) , and the time - averaged renal (CL_R) and nonrenal clearance (CL_{NR}):

$$CL = \frac{Dose}{AUC}$$

$$AUMC = \int_0^{\infty} C_p \times t \, dt$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

$$V_{ss} = CL \times MRT$$

$$CL_R = \frac{A_{e(\infty)}}{AUC}$$

$$CL_{NR} = CL - CL_R$$

where C_p is the plasma concentration of M1 - M4 at time t, and A_{e_∞} is

the amount of M1 - M4 excreted in urine up to time infinity (this was assumed to equal the total amount excreted in 24 h after iv administration, since negligible amount of M1 - M4 could be found in urine collected later).

Section 5. Statistical analysis

Levels of statistical significance were assessed using the t-test between two means for unpaired data. Significant differences were judged as $p < 0.05$. All results are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.).

Chapter 3. Result and discussion

Section 1. Hypertensive rats

The mean arterial plasma concentration - time profiles of M1 - M4 after iv administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHR and Kyoto-Wistar rats of 16 weeks of age are shown in Figures 1 - 4, respectively, and the corresponding pharmacokinetic parameters are listed in Table 1. After i.v. administration of DA-125 the plasma concentrations of each M1, M2 and M4 declined in a polyexponential fashion for the two groups of rats. It is of interest to note that most of the plasma concentrations of M2 and M4 in SHRs were significantly higher than in the control rats and this resulted in significantly higher AUCs for M2 (68.9 vs 29.3 g min/ml) and M4 (53.4 vs 33.4 g min/ml) in SHRs. This indicates that metabolism of M2 from M1 and M4 from Both M2 and M3 increased significantly in SHRs. Similar results were also obtained from furosemide¹² and acetaminophen¹⁰. The mean arterial plasma concentration - time profiles of M1 - M4 after iv administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHRs and Kyoto-Wistar rats of 6 weeks of age are shown in Figures 5 - 8, respectively, and the corresponding pharmacokinetic parameters are listed in Table 2. It is to be noted that the plasma concentrations of M1 - M4 and their pharmacokinetic parameters were not significantly different between SHRs and its control rats of 6 weeks of age. Above data indicate that the increased metabolism of M2 and M4 in SHRs of 16 weeks of age was

due to the hypertension itself, and not due to the heredity of SHRs. The mean arterial plasma concentration - time profiles of M1 - M4 after iv administration of DOCA-salt, 20 mg/kg, to SHRs and Kyoto-Wistar rats of 16 weeks of age are shown in Figure 9 - 11, respectively, and the corresponding pharmacokinetic parameters are listed in Table 3. Interesting results were obtained from DOCA-salt rats of 16 weeks of age. The plasma concentrations of M2 in DOCA-salt rats were significantly higher than in the control rats and this resulted in a significantly increase in AUC of M2 (130 vs 29.3 g min/ml) in DOCA-salt rats. The AUCs of M4 tended to increase in DOCA-salt rats. Above data indicates that the increased metabolism of DA-125 to M2 and M4 is due to hypertension itself.

Section 2. Protein-calorie malnutrition rats

The effects of dietary protein on body weight, food intake, and each organ weight are listed in Table I. Protein deprivation for 4 weeks caused a significant decrease in body weight gain and food consumption. Animals on the low-protein (5%) diet consumed approximately 46.4 % less food than those on the normal protein (23%) diet, despite ad libitum supply of food. As a result, their protein and caloric intakes decreased significantly by 88.4 and 47.8 %, respectively. The quantity of hepatic cytochrome p-450 per g liver protein were also significantly decreased in rats on protein-deficient diet. Similar trends were also observed in other assay.²⁴⁻²⁷ It has been reported²⁴ that the total plasma proteins and albumin concentration were also significantly decreased in rats on the

protein-deficient diet. The results are consistent with those described previously.^{27, 32, 33} As both the protein and calorie intakes decreased significantly in the protein-deficient rats, it is important to realize that the rats fed on the low-protein diet suffered from both protein and calorie deficiency. Therefore, any changes in the pharmacokinetics of DA-125 on low-protein diet rats should be attributed to PCM and not solely to protein deficiency. It has also been reported³ that the creatinine clearance pH and volume of 24-hr urine, amount of sodium, potassium and chloride excreted in 24-hr urine per 100 g body weight, and the concentrations of plasma sodium, chloride and potassium were not significantly different between the two groups of rats receiving different diets. Although the absolute weight of liver, kidney and stomach decreased significantly due to the protein-deficient diet, the relative (body weight-normalized) weight of kidney and stomach increased significantly in protein-deficient rats, whereas that of the liver was not significantly different between the two groups of rats. The mean arterial plasma concentration - time profiles of M1, M2, M3 and M4 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg, to PCM rats and its control are shown in Figure 12 - 15, respectively. AUC and amount excreted in 24 h urine after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg, to protein-calorie deficient (PCM) rats and its control rats are listed in Table 4. The plasma concentrations of M1 - M4 and corresponding pharmacokinetic parameters were not significantly different between two groups of rats except amounts excreted in 24 h urine of M1 and M2 and percent of dose excreted in 24 h urine of M4.

Section 3. Lewis-lung carcinoma bearing mice

In the preceding paper,² pharmacokinetic parameters of M1 were comparable between i.v. administration of DA-125 and M1 to rats, and the in vitro degradation half-life of DA-125 to M1 was 1.72 min in rat plasma, suggesting that DA-125 is rapidly transformed to M1 after i.v. administration of DA-125 to rats. DA-125 is a water-soluble prodrug of M1 and only M1 has antineoplastic activity among M1 - M4. Therefore, DA-125 was not measured in the present mouse study.

The mean plasma concentration-time curves of M1 - M4 after i.v. administration of DA-125, 25 mg/kg, to BDF1 mice (n=5 at each sampling time) and subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma-bearing BDF1 mice (n=10 at each sampling time) are shown in Figure 16, and the relevant pharmacokinetic parameters listed in Table 5. After i.v. administration of DA-125, the each plasma concentrations of M1, M2 and M4 seemed to decline in a polyexponential fashion, and almost 'constant' plasma concentrations of each M1, M2 and M4 were maintained from 2 to 8 h in both groups of mice studied. This was due to the continuous formation of M2 from M1 and M4 from M3, respectively.⁴ However, the plasma concentrations of M3 were detected for only up to 5 - 15 min and were lowest among M1 - M4 for both groups of mice due to the fast and almost 'complete' conversion of M3 to M4 and other metabolite(s).⁴ The plasma concentrations of M4 were lower than those of both M1 and M2 in both groups of mice, probably due to the fact that the rate and amount of the formation of M3 from M1 is slower and less than those of M2 from M1. It was reported that most pharmacokinetic parameters of M2 and M4 were

comparable after i.v. administration of M2 and M4, 5 mg/kg, respectively, to rats,⁴ and the formation of M4 from M2 was almost negligible in rats. Similar plasma profiles of M1 - M4 (Figure 16) were also obtained after i.v. administration of DA-125, 5, 10, 20, 30 and 40 mg/kg, to rats.⁴ The each mean plasma concentrations of M1 - M4 were not significantly different between the two groups of mice (Figure 16), resulting in comparable pharmacokinetic parameters of M1, M2 and M4 as listed in Table 5. The contribution of CL_R to CL for M1 were almost negligible (0.884 and 0.850%) for both groups of mice, and only 6.81 and 79.3 g of M1 (expressed in terms of DA-125) were excreted in 24-h urine and bile, respectively, after i.v. administration of DA-125, 10 mg/kg, to rats, suggesting that M1 was essentially completely transformed to M2 - M4 and other metabolite(s). M2 was the predominant metabolite among M1 - M4 excreted in 24 h urine for both groups of mice; 8.36 and 10.7% of the i.v. dose were excreted in 24 h urine as M2 (expressed in terms of DA-125) in the control and the tumor-bearing mice, respectively, but the corresponding values for M1 and M4 were both less than 1% for both the control and the tumor-bearing mice (Table 5). Similar results were also obtained from rats⁴ and dogs.³ As shown in rats and dogs, M3 was under detection limit in 24 h urine for both groups of mice. The mean concentrations in blood cells - time curves of M1 - M4 are also shown in Figure 1. The concentrations of each M1, M2 and M4 in blood cells seemed to be comparable between the two groups of mice, and those of M3 were under detection limit for both groups of mice. It is to be noted that the mean blood cells to plasma concentration ratio of M1 increased significantly ($p < 0.05$) in the tumor-bearing mice: the mean values were 0.800 and 1.19 for the control and the tumor-bearing mice, respectively.

The corresponding values, 0.813 - 0.934, were obtained from the control male Sprague-Dawley rat blood.² The decay patterns of M1 and M2 in blood cells were similar to those in plasma, but those of M4 were different between plasma and blood cells: M4 was detected in plasma for up to 8 h in both mice groups, but it was detected in blood cells for up to 30 min and 8 h for the control and tumor-bearing mice, respectively. The mean amount in each tissue-time curves of M1 -M4 including its AUA_t , is also shown in Figure 16. The mean amount of M1 at each time in heart, kidney, stomach, small intestine, large intestine and thymus was not significantly different between the control and the tumor-bearing mice, and hence the resultant AUA_t s of the tissues were comparable (Figure 16). However, the amount of M1 in lung was significantly higher in the tumor-bearing mice than in the control mice at each time, resulting in a considerably higher AUA_t (8940 vs 18600 $\mu\text{g min/g}$). On the other hand, the amount of M1 in the liver was significantly higher in the control mice than in the tumor-bearing mice at each time, resulting in a considerably higher AUA_t (3840 vs 962 $\mu\text{g min/g}$). The AUC_t (or AUA_t) of M1 for blood cells (84.3 vs 166 $\mu\text{g min/ml}$) and spleen (25200 vs 39000 $\mu\text{g min/g}$) tended to be higher in the tumor-bearing mice than in the control mice. The amount of M1, the only active antineoplastic compound among M1 - M4, was greatest in lung for up to 2 h in the tumor-bearing mice, resulting in the second largest AUA_t (1860 $\mu\text{g min/g}$) next to spleen (39000 $\mu\text{g min/g}$). The mean lung to plasma ratios of M1 were significantly ($p < 0.05$) higher in the tumor-bearing mice than in the control mice; the mean values were 68.2 and 121 for the control and the tumor-bearing mice, respectively, indicating M1 has higher affinity for the lung of the tumor-bearing mice than the control mice. The high

affinity of M1 for the lung was also reported after i.v. administration of DA-125 to control mice, rats and dogs. It is to be noted that the decay patterns of M1 in spleen and thymus were considerably slower than those in other tissues in both groups of mice. The mean amount of M2 in heart, lung, kidney, small intestine, large intestine, spleen and thymus was not significantly different between the control and the tumor-bearing mice, and hence the AUA_t s of the tissues were also comparable (Figure 16). However, the mean amount of M2 in liver and stomach were significantly higher in the control mice than in the tumor-bearing mice, resulting in a considerably higher AUA_t in liver (354 vs 1450 $\mu\text{g min/g}$) and stomach (1150 vs 2710 $\mu\text{g min/g}$). M2 was highly concentrated in the small intestine and spleen of both the control and the tumor-bearing mice. The AUA_t of M2 was considerably smaller than those of M1 in all tissues studied for both the control and the tumor-bearing mice, except in blood cells of control mice. M3 was not detected in blood cells and thymus, and was detected for a very short period of time in tissues with the exception of liver, kidney, small intestine and large intestine of both the control and the tumor-bearing mice. Therefore, the AUA_t of M3 was lowest among M1 - M4 in both mice groups. The mean amount of M4 in heart, lung, kidney, stomach, small intestine and large intestine were not significantly different between the control and the tumor-bearing mice, and hence the AUA_t s of the tissues were comparable. Generally, the AUA_t s of M4 were smaller than those of M1 and M2 except in liver for both mice groups. The amount and AUA_t of M1 - M4 in the tumor mass after i.v. administration of DA-125 to subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma-bearing mice are also shown in Figure 16. After i.v. administration of DA-125, the amount of M1 in the tumor mass immediately

reached a mean C_{max} of $3.75 \pm 1.83 \mu\text{g/g}$, which declined very slowly and then maintained an almost 'constant' level for up to 24 h. This suggested M1 had high affinity for the tumor mass. Almost 'constant' amount of M2 and M4, respectively, were also maintained for up to 24 h in the tumor mass, but M3 was under detection limit.

Chapter 4. References

1. H.J. Shim, E.D. Lee, E.J. Yoon, S.D. Lee, W.B. Kim, J. Yang and M.G. Lee, Simultaneous determination of DA-125 and its metabolites, M1, M2, M3 and M4 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.*, 656, 407-414 (1994).
2. H.J. Shim, E.D. Lee, E.J. Yoon, S.D. Lee, W.B. Kim, J. Yang and M.G. Lee, Pharmacokinetics of FT-ADM after intravenous administration of DA-125, a prodrug of FT-ADM or FT-ADM to rats. A new adriamycin analog containing fluorine. *Int.J.Pharm.*, 103, 147-154 (1994).
3. E.J. Yoon, E.D. Lee, W.H. Yoon, H.J. Shim, S.D. Lee, W.B. Kim, J. Yang and M.G. Lee, Pharmacokinetics of FT-ADM (M1) after intravenous administration of DA-125, a prodrug of FT-ADM to dogs. A new adriamycin analog containing fluorine. *Int.j.Pharma.* (1994)
4. E.J. Yoon, W.I. Lee, H.J. Shim, S.D. Lee, W.B. Kim, J. Yang and M.G. Lee, Pharmacokinetics of DA-125. A new adriamycin analog containing fluorine. The international symposium on the role of drug metabolism and pharmacokinetic research in new drug development. Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea, June 7, 1994, pp 65-116 (1994).
5. K. Okamoto and K. Aoki, Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap. Circ. J.*, 27, 282-293 (1963).

6. R.J. Barret, T.J. Buchenheimer, B. A. McGuirk and S.T. Kau, Comparative cardiovascular effects of loop-acting, thiazide-type and potassium-sparing diuretics in spontaneously hypertensive rats. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.*, 9 (2), 67-78 (1987).
7. P.J.S. Chiu, S. Vemulapalli and A. Barnett, Acute blood pressure and urinary responses to single dose combinations of captopril and diuretics in conscious spontaneously hypertensive rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 37, 105-109 (1985).
8. A. Scriabine, L.S. Watson, H.F. Russo, C.T. Ludden, C.S. Sweet, G.M. Fanelli, N.R. Bahidar and C.A. Stone, Diuretics and antihypertensive activity of 2-aminoethyl-4-(1,1-dimethyl-ethyl)-6-iodophenol hydrochloride (MK-447). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208, 148-154 (1979).
9. H.A. T. Struyker-Boudier, J.F.M. Smits, J.C.S. Kleinjans and H. Vanessen, Hemodynamic action of diuretic agents. *Clin. Exp. Hyper.*, A5, 209-223 (1983).
10. S.H. Jang, M.H. Lee and M.G. Lee, Pharmacokinetics of acetaminophen after intravenous and oral administration to spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar rats. *J. Pharm. Sci.*, 83, 810-814 (1994).
11. K. S. Han, S. H. Lee, M. G. Lee and N. D. Kim, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bumetanide after intravenous and oral administration to spontaneously hypertensive rats and DOCA-salt induced

- hypertensive rats. *Biopharm. Drug Dispos.*, 14 533-548 (1993)
12. S. H. Jang, M. G. Lee and N. D. Kim, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of furosemide after intravenous and oral administration to spontaneously hypertensive rats and DOCA-salt-induced hypertensive rats. *Biopharm. Drug Dispos.*, 15, 185-206 (1994)
13. L. T. Beilin, D. N. Wade, A. J. Honour and T. J. Cote, Vascular hyperreactivity with sodium loading and with deoxycorticosterone induced hypertension in the rat. *Clin. Sci.*, 39, 793-810 (1970)
14. T. Sugai, Y. nakagawa, K. Takeda and S. Imai, Arterial pressur-urinary output relationship in DOCA-saline hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, 245, R633-R636 (1983)
15. C. D. Sladek and M. L. Blair, Cholinergic stimulation of vasopressin release in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 6, 855-860(1984)
16. L. C. Eriksson, J. W. Depierre and G. Pallner, Preparation and properties of microsomal fractions. *Pharmacol. Ther.*, 2, 281-317 (1978)
17. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 173, 265-275 (1951)
18. T. Omura and R. Sato, The carbon monoxide-binding pigment of liver

microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem., 239, 2370-2378 (1964)

19. S. H. Kim, Y. M. Choi and M. G. Lee, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of furosemide in protein-calorie malnutrition. J. Pharmacokin. Biopharm., 21, 1-17 (1993)

20. W. L. Chiou, Critical evaluation of potential error in pharmacokinetic studies using the linear trapezoidal rule method for the calculation of the area under the plasma level-time curve. J. Pharmacokin. Biopharm., 6, 539-546 (1978)

21. W. L. Chiou, New calculation method for mean apparent drug volume of distribution and application to rationale dosage regimens. J. Pharm. Sci., 68, 1067-1069 (1979)

22. K. Krishnaswamy, Drug metabolism and pharmacokinetics in malnutrition, Clin. Pharmacokin., 3:216-240 (1978)

23. N. Buchanan, Drug kinetics in protein energy malnutrition, S. Afr. Med. J., 53:327-330 (1978)

24. S. H. Kim, Y. M. Choi and M. G. Lee, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of furosemide in protein-calorie malnutrition, J. Pharmacokin. Biopharm., 21:1-17 (1993)

25. S. H. Kim and M. G. Lee, Influence of protein and calorie

malnutrition on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of bumetanide in rats, *J. Pharm. Sci.*, 82:838-843 (1993)

26. D. Jung, Pharmacokinetics of theophylline in protein-calorie malnutrition, *Biopharm. Drug Dispos.*, 6:291-299 (1985)

27. D. Jung, Disposition of acetaminophen in protein-calorie malnutrition, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232:178-182 (1985)

28. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 173:265-275(1951)

29. T. Omura and R. Sato, The carbon monoxide-binding pigment of livermicrosomes I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, 239:2370-2378 (1964)

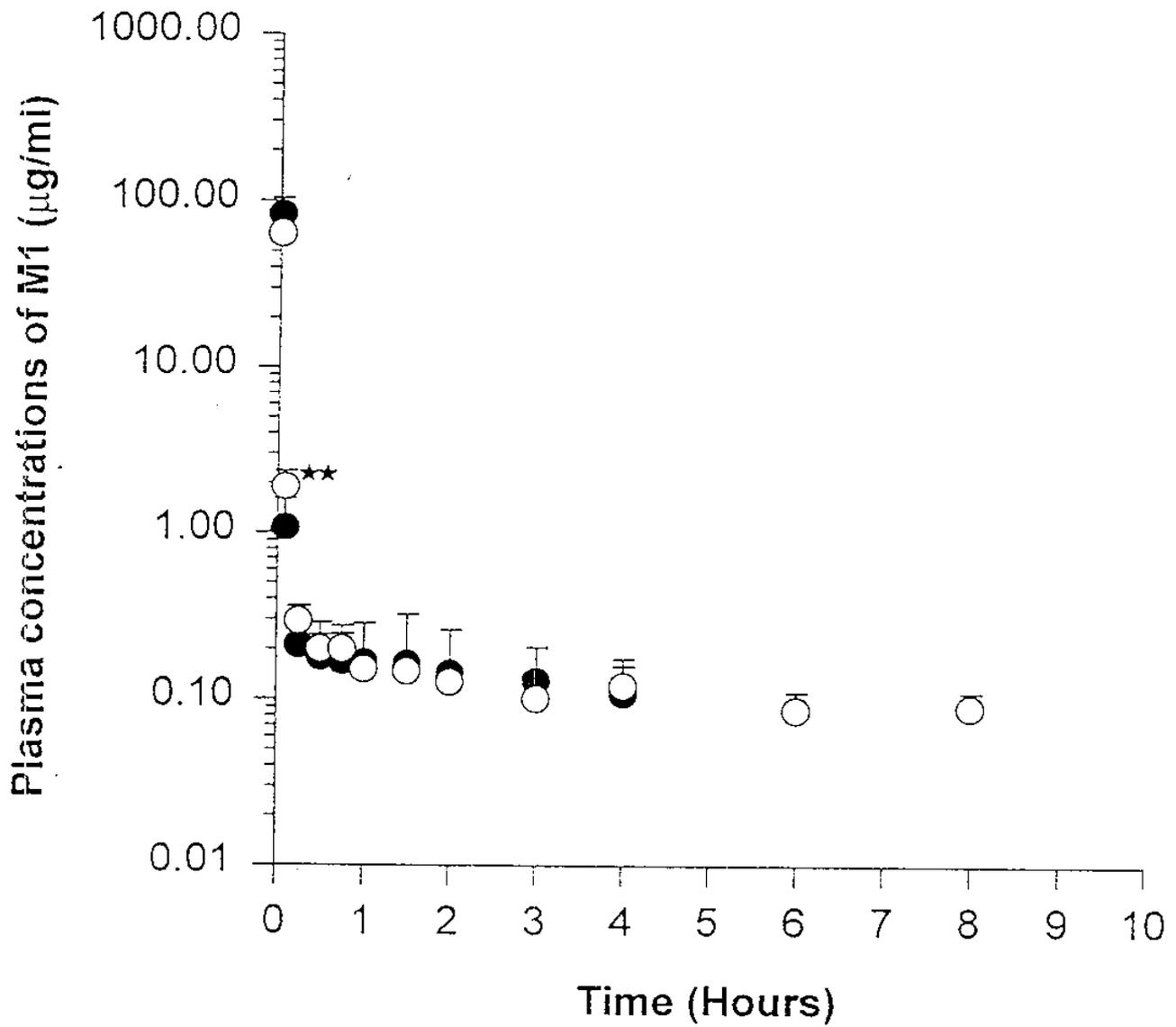
30. W. L. Chiou, Critical evaluation of potential error in pharmacokinetic studies using the linear trapezoidal rule method for the calculation of the area under the plasma level-time curve, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 6:539-546 (1978)

31. M. Gibaldi and D. Perrier, *Pharmacokinetics*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, 1982

32. D. Varma, Influence of dietary protein on the anti-inflammatory and ulcerogenic effects and on the pharmacokinetics of phenylbutazone in

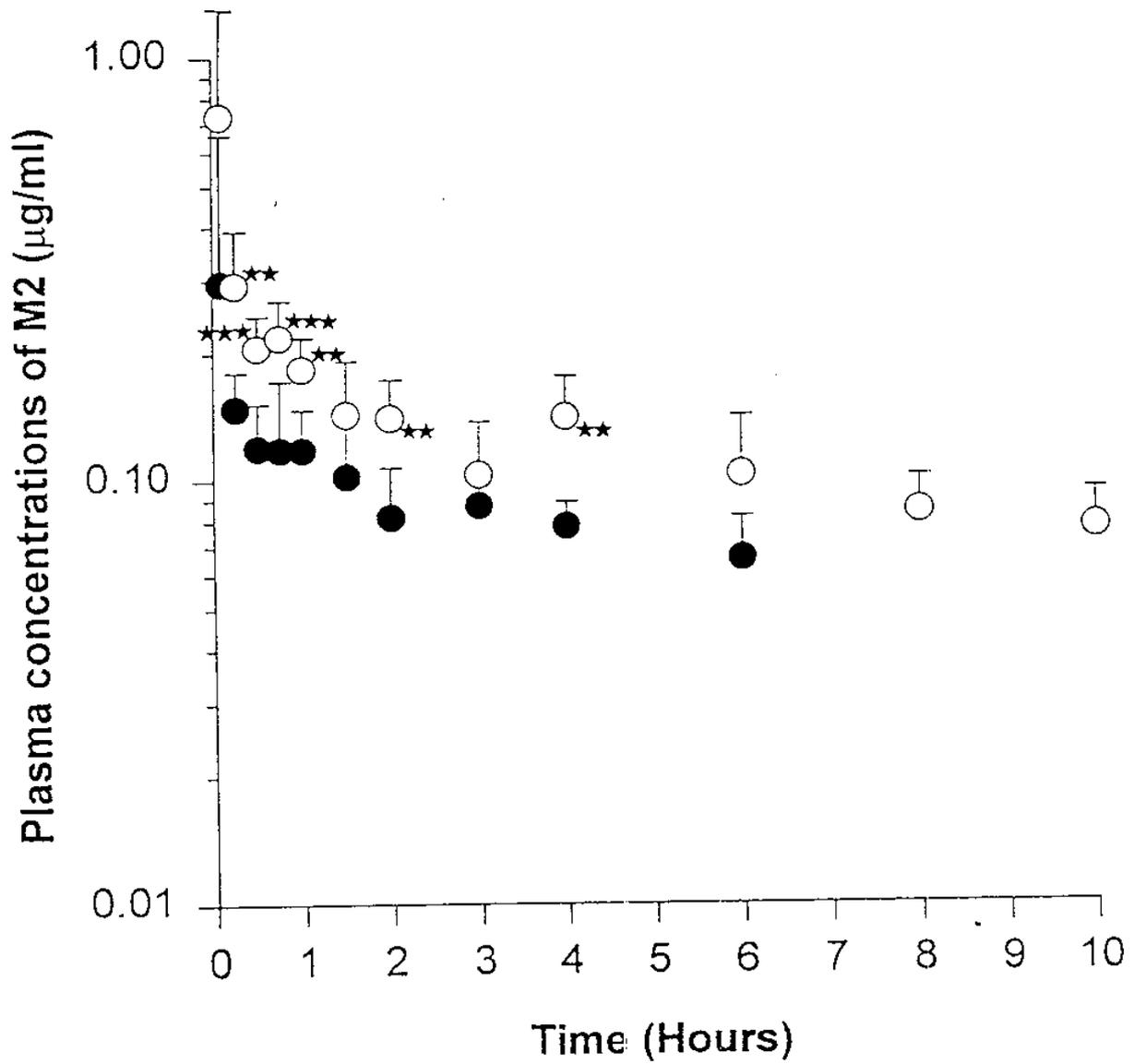
rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 211:338-344 (1979)

33. J. C. Merrill and T. M. Bray, The effect of dietary protein quantity on the activity of UDP-glucuronyltransferase and its physiological significance in drug metabolism, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60:1556-1561 (1982)



** p < 0.01

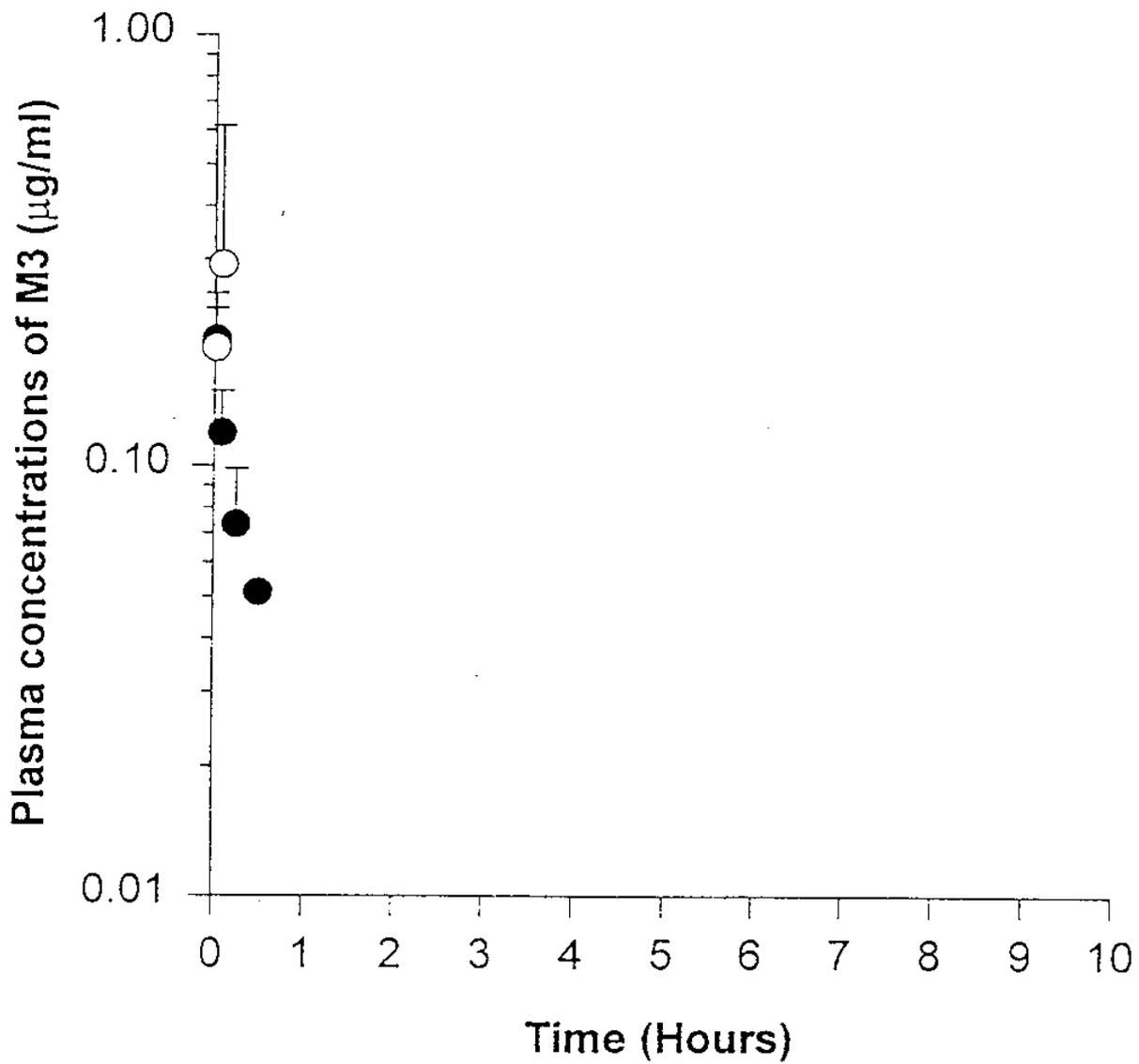
Fig. 1. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M1 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHR (○) and its control KW rats (●) of 12 weeks of age.



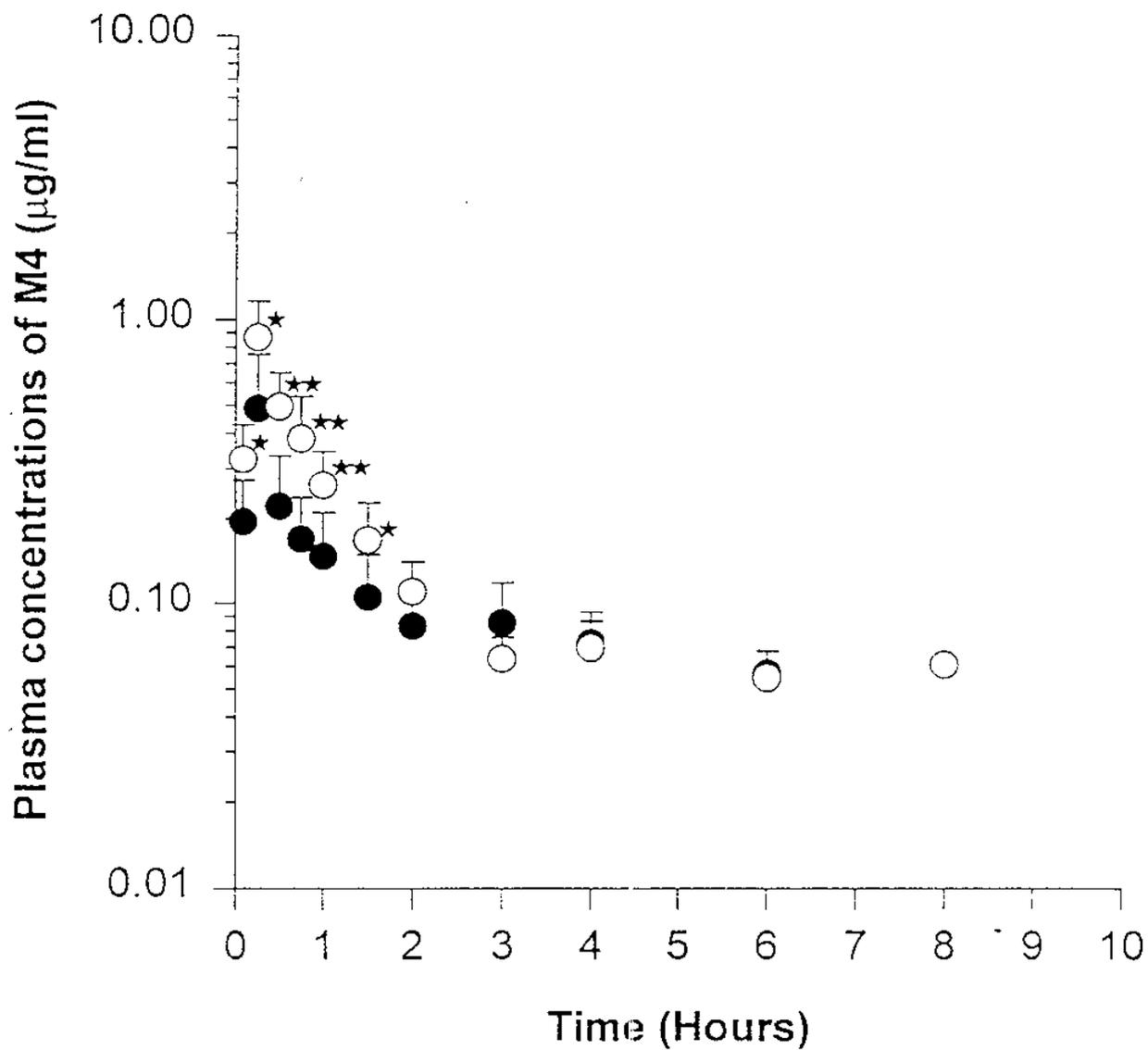
** p < 0.01 *** p < 0.001

Fig. 2.

Mean arterial plasma concentration - time profiles of M2 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHRs (○) and its control KW rats (●) of 12 weeks of age.

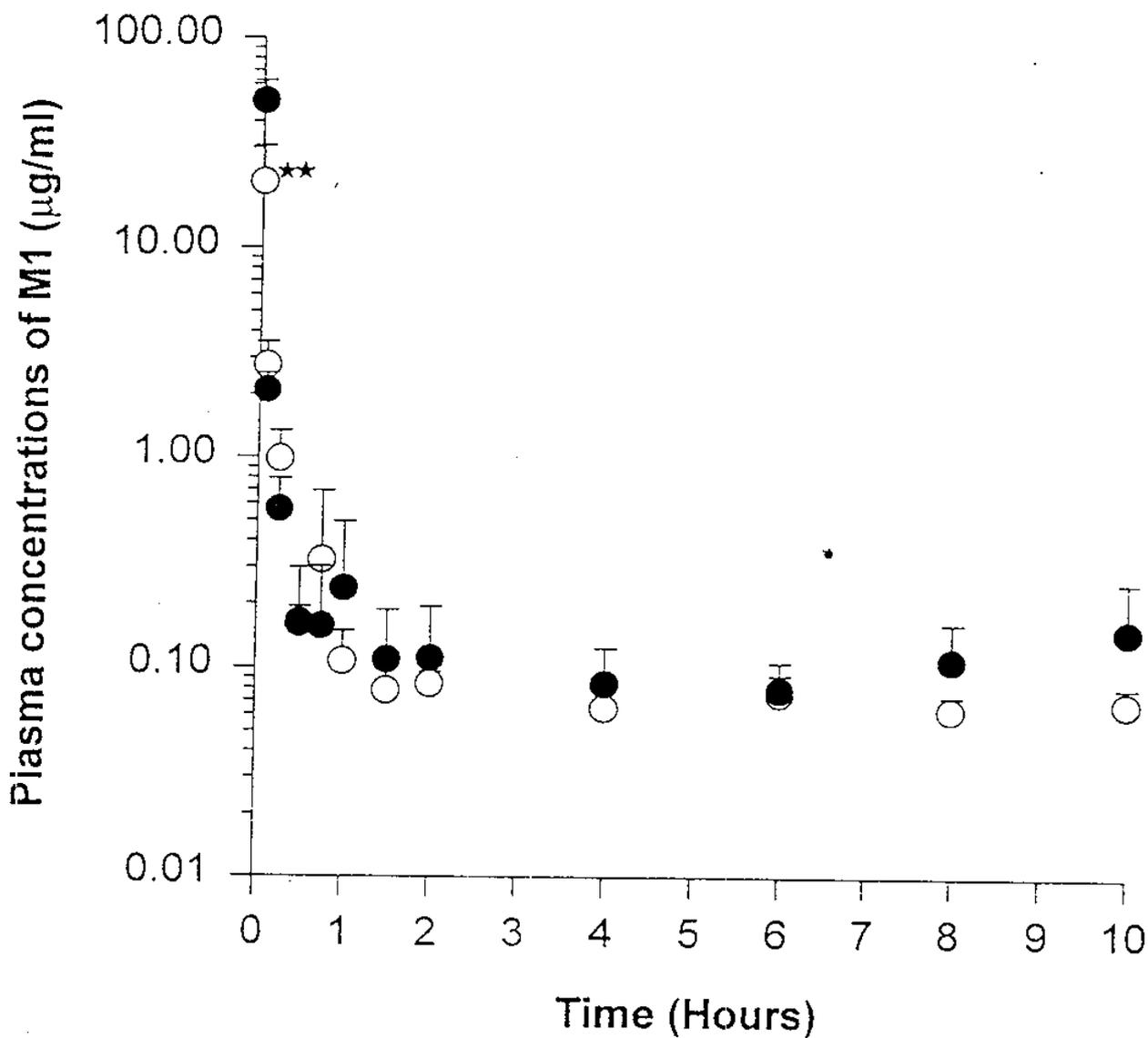


g. 3. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M3 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHRs (○) and its control KW rats (●) of 12 weeks of age.



* p < 0.05 ** p < 0.01

Fig. 4. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M4 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHRs (○) and its control KW rats (●) of 12 weeks of age.



** p < 0.01

Fig. 5.

Mean arterial plasma concentration - time profiles of M1 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHRs (○) and its control KW rats (●) of 6 weeks of age.

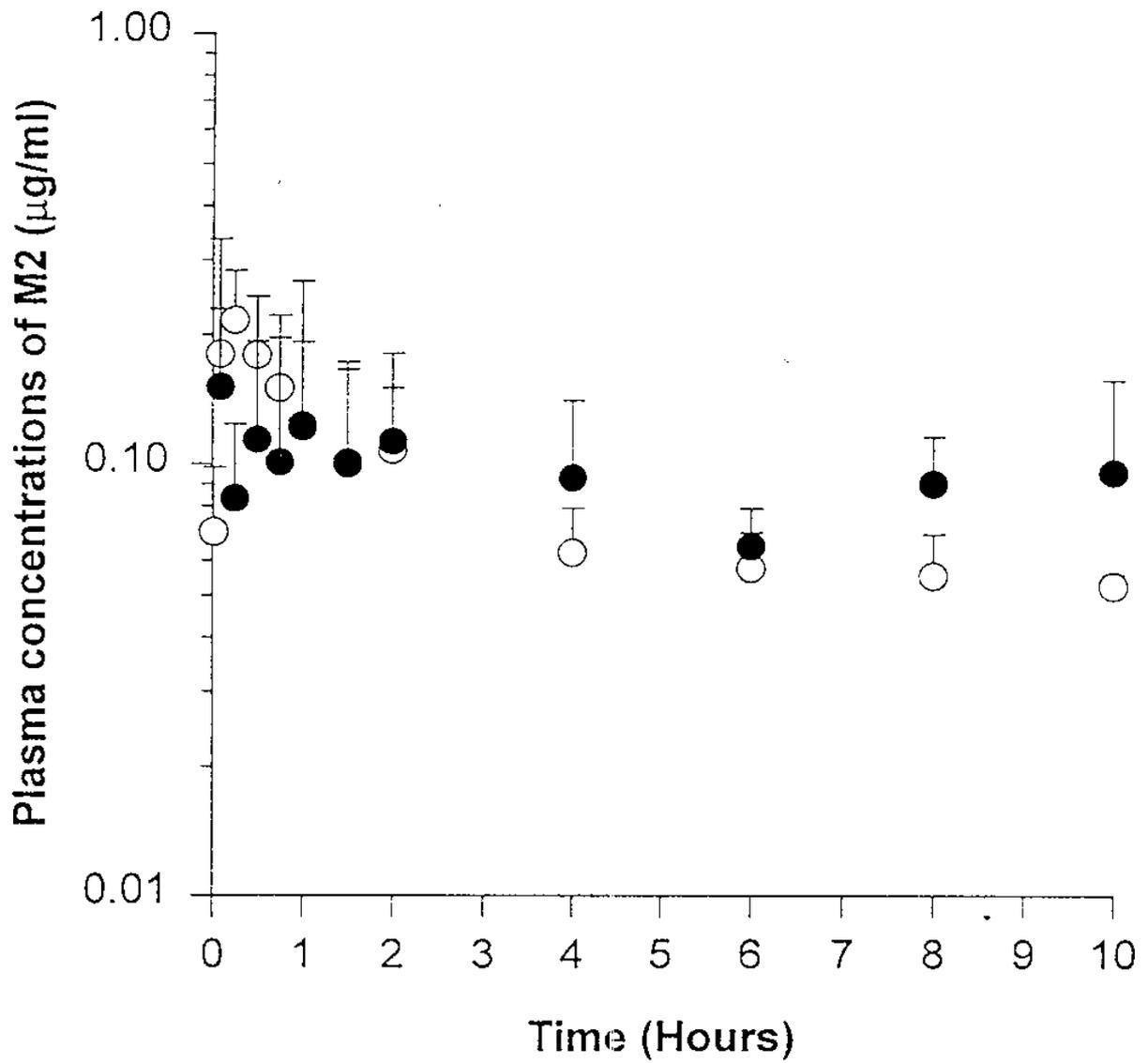
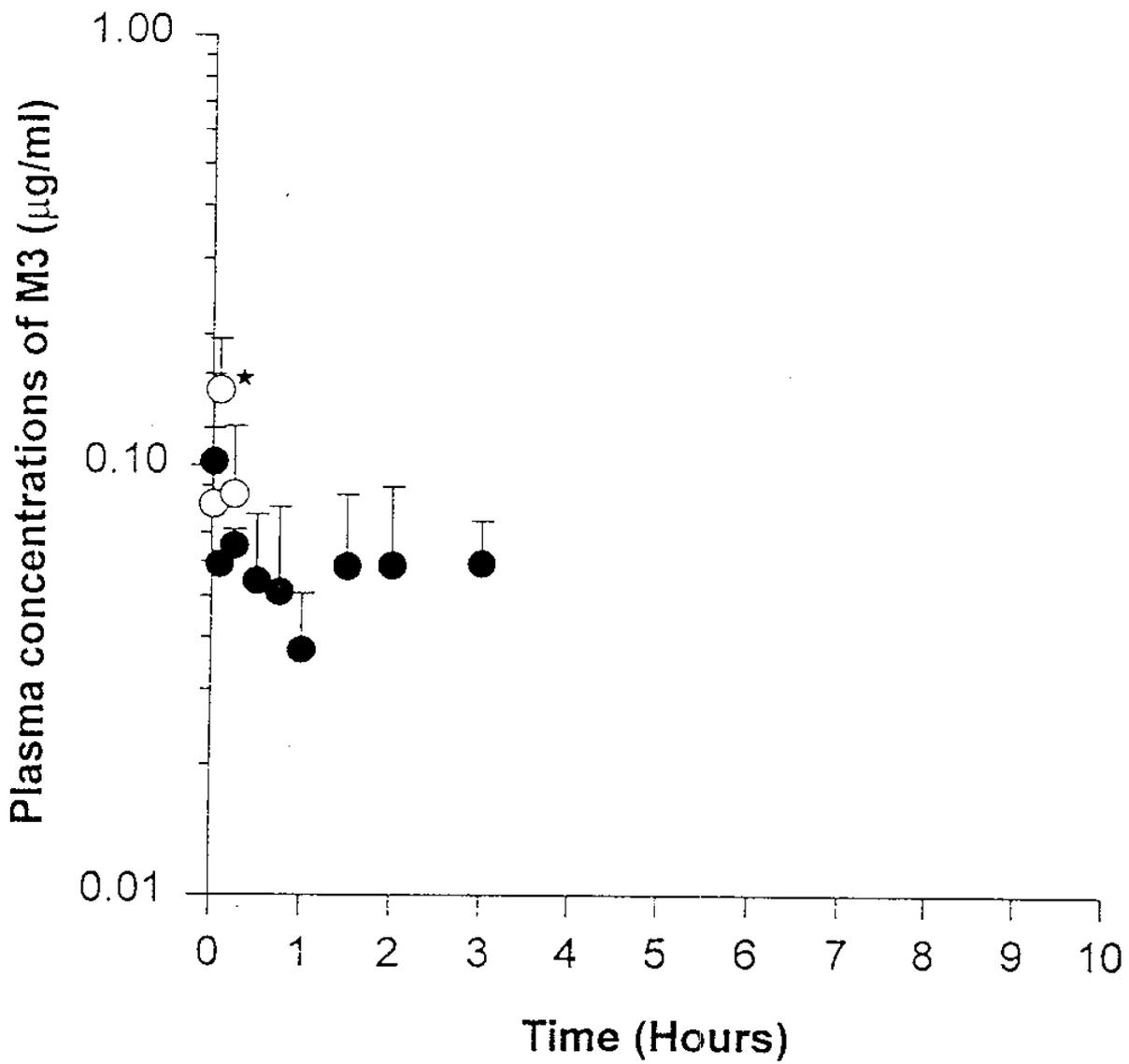


Fig. 6.

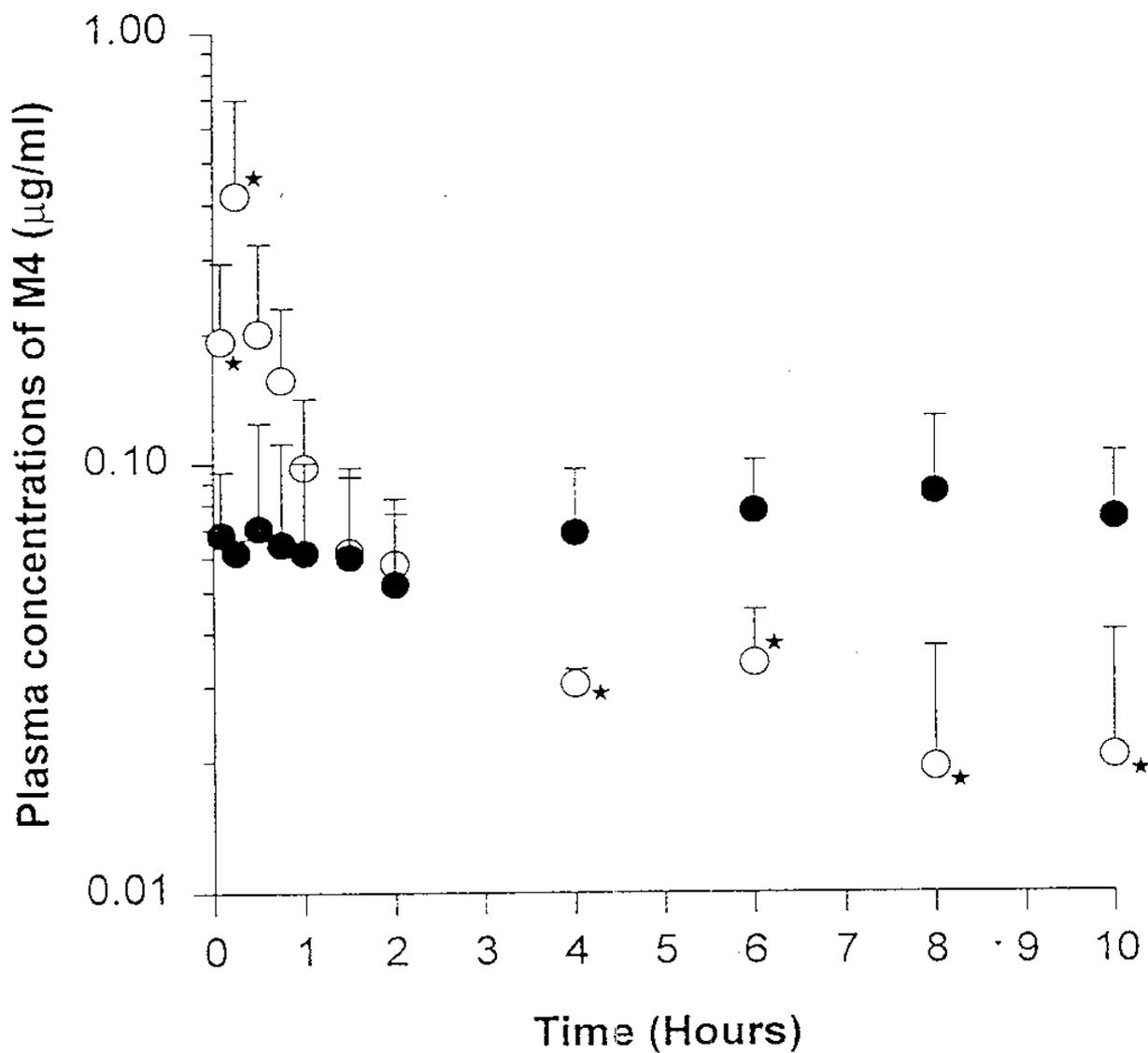
Mean arterial plasma concentration - time profiles of M2 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHRs (○) and its control KW rats (●) of 6 weeks of age.



* $p < 0.05$

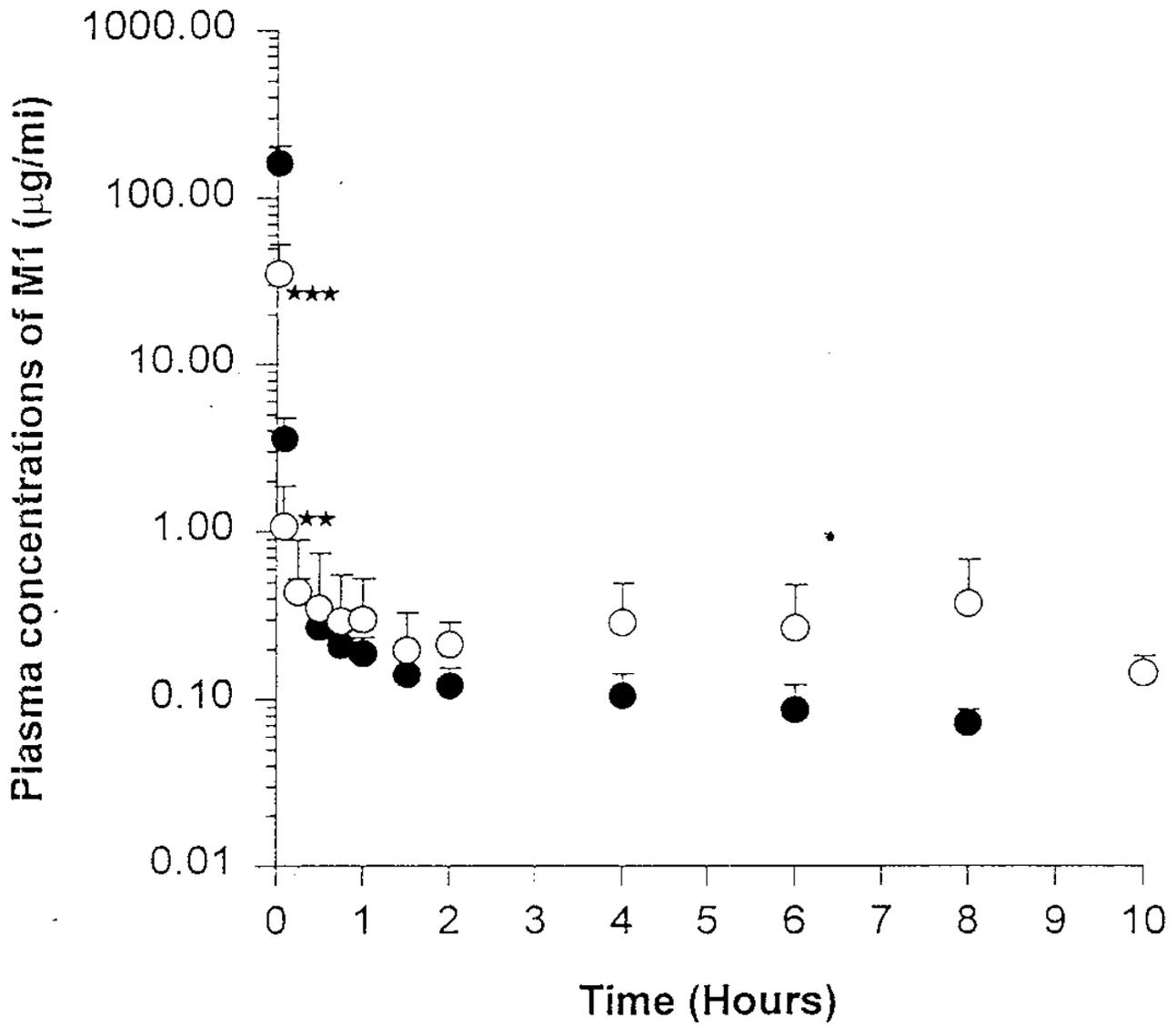
Fig. 7.

Mean arterial plasma concentration - time profiles of M3 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHRs (○) and its control KW rats (●) of 6 weeks of age.



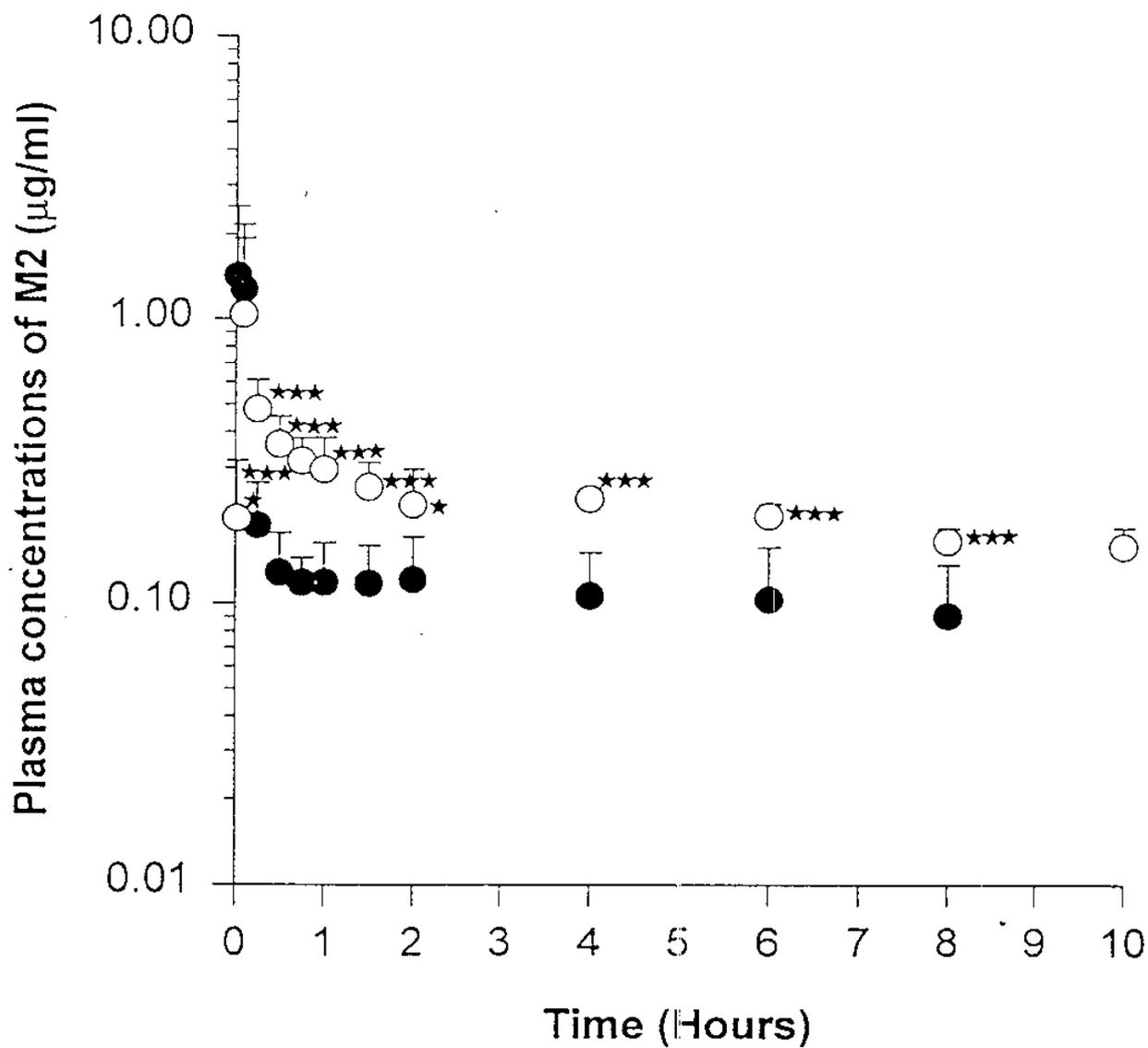
* $P < 0.05$

Fig. 8. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M4 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to SHRs (○) and its control KW rats (●) of 6 weeks of age.



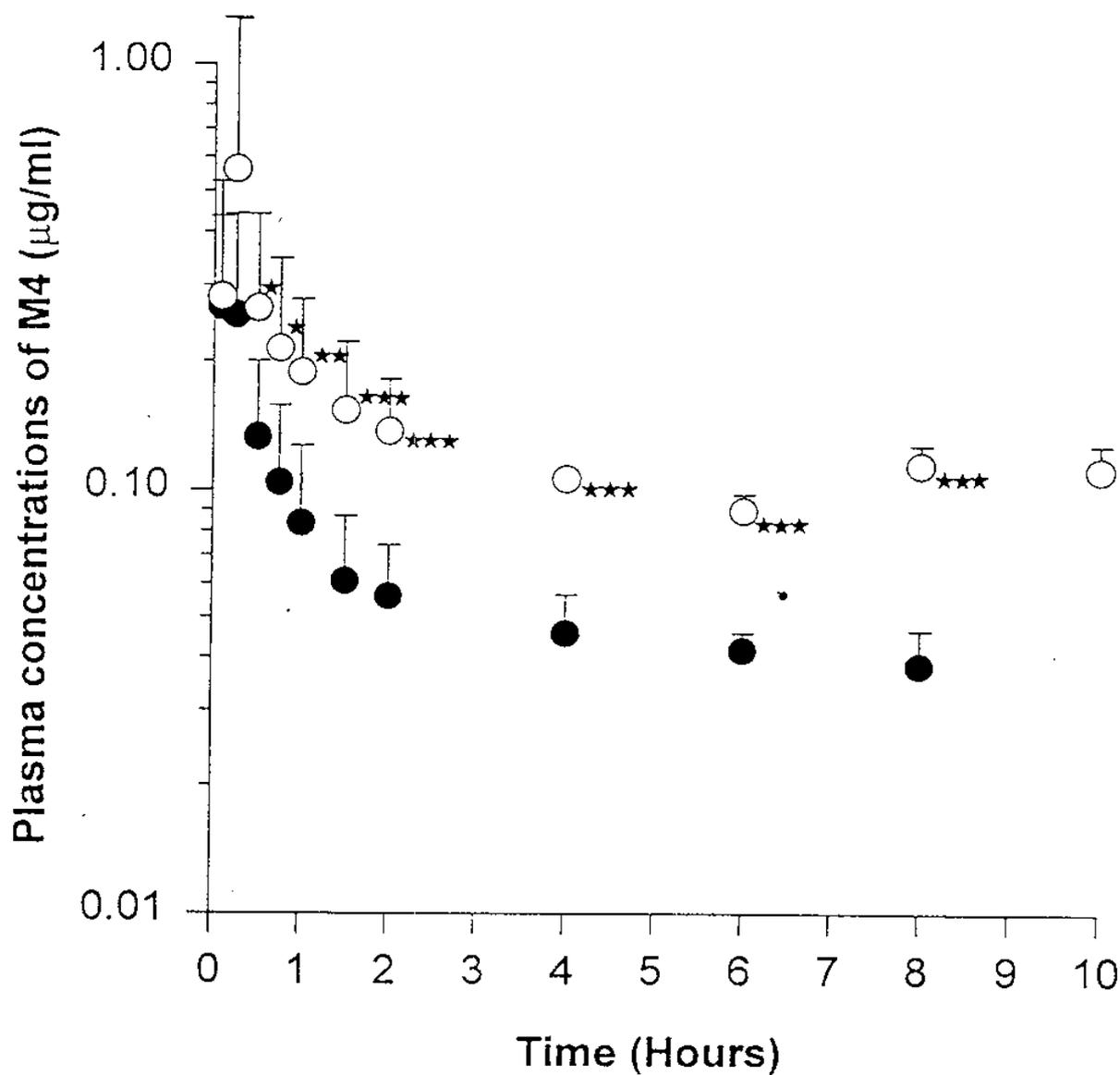
** p < 0.01 *** p < 0.001

Fig. 9. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M1 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to DOCA salt - treated rats (○) and its control (●).



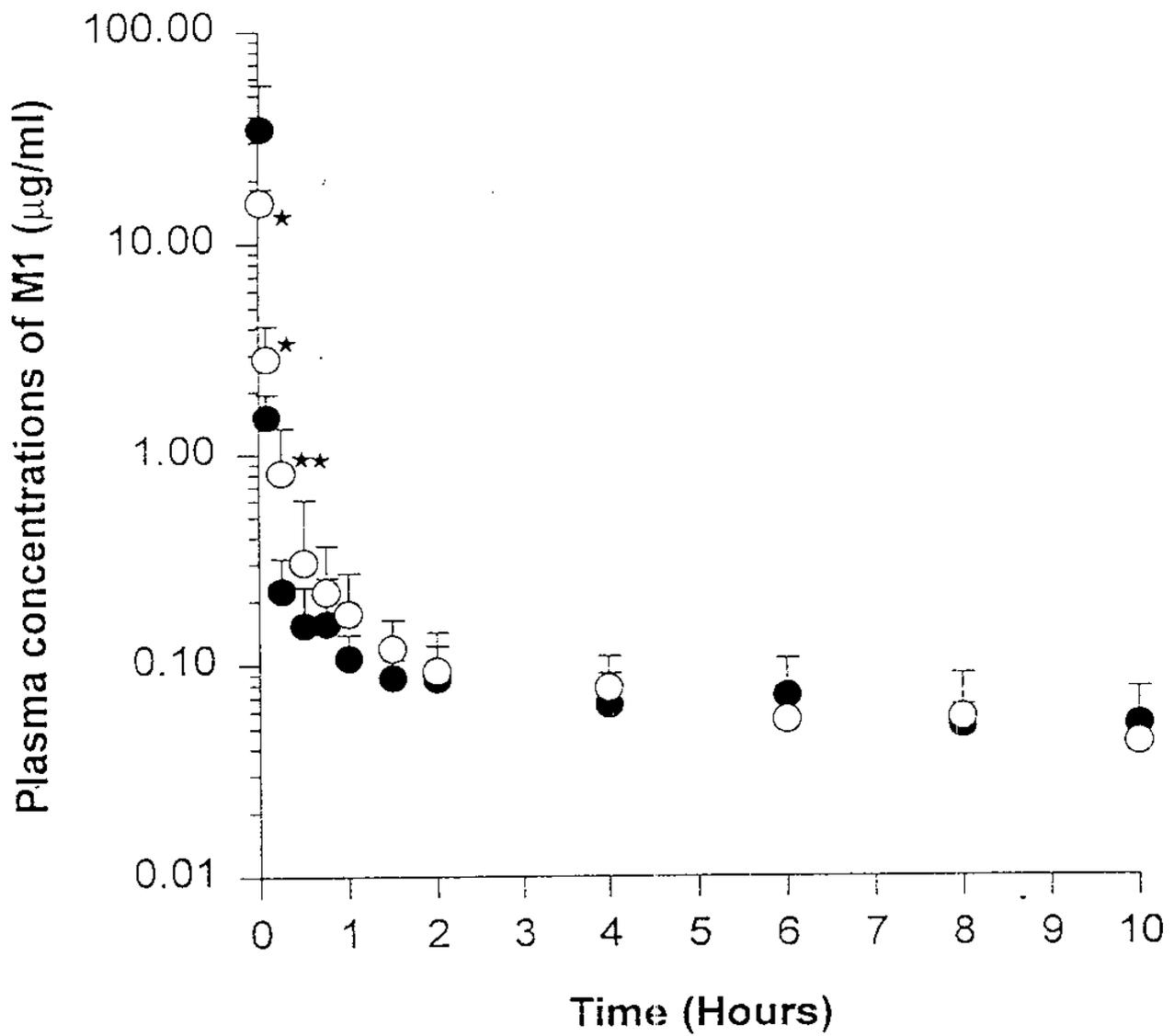
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Fig. 10. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M2 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to DOCA salt - treated rats (○) and its control (●).



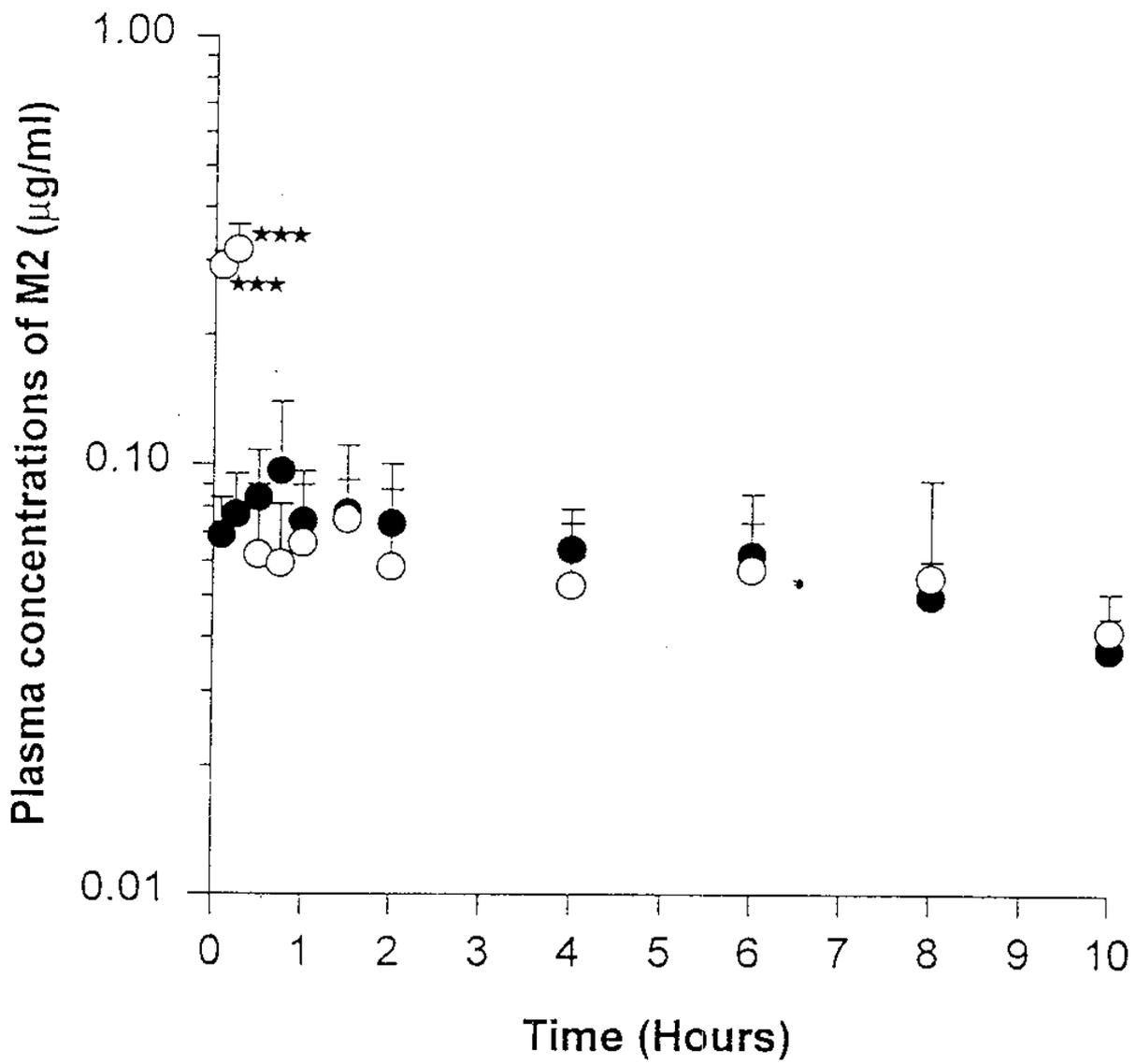
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Fig. 11. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M4 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to DOCA salt - treated rats (○) and its control (●).



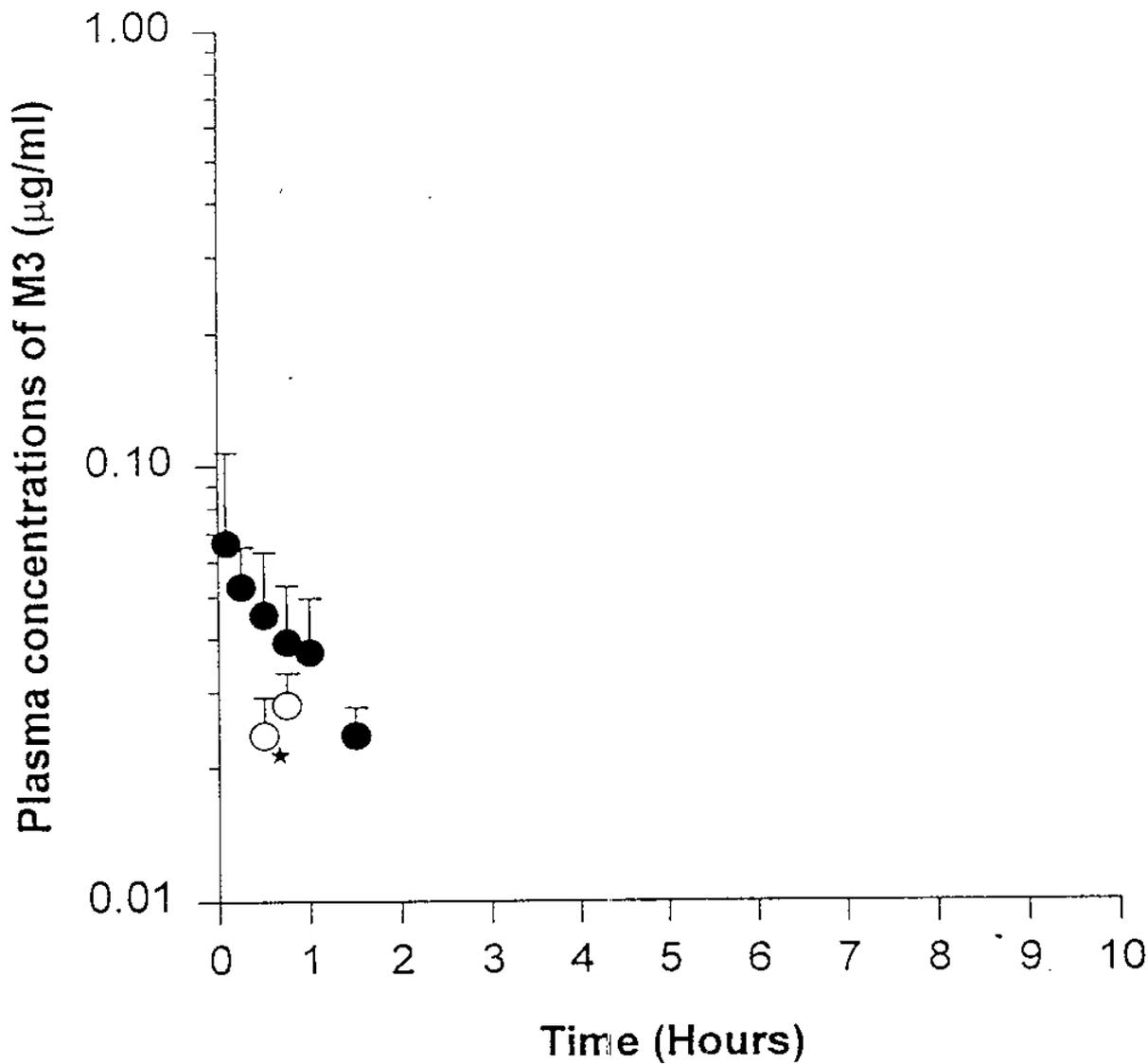
* p<0.05 ** p<0.01

Fig. 12. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M1 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg, to PCM rats (○) and its control (●).



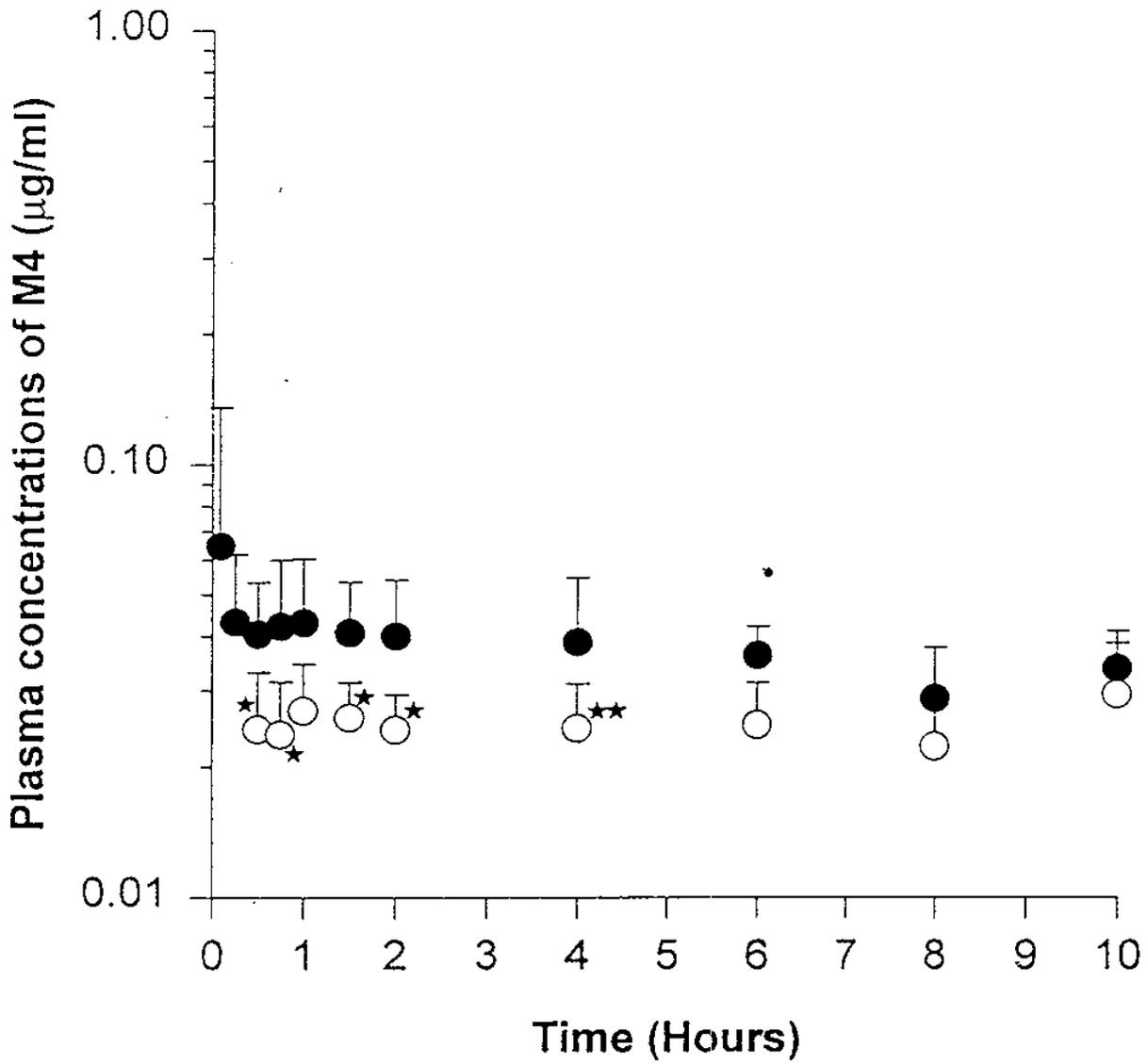
*** $p < 0.001$

Fig. 13. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M2 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg, to PCM rats (O) and its control (●).



* p < 0.05

Fig. 14. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M3 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg, to PCM rats (○) and its control (●).



* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Fig. 15. Mean arterial plasma concentration - time profiles of M4 after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg, to PCM rats (○) and its control (●).

Fig. 16-1

Plasma

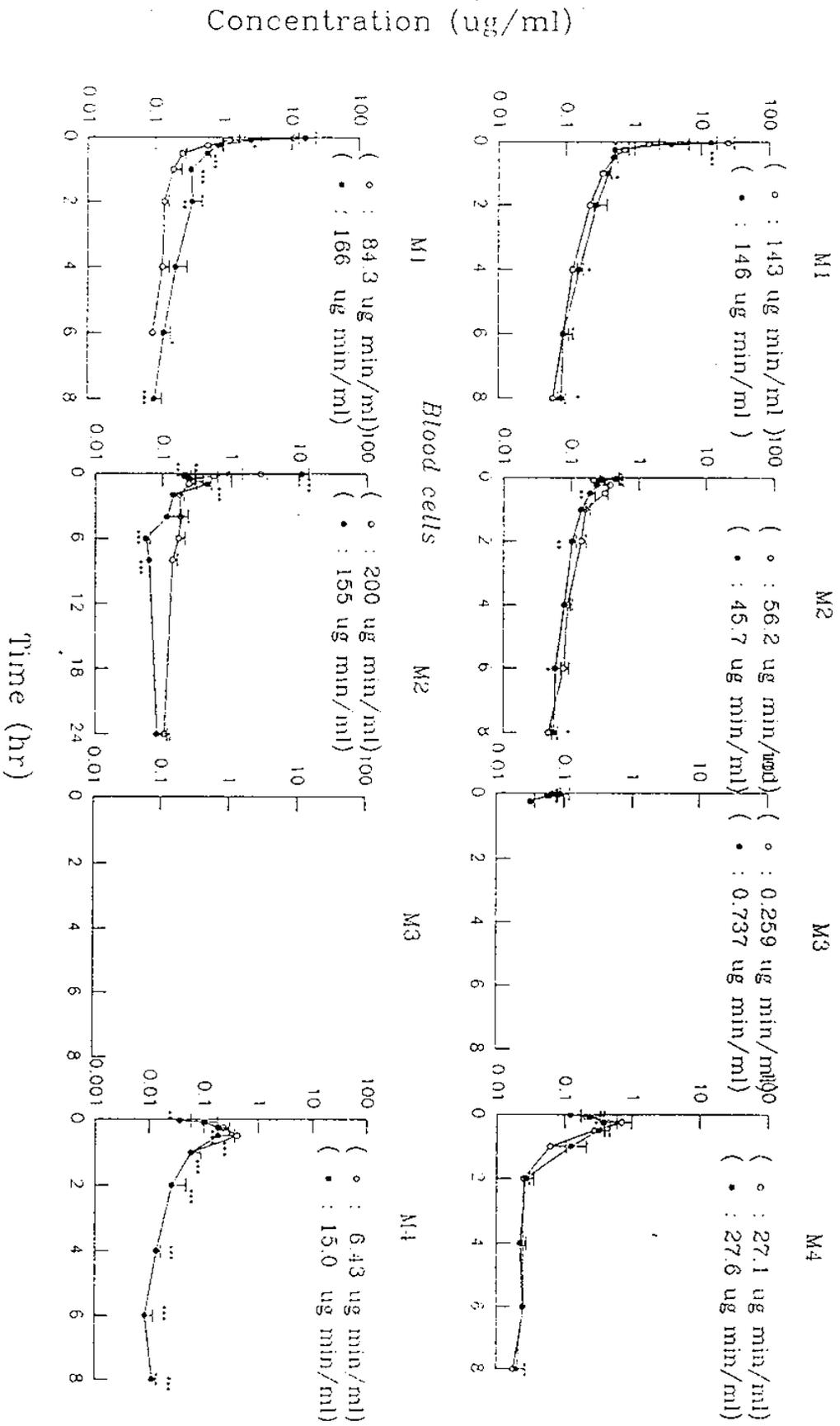
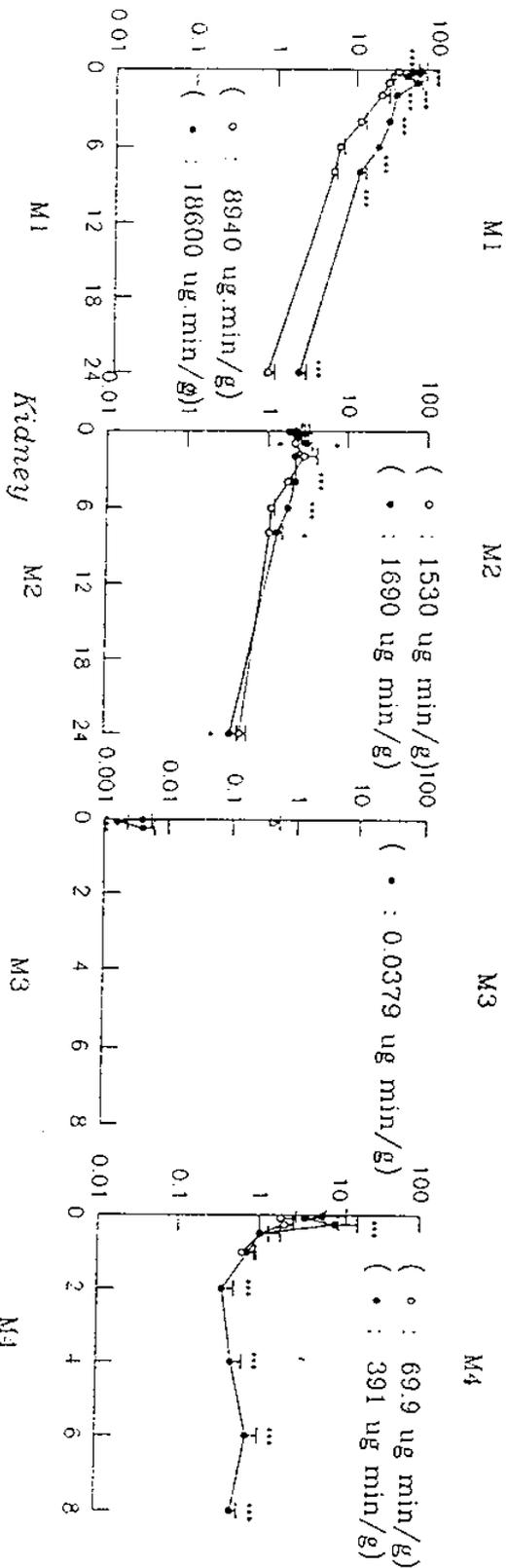


Fig. 16-2

Lung



Kidney

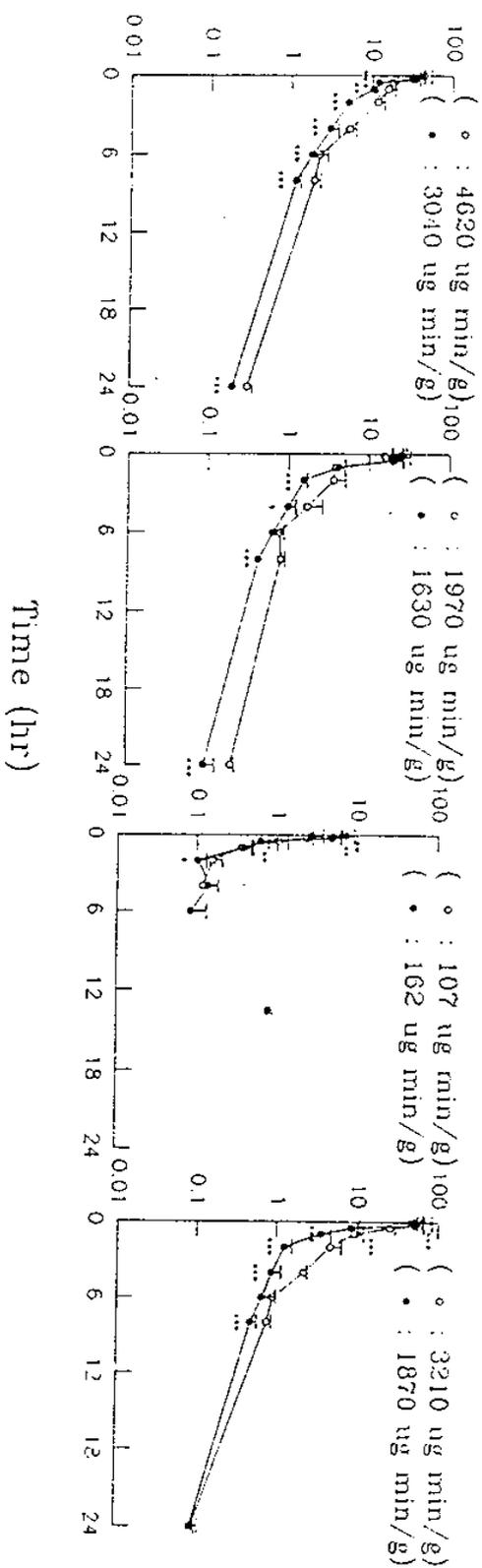
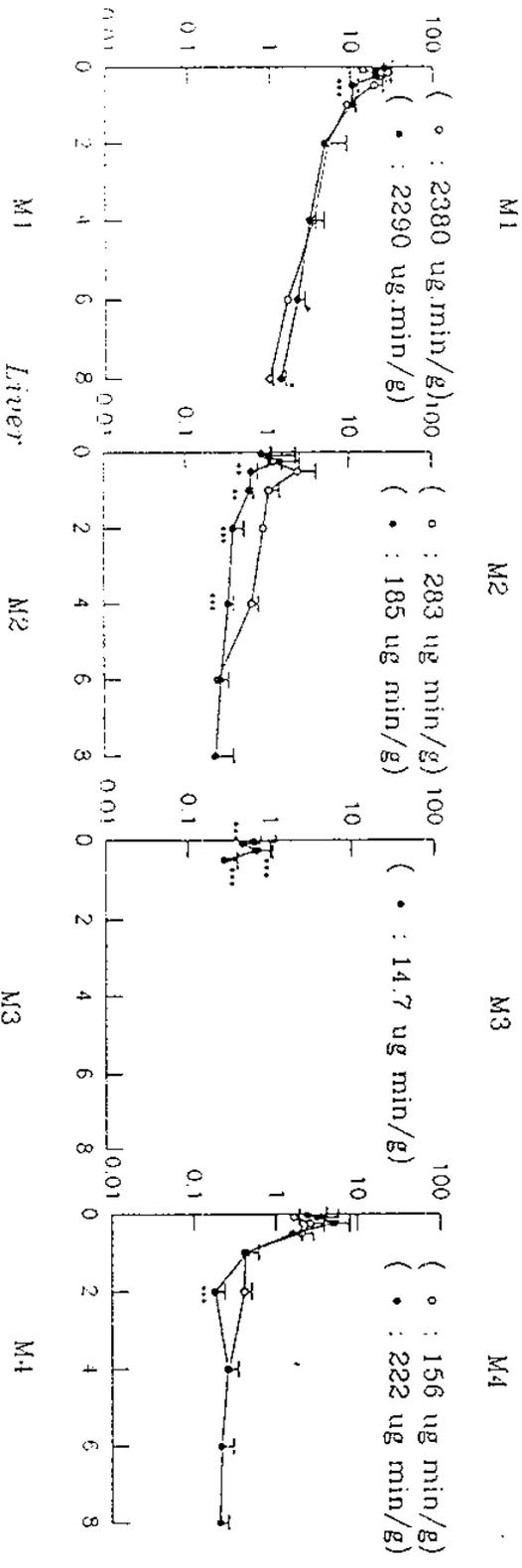
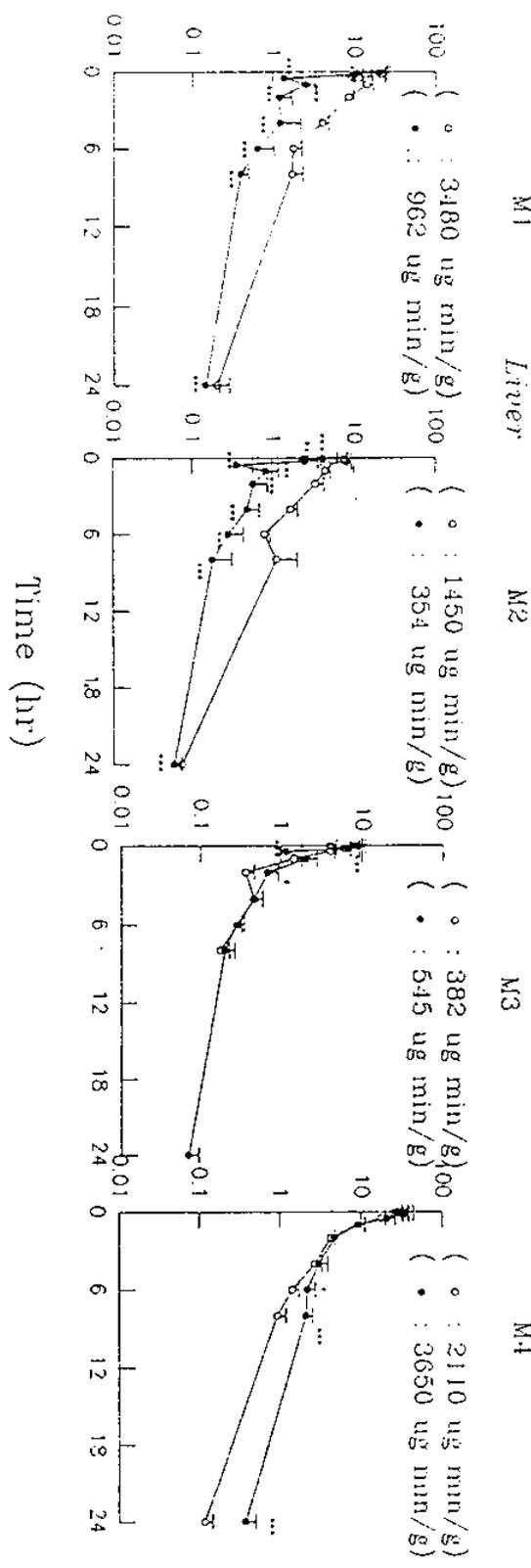


Fig. 16-3 Heart



Concentration (ug/g tissue)



Time (hr)

Fig. 16-4 Stomach

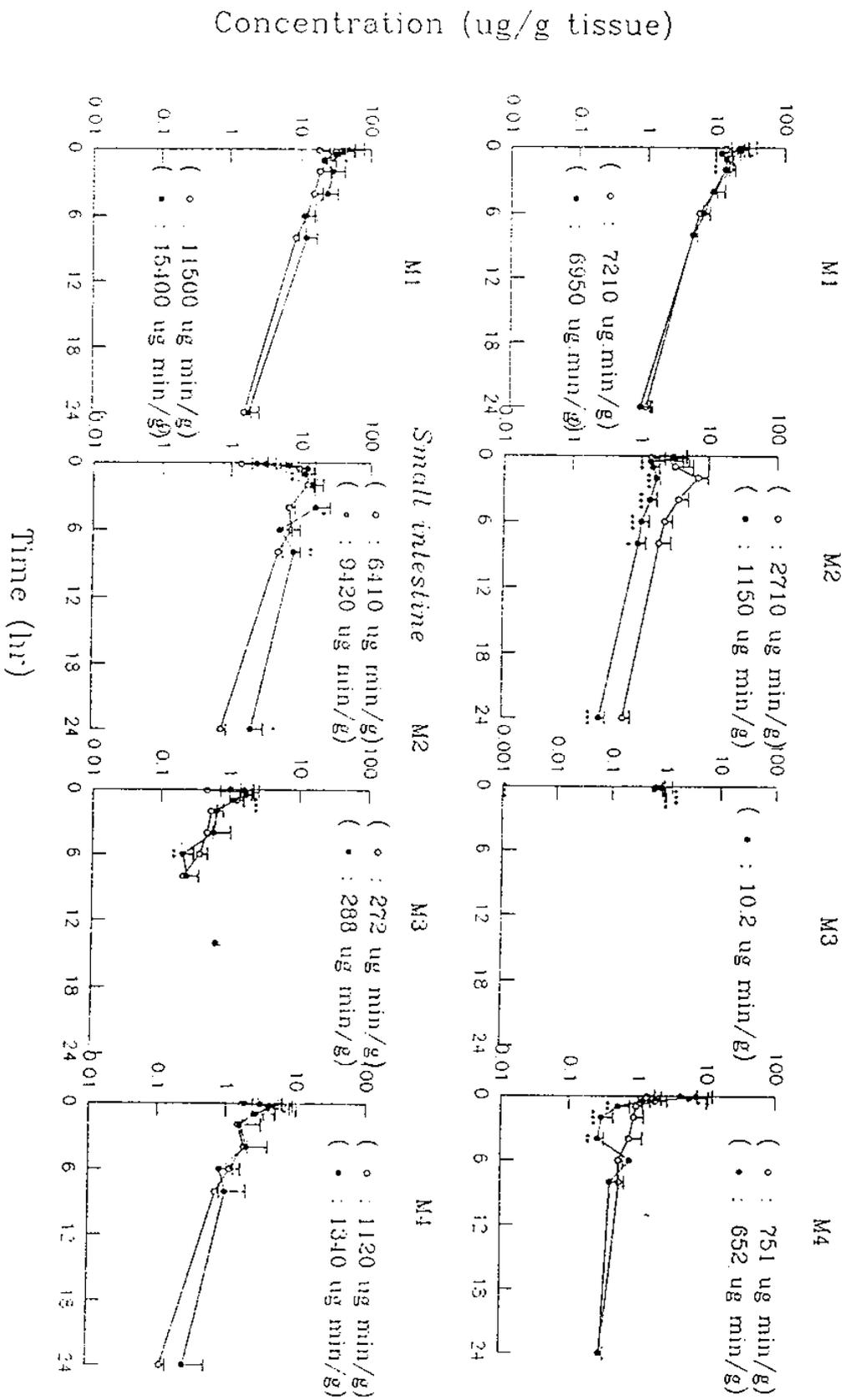


Fig. 16-5

Large intestine

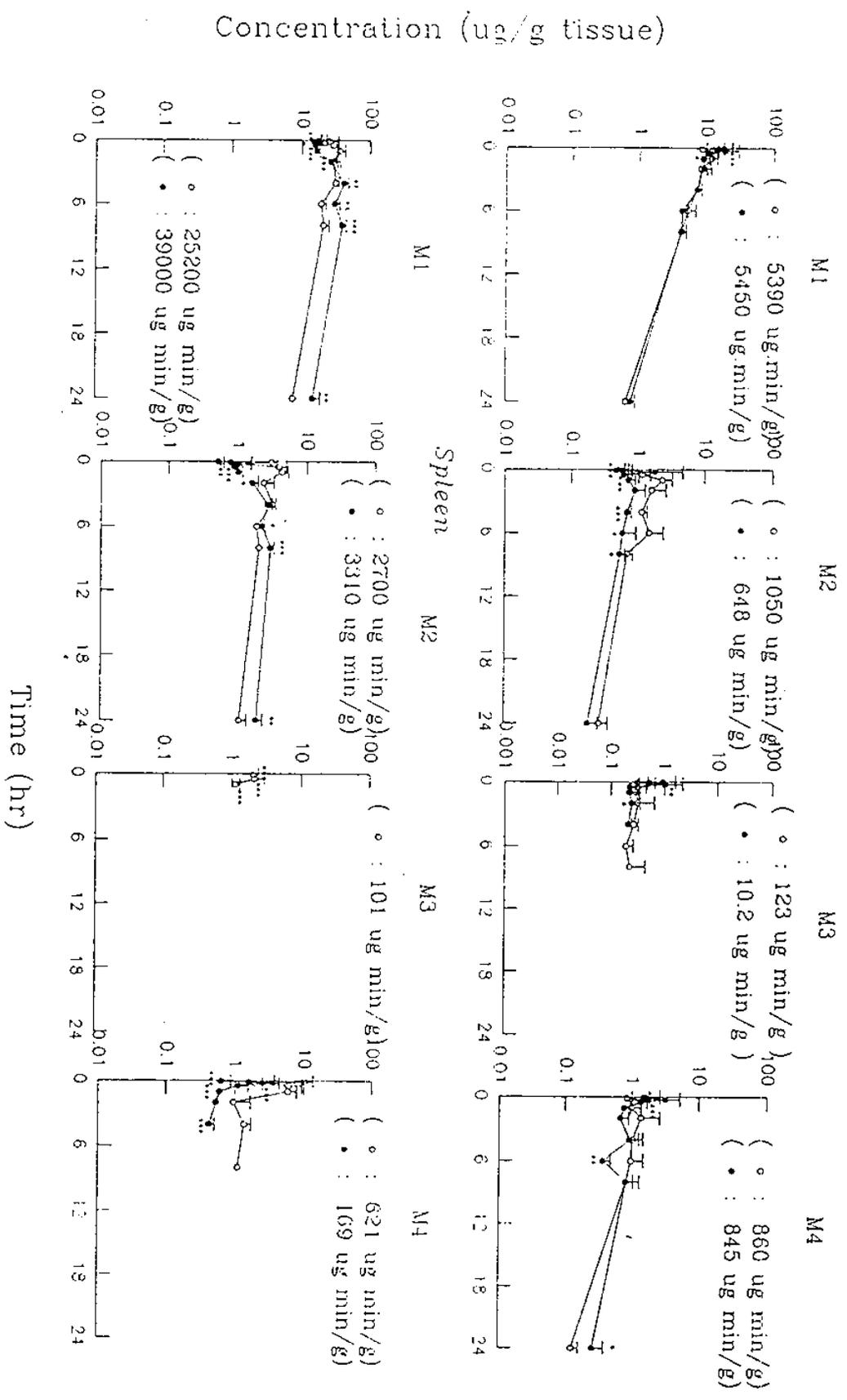


Fig. 16-6

Thymus

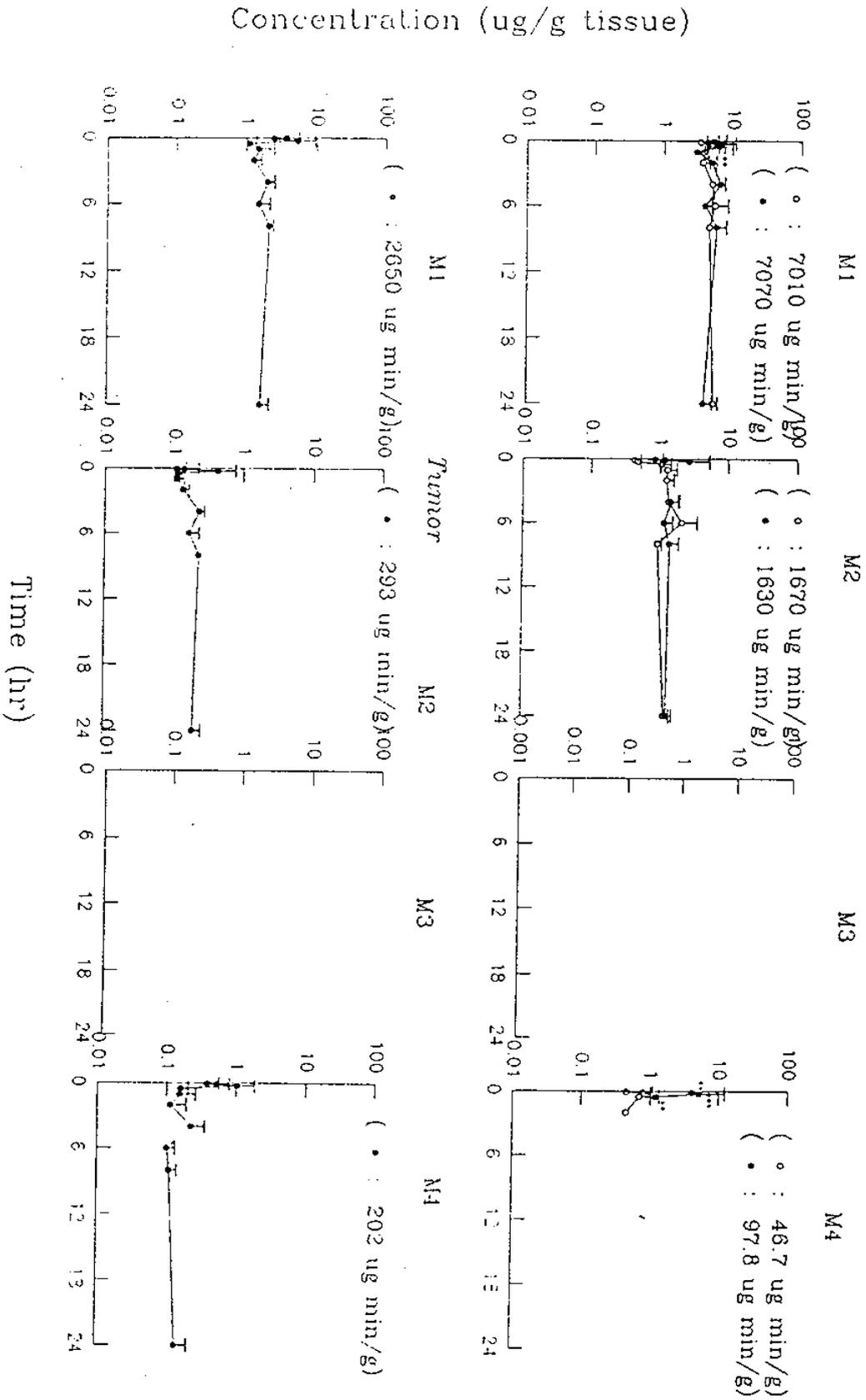


Table I. Effect of Dietary Protein on Body Weight, Food Intake and Certain Plasma, Urine and Hepatic Values in Male Rats (n=6)

Parameters	Protein Levels	
	5% (n=9)	23 (n=8)
Initial body weight (BW, g)	172 ± 6.94	119 ± 5.16
Final BW (g)	145 ± 7.82**	232 ± 21.7
Food intake (g/day/rat)	5.87	11.0
Protein intake (g/day/rat)	0.294	2.53
Calorie intake (Kcal/day/rat)	22.9	43.9
Liver weight (g)	4.49 ± 0.633***	10.6 ± 0.60
Liver weight (% of BW)	3.74 ± 0.423***	4.54 ± 0.16
Kidney weight (g)	1.27 ± 0.0915***	2.22 ± 0.23
Kidney weight (% of BW)	1.06 ± 0.0404**	0.944 ± 0.048
Stomach weight (g)	0.894 ± 0.05460***	1.05 ± 0.077
Stomach weight (% of BW)	0.746 ± 0.0404*	0.477 ± 0.045

* : p < 0.05

** : p < 0.01

*** : p < 0.001

Table 1 AUC and amount excreted in 24 h urine after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to spontaneously hypertensive rats (SHRs) and its control, Kyoto Wistar (KW) rats at 12 weeks.

	SHRs (n=7)				KW rats (n=9)			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
AUC ($\mu\text{g min/ml}$)	161 ± 15.9	68.9** ± 15.9	-	53.4* ± 14.1	153 ± 54.0	29.3 ± 15.3	2.81 ± 0.396	33.4 ± 14.9
Amount excreted in 24 h urine (μg)	8.94	271	-	10.4	9.28	232	-	2.63
% of dose excreted in 24 h urine	± 5.16 0.161 ± 0.0879	± 94.6 4.89 ± 1.66	-	± 14.8 0.254 ± 0.354	± 4.46 0.176 ± 0.0859	± 63.8 4.40 ± 1.21	-	± 1.51 0.0703 ± 0.0409

** : $p < 0.01$ and * : $p < 0.05$

Table 2 AUC and amount excreted in 24 h urine after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to spontaneously hypertensive rats (SHRs) and its control, Kyoto Wistar (KW) rats at 6 weeks.

	SHRs (n=5)				KW rats (n=6)			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
AUC ($\mu\text{g min/ml}$)	112 ± 29.5	85.4 ± 96.1	-	29.3 ± 6.83	161 ± 43.7	58.0 ± 21.7	18.7 ± 15.8	42.8 ± 12.4
Amount excreted in 24 h urine (μg)	6.37 ± 4.40	111 ± 47.3	0.990 ± 0.168	16.6 ± 15.7	6.55 ± 5.21	120 ± 77.4	1.26 ± 0.667	41.9 ± 36.3
% of dose excreted in 24 h urine	0.310 ± 0.221	5.40 ± 2.37	0.0675 ± 0.0118	1.12 ± 1.05	0.311 ± 0.250	5.65 ± 3.65	0.0838 ± 0.0454	2.75 ± 2.33

Table 3 AUC and amount excreted in 24 h urine after intravenous administration of DA-125, 20 mg/kg, to DOCA-treated rats and its control, Sprague-Dawley (SD) rats at 16 weeks.

	DOCA rats (n=8)				SD rats (n=13)			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
AUC ($\mu\text{g min/ml}$)	174* ± 82.4	130*** ± 22.5	-	92.0 ± 89.6	153 ± 54.0	29.3 ± 15.3	2.81 ± 0.396	33.4 ± 14.9
Amount excreted in 24 h urine (μg)	4.33 ± 4.07	149 ± 195	1.70 ± 1.52	35.0 ± 92.9	9.28 ± 4.46	232 ± 63.8	-	2.63 ± 1.51
% of dose excreted in 24 h urine	0.0660 ± 0.0604	2.30** ± 3.00	0.0367* ± 0.0340	0.771 ± 2.05	0.176 ± 0.0859	4.40 ± 1.21	-	0.0703 ± 0.0409

***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$ and *: $p < 0.05$

Table 4 AUC and amount excreted in 24 h urine after intravenous administration of DA-125, 10 mg/kg, to protein-calorie deficient (PCM) rats and its control rats.

	PCM rats (n=9)				Control rats (n=8)			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
AUC ($\mu\text{g min/ml}$)	91.8 ± 27.8	29.2 ± 8.62	-	11.2* ± 3.47	96.6 ± 33.6	28.2 ± 5.41	5.41 ± 2.75	15.6 ± 4.16
Amount excreted in 24 h urine (μg)	2.54* ± 1.75	48.1* ± 43.5	2.52 ± 1.70	60.7 ± 34.2	9.46 ± 6.84	146 ± 96.7	2.05 ± 1.15	43.4 ± 61.2
% of dose excreted in 24 h urine	0.210 ± 0.102	4.05 ± 3.71	0.341* ± 0.169	9.96 ± 3.96	0.504 ± 0.379	7.76 ± 5.21	0.151 ± 0.0803	3.24 ± 4.76

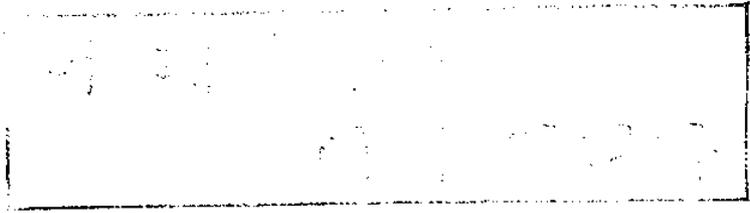
*: $p < 0.05$

Table 5. Mean pharmacokinetic parameters of M1 - M4 after intravenous administration of DA-125, 25 mg kg⁻¹, to the control BDF₁ mice (CM, n=5 at each sampling time) and subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma-bearing BDF₁ mice (TBM, n=10 at each sampling time)

	M1		M2		M3		M4	
	CM	TBM	CM	TBM	CM	TBM	CM	TBM
Amount excreted in 24 h urine* (µg) (% of the i.v. dose of DA-125)	3.81 (0.885)	3.37 (0.850)	38.0 (8.36)	42.2 (10.7)	UD ^b	UD	0.451 (0.137)	0.295 (0.105)
Plasma AUC _t (µg min ml ⁻¹)	143	146	56.2	45.7	0.259	0.737	27.1	27.6
CL (ml/min/kg)	144	147						
CL _R (ml/min/kg)	1.27	1.25	30.8	49.2			0.757	0.569

* : Expressed in terms of DA-125

^b : Under detection limit



위탁과제보고서 II

과제명 : DA-125 항종양치료제 장기독성연구

(생식독성시험(II) 및 13주 랫드아급성독성시험)

위탁 연구 기관 : 한국화학연구소 안전성센터

위탁연구책임자 : 정 문 구

연 구 원 : 하창수, 김형진, 김은주, 신천철, 김성훈,
이현결, 박종일, 장원철, 송시환, 차신우,
김정란, 최규갑, 유승룡, 김종춘, 이상준,
김희연, 김갑호, 마진열, 서정은, 이현숙,
배주현, 안종수, 양병철, 허정두, 김희영,
최희순, 최재문, 김영희, 홍미영

이 책의 저자
김영희 김희정

요약문

DA-125에 대한 독성평가연구의 일환으로 Sprague-Dawley계 rat를 이용한 주산기 및 수유기시험과 New Zealand White계 토끼를 이용한 최기형성시험을 실시하였다. 또한 rat에서의 6개월 만성독성시험의 용량결정시험으로 3개월 아급성독성시험을 완료하고 rat 및 dog에서의 6개월 만성독성시험을 실시중이다.

DA-125 0.04, 0.2 및 1 mg/kg을 SD rat에 임신 17일부터 포육 21일까지 정맥내 투여하여 모동물의 분만 및 수유 그리고 차세대동물의 성장 및 기능발달에 미치는 영향을 조사하였다. 시험결과 DA-125의 무해용량은 모동물과 차세대동물에서 0.2 mg/kg 그리고 조정후 남은 F1 랫드와 F2 태자에서 1 mg/kg 이상인 것으로 사료된다.

DA-125 0.2, 0.6 및 1.8 mg/kg을 New Zealand계 토끼에 기관형성기(임신 6일부터 18일)동안 정맥투여한 후 임신 28일에 제왕절개하여 시험물질이 모동물 및 태자발생에 미치는 영향을 조사하였다. 시험결과 DA-125의 무해용량은 모동물 및 태자에 있어서 모두 0.6 mg/kg 이하인 것으로 사료된다.

3개월 DRF시험으로 설정된 DA-125의 랫드에서의 6개월 만성독성용량은 0.032, 0.125, 0.5, 2.0 mg/kg이었다.



목 차

제 1 장	서 론	145
제 2 장	연구추진방법(실험방법)	147
제 1 절	랫트 주산기 및 수유기시험	147
1.	실험물질	147
2.	시험계	147
3.	사육환경	148
4.	투여량 및 시험군의 구성	150
5.	시험물질의 투여	151
6.	관찰 및 검사항목	152
7.	통계학적 분석	155
제 2 절	토끼 최기형시험	155
1.	시험물질	155
2.	시험계	156
3.	사육환경	156
4.	투여량 및 시험군의 구성	158
5.	시험물질의 투여	159
6.	관찰 및 검사항목	160
7.	통계학적 분석	161
제 3 절	랫트 아급성독성시험	162
1.	시험물질	162
2.	시험계	162
3.	사육환경	163

4. 투여량 및 시험군의 구성	165
5. 시험물질의 투여	167
6. 관찰 및 검사항목	167
7. 통계학적 분석	171
제 3 장 연구 결과 및 고찰	173
제 1 절 주산기 및 수유기 시험	173
1. 모동물에 미치는 영향	173
2. 차세대동물(F1)에 미치는 영향	174
3. F2 태자에 미치는 영향	177
4. 조정후 남은 F1랫트(포육 4일령)에 미치는 영향	177
제 2 절 토끼 최기형시험	178
1. 모동물에 미치는 영향	178
2. 태자에 미치는 영향	180
제 3 절 랫트 아급성독성시험	182
1. 일반증상 및 사망율	182
2. 체중	183
3. 사료섭취량	184
4. 물섭취량	184
5. 안검사	185
6. 뇨검사	185
7. 혈액학적 검사	185
8. 혈액생화학적 검사	186
9. 육안적 부검소견	186
10. 장기중량	187
11. 병리조직학적 검사	188

제 4 장	결 론	-----	191
제 5 장	참고문헌	-----	199



제 1 장 서 론

산업사회의 발달과 더불어 오늘날 인류는 수많은 화학물질의 홍수속에 살고 있다. 작업장에서의 화학물질에 대한 노출가능성은 과거보다 더욱 높아졌으며 의약품의 남용 또한 큰 사회적 문제로 등장하였다. 생체이물(xenobiotics)에 의한 신생아 기형유발, 남성 수정능력의 감소등은 피해자들에게 있어선 치명적인 일이 아닐 수 없다.

이 때문에 외부물질에 의한 생식독성학적 영향을 검색할 수 있는 민감한 동물모델과 평가모델을 개발, 확립하여 인체상황에 적용할 수 있는 신뢰성 있는 독성시험을 수행하는 일은 매우 중요하다고 판단된다.

역사적으로 볼 때 이미 19세기에 사람들은 인간과 동물에 있어서의 수태능력의 문제와 더불어 기형발현에 관심을 기울이기 시작했다^{1,2)}. 선천적 기형에 대한 학문적 접근은 Wolf(1939) 와 Gregg(1942) 가 톡소플라스마증(toxoplasmosis) 과 풍진(rubella)이 임신중 태아에 기형을 유발할 수 있다는 사실을 인식함으로써 처음으로 시작되었고³⁾ 이와 거의 동일한 시기에 외부물질(xenobiotics)이 여러 종류의 척추동물에서 기형을 유발할 수 있다는 사실이 발견되었다⁴⁾.

1961년도의 탈리도마이드(thalidomide) 사태⁵⁾를 계기로 표준화된 실험모델의 개발을 위한 국제적인 노력이 시도되었고⁶⁾ 1996년 1월 미국 식품의약국에 의해 발표된 FDA 생식독성 시험기준으로 종결지어졌다⁷⁾. 그 후 이 시험법은 우리나라는 물론 다른 선진국에서도 받아들여 현재 그대로 적용되고 있는 실정이다.

본 연구는 신규 항종양성 항생제 DA-125 에 대한 장기독성 연구의 일환으로 일차적으로 본 약제가 인체의 태아 형성과 출생후의 기능발달에 미치는 영향을 동물실험을 통하여 미리 예측하고 아울러 신의약품의 등록시 요구되는 독성시험자료를 확보하기 위하여 실시하였다. 이를 위해 랫트 주산기 및 수유기 시험과 토끼 최기형 시험을 실시하였으며 모동물, 태자 및 차세대동물에 대한 무

해용량을 파악하였다. 또한 DA-125 의 랫트 만성독성시험을 위한 예비시험의 일환으로 랫트 13주 아급성독성 시험을 실시하였으며 이에 그 결과를 보고하고자 한다. 그리고 개 만성독성시험은 개 아급성독성시험의 성적을 기초로 암수 공히 0, 0.0023, 0.0375, 0.15, 및 0.6 mg/kg 의 용량으로 현재 수컷은 17주째 그리고 암컷은 16주째 투여중에 있으며 그 결과는 내년도 연차 보고서에 발표할 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 장 연구추진방법(실험방법)

제 1 절 랫트 주산기 및 수유기시험

1. 시험물질

- 가. 명 칭 : DA-125
- 나. 시험기관내 코드번호 : K-254
- 다. 제조번호 : DA-125-039
- 라. 입 수 일 : 1993년 11월 5일
- 마. 입 수 량 : 2 g (500 mg/vial x 4 vials)
- 바. 외 관 : 적색분말
- 사. 보관조건 : 냉장보관
- 아. 공 급 자 : (주) 동아제약 연구소

2. 시험계

가. 종 및 계통

SD 계통의 특정병원체부재(SPF) 랫트

나. 공급원

한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물 육종실

다. 시험계의 선택이유

랫트는 독성시험에 적당한 실험동물로서 생식독성시험에 널리 사용되고 있으며, 또한 본 계통의 랫트는 풍부한 기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과 의 해석 및 평가시에 이러한 자료를 이용하는 것이 가능하다.

라. 주령 및 체중범위

- 입수시 주령 : 9~10 주령
- 입수시 동물수 : 암컷 200마리, 수컷 100마리
- 사용 동물수 : 교미확인된 암컷 100마리
- 군분리시 주령 : 10~11 주령
- 군분리시 체중범위 : 203.0~279.9 g
- 투여개시시 주령 : 13~14 주령
- 투여개시시 체중범위 : 212.2~411.0 g

마. 검역 및 순화

동물입수시 검역실에서 육안적 검역을 실시한 후 해당 동물실로 반입하였다. 동물입수후 1주일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시켰다. 순화기간중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 교배시켜시험에 사용하였다.

3. 사육환경

가. 환경조건

본 시험은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 13~18회/hr., 조명시간 12시간(오전 9시~오후 9시), 조도 200~300Lux로 설정된 한국화학연구소 안전성연구센터 BS-2동의 4호실에서 실시되었다. 시험종사원들은 모두 고압증기멸균(121°C , 30분) 또는 ethylene oxide gas 멸균된 작업복, 두건, 마스크, 장갑, 장화 등을 착용하고 Air 샤워를 거쳐 동물실에 입실한 뒤 작업을 실시하였다. 동물사육실이나 시험에 필요한 기자재는 파콤 A, 브롬셴트 및 70% 이소프로필 알콜로 각각 소독 및 멸균을 실시하여 동물시험실에 반입후 사용하였다.

나. 사육환경모니터링

시험기간의 사육기간 중, 동물실의 온, 습도는 자동온습도측정기에 의하

여 매시간마다 측정되었으며, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적(월1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험에 영향을 미칠것으로 사료되는 변동은 인정되지 않았다.

다. 사육상자, 사육필도 및 사육상자의 식별

순화기간 중에는 폴리카보네이트 사육상자(240W x 390L x 175Hmm)에 5마리씩, 그리고 임신기간 중에는 1마리씩 넣어 수용하였다.

교배시에는 스테인레스제 철망사육상자(195W x 330L x 175H mm)에 암수 각각 1마리씩 또는 2:1 씩 넣어 동거시켰다. 포육기간 중에는 모동물과 전포육태자를 그리고 이유후에는 F1 동물 3마리씩을 상기의 폴리카보네이트 사육상자에 수용하였다. 사육상자에는 시험번호 및 동물번호 및 투여량을 기입한 개체식별카드(매체대조군:백색, T1:황색, T2:녹색, T3:주황색)를 부착하였다.

라. 사료 및 물

(1) 사료 및 물의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료(제일사료주식회사)를 방사선조사 (2.0 Mrad) 멸균하여 자유섭취시켰으며 물은 상수도를 자외선 살균기로 소독시킨후 자유섭취시켰다.

(2) 사료분석 및 사료중 오염물질의 확인

사료의 조성분석(검사기관 : 제일사료주식회사), 미생물검사(검사기관 : 당연구소 실험동물의학실), 오염물질검사(검사기관 : 당연구소 환경독성연구실)를 실시한 결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

(3) 물중의 오염물질의 확인

물에 대하여는 대전직할시 보건환경연구원에 의뢰하여 일반수질 검사를 실시하였다. 물중의 오염물질 분석에 있어서 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

4. 투여량 및 시험군의 구성

가. 투여량 설정

랫트 수태능력시험(S-304)과 랫트 최기형시험(S-293)의 용량 및 시험성적을 참조하여 1 mg/kg/day 를 고용량으로 정하고 공비 5로 중용량 및 저용량을 0.2 및 0.04 mg/kg/day 로 설정하고 그외에 매체(1 mMol L(+) Lactic acid) 대조군을 두었다.

나. 시험군의 구성

군	성 별	동물수 (마리)	계획도살 동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg/day)
매체대조군 (vehicle)	female	25	1~25	1	0
저용량군 (T1)	female	25	26~50	1	0.04
중용량군 (T2)	female	25	51~75	1	0.2
고용량군 (T3)	female	25	76~100	1	1.0

다. 교배방법 및 임신유무 판정

철망사육상자에 암수 1:1 혹은 2:1의 비율로 동거시켰으며 질도말시 정충이 확인된 날을 임신 0일로 정했고 임신 유무의 최종판정은 자연분만시 태자의 출산 혹은 부검시 자궁의 착상흔적에 의해 실시하였다.

라. 군분리 및 동물식별

교미가 확인된 동물에 대하여 체중을 측정한 후 '리'자법에 의해 군분리를 실시하였다. 그리고 동물의 개체식별은 ear-punch 법을 이용하여 실시하였다.

5. 시험물질의 투여

가. 투여액의 조제법 및 조제빈도

1 mM L(+) Lactic acid 를 측정하여 생리식염수에 녹여 pH4.0으로 조정하여 vehicle 을 만들고 최고용량의 시험물질을 측정하여 vehicle에 녹여 투여 직전에 단계별로 희석하여 조제하였다.

나. 투여액중의 시험물질의 균질성 측정

조제된 투여액중의 일부를 채취하여, 시험물질의 균질성 측정을 실시하였다. 측정결과, 시험의 결과에 영향을 미칠만한 변동은 발견되지 않았다.

다. 투여경로 및 투여방법

동물의 미정맥내로 주사기와 주사바늘(25G)을 이용하여 2 ml/min의 속도로 시험물질을 투여하였다.

라. 투여경로 선택이유

선택된 투여경로는 사람의 임상예정 경로와 일치한다.

다. 투여기간

임신 17일부터 분만후 21일까지 1일 1회 오전중에 연속투여하였다.

바. 투여액량 계산

임신기간 중에는 임신 17일의 체중을, 포육기간 중에는 포육 0, 7 및 14일의 체중을 기초로 투여액량을 산출하였다.

6. 관찰 및 검사항목

가. 일반증상 관찰

시험기간중 1일 1회, 동물의 일반상태, 중독증상 및 사망유무에 관해서 관찰하였고, 투여기간중에는 투여 전후 1일 2회 관찰하였다.

나. 체중측정

각군의 모든 어미동물에 대하여 임신기간중에는 임신 0, 7, 10, 14, 17 및 20일에 그리고 포육기간중에는 포육 0, 7, 14 및 21일에 체중측정을 실시하였다.

다. 사료섭취량측정

체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다. 단, 제왕절개를 실시한 동물은 임신 19일에 그리고 포육 21일 부검을 실시한 동물은 포육 20일에 급여한 후 다음날 잔량을 측정하였다.

라. 임신, 포육기간중 관찰항목

(1) 임신, 분만상태의 관찰

유산, 조산 및 난산등의 이상을 관찰하였다.

(2) 분만일의 관찰

임신기간, 생존자수, 사산자수, 성별 및 외포이상을 관찰하였다.

(3) 포육기간중의 관찰

어미동물의 포육상태 및 사망자수에 관해서 관찰하였다. 이상의 관찰기록으로부터 다음의 자료를 산출하였다.

- 출산율 = (생존자를 출산한 모동물수/임신동물수)
- 성 비 = 수컷출생자수/암컷출생자수
- 포육 4일 생존율 = (포육 4일째의 조정전 생존자수/포육 0일째 생존자수) x 100
- 이유율 = (포육 21일째 생존자수/포육 4일째 조정자수) x 100
- 임신기간 등

다. 모동물의 해부검사

(1) 부 검 : 모든 모동물을 포육 21일째 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다.

(2) 장기중량 : 모든 부검동물에 대해 아래 장기의 습중량을 측정 하였다. 간장, 신장, 비장, 심장, 뇌, 부신, 난소

바. 차세대동물의 검사

모든 임신동물을 자연분만시켜 얻은 F1 동물을 생후 4일째에 각 어미동물에 대하여 암수 각각 4마리씩 되게 조정하고 각 시험군에 암수 각각 1마리씩 속하도록 4개의 시험군으로 나누는 후, 하기 4항목의 시험을 실시하였다. 그리고 조정후 남은 포육 생존자에 대해서는 Wilson 법⁸⁾, 현미해부법⁹⁾ 그리고 변형된 Dawson 법¹⁰⁾에 따라서 내장 및 골격검사를 실시하였다.

(1) 이유부검

이유일(포육 21일)에 부검을 실시하여 주요장기의 병변여부를 조사 하였다.

(2) 성장시험

(가) 일반증상관찰 : 매일 1회 동물의 일반증상을 관찰하였다.

(나) 체중측정 : 포육 0일부터 10주령까지 주1회 체중을 측정하였다.

(다) 발육분화 : 이개개전, 안검개열, 절치붕출, 피모발생, 정소하강, 질개구 등을 관찰하였고 분화가 완료된 포육일수를 기록하였다.

(라) 부검 : 10주령째에 부검하여 모든 동물에 관해서 아래 장기의 습중량을 측정하였다. 간장, 신장, 비장, 심장, 뇌, 부신, 난소 또는 고환

(3) 생식기능시험

(가) 교배 : 원칙적으로 형매교배를 피하여 암수를 10주령 이후에 동일군내의 동물끼리 교배시킨 후 아래와 같은 자료를 산출하였다.

- 교미율 : $(\text{교미확인 동물수} / \text{교배동물수}) \times 100$
- 수태율 : $(\text{임신시킨 동물수} / \text{교미확인 동물수}) \times 100$
- 임신율 : $(\text{임신된 동물수} / \text{교미확인 동물수}) \times 100$

(나) 체중측정 : 교미확인 암컷동물에 대해서 임신 0, 7, 14, 20 일에 체중을 측정하였다.

(다) 부검 : 수컷은 교미종료후에 그리고 임신암컷동물은 임신 20일째에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다.

(라) 제왕절개 : 임신 20일째 제왕절개하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 생존태자의 성별, 흡수배아수, 사망태자수, 생존태자의 체중, 외포 이상 등을 조사하고 그것을 기초로 다음과 같은 자료를 산출하였다.

- 착상율 = $(\text{착상수} / \text{임신황체수}) \times 100$
- 성비 = 수컷 생존태자수 / 암컷 생존태자수
- 생존태자의 암수별 평균체중 등

(4) 행동학습기능시험

아래 항목에 대한 행동기능검사를 실시하였다.

- 정향반사, 부주지성, 견인력, 동공반사, 청각반사
- 회전봉시험
- Open field test
- 수미로시험

7. 통계학적 분석

얻어진 시험자료에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 일반적으로 전체적인 검사항목에 대하여 일원배치분산분석을 유의수준 $\alpha=0.05$ 로 검정한 결과 유의한 결과가 나타날 경우에는 매체대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 검사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett's test 를 실시하였다. 빈도수를 나타내는 검사항목에 대해서는 순위화한 데이터를 이용한 비모수적 방법인 Kruskal-wallis's H test 를 실시하고, $p<0.05$ 인 경우 Dunnett's test 를 이용하여 군간의 유의차를 조사하였다. 일반증상 및 부검소견은 백분율 (frequency)로 표시하였다. 태자의 검사항목 중에서 성비에 관한 데이터는 '수컷생존태자수/생존태자수'을 계산하였으며 기억력검사의 분석은 X^2 검정을 실시하였다. 검정의 위험율은 5% 및 1%로 정하였다.

제 2 절 토끼 최기형시험

1. 시험물질

- 가. 명 칭 : DA-125
- 나. 시험기관내 코드번호 : K-254
- 다. 제조번호 : DA-125-039
- 라. 입 수 량 : 5 g (500 mg/vial x 10 vials)

마. 입수일 : 1993년 9월 21일

바. 외관 : 적색분말

사. 보관조건 : 냉장보관

아. 공급자 : 동아제약주식회사

2. 시험계

가. 종 및 계통

Rabbit, New Zealand White

나. 공급원

삼육실험동물연구센터 (경기도 오산시 서랑동 77-1)

다. 시험계의 선택이유

토끼는 실험동물로서의 역사가 길고 기초자료가 풍부하기 때문에 생식독성시험에 많이 이용되고 있다.

라. 주령 및 체중범위

- 입수시 동물수 : 교미확인된 암컷 84 마리
- 사용동물수 : 교미확인된 암컷 84 마리
- 투여개시시 주령 : 4~6개월령
- 투여개시시 체중범위 : 2.8~4.3 kg

마. 순화 및 검역

임신동물을 입수하기 때문에 순화기간은 없고 검역은 실험동물 공급원에서 실시했으며 일반증상관찰 및 체중측정시 이상이 인정되지 않는 건강한 동물만을 교배시켜 시험에 제공하였다.

3. 사육환경

가. 환경조건

본 시험은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 10~20회/hr., 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시), 조도 200~300 Lux로 설정된 한국화학연구소 안전성연구센터 중동물동의 5호실에서 실시되었다. 시험종사원들은 작업복, 두건, 마스크, 장갑, 장화등을 착용하고 동물실에 입실한 뒤 작업을 실시하였다.

나. 사육환경모니터링

시험기간의 사육기간 중, 동물실의 온습도는 자동온습도측정기에 의하여 매시간 마다 측정되었으며, 환기횟수, 조도 등의 환경조건은 정기적(월 1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

다. 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

시험기간중에는 스테인레스제 사육상자(500W x 420L x 340H mm)에 1 마리씩 넣어 사육하였다. 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 투여량을 기입한 색채식별카드(매체대조군 : 백색, T1 : 황색, T2 : 녹색, T3 : 주황색)를 부착하였다.

라. 사료 및 물

(1) 사료 및 물의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료(퓨리나코리아)를 자유섭취시켰으며, 물은 상수도수를 자외선살균기로 소독시킨 후 자유섭취시켰다.

(2) 사료의 일반성분 및 오염물질의 확인

사료의 조성분석(검사기관 : 퓨리나코리아 사료주식회사) 및 오염물질검사(검사기관 : 당센터 환경독성연구실)를 실시한 결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

(3) 물중의 오염물질의 확인

물에 대하여는 대전직할시 보건환경연구원에 의뢰하여 일반수질 검사를 실시하였다. 물중의 오염물질 분석에 있어서 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

4. 투여량 및 시험군의 구성

가. 투여량 설정

0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 및 3.0 mg/kg 의 6개 용량으로 예비시험(T-555)을 실시한 결과 3 mg/kg 군에서는 75%의 사망율이 나타났으나 그밖의 투여군에서는 어떠한 독성학적 반응도 관찰되지 않았다. 이를 기초로 1.8 mg/kg/day 를 고용량으로 정하고 공비 3으로 중용량 및 저용량을 0.6 및 0.2 mg/kg/day 로 설정하고 그외에 매체(1 mmol L(+) Lactic acid) 대조군을 두었다.

나. 시험군 구성

군	성 별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg/day)
매체대조군 (vehicle)	Female	21	1~21	0.2	0
T1	Female	21	22~42	0.2	0.2
T2	Female	21	43~63	0.2	0.6
T3	Female	21	64~84	0.2	1.8

다. 교배방법 및 판정

철망사육상자에 수컷과 암컷을 무작위로 1:1 로 동거교배(실험동물 공급원에서 실시)시켜 1회 이상의 교미동작이 확인된 날을 임신 0일로 정했고 최종판정은 제왕절개시 자궁의 착상흔적에 의해 실시하였다.

라. 군분리 및 동물식별

교미가 확인된 동물에 대하여 체중을 측정한 후 "르"자법에 의해 군분리를 실시하였다. 그리고 모동물의 개체식별을 위해 교미확인일에 흑색매직으로 개체번호를 동물의 우측귀에 표시하였다.

5. 시험물질의 투여

가. 투여액의 조제법 및 조제빈도

1 mMol L(+) Lactic acid 를 측정하여 생리식염수에 녹여 vehicle을 만들고 최고용량의 시험물질을 측정하여 vehicle 에 녹여 투여직 전에 단계별로 희석하여 조제하였다.

나. 투여액중의 시험물질의 균질성

조제된 투여액중의 일부를 채취하여, 시험물질의 균질성 측정을 실시하였다. 측정결과, 시험의 결과에 영향을 미칠만한 변동은 발견되지 않았다.

다. 투여경로 및 투여방법

동물의 이정맥에 주사기와 주사바늘(26G)을 이용하여 시험물질을 투여하였다.

라. 투여경로 선택이유

선택된 투여경로는 임상적용 예상경로와 일치한다.

마. 투여기간

임신 6일부터 임신 18일까지 1일 1회 오전중에 연속투여하였다.

바. 투여액량 계산

임신 6일, 임신 10일 및 임신 14일의 체중을 기준으로 해서 투여액량을 산출하였다.

6. 관찰 및 검사항목

가. 일반증상 관찰

시험기간중 1일 1회, 투여시에는 전후 2회, 동물의 일반증상, 중독증상, 유산, 조산 및 사망유무에 관해서 관찰을 실시하였다.

나. 체중측정

각 군의 전 어미동물에 대하여 임신 0, 6, 10, 14, 18, 23, 28일에 체중을 측정하였다.

다. 사료섭취량 측정

체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다. 단, 제왕절개로 인해 임신 27일에 급여한 후 다음날 잔량을 측정하였다.

라. 해부검사

(1) 부검

시험에 사용된 전 어미동물을 임신 28일째 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였고 이상장기에 대해서는 10% 포르말린에 고정하였다.

(2) 장기중량

부검동물에 대해서 간장, 신장, 비장, 심장, 흉선, 부신 및 난소의 습중량을 측정하였다.

다. 제왕절개

전 임신동물을 임신 28일째 부검하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수배아(태자)수, 사망태자수, 생존태자의 개체별 체중등을 조사하고 그것을 기초로 하여 다음과 같은 자료를 산출하였다.

- 착상율 = (착상수/임신황체수) x 100
- 성 비 = 수컷생존태자수/암컷생존태자수
- 생존태자의 암수별 평균체중 등

바. 태자의 형태학적 검사

(1) 외표검사

생존태자를 자궁에서 적출한 후 즉시 외표이상의 유무에 대하여 관찰하였다.

(2) 내부장기검사

모든 생존태자에 대해서 제왕절개일에 또는 태자의 냉장보관후 신선 태자의 내부장기 검사법¹¹⁾에 따라 내부장기 이상유무를 검사하였으며 이 때에 태자의 성별을 확인하였다.

(3) 골격검사

내부장기 검사후 모든 태자를 알콜에 고정한 후 Dawson 법¹⁰⁾에 따라 골격표본을 제작한 후 골격이상 유무 및 골화상태에 대하여 검사하였으며 검사종료후 골격검체를 모체별로 보존하였다.

7. 통계학적 분석

얻어진 데이터에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 일원배치 분산분석(ANOVA)을 실시하여 $p < 0.05$ 일 때 Dunnett검정 혹은 Scheffe 검정법을 실시하여 매체대조군과 유의한 차이가 있는 처치군을 알아보았다. 시험자료가 빈도수를 나타낼 경우에는 Kruskal-Wallis 의 H검정($p < 0.05$)법을 실시하고 순위화한 자료를 이용한 Dunnett 형의 검정 혹은 Scheffe 형 검정을 행하였

다. 출현율 및 백분율에 대한 데이터는 자료의 정리로써 표현되거나 혹은 순위화한 H검정을 실시하였다. 통계학적인 유의성은 위험율 1% 혹은 5%에서 검사하였다. 태자에 대한 시험자료는 모체단위로 해서 태자들의 성비, 평균체중, 황체수, 흡수태자수, 사망태자수, 외포기형, 내부장기기형 및 골격기형 발현율에 대하여 통계분석하였다.

제 3 절 랫트 아급성독성시험

1. 시험물질

- 가. 명 칭 : DA-125
- 나. 시험기관내 코드번호 : K-254
- 다. 로트번호 : DA-125-039
- 라. 입 수 일 : 1993년 9월 21일
- 마. 입 수 량 : 5 g
- 바. 외 관 : 적색분말
- 사. 순 도 : 첨부자료 참고
- 아. 보관조건 : 냉장보관
- 자. 공 급 자 : (주) 동아제약 연구소

2. 시험계

가. 종 및 계통

SD 계통의 특정병원체부재(SPF) 랫트

나. 공급원

한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물 육종실

다. 시험계의 선택이유

랫트는 독성시험에 적당한 실험동물로서 아급성독성시험에 널리 사용되고 있으며, 또한 본 계통의 랫트는 풍부한 기초자료가 축적되어 있어서, 시험 결과의 해석 및 평가시에 이러한 자료를 이용하는 것이 가능하다.

라. 주령 및 체중범위

- ◎ 수컷 ◦ 구입시 주령 : 4 주령
 - 구입시 동물수 : 60 마리
 - 구입시 체중 : 72.0~118.3 g
 - 투여개시시 주령 : 6 주령
 - 투여개시시 동물수 : 54 마리
 - 투여개시시 체중 : 149.5~203.1 g
- ◎ 암컷 ◦ 구입시 주령 : 4 주령
 - 구입시 동물수 : 60 마리
 - 구입시 체중 : 66.2~102.2 g
 - 투여개시시 주령 : 6 주령
 - 투여개시시 동물수 : 54 마리
 - 투여개시시 체중 : 126.1~162.1 g

마. 검역 및 순화

동물입수시 공급처(실험동물육종실)에서 제공한 시험계의 병원체검사 성적서를 참고로하여 입수동물의 검수검역을 실시하였다. 동물입수 후 11~12일간, 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰다. 순화기간중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

3. 사육환경

가. 환경조건

본 시험은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 10~20회/hr., 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시), 조도 150~300Lux로 설정된 한국화학연구소 안전성연구센터 BS-1동의 9호실에서 실시되었다. 시험종사원들은 모두 고압증기멸균된 작업복, 두건, 마스크, 장갑등을 착용하고 작업을 실시하였다. 동물사육실이나 시험에 필요한 기자재는 고압증기멸균기, 자외선조사상자, ethylen oxide gas 멸균기 및 70% 이소프로필 알콜로 각각 소독 및 멸균을 실시하여 동물실험실에 반입후 사용하였다.

나. 사육환경모니터링

시험기간중, 동물실의 온, 습도는 자동온습도측정기에 의하여 매시간마다 측정되었으며, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적(월1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험에 영향을 미칠것으로 사료되는 변동은 인정되지 않았다.

다. 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

스테인레스제 망사육상자(220W x 410L x 200H mm)에 순화기간 및 검역기간중에는 각각 5마리 이하/사육상자로 사육하였고, 투여관찰기간중에는 3마리 이하/사육상자로 사육하였다. 사육상자에는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별카드(대조군과 매체대조군:백색, 저용량군:황색, 중용량군:녹색, 고용량군:주황색)을 부착하였다. 사육상자의 교환은 2주에 1회 실시 하였다.

라. 사료 및 물

(1) 사료 및 물의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료(계일사료주식회사)를 방사선조사(2.0 Mrad) 멸균하여 자유섭취시켰다. 물은 상수도를 자외선 살균기로 소독시킨후 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

(2) 사료분석 및 사료중 오염물질의 확인

사료의 조성분석(검사기관 : 제일사료주식회사), 미생물검사(검사기관 : 당연구소 실험동물의학실), 오염물질검사(검사기관 : 당연구소 환경독성연구실)를 실시한 결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

(3) 물중의 오염물질의 확인

물에 대하여는 대전직할시 보건환경연구원에 의뢰하여 일반수질검사를 실시하였다. 물중의 오염물질 분석에 있어서 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

4. 투여량 및 시험군의 구성

가. 투여량 설정

ICR 마우스에 있어서 4주간 정맥투여 아급성독성의 결과(시험의뢰자측 공문: T-563 시험계획서에 첨부된 내용)에 의하여 투여용량을 설정하였고 아울러 saline 용액을 투여하는 대조군과 vehicle대조군을 두고 시험을 실시하였다.

나. 시험군의 구성

군	성 별	동물수 (마리)	계획도살 동물번호	투여액량 (ml/kg/day)	투여량 (mg/kg)
대조군 (saline)	male	9	1~9	1	0
	female	9	55~63	1	0
매체대조군 (vehicle)	male	9	10~18	1	0
	female	9	64~72	1	0
저용량군 (T1)	male	9	19~27	1	0.005
	female	9	73~81	1	0.005
중용량군 (T2)	male	9	28~36	1	0.024
	female	9	82~90	1	0.024
고용량군 (T3)	male	9	37~45	1	0.12
	female	9	91~99	1	0.12
최고용량군 (T4)	male	9	46~54	1	0.6
	female	9	100~108	1	0.6

다. 군분리 및 동물식별

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화기간중 건강하다고 판정된 동물의 전체에 대하여 체중을 측정하고 체중 5g 간격으로 구분시켜 두었다. 그리고 암수 각각의 평균체중에 가까운 개체를 암수 각각 54마리씩을 선택하였다. 5g 간격으로 구분되어 선택된 암수 각 54마리를 각군의 동물 마리수에 맞게 균등히 들어가도록 무작위법을 이용하여 분배하였다. 동물의 개체표식은 피모염색법을 이용하여 실시하였다.

5. 시험물질의 투여

가. 투여액의 조제법 및 조제빈도

1 mMol L(+) Lactic acid 를 측정하여 생리식염수에 녹인 후 pH4.0으로 조정된 vehicle 을 만들었다. 투여당일 아침마다 최고용량의 시험물질을 측정하여 vehicle 에 용해시켜 조제시험물질을 만들고 이를 다시 단계별로 희석하여 아래단계의 조제시험물질을 만들었다.

나. 조제시험물질의 안정성 및 균질성 측정

시험기간중 시험물질의 로트별로 조제시험물질의 안정성 및 균질성을 각 1회씩 측정하였다.

다. 투여경로 및 투여방법

복강투여용 주사침(25G)을 장착한 주사기를 이용하여 복강투여하였다.

라. 투여경로 선택이유

인간에서의 임상적용 예상경로인 정맥투여의 대응으로써 복강투여를 선택 하였다.

마. 투여기간

1회/일, 6일/주로하여 13주간 투여하였다.

바. 투여액량 계산

투여개시 직전의 체중을 측정하고 그 이후에는 주1회 체중을 측정하여 이를 기준으로 투여액량을 계산하였다.

6. 관찰 및 검사항목

가. 일반증상 및 사망의 관찰

시험기간중 모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 일반상태 증독증상 및 사망의 유무를 관찰하였고 이상이 있었던 경우 증상의 종류, 발견일 및 증상의 정도를 개별적으로 기록하였다.

나. 체중측정

모든 동물에 대하여 투여개시 직전에 1회 및 그 후에는 주1회 체중을 측정하였다.

다. 사료섭취량측정

모든 동물에 대하여 사육상자별로 주1회 체중측정일에 사료급이량을, 그리고 익일에 사료잔량을 측정하여 평균사료섭취량(g/rat/day)을 계산하였다.

라. 물섭취량측정

모든 동물에 대하여 사육상자별로 주1회 체중측정일에 물급이량을, 그리고 익일에 그 잔량을 측정하여 1마리당 평균물섭취량(g/rat/day)으로써 산출하였다.

마. 안검사

대조군과 매체대조군 및 각 투여군의 전례에 관해서 부검개시 전일에 안의 외관을 육안적으로 관찰하였다.

바. 뇨검사

계획도살예정동물의 모든 동물에 대하여, 투여최종주에 3시간 이내의 신선뇨를 가지고 뇨비중, pH, 뇨단백(protein), 뇨당(glucose), 케톤체(ketone body), 잠혈(occult blood), 빌리루빈(bilirubin), 유로빌리노겐(urobilinogen) 및 질산염(nitrite)을 뇨시험지(Multistix, Ames) 및 뇨자

동분석장치(CliniTeK-100, Ames)를 이용하여 검사를 실시하였으며 아울러 현미경을 이용한 노칩사검사도 실시하였다. 또한 16시간 축뇨를 채취하여 뇨량을 측정하였다.

사. 혈액학적 검사

모든 동물에 대하여 부검전에 하룻밤 절식시킨 후, 에테르 마취하여 개복후 후대정맥에서 채혈한 혈액으로 아래의 항목을 측정하였다. 응고방지제로서 혈액응고 검사에는 3.2% sodium citrate 을 이용하였으며, 그외의 측정항목에는 EDTA-2K 을 사용하였다.

항 목	단 위	방 법
㉑ WBC (White blood cell count)	$\times 10^3/\text{mm}^3$	전자저항법
㉒ RBC (Red blood cell count)	$\times 10^6/\text{mm}^3$	전자저항법
㉓ HGB (Hemoglobin concentration):Hb	g/dl	시안메트헤모글로빈변법
㉔ HCT (Hematocrit):Ht	%	㉒, ㉓ 항목으로 산출
㉕ MCV (Mean corpuscular volume)	fl	전자저항법
㉖ MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	㉒, ㉓ 항목으로 산출
㉗ MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration)	g/dl	㉓, ㉔ 항목으로 산출
㉘ Platelet	$\times 10^3/\text{mm}^3$	전자저항법
㉙ Differential leucocyte count	$\times 10^3/\text{mm}^3$	도말표본, Wright 염색법
㉚ Reticulocyte count	0/00	도말표본, New Methylen blue 염색법
㉛ Prothrombin time	sec	Clotting time method

㉑~㉘의 각 항목은 혈구자동계측장치 T-540 Coulter Counter Electronics 에 의하여 측정하였다. ㉙~㉚의 항목에 관해서는 혈액도말표본을 검경하여 검사하였다. ㉛의 항목에 관해서는 혈액응고 측정장치 COBAS FIBRO(F. hoffmann-La Roche & Co.)를 이용하여 측정하였다.

아. 혈액생화학적 검사

투여종료의 익일에 후대정맥으로부터 채혈한 혈액을 3,000rpm 으로 10분 간 원심분리하여 획득한 혈청을 이용하여 아래와 같은 항목을 측정하였다.

항 목	단위	방 법
㉠ GOT (Glutamic-oxaloacetic transaminase)	IU/l	UV-Rate법
㉡ GPT (Glutamic-pyruvic transaminase)	IU/l	UV-Rate 법
㉢ ALP (Alkaline phosphatase)	IU/l	P-NPP 법
㉣ CPK (Creatinine kinase)	IU/l	UV-Rate 법
㉤ GLU (Glucose)	mg/dl	Enzyme 법
㉥ TP (Total protein)	g/dl	Biuret 법
㉦ ALB (Albumin)	g/dl	BCG 법
㉧ Albumin/globulin비 (A/G)		
㉨ BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dl	Urease-UV 법
㉩ CRN (Creatinine)	mg/dl	Jaffe 법
㉪ TG (Triglyceride)	mg/dl	Enzyme 법
㉫ PL (인지질)	mg/dl	Enzyme 법
㉬ TCHO (Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme 법
㉭ TBIL (Total bilirubin)	mg/dl	Jendrassik-Cleghorn 법
㉮ Ca (Calcium)	mg/dl	OCPC 법
㉯ IP (무기인)	mg/dl	Enzyme 법
㉰ Cl (Chloride)	mmol/l	Coulometric titration 법
㉱ Na (Sodium)	mmol/l	염광광도법
㉲ K (Potassium)	mmol/l	염광광도법

㉠~㉤의 항목에 대해서는 자동분석장치(JCA VX-1000, Jeol Co.)를 이용하여 측정하였다. ㉥의 항목에 대해서는 Chlor Meter(C-200AP, Jookoo)를 이용하여 측정하였다. ㉦, ㉧의 항목에 대해서는 전해질 자동분석장치(IL943 flame photometer, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 측정하였다.

자. 부 검

투여개시 13주일 후에 대조군과 매체대조군 및 투여군의 생존동물에 대하여 최종계획도살을 실시하였다. 계획도살시 생존동물을 에테르 마취하에서 후대정맥으로 부터 채혈후 방혈치사시켜 부검하였다.

차. 장기중량측정

대조군과 매체대조군 및 투여군의 주요군과 회복군의 계획도살시에는 부검후 아래의 장기를 측정하였다.

뇌, 뇌하수체, 갑상선, 폐, 심장, 흉선, 간장, 신장, 비장,
부신, 정소, 전립선, 난소, 자궁

카. 병리조직학적 검사

투여한 모든 동물의 아래 장기는 10% 중성포르말린액에, 정소는 Bouin's 액에, 안구는 Davidson's 액에, 고정후 파라핀 포매, 박절하여 HE 염색을 실시하여 검경하였다. 뇌(대뇌, 소뇌), 뇌하수체, 갑상선(상피소체 포함), 폐(기관지 포함), 기관, 심장, 흉선, 간장, 신장, 췌장, 비장, 부신, 정소, 정낭, 전립선, 정소상체, 포피선, 난소, 자궁, 질, 음핵선, 유선(암컷), 방광, 식도, 위, 십이지장, 회장, 공장, 맹장, 결장, 직장, 대퇴골(골수포함), 골격근, 장일파절, 타액선, 대동맥, 안구(하드리안선 포함), 척수, 좌골신경, 피부(경부), 기타 육안적 이상부위 등 대조군과 매체대조군 및 최고용량군의 동물은 모든 동물에 대해서 상기조직을 표본제작하여 검경하였다. 저농도 및 중간농도 군에서는 육안적 부검소견이 인정되는 장기 및 최고용량군에서 시험물질에 의한 변화가 있는 장기에 대하여는 전군의 동물에 대하여 병리조직 검사를 하였다.

7. 통계학적 방법

얻어진 자료에 대한 통계분석은 매체대조군을 기준으로 다중비교 검정법을 실시하였다. 검사항목중 체중, 사료섭취량, 물섭취량, 뇨량, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사 및 장기중량에 대하여는 일원배치분산분석을 유의수준 $\alpha = 0.05$ 로 검정하였다. 검정결과 유의한 결과가 나타날 경우에는 매체대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 검사하기 위하여 다중비교법인 Duncan's test를 실시하였다. 뇨량을 제외한 뇨검사 항목에 대해서는 순위화한 데이터를 이용한 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis's H test 를 실시하고, $p < 0.05$ 인 경우 Duncan's test 를 이용하여 군간의 유의차를 조사하였다. 일반증상, 부검소견 및 병리조직학적 소견은 백분율(frequency)로 표시하고 필요에 따라 Fisher's exact test 를 이용하여 군간 유의차를 조사하였다. 검정의 위험율은 5% 및 1%로 정하였다.

제 3 장 연구 결과 및 고찰

제 1 절 랫트 주산기 및 수유기시험

1. 모동물에 미치는 영향

가. 일반증상(Table 1-1)

모동물의 임신기간동안 대조군을 포함한 모든 투여군에서 어떠한 특이증상도 관찰되지 않았다. 포육기간동안에는 0.04 mg/kg군에서 눈주위 암적색 분비물(dark material around eye)이 1례 발견되었는데 포육불량등의 스트레스 조건하에서 흔히 관찰되는 소견으로서 시험물질에 의한 변화는 아니었다. 그리고 분만시에는 1 mg/kg군에서 난산(difficult delivery)이 1례(5%) 나타났는데 이는 시험물질에 의한 영향으로 판단되었다.

나. 체중(Table 1-2)

모동물의 임신 및 포육기간동안의 체중은 1 mg/kg군에서 포육 7일 및 포육 14일째 체중이 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데, 시험물질에 의한 변화로 인정되었다.

다. 사료섭취량(Table 1-3)

1 mg/kg군에서 포육 1일째와 포육 8일째의 모동물의 사료섭취량이 통계학적으로 유의한 감소를 나타냈는데, 이는 시험물질에 의한 변화로 판단되었다.

라. 부검소견(Table 1-4)

모동물의 포육 21일째 부검시 0.04 mg/kg군에서 우측신장의 신우확장 (pelvis dilatation)이 1례 관찰되었는데 이것은 SD 랫트에 있어서 일반적으로 관찰되는 자연발생적 소견으로써 시험물질에 의한 변화는 아니었다. 그리고 대조군에서는 직장의 가스저류(expansion of rectum with gas)와 우측신장의 신우확장이 각각 1례씩 발견되었다.

마. 절대 및 상대장기중량(Table 1-5,1-6)

모동물의 포육 21일째 부검시 측정된 주요장기의 절대 및 상대장기중량에 있어서 1 mg/kg군의 비장이 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데 이는 시험물질의 투여에 기인한 독성증상으로 인정되었다.

2. 차세대동물(F1)에 미치는 영향

가. 출산시 소견 및 포육기간중의 생존율(Table 1-7)

모동물의 분만관찰시 1 mg/kg군에서 사산태자만을 출산한 동물이 1례 (5%) 발견되었는데, 이는 시험물질의 영향으로 사료되었다.

모동물의 임신기간, 출생시의 사산자수 및 생존자수, 생존자의 성비 그리고 포육생존자의 생존율에 있어서, 각 투여군과 대조군간의 유의성은 나타나지 않았다. 그리고 출생일의 생존자 관찰시 모든 군에서 어떠한 외포기형도 관찰되지 않았다.

나. 부검소견(이유부검군)(Table 1-8)

이유부검군에 속한 F1 암수동물의 포육 21일째 부검시 수컷의 0.2mg/kg군에서 좌측신장의 백색반점(white spot of kidney)이 1례 관찰되었는데 용량상관성이 결핍되어 시험물질에 의한 변화는 아니었다.

다. 분화상태(Table 1-9)

성장시험군에 속한 F1 암수동물의 형태분화(이개개전, 피모발생, 절치붕

출, 안검개열, 정소하강, 질개구)의 관찰시 분화일령은 암수 모두 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성을 나타내지 않았다.

라. 행동기능검사(Table 1-10)

행동시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 정향반사기능시험, 부주지성시험, 견인력시험, 동공반사시험, 청각반사시험 및 회전봉시험을 실시한 바, 합격일령에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다.

마. Open field test(Table 1-11)

행동시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 open field test 를 실시한 결과, 동물이 이동한 정방향의 수는 암수모두 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의차를 나타내지 않았다.

바. 수미로시험(Table 1-12)

행동시험군에 속한 F1 암수동물에 의해 수미로시험을 실시한 결과, 기억력시험의 경우 암컷의 1 mg/kg군의 합격율이 대조군에 비해 유의성있는 감소(28.6%)를 나타냈는데, 이는 시험물질의 영향으로 인정되었다. 그리고 학습시험(1~6회)과 역학습시험(1~6회)의 합격율에 있어서는 암수 모두 각 투여군과 대조군간의 유의차가 인정되지 않았다.

사. 일반증상(성장시험군)(Table 1-13)

성장시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 포육기간 및 이유후 10주령까지 일반증상 관찰을 실시한 바, 1 mg/kg군의 암수 각각 2례(9.5%)에서 꼬리끝부분의 괴사(necrosis of tail end)가 관찰되었는데, 이는 시험물질의 투여에 기인한 소견으로 사료되었다.

아. 체중(성장시험군)(Table 1-14)

성장시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 포육 0일부터 10주령까지 체중을

측정한 결과, 수컷동물의 경우 0.2 mg/kg군에서 7주령째 체중의 유의성있는 증가가 관찰되었다. 암컷동물에 있어서는 0.2 mg/kg군의 2주령 및 8주령째의 체중은 유의성있는 증가를, 그리고 1 mg/kg군의 2주령째 체중은 유의성있는 감소를 나타냈다. 상기소견들중에서 0.2 mg/kg군의 암수동물의 체중증가는 용량상관성이 없어서 군내의 몇몇 동물의 사료섭취의 증가에 기인한 것으로 사료되었고 1 mg/kg군의 암컷동물의 체중감소는 시험물질에 의한 영향으로 판단되었다.

자. 부검소견(성장시험군)(Table 1-15)

성장시험군에 속한 F1 암수동물에 대해 10주령째 부검을 실시한 바, 수컷동물의 경우 0.2 mg/kg군에서 우측신장의 신우확장이 1례 관찰되었고 1 mg/kg군에서는 좌측고환위축(testis-left atrophy)이 1례 (5%) 나타났는데 상기소견 중에서 고환위축은 발현율이 낮고 좌측에만 국한되어 시험물질과는 무관한 자연발생 소견으로 사료되었고 신우확장도 역시 자연발생적인 소견으로써 시험물질에 의한 변화는 아니었다. 암컷동물에 있어서는 대조군을 포함한 모든 투여군에서 어떠한 특이소견도 발견되지 않았다.

차. 장기중량(성장시험군)(Table 1-16,1-17)

성장시험군의 부검시 장기중량을 측정한 결과 수컷동물에 있어서는 0.2 mg/kg군에서 비장의 절대중량이 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈는데, 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향으로 판단되지 않았다. 그리고 암컷동물의 경우는 절대 및 상대중량에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의성은 인정되지 않았다.

카. 교배성적(Table 1-18)

생식시험군에 속한 F1 암수동물을 10주령 이후에 교배시켰을 때 교미율, 수태율 및 임신율에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 발견되지 않았다.

타. 체중(생식시험군)(Table 1-19)

F1 암컷동물의 임신기간동안의 체중에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다.

파. 부검소견(생식시험)(Table 1-20)

F1 동물의 부검시 수컷동물에 있어서는 0.2 mg/kg군에서 백내장(cataract)이 1례 관찰되었는데 이는 시험물질과는 무관한 선천성 기형(congenital anomaly)으로 사료되었다. 암컷동물에 있어서는 대조군에서 액와 및 서혜부 피하의 종괴(subcutis ; mass in the axillary and inguinal region)가 1례 발견되었다.

3. F2 태자에 미치는 영향

가. 제왕절개성적(Table 1-21)

F1 모동물의 제왕절개시 조사된 황체수, 착상수, 흡수배아수, 사망태자수, 산자수, 성비 및 생존태자의 체중은 모든 투여군에서 대조군에 대하여 유의성을 나타내지 않았다. 그리고 외포소견은 1 mg/kg군에서 복벽파열(gastroschisis)이 1례 관찰되었는데, 발현율이 낮아 시험물질의 영향으로 인정되지 않았다.

4. 조정후 남은 F1 랫트(포육 4일령)에 미치는 영향

가. 내부장기검사(Table 1-22)

포육 4일째 조정후 남은 태자의 내부장기 검사시 모든 군에서 어떠한 기형 또는 변이도 관찰되지 않았다.

나. 골격검사(Table 1-23)

포육 4일째 조정후 남은 태자의 골격검사시 말늑골단소(shortened 13th

rib)는 대조군, 0.04 및 0.2 mg/kg군의 순으로 각각 1, 2 및 1례씩 나타났고 요추의 천추화(sacralization of 6th lumbar vertebrae)는 대조군, 0.04, 0.2 및 1 mg/kg군의 순으로 각각 1, 3, 1 및 2례씩 관찰되었다. 요늑(14th rib)은 대조군과 1 mg/kg군에서 각각 1례씩 발견되었고 흉골의 추가골화점(additional ossification center of sternbrae)은 대조군, 0.04 및 0.2 mg/kg군에서 각각 6, 1 및 6례씩 관찰되었다. 그리고 대조군에서는 요늑과 흉골의 추가골화점의 복합변이가 1례 나타났다.

상기한 소견들중에서 말늑골단소는 경기형(minor anomaly)에 속하는 소견으로서 모독성(maternal toxicity)의 결과로 나타날 수도 있으나, 본 시험에서는 고용량군에서는 전혀 관찰되지 않아 자연발생적으로 나타난 것으로 판단되었다. 또한 요추의 천추화, 요늑 및 흉골의 추가골화점은 자연발생적인 변이(variation)에 속하는 소견들로서, 시험물질에 의한 변화는 아니었다.

제 2 절 토끼 최기형시험

1. 모동물에 미치는 영향

가. 일반증상(Table 2-1)

모동물의 임신기간동안 대조군에서 비루(nasal discharge)가 2례, 탈모(hair loss) 및 연변(soft faeces)이 각각 1례씩 관찰되었고 0.2 mg/kg군에서는 비루와 유루(lacrimation)가 각각 4례, 그리고 탈모가 2례 나타났다. 0.6 mg/kg군에서는 비루와 연변이 각각 5 및 1례씩 발견되었으며 1.8 mg/kg군에서는 비루가 4례 그리고 연변 및 외이의 부종(edema of outer ear)이 각각 2 및 1례씩 관찰되었다. 유산(abortion)은 대조군과 0.2 mg/kg군에서 각각 1례씩 나타났고 사망례는 0.2 mg/kg군에서 1례 발견되었다. 상기소견들중에서 각군에서 소수례씩 관찰된 비루, 유루, 탈모 및 외이의 부종은 보정

에 의한 물리적 자극증상으로 사료되었고 대조군, 0.6 mg/kg군 및 1.8 mg/kg군에서 각각 1, 1 및 2례씩 나타난 연변 그리고 대조군과 0.2 mg/kg군에서 각각 1례씩 발견된 유산은 투여 스트레스에 기인된 소견으로 추정되었다. 또한 0.2 mg/kg 군에서 1례 관찰된 동물의 사망은 병리부검소견에서 나타난 바와 같이 질병에 기인한 것으로서 시험물질에 의한 변화는 아니었다.

나. 체 중(Table 2-2)

모동물의 임신기간동안의 체중에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다.

다. 사료섭취량(Table 2-3)

모동물의 임신기간동안 모든 군에서 정상적인 사료섭취가 관찰되었다.

라. 부검소견(Table 2-4)

모동물의 임신 28일째 부검시 대조군에서 간장의 백색 반점(white spot of liver)과 신장의 거친표면(rough surface of kidney)이 각각 6 및 1례씩 나타났고 0.2 mg/kg군에서는 간장의 백색반점이 4례 관찰되었다. 0.6 mg/kg군에서는 간장의 백색반점, 신장의 거친표면 및 좌측신장결손(absence of left kidney)이 각각 10, 1 및 1례씩 발견되었고 1.8 mg/kg군에서는 간장의 백색반점이 4례 관찰되었다. 상기의 소견들은 병리조직소견이 없어서 병인을 단정하기는 어려우나 대조군에서도 관찰된 것으로 미루어보아 시험물질에 기인한 변화는 아니었다. 단, 0.6 mg/kg군에서 1례 나타난 좌측신장의 결손은 선천성 기형으로 판단되었다. 그리고 0.2 mg/kg 군의 사망례에서 발견된 심막염(pericarditis)과 폐염(pneumonia)은 동물의 사망을 유발한 직접적인 원인으로 사료되었다.

마. 장기중량(Table 2-5, 2-6)

부검시 측정된 장기중량은 1.8 mg/kg군에서 좌측난소의 절대중량이 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈고 간장의 상대중량은 유의성있는 증가를 그리고 난소의 상대중량은 유의성있는 감소를 보였다. 상기소견들중에서 1.8 mg/kg군에서 나타난 간장의 상대중량의 증가는 모동물의 체중감소에 따른 결과로서 사료되었고 난소의 절대 및 상대중량의 감소는 시험물질에 기인한 소견으로 판단되었다.

2. 태자에 미치는 영향

가. 제왕절개성적(Table 2-7)

제왕절개시 조사된 사망태자수, 성비 및 태자체중에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다. 황체수, 착상수 및 산자수는 1.8 mg/kg군에서 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈다. 반면에 착상수에 대한 흡수배아수의 비율은 1.8 mg/kg군에서 유의성있게 증가했다. 1.8 mg/kg에서 나타난 상기소견들은 모두 시험물질의 영향으로 사료되었다. 외포이상은 1.8 mg/kg군에서 척추외측만곡(scoliosis), 복벽파열(gastroschisis), 굴지증(camptodactylia) 및 흔적미(vestigial tail)의 복합기형과 척추후만증(kyphosis) 및 복벽파열의 복합기형이 각각 1례씩 총 2례(7.7%) 관찰되었다. 그런데 1.8 mg/kg군의 외포기형 발현율은 대조군에 비해 통계학적인 유의성은 나타나지 않았으나 자연발생적으로 출현하지 않는 척추만곡, 굴지증등의 특이소견이 관찰됨으로써 생물학적 유의성이 인정되어 시험물질에 기인한 소견으로 판단되었다.

나. 내부장기검사(Table 2-8)

임신 28일째 적출한 F1 태자의 내부장기 검사시 대조군에서는 신우 확장(dilatation of renal pelvis)과 식도전위(shift in position of esophagus)[변이(variation)]가 2례(1.8%) 관찰되었고 0.2 mg/kg 군에서는 외측뇌실확장(dilatation of lateral ventricle) 및 소안증(microphthalmia)

[기형(malformation)]이 1례(0.8%) 그리고 좌측총경동맥의 기시이상(abnormal origin of left A. carotis) 및 우측신장의 전위(dislocation of right kidney)[변이]가 3례(2.5%) 관찰되었다. 0.6 mg/kg군에서는 소안증[기형]이 1례(0.8%) 그리고 좌측총경동맥의 기시이상 및 식도전위[변이]가 4례(3.3%) 발견되었으며 1.8mg/kg군에서는 횡격막탈장(diaphragmatic hernia) 및 심실중격결손(ventricular septal defect)[기형]이 2례(7.7%) 그리고 총경동맥의 기시이상[변이]이 5례(19.2%) 관찰되었다. 상기소견들중에서 1.8 mg/kg군에서 나타난 기형 및 변이 발현율은 대조군에 비하여 통계학적인 유의차는 보이지 않았으나 New Zealand White 계통 토끼에 대한 기초데이터의 수치를 훨씬 상회하여서¹²⁾ 생물학적 유의성이 인정되었고 따라서 이는 시험물질에 기인된 소견으로 사료되었다.

다. 골격검사(Table 2-9)

임신 28일째 적출한 태자의 골격검사시 대조군에서는 파열늑골(broken rib), 부유늑골(flying rib), 늑골유착(fused ribs), 7번 늑골결손(absence of 7th rib), 7번 흉추결손(absence of 7th thoracic vertebrae) 및 11번 흉추결손(absence of 11th thoracic vertebrae)[기형(malformation)]이 3례(4.2%), 8번 요추(8th lumbar vertebrae), 13번 늑골(13th rib) 및 흉골개열(cleaved sternebrae)[변이(variation)]이 45례(34.9%) 그리고 아령형 흉추추체(dumbbell-shaped thoracic vertebral body) 및 흉추추체의 이분(bicentric thoracic vertebral body)[골화지연(retardation)]이 2례(1.9%) 관찰되었다. 0.2 mg/kg군에서는 흉골유착, 늑골유착 및 비대칭장골(asymmetric os ilium)[기형]이 4례(3.6%), 8번요추, 9번요추, 13번늑골 및 비대칭흉골(asymmetric sternebrae)[변이]이 47례(34.7%) 그리고 흉추추체 이분, 아령형 흉추추체, 흉골개열 및 아령형흉골(dumbbell-shaped sternebrae)[골화지연]이 7례(8.4%) 나타났다. 0.6 mg/kg 군에서는 늑골유착, 흉골유착, 3번 흉골돌출(protrusion of 3rd sternebra), 미추유착(fused caudal vertebrae) 및 9번 천

추추궁결손(absence of 9th thoracic vertebral arch)[기형]이 5례(4%), 6번요추, 8번요추, 13번늑골 및 비대칭흉골[변이]이 49례(38.8%) 그리고 아령형 흉추추체 및 흉골개열[골화지연]이 2례(2.1%) 관찰되었다. 또한 1.8 mg/kg군에서는 척추외측만곡(scoliosis), 척추전만증(lordosis), 요추추체유착(fused lumbar vertebral body), 천추추궁유착(fused sacral vertebral arches), 늑골유착, 흉골유착, 12번 늑골결손, 11번 및 12번 늑골결손, 7번 흉추결손과 1번 및 2번 요추추궁결손[기형]이 4례(20.6%), 8번 요추, 13번 늑골 및 비대칭흉골[변이]이 5례(22.2%) 그리고 흉골추체이분 및 흉골개열[골화지연]이 2례(11.7%) 발견되었다. 상기소견들중에서 1.8 mg/kg군에서 나타난 태자골격기형의 발현율은 대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 증가하지는 않았으나 척추 외측만곡, 천추전만증등의 특이소견이 관찰되어 생물학적 유의성이 인정되었고 따라서 시험물질에 의한 영향으로 사료되었다.

제 3 절 랫트 아급성독성시험

1. 일반증상 및 사망율 (Table 3-1~3-3)

수컷동물은 0.6 mg/kg(1.00 mg/kg) 투여군에서 투여 38일부터 투여 53일까지 1례의 동물이 탈모(hair loss)를, 투여 55일부터 투여기간 내 가끔씩 1례에서 2례의 동물이 연변(soft stool)을, 투여후 72일부터 가끔씩 1례에서 3례의 동물이 하리(diarrhea)를, 투여 83일부터 투여기간 내내 5례에서 6례의 동물이 허약(emaciation)을, 투여 85일부터 끝까지 1례에서 2례의 동물이 피모더러움(dirtied fur by urine)을, 투여 85일부터 투여 86일까지 1례의 동물이 피모지저분함(dirtied fur by feces)을, 투여 88일에는 1례의 동물이 코주위 암적색물질 저류(dark materials around nose)를, 나타내었다. 0.12 mg/kg 투여군에서는, 0.6 mg/kg 투여군의 일반증상보다 발현시기가 늦고, 출현빈도 및 심한

정도는 낮지만 같은 증상으로써 코주위 암적색물질 저류 및 탈모가 그리고 추가로 시험물질에 의한 영향이 아닌 상처(wound) 및 반흔(scar)의 증상이 관찰되었다. 0.024 mg/kg 투여군은 2례의 동물이 백내장(cataract)을, 0.005 mg/kg 투여군에서는 각 1례의 동물이 눈주위 암적색물질 저류(dark material around eye)와 부종(edema) 및 비만(obesity)의 증상이, 관찰되었으나, 이들 증상 모두는 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향은 아니라고 판단되었다. 그리고 매체대조군에서는 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았으며, 대조군에서는 2례의 동물에서 탈모가, 1례의 동물에서 반흔이 각각 관찰되었다. 그리고 0.6 및 0.12 mg/kg 투여군에서 관찰된 일반증상중 코주위 암적색물질저류를 제외한 증상은 시험물질의 투여에 의한 직, 간접 영향으로 판단되었다.

암컷동물은 0.6 mg/kg 투여군에서 투여 71일부터 투여 76일까지 1례의 동물이 입모(piloerection)를, 투여 82일부터 투여 종료시까지 8례에서 9례의 동물이 허약을, 투여 86일에는 1례의 동물이 연변을, 투여 87일에는 1례의 동물이 코주위 암적색물질 저류를 나타내었다. 0.12 mg/kg 투여군에서는 각 1례의 동물이 부종, 탈모, 상처 및 비만의 증상을 나타내었으나, 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향은 아니었다. 그외 투여군과 매체대조군 및 대조군에서는 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다. 아울러 0.6 mg/kg 투여군에서 코주위 암적색물질 저류의 증상을 제외한 위 증상들은 시험물질의 투여에 의한 직, 간접의 영향으로 판단되었다.

또한 시험기간동안 수컷동물의 경우 0.6 mg/kg 투여군에서 투여 55일째에 1례의 동물이, 투여 88일째에 또 1례의 동물이 사망하였으며 암컷동물의 모든 투여군에서는 사망동물이 관찰되지 않았다.

2. 체중 (Table 3-4, 3-5)

수컷동물은 0.6 mg/kg 투여군의 체중이 투여 6주(42일째)부터 투여 13주(90일째)까지 매체대조군의 체중보다 통계학적 유의성있는 감소로 인정되었으며, 그외 투여군의 체중은 매체대조군의 체중과 유사하게 증가하였다. 그리고 수컷

동물의 체중증가량 변화에서 0.6 mg/kg 투여군은 투여 5주에서 6주까지, 투여 10주에서 13주까지 매체대조군에 비하여 통계학적 유의성있는 체중증가량의 억제가 인정되었다.

암컷동물은 0.6 mg/kg 투여군의 체중이 투여 9주부터 투여 11주까지 및 투여 13주에 매체대조군의 체중보다 통계학적 유의성있는 감소로 인정되었다. 0.12 mg/kg 투여군의 체중은 투여 10주부터 투여 13주까지 통계학적 유의한 증가가 인정되었다. 그리고 암컷동물의 체중증가량 변화에서는 매체대조군과 투여군 사이에 통계학적 유의한 변화는 측정되지 않았다.

3. 사료섭취량 (Table 3-6, 3-7)

수컷동물의 사료섭취량의 변화의 경우, 0.6 mg/kg 투여군에서 투여 7주(50일째)부터 투여 8주(57일째)까지, 그리고 투여 10주(71일째)부터 투여 13주(90일째)까지의 기간동안 매체대조군의 사료섭취량에 비하여 통계학적 유의성있는 사료섭취량의 감소를 나타내었다.

암컷동물의 사료섭취량의 변화의 경우, 0.6 mg/kg 투여군에서 투여 7주, 투여 9주 및 투여 11주부터 투여 12주까지 측정된 사료섭취량이 통계학적 유의성 있는 감소로 인정되었다.

4. 물섭취량 (Table 3-8, 3-9)

수컷동물의 물섭취량의 변화의 경우, 모든 투여군에서 측정된 물섭취량이 매체대조군과 비교하여 통계학적 유의성있는 변화를 나타내지 않았다.

암컷동물의 경우 0.6 mg/kg 투여군에서 투여 9주 및 투여 11주부터 12주까지 측정된 물섭취량은 매체대조군과 비교할 때 통계학적 유의성있는 섭취량의 증가로 인정되었다. 0.12 mg/kg 투여군에서는 투여 13주의 물섭취량이 통계학적 유의한 증가로 측정되었다.

위의 암컷동물의 투여군에서 측정된 물섭취량의 유의한 증가는 용량상관성 면에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되었다.

5. 안검사 (Table 3-10)

수컷동물은 0.024 mg/kg 투여군에서 2례의 백내장 증상이 관찰되었으나 이는 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향이 아닌 자연발생적 증상으로 인정되었으며 따라서, 암수동물의 경우 모든 투여군 및 매체대조군과 대조군에서는 시험물질에 의한 안과적 이상의 증상이 관찰되지 않았다.

6. 뇨검사 (Table 3-11, 3-12)

수컷동물은 뇨 protein 측정치가 0.6 mg/kg 투여군에서, 뇨 nitrite 및 뇨 urobilinogen 의 측정치는 모든 투여군에서 매체대조군과 비교하여 통계학적 유의성있는 저하로 인정되었다. 뇨 bilirubin 은 0.024 mg/kg 투여군의 측정치가 통계학적 유의성있는 저하로 관찰되었으나 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향은 아니라고 판단되었다.

암컷동물의 뇨 protein 및 뇨 ketone 체는 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 통계학적 유의성있는 저하로 인정되었다.

7. 혈액학적 검사 (Table 3-13~3-16)

수컷동물의 경우 PLT 와 PT 시간은 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 매체대조군에 비하여 통계학적 유의성있는 증가로 인정되었다. WBC 와 Lymphocyte 의 측정치와 백분율은 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 통계학적인 유의한 감소로 인정되었다.

암컷동물의 경우 PLT 및 PT 시간은 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 매체대조군에 비하여 통계학적 유의성있는 증가로, Lymphocyte 백분율은 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 통계학적 유의한 감소로, 각기 인정되었다. RBC 는 0.024 mg/kg 투여군 및 0.005 mg/kg 투여군의 측정치가 매체대조군의 측정치와 비교할 때 통계학적 유의성있는 감소로 측정되었고, Lymphocyte 백분율은 대조군의 측정치가 통계학적 유의성있는 증가로 측정되어 매체대조물질에 의한 상대적

Lymphocyte 백분율의 감소를 반영하였다.

8. 혈액생화학적 검사 (Table 3-17,3-18)

수컷동물의 경우, TG, TP, ALB 및 PL 은 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 매체대조군과 비교하여 통계학적 유의성있는 감소로, ALP 및 BUN, TBIL은 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 매체대조군에 비하여 통계학적 유의성있는 증가로, 각각 인정되었다.

암컷동물의 경우, TP 및 ALB 는 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 매체대조군의 측정치보다 통계학적 유의성있는 감소로 인정되었고, BUN 및 Na 는 0.6 mg/kg 투여군의 측정치가 통계학적 유의성있는 증가로 인정되었다. BUN 은 0.024 mg/kg 투여군과 0.005 mg/kg 투여군의 측정치가 매체대조군의 측정치보다 통계학적 유의한 감소로 인정되었으나 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향은 아니라고 판단되었다. 대조군은 매체대조군에 비하여 BUN 측정치의 통계학적 유의한 감소가, TP 및 ALB 의 측정치가 통계학적 유의한 증가로 측정됨으로써, vehicle 에 의한 영향이 있었음이 판단되었다.

9. 육안적 부검소견 (Table 3-19,3-20)

부검된 수컷동물은 0.6 mg/kg 투여군에서 좌우측 부신(adrenal gland-left, right)의 종대(enlargement)가 1례, 간(liver)의 위축(atrophy)이 4례, 비장(spleen)의 위축이 5례, 흉선(thymus)의 위축 및 부종(edema)이 3례 및 1례, 폐(lung)의 암적색화(dark red discoloration)가 1례, 전립선(prostate gland)의 위축이 4례, 저정낭(seminal vesicle)의 위축이 4례, 투여부위 피부의 부종(edema)이 1례, 십이지장(duodenum) 및 공장(jejunum)의 팽대(expanded)가 각 1례씩, 공장의 장막내결절(nodule in serosa)이 1례, 회장(ileum), 맹장(cecum:caecum) 및 결장(colon)의 팽대가 각각 4례, 8례 및 3례, 복수(ascites)가 3례, 혈액성 복수(hemoperitoneum)가 1례가, 각각 관찰되었다. 0.024 mg/kg 투여군에서는 오른쪽 눈(eye ball-right)의 백색혼탁(white

opacity)이 1례가, 매체대조군에서 공장의 장막내 백색결절(white nodule in serosa)이 1례가, 그리고 대조군에서 흉선위축이 1례가 관찰되었으나 이들 소견들은 용량상관성이 결핍되어 시험물질의 영향은 아니라고 판단되었다.

계획도살군의 암컷동물은 0.6 mg/kg 투여군에서 간과 비장의 위축이 각 4례, 흉선의 위축이 5례, 피부와 타액선(salivary gland)의 부종이 1례, 회장의 팽대가 1례, 맹장의 팽대가 7례, 복수저류가 3례로, 각각 관찰되었다. 0.12 mg/kg 투여군은 우측부신의 형성부전(aplasia)이 1례, 간의 암적색반점(dark red spot)이 1례, 그리고 좌우측 안구내 백색혼탁이 각 1례씩 관찰되었으며, 0.005 mg/kg 투여군에서는 우측신장(kidney-right)의 신우확장(pelvis dilatation)이 1례가 관찰되었고, 매체대조군에서는 비장의 이소성비장(ectopic spleen)이 1례로 관찰되었으나 이들 모두는 용량상관성이 결핍되거나 자연발생적 소견으로써 시험물질에 의한 영향은 아니라고 판단되었다.

도중사망의 수컷동물은 0.6 mg/kg 투여군에서 2례(46번, 51번의 동물)가 관찰된 바, 비장의 위축, 소장외 팽대, 혈액성 복수 등의 부검이상 소견이 관찰되었다.

10. 장기중량(Table 3-21 ~ 3-24)

수컷동물의 경우, 뇌(brain)의 절대장기중량은 0.6 mg/kg 투여군에서 통계학적 유의한 감소가, 뇌의 상대장기중량은 0.6 mg/kg 투여군에서 통계학적 유의한 증가가 인정되었다. 뇌하수체(hypophysis)의 절대장기중량, 간의 절대 및 상대장기중량, 비장의 절대 및 상대장기중량, 좌우측 신장의 절대장기중량, 심장의 절대장기중량, 흉선의 절대 및 상대장기중량, 폐의 절대장기중량, 그리고 전립선의 절대장기중량은 0.6 mg/kg 투여군이 매체대조군과 비교하여 통계학적 유의한 감소를 나타내었고, 좌우측 부신의 상대장기중량과 정소의 상대장기중량 및 폐의 상대장기중량은 0.6 mg/kg 투여군에서 통계학적 유의한 증가로 인정되었다. 0.12 mg/kg 투여군에서의 심장의 상대장기중량이 통계학적 유의한 증가로, 0.024 mg/kg 투여군에서의 간과 흉선의 절대장기중량이 통계학적

유의한 증가로, 0.005 mg/kg 투여군에서의 뇌하수체의 절대장기중량이 통계학적 유의한 감소로 각각 관찰된 바 있으나 이들 모두는 용량상관성이 결핍되어 시험물질에 의한 영향은 아니라고 판단되었다.

암컷동물의 경우, 뇌의 상대장기중량이 0.6 mg/kg 투여군에서 통계학적 유의성있는 증가로 인정되었으며, 그러나 0.12 mg/kg 투여군에서의 통계학적 유의한 감소는 용량상관성이 결핍되어 시험물질에 의한 영향은 아니었다. 뇌하수체와 우측부신과 우측난소(ovary-right)와 간과 비장과 좌우측 신장 그리고 좌우측 갑상선(thyroid-left, right)의 절대장기중량은 0.6 mg/kg 투여군에서 통계학적 유의성있는 감소가 인정되었다. 심장과 흉선의 절대 및 상대장기중량은 0.6 mg/kg 투여군에서 통계학적 유의한 감소로 인정되었다. 폐의 상대장기중량은 0.12 mg/kg 투여군에서 통계학적 유의한 감소로 측정되었으나 용량상관성이 결핍되어 시험물질에 의한 영향은 아니라고 판단되었다.

11. 병리조직학적 검사 (Table 3-25, 3-26)

본 시험의 대조군과 매체대조군 및 0.6 mg/kg 투여군의 동물의 경우는 제반장기와 병변이 관찰된 장기로부터, 그리고 기타 투여군의 동물에 대해서는 육안소견이 관찰된 장기와 표적장기로 추정되는 장기로부터 병리조직표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다. 병리조직학적 검사에서 나타난 변화는 압수동물은 0.6 mg/kg 투여군에서 비장과 흉선의 위축 및 대퇴골의 모세관 확장증이었고, 수컷동물의 경우는 0.6 mg/kg 투여군에서 관찰된 간장의 주위염, 결장의 주위염 및 저정낭의 위축이었다. 그리고 장기별 병리조직학적 검사소견은 다음과 같았다.

가. 신장

수컷동물에서는 0.6 mg/kg 투여군에서 충혈(congestion)이 2례가, 매체대조군에서 충혈, 세뇨관 호염기화(tubular basophilia) 및 간질성 신염(interstitial nephritis)이 각각 1례씩이, 대조군에서 충혈이 2례, 단백원주(protein cast)가 1례, 그리고 세뇨관 호염기화가 1례로, 각기 관찰되었다.

따라서 시험물질의 투여에 따른 병리조직학적 소견은 신장에서 관찰되지 않았다. 암컷동물의 경우 0.6 mg/kg 투여군에서 단백원주가 1례, 0.005 mg/kg 투여군에서 신수종(hydronephrosis)이 1례, 매체대조군에서는 충혈이 1례, 대조군에서는 calyx 의 상피세포증생(epithelial hyperplasia/calyx)이 1례, 관찰되어 시험군간 각각 다른 소견을 보였고 또한 용량상관성을 비교하기에는 발생례가 적어 시험물질의 영향으로는 판단되지 않았다.

나. 비장

수컷동물에서는 0.6 mg/kg 투여군에서 위축(splenic atrophy)이 4례가 관찰되어 시험물질에 의한 영향으로 판단되었다. 매체대조군에서는 충혈이 1례가 관찰되었다. 암컷동물에서는 0.6 mg/kg 투여군에서 위축이 4례, 0.12 mg/kg 투여군에서 위축이 1례, 0.005 mg/kg 투여군에서 위축이 3례와 충혈이 1례, 매체대조군에서 위축과 대조군에서 충혈이 각 1례, 관찰되었다. 군간의 발생빈도 및 심한정도로 볼 때 0.6 mg/kg 투여군의 위축은 시험물질에 의한 영향으로 판단되었다.

다. 간장

수컷동물에서는 0.6 mg/kg 투여군에서 간장주위염(perihepatitis)이 1례가 관찰되었다. 그 밖에 0.005 mg/kg 투여군에서 림프구와 망상내피 세포침윤소(lymphocyte-R.E. cell foci)가 1례등, 매체대조군에서 림프구와 망상내피 세포침윤소가 4례, 대조군에서 림프구와 망상내피 세포침윤소가 5례 및 지방변성(lipidosis)이 1례로, 이들 모두는 자연발생적인 소견들이었다.

라. 결장

수컷동물의 경우 0.6 mg/kg 투여군에서 결장주위염(pericolitis)이 2례가 관찰되었다.

마. 정소상체

수컷동물의 경우, 0.6 mg/kg 투여군에서 정소상체주위염 (periepididymitis)이 1례가 관찰되었으나 발생빈도가 낮아 시험물질의 영향으로 판단하기에는 어려웠다.

바. 흉선

수컷 및 암컷동물의 경우 0.6 mg/kg 투여군에서 위축이 각 3례 및 1례씩 관찰되어 이는 시험물질의 영향으로 판단되었다.

사. 폐, 뇌하수체, 부신

수컷동물의 경우 0.6 mg/kg 투여군에서 충혈이 2례와 1례 및 1례로 관찰되었으나 정도 및 빈도면에서 시험물질의 영향은 아니라고 판단되었다.

아. 저정낭

수컷동물의 경우 0.6 mg/kg 투여군에서 위축이 5례가 관찰되어 발생빈도가 높으므로 시험물질에 의한 영향으로 판단되었다.

자. 대퇴골

수컷 및 암컷동물의 0.6 mg/kg 투여군에서 모세관 확장증 (telangiectasis)이 각 2례 및 3례로 관찰되어 이는 시험물질의 영향으로 인정되었다.

제 4 장 결 론

제 1 절 랫트 주산기 및 수유기 시험

DA-125는 기존의 adriamycin 의 결점인 심장독성과 조혈기계 독성등의 부작용을 줄이기 위하여 개발된 안트라사이클린계 항종양성 항생제의 일종이다. 이러한 DA-125를 0, 0.04, 0.2 및 1 mg/kg의 용량으로 Sprague-Dawley 계통의 랫트에 임신 17일부터 포육 21일까지 정맥투여하여 모동물의 일반상태 및 분만과 차세대동물의 성장 및 기능발달에 미치는 영향을 조사하였다.

모동물의 분만관찰시 1 mg/kg군에서 1례 발견된 난산은 사산자 출산으로 특징지워지는데, 시험물질에 의한 호르몬장애, 대사장애 등을 원인으로 고려할 수 있으나 본 시험에서는 투여스트레스, 체중감소에 따른 허약 등에 기인하여 야기된 것으로 추정된다. 모동물의 체중 및 사료섭취량에 있어서 1 mg/kg군에서 포육 1일 및 포육 8일째 나타난 사료섭취량의 감소는 시험물질 투여 및 출산 스트레스에 의해 야기된 식욕부진증(anorexia), 소화기계통의 점막손상등의 결과로서 이로인해 포육 7일부터 포육 14일까지의 체중이 감소한 것으로 판단된다. 1 mg/kg군에서 나타난 비장중량의 감소는 DA-125의 랫트 급성독성시험¹³⁾, 랫트수태능력시험¹⁴⁾, Tetrahydro-pyranyl adriamycin(THP-adriamycin)의 주산기 및 수유기시험¹⁵⁾에서도 관찰된 소견으로서 시험물질이 조혈기계 및 임파계에 속하는 비장에 독성증상을 나타냄을 알 수 있었다.

행동시험군에 속한 F1 동물의 수미로시험시 암컷의 1 mg/kg군에서 나타난 기억력시험의 합격율 저하는 시험물질 DA-125 또는 대사물질이 태반통과후 F1 암컷태자의 대뇌에 손상을 주었거나 모동물의 포유(lactation)시 시험물질이 F1 동물에 노출되어 야기된 것으로 추정되며 추후 기작, 성의차이 등에 대한 검토

가 필요한 것으로 사료된다. 성장시험군에 속한 F1 동물의 일반증상 관찰시 1 mg/kg군에서 암수 각각 2례씩 관찰된 꼬리 끝 부분의 괴사는 동일배당 출생자들에게서 포육 4일 또는 포육 7일째에 나타나기 시작하여 이유전에 괴사부위는 소실되고 새로운 조직으로 재생한 것으로 미루어보아 모동물에 투여된 시험물질 DA-125 가 수유(lactation)로 F1 동물에 전이되어 모세혈관의 분기점인 꼬리 끝 부분의 혈액순환 장애를 초래함으로써 야기된 것으로 추정된다. 성장시험군에 속한 F1 동물의 체중측정시 암컷의 1 mg/kg군에서 나타난 포육 2주일째 체중의 감소는 시험물질의 투여에 따른 출생시 체중의 감소와 포육불량등에 기인한 것으로 판단된다.

본 시험에서 얻은 결과중 1 mg/kg 군에서 나타난 비장중량의 감소는 상기한 바와같이 DA-125 와 같은 anthracycline 계 항암제인 THP- adriamycin 의 주산기 및 수유기시험¹⁵⁾에서도 관찰되었다. 그러나 그밖의 검사항목들에 있어서는 두 물질간에 질적독성효과(qualitative toxic effect)의 차이를 나타내지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 주산기 및 수유기시험에 의한 DA-125의 무해용량(no observed effect level)은 모동물과 차세대동물에 있어서 0.2 mg/kg 그리고 조정후 남은 F1 랫트와 F2 태자에 있어서 1 mg/kg 이상이라고 사료된다.

제 2 절 토끼 최기형시험

DA-125는 동아제약에서 개발중인 안트라사이클린계 항종양성 항생제이다. 이러한 DA-125를 0, 0.2, 0.6 및 1.8 mg/kg 의 용량으로 New Zealand White 계통의 토끼에 임신 6일부터 임신 18일까지 투여하여 모동물의 일반상태 및 태

자발생에 미치는 영향을 조사하였다.

모동물에서 나타난 난소중량의 감소와 제왕절개시 관찰된 황체수 및 착상수의 감소는 시험물질의 영향으로 상호연계되어 나타난 소견임이 명백하다. 토끼의 경우 착상일은 임신 7~8일로 보고되고 있는데¹⁶⁾, 본 최기형시험에서는 시험물질의 투여가 착상전인 임신 6일부터 시작되어 1차적으로 시험물질에 기인한 착상전 배아사망(preimplantation loss)이 유발되었고 이에 따른 결과로서 착상수의 감소, 임신황체의 퇴화에 따른 황체수의 감소가 난소중량의 감소가 초래된 것으로 사료된다. 또한 배아흡수율의 증가는 시험물질에 기인한 배아치사효과(embryocidal effect)로서 설명되며, 이로 인하여 산자수의 감소가 야기된 것으로 판단된다.

태자의 외표검사시 1.8 mg/kg군에서 관찰된 척추기형, 굴지증 및 복벽파열과 내부장기검사시 역시 1.8 mg/kg군에서 발견된 횡격막탈장 및 심실중격결손은 중기형(major anomaly)에 속하는 소견들로서 시험물질이 암세포와 마찬가지로 세포분열이 빠른 배아(태자)에 작용하여 세포 및 조직의 분화장애등을 야기시킴으로써 나타난 것으로 사료된다.

낮은 빈도의 변이는 보통 시험물질과 무관하게 자연발생적으로 나타날 수 있지만, 그 발현율이 현저히 높거나 용량상관성있게 나타날 경우 시험물질에 기인한 독성효과로 간주된다. 배아흡수의 증가로 검사태자수 작아 군간의 비교가 다소 어렵기는 하지만, 1.8 mg/kg군의 경우 좌측총경동맥의 기시이상과 같은 변이가 높은 발현율(19.2%)로 나타남으로써 DA-125는 변이유도물질임을 알 수 있었다.

태자의 골격검사시 1.8 mg/kg군에서 관찰된 척추기형, 요추추체유착, 요추추궁결손, 천추추궁유착, 늑골유착, 늑골결손 및 흉추결손은 중기형에 속하며 상기한 외표 및 내부장기 기형과 동일한 기작에 의하여 발현한 것으로 사료된다. 그리고 흉골유착은 경기형(minor anomaly)에 속하는 소견으로서 자연발생적으로도 나타날 수도 있으나 본 시험에서는 모독성(maternal toxicity)의 결과로 나타난 비특정 최기형효과(unspecific teratogenic effect)인 것으로

추정된다. 그런데 DA-125 와 동일 계열의 약제인 tetrahydropyranyladriamycin 의 최기형성연구¹⁷⁾ 에서는 어떠한 태자기형도 관찰되지 않아 두 물질간에 최기형유발에 차이가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 최기형시험에 의한 DA-125의 무해용량(no observed effect level)은 모동물 및 태자에 있어서 공히 0.6 mg/kg이라고 사료된다.

제 3 절 랫트 아급성독성시험

시험물질인 DA-125 를 0.005, 0.024, 0.12 및 0.6 mg/kg 용량으로 SD 랫트 에 13주간 연속 복강투여한 결과 나타난 일반증상으로는 탈모, 연변, 하리, 허약, 피모더러움, 피모지저분함, 코주위 암적색물질 저류등이었다. 이들 증상 중 탈모는 수컷동물의 0.6 mg/kg 투여군에서 1례만 관찰되었지만 DA-125 가 항암제인 점을 고려하면 시험물질의 영향이었다고 사료되었다. 또한 연변 및 하리의 증상이 관찰된 바, 이는 결장 및 맹장의 팽대의 육안적 부검소견 및 암컷 동물에서의 물섭취량의 증가등의 일반소견등을 미루어 볼 때, 시험물질이 소화기계통 점막에 영향을 주어 나타났다고 사료되었다. 그리고 허약등의 일반증상은 시험물질의 지속적 영향으로 나타났으며 이에 따라, 상태가 좋은 많은 개체에서 뇨 및 분변활동이 원활치 않아 생식기 및 항문주변의 피모가 오염된 상태인 피모더러움과 피모지저분함이 관찰되었다고 생각되었다. 코주위 암적색물질 저류는 복강투여시 보정에 의한 스트레스의 산물로써 혹은 자율신경 이상으로써 관찰되는 바, 이번 시험에서는 투여보정에 의한 스트레스에 따라 발생되었다고 사료되었다.

체중측정의 변화로써 수컷 및 암컷의 0.6 mg/kg 투여군에서 관찰된 체중감소는 투여중반기인 투여 6주 및 투여 9주째부터 시작되어 투여가 계속됨에 따라

지속되어 나타났으며 아울러 사료섭취량의 감소와 더불어 체중감소가 관찰되었다. 따라서 본 시험에서의 체중감소는, 시험물질의 투여에 따른 사료섭취량의 감소와 간, 비장, 심장 및 흉선등의 변화로 인한 장기중량의 상대적 감소등에 의한 결과로 추측되었다.

안검사의 경우, 수컷동물의 0.024 mg/kg 투여군에서 2례의 백내장 증상이 관찰되었으나 SD 계통의 랫트의 장기간 시험시 가끔 나타나는 자연발생적 증상으로 사료되었으며, 따라서 시험물질에 의한 안과적 이상의 증상은 관찰되지 않았다.

노검사의 경우, 수컷 및 암컷동물의 0.6 mg/kg 투여군에서 노 protein 의 측정치가 통계학적 유의한 저하로 나타난 바, 그 원인으로서는 사료섭취량 감소 및 간질환에 따른 혈장 단백질인 TP 의 감소등에 따른 것으로 추측되며 이것은 독성학적으로 크게 문제가 되지 않는다고 사료된다. 또한 수컷동물의 모든 투여군에서, 노 nitrite 및 노 urobilinogen 의 측정치가 통계학적 유의한 저하로 나타난 바, 본 시험에서의 통계학적 유의한 저하는 독성학적으로 의미가 없으며 다만 매체대조군의 측정치들이 노검사시 다소 높게 나타남으로써 상대적으로 관찰된 것으로 추측되었다. 그리고 암컷동물의 0.6 mg/kg 투여군에서 노 ketone 체의 측정치가 통계학적 유의성있는 저하로 나타난 바, 이는 독성학적 측면에서 별다른 의미가 없으며 그 원인은 알 수 없었다.

혈액학적 검사의 경우, 수컷 및 암컷동물의 0.6 mg/kg 투여군에서 PLT 측정치가 통계학적 유의한 증가로 관찰된 바, PLT가 랫트에서는 혈액중 수명이 4-5 일인 무핵의 원형성의 입자로서 혈관의 출혈방지의 생체방어기작을 담당하는 것으로 PLT 의 생산의 항진 또는 붕괴의 저하에 의하여 또는 만성염증, 급성염증 및 용혈성 빈혈시 PLT 가 증가하는 것이다. 본 시험의 PLT 증가는 투여경로가 복강투여인 점을 고려할 때 시험물질의 투여에 의한 소화기 계통의 주위염증 반응에 수반되어 나타난 것으로 추측된다. 아울러 PT 시간의 통계학적 유의한 증가로 관찰된 바, PT 의 연장은 선천성 응고인자 결핍증, 중중간실질장애, 항응고약(헤파린)투여, 비타민 K 결핍에 의한 응고인자 결핍증, 응고인자

등에 대한 자기항체가 존재할 때 발생된다. 본 시험에서는 시험물질이 응고계의 외인성 경로와 공통경로에 영향을 주어 PT 시간의 연장이 관찰되었다고 사료되는데 간실질장애 및 장관의 영양분 흡수 장애가 부분적으로 관여되지 않았을까 판단된다. 그리고 수컷동물의 0.6 mg/kg 투여군에서 WBC 측정치와 Lymphocyte 백분율이, 암컷동물의 0.6 mg/kg 투여군에서 Lymphocyte 의 백분율이, 각각 통계학적 유의한 감소로 관찰된 바, 이들 감소는 생산의 감소, 무효조혈 및 파괴의 항진의 3가지 원인에 따라 나타나는 것으로써 본 시험에서는 시험물질이 항암제인 것을 고려하면 시험물질에 의한 생산의 감소 및 파괴의 항진등에 따라 관찰되었다고 추측된다.

혈액생화학적 검사의 경우, 0.6 mg/kg 투여군의 수컷동물에서는 TG, TP, ALB 및 PL 의 측정치가, 0.6 mg/kg 투여군의 암컷동물에서는 TP 및 ALB 의 측정치가 각각 통계학적 유의한 감소로 인정되었다. 이들 수치는 간실질장애 혹은 영양분 흡수부전등에 의하여 감소될 수 있는데, 본 시험에서는 시험물질이 간장과 소장등의 소화기 계통에 영향을 미쳐 체내 영양분 흡수장애로 혈중농도가 저하되었다고 사료된다. 그리고 0.6 mg/kg 투여군의 고농도 수컷 및 암컷동물에서는 BUN 의 측정치가 통계학적 유의한 증가로 관찰된 바, BUN 의 증가는 신우, 방광 및 뇨도등의 기질적 폐색이나 신기능저하에 따른 배설장애로 나타나는데 네프론의 심한 손상이 동반될 때 의미를 찾을 수 있다고 알려져 있다. 본 시험의 병리조직학적 소견에서 방광 및 신장의 이상소견이 관찰되지 않아 BUN 의 증가는 시험물질이 신기능저하를 가져와 나타난 것인지 해석하기 어렵다. 0.6 mg/kg 투여군의 수컷동물에서 ALP 의 통계학적 유의한 증가가 관찰된 바, ALP 가 간장, 신장, 장관 및 골의 기능장애로 인하여 혈중에 높은 수치로 나타나는 비특이적 효소라는 점에서 간장 및 소장등의 제반장기가 시험물질의 영향을 다소 받았으리라 사료된다. 0.6 mg/kg 투여군의 암컷동물에서 Na 의 측정치가 통계학적 유의한 증가로 관찰되었다. Na 의 혈중농도가 K 및 Cl 의 혈중농도와 더불어 삼투압조절이나 수분의 과부족상태와 산, 염기 평형상태등의 파악에 중요한 것으로, 다양한 원인에 의한 수분섭취의 감소나 소화관등에

서의 수분상실의 증가에 의한 수분결핍증등에 의하여 혈중 Na 의 수치가 증가할 수 있다. 0.6 mg/kg 투여군에서 Na 의 측정치의 변화는 소화기계통 조직의 수분상실에 따른 것으로 볼 수도 있으나 혈중 Cl 의 측정치가 변동이 없음에 유의하면 통계학적 유의성은 인정되나 생물학적 유의성은 인정되지 않아 시험물질에 의한 특별한 영향으로는 사료되지 않는다.

부검소견의 경우 수컷 및 암컷동물은 0.6 mg/kg 투여군에서만 비교적 세포활성이 왕성한 소화기계통과 비장과 흉선등 조혈기계통등에서 위축등 이상소견이 관찰되었으며, 이는 중량을 측정한 해당장기의 장기중량에 있어서 절대 및 상대장기중량의 감소와 일치하였다. 몇례에 관찰된 복수의 저류는 시험물질의 복강투여에 따른 복막염으로 인한 2차적 반응으로 사료된다.

병리조직학적 소견의 경우 수컷 및 암컷동물은 0.6 mg/kg 투여군에서만 비장과 흉선의 위축 및 대퇴골의 모세관 확장증을 나타내어 공히 조혈기 제반장기에 시험물질의 독성영향이 발휘되었음을 알 수 있다. 수컷동물은 0.6 mg/kg 투여군에서 간장과 결장의 주위염 및 저장낭의 위축도 관찰되어 암컷동물보다 더 민감하게 시험물질의 영향을 받았으리라 사료된다.

DA-125 는 새로이 합성된 anthracycline 계 항암제로서 동일계 대표적 항암제 doxorubicin 보다 조혈기독성, 심장독성, 국소자극성등의 특징적 부작용을 경감할 목적으로 개발되었으며¹⁸⁾, 랫트를 이용한 4주간 미정맥 투여시¹⁹⁾ 1.0 mg/kg 투여군에서는 백혈구(WBC)감소, 혈소판(PLT)증가 및 흉선과 비장의 위축등의 조혈기 계통의 독성영향이 관찰되었고 0.2 mg/kg 투여군에서는 별다른 시험물질의 영향이 없었던 바, 본 시험의 경우 0.6 mg/kg 복강투여군에서도 백혈구 감소, 혈소판 증가, 그리고 흉선과 비장의 위축이 관찰되었으며 0.12 mg/kg 투여군에서는 별다른 이상소견이 관찰되지 않아, 본 시험물질은 랫트에 투여할 시 독성반응의 역치(threshold)가 매우 좁은 범위안에 존재함을 알 수 있다.

이상의 결과에 따라 SD 랫트에 있어서 DA-125 의 0.6 mg/kg 용량은 수컷동물의 확실중독량에, 암컷동물의 최대내성용량에 해당되며, 0.12 mg/kg 용량은 암수동물의 무해용량으로 추정되었다. 그리고 본 시험물질의 표적장기는 비장

과 홍선등의 조혈기장기들과 소장 그리고 저장낭이라고 사료된다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Smithells, R.W. (1980) : The challenges of teratology. *Teratology* 22:77-85
2. Warkany, J. (1977) : History of teratology. In : Wilson, J.G, Fraser, F.C. eds, *Handbook of teratology*, vol.1, Plenum Press, New York and London, pp.3-45
3. Warkany, J (1979) : The medical profession and congenital malformations(1900-1979) : *Teratology* 20:201-204.
4. Wilson, J. G. (1979) : The evolution of Teratological testing. *Teratology* 20:205-212.
5. McBride, W. G. (1977) : Thalidomide embryopathy. *Teratology* 16:79-82.
6. Palmer, A. K. and Cozens, D.D.(1980) : comments on the history of teratology testing. *Teratology* 21:260.
7. Food and Drug Administration, Department of Health, Education, and welfare : *Guidelines for Reproduction of Drugs for Human Use*. USA, Washington D.C, January, 1966

8. Wilson, J.G. and Warkany, J.(1972) : Teratology, Principles and Techniques. The university of Chicago press. pp 1-277.
9. Nishimura, K.(1974) : A microdissection method for detecting thoracic vesceal malformations in mouse and rat fetuses Cong.Anom. 14(1):23-40.
10. Dawson, A.B.(1926) : A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. Stain Technol. 1:123-124.
11. Stuckhardt, J. L. and Poppe, S. M. (1984) : Fresh vesceal examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 4:181-188
12. Morita, H, Ariyuki, F, Inomata N, Nishimura, K, Kasegawa, Kasegawa, Y, Miyamoto, M. and Watanabe, T. (1987) : Spontaneous malformations in laboratory animals : Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. Cong. Anom. 27:147-206.
13. 신천철(1991) : DA-125 의 랫트에 있어서 정맥투여 급성독성시험, 한국화학연구소 안전성연구센터. pp 1-265.
14. 정문구 등(1994) : 새로운 안트라사이클린계 항암제 DA-125 의 생식독성연구 : (II) 랫트 수태능력시험, 응용약물학회지 2(1):94-101.
15. Kurebe, M. et al(1986): A study on the effect of (2''R)-4'-0-tetrahydropyranyladriamycin, a new antitumor antibiotic, on reproduction. III. Its effects on perinatal and postnatal rats. Jpn. J.

of Antibiotics 39(2) : 507-525.

16. Manson, J. M. and Kang, Y. J. : Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In : Hayes W et al, eds. Principles and methods of toxicology. Raven press, New York 1989:311-359.

17. Kurebe, M, Asaoka, H, Moriguchi, M, Hata, T, Okano, K, and Ito, M(1986) : A study on the effect of (2''R)-4'-o-tetrahydropyranyl-adriamycin, a new antitumor antibiotic, on reproduction. II. Its teratogenicity in rats and rabbits. Jpn. J. of Antibiotics 39(2):161-190.

18. Ahn, B. O., Baik, N. G., Kim, O. J., Kang, K. K., Lee, S.B., Kim, W. B., Yang, J. and Kwang, H. K. (1993). Hematotoxicity and vascular irritation of DA-125, a new anthracycline anticancer agent. J. Appl. Pharmacol. 2:244-250.

19. Lee, S. B., Baik, N. G., Ahn, B. O., Kim, O. J., Kang, K. K., Lee, C. Y., Kim, W. B. and Yang, J. (1993). Subacute toxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent in rats. J. Appl. Pharmacol. 2:226-235.

Table 1-1. Clinical signs of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
GESTATION				
No. of observed	20	21	21	22
Normal	20 (100%)	21 (100%)	21 (100%)	21 (95%)
Difficult delivery	0	0	0	1 (5%)
POST PARTUM				
No. of observed	20	21	21	21
Normal	20 (100%)	21 (100%)	21 (100%)	21 (100%)
Normal	20 (100%)	21 (100%)	21 (100%)	22 (100%)

Table 1-2. Mean body weights of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

PERIOD	GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
GESTATION					
0 DAY	MEAN	249.8	247.2	245.8	246.7
	S. D.	17.04	20.34	19.83	20.59
	N	20	21	21	22
7 DAY	MEAN	283.6	281.8	281.5	282.2
	S. D.	19.76	21.97	19.88	22.10
	N	20	21	21	22
10 DAY	MEAN	296.7	296.1	296.4	297.2
	S. D.	20.18	22.72	20.39	21.42
	N	20	21	21	22
14 DAY	MEAN	319.9	319.1	319.5	320.1
	S. D.	21.35	25.80	20.45	21.86
	N	20	21	21	22
17 DAY	MEAN	352.8	348.6	353.8	351.5
	S. D.	25.13	28.59	23.08	23.49
	N	20	21	21	22
20 DAY	MEAN	391.7	387.0	394.4	382.1
	S. D.	28.00	34.95	24.25	24.06
	N	20	21	21	22
POST PARTUM					
0 DAY	MEAN	299.7	299.5	300.8	290.8
	S. D.	25.97	25.30	22.77	23.84
	N	20	21	21	22
7 DAY	MEAN	317.1	314.4	320.6	299.4*
	S. D.	20.55	23.49	18.24	23.97
	N	20	21	21	21
14 DAY	MEAN	323.6	321.7	328.2	307.7*
	S. D.	19.52	21.02	20.50	21.45
	N	20	21	21	21
21 DAY	MEAN	300.3	297.9	296.7	293.2
	S. D.	16.87	19.87	21.42	18.82
	N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$
 ** : Significantly different from control value at $p < 0.01$

Table 1-3. Mean food consumption of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

PERIOD	GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
GESTATION					
1 DAY	MEAN	17.7	16.4	18.3	18.4
	S. D.	4.28	3.20	2.65	3.71
	N	20	21	21	22
8 DAY	MEAN	23.9	24.1	25.8	24.7
	S. D.	3.25	4.54	2.77	3.31
	N	20	21	21	22
11 DAY	MEAN	24.8	24.2	24.7	24.8
	S. D.	3.67	3.50	2.67	3.70
	N	20	21	21	22
15 DAY	MEAN	25.9	24.9	26.5	26.2
	S. D.	3.67	4.65	3.55	3.65
	N	20	21	21	22
18 DAY	MEAN	25.4	25.4	26.1	23.5
	S. D.	3.89	3.89	3.52	3.34
	N	20	21	21	22
20 DAY	MEAN	26.6	25.3	26.7	24.5
	S. D.	4.82	4.77	5.70	5.88
	N	20	21	21	22
POST PARTUM					
1 DAY	MEAN	19.7	17.1	19.8	14.4*
	S. D.	5.57	5.28	6.03	4.46
	N	20	21	21	21
8 DAY	MEAN	48.7	47.4	50.2	43.4*
	S. D.	6.49	6.72	5.20	8.69
	N	20	21	21	21
15 DAY	MEAN	59.9	59.0	62.7	57.4
	S. D.	6.78	5.98	6.59	9.56
	N	20	21	21	21
21 DAY	MEAN	79.6	76.4	78.7	76.4
	S. D.	8.54	8.97	7.64	10.26
	N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$

** : Significantly different from control value at $p < 0.01$

Table 1-4. Gross findings of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
BRAIN				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
LIVER				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
SPLEEN				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	22
Pelvis Dilatation	1 5%	1 5%	0	0
NO GROSS FINDINGS	19 95%	20 95%	21 100%	22 100%
HEART				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
OVARY-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
OVARY-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	22
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	22 100%
RECTUM				
No. of Observations	20	21	21	22
Expanded with Gas	1 5%	0	0	0
NO GROSS FINDINGS	19 95%	21 100%	21 100%	22 100%

Table I-5. Absolute organ weights of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP :	CONTROL	T1	T2	T3
DOSE : (mg/kg)	0	0.04	0.2	1.0
BODY WEIGHT (G)				
MEAN	298.7	297.4	300.4	290.5
SD	17.08	20.05	22.76	18.60
N	20	21	21	21
BRAIN (G)				
MEAN	1.868	1.880	1.862	1.870
SD	0.0655	0.0771	0.0897	0.0584
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT (G)				
MEAN	0.037	0.037	0.040	0.038
SD	0.0049	0.0053	0.0061	0.0065
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)				
MEAN	0.032	0.034	0.035	0.033
SD	0.0051	0.0046	0.0052	0.0052
N	20	21	21	21
LIVER (G)				
MEAN	14.240	13.978	14.183	13.408
SD	1.2370	1.9927	1.5849	1.7975
N	20	21	21	21
SPLEEN (G)				
MEAN	0.522	0.504	0.528	0.412**
SD	0.0532	0.0491	0.0484	0.0443
N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT (G)				
MEAN	1.113	1.160	1.172	1.092
SD	0.0878	0.1250	0.0971	0.1013
N	20	21	21	21
KIDNEY-RIGHT (G)				
MEAN	1.173	1.219	1.202	1.151
SD	0.1117	0.1091	0.1124	0.1065
N	20	21	21	21

(REPORT CONTINUED)

Table 1-5. Absolute organ weights of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP :	CONTROL	T1	T2	T3
DOSE : (mg/kg)	0	0.04	0.2	1.0
HEART (G)				
MEAN	1.049	1.052	1.069	1.041
SD	0.0870	0.0934	0.1084	0.1059
N	20	21	21	21
OVARY-LEFT (G)				
MEAN	0.041	0.043	0.046	0.038
SD	0.0073	0.0073	0.0077	0.0074
N	20	21	21	21
OVARY-RIGHT (G)				
MEAN	0.045	0.042	0.042	0.038
SD	0.0092	0.0067	0.0063	0.0083
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (G)				
MEAN	0.069	0.071	0.075	0.071
SD	0.0090	0.0089	0.0107	0.0114
N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (G)				
MEAN	2.286	2.380	2.374	2.243
SD	0.1929	0.2261	0.1992	0.2010
N	20	21	21	21
OVARY-LEFT+OVARY-RIGHT (G)				
MEAN	0.086	0.085	0.088	0.076*
SD	0.0093	0.0102	0.0109	0.0114
N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's procedure

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$

** : Significantly different from control value at $p < 0.01$

(END OF REPORT)

Table 1-6. Relative organ weights of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
BRAIN (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.627	0.634	0.623	0.646
SD	0.0373	0.0309	0.0470	0.0472
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.012	0.013	0.013	0.013
SD	0.0019	0.0018	0.0019	0.0023
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.011	0.011	0.012	0.012
SD	0.0019	0.0019	0.0018	0.0020
N	20	21	21	21
LIVER (% BODY WEIGHT)				
MEAN	4.763	4.689	4.717	4.602
SD	0.2412	0.4736	0.3138	0.4132
N	20	21	21	21
SPLEEN (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.175	0.170	0.176	0.142**
SD	0.0159	0.0156	0.0160	0.0173
N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.373	0.391	0.391	0.376
SD	0.0291	0.0409	0.0290	0.0258
N	20	21	21	21
KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.393	0.411	0.401	0.396
SD	0.0363	0.0336	0.0363	0.0292
N	20	21	21	21
HEART (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.351	0.354	0.356	0.359
SD	0.0243	0.0271	0.0291	0.0295
N	20	21	21	21

(REPORT CONTINUED)

Table 1-6. Relative organ weights of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
OVARY-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.014	0.015	0.015	0.013
SD	0.0026	0.0024	0.0024	0.0026
N	20	21	21	21
OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.015	0.014	0.014	0.013
SD	0.0032	0.0024	0.0022	0.0026
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.023	0.024	0.025	0.025
SD	0.0035	0.0035	0.0034	0.0039
N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.766	0.801	0.792	0.772
SD	0.0632	0.0717	0.0622	0.0520
N	20	21	21	21
OVARY-LEFT+OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.029	0.029	0.029	0.026*
SD	0.0033	0.0036	0.0033	0.0036
N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's procedure

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$

** : Significantly different from control value at $p < 0.01$

(END OF REPORT)

Table 1-7. Reproductive and littering findings of dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
No. of dams	20	21	21	22
No. of implantations	310	314	327	353
Mean ± S.D	15.5 ± 1.3	15.0 ± 2.0	15.6 ± 2.2	16.0 ± 1.5
No. of perinatal deaths	0	1	2	17
% to implantation : Mean ± S.D	0	0.3 ± 1.4	0.6 ± 2.0	5.0 ± 16.3
No. of live young at birth				
Male	149	135	151	152
Female	138	154	152	149
Total	287	289	303	301
Mean ± S.D	14.4 ± 1.5	13.8 ± 2.4	14.4 ± 2.3	14.3 ± 1.4
% to implantation	92.7 ± 8.0	91.6 ± 8.3	92.6 ± 5.9	89.3 ± 9.9
Mean ± S.D				
No. of neonates with external anomalies	0	0	0	0
Pregnancy period (day) (Mean ± S.D)	22.2 ± 0.4	22.2 ± 0.4	22.1 ± 0.4	22.1 ± 0.3
Viability index ^{a)} (%)	97.9	98.3	98.7	98.7
Lactation index ^{b)} (%)	100	100	100	100
Delivery index ^{c)}	20/20	21/21	21/21	21/22

a) (No. of live offspring at day 4 / No. of live offspring at birth) x 100

b) (No. of live offspring at day 21 / No. of live offspring after litter size control) x 100

c) No. of dams with live newborns / No. of pregnant dams

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

Table 1-8. Gross findings of F1 pups on day 21 postnatally whose dams were treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
BRAIN				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%
LIVER				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%
SPLEEN				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	20	19	20	19
White Spot	0	0	1 5%	0
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	19 95%	19 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%
HEART				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%
TESTIS-LEFT				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%
TESTIS-RIGHT				
No. of Observations	20	19	20	19
NO GROSS FINDINGS	20 100%	19 100%	20 100%	19 100%

(REPORT CONTINUED)

Table 1-8. Gross findings of F1 pups on day 21 postnatally whose dams were treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
FEMALE				
BRAIN				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
LIVER				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
SPLEEN				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
HEART				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
TESTIS-LEFT				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%
TESTIS-RIGHT				
No. of Observations	19	19	21	18
NO GROSS FINDINGS	19 100%	19 100%	21 100%	18 100%

(END OF REPORT)

Table 1-9. Postnatal physical development results of F1 pups from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
No. of animals	20	21	21	21
Auricular detachment	2.55±0.51	2.61±0.50	2.67±0.48	2.76±0.44
Hair growth	8.85±0.49	8.86±0.48	8.95±0.50	9.14±0.57
Incisors eruption	10.95±0.69	10.52±0.68	10.90±0.89	11.05±0.86
Eyelid opening	13.30±0.73	13.24±0.77	13.24±0.70	13.62±0.59
Testis descent	22.15±0.67	22.29±0.85	22.10±0.83	22.33±0.86
FEMALE				
No. of animals	20	21	21	21
Auricular detachment	2.55±0.51	2.61±0.50	2.67±0.48	2.76±0.44
Hair growth	8.65±0.49	8.81±0.40	8.71±0.56	9.00±0.45
Incisors eruption	11.05±1.05	10.52±0.60	10.52±0.60	10.62±0.67
Eyelid opening	13.20±0.70	13.00±0.71	12.86±0.65	13.38±0.74
Vagina opening	30.35±0.67	30.57±0.68	30.24±0.44	30.57±0.68

Values are Mean±S.D. (days).

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

Table 1-10. Faculty tests results of F1 pups from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
No. of animals	20	21	21	21
Righting reflex	6.85±0.37	6.81±0.40	6.95±0.22	7.0
Negative geotaxis	11.15±0.37	11.05±0.22	11.33±0.48	11.14±0.36
Traction test	16.75±2.43	15.95±2.67	15.71±1.93	16.52±2.34
Pupillary reflex	21.0	21.0	21.0	21.0
Acoustic startle response	21.0	21.0	21.0	21.0
Rotating rod test	24.20±1.44	23.95±1.47	23.62±1.53	24.33±1.28
FEMALE				
No. of animals	20	21	21	21
Righting reflex	6.85±0.37	6.81±0.40	6.95±0.22	7.0
Negative geotaxis	11.10±0.31	11.24±0.44	11.43±0.51	11.05±0.22
Traction test	15.50±1.43	16.48±2.11	15.86±1.96	15.52±1.86
Pupillary reflex	21.0	21.0	21.0	21.0
Acoustic startle response	21.0	21.0	21.0	21.0
Rotating rod test	23.80±1.28	24.14±1.28	23.71±1.65	24.38±1.66

Values are Mean±S.D. (days).

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

Table 1-11. Open field test results of F1 pups from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
No. of animals	20	21	21	21
No. of squares	22.5±12.58	19.9±13.62	21.1±9.12	18.7±11.89
FEMALE				
No. of animals	20	21	21	21
No. of squares	31.3±13.92	32.3±14.96	29.1±11.41	30.0±14.43

Values are Mean±S.D.

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

Table 1-12. Water-filled simple T-maze test results of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
No. of animals	20	21	21	21
% of correct escapes				
Learning 1-6	76.7±11.34	69.8±16.35	73.0±11.15	75.4±18.72
Memory	70.0	81.0	71.4	90.5
Reverse learning 1-6	52.5±22.47	64.3±27.02	56.3±23.26	57.9±25.07
FEMALE				
No. of animals	20	21	21	21
% of correct escapes				
Learning 1-6	74.2±13.76	77.8±10.97	77.8±14.27	75.4±11.33
Memory	75.0	61.9	52.4	28.6*
Reverse learning 1-6	50.0±24.18	52.4±16.06	54.0±24.10	51.6±24.10

Values are Mean±S.D.

X² test

* Significantly different from control value at p<0.05

Table 1-13. Clinical signs of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
No. of observations	20	21	21	21
Terminal Sacrificed	20	21	21	21
Normal	20 100%	21 100%	21 100%	19 90.5%
Necrosis of tail end	0	0	0	2 9.5%
FEMALE				
No. of observations	20	21	21	21
Terminal Sacrificed	20	21	21	21
Normal	20 100%	21 100%	21 100%	19 90.5%
Necrosis of tail end	0	0	0	2 9.5%

Table 1-14. Mean body weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE					
0 DAY	MEAN	6.6	6.9	6.8	6.2
	S. D.	0.71	0.67	0.62	0.53
	N	20	21	21	21
1 WEEK	MEAN	17.6	18.1	18.6	16.3
	S. D.	2.14	1.60	1.81	1.56
	N	20	21	21	21
2 WEEK	MEAN	35.2	36.2	37.3	33.4
	S. D.	3.92	2.74	2.87	3.20
	N	20	21	21	21
3 WEEK	MEAN	58.7	59.9	61.1	55.9
	S. D.	6.93	4.82	5.34	4.49
	N	20	21	21	21
4 WEEK	MEAN	102.7	103.2	108.7	97.6
	S. D.	11.18	8.96	8.74	6.84
	N	20	21	21	21
5 WEEK	MEAN	162.0	163.9	170.2	156.2
	S. D.	12.19	11.37	13.18	11.05
	N	20	21	21	21
6 WEEK	MEAN	223.4	223.1	235.0	215.0
	S. D.	21.26	15.10	16.72	14.08
	N	20	21	21	21
7 WEEK	MEAN	283.9	286.7	301.3*	279.8
	S. D.	26.74	17.43	21.90	16.25
	N	20	21	21	21
8 WEEK	MEAN	343.4	340.7	359.6	335.2
	S. D.	23.78	19.76	26.30	21.22
	N	20	21	21	21
9 WEEK	MEAN	384.5	382.1	402.7	377.4
	S. D.	29.08	22.86	26.18	24.79
	N	20	21	21	21
10 WEEK	MEAN	421.2	414.8	437.3	412.4
	S. D.	29.62	26.63	31.48	29.33
	N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$

(REPORT CONTINUED)

Table 1-14. Mean body weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
FEMALE					
0 DAY	MEAN	6.3	6.6	6.4	5.9
	S. D.	0.90	0.69	0.67	0.69
	N	20	21	21	21
1 WEEK	MEAN	16.5	17.0	17.5	15.5
	S. D.	2.08	1.77	1.67	1.44
	N	20	21	21	21
2 WEEK	MEAN	33.7	34.9	36.2*	31.7*
	S. D.	3.42	2.50	1.93	2.54
	N	20	21	21	21
3 WEEK	MEAN	56.2	55.8	58.8	53.3
	S. D.	6.96	6.05	3.65	3.71
	N	20	21	21	21
4 WEEK	MEAN	94.0	92.6	98.2	88.2
	S. D.	10.15	7.22	6.52	7.01
	N	20	21	21	21
5 WEEK	MEAN	135.7	133.8	140.5	129.1
	S. D.	13.83	12.83	9.00	11.49
	N	20	21	21	21
6 WEEK	MEAN	169.1	169.7	175.9	162.6
	S. D.	15.08	12.57	13.94	11.84
	N	20	21	21	21
7 WEEK	MEAN	196.0	197.9	201.3	188.5
	S. D.	15.90	17.56	16.78	15.07
	N	20	21	21	21
8 WEEK	MEAN	214.7	219.3	225.7	209.4
	S. D.	19.85	17.30	21.15	15.87
	N	20	21	21	21
9 WEEK	MEAN	228.4	236.5	237.8	223.7
	S. D.	19.57	20.68	22.65	18.16
	N	20	21	21	21
10 WEEK	MEAN	241.7	250.7	251.4	240.7
	S. D.	22.18	18.98	27.80	20.95
	N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$

(END OF REPORT)

Table 1-15. Gross findings of 10 weeks old F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
BRAIN				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
LIVER				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
SPLEEN				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	21
Pelvis Dilatation	0	0	1 5%	0
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	20 95%	21 100%
HEART				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
TESTIS-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	21
Atrophy	0	0	0	1 5%
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	20 95%
TESTIS-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%

(REPORT CONTINUED)

Table 1-15. Gross findings of 10 weeks old F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
FEMALE				
BRAIN				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
LIVER				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
SPLEEN				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
HEART				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
OVARY-LEFT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%
OVARY-RIGHT				
No. of Observations	20	21	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	21 100%	21 100%	21 100%

(END OF REPORT)

Table 1-16. Absolute organ weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE: (mg/kg)		CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE					
BODY WEIGHT (G)					
	MEAN	421.2	414.8	437.3	412.4
	SD	29.62	26.63	31.48	29.33
	N	20	21	21	21
BRAIN (G)					
	MEAN	2.028	2.053	2.044	2.012
	SD	0.0964	0.0812	0.0907	0.1193
	N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT (G)					
	MEAN	0.028	0.028	0.029	0.028
	SD	0.0046	0.0032	0.0046	0.0050
	N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)					
	MEAN	0.025	0.025	0.026	0.025
	SD	0.0040	0.0036	0.0040	0.0056
	N	20	21	21	21
LIVER (G)					
	MEAN	19.341	19.101	19.566	18.157
	SD	2.4025	2.1593	2.6443	3.0278
	N	20	21	21	21
SPLEEN (G)					
	MEAN	0.733	0.734	0.827*	0.731
	SD	0.1311	0.1306	0.0929	0.1002
	N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT (G)					
	MEAN	1.669	1.659	1.691	1.585
	SD	0.1971	0.1175	0.1442	0.1344
	N	20	21	21	21
KIDNEY-RIGHT (G)					
	MEAN	1.697	1.712	1.773	1.694
	SD	0.1832	0.0943	0.1524	0.3589
	N	20	21	21	21

(REPORT CONTINUED)

Table 1-16. Absolute organ weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP:	CONTROL	T1	T2	T3		
	DOSE: (mg/kg)		0	0.04	0.2	1.0
MALE						
HEART (G)		MEAN	1.303	1.298	1.380	1.315
		SD	0.1346	0.0951	0.1587	0.1065
		N	20	21	21	21
TESTIS-LEFT (G)		MEAN	1.595	1.585	1.681	1.517
		SD	0.1551	0.1006	0.1198	0.2024
		N	20	21	21	21
TESTIS-RIGHT (G)		MEAN	1.633	1.583	1.685	1.568
		SD	0.1550	0.1012	0.1287	0.1308
		N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (G)		MEAN	0.054	0.053	0.055	0.053
		SD	0.0082	0.0055	0.0082	0.0099
		N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (G)		MEAN	3.366	3.371	3.464	3.279
		SD	0.3710	0.1989	0.2895	0.4126
		N	20	21	21	21
TESTIS-LEFT+TESTIS-RIGHT (G)		MEAN	3.228	3.168	3.366	3.086
		SD	0.3049	0.1991	0.2429	0.3053
		N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

* Significantly different from control value at $p < 0.05$

(REPORT CONTINUED)

Table 1-16. Absolute organ weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE: (mg/kg)		CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
FEMALE					
BODY WEIGHT (G)					
MEAN		241.7	250.7	251.4	240.7
SD		22.18	18.98	27.80	20.95
N		20	21	21	21
BRAIN (G)					
MEAN		1.855	1.918	1.880	1.821
SD		0.1032	0.1740	0.0696	0.1015
N		20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT (G)					
MEAN		0.035	0.036	0.036	0.037
SD		0.0071	0.0077	0.0077	0.0092
N		20	21	21	21
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)					
MEAN		0.032	0.031	0.035	0.035
SD		0.0052	0.0071	0.0049	0.0086
N		20	21	21	21
LIVER (G)					
MEAN		9.542	9.859	10.016	9.341
SD		1.1029	1.1127	1.6688	1.1671
N		20	21	21	21
SPLEEN (G)					
MEAN		0.485	0.485	0.524	0.473
SD		0.0735	0.0624	0.0692	0.0584
N		20	21	21	21
KIDNEY-LEFT (G)					
MEAN		0.942	0.982	0.982	0.919
SD		0.0832	0.0977	0.1011	0.0961
N		20	21	21	21
KIDNEY-RIGHT (G)					
MEAN		0.976	1.017	1.021	0.941
SD		0.0898	0.1044	0.1024	0.0916

(REPORT CONTINUED)

Table 1-16. Absolute organ weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE: (mg/kg)		CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
FEMALE					
HEART (G)					
	MEAN	0.843	0.875	0.828	0.842
	SD	0.0957	0.0803	0.1880	0.0800
	N	20	21	21	21
OVARY-LEFT (G)					
	MEAN	0.046	0.048	0.047	0.045
	SD	0.0083	0.0085	0.0084	0.0095
	N	20	21	21	21
OVARY-RIGHT (G)					
	MEAN	0.046	0.048	0.050	0.047
	SD	0.0079	0.0091	0.0081	0.0105
	N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (G)					
	MEAN	0.067	0.067	0.071	0.071
	SD	0.0117	0.0139	0.0087	0.0173
	N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (G)					
	MEAN	1.918	1.998	2.002	1.860
	SD	0.1676	0.1955	0.1968	0.1808
	N	20	21	21	21
OVARY-LEFT+OVARY-RIGHT (G)					
	MEAN	0.092	0.096	0.097	0.092
	SD	0.0116	0.0156	0.0137	0.0175
	N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

(END OF REPORT)

Table 1-17. Relative organ weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP:		CONTROL	T1	T2	T3
DOSE: (mg/kg)		0	0.04	0.2	1.0
MALE					
BRAIN (% BODY WEIGHT)					
	MEAN	0.483	0.497	0.469	0.490
	SD	0.0339	0.0353	0.0296	0.0372
	N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT (% BODY WEIGHT)					
	MEAN	0.007	0.007	0.007	0.007
	SD	0.0014	0.0009	0.0013	0.0011
	N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)					
	MEAN	0.006	0.006	0.006	0.006
	SD	0.0012	0.0009	0.0010	0.0013
	N	20	21	21	21
LIVER (% BODY WEIGHT)					
	MEAN	4.603	4.606	4.481	4.386
	SD	0.5826	0.4468	0.5807	0.5262
	N	20	21	21	21
SPLEEN (% BODY WEIGHT)					
	MEAN	0.174	0.177	0.190	0.178
	SD	0.0267	0.0300	0.0226	0.0231
	N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT (% BODY WEIGHT)					
	MEAN	0.397	0.401	0.387	0.385
	SD	0.0460	0.0334	0.0283	0.0269
	N	20	21	21	21
KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)					
	MEAN	0.404	0.414	0.406	0.411
	SD	0.0460	0.0286	0.0289	0.0786
	N	20	21	21	21

(REPORT CONTINUED)

Table 1-17. Relative organ weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
HEART (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.309	0.313	0.317	0.319
SD	0.0235	0.0197	0.0384	0.0177
N	20	21	21	21
TESTIS-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.380	0.383	0.386	0.369
SD	0.0400	0.0269	0.0367	0.0495
N	20	21	21	21
TESTIS-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.389	0.383	0.387	0.381
SD	0.0393	0.0280	0.0371	0.0347
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.013	0.013	0.013	0.013
SD	0.0024	0.0015	0.0023	0.0022
N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.801	0.815	0.793	0.796
SD	0.0897	0.0595	0.0552	0.0853
N	20	21	21	21
TESTIS-LEFT+TESTIS-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.768	0.766	0.773	0.750
SD	0.0784	0.0543	0.0728	0.0765
N	20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

(REPORT CONTINUED)

Table 1-17. Relative organ weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
FEMALE				
BRAIN (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.774	0.768	0.754	0.763
SD	0.0823	0.0772	0.0713	0.0852
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.015	0.014	0.015	0.015
SD	0.0028	0.0029	0.0038	0.0036
N	20	21	21	21
ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.013	0.012	0.014	0.014
SD	0.0025	0.0026	0.0023	0.0033
N	20	21	21	21
LIVER (% BODY WEIGHT)				
MEAN	3.950	3.931	3.979	3.882
SD	0.3094	0.3185	0.4509	0.3628
N	20	21	21	21
SPLEEN (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.201	0.194	0.209	0.197
SD	0.0247	0.0253	0.0263	0.0216
N	20	21	21	21
KIDNEY-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.391	0.392	0.391	0.383
SD	0.0264	0.0291	0.0261	0.0317
N	20	21	21	21
KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.405	0.406	0.407	0.391
SD	0.0288	0.0388	0.0282	0.0252
N	20	21	21	21

(REPORT CONTINUED)

Table 1-17. Relative organ weights of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE: (mg/kg)		CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
FEMALE					
HEART (% BODY WEIGHT)					
MEAN		0.349	0.349	0.330	0.350
SD		0.0238	0.0256	0.0773	0.0269
N		20	21	21	21
OVARY-LEFT (% BODY WEIGHT)					
MEAN		0.019	0.019	0.019	0.019
SD		0.0036	0.0034	0.0032	0.0042
N		20	21	21	21
OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)					
MEAN		0.019	0.019	0.020	0.020
SD		0.0034	0.0034	0.0033	0.0041
N		20	21	21	21
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)					
MEAN		0.028	0.027	0.028	0.030
SD		0.0049	0.0052	0.0048	0.0066
N		20	21	21	21
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)					
MEAN		0.795	0.798	0.799	0.774
SD		0.0523	0.0651	0.0505	0.0537
N		20	21	21	21
OVARY-LEFT+OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)					
MEAN		0.038	0.038	0.039	0.039
SD		0.0053	0.0059	0.0055	0.0074
N		20	21	21	21

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

(END OF REPORT)

Table 1-18. Fertility data of F1 rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

Group : Dose(mg/kg) :	Control 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
Male				
No. of mated animals	20	20	21	21
Copulation index ^{a)} (%)	20/20(100)	18/20(90)	21/21(100)	21/21(100)
Fertility index ^{b)} (%)	15/20(75)	10/18(56)	18/21(86)	20/21(95)
Female				
No. of mated animals	20	20	21	21
Copulation index ^{a)} (%)	20/20(100)	18/20(90)	21/21(100)	21/21(100)
Pregnancy index ^{c)} (%)	15/20(75)	10/18(56)	18/21(86)	20/21(95)

a) No. of animals with successful copulation/No. of mated animals

b) No. of impregnating animals/No. of animals with successful copulation

c) No. of pregnant animals/No. of animals with successful copulation

Table 1-19. Mean body weights of F1 female rats in the gestation period whose dams were treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
0 DAY	MEAN	259.6	264.8	268.2	271.5
	S. D.	24.35	25.06	33.80	31.65
	N	15	10	18	20
7 DAY	MEAN	300.1	298.8	304.0	302.8
	S. D.	24.77	20.29	30.83	28.00
	N	15	10	18	20
14 DAY	MEAN	335.0	329.1	338.5	337.2
	S. D.	26.40	16.87	32.49	25.00
	N	15	10	18	20
20 DAY	MEAN	405.8	400.9	416.9	420.9
	S. D.	41.22	24.47	30.78	29.72
	N	15	10	18	20

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

Table 1-20. Gross findings of F1 rats whose dams were treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
MALE				
BRAIN				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
LIVER				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
SPLEEN				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
HEART				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
TESTIS-LEFT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
TESTIS-RIGHT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
EYEBALL-RIGHT				
No. of Observations	20	20	21	21
Cataract	0	0	1 5%	0
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	20 95%	21 100%

(REPORT CONTINUED)

Table 1-20. Gross findings of F1 rats whose dams were treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP: DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
FEMALE				
BRAIN				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
LIVER				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
SPLEEN				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
HEART				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
OVARY-LEFT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
OVARY-RIGHT				
No. of Observations	20	20	21	21
NO GROSS FINDINGS	20 100%	20 100%	21 100%	21 100%
SUBCUTIS				
No. of Observations	20	20	21	21
Mass in the axillary and inguinal region	1 5%	0	0	0
NO GROSS FINDINGS	19 95%	20 100%	21 100%	21 100%

(END OF REPORT)

Table 1-21. Caesarean section data of F1 female rats from dams treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE(mg/kg) :	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
No. of pregnant animals	15	10	18	20
Corpora lutea Mean ± S.D.	18.33 ± 2.19	16.50 ± 3.37	18.22 ± 3.77	19.05 ± 2.72
Implantations Mean ± S.D.	16.00 ± 1.69	14.70 ± 3.37	16.50 ± 3.19	17.70 ± 2.47
* to corpora lutea : Mean ± S.D.	87.94 ± 9.76	88.61 ± 8.57	91.24 ± 6.64	93.20 ± 6.87
Fetal deaths (resorptions+dead fetuses)	14	9	15	24
Resorptions				
Total	14	9	15	22
Early	14	8	15	22
Late	0	1	0	0
Dead fetuses	0	0	0	2
Live fetuses				
Male/Female	101/125	74/64	136/146	167/163
Litter size(Mean ± S.D.)	15.07 ± 1.94	13.80 ± 3.19	15.67 ± 3.38	16.50 ± 2.50
* to implantation : Mean ± S.D.	94.01 ± 5.31	94.16 ± 5.08	94.35 ± 7.21	93.22 ± 5.97
Sex Ratio (male/female)	0.81	1.16	0.93	1.02
No. of fetuses with external anomalies (%)	0	0	0	1(0.3) ^{a1}
Body weight of live fetuses				
Male (Mean ± S.D.)	3.17 ± 0.41	3.06 ± 0.42	3.19 ± 0.16	3.29 ± 0.22
Female (Mean ± S.D.)	3.02 ± 0.37	2.94 ± 0.41	3.06 ± 0.21	3.17 ± 0.23

^{a1}Gastroschisis

Analysis of Variance using Dunnett's Procedure

Table 1-22. Visceral findings in the remaining F1 fetuses after litter size control whose dams were treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
No. of dams	20	19	21	21
No. of fetuses examined (mean ± S.D.)	57 (2.9 ± 0.81)	55 (2.9 ± 0.81)	59 (2.8 ± 1.12)	58 (2.8 ± 0.77)
No. of fetuses with malformations/variatioins	0	0	0	0

Table 1-23. Skeletal findings in remaining F1 fetuses after litter size control whose dams were treated with DA-125 during the perinatal and lactation periods

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	T1 0.04	T2 0.2	T3 1.0
No. of dams	20	20	21	21
No. of fetuses examined (mean ± S.D.)	64 (3.2 ± 0.89)	62 (3.1 ± 1.02)	72 (3.4 ± 1.21)	71 (3.4 ± 0.74)
No. of fetuses with malformations a) (%)	1(1.6)	2(3.2)	1(1.4)	0
No. of fetuses with variations b) (%)	8(12.5)	4(6.5)	7(9.7)	3(4.2)
No. of ossification centers				
No. of sternebrae	6.0	6.0	6.0	6.0
No. of metacarpals in both forelimbs	8.0	8.1 ± 0.45	8.0	8.0
No. of 1st & 2nd phalanges in both forelimbs	16.0	16.0	16.0	16.0
No. of 3rd phalanges in both forelimbs	10.0	10.0	10.0	10.0
No. of metatarsals in both hindlimbs	10.0	10.0	10.0	10.0
No. of 1st & 2nd phalanges in both hindlimbs	18.0 ± 0.14	18.0 ± 0.11	18.0	17.9 ± 0.44
No. of 3rd phalanges in both hindlimbs	10.0	10.0	10.0	10.0
No. of sacral and caudal vertebrae	24.1 ± 1.29	24.9 ± 1.52	24.4 ± 1.34	24.8 ± 1.09

a) Shortened 13th rib

b) Sacralization of 6th lumbar vertebrae, additional ossification center of sternebrae, 14th rib(lumbar)

Table 2-1. Clinical signs of rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

	DOSE: (mg/kg) GROUP: 0 CONTROL	0.2 T1	0.6 T2	1.8 T3
No. of observations	14	16	17	14
Terminal sacrifice	14	15	17	14
Normal	10	10	12	9
Found dead	0	1	0	0
Abortion	1	1	0	0
Nasal discharge	2	4	5	4
Hair loss	1	2	0	0
Lacrimation	0	4	0	0
Soft faeces	1	0	1	2
Edema of outer ear	0	0	0	1

Table 2-2. Mean body weights of rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

PERIOD	DOSE: (mg/kg) GROUP:	0	0.2	0.6	1.8
		CONTROL	T1	T2	T3
0 DAY	MEAN	3120.2	3090.7	3068.7	3089.1
	S. D.	308.2	283.7	286.0	257.8
	N	14	15	17	14
6 DAY	MEAN	3519.6	3500.8	3375.4	3452.9
	S. D.	325.1	305.6	334.8	297.8
	N	14	15	17	14
10 DAY	MEAN	3594.3	3627.7	3457.5	3479.4
	S. D.	269.1	301.7	267.1	278.1
	N	14	15	17	14
14 DAY	MEAN	3733.2	3728.2	3593.8	3540.9
	S. D.	314.6	336.7	270.0	309.2
	N	14	15	17	14
18 DAY	MEAN	3751.3	3801.0	3681.2	3575.8
	S. D.	331.1	310.7	251.0	311.8
	N	14	15	17	14
23 DAY	MEAN	3789.2	3903.4	3789.5	3673.2
	S. D.	376.9	311.6	271.3	320.9
	N	14	15	17	14
28 DAY	MEAN	3875.9	4010.0	3876.1	3752.2
	S. D.	449.3	315.4	286.0	360.5
	N	14	15	17	14

Analysis of variance using Dunnett's procedure

Table 2-3. Mean food consumption of rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

PERIOD	DOSE: (mg/kg) GROUP:	0	0.2	0.6	1.8
		CONTROL	T1	T2	T3
1 DAY	MEAN	211.6	183.1	195.5	185.6
	S. D.	48.3	69.5	83.2	69.5
	N	14	15	17	14
7 DAY	MEAN	198.3	204.3	178.9	197.2
	S. D.	43.0	43.1	51.1	31.9
	N	14	15	17	14
11 DAY	MEAN	205.8	215.9	185.1	185.1
	S. D.	40.8	46.5	34.3	31.8
	N	14	15	17	14
15 DAY	MEAN	179.5	189.5	194.4	172.2
	S. D.	35.1	49.7	33.8	30.9
	N	14	15	17	14
19 DAY	MEAN	160.1	178.3	176.5	174.8
	S. D.	44.6	43.2	41.4	26.0
	N	14	15	17	14
24 DAY	MEAN	190.2	169.2	140.8	178.5
	S. D.	74.8	65.6	51.2	67.7
	N	14	15	17	14
28 DAY	MEAN	155.7	167.5	156.8	162.5
	S. D.	41.7	41.0	57.3	42.8
	N	14	15	17	14

Analysis of variance using Dunnett's procedure

Table 2-4. Gross findings of rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

DOSE: (mg/kg) GROUP:	0 CONTROL	0.2 T1	0.6 T2	1.8 T3
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	14	15	17	14
NO GROSS FINDINGS	14 100%	15 100%	17 100%	14 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	14	15	17	14
NO GROSS FINDINGS	14 100%	15 100%	17 100%	14 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	14	15	17	14
ABSENCE	0	0	1 6%	0
ROUGH SURFACE	1 7%	0	1 6%	0
NO GROSS FINDINGS	13 93%	15 100%	15 88%	14 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	14	15	17	14
ROUGH SURFACE	1 7%	0	1 6%	0
NO GROSS FINDINGS	13 93%	15 100%	16 94%	14 100%
LIVER				
No. of Observations	14	15	17	14
WHITE-SPOT	6 43%	4 27%	10 59%	4 29%
NO GROSS FINDINGS	8 57%	11 73%	7 41%	10 71%
SPLEEN				
No. of Observations	14	15	17	14
NO GROSS FINDINGS	14 100%	15 100%	17 100%	14 100%
HEART				
No. of Observations	14	15	17	14
NO GROSS FINDINGS	14 100%	15 100%	17 100%	14 100%
THYMUS				
No. of Observations	14	15	17	14
NO GROSS FINDINGS	14 100%	15 100%	17 100%	14 100%
LUNG				
No. of Observations	14	15	17	14
NO GROSS FINDINGS	14 100%	15 100%	17 100%	14 100%
OVARY-LEFT				
No. of Observations	14	15	17	14
NO GROSS FINDINGS	14 100%	15 100%	17 100%	14 100%
OVARY-RIGHT				
No. of Observations	14	15	17	14
NO GROSS FINDINGS	14 100%	15 100%	17 100%	14 100%

Table 2-5. Absolute organ weights of rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

DOSE: (mg/kg)		0	0.2	0.6	1.8
GROUP:		CONTROL	T1	T2	T3
BODY WEIGHT (G)					
	MEAN	3875.9	4010.0	3876.1	3752.2
	SD	449.32	315.41	285.97	360.50
	N	14	15	17	14
KIDNEY-LEFT (G)					
	MEAN	9.349	9.333	9.142	9.311
	SD	1.7325	1.2216	1.3273	1.0819
	N	14	15	16	14
KIDNEY-RIGHT (G)					
	MEAN	9.369	9.235	9.607	9.192
	SD	1.4930	1.1462	2.6553	1.0518
	N	14	15	17	14
SPLEEN (G)					
	MEAN	2.046	1.992	1.962	2.151
	SD	0.9038	0.7031	0.6575	0.6495
	N	14	14	17	14
THYMUS (G)					
	MEAN	2.931	3.770	3.145	3.717
	SD	1.3491	1.5176	1.4420	1.1214
	N	14	15	17	14
LIVER (G)					
	MEAN	107.848	117.599	116.442	129.621
	SD	23.3496	27.6845	24.0094	24.1417
	N	14	15	17	14
OVARY-LEFT (G)					
	MEAN	0.613	0.672	0.507	0.403*
	SD	0.2010	0.1681	0.1876	0.1984
	N	14	15	17	14
OVARY-RIGHT (G)					
	MEAN	0.573	0.673	0.538	0.393
	SD	0.2031	0.1976	0.2069	0.1945
	N	14	15	17	14

(REPORT CONTINUED)

Table 2-5. Absolute organ weights of rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

		DOSE: (mg/kg) GROUP: 0 CONTROL	0.2 T1	0.6 T2	1.8 T3
HEART (G)	MEAN	8.487	8.969	8.385	8.502
	SD	1.3845	1.5194	1.0133	0.7964
	N	14	15	17	14
ADRENAL GLAND-LEFT (G)	MEAN	0.203	0.167	0.192	0.166
	SD	0.0671	0.0634	0.0689	0.0320
	N	14	15	17	14
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)	MEAN	0.207	0.160	0.162	0.146
	SD	0.1699	0.0663	0.0619	0.0391
	N	14	15	17	14

Analysis of variance using Dunnett's procedure

* Significantly different from control value at $p < 0.05$

(END OF REPORT)

Table 2-6. Relative organ weights of rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

DOSE: (mg/kg) GROUP:	0 CONTROL	0.2 T1	0.6 T2	1.8 T3
KIDNEY-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.243	0.234	0.238	0.249
SD	0.0503	0.0271	0.0344	0.0288
N	14	15	16	14
KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.244	0.232	0.247	0.246
SD	0.0469	0.0259	0.0579	0.0268
N	14	15	17	14
SPLEEN (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.053	0.050	0.051	0.058
SD	0.0240	0.0159	0.0160	0.0170
N	14	14	17	14
THYMUS (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.076	0.094	0.082	0.100
SD	0.0346	0.0372	0.0366	0.0286
N	14	15	17	14
LIVER (% BODY WEIGHT)				
MEAN	2.794	2.916	3.002	3.443**
SD	0.6135	0.4902	0.5453	0.5083
N	14	15	17	14
OVARY-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.016	0.017	0.013	0.011**
SD	0.0049	0.0038	0.0045	0.0046
N	14	15	17	14
OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.015	0.017	0.014	0.010*
SD	0.0049	0.0048	0.0051	0.0045
N	14	15	17	14

(REPORT CONTINUED)

Table 2-6. Relative organ weights of rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

DOSE: (mg/kg) GROUP:	0 CONTROL	0.2 T1	0.6 T2	1.8 T3
HEART (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.220	0.224	0.217	0.228
SD	0.0306	0.0293	0.0228	0.0192
N	14	15	17	14
ADRENAL GLAND-LEFT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.005	0.004	0.005	0.005
SD	0.0018	0.0017	0.0017	0.0009
N	14	15	17	14
ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)				
MEAN	0.005	0.004	0.004	0.004
SD	0.0046	0.0015	0.0016	0.0012
N	14	15	17	14

Analysis of variance using Dunnett's procedure

- * Significantly different from control value at $p < 0.05$
- ** Significantly different from control value at $p < 0.01$

(END OF REPORT)

Table 2-7. Findings at caesarean section in rabbits treated with DA-125 during the organogenetic period

DOSE: (mg/kg) GROUP:	0 CONTROL	0.2 T1	0.6 T2	1.8 T3
No. of pregnant animals	14	15	17	14
Corpora lutea Mean ± S. D.	12.64 ± 4.16	13.67 ± 5.27	12.06 ± 5.09	9.07 ± 3.34*
Implantations Mean ± S. D.	10.00 ± 3.57	10.53 ± 5.15	9.47 ± 4.64	5.50 ± 3.59**
% to corpora lutea (Mean ± S. D.)	80.33 ± 19.74	76.64 ± 21.24	78.83 ± 14.63	61.73 ± 30.70
Fetal deaths (resorptions+dead fetuses)	26	37	38	51
Resorptions (Mean ± S. D.)	19 1.36 ± 1.60	19 1.27 ± 2.55	25 1.47 ± 2.27	48 3.43 ± 2.77
% to implantations (Mean ± S. D.)	18.1 ± 28.7	14.1 ± 26.0	15.1 ± 25.4	69.0 ± 41.1**
Early	19	19	25	48
Late	0	0	0	0
Dead fetuses	7	18	13	3
Live fetuses Male/Female	61/53	59/62	64/59	15/11
Litter size (Mean ± S. D.)	8.14 ± 3.94	8.07 ± 4.59	7.24 ± 3.33	1.86 ± 2.88**
% to implantation (Mean ± S. D.)	78.12 ± 28.46	78.05 ± 24.97	79.60 ± 26.81	29.17 ± 39.60**
Sex Ratio (male/female)	1.15	0.95	1.08	1.36
No. of fetuses with external anomalies(%) anomalies(%)	0	0	0	2 ^{a)} (7.7)
Body weight of alive fetuses Male (Mean ± S. D.)	36.48 ± 6.64	34.48 ± 8.57	34.03 ± 5.35	36.44 ± 4.10
Female (Mean ± S. D.)	34.48 ± 5.89	33.80 ± 8.35	34.13 ± 6.30	34.74 ± 3.83

Kruskal-Wallis's H test using Dunnett's procedure

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$

** : Significantly different from control value at $p < 0.01$

^{a)} Camptodactylia, gastroschisis, kyphosis, scoliosis, vestigial tail

Table 2-8. Visceral findings in fetuses from dams treated with DA-125 during the organogenetic period

	DOSE: (mg/kg) GROUP: 0 CONTROL	0.2 T1	0.6 T2	1.8 T3
No. of dams	13	14	16	6
No. of fetuses examined (Mean ± S.D.)	114 (8.8 ± 3.3)	121 (8.6 ± 4.2)	123 (7.7 ± 2.9)	26 (4.3 ± 2.9)
No. of fetuses with malformations(%)	0	1 ^{a)} (0.8)	1 ^{b)} (0.8)	2 ^{c)} (7.7)
No. of fetuses with variations(%)	2 ^{d)} (1.8)	3 ^{e)} (2.5)	4 ^{f)} (3.3)	5 ^{g)} (19.2)

a) Dilatation of lateral ventricle, microphthalmia

b) Microphthalmia

c) Diaphragmatic hernia, ventricular septal defect

d) Dilatation of renal pelvis, shift in position of esophagus

e) Abnormal origin of left A. carotis, dislocation of right kidney

f) Abnormal origin of left A. carotis, shift in position of esophagus

g) Abnormal origin of left A. carotis

Table 2-9. Skeletal findings in fetuses from dams treated with DA-125 during the organogenetic period

DOSE: (mg/kg) GROUP:	0 CONTROL	0.2 T1	0.6 T2	1.8 T3
No. of dams	13	14	16	6
No. of fetuses examined	114(8.8±3.3)	121(8.6±4.2)	123(7.7±2.8)	26(4.3±2.9)
Malformations(%)	3a) (4.2±9.6)	4b) (3.6±11.5)	5c) (4.0±7.4)	4d) (20.6±23.1)
Variations(%)	45 (34.9±33.2)	47 (34.7±25.8)	49 (38.8±26.6)	5 (22.2±21.7)
Retardations(%)	2 (1.9±4.7)	7 (8.4±17.8)	2 (2.1±8.4)	2 (11.7±20.4)
No. of ossification centers				
No. of sternebrae	5.8±0.2	5.8±0.2	5.8±0.2	5.6±0.4
No. of metacarpals in both forelimbs	9.9±0.2	9.5±0.7	9.8±0.4	9.8±0.3
No. of 1st & 2nd phalanges in both forelimbs	16.8±0.8	16.4±1.1	16.1±1.9	16.3±1.9
No. of 3rd phalanges in both forelimbs	10.0±0.1	10.0	10.0±0.1	10.0±0.1
No. of metatarsals in both hindlimbs	8.0	8.0	8.0	8.0
No. of 1st & 2nd phalanges in both hindlimbs	15.7±0.4	15.3±1.0	15.3±1.0	15.7±0.7
No. of 3rd phalanges in both hindlimbs	8.0	8.0	8.0	8.0
No. of sacral and caudal vertebrae	19.2±0.6	19.2±0.6	19.1±0.6	19.1±1.1

Kruskal-Wallis's H test using Dunnett's procedure

Values are Mean±S.D.

- a) Broken rib, flying rib, fused ribs, absence of 7th rib, absence of 7th thoracic vertebrae, absence of 11th thoracic vertebrae
- b) Fused sternebrae, fused ribs, asymmetric os ilium
- c) Fused ribs, fused sternebrae, fused caudal vertebrae, protrusion of 3rd sternebra, absence of 9th thoracic vertebral arch
- d) Lordosis, scoliosis, fused ribs, fused sternebrae, fused lumbar vertebral body, fused sacral vertebral arches, absence of 12th rib, absence of 11th and 12th ribs, absence of 7th thoracic vertebrae, absence of 1st and 2nd lumbar vertebral arches

Table 3-1. Mortality of male and female rats

SEX	Dose (mg/kg)	TEST ON WEEKS													Mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MALE															
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
	0.005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
	0.024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
	0.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2/9
FEMALE															
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
	0.005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
	0.024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
	0.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9

Table 3-2. Observation frequency of male rats

GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
Found dead	0	0	0	0	0	2
Terminal sacrifice	9	9	9	9	9	7
Normal	9	9	9	9	9	9
Cannibalism	0	0	0	0	0	1
Cataract	0	0	0	2	0	0
Diarrhea	0	0	0	0	0	6
Soft stool	0	0	0	0	0	3
Dark materials around eye	0	0	1	0	0	0
Dark materials around nose	0	0	0	0	1	1
Edema	0	0	1	0	0	0
Emaciation	0	0	0	0	0	7
Hair loss	2	0	0	0	1	1
Scar	1	0	0	0	1	0
Wound	0	0	0	0	1	0
Dirtyed fur by urine	0	0	0	0	0	3
Dirtyed fur by feces	0	0	0	0	0	1
Obesity	0	0	1	0	0	0
Total Number of Animals	9	9	9	9	9	9

Table 3-3. Observation frequency of female rats

GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
Terminal sacrifice	9	9	9	9	9	9
Normal	9	9	9	9	9	9
Soft stool	0	0	0	0	0	1
Dark materials around nose	0	0	0	0	0	1
Edema	0	0	0	0	1	0
Emaciation	0	0	0	0	0	9
Hair loss	0	0	0	0	1	0
Piloerection	0	0	0	0	0	1
Scar	0	0	0	0	3	0
Wound	0	0	0	0	1	0
Obesity	0	0	0	0	1	0
Total Number of Animals	9	9	9	9	9	9

Table 3-4. Body weights of male rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
0 DAY	MEAN	172.7	177.8	172.9	176.9	168.3	177.3
	S.D.	13.80	12.00	14.43	15.22	15.83	16.19
	N	9	9	9	9	9	9
7 DAY	MEAN	234.5	242.7	235.5	242.9	228.7	236.5
	S.D.	16.88	16.46	15.49	17.42	15.89	19.20
	N	9	9	9	9	9	9
14 DAY	MEAN	288.7	296.0	290.9	299.9	278.8	284.9
	S.D.	19.09	16.35	17.68	18.46	13.60	22.74
	N	9	9	9	9	9	9
21 DAY	MEAN	334.4	338.7	334.4	335.9	321.3	325.4
	S.D.	20.57	18.91	21.51	27.05	14.80	26.48
	N	9	9	9	9	9	9
28 DAY	MEAN	370.5	370.9	367.7	377.9	354.1	354.2
	S.D.	20.23	22.51	21.88	21.48	19.80	31.40
	N	9	9	9	9	9	9
35 DAY	MEAN	402.3	397.7	397.1	409.9	385.2	371.5
	S.D.	22.67	26.21	19.36	22.30	21.98	38.56
	N	9	9	9	9	9	9
42 DAY	MEAN	424.9	421.9	422.4	434.4	406.5	378.2**
	S.D.	24.89	28.80	22.26	26.25	25.37	33.48
	N	9	9	9	9	9	9
49 DAY	MEAN	442.3	436.6	439.9	454.7	421.4	380.8**
	S.D.	26.43	28.99	24.48	23.89	27.69	36.44
	N	9	9	9	9	9	9
56 DAY	MEAN	448.8	456.7	447.8	461.6	441.4	381.8**
	S.D.	25.00	33.20	25.98	28.72	27.13	40.36
	N	9	9	9	9	9	8
63 DAY	MEAN	474.2	472.4	476.1	492.4	445.5	383.7**
	S.D.	28.74	34.82	26.09	30.18	34.02	36.93
	N	9	9	9	9	9	8

(REPORT CONTINUED)

Table 3-4. Body weights of male rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
70 DAY	MEAN	484.8	486.1	491.6	508.5	466.9	375.6**
	S.D.	32.90	36.83	27.61	29.45	32.59	32.75
	N	9	9	9	9	9	8
77 DAY	MEAN	499.9	500.1	504.2	524.8	477.7	370.4**
	S.D.	34.40	38.46	29.61	35.28	34.97	30.89
	N	9	9	9	9	9	8
84 DAY	MEAN	512.6	506.4	514.7	532.5	486.7	359.5**
	S.D.	35.96	38.71	29.32	34.97	33.98	29.28
	N	9	9	9	9	9	8
90 DAY	MEAN	517.4	510.1	519.7	541.7	490.7	342.7**
	S.D.	36.26	37.91	27.93	34.65	34.45	34.02
	N	9	9	9	9	9	7

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure

- * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
- ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-5. Body weights of female rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
0 DAY	MEAN	138.8	142.6	144.7	145.3	144.6	143.0
	S.D.	9.77	10.24	7.03	8.80	8.51	8.17
	N	9	9	9	9	9	9
7 DAY	MEAN	168.2	172.2	169.9	170.2	170.8	166.2
	S.D.	10.77	8.33	9.96	14.56	11.18	6.07
	N	9	9	9	9	9	9
14 DAY	MEAN	186.1	190.7	188.9	192.6	195.5	186.7
	S.D.	12.01	7.38	10.10	14.63	7.85	7.41
	N	9	9	9	9	9	9
21 DAY	MEAN	208.7	208.4	207.7	214.3	219.3	202.3
	S.D.	13.86	8.05	11.71	20.21	16.02	8.32
	N	9	9	9	9	9	9
28 DAY	MEAN	221.1	223.3	223.5	232.5	231.7	216.4
	S.D.	11.62	10.60	11.91	23.69	14.90	7.81
	N	9	9	9	9	9	9
35 DAY	MEAN	232.3	228.5	237.4	240.1	242.8	226.0
	S.D.	12.57	9.58	14.01	22.59	14.92	10.61
	N	9	9	9	9	9	9
42 DAY	MEAN	243.8	242.8	250.2	252.1	256.1	233.3
	S.D.	12.59	14.03	16.83	20.84	17.12	10.30
	N	9	9	9	9	9	9
49 DAY	MEAN	247.7	247.4	252.7	254.8	263.0	232.7
	S.D.	11.73	13.13	13.89	24.80	19.70	14.00
	N	9	9	9	9	9	9
56 DAY	MEAN	255.2	253.1	260.5	267.2	272.4	237.1
	S.D.	13.35	14.83	14.25	29.38	21.14	20.01
	N	9	9	9	9	9	9
63 DAY	MEAN	261.2	257.2	262.7	264.7	276.4	233.0*
	S.D.	11.66	13.85	13.45	21.65	22.95	19.64
	N	9	9	9	9	9	9

(REPORT CONTINUED)

Table 3-5. Body weights of female rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
70 DAY	MEAN	263.0	261.2	269.3	276.7	286.3*	235.2*
	S.D.	12.10	14.75	16.47	23.35	25.91	17.05
	N	9	9	9	9	9	9
77 DAY	MEAN	269.5	265.0	276.1	280.4	290.5*	237.6*
	S.D.	13.53	15.19	14.92	25.21	25.74	18.14
	N	9	9	9	9	9	9
84 DAY	MEAN	275.7	266.9	276.1	278.8	293.0*	241.7
	S.D.	13.61	16.74	15.75	21.31	30.59	17.28
	N	9	9	9	9	9	9
90 DAY	MEAN	274.3	271.3	278.9	286.9	299.1*	240.3*
	S.D.	9.73	20.20	18.18	18.16	32.42	15.23
	N	9	9	9	9	9	9

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure

- * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
 ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-6. Food consumptions of male rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
1 DAY	INTAKE (g)	26.7	29.1	27.7	28.5	25.9	27.9
	S.D.	2.93	2.61	0.54	0.62	2.32	0.69
	N	9	9	9	9	9	9
8 DAY	INTAKE (g)	32.6	31.6	32.3	32.6	38.1	30.5
	S.D.	0.59	1.42	1.82	1.62	12.25	2.02
	N	9	9	9	9	9	9
15 DAY	INTAKE (g)	33.4	33.5	35.4	34.5	33.9	33.6
	S.D.	0.64	1.45	2.11	1.39	2.05	2.69
	N	9	9	9	9	9	9
22 DAY	INTAKE (g)	34.7	33.6	35.2	34.1	34.4	33.4
	S.D.	0.45	0.56	2.26	0.77	2.39	1.67
	N	9	9	9	9	9	9
29 DAY	INTAKE (g)	33.4	35.0	35.0	36.6	36.4	31.9
	S.D.	5.14	1.48	1.75	1.82	1.40	6.89
	N	9	9	9	9	9	9
36 DAY	INTAKE (g)	35.4	31.9	34.4	33.0	33.3	29.5
	S.D.	3.79	0.64	0.65	1.00	0.85	4.34
	N	9	9	9	9	9	9
43 DAY	INTAKE (g)	36.5*	31.9	35.1	35.3	34.6	31.8
	S.D.	1.27	1.51	0.64	2.18	1.02	3.36
	N	9	9	9	9	9	9
50 DAY	INTAKE (g)	32.2	32.8	33.9	33.2	33.1	24.2**
	S.D.	2.54	1.90	1.55	1.27	0.85	5.58
	N	9	9	9	9	9	9

(REPORT CONTINUED)

Table 3-6. Food consumptions of male rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
57 DAY	INTAKE (g)	38.1	34.3	38.5	35.8	32.1	23.3*
	S.D.	7.54	1.41	2.15	5.46	3.32	4.57
	N	9	9	9	9	9	8
64 DAY	INTAKE (g)	32.5	31.3	30.2	31.5	31.5	26.7
	S.D.	1.25	2.64	4.47	1.24	2.02	5.83
	N	9	9	9	9	9	8
71 DAY	INTAKE (g)	31.4	34.1	32.4	33.4	33.8	15.0**
	S.D.	5.79	2.18	0.79	2.44	1.20	9.09
	N	9	9	9	9	9	8
78 DAY	INTAKE (g)	33.6	30.9	34.3	33.6	33.0	18.0**
	S.D.	0.88	1.92	0.65	1.39	0.97	2.64
	N	9	9	9	9	9	8
85 DAY	INTAKE (g)	35.2	31.7	33.1	32.2	34.0	14.7**
	S.D.	0.36	1.51	1.30	1.27	2.16	6.61
	N	9	9	9	9	9	8
90 DAY	INTAKE (g)	33.8	31.7	31.6	32.8	32.4	12.0**
	S.D.	1.16	1.01	1.29	0.18	2.52	5.60
	N	9	9	9	9	9	7

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure

- * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
- ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-7. Food consumptions of female rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
1 DAY	INTAKE (g)	20.9	21.2	21.6	20.7	22.9	20.6
	S. D.	1.56	0.98	1.93	2.31	3.55	1.61
	N	9	9	9	9	9	9
8 DAY	INTAKE (g)	21.2	21.7	23.8	22.8	24.9	23.7
	S. D.	1.27	0.60	2.93	3.36	1.81	1.06
	N	9	9	9	9	9	9
15 DAY	INTAKE (g)	20.4	22.1	22.7	20.9	24.1	22.1
	S. D.	2.15	1.89	0.57	2.87	2.25	1.03
	N	9	9	9	9	9	9
22 DAY	INTAKE (g)	25.3	24.0	24.2	26.9	26.4	23.0
	S. D.	1.00	1.38	2.98	4.01	2.46	0.84
	N	9	9	9	9	9	9
29 DAY	INTAKE (g)	22.9	22.1	24.4	23.6	26.3	21.1
	S. D.	0.64	1.99	1.33	2.44	3.31	0.37
	N	9	9	9	9	9	9
36 DAY	INTAKE (g)	25.7	26.9	26.2	26.7	27.2	24.9
	S. D.	0.98	5.35	2.33	1.64	2.90	1.16
	N	9	9	9	9	9	9
43 DAY	INTAKE (g)	23.2	21.7	23.0	18.4	24.5	20.6
	S. D.	0.76	0.67	1.39	4.33	2.95	1.66
	N	9	9	9	9	9	9
50 DAY	INTAKE (g)	22.9	31.6	23.1	23.1	25.9	17.2**
	S. D.	0.93	9.02	2.65	3.48	3.33	1.12
	N	9	9	9	9	9	9

(REPORT CONTINUED)

Table 3-7. Food consumptions of female rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
57 DAY	INTAKE (g)	22.8	21.0	23.1	23.5	24.3	17.5
	S. D.	1.56	2.42	1.78	1.96	1.89	1.24
	N	9	9	9	9	9	9
64 DAY	INTAKE (g)	23.8	23.2	22.6	25.0	24.4	18.2*
	S. D.	0.76	2.73	1.02	0.94	1.97	2.77
	N	9	9	9	9	9	9
71 DAY	INTAKE (g)	27.9	21.9	23.9	23.9	24.7	15.7
	S. D.	2.70	4.28	2.27	1.63	3.18	1.12
	N	9	9	9	9	9	9
78 DAY	INTAKE (g)	23.0	21.9	22.8	21.1	23.9	16.6*
	S. D.	2.31	2.59	1.75	2.47	0.90	2.19
	N	9	9	9	9	9	9
85 DAY	INTAKE (g)	20.5	19.1	19.8	20.4	22.2	13.7*
	S. D.	1.24	2.63	0.52	3.22	2.62	1.39
	N	9	9	9	9	9	9
90 DAY	INTAKE (g)	20.3	21.9	22.9	24.1	24.5	15.8
	S. D.	1.44	2.82	0.92	0.77	5.12	5.86
	N	9	9	9	9	9	9

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure

* Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
 ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-8. Water consumptions of male rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
1 DAY	INTAKE (g)	25.2*	31.5	31.3	29.7	28.6	29.6
	S. D.	3.24	1.17	2.60	2.12	1.67	2.32
	N	9	9	9	9	9	9
8 DAY	INTAKE (g)	34.1	35.5	35.1	35.1	32.9	34.1
	S. D.	0.40	1.95	5.23	2.39	1.82	2.47
	N	9	9	9	9	9	9
15 DAY	INTAKE (g)	34.6	40.1	37.9	35.7	34.5	38.1
	S. D.	3.59	2.61	5.89	3.54	0.65	5.75
	N	9	9	9	9	9	9
22 DAY	INTAKE (g)	35.4	37.8	35.7	41.9	35.9	34.7
	S. D.	1.49	3.65	3.40	14.69	1.42	4.32
	N	9	9	9	9	9	9
29 DAY	INTAKE (g)	34.9	39.7	35.8	38.0	36.5	36.3
	S. D.	2.34	4.10	3.06	8.05	0.97	3.55
	N	9	9	9	9	9	9
36 DAY	INTAKE (g)	38.0	38.1	36.5	35.7	36.3	38.9
	S. D.	3.03	1.43	4.16	3.83	2.66	8.02
	N	9	9	9	9	9	9
43 DAY	INTAKE (g)	37.5	39.6	38.5	34.2	38.8	47.6
	S. D.	3.65	0.73	6.93	1.75	1.46	11.59
	N	9	9	9	9	9	9
50 DAY	INTAKE (g)	34.5	42.3	40.8	38.9	39.1	50.0
	S. D.	9.28	2.86	5.87	9.38	2.93	12.46
	N	9	9	9	9	9	9
57 DAY	INTAKE (g)	41.9	35.5	43.9	46.0	33.9	41.9
	S. D.	9.91	5.25	7.87	6.49	6.12	5.48
	N	9	9	9	9	9	8
64 DAY	INTAKE (g)	34.0	34.3	33.8	34.3	37.3	46.5
	S. D.	5.47	4.70	7.28	6.85	7.04	10.51
	N	9	9	9	9	9	8

(REPORT CONTINUED)

Table 3-8. Water consumptions of male rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
71 DAY	INTAKE (g)	35.7	35.5	34.5	36.8	35.4	46.7
	S. D.	1.95	5.75	6.63	4.65	2.89	6.82
	N	9	9	9	9	9	8
78 DAY	INTAKE (g)	37.0	37.6	37.9	36.4	36.7	50.2
	S. D.	8.00	6.68	4.97	6.43	1.52	20.05
	N	9	9	9	9	9	8
85 DAY	INTAKE (g)	33.9	34.6	35.1	32.3	33.2	39.0
	S. D.	3.38	5.20	7.06	4.59	4.52	18.25
	N	9	9	9	9	9	8
90 DAY	INTAKE (g)	34.6	34.2	33.5	35.2	34.0	23.0
	S. D.	4.73	1.28	4.44	4.26	4.53	8.81
	N	9	9	9	9	9	7

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure

- * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
- ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-9. Water consumptions of female rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL VEHICLE		T1	T2	T3	T4
		0	0	0.005	0.024	0.12	0.6
1 DAY	INTAKE (g)	25.4	26.7	24.3	28.0	30.3	28.1
	S.D.	3.83	2.77	2.09	5.09	6.76	2.48
	N	9	9	9	9	9	9
8 DAY	INTAKE (g)	29.2	30.5	28.2	31.6	32.8	35.5
	S.D.	2.82	2.43	3.89	6.84	2.76	0.42
	N	9	9	9	9	9	9
15 DAY	INTAKE (g)	25.8	30.2	26.0	27.9	33.9	30.2
	S.D.	4.43	4.91	2.04	8.87	7.29	1.00
	N	9	9	9	9	9	9
22 DAY	INTAKE (g)	26.5	26.4	32.5	30.4	34.4	28.2
	S.D.	1.21	3.33	8.58	7.46	4.45	2.26
	N	9	9	9	9	9	9
29 DAY	INTAKE (g)	32.6	32.0	26.9	32.8	38.7	32.6
	S.D.	6.66	5.02	3.77	4.78	10.32	0.70
	N	9	9	9	9	9	9
36 DAY	INTAKE (g)	31.8	34.9	26.2	31.3	37.0	32.1
	S.D.	7.58	11.49	3.28	4.98	8.85	1.13
	N	9	9	9	9	9	9
43 DAY	INTAKE (g)	27.7	27.2	24.1	25.5	36.5	35.6
	S.D.	2.45	4.25	2.76	2.79	7.80	3.15
	N	9	9	9	9	9	9
50 DAY	INTAKE (g)	34.2	27.9	26.8	32.3	42.0	30.2
	S.D.	10.80	8.87	2.90	4.44	7.17	1.52
	N	9	9	9	9	9	9

(REPORT CONTINUED)

Table 3-9. Water consumptions of female rats

PERIOD	GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL VEHICLE		T1	T2	T3	T4
		0	0	0.005	0.024	0.12	0.6
57 DAY	INTAKE (g)	32.0	28.0	26.4	32.9	40.6	44.5
	S.D.	3.74	5.12	3.32	8.62	9.13	9.85
	N	9	9	9	9	9	9
64 DAY	INTAKE (g)	25.0	26.1	21.3	27.2	30.8	37.3**
	S.D.	2.73	5.76	2.31	1.19	3.74	4.95
	N	9	9	9	9	9	9
71 DAY	INTAKE (g)	30.0	28.6	26.4	36.3	38.6	39.3
	S.D.	5.69	4.90	2.55	8.07	7.67	1.97
	N	9	9	9	9	9	9
78 DAY	INTAKE (g)	31.0	29.2	24.9	29.9	35.4	44.0**
	S.D.	4.41	3.88	0.61	5.69	3.18	2.04
	N	9	9	9	9	9	9
85 DAY	INTAKE (g)	28.0	27.7	22.7	28.2	33.2	39.9**
	S.D.	4.14	4.19	1.46	0.81	3.96	4.74
	N	9	9	9	9	9	9
90 DAY	INTAKE (g)	27.0	27.0	24.3	31.0	41.2*	36.2
	S.D.	2.41	3.62	1.72	5.25	10.43	2.86
	N	9	9	9	9	9	9

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure

- * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
 ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-10. Ophthalmoscopy of male and female rats examined at 13 weeks

GROUP: DOSE: (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
MALE						
DAY 89 ^{a)}						
No. of animals examined	9	9	9	9	9	8
Cataract	0	0	0	2 (22%)	0	0
Normal	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	8 (78%)	9 (100%)	8 (100%)
FEMALE						
DAY 89 ^{a)}						
No. of animals examined	9	9	9	9	9	9
Normal	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (78%)	9 (100%)	9 (100%)

^{a)} Examination time (expressed in treatment day)

Table 3-11. Urinalysis of male rats[#] examined at 13 weeks

GROUP: DOSE(mg/kg) :	CONTROL VEHICLE		T1	T2	T3	T4
	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6
NO. OF ANIMALS EXAMINED	9	9	9	9	9	8
URINE VOLUME (ml/day)	11.8 ±3.4	13.6 ±5.4	13.6 ±3.5	14.8 ±4.6	13.8 ±3.7	19.9 ±7.1
1) SPECIFIC GRAVITY	0	3	2	1	2	2
	1	1	3	1	0	4
	2	1	2	3	3	1
	3	3	1	2	3	0
	4	0	1	2	0	1
	5	1	0	0	1	0
2) pH	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	1
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	6	1	1	2	1	2
	7	3	3	5	6	3
	8	5	5	2	2	3
3) PROTEIN	0	3	1	2	2	1
	1	3	3	3	0	7
	2	3	3	2	3	1
	3	0	2	1	4	0
	4	0	0	1	0	0
						0
						*
4) GLUCOSE	0	9	9	9	9	9
	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
5) KETONE	0	2	3	2	1	3
	1	7	4	3	5	5
	2	0	2	3	3	1
	3	0	0	1	0	0
	4	0	0	0	0	0
6) BILIRUBIN	0	5	4	8	9	8
	1	4	5	1	0	1
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
					*	

(REPORT CONTINUED)

Table 3-11. Urinalysis of male rats* examined at 13 weeks

GROUP: DOSE(mg/kg) :	CONTROL VEHICLE		T1	T2	T3	T4	
	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6	
7) OCCULT BLOOD	0 1 2 3 4	9 0 0 0 0	8 0 1 0 0	7 1 0 1 0	8 1 0 0 0	6 2 1 0 0	8 0 0 0 0
8) NITRITE	0 1	2 7	3 6	9 0 **	9 0 **	8 1 **	7 1 **
9) UROBILINOGEN	0 1 2 3 4	2 3 4 0 0	3 1 5 0 0	8 1 0 0 0 **	9 0 0 0 0 **	9 0 0 0 0 **	6 2 0 0 0 *
10) SEDIMENT CASTS	—	9	9	9	9	9	8
RBC	±	0	0	0	0	0	0
WBC	—	9	6	9	7	6	7
EPI	±	0	1	0	2	3	1
	+	0	2	0	0	0	0
	—	9	9	9	9	9	8
	±	0	0	0	0	0	0
	—	8	5	8	7	8	8
	±	1	4	1	2	1	0

1) 0: ≤ 1.005 2) 0: 5.0 6: 8.0 3) 0: - (negative) 4) 0: - (negative) 5) 0: - (negative)
 1: 1.010 1: 5.5 7: 8.5 1: +/- (trace) 1: +/- (trace) 1: +/- (trace)
 2: 1.015 2: 6.0 8: ≥ 9.0 2: 1+ (30 mg/dl) 2: 1+ (250mg/dl) 2: 1+ (15mg/dl)
 3: 1.020 3: 6.5 3: 2+ (100mg/dl) 3: 2+ (500mg/dl) 3: 2+ (40mg/dl)
 4: 1.025 4: 7.0 4: 3+ (≥ 300mg/dl) 4: 3+ (≥ 1000mg/dl) 4: 3+ (≥ 80mg/dl)
 5: ≥ 1.030 5: 7.5

6) 0: - (negative) 7) 0: - (negative) 8) 0: - (negative) 9) 0: 0.1 EU/dl
 1: 1+ (small) 1: +/- (Ca 10) 1: + (positive) 1: 1.0 EU/dl
 2: 2+ (moderate) 2: 1+ (Ca 25) 2: 2.0 EU/dl
 3: 3+ (large) 3: 2+ (Ca 80) 3: 4.0 EU/dl
 4: 3+ (Ca 200) 4: ≥ 8.0 EU/dl

10) 400 배율 1시야 평균치

CASTS	RBC	WBC	EPI
— 0	0	0	0
± ≤ 1	≤ 4	≤ 5	수개 (전시야)
+ 1~5	4~8	5~20	수시야에 1개 전후

*Sampling day ; Male Day 27~28

* Significantly different from control group (p<0.05)
 ** Significantly different from control group (p<0.01)

Kruskal-Wallis's H-test using Dunnett's procedure
 (END OF REPORT)

Table 3-12. Urinalysis of female rats^a examined at 13 weeks

GROUP: DOSE(mg/kg) :	CONTROL VEHICLE		T1	T2	T3	T4	
	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6	
NO. OF ANIMALS EXAMINED	9	9	9	9	9	9	
URINE VOLUME (ml/day)	8.8 ±2.5	8.8 ±3.6	8.1 ±4.2	9.7 ±5.3	13.3 ±6.4	19.3 ±8.6	
1) SPECIFIC GRAVITY	0 1 2 3 4 5	0 1 2 1 4 1	0 0 2 3 3 1	0 0 1 3 4 1	0 0 1 4 2 2	0 1 1 5 2 0	1 2 0 6 0 0
2) pH	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 0 0 4 0 0 1 2 2	0 0 0 2 1 0 0 5 1	0 0 1 1 0 1 1 3 1	0 1 1 0 0 0 2 4 1	0 0 0 0 1 3 2 2 1	0 0 0 1 1 1 2 3
3) PROTEIN	0 1 2 3 4	3 2 4 0 0	2 5 2 0 0	2 1 4 2 0	3 1 5 0 0	6 1 2 0 0	9 0 0 0 0 *
4) GLUCOSE	0 1 2 3 4	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0
5) KETONE	0 1 2 3 4	2 6 1 0 0	3 6 0 0 0	2 7 0 0 0	2 6 1 0 0	6 3 0 0 0	9 0 0 0 0 *
6) BILIRUBIN	0 1 2 3	8 1 0 0	8 1 0 0	4 5 0 0	6 3 0 0	8 1 0 0	9 0 0 0

(REPORT CONTINUED)

Table 3-12. Urinalysis of female rats* examined at 13 weeks

GROUP: DOSE(mg/kg) :	CONTROL VEHICLE		T1	T2	T3	T4	
	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6	
7) OCCULT BLOOD	0 1 2 3 4	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0	9 0 0 0 0	
8) NITRITE	0 1	9 0	8 1	8 1	9 0	7 2	8 1
9) UROBILINOGEN	0 1 2 3 4	8 1 0 0 0	8 1 0 0 0	5 4 0 0 0	7 2 0 0 0	8 1 0 0 0	8 1 0 0 0
10) SEDIMENT CASTS	—	9	9	9	9	9	9
RBC	±	0	0	0	0	0	0
WBC	±	8	8	6	8	8	7
EPI	±	1	1	3	1	1	2
	—	9	8	7	8	8	9
	±	0	1	2	1	1	0
	±	9	7	9	8	8	8
	±	0	2	0	1	1	1

1) 0: ≤1.005 2) 0: 5.0 6: 8.0 3) 0: - (negative) 4) 0: - (negative) 5) 0: - (negative)
 1: 1.010 1: 5.5 7: 8.5 1: +/- (trace) 1: +/- (trace) 1: +/- (trace)
 2: 1.015 2: 6.0 8: ≥9.0 2: 1+ (30 mg/dl) 2: 1+ (250mg/dl) 2: 1+ (15mg/dl)
 3: 1.020 3: 6.5 3: 2+ (100mg/dl) 3: 2+ (500mg/dl) 3: 2+ (40mg/dl)
 4: 1.025 4: 7.0 4: 3+ (≥300mg/dl) 4: 3+ (≥1000mg/dl) 4: 3+ (≥80mg/dl)
 5: ≥1.030 5: 7.5

6) 0: - (negative) 7) 0: - (negative) 8) 0: - (negative) 9) 0: 0.1 EU/dl
 1: 1+ (small) 1: +/- (Ca 10) 1: + (positive) 1: 1.0 EU/dl
 2: 2+ (moderate) 2: 1+ (Ca 25) 2: 2.0 EU/dl
 3: 3+ (large) 3: 2+ (Ca 80) 3: 4.0 EU/dl
 4: 3+ (Ca 200) 4: ≥8.0 EU/dl

10) 400 배율 1시야 평균치

CASTS	RBC	WBC	EPI
— 0	0	0	0
± ≤1	≤4	≤5	수개 (전시야)
+ 1~5	4~8	5~20	수시야에 1개 전후

*Sampling day : Female Day 27~28

* Significantly different from control group (p<0.05)

** Significantly different from control group (p<0.01)

Kruskal-Wallis's H-test using Dunnett's procedure

(END OF REPORT)

Table 3-13. Hematological values of male rats examined at 13 weeks

TESTS:	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
UNITS:	thousand	millions	g/dl	%	fl	pg	g/dl	thousand
GROUP :	CONTROL : 0(mg/kg)							
MEAN	10.30	9.37	15.9	48.2	51.5	17.0	33.0	1101
SD	1.606	0.358	0.50	1.66	1.44	0.51	0.61	71.4
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP :	VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)							
MEAN	10.05	9.26	15.8	47.8	51.7	17.1	33.1	1138
SD	3.732	0.721	0.89	2.75	1.56	0.53	0.40	99.0
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP :	T1 : 0.005(mg/kg)							
MEAN	9.49	8.97	15.5	46.7	52.1	17.3	33.1	1075
SD	2.416	0.443	0.50	1.47	1.58	0.65	0.72	120.6
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP :	T2 : 0.024(mg/kg)							
MEAN	10.80	9.03	15.7	47.7	52.8	17.4	33.0	1067
SD	2.567	0.348	0.52	1.76	1.93	0.63	0.46	85.6
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP :	T3 : 0.12(mg/kg)							
MEAN	9.07	9.11	15.5	46.9	51.5	17.0	33.0	1175
SD	3.326	0.531	0.65	2.18	1.85	0.66	0.50	97.2
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP :	T4 : 0.6(mg/kg)							
MEAN	4.45**	8.87	16.0	48.0	54.5	18.1	33.3	1475**
SD	2.870	0.900	0.42	1.07	5.23	1.63	0.59	229.5
N	6	6	6	6	6	6	6	6

(REPORT CONTINUED)

Table 3-13. Hematological values of male rats examined at 13 weeks

TESTS: UNITS:	PT second	RET. COUNT /1000	LY% %	LY# thousand
GROUP : CONTROL : 0(mg/kg)				
MEAN	13.8	11.4	94.5	9.74
SD	0.56	4.28	1.06	1.573
N	9	9	9	9
GROUP : VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)				
MEAN	14.6	11.3	95.0	9.55
SD	1.01	5.81	1.57	3.549
N	9	9	9	9
GROUP : T1 : 0.005(mg/kg)				
MEAN	14.2	9.6	94.2	8.95
SD	0.95	4.90	1.18	2.330
N	9	9	9	9
GROUP : T2 : 0.024(mg/kg)				
MEAN	14.7	11.8	94.2	10.18
SD	1.03	6.42	1.49	2.504
N	9	9	9	9
GROUP : T3 : 0.12(mg/kg)				
MEAN	14.4	13.1	94.0	8.55
SD	0.43	7.87	3.76	3.182
N	9	9	9	9
GROUP : T4 : 0.6(mg/kg)				
MEAN	19.0**	8.4	80.0**	3.63**
SD	3.94	5.77	6.33	2.423
N	7	7	6	6

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure

* Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
 ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-14. Hematological values of female rats examined at 13 weeks

TESTS: UNITS:	WBC thousand	RBC millions	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT thousand
GROUP : CONTROL : 0(mg/kg)								
MEAN	7.27	8.37	15.1	45.1	53.9	18.1	33.6	992
SD	2.372	0.319	0.62	1.73	1.07	0.58	0.84	55.9
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP : VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)								
MEAN	5.00	8.78	15.7	46.5	53.0	17.9	33.8	1016
SD	1.755	0.506	0.60	2.09	1.85	0.78	0.49	95.4
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP : T1 : 0.005(mg/kg)								
MEAN	5.92	8.23*	14.9	43.8	53.3	18.1	33.9	1011
SD	2.239	0.575	0.86	2.50	1.68	0.68	0.49	96.0
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP : T2 : 0.024(mg/kg)								
MEAN	6.03	8.05**	14.8	43.9	54.5	18.4	33.7	958
SD	1.256	0.313	0.53	1.58	1.86	0.63	0.49	96.2
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP : T3 : 0.12(mg/kg)								
MEAN	5.43	8.45	15.2	45.1	53.4	18.0	33.6	1055
SD	1.880	0.311	0.49	1.51	1.99	0.58	0.57	113.3
N	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP : T4 : 0.6(mg/kg)								
MEAN	4.99	8.53	15.3	45.4	53.2	18.0	33.8	1394**
SD	3.913	0.594	0.90	3.24	1.88	0.58	0.66	475.2
N	8	8	8	8	8	8	8	8

(REPORT CONTINUED)

Table 3-14. Hematological values of female rats examined at 13 weeks

TESTS: UNITS:	PT second	RET. COUNT /1000	LY% %	LY# thousand
GROUP : CONTROL : 0(mg/kg)				
MEAN	14.6	17.2	94.0	6.82
SD	0.93	6.12	2.86	2.157
N	9	9	9	9
GROUP : VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)				
MEAN	15.1	13.1	94.0	4.70
SD	0.59	4.14	2.20	1.635
N	9	9	9	9
GROUP : T1 : 0.005(mg/kg)				
MEAN	15.0	11.4	94.3	5.60
SD	0.71	3.28	3.95	2.229
N	9	9	9	9
GROUP : T2 : 0.024(mg/kg)				
MEAN	15.1	17.1	95.2	5.76
SD	0.76	5.93	1.81	1.273
N	9	9	9	9
GROUP : T3 : 0.12(mg/kg)				
MEAN	15.2	16.7	93.5	5.10
SD	1.27	4.09	2.69	1.857
N	9	9	9	9
GROUP : T4 : 0.6(mg/kg)				
MEAN	16.4*	15.2	85.4**	3.99
SD	1.41	7.87	11.93	2.452
N	8	9	9	9

Analysis of Variance using DUNNETT'S Procedure

* Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
 ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-15. Differential leucocyte count of male rats examined at 13 weeks

TESTS: UNITS:	Segmented thousand	Bands thousand	Eosinophil thousand	Basophils thousand	Lymphocyte thousand	Monocytes thousand
GROUP : CONTROL : 0(mg/kg)						
MEAN	1.439	0.000	0.046	0.000	8.730	0.086
SD	0.5625	0.0000	0.0554	0.0000	1.6831	0.0930
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)						
MEAN	1.216	0.000	0.116	0.000	8.633	0.084
SD	0.6022	0.0000	0.1396	0.0000	3.2772	0.1527
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : T1 : 0.005(mg/kg)						
MEAN	1.377	0.000	0.088	0.000	7.873	0.155
SD	0.5512	0.0000	0.0653	0.0000	2.1979	0.1823
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : T2 : 0.024(mg/kg)						
MEAN	1.824	0.000	0.075	0.000	8.654	0.244
SD	0.7411	0.0000	0.0765	0.0000	2.2075	0.1443
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : T3 : 0.12(mg/kg)						
MEAN	0.993	0.000	0.077	0.000	7.862	0.141
SD	0.8786	0.0000	0.1063	0.0000	2.6044	0.2236
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : T4 : 0.6(mg/kg)						
MEAN	1.566	0.000	0.000	0.000	2.801**	0.081
SD	0.9133	0.0000	0.0000	0.0000	2.0105	0.1157
N	6	6	6	6	6	6

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

* Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
 ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

Table 3-16. Differential leucocyte count of female rats examined at 13 weeks

TESTS: UNITS:	Segmented thousand	Bands thousand	Eosinophil thousand	Basophils thousand	Lymphocyte thousand	Monocytes thousand
GROUP : CONTROL : 0(mg/kg)						
MEAN	0.950	0.000	0.067	0.000	6.098*	0.156
SD	0.7184	0.0000	0.0639	0.0000	2.0060	0.1406
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)						
MEAN	0.583	0.000	0.034	0.000	4.219	0.160
SD	0.1495	0.0000	0.0342	0.0000	1.6271	0.1226
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : T1 : 0.005(mg/kg)						
MEAN	0.576	0.000	0.057	0.000	5.093	0.194
SD	0.3645	0.0000	0.0587	0.0000	2.1550	0.1810
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : T2 : 0.024(mg/kg)						
MEAN	0.594	0.000	0.093	0.000	5.154	0.193
SD	0.3223	0.0000	0.0614	0.0000	1.3398	0.1143
N	9	9	9	9	9	9
GROUP : T3 : 0.12(mg/kg)						
MEAN	0.790	0.000	0.041	0.000	4.374	0.220
SD	0.4248	0.0000	0.0485	0.0000	1.8026	0.1088
N	9	9	9	9	9	9
Group : T4 : 0.6(mg/kg)						
MEAN	2.158	0.000	0.018	0.000	2.752	0.061
SD	2.9882	0.0000	0.0414	0.0000	1.5789	0.0677
N	8	8	8	8	8	8

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

* Significantly different from vehicle control group (p<0.05)

Table 3-17. Serum biochemical values of male rats examined at 13 weeks

TEST(s): UNITS:	GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	BUN mg/dl	CRN mg/dl	GLU mg/dl	TCHO mg/dl	TG mg/dl	TP g/dl	ALB g/dl
GROUP: CONTROL : 0(mg/kg)										
MEAN	129.02	49.58	203.52	15.51	0.74	149.61	89.59	85.18	7.29	4.72
SD	28.458	20.978	38.536	1.795	0.040	35.849	12.900	35.805	0.193	0.174
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)										
MEAN	105.33	33.45	205.24	15.94	0.76	152.17	94.96	81.78	7.24	4.72
SD	20.893	5.416	40.434	1.491	0.058	26.428	15.780	46.541	0.177	0.103
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T1 : 0.005(mg/kg)										
MEAN	100.43	41.10	195.94	15.37	0.80	145.58	86.78	94.58	7.19	4.69
SD	13.569	13.080	33.588	1.503	0.078	24.005	16.688	64.885	0.197	0.233
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T2 : 0.024(mg/kg)										
MEAN	92.74	32.70	185.87	14.88	0.77	152.31	78.31	115.57	7.25	4.71
SD	20.947	7.900	49.422	2.100	0.071	33.878	13.207	75.034	0.165	0.151
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T3 : 0.12(mg/kg)										
MEAN	96.86	31.39	185.43	16.12	0.75	173.06	83.52	69.39	7.11	4.60
SD	25.260	4.560	36.334	2.591	0.074	52.704	11.063	14.982	0.255	0.208
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T4 : 0.6(mg/kg)										
MEAN	132.96	48.79	276.50*	32.68**	0.72	111.44	79.26	28.26*	6.15**	4.06**
SD	77.080	32.734	113.533	13.490	0.089	48.304	38.789	10.105	0.744	0.434
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

(REPORT CONTINUED)

Table 3-17. Serum biochemical values of male rats examined at 13 weeks

TEST(s): UNITS:	TBIL mg/dl	CA mg/dl	IP mg/dl	CPK IU/L	PL mg/dl	A/G ratio	NA mmol/l	K mmol/l	CL mmol/l
GROUP: CONTROL : 0(mg/kg)									
MEAN	0.65	9.29	8.29	324.63	146.08	1.84	140.4	6.56	102.7
SD	0.197	1.367	0.958	145.889	15.622	0.105	1.95	2.040	1.73
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)									
MEAN	0.68	9.85	8.17	291.86	149.09	1.88	141.0	7.00	103.6
SD	0.129	0.446	1.353	143.017	13.452	0.123	1.66	2.325	0.78
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T1 : 0.005(mg/kg)									
MEAN	0.66	9.35	8.07	245.54	149.33	1.90	140.1	6.36	102.6
SD	0.217	1.038	1.319	107.609	8.839	0.222	2.23	2.294	2.26
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T2 : 0.024(mg/kg)									
MEAN	0.56	9.30	8.30	236.99	139.43	1.86	140.4	6.80	102.5
SD	0.145	1.782	1.354	138.583	11.701	0.144	1.93	1.606	1.31
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T3 : 0.12(mg/kg)									
MEAN	0.70	9.86	8.67	258.44	136.39	1.84	139.5	7.11	103.3
SD	0.181	0.718	1.183	185.959	9.407	0.135	1.72	1.999	1.66
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T4 : 0.6(mg/kg)									
MEAN	1.12**	9.23	8.20	359.21	117.13**	1.97	142.2	5.84	104.3
SD	0.494	0.467	1.342	335.148	46.131	0.188	1.92	0.960	1.53
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Analysis of Variance using DUNCAN's Procedure
 * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
 ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)
 (END OF REPORT)

Table 3-18. Serum biochemical values of female rats examined at 13 weeks

TEST(s): UNITS:	GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	BUN mg/dl	CRN mg/dl	GLU mg/dl	TCHO mg/dl	TG mg/dl	TP g/dl	ALB g/dl
GROUP: CONTROL : 0(mg/kg)										
MEAN	113.70	37.76	94.06	16.44**	0.72	130.54	82.76	47.47	7.73**	5.29**
SD	23.482	11.193	23.093	2.484	0.048	26.862	18.317	5.363	0.368	0.465
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)										
MEAN	93.45	29.45	115.90	19.32	0.75	127.32	78.90	40.18	7.50	5.12
SD	29.783	8.422	20.751	2.939	0.073	20.001	10.715	7.205	0.179	0.271
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T1 : 0.005(mg/kg)										
MEAN	86.66	26.61	100.68	15.28**	0.70	136.89	78.58	74.26	7.54	5.16
SD	8.576	3.995	27.554	2.732	0.059	26.907	8.326	75.977	0.404	0.369
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T2 : 0.024(mg/kg)										
MEAN	94.38	32.88	96.62	15.43**	0.74	141.56	81.07	45.37	7.46	5.14
SD	14.986	14.624	25.472	4.071	0.069	24.199	14.779	8.283	0.365	0.354
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T3 : 0.12(mg/kg)										
MEAN	101.10	38.19	117.60	17.75	0.74	129.15	81.86	51.98	7.40	5.05
SD	28.987	25.387	44.124	2.217	0.107	17.724	11.149	29.249	0.244	0.190
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T4 : 0.6(mg/kg)										
MEAN	102.98	27.58	134.93	28.21**	0.69	118.42	78.78	43.28	6.88**	4.64**
SD	33.108	9.910	54.824	13.424	0.047	19.113	19.083	12.731	0.494	0.438
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9

(REPORT CONTINUED)

Table 3-18. Serum biochemical values of female rats examined at 13 weeks

TEST(s): UNITS:	TBIL mg/dl	CA mg/dl	IP mg/dl	CPK IU/L	PL mg/dl	A/G ratio	NA mmol/l	K mmol/l	CL mmol/l
GROUP: CONTROL : 0(mg/kg)									
MEAN	0.65	10.22	7.94	276.95	171.31	2.20	140.8	5.34	105.8
SD	0.125	0.483	1.056	126.061	22.008	0.347	1.10	1.361	2.51
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: VEHICLE CONTROL : 0(mg/kg)									
MEAN	0.74	10.08	8.53	183.45	161.22	2.17	140.4	6.85	106.2
SD	0.132	0.652	1.480	135.170	14.307	0.226	1.27	1.925	2.25
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T1 : 0.005(mg/kg)									
MEAN	0.68	9.04	7.87	224.17	172.20	2.18	140.1	5.84	105.5
SD	0.106	2.190	1.282	81.464	11.773	0.251	0.98	1.545	1.49
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T2 : 0.024(mg/kg)									
MEAN	0.69	9.59	8.23	201.12	168.19	2.23	140.6	5.27	105.3
SD	0.188	1.464	1.320	98.870	16.123	0.178	1.72	1.501	1.96
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T3 : 0.12(mg/kg)									
MEAN	0.63	9.97	8.66	228.96	169.47	2.16	140.0	6.83	105.0
SD	0.109	0.471	1.117	166.116	16.895	0.167	2.31	1.468	3.16
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
GROUP: T4 : 0.6(mg/kg)									
MEAN	0.77	8.91	8.87	256.78	148.73	2.09	142.7**	5.37	106.9
SD	0.245	1.663	0.894	140.281	24.338	0.247	2.46	1.571	2.77
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9

Analysis of Variance using DUNCAN's Procedure
 * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
 ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)
 (END OF REPORT)

Table 3-19. Gross findings of male rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL VEHICLE CONTROL				T1	T2	T3	T4
	0	0	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6
BRAIN								
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9	9
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%
HYPHYSIS								
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9	9
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%
ADRENAL GLAND-LEFT								
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9	9
Enlargement	0	0	0	0	0	0	0	1 11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8 89%
ADRENAL GLAND-RIGHT								
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9	9
Enlargement	0	0	0	0	0	0	0	1 11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8 89%
LIVER								
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9	9
Atrophy	0	0	0	0	0	0	0	4 44%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	5 56%
SPLEEN								
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9	9
Atrophy	0	0	0	0	0	0	0	5 56%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	4 44%

(REPORT CONTINUED)

Table 3-19. Gross findings of male rats examined at 13 weeks

GROUP :	CONTROL	VEHICLE CONTROL	T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6
THYMUS						
No. of Observations	9	9	9	9	9	9
Atrophy	0	1 11%	0	0	0	3 33%
Edema	0	0	0	0	0	1 11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	8 89%	9 100%	9 100%	9 100%	5 56%
LUNG						
No. of Observations	9	9	9	9	9	9
Dark Red Discoloration	0	0	0	0	0	1 11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8 89%
PROSTATE GLAND						
No. of Observations	9	9	9	9	9	9
Atrophy	0	0	0	0	0	4 44%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	5 56%
SEMINAL VESICLE						
No. of Observations	9	9	9	9	9	9
Atrophy	0	0	0	0	0	4 44%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	5 56%
SKIN						
No. of Observations	9	9	9	9	9	9
Edema	0	0	0	0	0	1 11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8 89%
DUODENUM						
No. of Observations	9	9	9	9	9	9
Expanded	0	0	0	0	0	1 11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8 89%

(REPORT CONTINUED)

Table 3-19. Gross findings of male rats examined at 13 weeks

GROUP :	CONTROL	VEHICLE	CONTROL	T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6
JEJUNUM							
Nodule in Serosa	0	0	0	0	0	0	1 11%
White Nodule in Serosa	1 11%	0	0	0	0	0	0
NO GROSS FINDINGS	8 89%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	7 78%
ILEUM							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Expanded	0	0	0	0	0	0	4 44%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	5 56%
CAECUM							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Expanded	0	0	0	0	0	0	8 89%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	1 11%
COLON							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Expanded	0	0	0	0	0	0	3 33%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	6 67%
EYE BALL-RIGHT							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
White Opacity	0	0	0	0	1 11%	0	0
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8 89%	9 100%	9 100%

(REPORT CONTINUED)

Table 3-19. Gross findings of male rats examined at 13 weeks

OTHER	GROUP :					T3	T4
	CONTROL	VEHICLE	CONTROL	T1	T2		
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6	
No. of Observations	0	0	0	0	5	9	
Ascites	0	0	0	0	0	3 33%	
Autolysis	0	0	0	0	0	1 11%	
Hemoperitoneum	0	0	0	0	0	1 11%	
Pinna Hematoma	0	0	0	0	1 20%	0	
NO GROSS FINDINGS	0	0	0	0	4 80%	5 56%	

(END OF REPORT)

Table 3-20. Gross findings of female rats examined at 13 weeks

GROUP :	CONTROL	VEHICLE	CONTROL	T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6	
ADRENAL GLAND-RIGHT							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Aplasia	0	0	0	0	1 11%	0	0
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8 89%	9 100%	9 100%
LIVER							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Atrophy	0	0	0	0	0	4 44%	0
Dark Red Spot	0	0	0	0	1 11%	0	0
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8 89%	5 56%	5 56%
SPLEEN							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Atrophy	0	0	0	0	0	4 44%	0
Ectopic Spleen	0	1 11%	0	0	0	0	0
NO GROSS FINDINGS	9 100%	8 89%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	5 56%
KIDNEY-RIGHT							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Pelvis Dilatation	0	0	1 11%	0	0	0	0
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	8 89%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%
THYMUS							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Atrophy	0	0	0	0	0	5 56%	0
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	4 44%	4 44%

(REPORT CONTINUED)

Table 3-20. Gross findings of female rats examined at 13 weeks

	GROUP : DOSE : (mg/kg)					T4	
	CONTROL	VEHICLE	CONTROL	T1	T2		T3
	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6	
SALIVARY GLAND							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Edema	0	0	0	0	0	1	11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8	89%
SKIN							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Edema	0	0	0	0	0	1	11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8	89%
ILEUM							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Expanded	0	0	0	0	0	1	11%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8	89%
CAECUM							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
Expanded	0	0	0	0	0	7	78%
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	2	22%
EYE BALL-LEFT							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
White Opacity	0	0	0	0	1	11%	0
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8	89%	9 100%
EYE BALL-RIGHT							
No. of Observations	9	9	9	9	9	9	9
White Opacity	0	0	0	0	1	11%	0
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	8	89%	9 100%

(REPORT CONTINUED)

Table 3-20. Gross findings of female rats examined at 13 weeks

GROUP :	CONTROL	VEHICLE CONTROL	T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6
OTHER						
No. of Observations	9	9	9	9	9	9
Ascites	0	0	0	0	0	3
NO GROSS FINDINGS	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	9 100%	6 67%

(END OF REPORT)

Table 3-21. Absolute organ weights of male rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	CONTROL 0.005	T1 0.024	T2 0.12	T3 0.6	T4 0.6
BODY WEIGHT (G)							
MEAN	487.1	481.2	491.6	511.8	459.4	313.9**	
SD	33.73	35.13	26.94	32.19	34.39	38.19	
N	9	9	9	9	9	7	
BRAIN (G)							
MEAN	2.209	2.171	2.157	2.233	2.163	2.000**	
SD	0.0833	0.1038	0.0758	0.1051	0.0626	0.1057	
N	9	9	9	9	9	7	
HYPOPHYSIS (G)							
MEAN	0.014	0.014	0.012*	0.013	0.015	0.010**	
SD	0.0020	0.0015	0.0021	0.0022	0.0016	0.0010	
N	9	9	9	9	9	7	
ADRENAL GLAND-LEFT (G)							
MEAN	0.029	0.028	0.030	0.031	0.029	0.031	
SD	0.0040	0.0026	0.0037	0.0044	0.0034	0.0040	
N	9	9	9	9	9	7	
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)							
MEAN	0.025	0.025	0.026	0.028	0.027	0.027	
SD	0.0045	0.0030	0.0015	0.0025	0.0031	0.0037	
N	9	9	9	9	9	7	
LIVER (G)							
MEAN	12.690	11.856	12.511	13.402*	11.667	6.645**	
SD	1.3938	1.3984	1.1899	1.4063	1.5689	1.4947	
N	9	9	9	9	9	7	
SPLEEN (G)							
MEAN	0.709	0.708	0.695	0.808	0.704	0.338**	
SD	0.0698	0.1380	0.0925	0.1288	0.1108	0.1134	
N	9	9	9	9	9	7	
KIDNEY-LEFT (G)							
MEAN	1.561	1.421	1.418	1.556	1.458	0.892**	
SD	0.2283	0.0846	0.1061	0.0913	0.1366	0.1647	
N	9	9	9	9	9	7	
KIDNEY-RIGHT (G)							
MEAN	1.570	1.470	1.451	1.579	1.498	0.921**	
SD	0.2080	0.0754	0.1057	0.1368	0.1518	0.1661	
N	9	9	9	9	9	7	
HEART (G)							
MEAN	1.409	1.378	1.360	1.437	1.467	0.864**	
SD	0.1169	0.1549	0.1099	0.1471	0.2339	0.0792	
N	9	9	9	9	9	7	

(REPORT CONTINUED)

Table 3-21. Absolute organ weights of male rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	CONTROL 0.005	T1 0.024	T2 0.12	T3 0.6	T4 0.6
THYMUS (G)							
MEAN	0.350	0.282	0.318	0.369*	0.311	0.137**	
SD	0.0453	0.0722	0.0498	0.0920	0.0637	0.0733	
N	9	9	9	9	9	7	
LUNG (G)							
MEAN	1.637	1.595	1.564	1.626	1.651	1.182**	
SD	0.1066	0.1499	0.0937	0.0820	0.2000	0.0869	
N	9	9	9	9	9	7	
TESTIS-LEFT (G)							
MEAN	1.709	1.702	1.486	1.769	1.696	1.483	
SD	0.0820	0.1392	0.5729	0.0809	0.1057	0.1629	
N	9	9	9	9	9	7	
TESTIS-RIGHT (G)							
MEAN	1.713	1.694	1.468	1.712	1.694	1.491	
SD	0.0869	0.1642	0.5602	0.1034	0.1060	0.1382	
N	9	9	9	9	9	7	
THYROID-LEFT (G)							
MEAN	0.012	0.013	0.207	0.011	0.011	0.009	
SD	0.0024	0.0054	0.5839	0.0019	0.0028	0.0013	
N	9	9	9	9	9	7	
THYROID-RIGHT (G)							
MEAN	0.013	0.012	0.203	0.011	0.012	0.008	
SD	0.0026	0.0047	0.5731	0.0018	0.0035	0.0025	
N	9	9	9	9	9	7	
PROSTATE GLAND (G)							
MEAN	0.737	0.685	0.643	0.729	0.703	0.293**	
SD	0.1787	0.1313	0.2145	0.2324	0.2743	0.1927	
N	9	9	9	9	9	7	
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (G)							
MEAN	0.053	0.053	0.055	0.059	0.056	0.057	
SD	0.0080	0.0055	0.0044	0.0065	0.0062	0.0073	
N	9	9	9	9	9	7	
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (G)							
MEAN	3.131	2.892	2.869	3.134	2.956	1.813**	
SD	0.4207	0.1516	0.2081	0.2246	0.2846	0.3288	
N	9	9	9	9	9	7	

(REPORT CONTINUED)

Table 3-21. Absolute organ weights of male rats examined at 13 weeks

GROUP :	CONTROL	VEHICLE CONTROL	CONTROL T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6
TESTIS-LEFT+TESTIS-RIGHT (G)						
MEAN	3.422	3.396	2.954	3.481	3.390	2.974
SD	0.1635	0.3011	1.1317	0.1768	0.2077	0.2993
N	9	9	9	9	9	7
THYROID-LEFT+THYROID-RIGHT (G)						
MEAN	0.025	0.026	0.410	0.023	0.024	0.017
SD	0.0037	0.0098	1.1570	0.0033	0.0059	0.0035
N	9	9	9	9	9	7

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

* Significantly different from vehicle control group (p<0.05)

** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-22. Absolute organ weights of female rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE CONTROL 0	T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
BODY WEIGHT (G)						
MEAN	260.3	253.1	262.5	268.6	280.0	218.9**
SD	9.33	17.42	14.89	17.98	30.27	22.85
N	9	9	9	9	9	9
BRAIN (G)						
MEAN	1.981	1.951	1.981	1.951	1.956	1.929
SD	0.0920	0.0865	0.0635	0.0626	0.1068	0.1063
N	9	9	9	9	9	9
HYPOPHYSIS (G)						
MEAN	0.015	0.014	0.016	0.015	0.014	0.010**
SD	0.0029	0.0018	0.0017	0.0026	0.0017	0.0027
N	9	9	9	9	9	9
ADRENAL GLAND-LEFT (G)						
MEAN	0.032	0.031	0.032	0.033	0.032	0.030
SD	0.0021	0.0039	0.0074	0.0039	0.0049	0.0062
N	9	9	9	9	9	9
ADRENAL GLAND-RIGHT (G)						
MEAN	0.030	0.031	0.028	0.032	0.029	0.026**
SD	0.0024	0.0031	0.0034	0.0037	0.0032	0.0029
N	9	9	9	9	8	9
LIVER (G)						
MEAN	6.413	6.190	6.332	6.708	6.837	5.298**
SD	0.3349	0.6383	0.4172	0.6673	0.9932	0.8201
N	9	9	9	9	9	9
SPLEEN (G)						
MEAN	0.456	0.402	0.411	0.450	0.440	0.332*
SD	0.0369	0.0771	0.0504	0.0491	0.0552	0.0904
N	9	9	9	9	9	9
KIDNEY-LEFT (G)						
MEAN	0.856	0.876	0.872	0.867	0.866	0.681**
SD	0.0443	0.1021	0.0520	0.1014	0.1113	0.1062
N	9	9	9	9	9	9
KIDNEY-RIGHT (G)						
MEAN	0.857	0.900	0.891	0.881	0.880	0.687**
SD	0.0445	0.1156	0.0502	0.1151	0.1044	0.1217
N	9	9	9	9	9	9
HEART (G)						
MEAN	0.852	0.882	0.869	0.864	0.910	0.675**
SD	0.0512	0.0600	0.0549	0.0622	0.0744	0.1333
N	9	9	9	9	9	9

(REPORT CONTINUED)

Table 3-22. Absolute organ weights of female rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	CONTROL 0.005	T1 0.024	T2 0.12	T3 0.6	T4 0.6
THYMUS (G)							
MEAN	0.264	0.248	0.265	0.239	0.279	0.131**	
SD	0.0538	0.0764	0.0504	0.0450	0.0386	0.0648	
N	9	9	9	9	9	9	
LUNG (G)							
MEAN	1.121	1.139	1.112	1.138	1.100	1.011	
SD	0.0352	0.1312	0.1212	0.0971	0.0856	0.1254	
N	9	9	9	9	9	9	
OVARY-LEFT (G)							
MEAN	0.040	0.034	0.036	0.040	0.039	0.029	
SD	0.0095	0.0063	0.0072	0.0056	0.0087	0.0103	
N	9	9	9	9	9	9	
OVARY-RIGHT (G)							
MEAN	0.041	0.039	0.039	0.047	0.041	0.027*	
SD	0.0116	0.0043	0.0080	0.0125	0.0101	0.0110	
N	9	9	9	9	9	9	
THYROID-LEFT (G)							
MEAN	0.008	0.009	0.008	0.008	0.009	0.006**	
SD	0.0020	0.0023	0.0025	0.0011	0.0020	0.0012	
N	9	9	9	9	9	9	
THYROID-RIGHT (G)							
MEAN	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010	0.006*	
SD	0.0028	0.0021	0.0019	0.0031	0.0019	0.0020	
N	9	9	9	9	9	9	
UTERUS (G)							
MEAN	0.450	0.532	0.533	0.533	0.484	0.443	
SD	0.0644	0.2451	0.1634	0.1728	0.1433	0.2883	
N	9	9	9	9	9	9	
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (G)							
MEAN	0.062	0.061	0.060	0.064	0.060	0.056	
SD	0.0041	0.0061	0.0098	0.0073	0.0059	0.0091	
N	9	9	9	9	8	9	
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (G)							
MEAN	1.714	1.775	1.763	1.748	1.746	1.369**	
SD	0.0820	0.2140	0.1056	0.2153	0.2148	0.2238	
N	9	9	9	9	9	9	

(REPORT CONTINUED)

Table 3-22. Absolute organ weights of female rats examined at 13 weeks

GROUP :	CONTROL	VEHICLE	CONTROL	T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6	
OVARY-LEFT+OVARY-RIGHT (G)							
MEAN	0.081	0.073	0.074	0.087	0.080	0.055*	
SD	0.0207	0.0087	0.0146	0.0170	0.0171	0.0200	
N	9	9	9	9	9	9	
THYROID-LEFT+THYROID-RIGHT (G)							
MEAN	0.017	0.018	0.017	0.017	0.019	0.012**	
SD	0.0043	0.0041	0.0037	0.0039	0.0034	0.0030	
N	9	9	9	9	9	9	

Analysis of Variance with DUNCAN'S Procedure

- * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
- ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-23. Relative organ weights of male rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	CONTROL T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
BRAIN (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.455	0.453	0.440	0.438	0.473	0.646**
SD	0.0313	0.0388	0.0306	0.0294	0.0370	0.0918
N	9	9	9	9	9	7
HYPOPHYSIS (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003
SD	0.0004	0.0003	0.0005	0.0005	0.0003	0.0000
N	9	9	9	9	9	7
ADRENAL GLAND-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.010**
SD	0.0006	0.0005	0.0009	0.0008	0.0007	0.0021
N	9	9	9	9	9	7
ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.009**
SD	0.0006	0.0009	0.0006	0.0005	0.0008	0.0013
N	9	9	9	9	9	7
LIVER (% BODY WEIGHT)						
MEAN	2.604	2.460	2.545	2.616	2.534	2.111**
SD	0.1906	0.1514	0.1885	0.1868	0.2087	0.3366
N	9	9	9	9	9	7
SPLEEN (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.146	0.147	0.141	0.157	0.153	0.107**
SD	0.0172	0.0230	0.0182	0.0196	0.0206	0.0272
N	9	9	9	9	9	7
KIDNEY-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.320	0.296	0.289	0.304	0.317	0.284
SD	0.0302	0.0223	0.0272	0.0134	0.0167	0.0304
N	9	9	9	9	9	7
KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.322	0.307	0.296	0.309	0.326	0.293
SD	0.0272	0.0237	0.0301	0.0221	0.0224	0.0302
N	9	9	9	9	9	7
HEART (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.290	0.287	0.277	0.281	0.319*	0.277
SD	0.0184	0.0266	0.0265	0.0207	0.0451	0.0280
N	9	9	9	9	9	7

(REPORT CONTINUED)

Table 3-23. Relative organ weights of male rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	CONTROL 0.005	T1 0.024	T2 0.12	T3 0.12	T4 0.6
THYMUS (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.072	0.058	0.065	0.072	0.068	0.068	0.043*
SD	0.0095	0.0134	0.0103	0.0177	0.0134	0.0134	0.0205
N	9	9	9	9	9	9	7
LUNG (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.336	0.332	0.319	0.318	0.361	0.361	0.379**
SD	0.0141	0.0197	0.0306	0.0170	0.0530	0.0530	0.0240
N	9	9	9	9	9	9	7
TESTIS-LEFT (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.352	0.354	0.302	0.347	0.370	0.370	0.479**
SD	0.0179	0.0257	0.1177	0.0278	0.0299	0.0299	0.0838
N	9	9	9	9	9	9	7
TESTIS-RIGHT (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.352	0.353	0.299	0.336	0.370	0.370	0.481**
SD	0.0194	0.0334	0.1157	0.0318	0.0281	0.0281	0.0726
N	9	9	9	9	9	9	7
THYROID-LEFT (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.003	0.003	0.043	0.002	0.002	0.002	0.003
SD	0.0007	0.0012	0.1222	0.0005	0.0007	0.0007	0.0005
N	9	9	9	9	9	9	7
THYROID-RIGHT (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.003	0.003	0.042	0.002	0.003	0.003	0.003
SD	0.0007	0.0011	0.1198	0.0003	0.0010	0.0010	0.0010
N	9	9	9	9	9	9	7
PROSTATE GLAND (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.151	0.145	0.131	0.143	0.154	0.154	0.091
SD	0.0349	0.0384	0.0427	0.0458	0.0614	0.0614	0.0524
N	9	9	9	9	9	9	7
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.011	0.011	0.011	0.012	0.012	0.012	0.019**
SD	0.0010	0.0013	0.0015	0.0010	0.0014	0.0014	0.0034
N	9	9	9	9	9	9	7
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.641	0.603	0.585	0.613	0.644	0.644	0.576
SD	0.0526	0.0446	0.0568	0.0344	0.0378	0.0378	0.0595
N	9	9	9	9	9	9	7

(REPORT CONTINUED)

Table 3-23. Relative organ weights of male rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	CONTROL T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
TESTIS-LEFT+TESTIS-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.704	0.707	0.601	0.683	0.741	0.960**
SD	0.0362	0.0584	0.2332	0.0588	0.0573	0.1565
N	9	9	9	9	9	7
THYROID-LEFT+THYROID-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.005	0.005	0.086	0.004	0.005	0.005
SD	0.0007	0.0019	0.2420	0.0005	0.0016	0.0011
N	9	9	9	9	9	7

Analysis of Variance using DUNCAN'S Procedure

- * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
- ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-24. Relative organ weights of female rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	CONTROL T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
BRAIN (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.762	0.773	0.756	0.728	0.706*	0.886**
SD	0.0434	0.0403	0.0399	0.0380	0.0879	0.0528
N	9	9	9	9	9	9
HYPOPHYSIS (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005
SD	0.0015	0.0007	0.0009	0.0010	0.0009	0.0010
N	9	9	9	9	9	9
ADRENAL GLAND-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.012	0.012	0.012	0.012	0.011	0.014
SD	0.0011	0.0014	0.0033	0.0011	0.0007	0.0027
N	9	9	9	9	9	9
ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.012	0.012	0.011	0.012	0.011	0.012
SD	0.0013	0.0010	0.0018	0.0011	0.0011	0.0012
N	9	9	9	9	8	9
LIVER (% BODY WEIGHT)						
MEAN	2.468	2.444	2.412	2.500	2.437	2.418
SD	0.1744	0.1539	0.0870	0.2301	0.1390	0.2651
N	9	9	9	9	9	9
SPLEEN (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.175	0.158	0.157	0.168	0.158	0.150
SD	0.0154	0.0215	0.0202	0.0162	0.0168	0.0306
N	9	9	9	9	9	9
KIDNEY-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.330	0.346	0.333	0.323	0.310	0.311
SD	0.0258	0.0302	0.0200	0.0324	0.0273	0.0331
N	9	9	9	9	9	9
KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.330	0.355	0.340	0.328	0.315	0.313
SD	0.0221	0.0347	0.0237	0.0363	0.0257	0.0413
N	9	9	9	9	9	9
HEART (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.327	0.349	0.331	0.322	0.327	0.307**
SD	0.0209	0.0221	0.0158	0.0100	0.0334	0.0409
N	9	9	9	9	9	9

(REPORT CONTINUED)

Table 3-24. Relative organ weights of female rats examined at 13 weeks

GROUP : DOSE : (mg/kg)	CONTROL 0	VEHICLE 0	CONTROL T1 0.005	T2 0.024	T3 0.12	T4 0.6
THYMUS (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.102	0.097	0.101	0.089	0.101	0.058**
SD	0.0238	0.0255	0.0209	0.0188	0.0194	0.0247
N	9	9	9	9	9	9
LUNG (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.431	0.450	0.424	0.424	0.397*	0.462
SD	0.0166	0.0387	0.0405	0.0365	0.0515	0.0400
N	9	9	9	9	9	9
OVARY-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.015	0.013	0.014	0.015	0.014	0.013
SD	0.0036	0.0024	0.0033	0.0019	0.0033	0.0039
N	9	9	9	9	9	9
OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.016	0.016	0.015	0.017	0.015	0.012
SD	0.0044	0.0015	0.0038	0.0042	0.0035	0.0038
N	9	9	9	9	9	9
THYROID-LEFT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003
SD	0.0008	0.0010	0.0009	0.0000	0.0007	0.0005
N	9	9	9	9	9	9
THYROID-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.003
SD	0.0012	0.0007	0.0007	0.0009	0.0009	0.0009
N	9	9	9	9	9	9
UTERUS (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.173	0.209	0.202	0.199	0.176	0.205
SD	0.0269	0.0925	0.0577	0.0631	0.0610	0.1418
N	9	9	9	9	9	9
ADRENAL GLAND-LEFT+ADRENAL GLAND-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.024	0.024	0.023	0.024	0.022	0.026
SD	0.0023	0.0021	0.0045	0.0020	0.0016	0.0039
N	9	9	9	9	8	9
KIDNEY-LEFT+KIDNEY-RIGHT (% BODY WEIGHT)						
MEAN	0.660	0.701	0.672	0.651	0.624	0.624
SD	0.0461	0.0628	0.0415	0.0682	0.0522	0.0721
N	9	9	9	9	9	9

(REPORT CONTINUED)

Table 3-24. Relative organ weights of female rats examined at 13 weeks

GROUP :	CONTROL	VEHICLE	CONTROL	T1	T2	T3	T4
DOSE : (mg/kg)	0	0	0.005	0.024	0.12	0.6	
OVARY-LEFT+OVARY-RIGHT (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.031	0.029	0.028	0.032	0.029	0.025	
SD	0.0080	0.0032	0.0067	0.0056	0.0058	0.0070	
N	9	9	9	9	9	9	
THYROID-LEFT+THYROID-RIGHT (% BODY WEIGHT)							
MEAN	0.007	0.007	0.007	0.006	0.007	0.005	
SD	0.0018	0.0016	0.0012	0.0009	0.0014	0.0012	
N	9	9	9	9	9	9	

Analysis of Variance with DUNCAN'S Procedure

- * Significantly different from vehicle control group (p<0.05)
- ** Significantly different from vehicle control group (p<0.01)

(END OF REPORT)

Table 3-25. Histopathological findings of male rats examined at 13 weeks

		Control		Vehicle		T1		T2		T3		T4	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
NUMBER OF ANIMALS :		9		9		9		9		9		9	
KIDNEY	# EX	9		9		9		9		9		8	
CONGESTION		2 (22)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		2 (22)	
PROTEIN CAST		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
TUBULAR BASOPHILIA		1 (11)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
INTERSTITIAL NEPHRITIS		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
SPLEEN	# EX	9		9		9		9		9		8	
CONGESTION		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
SPLENIC ATROPHY		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		4 (44)	
LIVER	# EX	9		9		9		9		9		8	
LYMPHOCYTE-R. E. CELL FOCI		5 (56)		4 (44)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
LIPIDOSIS		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
PERIHEPATITIS		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
CONGESTION		0 (0)		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		2 (22)	
HEART	# EX	9		9		0		0		0		8	
MYOCARDITIS		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
STOMACH	# EX	9		9		0		0		0		7	
DUODENUM	# EX	9		9		0		0		0		7	
JEJUNUM	# EX	9		9		0		0		0		7	
ILEUM	# EX	9		9		0		0		0		7	
CECUM	# EX	9		9		0		0		0		7	
COLON	# EX	9		9		0		0		0		7	
PERICOLITIS		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		2 (22)	
RECTUM	# EX	9		9		0		0		0		7	
MESENTERY LYMPH NODE	# EX	9		9		0		0		0		7	
AORTA	# EX	9		9		0		0		0		8	
PREPUTIAL GLAND	# EX	9		9		0		0		0		7	
ABSCESS		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	

(REPORT CONTINUED)

Table 3-25. Histopathological findings of male rats examined at 13 weeks

		Control		Vehicle		T1		T2		T3		T4	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
NUMBER OF ANIMALS :		9		9		9		9		9		9	
PANCREAS	# EX	9		9		0		0		0		8	
FOCAL PANCREATITIS		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
LIPIDOSIS		4 (44)		5 (56)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
PERIPANCREATITIS		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
THYMUS	# EX	9		9		9		9		9		7	
ATROPHY		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		3 (33)	
TESTIS	# EX	9		9		0		0		0		8	
EPIDIDYMISS	# EX	9		9		0		0		0		8	
PERIEPIDIDYMITIS		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
SEMINAL VESICLE	# EX	9		9		0		0		0		7	
ATROPHY		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		5 (56)	
PROSTATE GLAND	# EX	9		9		0		0		0		7	
URINARY BLADDER	# EX	9		9		0		0		0		7	
CEREBRUM	# EX	9		9		0		0		0		8	
CONGESTION		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
CEREBELLUM	# EX	9		9		0		0		0		8	
CONGESTION		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
SPINAL CORD	# EX	9		9		0		0		0		8	
MAMMARY GLAND	# EX	8		9		0		0		0		6	
SKIN	# EX	9		9		0		0		0		8	
HARDERIAN GLAND	# EX	9		9		0		0		0		8	
CHRONIC ADENITIS		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
EYE	# EX	9		9		0		1		0		7	
CATARACTA		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)	
LUNG	# EX	9		9		0		0		0		8	
CONGESTION		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		2 (22)	
TRACHEA	# EX	9		9		0		0		0		8	

(REPORT CONTINUED)

Table 3-25. Histopathological findings of male rats examined at 13 weeks

		Control		Vehicle		T1		T2		T3		T4	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
NUMBER OF ANIMALS :		9		9		9		9		9		9	
THYROID GLAND	# EX	9		9		0		0		0		8	
ULTIMOBANCHIAL BODY REMANT		3 (33)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
CHRONIC INFLAMMATOIN		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
CONGESTION		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
PITUITARY GLAND	# EX	9		9		0		0		0		8	
CONGESTION		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
ADRENAL GLAND	# EX	9		9		0		0		0		8	
CONGESTION		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
ESOPHAGUS	# EX	9		9		0		0		0		8	
FEMUR	# EX	9		9		9		9		9		7	
TELANGIECTASIS		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		2 (22)	
MASTOCYTOSIS		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)		1 (11)		0 (0)	
SKELETAL MUSCLE	# EX	9		9		0		0		0		8	
SCIATIC NERVE	# EX	9		9		0		0		0		8	
SALIVARY GLAND	# EX	9		9		0		0		0		8	
EAR	# EX	0		0		0		0		1		0	
HEMATOMA		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)		0 (0)	

(END OF REPORT)

Table 3-26. Histopathological findings of female rats examined at 13 weeks

		Control		Vehicle		T1		T2		T3		T4	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
NUMBER OF ANIMALS :		9		9		9		9		9		9	
KIDNEY	# EX	9		9		1		0		0		9	
CONGESTION		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
PROTEIN CAST		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	
EPITHELIAL HYPERPLASIA/ CAL		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
HYDRONEPHROSIS		0 (0)		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
SPLEEN	# EX	9		9		9		9		9		9	
CONGESTION		1 (11)		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
SPLENIC ATROPHY		0 (0)		1 (11)		3 (33)		0 (0)		1 (11)		4 (44)	
LIVER	# EX	9		9		9		9		9		9	
LYMPHOCYTE-R. E. CELL FOCI		0 (0)		0 (0)		0 (0)		2 (22)		0 (0)		0 (0)	
COAGULATION NECROSIS		0 (0)		0 (0)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
HEART	# EX	9		9		0		0		0		9	
STOMACH	# EX	9		9		0		0		0		9	
DUODENUM	# EX	9		9		0		0		0		9	
JEJUNUM	# EX	9		9		0		0		0		9	
ILEUM	# EX	9		9		0		0		0		9	
CECUM	# EX	9		9		0		0		0		9	
COLON	# EX	9		9		0		0		0		9	
RECTUM	# EX	9		9		0		0		0		9	
MESENTERY LYMPH NODE	# EX	9		9		0		0		0		9	
AORTA	# EX	9		9		0		0		0		9	
CLITORIAL GLAND	# EX	9		9		0		0		0		9	
PANCREAS	# EX	9		9		0		0		0		9	
LIPIDOSIS		1 (11)		1 (11)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
THYMUS	# EX	9		9		9		9		9		9	
ATROPHY		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (11)	

(REPORT CONTINUED)

Table 3-26. Histopathological findings of female rats examined at 13 weeks

		Control		Vehicle		T1		T2		T3		T4	
		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
NUMBER OF ANIMALS :		9		9		9		9		9		9	
VAGINA	# EX	9		9		0		0		0		9	
UTERUS HYDROMETRA	# EX	9		9		0		0		0		9	
		0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(11)
OVARY CONGESTION	# EX	9		9		0		0		0		9	
		0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(11)
URINARY BLADDER	# EX	9		9		0		0		0		9	
CEREBRUM	# EX	9		9		0		0		0		9	
CEREBELLUM	# EX	9		9		0		0		0		9	
SPINAL CORD	# EX	9		9		0		0		0		9	
MAMMARY GLAND	# EX	9		9		0		0		0		9	
SKIN	# EX	9		9		0		0		0		9	
HARDERIAN GLAND	# EX	9		9		0		0		0		9	
EYE CATARACTA	# EX	9		9		0		0		1		9	
		0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(11)	0	(0)
LUNG	# EX	9		9		0		0		0		9	
TRACHEA	# EX	9		9		0		0		0		9	
THYROID GLAND ULTIMOBANCHIAL BODY REMANT	# EX	9		9		0		0		0		9	
		3	(33)	1	(11)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(11)
PITUITARY GLAND CONGESTION	# EX	9		9		0		0		0		9	
		0	(0)	1	(11)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
ADRENAL GLAND	# EX	9		9		0		0		0		9	
ESOPHAGUS	# EX	9		9		0		0		0		9	
FEMUR TELANGIECTASIS MASTOCYTOSIS	# EX	9		9		9		9		9		9	
		1	(11)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	3	(33)
		2	(22)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(11)

(REPORT CONTINUED)

Table 3-26. Histopathological findings of female rats examined at 13 weeks

	Control		Vehicle		T1		T2		T3		T4	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
NUMBER OF ANIMALS :												
SKELETAL MUSCLE	# EX	9	9	9	0	0	0	0	0	0	9	9
SCIATIC NERVE	# EX	9	9	0	0	0	0	0	0	9	9	9
SALIVARY GLAND	# EX	9	9	0	0	0	0	0	0	9	9	9

(END OF REPORT)

위탁과제보고서 III

과제명 : DA-125 항종양치료제 효력연구

위탁 연구 기관 : 서울대학교 의과대학

위탁연구책임자 : 박 재 갑

연 구 원 : 현 진 원

1. 姓名: 张三
2. 性别: 男
3. 年龄: 25
4. 职业: 程序员
5. 籍贯: 广东
6. 学历: 本科
7. 婚姻状况: 未婚
8. 联系电话: 13800000000
9. 电子邮箱: zhangsan@example.com
10. 身份证号: 110101199001010001

요 약 문

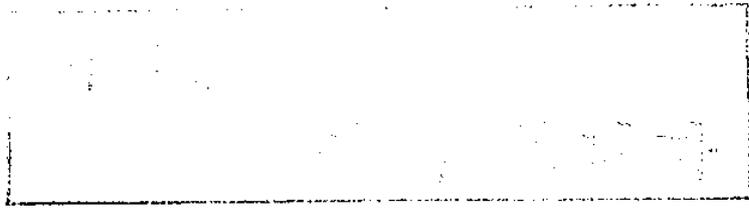
한국인의 암조직으로부터 수립한 독소루비신 내성 인체암 세포주들에 대한 DA-125의 *in vitro* 세포독성을 MTT법으로 측정하여 독소루비신과 비교 평가하였다.

SNU-1/DOX 250, SNU-16/DOX 250 등의 내성 위암 세포주에 대하여 DA-125는 독소루비신보다 각각 64배, 28배 강한 세포독성을 보였으며, SNU-C4/DOX 1000, SNU-C2A/DOX 1000 등의 내성 대장암세포주에 대하여 DA-125는 독소루비신보다 67배 이상의 강한 세포독성을 나타내었다.



목 차

제 1 장 서론	309
제 2 장 연구추진방법 (실험방법)	311
제 1 절 생물활성 검사용 시료의 조제	311
제 2 절 활성검사모델	311
1. 암세포주의 배양 및 Doxorubicin에 대한 내성 세포주의 유도	311
2. MTT assay를 통한 대조군 세포주(SNU-)와 Doxorubicin-resistant세포주(SNU-/DOX) 에서 Doxorubicin에 대한 세포감수성의 측정	311
제 3 절 실험방법	312
1. 암세포의 배양	312
2. 예비실험	313
3. 본실험	313
4. 결과분석	314
제 3 장 연구결과 및 고찰	315
제 4 장 결론	316
제 5 장 참고문헌	317



제 1 장 서 론

항암제의 개발을 효과적으로 수행하려면 많은 후보물질이 확보 가능해야 함과 동시에 치료하고자 하는 질환에 대한 이들 많은 후보물질들의 효능 여부를 빠르고 정확하게 결정할 수 있는 효율적인 생물활성 검색 시스템이 필수적이다.

항암제 개발전략의 최근 동향은 역시 화학합성 또는 천연물로부터 유래하는 많은 후보물질의 약효여부를 조직적으로 검색하는 대량검색이 가장 각광을 받고 있는데 이 전략에서는 민감하면서도 실험조작이 간편한 능률적인 생물활성 대량검색 시스템이 가장 중요한 요소로서 최근에는 사람의 대표적인 암들로부터 수립된 암 세포주에 대한 생체외 세포 독성 검사로 1차 검색을 실시하는 경향이다. 1차 검색에서 어느 특정한 암세포에 대해 선택적인 세포 독성을 보이면, 그 암세포를 누드 마우스에 이식하여 종양을 만들고 이에 대한 치료효과를 검색하는 이형이식 체내검사로 이행하는 것이 일반적으로 쓰이는 방법으로 이를 “질환-지향성” 항암제 검색 시스템 (“disease-oriented” screening system)이라고 불리운다.¹⁾

본 연구팀은 최근 10여년간 생체외 세포 독성 검사시에 필수적으로 요구되는 110여 종류의 암세포주들을 수립하였다. 특히 한국인에 호발하는 위암, 간암, 자궁암, 대장암 등은 10여종씩이 수립되었고 이들 중 위암 및 대장암 세포주들은 다양한 특성 분석이 이루어진 후 보고되었다.²⁾⁻⁷⁾ 본 연구팀이 개발한 세포주들은 신규 항암제 개발 및 검색에도 많이 사용되고 있다.⁸⁾⁻¹²⁾

본 연구팀은 선행연구에서 신규 항암성 항생물질 DA-125가 국내 암환자

로부터 분리, 수립된 여러 인체 암세포주에 대해 동일 계열의 항암제중 가장 널리 사용되고 있는 독소루비신보다 3 - 10배 이상 강한 세포독성을 보이는 물질임을 밝힌 바 있다. 따라서 본 연구는 현재 항암화학요법시 가장 문제시 되고 있는 항암제의 다제 내성에 대한 DA-125의 효과를 평가하기 위하여 독소루비신내성 인체암에 대한 DA-125의 *in vitro*세포독성을 독소루비신과 비교평가하였다.

제 2 장 연구추진방법(실험방법)

제 1 절 생물활성 검사용 시료의 조제

DA-125와 Adriamycin(W)은 5 ml의 3차 증류수에 용해시켜 1 mg/ml의 stock solution을 만든 후 0.2 μ m의 syringe filter(Gelman Sciences)로 여과하였다. 각 시료를 0.1 μ g/ml까지 half-log로 희석하여 실험에 사용하였다.

제 2 절 활성검사모델

1. 암세포주의 배양 및 독소루비신에 대한 내성세포주의 유도

내성 유도 실험시 사용한 인체암세포주는 SNU-1, SNU-16, (위암세포주), SNU-C2A, SNU-C4(대장암세포주) 등 4종이었다. 암세포의 배양은 R10(RPMI 1640 + 10% heat inactivated bovine calf serum)을 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 표준적인 방법으로 배양하였다. 독소루비신에 대한 내성의 유도는 각 세포주의 배양액에 독소루비신의 농도를 점차 증가시켜 마지막 농도에 고정하였다. 현재 내성이 유도된 가장 높은 농도는 위암세포주의 경우 250 ng/ml, 대장암세포주는 1000 ng/ml이다.

2. MTT assay를 이용한 대조군세포주(SNU-)와 독소루비신 내성 세포주(SNU-/DOX)에서 독소루비신에 대한 세포감수성의 측정

부유성장하는 위암세포주는 피펫으로 붙어자라는 대장암세포주는 트립신 처리하여 single cell suspension을 만든 후 haemocytometer로 적정 세포수를 계산하여 같은 수의 세포를 R10배지 180 μ l속에 현탁시켜 각 well에 분주하고 각 농도의 독소루비신을 20 μ l씩 첨가하였다. 4일 동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 MTT(2 mg/ml PBS)를 50 μ l씩 각 well에 첨가하여 4시간 더 배양한 후 100% DMSO를 각 well에 넣고 10분동안 흔들어서 tetrazolium이 환원되어 형성된 formazan crystal을 용해시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포수를 구하고 각 시료의 희석배수당 8 well을 사용하여 흡광도의 평균과 표준편차를 구하였다. 각 농도에서 생존율을 구한 후 IC₅₀을 결정하고 SNU-/DOX의 IC₅₀값에 대한 SNU-의 IC₅₀값의 비(IC₅₀ of SNU-DOX/IC₅₀ of SNU-)로 유도된 내성의 정도를 결정하였다.

제 3 절 실험방법

1. 암세포의 배양

사용한 배지는 RPMI-1640에 HEPES buffer(4.25 g/ml), NaHCO₃(2 g/ml)와 열불활성화시킨 bovine calf serum을 10%되게 첨가한 R10배지를 사용하였으며 75 cm²-flask에 15 ml의 배지를 넣고 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂ 분압)에서 4-5일 간격으로 배지를 갈아주었다. Anchorage dependent cell을 trypsinization하여 culture flask에 cell을 떼어 놓은 다음에 배양액의 일부를 매주 개 75cm²-flask에 옮기고 suspended cell은 바로 배양액의 일부를 옮겨 배양하였다.

2. 예비실험

본 실험에 앞서 각 세포주마다 MTT assay에 사용할 각 well의 적정세포수를 결정하였다. 이 세포수는 약물처리하지 않은 대조군에서 세포접종 당시와 4일후 MTT 실험 종료시에 모두 세포가 지수함수적으로 활발히 증식하면서, MTT 처리후의 OD₅₄₀ 값이 0.6 - 0.7에 이를 수 있는 충분한 값이다.

3. 본실험

Suspended cell은 pipet disaggregation에 의해 anchorage dependent cell은 trypsinization에 의해 single cell suspension을 만든 후 hemocytometer를 사용하여 cell counting을 하였다. 예비실험에서 결정된 적정수의 세포를 180 μ l의 배지에 부유시켜 각 well에 분주하였으며 각 농도의 시료를 20 μ l씩 첨가하였다. 흡광도 측정시 사용할 blank에는 세포 없는 배지만을 180 μ l 가하고 PBS 또는 약물을 20 μ l 첨가하였다. 암세포와 약물이 접종된 plate를 37°C, 5% CO₂하에서 4일간 배양후 0.1 mg의 MTT (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ; Sigma M 2128)를 모든 well에 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하였다. 배양 종료시 plate를 450 x g 에서 5분간 원심분리한 후 배지를 30 μ l 정도만 남기고 모두 빨아내었다. (이때 각 well의 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의하였다). 배지가 제거된 각 well에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150 μ l씩 가한 후에 formazan 결정이 녹을 때까지 약 10분간 가볍게 진탕해 주고 바로 microplate reader(scanning multiwell spectrophotometer)로 540 nm에서의 흡광도를

측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan(blue)으로 분해된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 세포(viable cells)수와 비례한다.

4. 결과분석

시험군에서 8개 well로 부터 한 컬럼의 평균 OD₅₄₀ 값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD₅₄₀ 값에 대한 백분율 값을 산출하였다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값이다. 50% 억제농도(IC₅₀)는 이 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였으며 이 IC₅₀값을 항암효과의 지표로 사용하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

독소루비신 내성 위암세포주 SNU-1/DOX250, SNU-16/DOX250는 독소루비신에 대하여 각각 257배, 121배의 상대적 내성도를 보였으며, 대장암세포주 SNU-C4/DOX1000, SNU-C2A/DOX1000에 대해서는 각각 58배이상, 57배이상의 상대적 내성도를 나타내어 이들 내성암세포주가 독소루비신에 대해 강한 내성을 획득하였음을 시사하였다. 이들 내성 암세포주들에 대한 DA-125의 항암력을 평가하여 독소루비신과 비교하였다(표 1). DA-125는 독소루비신보다 SNU-1/DOX250, SNU-16/DOX250, SNU-C4/DOX100, SNU-C2A/DOX1000에 대하여 각각 64배, 28배, 67배이상, 67배 이상의 강한 세포독성을 나타내었다.

제 4 장 결 론

한국인의 암조직으로부터 수립한 독소루비신 내성 인체암 세포주들에 대한 DA-125의 *in vitro* 세포독성을 MTT법으로 측정하여 독소루비신과 비교 평가하였다.

SNU-1/DOX 250, SNU-16/DOX 250 등의 내성 위암 세포주에 대하여 DA-125는 독소루비신보다 각각 64배, 28배 강한 세포독성을 보였으며, SNU-C4/DOX 1000, SNU-C2A/DOX 1000 등의 내성 대장암세포주에 대하여 DA-125는 독소루비신보다 67배 이상의 강한 세포독성을 나타내었다.

이러한 결과로 비추어 볼 때 DA-125는 기존의 항암제로 유력한 독소루비신보다 독소루비신 내성 암세포주들에 대해 약효가 우수하므로, 임상에서의 다제 내성암에 대한 효과가 기대되는 바 임상연구에서 그 효과를 평가하는 것이 필요하다.

제 5 장 참고문헌

1. Boyd, M.R. :Principle and practice of oncology 3(10), 1-12, 1989.
2. Gazdar, A.F., Park, J.G., and Oie, H.K. :Colon cancer cell(edited by Poste, G.). Academic Press, Orlando,FL, P227, 1990
3. Park, J.G., Frucht, H., Larocca, R.V., Bliss, Jr., D.P., Kurita, Y., Chen, T.R., Henslee, J.G., Trepel, J.B., Jensen, R.T., Johnson, B.E., bang, Y.J., and Kim, J.P. : Cancer Res. 50, 2773(1990)
4. Park, J.-G., Oie,H.K., Sugarbaker,P.H., Henslee,J.G., Chen,T.-R., Johnson,B.E. and Gazdar,A.F.: Cancer Res. 47, 6710 (1987).
5. 박 재갑, 권 남숙, 김 진복, 오 승근, 이 건욱, 최 국진, 김 수태, 방 영주, 김 노경, 강 순범, 신 면우, 이 상훈, 김 주현, 이 종욱, 김 광현, 박 명희, 김 용일, 허버드 오이, 제인 트레펠, 아디 가즈다 : 대한암학회지 20,105 (1988).
6. 박 재갑, 권 남숙, 노 동영, 홍 인규, 오 승근, 이 건욱, 박 용현, 홍 성국, 최 국진, 김 진복, 김 수태, 허 대석, 방 영주, 박 선양, 김 노경, 고 창순, 안 효섭, 최 영민, 강 순범, 신 희철, 이 효표, 김 승욱, 이 상훈, 이 한구, 왕 규창, 정 희원, 김 현집, 한 대희, 성 숙환, 김 주현, 이 상은, 이 종욱, 김 시황, 김 영균, 김 광현, 유 영석, 박 명희, 박 성희,

김 용일, 허버드 오이, 아디 가즈다 : 대한암학회지 22, 1 (1990).

7. 박 재갑, 전 유미, 박 규주, 양 한광, 노 동영, 김 선희, 오 승근, 이 건
욱, 박 용현, 최 국진, 김 진복, 김 수태, 허 대석, 방 영주, 박 선양, 김
병국, 김 노경, 최 규완, 김 정룡, 고 창순, 안 효섭, 최 영민, 강 순범,
신 희철, 이 효표, 김 승욱, 이 상훈, 이 한구, 왕 규창, 정 희원, 김 현
집, 한 대회, 성 숙환, 김 주현, 이 은석, 이 상은, 최 황, 이 종욱, 김 시
황, 김 영균, 김 광현, 민 양기, 유 영석, 박 명희, 박 성희, 김 용일 : 대
한암학회지 23, 169 (1991).

8. Gazdar, A.F., Kadoyama, C., Venzon, D., Park, J.-G., Tsai, C.-M.,
Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Ihde, D.C. and Giaccone, G. :
J.Natl.Cancer Inst Monogr.13,191 (1992).

9. Gazdar, A.F., Tsai, C.M., Park, J.-G., Ihde, D., Mulshine, J.,
Carmichael, J., Mitchell, J., and Minna, J.D.: Prediction of tumor
treatment response(edited by Chapman, J.D., Peters, L.J., Withers,
H.R.). Pergamon press, New York, p175, (1988).

10. Park, J.G., Collins, J.M., Gazdar, A.F., Allegra, C.J.,
Steinberg, S.M., Greene, R.E. and Kramer, B.S.: J.Natl.Cancer Inst.
188, 1560 (1988).

11. Park, J.-G., Kramer, B.S., Lai, S.-L.: J.Natl.Cancer Inst. 82, 193
(1990).

12. Park, J.-G., Kramer, B.S., Steinberg, S.M., Carmichael, J.,
Collins, J.M., Minna, J.D. and Gazdar, A.F.: Cancer Res. 47, 5878
(1987).

표 1. 독소루비신 내성암세포주에 대한 DA-125와 독소루비신의 in vitro cytotoxicity(In vitro cytotoxicity of DA-125 and Doxorubicin against doxorubicin-resistant cell line)

Sample	IC50($\mu\text{g/ml}$)			
	SNU-1/ DOX250	SNU-16/ DOX250	SNU-C4/ DOX1000	SNU-C2A/ DOX1000
Doxorubi- cin(W)	19.0	10.08	>100	>100
DA-125	0.299	0.361	1.50	1.50

위탁과제보고서 IV

과제명 : DA-125 항증양치료제 제 1 상 임상연구

위탁 연구 기관 : 연세대학교 의과대학 연세암센터

위탁연구책임자 : 노 재 경

연 구 원 : 김주향, 강현철, 임호영, 이경희,
이혜란, 조재용, 라선영

이 책의 목적

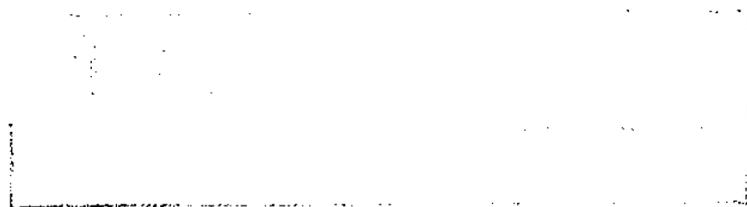
이 책의 목적

요약문

DA-125는 전임상 연구결과 항종양효과가 우수하고, 심장독성이 적은 새로운 Anthracycline계 항암 후보물질이다. 본 연구는 암환자를 대상으로 한 DA-125의 제 1 상 임상연구로서, 비무작위 개방 제 1상 임상연구로 진행고형암으로 병리 진단된 후 ECOG 수행상태 0-2, 적절한 간, 신장 기능을 확인한 환자를 대상으로 하였다.

DA-125는 정맥주사하였으며 마우스 LD₁₀의 10%인 20mg/m²부터 투여를 시작하여 Modified Fibonacci method에 근거하여 증량하였다. 각 용량마다 최소 3예 이상을 대상으로 WHO grade III이상의 부작용이 관찰되지 않았을 경우 다음 용량으로 증량하였다. 부작용은 WHO 독성기준에 의하여 분류하였고, DA-125투여 직전부터, 투여 후 96시간까지 일정시간 간격으로 혈액과 소변을 채취하여 임상약동력학 시험을 실시하였다.

대상환자는 9예였으며, 대상질환별로는 폐암 3예, 대장암 3예, 두경부 종양 3예였다. DA-125 20mg/m² 3예, 40mg/m² 3예, 60mg/m² 3예에서 시행되었다. 특기할만한 부작용은 20mg/m² 3예에서는 관찰되지 않았으며, 40mg/m² 3예중 2예에서 WHO Grade I의 식욕부진, 구토가 관찰되었고 각각 1예에서 WHO Grade I, II의 호중구감소증이 관찰되었으나 Grade III이상의 부작용은 없었다. 60mg/m²을 투여한 환자 1예의 경우 약물투여 5시간 후 occasional PVC와 저혈압(70/50 mmHg)이 관찰되었으나 자각증상은 없었으며 약 20분 후 저절로 회복되었고, 다른 중증의 부작용은 관찰되지 않았다. 항종양효과는 4주간의 관찰이 끝난 예에서 안정성 병변(stable disease)을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 DA-125는 3단계인 60mg/m²까지는 WHO Grade II이상의 급성기 부작용은 없었으며, 2단계인 40mg/m²까지는 WHO Grade II이상의 아급성기 부작용 없이 모든예에서 비교적 잘 견디는 것을 관찰할 수 있었다.

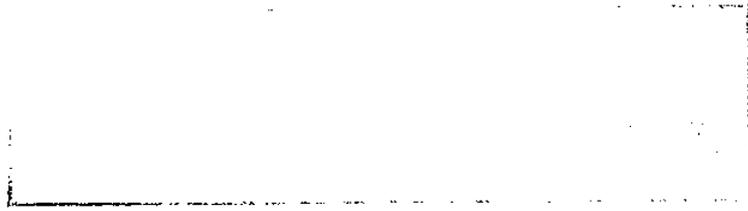


목 차

제 1 장	서론 -----	329
제 2 장	연구추진방법 (실험방법) -----	331
제 1 절	연구의 개요 -----	331
1.	임상시험용 의약품 -----	331
2.	임상단계 -----	331
3.	연구목적 -----	331
4.	임상설계 -----	331
5.	연구대상 -----	331
6.	연구방법 -----	331
7.	피험자수 -----	331
8.	안전성평가 -----	331
제 2 절	임상시험용 의약품의 제형, 공급, 관리, 수거 -----	333
1.	제제의 조성 -----	333
2.	보관 -----	333
3.	사용기간 -----	333
4.	공급, 관리 및 수거 -----	333
제 3 절	피험자 선정 및 제외기준 -----	333
제 4 절	임상시험 방법 -----	334
1.	주사액 조제 방법 -----	334
2.	투여방법 -----	334
3.	투여량 -----	334

제 5 절 관찰 및 검사	336
1. 이화학 소견 및 문진	336
2. 검사기간	338
3. 항암효과	338
제 6 절 약물동력학 시험	338
1. 약물용량	338
2. 혈액채취	339
3. 소변채취	339
4. 약동력학적 검사	339
제 7 절 평가기준 및 방법	339
1. 부작용 평가기준	339
2. 항종양효과 평가기준	340
3. 약동력학적 분석	340
제 8 절 피험자 동의/임상연구심사위원회 승인	340
제 9 절 피험자 임상시험 중단	341
제10 절 임상시험 종료	341
제 3 장 연구결과 및 고찰	342
제 1 절 투여증례수	342
제 2 절 배경인자	342
제 3 절 부작용	342
1. 자. 타각 증상	342
2. 혈액검사	343
3. 혈액생화학적 검사	344
4. 뇨검사	344

제 4 절 항암효과	-----	345
제 5 절 임상약동력학	-----	345
제 4 장 결 론	-----	346
제 5 장 참고문헌	-----	347



제 1 장 서 론

Anthracycline계 항암제는 고형종양 및 혈액종양에 가장 흔히 사용되는 항암제로 임상에서 doxorubicin과 daunorubicin이 널리 이용되고 있다. 이들 항암제는 악성임파종, 급성백혈병, 유방암, 위암 등의 여러 악성 종양에 사용되고 있으나, 계속 반복 사용시 발생하는 약제내성(MDR) 및 만성 심장 독성이 임상적으로 큰 문제점으로 지적되고 있다.

약제내성과 만성 심장독성을 개선시키기 위하여 많은 anthracycline 유도체(mitoxanthrone, epirubicin 등)가 개발되었으나 아직도 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있다. anthracycline계 항암성 항생물질의 항암력을 증강시키기 위한 방법의 하나로 aglycone과 당의 결합을 안정화하기 위해 당부위에 불소원자를 도입한 화합물이 합성되어, doxorubicin보다 우수한 항종양 효과를 나타내었으나 수용성이 극히 낮아 주사제로 개발이 불가능하였다. 동아제약 연구소에서는 불소화 anthracycline의 수용성을 높이기 위하여 14위치의 수산기에 다양한 아미노산들을 도입하여 수용성과 안정성을 향상시킨 물질들을 합성하였다. 그 중, 항종양 효과가 탁월하고 수용성 및 안정성에서 우수한 화합물, 즉, β -alanine을 결합시킨 물질을 선별하여 DA-125로 명명한 후 전임상 평가를 시작하였다(1).

DA-125는 여러종류의 인체암 세포주에 대하여 doxorubicin에 비하여 1~5배의 우수한 *in vitro* 세포독성을 나타내었으며, 특히 다제내성 세포주에 대해서는 400배까지의 높은 활성을 나타내었다(2). *In vivo* 항암력에 있어서도 L1210 및 P388D1 mouse 백혈병에 대하여 doxorubicin에 비해 우수한 항종양 효과와 넓은 치료역을 나타내었으며, 복강투여뿐 아니라 정맥투여의 경우에도 많은 치유예가 확인되었다(2,3,5,6). 또한 mouse 고형종양과 nude mice에 이식한 인체암(유방암, 폐암, 대장암)에 대해서도 정맥투여에 의해 doxorubicin보다 높은 항종양 효과를 나타내었으며, 특히 MX-1 인체 유방암에 있어서는 3/6의 치유예가 발견되었다(3,4).

한편, 안전성에 있어서는 정맥투여시 mice, rat에 대한 LD₁₀, LD₅₀ 값이 doxorubicin에 비하여 4~5배 크고(7,8) dog에 있어서도 저독성의 경향을 나타내었으

며, 이중 주된 독성은 백혈구 감소였다(9). Hamster의 심전도에 미치는 영향, rat의 심전도, 적출심장 기능 및 심근조직에 미치는 영향, 그리고 rat의 심근조직에서의 지질과산화에 미치는 영향 등에 대한 실험결과를 바탕으로 평가할 때 DA-125의 심장독성은 doxorubicin에 비해 현저히 적은 것으로 확인되었다(10). 또한 DA-125는 주사시의 피부자극성 및 혈관염 발생이 doxorubicin에 비하여 적고 회복이 빨랐다(11). 이와 같은 DA-125의 전임상시험 결과를 기초로 하여 암환자를 대상으로 제 1상 시험을 실시하기 위해 본 시험을 계획하였다. 본 연구의 목적은 DA-125의 단독 정맥 투여에 의한 1) 부작용 평가, 2) 최대허용량 (Maximally Tolerated Dose : MTD) 및 약물사용 제한독성 (Dose Limiting Factor : DLF) 결정, 3) 약물동태학적 특성 평가, 4) 항종양 효과 평가 (Optional), 5) 제 2상 시험에서 권장되는 투여량 결정등이다.

제 2 장 연구추진방법(실험방법)

제 1 절 연구의 개요

1. 임상시험용 의약품 : DA-125 주사제 (Anthracycline계열 항암제)
2. 임상단계 : Phase I
3. 연구목적 : 안전성 및 MTD 결정
약물동태학적 특성 평가
항종양 효과 (Optional)
4. 임상설계 : Open non-randomized Phase I study
5. 연구대상 : 피험자 선정기준과 제외기준에 적합한 진행 암환자
6. 연구방법 : 투여 - 정맥주사
Starting dose - 20 mg/m² (Murine LD₁₀의 10%)
용량증가 : Fibonacci 변법
7. 피험자수 : 단계별로 최소 3명의 환자를 대상
8. 안전성 평가 : 이학적 소견 및 문진
일반소견 및 자타각 증상

1. 선정기준

입원 환자를 대상으로 다음 각호의 조건을 충족하는 환자를 선정하였다.

가. 조직병리검사나 세포진검사에 의해 악성종양으로 진단된 진행, 재발 또는 전이 암환자

나. 시험참여 시점에서 표준치료법이 없거나 기존의 통상적인 치료법으로는 효과를 기대하기 어려운 환자

다. 간, 신장, 골수 기능이 정상이고, 심장, 폐 등에 기능장애가 없는 경우

1) 백혈구 : 4,000/mm³ 이상

2) 혈소판 : 100,000/mm³ 이상

3) Hemoglobin : 10 g/dl 이상

4) Total Bilirubin : 2 mg/dl 이하

5) GOT 또는 GPT : 정상치의 1.5배 이하

6) Creatinine : 정상치 범위의 1.5배 이하

7) 심전도(ECG) 이상이 없는 경우

라. 일상생활 수행능력(ECOG performance status)이 0 - 2 인 경우 (별첨 1)

마. 부작용등을 관찰할 수 있도록 충분한 기간(적어도 2개월 이상)동안 생존이 기대되는 경우

바. 급성감염증이 없는 경우

사. 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 서면동의서에 서명한 경우

아. 15세 이상 70세 미만의 연령

자. 전치료의 영향이 없고 원칙적으로 전치료와의 간격이 4주 이상인 경우(전치료에 Nitrosourea계 알킬화제, 방사선이 사용된 경우에는 6주 이상의 경과가 요망됨)

2. 제외기준

가. Anthracycline계 항암제를 투여받은 환자

나. 임신부, 수유부 또는 임신가능성이 있거나 적절한 피임조치를 취하지 않은

임상검사(혈액검사, 혈액생화학 검사, 소변검사)
흉부 X선 검사
심장독성 검사

제 2 절 임상시험용 의약품의 제형, 공급, 관리 및 수거

1. 제제의 조성

주사용 DA-125는 1 Vial중 DA-125 50 mg(역가)를 함유하고 부형제로 D-mannitol 250 mg을 함유하는 동결건조품으로 제조되었다.

2. 보관

실온보관, 차광한 밀봉용기

3. 사용기간

6개월

4. 공급, 관리 및 수거

임상시험용 의약품은 임상시험 의료기관 약국에 공급하고, 임상시험 의료기관 약국에서 관리하며 임상연구 종료후 미사용 임상시험용 의약품은 동아제약에서 수거한다.

제 3 절 피험자 선정 및 제외기준

여성 / 중대한 합병증이 있는 경우

제 4 절 임상시험 방법

1. 주사액 조제 방법

DA-125 50 mg(역가) Vial을 생리식염수 적당량(10 ml)으로 용해시켰다. 용해 후 신속히 사용하고 일단 조제한 잔액은 폐기하였다.

2. 투여방법

정맥혈관으로 150~250 ml의 생리식염수 또는 5% 포도당 용액을 자유조절식 정맥 수주관을 사용하여 수주하다가 별도로 조제한 약액을 5분 이상에 걸쳐서 서서히 수주 관내로 주사한 다음 다시 생리식염수의 수주를 계속하여 수주관 내의 약액이 완전히 세척되어 주입되도록 하였다.

3. 투여량

가. 초회투여량 : 20 mg/m^2

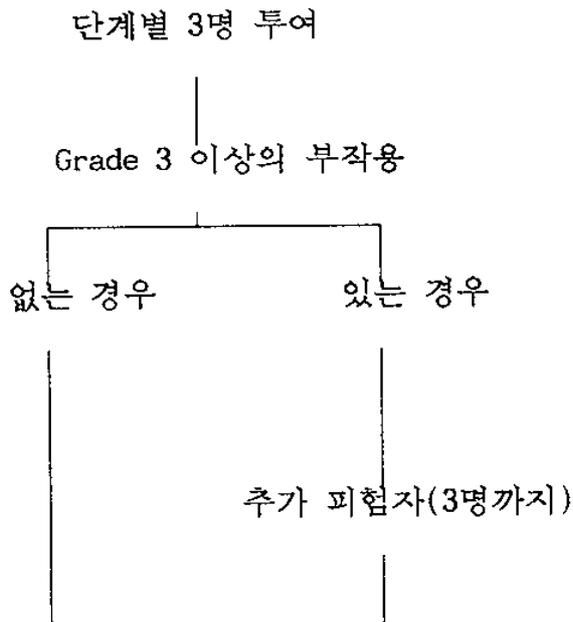
이 용량은 mouse에 대한 10% 치사량(murine LD₁₀)의 1/10에 해당한다.

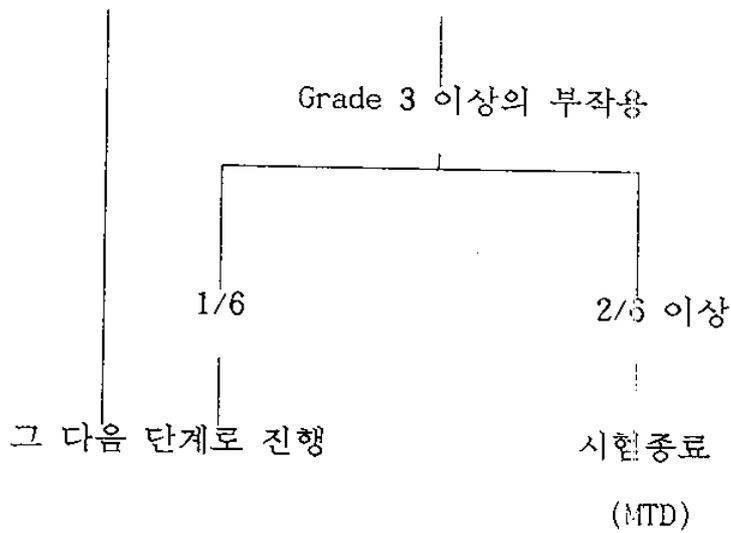
나. 투여량의 증량 : Fibonacci 변법에 의거 다음과 같이 단계적으로 증량하였다. 동일한 환자에서 다음 용량으로의 증량은 허용치 않았다.

투여단계	투여량	최소피험자수
1단계 (n)	20 mg/m ²	3
2단계 (2n)	40 mg/m ²	3
3단계 (3n)	60 mg/m ²	3

다. 최대허용량(Maximally Tolerated Dose : MTD)

각 용량단계마다 최소한 3명의 피험자에서 관찰하였다. 첫번째 피험자는 적어도 3주간 관찰하여 부작용이 없을 경우 나머지 2명의 피험자를 추가하였다. 만일 WHO 부작용기준에 따른 Grade 3이상의 부작용이 3명중 1명에서 관찰될 경우 그 단계에서 3명의 피험자를 추가하여 검토하였다. 추가된 피험자를 포함한 6명중 2명의 피험자에서 Grade 3이상의 부작용이 관찰되면 이 시험을 종료하며 이때 관찰된 부작용을 약물 사용제한독성(Dose Limiting Factor, DLF)이라 하고 이 단계의 용량을 최대허용량(Maximally Tolerated Dose, MTD)라고 한다.





라. 임상권장량

MTD의 전단계 용량과 MTD의 중간용량에서 시험을 시행하여 WHO Grade III 이상의 부작용이 발현되지 않는 경우로 정한다. (2/6 이하)

제 5 절 관찰 및 검사

1. 이학적 소견 및 문진

가. 일반소견

체중, 체온, 맥박, 호흡, 혈압, Performance Status(ECOG)

나. 자·타각 증상

증상, 증상의 정도, 출현시기, 지속시기를 조사표에 기록하였다.

다. 심장독성 검사

1) ECG : 매 치료시마다

2) Holter monitoring : 투여개시후 24시간

각 용량마다 최소 1회에서 시행한다.

3) RVG : 매 치료전마다 실시

4) Biopsy(optional)

라. 흉부 X선 검사 : 매 치료전 및 투여후 4주

마. 임상검사

1)혈액검사 : 격일 간격 (3~4주까지)으로 시행하고 백혈구치 $3000/\text{mm}^3$ 이하인 경우 매일 시행하고 $3000/\text{mm}^3$ 이상으로 회복된 후에는 1주간격으로 계속하였다. CBC with differential count and platelet, reticulocyte count를 실시하였다.

2) 혈액화학 검사 : 투여전, 투여후 24시간, 그 후는 주 1회

SMA-12(Calcium, inorganic phosphate, glucose, BUN, creatinine, uric acid, cholesterol, totoal protein, albumin, total bilirubin, alkaline phosphatase, SGOT, SGPT),Electrolytes(Na, K, Cl, $t\text{CO}_2$ content), γ -GT, LDH, PT, PTT

3) 소변검사 : 투여전, 투여후 24시간, 그 후는 주 1회

2. 검사기간

검사항목		검사시기	투여전	투여 후			
				1 일째	1 주째	2 주째	3 주째
자-타각 증사			○	○	○	○	○
심장	ECG		○	○	○	○	○
	Holter monitoring		투여개시후 24시간				
독성	RVG		○				
	Biopsy		Optional				
흉부 X선 검사			○				○
임상 검사	혈액		격일간격(3~4주까지)으로 시행하고 백혈구치 $3000/\text{mm}^3$ 이하인 경우 매일 시행하고 $3000/\text{mm}^3$ 으로 회복된 후에는 1주간격으로 계속한다				
	혈액화학		투여전, 투여후 24시간, 그 후는 주 1회				
	소변		투여전, 투여후 24시간, 그 후는 주 1회				

3. 항암효과

항종양 효과의 관찰은 제 1상 임상시험 본래의 목적은 아니지만 그 효과에 대해서 조사표에 기재하였다.

제 6 절 약물동력학 시험

1. 약물용량 : 각 용량 단계별로 실시하였다.

2. 혈액채취

투여전, 투여후 5, 15, 30분, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주의 시간중 각 용량 단계별로 필요한 시간에 1회 5 ml의 혈액을 채취하였다.

3. 소변채취

0-2, 2-4, 4-8, 8-12, 12-24, 24-48, 48-96시간에 채취한 소변의 부피를 측정후 ice jar내에 보관하였다.

4. 약동력학적 검사

혈장과 뇨중의 대사체(M1, M2, M3, M4)의 농도를 HPLC법으로 측정하였다.

제 7 절 평가기준 및 방법

1. 부작용 평가 기준

부작용 평가는 WHO 부작용 평가기준을 이용하였다. WHO 부작용 평가기준에 포함되어 있지 않은 부작용에 대해서는 다음 기준을 사용하였다.

등급	기 준
0도	부작용 없음
1도	경도의 부작용 (mild)
2도	중등도의 부작용 (moderate)
3도	중증의 부작용 (severe)
4도	치명적인 부작용 (life0threatening)

2. 항종양 효과 평가 판정기준

가. Complete Response

Complete disappearance of all measurable disease for some minimum time period, usually 1 month

나. Partial Response

Shrinkage of tumor such that sum of the products of two major perpendicular diameters of all measured lesions(S) posttreatment is $< 50\%$ of S pretreatment for some minimum time period(usually 1 month), in the absence of growth of any lesion or the appearance of new lesions.

다. Stable Disease

No significant change in tumor size or extent during the observation period.

라. Progressive Disease

Increase in tumor size such that S posttreatment exceeds S pretreatment by some fixed amount, usually 25% or 50%, or the appearance of any new lesions during the observation period.

3. 약동력학적 분석

DA-125 투여후 혈장의 대사체 농도, 뇨의 대사체 농도와 양을 측정하여 C_{max} , T_{max} , AUC, half-life, renal clearance 등의 parameter를 구하였다.

제 8 절 피험자 동의/임상연구심사위원회 승인

1. 피험자 동의

본 시험의 실시에 있어서 피험자 또는 가족에게 본시험의 내용에 관하여 설명하

고 시험참가의 동의를 얻어 동의서를 작성하고 조사표에 동의 취득 년월일을 기재하였다.

2. 임상연구심사위원회

본 시험의 실시에 있어서 연세암센터의 임상연구심사위원회의 승인을 받았다.

제 9 절 피험자 임상시험 중단

다음에 해당하는 피험자는 더 이상의 임상시험을 하지 않았다.

- (1) 병이 진행되는 환자
- (2) 4도 이상의 부작용이 발생한 환자
- (3) 환자의 수행상태가 ECOG 기준 4인 경우
- (4) 더 이상의 치료를 거부하는 환자

제 10 절 임상시험 종료

본 임상시험은 DA-125의 최대허용량(Maximally Tolerated Dose : MTD)를 결정하기 위한 Phase I 임상시험으로서 MTD가 결정되면 전단계와 MTD 용량사이의 용량에서 임상시험을 시행하여 임상권장량을 결정한 후 임상시험을 종료하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

제 1 절 투여증례수

DA-125의 제 1상 임상시험에 등록하여, 약물을 투여받은 환자는 총 9예로서, 20 mg/m² 3예, 40 mg/m² 3예, 60mg/m² 3예였다.(표 1.)

제 2 절 배경인자

시험에 참가한 환자 총 9명의 남녀비는 5:4, 중앙연령은 53세(30-70세)이었고, 전신상태(P.S)는 0- 2이었다. 모두 화학요법이나 방사선요법의 전치료를 받은 환자들이었다.(표 2.) 종양별로는 폐암 3예, 대장암 3예, 두경부종양 3예였다.

제 3 절 부작용

1. 자타각 증상

가. 구내염

투여 전에 모두에서 구내염은 관찰되지 않았다.(표 3.)

나. 오심, 구토

40mg/m²을 투여한 환자 3예중 2예에서 경중(Grade I)의 구토가 관찰되었지

만, 나머지 환자에서는 관찰되지 않았다.

다. 식욕부진

오심·구토를 나타낸 환자에서 경중(Grade I)의 식욕부진이 나타났지만, 구토가 소실되면서 식욕부진도 소실되었다.(표 5.)

라. 하리

투여 전예에서 하리의 부작용은 관찰되지 않았다.(표 6.)

마. 정맥염

투여 전예에서 약물에 의한 정맥염은 관찰되지 않았다.(표 7.)

바. 탈모

투여 전예에서 탈모독성이 발현되지 않았다.(표 8.)

사. 발열

투여 전예에서 발열등의 체온 변화는 나타나지 않았다.(표 9)

아. 알러지(allergy)

투여 전예에서 약물에 의한 알러지 현상은 관찰되지 않았다.(표 10.)

자. 전신권태감

투여 전예에서 전신 권태감의 부작용은 발현되지 않았다.(표 11.)

차. 심전도(ECG)

투여 전예에서 ST segment의 강하등 ECG 상의 이상변화는 관찰되지 않았다.(표 12.)

2. 혈액 검사(Hematology)

가. 혈색소(Hemoglobin)수의 변화

20mg/m²의 3예중 2예, 40mg/m²의 3예중 2예, 60mg/m²의 2예에서 혈색소가 투여전치에 비해 약간 상승(WHO Grade I --> WHO Grade II 혹은 WHO Grade 0 --> WHO Grade I)하는 경향이 나타났으나 대부분 일주일 이내 저절로 회복되는

경미한 것들이었다. (표 13., 표 14.)

나. 백혈구수의 변화

20mg/m², 60mg/m² 각각 1예에서 Grade I의 백혈구감소증이 각각 투여 2일, 11일 후에 나타났으나 2 -3일 후 곧바로 회복되었으므로 약물에 의한 것이라고 보기 어렵다. 40mg/m² 3예중 각각 1예씩 Grade I, Grade II의 백혈구 감소증이 나타났으나, 모두 2주 이내 회복되었다. (표 15., 표 16.)

다. 호중구수의 변화

40mg/m² 3예중 각각 1예씩 Grade I, Grade II의 호중구 감소증이 나타났으나, 각각 3일, 7일 만에 회복되는 경미한 것이었다. (표 17., 표 18.)

라. 혈소판수의 변화

60mg/m² 1예에서 Grade I 혈소판수 감소증이 나타났으나, 2일 후에 정상으로 회복되었다. (표 19., 표 20.)

3. 혈액생화학적 검사

간기능 및 신장기능의 지표가 되는 GOT, GPT, Total Bilirubin, Creatinine, Alkaline Phosphatase, BUN등의 혈액 생화학적 검사에서 투여 전에 정상범위를 유지하고 독성의 발현 징후는 관찰되지 않았다. (표 21. - 표 26.)

4. 뇨검사

뇨단백, 뇨 pH, 뇨 육안검사 등의 뇨검사시에도 투여 8예 모두에서 이상을 발견하지 못하였다. (표 27.)

제 4 절 항암효과

항암효과는 원칙적으로 제 1상 임상시험에서는 측정하지 않으며, 투여 전에 안정적 병변이 유지되었다.

제 5 절 임상약동력학

DA-125 20, 40, 60 mg/m²를 투여받은 암환자에서의 M1의 AUC는 각각 0.154 ± 0.031, 0.317 ± 0.063, 0.426 ± 0.000, M2의 AUC는 각각 0.684 ± 0.500, 1.190 ± 0.068, 2.150 ± 0.120으로 투여용량이 증가함에 따라 비례하여 증가하였다. 혈장중 반감기는 M1(1 - 2 시간)보다 M2(8.5 - 10 시간)가 훨씬 긴 것으로 나타났다. 뇨 중 배설은 주로 M2의 형태로, 96시간까지의 배설량은 약 10 - 25% 였다.(표 28 - 30, Fig. 1 - 6)

제 4 장 결 론

국내 암환자를 대상으로 단회 정맥 주사시 DA-125는 3단계인 $60\text{mg}/\text{m}^2$ 까지는 WHO grade II이상의 급성기 부작용은 없었으며, 2단계인 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 까지는 WHO grade II이상의 아급성기 부작용 없이 모든예에서 비교적 잘 견디는 것을 관찰할 수 있었다.

제 5 장 참고문헌

1. K.D. Ok, J.B. Park, M.S. Kim(1993) Anthracycline glycoside derivative, USP 5,200,001
2. 김원배, 박정배, 안병옥, 류병권, 양중익, 박재갑, 홍원선, 김선진, 임종식(1993) 새로운 anthracycline계 항암제 DA-125의 in vitro 세포독성 및 마우스 백혈병에 대한 항종양 효과. 대한암학회 초록집 19:47
3. 박정배, 안병옥, 류병권, 김원배, 양중익, 김선진 (1993) 새로운 anthracycline 계 항암제 DA-125의 고형종양 및 누드마우스에 이식된 체암에 대한 항암효과. 대한 암학회 초록집 19:48
4. 항종양 치료제 개발연구, 과학기술처, 1993
5. 신규 항암제 DA-125 개발연구, 서울대학교 의과대학, 1992
6. 신규 항암제 DA-125 개발연구, 경희대학교 약학대학, 1993
7. DA-125의 마우스에 있어서 정맥내 투여 급성독성시험(S-239), 한국화학연구소 안전성 연구센터, 1991
8. DA-125의 랫트에 있어서 정맥내 투여 급성독성시험(S-240), 한국화학연구소 안전성 연구센터, 1991
9. DA-125 toxicity of dogs by repeated intravenous administration for 13 weeks

followed by a 5-week recovery period for selected animals, Huntingdon Research Centre, 1993

10. Baik, N.G., Ahn, B.O., Lee, S.B., Kim, W.B., Yang J. and Watanabe, J. (1993) A Study on Cardiotoxicity of DA-125, a New Anticancer Antibiotic, J. Appl. Pharmacol. 1, 9-19

11. Ahn, B.O., Baik, N.B., Kim, O.J., Kang, K.K., Lee, S.B., Kim, W.B., Yang J., Ko, K.H. (1993) Hematotoxicity and vascular irritation of DA-125, a new anthracycline anticancer agent. J. Appl. Pharmacol. 2, 244-250

표 1. 투여증례수(Number of patient)

투 여 량	투 여 증 례 수	적 격 증 례 수
n *	3	3
2 n	3	3
3 n	3	3
계	9	9

* n = 20 mg/m²

표 2. 배경인자(Background of Patient)

등록증례수			9
적격증례수			9
성별	남성		5
	여성		4
연령	중앙치 (범위)		53(30~70)
전신상태 (P. S)	0	-	1
	1	-	5
	2	-	3
전치료	화학요법	유	9
	방사선요법	유	7
전치료 (화학요법, 방사선요법)	무		0
종양별 증례수	폐암		3
	대장암		3
	두경부암		3

표 3. 구내염(Stomatitis)

투여량 (mg/m ²)	등 록 증 례 수	적격증례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				I	Grade II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 4. 오심, 구토(Nausea & Vomitting)

투여량 (mg/m ²)	등 중 레 수	적격중례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	2	-	-	-	66.7
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	2	0	0	0	22.2

표 5. 식욕부진(Anorexia)

투여량 (mg/m ²)	등 증 례 수	적격증례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	2	2	-	-	-	66.7
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	2	0	0	0	22.2

표 6. 하리(Diarrhea)

투여량 (mg/m ²)	등 중 례 수	적격중례	관찰·검사 실시여수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 7. 정맥염(Phlebitis)

투여량 (mg/m ²)	등 증 례 수	적격중례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 8. 탈모(Alopecia)

투여량 (mg/m ²)	등 중 레 수	적격중례	관찰·검사 실시에수	발 현 수				계 (%)
				Grade I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 9. 발열(Fever)

투여량 (mg/m ²)	등 증 례 수	적격 증례	관찰-검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				I	Grade II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

○

표 10. 알러지(Allergy)

투여량 (mg/m ²)	등 중 레 수	적격중례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표11. 전신권태감(Fatigue)

투여량 (mg/m ²)	등 중 례 수	적격중례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				I	Grade II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 12. 심전도(ECG)

투여량 (mg/m ²)	등 중 레 수	적격중례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 13. 혈색소(Hemoglobin)

투여량 (mg/m ²)	등 록 증 례 수	적격증례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				I	Grade II	III	IV	
20	3	3	3	1	1	-	-	2 (66.7)
40	3	3	3	-	2	-	-	2 (66.7)
60	3	3	3	1	1	-	-	2 (66.7)
계	9	9	9	2	4	0	0	6 (66.7)

투여 전 Grade	적격증례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
			I	Grade II	III	IV	
0	4	4	1	-	-	-	1 (25.0)
I	5	5	1	4	-	-	5 (100.0)
계	9	9	2	4	0	0	6 (66.7)

표 14. 혈색소의 변화양상(Change pattern in hemoglobin)

투여량	혈색소감소 (< 11.0 g/dl)	혈색소량 (g/dl)		최저치까지의 일수	회복까지의 일수
		투여전치	최저치		
n *	2/3	10.7/9.9	8.7/9.7	9/14	11/20
2n	2/3	10.8/10.1	9.3/9.2	7/7	19/15
3n	2/3	9.7/11.5	8.4/10.3	6/7	13/14
계	6/9				

* n = 20 mg/m²

표 15. 백혈구(WBC)

투여량 (mg/m ²)	등록 증례수	적격증례	관찰·검사 실시예수	발현수				계 (%)
				I	Grade II	III	IV	
20	3	3	3	1	-	-	-	1 (33.3)
40	3	3	3	-	2	-	-	2 (66.7)
60	3	3	3	1	-	-	-	1 (33.3)
계	9	9	9	2	2	0	0	4 (44.4)

투여전 Grade	적격증례	관찰·검사 실시예수	발현수				계 (%)
			I	Grade II	III	IV	
0	9	9	2	2	-	-	4 (44.4)
계	9	9	2	2	0	0	4 (44.4)

표 16. 백혈구의 변화양상(Change pattern in WBC)

투여량	백혈구감소 ($< 4 \times 10^3/\text{mm}^3$)	백혈구수($\times 10^3/\text{mm}^3$)		최저치까지의 까지의 일수	회복까지의 일수
		투여전치	최저치		
n *	1/3	5.4	3.6	2	5
2n	2/3	4.0/4.5	2.3/2.7	9/7	19/21
3n	1/3	6.1	3.7	11	13
계	4/9				

* n = 20 mg/m²

표 17. 호중구(Neutrophil)

투여량 (mg/m ²)	등록 증례수	적격증례	관찰·검사 실시예수	발현수				계 (%)
				I	Grade II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	1	1	-	-	2 (66.7)
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	1	1	0	0	2 (22.2)

투여전 Grade	적격증례	관찰·검사 실시예수	발현수				계 (%)
			I	Grade II	III	IV	
0	9	9	1	1	-	-	2 (22.2)
계	9	9	1	1	0	0	2 (22.2)

표 18. 호중구의 변화양상(Change pattern in neutrophil)

투여량	호중구감소 ($< 2 \times 10^3 / \text{mm}^3$)	호중구수($\times 10^3 / \text{mm}^3$)		최저치까지의 까지의 일수	회복까지의 일수
		투여전치	최저치		
n *	0/3	-	-	-	-
2n	2/3	2.9/2.8	1.7/1.3	12/13	15/21
3n	0/3	-	-	-	-
계	2/9				

* n = 20 mg/m²

표 19. 혈소판(Platelets)

투여량 (mg/m ²)	등록 예수	적격중례	관찰·검사 실시예수	발현수				계 (%)
				I	Grade II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	1	-	-	-	1(33.3)
계	9	9	9	1	0	0	0	1(11.1)

투여전 Grade	적격중례	관찰·검사 실시예수	발현수				계 (%)
			I	Grade II	III	IV	
0	9	9	1	-	-	-	1 (11.1)
계	9	9	1	0	0	0	1 (11.1)

표 20. 혈소판수의 변화양상(Change pattern in platelet)

투여량	혈소판감소 ($< 100 \times 10^3 / \text{mm}^3$)	혈소판수($\times 10^3 / \text{mm}^3$)		최저치까지의 까지의 일수	회복까지의 일수
		투여전치	최저치		
n [*]	0/3	-	-	-	-
2n	0/3	-	-	-	-
3n	1/3	155	85	11	13
계	1/9				

* n = 20 mg/m²

표 21. GOT

투여량 (mg/m ²)	등 중 레 수	적격중례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				I	Grade II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 22. GTP

투여량 (mg/m ²)	등 중	록 례 수	적격중례	관찰·검사 실시에수	발 현 수				계 (%)
					Grade				
					I	II	III	IV	
20	3		3	3	-	-	-	-	0
40	3		3	3	-	-	-	-	0
60	3		3	3	-	-	-	-	0
계	9		9	9	0	0	0	0	0

표 23. Total Bilirubin

투여량 (mg/m ²)	등 증 례 수	적격 증례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 24. Alkaline Phosphatase

투여량 (mg/m ²)	등 록 증 록 수	적격증례	관찰·검사 실시여수	발 현 수				계 (%)
				Grade I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 25. BUN(Blood Urea Nitrogen)

투여량 (mg/m ²)	등 록 증 례 수	적격증례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 26. Creatinine

투여량 (mg/m ²)	등 록 증례 수	적격증례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 27. 뇨단백(尿蛋白)(Urine protein)

투여량 (mg/m ²)	등 증 례 수	적격 증례	관찰·검사 실시예수	발 현 수				계 (%)
				Grade				
				I	II	III	IV	
20	3	3	3	-	-	-	-	0
40	3	3	3	-	-	-	-	0
60	3	3	3	-	-	-	-	0
계	9	9	9	0	0	0	0	0

표 28. DA-125 20mg/m² 를 정맥 투여받은 환자에서의 M1과 M2의 약동력학 parameter(Pharmacokinetic parameters of M1 and M2 after intravenous administration of DA-125, 20 mg/m² to cancer patients)

pharmacokinetic parameters		Mean ± S.D.
M1	t 1/2(hr)	1.120 ± 0.923
	AUC (μg hr/ml)	0.154 ± 0.0305
	AUMC (μg hr ² /ml)	0.236 ± 0.178
	MRT (hr)	1.410 ± 1.03
	CL (ml/hr kg)	3136 ± 550
	Vdss (ml/kg)	4518 ± 2470
M2	t 1/2 (hr)	8.510 ± 6.00
	AUC (μg hr/ml)	0.684 ± 0.500

표 29. DA-125 40mg/m² 를 정맥 투여받은 환자에서의 M1과 M2의 약동력학 parameter(Pharmacokinetic parameters of M1 and M2 after intravenous administration of DA-125, 40 mg/m² to cancer patients)

pharmacokinetic parameters		Mean ± S.D.
M1	t 1/2(hr)	2.560 ± 0.223
	AUC (μg hr/ml)	0.317 ± 0.063
	AUMC (μg hr ² /ml)	0.680 ± 0.221
	MRT (hr)	1.410 ± 1.030
	CL (ml/hr kg)	3140 ± 502
	Vdss (ml/kg)	6596 ± 1134
M2	t 1/2 (hr)	9.430 ± 2.05
	AUC (μg hr/ml)	1.190 ± 0.068

표 30. DA-125 60mg/m² 를 정맥 투여받은 환자에서의 M1과 M2의 약동력학 parameter(Pharmacokinetic parameters of M1 and M2 after intravenous administration of DA-125, 60 mg/m² to cancer patients)

pharmacokinetic parameters		Mean ± S. D.
M1	t 1/2(hr)	2.510 ± 1.720
	AUC (μg hr/ml)	0.426 ± 0.00
	AUMC (μg hr ² /ml)	1.060 ± 0.697
	MRT (hr)	2.480 ± 1.65
	CL (ml/hr kg)	3117 ± 28.9
	Vdss (ml/kg)	7791 ± 5229
M2	t 1/2 (hr)	9.960 ± 2.02
	AUC (μg hr/ml)	2.150 ± 1.21

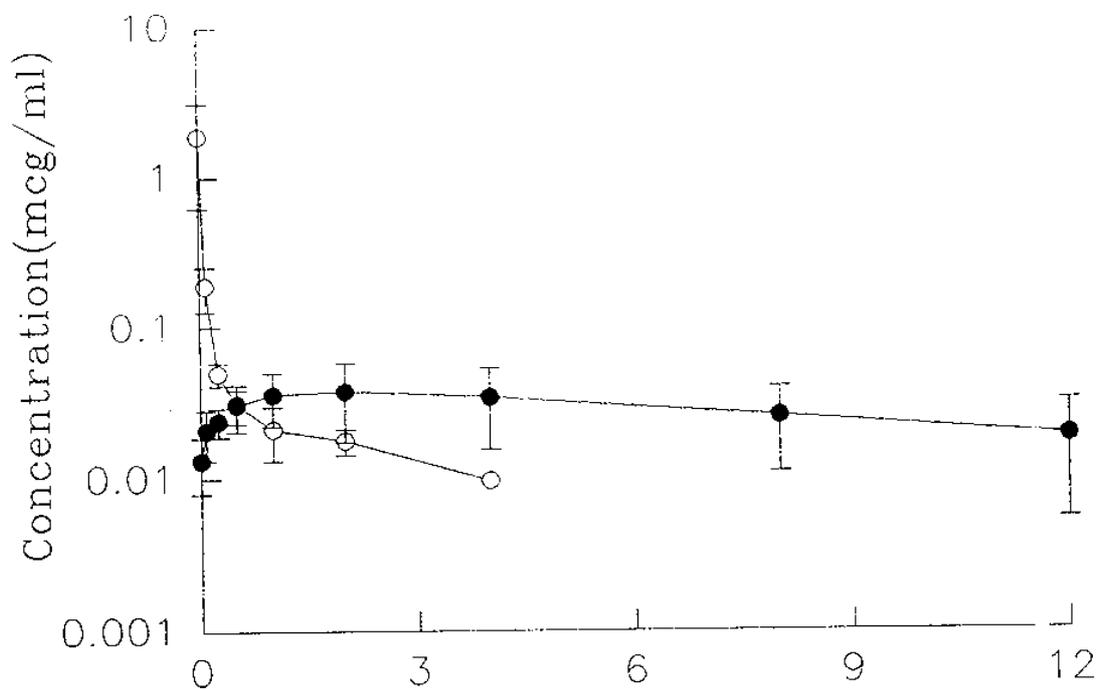


Fig. 1. Mean plasma concentrations of M1 (\circ), and M2 (\bullet) after intravenous administration of DA-125, 20 mg/m² to cancer patients.

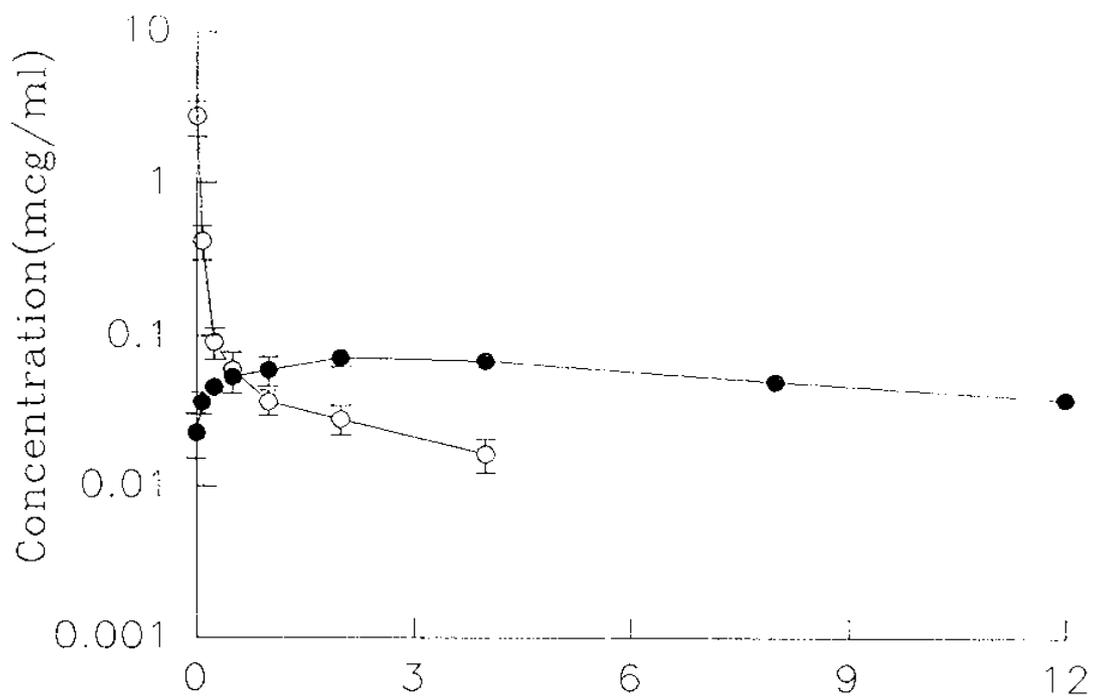


Fig. 2. Mean plasma concentrations of M1 (\circ), and M2 (\bullet) after intravenous administration of DA-125, 40 mg/m² to cancer patients.

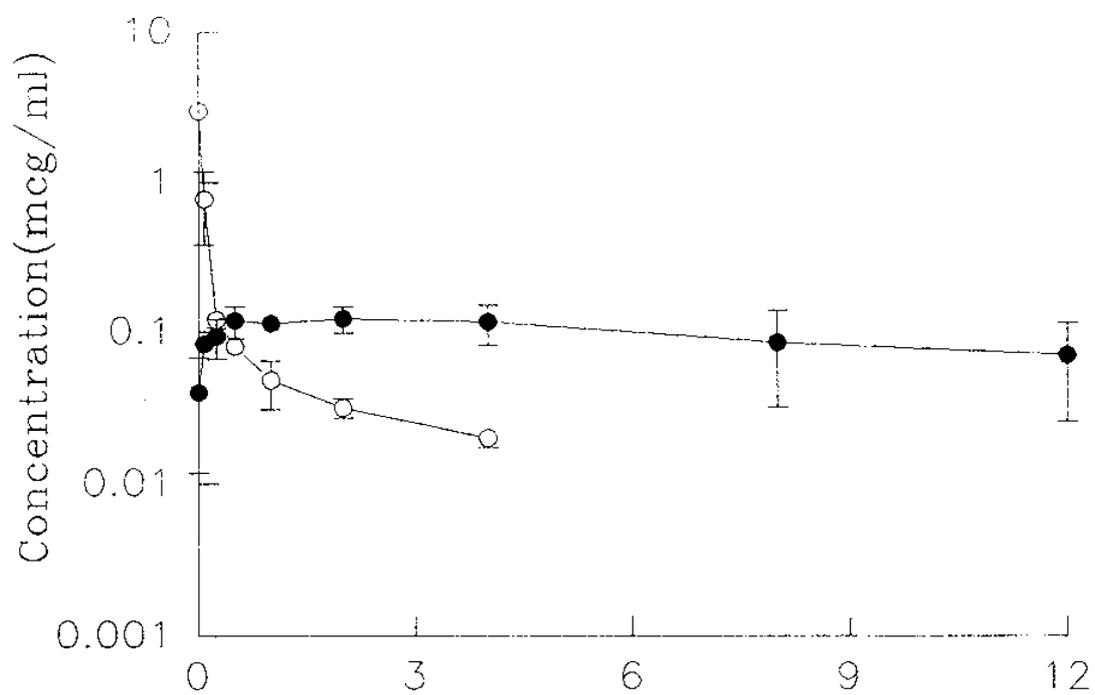


Fig. 3. Mean plasma concentrations of M1 (\circ), and M2 (\bullet) after intravenous administration of DA-125, 60 mg/m² to cancer patients.

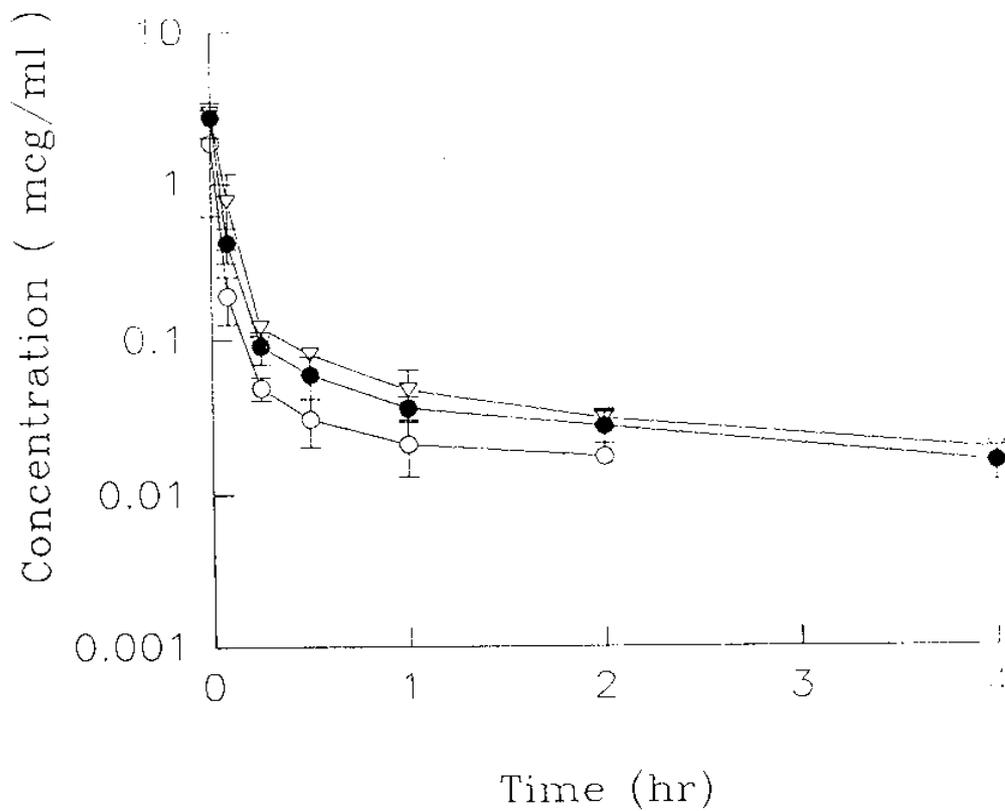


Fig. 4. Mean plasma concentrations of M1 after intravenous administration of DA-125, 20 (○), 40 (●) and 60 (▽) mg/m² to cancer patients.

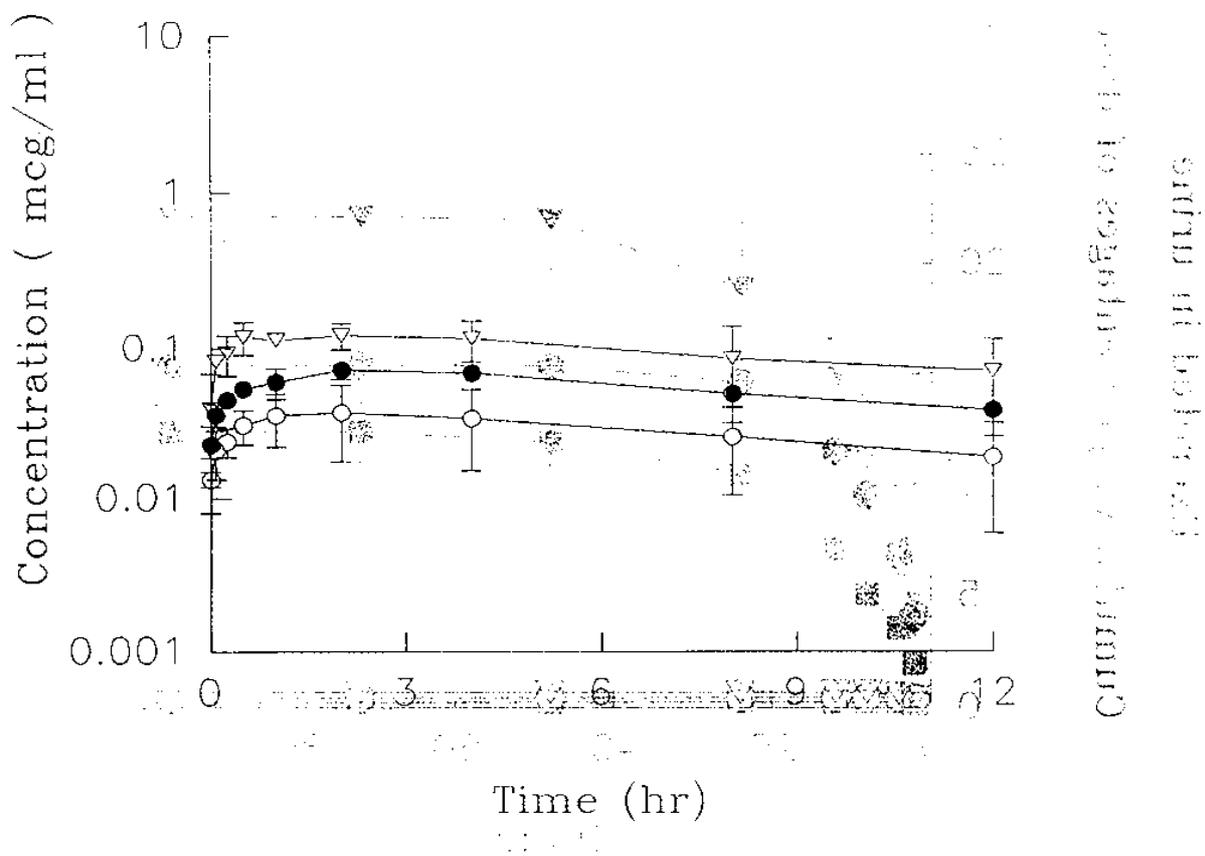


Fig. 5: Mean plasma concentrations of M2 after intravenous administration of DA-125, 20 (○), 40 (●) and 60 (▽) mg/m² to cancer patients. M

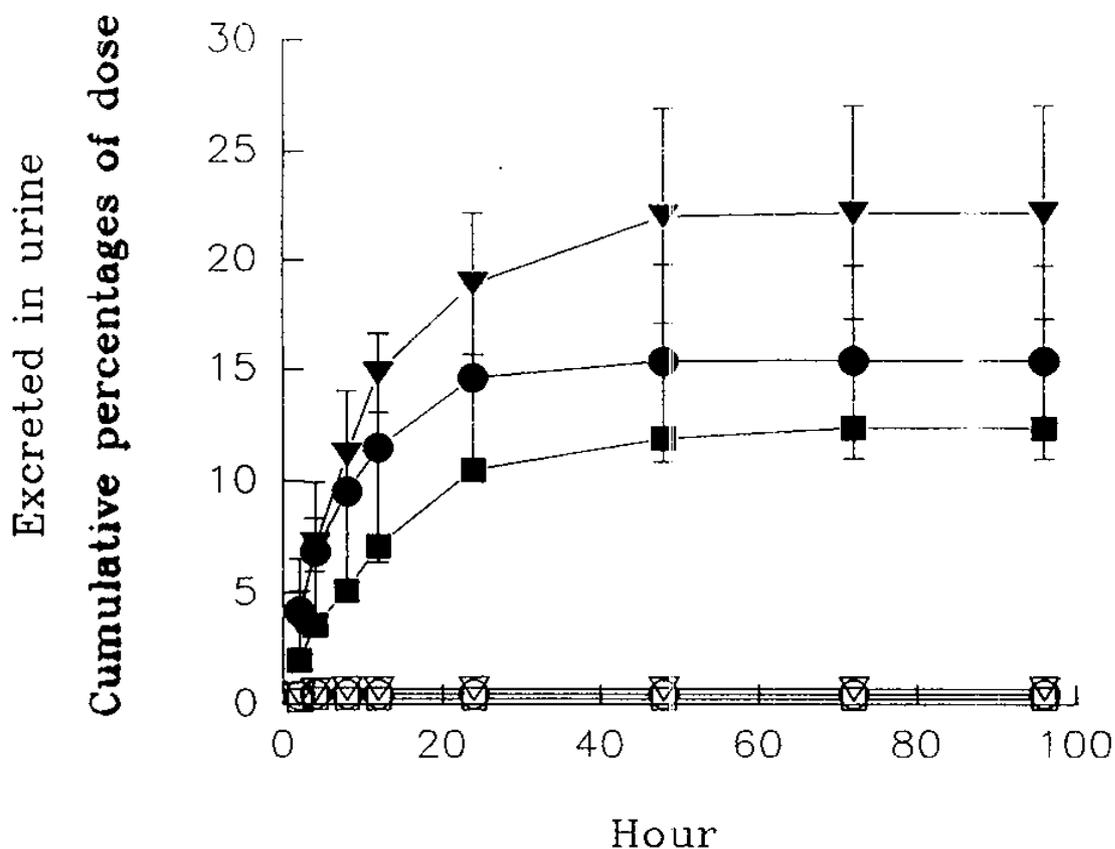


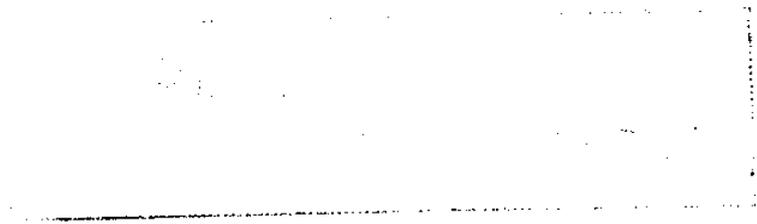
Fig. 6. Mean cumulative percentages of dose excreted in urine as M1 and M2 (after intravenous administration of DA-125, 20 (M1 ○, M2 ●), 40 (M1 ∇, M2 ♥) and 60 (M1 □, M2 ■) mg/m² to cancer patients.

별첨

[별첨 1] ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Performance Status

일상생활수행능력 (ECOG performance status)

Performance status	Definitions
0	Asymptomatic
1	Symptomatic, fully ambulatory
2	Symptomatic, in bed < 50% of the day
3	Symptomatic, in bed > 50% of the day, but not bedridden
4	Bedridden



제7장 향후 연구 추진계획

이 화가는

여면 일이다

제 7 장 향후 연구계획

DA-125 개발연구는 1차년도(1991)에 전임상 평가연구, 2차년도(1992)에 제 1상 임상시험연구를 완료하였으며, 만성독성시험, 질병상태에서의 ADME 연구 및 국내임상분리 내성암주에 대한 항암력시험 등의 후기 비임상연구를 계속과제로 수행중이다.

3차년도(1994)에는 전기 제 2상 임상연구를 5개 기관 공동연구로 실시하고, 수행중인 후기 비임상연구를 완료하며, 표준물질 제조, 합성원료의 공업용 원료대체 및 규격설정 등의 산업화연구를 실시할 계획이다.

이 연구는 전기 제 2상 임상시험의 결과에 따라 제 2단계(1995~1997)기간 중에 후기 제 2상 임상시험 및 산업화연구를 완료하고 신약허가를 취득하여 발매하며, 적용증 확대를 위한 임상연구와 부작용 모니터링을 계속할 계획이다.

