

Nitrofen 이 백서의 횡격막 발달에 미치는 영향에 관한 연구

한양대학교 의과대학 임상병리학교실*

서울대학교 의과대학 병리학교실**

정 화 순* · 지 제 근**

서 론

선천성 횡격막 탈장은 횡격막의 발달부전으로 결손이 생기고 이를 통해 복강내 장기의 흉강내 이입으로 인한 호흡부전에 의해 사망하므로 신속히 진단하고 외과적인 수복을 하지 않으면 대부분이 사망하는 중요한 기형이다.

선천성 횡격막 탈장중 특히 문제가 되는 것은 배외측(dorsolateral) 부위의 커다란 결손을 보이는 Bochdalek 형으로 사람의 경우 특히 왼쪽에 빈발한다. 이러한 Bochdalek 탈장의 원인은 알려져 있지 않고 있으며 따라서 실험적으로 횡격막 결손을 일으킬 수 있는 방법이 모색되어 왔다. 그러나 각종 기형원에 의한 기형형성이 다양함에도 불구하고 횡격막 탈장에 대한 지견은 거의 없다가 비교적 최근에 와서 Weatherholtz 등¹⁾ 및 Costlow 등²⁾이 nitrofen 이란 제조제의 독성검사를 하다가 쥐에서 수신증, 심기형 뿐만 아니라 횡격막 결손이 있음을 기술한 바 있다.

그러나 아직까지의 실험결과는 횡격막 결손의 유무와 빈도만을 기술하였을 뿐 그 형성과정에 대한 검토가 없으며 또 그 발생빈도도 낮아 확실한 결론을 내리기가 미흡한 실정이다.

한편 nitrofen 은 화학명이 2, 4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether로서 우수한 제조제의 하나이며 우리나라에서도 톡크(TOK)란 상품명으로 제조 사용되고 있다.

따라서 저자들은 nitrofen 을 사용하여 실험동물에서 횡격막 결손을 일으키는 빈도를 관찰하고 특히 이러한

접 수 : 1984년 6월 13일

이 논문은 1984년 서울대학교병원 대단위 연구비의 일부 보조를 받았다. 본 논문의 요지는 대한병리학회 제 9차 춘계학술대회에서 구연으로 발표하였음.

횡격막 결손의 발생시기 및 발달과정을 규명하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

실 험 방 법

1) 실험동물

체중이 200~300 gm 이 되는 Sprague-Dawley 계 암컷 백서 60마리를 사용하였다. 처음 용량과 투여시기를 결정하는 실험에서는 임신되어 분만한 어미를 반복하여 사용하였으며, 후에 태생초기의 횡격막 결손 소견을 보기 위하여는 임신중에 도살하였다.

2) 실험방법

(1) 수태확인 : 성숙한 암컷백서를 동일한 환경에서 시판 사료로 사육하여 숫컷을 같은 동물장에 넣어서 다음날 아침 질도말표본에서 정자가 관찰되면 수태가 이루어진 것으로 간주하여 이날을 임신 제 1일로 정하였다.

(2) 실험군 :

실험 I : 실험군은 nitrofen 의 두어량과 두어인에 따라 4군으로 나누고, 임신 제10일에 옥수수기름에 녹인 nitrofen 250 mg/kg 을 경구 투여한 군을 제 I 군으로, 임신 제11일째 250 mg/kg 투여군을 제 II 군으로, 임신 제10일째 350 mg/kg 투여군을 제 III 군으로, 임신 제11일째 350 mg/kg 투여군을 제 IV 군으로 하였으며 대조군은 옥수수기름 0.5 ml 만을 임신 제 11일에 경구 투여하였다. 실험군은 각각 10마리씩, 대조군은 5마리를 사용하였다.

실험 II : 실험 I 의 결과를 토대로 nitrofen 350 mg/kg 을 임신 제10일째 경구 투여한 것은 A 군으로, nitrofen 250 mg/kg 을 임신 제11일째 경구 투여한 것은 B 군으로 하였다.

실험 III: 임신백서 9마리에 nitrofen 350 mg/kg 을 임신 제10일에 경구 투여하고 관찰시기에 따라 임신 제 15일군(C 군), 임신 제17일군(D 군), 임신 제19일 군(E 군)의 3군으로 각각 3마리씩 사용하였고, 대조군은 각각 2마리를 사용하였다.

(3) 실험방법:

a. Nitrofen 투여법: 분말로 되어 있는 nitrofen (technical grade)을 50°C 의 욕수수기류에 완전히 용해시킨 후 용량을 약 0.5~0.7 ml 정도로 하여 삼판을 이용하여 경구 투여하였다.

b. 관찰방법: 실험 I 은 모두 임신 제22일에 자연 분만시킨 후 태자의 생존 유무를 관찰하고 이들 태자를 1주일간 10% 포르말린 용액에 고정시킨후 육안적으로 기형 유무를 관찰하였다.

실험 II에서는 실험군 전체에서 임신 제22일에 자연 분만시킨후 생존 유무와 체중을 측정하고 이들 태자를 10% 포르말린용액에 1주일간 고정시킨후 육안적 및 해부현미경으로 기형 유무를 관찰하고, 횡격막 결손에 대해서는 현미경 표본을 만들어서 광학현미경하에서 관찰하였다.

횡격막의 육안적 관찰은 결손부위의 위치, 모양, 크기, 결손변연부의 형태, 흉강내로 돌출된 장기등에 대해 시행하였다. 광학현미경하에서는 결손변연부 횡격막의 모양, 횡격막 근육의 변성, 염증 유무등을 관찰하였다.

체는 육안적인 형태, 분엽상의 관찰과 무게를 측정하였다.

임신 제15일, 제17일, 제19일째 관찰군은 계왕절개 하였으며 임신 제15일째 군은 크기가 작아 육안적 관찰없이 현미경표본을 제작, 횡격막 발달과정을 관찰하였고, 제17일군, 제19일군에 대해서는 육안적으로 횡격막 결손유무, 위치, 모양 등을 관찰하고 현미경표본을 제작하여 제22일째 분만군과 동일한 방법으로 관찰하였다.

3. 통계처리는 Kruskal-Wallis test, student t-test 및 Wilcoxon test 를 이용하였다.

실 험 성 적

1) 실험 I: Nitrofen 용량 및 투여일에 따른 치사율과 기형발생빈도 관찰(Table 1)

횡격막 결손이 제 I 군에서는 85마리중 42마리, 제 II 군에서는 87마리중 23마리, 제 III 군에서는 62마리중 41마리, 제 IV 군에서는 63마리중 26마리에서 횡격막 결손이 있었고 대조군은 53마리중 1예도 횡격막 결손이 없었다. 즉 I, II, III, IV 모든 실험군에서 유의있는 횡격막 결손의 발생빈도를 볼 수 있었다($p < 0.05$). Wilcoxon test 에 의하면 제 III 군(350 mg/kg, 제10일째)이 횡격막 결손 유발에 가장 예민하고 제 II 군(250 mg/kg 제11일째)이 가장 낮으며 제 I 군과 IV 군은 순위를 정할 수 없었다. 즉 횡격막 결손 유발에는 용량 350 mg/

Table 1. Diaphragmatic defect and neonatal lethality of nitrofen exposure by dose and administered day

Group	Control	I	II	III	IV
Dose(mg/kg)	0	250	250	350	350
Administered day(gestation)	0	10	11	10	11
No. of litters	5	9	8	6	7
No. of examined pups (exam. for lethality)	53	85 (52)	87 (59)	62 (44)	63 (22)
No. of DD($p < 0.05$)*	0	42 (8)**	23 (8)	41 (6)	26 (7)
Mean litter frequency of anomalies	—	0.456	0.259	0.663	0.431
No. of dead fetuses (%)	0	27 (51.9)	23 (39.0)	35 (79.5)	6 (27.2)
No. of DD/No. of dead fetuses(%)	—	20/27 (74.1)	17/23 (73.9)	26/35 (74.3)	6/6 (100)
No. of heart anomaly	—	3	1	1	1

*: P-value are derived from the Kruskal-Wallis test

** : Number of anomalies observed(Number of litters in which anomalies occurred)

DD: Diaphragmatic defect

Table 2. Soft tissue anomalies including diaphragmatic defect in fetus exposed to nitrofen

	Control	A	B	A+B
Dose(mg/kg)	0	350	250	—
Administered day (gestation)	0	10	11	—
No. of litters	4	6	8	14
No. of pups examined	43	52	79	131
Diaphragmatic defect ($p < 0.05$)*	0	37(6)** 0.71***	53(8) 0.67	90(14) 0.69
Diaphragmatic defect with heart anomaly(%)	0	10 0.08	0	10 0.08
Heart anomaly only	0	2	0	2
Muscle defect with hernia on posterior wall of body	0	18	0	18

*: P-value are derived from the Kruskal-Wallis test

** : Number of anomalies observed(number of litters in which the anomalies occurred)

***: Mean litter frequency of the anomalies

Table 3. Examined heart anomalies

Anomalies	Number
Truncus arteriosus with pulmonary stenosis(type I)	2
Truncus arteriosus with pulmonary stenosis(type I) and VSD and Rt. side aortic arch	1
Rt. side aortic arch with anomalous origin of Lt. subclavian artery and PDA	2
Complete interruption of aortic arch with VSD and PDA(type B2)	1
Complete interruption of aortic arch with VSD and PDA(type B)	2
Rt. side aortic arch with anomalous origin of Rt. carotid artery and PDA	2
Rt. atrial wall defect and anomalous origin of Lt. subclavian and carotid artery and large PDA	1
Anomalous origin of Lt. carotid and subclavian artery and large PDA	1

kg, 투여일은 제10일째로 함이 가장 높은 발생빈도를 얻을 수 있으며 또한, 용량과 투여일이 상호 영향을 끼침을 알 수 있었다.

제 I 군의 1마리를 제외한 모든 어미에서 횡격막 결손을 갖는 태자를 출산했고, 어미위가 횡격막 결손을 갖는 태자를 출산할 확률은 제 I 군이 0.456, 제 II 군이 0.259, 제 III 군이 0.663, 제 IV 군이 0.431이었다. 한편 출생후 곧 사망한 태자에서 횡격막 결손이 관찰된 예는 제 I 군이 27마리중 20마리(74.1%), 제 II 군이 23마리중 17마리(73.9%), 제 III 군이 35마리중 26마리(74.3%), 제 IV 군이 6마리중 6마리(100%)였고 총 91마리중 69마리(75.0%)였다. 이러한 소견은 어린 동물들의 신생아 사망의 중요한 원인이 되고 있음을 알 수 있었다. 치사율은 제 I 군, 제 II 군, 제 III 군, 제 IV 군이 각각

51.9%, 39.0%, 79.5%, 27.2%이었다.

심장기형은 제 I 군이 3예, II, III, IV 군이 각각 1예가 관찰되었다.

2) 실험 II: 횡격막 결손을 포함한 다른 기형의 발생빈도(Table 2)

실험 I의 결과에서 모든 군에서 횡격막 결손이 유의하게 높은 빈도로 발생함이 관찰됨으로 가장 높은 빈도를 보인 제 III 군과, 가장 낮은 빈도를 보인 제 II 군의 투여용량과 투여일을 택하여서 생존율, 횡격막 결손의 발생빈도, 다른 동반기형, 횡격막 결손과 생존율과의 관계를 비교 관찰함과 동시에 투여용량과 투여일에 따른 횡격막 결손의 특성(위치, 크기, 모양, 탄장장기)도 관찰하였다.

Table 4. Location and characteristics of diaphragmatic defect

Group	No. (%)	A			No. (%)	B			No. (%)	Total		
		Size				Size				Size		
Location		S	M	L		S	M	L		S	M	L
Rt. posterior	11(30)	2	8	1	49(92)	11	36	2	60(67)	13	44	3
Lt. posterior	14(38)	0	1	13	0	0	0	0	14(15)	0	1	13
Rt. and Lt. posterior	6(16)	0	0	6	2(4)	0	2	0	8(9)	0	2	6
Others(multiple or median)	6(16)	0	4	2	2(4)	0	2	0	8(9)	0	6	0
Total (%)	37 (100)	2 (5.4)	13 (35.1)	22 (67.6)	53 (100)	11 (20.7)	40 (75.5)	2 (3.8)	90 (100)	13 (14.4)	53 (58.9)	22 (24.4)

S: small, less than one thirds of hemidiaphragm
 M: medium, one thirds to two thirds of hemidiaphragm
 L: large, more than two thirds of hemidiaphragm

Table 5. Content of diaphragmatic hernia

	Liver	Stomach	Intestine	Pancreas	Kidney	Adrenal
Rt. posterior	60	0	10	1	2	2
Lt. posterior	14	14	2	2	0	0
Both	8	1	2	0	2	2
Others	8	3	1	1	1	1
Total	90	18	15	4	5	5

그 결과 A군에서는 52마리중 37마리, B군에서는 79마리중 53마리에서 횡격막 결손이 관찰되고 심장기형은 A군에서만 12예 관찰되었고 이중 10예에서는 횡격막 결손이 동반되었다.

관찰된 심장기형으로는 Table 3과 같다. 또한 늑골과 요추사이의 근육이 결손된 예가 18예 있었다.

3) 횡격막 결손의 특성 (Table 4)

(1) 위치: 제 10일째, 350 mg/kg 투여군(A군)은 횡격막 결손 37예중 31예가 후외측 부위에, 6예에서는 건(tendon) 부위에 위치하거나 3개이상의 다발성 결손을 보였고, 제 11일째 250 mg/kg 투여군(B군)은 53예중 51예가 후외측부위에, 2예가 전부위에 위치하였다. 또한 A군에서는 우측에 11예, 좌측에 14예, 양측에 온 것이 6예, 그외(다발성이거나 중심에 위치한)가 6예였고, B군에서는 양측성 2예, 다발성 2예를 제외한 49예가 모두 우측에 있었다.

(2) 크기: 횡격막 결손부위가 일측 횡격막의 1/3 이하일 때, 1/3~2/3사이, 2/3이상 차지할 때를 각각

대·중·소로 나누었을 때 A군에서는 대(大)가 37예중 22예로 가장 많고 B군에서는 중(中)이 53예중 38예로 가장 많아 A군에서 비교적 결손부위가 컸다.

좌우에 따른 결손의 크기는 우측은 60예중 44예가 중(中)이었고, 좌측은 14예중 13예가 대(大)로 좌측이 우측보다 결손크기가 훨씬 컸다. 크기는 장축의 지름을 측정하였을 때 A군에서 우측은 평균 4.6±1.3 mm, 좌측은 평균 8.6±2.0 mm, 양측성은 평균 6.7±1.0 mm, 기타는 평균 5.3±2.5 mm 이었고 0.4 mm의 육안으로 관찰안되는 매우 작은 것부터 10 mm의 일측 횡격막을 전부 점유하는 것까지 다양했다. 전부위에 온 것은 대부분 크기가 작고 일부는 건의 얇은 막으로 덮혀 있어 전부위가 약화되어 온 것으로 사료되었다.

(3) 모양: 대부분 난원형이었으나 1예에서는 근육주랑 사이로 간이 올라와 있는 나뭇잎 모양을 나타냈고, 1예의 중앙부 전방 전부위에 온 것은 부정형의 형태를 나타냈다.

(4) 탈장장기 (Table 5): 간은 위치에 상관없이 전에서 전체 혹은 일부가 탈장된 상태로 관찰되었고, 간

Table 6. Ratio of total lung weight to total body weight.(in fetus of nitrofen exposure with 350 mg/kg orally on gestation day 10)

	Control	Experiment					
		Without DD	with DD	Rt. DD	Lt. DD	Both	Others
Examined fetuses	43	15	37	11	14	6	6
TLW/TBW (%)	2.37 ±0.16	2.15±0.41 1.53±0.31*		1.68* ±0.35	1.48* ±0.26	1.48* ±0.31	1.38* ±0.28
Right/Left(lung) (%)	1.89 ±0.17	1.91±0.13 2.15±0.49		1.94 ±0.36	2.39* ±0.45	2.43* ±0.41	1.93 ±0.45

*: p<0.05, Student t-test
TLW: Total lung weight

DD: Diaphragmatic defect
TBW: Total body weight

Table 7. Development of diaphragm according to gestation day in pups exposed to nitrofen(350 mg/kg orally on gestation day 10)

Gestation day	Litter No.	No. fetus	Diaphragmatic defect on gross examination				Light microscopic examination
			Total	Right	Left	Both	
15	C-1	13	No gross examination				Variable developmental stage of pleuroperitoneal fold
	C-2	9					
	C-3	1					
	Cont	11					Most showed closure of pleuroperitoneal membrane
17	D-1	12	9	5	2	2	Most of defected margin showed smooth round end with protrusion of liver into thoracic cavity. Two cases showed absence of pleuropericardial membrane and pleuroperitoneal membrane.(stage of gestation 15 th day or earlier) Presented diaphragm with partial muscle development.
	D-2	9	8	3	3	2	
	D-3	2	2	0	2	0	
	Cont-1	9	No diaphragmatic defect				Complete closure of diaphragm with partial muscle development.
	Cont-2	10					
19	E-1	14	8	4	3	1	Most of defected margin showed rounded end. Some showed tapered end. One case of E1 showed focal vacuolar degeneration of muscle.
	E-2	8	6	0	6	0	
	E-3	13	10	4	6	0	
	Cont-1	9	No diaphragmatic defect				Complete development of diaphragm including muscle formation.
	Cont-2	13					

을 제외하고, 좌측은 주로 위가, 우측은 주로 소장이며, 그외에는 드물게 췌장, 신장, 부신이 탈장된 상태로 흉강에서 관찰되었다.

4) 폐의 변화

해부현미경(dissecting microscope)에 의한 관찰에서 흉강을 열었을 때 횡격막 결손이 있는 부위는 대개 간

이 폐를 위로 밀어서 윗부분에서 매우 작은 부위만 관찰되고 반대편 폐는 복강내 장기(간)가 앞쪽에서 심장과 함께 밀어서 뒷쪽으로 이동되어 있었다.

폐의 무게는 횡격막 결손이 있는 예에서 폐의 무게를 체중의 비로 구하였을 때 1.53±0.31%로 대조군의 2.37±0.16%보다 유의적인 감소를 보여주었고(p<0.05), 그중 좌측에 있는 경우는 좌측 폐에 더 심한 감

Table 8. Effect of nitrofen on birth weight

	No. of litters	No. of fetuses	Birth weight (gm; Mean±SD)
Experiment*	6	52	5.15±0.6
Control	4	43	5.96±0.21

*: Nitrofen administered orally with 350 mg/kg on gestation day 10

Table 9. Frequency of diaphragmatic defect according to sex

	Examined fetus	Diaphragmatic defect	%
Male	71	49	69.0
Female	60	41	68.3

소를 보여주었으며($p < 0.05$), 우측에 있는 경우는 양측 모두 감소하였다(Table 6).

5) 횡격막의 현미경적 관찰소견

횡격막 결손의 발달부위가 근육조직이 점점 가늘어지며 얇은 막조직에 의해 연결되어 끝나는 몇 예를 제외하곤 대부분 평활하고 둥근면을 보여주었다. 횡격막 근육에서 염증소견이나 퇴행성 변화는 관찰되지 않았다. 횡격막 결손 발달과 탈장장기가 만나는 장기는 전부 간이었는 데 횡격막과 만나는 부위의 간은 심한 함몰을 보여주었으나 이 부위에서 간이나 횡격막에서 변성이나 염증은 관찰할 수 없었다.

6) 횡격막 발달과정에 따른 관찰(Table 7)

임신 제15일 군은 육안적 관찰은 하지 않았고 현미경적 소견에서 pleuroperitoneal canal이 열린 상태로 관찰되었고 여러 발달단계의 늑복막간 주벽이 관찰되었으며 반면, 대조군의 대부분은 늑복막 폐쇄를 보였다.

임신 제17일 군은 실험군 3마리에서 모두 횡격막 결손을 갖는 태자를 출산했고 태자 23마리중 19마리에서 육안적으로 관찰되었는데 횡격막 결손부위의 경계는 명확하였다.

현미경적 관찰에서 pleuroperitoneal membrane이 아직 열린채로 있고 흉강내로 간이 돌출되어 있었다. 횡격막 결손 발달은 둥글게 끝나고 복강장기의 돌출없이 얇은 막으로 덮힌 예도 있었다. 일부 형성된 횡격막은 부분적인 근육의 발달을 볼 수 있었다.

태자 2예(D₂)에서는 우측은 대조군(제17일군)과 같은 발달단계를 보이는 반면 좌측에서는 늑복막간 주벽

이 형성되기 시작하는 발달시기(임신 제15일 이전 시기)의 형태가 관찰되었다. 대조군에서는 모두 결손부위 없이 흉강과 복강을 완전히 나누는 횡격막은 형성되었으나 근육의 발달은 일부에서만 이루어지고 있었다.

임신 제19일 군은 실험군 3마리에 모두 횡격막 결손을 갖는 태자를 출산했고 35마리중 24마리가 횡격막 결손을 보였으며 22일에 출생한 태자와 같은 소견을 보였다. 대조군은 횡격막 결손이 없고 근육층까지 완전한 발달을 보여 주었다.

7) 기 타

Nitrofen에 의한 체중의 변화는 실험군에서 5.15±6.6 gm으로 대조군의 5.96±0.21 gm보다 현저히 적었다(Table 7).

성별비는 숫컷이 71예중 49예(69%), 암컷이 60예중 41예(68.3%)로 성별차는 없었다(Table 8).

고 안

Nitrofen의 독성에 대한 연구는 Ambrose 등³⁾에 의해 처음 이루어졌고 경구 투여시 급성 치사량(LD₅₀)은 백서에서 3.58 g/kg이고 음식물중에 50,000 ppm 존재시 1주내에 사망하고 12,500 ppm 존재시는 13주내에 사망함을 밝히고 개에 대한 실험에서는 20~200 ppm에서는 부작용이 없으나 1,000 ppm을 공급했을 때 자손이 생존하지는 못하나 현미경적 병변은 발견되지 않았다고 한다.

또한 nitrofen은 암유발인자로도 작용하여 Chu 등⁴⁾에 의하면 동물에서 체암과 간암을 유발함이 기술되었고 Millman 등⁵⁾은 쥐장의 외분비선의 선암종을 보고하

었다.

신생아의 사망에 대하여 Kimbrough등⁶⁾은 임신 백서에서 임신 제 7일에서 18일에 걸쳐 50 mg/kg 투여시 그 태자들이 출생후 청색증을 나타내며 호흡장애 증세로 사망함을 관찰하고 사망의 주요 원인장기를 폐라고 간주하였다. 또한 사망한 백서의 폐가 광학현미경으로는 완전히 확장이 안되고 폐포상피는 편평상피로 덮혀 있었으며 전자현미경적 관찰에서는 폐포내에서 lamellar body와 유사한 물질을 관찰하고 nitrofen이 폐의 발달과정에서 표면활성물질(Surfactant)생산에 영향을 끼치고 신생아에서의 호흡부전이 폐포내에 표면활성물질결핍에 기인한다고 시사하였다.

그러나 Stone 등⁷⁾은 nitrofen을 처치한 경우 태자의 폐무게는 현저히 감소해 있으나 표면활성물질 생산은 생화학적 또는 물리화학적으로 모두 정상임을 관찰하고 또한 nitrofen과 표면활성물질 생산을 자극하는 dexamethasone을 동시에 투여시 태자에 대한 nitrofen의 영향이 감소되지 않으므로 폐가 일차 표적장기가 아니거나 nitrofen이 폐의 발달과정중 비교적 조기의 밝혀지지 않은 단계에 영향을 미친 것이라고 보고하였다.

또한 Weatherholtz 등¹⁾에 의해서도 비교적 많은 용량의 nitrofen(technical grade)투여가 수신증, 횡격막 결손등의 기형 유발인자가 됨을 보고하였다.

Nitrofen에 대한 연구는 Costlow 등²⁾에 의해 비교적 광범위하게 연구되었는데 신생아 생존율과 출생체중의 관찰에서 임신 제11일이 가장 예민한 날짜로 체중이 의의있게 감소되어 있고 출생 48시간내에 56%가 사망하며, 임신 제11일에 투여용량을 증가시킬수록 사망률은 증가하며 50%치사량(LD₅₀)은 116 mg/kg으로 보고하고 있다.

기형의 빈도는 용량에 달려있어 15%치사량에서 45%가, 99% 치사량에서 91%가 기형을 초래하며, 사망예의 75%에서 심장기형 또는 횡격막 결손이 존재함으로 심장의 기형과 횡격막 결손이 사망 원인을 시사하였다.

저자들의 실험 I에서는 신생아 사망예에서 횡격막 결손이 75%이상으로 횡격막 결손이 사망원인의 주요인자로 간주되며 어미중 1마리를 제외한 29마리 모두 횡격막 결손을 갖는 태자를 출산했고, 태자의 45%에 해당되었으며 제10일째, 350 mg/kg 투여군이 가장 예민한 조건으로 나타났다. 그러나 Warkany 등⁸⁾은 횡격막 결손이 사망의 중요원인이 되지만 태자가 호흡하기에 도 곤란할 정도로 허약함에 의한 것도 배제할 수 없다

고 하였다.

본 실험성적에서도 후자의 인자를 고려하여야 되겠지만 횡격막결손이 없는 태자는 건강한 것으로 보아 전신성 독성효과보다는 탈장에 의한 기계적인 것이 중요하다고 생각된다.

횡격막 결손은 기형중에서 비교적 흔한 편으로 출생아 100명중에서 0.45⁹⁾, 0.31¹⁰⁾로 보고되고 있다. 또한 정도가 심한 기형아의 8.5%에서 사산아 및 신생아 사망의 1.4%에서 횡격막 결손이 관찰된다¹¹⁾.

횡격막 결손의 원인으로 사람에서는 유전적 요인으로 8명의 성인 형제에서의 보고¹²⁾, 그의 형제에서의 보고^{13,14)}, trisomy 18을 가진 신생아의 보고¹⁵⁾ 등 그의 다수의 보고¹⁶⁾가 있다. 한편 실험동물로 쥐에서 strain 간에 차이가 있어 Stock에서는 2.7%가, D.H.는 7.7%가, Long Evans는 0.9%가 자연발생함으로 유전적 요인을 들 수 있으며¹⁷⁾ thalidomide, quinine, phenmetrazine과 같은 약물¹⁷⁾을 들 수 있고 그의 비타민 A 결핍에서도 19%내지 3분의 2에서 횡격막 결손이 관찰된다^{18,19)}.

횡격막 결손의 발생기전을 밝히는데 있어 우선 횡격막의 발달과정을 살펴보면 사람에서의 횡격막 발달은 Patten²⁰⁾, Arey²¹⁾, Bremer 등²²⁾에 의해 잘 기술되어 있다. 백서에서의 횡격막 형성²³⁾은 septum transversum(횡행중격), pleuroperitoneal membrane(흉복막), 종격동, 배측 측벽 장간막에서 유래되는 근육층의 융합으로 형성되는 복잡한 과정을 밟는데 임신 제 11일째 foregut(전장)의 앞쪽에 횡행중격의 출현으로 시작되고 흉복막을 형성하기 위한 세포이동은 12~13일에 시작되며 흉복막간 통로의 폐쇄는 여러 주위 장기 및 측벽 배벽에서 추가되는 조직의 배열로 이루어진다.

횡격막 결손의 발생기전에 대해서 2가지 가능성을 주장하였는데, 첫째로 pleuroperitoneal canal의 폐쇄는 간 및 신장, 부신등의 성장에 의한 기계적인 폐쇄(mechanical closure)로 일어나며 이들 장기의 성장 지연으로 인한 폐쇄가 지연될 때 탈장이 초래되거나, 둘째로 intestinal loop가 umbilical coelom으로 이동되지 못하고 pleuroperitoneal canal로 통과됨에 기인한다고 한다²³⁾. 그러나 Warkany 등⁸⁾은 비타민 A결핍에 의한 횡격막 결손에 대한 실험에서 백서의 strain에 따른 대조군 및 실험군에서의 횡격막 결손의 빈도 차이를 관찰하고 affected strain에서는 횡격막의 폐쇄가 늦어지는데 비타민 A 결핍시 더욱 폐쇄를 지연시킴으로써 횡격막 결손이 일어난다는 가설을 내세웠다.

저자들의 nitrofen 에 의한 횡격막 결손의 발생에 대한 임신주기별 관찰에서 정상대조군에서의 흉복막에 의한 횡격막 폐쇄는 15일경이고 근육까지의 완전한 형성은 17~18일경이며, nitrofen 투여군에서는 대부분 횡격막 발달이 지연됨을 알 수 있고 특히, 제15일째 투여군의 2에서 우측은 흉복막이 완성되어 있는 반면 좌측은 흉복막 및 pleuropericardial membrane 까지 거의 형성되지 않음이 관찰되었다(임신 제15일 이전의 발달 단계), 또한 횡격막 결손부의 발달이 대개 평활하고 둥글며 염증이나 변성이 없는 점과 간이 흉강내로 이동된 후에도 계속 성장하므로 횡격막과 만나는 부위가 심한 함몰을 보이고 간과 횡격막이 만나는 부위에 양쪽다 염증이나 변성이 없는 점, 흉강내의 간의 조직학적 소견에 이상이 없는 점 그리고, 횡격막의 폐쇄는 15일경이고 nitrofen 투여는 10일인 것으로 미루어 nitrofen 이 횡격막 발달의 비교적 조기의 밝혀지지 않은 단계에 작용하여 성장의 지연내지 정지를 일으키는 것으로 사료된다.

횡격막 결손에서의 사망률에 영향을 미치는 요인으로는 증상의 발현시기에 따라 생후 24시간을 기준으로 그 이전에 증상이 나타나면 사망률이 44%, 그 이후는 6%로 보고하고 있고²⁴⁾, Johnson 등²⁵⁾은 72시간을 기준으로 그 이전에 증상이 오면 사망률이 47%, 그 이후는 0%이고 전체적 사망률은 25%이다^{26,27)}.

횡격막 결손에서의 가장 중요한 사망요인은 폐저형성증이며^{9,11)} 단순한 무기폐가 아니고 폐저형성증임을 광학현미경 관찰에서 밝히고 있다^{28,29)}. 폐저형성증의 정도는 결손이 일어나는 당시의 태자에서 형성시기와 복강장기의 이동정도에 달려있다. 즉 결손이 일어나는 시기가 빠를수록 폐저형성증은 현저하다^{28,29)}. 폐저형성증의 기전은 pleuroperitoneal canal 이 열려있어 간, 중장(midgut), 비장등이 흉강내로 들어가는 시기가 바로 기관지가 빠르게 성장하는 시기로 이 성장의 방해로 일어난다. Berdon 등²⁹⁾은 횡격막 결손에서의 폐저형성증을 정도에 따라 3군으로 분류하여 사망률을 관찰하고 횡격막 결손에서의 사망의 주원인이 폐저형성증임을 강조하고 심한 폐저형성증은 호흡불량증후군과 유사한 증세를 나타낸다고 보고하고 있다. 폐의 크기는 현저히 작아져 정상의 1/2~1/3에 달하거나³⁰⁾ 심한 경우는 폐의 무게가 정상의 10%까지도 감소한다³¹⁾. DeLorimier 등²⁸⁾은 폐중에 대한 폐의 무게비가 정상의 23~75%로 감소됨을 보고하고 있다. 횡격막 탈장이 있는 쪽이 훨씬 심하고 특히 하임이 영향을 더 받는다고 한다³²⁾.

저자들의 실험에서 폐는 복강내에서의 이동된 장기에 치우쳐서 상부에서 작게 관찰되며 폐중에 대한 폐무게가 $1.53 \pm 0.31\%$ 로 대조군 $2.37 \pm 0.16\%$ 에 비해 현저히 의의있는 감소를 보이고 대조군의 64%에 해당되었다.

횡격막 결손은 위치에 따라 Bochdalek 허니아(65%), 식도열공허니아(10.4%), Morgagni 허니아(9%), short esophagus(9%), 횡격막 내번증(13%)등으로 분류된다¹¹⁾.

Bochdalek (posterolateral) 허니아는 후장간막과 늑복막의 융합의 실패로 오며 대부분 좌측(83~94%)에 발생하며^{9,10,32)} 좌측이 많은 이유는 좌측이 우측보다 늑복막의 융합이 늦고 우측은 간의 보호를 받는 것으로 설명하고 있다³³⁾. 양측성으로 오는 경우의 보고^{34,36)}는 매우 드물다. Retrosternal 허니아는 Morgagni 공을 통해 일어나며 복강장기의 심한 이동은 없다.

탈장낭은 Bochdalek 허니아의 경우는 10%이고 Retrosternal 허니아의 경우는 50%이다. 탈장낭은 늑복막폐쇄전에 일어나면 낭이 없고 늑복막폐쇄가 경부 근원 세포에서 유래되는 근육이동사이에 일어나면 낭이 존재한다¹¹⁾. 비타민 A 결핍에 의한 횡격막 결손은 주로 우측 배부에 발생하고 보충영양을 투여하지 않으면 우측이 많고 보충영양을 투여한 군에서는 좌측이 많은데 이러한 좌우의 이동 이유는 전혀 알 수 없다고 한다⁸⁾. Nitrofen 을 임신 제11일째 투여한 Costlow 등²⁾의 실험에서는 대부분이 우측에 발생했다.

저자들의 실험에서는 350 mg/kg, 임신 제10일째 투여군에서의 좌우측 발생률은 비슷하고, 양측성이 6예(16%), 다발성이 6예(16%)였고, 250 mg/kg, 임신 제11일째 투여군은 좌측은 1예도 없고 92%에서 우측에 발생했는데 용량과 투여일에 따른 부위의 변화에 대한 이유는 알 수 없었다.

결손부위의 크기는 우측은 60예중 44예가 중간크기, 좌측은 14예중 13예가 대(大)로 좌측이 우측보다 대체로 크나 그 이유는 알 수 없었다.

탈장장기는 좌측의 경우 위, 소장, 대장, 비장, 간, 췌장, 좌측신장 및 부신이고 우측의 경우는 간, 소장, 대장이며¹¹⁾, Mishalany 등³⁷⁾은 소장, 대장, 위, 비장, 간, 신장, 망막, 부신, 췌장등이 탈장되며 주로 소장, 대장, 위, 간, 비장이 많다고 보고하고 있다.

저자들의 관찰로는 간이 90예 전부에서, 좌측의 경우 위의 탈장이 간 다음으로 동반되었고, 우측의 경우는 간 다음으로 소장이 탈장되었다. 또한 이들 장기의 탈

장은 본 관찰로는 늑막이 폐쇄가 일어나지 않은 시기에 동시에 일어나며 그후에도 간이 흉강내에서 계속 성장함으로 횡격막과 만나는 부위는 심한 함몰을 보이고 간이 고정되어 있어 폐기역할을 하므로 다른 장기의 탈장을 다소 막는 것으로 사료되었다.

결 론

Nitrofen 이 동물에서 횡격막 발달 장애를 일으키는 양상과 기전을 규명하기 위하여 Sprague-Dawley 계 백서들 사용하여 그 태자를 기형학적으로 관찰하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Nitrofen 은 백서에서 선천성 횡격막 결손을 상당히 규칙적으로 일으킨다.

2) 횡격막 결손을 유발하는 가장 적절한 nitrofen 의 용량은 체중 kg 당 350 mg 이고, 임신 제10일에 투여 함이 가장 효과적이었으며, 그 발생빈도는 66.3%였다.

3) Nitrofen 투여에 의한 사망원인의 일차적 표적장기는 횡격막이고 결손에 의한 폐저형성증이 사망의 중요인자가 된다. 한편 횡격막 결손은 대부분 Bochdalek 형이었고 극히 일부가 tendon 부위의 약화에 기인하였다.

4) 횡격막 결손의 좌우 위치의 차이는 투여용량과 투여일에 따라 다르다. 즉 임신 제10일째, 350 mg/kg 투여군에서는 우측 30%, 좌측 38%, 양측 16%, 기타 16%로 좌우 차가 없으나, 임신 제11일째, 250 mg/kg 투여군에서는 우측이 92%로 대부분을 차지했다

5) 횡격막 결손의 발생기전으로는 임신 10일 이후에 나타나는 조직자체의 발육 지연으로 사료되었다.

REFERENCES

- 1) Weatherholtz W, et al: *Teratogenicity study of TOK E-25 in rats. Report from Hazelton laboratories of America Inc. to Rohm and Hass Corp., 1979*
- 2) Costlow RD and Manson JM: *The heart and diaphragm: Target organs in the neonatal death induced by nitrofen(2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether). Toxicology 20:209-227, 1981*
- 3) Ambrose AM et al: *Toxicological studies on 2, 4-dichloro-p-nitrophenyl ether. Toxicol Appl Pharmacol 19:263-275, 1971*

- 4) Chu KC et al: *Report on the bioassay of nitrofen for possible carcinogenicity. National Cancer Institute carcinogenesis technical Report No. 26, United States department of health, education, and welfare, public health service, National Institutes of Health, 1978*
- 5) Millman HA, et al: *Pancreatic carcinogenesis and naturally occurring pancreatic neoplasms of rats and mice in the NCI carcinogenesis testing program. J Environ Path Tox 1:829-840, 1978*
- 6) Kimbrough RD, Gaines TB, Linder RE et al: *2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl-ether (TOK). Arch Environ Health 28:316-320, 1974*
- 7) Stone LC and Manson JM: *Effects of the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether (nitrofen) on fetal lung development in rat. Toxicology 20:195-207, 1981*
- 8) Warkany J and Roth CB: *Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency. II. Effect of varying the preparatory diet upon the yield of abnormal young. J Nutrition 35:1-11, 1948*
- 9) Butler N and Claireaux AE: *Congenital diaphragmatic hernia as a cause of perinatal mortality. Lancet 1:659-663, 1962*
- 10) David TJ, Illingworth CA: *Diaphragmatic hernia in the South-west of England. J Med Genet 13:253-262, 1976*
- 11) Holder TM and Ashcroft KW: *Congenital diaphragmatic hernia. Pediatric Surgery, Chicago Year book Medical Publisher Vol. 1, pp.432-445, 1979*
- 12) Heron IC: *Familial diaphragmatic hernia. California Med 73:497-499, 1950*
- 13) Passarge E, Halsey H and German J: *Unilateral agenesis of the diaphragm. Hum Genet 5: 226-230, 1968*
- 14) Pollack LD and Hall JG: *Posterolateral(Bochdalek's) diaphragmatic hernia in sisters. Am J Dis Child 133:1186-1188, 1979*
- 15) Kajii T, Oikawa K, Itakura K, et al: *A probable 17-18 trisomy syndrome with phocomelia, exomphalos, and agenesis of hemidiaphragm.*

- Arch Dis Child* 39:519-522, 1964
- 16) Wolff G: *Familial congenital diaphragmatic defects: Review and conclusions. Hum Genet* 54:1-5, 1980
 - 17) Hobolth N: *Drugs and foetal abnormalities, letter to the editor. Lancet* 2:1333, 1962
 - 18) Andersen DH: *Effect of diet during pregnancy upon the incidence of congenital hereditary diaphragmatic hernia in the rat. Am J Path* 25:163-185, 1949
 - 19) Wilson JG, Roth CB and Warkany J: *An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. (Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation). Am J Anat* 92:189-217, 1953
 - 20) Patten BM: *Human embryology 3rd ed New York, McGraw-Hill book company Inc pp.502-518, 1968*
 - 21) Arey LB: *Developmental anatomy. A textbook and laboratory manual of embryology. Philadelphia, Saunder Company. pp. 1965, 287-294*
 - 22) Bremer JL: *The diaphragm and diaphragmatic hernia. Arch Pathol* 36:539-549, 1943
 - 23) Boyden EA: *The structure of compressed lungs in congenital diaphragmatic hernia. Am J Anat* 134:497-508, 1972
 - 24) McNamara JJ, Eraklis AJ and Gross RE: *Congenital posterolateral diaphragmatic hernia in the newborn. J Thoracic and Cardiovas Surg* 55:55-59, 1968
 - 25) Johnson DG, Deaner RM and Koop CE: *Diaphragmatic hernia in infancy; Factors affecting the mortality rate. Surgery* 62:1082-1091, 1967
 - 26) Campanale RP and Rowland RH: *Hypoplasia of the lung associated with congenital diaphragmatic hernia. Ann Surg* 142:176-189, 1955
 - 27) Moore KL: *The developing human 3rd ed. Clinically oriented embryology. Saunder Company. pp.167-178, 1982*
 - 28) DeLorimier AA, Tierney DF and Parker HR: *Hypoplastic lungs in fetal lambs with surgically produced congenital diaphragmatic hernia, Surgery* 62:12-17, 1967
 - 29) Berdon WE, Baker DH and Amoury R: *The role of pulmonary hypoplasia in the prognosis of newborn infants with diaphragmatic hernia and eventration. Am J Roentgenol* 103:414-421, 1968
 - 30) Areechon W and Reid L: *Hypoplasia of lung with congenital diaphragmatic hernia. Br Med J* 1:230-233, 1963
 - 31) Reale FR and Esterly JR: *Pulmonary hypoplasia: a morphometric study of the lungs of infants with diaphragmatic hernia, anencephally, and renal malformations. Pediatrics* 51:91-96, 1973
 - 32) Scheer CW and Linville JL: *Congenital diaphragmatic hernia through foramen of Bochdalek. Arch Surg* 91:823-828, 1965
 - 33) Bloss RS, Aranda JV, Beardmore HE: *Congenital diaphragmatic hernia: Pathophysiology and pharmacologic support. Surgery* 89:518-524, 1981
 - 34) Conde J, Mendaza E and Parra DM: *Congenital bilateral posterolateral and anterior diaphragmatic defects. J Pediat Surg* 14:185-186, 1979
 - 35) Levy JL, Guynes WA, Louis JE et al: *Bilateral congenital diaphragmatic hernias through the foramina of Bochdalek. J Pediat Surg* 4:557-559, 1969
 - 36) Thomas MP, Stern LM and Morris LL: *Bilateral congenital diaphragmatic defects in two siblings. J Pediat Surg* 11:465-467, 1976
 - 37) Mishalany HG, Nakada K and Wolley MM: *Congenital diaphragmatic hernia. Arch Surg* 114:1118-1123, 1979

= Abstract =

Effect of the Nitrofen on Diaphragmatic Development of Rat

Wha Soon Chung, M.D.* and Je Geun Chi, M.D.**

Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Hanyang University, Department of Pathology, School of Medicine, Seoul National University***

Enormous increase of use of herbicide was brought to problem with adverse effect on environment and its inhabitant. And the teratogenic effects of a few herbicides were reported.

Nitrofen, 2,3-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether is an organic chemical placed in nitrophenol/aniline group. This chemical has been one of most widely used herbicides in Korea.

Initial toxicity study of nitrofen was done by Ambrose with lung toxicity. Respiratory distress and cyanosis of neonatal rats following nitrofen exposure in uterus was described by Kimbrough et al and suggested that nitrofen might be affecting surfactant production. Later, it was reported that cardiac anomaly accounted for the neonatal distress and death.

This experiment was attempted to produce diaphragmatic defect in offsprings of rats by nitrofen administration orally in early developmental stage and to find characteristics of diaphragmatic defect.

Following results and conclusions were made.

1) Nitrofen was a potent teratogenic agent in rats in dose of 350 mg/kg at 10th day of gestation. It was fairly selective in producing diaphragmatic defect. The overall frequency of diaphragmatic defect was 66.3%.

2) Diaphragm was the primary target organ in nitrofen induced neonatal death, and pulmonary hypoplasia due to diaphragmatic defect was major contributor of direct cause of neonatal death.

3) In majority the defect was in the posterolateral(Bochdalek) portion of the diaphragm and in some cases, diaphragmatic defect was due to attenuation of central tendon.

4) The difference in the sidedness of the defect was obviously noted; in group of administration of 250 mg/kg at gestation 11th day, the great majority were right sided(92%), while in group of administration of 350 mg/kg at gestation 10th day no difference was observed.

5) Pathogenesis of nitrofen induced diaphragmatic defect was thought probable due to delay or arrest of development of pleuroperitoneal fold.



Fig. 1. Complete closure of pleuroperitoneal membrane at gestation 15th day in normal control.



Fig. 2. Opened pleuroperitoneal canal at gestation 15th day in nitrofen treatment group.

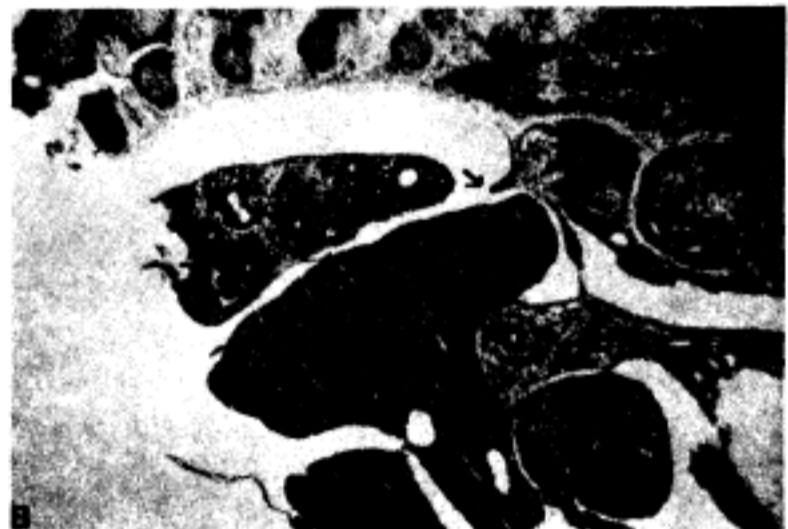
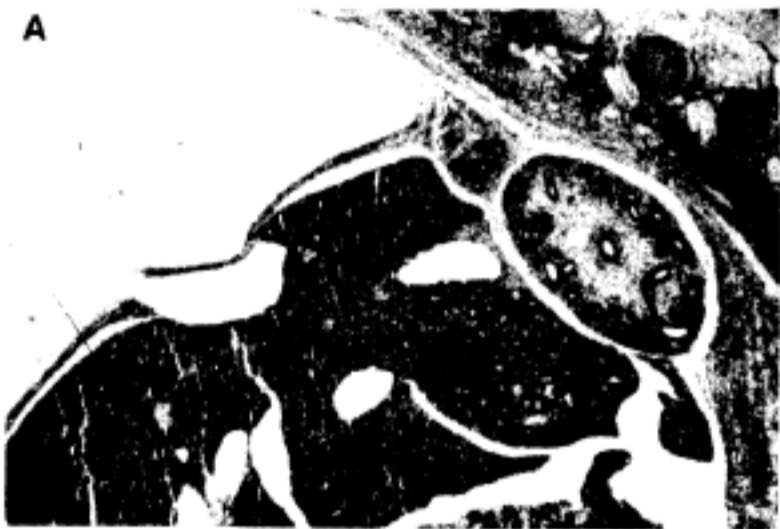


Fig. 3. Right side of diaphragm(A) showed complete closure of pleuroperitoneal membrane while left side(B) showed opened pleuroperitoneal canal in a rat of gestation 17th day of nitrofen treatment group.

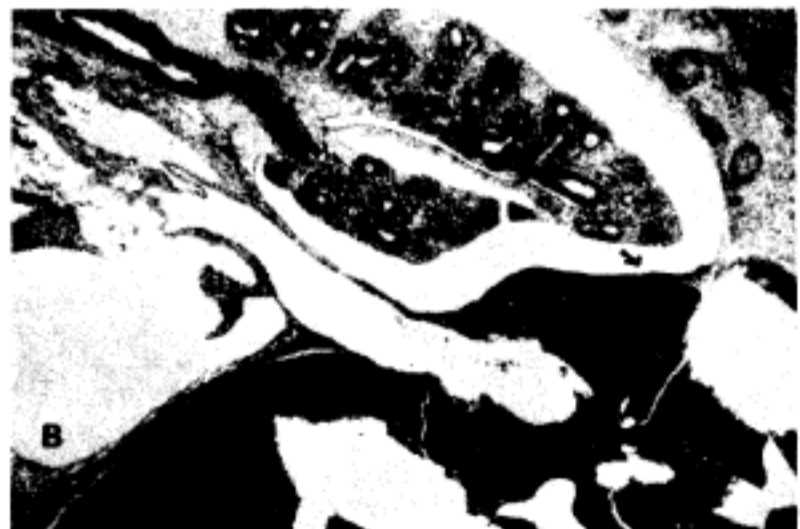
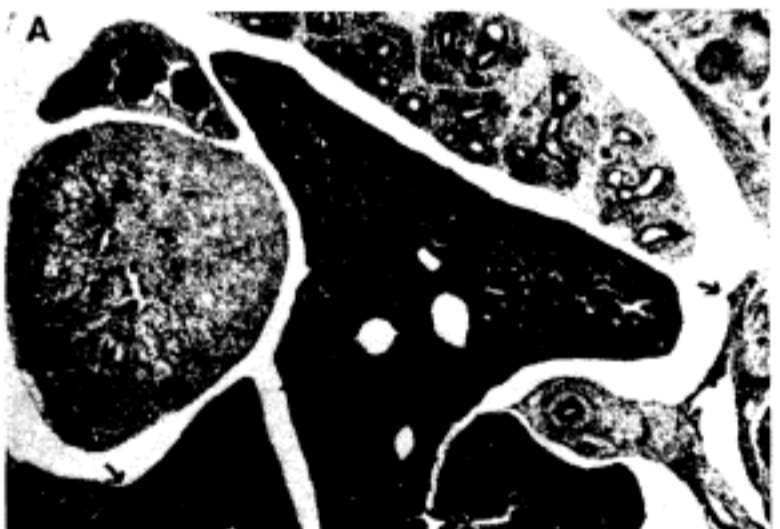


Fig. 4. Almost absence of pleuroperitoneal and pleuropericardial membrane with protrusion of liver into thoracic cavity are noted at left side of diaphragm(A) in a rat of gestation 17th day of nitrofen treatment group. Right side showed tiny pleuroperitoneal fold with opened pleuroperitoneal membrane(B).

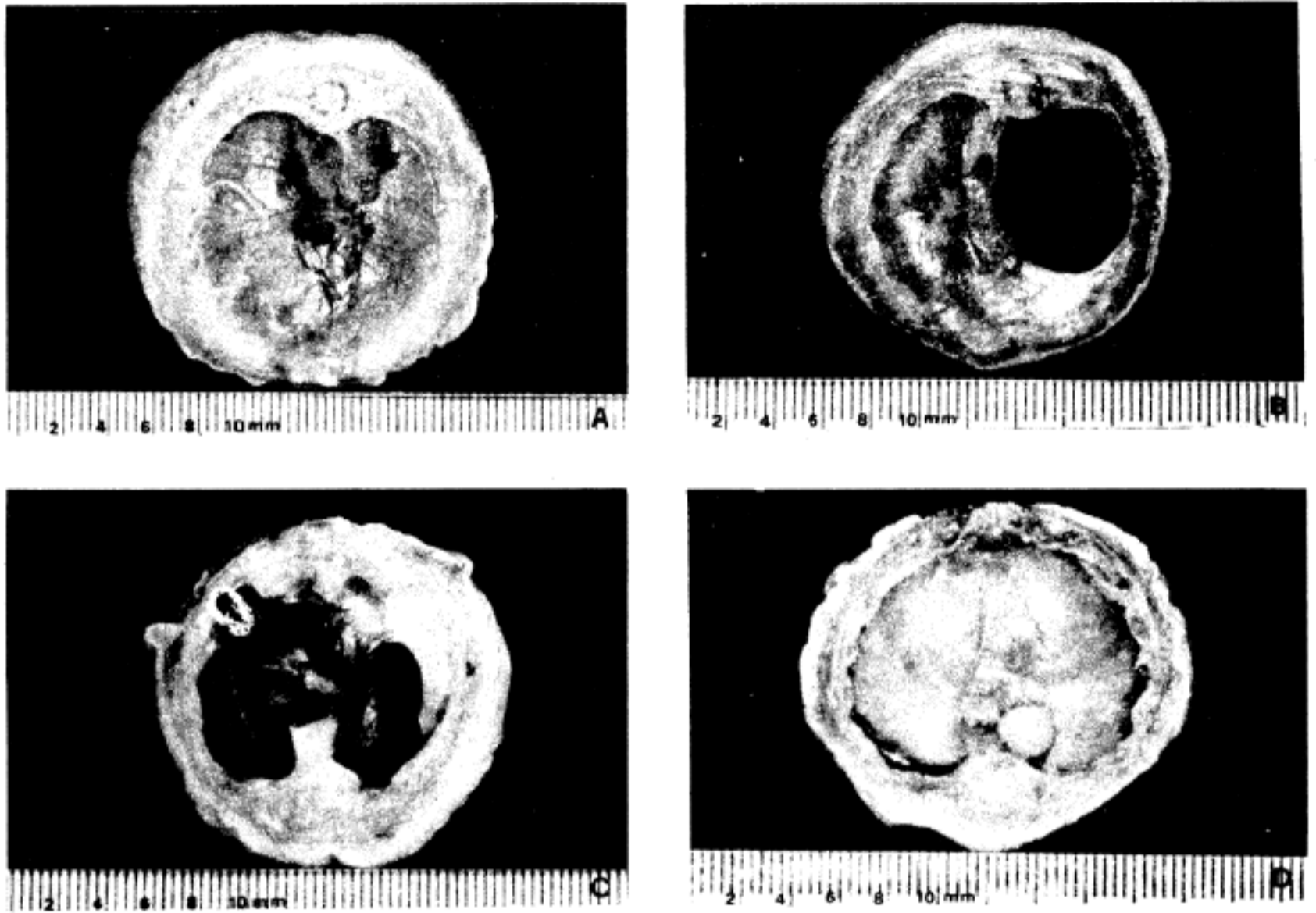


Fig. 5. Photograph showed variety of diaphragmatic absect.

A: Normal

B: Large defect on posterior lateral portion of left side

C: Both diaphragmatic hernia with protrusion of liver and stomach into thoracic cavity

D: Two small defect on one side.

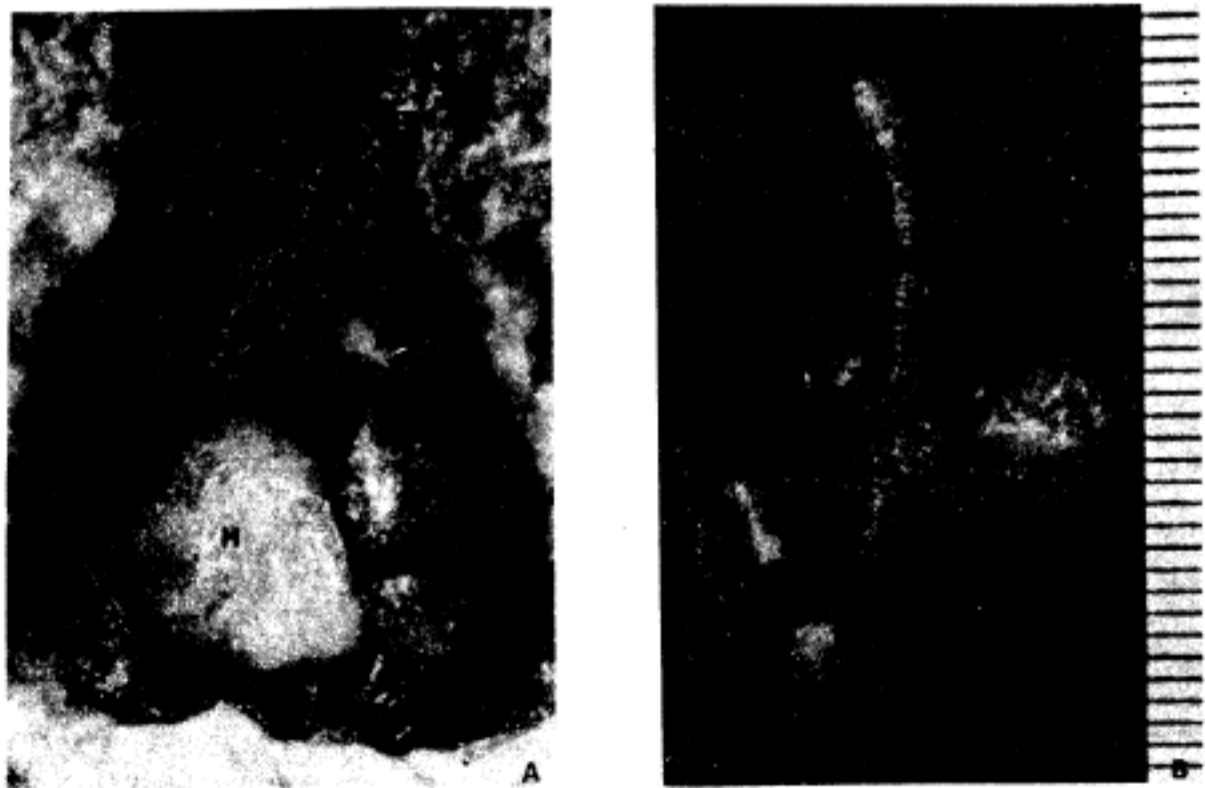


Fig. 6. A: Displacement of lung with small size by protrusion of large portion of liver.

B: Hypoplasia of left lung.

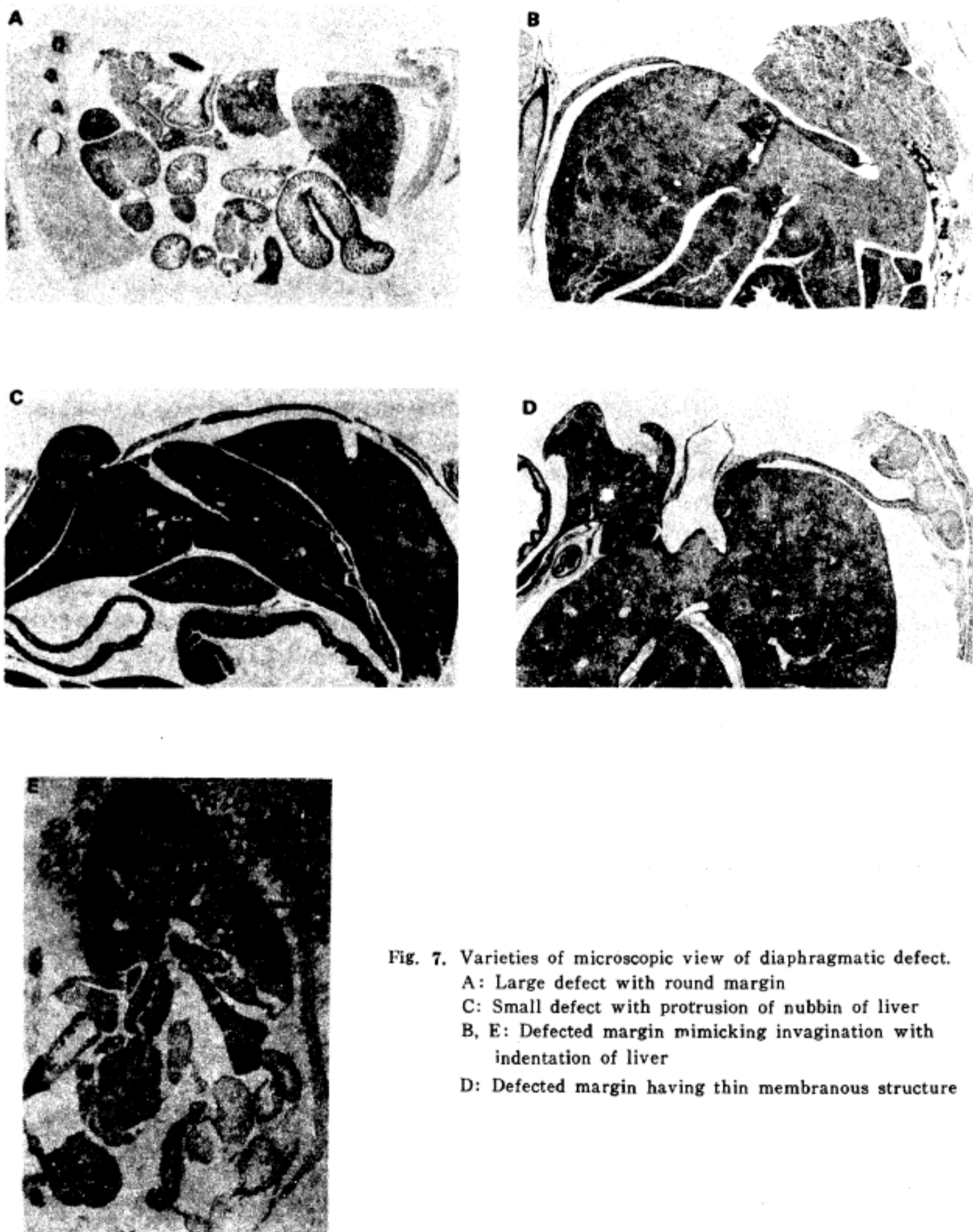


Fig. 7. Varieties of microscopic view of diaphragmatic defect.
A: Large defect with round margin
C: Small defect with protrusion of nubbins of liver
B, E: Defected margin mimicking invagination with indentation of liver
D: Defected margin having thin membranous structure