

메틸사이클로헥산의 독성과 신경에 미치는 영향 연구 Toxicity of Methylcyclohexane and the Effects on Nervous System

김현영* · 김태균 · 강민구

Hyeon-Yeong Kim · Tae-Gyun Kim · Min-Gu Kang

한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원

Occupational Safety&Health Research Institute, KOSHA

ABSTRACT

Methylcyclohexane is frequently used in industrial sites (2,592tons/year) as rubber adhesives, ink, paint thinners, organic solvents, and so on. However, there are limited data on the toxic evaluation of methylcyclohexane. This study aims to predict the hazards and neurological effects of methylcyclohexane using SD rats in order to prevent health disorders of workers. The OECD Guideline for Testing of Chemicals (OECD, 2001) was used as a reference during the tests. For 13 weeks (once a day, five days per week) 0, 10, 100 and 1,000mg/kg/day of methylcyclohexane was injected to SD rats to observe any changes in the body or organ weight, hematology, histopathology, mobility, blood pressure, and neurotransmitter. As a result, some male and female SD rats injected with 1,000mg/kg/day of methylcyclohexane died. On the other hand, surviving rats showed significant changes such as hematological changes involving the decrease in the number of red blood corpuscles, and the decrease or increase in the weight of the lungs, kidneys, spleens, and livers ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Also histopathological lesions were observed in the hearts and kidneys. In the test for the effect on the nervous system, SD rats injected with 100mg/kg/day of methylcyclohexane had higher blood pressure levels compared to the control group. However, no abnormal effects was observed in the mobility, serotonin, neurotransmitter, and the biopsy of the brain and coronary arteries. The study results revealed that the livers, hearts, and kidneys were affected by methylcyclohexane. The absolute toxic dose of methylcyclohexane is 1,000mg/kg/day, NOAEL is 100 mg/kg/day, and it is not a toxic substance to the nervous system.

Key words : methylcyclohexane, Neuro Toxicity, Toxicity, LD₅₀, LC₅₀

I. 서 론

고무의 접착제, 잉크 및 도료희석제, 세정제 등으로 많이 사용되며 인체에 장기간 노출시 중추신경계와 말초신경계 이상증상 등의 신경계 장애물질로 알려져 있으나 (Valentini F., 1994) 노출농도 또는 노출기간에 따른 각종 장기미치는 생체영향 등 정량적 독성평가 자료가 부족한 휘발성 유기용제 메틸사이클로헥산(methylcyclohexane)에 대해 동물실험을 통하여 유해성을 평가하고자 하였다. 문헌조사 결과 SD rats를 이용 4시간 단회 흡입노출시 반수치사농도 LC₅₀은 3,750ppm (15.05 mg/L)으로 알려져 (김현영 등, 2006) 있으며, 노동부 고시 제2009-68호 “화학물질의 분류·표시 및 물질안전보건자료에 관한 기준” (노동부, 2009)에 의하면 급성독성물질 구분 4 ($10 < LC_{50} \leq 20$ mg/L)에 해당되었으나 투여 경로

에 따른 각종 생체에 미치는 유해성과 유해농도, 주요 표적장기, 신경계에 미치는 영향연구 등은 부족하였다. 본 시험물질은 CAS No. 108-87-2의 C₇H₁₄의 화학식을 가지는 분자량 98.18의 휘발성 유기용제로 마우스에서 경구 반수치사량은 2,250mg/kg/day, 흡입 반수치사농도는 41,500mg/m³/2h이었으며, 랫드의 경구 반수치사량은 3,200 mg/kg/day 이상이며, 토끼에서 반수치사농도는 7,613 ppm/4h로 알려져 있다(ACGIH, 2007; 後藤綱, 1994). 반복노출에 의한 생체영향 평가연구로 오래된 독성시험 결과이기는 하지만 Lazarew (1929)는 마우스에서 7,500-10,000ppm으로 2시간 동안 노출하면 쇠약을 나타내고, 10,000-12,500ppm의 노출은 사망을 초래하며, Treon 등 (1943)은 토끼에서 3,330ppm으로 10주간 반복노출하면 간과 신장에 경미한 손상을 유발하나 1,200ppm의 노출은 독성영향이 없고, 원숭이에서 370ppm의 지속적인 노출도 영향이 없다고 하였다. 또한 사람에 대한 역학조사에서 ethylacetate, cyclohexane 등이 포함된 메틸사이클로헥산을 용제로 하는 접착제 사용의 구두 수선공에서 중추신경계와 말초신경계 증상이 발생한 사례가 보고되었으며, 작업 전환 및 노출 중단 이후에도 말초신경 이상

*Corresponding author: Kim Hyeon-Yeong
403-711 인천광역시 부평구 구산동 34-4
Tel: 032-5100-821, Fax: 032-502-7197
E-mail: kk3843@yahoo.co.kr
Received: 2011. 2. 28, Revised: 2011. 5. 30.
Accepted: 2011. 6. 9.

증상은 수개월 지속되었다는 보고 (Valentini F., 1994)와 Casarett과 Doull(1975) 및 Gosselin 등(1984)의 연구에서도 고농도 노출시 자극성을 유발하고 장시간 노출 시 행동장애 등의 신경독성이 있는 물질로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 실험동물을 이용 노동부 고시(2008) 및 OECD(2001) 화학물질의 유해성 시험기준에 따라 메틸사이클로헥산의 13주간 반복 투여시 투여 농도별 실험동물의 혈액학적 변화, 운동성과 중추신경계에 미치는 영향, 표적장기 등 생체에 미치는 유해성을 규명하고 독성 및 무독성량(NOEL)을 확인하여 취급 근로자의 건강장해 예방을 위한 유해물질 분류의 기초자료와 물질안전보건자료(MSDS)의 정보를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육환경

실험동물은 SLC Japan에서 생산된 6주령의 특정병원체 부재 (specific pathogen free, SPF)의 S.D(Sprague-Dawley) rat를 주식회사 중앙실험동물에서 구입하였다. 이를 사육시설에서 검역 및 1주간 순화 후 각 군의 평균 체중이 최대한 균일하게 분포되도록 층화무작위 추출법으로 분배하여 대조군과 시험물질 각 투여군으로 구분하고, 폴리스폰케이지 사육상자(W 235×L 380×H 175 mm)에서 사육하였다. 사육환경은 온도 22±3℃, 상대습도 30-70%, 조명 150-300Lux로 12시간으로 하였으며, 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(LabDiet Picolab 5053 PMI)를 오리엔트바이오㈜로부터 공급받아 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 식수는 상수도수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후, 물병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시험물질

시험물질은 CAS No. 108-87-2의 메틸사이클로헥산(methylcyclohexane)으로 Sigma-Aldrich (U.S.A.)사의 Lot No. 01144TH로 제조된 500 g의 1급 시약(98.9%)을, 부형제로는 Sigma-Aldrich (U.S.A.)사에서 제조된 Olive oil을 사용하였으며, 시험물질을 Olive oil에 각 농도별로 혼합 희석하였으며, 1회 총 투여량은 각 1ml/kg/day로 하였다.

3. 시험군의 구성 및 투여농도 설정

실험동물은 암, 수 동물 각 5마리를 한 군으로 하였다. 시험물질 투여농도는 메틸사이클로헥산의 유해성 평가 및 유해물질 분류를 위한 기초자료 제공을 위해 노동부 고시 제2009-68호 “화학물질의 분류, 표시 및 물질안전보건자료에 관한 기준”(노동부, 2009) 및 화학물질의 분류·표지에 관한 세계조화시스템 (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS)에 의한 화학물질의 분류의 기준 농도와 급성독성시험 결과의 치사농도(LC₅₀, LD₅₀)와 반복투여 독성시험의 관

련 문헌(김현영, 2006; ACGIH, 2007; Treon, 1943; 後藤綱, 1994) 및 선행연구에서 나타난 시험물질의 시험 농도별 독성결과 농도를 참고하여 대조군을 기준으로 저 농도군은 독성영향이 나타나지 않을 농도(NOEL), 고농도군은 확연히 나타날 수 있는 확실영향 농도로 예측하여 0, 10, 100, 1,000mg/kg/day의 농도로 설정하였으며, 투여경로는 실험동물 경배부의 피하에 1일 1회, 주 5일, 13주간 피하주사 하였다.

4. 시험방법

시험방법과 실험항목은 노동부 고시(2009), 국립환경과학원 「화학물질유해성시험연구기관의 지정 등에 관한 규정, 2004」, OECD 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 2001」의 시험방법을 기준으로 시험물질 투여에 의한 실험동물의 생사 유·무와 임상증상, 체중변화, 혈액 및 혈액생화학적검사, 병리조직검사 등을 검사하였다.

혈액학적검사의 경우 시험물질 투여(13주간) 완료 후 복대동맥으로부터 채혈한 혈액을 자동혈액분석기(Advia 2120, Siemens, USA)를 이용하여 분석하고, 또한 혈액생화학적검사를 위해 채혈한 혈액의 일부를 3,000rpm으로 10분간 원심 분리하여 얻은 혈청은 AU400 자동생화학분석기(AU 400, Olympus, Japan)로, 전해질은 전해질 분석기(Rapidchem 744 Analyzer, Siemens, USA)를 활용하여 측정하였으며, 병리조직검사는 부검 후 10% 중성완충포름알린 용액에 고정된 각 장기를 파라핀 포매 후 4-5μm 두께로 박절한 다음 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 하여 광학현미경으로 검사하였으며, 추가 시험으로 운동성 변화검사, 낙하 착지시험, 혈압 측정, 혈청을 이용한 세로토닌분석 등을 수행하였다.

1) 운동성 변화검사

시험물질 투여 종료 전 적외선 감지장치를 이용 실험동물의 운동량을 측정하였다. 시험방법은 운동능력 측정 장치 (Activity monitoring system, Sibata, Japan)를 이용 시험물질 투여 종료 1주일 전 동물케이지 상부에 적외선 감지 장치를 부착 실험동물의 움직임을 계수하여 이를 적산 기록되게 하고 이를 대조군과 각 군별 운동성의 변화를 비교 평가하였다.

2) 낙하 착지시험

시험물질 장기 노출에 의한 운동성 및 말초신경계에 미치는 영향을 관찰하기 위해 시험물질 투여 종료 1주일 전 실험동물에 대해 Adriana ferrero (2007), Ross (2000)의 방법에 의한 낙하시험(landing foot splay test)을 실시하였다. 시험방법은 대조군을 포함 각 투여 군별 각각의 실험동물을 30cm 높이에서 자유 낙하시켜 착지하는 지점의 실험동물 앞발의 간격(front legs)과 뒷발의 간격(hind legs)을 측정하여 착지의 유연성을 평가 하였다.

Table 1. Activity counts for 72 hours SD male & female rats subcutaneous injection to methylcyclohexane for 13 weeks

Parameters	Methylcyclohexane (mg/kg/day)			
	0	10	100	1,000
Male				
Sensor 1	22,723	25,278	30,870	42,076
Sensor 2	28,971	29,400	36,244	-
Sensor 3	27,502	30,132	41,770	-
Sensor 4	19,486	-	31,061	-
Sensor 5	28,541	20,920	28,622	-
Mean \pm SD	25,444 \pm 4,158	26,432 \pm 4,251	33,713 \pm 5,299	(42,076)*
Female				
Sensor 1	47,896	34,170	21,325	51,050
Sensor 2	35,107	38,365	40,950	-
Sensor 3	34,401	31,878	32,199	-
Sensor 4	25,377	37,498	41,370	-
Sensor 5	24,780	34,180	35,292	-
Mean \pm SD	33,512 \pm 9,389	35,218 \pm 2,666	32,427 \pm 9,607	(51,050)*

All values are expressed as mean \pm SD.

Significant differences as compared with control : * p<0.05.

3) 혈압측정시험

시험물질 투여종료 1주일 전 혈압측정장치(LE5650-6., Panlab com., Spain)를 이용 시험물질 투여군별 실험동물의 혈압 및 심장박동수를 측정하였다. 방법은 실험동물 5마리를 각각의 고정틀(restrainer)에 넣고 Scanner & Heater를 이용 동물의 체온과 운동성을 안정화 시킨 후 실험동물의 꼬리(몸통으로부터 1/3 위치)에 혈류의 흐름을 막는 압력 커프(cuff)와 혈류의 맥동을 측정할 수 있는 트랜스듀서(transducer)를 고정하여 최고 혈압(systolic pressure), 최저혈압(diastolic pressure), 평균혈압(mean pressure), 심장 박동수(heart rate)를 측정하였다.

4) 혈청을 이용한 세로토닌의 분석

뇌 신경계 전달물질인 세로토닌의 분석은 시험물질 투여 종료 후 실험동물의 복대 동맥에서 전혈(whole blood)을 채혈한 후 원심분리(2,000rpm, 10분)를 통해 분리된 혈청(serum)을 이용하였다. 세로토닌은 Uscnlife사의 rat용 Elisa kit(Wuhan, China)을 활용하였으며 microplate reader(Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다(검출한계: 0.625-40ng/ml).

5. 통계처리

시험결과는 평균값과 표준편차로 표기하였다. Bartlett test에서 분산이 균일하게 나온 결과는 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 하였고, 균일하지 않은 자료는 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis test를 실시하였다. 분석결과 군간 차이가 인정되면 Dunnett's test로 대조군과 시험물질 투여군간의 유의차를 검정하였다. 일반증상과 부검소견 및 병리조직 소견 등은 백분율로 나타낸 다음 Fisher's exact test로 유의차를 조사하였으며, 모

든 통계분석은 SPSS 18 프로그램을 이용하였고 통계학적 유의수준은 5% 및 1%로 정하였다.

III. 연구결과

1. 임상증상 관찰결과

시험물질 투여기간 중 대조군을 포함 10 및 100mg/kg/day군은 폐사동물이 없었으며, 1,000mg/kg/day 군의 경우 암, 수 각 4마리가 폐사하였고(투여개시 5일에서 60일 사이) 생존동물에는 특이적 증상은 없었다.

2. 체중변화 측정 결과

시험물질 투여 기간별 대조군과 10, 100 및 1,000mg/kg/day군의 체중 측정결과를 Figure 1,2에 나타내었다. 1,000mg/kg/day 군의 경우 암, 수 모두 투여 익일부터 대조군(288.96 \pm 12.99g)을 기준으로 급격한 체중 저하(241.98 \pm 18.80g)의 유의성 있는(p<0.001) 변화가 있었고, 100mg/

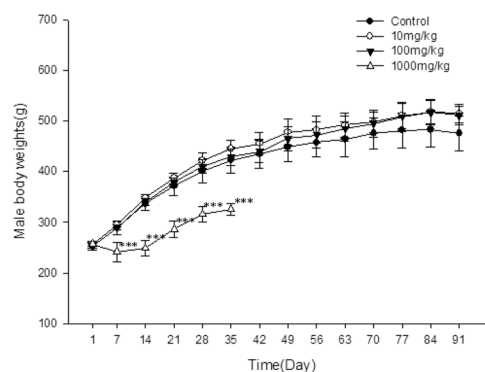


Figure 1. Changes of body weight in male rats exposed to methylcyclohexane for 13 weeks

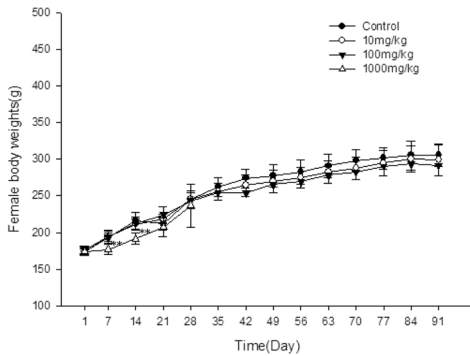


Figure 2. Changes of body weight in female rats exposed to methylcyclohexane for 13 weeks

kg/day군은 대조군(288.96 ± 12.99 g)에 비해 체중 저하(290.31 ± 04.03 g)를 보였으나 유의성은 없었다.

3. 부검 소견

시험물질 투여 종료 후 생존동물에 대해 대조군을 포함 시험물질 투여군에 대해 부검하고 육안적 관찰 결과 100mg/kg/day군의 경우 장기 유착이 일부 관찰되었고, 10mg/kg/day군을 포함 암, 수 모두 투여 농도 의존적으로 복강 내 농포, 폐장의 변색(갈 변화), 비장변색(암적색), 일부 간장의 위축 및 암적색 변화 등이 관찰되었다.

4. 혈액학적 검사

시험물질 투여종료 후 암·수 동물을 부검하여 혈액 항목의 수치를 조사한 결과 수컷에서는 대조군을 기준으로 10 및 100mg/kg/day 특이적 이상 항목은 없었으나, 암컷에서는 100mg/kg/day 투여군의 단핵구수(monocyte)가 대조군($1.25 \pm 0.26 \times 10^3/\text{mm}^3$)을 기준으로 통계학적으로 유의하게($p < 0.05$) 감소($0.84 \pm 0.26 \times 10^3/\text{mm}^3$)하였다. 단, 1,000 mg/kg/day군의 생존 동물의 경우 호중구와 림프구, 단핵구, 호산구, 호염기구, 총 백혈구 및 혈소판의 수가 대조군에 비해 증가하였고, 적혈구수와 혈색소량, 적혈구용적, 평균적혈구용적 및 평균 적혈구혈색소량 등은 감소하였다.

5. 혈액생화학적 검사

암, 수 실험동물의 혈액생화학적치의 변화를 분석한 결과 수컷동물에서는 10mg/kg/day군에서 무기인(Inorganic phosphorus) 농도가 대조군(5.36 ± 0.32 mg/dl)을 기준으로 통계학적으로 유의하게($p < 0.01$) 증가(5.92 ± 0.30 mg/dl)하였고, 100mg/kg/day군에서는 총 단백질량과 알부민 및

무기인의 농도가 대조군(6.12 ± 0.19 mg/dl, 4.00 ± 0.12 mg/dl, 5.36 ± 0.32 mg/dl)에 비해 통계학적으로 유의하게($p < 0.01$) 각각 증가(6.54 ± 0.11 mg/dl, 4.22 ± 0.04 mg/dl, 6.82 ± 0.30 mg/dl) 하였으며, 암컷에서는 100mg/kg/day 투여군의 혈액요소질소와 크레아티닌, 알라닌 아미노전이효소, 아스파테이트 아미노전이효소, 젖산탈수소효소 및 알카리포스파타제 수치가 대조군에 비해 현저하게 증가하였으나 개체 차이에 의한 표준편차가 커 통계학적인 유의차는 인정되지 않았다. 단, 1,000mg/kg/day군의 경우 생존 동물수가 적어 통계적 유의성을 평가할 수 없었지만 대조군을 기준으로 수컷은 알카리포스파타제와 크레아티닌 스포키나제 및 무기인의 증가와 암컷에서는 혈액요소질소가 감소하였고, 젖산탈수소효소와 알카리포스파타제는 증가되었다.

6. 장기중량 변화

시험물질 투여 종료 후 부검하여 장기를 적출하고 각 장기에 대해 중량을 측정된 결과 수컷 1,000mg/kg/day군에서 흉선과 부신, 폐, 신장, 비장, 간 및 뇌의 중량이 대조군을 포함 10, 100mg/kg/day군 보다도 현저하게 증가하였고, 암컷 1,000mg/kg/day군에서도 흉선과 부신, 난소, 폐, 신장, 비장 및 간의 중량이 현저하게 증가하였다. 그러나 대조군을 기준으로 10, 100mg/kg/day군에서는 특이적 유의성은 없었다.

7. 병리조직학적 검사결과

뇌, 간장, 폐, 심장, 관상동맥, 신장, 고환(난소)에 대해 병리조직학적 변화를 검사한 결과 1,000mg/kg/day군 간장에서는 (Figure 3)과 같이 담관과형성(bile duct proliferation)과 (Figure 4)의 충혈(hyperemia)을 보여주는 변성, 그리고 미세육아종(microgranuloma)이 각 1례 관찰되었고, 100mg/kg/day군에서는 일부 간장의 공포변성(cytoplasmic vacuolation)도 관찰되었다. 폐의 경우 1,000mg/kg/day군에서 (Figure 5)와 같이 부분적으로 충혈/출혈(congestion/hemorrhage) 현상을 보였으나 정도가 미약하였으며, 심장의 경우 1,000 mg/kg/day군의 경우 (Figure 6)에서와 같이 심근괴사(myocardial necrosis)가 있었으며, 신장의 경우 대조군 (Figure 7)을 기준하여 1,000mg/kg/day군의 경우 (Figure 8)과 같이 조직의 충혈/출혈(congestion/hemorrhage) 현상을 보였다. 그러나 고환 세정관의 직경과 생식세포의 두께를 측정된 결과 시험물질의 투여에 기인된 영향은 인정되지 않았다.

Table 2. Landing foot splay evaluated during the functional observational battery after the 13 weeks

(unit: cm)

Sex	Position	Control	10mg/kg/day	100mg/kg/day
Male	Front legs	2.50 ± 0.81	2.66 ± 0.62	2.38 ± 0.42
	Hind legs	5.15 ± 1.93	6.16 ± 1.13	5.83 ± 1.89
Female	Front legs	2.54 ± 0.82	2.17 ± 0.60	2.59 ± 1.11
	Hind legs	5.79 ± 1.45	4.82 ± 1.21	4.45 ± 0.72

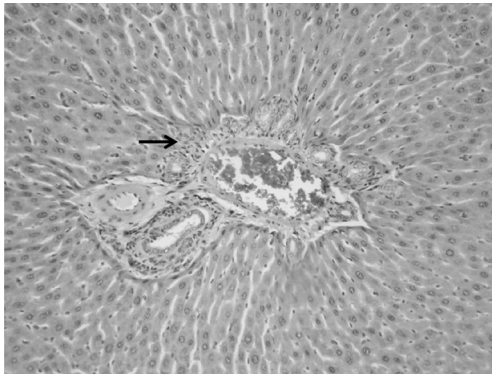


Figure 3. Representative photograph of liver from the 1,000mg/kg/day group, showing bile duct proliferation.

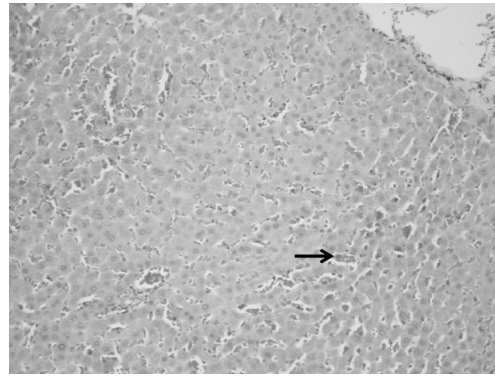


Figure 4. Representative photograph of liver from the 1,000mg/kg/day group, showing hyperemia.

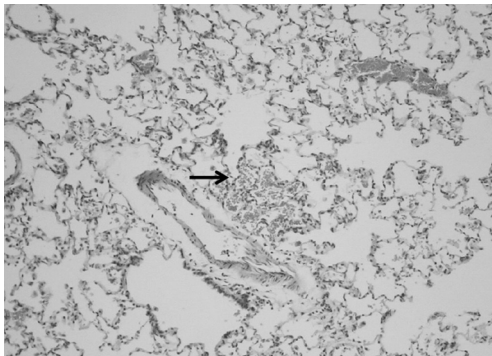


Figure 5. Representative photograph of lung from the 1,000mg/kg group, showing local congestion/ hemorrhage.

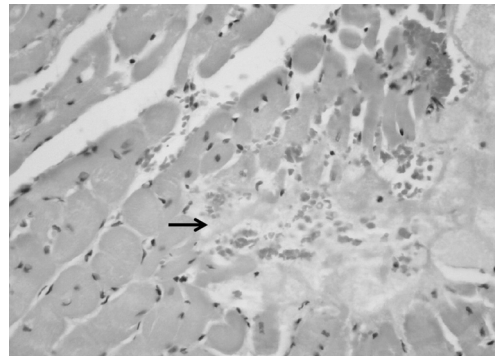


Figure 6. Representative photograph of heart from the 1,000mg/kg/day group, showing myocardial necrosis.

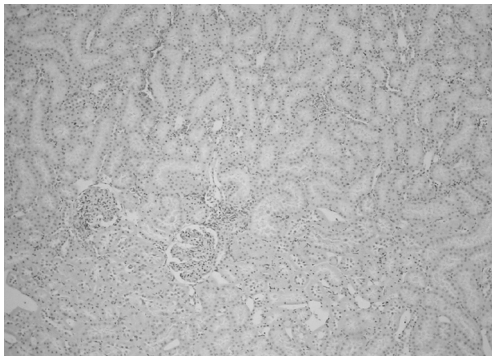


Figure 7. Representative photograph of kidney from the control group, showing normal appearance.

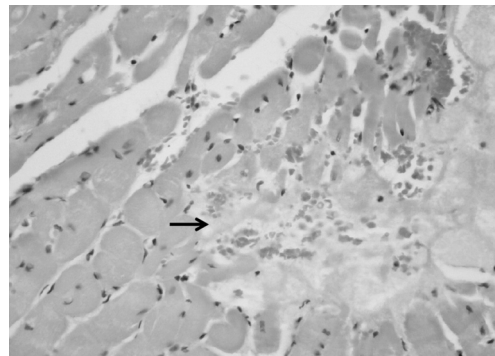


Figure 8. Representative photograph of kidney from the 1,000mg/kg/day group, showing congestion.

8. 운동성 변화 검사 결과

적외선 감지기를 이용 시험물질 투여에 따른 시험군 별 운동성을 측정된 결과를 **Table 1**에 나타내었다. 실험동

물의 운동량은 수컷 보다 암컷이 많았으며, 수컷군의 경우 대조군을 기준으로 10 및 100mg/kg/day군의 운동량이 투여농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였으나 유의성

Table 3. Changes in mean arterial pressure(MP), systolic pressure(SP), diastolic pressure(DP) and heart rate (HR) in male and female rats exposed to methylcyclohexane for 13 weeks

Parameter	Sex	Control	10mg/kg/day	100mg/kg/day
HR (heart rate)	Male	395.4±92.5	440.4±53.3	411.2±83.5
	Female	432.4±80.8	522.0±80.9	432.0±91.7
SP (systolic pressure)	Male	182.4±38.5	228.4±66.3	256.8±60.9
	Female	159.4±49.5	205.2±57.1	243.4±53.2
DP (diastolic pressure)	Male	146.2±37.1	191.8±69.9	207.0±59.1
	Female	136.6±45.7	164.6±36.5	198.4±47.8
MP (mean pressure)	Male	158.0±37.4	203.6±68.3	223.2±58.7
	Female	143.8±46.9	178.0±41.7	213.2±48.1

($p<0.001$)은 없었으며, 암컷군의 경우 대조군을 기준으로 투여군의 운동성이 증가 또는 감소하여 농도변화에 따른 비례적 의존성은 없었다. 따라서 시험물질 투여에 의한 실험동물의 운동량 증가 또는 감소의 영향은 없는 것으로 판단되었다. 단, 1,000mg/kg/day 고농도군의 경우 암·수 모두 운동성이 다른 농도군에 비해 많은 경향을 보였으며 이는 시험물질 투여에 따른 독성 영향의 행동 특성 이상으로 판단되었다.

9. 실험동물의 낙하 착지시험 결과

시험물질 반복 투여에 따른 말초신경 등 운동성 변화를 검사한 착지시험(landing foot splay test) 결과를 Table 2에 나타내었다. 낙하할 경우 낙하지점의 실험동물 앞발 간격(front legs)과 뒷발의 간격(hind legs)을 측정한 결과 수컷의 경우는 대조군에 비해 시험물질 투여군의 특이적 차이는 없었으나, 암컷의 경우 대조군에 비해 농도의존적으로 뒷발의 간격이 좁아지는 경향을 나타내는 불안정성을 보였으며, 통계적 유의성은 인정되지 않아 시험물질에 의한 낙하시 불안전성 등 말초신경의 변화 등 운동성(자세)에 미치는 영향은 없는 것으로 판단하였다.

10. 실험동물의 혈압변화 측정결과

시험물질의 반복 투여시 나타나는 실험동물의 혈압변화를 측정한 결과를 Table 3 및 Figure 9에 나타내었다. 심장 박동 수(heart rate)의 경우는 암, 수 모두 시험물질 투여 농도에 따른 증가 또는 감소가 없었으나, 최고 혈압(systolic pressure), 최저혈압(diastolic pressure), 평균혈압(mean pressure)의 경우 암, 수 모두 시험물질 투여농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였으며, 통계적 유의성은 인정되지 않았다.

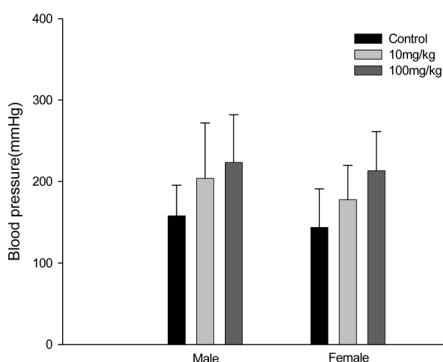


Figure 9. Changes in mean blood pressure in male and female rats exposed to methylcyclohexane for 13 weeks

Table 4. Serotonin values in serum of male and female rats treated with (mean pressure)의 경우 암, 수 모두 시험물질 투여농도에 methylcyclohexane for 13 weeks

Sex/Parameter		Concentration of methylcyclohexane		
		Control	10mg/kg/day	100mg/kg/day
Male	Serotonin	0.1309±0.0052	0.1290±0.0030	0.1271±0.0018
Female	(ng/ml)	0.1358±0.0050	0.1323±0.0037	0.1284±0.0028

11. 혈청을 이용한 serotonin 분석결과

시험물질 투여 완료 후 실험동물의 혈청(serum)을 이용하여 뇌의 신경계 전달 물질로 알려진 세로토닌(serotonin)의 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. 대조군을 기준으로 10, 100mg/kg/day의 투여군에서 세로토닌의 농도변화는 관찰되지 않았다. 따라서 랫드를 이용 메틸사이클로헥산의 13주간 반복 투여의 경우 시험물질에 의한 세로토닌의 영향은 없는 것으로 판단되었다.

IV. 고 찰

메틸사이클로헥산은 휘발성이 높고 유기물질 용해력이 강해 고무접착제, 페인트 희석제, 금속세정 공정에서 많이 사용되고 있으며, 국내 연간 사용량이 약 2,592톤이며, 취급 근로자수는 600여명(노동부, 2008)에 이르고 있으나 사람에 미치는 유해특성, 특히 투여 농도별 또는 노출기간에 따른 독성평가 자료는 매우 부족하여 실험동물을 이용 반복 장기(13주) 투여에 따른 농도별 생체에 미치는 영향을 검토하고 특히 운동성 및 신경계에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 메틸사이클로헥산 경구 투여시 반수치사량 LD₅₀은 2,250mg/kg/day(마우스), 3,200mg/kg/day 이상(랫드), 흡입에 의한 반수치농도 LC₅₀은 41,500mg/m³/2h(마우스), 7,613ppm/4h(토끼)로 알려져 있다(ACGIH, 2009), 증기는 눈과 점막에 강한 자극 증상을 유발하고 narcosis 증상과 간장과 신장을 포함한 여러 장기에 출혈성 변화가 보였다는 보고(NIOSH, 2009)가 있다. 또한 인체의 건강에 미치는 역학조사에서 ethylacetate, cyclohexane 등이 포함된 메틸사이클로헥산을 용제로 하는 접착제를 다년간 사용한 구두 수선공에서 중추신경계와 말초신경계 이상 증상이 발생한 사례(Valentini 등, 1994)도 일부 보고된 바 있어 고농도 노출이나 장기간 노출에는 중추신경계에 영향을 미치는 물질로 사료된다. 최근 자료에 의하면 랫드를 이용 흡입노출에 의한 반수치사농도 LC₅₀는 3,750ppm (15.054mg/L)으로 GHS의 유해물질 4류에 해당되었으며, 아급성흡입독성시험에서는 400ppm군에서 체중의 감소, 운동성의 증가, 1,600ppm에서 HGB (hemoglobin) 감소 및 CHO(cholesterol)의 증가가 있었으나 병리조직검사에서 특이적 이상이 없었는 보고(김현영 등, 2006)가 있었으나 신경에 미치는 영향과 시험물질 투여경로에 따른 비교연구는 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 피하투여에 의한 생체에 미치는 유해성을 연구하고자 하였으며, 특히 운동성을 포함한 신경계에 영향을 확인하고자 하였다.

본 연구결과에서도 아급성흡입독성연구(김현영 등,

2006)에서와 같이 10, 100mg/kg/day군에서는 사망예가 없었으나 1,000mg/kg/day군의 암·수 동물에서 사망동물이 시험물질 투여개시 후 14-24일에 관찰되었으며, 이는 일반증상관찰시 운동성 감소와 사망으로 나타난 독성소견과 일치하는 것으로 심한 운동성감소가 동반된 것으로 보아 시험물질의 반복투여에 의한 전신독성 유발로 판단되었다. 생존동물에 대한 혈액검사 결과 수컷 10 및 100mg/kg/day군에서는 적혈구수와 혈색소량, 적혈구용적, 평균적혈구용적 등의 변화가 없었으나 암컷 100mg/kg/day군에서 단핵구(monocyte)가 농도에 비례하여 유의하게($p<0.05$) 감소하였다. 그러나 본 결과는 랫드 혈액검사치의 정상 범위(강진석, 2001) 내에 있어 메틸사이클로헥산에 의한 독성학적 유해영향으로 평가되지는 않았다. 1,000mg/kg/day 투여군의 경우 적혈구수와 혈색소량, 적혈구용적, 평균적혈구용적을 포함 혈액검사 결과가 대조군에 비해 현저하게 증가하였거나 감소하였는데, 이는 시험물질에 의한 독성학적 영향으로 판단되었다. 혈액생화학적 검사에서는 수컷 100mg/kg/day군에서 관찰된 총 단백질량과 알부민의 증가는 유의성이 인정되었으나 증가정도가 미약하였고, 투여농도에 따른 용량 의존성이 없었으며, 암컷동물에서는 유사한 소견이 인정되지 않은 것으로 보아 시험물질의 투여와는 관련이 없는 우발적인 소견으로 판단되었다. 수컷 10 및 100mg/kg/day 투여군에서 관찰된 무기인의 증가는 투여농도 의존적으로 증가하였으나 암컷에서는 관찰되지 않았고, 또한 무기인 증가와 관련되는 부갑상선 기능 저하증이나 신부전증, 비타민 D과다증 등의 소견이 인정되지 않은 것으로 나타나 시험물질의 투여와 관련성은 확인할 수 없었다. 장기 중량 측정결과에서는 1,000mg/kg/day 투여군의 암, 수 동물에서 관찰된 주요장기의 중량증가는 동물수가 각각 1레로(5마리 중 4마리 폐사) 통계학적 의미는 없으나 대조군에 비해 현저하게 증가하였고, 암·수 모두 일치하는 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것으로 판단된다. 병리조직검사 결과 10, 100mg/kg/day군의 간장 및 신장에서 일부 이상소견이 있었으나 투여농도 의존적이지 않아 시험물질에 의한 영향으로 볼 수 없었다. 즉, 10 및 100mg/kg/day 투여군의 암, 수 실험동물에서 관찰된 간의 조직학적 이상소견들은 발생빈도가 낮았고, 정상 랫드에서도 흔히 관찰되는 소견(Boorman 등, 1990; Greaves, 1990; Haschek과 Rousseaux, 1998; Kim 등, 2006)이어서 시험물질의 노출과는 관련이 없는 자연발생적 소견(spontaneous findings)으로 판단하였다. 신경계에 미치는 독성잠재력을 평가하기 위한 뇌조직과 관상동맥 검사에서는 시험물질의 투여에 기인된 조직학적 변화는 인정되지 않았다. 그러나 1,000mg/kg/day군에서는 Figure 3-8에서와 같이 간장의 미세육아종과 담관과형성, 심장의 충혈/출혈과 심근괴사, 일부 폐의 경우 비특이적인 대식세포 집합과 국소 충혈/출혈, 신장은 단백질주와 충혈/출혈, 그리고 암컷동물에서 관찰된 간장의 담관과형성과 충혈(hyperemia), 신장의 충혈

/출혈은 정상 랫드에서는 관찰되지 않는 소견이고 이상정도가 심한 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 소견으로 판단된다. 따라서 랫드에 메틸사이클로헥산을 13주간 반복 투여시 1,000mg/kg/day 용량에서 간장 및 신장에 심각한 조직학적 이상을 초래하는 것으로 확인되어, 고농도 노출시 표적장기(target organ)는 간장, 심장 및 신장으로 판단되었으며 이는 Kinkead 등(1985)의 체중증가 억제와 신장병증(nephropathy)의 독성학적영향이 관찰되고, 노관 신장증(tubular nephrosis) 보고(Johannsen과 Levinskas, 1987) 등과 유사한 결과로 시험물질 투여군 암, 수동물의 여러 장기에서 관찰되었던 충혈/출혈 소견과 종합하여 볼 때 시험물질과 관련된 이상소견으로 판단되었다.

그리고 시험물질 반복 노출시 중추신경계에 미치는 관련성 여부를 확인하기 위해 운동성의 변화를 측정할 결과 수컷의 경우 투여농도 증가에 따른 운동량의 증가 경향을 보였으나 유의성이 인정되지 않았으며, 암컷의 경우 대조군과 유사하거나 농도 의존적이지 못했다. 또한 낙하시험에서는 Table 2와 같이 암컷군의 경우 대조군을 기준으로 투여군에서 뒷발의 간격이 좁아지는 불안정성을 보였으나 유의성이 없고 투여농도에 의존적이지 못했다. 시험물질 투여에 의한 실험동물의 혈압에 미치는 영향검사에서는 Table 3의 결과와 같이 심장 박동 수에는 변화가 없었으나 혈압의 증가는 시험물질 투여농도에 비례하여 증가하는 경향을 보여 이는 시험물질에 의한 영향으로 판단하였다. 그리고 뇌신경계 전달 물질로 알려진 세로토닌(serotonin)을 분석한 결과 Table 4에서와 같이 대조군을 기준할 때 10, 100, 1,000g/kg/day군에서 세로토닌의 변화는 매우 낮았으며 투여농도 의존적이지 못해 시험물질에 의한 영향은 매우 적은 것으로 판단하였다. 따라서 메틸사이클로헥산의 노출에 따른 세로토닌의 변화로 뇌기능의 자극 또는 불안증 증가로 침정작용(沈靜作用)을 일으켜 우울증이나 부정적인 감정과 충동을 일으키는 영향은 나타나지 않는 것으로 예측되었다. 이의 연구 결과에 의하면 메틸사이클로헥산의 급성독성은 LC_{50} 은 3,750ppm으로 고용노동부 고시 2009-68호 유해물질 분류기준에서 급성독성 유해물질 4류에 해당되었다. 그리고 본 연구결과에서의 확실중독량(absolute toxic dose)은 1,000mg/kg/day, 무독성량(NOEL)은 100mg/kg/day 이하에 해당되어 GHS 및 노동부 고시 제2009-68호 “화학물질의 분류·표시 및 물질안전보건자료에 관한 기준”의 유해물질 기준($10<\text{용량}\leq 100\text{mg/kg/day}$, 90일)에는 해당되지 않는 물질로 나타났다. 그러나 본 연구 결과는 SD rats를 이용 피하투여에 의한 13주간 반복투여에 의한 동물시험결과의 제한점이 있으며, 장기적으로는 이의 보안을 위해 2년 반복투여에 의한 만성독성 및 발암성시험을 통해 저 농도, 장기 노출의 경우에는 각 장기별 생체에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 세부적인 연구를 통해 특수독성과 만성독성, 그리고 발암성의 유, 무를 확인하고, 사람에 대한 영향 검토를 위해 메틸

사이클로헥산의 취급 근로자에 대한 역학조사를 통해 건강장해의 관련성 여부 규명 등 종합적 유해성 평가를 통하여 안전성의 정도를 판단하여야 할 것이다.

V. 결 론

고무의 접착제, 잉크 및 도료희석제, 유기용제 등으로 많이 사용되나 신경계를 포함 독성평가 자료가 부족한 메틸사이클로헥산을 시험물질로 SD rats를 이용 1일 1회, 주 5일, 13주간 0, 10, 100 및 1,000mg/kg/day 농도로 반복투여 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 1,000mg/kg/day군에서는 암·수 모두 80%의 치사율을 나타내었으며, 생존동물에서는 적혈구수 감소를 포함한 혈액학적 변화와 폐장, 신장, 비장 및 간장 중량의 유의성($p<0.05$, $p<0.01$) 있는 변화, 그리고 심장 및 신장에서 병리조직학적 이상소견이 관찰되었다. 그러나 100mg/kg/day군에서는 사망동물이나 특이적 임상증상 등 시험물질에 의한 영향소견은 없었다.

2. 신경계 영향 검토에서 시험물질의 투여 농도 의존적으로 암·수 모두 대조군을 기준으로 100mg/kg/day군에서 일부 혈압 상승의 경향을 보였으나 운동성, 신경 전달 물질인 serotonin, 그리고 뇌와 관상동맥의 조직변화 등 특이적 영향은 없었다.

따라서 메틸사이클로헥산은 13주 반복투여시 확실중독량(absolute toxic dose)은 1,000mg/kg/day이었고, 무독성량(NOEL)은 100mg/kg/day이었다. 표적 장기는 간장, 심장 및 신장이었고, 신경계 독성물질에는 해당되지 않았다.

참고문헌

- 강진석, 김기택, 박인승. 독성병리학 도감. 청구문화사; 2001 (80-81)
- 김현영, 이성배, 강민구, 송시환. 메틸사이클로헥산의 흡입독성과 유해성 평가. 환경독성학회지 2006; 21:(173-184)
- 노동부, 노동부 고시 제2009-68호, 화학물질의 분류·표시 및 물질안전보건자료에 관한 기준. 노동부; 2009
- 노동부, 노동부 고시 제2008-11호, 산업화학물질의 유해·위험성 시험 등에 관한 기준. 노동부; 2008
- ACGIH. Methylcyclohexane. In: Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 2007
- Adriana F, Alejandra M, Cristina B, Noelia Z. Acute and subacute toxicity evaluation of ethanolic extract from fruits of schinus molle in rats. Journal of ethnopharmacology 2007;113:(441-447)
- Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA Jr, Mackenzie WF. Pathology of the Fischer rat. Reference and atlas. Academic Press; 1990
- Casarett LJ, Doull J. The Basic Science of Poisons. NewYork: Macmillan publishing Co., Toxicology-1975, (82)
- Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC. Clinical Toxicology of Commercial Products, 5th ed. Baltimore; 1984, (151)
- Greaves P. Histopathology of preclinical studies: Interpretation and relevance in drug evaluation. Elsevier; 1990
- Haschek WM, Rousseaux CG. Fundamentals of toxicologic pathology. Academic Press; 1998
- Johannsen FR, Levinskas GJ. Acute and subchronic toxicity of tetramethylcyclohexanes. J Appl Toxicol 1987;7(4):(245-248)
- Kinthead ER, Haun CC, Schneider MG, Vernot EH, MacEwen JD. Chronic inhalation exposure of experimental animals to methylcyclohexane. Wright-Patterson Air Force Base. OH: Air Force Aerospace Medical Research Laboratory; 1985
- Lazarew NF. Zur toxikologie des benzins (The toxicology of gasoline). Arch Hyg; 1929, (228-239)
- NIOSH. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, Cyclohexane, methyl -. 2000 [cited 2009]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/niosh-rtecs/GV5D75C8.html>.
- OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemical (Dec 17, 2001) No. 423 'Oral Toxicity'; 2001
- Ross JF. Relationship between functional and morphologic endpoints in neurotoxicity testing. Toxicologic pathology 2000;28(1):(132-136)
- Treon JF, Crutchfield WE Jr, Kitzmiller KV. The physiological response of animals to cyclohexane, methylcyclohexane, and certain derivatives of these compounds. J Ind Hyg Toxicol 1943;25(8):(323-347)
- Valentini F, Agnesi R, Dal Vecchio L, Bartolucci GB, De Rosa E. Does n-heptane cause peripheral neurotoxicity? A case report in a shoemaker. Occup Med (lond) 1994;44(2):(102-104)
- 後藤綱, 池田正之, 原 一郎. 産業中毒使覽. 1994, (531-532)