한국산업위생학회지, 제23권 제1호(2013)
J Korean Soc Occup Environ Hyg, 2013: 23(1): 1-10

1,4-Dichlorobutane의 랫드 2주 반복경구투여독성시험
2-Week repeated oral dose toxicity study of 1,4-dichlorobutane in rats

김종규[1] · 이인철[2] · 김성환[2] · 백형선[2] · 배진숙[3] · 송시환[3] · 김종춘[2]* · 정용현[1]*
Jong-Kyu Kim[1] · In-Chul Lee[2] · Sung-Hwan Kim[2] · Hyung-Seon Baek[2] · Jin-Sook Bae[3]
Si-Whan Song[3] · Jong-Choon Kim[2]* · Yong-Hyun Chung[1]*

[1]산업안전보건연구원 화학물질센터 · [2]전남대학교 수의과대학 · [3]㈜켐온 전임상연구센터
[1]Chemical Safety & Health Research Center, Occupational Safety & Health Research Institute
[2]College of Veterinary Medicine, Chonnam National University · [3]Preclinical Research Center, ChemOn Inc.

ABSTRACT

Objectives: The present study investigated the potential subacute toxicity of 1,4-dichlorobutane (1,4-DCB) by a 2-week repeated oral dose in male Sprague-Dawley rats.

Materials and Methods: The test chemical was administered once daily by gavage to male rats at dose levels of 0, 74, 222, 667, and 2000 mg/kg/day for 2 weeks. All rats were sacrificed at the end of treatment period. During the test period, clinical signs, mortality, body weights, food and water consumption, urinalysis, hematology, serum biochemistry, gross findings, and organ weights were examined.

Results: At 2000 mg/kg/day, treatment-related clinical signs, as evidenced by hypothermia, decreased locomotor activity, piloerection, lying on side, and prone position were observed. All the rats were found dead on test day 2. At 667 mg/kg/day, polyuria, suppressed body weight gain, food consumption, and spleen and thymus weights, and increased adrenal gland and liver weights were observed.Hematological and serum biochemical investigations revealed increases in the alanine aminotransferase, alkaline phosphataseand total bilirubinand decreases in the serum Na^+ level, white blood cell count and lymphocyte ratio. There were no treatment-related adverse effects in the 74 and 222 mg/kg/day groups.

Conclusions: In the present experimental conditions, target organs were determined to be spleen, thymus,and liver. The no-observed-adverse-effect level was considered to be 222 mg/kg/day in male rats.

Key words : 1,4-Dichlorobutane,Subacute toxicity, Target organ, No-observed-adverse-effect level

Ⅰ. 서 론

1,4-Dichlorobutane (CAS No.: 110-56-5; 1,4-DCB)은 dichlorobutane의 다양한 이성질체 중의 하나로 끓는점은 161~163℃, 녹는점은 -38℃, 그리고 분자식은 $C_4H_8Cl_2$의 특성을 가지고 있다. 유기염소계에 속하는 무색의 액상 화학물질로 합성섬유인 nylon 6,6의 전구체로 사용되며, 스판덱스 섬유 전구체인 tetrahydrofuran의 합성 등에 폭 넓게 사용되고 있다. 1,4-DCB는 우리나라에서 연간 유통량이 181,487톤인 대량생산 화학물질(high production volume, HPV)로 휘발이나 비산이 쉬워 작업장의 근로자에 쉽게 노출되어 건강장해 발생 가능성이 높다(Merk Milipore, 2013; KOSHA, 2007).

한국산업안전보건공단(www.kosha.net)에서 제공하고 있는 물질안전보건자료(Material Safety Data Sheet)에 따르면, 1,4-DCB는 눈과 피부 및 호흡기에 자극성이 있다는 것 외에 독성학적 자료나 인체노출정보는 매우 제한적이다(KOSHA, 2007; Sigma-Aldrich, 2013). 이전의 동물실험결과에 따르면, 랫드 경구투여 반수치사량은 3420 mg/kg이라고 하며(Merk Millipore, 2013), ICR 마우

*Corresponding author: Yong-Hyun Chung, 대전광역시 유성구 문지동 산업안전보건연구원 화학물질센터, Tel: 042-869-0344, Fax: 042-869-9001, E-mail: ch935@kosha.net
*Corresponding author: Jong-Choon Kim, 광주광역시 북구 용봉동 전남대학교, Tel: 062-530-2827, Fax: 062-530-2809, E-mail: toxkim@jnu.ac.kr, Received: 2013. 2. 5., Revised: 2013. 3. 7., Accepted:

스의 골수세포를 이용한 소핵(micronucleus) 시험에서 소핵유발성은 없다고 보고되었다(Lim 등, 2011). 마우스에 복강투여시 폐에 종양유발성은 없다고 하며(Poirier 등, 1975), 랫드에 30일간 반복투여시 자가면역반응을 일으키는 최소용량은 0.0022 mg/kg으로 보고된 바 있다(Vinogradov, 1979). 상기한 바와 같이 1,4-DCB의 독성학적 정보는 매우 제한적으로 알려져 있고, 반복노출에 의한 독성영향과 무해용량 및 표적장기 그리고 일일허용섭취량에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다. 최근 들어 1,4-DCB의 생산량이 증가하고 있고 다양한 목적으로 폭 넓게 사용되고 있기 때문에 노출과 건강장해 가능성이 높아지고 있어 사람에 대한 잠재적 위해성은 점차 증가하고 있다. 따라서 반복노출에 의한 독성학적 영향과 무해용량 및 표적장기를 규명하는 연구가 시급한 실정이다.

본 시험은 1,4-DCB에 대한 안전성 평가의 일환으로 2주 반복경구투여에 따른 독성학적 특성과 무해용량(No-observed-adverse-effect level) 및 확실중독량(absolute toxic dose)을 조사하고, 13주 아급성독성시험의 용량을 설정하기 위해 수행하였다. 1,4-DCB는 휘발성 물질이고 작업환경 관리나 취급부주의 시 주로 흡입을 통하여 노출이 이루어지지만 흡입된 1,4-DCB는 호흡기로부터 제거되는 과정에서 위장관계로 혼입될 수 있고, 우연한 사고나 다양한 매체를 통해 경구로도 섭식될 수 있다. 또한, 경구투여는 동물에게 투여된 시험물질의 양을 정확하게 산출할 수 있어서 노출수준에 따른 독성학적 특성과 용량반응 상관성의 규명이 용이하기 때문에 본 시험에서는 경구투여를 선택하였다.

Ⅱ. 연구내용 및 방법

1. 시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 코아텍(경기도 평택시)으로부터 입수한 6주령의 수컷 특정병원체 부재(specific pathogen-free) Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것을 선발하여 시험에 사용하였다. 동물실의 사육환경은 온도 23 ± 3℃, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간(08:00 점등~20:00 소등) 및 조도 200~300 Lux로 설정된 사육환경에서 스테인레스제 망사육상자(235W × 380L × 175H mm)에 사육상자당 2마리씩 수용하였으며, 멸균된 실험동물용 고형사료(코아텍, 평택)와 상수도수를 자유 급식시켰다. 본 실험에 사용된 모든 동물은 미국 National Research Council (1996)의 "실험동물의 관리와 사용에 관한 지침"에 따라 유지하였으며, 동물실험은 (주) 켐온의 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에 수행되었다.

2. 시험물질 및 투여

본 시험에 사용한 1,4-DCB는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 투여 직전에 투여용량에 맞게 corn oil (Sigma-Aldrich Co.)에 용해하여 조제하였다. 부형제 대조군은 corn oil 용액만을 사용하였다. 시험물질은 강제 경구투여 하였으며, 투여액량은 가장 최근에 측정된 개체별 체중을 기준으로 kg당 2 ml로 계산하였다(Kim 등, 2010).

3. 시험군 구성 및 용량설정 근거

총 30마리의 수컷 랫드를 4군의 시험군에 체중이 균등히 분배되도록 체중순위에 의한 무작위법으로 군분리 하였다. 랫드에서 1,4-DCB의 경구반수치사량은 3420 mg/kg으로 알려져 있으며(Millipore, 2013), 본 실험실에서 수행한 단회경구투여 독성시험에서 최고용량인 2000 mg/kg 투여군에서도 사망동물이 관찰되지 않아 2000 mg/kg/day 투여군을 고용량군으로 설정하였고, 공비 3을 적용하여 667, 222 및 74 mg/kg/day 투여군과 부형제 대조군(vehicle control, 0 mg/kg/day)을 추가하였다

4. 일반증상 관찰 및 체중측정

투여당일에는 투여 후 6시간까지 매 시간마다 동물의 일반증상과 중독증상 및 사망유무에 대해서 관찰하였고, 투여 익일부터 부검 시까지는 매일 1회 이상 일반증상을 관찰하였다. 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후에는 주 1회씩 체중을 측정하였다.

5. 사료섭취량 및 물섭취량

사료섭취량과 물섭취량은 투여 개시일과 투여개시 후 주 1회씩 측정하였다. 사육상자별로 사료와 물을 정량급여한 다음 익일 오전에 잔량을 측정하여 그 차이를 계산하였고, 마리당 평균사료섭취량과 평균물섭취량으로 산출하였다.

6. 요검사

부검 2일전 군당 5 마리를 대사 케이지에 수용하여

3~4 시간 동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1 ml을 취하여 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, USA)와 요자동분석기(CliniTek 100, SIEMENS, USA)를 이용하여 요당(glucose)과 빌리루빈(bilirubin). 케톤체(ketone body), 요비중(specific gravity), 잠혈(occult blood), pH, 요단백(protein), 유로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite) 및 백혈구(leukocyte)를 측정하였다.

7. 부검

투여개시 후 14일째에 모든 생존동물을 에테르로 마취시키고 개복하여 후대정맥에서 채혈을 실시한 후, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈치사 시켰다. 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였으며, 고환과 부고환, 전립선, 비장, 신장, 부신, 간, 흉선, 심장, 폐 및 뇌를 적출하여 습중량을 측정하고, 부검 시 체중에 대 한 상대장기중량(organ-to-body weight ratio, %)을 계산 하였다.

8. 혈액학적 검사

부검 시 채혈한 혈액 중 약 1 ml을 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle (Vacutainer 3 ml, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 이용하여 백혈구수(white blood cell count, WBC)과 적혈구수(red blood cell count, RBC), 호중구(neutrophil, NEU), 림프구(lymphocyte, LYM), 단핵구(monocyte, MON), 호산구(eosinophil, EOS), 호염기구(basophil, BAS), 대형비염색성세포(large unstained cells, LUC), 헤마토크리트(hematocrit, HCT), 헤모글로빈 농도(hemoglobin concentration, HB), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 적혈구 분포대(red cell distribution width, RDW) 및 혈소판수(platelet count, PLT)를 측정하였다.

9. 혈청생화학적 검사

부검 시 채혈한 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 5 ml 용량의 vacutainer tube (IMPROVE, IMPROVE Germany)에 주입하고 15~20분간 상온에 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리(MF300, Hanil, Korea)하였다. 분리된 혈청은 혈액생화학분석기(AU 400, Olympus, Japan)를 이용하여 아스파라진산 아미노전이효소(aspartate aminotransferase, AST)와 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP), 혈중요소질소(blood urea nitrogen, BUN), 크레아티닌(creatinine, CRE), 혈당(glucose, GLU), 총콜레스테롤

Table 1. Clinical signs of male rats treated with 1,4-dichlorobutane for 2 weeks

Dose (mg/kg/day)	Findings	Days after treatment														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	Appears normal	5[a]	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
74	Appears normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0
	Polyuria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5
222	Appears normal	5	5	5	5	0	0	0	0	5	5	5	5	0	0	0
	Polyuria	0	0	0	0	5	5	5	5	0	0	0	0	5	5	5
667	Appears normal	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Polyuria	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2000	Appears normal	5	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hypothermia	0	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Decreased locomotor activity	0	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Staining around mouth	0	5	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
	Piloerection	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
	Prone position	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
	Lacrimation	0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lying on side	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Death	0	0	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[a]A single rat may be represented more than once in the listing individual signs.

(total cholesterol, T-CHO), 총단백질(total protein, TP), 크레아틴 인산효소(creatine phosphokinase, CPK), 알부민(albumin, ALB), 총빌리루빈(total bilirubin, T-BIL), 중성지방(triglyceride, TG), 무기인산(inorganic phosphorus, IP) 및 칼슘(Ca^{2+}) 농도를 측정하였다. 전해질은 전해질분석기(RAPIDCHEM 744 $Na^+/K^+/Cl^-$ Analyzer, SIEMENS, USA)를 이용하여 측정하였다.

10. 통계학적 분석

시험기간 중 측정된 체중과 사료섭취량, 물섭취량, 장기중량, 혈액 및 혈청생화학적 검사결과는 평균과 표준편차로 표기하였으며, 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)으로 분석한 다음 유의차가 인정되면 Dunnett 다중비교법(1964)으로 군간 유의차를 분석하였다. 일반증상과 요검사 결과와 같은 비모수적인 다중비교의 경우에는 Kruskal-Wallis' H-test (1952)를 실시하였으며, 집단 간 차이가 존재하는지를 검정한 후, 군간 유의성이 인정되면 Mann-Whitney U-test로 군간 유의차를 분석하였다. 시험자료에 대한 통계학적 분석은 Path/Tox System (version 4.2.2; Xybion Medical System Co., USA) 및 SAS software (version 9.1; SAS Institute, Inc., USA)를 이용하여 실시하였고, 5% 및 1%에서 유의차를 검정하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 사망동물 및 일반증상

시험기간 중 사망동물과 일반증상을 관찰한 결과는 **Table 1**에 요약하였다. 시험물질의 투여와 관련하여 복와위(prone position)와 횡와위(lying on side), 유루(lacrimation), 입모(piloerection), 자발운동 감소(decrease of locomotor activity), 저체온(hypothermia), 다뇨(polyuria) 및 입주위 염색(staining around mouth) 소견들이 관찰되었다. 상기 소견들은 2000 mg/kg/day 투여군에서 투여개시 후 1일째에 높은 빈도로 관찰되었고, 투여개시 후 2일째에는 2000 mg/kg/day 투여군의 모든 동물에서 사망이 관찰되었다. 74, 222 및 667 mg/kg/day 투여군에서는 시험기간 중 다뇨가 모든 동물에서 관찰되었다.

2. 체중

시험기간 중 시험동물의 체중을 측정한 결과, **Table 2**에 나타낸 바와 같이 대조군과 74 및 222 mg/kg 투여군에서는 모든 동물이 정상적인 체중증가를 나타내었다. 반면, 667 mg/kg 투여군에서는 시험물질 투여개시 후 2일 및 14일째의 체중과 체중증가량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다.

Table 2. Body weight changes in male rats treated with 1,4-dichlorobutane for 2 weeks

Parameters	1,4-Dichlorobutane (mg/kg/day)				
	0	74	222	667	2000
No. of rats	5	5	5	5	5
Body weight (g)					
Day 0	170.9 ± 5.29[a]	168.4 ± 2.61	169.6 ± 4.89	170.0 ± 4.20	162.7 ± 4.90
Day 7	225.3 ± 15.19	224.8 ± 5.41	208.7 ± 18.49	190.8 ± 3.92**	
Day14	260.7 ± 11.98	266.91 ± 5.19	253. ± 8.40	220.8 ± 8.35**	
Body weight gain (g)[b]	89.9 ± 6.77	98.5 ± 5.12	83.7 ± 8.55	50.8 ± 9.728**	

[a] Values are presented as mean ± SD.
[b] Body weight gain = body weight on Day 14 - body weight on Day 0.
** Significant difference at $P < 0.01$ level when compared with the control group.

Table 3. Daily Food consumptionin male rats treated with 1,4-dichlorobutane for 2 weeks

Parameters	1,4-Dichlorobutae (mg/kg/day)				
	0	74	222	667	2000
No. of rats	5	5	5	5	5
Food consumption (g)					
Day 0	20.1 ± 0.86[a]	19.4 ± 0.17	18.0 ± 0.35**	15.1 ± 1.59**	2.1 ± 0.20**
Day 7	20.7 ± 1.48	22.2 ± 1.72	20.7 ± 2.64	16.3 ± 8.45	-
Day 14	21.8 ± 0.34	24.0 ± 0.09	26.8 ± 2.80	22.4 ± 0.72	-

[a] Values are presented as mean ± SD.
** Significant difference at $P<0.01$ level when compared with the control group.

3. 사료섭취량 및 물섭취량

사료섭취량을 측정한 결과, **Table 3**에서 보는 바와 같이 시험물질 투여군에서 투여개시일의 사료섭취 량이 대조군에 비해 용량의존적으로 감소하였다. 222, 667 및 2000 mg/kg/day 투여군에서의 사료섭취량은 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 물섭취량 측정 결과(**Table 4**), 2000 mg/kg/day 투여군에서는 투여개시일의 섭취량이 대조군에 비해

Table 4. Daily water consumptionin male rats treated with 1,4-dichlorobutane for 2 weeks

Parameters	1,4-Dichlorobutae (mg/kg/day)				
	0	74	222	667	2000
No. of rats	5	5	5	5	5
Water consumption (g)					
Day 0	21.4 ± 0.74[a]	24.5 ± 0.09	30.5 ± 7.76	30.3 ± 2.85	2.13 ± 1.16**
Day 7	26.4 ± 1.91	30.5 ± 1.87	27.6 ± 3.51	46.0 ± 4.80**	-
Day14	25.5 ± 0.79	34.1 ± 4.06	37.0 ± 1.53*	64.2 ± 10.13**	-

[a]Values are presented as mean ± SD.
*Significant difference at $P < 0.05$ level when compared with the control group.
**Significant difference at $P < 0.01$ level when compared with the control group.

통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 반면, 667 mg /kg/day 투여군에서는 투여개시 후 7일과 14일째에, 그리고 222 mg/kg/day 투여군에서는 투여개시 후 14일째 물섭취량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다.

4. 요검사

Table 5에서 보는 바와 같이 모든 시험군의 요검사 항목에서 시험물질의 투여에 의한 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

5. 육안적 부검소견

투여개시 후 14일째에 모든 생존동물을 부검하여 육안적 부검소견을 관찰한 결과(자료 미제시), 74 및 222 mg/kg/day 투여군에서 흉선의 발적(redness)이 각각 1례씩 관찰되었다.

6. 혈액학적 검사

혈액학적 검사결과(**Table 6**), 222 mg/kg/day 투여군에서 RDW와 MON 비율이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다. 667 mg/kg/day 투여군에서는 MCHC와 PLT, WBC 및 LYM 비율이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소한 반면, RDW와 NEU 및 MON 비율은 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다.

7. 혈청생화학적 검사

혈청생화학적 검사결과(**Table 7**), 222 mg/kg/day 투

Table 5. Urinalysis findingsin male rats treated with 1,4-dichlorobutane for 2 weeks

Parameters	Grades	1,4-Dichlorobutae (mg/kg/day)			
		0	74	222	667
No. of rats		5	5	5	5
GLU	-	5	5	5	5
BIL	-	5	5	5	4
	±	0	0	0	0
	1+	0	0	0	1
KET	-	4	0	1	0
	±	1	5	4	2
	1+	0	0	0	2
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	1
SG	≤ 1.005	1	0	0	0
	1.010	0	0	0	0
	1.015	0	0	0	0
	1.020	1	0	0	1
	1.025	2	1	2	0
	≥ 1.030	1	4	3	4
pH	6.0	0	0	0	0
	6.5	0	0	0	1
	7.0	0	1	0	0
	7.5	0	1	1	1
	8.0	5	3	4	3
PRO	-	0	0	0	0
	±	1	0	0	1
	1+	0	0	3	1
	2+	4	4	2	3
	3+	0	1	0	0
URO	0.1	5	5	5	5
	1.0	0	0	0	0
NIT	-	5	5	5	5
OB	-	4	5	5	5
	±	1	0	0	0
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
WBC	-	1	0	2	1
	±	1	1	2	4
	1+	3	3	1	0
	2+	0	1	0	0
	3+	0	0	0	0

GLU, glucose; BIL, bilirubin; KET, ketone body; SG, specific gravity;OB, occult blood;PRO, protein;URO, urobilinogen; NIT, nitrite; and WBC, leukocyte.

Table 6. Hematological values in male rats treated with 1,4-dichlorobutane for 2 weeks

Parameters	1,4-Dichlorobutane (mg/kg/day)			
	0	74	222	667
No. of rats	5	5	5	5
RBC ($\times10^{12}$/l)	7.32 ± 0.33[a]	7.28 ± 0.30	7.14 ± 0.27	7.65 ± 0.15
HB (g/dl)	14.08 ± 0.29	14.12 ± 0.84	13.70 ± 0.37	14.06 ± 0.34
HCT (%)	43.74 ± 2.63	43.74 ± 2.63	42.94 ± 1.37	43.86 ± 1.57
MCV (fl)	59.26 ± 1.41	60.06 ± 1.51	60.20 ± 1.66	57.42 ± 2.11
MCH (pg)	19.24 ± 0.44	19.38 ± 0.51	19.20 ± 0.60	18.36 ± 0.50*
MCHC (g/dl)	32.46 ± 0.18	32.24 ± 0.09	31.90 ± 0.69	31.98 ± 0.40
RDW (%)	11.54 ± 0.09	11.82 ± 0.30	12.82 ± 0.65**	12.32 ± 0.41*
PLT ($\times10^{9}$/l)	1436.0 ± 142.36	1316.8 ± 58.48	1477.2 ± 147.43	1159.6 ± 93.29**
WBC ($\times10^{9}$/l)	9.11 ± 1.46	8.55 ± 0.68	8.04 ± 2.67	5.51 ± 1.08**
NEU (%)	8.96 ± 1.78	12.48 ± 5.15	11.94 ± 1.14	18.18 ± 4.83**
LYM (%)	87.50 ± 1.90	82.60 ± 5.79	82.92 ± 1.99	76.14 ± 5.30**
MON (%)	2.20 ± 0.50	3.34 ± 0.86	3.66 ± 0.87*	4.32 ± 0.70**
EOS (%)	0.40 ± 0.14	0.42 ± 0.30	0.50 ± 0.21	0.46 ± 0.26
BAS (%)	0.26 ± 0.15	0.28 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.20 ± 0.07
LUC (%)	0.66 ± 0.11	0.84 ± 0.38	0.88 ± 0.18	0.72 ± 0.13

[a] Values are presented as mean ± SD.
RBC, red blood cells; HB, hemoglobin, HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; PLT, platelet; WBC, white blood cells, NEU, neutrophil; LYM, lymphocyte; MON, monocyte; EOS, eosinophil; BAS, basophil; and LUC, large unstained cells.
*Significant difference at $P < 0.05$ level when compared with the control group.
**Significant difference at $P < 0.01$ level when compared with the control group.

Table 7. Serum biochemical values in male rats treated with 1,4-dichlorobutane for 2 weeks

Parameters	1,4-Dichlorobutane (mg/kg/day)			
	0	74	222	667
No. of rats	5	5	5	5
AST (IU/dl)	83.90 ± 3.66[a]	97.68 ± 16.91	108.14 ± 9.25*	84.84 ± 16.74
ALT (IU/dl)	37.54 ± 2.92	39.30 ± 7.94	46.62 ± 5.45	50.54 ± 8.55*
ALP (mg/dl)	213.08 ± 30.33	214.10 ± 30.38	296.70 ± 54.59	394.12 ± 110.41**
BUN (mg/dl)	17.68 ± 3.31	17.42 ± 4.13	22.62 ± 2.57	14.74 ± 3.51
CRE (mg/dl)	0.50 ± 0.07	0.47 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.45 ± 0.02
GLU (mg/dl)	106.70 ± 7.98	114.16 ± 18.54	113.78 ± 5.42	137.66 ± 33.18
T-CHO (mg/dl)	112.60 ± 11.06	99.20 ± 19.28	94.40 ± 7.80	125.00 ± 13.95
T-BIL (mg/dl)	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.04**
TP (g/dl)	5.96 ± 0.30	5.95 ± 0.15	6.06 ± 0.13	5.97 ± 0.28
ALB (g/dl)	3.13 ± 0.13	3.16 ± 0.06	3.23 ± 0.08	3.16 ± 0.14
CPK (IU/l)	182.40 ± 22.50	216.40 ± 30.36	177.40 ± 24.37	112.80 ± 26.87**
TG (mg/dl)	57.80 ± 9.42	87.40 ± 38.82	219.40 ± 182.37	86.60 ± 45.37
Ca^{2+} (mg/dl)	10.17 ± 0.40	9.93 ± 0.14	9.80 ± 0.23	9.85 ± 0.44
IP (mg/dl)	9.42 ± 0.66	9.35 ± 0.41	9.80 ± 0.50	10.13 ± 1.31
Na^{+} (mmol/l)	143.48 ± 0.73	141.46 ± 0.68	140.26 ± 2.03*	139.10 ± 2.47**
K^{+} (mmol/l)	4.86 ± 0.77	4.93 ± 0.25	4.92 ± 0.20	5.07 ± 0.55
Cl-(mmol/l)	103.14 ± 0.92	102.64 ± 0.42	102.98 ± 1.17	102.62 ± 2.68

[a] Values are presented as mean±SD.
AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CRTN, creatinine; GLU, glucose; T-CHO, total cholesterol; T-BIL, total bilirubin; TP, total protein; ALB, albumin; CPK, creatine phosphokinase; TG, triglyceride; Ca^{2+}, calcium; IP, inorganic phosphate; PL, phospholipid; Na^{+}, sodium; K^{+}, potassium; and Cl^{-}, chloride.
*Significant difference at $P < 0.05$ level when compared with the control group.
**Significant difference at $P < 0.01$ level when compared with the control group.

여군에서 AST 수치가 대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 증가한 반면, Na^{+} 수치는 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다. 667 mg/kg/day 투여군에서는 ALT와 ALP 및 T-BIL 수치가 대조군에 비해 통계 학적으로 유의성 있게 증가하였으며, CPK와 Na^{+} 수치는 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다.

8. 장기중량

투여 후 14일째에 생존동물을 부검하여 주요 장기의 무게를 측정한 결과(**Table 8**), 74 mg/kg/day 투여군에서

Table 8. Absolute and relative organ weights in male rats treated with 1,4-dichlorobutane for 2 weeks

Parameters	1,4-Dichlorobutane (mg/kg/day)			
	0	74	222	667
No. of rats	5	5	5	5
Brain (g)	1.758 ± 0.0427[a]	1.769 ± 0.0355	1.775 ± 0.0348	1.676 ± 0.0352**
per body weight (%)	0.738 ± 0.0285	0.735 ± 0.0269	0.802 ± 0.0404*	0.862 ± 0.0401**
Liver (g)	7.491 ± 0.5420	8.736 ± 0.5778**	9.621 ± 0.6318**	9.330 ± 0.8202**
per body weight (%)	3.141 ± 0.1306	3.630 ± 0.2351*	4.347 ± 0.3422**	4.791 ± 0.3903**
Spleen (g)	0.656 ± 0.0585	0.696 ± 0.0807	0.594 ± 0.0521	0.363 ± 0.0405**
per body weight (%)	0.275 ± 0.0211	0.289 ± 0.0293	0.268 ± 0.0180	0.187 ± 0.0201**
Heart (g)	0.955 ± 0.0708	0.965 ± 0.0553	0.938 ± 0.0238	0.762 ± 0.0540**
per body weight (%)	0.401 ± 0.0204	0.401 ± 0.0172	0.424 ± 0.0100	0.391 ± 0.0253
Thymus (g)	0.533 ± 0.0897	0.594 ± 0.0702	0.544 ± 0.0507	0.305 ± 0.0602**
per body weight (%)	0.223 ± 0.0319	0.247 ± 0.0289	0.246 ± 0.0252	0.156 ± 0.0281**
Lung (g)	1.370 ± 0.0677	1.281 ± 0.0575	1.266 ± 0.1239	1.132 ± 0.1236**
per body weight (%)	0.575 ± 0.0254	0.532 ± 0.0208	0.571 ± 0.0421	0.582 ± 0.0639
Prostate (g)	0.245 ± 0.0585	0.249 ± 0.0454	0.338 ± 0.2479	0.124 ± 0.0138
per body weight (%)	0.102 ± 0.0199	0.104 ± 0.0199	0.152 ± 0.1100	0.064 ± 0.0082
Kidney-left (g)	0.872 ± 0.0497	0.900 ± 0.0193	0.977 ± 0.0610*	0.878 ± 0.0650
per body weight (%)	0.366 ± 0.0143	0.374 ± 0.0069	0.441 ± 0.0211**	0.451 ± 0.0378**
Kidney-right ((g)	0.892 ± 0.0534	0.949 ± 0.0342	0.975 ± 0.0152**	0.893 ± 0.0290
per body weight (%)	0.375 ± 0.0238	0.394 ± 0.0133	0.441 ± 0.0157**	0.459 ± 0.0201**
Adrenal gland-left (g)	0.0210 ± 0.0015	0.0209 ± 0.0015	0.0229 ± 0.0022	0.0274 ± 0.0019**
per body weight (%)	0.0088 ± 0.0005	0.0087 ± 0.0006	0.0104 ± 0.0011*	0.0141 ± 0.0012**
Adrenal gland-right (g)	0.0217 ± 0.0012	0.0221 ± 0.0019	0.0216 ± 0.0020	0.0258 ± 0.0019**
per body weight (%)	0.0091 ± 0.0006	0.0092 ± 0.0008	0.0098 ± 0.0008	0.0132 ± 0.0011**
Testis-left (g)	1.566 ± 0.0692	1.621 ± 0.0846	1.524 ± 0.0951	1.449 ± 0.0418
per body weight (%)	0.658 ± 0.0490	0.674 ± 0.0333	0.688 ± 0.0341	0.745 ± 0.0380**
Testis-right (g)	1.564 ± 0.0251	1.626 ± 0.0822	1.561 ± 0.1354	1.471 ± 0.0376
per body weight (%)	0.657 ± 0.0302	0.676 ± 0.0306	0.704 ± 0.0553	0.756 ± 0.0335**
Epididymis-left (g)	0.261 ± 0.0125	0.266 ± 0.0141	0.263 ± 0.0205	0.212 ± 0.0182**
per body weight (%)	0.110 ± 0.0082	0.111 ± 0.0051	0.119 ± 0.0099	0.109 ± 0.0100
Epididymis-right (g)	0.276 ± 0.0170	0.258 ± 0.0133	0.272 ± 0.0469	0.222 ± 0.0416
per body weight (%)	0.116 ± 0.0076	0.107 ± 0.0068	0.123 ± 0.0207	0.114 ± 0.0205

[a]Values are presented as mean ± SD.
*Significant difference at $P < 0.05$ level when compared with the control group.
**Significant difference at $P < 0.01$ level when compared with the control group.

간의 절대 및 상대중량이 대조군에 비해 각각 통계 학적으로 유의성 있게 증가하였다. 222 mg/kg/day 투여 군에서는 좌측 부신과 뇌의 상대중량, 그리고 간과 좌우측 신장의 절대 및 상대중량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다. 667 mg/kg/day 투여군에서는 뇌와 심장, 폐 및 좌측 부고환의 절대 중량과 비장과 흉선의 절대 및 상대중량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성있게 감소하였으며, 뇌와 좌측 고환의 상대중량과 간과 신장 및 좌우측 부신의 절대 및 상대중량은 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다.

Ⅳ. 고 찰

본 연구는 1,4-DCB의 아급성독성을 조사하기 위해

수컷 랫드에게 0, 74, 222, 667 및 2000 mg/kg/day 용량으로 14일간 반복경구투여한 후 일반증상과 체중, 사료섭취량, 물섭취량, 혈액 및 혈청생화학치, 부검소견 및 장기중량의 변화를 관찰하였다. 시험결과, 1,4-DCB의 2주간 반복경구투여는 일반증상의 증가와 사망, 체중증가의 억제, 사료섭취량의 감소, 혈액 및 혈청생화학적 변화, 그리고 간과 비장 및 흉선의 중량변화를 초래하는 것으로 확인되었다.

시험기간 중 시험물질 투여군에서 관찰된 저체온과 자발운동 감소, 입주위 염색, 입모, 복와위, 유루 및 횡와위 소견은 독성증상이 현저하게 나타난 고용량군에서 관찰된 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것으로 판단된다. 상기 소견들은 투여개시 후 1일째에 높은 빈도로 관찰되었으며, 전신적인 독성증상이 진행되어 투여 2일째에 모두 사망하였다. 667 mg/kg/day 시험군에서 관찰된 다뇨 소견은 용량의존적으로 증가하였고, 물섭취량의 증가와 혈중 Na^+ 농도의 감소와 일치하는 것으로 보아 시험물질의 투여에 의한 독성소견으로 판단된다. 반면, 74 및 222 mg/kg/day 시험군에서 관찰된 다뇨소견은 관련되는 다른 항목의 변화가 동반되지 않아 독성학적 중요성은 없는 것으로 사료된다.

체중 측정 시, 시험물질 투여군에서 관찰된 체중증가의 억제는 일반증상의 증가 및 사료섭취량의 감소와 일치하는 소견으로 시험물질의 투여에 기인된 영향으로 판단된다. 특히, 667 mg/kg/day 투여군에서는 시험기간 동안 지속적으로 체중증가의 억제가 관찰되었다. 화학물질의 일반독성 평가 시, 체중의 변화는 독성영향에 대한 민감한 표지자로서 잘 알려져 있다(Kim 등, 2002; Bailey 등, 2004).

사료섭취량 측정 시, 667 mg/kg/day 투여군에서 투여 1일째에 관찰된 섭취량의 용량의존적인 감소는 체중증가의 억제와 일치하는 소견으로서 1,4-DCB의 투여가 식욕부진(anorexia)을 초래하고, 이로 인해 체중증가의 억제를 유발하는 것으로 판단된다.

물섭취량 측정 시, 2000 mg/kg/day 투여군에서 투여개시일에 관찰된 섭취량의 감소는 시험물질의 투여에 기인된 전신독성에 의해 물섭취량이 감소한 것으로 사료된다. 222 및 667 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 물섭취량의 증가는 명확한 용량의존성을 나타낸 것으로 보아 시험물질의 투여에 의한 소견으로 판단되며, 이로 인해 다뇨와 혈중 Na^+의 감소가 초래된 것으로 판단된다. Androgue와 Madias (2000)의 보고에 따르면 과량의 수분 섭취는 희석성 저나트륨혈증(dilutional hyponatremia)의 원인이 된다고 한다.

혈액학적 검사 시, 667 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 MCHC와 PLT의 감소, 그리고 RDW의 증가는 용량상관성이 인정되지 않았고, 또한 랫드에서 관찰되는 정상범위내의 변화(Kang 등, 2004; Wolford 등, 1986)여서 시험물질의 투여와는 관련이 없는 우발적 소견(incidental findings)으로 판단된다. 반면, 667 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 WBC와 LYM은 대조군에 비해 현저히 감소하였으며, 또한 흉선 및 비장의 중량감소가 동반된 것으로 보아 시험물질의 투여에 의한 소견으로 사료 된다. 상기 시험군에서 관찰된 NEU와 MON 비율의 증 가는 LYM 비율의 감소에 따른 상대적인 결과로 독성학적 중요성은 없는 것으로 판단된다.

혈청생화학 검사 시, 222 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 AST의 증가와 667 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 CPK의 감소는 용량상관성이 인정되지 않았고, 랫드에서 관찰되는 정상범위내의 변화여서 시험물질의 투여와는 관련성이 없는 우발적인 소견으로 사료된다(Kang 등, 2004; Petterino와 Argentino-Storino, 2006). 반면, 667 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 ALT와 ALP 및 T-BIL의 증가는 명확한 용량의존성을 나타내었고, 간 중량의 증가가 동반된 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 독성소견으로 판단된다.

일반독성시험에서 주요 장기의 중량변화는 잠재적 독성물질의 검색에 민감한 표지자로 유용하게 이용되고 있다(Andersen 등, 1999; Bailey 등, 2004). 222 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 뇌의 상대중량 증가와 667 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 뇌 및 좌우측 고환의 상대중량 증가, 그리고 뇌와 심장, 폐 및 좌측 부고환의 절대중량 감소는 용량상관성이 인정되지 않았고, 체중감소에 의한 소견으로 판단되어 시험물질의 투여와는 관련이 없는 것으로 사료된다. 또한, 74 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 간의 절대 및 상대중량 증가와 222 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 간과 좌우측 신장의 절대 및 상대중량과 좌측 부신의 상대중량 증가, 그리고 667 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 좌우측 신장의 상대중량 증가는 중량변화가 현저하지 않았고 혈청생화학적 검사에서도 일치되는 변화가 관찰되지 않아 독성학적인 의의는 없는 변화로 판단된다. 반면, 667 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 부신의 절대 및 상대중량 증가는 일반증상의 증가와 일치하는 소견으로 시험물질의 투여에 의한 독성영향과 스트레스 발현에

의해 나타난 것으로 판단된다. 부신 중량은 다양한 스트레스 인자에 의해 영향을 받는 것으로 증명된 바 있다(Ulrich-Lai 등, 2006). 667 mg/kg/day 투여군 에서 관찰된 간의 절대 및 상대중량 증가는 대조군에 비해 현저하게 증가하였고, 간기능 이상과 관련된 혈청생화학적 수치의 변화를 동반한 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 독성영향으로 사료된다. 상기 시험군에서 관찰된 흉선과 비장의 절대 및 상대중량 감소 역시 대조군에 비해 현저하였고, 혈액검사에서 LYM의 감소가 동반된 것으로 보아 시험물질의 투여에 의한 면역억제 효과로 판단된다. 전구 림프세포들의 성숙과 특이적 면역반응을 수행하는 림프기관인 흉선과 비장의 중량변화는 면역기능 이상을 측정하는 중요한 지표로 잘 알려져 있다(Gehrs 등, 1997).

종합해 보면, 랫드에서 1,4-DCB의 2주 반복경구투여는 667 mg/kg/day 이상의 용량에서 다양한 일반증상, 체중증가의 억제, 혈액 및 혈청생화학 수치의 변화, 간중량의 증가와 비장 및 흉선중량의 감소를 초래하였다. 본 시험조건 하에서 1,4-DCB의 무해용량은 222 mg/kg/day로 산출되었으며, 표적 장기는 간과 비장 및 흉선으로 나타났다. 본 시험결과는 1,4-DCB의 반복경구투여에 의한 아급성독성 정보를 제공함으로써 유해위험성 평가자료로서 활용될 수 있을 뿐만 아니라 산업현장에서의 작업환경 관리를 위한 노출기준 설정에도 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 한국산업안전보건공단으로부터 지원받아 수행된 연구이며, 전남대학교 동물의학연구소의 일부 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

Andersen H, Larsen S, Spliid H, Christensen ND. Multivariate statistical analysis of organ weights in toxicity studies. Toxicology 1999:136:67-77.

Androgue HJ, Madias NE. Hyponatremia. New England Journal of Medicine 2000;342:1581-1589.

Bailey SA, Zidell RH, Perry RW. Relationships between organ weight and body/brain weight in rat: what is the best analytical endpoint? Toxicologic Pathology 2004;32:448-466.

Dunnett CW. New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 1964; 20: 482-491.

Gehrs BC, Riddle MM, Williams WC, Smialowicz RJ. Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: II. Effects on the pup and the adult. Toxicology 1997;122:229-240.

Kang BH, Kim YB, Lee HS, Kim YH, Im WJ, Ha CS. Background data on hematology, blood biochemistry and organ weights for 2 weeks and 4 weeks repeated-dose toxicity studies using Sprague-Dawley (SD) rats. The Korean Journal of Laboratory Animal Science 2004;20:2:134 – 140

Kim JC, Kang BH, Shin CC, Kim YB, Lee HS, Kim CY, Han J, Kim KS, Chung DW, Chung MK. Subchronic toxicity of plant sterol esters administered by gavage to Sprague-Dawley rats. Food and Chemical Toxicology 2002;196:77-86.

Kim SH, Lim JH, Shin IS, Moon C, Park SH, Kim SH, Lee JS, Kwon EH, Kim JC. Evaluation of the toxicological properties and hepatoprotective effects of PAI-N002, a mixture of herbal extracts, in rats. Molecular and Cellular Toxicology 2010;6:239-246.

Korea Occupational Safety and Health Agency (KOSHA). Listing of Preferential Assessment Substances for Hazard Identification Assessment; 2007.

Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion analysis of variance. J Am Stat Assoc 1952;47: 583-621.

Merck Millipore. 1,4-Dichloropropane Material Safety Data Sheet. Available at: http://www.chemdat.merck.de/ sweden/ chemicals/1-4-dichlorobutane/MDA_CHEM-803227 /p_ufub.s1OS_UAAAEnrtkB3YVi. Accessed January 3, 2013.

Petterino C, Argentino-Storino A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. Experimental and Toxicologic Pathology 2006; 57:213-219.

Poirier LA, Stoner GD, Shimkin MB. Bioassay of alkyl halides and nucleotide base analogs by pulmonary tumor response in strain A mice. Cancer Research 1975;35:1411-1415.

Rim KT, Kim SJ, Kim JK, Chung YH, Park SY, Yang JS. In vivo micronucleus test of methylcyclopentane and 1,4-dichlorobutane. Journal of the Korea Society for Environmental Analysis 2011;14:2:89-93.

Sigma-Aldrich. 1,4-Dichlorobutane Material Safety Data Sheet. Available at: http://www.sigmaaldrich.com/ MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language= EN-generic&country=KR&brand=ALDRICH&productNumber=D59100&PageToGoToURL=http%3A

%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2FD59100%3Flang%3Dko. Accessed January 3, 2013.

Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2006;291:E965-E973.

Vinogradov GI. Autosensitizing effect in the per os uptake of chemical substances into the body. Vrach Delo 1979;9:100-102.

Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB, Ruhren R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. Journal of Toxicology and Environmental Health 1986;18:161-188.