

연구보고서

유기용제(1,2-Dichlorobenzene)의 성별간 독성차이 규명 연구

조은상·최혜연·임경택·김용순

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



요 약 문

연구기간

2019년 01월 ~ 2019년 11월

핵심 단어

1,2-Dichlorobenzene, 1,2-DCB, 흡입독성시험, B6C3F1, upper respiratory toxicity, liver toxicity

연구과제명

유기용제(1,2-Dichlorobenzene)의 성별간 독성차이 규명 연구

1. 연구배경

1,2-Dichlorobenzene은 방향성 벤젠화합물로 제초제, 살충제, 왁스 등의 용매로 이용되거나 금속, 가죽류의 탈지 용액 또는 염료의 중간반응물로 이용된다. 알려진 유해·위험성은 피부부식성, 피부자극성, 피부과민성, 특정표적장기독성 등이 있다. 국내에서 다량 유통 및 사용되는 화학 물질이나, 사용량에 비해 독성기전에 대한 연구가 적어 추가적인 자료가 필요하며, 장기 독성에 대해 성별간의 차이가 있을 것으로 예상되어, 연구 결과를 바탕으로 향후 발암성 시험 및 인체유해성 조사를 위한 기초적인 자료를 생산하고자 하였다.

2. 주요 연구내용

- 연구결과

- 1) 알려진 물질 정보 및 선행 독성 시험에 대한 조사를 바탕으로 28일 및 90일 전신 흡입노출을 수행한 F344 랫드 및 B6C3F1 마우스의 생체 시료 분석 결과 일반 독성시험 결과로, 28일 노출

된 암수 랫드에서 간의 이상 소견이 관찰되었고, 암수 마우스의 고농도 군에서 사망 및 빈사개체가 발생하였으며, 수컷 마우스의 간과 암수 마우스의 비강 조직에서 이상 소견이 관찰되었다.

- 2) 90일 노출된 암수 랫드에서 뚜렷한 독성 영향은 관찰되지 않았으나, 수컷 마우스의 간 및 암수 마우스의 비강 조직에서 이상 소견이 관찰되었다.
- 3) 면역조직화학법을 통해 90일간 시험물질에 노출된 마우스에서 대사 관련 효소인 시토크롬 P450 (CYP2E1 및 CYP3A4)의 발현도를 확인한 결과, 간의 경우 고농도 노출 군 및 수컷(암컷 대비) 노출군에서 CYP450 효소가 통계적으로 유의하게 증가했고, 비강의 경우 고농도 노출군 및 암컷(수컷대비)에서 CYP450 효소의 발현도가 미미하게 증가하는 양상을 보였다.
- 5) 세포손상의 결과로서 지질과산화 산물인 MDA 및 HNE가 마우스의 암수 노출군에서 증가하는 경향이 관찰되었으나, ROS/RNS는 증가경향을 보이지 않았다.

- 시 사 점

1,2-Dichlorobenzene을 28일 및 90일간 전신 흡입 노출한 동물(랫드 및 마우스) 시료에서 시험 물질에 의한 간독성 및 비강 독성이 관찰되었고, 각 장기에서 시토크롬 P450의 성별간 발현도 차이 및 지질과산화 산물이 변화함에 따라 시험물질의 초기 대사 산물의 영향에 의한 독성 및 이에 따른 대사 속도 등의 성별 차이가 있음을 시사한다.

3. 연구 활용방안

- 제 언

연구 결과를 통해 화학물질에 의한 독성 기전 연구에 기여하고,

해당 물질 취급 근로자의 건강 유해성 평가 및 노출 농도 제한 설정 등의 기초 자료를 마련할 수 있을 것으로 판단된다.

- 활용

- 연구 결과보고서 배포를 통해 기초 연구에 활용
- 유관학회(한국독성학회 등) 학술대회 발표 예정

4. 연락처

- 산업안전보건연구원 산업화학연구실 병리검사부 조은상
- ☎ 042) 869. 8534
- E-mail escho@kosha.or.kr

차 례

I. 서론	1
1. 연구 배경 및 필요성	1
1) 1,2-Dichlorobenzene의 물질 정보	1
2) 주요 용도 및 사용처	4
3) 국내·외 연간 사용량 등	4
4) 인체 노출 경로 및 노출 기준	5
5) 연구의 필요성	7
2. 연구 목표	9
1) 1,2-Dichlorobenzene의 독성 정보 탐색	9
2) 흡입독성 시험 수행을 통한 독성 평가 및 독성 기전 탐색	9
II. 연구 내용 및 방법	11
1. 연구 체계	11
2. 선행 연구 분석	12
3. 실험 방법	13
1) 시험 물질	13
2) 랫드 및 마우스를 이용한 흡입 독성시험	13
3) 혈액 시료 분석	18
4) 조직병리 검사	20

5) 생체장기 내 특정 단백 검사	23
6) 면역 조직화학 검사(Immunohistochemistry)	27
III. 연구 결과	29
1. 독성 정보 탐색	29
1) 체내 흡수 및 대사 기전	29
2) 동물을 이용한 기존 독성 시험 결과	31
2. 혈액 시료 분석 결과	37
1) 랫드를 이용한 흡입독성시험	37
2) 마우스를 이용한 흡입독성시험	41
3. 일반 조직병리 검사 결과	44
1) 랫드를 이용한 흡입독성시험	44
2) 마우스를 이용한 흡입독성시험	48
4. 특수염색 검사 결과	54
5. 면역 조직화학적 검사 결과	56
6. 조직 내 특정단백질 검출 결과	62
IV. 고찰	65
V. 결론	71
참고문헌	73

Abstract	79
----------------	----

표 차례

<표 1-1> Dichlorobenzene 이성질체의 물질별 상세 정보	2
<표 1-2> Dichlorobenzene 이성질체의 물리화학적 특성	3
<표 1-3> 인체 노출 경로 및 독성 정보	6
<표 1-4> 인체 노출 기준	7
<표 2-1> 시험 물질의 정보	13
<표 2-2> 시험군의 구성 및 노출 농도	14
<표 2-3> 흡입 독성 시험 환경 조건	15
<표 2-4> 독성 시험의 부검 후 보관 조직	17
<표 2-5> 혈액학적 검사의 분석 항목	18
<표 2-6> 혈액생화학적 검사의 분석 항목	19
<표 2-7> 혈액응고능 검사의 분석 항목	20
<표 2-8> 지질과산화물 측정 방법	26
<표 2-9> 이용 항체의 상세 정보	28
<표 3-1> 실험동물을 이용한 1,2-Dichlorobenzene의 만성 및 발암성 독성시험 조사 결과 요약	34
<표 3-2> 1,2-Dichlorobenzene의 기존 유전독성시험 결과 요약	36
<표 3-3> 랫드를 이용한 28일 및 90일 시험의 혈액학 및 혈액응고 분석 결과	38
<표 3-4> 랫드를 이용한 28일 및 90일 시험의 혈액생화학 분석 결과	40
<표 3-5> 마우스를 이용한 90일 시험의 혈액학적 분석 결과	42
<표 3-6> 마우스를 이용한 90일 시험의 혈액생화학 분석 결과	43
<표 3-7> 랫드를 이용한 28일 및 90일 시험의 군별 체중 및 장기(간) 중량 변화	45
<표 3-8> 마우스를 이용한 28일 및 90일 시험의 군별 체중 변화	49
<표 3-9> 마우스를 이용한 90일 시험의 군별 조직병리학적 주요 소견	51

그림 차례

[그림 2-1] 연구과정 모식도	11
[그림 2-2] 흡입시험의 발생 및 노출 모식도	16
[그림 2-3] 조직병리검사 슬라이드의 일반 염색과정 작업 모식도	21
[그림 2-4] 조직병리검사 슬라이드의 특수 염색과정 작업 모식도	22
[그림 2-5] Bicinchoninic acid을 이용한 단백질 정량법의 모식도	23
[그림 2-6] <i>In vitro</i> ROS/RNS assay의 모식도	24
[그림 2-7] 대사 산물로서 MDA 및 HNE의 생성 모식도	25
[그림 3-1] 1,2-Dichlorobenzene의 대사기전 모식도	30
[그림 3-2] 1,2-Dichlorobenzene에 의한 랫드 간 및 비강의 현미경적 소견	47
[그림 3-3] 1,2-Dichlorobenzene에 의한 마우스 간 및 비강의 현미경적 소견	52
[그림 3-4] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스 간의 일반 염 색(H&E) 결과	53
[그림 3-5] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스 간의 특수염 색(Masson' s trichrome staining) 결과	55
[그림 3-6] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스 간의 CYP2E1 발현	57
[그림 3-7] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스 간의 CYP3A4 발현	58
[그림 3-8] 1,2-Dichlorobenzene에 흡입 노출된 마우스 간에서 CYP450 성별 간 발현 차이	59
[그림 3-9] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스 비강의	

CYP2E1 발현	60
[그림 3-10] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스 비강의 CYP3A4 발현	61
[그림 3-11] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출한 마우스 간의 지질과 산화 관련 지표 변화	63

I. 서론

1. 연구 배경 및 필요성

1) 1,2-Dichlorobenzene의 물질 정보

1,2-Dichlorobenzene(CAS No. 95-50-1, UN No. 1591, EU No. 202-425-9, KE No. KE-10066)은 화학적 특성에 따라 ortho-dichlorobenzene (o-dichlorobenzene) 또는 o-DCB로 불리기도 하며, 국문으로는 오르토-디클로로벤젠으로 기재된다.

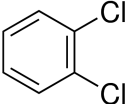
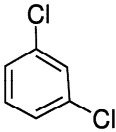
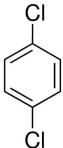
1,2-Dichlorobenzene은 할로젠화 방향족 화합물인 디클로로벤젠(Dichlorobenzene) 이성질체의 하나로 그 밖의 이성질체로 1,3-dichlorobenzene (meta-dichlorobenzene) 및 1,4-dichlorobenzene (para-dichlorobenzene)이 존재한다. 디클로로벤젠은 적당한 온도와 대기압에서 촉매제가 있는 상태에서 액체 벤젠과 염소 가스의 반응에 의해 이소메릭 혼합물로 생성되는데, 반응 조건 및 촉매를 변경함으로써 각 이성질체의 비율을 변화시킬 수 있다. 각 이성질체의 특성 및 물리화학적 성상은 <표 1-1> 및 <표 1-2>에 나타내었다.

이중 1,2-Dichlorobenzene은 무색의 방향성 액체로 제초제, 살충제의 기본화합물이나 왁스, 레진, 타르, 고무, 오일 등의 솔벤트로 주로 사용되며, 금속, 가죽 등의 탈지 용액 또는 페인트 등에도 이용된다. 물질안전보건자료에 기재되는 유해·위험성에 대한 주요 사항으로 피부부식성/피부자극성(구분2), 피부과민성(구분1), 특정표적장기독성(구분3:호흡기계), 급성 수생환경 유해성(구분1), 만성 수생환경 유해성(구분2) 등이 알려져 있다 (안전보건공단, 2019).

국내 규제사항에 따라 1,2-Dichlorobenzene은 산업안전보건법 상 관리대상 유해물질, 작업환경측정대상인자(6개월), 특수건강진단대상유해인자(12개월), 및

영업비밀인정제외물질로 지정되어 있고, 화학물질관리법 상 기존화학물질에 속하며, 위험물안전관리법에 의해 4류 제2석유류(비수용성)으로 분류되어 지정수량은 1000L로 관리되고 있다 (안전보건공단, 2019).

<표 1-1> Dichlorobenzene 이성질체의 물질별 상세 정보

화학 물질	1,2-Dichlorobenzene	1,3-Dichlorobenzene	1,4-Dichlorobenzene
유사명	o-Dichlorobenzene; 1,2-DCB; o-Chlorophenyl chloride; PDB; o-Dichlorobenzol	m-Dichlorobenzene; 1,3-DCB; m-Phenylene dichloride; m-DCB; m-Dichlorobenzol	p-Dichlorobenzene; 1,4-DCB; p-Phenylene dichloride; p-DCB; p-Dichlorobenzol
화학적 구조			
구조식	$C_6H_4Cl_2$	$C_6H_4Cl_2$	$C_6H_4Cl_2$
CAS 번호	95-50-1	541-73-1	106-46-7

(자료: HSDB, 2005; EPA, 2004)

<표 1-2> Dichlorobenzene 이성질체의 물리화학적 특성

화학 물질	1,2-Dichlorobenzene	1,3-Dichlorobenzene	1,4-Dichlorobenzene
분자량	147.00	147.00	147.00
색상	무색	무색	흰색
상태	액상	액상	고상
녹는점	-16.7 °C	-24.8 °C	52.7 °C
끓는점	180 °C	173 °C	174 °C
밀도	1.3059 g/mL	1.2884 g/mL	1.2475 g/mL
취기 한 계	물 : 0.01 mg/L 공기 : 50 ppm	물 : - 공기 : 0.02 ppm	물 : 0.003 mg/L 공기 : 15-30 ppm
용해도 (물)	145 mg/L	123 mg/L	79 mg/L
발화점	73.9 °C	-	73.9 °C
변환계 수	1 mg/m ³ = 0.166 ppm 1 ppm = 6.01 mg/m ³	1 mg/m ³ = 0.166 ppm 1 ppm = 6.01 mg/m ³	1 mg/m ³ = 0.166 ppm 1 ppm = 6.01 mg/m ³

(자료: HSDB, 2005; EPA, 2004)

2) 주요 용도 및 사용처

1,2-Dichlorobenzene은 다양한 산업 분야에서 용매로서 이용된다고 알려져 있다. 1,2-Dichlorobenzene은 제초제 및 염료 생산에 이용되는 3,4-dichloroaniline의 생산에 주로 이용되며, 기타 제초제의 기본 재료; 왁스, 검, 레진, 타르, 고무, 오일 및 아스팔트용 용제; 살충제; 금속, 가죽, 종이, 드라이클리닝, 벽돌, 커버, 모직물용 그리스 제거제; 모터 오일 첨가제; 페인트 첨가제 등으로 이용된다. (EPA, 2004)

국내 생산 및 이용 용도로는 금속, 가죽, 모직, 종이, 벽돌, 청소제, 드라이클리닝 등에 이용; 금속 광택제 및 소화기; 훈증제, 살충제, 가축 방목장 및 토양; 표면 물질 제거를 위한 용매, 왁스, 검, 수지, 타르, 고무, 기름, 아스팔트와 비철금속의 산화물로 이용; 납 및 탄소 퇴적물의 제거; 엔진 청소용 세척제; 녹 방지 및 나무보존용 화합물; 자석코일 냉각액의 일부; 3,4-dichloroaniline 등의 유기물이나 제초제 합성의 중간산물; 염색제 등이 알려져 있다 (원정일, 2005).

3) 국내·외 연간 사용량 등

(1) 국내 생산·사용량

국내의 경우 1,2-Dichlorobenzene을 직접 생산하는 업체는 없는 것으로 보고되고 있다. 주로 일본, 독일 등에서 수입하여 사용하는 있으며, 2005년 발간된 연구보고서 기준, 유통사업장은 10개소 및 유통 현황은 125.3톤으로 보고되었다. (원정일, 2005) 2014년 화학물질유통량조사에 따르면 연간 유통량(제조 및 수입량에서 수출량 제외)은 약 516톤으로 조사되었다.

(2) 국외 생산·사용량

해외의 경우 2005년 조사 기준으로 미국에서의 생산량은 1975년 24,700톤에

서 1993년 15,800톤으로 감소된 것으로 나타났으며(EPA, 2004), 유럽내 화학물질 관리제도인 REACH(Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)에 따라 연간 10,000-100,000톤 이상 제조/유통되는 화학물로 지정되어 관리되고 있다. (ECHA, 2019)

4) 인체노출 경로 및 노출 기준

(1) 인체 노출 경로

주요 인체 노출 경로로 흡입, 피부 및 안구 등이 알려져 있으며, 혼동하여 경구 섭취하는 경우도 보고되었다. 그러나 근로자 등 인체 노출의 경우 대부분 단독 화합물질 형태가 아닌 벤젠 등의 유기용매와의 혼합 물질에 의한 노출의 경우가 많았고, 주로 안구, 피부 및 호흡기도 자극 및 중추신경계 기능 저하를 유도하는 것으로 알려져 있다 (EPA, 2004). 기타 알려진 인체노출 주요 증상은 <표 1-3>에 나타내었다.

<표 1-3> 인체 노출 경로 및 독성 정보

노출 경로	주요 증상
흡입 노출	- 일반 증상 : 호흡기관의 염증, 간 및 신장 손상, 졸음, 무의식 및 중추신경계 기능저하 등 유발 가능 (화학물질안전원, 2019) - 평균 15 ppm 노출된 남성 근로자에서 눈, 코 자극 및 혈액학적 변화는 관찰되지 않음 (Hollingsworth et al., 1958) - 100 ppm 노출된 근로자에서 안구 및 호흡기 자극 보고됨(Elkins, 1950) - 트리클로로에틸렌 및 유기화합물에 노출된 약 14,500 명의 남녀 근로자 대상의 코호트 연구에서 1,2-Dichlorobenzene과 다발성골수종 및 비호지킨성림프종이 연관된 것으로 추정됨 (Spirtas et al., 1991) - 염소화벤젠화합물(Dichlorobenzenes)에 노출되어 5건의 혈액장애(만성림프구성백혈병, 급성골수아세포성백혈병, 골수증식증후군) 보고 (IARC, 1982) - Dichlorobenzene 이성질체에 장기간 노출된 근로자에서 만성림프구성백혈병과 연관성 보고 (IARC, 1982)
피부 노출	- 일반 증상 : 피부의 작열통, 가려움, 홍반을 동반한 자극 유발하며, 직접적인 접촉 또는 시간 경과 후 중증도 염증 유발 가능 (화학물질안전원, 2019) - 반복 노출은 홍반, 부어오름, 수포 등의 접촉성 피부염을 유발 가능 (OECD, 2001) - 사람 피부에 15~60분 동안 적용할 경우 자극이 나타날 수 있으며, 접촉 후 피부염이 발생한 실험자의 추적 patch test 결과 피부과민성 보고 (OECD, 2001)
안구 노출	- 일반 증상 : 접촉에 의해 자극, 눈물, 작열통 유발 및 증기에 의해 안자극 유발 (화학물질안전원, 2019)
경구 노출	- 일반 증상 : 섭취 시 중추신경계의 기능 저하, 신장의 손상, 간의 손상을 일으킬 수 있음 (화학물질안전원, 2019)

(2) 노출 기준

국내 및 국외의 대다수 기관에서 25 ppm로 시간가중평균노출기준(Time weighted average, TWA)이 고시되어 있으며, 단시간노출기준(Short term exposure limit, STEL) 및 최고노출농도(Ceiling limits, CEIL)은 50 ppm으로 알려져 있다. 주요 기관 별 노출기준은 <표 1-4>으로 나타내었다.

<표 1-4> 인체 노출 기준

기관(기준)	노출 기준
국내 고용노동부 고시 (제2016-41)	25 ppm TWA 50 ppm STEL
ACGIH (TLV)	25 ppm TWA 50 ppm STEL
NIOSH (REL)	50 ppm CEIL
OSHA(PEL)	50 ppm CEIL

5) 연구의 필요성

1,2-Dichlorobenzene은 유통량, 노출 근로자 수, 산안법 관련, 노출기준 및 직업병 발생 여부 등을 고려, 화학물질 유해성시험 평가 운영위원회의 시험물질 선정 회의 결과에 의해 흡입독성 연구센터의 2018년 발암성 흡입독성시험 물질로 지정되어 있다. 그러나 인체발암성 물질 유발물질로 지정된 1,4-dichlorobenzene 등 이성질체에 비해 알려진 독성이 적고, 제조 및 사용량

에 비해 독성기전에 대한 연구가 적어, 추가적인 자료가 필요한 실정이다. 또한 이성질체인 1,4-dichlorobenzene은 내분비 장애물질로 부신피질기능이상을 유발하는 것으로 알려져 있으며(SC, 2002), dichlorobenzene 류에 대해 랫드 및 마우스의 간세포를 이용한 *in vitro* 효소대사 실험 결과 성별간 대사 속도의 차이가 있는 것으로 보고되어 있다 (NICNAS, 2001).

이에 따라 발암성 시험을 위한 동물의 아급성 및 아만성 흡입독성시험의 분석 결과 종별/성별 차이가 있을 것으로 예상되며, 연구 결과를 바탕으로 향후 발암성 시험 및 인체유해성 조사를 위한 기초적인 자료를 생산하여 해당 화학물질을 사용 및 유통하는 작업장 및 남성/여성 근로자를 위한 독성 관련 추가 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 연구 목표

1) 1,2-Dichlorobenzene의 독성 정보 탐색

문헌 조사를 기반으로 하여 동물 및 세포를 대상으로 기존의 경구, 경피, 흡입 독성 시험 결과 등을 탐색하여 주요 영향 장기를 알아보고, 최신 연구결과의 추가적 조사 및 물질의 생체 유입 이후의 대사 과정 및 대사 산물을 검토하여 관련된 기전의 독성 연관성을 조사한다.

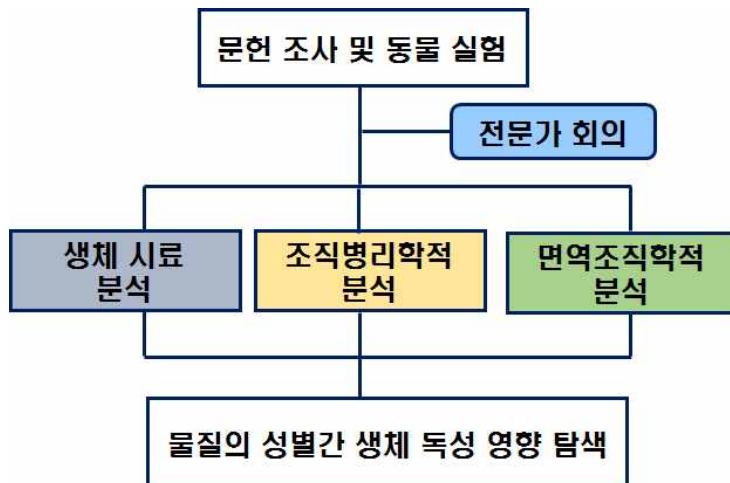
2) 흡입독성시험 수행을 통한 독성 평가 및 독성 기전 탐색

실험동물(마우스)을 이용한 1,2-Dichlorobenzene의 아만성 (90일) 전신 흡입 노출 시험을 통해 생산된 시험 동물의 생체 내 지표 변화를 알아보고 조직병리학적 검사 및 생체 표본의 실험실적 분석을 통해 성별 간 일반 독성 및 대사 산물과 효소 등의 특이 단백질의 발현 위치 및 정도 차이 여부를 조사한다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 연구 체계

본 연구는 랫드 및 마우스를 이용해 1,2-Dichlorobenzene에 의한 신체 영향 및 장기 독성 매커니즘을 탐색하고자 하였다. 연구과정의 모식도는 [그림 2-1]과 같다.



[그림 2-1] 연구과정 모식도

2. 선행 연구 분석

화학물질에 의한 생체 내 독성 기전 및 성별간 대사 정도 차이를 알아보기 위해 문헌 조사를 통해 실험 동물을 이용하여 연구하거나 시험 물질 대사 산물을 실험 동물의 장기 또는 세포 등에 주입하여 기전 반응을 조사한 보고서 또는 논문을 탐색했다.

1,2-Dichlorobenzene은 인체노출 사례가 거의 없기 때문에, 동물을 이용한 기존 독성시험을 위주로 문헌을 조사하였다. 주로 랫드, 마우스 및 토끼를 이용해 실시되는 반수치사용량 또는 반수치사농도를 조사하는 급성 독성 시험 또는 표피나 점막의 자극 용량/농도를 알아보는 피부/안구자극 시험의 사례를 조사하였다. 또한 시험 물질에 의한 전신적·국소적 독성 반응을 알아보기 위해 실시하여 부검 이후 혈액 분석, 조직 장기 분석을 통해 생체 내 변화나 병변 등을 탐색하는 아급성 (14일 또는 28일) 또는 아만성 (90일) 시험의 사례를 조사하였다. 추가적으로 실험동물의 전 생애(보편적으로 마우스는 18개월, 랫드는 24개월) 동안 물질에 노출하여 암 여부 등의 생체 독성 변화를 알아보는 만성/발암성 시험의 사례를 조사하였다. 기타 시험으로 유전체의 변이/변화 또는 공유결합을 탐색할수 있는 유전독성 시험들에 대해 조사하여 최신의 결과까지 탐색하였다.

또한 1,2-Dichlorobenzene의 대사는 시토크롬P450에 의한 촉매적 산화반응에 의해 중간에폭시드(Intermediate epoxide)를 형성하는 것으로 시작되어, 세포단백질과 결합 또는 가수분해 되어 다양한 2차적 대사 산물을 생산하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 대사과정 중의 종차 또는 성별차에 대해 추가적으로 알려진 내용이 거의 없어, 이를 중점으로 최종 대사 산물 또는 대사 속도 등의 차이에 대해 탐색하였다.

3. 실험 방법

1) 시험 물질

동물 시험을 위해 사용된 1,2-Dichlorobenzene의 정보는 <표 2-1>에 표시하였다.

<표 2-1> 시험 물질의 정보

시험물질 (1,2-Dichlorobenzene)	
생산	SAMCHUN Pure chemical Co., LTD
Lot No.	010917, 152016,
순도	99.85%, 99.84%
조건	실온 보관

2) 랫드 및 마우스를 이용한 흡입독성시험

(1) 시험계 및 실험군 구성

랫드 및 마우스 모두 SLC사 (Japan SLC, Sizuoka, Japan)에서 생산된 특정 병원체부제(SPF, Specific pathogen free) 동물을 중앙실험동물 (Central Lab. Animal Inc., Seoul, Korea)을 통해 구매하였다. 랫드의 경우 Fisher344/NSlc 랫드를 구입하여 사용하였고, 검역 및 순화기간 동안에는 3마리 이하로 폴리설 폰케이지 (W310 x L500 x H200 mm)에서 사육하고 노출기간에는 1마리씩 6연식 철망케이지 (W240 x L1200 x H200 mm)에 수용하여 사육했다. 사료는 감

마선이 조사된 실험동물용 고형사료 (Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, ENVIGO RMS Inc., U.S.A.)를 자유 급여하였으며, 물은 미세여과기와 자외선 유수살균장치를 통과한 상수도수를 자유급수했다. 마우스의 경우 B6C3F1/Slc 마우스를 실험에 이용하였고, 검역 및 순화기간 동안에는 3마리 이하로 폴리선폰케이지 (W145 x L290 x H140 mm)에서 사육하고 노출기간에는 1마리씩 2열 12연식 철망케이지 (W220 × L600 × H150 mm)에서 사육했다. 사료 및 음수는 랫드와 동일하게 공급하였으며, 노출 농도 및 군 구성은 <표 2-2>에 표시하였다.

<표 2-2> 시험군의 구성 및 노출 농도

시험종류	시험계	군	농도 (ppm)	성별	동물수
아급성 (28일)	F344 (랫드)	Control	0	M/F	5/5
		T1	50	M/F	5/5
		T2	150	M/F	5/5
		T3	450	M/F	5/5
	B6C3F1 (마우스)	Control	0	M/F	5/5
		T1	50	M/F	5/5
		T2	150	M/F	5/5
		T3	450	M/F	5/5
아만성 (90일)	F344 (랫드)	Control	0	M/F	10/10
		T1	30	M/F	10/10
		T2	100	M/F	10/10
		T3	300	M/F	10/10
	B6C3F1 (마우스)	Control	0	M/F	10/10
		T1	30	M/F	10/10
		T2	60	M/F	10/10
		T3	120	M/F	10/10

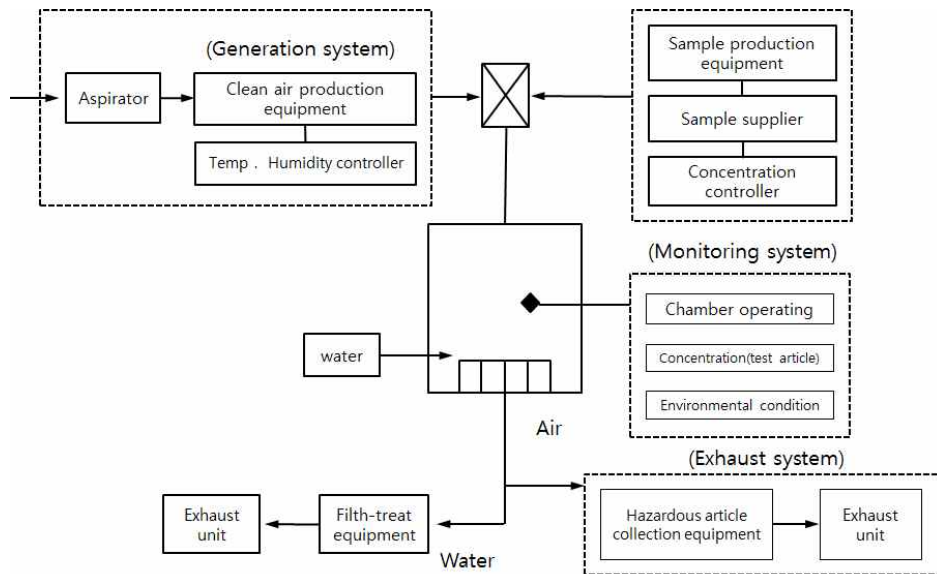
(2) 노출 방법

시험물질을 일정한 온도로 설정된 항온수조와 연결된 가스발생기 (Liquid Vapor Generator, LVG-04-A, HCT CO., Korea)에 넣은 후 청정공기를 주입하여 시험물질을 기화시키고, 시험물질은 청정공기를 혼합하여 설정된 농도로 흡입 챔버 내에 공급되었다. 노출은 6시간/일로 28일 또는 90일간 실시하였다. 챔버 내 환경 조건은 <표 2-3>에 나타내었다.

<표 2-3> 흡입 독성 시험 환경 조건

항목	범위
온도 (°C)	22 ± 3
상대습도 (%)	50 ± 20
차압 (Pascal)	-40 이하
환기횟수 (횟수/시간)	10 ~ 15
산소 농도 (%)	19 이상

시험 물질의 분석은 챔버 내 호흡기 근처에 연결된 샘플링장치를 통해 가스 크로마토그래피(Gas chromatography, TRACE1310, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 시간당 1회 이상 측정 하였고, 대조군은 노출군과 동일한 환경을 유지하며 시험물질이 포함되지 않은 청정공기만을 공급했다. 시험물질의 노출 및 분석 과정의 모식도는 [그림 2-2]에 나타냈다.



[그림 2-2] 흡입시험의 발생 및 노출 모식도

(3) 부검 및 시료 채취

관찰기간 종료 후 동물은 부검 전 랫드는 16시간 이상, 마우스는 4시간 이상 절식시키고 대신 음용수는 자유급수 했다. 체중 측정 후, 동물은 이소플로란(isoflurane)으로 흡입 마취하여 복대동맥(랫드) 또는 후대정맥(마우스) 으로부터 전혈을 채취해 시료로 이용했다. 부검 시 이상소견이 관찰된 장기와 지정된 장기<표 2-4>에 대해 무게를 잰 후 조직고정을 실시하였고, 추가 연구를 위한 간 조직(90일 마우스 흡입독성시험)을 절제해 냉동보관 하였다.

<표 2-4> 독성 시험의 부검 후 보관 조직

고정 조직 (90일, 마우스 기준)	
Abnormal lesions(육안적 병변)	Pancreas(췌장)
Adrenals(부신)*	Parathyroids(부갑상선)
Animal ID(개체번호)	Pituitary(뇌하수체)
Aorta(대동맥)	Prostate(전립선)
Bone marrow(골수)	Rectum(직장)
Brain(뇌)*	Salivary glands, submandibular(악하선)
Cecum(맹장)	Salivary glands, sublingual(설하선)
Colon(결장)	Salivary glands, parotid(이하선)
Duodenum(십이지장)	Sciatic nerve(좌골신경)
Epididymides(부고환)*	Seminal vesicles(정낭)
Esophagus(식도)	Skeletal muscle(골격근)
Eyes(안구)	Skin(피부)
Femur(대퇴골)	Spinal cords(척수)
Harderian glands(하더선)	Spleen(비장)*
Heart(심장)*	Sternum(흉골)
Ileum(회장)	Stifle joint(슬관절)
Jejunum(공장)	Stomach(위)
Kidneys(신장)*	Teeth(치아)
Larynx(후두)	Testes(고환)*
Liver(간)/Gall bladder(담낭)*	Thymus(흉선)*
Lung(폐)*	Thyroids(갑상선)
Lymph node, tracheobronchial(기관기관지림프절)	Tongue(혀)
Lymph node, mesenteric(장간막림프절)	Trachea(기관)
Mammary gland(유선)	Urinary bladder(방광)
Nasal cavity(비강)	Uterus(자궁)*
Optic nerves(시신경)	Vagina(질)
Ovaries(난소)*	

* 무게 측정 장기

3) 혈액 시료 분석

(1) 시료 준비

채취한 혈액을 혈액학적 검사를 위해 적정량을 EDTA-2K 또는 3.2% sodium citrate가 포함된 응고 방지용 혈액 튜브에 넣어 각 항목을 검사하였다. 또한 일정량을 항응고제가 없는 혈액 튜브 (SST tube)에 넣고, 실온에서 30분 이상 방치시킨 후 원심분리 (약 3,000 rpm, 10분)하여 혈청을 분리했다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -80°C 의 냉동고에 밀봉하여 보관하였다.

(2) 혈액학적 검사

혈액 내 적혈구 및 백혈구 관련 검사 지표들을 분석하기 위해 혈액생화학분석기(ADVIA2120i hematology analyzer (Siemens, Germany)를 이용해 실시하였다. 분석한 항목은 <표 2-5>에 표시하였다.

<표 2-5> 혈액학적 검사의 분석 항목

Hematology Parameters	
백혈구수(Total leukocyte count, WBC)	적혈구수(Erythrocyte count, RBC)
망상적혈구(Reticulocyte count, RET)	혈색소량(Hemoglobin, HGB)
백혈구감별수(WBC differential count)	헤마토크리트치(Hematocrit, HCT)
혈소판수(Platelet count, PLT)	
평균적혈구용적(Mean corpuscular volume, MCV)	
평균적혈구헤모글로빈량(Mean corpuscular hemoglobin, MCH)a	
평균적혈구헤모글로빈농도(Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	

(3) 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 분리된 혈청으로 혈액생화학분석기 (Toshiba 120FR Neo Chemistry analyzer, Toshiba Co., Japan)를 이용해 <표 2-6>의 항목에 대해 진행하였다.

<표 2-6> 혈액생화학적 검사의 분석 항목

Clinical Chemistry Parameters	
혈당(Glucose, GLU)	총빌리루빈(Total bilirubin, TBIL)
혈액요소질소(Blood urea nitrogen, BUN)	칼륨(Potassium, K)
총단백(Total protein, TP)	칼슘Calcium, Ca)
알부민(Albumin, ALB)	염소(Chloride, Cl)
크레아티닌(Creatinine, CREA)	무기인(Inorganic phosphorus, IP)
총콜레스테롤(Total cholesterol, TCHO)	나트륨Sodium, Na)
트리글리세라이드(Triglyceride, TG)	
알부민/글로불린 비율(Albumin/globulin ratio, A/G ratio)	
아스파테이트 아미노기전이효소(Aspartate aminotransferase, AST)	
알라닌 아미노기전이효소(Alanine aminotransferase, ALT)	
알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP)	

(4) 혈액 응고능 검사

혈액 응고능 검사는 혈액 양에 따라 랫드에서만 실시하였으며, 혈액응고능분석기 (ELITE coagulation analyzer, Instrumentation Laboratory, USA)를 이용하였다. 분석한 항목은 <표 2-7>에 표시하였다.

<표 2-7> 혈액응고능 검사의 분석 항목

Coagulation Parameters
프로트롬빈시간(Prothrombin time, PT)
부분활성트롬보플라스틴시간(Activated partial thromboplastin time, APTT)

(5) 데이터의 분석

혈액 시료에서 수집된 데이터는 군간 평균 (mean)과 표준편차 (Standard deviation, SD)로 표시했으며, 통계분석은 Bartlett test 및 Levene 검정을 이용하여 등분산 검정을 실시한 후 등분산된 데이터는 일원배치분산분석 (ANOVA)으로 처리하고, 군간 차이는 Dunnett's test로 분석하였다. 등분산을 이루지 않는 데이터는 Kruskal-Willis test로 검정하고, 유의성이 있는 경우의 군간 차이는 Dunn's Rank Sum test를 이용해 분석하였다.

4) 조직병리검사

(1) 조직의 삭정 (Trimming) 및 포매 (Embedding)

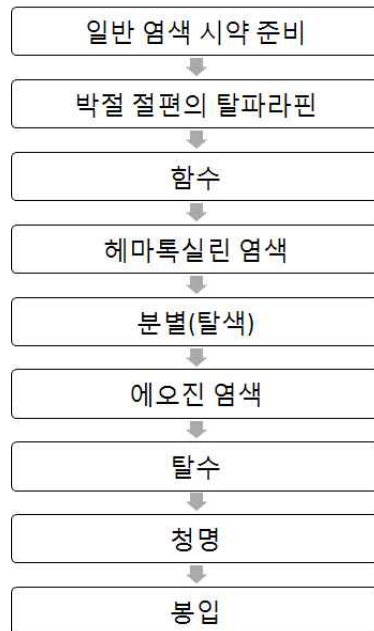
조직의 고정은 10% 중성포르말린 용액 또는 Davison's 고정액을 이용했으며, 고정된 조직은 흡입독성연구센터의 표준작업지침 (SOP, Standard operating procedure)에 따라 삭정해 카세트에 넣고 흐르는 물로 6시간 이상 수세하여 고정액을 제거했다. 조직전처리기 (Tissue processor, Leica, Germany)를 이용해 파라핀 블록을 만들기 위해 탈수 (Dehydration) - 청명 (Clearing) - 침투 (Paraffin infiltration) 과정을 거쳐 포매기 (Tissue embedding center, Leica, Germany)에서 적당한 크기의 몰드를 이용해 블록으로 만들었다.

(2) 파라핀 블록의 박절

미세박절기 (Tissue microtome, Leica, Germany)를 이용해 3 ~4 μm 의 두께로 파라핀블록을 얇게 잘라낸 후 박절된 파라핀 조각은 항온수조에 띄운 후 유리슬라이드에 올려 건조시켰다.

(3) 조직슬라이드의 염색 (일반염색)

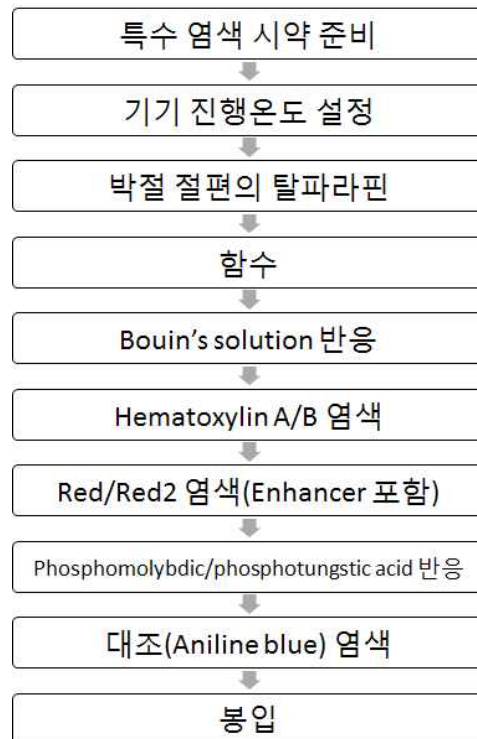
자동염색봉입기 (Automatic stainer, DAKO, Denmark)를 이용하였으며 사용된 시약(Hematoxylin, Eosin 및 봉입제)은 자동염색봉입기 전용으로 시판되는 시약을 사용하였다 (Dako hematoxylin, CS700; Dako Eosin, CS701; Dako mounting medium, CS703; DAKO, Denmark). 현미경 검경을 위한 염색 슬라이드의 제작은 다음과 같은 절차로 진행했다.[그림 2-3]



[그림 2-3] 조직병리검사 슬라이드의 일반 염색과정 작업 모식도

(4) 조직슬라이드의 염색 (특수염색)

특수염색기 (Ventana BenchMark Special Stains, Roche, USA)를 이용하였으며 사용된 시약(특수염색 키트 및 봉입제)은 특수염색 및 자동염색봉입기 전용으로 시판되는 시약을 사용하였다 (Trichrome staining kit, 860-031, Roche, USA; Dako mounting medium, CS703, DAKO, Denmark). 현미경적 분석을 위한 염색 슬라이드의 제작은 다음과 같은 절차로 진행했다.[그림 2-4]

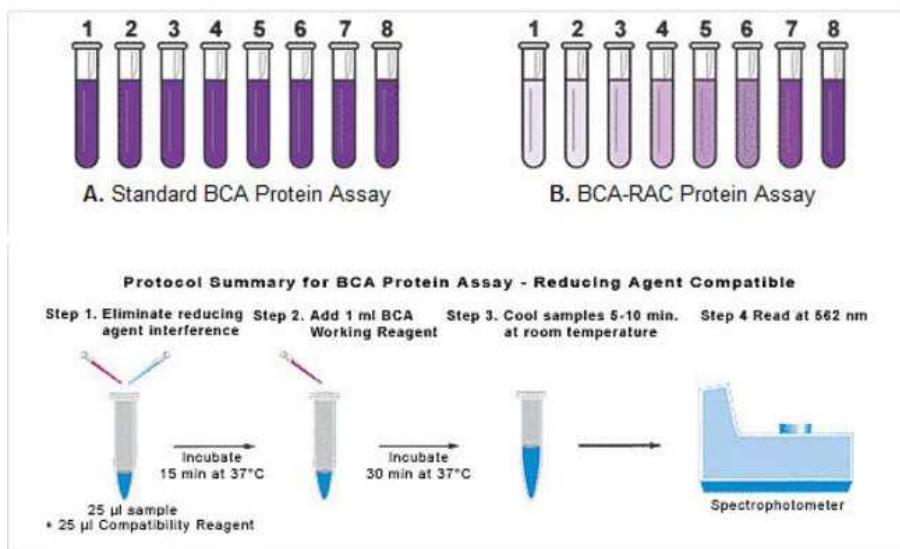


[그림 2-4] 조직병리검사 슬라이드의 특수 염색과정 작업 모식도

5) 생체장기 내 특정 단백 검사

(1) 생체 시료의 준비

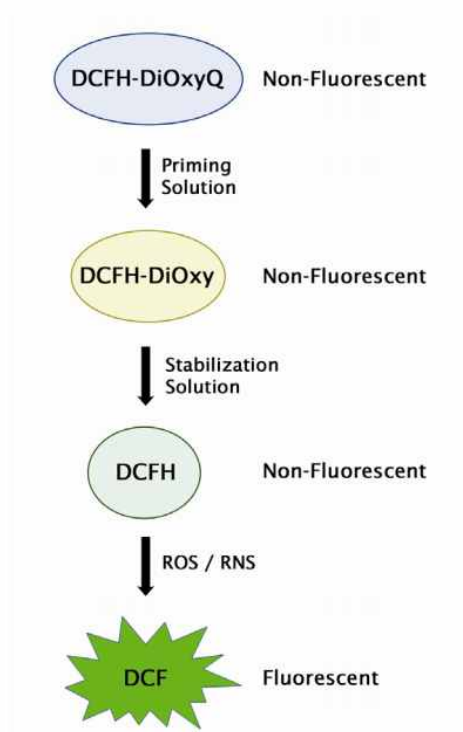
연구에 사용하기 위하여 90일 흡입독성시험을 실시한 암/수 마우스의 간조직을 일부 절제해 (약 0.1~0.2g) 냉동보관(-80℃) 하여 준비하였다. 냉동된 각 간조직 샘플을 적당량 채취해 lysates 버퍼를 이용해 homogenate를 준비한 후, 각 샘플들의 단백질량을 일정하게 맞추기 위해 BCA assay kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, #23227, Thermo Fisher Scientific, IL, USA)를 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 키트의 작용 원리 및 간단한 실험 모식도를 [그림 2-5]에 나타내었다.



[그림 2-5] Bicinchoninic acid을 이용한 단백질 정량법의 모식도

(2) ROS/RNS assay

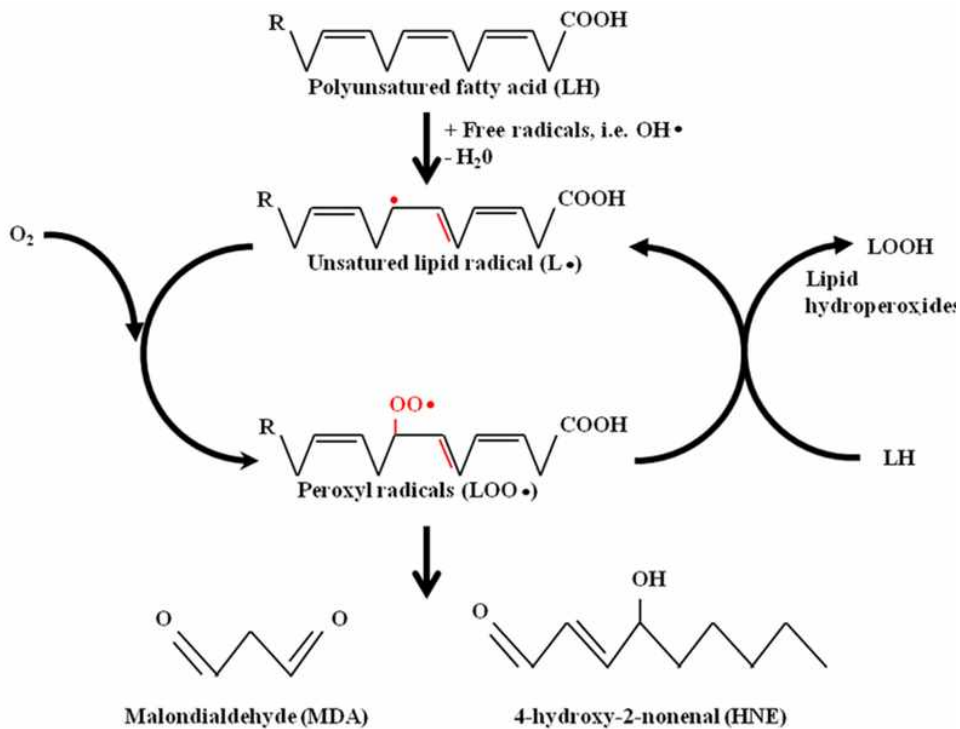
총 ROS/RNS 활성산소 활성도를 측정하기 위해 OxiSelect™ *In Vitro* ROS/RNS Assay Kit (Cell Biolabs INC., CA, USA)를 이용하여 실험을 수행하였다. 실험의 원리를 [그림 2-6]에 간략하게 모식도로 표시하였다.



[그림 2-6] *In vitro* ROS/RNS assay의 모식도

(2) MDA 및 HNE adduct competitive assay

지질 과산화(Lipid peroxidation)는 동/식물의 세포의 세포 손상을 나타내는 매커니즘으로, MDA, 4-HNE 등의 반응성 화합물을 형성한다 (Barrera et al., 2018). 이와 관련된 대사 산물 생성 과정의 모식도를 [그림 2-7]에 표시하였다.



[그림 2-7] 대사산물로서 MDA 및 HNE의 생성 모식도

따라서 각각의 산물에 대한 탐색 키트를 이용하여(OxiSelect™ MDA Adduct Competitive ELISA kit, Cell Biolabs, INC., USA; OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA kit, Cell Biolabs, INC., USA) 지질 과산화의 최종산물인 MDA와 HNE를 측정하였다. 각 실험의 원리 및 과정을 <표 2-8>에 나타내었다.

<표 2-8> 지질과산화물 측정 방법

MDA	HNE
1. MDA conjugate가 코팅된 플레이트의 well에 샘플 또는 MDA-BSA 표준 50 μL를 첨가 후 실온에서 10분 동안 웨이커에서 반응시킨다. 2. 희석된 anti-MDA antibody 50 μL를 각 well마다 넣고, 웨이커에서 상온에서 1시간 배양한다. 3. 250 μL의 세척 버퍼로 3회 세척한다. 4. 희석된 2차 antibody-HRP conjugate 100 μL를 모든 well에 넣고 웨이커에서 상온으로 1시간 배양한다. 5. 250 μL의 세척 버퍼로 3회 세척한다. 6. 상온의 Substrate Solution을 각 well에 100 μL 첨가 후 실온에서 20분간 웨이커에서 반응시킨다. 7. 각 well에 stop solution 100 μL를 넣어 효소 반응을 멈춘다. 8. Microplate reader를 이용해 450nm에서 결과를 측정한다.	1. HNE conjugate가 코팅된 플레이트의 well에 샘플 또는 HNE-BSA 표준 50 μL를 첨가 후 실온에서 10분 동안 웨이커에서 반응시킨다. 2. 희석된 anti-HNE antibody 50 μL를 각 well마다 넣고, 웨이커에서 상온에서 1시간 배양한다. 3. 250 μL의 세척 버퍼로 3회 세척한다. 4. 희석된 2차 antibody-HRP conjugate 100 μL를 모든 well에 넣고 웨이커에서 상온으로 1시간 배양한다. 5. 250 μL의 세척 버퍼로 3회 세척한다. 6. 상온의 Substrate Solution을 각 well에 100 μL 첨가 후 실온에서 20분간 웨이커에서 반응시킨다. 7. 각 well에 stop solution 100 μL를 넣어 효소 반응을 멈춘다. 8. Microplate reader를 이용해 450nm에서 결과를 측정한다.

6) 면역 조직화학 검사 (Immunohistochemistry)

(1) 면역 조직화학 검사용 슬라이드의 제작

연구에 사용하기 위하여 90일 흡입독성시험을 실시한 암/수 마우스 조직을 이용하여 면역조직화학 검사를 위한 슬라이드를 제작하였다.

간조직의 경우, 면역 염색에 이용되는 항체 등 시약을 절감하고 동일한 실험 조건을 만들기 위해, 간 조직 중 일반 조직슬라이드 제작 이후 남은 조직을 이용하여 파라핀 블록을 다시 생산하여 슬라이드를 제작하였다. 비강의 경우 간 조직과 달리 일반 조직슬라이드 제작에 전체 비강조직이 이용되었기 때문에 여유 조직이 없어, 기존의 파라핀 블록을 이용하여 슬라이드를 제작하였으며, 일반적으로 항원반응을 최소화하는 것으로 알려진 탈회용액(Rapidcal·Immuno, BBC Biochemical, USA)을 사용하였다.

(2) 조직슬라이드의 면역 조직화학 염색

면역조직화학 염색법 중 peroxidase-conjugated polymer를 이용한 키트 (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, K5007, DAKO, Denmark)를 사용하여 아래와 같이 실시하였다.

가) 항원 복원 (antigen retrieval) : 탈파라핀이 완료된 슬라이드를 citrate buffer를 이용하여 10분간 압력솥을 이용해 중탕하였다.

나) 내재성 효소의 억제 : 수세 후 3% 과산화수소 용액에 반응시켰다.

다) 일차 항체 반응 : 수세 후 각각의 일차 항체를 2시간동안 조직슬라이드와 반응시켰다. 이용된 각 1차 및 2차 항체의 농도 및 정보는 <표 2-9>에 표시하였다.

라) 이차 항체 반응 : 수세 후 20분간 2차 항체 (Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse, DAKO, Denmark)와 조직슬라이드와

반응시켰다.

마) chromogen 발색 : 수세 후 발색제 (Dako REAL™ DAB+ Chromogen, DAKO, Denmark)를 이용해 2차 항체의 Dextran coupled peroxidase를 검출했다.

바) 대조염색 및 봉입 : 헤마톡실린 대조염색을 실시한 후 수세, 탈수, 청명 및 봉입 과정을 수행했다.

<표 2-9> 이용 항체의 상세 정보

일차 항체	제조사	제품 번호	2차	반응 농도
Cytochrome P450 2E1	Abcam	ab28146	Rabbit	1:250
Cytochrome P450 3A4	Abcam	ab3572	Rabbit	1:500
anti-rabbit IgG(peroxidased)	Dako	K5007	-	ready to use

(3) 항체 발현 정도 정량을 위한 통계적 분석

발색 정도의 정량을 위해 간의 중심 정맥 주변을 무작위로 개체 당 5장씩 배울 200배의 현미경 사진을 찍었다. 이후 Image J 프로그램 (National Institutes of Health, Maryland, USA)을 이용해 현미경 사진의 색상을 청색/갈색으로 분리하여 색상의 강한 정도(intensity)를 측정했으며, 수치화된 발색 강도는 F-검정 실시 후, 독립표본 T-검정을 이용하여 군간 차이를 표시하였다 (Microsoft excel, WA, USA)

III. 연구 결과

1. 독성정보 탐색

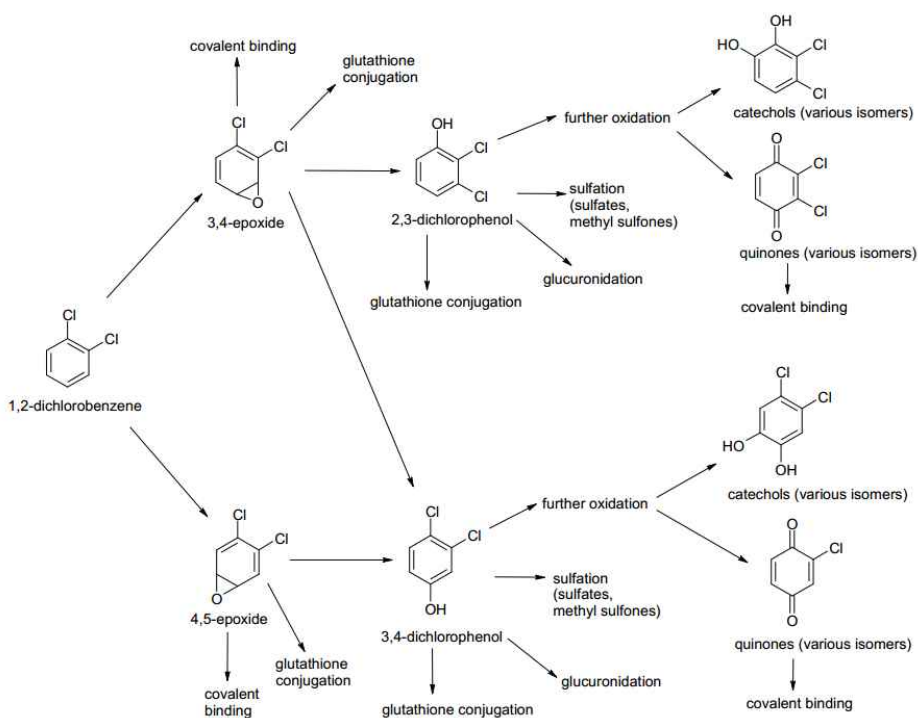
1) 체내 흡수 및 대사 기전

선행 문헌 조사 결과에 따르면 1,2-Dichlorobenzene은 체내에 빠르게 흡수되고 퍼지며, 대사 초기에는 시토크롬 (CYP) P450에서 aromatic ring의 산화 작용으로 중간 에폭시드가 형성된다 (Nedelcheva et al., 1998; Hissink et al., 1996; Bogaards et al., 1995). 이 에폭시드는 세포 단백질과 직접 반응하거나, 글루타티온 (GSH) 또는 글루쿠론산에 결합하거나, 2,3-디클로로페놀 또는 3,4-디클로로페놀을 형성하도록 가수분해 되기도 한다 (US EPA, 2004). [그림 3-1]

또한 생성된 디클로로페놀 대사물들은 GSH, 글루쿠론산 또는 황산염과 결합할 수 있고, 더 나아가 카테콜, 하이드로퀴논 또는 벤조퀴논으로 산화할 수 있다고 알려져 있다 (Hissink et al., 1996; Den Besten et al., 1992). 노출된 동물의 소변을 대상으로 한 연구 결과에 의하면, 상당한 양의 2차 대사물과 소량의 디클로로페놀이 검출됨에 따라, 1,2-Dichlorobenzene의 경우 2차 대사량이 광범위하다는 것을 알수 있다고 보고되고 있다 (Hissink et al., 1996; Hawkins et al., 1980).

1,2-Dichlorobenzene의 독성이 초기 시토크롬 P450 관련 대사에서 에폭시드로의 결과라는 가설을 뒷받침하는 상당한 증거가 존재하며, 이어서 세포 내 분자에 대한 에폭시드의 반응이 이어진다. F344 랫드에 0.9 - 5.4mmol/kg (132 - 794mg/kg)의 1,2-dichlorobenzene을 복강 내 주사하였을 때, 모든 용량에서 24시간까지 최대의 간독성 반응을 나타냈으며, 72시간 내내 점진적으로 감소하였다. CYP P450 억제제인 SKF-525A를 이용한 전처리하는 1,2-Dichlorobenzene

에 의한 ALT 증가를 효과적으로 차단하였다 (Stine et al., 1991). 또한 이와 유사한 연구에서, 피페로닐 부산화물 (CYP P450 억제제)을 사용한 전처리 시 1,2-dichlorobenzene에 의한 간독성을 현저히 감소되었다는 보고가 있다 (Valentovic et al., 1993). 추가적으로 1,2-Dichlorobenzene의 간독성에 반응성 중간체 (reactive intermediate)가 관여한다는 추가적인 연구로, 간의 GHS를 고갈시키는 포론 (phorone)을 전처리 했을 때 1,2-Dichlorobenzene 투여 후 혈청 ALT 농도가 크게 향상되었다는 보고가 있다 (Stine et al., 1991). 이후의 연구로, CYP P450의 비경쟁 억제제인 1-아미노벤조트리졸을 전처리한 F344 또는 SD 랫드에 1,2-Dichlorobenzene을 경구 투여한 경우 간의 GSH 농도 감소를 억제시켰고, 담즙 내 GSSG의 농도를 증가시켰다는 연구 결과가 있다 (Younis et al., 2000)



[그림 3-1] 1,2-Dichlorobenzene의 대사 기전 모식도

2) 동물을 이용한 기존 독성시험 결과

(1) 급성 시험

문헌 조사를 통해 랫드 등을 이용한 급성 경구, 경피, 흡입, 피부자극, 안자극 시험 결과를 확인하였다. 대표적으로, 랫드에서 실시된 단일 경구 노출에 대한 LD50은 1516 - 2138 mg/kg/bw, F344 랫드 및 SD 랫드에 대해 각각 1.66 mL/kg 과 1.76 mL/kg 의 보고가 있다 (Kulkarni et al., 1996). 랫드의 흡입 노출에 대한 LC100은 10시간 노출한 경우 977ppm (5.9mg/L) 이하로 알려져 있으며, 4시간 노출한 경우 총 20마리의 랫드 중 1마리가 941ppm (5.6mg/L)에서 폐사한 보고가 있다 (OECD, 2001).

(2) 아급성 및 아만성 시험

문헌 조사를 통해 경구 또는 흡입노출시험의 아급성 또는 아만성 시험의 결과를 확인하였다. 흡입 노출 시험으로, 1,2-Dichlorobenzene을 포함하는 화학물질을 수컷 Swiss 마우스에 0, 64, 163 ppm의 농도로 4, 9, 또는 14일간 노출해 호흡기만을 검사한 결과, 노출군에서 비강의 후각상피에 조직병리학적 소견이 나타났다. 초기 4일간 소견의 등급은 매우 심함(severe)이었다가 14일 노출시의 소견은 중간(moderate)으로 나타났다 (Zissu, 1995).

경구 노출 시험의 경우, 콘오일에 의석한 1,2-Dichlorobenzene을 F344/N 랫드와 B6C3F1 마우스(암수 각 10마리)에게 0, 30, 60, 125, 250 또는 500 mg/kg/일 의 용량 (환산용량 0, 21.4, 42.9, 89.3, 179 또는 357 mg/kg)으로 주당 5일, 총 13주 동안 경구적으로 투여한 결과, 마우스의 경우 사망개체(고용량 수컷 4/암컷3)가 발생하였으며, 랫드 및 마우스의 간에서 변성 및 괴사, 비장과 흉선의 림프구 감소, 신세뇨관 변성(수컷 랫드에만 해당), 헤모글로빈, 헤마토크리트 및 적혈구 수(랫드에만 해당)의 경미한 감소가 500mg/kg 용량에서 유도되었다. 따라서 랫드의 LOAEL은 89.3 mg/kg, 마우스의 NOAEL 및 LOAEL은 각각 89.3

및 179 mg/kg 으로 보고되었다 (NTP, 1985). 또한 콘오일에 의식한 1,2-Dichlorobenzene을 암수 SD 랫드에게 0, 25, 100 또는 400 mg/kg/일의 용량으로 주당 5일, 총 13주 동안 경구적으로 투여한 결과, 임상증상, 혈액학적 검사 및 뇨검사에서 시험 물질에 의한 이상 소견은 나타나지 않았으나, 수컷 랫드의 체중이 400 mg/kg 투여군에서 통계적으로 의미있게 감소하였다. 또한 용량상관성 있는 간의 무게 증가가 암수 모두 100 mg/kg 군 이상에서 나타났으며, 400 mg/kg군에서 신장무게의 증가가 나타났고, 비장의 무게는 400 mg/kg 군에서 감소한 것으로 나타났다. 조직병리학적 검사 결과 간에서 변성, 간세포 비대, 단일세포사멸(수컷)이 암수 400 mg/kg 군에서 발견되었다 (Robinson et al., 1991).

(3) 만성 및 발암성 시험

문헌 조사를 통해 경구 투여 및 흡입 노출을 통한 동물 시험의 결과를 확인하였다. 1985년 NTP에서 실시한 F344 랫드 및 B6C3F1 마우스를 이용한 경구 발암성 시험 결과에서 몇몇 종양의 경우 고농도 투여군에서 종양 발병률이 유의미하게 증가하였으나 검토 결과 인정되지 않았다.

랫드의 경우 수컷 부신의 크롬친화성세포종이 저농도 투여군에서 유의성 있게 증가하였으나, 생존률에 영향을 미치는 종양의 종류에 속하지 않고(악성이 아님), Fisher's Extract test 및 Cochran-Armitage test 결과 유의성이 없는 것으로 나타났으며, 고농도 투여군 또는 암컷 투여군에서는 크롬친화성세포종이 증가하지 않아 기각되었다. 또한 수컷 고환의 사이질세포종양(Interstitial cell tumor)가 대조군 및 각 투여군에서 Life-table test에서 증가한 것으로 나타났으나 생존률에 영향을 미치는 종양이 아니며 이런 경우 유의미한 결과를 도출할 수 있는 incidental tumor test에 의해 유의성있는 결과가 나타나지 않아 기각되었다. 또한 Cochran-Armitage test의 결과 역유의미(negative trend)한 결과가 나타났다. 마우스의 경우 림프종의 발병률이 수컷 고농도 투여 마우스에

서 유의하게 증가하였으나, 악성림프종과의 혼합 결과에서는 오히려 대조군보다 발병률이 낮아지는 결과로 시험물질에 의한 종양으로 인정되지 않았다. 또한 폐의 세기관지폐포암종의 경우 Cochran-Armitage 시험 결과 수컷 고농도 투여 마우스에서 유의성이 있는 것으로 나타났으나, 선종과의 혼합 결과 유의성이 나타나지 않아 기각된 보고가 있다. 기타 만성 및 발암성 시험의 주요 시험 결과는 <표 3-1>로 간략하게 정리하였다.

<표 3-1> 실험동물을 이용한 1,2-Dichlorobenzene의 만성 및 발암성 독성시험 결과 요약

시험 종류	투여 용량	투여 기간	독성	문헌
경구 투여	13.5, 135, 270mg/kg 241mg/kg (2day/wk)	192일	- 랫드 - 중/고용량에서 간, 신장 무게 증가 - 고용량에서 간세포 부종	Hollingsworth et al., 1958
흡입 노출	49, 93 ppm	6-7 개월	- 알비노 랫드(암수), 기니피그(암수), 알비노 래빗(암수), 마우스(암컷), 원숭이(암컷) - 93 ppm 군에서 수컷 랫드 체중 감소 및 수컷 기니피그의 비장 무게 감소 - NOAEL : 49 ppm - LOAEL : 93 ppm	Hollingsworth et al., 1958
경구 투여	0, 42.9, 85.7 mg/kg	103주	- 암수 F344 랫드 - 시험물질에 의한 중양 소견 없음	NTP, 1985
경구 투여	0, 42.9, 85.7 mg/kg	103주	- 암수 B6C3F1 마우스 - 수컷 고용량군에서 신장의 신세뇨관 재생 - 시험물질에 의한 중양 소견 없음 - NOAEL : 42.9 mg/kg	NTP, 1985

(4) 유전독성 및 기타 시험

태아 발생 시험의 결과로 임신한 F344 랫드 및 뉴질랜드 토끼를 이용하여 임신 6-15일(토끼) 또는 임신 6-18일(랫드)에 일일 6시간씩 0, 100, 200, 400ppm 1,2-Dichlorobenzene을 흡입노출 한 결과, 시험물질에 노출된 랫드 및 토끼(400 ppm)에서 모체의 체중이 감소하였고, 고농도 랫드에서 모체의 간무게가 증가하였다. 그러나 배태자에서 기형발생률은 유의한 증가를 나타내지 않았다 (Hayes, 1985). 추가의 연구에서, 임신한 SD 랫드를 이용해 50, 100, 200의 용량으로 임신6-15일에 경구 투여한 결과, 모체에 악영향 및 기형성이 관찰되지 않았다. (Ruddick et al., 1983).

기타 유전독성 시험 결과로 1,2-Dichlorobenzene은 *Salmonella typhimurium* 변이 균주 및 TA100, TA1535, TA1537, TA1538 또는 TA98 균주에 돌연변이를 일으키지 않았으나, *Saccaromyces cerevisiae*의 D7 균주의 유전자 전환 및 역변이를 유도하였으며, *Aspergillus nidulans*에서 약한 유전체 돌연변이를 유발했다. 또한 수컷 마우스의 복강내 투여 후 골수에서 소핵다염색소 적혈구의 빈도를 증가시켰다는 결과와 말초 혈액에서 소핵다염색소 적혈구의 빈도를 증가시키지 않았다는 상반된 연구결과가 존재한다. 그리고 암컷 랫드에 경구 투여 후 DNA 손상은 유도되지 않았다. 추가적으로 마우스 및 랫드의 다양한 장기에 대해 DNA의 covalent binding이 보고되었다. 이에 따라 유럽연합(EU)에서는 1,2-dichlorobenzene을 유전독성물질로 규정하고 있지 않으며, 기반이 되는 유전독성 관련 결과를 <표 3-2>로 정리하였다.

<표 3-2> 1,2-Dichlorobenzene의 기존 유전독성시험 결과 요약

시험 종류	결 과 ^a (without EMA ^b)	결 과 ^a (with EMA ^b)	용 량 ^c	문 헌
Salmonella typhimurium TA100, TA98, TA1535, TA1537, reverse mutation	-	-	100 ug/plate	Haworth et al., 1983
Salmonella typhimurium TA100, TA98, TA1535, TA1537, TA1538, reverse mutation	-	-	832 ug/plate	Shimizu et al., 1983
Salmonella typhimurium, reverse mutation	-	not tested	NR	Andersen et al., 1972
Aspergillus nidulans, reverse mutation	(+)	not tested	200	Prasad, 1970
Saccharomyces cerevisiae, homozygosis by mitotic recombination or gene conversion	-	+	74	Paolini et al., 19
Saccharomyces cerevisiae, reverse mutation	-	+	74	Paolini et al., 19
DNA strand breaks, cross-link or related damage, female rat liver cells, in vivo	-		300, po, 2회	Kitchin et al., 1993
Micronucleus formation, male mouse bone-marrow cells in vivo	+		93.5 po, 2회	Mohtashamipur et al., 1987
Micronucleus formation, male mouse peripheral reticulocytes in vivo	-			Kim and Ryu, 2007
Binding(covalent) to calf thymus DNA in vitro	-	+	15	Paolini et al., 1998
Binding(covalent) to DNA, male rat liver, lung, kidney and stomach in vivo	+		0.4 ip, 1회	Colacci et al., 1990
Binding(covalent) to DNA, male mouse liver, lung, kidney and stomach in vivo	+		0.4 ip, 1회	Colacci et al., 1990

a : +, positive; (+), weak positive; -, negative; b : exogenous metabolic activation; c : po, per oral; ip, intraperitoneal

2. 혈액 시료 분석 결과

1) 랫드를 이용한 흡입독성시험

(1) 혈액학 및 혈액응고 검사

1,2-Dichlorobenzene을 아급성 (28일) 흡입 노출시킨 암수 F344 랫드를 이용해 (노출농도 : 0, 50, 150, 450 ppm) 혈액 시료를 이용해 혈액학적 분석을 실시한 결과, 통계적으로 유의한 수치로서, 수컷 고농도에서 HCT 증가 및 MCH, MCHC의 감소가 관찰되었고, 암컷 중농도 및 고농도에서 MCH의 감소와 고농도에서 MCHC의 감소가 관찰되었다. 또한 수컷 고농도에서 APTT 및 PT의 증가와 암컷 고농도에서 PT의 증가가 관찰되었다.

1,2-Dichlorobenzene을 아만성(90일) 흡입 노출시킨 암수 F344 랫드를 이용해 (노출농도 : 0, 30, 100, 300 ppm) 혈액 시료를 이용해 혈액학적 분석을 실시한 결과, 수컷 고농도에서 PT의 증가와 중농도에서 MCH의 감소가 통계적으로 유의하게 관찰되었다. 변화한 항목의 각 군 평균 및 표준편차는 <표 3-3> 로 나타내었다.

<표 3-3> 랫드를 이용한 28일 및 90일 시험의 혈액학 및 혈액응고 분석 결과

Parameters	Control			T1			T2			T3		
28 Day inhalation study - Male												
HCT (%)	42.82	±	1.165	43.78	±	1.489	43.86	±	0.934	45.96	±	1.352*
MCH (pg)	16.80	±	0.187	16.84	±	0.152	16.62	±	0.130	16.44	±	0.305*
MCHC (g/dL)	34.08	±	0.268	34.14	±	0.152	33.78	±	0.377	33.38	±	0.449*
APTT(sec)	16.18	±	0.638	17.32	±	0.370	17.58	±	0.327	18.94	±	2.399+
PT(sec)	10.88	±	0.522	10.98	±	0.359	11.32	±	0.363	12.06	±	0.568+
28 Day inhalation study - Female												
MCH (pg)	17.38	±	0.130	17.42	±	0.110	17.20*	±	0.071	16.88	±	0.084+
MCHC (g/dL)	34.66	±	0.270	34.58	±	0.356	34.28	±	0.217	33.74	±	0.167+
PT (sec)	11.22	±	0.409	11.14	±	0.344	11.42	±	0.804	12.63	±	0.499+
90 Day inhalation study - Male												
MCH (pg)	16.24	±	0.171	16.21	±	0.208	15.95	±	0.172+	16.29	±	0.247
PT (sec)	11.02	±	0.294	11.38	±	0.603	11.04	±	0.331	11.54	±	0.572*

Values are mean ± SD

*, + : significantly different from the controls at $p < 0.05$ or 0.01.

(2) 혈액생화학적 검사

1,2-Dichlorobenzene을 아급성 (28일) 흡입 노출시킨 암수 F344 랫드를 이용해 (노출농도 : 0, 50, 150, 450 ppm) 혈액 시료를 이용해 혈액생화학적 분석을 실시한 결과, 통계적으로 유의하게 수컷 중농도 및 고농도에서 TP 및 ALB의 증가가 관찰되었고, 고농도에서 ALT의 증가가 관찰되었고, 암수 모두 고농도에서 GLU가 감소하였다. 또한 TG의 경우 수컷 중/고농도에서 감소되었으나 암컷 고농도에서 증가하였다. 이밖에 수컷 중농도에서 ALP의 감소와 고농도에서 TBIL 및 K가 증가하였고, 암컷 고농도에서 Ca, TCHO, Na가 증가하였다.

1,2-Dichlorobenzene을 아만성(90일) 흡입 노출시킨 암수 F344 랫드를 이용해 (노출농도 : 0, 30, 100, 300 ppm) 혈액 시료를 이용해 혈액생화학적 분석을 실시한 결과, 통계적으로 유의하게 수컷 고농도에서 Na 및 TG의 증가, TBIL의 감소가 나타났고, 수컷 중농도에서 TP, ALB, Ca, TCHO, TG의 증가 및 ALT의 감소가 관찰되었다. 암컷 고농도에서 Na의 증가 및 중/고농도에서 TCHO의 증가, 중농도에서 TG의 증가가 관찰되었다. 변화한 항목의 각 군 평균 및 표준편차는 <표 3-4> 로 나타내었다.

<표 3-4> 랫드를 이용한 28일 및 90일 시험의 혈액생화학 분석 결과

Parameters	Control			T1			T2			T3		
28 Day inhalation study – Male												
TP (g/dL)	5.42	±	0.110	5.56	±	0.089	5.66	±	0.114*	5.96	±	0.207+
ALB	3.78	±	0.045	3.86	±	0.089	3.96	±	0.055+	4.20	±	0.122+
ALT (IU/L)	31.88	±	2.620	31.04	±	2.202	31.66	±	2.561	37.52	±	1.897+
GLU (mg/dL)	154.54	±	15.540	152.38	±	14.500	134.30	±	7.568	94.90	±	12.488+
TG (mg/dL)	50.66	±	11.100	49.82	±	15.643	29.38	±	7.164*	29.44	±	7.847*
ALP (IU/L)	716.88	±	47.487	718.04	±	52.600	628.28	±	30.035*	669.72	±	45.936
TBIL (mg/dL)	0.152	±	0.0164	0.150	±	0.0071	0.160	±	0.0200	0.220	±	0.0122+
K (mmol/L)	4.56	±	0.098	4.70	±	0.092	4.81	±	0.256	4.95	±	0.117+
28 Day inhalation study – Female												
GLU (mg/dL)	128.42	±	11.299	128.24	±	13.804	115.76	±	18.696	86.30	±	14.237+
Ca (mg/dL)	9.38	±	0.148	9.38	±	0.084	9.48	±	0.228	9.68	±	0.126*
TCHO (mg/dL)	59.44	±	2.261	67.22	±	4.622	68.80	±	7.630	71.78	±	7.350*
Na (mmol/L)	139.18	±	0.563	139.18	±	0.973	139.38	±	1.013	141.15	±	0.755+
90 Day inhalation study – Male												
Na (mmol/L)	118.90	±	0.757	118.77	±	0.884	118.78	±	0.561	119.85	±	0.750*
TG (mg/dL)	28.01	±	8.577	36.89	±	7.012	42.77	±	10.285+	45.18	±	9.765+
TBIL (mg/dL)	0.187	±	0.0241	0.175	±	0.0384	0.176	±	0.0337	0.142	±	0.0270+
TP (g/dL)	5.20	±	0.105	5.21	±	0.145	5.56	±	0.158+	5.20	±	0.094
ALB (g/dL)	3.58	±	0.079	3.62	±	0.079	3.79	±	0.074+	3.58	±	0.063
Ca (mg/dL)	8.40	±	0.115	8.47	±	0.134	8.64	±	0.184+	8.49	±	0.191
TCHO (mg/dL)	59.28	±	5.289	61.05	±	6.181	69.11	±	7.483+	63.58	±	5.482
ALT (IU/L)	35.98	±	3.540	32.91	±	3.496	30.22	±	2.318+	36.12	±	2.789
90 Day inhalation study – Female												
Na (mmol/L)	119.17	±	0.574	119.54	±	0.513	119.69	±	0.976	120.30	±	0.804+
TCHO (mg/dL)	77.80	±	6.471	83.02	±	6.674	88.42	±	9.055*	87.46	±	3.805*
TG (mg/dL)	15.09	±	5.517	19.87	±	7.669	29.06	±	10.673+	23.74	±	9.766

Values are mean ± SD

*, + : significantly different from the controls at $p < 0.05$ or 0.01 .

2) 마우스를 이용한 흡입독성시험

(1) 혈액학적 검사

1,2-Dichlorobenzene을 아급성 (28일) 흡입 노출시킨 암수 B6C3F1 마우스를 이용해 (노출농도 : 0, 50, 150, 450 ppm) 혈액 시료를 이용해 혈액학적 분석을 실시한 결과, 통계적으로 유의한 지표 변화는 관찰되지 않았다.

1,2-Dichlorobenzene을 아만성(90일) 흡입 노출시킨 암수 B6C3F1 마우스를 이용해 (노출농도 : 0, 30, 60, 120 ppm) 혈액 시료를 이용해 혈액학적 분석을 실시한 결과, 통계적으로 유의하게 수컷 중/고농도에서 RET% 및 RETA가 증가하였고, 저농도에서 NEU% 및 EOS% 수치가 증가했고 LYM%가 감소했다. 암컷 고농도에서 PLT가 증가했고 중/고농도에서 NEU%가 증가했다. 저/중/고농도에서 LYM%가 감소했으며, RET% 및 RETA가 감소했다. 변화한 항목의 각 군 평균 및 표준편차는 <표 3-5> 로 나타내었다.

<표 3-5> 마우스를 이용한 90일 시험의 혈액학적 분석 결과

Parameters	Control			T1		T2			T3			
90 Day inhalation study – Male												
RETA (x10 ³ /uL)	244.44	±	9.848	228.17	±	19.467	220.20	±	18.955+	203.55	±	15.800+
RET% (%)	2.558	±	0.0832	2.395	±	0.1602	2.282	±	0.1528+	2.151	±	0.1819+
NEU% (%)	15.65	±	3.379	21.41	±	2.569*	18.95	±	5.077	16.62	±	5.870
EOS% (%)	2.58	±	0.689	3.91	±	1.021*	3.60	±	1.146	2.29	±	1.010
LYM% (%)	79.06	±	6.005	72.49	±	2.731+	75.46	±	5.418	77.10	±	3.628
90 Day inhalation study – Female												
RETA (x10 ³ /uL)	258.49	±	41.231	198.94	±	44.295+	211.02	±	38.954*	182.30	±	31.022+
RET% (%)	2.719	±	0.4397	2.112	±	0.4531+	2.245	±	0.3738*	1.961	±	0.3264+
NEU% (%)	19.50	±	3.292	25.52	±	5.433	26.26	±	5.617*	26.48	±	7.171
LYM% (%)	74.69	±	3.265	68.71	±	5.733*	67.22	±	4.699+	67.57	±	6.497*
PLT (x10 ³ /uL)	997.0	±	100.82	1015.8	±	62.54	1034.6	±	70.34	1093.4	±	39.21*

Values are mean ± SD

*, + : significantly different from the controls at $p < 0.05$ or 0.01 .

(2) 혈액생화학적 검사

1,2-Dichlorobenzene을 아급성 (28일) 흡입 노출시킨 암수 B6C3F1 마우스를 이용해 (노출농도 : 0, 50, 150, 450 ppm) 혈액 시료를 이용해 혈액생화학학적 분석을 실시한 결과, 통계적으로 유의한 지표 변화는 관찰되지 않았다.

1,2-Dichlorobenzene을 아만성(90일) 흡입 노출시킨 암수 B6C3F1 마우스를 이용해 (노출농도 : 0, 30, 100, 300 ppm) 혈액 시료를 이용해 혈액학적 분석을 실시한 결과, 통계적으로 유의하게 수컷 고농도에서 TG가 증가했고, 저/중/고 농도에서 ALP가 증가했다. 암컷의 경우 고농도에서 Na 수치가 증가하였다. 변화한 항목의 각 군 평균 및 표준편차는 <표 3-6> 로 나타내었다.

<표 3-6> 마우스를 이용한 90일 시험의 혈액생화학 분석 결과

Parameters	Control			T1			T2			T3		
90 Day inhalation study - Male												
TG (mg/dL)	60.66	±	17.763	57.06	±	18.624	65.21	±	13.763	78.57	±	12.725*
ALP (IU/L)	166.51	±	12.384	192.05	±	10.168+	192.89	±	11.440+	205.40	±	18.207+
90 Day inhalation study - Female												
Na (mmol/L)	136.47	±	1.125	137.08	±	0.809	137.38	±	1.023	137.67	±	0.686

Values are mean ± SD

*, + : significantly different from the controls at $p < 0.05$ or 0.01 .

3. 일반 조직병리 검사 결과

1) 랫드를 이용한 흡입독성시험

1,2-Dichlorobenzene을 28일 동안 흡입 노출시킨 F344 랫드의 부검시 암수 고농도 및 수컷 중농도에서 체중이 유의성 있게 감소되었으며, 시험 물질과 관련된 육안소견은 발견되지 않았다. 장기 중량의 변화로 암수 모두에서 통계적으로 유의하게 시험물질과 관련된 변화로서 간 중량의 증가가 관찰되었고, 기타 중량 변화로 수컷에서 비장 및 흉선 중량의 감소, 부신 중량의 증가, 심장 중량의 감소, 고환 및 뇌 중량 증가, 폐 중량의 감소/증가가 관찰되었고, 암컷에서 부신 중량 증가, 신장 및 심장 중량 증가 등이 관찰되었다.

1,2-Dichlorobenzene을 90일동안 흡입 노출시킨 F344 랫드의 부검시 체중 변화는 관찰되지 않았으며, 시험 물질과 관련된 육안소견은 발견되지 않았다. 장기 중량의 변화로 수컷에서 신장, 간, 부신, 폐 중량의 증가와 암컷에서 자궁 중량의 증가/감소, 비장 중량의 감소가 관찰되었으나, 시험물질과의 연관성은 없었다.

각 시험 별 체중 변화와 시험물질의 투여와 관련이 있는 것으로 판단된 28 시험의 장기 무게 변화 중 간의 절대적 및 상대적(체중 대비) 중량의 변화를 <표 3-7>에 나타내었다.

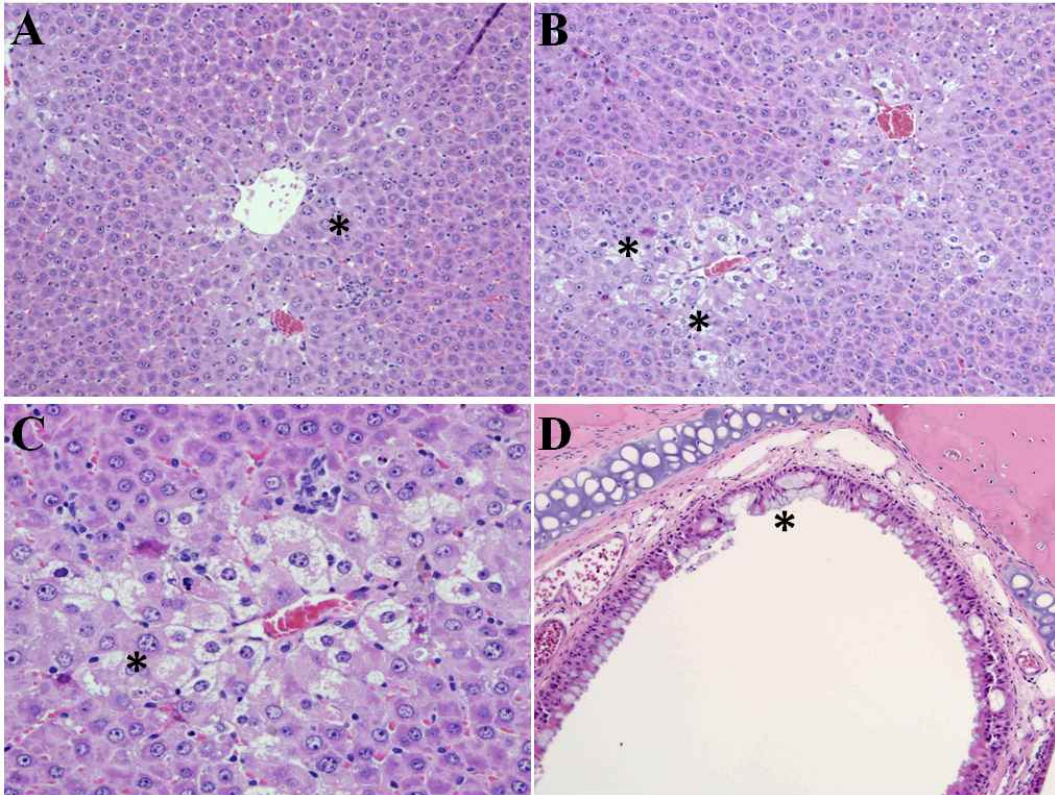
<표 3-7> 랫드를 이용한 28일 및 90일 시험의 군별 체중 및 장기(간) 중량 변화

Parameter (g)	Control			T1			T2			T3		
28 Day inhalation study - Male												
Body weights	222.676	±	12.7737	217.762	±	8.0238	205.054	±	6.0640*	194.108	±	9.5649+
Liver weights (Absolute)	6.0058	±	0.5663	6.3176	±	0.2411	6.5710	±	0.3390	7.0830	±	0.3578+
Liver weights (Relative)	2.9591	±	0.1394	3.1753	±	0.0622+	3.5325	±	0.0803+	4.0762	±	0.0674+
28 Day inhalation study - Female												
Body weights	153.062	±	6.4539	145.324	±	3.2822	142.956	±	6.6938	133.678	±	7.8827+
Liver weights (Absolute)	3.7472	±	0.1689	3.8166	±	0.2474	4.1108	±	0.1721	4.9684	±	0.3152+
Liver weights (Relative)	2.6866	±	0.0923	2.8843	±	0.1396	3.1681	±	0.0996+	4.1309	±	0.1678+
90 Day inhalation study - Male												
Body weights	323.681	±	12.5143	308.264	±	14.6271	307.875	±	11.6034	323.255	±	23.3026
90 Day inhalation study - Female												
Body weights	159.436	±	7.6403	169.515	±	15.2281	165.156	±	11.6872	169.852	±	9.9267

Values are mean ± SD.

*, + : significantly different from the controls at $p < 0.05$ or 0.01 .

일반 헤마톡실린 및 에오진 염색 후 현미경으로 관찰된 소견으로 28일 흡입 독성시험의 경우, 암수 고농도의 간에서 소엽중심성 간세포 거대세포핵(Karyocytomegaly), 암컷의 간에서 소엽중심성 간세포 공포화(vacuolation) 등이 관찰되었으며, 비강에서 점액세포 과형성(hyperplasia)가 암수 모두 관찰되었다. 90일 흡입독성시험의 경우, 시험물질에 의한 조직병리학적 소견은 관찰되지 않았다. 랫드의 28일 흡입노출시험에서 관찰된 간 및 비강의 대표적 소견을 현미경 사진으로 나타냈다 [그림 3-1].



- A : Centrilobular karyocytomegaly of hepatocytes, liver, T3 male rat (x100)
 B : Centrilobular vacuolation of hepatocytes, liver, T3 female rat (x200)
 C : Single cell necrosis of hepatocytes, liver, T3 female rat (x400)
 D : Hyperplasia of mucocytes in respiratory epithelium, nasal cavity, T3 female rat (x200)

[그림 3-2] 1,2-Dichlorobenzene에 의한 랫드 간 및 비강의 현미경적 소견

A-C), 고농도군의 수컷 랫드의 간에서 소엽중심성 간세포 거대세포핵(별표)이 관찰되었고 고농도군의 암컷 랫드의 간에서 소엽중심성 간세포 공포화(별표) 및 단일세포괴사(별표)가 관찰되었다. D), 고농도군의 암컷 랫드에서 비강 호흡상피의 점액세포 과형성(별표)이 관찰되었다. 헤마톡실린 및 에오신 염색.

2) 마우스를 이용한 흡입독성시험

1,2-Dichlorobenzene을 28일 동안 흡입 노출시킨 B6C3F1 마우스의 부검 시 체중 변화는 관찰되지 않았으나, 수컷 고농도 군의 모든 개체가 사망 (1/5) 또는 빈사 (4/5)처리 되었고, 중농도 군에서 사망개체가 2례 (2/5) 발생하였다. 암컷은 고농도 군의 전개체 (5/5)가 사망하였다. 부검시 주요 육안소견으로 수컷의 간에서 적색부위 및 황색 반점이 관찰되었고, 비장 및 흉선에서 소형화가 관찰되었다. 암컷의 비장에서 흑색 부위가 관찰되었으며, 통계적으로 유의한 장기 중량의 변화는 관찰되지 않았다. 1,2-Dichlorobenzene을 90일동안 흡입 노출시킨 B6C3F1 마우스의 부검시 체중 변화는 관찰되지 않았으며, 주요 육안 소견으로 수컷 고농도군의 간에서 반점이 관찰되었다. 장기 중량의 변화로 수컷에서 심장, 간, 비장 중량 감소, 뇌, 폐, 고환, 부고환 중량 증가가 관찰되었고, 암컷에서 뇌, 심장, 비장 중량 감소가 관찰되었다. 각 시험 별 체중 변화를 <표 3-8>에 나타내었다.

<표 3-8> 마우스를 이용한 28일 및 90일 시험의 군별 체중 변화

Parameter (g)	Control	T1	T2	T3
28 Day inhalation study - Male				
Body weights	27.918 ± 1.0125	27.074 ± 0.8906	27.183 ± 0.2957	- - -
28 Day inhalation study - Female				
Body weights	24.514 ± 1.7974	22.848 ± 1.1062	23.174 ± 0.3109	- - -
90 Day inhalation study - Male				
Body weights	32.786 ± 1.9613	29.384 ± 1.5611+	30.009 ± 1.3365+	31.179 ± 1.2032
90 Day inhalation study - Female				
Body weights	25.178 ± 0.7284	24.871 ± 1.0295	24.506 ± 1.4995	25.553 ± 0.6437

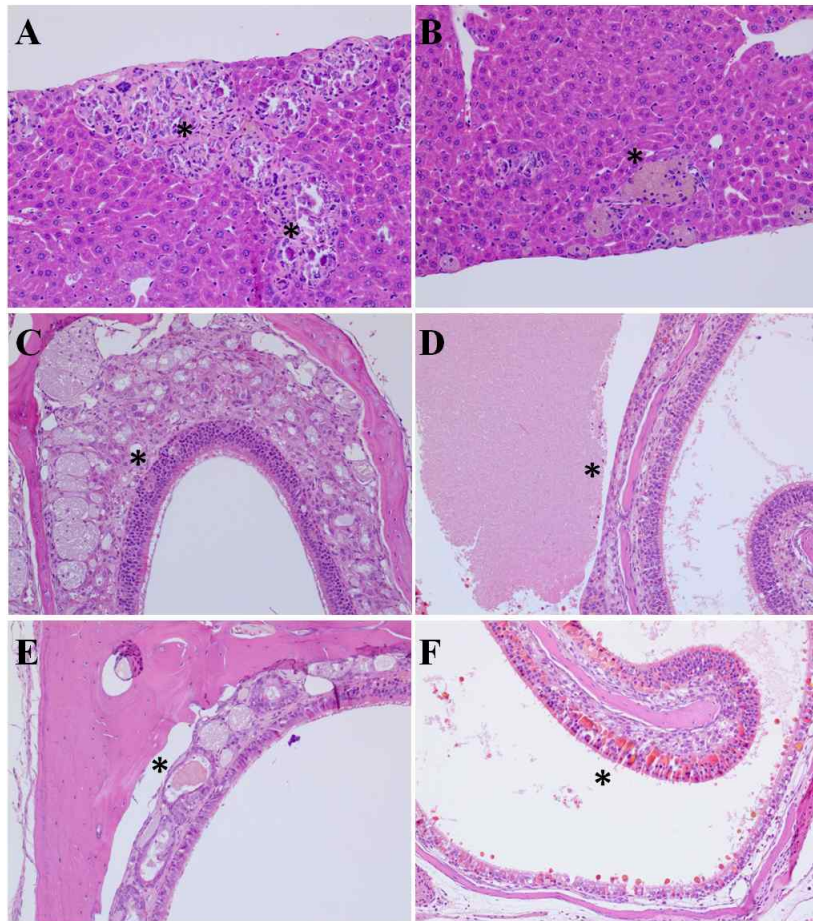
Values are mean ± SD.

일반 헤마톡실린 및 에오진 염색 후 현미경으로 관찰된 주요 소견으로 28일 흡입독성시험의 경우, 수컷 중농도의 간에서 이영양성 무기질침착(Mineralization, dystrophic) 및 색소 침착(Pigmentation)이 관찰되었고, 암수 모든 투여군의 비강에서 재생동반변성(Degeneration/regeneration), 분비샘 확장(Dilation, glands), 호산성소구(Eosinophilic globules) 및 위축(Atrophy) 등이 관찰되었다. 90일 흡입독성시험의 경우, 수컷 고농도의 간에서 28일 시험과 동일하게 이영양성 무기질침착 및 색소 침착 등이 관찰되었고, 암수 모든 투여군의 비강에서 호산성 소구, 기저세포 증생, 호흡상피 화생 및 호산성 소구 등이 관찰되었다. 90일 시험의 투여군 별 상세한 소견의 빈도는 [표 3-9]로 정리하였으며, 마우스의 흡입노출시험에서 관찰된 간 및 비강의 대표적 소견과 암수간의 대조군 및 고농도 군과의 차이를 보인 간조직의 소견을 군 별 현미경 사진으로 나타냈다 [그림 3-2, 3].

<표 3-9> 마우스를 이용한 90일 시험의 군별 조직병리학적 주요 소견

Organ, Histopathologic findings	Group	Male				Female			
		C	T1	T2	T3	C	T1	T2	T3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
Liver, Mineralization, dystrophic	1>	0	0	0	3	0	0	0	0
	2>	0	0	0	3	0	0	0	0
	3>	0	0	0	3	0	0	0	0
	TFI	0	0	0	9	0	0	0	0
Liver, Necrosis	1>	0	0	0	1	0	0	0	0
	TFI	0	0	0	1	0	0	0	0
Liver, Pigmentation	1>	0	0	0	8	0	0	0	0
	2>	0	0	0	1	0	0	0	0
	TFI	0	0	0	9	0	0	0	0
Nasal cavity, Atrophy	1>	0	0	0	0	0	2	1	2
	2>	0	0	0	1	0	2	3	1
	3>	0	0	0	0	0	1	0	2
	4>	0	0	0	1	0	0	0	0
	TFI	0	0	0	2	0	5	4	5
Nasal cavity, Dilatation, glands	2>	0	0	0	0	0	1	4	6
	3>	0	0	0	0	0	4	6	0
	TFI	0	0	0	0	0	5	10	6
Nasal cavity, Eosinophilic globules	1>	0	7	2	2	0	0	0	0
	2>	0	3	3	5	0	4	1	0
	3>	0	0	3	1	0	5	4	8
	4>	0	0	2	2	0	1	5	1
	TFI	0	10	10	10	0	10	10	9
Nasal cavity, Hyperplasia, basal cell	1>	0	1	3	3	0	3	3	6
	2>	0	2	2	3	0	4	3	3
	3>	0	4	5	3	0	2	2	0
	4>	0	3	0	1	0	1	0	0
	TFI	0	10	10	10	0	10	8	9
Nasal cavity, Respiratory metaplasia	1>	0	0	6	0	0	1	0	0
	2>	0	3	2	1	0	3	5	0
	3>	0	6	2	0	0	4	4	0
	4>	0	2	0	0	0	2	1	0
	TFI	0	10	10	1	0	10	10	0

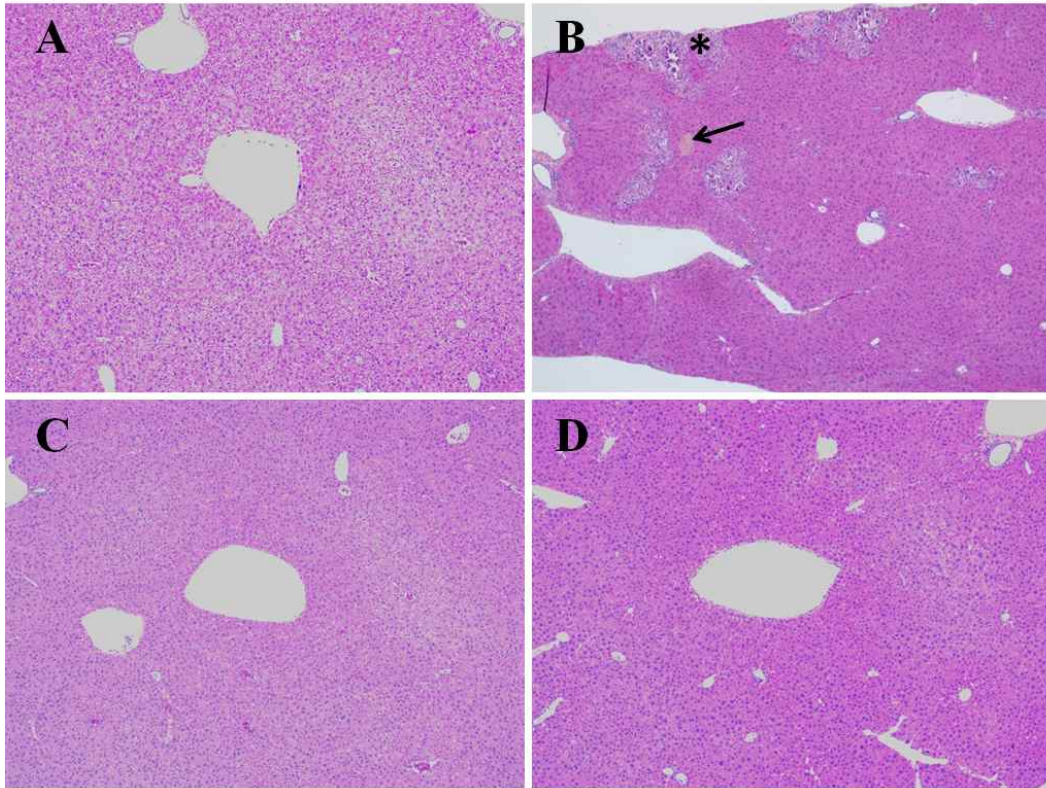
C : Control group; N : Number of examined animals; TFI : Total finding incidence



- A : Dystrophic mineralization, liver, T3 male mouse (x100)
 B : Pigmentation, liver, T3 male mouse (x100)
 C : Basal cell hyperplasia, nasal cavity, T3 male mouse (x100)
 D : Atrophy of olfactory epithelium, nasal cavity, T3 male mouse (x200)
 E : Dilation of glands, olfactory epithelium, nasal cavity, T3 female mouse (x200)
 F : Eosinophilic globules, nasal cavity, T3 male mouse (x200)

[그림 3-3] 1,2-Dichlorobenzene에 의한 마우스 간 및 비강의 현미경적 소견

A), B), 고농도군의 수컷 마우스의 간에서 이형양성 무기질침착(별표) 및 색소침착(별표)이 관찰되었다. C-F) 암수 고농도군의 비강에서 기저세포 증생(별표), 후각상피 위축(별표), 분비샘 확장(별표) 및 호산성 소구(별표)가 관찰되었다. 헤마톡실린 및 에오신 염색.



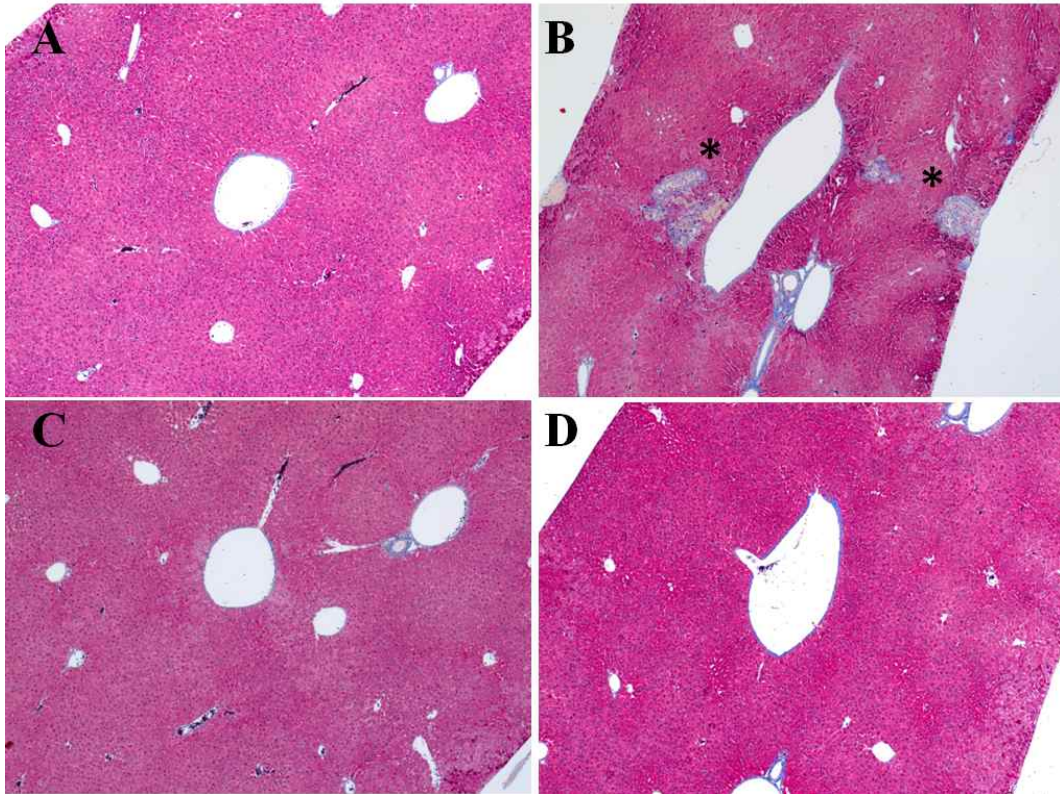
- A: Liver, control male mouse (x100)
 B: Liver, T3 male mouse (x100)
 C: Liver, control female mouse (x100)
 D: Liver, T3 female mouse (x100)

**[그림 3-4] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스
간의 일반 염색(H&E) 결과**

A), C), D), 대조군의 수컷 및 암컷 마우스와 고농도군의 암컷 마우스의 간에서 이상 소견은 관찰되지 않았다. B), 고농도군의 수컷 마우스의 간에서 이영양성 무기질침착(별표) 및 색소침착(화살표)이 관찰되었다. 헤마톡실린 및 에오신 염색.

4. 특수염색 검사 결과

1,2-Dichlorobenzene을 90일 동안 흡입 노출시킨 B6C3F1 마우스의 간 조직을 이용한 Masson's trichrome 특수염색 결과 수컷 고농도 군의 간조직에서 진한 파란색으로 염색된 섬유조직 (collagen fiber)가 확인되었다. 이러한 섬유조직은 일반 헤마톡실린 및 에오신 염색상에서 확인된 이형양성 무기질 침착된 부위를 둘러싸며 생성되어 있으며, 간의 혈관 및 담관 주변에도 일부 증식되어 있었다. 수컷 대조군 및 암컷 대조군과 고농도 군에서는 이러한 간조직의 비대해진 섬유화 부분이 관찰되지 않았다. 특수염색의 결과로 관찰된 간조직의 소견을 [그림 3-4] 로 나타내었다.



A: Liver, control male mouse (x100)

B: Liver, T3 male mouse (x100)

C: Liver, control female mouse (x100)

D: Liver, T3 female mouse (x100)

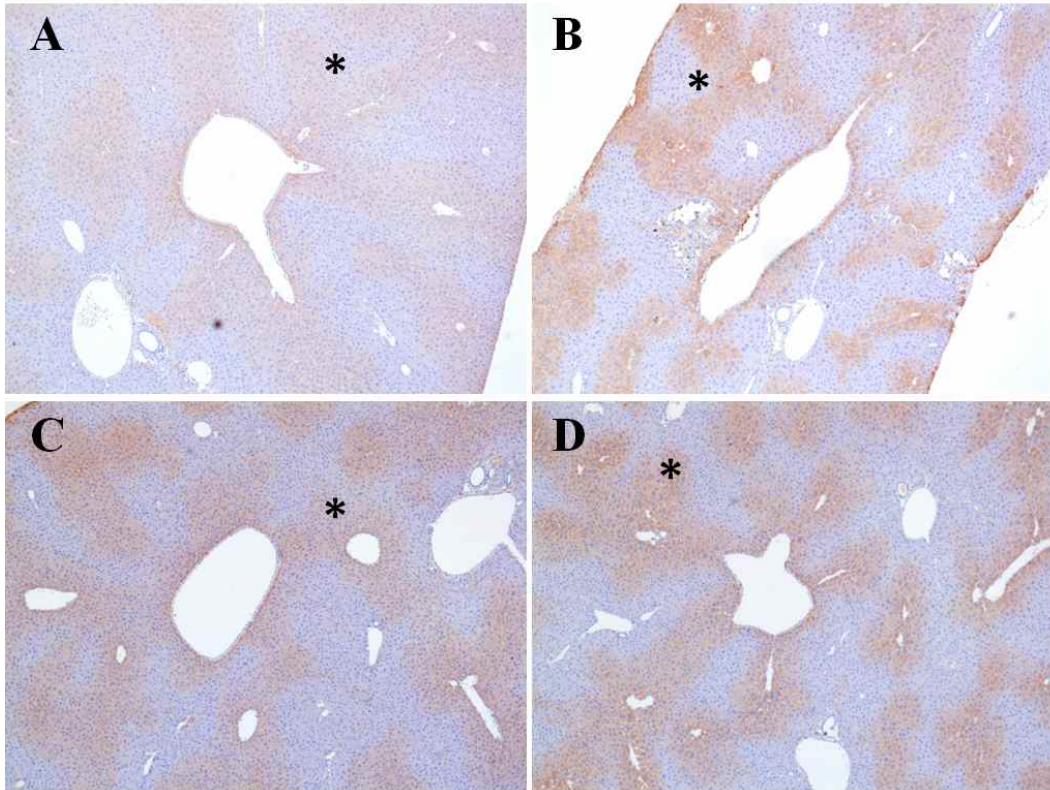
[그림 3-5] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스 간의 특수염색(Masson's trichrome staining) 결과

A), C), D), 대조군의 수컷 및 암컷 마우스와 고농도군의 암컷 마우스의 간에서 과도한 섬유증식은 확인되지 않았다. B), 고농도군의 수컷 마우스의 간에서 이형양성 무기질침착부위 주변으로 파란색으로 염색된 섬유조직 증식(별표)이 확인되었다. Masson's trichrome 특수염색.

5. 면역 조직화학적 검사 결과

1,2-Dichlorobenzene을 90일 동안 흡입 노출시킨 B6C3F1 마우스의 간 및 비강 조직을 이용한 면역조직화학염색 결과 CYP2E1 및 CYP3A4 발현이 확인되었다. 간 조직의 경우 CYP2E1은 중심정맥(central vein) 부위를 중심으로 zone 3 에서 zone 2 까지 확장된 형태로 발현되었으며, 대조군에 비해 암수 모두 고농도 군에서 발현이 잘 되었으며, 암수간의 발현도 차이는 크지 않았다. CYP3A4는 CYP2E1과 비슷하게 중심정맥 부위에서 zone 3 및 zone 2를 거쳐 발현되었으며, 대조군에 비해 암수 모두 고농도군에서 intensity가 증가한 것으로 관찰되었다. 또한 암컷 고농도 군에 비해 수컷 고농도 군에서 발현도가 높게 나타나는 양상을 보였다. 일반 헤마톡실린 및 에오진 염색상에서 관찰된 시험물질에 의한 간의 소견 부위 (이영양성 무기질침착) 주변 조직의 경우 CYP2E1 및 CYP3A4 모두 특별한 intensity를 나타내지는 않았다. [그림 3-5, 6, 7]

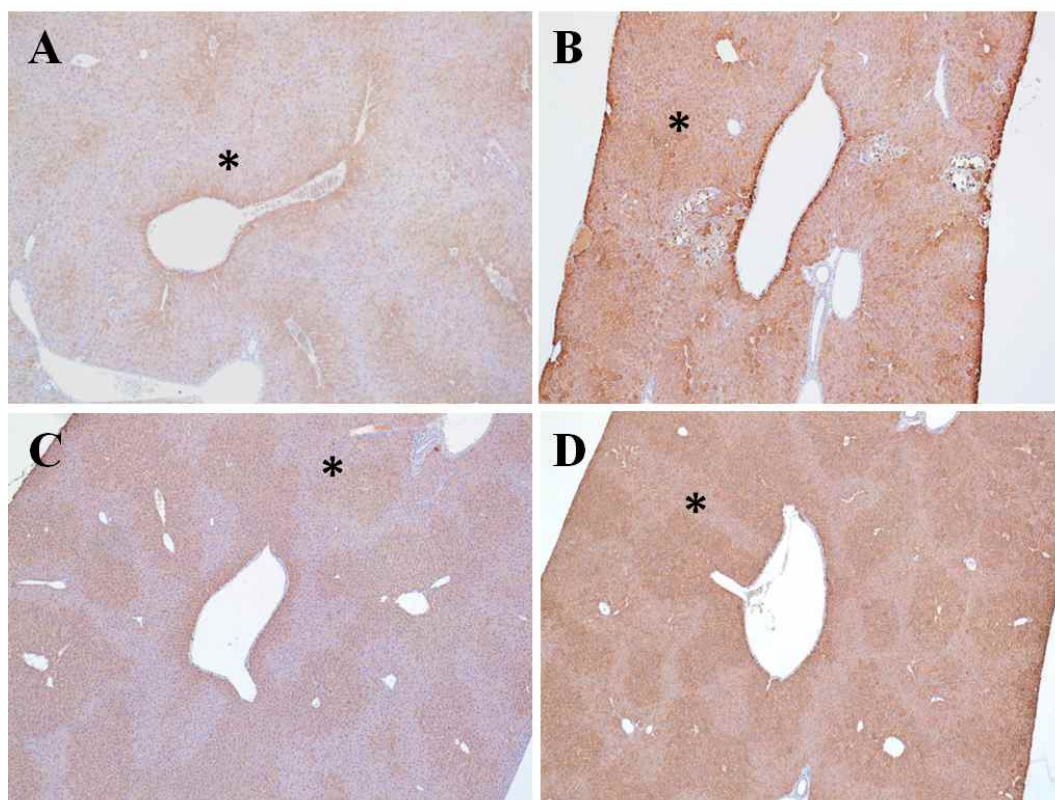
비강의 경우 CYP2E1은 간조직 대비 발현이 거의 되지 않는 정도의 낮은 intensity를 보였으나, 대조군에 비해 고농도 군의 호산성 소구 소견 부위에 반응하여 발현된 양상을 보였으며 암컷의 intensity가 약간 증가한 경향을 보였다. CYP3A4는 대조군에 비해 고농도 군의 level II-III의 호흡상피 및 후각상피부분에 intensity가 증가하며 발현되었다. 또한 호산성 소구 부위 및 확장된 분비샘 부분에서 향상된 intensity를 보였으며, 암컷에서 증가한 경향을 보였다. [그림 3-8, 9].



A: Liver, control male mouse (x100)
 B: Liver, T3 male mouse (x100)
 C: Liver, control female mouse (x100)
 D: Liver, T3 female mouse (x100)

**[그림 3-6] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스
 간의 CYP2E1 발현**

A), C), 대조군의 수컷 및 암컷 마우스의 간에서 갈색으로 염색된 CYP2E1 항체 부위 (별표)가 확인되었다. B), D), 고농도군의 수컷 및 암컷 마우스의 간에서 발현된 CYP2E1 항체 반응 부위(별표)가 중심정맥 주변으로 확장되었음을 확인하였다. 면역조직화학염색.



A: Liver, control male mouse (x100)

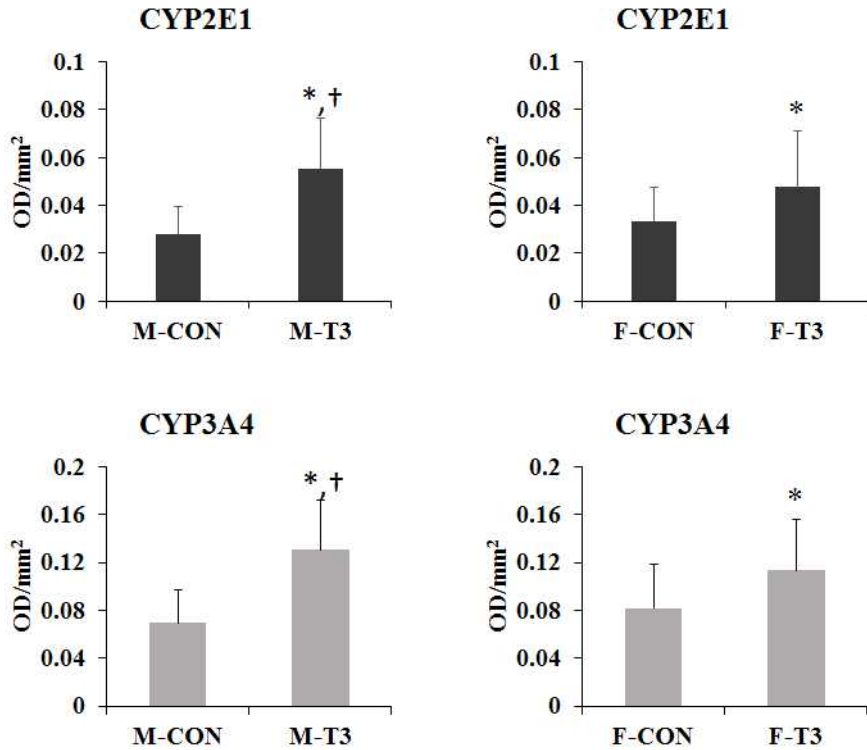
B: Liver, T3 male mouse (x100)

C: Liver, control female mouse (x100)

D: Liver, T3 female mouse (x100)

[그림 3-7] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스 간의 CYP3A4 발현

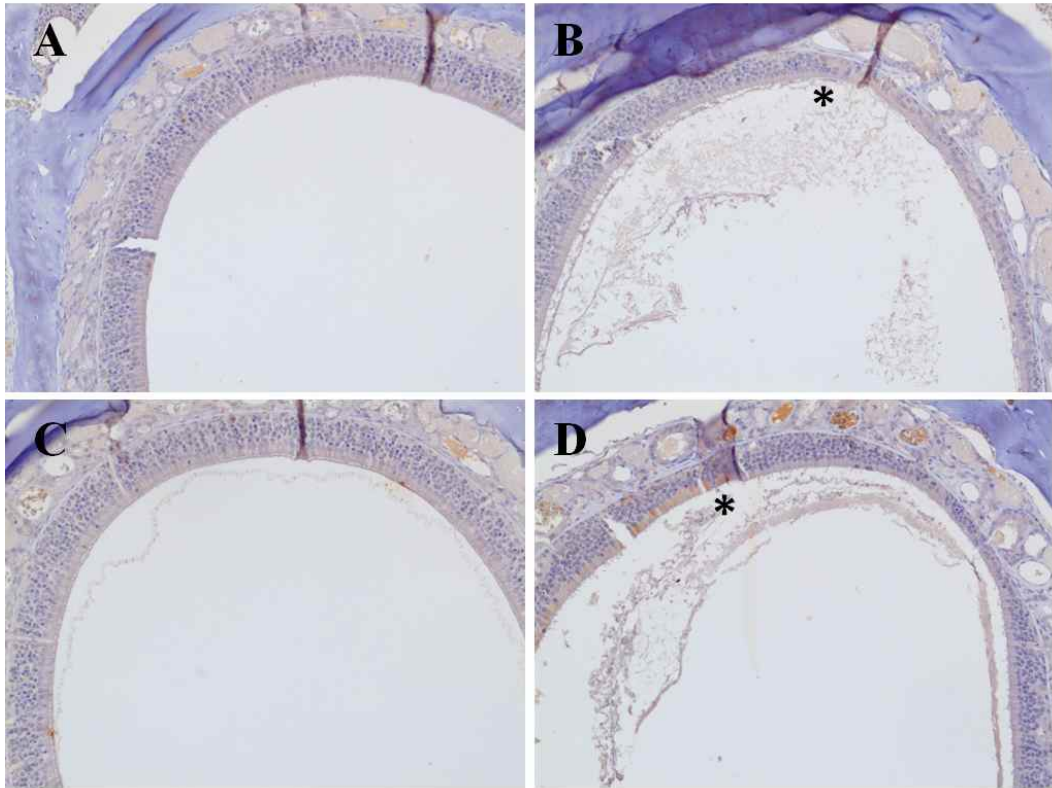
A), C), 대조군의 수컷 및 암컷 마우스의 간에서 갈색으로 염색된 CYP3A4 항체 부위(별표)가 확인되었다. B), D), 고농도군의 수컷 및 암컷 마우스의 간에서 발현된 CYP3A4 항체 반응 부위(별표)가 중심정맥 주변으로 확장되었음을 확인하였다. 면역조직화학염색.



*, + : Significantly different from the controls or female T3 group at $p < 0.05$, respectively.

[그림 3-8] 1,2-Dichlorobenzene에 흡입 노출된 마우스 간에서 CYP450 성별간 발현 차이

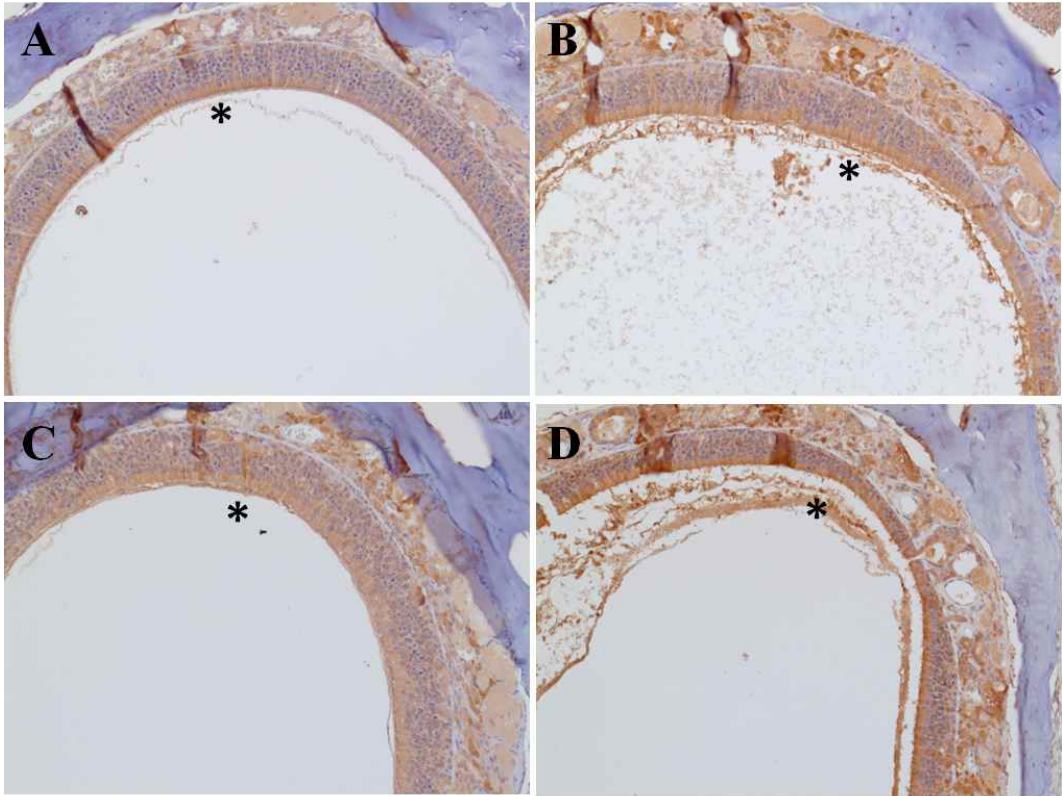
마우스의 간조직에서 암수 모두 대조군에 비해 고농도 군에서 통계적으로 유의하게 CYP2E1 및 CYP3A4 효소 발현이 증가하였으며($p < 0.05$), 암컷 고농도 군에 비해 수컷 고농도 군에서 통계적으로 유의하게 높은 발현도를 나타내었다($p < 0.05$)



A: Liver, control male mouse (x200)
B: Liver, T3 male mouse (x200)
C: Liver, control female mouse (x200)
D: Liver, T3 female mouse (x200)

**[그림 3-9] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스
비강의 CYP2E1 발현**

A), C), 대조군의 수컷 및 암컷 마우스의 비강에서 CYP2E1 항체의 발현이 거의 확인되지 않았다. B), D), 고농도군의 수컷 및 암컷 마우스의 비강에서 발현된 CYP2E1 항체 반응(별표)이 호산성 소구 부위에서 미약하게 확인되었다. 면역조직화학염색.



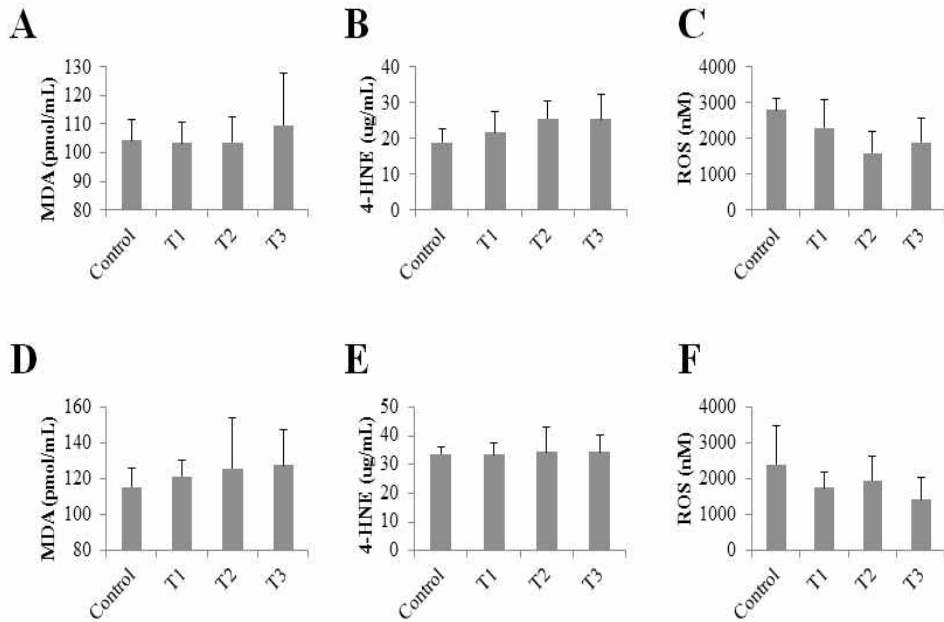
A: Liver, control male mouse (x200)
 B: Liver, T3 male mouse (x200)
 C: Liver, control female mouse (x200)
 D: Liver, T3 female mouse (x200)

**[그림 3-10] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출된 마우스
 비강의 CYP3A4 발현**

A), C), 대조군의 수컷 및 암컷 마우스의 비강에서 옅은 갈색으로 보이는 CYP3A4 항체의 발현 부위가 확인되었다. B), D), 고농도군의 수컷 및 암컷 마우스의 비강의 후각상피 부분에서 넓고 진한 갈색으로 염색된 CYP3A4 항체 반응(별표)이 확인되었다. 면역조직화학염색.

6. 조직 내 특정단백질 검출 결과

1,2-Dichlorobenzene을 90일 동안 흡입 노출시킨 B6C3F1 마우스의 냉동 간 조직을 이용하여 실시한 ROS/RNS, MDA 및 HNE의 ELISA 시험 결과, 암수 모두 시험물질 농도에 따라 ROS 및 RNS가 감소하는 경향이 관찰되었다. 그러나 지질과산화 산물인 MDA 및 HNE의 경우 수컷은 모두 증가하는 경향이 관찰되었고, 암컷은 MDA의 증가 경향이 확인되었다. [그림 3-10]



A, B, C : 1,2-Dichlorobenzene inhaled male mouse
D, E, F : 1,2-Dichlorobenzene inhaled female mouse

[그림 3-11] 1,2-Dichlorobenzene에 90일간 흡입 노출한 마우스 간의 지질과산화 관련 지표 변화

A), B), D), E), 1,2-DCB의 노출 농도에 따라 수컷에서 지질과산화 산물인 MDA 및 HNE가 증가함이 확인되었고, 암컷에서는 지질과산화 산물 중 MDA의 증가 경향이 확인되었다. C), F), 수컷 및 암컷 모두 1,2-DCB의 노출 농도에 따른 ROS 및 RNS의 감소 경향이 확인되었다.

IV. 고찰

1,2-Dichlorobenzene은 염소분자를 포함하는 벤젠화합물로 Dichlorobenzene 이성질체의 하나이다. 제초제, 살충제, 왁스 등의 용매로 이용되거나 금속, 가죽류의 탈지 용액 또는 염료의 중간반응물로 이용된다. 알려진 유해·위험성은 피부부식성, 피부자극성, 피부과민성, 특정표적장기독성 등이 있다. 국내에서 제조되는 경우보다 수입에 의존하여 사용하며, 최근 조사된 연간 사용량은 약 500여 톤으로 다량 사용되는 화학물질이다.

사람에서의 독성은 흡입 시 호흡기관의 염증, 간 및 신장 손상, 졸음, 무의식 및 중추신경계 기능저하 등을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 피부 노출 시 작열통, 가려움, 홍반을 동반한 자극 등을 유발하여 반복 노출 시 접촉성 피부염을 유발할 수 있는 것으로 보고되고 있다 (OECD, 2001).

알려진 동물실험의 결과로 90일 이내 아만성 노출의 경우, 흡입 노출 시 마우스의 상부 호흡기계 중 비강의 후각상피에 독성을 나타냈다는 보고가 있으며, 경구 투여 시 F344 랫드 및 B6C3F1 마우스에서 체중 감소, 간세포 변성, 피사 및 비장과 흉선의 림프구 감소, 신세뇨관 변성 등을 유발한다는 보고가 있다 (NTP, 1985). 또한 SD 랫드에 경구 투여 시 간 및 신장 무게 증가, 비장 무게 감소, 간세포 변성, 비대 및 단일세포사멸 등이 나타났다는 결과가 있다 (Robinson et al., 1991) 만성 및 발암성 동물 시험의 경우 경구 및 흡입 노출 시험의 결과가 있는데, 시험 결과 크롬친화성세포종, 사이질세포종양, 림프종, 악성림프종, 세기관지폐포암종 및 선종 등 여러 장기에서 종양이 유발된 보고가 있었지만 연구진에 의해 시험물질에 의한 발암성으로 인정되지 않았다 (NTP, 1985)

동물 또는 세포 등을 이용한 배태자 시험 및 유전독성 시험의 결과는 매우

다양하게 보고되고 있으나, 랫드 및 마우스의 DNA-covalent binding 양성 결과 및 마우스 소핵시험 양성 결과가 확인된 바 있으나 (Mohtashamipur et al., 1987; Colacci et al., 1990), 말초 혈액에서 소핵다염색소 적혈구의 빈도를 증가시키지 않았다는 상반된 연구결과가 존재함에 따라 유럽연합(EU)에서는 1,2-dichlorobenzene을 유전독성물질로 규정하지 않았다 (Kim and Rye, 20007). 또한 임신한 F344 랫드 및 뉴질랜드 토끼를 이용한 시험 결과, 배태자에서 기형발생률은 유의하게 증가하지 않았으며 (Hayes, 1985), 임신한 SD 랫드를 이용한 시험에서 태자의 기형성이 관찰되지 않았다. (Ruddick et al., 1983).

그러나 유전독성 시험 결과 중 마우스 소핵시험의 시험 과정에서 다양한 종류의 벤젠화합물을 함께 실험하였는데 dichlorobenzene 이성질체 중 1,3-dichlorobenzene

+e 이 가장 높은 빈도를 보였으며 1,4-dichlorobenzene 역시 1,2-Dichlorobenzene보다 높은 빈도를 보였다. 이 중 1,4-dichlorobenzene의 경우 랫드 및 마우스의 경구 투여로 간세포 선종/암종, 신장 암종 및 단핵구성 백혈병, 양성 및 악성 크롬친화성세포종 등의 보고가 있으며 (IARC, 1987), 추가적인 흡입 시험의 결과로 마우스에서 간세포 암종 유발 등이 보고되어 (Aiso et al., 2005), 동물실험의 충분한 근거가 존재하여 사람에서 발암성 가능 물질로 알려져 있다 (NTP, 2016). 또한 인체 대상의 여러 코호트 연구에서 dichlorobenzenes에 의한 사람에서의 종양 가능성이 제기되어 왔으나. 아직까지 추가적인 연구는 진행되지 않고 있다 (IARC, 1999).

화학물질 유통량, 노출 근로자 수 등을 고려함과 동시에, 1,2-Dichlorobenzene에 대한 GLP 및 OECD 가이드라인 등에 맞는 최신의 흡입 발암성 실험 결과생산을 위해 랫드 및 마우스의 발암성 시험을 준비 중에 있는데, 기초가 될 추가 자료가 요구됨에 따라 28일 또는 90일간의 전신 흡입 노출시험을 한 실험동물 생체 시료를 이용하여 시험 물질에 대한 랫드 및 마우스의 생체의 변화에서 성별 차이를 확인하고, 병변에 대한 독성병리 기전에 대

하여 연구하고자 하였다.

F344 랫드를 이용한 28일 흡입독성 시험에서 암수 고농도군에서 시험물질에 의한 체중변화가 인정되었으며 간의 절대/상대 중량이 증가하였다. 이러한 중량 변화는 조직병리학적 소견에서 나타난 소엽중심성의 간세포 거대세포핵, 공포화, 단일세포 괴사와 연관된 것으로 여겨진다. 그러나 90일 흡입독성 시험의 결과는 노출 기간의 증가에도 불구하고 암수 랫드에게 시험물질에 의한 체중, 육안소견, 혈액학/혈액생화학, 조직병리학적 변화를 유발하지 않았다. B6C3F1 마우스를 이용한 28일 흡입독성 시험에서 암수 고농도군에서 사망 및 빈사개체가 발생하였고, 생존한 수컷 마우스의 간에 괴사와 관련된 이영양성 무기질 침착 등을 유발하였으며, 암수 모두의 비강에서 상피의 위축, 호산성 소구, 기저세포 증생, 재생 동반 변성 등을 유발하였다. 90일 시험의 결과, 사망개체는 발생하지 않았으나 수컷 고용량 마우스에서 동일한 소견이 관찰되었고, 암수 모든 노출군에서 비강의 조직병리학적 이상 소견이 나타났다.

F344 랫드의 경우 동일 용량의 1,2-Dichlorobenzene 노출에 대해 성별간의 특정 장기 독성 등 특별한 차이는 관찰되지 않았으며, 28일 및 90일 시험의 결과에서 나타난 시험물질에 의한 변화는 지속적인 노출에 더하여 초기 노출의 회복이 함께 나타난 결과로 생각된다. B6C3F1 마우스의 경우는 랫드와 달리 동일 농도로 실시한 28일 시험의 초기노출 단계에서 대다수의 사망/빈사 개체가 발생하였으며, 90일 시험에도 수컷 마우스에 특징적인 간의 독성을 나타냈다.

그러나 흡입 노출된 마우스에서 발견된 비강의 소견은 정도와 빈도의 미미한 차이는 있지만, 암수 모두 비강 중 유기용제 계열의 화합물에 영향을 많이 받는 것으로 알려진 호흡상피에서 후각상피로 이어지는 특정 부위에 공통적으로 시험물질에 의한 손상이 발생되었다. 이와 관련, 비강 크기 및 성별등에 따라 호흡량 및 종차 등의 이유로 예상되었던 시험물질에 의한 독성의 차이는 확인되지 않았지만, 호흡기를 통해 시험물질이 실험동물의 생체내로 진입 후 상

피 등에 영향을 미친 것으로 여겨지며, 이에 대한 확실한 검증은 각 시험 동물의 혈류 내 특정 대사성 산물을 탐색하는 등의 추가적 연구를 통해 이뤄질 수 있을 것으로 생각된다.

마우스의 실험 결과, 1,2-Dichlorobenzene의 흡입독성은 추가적으로 간에서 일차적인 대사가 일어나며, 초기 변화에 적응한 개체는 지속적인 조직 손상 및 회복을 반복하는 양상을 보이는 것으로 여겨진다. 이에 대한 1,2-Dichlorobenzene의 대사 관련 문헌 연구 결과, 시험 물질은 빠르게 흡수되어 대사 초기에 시토크롬 (CYP) P450에 의한 산화 작용으로 중간에폭시드를 형성하는데, 이와 간독성이 연관된다는 연구 결과가 존재하며, CYP P450 억제하거나, GSH를 고갈시킬 경우 간독성의 감소 또는 증가한다는 보고가 있다 (Stine et al., 1991; Valentovic et al., 1993). 또한 랫드 및 마우스의 간세포를 이용한 효소대사 실험 결과 동물 종 및 성별 간 대사 속도의 차이가 있는 것으로 보고되었다.

F344 및 Spratue-Dawley (SD) 랫드를 이용한 실험에서, F344 랫드는 SD 랫드에 해 1,2-Dichlorobenzene을 빨리 대사하였고, 이와 유사하게 반응성 1,2-Dichlorobenzene 대사물의 각 랫드의 간에 대한 공유결합 (covalent binding)의 정도도 F344 랫드에서 높게 나타났다 (Fisher et a., 1995). 그리고 랫드 간의 마이크로솜내 대사에 있어 Wistar, F344 및 SD 랫드를 대상으로 한 연구 결과에 따르면 대사 속도는 Wistar와 F344가 비슷하고 SD 랫드가 느린 것으로 보고되었다. 또한 epoxide hydrolase의 억제에 의해 dihydrodiol이 감소하고 공유결합이 증가하는데, F344 랫드의 마이크로솜은 다른 랫드 변종들에 비해 낮은 수준의 에폭시드 하이드롤라아제 활성을 가지고 있음이 보고되었고, 이는 공유 결합에 있어 랫드의 종간 차이에 epoxide가 연관되었음을 시사한다 (Hissink et al., 1996).

1,2-Dichlorobenzene의 성별 차이에 대한 문헌에서 랫드(Wistar) 및 마우스 (B6C3F1)를 이용한 실험 결과, 암컷 랫드의 마이크로솜은 수컷 랫드보다 더 빨

리 1,2-DCB를 대사했으나, 대조적으로 수컷 마우스의 마이크로솜은 암컷 생쥐의 마이크로솜보다 1,2-DCB 신진대사에 있어서 효율적이었고, 마우스에서의 1,2-DCB의 마이크로솜 대사량은 랫드에 비해 7배 빠르다는 보고가 있다. 추가적으로, 대사물의 공유 결합은 암수 모두에서 랫드에 비해 마우스에서 더 높았다. (Nedelcheva et al., 1998).

간 대사 관련, 주요 효소를 확인하기 위해 90일 흡입독성 시험의 마우스 생체 시료를 이용해 간 및 비강에서의 CYP450 유도를 확인한 결과, CYP2E1 및 CYP3A4는 간의 중심정맥을 중심으로 발현되었으며, CYP3A4가 CYP2E1에 비해 높은 intensity를 나타냈고, 암수 모두 노출군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였고 또한 수컷 마우스에서 암컷 마우스보다 유의성 있게 발현도가 증가했다. 비강의 경우 CYP2E1은 CYP3A4 대비 낮은 발현도를 보였으나, 두 효소 모두 대조군에 비해 고농도 군의 호산성 소구 소견 부위에 반응하여 발현된 양상을 보였으며 암컷의 intensity가 약간 증가한 경향을 보였다. 간과 비강에서 각 CYP450 효소의 성별 간 발현도 차이에 대해 비강의 현미경적 사진으로 확인된 암컷에서의 효소의 증가 경향은 비강 조직에서의 발현 정도를 수치화하여 분석할 수 없는 발현 양상을 보여 통계적 유의성을 확인하기 어렵고, 비강의 칼슘을 제거하기 위해 사용된 탈회 용액에의 보존 시간과 비강을 포함한 머리뼈 부위의 크기에 따라 미미하게 표면 항원에 영향을 미친 것으로 여겨진다.

추가적으로 이와 관련된 기존 연구 결과로서, CYP450 효소는 화학물질의 간 대사에 대해 중요한 역할을 수행하며, ROS (reactive oxygen species)를 생성하여 산화적 손상(oxidative stress)을 유발하고, 지질과산화(lipid peroxidation), 단백질 불활성화 및 DNA 손상 등에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Cederbaum et al., 2001). 이에 따른 산화적 손상을 탐색하기 위해 보편적으로 생체 내 반응 시간이 짧은 free radical 반응보다 이에 의해 유발된 MDA, HNE 등의 생물학적 지표를 분석하는 것으로 보고된다 (Kanter et al., 1993).

ELISA 시험법을 이용해 분석한 90일 흡입독성시험의 마우스 간 조직 내 ROS/RNS, MDA 및 HNE 측정 결과, 암수 모두 시험물질 농도에 따라 ROS 및 RNS가 감소하는 경향이 관찰되었다. 그러나 지질과산화 산물인 MDA 및 HNE의 경우 수컷 마우스에서 증가하는 경향이 관찰되었고, 암컷 마우스에서 MDA의 증가 경향이 확인되었다. 이러한 결과는 기존의 알려진 1,2-DCB의 초기 대사 산물에 의한 간독성과 일치하는 것으로, 다만 ROS/RNS의 감소는 초기손상 단계 이후를 지나 지속적인 시험물질 노출에 의한 지속적인 조직 손상 및 회복에 따른 것으로 여겨진다. 다만 연구의 제한점으로서, 본 연구의 결과는 1,2-Dichlorobenzene을 흡입 노출한 동물에서 실험적으로 시험물질에 의한 장기 독성 및 대사 관련 효소의 변화를 확인한 것으로, 주요 대사 효소 등 인체의 경우와는 차이가 있으며, 실험 동물 생체 내 대사체의 정량적 검증 등을 통해 실제적으로 각 개체에서의 물질 대사 여부 및 대사량 확인하는 등의 추가적 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

V. 결 론

1,2-Dichlorobenzene은 다양한 산업 분야에서 이용되며, 제초제, 살충제 및 왁스 등의 용매로 이용되거나 탈지 용액 또는 염료의 생산 과정 중에 이용된다. 기존의 알려진 유해·위험성에 따르면, 1,2-DCB는 피부 부식성, 피부자극성, 피부과민성, 특정표적장기독성을 유발하는 것으로 알려져 있고, 전량 수입·사용중인 물질로 최근의 연간 사용량은 약 500여 톤으로 다량 사용되는 물질이다.

주요 노출 경로로 흡입, 피부 등이 알려져 있으나, 근로자 등 인체 노출의 경우 대부분 단독 화합물질 형태가 아닌 벤젠 등의 유기용매와의 혼합 물질에 의한 노출의 경우가 많아 인체 위해성 등의 정보가 부족한 실정이다. 또한 이성질체인 1,4-dichlorobenzene은 내분비 교란물질 및 인체 발암성 가능 물질로 알려져 있고, 1,2-Dichlorobenzene에 대해 효소대사 실험 결과 대사 속도 등의 성별 차이 있는 것으로 알려져 있어, 이에 따라 동물의 흡입독성시험의 결과 종별/성별 차이가 있을 것으로 예상되며, 연구 결과를 바탕으로 향후 발암성 시험 및 인체유해성 조사를 위한 기초적인 자료를 생산하고자 했다.

문헌 조사를 통해 물질 정보 및 선행 독성 시험에 대한 조사를 바탕으로 28일 및 90일 전신 흡입노출을 수행한 F344 랫드 및 B6C3F1 마우스의 생체 시료 분석 결과 28일 노출된 암수 랫드에서 시험물질에 의한 체중 변화, 간 중량 변화 및 간세포 거대세포핵, 공포화, 단일세포괴사 등 병리조직학적 이상 소견이 관찰되었고 마우스에서 암수 모두 고농도군의 사망/빈사 개체 및 비강의 상피 위축, 호산성 소구, 기저세포 증생, 재생 동반 변성 등의 조직병리학적 소견이 관찰되었고, 수컷 마우스에서 괴사 소견과 관련된 이영양성 무기질 침착 등이 유발되었다. 90

일 시험의 결과 랫드에서 시험물질에 의한 생체 지표의 변화는 관찰되지 않았으며, 암수 모두 및 수컷 마우스에서 28일과 동일한 소견이 관찰되었다.

이러한 마우스의 성별 간 소견 차이에 대해, 면역조직화학법을 통해 대사 관련 효소인 시토크롬 P450 (CYP2E1 및 CYP3A4)의 발현 증가와 장기 별 성별에 따른 발현도 차이가 확인되었다. 또한 세포손상 관련, 지질과산화 산물인 MDA 및 HNE가 마우스의 암수 노출군에서 증가하는 경향이 관찰되었다.

관련 문헌 및 실험 결과를 종합적으로 살펴볼 때, 1,2-Dichlorobenzene은 랫드의 간과 마우스의 간 및 비강에 장기 특이적 독성을 유발하고, 이러한 독성은 시토크롬 P450의 성별간 발현도 차이 및 시험물질의 초기 대사 산물과 연관된 지질과산화 산물의 변화에 따른 것으로 여겨진다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 해당 물질에 의한 독성 기전 연구의 기초 자료를 마련하고, 화학물질을 사용하는 작업장에 성별 등 차이에 대한 독성 관련 추가 정보를 제공하며, 유해 화학물질 노출 근로자의 건강 유해성 평가 등에 보조 자료를 추가할 수 있을 것으로 판단된다.

참고 문헌

안전보건공단 (2019) 화학물질정보검색 및 물질규제정보: o-디클로로벤젠. <http://msds.kosha.or.kr/kcic/msdsdetail.do>

원정일 (2005) 유해물질 산업보건 편람. 14, o-디클로로벤젠 (d-Dichlorobenzene). p. 14-15

Aiso S, Takeuchi T, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. (2005) Carcinogenicity and chronic toxicity in mice and rats exposed by inhalation to para-dichlorobenzene for two years. J Vet Med Sci 67(10): 1019-1029.

Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A, Cetrangolo GP, Giordano G, Cucci MA, Graf M, Gentile F. (2018) Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. Antioxidants (Basel). 30;7(8).

Bogaards JJ, Van Ommen B, Wolf CR, van Bladeren PJ. (1995) Human cytochrome P450 in the oxidation of chlorinated benzenes. Toxicol Appl Pharmacol 132:44-52.

Cederbaum AI, Wu D, Mari M, Bai J. (2001) CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. Free Radic Biol Med.

15;31(12):1539-43.

den Besten C, Ellenbroek M, van der Ree MA, Rietjens IM, van Bladeren PJ. (1992) The involvement of primary and secondary metabolism in the covalent binding of 1,2- and 1,4-dichlorobenzenes. *Chem Biol Interact* 84:259-275

Fisher RL, Hasal SJ, Sipes IG, Gandolfi AJ, Brendel K. (1995) Comparative metabolism and toxicity of dichlorobenzenes in Sprague-Dawley, Fischer-344 and human liver slices. *Human Expt Toxicol*, 14:414-421.

Hayes WC, Hanley TR Jr, Gushow TS, Johnson KA, John JA. (1985) Teratogenic potential of inhaled dichlorobenzene in rats and rabbits. *Fund. Appl. Toxicol.* 5: 190-202.

Hawkins DR, Chasseaud LF, Woodhouse RN, Cresswell DG. (1980) The distribution of excretion and biotransformation of p-dichloro[14C]benzene in rats after repeated inhalation, oral and subcutaneous doses. *Xenobiotica* 10:81-95

Hissink AM, Oudshoorn MJ, Van Ommen B, Haenen GR, Van Bladeren PJ. (1996) Differences in cytochrome P450-mediated biotransformation of 1,2-dichlorobenzene by rat and man: implications for human risk assessment. *Chem Res Toxicol* 9:1249-1256

Hollingsworth RL, Adams EM, Rowe VK, Oyen F, Torkelson TR. (1958) Toxicity of o-dichlorobenzene. Studies on animals and industrial experience. A.M.A. Arch. Indust. Health 17: 180-187.

IARC. (1987). ortho-Dichlorobenzene and para-dichlorobenzene. In Overall Evaluations of Carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, suppl. 7. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. pp. 192-193.

IARC. (1999). Dichlorobenzenes. In Some Chemicals that Cause Tumors of the Kidney or Urinary Bladder in Rodents and Some Other Substances. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 73. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. pp. 223-276.

Kanter MM, Nolte LA, Holloszy JO. (1993) Effect of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. J Appl Physiol 74:965-969.

Kulkarni SG., Duong H, Gomila R, Mehendale HM. (1996) Strain differences in tissue repair response to 1,2-dichlorobenzene. Archives of Toxicology 70 (11): 714-23

Lawlor, T., S.R. Haworth and P. Voytek. (1979) Evaluation of the genetic activity of nine chlorinated phenols, seven chlorinated benzenes, and three chlorinated hexanes. Environ. Mutagen. 1(2): 143.

(Abstr.)

Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Frantik E. (1998) Cytochrome P450 catalyzed oxidation of monochlorobenzene, 1,2- and 1,4-dichlorobenzene in rat, mouse, and human liver microsomes. *Chem Biol Interact* 115:53-70

NTP (National Toxicology Program). (1985). Toxicology and carcinogenesis studies of 1,2-dichlorobenzene (o-dichlorobenzene) (CAS No. 95-50-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage study). NTP, Research Triangle Park, NC. NTP-TR- 255. NIH Publ. No. 86-2511.

NTP (National Toxicology Program). (2016). Report on Carcinogens, Fourteenth Edition.; Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <https://ntp.niehs.nih.gov/go/roc14>

OECD (2001). Screening information data(SID) set for 1,2-dichlorobenzene, 95-50-1. p.23

Prasad I, Pramer D. (1968) Mutagenic activity of some chloroanilines and chlorobenzenes. *Genetics*. 60: 212-213. (Abstract) U.S. EPA. 1985.

Robinson M, Bercz JP, Ringhand HP, Condie LW, Parnell MJ. (1991) Ten- and ninety-day toxicity studies of 1,2-dichlorobenzene

administered by oral gavage to Sprague-Dawley rats. Drug Chem Toxicol 14:83-112.

Ruddick JA, Black WD, Villeneuve DC. (1983) A teratological evaluation following oral administration of trichloro- and dichlorobenzene isomers to the rat. Teratology 27:73A-74A.

SC. (2002). List of Endocrine Toxicants, New York, NY, US, Scorecard, Environmental Defense, available at http://www.scorecard.org/health-effects/chemicals.tcl?short_hazard_name=repro&all_p=t

Stine ER, Gunawardhana L, Sipes IG. (1991) The acute hepatotoxicity of the isomers of dichlorobenzene in Fischer-344 and Sprague-Dawley rats: isomer-specific and strain-specific differential toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 109:472-481

U.S. EPA. (1987). Drinking Water Criteria Document for ortho-Dichlorobenzene, meta-Dichlorobenzene, para-Dichlorobenzene. Office of Drinking Water, Washington, DC.

U.S. EPA. (2004). IRIS Toxicological Review of Dichlorobenzenes External Review Draft). US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA/635/R-03/015

Valentovic MA, Ball JG, Anestis D, Madan E (1993) Modification of

P450 activity and its effect on 1,2-dichlorobenzene toxicity in Fischer 344 rats. *Toxicology* 79:169-180

YJ Kim and JC Ryu. (2007) Evaluation of the Genetic Toxicity of Synthetic Chemical (XVII) -In vitro Mouse Lymphoma Assay and In vitro Supravital Micronucleus Assay with 1, 2-Dichlorobenzene. *Molecular and Cellular Toxicology*, 3:113-118.

Younis HS, Hoglen NC, Kuester RK, Gunawardhana L, Sipes IG. (2000) 1,2-Dichlorobenzene-mediated hepatocellular oxidative stress in Fischer-344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 163:141-148

Zapata-Gayon C, Zapata-Gayon N, Gonzalez-Angulo A. (1982) Clastogenic chromosomal aberrations in 26 individuals accidentally exposed to ortho dichlorobenzene vapors in the National Medical Center in Mexico City. *Arch. Environ. Health*. 37(4): 231-235.

Zissu D. (1995) Histopathologic changes in the respiratory tract of mice exposed to ten families of airborne chemicals. *J Appl Toxicol* 15:207-213.

Abstract

A Study on the Sex Difference in Organic Solvents (1,2-Dichlorobenzene) in laboratory animals

Eun-Sang Cho, Hye-Youn Choi, Kyung-Taek Rim, Yong-soon Kim

Occupational Safety Research Department,
Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA

Objective

1,2-Dichlorobenzene (1,2-DCB) is used in various industrial areas, as a solvent such as herbicides, pesticides and wax, or process of degreasers or production of dyes. According to studies about hazards and risks of 1,2-DCB, this substance is known to cause skin corrosion, skin irritability, skin irritability and certain target organ toxicity. Although inhalation and skin are known as major exposure routes, most human exposure, such as industrial workers, is caused by mixed substances with organic solvents such as benzene, rather than in the form of a single compound, which lacks information such as human hazards. In this study, we investigated the specific organ toxicity and sex differences using rat and mouse inhaled for

28 or 90 days of 1,2-DCB.

Method

We performed 28 or 90-day repeated inhalation toxicity study of 1,2-DCB using male and female F344 rats and B6C3F1 mice. The animals were exposed to 0-450 ppm of test substance during 4 weeks or 0-300 ppm of test substance during 13 weeks. After sacrifice, the hematology, coagulation and blood chemistry were performed and the organs were collected and histopathological assessments, immunohistochemistry (IHC) and lipid peroxidation were investigated.

Result

28-day exposed male and female rats demonstrated changes in body weight and liver weight, and histopathological findings of liver, and both male and female mice were shown toxicological findings in liver and nasal cavity. The results of the 90-day studies showed no changes caused by test substance in rats, but the same findings as 28 days in both male and female mice. For these differences of sexes of mice, the IHC analysis identified the increase in the expression of metabolism-related enzymes, cytochrome P450s, and the difference in expression due to gender by organ. Also, increases were observed for MDA and HNE, products of lipid peroxide which is associated with cell damage in the male exposed group of mice.

Conclusion

Based on the comprehensive review of relevant literature and experimental results, 1,2-DCB is believed to cause specific organ toxicity in the liver of rats and liver and nasal cavity of mice, which is caused by differences in intersex manifestations of cytochrome P450 and changes in lipid and oxidative products associated with the early metabolites of test substance.

Keywords : 1,2-Dichlorobenzene, 1,2-DCB, inhalation toxicity,
B6C3F1, upper respiratory toxicity, liver toxicity

〈〈연 구 진〉〉

연 구 기 관 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

연구책임자 : 조 은 상 (연구위원, 산업화학연구실)

연 구 원 : 최 혜 연 (연 구 원, 산업화학연구실)

연 구 원 : 임 경 택 (부장, 산업화학연구실)

연 구 원 : 김 용 순 (연구위원, 산업화학연구실)

〈〈연 구 기 간〉〉

2019. 1. 1 ~ 2019. 11. 30

본 연구보고서의 내용은 연구책임자의 개인적 견해이며, 우리 연구원의 공식견해와 다를 수도 있음을 알려드립니다.

산업안전보건연구원장

**유기용제(1,2-Dichlorobenzene)의
성별간 독성차이 규명 연구**

2019-연구원-1613

발 행 일: 2019년 11월 30일
발 행 인: 산업안전보건연구원 원장 고 재 철
연구책임자: 산업화학연구실 연구위원 조 은 상
발 행 처: 안전보건공단 산업안전보건연구원
주 소: (44429) 울산광역시 중구 종가로 400
전 화: (042) 869-0300
F A X: (042) 863-8361
Homepage: <http://oshri.kosha.or.kr>
