

## 1,4-Dichlorobutane 생식능 및 차세대영향시험

정용현<sup>1\*</sup> · 김종규<sup>1</sup> · 유욱준<sup>2</sup>

<sup>1</sup>산업안전보건연구원 화학물질센터 · <sup>2</sup>안전성평가연구소

## Reproductive and Developmental Toxicity Study of 1,4-Dichlorobutane

Yong Hyun Chung<sup>1\*</sup> · Jong Kyu Kim<sup>1</sup> · Wook Joon Yu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Chemical Safety and Health Research Center, Occupational Safety & Health Research Institute, KOSHA, Daejeon

<sup>2</sup>Korea Institute of Toxicology, KRICT, Daejeon

### ABSTRACT

**Objectives:** The present study was conducted in order to investigate the reproductive toxicity in rats exposed to 1,4-dichlorobutane.

**Methods:** The test chemical was administered orally at 0, 8.3, 50 and 300 mg/kg/day. Males were administered daily for 10 weeks prior to the mating period. Females were administered from between two weeks before mating to the 21<sup>st</sup> day of lactation.

**Results:** In both sexes, a decrease in body weight and an increase in the weights of the liver and kidneys were observed. In males, discoloration of the liver, hepatocyte hypertrophy and mineralization in the kidneys were observed. In females, animal deaths, dystocia and pup deaths due to maternal dysfunction were observed. In F1 animals of both sexes, a decrease in body weight was observed at 300 mg/kg/day. An increase in the weights of the liver in both sexes, mineralization in the kidneys of males, animal deaths, hepatocyte hypertrophy and pup deaths due to maternal dysfunction were observed at 50 mg/kg/day. Mineralization in the kidneys of males was observed at 8.3 mg/kg/day. Therefore, the no-observed-adverse-effect ROSs of 1,4-dichlorobutane were considered to be under 8.3 mg/kg/day for males, 8.3 mg/kg/day for females, more than 300 mg/kg/day for fertility in both sexes, 8.3 mg/kg/day for maternal functions and 50 mg/kg/day for F1 offspring. The absolute toxic dose was believed to be 8.3 mg/kg/day for males, 50 mg/kg/day for females, 50 mg/kg/day for maternal functions and 300 mg/kg/day for F1 offspring. However NOAEL for fertility could not be determined since there were no treatment-related changes.

**Conclusions:** Under the present experimental conditions, 1,4-dichlorobutane is a Category 1B Reproductive Toxicant (presumed human reproductive or developmental toxicant).

**Key words :** 1,4-dichlorobutane, reproductive and developmental toxicity, spermatotoxicity

### I. 서 론

1,4-dichlorobutane(1,4-DCB, Cas No. 110-56-5, C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>)은 무색의 액체로 유기염소계 화학물질인 Dichlorobutane의 다양한 이성질체중 하나이다. 합성섬유인 nylon 6,6의 전구체나 스판덱스 섬유 전구체인 Tetrahydrofuran의 합성 등에 이용되는 1,4-DCB는 우리나라에서도 연간 181,487톤이 유통되고 있는 대량생산 화학물질(High Production Volume, HPV)이다. 그러나 독성학적 자료나 인체노출정보는 매우 제한적이다(KOSHA, 2007).

그동안 수행된 동물실험결과에 의하면, 랫드 경구투여 반수치사량은 3,420 mg/kg이며(Merck Millipore, 2013), ICR 마우스의 골수세포를 이용한 소핵(Micronucleus) 시험 결과에서 소핵유발성은 없다고 보고되었다(Rim et al., 2011). 1,4-DCB를 랫드의 경구로 2주간 반복 투여한 결과 1,4-DCB의 무해용량(No-observed-adverse-effect level)은 222 mg/kg/day으로 산출되었으며, 표적 장기는 간과 비장 및 흉선으로 나타났다(Kim et al., 2013). 1,4-DCB를 랫드의 경구로 4주간 반복 투여한 시험에서 1,4-DCB의 무해용량은 300 mg/kg/day으로 산출되었으

\*Corresponding author: Yong Hyun Chung, Tel: 042-869-0344, E-mail: chungyh59@gmail.com

Chemical Safety and Health Research Center, Occupational Safety & Health Research Institute, KOSHA, 339-30, Expo Yuseong-Gu, Daejeon 305-380

Received: August 5, 2013, Revised: September 23, 2013, Accepted: September 24, 2013

며, 표적 장기는 간과 신장으로 나타났다(Yu et al., 2013).

본 연구는 아직 규명되지 않은 1,4-DCB가 생식능 및 차세대에 미치는 영향을 평가하기 위하여 1,4-DCB를 랫드의 경구로 반복투여한 후, 암수 생식장기의 기능과 성주기 변화, 교미행동, 수태, 분만, 포육 및 출생 후 성장에 미치는 영향을 평가하여 1,4-DCB의 무해영향농도를 산출하고, 화학물질의 분류·표지 세계조화시스템(Globally Harmonized System on Classification and Labeling for Chemicals)과 화학물질의 분류·표지 및 물질안전보건자료에 관한 기준(노동부고시 제2012-14호)에 따라 생식독성물질의 유해성 구분을 평가하기 위하여 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험법

시험물질 1,4-DCB가 생식능 및 차세대에 미치는 영향을 평가하기 위하여 국제적으로 통용되고 있는 시험법인 OECD Test Guideline No. 415(One-Generation Reproduction Toxicity Study)에 따라 OECD Principles of Good Laboratory Practice에 준하여 실시하였다(OECD, 2008).

### 2. 시험동물 및 사육환경

시험동물은 특정병원체 부재(Specific-pathogen free) SD 랫드 4주령의 수컷 116마리와 6주령의 암컷 116마리를 오리엔트 바이오에서 구입하였다. 수컷은 입수 후 1주일 간, 암컷은 입수 후 2주일간 순화 및 검역한 후 건강하고 체중이 고른 암수 각각 96마리를 선별하여 시험에 사용하였다.

동물실 사육환경은 온도  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도 40-60%, 환기회수 10~20 회/hr, 형광등조명 12 hr, (08:00 점등~20:00 소등) 및 조도 150~300 Lux를 유지하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(PMI Nutrition International, USA)를 자유롭게 섭취시켰으며, 물은 자외선 유수살균기를 이용하여 소독한 상수도수를 자유롭게 섭취시켰다. 순화 및 검역기간에는 암수 모두 스테인레스제 망사육상자(255W × 465L × 200H mm)에 암수 각각 4마리 이하씩 수용하였으며, 교배 전 투여기간에는 암수 모두 스테인레스제 망사육상자에 2마리씩 수용하였다. 교배 시에는 스테인레스제 망사육상자에 암수 1:1로 수용하였으며, 임신 및 포육기간에는 폴리카보네이트제 사육상자(240W × 390L × 180H)에 개체별로 수용하였다.

### 3. 투여량 설정 및 군구성

용량설정 예비시험에서 0, 10, 100, 300, 500 및 1000 mg/kg의 용량으로 1세대 번식독성 예비시험을 실시한 결과, 암컷 1000 및 500 mg/kg/day 투여군에서 사망동물이 관찰되었고, 수컷 1000 mg/kg/day 투여군에서 체중감소가 관찰되었다. 간과 신장의 중량은 수컷에서는 수컷 > 100 및 > 500 mg/kg/day에서 증가하였고, 암컷 > 300 mg/kg/day에서 증가하였다. 이러한 예비 시험결과를 기초로 300 mg/kg/day를 고용량군으로 설정하고, 공비 6을 적용하여 50 및 8.3 mg/kg/day의 중용량군과 저용량군을 설정하였다. 그 외에 용매를 투여하는 부형제대조군을 두었다. 시험군 구성은 건강한 동물만을 선별하여 체중을 측정한 다음 각 시험군에 체중이 균등히 분배되도록 무작위로 구성하였다. 각 군당 시험동물은 수컷 24마리, 암컷 24마리로 하였다.

### 4. 시험물질 투여

본 시험에 사용된 1,4-DCB는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 시험물질은 주 2회 이상 조제하였으며, 부형제인 Corn oil(Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)에 혼합하여 조제하였다. 대조군은 부형제인 corn oil만 투여하였다. 1,4-DCB 투여는 매일 08시에서 15시 사이에 경구투여용 주사침(Sonde)과 주사기를 이용하여 위내로 직접 주입하였다. 투여액은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 kg당 4 mL를 투여하였다. 수컷은 교배 10주전부터 교배기간의 종료시점까지 투여하였으며, 암컷은 교배 2주일 전부터 임신 및 포육 21일 까지 1일 1회 반복 투여하였다.

### 5. 일반증상관찰 및 체중측정

시험동물의 순화기간 및 비투여 기간에는 1일 1회, 투여 시에는 투여전후 각각 1회씩 동물의 일반상태, 증독증상 및 사망유무, 유산, 조산, 난산 등을 관찰하였다. 교배개시일 및 교배확인 된 암컷동물에 대해서는 추가로 1회 더 일반증상을 관찰하였다. 분만일에는 1 또는 2회 일반증상을 추가로 관찰하였다.

시험동물의 체중은 자동전자저울로 측정하였으며, 교배 전 및 교배기간의 암수동물은 주 2회씩, 임신동물은 임신 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 및 20일에 측정하였으며 포육동물은 포육 1, 4, 7, 14 및 21일에 측정하였다.

### 6. 사료섭취량측정

교배 전에는 암수 모두 주 1회 간격으로, 그리고 임신

기간 중에는 체중측정과 동일한 간격으로 체중측정일에 사료를 급여하였고 익일 잔량을 측정하였다. 단, 교배일에는 암수 공히 동거로 인해 교배전일에 사료를 급여하였고, 익일 잔량을 측정하였다. 또한 포육 21일의 부검을 위해 포육 20일에 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다.

## 7. 성주기 검사

암컷동물은 시험물질의 투여개시 후 2주간 질도말 검사를 실시하여 성주기의 규칙성과 기간을 조사하였다.

## 8. 교배 및 관찰항목

수컷은 70일간, 그리고 암컷은 14일간의 투여가 종료된 후 동일 시험군의 암수동물을 1:1로 최장 3주간 동거교배 시켰다. 익일 오전 중에 질전이나 질도말에서 정자가 확인되면 교미한 것으로 판정하여 임신 0일로 정하였으며, 교미확인동물은 개체별로 분리하여 시험을 진행하였다. 상기 결과를 기초로 하여 교미율<(교미확인 동물수/교미동물수)×100>, 수태율<(임신시킨 동물수/교미확인 동물수)×100>, 임신율<(임신된 동물수/교미확인 동물수)×100> 등의 자료를 산출하였다.

## 9. 임신, 포육기간 중 관찰항목

임신과 분만 상태(유산, 조산 및 난산) 등의 이상을 관찰하였으며, 분만일에는 임신기간, 생존/사망자수, 생존자의 성별, 발육이상 신생자(부형제 대조군의 신생자와 비교할 때 현저하게 작은 동물) 및 외표이상을 관찰하였다.

포육동물에 대한 체중측정은 포육 1, 4, 7, 14 및 21일째에 암·수 출생자를 구별하여 모동물별로 개별 체중을 측정하였다.

포육기간중에는 모동물의 포육상태와 생후 4일 및 21일째에 F1 동물의 생존자수를 확인하였다. 모든 출생자에 대하여는 1일 1회 일반증상을 관찰하였고, 임신기간, 출산율 <(생존자를 출산한 암컷동물수/임신암컷동물수)×100>, 생후 4일째 생존율<(생후 4일째 생존자수/생후 0일째 생존자수)×100>, 이유율<(생후 21일째 생존자수/생후 4일째 조정자수)×100>을 산출하였다.

사산자와 포육기간중의 사망자에 대해서는 외표검사와 부검을 실시하여 내부장기 기형발생 유무를 조사하였다.

## 10. 부검 및 장기중량 측정

수컷은 교배 종료 후 부검 전일 절식시키고 부검

하였다. 암컷 모동물은 포육 21일째 F1동물과 분리 후 하루 동안 절식시킨 후 부검하였다. F1동물은 21일령에 부검하였다. 단, 교미 미확인 암컷동물에 대해서는 최종동거일로부터 15일 이후에 부검하였다. 교미확인이 되었지만 분만하지 못한 암컷동물은 교미 후 27일째 이후에 부검하였다.

각 시험동물은 체중을 측정한 후 Isoflurane(채혈시) 또는 CO<sub>2</sub> 가스 마취(비채혈시)로 안락사를 시킨 후 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대하여 육안 검사를 실시하고, 이상 장기는 10% 중성완충포르말린액에 보존하였다. 암컷 모동물 부검 시 착상흔을 계수하였다.

F1 동물은 생후 21일째에 CO<sub>2</sub> 가스로 안락사 시킨 후 부검하여 육안적 소견을 검사하고, 각 모동물별로 암수 1마리씩 무작위로 선택하여 간 및 신장을 10% 중성완충포르말린액에 고정하였다.

장기중량측정은 비임신동물, 모든 출생자가 사망한 모동물 및 사망 동물을 제외한 모든 부검동물의 간, 신장의 장기중량을 측정하였다.

## 11. 정자검사

부검 시 수컷동물은 각 군당 10마리씩 부검일이 빠르고 동물번호가 빠른 동물을 선택하여 다음과 같은 검사를 실시하였다.

### 1) 고환 당 정자두부 수 검사

중량을 측정한 좌측고환의 백막을 제거하여 5 ml의 증류수가 들어있는 튜브에 넣은 다음 균질기(Homogenizer)를 이용하여 충분히 균질화한 후, 이 균질액에서 500 μL를 취하여 300 μL 1% collagenase(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 들어있는 튜브에 넣었다. 여기에 0.1% trypsin-EDTA(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 넣고 37°C에서 30분간 둔 후, 100 μL 0.5% Sodium dodecyl sulfate를 넣고 10분 동안 80 rpm으로 Shaking하였다. 처리된 시료 한 방울을 취하여 혈구계산판(Hemocytometer, Neubauer, Germany)에 고르게 퍼지도록 주입한 뒤 정자가 계산판내에서 충분히 안정되도록 5분 이상 방치한 후에 200배율 광학현미경으로 관찰하여 고환 당 총 정자두부 수를 계산하였다.

### 2) 정자운동성 측정

정자의 운동성(Motility)을 측정하기 위해 좌측부고

환 미부를 5 mg/ml의 Bovine serum albumin과 pH 7.4로 조정된 CO<sub>2</sub>-independent Media(Gibco, USA) 5 mL이 들어있는 1회용 배양접시에 넣고서 주사용 바늘을 이용하여 부고환내 정자들이 스며 나오도록 한 다음 37°C의 배양기에서 5분간 배양하였다. HTM-TOX IVOS 정자분석기(Hamilton-Thorne Co., USA)를 이용하여 Motility, Path velocity(VAP), Straight line velocity(VSL), Curvilinear velocity(VCL), The amplitude of the lateral head displacement(ALH), The beat cross-frequency(BCF), Straightness(STR), Linearity(LIN) 등의 항목을 검사하였다.

### 3) 부고환 미부당 정자 수 측정

정자운동성 검사 후 남은 정자배양액을 50 ml 튜브에 넣고 부고환 미부를 세절한 다음 5 ml의 멸균증류수를 넣는다. 균질기를 이용하여 1분 이상 균질화한 후, 정자두부수와 같은 방법으로 처리한 다음 혈구계산판에서 정자수를 계수하여 부고환당 총 정자수를 계산하였다.

### 4) 정자형태 검사

정자의 형태학적 검사를 위해 좌측 부고환 미부에서 얻은 정자배양액을 슬라이드 글라스 상에서 1% eosin Y와 2:1로 잘 혼합하여 염색표본을 만든 후, 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 형태학적 이상 유무를 관찰하였다.

## 12. 조직병리학적 검사

비임신동물을 제외한 부형제대조군 및 모든 투여군의 동물에 대해서는 정낭선(응고선 포함), 전립선, 난소, 자궁, 자궁경, 뇌하수체, 질, 간, 신장, 타액선, 갑상선 및 이상장기를 10% 중성완충포르말린액으로 고정시켰으며, 고환 및 부고환은 Bouin's액에 고정하였다. 차세대동물에 대해서 각 모동물별로 암수 1마리씩 무작위로 선택하여 간 및 신장을 10% 중성완충포르말린액으로 고정시켰다. 그리고 고정된 장기는 조직검체를 제작하여 조직병리학적 검사를 실시하였다.

## 13. 호르몬 분석

정자독성을 평가한 동물에 대해서는 부검 시 복대동맥에서 채혈한 후 외부기관(삼광임상검사센터)에 의뢰하여 혈중 테스토스테론 농도를 측정하였다.

## 14. 자료의 통계처리

자료에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 검사항목에 대해 Bartlett법으로 등분산 검정을 실시하였으며 유의성이 인정되지 않을 경우에는 일원배치분산분석을 유의수준  $\alpha=0.05$ 로 검정하여, 유의성이 인정되면 유의한 결과가 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett test를 실시하였다. Bartlett법에서 유의성이 인정된 경우에는 부등분산으로서 Non-parametric 통계학적 방법에 이용되는 Kruskal-Wallis(H) 검정을 유의수준  $\alpha=0.05$ 로 검정하여 유의성이 인정된 경우에만 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 조사하기 위하여 Dunn's Rank Sum test를 실시하였다. 시험자료가 빈도수를 나타낼 경우에는 Kruskal-Wallis(H) 검정을 실시하였고, 순위화한 자료를 이용한 Dunnett형 검정을 수행하였다. 출현율 및 백분율에 대한 시험자료는 자료의 정리로써 표현되거나 혹은 순위화한 H-검정 및 Fisher exact test를 실시하였다. 태자에 대한 시험자료는 한배에서 나온 황체수, 흡수배자(태자)수 및 사망태자수를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 통계학적인 유의성은 1% 혹은 5%에서 검사하였다. 이러한 분석은 GLP 독성시험용 전산프로그램인 Path/Tox System 또는 SAS program(SAS/STAT, Version 9.2, NC, USA) 을 이용하여 실시하였다.

## III. 연구결과

### 1. 친세대 모동물의 사망률 및 일반증상

친세대 사망률은 암컷 모동물에서는 사망동물이 50 mg/kg 투여군에서 5례, 300 mg/kg 투여군에서 12례가 관찰되었지만, 수컷 모동물에서는 사망동물이 관찰되지 않았다.

시험기간 동안 유연(Salivation)이 암수 모든 시험동물에서 빈번하게 관찰되었다(Table 1). 이외에 시험물질 투여와 무관한 이상소견이 낮은 빈도로 관찰되었다.

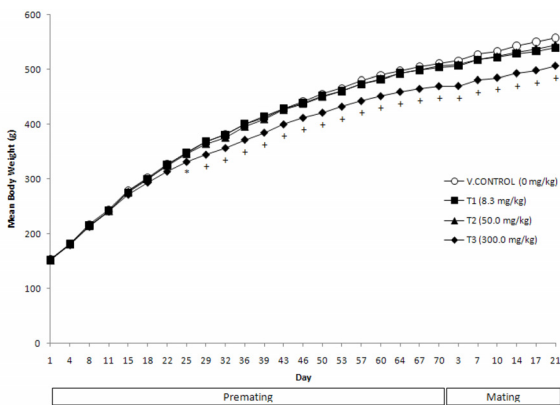
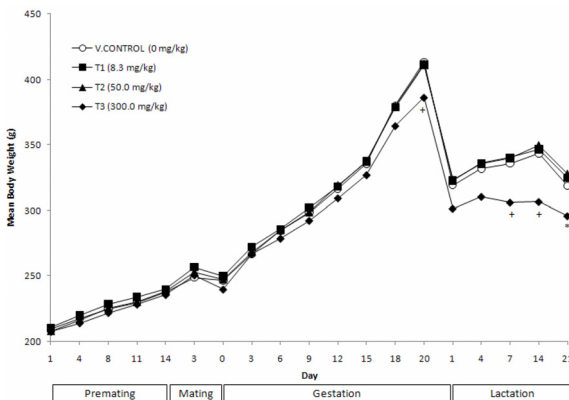
### 2. 친세대 동물의 체중

시험 기간 중 수컷동물의 체중을 측정한 결과(Figure 1), 300 mg/kg 투여군에서 투여 25일 이후 전 기간 동안 체중이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ).

교배전 기간과 임신기간 및 포육기간 동안 암컷동물의 체중을 측정한 결과(Figure 2), 300 mg/day 투여

**Table 1.** Salivation signs of rats treated with 1,4-dichlorobutane

|                | 1,4-Dichlorobutane(mg/kg/day) |      |       |       |
|----------------|-------------------------------|------|-------|-------|
|                | 0                             | 8.3  | 50    | 300   |
| <b>Male</b>    |                               |      |       |       |
| Premating      |                               |      |       |       |
| No. of animals | 0/24                          | 8/24 | 24/24 | 24/24 |
| Mating         |                               |      |       |       |
| No. of animals | 0/24                          | 5/24 | 24/24 | 24/24 |
| <b>Female</b>  |                               |      |       |       |
| Premating      |                               |      |       |       |
| No. of animals | 0/24                          | 3/24 | 17/24 | 23/24 |
| Mating         |                               |      |       |       |
| No. of animals | 0/24                          | 0/24 | 2/24  | 15/24 |
| Gestation      |                               |      |       |       |
| No. of animals | 0/24                          | 1/23 | 11/24 | 21/22 |

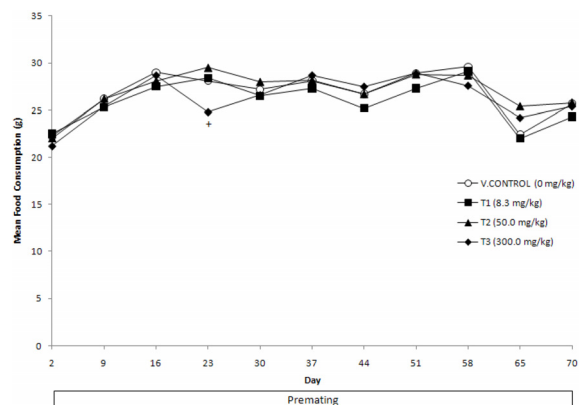
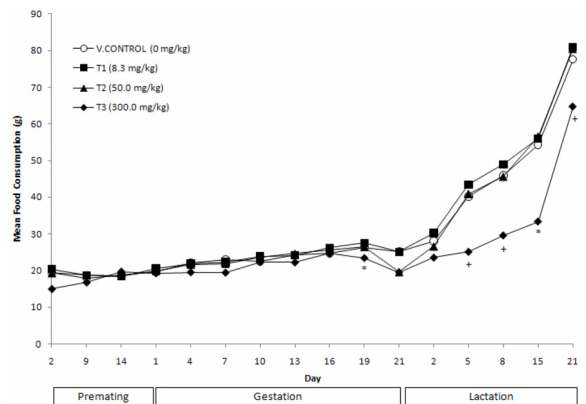
**Figure 1.** Mean body weight changes in male rats treated with 1,4-Dichlorobutane.\* : Significant differences from control group( $p<0.05$ )+ : Significant differences from control group( $p<0.01$ )**Figure 2.** Mean body weight changes in female rats treated with 1,4-Dichlorobutane\* : Significant differences from control group( $p<0.05$ )+ : Significant differences from control group( $p<0.01$ )

군에서 임신 20일째 및 포육 7일째 이후 대조군과 비교할 때 유의하게 감소하였다( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ).

### 3. 친세대 동물의 사료섭취량

시험기간 중 수컷동물의 사료섭취량을 측정한 결과 (Figure 3), 100 mg/kg 투여군에서 교배전 투여 23일째에 사료섭취량이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다( $p<0.01$ ).

암컷동물의 사료섭취량을 측정한 결과(Figure 4), 300 mg/kg 투여군에서 사료섭취량이 교배전 투여 2일째와 임신 19일째 및 포육 5일 이후 전 기간 동안 대조군과 비교할 때 유의하게 감소하였다( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ).

**Figure 3.** Daily food consumption of male rats treated with 1,4-Dichlorobutane+ : Significant differences from control group( $p<0.01$ )**Figure 4.** Daily food consumption of female rats treated with 1,4-Dichlorobutane\* : Significant differences from control group( $p<0.05$ )+ : Significant differences from control group( $p<0.01$ )

#### 4. 친세대 동물의 부검소견

교배종료 후 암수 모동물의 부검한 결과, 수컷 0, 8.3, 50 및 300 mg/kg 투여군에서 간의 변색이 1, 2, 3 및 17례 관찰되었다.

#### 5. 친세대 동물의 장기증량

부검시 암수 모동물의 장기증량을 측정하여 대조

군의 장기증량과 유의성을 평가한 결과(Table 2, 3), 간장은 300 mg/kg 투여군 암수 절대/상대 증량이 유의하게 증가하였고( $p<0.01$ ), 50 mg/kg 투여군 암수 상대 증량도 유의하게 증가하였다( $p<0.01$ ). 신장은 300 mg/kg 투여군의 수컷 절대/상대 장기증량과 암컷 상대증량이 유의하게 증가하였으며( $p<0.01$ ), 50 mg/kg 투여군의 수컷 상대증량도 유의하게 증가하였다( $p<0.01$ ). 비장

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

| Parameters         | 1,4-Dichlorobutane(mg/kg/day) |                 |                             |                              |
|--------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|
|                    | 0                             | 8.3             | 50                          | 300                          |
| No. of male rats   | 24                            | 24              | 24                          | 24                           |
| Liver(g)           | 14.820 ± 2.5437               | 14.412 ± 2.0080 | 16.071 ± 2.7890             | 19.884 ± 2.3314 <sup>+</sup> |
| per body weight(%) | 2.803 ± 0.2241                | 2.822 ± 0.2570  | 3.145 ± 0.2767 <sup>+</sup> | 4.258 ± 0.2785 <sup>+</sup>  |
| Kidney(g)          | 3.748 ± 0.4674                | 3.655 ± 0.3795  | 3.916 ± 0.4894              | 4.521 ± 0.4856 <sup>+</sup>  |
| per body weight(%) | 0.714 ± 0.0520                | 0.718 ± 0.0607  | 0.771 ± 0.0545 <sup>+</sup> | 0.971 ± 0.0848 <sup>+</sup>  |
| Brain(g)           | 2.041 ± 0.0674                | 2.066 ± 0.0804  | 2.037 ± 0.0689              | 2.064 ± 0.1040               |
| per body weight(%) | 0.392 ± 0.0414                | 0.408 ± 0.0317  | 0.404 ± 0.0397              | 0.445 ± 0.0420 <sup>+</sup>  |
| Pituitary gland(g) | 0.012 ± 0.0022                | 0.012 ± 0.0024  | 0.012 ± 0.0020              | 0.011 ± 0.0021               |
| per body weight(%) | 0.002 ± 0.0004                | 0.002 ± 0.0005  | 0.002 ± 0.0003              | 0.002 ± 0.0005               |
| Spleen(g)          | 0.782 ± 0.1082                | 0.767 ± 0.1409  | 0.776 ± 0.1623              | 0.634 ± 0.0943 <sup>*</sup>  |
| per body weight(%) | 0.149 ± 0.0136                | 0.150 ± 0.0201  | 0.152 ± 0.0235              | 0.136 ± 0.0157 <sup>+</sup>  |
| Heart(g)           | 1.629 ± 0.2173                | 1.539 ± 0.1532  | 1.541 ± 0.1630              | 1.548 ± 0.1778               |
| per body weight(%) | 0.311 ± 0.0438                | 0.302 ± 0.0214  | 0.304 ± 0.0271              | 0.332 ± 0.0314 <sup>+</sup>  |
| Thymus             | 0.404 ± 0.0798                | 0.394 ± 0.1033  | 0.356 ± 0.0839              | 0.317 ± 0.0491 <sup>+</sup>  |
| per body weight(%) | 0.077 ± 0.0135                | 0.077 ± 0.0185  | 0.070 ± 0.0148              | 0.068 ± 0.0102               |
| Salivary glands    | 0.675 ± 0.0749                | 0.680 ± 0.0770  | 0.677 ± 0.0913              | 0.608 ± 0.0622 <sup>+</sup>  |
| per body weight(%) | 0.129 ± 0.0112                | 0.134 ± 0.0128  | 0.134 ± 0.0158              | 0.131 ± 0.0149               |
| Seminal vesicle(g) | 1.947 ± 0.2933                | 1.928 ± 0.3309  | 2.006 ± 0.2886              | 1.936 ± 0.3190               |
| per body weight(%) | 0.374 ± 0.0660                | 0.381 ± 0.0761  | 0.397 ± 0.0612              | 0.417 ± 0.0723               |
| Prostate(g)        | 0.627 ± 0.1240                | 0.664 ± 0.1464  | 0.651 ± 0.1578              | 0.586 ± 0.1474               |
| per body weight(%) | 0.120 ± 0.0232                | 0.131 ± 0.0281  | 0.129 ± 0.0329              | 0.126 ± 0.0322               |
| adrenal glands(g)  | 0.056 ± 0.0090                | 0.054 ± 0.0081  | 0.058 ± 0.0084              | 0.054 ± 0.0084               |
| per body weight(%) | 0.011 ± 0.0015                | 0.011 ± 0.0016  | 0.011 ± 0.0017              | 0.012 ± 0.0018               |
| Testes(g)          | 3.505 ± 0.2204                | 3.436 ± 0.6028  | 3.421 ± 0.3057              | 3.400 ± 0.2684               |
| per body weight(%) | 0.672 ± 0.0622                | 0.678 ± 0.1266  | 0.680 ± 0.0899              | 0.736 ± 0.0966 <sup>*</sup>  |
| Epididymides       | 1.407 ± 0.0963                | 1.377 ± 0.1993  | 1.380 ± 0.1093              | 1.355 ± 0.1036               |
| per body weight(%) | 0.270 ± 0.0288                | 0.272 ± 0.0435  | 0.274 ± 0.0380              | 0.293 ± 0.0369               |
| Lung(g)            | 1.690 ± 0.1413                | 1.680 ± 0.1170  | 1.672 ± 0.1549              | 1.525 ± 0.1184 <sup>+</sup>  |
| per body weight(%) | 0.324 ± 0.0320                | 0.331 ± 0.0254  | 0.330 ± 0.0264              | 0.328 ± 0.0254               |
| Thyroid/parathy(g) | 0.023 ± 0.0040                | 0.021 ± 0.0042  | 0.021 ± 0.0037              | 0.022 ± 0.0039               |
| per body weight(%) | 0.004 ± 0.0006                | 0.004 ± 0.0008  | 0.004 ± 0.0008              | 0.005 ± 0.0008               |

Values are presented as Mean ± S.D.

<sup>\*</sup>: Significant differences from control group( $p<0.05$ )

<sup>+</sup>: Significant differences from control group( $p<0.01$ )

**Table 3.** Absolute and relative organ weights in female rats treated with 1,4-dichlorobutane

| Parameters         | 1,4-Dichlorobutane(mg/kg/day) |                 |                  |                  |
|--------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
|                    | 0                             | 8.3             | 50               | 300              |
| No. of female rats | 23                            | 23              | 18               | 5                |
| Liver(g)           | 12.176 ± 1.1846               | 12.355 ± 1.3398 | 13.382 ± 1.1637+ | 14.275 ± 1.6242* |
| per body weight(%) | 4.154 ± 0.3617                | 4.152 ± 0.3458  | 4.516 ± 0.3284+  | 5.533 ± 0.4785*  |
| Kidney(g)          | 2.255 ± 0.2051                | 2.370 ± 0.1664  | 2.388 ± 0.2575   | 2.425 ± 0.1356   |
| per body weight(%) | 0.769 ± 0.0672                | 0.798 ± 0.0509  | 0.807 ± 0.0877   | 0.943 ± 0.0754*  |
| Brain(g)           | 1.925 ± 0.1010                | 1.908 ± 0.0703  | 1.898 ± 0.0774   | 1.891 ± 0.0342   |
| per body weight(%) | 0.657 ± 0.0326                | 0.644 ± 0.0406  | 0.642 ± 0.0426   | 0.736 ± 0.0603+  |
| Pituitary gland(g) | 0.004 ± 0.0006                | 0.005 ± 0.0009  | 0.004 ± 0.0008   | 0.005 ± 0.0006   |
| per body weight(%) | 0.002 ± 0.0004                | 0.002 ± 0.0005  | 0.002 ± 0.0003   | 0.002 ± 0.0005   |
| Spleen(g)          | 0.607 ± 0.1082                | 0.595 ± 0.1409  | 0.608 ± 0.1623   | 0.356 ± 0.0943*  |
| per body weight(%) | 0.207 ± 0.0238                | 0.200 ± 0.0190  | 0.205 ± 0.0259   | 0.136 ± 0.0238*  |
| Heart(g)           | 1.093 ± 0.0985                | 1.135 ± 0.1077  | 1.054 ± 0.0958   | 0.901 ± 0.0419*  |
| per body weight(%) | 0.373 ± 0.0329                | 0.382 ± 0.0256  | 0.356 ± 0.0332   | 0.351 ± 0.0395   |
| Thymus             | 0.0532 ± 0.0798               | 0.263 ± 0.0382  | 0.226 ± 0.0519   | 0.106 ± 0.0579*  |
| per body weight(%) | 0.087 ± 0.0173                | 0.089 ± 0.0128  | 0.076 ± 0.0168   | 0.040 ± 0.0168*  |
| Salivary glands    | 0.508 ± 0.0471                | 0.533 ± 0.0664  | 0.514 ± 0.0656   | 0.405 ± 0.0559*  |
| per body weight(%) | 0.174 ± 0.0154                | 0.179 ± 0.0191  | 0.173 ± 0.0194   | 0.157 ± 0.0182   |
| adrenal glands(g)  | 0.068 ± 0.0105                | 0.070 ± 0.0105  | 0.075 ± 0.0127   | 0.093 ± 0.0190*  |
| per body weight(%) | 0.023 ± 0.0038                | 0.024 ± 0.0043  | 0.026 ± 0.0044   | 0.037 ± 0.0095*  |
| Ovaries(g)         | 0.099 ± 0.0161                | 0.097 ± 0.0121  | 0.099 ± 0.0122   | 0.068 ± 0.0173*  |
| per body weight(%) | 0.034 ± 0.0050                | 0.033 ± 0.0039  | 0.034 ± 0.0046   | 0.026 ± 0.006*   |
| Lung(g)            | 1.296 ± 0.1057                | 1.334 ± 0.0856  | 1.326 ± 0.0998   | 1.207 ± 0.0715   |
| per body weight(%) | 0.442 ± 0.0288                | 0.449 ± 0.0247  | 0.447 ± 0.0210   | 0.469 ± 0.0229   |
| Thyroid/parathy(g) | 0.018 ± 0.0040                | 0.019 ± 0.0047  | 0.017 ± 0.0039   | 0.017 ± 0.0071   |
| per body weight(%) | 0.006 ± 0.0014                | 0.006 ± 0.0017  | 0.006 ± 0.0012   | 0.007 ± 0.0022   |
| Uterus/Cervix      | 0.645 ± 0.2072                | 0.654 ± 0.2040  | 0.600 ± 0.2092   | 0.411 ± 0.1324   |
| per body weight(%) | 0.220 ± 0.0687                | 0.221 ± 0.0705  | 0.204 ± 0.0759   | 0.157 ± 0.0349   |

Values are presented as Mean ± S.D.

\* : Significant differences from control group(p<0.01)

은 300 mg/kg 투여군의 암수 절대/상대 중량이 유의한 감소를 보였다(p<0.01, p<0.05). 흉선은 300 mg/kg 투여군의 수컷 절대중량과 암컷 절대/상대중량이 유의하게 감소하였다(p<0.01). 타액선은 300 mg/kg 투여군의 암수 절대중량이 유의하게 감소하였다(p<0.01). 폐는 수컷 300 mg/kg 투여군의 절대중량이 유의하게 감소하였다(p<0.01). 심장은 300 mg/kg 투여군의 수컷 상대중량이 유의하게 증가하였고(p<0.01), 암컷 절대중량은 유의하게 감소하였다(p<0.01). 부신은 암컷 300 mg/kg 투여군의 절대/상대 중량이 유의한 증가를 보였다(p<0.01). 난소는 암컷 300 mg/kg 투여군의 절대/상대

중량이 유의하게 감소하였다(p<0.01). 뇌는 암수 300 mg/kg 투여군의 상대중량이 유의하게 증가하였다(p<0.01). 고환은 수컷 300 mg/kg 투여군의 상대중량이 유의하게 증가하였다(p<0.05).

## 6. 친세대 동물의 조직병리학적 소견

친세대 모동물에 대한 조직병리학적 검사를 실시한 결과(Table 4), 시험물질 투여와 연관된 소견이 간과 신장에서 관찰되었다.

매우 약한 정도(+)에서 약한 정도(++)까지의 간세포 비대(Hepatocyte hypertrophy)가 수컷과 암컷 300 mg/

**Table 4.** Histopathological findings of the rats treated with 1,4-dichlorobutane

| Dose(mg/kg/day)                   | Male |     |    |     | Female |     |    |     |
|-----------------------------------|------|-----|----|-----|--------|-----|----|-----|
|                                   | 0    | 8.3 | 50 | 300 | 0      | 8.3 | 50 | 300 |
| No. of rats examined              | 24   | 24  | 24 | 24  | 24     | 23  | 24 | 21  |
| Kidney                            |      |     |    |     |        |     |    |     |
| Tubular degeneration/regeneration | 9    | 5   | 8  | 6   | 0      | 4   | 3  | 2   |
| Mineralization, cortex            | 7    | 5   | 9  | 5   | 1      | 0   | 3  | 1   |
| Inflammatory cell foci            | 11   | 5   | 10 | 5   | 2      | 3   | 4  | 0   |
| Cyst                              | 1    | 0   | 1  | 0   | 0      | 1   | 2  | 1   |
| Mineralization, corticomedulla    | 0    | 0   | 0  | 0   | 11     | 14  | 9  | 8   |
| Tubular dilatation                | 0    | 0   | 0  | 0   | 1      | 0   | 0  | 2   |
| Tubular vacuolation, diffuse      | 0    | 0   | 0  | 0   | 0      | 0   | 0  | 5   |
| Hydronephrosis                    | 0    | 1   | 0  | 1   | 0      | 0   | 0  | 0   |
| Tubular cell hyperplasia          | 0    | 0   | 2  | 1   | 0      | 0   | 0  | 0   |
| Casts                             | 1    | 2   | 5  | 1   | 0      | 0   | 0  | 3   |
| Hyaline droplets                  | 0    | 0   | 0  | 0   | 0      | 0   | 0  | 1   |
| Tubular necrosis                  | 0    | 0   | 0  | 0   | 0      | 0   | 0  | 1   |
| Focal nephropathy                 | 0    | 0   | 0  | 0   | 0      | 0   | 1  | 0   |
| Mineralization, medulla           | 4    | 9   | 11 | 17  | 6      | 6   | 4  | 4   |
| Liver                             |      |     |    |     |        |     |    |     |
| Inflammatory cell foci            | 20   | 21  | 24 | 19  | 12     | 11  | 13 | 1   |
| Hepatocyte hypertrophy            | 0    | 0   | 0  | 14  | 0      | 0   | 9  | 16  |
| Peripotal vacuolation             | 3    | 8   | 17 | 10  | 0      | 0   | 0  | 6   |
| Pigment, sinusoid                 | 0    | 0   | 0  | 0   | 0      | 0   | 3  | 6   |
| Bile duct hyperplasia             | 0    | 0   | 0  | 0   | 0      | 0   | 0  | 1   |
| Salivary glands                   |      |     |    |     |        |     |    |     |
| Inflammatory cell foci            | 1    | 0   | 1  | 0   |        |     |    |     |
| Atrophy                           |      |     |    |     | 0      | 0   | 1  | 4   |
| Pituitary gland                   |      |     |    |     |        |     |    |     |
| Cyst, pars intermedia             | 2    | 3   | 2  | 3   | 2      | 0   | 0  | 2   |
| Cyst, pars distalis               | 0    | 0   | 2  | 2   | 0      | 2   | 0  | 0   |
| Vacuolation                       | 6    | 4   | 6  | 6   |        |     |    |     |
| Thyroid glands                    |      |     |    |     |        |     |    |     |
| Follicular cell hypertrophy       | 10   | 7   | 12 | 7   | 10     | 6   | 6  | 0   |
| Teates                            |      |     |    |     |        |     |    |     |
| tubular atrophy                   | 1    | 1   | 1  | 2   |        |     |    |     |
| Tubular dilation                  | 1    | 0   | 0  | 0   |        |     |    |     |
| Epididymides                      |      |     |    |     |        |     |    |     |
| Inflammatory cell foci            | 4    | 5   | 6  | 5   |        |     |    |     |
| Aspermia                          | 0    | 1   | 1  | 0   |        |     |    |     |
| Seminal vesicle                   |      |     |    |     |        |     |    |     |
| Inflammatory cell foci            | 0    | 2   | 1  | 0   |        |     |    |     |
| Prostate                          |      |     |    |     |        |     |    |     |
| Inflammatory cell infiltration    | 6    | 13  | 11 | 9   |        |     |    |     |



kg/day 투여군에서 각 14/24레와 16/21레 관찰되었고 암컷 50 mg/kg/day 투여군에서 9/24레 관찰되었다. 간세포비대는 시험물질에 의한 변화로 판단되고 시험물질에 대한 적응성 변화로 보인다. 수컷 0, 8.3, 50, 및 300 mg/kg/day 투여군에서 매우 약한 정도(+)에서 중간 정도(+++)까지의 문맥주위 공포형성(Periportal vacuolation)이 각각 3/24레, 8/24레, 17/24레, 및 10/24레가 관찰되었다. 문맥주위 공포형성은 발생 빈도가 투여군에서 높게 관찰되나 부형제가 Corn oil인 점과 용량 상관성이 없는 점을 고려할 때 시험물질에 의한 변화는 아닌 것으로 판단된다. 또한 조직구 또는 림프구 침윤이 특징적인 염증세포 병소(Inflammatory cell foci)가 부형제 대조군을 포함하여 모든 투여군에서 관찰되었으나 용량상관성이 없어 시험물질에 의한 변화는 아닌 것으로 판단된다.

수컷 0, 8.3, 50, 및 300 mg/kg/day 투여군의 신장에서 매우 약한 정도의 광물질침착(Mineralization, medulla)이 각각 4/24레, 9/24레, 11/24레, 및 17/24레가 관찰되었다. 용량에 따른 빈도수 증가를 고려할 때 시험물질 투여에 의한 변화로 판단된다. 광물질침착에 따른 세포손상은 관찰되지 않았으나 오랜 기간 노출 시 주위 조직에 영향을 줄 수 있다. 암컷에서는 용량에 따른 변화가 관찰되지 않았다. 수컷에서 정도와 빈도가 높게 나타나 시험물질의 노출기간의 차이 또는 성차에 따른 것으로 판단된다. 이 외에 장기에서 관찰된 병리조직 소견은 발생빈도와 정도가 용량에 따른 변화가 관찰되지 않았거나 체중변화(자궁과 질의 위축)와 연관되어 나타날 수 있는 소견이었다. 또한 동일 종의 랫드에서 관찰될 수 있는 소견으로 시험물질과의 연관성은 적은

**Table 5.** Reproductive and littering findings of dams treated with 1,4-dichlorobutane during pre-mating, mating, lactation periods

| Parameters                             | 1,4-Dichlorobutane(mg/kg/day) |             |              |              |
|--|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|
|  | 0                             | 8.3         | 50           | 300          |
| Estrous cycle                          |                               |             |              |              |
| - Length(days)                         | 4.00 ± 0.0                    | 4.06 ± 0.22 | 4.11 ± 0.37  | 4.19 ± 0.29  |
| - Regularity                           |                               |             |              |              |
| Regular(%)                             | 23(95.8)                      | 23(95.8)    | 22(91.7)     | 18(81.8)     |
| Irregular(%)                           | 1(4.2)                        | 1(4.2)      | 2(8.3)       | 4(18.2)      |
| Females placed with males(N)           | 24                            | 24          | 24           | 21           |
| Copulation index(%) <sup>*</sup>       | 24/24(100)                    | 24/24(100)  | 24/24(100)   | 21/21(100)   |
| Precoital index(day) <sup>†</sup>      | 2.6 ± 2.62                    | 2.6 ± 1.24  | 2.3 ± 2.22   | 2.6 ± 1.43   |
| Female fecundity index(%) <sup>‡</sup> | 24/24(100)                    | 23/24(95.8) | 24/24(100)   | 18/24(85.7)  |
| Male fertility index(%) <sup>§</sup>   | 24/24(100)                    | 23/24(95.8) | 24/24(100)   | 18/21(85.7)  |
| Delivery index(%) <sup>  </sup>        | 24/24(100)                    | 23/24(95.8) | 24/24(100)   | 16/18(88.9)  |
| No. of dams showing dystocia           | 0                             | 0           | 0            | 2            |
| No. of dams without litter             | 0                             | 0           | 1            | 3            |
| Duration of gestation(day)             | 21.6 ± 0.38                   | 21.7 ± 0.42 | 21.7 ± 0.39  | 21.9 ± 0.27  |
| Stillborn pups(N)                      | 2                             | 2           | 3            | 5            |
| Pups with external anomalies(N)        | 1                             | 1           | 0            | 1            |
| Pups alive at birth(N)                 | 13.7 ± 1.43                   | 13.8 ± 1.50 | 13.0 ± 2.75  | 12.7 ± 1.82  |
| Male/female                            | 178 / 151                     | 158 / 160   | 174 / 138    | 102 / 101    |
| Viability index(%) <sup>¶</sup>        | 99.4 ± 2.10                   | 98.5 ± 2.96 | 94.4 ± 20.40 | 90.3 ± 13.97 |
| Lactation index(%) <sup>**</sup>       | 100                           | 100         | 100          | 100          |

Values are presented as Mean ± S.D.

<sup>\*</sup> Copulation index =(No. of animals with successful copulation / No. of mated animal) × 100.

<sup>†</sup> Precoital index = No. of days taken to mate

<sup>‡</sup> Female fecundity index =(No. of females pregnant / No. of females mated) × 100.

<sup>§</sup> Male fertility index =(No. of impregnating animals / No. of animals with successful copulation) × 100.

<sup>||</sup> Delivery index =(No. of delivering females / No. of pregnant females) × 100.

<sup>¶</sup> Viability index =(No. of live pups at day 4 / No. of live pups at birth) × 100.

<sup>\*\*</sup> Lactation index =(No. of live pups at day 21 / No. of live pups after litter size control) × 100

것으로 판단된다.

## 7. 천세대 동물의 성주기검사, 교배소요기간, 교배 결과

각 군당 암컷동물을 2주간 성주기검사를 실시한 결과(Table 5), 성주기 기간과 규칙성 모두 대조군과 시험물질 투여군 간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

각 군당 교미가 확인된 암컷동물의 교미소요기간을 산출한 결과(Table 5), 대조군과 시험물질 투여군 간에 유의한 차이는 인정되지 않았다.

수컷동물은 70일간 그리고 암컷동물은 14일간 시험물질을 투여한 후 최장 3주간 동거교배 시킨 결과(Table 5), 암수동물의 교미율과 수컷 수태율 및 암컷 임신율 모두 대조군과 시험물질 투여군간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

## 8. 천세대 수컷 모동물의 혈중 호르몬 농도 및 정자 분석

교배 종료 후, 각 군당 10마리의 수컷동물을 부검하여 혈중 테스토스테론 농도 및 정자검사를 실시한 결과, 정자운동성은 대조군과 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 6). 정자수를 관찰한 결과, 고환에서는 대조군과 비교하여 300 mg/kg/day 투여군은 유의하게 감소되었지만, 부고환 미부에서는 대조군과 비교하여 8.3, 50, 300 mg/kg/day 투여군에서 유의하게 증가되었다(Table 7). 정자 형태의 경우 대조군과 시험물질 투여군 간에 유의차는 관찰되지 않

았다. 한편, 혈중 테스토스테론 농도는 50 및 300 mg/kg/day 투여군은 유의하게 증가되었다.

## 9. 생식 및 산자 조건

교미가 확인된 암컷동물에 대해 생식 및 산자조건을 관찰한 결과(Table 5), 난산은 300 mg/kg 투여군에서 2례가 있었다. 모든 신생자가 사망한 모동물이 50 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 1 및 3례 관찰되었다. 비임신 동물은 8.3 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 1례 및 2례 관찰되었다.

## 10. F1 동물의 체중과 부검조건

자연 분만된 F1 암·수동물의 체중을 측정한 결과(Table 8), 관찰기간동안 300 mg/kg 투여군 암수동물에서 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다.

모든 F1 생존동물을 포육 21일째 부검하여 관찰한 결과, 시험물질 투여에 기인한 이상소견은 관찰되지 않았다.

## 11. F1 동물의 간 및 신장에 대한 조직병리학적 검사

모든 F1 생존동물을 포육 21일째 부검하여 간 및 신장에 대한 조직병리학적 검사를 실시한 결과(Table 9), 시험물질 투여와 연관된 소견은 관찰되지 않았다.

간의 위축은 매우 약한 정도로 수컷과 암컷 300 mg/kg/day 투여군에서 각각 4/6례 및 2/6례 관찰되었고 신장의 위축은 매우 약한 정도에서 약한 정도까지 수

**Table 6.** Sperm motility of the male rats treated with 1,4-dichlorobutane

| Parameters        | 1,4-Dichlorobutane(mg/kg/day) |               |               |               |
|-------------------|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                   | 0                             | 8.3           | 50            | 300           |
| No. of males      | 10                            | 10            | 10            | 10            |
| Motile Parameters |                               |               |               |               |
| Motility(%)       | 86.8 ± 6.11                   | 82.7 ± 7.33   | 80.4 ± 8.67   | 82.1 ± 7.87   |
| VAP(μm/s)         | 140.5 ± 11.64                 | 131.2 ± 14.56 | 134.5 ± 12.84 | 133.3 ± 13.21 |
| VSL(μm/s)         | 94.4 ± 7.34                   | 90.5 ± 12.40  | 90.6 ± 5.83   | 88.3 ± 10.74  |
| VCL(μm/s)         | 290.0 ± 20.25                 | 275.6 ± 32.46 | 280.8 ± 21.13 | 279.8 ± 27.70 |
| ALH(μm)           | 18.1 ± 1.42                   | 17.3 ± 1.06   | 17.9 ± 2.41   | 17.8 ± 2.37   |
| BCF(Hz)           | 21.6 ± 2.20                   | 21.5 ± 1.40   | 21.2 ± 1.27   | 22.1 ± 2.50   |
| STR(%)            | 68.8 ± 3.52                   | 70.4 ± 4.67   | 69.0 ± 5.68   | 67.6 ± 5.34   |
| LIN(%)            | 33.3 ± 1.77                   | 33.7 ± 2.87   | 33.2 ± 2.39   | 32.4 ± 2.17   |

Motility(%) = Percentage of motile spermatozoa, VAP(μm/s) = Path velocity, VSL(μm/s) = Straight line velocity  
VCL(μm/s) = Curvilinear velocity, ALH(μm) = Amplitude of the lateral head displacement, BCF(Hz) = Beat cross-frequency  
STR(%) = Straightness ; VSL/VAP(%), LIN(%) = Linearity ; VSL/VCL(%)

**Table 7.** Serum testosterone levels and sperm examination results of the male rats treated with 1,4-dichlorobutane

| Parameters                        | 1,4-Dichlorobutane(mg/kg/day) |                           |                            |                            |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                   | 0                             | 8.3                       | 50                         | 300                        |
| No. of males examined             | 10                            | 10                        | 10                         | 10                         |
| Serum testosterone levels(ng/ml)  | 0.91 ± 0.699                  | 1.35 ± 0.989              | 3.04 ± 2.293 <sup>‡</sup>  | 2.58 ± 2.117 <sup>†</sup>  |
| Sperm head count(x106/testis)     | 166.1 ± 24.01                 | 152.2 ± 26.31             | 152.7 ± 11.8               | 130.4 ± 33.64 <sup>†</sup> |
| Sperm head count(x106/epididymis) | 185.4 ± 22.96                 | 238.0 ± 25.7 <sup>‡</sup> | 216.1 ± 26.42 <sup>†</sup> | 226.8 ± 29.55 <sup>‡</sup> |
| Sperm abnormality(%) <sup>*</sup> | 7.8 ± 4.66                    | 5.8 ± 3.5                 | 4.7 ± 3.68                 | 6.1 ± 3.2                  |
| No. of abnormal sperms            | 156                           | 115                       | 94                         | 121                        |
| Small head                        | 63                            | 30                        | 15                         | 41                         |
| Amorphous head                    | 7                             | 1                         | 2                          | 0                          |
| Excessive hook                    | 7                             | 6                         | 3                          | 2                          |
| Folded tail                       | 5                             | 14                        | 8                          | 2                          |
| No tail                           | 14                            | 17                        | 25                         | 23                         |

<sup>\*</sup> Sperm abnormality =(No. of abnormal sperms/No. of examined sperms)× 100

<sup>†</sup> : Significant differences from control group(p<0.05)

<sup>‡</sup> : Significant differences from control group(p<0.01)

**Table 8.** Body weights(g) of F1 rats

|               | 1,4-Dichlorobutane(mg/kg/day) |             |              |               |
|---------------|-------------------------------|-------------|--------------|---------------|
|               | 0                             | 8.3         | 50           | 300           |
| Male          |                               |             |              |               |
| Day 1 Growth  | 7.6 ± 0.54                    | 7.8 ± 0.56  | 7.5 ± 0.63   | 6.8 ± 0.94 +  |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 22           | 14            |
| Day 4 Growth  | 10.9 ± 0.86                   | 11.3 ± 1.04 | 11.1 ± 1.08  | 9.4 ± 1026 +  |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 22           | 9             |
| Day 7 Growth  | 18.3 ± 1.17                   | 18.9 ± 1.65 | 18.7 ± 1.61  | 14.0 ± 1.71 + |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 22           | 8             |
| Day 14 Growth | 36.7 ± 2.00                   | 37.8 ± 3.27 | 37.0 ± 3.29  | 24.8 ± 2.47 + |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 20           | 6             |
| Day 21 Growth | 59.5 ± 3.45                   | 61.7 ± 5.02 | 57.3 ± 14.73 | 41.5 ± 5.12 + |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 18           | 6             |
| Femle         |                               |             |              |               |
| Day 1 Growth  | 7.1 ± 0.49                    | 7.3 ± 0.57  | 7.1 ± 0.52   | 6.4 ± 0.98 *  |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 22           | 14            |
| Day 4 Growth  | 10.4 ± 0.74                   | 10.6 ± 1.07 | 10.7 ± 0.92  | 9.0 ± 1.55 *  |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 22           | 9             |
| Day 7 Growth  | 17.4 ± 1.11                   | 17.8 ± 1.94 | 17.9 ± 1.24  | 12.9 ± 2.85 + |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 20           | 6             |
| Day 14 Growth | 35.1 ± 1.93                   | 36.2 ± 3.52 | 35.6 ± 2.87  | 24.2 ± 1.68 + |
| No. of dams   | 24                            | 23          | 20           | 6             |
| Day 21 Growth | 57.3 ± 2.99                   | 59.3 ± 5.01 | 55.0 ± 13.67 | 40.9 ± 3.66 + |
| No. of dams   |                               |             |              |               |

Values are presented as Mean±S.D.

\* : Significant differences from control group(p<0.05)

+ : Significant differences from control group(p<0.01)

Table 9. Histopathological findings of F1 rats

| Dose(mg/kg/day)                   |      | Male |     |    |     | Female |     |    |     |
|-----------------------------------|------|------|-----|----|-----|--------|-----|----|-----|
|                                   |      | 0    | 8.3 | 50 | 300 | 0      | 8.3 | 50 | 300 |
| No. of male rats examined         |      | 24   | 23  | 24 | 21  | 24     | 24  | 24 | 24  |
| Kidney                            | # Ex | 24   | 23  | 18 | 6   | 24     | 23  | 18 | 6   |
| Tubular degeneration/regeneration |      | 10   | 5   | 5  | 0   | 3      | 6   | 5  | 0   |
| Tubular dilatation                |      | 0    | 1   | 2  | 2   | 0      | 1   | 2  | 1   |
| Fibrosis                          |      | 1    | 0   | 0  | 0   | 0      | 1   | 1  | 0   |
| Cyst                              |      | 3    | 3   | 2  | 1   | 6      | 4   | 4  | 0   |
| Mineralization                    |      | 0    | 1   | 0  | 0   | 0      | 1   | 0  | 0   |
| Atrophy                           |      | 0    | 0   | 0  | 2   | 0      | 0   | 0  | 5   |
| subacute inflammation             |      |      |     |    |     | 1      | 0   | 0  | 0   |
| Forcal nephropathy                |      |      |     |    |     | 0      | 0   | 1  | 0   |
| Liver                             | # Ex | 24   | 23  | 18 | 6   | 24     | 23  | 18 | 6   |
| Extramedullary hemopoiesis        |      | 24   | 23  | 18 | 2   | 24     | 23  | 18 | 6   |
| Focal necrosis                    |      | 0    | 1   | 0  | 0   |        |     |    |     |
| Atrophy                           |      | 0    | 0   | 0  | 4   | 0      | 0   | 0  | 2   |

컷과 암컷 300 mg/kg/day 투여군에서 각각 2/6레 및 5/6레 관찰되었다. 50 mg/kg/day 이하의 투여군에서는 위축소견이 관찰되지 않았다.

간의 골수외조혈은 암수 모두 대조군, 8.3, 50 mg/kg/day 투여군에서는 관찰한 모든 동물에서 매우 약한 정도에서 약한 정도까지 각각 24/24레, 23/23레, 및 18/18레 관찰되었다. 암컷의 경우, 대조군, 8.3, 50 mg/kg/day 투여군에서 약한 정도의 골수외조혈이 38%~54% 분포하고 수컷에 비해 정도가 높은 편이었다. 수컷과 암컷 300 mg/kg/day 투여군에서 매우 약한 정도에서 약한 정도까지 골수외조혈이 각각 2/6레 및 6/6레 관찰되었다. 300 mg/kg/day 투여군에서의 골수외조혈은 다른 군과 비교했을 때 정도와 빈도가 낮았다.

## 12. F1 동물의 내부장기 검사

분만 후 4일째에 군조정환 후 제외된 모든 F1 생존동물에 대하여 내부장기검사를 실시한 결과, 시험물질 투여에 기인한 이상소견은 관찰되지 않았다(Data not shown).

## IV. 고 찰

본 연구는 근로자의 건강장해 발생 가능성이 높은 1,4-Dichlorobutane에 대하여 OECD Test Guideline No. 415의 1세대 번식독성시험법(One-Generation Reproduction

Toxicity Study) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice(1997)에 준하여 생식능 및 차세대에 미치는 영향을 평가하였다(OECD, 2008).

시험기간중 50 및 300 mg/kg에서 관찰된 암컷 모동물의 사망은 용량의존적으로 관찰되어 시험물질에 기인한 독성학적 영향으로 판단되었다. 또한, 시험기간중 모든 시험물질 투여군에서 관찰된 유연은 빈도수가 높게 관찰되어 시험물질 투여에 기인한 소견으로 판단되었다. 그러나 타액선에 대한 조직병리학적 검사에서 시험물질에 기인한 이상소견이 관찰되지 않았고 시험물질 투여 직후 유연이 관찰된 후 소실되었으며 부교감계 신경자극에 따른 증상인 유루(Lacrimation)나 비 분비물(Nasal discharge) 등이 관찰되지 않아 유연은 독성학적 의미가 없는 증상으로 사료되었다.

암수 300 mg/kg 투여군의 체중을 측정한 결과, 투여 25일 이후부터 시험종료시까지 체중 감소를 보인 수컷 300 mg/kg 투여군과 임신 20일 및 포육 7일 이후에 체중 감소를 보인 암컷 300 mg/kg 투여군은 대조군과 비교하면 약 10%의 감소를 보여 시험물질 투여에 기인한 영향으로 판단되었다.

사료섭취량 측정 결과 중, 수컷 300 mg/kg 투여군에서 교배전 투여 23일째에 관찰된 사료섭취량의 감소는 전 투여기간 중 일시적으로 관찰된 것으로 보아 시험물질 투여와 무관한 것으로 판단되었다. 그러나 암컷 300 mg/kg 투여군에서 교배전 투여 2일째와 포육 7일째

이후기간에 관찰된 사료섭취량의 감소는 시험물질 투여에 기인한 것으로 판단되었다.

간 중량증가는 암수 300 및 50 mg/kg/day 투여군에서 관찰되었다. 신장의 중량 증가는 수컷 50 및 300 mg/kg 투여군과 암컷 300 mg/kg 투여군에서 관찰되었다. 이들 소견은 각각 간의 간세포비대(Hepatocyte hypertrophy)와 신장 수질의 광물질침착(Mineralization)과 연관된 것으로 시험물질에 의한 독성학적 변화로 판단된다. 시험물질 투여군에서 관찰된 심장, 비장, 흉선, 폐, 난소의 중량 감소는 체중 감소, 또는 스트레스에 따른 것으로 판단되나 병리조직 검사를 실시하지 않아 확인할 수 없었다. 암수 300 mg/kg 투여군에서 관찰된 뇌의 상대중량 증가와 수컷 300 mg/kg 투여군에서 관찰된 심장과 고환의 상대중량 증가는 체중감소에 따른 상대적인 중량 증가로 판단된다.

부검시 수컷 300 mg/kg 투여군에서 관찰된 간의 변색은 조직병리학적 검사시 관찰된 간세포비대 또는 문맥주위 공포형성과 연관된 것으로 시험물질에 의한 변화로 사료된다. 그러나 8.3 및 50 mg/kg 투여군에서 관찰된 간의 변색은 빈도수가 낮아 시험물질에 기인한 독성학적인 변화로 판단하기 어렵다. 이외에 관찰된 소견은 발생 빈도가 낮아 시험물질과의 연관성은 없는 것으로 판단된다.

조직병리학적 검사시, 시험물질 투여와 연관된 소견이 간과 신장에서 관찰되었다. 수컷 300 mg/kg 투여군 및 암컷 50 및 300 mg/kg 투여군에서 관찰된 간세포비대(Hepatocyte hypertrophy)와 수컷 시험물질 투여군에서 관찰된 문맥주위 공포형성은 발생 빈도가 높게 관찰되었으나 용량상관성이 없는 것으로 보아 시험물질에 기인한 독성학적인 변화로 판단하기 어렵다. 또한 조직구 또는 림프구 침윤이 특징적인 염증세포 병소(Inflammatory cell foci)가 부형제 대조군을 포함하여 모든 투여군에서 관찰되었으나 용량상관성 없어 시험물질에 의한 변화는 아닌 것으로 판단된다. 수컷모동물의 모든 시험물질 투여군에서 관찰된 신장의 광물질침착(Mineralization, medulla)은 용량상관성이 있어 시험물질 투여에 의한 변화로 판단된다. 광물질침착에 따른 세포독성은 관찰되지 않았으나 오랜 기간 노출 시 주위 조직에 영향을 줄 수 있으므로 잠재적인 독성이 있을 것으로 판단된다. 암컷모동물에서는 용량상관성이 관찰되지 않았다. 수컷에서 정도와 빈도가 높은 이유는 시험물질의 노출기간의 차이 또는

성차에 따른 것으로 판단된다. 이 외에 장기에서 관찰된 병리조직 소견은 발생빈도와 정도가 용량에 따른 변화가 관찰되지 않았거나 동일종의 랫드에서 관찰될 수 있는 소견으로 시험물질과의 연관성은 적을 것으로 판단된다.

교배와 관련된 성주기, 교배소요시간, 교미율, 수컷의 수태율 및 암컷의 임신율을 검사한 결과, 어떠한 요인에서도 시험물질에 기인된 변화는 인정되지 않았다. 따라서 본 시험물질은 랫드의 수태능에 대한 영향은 없는 것으로 판단되었다.

정자분석 결과 정자운동성, 정자 형태에서는 대조군과 통계학적 유의성을 보이지 않았다. 정자수는 고환에서는 대조군과 비교하여 300 mg/kg/day 투여군에서 유의하게 감소하였고, 부고환 미부에서는 대조군과 비교하여 8.3, 50, 300 mg/kg/day 투여군에서 유의하게 증가하였지만, 고환과 부고환 내 모든 정자수는 생리적 범위 내로 판단되었다. 혈중 테스토스테론 농도는 50 및 300 mg/kg/day 투여군에서 증가하였으나 용량상관성이 없는 우발적인 변화로 판단된다. 따라서 본 시험물질은 수컷의 정자 및 성호르몬 분비에 관련하여 독성이 없는 것으로 판단되었다.

암컷동물의 분만 상태 및 산자 소견 관찰 결과 300 mg/kg 투여군에서 관찰된 난산, 50 및 300 mg/kg 투여군에서 관찰된 모든 신생자가 사망한 모동물은 시험물질 투여에 기인한 독성학적인 변화로 사료되었다. F1 동물의 체중측정 결과 300 mg/kg 투여군에서 관찰된 체중감소는 모동물의 포육기능 이상 및 자궁내발육지연(Intrauterine growth retardation)에 기인한 것으로 시험물질의 영향으로 판단되었다.

## V. 결 론

랫드에 1,4-DCB를 경구로 반복 투여한 300 mg/kg 용량군의 암수모동물에서는 체중감소, 간 및 신장의 중량증가, 간세포비대를 보였으며, 수컷모동물에서는 간의 변색, 신장의 광물질 침착을 보였다. 암컷모동물에서는 사망, 사료섭취량 감소를 유발하였고, 암컷모동물의 난산, 모체기능이상에 기인한 신생자사망, 암수 차세대동물의 체중감소를 유발하였다.

또한 50 mg/kg/day 용량에서는 암수모동물의 간의 중량증가, 수컷모동물의 신장의 광물질침착, 암컷 모동물의 사망, 암컷 모동물의 간세포비대, 모체기능이상

에 기인한 신생자사망이 유발되었으며, 8.3 mg/kg/day 용량에서는 수컷모동물의 신장의 광물질침착이 관찰되었다.

따라서 본 시험조건에 의한 1,4-DCB의 일반독성 무해용량은 수컷은 8.3 mg/kg/day 미만, 암컷은 8.3 mg/kg/day으로 판단되었으며, 수태능력 무해용량은 암수 공히 300 mg/kg/day 이상, 모체기능 무해용량은 8.3 mg/kg/day, 그리고 차세대 동물 무해용량은 암수 공히 50 mg/kg/day으로 확인되었다.

본 시험에서 관찰된 생식독성시험 결과에 근거하여 볼 때, 1,4-DCB는 암수 동물에 대한 일반독성을 유발할 뿐만 아니라 모체기능 및 차세대에도 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 단 암수 모동물의 수태능력에 대한 효과는 미미한 것으로 사료되었다. 따라서 화학물질의 분류·표지 세계조화시스템과 노동부고시(제2012-14호) 화학물질의 분류·표지 및 물질안전보건자료에 관한 기준에 따라 생식독성물질의 유해성구분을 평가한 결과(MoEL, 2012), 1,4-DCB는 사람에게 생식독성이 있는 것으로 추정되는 물질인 Category 1B로 평가되었다. 특히 임신동물 대한 독성이 강한 것으로 보아 임신여성 및 모유수유중인 여성에 대해서는 본 물질에 대해서 노출이 되지 않도록 특별한 관리가 필요한 것으로 판단된다.

## 참고문헌

Kim JK, Lee IC, Kim SH, Baek HS, Song SW, Kim JC, Chung YH. 2 weeks repeated oral dose toxicity study of 1,4-Dichlorobutane in rats. J Korean Soc Occup Environ Hyg 2013;23(1):1-10

- Korea Occupational Safety and Health Agency (KOSHA). Listing of Preferential Assessment Substances for Hazard Identification Assessment.; 2007. p. 46-217
- 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\\_UAAAEnrkB3YVi](http://www.chemdat.merck.de/sweden/chemicals/1-4-dichlorobutane/MDA_CHEM-803227/p_ufub.s1OS_UAAAEnrkB3YVi). Accessed January 3, 2013.
- Ministry of Employment and Labor(MoEL). Exposure limits for chemical substances and physical Agents(MoEL Public Notice No. 2012-14).; 2012. p. 50
- Organization for Economic Cooperation and Development(OECD). (2008): Chemicals Testing: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Sections 1-5. Available online from [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_1916054\\_1\\_1\\_1\\_1,0\\_0.html](http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,0_0.html).
- Rim KT, Kim SJ, Kim JK, Chung YH, Park SY, Yang JS. In vivo micronucleus test of methylcyclopentane and 1,4-dichlorobutane. J. of the Korean Society for Environmental Analysis 2011;14(2):89-93
- Yu WJ, Lee IC, Lee JS, Lee SM, Kim SH, Baek HS, Moon CJ, Kim SH, Chung YH, Kim JC. 4 weeks repeated oral dose toxicity study of 1,4-Dichlorobutane in rats. Lab Anim Res 2013;29(1): 48-54