

보건분야-연구자료
연구원 2001-20-58
H-RD-I-2001-20-58

할로겐 화합물에 의한 소핵유발 연구

- 1,1-Dichloro-1-fluoroethane의 복강내 투여 및 반복흡입폭로에 의한
골수세포 소핵 유발 -

한 국 산 업 안 전 공 단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 2000년도 산업안전보건연구원 연구사업인
“할로젠 화합물에 의한 소핵유발연구”의 연구결과 최종보고서
로 제출합니다.

2000년 12월 31일

연구주관부서 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터

연구 책임자 : 선임연구원 맹 승 희

공동 연구자 : 김 현영, 임 철홍, 이 종윤, 이 성배, 장 동혁

요 약 문

1. 과 제 명 : 할로젠 화합물에 의한 소핵 유발 연구

- 1,1-Dichloro-1-fluoroethane의 복강내 투여 및 반복 흡입폭로에 의한 골수세포 소핵 유발 -

2. 연구기간 : 2000년 1월 1일 - 2000년 12월 31일

3. 연 구 자 : 총괄연구책임자 : 맹 승희 (선임연구원)

공 동 연 구 자 : 김 현영 (책임연구원)

: 임 철홍 (선임연구원)

: 이 성배 (연구원)

: 이 종윤 (연구원)

: 장 동혁 (연구원)

4. 연구목적

본 연구는 할로젠 화합물 중 정밀부품 혹은 전자부품의 세정제로 널리 이용되고 있으나 오존층을 파괴함으로써 공중보건과 환경에 악영향을 미칠 수 있는 HCFC 물질을 함유하고 있으며 암 발생의 문제점도 제시되고 있는 물질의 하나인 1,1-dichloro-1-fluoroethane에 대해서 설

치류를 이용하여 소핵유발성을 관찰하되 폭로방법을 복강 내 단 회 투여방법과 반복 흡입폭로방법을 택하여 상호 비교하고자 하였다. 또한 화학물질의 유해성 분류 등 유해성 평가시 실험동물에서의 유전독성시험법의 중요성이 강조됨에 따라 in vivo의 시험법인 소핵시험을 통해 본 할로젠 화합물의 유전독성을 평가함으로써 작업장에서 사용되는 1,1-dichloro-1-fluoroethane의 유해성을 실험적으로 밝혀 물질안전보건자료 (MSDS)의 독성 정보를 제공함에 목적이 있다.

5. 연구내용

전자부품 등의 금속세정제로 많이 사용되고 있는 1,1-dichloro-1-fluoroethane을 이용하여 소핵시험을 실시하되, 먼저 화학물질의 유해성시험법으로 OECD (OECD guidelines for testing of chemicals) 등 국제적으로 통용되고 있는 설치류 골수세포를 이용한 소핵 시험법을 채택, 본 연구에서는 ICR 마우스를 이용, 복강 내 단 회 투여, 투여 24시간 후 표본을 작성, 골수세포에서의 소핵유발빈도를 관찰하였다. 또한 흡입폭로방법을 활용하기 위해서는 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 이용, 1일 6시간, 주 5일, 13주간 동안 1,500, 3,000, 6,000 ppm의 농도로 전신 노출시킴으로써 반복흡입폭로를 시킨 후 골수세포에서의 소핵유발빈도를 관찰하였다.

6. 활용계획

할로젠 화합물로서 작업장에서 많이 쓰이고 잠재위험성이 있을 것으로 추측되고 있는 1,1-dichloro-1-fluoroethane에 대한 유전독성을 밝힘으로써 MSDS의 독성정보를 제공하고 근로자 암 발생 등 직업병을 예방, 건강보호를 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

7. 연구개요

본 연구결과 1,1-dichloro-1-fluoroethane의 소핵유발은 폭로방법에 따라 그 결과가 상이하였다. OECD등의 여러 곳에서 가이드라인으로 제시하고 있는 시험법인 복강 내 단 회 투여방법으로는 골수세포에서의 소핵유발성은 나타내지 않았으나 13주간 반복 흡입 폭로시켰던 흰쥐의 골수세포에서는 소핵유발이 관찰되었다.

8. 중 심 어

1,1-dichloro-1-fluoroethane, 소핵, 반복흡입폭로

제 1 장 서 론

1. 연구배경 및 목적

할로겐화합물은 화합물내에 Cl, Br, F, I 등의 관능기가 포함된 것으로서 그 중 많은 물질들이 미생물 복귀돌연변이유발 또는 발암성, 및 산화적 손상, 세포독성에 관련되어 있는 것으로 알려져 이들 물질의 분자적 구조 특성과 관련하여 유전독성예측을 하는데 많이 활용되고 있다 (Tuppurainen, 1999; Crebelli 등, 1995; Eriksson 등; 1991).

1,1-Dichloro-1-fluoroethane은 할로겐 화합물의 하나로서 금속의 세정효과 및 전자부품의 표면 백화방지 효과가 크다는 이점으로 정밀부품이나 전자부품의 세정제로 널리 이용되고 있는 물질로 국내 유통량 466위를 차지하고 있어 그 사용근로자도 다수인 것으로 예측되고 있다 (한국화학연구소, 1997).

1,1-Dichloro-1-fluoroethane은 오존층 파괴 등으로 공중보건과 환경유해를 끼칠 수 있는 HCFC물질을 포함하고 있어 태양열의 과다노출로 인한 지구온난화, 피부암과 백내장 등의 질병유발의 잠재 위험성이 있음이 제시되고 있다. 따라서 이 물질은 HCFC-141b로 분류하기도 하며 2015년까지 90% 사용이 불가능하게 되었고, 2039년까지는 개발도상국에서만 사용하도록 하고 2040년부터는 전세계적으로 사용을 금지하는 물질로 되어 있다 (김 등, 2000).

1,1-Dichloro-1-fluoroethane에 대한 연구는 주로 실험동물에서의 급성독성과 세포유전독성 연구가 이루어져 왔는데 이 물질의 쥐에 대한 반치사 농도

(LC₅₀)는 약 60,000 ppm이며, 10 pph에서 4시간 폭로시킨 설치류에서 세포유전 독성이 관찰되었을 뿐(RTECS, 1998) 그 독성연구 보고는 소수이었다.

이 물질을 사용하는 근로자들에 대한 연구보고로는 탈지탱크를 청소하는 근로자에게서 1,1-Dichloro-1-fluoroethane의 흡입에 의한 치명적 독성반응으로 사망한 증례가 있었으며 (Astier 등, 1997), 최근 국내 산업현장에서 이 물질을 이용하여 세척작업을 하는 근로자에서 기관지 천식이 발생한 보고가 있었다 (안연순 등, 1998).

설치류를 이용한 소핵시험은 화학물질을 폭로시켰을 때 유발된 염색체이상을 골수의 다염성 적혈구 중에서 나타난 소핵을 관찰하는 시험법으로 화학물질 등의 발암성을 단기적으로 스크리닝하는 실험동물을 이용한 단기 유전독성 시험법의 하나이다. 이 시험방법은 미생물복귀돌연변이시험과 염색체이상시험과 함께 화학물질의 유해성 평가방법으로 국제적으로 필수적 규제시험의 하나로 이용되고 있으며 최근에 이르러 in vivo의 시험법으로써 더욱 그 관심이 증대되고 있다.

소핵시험을 실시하는 데 있어서 주로 사용되고 있는 시험물질의 폭로방법은 주로 경구 또는 복강내 단회 투여를 실시한 연구가 주로 이루고 있으나 비점이 낮고 휘발성이 강한 물질에 대해서는 흡입에 의한 폭로방법이 채택되어 왔다.

따라서 본 연구에서는 할로겐 화합물의 하나로서 국내 유통량이 높고 사용 근로자수가 많아 근로자건강보호를 위해 또한 환경보호 측면에서 중요하다고 할 수 있는 1,1-dichloro-1-fluoroethane에 대해 OECD 시험가이드라인 474와 林 眞 (1991)의 방법에 준하여, 복강내 투여에 의한 마우스 골수세포에서의 소핵유발을 관찰하고, 본 연구대상물질이 휘발성이 있고 독성이 비교적 낮은 것을 감안하여 13주 반복흡입폭로를 시킨 흰쥐의 골수세포에서의 소핵유발을 관

참함으로써 1,1-dichloro-1-fluoroethane의 유전독성을 실험동물에서 평가하여
이 물질에 대한 작업환경관리를 위한 유해성 자료를 제공하고자 하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

1. 화학물질 및 실험동물

연구대상물질인 1,1-dichloro-1-fluoroethane은 U.S.A.의 Allied Signal사의 상품명 Genetron 141b (Lot No. ES0021B, ES0063A, 순도 99.5%)를 사용하였다. 복강내 투여에 의한 실험을 위해 사용한 음성대조물질 및 희석용매로는 olive oil (ICN biomedical Inc.)를 사용하였으며, 양성대조물질은 mitomycin C (Sigma Chem Co.)를 사용하였다. 흡입폭로 실험을 위한 대조물질 및 희석제로는 Hepa Filter를 통과시켜 정화시킨 청정공기를 사용하였다.

복강내 투여를 위한 실험에 사용한 실험동물은 7주령의 ICR 마우스를 사용하였으며, 흡입폭로를 위한 실험에는 5주령의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였는데 이들 모두는 특정병원체부재동물 (Specific Pathogen Free, SPF)로서 대한 실험동물 센터에서 구입하였으며 청정의 동물실 및 흡입챔버에서 1주간 순화시켜 사용하였다.

2. 동물의 사육관리

본 연구를 위한 실험동물들은 온도 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 30 - 70%, 환기회수 12-15회/시간, 조명 150 - 300 Lux, 명암주기를 12시간으로 한 청정사육실 혹은 청정 흡입챔버 내에서 관리하였으며, 동물 수용은 개별적으로 하고 급식은 고형사료 급식기에서 멸균배합사료 (제일제당 주식회사)를 자유 급식시켰

다. 단, 반복 흡입폭로시험에서 사료의 공급은 물질 폭로시간 동안에는 공급하지 않았으며 폭로 종료후 사료를 공급하였다. 음용수는 수돗물을 1차 여과한 멸균 정제수를 자동급수로 하여 자유로이 섭취토록 하였다.

사용동물에 대해 체중측정은 동물도입과 순화 종료후, 군분리시 측정하고, 단회 복강투여시킨 마우스는 투여시 측정하였다. 13주 반복 흡입폭로시킨 흰쥐들은 폭로기간중 4주까지 주 2회, 5주부터 13주까지는 주 1회에 걸쳐 동물체중을 측정하였다.

3. 투여/폭로 농도설정 및 투여/폭로방법

마우스에 복강 내 단 회 투여하여 실시한 소핵유발시험의 경우는 문헌검색에 의한 LD₅₀값으로부터 1,500 mg/kg을 최고농도로 하여 중농도 1,000 mg/kg, 저농도 500 mg/kg의 3단계 농도군을 설정하였으며, 음성 및 양성대조군을 두었다. 이때 각 군당 6마리씩의 숫컷 마우스를 할당하되 군분리는 체중지표로 층화 임의추출법에 의해 실시하였다. 마우스 복강내 물질의 투여는 단회 투여하였으며 1,1-dichloro-1-fluoroethane을 olive oil에 용해시켜 투여하였는데 이때 투여량은 체중 kg당 10ml으로 하였다. 사용한 양성대조물질은 mitomycin C는 투여농도 0.5 mg/kg으로 하였다.

13주 반복흡입폭로방법으로 실시한 경우는 내부용적 1 m³의 흡입챔버 (Model No. SIS-20RG, SIBATA Co., LTD, Japan)와 유기용제 가스발생 장치 등을 이용한 전신폭로 방법을 택하였다. 이 때의 폭로농도는 예비시험을 통해 설정하였으며 고농도 6,000 ppm, 중농도 3,000 ppm, 저농도 1,500 ppm의 3단계 농도군을 설정하였으며 음성대조군을 함께 두었다. 이때 각 군당 암, 수 10마리씩의 흰쥐를 할당하였다.

흡입의 폭로방법은 gas generator (Model No. VG-4R, SIBATA Co., LTD, Japan)를 이용하여 시험물질을 기화시킨 후 일정량을 청정공기와 혼합하여 설정농도로 조절한 후 흡입챔버내로 공급, 실험동물에 전신폭로시켰다. 흡입폭로 중 각 군별 흡입챔버 내의 환경조건들을 모니터링하였는데 온도, 습도, 압력, 환기량은 챔버내 부착된 센서와 환경제어장치 (Model No. ICS-20RG, SIBATA Co., LTD, Japan)를 이용 30분에 1회 측정하고 자동기록하였다. 시험물질의 농도는 자동샘플링 장치가 부착된 가스크로마토그래프 (Model No. GCS-14PFFS, SHIMADZU, Japan)를 이용 폭로기간 중 15분 간격으로 1회씩 모니터링하였다.

측정기기인 가스크로마토그래프(GC)의 분석에는 FID(flame Ionization Detector)와 Silicon DC-200 15% Chromosorb (AW-DMCS)컬럼을 사용하였다. GC의 calibration은 1,1-dichloro-1-fluoroethane 시약을 사용, 표준가스를 조제, 사용하였는데 Hamilton syringe 2L(Model S-2000, USA)를 이용하여 실리콘관을 통과시켜 습기를 제거한 깨끗한 공기 8L를 10L용 Teflon bag에 정확히 충전시킨 후 시험물질을 Hamilton microsyringe (Pat No. 3150801, #1710, USA)로 원하는 농도로 정확히 Teflon bag에 주입시켜 충분히 기화시킨 다음 이를 표준가스로 하여 GC calibration을 하였다.

4. 소핵표본의 제작 및 염색, 관찰

소핵표본은 실험동물의 대퇴골 골수세포를 슬라이드 글라스에 도말하여 작성하였는데, 복강 내 단 회 투여 후 24시간이 지난 마우스는 경추 탈골하여 질식시키고, 흡입폭로 시킨 흰쥐는 에테르 마취를 시켜, 되도록 혈액이 묻지 않게 하여 대퇴골을 적출하였다. Fetal bovine serum (FBS)을 사용하여 대퇴골

에서 골수세포를 추출, 원심관에 씻어 모아, 1000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상등액을 버리고 소량의 혈청으로 세포를 현탁시켰다. 잘 닦인 슬라이드에 세포 현탁액을 도말하여 실온에서 건조시킨 후 메탄올로 5분간 고정하였다.

메탄올로 고정한 표본을 acridine orange액 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 점적하고 cover glass를 덮어 형광염색하였다.

표본의 관찰은 맹검법 (blind method)으로 하였으며, 400배 배율에서 형광 현미경(NIKON, OPTIPHOT2)으로 BA-2 filter를 사용하여 관찰하였다.

표본의 관찰은 세포도말상태가 좋은 곳을 선택하여 다염성 적혈구 (PCE, polychromatic erythrocytes) 약 1000개에서 소핵을 갖는 세포를 계수하였다. 다염성 적혈구의 판정은 관찰시야에서 핵이 없이 적색형광 빛을 보이는 것을 다염성 적혈구로 하였으며, 소핵은 그 크기가 제일 큰 것은 적혈구 직경의 1/2 인 것, 제일 작은 것은 식별이 가능한 것까지로 하여 관찰하였으며 주로 원형이나 도너츠형, 반원형의 형태의 것도 포함시켰다. 소핵의 색은 근접한 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광 빛을 띠는 것으로 하였다.

물질투여에 따른 골수세포의 증식 억제를 관찰하기 위해서는 다염성 적혈구 (PCE)와 정염성 적혈구 (NCE, normochromatic erythrocytes) 의 합인 전체 적혈구중 다염성 적혈구의 비율을 관찰하였는데 이는 세포도말상태가 좋은 곳에서 다염성 적혈구(PCE) 및 정염성 적혈구 (NCE, normochromatic erythrocyte)를 합한 전체적혈구수 중 다염성적혈구의 비율을 계측함으로써 관찰하였다.

5. 통계처리

음성대조군에 대한 투여군 들의 소핵출현빈도의 유의차 검정은 5% 유의수

준에서 Dunnett의 다중비교방법에 의한 분산분석법 또는 Kruskal-Wallis의 분산분석법을 통해 실시하였으며, 농도증가에 따른 용량의존성에 대한 검정은 Cochran-Armitage의 경향검정을 실시하였다.

또한 음성대조군에 대한 투여군 들에서의 전체적혈구중 다염성적혈구의 비율의 유의차 검정도 5%의 유의수준에서 Dunnett의 다중비교방법에 의한 분산분석법 또는 Kruskal-Wallis의 분산분석법을 통해 실시하였다.

제 3 장 연구결과

1. 실험동물의 일반사항

복강내 투여를 위해 도입한 마우스는 7일간의 검역과 순화를 시키고 건강한 동물 30마리에 대해 군 구성을 실시하였는데 군 구성시 체중의 범위는 31.5g - 42.4g이었으며, 각 실험군의 군 구성할 때 및 투여시의 평균 체중은 표 1과 같았다.

표 1. 복강내 투여를 위한 마우스의 군구성 및 투여할 때 평균체중 (g)

투 여 농 도	군구성시	투여시
0 (olive oil)	37.8 ± 1.57	38.3 ± 1.3
500 mg/kg	37.9 ± 1.36	38.4 ± 0.8
1000 mg/kg	38.1 ± 1.25	38.9 ± 0.8
1500 mg/kg	37.7 ± 1.24	38.3 ± 1.4
mitomycin C (양성대조군)	38.0 ± 1.32	38.4 ± 1.3

13주간 흡입폭로시킨 동물들에 대한 체중변화를 살펴보면 그림 1 및 2와 같았다. 폭로기간 중 체중의 변화를 대조군과 비교한 결과 암, 수 모두에서 고 농도로 폭로한 군일수록 체중이 감소하는 경향을 볼 수 있었으나 통계적 유의성은 없었다.

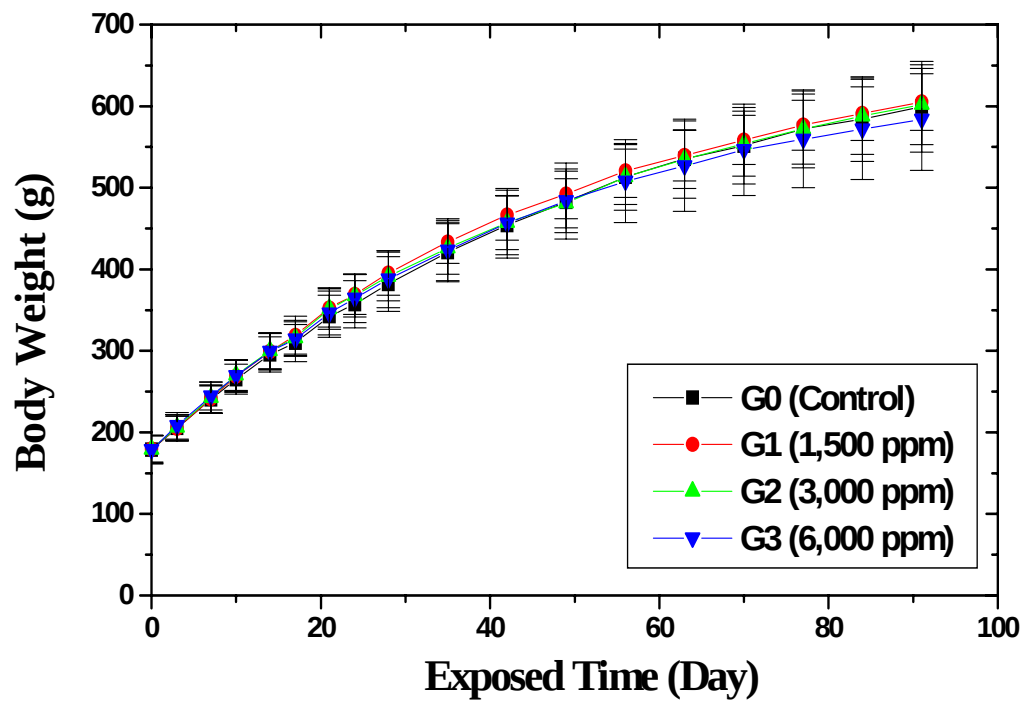


그림 1. Body weight changes in male rats during a 13 weeks period of the 1,1-dichloro-1-fluoroethane inhalation

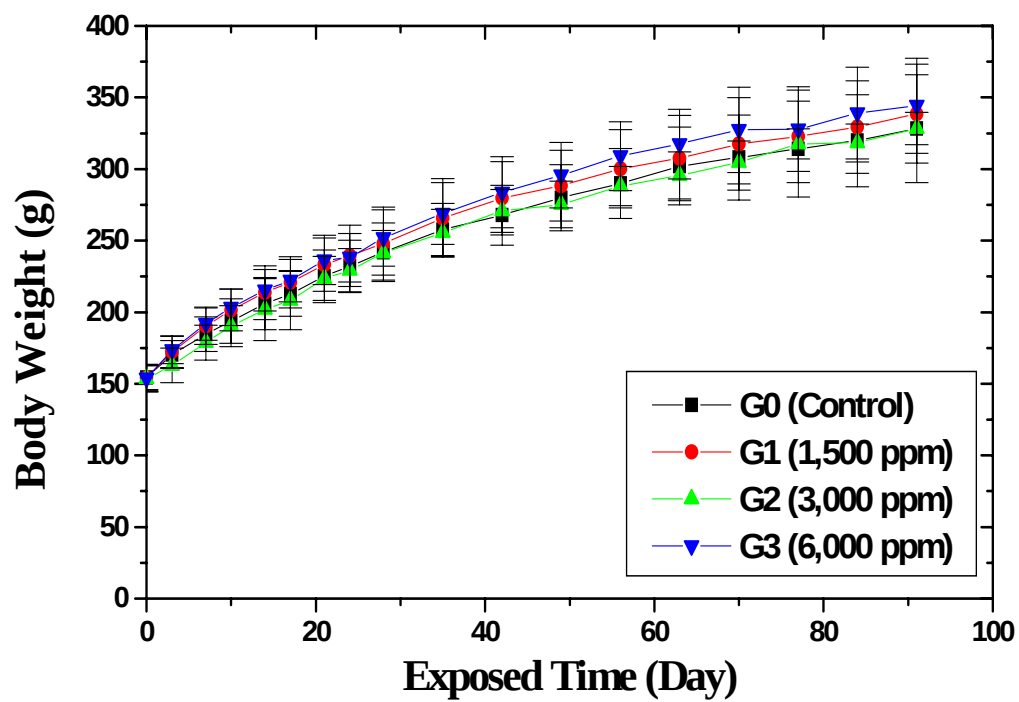


그림 2. Body weight changes in female rats during a 13 weeks period of the 1,1-dichloro-1-fluoroethane inhalation

2. 흡입챔버환경측정

13주간 반복 투여기간중 각 군의 흡입 챔버내 온도, 습도, 압력, 환기량의 측정치 평균은 표 2와 같았다.

표 2. Environmental condition in inhalation chamber during the experiment

Items	Chamber 0 (control)	Chamber 1 (1,500 ppm)	Chamber 2 (3,000 ppm)	Chamber 3 (6,000 ppm)
T (°C)	23.5 ± 0.77	23.1 ± 0.84	23.3 ± 0.93	23.2 ± 0.92
RH (%)	53.8 ± 4.94	55.4 ± 4.83	55.7 ± 5.43	56.8 ± 5.87
P (mmH ₂ O)	-10.1 ± 0.12	-10.0 ± 0.09	-10.0 ± 0.21	-10.1 ± 0.16
R (L/min)	208.0 ± 1.46	208.6 ± 1.36	206.9 ± 2.80	205.0 ± 2.36

T, temperature; RH, relative humidity; P, pressure; R, flow rate

All data values are expressed as total mean (for 13 weeks) ± SD

챔버내 환기량은 205.0 - 208.6 ℓ/min으로 흡입챔버내 용량이 1,000 ℓ (1 m³)를 감안하면 시간당 환기 횟수는 12.30 - 12.52회로 온도, 습도, 압력 등을 포함하여 각각 실험동물 사육 환경조건에 부합하였다. 물질폭로 중 각 투여군의 흡입챔버내 물질의 농도를 매일 모니터링한 결과 13주간 폭로농도의 최고치와 최저치 및 총 평균은 표 2와 같았다. 측정된 결과는 설정치의 ±4.16 - 2.53%이내의 범위에서 투여되었음을 알 수 있었다.

표3. 각 폭로군에서의 1,1-dichloro-1-fluoroethane 농도 측정치

폭 로 군	농 도 (ppm)			
	설정치	상한치	하한치	평균 ± 편차
대조군	0	0	0	0.0 ± 0.0
group 1	1,500	1,549.5	1,437.6	1,501.0 ± 16.32
group 2	3,000	3,091.4	2,897.0	2,999.8 ± 35.37
group 3	6,000	6,160.5	5848.1	6,000.0 ± 64.55

3. 복강 내 단 회 투여에 의한 마우스 골수세포에서의 소핵 유발

복강내에 단회 투여하고 24시간 후 도살하여 작성한 소핵표본의 관찰결과는 표4와 같았다. 음성대조군의 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 $0.21 \pm 0.12(\%)$ 이었으며, 500 mg/kg 투여군의 소핵출현빈도는 $0.28 \pm 0.14(\%)$, 1,000 mg/kg 투여군에서의 빈도는 $0.26 \pm 0.17(\%)$, 1,500 mg/kg 투여군에서의 빈도는 $0.28 \pm 0.17(\%)$, 양성대조군의 빈도는 $1.18 \pm 0.38(\%)$ 이었다. 즉 1,1-dichloro-1-fluoroethane를 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 증가하는 투여농도군은 관찰되지 않았다.

또한 복강내 단회 투여한 마우스에 있어서 골수의 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율에 관한 결과는 표4와 같았다. 음성 대조군에서 전체 적혈구중 다염성 적혈구의 비율은 $43 \pm 6.6 (\%)$ 이었으며, 500 mg/kg 투여군의 비율은 $38 \pm 4.5 (\%)$, 1,000 mg/kg 투여군은 $4.6 \pm 7.8 (\%)$, 1,500 mg/kg 투여군은

42 ± 7.6 (%)이었다. 따라서 전체 적혈구수 중 다염성 적혈구의 비율은 음성 대조군과 비교하였을 때 차이가 없어, 골수세포 증식억제 현상은 관찰되지 않았다.

4. 반복 흡입폭로에 의한 흰쥐 골수세포에서의 소핵 유발

13주간 1,1-dichloro-1-fluoroethane을 전신 흡입폭로한 흰쥐를 폭로 종료 24시간후 도살하여 작성한 소핵표본관찰 결과는 표5, 표6 및 표7, 그리고 그림 4와 같았다. 수컷에서 음성대조군의 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 0.25±0.11(%)이었으며, 1,500ppm 폭로군의 소핵출현빈도는 0.52±0.15(%), 3,000ppm 폭로군에서의 빈도는 0.54±0.12(%), 6,000ppm 폭로군에서의 빈도는 0.58±0.17(%)이었다. 즉 1,1-dichloro-1-fluoroethane를 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하였을 때 모든 투여농도군에서 통계적으로 유의하게 증가하는 양상을 나타내었고 ($p<0.05$), 농도에 따른 용량의존성을 나타내었다 ($p<0.01$).

암컷에서는 음성대조군의 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 0.30±0.11(%)이었으며, 1,500ppm 폭로군의 소핵출현빈도는 0.36±0.15(%), 3,000 ppm 폭로군에서의 빈도는 0.39±0.12(%), 6,000ppm 폭로군에서의 빈도는 0.48±0.17(%)이었다. 즉 암컷에 있어서는 폭로농도가 증가함에 따라 소핵유발 빈도도 증가하는 양상을 보였으나 ($p<0.01$)음성대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 나타내는 실험군은 없었다.

암수 합하여 관찰결과를 분석한 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 0.28±0.10(%)이었으며, 1,500 ppm 폭로군의 소핵출현빈도는 0.44±0.12(%), 3,000 ppm 폭로군에서의 빈도는 0.47±0.13(%)

6,000 ppm 폭로군에서의 빈도는 $0.53 \pm 0.18(\%)$ 이었다.

즉, 1,1-dichloro-1-fluoroethane를 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하였을 때 모든 투여농도 군에서 통계적으로 유의하게 증가하는 양상을 나타내었고 ($p < 0.05$), 농도에 따른 용량의존성을 나타내었다 ($p < 0.01$).

13주간 흡입폭로시킨 흰쥐에 있어서 골수의 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율에 관한 결과는 표 5, 6, 7 및 그림 5와 같았다. 수컷에서의 음성 대조군에서 전체 적혈구중 다염성 적혈구의 비율은 $21.3 \pm 2.96 (\%)$ 이었으며, 1,500 ppm 폭로군의 비율은 $21.0 \pm 2.10 (\%)$, 3,000 ppm 폭로군은 $20 \pm 2.64 (\%)$, 6,000 ppm 폭로군은 $16.0 \pm 1.36 (\%)$ 이었다. 전체 적혈구수 중 다염성 적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하였을 때 가장 높은 폭로 농도군에서 통계적으로 유의하게 감소하였음을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$). 암컷의 경우도 마찬가지로 음성대조군에서는 음성 대조군에서 전체 적혈구중 다염성 적혈구의 비율은 $25 \pm 4.12 (\%)$ 이었으며, 1,500 ppm 폭로군의 비율은 $21 \pm 3.0 (\%)$, 3,000 ppm 폭로군은 $27 \pm 4.88 (\%)$, 6,000 ppm 폭로군은 $19 \pm 5.28 (\%)$ 으로 전체 적혈구수 중 다염성 적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하였을 때 가장 높은 폭로 농도군에서 통계적으로 유의하게 감소하였음을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$). 암수를 합하여 분석하였을때에도 음성대조군에 비해 가장 높은 농도로 폭로시킨 실험군에서 통계적으로 유의하게 다염성 적혈구의 비율이 감소하여 적혈구 생성억제가 일어났음을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$).

표4. 복강내 단회 투여한 마우스에서의 소핵 유발 빈도 및 다염성적혈구빈도

투여농도 (mg/kg)	동물수	관찰 PCE수	MNPCE 빈도(%)	PCE/PCE+NCE (%)
0 (olive oil)	6	1004	0.20	35
		1031	0.19	42
		1035	0.10	54
		1017	0.10	40
		1019	0.29	49
		1015	0.39	41
	mean±SD	1020.3±11.5	0.21±0.12	43±6.6
500	5	1100	0.45	35
		1087	0.09	36
		1031	0.19	34
		1043	0.38	45
		1047	0.29	40
	mean±SD	1061.6±30.1	0.28±0.14	38±4.5
1000	6	1007	0.20	45
		1051	0.48	40
		1022	0	58
		1037	0.19	39
		1014	0.30	41
	mean±SD	1025.5±16.0	0.26±0.17	46±7.8
1500	6	1225	0.16	43
		1040	0.29	40
		1010	0.40	31
		1109	0.09	48
		1093	0.55	37
	mean±SD	1092.7±87.3	0.28±0.17	42±7.6
mitomycin C (양성대조)	5	1038	0.87	43
		1026	1.07	32
		1033	1.16	54
		1074	1.86	52
		1044	1.44	38
	mean±SD	1043±18.5	1.28±0.38	44±9.2

표5. 반복흡입폭로에 의한 수컷 흰쥐에서의 소핵유발빈도 및 다염성적혈구비율

투여농도 (ppm)	동물수	관찰 PCE수	MNPCE 빈도(%)	PCE/PCE+NCE (%)
	10	1027	0.19	24
		1034	0.19	18
		1021	0.49	21
		1022	0.29	24
		1087	0.09	18
		1014	0.39	17
		1009	0.20	19
		1020	0.20	27
		1013	0.39	20
		1015	0.10	25
	mean±SD	1026.2±13.88	0.25±0.11	21.3±2.96
	10	1027	0.39	17
		1017	0.39	17
		1026	0.78	21
		1025	0.39	17
		1026	0.49	22
		1022	0.88	21
		1016	0.39	21
		1055	0.66	26
		1029	0.49	21
		1013	0.30	22
	mean±SD	1025.6±7.00	0.52±0.15	21±2.10
	10	1042	0.38	16
		1022	0.59	19
		1066	0.47	22
		1034	0.77	23
		1073	0.56	15
		1023	0.49	21
		1048	0.57	21
		1014	0.79	24
		1022	0.39	18
		1059	0.38	24
	mean±SD	1040.3±17.30	0.54±0.12	20±2.64
	10	1027	0.49	18
		1100	0.64	15
		1016	0.69	18
		1042	0.77	16
		1026	0.88	16
		1033	0.77	14
		1040	0.19	13
		1017	0.59	16
		1016	0.39	14
		1026	0.39	17
	mean±SD	1034.3±15.82	0.58±0.17	16±1.36

표6. 반복흡입폭로에 의한 암컷 흰쥐에서의 소핵유발빈도 및 다염성적혈구비율

투여농도 (ppm)	동물수	관찰 PCE수	MNPCE 빈도(%)	PCE/PCE+NCE (%)
10		1137	0.18	26
		1013	0.10	23
		1028	0.29	27
		1040	0.29	20
		1042	0.48	13
		1018	0.29	33
		1035	0.19	28
		1015	0.30	28
		1103	0.36	28
		1018	0.49	23
	mean±SD	1044.9±30.04	0.30±0.09	25±4.12
10		1031	0.29	24
		1020	0.29	22
		1058	0.39	22
		1041	0.48	21
		1015	0.49	24
		1068	0.28	25
		1023	0.39	24
		1040	0.38	19
		1028	0.29	11
		1009	0.30	18
	mean±SD	1033.3±14.76	0.36±0.07	21±3.00
8		1082	0.28	31
		1017	0.69	23
		1009	0.40	20
		1016	0.49	20
		1017	0.49	31
		1091	0.37	37
		1091	0.18	30
		1022	0.20	27
	mean±SD	1043.1±33.65	0.39±0.13	27±4.88
10		1025	0.59	16
		1057	0.85	18
		1039	0.58	12
		1022	0.49	17
		1029	0.78	10
		1005	0.20	25
		1020	0.39	18
		1031	0.48	25
		1063	0.19	17
		1031	0.29	34
	mean±SD	1032.2±12.48	0.48±0.17	19±5.28

표7. 반복 흡입폭로시킨 흰쥐에서의 소핵유발빈도 및 다염성적혈구비율

		0 ppm	1,500 ppm	3,000 ppm	6,000 ppm
MNPCE 빈도 (%)	M (male)	0.25±0.11	0.52±0.15*	0.54±0.12*	0.58±0.17*
	F (female)	0.30±0.09	0.36±0.07	0.39±0.13	0.48±0.17
	M+F	0.28±0.10	0.44±0.12**	0.47±0.13**	0.53±0.18**
PCE/ PCE+NCE (%)	M (male)	21.3±2.96	21.0±2.10	20.0±2.64	16.0±1.36*
	F (female)	25.0±4.12	21.0±3.00	27.0±4.88	19.0±5.28*
	M+F	23.0±3.90	21.0±2.55	23.0±4.43	17.0±3.39**

MNPCE, micronucleus in polychromatic erythrocyte; PCE, polychromatic erythrocyte; NCE, normochromatic erythrocyte

*, p<0.05 in Dunnett's ANOVA

**, p<0.05 in Kruskal-Wallis's ANOVA

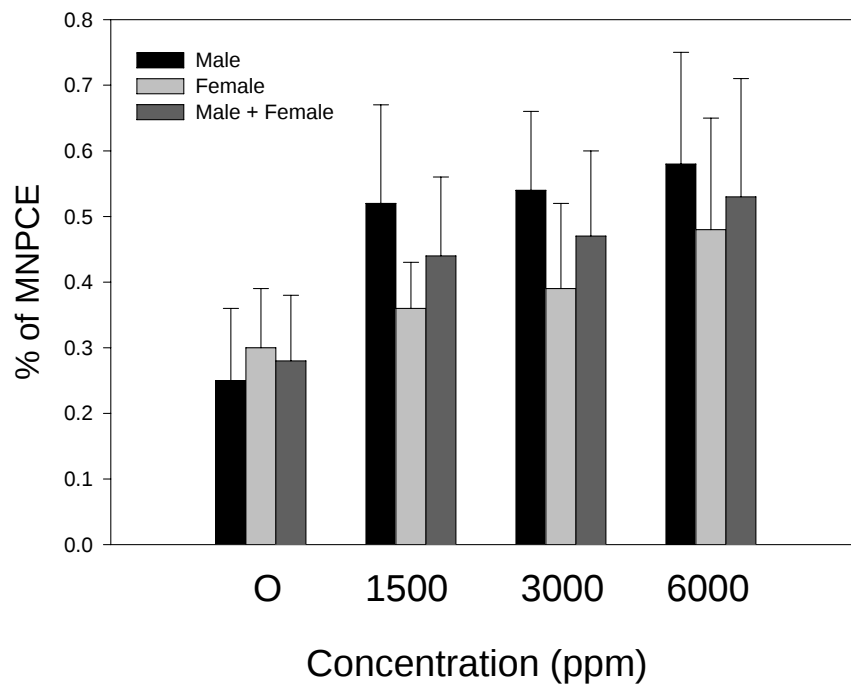


그림 3. 1,1-dichloro-1-fluoroethane의 13주 흡입폭로한 흰쥐에서의 소핵유발빈도

*, $p < 0.05$ in Dunnett's ANOVA

**, $p < 0.05$ in Kruskal-Wallis's ANOVA

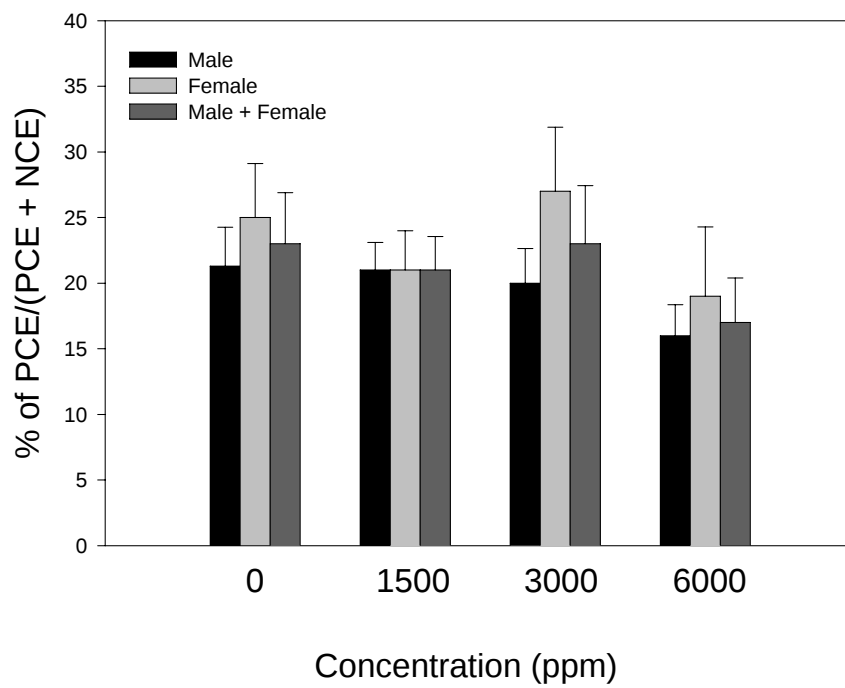


그림 4. 1,1-dichloro-1-fluoroethane의 13주 흡입폭로한 흰쥐에서의 전체적혈구(PCE + NCE)에 대한 다염성 적혈구 (PCE)의 비율

*, $p < 0.05$ in Dunnett's ANOVA

**, $p < 0.05$ in Kruskal-Wallis's ANOVA

제 4 장 고 찰

1,1-Dichloro-1-fluoroethane에 대한 독성에 관한 연구는 급성독성 등 실험 동물을 통해 몇몇 이루어져 왔는데, Millischer 등 (1995)의 보고에 따르면 이 물질은 염색체 이상을 초래하는 유전 독성은 없으나, 고농도로 장기간 (20,000 ppm, 104주) 흡입시킨 설치류의 고환에서 종양이 발생한 결과를 보고하였다. Brock 등 (1995)은 이 결과에 대해 실험동물의 주령 증가에 따라 나타나는 호르몬 변화가 종양발생의 원인으로 추정하고 이 물질의 독성은 미약한 것으로 판단하였다.

그러나 본 연구에서 1,1-dichloro-1-fluoroethane에 대해 소핵시험을 실시한 결과, 마우스를 이용하여 복강내 단회 투여하여 실시한 실험에서는 소핵유발이 관찰되지 않았으나 13주간 반복 흡입 폭로시켰던 흰쥐에서는 소핵유발이 통계적으로 유의하게 상승한 것이 관찰되었고 농도가 상승함에 따라 소핵빈도도 상승하는 용량의존성이 통계적으로 유의하게 관찰되어 ($p < 0.01$) 본 물질은 염색체 이상이나 유사분열과정의 이상을 일으킴으로서 유전독성을 나타내는 물질임을 보여 주었다.

Schumid 등(1975)이 소핵시험을 개발할 당초에는 24시간 간격으로 2회 물질을 투여하고 2회째 투여후 6시간후 표본을 작성하는 법을 추천하였었다. 그러나 소핵의 생성과정에 대해 논의가 있어 온 후 표본작성 6시간 전의 투여는 소핵유발에 관여하지 않는 것으로 알려져 일반적으로 화학물질에 대한 유전독성 스크리닝방법으로서 소핵시험은 단회 투여하여 24시간 후 표본 작성하는 방법이 이용되어 왔으며 이로써 여러 화학물질의 유전독성에 대해 보고되어

왔다. 그러나 실질적으로 어떤 화학물질에 대한 유전독성여부를 판단하기 위해 소핵실험을 실시할 경우 어느 정도의 간격으로 몇 회 투여하는 것이 소핵유발에 적절한 것인가에 대해서는 화학물질마다 다른 것으로 제시되어 왔다 (Hayashi, 1991).

화학물질을 단회 투여하는 것에 비하여 반복적으로 투여하는 경우 소핵유발 효과는 가산적으로 나타나는 것으로 보고되어 왔는데 즉 각각의 투여에 의해 독립적으로 기대되는 각 시점에서의 출현빈도를 합한 것이 되며, 또한 화학물질의 투여에 의한 골수세포의 증식억제의 지표가 되는 전체 적혈구에 대한 PCE의 비율은 각각의 투여에 의해 일어나는 영향의 곱으로 나타난다고 보고되어 있다 (Salamone 등, 1980; Hayashi, 1991).

그러나, 증식억제가 별로 강하지 않은 범위에서 나타난 소핵의 출현이 장시간에 걸치는 경우 즉 투여의 간격보다 소핵출현의 지속이 긴 경우, 반복투여에 의한 소핵의 출현이 이러한 가산효과에 의해 단회 투여 한 것보다 현저하게 나타나게 되는 반면, 소핵출현의 지속성이 없는 경우는 전회 투여에 의한 영향이 전부 소멸되어 소핵출현에 대한 반복투여에 의한 가산효과가 거의 없게 된다. 또한 골수세포 증식억제가 강하게 나타내는 상황에서는 다염성 적혈구가 없어지기 때문에 소핵의 관찰자체가 불가능하게 된다.

본 연구에서 1,1-dichloro-1-fluoroethane에 대해 단회 복강내 투여방법과 13주 반복흡입폭로 방법에 의해 실시한 소핵시험결과는 서로 상이하었는데 이는 본 물질에 의해 유발된 소핵은 출현의 지속시간이 비교적 긴 편이어서 단회 투여한 소핵유발빈도보다 반복 폭로시켰을 경우 가산 효과가 있음을 나타내고 있다.

또한 골수세포 증식 억제 현상도 고농도로 반복 흡입폭로에 의해 실시한 방법에서 강하게 관찰되었는데 이 또한 높은 농도에서 반복 폭로에 의해 골수

세포 억제 현상의 상승효과가 현저하였음을 보여 주고 있다.

1,1-Dichloro-1-fluoroethane의 급성 또는 아만성 독성 연구에서 호흡기와 관련된 독성 현상은 없는 것으로 보고되어 있다 (Brock 등, 1995). 즉 현재까지 이 물질은 피부 또는 눈에 대한 자극성이외에는 인체에 유해한 독성은 없는 비교적 안전한 물질로 평가되어 왔다 (Dekant, 1996). 한편 본 물질은 간의 cytochrome P-450 효소계에서 대사되어 2,2-dichloro-2-fluoroethanol 및 dichlorofluoroacetic acid 형태로 되어 소변으로 배설되는 것으로 알려져 있으나 (Loizou 등, 1993; Tong 등, 1998), 생체 내에서의 대사 및 이 과정에서 나타나는 유해성에 대한 연구는 아직 불충분한 상태이다 (Anders, 1991).

본 연구결과에서 소핵유발의 차이성을 투여 횟수라는 요인뿐 아니라 투여 경로 측면에서 고찰해 볼 수 있으나 본 물질의 대사체에 대한 유해성 자료가 불충분하므로 실험동물 내로 흡수된 후의 독성작용을 비교할 수는 없었다. 단지 본 물질이 휘발성이 높은 물질이므로 올리브 오일에 희석하여 복강내 투여하는 것 보다 흡입챔버를 이용하여 흡입폭로시키는 것이 보다 효율적으로 동물에 흡수될 수 있다는 점을 고려할 수 있겠으나 본 물질이 호흡기 독성이 없는 것으로 보고된 것등을 감안하고, 또한 소핵을 관찰하는 목적장기가 골수이므로 폭로경로에 의한 차이는 없는 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서 복강내 투여한 농도는 500 mg/kg, 1,000 mg/kg, 1,500 mg/kg이었으며, 흡입폭로의 경우 폭로농도는 1,500 ppm, 3,000 ppm, 6,000 ppm으로 하루 6시간의 폭로시간을 고려하여 계산하면 복강 투여한 농도와 거의 상당하였으므로 연속 투여에서의 소핵빈도 가산효과를 좀 더 강하게 예측할 수 있었다.

즉 화학물질의 안전성을 평가하기 위한 소핵시험에 있어서 가장 좋은 투여 방법을 하나로 한정하는 것은 불가능하며 반복 투여에 의한 소핵출현을 증가

의 장점과 세포증식억제가 강하게 될 수 있다는 점을 상호 고려하여 결정하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

본 연구에서 13주 반복 흡입폭로시킨 흰쥐에서의 소핵유발 빈도가 암수 모두에서 모든 폭로군에서 대조군에 비하여 상승함을 관찰하였지만 암컷의 경우는 통계적 유의성이 관찰되지 않아 소핵시험을 하는데 있어서 수컷의 설치류를 이용하는 것이 보다 효과적임을 나타내었다. 그러나 암 수 모두에서 폭로농도가 증가함에 따라 소핵유발빈도도 점차 상승하는 용량의존성을 나타내어 ($p<0.01$) 소핵시험을 하는데 있어 실험동물의 성별 차이는 크지 않은 것으로 사료되었다.

제 5 장 결 론

할로겐 화합물 중 정밀부품 혹은 전자부품의 세정제로 널리 사용되고 있으나 공중보건과 환경에 악영향을 미칠 수 있는 HCFC 물질을 함유하고 있으며 암 발생의 문제점 등도 제시되고 있는 물질인 1,1-dichloro-1-fluoroethane에 대한 유전독성을 복강내 단 회 투여에 의한 마우스 골수세포에서의 소핵 유발과 13주 흡입 반복 폭로에 의한 흰쥐 골수세포에서의 소핵 유발시험을 실시하여 관찰한 결과, 다음과 같았다.

1. 1,1-Dichloro-1-fluoroethane을 500 mg/kg, 1,000 mg/kg, 1,500 mg/kg의 농도로 마우스 복강 내에 단 회 투여하여 24시간 후 작성한 마우스 골수 세포소핵표본을 관찰한 결과, 투여군에서의 소핵 빈도는 대조군에 비하여 차이가 없었으며, 골수세포 증식 억제 현상도 관찰되지 않았다.
2. 1,500 ppm, 3,000 ppm, 6,000 ppm으로 하루 6시간, 주 5일, 13주간 반복 흡입폭로시킨 흰쥐의 골수 세포 표본을 관찰한 결과, 수컷의 경우 각각의 투여군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하였을 때 모든 투여농도군에서 통계적으로 유의하게 증가하는 양상을 나타내었고 ($p<0.05$), 농도에 따른 용량의존성을 나타내었다 ($p<0.01$).
3. 암컷에서는 폭로농도가 증가함에 따라 소핵 유발 빈도도 증가하는 양상을 보였으나 ($p<0.05$) 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 소핵유발빈도

차이를 나타내지는 않았다.

4. 암수 모두에서의 관찰결과를 분석한 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 $0.28 \pm 0.10(\%)$ 이었으며, 1,500 ppm 폭로군의 소핵출현빈도는 $0.44 \pm 0.12(\%)$, 3,000 ppm 폭로군에서의 빈도는 $0.47 \pm 0.13(\%)$, 6,000 ppm 폭로군에서의 빈도는 $0.53 \pm 0.18(\%)$ 이었다. 즉, 1,1-dichloro-1-fluoroethane를 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 비교하였을 때 모든 투여농도군에서 통계적으로 유의하게 증가하는 양상을 나타내었고 ($p < 0.05$), 농도에 따른 용량의존성을 나타내었다 ($p < 0.01$).
5. 13주간 흡입폭로시킨 흰쥐에 있어서 골수의 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율에 관한 결과, 수컷 및 암컷 모두의 경우 가장 높은 폭로 농도군(6,000 ppm)에서 통계적으로 유의하게 감소하였음을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$).

이상의 결과를 통하여 1,1-dichloro-1-fluoroethane은 13주 반복흡입폭로에 의해 골수세포에서 소핵이 유발됨이 관찰되어 유전독성이 있으며, 고농도에서는 골수세포 증식억제도 일으킨다고 평가되었다.

제 6 장 참고문헌

1. 안 연순, 홍 천수, 강 성규 (1998). 1,1-Dichloro-1-fluoroethane에 폭로된 근로자의 천식. 제21차 대한산업의학회 추계학술대회연제집. 대한산업의학회, 106-108.
2. Anders, M.W. (1991). Metabolism and toxicity of hydrochlorofluorocarbons : Current knowledge and needs for the future. Environ. Health Perspect. 96. 185-191.
3. Astier, A. & Paraire, F. (1997). Fatal intoxication with 1,1-dichloro-1-fluoroethane. N. Engl. J. Med., 337-940.
4. Brock, W.J., Trochinowicz, H.J., Millischer, R.J., Farr, C., Kawano, T., Rusch, G.M. (1995). Acute and subchronic toxicity of 1,1-dichloro-1-fluoroethane (HCFC-141b). Food Chem. Toxicol. 33, 483-490.
5. Crebelli, R., Andreaoli, C., Carere, A., Conti, L., Crochi, B., Cotta-Ramusino, M., Benigni, R. (1995). Toxicology of halogenated aliphatic hydrocarbons: Structure and molecular determinants for the disturbance of chromosome segregation and the induction of lipid

- peroxidation. *Chemico-Biological Interactions* 98, 113-129.
6. Dekant, W. (1996). Toxicology of chlorofluorocarbon replacements. *Environ. Health Perspect.* 104 s(1), 75-83.
 7. Eriksson, L., Jonsson, J., Hellberg, S., Lindgren, F., Sjostorm, M. & Wold, S. (1991). A strategt for ranking environmentally occurring chemicals: Part V. The development of two genotoxicity QSARs for halogenated aliphatics. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 585-596.
 8. 林 眞 (1991). 小核試験 - 実験法からデータの 評価まで, 醫藥安全性研究會 monograph series No. 2. サイエンティスト社.
 9. Hayashi, M., Sofuni, T. & Morita., T. (1991). Simulation study in effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.*
 10. 김 현영, 임 철홍, 김 철우, 정 용현, 맹 승희, 이 성배, 한 정희, 이 종윤, 장 동혁, 전 윤석, 최 수영, 강 대봉, 함 병진, 이 용묵 (2000). 1,1-Dichloro-1-fluoroethane의 랫드를 이용한 아만성 흡입독성연구. 한국 산업안전공단, 산업안전보건연구원 연구집 (in press).
 11. 한국화학연구소 (1997). 국내 화학물질 유통량 조사 자료.

12. Loizou, G.D. & Anders, M.W. (1993). Gas-uptake pharmacokinetics and biotransformation of 1,1-dichloro-1-fluoroethane (HCFC-141b). *Drug Metab. Dispos.* 21, 634-639.
13. Millischer, R.J., de Rooji, C.G., Rusch, G.M., Farr, C.H., Ben-Dyke, R., Hardy, C.J., Lewis, D.J., Hodson-Walker, G. (1995). Evaluation of the genotoxicity potential and chronic inhalation toxicity of 1,1-dichloro-1-fluoroethane (HCFC-141b). *Food Chem. Toxicol.* 33, 491-500.
14. OECD (1993). OECD guidelines for the testing of chemicals.
15. RTECS (1998). National Institute for Occupational Safety & Health (NIOSH). Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.
16. Salamone, M., Heddle, J., Stuart, E. & Katz, M. (1980). Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 metal agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat. Res.* 74, 347-356.
17. Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9-15.
18. Tong, Z., Utell, M.J., Morrow, P.E., Rusch, G.M., Anders, M.W. (1998). Metabolism of 1,1-dichloro-1-fluoroethane (HCFC-141b) in human

volunteers. Drug Metab. Dispos. 26, 711-3.

19. Tuppurainen, K. (1999). Frontier orbital energies, hydrophobicity and steric factors as physical QSAR descriptors of molecular mutagenicity. A review with a case study : MX compounds. Chemosphere 38, 3015-3030.

할로젠 화합물에 의한 소핵유발 연구
(연구원 2001-20-58)

발 행 일 : 2001년 1월 31일

발 행 인 : 산업안전보건연구원 원장 정 호 근

연구책임자 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터 선임연구원 맹승희

발 행 처 : 한국산업안전공단 산업안전보건연구원

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : (032) 5100 - 842

F A X : (032) 5180 - 867
