

## Chlorophenol 類의 細胞化學的 毒性에 관한 研究

鄭 勇

서울대학교 大學院 藥學科

(Received August 1, 1978)

Yong Chung

Department of Pharmacy, Graduate School, Seoul National University  
Seoul 151

Studies on Cytochemical Toxicities of Chlorophenols to the Rat

**Abstract**—Chlorination of the polluted water may produce odoriferous and objectionable-tasting chlorophenols which are hazardous to health.

These studies were undertaken to investigate the hazardous effects of chlorophenols to the rat. 1. The chlorophenols such as o-chlorophenol and 2,6-dichlorophenol inhibited rat growth and caused increment of the ratio between liver weight and body weight. 2. The hemoglobin content, hematocrit ratio and A/G of rat blood were decreased by chlorophenols administration. The activities of alkaline phosphatase, lactic dehydrogenase (LDH) and glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) in serum as well as in liver were increased provisionally and decreased after one or two weeks administration. 3. The liver mitochondrial respiration ( $QO_2$ ) was inhibited by chlorophenols treatment in *in-vivo* and *in-vitro* test. 4. The liver microsomal cytochrome P-450 was decreased by chlorophenols administration. 5. Liver tissue was degenerated with congestion, atrophy, swelling, vacuolation, dilation of rough endoplasmic reticulum and denature of mitochondrial particle with swelling, and cristal destruction by chlorophenols administration. 6. After one and two weeks of administration of chlorophenols to rat, the aberrations of bone marrow chromosome and inhibition of its mitosis were observed respectively.

最近 急激한 産業化와 人口增加는 工場 및 都市로 부터 廢, 下水量을 增加시키며 이들은 곳 곳의 上水源을 汚染시키고 있다. 따라서 各 上水淨水場은 各種 藥品使用量이 增加하고 있으며, 더욱이 鹽素使用量도 增加하고 있고<sup>1)</sup> 上水處理事前에 鹽素를 投入하는 境遇도 있다.

鹽素는 殺菌力以外에도 強力한 酸化作用으로 無機物을 酸化시키고 有機物을 分解하여 廢, 下水의 BOD를 減少시키며 냄새 및 色의 原因을 除去시키기도 하므로 近來에는 廢, 下水處理에도 應用되기도 한다<sup>2~4)</sup>.

그러나 家庭下水나 工場廢水로 부터 各種 排出物이 上水源에 汚染되어 鹽素 消毒으로 各種 鹽素化合物을 形成한다<sup>5~11)</sup>.

이들 不純鹽素系化合物中에는 chlorophenols(C. P.)와 같이 不快 臭味을 나타내는 것도 있으며<sup>11)</sup>, 이들을 함유한 물은 各種生物에 有毒作用을 나타내기도 한다.

Elliott, D. S. 등은 생쥐에 鹽素消毒된 水道水를 投與한 實驗群에서 같은 물을 樹脂로 不純物을 除去하고 投與한 對照群보다 出産率이 현저히 낮았으며 死産과 未熟胎兒가 많았다고 報告하고 있으며<sup>12)</sup> 原因物質들은 汚染된 微量重金屬化合物 및 各種 殘留農藥, 또는 鹽素消毒後 生成된  $\text{CHCl}_3$  등 數種의 鹽素系化合物 등으로 추정하였다<sup>13)</sup>. 特히 할로겐 化合物들에 의한 慢性毒性이 경고된다고 하였다<sup>14~16)</sup>. 또한 Keith, H. L. 등은 1969年부터 1972年까지 美國의 New Orleans의 13個都市의 上水中에서 數種의 有毒性 殘留農藥과 더불어 各種鹽素系有機化合物들 117種을 XAD-Resin을 이용한 carbon chloroform extraction(CCE)法으로 發見하였다<sup>5)</sup>. 이들 중에는 生體의 흡수되어 代謝되어 C. P.을 生成하는 polychlorinated biphenyls(PCB), r-BHC 및 tetra chlorodibenzo-p-dioxin 과 같은 猛毒性인 有機鹽素系農藥도 있다<sup>17~22)</sup>.

이들은 肝組織細胞內의 N-methylation 또는 hydroxylation enzyme의 活性을 增加시키고<sup>23,24)</sup> uroporphyrin 蓄積量을 增加시키며 一時的으로 循環型 steroid를 減少시킨다<sup>25)</sup>. 急性毒性인 境遇體重減少, ataxia, 설사, 血淚症, 漸進的脫水, 中樞神經系抑制로 死亡하게 되며 亞急性인 境遇肝臟의 肥大나 hepatic porphyria를 일으키며<sup>26)</sup> 慢性的으로는 肝細胞에 特異한 病變을 일으킨다<sup>27,28)</sup>. 더욱이 이들은 發癌性이 있다는 報告도 있다<sup>29~33)</sup>.

이러한 C. P.들은 汚染된 殘留性 農藥 및 PCB 등에서 由來하기도 하나 분노등의 排出下水 및 工場廢水의 phenol 化合物에 鹽素消毒에 의하여도 生成되어 鹽素消毒한 廢水處理場의 放流水<sup>4)</sup> 및 河川水<sup>5)</sup>에서 發見된다.

따라서 著者は 아직까지 C. P.의 毒性에 關하여서는 充分한 研究報告가 未洽한 段階임으로 이들의 毒性에 따른 細胞化學的 變化를 調査하여 報告한다.

## 實驗 方法

**實驗 材料**—特級 o-chlorophenol(o-C. P., 東京化成工業製), 特級 2,6-dichlorophenol(2,6-C. P. 東京化成工業製)

**實驗 動物**—體重 約 150g의 雄性白鼠(Sprague-Dawley strain)

**實驗群**—o-C. P. 및 2,6-C. P.를 各各 白鼠 kg當 0.065g 및 0.130g을 olive 油에 溶解시켜 隔日로 1~3週間씩 經口投與하였다. 이들 實驗動物은 C. P. 投與前 1週間 實驗室內의 環境에 適應시켰으며 實驗動物은 1週, 2週 및 3週마다 實驗日의 24時間前에 絶食한 後 屠殺하였다. 이때에 各 實驗動物의 飼料는 vitamine E free basal ration에 vitamine E<sup>34)</sup>를 50mg/kg 混合하여 使用하였다. 對照群 및 各 實驗群은 各各 6마리씩 使用하였다.

**肝組織液 調製**—實驗對象白鼠는 頸動脈으로부터 採血 屠殺하고 肝組織을 切取하였다.

採取한 肝組織은 4°C 以下의 冷凍室에서 冷却한 0.25M sucrose 液과 homogenizer로 磨碎하여 10% (W/V)가 되도록 하고 磨碎液은 細胞膜片等을 除去하기 위하여 二重거즈로 濾過하고 600 ×g로 15分間 遠心沈澱시켰다. 이 上澄液을 12,500 ×g로 30分間 遠心分離시켜 mitochondria 部分과 cytoplasm으로 分離시켜 各已 試驗液으로 使用하였다<sup>35)</sup>. 이때 遠心沈澱은 冷凍遠心分離機(International Centrifuge Model. PR-2, International Equipment Co., U. S. A)를 使用하였다.

**Mitochondria 呼吸量測定**—各 實驗群의 肝組織 mitochondria 液에 대하여 Warburg 方法<sup>36)</sup>에 의하여 呼吸量을 測定하였다(*in vivo test*). 또한 對照群의 肝組織 mitochondria 液에 o-C. P. 와 2.6-C. P. 液을 各各 ml 當 0.003 $\mu$ g, 0.03 $\mu$ g, 0.3 $\mu$ g, 3.0 $\mu$ g 을 加하고 그 呼吸量을 測定하였다(*in vitro test*).

#### 血液 및 肝組織의 蛋白質 및 酵素活性度 測定

1) Hemoglobin-Cannan, R. K. 方法에 따라 血液中 總 hemoglobin 을 Drabkin's 溶液에 의해 生成되는 cyanmethemoglobin 量으로 測定하였다<sup>37)</sup>.

2) Hematocrit-capillary method 에 따라 全血液에 대한 plasma cell 의 比率(%)로 測定하였다.

3) 蛋白質量-血清中의 蛋白質含量은 Biuret 反應<sup>38)</sup>을 이용한 Technicon Co. 의 SMA 12/60 survey model, autoanalyzer 로 測定하였고 肝組織液中의 蛋白質量은 Koch 및 McMeekin 의 方法에 따라 semimicro Kjeldahl 法으로 測定하였다<sup>39)</sup>.

4) Albumin-血清 albumin 이 2-(4'-hydroxy azobenzene) benzoic acid (HABA)와 定量的으로 결합하는 Rustein<sup>40)</sup> 등의 方法을 Ness<sup>41)</sup> 등이 수정 보완한 方法을 利用한 SMA 12/60, survey model, autoanalyzer 로 測定하였다.

5) Alkaline phosphatase 活性度-Bessey 등의 方法<sup>42)</sup>에 따라 p-nitrophosphate 을 基質로 使用하여 SMA 12/60, survey model, autoanalyzer 로 測定하였으며 그 活性度は SI unit 로 表示하였다.

6) Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 活性度-Morgenstern 등의<sup>43,44)</sup> 方法에 따라 SMA 12/60, survey model, autoanalyzer 로 測定하였으며 그 活性度は SI unit 로 表示하였다.

7) Lactic dehydrogenase(LDH) 活性度-Neilands 의 方法에 따라 LDH 에 의하여 lactate 가 pyruvate 로 酸化할때에 還元되는 NADH 의 量을 測定하였다<sup>45)</sup>.

8) Microsomal cytochrome P-450-Mitoma 등의 方法에 따라 白鼠肝組織으로부터 microsome 을 分離하였다<sup>46)</sup>. Omura 등의 方法<sup>47)</sup>에 따라 이 分離된 microsome 液을 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에서 CO 가스를 飽和시키고 450 m $\mu$  에서 그 吸光度를 測定하였다.

이때 cytochrome P-450 의 molar extinction coefficient 는 91cm<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup> 을 使用하였다<sup>48)</sup>.

#### 組織學的 檢査

1) 光學顯微鏡的 檢査-各 實驗動物의 肝組織의 小葉中間部의 一部를 採取하고 約 3.6% 中性 formalin 에 固定하고 一律적으로 hematoxylin-eosin 染色을 하였다. 糖의 變動을 보기 위하여 PAS 染色을, 그리고 脂質沈着을 보기 위하여 cryostat 로서 冷凍切片을 만들어 oil red-O 染色을 施行하여 光學顯微鏡으로 檢査하였다.

2) 電子顯微鏡的 檢査-屠殺 即時 肝組織을 細切하여 1.0% OsO<sub>4</sub> 液과 磷酸衝液(pH 7.4)에 2 時間 固定하여 alcohol로 脫水하고 Epon 812 에 包埋한 다음 MT-2 ultramicrotome (Soral Co.) 으로 500Å 의 切片을 만들었다. 이것을 uranyl acetate 에 30 分間, lead citrate 에 10 分間 2重 染色하고 電子顯微鏡(Hu-11, EI, Hitachi Co.)으로 觀察하였다.

**骨髓細胞 染色體 檢査**-實驗動物의 大腿骨을 採取하고 주사기로 骨髓細胞를 내어 얻은 細胞浮遊液을 Tjio & Wang 의 方法에 따라 MEM 培養液(minimum essential medium, Gibus Co., Ltd.)에서 培養하고 中期核相 染色體를 檢査하였다<sup>49,50)</sup>.

### 實驗 成績 및 考察

白鼠 成長에 미치지 影響-各 對照群의 體重增加를 觀察한 結果 다음 Table I 과 같았다. 對照群은 1 週, 2 週 및 3 週間에 平均 20.7%, 35.2% 및 43.4%의 體重增加를 보였으나 o-C. P. 投與 I 및 II 群은 平均 10.0~13.8%, 22.0~23.0% 및 27.3~28.3%增加와 또한 2.6-C. P. 投與 I 및 II 群은 10.3~10.5%, 16.3~21.9% 및 23.5~27.1%로 增加하였다.

Table I—Effect of Chlorophenols on Rat Growth

(weight:gm)

Exp. group	Exp. period (week)			
	0	1	2	3
Control	145±8.3	177±10.4	196±10.8	208±12.2
o-C. P.	I	**173±8.9	*187±10.2	*199±13.4
	II	**165±10.3	*183±12.3	*191±14.4
2.6-C. P.	I	**171±12.9	*189±11.0	*197±15.6
	II	**169±12.3	*178±12.4	*189±18.2

(M±S. E.), \*p<0.01, \*\*0.01<p<0.05

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2.6-C. P. : 2.6-dichlorophenol

本 實驗結果 o-C. P. 및 2.6-C. P. 는 白鼠의 機能의 異常을 일으켜 正常的 成長을 阻害시키는 것으로 생각된다.

肝臟의 重量變化-C. P. 에 의한 各實驗群의 肝臟의 重量變化를 보면 다음 Table II 와 같다.

Table II—Effect of Chlorophenols on Rat Liver Weight

(gm/kg)

Exp. group	Exp. period (week)				
	0	1	2	3	
Control	5.4±0.32	5.3±0.34	5.6±0.24	5.2±0.43	
o-C. P.	I	5.3±0.28	5.7±0.43	5.8±0.52	5.8±0.62
	II	5.2±0.43	5.9±0.51	6.1±0.62	*6.7±0.67
2.6-C. P.	I	5.4±0.41	6.2±0.60	*6.5±0.73	*7.0±0.83
	II	5.4±0.24	*6.5±0.56	*6.7±0.61	*7.1±0.91

(M±S. E.), \*p<0.01

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2.6-C. P. : 2.6-dichlorophenol

單位 體重에 對한 肝臟의 무게는 正常對照群에서 平均 5.2~5.6g/kg 이었으나 o-C. P. 投與 I 群을 除外한 他群에서 增加하고 있었다. 特히 3 週實驗群에서 o-C. P. 投與 II 群은 28.8%, 2.6-C. P. 投與 I 群은 29.6%, 2.6-C. P. 投與 II 群은 31.5%로 增加하였다.

이러한 現象은 肝機能低下 또는 異常이 있을 境遇에 一般的으로 볼 수 있는 것이며 PCB 等 肝臟에 特異的인 機能障害를 일으키는 物質等에서도 肝臟의 肥大가 있으며 이러한 肝肥大는 또 한 各種 酵素活性에 影響이 있다. 酵素의 活性의 變化는 이미 肝肥大現象以前에 온다고 한다<sup>51)</sup>.

血液相의 變化-1) Hemoglobin 과 Hematocrit : 對照群의 白鼠 血中の hemoglobin 에 比하여 各 3 週實驗群에서는 Table III 에서와 같이 減少하는 傾向이 있었다.

또한 血液中の plasma cell 의 比인 hematocrit ratio(%)는 Table IV 에서와 같이 各 3 週實驗群에서 減少가 뚜렷하였다.

이러한 現象은 C. P. 의 毒性에 의하여 hemoglobin 및 血球生成이 阻害됨을 말하여 준다.

2) 血清中 總蛋白, Albumin 및 A/G(Albumin/Globulin) : 各 實驗群에서 血清蛋白 및 albumin

Table III—Effect of Chlorophenols on Hemoglobin of Rat Blood.

(gm%)

Exp. group	Exp. period (week)		
	1	2	3
Control	15.2±0.78	15.2±0.76	15.4±0.85
o-C. P.	I	15.1±0.34	15.3±0.92
	II	15.4±0.66	14.9±0.70
2.6-C. P.	I	15.2±0.56	15.0±0.59
	II	15.4±0.62	*13.6±0.81

(M±S. E.), \*p<0.01

Table IV—Effect of Chlorophenols on Hematocrit Ratio of Rat Blood.

(%)

Exp. group	Exp. period (week)		
	1	2	3
Control	49.2± 1.8	48.9± 1.4	49.3±1.1
o-C. P.	I	50.0± 2.3	51.2± 1.6
	II	49.3± 1.7	48.3± 1.9
2.6-C. P.	I	49.6± 1.9	49.9± 2.0
	II	51.4± 2.3	48.8± 1.7

(M±S. E.), \*p<0.01

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2.6-C. P. : 2.6-dichlorophenol

의 함유량은 다음 Table V 및 VI과 같이 對照群과 有意한 變化가 없었으나 A/G는 2.6-C.P. 投與 3週에서 減少를 하였다(Table VII).

이는 血清 蛋白質中 globulin의 增加로 因한 것으로 生體의 外部異物質에 對한 防禦機轉에 의한 反應으로 생각된다.

Table V—Total Serum Protein of Rat treated with Chlorophenols

(gm %)

Exp. group	Exp. period (week)		
	1	2	3
Control	6.3±0.34	6.4±0.46	6.5±0.66
o-C. P.	I	6.5±0.56	6.3±0.73
	II	6.8±0.44	6.8±0.37
2.6-C. P.	I	6.8±0.54	6.5±0.81
	II	6.9±0.61	6.6±0.53

(M±S. E.)

Table VI—Rat Serum Albumin treated with Chlorophenols

(gm %)

Exp. group	Exp. period (week)		
	1	2	3
Control	2.9±0.52	3.0±0.63	3.0±0.77
o-C. P.	I	3.1±0.54	3.0±0.72
	II	2.9±0.60	2.9±0.66
2.6-C. P.	I	2.9±0.83	2.9±0.69
	II	3.0±0.81	3.0±0.77

(M±S. E.)

I : group treated with 0.065g/kg chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2.6-C. P. : 2.6-dichlorophenol

血中 酵素 活性의 變化-1) Alkaline phosphatase 活性 : 다음 Table VIII과 같이 對照群에 比하여 o-C. P. 投與 I 群에서는 變化가 없었으나 o-C. P. 投與 II 群과 2.6-C. P. 投與 I 및 II 群에서는 1週에 活性度가 增加되었고 3週에서는 減少되었다.

2) LDH 活性 : Table IX에서와 같이 o-C. P. 投與群은 對照群에 比하여 1~2週間 活性度의 현저한 上昇을 보였고, 2.6-C. P.는 1週에 높은 活性度를 나타내었다.

各 3週實驗群의 LDH 活性度는 對照群과 差異가 없었다.

**Table VII**—A/G of Rat Serum treated with Chlorophenols

(gm %)

Exp. group	Exp. period (week)		
	1	2	3
Control	0.8±0.14	0.9±0.15	0.8±0.16
o-C. P.	I	0.9±0.16	0.9±0.17
	II	0.8±0.15	0.7±0.15
2,6-C. P.	I	0.7±0.17	0.8±0.18
	II	0.8±0.17	0.8±0.16

(M±S. E.), \*0.01<p<0.05

**Table VIII**—Serum Alkaline Phosphatase Activities of Rat treated with Chlorophenols

(mU/ml)

Exp. group	Exp. period (week)		
	1	2	3
Control	326±37	322±42	305±51
o-C. P.	I	345±40	305±52
	II	**370±39	323±31
2,6-C. P.	I	336±49	**366±37
	II	*375±62	312±22

(M±S. E.), \*\*0.01<p<0.05, \*p<0.01

**Table IX**—Serum LDH Activities of Rat treated with Chlorophenols

(×10<sup>-3</sup>μM/min/mg)

Exp. group	Exp. period (week)		
	1	2	3
Control	0.8±0.08	0.8±0.09	0.8±0.10
o-C. P.	I	*0.9±0.05	*1.3±0.07
	II	*1.3±0.06	*1.1±0.09
2,6-C. P.	I	*0.9±0.06	0.8±0.07
	II	*0.9±0.06	0.8±0.07

(M±S. E.), \*0.01<p<0.05

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2,6-C. P. : 2,6-dichlorophenol

Table X—Serum GOT Activities of Rat treated with Chlorophenols

Exp. group	Exp. period (week)			
	1	2	3	
	Centrol	321±40	307±31	316±33
o-C. P.	I	345±66	**375±39	**386±37
	II	**395±42	*520±53	*420±38
2.6-C. P.	I	366±52	**395±54	**387±42
	II	383±50	*480±38	**389±52

(M±S. E.), \*\*0.01&lt;p&lt;0.05, \*p&lt;0.01

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2.6-C. P. : 2.6-dichlorophenol

3) GOT 活性 : Table X 과 같이 大體로 全實驗群에서 C. P. 의 投與 時間經過에 따라 增加 또는 增加後 減少하였다

各 實驗群의 過量投與群(各 II 群)에서는 2 週에 그 活性度는 매우 增加하였으며 後 減少現象을 나타내었으며 少量投與群(各 I 群)은 그 活性도가 實驗經過에 따라 3 週까지 서서히 增加하는 傾向을 나타내었다. 이때에 實驗群의 活性는 對照群 보다는 높았다.

血清中 alkaline phosphatase, LDH 및 GOT 活性이 大體로 對照群에 比하여 높았으나 一時增加한 後 減少하는 것은 肝臟機能異常에서 오는 現象<sup>52,53</sup>)으로 생각된다. 이들의 實驗 1 週 및 2 週에서의 增加는 肝組織酵素가 血中으로 流出된 現象이며 3 週以後의 減少現象은 肝組織의 강한 機能抑制 또는 損傷에 起因된 것으로 생각된다.

肝機能에 미치는 影響-1) Mitochondria 의 呼吸 : C. P. 을 投與한 各 實驗動物의 肝組織細胞 mitochondria 의  $QO_2$  를 測定한 結果는 다음 Table XI 과 같다. 50 分間의  $QO_2$  를 보면 o-C. P. 投與 I 群과 II 群의 1 週實驗群은 對照群에 比하여 17.9% 및 19.7%의 減少를, 2 週實驗群은 61.3% 및 62.2%의 減少를, 그리고 3 週實驗群은 66.3% 및 68.7%가 各各 減少하였다 (p<0.01).

또한 2.6-C. P. 投與 I 및 II 群에서는 1 週實驗群에서 9.8% 및 14.6%가 減少하고 2 週實驗群에서 42.4% 및 69.8%가 減少하였다. 그리고 3 週實驗群에서 60.5% 및 74.1%가 減少하였다 (p<0.01).

한편 肝組織 mitochondria 液에 C. P. 를 處理한 in vitro 實驗에서 다음 Table XII 와 같은 結果를 얻었다.

C. P. 投與 濃도가 높을수록 mitochondrial  $QO_2$  는 減少하였다. 大體로 o-C. P. 을  $2.3\mu\text{mol}$  以上에서 그리고 2.6-C. P. 가  $18.0\mu\text{mol}$  以上에서 그  $QO_2$  가 減少가 顯著하였다 (p<0.01).

以上の o- 및 2.6-C. P. 는 in vivo 또는 in vitro 에서 肝組織 mitochondria 의 呼吸을 阻害시키는 것으로 보아 肝組織 mitochondria 의 機能에 의한 物質의 好氣의 代謝에 障害가 있다는 것을 말하여 주며 이는 特히 energy 代謝過程中 酸化的 磷酸化反應에 크게 影響이 있음을 말하여



**Table XI**—Effect of Chlorophenols on Mitochondrial Respiration of Rat Liver (*in vivo*).

QO<sub>2</sub>( $\mu$ l/hr. /mg. of protein)

Exp. group	Respiration time (min.)						
	10	20	30	40	50		
Control	22.3±3.52	44.9±3.41	62.8±5.85	79.8±6.82	94.1±8.92		
1 week	o-C. P.	I	13.7±2.53	23.1±3.41	43.7±4.38	66.5±4.62	77.3±5.38
		II	13.3±1.85	21.2±2.72	43.3±3.52	60.3±3.89	75.6±6.15
	2,6-C. P.	I	15.8±1.97	31.3±2.11	52.5±3.55	70.4±3.70	85.3±6.57
		II	14.5±1.89	26.7±3.26	48.9±4.28	68.8±4.49	80.3±7.26
2 week	o-C. P.	I	8.4±1.92	16.7±1.73	23.6±3.24	30.1±3.17	36.4±3.79
		II	8.3±1.45	16.0±1.84	22.8±2.67	29.4±3.56	35.6±3.15
	2,6-C. P.	I	12.8±1.78	25.9±3.17	37.0±4.21	45.9±3.20	54.1±3.42
		II	6.7±0.72	12.8±0.93	18.4±1.93	23.7±2.38	28.5±2.54
3 week	o-C. P.	I	7.3±13.6	15.3±2.31	20.2±2.35	27.1±2.47	31.3±4.20
		II	6.2±0.78	13.2±1.93	19.3±2.13	26.8±2.38	29.5±2.74
	2,6-C. P.	I	8.9±1.23	18.8±2.10	24.7±3.45	31.2±3.46	37.1±2.17
		II	6.2±1.04	11.2±1.46	16.4±2.10	20.8±1.87	24.3±1.93

(M±S. E.)

**Table XII**—Effect of Chlorophenols on Mitochondrial Respiration of Rat Liver (*in vitro*)

QO<sub>2</sub>( $\mu$ l/hr. /0.2ml)

Chlorophenol conc. ( $\mu$ mol)	Respiration time (min.)					
	10	20	30	40	50	
Control	0	3.6±0.43	7.1±0.61	10.8±0.94	14.2±1.26	17.3±1.68
o-C. P.	0.23	3.6±0.39	7.2±0.58	10.4±0.82	14.1±13.1	16.9±1.63
	*2.30	2.8±0.42	5.7±0.63	8.1±0.91	11.1±1.04	13.4±14.2
	*23.0	3.3±0.34	4.8±0.67	6.8±1.04	9.3±1.13	11.2±1.29
	*230	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
2,6-C. P.	0.18	4.0±0.34	8.7±0.72	12.3±1.04	15.9±1.34	19.0±1.36
	1.80	3.4±0.29	6.9±0.93	10.5±0.92	14.0±1.92	17.3±1.45
	*18.0	2.9±0.37	5.8±0.78	8.6±0.83	11.5±1.01	14.3±1.48
	*180	0.3±0.34	0.4±0.33	0.4±0.32	0.5±0.42	0.6±1.42

(M±S. E.), \*p<0.01 for 50 min.

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2,6-C. P.: 2,6-dichlorophenol

준다.

2) Microsomal cytochrome P-450의 변화 : C.P.에 의한 肝臟組織의 microsomal cytochrome P-450의 對照群  $1.3 \pm 0.14 \mu\text{mol/gm}$ 에 대하여 實驗 3週群에서는 Table XIII과 같이 o-C.P.投與 I 및 II群에서 21.6% 및 31.2%의 減少를 그리고 2,6-C.P.投與 I 및 II群에서 22.4% 및 42.4%의 減少를 보였다.

그리고 各 實驗群에서 實驗經過에 따라 그 減少가 뚜렷하였다. 여기서 cytochrome P-450이 炭水化物系化合物의 好氣的 代謝에 매우 重要하게 作用하므로<sup>54-57)</sup> 그 減少로 인한 代謝機能 障害가 豫想되며, 또한 r-BHC 및 polychlorinated biphenyl(PCB)이 生體內에서 代謝되어 活性物質인 penta-C.P.를 生成하며 이들은 또한 cytochrome P-450을 減少시키며 heme合成에 障害를 일으킨다는 報告<sup>58)</sup>가 있어 C.P.들도 生體內에서 heme生成에 阻害要因으로 作用될 것으로 생각된다.

3) 肝組織中 LDH 및 GOT 活性의 變化 : o- 및 2,6-C.P.中毒에 의한 LDH 및 GOT의 活性은 다음 Table XIV 및 XV와 같이 C.P.投與濃度 및 投與期間에 따라 低下되었다.

Table XIII—Effect of Chlorophenols on Microsomal Cytochrome P-450 of Rat Liver

( $\mu\text{mole/gm}$ )

Exp. group	Exp. period (week)			
	0	1	2	3
Control	$1.3 \pm 0.14$	$1.2 \pm 0.11$	$1.3 \pm 0.17$	$1.3 \pm 0.14$
o-C.P.	I	$1.2 \pm 0.09$	$1.2 \pm 0.11$	$*1.0 \pm 0.04$
	II	$1.3 \pm 0.08$	$1.1 \pm 0.08$	$**1.1 \pm 0.02$
2,6-C.P.	I	$1.3 \pm 0.06$	$1.2 \pm 0.04$	$*1.0 \pm 0.12$
	II	$1.3 \pm 0.07$	$**1.1 \pm 0.06$	$*0.9 \pm 0.07$

( $M \pm S.E.$ ), \* $p < 0.01$ , \*\* $0.01 < p < 0.05$

Table XIV—Effect of Chlorophenols on LDH of Rat Liver

( $10^{-3} \mu\text{M/min/mg}$ )

Exp. group	Exp. period (week)			
	0	1	2	3
Control	$23.3 \pm 8.36$	$24.3 \pm 9.21$	$21.9 \pm 4.26$	$22.5 \pm 5.78$
o-C.P.	I	$21.9 \pm 7.60$	$24.4 \pm 6.56$	$*18.9 \pm 5.17$
	II	$22.4 \pm 6.90$	$28.3 \pm 4.79$	$*17.8 \pm 5.58$
2,6-C.P.	I	$22.3 \pm 6.70$	$28.4 \pm 5.90$	$**16.8 \pm 3.30$
	II	$23.3 \pm 7.71$	$23.3 \pm 3.88$	$**16.1 \pm 4.73$

( $M \pm S.E.$ ), \* $0.01 < p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C.P. : o-chlorophenol

2,6-C.P. : 2,6-dichlorophenol

Table XV—Effect of Chlorophenols on GOT of Rat Liver

Exp. group	Exp. period (week)				
	0	1	2	3	
Control	56.7±9.32	58.3±8.21	58.1±10.01	57.9±8.88	
o-C. P.	I	58.9±7.89	59.2±6.72	*45.2±5.63	*42.4±4.93
	II	58.0±7.52	61.2±5.24	*43.3±5.23	*41.0±6.23
2.6-C. P.	I	60.0±7.63	58.5±4.83	*46.2±4.92	*41.0±6.33
	II	59.2±8.66	53.2±8.40	*40.2±6.01	*38.1±6.72

(M±S. E.), \*p<0.01

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol  
 II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol  
 o-C. P. : o-chlorophenol  
 2.6-C. P. : 2.6-dichlorophenol

LDH는 o-C. P. 投與 I 및 II 群에서는 對照群에 比하여 3週中毒實驗에서 27.9% 및 30.6% 減少를 2.6-C. P. 投與 I 및 II 群에서는 33.1% 및 37.0%의 各各 그 活性이 減少되었으며, GOT는 投 o-C. P. 投與 I 및 II 群에서는 25.9% 및 30.6%를 그리고 2.6-C. P. 投與 I 및 II 群에서는 各各 29.2% 및 34.2%의 活性이 低下되었다.

그러나 實驗 1週群에서는 LDH 및 GOT의 活性이 약간 上昇되는 傾向이 있었다. 肝組織中の LDH 및 GOT의 變化樣狀은 大體로 血液中の 各 酵素의 活性度의 變化와 비슷하였다.

2週以後 實驗群에서의 LDH 및 GOT의 減少는 肝臟의 炭水化物代謝에 크게 影響을 미치고 있다는 것을 말하여 준다.

亦是 GOT의 減少는 mitochondria의 QO<sub>2</sub> 減少率과 같이 생각할 때 TCA cycle에도 阻害를 당하고 있다고 보겠다. 그리고 初期中毒에 LDH 및 GOT의 活性增加는 肝組織의 一時的 損傷에서 오는 一時的 現象이며 그 損傷度가 심하여 질수록 그들의 活性은 떨어진다고 하겠다. 卽 2週後 實驗群에서의 酵素의 活性低下는 肝組織의 變性에 起因하는 現象이라 하겠다.

肝臟 組織의 變化-光學顯微鏡的 所見에서 對照群은 細胞質에 均等한 好鹽基性 顆粒質이 充滿되어 있고 中心靜脈 및 門脈部位의 整列된 細胞들을 볼 수 있으며 核에는 別로 變化가 없었다 (Fig. 1, 2, 3). C. P. 投與 1週群에서는 모두 鬱血과 中心靜脈 周圍의 萎縮을 觀察할 수 있었다 (Fig. 4, 5).

2週群에서는 1週群에서 보다 심한 鬱血과 混濁腫脹을 볼 수 있으며 細胞質 顆粒이 均質하게 차여있지 않으며 中心靜脈部位의 細胞의 配列이 고르지 않다.

3週群에서는 細胞質에 變化가 매우 심하였다. 特히 細胞質의 空胞化가 深하며 細胞와 細胞의 間隔이 不明하다 (Fig. 6, 7). 이들은 oil red O 및 PAS 染色으로 空胞內質은 水性液으로 確認되었다.

이러한 變化들은 肝組織 中間層에서 현저하였다. 그러나 壞死, 또는 核分裂 및 核의 增大, 肝硬變症등은 觀察되지 않았다.

또한 電子顯微鏡의 所見을 보면 C.P. 投與群들은 다음 Table XVI 에서와 같이 rough endoplasmic reticulum(RER)의 擴張과 空胞가 增加되었으며 mitochondria의 變性과 cristae의 損失, 核膜의 不均衡等의 變化가 뚜렷하였다.

Table XVI--Electron Microscopic Observation of Rat Liver treated with Chlorophenols

Experimental group	E. M. Observation						
	SER proliferation	RER dilated	Vacuol formation	Mitochondrial denature	Cristae destroyed	Microboddy	Nucleus membrane shrinkage
Control	—	—	—	—	—	—	—
1 week	o-C. P. (I)						
	o-C. P. (II)						
	2.6-C. P. (I)	+	±	+	++	±	+
	2.6-C. P. (II)						
2 week	o-C. P. (I)						
	o-C. P. (II)						
	2.6-C. P. (I)	++	++	++	++	+	++
	2.6-C. P. (II)						
3 week	o-C. P. (I)						
	o-C. P. (II)						
	2.6-C. P. (I)	###	###	++	###	+	++
	2.6-C. P. (II)						

— : no change, + : slight change, ++ : medium change, ### : severe change

SER : Smooth endoplasmic reticulum, RER : Rough endoplasmic reticulum

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.130g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2.6-C. P. : 2.6-dichlorophenol

이들 變化는 各 投與 2週群들에서부터 뚜렷하였으며 3週群에서는 더욱 심하였다(Fig. 11, 12, 13, 14). 그러나 核內의 미세구조의 變化 및 golgi小體의 變化는 觀察할 수 없었다.

以上の 組織形態學的인 觀察의 結果 o 및 2.6-C. P.는 mitochondria의 變性과 RER의 擴張 또는 空胞의 現象을 招來하였다. 이것은 一般的으로 低酸素症 또는 一酸化炭素中毒時에서도 볼 수 있는 것으로<sup>59)</sup> 이는 細胞內呼吸의 支障을 말하여 준다.

여기서 RER의 變性으로 인한 ribosome의 脫落은 smooth endoplasmic reticulum(SER)의 增加를 가져오며 蛋白質合成을 阻害할 것이라 생각된다.

이러한 變化는 大體로 有機鹽素劑인 PCB의 中毒現象과 類似<sup>60, 61, 62)</sup> 하나 PCB中毒에서의 adenofibrosis는 發見치 못하였다.

骨髓細胞 染色體에 미치는 影響-C. P. 投與 白鼠 各 實驗群의 骨髓細胞에서 나타난 異常染色體로 染色分體缺失, 染色體缺失, 二同圓體染色體 및 環染色體로 區分하여 觀察한 結果 다음 Table XVII 과 같았다.

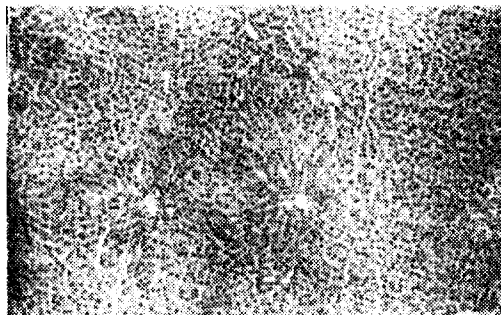


Fig. 1—Light Microscopy for Rat Liver, Control ( $\times 25$ ).

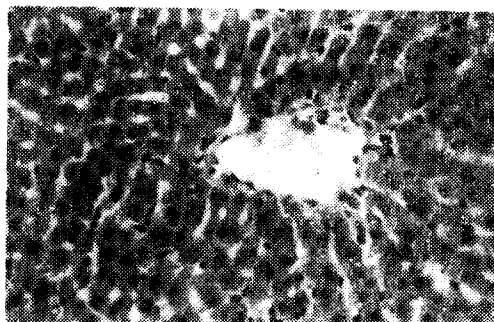


Fig. 2—Light Microscopy for Rat Liver. Control ( $\times 100$ ) :portal vein.

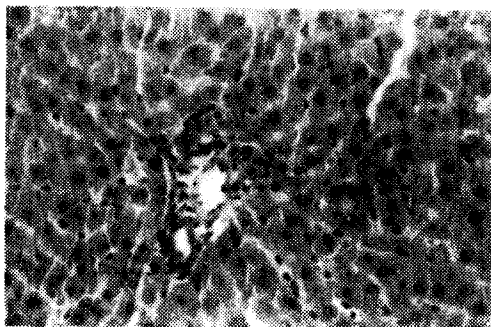


Fig. 3—Light Microscopy for Rat Liver, Control ( $\times 100$ ) :Central vein.

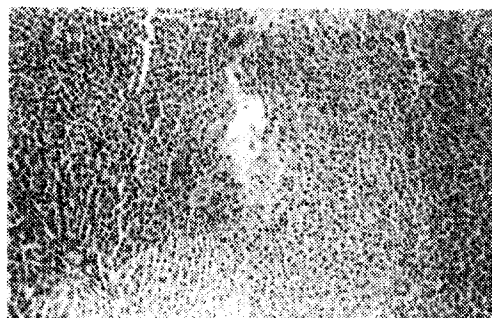


Fig. 4. Light Microscopy for Rat Liver treated with o-Chlorophenol(0.130g/kg) for 1 week( $\times 25$ ): Congestion and atrophic change.

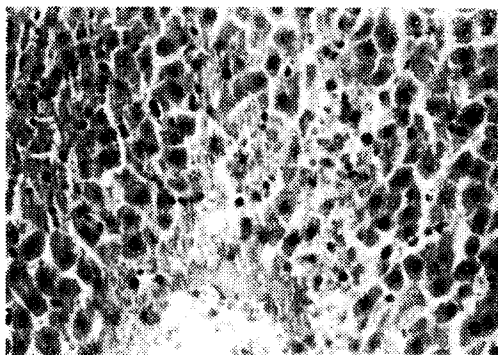


Fig. 5—Light Microscopy for Rat Liver treated with o-Chlorophenol(0.130g/kg) for 1 week( $\times 100$ ): Congestion and atrophic change.

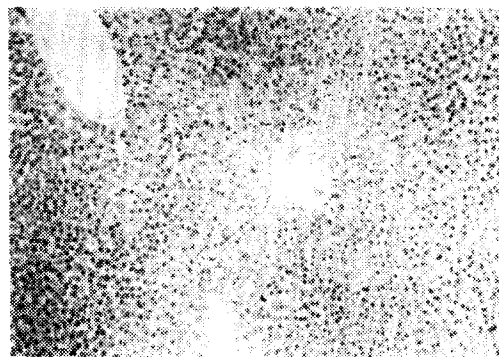
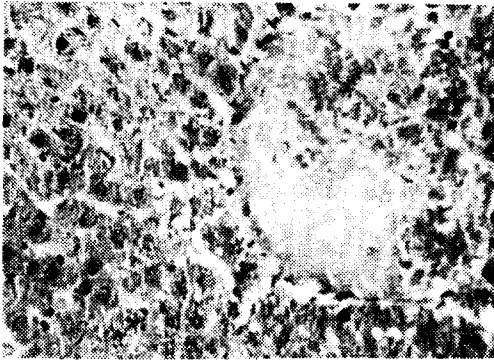
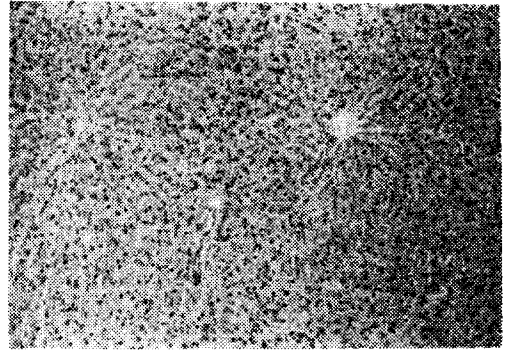


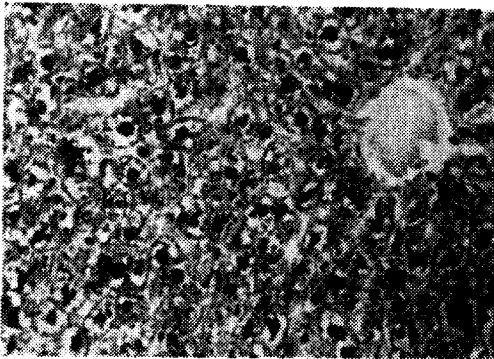
Fig. 6—Light Microscopy for Rat Liver treated with o-Chlorophenol(0.130g/kg) for 2 weeks( $\times 25$ ): Congestion and cloudy swelling.



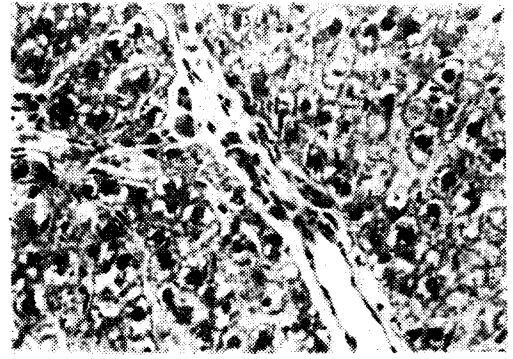
**Fig. 7**—Light Microscopy for Rat Liver treated with o-Chlorophenol(0.130g/kg) for 2 weeks( $\times 100$ ): Congestion and cloudy swelling and cell membrane disruption.



**Fig. 8**—Light Microscopy for Rat Liver treated with 2,6-dichlorophenol(0.065g/kg) for 3 weeks( $\times 25$ ): Congestion and vacuolar change.



**Fig. 9**—Light Microscopy for Rat Liver treated with 2,6-dichlorophenol(0.065g/kg) for 3 weeks. Around central vein( $\times 100$ ): Congestion and vacuolar change.



**Fig. 10**—Light Microscopy for Rat Liver treated with 2,6-dichlorophenol(0.065g/kg) for 3 weeks. Around portal vein( $\times 100$ ): Vacuolar change.



**Fig. 11**—Electron Microscopy for Control Rat Liver ( $\times 1,600$ ) N:Nucleus, M:Mitochondria RER: Rough endoplasmic reticulum, Gy:Glycogen



**Fig. 12**—Electron Microscopy for Rat Liver treated with o-Chlorophenol(0.065g/kg) for 1 week ( $\times 1,000$ ): RER destroyed, vacuolar changed and nucleus membrane denatured, microbodies (dense material) increased



Fig. 13—Electron Microscopy for Rat liver treated with 2,6-dichlorophenol (0.065g/kg) for 2 weeks ( $\times 2,250$ ): Nucleus membrane and mitochondria denatured, RER proliferated.

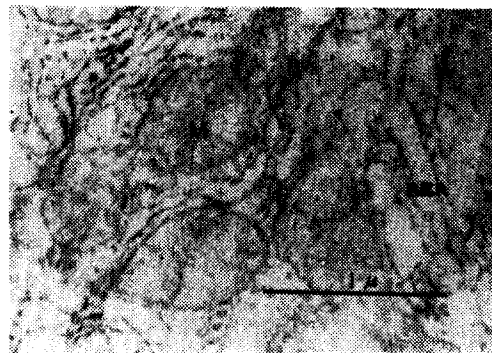


Fig. 14—Electron Microscopy for Rat Liver treated with o-Chlorophenol (0.065g/kg) for 3 weeks ( $\times 5,000$ ): Mitochondrial structure and cristae destroyed and vacuolized.

對照群에서는 細胞當 異常率이 4%인 反面에 1週間 o-C.P., 0.13g/kg 投與群과 2,6-C.P., 0.13g/kg 投與群에서 染色分體缺失 12%와 染色體缺失 2%를 나타내었다.

그리고 2週以上の 實驗群에서는 中期分裂相이 全히 觀察되지 않았다.

以上の C.P.에 의한 白鼠骨髓細胞의 染色體異常型은 主로 染色分體缺失이었으며 C.P.의 中毒效果가 強하여짐에 따라 染色體의 分裂增殖이 抑制된다고 본다. C.P.의 骨髓染色體에 미치는 影響과 關聯하여 發癌性 또는 突然變異性도 排除할 수 없다. DDT 및 Kanechlor 500 등의 鹽素系 炭化水素가 發癌性이 있다는 報告가 있다<sup>31, 32</sup>).

Table XVII—Chromosome Aberrations of Rat Bone-Marrow Cells by Chlorophenols Treatment

Exp. group	No.	Total metaphases score	Types of aberrations*				Total** Breaks %	
			Chd. del	Chs. del	Dicent	Ring		
Control	2	50	1	1	—	—	4	
1 week	o-C. P. (II)	2	50	6	—	—	—	12
	2,6-C. P. (II)	2	50	6	1	—	—	14
2 week	o-C. P. (II)	2	50	} mitotic inhibition				
	2,6-C. P. (II)	2	50					
3 week	o-C. P. (II)	2	50					
	2,6-C. P. (II)	2	50					

\*Chd. del : Chromatid deletion

Chr. del : Chromosome deletion

Dicent : Dicentric chromosome

Ring : Ring chromosome

\*\*Total Breaks : Chd. del + Chs. del + 2(Dicent + Ring)

I : group treated with 0.065g/kg of chlorophenol

II : group treated with 0.13g/kg of chlorophenol

o-C. P. : o-chlorophenol

2,6-C. P. : 2,6-dichlorophenol

이러한 事實은 毒性樣狀이 類似한 化合物과 比較하여 앞으로 더욱 研究 究明하여야 할 課題이다. 또한 骨髓細胞增殖의 阻害는 造血作用에도 直接的으로 支障이 있음을 말하여 준다.

### 結 論

Chlorophenol 化合物의 生體에 대한 毒性을 究明하기 위하여 o-chlorophenol 및 2,6-dichlorophenol 을 各各 0.065g/kg 및 0.130g/kg 을 白鼠에 隔日로 1~3 週間 經口投與하고 그 血液相의 變化 및 肝臟의 細胞化學的 變化를 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 白鼠의 成長에 따라 體重增加를 減少시키며 肝臟의 肥大와 그 重量의 增加現象을 나타내었다.
2. 血液中の hemoglobin 과 hematocrit ratio 를 低下시키고 血清中の A/G 를 減少시켰다.
3. 血液 및 肝臟中の alkaline phosphatase, lactic dehydrogenase, 및 glutamic oxaloacetic transaminase 의 活性을 大體로 1 週 實驗群에서 一時 增大시키며 그後 減少시켰다.
4. 肝細胞 mitochondria 의 呼吸을 *in vivo* 또는 *in vitro* 實驗에서 모두 抑制하였으며 microsomal cytochrome P-450 을 減少시켰다.
5. 肝臟의 組織形態學的인 變化를 光學 및 電子 顯微鏡으로 觀察한 結果, 原形質內에서 rough endoplasmic reticulum 의 擴張과 自由型 ribosome 이 增加되고 mitochondria 의 浮腫 및 變性을 보였고 空胞가 생겼다. 核에는 큰 變化는 없었으나 核膜의 萎縮現象을 나타내었다.
6. 骨髓細胞染色體에 影響을 미쳐 染色體分體缺失等の 異常染色體出現과 中期分裂相의 中止現象을 나타내었다.

### 文 獻

1. 延世大學校 公害研究所 「漢江水質汚染度調査研究」 科學技術處 R-75-31 (1975).
2. R. Zalum, *J. W. P. C. F.*, **45**, 2770(1974).
3. R. Zalum., *J. W. P. C. F.*, **47**, 1087(1975).
4. J. L. Robert, *J. W. P. C. F.*, **47**, 601(1975).
5. H. L. Keith, et al., Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water, 1976 pp. 329-373. Ann Arbor Science
6. W. A. Garrison, *ibid.*, pp. 517-585.
7. W. H. Glaze, et al., *ibid.* pp. 247-254.
8. R. D. Keopter. *ibid* pp. 399-416.
9. T. A. Bellar, Water pollution control series, EPA-670/74-008(1974).
10. W. H. Glaze, et al., *J. Chromatographic Science*, **11**, 580(1973).
11. H. R. Burtshell, et al., *J. A. W. W. A.*, **51**, 205(1959).
12. S. D. Elliot, et al., *Biology of Reproduction*, **11**, 162(1974).
13. D. J. Mckinney, et al., Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water 1976 pp. 417-432, Ann Arbor Science
14. A. B. Sehwez, et al., *Toxicol, Appl.*, **28**, 442(1974).
15. J. D. Thompson, et al., *ibid.*, **29**, 348(1974),
16. A. L. Allen, et al., *J. Hygiene*, **46**, 184(1948).
17. J. J. Freal. et al., *Agr. Food Chem.*, **21**, 424(1973).



18. C. J. Karapally, *et al.*, *Agr. Food Chem.*, **21**, 811(1973).
19. N. Kurihara, *et al.*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **4**, 220(1974).
20. S. Graniok, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1359(1966).
21. K. R. Ockner, *et al.*, *Nature*, **189**, 499(1961).
22. H. A. Conney, *Pharmacol. Rev.*, **19**, 317(1967).
23. H. A. Conney, *et al.*, *Science*, **178**, 576(1972).
24. S. T. Chen, *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **26**, 504(1973).
25. Bauckner, *et al.*, *Toxicol. Pharmacol.*, **24**, 343(1973).
26. G. J. Vos, *et al.*, *Food Cosmet. Toxicol.*, **8**, 625(1970).
27. O. R. Kimbrough, *et al.*, *Arch. Environ. Health*, **27**, 389(1973).
28. O. R. Kimbrough *et al.*, *Arch. Environ. Health*, **25**, 354(1972).
29. F. C. Tumasonis, *et al.*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **1**, 312(1973).
30. T. N. Kimura, *et al.*, *Gann.*, **64**, 105(1973).
31. H. Hagiwara, *et al.*, *Gann.*, **63**, 805(1972).
32. M. Uchiyama, *et al.*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 687(1974).
33. S. Green, *et al.*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 14(1975).
34. Myger Freed, *Methods of Vitamine Assay*. Assoc. of Vitamine Chemist. V. C. Chapter 6. Interscience Publishers, John Wiley & Sons, **1966**.
35. J. S. Gatley, *et al.*, *Biochem. J.*, **158**, 307(1976).
36. W. W. Umbreit, *et al.*, *Manometric Techniques, Respiratory Enzymes*, pp **1964**, Burges Publishing Company (1964).
37. K. R. Cannan, *Clin. Chem.*, **4**, 346(1958).
38. G. A. Gornall, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751(1949)
39. C. F. Koch, *et al.*, *J. Chem. Soc.*, **46**, 1066(1924),
40. D. D. Rustein, *J. Clin. Invest.*, **32**, 211(1964).
41. J. A. Ness, *Clin. Chem.*, **12**, 532(1965).
42. A. O. Bessey, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **164**, 321(1946).
43. S. Morgenstern, *Clin. Chem.*, **11**, 876(1965).
44. S. Morgenstern, *et al.*, *Clin. Chem.*, **12**, 95(1966).
45. B. J. Nailands, *Method in Enzymology I*. p. 449, Academic Press Inc. New York. (1955).
46. C. Mitoma, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**, 431(1956).
47. T. Omura, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370(1964).
48. M. Klingenberg, **78**, 376(1958).
49. H. Tjio, *et al.*, J. J. Yunis ed. New York Academic Press. (**1965**)
50. S. P. Moorhead, *et al.*, *J. Cell Comp. Physiol.*, **62**, 57(1963).
51. C. L. Litterst, *et al.*, *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, **23**, 112(1972)
52. M. J. Lynch, *et al.*, *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*, W. B. Sanders Co., **1969**  
p. 307.
53. S. E. Miller, *Clinical Pathology* Williams and Wilkins Co., **1960**, p. 294,
54. L. Ernster, *et al.*, *Federation Proc.*, **24**, 1190(1965).
55. R. J. Gillete, *Adanced Pharmacol.*, **4**, 219(1967).
56. S. H. Mason, *et al.*, *Federation Proc.*, **24**, 1172(1965).

57. T. Omura, *et al.*, *Federation Proc.*, **24**, 1181(1965).
58. F. DeMatteis, *et al.*, *Biochem. J.* **126**, 1149(1972).
59. 林就範, 延世醫大論文集, **3**, 160(1970).
60. D. B. Peakall, *Critical Rev. in Environ. Contro.*, **5**, 469(1975).
61. O. R. Kimbrough, *et al.*, *Arch. Environ. Health.*, **25**, 354(1972).
62. O. R. Kimbrough *et al.*, *Arch. Environ. Health.*, **27**, 380(1973).