

## 1,3-Dichloropropanol 흡입에 의한 랫드간의 조직변화에 관한 연구

김성화<sup>1</sup> · 박오성<sup>1</sup> · 이성배<sup>2</sup> · 최종윤<sup>1</sup> · 권효정<sup>1</sup> · 손석우<sup>1</sup> · 박일권<sup>1</sup> · 이경열<sup>1</sup> · 손화영<sup>1</sup>  
이미영<sup>1</sup> · 이근좌<sup>1</sup> · 김현영<sup>2</sup> · 이강이<sup>3</sup> · 송치원<sup>4</sup> · 김무강<sup>1</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 수의과대학, <sup>2</sup>산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터,  
<sup>3</sup>대전대학교 한의과대학, <sup>4</sup>식약청국립독성연구원 독성연구부 일반독성과

## Hepatic Tissue Changes by the 1,3-Dichloropropanol Inhalation in the Rat

Sung-Hwa Kim<sup>1</sup>, O-Sung Park<sup>1</sup>, Sung-Bae Lee<sup>2</sup>, Jong-Yun Choi<sup>1</sup>, Hyo Jung Kwon<sup>1</sup>, Sek-Woo Son<sup>1</sup>,  
Il-Kwon Park<sup>1</sup>, Kyoung-Youl Lee<sup>1</sup>, Hwa-Young Son<sup>1</sup>, Mee-Young Lee<sup>1</sup>, Guen-Jwa Lee<sup>1</sup>,  
Hyeon-Young Kim<sup>2</sup>, Kang-Yi Lee<sup>3</sup>, Chi Won Song<sup>4</sup> and Moo-Kang Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of the Veterinary Medicine Chungnam National University, Daejeon 305-764

<sup>2</sup>Occupational Safety & Health Research Institute Center For Occupational Toxicology, Daejeon 305-380

<sup>3</sup>College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 302-764

<sup>4</sup>Department of Toxicological Research Division of General Toxicology. NITR, KFDA, Seoul 122-704, Korea

Received February 7, 2005; Accepted March 10, 2005

**ABSTRACT.** 1,3-Dichloro-2-propanol (1,3-DCP) is known as chloride chemicals and causes severe hepatotoxic agent. The Ito cells and Kupffer's cells of the liver in the 5 old F344 Rats were exposed to 1,3-DCP gas chamber for 6 hours/ a day, 5 days/ a week, and 13 weeks, in the 0, 5, 20, 80 ppm, respectively. After then the body weights, liver weights, and relative liver weight to body weight were measured, and the hepatic tissues were prepared by the routine and Immunostain method, and observed by the LM, and EM. In the results, there were severe body weight decrease ( $p < 0.05$ ) in the 80 ppm of the male and female rats. The relative liver weights to the body weight were increased relate with exposed 1,3-DCP concentration ( $P < 0.001$ ). Inflammatory cells, infiltration was observed at the perivascular area in the 20 ppm exposed group, and bilirubin pigment infiltration, bile duct hyperplasia, inflammation hepatocytic necrosis, fibrosis were observed in the 80 ppm exposure group. In the 80 ppm exposure group, disarrangement of the endothelial cells, erythrocytes and hepatic cell fragment in the Disse space and numerous migration macrophages were observed in the necrotic area by EM observation. In the immunostained hepatic tissues positive stained ED1 cells were extremely increased ( $P < 0.05$ ) in central vein area, but ED2 was weakly positive immunostained in the 80 ppm exposed group. Immunostained desmin was observed in the Ito cell. It was no difference in the low and medium exposed group but it was typical increase in the necrotic area. In conclusion, These results suggest that NOAEL of 1,3-DCP may be 5 ppm in rats and the Immunostained of desmin, ED1 and ED2 positive cells activated in the inflammatory liver were related to the exposure volume and density. The increase of the Ito cells were related to the severe phagocytosis of the Kupffer's cells.

**Keywords:** 1,3-DCP, Inhalation, Liver, Ito cell, Kupffer cell.

## 서 론

디클로로프로판올(Dichloropropanols; DCPs)은 경수지, 페인트 용제, 물의 염소화 또는 종이 제작과정에 사용되며(Budavari *et al.*, 1989) 식품에서는 스프 또는 간장에서 소량의 유해물질로 검출되는 염소화합물로(L'Huillier *et al.*, 2002) 1,3-Dichloro-2-propanol(1,3-DCP)와 2,3-Dichloro-1-propanol(2,3-DCP)의 두 가지 이성질체가 있다(Fujishiro *et al.*, 1994).

1991년에 DCPs 합성 탱크를 청소하던 두 명의 근로자가 급성간독성으로 사망했다는 사실이 보고 된 후(Iwasa *et al.*, 1992) 이 물질의 독성에 대해 관심을 가지게 되었다. DCPs의 이성질체 중 1,3-DCP를 랫드에 LD<sub>50</sub>의 1/2량을 단회 복강내로 투여한 결과 극심한 간 손상이 나타났으며(Haratake *et al.*, 1993) 랫드를 굶긴 후 1,3-DCP를 피하 또는 복강으로 투여하였을 때 간세포괴사가 생겼다는 보고가 있다(Fry *et al.*, 1999). 그리고 DCPs의 이성질체인 1,3-DCP와 2,3-DCP를 랫드에 50 mg/kg로 단회 피하주사 한 후 생체내의 변화상태를 조사한 결과 1,3-DCP 처치군에서는 6시간 후에 transaminase가 현저히 증가되었고, 혈소판 수가 감소하였으며 광범위한 간 괴사가 있었다. 반면, 2,3-DCP 처치군에서는 어떠한 간조직 변화도 보이지 않았기 때문에(Haratake *et al.*, 1993; Fujishiro *et al.*, 1994) 1,3-DCP와 2,3-DCP가 간에 미치는 영향에 대해서는 현저한 독성학적 차이가 있는 것으로 확인되었다. 그럼으로 DCPs를 사용하는 작업현장에서는 1,3-DCP에 관한 작업환경관리와 근로자 건강장해 예방을 위한 환경적, 생리학적 모니터링이 필요한 물질로 검토되었다.

간장은 실질세포와 비실질세포로 나뉘며 실질세포는 간세포이고 비실질세포에는 동모양모세혈관 내피세포, 별큰포식세포(일명 쿠퍼세포), Ito 세포(perisinusoidal cell 혹은 fat-storing cell) 등이 포함되어 있다. Ito 세포는 주로 Disse공간 내에 존재하며, 간세포보다는 작고 형태가 불규칙적이며 난원형의 핵을 가지고 있다. Ito 세포질은 넓게 염색되나 항상 지방방울을 포함하고 있으며, 일반적으로 제작된 조직표본에서는 보기 어렵지만 중간세사 섬유단백질인 desmin을 면역조직화화학적 방법으로 염색하면 쉽게 확인할 수 있다(Yokoi *et al.*, 1984; Burt *et al.*, 1986). 쿠퍼세포는 내피세포사이에 주로 산재하고 있으며, 세포질에 공포를 가진 크고 난원형 또는 구형의 세포이다. 이를 전자현미경으로 관찰하면 수많은 용해소체, 포식소체, 포식용해소체, 위축이 있는 것이 특징이며 단핵구와 쿠퍼세포는 ED1과 ED2의 단순항체 면역염색으로 검출할 수 있다(Dijkstra *et al.*, 1985).

간의 *In vitro* 연구에서 Ito 세포가 세포외 기질 단백질을 생산할 수 있다고 하였으며(Arenson *et al.*, 1988; Geerts *et al.*, 1989), 이러한 주장은 급성과 만성 간손상시 Ito 세포로부터 간의 섬유화형성이 생길 수 있다는 것을 주장한 연구도 있다(Bissell *et al.*, 1990; Gressmer *et al.*, 1990; Milani *et al.*, 1990). 그 외 1,3-DCP를 랫드 복강내에 LD<sub>50</sub>의 1/2량으로 단회 투여한 후 경시적으로 관찰한 결과 급성간 손상시 혈액에서 유래된 단핵구가 증가하였고 그 다음 쿠퍼세포가 증가되면서 이것이 Ito 세포를 활성화시켜 간세포가 재생되고 파괴된 간 조직에 섬유화가 일어나 치유된다는 보고가 있다(Haratake *et al.*, 1994).

상술한 바와 같이 현재까지 간장에 미치는 DCPs의 영향을 알기 위한 연구들이 많이 이루어져왔으며 그들의 대부분이 복강, 또는 경구 투여 등에 의한 연구이었다. 그러나 이제까지 실제로 산업현장에서와 동일한 상태에서 대, 중, 소 가스농도노출에 따르는 간 조직 변화에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 산업현장과 같은 환경에서 시험물질인 1,3-DCP를 가스 농도별로 분무한 후 이를 흡입한 생체에서 생길 수 있는 간독성, 특히 Ito 세포와 쿠퍼세포의 변화를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 사육환경

실험동물은 암수 각각 5주령의 특정병원체 부재인 F344 랫드를 SLC Japan에서 분양 받아 10일간 순화시킨 후 사용하였다. 군 분리시 실험동물의 체중은 수컷은 143.7 ± 7.1 g, 암컷은 129.3 ± 4.5 g이었다. 한 그룹의 대조군과 세단계의 노출군으로 분리 한 후 4대의 흡입챔버(inhalation chamber)내 5연식 금망케이지를 사용하여 군별, 동물별로 각각 개별 수용하였으며, 사료 및 음수는 자유롭게 섭취시켰다. 사육조건은 온도 22 ± 3°C, 상대습도 50 ± 20% (단, 시험물질 투여 시는 제외), 환기회수 12~15회/시간, 조명 150~300 Lux로 12시간(오전 8시~오후 8시)으로 GLP 시설기준에 맞추어 실시하였다.

### 시험물질 및 노출방법

시험물질은 1,3-DCP(Acros Organics)를 사용하였으며 노출 방법은 gas generator(G.C)를 이용하여 시험물질을 가열(40°C)기화시킨 후 일정량을 청정공기와 혼합시켜 설정농도로 조절한 후 흡입챔버내로 공급하여 실험동물에 전신 노출시켰다. 대조군은 Hepa filter 및 온습도 조절을 통한 정화된 청정공기를 사용하였다. 실험동물은 대조군과 노출농도가 5, 20, 80 ppm의 3단계로 암수 각 10마

리를 한 군으로 총 80마리를 사용하였으며, 시험물질 투여기간은 1일 6시간, 주 5일, 13주간으로 하였다.

### 체중측정

도입된 동물을 순화 종료한 후 군분리를 위해 체중을 측정하였고, 가스 노출 개시 후 1주일간은 매일 측정하였으며 그 후부터는 주 1회씩 측정하였다.

### 병리조직학적 검사

가스 노출 종료 후 1일간 절식시켰으며, 부검 전 실험 동물을 CO<sub>2</sub>로 질식사시켜 개복하고 복대동맥으로부터 채혈한 후 간을 취해 중량을 측정하였다. 측정된 간에서 일부 간 조직을 채취하여 10% 중성 formalin 용액에 고정하였고 paraffin에 포매하여 Hematoxylin과 Eosin 염색을 하여 조직의 변화 정도를 광학현미경으로 관찰하였다.

### 면역조직화학적 검사

면역조직화학적 검사를 위하여 남아있는 간조직의 일부를 4% paraformaldehyde에 24시간 고정 후 동결술상을 최소화하기 위하여 30% sucrose 용액에 간 조직이 완전히 가라앉을 때까지 침적시켰다. 침적된 간 조직을 냉동절편기(Reichert-Jung)를 사용하여 5 μm로 각각 냉동절편 하여 -70°C 냉동실에 보관하였다. 조직절편의 내재성 과산화수소효소(endogenous peroxidase)를 비활성화시키기 위해 0.1 M PBS(pH 7.4)에 희석한 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 조직절편을 10분간 반응시킨 다음 과산화수소 용액을 제거하기 위하여 0.1 M PBS로 10분간 3회 수세하였다. 이어서 비특이성 항원에 대한 면역반응을 방지하고 단순항체의 침투성을 증가시킬 수 있게 1차 항체가 첨가된 PBS 용액(0.5% Triton X-100, 10% NGS)에 넣고 4°C에서 48~72시간 반응시킨 후 PBS로 10분간 3회 수세하여 반응이 되지 않고 남아 있는 1차 항체를 제거하였다. 본 연구에서 조직화학염색에 이용한 1차 단순항체는 혈액 단핵구와 내재하는 쿠퍼세포를 검출하기 위해 ED1(1 : 200), 내재하는 쿠퍼세포만을 검출하기 위해 ED2(1 : 100), Ito 세포를 검출하기 위해 Desmin(1 : 50)을 사용하였으며 2차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG를 1 : 250이 되도록 희석하여 사용하였다. 2차 항체를 4°C에서 24시간 반응시킨 후 PBS로 다시 수세하고 Avidin-Biotin complex(ABC)를 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 PBS로 수세하고 DAB(Sigma) 용액으로 면역반응 정도에 따라 5~10분간 발색시킨 후 hematoxylin에 1분간 대조염색 하였으며 알콜용액으로 탈수시켜 xylene 투명과정을 거쳐 consul-mount로 봉입하여 영구표본을 제작하였다.

### 세포수 산정

세포수는 계수선 400배 확대율 접안경이 마련된 광학현미경을 이용하여 단위면적(1 mm<sup>2</sup>)당 면역염색 양성세포수를 산정하였다. 군당 3마리인 랫드의 간 조직에서 임의대로 엽을 정하여 zone I, zone II, zone III의 세포를 선정하였고 그 산정수치들의 평균치와 표준편차(mean ± SD)를 구하였다. 단핵구와 쿠퍼세포는 뚜렷한 세포핵 및 적어도 1개의 세포질 돌기를 나타내는 단 세포만을 대상으로 하였다.

### 통계학적 해석

자료 분석을 위해서는 Sigma Stat 통계프로그램을 사용하였으며, 모든 수치는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. One-way ANOVA를 이용하여 대조군과 시험물질 투여군 간의 통계학적 유의성을 검사하고 그 유의수준을 p<0.05와 p<0.01 등으로 검증하였다.

### 전자현미경적 검사

전자현미경적 관찰을 위하여 일부 간 조직을 1 mm<sup>3</sup>로 잘게 잘라 4°C의 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS(pH 7.4) 용액에 전고정한 다음 조직을 0.1 M PBS(pH 7.4)용액에 10분간 2회 수세하였다. 이어서 4°C의 1% OsO<sub>4</sub>(osmium tetroxide) 용액에 1시간 후고정한 후 0.1 M PBS용액에 10분 간 2회 수세하였다. 수세한 slide를 연속적인 농도의 알콜용액과 Propylene oxide로 탈수시킨 후 에폭시 수지에 포매시켰다. 관찰을 위한 절편박질은 초박절기(Ultracut UCT, Leica)로 70 nm되게 절단하였으며 박질편을 uranyl acetate와 lead citrate로 전자염색하여 자이스 투과전자현미경(EM 912 Omega, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰 분석하였다.

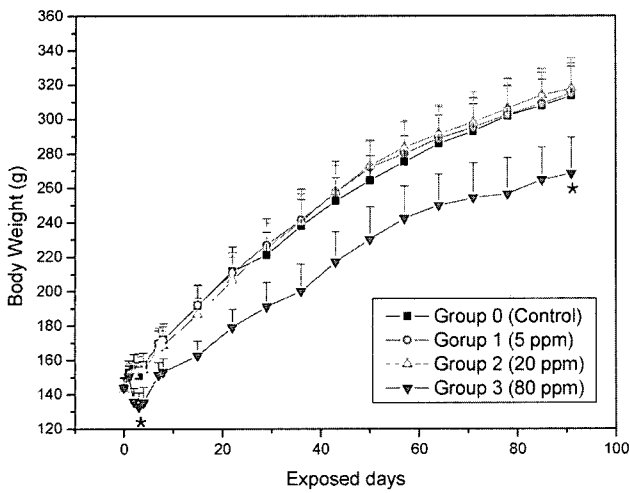
## 결 과

### 체중변화

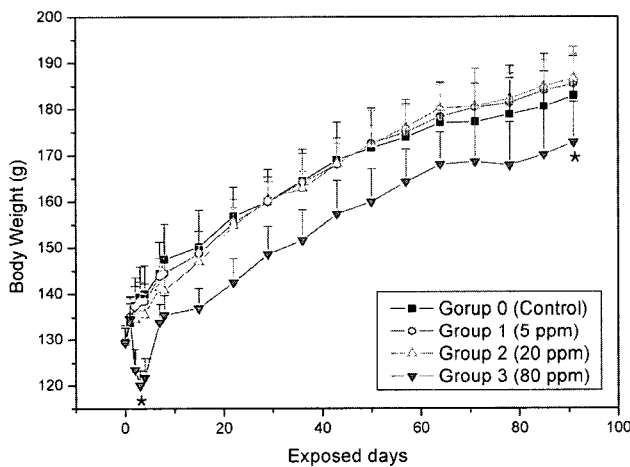
실험기간 중 암수동물의 체중을 측정한 결과 시험물질 노출 후 1일째 80 ppm 노출군 암, 수 모두에서 현저한 체중 감소가 있었으며(p<0.05), 그 이후에도 대조군에 비해 첫째 날처럼 뚜렷하지는 않았지만 지속적인 체중감소가 있었다(Fig. 1과 Fig. 2).

### 장기 중량

부검시 적출한 간의 중량 및 체중에 대한 간의 상대중량을 측정한 결과(Table 1 및 Table 2) 암수 모든 투여군에서 간의 절대 중량이 농도 의존적으로 증가하였으며, 상대중량 역시 암수 모든 투여군에서 대조군에 비해 통계



**Fig. 1.** Changes of body weights in male F344 rats inhaled with 1,3-dichloro-2-propanol. \*, Significant difference at  $p < 0.05$  level.



**Fig. 2.** Changes of body weights in female F344 rats inhaled 1,3-dichloro-2-propanol. \*, Significant difference at  $p < 0.05$  level.

**Table 1.** Liver weight of F344 rats after inhaled 1,3-Dichloro-2-propanol for 13 weeks

Unit : g				
Sex	Control	5 ppm	20 ppm	80 ppm
Male	7.89 ± 0.45	9.20 ± 0.53	10.57 ± 0.63	10.66 ± 1.20
Female	4.22 ± 0.35	5.04 ± 0.24	5.86 ± 0.26	8.05 ± 0.56

**Table 2.** Relative liver weights to the body weight of F344 rats after inhaled 1,3-Dichloro-2-propanol for 13 weeks

Unit : mg/100 g B.W.				
Sex	Control	5 ppm	20 ppm	80 ppm
Male	2693.04 ± 2.89	3115.22 ± 3.14**	3542.31 ± 3.97**	4264.38 ± 6.39***
Female	2484.71 ± 4.39	2923.00 ± 3.06**	3367.49 ± 6.16**	4978.18 ± 6.46***

\*\*, Significant difference at  $p < 0.01$  level, \*\*\*,  $p < 0.001$ .

학적으로 유의성( $p < 0.01$ )있게 증가하였다.

**병리조직학적 소견**

대조군과 1,3-DCP에 노출된 모든 동물의 간 조직을 광학현미경을 이용하여 검사한 결과 대조군과 저농도군의 간은 삼조체가 뚜렷하게 관찰되었으며 소엽의 형태도 정상적인 구조를 유지하였다. 즉 핵의 크기가 일정하고 세포질의 염색형태가 동일하며 간세포사이의 동모양모세혈관 공간이 비교적 깨끗하고 내피세포의 핵도 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 3a, b).

그러나 중농도군의 간에서는 중심정맥주변에 림프구의 침윤을 특징으로 하는 염증소견이 암수 모두에서 관찰되었으며 심한 예에서는 간세포의 괴사도 관찰되었다(Fig. 3c).

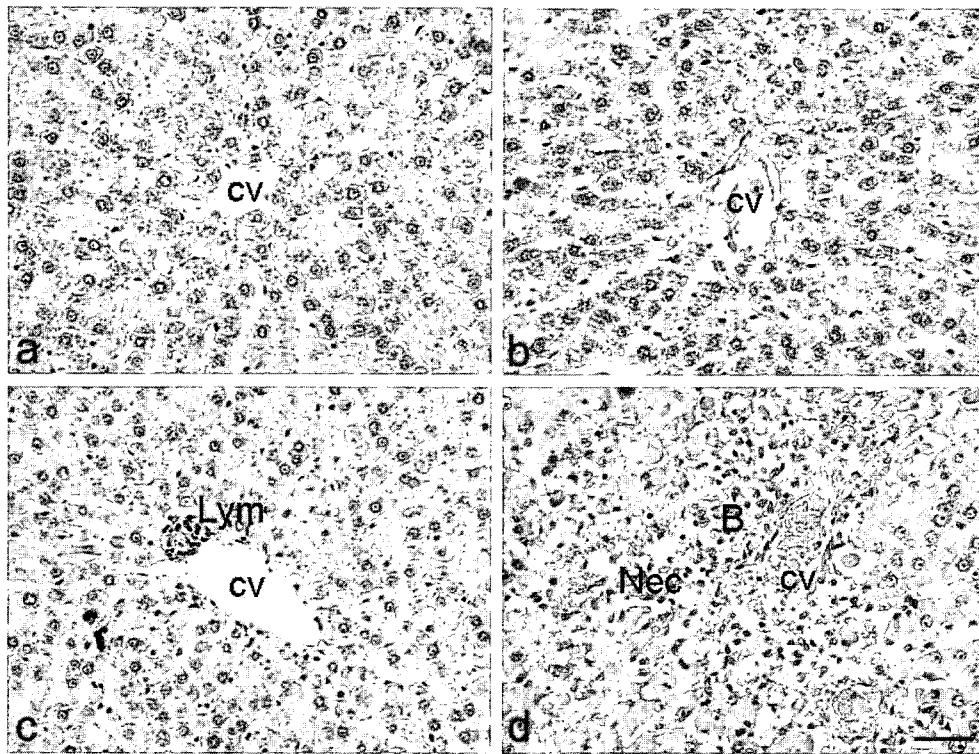
고농도군의 간에서는 전체적으로 다핵성 거대 간세포와 림프구의 침윤이 두드러졌으며, 문맥주변부와 소엽주위의 섬유화, 빌리루빈의 색소침착, 담관의 증식, 호중구침윤이 관찰되었다(Fig. 3d).

**면역조직화학적 관찰**

**ED1 immunolabelling.** 단핵구와 쿠퍼세포를 관찰하기 위하여 그들의 표지인자인 ED1 단순항체를 간 조직에 처리하여 zone I, zone II, zone III로 나누어 확인한 결과 대조군과 저농도군에서는 동모양모세혈관(sinusoidal) 주위에서 주로 나타났으며 이들은 세포의 크기가 크고 여러 개의 세포돌기를 갖고 있는 쿠퍼세포의 특징적인 특유의 형태를 보였다. 가끔씩은 sinusoidal lumen에서 작고 둥근 세포가 염색되어 나타난 것도 있었는데 이 세포들은 혈액에서 유래된 단핵구인 것으로 판정되었다(Fig. 4a~c).

중농도군에서는 대조군에 비해 중심정맥주위에서 약간 증가된 ED1 양성세포를 관찰할 수 있었으며 고농도군에서는 손상된 perivenular zones에서 ED1 양성세포가 현저하게 증가하였다(Fig. 4d~f). 대조군에 비해 저농도군과 중농도군에서는 ED1 양성세포수에 별다른 차이가 없었지만 고농도군의 perivenular zones에서는 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 5과 Fig. 6).

**ED2 Immunolabelling.** 대조군, 저농도군 및 중농도군에서 ED2 양성 쿠퍼세포가 sinusoid에서 관찰되었으며



**Fig. 3.** Histopathological lesions of the liver. **a** : control group; **b** : normal architecture in low dosage group; **c** : Lymphoid cell infiltration a round the central vein (CV) of the intermediate group; **d** : Hepatic necrosis (Nec), bilirubin pigmentation (B) and inflammatory cell infiltration in the high dosage group. Bar = 50  $\mu$ m.

(Fig. 8a), 고농도군에서는 손상된 perivenular zones에서 약간 관찰되었으나 ED1 양성세포보다는 상당히 적게 관찰되었으며(Fig. 7b) 그 면역염색성도 광범위하고 미약하여 정상화 할 수가 없었다.

**Desmin immunolabeling.** 대조군과 저농도, 중농도군에서 desmin 양성세포가 간 문맥과 간정맥을 이루는 혈관의 근육세포에서 나타났다. Ito 세포의 독특한 방사상 형태를 나타내는 양성세포도 sinusoid에서 소수 확인되었다(Fig. 8a).

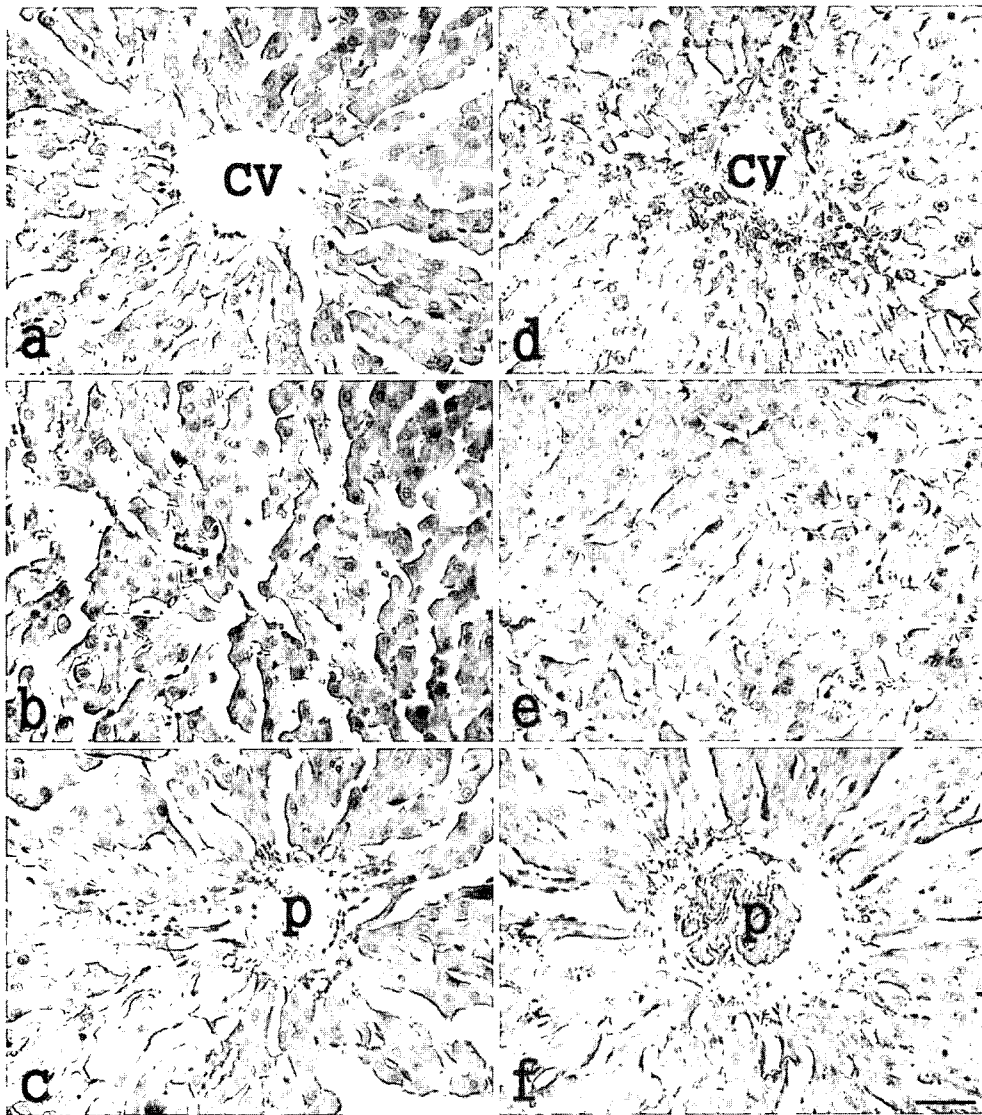
고농도군에서 desmin 양성반응은 손상된 Perivenular zones 즉 괴사부위에서 강한 면역염색반응을 나타내었다(Fig. 8b).

#### 전자현미경 관찰소견

초미세 구조 검사결과 1,3-DCP에 노출된 고농도군에서 내피세포의 배열이 무너지고 Disse 공간에서 적혈구 및 파괴된 간세포의 파편들이 관찰되었으며 괴사부위에서는 유주된 거짓발돌기를 특징으로 하는 큰포식세포가 다수 관찰되었다. 간의 동모양혈관 구조는 거의 파괴되어 적혈구가 간세포와 직접 인접해 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 9).

#### 고찰

1,3-DCP는 역시 염소화합물질로 경수지, 셀룰로이드, 페인트 또는 수용성 물감, 교착제의 재료로 널리 사용하고 있다(Budavari *et al.*, 1989). 1980년대 중반 산분해 HVP(hydrolyzed vegetable protein)의 제조 과정에서 생성되는 1,3-DCP와 3-chloro-1,2-propanediol(3-CPD)의 존재가 알려지고 유해성의 논란이 제기되면서(Van Bergen *et al.*, 1992) 많은 관심이 집중되었으며, 본 물질에 대해 SOS chromotest와 Ames test를 이용하여 1,3-DCP의 유전독성 및 유전독성 메카니즘이 밝혀지고(Hahn *et al.*, 1991) 발암성(COC Statement; Sangyo, 1999) 이 있는 물질로 알려졌지만 그에 의한 심한 간독성에 대한 연구는 없었다. 그러나 최근에 Iwasa(1992) 등이 일본에서 1991년 산업체 공장에 있는 Dichloropropanols(DCPs) 탱크를 청소하던 두 명의 중년 남자가 일을 끝낸 2시간부터 구토함으로 병원에 옮겼으나 혼수상태가 지속되다가 각각 4일과 11일 만에 사망하여 원인규명을 위한 부검결과 간 괴사 소견 등이 알려지면서 1,3-DCP와 2,3-DCP에 대해 많은 관심을 갖게 되었으며 dichlorohydrins(1,3-DCP와 2,3-DCP)는 대사과정 중에 3CPD(3-chloro-1,2-propanediol)

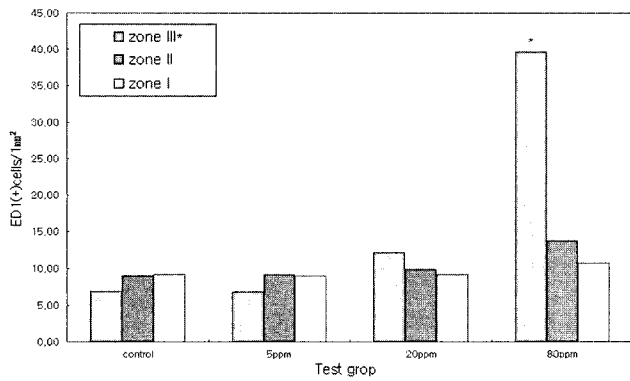


**Fig. 4.** Positive ED1 immunostain cell control (a-c) and high dosage group (d-f). CV; central vein, P; portal triad. Hematoxylin counter stain. Bar = 50  $\mu$ m.

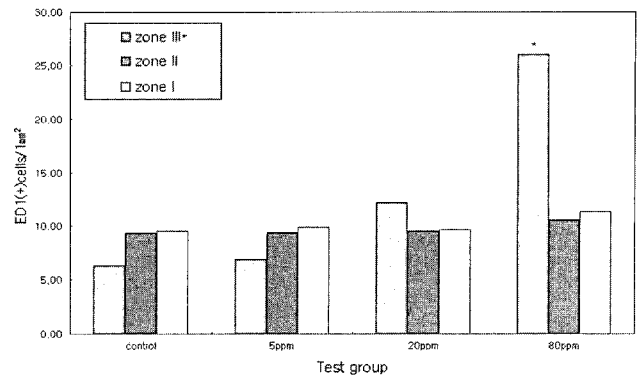
와 2CPD(2-chloro-1,3-propane-diol)로 된 후 PPD(1,2-propanediol)로 변화되면서 그 대사산물이 생체에 영향을 미칠 수 있을 것이라는 주장도 있었다(Koga *et al.*, 1992).

이러한 가운데 Haratake(1993) 등은 이 DCPs의 영향을 알아내기 위해 8주령 수컷 Wistar 랫드에 이성체인 1,3-DCP와 2,3-DCP를 복강 또는 피하로 50 mg/Kg을 주입한 후 1시간, 1일, 2일, 3일, 1주 후에 각각 희생시켜 검사한 결과 1,3-DCP를 주입 6시간 이후부터 GPT가 증가되고 간 울혈, 색소침착, 육아종형성, 간소엽중심부위 공포변성, 동양혈관 내피세포 파괴 등을 수반하는 국소 또는 Submassive 간 괴사 소견이 관찰되는 반면 2,3-DCP는 주로 신장병변을 일으켰다고 보고 한바 있고 Katoh(1998) 등은 8주령 수컷 Wistar 랫드 72마리의 복

강 내로 1,3-DCP LD<sub>50</sub>의 2배(0.11 ml/kg), 1배, 1/2, 1/4, 1/8을 주입한 후 6시간째에 희생시켜 조사한 결과 1,3-DCP 주입용량에 따라 간독성과 SGPT가 증가하고 그 증가원인 중의 하나가 lipid peroxidation의 증가이며, 간을 제외한 장기에서는 뚜렷한 독작용이 없음을 보고 하였다. 平田美由紀(1993) 등은 8주령 수컷 마우스의 등쪽 피하에 LD<sub>50</sub>의 량(2,3-DCP 24.5 mg/kg, 1,3-DCP 20.3 mg/kg)을 1회 주사한 후 1주 후에 도살하여 관찰한 결과 2,3-DCP 주입군에서는 주로 신장병변을 일으켰으며 1,3-DCP 주입군에서는 간의 세포질 내 공포형성, 간세포 국소적 괴사, 다핵거대세포증식, 섬유아세포증식, 유사분열상 등과 같은 주로 간세포병변을 일으켰다고 보고를 하였다. 이상의 연구에서와 같이 연구대상으로 삼은 동물, 연령,



**Fig. 5.** No. of ED1-positive cells in male rats liver after 1,3-Dichloro-2-propanol for 13 weeks. \*; Significant difference at  $p < 0.05$  level.

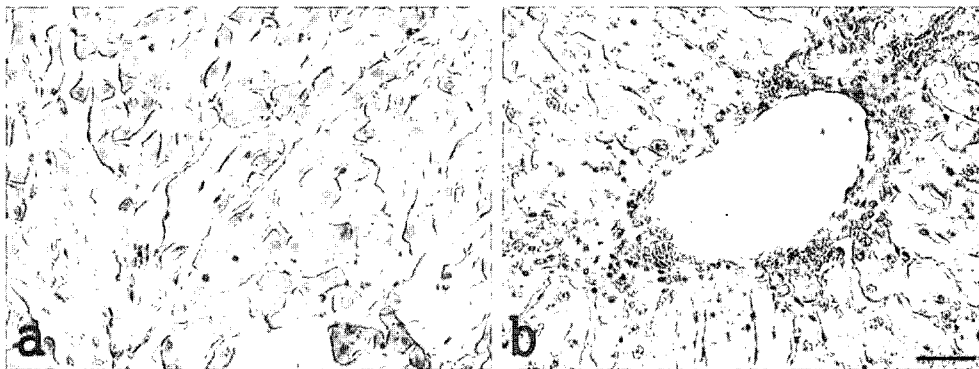


**Fig. 6.** No. of ED1-positive cells in female rats liver after 1,3-dichloro-2-propanol for 13 weeks. \*; Significant difference at  $p < 0.05$  level.

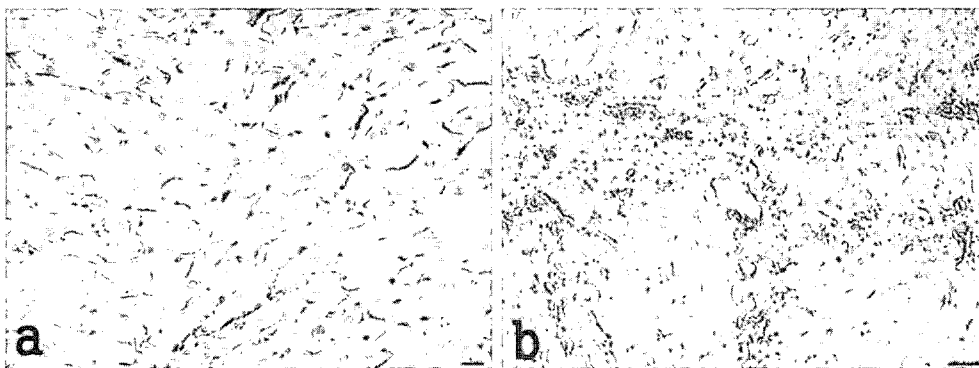
주입방법, 관찰기간 등이 다양하고 그 결과도 모두 다양하게 보고되었다. 그러나 산업현장에서 많이 대두될 수 있는 폭로방법에 의한 흡입연구는 아직 없었다.

본 실험에서 1,3-DCP를 랫드에 13주간 흡입시킨 결과, 대조군에 비해 고농도군에서 암수 랫드의 체중이 노출 1

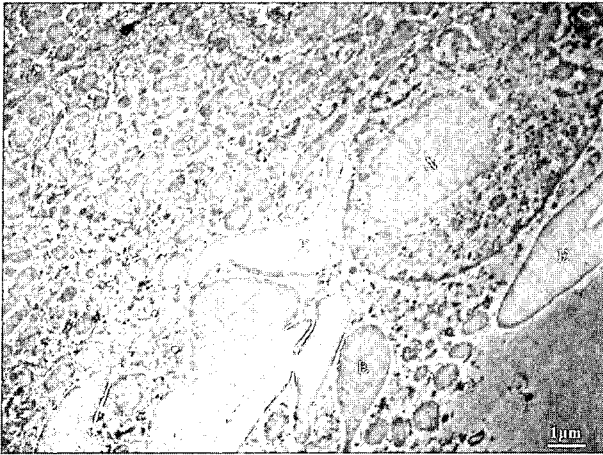
일째 현저하게 감소되었고 노출 기간 중에도 대조군에 비해 현저한 감소가 있었으나 사료섭취량은 별다른 차이가 없는 것을 볼 때 체중감소는 사료섭취량과는 관계없고 1,3-DCP 가스의 폭로에 기인된 생체반응 소견으로 인정되었다.



**Fig. 7.** ED2-positive immunostain cells in liver of the control (a) and high density 1,3-DCP exposure group (b). Hematoxylin counter stain. Bar = 50  $\mu$ m.



**Fig. 8.** Immunohistochemical stain for desmin in the liver. Desmin-positive cells in the centrilobular areas of the liver at control (a) and high dosage group (b). Bar = 25  $\mu$ m.



**Fig. 9.** Erythrocytes (E) near hepatocyte in high dosage. N; hepatocyte nucleus. Bar = 1  $\mu$ m.

간 무게 및 체중에 대한 간의 상대무게를 측정한 결과, 대조군에 비해 투여군의 간 절대 무게가 농도 의존적으로 증가되었으며 상대무게 역시 통계적으로 유의성 있게 증가되었는데 이는 흡입된 1,3-DCP 가스에 의한 간의 염증 반응과 손상된 간조직 회복을 위한 간의 재생과 증식 그리고 섬유화 등에 의한 결과로 사료되며 이와 같은 결과는 다른 연구에서도 보고된 바 있다(Katoh *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999).

병리조직학적 검사 결과, 중농도군과 고농도군의 간 조직에서 관찰된 간세포 괴사, 괴립세포와 다형핵세포 침윤, 섬유화 및 담즙색소 침착, 담관 증식 등은 시험물질의 폭로에 기인된 간세포 손상으로 판단되며 1,3-DCP가 실험동물과 사람에서 심각한 간세포 괴사를 일으키는 것은 대사체인 1,3-dichloroacetone 때문이라는 보고도 있다(Hahn *et al.*, 1991; Shiozaki *et al.*, 1994; Kuroda *et al.*, 2002). 1,3-DCP의 대사에는 cytochrome 2E1과 1A2가 관여하는 것으로 알려져 있으며 대사체에 의한 독성기작 으로서는 지질과산화의 증가와 Glutathione의 고갈, 그리고 미토콘드리아 막전위의 파괴가 관여하는 것으로 알려져 있다(Hammond *et al.*, 1997; Stott *et al.*, 1997; Katoh *et al.*, 1998; Fry *et al.*, 1999). 그리고 18시간 실험동물을 절식 후 1,3-DCP에 노출시켰을 때 절식이 간 CYP2E1의 활성을 향상시키고 Glutathione를 감소시킴으로써 1,3-DCP의 간 독성이 증가된다고 하였다(Fry *et al.*, 1999). 이러한 결과들을 미루어 볼 때 1,3-DCP가 발생하는 작업장에 종사하는 노동자들의 영양상태도 간독성 정도에 차이 있을 것이라 판단된다. 또한 1,3-DCP의 대사 물질이 일으키는 간 괴사 소견은 대체로 간의 중앙엽을 중심으로 발생하는 세포괴사이기 때문에(Sax *et al.*, 1989; Laslin *et al.*, 1990) 이러한 소견은 사염화탄소에 의한

간변화와의 유사하다(Maddrey *et al.*, 1985). Haratake (1993) 등이 1,3-DCP LD<sub>50</sub>의 1/2량을 랫드에 단회 복강 투여하여 시행한 연구에서 1,3-DCP 투여 6시간 후에 심한 출혈과 공포가 나타났으며 24시간 후에는 응고성 괴사 소견이 관찰되었고 48시간 후에는 동모양모세혈관의 특징이 소실됨과 동시에 괴사되었던 간세포가 붕괴되기 시작하였다고 하였으며, 72시간 후에는 색소가 침착된 큰포식세포의 축적이 일어나면서 간세포의 재생이 일어났고, 1주 후에는 혈관주위에 섬유화가 일어나면서 치유되는 것이 관찰되었다고 보고하였지만 본 연구에서는 그와 같은 뚜렷한 공포변성이 관찰되지 않았고 중농도군과 고농도군의 간에서 괴립세포와 다형핵 세포 침윤 그리고 섬유화만 관찰되었고 Haratake 등이 언급하지 않은 담관 증식이 관찰되었다. 이러한 차이는 Haratake 등은 8주령 Wistar 계 랫드의 피하 또는 복강내로 50 mg/kg를 1차 주사한 후 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 h 그리고 1주일 후에 희생시켜 연구한 것이었고 본 연구에서는 랫드를 6시간/일, 5일/주, 13주간 5, 20, 80 ppm에 지속적으로 노출시킨 후 검사한 결과이기 때문에 시험대상동물의, 주입부위, 주입용량, 도살시기 등이 서로 다르기 때문에 그 결과도 다르게 발현될 수 있을 것으로 사료된다.

면역조직염색 결과 대조군에 비해 고농도군의 중심정맥 주위에서 ED1 양성세포가 증가하였고 ED2 양성반응은 고농도군의 괴사부위 즉 중심정맥 부위에서 ED1보다 훨씬 적게 관찰되었는데 이는 Johnson(1992) 등이 사염화탄소에 의한 급성간손상 시 동모양모세혈관 주위의 세포활동에 관한 연구에서 밝혀진 것처럼 혈액 단핵구에 의해 간의 쿠퍼세포가 증가되기 때문인 것으로 사료된다. desmin 면역염색에서는 대조군에 비해 저농도군, 중농도군에서 별다른 차이를 관찰할 수 없었지만 고농도군의 괴사부위에서는 현저한 증가를 보였다. 이는 급성 간손상동안 증가된 쿠퍼세포의 자극에 의한 Ito 세포가 증가되었다는 연구와 비슷한 결과였다(Arenson *et al.*, 1988; Gressmer *et al.*, 1990).

전자현미경으로 관찰한 초미세 구조 검사결과 1,3-DCP에 노출된 고농도군에서 내피세포의 배열이 무너지고 Disse 공간에서 적혈구 및 파괴된 간세포의 파편들이 관찰되었으며 괴사부위에서는 유주된 위축을 특징으로 하는 대식구가 다수 관찰되었다. 또 동모양모세혈관 구조는 거의 파괴되어 적혈구가 간세포와 직접 인접하는 것을 관찰할 수 있었는데 이러한 1,3-DCP의 연구결과는 1,3-DCP에 유도된 랫드의 심한 간손상(Haratake *et al.*, 1994)연구, 그리고 Selenium에 의한 Rat간의 동모양모세혈관 손상(Bioulac *et al.*, 1992) 등의 독성연구결과와도 유사하였다.



이상의 결과들을 볼 때 1,3-DCP를 13주간 F344 랫드에 반복 흡입노출시켰을 때 체중감소, 간 무게 및 체중에 대한 간 상대 무게 증가를 알 수 있었으며 흡입노출에 따르는 간조직변화는 저용량(5 ppm)에서는 별다른 차이를 보이지 않았지만 중용량에서는 수컷의 간장에서 괴사와 염증소견이 각각 1예씩 관찰된 바 있었고 암컷 1예에서도 염증소견이 관찰된 바 있었다. 고용량에서는 여러 개체의 간장에서 더 심한 병변을 일으키는 것이 확인되었으며 이러한 결과는 폭로 용량에 따라 독성이 증가되었다. 이는 다른 연구자들이 wister계 랫드와 마우스에서 1,3DCP를 복강 또는 피하주입한 후 생체에 일어난 변화들을 보고한 연구결과와도 일치되는 점이 많았다(平田美由紀 *et al.*, 1993; Haratake *et al.*, 1993; Katoh *et al.*, 1998). 결론적으로 F344 랫드에 1,3-DCP를 13주간 반복흡입시켰을 때 체중감소와 간세포괴사, 염증세포 침윤을 특징으로 하는 간의 독성변화 등을 볼 수 있었으며, 체중변화와 간의 병리조직, 면역염색조직, 전자현미경소견등을 종합해볼 때 1,3-DCP에 의한 NOAEL은 암수 공히 5 ppm으로 추정되며 본 시험자료는 1,3-DCP가 발생하는 작업환경에서 근무하는 근로자의 직업병을 예방하기 위한 작업환경노출 기준을 설정하는데에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 지원(과제고유번호 : ICRC/2003/005)으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Arenson, D.M., Friedman, S.L. and Bissell, D.M. (1988): Formation of extracellular matrix in normal rat liver: lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterology*, **95**, 441-447.
- Bioulac, S.P., Dubuisson, L., Bedin, C., Gonzalez, P., De Tinguy, M.E., Garcin, H. and Balabaud, C. (1992): Nodular regenerative hyperplasia in the rat induced by a selenium-rich diet: study of a model. *Hepatology*, **16**, 418-425.
- Bissell, D.M., Friedman, S.L., Maher, J.J. and Roll, F.J. (1990): Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology*, **11**, 487-498.
- Budavari, S. (1989): The Merck Index (Merck, Rahway) 3085.
- Burt, A.D., Robertson, J.L., Heir, J. and MacSween, R.N.M. (1986): Desmin-containing stellate cells in rat liver; distribution in normal animals and response to experimental acute liver injury. *J. Pathol.*, **150**, 29-35.
- COC Statement. Carcinogenicity of 3-Monochloro propane 1,2-Diol (3-MPCD). December 2000-COC/00/S5 (Update of COC/99/S5). htm Computed by QSAR program (Topkat Ver. 6.1).
- Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Joling, P. and Kraal, G. (1985): The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*, **54**, 589-599.
- Fry, J.R., Sinclair, D., Piper, C.H., Townsend, S.L. and Thomas, N.W. (1999): Depression of glutathione content, elevation of CYP2E1-dependent activation, and the principal determinant of the fasting-mediated enhancement of 1,3-Dichloro-2-propanol Hepatotoxicity in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 351-355.
- Fujishiro, K., Imazu, K., Makita, Y. and Inoue, N. (1994): Liver injury induced by dichloropropanol is-changes in the time course on hematological and blood chemical examinations. *Fukuoka Igaku Zasshi*, **85**, 247-250.
- Geerts, A., Vrijssen, R., Rauterberg, J., Burt, A., Schellinck, Wisse E. (1989): *In vitro* differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J. Hepatol.*, **9**, 59-69.
- Gressmer, A.M. and Bachem, M.G. (1990): Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis.*, **10**, 30-46.
- Hahn, H., Eder, E. and Deininger, C. (1991): Genotoxicity of 1,3-dichloro-2-propanol in the SOS chromotest and in the Ames test. Elucidation of the genotoxic mechanism. *Chem. Biol. Interact.*, **80**, 73-88.
- Hammond, A.H. and Fry, J.R. (1997): Involvement of cytochrome P4502E1 in the toxicity of dichloropropanol to rat hepatocyte cultures. *Toxicology*, **118**, 171-179.
- Haratake, J., Furuta, A. and Hashimoto, H. (1994): Immunohistochemical and ultrastructural study of hepatic sinusoidal lining during dichloropropanol-induced acute hepatic necrosis. *Liver*, **14**, 90-97.
- Haratake, J., Furuta, A., Iwasa, T., Wakasugi, C. and Imazu, K. (1993): Submassive hepatic necrosis induced by dichloropropanol. *Liver*, **13**, 123-129.
- Iwasa, T., Abe, T., Hiramatsu, K., Kubori, S., Inoue, N., Fujishiro, K. and Koga, M. (1992): Fulminant hepatitis after the inhalation of dichloropropanols. *J. UOEH*, **14**, 67-71.
- Johnson, S.J., Hines, J.E. and Burt, A.D. (1992): Macrophages and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury. *J. Pathol.*, **166**, 351-358.
- Katoh, T., Haratake, J., Nakano, S., *et al.* (1998): Dose-dependent effects of dichloropropanol on liver histology and lipid peroxidation in rats. *Industrial health.*, **36**, 318-323.
- Koga, M., Inoue, N., Imazu, K., Yamada, N. and Shinoki, Y. (1992): Identification and quantitative analysis of urinary metabolites of dichloropropanols in rats. *Juoeh.*, **14**, 13-22.
- Kuroda, Y., Fueta, Y., Kohshi, K., Nakao, H., Imai, H. and Katoh, T. (2002): Toxicity of dichloropropanols. *J. UOEH*, **24**, 271-280.
- Laslin, D.L. (1990): Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin Liver Dis.*, **10**, 293-304.
- L'Huillier, N., Pratten, M.K. and Clothier, R.H. (2002): The relative embryotoxicity of 1,3-dichloro-2-propanol on primary chick embryonic cells. *Toxicology In Vitro*, **16**, 433-442.

- Maddrey, W.C. (1985): Drug and chemical-induced hepatic injury. In: *Bochus Gastroenterology*, 4th ed. Vol. 5, eds. by Haubrich, W.S. and Kaiser, M.H., Roth JLA, 2922-2956.
- Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Kim, K.Y., Rieken, E.O. and Stein, H. (1990): Procollagen expression by non-parenchymal liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*, **98**, 175-184.
- Sangyo Eiseigaku Zasshi (1999): November 1, **41**, 202-203.
- Sax, N. and Lewis, R.J. Jr. (1989): Dangerous properties of industrial materials. Vol II, 7th ed, 1173-1174.
- Shiozaki, T., Mizobata, Y., Sugimoto, H., Yoshioka, T. and Sugimoto, T. (1994): Fulminant hepatitis following exposure to dichlorohydrin-report of two cases. *Hum. Exp Toxicol.*, **13**, 267-270.
- Stott, I., Murthy, A., Robinson, A., Thomas, N.W. and Fry, J.R. (1997): Low-dose diethyldithio-carbamate attenuates the hepatotoxicity of 1,3-dichloro-2-propanol and selectively inhibits CYP2E1 activity in the rat. *Hum. Exp. Toxicol.*, **16**, 262-266.
- Van Bergen, C.A., Collier, P.D., Cromie, D.D.O., Lucas, R.A., Preston, H.D. and Sissons, D.J. (1992): Determination of chloropropanols in protein hydrolysates. *Chromatography*, **589**, 109.
- Yokoi, Y., Namihisa, T., Kuroda, H., *et al.* (1984): Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology*, **4**, 709-714.
- Yu, X.Z., Kamijima, M., Ichihara, G., Li, W.X., Kitoh, J., Xie, A., Shibata, E., Hisanaga, N. and Takeuchi, Y. (1999): 2-Bromopropane causes ovarian dysfunction by damaging primordial follicles and their oocytes in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **159**, 185-193.
- 平田美由紀, 田中昭代, 大村 実, 井上尚英 (1993): 마우에 대한 디크로로 프로페놀의 급성독성: 이성체의 독성비교. *Jpn. J. Ind. Health*, **35**.