



랫드 전배아배양법을 이용한 2-Bromopropane의 최기형성 평가

김종춘¹ · 신동호¹ · 김성호¹ · 양영수¹ · 오기석¹ · 강성철² · 정문규³

¹전남대학교 수의과대학, ²북경협화외대, ³한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

Teratogenicity Evaluation of 2-Bromopropane Using Rat Whole Embryo Culture

Jong-Choon Kim¹, Dong-Ho Shin¹, Sung-Ho Kim¹, Young-Soo Yang¹, Ki-Seok Oh¹,
Cheng-Zhe Jiang² and Moon-Koo Chung³

¹College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Center for Safety Evaluation and Research of Drugs, Institute of Laboratory,
Animal Science. CAMS, Peking Union Medical College, China

³Korea Institute of Toxicology, KRICT, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

Received February 23, 2006; Accepted May 12, 2006

ABSTRACT. Recently, we have reported that the environmental pollutant 2-bromopropane (2-BP) induces a significant embryo-fetal developmental toxicity in rats. However, the cause of developmental toxicity and the relationship between maternal and developmental toxicities could not be elucidated because the developmental toxicity of 2-BP was observed only in the presence of maternal toxicity. The *in vitro* teratogenicity study using whole embryo culture was carried out to understand the teratogenic properties and the possible mechanism of teratogenicity induced by 2-BP in rats. Rat embryos aged 9.5 days were cultured *in vitro* for 48 hrs at medium concentrations of 0, 1, 3, or 10 mg/ml of 2-BP. Embryos were evaluated for growth, differentiation, and morphological alterations at the end of the culture period. At 10 mg/ml, 2-BP caused a delay in the growth and differentiation of embryos and an increase in the incidence of morphological alterations, including altered yolk sac circulation, abnormal axial rotation, craniofacial hypoplasia, open neuropore, absent optic vesicle and kinked somites. At 3 mg/ml, only a delay in the growth and differentiation of embryos was observed. There were no adverse effects on embryonic growth and development at the concentration of 1 mg/ml. The results showed that the exposure of 2-BP to rat embryos results in a developmental delay and morphological alterations at dose levels of 3 mg/ml culture media or higher and that 2-BP can induce a direct developmental toxicity in rat embryos.

Keywords: 2-Bromopropane, Embryotoxicity, Teratogenicity, *In vitro*, Rats.

서 론

2-Bromopropane(2-BP)은 의약품이나 염료 및 기타 유기물질의 합성에 중간체로 사용되며, 국내에서는 chlorofluorocarbons(CFC)와 1,1,1-trichloroethane의 대체물질로도 많이 사용되었다(HSDS, 2001; Boekelheide *et al.*,

2004). 이 물질은 비가연성의 휘발성물질로서 환경 중에서 쉽게 파괴되고 CFCs보다 오존층 파괴가 적은 특성이 있어서 산업현장에서 사용량이 크게 증가하였다. 그러나 사용량의 증가에 따라 환경 및 생태계의 유출 가능성과 인체노출에 의한 부작용에 대해서 큰 주목을 받아 왔다. 최근 산업현장에서 발생한 2-BP 중독사고로 인해 사용이 크게 제한되고는 있으나 대량생산화학물질인 1-BP 내에 불순물로 존재하고, 또한 화학합성 중간체로 사용되기 때문에 인체 노출기회는 여전히 크다고 할 수 있다.

1995년 경남 양산소재의 모 전자회사 남녀 근로자에게

Correspondence to: Jong-Choon Kim, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
E-mail: toxkim@chonnam.ac.kr

서 발생한 생식기독성과 혈액독성은 역학조사 결과, 반도체 세정제로 사용한 Solvent 5200의 주성분인 2-BP가 원인물질로 추정되었다(Park *et al.*, 1997). 이후 실험동물을 이용한 독성시험에서 2-BP가 고환 및 난소독성과 혈액독성을 유발하는 것이 증명되었으며, 세포증식이 활발하게 이루어지는 고환의 정조세포(spermatogonium)와 난소의 난원세포(oogonium) 및 골수세포가 주요 표적세포로 확인되었다(Omura *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999). 세포증식에 장애를 주는 화학물질이 다양한 형태의 독성을 유발한다는 것은 매우 잘 알려져 있으며(Kim *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2005), 2-BP 역시 세포증식이 활발한 세포에 부작용을 유발하기 때문에 고환독성이나 난소독성, 조혈기독성 외에도 여러 형태의 부작용을 유발할 가능성이 높다. 최근의 연구보고(Ishikawa *et al.*, 2001)에 의하면, 마우스에서 임신 개시일에 2-BP를 900 mg/kg 이상의 용량으로 단회 투여하면 착상 전 배아의 세포수가 감소하고 돌연변이의 발생빈도가 증가한다고 하였다. 이와 같이 2-BP가 세포분열이 활발한 생식세포와 조혈기세포에 손상을 주고, 배아의 세포증식 억제와 돌연변이 발현빈도를 증가시킨다는 사실을 감안해 보면 세포분열이 활발한 배·태아에 노출되면 심각한 발생독성을 초래할 가능성이 높다. Kang *et al.*(2002)의 연구논문에 의하면 랫드에서 임신 및 수유기간 동안 2-BP를 1,215 mg/kg 용량으로 반복 피하투여하면 출생자수가 감소하고, F1 동물의 생식기 손상이 초래된다고 하였다. 최근에 본 연구자들은 임신 랫드에게 2-BP를 투여한 결과, 500 mg/kg/day 이상의 용량에서 배아의 발육지연과 기형 및 치사를 유발한다는 것을 증명한 바 있다(Kim *et al.*, 2004). 그러나 2-BP의 배·태아 발생독성이 모독성과 동반되어 나타났기 때문에 관찰된 발생독성이 2-BP의 직접적 영향인지, 아니면 모독성에 기인된 2차적인 영향지는 구분할 수가 없었으며, 이에 대한 추가 연구가 필요하였다.

본 연구는 *in vivo* 시험(Kim *et al.*, 2004)에서 관찰된 2-BP의 랫드 최기형성이 배·태아에 대한 직접적 영향인지, 아니면 모독성에 기인된 간접적 영향인지를 밝히기 위해 랫드 전배아배양법을 이용한 *in vitro* 최기형성시험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경

실험동물은 오리엔트 바이오(서울)로부터 구입한 특정병원체 부재(specific-pathogen free) 랫드를 사용하였으며, 성 성숙이 완료된 10주령의 동물을 시험에 공시하였다. 실험동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 인공조명

12시간(08시부터 20시)으로 유지된 실험실에 사육하였으며, 건강한 동물만 선발하여 사용하였다. 교배를 위해 암수 2:1로 동일 사육상자에 동거시킨 다음 익일 오전 질도말에서 정자가 확인된 암컷을 교배가 성립된 것으로 하였고, 지난 밤의 자정을 임신 0일로 산정하였다. 임신동물은 스테인레스제 망 덮개가 있는 투명한 폴리카보네이트 사육상자에 개체별로 사육하였으며, 물(평균 상수도수)과 사료(PMI Nutrition International, IN, USA)는 자유 섭취시켰다. 본 실험에 사용된 모든 동물은 미국 NRC (1996)의 "실험동물의 관리와 사용에 관한 지침"에 따라 유지하였다.

배양배지의 조제

배아배양에 사용한 배지는 랫드 전혈로부터 얻은 IC (immediately centrifuged) 혈청을 이용하였다. 먼저, 채혈에 이용할 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 하룻밤 절식시킨 후 에테르로 마취하여 복대동맥에서 채혈하였다. 10 ml의 주사기를 이용하여 마취된 동물의 호흡이 멈출 때까지 채혈하였으며, 이때 용혈이 발생하지 않도록 조심하였다. 채혈한 혈액은 즉시 4°C 에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리한 다음, 섬유소응괴(fibrin clot)가 완전히 형성되도록 30분 이상 냉장고에 방치하였다. 면봉을 이용하여 섬유소응괴내의 혈청과 섬유소를 분리하였다. 섬유소성분을 제거하고 다시 한번 원심분리한 다음 혈청을 모아서 56°C 에서 40분간 열비동화(heat inactivation)시켰다. 열비동화 과정 중 15분과 30분경에 배양 시 사용하는 혼합가스를 튜브내의 혈청표면에 흘러보내어 혈청 중에 용존하는 에테르가 휘발되도록 하였다. 비동화가 끝난 혈청은 공경 $0.22 \mu\text{m}$ 의 microfilter(Millipore, USA)로 여과멸균을 하였고, 사용할 때까지 -20°C 의 초저온냉동고(deep freezer)에 보관하였다.

시험물질의 조제

2-BP를 배양배지 당 0, 1, 3 및 10 mg/ml의 농도로 IC 혈청에 용해하여 클린벤치내에서 무균적으로 배양 직전에 조제하였다.

용량설정 근거 및 시험군의 구성

본 시험의 용량을 설정하기 위해 0.1, 0.3, 1, 3, 10 및 20 mg/ml의 용량으로 예비시험을 실시한 결과, 20 mg/ml 용량에서는 배아의 높은 치사율과 높은 빈도의 형태학적 이상이 관찰되었고 10 mg/ml 용량에서는 배아사망은 인정되지 않았으나 발육지연과 형태학적 이상의 증가가 인정되었다. 반면, 3 mg/ml 이하의 용량에서는 현저한 독성영향이 인정되지 않았다. 상기 결과에 기초하여 10 mg/ml(81.3 mM)을 고용량군으로 설정하였고, 공비 3을 적용

하여 3 및 1 mg/ml의 중용량 및 저용량군과 대조군(IC 혈청)을 추가하였다.

배양조건

전배아배양기(Ikemoto Rica Co., Japan)의 내부온도는 $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 배양기 회전장치의 회전속도는 35 rpm으로 하였다. 배양병 내의 가스공급은 혼합제조된 가스(주)대성산소)를 공경 0.45 μm 의 microfilter (Millipore, Ireland)로 여과·멸균한 다음 습윤하게 하여, 분당 150 ml의 비율로 연속 공급하였다. 혼합가스의 농도는 이전시험(김 등, 2004)에 보고한 바와 같이 배양개시 후 처음 17시간은 산소 5%와 이산화탄소 5% 및 질소 90%, 그 다음 7시간은 산소 20%와 이산화탄소 5% 및 질소 75%, 그리고 나머지 24시간은 산소 40%와 이산화탄소 5% 및 질소 55%의 비율로 공급하였다.

배아적출

배아의 적출과 배양방법은 New(1978)의 방법에 준하여 수행하였다. 배아적출은 오염을 방지하기 위해 클린벤치 내에서 멸균된 기구와 시약을 사용하여 수행하였다. 임신 9.5일령의 랫드를 에테르로 마취하고, 70% 에탄올로 복부를 소독한 다음 절개하여 오염되지 않도록 주의하면서 자궁을 적출 하였다. 적출된 자궁은 0.05% glucose와 0.03% sodium bicarbonate가 함유되어 있는 HBSS (Hanks' balanced salt solution, Sigma Chemical Co., MO, USA) 용액으로 옮겼다. 핀을 이용하여 자궁의 양쪽 끝을 고정하고, 미세가위를 이용하여 자궁벽을 절개하여 배아가 들어있는 탈락막(decidua)을 노출시켰다. 입체현미경하에서 미세한 watchmaker's forceps를 이용하여 탈락막내에 있는 수태산물(conceptus)을 분리시킨 후 라이케르트막(Reichert's membrane)을 제거하였다. 적출한 수태산물을 옮길 때에는 손상을 방지하기 위해서 입구가 큰 스포이드를 이용하였다.

배아배양

상기한 방법으로 적출한 수태산물 중 배아의 발생상태를 관찰하여 머리주름기(head-fold stage)를 나타내는 동일한 발생기의 48마리를 선별하여 배양하였으며, 적출 중 손상되었거나 발생정도가 상이한 수태산물은 배양에서 제외하였다. 이렇게 선별된 수태산물은 배양액이 2 ml씩 들어 있는 15 ml 용량의 배양병에 2마리씩 넣어 전배아배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

배양배아의 관찰

48시간의 배양이 종료된 수태산물에 대해서 실제현미경

(stereoscope)과 fiber optic illuminator를 이용하여 다음과 같이 관찰하였다. 먼저, 난황주머니 순환(yolk sac circulation)과 난황주머니 직경(yolk sac diameter)을 관찰·측정하고, 난황주머니를 절개하여 배아를 분리하였다. 배아에 대해서는 머리영덩이간 길이(crown-rump length)와 머리길이(head length) 및 체질수(somite number)를 측정하였다. 난황주머니 직경은 최대치와 최소치를 각각 측정하였으며, 머리영덩이간 길이는 중뇌(mesencephalon)의 첨단부로부터 영덩이까지의 최대 길이를, 그리고 머리 길이는 전뇌(prosencephalon)의 전외측 팽출부인 중뇌(telencephalon)에서부터 능뇌(rhombencephalon) 미추부까지의 최대 길이를 측정하여 기록하였다. 배아의 발육 및 분화정도에 대해서는 van Maele-Fabry *et al.*(1990)의 평가기준에 따라 점수화 하였으며, 형태학적 소견에 대한 용어는 Wise *et al.*(1997)이 보고한 실험동물의 발생학적 이상에 대한 용어통일안을 기준으로 하여 표기하였다. 배양배아의 총단백질량은 Bradford 법(1976)에 따라 측정하였다.

통계학적 분석

시험물질 투여군과 부형제대조군과의 차이를 비교하기 위하여 GraphPad InStat v. 3.0(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 통계학적 분석을 실시하였다. 시험결과는 가능한 한 평균값과 표준편차로 표기하였다. 배아의 성장 및 분화에 대한 자료는 일원배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 한 다음, 군간 차이가 인정되면 Dunnett 다중비교법(1964)으로 유의차를 분석하였다. 배아의 기형발생률에 대해서는 Fisher's exact probability test(1952)로 유의차를 조사하였다. 통계학적 유의수준은 5% 및 1%에서 검정하였다.

결 과

임신 9.5일령의 랫드 전배아를 2-BP가 0, 1, 3 및 10 mg/ml의 농도로 들어 있는 배지에서 48시간 동안 배양한 다음 배아의 성장과 분화정도를 관찰한 결과는 Table 1에 요약하였다. 저농도인 1 mg/ml 용량군에서의 배아는 정상적으로 성장하여 부형제대조군의 배아(Fig. 1A)와 유사한 결과를 나타내었다. 반면 3 mg/ml 용량군의 배아는 난황주머니의 최대 및 최소직경과 요막(allantois), 머리영덩이간 길이, 머리길이, 인두굽이(brachial bar), 뒷다리 짝(hind limb bud), 총 형태학적 발생점수 및 배아의 단백질 함량이 부형제대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 최고용량인 10 mg/ml 용량군의 배

Table 1. Effects of 2-bromopropane on the growth and development of cultured rat embryos

Parameters	2-BP concentration (mg/ml)			
	0	1	3	10
No. of embryos examined	12	12	12	12
No. of viable embryos	12	12	12	12
Yolk sac circulation	4.2 ± 0.58 ^a	3.8 ± 0.39	3.5 ± 0.80	3.0 ± 0.74**
Yolk sac diameter				
Maximum (mm)	4.7 ± 0.27	4.6 ± 0.36	4.3 ± 0.20*	4.0 ± 0.46**
Minimum (mm)	4.3 ± 0.25	4.1 ± 0.38	3.9 ± 0.16*	3.7 ± 0.34**
Allantois	3.0	2.7 ± 0.49	2.3 ± 0.49**	2.0 ± 0.45**
Crown-rump length (mm)	4.1 ± 0.22	4.0 ± 0.30	3.5 ± 0.23**	3.4 ± 0.26**
Head length (mm)	2.1 ± 0.09	2.0 ± 0.14	1.9 ± 0.10**	1.8 ± 0.16**
Flexion	5.0	5.0	5.0	4.6 ± 0.39
Heart	4.0	4.0	3.9 ± 0.29	3.6 ± 0.46
Caudal neural tube	5.0	5.0	4.8 ± 0.45	4.6 ± 1.16
Hind brain	5.0	5.0	4.7 ± 0.49	4.4 ± 0.51**
Mid brain	4.0	4.0	3.9 ± 0.29	3.9 ± 0.29
Fore brain	5.0	4.9 ± 0.29	4.8 ± 0.45	4.6 ± 0.51*
Otic system	4.0	4.0	4.0	3.9 ± 0.29
Optic system	4.0	4.0	4.0	4.0
Olfactory system	1.3 ± 0.78	1.1 ± 0.29	1.1 ± 0.29	1.0
Branchial bars	3.0	3.0	2.5 ± 0.52**	2.2 ± 0.39**
Maxillary process	2.1 ± 0.29	2.0	1.9 ± 0.29	1.7 ± 0.65
Mandibular process	3.0	3.0	3.0	2.8 ± 0.39
Fore limb bud	2.8 ± 0.39	2.9 ± 0.29	2.4 ± 0.51	2.4 ± 0.29
Hind limb bud	1.6 ± 0.51	1.4 ± 0.56	0.8 ± 0.45**	1.0 ± 0.43**
No. of somite pairs	25.7 ± 1.23	24.3 ± 1.37	23.7 ± 1.78	22.4 ± 3.65**
Total morphological score	61.4 ± 1.44	59.7 ± 1.07	56.7 ± 2.42**	55.6 ± 3.00**
Protein content (ug/embryo)	267.0 ± 29.5	259.7 ± 25.4	206.0 ± 34.1**	177.4 ± 25.3**

^a Values are presented as means ± S.D.

*Significant difference at $P < 0.05$ level compared with the control group.

**Significant difference at $P < 0.01$ level compared with the control group.

아는 상기한 항목뿐만 아니라 난황주머니 순환(yolk sac circulation)과 후뇌, 전뇌 및 체절수(somite number)도 부형제대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다.

배아에서 관찰된 형태학적 이상의 종류 및 발현빈도는

Table 2. Effects of 2-bromopropane on the morphological alterations of cultured rat embryos

Parameters	2-BP concentration (mg/ml)			
	0	1	3	10
Embryos examined	12	12	12	12
Embryos with malformations (%) ^a	1 (8.3)	1 (8.3)	1 (8.3)	6 (50)
Altered yolk sac circulation	0	0	0	1
Abnormal axial rotation	1	1	1	2
Craniofacial hypoplasia	0	0	0	2
Open cranial neuropore	0	0	0	1
Open anterior neuropore	0	0	0	3
Absent optic vesicle	0	0	0	1
Hematoma	0	0	0	1
Kinked somites	0	0	0	1

^aA single embryo may be represented more than once in listing individual defects.

Table 2에 요약하였다. 부형제대조군과 1 및 3 mg/ml 용량군에서는 배아의 몸통회전이상(abnormal axial rotation)이 각각 1례 관찰되어 각 시험군간에 차이가 인정되지 않았다. 반면 10 mg/ml 용량군에서는 난황낭순환이상(altered yolk sac circulation)과 두개 신경구멍열림(open cranial neuropore), 체절만곡(kinked somites, Fig. 1B), 눈소포 결손(absent optic vesicle, Fig. 1B) 및 혈종(hematoma, Fig. 1B)이 각각 1례, 몸통회전이상과 두개안면부 형성부전(craniofacial hypoplasia, Fig. 1B)이 각각 2례, 그리고 앞 신경구멍열림(open anterior neuropore, Fig. 1B)이 3례 관찰되었다. 배아기형의 발생빈도는 비록 통계학적 유의성은 인정되지 않았으나 부형제대조군에 비해 현저하게 증가한 것으로 나타났다.

고 찰

화학물질에 의한 배·태아 발생독성은 시험물질이 배·태아에 직접적으로 작용하거나 모동물과 태반에 독성을 나타냄으로써 간접적으로 유발되기도 하며, 두 가지의 원

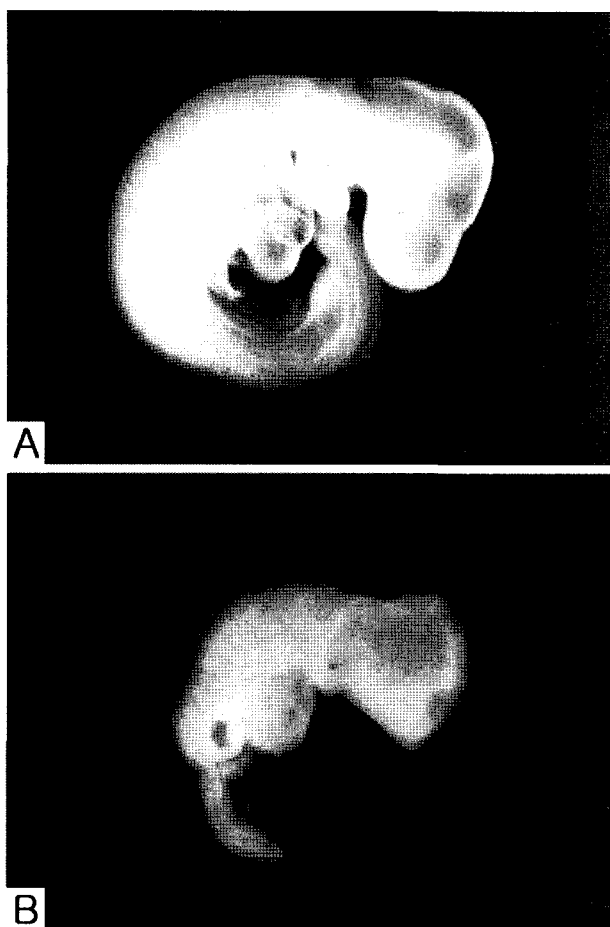


Fig. 1. Representative photographs of 11.5-day old whole embryos cultured for 48 hrs *in vitro*. (A) a control embryo, showing normal appearance. (B) an embryo treated with 10 mg/ml 2-bromopropane, showing severe growth retardation, abnormal axial rotation, kinked somites, absent optic vesicle, hematoma, and craniofacial hypoplasia.

인이 복합적으로 작용하여 나타나기도 한다. 특히, 배·태아 발생독성이 모독성과 동반되어 나타날 경우 독성조건이 시험물질의 직접적인 영향인지 아니면 모독성에 기인된 2차적인 영향인지를 구분하는 것은 매우 어렵게 된다 (Kim *et al.*, 2001, 2003). Khera(1987)의 연구보고에 따르면, 화학적이나 물리적 원인에 의해 유발된 모독성은 태아의 기형 발현율과 사망률을 현저하게 증가시킨다고 하였다. 반면, Chernoff *et al.*(1989)과 Kavlock *et al.*(1985)은 모동물의 체중감소나 사망을 유발하는 과도한 모독성도 항상 상응하는 발생독성을 야기하지는 않는다고 하였다. 이와 같이 배·태아 발생독성시험에서 모독성과 발생독성간의 상관관계는 아직까지도 매우 중요한 쟁점으로 남아있다(Chahoud *et al.*, 1999).

본 연구는 이전의 랫드 *in vivo* 시험(Kim *et al.*, 2004)에서 관찰된 2-BP의 배·태아 발생독성이 2-BP의 직접적

영향인지, 아니면 모독성에 의한 간접적 영향인지를 규명하기 위해 전배아배양법을 이용한 *in vitro* 시험을 수행하였다. 시험결과, 2-BP의 배·태아 발생독성은 시험물질에 의한 직접적인 작용에 의해 초래된 것으로 확인되었다.

배양배아의 성장과 분화소견 관찰시, 3 mg/ml 용량군의 배아에서 관찰된 난황주머니의 직경과 요막, 머리-엉덩이간 길이, 머리길이, 인두굽이, 뒷다리썩, 총 형태학적 발생점수 및 단백질 함량의 감소와 10 mg/ml 용량군에서 추가로 관찰된 난황주머니 순환과 후뇌, 전뇌 및 체절수의 감소는 노출용량의 증가에 따른 용량의존적 감소를 나타낸 것으로 보아 2-BP의 노출에 의한 소견으로 판단된다. 본 시험에서 관찰된 배아의 성장억제효과는 랫드 *in vivo* 최기형성시험(Kim *et al.*, 2004)에서 관찰된 태아의 발육지연소견과 일치하는 결과로써, 2-BP는 3 mg/ml 이상의 배지농도에서 배아의 성장 및 발육을 직접적으로 억제한다는 것을 보여준다.

배양배아의 형태학적 소견 관찰시, 10 mg/ml 용량군에서 관찰된 기형의 발생빈도는 비록 대조군에 비해 통계학적으로 유의성은 인정되지 않았지만 부형제대조군에 비해 현저하게 증가(약 6배)하였고, 정상적으로는 관찰되지 않는 중기형(major anomaly)인 것으로 보아 시험물질에 의한 영향으로 사료된다. 2-BP에 의해 유발된 배아기형은 주로 두부와 체절 및 신경계에서 주로 관찰되었으며, 이는 *in vivo* 최기형성시험(Kim *et al.*, 2004)의 결과와도 유사한 소견이다.

이전 시험의 연구결과에 의하면, 실험동물에게 2-BP의 투여는 생식장기와 골수, 중추신경계, 면역계 등에 다양한 부작용을 초래한다고 한다(Boekelheide *et al.*, 2004). 생식독성의 경우, 2-BP 투여에 의해 유발된 고환이나 난소의 기능이상은 수컷의 초기 정자발생세포나 암컷의 원시난포와 난모세포의 손상에 의해 초래된 것으로 확인되었으며, 이 결과는 높은 세포 증식율을 나타내는 세포나 장기가 2-BP의 일차적 표적장기임을 암시해 준다(Omura *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999). 최근의 보고에 의하면, 2-BP는 배양된 간질세포에서 DNA를 손상시키고, 세포 항산화 방어체계의 손상과 지질과산화물을 증가시키는 것이 증명되었다(Wu *et al.*, 2002). 또한, Zhao *et al.*(2002)은 2-BP가 생리적 상태에서 2'-deoxyguanosin에 작용하여 DNA 부가체로서 N⁷-isopropyl guanine을 형성하는 것을 증명한 바 있다. 상기 연구결과들은 2-BP에 의한 DNA의 손상이 2-BP 노출에 의해 야기된 여러 형태의 독성과 밀접하게 관계된다는 것을 강하게 암시해 주고 있다. 따라서 본 시험에서 관찰된 2-BP의 배아독성도 상기한 독성 기전에 의한 직접적인 영향으로 사료된다. 본 시험에서는 2-BP를 배아에 직접 노출시켜 배·태아 발생독성을 평가

하였으며, 본 시험 결과는 *in vivo* 최기형성시험(Kim *et al.*, 2004)에서 관찰된 태아의 발육지연과 기형조건이 모독성에 의한 간접적 영향이라기보다는 2-BP가 배·태아에 직접적으로 작용하여 발생독성을 유발한다는 것을 나타낸다. 모체와 태아간의 혈액-태반장벽(blood-placental barrier)은 분자량이 600 이상인 화학물질의 통과를 제한하는 것으로 알려져 있으며(Mirkin, 1973), 2-BP의 분자량이 123이라는 것으로 고려해 볼 때 본 물질은 모체 혈액에서 쉽게 태아로 이행하여 발생독성을 초래할 것으로 판단된다. Kawai *et al.*(1997)의 독성동태연구에 따르면, 2-BP는 빠르게 흡수되어 아세트산으로 산화되는 이소프로필 알콜과 브로마이드로 완전히 대사되고, 최종적으로는 아세트산과 브로마이드 형태로 뇨를 통해 배설된다고 한다. 2-BP 대사체 중에서 이소프로필 알콜은 임신 랫드에 노출시 태아체중 감소와 골격기형 증가를 초래한다고 한다(Nelsom *et al.*, 1988). 본 시험의 경우, 간대사효소계에 의한 대사활성화에 대한 영향은 조사하지 않아 대사체들이 2-BP의 발생독성이 미치는 영향은 규명하지 못하였다. 그러나 본 시험결과는 2-BP이 원물질 자체로서 배·태아에 발육지연과 기형을 초래한다는 것을 보여주며, 이는 *in vivo* 시험에서 관찰된 배·태아발생독성이 최소한 부분적으로는 2-BP의 직접적 독성에 기인된 것이라는 것을 암시해 준다. 2-BP의 배·태아 발생독성에 대한 대사체의 영향을 규명하기 위해서는 대사활성계를 이용한 추가적인 *in vitro* 시험이 요구된다.

결론적으로 환경오염물질 2-BP은 랫드 전배아에 노출시 3 mg/ml 이상의 배지농도에서 배아의 성장과 분화를 억제하고 형태학적 이상을 초래하며, 랫드 배아에 직접적으로 작용하여 발생독성을 야기할 수 있다는 것을 암시해 준다.

감사의 글

"이 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임"(R05-2003-000-10700-0).

참고문헌

- Boekelheide, K., Darney, S.P., Daston, G.P., David, R.M., Luderer, U., Olshan, A.F., Sanderson, W.T., Willhite, C.C. and Woskie, S. (2004): NTP-CERHR Expert Panel Report on the reproductive and developmental toxicity of 2-bromopropane. *Reprod. Toxicol.*, **18**, 189-217.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anat. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Chahoud, I., Ligensa, A., Dietzel, L. and Faqi, A.S. (1999): Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod. Toxicol.*, **13**, 375-381.
- Chernoff, N., Rogers, J.M. and Kavlock, R.J. (1989): An overview of maternal toxicity and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. *Toxicology*, **59**, 111-125.
- Chung, M.K., Kim, J.C. and Han S.S. (2005): Embryotoxic effects of CKD-602, a new camptothecin anticancer agent, in rats. *Reprod. Toxicol.*, **20**, 165-173.
- Dunnnett, C.W. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, **20**, 482-491.
- HSDB. Hazardous Substances Data Bank, Bethesda (MD). (2001): National Institutes of Health. Available from URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
- Ishikawa, H., Tian, Y. and Yamauchi, T. (2001): Induction of micronuclei formation in preimplantation mouse embryos after maternal treatment with 2-bromopropane. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 81-85.
- Kang, K.S., Li, G.X., Che, J.H. and Lee, Y.S. (2002): Impairment of male rat reproductive function in F1 offspring from dams exposed to 2-bromopropane during gestation and lactation. *Reprod. Toxicol.*, **16**, 151-159.
- Kavlock, R.J., Chernoff, N. and Rogers, E.H. (1985): The effect of acute maternal toxicity on fetal development in the mouse. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **5**, 3-13.
- Kawai, T., Okada, Y., Odachi, T., Horiguchi, S., Zhang, Z., Moon, C. and Ikeda, M. (1997): Diffusive sampling and biological monitoring of 2-bromopropane. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **33**, 23-28.
- Khera, K.S. (1987): Maternal toxicity in human and animals: effects on fetal development and criteria for detection. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **7**, 287-295.
- Kim, J.C., Kim, S.H., Shin, D.H., Ahn, T.H., Kim, H.C., Kim, Y.B., Jiang, C.Z., Han, J. and Chung, M.K. (2004): Effects of prenatal exposure to the environmental pollutant 2-bromopropane on embryo-fetal development in rats. *Toxicology*, **196**, 77-86.
- Kim, J.C., Shin, H.C., Cha, S.W., Koh, W.S., Chung, M.K. and Han, S.S. (2001): Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. *Life Sci.*, **69**, 2611-2625.
- Kim, J.C., Shin, D.H., Kim, S.H., Ahn, T.H., Kang, S.S., Jang, B.S., Kim, C.Y. and Chung, M.K. (2003): Developmental toxicity evaluation of the new fluoroquinolone antibacterial DW-116 in rats. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **23**, 123-136.
- Kim, J.C., Yun, H.I., Shin, H.C., Han, S.S. and Chung, M.K. (2000): Embryo lethality and teratogenicity of a new fluoroquinolone antibacterial DW-116 in rats. *Arch. Toxicol.*, **74**, 120-124.
- Kruskal, W.H. and Wallis, W.A. (1952): Use of ranks in one criterion variance analysis. *J. Am. Statist. Assoc.*, **47**, 614-617.
- Mirkin, B.L. (1973): Maternal and fetal distribution of drugs in pregnancy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **14**, 643-647.
- Nelson, B.K., Brightwell, W.S., MacKenzie-Taylor, D.R., Khan, A., Burg, J.R., Weigel, W.W. and Goad, P.T. (1988): Teratogenicity of n-propanol and isopropanol administered at

- high inhalation concentrations to rats. *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 247-254.
- New, D.A.T. (1978): Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.*, **53**, 81-122.
- NRC (National Research Council). (1996): Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council, National Academy, Washington, USA.
- Omura, M., Romero, Y., Zhao, M. and Inoue, N. (1999): Histopathological evidence that spermatogonia are the target cells of 2-bromopropane. *Toxicol. Lett.*, **104**, 19-26.
- Park, J.S., Kim, Y.H., Park, D.W., Choi, K.S., Park, S.H. and Moon, Y.H. (1997): An outbreak of hematopoietic and reproductive disorders due to solvents containing 2-bromopropane in an electronic factory, South Korea: Epidemiological survey. *J. Occup. Health*, **39**, 38-143.
- van Maele-Fabry, G., Delhaise, F. and Picard, J.J. (1990): Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. *In vitro*, **4**, 149-156.
- Wise, L.D., Beck, S.L., Beltrame, D., Beyer, B.K., Chahoud, I., Clark, R.L., Clark, R., Druga, A.M., Feuston, M.H., Guittin, P., Henwood, S.M., Kimmel, C.A., Lindstrom, P., Palmer, A.K., Petrere, J.A., Solomon, H.M., Yasuda, M. and York, R.G. (1997): Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (Version 1). *Teratology*, **55**, 249-292.
- Wu, X., Faqi, A.S., Yang, J., Pang, B.P., Ding, X., Jiang, X. and Chahoud, I. (2002): 2-Bromopropane induces DNA damage, impairs functional antioxidant cellular defenses, and enhances the lipid peroxidation process in primary cultures of rat Leydig cells. *Reprod. Toxicol.*, **16**, 379-384.
- Yu, X., Kamijima, M., Ichihara, G., Li, W., Kitoh, J., Xie, Z., Shibata, E., Hisanaga, N. and Takeuchi, Y. (1999): 2-Bromopropane causes ovarian dysfunction by damaging pre-mordial follicles and their oocytes in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **159**, 185-193.
- Zhao, L.X., Kim, E.K., Lim, H.T., Moon, Y.S., Kim, N.H., Kim, T.H., Choi, H., Chae, W., Jeong, T.C. and Lee, E.S. (2002): Synthesis, characterization and *in vitro* identification of N7-guanine adduct of 2-bromopropane. *Arch. Pharm. Res.*, **25**, 39-44.
- 김종춘, 신진영, 신동호, 강성철, 정나영, 백성수, 정문구 (2004): 발생독성 검색을 위한 마우스 전배자배양법의 확립. *한국실험동물학회지*, **20**, 49-54.