J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 23, No. 4, pp. 391-403 (2007)

Official Journal of
Korean Society of Toxicology
Available online at http://www.toxmut.or.kr

랫드를 이용한 Acetanilide의 반복투여 및 생식/발생독성 병행시험

정문구[1] · 백성수[1] · 이상희[2] · 김현미[2] · 최경희[2] · 한상섭[1]
[1]한국화학연구원 안전성평가연구소 생식독성실, [2]국립환경과학원 환경노출평가과

Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicities of Acetanilide in Rats

Moon-Koo Chung[1], Sung-Soo Baek[1], Sang-Hee Lee[2], Hyun-Mi Kim[2], Kyung-Hee Choi[2] and Sang-Seop Han[1]
[1]Reproductive Toxicology Division, Korea Institute of Toxicology, KRICT, Daejeon 305-343
[2]Environmental Exposure Assessment Division, National Institute of Environmental Research, Korea

Received June 27, 2007; Accepted December 13, 2007

The study was conducted to assess the repeated dose and reproduction and developmental toxicities of acetanilide, an intermediate for drug production, as a part of OECD Screening Information Data Set (SIDS) program. The test agent was administered by gavage at dose levels of 0, 22, 67, 200 and 600 mg/kg to Sprague-Dawley rats (12/group/sex) during pre-mating and mating period for males(up to 30 days) and females and pregnancy and early lactation period for females (up to 39~50 days). At 22 mg/kg, decreases in HGB, HCT (males) and MCHC (females), hyperplasia of spleen red pulp, hyperplasia of femur bone marrow (both sexes) were observed. At 67 mg/kg, salivation (males), reduced food consumption (both sexes), decreases in RBC, HGB, HCT and MCHC (males), increases in MCV (males) and spleen weight (males), hyperplasia of spleen red pulp and femur bone marrow (both sexes) were observed. At 200 mg/kg, decreases in locomotor activity and salivation (both sexes), reduced food consumption (both sexes), decreases in RBC, HGB, HCT and increases in MCV, MCH, BUN, T-BIL (males), enlargement of spleen (both sexes), increased weight of spleen (males), hyperplasia of spleen red pulp and femur bone marrow and extramedullary hematopoiesis of liver (both sexes), atrophy of thymus and corpus luteum hyperplasia of ovary (females) were observed. At 600 mg/kg, decreases in locomotor activity, cyanosis (both sexes), reddish tear, and salivation (males), mortality (4 out of 12 females), decreased body weight (females), reduced food consumption (both sexes), decreases in RBC, HGB, HCT and MCHC and increases in WBC, MCV, MCH, reticulocyte, neutrophil, lymphocyte, monocyte, AST, ALT, BUN, T-BIL, ALB, Ca and A/G ratio (males), enlargement of spleen, increased weights of spleen (both sexes), liver (males), kidney and ovary, decreased weights of thymus (females), hyperplasia of spleen red pulp, hyperplasia of femur bone marrow and extramedullary hematopoiesis of liver (both sexes), and atrophy of thymus and corpus luteum hyperplasia of ovary (females) were observed. Regarding the reproduction and development toxicities, there were no treatment-related changes in precoital time, mating index, fertility index and pregnancy index at all doses tested. At 22 and 67 mg/kg, there were no adverse effects on all the parameters observed. At 200 mg/kg, decreased body weight of pups (day 4 p.p.) were observed. At 600 mg/kg, decreased body weight of pups (day 0 and 4 p.p.) and viability index (day 4 p.p.), increased incidence of newborns dead or with abnormal clinical signs were observed. The results suggest that the NOAELs for general toxicity are < 22 mg/kg, LOAELs are 22 mg/kg and the NOAELs for reproductive toxicity are 67 mg/kg.

Key Words: Acetanilide, Combined repeated dose toxicity study with the reproductive/developmental toxicity screening test, Rats.

Correspondence to: Moon-Koo Chung, Korea Institute of Toxicology, KRICT, 100 Jangdong, Yuseong, Daejeon 305-343, Korea
E-mail: mkchung@kitox.re.kr

서 론

OECD SIDS(Screening Information of Data Set) 프로그램은 연간 1000톤 이상 생산되는 대량 화학물질(High Production Volume Chemicals, HPVCs)에 대해 물리화학적 성질, 환경 중 거동, 생태 및 인체 독성 등의 기존자료를 바탕으로 동 물질의 환경 및 인체에 미치는 초기 위해성을 평가하는 사업으로서 각 수행 회원국은 화학물질의 기초 독성 자료와 대략의 노출자료등 위해성 평가에 필요한 기초정보를 획득하여 생태 및 인체 위해성의 후속 평가 수행여부를 결정하는 프로그램이다. 우리나라 환경부에서는 1998년 유통량 조사 기준으로 460여종의 화학물질을 HPVCs로 분류하고 있으며, 1996년 OECD 가입당시 조건부로 수락한 '기존화학물질 위해성 저감 및 체계적 조사를 위한 상호협력규정'을 이행하기 위해 OECD와 협의하여 1999년부터 benzoyl peroxide 등 7종의 HPVCs에 대한 환경 및 인체 초기 위해성을 평가하기로 함으로써 본 프로그램에 적극적으로 참여하고 있다(환경부, 2000).

Acetanilide는 주로 의약품과 염료의 합성에서 중간체로, 과산화수소와 섬유소 아세테트의 안정제로, 가소제 그리고 고무 촉성제로 사용되며, 우리나라에서 연간 약 2300톤 정도 생산되는 HPVCs 중 하나로 OECD SIDS 프로그램 대상 화학물질로 등재되어 있는 물질이다. Acetanilide는 의약품과 염료의 중간체로서 폐쇄된 시스템에서 생산되고 이용되며 소비자 물품에는 본질적으로 존재하지 않는다. 따라서 환경으로의 방출은 지역적인 제조장에서 공기와 폐수를 통해서만 일어나는 것으로 간주된다. Acetanilide의 분진이나 증기의 흡입은 호흡기관이나 점막을 자극하기도 하고 피부 발진을 일으킬 수도 있으며, 만일 인체 내로 섭취된다면 고도의 독성 영향을 나타낼 수 있다(국립환경연구원, 2001). 인도에서 acetanilide에 노출된 공장 근무자들이 근무시간 이후에 청색증, 흉부통증, 현기증, 상복부 통증 등으로 고생하였다는 보고가 있다(Clayton and Clayton, 1982). 이러한 징후는 acetanilide의 경증 중독의 결과와 매우 비슷하다(Thienes and Haley, 1972). 급성중독의 한 측면은 중추신경계의 교란으로 자살의 지경에 이를 수 있는 것이고(Thienes and Haley, 1972), 만성중독은 빈혈증과 sulfhemoglobinemia혈증에 이를 수 있다(Grant, 1974). 또한 Sax(1979)는 접촉, 흡입 또는 섭취는 피부의 습진인 피부염을 일으킬 수 있다고 보고하였다.

OECD SIDS 프로그램에서는 화학물질의 인체영향을 평가하기 위해서 필수적으로 급성독성, 반복투여 독성, *in vitro* 및 *in vivo* 유전독성 그리고 생식/발생독성 등에 대한 신뢰성있는 자료를 요구하고 있다(OECD, 2002). 그러나 acetanilide에 대한 기존의 독성자료를 검토한 결과 급성독성에 관한 정보는 있으나, 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)의 결정에 필요한 반복투여독성, 생식독성 및 발생독성에 대한 연구자료가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 반복투여독성 및 생식/발생독성에 대한 신뢰성 있는 자료를 생산하고자 OECD에서 제안하고 있는 시험방법(OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 422)에 따라 암수 랫드에 acetanilide를 반복 경구투여한 후 이에 따른 반복투여독성과 함께 생식/발생독성을 평가하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질. 본 시험에는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 백색결정체의 Acetanilide(Lot No. 02910EU)를 1% Carboxymethyl cellulose 수용액(CMC, Lot No. 07326-3)에 현탁시켜 사용하였다.

실험동물 및 사육환경. (주) 바이오제노믹스(서울)에서 구입한 7주령의 Sprague-Dawley 랫드를 1주일간 검역과 순화사육을 거쳐 외견상 건강한 암수 각각 60마리를 선별해 시험에 사용하였다. 본 시험은 온도 23 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~20회/hr., 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 시험기간중 방사선조사(25 kGy)로 멸균한 실험동물용 고형사료[제일사료(주), 대전광역시 대덕구 대화동]와 자외선 유수살균기로 소독한 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

투여량의 설정과 시험군의 구성. 38, 75, 150, 300 및 600 mg/kg의 용량으로 acetanilide에 대한 랫드 14일 반복투여독성시험을 실시한 바, 수컷동물의 경우 150 mg/kg 이상의 투여군에서는 사료섭취량의 감소 및 비장중량의 증가가, 300 mg/kg 이상의 투여군에서는 WBC 증가 및 RBC의 감소가, 그리고 600 mg/kg 투여군에서는 ALT, AST, BUN, T-BIL 및 albumin의 증가가 관찰되었다. 암컷동물에 있어서는 150 mg/kg 이상의 투여군에서 사료섭취량의 감소 및 RBC의 감소가, 300 mg/kg 이상의 투여군에서 간장중량의 증가가, 그리고 600 mg/kg 투여군에서는 비장중량의 증가, WBC의 증가 및 ALT의 증가가 발견되었다. 이를 기초로 600 mg/kg을 최고용량으로 정하고 공비 3으로 하여 아래 단계의 용량을 200, 67 및 22 mg/kg으로 설정하였고, 그 외에 매체(1% CMC)대조군을 두었으며, 각 군당 암수 12마리씩으로 구성하였다.

투여방법 및 투여기간. 경구투여용 존데(sonde)가 장착된 주사기를 이용하여 수컷은 교배전 2주간 및 교배기간(30일간), 암컷은 교배전 2주간, 교배기간, 임신기간 및 포육 3일째까지(39~50일간) 1일 1회씩 반복투여하였다. 투여액량은 주 1회씩 측정된 체중을 기준으로 하여 kg당 10 ml로 산출하였다.

관찰 및 검사항목.

일반증상 관찰: 시험기간중 1일 1회 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 관해서 관찰하였다.

체중 측정: 교배전의 암수동물은 주 1회, 임신동물은 임신 0, 7, 14 및 20일째 그리고 포육동물은 포육 0 및 4일째에 체중을 측정하였다.

사료섭취량 측정: 체중측정일에 사료를 급여하고 익일 잔량을 측정하여 일일 섭취량을 계산하였다. 단, 교배일에는 암수 공히 동거로 인해 교배전일에 사료를 급여하고 익일 잔량을 측정하였다. 포육 4일째 측정은 포육 3일째에 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다.

교배의 판정: 스테인레스제 망사육상자에 암수 1 : 1로 동거시킨 후, 질전 또는 질도말시 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하였으며, 최종판정은 제왕절개시 자궁의 착상흔적에 따랐다. 이를 기초로 교미율, 수태율 및 임신율을 산출하였다.

임신, 포육기간중 관찰항목: 유산, 조산 및 난산등의 이상을 관찰하였고, 분만일에는 임신기간, 생존자수 및 사산자수, 생존자의 성별, 체중 및 외표이상을 관찰하였다. 포육기간중에는 어미동물의 포육상태 및 사망자수에 관해서 관찰하였다. 이상의 관찰기록으로부터 임신기간, 출산율, 성비, 생후 4일째 생존율을 조사하였고, 생후 0일 및 4일째 생존자의 체중을 측정하였다.

혈액학적 검사: 계획도살되는 수컷동물에 대하여 부검전에 하룻밤 절식시킨 후 에테르로 마취하여 개복후 복대동맥에서 채혈한 혈액으로 아래의 항목을 측정하였다. 응고방지제로서 혈액응고 검사에는 3.2% sodium citrate를 이용하였으며 그 외의 측정항목에는 EDTA-2K를 사용하였다. 혈구자동계측장치(T-540 Coulter Counter, Coulter Counter Electronics, 미국)를 이용하여, WBC(White blood cell count), RBC(Red blood cell count), HGB (Hemoglobin concentration), HCT (Hematocrit), MCV (Mean corpuscular volume), MCH(Mean corpuscular hemoglobin), MCHC(Mean corpuscular hemoglobin concentration) 및 PLT(Platelet)를 측정하였고, 백혈구감별계산(Differential leucocyte count)은 혈액도말표본을 검경하여 검사하였다. 또한 Prothrombin time에 관하여는 혈액응고시간측정장치인 COBAS FIBRO(F. Hoffmann & La Roche Co., UK)를 이용하였고, Met-hemoglobin은 Spectrophotometer(UV-2401PC)를 이용하여 측정하였다.

혈액생화학적 검사: 혈액학적 검사를 실시한 수컷동물에 대하여 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 복대동맥으로부터 채혈한 혈액을 약 10~15분간 상온에 방치하였다가 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하여 검사를 실시하였다. AST(Aspartate aminotransferase), ALT(Alanine aminotransferase), ALP(Alkaline phosphatase), GLU(Glucose), TP(Total protein), ALB (Albumin), A/G(Albumin/globulin ratio), BUN(Blood urea nitrogen), CRE(Creatinine), TCHO(Total cholesterol), TBIL(Total bilirubin), TG(Triglyceride), PL-E(Phospholipid), Ca(Calcium), IP(Inorganic phosphorus)의 항목에 대해서는 자동분석장치(Shimadzu-CL-7200, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 측정하였고, Na(Sodium), K (Potassium), Cl(Chloride)의 항목에 대해서는 전해질 자동분석장치(644 Na, K, Cl Analyzer, Ciba-Corning, USA)를 이용하여 측정하였다.

부검: 투여종료 후에 매체대조군 및 투여군의 생존동물에 대하여 계획도살하여 부검을 실시하였다. 암컷동물은 포육 4일째에 부검하였고, 부검시에는 황체수 및 착상수를 계수하였다. 이상의 관찰기록으로 착상전 배자사망률 및 착상후 배자사망률을 산출하였다. 비임신동물은 최종동거일로부터 24~26일째에 부검하였고, 생후 4일령 F1 동물은 외표이상의 유무에 대하여 관찰하였다.

장기중량측정: 매체대조군 및 투여군의 최종 계획도살시에는 혈관절단에 의한 부검후 간장, 신장, 부신, 고환, 부고환, 흉선, 비장, 뇌, 심장, 난소, 자궁, 갑상선, 저정낭(응고선포함), 전립선의 중량을 측정하였다.

병리조직학적검사: 모든 동물에 대해서 뇌, 척수, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 간장, 신장, 부신, 비장, 심장, 흉선, 갑상선, 기관, 폐, 뇌하수체, 난소, 자궁, 질, 고환, 부고환, 저정낭(응고선포함), 전립선, 유선, 방광, 장간막림프절, 악하림프절, 좌골신경, 골수(대퇴골)를 적출하여 10% 중성완충포르말린액에 고정하였고, 고환은 Bouin액에 고정하였다. 매체대조군과 고용량군의 모든 고정장기를 파라핀 포매, 박절하여 Hematoxylin & eosin (H&E) 염색표본을 만든 다음 병리조직학적 이상유무를 조사하였고, 고환의 경우 PAS 염색을 실시하여 정자형성의 이상 유무를 조사하였으며, 중간용량군과 저용량군에서는 투여와 관련된 변화가 관찰된 장기에 대하여 염색표본을 만들어 검경하였다.

통계학적 분석. 얻어진 시험자료에 대한 통계분석은 다중비교 검정법을 실시하였다. 각군의 시험자료의 성질

상 그리고 동물수에 있어서 충분히 큰 표본이므로 정규분포를 가정하고, 일원배치분산분석을 실시하고 검정한 결과 유의성이 나타났을 경우에는 매체대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 검사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett 검정 혹은 Scheffe 검정법을 실시하였다. 시험자료가 빈도수를 나타낼 경우에는 Kruskal-Wallis(H) 검정을 실시하고 순위화한 자료를 이용한 Dunnett형의 검정 혹은 Scheffe형 검정을 실시하여 군간의 유의차를 조사하였다. 출현률 및 백분률에 대한 시험자료는 자료를 정리함으로써 χ^2-test를 하거나 순위화한 Kruskal-Wallis(H) 검정을 실시하였다. 통계학적 유의성은 위험률 1% 혹은 5%에서 검사하였다.

결 과

일반독성학적 영향:

수컷동물의 일반증상: 교배전 및 교배기간동안 수컷동물에 대하여 일반증상관찰을 실시한 결과, 600 mg/kg 투여군에서는 자발운동저하(decrease in locomotor activity), 유연(salivation) 및 청색증(cyanosis)이 각각 12례씩, 적색유루(reddish tear)가 8례, 탈모(loss of fur)가 1례 관찰되었고, 200 mg/kg 투여군에서는 유연이 9례, 자발운동저하가 5례 발견되었다. 67 mg/kg 투여군에서는 유연이 5례 관찰되었고, 22 mg/kg 투여군에서는 어떠한 이상증상도 나타나지 않았다.

상기의 증상들 중에서 600 mg/kg 투여군의 소견들은 투여당일에만 투여후 약 2시간 동안 지속적으로 관찰된 반면에, 67 및 200 mg/kg 투여군의 증상들은 투여당일부터 계속해서 즉시 회복되는 경향을 보였다. 상기의 소견들 중에서 600 mg/kg 투여군에서 1례 관찰된 탈모는 발현율이 낮아서 시험물질과는 무관한 소견으로 사료되었고, 그 밖의 소견들은 모두 시험물질의 영향으로 판단되었다.

암컷동물의 일반증상: 암컷동물의 경우 교배전 기간동안 600 mg/kg 투여군에서는 자발운동저하 및 청색증이 각각 12례씩, 탈모 및 유연이 각각 4례씩, 적색유루가 3례, 보행실조(ataxic gait)가 1례 관찰되었고, 200 mg/kg 투여군에서는 유연이 3례, 자발운동저하가 1례 발견되었으며, 22 및 67 mg/kg 투여군에서는 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다. 수컷동물의 경우와 마찬가지로 600 mg/kg 투여군에서는 투여당일에 투여후 약 2시간 동안 지속적으로 증상이 관찰되었다. 그리고 임신 및 포육기간 동안에는 600 mg/kg 투여군에서 청색증이 11례, 탈모가 4례, 유연이 1례 관찰되었다.

상기의 소견들 중에서 600 mg/kg 투여군에서 교배전 기간동안에 관찰된 청색증 및 자발운동저하와 임신 및 포육기간 동안 발견된 청색증은 시험물질에 기인한 소견으로 사료되었고, 그 밖의 소견들은 발현율이 낮아서 시험물질의 영향으로 단정하기는 어려웠다. 사망동물은 임신기간동안에 3례, 포육기간동안에 1례 발견되었는데, 이는 모두 시험물질의 투여에 기인한 것으로 판단되었다.

수컷동물의 체중: 수컷동물의 교배전 및 교배기간동안의 체중은 600 mg/kg 투여군에서 투여 7일째의 체중이 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데, 투여 13일째부터는 회복되는 경향을 보여서 시험물질에 의한 독성학적 영향으로는 판단되지 않았다(Table 1).

암컷동물의 체중: 교배전 및 임신기간동안의 암컷동물의 체중에 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 통계학적 유의차는 인정되지 않았다. 포육기간 동안의 체중은 600 mg/kg 투여군에서 포육 0일 및 4일째에 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데, 이는 시험물질에 의한 변화로 판단되었다(Table 2).

수컷동물의 사료섭취량: 수컷동물의 교배전 및 교배기간 동안의 사료섭취량은 67, 200 및 600 mg/kg 투여군에서 투여 1일째의 사료섭취량이 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데, 이 후부터는 정상적인 사료섭취가 관찰되었다. 상기한 사료섭취량의 감소는 투여 첫날째에만 보이고 그 후에 회복된 변화로

Table 1. Body weights in the male rats treated with acetanilide during the pre-mating and mating periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
No. of male rats	12	12	12	12	12
Day 0	292.9 ± 19.44	294.6 ± 13.44	286.9 ± 11.05	294.8 ± 18.06	296.1± 12.72
Day 7	323.1 ± 20.27	332.3 ± 19.19	314.4 ± 14.77	315.6 ± 22.92	298.8 ± 17.26*
Day 13	345.1 ± 23.30	361.3 ± 25.19	335.1 ± 15.81	344.3 ± 27.63	334.6 ± 18.18
Day 21	368.7 ± 22.75	381.9 ± 25.10	362.2 ± 17.01	369.1 ± 26.87	356.5 ± 23.67
Day 27	387.1 ± 26.63	407.3 ± 23.95	383.4 ± 16.37	391.0 ± 29.37	381.6 ± 26.78

Values are presented as mean ± SD (g).
* Indicates a significant difference at $p < 0.05$ compared with the control group.

Table 2. Body weights in the female rats treated with acetanilide during the pre-mating, gestation and early lactation periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
Pre-mating period					
No. of female rats	12	12	12		
Day 0	207.5 ± 12.09	209.2 ± 10.40	211.2 ± 12.08	205.2 ± 14.42	207.9 ± 13.02
Day 7	227.8 ± 16.09	233.7 ± 7.61	233.8 ± 15.84	21.93 ± 16.18	218.8 ± 13.15
Day 13	238.8 ± 13.68	245.9 ± 11.34	246.4 ± 18.08	229.7 ± 14.44	232.6 ± 16.39
Gestation period					
No. of pregnant females	11	12	12	10	11
Day 0	248.8 ± 27.69	251.0 ± 10.84	249.0 ± 27.40	236.1 ± 15.69	233.9 ± 19.36
Day 7	292.0 ± 24.73	300.4 ± 16.12	298.5 ± 23.94	280.3 ± 19.54	279.1 ± 19.24
Day 14	338.1 ± 25.26	343.3 ± 14.87	343.0 ± 20.57	324.4 ± 19.95	316.3 ± 28.39
Day 20	424.2 ± 23.08	420.0 ± 32.57	429.6 ± 25.05	398.8 ± 31.01	394.6 ± 29.02
Lactation period					
No. of lactating females	11	12	12	10	8
Day 0	330.1 ± 23.26	338.2 ± 14.25	326.2 ± 20.03	310.0 ± 23.26	294.8 ± 30.61*
No. of lactating females	11	12	12	10	7
Day 4	348.6 ± 24.70	354.6 ± 15.91	348.9 ± 25.22	324.0 ± 21.96	313.4 ± 22.92*

Values are presented as mean ± SD (g).
* *Indicates a significant difference at p<0.05 compared with the control group.*

Table 3. Food consumption in the male rats treated with acetanilide during the pre-mating, mating periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
No. of male rats	12	12	12	12	12
Day 1	39.0 ± 4.50	37.9 ± 3.89	22.8 ± 8.68**	10.9 ± 2.11**	8.3 ± 2.14**
Day 8	42.6 ± 5.61	39.2 ± 6.82	38.0 ± 3.90	38.9 ± 2.27	39.2 ± 3.93
Day 14	39.6 ± 5.08	35.9 ± 4.75	31.6 ± 5.96	35.0 ± 4.33	35.6 ± 1.73
Day 22	30.9 ± 1.53	32.8 ± 3.29	33.1 ± 4.12	34.4 ± 2.48	34.1 ± 3.02
Day 28	34.8 ± 4.38	34.2 ± 2.61	36.7 ± 2.39	35.2 ± 2.05	34.5 ± 3.45

Values are presented as mean ± SD (g).
** Indicates a significant difference at p<0.01 compared with the control group.

Table 4. Food consumption in the female rats treated with acetanilide during the pre-mating, gestation and early lactation periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22			
Pre-mating period					
No. of female rats	12	12	12	12	12
Day 1	25.4 ± 3.49	24.7 ± 5.33	21.1 ± 2.40*	12.5 ± 2.96**	10.8 ± 2.40**
Day 8	22.9 ± 1.54	24.0 ± 4.72	22.9 ± 3.20	20.7 ± 2.01	22.2 ± 3.13
Day 13	24.4 ± 2.40	25.5 ± 3.97	24.9 ± 3.49	22.7 ± 2.49	26.3 ± 5.16
Gestation period					
No. of pregnant females	11	12	12	10	11
Day 1	21.8 ± 3.64	24.1 ± 3.51	23.6 ± 4.86	21.8 ± 3.13	18.7 ± 3.04
Day 8	33.2 ± 6.98	31.5 ± 3.02	34.5 ± 6.63	26.8 ± 4.62	26.4 ± 1.70
Day 15	30.4 ± 2.38	32.2 ± 5.47	31.2 ± 3.60	29.5 ± 5.54	30.6 ± 5.29
Day 21	29.5 ± 7.79	32.5 ± 5.93	30.1 ± 11.01	30.6 ± 10.34	23.1 ± 7.21
Lactation period					
No. of lactating females	11	12	12	10	8
Day 1	23.6 ± 6.10	21.0 ± 7.74	25.7 ± 7.11	18.9 ± 5.13	15.8 ± 4.23
No. of lactating females	11	12	12	10	7
Day 4	52.8 ± 6.59	50.7 ± 7.34	55.5 ± 8.86	54.3 ± 15.99	43.0 ± 9.86

Values are presented as mean ± SD (g).
*, ** Indicate a significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ compared with the control group, respectively.

Table 5. Hematological values in the male rats treated with acetanilide during the pre-mating, mating periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
No. of male rats	12	12	12	12	12
White blood cell count (× 10^3)	9.47 ± 1.622	9.797 ± 2.030	9.28 ± 2.592	18.63 ± 15.207	54.45 ± 19.063**
Red blood cell count (× 10^6)	8.06 ± 0.398	7.64 ± 0.486	7.03 ± 0.382**	6.29 ± 0.518**	5.23 ± 0.447**
Hemoglobin concentration (g/dl)	15.4 ± 0.82	14.4 ± 0.45**	14.3 ± 0.58**	14.4 ± 0.40**	13.7 ± 0.64**
Hematocrit (%)	46.5 ± 2.33	44.4 ± 1.34*	44.4 ± 1.87*	44.2 ± 1.14**	43.0 ± 1.66**
Mean corpuscular volume (fl)	57.7 ± 1.30	58.2 ± 2.38	63.2 ± 2.46**	70.8 ± 7.04**	82.5 ± 5.49**
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	19.1 ± 0.57	18.9 ± 0.83	20.4 ± 0.94	23.0 ± 2.31**	26.4 ± 1.75**
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	33.0 ± 0.63	32.4 ± 0.68*	32.2 ± 0.56**	32.5 ± 0.30	32.0 ± 0.49**
Platelet (× 10^3)	933 ± 97.6	1050 ± 106.5	1090 ± 148.8*	957 ± 169.8	897 ± 82.9
Prothrombin time (second)	15.3 ± 0.95	15.6 ± 0.88	15.4 ± 0.88	15.1 ± 0.71	15.8 ± 1.46
Reticulocyte count (‰)	2.5 ± 3.66	5.9 ± 6.82	6.4 ± 4.10	8.8 ± 9.85	15.0 ± 11.35**
Met-hemoglobin (g/dl)	0.262 ± 0.1520	0.286 ± 0.0633	0.536 ± 0.7066	0.198 ± 0.1267	0.326 ± 0.3719
Differential leucocyte count (× 10^3)					
Neutrophil	1.54 ± 1.059	1.26 ± 0.459	1.48 ± 0.687	3.43 ± 2.769	15.07 ± 9.060
Eosinophil	0.05 ± 0.070	0.03 ± 0.079	0.04 ± 0.052	0.07 ± 0.137	0.18 ± 0.378
Basophil	0.00 ± 0.000	0.00 ± 0.000	0.00 ± 0.000	0.00 ± 0.000	0.00 ± 0.000
Lymphocyte	7.74 ± 1.680	8.36 ± 1.947	7.61 ± 2.216	14.87 ± 12.562	38.34 ± 13.109**
Monocyte	0.14 ± 0.108	0.14 ± 0.089	0.15 ± 0.132	0.26 ± 0.241	0.86 ± 0.865**

Values are presented as mean ± SD.
*, ** Indicate a significant difference at $p<0.05$ and $p<0.01$ compared with the control group, respectively.

서 시험물질의 독성학적 영향이라기 보다는 처치 도중에 경험하는 스트레스에 기인한 것으로 사료된다(Table 3).

암컷동물의 사료섭취량: 암컷동물의 경우 교배전기간의 사료섭취량은 67, 200 및 600 mg/kg 투여군에서 투여 1일째에 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데, 이 후부터는 정상적인 사료섭취가 관찰되었다. 상기한 사료섭취량의 감소는 수컷동물의 경우와 마찬가지로 투여 첫날째에만 보이고 그 후에 회복된 변화로서 수컷동물의 경우와 같이 처치 도중에 경험하는 스트레스에 기인한 것으로 사료된다. 또한 임신 및 포육기간 동안의 사료섭취량에 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 통계학적 유의성은 인정되지 않았다(Table 4).

수컷동물의 혈액학적 검사: 수컷동물의 혈액학적 검사시 600 mg/kg 투여군에서는 RBC, HGB, HCT 및 MCHC의 통계학적 유의한 감소와 WBC, MCV, MCH 및 RET의 통계학적 유의한 증가가 관찰되었고, 200 mg/kg 투여군에서는 RBC, HGB 및 HCT의 통계학적 유의한 감소와 MCV 및 MCH의 통계학적 유의한 증가가 발견되었다. 67 mg/kg 투여군에서는 RBC, HGB, HCT 및 MCHC의 통계학적 유의한 감소와 MCV 및 PLT의 통계학적 유의한 증가가 관찰되었고, 22 mg/kg 투여군에서는 HGB, HCT 및 MCHC의 통계학적 유의한 감소가 관찰되었다.

백혈구감별계산에서는 600 mg/kg 투여군에서 호중구(neutrophil), 림프구(lymphocyte) 및 단핵구(monocyte)가 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈다. 상기의 소견들 중에서 67 mg/kg 투여군에서 관찰된 PLT의 증가는 용량상관성이 결핍되어 시험물질과는 무관한 우발적 소견으로 사료되었고, 그 밖의 소견들은 시험물질의 영향으로 인정되었다(Table 5).

수컷동물의 혈액생화학적 검사: 수컷동물의 혈액생화학적 검사시 600 mg/kg 투여군에서는 AST, ALT, BUN, T-BIL, ALB, Ca 및 A/G비가 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈고, 200 mg/kg 투여군에서는 BUN 및 T-BIL의 통계학적 유의한 증가와 Na의 통계학적 유의한 감소가 관찰되었다. 그리고 22 및 67 mg/kg 투여군에서는 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다. 상기의 소견들 중에서 Na의 감소는 용량상관성이 결핍되어 시험물질과는 무관한 우발적 소견으로 판단되었고, 그 밖의 소견들은 시험물질의 영향으로 판단되었다(Table 6).

수컷동물의 부검소견: 수컷동물의 부검시 600 mg/kg 투여군에서는 비장종대(spleen: enlargement)가 10례 관찰되었고, 200 mg/kg 투여군에서는 비장종대가 6례, 고환위축(testis: atrophy)이 1례, 부고환위축이 1례, 그리고 좌측부고환미부결절(epididymis-left: tail, nodule)이 1례 발견되었다. 67 mg/kg 투여군에서는 특이소견이 관찰되지 않았고, 22 mg/kg 투여군에서는 좌측고환위축이 1례, 그리고 우측갑상선종대가 1례 나타났고, 매체대조군

Table 6. Serum biochemical values in the male rats treated with acetanilide during the pre-mating, mating periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
No. of male rats	12	12	12	12	12
Aspartate aminotransferase (IU/l)	129.7 ± 31.46	135.6 ± 34.53	149.9 ± 38.46	160.6 ± 34.42	178.2 ± 64.42*
Alanine aminotransferase (IU/l)	42.8 ± 4.99	42.0 ± 4.75	43.0 ± 6.52	48.4 ± 6.46	117.2 ± 127.28**
Alkaline phosphatase (IU/l)	344.7 ± 64.94	359.5 ± 56.64	365.2 ± 59.55	328.4 ± 86.05	321.3 ± 45.99
Glucose (mg/dl)	151.7 ± 19.77	143.3 ± 22.61	136.1 ± 16.95	144.8 ± 23.68	141.1 ± 21.85
Total Protein (g/dl)	6.00 ± 0.347	5.96 ± 0.220	5.92 ± 0.132	6.05 ± 0.283	6.13 ± 0.330
Albumin (g/dl)	4.09 ± 0.166	4.11 ± 0.136	4.16 ± 0.107	4.23 ± 0.150	4.39 ± 0.180**
Albumin/globulin ratio	2.18 ± 0.247	2.23 ± 0.224	2.38 ± 0.230	2.34 ± 0.187	2.56 ± 0.334**
Blood urea nitrogen (mg/dl)	15.9 ± 1.97	14.9 ± 1.80	15.9 ± 2.28	18.2 ± 2.27*	19.9 ± 2.01**
Creatinine (mg/dl)	0.56 ± 0.123	0.57 ± 0.087	0.65 ± 0.114	0.55 ± 0.122	0.62 ± 0.097
Total cholesterol (mg/dl)	50.3 ± 12.88	49.5 ± 12.71	49.6 ± 12.02	56.2 ± 17.89	57.5 ± 10.37
Total bilirubin (mg/dl)	0.07 ± 0.009	0.09 ± 0.021	0.09 ± 0.015	0.14 ± 0.035**	0.23 ± 0.070**
Triglyceride (mg/dl)	3.79 ± 11.32	38.3 ± 19.29	31.6 ± 15.71	30.8 ± 10.55	37.1 ± 12.25
Phospholipid (mg/dl)	111.2 ± 16.29	109.8 ± 17.04	109.8 ± 16.40	117.7 ± 21.88	126.4 ± 14.27
Calcium (mg/dl)	9.97 ± 0.430	9.83 ± 0.249	9.70 ± 0.384	9.97 ± 0.425	10.39 ± 0.228**
Inorganic phosphorus (mg/dl)	8.86 ± 1.254	8.67 ± 0.817	8.77 ± 0.698	8.93 ± 0.854	9.61 ± 0.853
Sodium (mmol/l)	143.1 ± 1.08	143.3 ± 1.37	142.6 ± 1.00	141.9 ± 1.24*	142.6 ± 0.79
Potassium (mmol/l)	4.85 ± 0.381	4.65 ± 0.303	4.84 ± 0.449	5.06 ± 0.624	4.96 ± 0.548
Chloride (mmol/l)	103.0 ± 1.65	103.8 ± 1.40	103.7 ± 1.15	102.8 ± 1.06	103.2 ± 1.03

Values are presented as mean ± SD.
*, ** Indicate a significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ compared with the control group, respectively.

Table 7. Organ weights in the male rats treated with acetanilide during the pre-mating, mating periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
No. of male rats	12	12	12	12	12
Body weight (g)	360.6 ± 23.76	378.6 ± 22.45	358.8 ± 17.08	361.6 ± 27.07	345.2 ± 24.90
Brain (g)	2.001 ± 0.0763	2.004 ± 0.0853	2.000 ± 0.1180	2.012 ± 0.0929	1.999 ± 0.0974
per body weight (%)	0.557 ± 0.0349	0.530 ± 0.0314	0.558 ± 0.0253	0.559 ± 0.0409	0.581 ± 0.0443
Liver (g)	9.894 ± 0.8652	10.132 ± 0.6404	10.008 ± 0.7431	10.602 ± 0.8883	11.551 ± 1.4288**
per body weight (%)	2.742 ± 0.0913	2.677 ± 0.1104	2.789 ± 0.1526	2.936 ± 0.1942*	3.339 ± 0.2289**
Spleen (g)	0.688 ± 0.0846	0.892 ± 0.1065	1.011 ± 0.1708*	1.655 ± 0.3538**	2.707 ± 0.4235**
per body weight (%)	0.191 ± 0.0180	0.235 ± 0.0220	0.282 ± 0.0445*	0.459 ± 0.1010**	0.785 ± 0.1159**
Heart (g)	1.294 ± 0.0931	1.329 ± 0.0660	1.259 ± 0.0747	1.248 ± 0.0882	1.313 ± 0.1061
per body weight (%)	0.360 ± 0.0263	0.352 ± 0.0204	0.351 ± 0.0226	0.346 ± 0.0177	0.381 ± 0.0205
Prostate (g)	0.583 ± 0.1265	0.522 ± 0.1019	0.494 ± 0.0970	0.481 ± 0.0902	0.504 ± 0.0844
per body weight (%)	0.162 ± 0.0316	0.138 ± 0.0271	0.138 ± 0.0288	0.134 ± 0.0260	0.146 ± 0.0207
Thymus (g)	0.393 ± 0.1160	0.435 ± 0.0770	0.375 ± 0.0821	0.360 ± 0.0707	0.326 ± 0.0709
per body weight (%)	0.109 ± 0.0338	0.115 ± 0.0178	0.104 ± 0.0220	0.100 ± 0.0197	0.095 ± 0.0205
Seminal vesicle (g)	1.596 ± 0.3293	1.518 ± 0.3194	1.437 ± 0.2638	1.426 ± 0.1894	1.332 ± 0.2775
per body weight (%)	0.442 ± 0.0878	0.403 ± 0.0856	0.402 ± 0.0804	0.395 ± 0.0481	0.385 ± 0.0671
Adrenal glands (g)	0.062 ± 0.0109	0.067 ± 0.0085	0.062 ± 0.0101	0.064 ± 0.0135	0.063 ± 0.0068
per body weight (%)	0.017 ± 0.0027	0.018 ± 0.0027	0.017 ± 0.0030	0.018 ± 0.0034	0.018 ± 0.0026
Kidneys (g)	2.565 ± 0.2193	2.765 ± 0.2392	2.612 ± 0.2693	2.706 ± 0.1953	2.769 ± 0.3467
per body weight (%)	0.713 ± 0.0597	0.733 ± 0.0759	0.728 ± 0.0667	0.751 ± 0.0568	0.801 ± 0.0665**
Testes (g)	3.156 ± 0.2683	3.115 ± 0.3174	3.090 ± 0.2376	3.022 ± 0.6945	3.114 ± 0.3477
per body weight (%)	0.878 ± 0.0934	0.826 ± 0.0968	0.863 ± 0.0707	0.838 ± 0.1925	0.903 ± 0.0912
Thyroid glands (g)	0.020 ± 0.0032	0.061 ± 0.1399	0.018 ± 0.0033	0.019 ± 0.0067	0.019 ± 0.0040
per body weight (%)	0.006 ± 0.0011	0.017 ± 0.0383	0.005 ± 0.0011	0.005 ± 0.0018	0.006 ± 0.0012
Epididymides (g)	1.173 ± 0.1025	1.156 ± 0.1216	1.152 ± 0.1197	1.086 ± 0.1886	1.129 ± 0.1276
per body weight (%)	0.326 ± 0.0326	0.306 ± 0.0347	0.322 ± 0.0343	0.301 ± 0.0510	0.328 ± 0.0343

Values are presented as mean ± SD.
*, ** Indicate a significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ compared with the control group, respectively.

에서는 우측신장의 신우확장(pelvis dilatation)이 1례 관찰되었다.

상기의 소견들 중에서 200 및 600 mg/kg 투여군에서 높은 빈도로 발견된 비장종대는 시험물질의 영향으로 인정되었고, 그 밖의 소견들은 발현율이 낮고 용량상관성이 결핍되어 시험물질과는 무관한 자연발생적 소견으로 사료되었다.

암컷동물의 부검소견: 암컷동물의 부검소견시 600 mg/kg 투여군에서는 비장종대가 10례, 흉선위축이 4례, 간장 우측엽결절(liver: right lobe, nodule), 백색난소(ovary: white discoloration), 부신의 암적색반점(adrenal gland: dark-red spot), 백색난소(ovary: white discoloration) 및 태반결절(uterus: placenta, nodule)이 각각 1례 관찰되었고, 200 mg/kg 투여군에서는 비장종대가 7례 발견되었다. 67 mg/kg 투여군에서는 비장종대가 2례, 흉선위축이 1례 관찰되었으며, 22 mg/kg 투여군에서는 이상소견이 나타나지 않았다.

상기의 소견들 중에서 200 및 600 mg/kg 투여군에서 관찰된 비장종대는 시험물질에 의한 변화로 사료되었고, 그 밖의 소견들은 발현율이 낮아서 시험물질의 영향으로는 판단되지 않았다.

수컷동물의 장기중량: 수컷동물의 부검시 측정한 주요 장기의 절대중량은 600 mg/kg 투여군의 간장과 67, 200 및 600 mg/kg 투여군의 비장이 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈고, 상대중량은 67 mg/kg 투여군의 비장, 600 mg/kg 투여군의 우측신장 그리고 200 및 600 mg/kg 투여군의 간장 및 비장이 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈다(Table 7).

상기의 소견들 중에서 200 mg/kg 투여군에서 나타난 간장 상대중량의 증가와 600 mg/kg 투여군에서 관찰된 우측신장 상대중량의 증가는 체중감소에 따른 상대적 증가로 사료되었고, 그 밖의 소견들은 모두 시험물질에 의한 변화로 사료되었다.

암컷동물의 장기중량: 암컷동물의 부검시 측정한 주요 장기의 절대중량은 200 및 600 mg/kg 투여군에서 흉선중량의 통계학적 유의한 감소가 관찰되었고, 600 mg/kg 투여군에서는 비장, 신장 및 난소 중량의 통계학적 유의한 증가가 발견되었다. 상대중량은 200 및 600 mg/kg 투여군에서 뇌 및 신장중량의 통계학적 유의한 증가가 관찰되었고, 600 mg/kg 투여군에서는 비장, 심장 및 난소 중량의 통계학적 유의한 증가와 흉선중량의 통계학적 유의한 감소가 나타났다.

상기의 소견들 중에서 200 mg/kg 투여군에서 관찰된 흉선의 절대중량의 감소는 상대중량이 정상범위에 속하여 시험물질에 기인한 독성학적 변화는 아니라고 판단되었고,

Table 8. Organ weights in the female rats treated with acetanilide during the pre-mating, gestation and early lactation periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
No. of female rats	11	12	12	10	7
Body weight (g)	349.2 ± 26.04	355.6 ± 17.48	348.9 ± 25.22	323.7 ± 22.10*	317.4 ± 22.75*
Brain (g)	1.971 ± 0.1065	1.971 ± 0.0599	1.957 ± 0.0729	1.961 ± 0.0899	1.988 ± 0.0943
per body weight (%)	0.566 ± 0.0234	0.556 ± 0.0310	0.564 ± 0.0482	0.607 ± 0.0340*	0.628 ± 0.0285**
Liver (g)	17.465 ± 1.5325	16.387 ± 2.2050	17.364 ± 2.3362	16.412 ± 0.9074	16.485 ± 6.7227
per body weight (%)	5.009 ± 0.3662	4.607 ± 0.5735	4.982 ± 0.6163	5.076 ± 0.1796	5.235 ± 2.0779
Spleen (g)	0.757 ± 0.0971	0.735 ± 0.1051	1.119 ± 0.1875	1.853 ± 0.3409	5.594 ± 7.4916**
per body weight (%)	0.217 ± 0.0289	0.207 ± 0.0279	0.321 ± 0.0516	0.572 ± 0.0950	1.706 ± 2.1812**
Heart (g)	1.230 ± 0.1315	1.226 ± 0.0646	1.236 ± 0.1249	1.206 ± 0.0766	1.352 ± 0.1556
per body weight (%)	0.352 ± 0.0290	0.345 ± 0.0153	0.355 ± 0.0321	0.374 ± 0.0252	0.426 ± 0.0393**
Uterus (g)	0.740 ± 0.1200	0.714 ± 0.1066	0.869 ± 0.1395	0.811 ± 0.1681	0.771 ± 0.2094
per body weight (%)	0.214 ± 0.0406	0.202 ± 0.0345	0.252 ± 0.0518	0.252 ± 0.0545	0.243 ± 0.0609
Thymus (g)	0.369 ± 0.1007	0.317 ± 0.0840	0.323 ± 0.1519	0.252 ± 0.0534*	0.139 ± 0.0254**
per body weight (%)	0.105 ± 0.0221	0.090 ± 0.0251	0.092 ± 0.0413	0.077 ± 0.0132	0.044 ± 0.0086**
Adrenal glands (g)	0.100 ± 0.0182	0.091 ± 0.0082	0.101 ± 0.0215	0.084 ± 0.0066	0.103 ± 0.0233
per body weight (%)	0.029 ± 0.0053	0.026 ± 0.0030	0.029 ± 0.0058	0.026 ± 0.0017	0.033 ± 0.0074
Kidneys (g)	2.575 ± 0.1898	2.578 ± 0.1759	2.726 ± 0.2451	2.653 ± 0.2231	2.920 ± 0.3698*
per body weight (%)	0.739 ± 0.0552	0.726 ± 0.0480	0.783 ± 0.0693	0.821 ± 0.0606*	0.919 ± 0.0812**
Ovaries (g)	0.122 ± 0.0236	0.112 ± 0.0114	0.135 ± 0.0194	0.116 ± 0.0151	0.166 ± 0.0541**
per body weight (%)	0.035 ± 0.0065	0.032 ± 0.0042	0.039 ± 0.0057	0.036 ± 0.0062	0.052 ± 0.0173**
Thyroid glands (g)	0.020 ± 0.0069	0.017 ± 0.0035	0.021 ± 0.0060	0.016 ± 0.0054	0.017 ± 0.0041
per body weight (%)	0.006 ± 0.0019	0.005 ± 0.0011	0.006 ± 0.0019	0.005 ± 0.0015	0.005 ± 0.0014

Values are presented as mean ± SD.
*, ** Indicate a significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ compared with the control group, respectively.

200 mg/kg 투여군의 뇌 및 신장 그리고 600 mg/kg 투여군의 뇌 및 심장의 상대중량의 증가는 체중감소에 따른 상대적 증가로 사료되었으며, 그 밖의 소견들은 시험물질의 영향으로 인정되었다(Table 8).

수컷동물의 조직병리학적 소견: 수컷동물의 조직병리학적 검사시 600 mg/kg 투여군에서는 비장의 적수과형성(spleen: hyperplasia/red pulp) 및 대퇴의 골수과형성(femur: hyperplasia/bone marrow)이 각각 12례, 간장의 골수외조혈(liver: extramedullary hematopoiesis)이 11례, 간장의 염증(liver: inflammation) 및 갑상선의 ultimobranchial cyst가 각각 1례 관찰되었고, 200 mg/kg 투여군에서는 비장의 적수과형성 및 대퇴의 골수과형성이 각각 12례, 간장의 골수외조혈이 9례, 고환위축 및 부고환의 무정자증(epididymis: aspermia)이 각각 1례 나타났다. 67 mg/kg 투여군에서는 비장의 적수과형성이 12례, 대퇴의 골수과형성이 8례, 간장의 골수외조혈이 4례, 그리고 간장의 염증이 1례 관찰되었고, 22 mg/kg 투여군에서는 비장의 적수과형성이 12례, 대퇴의 골수과형성이 7례, 간장의 골수외조혈, 고환위축(testis: atrophy) 및 갑상선의 염증(thyroid gland: inflammation)이 각각

Table 9. Histopathological findings of rats treated with acetanilide during the pre-mating, mating, gestation and early lactation periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
Male					
Liver					
Inflammation	1/12	0/12	1/12	0/12	1/12
Extramedullary hematopoiesis	0/12	1/12	4/12	9/12**	11/12**
Spleen					
Hyperplasia/red pulp	0/12	12/12**	12/12**	12/12**	12/12**
Thymus	0/12	0/0	0/0	0/0	0/12
Adrenal gland	0/12	0/0	0/0	0/0	0/12
Thyroid gland					
Ultimobranchial cyst	1/12	0/12	0/0	0/0	1/12
Inflammation	0/12	1/12	0/0	0/0	0/12
Femur					
Hyperplasia/bone marrow	0/12	7/12**	8/12**	12/12**	12/12**
Testis					
Atrophy	0/12	1/12	0/0	1/12	0/12
Epididymis					
Aspermia	0/12	0/0	0/0	1/12	0/12
Prostate	0/12	0/0	0/0	0/0	0/12
Seminal vesicle	0/12	0/0	0/0	0/0	0/12
Female					
Liver					
Centrilobular hypertrophy	0/11	1/12	0/11	0/10	0/7
Extramedullary hematopoiesis	1/11	1/12	4/11	7/10**	6/7**
Hyperplasia/bile duct	0/11	0/12	0/11	0/10	1/7
Spleen					
Hyperplasia/red pulp	0/11	10/12**	12/12**	10/10**	7/7**
Thymus					
Atrophy	211	1/12	5/12	7/10**	7/7**
Adrenal gland					
Vacuolation/Cortex	0/11	0/0	0/0	0/0	1/7
Thyroid gland					
Ultimobranchial cyst	1/11	0/0	0/0	0/0	1/7
Femur					
Hyperplasia/bone marrow	0/11	5/12*	11/11**	10/10**	7/7**
Pigmentation	0/11	1/12	0/11	0/10	0/7
Ovary					
Hyperplasia/corpurs luteum	0/11	0/12	0/11	2/10	5/7
Uterus	0/11	0/0	0/0	0/0	0/7
Vagina	0/11	0/0	0/0	0/0	0/7
Mammary gland	0/11	0/0	0/0	0/0	0/7

*, ** Indicate a significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ compared with the control group, respectively.

1례 발견되었으며, 매체대조군에서는 신장의 수신증(hydronephrosis), 간장의 염증 및 갑상선의 ultimobranchial cyst가 각각 1례 관찰되었다.

상기의 소견들 중에서 모든 투여군에서 관찰된 비장의 적수과형성 및 대퇴의 골수과형성과 200 및 600 mg/kg 투여군에서 발견된 간장의 골수외조혈은 시험물질의 영향으로 인정되었고, 그 밖의 소견들은 발현률이 낮고 용량상관성이 결핍되어 자연발생적 또는 우발적 소견으로 사료되었다(Table 9).

암컷동물의 조직병리학적 소견: 암컷동물의 조직병리학적 검사시 600 mg/kg 투여군에서는 비장의 적수과형성, 대퇴의 골수과형성 및 흉선위축이 각각 7례, 간장의 골수외조혈이 6례, 난소의 황체비대(ovary: hyperplasia/corpus luteum)가 5례, 그리고 부신피질의 공포화(adrenal gland: vacuolation/cortex), 갑상선의 ultimobranchial cyst 및 간장의 담관증생(liver: hyperplasia/bile duct)이 각각 1례 관찰되었고, 200 mg/kg 투여군에서는 비장의 적수과형성 및 대퇴의 골수과형성이 각각 10례, 간장의 골수외조혈 및 흉선위축이 각각 7례, 그리고 난소의 황체비대가 5례 나타났다. 67 mg/kg 투여군에서는 비장의 적수과형성이 12례, 대퇴의 골수과형성이 11례, 흉선위축이 5례, 그리고 간장의 골수외조혈이 4례 관찰되었고, 22 mg/kg 투여군에서는 비장의 적수과형성이 10례, 대퇴의 골수과형성이 5례, 간장의 골수외조혈, 흉선위축, 대퇴의 색소침착(femur: pigmentation) 및 간장의 소엽중심성비대(liver: centrilobular hypertrophy)가 각각 1례 발견되었으며, 매체대조군에서는 흉선위축이 2례, 그리고 간장의 골수외조혈 및 갑상선의 ultimobranchial cyst가 각각 1례 관찰되었다(Table 9).

상기의 소견들 중에서 모든 투여군에서 관찰된 비장의 적수과형성 및 대퇴의 골수과형성, 200 및 600 mg/kg 투여군에서 발견된 간장의 골수외조혈 및 흉선위축 그리고 난소의 황체비대는 시험물질의 영향으로 판단되었고, 그 밖의 소견들은 발현률이 낮고 용량상관성이 결핍되어 우발적인 소견으로 사료되었다.

생식독성학적 영향:

교배소요시간: 교배 후 교미확인되기까지 걸린 시간은 모든 투여군에서 매체대조군과 비교할 때에 통계학적 유의성을 나타내지 않았다(Table 10).

교배성적: 교미율, 수태율 및 임신율은 모든 투여군에서 매체대조군과 비교할 때에 통계학적 유의성을 나타내지 않았다(Table 11).

출산시 소견, 포육기간중의 생존율 및 체중: 모동물의 임신기간, 황체수, 착상수 및 생존자의 성비에 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 통계학적 유의차는 인정되지 않았다. 200 mg/kg 투여군에서 생후 4일째 암수동물의 체중은 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈고, 600 mg/kg 투여군에서는 생후 0일 및 4일째 암수동물의 체중과 F1 동물의 생후 4일째 생존율

Table 10. Precoital time of parent animals treated with acetanilide during the pre-mating periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
No. of females paired	12	12	12	12	12
No. of females	12	12	12	11	11
mated Days (Mean ± S.D.)	2.8 ± 3.04	2.6 ± 1.16	2.6 ± 2.47	2.9 ± 1.22	2.1 ± 0.94

Precoital time = No. of days taken to mate.

Table 11. Fertility data of parent animals treated with acetanilide during the pre-mating periods

Parameter	Dose (mg/kg)				
	0	22	67	200	600
Male					
No. of mated rats	12	12	12	12	12
Copulation index[a] (%)	12/12(100)	12/12(100)	12/12(100)	11/12/(92)	11/12(92)
Fertility index[b] (%)	11/12(92)	12/12(100)	12/12(100)	10/11/(91)	11/11(100)
Female					
No. of mated rats	12	12	12	12	12
Copulation index[a] (%)	12/12(100)	12/12(100)	12/12(100)	11/12/(92)	11/12(92)
Pregnancy index[c] (%)	11/12(92)	12/12(100)	12/12(100)	10/11/(91)	11/11(100)

[a]No. of animals with successful copulation/No. of mated animals.
[b]No. of impregnating animals/No. of animals with successful copulation.
[c]No. of pregnant animals/No. of animals with successful copulation.

Table 12. Reproductive and littering findings of dams treated with acetanilide during the pre-mating, gestation and early lactation periods

Parameter		Dose (mg/kg)				
		0	22	67	200	600
No. of dams		11	12	12	10	8
No. of corpora lutea		17.8 ± 1.25	14.0 ± 4.97	17.0 ± 2.34	15.6 ± 2.59	17.8 ± 1.98
No. of implantations		15.5 ± 3.05	13.7 ± 5.05	15.8 ± 1.91	14.7 ± 2.58	17.0 ± 1.07
No. of perinatal deaths		2	0	3	3	11*
% to implantation		1.1 ± 2.48	0	1.7 ± 3.11	1.9 ± 4.22	8.1 ± 9.86*
Litter size at birth		14.5 ± 2.84	13.3 ± 5.26	14.9 ± 1.88	13.7 ± 2.75	13.5 ± 2.73
Male		80	72	92	68	47
Female		80	88	87	69	61
% to implantation		93.9 ± 6.50	95.0 ± 9.90	94.8 ± 5.61	93.0 ± 6.82	79.6 ± 16.2
No. of neonates with clinical signs (%)		0	0	0	0	10(9.3)**[1]
Pregnancy period (day)		21.6 ± 0.30	21.8 ± 0.44	21.7 ± 0.26	21.8 ± 0.35	19.9 ± 7.26
Viability index[a]		98.3 ± 2.89	90.0 ± 28.5	97.9 ± 4.11	98.6 ± 2.91	65.1 ± 41.12*
Body weights of pups (g)						
Male	0 Day	7.2 ± 0.78	7.2 ± 0.43	7.0 ± 0.55	6.4 ± 0.77	5.7 ± 0.84**
	4 Day	11.7 ± 1.45	11.7 ± 0.94	11.1 ± 1.18	9.9 ± 1.34**	9.1 ± 0.54**
Female	0 Day	6.8 ± 0.81	6.9 ± 0.71	6.5 ± 0.37	6.0 ± 0.73	5.2 ± 0.66**
	4 Day	11.1 ± 1.68	10.5 ± 1.08	10.5 ± 1.14	9.3 ± 1.30*	8.7 ± 0.86*

Values are presented as mean ± SD.
[a](No. of live offspring at day 4/No. of live offspring at birth) × 100
[1]Icterus, Cyanosis.
*, ** Indicate a significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ compared with the control group, respectively.

이 통계학적으로 유의성있는 감소를 보였으며, 사산자수는 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈는데, 이들은 모두 시험물질의 영향으로 인정되었다. 출생일의 생존자 관찰시 600 mg/kg 투여군에서 청색증(cyanosis), 황달(icterus) 등의 일반증상이 비교적 높은 빈도로 관찰되었는데, 이는 시험물질에 의한 변화로 판단되었다. 그리고 생후 4일령 F1 동물의 도살전 외표관찰시 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다(Table 12).

고 찰

시험물질 acetanilide는 의약품과 염료의 합성을 위한 중간체로서 사용되는 화학물질이다. 본 화학물질의 독성작용을 살펴보면 acetanilide는 aniline으로 대사된 후 메트헤모글린 빈혈증(methemoglobinemia)을 일으키고, 그 결과 용혈성빈혈(hemolytic anemia)이 야기되며, 임상적으로는 청색증을 나타낸다고 한다(이창업, 1993).

Acetanilide의 독성을 살펴보면 급성독성은 마우스, 쥐, 기니픽등 여러 종류의 실험동물에서 조사되었고, LD_{50}의 범위는 동물 종에 따라 다르며, 경구로는 886~2033 mg/kg, 복강으로는 500~715 mg/kg이었다(Thienes and Haley, 1972). Acetanilide에 대한 인체 노출은 접촉, 흡입, 섭취에 의하여 피부의 습진을 유발하였고(Sax, 1979), 시력상실과 반팽창된 비반응성 동공을 가져왔다(Grant, 1974). 따라서 acetanilide는 안구 자극제로 간주되어야 한다. 대부분의 동물실험에서 관찰된 acetanilide의 반복투여독성은 methemoglobin과 sulfhemoglobin의 생성 그리고 빈혈이었다(Patty, 1963). 유전독성시험에서 acetanilide는 Salmonella typhimurium TA 97, 98, 100, 1535 & 1538 균주에서 대사활성화가 있든 없든 돌연변이 유발성이 없는 것으로 나타났다(Zeiger *et al.*, 1988). Acetanilide의 생식독성에 관해서는 아직 보고된 바가 없다.

이러한 acetanilide를 0, 22, 67, 200 및 600 mg/kg의 용량으로 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 수컷동물은 교배 2주일 전부터 교배기간 종료시까지, 암컷동물은 교배 2주일 전부터 교배기간, 임신기간, 그리고 포육 3일째까지 경구투여하여 반복투여독성 및 번식/발생독성을 조사하였다.

암수동물의 일반증상관찰시 수컷 600 mg/kg 투여군에서 관찰된 자발운동저하, 적색유루, 유연 및 청색증, 200 mg/kg 투여군에서 나타난 자발운동저하 및 유연, 67 mg/kg 투여군에서 관찰된 유연과 암컷 600 mg/kg 투여군에서 발견된 자발운동저하 및 청색증은 시험물질 acetanilide의 투여에 기인한 특이한 독성증상으로서 600 mg/kg 투여군의 경우 투여당일에는 투여후 약 2시간 동안 지속되었으나 다음 날부터는 빨리 회복되는 경향을 나타냈다. 암컷 600 mg/kg 투여군에서 발견된 사망동물중 3례는 임신말기에, 1례는 포육초에 발견되었는데, 정확한

사망원인을 규명할 수는 없었으나 출산 전후에 사망한 것으로 미루어 볼 때에 난산의 결과 초래된 것으로 판단된다.

암수동물의 체중에 있어서 암컷 600 mg/kg 투여군에서 포육 0일 및 4일째에 관찰된 체중의 감소는 투여용량의 증가에 따라 용량의존적으로 감소한 것으로 보아 시험물질에 기인한 모동물의 청색증 등의 부작용의 결과로서 나타난 것으로 추정된다. 암수 동물의 사료섭취량 측정시 암수 67, 200 및 600 mg/kg 투여군에서 투여 1일째에 발견된 사료섭취량의 감소는 투여스트레스에 의한 식욕부진 등의 결과로서 판단된다.

수컷동물의 혈액검사시 발견된 RBC, HGB, HCT 및 MCHC의 감소(22, 67, 200 및 600 mg/kg 투여군)와 MCV, MCH 및 RET의 증가(200 및 600 mg/kg 투여군)는 모두 빈혈(anemia)을 나타내는 지표로서 시험물질 acetanilide에 의해 빈혈이 유발된 것을 시사하며, 이는 비장, 골수, 간장에서 나타난 조혈기능관련 병변들과 일치한다. 메트헤모글로빈은 acetanilide를 1000 mg/kg 이상의 고용량으로 장기간 투여할 경우 혈액검사시 검출이 가능하다고 한다(Smith, 1940). 본 시험에서는 최고용량군인 600 mg/kg 투여군에서도 혈중 메트헤모글로빈의 증가는 관찰되지 않았다. 한편 백혈구감별계산에서 발견된 호중구, 림프구 및 단핵구의 증가는 조직병리학적 관찰시 나타난 간장의 염증과 관련된 것으로 사료된다.

혈액생화학적 검사 결과, 200 및 600 mg/kg 투여군에서 AST, ALT, ALB, A/G비, 총빌리루빈 등의 수치들이 증가하였다. AST 및 ALT는 간세포안에 들어있는 효소로서 간세포가 파괴되거나 손상을 받으면 혈중농도가 증가하는데, 이는 조직병리학적 검사시 나타난 간장의 염증과 관련된 소견으로 판단된다. 헤모글로빈의 체내 대사산물인 빌리루빈의 증가는 빈혈 소견으로서 적혈구 사멸이 활발히 일어난 것을 시사하며, 이로 인하여 조직병리학적 검사시 간장의 골수외조혈이 관찰된 것으로 사료된다. BUN, 칼슘 등의 증가는 운동실조 등과 관련있는 생리적 변화로 추정되지만 이와 관련된 조직병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

암수동물의 조직병리학적 검사시 모든 투여군에서 관찰된 비장의 적수과형성과 대퇴의 골수과형성 그리고 200 및 600 mg/kg 투여군에서 발견된 간장의 골수외조혈은 모두 빈혈이 있을 때 나타나는 조직학적 변화의 일부로 판단되었고, 암컷 200 및 600 mg/kg 투여군에서 나타난 흉선위축은 시험물질에 의한 면역계의 영향의 결과로 나타난 2차적 변화로 사료된다.

교배소요시간, 교미율, 수태율 및 임신율에 있어서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 그런데 acetanilide의 랫드 번식시험은 수행되지 않아서 교배성적은 아직 보고된 바가 없으며, 마우스를 이용한 acetanilide의 사료혼합투여 다세대 시험에서는 3~4대째에 현저한 생존율의 감소가 나타났다고 한다(Wright, 1967).

출산 및 포육기간중의 검사시 200 mg/kg 투여군에서 관찰된 생후 4일째 암수동물의 체중감소와 600 mg/kg 투여군에서 나타난 생후 0일 및 4일째 암수동물의 체중 및 생후 4일째 생존율의 감소 그리고 사산자수의 증가는 시험물질의 투여에 기인한 모독성과 시험물질의 태반통과 또는 수유에 따른 직접적인 신생자 독성에 기인한 것으로 판단된다. 또한 출생자의 외표관찰시 발견된 청색증, 황달 등의 일반증상 발현율의 증가는 acetanilide의 투여에 기인한 메트헤모글로빈 빈혈증의 결과로 사료된다.

본 시험과는 별도로 수컷동물을 이용하여 67, 200 및 600 mg/kg의 용량으로 독성동태시험을 실시한 결과, 시험물질 acetanilide의 대사물질인 aniline을 분리할 수 있었고, 초회 투여시에 비해 반복투여에 따른 혈중농도 변화도 크게 인정되지 않아 반복투여에 따른 체내 축적성의 가능성은 적을 것으로 판단된다.

본 시험의 경우 모든 투여군에서 관찰된 HGB, HCT 및 MCHC의 감소와 비장의 적수과형성 및 대퇴의 골수과형성은 생체기능장애 유발과는 무관한 시험물질 특유의 생리활성작용으로 평가되며 독성작용의 표출로는 판단되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 반복투여독성 및 번식/발생독성 병행시험에서 일반 독성학적 NOAEL은 <22 mg/kg, LOAEL은 22 mg/kg 그리고 생식독성학적 NOAEL은 67 mg/kg으로 판단된다.

참고문헌

국립환경연구원 (2001). 국내 화학물질 유통량 조사 현황

이창업 (1993). 수의독성학 pp.133-135, 서울대학교 출판부.

환경부 (2000). 유해화학물질관리 기본계획, pp. 53-73.

Clayton, G.D. and Clayton, F.E. (1982). Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, Volume 2A, 2B, 2C, Toxicology (3rd ed.) New York, John Wiley Sons, p. 2416. 1981-1982.

Grant, W.M. (1974). Toxicology of the eye. 2nd ed. Springfield, Illnois: Chales C. Thomas, p. 76.

OECD Secretariat (2002). Manual for investigation of HPV Chemicals.

Patty, F. (1963). Industrial Hygiene and Toxicology, Volume II, Toxicology. (2nd ed.) New York; Interscience Publishers, pp. 1835-1836.

Sax, N.I. (1979). Dangerous properties of industrial materials. 5th ed. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 333.

Smith, P.K. (1940). Changes in blood pigments associated with the prolonged administration of large doses of acetanilide and related compounds. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **70**, 171-178.

Thienes, C. and Haley, T.J. (1972). Clinical Toxicology. 5th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, p. 80.

Wright, H.N. (1967). Chronic toxicity studies of analgesic and antipyretic drugs and congeners. *Tox. Appl. Pharm.*, **11**, 280-292.

Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1988). Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 1-158.