



랫드에서 초산 제3부틸의 최기형성 시험

안태환¹ · 양영수¹ · 이종찬¹ · 강성수¹ · 배춘식¹ · 김성호¹ · 김종춘¹ · 김현영² · 정용현²

¹전남대학교 수의과대학, ²산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터

Teratogenicity Study of *tert*-Butyl Acetate in Rats

Tai-Hwan Ahn¹, Young-Su Yang¹, Jong-Chan Lee¹, Seong-Soo Kang¹, Chun-Sik Bae¹,
Sung-Ho Kim¹, Jong-Choon Kim¹, Hyeon-Yeong Kim² and Yong-Hyun Chung²

¹College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju

²Chemical Safety & Health Research Center, Occupational Safety & Health Research Institute, Daejeon, Korea

Received April 12, 2007; Accepted May 19, 2007

tert-Butyl acetate is an organic solvent used for coatings, industrial cleaning, and surface treatment applications. This study investigated the potential adverse effects of *tert*-butyl acetate on pregnant dams and embryo-fetal development after maternal exposure on gestational days 6 through 19 in rats. The test chemical was administered to pregnant rats by gavage at dose levels of 0, 500, 1,000, 1,500, and 2,000 mg/kg/day. All dams were subjected to a caesarean section on day 20 of gestation and their fetuses were examined for any external, visceral, and skeletal abnormalities. At 2,000 mg/kg, treatment-related clinical signs, including piloerection, abnormal gait, decreased locomotor activity, loss of fur, reddish tear, anorexia, nasal discharge, vocalization and coma, were observed in a dose-dependent manner. All dams died between the 2nd day and 5th day of treatment due to a severe systemic toxicity. At 1,500 mg/kg, minimal maternal toxicity including an increase in the incidence of decreased locomotor activity and loss of fur, and an increase in the weights of adrenal glands and liver was observed. On the contrary, no significant adverse effect on the embryo-fetal development was detected. There were no adverse effects on either pregnant dams or embryo-fetal development at <1,000 mg/kg. These results show that a 14-day repeated oral dose of *tert*-butyl acetate in rats caused a minimal maternal toxicity including increases in the incidence of clinical signs and the weights of adrenal glands and liver, but no embryotoxicity and teratogenicity at 1,500 mg/kg/day. Under these experimental conditions, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of *tert*-butyl acetate is estimated to be 1,000 mg/kg per day for dams and 1,500 mg/kg per day for embryo-fetal development.

Key words: *tert*-Butyl acetate, Industrial chemical, Developmental toxicity, Maternal toxicity, Rats.

서 론

초산 제3부틸(*tert*-butyl acetate, CAS NO., 540-88-5)은 코팅제와 산업 세정제 및 표면처리제로 주로 사용되며, 의약품이나 조미료, 기타 유기화합물의 제조과정에서도 사용되는 산업용 유기용매로써 C₆H₁₂O₂의 화학구조(분자

량 116)와 과일향기를 갖는 무색 액체이다. 사람에서의 주요 노출경로는 흡입과 경구, 피부/안구 접촉으로써 노출 시 소양증과 안구염증, 상부기도의 자극, 두통, 피사, 피부염 등을 초래하게 된다. 흡입노출 시 200~300 ppm의 노출농도에서 코와 눈에 약한 자극을 유발하며, 3,300 ppm 농도에서는 단기노출에도 심한 자극성을 나타낸다고 한다(HSDB, 2006). 노출근로자의 안구와 호흡기계 자극성에 기초하여 미국 산업안전보건청(OSHA)에서는 8시간 가중 허용노출한계(Permissible Exposure Limit, PEL)와 작업장 허용농도(Threshold Limit Value, TLV)를 200 ppm

Correspondence to: Yong-Hyun Chung, Chemical Safety & Health Research Center, Occupational Safety & Health Research Institute, Daejeon, Korea
E-mail: ch935@kosha.net; toxkim@chonnam.ac.kr

(950 mg/m³)으로 설정하고 있다. 그러나 본 물질의 노출과 관련하여 산업근로자가 아닌 일반집단을 보호하기 위한 표준치는 설정되어 있지 않다.

본 물질에 대한 독성정보는 급성독성과 유전독성, 국소 자극성 등에 대해서 제한적으로 알려져 있을 뿐 반복노출에 의한 독성영향에 대해서는 아직까지 조사된 바가 없다 (Budroe et al., 2004). 급성독성 시험에서 고농도로 흡입 노출시 폐 충혈과 출혈 및 중추신경계 증상을 나타내며, 105 ppm(500 mg/m³)은 저독성 용량으로 나타났다(Industrial Biotest Laboratories Inc., 1958). 반면 또 다른 급성독성시험에서는 4시간 흡입노출 반수치사량이 470 ppm(2,230 mg/m³) 이상으로 확인되었다(Stillmeadow Inc., 1997). 본 물질은 산화적 DNA 손상에 감수성이 높은 살모넬라 균주와 사람 HL-60 백혈병 세포를 이용한 시험에서 유전독성물질로 밝혀졌다. 독성동태 시험에 따르면, 초산 제3부틸은 랫드에서 부탄올(*tert*-butanol)로 대사되며 (Girkin and Kirkpatrick, 2000), 흡입된 초산 제3부틸과 대사체는 노출기간 중에 혈액에 축적된다고 한다(Groth and Freundt, 1994). 랫드와 마우스를 이용한 발암성 시험에서 부탄올은 암을 유발하는 것으로 보고된 바 있다 (Budroe et al., 2004). 본 물질이 DNA에 손상을 주는 유전독성물질이고, 대사체가 발암성을 나타내는 점을 감안해 보면 세포분열이 활발한 배·태아나 생식장기가 노출될 경우 심각한 생식·발생독성을 유발할 가능성이 높다. 그러나 아직까지 초산 제3부틸이 생식·발생에 어떠한 부작용을 초래하는지에 관해서는 연구된 바가 없다. 따라서 산업현장과 일상생활에서 생산량과 노출량이 많은 초산 제3부틸의 노출기준과 잠재적 독성영향을 규명하기 위해서는 신뢰성 있는 생식·발생독성의 평가가 시급히 요구된다.

본 연구는 초산 제3부틸의 최기형성을 평가하기 위해 임신 랫드에게 시험물질을 경구투여하여 임신모체에 미치는 모독성과 착상과 배·태아의 발생에 미치는 발생독성을 조사하고, 확실중독량(absolute toxic dose)과 무해용량(no-observed-adverse-effect level)을 산출하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경. 본 시험에서는 특정병원체무재(specific pathogen-free) Sprague-Dawley 랫드를 확인 실험동물연구센터(나주)로부터 구입하여 사용하였다. 6주령의 수컷과 5주령의 미경산 암컷을 입수한 후 5주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판단된 것을 선발하여 시험에 공시하였다. 암수 2:1로 동일한 사육상자에 하룻밤 동거교배 시킨 다음 익일 오전에 질전(vaginal plug)과 질도말에서 정자가 확인된 동물을 교배가 성립된

것으로 판정하였다. 임신동물의 경우 교배가 확인된 날을 임신 0일로 정하였으며, 임신의 최종판정은 제왕절개 시 자궁의 착상흔적에 따랐다. 동물실의 사육환경은 온도 23 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 조명시간 12시간(오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 200~300 lux로 설정된 시설에서 수행하였다. 시험기간 중 실험동물용 고품사료(삼양사료, 원주)와 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험에 사용된 모든 동물은 미국 National Research Council의 "실험동물의 관리와 사용에 관한 지침"에 따라 유지하였다.

시험물질 및 처치. 시험물질 초산 제3부틸(CAS NO. 540-88-5)은 Sigma-Aldrich 사에서 구입하여 사용하였으며, 매일 투여직전에 각 투여용량에 맞게 corn oil에 희석하여 조제하였다. 시험물질의 투여는 경구투여용 주사침(sonde)과 주사기를 이용하여 임신 6일부터 19일까지 14일간 1일 1회씩 반복 경구투여 하였다. 랫드 최기형성 시험에서의 시험물질의 투여는 주요 기관형성기인 임신 6일에서 15일을 추천하고 있으나 최근에는 임신 후반기의 노출에 의한 영향을 평가하기 위해 분만전일까지 투여하는 것을 권장하고 있다(OECD, 2001). 투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 하여 계산(5 ml/kg)하였으며, 부형제대조군 동물은 시험물질을 희석할 때에 사용한 corn oil만을 투여하였다.

시험군의 구성. 교배가 확인된 건강한 암컷 랫드를 선발하여 체중을 측정된 다음 부형제대조군과 초산 제3부틸 500, 1,000, 1,500 및 2,000 mg/kg/day의 5개 시험군에 10마리씩 체중이 균등히 분배되도록 체중순위에 따라 무작위로 군분리 하였다.

용량설정 근거. 375, 750, 1,500 및 3,000 mg/kg 용량으로 예비시험을 실시한 결과, 3,000 mg/kg 용량에서는 심한 전신독성영향으로 투여당일에 모든 임신동물이 사망하였다. 반면, 1,500 mg/kg 용량에서는 모동물의 체중증가억제 경향과 사료섭취량의 감소 등 경미한 모독성이 인정되었다. 이 결과를 근거로 하여 명백한 독성용량으로 예상되는 2,000 mg/kg/day을 최고용량으로 설정하였고, 용량상관성을 관찰하기 위해 공비 2를 적용하여 중용량 및 저용량군과 부형제대조군을 추가하였다.

일반증상 관찰. 시험기간 중 1일 1회씩 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 대해서 관찰하였고, 일반증상이 관찰된 동물에 대해서는 투여전후로 1일 2회씩 관찰하였다.

체중측정. 모든 임신동물에 대해서 임신 0, 6, 9, 12, 15 및 20일째에 개체별로 체중을 측정하였다.

사료섭취량 측정. 모든 임신동물에 대하여 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하여 일일 마리당 평균 섭취량을 산출하였다. 단, 임신 20일의 경우에는 제왕절개로 인하여 임신 19일째에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다.

부검 및 장기중량 측정. 각 군의 모든 생존동물을 임신 20일째에 에테르로 마취한 후 방혈치사 시켜 부검하였다. 체표와 두부, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 이상유무를 관찰한 다음 간장, 비장, 신장, 심장, 흉선, 부신 및 난소를 적출하여 전자저울을 이용하여 습중량을 측정하였다. 각 장기의 상대중량은 부검 시 체중에 대한 비율(organ-to-body weight ratio, %)로 산출하였다.

제왕절개. 각 군의 모든 임신동물들을 임신 20일째에 제왕절개하여 자궁과 난소를 적출한 다음 임신자궁중량, 임신황체수, 착상수, 생존태아수, 흡수배아수 및 사망태아수를 조사하였다. 흡수배아의 경우 태반조직만 보일 경우에는 초기흡수(early resorption)로 하였고, 태반 및 태아의 근조적이 관찰될 경우에는 후기흡수(late resorption)로 분류하였다. 배아가 착상초기에 흡수 또는 사망하여 착상부위를 관찰하기 어려운 경우에는 착상부위를 명확히 구분하기 위해 2% NaOH 용액에서 1시간 동안 침적한 다음 황색 또는 황갈색의 착상흔을 계수하였다(Yamada *et al.*, 1998). 생존태아와 태반은 개체별로 중량을 측정하였고, 이 때 태아의 성별을 확인하였다.

통계학적 분석. 시험결과는 가능한 한 평균값과 표준편차로 표기하였고, 통계학적 비교단위는 임신된 모동물 또는 동복자로 하였다. 모동물의 체중과 사료섭취량, 장기중량, 태아체중 등의 모수적 자료는 일원배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 한 다음, 군간 차이가 인정되면 Scheffe 다중비교법(1953)으로 유의차를 분석하였다. 임신황체수와 착상수, 생존 및 사망태아수 등의 비모수적 자료는 Kruskal-Wallis ANOVA(1952)를 한 다음, 군간 차이가 인정되면 Scheffe 다중비교법으로 분석하였다. 태아의 성비와 외표, 내장 및 골격기형 등의 빈도수를 나타내는 자료는 Fisher exact probability test(1995)로 유의차를 조사하였다. 모든 통계분석은 GraphPad InStat v. 3.0(GraphPad Software, Inc., CA, USA)을 이용하여 대조군과 투여군 결과의 통계학적 차이를 분석하였다. 통계학적 유의수준은 5% 및 1%에서 검정하였다.

Table 1. Clinical findings of pregnant rats treated with *tert*-butyl acetate during gestational days 6 through 19

Parameters	<i>tert</i> -Butyl acetate (mg/kg/day)				
	0	500	1,000	1,500	2,000
No. of dams examined	10	9	9	10	10
No. of dams with clinical signs ^a	1	1	2	4	10
Piloerection	0	0	0	0	4
Abnormal gait	0	0	0	0	8
Decreased locomotor activity	0	0	0	2	7
Reddish tear	0	0	0	0	2
Loss of fur	1	1	1	2	4
Anorexia	0	0	1	1	8
Nasal hemorrhage	0	0	0	1	3
Vocalization	0	0	0	0	2
Coma	0	0	0	0	8
Found dead	0	0	0	0	10

^aA single dam may be represented more than once in listing individual signs.

결 과

일반증상. 시험물질의 투여에 의해 다양한 일반증상들이 관찰되었으며, 빈도 및 정도가 용량의존적으로 증가하였다(Table 1). 시험물질의 투여에 기인된 주요 증상으로는 입모(piloerection)와 적색유루(reddish tear), 탈모(loss of fur), 운동성 감소(decreased locomotor activity), 보행이상(abnormal gait), 식욕결핍(anorexia), 비출혈(nasal hemorrhage), 이상발성(vocalization), 혼수상태(coma) 및 사망이 나타났다. 2,000 mg/kg 투여군에서는 상기 소견들이 투여개시일부터 관찰되기 시작하였으며, 전신적인 독성영향이 심하여 투여개시 후 2일째부터 5일째 사이에 모든 동물이 사망하였다. 1,500 mg/kg 투여군의 동물에서는 운동성 감소와 탈모 증상이 투여 초반기에 일시적으로 관찰되다가 임신 중기부터는 회복되어 관찰되지 않았다. 반면 1,000 mg/kg 이하 투여군에서는 시험물질의 투여와 관련된 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았다.

체중. 임신기간 중 모동물의 체중을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 2,000 mg/kg 투여군에서는 임신 9일째의 체중이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 1,500 mg/kg 투여군에서는 시험물질 투여기간 동안의 증체량과 부검 시 모동물 체중에서 임신자궁중량을 제한 모동물의 보정중량이 대조군에 비해 각각 다소 감소하였으나 통계학적으로 유의성은 인정되지 않았다.

사료섭취량. 임신기간 중 모동물의 사료섭취량을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 2,000 mg/kg 투여군에서 임신 9일째의 섭취량이 대조군에 비해 통계학적으로

Table 2. Body weight of the pregnant rats treated with *tert*-butyl acetate during gestational days 6 through 19

Parameters	<i>tert</i> -Butyl acetate (mg/kg/day)				
	0	500	1,000	1,500	2,000
No. of pregnant rats	10	9	9	10	10
Gestational day 0	249.3 ± 19.44 ^a	246.3 ± 17.76	243.1 ± 17.02	248.5 ± 14.02	247.7 ± 17.70
Gestational day 6	276.9 ± 22.48	277.7 ± 21.63	272.3 ± 20.15	280.2 ± 14.13	278.1 ± 15.25
Gestational day 9	286.0 ± 21.58	285.9 ± 20.02	277.8 ± 21.58	281.9 ± 12.05	260.2 ± 17.29 ^{a,c}
Gestational day 12	307.4 ± 26.31	311.0 ± 22.81	295.8 ± 23.54	298.1 ± 12.39	-
Gestational day 15	327.8 ± 29.93	328.8 ± 23.92	312.3 ± 23.94	316.8 ± 12.45	-
Gestational day 20	399.9 ± 34.71	400.5 ± 30.05	377.1 ± 39.84	383.1 ± 11.65	-
Body weight gain during treatment period	122.9 ± 13.35	122.8 ± 14.30	104.9 ± 24.24	102.9 ± 10.26	-
Corrected body weight ^b	314.4 ± 25.05	314.4 ± 20.50	299.8 ± 30.17	298.8 ± 10.08	-
Gravid uterine weight	85.5 ± 11.08	86.1 ± 18.15	77.4 ± 23.59	84.3 ± 2.21	-

^aValues are presented as means ± S.D. (g).

^bBody weight on gestational day 20 - gravid uterine weight.

^cSeven females were excluded due to deaths.

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

Table 3. Food consumption of the pregnant rats treated with *tert*-butyl acetate during gestational days 6 through 19

Parameters	<i>tert</i> -Butyl acetate (mg/kg/day)				
	0	500	1,000	1,500	2,000
No. of pregnant rats	10	9	9	10	10
Gestational day 0	14.8 ± 5.01 ^a	15.1 ± 4.21	14.5 ± 3.36	13.9 ± 3.14	13.8 ± 4.04
Gestational day 6	18.7 ± 5.16	19.4 ± 5.20	18.0 ± 6.32	17.2 ± 4.59	16.5 ± 4.23
Gestational day 9	21.3 ± 5.21	23.2 ± 5.37	17.4 ± 3.06	16.6 ± 3.02	8.2 ± 6.02 ^{a,b}
Gestational day 12	24.5 ± 5.33	25.8 ± 3.07	23.6 ± 6.13	23.8 ± 8.88	-
Gestational day 15	23.5 ± 7.08	25.8 ± 3.07	24.6 ± 3.51	24.3 ± 3.93	-
Gestational day 19	23.2 ± 6.78	25.0 ± 3.05	24.9 ± 5.70	26.6 ± 2.14	-

^aValues are presented as means ± S.D. (g).

^bSeven females were excluded due to deaths.

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

Table 4. Organ weights of dams treated with *tert*-butyl acetate during gestational days 6 through 19

Parameter	<i>tert</i> -Butyl acetate (mg/kg/day)			
	0	500	1,000	1,500
No. of female rats	10	9	9	10
Body weight (g)	399.9 ± 34.71 ^a	400.5 ± 30.05	378.7 ± 39.93	383.1 ± 11.65 ^{**}
Lung (g)	1.32 ± 0.115	1.33 ± 0.185	1.31 ± 0.157	1.34 ± 0.129
per body weight (%)	0.33 ± 0.035	0.33 ± 0.047	0.35 ± 0.039	0.35 ± 0.028
Adrenal glands (g)	0.068 ± 0.0115	0.068 ± 0.0104	0.074 ± 0.0116	0.086 ± 0.0158 [*]
per body weight (%)	0.017 ± 0.0021	0.017 ± 0.0023	0.020 ± 0.0035	0.022 ± 0.0042 ^{**}
Liver (g)	16.54 ± 1.91	16.34 ± 1.592	16.43 ± 2.109	18.25 ± 1.576 ^{**}
per body weight (%)	4.14 ± 0.311	4.08 ± 0.307	4.34 ± 0.439	4.76 ± 0.296 ^{**}
Spleen (g)	0.66 ± 0.109	0.71 ± 0.101	0.62 ± 0.105	0.62 ± 0.083
per body weight (%)	0.17 ± 0.023	0.18 ± 0.018	0.16 ± 0.024	0.16 ± 0.019
Kidneys (g)	2.02 ± 0.285	2.00 ± 0.237	2.07 ± 0.223	2.23 ± 0.300
per body weight (%)	0.51 ± 0.057	0.50 ± 0.061	0.55 ± 0.087	0.58 ± 0.069
Thymus (g)	0.345 ± 0.1129	0.392 ± 0.1015	0.317 ± 0.0555	0.322 ± 0.1430
per body weight (%)	0.086 ± 0.0254	0.098 ± 0.0230	0.084 ± 0.0134	0.084 ± 0.0377
Heart (g)	0.97 ± 0.160	1.03 ± 0.119	0.97 ± 0.087	0.94 ± 0.075
per body weight (%)	0.24 ± 0.029	0.26 ± 0.027	0.26 ± 0.027	0.25 ± 0.015
Ovaries (g)	0.110 ± 0.0276	0.111 ± 0.0185	0.114 ± 0.0167	0.119 ± 0.0251
per body weight (%)	0.028 ± 0.0068	0.028 ± 0.0054	0.030 ± 0.0029	0.031 ± 0.0065

^aValues 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.

유의성 있게 감소하였다.

부검소견. 임신 20일째에 모동물을 부검하여 육안적인 부검소견을 관찰한 결과, 1,500 mg/kg 투여군에서 소장외 증혈(congestion), 위의 팽대 및 가스저류 소견이 각각 2례 관찰되었다. 2,000 mg/kg 투여군의 사망동물을 부검한 결과, 위 팽대(expansion)가 8례, 소장상부의 충·출혈이 4례, 그리고 간 비대(hepatomegaly)가 3례 관찰되었다.

절대 및 상대 장기중량. 임신 20일째에 모체를 부검하여 주요장기의 절대중량과 상대중량을 측정된 결과는 Table 4에 나타났다. 1,500 mg/kg 투여군에서는 간의 상대중량이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였고, 부신의 절대 및 상대중량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다.

제왕절개 소견. 임신 20일째에 모체를 제왕절개하여 얻은 생식결과는 Table 5에 나타내었다. 각 군당 10마리의 교배동물 중 500과 1,000 mg/kg 투여군에서는 9마리, 부형제대조군과 1500, 2,000 mg/kg 투여군에서는 10마리가 임신하여 높은 임신율을 나타내었다. 임신황체수와 착상 수, 배아의 착상 전·후 소실률(pre- and post-implantation loss), 사망태아 수, 생존태아의 외표와 성비 및 태반중량에 있어서 대조군과 투여군간에 통계학적

Table 6. Visceral alterations in fetuses from the pregnant rats treated with *tert*-butyl acetate during gestational days 6 through 19

Parameters	<i>tert</i> -Butyl acetate (mg/kg/day)			
	0	500	1,000	1,500
Fetuses examined	66	63	59	71
Litters examined	10	9	9	10
Fetuses with malformations	0	0	0	0
Litters affected	0	0	0	0
Fetuses with variations (%) ^a	7(10.6)	11(17.5)	6(10.2)	8(11.3)
Litters affected (%) ^b	5(50)	7(77.8)	5(55.6)	6(60)
Misshapen thymus	2	6	2	3
Dilated renal pelvis	3	5	3	4
Dilated ureter	0	2	0	2

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

^bIncludes litters with one or more affected fetuses.

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

으로 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 생존태아의 체중 역시 대조군과 시험군간에 통계학적 차이는 인정되지 않았으나 1,500 mg/kg 투여군의 태아체중은 대조군에 비해 다소 감소(수컷은 약 8%, 암컷은 약 13%)한 경향이 인정되었다.

태아 내부장기 소견. 생존 태아의 내부장기 기형과 변이를 관찰한 결과(Table 6), 내부장기 기형은 어떤 시험군

Table 5. Caesarean section data of the pregnant rats treated with *tert*-butyl acetate during gestational days 6 through 19

Parameters	<i>tert</i> -Butyl acetate (mg/kg/day)			
	0	500	1,000	1,500
No. of mated females	10	10	10	10
No. of pregnant females	10	9	9	10
No. of dead females	0	0	0	0
No. of females totally resorbed	0	0	0	0
No. of corpora lutea	15.5 ± 1.72 ^a	16.3 ± 1.08	15.5 ± 2.13	16.1 ± 1.60
No. of implantation sites	14.6 ± 2.12	15.2 ± 3.27	13.8 ± 4.27	15.5 ± 1.18
Pre-implantation loss (%) ^b	5.9 ± 8.42	7.2 ± 15.09	13.7 ± 20.02	3.4 ± 5.23
Fetal deaths	0.9 ± 0.57	0.8 ± 0.83	0.4 ± 0.73	0.8 ± 1.23
Resorption: Early	0.8 ± 0.63	0.7 ± 0.71	0.4 ± 0.73	0.8 ± 1.23
Late	0.1 ± 0.32	0	0	0
Dead fetuses	0	0.1 ± 0.33	0	0
Post-implantation loss (%) ^c	6.4 ± 4.03	5.5 ± 5.67	2.8 ± 4.36	4.9 ± 7.26
Litter size	13.7 ± 2.31	14.4 ± 3.36	13.3 ± 4.03	14.7 ± 1.06
Male/female	78/59	60/70	59/61	71/75
Sex ratio	1.32	0.86	0.97	0.95
External anomalies	0	0	0	0
Fetal weight: Male	4.0 ± 0.63	3.9 ± 0.38	3.8 ± 0.62	3.7 ± 0.41
Female	4.0 ± 0.65	3.7 ± 0.35	3.7 ± 0.70	3.5 ± 0.34
Placental weight (g)	0.53 ± 0.119	0.49 ± 0.090	0.49 ± 0.080	0.50 ± 0.107

^aValues are presented as means ± S.D. (g).

^bPre-implantation loss (%) = [(No. of corpora lutea - No. of implantation sites) / No. of corpora lutea] × 100.

^cPost-implantation loss (%) = [(No. of implantation sites - No. of live embryos) / No. of implantation sites] × 100.

Table 7. Skeletal alterations and ossification degree in fetuses from the pregnant rats treated with *tert*-butyl acetate during gestational days 6 through 19

Parameters	<i>tert</i> -Butyl acetate (mg/kg/day)			
	0	500	1,000	1,500
Fetuses examined	71	67	61	75
Litters examined	10	9	9	10
Fetuses with malformations (%) ^a	0	0	1(1.6)	0
Litters affected (%) ^b	0	0	1(11.1)	0
Thoracic hemivertebra	0	0	1	0
Scoliosis	0	0	1	0
Fetuses with variation (%) ^a	36(50.7)	43(64.2)	48(78.7)	55(73.3)
Litters affected (%) ^b	10(100)	9(100)	8(88.9)	10(100)
Short supernumerary rib	7	6	13	17
Supernumerary lumbar vertebra	0	1	0	0
Misshapen sternebra	0	1	0	2
Misaligned sternebra	0	0	0	2
Bipartite ossification of thoracic centrum	0	1	0	2
Enlarged fontanel	0	0	1	0
Incomplete ossification of supraoccipital	0	0	1	1
Dumbbell ossification of thoracic centrum	32	42	43	46
No. of ossification centers				
Sternebra	5.3 ± 0.86 ^c	5.1 ± 0.96	4.9 ± 0.78	5.0 ± 0.88
Metacarpals in both limbs	7.4 ± 0.91	7.3 ± 0.96	6.9 ± 1.00	7.1 ± 1.00
First phalanges in both forelimbs	0.6 ± 1.46	0.1 ± 0.49	0.4 ± 1.20	0
Metatarsals in both hindlimbs	8.1 ± 0.52	8.0 ± 0.24	8.0 ± 0.00	8.0 ± 0.00
First phalanges in both hindlimbs	0.2 ± 0.65	0	0	0
Sacral and caudal vertebra	8.5 ± 0.75	8.0 ± 0.48	7.7 ± 1.16	7.8 ± 0.67

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

^bIncludes litters with one or more affected fetuses.

^cValues are presented as means ± S.D.

에서도 관찰되지 않았다. 내부장기 변이소견으로는 흉선 형태이상(misshapen thymus)과 신우확장(dilated renal pelvis) 및 요관확장(dilated ureter)이 대조군 및 투여군에서 소수 관찰되었으나 시험군간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

태아의 골격 소견. 태아골격의 기형과 변이 유무를 관찰한 결과(Table 7), 1,000 mg/kg 투여군에서 편측성 흉추추체(thoracic hemivertebra)와 척추만곡(scoliosis)이 각각 1례 관찰되었고, 그 외의 시험군에서는 골격기형이 관찰되지 않았다. 골격변이소견으로서는 1,500 mg/kg 군에서 짧은 늑골수 과다(short supernumerary rib)와 흉추체 아령형골화(dumbbell ossification of thoracic centrum)가 대조군에 비해 다소 증가하였으나 통계학적인 유의성은 인정되지 않았다. 또한 요추과다(supernumerary lumbar vertebra)와 흉골분절 형태이상(misshapen sternebra), 흉골분절 배열이상(misaligned sternebra), 흉추체 이분골화(bipartite ossification of thoracic centrum), 천문확장(enlarged fontanel) 및 상후두골 불완전골화(incomplete ossification of supraoccipital)가 투여군에서 관찰되었으나 발생빈도가 매우 낮았고, 대조군과

유의차도 인정되지 않았다. 태아의 주요 골격부위 골화점수를 관찰한 결과, 모든 골화부위에서 대조군과 투여군간에 통계학적으로 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

고 찰

초산 제3부틸의 최기형성을 평가하기 위해 랫드에게 임신 6일에서 19일까지 14일간 반복 경구투여한 결과, 1,500 mg/kg의 용량은 경미한 모독성을 유발하나 배·태아에 발생독성은 유발하지 않으며, 2,000 mg/kg 용량은 임신동물의 사망을 초래하는 것으로 확인되었다.

일반증상관찰시 시험물질 투여군에서 관찰된 다양한 일반증상은 투여용량의 증가에 따라 용량의존적으로 증가한 것으로 보아 시험물질의 투여가 직접적인 원인이라는 것을 나타낸다. 투여와 관련된 주요 일반증상은 입모와 적색유루, 탈모, 운동성 감소, 보행이상, 식욕결핍, 비출혈, 이상발성 및 혼수상태였으며, 이들 소견은 주로 초기 투여기간에, 특히 투여 후 2~3시간 사이에 집중적으로 관찰되었다. 초산 제3부틸은 자극성으로 인하여 소양증과 안구염증, 상부기도의 자극, 두통, 괴사, 피부염 등을 초래하는 것으로 알려져 있으며(HSDB, 2006), 본 시험에서

관찰된 일반증상도 경구투여된 시험물질의 위장관계 자극성이 주요 원인으로 추정되며, 이로 인해 스트레스성 반응과 전신성 독성증상이 나타난 것으로 판단된다. 특히, 2,000 mg/kg 투여군의 동물들은 상기한 독성증상이 심하여 투여개시 후 2일에서 5일 사이에 모두 사망하였으며, 이 용량은 모동물의 치사용량으로 확인되었다. 반면 1,500 mg/kg 용량에서는 일시적이고 경미한 일반증상만 관찰되었고, 사망동물은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 본 물질의 최소치사량(minimal lethal dose)이 1,500 mg/kg을 상회하지만 2,000 mg/kg에 근접할수록 치사율이 급격히 증가한다는 것과 치사율에 대한 본 시험물질의 용량반응 기울기는 매우 가파르다는 것을 암시해 준다.

체중측정 시, 1,500 mg/kg 투여군에서 관찰된 투여기간중의 증체량감소 경향은 비록 통계학적인 차이는 인정되지 않았으나 명확한 용량의존적 감소를 나타낸 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것임을 알 수 있었다. 상기 투여군에서 관찰된 모체의 증체량 감소는 제왕절개 시 임신자궁의 중량에는 차이가 없는 것으로 보아 시험물질이 모체에 직접 작용하여 체중증가 억제를 유발한 것으로 판단된다. 1,500 mg/kg 투여군의 사료섭취량도 일시적으로 대조군에 비해 다소 감소한 것으로 나타났으나 통계학적으로 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

임신 20일째의 모동물 부검 시 1,500 mg/kg 투여군에서 관찰된 소장외의 충혈과 위의 팽대 및 가스저류 소견과 2,000 mg/kg 투여군의 사망동물에서 관찰된 위의 팽대와 소장외의 충·출혈 및 간비대는 시험물질의 투여에 의한 자극성과 간손상의 결과로 판단되며, 위장관계와 간이 초산 제3부틸의 주요 표적장기임을 암시해 준다.

일반 및 특수독성시험에서 주요 장기의 중량변화는 잠재적인 독성물질의 검색에 민감한 표지자로 유용하게 이용되고 있다(Andersen *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). 본 시험의 주요 장기에 대한 중량측정 시, 1,500 mg/kg 투여군에서 관찰된 부신의 절대 및 상대중량의 증가는 용량의존적으로 나타난 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 소견으로 판단된다. 이 결과는 본 시험군에서 관찰된 입모와 적색유루, 운동성감소 등 스트레스성 일반증상의 증가와 일치하는 소견으로써 시험물질의 투여에 기인된 스트레스가 주요 원인으로 판단된다. 부신이 다양한 스트레스 인자에 의해 영향을 받는다는 것은 많은 연구를 통해서 잘 증명된바 있다(Rees, 1976; Odio and Maickel, 1985; Kioukia-Fougia *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004, 2006). 1,500 mg/kg 투여군에서 나타난 간의 상대중량 증가는 용량의존적으로 증가하였고, 2,000 mg/kg 투여군의 사망동물에서도 간비대가 관찰된 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 소견

으로 판단된다. 알콜이 간대사를 유도하고, 간질환을 초래한다는 것은 이전 연구에서 잘 증명된 바 있으며(Lee *et al.*, 2001), 부틸 알콜로 대사되는 초산 제3부틸 역시 고농도에서 간독성을 유발하는 것으로 판단된다(Budroe *et al.*, 2004). 본 시험의 1,500 mg/kg 투여군에서 관찰된 간중량의 증가는 특징적인 간병변은 유발하지 않은 것으로 보아 간 미세소체 효소의 유도에 의해 나타난 것으로 사료된다(Amacher *et al.*, 1998). 이전 연구결과(NTP, 1995)에 따르면, 마우스에게 초산 제3부틸을 20~40 ppm의 농도로 13주간 흡입노출하면 간중량이 증가하는데, 이는 CYP-450의 유도에 의한 것이라고 하였다.

제왕절개 시 1,500 mg/kg 투여군에서 관찰된 태아체중의 감소경향은 명백한 용량의존성을 나타내었고, 골격검사에서 발육지연의 지표로 평가되는 흉추체 아령형골화의 발생빈도가 다소 증가한 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 자궁 내 발육지연효과(intrauterine retardation effects)로 판단된다. 그러나 대조군과 통계학적인 차이가 인정되지 않았을 뿐만 아니라 태아발육과 관련된 다른 평가항목에서도 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않아 독성학적으로 중요성은 없는 것으로 판단된다.

태아의 골격 검사 시, 1,500 mg/kg 투여군의 요추에서 관찰된 여분의 늑골(lumbar rib, 요늑), 즉 늑골수 과다는 정상 랫드에서는 흔히 관찰되지 않는 비가역적인 골격변이소견이다(Morita *et al.*, 1987; MARTA, 1997; Kim *et al.*, 2004). 이전 연구결과에 따르면, Yasuda and Maeda(1972)는 최기형성의 지표로써 요늑의 중요성과 활용가능성을 제시하였으며, Kimmel and Wilson(1973)은 요늑이 고용량에서 화학물질의 최기형성 지표로 간주될 수 있다고 하였다. 본 시험의 1,500 mg/kg 투여군에서 관찰된 늑골수 과다의 증가는 빈도가 현저하지 않아 대조군과 명백한 차이는 없었지만 투여용량이 증가하면 태아에 기형을 초래할 가능성이 있음을 암시해 준다. 상기 소견 이외에 내부장기와 골격에서 관찰된 이상소견들은 정상 랫드에서도 흔히 관찰되는 소견이거나 발생빈도가 매우 낮아 시험물질의 투여와는 관련이 없는 자연발생적인 소견으로 사료된다(Morita *et al.*, 1987; MARTA, 1997; 김 등, 2001).

결론적으로 초산 제3부틸을 임신랫드에게 반복 경구투여하면 1,500 mg/kg 용량에서 경미한 모독성(일반증상과 간 및 부신중량의 증가)을 유발하나 최기형성을 포함한 배·태아 발생독성은 관찰되지 않았다. 한편, 2,000 mg/kg 용량은 모든 임신동물이 사망하여 치사용량으로 나타났다. 본 시험조건 하에서 모체와 배·태아발생에 대한 초산 제3부틸의 무해용량은 각각 1,000 및 1,500 mg/kg/day로 산출되었다. 본 시험결과는 초산 제3부틸의 모독성

과 배·태아 발생독성 정보를 제공함으로써 초산 제3부틸의 위해성평가와 물질보건안전자료의 작성에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Amacher, D.E., Schomaker, S.J. and Burkhardt, J.E. (1998). The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight and histological change in rat toxicology studies. *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 831-839.
- Andersen, H., Larsen, S., Spliid, H. and Christensen, N.D. (1999). Multivariate statistical analysis of organ weights in toxicity studies. *Toxicology*, **136**, 67-77.
- Bailey, S.A., Zidell, R.H. and Perry, R.W. (2004). Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicol. Pathol.*, **32**, 448-466.
- Budroe, J.D., Brown, J.P., Salsmon, A.G. and Marty, M.A. (2004). Acute toxicity and cancer risk assessment values for tert-butyl acetate. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **40**, 168-176.
- Fisher, R.A. (1970). *Statistical methods for research workers* 14th ed. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Girkin, R. and Kirkpatrick, D. (2000). Report to the Lyondell Chemical Company Worldwide, 14C-[tertiary-Butyl Acetate]: Metabolism and Pharmacokinetic Study in the Rat after Inhalation, Huntingdon Life Sciences Ltd, Huntingdon, Cambs, UK, pp. 190.
- Groth, G. and Freundt, K.J. (1994). Inhaled tert-butyl acetate and its metabolite tert-butyl alcohol accumulate in the blood during exposure. *Hum. Exp. Toxicol.*, **13**, 478-480.
- HSDB. Hazardous Substance Data Bank. (2006). National Library of Medicine, URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.
- Industrial Biotest Laboratories Inc. (1958). Toxicity studies on TFA-168. tert-butyl acetate. Performed by Industrial Bio-Test Laboratories, Inc., Northbrook IL for Albemarle Corporation, Baton Rouge LA. Submitted to US EPA, April 23, 1994. EPA/OTS Doc # 86940000229, NTIS/OTS0556824.
- Kim, H.Y., Lee, S.B., Chung, Y.H., Lim, C.H., Yu, I.J., Park, S.C., Shin, J.Y., Kim, S.H., Shin, D.H. and Kim, J.C. (2006). Evaluation of subchronic inhalation toxicity of dimethyl disulfide in rats. *Inhal. Toxicol.*, **18**, 395-403.
- Kim, J.C., Shin, D.H., Kim, S.H., Kim, J.K., Park, S.C., Son, W.C., Lee, H.S., Suh, J.E., Kim, C.Y., Ha, C.S. and Chung, M.K. (2004). Subacute toxicity evaluation of a new camptothecin anticancer agent CKD-602 administered by intravenous injection to rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **40**, 356-369.
- Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973). Skeletal deviations in rats: malformations or variations? *Teratology*, **8**, 309-315.
- Kioukia-Fougia, N., Antoniou, K., Bekris, S., Liapi, C., Christofidis, I. and Papadopoulou-Daifoti, Z. (2002). The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **26**, 823-830.
- Kruskal, W.H. and Wallis, W.A. (1952). Use of ranks in one criterion variance analysis. *J. Am. Statist. Assoc.*, **47**, 614-617.
- Lee, D.H., Ha, M.H. and Christiani, D.C. (2001). Body weight, alcohol consumption and liver enzyme activity: a 4-year follow-up study. *Int. J. Epidemiol.*, **30**, 766-770.
- MARTA (Middle Atlantic Reproduction Teratology Association). (1997). Appendix B: Historical Control Data in Handbook of Developmental Toxicology (Hood, R.D. ed.). CRC Press, New York, pp. 716-724.
- Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Kasegawa, Y., Miyamoto, M. and Watanabe, T. (1987). Spontaneous malformations in laboratory animals: frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice. *Cong. Anom.*, **27**, 147-206.
- NRC (National Research Council). (1996). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Research Council, National Academy, Washington, USA.
- NTP (National Toxicology Program). (1995). Toxicology and carcinogenesis studies of tert-butyl alcohol (CAS No. 75-65-0) in: F344/N Rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). NTP TR436, NIH Publication No. 95-3167. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- Odio, M.R. and Maickel, R.P. (1985). Comparative biochemical responses of rats to different stressful stimuli. *Physiol. Behav.*, **34**, 595-599.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). (2001). Guideline 414: Prenatal Developmental Toxicity Study, URL: <http://www.oecd.org/ehs/test/health.htm>.
- Rees, W.L. (1976). Stress, distress and disease. *Br. J. Psychiat.*, **128**, 3-18.
- Scheffe, H. (1953). A method of judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika*, **40**, 87-104.
- Stillmeadow Inc. (1997). tert-Butyl acetate. Volume V. Acute inhalation toxicity study in rats. Sponsored by MB Research Laboratories, Inc. for Arco Chemical Company, Newtown Square, PA. Submitted to US EPA, November 4, 1997. EPA/OTS, Doc #87980000002, NTIS/OTS0573684-1.
- Yamada, T., Ohsawa, K. and Ohno, H. (1998). The usefulness of alkaline solutions for clearing the uterus and staining implantation sites in rats. *Exp. Anim.*, **37**, 325-331.
- Yasuda, M. and Maeda, H. (1972). Significance of lumbar rib as an indicator in teratogenicity tests. *Teratology*, **6**, 124-125.