

## 계태아를 이용한 농약(folpet)의 기형독성 연구

임윤규 · 허강준\* · 이영순\*\*

제주대학교 농과대학 수의학과

충북대학교 농과대학 수의학과\*

서울대학교 수의과대학\*\*

(1994년 3월 18일 접수)

### Studies on the teratogenicity of folpet in the developing chick embryo

Yoon-kyu Lim, Gang-joon Heo\*, Yong-soon Lee\*\*

*Department of Veterinary Medicine, Cheju National University*

*Department of Veterinary Medicine, Chungbuk National University\**

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*\**

(Received March 18, 1994)

**Abstract:** A teratogenicity test of 'folpet' was carried out in the developing chick embryos to investigate and validate the safety of rural environmental hazardous materials. Folpet was administered to chick embryos' yolk sac at a rate of 0.1mg and 0.01mg per SPF eggs at 96 hours of incubation. The morphological changes were examined.

Fertility ratio of SPF eggs used was 94.9%. Hatching rate of untreated control group was 74.4% and the group dosed with 100ul of corn oil into the yolk sac was 70.0%. The LD<sub>50</sub> of folpet was 0.663mg/100ul/egg. After hatching, mean body weight, body length, claw length and beak length of high and low dose administered groups were not significantly different from untreated and vehicle control group. There was no abnormal appearance in all the groups. Therefore it seems that, within the doses applied, folpet dose not induce potential teratogenicity in the developing chick embryos.

**Key words :** folpet, teratogenicity, chick embryo

## 서 론

농약의 사용량이 크게 증가됨에 따라 환경오염, 특히 축산물예의 오염과 잔류, 또 사용자에의 중독등은 심각한 사회문제가 되고 있으며, 이들 농약들이 가축 야생 동물 및 어류에 위협을 초래하고 있음은 잘 알려진 사실이다. 사람에서의 농약중독뿐 아니라, 어떤 종류의 농약은 유전자에 독성을 나타내기도 하며 여러가지 기

형발생 등과 같은 독성을 나타내기도 하여 공중보건상 심각한 문제를 야기시킬 수도 있다.

우리나라에서 많이 사용되는 phthalimide계 살균제의 하나인 folpet [N-(trichloromethylthio) phthalimide]은 1952년 미국의 Standard oil development사에서 개발한 약제이다. 상품명으로는 phaltan, polpan, tiniophal 등으로 알려져 있으며, 사과나 딸기, 오이, 포도 등에 주로 살포하고 있다.

이 연구는 농촌진흥청 농업특정과제연구지원에 의하여 이루어졌음.

이 약제는 무색의 결정체로서 용점이 177℃ 이며, 실온의 물에는 녹지 않고 유기용매에는 약간 녹는다. 부식성이 없으며 물에 의하여 천천히 분해되지만 강알칼리에 의하여 쉽게 분해된다. 알려진 독성은 아주 낮지만 눈과 피부에 자극성을 나타낼 수도 있다. 랫드에 대한 경구독성 LD<sub>50</sub>치는 10,000mg/kg 이며 어독성은 큰 것으로 알려져 있다.<sup>7</sup>

Folpet은 화학적 구조가 thalidomide [N-(2,6-dioxo-3-piperidyl) phthalimide] 와 유사하므로 이의 기형성에 대하여서는 상당히 흥미가 있으나, 아직 상세한 규명은 되어있지 못한 실정이다.

계태아를 이용한 기형형성시험은, 이용이 편리하고 적은 비용으로 많은 수의 공시동물을 이용할 수 있다는 잇점이 있을 뿐 아니라 광범위한 화학적 및 물리적 요인에 감수성이 높으며 형태학적인 발육이 포유동물의 경우와 유사하다는 점 때문에 최근에 널리 소개되어 이용되고 있으며, 기형형성시험으로서 유용한 방법이 될 수 있을 것이다.<sup>8,10</sup>

본 실험은, 국내에서 농작물의 살균제로 널리 사용되고 있으므로 농촌환경에 위해를 줄 가능성이 있는 folpet을 발육중인 계태아에 투여하여 기형독성의 발현 여부를 확인하고 또한 농촌 환경 위해물질에 대한 안전성을 파악하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

시험용 수정란 : '성일파마'에서 제공한 SPF란 (Hy-Vac lab eggs co, USA)를 사용하였다. 품종은 White leghorn이며, 대형란과 소형란을 골라낸 52g 내지 63g의 것을 사용하였다.

시험물질 : 농약연구소에서 제공한 folpet 원제를 corn oil (Sigma, USA) 혹은 0.5% tween 80 (Hayashi pure chemical industry, Japan)으로 용해하고 고압멸균한 후 초음파 (120 watt, 20초)로 균질화시켜 시험물질로 사용하였다.

시험군 설정 및 투여 : 무처치 대조군을 설정하고, 시료를 0.5% tween 80 및 corn oil로 용해하여, 4일간 발

육시킨 란의 난황내로 투여하여, 적절한 용매와 경로 및 용량을 선정하였다.

용매를 결정한 후의 분실현설계와 각 군의 처치내용 및 수정란의 수는 Table 1과 같다.

부란기의 조건 : 상대습도, 온도, 공기순환등을 조절할 수 있는 것으로 난좌를 회전시키는 교반시설이 갖추어진 부란기 (Showa, Japan)로서, 발육조건은 37.8℃의 온도와 상대습도 80%-90%를 유지하도록 하였다.

검란 : 검란은 매일 같은 시각에 행하였으며, 검란시 발육정지란 및 사란을 수거하여 태아의 발육정도를 검사하고, 실체현미경으로 기형발생을 검색하였다. 발육이 계속된 태아는 부란 23일 까지 자연부화시켰으며 부화하지 않은 태아는 폐사된 것으로 간주하여 난각을 제거시킨 후 외형검사와 골격검사를 실시하였다.

골격염색 : 계태아의 복강을 열고 육안적인 검사를 한 후 장기를 모두 제거하였다. 이때 70-80%의 물에 약 20초간 처리하여 모든 피부도 함께 제거하고 지방 조직도 제거한 다음 95%의 ethanol에 약 1주일간 태아를 고정하였다. 후 즉시 박피하지 않은 경우에는 4%의 식염수에 하룻밤 침적시킨 후 박피하였다. Cartilage는 alcian blue 용액(800ml의 95% ethanol, 200ml의 acetic acid, 150mg의 alcian blue)에 3-5일간 담그어 적절한 정도까지 염색한 다음 흐르는 물로 행구고 95%의 ethanol로 연조직 부분을 탈색시켰다. 칼슘침착된 부분을 이중염색하기 위하여 0.002% alizarin red S 용액 (2mg의 alizarin red S 를 1%의 KOH 100ml에 용해)에 침적시키고 적절한 염색을 확인하였다. 이 후 흐르는 물로 행구고 glycerin과 70% ethanol이 동량으로 혼합된 용액에 침적시키며 탈색을 확인한 후 순수한 glycerin과 70% ethanol이 동량으로 혼합된 용액에 침적시키며 탈색을 확인한 후 순수한 glycerin에 보관하며 입체현미경(Olympus SZ4045TR, Japan) 으로 계태아의 골격기형을 관찰하였다(Fig 1).<sup>2,11</sup>

검사와 통계학적 처리 : 부화된 병아리는 육안적으로 외형검사를 한 후 ether로 마취시켜 전후지의 길이, 체중, 부리 및 발톱의 길이 등을 측정하고, 부검하여 장기 검사를 하며, 각 군마다 5마리씩을 alizarin red S와 alcian blue 로 이중염색하여<sup>12</sup> 골격검사를 하였다. LD<sub>50</sub>

Table 1. Experimental groups and each treatment of folpet

	Untreated control	Vehicle control	Low dose	High dose
Number of eggs	24	23	23	23
Treatment		0.1ml/egg	0.1mg/egg	0.01mg/egg
Administration time(hrs)		96 hrs		
Administration route		injection to yolk sac		

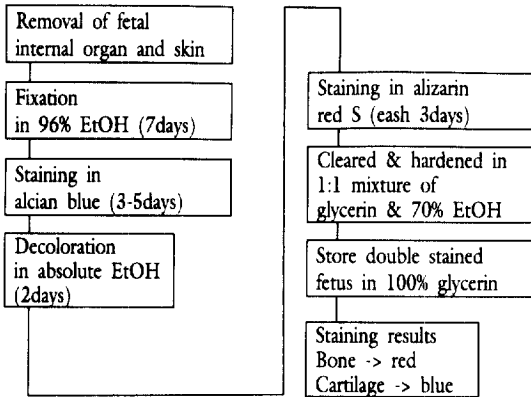


Fig 1. Diagram of double staining of fetal skeletons for cartilage and bone

측정은 Speaman-Kärber 법에 의거한 자연사를 고려한 사망률 정정법<sup>13</sup>으로 실시하였으며, 대조군과 각 실험군간의 유의성 검정은 'Minitab' package programme를 이용하여 ANOVA를 실시하였다.

## 결 과

수정률 : 138개의 SPF란 중 131개의 수정이 확인되어 수정률은 94.9%이었다.

용매에 따른 부화율 : Corn oil 및 0.5%의 tween 80을 각 100 $\mu$ l씩 난황내에 투여한 결과 Table 2와 같이, 무처치 대조군은 74.4%, corn oil은 70.0%, tween

80은 62.9%를 나타내어, 각 용매는 무처치 대조군에 비하여 다소 낮은 부화율을 나타내었다. 한편 부화시의 평균체중은 tween 80의 경우 무처치 대조군과 corn oil투여군에 비하여 유의한 체중감소를 보였으므로 (Table 2), 이 후의 실험투여는 corn oil을 용매로 사용하였다.

반수 치사량(LD<sub>50</sub>) : 계태아 각 군당 10mg부터 0.01mg의 시료를 corn oil 100 $\mu$ l에 용해하여 난황내로 접종한 결과 LD<sub>50</sub>은 0.663mg/100 $\mu$ l/egg로 나타났다 (Table 3).

육안적인 외형검사 : 부화된 병아리에서 체중, 체장, 전후지의 길이, 발톱 및 부리길이에 미치는 영향을 조사한 것을 Table 4에 나타내었다. Folpet 투여군 고용량과 저용량 모두 무처치 대조군과 용매투여군에 비교하여 체중, 체장, 전후지의 길이, 발톱 및 부리길이에 유의한 차이가 없었다.

폐사율과 기형발생정도 : 각 군의 폐사율과 기형발생수 및 종류는 Table 5에 나타난 것과 같이 자연사로 인정된 경우가 무처치대조군, 용매대조군, 저용량투여군, 고용량투여군에서 각각 6, 5, 7, 6건이 있었으며, 무처치 대조군에서 후두부의 총혈을 보인것 1건 외에는 각 군에서 이상을 나타낸 경우가 발견되지 않았다.

## 고 찰

계란을 부란기에서 부화시키며 각종 실험을 하기위

Table 2. Comparison of solvents producing effects in the developing chicken embryo

Solvents	No of embryos	No of dead embryos	No of hatched embryos	Rate of hatching (%)	Body weight at hatching (g)
Control	43	8	32	74.4	36.01 $\pm$ 1.94
Corn oil	20	6	14	70.0	35.53 $\pm$ 2.37
Tween 80	39	12	27	69.2	31.95 $\pm$ 2.73*

\*Significantly different from control group (P<0.001)

Table 3. Mortality of chick embryos after single administration of folpet

Group (mg/100 $\mu$ l/egg)	No of egg	Hatch (D23)	Final mortality(%)	Modified* mortality(%)	LD50 (mg/100 $\mu$ l/egg)
10	10	0	10/10 (100)	(100)	
1	10	3	7/10 (70)	(57.1)	
0.1	10	7	3/10 (30)	(0)	0.663
0.01	10	7	3/10 (30)	(0)	
Vehicle control	10	7	3/10 (30)		

\*modified mortality(%) =  $\frac{\text{final mortality} - \text{natural mortality(vehicle control)}}{100 - \text{natural mortality}}$

**Table 4.** Effects of folfet on the body weight and body length of chicks at hatching

	Untreated control	Vehicle control	High dose	Low dose
Body weight(g)	41.15±3.74	41.07±1.72	40.26±3.45	42.33±2.63
Body length(cm)	9.11±0.50	9.32±0.34	9.46±0.32	9.61±0.31
Fore-limb length(cm)	3.24±0.15	3.20±0.13	8.18±0.11	3.11±0.11
Hind-limb length(cm)	7.28±0.19	7.38±0.22	7.51±0.20	7.50±0.16
Claw length(mm)	3.84±0.32	3.92±0.21	3.59±0.36	3.73±0.30
Beak length(cm)	1.29±0.08	1.33±0.11	1.26±0.07	1.29±0.06

**Table 5.** Experimental data demonstrating mortality rates and frequencies of embryos with malformations following treatment of folfet

	Untreated control	Vehicle control	Low dose	High dose
Total no of embryos	24*	23	23	23
Dead or unhatched embryos	6(25)	5(22)	7(30)	6(26)
Leg malformations	-	-	-	-
Abnormal features	-	-	-	-
Wry neck	-	-	-	-
Beak malformation	-	-	-	-
Brain malformation	-	-	-	-
Eye defect	-	-	-	-
Generalized edema	-	-	-	-
Hematoma	-	-	-	-
Occipital region congestion	1 (4)	-	-	-
Ocephalothoracopagus	-	-	-	-
Embryos affected	1 (4)	-	-	-
Affected including death	7(29)	5(22)	7(30)	6(26)

\*: No of tested embryos

†: Percentages of frequency

해서는 충분한 비율로 수정되어 있어야 하고 또한 적절한 발육조건이 갖추어져 양호한 부화율을 나타내야 되는데, 실험에서 사용한 SPF계란의 수정율은 94.7%, 부화율은 약 75%를 나타내었으며, 이러한 정도의 수정율의 및 부화율의 계란은 실험에의 공여가 적절한 것으로 생각된다.<sup>6</sup>

대상시료의 독성검사시에는 안전성이 확립된 적절한 용매를 사용하여 완전히 용해하여 투여하여야 정확한 실험결과가 도출되므로, 먼저 적절한 용매를 선정하여야 한다. Folpet은 각종 용매에 난용성인 것으로 알려져 있으며, 예비실험중 corn oil 및 tween 80을 사용하여 용해를 시도하여 보았으나 완전히 용해되지는 않았다. 다만 0.5% tween 80으로 0.01mg/100μl되게 희석하였을 때부터 비로써 맑게 용해됨을 관찰하였다. 한편 tween 80은 용매 그 자체가 계태아의 체중을 감소시키는 결과를 얻었으므로 (Table 2), 본 실험의 용매는 corn oil로 택하였다. 투여시에 용해되지 않으므로 시료와 잘 혼합되도록 진탕시켜 투여하였다.

예비시험중 투여경로 결정을 위하여 corn oil을

100μl씩 기실 혹은 난황내로 투여하여 보았으며 이결과 기실투여의 경우 약 반수가량의 계태아가 초기에 (입란 5-6일) 발육이 정지되었다(23개 중 12). Folpet을 혼합하여 접촉한 경우에는 시료가 용해되지 않아 흡수되지 않은 상태로 기실내에 존재하였고, 거의 모든 계태아가 초기에 발육정지되었기 때문에 투여경로로는 난황내접종을 택하였다. 이러한 초기발육정지의 이유는 아마도 corn oil이나 용해되지 않은 folpet 원재의 결정체가 기실막에 작용하여 계태아의 정상적인 호흡에 지장을 준 결과인 것으로 생각된다.

각 실험용량군에서 모두 육안적인 회형검사와 기형발생율에서 음성의 결과를 나타내었다. 기형독성시험시의 투여량은, LD<sub>50</sub>양의 1/3 내지 1/4를 고용량으로 설정한 후 등비로 저용량을 설정함이 적당하다 하였는데<sup>4</sup>, 본 실험에서는 산출된 LD<sub>50</sub>의 값의 약 1/5인 계태아당 0.1mg을 고용량으로 0.0mg을 저용량으로 설정하여 투여하였다. 즉, 반수치사량의 1/5에 해당하는 용량의 투여에도 불구하고 어떠한 일반독성이나 기형독성이 발현되지 않았다. 이러한 사항을 미루어 볼 때,

반수치사량측정시의 계태아 폐사는 약제 고유의 독성 그 자체보다는 오히려, folpet이 난용성이므로 그 결정체가 난황중에 존재하며 계태아의 발육시 물리적인 손상을 일으킨 것으로 생각되며, 상대적으로 결정체의 양이 많은 시험고용량군 이상의 투여시(1.0mg/100 $\mu$ l/egg 이상)에 폐사가 일어난 것이 아닐까 하는 생각이 든다.

그러므로 용해도의 한도내에서 folpet의 계태아에 대한 기형독성은 인정되지 않았다.

## 결 론

농촌환경위해물질의 안전성평가를 위하여 folpet을 계태아에 투여하여 기형독성실험을 실시 하였다. SPF 계란을 부화시켜 96시간에 0.1mg 및 0.01mg의 folpet을 corn oil에 섞어 난황내로 투여하고 형태학적인 이상을 관찰하였다.

실험에 사용된 SPF계란의 수정율은 94.7% 이었다. 부화율은 무처치대조군의 경우 74.4% 이었으며, 용매로서 corn oil을 100 $\mu$ 씩 투여하였을 때 70.0%를 나타내었다. Corn oil에 folpet을 용해하여 투여하였을 때 LD<sub>50</sub> 값은 0.663mg/100 $\mu$ l/egg 이었다. 고용량 및 저용량군에서의 부화후 평균체중, 체장, 부리의 길이, 발톱의 길이는 무처치대조군 및 용매대조군과 비교할때 유의한 차이가 없었으며, 각군에서 형태학적인 이상이 발현되지 않았다. 그러므로 투여용량내에서의 folpet은 계태아에 대한 기형독성이 없는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Misawa M, Doull J, Kitos PA, et al. Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. I. Diazinone treatment on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 57:20-29.

- Misawa M, Doull J, Uyeki EM. Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. III. Development of cartilage and bone. *J Toxicol Environ Health* 1982; 10:551-563.
- 조준형. 계태아에서 Diazinon에 의해 유발된 골격 기형과 mineralization 억제에 관한 형태학적 및 생화학적인 연구. 서울대학교 박사학위논문. 1989
- 이성환, 홍종욱. 개정농약학. 향문사, 서울. 1990; p96.
- 농약공업협회. 농약사용지침서 1991; p217.
- Abdou HP, Adams J, Alessandri MC, et al. *Remington's Pharmaceutical Sciences* 17th ed., Gennaro AR (Eds.), Easton Pennsylvania: Mack Publishing Co, 1985; p1259.
- 양환승, 이두형, 이승찬 등. 3정 신농약. 향문사, 서울. 1990; p164
- Verret MJ, Scott WF, Reynaldo EF, et al. Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. *Toxico Appl Pharmacol* 1980; 56:265-273.
- 이영순. Chick embryo를 이용한 식품첨가물의 기형독성시험. 1987; 2(1):41-49.
- 임윤규, 최재준, 이민웅 등. Chick embryo를 이용한 식품간류농약의 기형성 연구. *식품위생학회지* 1990; 5(4):171-178.
- Jensh RP, Brent RL. Rapid schedule for KOH clearing and alizarin res S staining of fetal rat bone. *Stain Technol* 1966; 41(3):179-183.
- Simons EB, VanHorn JR. A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton for chicken embryos. adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. *Acta Morphol Neerl Scand* 1986; 65:51-57.
- 고웅린. 계량의학통론. 신광출판사 1982; pp63-64.
- 青山博昭, 鈴木利紀子, 寺本昭二. 新毒性試験法 - 方法과 評價 - Realize Inc. 1988; 207-231.