

<원 저>

랫드에서 amitraz의 출생 전후 발생 시험

김성환 · 임정현 · 박나형 · 문창중 · 박수현 · 강성수 · 배춘식 · 김성호 · 신동호 · 김종춘*

진남대학교 수의과대학
(게재승인: 2010년 6월 1일)

Pre- and postnatal development study of amitraz in rats

Sung-Hwan Kim, Jeong-Hyeon Lim, Na-Hyeong Park, Changjong Moon, Soo-Hyun Park,
Seong-Soo Kang, Chun-Sik Bae, Sung-Ho Kim, Dong-Ho Shin, Jong-Choon Kim*

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

(Accepted: June 1, 2010)

Abstract : This study investigated the potential effects of amitraz on the pre- and postnatal development, behavior, and reproductive performance of offspring of parent rats given amitraz during pre-mating, gestation, and lactation. The test chemical was administered via the drinking water containing 0, 40, 120, and 360 ppm to male rats from 2 weeks before mating to the end of 14-day mating period and to females from 2 weeks before mating, throughout mating, gestation and lactation up to weaning. Based on fluid consumption, the male rats received an average of 0, 5.7 ± 1.33 , 13.2 ± 2.08 , and 35.8 ± 3.42 mg/kg/day amitraz, and the female rats received an average of 0, 8.7 ± 4.42 , 20.1 ± 9.60 , and 47.6 ± 22.38 mg/kg/day amitraz, respectively. At 360 ppm, an increase in the incidence of abnormal clinical signs, a suppression in the body weight gain, a decrease in the food consumption and litter size, an increase in the post-implantation loss, and a decrease in the seminal vesicle weight were observed in the parent animals. In addition, a suppression in the body weight gain, a decrease in the grip strength, a delay in the negative geotaxis, an increase in the pre- and post-implantation loss, and a decrease in the number of live embryos were observed in the offspring. At 120 ppm, suppressed body weight gain and reduced food consumption were observed in the parent rats. Suppressed body weight gain and decreased grip strength were also observed in the offspring. There were no signs of either reproductive or developmental toxicity at 40 ppm. Under these experimental conditions, the no-observed-adverse-effect level of amitraz for parent rats and their offspring was estimated to be 40 ppm in rats.

Keywords : amitraz, pre- and postnatal study, rats, reproductive and developmental toxicity

서 론

Amitraz {N,N-[(methylimino)dimethylidene]di-2,4-xylylidine}는 formamidine 계열의 살충제로 미국 식품의약품안전청과 환경보호청으로부터 인증된 물질이다 [16]. 본 살충제는 농업분야에서 붉은응애와 잎벌레, 깍지벌레 및 진딧물의 박멸에 많이 사용되고 있으며, 수의분야에서는 돼지와 소, 양, 염소 및 개에서 외부기생충 구제를 위

해 주로 이용되고 있다. 약리학적 활성은 모노아민 산화 효소 억제 [6, 23]와 알파-2 교감신경성 효능작용 [32] 및 프로스타글란딘 합성 억제 [35]로 알려져 있다.

Amitraz는 1974년 이래로 여러 나라에서 살충제와 수의약품으로 사용되어 왔으며, 최근 생산 및 사용량의 증가로 사람과 동물에서 중독사고의 빈도가 점차 증가하고 있다 [16, 30, 33]. 주요 독성영향으로는 중추신경계 억압과 진정, 호흡완만, 서맥, 저혈압, 저체온, 고혈당증,

*Corresponding author: Jong-Choon Kim

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2827, Fax: +82-62-530-2809, E-mail: toxkim@chonnam.ac.kr]

위장관운동의 감소, 고창중, 다뇨, 구토, 식욕부진 등이 알려져 있다 [3, 8, 20, 33]. Amitraz의 생식발생독성 영향을 규명하기 위해 지난 수십년간 많은 동물실험이 수행되어 왔다. 이전 연구에 따르면, 암컷 마우스에 50 mg/kg 용량으로 5일간 반복 경구투여한 후 교배를 시키면 태아사망의 증가와 산자수의 감소가 나타난다고 한다 [14]. Al-Thani 등 [4]은 수컷 마우스에게 10 mg/kg 용량으로 12주간 반복 경구투여 하여 수태능력과 생식기관의 발달에 심각한 부작용을 초래하는 것을 증명하였다. 차세대 발생에 대한 영향을 평가하기 위해 랫드에게 20 mg/kg 용량으로 임신 1, 4, 7, 10, 13, 16 및 19일째에 경구투여한 결과, 태어난 새끼에서 피모발생 일령은 촉진되었으나 질개구와 절치발생 일령은 지연되었다고 한다 [27]. 후속연구에서 포육중인 랫드 어미에게 10 mg/kg 용량으로 포육 1, 4, 7, 10, 13, 16 및 19일째에 경구투여한 결과, 새끼에서 피모발생과 안검개열, 고환하강, 청각반사 및 정향반사는 지연되었으나 운동활성은 증가하였다고 한다 [28]. 본 연구실에서는 최기형성 시험 [17]에서 amitraz가 배아독성과 최기형성을 나타냄을 증명하였고, 또한 생식발생독성검색 시험 [21]을 수행하여 수컷 랫드에서 정낭선 중량과 정자 운동성의 감소, 암컷에서 산자수의 감소와 착상 후 배아사망의 증가를 보고한 바 있다. 상기한 많은 연구에도 불구하고 amitraz가 임신 및 포육중인 랫드 모체에 노출되었을 때 모체와 어미를 통해 노출된 새끼의 신체발달과 행동 및 생식기능에 미치는 영향에 대한 연구는 아직까지 크게 미흡한 실정이다.

본 연구는 교배전과 임신 및 포육중인 랫드에 amitraz를 경구투여 하여 친세대 동물과 차세대동물의 출생 전후 발생, 행동 및 생식기능에 미치는 잠재적 영향을 조사하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 10주령의 특정병원체부재 Sprague-Dawley 랫드를 오리엔트 바이오(한국)로부터 구입하여 사용하였다. 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. 순화 및 검역기간에는 스테인레스제 망 사육상자(240 W×390 L×175 H mm)에 3마리씩 수용하였고, 교배 시에는 암수 1:1로 수용하였으며, 임신 및 포육동물은 사육상자당 1마리씩 수용하였다. 시험기간 중 실험동물용 고형사료(삼양사료, 한국)와 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시험물질 조제 및 투여

시험물질 amitraz는 녹십자수의약품(한국)으로부터 구입하여 사용하였으며, 매일 투여 직전에 각 시험군의 투여용량에 맞게 칭량한 후 부형제인 상수도수에 희석하여 조제하였다. 부형제대조군은 상수도수만 공급하였다. 시험물질은 수컷의 경우 교배 2주전부터 교배 개시 후 2주까지, 암컷의 경우 교배 2주전부터 교배, 임신 및 분만 21일까지 음수를 통해 경구투여 하였다.

시험군의 구성 및 용량설정 근거

대조군과 amitraz 40, 120 및 360 ppm의 4개 시험군에 12마리씩 체중이 균등히 분배되도록 무작위로 군분리 하였다. 본 시험의 용량은 용량설정에비시험의 결과에 따라 명백한 독성영향이 나타날 것으로 예상되는 360 ppm을 고용량으로 설정하였고, 공비 3을 적용하여 120 및 40 ppm의 중간 및 저용량군과 대조군을 추가하였다.

친세대 동물의 관찰

일반증상 관찰

시험기간 중 1일 1회씩 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 대해서 관찰하였고, 이상이 있으면 증상의 종류, 발견일과 시각, 지속시간 또는 증상의 정도를 개체별로 기록하였다.

체중 및 사료섭취량 측정

친세대 수컷과 교배 전 암컷동물은 주 2회씩 체중을 측정하였으며, 임신동물은 임신 0, 3, 7, 10, 14 및 20일째에, 그리고 분만 후 암컷동물은 주 1회씩 측정하였다. 사료섭취량은 체중 측정일에 사료를 급여하고 익일 잔량을 측정하여 일일 사료섭취량을 계산하였다.

시험물질 섭취량의 산출

친세대 암수동물은 체중 측정일에 음수를 급여하고 익일 잔량을 측정하였고, 측정된 물 섭취량을 기초로 하여 일일 평균 시험물질 섭취량을 산출하였다.

교배

동일 시험군내의 동물을 암수 1:1로 2주간 동거교배시켰으며, 질전(vaginal plug)이나 질도말 시 정자가 확인되면 교배가 성립된 것으로 판정하였다. 임신동물의 경우 교배가 확인된 날을 임신 0일로 정하였으며, 임신의 최종판정은 분만과 부검 시 자궁의 착상흔적에 따랐다. 이를 기초로 교미율, 수태율 및 교미 소요기간을 산출하였다.

분만성적 및 신생아의 관찰

유산이나 사산 등의 분만상태를 관찰하고, 분만이 완료된 날을 분만 0일로 산정하여 임신기간과 분만율을 산출하였다. 분만이 완료된 후 생존 및 사망자수를 확인하였고, 출생 시 암수동물의 체중을 측정하였다.

부검

친세대 수컷동물은 교배가 완료된 후에 에테르 마취하에 부검하여 육안적 부검소견을 관찰하였고, 고환과 부고환, 전립선 및 정낭선을 적출하여 습중량을 측정한다. 다음 부검 시 체중에 대한 상대증량으로 환산하였다. 암컷동물은 포육 21일째에 부검하여 부검소견 관찰과 난소의 증량을 측정 후 임신황체수와 착상수를 관찰하였고, 착상 전 및 착상 후 배아사망률을 산출하였다.

차세대 동물의 관찰

일반증상 관찰

시험기간 중 1일 1회씩 동물의 일반증상과 증독증상 및 사망유무에 대해서 관찰하였고, 증상의 종류와 일시, 지속시간 및 증상의 정도를 개체별로 기록하였다. 출생시와 출생 후 4일째 및 21일째에는 각 모체당 생존한 새끼수를 확인하여 4일째 생존율과 이유율을 산출하였다.

시험군 조정 및 시험항목

출생 후 4일째에 각 모체당 8마리(암수 4:4)가 되도록 무작위로 새끼수를 조정한다. 다음 성장시험군과 행동시험군, 이유부검군 및 생식기능시험군의 4군으로 구분하였다(4일 이전에는 새끼를 무작위로 선정하여 시험). 군 조정 후 남은 여분의 새끼는 외표검사 후 안락사시켰다.

성장시험군 관찰

암수동물의 신체발달을 조사하기 위해 분만일로부터 출생 후 10주째까지 주 1회씩 체중을 측정하였고, 항문-성기간 길이(anogenital distance)와 귓바퀴분리(pinna detachment), 피모발생(hair growth), 절치돌출(incisors eruption), 안검개열(eyelid opening), 포피분리(preputial separation), 질개구(vaginal opening) 및 첫발정(first estrus) 일령을 관찰하였다. 항문-성기간 길이는 생후 1일 및 21일에 생식유두에서 항문까지의 길이를 측정하였고, 귓바퀴분리는 생후 2일부터 귓바퀴가 떨어진 날을 기록하였다. 피모발생은 생후 7일부터 복부의 피모발생 여부를 관찰하여 기록하였다. 절치돌출은 생후 11일부터 관찰하여 절치가 잇몸 위로 돌출된 날을 기록하였고, 안검개열은 생후 21일부터 관찰하여 안검이 분리되는 날을 기록하였다. 포피개열은 생후 27일부터, 질개구는 생

후 30일부터 관찰하였다. 질개구 후 질상피세포를 도말한 다음 검경하여 무핵의 각화상피세포가 관찰되는 날을 첫발정일로 기록하였다. 생후 10주째에 부검하여 뇌, 심장, 간, 신장, 부신, 비장, 폐, 흉선, 고환, 부고환, 난소, 전립선 및 정낭선을 적출하여 습중량을 측정한다. 다음 부검 시 체중에 대한 상대증량으로 환산하였다.

행동시험군 관찰

신경행동학적 변화를 평가하기 위해 정향반사(right reflex)와 비랑회피(cliff drop aversion), 부주지성(negative geotaxis), 악력(grip strength), 운동활성성(locomotor activity) 및 회전봉(rota-rod) 시험을 실시하였다. 정향반사시험은 생후 2일 및 5일째에 Palanza 등 [26]의 방법에 준하여 동물의 등을 바닥에 놓았을 때 정방향으로 돌아오는 시간을 최대 2분까지 측정하였다. 비랑회피시험은 생후 2일 및 5일째에 Palanza 등 [26]의 방법에 준하여 절벽으로 된 플랫폼 가장자리에서 동물의 머리와 앞발을 내밀어 놓은 후 머리와 앞발이 가장자리와 평행이 될 때까지 돌아오는데 소요되는 시간을 최대 2분까지 측정하였다. 부주지성시험은 Cada 등 [7]의 방법에 준하여 실시하였다. 생후 10일째에 표면이 거친 45도의 경사면 위에 머리를 아래로 향하게 놓은 다음 머리가 위쪽으로 향할 때까지 되돌아오는데 소요되는 시간을 최대 2분까지 측정하였다. 악력시험은 Meyer 등 [22]의 방법에 준하여 실시하였다. 생후 21일과 60일째에 인장력측정기(Iwoog-500; 이우과학, 한국)를 이용하여 양쪽 앞발을 측정봉에 잡게 한 다음 꼬리를 서서히 안정되게 잡아당겨 떨어질 때까지의 최대악력을 측정하였으며, 3회 실시하여 평균값을 기록하였다. 운동활성시험은 Lazarini 등 [19]이 실시한 방법에 준하여 생후 21일과 60일에 실시하였으며, locomotor activity 측정장치(ENV-515; MED-Associates, USA)를 통하여 10분 동안 챔버(43.2 cm x 43.2 cm)안에서의 보행거리와 위치, 보행시간 및 빈도, 몸단장횟수(grooming), 뒷발로 서있는(rearing) 시간 및 횟수, 그리고 정지해 있는 시간을 activity monitor program으로 관찰하여 기록하였다. 회전봉시험은 Ekambaram 등 [9]의 방법에 준하여 생후 22일에 실시하였다. 직경 6 cm의 회전봉에 동물을 올려놓고 15 rpm의 속도로 회전시킨 다음 바닥으로 떨어질 때까지의 시간을 최대 2분까지 측정하였으며, 3회 실시하여 평균값을 기록하였다.

이유부검군 관찰

생후 21일째에 에테르 마취하에 부검하여 육안적 부검소견을 관찰한 후 고환과 부고환, 난소, 전립선 및 정낭선을 적출하여 습중량을 측정하고, 부검 시 체중에 대

한 상대증량을 산출하였다.

생식기능시험군 관찰

암컷동물은 교배 전 2주간 질상피세포 도말검사를 통해 발정주기를 관찰하였으며, 질상피세포의 성상에 따라 발정 전기(proestrus)와 발정기(estrus), 발정후기(metestrus) 또는 휴지기(diestrus)로 분류하여 성주기의 기간과 규칙성을 조사하였다. 교배는 10주령에 실시하였으며 동일 용량군에서 형매교배를 피하여 암수 1:1로 하룻밤 동거교배 시킨 다음 익일 오전에 질전 또는 질도말 시 정자가 확인된 동물을 교배가 성립된 것으로 판정하였다. 교배가 확인된 날을 임신 0일로 정하였으며, 임신 13일째에 에테르 마취하에 제왕절개 하여 임신황체수와 착상수, 흡수태아수, 생존태아수, 사망태아수 등을 조사하였다. 수컷동물은 교배 확인 후 안락사시켰다.

통계학적 분석

통계학적 비교단위는 임신동물 또는 동복자로 하였고 [34], 시험결과는 가능한 한 평균값과 표준편차로 표기하였다. 체중, 사료섭취량, 혈청생화학치, 장기중량 등의 모수값(parametric data)은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시한 후 유의성이 인정되면 군간 차이를 조사하기 위해 Scheffe 다중비교법으로 유의차를 조사하였으며 [31], 일반증상과 태아사망을 등의 비모수값(non-parametric data)은 Kruskal-Wallis ANOVA [18]로 유의성을 조사한 후 통계학적 차이가 인정된 자료는 Scheffe 다중비교법 또는 Fisher's exact test로 유의차를 분석하였다 [10]. 전체적으로 검정의 유의수준은 1% 혹은 5%에서 검사하였다. 시험자료에 대한 통계분석은 SAS program(SAS Institute, USA)을 이용하여 실시하였다.

결 과

친세대 생식독성

시험기간 중 일반증상을 관찰한 결과, 수컷동물에서는 360 ppm 투여군에서 적색유루가 5례, 비루가 4례, 피모색소침착이 4례, 피모거침이 5례, 그리고 신경과민이 2례 관찰되었다. 암컷동물에서는 360 ppm 투여군에서 적색유루가 8례, 비루가 5례, 피모색소침착이 8례, 피모거침이 5례, 그리고 신경과민이 5례 관찰되었고, 120 ppm에서 적색유루와 피모발생이 각각 2례, 그리고 40 ppm 투여군에서 피모색소침착이 2례, 비루와 탈모가 각각 1례 관찰되었다.

임수동물의 체중을 측정한 결과(Figs. 1 and 2), 수컷

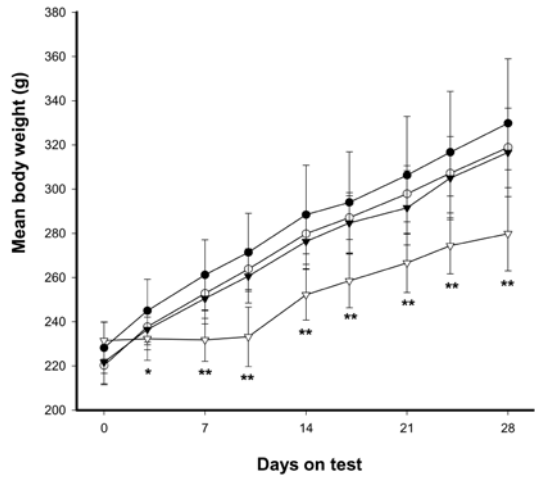


Fig. 1. Body weight changes of male rats treated with amitraz at concentrations of 0 (●), 40 (○), 120 (▼), and 360 (▽) ppm. Values are presented as means ±SD (g). **,***Indicate a significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ levels, respectively, when compared with the control group.

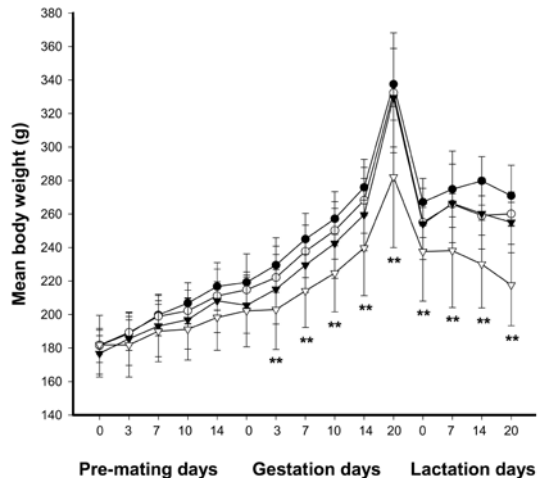


Fig. 2. Body weight changes of female rats treated with amitraz at concentrations of 0 (●), 40 (○), 120 (▼), and 360 (▽) ppm. Values are presented as means ±SD (g). ***Indicates a significant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

360 ppm 투여군에서 투여개시 후 3일째부터 부검 시까지와 암컷 360 ppm 투여군에서 임신 및 포유기간 중의 체중이 대조군에 비해 각각 통계적으로 유의성 있게 감소하였다. 반면, 120 및 40 ppm 투여군의 암수동물에서는 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 체중차이

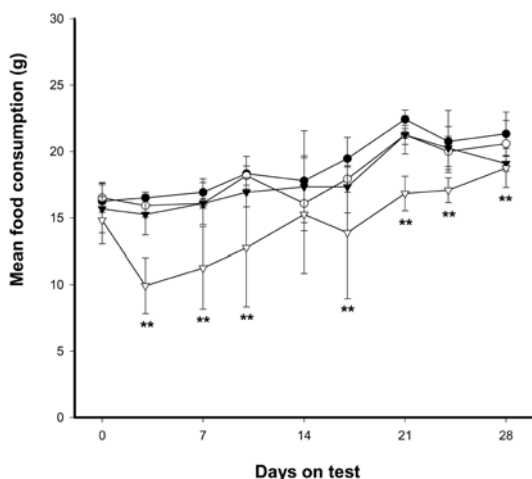


Fig. 3. Food consumption of male rats treated with amitraz at concentrations of 0 (●), 40 (○), 120 (▼), and 360 (▽) ppm. Values are presented as means ± SD (g). **Indicates a significant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

는 인정되지 않았다.

사료섭취량을 측정된 결과(Figs. 3 and 4), 수컷동물에서는 360 ppm 투여군에서 투여개시 후 3~10일과 17~28일, 그리고 120 ppm 투여군에서 투여개시 후 28일째의 사료섭취량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 암컷동물에서는 360 ppm 투여군에서 투여개시 후 0일과 3일, 임신 3일 및 포육 7~20일, 그리고 120 ppm 투여군에서 투여개시 후 3일과 10일 및 포육 14일째의 사료섭취량이 유의성 있게 감소하였다.

물 섭취량을 기준으로 하여 각 시험군의 시험물질 섭취량을 산출한 결과, 40과 120 및 360 ppm 투여군의 순으로 수컷은 5.7 ± 1.33 , 13.2 ± 2.08 및 35.8 ± 3.42 mg/kg/day, 그리고 암컷은 8.7 ± 4.42 , 20.1 ± 9.60 및 47.6 ± 22.38 mg/kg/day였다.

2주간의 시험물질 투여 후 동일 시험군의 암수동물을 교배시켜 생식성적을 조사한 결과(Table 1), 360 ppm 투여군에서 착상 후 배아사망률이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였으며, 분만 시와 출생 후 4일째의 새끼수는 각각 유의성 있게 감소하였다. 또한, 출생 시 사경(torticollis)을 가진 외표기형 새끼가 1례 관찰되었으며, 분만 후 13일째에 모체 1례에서는 모든 산자가 사망하였다. 360 ppm 투여군의 새끼에서 출생 후 4일째 생존율과 생후 21일째 이유율은 통계학적 유의성은 인정되지 않았으나 대조군에 비해 약 9%와 18%가 감소하였다.

부검 시 암수동물의 주요 생식장기를 적출하여 상대

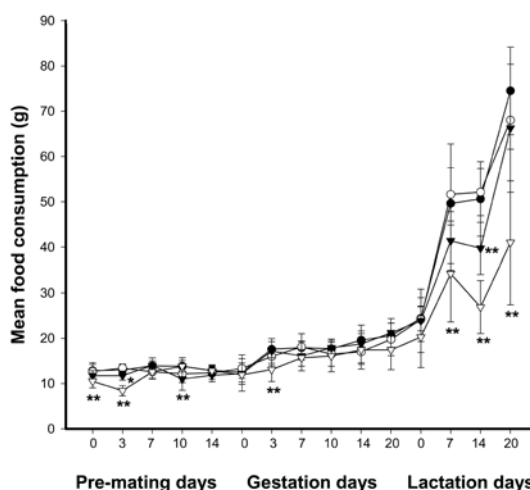


Fig. 4. Food consumption of female rats treated with amitraz at concentrations of 0 (●), 40 (○), 120 (▼), and 360 (▽) ppm. Values are presented as means ± SD (g). **Indicates a significant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

증량을 측정된 결과(Table 2), 수컷 360 ppm 투여군에서 정낭선 중량이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다.

차세대 발생독성

F1 동물의 신체발달을 평가하기 위해 성장시험군 동물의 체중을 측정된 결과(Tables 3 and 4), 수컷동물에서는 360 ppm 투여군에서 2주째부터 10주째까지, 그리고 120 ppm 투여군에서 2주와 3주 및 6~10주째의 체중에 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 암컷동물에서는 360 ppm 투여군에서 생후 2~8주 및 10주째에, 그리고 120 ppm 투여군에서 2주와 3주째의 체중이 대조군에 비해 각각 유의성 있게 감소하였다. 또 다른 신체발달 지표인 항문-성기간 길이와 컷바퀴분리, 피모발생, 절치붕출, 안검개열, 포피개열, 질개구 및 첫 발정 일령을 관찰한 결과, 모든 항목에서 대조군과 투여군간에 통계학적으로 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 성장시험군 동물을 생후 10주째에 부검하여 주요 장기의 장기중량을 측정된 결과, 수컷 360 ppm 투여군에서 흉선의 상대중량이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다(대조군 0.16 ± 0.33 ; 360 ppm 투여군 0.21 ± 0.01).

이유부검군의 암수동물을 생후 21일째에 부검한 결과, 모든 시험군의 암수동물에서 어떠한 육안적 이상소견도 관찰되지 않았으며, 생식장기의 중량에서도 대조군과 투여군간에 유의차가 인정되지 않았다.

Table 1. Reproductive and littering findings of dams treated with amitraz

	Amitraz in water (ppm)			
	0	40	120	360
Reproductive performance				
No. of mated pairs	12	12	12	12
No. of copulated pairs	12	12	11	12
Copulation index (%) [*]	100	100	91.67	100
Pre-coital time (days)	2.25 ± 0.97 [†]	2.67 ± 1.30	1.82 ± 1.25	2.42 ± 0.90
No. of pregnant females	12	11	11	11
Pregnancy index (%) [‡]	100	91.67	100	91.67
Parturition data				
No. of normal parturition	12	11	11	11
Gestation length (days)	21.71 ± 0.40	21.91 ± 0.44	21.86 ± 0.50	21.95 ± 0.52
No. of corpora lutea	13.83 ± 2.62	14.36 ± 2.25	15.45 ± 1.92	13.45 ± 1.63
No. of implantations	12.17 ± 1.90	13.45 ± 1.86	13.00 ± 1.34	11.18 ± 3.22
Pre-implantation loss (%) [§]	11.16 ± 9.00	5.82 ± 7.92	14.80 ± 12.57	17.09 ± 22.46
No. of live pups at birth	10.92 ± 2.97	11.64 ± 3.35	12.00 ± 1.84	6.36 ± 3.59 ^a
No. of stillborns	0	0.55 ± 1.81	0.18 ± 0.60	0.55 ± 1.29
Post-implantation loss (%)	11.23 ± 15.66	13.83 ± 19.12	7.92 ± 7.86	39.67 ± 29.79 ^a
Pups weight (g): males	5.63 ± 0.53	5.42 ± 0.50	5.40 ± 0.42	5.12 ± 0.44
females	5.18 ± 0.58	5.02 ± 0.50	4.91 ± 0.53	4.67 ± 0.46
Sex ratio (male/female)	1.09 ± 0.74	0.76 ± 0.45	0.87 ± 0.46	0.61 ± 0.57
No. of pups with external anomalies (%)	0	0	0	1 [¶]
Postnatal day 4				
No. of live pups	10.83 ± 2.92	11.64 ± 3.35	11.91 ± 1.92	6.27 ± 3.74 ^a
Viability index on PND 4 (%) ^{**}	99.36 ± 2.22	100	99.17 ± 2.74	90.91 ± 30.15
Weaning index (%) ^{††}	100	100	100	81.54 ± 35.03

^{*}Copulation index = (No. of animals with successful copulation/No. of mated animals) × 100. [†]Values are expressed as means ± SD. [‡]Pregnancy index = (No. of pregnant animals/No. of animals with successful copulation) × 100. [§][(No. of corpora lutea - No. of implantation sites)/No. of corpora lutea] × 100. ^{||}[(No. of implantation sites - No. of live embryos)/No. of implantation sites] × 100. [¶]Torticollis. ^{**}Viability index on PND 4 = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0) × 100. ^{††}Weaning index = (No. of live pups on postnatal day 21/No. of live pups after culling on postnatal day 4) × 100. ^aSignificant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

Table 2. Relative reproductive organ weights of F₀ male and female rats treated with amitraz

	Amitraz in water (ppm)			
	0	40	120	360
No. of males				
No. of males	12	12	12	12
Body weight at term	329.8 ± 29.11 [*]	318.2 ± 11.58	319.3 ± 18.04	274.1 ± 19.60 [†]
Testis : right	90.46 ± 0.04	90.48 ± 0.04	90.47 ± 0.03	90.51 ± 0.05
left	90.47 ± 0.04	90.49 ± 0.04	90.47 ± 0.03	90.53 ± 0.03
Epididymis : right	90.17 ± 0.01	90.17 ± 0.02	90.16 ± 0.01	90.17 ± 0.01
left	90.17 ± 0.01	90.17 ± 0.01	90.16 ± 0.01	90.18 ± 0.02
Ventral prostate	90.21 ± 0.03	90.23 ± 0.03	90.21 ± 0.04	90.19 ± 0.03
Seminal vesicles	90.42 ± 0.04	90.43 ± 0.03	90.39 ± 0.07	90.33 ± 0.07 [†]
No. of females				
No. of females	12	11	11	11
Body weight at term	269.9 ± 18.20	260.1 ± 6.90	255.0 ± 18.13	216.6 ± 24.32 [†]
Ovary : right	0.023 ± 0.006	0.024 ± 0.005	0.023 ± 0.003	0.026 ± 0.005
left	0.022 ± 0.006	0.024 ± 0.005	0.023 ± 0.007	0.025 ± 0.005

^{*}Values are expressed as means ± SD (% organ-to-body weight ratio). [†]Significant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

Table 3. Body weight changes in F₁ male rats treated with amitraz during gestation and lactation period

	Amitraz in water (ppm)			
	0	40	120	360
No. of males	12	11	11	11
Week 0	6.83 ± 0.63*	6.62 ± 0.60	6.60 ± 0.52	6.20 ± 0.44
Week 1	17.61 ± 1.43	17.25 ± 1.95	16.42 ± 1.65	16.27 ± 3.64
Week 2	35.95 ± 2.61	34.44 ± 1.86	31.30 ± 1.99‡	28.27 ± 5.17‡
Week 3	50.31 ± 2.83	49.59 ± 3.25	44.70 ± 3.77†	39.32 ± 7.08‡
Week 4	89.51 ± 2.88	85.48 ± 6.15	81.33 ± 10.98	72.20 ± 14.77‡
Week 5	144.9 ± 9.83	141.3 ± 4.72	134.5 ± 9.86	123.0 ± 15.77‡
Week 6	198.5 ± 8.18	191.6 ± 8.80	180.7 ± 14.77†	178.7 ± 19.69‡
Week 7	249.4 ± 11.01	244.7 ± 7.24	231.8 ± 12.38†	225.7 ± 24.83‡
Week 8	293.4 ± 10.06	291.7 ± 8.33	274.4 ± 15.87†	268.0 ± 24.81‡
Week 9	345.3 ± 22.64	334.0 ± 16.00	311.6 ± 23.96‡	306.0 ± 24.52‡
Week 10	374.6 ± 19.23	361.2 ± 12.87	344.8 ± 13.82‡	330.3 ± 17.28‡

*Values are expressed as means ± SD (g). †Significant difference at $p < 0.05$ compared with the control group. ‡Significant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

Table 4. Body weight changes in F₁ female rats treated with amitraz during gestation and lactation period

	Amitraz in water (ppm)			
	0	40	120	360
No. of females	12	11	11	11
Week 0	6.38 ± 0.58*	6.22 ± 0.50	6.11 ± 0.53	5.87 ± 0.46
Week 1	16.68 ± 1.82	16.13 ± 0.93	15.44 ± 1.17	14.55 ± 3.06
Week 2	34.01 ± 2.03	32.58 ± 1.72	29.55 ± 2.07‡	26.45 ± 5.37‡
Week 3	49.33 ± 4.55	46.81 ± 2.71	43.94 ± 2.89†	36.72 ± 5.66‡
Week 4	83.04 ± 6.43	78.13 ± 4.73	75.68 ± 11.16	67.47 ± 11.73‡
Week 5	120.9 ± 6.56	115.4 ± 5.94	112.5 ± 6.57	107.3 ± 12.61‡
Week 6	153.8 ± 4.06	148.4 ± 11.38	146.1 ± 5.08	142.5 ± 13.19†
Week 7	180.8 ± 5.70	173.8 ± 13.20	173.0 ± 7.39	166.8 ± 14.20†
Week 8	201.6 ± 5.97	193.8 ± 14.22	190.5 ± 8.57	185.2 ± 2.50‡
Week 9	212.1 ± 5.28	206.1 ± 17.90	204.3 ± 12.34	200.3 ± 15.03
Week 10	227.0 ± 9.21	224.7 ± 13.87	222.0 ± 8.91	210.7 ± 12.45‡

*Values are expressed as means ± SD (g). †Significant difference at $p < 0.05$ compared with the control group. ‡Significant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

Table 5. Behavioral tests of F₁ male rats treated with amitraz during gestation and lactation period

	Amitraz in water (ppm)			
	0	40	120	360
No. of males	12	11	11	11
Surface righting (sec)				
Day 2	3.71 ± 0.68*	2.63 ± 0.42	4.71 ± 1.23	6.29 ± 1.54
Day 5	1.13 ± 0.13	1.25 ± 0.16	1.38 ± 0.18	1.13 ± 0.13
Cliff drop aversion (sec)				
Day 2	83.29 ± 13.78	92.29 ± 11.15	82.17 ± 13.95	110.83 ± 9.17
Day 5	22.00 ± 6.57	14.13 ± 4.21	17.25 ± 4.74	19.75 ± 6.17
Negative geotaxis (sec)	7.13 ± 1.19	9.75 ± 2.23	7.50 ± 0.76	9.63 ± 1.43
Grip strength (gf)				
Day 21	293.88 ± 7.90	276.63 ± 9.89	253.5 ± 9.44†	243.14 ± 13.93‡
Day 60	988.38 ± 22.85	1003.38 ± 16.42	939.00 ± 29.76	906.00 ± 34.26
Rota-road test (sec)				
Day 22	53.63 ± 13.83	53.00 ± 12.73	49.50 ± 14.10	46.57 ± 11.93

*Values are expressed as means ± SD. †Significant difference at $p < 0.05$ compared with the control group. ‡Significant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

Table 6. Behavioral tests of F₁ female rats treated with amitraz during gestation and lactation period

	Amitraz in water (ppm)			
	0	40	120	360
No. of females	12	11	11	11
Surface righting (sec)				
Day 2	6.00 ± 1.93*	7.00 ± 1.72	6.43 ± 1.69	6.71 ± 0.84
Day 5	1.25 ± 0.16	1.25 ± 0.16	1.50 ± 0.19	1.13 ± 0.13
Cliff drop aversion (sec)				
Day 2	113.14 ± 6.86	93.57 ± 13.19	78.29 ± 11.68	73.67 ± 10.55
Day 5	17.38 ± 6.14	11.63 ± 2.71	14.25 ± 3.36	18.38 ± 8.12
Negative geotaxis (sec)	5.88 ± 0.79	6.88 ± 0.81	7.50 ± 0.93	10.0 ± 1.35 [†]
Grip strength (gf)				
Day 21	265.25 ± 14.11	255.50 ± 13.46	225.75 ± 7.91	236.86 ± 17.47
Day 60	844.38 ± 22.51	792.50 ± 25.27	733.13 ± 24.70 [†]	780.00 ± 30.36
Rota-road test (sec)				
Day 22	49.88 ± 11.86	47.13 ± 9.51	48.38 ± 14.15	40.20 ± 8.65

*Values are expressed as means ± SD. [†]Significant difference at $p < 0.05$ compared with the control group.

Table 7. Reproductive findings of F₁ male and female rats treated with amitraz during gestation and lactation period

	Amitraz in water (ppm)			
	0	40	120	360
Males				
No. of mated males	12	11	11	11
Copulation index (%) [*]	12 (100)	9 (81.8)	11 (100)	10 (90.9)
Fertility index (%) [†]	11 (91.7)	8 (88.9)	10 (90.9)	10 (100)
Females				
No. of mated females	12	11	11	11
Copulation index (%)	12 (100)	9 (81.8)	11 (100)	10 (90.9)
Pregnancy index (%) [‡]	11 (91.7)	8 (88.9)	10 (90.9)	10 (100)
Body weight (g): gestation day 0	234.5 ± 9.68	228.3 ± 11.83	229.4 ± 12.66	214.8 ± 16.90 ^b
gestation day 7	271.5 ± 11.22	264.8 ± 23.96	265.8 ± 10.97	250.0 ± 18.40 ^a
gestation day 13	302.0 ± 10.65	293.7 ± 17.01	294.8 ± 20.20	282.5 ± 19.23
No. of corpora lutea	14.43 ± 1.13 [§]	16.60 ± 1.52	16.29 ± 2.14	15.67 ± 3.56
No. of implantation sites	13.43 ± 1.27	15.60 ± 1.14	14.29 ± 1.38	13.50 ± 3.67
Pre-implantation loss (%)	6.63 ± 9.15	5.78 ± 5.80	11.69 ± 7.79	14.06 ± 15.29
No. of live embryos	12.43 ± 1.90	14.80 ± 0.84	13.86 ± 1.77	10.50 ± 4.97
No. of dead embryos	1.00 ± 1.83	0.80 ± 1.30	0.43 ± 0.53	3.00 ± 4.69
Post-implantation loss (%) [¶]	7.45 ± 13.04	4.78 ± 7.69	3.22 ± 4.02	20.0 ± 31.27

*Copulation index = (No. of animals with successful copulation/No. of mated animals) × 100. [†]Fertility index = (No. of impregnating animals/No. of animals with successful copulation) × 100. [‡]Pregnancy index = (No. of pregnant animals/No. of animals with successful copulation) × 100. [§]Values are expressed as means ± SD. ^{||}[(No. of corpora lutea - No. of implantation sites)/No. of corpora lutea] × 100. [¶][(No. of implantation sites - No. of live embryos)/No. of implantation sites] × 100. ^aSignificant difference at $p < 0.05$ compared with the control group. ^bSignificant difference at $p < 0.01$ compared with the control group.

행동시험군 동물에 대해 정향반사와 벼랑회피, 부주 지성, 악력 및 회전봉 시험을 실시한 결과, 수컷동물에서는 120 및 360 ppm 투여군에서 생후 21일째의 악력이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다(Table 5). 암컷동물에서는 120 ppm 투여군에서

생후 60일째의 악력이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고, 360 ppm 투여군에서 부주지성이 대조군에 비해 유의성 있게 지연되었다(Table 6). 행동시험군 동물에 대해 운동활성을 조사한 결과, 대조군과 투여군간에 통계학적으로 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

생식기능시험군 동물의 생식능력을 조사한 결과(Table 7), 비록 대조군에 비해 통계학적 유의성은 인정되지 않았으나 360 ppm 투여군의 착상 전 및 착상 후 배아사망률과 사망배아수는 대조군에 비해 각각 2.1배, 2.7배 및 3배 증가하였고, 이로 인해 생존배아수는 대조군에 비해 15.5% 감소하였다.

고 찰

본 연구는 amitraz의 교배전과 임신 및 포육기 노출이 친세대 및 차세대의 생식발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행하였다. 시험결과, 랫드에 amitraz의 반복 경구투여는 120 ppm 이상의 용량에서 다양한 생식발생 독성을 유발하는 것으로 확인되었다.

일반증상 관찰 시 360 ppm 투여군의 암수동물에서 관찰된 적색유루와 비루, 피부색소침착, 피부거침, 탈모 및 신경과민 소견은 발생빈도가 높았고, 용량의존적으로 증가한 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것으로 판단된다. 반면, 120 및 40 ppm 투여군에서 관찰된 일반증상은 발생빈도가 매우 낮았고, 관련된 다른 소견도 동반되지 않아 독성학적인 중요성은 없는 것으로 사료된다.

체중증정 시 360 ppm 투여군의 암수동물에서 관찰된 체중증가의 억제제는 용량의존적으로 나타났고, 또한 암수 공히 일치된 소견인 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것으로 판단된다. Amitraz의 투여에 의한 체중증가의 억제는 랫드 최기형성 [17]에서도 관찰된 소견으로써 일반증상에서 관찰된 다양한 독성증상과 함께 전신적 독성소견의 지표로 사료된다. 사료섭취량 측정 시 360 ppm 투여군의 암수동물에서 관찰된 섭취량의 감소는 시험물질의 투여에 기인된 식욕부진의 결과로 판단되며, 이로 인해 체중증가의 억제가 동반된 것으로 판단된다. 120 ppm 투여군의 암수동물에서도 산발적이지만 사료섭취량의 감소가 관찰되었으며, 본 용량에서도 식욕부진을 초래하는 것으로 확인되었다.

친세대 동물의 생식기능을 평가한 결과, 본 시험조건에서 amitraz의 투여는 교미율과 교미 소요기간, 수태율, 임신기간, 임신황체수, 착상수, 착상 전 배아사망률, 산자수, 그리고 새끼의 체중과 성비에는 어떠한 영향도 끼치지 않는 것으로 나타났다. 반면, 360 ppm 투여군에서 관찰된 착상 후 배아사망률의 증가와 출생 시 및 생후 4일째의 산자수 감소는 시험물질의 배태아치사효과에 기인된 것으로 판단되며, 이는 이전 시험 [17, 21]에서 보고된 연구결과와도 일치하는 소견이다. 360 ppm 투여군의 출생 후 4일째 생존율과 포육 21일째 이유율의 감소는 대조군에 비해 비록 통계학적 유의차는 인정되지 않았지만 착상 후 배태아사망의 증가와 일치하였고,

또한 정상적인 랫드에서는 흔히 관찰되지 않는 소견 [1, 2]이어서 본 소견 역시 시험물질의 투여에 기인된 중요한 독성소견으로 판단된다. 출생 시 360 ppm 투여군의 새끼 1례에서 관찰된 사경은 발생빈도가 매우 낮아 시험물질 투여와의 관련성은 명확히 알 수는 없었다. 그러나 amitraz가 랫드 태아의 척추에 다양한 기형을 유발한다는 최기형성 시험 [17]의 결과로 미루어 볼 때 본 소견은 시험물질의 투여에 의해 경추나 흉추에 형태학적 이상이 초래되어 나타났을 것으로 추정된다.

수컷동물의 부검 시 360 ppm 투여군에서 관찰된 정낭선 중량의 감소는 명백한 용량상관성을 보여 시험물질의 투여에 기인된 소견으로 사료된다. 정낭선은 androgen 의존성의 부생식선으로 중량감소는 남성호르몬의 분비기능 이상을 암시할 수 있다 [15, 25, 29]. 이전 연구 [12, 13]에 의하면, formamidine 계열 살충제는 알파-2 교감신경성 효현작용으로 인하여 시상하부-뇌하수체-성선 축으로 유지되는 호르몬 조절에 이상을 초래할 수 있다고 한다. 실제 수컷 랫드에 formamidine 계열 살충제인 chlordimeform 투여 시 혈중 황체형성 호르몬과 및 테스토스테론 농도가 감소한다는 것이 증명된 바 있다 [13].

차세대 동물의 신체발달에 미치는 영향을 평가한 결과, amitraz는 120 ppm 이상 투여군에서 암수동물의 체중증가 억제를 나타내었다. 본 소견은 암수 공히 명확한 용량의존성을 나타내었고, 출생 후 10주까지 지속적으로 관찰된 것으로 보아 시험물질의 투여에 의한 발육 지연 효과로 판단된다. 반면, 신체발달에 대한 다른 평가항목에서는 시험물질의 투여에 기인된 변화가 인정되지 않았다. 부검 시 수컷 360 ppm 투여군에서 관찰된 흉선 중량의 증가는 증가 정도가 미약하였고, 또한 동일군의 암컷동물에서는 관찰되지 않은 것으로 보아 독성학적인 중요성은 없는 것으로 판단된다.

운동과 전정기능의 발달, 감각 및 인지기능을 전반적으로 조사할 수 있는 신경행동 시험법 [5]을 이용하여 차세대 동물의 행동기능을 평가한 결과, 정향반사와 벼랑회피, 회전봉 및 운동활성 시험에서는 대조군과 투여군간에 차이가 인정되지 않았으나 수컷 120 및 360 ppm 투여군에서 생후 21일째와 암컷 120 ppm 투여군에서 60일째에 악력의 감소가 관찰되었고, 암컷 360 ppm 투여군에서 부주지성의 지연이 인정되었다. 악력과 부주지성의 평가결과가 암수동물에서 완전히 일치하지는 않았으나 수컷 동물에서 관찰된 악력의 감소와 암컷동물에서 관찰된 부주지성의 지연은 명확한 용량의존성을 나타내었고, 암컷동물의 악력과 수컷 동물의 부주지성도 유사한 경향을 나타낸 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 결과로 판단된다. 상기 소견들은 다른 행동기능

평가에서 이상이 관찰되지 않은 것으로 보아 신체발달의 지연이 주요 원인인 것으로 사료된다. 이전 연구에 따르면, 임신 또는 포육 중인 어미 랫드에 amitraz를 10~20 mg/kg 용량으로 반복 경구투여 하면 새끼의 신체발달 장애와 신경행동 장애가 나타난다고 하였다 [27, 28]. 성숙 랫드에 100-200 mg/kg 용량으로 복강투여 하면 운동과 긴장 및 공격 반응이 증가하고, 10-50 mg/kg 용량에서는 각성반응과 뒷발로 서는 행동의 감소와 자율신경의 변화가 관찰된다고 하였다 [24]. 반면, 수컷 랫드에 100 mg/kg 용량으로 투여 시 운동활성이 감소한다는 연구결과도 보고된 바 있다 [11]. 본 시험에서 관찰된 새끼의 신체발달 지연은 이전 연구결과와 일치하지만 정향반사와 비랑회피, 회전봉, 운동활성 시험 등의 신경행동 시험에서는 어떠한 영향도 인정되지 않아 다소 상반된 연구결과를 나타내었다. 본 시험과 상기 여러 시험간에 나타난 신경행동시험 결과의 불일치는 시험방법과 투여기간, 투여용량, 동물의 계통과 주령 등의 차이에 기인된 것으로 사료된다.

차세대 동물의 생식기능을 평가한 결과, amitraz는 성주기와 교미율, 수태율, 임신율, 임신황체수 및 착상수에 영향을 끼치지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 360 ppm 투여군의 F1 동물에서 임신기간 중 체중증가의 억제와 관찰되어 amitraz의 출생 전후 노출이 차세대 동물의 임신모체 체중에도 영향을 끼치는 것으로 나타났다. 또한 대조군에 비해 2-3배 증가한 착상 전 및 착상 후 배아사망률과 사망배아수, 그리고 이로 인한 생존배아수의 감소는 비록 통계학적 유의차는 인정되지 않았으나 대조군에 비해 현저한 차이가 인정되었고, 랫드에서 관찰되는 정상범위 [1, 2]를 초과하는 결과여서 시험물질의 투여가 직접적인 원인으로 판단된다. 이들 결과는 랫드에 amitraz의 투여가 친세대 동물뿐만 아니라 차세대 동물의 생식기능에도 악영향을 끼칠 수 있음을 암시해 준다.

결 론

본 연구는 랫드에 amitraz를 경구투여 하여 친세대 동물과 차세대동물의 출생 전후 발생, 행동 및 생식기능에 미치는 잠재적 영향을 조사하였다. 연구결과, 랫드에서 교배전, 임신 및 포육기에 amitraz의 물혼합 경구투여는 360 ppm용량에서 친세대 동물의 일반증상의 증가와 체중증가의 억제, 사료섭취량의 감소, 배아 사망률의 증가, 산자수의 감소 및 정낭선 중량의 감소를 유발하였으며, 차세대 동물에서는 체중증가의 억제와 악력의 감소, 부주지성의 지연, 배아사망률의 증가 및 생존배아수의 감소를 초래하였다. 120 ppm 용량에서는 친세대 동물의

체중증가 억제와 사료섭취량 감소, 그리고 차세대 동물의 체중증가 억제 및 악력 감소를 나타내었다. 본 시험 조건하에서 친세대 및 차세대의 생식발생에 대한 amitraz의 무해용량은 40 ppm으로 사료된다. 본 연구결과는 반복 경구노출에 의한 amitraz의 친세대 생식독성과 차세대 발생독성에 대한 정보를 제공하여 인체 위해성 평가에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2009년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구임(지역거점연구단육성사업/바이오하우징연구사업단). 또한 본 연구는 전남대학교 동물의학연구소의 일부 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. 김중준, 이상준, 배진숙, 박종일, 김용범, 정문구. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 발생독성시험의 기초 자료연구. 한국독성학회지 2001, **17**, 83-90.
2. 김중준, 이상준, 서정은, 차신우, 김충용, 한정희, 정문구. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 수태능 및 초기배 발생시험의 기초자료연구. 한국독성학회지 2002, **18**, 167-174.
3. Agin H, Calkavur S, Uzun H, Bak M. Amitraz poisoning: clinical and laboratory findings. Indian Pediatr 2004, **41**, 482-486.
4. Al-Thani RK, Al-Thani AS, Elbetieha A, Darmani H. Assessment of reproductive and fertility effects of amitraz pesticide in male mice. Toxicol Lett 2003, **138**, 253-260.
5. Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim Behav 1975, **23**, 896-920.
6. Aziz SA, Knowles CO. Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. Nature 1973, **242**, 417-418.
7. Cada AM, Gray EP, Ferguson SA. Minimal behavioral effects from developmental cerebellar stunting in young rats induced by postnatal treatment with α -difluoromethylornithine. Neurotoxicol Teratol 2000, **22**, 415-420.
8. Cullen LK, Reynoldson JA. Cardiovascular and respiratory effects of the acaricide amitraz. J Vet Pharmacol Ther 1987, **10**, 134-143.
9. Ekambaram P, Paul V. Calcium preventing locomotor behavioral and dental toxicities of fluoride by decreasing serum fluoride level in rats. Environ Toxicol

- Pharmacol 2001, **9**, 141-146.
10. **Fisher RA, Bennett JH, Yates F.** Statistical Methods, Experimental Design, and Scientific Inference. pp. 1-323, Oxford University Press, Oxford, 1990.
 11. **Flório JC, Sakate M, Palermo-Neto J.** Effects of amitraz on motor function. *Pharmacol Toxicol* 1993, **73**, 109-114.
 12. **Goldman JM, Cooper RL, Edwards TL, Rehnberg GL, McElroy WK, Hein J.** Suppression of the luteinizing hormone surge by chlordimeform in ovariectomized, steroid-primed female rats. *Pharmacol Toxicol* 1991, **68**, 131-136.
 13. **Goldman JM, Cooper RL, Laws SC, Rehnberg GL, Edwards TL, McElroy WK, Hein JF.** Chlordimeform-induced alterations in endocrine regulation within the male rat reproductive system. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990, **104**, 25-35.
 14. **Hayes WJ.** Handbook of Pesticide Toxicology. Vol. 1. Academic Press, San Diego, 1991.
 15. **Huang HFS, Li MT, Von Hagen S, Zhang YF, Irwin RJ.** Androgen modulation of the messenger ribonucleic acid of retinoic acid receptors in the prostate, seminal vesicles, and kidney in the rat. *Endocrinology* 1997, **138**, 553-559.
 16. **Jorens PG, Zandijk E, Belmans L, Schepens PJ, Bossaert LL.** An unusual poisoning with the unusual pesticide amitraz. *Hum Exp Toxicol* 1997, **16**, 600-601.
 17. **Kim JC, Shin JY, Yang YS, Shin DH, Moon CJ, Kim SH, Park SC, Kim YB, Kim HC, Chung MK.** Evaluation of developmental toxicity of amitraz in Sprague-Dawley rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007, **52**, 137-144.
 18. **Kruskal WH, Wallis WA.** Use of ranks in one criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 1952, **47**, 583-621.
 19. **Lazarini CA, Florio JC, Lemonica IP, Bernardi MM.** Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol Teratol* 2001, **23**, 665-673.
 20. **Leung VK, Chan TY, Yeung VT.** Amitraz poisoning in humans. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999, **37**, 513-514.
 21. **Lim JH, Kim SH, Kim KH, Park NH, Shin IS, Moon C, Park SH, Kim SH, Kim JC.** Reproductive and developmental toxicity of amitraz in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Res* 2010, **26**, 67-74.
 22. **Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT.** A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol* 1979, **1**, 233-236.
 23. **Moser VC.** Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. IV. Assessment of toxicity syndrome using a functional observational battery. *Fundam Appl Toxicol* 1991, **17**, 7-16.
 24. **Moser VC, Macphail RC.** Yohimbine attenuates the delayed lethality induced in mice by amitraz, a formamidine pesticide. *Toxicol Lett* 1985, **28**, 99-104.
 25. **Mukherjee M, Chattopadhyay S, Mathur PP.** Effect of flutamide on the physiological status of epididymis and epididymal sperms. *Andrologia* 1992, **24**, 113-116.
 26. **Palanza P, Parmigiani S, vom Saal FS.** Effects of prenatal exposure to low doses of diethylstilbestrol, o,p'DDT, and methoxychlor on postnatal growth and neurobehavioral development in male and female mice. *Horm Behav* 2001, **40**, 252-265.
 27. **Palermo-Neto J, Flório JC, Sakate M.** Developmental and behavioral effects of prenatal amitraz exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1994, **16**, 65-70.
 28. **Palermo-Neto J, SkatM, Flório JC.** Developmental and behavioral effects of postnatal amitraz exposure in rats. *Braz J Med Biol Res* 1997, **30**, 989-997.
 29. **Patil S, Patil SR, Londonkar R, Patil SB.** Effects of pathidine on spermatogenesis in albino rats. *Ind J Pharmacol* 1998, **30**, 249-253.
 30. **Proudfoot AT.** Poisoning with amitraz. *Toxicol Rev* 2003, **22**, 71-74.
 31. **Scheffé H.** A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika* 1953, **40**, 87-104.
 32. **Shin DH, Hsu WH.** Influence of the formamidine pesticide amitraz and its metabolites on porcine myometrial contractility: involvement of α_2 -adrenoceptors and Ca^{2+} channels. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, **128**, 45-49.
 33. **Ulukaya S, Demirag K, Moral AR.** Acute amitraz intoxication in human. *Intensive Care Med* 2001, **27**, 930-933.
 34. **Weil CS.** Selection of the valid number of sampling units and a consideration of their combination in toxicological studies involving reproduction, teratogenesis or carcinogenesis. *Food Cosmet Toxicol* 1970, **8**, 177-182.
 35. **Yim GKW, Holsapple MP, Pfister WR, Hollingworth RM.** Prostaglandin synthesis inhibited by formamidine pesticides. *Life Sci* 1978, **23**, 2509-2515.