

흰쥐에 있어서 Fthalide의 독성

김영찬⁷ · 장영수*

국립춘천정신병원 약제과, *보건복지부 마약관리과

The Toxicity of Fthalide in Rats

Young Chan Kim and Young Soo Chang*

Pharmaceutical Division, National Chun Chon Mental Hospital, ChunChun 200-111, Korea

*Narcotic Control Division, Ministry of Health and Welfare, KwaChun 427-070, Korea

Abstract—The acute toxicity of fthalide in rat was studied *in vivo* by the observations of the changes in hematogram, serological parameters, content of cytochrome p-450, activities of NADPH-cytochrom c reductase, glucose-6-phosphatase, and the contents of cholinesterase and carboxylesterase in liver. Fthalide is a practically non-toxic substance(LD50 is 3,86g/Kg), but rats were intoxicated with fthalide at a oral dose of 100 mg/kg for 12 days. WBC were significantly decreased and activities of ALT and LDH, on the contrary, the content of glucose in serum were slightly increased. Cytochrome p-450 and lipid peroxide in liver were significantly increased in the fthalide-intoxicated rats. The longer administration of fthalide showed further increase of carboxylesterase activity in liver and serum, but decrease of activities of glucose-6-phosphatase and cholinesterase in liver and serum. These results show that fthalide can induce the hepatocellular injury and neurotoxicity.

Keywords □ Fthalide (4,5,6,7-tetrachlorophthalide), acute toxicity, cytochrome p-450, NADPH-cytochrom c reductase, glucose-6-phosphatase, transaminase, cholinesterase, carboxylesterase, NADPH-glucose-6-phosphatase.

유기염소계 살충제는 대부분 지용성이며, 생분해가 어려워 환경내에 오랫동안 잔류한다. 예를들면 DDT는 잔류기간이 10년이상이 되는 난분해성화합물로 생태계 및 인체에 오랫동안 영향을 미치게 된다.¹⁾

지용성이 큰 유기염소계 살충제는 지방조직에 축적되기 쉬우며, 살충제는 선택독성을 나타내고, 해충의 exoskeleton에 쉽게 투과할 수있으나 포유동물에서 경피흡수는 상대적으로 낮다고 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 유기염소계 살충제의 독성기전은 아직 명확하게 규명되어 있지 않았으나, Dable등⁵⁾은 충추신경계에 작용하여 신경독성을 유발하며 2차적으로 운동 신경섬유와 motor cortex에 영향을 미치거나 신경막에서의 나트륨과 칼륨이온의 이동에 영향을 미치는데 이는 세포막과 관계된 효소반응에 영향을 미친다고 보고되어 있다. 따라서 유기염소계 살충제의 급성독성은 비정상적인 활동전압때문

이라고 알려져 있다.

Fthalide(4,5,6,7-tetrachlorophthalide)⁶⁾는 도열병에 사용되고 있는 유기염소계 살충제의 일종으로 사용한 논어의 토양이나 곡물에서 그 잔류량은 매우 적었고 식물독성도 나타나지 않았다고 보고되어 있다. Fthalide의 급성독성으로는 흰쥐와 마우스에 10 g/kg을 투여할 때 아무런 독성작용도 발현되지 않았다고 보고되어 있으며 더욱이 어류에 대해서도 독성이 낮았고 토기의 피부 및 망막에 대한 자극작용도 나타나지 않는다고 보고되고 있다.⁷⁾ 이와같이 포유동물에 대한 독성이 낮다는 보고가 있었으나 생식 독성이나 최기형성에 대한 독성에 관하여 명확한 보고가 없으므로 그의 안전성 평가에 대한 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

Sato등⁸⁾은 세정하지 않은 쌀에서 fthalide의 허용 잔류량은 1 ppm이라고 보고하였으며, 이는 사람이 하루에 섭취 가능한 양의 1/20이다. 즉 500 g의 쌀에 fthalide 1 ppm이 들어 있다고 할 때 섭취되는 하루의

⁷⁾ 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

fthalide양은 총 10 µg/kg/day가 된다고 보고하였다. 또 하루에 fthalide를 섭취한 어미 송어에서 가장 높은 농도일 때 565~772 mg/kg/day이며 이 수치는 사람에게 의하여 섭취되는 양에 비하면 70,000배에 해당되지만 사람이 송어를 섭취할 때 아무 이상을 발견하지 못하였다고 보고하였으며, 그들은 fthalide는 24시간 이내 양 1/9이 뇨로 배설되며 주 대사산물은 3,4,5,6-tetrachloro-2-hydroxymethylbenzoate와 미반응의 fthalide라고 보고하였으며, 이들 대사산물도 흰쥐의 생식이나 수태형성에는 유해작용이 나타나지 않았으며, 사료에 fthalide 0.01~0.1%를 섞어 사육한 흰쥐에서도 중독증상이나 사망은 나타나지 않았고 체중변화 및 사료섭취량, 식수량에서도 대조군과 차이가 없었으며 병리학적 및 혈액학적 소견에서도 이상이 없었고, 최기형성 및 번식율에서도 이상이 나타나지 않았다고 보고하였다. 그러나 fthalide가 독성은 적지만 대사효소계에 영향을 미칠 것으로 사료되나 아직 여기에 대하여는 연구된 바 없다.

따라서 저자는 fthalide의 독성기전을 연구할 목적으로 흰쥐에 100 mg/Kg씩 12일간 경구 투여하고 혈액 및 혈청 생화학적 변화 및 약물대사효소에 미치는 영향과 간장 및 신장의 과산화지질 및 glucose-6-phosphatase를 측정하여 세포막에 미치는 영향과 cholinesterase 및 carboxylesterase를 측정하여 신경독성에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 투여 횟수가 증가됨에 따라 독성이 점점 심해지고 12일 투여군에서 유의성있는 특징적인 독성이 나타났다.

실험 방법

시약 및 기기

시약 - 본 실험에 사용한 fthalide는 주식회사 경농 제품(순도 92.8%)을 사용하였고, corn oil, barbital sodium salt, cytochrome C, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), glucose 6-phosphate disodium salt hydrate, β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, propionylthiocholine iodide, quinidine sulfate, 2-thiobarbituric acid, tris-(hydroxymethyl)-aminomethane 및 albumin 등은 Sigma사 제품을 사용하였고, naphthanil diazo blue, β-naphthyl acetate 및 1,1,3,3-tetraethoxyproph-

ane들은 Tokyo Kasei사 제품을, CO gas(99%)는 Matheson Gas product 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

기기 - UV spectrophotometer와 graphic printer(PR-1), autoanalyzer(CL-20)는 Shimatzu사제, high speed centrifuge (KR-20000T)는 Kubota사제, Potter Elverhjem type teflon-glass homogenizer 는 Fisher Scientific사제, Coulter counter (sysmex - 2500)는 Toaco사제를 사용하였다.

실험동물 및 약물투여 방법 - 체중 200 g 내외의 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 한국실험동물센터에서 분양받아 1주일간 실험실 환경에 적응시킨후 1개군 10마리로 하여 polycarbonate cage내에서 사육하였다. 사료는 시판 배합고형사료(신촌사료 주식회사)를 급식하였으며 급수는 수도수를 자유로이 섭취하도록 하였다. 실험군은 약물을 1일 1회씩 12일간 각각 경구 투여하였으며 희생되기 24시간 전부터는 물만 공급하고 절식시켰다. 사료의 조성은 조단백질 22.2%이상, 조지방 3.5%이상, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, Ca 0.6%이상, P 0.4%이상 이었다. 대조군에는 corn oil을 5.0 ml/kg씩 경구 투여하였으며, 약물투여군에는 corn oil에 현탁시킨 fthalide를 100 mg/kg씩 대조군과 동일한 방법으로 투여하였다.

LD₅₀ 치의 측정 - 체중 200 g 내외의 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐에 경구투여한 다음 24시간 이후의 치사유무를 관찰하여 Behrens-Karber법에 따라 LD₅₀ 치를 구하였다.

체중, 간장 및 신장의 증량측정 - 약물투여전의 체중과 최종약물투여 24시간 후의 체중을 측정하여 약물투여 전후의 체중증감비율을 산출하였다. 체중을 측정할 흰쥐는 ether로 마취시키고 신속히 복부 정중선을 따라 개복하여 복부대동맥에서 채혈하였다. 채혈 후 간장 및 신장을 원형을 유지하면서 생리식염액으로 관류하여 혈액을 제거한 후에 적출하고 생리식염으로 깨끗히 씻어 여지로 수분을 제거한 다음 즉시 무게를 측정하였다.

혈액학적 및 혈청 생화학적 변화의 측정 - 복부대동맥에서 채혈한 혈액 일부는 Coulter counter로 혈액학적 검사를 하였으며 일부는 시험관에 넣어 30분간 방치한 후에 2,000 g에서 20분간 원심분리시켜 얻은 혈청을 blood autoanalyzer를 사용하여 혈청 생화학적 검

사를 실시하였다.

간장 및 신장 microsome 분획의 분리 - 척출한 간장 및 신장을 잘게 썰어 Potter Elvehjem homogenizer 를 사용하여 0.25 M sucrose용액에서 homogenize시켰다. 10~20%의 간장 homogenate를 Kamath등⁹⁾의 방법을 개량한 Cinti등¹⁰⁾의 방법에 따라 differential centrifugation을 하였다. Homogenate를 600 g에서 5분간 원심분리하고 그 상등액을 취하여 2°C에서 12,000 g로 10분간 원심분리하고 microsome을 완전히 침전하기 위하여 8 mM CaCl₂ 용액을 post-mitochondrial supernatant에 가한 후 다시 2°C에서 27,000 g로 15분간 원심분리하였다. 상기의 과정은 4°C에서 시행하였다.

여기서 얻은 pellet를 동량의 0.15 M KCl을 가하여 세척한 후 재현탁시키고 다시 27,000 g에서 15분간 원심분리한 다음 그 pellet을 microsome분획으로 사용하였다.

Cytochrome P-450 함량측정 - Microsome 분획중의 cytochrome P-450 함량측정은 Omura와 Sato¹¹⁾의 방법을 참조하고 Matsubara등¹²⁾의 변법에 준하여 differential spectrophotometry로 측정하였다. Microsomal pellet에 0.2 M 인산염완충액 (10⁻³ M EDTA, pH7.4)을 넣어 microsomal suspension을 만든 후 그 일정량을 취해 CO gas를 1분간 bubbling시킨 다음 2개의 cuvette에 양등분하였다. 3분간 방치 후 소량의 sodium dithionite를 sample cuvette에 가하고 1분 후에 450 nm와 500 nm에서 흡광도를 측정하고 그 차이를 molar extinction difference를 104 mM⁻¹로 하여 cytochrome P-450의 함량을 계산하였다.

NADPH-cytochrome c reductase 활성측정 - Masters등¹³⁾ 및 Mazel¹⁴⁾의 방법에 준하여 인산염완충액 (10⁻³ M EDTA, pH7.6)을 사용하고 NADPH-cytochrome c reductase 활성측정용 현탁액으로 사용하였다. 배양액은 용액-I은 NADPH 5.7 mg, KCN 9.75 mg, nicotinamide 366 mg을 0.05 M 인산완충액 100 ml를 넣어 제조하였고(pH 7.6), 용액-II는 cytochrome c 3.68 mg을 증류수 1 ml에 녹여 사용하였으며, 용액-III은 KCN 9.75 mg, nicotineamide 366 mg을 0.05 M 인산완충액을 넣어 100 ml로 조제하여 사용하였다.

Sample cuvette에는 용액-I 2 ml를, reference cu-

vette에는 용액-III 2 ml를 가하고 25°C에서 8분간 배양시킨 다음 각각의 cuvette에 용액-II를 0.15 ml씩 가하였다. 이 혼합물을 다시 25°C에서 2분간 배양시키고 위에서 만든 microsomal suspension 0.5 ml씩을 각 cuvette에 가하여 총량을 3 ml로 한 다음 신속히 혼합하고 25°C를 유지하면서 reaction rate가 linear하게 되는 3~4분 사이에 550 nm에서 1분간의 흡광도차를 측정하고 molar extinction difference를 19.1 mM⁻¹ · cm⁻¹로 하여 NADPH-cytochrome c reductase의 활성을 계산하였다.

Microsome 분획중 단백질 함량측정 - Microsome 분획 중 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 Lowry¹⁵⁾법에 따라 정량하였다.

간장 microsome 분획중 과산화지질 측정 - Oishi법¹⁶⁾에 준하여 측정하였다. 즉 microsome 분획 0.2 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml를 넣어 용해시킨 후 pH 3.5인 20%초산완충액 1.5 ml 및 0.8% 2-thiobarbituric acid (TAB) 시액 1.5 ml를 넣어 4.0 ml가 되게 하였다. 이 액을 95°C에서 60분간 가열한 후 증류수 1.0 ml 및 n-butanol-pyridine 혼액 (15:1) 5.0 ml로 추출하였다. 따로 1,1,3,3-tetraethoxy-propane 5 nM을 표준으로 표준곡선을 작성하여 비교 과산화지질을 정량하였다.

간장 glucose-6-phosphatase의 활성측정 - 척출한 간장을 냉각된 0.1 M Tris-maleate완충액(pH6.2)으로 세척하여 닦아 낸 다음 무게를 칭량하고 homogenizer를 사용하여 냉각된 Tris-maleate 완충액(pH 6.2)으로 20%(w/v) 간장 homogenate를 조제한 후 다시 냉각된 Tris-maleate 완충액(pH 6.2)으로 단계적으로 희석하여 농도가 20 mg/ml가 되도록 하였다.

Triger와 Plaa의 변법¹⁷⁾에 따라 Tris-maleate 완충액(pH 6.2) 0.4 ml와 glucose-6-phosphate용액 0.5 ml를 시험관에 넣어 metabolic shaking incubator에서 37°C로 20분간 반응시켰다. 이 반응을 10% trichloroacetic acid (TCA) 5.0 ml를 넣어 중지시킨 다음 원심분리하고 그 상등액 2.0 ml를 취하여 Fiske-Subbarow법¹⁸⁾에 따라 무기인인의 함량을 측정하였다.

간장 및 혈청 cholinesterase활성 측정 - 간장 cholinesterase의 활성은 간장 1 g에 0.036 M phosphate buffer(pH7.6) 10 ml를 homogenizer에 넣고 저온에서 충분히 마쇄한 후 동일 buffer로 10 mg/ml로

희석한 다음 검체로 사용하였고 혈청은 증류수로 50~100배 희석한 다음 검체로 사용하였다. 이 검체를 Ellman등¹⁹⁾의 방법에 따라 실험하였다. DTNB(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) buffer (0.42 mM/l, pH 7.6) 3 ml를 blank test tube와 sample test tube에 각각 넣고 37°C에서 5분간 미리 배양하였다.

sample test tube에 기질로서 propionylthiocholine iodide용액 (10 mM/L) 1 ml를 넣고 37°C에서 정확히 3분간 배양시킨 후 반응을 정지시키기 위해 quinidine 용액 (14 mM/L) 1 ml를 가하였다. Blank test tube에는 quinidine용액, 검체, 기질액 순서로 가한 다음 대조액으로 하여 5분 이내에 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간장 및 혈청 carboxylesterase 활성측정 - 간장 carboxylesterase 활성은 간장 1 g에 0.25 M sucrose 10 ml를 homogenizer에 넣고 저온에서 충분히 마쇄한 후 3,000 g에서 수분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상등액을 검체로 하였으며, 혈청은 증류수로 5~100배 희석하여 검체로 하였다. 이 검체를 Nachlas등²⁰⁾의 방법에 따라 효소활성을 측정하였다. 즉 1 ml의 검체에 기질액 6 ml를 가하고 37°C에서 20분간 배양시킨 후 naphthanil diazo blue B용액 1 ml (4mg powder/H₂O 1 ml)를 가하고 교반하였다. 3분 후 40% trichloroacetic acid 1 ml, ethyl acetate 10

ml를 가하고 교반한 다음 원심분리하여 ethyl acetate층을 분리하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 따로 β-naphthol을 사용한 표준곡선을 작성하여 검체에서 생성된 β-naphthol의 양을 계산하여 활성을 측정하였다.

기질액은 β-naphthyl acetate 10 ml를 2 ml의 acetone에 녹인 후 veronal buffer (pH 7.4) 50 ml와 증류수 48 ml를 넣어 조제하였다. veronal buffer는 barbitol 10.3 g을 증류수에 녹여 500 ml로 제조한 액 58.1 ml를 취하고 여기에 0.1 N HCl 41.9 ml를 가하여 조제하였다.

결과 및 고찰

LD₅₀치

Fthalide를 흰쥐에 경구투여하고 난 24시간 후의 치사유무를 관찰하여 Behrens-Karber법에 의하여 LD₅₀치를 구한 결과 LD₅₀치는 3.860 mg/kg이었다. 이는 살충제의 일반적인 독성기준에 의하면 실질적으로 무독한 상태로 구분할 수 있다. Sato등⁸⁾은 fthalide를 흰쥐와 생쥐에 투여할 때 아무런 급성경구 독성작용은 나타나지 않았으며 3%를 사료에 섞어 사육할 때에도 아무 이상이 발견되지 않았다고 보고하였던 것은 LD₅₀치가 낮기때문이라 사료된다.

Table I— Effect of fthalide on body weight gain in rat

Group	Day	Initial body weight	Final body weight	Gained(%)
Control	3	215.4 ± 4.95	216.4 ± 5.27	0.46
	6	212.6 ± 3.65	219.8 ± 4.95	3.39
	9	214.2 ± 5.23	225.3 ± 5.21	5.18
	12	210.6 ± 4.75	240.6 ± 4.95	14.25
Fthalide (100 mg/kg)	3	215.9 ± 4.75	217.9 ± 5.25	0.93
	6	210.4 ± 5.05	220.6 ± 4.45	4.85
	9	214.9 ± 4.62	230.9 ± 5.72	7.45

Each value is the mean ± SE

Table II— Effect of fthalide on liver and kidney weight per body weight ratio(%) in rats

Groups	Days	Liver weight	Liver Weight/Body weight	Kidney Weight	Kidney Weight/Body weight
Control	3	6.74 ± 0.24	3.11 ± 0.08	1.70 ± 0.07	0.78 ± 0.05
	6	6.82 ± 0.32	3.10 ± 0.05	1.76 ± 0.09	0.80 ± 0.06
	9	7.25 ± 0.28	3.11 ± 0.07	1.81 ± 0.04	0.80 ± 0.03
	12	7.46 ± 0.33	3.10 ± 0.09	1.84 ± 0.05	0.78 ± 0.05
Fthalide (100 mg/kg)	3	6.84 ± 0.29	3.14 ± 0.09	1.71 ± 0.07	0.78 ± 0.04
	6	6.99 ± 0.27	3.17 ± 0.06	1.74 ± 0.10	0.79 ± 0.06
	9	7.43 ± 0.21	3.21 ± 0.08	1.82 ± 0.09	0.79 ± 0.06
	12	7.62 ± 0.27	3.19 ± 0.06	1.96 ± 0.09	0.82 ± 0.07

Each value is the mean ± SE

체중, 간장 및 신장의 중량변화

체중변화 - Fthalide를 투여한 실험군의 체중변화는 Table I에서 보는 바와 같이 대조군에서는 체중이 3.6 및 12일째에 각각 0.46, 3.39 및 14.25% 증가되어 있으나 fthalide를 투여한 실험군에서 약간 감소하는 경향을 보였으나 대조군과 비교하면 유의성있는 변화가 없었다. Sato등⁸⁾이 fthalide 0.01~9.1%를 사료에 섞어서 사육한 흰쥐에서 체중변화, 사료섭취량 및 식수량에서 대조군과 차이가 없었다고 보고한 것과 일치하였다.

Table III—Effect of fthalide on total feed intake in ten rats

Groups	Total intake(g) after administration of fthalide			
	3rd day	6th day	9th days	12th days
Control	349	705	1074	1394
	342	677	1054	1319

Table IV— Effect of fthalide on blood parameters in rats

Groups	Days	WBC	RBC	Hgb	Hct	MCV	MCH	MCHC	PLT
Control	1	9.2 ± 2.17	7.0 ± 0.4	13.9 ± 0.6	39.7 ± 1.89	54.2 ± 1.87	20.1 ± 0.69	32.7 ± 0.81	729 ± 53
	2	10.7 ± 1.08	7.3 ± 0.5	13.3 ± 0.9	41.0 ± 2.69	55.1 ± 1.61	18.2 ± 0.37	33.3 ± 0.54	764 ± 72
	3	9.7 ± 1.86	7.4 ± 0.4	14.1 ± 0.5	41.8 ± 2.91	52.9 ± 1.21	18.0 ± 1.21	33.5 ± 1.87	810 ± 59
	4	10.0 ± 2.34	7.5 ± 0.2	13.1 ± 0.5	52.4 ± 1.78	52.4 ± 1.78	19.7 ± 0.47	33.9 ± 0.41	806 ± 82
Fthalide (100 mg/kg)	1	10.3 ± 0.54	8.0 ± 1.13	14.3 ± 0.71	43.4 ± 2.44	54.3 ± 2.99	18.0 ± 2.65	33.3 ± 1.17	766 ± 21
	2	10.1 ± 0.38	7.3 ± 0.09	13.1 ± 0.91	41.6 ± 3.01	53.5 ± 3.01	17.7 ± 3.00	32.9 ± 3.05	779 ± 29
	3	8.8 ± 0.91	6.8 ± 0.17	13.2 ± 0.84	41.9 ± 1.59	53.6 ± 1.75	20.7 ± 2.74	32.5 ± 2.75	781 ± 30
	4	7.9 ± 0.41*	7.6 ± 0.11	14.5 ± 1.09	24.8 ± 4.03	65.6 ± 4.36	18.8 ± 2.51	33.5 ± 3.34	799 ± 37

Each value is the mean ± SE

Significant difference from control (*: p<0.05)

WBC: white blood cell, RBC: red blood cell, Hgb: hemoglobin, Hct: hematocrit

MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin

MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT: platelet

*: p < 0.05

Table VI—Effect of fthalide on hepatic and renal microsomal cytochrome P-450 contents, NADPH-cytochrome C reductase activity in rats.

Groups	Day	Liver		Kidney	
		P-450	Cyto. C red	P-450	Cyto C red
Control	3	0.795 ± 0.043	114.50 ± 8.79	0.395 ± 0.029	9.43 ± 0.74
	6	0.790 ± 0.072	119.45 ± 7.94	0.396 ± 0.034	9.16 ± 0.65
	9	0.784 ± 0.109	120.38 ± 6.43	0.384 ± 0.027	9.45 ± 0.59
	12	0.804 ± 0.062	117.84 ± 7.52	0.390 ± 0.045	9.54 ± 0.43
Fthalide(100 mg/kg)	3	0.794 ± 0.074	136.95 ± 8.95	0.414 ± 0.052	9.21 ± 0.97
	6	0.843 ± 0.065	130.49 ± 5.43	0.444 ± 0.085	9.43 ± 0.45
	9	0.901 ± 0.019	130.59 ± 7.62	0.524 ± 0.069	9.76 ± 0.54
	12	1.089 ± 0.074*	134.39 ± 4.75	0.532 ± 0.045	9.83 ± 0.36

Each value is the mean ± SE

Significant difference between control & treated group. (*: p<0.05)

unit: Cytochrome P-450 (n mole/mg protein)

NADPH-cytochrome C reductase (Cyt.C red) (n mole cyt.C.reduced/min/mg protein)

간장 및 신장의 중량변화 - 간장 및 신장의 중량 변화는 Table II에서 보는 바와 같이 fthalide투여군에서 투여횟수가 증가함에 따라 간장 및 신장의 중량대 체중에 대한 비율은 증가하는 경향이 있었다. 즉 간장 및 신장 중량에 대한 체중 비율은 대조군에서는 약 3.11% 였으나 fthalide투여군에서는 약 3.20% 로서 약간의 증가가 있었다. 이는 약물투여에 의하여 간비대가 일어난 데 원인이 있다고 사료된다. Bond등²¹⁾은 천연 pyrethrin 1.85% mg을 흰쥐에 90일간 매일 경구투여 하였을 때 체중 증가율은 감소하나 간장의 중량은 증가된다는 보고와 일치하였다.

한편 각 군에서 12일간의 평균 사료 섭취량은 Table III에서 보는 바와 같이 fthalide 투여군에서는 제6일째에 677g로서 대조군의 705g에 비하여 감소되었으나 모든 실험군에서 차이가 없었다.

Table V -- Effect of fthalide on biochemical parameters in serum of rats

Groups	Days	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	ALP (U/L)	Glucose (mg/dl)	TG (mg/dl)	Cholest (mg/dl)	BUN (mg/dl)	total	Protein(g/dl) albumin
Control	1	76.2 ± 4.75	42.0 ± 3.21	428.5 ± 29.65	245.5 ± 29.65	147.1 ± 8.39	58.4 ± 4.75	50.9 ± 6.24	19.2 ± 1.05	5.9 ± 0.15	2.1 ± 0.09
	2	79.7 ± 5.41	41.9 ± 2.98	445.4 ± 31.43	252.7 ± 19.32	150.8 ± 7.51	59.5 ± 5.21	55.4 ± 5.78	20.3 ± 1.27	6.4 ± 0.17	2.3 ± 0.14
	3	74.7 ± 4.05	42.5 ± 3.43	450.7 ± 24.51	256.4 ± 27.49	147.7 ± 8.41	49.9 ± 3.72	59.4 ± 4.96	19.1 ± 1.09	6.6 ± 0.21	2.2 ± 0.12
Fthalide (100mg/kg)	4	78.2 ± 7.21	45.2 ± 4.01	464.4 ± 31.54	236.2 ± 16.72	152.6 ± 7.05	55.6 ± 6.05	51.8 ± 3.47	17.9 ± 1.65	6.8 ± 0.14	2.3 ± 0.14
	1	74.3 ± 7.44	40.9 ± 3.72	453.9 ± 29.43	230.4 ± 17.03	148.9 ± 6.45	58.9 ± 4.21	56.6 ± 3.92	25.6 ± 1.07	6.1 ± 0.14	2.1 ± 0.12
	2	70.2 ± 6.59	47.5 ± 2.96	439.3 ± 31.72	274.4 ± 16.43	173.4 ± 5.27	56.7 ± 3.69	63.5 ± 2.75	19.8 ± 2.43	5.8 ± 0.42	2.3 ± 0.25
	3	81.0 ± 6.94	49.3 ± 3.65	490.4 ± 32.49	259.5 ± 17.48	180.2 ± 8.72	52.6 ± 7.49	64.4 ± 3.79	26.7 ± 1.42	5.6 ± 0.59	2.3 ± 0.14
	4	95.7 ± 7.46*	55.2 ± 4.01	527.5 ± 19.56*	255.7 ± 14.52	189.4 ± 7.22*	56.6 ± 6.54	64.4 ± 4.05	24.9 ± 2.01	6.6 ± 0.44	2.3 ± 0.26

Each value is the mean ± SE

Significant difference between control & treated groups (*:P<0.05)

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase

LDH: lactic dehydrogenase, ALP: alkaline phosphatase

TG: triglyceride, Cholest: Cholesterol

혈액학적 및 혈청 생화학적 변화

혈액학적 변화 - Fthalide를 투여할 때 혈액상의 변화는 Table IV에서 보는 바와 같이 WBC값이 대조군에 비하여 약물의 투여횟수가 증가할수록 점차 감소하는 경향을 보였으며 RBC, Hgb, Hct등에서는 별 변화가 없었다. Parker²²⁾은 0~1,000 ppm의 fenvalerate를 함유한 사료를 흰쥐에 2년간 경구투여하였을 때 혈액상의 변화를 발견하지 않았다고 보고하였으며, 홍등²³⁾은 cypermethrin 10 mg/kg을 흰쥐에 2주간 투여하였을 때 WBC가 약간 감소하였을 뿐 다른 혈액학적 변화는 대조군과 유사하였다고 보고한 결과와 일치하였다. 본 실험에서도 fthalide투여에 의한 혈액상의 변화는 모든 항목에서 대조군과 비교할 때 유의한 차이가 없었다.

혈청 생화학적 변화 - Fthalide투여에 따른 혈청 생화학적 변화는 Table V에서 보는 바와 같다. Aspartate aminotransferase(이하 AST)의 활성변화는 약물의 투여 횟수가 증가할 수록 대조군에 비하여 점차 증가하였으며 특히 12일 투여군에서는 유의성있는 증가를 나타내었다. 그러나 alanine aminotransferase(이하 ALT)의 활성변화는 투여 횟수가 증가함에 따라 약간 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없다. Dikshith등²⁴⁾은 독성의 초기단계에서 조직상해가 일어나기 이전에 막투과성의 변화가 생길 경우 transaminase 활성이 증가된다고 보고하였는데 본 실험에서도 AST가 증가된 것으로 보아 조직상해가 진행되는 것으로 사료된다.

Latic dehydrogenase(이하 LDH)활성에 있어서는 fthalide를 투여할 때 투여횟수가 증가함에 따라 유의성있게 증가되었다. Conish등²⁵⁾에 의하면 일반적으로 LDH의 혈중으로의 분비는 조직손상의 지표가되며 간

손상에 의해서는 LDH isoenzyme의 pattern으로 볼 때 혈청 LDH-5-isoenzyme활성이 증가되고 신장의 손상에 의해서 LDH₁과 LDH₂ isoenzyme활성이 증가된다고 보고하였다. 본 실험에서도 fthalide를 12일간 투여한 결과 이 효소의 활성이 증가된 것은 조직상해 유발에 기인하는 것이 아닌가 사료된다. 한편 Ray등²⁶⁾은 deltamethrin 중독에 의하여 유발된 운동량의 증가가 혈중 Lactate양을 증가시키며 그에 따라 산중독증을 일으킨다고 보고한 바 있다. LDH는 포도당에서 생성된 pyruvate를 lactate로 환원하는데 관여하는 효소이므로 본 실험에서도 fthalide투여에 의한 LDH의 활성 증가는 혈중 lactate양이 증가하는 원인과 관련이 있는 게 아닌가 사료된다.

Alkaline phosphatase(이하 ALP)활성은 약물의 투여횟수가 증가할수록 점차 상승하는 경향을 보이나 유의성은 없었다. Glucose량의 변화는 LDH의 활성변화와 유사하였지만 특히 12일 투여군에서는 혈중 glucose치가 현저히 증가되었다.

Triglyceride(TG) 및 cholesterol은 대조군에 비해 유의성있는 변화가 없었으며, blood urea nitrogen(이하 BUN) 및 total protein량은 투여 횟수가 증가됨에 따라 약간 증가되었으나 통계학적으로 유의성은 없었다. 그 밖의 다른 혈청 생화학적 변화가 대조군과 비교하여 유의성있는 변화가 나타나지 않았다.

간장 및 신장 microsome분획중 cytochrome P-450함량과 NADPH-cytochrome c reductase 활성의 변화 - 간장 및 신장 microsome분획중의 cytochrome P-450 함량과 NADPH-cytochrome c reductase 활성의 변화는 Table VI에서 보는 바와 같다.

간장 microsome분획중의 cytochrome P-450함량은 fthalide 투여 횟수가 증가됨에 따라 약간 증가하는

Table VII - Effect of fthalide on hepatic and renal microsomal protein concentration (mg/g wet weight) in rats

Group	Days	Liver	VP(%) ^a	Kidney	VP(%) ^a
Control	3	21.83 ± 0.65	-	18.96 ± 0.45	-
	6	22.79 ± 0.54	-	18.75 ± 0.25	-
	9	23.15 ± 0.87	-	18.92 ± 0.48	-
	12	23.26 ± 0.73	-	19.04 ± 0.56	-
Fthalide (100 mg/kg)	3	22.64 ± 0.74	3.24	19.43 ± 0.36	2.48
	6	23.72 ± 4.08	4.08	19.84 ± 0.21	5.81
	9	25.04 ± 0.71	8.16	20.01 ± 0.40	5.75
	12	25.53 ± 0.92	9.76	20.74 ± 0.56	8.93

Each value the mean ± SE

a: variation percent

Table VIII—Effect of fthalide on hepatic microsomal TBA-value in rats.

Groups	Days	TBA-value	VP(%) ^a
Control	3	1.569 ± 0.043	-
	6	1.604 ± 0.016	-
	9	1.625 ± 0.045	-
	12	1.609 ± 0.017	-
Fthalide (100 mg/kg)	3	1.572 ± 0.035	0.19
	6	1.696 ± 0.043	5.61
	9	1.732 ± 0.029	6.58
	12	1.795 ± 0.042*	11.56

Each value is the mean ± SE
Significantly different from control (*: p. 0.05)
Unit: nM/min/mg protein
a: variation percent

경향이 있어 12일 투여군에서는 유의성있게 증가되었다. 간 microsome 분획중의 NADPH-cytochrome c reductase 활성은 대체로 대조군과 유사한 경향을 나타내었다. Hart등^{26,27)}은 흰쥐에 유기염소계 살충제 투여에 의하여 약물 대사효소의 활성이 증가하였으며 다른 약물들의 대사를 활성화 시켰다고 보고한 바 있었는데 그 결과와 일치하였다.

신장 microsome분획중의 cytochrome P-450 함량 및 NADPH-cytochrome c reductase의 활성은 fthalide를 투여할 때 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. Fthalide는 주로 간에서 대사되어 쉽게 신장을 통해 배설되는데 주 대사산물은 3,4,5,6-tetrachloro-2-hydroxylmethylbenzoate 와 미반응의 fthalide 라고 보고되어 있다.²¹⁾ 본 실험에서도 fthalide를 투여할 때 신장에서의 약물대사효과가 약간의 활성증가를 보이는 것은 일부 미대사산물이 신장에 도달되어 약물 대사효소 유도에 약간의 영향을 미치는 것으로 사료된다.

간장 및 신장 microsome분획중 단백질함량의 변화

간장 및 신장 microsome 분획중의 단백질함량의 변화는 Table VII에서 보는 바와 증가하였으며 투여 횟수가 증가할수록 현저히 더 큰 차이로 증가되었으나 유의성은 없었다. 신장 microsome 분획중의 단백질 함량은 각 실험군에서 거의 변화가 없이 유사한 경향을 나타내었다. 일반적으로 microsome 분획중의 단백질 함량은 약물대사효소의 활성과 관계가 있는데 본 실험에서도 단백질 함량증가는 약물대사효소의 활성증가와 비례하는 경향을 보여주고 있다.

간장 microsome분획중 과산화지질의 변화 - 간장 microsome 분획중의 과산화지질의 변화는 Table

Table IX—Effect of fthalide on hepatic and glucose-6-phosphatase activity in rats.

Groups	Days	G-6-pase	VP(%) ^a
Control	3	73.394 ± 5.25	-
	6	72.747 ± 6.45	-
	9	73.299 ± 3.95	-
	12	75.724 ± 6.04	-
Fthalide (100 mg/kg)	3	74.214 ± 3.09	-0.24
	6	72.452 ± 6.21	-0.40
	9	65.856 ± 5.43	-10.15
	12	66.779 ± 4.36	-17.10

Each value is the mean ± SE
Unit: mMpi/min/mg protein
a: variation percent

VIII에서 보는 바와 같다. Fthalide 투여군에서는 모두 대조군에 비해 약간 증가하였으나 12일 투여군에서는 유의성있게 증가되었다. 이것은 fthalide가 생체 지질 막의 인지질중 불포화 지방산을 산화시켜 과산화지질로 변화시켰다는 결과를 보여주는 것으로 사료된다.

간장 glucose-6-phosphatase 활성 변화 - 간장 homogenate중의 glucose-6-phosphatase 활성의 변화는 Table IX에서 보는 바와 같이 fthalide 투여군에서 약물투여 횟수가 증가함에 따라 대조군에 비해 활성이 감소되었으나 유의성있는 변화는 볼 수 없었다.

일반적으로 glucose-6-phosphatase는 세망내피계와 관련이 있고 이 효소의 활성저하는 특이적으로 세포소기관의 상해를 반영한다. Feuet²⁸⁾은 10종의 간독성 물질을 흰쥐에 투여할 때 이 효소의 활성이 저해된다고 보고하였다. 또한 Grice등³⁰⁾은 glucose-6-phosphatase 활성의 변화가 초기 간상해의 지표로 이용되며 조직학적으로 검출되는 장기손상에 앞서서 일어난다고 보고하였다.

본 실험결과 fthalide를 장기간 투여한 실험군에서 glucose-6-phosphatase 활성이 저하 되는 것으로 보아 간장손상에 영향을 주지 않았으나 장기간 투여군에서는 간장의 손상을 일으키는 것으로 사료된다.

간장 및 혈청 cholinesterase 활성의 변화 - 간장 및

혈청중의 cholinesterase 활성변화는 Table X에서 보는 바와 같다. 간장 cholinesterase활성 변화는 fthalide의 투여 횟수가 증가함에 따라 대조군에 비해 감소되는 경향을 나타내었으며, 혈청 cholinesterase활성 변화는 간장 cholinesterase 활성 변화와 유사한 경향을 보이나 간장에서 보다는 더욱 더 감소하는 성향이 있었다.

Table X— Effect of fthalide on hepatic and serum cholinesterase activity in rats.

Groups	Days	Liver	VP(%) ^a	Serum	VP(%) ^a
Control	3	3.436 ± 0.24	-	2.556 ± 0.14	-
	6	3.529 ± 0.21	-	2.605 ± 0.13	-
	9	3.504 ± 0.35	-	2.596 ± 0.19	-
	12	3.605 ± 0.29	-	2.543 ± 0.25	-
Fthalide (100mg/kg)	3	3.256 ± 0.29	-0.32	2.456 ± 0.18	-3.19
	6	3.425 ± 0.31	-7.74	2.243 ± 0.16	-13.90
	9	3.217 ± 0.43	-8.19	2.209 ± 0.20	-14.91
	12	3.096 ± 0.25	-14.12	2.145 ± 0.26	-17.50

Each value is the mean ± SE

Unit: liver: $\mu\text{m min g(wet wt.)}$ Serum: $\mu\text{m/min/ml}$

a: variation percent

Table XI— Effect of fthalide on hepatic and serum carboxylesterase activity in rats.

Groups	Days	Liver	VP(%) ^a	Serum	VP(%) ^a
Control	3	28.49 ± 1.69	-	112.43 ± 8.30	-
	6	28.72 ± 1.57	-	109.85 ± 7.21	-
	9	27.91 ± 1.09	-	108.76 ± 9.43	-
	12	28.15 ± 1.74	-	110.64 ± 7.92	-
Fthalide (100 mg/kg)	3	29.42 ± 1.73	-	115.96 ± 7.25	3.14
	6	30.15 ± 1.25	3.26	116.21 ± 7.01	4.91
	9	31.35 ± 1.96	4.98	118.21 ± 5.96	8.79
	12	34.35 ± 2.71	6.83	121.49 ± 7.06	12.72

Each value is the mean ± SE

Unit: Liver $\mu\text{m } \beta\text{-naphtho/g (wet wt.)hr}$

Serum $\mu\text{m } \beta\text{-naphthol/ml/hr.}$

a: variation percent

Reihold등³¹⁾은 cholinesterase의 활성이 유기인계 살충제와 같이 acetylcholinesterase에 직접 작용하는 화합물에 의해 주로 억제되거나 간손상이나 영양부족 상태에서도 감소된다고 보고한 바 있다. 일반적으로 유기인계 살충제를 비롯한 살충제에 폭로될 때 대체적으로 cholinesterase 활성이 심하게 억제되어 신경독성을 유발시킨다고 보고하였다. 본실험에서도 fthalide투여로 간장 및 혈청 cholinesterase 활성이 저하되는 것은 Reihold등³¹⁾의 보고와 일치하는 것으로 사료된다.

간장 및 혈청 carboxylesterase 활성의 변화 - 간장 및 혈청중의 carboxylesterase의 활성 변화 Table XI에서 보는 바와 같이 간장 homogenate중의 carboxylesterase 활성변화는 fthalide 투여군도 대조군과 유사한 경향을 나타내고 있으나, 투여 횟수가 늘어감에 따라 증가되는 경향이 있었다. 또한 혈청 염소계 살충제를 흰쥐에 경구투여한 후 유기인계 살충제인 paraoxon를 투여할 때 paraoxon의 독성을 감소시키는 작용을 나타냈다고 보고하였는데 이것은 유기염소

계 살충제에 의하여 간에서의 esterase(A-esterase)의 활성이 증가되었기 때문에 free paraoxon의 양을 감소시키는 것이 그 원인이라고 알려져 있다.

결론

Pthalide의 독성을 규명하기 위하여 흰쥐에 100 mg/kg씩 12일간 경구투여하고 혈액학적 및 혈액 생화학적 변화와 약물대사효소에 미치는 영향을 실험하였고, 또 간장 및 신장의 과산화지질 및 glucose-6-phosphatase 활성을 측정하여 세포막에 미치는 영향을 실험하였고, cholinesterase와 carboxylesterase 활성을 측정하여 신경독성에 미치는 영향을 시험하였다. 그 결과는 다음과 같았다.

1. Fthalide는 LD₅₀이 3.86 g/Kg로서 저독성 물질이지만 12일 투여군에서 백혈구치가 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었으며, ALT 및 LDH 활성과 혈당이 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다.

2. Fthalide 12일 투여군에서 간장 cytochrome P-

450함량이 유의성있게 증가되었으며, fthalide의 투여 횟수가 증가함에 따라 신장 cytochrome p-450 및 간장과 신장의 NADPH-cytochrome c reductase 활성이 증가하는 경향은 있었으나 유의성은 없었다.

3. Fthalide 12일 투여군에서 간장의 과산화지질 형성이 유의성있게 촉진되었으나, 간 glucose-6-phosphatase 활성은 fthalide의 투여 횟수가 증가됨에 따라 감소되는 경향은 있었으나 유의성은 없었다.

4. Fthalide 투여군에서 간 및 혈청중 cholinesterase는 감소되는 경향은 있었으나 유의성은 없었고, 간 및 혈청중 carboxylesterase활성은 증가되는 경향은 있었으나 유의성은 없었다

이상의 결과로 보아 fthalide는 저독성 물질이지만 1회 100 mg/Kg씩 1일1회씩 12일 이상 투여 하면 세포독성과 신경독성이 나타난다는 것을 보여주었다.

참고문헌

- 1) Chida, T.: Studies on mechanism of controlling of fthalide aganist Rice Blast Disease. *Japan Pesticide Science* **14**, 363 (1989).
- 2) Murakami, Y., Matsumoto, H., Tanaka, R., Nakazaea, H. and Fujita, M.: Simultaneous determination of organochlorine herbicides and fungicides in Blue Mussel (*Mytilus edulis*) by Gas Chromatography. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **27**(6), 642 (1986).
- 3) Sato, R., Teramoto, S. and Shirasu, Y.: Two-generation reproduction studies in rats with fthalide. *J. Pesticide Sci.* **5**, 367 (1980).
- 4) Morgan, D. P.: *Recognition and management of pesticide poisoning* 3rd ed. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C., p238 (1982).
- 5) Matsumura, F. and Ghiasuddin S. M.: DDT-sensitive Ca-ATPase in the axonic membrane. *Neurotoxicology of insecticides and pheromones* edited by Narahashi, T., Plenum Press, New York, p245 (1979).
- 6) Narahashi, T.: Nerve membrane ionic channels as the target site of insecticides. *Neurotoxicology of insecticides and Pheromones*, edited by Narahashi, T., Plenum press, New York, p211 p352

- (1979).
- 7) Telch, J. and Jarvis, D. A.: Acute intoxication with lindane (gamma benzene hexachloroide): *CMA J.* **126**, 662-663 (1982).
- 8) Dable, W. E. and Gaines, T. B.: Poisoning by DDT: Relation between clinical signs and concentration in rat brain. *Science* **142**, 1474 (1963).
- 9) Kamath, S. A., Kummerow, F. A. and Narayan, K. A.: A simple procedure for the isolation of rar liver microsomes. *FEBS Letters* **17**, 90 (1971).
- 10) Cinti, D. L., Mildeus, P. and Schenkman, J. B.: Kinetic parameters of drug metabolizing enzymes in Ca²⁺ sedimented microsomes from rat liver *Biochem. Pharmacol.* **21**, 3249 (1972).
- 11) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monooxide-binding pigment of liver miclosomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 (1964).
- 12) Matsubura, T., Koike, M., Touchi, A., Tochino, Y. and Sugeno, K.: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Analytical Biochemistry* **75**, 596 (1976).
- 13) Masters, B. S. S., Willis, Jr. C. H. and Kamin, H.: The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver. *Enzymology* (edited by Estabrook, R.W. and Pullman, M.E). Academic Pres. New York, p 565 (1967).
- 14) Mazel, P.: Comparison of microsome from control and phenobarbital treated rats as to NADPH-cytochrome c reductase activity. *Fundamentals of Drug disposition* edited by La Du, E. N., Mandel, H. G. and Way, E. L.), P575 (1972).
- 15) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1971).
- 16) 大石誠子: 遇酸化脂質 測定法. *最新醫學*, **33**, 660 (1966).
- 17) Traiger, G. J. and Plea, G. L.: Differences in the potentiation of carbon tetrachloride in rats by ethanol and isopropanol pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **20**, 105 (1971).
- 18) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375 (1925).

- 19) Ellman, G. L., Courtney, K. D., Ander, Jr. V. and Featherstone, R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
- 20) Nachlas, M. M. and Seligman, A. M.: Evidence for the specificity of esterase and lipase by the use of three chromogenic substrates. *J. Biol. Chem.* **181**, 345 (1949).
- 21) Bond, H., Mauger, K. and Defeo, J. J.: Interactions in the toxicity of pyrethrum, synergist and other chemicals to mammals. *pyrethrum*, The Natural Insecticide (edited by Casida, J. E.) Academic Press, New York, p174 (1973).
- 22) Parker, C. M., Patterson, D. R., Van Gelder, G. A., Gordon, E. B., Valerio, M. G. and Hall, W. C.: Chronic toxicity and carcinogenicity evaluation of fenvalerate in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* **13**, 83 (1984).
- 23) 홍사덕, 정규혁: Cypermethrin 과 piperonyl butoxide가 rat 의 毒性반응에 미치는 영향. *大韓藥學會誌*, **34**, 69-79 (1990).
- 24) Dikshithm, T. S. S., Datta, K. K., Raizada, R. B. and Kushwah, H.S.: Effects of paraquat dichloride in male rabbits. *Indian journal of Experimental Biology* **17**, 926 (1979).
- 25) Cornish, H. H. Barth, M. L. and Dodson, V. N.: Isozyme profiles and protein patterns in specific organ damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **16**, 411 (1970).
- 26) Ray, D. E. and Cremer, J. E.: The action of decamethrin (A synthetic pyrethride) on the rat. *Pestic. Biochem. Physiol.* **10**, 333 (1979).
- 27) Hart, L. G. and Fouts, J. R.: Effect of acute and chronic DDT aministration on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. *Proc. Soc. Exprl. Biol. Med.* **114**, 388 (1963).
- 28) Hart, L. G., Shultice, R. W. and Fouts, J. R.: Stimulatory effects of chlordane on hepatic metabolism in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **5**, 371 (1963).
- 29) Feuer, G., Golberg, L. and Le. Pelley, J. R.: Liver response tests, I. Exploratory studies on glucose-6-phosphatase and other liver enzymes. *Fd. Cosmet. Toxicol.* **3**, 235 (1965).
- 30) Crice, H. C.: The changing role of pathology on modern safety evaluation. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **1**, 119 (1972).
- 31) Reinhold, J. G.: Measurement of serum CHE activity. *Am. J. Clin. Path.* **23**, 645 (1953).