

## 송사리 태아를 이용한 농약기형독성에 관한 연구

성하정 · 이해근 · 정영호 · 조명행\*

농업과학기술원 농약안전성과, \*서울대학교 수의과대학  
(95. 12. 12. 접수)

### Teratological test of pesticide using medaka embryo

Ha Jung Sung, Hae Keun Lee, Young Ho Jeong and Myung Haing Cho\*

National Agricultural Science and Technology Institute, Division of Pesticide Safety, Suwon, Korea

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

**ABSTRACT :** This study was performed to examine the availability of using medaka (*Oryzias latipes*) in teratological test. Medaka embryos were collected within 2 hours post-fertilization and cultured in petri dishes containing buffered saline until hatching. The embryos were treated with 0.56 mg/l chlorpyrifos-methyl and 10 mM methyl methanesulfonate at 20 stages (about 35 hours post-fertilization). Eleven developmental features were selected and observed from 33 stages (about 9 days post-fertilization). Scoring system was developed and applied for the measurement of potential teratological effects by the test compound. Chlorpyrifos-methyl did not induce teratological effect in medaka embryos. However, we found teratological test using medaka embryo reduced the cost, labors, period and space of experiment significantly compared with teratological study using rodents. Above findings strongly suggest that medaka embryo can be used as a lab animal model for teratogenicity test instead of rodents.

**Key words :** Medaka, *Oryzias latipes*, Teratological test, Scoring system

## 서 론

인구가 기하급수적으로 증가하는 현실에서 인류는 식량 증산이라는 공동의 목표를 맞이하게 되었다. 그런데 식량생산에서 병해충에 의한 손해는 전세계적으로 막대하며, 국내에서도 6-15%에 이르고 있고(정, 1980), 벼의 경우 병해충 방제용으로 농약을 사용함으로써 연간 3,202천석의 쌀을 더 생산할 수 있으며, 이를 금액으로 환산하면 약 6,501억원이나 되고, 여기에서 농약구입비 1,745억원을 제하더라도 연간 약 4,756억원의 소득이 추가로 얻어지게 된다. 과수 및 채소류의 경우 농약을 사용하지 않으면 병해충에 의한 감수량이 40-94%나 되어 농약이 없으면 수확을 거의 할 수 없는 지경으로 피해가 크다. 그리고 산업구조의 변화로 1차 산업에서의 노동력이 점차 감소하여서 제초제 및 생장조절제 등의 사용량도 증가하고 있다. 제초제가 사용되기 이전에는 10ha(300평)를

제초하는데 6.3명의 인력과 50.6시간의 노동시간이 소요되었으나 제초제 사용이 일반화된 '80년대 후반에는 제초시간이나 인력이 1/10이하로 감소하였으며, 전국 거봉 재배면적의 50%(589ha)에만 생장조절제를 처리하더라도 연간 89억원의 소득이 추가로 얻어지게 되는 효과가 있다고 한다(농약연구소, 1994). 이와같은 이유로 농약의 사용량은 날로 증가하고 있으며 '95년 현재 국내에서 사용중인 농약의 품목수는 605종, 그 사용량은 26,718톤에 이르고 있다(농약공업협회, 1994).

농약의 사용량이 증가함에 따라 가축 및 인체에 대한 중독이 빈번히 발생하고 있고(정, 1982; 김, 1985), 환경에 미치는 영향에 대한 관심이 고조되고 있다. 농약사용시 발생하는 직접적인 피해의 대부분은 자살 및 과실부주의에 기인하는 것이다. 또한 사용한 농약의 일부는 씻겨내려가는 등 여러가지 방법으로 지하수 및 표면수 등의 물로 이동하게 되며 이로 인

하여 독성이 연쇄적으로 유발될 가능성이 있다.

현재 농약의 품목고시를 위하여 시행되는 독성에 대한 실험 항목은 설치류에 대한 급성 경구, 급성 경피 및 흡입독성 그리고 급성어독성만을 실시하고 있으며(농촌진흥청, 1994), 또한 의약품에 대한 기형실험에는 설치류 즉 랫드나 마우스로 시행하는 것으로 규정되어 있다(국립보건안전연구원, 1994). 따라서 현재의 농약에 대한 독성시험만으로 환경생물에 대한 종합적인 영향을 평가하기에는 미흡하므로, 본 실험에서는 국제적으로 널리 사용되고 있는 송사리 *Oryzias latipes*를 이용하여 기형독성시험법을 확립하여 농약을 단기간내에 저렴한 비용으로 screening법을 개발하는 한편 설치류의 실험을 대체할 수 있는지의 가능성을 찾고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물 및 실험물질

공시어인 송사리(*Oryzias latipes*)는 한국화학연구소(대전)에서 분양받아 10리터 수조에 30마리씩 넣어 25°C를 유지하였고, 12시간의 명암주기를 주었다. 먹이는 갯 부화된 바다 새우와 인공열대어 먹이 TetraMin(부산 관상어용식품)을 각각 아침과 저녁 하루 2번씩 공급하였으며 물은 오염이 안된 것으로 확인된 지하수를 이용하였다.

실험군은 대조군, 유기인계 농약인 chlorpyrifos-methyl(CPM, 영일화학) 투여군 및 양성대조군으로 alkylating agent인 methyl methanesulfonate(MMS, Sigma) 투여군으로 나누었다.

#### 2. 채란 및 실험물질의 처치

수정후 2시간이내에 송사리 배 밑에 붙어 있는 수정란을 채취하여 수정란 배양액(Kirchen과 West, 1976)을 채운 Petri dish에 30개씩 넣어 25°C로 배양하였고, 채취 33시간후(20 stages)에 실험물질을 2시간 동안 수정란에 적용하였다.

CPM의 투여량은 LC1인 0.56 mg/l으로, MMS는 11 mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에 10 mM되게 녹여 사용 직전에 만들어서 적용하였고, 대조군에는 사용한 용매를 넣었다. Chlorpyrifos-methyl의 lethal concentration 1(LC1)은 급성어독성 실험방법을 정하고 있는 농약의 시험기준과 방법(농촌진흥청, 1994)에 준하여 구하였다.

#### 3. 수정란의 기형검사

수정란 채취후 9일부터 수정란 생존 여부, heart, tail, pig-

**Table 1.** Frequency of malformations in medaka embryos exposed to 0.56 mg/l chlorpyrifos-methyl(CPM) and 10 mM methyl methanesulfonate(MMS) at 20 stages for 2 hrs, respectively

Organ	Control(301)	CPM(381)	MMS(443)
Heart	20	16	188*
Tail	6	9	83*
Pigmentation	9	10	52*
Hatching	0	0	30*
Urinary Bladder	14	9	89*
Liver	17	22	173*
Head	5	12	72*
Ear	3	4	35*
Eye	6	4	86*
Circulation system	8	9	138*
Vertebrae	4	3	47*

\*: significantly different for control group(p<0.05)



**Fig. 1.** Control medaka embryo at 35 stages (40X).

mentation, hatching, urinary bladder, head, ear, eye 및 blood/circulation 등의 이상유무를 입체현미경으로 검사하였다. 28일 까지 미부화란은 부화되지 않은 것으로 간주하였으며 결과는 Chi-Square test로 유의성을 검정하였다.

### 결과 및 고찰

수정란에서 입체현미경으로 기형검사를 한 결과는 다음과 같다(표 1).

**심장** : 미분화된 심장은 tube type으로 나타났고, 그 빈도는 대조군이 20/301건, CPM 투여군은 16/381건 및 MMS 투여군은 188/443건이었는데 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다(p<0.05, 그림 3).

**꼬리** : 꼬리의 기형은 구부러지거나 형성부전된 형태로 나타났다으며, 그 빈도는 대조군이 6/301건, CPM 투여군이 9/



**Fig. 2.** Embryo (35 stages) was treated with 10 mM methyl methanesulfonate (MMS) at 20 stages for 2 hrs (36X). Note liver is absent.



**Fig. 3.** Embryo (stage 35) was treated with 10 mM methyl methanesulfonate at 20 stages for 2 hrs (36X). Note tube type of heart.

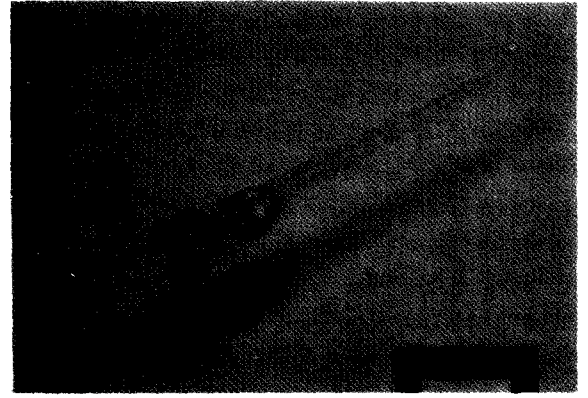
381건 및 MMS 투여군이 83/443건이었고 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ , 그림 5와 6).

**착색** : 착색이 정상적으로 이루어지지 않은 수정란의 빈도는 대조군이 9/301건, CPM 투여군이 10/381건 및 MMS 투여군이 52/443건이었으며 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ ).

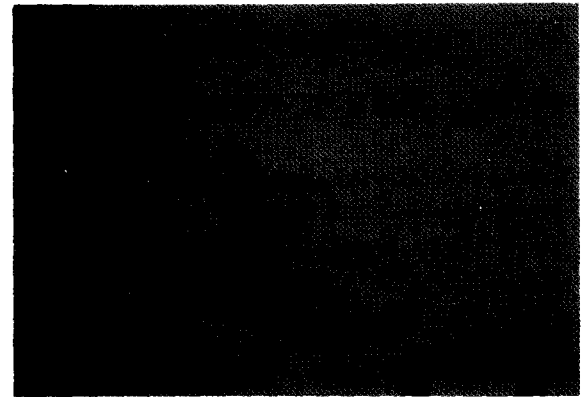
**부화** : 부분부화는 MMS 투여군에서만 30/443건 관찰되었다.

**방광** : 방광 미형성의 빈도는 대조군이 14/301건, CPM 투여군이 9/381건 및 MMS 투여군이 89/443건이어서 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ ).

**간장** : 간장 발육부전의 빈도는 대조군이 17/301건, CPM 투여군이 22/381건 및 MMS 투여군이 173/443건으로 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ , 그림 2).



**Fig. 4.** Newly hatched control medaka (20X).



**Fig. 5.** Newly hatched medaka from 10 mM MMS treated group showed abnormal flexure (20X).

**머리** : 머리의 형성부전은 대조군이 5/301건, CPM 투여군이 12/381건 및 MMS 투여군이 72/443건으로 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ ).

**귀** : 귀의 무형성은 대조군이 3/301건, CPM 투여군이 4/381건 및 MMS 투여군이 35/443건으로 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ ).

**눈** : 눈의 형성부전은 대조군이 6/301건, CPM 투여군이 4/381건 및 MMS 투여군이 86/443건으로 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ , 그림 3).

**순환계** : 순환계 이상은 혈액이 몰려 있거나 혈관형성부전으로 나타나며 그 빈도는 대조군이 8/301건, CPM 투여군이 9/381건 및 MMS 투여군이 138/443건으로 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ , 그림 3).

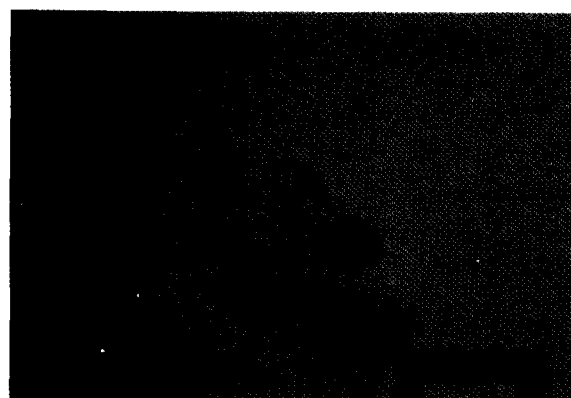
**척추** : 척추변형의 빈도는 대조군이 4/301건, CPM 투여군이 3/381건 및 MMS 투여군이 47/443건으로 MMS 투여군만이 유의성이 인정되었다( $p < 0.05$ , 그림 5).

**Table 2.** Medaka embryo developmental parameter and score chart

Organ	Score	Developmental Endpoint
Heart	0	No evidence of heart development
	1	Weak contraction of heart anlage
	2	Narrow heart tube present
	3	Enlarged heart chambers starting to differentiate
	4	Fully differentiated heart
Tail	0	No tail formation
	1	Tail bud formed
	2	Anterior somites twitch
	3	Tail thrashes
	4	Tail tip reaches eye
Pigmentation	5	Tail tip reaches hindbrain
	0	No Pigmentation
	1	Reddish-brown chromatophores
Hatching	2	Gold chromatophores along tail
	0	No hatching occurs
	1	Partial hatching
Urinary Bladder	2	Fully hatched
	0	Bladder is absent
	1	Colorless bladder present
Liver	2	Greenish bladder visible
	0	Liver is absent
	1	Colorless liver anlage present
Head	2	Liver has colorless globules, covers urinary bladder
	0	No brain divisions or jaw present
	1	Three primary brain divisions
	2	Jaw formation
Ear	3	Jaw movement
	0	No otic vessel observable
	1	Otocyst present
Eye	0	Optic cup absent
	1	Early optic cup present
	2	Eye pigmentation granules present
	3	Pigmentation complete
	4	Cornea lifted off lens
Circulation	5	Eye movement
	0	No circulation present
	1	Colorless blood circulation
	2	Red blood

Chlorpyrifos-methyl은 현재 벼, 담배, 배추 및 국화 등에서 살충제로서 사용되고 있으며, 송사리에서 기형 작용이 없는 것으로 나타나 설치류에서의 결과와 일치하였다(일본삼공주 식회사 안전성시험센터, 1976).

설치류를 사용한 실험에서는 기형의 유무만을 관찰하나 송사리에서는 수정란이 투명하여 입체현미경으로 직접 명확한 관찰이 가능하여 기형의 정도를 숫자화 할 수 있어서 일어난 독성반응 정도의 정량적 판단이 가능하다(Shi와 Faustman,



**Fig. 6.** Newly hatched medaka from 10 mM MMS treated group showed aplasia of tail (20X).

**Table 3.** Mean morphological score of malformations in medaka embryos exposed to 0.56 mg/l chlopyrifos-methyl (CPM) and 10 mM methyl methanesulfonate (MMS) at 20 stages for 2 hrs, respectively

Organ	Control(301)	CPM(381)	MMS(443)
Heart	3.99±0.02	3.95±0.04	3.18±0.07*
Tail	4.90±0.21	4.88±0.04	3.44±0.10*
Pigmentation	1.98±0.01	1.97±0.01	1.60±0.07*
Hatching	2.00±0.00	2.00±0.00	1.77±0.05*
Urinary Bladder	1.92±0.01	1.94±0.03	1.52±0.05*
Liver	1.86±0.03	1.79±0.04	1.24±0.05*
Head	2.99±0.01	2.98±0.01	1.88±0.09*
Ear	0.99±0.01	0.99±0.01	0.92±0.03*
Eye	4.08±0.04	4.16±0.03	3.67±0.05*
Circulation system	1.96±0.03	1.98±0.01	1.18±0.07*

\*: significantly different for control group (p<0.05)

1987). 본 실험에서 표 2의 scoring system을 사용하여 표 3을 만들었다. 그 결과는 표 1과 같은 유의성을 나타내었으며 숫자화 하였기 때문에 그 차이를 쉽게 알아볼 수 있었다.

어류 중에서 송사리를 사용한 기형실험은 설치류를 이용한 실험보다 ① 태아를 육안적으로 명확히 구분이 가능함, ② 사육이 쉽고 수정란을 정기적으로 사용할 수 있음, ③ 개체가 작아 좁은 공간에서도 대량사육이 가능함, ④ 부화기간이 짧음(10-21일), ⑤ 기형반응이 다른 종과 일관되게 나타남, ⑥ 모체를 희생시키지 않고 수정란의 수집이 가능함 및 ⑦ 실험동물을 취급의 용이함 등의 이점이 있다. 또한 어류수정란을 이용한 기형실험은 생체실험뿐만이 아니라 생물배양체계를 이용할 수 있어 시험관내 실험도 가능하여 실험을 더욱 용이하게 수행 할 수 있다. 송사리를 이용한 기형실험은 생물적 특성 때문에 설치류를 이용하는 것보다 비용, 노동력, 기간, 및 실험

공간을 반 이상 줄일 수 있는 장점이 있다(Birge 등, 1983; Cameron 등, 1985; Laale와 Lerner, 1981; Shi와 Faustman, 1987; Solomon과 Faustman, 1987). 현재까지 송사리를 aflatoxin, tolbutamide, toluene, heavy metals 및 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid 등의 여러가지 화학물질의 기형실험에 사용한 결과 설치류의 결과와 일치하는 것으로 나타났다(Hiraoka 등, 1985; Llewellyn 등, 1977; Schreiweis와 Murray, 1976; Smithberg, 1962; Stoss와 Haines, 1979). 따라서 송사리를 이용한 기형실험은 농약을 비롯한 환경독성물질의 환경생물에 대한 기형실험 및 설치류의 전시험법으로 사용이 가능하리라 사료된다.

## 결 론

농약의 환경생물독성시험기법을 확립하기 위한 시험의 일환으로 유기인계 살충제인 chlorpyrifos-methyl과 양성대조물질인 methyl methanesulfonate를 사용하여 송사리 태아에 대한 기형실험을 실시한 결과는 다음과 같았다.

1. Chlorpyrifos-methyl은 송사리 수정란에서 기형을 야기하지 않는 것으로 나타났다.
2. Methyl methanesulfonate는 특히 심장, 순환계 및 간장에 이상을 일으키는 기형을 유발시켰다.
3. 송사리를 이용한 기형독성시험은 설치류를 이용하는 것보다 비용, 노동력, 기간 및 실험공간을 크게 줄일 수 있었다.

## 참고문헌

- Birge, W.J., J.A. Black, and A.G. Westerman, (1983): Evaluation of aquatic pollutants using fish and amphibian eggs as bioassay organism. In: *Animals as Monitors of Environmental Pollutants*, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. pp108-118.
- Cameron, I.L., W.C. Lawrence, and J.B. Lum, (1985): Medaka eggs as a model system for screening potential teratogens, *Prog. Clin. Biol. Res.* **163C**: 239-243.
- Hiraoka, Y., S. Ishizawa, T. Kamada, and T. Okuda, (1985): Acute toxicity of 14 different kinds of metals affecting medaka fry, *Hiroshima J. Med.* **34**: 327-330.
- Kirchen, R.V. and W.R. West, (1976): Modification and standardization of the culture of early postimplantation embryos for toxicological studies, *Arch. Toxicol.* **58**: 84-88.
- Laale, H.W. and W. Lerner, (1981): Teratology and early fish development, *Amer. Zool.* **21**: 517-533.
- Llewellyn, G.C., G.A. Stephenson, and J.W. Hofman, (1977): Aflatoxin B1 induced toxicity and teratogenicity in Japanese medaka eggs, *Toxicol.* **15**: 582-587.
- Schreiweis, D.O. and G.J. Murray, (1976): Cardiovascular malformations in *Oryzias latipes* embryos treated with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, *Teratology* **14**: 287-290.
- Shi, M. and E.M. Faustman, (1987): Development and characterization of a morphological scoring system for medaka (*Oryzias latipes*) embryo culture. 26th America Society of Toxicology Annual Meeting.
- Smithberg, M., (1962): Teratogenic effects of tolbutamide on the early development of the fish, *Am. J. Anat.* **111**: 205-213.
- Solomon, F.P. and E.M. Faustman, (1987): Developmental toxicity of four model alkylating agents on Japanese medaka fish embryos, *Environ. Toxicol. Chem.* **6**: 747-753.
- Stoss, F.W. and T.A. Haines, (1979): The effects of toluene on embryos and fry of the Japanese medaka with a proposal for rapid determination of maximum acceptable toxicant concentration, *Environ. Pollut.* **20**: 139-148.
- 국립보건안전연구원 (1994): 의약품 등의 독성시험 기준.
- 김인옥 (1985): 경기도 일부지역에서 농약 살포에 의한 농약 중독의 위험요인 및 예방에 관한 조사, 서울대학교 보건대학원 석사학위논문.
- 농약공업협회 (1994): 농약연보.
- 농약연구소 (1994): 농약의 사용현황과 안전성.
- 농촌진흥청 (1994): 농약의 시험기준과 방법. 농촌진흥청고시 제1994-1호. pp76-78.
- 일본삼공주식회사 안전성시험센터 (1976): Chlorpyrifos-methyl의 최기형성 시험.
- 정대업 (1982): 농촌 주민의 농약 사용에 대한 지식 태도 및 농약중독경험 관한 조사, 조선 대학교 의과대학 석사학위논문.
- 정후섭 (1980): 식량 증산에 있어서 병해충방제의 중요성. 농약과 식물보호 1, pp86.