

## 일본 메추리를 이용한 급성 경구독성시험법의 확립

최은실 · 박종환 · 홍정주 · 박재학\*  
서울대학교 수의과대학 실험동물의학

### Acute Oral Toxicity Test in Japanese Quail

Eun-Sil Choi, Jong-Hwan Park, Jung-Joo Hong and Jae-Hak Park\*

Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,  
Seoul National University

(Received July 3, 2001)

(Accepted November 17, 2001)

**ABSTRACT** : The acute oral LD<sub>50</sub> toxicity values of isazofos, pyraclofos, diazinon and methomyl were determined for Japanese quail based on OECD guideline. The LD<sub>50</sub> of isazofos, pyraclofos and diazinon was 16.26 mg/kg, 41.26 mg/kg and 7.11 mg/kg body weight in female respectively. And the LD<sub>50</sub> of each chemicals in male was 21.44, 35.64, 8.28 mg/kg body weight respectively. Diazinon was the most susceptible compounds to Japanese quail in both sexes. The LD<sub>50</sub> of methomyl was 21.24 mg/kg body weights in female, and 28.28 mg/kg body weight in male respectively. Diazinon, isazofos and methomyl were more toxic in the female than male. The symptoms of poisoning were similar in quails administrated with each chemicals. The clinical signs in Japanese quail were ataxia, salivation, diarrhea, ruffled feather and convulsion at dead point. There were severe hemorrhage and catarrhal inflammation from duodenum to ileum in all compounds. In Japanese quail treated with organophosphorus and carbamate compounds, brain acetylcholinesterase was inhibited by 88-96. The recovery was not observed after 5 h in sublethal dose.

**Key Words** : Acute oral toxicity test, Japanese quail, Organophosphate compounds, Carbamate compound, Acetylcholinesterase

#### I. 서 론

조류를 이용한 화학물질의 독성평가는 이전부터 많이 이용되어 왔다(Romijn 등, 1995; Prior 등, 1976). 그러나 최근 시험법에 대한 정보의 요구가 증가하여 정보의 질을 향상시키고 불필요한 시험법을 감소시키며 각 나라간의 data를 상호 승인하고자 하는 움직임이 있다. 특히 현재 우리나라에서는 조류를 이용한 독성 시험법이 확립되어 있지 않아 환경 위해성 평가를 위한 적당한 시험법이 없는 상태이다.

1999년 국내에서 출하된 농약은 2만5천8백37톤이고, 이중 살충제는 9천5백44톤으로 전체 농약 출하량의 38%에 해당한다(농약정보 2000. 7월 호, 농약공업협회, pp. 22-24). 그리고 세계적으로 1999년 6백만 톤의 농약이 생산되어 이 중 28%가 살충제였다(농약정보. 2000. 10월 호, 농약공업협회, p. 8). 또한 국내 생산 살충제는 약 355종에 이

르며 이중 164종이 유기인계와 카바메이트계 농약으로 전체 살충제의 46%를 차지한다(농약 품목 원제 등록현황. 2000. 농약공업협회, pp. 183-251). 이러한 살충제의 살포는 종종 비특이적으로 생물체에 해를 끼치며, 야생동물의 폐사 원인이 된다(Carson, 1962; Frank 등, 1991; Goldstein 등, 1999; Henny 등, 1985; Kendall 등, 1992; Littrell, 1986; Mendelsohn 등, 1977; Stone, 1979; White 등, 1979). 또한 50% 이상의 유기인계 농약과 90% 이상의 카바메이트계 농약이 조류에 대해 강독성(LD<sub>50</sub> < 40 µg/g)을 지니고 있다(Smith, 1987). 유기인계 농약과 카바메이트계 농약에 대한 독성 연구는 사람(Jorg-Michael 등, 1999)을 포함한, 소형 돼지(George 등, 1999), 랫드 등의 포유류는 물론 일본 메추리를 포함한 다양한 종류의 조류(Bhunya 등, 1994; David 등, 1997; Romijn 등, 1995), 그리고 새우(Peter 등, 1998; Shannon 등, 2000), 등에(Roast 등, 2000) 등의 수중 무척추동물에서 활발하게 수행되어 왔다. 유기인계 약물은 신경계 acetylcholinesterase(AChE: E. C.3.1.1.7)

\*To whom correspondence should be addressed

의 esteratic site에 비가역적으로 결합하여 근 신경연결등의 시냅스에 acetylcholine의 축적을 유도한다. 이러한 AChE의 억제에 의해 cholinergic crisis가 발생하여 침, 땀, 눈물 등의 분비물 증가, 동공수축, 설사, 중추신경계 억제, 부정맥, 심박출의 감소 등의 심맥관계 증상, 근육 약화에 의한 muscle twitch, 그리고 죽음의 결정적 원인이 되는 호흡장애 등의 증상을 보인다(Ecobichon, 1991). 특히 조류에서는 구역질, 기면 상태, 머리 끄떡임, 날개 늘어뜨림, 정좌 반사에 대한 반응 저하, 마비, 후궁반장, 깃털 세움 및 혼수 등의 증상을 나타낸다(Somers 등, 1991). 카바메이트계 농약은 유기인계 농약과 함께 대표적인 AChE 억제제이다. 그러나 유기인계 농약이 AChE의 esteratic site에 비가역적으로 결합하는데 반해 카바메이트계 농약은 가역적으로 결합하는 것으로 알려져 있다(Green, 1983; Lennox 등, 1985). 유기인계 농약과 카바메이트계 농약의 표적 효소인 AChE는 모든 동물들이 갖고 있고 이들 약물에 대해 매우 민감하게 반응하므로 이 효소는 스트레스와 오염원에 노출 정도를 알 수 있는 생화학적 지표로 사용될 수 있다(Scaps 등, 1997). 야생동물에서 AChE 활성의 모니터링은 이러한 살충제의 환경 오염 정도를 확인하는 일반적인 방법으로 사용되어져 왔다(Hill, 1989).

OECD에서 제안하고 있는 방법을 이용하여 국내에서 사용되는 유기인계와 카바메이트계 농약에 대한 일본 메추리에서의 급성경구독성시험법을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험 물질

국내에서 주로 사용되고 있는 유기인계 살충제 3종과 카바메이트계 살충제 1종을 농업과학기술원 일반 독성실로부터 제공받았다.

유기인계 살충제는 diazinon(phosphorothioic acid, O, O-Diethyl O-(2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinyl ester. CAS No. 333415, 98.8%), pyroclofos(O-(1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl) O-ethyl S-propyl phosphorothioate, CAS No. 89784601, 94%), isazofos(O-(5-chloro-1-(1-methylethyl)-1H-1,2,4-triazol-3-yl) O, O-diethyl phosphorothioate, CAS No. 42509808, 96.9%)를 사용하였으며(Fig. 1), 카바메이트계 살충제는 methomyl(N-[[[(Methylamino)carbonyl]oxy]ethanimidothioic acid methyl ester, 98.8%)을 사용하였다.

### 2. 동물

동물은 42±7 일령, 평균 체중 수컷 106.02±6.8 g, 암컷

110.20±9.7 g의 성 성숙이 이루어진 일본 메추리(Japanese quail, *Coturnix japonica*)를 이용하였다. 일본 메추리는 서울대학교 동물자원학과 한재용 교수 실험실에서 분양 받아, 본 실험실에서 수정란을 생산, 부화하고, 번식 시켜 실험동물로 사용하였다. 수정란은 38~39°C의 온도, 50~70%의 습도의 조건에서 부화시켰다. 0~7 일령의 유추는 32~35°C, 8~14 일령은 28~32°C, 14 일령 이상에서는 22~28°C로 온도를 조절하였으며, 채광은 14/10 h(light/dark) cycle로 자동 조절장치를 이용하여 유지하였다. 성추는 90×60×22(가로 세로 높이)cm 크기의 철망 케이지에서 5~10마리씩 사육하였다. 번식을 위한 메추리의 경우엔 암컷과 수컷의 비율이 2:1에서 3:1이 되도록 한 케이지에서 사육하였으며, 실험용 메추리는 성을 분리하여 사육하였다. 사료(삼양사료; 조단백 18.0% 이상, 조지방 2.3% 이상, 조섬유 6.0% 이하, 조회분 15.0% 이하, 칼슘 3.0% 이상, 인 0.6% 이상)와 물을 자유 급식하였다.

### 3. 급성경구독성시험

조류에서의 급성경구독성시험법은 US EPA 71-1(1982)과 US-EPA - Code of Federal Regulations(1993) 등 몇 가지 제안된 방법이 있지만 OECD guideline은 아직까지 확립되어 있지 않다. 본 실험은 1996년 개최된 SETAC/OECD workshop에서 제안하고 있는 조류 독성 시험법(OECD's Guidelines for the Testing of Chemicals, Monograph Series on Testing and Assessment, Report of the SETAC/OECD Workshop on Avian Toxicity Testing)에 근거하여 수행하였다.

#### 1) 동물의 준비

시험에는 모두 건강한 동물이 사용되었으며, 실험군과 대조군을 무작위로 할당하였다. 동물은 투여 전 12~15시간 절식시켰다.

#### 2) Up and down test

Up and down test는 대략적인 LD<sub>50</sub>치를 결정하기 위한 range-finding test로써 이용될 수 있다. 한 농도에 두 마리의 동물을 사용하여 두 마리 모두 사망 할 경우 이보다 낮은 농도를, 두 마리 모두 생존할 경우 이보다 높은 농도를 투여하는 식으로 진행하여 두 마리 중 한 마리만 생존하는 농도를 찾아 이 농도를 기준으로 definitive LD<sub>50</sub> test의 농도를 결정하였다(Deichmann and Leblanc, 1949; Bruce, 1985).

#### 3) Definitive LD<sub>50</sub> test

투여 약물의 용량을 각 개체의 체중에 따라 정하여 옥수

수기름에 희석하여 소낭까지 존대를 이용하여 강제 투여 하였다. 대조군과 4개 농도의 실험군을 두었으며, 각 군의 동물 수는 암수 각각 10마리로 하였다. 사망률은 투여 후 24시간 동안 관찰하였으며, 투여 후 14일까지 지연성 독성을 관찰하였다. 투여 후 1~2시간 동안은 정밀 관찰하여 실험 동물에서 발생하는 역류를 관찰하였으며, 역류가 관찰된 경우 재투여 하였다. 투여 후 나타나는 임상증상으로는 운동 실조, 외부자극에 대한 반응, 침 흘림, 설사, 경련, 깃털 부풀림 등을 검사하였다. 동물의 체중은 시험실시 전, 사망 시, 시험실시 1주일 경과 후 및 시험 종료 시 측정하였다. 죽은 동물은 부검을 실시하여 병리조직학적 분석을 하였다. 각 약물에 대한 definitive test는 시험의 재현성을 보이기 위해 암컷에서 3회 실시하였다.

#### 4) 병리조직학적 평가

사망한 개체와 실험기간이 종료된 개체를 부검하여 각 장기를 10% 중성 포르말린에 24시간 이상 고정하였다. 고정 후 alcohol-xylene으로 processing하여 파라핀 포매 한 후, 2  $\mu$ m의 슬라이드 절편을 만들어 H&E 염색을 하였다.

#### 5) 통계처리

Origin 프로그램을 이용하여 LD<sub>50</sub>치를 측정하였고, ANOVA analysis로 95% 유의수준에서 검증하였다.

### 4. 메추리 뇌에서 Acetylcholinesterase(AChE) Activity 측정

암컷 메추리를 사용, 급성경구독성시험 시와 동일한 농도군으로 군 당 3마리씩 농약을 투여하였다. 투여 후 1시간, 3시간, 5시간에 각각 부검하여 뇌를 적출한 후 AChE (EC 3.1.1.7) activity를 측정하였다. 최고 농도군에서는 한 마리를 투여하여 사망시 부검하였다. AChE activity 측정은 George 등이 사용한 방법을 사용하였다(George 등, 1961). 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0)에서 분쇄한 뇌를 DTNB reagent와 acetylthiocholine iodide를 혼합하여 흡광도 412 nm에서 분당 흡광도의 변화를 측정하였다.

## III. 결 과

### 1. 일본 메추리의 사육 및 번식

메추리의 주령 별 체중 증가와 사료 섭취량을 관찰한 결과, 생후 1~2일부터 먹이를 급여하기 시작하여 생후 1주일에 평균 24.5 g의 사료를 먹고, 9.8 g의 체중 증가를 보였다. 이로써 사료 섭취량의 약 40%가 체중 증가에 이용

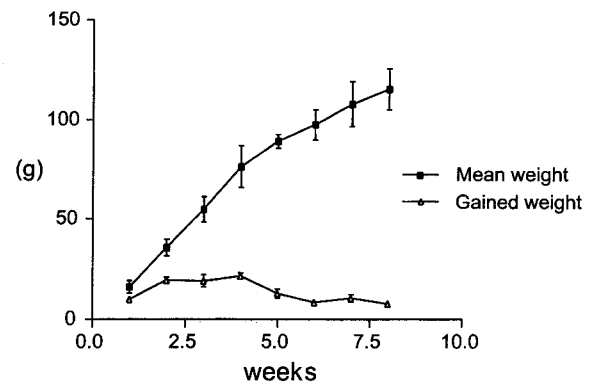


Fig. 1. Body weight change of female Japanese quails.

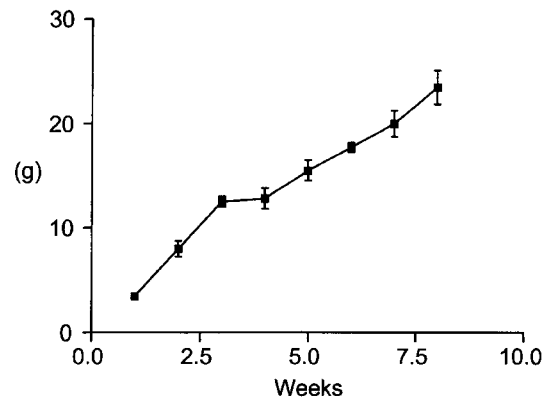


Fig. 2. Food consumption change of female Japanese quails.

됨을 알 수 있었다. 2주령에는 35%, 3주령에는 12%, 6주령에는 6%, 7주령에 7%, 8주령에 4%가 체중증가에 이용되었으며, 평균 체중 115.3 g이 되어 성장이 거의 끝났다. 사료의 섭취량과 증체량은 4주령까지는 증가하였으나 성숙이 개시되는 5~6주령에서부터 사료 섭취량은 꾸준히 증가하였으나 증체량은 서서히 감소하는 양상을 보였다 (Figs. 1, 2). 빠른 성장을 보이는 4주령까지의 어린 메추리는 성 분류에 어려움이 있어 사료 섭취량과 증체량은 암수 통합하여 측정하였다.

일본 메추리는 40~50일령에 성 성숙이 완성되어 알을 낳기 시작하였다. 알의 평균 무게는 10~20 g이었다. 알의 평균 수정율은 94.6%이었으나 부화율은 76.7%이었다. 부화의 적절 온도는 38~39°C이었으며 부화기간은 16~17일이었다. 또한 부화한 후 1주일간 생존하는 생존율은 50%를 조금 넘게 아주 낮았다. 성장과 함께 사망률도 줄어들었으나, 부화 후 12주령일 때의 평균 생존율은 약 40%정도였다(Fig. 3). 메추리는 평균 10일에 7~9개의 알을 산란하였으며, 산란률은 12주령에서 마리 당 8~10개에 알을 산란하는 90% 이상의 산란 피크를 보였다(Fig. 4).

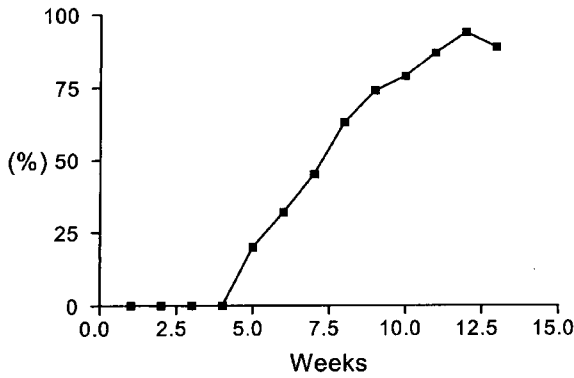


Fig. 3. Survival rate of Japanese quail.

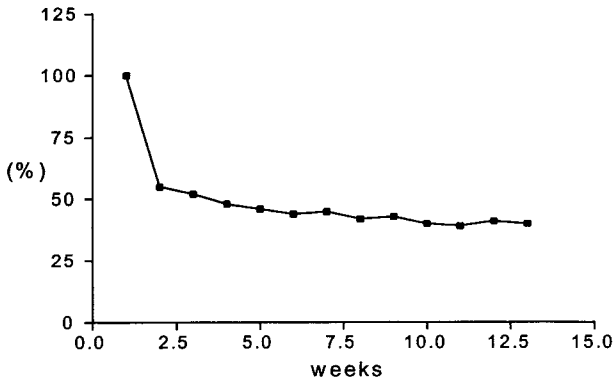


Fig. 4. Reproduction rate of Japanese quail.

2. 급성 경구독성시험

1) Up and down test

각 약물에 대한 up and down test 결과, Isazofos에서는 20 mg/kg의 농도 투여 시 두 마리 중 한 마리가 생존하였고, pyraclofos는 50 mg/kg에서, diazinon의 경우는 5 mg/kg에서 1/2 치사를 보였다. Methomyl은 20 mg/kg에서 1/2의 치사를 보였다. 이 시험의 결과 값을 definitive LD<sub>50</sub> test의 중간 농도로 정하였다(Table 1).

2) Definitive LD<sub>50</sub> test

Table 1. Mortality of Japanese quail administered organophosphate and carbamate compounds by up and down test

Insecticide	Dose level (mg/kg)						
	5	10	20	50	100	200	2000
Diazinon	1/2	2/2	2/2	N	N	2/2	2/2
Isazofos	N	N	1/2	N	N	2/2	2/2
Pyraclofos	N	N	0/2	1/2	2/2	2/2	2/2
Methomyl	N	N	1/2	N	N	2/2	2/2

Represented in number of death animal/number of experiment animal, N = Not done. Quails were clinically examined at least once a day for 14 days.

Table 2. LD<sub>50</sub> of diazinon for acute oral toxicity test in Japanese quail (p < 0.05)

Insecticide	Sex of animals	Dose level (mg/kg)	Mortality	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Diazinon	Female <sup>a</sup>	0	0/10	4.42±0.02
		2.5	0/10	
		5	7/10	
		10	10/10	
		20	10/10	
	Female <sup>b</sup>	0	0/10	5.74±1.59
		2.5	0/10	
		5	4/10	
		10	8/10	
		20	10/10	
Female <sup>c</sup>	0	0/10	7.46±0.10	
	2.5	0/10		
	5	1/10		
	10	9/10		
	20	10/10		
Male	0	0/10	5.50±0.92	
	2.5	1/10		
	5	4/10		
	10	8/10		
	20	10/10		

Acute oral toxicity test was independently conducted in each group of female (a, b, and c).

Table 3. LD<sub>50</sub> of isazofos for acute oral toxicity test in Japanese quail (p < 0.05)

Insecticide	Sex of animals	Dose level (mg/kg)	Mortality	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Isazofos	Female <sup>a</sup>	0	0/10	18.31±1.60
		10	2/10	
		20	6/10	
		40	8/10	
		80	10/10	
	Female <sup>b</sup>	0	0/10	17.06±0.61
		10	2/10	
		20	6/10	
		40	10/10	
		80	10/10	
Female <sup>c</sup>	0	0/10	14.50±1.92	
	10	3/10		
	20	7/10		
	40	8/10		
	80	10/10		
Male	0	0/10	19.66±0.04	
	10	0/10		
	20	6/10		
	40	10/10		
	80	10/10		

Acute oral toxicity test was independently conducted in each group of female (a, b, and c)

유기인계 농약(3종)과 카바메이트계 농약(1종)에 대한 암수 일본 메추리에서의 급성 경구독성시험 결과, 각 약물

**Table 4.** LD<sub>50</sub> of pyraclofos acute oral toxicity test in Japanese quail (p < 0.05)

Insecticide	Sex of animals	Dose level (mg/kg)	Mortality	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Pyraclofos	Female <sup>a</sup>	0	0/10	43.96±7.33
		20	1/10	
		40	4/10	
		80	8/10	
		160	10/10	
	Female <sup>b</sup>	0	0/10	44.29±6.49
		20	2/10	
		40	4/10	
		80	10/10	
		160	10/10	
	Female <sup>c</sup>	0	0/10	38.24±3.66
		20	2/10	
		40	5/10	
		80	10/10	
		160	10/10	
Male	0	0/10	35.69±3.24	
	20	1/10		
	40	6/10		
	80	9/10		
	160	10/10		

Acute oral toxicity test was independently conducted in each group of female (a, b, and c).

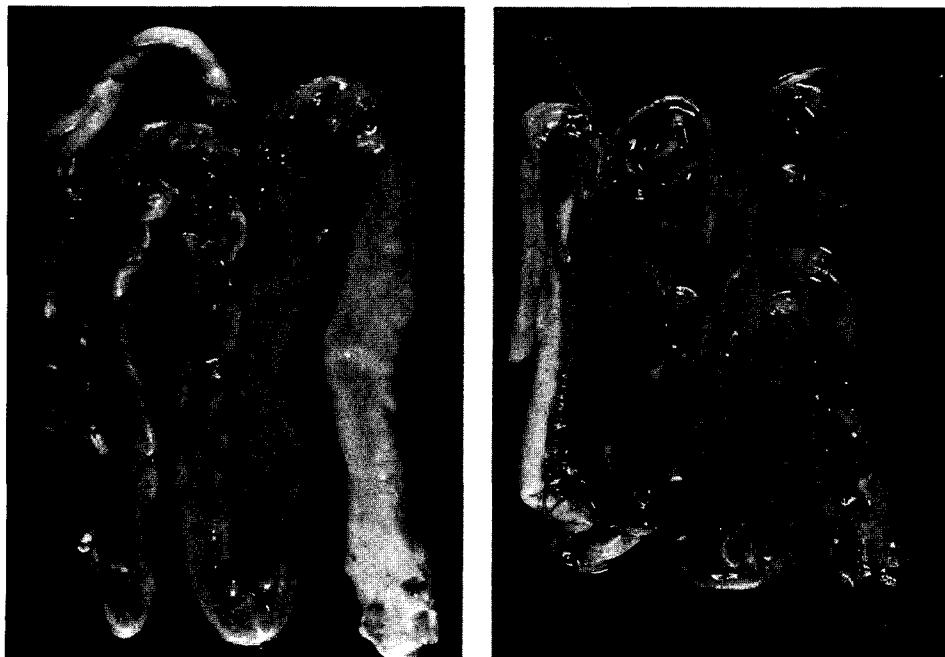
모두 성별에 따른 독성의 차이는 발견할 수 없었고, 3종의 유기인계 농약 중 diazinon이 암수 모두에서 가장 높은 독성을 보였다(Tables 2~5).

**Table 5.** LD<sub>50</sub> of methomyl for acute oral toxicity test in Japanese quail (p < 0.05)

Insecticide	Sex of animals	Dose level (mg/kg)	Mortality	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Methomyl	Female <sup>a</sup>	0	0/10	22.19±0.78
		10	1/10	
		20	4/10	
		40	9/10	
		80	10/10	
	Female <sup>b</sup>	0	0/10	20.34±0.04
		10	0/10	
		20	4/10	
		40	10/10	
		80	10/10	
	Female <sup>c</sup>	0	0/10	28.15±2.27
		10	1/10	
		20	2/10	
		40	9/10	
		80	10/10	
Male	0	0/10	31.09±3.67	
	10	1/10		
	20	1/10		
	40	9/10		
	80	10/10		

Acute oral toxicity test was independently conducted in each group of female (a, b, and c).

약물에 따라 개체가 사망에 이르는 시간은 조금씩 차이가 있었다. 가장 높은 독성을 보였던 diazinon의 경우 치사를 보이는 고농도 군에서는 투여 후 3시간 내에 모두 사



**Fig. 5.** Intestine of Japanese quail administered with PBS (C) and Isazofos (I). Marked hemorrhage was seen in the intestinal mucosa from duodenum to ileum.

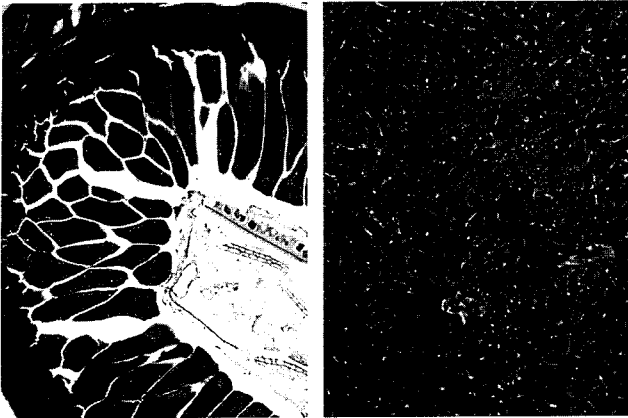


Fig. 6. Jejunum and liver of control Japanese quail. Villi were intact and no fatty droplets were found in the hepatocytes.

망하였다. 다른 두 유기인계 약물의 경우도 치사는 1~8시간 이내에 모두 나타났으며, 이후 14일 간의 관찰 기간 동안에는 사망개체를 발견할 수 없었다. 단, pyraclofos의 경우, 80 mg/kg 투여군에서 투여 3일만에 사망하였다. 투여

3일만에 사망 한 개체의 체중은 실험 전 체중보다 무려 40.5 g 감소하였다. 그러나 체중 감소 이외의 임상 증상은 발견할 수 없었다. 시험 종료 3일전에 사망개체가 있을 경우 시험기간을 1주일 연장해야 하는 규정이 있으나, 본 실험에서는 투여 후 3일만에 폐사하였으므로 시험기간을 연장하지 않았다. Methomyl의 경우 투여 직후부터 사망을 보였으며, 사망 개체들은 1시간 내에 모두 사망하였다. 사망 시 보이는 각 개체별 임상증상은 약물에 관계없이 모두 동일하였고, 운동실조와 심한 경련을 나타낸 후 사망하였다. 사망하지 않은 동물에서도 운동실조는 24시간 지속적으로 나타났다. 임상 증상은 저농도 군으로 갈수록 그 증상이 경미하였으나, 침 흘림 증상과 깃털 부풀림 증상은 저농도 군에서도 다수의 개체에서 발견할 수 있었다. 체중은 투여 후 1일의 체중과 사망시의 체중, 투여 7일째와 14일째 각각 측정하였다. 투여 후 1일째의 체중은 저 농도 투여 군에서는 평균  $12.93 \pm 3.7$  g의 체중감소를 보였다. 특히 isazofos의 10 mg/kg 투여군에서는 평균 18.2 g로 크게 감소하였다. 그러나 모든 약물의 고농도군은 투여 후 짧은 시간 내에 사망하는 개체가 많아 체중의 감소가 현저하지

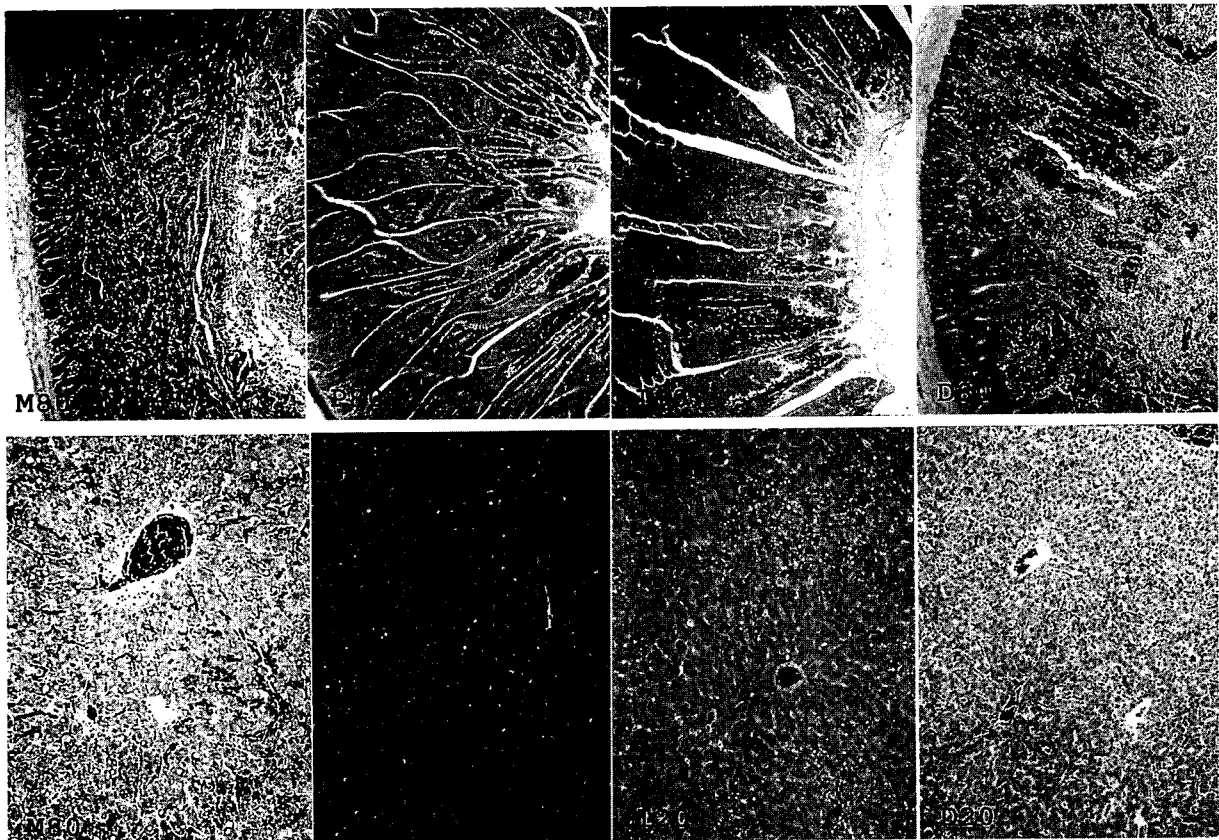


Fig. 7. Many blood vessels in lamina propria were dilatated and hemorrhage was seen in the quail administered with diazinon (D), isazofos (I), pyraclofos (P), and methomyl (M). Villi were markedly atrophied and desquamated. Many minute fatty droplets were infiltrated in the hepatocytes of quail administered with diazinon (D), isazofos (I), pyraclofos (P), and methomyl (M). Except the quail administered with isazofos, fatty droplets were infiltrated in the hepatocytes around portal tract, whereas around central veins in the quail with administered with isazofos.

않았다. 투여 7일째에는 모든 약물과 모든 농도군에서 체중이 급격히 증가하여 정상 체중으로 회복되었지만, 14일째의 체중 변화는 개체차이를 보였다.

### 3) 육안 병변의 관찰

사망 개체를 포함하여 시험 종료 시 모든 개체를 부검하여 육안 병변을 관찰하였다. 유기인계 농약의 투여 군에서 근위 점막의 흑갈색 변화와 십이지장에서 회장까지의 미만성 점상 출혈을 관찰하였다. 단 diazinon의 근위에서는 출혈에 의한 흑갈색 변화는 관찰할 수 없었다. 소장 및 맹장 출혈은 pyraclofos 투여군에서 가장 현저하였다. 카바메이트계 농약인 methomyl의 투여군에서는 유기인계 농약의 소견과는 달리, 근위에서의 병변은 관찰할 수 없었고, 십이지장에서 회장까지의 출혈이 관찰되었다(Fig. 5).

### 4) 병리조직학적 관찰

대조군 메추리의 소장 및 간장에서는 병변이 관찰되지 않았다(Fig. 5). 모든 시험 물질 투여군 중 사망한 개체로부터 소장 및 간장에서 병변이 관찰되었다. 소장에서는 villi가 고도로 위축되었고, 상피세포가 탈락하였다. 고유점막층에는 림프구가 중등도로 침윤하였고, 충혈 및 출혈이 관찰되었다(Figs. 6, 7). 간장에서는 지방구의 간세포질내 침윤이 모든 시험물질 투여군에서 관찰되었다. Diazinon, pyraclofos, methomyl 투여군에서는 지방구가 문맥주변 간세포에 침윤하였으나, Isazofos 투여군에서는 중심정맥 주변부에 침윤하였다(Fig. 7).

## 3. Brain Acetylcholinesterase Activity

AChE의 측정 결과, 사망한 개체에서는 대조군과 비교하여 3.77%~18.76%의 활성을 보였다. Isazofos는 사망 개체에서 11.77%의 활성을 보였으며, 저농도 군에서는 이에 비해 약 5.7배 높은 66.44%의 활성을 나타내었다. 5시간 경과 후 40 mg/kg 농도군을 제외한 나머지 군에서의 활성의 회복은 확인할 수 없었다. Pyraclofos의 경우도 죽은 개체에서 7.53% 낮은 활성을 보였다. 5시간 경과 후 모든 농도군에서 활성의 회복은 확인할 수 없었다. 특히 고농도 군에서는 시간이 경과함에 따라 활성이 더 감소하였고, 80 mg/kg 투여군의 5시간 경과 시에는 사망개체와 비슷한 7.93%의 활성을 나타내었다. Diazinon 투여군에서는 사망 개체에서 16.64%와 18.76%의 활성을 보였다. 저농도 군에서는 투여 3시간에 약간의 활성 감소를 보였으나 투여 5시간이 경과하면서 서서히 회복하는 경향을 나타내었다. 그러나 정상 활성 치료의 회복은 보이지 않았다. 카바메이트계 농약인 methomyl은 사망개체에서 3.77%의 아주 낮은 활성을 보였고 저농도 군에서도 투여 1시간

**Table 6.** Brain AChE activity (% of Control) after 1, 3 and 5 hr exposure to organophosphate and carbamate insecticides

Insecticides	Dose level (mg/kg)	Time after exposure			
		1 h	3 h	5 h	Death
Diazinon	2.5	70.01	66.01	75.13	-
	5	60.99	57.87	66.34	-
	10	-	-	-	16.44
	20	-	-	-	18.76
Isazofos	10	66.44	60.72	52.06	-
	20	63.64	48.95	69.32	-
	40	43.45	53.01	65.95	-
	80	-	-	-	11.77
Pyraclofos	20	45.19	28.97	33.87	-
	40	33.59	11.19	14.34	-
	80	28.78	14.86	7.89	-
	160	-	-	-	7.53
Methomyl	10	22.22	49.32	44.72	-
	20	15.61	43.10	45.48	-
	40	-	-	37.34	3.77
	80	-	-	-	3.90

에 22.22%, 15.61%의 낮은 활성을 보였다. 그러나 투여 3시간만에 약 30~40%의 활성 회복 경향을 보여 29.32%와 43.10%의 활성을 나타냈다(Table 6).

## IV. 고 찰

일본 메추리를 실험 동물로 사용하는 데는 많은 이점이 있다. 일본 메추리는 체구가 작고, 생활 주기가 짧아 성장에 따른 살충제의 효과를 알아보는데 효과적일 뿐 아니라, 물질과 환경에 따른 산란률, 수정율의 차이를 측정하는데도 용이하다. 그러나 일본 메추리를 이용하는 데는 몇 가지 어려운 점도 있다. 우선 시험용 닭에 비해 높은 자연 사망률을 가지고 있으며, 날 수 있고, 활동이 매우 민감해 다루기가 어렵다(Martin 등, 1971). 본 실험실에서는 일본 메추리의 수정란을 부화하고 번식, 사육하여 실험에 사용하였다. 수정율은 약 94%에 달했으나, 부화율은 76%, 부화 1주일 후의 생존율은 55%, 12주에 이르러서는 40%의 낮은 생존율을 보였다. 이는 부화 초기에는 16.6 g의 작은 개체라 외부 환경의 변화에 민감하여 작은 온도와 습도의 차이에도 폐사하기 때문이다. 그리고 부화 직후 바닥이 미끄러운 곳에 오래 방치할 경우 다리가 벌어져 걷지 못하는 기형을 나타내어 폐사의 주요 원인이 되므로 이점을 유의해야 한다. 또한 음수는 너무 큰 용기에 공급할 경우 유추의 익사의 위험이 있으므로 주의해야 한다.

Alan 등이 diazinon과 methomyl에 대한 broiler chick에서 급성 경구독성시험을 실시한 결과, diazinon의 LD<sub>50</sub>값은 3.0 mg/kg이고, methomyl의 LD<sub>50</sub>값은 41 mg/kg이었다(Alan 등, 1997). 일본 메추리에 대한 정확한 참고 자료는

없었으나, bobwhite quail이 isazofos의 경구 독성시험에서 11.1 mg/kg의 LD<sub>50</sub>값을 갖는다고 알려져 있으며, 본 실험에서는 16.79±4.70 mg/kg(p < 0.05)이었다. 본 실험에 사용한 농약에 대한 일본 메추리에서의 급성 경구독성 시험의 국제적 자료를 얻을 수 없어 비교할 수는 없었으나, 3번에 걸친 실험의 결과 표준 편차는 1.9를 넘지 않는 수치를 얻을 수 있었다. Definitive LD<sub>50</sub> test 실시 전 시행한 up and down test의 결과 diazinon 5 mg/kg, isazofos 20 mg/kg, pyraclofos 50 mg/kg 및 카바메이트계 농약인 methomyl은 20 mg/kg의 농도에서 1/2의 사망률을 보였다. 이는 definitive LD<sub>50</sub>에 의해 얻어진 결과인 diazinon 7.11 mg/kg, isazofos 16.26 mg/kg, pyraclofos 41.26 mg/kg 그리고 methomyl 16.62 mg/kg과 매우 유사한 값을 나타내었다. 이 결과는 많은 동물을 사용해야 하는 definitive LD<sub>50</sub> test의 단점을 보완하여 동물의 복지 차원에서, 그리고 많은 실험 동물을 확보할 수 없는 야생조류의 농약 독성을 측정하는데 up and down test로 대체할 수 있음을 보여주고 있다.

유기인계 농약에 노출된 조류에서는 일시적인 체중의 현저한 감소가 있었는데, 이는 약물에 의한 stress로 인한 일반적인 현상이다(Grue 등, 1991). 이러한 현상은 사망개체를 보이지 않는 저농도군에서 더욱 현저하다. 본 실험에서는 투여 1일 경과 후 사망하지 않은 개체들은 12.93±3.7 g의 체중 감소를 보였는데, 이는 평균 체중의 11.1%에 해당한다. 대부분의 조류에서 6~7%의 체중 감소를 보이나(Baldwin과 Kendeigh, 1985), 이번 실험 결과는 이보다 좀더 현저한 감소치를 보였다. 이는 일본 메추리의 체구가 작기 때문에 변화 폭이 현저하였던 것으로 생각된다. 급성으로 유기인계 농약에 노출된 찌르레기(Hart, 1986), bobwhite quail(Stromborg, 1986), house sparrow(Mehrotra 등, 1967) 등의 조류에서 사료 소비량이 감소하였다고 보고된 바 있으나, 본 실험에서는 약물 투여 후 사료 소비량의 감소는 isazofos와 pyraclofos의 고농도 군에서 나타났을 뿐, diazinon 투여 동물에서는 발견할 수 없었다. 따라서 유기인계 농약에 의한 식욕 감퇴는 명확하게 설명할 수 없었고, 농약에 따라 다른 양상을 보이는 것으로 생각된다.

유기인계 농약의 투여에 의한 육안 소견은 보고된 예가 드물고, 대부분의 연구에서는 특징적인 육안 소견이 관찰되지 않았다(Martin 등, 1969; Robert 등, 1986). 그러나, 유기인계 농약인 omathoate의 메추리를 이용한 독성 시험(Lorke, 1980)에서는 간장의 흑갈색 변화와 장의 급성 출혈이 관찰되었다. 본 실험의 결과 유기인계 농약은 사망농도에서 심한 십이지장의 점상 출혈을 보였고, 폐장의 급성 출혈이 관찰되었다. Pyraclofos와 isazofos 투여 군에서는 근위의 흑갈색 변화도 현저하였다. 이러한 증상은 pyraclofos 투여군에서 더욱 현저하여 십이지장의 점상 출혈은 회장까지 관찰되었다. 반면, 카바메이트계 농약인

methomyl 투여군에서는 십이지장과 소장의 출혈을 관찰할 수는 없었으나, 카타르성 염증을 확인하였고, 역시 폐장의 출혈이 관찰되었다. 유기인계 농약과 카바메이트계 농약은 급성독성으로 십이지장에서 회장까지 미만성의 출혈과 출혈을 일으키는 것을 알 수 있었다.

Brain AChE의 활성을 측정한 결과, 사망개체는 88~96%의 활성 억제를 볼 수 있었고, 저농도군에서도 정상에 비해 현저히 억제된 것을 알 수 있었다. AChE의 활성의 억제는 모든 약물에서 농도 의존적으로 나타나 저농도의 투여군에서는 고농도 투여군에 비해 높은 활성을 보였다. 유럽 찌르레기에 유기인계 약물인 chlorfenvinphos를 투여하여 뇌의 AChE 활성을 측정한 결과, 5시간 경과 후 AChE의 활성이 회복되었다(Fryday 등, 1995). 그러나 본 실험에 사용한 유기인계 약물인 isazofos, pyraclofos와 diazinon에서는 5시간 경과 후에도 뚜렷한 회복을 확인할 수 없었다. Pyraclofos의 경우 오히려 시간이 경과할수록 활성은 억제되어 80 mg/kg 투여군의 5시간 경과 시 사망개체와 비슷한 7.93%의 활성만을 나타내었다. 카바메이트계 농약인 methomyl은 투여 1시간에 15~22%의 활성이었으나 투여 3시간에는 27% 이상 회복하였다. 이는 카바메이트계 농약은 AChE와 불안정하게 가역적으로 결합하므로 유기인계 약물에 비해 회복이 빠른 것으로 생각된다(Kai 등, 1999). AChE 활성은 급성 경구독성시험의 결과 알게 된 약물의 독성과는 상관관계가 없었다. 즉 급성 경구독성시험시 가장 높은 독성을 보였던 diazinon의 경우 모든 농도, 모든 시간에서 가장 낮은 독성을 보인 pyraclofos에 비해 높은 활성을 보였다. 이것은 Chambers(1992)와 Thompson(1995) 등이 랫드와 유럽 찌르레기를 이용한 시험의 결과와 일치한다. 그러므로 AChE의 활성 정도만으로 물질의 독성 정도를 알 수는 없다. 그러나 이 실험의 결과 유기인계 약물과 카바메이트계 약물에 노출된 일본 메추리는 저농도일지라도 정상에 비해 매우 낮은 활성을 나타내므로 야생 동물에서 이들 약물에 노출 유무를 판단하는 지표로 사용할 가치가 있을 것으로 사료된다.

일본메추리의 급성독성시험을 수행하여 확립함으로써 환경위해성 물질 평가 법을 확립할 수 있었다. 이러한 시험법의 확립으로 살충제 등의 국내에서 개발되는 농약의 조류를 이용한 환경 위해성 평가의 적용 및 평가 자료에 대한 국제적 공유의 가능성을 기대할 수 있다. 또한 일본 메추리를 이용한 식이 독성시험법의 확립과 생식독성 및 지연성 독성 시험법의 확립을 위한 더 많은 연구가 이루어 질 것으로 기대된다.

## 참고문헌

Alan, S., Michel, B., Vera, H. and Evgenia, E. (1997): New



- treatment regimens in organophosphate (Diazinon) and carbamate (Methomyl) insecticide-induced toxicosis in fowl. *Vet. Human. Toxicol.*, **39(6)**, 347-350.
- Baldwin and Kendeigh (1985): Laboratory evaluation of four organophosphate as larvicides against field collection salt marsh *Calicoides* spp. (Diptera: ceratopogonia). *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, **1(1)**, 48-50.
- Bhunya, S.P. and Jena, G.B. (1994): Evaluation of genotoxicity of a technical grade organophosphate insecticide, Tafethion (ethion), in chicks. *In Vivo.*, **8(6)**, 1087-1089.
- Bradbury, S.P. and Coats, J.R. (1982): Toxicity of fenvalerate to bobwhite quail (*Colinus virginianus*) including brain and liver residues associated with mortality. *J. Toxicol. Environ. Health*, **10(2)**, 307-319.
- Bruce, R.D. (1985): An up and down procedure for acute toxicity testing. *Fundamental and applied toxicology* **(5)**, 151-157.
- Carson, R. (1962): Silent spring. Houghton Mifflin, Boston, MA.
- David, C.C.W., Yu, P.N., Roy Choi, C.Y., Pine, W.T. and Karl, W.K.T. (1997): Denervation decreases the ipsilateral expression of AChE in chick lumbaric moter neurons. *Neuroscience Letters*, **232**, 83-86.
- Deichmann, W. and Leblanc, T.J. (1943): Determination of the approximate lethal dose with about 6 animals. *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **25**, 415-417.
- Ecobichon, D.J. (1991): Pesticides. In : Amdur M.O., Doull, J. and Klaassen, C.D. (Eds.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Pergamo Press, New York, pp. 580-592.
- Frank, R., Mineau, P., Braun, H.E., Barker, I.K., Kennedy, S.W. and Trudeau, S. (1991): Deaths of Canata gees following spraying of turf with diazinon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **46**, 852-858.
- Fryday, S.L., Hart, A.D. and Marczylo, T.H. (1995): Effects of sublethal exposure to an organophosphate on the flying performance of captive starlings. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **55(3)**, 366-373.
- George, L.E., Diane, K.C., Valentino Andres, Jr. and Robert, M.F. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95.
- Goldstein, M.I., Lacer, T.E.Jr., Woodbridge, B., Bechard, M.J., Canavelli, S.B., Zaccagnini, M.E., Cobb, G.P., Scollon, E.J., Tribolet, R. and Hooper, M.J. (1999): Monocrotophos-induced mass mortality of Swainson's hawks in Argentina, 1995~1996. *Ecotoxicology*, **8(3)**, 201-214.
- Green, A.L. (1983): A theoretical kinetic analysis of the protective action exerted by eserine and other carbamate anticholinesterases against poisoning by organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1717-1722.
- Grue, C.E., Hart, A.D.M. and Mineau, P. (1991): Biological consequences of depressed brain cholinesterase activity in wildlife. In: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Elsevier. Amsterdam. pp. 151-209.
- Hart, A.D. and Westlak, G.E. (1986): Acetylcholinesterase activity and the effects of chlorfenvinphos in regions of the starling brain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **37(5)**, 774-782.
- Henny, C.J., Blus, L.J., Kolbe, E.J. and Fitzner, R.E. (1985): Organophosphate insecticide (famphur) topically applied to cattle kills magpies and hawks. *J. Wildl. Manage*, **49**, 648-658.
- Hill, E.F. (1989): Sex and storage affect cholinesterase activity in blood plasma of japanese quail. *J. Wildl. Dis.*, **25(4)**, 580-585.
- Jorg-Michael, C., Rita, S., Holger, W. and Ronald, Z. (1999): Orgaonphosphate inhibition of human heart muscle cholinesterase isoenzymes. *Chemico-Biological Interactions*, **199-120**, 183-192.
- Kai, T., Eila, K.K., Frank, M. and Osmo, H. (1999): Success of pyridostigmine, physostigmine, eptastigmine and phosphotriesterase treatments in acute sarin intoxication. *Toxicology*, **134**, 169-178.
- Kendall, R.J., Brewer, L.W., Hitchcock, R.R. and Mayer, J.R. (1992): American pigeon mortality associated with turf application of diazinon AG500. *J. Wildl. Dis.*, **28(2)**, 263-267.
- Lennox, W.J., Harris, L.W., Talbot, B.G. and Anderson, D.R. (1985): Relationship between reversible acetylcholinesterase inhibition and efficacy against soman lethality. *Life Sci.*, **37**, 793-798.
- Littrell, E.E. (1986): Mortality of American wigeon on a golf course treated with the organophosphate, diazinon. *Calif. Fish. Game.*, **72(2)**, 122-124.
- Martin, S., Ernest, R. and Yates, J.R. (1971): Comparative Toxicity of Four Halogenated Organophosphorus Insecticides to Chicks, Japanese Quail, and Diptera. *J. Economic. Entomol.* **64(4)**, 814-819.
- Mendelssohn, H. and Paz, U. (1977): Mass mortality of birds of prey caused by azodrin, an organophosphorus insecticide. *Biol. Conserv.*, **11**, 163-169.
- Peter, B.K., Michael, H.F., Geoffrey, I.S., Shawn, L.L. and Edward, F.W. (1998): Lethal and sublethal effects of malathion on three life stages of grass shrimp, *Palaeomonetes pugio*. *Aquatic. Toxicology*, **40**, 311-322.
- Prior, M.G., Sisodia, C.S. and O'Neil, J.B. (1976): Acute oral ochratoxicosis in day-old White Leghorns, turkeys and Japanese Quail. *Poult. Sci.*, **55(2)**, 786-790.
- Roast, S.D., Widdows, J. and Jones, M.B. (2000): Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) by the

- organophosphate pesticide chlorpyrifos. *Aquatic Toxicol.*, **47**, 227-241.
- Robert, E., Peter, M. and David, H.H. (1986): Comparative Toxicity of cis-Cypermethrin in Rainbow Trout, Frog, Mouse, and Quail. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84**, 512-522.
- Romijn, C.A.F.M., Grau, R., Guth, J.A., Harrison, E.G., Jackson, C.M., Lefebvre, B., Smith, W.W. and Street, J.R. (1995): The use of Japanese and bobwhite quail as indicator species in avian toxicity test. *Chemosphere*, **30(6)**, 1033-1040.
- Scaps, P., Demuyne, S., Descamps, M. and Dhainaut, A. (1997): Effects of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and cholineacetyltransferase activities of the polychaete *Nereis diversicolor*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **33(2)**, 203-208.
- Shannon, A.L., Michael, H.F. and Peter, B.K. (2000): The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition. *Aqua Toxicol.*, **48**, 127-134.
- Smith, G.J. (1987): Pesticide Use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorus and Carbamate Compounds. US Fish. Wildl. Serv., *Resource Publication*, pp. 170-171.
- Somers, J.D., Barrett, M.W. and Khan, A.A. (1991): Simulated field ingestion of carbofuran-contaminated feedstuffs by pheasants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 521-528.
- Stone, W.B. (1979): Poisoning of wild birds by organophosphate and carbamate pesticides. *N.Y. Fish. Game J.*, **26**, 37-47.
- Stromborg, K.L. (1986): Reproduction of bobwhite fed different dietary concentration of an organophosphate insecticide, methamidophos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15(2)**, 143-147.
- Thompson, H.M., Langton, S.D. and Hart, A.D.M. (1995): Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife - a biochemical approach. *Comp. Biochem. Physiol.*, **111(1)**, 1-12.
- White, D.H., King, K.A., Mitchell, C.A., Hill, E.F. and Lamont, T.G. (1979): Reactivation of organophosphate-inhibited AChE with oximes. In: Chambers JE, Levi PE (eds) *Organophosphates: chemistry, fate, and effects*. Academic Press, Orlando, FL.