

유기인계 농약의 연령에 따른 감수성 차이

성 하 정
농업과학기술원 농약안전성과

Difference of Age-Related Sensitivity to Organophosphates

Ha Jung Sung

Pesticide Safety Division, National Institute of Agricultural Science and Technology,
Seodun-Dong 249, Suwon 441-707
(Received November 11, 2001)
(Accepted December 4, 2001)

ABSTRACT : The potential for a given anticholinesterase pesticide to exhibit age-related toxicity is essential information for an accurate and proper risk assessment of that compound. This investigation was designed to study the age-related toxicity of active metabolites of four organophosphates using *in vitro* detoxification measurement. The blood samples were collected from 1 month and 18 months old rats. The IC_{50} values of mouse brain recombinant AChE of chlorpyrifos-oxon, diazoxon, malaoxon and paraoxon were 10.35, 112.84, 151.28 and 18.43 nM, respectively. When the plasma of young rats, and $CaCl_2$ were added, the IC_{50} values of mouse brain recombinant AChE of chlorpyrifos-oxon, diazoxon, malaoxon and paraoxon were 31.89, 164.25, 139.94 and 16.36 nM, respectively. The IC_{50} values of mouse brain recombinant AChE of chlorpyrifos-oxon, diazoxon, malaoxon and paraoxon were changed to 136,840, 1244.45, 654.54 and 32.66 nM by A-esterases in adult rats. These results suggest that four organophosphates have a potential toxicity to exhibit age-related sensitivity.

Key Words : Organophosphate, Chlorpyrifos, Diazinon, Malathion, Parathion, Carboxylesterase, A-esterase, *In vitro* detoxification measurement

I. 서 론

식량생산에서 병충해에 의한 감수율은 6~28%에 이르고 있어 그 손실에 막대하다(농약의 안전성과 작물보호, 1999). 따라서 식량증산을 위한 농약의 사용량은 64년에 1,115톤이었던 것이 74년, 84년 및 94년에는 각각 5.2배인 5,844톤, 15배인 16,688톤 및 24배인 26,282톤으로 크게 증가하였다(정, 1986; 농약연보, 1995). 농약사용량의 증가에 따라 인체 또는 가축에서 농약중독이 빈번히 발생하고 있다(이, 1981; 정, 1982; 김 1985). 그런데 농약중독 발생건수 중 살충제 계통에 의한 것이 87.3%를 점유하고 있고(공중보건연구회, 1985), 유기인계 살충제는 국내에서 등록·사용되고 있는 살충제 286개 중 107개로 살충제중 가장 많은 부분을 차지하고 있으며, 그 중 다이아지논 diazinon, 파라치온 parathion, 이피엔 EPN, 디디브이피 DDVP, 클로피리포스 chlorpyrifos, 포스파미돈 phosphamidon, 모노크로토포스 monocrotophos, 메치다치온 methidathion, 에프프로포스 ethoprofos 및 터부

포스 terbufos 등이 많이 사용되고 있다(농약연보, 1999).

유기인계 살충제는 생체내에서 acetylcholinesterase(AChE)의 기능을 비가역적으로 억압함으로써, 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)이 체내에 과도하게 축적되어서 독성을 나타내고, 이에 따른 임상증상은 구역, 구토, 설사, 발한, 배변, 배뇨, 축동, 호흡곤란, 유연 등의 muscarine양 증상과 근섬유 수축, 호흡마비 등의 nicotine양 증상, 그리고 두통, 언어장애, 착란, 혼수, 체온상승 등의 중추신경계 증상으로 나눌 수 있다(Ecobichon, 1996). 그리고 최근 미국 National Research Council의 "Pesticides in the Diets of Infants and Children(1993)"에 따르면 태아와 신생아는 성인보다 독성물질에 대한 감수성이 높을 가능성이 있다고 보고하였다. 이에 따라 미국은 새로운 법률인 Food Quality Protection Act(1996)을 제정하여 미국환경청으로 하여금 어린이의 농약에 대한 감수성 증가여부를 평가하도록 하였다.

본 시험에서는 유기인계 농약이 carboxylesterases와 A-esterases에 의하여 해독된다는 점에 착안한 시험관내 해독

시험법(Padilla 등, 2000)을 이용하여, 몇 가지 유기인계 살충제에 대한 연령감수성과 해독효소활성도의 차이를 밝혀 유기인계 살충제의 정확한 위해성평가를 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

Chlorpyrifos-oxon(CPO), diazoxon, malaoxon 및 paraoxon 등은 Chem Service(Westchester, USA)로부터 구입하였다. 그리고 Mouse brain recombinant AChE(R-AChE)는 Dr. Stephanie Padilla로부터 입수하였으며, 일반적인 시약들은 Sigma Chemical(St. Louis, USA)으로부터 구입하였다.

2. 시험동물사육 및 혈장의 조제

실험동물은 특정병원체 부재 Sprague-Dawley 스킷 렫드를 한림실험동물에서 구입하여, 일정시간 동안 순화 사육한 후 시험에 사용하였다. 사육조건은 온도 22±1°C, 습도 55±10% 그리고 명암은 12시간마다 자동조절되는 환경에서 사육하였다. 사료와 물은 자유로이 공급하였다.

생후 1개월 또는 18개월 렫드의 혈액을 에테르 마취 후 복대정맥에서 혈액을 채취한 후, 4°C에서 냉장원심분리기로 혈장을 분리하여 -80°C의 초저온냉동고에서 보관하면서 사용하였다.

3. IC₅₀ 결정 및 계산

시험관내 해독시험법을 위하여, R-AChE는 1% Triton X-100과 1% bovine serum albumin을 포함한 Ellman buffer(Ellman 등, 1961)로 50,000배로, 그리고 렫드 혈장은 1% Triton X-100을 포함한 Ellman buffer로 50배 희석하였다. 각 억제곡선을 결정하기 위하여, 희석된 R-AChE 20 µl, 각 유기인계 살충제의 활성대사체 1 µl, 및 DTNB [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)]가 포함된 Ellman buffer 59 µl씩을 각 well에서 혼합한 후, 26°C에서 10분간 반응시켰고, DTNB와 acetylthiocholine이 포함된 Ellman buffer 120 µl씩을 첨가하여 그 활성도를 96-well microtiter plate reader(Molecular Devices, Inc., USA)를 이용하여 5분간 측정하였다. IC₅₀값의 계산은 Litchfield와 Wilcoxon 법(Tallarida와 Murray, 1986)으로 하였다.

4. 시험관내 해독시험

시험관내 해독시험법의 전체적인 조건은 Table 1에 표

Table 1. Microtiter Plate Conditions for *in vitro* detoxification measurements

Condition	Plasma	Inhibitor	CaCl ₂	EGTA	R-AChE
A. R-AChE	-	○	-	-	○
B. Plasma detoxification	○	○	○	-	○
C. Blank for B	○	○	○	-	-
D. Carboxylesterase	○	○	-	○	○
E. Blank for D	○	○	-	○	-
F. Plasma IC ₅₀	○	○	-	-	-

○ : indicates that this particular ingredient was added to the indicated "condition".

시하였다. 즉, 50배희석 혈장 20 µl, 유기인계 살충제의 활성대사체 1 µl, 2 mM CaCl₂ 또는 1 mM EGTA를 넣은 후, 각 well에 60 µg가 되게 DTNB가 포함된 Ellman buffer를 첨가하여 chlorpyrifos-oxon은 30분간 그리고 diazoxon, malaoxon 및 paraoxon 등은 60분간 1차(해독)반응을 시켰다. 1차배양 후, 희석된 R-AChE 20 µl를 넣어 2차(억제)반응을 10분간 시킨 후, 기질과 발색시약을 넣어 반응시키면서 5분간 그 활성도를 microtiter plate reader(Molecular Devices, Inc., USA)를 이용하여 측정하였다. DTNB와 acetylthiocholine의 최종농도는 각각 0.33 mM과 1 mM이었으며, 시험은 26°C에서 수행되었다.

III. 결 과

1. Chlorpyrifos-oxon에 대한 연령에 따른 해독능력 비교

Chlorpyrifos-oxon에 대한 mouse brain recombinant AChE의 IC₅₀값은 10.35 nM이었으나, 1개월령 렫드혈장의 carboxylesterases와 A-esterases에 의하여 각각 10.97과 31.89 nM으로 변화였고, 18개월령 렫드혈장의 carboxyl-

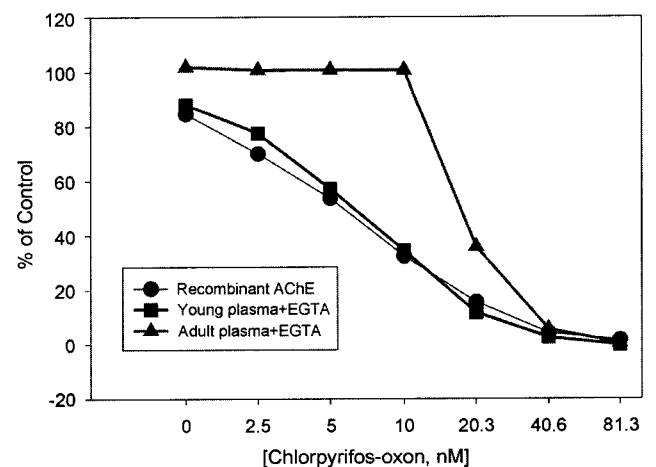


Fig. 2. Comparison of the detoxification of CPO by A-esterases in young and adult plasma.

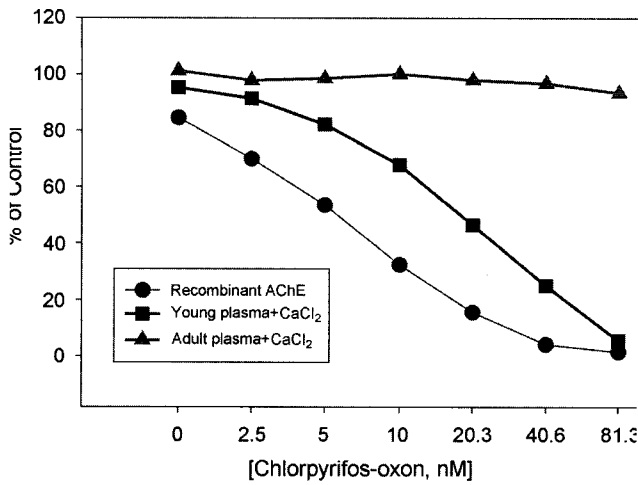


Fig. 2. Comparison of the detoxification of CPO by A-esterases in young and adult plasma.

esterases와 A-esterases에 의하여 각각 39.13과 136,840 nm으로 변화여서, CPO에 대한 해독활성은 해독효소 중에서는 A-esterases가, 그리고 18개월령 랫드혈장이 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 1과 2).

2. Diazoxon에 대한 연령에 따른 해독능력 비교

Diazoxon에 대한 mouse brain recombinant AChE의 IC₅₀값은 112.84 nm이었으나, 1개월령 랫드혈장의 carboxylesterases와 A-esterases에 의하여 각각 103.78과 164.25 nm로 변화였고, 18개월령 랫드혈장의 carboxylesterases와 A-esterases에 의하여 각각 141.13과 1244 nm로 변화여서, diazoxon에 대한 해독활성은 해독효소 중에서는 A-esterases

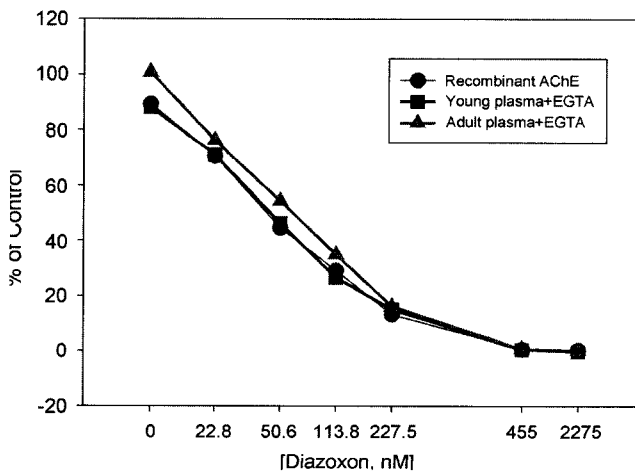


Fig. 3. Comparison of the detoxification of diazoxon by carboxylesterases in young and adult plasma.

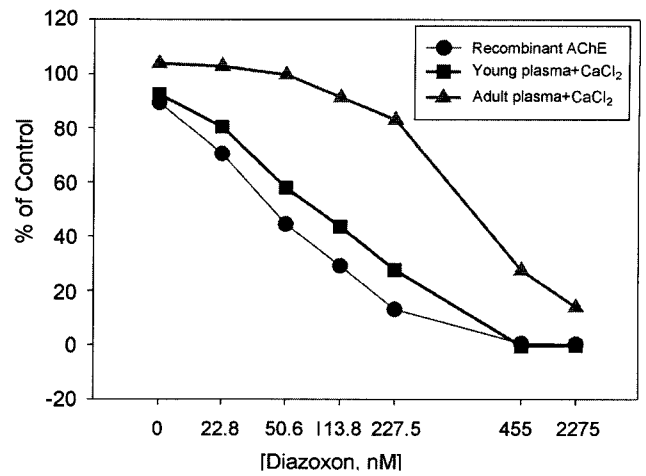


Fig. 4. Comparison of the detoxification of diazoxon by A-esterases in young and adult plasma.

가, 그리고 18개월령 랫드혈장이 더 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3과 4).

3. Malaoxon에 대한 연령에 따른 해독능력 비교

Malaoxon에 대한 mouse brain recombinant AChE의 IC₅₀값은 151.28 nm이었으나, 1개월령 랫드혈장의 carboxylesterases와 A-esterases에 의하여 각각 204.27과 139.94 nm로 변화였고, 18개월령 랫드혈장의 carboxylesterases와 A-esterases에 의하여 각각 813.16과 654.54 nm로 변화여서, malaoxon에 대한 해독활성은 해독효소 중에서는 carboxylesterases가, 그리고 18개월령 랫드혈장이 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 5과 6).

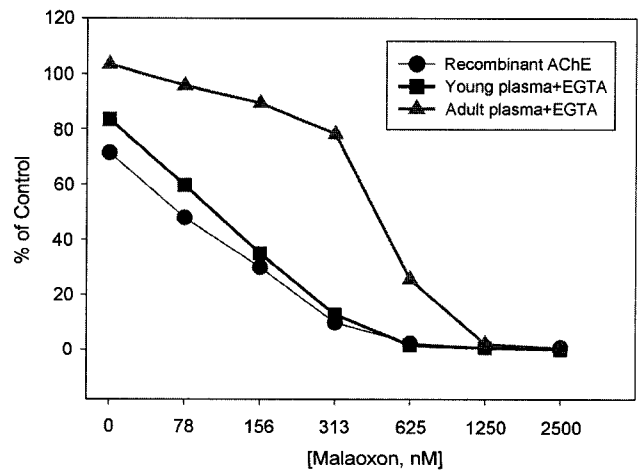


Fig. 5. Comparison of the detoxification of malaoxon by carboxylesterases in young and adult plasma.

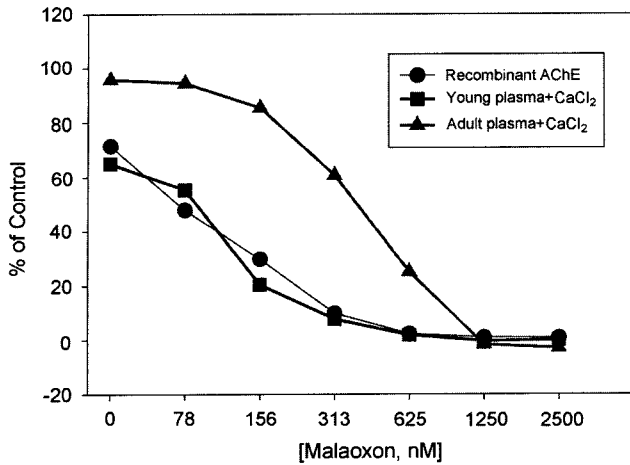


Fig. 6. Comparison of the detoxification of malaoxon by A-esterases in young and adult plasma.

4. Paraoxon에 대한 연령에 따른 해독능력 비교

Paraoxon에 대한 mouse brain recombinant AChE의 IC₅₀값은 18.43 nm이었으나, 1개월령 랫드혈장의 carboxylesterases와 A-esterases에 의하여 각각 16.48과 16.36 nm로 변화하였고, 18개월령 랫드혈장의 carboxylesterases와 A-esterases에 의하여 각각 32.03과 32.66 nm로 변화하여서, malaoxon에 대한 해독활성은 해독효소 간에서는 차이가 없었으나, 18개월령 랫드혈장에서는 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 7과 8).

IV. 고 찰

유기인계 살충제는 환경잔류문제로 오래전에 사용금지

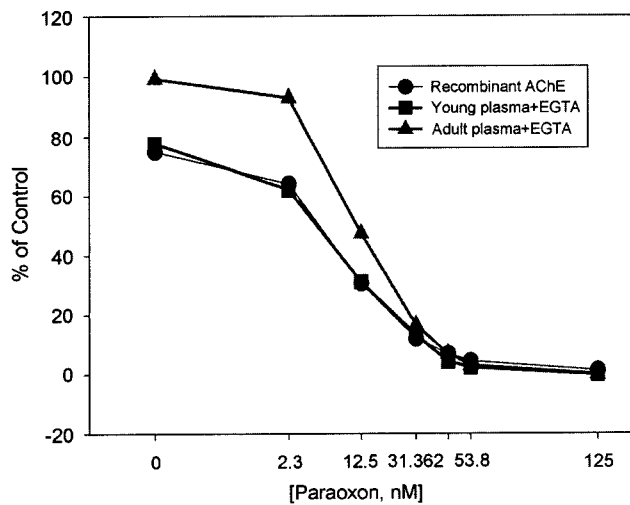


Fig. 7. Comparison of the detoxification of paraoxon by carboxyl-esterases in young and adult plasma.

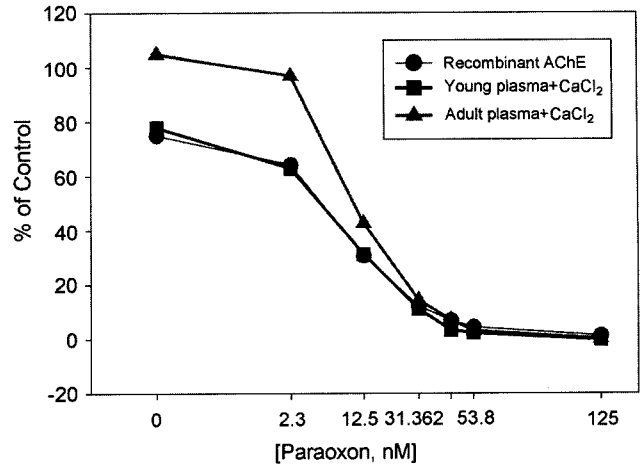


Fig. 8. Comparison of the detoxification of paraoxon by A-esterases in young and adult plasma.

된 DDT와 같은 유기염소계 살충제의 대체물질로 광범위하게 사용되어져 왔다(Ecobichon, 1996). 유기인계 살충제는 그 작용기전이 신경전달계에 직접적으로 영향을 미침으로서 곤충뿐만이 아니라 포유동물에게도 독성을 일으킬 수 있는데, 특히 1930년대에 사용되었던 tri-ortho-cresyl phosphate(TOCP)는 수천명의 사람들에게 말초신경 손상에 의한 무기력증과 운동실조증을 동반하는 지발성만성신경독성을 초래하였다(Smith 등, 1930).

최근에 유기인계가 다시 주목되고 있는 것은 위해성평가방법의 변화 때문이다. 기존에는 특정 한가지 유해물질의 독성자료와 식이노출자료를 고려하여 위해성평가를 실시하였는데, 현재에는 물, 토양 및 식품 등의 모든 노출상황을 고려한 통합노출(aggregate exposure)과 유기인계 살충제와 같이 공통의 작용기전을 가지는 물질은 누적노출(cumulative exposure)을 사용한 위해성평가를 시행되고 있다. 또한 독성자료에 의한 1일섭취허용량을 결정에서도, 노출양상에 따라 일부 취약한 인구집단, 특히 어린이에게 더 큰 독성을 일으킬 수 있기 때문에(Wagner와 Orwick, 1994; Lifshitz 등, 1999), 안전계수 10을 추가로 부여하고 있다(Food Quality Protection Act, 1996). 따라서 어떤 농약이 어린이에게 더욱 영향을 미치는지의 여부를 알아내는 것은 정확한 위해성평가를 위하여 아주 중요하다.

본 시험에서는 유기인계 살충제가 체내에서 주로 A-esterases와 carboxylesterases에 의하여 대사된다는 Clement (1984), Morgan 등(1994), Chanda 등(1997) 및 Tang과 Chambers(1999) 등의 보고에 착안하여 랫드의 혈장을 사용한 시험관내시험법(Padilla 등, 2000)으로 어린동물과 성숙동물 간의 대사능력차이를 보고자 하였다. 그 결과 chlorpyrifos-oxon, diazoxon, malaoxon 및 paraoxon 등 4가지 유기인계 살충제활성대사체에 대한 어린동물 대사효

소의 활성이 떨어져 독성이 커지는 것으로 나타났다. 이는 Pope 등(1991)과 Moser 등(1998)의 chlorpyrifos, methyl parathion 및 parathion 등을 사용한 신생자와 성숙동물의 최대내성용량(maximal tolerated dose)비교시험, Wolfe와 Kendall(1998)의 diazinon과 terbufos의 조류LD₅₀값 비교 시험, Misawa 등(1982)의 diazinon을 이용한 계태아기형 시험 및 Hamm 등(2001)의 diazinon을 이용한 어류모델 시험 등의 생체시험결과와 일치되어서 어린이감수성을 빠른 예측을 가능케하는 좋은 시험법이라 사료된다.

유기인계 살충제에 대한 어린동물의 감수성이 높아지는 것은 유기인계에 의해 억제된 AChE의 회복속도와 muscarinic receptor adaptation의 느림(Liu 등, 1999), 태자발 생시 유기인계물질의 흡수와 활성화 증가(Hamm 등, 2001), 뇌 DNA합성 저해(Whitney 등, 1995) 및 유기인계 산소활성체의 낮은 대사능력(Benke와 Murphy, 1975; Morgan 등, 1994; Mortensen 등, 1996; Atterberry 등, 1997; Moser 등, 1998) 등으로 설명되고 있다.

이미 미국에서는 어린이아이가 많이 먹는 채소와 과일에 사용되는 유기인계 살충제인 methyl parathion을 사용 금지시켰다(US/EPA, 1999). 유기인계 살충제는 국내에서도 과실, 채소 등의 농산물과 가정용 살충제로서 많이 사용되기 때문에 통합·누적노출평가의 조기 본격적인 도입은 어린이의 보호에 아주 시급한 과제라 사료된다.

참고문헌

- Atterberry, T.L., Burnett, W.T. and Chambers, J.E. (1997): Age-related differences in parathion and chlorpyrifos toxicity in male rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**, 411-418.
- Benke, G.M. and Murphy, S.M. (1975): The influence of age on the toxicity and metabolism of methyl parathion and parathion in male and female rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31**, 254-269.
- Chanda, S.M., Mortensen, V.C., Moser, V.C. and Padilla, S. (1997): Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: An *in vitro* and *in vivo* comparison. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **38**, 148-157.
- Clement, J.G. (1984): Role of aliesterase in organophosphate poisoning, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **4**, S96-S105.
- Ecobichon, D.J. (1996): Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's Toxicology, 5th ed., McGraw-Hill, pp. 643-689.
- Ellman, G.L., Courtney D.K., Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95.
- Food Quality Protection Act (1996), Public Law, pp. 104-170.
- Hamm, J.T., Wilson, B.W. and Hinton, D.E. (2001): Increasing uptake and bioactivation with development positively modulate diazinon toxicity in early life stage medaka, *Toxicol. Sci.*, **61(2)**, 304-313.
- Lifshitz, M., Shahak, E. and Sofer, M. (1999): Carbamate and organophosphate poisoning in young children, *Pediatric Emergency Care*, **15(2)**, 102-103.
- Liu, J., Olivier, K. and Pope, C.N. (1999): Comparative neurochemical effects of repeated methyl parathion or chlorpyrifos exposures in neonatal and adult rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **158(2)**, 186-196.
- Misawa, M., Doull, J. and Uyeki, E.M. (1982): Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos, *J. Toxicol. Environ. Health*, **10(4-5)**, 551-563.
- Morgan, E.W., Yan, B., Greenway, D. and Parkinson, A. (1994): Regulation of two rat liver microsomal carboxylesterase isozymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 513-526.
- Mortensen, S.R., Chanda, S.M., Hooper, M.J. and Padilla, S. (1996): Maturation differences in chlorpyrifos-oxonase activity may contribute to age-related sensitivity to chlorpyrifos, *J. Biochem. Toxicol.*, **11**, 279-287.
- Moser, V.C., Chanda, S.M., Mortensen, S.R. and Padilla, S. (1998): Age- and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities, *Toxicol. Sci.*, **46**, 211-222.
- National Research Council (1993): Pesticides in the diets of infants and children, Washinton, DC, National Academy Press, pp. 1-12.
- Padilla, S., Buaazrd, J. and Moser, V.C. (2000): Comparison of the role of esterases in the differential age-related sensitivity to chlorpyrifos and methamidophos, *Neurotoxicol.*, **21(1-2)**, 49-56.
- Pope, C.N., Chakraborti, T.K., Chapman, M.L., Farrar, J.D. and Arthun, D. (1991): Comparison of *in vivo* cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides, *Toxicol.*, **68**, 51-61.
- Smith, M.I., Elvove, E. and Frazier, W.H. (1930): The pharmacological action of certain phenol esters, with special reference to the etiology of so-called ginger paralysis, *Pub. Health Rep.*, **45**, 2509-2524.
- Tallarida, R.J. and Murray, R.B. (1986): Manual of pharmacologic calculations with computer programs, 2nd ed., Springer-Verlag, pp. 153-158.
- Tang, J. and Chambers, J.E. (1999): Detoxication of paraoxon by rat liver homogenate and serum carboxylesterases and A-esterases, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **13(5)**, 261-268.

- US/EPA (1999): A cancellation agreement and risk reduction strategy, F.R. Notice 64(156), pp. 44219-44220.
- Wagner, S.L. and Orwick, D.L. (1994): Chronic organophosphate exposure associated with transient hyper-tonia in an infant, *Pediatrics*, **94(1)**, 94-97.
- Whitney, K.D. Seidler, F.J. and Slotkin, T.A. (1995): Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134(1)**, 53-62.
- Wolfe, M.F. and Kendall, R.J. (1998): Age-dependent toxicity of diazinon and terbufos in European starlings and red-winged blackbirds, *Environ. Toxicol. Chem.*, **17(7)**, 1300-1312.
- 공중보건연구회 (1985): 서울대학교 보건대학원, 춘성군 지역사 회 보건실습보고서.
- 김인옥 (1985): 경기도 일부지역에서 농약살포에 의한 농약중독의 위험요인 및 예방에 관한 조사, 서울대학교 보건대학원, 석사학위논문.
- 농약연보 (1995), 농약공업협회.
- 농약연보 (1999), 농약공업협회
- 농약의 안전성과 작물보호 (1999), 농업과학기술원, 농촌진흥청.
- 이태구 (1981): 일부 농가의 농약안전사용 및 중독경험에 관한 조사, 서울대학교 보건대학원, 석사학위논문.
- 정대업 (1982): 농촌 주민의 농약사용에 대한 지식태도 및 농약 중독경험에 관한 조사, 조선대학교 석사학위논문.
- 정후섭 (1986): 식량증산에 있어서 병충해방제의 중요성, 농약 과 식물보호, **1**, 86-93.