

살충제 카바릴이 아프리카발톱개구리의 발생에 미치는 독성영향

신상희 · 이미주 · 이유화 · 정선우 · 윤춘식

창원대학교 생물학과

(2009년 6월 12일 접수; 2009년 7월 13일 수정; 2009년 8월 9일 채택)

The Toxic Effects of a Pesticide Carbaryl on the Development of African Clawed Frog, *Xenopus laevis*

Sang-Hee Shin, Mi-Ju Lee, Yu-Hwa Lee, Seon-Woo Cheong and Chun-Sik Yoon

Department of Biology, Changwon National University, Kyungnam 641-773, Korea

(Manuscript received 12 June, 2009; revised 13 July, 2009; accepted 9 August, 2009)

Abstract

We investigated the toxic effects of carbaryl on early embryo development in the African clawed frog, *Xenopus laevis*. To test the toxic effects, frog embryo teratogenesis assays using *Xenopus* were performed. Embryos were exposed to various concentrations of carbaryl (5~320 μM). LC_{100} for carbaryl was 320 μM , and the LC_{50} determined by probit analysis was the concentration of 235.68 μM . Exposure to 160 μM of carbaryl resulted in 10 different types of severe external malformations. Histological examination revealed dysplasia of the eyes, heart, guts, somatic muscle, dorsal, liver, blood vessel and swelling of the pronephric ducts. Malformation of neural tissue and brain was not severe even in the high dose of carbaryl. Benzidine blood stain showed distinct inhibition of inducing erythrocytes in embryos and animal cap explants. Electron micrographs of embryo revealed retinal detachment, loose photoreceptor lamella and the degeneration of sarcomeres in the carbaryl-treated group. The mitochondrial degeneration was also observed in the test group.

Key Words : Carbaryl, Toxic effects, *Xenopus laevis*, Malformation, Frog

1. 서 론

본 연구에서는 농약 중 카바릴의 독성효과에 대하여 실험하였다. 카바릴은 카바메이트계 살충제로 환경호르몬의 일종으로 알려져 있다. 화학명, 1-naphthyl-N-methylcarbamate이며, CAS number는 63-25-2이고 분자량은 201.20, 분자식은 $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ 이다

(PAN Pesticides Database-Chemicals). 카바릴은 생체 내에서 아세틸콜린 가수분해효소를 억제하는 것으로 잘 알려져 있다. 미국에서 1956년에 NAC (N-acetylcysteine)를 유효성분으로 하는 NAC제를 세빈 (Sevin)이라는 상품명으로 개발한 것으로 한국에서는 '나크 수화제'라고 고시되어 있고 상표로는 경농 나크, 동부나크, 세빈, 세단 등이 있다¹⁾. 카바릴은 매년 1천만~1천5백만 파운드 단위로 미국의 농장 및 가정집에서 해충 방제 및 위생학적인 목적으로 사용되고 있고, 수십억 달러의 농약산업에서 중요 부

Corresponding Author : Chun-Sik Yoon, Department of Biology, Changwon National University, Kyungnam 641-773, Korea

Phone: +82-55-213-2757

E-mail: biobioy@hanmail.net

분을 차지하는 화학 살충제들 중 하나이다. 카바릴은 백색의 결정으로 일반적인 유기용매에는 녹기 어렵고, 열, 광선, 산성에는 안정하지만 알칼리에는 분해되기 쉬우며 인, 염소를 함유하지 않는 것이 특징이다. 토양 중에서는 반감기가 30일이다. 주로 벼, 과실에 사용되며 미국, 일본, EC 등 23개국에서 사용되고 있는데 국내에서는 연간 39톤의 소모가 일어나고 있다. 본 물질은 잎말이나방, 진딧물류에 유효하며 사람, 가축, 어류에 대하여 모두 저독성이지만 다른 많은 생물의 범위에서 많은 독성효과가 보고되고 있다.

카바릴이 속해있는 카바메이트계 살충제 중 ZZ-Aphox는 *Rana perezi*의 올챙이에서 아가미, 간, 담낭, 심장, 척색의 구조적 변화를 일으킨다고 알려져 있고²⁾, 골격계의 기형유발이³⁾ 보고되었다. 카바릴을 쥐에 흡입 시켰을 때는 수면시간 감소, 간의 세포원형질 내 아세틸콜린에스테라제 활성 감소, 모양체 형성저해와 분리를 가져왔다⁴⁾. 위스터 수컷의 꼬리피부로 흡수 시켰을 경우에는 피부, 간, 뇌, 폐의 기형을 유발하였다⁵⁾. 또 위스터 수컷의 간에서 미토콘드리아를 분리해서 관찰한 결과 인산화 복합체에 영향을 주지 않고 미토콘드리아 호흡을 방해하며, membrane potential을 감소시켰으며, 다른 살충제들보다 미토콘드리아에 대한 독성이 강하다는 보고가 있다⁶⁾. 카바릴과 부프로페진(buprofezin)을 쥐의 간에 복합처리 했을 때, cytochrome p-450의 함유량과 NADPH-cytochrome c의 증가가 일어났다는 보고가 있다⁷⁾. 카바릴과 트리클로르판(trichlorophan)에 분화 중인 생쥐의 신경배 세포를 노출시키면 축색돌기 발생이 억제된다고 보고되었다⁸⁾. 양서류 *Rana sphenoccephala*는 카바릴에 노출되었을 때 내장기관과 사지의 기형을 보이고 장기간 노출 시에는 몸의 크기가 감소되고 변태시기가 지연되며 이러한 몸의 크기 감소는 개체수의 감소에 대한 잠재적 원인이 된다고 하였다⁹⁾. *Xenopus laevis*에 페니트로치온(fenitrothion)과 카바릴을 함께 처리 하면 낭배형성기에 가장 민감하며 몸의 외형변경, 선천성 소두태아, 수종, 심장, 척색이 비정상적으로 발생한다고 알려졌다¹⁰⁾.

카바릴의 독성효과에 대한 연구는 이와 같이 주로 쥐를 비롯한 포유류에 대하여는 비교적 자세히

연구되어 있으나 양서류에 대한 카바릴의 단독 독성효과 연구는 자세히 이루어져 있지 않은 실정이다. 본 연구에서는 카바릴이 *Xenopus laevis*의 초기 배발생에 미치는 독성효과를 파악하여 농약류 내분비계 교란물질이 생태계에서 양서류의 생존과 개체군에 어떤 영향을 줄 것인가를 예측하려 한다. 이를 위해 첫째로 독성실험의 수행은 국제규격화와 객관화를 도모하기 위하여 FETAX법을 이용하였으며¹¹⁾ 기관별 이상 발생과 농도별 생존율을 조사하였다. 둘째로 카바릴에 의해 유도된 외형적 이상군에 대하여 조직학적 연구를 행하였으며 정상조직과 비교하여 조직별 발생이상 패턴을 알아보았다. 셋째, 본 연구의 결과 중 일부로 나타난 카바릴에 의한 체내 혈구감소현상을 증명하기 위하여 benzidine blood stain을 행하고 이를 배와 동물극 분리배양편에 적용하였다. 넷째, 카바릴에 의해 유도된 세포 및 조직의 손상을 미세형태학적으로 확인하기 위하여 투과전자현미경을 이용하여 정상조직과 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 독성평가

*Xenopus laevis*는 미국에서 수입(Nasco Co., USA)하여 22±2°C의 수조에서 사육, 유지 하였다. 3년 이상 성적으로 성숙된 암수개체를 사용하였으며, 산란을 위해 암수 모두 500~600 IU씩 HCG(human chorionic gonadotrophin; Sigma)를 주사하였다. 수정란을 얻은 후 3% cysteine hydrochloride(in sterile FETAX solution, pH 7.8)로 젤리층을 제거하고 배는 멸균된 FETAX 배양액(solution composition in mg/L: NaCl, 625; NaHCO₃, 96; KCL, 30; CaCl₂, 15; CaSO₄ · 2H₂O, 60; and MgSO₄, 70)으로 10회 세척 한 후 늦은 포배기 배(st. 9)를 실험에 이용하였다. 본 실험에 사용된 배의 발생단계는 Nieuwkoop과 Faber를¹²⁾ 따랐다.

FETAX(Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus)를 하기 위하여 멸균상태에서 stage 9의 배를 무작위로 25개 선택하여 10 ml FETAX 배양액이 들어있는 직경 60 mm 유리제 페트리디시에 배양하였으며, 이를 대조군으로 하였다. 용매대조군은 실험농도 중 최고농도인 0.08%(v/v)의 아세톤을 용매 대조군으로 하였다. LC₁₀₀을 찾기 위한 실험용액의 농도는 2 배수로 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 μM으로 하였고,

LC₅₀을 찾기 위한 실험용액의 농도는 ASTM E 규정에 따라 LC₁₅와 LC₉₃ 사이에서 10 μ M 간격으로 세분하여 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 μ M으로 하였다. 각 농도에서 세 번 반복하여 실험하였으며, 각각 세 번의 실험은 다른 암수 쌍으로부터 얻은 배를 사용하였다. 배의 선택은 FETAX의 표준 지침을 이용하였다. 대조군과 실험군은 96시간동안 24 \pm 0.5 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. pH는 7.2~7.4 범위로 하였고 배양액은 매일 교환하였으며, 치사한 배는 매일 제거하였다. 생존한 배는 ethylene glycol monophenyl ether(0.05%)로 마취시켰으며, 실험이 끝난 후 3% 중성포르말린으로 고정하였다. 배의 생존률과 기형률은 대조군의 값과 비교하였다. 배의 체장은 해부현미경하에서 micrometer로 측정하였으며, 외형적 기형 또한 해부현미경(Zeiss)으로 관찰하였다.

2.2. 조직학적 연구

FETAX 실험을 마친 배를 Bouin's solution(Picric acid 15 : Formalin 5 : Acetic acid 1)에서 6시간 동안 실온에서 고정하였다. 이 후 70%, 90%, 100% ethanol로 탈수하고, xylene으로 투명화하였다. paraffin(Paraplast Plus: Sigma)으로 포매하여 microtome으로 8 μ m 두께로 절편한 후 xylene으로 paraffin을 제거하고 100%, 90%, 70%, 50% ethanol로 탈수한 다음, hematoxylin-eosin 염색하였다. 다시 50%, 70%, 90%, 100% ethanol 탈수과정과 xylene에 의한 투명화를 한 후 퍼마운트로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 조직표본은 대조군, 실험군을 10개체씩 현미경하에서 조직판독 후 이상조직의 비율을 기록하였다.

2.3. Benzidine에 의한 혈구염색

12% glacial acetic acid에 0.4% benzidine(Sigma#B-3503 CARCINOGEN)를 용해시킨 용액에 실험한 배와 동물극 분리편을 5분간 고정시켰다. 그리고 0.3%의 과산화수소(H₂O₂)를 첨가하여 실온(22 $^{\circ}$ C)에서 10-15분 동안 반응시켰다. 발색된 표본의 청색 침전물은 과산화물이 존재할 때 불안정하며 배 및 동물극 분리편을 차츰 파괴시키므로 청색이 나타나는 것이 관찰되면 즉시 사진 촬영을 하였다. 촬영 후에 12% glacial acetic acid로 과산화물을 세척하고 메탄올로 고정하였다¹³⁾.

2.4. 동물극 분리배양

동물극 분리 배양법 (animal cap assay)은 중배엽 유도방법과 동일하게 행하였으며^{14,15)}, 모든 과정은 멸균상태에서 이루어졌다. 멸균된 3% agar plate 위에서 stage 9의 배만을 선별하여 핀셋(watchmaker's tweezers)으로 난막을 제거하고 전기분해한 텅스텐 니들로 동물극(예정 외배엽 지역으로 배 크기의 1/10 정도)을 분리한 후, 0.1% bovine serum albumin(BSA; Sigma)이 포함된 Steinberg's solution(SS; 60 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM Ca(NO₃)₂, 0.83 mM MgSO₄ · H₂O, 5 mM Tris-HCl)으로 정상배가 stage 43에 도달할 때까지 배양하여 이를 대조군으로 하였다. activin A 단독 처리군에서 동물극 분리편은 0.5 ng/ml activin A(in SS containing 0.1% BSA)에 노출시켰다. 카바릴 처리군에서 동물극 분리편은 카바릴 sublethal 농도인 160 μ M(in control solution)에 노출시켰다. 혈구 유도 및 카바릴에 의한 혈구발생저해를 확인하기 위하여 mSCF(Stem cell factor from mouse, Sigma) 단독처리군은 30 ng/ml, 복합처리군에서는 30 ng/ml mSCF 와 0.5 ng/ml activin A의 복합처리, 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 및 카바릴 160 μ M의 복합처리액에서 각각 배양하였다.

동물극 분리편은 정상배가 stage 43에 도달할 때까지 20 $^{\circ}$ C에서 3일(72시간)간 배양하였다. 배양용기는 멸균 96-well plate를 사용하였고, 1well 당 1개씩의 동물극 분리편을 넣었으며, 대조군 및 처리군의 배양액은 120 μ l씩 분주하였다.

2.5. 미세형태학적 연구

미세구조의 관찰은 투과전자현미경을 이용하였으며 이를 위해 대조군과 카바릴을 처리 배양한 배를 0.1M 인산완충액(pH 7.4), 2.5% glutaraldehyde 용액, 2% paraformaldehyde 용액과 3차 증류수를 이용하여 4시간 전고정하고 0.1 M 인산완충액으로 세척하였다. 후고정은 0.1 M 인산완충액으로 완충시킨 1% 오스뮴산으로 4 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 고정하였으며, 고정된 시료는 0.5% uranyl acetate 용액으로 염색하였다. 이들 시료를 에탄올(50, 70, 90, 100%)과 propylene oxide로 탈수한 후, epon-araldite에 포매하였다¹⁶⁾. 포매한 시료를 초박절편기(LDK NOVA)에서 다이아몬드 나이프(Diatome)로 0.1 μ m 두께로 절

편한 후 2% uranyl acetate 용액과 lead citrate 용액으로 각각 염색하여¹⁷⁾ 투과전자현미경(Jeol 1200 EX2)으로 조영하였다. *Xenopus laevis* 배에 대한 전자현미경 관찰 결과의 분석은 Tardin¹⁸⁾에 따랐다.

2.6. 통계학적 분석

LC₅₀을 결정하기 위하여 SPSS Software(version 7.0)를 사용하여 Probit 분석을 행하였다. 카바릴을 처리한 실험군의 성장이 대조군에 비하여 유의미하게 저해되었는지 평가하기 위하여 SPSS 중 student's t-test의 독립표본 검증법을 사용하여 95% 신뢰한계에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 독성평가

카바릴 농도별로 *Xenopus laevis* 후기낭배기의 배(st.9)를 150개 사용하여 96시간 노출 배양한 결과 대조군과 아세톤 처리군에서 st.46으로 발생한 비율은 100%였다. 실험군에서는 수종(edema)을 포함한 10가지의 기형발생이 관찰되었으며 이것은 카바릴의 농도가 증가 할수록 증가하였다(Fig. 1). FETAX

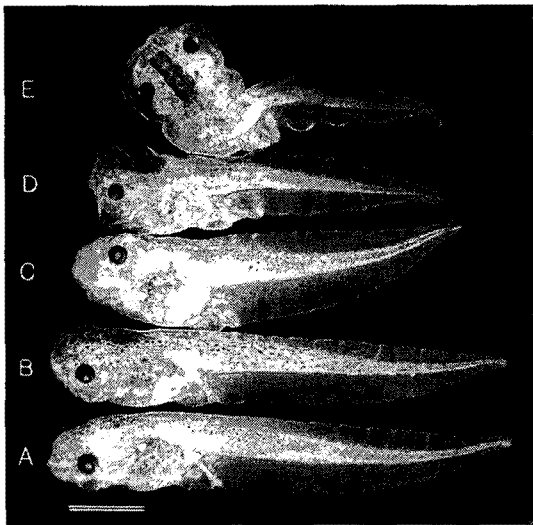


Fig. 1. Tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to carbaryl at the blastula stage. Control tadpole (bottom) and test tadpoles (others).

(A): Control embryo of *X. laevis*, (B): acetone control embryos, (C-E): carbaryl-treated embryos(20, 40, 80 μM). bar: 1 mm.

배양액에 배양한 대조군과 용매대조군, 5, 10, 20 μM 의 카바릴에 노출된 배의 생존율은 100%씩으로 나타났다고 40, 80, 160 μM 농도에 노출된 배의 생존율은 각각 98.67%, 96.67%, 92.00%이며, 320 μM 에서는 모든 배가 치사하였다. 따라서 *Xenopus laevis* 배에 대한 카바릴의 LC₁₀₀은 320 μM 으로 나타났다(Fig. 2).

96h LC₅₀을 결정하기 위하여 농도 당 50 개체로 LC 15~93% 사이의 농도인 200~260 μM 을 10 μM 간격으로 분할해서 3번의 반복실험을 한 결과 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260 μM 카바릴에 노출된 배의 생존율은 각각 85.33%, 78.67%, 67.33%, 65.33%, 55.33%, 44.00%, 6.67%이었다. 240, 250 μM 의 생존율이 각 55.33%, 44.00%이었으므로 LC₅₀은 245 μM 정도로 예측된다. 이를 확인하기 위하여 Probit 분석을 행한 결과 LC₅₀은 235.68 μM 로 나타났다.

대조군과 용매대조군, 그리고 카바릴 실험군에서 생존한 배의 기형비율은 대조군에서 1.33%, 용매대조군에서 2.67%이었으며, 5, 10, 20, 40, 80, 160 μM 의 카바릴 실험군에서는 기형발생률이 각각 2.00%, 8.67%, 34.00%, 63.33%, 94.67%, 100%였다. 5, 10 μM 의 카바릴이 처리된 군에서는 2.00%, 8.67%로 낮게 나타났다. 관찰된 외형적 기형은 10가지로 나타났다(Fig. 3). 수포는 피부에서 신체적 위치에 상관없이 나타나며, 40 μM 이상의 농도에서 뚜렷하게 나타나기 시작하여 160 μM 에서는 전체 개체수의 34.06%의 비율로 나타났다. 정상배의 눈은 머리의 측면에 위치하지만 카바릴 처리군의 눈은 두부의 중앙으로 향하는 구심성의 안배를 보여주는 경향이

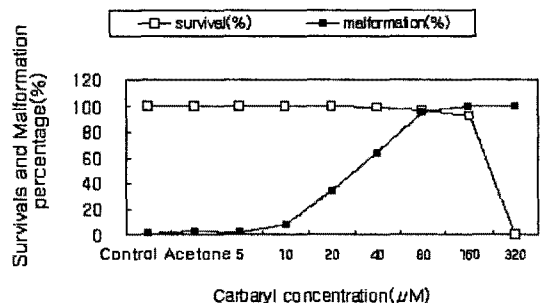


Fig. 2. The percentage of survivals and malformations in *Xenopus laevis*. Blastula embryos were exposed to carbaryl for 96 h at $24\pm 0.5^\circ\text{C}$.

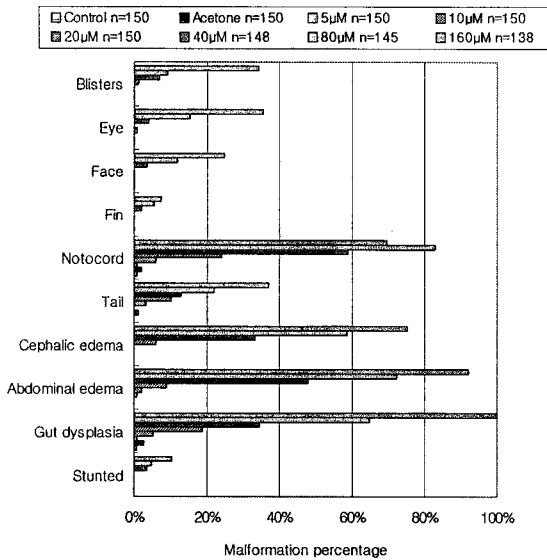


Fig. 3. Various external malformations were observed in tadpoles exposed to 5~160 μM of carbaryl.

있었다. 렌즈의 결핍과 관련된 기형은 특이적으로 관찰되었으며 눈의 기형은 40 μM 이상부터 뚜렷하게 발생이상이 관찰되며, 160 μM에서는 개체수의 35.51%의 비율로 발생이상을 나타냈다. 코 부분의 함몰, 눈의 헤르니아와 수종 발생으로 인한 안면이상은 160 μM 실험개체의 24.64%에서 나타났다. 지느러미는 체장이 심하게 감소한 개체에서 주름져 나타났다. 카바릴의 처리에 의해 가장 뚜렷하고 심한 이상을 나타낸 것은 척색(notochord), 두부수종(cephalic edema), 복부수종(abdominal edema), 소화관 형성 부전(dysplasia of gut)을 들 수 있으며 꼬리의 형성이상도 자주 관찰되었다. 40, 80 μM 카바릴 노출군의 척색은 축만되어 있었으며 꼬리는 아래로 휘어져 나타났으나, 160 μM에서는 척색이 등 쪽으로 휘어져 나타났다. 척색은 80 μM에서 가장 높은 이상 비율을 보였으며 실험한 배의 82.76%에서 구부러짐을 보였다. 수종은 복부와 두부에 집중적으로 나타났으며 160 μM 실험개체의 75.36%에서 두부수종이 나타났다. 복부수종은 소화관 발달부전을 동반하였으며 체강 내에는 체액으로 가득 차 있었다. 40 μM 카바릴 처리개체 중 47.97%에서 수종발생을 보이며 160 μM 처리군에서는 92.03%의 개체에서 복부수종발생을 나타내었다. st.46 정상배의 장

은 밀집하고 잘 회전하고 있지만 실험군 배의 장은 짧고 느슨하며, 발달장애를 보였고 고농도에서는 장의 발달이 확인되지 않았다. 소화관 발달 부전은 고농도의 카바릴 처리 시 가장 심각한 발달이상으로 나타났으며 160 μM 처리 시 모든 실험개체가 이러한 이상을 나타내었다. 결국 구심성의 눈, 주름진 지느러미, 굵은 척색, 굵은 꼬리, 소화관의 형성부전, 수포와 수종은 40 μM 이상의 농도를 처리한 배에서 현저한 증가를 보였다. 외형적인 기형을 관찰할 때, 카바릴에 노출된 농도 40 μM에서부터 피하에서 출혈현상이 발견되었으며 출혈은 배의 전단에서부터 꼬리 말단까지 분포하는 것을 발견 할 수 있었다. 또한 농도가 증가할수록 심장 내 적혈구의 감소가 관찰되었으며 게다가 160 μM 카바릴 처리한 배의 심장에서는 혈구가 거의 관찰되지 않았다. 이의 확인은 benzidine blood stain에서 다루었다.

실험군의 평균 체장(mm)±SD를 대조군과 비교 하였다. 대조군에서 체장은 8.82±0.48이었으며, 용매 대조군과 5 μM 카바릴 처리군의 평균 체장은 각각 8.71±0.57(t:1.86)과 8.75±0.44(t:1.37)로 대조군에 비하여 약간 감소하였으나, 유의미한 변화는 보여주지 않았다. 그러나 10, 20, 40, 80, 160 μM 카바릴이 처리된 군은 각각 8.23±0.67(t:8.83***, P<0.001), 7.23±1.01 (t: 16.70***, P<0.001), 6.74±1.06(t:21.87***, P<0.001), 6.22±1.00 (t: 28.38***, P<0.001), 5.76±0.86(t:37.01***, P<0.001)로 나타나 대조군과의 매우 유의미한 차이를 나타내었다(Fig. 4).

FETAX 법을 이용하여 *Xenopus laevis*의 초기 배를 실험한 결과 LC100은 320 μM이었고 LC50은 245

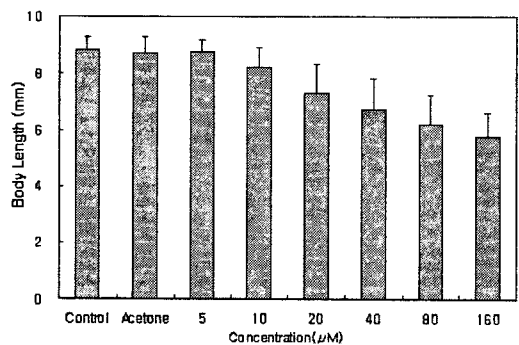


Fig. 4. Body length of control and carbaryl-treated embryos (p<0.01 and error bars show 95.0%).

μM 으로 LC₁₀₀과 LC₅₀의 농도차가 근소한 것으로 보아 두 농도 사이에 생존률이 급격히 저하되는 농도가 있을 것으로 예측된다. LC₅₀의 이론적 추정치인 probit 분석결과는 235.68 μM 로서 실제 실험결과와 10 μM 정도 차이가 났다. 이것은 실험 시 개체에 따른 차이라고 생각된다.

카바릴의 농도가 증가할수록 기형 발생률은 증가하였으며, 기형은 비교적 낮은 농도에서부터 비특이적으로 나타났고 160 μM 카바릴 처리군에서는 전체 기형 type에 대하여 100%의 기형이 관찰되었다. 눈은 렌즈 뒤쪽에 위치하는 색소세포층과 광수용세포의 분리로 망막이 분리되고, 렌즈 헤르니아가 관찰되었다. 이는 니켈 클로라이드(nickel chloride)를 *Xenopus laevis* 배형성에 투여하였을 때, 소안구, 탈색, 맥락막과 망막의 헤르니아, 홍채결손 등 눈의 기형발생을 일으키고¹⁹⁾, 파라콰트(paraquat)를 *Xenopus laevis*에 노출 시 소안구증과 관련된 수종을 나타낸다²⁰⁾는 보고와 유사한 결과이다.

독성물질에 대한 독성평가의 가장 객관적인 기준은 성장저해를 들 수 있다. 카바릴 처리시 실험개체의 체장이 심각하게 줄어들었으며 지느러미는 주름져 나타났다. 다른 연구에서도 이와 유사한 성장저해 독성을 나타내는 결과가 있었는데 노닐페놀 에톡시레이트(nonylphenol ethoxylate)에 *Xenopus laevis* 배를 노출시켰을 때 이러한 독성효과가 있는 것으로 보고하고 있다²¹⁾. 척색(notochord)은 80 μM 처리군의 82.76%에서 구부러짐이 나타난 것에 비해 160 μM 처리군에서는 69.57%가 나타난 것은 고농도 처리에서 체장감소가 심각하게 일어나면서 구부러짐이 오히려 적게 나타난 것으로 보인다. 게다가 척색은 비뚤어져 있었고 척색을 싸고 있는 체절은 조밀하지 않았으며, 근육형성이 제대로 이루어지지 않았다. 이것은 카바릴에 의해 아세틸콜린에스테라아제의 저해와 척색 결합조직의 불규칙한 배열로 인한 축의 골격과 근육의 경직성 경련의 피해가 일어났다는 보고와 유사하다²²⁾. 정상적인 배에서는 소화관의 발달과 더불어 난황이 현저하게 감소하게 되지만¹²⁾, 카바릴이 처리된 배의 소화관 발달 부전은 고농도의 카바릴 처리 시 가장 심각한 발달이상으로 나타났으며 소화관 선세포 발육부전으로 난황과립이 아직 존재하는 것을 발견할 수 있었다.

카바릴과 트리클로르판(trichlorophan)에 노출된 생쥐의 신경배 세포는 축삭돌기의 발생이 억제된다는 보고가 있었지만⁸⁾ 본 연구에서 *Xenopus laevis*의 배에 대하여는 카바릴이 고농도에서도 신경조직의 심각한 발생이상을 초래하지는 않았다.

FETAX assay 실험을 마친 배를 마취하여 관찰하였을 때, 심장 내 적혈구의 감소가 관찰되었으며, 심박동이 느려지는 것을 관찰할 수 있었다. 조직학적 관찰에서는 심근 발육부전을 보이고 있었으며 혈구가 거의 보이지 않았는데 이는 카바릴을 *Danio rerio*에 처리 시 아세틸콜린에스테라아제 저해가 일어나 정맥동과 동맥궁 사이의 혈액순환이 방해받았다는 보고²³⁾와 관계가 있는 것으로 생각되나 본 연구에서는 카바릴이 *Xenopus laevis*에 대하여 대동맥궁 발생저해 현상을 동반하기는 하였지만 혈액순환저하로 심장 내 혈구가 초래되었다고는 생각되지 않으며 오히려 혈구분화 자체가 저해되는 독성효과로 생각될 수 있다.

3.2. 조직학적 연구

FETAX 실험을 마친 배의 조직학적 관찰을 한 결과 160 μM 카바릴 처리된 배에서 눈, 심장, 출혈, 소화관, 근육, 간, 전신관(pronephric duct) 등의 다양한 조직학적 기형이 관찰되었다(Fig. 5).

정상배의 눈은 렌즈, 유리체방, 망막층이 잘 발달하였으며 안배는 머리의 측면에 위치하였다(Fig. 5-A). 한편 카바릴이 처리된 올챙이의 눈의 위치는 두부의 중심으로 향하고 눈의 크기가 줄어들었으며, 렌즈 뒤쪽에 위치하는 색소세포층과 광수용세포의 분리로 망막이 분리되고 렌즈 헤르니아가 관찰되었다. 게다가 구강의 구전 상피세포의 이행이 발견되었다(Fig. 5-B). 정상배에서 심장은 1심방 2심실로 정상적으로 분화하였으며 적혈구가 일정량 이상 분포하였지만(Fig. 5-C), 카바릴 처리 시 심장은 얇은 심근을 가져 심근 발육부전을 보이고 있었으며, 심장에서 혈구가 거의 보이지 않았다(Fig. 5-D). 정상배의 소화관은 식도, 간, 장 등으로 복잡한 구조로 잘 분화하였으나(Fig. 5-E), 카바릴 처리 시 소화관은 단순화되고 팽대 되었으며 분화가 이루어지지 않았다. 그리고 복강 내에 출혈현상이 관찰되었다(Fig. 5-F). 정상배에서 척색 양쪽의 체절은 조밀하게 서로 밀착하고 규칙적으로 배열되어 있

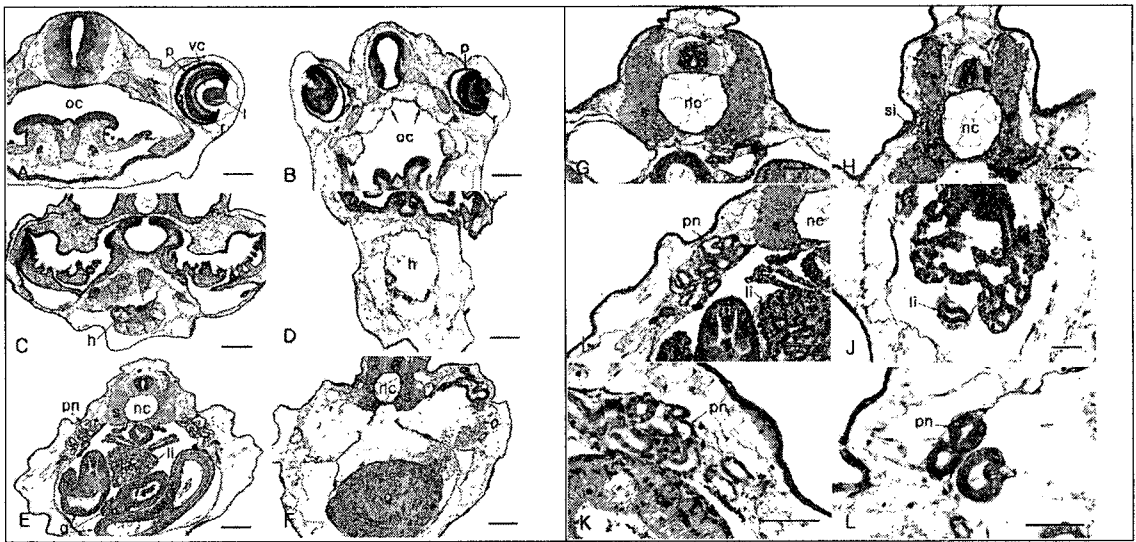


Fig. 5. Comparative histology showing malformations in *Xenopus laevis* tadpoles exposed to 160 μM of carbaryl for 96 h. : (A-B) tadpoles sectioned at the level of the eye, (A) control, (B) carbaryl-exposed; (C-D) tadpoles sectioned at the level of the heart and hemorrhage, (C) control, (D) carbaryl-exposed; (E-F) tadpoles sectioned at the level of the gut, (E) control, (F) carbaryl-exposed; (G-H) tadpoles sectioned at the level of the somites, (G) control, (H) carbaryl-exposed; (I-J) tadpoles sectioned at the level of the liver, (I) control, (J) carbaryl-exposed; (K-L) tadpoles sectioned at the level of the pronephros, (K) control, (L) carbaryl-exposed; (b, brain; g, gut; h, heart; l, lens; li, liver; nc, notochord; oc, oral cavity; p, pigment epithelium; pn, pronephros; r, retina; s, somatic muscles; si, swollen integument; vc, viterous chamber; bar(A-J)=100 μm , bar(K-L)=50 μm .

나(Fig. 5-G), 실험군의 척색은 구부러졌으며 그를 싸고 있는 체절은 조밀하지 않았으며, 근육형성이 정상적으로 이루어지지 않았다. 그리고 표피세포의 팽대가 발견되었다(Fig. 5-H). 정상배의 간세포(hepatic cell)들은 줄을 이루어 서로 밀착하며 빈공간이 거의 없었으나(Fig. 5-I), 실험군의 간은 심장 쪽에 침투하여 기관 사이에 구분이 가지 않았으며 간세포들이 줄을 이루어 밀착하지 않고 망상으로서 밀도가 높지 않았다(Fig. 5-J). 정상배의 전신관을 보면 전신관의 전형적인 특징인 수포가 관찰되었으며, 절편은 얇고 복잡하며 고리모양을 이루고 있었다(Fig. 5-K). 그러나 카바릴 처리 시 전신관을 구성하는 세포는 팽대되었으며 세포 내부의 함유물이 증가한 것처럼 보였다(Fig. 5-L).

카바릴 실험군 조직절편을 10개체씩 광학현미경 하에서 대조군과 비교하여 주요 이상조직의 비율을 카바릴 처리 농도별로 기록한 결과 20 μM 카바릴 처리군에서 전세포 발달의 이상으로 소화관 이상과 척색의 구부러짐이 관찰개체의 10%, 20%로 각 각

나타났다. 40 μM 카바릴 처리군에서는 복강 내의 출혈, 소화관 형성부진, 근육 형성부진, 척색의 구부러짐, 구전정 표피세포 이상이 관찰개체의 30%, 10%, 50%, 100%, 10%로 각 각 나타났다. 80 μM 카바릴 처리군은 눈 헤르니아, 복강 내의 출혈, 소화관, 근육 형성부진, 척색 구부러짐, 간, 구전정 발달 이상이 각각 40%, 60%, 20%, 60%, 100%, 20%, 10%, 20%로 나타났다. 160 μM 에서는 눈, 심장, 출혈, 소화관, 근육, 척색, 간, 신장, 구강 형성이상 이 관찰한 전체 개체에서 나타났으며, 저농도에서 고농도로 갈수록 조직학적 이상의 정도가 더욱 심한 것으로 나타났다. 카바릴을 처리한 군에서 나타나는 조직학적 이상 중 신경조직에 대한 영향은 매우 약하여 조직절편에서 신경조직의 이상을 확인할 수 없었다. 이는 다른 농약류에서는 강한 신경분화저해효과가 나타나는 경우가 있으며 살충제 배도닐과 그 대사산물의 경우에는 *Xenopus*에서 신경계의 분화를 저해한다는 연구결과^{24,25}와 본 연구결과를 비교했을 때 신경계에 미치는 영향의 정도는 다르다는 것을 알 수

있다.

3.3. 배와 배양조직에서 혈구분화 저해

카바릴에 의한 혈구 분화저해독성을 확인하기 위해 배와 동물극 분리배양 조직 내 혈구의 발생량 변화를 benzidine 혈액염색법을 이용하여 관찰하였다.

적혈구 발생저해를 *in vivo*에서 확인하기 위하여 FETAX실험을 마친 배를 마취하여 benzidine 반응을 시킨 결과 대조군의 주요 혈관과 심장에서 혈구가 청색으로 염색이 된 것을 관찰할 수 있었다. 80 μ M 카바릴에 처리된 실험군에서는 심방에서는 혈액이 관찰되지만 심실에서는 혈액이 관찰되지 않는 것으로 보아 심장내의 혈액이 감소하였다는 것을 알 수 있었다. 160 μ M 카바릴 처리된 실험군에서는 benzidine 반응 상태로 보아 심장에 혈액이 관찰되지 않았으며, 대동맥궁 형성이 제대로 이루어지지 않은 것을 알 수 있었다.

*in vitro*에서 카바릴에 의한 적혈구의 발생저해를 확인하기 위해서 미분화 세포괴를 배양하는 동물극 분리 배양법(animal cap assay)을 이용하였다. 실험은 미분화 세포괴로부터 혈구세포를 먼저 유도하고 카바릴의 첨가에 의해 혈구유도를 효과적으로 저해할 수 있는가를 확인하는 방법으로 실행하였다. 실험이 행해진 군은 대조군, 160 μ M 카바릴 단독처리군, 30 ng/ml mSCF 단독처리군, 0.5 ng/ml activin A 단독처리군, 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합처리군, 그리고 혈구발생저해 확인을 위한 복합처리군으로서 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A와 160 μ M 카바릴의 6개 군으로 하였다. 그 결과 대조군 동물극 분리편은 오직 비정형표피조직만 분화하였으며 benzidine의 반응을 나타내지 않았다(Fig. 6-A). 160 μ M 카바릴과 30 ng/ml mSCF 단독처리군에서도 비정형표피조직 이외에 다른 조직은 분화하지 않았으며, benzidine에 반응을 나타내지 않았다(Fig. 6-B,C). 강력한 중배엽 유도인자인 activin A를 0.5 ng/ml의 농도로 대조군 배양액에 첨가했을 때 동물극 분리편은 팽대 되었으나 혈구는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 6-D). 한편, 30 ng/ml mSCF 용액과 0.5 ng/ml activin A를 혼합한 용액에서 배양된 동물극 분리편은 팽대되었으며 benzidine에 강하게 반응하는 분리편이 실험 case의 30%에서 나타났다(Fig. 6-E). 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A와

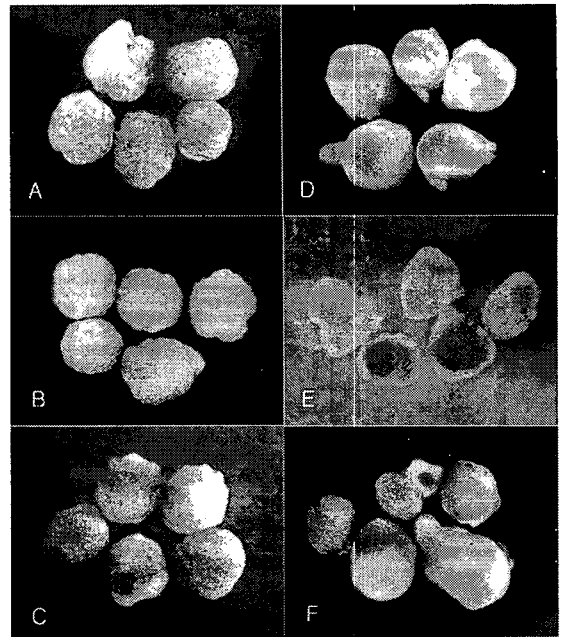


Fig. 6. Animal cap explants stained with benzidine to show inducing or inhibiting circulating erythrocytes. Benzidine treated animal cap explants of *Xenopus laevis*. Control and 160 μ M of 30 ng/ml mSCF treated animal cap explants showed only atypical epithelium without benzidine reaction(A-C). 0.5 ng/ml activin A treated explants swelled but did not show benzidine reaction(D). 30% of explant incubated in the mixture of 30 ng/ml mSCF and 0.5ng/ml activin A showed distinct benzidine reaction in their inner space(E). The addition of 160 μ M carbaryl to the mixture of 30 ng/ml mSCF and 0.5 ng/ml activin A showed distinct inhibition of inducing erythrocytes in explants(F).

160 μ M 카바릴의 복합처리 한 동물극 분리편은 조금 팽대하거나, 비정형표피조직만 분화하였으며 혈구가 감소되어 20개 중 한 개의 동물극 분리편에서만 benzidine 반응이 약하게 나타났다(Fig. 6-F). 이것으로 mSCF와 activin A에 의해서는 혈구가 실험한 동물극 분리편의 30%에서 유도되지만 카바릴이 첨가되었을 때는 혈구유도효과가 급격히 감소하여 카바릴이 혈구형성을 저해한다는 것을 알 수 있었다.

Benzidine 혈구반응을 마친 동물극 분리편을 조직 절편하여 카바릴에 의한 혈구분화의 저해효과를 확인하였다. 그 결과, 대조군 동물극 분리편은 비정형 표피조직만 분화하였으며(Fig. 7-A), 160 μ M 카바릴

단독 처리된 동물극 분리편은 비정형 표피조직 외에 다른 조직을 분화시키지는 못하였으나, 분리편 내부에 공간이 형성되고 내부에서 괴사가 일어나기 시작하였다(Fig. 7-B). 30 ng/ml mSCF로 단독 배양한 동물극 분리편은 대조군과 유사한 결과를 보여 주었으며 비정형표피조직만 분화하였다(Fig. 7-C). 0.5 ng/ml activin A로 단독처리한 동물극 분리편은 한 층의 표피조직으로 둘러싸이고 내부에 한 층의 중배엽성 intercellular membrane을 형성하였고, 신경조직을 약하게 분화시키는 분리편이 많았다. 그러나 혈구의 분화는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 7-D). 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A로 혼합처리된 동물극 분리편에서는 한 층의 표피조직이 발달하고 내부의 공간 내에 한 층의 중배엽성 intercellular membrane을 형성하였고 거기에 많은 혈구세포가 분화하고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 7-E). 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A와 160 μ M 카바릴의 복합처리된 동물극 분리편은 카바릴 단독처리와 유사한 결과를 보였으며 대부분의 분리편에서는 비정형표피조직과 내부의 액체로 찬 공간이 자주 관찰되었다(Fig. 7-F).

*Xenopus laevis*에 대한 심각한 저해작용은 아니지만 조직학적 이상 중 혈구분화 저해독성은 다른 실험 결과에서는 자주 볼 수 없었다. 혈구가 감소하고 심장의 붉은 빛이 없고 비어 있는 것에 주목을 해서 카바릴이 혈구분화를 저해하는 것이 아닌가하는 추측을 하였고 이를 입증하기 위하여 혈액검출 시 사용하는 benzidine 혈액염색법을 적용하였다. *Xenopus laevis*의 배 발생 중 BMP-2, 4(bone morphogenetic proteins)는 신경배에서 인두낭, 심장, 혈액근, 원구의 유도과 관련되어 있는데 특히 BMP-4에 의해 적혈구가 유도되는 것을 benzidine 혈액염색법을 이용하여 확인된 연구결과가 있다²⁶⁾. 이처럼 benzidine은 과산화수소가 존재 할 때 헤모글로빈(hemoglobin)의 헤마틴 그룹(heme group)에 의해 산화되어 청색 침전물의 형태를 만들어 내는 시약으로, 분화된 적혈구에 특이적으로 조직화학적 염색을 하게 된다¹³⁾. 이러한 방법을 이용하여 미분화 세포괴를 배양하는 동물극 분리배양편에서 카바릴의 혈구형성저해 효과를 검증하였다. 이를 위해 activin A를 중배엽 유도인자로 이용하였으며 mSCF는 중배엽 중 혈구를

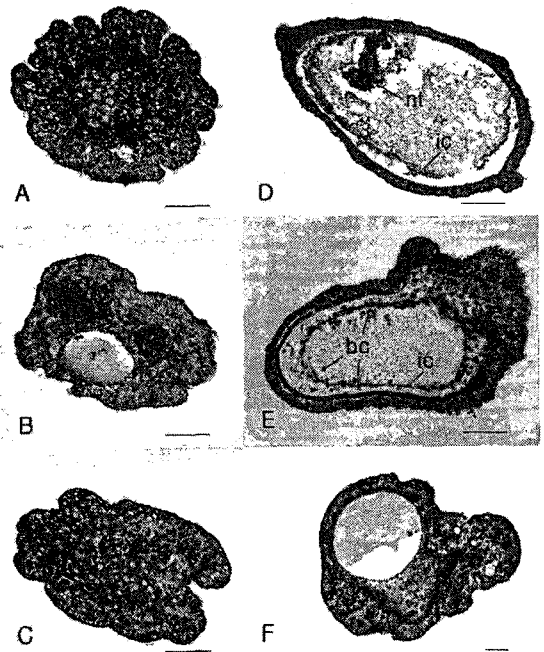


Fig. 7. The histological verification of the induction or inhibition erythrocytes in animal cap explants of *Xenopus laevis*. Mesoderm induction by activin A and its inhibition by test materials using an animal cap assay in presumptive ectoderm of *X. laevis*: (A) Only atypical epithelia was observed in control explants. (B) Explants exposed to 160 μ M carbaryl also exhibited only atypical epithelium, but showed innerspace in each explant. (C) Explants exposed to 30 ng/ml mSCF, only atypical epithelium developed. (D) Neural tissue, intercellular membrane were induced but blood cell was hardly induced by a single dose of 0.5 ng/ml activin A, (E) The explants incubated in a mixture of 0.5 ng/ml activin A and 30 ng/ml mSCF showed intercellular and blood cells. (F) In explants incubated in a mixture of 0.5 ng/ml activin A and 30 ng/ml mSCF and 160 μ M carbaryl(bc, blood cell; ic, intercellular membrane; nt, neural tissue; bar=100 μ m).

선택적으로 유도하는 효과를 얻기 위하여 사용하였다. activin A는 형질전환성장인자(TGF- β : transforming growth factor- β)에 속하는 중배엽 유도인자로서 농도에 따라 서로 다른 조직을 매우 뚜렷하게 유도하는 특성을 가지고 있다²⁷⁾. 예를 들어 0.1~0.5 ng/ml activin A에서 동물극 분리편을 배양했을 때

주로 혈구양세포(blood like cell)와 간충조직이 유도된다. 반면 신경조직, 근육, 약간의 척색, 간충조직은 10 ng/ml activin A에서 유도되며 척색은 50 ng/ml activin A에서 높은 빈도로 분화하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 본 실험에서 사용된 mSCF(Stem Cell Factor from rat)은 activin A와 결합하여 다수의 백혈구와 소수의 적혈구를 유도한다는 보고가 있으므로²⁹⁾ 본 실험에서 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A를 복합처리 할 경우 혈구양세포, 특히 적혈구의 유도를 할 수 있을 것이라 예측하였다. 이러한 적혈구의 분화 조건에 160 μ M 카바릴을 첨가하였을 때 동물극 분리편의 혈구유도능은 급감하여 카바릴 단독처리와 유사한 결과를 보였으며, 20개체 중에서 한 개체만 benzidine에 반응하였다. 이로써 카바릴은 혈구분화유도를 효과적으로 저해한다는 사실을 확인하였으며 이러한 결과는 카바릴은 *Xenopus laevis*의 배발

생에서 혈구분화를 강하게 저해한다는 사실을 밝히는 것이 된다.

3.4. 미세 형태학적 연구

0.1% BSA가 포함된 Steinberg's 생리식염수에서 96시간 동안 배양된 대조군의 배와 160 μ M 카바릴에서 배양된 배의 눈과 등 쪽의 체절성근육의 미세구조를 전자현미경으로 비교 관찰하였다(Fig. 8).

그 결과 먼저 눈은 대조군에서 광수용세포인 원추세포와 간상세포가 교대로 규칙적으로 배열하여 망막색소상피에 말단부가 매몰되어 있었다. 광수용세포말단부는 photoreceptor lamella의 치밀한 층으로 구성되어 있었으며 그 하부에 많은 미토콘드리아가 밀집되어 있었다(Fig. 8-A). 그러나 카바릴 처리군에서는 광수용세포말단부와 망막색소상피 사이에 넓은 간극이 형성되어 있었으며 임상에서 망

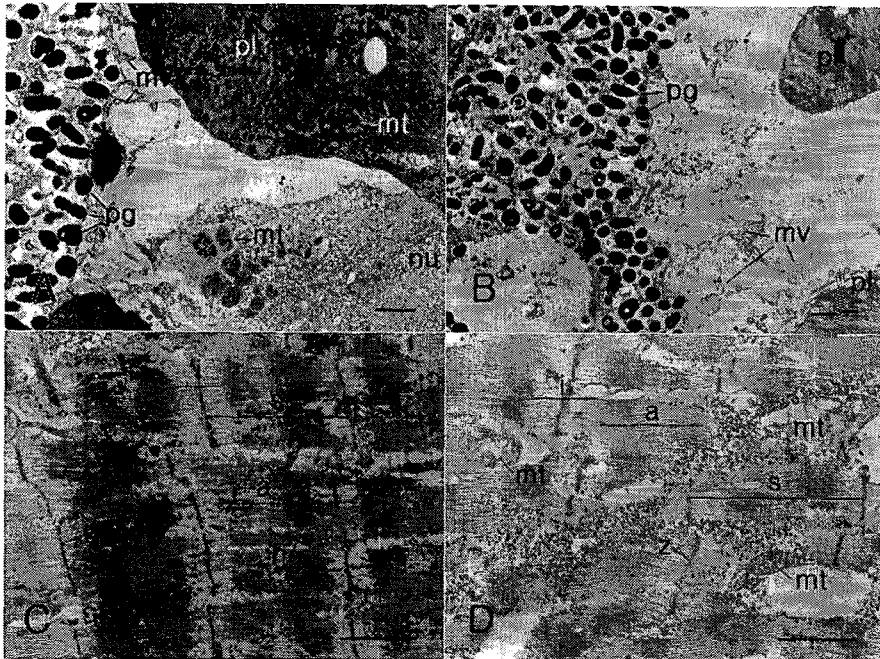


Fig. 8. Electron micrographs of retina and somatic muscle of control and carbaryl treated group. Control embryo explant(A,C), test embryos exposed to 160 μ M carbaryl(B,D). The carbaryl-exposed embryos frequent multi-vesicular body and retinal detachment, photoreceptor lamella was nor compact and loosely arranged(B). Somatic muscle of carbaryl treated embryos showed irregular arrangement of sarcomere and showed degeneration of myofilaments. The degeneration of mitochondria was also seen(D). (a, A band; h, H band; i, I band; mt, mitochondria; mv, microvilli; nu, nucleus; pg, pigment granule; pl, photoreceptor lamella; s, sarcomere; z, Z line; bar=1 μ m).

막분리층으로 불린다. 그리고 photoreceptor lamella의 층상배열이 불규칙하고 매우 성글게 배열되어 있었다. microvilli는 멜라닌 색소과립층의 광수용세포에서 다수 관찰되며 이것은 광수용세포의 대사산물을 수거하는 장치로 알려지고 있다. 대사산물은 광수용세포로부터 pigment epithelium 색소과립층으로 이동하여 파괴되는데 microvilli가 카바릴 처리군에서는 파괴되어 정상적인 기능을 수행하지 않는 것으로 보인다(Fig. 8-B). 대조군은 근원섬유마디에서 A 띠, I 띠, H 띠 및 Z 선을 관찰할 수 있었다(Fig. 8-C). 그러나 카바릴 처리군에서는 H 띠가 명확치 않았으며, 근절이 불규칙하였으며 근섬유의 밀도가 감소되었다(Fig. 8-D). 또 대조군에서는 미토콘드리아의 이중막이 뚜렷하고 cristae가 잘 발달되어 있는 반면 카바릴 처리 시에는 미토콘드리아가 팽대되는 변성을 보여주었다(Fig. 8-A, D).

투과전자현미경으로 눈과 등 쪽의 체질성 근육을 비교 관찰한 결과 정상적인 눈의 발생은 photoreceptor lamella 말단이 색소상피에 파묻혀 있으며 규칙적이고 치밀한 광수용세포인 원추세포와 간상세포의 층상배열을 보여준다. 그러나 카바릴 처리군에서는 이러한 층상배열의 불규칙함과 밀도 저하가 나타났으며, 이는 기능적 시각계의 발달이 저하됨을 나타낸다. 또한 색소상피와 광수용세포간의 넓은 간극에서 다수로 나타나는 microvilli는 광수용세포의 대사노폐물을 색소상피 쪽으로 인도하여 처리한다는 보고가 있으며 카바릴 처리군에서는 이러한 microvilli의 심각한 파괴가 관찰되고 이것으로 기능적인 시각기능의 저해활동이 저해된다는 것을 시사한다. 괴사하고 있는 세포에서 나타나는 전형적인 특징 중 하나는 미토콘드리아의 파괴인데 카바릴 처리한 근육에서 관찰된 미토콘드리아의 팽대 및 이중막의 파괴는 곧 이 조직의 괴사를 입증하는 또 다른 증거이기도 하다. 카바릴이 미토콘드리아에 독성을 가진다는 보고는 카바릴이 다른 살충제들보다 미토콘드리아에 대한 독성이 강하다는 보고와 미토콘드리아의 팽대 및 변성, 그리고 크리스타 붕괴에서 유사한 결과를 보여주었다⁶⁾. 그리고 근육에서는 체질간격이 불규칙하여 근육조직의 밀도가 감소하였는데 이는 파라콰트(paraquat)를 *Xenopus laevis*에 처리 시 조직사이의 체질 간격이 상당히 감

소되고 근원섬유 요소의 작은 층만 있는 근육 이상이 있다는 보고와 유사하였다³⁰⁾. 또한 클로르피리포스(chlorpyrifos)와 말라치온(malation)을 복합처리 시 나타나는 근원섬유의 극단적 분리³¹⁾와도 유사하였다.

양서류는 농경지등의 수변에서 서식하면서 농약에 직접적으로 영향을 받는 동물이다. 일반적으로 난은 젤리층으로부터 보호받지만 농약들은 환경에 대한 지속성을 가지므로 발달동안 농약에 노출될 위험을 가지고 있다. 카바릴은 저독성으로 알려져 있기는 하지만 본 실험의 결과에서 보여주듯이 *Xenopus laevis*에 배 발생과 기관형성에 치명적인 영향을 미치는 것을 확인하였다.

카바릴은 토양에서 30일간의 반감기까지 독성효과가 오래 잔존한다. 쥐의 위장 내에서 카바릴과 말라치온(malation)이 혼합하여 존재할 때 카바릴이 말라치온의 반감기를 증가시켜 독성효과가 오래 유지되었다는 보고가 있으며³²⁾, *Hyla versicolor*에 카바릴을 저농도로 4일간 노출시켰을 때 3~4%의 사망률을 나타냈지만 10~16일 간 노출시켰을 때 10~60%, 포식자를 같이 두었을 때는 60~98%로 사망률이 급증한다는 보고가 있다³³⁾.

양서류들은 담수지 감소와 벌목에 의한 서식처 감소 때문이기도 하지만 48%의 미확인된 과정들에 의해 개체군 절멸의 위험에 처했다³⁴⁾. 카바릴은 전세계적으로 농경지에서 광범위하게 사용되고 있고 양서류 초기 발생 기관형성에 영향을 미치게 될 것이다. 예를 들면 성장저해는 독성물질의 가장 뚜렷한 독성효과이며, 그 외 척색의 구부러짐, 수종, 수포, 근육, 소화관, 심장, 눈, 신장, 간 형성이상 등의 기형종류는 개체의 죽음을 유도하고 개체군을 감소시키는 영향을 주게 될 것이다. 따라서 농업 목적으로 이용한 여러 가지 농약류 내분비계 교란물질은 농장에 근접한 늪 같은 수계 서식지에 노출되어 양서류의 초기 배 발생동안 직접적인 손상을 야기할 가능성이 높으며, 자연환경에서 양서류의 기형과 농약의 사용 사이의 상호관계에 관한 더욱 다양하고 심도 있는 연구가 필요한 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 아프리카발톱개구리 *Xenopus laevis*의 초기 배발생에 미치는 carbaryl의 독성효과를

연구하였다. 독성효과의 실험은 *Xenopus laevis*를 이용하여 FETAX assay에 따라 증명하였다. 배(embryo)는 다양한 농도의 carbaryl(5~320 μ M)에 노출시켜 실험하였다. carbaryl에 대한 LC₁₀₀은 320 μ M였고, LC₅₀은 235.68 μ M였으며, probit 분석을 행한 결과와 유사하였다. 160 μ M 카바릴에 노출시켰을 때 10가지 형태의 다양한 외형적 기형이 관찰되었다. 조직학적 연구에서는 눈, 심장, 소화관, 근육, 척색, 간, 혈관에서 형성부전, 전신관에서는 부풀림이 관찰되었다. 신경조직과 뇌에 대하여 carbaryl에 의한 저해는 고농도에서도 나타나지 않았다. benzidine 혈구염색법으로 배와 동물극 분리 편에서 carbaryl에 의한 적혈구분화유도의 저해를 증명하였다. 투과전자현미경을 통한 미세형태학적 관찰에서는 carbaryl이 처리된 배의 눈에서는 망막분리, 느슨한 photoreceptor lamella와 근육에서는 근질의 불규칙과, 근섬유 밀도 감소, 미토콘드리아 붕괴도 처리군에서 자주 발견되었다.

감사의 글

본 연구는 한국한술진흥재단 학문후속세대양성사업(KRF-2006-353-C00045)의 지원으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- 1) 농약공업협회, 2000, 농약사용지침서, 269pp.
- 2) Pilar H. M., H. M. Paz and R. Alvarez, 1993, The carbamate insecticide ZZ-Aphox induced structural changes of gills, liver, gall-bladder, heart, and notochord of *Rana perezi* tadpoles, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25(2), 184-191.
- 3) Alvarez R, M. P. Honrubia and M. P. Herraes, 1995, Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox and Folidol during larval development of *Rana praezi*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 28(3), 349-356.
- 4) Lee T. K. and S. U. Hong, 1985, Toxicological study of carbaryl in rats, Arch. Pharmacol. Research, 8(3), 119-132.
- 5) Tós-Luty S., D. Przebirowska, J. Latuszynska and M. Tokarska-Rodak, 2001, Histological and ultrastructural studies of rats exposed to carbaryl, Ann. Agric. Environ. Med., 8(2), 137-144.
- 6) Moreno A. J., T. L. Serafim, P. J. Oliveira and V. M. Madeira, 2007, Inhibition of mitochondrial bioenergetics by carbaryl is only evident for higher concentrations - Relevance for carbaryl toxicity mechanisms, Chemosphere, 66(3), 404-411.
- 7) Hong S. U. and J. W. Lee, 1992, Toxic, effect of combination of buprofezin and carbaryl in rats, The Korean Society of Environmental Toxicology, 7(3-4), 17-35.
- 8) Flaskos J., M. J. Fowler, C. Teurtrie and A. J. Hargreaves, 1999, The effects of carbaryl and trichlorophan on differentiating mouse N2a neuroblastoma cells, Toxicol. Lett., 110(1-2), 79-84.
- 9) Bridges C. M., 2000, Long-term effects of pesticide exposure at various life stage of the Southern Leopard Frog (*Rana sphenoccephala*), Arch. Environ. Contam. Toxicol., 39(1), 91-96.
- 10) Elliott-Feeley E. and J. B. Armstrong, 1981-1982, Effects of fenitrothion and carbaryl on *Xenopus laevis* development, Toxicology, 22(4), 319-335.
- 11) ASTM(American Society for Testing and Materials), 1998, Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*(FETAX), Philadelphia, 16pp.
- 12) Nieuwkoop P. D. and J. Faber, 1956, Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), North-Holland Publishing Company, 243pp.
- 13) Orkin S. H., F. I. Harosi and P. Leder, 1975, Differentiation in erythroleukemic cells and their somatic hybrids, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72(1), 98-102.
- 14) Cooke J., J. C. Smith, E. J. Smith and M. Yaqoob, 1987, The organization of mesodermal pattern in *Xenopus laevis*: experiments using a *Xenopus* mesoderm-inducing factor, Development, 101, 893-908.
- 15) Slack J. M. W., 1991, The nature of the mesoderm-inducing signal in *Xenopus*: A transfilter induction study, Development, 113, 661-669.
- 16) Luft J. H., 1963, Embedding media - old and new. In: Koehler JK, editor, Advanced techniques in biological electron microscopy, Springer-Verlag, 1-34.
- 17) Reynold E. S., 1963, The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, J. Cell Biol., 17, 208-212.
- 18) Tardin D., 1972, Ultrastructural features of neural induction in *Xenopus laevis*, J. Anat., 111, 1-4.
- 19) Hauptman O., D. M. Albert, M. C. Plowman, S. M. Hopfer and F. W. Sunderman Jr., 1993, Ocular malformation of *Xenopus laevis* exposed to nickel during embryogenesis, Ann. Clin. Lab. Sci., 23(6), 397-406.
- 20) Vismara C., R. Bacchetta, B. Cacciatore, G. Vailati and U. Fascio, 2001, Paraquat embryotoxicity in the

- Xenopus laevis* cleavage phase, *Aquat. Toxicol.*, 55, 85-93.
- 21) Mann R. M. and J. R. Bidwell, 2001, The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs, *Environ. Pollut.*, 114(2), 195-205.
 - 22) Bacchetta R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara and G. Vailati, 2007, Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos, *Sci. Total. Environ.* 392, 110-118.
 - 23) Lin C. C., M. N. Hui and S. H. Cheong, 2007, Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish(*Danio rerio*) embryos, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222, 159-168.
 - 24) Yoon C. S., J. H. Jin, J. H. Park, H. J. Youn and S. W. Cheong, 2003, The fungicide benomyl inhibits differentiation of neural tissue in the *Xenopus laevis* embryo and animal cap explants, *Environ. Toxicol.*, 18, 327-224.
 - 25) Yoon C. S., J. H. Jin, J. H. Park, C. Y. Yoe, S. J. Kim, Y. G. Hwang, S. J. Hong and S W. Cheong, 2008, Toxic effects of carbendazim and n-butyl isocyanate, metabolites of the fungicide benomyl, on early development in the African clawed frog, *Xenopus laevis*, *Environ. Toxicol.*, 23(1), 131-144.
 - 26) Hemmati-Brivanlou A. and G. H. R. Thomsen, 1995, Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4, *Dev. Genet.*, 17(1), 78-89.
 - 27) Ariizumi T. and M. Asashima, 1994, *In vitro* control of the embryonic form of *Xenopus laevis* by activin A: Time and dose-dependent inducing properties of activin-treated ectoderm, *Dev. Growth Differ.* 36, 499- 507.
 - 28) Ariizumi T., K. Sawamura, H. Uchiyama and M. Asashima, 1991, Dose and time-dependent mesoderm induction and outgrowth formation by activin A in *Xenopus laevis*, *Int. J. Dev. Biol.*, 35, 407-414.
 - 29) Miyayama Y., R. Shiurba, S. Nagata, C. J. Pfeiffer and M. Asashima, 1998, Induction of blood cells in *Xenopus* embryo explants, *Dev. Genes Evol.*, 207(7), 417-426.
 - 30) Vismara C., R. Bacchetta, B. Cacciatore, G. Vailati and U. Fascio, 2001, Paraquat embryotoxicity in the *Xenopus laevis* cleavage phase, *Aquat Toxicol.*, 55, 85-93.
 - 31) Bonfantia P., A. Colombo, F. Orsina, I. Nizzetto, M. Andrioletti, R. Bacchetta, P. Mantecca, U. Fascioc, G. Vailati and C. Vismara, 2004, Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development, *Aquat. Toxicol.* 70(3), 189-200.
 - 32) Lechner W. D. and M. S. Abdel-Rahman, 1986, Kinetics of carbaryl and malation in combination in the rat, *J. Toxicol. Environ. Health* 18(2), 241-256.
 - 33) Relyea R. A. and N. Mills, 2001, Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98(5), 2491-2496.
 - 34) Stuart S. N., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Yong, A. S. Rodrigues, D. L. Fischman and R. W. Waller, 2004, Status and trends for amphibian declines and extinctions worldwide, *Science* 306, 1783-1786.