Kor. J. Food Hygiene 5 (4), 171-178 (1990)

Chick embryo를 이용한 식품잔류농약의 기형성 연구

임윤규 · 최재준 · 이민웅* · 이영순

*서울대학교 수의과대학 · *동국대학교 농과대학*

Teratogenicity of Food Residual Organophosphate in the Developing Chick Embryo

Yoon-Kyu Lim, Jai-Joon Choi, Min-Woong Lee* and Yong-Soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 440-744, Korea

**College of Agriculture, Dong Guk University*

ABSTRACT—Potential teratogenicity of Azinphos-methyl and Carbaryl was investigated in developing chick embryos. 100 μl of Azinphos-methyl and Carbaryl was injected into air sac on day 4 of incubation. Body weight changes and morphological changes were examined. The results obtained were summarized as follows;

1. Body length, limb lengths and claw length of groups treated with high dose of Azinphos-methyl and Carbaryl were significantly shortened compared to untreated of vehicle control and body weights of them were significantly lower than those of control groups.

2. Treatment of Azinphos-methyl andCarbaryl increased incidence ratios of dead embryo by dosage (Azinphos-methyl: 18%, 21%, 41%, Carbaryl: 26%, 50%).

3. One case of beak malformation occurred in Carbaryl treatment group.

Keyword□Chick embryo, Teratogenicity, Azinphos-methyl, Carbaryl

1940년대 합성유기 염소제인 DDT가 살충제로 사용된 이래 유기인계등 각종의 유기합성 농약의 사용량이 해마다 증가하는 추세에 있으며, 이에 따라 토양 및 축산물의 오염 및 잔류 그리고 이것을 접하게 되는 사람에 대한 중독등이 사회적으로 심각한 문제를 제기하고 있다. 우리나라에서 사용되고 있는 농약(살충제, 살균제등)은 400여 품목에 달하며 그 생산량은 1988년도에 유효성분으로서 약 17,500톤에 달하고 있다.(농약공업협회, 1989)

이와같이 농약의 사용량이 많아 짐에 따라 인체 또는 가축에서 농약 중독이 빈번히 발생하고 있다. 일본의 경우, 1953년에서 1963년 사이에 사람에서 19,436건의 유기인계 중독사고가 발생했다고 하며 (Namba, 1971) 1966년 미국 캘리포니아주에서 실시한 조사에 의하면, 농업 종사자 1,000명중 8.5명이 농약에 대한 질병을 앓고 있다고 한다. 우리나라의 경우 경기도, 충청북도 및 강원도에서 44.1%(이택구, 1981), 그리고 전라남도에서 38.1%(정대업, 1982)로서 이 중 살충제에 의한 중독 발생율이 87.3%를 점유한다.(공중보건연구회, 1985)

유기인계 살충제의 하나인 Azinphos-methyl은 상품명으로는 Guthion, contnionmethyl, Mehtyl Guthion 등으로 알려져 있으며, 귤이나 사과밭에 주로 살포하는 살충제로서 랫드에 경구적으로 투여시 LD50치는 15 mg/kg이라고 한다.

Carbamate계 살충제의 하나인 Carbaryl은 상품명으로는 Sevin, NAC 등으로 알려져 있으며, 논이나

Received for publication 26, November, 1990
Reprint request; Dr. Y.K. Lim at above address

Table 1. Experimental Groups & Each Treatment of Azinphos-methyl

	Untreated control	Vehicle control	Low dose	Middle dose	High dose
Number of eggs	15	17	17	17	17
Treatment	Corn oil 0.1 ml/egg	0.2 mg/egg	1.0 mg/egg	5.0 mg/egg	
Administration Time (hrs)	96 hrs				
Administration Route	Injection to air sac				

Table 2. Experimental Groups & Each Treatment of Carbaryl

	Untreated control	Vehicle control	Low dose	High dose
Number of eggs	15	16	16	16
Treatment	Corn oil 0.1 ml/egg	0.2 mg/egg	1.0 mg/egg	
Administration time (hrs).	96 hrs			
Administration route	Injection to air sac			

사과밭, 담배밭 등에 주로 살포하는 살충제로서 랫드에 경구적으로 투여시 LD50치는 약 280 mg/kg 이라고 한다.(농약공업협회 1989)

이렇게 빈번히 사용되고 있는 Azinphos-methyl과 Carbaryl의 독성은 알려져 있으나, 최기형성에 대하여는 상세히 규명되어 있지 못한 실정이다.

기형시험의 방법은 태자의 기형형성기에 투여하는 형태를 취하게 되는데, 계태아를 이용한 기형 시험방법은 적어도 다음과 같은 이유로 해서 최근 널리 소개, 이용되고 있다. ① 이용이 편리하다 ; ② 적은 비용으로 많은 수의 공시동물을 이용할수 있다 ; ③ 광범위한 화학적, 물리적요인에 감수성이 높다 ; ④ 형태학적 발육이 포유동물의 경우와 유사하는 점이다.

본 연구의 목적은 계태아를 이용하여 현재 국내에서 사용하고 있는 농약중 Azinphos-methyl과 Carbaryl를 대상으로 기형독성유무를 확인하고, 그에 대한 안전성을 파악함으로써 국민 보건향상에 이바지 하고자 한다.

재료 및 방법

시험용 수정란－국내 유일의 SPF계란 생산장인 천호 SPF 계란 농장으로 부터 모든 수정란을 구입하였다. 수정율과 부화율이 90% 이상으로서 품종은 White Leghorn 이며 대형란과 소형란을 골라낸 52～63 g의 것을 사용하였다.

시험물질－논이나 사과 밭 등에 많이 살포하고 있는 Carbaryl과 Aziophos-methyl을 시험물질로 사용하였다.

시험군 설정 및 투여－실험설계와 각 군의 처치내용 및 수정란의 수는 Table 1과 Table 2에 나타내었다. 무처치 대조군을 설정하고 Azinphos-methyl 및 Carbaryl을 Corn oil를 용매로 사용하여 실험설계에 맞는 용량을 녹여 4일간 발육시킨 란의 혈관 분포가 왕성이 일어날 때 기실로(air sac)하였다. Azinphos-methyl의 투여용량은 저용량(0.2 mg/egg), 중간용량(1.0 mg/egg) 그리고 고용량(5.0 mg/egg)으로 나누었으며, Carbaryl의 투여용량은 저용량(0.2 mg/egg), 고용량(1.0 mg/egg)으로 나누어 각각의 용매에 녹인 다음 검란하여 기실로 투여용량이 0.1 ml 씩 되도록 조제하여 각각 투여하였다. 용매 대조군은 동량의 용매를 air sac에다 투여량 0.1 ml씩 투여 하였다.

부란기의 조건－상대습도, 온도, 공기순환등을 조절할 수 있는 것으로 난좌를 회전 시키는 교반시설이 갖추어진 부란기로써, 발육조건은 37.8℃의 온도와 상대습도 61%를 유지하도록 하였다.

검란－검란은 매일 같은 시각에 행하였으며, 검란시

Table 3. Effects of Azionphos-methyl on the Body Weight and Body length of Hatchlings (Mean ± S.D.)

	Untreated control	Vehicle control	Low dose	Middle dose	High dose
Body weight (g)	27.83 ± 2.88	23.68 ± 4.07a	21.56 ± 3.69b	21.39 ± 4.73b	17.97 ± 3.87b,d
Body length (cm)	8.73 ± 0.62	8.12 ± 0.45a	7.91 ± 0.62b	7.69 ± 0.72b	7.18 ± 0.76b,d
Fore-limb length (cm)	3.49 ± 0.22	3.05 ± 0.47a	2.94 ± 0.31b	3.03 ± 0.37b	2.69 ± 0.38b,c
Hind-limb length (cm)	6.90 ± 0.46	6.25 ± 0.54a	5.99 ± 0.69b	5.75 ± 0.90b	5.30 ± 0.93b,d
Claw length (mm)	3.04 ± 0.06	2.90 ± 0.32	2.91 ± 0.26	2.92 ± 0.40	2.50 ± 0.53b,c
Beak length (cm)	1.17 ± 0.07	1.09 ± 0.08	1.05 ± 0.10	1.09 ± 0.10	1.04 ± 0.10

a: significantly different from the untreated control group ($p < 0.01$)
b: significantly different from the untreated control group ($p < 0.001$)
c: significantly different from the vehicle control group ($p < 0.05$)
d: significantly different from the vehicle control group ($p < 0.001$)

Table 4. Experimental Data Demonstrating mortality Rates and Frequencies of Embryos with Malformations following Treatment of Azinphos-methyl.

	Untreated control	Vehicle control	Low dose	Middle dose	High dose
Total No. of embryos	15	17	17	17	17
No. of dead embryos	0 (0)	3 (18)	3 (18)	5 (29)	7 (41)
No. with leg malformations	·	·	·	·	·
No. with abnormal features	·	·	·	·	·
No. with wry neck	·	·	·	·	·
No. with beak malformation					
No. with brain malformations	·	·	·	·	·
No. with eye defect	·	·	·	·	·
No. with generalized edema	·	·	·	·	·
No. with hematoma	·	1 (6)	1 (6)	1 (6)	4 (24)
No. congestion of occipital region	·	1 (6)	2 (12)	2 (12)	3 (18)
No. with cephalothoracopagus	·	·	·	·	·
No. embryos affected	1 (7)	4 (24)	5 (29)	4 (24)	8 (47)
No. affected including death	1 (7)	7 (41)	8 (47)	9 (53)	15 (88)

Table 5. Effects of Carbaryl on the Body Weight and Body length of Hatchlings (Mean ± S.D.)

	Untreated control	Vehicle control	Low dose	High dose
Body weight (g)	38.58±3.55	32.36±6.12b	28.42±8.63c	25.75±7.89c,d
Body length (cm)	10.25±0.41	9.24±1.05a	8.97±1.26c	8.50±1.16c
Fore-limb length (cm)	4.26±0.48	3.81±0.43a	3.38±0.54c,d	3.08±0.52c,e
Hind-limb length (cm)	7.60±0.48	6.91±0.75b	6.05±1.10b	6.23±1.03c,d
Claw length (mm)	3.88±0.30	3.57±0.68	3.50±0.44b	3.38±0.65a
Beak length (cm)	1.13±0.06	1.11±0.08	1.03±0.15	1.00±0.07

a: significantly different from the untreated control group ($p<0.05$)
b: significantly different from the untreated control group ($p<0.01$)
c: significantly different from the untreated control group ($p<0.001$)
d: significantly different from the vehicle control group ($p<0.05$)
e: significantly different from the vehicle control group ($p<0.001$)

발육 정지란 및 사란을 수거하여 태아의 발육정도를 검사하였고, 실체현미경으로 기형 발생을 검색하였다. 발육이 계속된 태아는 부란 22일까지 자연부화 시켰으며 부화하지 않은 태아는 폐사된 것으로 간주하여 난각을 제거 시킨후 외형검사와 골격검사를 실시하였다.

검사와 통계학적 처리－부화된 병아리는 육안적으로 외형검사를 한후 에테르로 마취시켜 체중, 체장, 전지와 후지의 길이, 부리의 길이등을 측정 하고 부검을 하여 장기 검사를 하였으며, 각군마다 5마리씩을 Alizarin red S 와 Alcian blue로 이중염색하여 실체 현미경으로 골격검사를 하였다(14). 대조군과 실험군, 그리고 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's T-test로 하였다.

결과 및 고찰

육안적인 외형 검사－부화 병아리에서 체중, 체장, 전후지의 길이, 발톱 및 부리길이에 미치는 영향을 조사한 것이 Table 3과 Table 5이다.

Azinphos-methyl 투여군은 체중, 체장 및 전·후지의 길이가 용매 투여군과 시험물질 투여군 중에서 저농도와 중·고농도 투여군이 무처치 대조군보다 유의성 있게 감소하였으며 고농도 투여군에서 용매 대조군에 비해 유의성있는 감소를 보였다(Table 5). 또한, 발톱길이는 고농도 투여군에서 무처치 대조군과 용매대조군보다 유의성있게 감소하였다(Table 3).

Carbaryl 투여군 역시 체중, 체장 및 전·후지의 길이가 용매 투여군과 시험물질 투여군 중에서 저농도와 고농도 투여군이 무처치 대조군보다 유의성 있게 감소하였으며 체중, 전후지 길이에서는 고농도 투여군이 용매 대조군에 비해 유의성있는 감소를 보였다(Table 3). 또한, 발톱길이는 저농도와 고농도 투여군 모두 무처치 대조군보다 유의성있게 감소하였으며 약간의 깃털 발육이상도 볼 수 있었다.

그러나, 부리 길이의 변화는 Azinphos-methyl 과 Carbaryl 모두 유의성있는 변화는 볼 수 없었다.

폐사율과 기형발생 정도－각 군의 폐사율과 기형발생수 및 종류는 Table 4와 Table 6에 나타내었다. Azinphos-methyl 투여군에서 폐사율이 용매 대조군이 18%에 반하여 용량별로 각각 18%, 29%, 41%로 나타났으며, 피하직 출혈을 보인것, 후두부에 충혈을 보인것 등이 나타났다(Table 4). 그러나, 사지나 부리 및 뇌에 이상은 없었다. Carbaryl 투여군에서는 폐사율이 용매 대조군이 19%에 반하여 용량별로 각각 26%, 50% 나타났으며, 다리이상을 보인 것이 용매 대조군이 13%에 반하여 용량별로 각각 25%, 38%로 나타났다(Table 6). 특이한 것은 저용량(0.2 mg/kg) 투여군에서 부리이상이 나타났다. 그 밖에

Table 6. Experimental Data Demonstrating mortality Rates and Frequencies of Embryos with Malformations following Treatment of Carbaryl.

	Untreated control	Vehicle control	Low dose	High dose
Total No. of embryos	15	16	16	16
No. of dead embryos	0 (0)	3 (19)	5 (26)	8 (50)
No. with leg malformations	0 (0)	2 (13)	4 (25)	6 (38)
No. with abnormal features	0 (0)	0 (0)	3 (19)	4 (25)
No. with wry neck	·	·	·	·
No. with beak malformation	0 (0)	0 (0)	1 (6)	0 (0)
No. with brain malformations	·	·	·	·
No. with eye defect	·	·	·	·
No. with generalized edema	·	·	·	·
No. with hematoma	·	·	·	·
No. congestion of occipital region	2 (13)	2 (13)	5 (26)	5 (26)
No. with cephalothoracopagus	·	·	·	·
No. embryos affected	2 (13)	3 (19)	6 (38)	7 (44)
No. affected including death	2 (13)	6 (39)	11 (69)	14 (88)

후두부에 충혈을 보인 것 등이 있었으나 사지, 뇌 등의 이상은 없었다.

Azinphos-methyl 및 Carbaryl은 생체내에서 Cholinesterase의 활성을 비가역적으로 억제하여 결과적으로 cholinergic site에 acetylcholine을 축적시킴으로써 오심, 구토, 발한, 배변, 배뇨, 축동, 호흡곤란, 설사 등의 muscarine양 증상과 근섬유속연축, 호흡마비 등의 nicotine양 증상 그리고 두통, 언어장애, 착란, 혼수, 체온상승 등의 중추 신경계 증상을 나타낸다(Tomokuni 등, 1985 ; Mount 등, 1984 ; Brown 등, 1986). Stromberg(1986)는 monocrotophos 투여를 조류에 투여할 때 사료섭취와 산란율이 감소하고 폐사율이 증가한다고 하였다. 따라서 본 실험에서 Azinphos-methyl과 Carbaryl를 투여해서 나타난 폐사율의 증가는 이와 같은 맥락에서 이해될 수 있을 것이다.

여러가지 유기인계 살충제와 alkylcarbarmate계 살충제들은 강력한 기형발생인자로서(Rugaaju 등, 1985 ; Kitos 등, 1981) 이들을 계태아에 투여시 두가지 형태의 발육부전이 나타난다고 한다. 제 1형은 소지증, 부리이상 및 피모발생부전 등을 일으키는 기형으로서 조직내 NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) 농도의 감소에 기인하는 것으로 nicotinamide, nicotinic acid 그리고 기타 다른 NAD 전구물질의 투여로 기형발생이 감소된다고 하며 (Hendersone 등, 1982 ; Moscioni 등, 1977 ; Proctor등, 1976) 제 2형은 사경, 단경, 관절만곡, 후지근육 발육부전 등 을 일으키는 기형으로서 cholinergic system의 부전에 기인하는 것으로서 2-PAM의 투여에 의해 기형발생이 줄어든다고 한다(Misawa 등, 1981 ; Moxcioni 등, 1977).

본 실험에서는 Azinphos-methyl 투여군에서는 체장, 체중, 전 · 후지의 길이가 감소하였으나, 특이할 만한 기형은 발생되지 않았다(Table 4). 그러나, Carbaryl 투여군에서는 체중, 체장, 전후지의 길이 감소외에도 부리이상이나 경도의 피모발육부전 등이

나타났으므로 Moscioni 등이 분류한 미약한 1형 기형이 발생했다고 볼 수 있으며 이것의 원인은 Proctor등 (1976)의 연구에서와 같이 NAD level의 감소에 의한 것이라고 생각된다.

국문요약

계태아를 이용하여 현재 국내에서 사용하고 있는 농약중 Azinphos-methyl과 Carbaryl를 대상으로 기형 유무가 있는지 확인하기 위하여 실험하였다. Azinphos-methyl과 Carbaryl을 corn oil를 용매로 사용하여 혈관분포가 왕성이 일어날때 기실로 투여하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Azinphos-methyl 투여군은 고농도 투여군에서 체중, 체장, 전지·후지의 길이, 발톱길이가 용매 대조군과 무처치 대조군에 비해 유의성있는 감소를 보였으며, 저농도와 중농도 투여군에서도 무처치 대조군과 유의성 있는감소를 보였다. 이는 Azinphos-methyl이 계태아의 성장에 영향이 있음을 알 수 있었다.

2. Azinphos-methyl은 용량별 폐사율이 각각 18%, 29%, 41%로 나타나 계태아의 폐사율을 증가시키는 것으로 나타났으나, 기형은 없었다.

3. Carbaryl 투여군에서는 체중, 체장 및 전·후지의 길이에 있어서 고농도로 투여한 군에서는 무처치 대조군 및 용매 대조군에 비해 유의성있는 감소를 보였으나, 체장 및 발톱길이는 저농도 및 고농도 투여군 모두 무처치 대조군에 비해 유의성있는 감소를 나타냈다.

4. Carbaryl 투여군은 폐사율이 용량별로 26%, 50%로 나타나 계태아의 폐사율을 증가시키는 것으로 나타났으며 경도의 피모 발육부전과 부리 이상이 나타났다.

참고문헌

1. Brown, C., Gross, W.B. and Ehrich, M.: Effect of social stress on the toxicity of malathion in young chickens, *Avian Diseases* **30**(4), 679-682 (1986).
2. Faherty, J.F., Jackson, B.A. and Greene, M.F.: Surface staining of 1 mm (Wislon) slices of fetuses for internal visceral examination, *Stain Technol.*, **47**, 53-58 (1972).
3. Hamburger, V. and Hamilton, H.L.: A series of normal stages on the development of the chick embryos, *J. Morphol.*, **88**, 49-92 (1951).
4. Hendersone, M. and Kitos, P.A.: Do organophosphate insecticides inhibit the conversion of tryptophan to NAD in ovo, *Teratology*, **26**, 173-181 (1982).
5. Hoffman, D.J. and Sileo, L.: Neurotoxic and teratogenic effects of an organophospgorus insecticide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 284 (1978).
6. Kimmel, C.A. and Trammell, C.: A rapid procedure of routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals, *Stain Technol.*, **65**, 271 (1965).
7. Kitos, P.A., Anderson, D.C, Uyeki, E.M., Misawa, M. and Wyttenbach, C.R.: Teratogenic effect Cholinergic insecticides in chick embryc. II. Effect on the the NAD content of early embryos, *Biochem. Pharmac.* **30**, 2225-2235 (1981).
8. Misawa, M., Doull, J. and Uyeki, E.M.: Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. I. Diazine treatment on acetylcholinesterase activities, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **57**, 20-29 (1981).
9. Mount, M.E.: Comparison of measurement of dialkyl phosphates in milk/urine and blood cholinesterase and insecticide concentrations in goats exposed to the organophosphate insecticide, imidan, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **72**, 236-244 (1984).
10. Moscioni, A.D., Engel, J.L. and Casida, J.E.: Kynureine formidase inhibition as a possible mechanism for certain teratogenic effects of organophosphorus and methylcarbamate insecticides in chicken embryos, *Biochem. Pharmac.* **26**, 2251-2258 (1977).
11. Namba, T.: Cholinesterase Inhibition by Organophosphorus Compounds and Its Clinical

Effects, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **44**, 289 (1971).
12. Proctor, N.H., Moscioni, A.D. and Casida, J.E.: Chicken embryo NAD levels lowered by teratogenic organophophorus and methylcarbarmate insecticides, *Biochem. Pharmacol.* **25**, 757-762 (1976).
13. Rugaaju, S.K. and Kitos, P.A.: Effects of diazinon on nucleotide and amino acid contents of chick embryos. Teratogenic considerations, *Biochem. Pharmacol.* **34**(11), 1937-1943 (1985).
14. Simons, E.B. and VanHorn, J.R.: A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skelton for chicken embryos, adapted to the clearing procedure on potassium hydroxide, *Acta Morphol. Neerl. Scand.*, **8**, 281-292 (1971).
15. Stromborg, K.L.: Reproductive toxicity of monocrotophos to bobwhite quail, *Poultry Science*, **65**, 51-57 (1986).
16. Tomokuni, K., Hasegawa, T., Hirai, Y. and Koga, N.: The tissue distribution of diazinon and the inhibition of blood cholinesterase activities in rat and mice receiving a single intraperitoneal dose of diazinon, *Toxicology*. **37**, 91-98 (1985).
17. Verrett, M.J., *et al.*: Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **56**, 265-273 (1980).
18. 농약공업협회 : 농약연보, (1989).
19. 농약공업협회 : 농약사용지침서, (1987).
20. 서울대학교 보건대학원 공중보건연구회 : 춘성군 지역사회 보건실습 보고서 p25, (1985).
21. 이택구 : 일부 농가의 농약 안전사용 및 중독 경험에 관한 조사, 서울대학교 보건대학원 석사학위 논문, (1987).
22. 정대업 : 농촌 주민의 농약사용에 대한 지식태도 및 농약 중독 경험에 관한 조사 조선대학교 의과대학 석사학위 논문, (1982).

본 연구는 과학재단 목적기초연구에 의한 연구임