

한국산 양서류 배아를 활용한 화학물질의 기형성 평가에 관한 연구

A Study on the Evaluation of teratogenicity of chemical by
Korean Amphibia embryo

고선근¹, 정성용²

호남대학교 생명과학과¹, 호남대학교 대학원 생물학과²

I. 연구목적

화학물질에 대한 독성평가와 환경오염물질의 독성 및 기형유발에 대한 연구는 개구리의 배아를 활용 하는 Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*(FETAX) 방법이 널리 사용되어지고 있으며 이러한 FETAX 방법에 따라 다른 여러 나라에서 그 나라에 서식중인 개구리들의 배아를 활용하려는 연구가 진행되어지고 있다. 우리나라에서는 국내에 서식하고 있는 산개구리의 배아를 활용하는 극히 일부의 연구가 진행된 바 있으나 연중 번식이 가능한 *Xenopus*와는 달리 국내에 서식하고 있는 양서류는 계절적 번식을 하는 특징을 나타내어 양서류 배아 채취 및 활용에 계절적 제약을 받고 있다 따라서 본 연구에서 번식기가 서로 다른 한국산 양서류의 주요 번식기를 조사하여 배아채취 가능시기 등을 파악하고 이들 배아의 활용여부를 위해 FETAX 방법에 따라 배아를 배양하면서 중금속 및 농약을 처리하여 LC₅₀, EC₅₀ 및 Teratogenic Index(TI)를 구하고 기형양상 등을 조사하여 한국산 양서류 배아를 활용한 환경오염물질의 효과를 평가할 수 있는 기법으로 활용하고자 한다

II. 재료 및 방법

1 양서류 주요 번식기 조사 및 배아 채취

광주 및 전남지방에 서식하는 양서류 중 도롱뇽, 산개구리, 참개구리, 무당개구리의 산란시기를 관찰하여 주요 번식기를 조사하고 이들의 배아를 직접 채취하여 배아들 중 세포질들이 균일한 할구들을 가진 배아들을 선택하여 젤리층을 제거하고 포배기 및 낭배기까지 배양하여 각각 실험에 사용하였다

2. 배양액 및 중금속, 농약

Amphibian Ringer 용액(AR; 6.6 g NaCl/ ℓ , 0.15 g KCl/ ℓ , 0.15 g CaCl₂/ ℓ , 0.2 g NaHCO₃/ ℓ , 0.05 g Streptomycin/ ℓ , 0.03 g Penicillin/ ℓ)을 제조하여 pH 7.4로 맞추어 배양에 사용하였으며 배아의 발생단계에 미치는 영향을 보기 위해 사용했던 중금속인 cd²⁺은 1000 ppm Stock solution(Aldrich Chem.)을 사용하였으며 농약인 benomyl(농업과학기술원)은 DMSO에 녹여 Stock solution으로 제조한 후 AR용액으로 희석하여 사용하였다.

3. 시험물질 처리

시험물질이 포함되지 않는 대조군과 시험물질이 농도별로 포함된 실험군으로 나누어 24시간마다 새로운 용액으로 교환하면서 96시간 배양하였으며 시험물질의 농도 구간은 5개 이상으로 정하여 실시하였고 모든 농도구간에 대해 각기 다른 개체에서 채취한 배아들을 사용하여 3회 이상 반복 실험하였다.

4. 결과처리 및 분석

양서류의 주요 번식기는 야외관찰에서 산란된 배아들을 직접 채취 할 수 있는 시기 및 기간을 조사를 하였다. 채취된 배아를 배양하면서 시험물질들의 각 농도별로 사망율을 조사하고 96시간 후 3% Formalin에 고정하였다. 이들 고정된 개체들을 대상으로 기형 개체 수 및 양상을 조사하고 그 결과들을 %로 환산하여 Probit analysis Program으로 분석하여 LC₅₀, EC₅₀을 구하였으며 아울러 방법에 따라 96-h LC₅₀ 값을 96-h EC₅₀ 값으로 나누어 Teratogenic Index(TI)를 구하여 TI 값이 1.5 이상이 되면 유해성이 있는 물질로 판정하였다. 기형의 종류는 정상발생 올챙이를 기준으로 올챙이 꼬리가 파상을 나타내는 양상, 꼬리가 휘어지는 양상 등을 관찰하여 꼬리기형으로 판정하였고 복부의 돌출현상 등을 관찰하여 복부기형으로 판정하였다. 또한 몸 전체에 형성된 수포(물집)의 형성을 관찰하여 수포형성기형(Edema)으로 판정하였다.

III. 결 과

무당개구리의 배아 배아채취 가능 시기는 4월~8월(배란된 난자 수 평균 20~30

개, 난자의 직경: $2.70\text{mm}\pm 0.2$)이었다. cd^{2+} 처리결과 기형도 지수는 2.4를 나타내었고 치사율은 1ppm 이상의 농도에서 50% 이상의 치사율을 나타내었으며 기형율은 0.01ppm부터 10% 이상의 기형을 나타내었다 기형양상은 복부기형과 꼬리기형의 비율이 높았으며 성장율은 0.1ppm부터 대조군(9.1mm)에 비해 성장을 억제 하였다(8.6 mm) 한편 benomyl을 처리결과 기형도 지수는 3.7을 나타내었고 10ppm 이상의 농도에서 60% 이상의 치사율을 나타내었으며 기형율은 0.1ppm부터 10% 이상의 기형을 나타내었다. 기형양상은 복부기형의 비율이 높았으며 성장율은 0.01ppm부터 대조군(9.1mm)에 비해 성장을 억제 하였다(8.5mm).

참개구리의 배아: 배아채취 가능 시기는 5월~6월(배란된 난자 수: 평균 1000개, 난자의 직경: $1.80\text{mm}\pm 0.1$)이었다. cd^{2+} 처리결과 기형도 지수는 3.9를 나타내었고 치사율은 1ppm 이상 농도에서 66% 이상의 치사율을 나타내었으며 기형율은 0.01ppm부터 10% 이상의 기형을 나타내었다 기형양상은 꼬리기형의 비율이 높았으며 성장율은 0.5ppm부터 대조군(7.3mm)에 비해 성장을 억제 하였다(7.1mm). 또한 benomyl을 처리 결과 기형도 지수는 4.9를 나타내었고 10ppm 이상의 농도에서 60% 이상의 치사율을 나타내었으며 기형율은 0.1ppm부터 10% 이상의 기형을 나타내었다. 기형양상은 복부기형의 비율이 높았으며 성장율은 0.1ppm부터 대조군(7.3mm)에 비해 성장을 억제 하였다(6.1mm).

산개구리의 배아 배아채취 가능 시기는 2월~5월(배란된 난자 수 평균 700~800개, 난자의 직경: $2.20\text{mm}\pm 0.2$)이었다. cd^{2+} 처리결과 기형도 지수는 2.6를 나타내었고 치사율은 5ppm 이상 농도에서 50% 이상의 치사율을 나타내었으며 기형율은 0.1ppm부터 30% 이상의 기형을 나타내었다 기형양상은 복부기형과 척추기형과 꼬리기형의 비율이 높았으며 성장율은 0.5ppm부터 대조군(11.8mm)에 비해 성장을 억제 하였다(10.5mm)

도롱뇽의 배아: 배아채취 가능 시기는 2월~5월(배란된 난자 수 평균 20~60개, 난자의 직경: $2.80\text{mm}\pm 0.3$)이었다. cd^{2+} 처리결과 기형도 지수는 1.6을 나타내었고 치사율은 5ppm 이상 농도에서 40% 이상의 치사율을 나타내었으며 기형율은 0.01ppm부터 10% 이상의 기형을 나타내었다 기형양상은 복부기형의 비율이 높았으며 성장율은 0.1ppm부터 대조군(11.9mm)에 비해 성장을 억제 하였다(8.2mm)

IV. 고찰

국내에 서식하고 있는 양서류의 주요번시기를 조사한 결과 배란된 난자의 채취 시기는 양서류의 종에 따라 각각 다르며 대체적으로 국내에 서식하는 양서류의 배란된 난자는 2월~8월에 채취가 가능하여 시험에 사용할 수 있음을 알 수 있었으며 본 시험에 사용했던 시험물질 모두가 양서류의 배아 발생과정에 매우 민감하게 반응하여 배아들을 치사시키거나 발생을 저해하고 기형을 유발하였다 이러한 사실들로 보아 국내에 서식하고 있는 양서류의 배아들은 화학 물질 및 환경오염물질의 독성 등을 파악하는데 좋은 모델로 사용되어 질 수 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Bantle JA, Dumont JN, Finch RA, and Linder G. 1991 Atlas of Abnormalities: a Guide the Perfomance of FETAX. Oklahoma State Pulications Department
2. Bantle JA, Fort DJ, Rayburn JR, Deyoung DJ, Bush SJ. 1990. Further validation of FETAX: evaluation of the developmental toxicity of five known mammalian teratogens and non-teratogens. Drug Chem Toxicol 13:267-282
- 3 Deucher EM 1972 "Xenopus laevis and Developmental Biology" Biological Reviews, 47, 37-112.
- 4 Fort DJ, Dawson DA, Bantle JA. 1988. Development of ametabolic activation system for the frog embryo teratogenesis assay Xenopus(FETAX). Teratog. Carcinog. Mutagen 8:251-264.
- 5 Rayburn JR, DJ Fort, R McNew, and JA Bantle. 1991 Synergism and antagonism induced by three carrier solvents with t-retinoic acid and 6-aminonicotinamide using FETAX. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 46:625-632.