

Rats에 있어서 Fthalide의 毒性에 관한 研究

홍 사 옥·김 영 찬*·김 정 진

성균관대학교 약학대학·성균관대학교 산업보건학과*

The Toxic Effect of Fthalide in Rats

Sa Uk Hong, Young Chan Kim* and Jung Jin Kim

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University

*College of Health Industry, Sung Kyun Kwan University**

ABSTRACT

This study was done to determine the toxic effect of fthalide in rats which have oral administration at levels of 100 mg/kg/day for twelve days. It was examined the hematogram and serological parameters, and also the content of cytochrome P-450, the activity of NADPH-cytochrome c reductase, glucose-6-phosphatase, cholinesterase and carboxylesterase in liver.

Any significant alteration of hematogram was not found but the value of AST, LDH and content of glucose in serum were statistically increased.

The content of cytochrome P-450, the activity of NADPH-cytochrome c reductase were increased but glucose-6-phosphatase were slightly decreased compare with that of control group.

The activity of cholinesterase was decreased slightly and on the contrary the activity of carboxylesterase was found to be the tendency of increase in both of liver and serum.

서 론

Fthalide (4, 5, 6, 7-tetrachlorophthalide)는 도열병에 사용되고 있는 유기염소계 살충제의 일종이며 유기수은제 대신 선택성이 높은 도열병예방제로 이용되었다¹⁻²⁾. Fthalide는 예방효과와 잔류성이 우수하며, 입도열병이나 이삭도열병에 다같이 탁월

한 방제작용을 나타내는 약제로 알려져 있다. 또한 fthalide는 포유동물이나 어개류에는 독성이 낮고 rat와 mice에 투여할 때 어떤 독성작용도 발현되지 않았다고 보고되어 있다³⁻⁴⁾.

작용기전은 아직 명확히 규명되지는 않았으나 도열병균의 예방에는 강력하게 균의 성장을 억제하였으며 토양배지에서 도열병균의 포자발아 및 균의 성장은 거의 저해하지 않았다. Fthalide는 고농도에

서 세포독성물질이 축적되는 원인이 되며 NADPH-dependent 환원효소를 차단하여 1, 3, 6, 8-tetrahydroxynaphthalene에서 scytalone으로 변환한다⁵⁾. 또한 fthalide는 melanine 합성과정에서 1, 8-dihydroxynaphthalene (DHN)으로 전환시 1, 3, 8-trihydroxynaphthalene에서 vermeline으로 전환이 포함된 반응에서 pentakelide를 경유한 melanine 생합성 저해가 확실하다고 한다⁵⁾. Tricyclazole이 색소합성에 대한 작용에서부터 melanine 생합성 작용의 방해, 저해, 대사산물의 축적이 나타난다⁶⁻⁷⁾. 도열병의 melanine 합성과 벼표피 침입에 대한 연관성은 불명확하나 fthalide가 숙주체내에서 대사되어 작용이 발현되는 것은 아니며 fthalide 자신이 직접 작용하는 것이라고 볼 수 있다⁷⁾. 즉 도열병균의 부착기형성 이후 침입과정에서 침입계의 형성을 저지시키며 그 작용점은 침입계 형성 이전의 생육단계에 있는 것으로 시사되고 있다.

세정하지 않은 쌀에서 fthalide의 허용 잔류량은 1ppm으로 ADI양의 1/20에 해당된다. Fthalide는 24시간 이내 약 11%가 뇨로 배설되며 주 대사산물은 3, 4, 5, 6-tetrachloro-2-hydroxymethylbenzoate와 미반응의 fthalide가 배설되고 이들 대사산물도 rat의 생식이나 embryo의 형성에 유해작용이 나타나지 않았다고 한다. 또한 병리학 및 혈액학적 소견에서도 대조군과 유사하였으며 최기형성 및 번식율에서도 대조군과 유사하였다고 한다⁷⁾. 이와 같이 fthalide의 독성은 아직 포유동물에서 규명되어 있지 않은 상태이다.

따라서 급변 저자등은 fthalide를 택하여 독성기전을 연구할 목적으로 rat의 혈청 및 약물대사효소에 미치는 영향을 조사하여 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

1. 실험동물 및 약물투여 방법

체중 200g 내외의 건강한 웅성 Sprague-Dawley 계 rat를 한국실험동물센터에서 분양받아 1주일간 실험실 환경에 적응시킨후 1개군을 10마리로 하여

polycarbonate cage 내에서 사육하였다. 사료는 시판배합 고형사료(신촌 사료 주식회사)를 급식하였으며 급수는 수도수를 자유로이 섭취하도록 하였다. 실험군은 다음과 같이 구분하여 약물을 1일 1회 12일간 각각 경구로 투여 하였으며 희생전은 24시간 동안 물만 공급하여 절식시켰다.

- 1) 대조군 : Corn oil를 5.0ml/kg씩 경구투여 하였다.
- 2) 약물 투여군 : Fthalide를 corn oil에 현탁하여 100mg/kg을 대조군과 동일한 방법으로 투여하였다.

2. 체중, 간장 및 신장의 중량측정

약물투여 전의 체중과 최종약물투여 24시간 후의 체중을 측정하여 약물투여 전후의 체중증감비율을 산출하였다. 체중을 측정된 rat는 ether로 마취시키고 신속히 복부정중선을 절개하여 복부대동맥에서 채혈하였다. 채혈후 간장 및 신장을 원형을 유지하면서 saline용액으로 관류하여 혈액을 제거한 후에 적출하고 saline용액을 깨끗이 씻어 여지로 수분을 제거한 다음 즉시 무게를 측정하였다⁸⁾.

3. 혈액상 및 혈청생화학 변화측정

복부대동맥에서 채혈한 혈액의 일부는 Coulter Counter로 혈액상을 검사 하였으며 일부는 혈청을 분리하여 얻은 혈청을 blood autoanalyzer를 사용하여 혈청생화학 검사를 하였다.

4. 간장 및 신장 microsome 분획의 분리

적출한 간장 및 신장을 잘게 썰어 Potter Elvehjem homogenizer를 사용하여 0.25M sucrose 용액으로 homogenize 시켰다. 10~20%의 간장 homogenate를 Kamath등⁹⁾의 방법을 개량한 Cinti 등¹⁰⁾의 방법에 따라 differential centrifugation을 하였다. 여기서 얻은 pellet을 동량의 0.15M KC1을 넣어 세척한 후 재 현탁시키고 27,000xg에서 15분간 원심분리 하여 얻은 pellet을 microsome분획으로 사용하였다.

- 1) Cytochrome P-450 함량측정

Microsome 분획중의 cytochrome P-450 함량 측정은 Omura와 Sato¹¹⁾의 방법을 참조하고 Matsubara등¹²⁾의 변법에 준하여 differential spectrophotometry로 450 nm에서 흡광도를 측정하고 그 차이를 molar extinction difference를 104 mM^{-1} 로 하여 cytochrome P-450의 함량을 계산하였다.

2) NADPH-cytochrome c reductase 활성측정 Masters등¹³⁾ 및 Mazel¹⁴⁾의 방법에 준하여 reaction rate가 linear하게 되는 3~4분 사이에 550 nm의 파장에서 1분간의 흡광도차를 측정하고 molar extinction difference를 $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 로 하여 NADPH-cytochrome c reductase의 활성을 계산하였다.

3) Microsomal protein 함량측정

Microsome 분획중 단백질 함량은 Lowry등¹⁵⁾의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

4) 간장 microsome 분획중 과산화 지질측정

Oishi의 방법¹⁶⁾에 준하여 측정하였으며 표준액으로 1.1.3.3.-tetra-ethoxypropane 5 n mole을 사용하였다.

7. 간장 glucose-6-phosphatase의 활성측정

Traiger와 Plaa의 변법¹⁷⁾에 따라 Tris-maleate 완충액(pH 6.2) 0.4ml와 glucose-6-phosphate 용액 0.5 ml를 시험관에 넣어 metabolic shaking incubator에서 37°C로 20분간 반응 시켰다. 이 반응을 10% trichloroacetic acid (TCA) 5.0ml를 넣어 중지시킨 다음 원심분리하고 그 상등액을 2.0 ml 취하여 Fiske-Subbarow방법¹⁸⁾에 따라 무기인의 함량을 측정하였다.

8. 간장 및 혈청 cholinesterase의 활성측정

간장 cholinesterase의 활성은 간 1g에 0.036M phosphate buffer (pH 7.6) 10ml로 homogenization하여 Ellman등¹⁹⁾의 방법에 따라 실험하였다. DTNB (5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) buffer (0.421 mM/1, pH 7.6) 3 ml을 blank test

tube와 sample test tube에 각각 넣고 37°C에서 5분간 preincubation 시켰다. Sample test tube에 substrate로 propionylthiocholine iodide 용액 (10 mM/1) 1 ml를 넣고 37°C에서 정확히 3분간 incubation 시킨후 반응을 정지시키기 위해 quinidine 용액 (14 mM/1) 1 ml를 가하였다. Blank test tube에는 quinidine 용액, 검체, substrate순서로 가한 blank를 대조로 하여 5분 이내에 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 간장 및 혈청 carboxylesterase 활성측정

간장 carboxylesterase 활성은 간 1g에 0.25M sucrose 10ml를 homogenizer에 넣고 저온에서 충분히 마쇄한 후 3,000xg에서 수분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상등액을 검체로 하였으며, 혈청은 증류수로 50~100배 희석하여 검체로 하였다.

이 검체를 Nachlas등²⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다.

즉 1 ml의 검체에 substrate 6 ml를 가하고 37°C에서 20분간 incubation 시킨 후 Naphthanil Diazo Blue B 용액 1 ml (4 mg powder/H₂O 1 ml)를 가하고 교반하였다. 3분후 40% trichloroacetic acid 1 ml, ethylacetate 10 ml를 가한 다음 교반, 원심분리 하였다. 분리한 ethyl acetate 층을 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 따로 β -naphthol을 사용한 표준곡선을 이용하여 검체에서 생성된 β -naphthol의 양을 계산하여 활성을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

1. LD₅₀ 치의 측정

Fthalide를 corn oil에 현탁하여 rat에 경구투여한 LD₅₀치는 3,860 mg/kg으로 살충제의 일반적인 독성기준에 의하면 practically nontoxic한 상태로 구분할 수 있다. Sato등⁷⁾은 급성경구 독성으로 fthalide를 rat와 mice에 투여할때 아무런 독성작용도 나타나지 않았으며 3%를 사료에 섞어 사육할 때에도 별 이상이 발견되지 않았다고 보고하였다.

2. 체중, 간장 및 신장의 중량변화

Fthalide 투여에 의한 체중변화는 Table 1에서 보는바와 같다. 대조군에서는 체중증가율이 3일에 0.46%, 6일에 3.39% 이며 12일에는 14.25%로 나타났다. Fthalide를 투여한 군에서 약간 감소하는 증후가 보이나 별로 변화가 없었다. Fthalide 0.01-9.1%를 사료에 섞어서 사육한 rat에서 체중변화, 사료량 및 식수섭취량이 대조군과 차이가 없었다고 보고한바 있다⁷⁾.

간장 및 신장의 중량 변화는 Table 2에서 보는 바와 같다. Fthalide 투여군에서 투여 횟수가 증가함에 따라 체중에 대한 간장 및 신장 중량비율은 대조

군에서는 대체로 3.11% 범위였으나 fthalide 투여군에서 3.20% 범위로 약간씩 증가하는 경향이 있었다. 이것은 약물투여에 의하여 간이 비대하여진 영향이라고 사료된다. 각 군에서 12일간의 평균 사료 섭취량은 Table 3에서 보는 바와같이 fthalide투여군과 대조군이 비슷하며 체중의 감소량과 사료 섭취량이 비례하였다.

3. 혈액상 및 혈청 생화학적 변화

Fthalide를 투여할때 혈액상의 변화는 Table 4에서 보는 바와 같다. WBC 값은 약물의 투여횟수가 증가할 수록 점차 감소하는 경향을 보였으며 RBC, Hgb, Hct 등의 타항목에서는 별 변화가 없었다.

Fthalide투여할때 혈청생화학 변화는 Table 5에서 보는바와 같다. Aspartate aminotransferase (AST)의 활성변화는 약물의 투여횟수가 증가할 수록 점차 증가하였으며 12일 투여군에서는 유의성있는 증가를 나타내었다. Alanine aminotransferase

Table 1. Effect of fthalide on body weight gain in rat.

Group	Days	Initial	Final	Gained (%)
Control	3	215.4±4.95	216.4±5.27	0.46
	6	212.6±3.65	219.8±4.95	3.39
	9	214.2±5.23	225.3±5.21	5.18
	12	210.6±4.75	240.6±4.95	14.25
Fthalide	3	215.9±4.75	217.9±5.25	0.93
	6	210.4±5.05	220.6±4.45	4.85
	9	214.9±4.62	230.9±5.72	7.45
	12	213.6±5.85	230.9±4.45	13.01

-Each value is mean±SE

-Fthalide 10mg/kg

Table 3. Effect of fthalide average feed efficacy in rats.

Groups	Days	Total Intake (g)			
		3	6	9	12
Control		349	705	1074	1394
Fthalide		342	677	1054	1349

Table 2. Effect of fthalide on liver and kidney weight per body weight ratio (%) in rats.

Groups	Days	Liver W.	Liver W./B.W	Kidney W.	Kidney W./B.W
Control	3	6.74±0.24	3.11±0.08	1.70±0.07	0.78±0.05
	6	6.82±0.32	3.10±0.05	1.76±0.09	0.80±0.06
	9	7.25±0.28	3.21±0.07	1.81±0.04	0.80±0.03
	12	7.46±0.33	3.10±0.09	1.84±0.05	0.78±0.05
Fthalide	3	6.84±0.29	3.14±0.09	1.71±0.07	0.78±0.04
	6	6.99±0.27	3.17±0.06	1.74±0.10	0.79±0.05
	9	7.43±0.21	3.21±0.08	1.82±0.09	0.79±0.06
	12	7.62±0.27	3.19±0.06	1.96±0.09	0.82±0.07

-Each value is the mean±SE

-W; weight B.W; body weight

-Fthalide 100mg/kg

Table 4. Effect of fthalide on blood parameters in rats.

Groups	Days	WBC [10 ³]	RBC [10 ⁶]	Hgb [g/dL]	Hct [%]	MCV [um ³]	MCH [pg]	MCHC [g/dL]	PLT [10 ⁹]
Control	3	9.2±2.17	7.0±0.41	13.9±0.61	39.7±1.89	54.2±1.87	20.1±0.69	32.7±0.81	729±53
	6	10.7±1.08	7.3±0.51	13.3±0.90	41.0±2.69	55.1±1.61	18.2±0.37	33.3±0.54	764±72
	9	9.7±1.86	7.4±0.47	14.1±0.52	41.8±2.91	52.9±1.21	18.0±1.21	33.5±1.87	810±59
	12	10.0±2.34	7.5±0.28	13.1±0.53	39.5±1.49	52.4±1.78	19.7±0.47	33.9±0.41	806±82
Fthalide	3	10.3±0.54	8.0±0.13	14.3±0.71	43.4±2.44	54.3±2.99	18.0±2.65	33.3±1.17	766±21
	6	10.1±0.38	7.3±0.09	13.1±0.91	41.6±3.01	53.5±3.01	17.7±3.00	32.9±3.05	779±29
	9	8.8±0.91	6.8±0.17	13.2±0.84	41.9±1.59	53.6±1.75	20.7±2.74	32.5±2.75	781±30
	12	7.9±0.41*	7.6±0.11	14.5±1.09	43.8±4.03	56.6±4.36	18.8±2.51	33.5±3.34	799±37

Each value is the mean±SE. Fthalide 100mg/kg.

WBC: white blood cell, REC: red blood cell, Hgb: hemoglobin, Hct: hematocrit

MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin,

MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT: platelet

Table 5. Effect of fthalide on biochemical parameters in serum of rats.

Groups	Days	AST [U/L]	ALT [U/L]	LDH [U/L]	ALP [U/L]	Glucose [mg/dL]	TG [mg/dL]	Cholest. [mg/dL]	BUN [mg/dL]	Protein (g/dL) total albumin
Control	3	76.2±4.75	42.0±3.21	428.5±29.65	245.5±17.63	147.1±8.39	58.4±4.75	50.9±6.24	19.2±1.05	5.9±0.15 2.1±0.09
	6	79.7±5.41	41.9±2.98	445.4±31.43	252.7±19.32	150.8±7.51	59.5±5.21	55.4±5.78	20.3±1.27	9.4±0.17 2.3±0.14
	9	74.7±4.05	42.5±3.43	450.7±24.51	256.4±17.49	147.7±8.47	49.9±3.72	59.4±4.96	19.1±1.09	6.6±0.21 2.2±0.12
	12	78.2±7.21	45.2±4.01	464.4±31.54	236.2±16.72	152.6±7.05	55.6±6.05	51.8±3.47	17.9±1.65	6.8±0.14 2.3±0.14
Fthalide	3	74.3±7.44	40.9±3.72	453.9±29.43	230.4±17.03	148.9±6.45	58.9±4.21	56.6±3.92	25.6±1.07	6.1±0.14 2.1±0.12
	6	70.2±6.59	47.5±2.96	439.3±31.72	274.4±16.43	173.4±5.27	56.7±3.69	63.5±2.75	19.8±2.43	5.8±0.42 2.3±0.25
	9	81.0±6.94	49.3±3.65	490.4±32.49	259.5±17.48	180.2±8.72	52.6±7.49	64.4±3.79	26.7±1.42	6.6±0.59 2.3±0.14
	12	95.7±7.46*	55.2±4.01	527.5±19.56*	255.7±14.52	189.4±7.22*	56.6±6.54	64.4±4.05	24.9±2.01	6.6±0.44 2.3±0.26

Each value is the mean±SE. Fthalide 100 mg/kg.

Significant difference between control & treated groups (*; P<0.05)

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase,

LDH: lactic dehydrogenase, ALP: alkaline phosphatase,

TG: triglyceride. Cholest: cholesterol

(ALT)의 활성변화는 투여횟수가 증가함에 따라 약간 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다.

Dikshith등²²⁾은 독성의 초기단계에서 병리학적인 조직손상이 일어나기 이전에 막투과성의 변화가 일어날경우 AST의 활성 변화없이 ALT의 활성이 증가된다고 보고하였다. Latic dehydrogenase (LDH) 활성에 있어서는 Fthalide를 투여할때 투여 횟수가 증가함에 따라 유의성있게 증가하였다.

Conish등²³⁾에 의하면 일반적으로 LDH의 혈중

로 분비는 조직손상의 지표가 된다고 보고하였다. 본 실험에서도 Fthalide를 12일간 투여에 의하여 LDH활성이 증가하였는데 이것은 조직손상의 유발에 기인하는 것이 아닌가 사료된다.

Alkaline phosphatase (ALP) 활성은 약물의 투여횟수가 증가할수록 점차 상승하는 경향을 보이나 유의성은 없었다. Glucose량의 변화는 LDH의 활성변화와 유사하였으며 12일 투여군에서는 혈중 glucose치가 현저히 증가하였음을 보였다. Trigly-

ceride (TG) 및 cholesterol은 대조군에 비해 별 변화가 없으며 blood urea nitrogen (BUN) 및 total protein량은 투여 횟수가 증가함에 따라 증가하는 경향은 있으나 유의성은 없었다.

4. 간장 및 신장 microsome 분획중의 cytochrome P-450 함량과 NADPH-cytochrome c reductase 활성 변화

간장 및 신장 microsome 분획중의 cytochrome P-450 함량과 NADPH-cytochrome c reductase 활성의 변화는 Table 6에서 보는바와 같다. 간 microsome 분획중의 cytochrome P-450 함량은 Fthalide의 투여횟수가 증가함에 따라 약간 증가하는 경향이 있으나 유의성은 없었다. 간 microsome 분획중의 NADPH-cytochrome c reductase 활성은 대체로 대조군과 유사한 경향을 나타내었다.

Hart등²⁴⁺²⁵⁾은 rat에 유기염소계 살충제 투여에 의하여 약물대사효소의 활성이 증가하였으며 다른 약물들의 대사를 활성화시켰다고 보고한바 있다.

Ikegami²¹⁾등은 유기염소계 살충제가 rat에서 간장의 vitamin-A 감소와 약물대사효소인 P-450 유도 상관성이 있다고 보고하였다.

신장 microsome 분획중의 cytochrome P-450

함량 및 NADPH-cytochrome c reductase의 활성은 Fthalide를 투여할때 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. Fthalide는 주로 간에서 대사되어 쉽게 신장을 통해 배설되는데 주 대사산물은 3, 4, 5, 6-tetrachloro-2-hydroxymethylbenzoate와 미반응의 fthalide라고 보고되어 있다⁷⁾, 본 실험에서도 fthalide를 투여할때 신장에서 약물대사효소의 활성이 미약하게 증가하는 경향이 보이는 것은 일부 미대사산물이 신장에 도달되어 약하게 약물대사효소를 유도하는데 영향을 미치는 것으로 사료된다.

5. 간장 및 신장 microsome 분획중의 protein 함량 변화

간장 및 신장 microsome 분획중의 protein 함량의 변화는 Table 7에서 보는 바와 같다. 간장 microsome 분획중의 protein 함량은 fthalide를 투여한 군에서 증가하였으며 투여횟수가 증가할수록 증가폭도 컸다. 그러나 신장 microsome 분획중의 protein함량은 각 실험군에서 거의 변화가 없이 유사한 경향을 나타내었다.

일반적으로 microsome 분획중의 protein 함량은 약물대사효소의 활성과 관계가 있으며 본 실험에서도 protein 함량 증가는 약물대사효소의 활성증가

Table 6. Effect of fthalide on hepatic & renal microsomal cytochrome P-450 contents, NADPH-cytochrome c reductase activity in rats.

Groups	Days	Liver		Liver	
		P-450	Cyto. c red.	P-450	Cyto. c red.
Control	3	0.795±0.043	114.50±8.79	0.375±0.029	9.43±0.74
	6	0.790±0.072	119.45±7.94	0.396±0.034	9.16±0.65
	9	0.784±0.109	120.38±6.43	0.384±0.027	9.45±0.59
	12	0.804±0.062	117.84±7.52	0.390±0.045	9.54±0.43
Fthalide	3	0.794±0.074	136.95±8.95	0.414±0.052	9.12±0.97
	6	0.843±0.065	130.49±5.43	0.444±0.085	9.43±0.45
	9	0.901±0.019	130.59±7.62	0.524±0.069	9.76±0.54
	12	1.089±0.074*	134.39±4.75	0.532±0.045	9.83±0.36

Each value is the mean±SE

Significant difference between control & treated group. (*; p<0.05)

P-450: Cytochrome P-450 (n mole/mg protein).

Cyto. c red.: NADPH-cytochrome c reductase

-Fthalide 100mg/kg

Table 7. Effect of fthalide on hepatic and renal microsomal protein concentration (mg/g wet weight) in rats.

Groups	Days	Liver	VP (%) ^a	Kidney	VP (%) ^a
Control	3	21.83±0.65	—	18.86±0.45	—
	6	22.79±0.54	—	18.75±0.25	—
	9	23.15±0.87	—	18.92±0.48	—
	12	23.26±0.73	—	19.04±0.56	—
Fthalide	3	22.64±0.74	3.24	19.43±0.36	2.48
	6	23.72±4.08	4.08	19.84±0.21	5.81
	9	25.04±0.71	8.16	20.01±0.40	5.75
	12	25.53±0.92	9.76	20.74±0.56	8.93

Each value is the mean±SE
 a : Variation percent
 -Fthalide 100 mg/kg

와 비례하는 경향을 보여주고 있다.

7. 간장 microsome 분획중의 과산화지질의 변화

간장 microsomal 분획중의 과산화지질의 변화는 Table 8에서 보는 바와 같다. Fthalide를 투여한 군에서는 모두 대조군에 비해 약간씩 증가하였으며 12일 투여에 의해서는 유의성있는 증가를 나타내었다. 이것은 fthalide가 생체 인지질막 등 불포화 지방산을 산화시켜 과산화지질로 변화시키는 것으로 사료된다. Feuer²⁶⁾등은 간독성 물질인

CCl₄를 투여하였을때 과산화지질의 함량이 증

Table 8. Effect of fthalide on hepatic microsomal TBA-value in rats.

Groups	Days	TBA-value	VP (%) ^a
Control	3	1.569±0.043	—
	6	1.604±0.016	—
	9	1.625±0.045	—
	12	1.609±0.017	—
Fthalide	3	1.572±0.035	0.19
	6	1.696±0.043	5.16
	9	1.732±0.029	6.58
	12	1.795±0.042	11.56

Each value is the mean±SE
 Unit; nM/min/mg protein.
 a; Variation percent
 -Fthalide 100 mg/kg

Table 9. Effect of fthalide on hepatic glucose-6-phosphatase activity in rats.

Groups	Days	G-6-Pase	VP (%) ^a
Control	3	73.394±5.25	—
	6	72.747±6.45	—
	9	73.299±3.95	—
	12	75.724±6.04	—
Fthalide	3	74.214±3.09	-0.24
	6	72.452±6.21	-0.40
	9	65.856±5.43	-10.15
	12	66.779±4.36	-17.10

Each value is the mean±SE
 Unit; nM/min/mg protein.
 a; Variation percent
 -Fthalide 100 mg/kg

가하였다고 보고하였다.

9. 간장 glucose-6-phosphatase 활성 변화

간장중의 glucose-6-phosphatase 활성변화는 Table 9에서 보는 바와 같다. Fthalide의 투여 횟수가 증가함에 따라 이 효소의 활성이 감소되었으나 유의성있는 변화는 볼 수 없었다.

Glucose-6-phosphatase는 endoplasmic reticulum과 관련이 있고 이 효소의 활성저하는 특히적으로 organella의 손상을 반영한다고 한다.

Feuer²⁶⁾은 10종의 간독성물질을 rat에 투여할

때 모두 이 효소의 활성이 저해된다고 보고하였다. 또한 Grice등²⁷⁾은 glucose-6-phosphatase 활성 변화가 초기 간손상의 지표로 이용되며 조직학적으로 검출되는 장기손상에 앞서서 일어난다고 보고하였다. 본 실험결과 fthalide를 투여한 군에서는 간장 손상에 영향을 주지 않았지만 장시간 투여한 군에서는 간장의 손상을 일으키는 것으로 사료된다.

10. 간장 및 혈청 cholinesterase 활성 변화

간장 및 혈청중 cholinesterase 활성 변화는 Table 10에서 보는 바와 같다. 간장 cholinesterase

활성 변화는 fthalide의 투여횟수가 증가함에 따라 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었다. 혈청 cholinesterase 활성 변화는 간장 cholinesterase 활성 변화와 유사한 경향을 보이나 간장에서보다도 더욱더 감소하는 경향이 있었다.

Reihold등²⁸⁾은 cholinesterase의 활성이 유기인계 살충제와 같이 acetylcholinesterase에 직접 작용하는 화합물에 의해 주로 억제되나 그 이외 염소계 농약이나 간손상 및 영양부족 상태에서도 감소된다고 보고한 바 있다.

Table 10. Effect of fthalide on hepatic and serum cholinesterase activity in rats.

Groups	Days	Liver	VP (%) ^a	Serum	VP (%) ^a
Control	3	3.436±0.24	—	2.556±0.14	—
	6	3.529±0.21	—	2.605±0.13	—
	9	3.504±0.35	—	2.596±0.19	—
	12	3.605±0.29	—	2.543±0.25	—
Fthalide	3	3.225±0.31	-0.32	2.456±0.18	-3.91
	6	3.256±0.29	-7.74	2.243±0.16	-13.90
	9	3.217±0.43	-8.19	2.209±0.20	-14.91
	12	3.096±0.25	-14.12	2.145±0.26	-17.50

Each value is the mean±SE

Unit; Liver ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ wet wt.), Serum ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$)

a; Variation percent.

-Fthalide 100 mg/kg

Table 11. Effect of fthalide on hepatic and serum carboxylesterase activity in rats.

Groups	Days	Liver	VP (%) ^a	Serum	VP (%) ^a
Control	3	28.49±1.69	—	112.43±8.30	—
	6	28.72±1.57	—	109.85±7.21	—
	9	27.94±1.09	—	108.76±9.43	—
	12	28.15±1.74	—	110.64±7.92	—
Fthalide	3	29.42±1.73	3.26	115.96±7.25	3.14
	6	30.15±1.25	4.98	116.21±7.01	4.91
	9	31.35±1.96	6.83	118.21±5.96	8.79
	12	34.35±2.71	9.10	121.49±7.06	12.72

Each value is the mean±SE

Unit; Liver (μM β -naphthol/g wet wt./ hr.)

Serum (μM β -naphthol/ml/hr.)

a; Variation percent.

-Fthalide 100mg/kg

11. 간장 및 혈청 carboxylesterase 활성 변화

간장 및 혈청중 carboxylesterase의 활성 변화는 Table 11에서 보는 바와 같다. 간장중의 carboxylesterase 활성 변화는 fthalide를 투여할때 점차 증가하는 경향이였으며 혈청 carboxylesterase 활성 변화는 간장의 carboxylesterase와 유사한 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다.

결 론

혈액상의 변화에서는 fthalide 투여군에서 WBC 값이 대조군에 비해 감소하는 경향이 있었으며, 혈청생화학 변화는 AST, LDH의 활성 및 glucose 량이 대조군에 비해 증가하였다. Fthalide 투여군에서 간장 cytochrome P-450은 함량 12일 투여군에서 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다. 신장 cytochrome P-450 및 간장 및 신장의 NADPH-cytochrome c reductase 활성변화는 증가하는 경향은 있으나 유의성은 없었다.

간장에서 과산화지질 및 glucose-6-phosphatase 활성 변화는 유의성이 없었으나 fthalide를 장시간 투여할때 증가하였다. Cholinesterase 및 carboxylesterase 활성변화는 간장, 혈청에서 모두 유사한 경향을 나타내었다. Cholinesterase는 fthalide를 12일간 투여한 군에서 유의성있게 감소하였으며 carboxylesterase의 활성은 투여횟수가 증가함에 따라 대조군에 비해 약간씩 증가하였다. 따라서 fthalide의 포유동물에 대한 급성독성은 매우 약하다는 것을 알수 있었다.

REFERENCES

1. 青水勝道, 内田宋三郎 : 特公昭 44-32592. (1969)
2. K. Nambu: *Jpn. Pestic. Inf.* 10, 73. (1972)
3. M. Ishida & K. Nambu: *Noyaku Kagaku* 3, 10(1975)
4. T. Tokuda, M. Nishiki, H. Hoshi, K. Shinoda, M. Ishida & T. Misato: *J. Pesticide Sci.* 1, 283(1976)
5. I. Yamaguchi, S. Sekido. H. Seto & T. Misato: *J. Pesticide Sci.* 8, 545(1983)
6. T. Chida: Studies on mechanism of controlling action of fthalide aganist Rice Blast Disease. *Japan Pesticide Science.* 14, 363-371. (1989)
7. R. Sato, S. Teramoto, Y. Shirasu: Two-generation reproduction studies in rats with fthalide. *J. Pesticide Sci.* 5, 357-361(1980)
8. Carlson, G.P. and Schoenig, G.P.: Introduction of liver microsomal NADPH-cytochrome c reductase and cytochrome P-450 by some new synthetic pyrethroids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 52, 507-512(1980)
9. Kamath, S.A., Kummerow, F.A. and Narayan, K.A.: A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes. *FEBS Letters*, 17, 90-92 (1971)
10. Cinti, D.L., Moldeus, P. and Schenkman, J.B.: Kinetic parameters of drug metabolizing enzymes in Ca^{2+} -sedimented microsomes from rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 21, 3249-3256 (1972)
11. Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378(1964)
12. Matsubura, T., Koike, M., Touchi A., Tochino, Y. and Sugeno, K.: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Analytical Biochemistry*, 75, 596-603(1976)
13. Masters, B. S. S., Willism, Jr., C.H. and Kamin, H.: The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver. In *enzymology* (edited by Estabrook, R.W. and Pullman, M.E.). *Academic Pres. New York.* 10, pp 565-573(1967)
14. Mazel, P.: Comparison of microsome from control and phenobarbital treated rats as to NADPH-cytochrome c reductase activity. In *fundamentals of Drug Metabolism and Drug*

- Disposition (edited by La Du, E.N., Mandel, H. G. and Way. E.L.), pp. 575-577 (1972)
15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1971)
 16. 大石誠子: 過酸化脂質 測定法 最近醫學 33, 660 (1966).
 17. Traiger, G.J. and Plaa, G.L.: Differences in the potentiation of carbon tetrachloride in rats by ethanol and isopropanol pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20, 105-112 (1971).
 18. Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400 (1925).
 19. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Ander, Jr., V. and Featherstone, R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95 (1961).
 20. Nachlas, M.M. and Seligman, A.M.: Evidence for the specificity of esterase and lipase by the use of three chromogenic substrates. *J. Biol. Chem.*, 181, 343-355 (1949).
 21. Ikegami, S., Tsuchihashi, F., Nishide, E.: Decrease in hepatic storage of Vitamin A and induction of cytochrome P-450 by dietary organochlorine pesticides in rats. The National Institute of Health and Nutrition, Japan, 2, 1-7 (1992).
 22. Dikshith, T.S.S., Datta, K.K., Raizada, R.B. and Kushwah, H.S.: Effects of paraquat dichloride in male rabbits. *Indian Journal of Experimental Biology*, 17, 926-928 (1979).
 23. Cornish, H.H., Barth, M.L. and Dodson, V.N.: Isozyme profiles and protein patterns in specific organ damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 411-423 (1970).
 24. L.G. Hart & J.R. Fouts: Effect of acute and chronic DDT administration on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. *Proc Soc. Exptl. Biol. Med.* 114, 388-392 (1963).
 25. L.G. Hart, R.W. Shultice, J.R. Fouts: Stimulatory effects of chlordane on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 5, 371-386 (1963).
 26. Feuer, G., Golberg, L., and Le Pelley, J.R.: Liver response tests, I. Exploratory studies on glucose-6-phosphatase and other liver enzymes. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, vol. 3, pp 235-249 (1965).
 27. Grice, H. C.: The changing role of pathology on modern safety evaluation. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1, 119-152 (1972).
 28. Reinhold, J.G., et al: Measurement of serum CHE activity. *Amer. J. Clin. Path.* vol. 23, p645 (1953).