

## 잉어稚魚와 금붕어에 대한 folpet의 急性 및 亞急性毒性에 관한 연구

허강준 · 이영순\* · 임윤규\*\*

충북대학교 수의과대학 수의학과 어류질병학연구소

서울대학교 수의과대학\*

제주대학교 농과대학 수의학과\*\*

(1994년 3월 2일 접수)

### Acute and subacute toxicity of folpet to fingerings of common carp, *Cyprinus carpio* and goldfish, *Carassius auratus*

Gang-joon Heo, Yong-soon Lee\*, Yoon-kyu Lim\*\*

Department of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University\*\*

(Received March 2, 1994)

**Abstract** : The acute and subacute toxicity of fungicide folpet was evaluated in fingerings of common carp, *Cyprinus carpio* and goldfish, *Carrassius auratus*. Dipping of fishes for acute toxicity was performed for a period of 24h, and the TLm value(median tolerance limit) was 1.52 ppm in common carp and 1.45 ppm in goldfish.

Severe damages were observed in various organs and among them, clubbing of gill lamella, lytic degeneration and vacuolation of liver cells, and epithelial edema of renal tubules were relatively prominent. The most significant changes were hyperbasophilic foci of liver cells in subacute toxicity test and these can imply the possibility of hepatocarcinogenicity of folpet.

**Key words** : folpet, toxicity, hyperbasophilic foci, common carp, goldfish

## 서 론

최근 환경의 오염은 날로 심해지고 있으며, 그 중에서도 생활하수, 산업폐수 및 축산폐수 등으로 인한 수질오염은 우리나라에서 그 피해의 정도가 더욱 심각하여 수자원의 이용을 제한하고 있다. 이 중에서도 각종 농약의 사용에 의한 영향은 수질오염의 주요 원인이 되고 있으며, 하천 및 인근수역의 생태계에 미치는 피해 또한 크다고 할 수 있겠다.<sup>10,11</sup>

한편 수생동물인 어류는 이러한 수질오염에 민감하게 반응하여 자주 어류의 집단폐사의 원인이 되고 있

다. 이러한 어류의 발병원인이나 폐사기전을 연구함에 있어서 부검이나 광학현미경 및 전자현미경 등을 이용한 병리학적 관찰조건은 매우 유효한 수단이 되고 있다. 어류의 조직은 인간을 포함한 포유동물과 거의 유사하여 비교병리학적인 측면에서도 어류의 독성병리 실험은 많이 이용되고 있는 실정이다. 이와 같은 어류 독성 연구의 발전에 의하여 어류를 실험동물로 사용한 각종 농약에 의한 독성병리실험은 다수 보고되고 있으나,<sup>1,7</sup> 일부 농약 성분에 대한 연구는 아직 구체적으로 시행되지 않고 있는 실정이다. 이러한 농약에 대한 어류독성 영향 평가에 대한 결과 물고기는 아가미에 병변

을 일으켜 그 결과 호흡곤란에 의한 사망을 일으킨다는 보고가 있으나,<sup>8,9,12</sup> 다른 기관에의 영향이나 일부의 다른 농약성분에 대한 독성실험에 대해서는 그 연구가 미비한 상황이다.

folpet의 화학명은 N-(trichloromethylthio) phthalimide( $C_9H_4Cl_3NO_2S$ )로 과일이나 채소류의 방미제(fungicide)로 사용되고 있다. 수정과 같은 무색으로 실온에서 물 1 liter에 1 mg을 녹일 수 있으며 물에 의해서 천천히 가수분해되고 alkali와 재빨리 결합하는 특성을 갖고 있다. 또한 folpet은 점막표면에 자극독성을 갖는 물질로서 rat를 사용한 동물실험에서 그 LD<sub>50</sub>가 >5000 mg/kg으로 보고되어 있다.<sup>13</sup>

예를 들면 DDT와 dieldrin와 같은 유기염소계 살충제는 그 안정성과 환경잔류성의 특성으로 농업에서의 유기인계 살충제의 사용을 증가시켜왔으며, diazinon과 malathion은 여러나라에서 가장 많이 쓰이는 유기인계 살충제이다. 이러한 농약들은 인간에게 안전하다고 알려진 양이라하더라도 수중환경에 규칙적으로 노출될 경우 어류와 다른 수중생물들에게 위험을 줄 수 있다.<sup>2</sup> 또한 문헌상으로는 송사리나 물벼룩을 비롯한 다양한 수중생물에 대해 급성독성시험을 한 농약들이 다수 보고되어 있지만<sup>8,9,12</sup> 잉어를 비롯한 담수어종에 대한 folpet의 연구결과는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 잉어의 치어와 금붕어를 실험동물로 사용하여 현재 농약으로 사용되고 있는 folpet이 어떠한 어류독성을 갖고 있는가를 병리학적으로 검사하여 어류에 대한 독성 정도 및 영향을 구체적으로 밝혀내고, 환경에 대한 영향이 적은 즉 수중생태계는 물론 가축과 인간에 미치는 영향을 최소화하는 농약을 개발함에 있어서 그 방향을 결정하고자 하는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

공시약제 : 방미제(fungicide)으로 알려진 folpet(=N-(trichloromethylthio) phthalimide)을 공시약제로 사용하였다.

공시어종 : 잉어(carp, *Cyprinus carpio*)의 건강한 치어(평균체장  $6.3 \pm 0.4$  cm, 평균체중  $5.1 \pm 0.5$  g)와 금붕어(goldfish, *Carassius auratus*)의 성어(평균체장  $4.5 \pm 0.3$  cm, 평균체중  $3.5 \pm 0.4$  g)를 충청북도 내수면 시험개발장의 양어지에서 무작위로 400~500마리씩 채집하여 실험을 시작할 때까지 수조 내에서 일주일간 실험조건에서 적응을 시켰다. 또한 적응기간 동안 사료

는 1일 1회 투여하였고, 실험을 시작하기 18시간 전부터 절식을 시켜서, 실험실에서의 독성시험에 사용하였다.

실험수조 : 각 공시어는 20 마리씩을 한 군으로 하여 공기주입장치와 순환여과장치 그리고 형광등이 설치된 40 liter의 유리수조에서 사육하였다. 수조의 수온은  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

반수생존농도(=TLm<sub>24h</sub>)의 측정 : 시험을 시작하기 전에 공시약제를 0.1 ppm부터 농도별로 10배 희석의 계열을 준비한 후 20마리의 공시어를 넣어 예비실험을 행하였다. 대략의 TLm<sub>24h</sub>을 측정하여 다음에 희석계열의 농도간격을 더욱 좁게 하여 정확한 TLm<sub>24h</sub>(LC<sub>50</sub> = median tolerance limit)을 결정하였다. 이와 같이 시험 결과로부터 TLm<sub>24h</sub>을 구하기 위하여 다도로프법을 사용하였다. 즉 편대수 그래프의 배수농금(x축)에 공시약제의 농도를 적고 보통농금(y축)에는 생존율을 적어서 측정된 생존율이 50%보다 높은 점과 낮은 점에서 가장 50%에 가까운 것을 선택하였다. 이 양점을 직선으로 연결하여 50%선과 교차하는 점의 농도를 TLm<sub>24h</sub>으로 하였다.

급성독성시험 : 반수생존농도의 공시약제를 희석한 수조내에 공시어를 24시간 동안 사육하면서 유영상행동의 행동소견과 폐수정도를 대조군과 비교 관찰하였다. 시험 도중 사망한 어체는 발견 즉시 제거하였으며, 생사의 판정은 어체에 자극을 주었을 때의 반응의 유무를 기준으로 하였다. 그리고 죽은 직후의 공시어를 부검하여 내장소견을 관찰하고 병리조직학적 분석을 행하여 그 독성에 의한 병리학적인 변화를 검사하였다.

아급성독성시험 : 공시약제를 0.2 ppm농도로 희석한 실험수조에서 3개월 동안 공시어 30마리를 사육하였다. 사육수는 3일 간격으로 환수하였으며, 환수 후에는 공시약제의 농도를 일정하게 유지하여 주었다. 시험 기간동안 공시어의 외부소견 및 폐사상황 등을 관찰하고, 질병의 발생의 유무, 수질변화(수온, pH, 용존산소량 등)를 살피고, 병리조직학적검사 등을 통하여 장기간에 걸친 시험약제의 독성을 검토하였다.

병리조직학적 검사 : 공시어를 급성 및 아급성독성시험 후 두경부 절단에 의하여 즉살시킨 후 어체의 크기에 따라 2~3등분하여 횡절단하였다. 이를 포르말린 10% 완충용액에 24시간동안 고정시킨 후 8% 개미산수용액(formic acid, HCOOH)을 사용하여 산탈회 처리를 하였다. 다음에 에탈알코올 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매를 한 후, 4~5 $\mu\text{m}$ 의 파라핀 조직절편을 제작하여 hematoxylin and eosin(H & E)염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

TLm<sub>24h</sub>의 측정 : 0.1 ppm부터 단계 농도별로 준비를 하여 잉어와 금붕어에서 예비실험을 행한 결과, 1~2 ppm 사이에서 반수생존농도를 나타내었다. 농도의 간격을 좁게 하여 본 실험을 행하여 TLm<sub>24h</sub>을 다도로프법에 의해 구한 결과 잉어의 TLm<sub>24h</sub>은 1.52 ppm이었고, 금붕어의 TLm<sub>24h</sub>은 1.45 ppm이었다(Table 1).

Table 1. Acute toxicity of folpet in fishes

Fish	Body weight (g)	Body length (cm)	Water temp (°C)	Time (hr)	TLm <sub>24h</sub> (ppm)
Medaka	0.25	2.8	25	24	0.86
Goldfish	3.5	4.5	25	24	1.45
Carp	5.1	6.3	25	24	1.52

### 급성독성

1) 외부소건의 관찰 : 공시어는 TLm<sub>24h</sub>의 농도에서 5~6시간 후부터 바닥에 가라앉기 시작하였으며 아가미운동이 완만해지기 시작하였다. 또한 체표로부터 다량의 점액을 분비함이 인정되었다. 12시간이 지나면서부터는 유영운동을 멈추거나 바닥에 가라앉은 물고기 중에서 건드려도 반응이 없이 사망하는 개체가 발생하였다.

2) 병리조직학적 소견 : 반수생존농도 이하의 농도에서는 모든 잉어와 금붕어의 아가미가 정상적인 소견을 나타내었으나, TLm<sub>24h</sub> 이상의 농도에서는 새박판 상피세포의 탈락과 증생으로 인한 새변의 곤봉화가 인정되었으며(Fig 1), 간장에서는 간세포질의 용해 및 공포화와 소견을 관찰할 수 있었다(Fig 2). 신장에서는 약간의 세뇨관 상피세포의 부종 현상을 관찰할 수 있었으며(Fig 3), 소화기에서는 일부 개체에서 약간의 장관점막 상피세포의 탈락현상이 관찰되었다. 그러나 비장 및 그 밖의 장기는 정상적인 소견을 나타내었다.

### 아급성독성

1) 외부소건의 관찰 : 3개월 동안 공시어를 0.2 ppm의 농도로 희석된 수조에 사육하면서 관찰한 결과 대부분의 공시어에서 섭이상황이나 유영상황이 거의 정상 개체와 다름없이 활발하였으나, 전반적으로 체표로부터 점액분비가 지속적으로 증가하는 경향을 보였다. 또한 외부소견도 거의 정상개체와 다름없었다.

2) 병리조직학적 소견 : 잉어와 금붕어 모두 같은 병리학적 소견을 나타내었다. 우선 아가미의 경우 개체에 따라 약간 차이가 있는 새박판 상피세포의 탈락과 기저부의 증생(hyperplasia)이 관찰되었으며(Fig 4). 급성독성 시험에서 볼 수 있었던 새변의 곤봉화는 인정되지

않았다. 또한 외부소견에서 관찰할 수 있었던 점액분비의 증가는 병리조직학적 소견에서도 체표의 점액분비세포의 비대가 관찰됨으로써 입증되었다(Fig 5). 간장에서의 유의할 만한 변화는 간세포질의 용해 및 공포화와 함께 특이한 소견으로써 간세포질의 호염기성 집락(hyperbasophilic foci)이 인정되었다(Fig 6). 신장에서는 세뇨관상피의 부종현상이 관찰되었는데 이는 급성독성 시험에서 관찰되는 것보다 더욱 심하게 나타나 거의 세뇨관을 폐색시킬 정도의 상피세포의 부종을 관찰할 수 있었다. 한편 췌장, 비장 및 장관에서는 별다른 변화가 인정되지 않았다.

## 고 찰

공시약제의 송사리(medaka, *Oryzias latipes*)에 대한 독성시험(평균체장 2.8 cm, 평균체중 0.25 g의 송사리를 수온 25°C의 2 liter의 수조에서 24시간 동안 시험함)을 행한 결과 그 TLm<sub>24h</sub>는 0.86 ppm이었다.<sup>8,9</sup> 그러나 잉어의 TLm<sub>24h</sub>은 1.52 ppm이었고, 금붕어의 TLm<sub>24h</sub>은 1.45 ppm이었다. 이상에서 온수성 어종인 잉어와 금붕어는 두배 가까이 용존산소량을 필요로 하는 냉수성 어종인 송사리보다도 folpet에 대한 감수성이 낮음을 알 수 있었다.

독성시험에서 관찰된 외부소견에서 공시어의 폐사원인은 각종 농약성분의 독성시험에서와 마찬가지로 아가미의 점막상피조직에 자극을 주어 생체 방어기전에 의한 과다한 점액의 분비를 동반한 호흡곤란을 야기하여 사망한 것으로 사료되었다.<sup>8,9,12</sup>

즉 folpet의 독성이 아가미의 상피조직 세포에 강한 자극을 주어, 상피세포의 용해 및 탈락을 일으키고, 새박판 기저부의 상피세포의 과다한 증생을 유발하여, 새박판이 서로 융합된 것과 같은 새변의 곤봉화를 야기하였다. 이와 같은 상황에서는 아가미의 호흡작용을 담당하고 있는 상피조직의 면적이 극도로 감소함으로써, 모세혈관에서의 충분한 이산화탄소와 산소의 교환이 이루어지지 않아 산소부족으로 질식 상태에 이르러 사망한다.<sup>8</sup>

또한 아급성 독성시험의 0.2 ppm의 농도에서는 아가미의 점막이 자극을 받아 그 방어기전으로 점액이 계속적으로 분비되나, 상피세포의 탈락 및 증생으로 인한 호흡곤란을 일으킬 정도의 독성이 아니었으며 대부분이 체내에서 생분해된다고 사료되었다.

병리조직학적 소견으로는 0.2 ppm 농도의 folpet이 아가미에게 그다지 현저한 독성을 주지는 않았으나, 상

피조직에 지속적인 자극을 주어 이로 인해 상피조직의 기저부에 증생이 일어났음을 알 수 있었다. 또한 체표에 있어서도 지속적인 자극으로 말미암아 체표의 상피에 존재하는 점액분비 세포가 극도로 비대하였음이 인정되었다. 간장에서의 유의할 만한 변화는 간세포질의 용해 및 공포화와 함께 특이한 소견으로써 간세포들의 호염기성 집락(hyperbasophilic foci)이 인정되었다. 이러한 과염기성 간세포들은 대부분의 개체에서 관찰되었으며 개체당 평균 2~3개소에서 이러한 집락을 발견할 수 있었다. 신장에서는 세뇨관상피의 부종현상이 관찰되었는데 이는 급성독성 시험에서 관찰되는 것보다 더욱 심하게 나타나, 거의 세뇨관을 폐색시킬 정도의 상피세포의 부종을 관찰할 수 있었다. 일반적으로 대부분의 독성물질은 간장에서 생분해가 된다고 사료되나 배설기관인 신장에서 일부 분해되지 않은 folpet성분이 세뇨관상의 상피세포에 영향을 미쳤음이 인정되었다.

환경중의 화학물질은 수생생물인 어류에 있어서 여러가지 영향을 미칠 수 있는데, 이러한 화학물질은 어류에 있어서 종양을 유발할 수 있다.<sup>3,5</sup> 무지개송어에서 aflatoxin B<sub>1</sub>을 투여함으로써 간암을 유발함은 잘 알려진 사실로서 aflatoxin B<sub>1</sub>에 노출된 무지개송어의 간장에 있어서 그 병리학적 진행과정을 살펴보면, 초기단계에 있어서는 다핵의 거대세포와 함께 결과적으로 간세포의 퇴행 및 괴사가 진행된다. 그 다음에 간세포는 종창되고 glycogen 과립이 결여된 호산성의 간세포가 관찰되며 이는 왕성한 유사분열과 함께 소결절화의 경향을 보여 침윤현상과 함께 림프구에 의해 둘러싸인다. 세번째 단계에서는 호염기성의 간세포와 약간 종창된 소포성의 핵이 나타난다. 마지막으로 높은 호염기성의 경향을 보이는 세포들이 소주(trabeculae)를 형성하며, 세포질에 대한 핵의 비율이 증가하며 왕성한 핵분열과 함께 주위의 정상적인 세포조직들을 압박, 침투한다고 보고하였다.<sup>4,6</sup>

본 연구에서 나타난 간세포들의 호염기성 집락의 결과를 aflatoxin B<sub>1</sub>에 의해 유발된 간암의 병리학적 진행 단계에 그대로 적용시킬 수 있는가는 folpet이 어류에 대해 발암원성을 가질 수 있는가를 결정하는 중요한 열

쇠가 될 것으로 보인다. 관찰조건만으로 보면 간세포의 집락화, 염기화 및 왕성한 핵분열 등은 위에 서술한 종양화단계의 중간과정을 밟고 있는 것처럼 보인다. 그러나, aflatoxin B<sub>1</sub>에 의해 유발한 간암화 단계에서 호염기성의 병소가 출현하기 위해서 4~6개월 정도의 노출기간이 필요한데 비해, 본 연구에서는 노출기간이 비교적 짧았던 점을 고려할때, 이를 종양화와 곧바로 연결시키는 것은 무리가 있으며, 단지 발암원의 가능성을 추측할 수 있다.

## 결 론

본 연구에서 folpet을 사용한 급성독성시험 결과 잉어의 TLm<sub>24h</sub>은 1.52 ppm이었고, 금붕어의 TLm<sub>24h</sub>은 1.45 ppm이었다. 또한 공시어는 바닥에 가라 앉으면서 유영을 멈추고 아가미덮개의 움직임이 완만하였으며, 체표로부터 다량의 점액을 분비함이 인정되었다. 병리조직학적 소견으로서는 아가미의 상피세포 탈락과 곤봉화, 간세포의 용해와 공포화가 인정되었으며, 그리고 신장에서 약간의 세뇨관 부종과 소화기 상피세포의 탈락을 관찰할 수 있었다.

아급성독성시험에 있어서 대부분의 개체에서 섭이상황이나 유영상황이 정상개체와 다름없이 활발하였으나 전반적으로 점액분비가 지속적으로 증가하는 경향을 보였다. 병리조직학적 소견으로서는 아가미의 경우에 개체에 따라 약간의 정도 차이가 인정되는 새박관 기저부의 증생이 관찰되었으며, 체표의 점액분비 세포비대를 관찰할 수 있었다.

또한 간장에서의 유의할 만한 변화는 간세포질의 용해 및 공포화와 함께 특이한 소견으로써 간세포들의 과염기성 집락이 인정되었다. 이러한 호염기성 간세포들은 대부분의 개체에서 관찰되었으며, 개체당 평균 2~3개소에서 이러한 소견을 관찰할 수 있었다. 신장에서는 거의 세뇨관을 폐색시킬 정도의 세뇨관 상피세포의 부종현상이 관찰되었다. 한편 췌장, 비장 및 장관에서는 별다른 변화가 인정되지 않았다.

## Legends for photographs

Fig 1. Light photomicrograph of gill of common carp treated 1.52 ppm folpet for 24 hrs after exposure. Clubbing of gill lamella due to hyperplasia of second gill lamellas is evident. X 100, H & E stain.

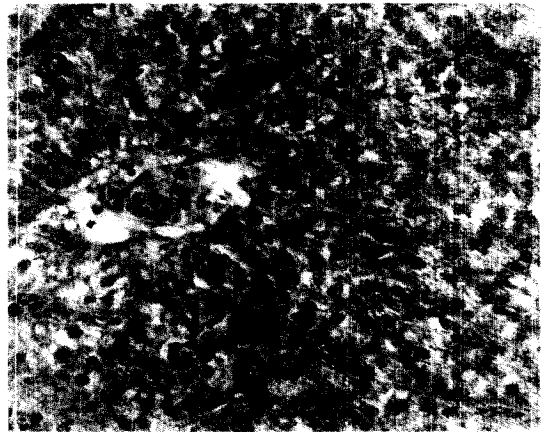
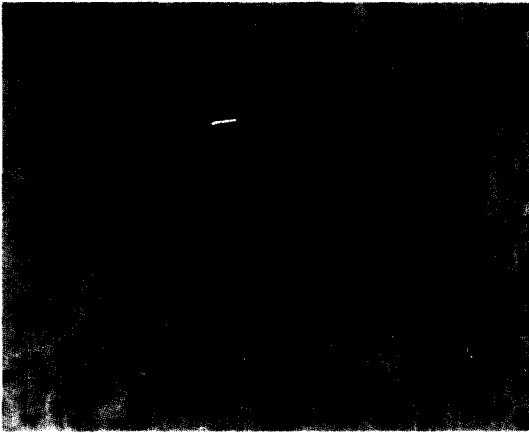
Fig 2. Light photomicrograph of liver of common carp treated 1.52 ppm folpet for 24 hrs after exposure. Lytic degeneration and vacuolation of liver cells are appeared. X 200, H & E stain.

Fig 3. Light photomicrograph of kidney of common carp treated 1.52 ppm folpet for 24 hrs after exposure. Epithelial edema of renal tubules are relatively prominent. X 400, H & E.

Fig 4. Light photomicrograph of gill of common carp treated 0.2 ppm folpet for 3 months. Swelling of epithelial cells and slight hyperplasia of basal cells of second gill lamellas are appeared. X 200, H & E stain.

Fig 5. Light photomicrograph of the skin of common carp treated 0.2 ppm folpet for 3 months. Swelling of mucous cells exist in the epidermis. X 200, H & E stain.

Fig 6. Light photomicrograph of liver from common carp treated 0.2 ppm folpet for 3 months. Note possible hyper-basophilic foci of liver cells(arrow). X 200, H & E stain.



## 참 고 문 헌

1. Couch JA. *Histopathological effects of pesticides and related chemicals on the livers of fishes*. In: Ribelin WE & Migaki, A. ed. University of Wisconsin Press 1975; 555-584.
2. La Roche G. Biological effects of short-term exposure to hazardous materials. In *Control of Hazardous Material Spills Houston University of Houston and Environmental Protection Agency*. 1972; 199-206.
3. Matsushima T and Sugimura T. Tumor induction by carcinogenic agents in aquarium fish. *J. Natl. Cancer inst* 1976; 55:129-136.
4. NeWberne PM, Butler WH. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals, *A review Cancer Res* 1969; 29:236-250.
5. Pliss GB, Khudoley W. Tumor induction by carcinogenic agents in aquarium fish. *J.Natl.Cancer Inst* 1975; 55:129-136.
6. Sato S, Matsushima T, Tanaka, et al. Hepatic tumors in the guppy inducer by aflatoxin B<sub>1</sub>, diaethylnitrosamine and 2-acethylaminofluorence. *J. Natl. Cancer inst* 1973; 50:767-788.
7. Sprague JB. Measurement of polluted toxicity to fish.3. Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res* 1971; 5:245-266.
8. 西内康浩, 淺野和他. 農藥製劑の數種淡水水産動物に對する毒性, LIX. 水産増殖 1979; 27(1):48-55.
9. 西内康浩. 農藥製劑の數種淡水水産動物に對する毒性, LXXI. 水産増殖 1980; 27(4):222-237.
10. 西内康浩, 吉田孝二. 各種農藥の淡水産類におよぼす影響. 農藥検査所報告 1972; 12:86-92.
11. 西内康浩. 農藥の水生動物に對する影響評價-I. 生態化學 1981; 4(2); 31-46.
12. 西内康浩, 淺野和他. 農藥製劑の 數種淺水水産動物に對する毒性, LXVII. 水産増殖 1979; 27(3): 186-189.
13. Budavari S. *The Merck Index*. 11th ed. Rahway, NJ: Merck & Co., Inc., 1989; 4147.