

[報 文]

중기발암성시험기법을 이용한 Carbendazim의 간발암성 검색

성하정 · 이제봉 · 정미혜 · 이해근

농업과학기술원 농약안전성과

Hepatocarcinogenic Screening of Carbendazim Using Medium-term Carcinogenicity Bioassay

Ha-Jung Sung, Je-Bong Lee, Mi-Hye Jeong and Hae-Keun Lee

Division of Pesticide Safety, Institute of Agricultural Science and Technology, RDA

ABSTRACT

Carbendazim, which is widely used fungicide, was investigated for rat hepatocarcinogenesis using a medium-term carcinogenicity bioassay. All rats were initially given a single dose (200 mg/kg) of diethylnitrosamine (DEN) i.p. and then, starting 2 weeks later, carbendazim treatment group and positive control group received carbendazim (7 mg/kg/day) and 2-acetylaminofluorene (2-AAF, 1%), respectively, in the diet for 6 weeks. All rats were subjected to two-thirds partial hepatectomy (PH) at week 3 and sacrificed at week 8. Carcinogenic potential was scored by comparing the number and area per cm² of induced glutathione-S-transferase placental form (GST-P) positive foci in the liver. Carbendazim had no effect in the increase of body weight, hematological and biochemical values, and the number and area of GST-P positive foci. These results suggest that this bioassay using DEN-PH method can be useful for detection of hepatocarcinogenic potentials of pesticide.

서 론

농약은 농산물 생산에 가장 큰 장애요인인 병해충과 잡초를 방제하는데 사용되는 약제이므로 잘못 사용하면 농작물에 약해를 일으키거나 농산물, 먹거리 및 환경을 오염시키는 부작용을 일으킬 가능성이 있다.¹⁾

OECD와 보건복지부 등의 독성시험법에 따른 발암성시험에서는 약 2년간 시험물질을 투여하도록 규정하고 있다.^{2,3)} 따라서 발암성시험에 의한 결과를

얻기까지는 막대한 시간, 경비 및 인력이 필요하다. 그러나 매년 합성되는 막대한 수의 신물질에 대한 발암성을 평가하기에는 기존의 인력 및 시설이 현저하게 부족하게 되어, 발암성 진단율이 높은 단기간의 in vivo 평가법의 개발을 위한 활발한 연구가 진행되어왔다. Solt와 Farber⁴⁾는 rat에 암의 initiator인 diethylnitrosamine (DEN)을 1회 투여한 후 암의 promotor인 2-acetylaminofluorene (2-AAF)을 투여하면서 그 사이에 간부분절제술을 실시하여 간세포의 재생을 촉진시키는 간발암모델을 개발하였고, Ito⁵⁾ 등은 전암지표로 glutathione-

S-transferase placental form (GST-P)을 사용한 DEN-PH (diethylnitrosamine-partial hepatectomy) 모델을 개발하여 현재 간암유발물질 검색법 또는 간장 이외의 장기에 발암유발이나 발암억제 효과를 검색할 수 있는 증기다장기 발암성시험법으로 이용되고 있다.

Carbendazim은 benzimidazole계 살균제로, 급성경구 LD₅₀는 rat와 개에서 각각 >15,000과 >2,500 mg/kg이고, 급성경피 LD₅₀는 토끼와 rat에서 각각 >10,000과 >2,000 mg/kg 이상이어서 급성독성측면에서는 안전하지만, 미국 EPA에서는 약간의 발암가능성을 가진 C그룹 (possible human carcinogen)으로 분류하였으며,⁶⁾ 국내등록 사용중인 benzimidazole계 살균제는 4성분 (29개 품목)으로 연간 사용량이 많고 ('95년 990M/T),⁷⁾ 콩나물 재배시에 오·남용으로 사회적으로 문제화되기도 하였다.

본 실험에서는 DEN-PH 모델을 이용하여 benzimidazole계 살균제인 carbendazim의 rat에서의 간 발암성 여부를 검색하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

5주령의 SD계 rat를 대한실험동물(주)에서 분양 받아 실험실에서 1주일간 순화시킨 다음 실험에 사용하였다. 동물사육조건은 온도 23±2°C, 습도 50±10% 그리고 조명시간은 12시간 (오전 7시~오후 7시) 등으로 유지하였으며, 케이지당 3~4마리의 동물을 수용하였고, 사료와 물을 자유로이 급여하였다.

2. 실험물질 투여

각 10마리씩의 동물을 음성대조군, 양성대조군 및 carbendazim투여군으로 나누어 실험개시에는 모든 군의 동물에 DEN (Sigma, USA)을 200 mg/kg 체중 수준으로 생리식염수와 함께 복강으로 1회 투여하였고, 2주 후부터 음성대조군에는 기초 사료를, 농약투여군에는 7 mg/kg/day의 carbendazim을 그리고 양성대조군에는 1% 2-AAF (Sigma, USA)를 실험종료시까지 투여하였으며, 3주 째에는 간장부분 절제술 (좌우 중심엽과 좌측외엽)을 시행하였다 (그림 1).

3. 체중, 사료소비량 및 간중량 측정

실험동물의 체중은 시험시작 직전과 매주 1회 측정하였고, 매주 1일간의 사료소비량을 측정하여 carbendazim의 투여량을 산출하였으며, 그리고 간 조직 채취 시에 간중량을 측정하였다.

4. 혈액 및 혈액생화학적 검사 및 GST-P 양성증식소 측정

부검시 채혈하여 백혈구, 적혈구, 혈소판 및 혈액색농도 등을 자동혈액분석기 (Baker system 9118⁺, Biochem Immunosystems)로 측정하였다. 또한 혈청을 분리하여 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), creatinine, blood urea nitrogen (BUN) 및 총단백질 등을 자동생화학측정기 (System 103, Gilford)로 측정하였다.

부검즉시 간조직을 2~3 mm 두께의 절편으로 만들어 cold acetone에 고정 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 GST-P에 대한 면역염색을 실시하여 자동영상분석기 (IBAS, Kontron)로 cm²당 GST-P 양성 증식소의 수와 면적을 측정하였다.

5. 자료의 통계처리

성적에 대한 유의성 검정은 student's t-test를 실시하였다.

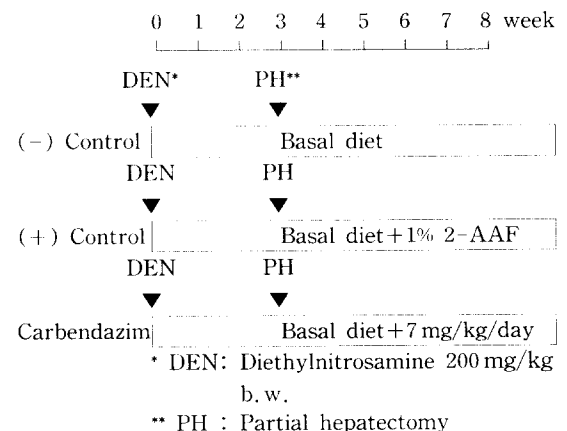


Fig. 1. Experimental design and the schedule of treatment.

결과 및 고찰

투여종료 시에 체중과 간장의 무게를 측정된 결과, 음성대조군, 양성대조군 및 농약투여군에서의 체중은 각각 299.4±4.2 g, 274.5±6.9 g 및 293.2±6.0 g으로 그리고 간상대중량은 각각 2.62±0.06 g, 3.18±0.05 g 및 2.63±0.04 g으로 양성대조군만이 유의한 (p<0.01) 차이를 보였다(표 1).

Table 1. Changes of final body weight and relative liver weight of the rats treated with different chemicals for 8 weeks

Group	(Mean±S.E.)	
	Body weight (g)	Relative liver weight (g/100g b.w.)
Negative control	299.4±4.2	2.62±0.06
Positive control	274.5±6.9**	3.18±0.05**
Carbendazim	293.2±6.0	2.63±0.04

** significantly different from control group (p<0.01)

Table 2. Hematological values of the rats treated with different chemicals for 8 weeks

Group	(Mean±S.E.)			
	WBC ¹⁾ (10 ³ /μl)	RBC ²⁾ (10 ⁶ /μl)	PLT ³⁾ (10 ³ /μl)	HGB ⁴⁾ (g/dl)
Negative control	9.50 ±0.74	8.87 ±0.40	893.6 ±39.4	11.07 ±0.52
Positive control	11.15 ±0.80	8.72 ±0.28	939.7 ±25.5	10.76 ±0.21
Carbendazim	8.77 ±0.45	8.65 ±0.58	922.7 ±83.1	10.71 ±0.71

- 1) WBC : White blood cell
- 2) RBC : Red blood cell
- 3) PLT : Platelet
- 4) HGB : Hemoglobin

부검시에 채혈하여 혈액학적 검사를 실시한 결과, 음성대조군, 양성대조군 및 농약투여군에서의 백혈구수 (10³/μl)는 각각 9.50±0.74, 11.15±0.80 및 8.77±0.45, 적혈구수 (10⁶/μl)는 각각 8.87±0.40, 8.72±0.28 및 8.65±0.58, 혈소판수 (10³/μl)는 각각 893.6±39.4, 939.7±25.5 및 922.7±83.1 그리고 혈색소량 (g/dL)은 각각 11.07±0.52, 10.72±0.21 및 10.71±0.71로 나타나 생리적 범위 내에서 변화를 보여서 유의한 변화가 없었다(표 2).

부검시 채취한 혈액을 냉장원심분리하여 얻은 혈청에서 혈액생화학적 검사를 실시한 결과, GOT, creatinine 및 BUN 등은 모든 군에서 유의한 차이가 없었으나, 음성대조군, 양성대조군 및 농약투여군에서의 GPT (U/L)는 각각 63.0±2.8, 84.6±6.3 및 68.7±4.2으로 그리고 총단백질 (g/dl)은 9.64±0.18, 9.13±0.14 및 9.50±0.12으로 양성대조군에서만 유의한 (p<0.01) 차이를 보였다(표 3).

부검시 채취한 간에서 GST-P에 대한 면역염색을 실시한 결과, 음성대조군, 양성대조군 및 농약투여군에서의 GST-P의 foci 수/cm²는 각각 4.85±0.46개, 20.11±1.70개 및 4.78±0.69개로 그리고 GST-P의 foci 면적/cm²은 각각 0.18±0.02, 5.56±0.37 및 0.21±0.02으로 양성대조군만이 유의하게 (p<0.01) 증가하였다(표 4).

장기간의 발암성시험을 대체할 수 있는 시험법의 개발에 많은 연구가 진행되어, 유발 (initiation)과 촉진 (promotion)의 2단계를 거쳐 발암성을 검색하는 방법이 채택하고 있는 Pitot법⁸⁾과 Peraino법⁹⁾ 등이 일반적으로 인정되었으나, 이 방법들은 관찰기간이 20~39주로 길어서 신속한 검색법이라고 보기에는 어려웠다. 그러나 Ito⁵⁾ 등은 Solt-Farber⁴⁾의

Table 3. Biochemical values of the rats serum treated with different chemicals for 8 weeks (Mean±S.E.)

Group	GOT ¹⁾ (U/L)	GPT ²⁾ (U/L)	Creatinine (mg/dl)	BUN ³⁾ (mg/dl)	Total protein (g/dl)
Negative control	90.9±4.4	63.0±2.8	1.63±0.07	12.7±0.3	9.64±0.18
Positive control	104.1±7.3	84.6±6.3**	1.51±0.07	12.3±0.3	9.13±0.14**
Carbendazim	99.2±8.2	68.7±4.2	1.56±0.11	12.0±0.5	9.50±0.12

- 1) GOT : glutamic oxaloacetic transaminase
- 2) GPT : glutamic pyruvic transaminase
- 3) BUN : blood urea nitrogen
- ** significantly different from control group (p<0.01)

Table 4. Number and area of GST-P¹⁾ foci in the rat liver treated with different chemicals for 8 weeks (Mean±S.E.)

Group	No of foci (No/cm ²)	Area of foci (mm ² /cm ²)
Negative control	4.85±0.46	0.18±0.02
Positive control	20.11±1.70**	5.56±0.37**
Carbendazim	4.78±0.69	0.21±0.02

1) GST-P : glutathione-S-transferase placental form
 ** significantly different from control group (p<0.01)

간발암 모델을 기초로 하여 rat에 DEN을 1회 투여한 후 검색물질을 투여하면서 그 사이에 간부분 절제술을 하여 간변화를 증폭시키고 간전암병변의 지표효소로서 GST-P를 사용하는 8주 간발암성 검색법 (DEN-PH)을 개발하였다. 여기에 사용되는 발암지표인 GST-P는 이전에 간전암지표로 사용되었던 γ -glutamyl transpeptidase보다 더욱 염색성이 뛰어나서 작은 전암병소의 구분이 가능하고, 기타 물질에 의해 비특이적 유발이 되는 경우가 드문 것으로 나타났다.¹⁰⁾ DEN-PH모델은 간발암성 물질의 95%까지 검출해 내어서 좋은 검색법으로 인정받고 있어,¹¹⁾ 현재에는 발암물질과 발암억제물질의 검색에 이용되고 있다.¹²⁾

Carbendazim은 1973년 살균성이 최초로 보고되어 1974년 농약으로 개발되어 탄저병, 겉무늬썩음병, 검은별무늬병, 잭빛곰팡이병, 잎곰팡이병, 둥근무늬낙엽병 및 흰가루병 등에 광범위한 작물에 적용되고 각 나라에서 사용량도 많아서,⁶⁾ 식품의 오염가능성이 크기 때문에 많은 연구가 이루어져 왔다.

Carbendazim은 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 돌연변이시험에서 mitotic spindle에 영향을 주어 chromosome nondisjunction을 야기한다고 하였고,¹³⁾ N-nitroso 화합물과 병용투여하였을 때, swiss mice에서 악성 임파종을 일으킨다고 보고되었다.¹⁴⁾ 그러나 *Drosophila melanogaster*를 이용한 염색체 이상시험,¹⁵⁾ Salmonella-microsome assay 및 소핵시험에서는 돌연변이성이 없는 것으로 나타났는데,¹⁶⁾ 최근의 연구에 따르면 돌연변이는 carbendazim의 합성시 불순물인 2,3-diaminophenazine과 2-amino-3-hydroxyphenazine에 의하여 발생하고, 순수정제된 carbendazim에 의해서는 야기되지 않는 것으로 밝혀졌다.¹⁷⁾

Wilson¹⁸⁾은 돌연변이는 유전적인 요인뿐만이 아니라 에너지원과 기질의 불충분, 효소활성의 억제, 막투과성의 변화 및 삼투압의 불균형과 같은 비유전적 요인들과도 관련 있다고 하였는데 본 시험의 양성대조군에서 체중의 감소, 혈청총단백질량의 저하 및 간장기능 이상 등의 결과는 돌연변이를 초래하는 하나의 원인일 것으로 생각된다.

WHO¹⁹⁾에 따르면 carbendazim은 대부분의 독성 시험에 이상이 없으나, 장기급여시험에서 간장에 이상을 일으키는 것으로 보고되었는데, 이것은 계통특이적인 반응이어서 swiss 마우스와 CD-1 마우스에서만 간암을 유발시키고, 그 이외의 마우스 또는 랫드에서는 발암성이 없는 것으로 보고되어 본 실험의 결과와 일치하였다. 따라서 DEN-PH모델은 농약의 간발암성 검색에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이라 사료된다.

결 론

본 실험에서는 DEN-PH모델을 사용하여 benzimidazole계 살균제인 carbendazim의 rat에서의 간발암성 여부를 검색하고자 수행하였다. 본 실험의 결과, carbendazim은 rat의 체중, 혈액상 및 혈액 생화학치에 영향을 주지 않는 것으로 나타났고, 전암지표인 GST-P의 면역염색에서도 변화가 없어 간발암성이 없는 것으로 증명되었으며, 그리고 중기 발암성시험법인 DEN-PH모델은 농약의 간발암성 유무검색법으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 농업과학기술원, 농약의 사용현황과 안전성. 4-5(1996)
2. OECD, OECD guidelines for the testing of chemicals. 451(1993)
3. 보건복지부, 의약품등의독성시험기준. 식품의약품안전본부 고시 제96-8호(1996)
4. Solt D.B. and Farber E., New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* **263**, 701-703(1976)
5. Ito N., Tsuda H., Tatematsu M., Inoue T., Tagawa Y., Aoki T., Uwagawa S., Kagawa M., Ogiso T. and Masui T., Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione-S-transferase placental

- form positive foci in rats-an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis* **9**(3), 387-394(1988)
6. US/EPA, Office of pesticide programs list of chemical evaluated for carcinogenic potential (1996)
 7. 농약공업협회, 농약연보, (1996)
 8. Pitot H.C. and Sirica A.E., The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **605**, 191-215(1980)
 9. Peraino C., Fry R.J.M., Staffeldt E. and Christopher P., Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantion and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.* **35**, 2884-2890 (1975)
 10. Sato K., Tumor markers with special reference to marker enzymes for chemical hepatocarcinogenesis. *Toxicology Forum* **10**, 55-64 (1987)
 11. Shirai T., A medium-term rat liver bioassay as a rapid in vivo test for carcinogenic potential: a historical review of model development and summary of results from 291 tests. *Toxicol. Pathol.* **25**(5), 453-460(1997)
 12. 김대중 · 한범석 · 조승목 · 안병우 · 문애리 · 이법이 · 김창옥 · 최광식 · 한익수 · 정상우 · 이준섭, 중기다장기 발암모델에서 발암수식인자의 작용기전에 관한 연구(II), 식품 의약품안전본부연보 **5**, 267-277(1992)
 13. Wood J.S., Genetic effects of methyl benzimidazole-2-yl-carbamate on *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **2**(9), 1064-1079(1982)
 14. Borzaonyi M. and Csik M., Induction of malignant lymphomas in swiss mice by n-nitroso compounds formed in vivo. *Int. J. Cancer* **15**(5), 830-838(1975)
 15. Lamb M.J. and Lilly L.J., An investigation of some genetic toxicological effects of the fungicide benomyl. *Toxicology* **17**(1), 83-95(1980)
 16. Dolaro P., Vezzani A., Caderni G., Coppi C. and Torricelli F., Genetic toxicity of a mixture of fifteen pesticides commonly found in the Italian diet. *Cell. Biol. Toxicol.* **9**(4), 333-343 (1993)
 17. Sarrif A.M., Arce G.T., Krahn D.F., O'Neil R.M. and Reynolds V.L., Evaluation of carbendazim for gene mutations in the Salmonella /Ames plate-incorporation assay. *Mutat. Res.* **321**(1-2), 43-56(1994)
 18. Wilson, J.G., Current status of teratology: Handbook of teratology. **1**, 47-74(1977)
 19. WHO, Environmental Health Criteria 149 (carbendazim). 50-85(1993)