大韓獸醫學會誌(2004) 第44卷 第4號
Korean J Vet Res(2004) 44(4) : 523~532

임신 중 살충제 amitraz에 노출된 랫드의 모독성 평가

신진영 · 오기석 · 신동호 · 김성호 · 김형진[1] · 박승춘[2] · 이현숙[3] · 정문구[3] · 김종춘*

전남대학교 수의과대학
[1]한국생명공학연구원
[2]경북대학교 수의과대학
[3]한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

(게재승인: 2004년 9월 15일)

Evaluation of maternal toxicity in rats exposed to the insecticide amitraz during pregnancy

Jin-Young Shin, Ki-Suk Oh, Dong-Ho Shin, Sung-Ho Kim, Hyoung-Chin Kim[1], Seung-Chun Park[2], Hyun-Sook Lee[3], Moon-Koo Chung[3] and Jong-Choon Kim*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National Universiyt, Gwangju 500-757, Korea
[1]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea
[2]College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
[3]Korea Institute of Toxicology, KRICT, Daejeon 305-600, Korea

(Accepted: September 15, 2004)

Abstract : The present study was carried out to investigate the potential adverse effects of amitraz on pregnant dams after maternal exposure during the gestational days (GD) 1 through 19 in Sprague-Dawley rats. The test chemical was administered orally to pregnant rats at dose levels of 0, 3, 10, or 30 mg/kg/day. During the test period, clinical signs, mortality, body weights, food consumption, serum biochemistry, gross findings, organ weights and reproductive findings on GD 20 were examined. In the 30 mg/kg group, an increase in the incidence of abnormal clinical signs and death, a suppression in the body weight gain, and a decrease in the food consumption were observed. A decrease in the liver weight and increases in the kidneys, adrenal glands and heart weights were also found. Serum biochemical investigations revealed increases in the aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin, and chloride. In addition, an increase in the fetal death and decreases in the litter size and fetal body weight were seen at caesarean section. In the 10 mg/kg group, an increase in the incidence of abnormal clinical signs, decreases in the food consumption and liver weight, increases in the total bilirubin and chloride, and a decrease in the fetal body weight were observed. There were no adverse effects on clinical signs, mortality, body weights, food consumption, serum biochemistry, gross findings, organ weights and reproductive findings in the 3 mg/kg group. Based on the results, it was concluded that the 19-day repeated oral dose of amitraz to pregnant rats caused increases in the clinical signs, kidneys, adrenal glands and heart weights, AST, total bilirubin and chloride and decreases in the body weight gain, food consumption and liver weight at the dose levels of above 10 mg/kg/day. Under the present experimental conditions, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of amitraz was considered to be 3 mg/kg/day.

Key words : amitraz, insecticide, maternal toxicity, serum biochemistry, pregnant rats

본 논문은 2004년도 전남대학교 특별연구사업비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사를 드립니다.

*Corresponding author: Jong-Choon Kim
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2827, Fax: +82-62-530-2809, E-mail: toxkim@chonnam.ac.kr]

서 론

Amitraz는 formamidine계열의 살충제로서 triazapentadiene (N,N'-[(methylimino) dimethylidyne]di-2,4-xylidine)의 상품명이다 [23]. 본 살충제는 붉은 잎응애(red spider mites)와 잎벌레(leaf miners), 깍지벌레(scale insects) 및 진딧물(aphids)의 박멸에 폭 넓게 사용되고 있으며, 수의분야에서도 진드기나 이, 기타 해충 등의 외부기생충을 구제하는데 많이 이용되고 있다 [5, 24]. 미국 환경보호청 [26]에 따르면, amitraz는 class III(경구 반수치사량, 500~5,000 mg/kg)에 속하는 약한 독성물질로서 마우스 경구반수치사량은 1,600 mg/kg 이상이며, 랫드 경구반수치사량은 600 mg/kg 이상, 그리고 랫드 경피 반수치사량은 1,600 mg/kg 이상이라고 한다 [20]. 비글개에 있어서 경구반수치사량은 100 mg/kg으로 알려져 있으나 피하노출시 반수치사량은 22.3 mg/kg으로서 동물종과 투여경로에 따라 독력에 많은 차이가 있는 것으로 나타났다 [2, 20]. 본 물질은 경구 또는 피부노출시 흡수율이 매우 높기 때문에 독성학적 위해성(risk)은 매우 높으며, 이로 인해 사람 및 동물에서의 중독사고는 빈번하게 발생하고 있다 [7, 9, 25, 29]. 실험동물에서 밝혀진 주요 독성영향으로서는 진정(sedation), 중추신경계 억압, 서맥(bradycardia), 저체온, 저혈압, 호흡완만, 고창증(bloat), 위장관 운동의 감소, 다뇨(polyuria), 구토, 식욕부진, 산동(mydriasis), 고혈당증(hyperglycemia) 등이 알려져 있다 [6, 14]. 생식독성학적 측면에서 살펴보면, amitraz는 수태능력과 생식능력에 심각한 부작용을 초래한다. 암컷 마우스에 50 mg/kg 용량으로 5일간 반복 경구투여한 후 교배를 시키면, 태아의 사망이 증가하고 분만되는 생존자수가 감소한다고 한다 [10]. 최근 보고된 Al-Thani 등 [4]의 연구결과 역시, 수컷마우스에게 10 mg/kg 이상의 용량으로 12주 동안 반복 경구투여하면 수태능력과 생식기관의 발달에 부작용을 초래하는 것으로 확인되어 수컷의 생식기능 이상을 유발하는 것인 확인되었다. 랫드에 임신 8일에서부터 20일까지 0, 1, 3 및 12 mg/kg 용량으로 반복경구투여하면 임신모체의 일반증상과 체중 및 사료섭취량에는 어떠한 영향도 끼치지 않으나 12 mg/kg 용량에서 태아체중의 감소와 흉골분절의 골화지연을 유발한다고 한다 [10]. 토끼에서는 임신 6일에서부터 18일까지 0, 1, 5 및 25 mg/kg 용량으로 반복 경구투여하면 25 mg/kg 용량에서 한배새끼수가 감소하고 유산이 증가한다고 하였다 [16]. 임신 동물을 이용하여 모독성 및 발생독성을 평가한 상기 두시험의 경우, 모독성이 관찰되지 않은 용량에서도 착상된 배아와 태아에는 심각한 부작용을 유발하는 것으로 나타났다. 그러나, 시험물질의 투여기간이 최근의 독성시험기준 [11, 18, 27]에서 권장되는 임신 전 기간의 노출로 수행되지 못하였고, 또한 상대적으로 투여용량이 낮게 설정되어 모체에 미치는 독성영향은 전혀 관찰할 수가 없었다.

따라서 본 연구는 amitraz를 랫드에게 임신 1일에서부터 19일까지 반복 경구 투여하였을 때 임신 모체 및 생식성적에 미치는 독성 잠재력을 평가하고, 이에 대한 무해용량(no-observed-adverse-effect level)을 규명하기 위해 수행하였다. 본 시험물질의 투여경로는 사람과 동물에 있어서 주요 노출경로중의 하나인 경구를 선택하였다.

재료 및 방법

시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 특정병원체부재(specific pathogen free, SPF) Sprague-Dawley 랫드를 화인실험동물연구센터(나주)로부터 구입하여 사용하였다. 성성숙이 완료된 10주령의 수컷과 동일주령의 미경산 암컷을 입수한 후 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판단된 것을 선발하여 시험에 공시하였다. 암수 2:1로 동일한 사육상자에 하룻밤 동거교배시킨 다음 익일 오전에 질전(vaginal plug)이 확인된 동물을 교배가 성립된 것으로 판정하였다. 임신동물의 경우 교배가 확인된 날을 임신 0일로 정하였으며, 임신의 최종판정은 제왕절개시 자궁의 착상흔적에 따랐다. 동물실의 사육환경은 온도 23±3ºC, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 200~300 lux로 설정된 시설에서 수행하였다. 순화 및 검역기간에는 스테인레스제 망 사육상자(240W×390L×175H mm)에 3마리씩 수용하였으며, 교배 시에는 암컷과 수컷을 1마리씩 수용하였고, 교배가 확인된 임신동물은 사육상자당 1마리씩 수용하였다. 시험기간 중 실험동물용 고형사료(삼양사료, 원주)와 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험에 사용된 모든 동물은 미국 National Research Council [17]의 “실험동물의 관리와 사용에 관한 지침”에 따라 유지하였다.

시험물질 및 처치

시험물질 amitraz는 시판되고 있는 상품(TAKTIC®, 동진제약)을 구입하여 사용하였으며, 투여직전에 각 투여용량에 맞게 멸균증류수에 희석하여 조제하였다. 시험물질의 투여는 경구투여용 주사침(sonde)과 주사기를 이용하여 임신 1일부터 19일까지 19일간 1일 1회씩 반복경구투여 하였다. 랫드 최기형성 시험에서의 투여기간은 주요 기관형성기인 임신 6일에서 15일을 사용하기도 하나 최근에는 분만전일까지 투여하는 것을 권장하고 있다 [18]. 투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준

으로 하여 kg당 10 m*l*로 계산하였다. 부형제대조군 동물은 시험물질을 희석할 때에 사용한 멸균증류수만을 투여하였다.

시험군의 구성

교배가 확인된 건강한 암컷 랫드를 체중을 측정한 다음 부형제대조군(vehicle control)과 amitraz 3, 10 및 30 mg/kg/day의 4개 시험군에 8마리씩 체중이 균등히 분배되도록 체중순위에 의한 "ㄹ" 자법에 따라 무작위로 군분리 하였다.

투여량의 설정 및 설정근거

용량설정시험을 0, 10, 20 및 40 mg/kg 용량으로 실시한 결과, 40 mg/kg 용량에서는 6마리의 임신동물중 3마리가 사망하였고, 모든 착상배아가 사망하였다. 반면 20 mg/kg 용량에서는 모동물의 체중증가억제와 태아체중의 감소 등 경미한 독성만 인정되었다. 이 결과를 근거로 하여 명백한 발생독성이 예상되는 30 mg/kg/day을 최고용량으로 설정하였다. 독성반응의 용량상관성을 관찰하기 위해 공비 3을 적용하여 중용량 및 저용량군을 설정하였고, 독성소견을 비교하기 위한 부형제대조군을 추가하였다.

일반증상 관찰

시험기간 중 1일 1회씩 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 대해서 관찰하였고, 일반증상이 관찰된 동물에 대해서는 투여전후로 1일 2회씩(09:00 및 16:00) 관찰하였다.

체중측정

전 임신동물에 대해서 임신 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 및 20일째에 개체별로 체중을 측정하였다.

사료섭취량 측정

사료섭취량은 모든 임신동물에 대하여 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다. 단, 임신 20일째의 경우에는 제왕절개로 인하여 임신 19일째에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다.

부검

각 군의 모든 임신동물들을 임신 20일째에 에테르로 마취하여 혈청생화학적 검사를 위한 채혈을 한 다음 부검하여 체표, 두부, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다.

장기중량 측정

채혈 후 방혈치사를 시킨 다음 간장, 비장, 신장, 심장, 흉선, 부신 및 난소를 적출하여 전자저울(BP310S 또는 R200D, Sartorius, Germany)을 이용하여 습중량을 측정하였다. 각 장기의 상대중량은 부검 전 절식된 체중에 대한 비율(organ-to-body weight ratio, %)로 산출하였다.

혈청생화학적 검사

부검시 모든 임신모체의 후대정맥에서 채혈한 혈액을 혈청분리관(Iatron Laboratoies Inc., Japan)에 넣고 15분간 상온에 방치하였다가 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청을 -80°C의 저온 냉동기에 분석할 때까지 보관하였다. 혈청분석은 자동분석장치(Shimadzu CL-7200, Shimadzu Co., Japan)를 사용하여 알카리성 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP), aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN), 칼슘, 총 콜레스테롤, 크레아틴 포스포키나제(creatine phosphokinase, CPK), 총 단백질, 알부민, 글로부린, 크레아티닌(creatinine), 혈당, 무기인, 총 빌리루빈, 나트륨, 칼륨 및 염소 수치를 측정하였다.

제왕절개

각 군의 모든 임신동물들을 임신 20일째에 제왕절개하여 자궁과 난소를 적출한 다음 임신자궁중량, 임신황체수, 착상수, 생존태아수, 흡수배아수 및 사망태아수를 조사하였다. 흡수배아의 경우 태반조직만 보일 경우에는 초기흡수(early resorption)로 하였고, 태반 및 태아의 근조직이 관찰될 경우에는 후기흡수(late resorption)로 분류하였다. 배아가 착상초기에 흡수 또는 사망하여 착상부위를 관찰하기 어려운 경우에는 착상부위를 명확히 구분하기 위해 2% NaOH 용액에서 1시간 동안 침적한 다음 황색 또는 황갈색의 착상흔을 계수하였다 [30]. 생존태아와 태반은 개체별로 중량을 측정하였고, 이 때 태아의 성별을 확인하였다.

통계학적 분석

시험자료에 대한 통계분석은 SAS program [21]을 이용하여 실시하였다. 통계학적 비교단위는 임신동물 또는 동복자로 하였고 [28], 시험결과는 가능한 한 평균값과 표준편차로 표기하였다. 체중, 사료섭취량, 혈청생화학치, 장기중량 등의 모수값(parametric data)은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시한 후 유의성이 인정되면 군간 차이를 조사하기 위해 Scheffe 다중비교법으로 유의차를 조사하였으며 [22], 일반증상과 태아사망률 등의 비모수 값(non-parametric data)은 Kruskal-Wallis ANOVA [13]로 유의성을 조사한 후 통계학적 차이가 인정된 자료는 Scheffe 다중비교법 또

는 Fisher's exact test로 유의차를 분석하였다 [8]. 전체적으로 검정의 유의수준은 1% 혹은 5%에서 검사하였다.

결 과

일반증상

임신기간 중 amitraz 투여에 의해 유발된 모동물의 일반증상은 Table 1에 나타내었다. 시험물질의 투여에 기인된 일반증상으로서는 적색유루(reddish tear)와 비루(nasal diacharge), 피모착색(fur staining), 허약(weakness), 탈모(alopecia), 피모거침(dull fur), 유연(salivation), 운동성 감소(decreased locomotor activity), 이상발성(vocalization) 및 사망이 나타났다. 3 mg/kg/day 투여군에서는 비루와 피모착색 및 탈모 증상이 투여 초기에 일시적으로 관찰되다가 임신 중기부터는 회복되어 관찰되지 않았다. 10 mg/kg/day 투여군에서는 적색유루와 비루, 피모착색 및 이상발성이, 30 mg/kg/day 투여군에서는 상기한 대부분의 소견들이 투여초기부터 부검시까지 지속적으로 관찰되었으며, 독성증상의 발생빈도 및 정도가 용량의존적으로 증가하였다. 특히, 30 mg/kg 투여군에서의 1례는 상기 독성소견들이 악화되어 임신 15일째에 사망하였다.

Table 1. Clinical findings of pregnant rats treated with amitraz during gestational days 1 through 19

Parameters	Amitraz (mg/kg per day)			
	0	3	10	30
No. of mated females	8	8	8	8
No. of pregnant females	7	8	8	8
No. of dams with clinical signs[a]	0	2	7	8
Reddish tear	0	0	7	7
Nasal discharge	0	1	2	2
Fur staining	0	1	2	3
Weakness	0	0	0	2
Alopecia	0	1	0	1
Dull fur	0	0	0	3
Salivation	0	0	0	2
Decreased locomotor activity	0	0	0	3
Vocalization	0	0	2	1
Found dead	0	0	0	1

[a]A single dam may be represented more than once in listing individual signs.

체중

임신기간 중 모동물의 체중을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 30 mg/kg 투여군에서는 임신 15일 및 20일째의 체중이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 10 mg/kg 투여군에서는 임신 15일째의 체중이 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다. 30 mg/kg/day 투여군에서는 시험물질 투여기간(임신 1일에서 19일) 동안의 증체량과 부검시 모동물 체중에서 임신자궁중량을 제한 모동물의 보정중량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 또한, 제

Table 2. Body weight (g) of pregnant rats treated with amitraz during gestational days 1 through 19

Parameters	Amitraz (mg/kg per day)			
	0	3	10	30
Number of dams	7	8	8	7
Gestational day 0	241.7±18.38[a)]	238.8±13.82	240.1±13.39	246.4±19.29
Gestational day 3	247.0±4.04	236.0±15.93	238.1±14.46	238.6±16.26
Gestational day 6	255.1±7.49	243.4±18.65	245.1±12.45	240.1±14.15
Gestational day 9	257.4±14.38	257.6±20.89	239.0±3.00	243.1±15.91
Gestational day 12	275.6±10.86	268.0±23.13	248.5±14.22	248.0±18.60
Gestational day 15	292.3±10.66	283.6±22.10	258.9±13.51*	248.3±27.24**
Gestational day 20	348.9±18.76	344.9±33.03	320.5±20.75	263.4±22.85**
Body weight gain during pregnancy	107.1±22.99	106.1±24.51	80.5±15.55	17.0±30.7**
Corrected body weight[b)]	283.5±11.20	279.7±24.40	256.9±14.67	248.0±27.4*
Gravid uterine weight	65.3±12.22	65.2±12.42	63.6±6.66	15.4±18.0**

[a)]Values are expressed as mean±S.D.

[b)]Corrected body weight = body weight on gestational day 20 - gravid uterine weight

*Significant difference at $p<0.05$ level compared with the control group.

**Significant difference at $p<0.01$ level compared with the control group.

왕절개시 측정된 임신자궁중량 역시 대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였다.

사료섭취량

임신기간 중 모동물의 사료섭취량을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 30 mg/kg 투여군에서는 임신 4일과 13일 및 16일째, 10 mg/kg 투여군에서는 임신 4일 및 7일째, 그리고 3 mg/kg 투여군에서는 임신 4일째의 섭취량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다.

Table 3. Food consumption (g) of pregnant rats treated with amitraz during gestational days 1 through 19

Parameters	Amitraz (mg/kg per day)			
	0	3	10	30
Number of dams	7	8	8	7
Gestational day 1	10.0±1.55[a)]	9.4±1.19	9.6±2.97	7.9±3.24
Gestational day 4	10.0±3.70	14.9±1.55**	1.8±2.66**	1.7±2.14**
Gestational day 7	15.3±0.95	11.6±3.67	9.4±3.29**	12.0±1.91
Gestational day 10	11.5±4.57	15.4±2.50	10.4±2.20	9.7±3.09
Gestational day 13	16.0±2.45	16.3±1.37	15.8±3.92	10.7±2.63**
Gestational day 16	18.3±0.67	18.4±1.30	16.3±3.52	14.3±1.89**
Gestational day 20	20.3±1.21	21.1±1.13	21.2±1.33	16.4±5.59

[a)]Values are expressed as mean±S.D.

**Significant difference at $p<0.01$ level compared with the control group.

Table 4. Absolute and relative organ weights of pregnant rats treated with amitraz during gestational days 1 through 19

Parameters	Amitraz (mg/kg per day)			
	0	3	10	30
Number of dams	7	8	8	7
Body weight at term	348.9±18.76[a)]	344.9±33.03	320.5±20.75	263.4±22.85**
Liver (g)	12.07±0.999	11.55±1.440	9.72±1.604**	9.37±1.761**
per body weight (%)	3.46±0.173	3.35±0.167	3.03±0.242**	3.74±0.273
Spleen (g)	0.60±0.111	0.65±0.095	0.55±0.053	0.49±0.066
per body weight (%)	0.17±0.029	0.19±0.021	0.17±0.020	0.20±0.037
Heart (g)	0.93±0.062	0.90±0.091	0.87±0.041	0.84±0.055
per body weight (%)	0.27±0.024	0.26±0.016	0.27±0.022	0.34±0.027**
Kidneys (g)	1.49±0.111	1.55±0.140	1.44±0.140	1.49±0.179
per body weight (%)	0.42±0.038	0.45±0.027	0.45±0.023	0.57±0.102**
Adrenal glands (g)	0.059±0.007	0.062±0.010	0.064±0.012	0.078±0.010**
per body weight (%)	0.017±0.002	0.018±0.004	0.020±0.003	0.030±0.005**
Thymus (g)	0.17±0.057	0.22±0.027	0.18±0.042	0.16±0.064
per body weight (%)	0.05±0.013	0.07±0.012	0.05±0.014	0.08±0.035*
Ovaries (g)	0.10±0.044	0.11±0.018	0.12±0.024	0.10±0.017
per body weight (%)	0.03±0.013	0.03±0.004	0.04±0.007	0.04±0.006

[a)]Values are expressed as mean±S.D.

*Significant difference at $p<0.05$ level compared with the control group.

**Significant difference at $p<0.01$ level compared with the control group.

부검소견

임신 20일째에 모동물을 부검하여 육안적으로 관찰한 결과, 30 mg/kg 투여군에서 소장과 위의 충혈(congestion), 위의 팽대 및 가스저류 소견이 1례 관찰되었다.

절대 및 상대 장기중량

임신 20일째에 모체를 부검하여 주요장기의 절대중량과 상대중량을 측정한 결과는 Table 4에 나타냈다. 30 mg/kg 투여군에서는 간의 절대중량이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 부신의 절대 및 상대중량과 심장, 신장 및 흉선의 상대중량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다. 10 mg/kg 투여군에서는 간의 절대 및 상대 중량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다.

혈청생화학적 소견

임신 20일째에 모체를 부검하여 혈청생화학검사를 한 결과는 Table 5에 나타내었다. 3 mg/kg/day 투여군에서는 혈액요소질소가, 10 mg/kg/day 투여군에서는 혈액요소질소와 총 콜레스테롤, 총 빌리루빈 및 염소수치가 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다. 그리고 30 mg/kg/day 투여군에서는 AST와 칼슘, 총 단백질, 알부민, 총 빌리루빈, 나트륨 및 염소수치가 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다.

제왕절개 소견

임신 20일째에 모체를 제왕절개하여 얻은 생식결과는 Table 6에 나타내었다. 각 군당 8마리의 교배동물 중 3, 10 및 30 mg/kg/day 투여군에서는 모든 교배동물이, 그리고 부형제대조군에서는 7마리가 임신하여 높은 임신율을 나타내었다. 임신황체수와 착상수, 배아의 착상 전 소실율(pre-implantation loss), 사망태아수, 성비 및 태반중량에 있어서 대조군과 각 투여군간에 통계학적으로 유의성있는 차이는 인정되지 않았다. 반면, 30 mg/kg/day 투여군에서 통계학적으로 유의성은 인정되지 않았지만 착상된 모든 배아가 사망한 모체가 3례 관찰되어

Table 5. Serum biochemical values of pregnant rats treated with amitraz during gestational days 1 through 19

Parameters	Amitraz (mg/kg per day)			
	0	3	10	30
Number of dams	7	8	8	7
Alkaline phophatase (IU/l)	135.9±8.45[a)]	142.3±66.04	135.0±43.00	127.5±30.87
Aspartate aminotransferase (IU/l)	79.9±18.75	112.9±33.35	85.6±29.24	126.2±27.08*
Alanine aminotransferase (IU/l)	70.3±6.96	74.3±7.61	79.9±8.53	70.2±3.13
Blood urea nitrogen (mg/dl)	14.8±1.49	19.8±1.86**	18.4±2.99*	17.8±2.57
Calcium (mg/dl)	7.4±0.47	7.4±0.31	7.2±0.28	7.9±0.40**
Total cholesterol (g/dl)	83.3±11.46	89.8±12.03	101.2±6.86*	94.7±9.99
Creatine phosphokinase (IU/l)	226.3±179.33	362.0±128.21	150.6±44.86	409.0±306.22
Total protein (g/dl)	5.80±0.447	5.74±0.119	5.55±0.280	6.48±0.306**
Albumin (g/dl)	2.6±0.31	2.7±0.16	2.6±0.19	3.3±0.33**
Globulin (g/dl)	3.16±0.151	3.08±0.116	2.99±0.158	3.16±0.123
Creatinine (mg/dl)	0.42±0.048	0.43±0.028	0.42±0.044	0.38±0.038
Glucose (mg/dl)	122.9±17.86	114.6±29.24	118.6±31.39	115.3±26.70
Inorganic phosphate (mg/dl)	5.3±0.97	5.4±0.87	4.7±0.72	5.2±1.00
Total bilirubin (mg/dl)	0.06±0.013	0.07±0.016	0.08±0.012*	0.11±0.012**
Sodium (mmol/l)	119.0±7.55	120.3±7.52	119.1±4.61	132.8±4.12**
Potassium (mmol/l)	4.0±1.02	4.2±0.95	3.6±0.78	4.0±0.51
Chloride (mmol/l)	90.6±3.55	91.9±2.23	94.6±1.85*	98.0±3.35**

[a)]Values were expressed as mean±S.D.

*Significant difference at $p<0.05$ level compared with the control group.

**Significant difference at $p<0.01$ level compared with the control group.

Table 6. Caesarean section data of pregnant rats treated with amitraz during gestational days 1 through 19

Parameters	Amitraz (mg/kg per day)			
	0	3	10	30
No. of mated females	8	8	8	8
No. of pregnant females	7	8	8	8
No. of dead females	0	0	0	1
No. of dams totally resorbed	0	0	0	3
Corpora lutea	14.0±1.83[a)]	14.5±2.07	15.0±1.60	14.9±1.77
Implantations	12.6±1.90	13.4±2.20	13.5±1.69	12.4±1.27
Pre-implantation loss[b)] (%)	10.0±8.34	7.8±6.04	8.9±14.72	14.8±16.59
Fetal deaths	1.0±0.82	0.5±0.53	0.8±0.89	9.9±3.93**
Resorptions: Early	1.0±0.82	0.5±0.53	0.3±0.46	8.7±3.73**
Late	0	0	0.5±0.93	1.0±1.41
Dead fetuses	0	0	0	0.1±0.38
Post-implantation loss[c)] (%)	8.7±7.47	3.8±4.13	5.4±6.36	79.7±32.90**
Litter size	11.6±2.57	12.9±2.17	12.8±1.75	2.6±3.95**
Sex ratio	1.03	1.06	0.85	1.25
(♂/♀)	(41/40)	(53/50)	(47/55)	(10/8)
Fetal body weight (g)				
Male	3.8±0.29	3.6±0.34	3.4±0.26	2.6±0.28**
Female	3.7±0.26	3.5±0.34	3.3±0.22*	2.1±0.15**
Placental weight (g)	0.46±0.061	0.45±0.057	0.45±0.069	0.43±0.083

[a)]Values are expressed as mean±S.D.
[b)]Pre-implantation loss (%) = [(no. of corpora lutea - no. of implantation sites)/no. of corpora lutea] ×100.
[c)]Post-implantation loss (%) = [(no. of implantation sites - no. of live fetuses)/no. of implantation sites] ×100.
*Significant difference at $p<0.05$ level compared with the control group.
**Significant difference at $p<0.01$ level compared with the control group.

대조군에 비해 증가경향을 나타내었다. 또한, 초기흡수의 증가에 의한 태아사망율과 배아의 착상 후 소실율(post-implantation loss)은 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 증가하였고, 한배새끼수(litter size)와 암수 생존태아의 체중은 대조군의 결과에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다.

고 찰

본 연구는 농업 및 수의분야에서 살충제로 폭 넓게 사용되고 있는 amitraz의 모독성 잠재력을 조사하고자 랫드에게 임신 1일에서부터 19일까지 0, 3, 10 또는 30 mg/kg/day 농도로 반복 경구투여하여 일반증상과 사료섭취량, 부검소견, 장기중량, 혈청생화학치 및 제왕절개 성적을 평가하였다. 시험결과, 임신 랫드에 amitraz의 반복 경구투여는 모체의 일반증상과 체중, 사료섭취량, 장기중량, 혈청생화학치 및 생식성적에 다양한 부작용을 유발하는 것으로 나타났다.

시험기간 중 임신모체에서 관찰된 일반증상으로는 적색유루와 비루, 피모착색, 허약, 탈모, 피모거침, 유연, 운동성감소 및 이상발성이었으며, 이들 소견은 발생빈도와 정도가 용량의존적으로 증가한 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것으로 판단된다. 10 및 30 mg/kg 투여군에서는 상기 소견들이 투여 전 기간에 걸쳐 지속적으로 관찰되었으며, 최고용량군인 30 mg/kg 투여군에서의 한 개체는 상기 소견들이 점차 악화되어 임신 15일째에 사망하였다. 한편, 3 mg/kg 투여군에서는 투여초기에 일시적으로 관찰된 비루와 피모착색 및 탈모 소견은 발생정도가 미약한 가역적인 변화였고, 또한 다른 병리학적 소견을 동반하지 않았기 때문에 독성학적인 중

요성은 없는 것으로 사료된다.

임신모체의 체중측정시, 10 및 30 mg/kg 투여군에서 임신 말기에 관찰된 체중증가의 억제는 명확한 용량의존적인 감소를 나타낸 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것으로 판단된다. 30 mg/kg 투여군의 경우, 체중증가의 억제로 인해 임신기간 중의 증체량이 대조군에 비해 현저하게 감소한 것으로 나타났다. 이는 Table 2에서 보는 바와 같이 임신자궁중량의 현저한 감소가 가장 큰 원인으로 확인되었다. 또한, 30 mg/kg 투여군에서 부검시 모체체중에서 임신자궁중량을 제한 모체의 실질중량이 감소한 것은 임신자궁(배·태아 발생) 뿐만 아니라 모체에도 명백한 독성을 유발한다는 것을 암시해 준다.

사료섭취량 측정시, 10 및 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 섭취량의 감소는 일반증상의 증가와 체중증가의 억제와 일치하는 소견으로서 시험물질의 투여에 기인된 소견으로 판단된다. 반면, 최저용량인 3 mg/kg 투여군에서 임신 4일째에 관찰된 사료섭취량의 증가는 중간 및 최고용량군의 결과와는 상반되는 결과로서 이후에는 대조군의 섭취량과 유사한 결과를 나타낸 것으로 보아 우발적인 소견(incidental finding)으로 판단된다.

임신 20일째의 모동물 부검시, 30 mg/kg 투여군의 1례에서 관찰된 소장과 위의 충혈, 위의 팽대 및 가스저류 소견은 동일군의 다른 동물에서는 어떠한 이상소견도 관찰되지 않은 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 소견으로 생각되지는 않았다.

장기중량 측정시, 10 mg/kg 투여군에서 관찰된 간의 절대 및 상대중량 감소와 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 간의 절대중량 감소는 모동물의 현저한 체중감소가 주요 원인으로 사료되지만 시험물질의 투여와도 밀접한 연관성이 있는 것으로 판단된다. 이러한 해석은 혈청생화학 분석시, 10 mg/kg 이상의 투여군에서 총 빌리루빈치가 용량의존적으로 증가하였고, 30 mg/kg 투여군에서는 AST가 증가한 것에 의해서도 잘 지지된다. 본 시험의 결과와 유사하게 Al-Qarawi 등 [3]도 랫드에게 amitraz를 투여시 ALT가 증가하였으며, Filazi 등 [7]도 마우스에게 amitraz를 45 mg/kg/day로 투여시 AST 및 ALT가 증가하여 amitraz가 간독성 유발물질임을 증명한 바 있다. 따라서 본 시험 조건하에서 amitraz 10 mg/kg 이상의 반복 경구투여는 간독성과 관련된 모든 항목에서 일정한 용량의존성을 나타내지는 않았지만 간독성을 유발한다는 것을 강하게 암시해 준다. 혈청생화학 검사시 AST와 ALT, 총빌리루빈, ALP 등은 간기능부전이나 간손상의 평가에 이용되는 유용한 생물학적 표지자로 잘 알려져 있다 [12, 15]. 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 심장의 상대중량 증가는 용량의존적으로 나타난 것으로 보아 시험물질의 투여와 관련이 있는 것으로 판단되나 혈청생화학치의 변화나 부검소견 등 다른 소견과는 일치되는 변화가 동반되지 않아 독성학적으로 중요성은 없는 것으로 판단된다. 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 신장의 상대중량 증가는 용량의존적으로 증가하였고, 생화학지표에서 혈청요소질소의 증가와 전해질 불균형이 나타난 것으로 보아 시험물질의 투여에 의해 신장독성도 동반된 것으로 사료된다. 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 부신의 절대 및 상대중량 증가는 용량의존적으로 증가한 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것으로 사료되며, 이는 독성반응에 의한 스트레스가 주요 원인으로 사료된다. 한편, 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 흉선의 상대중량 증가는 용량의존성이 결여되어 시험물질의 투여에 의한 독성반응은 아닌 것으로 판단되며, 체중의 감소에 따른 것으로 보인다.

혈청생화학 검사시 3 및 10 mg/kg 투여군에서 관찰된 혈청요소질소의 유의성있는 증가는 용량상관성이 인정되지 않았고, 신장기능과 관련되는 다른 혈청생화학치의 변화가 동반되지 않았으며, 또한 신장중량이나 부검소견에서 어떠한 변화도 인정되지 않아 독성학적으로 의미없는 소견으로 판단된다. 반면, 최고용량군인 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 혈청요소질소의 미약한 증가는 신장중량의 증가와 혈청 나트륨 및 염소의 증가가 동반된 것으로 보아 시험물질일의 투여에 기인된 것으로 사료된다. Filazi 등 [7]이 수행한 실험에서는 마우스에 amitraz를 45 mg/kg 용량으로 1회 경구투여시 신기능 장애의 지표로서 혈청요소질소와 인의 수치가 유의성 있게 증가하여 amitraz가 신장기능이상이 유발함이 증명되었으며, 이는 Al-Qarawi 등 [3]의 연구에서도 확인된 바 있다. 본 시험에서 혈청 중 염소수치는 10 mg/kg 투여군에서도 증가하여 신장독성과 관련된 다른 항목의 변화없이 전해질 이상이 유발될 수 있음을 나타내 준다. 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 칼슘농도의 증가와 10 mg/kg 투여군에서 관찰된 총 콜레스테롤의 증가는 용량상관성이 결여되었을 뿐만 아니라 Sprague-Dawley 랫드에서 관찰되는 정상범위내의 변화여서 우발적인 소견으로 사료된다 [1, 12]. 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 총 단백질과 알부민의 증가 역시 용량의존성이 결여되었고, 관련되는 병리학적 소견이 인정되지 않아 독성학적으로 중요성이 없는 변화로 판단된다.

임신 20일째에 모동물을 제왕절개한 결과, 임신황체수와 착상수는 각 시험군간에 차이가 인정되지 않았으며, 배아의 착상 전 소실율도 시험군간에 차이가 인정되지 않아 amitraz는 초기배아의 발생과 착상에는 어떠한 부작용도 유발하지 않는 것으로 나타났다. 반면, 30 mg/kg 투여군에서 배아의 착상 후 소실율은 대조군에 비해 현저하게 증가(약 9배)하였고, 착상된 모든 배아가 사망

한 모체도 7마리의 모체 중 3마리에서 관찰되었다. 본 용량군에서 관찰된 배아의 착상 후 소실은 배아의 초기 흡수 증가가 주요 원인으로 나타났다. 이는 착상 초기의 배아가 착상전의 배아나 기관형성기 이후의 태아에 비해 현저하게 민감하다는 것을 암시해 준다. 배아의 착상 후 소실율의 증가는 본 시험군에서 관찰된 한배새끼수 감소의 직접적 원인으로 확인되었다. 10 및 30 mg/kg 투여군에서 관찰된 태아의 체중감소는 용량의존적으로 감소한 것으로 보아 시험물질의 투여에 기인된 것으로 판단되며, 체중감소로 확인된 태아의 발육지연은 모체의 체중증가억제와 사료섭취량의 감소, 혈청생화학치의 변화 등 모독성이 확인된 용량에서만 관찰된 것으로 보아 모독성에 의한 이차적인 영향을 배제할 수는 없으나 본 시험에서 관찰된 모독성과 발생독성의 명확한 상관성과 amitraz의 최기형성 잠재력을 규명하기 위해 현재 태아의 내부장기와 골격의 형태학적 검사를 진행하고 있으므로 그 결과에 따라 원인이 규명될 것으로 기대된다. 최근, amitraz가 개구리 배아에 기형을 유발한다는 Osano 등 [19]의 연구결과가 보고되어 본 시험에서 얻어진 랫드 태아의 형태학적 평가가 수행되면 amitraz의 최기형성 확인은 물론 생물학적 비교자료로서도 의미있는 결과를 얻을 수 있을 것이다.

상기한 결과를 종합하여 볼 때, amitraz를 임신랫드에게 19일간 반복 경구투여하면 10 mg/kg 용량에서는 일반증상과 체중증가의 억제, 사료섭취량의 감소, 간중량의 감소, 혈청 총 빌리루빈과 염소의 증가 및 태아체중의 감소를 유발하며, 30 mg/kg 용량에서는 일반증상과 사망, 체중증가의 억제, 사료섭취량의 감소, 간중량의 감소, 신장과 부신 및 심장중량의 증가, 혈청 중 AST와 총 빌리루빈 및 염소의 증가, 태아사망의 증가, 한배새끼수의 감소 및 태아체중의 감소를 초래하였다. 본 시험조건하에서 임신랫드에 대한 amitraz의 무해용량은 3 mg/kg/day로 사료된다.

참고문헌

1. **강부현, 손화영, 하창수, 이현숙, 송시환.** Ktc: Sprague-Dawley rats의 혈액학 및 혈액생화학치의 자료분석. 한국실험동물학회지. 1995, **11**, 141-145.
2. **허정두, 김영길, 이현숙, 김충용, 박승춘, 신진영, 김성호, 신동호, 김종춘.** 개에서 진드기 살충제 amitraz의 단회피하투여 독성시험. 한국생명공학회지. 2004, **14**, 547-552.
3. **Al-Qarawi, A. A., Al-Damegh, M. S. and Adam, S. E.** Effect of amitraz given by different routes on rats. Vet. Hum. Toxicol. 1999, **41**, 355-357.
4. **Al-Thani, R. K., Al-Thani, A. S., Elbetieha, A. and Darmani, H.** Assessment of reproductive and fertility effects of amitraz pesticide in male mice. Toxicol. Lett. 2003, **138**, 253-260.
5. **Budavari, S.** The Merck Index, 11th ed.. Merck and Company Inc, Rathway, NJ. 1989, 522-528.
6. **Cullen, L. K. and Reynoldson J. A.** Cardiovascular and respiratory effects of the acaricide amitraz. J. Vet. Pharmacol. Ther. 1987, **10**, 134-143.
7. **Filazi, A., Sireli, M. and Kalkan, F.** The influence of amitraz on biochemical parameters in mice. Hum. Exp. Toxicol. 2003, **22**, 99-101.
8. **Fisher, R. A.** Statistical Methods: Experimental Design and Scientific Inference. pp. 1-323, Oxford University Press, New York, USA, 1995.
9. **Grossman, M. R.** Amitraz toxicosis associated with ingestion of an acarcide collar in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1993, **203**, 55.
10. **Hayes, W., Jr. and Laws, E. R., Jr.** Handbook of Pesticide Toxicology Volume 1. Academic Press, New York, 1991.
11. **International Conference on Harmonization (ICH).** Guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products, Fed. Regist. 1994, **59**, 48746-48752.
12. **Kim, J. C., Shin, D. H., Ahn, T. H., Kang, S. S., Song, S. W., Han, J., Kim, C. Y., Ha, C. S. and Chung, M. K.** 26-Week oral repeated dose toxicity study of the new quinolone antibacterial DW-116 in Sprague-Dawley rats. Food Chem. Toxicol. 2003, **41**, 637-645.
13. **Kruskal, W. H. and Wallis W. A.** Use of ranks in one criterion variance analysis. J. Am. Statist. Assoc. 1952, **47**, 614-617.
14. **Leung, V. K., Chan T. Y. and Yeung V. T.** Amitraz poisoning in humans. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 1999, **37**, 513-514.
15. **Loeb, W. F. and Quimby, F. W.** The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. 2nd Ed. Taylor & Francis, Philadelphia, 1999.
16. **Meister, R. T.** Farm Chemicals Handbook. Meister Publishing Company. Willoughby, OH, USA, 1994.
17. **National Research Council.** Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council. National Academy, Washington DC, 1996.
18. **Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD).** OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Guideline 414: Teratogenicity, Paris,

1995.

19. **Osano, O., Oladimeji, A. A., Kraak, M. H. S. and Admiraal, W.** Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (Xenopus) embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2002, **43**, 42-49.
20. **Patton, D. S. G. and Sutton, M. M.** *Acute toxicity studies on BTS 27,419, an acaricide*. Unpublished report No. P71544 from The Boots Pure Drug Company, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd, 1971.
21. **SAS Institute, Inc.** SAS/STAT Software: Changes and Enhancements Through Release 6.12. SAS Institute, Cary, 1997.
22. **Scheffe, H.** A method of judging all contrasts in the analysis of variance. Biometika. 1953, **40**, 87-104.
23. **The Agrochemicals Handbooks.** Royal Society of Chemistry Information Systems, 3rd ed. Unwin Brothers Ltd, Surrey, 1994.
24. **Thomson, W. T.** Agricultural Chemicals. Book II: Herbicides. Thomson Publications, Fresno, 1993.
25. **Ulukaya, S., Demirag, K. and Moral, A. R.** Acute amitraz intoxication in human. Intensive Care Med. 2001, **27**, 930-933.
26. **U. S. Environmental Protection Agency.** EPA Fact Sheet No. 14 Amitraz. U.S. EPA. Washington DC, 1987.
27. **U. S. Environmental Protection Agency.** Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.3700, Prenatal developmental toxicity study, Public Draft, U.S. Government Printing Office, Washington DC, 1996.
28. **Weil, C. S.** Selection of the valid number of sampling units and a consideration of their combination in toxicological studies involving reproduction, teratogenesis or carcinogenesis. Food. Cosmet. Toxicol. 1970, **8**, 77-182.
29. **Xavier, F. G., Kogika, M. M. and Spinosa, H. D. S.** Common causes of poisoning in dogs and cats in a Brazilian veterinary teaching hospital from 1998 to 2000. Vet. Hum. Toxicol. 2002, **44**, 115-116.
30. **Yamada, T., Ohsawa, K. and Ohno, H.** The usefulness of alkaline solutions for clearing the uterus and staining implantation sites in rats. Exp. Anim. 1998, **37**, 325-331.