농약과학회지 제15권 제4호 (2011)
The Korean Journal of Pesticide Science Vol. 15, No. 4, pp. 374~382

연구보문/잔류·안전성

제초제 Methiozolin의 유전독성평가

구석진 · 이종윤[1] · 박철범[2]*

목우연구소, [1]한국화학시험연구원, [2]호서대학교 안전성평가센터

(2011년 12월 5일 접수, 2011년 12월 18일 수리)

Mutagenicity Studies of the Herbicide Methiozolin

Suk-jin Koo, Zong-Yun Lee[1] and Cheol-Beom Park[2]*

Moghu Research Center Ltd. Research, [1]Korea testing & research, [2]Hoseo Toxicological Research Center, 165 Sechul-ri, Baebang-eup, Asan-city, Chungnam, 336-795 Korea

Abstract

We investigated the mutagenicity of methiozolin, newly developed herbicide, in vitro reverse mutation test using *Salmonella typhimurium and Escherichia coli*, chromosome aberration test using chinese hamster lung (CHL) cells and in vivo micronucleus test of mice. In the reverse mutation test, the methiozolin did not induce mutagenicity in Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA with and without metabolic activation at 5,000 ㎍/plate. In the chromosome aberration test, the results showed no incidence of increased structural and numerical chromosome abberrations at any doses tested (80, 40, 20 ㎍/mL). In micronucleous test, the ratio of micronuclei was measured in polychromatic erythrocytes with treated methiozolin for ICR mice. No incidence of increased micronuclei were observed in polychromatic erythrocytes (1,500, 1,000, 500 mg/kg). Based on these results, we concluded that methiozolin has no mutagenic toxicity in vitro and in vivo systems.

Key words Mutagenicity, Herbicide, Methiozolin

서 론

1894년 DDT의 개발 이후 농약의 오남용으로 인한 생태계 파괴 및 환경오염등의 문제가 야기될 뿐만 아니라, 식품 위해성에 대한 인식 변화로 인해 보다 안전한 농약의 개발이 절실하다(Ashton 등, 1981; Brown 등, 1978; Chun 등, 1996; 황 등, 2001). 제초제는 잡초를 제거하여 노동력 절약과 수확량 증대를 위한 농약으로 특정 제초제의 경우 인체독성이 강하여 사회적문제가 되거나 환경생물에 위해성이 나타나 규제된 바 있으나, 일반적으로 제초제는 인체독성이나 환경생물에 대한 독성이 낮은 것으로 알려져 있다. 유효성, 편이성 및 높은 제초 효과를 갖는 제품 개발의 역사 40 여년 중에서 최근 15년 사이에 등장한 새로운 제초제는 기존의 제초제 보다 안전하고 유용한 제품으로 알려져 있다(권 등, 1986; Lyga 등, 1991; Kearney와 Kaufman, 1988; Hay, 1999; Yogo, 2000).

Methiozolin은 기존 다른 제초제와는 전혀 다른 화학계통에 속할 뿐만 아니라 작용특성 또한 새로운 물질로 식물세포벽 생합성 저해활성을 갖는 다는 사실이 밝혀져 있다(구 등, 2010; Lee 등, 2007). Methiozolin은 이속사졸린계통의 신물질로 이에 대한 연구가 진행된 것이 거의 없다. Methiozolin과 구조적으로 유연관계에 있는 화학물질로는 Rheinheimer 등(1991)이 최초로 합성 및 보고 하였는데, 생물활성에 대한 상세한 자료제시 없이 일부 화합물이 유채에 대해서 안전성이 있고 발아전처리로 잡초들을 방제한다고 보고한바 있다.

이후 Munro와 Patel(1993)은 isoxazolin에 nitro 기를 포함하는 benzene 환을 도입한 유도체에 대해 보고하였다. 그

*연락저자 : Tel. +82-41-540-9676, Fax. +82-41-540-9839
E-mail: cbpark@hoseo.edu

리고 Morida 등은 isoxazoline에 각종 alkyl, alkoxy 및 allyl 기를 포함하는 유도체를 합성하였고, Uehara 등은 isoxazoline에 Pyrazole 치환제를 도입한 유도체의 합성과 벼 제초제로서의 생물활성에 대해 보고하였다(구 등, 2010). 그러나 이들 화합물에서는 특기할 만한 활성이 없었으므로 Ryu 등(2002)은 isoxazoline환에 치환된 thiophene환을 도입한 유도체에 대해 보고하였으며, Hwang 등(2005)은 이중 5-(2,6-Difluoro-benzyloxymethyl)-5-methyl-3-(3-methyl-thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-isoxazole의 벼 제초제로서 이용을 시도하였고, 구와 황(2007)은 methiozolin이 온실 발아조건에서 발아 전 처리 시 100~500 g ha^{-1} 약량으로 콩, 옥수수, 목화, 밀, 벼 등 주요작물에 대해 높은 안전성을 가지면서 피, 강아지풀, 미국개기장, 바랭이 등 화본과 잡초만을 선택적으로 방제해 잔디 제초제로서 유효하다고 보고하였다.

Methiozolin에 대한 독성 연구는 현재까지 미미한 실정이다. 따라서 새로 개발된 제초제의 경우 사용 전 인체 독성에 대한 연구는 매우 중요하다. 유전독성의 평가에는 전통적으로 박테리아를 이용한 복귀돌연변이 시험과 Chinese hamster lung(CHL) cell을 이용하는 염색체 이상시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험이 사용되고 있다. 유전독성 시험은 발암성을 예측 할수 있는 시험으로 농약의 개발을 위한 시험에서 가장 먼저 선행되어야 할 시험이다. 그동안 새로 개발된 methiozolin에 대한 독성의 자료가 없어서 유전독성 시험은 인체 안전성을 위해 시급히 수행해야할 시험이다.

따라서 본 연구는 methiozolin에 대한 유전독성 여부를 검토하기 위해서 수행되었다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

시험물질은 목우연구소에서 제공 받아 냉장보관하면서 시험에 사용하였다. 양성대조물질인 2-aminoanthracene(2-AA sodiumazide(NaN3), 9-aminoacridine(9-AA), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF-2), mitomycin C(MMC) 및 cyclophosphamide(CPA) 및 대조물질 DMSO는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

복귀돌연변이 시험

본시험에 사용된 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA로 Molecular toxicology Inc에서 입수하여 사용하였다. 시험물질 methiozolin은 DMSO에 현탁시켜 제조하였다. 처리농도는 TA100 균주를 이용하여 5,000 ㎍/plate를 최고농도로 제조하여 직접법과 S9 mixture를 이용한 대사활성법을 실시하였다. 예비독성시험결과 5,000 ㎍/plate의 농도에서 시험물질에 대한 세포독성을 보이지 않아 본시험 농도로 설정하였다. 용매대조군으로는 DMSO를 사용하였으며, 직접법에 의한 양성대조물질로는 TA98과 TA100은 AF-2, TA1535균주는 NaN3, TA1537균주는 9-AA를 WP2urvA는 AF-2를 대사활성법에서는 모든 균주에 2-AA를 사용하였다. *Salmonella typhimurium* 및 *Escherichia coli* 각균주는 10 mL의 nutrient broth에 접종하여 37℃에서 약 16시간 회전식 진탕배양기에서 배양하였다. 조제액 100 μl 및 대사활성계 비적용일 때에는 0.1 mol/L 인산완충용액(pH 7.4) 500 μl를, 대사활성계 적용일 때에는 S9 mix 500 μl를, 이미 건열멸균된 시험관에 넣고, 균 현탁액 100 μl를 첨가하여, 37℃ 진탕배양기에서 20분간 선회배양한 다음, 45℃에 보관된 top agar 2 mL을 첨가하여 잘 혼합한 후 Vogel-Bonner 최소 Glucose 한천평판배지 위에 중층한 후 37℃ 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 후 페트리디쉬에 발생한 복귀변이 콜로니수는 콜로니카운터(ProtoCOL, SYNBIOSIS, UK)로 자동 계측 하였다. 용량설정시험 및 본시험에서 얻어진 복귀변이 콜로니수는 실측치로 기록하였으며 용량군당 평균과 표준편차를 구하였다. 결과는 복귀돌연변이 콜로니수의 실측치로 표시하며 각 농도군 당 복귀돌연변이 콜로니수의 평균과 표준편차를 구하였다. 대사활성계 존재 유무에 관계없이 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비하여 한 개 이상의 용량에서 명확히 증가하고, 2배 이상이면서, 용량의존성을 가지며, 그 작용에 재현성이 인정될 경우 양성으로 판정하였다. 그 외에는 음성으로 판정하였다(농촌진흥청, 2009).

염색체 이상시험

사용한 포유동물세포는 Chinese hamster lung fibroblast (CHL) 세포주로 American Type Culture Collection(ATCC)에서 입수한 후 사용하였다. 세포는 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Cambrex Bio Science Walker sville, Inc., USA)을 사용하여 온도 37℃, 습도 95%, CO_2농도가 5%로 설정된 CO_2 인큐베이터 (Mco-20AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다.

사용배지는 EMEM에 heat inactivation시킨 Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco, USA)을 10%가 되도록 첨가하고, Penicillin-streptomycin(Gibco, USA)을 100 : 1의 비율로 넣어 사용하였다.

세포증식억제시험(MTT assay)은 0, 10, 20, 39, 78, 156,

313, 625, 1,250, 2,500 및 5,000 ㎍/mL의 용량으로 실시하였다. 세포증식억제시험 결과에 따라서, 본시험은 단시간처리법 및 연속처리법의 경우 대사활성계 적용유무에 관계없이 20, 40 및 80 μg/mL의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 실시하였다. 염색체이상시험은 75 cm^2 세포배양용 플레이트(Nunc, USA)에 계대배양된 세포부유액의 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수한 후 5×10^4 cells/mL의 세포농도로 60 mm 세포배양용 페트리디쉬(Nunc, USA)에 5 mL씩 분주한 다음, 3계열(단시간처리법의 비대사활성화, 대사활성화 및 연속처리법)로 구분하고, 음성대조군, 시험물질군 및 양성대조군으로 나누었다. 각 시험군은 각각 2매의 페트리디쉬를 사용하였다. 단시간처리법은 각 페트리디쉬에 음성대조물질, 각 용량의 시험물질조제액을 첨가하였다. 대사활성화계열에는 S9의 최종농도가 5% 되도록 S9 mix를 첨가하였다. 비대사활성화계열에는 S9 mix와 동일한 양의 0.1 mol/L 인산완충액(pH 7.4)을 첨가하였다. 그리고 양성대조물질로는 비대사활성화 및 대사활성화 모두에 MMC를 0.05 ㎍/mL 첨가하였다. 모든 계열을 6시간 배양한 후 신선한 배지로 교환하고 다시 18시간 더 배양하였다. 연속처리법은 각 페트리디쉬에 음성대조물질, 각 농도의 시험물질조제액을 첨가하였다. 그리고 양성대조물질 MMC를 0.05 ㎍/mL 첨가하여 24시간 배양하였다. 각 계열의 배양은 온도 37℃, 습도 95%, 5% CO_2로 설정된 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액(Gibco, USA)을 최종농도가 0.25 ㎍/mL되게 첨가하였다. 배양종료 후 37℃로 가온한 0.25% Trypsin-EDTA로 처리하여 15 mL 원심분리관에 넣고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 모은 후 37℃의 저장액(0.075M KCl) 5 mL에 잘 현탁시킨 후, 37 ℃에 30분간 방치하고, 냉각 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)을 1 mL를 가하여 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 5 mL의 냉각 고정액으로 고정하고 원심분리(2,000 rpm, 4℃, 5분)하였다. 이와 같은 처리를 2회 반복하고, 얻은 세포현탁액을 잘 부유시켜 슬라이드글래스 2군데에 1-2방울씩 떨어뜨려 검체를 제작하였다. 하룻밤을 건조한 슬라이드글래스를 5% Giemsa(0.1M Sorenson 인산완충액, pH 6.8)로 30분간 염색, 수세하여 건조해 맹검법으로 검체에 번호를 매겼다. 각 슬라이드 중에서 잘 흩어진 100개(1개 용량당 200개)의 분열중기상을 1,000배의 현미경(BX51, OLYMPUS, Japan)에서 관찰하였다. 염색체 이상을 가진 분열중기상의 세포수의 출현율이 음성대조군에 비하여 확실히 증가하고 또, 용량 의존성이 인정되는 경우, 또한 한 개의 용량에서 확실히 증가되고 재현성이 인정되는 경우는 양성으로 판정하고 그 외는 음성으로 판정하였다. Gap은 구조이상에 포함하지 않는 결과로 표기하고 종합판단에도 gap을 포함시키지 않고 결과를 평가하였다. 시험물질의 염색체이상유발성에 대한 최종판정은 Toshio Sofuni 등의 판정기준에 따라 염색체이상을 가지는 세포의 빈도가 5% 미만을 음성, 5%이상 10%미만을 의양성, 10% 이상을 양성으로 하였다(농촌진흥청, 2009).

소핵시험

6주령의 암수 특정병원체 부재 ICR 마우스 각 52마리를 ㈜오리엔트바이오로부터 구입하여 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시켜 시험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 20 ± 3℃, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 200~300 Lux로 유지하였다. 실험동물은 마우스용 와이어 케이지(72×240×120 mm, 대종기기 제작)에 2마리씩 넣어 사육하였고, 음수와 사료는 자유로이 급여하였다. 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 용량으로 독성예비시험을 실시한 결과, 수컷의 경우 2마리가 독성이 발현되어 최고용량을 1,500 mg/kg 으로 하여 1,000 및 500 mg/kg을 중용량 및 저용량으로 하였고, 암컷의 경우 모든 투여군에서 특이한 일반증상 및 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서 암컷의 본시험의 용량은 2,000 mg/kg을 최고용량으로 설정하고, 그 이하 1, 000 및 500 mg/kg을 중용량 및 저용량으로 선정하였으며 투여액량은 10 mL/kg으로 하였다. 투여기간동안 1일 1회 일반증상 관찰을 실시하였으며, 일반상태의 변화, 운동성, 외관, 자율신경 등의 일반증상 및 사망동물을 관찰하였다. 체중측정은 투여전과 골수채취 직전 2 회에 걸쳐 체중을 측정하였다. 독성예비시험에서 결정된 최고용량을 투여한 후, 24, 48 및 72시간에 골수세포를 채취하여 소핵이 증가되는 시간대를 본시험에서의 골수세포 채취시간으로 결정하였다. 골수세포의 채취는 시험물질 투여 후, 본시험에 앞서 수행된 소핵유발빈도 시험에서 결정된 골수세포채취 시간에 경추탈골법으로 마우스를 도살하고 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양끝 단을 가위로 절단하여 200 μl의 우태아혈청(Fetal bovine serum, Hyclone, USA)을 관류시켜 채취하였다. 채취한 골수를 4℃로 설정된 1,000 rpm에서 약 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 슬라이드글래스에 낙하하고 도말하여 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 공기 중에서 충분히 건조한 다음 5% Giemsa액으로 염색하여 배율이 1,000배의 현미경으로 관찰하였다. 코드화된 검체에 대하여 동물개체별로 다염성적혈구(PCE, Polychromatic erythrocyte)와 정염성적혈구(NCE, Normochromatic erythrocyte)의 합

이 1,000개가 되도록 계수하여 총적혈구 중 다염성적혈구의 비 [PCE/(PCE+NCE)]를 구했다. 이어서 PCE가 2,000개가 되도록 계수하여 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구(MNPCE, Micronucleated Polychromatic erythrocyte) 의 비 [MNPCE/(10,000 PCE)]를 구하였다. 소핵을 지닌 다염성 적혈구의 유발빈도가 음성대조군 또는 historical data와 비교하여 통계적으로 유의하게 상승하고 용량에 의존적으로 증가하거나 적어도 1개 이상의 용량군에서 통계적으로 유의한 재현성이 관찰될 때 양성으로 판정하였다. 소핵의 유발빈도에 대해서는 Kastenbaum & Bowman의 표를 이용하여 5% 유의수준에서 검증하였다. 다염성 적혈구의 출현비율에 대해서는 t-test법을 이용하여 5% 유의수준에서 통계적 유의성을 검증하였으며, 체중의 변화는 ANOVA test를 실시하여 5% 유의수준에서 통계적인 유의성을 검증하였다(농촌진흥청, 2009).

결과 및 고찰

복귀돌연변이시험

Salmonella. typhimurium 및 *Escherichia coli*를 이용한 복귀돌연변이시험에서 시험물질 methiozolin은 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA등 5종의 시험균주에서 S-9을 적용하지 않은 직접법의 경우 전용량단계에 걸쳐 음성대조군과 비슷한 정도의 복귀돌연변이 수를 나타내어 통계학적으로 유의성을 보이지 않았으며, S-9을 첨가한 대사활성화법에서도 S9 부재와 마찬가지로 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 그러나 양성대조물질의 복귀돌연변이 빈도는 S9 첨가 및 부재 모두 복귀 돌연변이 집락수가 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 1).

염색체이상 시험

시험물질에 대해 CHL cell을 이용한 in vitro 염색체 이상 시험은 S9을 mixture를 첨가하지 않은 직접법과 S9 mixture를 첨가한 대사 활성화법으로 수행하였다. 처리농도는 80, 40, 20 ㎍/mL 농도로 설정하였다. 직접법과 S9 mixture를 첨가한 대사활성시험결과 모두 시험농도에서 음성대조군과 비교시 통계학적 유의성 및 용량 의존성을 보이지 않았으며, 또한 chromosome에 대한 이상은 관찰되지 않았다(Table 2). 양성대조군 MMC는 음성 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이와 같은 결과는 methiozolin이 염색체에 영향을 미치지 않는 물질로 판단된다(Table 2, 3, 4).

소핵시험

수컷 마우스를 이용한 시험물질의 소핵시험결과, 시험 물질 투여후 특이한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 소핵 다염성 적혈구와 총 적혈구대비 다염성 적혈구수의 계수 결과를 Table 5에 나타내었다. 음성 대조군에서의 다염성 적혈구 1,000개당 소핵 다염성 적혈구수의 관찰 빈도는 0.09% 였으며, 양성 대조군은 5.03%으로 음성 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 고용량, 중간용량 및 저용량군이 각각 0.07%, 0.06%, 0.08%로 음성대조군에 비해 시험물질 투여군 모두 통계학적 유의성은 없었다. 또한 총 적혈구 대비 다염성 적혈구수의 관찰 빈도를 조사한 결과(Table 5), 고용량군, 중간용량군 및 저용량군의 빈도가 각각 55%, 57%, 57% 으로 음성대조군의 56%와 비교해볼 때 유의적인 차이가 없었다. 또한 자연 소핵발생율이 0.2% 내외이고, 음성 대조군과 비교하여 볼 때 차이가 없어 시험물질이 마우스의 골수적혈구아세포의 분화과정에서 염색체 이상은 발현하지 않은 것으로 사료된다.

새로 개발된 제초제인 methiozolin의 유전독성 영향을 평가하기 위하여 *Salmonella typhimurium*과 *Escherichia coli*를 이용한 복귀돌연변이 시험, CHL 세포를 이용한 염색체 이상시험 및 mouse 골수 세포에서의 소핵시험을 수행한 결과, 모두 음성으로 판정되었다. 양성대조군은 음성대조군과 비교시 유의적인 증가가 관찰되어 본시험이 적정히 수행되었음을 나타내었다. 유전독성물질의 유전자 손상으로 나타나는 암발생에 대한 관심이 높아지면서 변이원성 시험은 돌연변이원성 및 발암물질을 단기적으로 쉽게 검색할 수 있도록 개발된 시험법으로 유전자, 염색체 및 DNA등에 미치는 영향을 평가하고 그 결과를 토대로 발암성을 예측하는 시험법으로 널리 이용되고 있다(Maron과 Ames, 1983). 사용된 *Salmonella* 균주는 histidine 요구성 이었고, *Escherichia coli* 균주는 tryptophan 요구성 이었다. 복귀 돌연변이의 검토는 histidine과 tryptophan이 적은 배지에서 자라난 colony의 계수에 의해서 평가된다. 번역틀 돌연변이(frameshift mutation)와 염기쌍 치환 돌연변이(base-pair substitution mutation)를 알아내기 위해 적절한 균주들이 선택되었다. 벤조피렌 같은 원래 유전독성이 없으나 대사될 경우 유전독성을 나타내는 시험물질을 확인하기 위해 랫드 간장의 추출물(S9 mix)을 첨가하는 것은 가이드라인에서 규정하는 표준적인 방법이다. 대사활성화를 시킨 경우에 colony의 수가 전체적으로 대사활성화가 없는 경우와 비교할 때 차이를 관찰할 수 없는 것으로 보아 methiozolin은 그 자체나 체내 대사를 통해 활성화가 되

Table 1. Result of bacterial reverse mutation assay (group summary)

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (μg/plate)	Colonies/plate (Mean ± S.D.) [Factor][a] Without S-9 mix	With S-9 mix
TA98	Test	0	19 ± 2	24 ± 8
	Article	312.5	21 ± 5 [1.1]	26 ± 7 [1.1]
		625	18 ± 5 [0.9]	28 ± 3 [1.2]
		1250	14 ± 5 [0.7]	23 ± 11 [1.0]
		2500	17 ± 5 [0.9]	25 ± 8 [1.0]
		5000	18 ± 1 [0.9]	25 ± 1 [1.0]
TA100	Test	0	92 ± 13	85 ± 9
	Article	312.5	95 ± 11 [1.0]	97 ± 11 [1.1]
		625	83 ± 6 [0.9]	95 ± 7 [1.1]
		1250	95 ± 6 [1.0]	88 ± 4 [1.0]
		2500	90 ± 4 [1.0]	96 ± 8 [1.1]
		5000	98 ± 13 [1.1]	95 ± 15 [1.1]
TA1535	Test	0	12 ± 3	13 ± 2
	Article	312.5	10 ± 2 [0.8]	15 ± 3 [1.1]
		625	10 ± 4 [0.8]	11 ± 4 [0.9]
		1250	10 ± 1 [0.9]	13 ± 3 [1.0]
		2500	10 ± 5 [0.8]	13 ± 2 [1.0]
		5000	11 ± 4 [0.9]	13 ± 2 [1.0]
TA1537	Test	0	8 ± 3	12 ± 3
	Article	312.5	6 ± 2 [0.7]	13 ± 2 [1.1]
		625	10 ± 4 [1.2]	13 ± 5 [1.1]
		1250	11 ± 2 [1.3]	14 ± 2 [1.2]
		2500	8 ± 2 [0.9]	13 ± 2 [1.1]
		5000	8 ± 2 [0.9]	9 ± 1 [0.8]
WP2uvrA	Test	0	27 ± 6	39 ± 9
	Article	312.5	26 ± 12 [0.9]	41 ± 2 [1.1]
		625	25 ± 3 [0.9]	35 ± 13 [0.9]
		1250	23 ± 3 [0.8]	38 ± 2 [1.0]
		2500	31 ± 10 [1.1]	32 ± 9 [0.8]
		5000	22 ± 7 [0.8]	32 ± 8 [0.8]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	426 ± 27 [22.1]	
TA100	AF-2	0.01	513 ± 19 [5.6]	
TA1535	NaN3	0.5	252 ± 23 [21.0]	
TA1537	9-AA	80.0	789 ± 20 [94.7]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	188 ± 18 [6.9]	
TA98	2-AA	0.5		409 ± 37 [17.1]
TA100	2-AA	1.0		630 ± 39 [7.4]
TA1535	2-AA	2.0		208 ± 18 [15.6]
TA1537	2-AA	2.0		245 ± 22 [21.0]
WP2uvrA	2-AA	10.0		223 ± 15 [5.7]

[a] No. colonies of treated plate/No. of colonie of negative control plate
NaN3 : sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

어도 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

염색체 이상시험에서는 직접법 및 대사활성법에서 24시간 투여후 각 농도별 염색체 이상 세포의 출현빈도를 조사한 결과 음성대조군과 유의차가 없었으며 용량의존적 증가도 관찰되지 않았으며, 이상세포의 평균 출현율이 5% 미만으로 시험물질은 염색체 이상 유발성에 대해 음성으로 판단되었다. 염색체이상시험은 배양된 포유류의 세포에서 염색체의 구조적 이상을 확인하는 시험이다. 염색체의 변이는 인간의 유전적 질병의 원인이며 체세포에서 암을 발생시키는데 관여하는 암 유발유전자와 암 억제 유전자의 변화를 확실하게 알 수 있는

Table 2. Result of chromosome aberration test - Without metabolic activation (-S9, 6 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (ug/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent (%) of cells showing strcutural aberration								Judgement
						Gap	Chromatid type		Chromosome type		Others	Total		
						g	ctb	cte	csb	cse		-g	+g	
Not Treated	0	0	100	1	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1(0.5)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	
Negative Control	6	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	1		1	0	0	0	0	0	0	1	
			200	1(0.5)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	
Test item	6	20	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			100	0		1	0	1	0	0	0	1	2	
			200	0(0.0)		1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	3(1.5)	
		40	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
			200	0(0.0)		1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)	
		80	100	0	-	3	0	0	0	0	0	0	3	-
			100	1		1	1	0	0	0	0	1	2	
			200	1(0.5)		4(2.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	5(2.5)	
Positive Control (MMC)	6	0.5	100	1	-	7	16	57	0	4	0	77	84	+
			100	0		6	11	61	0	1	0	73	79	
			200	1(0.5)		13(6.5)	27(13.5)	118(59.0)	0(0.0)	5(2.5)	0(0.0)	150(75.0)	163(81.5)	

Table 3. Result of chromosome aberration test - Without metabolic activation (+S9, 6 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (ug/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent (%) of cells showing strcutural aberration								Judgement
						Gap	Chromatid type		Chromosome type		Others	Total		
						g	ctb	cte	csb	cse		-g	+g	
Not Treated	0	0	100	1	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1(0.5)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	
Negative Control	6	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	1		1	0	0	0	0	0	0	1	
			200	1(0.5)		1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	
Test item	6	20	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			100	0		1	0	1	0	0	0	1	2	
			200	0(0.0)		1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	3(1.5)	
		40	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
			200	0(0.0)		1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)	
		80	100	0	-	3	0	0	0	0	0	0	3	-
			100	1		1	1	0	0	0	0	1	2	
			200	1(0.5)		4(2.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	5(2.5)	
Positive Control (MMC)	6	0.5	100	1	-	7	16	57	0	4	0	77	84	+
			100	0		6	11	61	0	1	0	73	79	
			200	1(0.5)		13(6.5)	27(13.5)	118(59.0)	0(0.0)	5(2.5)	0(0.0)	150(75.0)	163(81.5)	

Table 4. Result of chromosome aberration test - Without metabolic activation (-S9, 24 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concen-tration (ug/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judge-ment	Numbers and percent (%) of cells showing strcutural aberration								Judge-ment
						Gap	Chromatid type		Chromosome type		Others	Total		
						g	ctb	cte	csb	cse		-g	+g	
Not Treated	0	0	100	1	-	2	0	0	0	0	0	0	2	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1(0.5)		2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	
Negative Control	24	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	1(0.5)		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Test item	24	20	100	1	-	3	0	0	0	0	0	0	3	-
			100	0		2	0	0	0	0	0	0	2	
			200	1(0.5)		5(2.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	
		40	100	1	-	0	0	1	0	0	0	1	1	-
			100	0		1	0	0	0	0	0	0	1	
			200	1(0.5)		1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)	
		80	100	0	-	1	1	0	0	0	0	0	2	-
			100	1		1	0	0	0	0	0	1	1	
			200	1(0.5)		2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	3(1.5)	
Positive Control (MMC)	24	0.05	100	0	-	1	17	29	0	0	0	46	47	+
			100	0		3	10	32	0	0	0	42	45	
			200	0(0.0)		4(2.0)	27(13.5)	61(30.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	88(44.0)	92(46.0)	

Table 5. Micronucleus test of methiozolin in ICR mice (group summary)

Sex	Chemical Treated	Dose (mg/kg)	No. of Animal	MNPCE/10000PCE's (Mean ± S.D., %)	PCE/(PCE+NCE) (Mean ± S.D., %)
Male	Vehicle	0	6	0.09 ± 0.07	55.57 ± 3.25
	Test items	500	6	0.07 ± 0.06	55.07 ± 2.32
	Test items	1000	6	0.06 ± 0.06	57.29 ± 3.12
	Test tiems	1500	6	0.08 ± 0.05	56.99 ± 2.56
	CPA	70	6	5.03 ± 0.34*	40.60 ± 2.15*
Female	Vehicle	0	6	0.10 ± 0.06	55.97 ± 1.66
	Test items	500	6	0.09 ± 0.04	57.25 ± 3.22
	Test items	1000	6	0.06 ± 0.04	55.58 ± 1.68
	Test tiems	2000	5	0.04 ± 0.05	55.66 ± 2.21
	CPA	70	6	5.60 ± 0.49*	42.84 ± 1.88*

근거이다. Methiozolin의 chinese hamster lung 세포에서의 세포증식억제시험의 결과 세포 독성이 관찰되었고, 고용량은 50% 이상이 생존이 가능한 80 μg/mL으로 설정되었다. Methiozolin의 작용기전은 잘 알려져 있지 않지만, 수경상태에서 옥수수 뿌리에 [^{14}C] glucose를 이용하여 세포벽 생합성 저해 정도를 측정한 결과 1 μM 농도에서 cellulose 및 hemicellulose의 생합성을 50% 이상 저해하는 것을 볼때 식물세포벽 생합성 저해활성을 갖는 다고 한다(Lee 등, 2007). Methiozolin의 chinese hamster lung 세포에서의 세포 독성 기전은 알려진 것이 없으나, 많이 사용되는 제초제 Glyphospate는 인간의 제대, 발생, 태반 세포에서 세포 사멸사와 괴사를 야기하는 것으로 보고 되었다(Benachour 등, 2009). 또한 랫드 고환 세포에서 괴사 및 세포사를 야기하였는데 테스토스테론의 저하를 일으킨다고 한다(Clair 등, 2011). 원제와 유제(시험물질)의 피부에 대한 시험 결과를 비교 해본 결과 유제에서만 피부 자극이 나온 것으로 보아 methiozolin의 약한 독성은 용매에 의한 영향으로 사료된다. 염색체의 변이는 없지만, 세포독성이 나타났으므로 피부 또는 안점막에 대한 자극이 예

상되며, 실제로 내부에서 실시한 급성 독성 평가에서 피부자극과 안자극성이 나타나 본 시험의 결과와 일치되는 결과라고 할 수 있다.

마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서 소핵 다염성 적혈구의 관찰빈도가 음성 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 나타나지 않아 시험물질은 소핵 유발성이 없는 것으로 판단되었다. 시험물질 투여후 24시간 동안 사망동물은 없었으며 특이한 임상증상도 관찰되지 않았다. 골수에서의 소핵의 유발은 독성물질이 간에서 대사되어 혈류를 통해서 골수에 도달하여 적혈구의 염색체 이상을 유발하는 것을 의미 한다. 대사물이 빠르게 그 활성을 잃게 되면 복귀 돌연변이나 염색체 이상시험에서 양성이 나올 경우에도 소핵시험에서 음성을 나타내게 된다. Methiozolin의 토양에서의 대사는 미생물에 의해 빠르게 소실된다. 마우스 체내에서의 대사에 대해서는 보고 된 바가 없지만, 원제의 만성독성시험의 경우 5,000 ppm 까지 독성이 없는 것으로 보아 대사 산물에 대한 독성이 없는 것으로 사료된다.

이상의 시험에서 시험물질은 유전독성이 없는 물질로 사료되며 만성 독성 등을 통해 인체에 대한 안전성에 대한 보다 다양한 자료를 확보하는 것이 필요하다고 사료된다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Ashton, F.M. and A.S. Crafts (1981) Mode action of herbicides. 2nd Ed. J. Wiley & Sons, New York. p. 34.

Benachour, N. and G.E. Seralini (2009) Glyphosate Formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. Chem. Res. Toxicol., 22(1):97~105.

Brown, A.W.A. (1978) Ecology of pesticides. J. Wiley and Sons, New York. P325.

Chun, J.C. and S.Y. Ma (1996) Herbicidal property and soil behavior of new herbicide azimusulfuron. korean J. environ. Agric., 15(4):501~505.

Clair, E., R. Mesnage, C. Travert, G.E. Seralini (2011) A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. Toxicol In Vitro. 19: Epup.

Hay, J.V. (1999) Herbicide discovery in the 21st century- a look into the crystal ball. Special Publication-Royal Society of Chemistry, 233(Pesticide Chemistry and Bioscience):55~65.

Hwang, I.T., H.R. Kim, D.J. Jeon, K.S. Hong, J.H. Song, K.Y. Cho (2005) 5-(2,6-Difluoro-benzyloxymethyl)-5-methyl-3-(3-methyl-thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-isoxazole as a useful rice herbicide. J. Agric. Food Chem. 53:8639~8643.

Kearney, P.C. and D.D. Kaufman (1988) Herbicides. Chemistry, degradation, and mode of action. 430p. Marcel Dekker, Inc, New York.

Lee, J.N., S.J. Koo, K.H. Hwang, I.T. Hwang, D.J. Jeon, H.R. Kim (2007) Mode of action of a new isoxazolin compound. Asian pacific weed science society coonference pp. 591~601.

Lyga, J.W., R.M. Patera, G. Theodoridis, B.P. Halling, F.W. Hotzman, M.J. Plummer (1991) Synthesis and quantitative structure-activity relationships of herbicidal N-(2-Fluro-5-methoxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophthalimides., J. Agric Food Chem. 39:1667~1673.

Maron, D.H and B.N. Ames (1983) Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Mutation Res. 113:173~215.

Munro, D. M., and S.B. Patel (1993). Herbicidal compounds. US Patent 5, 262, 388.

Rheinheimer, J., K. Eicken, H. Theobald, T. Kueenhoehner, F.O. Westphalen, B. Wuerzer, J. Frank, N. Meyer (1991) Isoxazolines, their preparation and their use. Us patent 4, 983, 210.

Ryu, E. K., H.R. Kim, D.J. Jeon, J.W. Song, K.M. Kim, K.S. Hong (2002) Preparation of herbicidal 5-benzlyoxymethul 1,2-isoxazoline derivatives of weed control in rice. Patent No. WO 200209185.

Yogo, Y. (2000) Challenge to discovery of novel action site of herbicides. Nippon Noyaku Gakkaishi, 25(3):276~280.

권용웅, 조광연, 소창호, 이강휘, 조용섭 (1986) 제초제 연구동향과 신규제초제 개발전망, 한국잡초학회지 6(1):138~148.

구석진, 황기환 (2007) 제초성 5-벤질옥시메틸-1,2 이속사졸린 유도체 화합물의 용도, 대한민국특허 제 10-0814420.

구석진, 황기환, 전만석, 김성헌, 임종수, 이동국, 정근회, 고영관, 류재욱, 구동완, 우재춘 (2010) 신규 잔디 제초제 메티오졸린(methiozolin)의 개발. 한국잡초학회지 30(4):323~329.

농촌진흥청 (2009) 농약 관리법령 및 고시, 훈령집 (발간등록번호 11-1390000-002515-01). 인축 독성 시험기준과 방법 pp. 246-252. 대한민국.

황인택, 문영희, 한성수, 전채철 (2001) 제초제와 환경. 한국 잡초학회지 21(2):146~166.

제초제 Methiozolin의 유전독성평가

구석진 · 이종윤[1] · 박철범[2]*

목우연구소, [1]한국화학시험연구원, [2]호서대학교 안전성평가센터

요 약 제초제인 methiozolin에 대한 유전독성 영향을 평가하기 위하여 in vitro 시험으로 복귀돌연변이시험과 염색체 이상시험을 수행하였고, 그리고 in vivo 시험으로 소핵시험을 수행하였다. *Salmonella typhimurium*, 균주 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 및 *Escherichia coli* WP2uvrA를 이용한 복귀 돌연변이 시험에서 직접법과 대사활성화법(S9 mixture) 모두 5,000 ㎍/plate에서 돌연변이 수는 음성 대조군과 유의차가 없었다. Chinese hamster lung(CHL) 세포를 이용한 구조적, 숫적 염색체 이상시험결과 직접법과 대사활성화법의 경우 methiozolin을 투여한 모든 군(80, 40, 20 ㎍/mL)의 세포에서 염색체 이상이 관찰되지 않았다. ICR 마우스를 이용한 소핵시험에서는 methiozolin의 복강투여가 골수세포에서 다염성 적혈구(polychromatic erythrocytes) 및 소핵(micronucleous)을 가진 다염성 적혈구의 출현율을 조사하였는데, 모든 농도(1,500, 1,000, 500 mg/kg)에서 음성대조군과 유의한 차이가 나타나지 않아 소핵을 유발하는 독성이 없는 것으로 판단된다. 이상의 결과로부터 제초제인 methiozolin은 세균, 세포 및 동물체내에서 유전독성을 유발하지 않는 물질로 사료된다.

색인어 유전독성, 제초제, Methiozolin