

토끼에서 Etofenprox와 Spinosad 합제의 국소자극성 시험

황운환¹·김명석¹·송인배¹·임종환²·박병권³·양승호¹·임용현¹·송지용¹·

안성한¹·남현수¹·임정교¹·정상일⁴·명노일⁴·윤효인^{1*}

충남대학교 수의과대학 · 동물의과학연구소¹,

진진바이오팜 (주)², 비엔씨 바이오팜(주)³, 엠엔에이치 엘씨⁴

Local Irritation Test of a New Formulation with Etofenprox and Spinosad in Rabbits

Youn-Hwan Hwang¹, Myoung-Seok Kim¹, In-Bae Song¹, Jong-Hwan Lim², Byung-Kwon Park³,

Cheng-Hao Yang¹, Yong-Hyun Lim¹, Chi-Yong Song¹, Sung-Han An¹, Hyun-Su Nam¹,

Jeong-Gyo Lom¹, Sang-Il Chung⁴, Ro-Eal Myung⁴ and Hyo-In Yun^{1*}

¹Research Institute of Veterinary Medicine and College of Veterinary Medicine,

Chungnam National University,

²JUNJINBIO, ³B&CBiopharm, ⁴MNHLC

Abstract : This study was performed to evaluation the skin and eye irritation of etofenprox 8% and spinosad 4% combination in male New Zealand White rabbits. In skin irritation test, the combination of etofenprox and spinosad did not showed any change of body weight but caused slight skin irritation with the P.I.I. (primary irritation index) value 0.25. The etofenprox and spinosad combination showed severe eye irritation 1 h, 24 h, 48 h, and 72 h after ocular treatment, having the A.O.I. (acute ocular irritation) value of 37.3. Therefore, these result indicated that the combination of etofenprox and spinosad might be irritant formulation on eye and skin.

Key words : irritation, etofenprox, spinosad, rabbit

*Corresponding author: 042-821-6759, hiyun@cnu.ac.kr

서 론

농업분야에서 농작물의 생산성 증대를 위해 사용하는 살충제는 유기인계 및 피레스로이드계 약물이 주로 사용되고 있다. 하지만 불필요한 오남용으로 대상 병해충들의 내성 획득으로 인해 살충효과가 저해되고 있다^{1,2}. 이를 극복하고자 현재 저용량, 고효율의 살충제 합제에 대한 개발이 요구되고 있으며 그에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다³. 하지만 농작물의 안전적 생산과 품질 향상을 위하여 농약의 사용은 필수적이거나 오늘날 각종 유해 물질이 자연 환경 중으로 방출되어 그것이 농작물, 어패류, 식용동물에 이행되고 축적되어 사람의 건강에 잠재적인 위험을 주고 있다.

Pyrethroid계 살충제인 Etofenprox (Fig 1A)는 Mitsui Toatsu Chemicals에서 개발되었다⁴. Etofenprox는 접촉독 및 섭식독 작용제로서 곤충의 신경계를 교란시켜 살충효과를 나타내고, 벼물바구미, 잎말이나방 등의 방제에 쓰이고, 국내의 경우 Etofenprox 20% 유제는 상품명 세베로로 등록되어 있다. Spinosad계 (Fig 1B) 약물은 Dow Agroscience가 개발한 생물농약 살충제로 자연발효 상태에서 *Saccharopolyspora spinosa*가 생산하는 2차 대사산물인 거대환상 락톤 구조의 spinosyn A와 D로 주로 이루어진다⁵. Spinosad는 독특한 작용기작, 경제적으로 중요한 해충에 대한 고도의 활성수준, 짧은 반감기, 포유류, 조류, 어류 및 심지어 대부분의 유용곤충에 대한 큰 안전성을 보인다. Spinosad는 나비목 곤충, 딱정벌레, 총채벌레의 방제에 이용할 수 있도록 미국과 35개 이상의 국가에서 180개 이상의 작물에 등록되었다.

본 연구에서는 Etofenprox와 Spinosad 복합처방의 피부 자극성시험과 안점막 자극성시험을 시행하여 독성 평가를 통해 안전 사용기준의 설정 및 인축 독성을 최소화하기 위해 기초 자료를 확보하고자 한다. 본 시험은 농촌진흥청 고시 2008-4호 '독성시험 기준과 방법'에 준하여 실시하였다⁵.

재료 및 방법

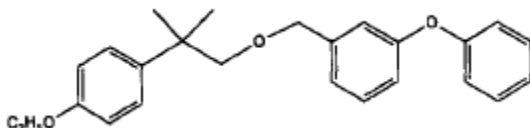
시험물질

시험물질인 Etofenprox와 Spinosad(EC) 합제는 백색의 액상형태의 제품을 동부한농에서 공급받아 시험에 공시하였다. 시험약제 내의 유효성분인 Etofenprox 및 Spinosad은 각각 8% 및 4% 함유되어 있다.

시험동물

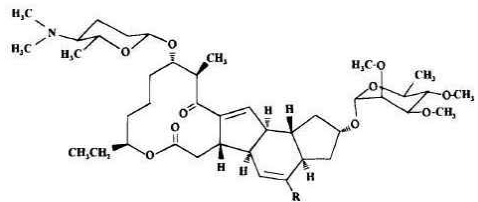
모든 시험동물은 기초자료가 충분히 축적되어 시험에 이용하기 용이한 시험동물 종인 New Zealand White 토끼를 이용하였다. 피부자극성 및 안점막 자극성 시험에는 2kg 내외의 토끼를 시험동물로 사용하였으며 모든 동물은 구입한 후 1주 동안 동물 실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 무작위로 선별하여 본 시험에 공시하였다. 사육환경은 온도 22.3±1.0℃, 상대습도 51.5±0.6%, 환기횟수 13-18회/h, 조명시간 12시간 (오전 7시-오후 7시), 조도 200-300 Lux의 조건을 유지하였으며, 시판 사료와 음용수를 자유급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다^{7,8}. 피부자극성 및 안점막 자극성 시험에 사용된 토끼는

(A)



Etofenprox

(B)



Spinosad

Fig. 1. Chemical structures of tested substances.

자동 급수 및 배설물 수세처리가 가능한 stainless steel 3단 케이지(MJ, 서울)에 개별 수용하여 순화 및 시험기간 동안 사육하였다. 사료는 토끼용 고품 사료 (샘타코 Bio Korea, NIH 32)를 자유 급여 시켰으며, 음수도 상수도수를 자유 급여 시켰다.

피부 자극성 시험

Etofenprox와 Spinosad 합제의 피부자극성을 평가하기 위해 6마리의 New Zealand White 토끼를 시험에 공시하였으며, 시험약제의 처리 약량은 1마리 당 원제 1 ml (1 ml/site)를 처리부위에 1회 도포하였고, 무처리 대조부위는 증류수를 공시 약량과 동일하게 처리하였다^{9,10,11}. 시험개시 24시간 전에 약제처리를 위해서 토끼 등 부위의 체모를 동물용 전기 제모기를 이용하여 12×12 cm² 넓이로 제모시켰다. 제모시킨 토끼의 등 부위를 처치부와 대조부로 나누고, 여기에 각각 비찰과 부위와 찰과 부위를 두어 모두 4 구획을 설정하여 시험을 실시하였다. 찰과 부위는 주사기 바늘 끝을 이용하여 井자 모양으로 표피에 출혈을 일으키지 않을 정도로 손상을 주어 찰과 상태로 만들었다. 시험물질을 처치하기 위해 외과용 테이프를 사용하는 Microfoam (3 M, U.S.A)을 5×5 cm²로 만든 후 여기에 2.5×2.5 cm² 크기의 거즈를 부착한 패치에 시험물질 및 대조물질 1 ml를 상기 4구획 중 지정된 곳의 거즈에 적하하였다. 약제 처리 4시간 후 도포물을 제거하고 피부에 남아 있는 시험물질은 증류수를 이용하여 제거하였다. 시험물질 처리 후 피검 피부가 정상으로 회복될 때까지의 외관 및 일반증상에 대하여 관찰하였다. 공시된 모든 동물에 대하여 시험물질 적용 전, 적용 후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일째에 체중을 측정하였다. 투여 후 4시간, 24시간, 48시간, 72시간, 7일째에 투여부위에 대해 홍반과 가피 형성, 부종 형성 등의 피부자극반응을 관찰하였다. 피부일차자극성 시험 개량법(Federal Register 37, 27635, 1972)에 의해 4시간, 24시간 및 48시간의 성적을 이용하여 1차 자극지수(P.I.I.: primary irritation index) 값을 계산하였다. 물질의 자극도의 구분은 피부 일차 자극표에 표시한 기준에 따라 평가하였다^{12,13}.

안점막 자극성시험

Etofenprox와 Spinosad 합제의 안점막 자극성을 평가하기 위해 6마리의 New Zealand White 토끼를 시험에 공시하였으며, 시험물질 0.1 ml을 결막낭내에 1회 처리하였다. 시험개시 24시간 전에 양쪽 눈에 1% fluorescein 용액을 점안한 후 검안하여 건강한 눈을 갖고 있는 토끼를 공시하였다. 시험물질 처리는 오른쪽 하안검을 가볍게 잡아당기고 결막낭내에 투약하였다. 왼쪽 눈은 무처리 대조로 하였다. 시험물질 처리 후 안점막이 정상으로 회복될 때까지의 외관 및 일반증상에 대하여 관찰하였고 공시된 모든 동물에 대하여 시험물질 적용 전, 적용 후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일째에 체중을 측정하였다. 투여 후 1시간, 24시간, 48시간, 72시간, 7일째에 각막, 홍채 및 결막 등을 관찰 조사하였다. 시험물질에 대한 자극의 평가는 Draize 등이 제안한 방법에 따라 평가하였다^{14,15}.

결과 및 고찰

피부자극성 시험기간 동안 모든 개체에서 시험물질인 Etofenprox와 Spinosad 합제 처리에 기인한 중독증상 및 치사동물이 관찰되지 않았다. 시험기간 중 시험물질에 의한 체중변화도 관찰 되지 않았다. 시험물질 투여 후 4, 24, 48 및 72 시간째 각각 비찰과와 찰과 부위에서의 홍반, 부종 및 가피 형성 여부 등에 대한 피부반응을 평가한 결과, 시험물질은 일부동물의 찰과부위에서 홍반 및 부종이 관찰되었다 (Table 1). 관찰된 피부반응은 관찰 24일째 이후에는 모두 소실되었다. P.I.I. (primary irritation index) 값이 0.25로서 시험물질은 경도의 피부자극성을 나타내었다.

안점막 자극 시험 결과, 모든 동물에서 시험물질 Etofenprox와 Spinosad 합제 처리 후 시험물질에 기인한 어떠한 중독증상 및 치사 동물이 관찰 되지 않았다. 시험물질 처리 후 체중은 정상적으로 증가하였다. 시험물질의 안점막 노출 후 1, 24, 48, 72 시간째에 각막혼탁, 홍채반응 및 결막의 발적, 부종, 배출물 여부를 토대로 안자극성 반응을 평가하였다.

Table 1. The result of skin reaction in rabbits treated with etofenprox 8% and spinosad 4% combination

Site	Control site								Test site								
	Erythema & Eschar				Edema				Erythema & Eschar				Edema				
	Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		
Time (hr)	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	
Animal No.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mean score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Total score	0								1								
PII	0								0.25								

PII, primary irritation index. Total score/4.

Table 2. Scores of ocular lesions in rabbits treated with etofenprox 8% and spinosad 4% combination

Animal No.	Ocular lesions	Observation time (hr)			
		1	24	48	72
1	Cornea (A)	0	10	10	10
	Iris (B)	0	0	0	0
	Conjunctiva (C)	4	12	14	18
	IOI (A+B+C)	4	22	24	28
2	Cornea (A)	0	10	20	20
	Iris (B)	0	0	0	0
	Conjunctiva (C)	4	14	14	18
	IOI (A+B+C)	4	24	34	38
3	Cornea (A)	0	10	25	25
	Iris (B)	0	0	0	0
	Conjunctiva (C)	2	18	12	16
	IOI (A+B+C)	2	28	37	41
4	Cornea (A)	0	20	15	25
	Iris (B)	0	0	0	0
	Conjunctiva (C)	2	18	12	16
	IOI (A+B+C)	2	38	27	41
5	Cornea (A)	0	15	20	20
	Iris (B)	0	0	0	0
	Conjunctiva (C)	2	16	12	18
	IOI (A+B+C)	2	31	32	38
6	Cornea (A)	0	25	25	20
	Iris (B)	0	0	0	0
	Conjunctiva (C)	4	14	12	18
	IOI (A+B+C)	4	39	37	38
	MOI	3	30.3	31.8	37.3

Cornea, opacity×area×5; iris, values×5; Conjunctiva, (redness+chemosis+discharge)×2

MOI (mean ocular irritation index), sum of IOI/6.

시험에 이용된 모든 개체에서 시험물질 처리 후 각막혼탁, 결막의 심한 발적, 부종 및 배출물이 관찰 되었다. A.O.I.(acute ocular irritation)는 37.3으로 나타났다 (Table 2). 시험물질은 안점막 자극 평가 결과, 토끼에 대한 안점막 자극은 중등도 자극성을 나타나는 것으로 평가 되었다. Etofenprox와 Spinosad 원제는 피부자극성이 없으며 경도의 안점막 자극성을 나타내는 것으로 보고 되어 있으나, 본 시험결과는 복합처방, 부형제나 이용된 제형의 차이에 따라 시험물질의 피부 및 안점막 자극성이 유도된 것으로 판단된다^{6,16}.

이상의 결과를 종합해 볼 때, Etofenprox 8%와 Spinosad 4% 합제는 경도의 피부자극성과 중등도의 안점막 자극성을 나타내는 것으로 확인되었으며 실제 적용에 있어 주의가 요구되는 것으로 판단된다.

참고문헌

- Zhu Y Z, Kim SM, Hur JH. Residue of fludioxonil in peach (*Prunus persica*) fruit. *Agr Sci Inst Agr Sci Kangwon Nat Univ* 2002; 13:103-107.
- Hillaker TL, Botsford JL. Toxicity of herbicides determined with a microbial test. *Bull Environ Contam Toxicol* 2004;73:599-606.
- Ma J, Lin F, Wang S et al. Acute toxicity assessment of 20 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. *Bull Environ Contam Toxicol* 2004;72:1164-1171.
- Kim SS, Lee SM, Koo MY et al. Residual analysis and safety uses of methoxyfenozide and etofenprox in pastures. *J Agr Sci Inst Agr Sci* 2003;14:59-66.
- 농촌진흥청. 농약 독성시험 기준과 방법. 농촌진흥청 고시 제2008-4호. 수원: 농촌진흥청. 2008.
- Gao R, Dong J, Zhang W et al. Dietary risk assessment of spinosad in China *Regul Toxicol Pharmacol* 2007;49:31-42.
- Joseph CS, Georgene MR, Georgene MR. Laboratory animal management. In: *CRC Handbook of Toxicology*, Eds. Micheal, JD. and Mannfred, AH. New York : CRC Press, 1995:1-50.
- Sheri AR, Gray TB. Animal care and facilities. In: *Principles and methods of toxicology*, 3rd ed. New York: Raven Press, 1994:497-544.
- Rusty ER, Kimberly LB, Deborah AD et al. Dermal irritation and sensitization. In: *CRC Handbook of toxicology*. New York: CRC Press, 1995:105-162.
- Esther P, Howard M. Dermatotoxicology. In: *Principles and methods of toxicology*, 3rd ed. New York: Raven Press, 1994:787-789.
- Yamarik TA. Safety assessment of dichlorophene and chlorophene. *Int J Toxicol* 2004;23:1-27.
- Shopsis C, Borenfreund E, Walberg J et al. A battery of potential alternatives to the Draize test: uridine uptake inhibition, morphological cytotoxicity, macrophage chemotaxis and exfoliative cytology. *Food Chem Toxicol* 1985;23:259-266.
- Brendan JD. Toxicology of the eye. In: *CRC Handbook of toxicology*, New York: CRC Press, 1995:163-216.
- Ping KC, Wallace AH. Acute toxicity and eye irritancy. In: *Principles and methods of toxicology*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994:603-606.
- Esther P, Howard M. Dermatotoxicology. In: *Principles and methods of toxicology*, 3rd ed. New York: Raven Press, 1994:775-778.
- DE, Forshaw PJ. Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies, and therapy. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000;38:95-101.