



ORIGINAL ARTICLES

천연제초활성 소재 Herbicidin의 설치류와 토끼에 대한 독성평가

박흥현 · 김남석 · 유아선¹ · 박연기 · 전경미* · 김영숙² · 최정섭²

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과, ¹농촌진흥청 국립축산과학원 가금연구소, ²한국화학연구원 친환경신물질연구센터

Toxicity Evaluation of a Natural Herbicidal Material, Herbicidin to Rodents and Rabbits

Hong-Hyun Park, Namseok Kim, Are-Sun You¹, Yeon-Ki Park, Kyongmi Chon*, Young-Sook Kim², Joung-Sup Choi²

Toxicity and Risk Assessment Division, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

¹National Institute of Animal Science, RDA, Pyeongchang 25340, Republic of Korea

²Eco-friendly and New Materials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon, 34114, Korea

(Received on September 25, 2020. Revised on October 27, 2020. Accepted on November 16, 2020)

Abstract To test the acute toxicity of herbicidin A, made of natural herbicidal material on rodents (mice and rats) and rabbits, mouse acute oral toxicity, rat acute dermal toxicity and rabbit acute dermal/eye irritation/corrosion tests were performed. In the mouse acute oral toxicity tests, after one oral injection of herbicidin A (2,000 mg/kg b.w), no fatalities or apparent abnormalities of the mice were observed during 14 days of monitoring period. In the rat acute dermal toxicity tests, after applying a single dose of herbicidin A (2,000 mg/kg b.w) evenly to the skin, no lethality or visible sign of dermal toxicity were observed during 14 days of monitoring period. In the rabbit dermal/eye irritation/corrosion tests, after applying 0.5 g of raw herbicidin A on the skin, and 0.1 g on the ocular membrane, no toxic symptoms were shown on the skin or eyes of rabbits. The results of this study showed that herbicidin A was little to no toxicity to mice, rats and rabbits at the standard concentration of the basic test stage.

Key words Acute oral toxicity, Acute dermal toxicity, Dermal irritation/corrosion, Eye irritation/corrosion, Herbicidin

서 론

외래 잡초는 국가 간의 교류가 활발해지면서 비행기나 배를 통해 다양한 종류가 유입되고 있는데, 도로변, 생활 주변 뿐만 아니라 농경지, 산지, 주요 하천 및 댐 주변 등으로 급속하게 확산되어 서식지 파괴, 환경오염, 식생의 단순화 등 심각한 문제를 일으키고, 작물생산에도 크게 영향을 끼쳐 국내 생태계에 악영향을 미치고 있다.

특히 최근에 공항이나 항만의 물류 집결 지역이나 수입

사료 육상 이동로를 따라 가시상추, 서양금혼초, 가시박 등 외래 잡초 유입이 증가하여 생태계를 교란하고 있고, 농경지로의 침입도 점차 진행되고 있는 실정으로 우리나라의 논, 밭, 과수원 및 목초지 등에서도 총 28과 166종의 외래 잡초가 발견되었다(Choi, 2017; Kim et al., 2018).

그동안 외래 잡초 방제법이 다양하게 개발되었지만, 유기합성 제초제 위주의 잡초방제는 장기 사용으로 인한 저항성 잡초 출현(Riches et al., 1996), 사람과 가축 및 환경생물 독성 및 환경 오염 우려가 항상 존재한다. 가지를 잘라내거나 뿌리를 뽑아 제거하는 물리적인 방법은 잡초 종합방제 측면에서 활용되지만, 노동력이 많이 들고 완전한 제거가 불가

*Corresponding author
E-mail: kmchon6939@korea.kr

능한 단점이 있다. 따라서 생력적으로 외래 잡초를 방제하기 위해서는 기존 유기합성 제초제보다 환경오염이나 독성 측면에서 상대적으로 안전한 새로운 제초제 개발이 요구된다.

외국에서는 이러한 제초제 개발을 위해서 사람과 가축에 영향이 없는 식물 특이적인 신규 작용점이나 미생물이 생산하는 천연 유도 저항성 물질을 대상으로 토양 미생물이나 이들이 생산하는 대사산물을 이용한 천연물 소재 제초제 탐색과 개발이 활발히 추진되고 있다(Duke et al., 2000; Mitchell et al., 2001; Chaimovitch et al., 2010; Bailey and Falk, 2011; Bailey, 2014).

천연 유래 소재의 제초제는 기존 합성 제초제보다 개발 비용에 비해 성공률이 높아 상대적으로 경제적인 것으로 평가되고 있다(Pyon et al., 2017). 국내 유기합성 제초제를 대체할 수 있는 자생식물과 미생물을 활용한 새로운 제초제 개발을 위한 활발한 연구가 이루어지고 있지만, 제품화된 것은 아직 없는 실정이다(Kim et al., 1996; Kim et al., 1997; Park et al., 2012; Lee et al., 2013; Won et al., 2015; Kim et al., 2015; Kim et al., 2018).

개발된 제초제의 경우 사용 전 인체 독성에 대한 연구가 매우 중요하다. 제초제 관련 급성독성시험의 선행연구 자료에 의하면 glufosinate의 랫드 급성경구독성(LD₅₀: 1500-2000 mg/kg)과 안점막자극 및 피부자극성 시험결과가 보고된 바 있다(Cox C., 1996). Koo et al. (2011)는 methozolin의 급성 경구(LD₅₀: 2,000 mg/kg b.w 이상) 및 경피 독성시험(LD₅₀: 4000 mg/kg b.w 이상), 피부자극성 및 안점막 자극성시험결과를 보고하였다. Suyatna와 Darmayanti (2003)는 glyphosate isopropylamine과 2,4 D-isopropylamine의 혼합물에 대한 안점막자극성 시험결과를 발표하였다. 하지만 천연 제초활성 소재에 대한 급성독성평가 연구자료는 거의 없는 상태이다.

한국화학연구원에서는 생태계 교란 외래잡초의 친환경적 제거를 위해 미생물 대사체 기반 후보 소재를 선별하고 있으며, 실용화를 위해 국립농업과학원과 공동으로 방제효과와 독성 등을 평가하고 있다(Won et al., 2015; Park et al., 2019). 이에 본 연구에서는 Park et al. (2019)이 보고한 herbicidin의 어류 및 육상생물에 대한 독성평가에 이어 설치류와 토끼에 대한 급성독성을 추가로 평가하였다.

재료 및 방법

Herbicidin의 설치류에 대한 급성독성평가

시험물질 및 시험장소

본 독성시험에 사용한 원제는 천연제초활성 소재 herbicidin A (95%, powder)로 한국화학연구원으로부터 제공받아 사용하였다. 독성 시험은 식약처 실험동물 등록시설인 국립농업

과학원 독성 기능성 연구동 실험동물사육실에서 이루어졌다.

시험동물

모든 시험은 국립농업과학원 동물실험윤리위원회 승인 후 (승인번호: NAS-201901, NAS-202001) 수행하였다. 본 연구에 사용한 마우스(ICR 생쥐, 7주령 암컷)와 랫드(Sprague Dawley rat, 7주령 암컷), 그리고 토끼(New Zealand White rabbit, 7주령 암컷)는 한일 실험 동물센터(전북 완주군 소재)에서 구입하였으며, 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 10%, 12시간의 명암조건에서 일주일간 적응시킨 후 사용하였다. 고향사료와 물은 자유 급식시켰다.

마우스 급성경구독성시험(급성독성등급법)

마우스에 대한 급성경구독성시험은 OECD의 가이드라인(OECD, 2001) 및 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」의 인축독성 시험기준과 방법(RDA, 2019)의 급성경구독성 시험 중 급성독성등급법에 준하여 시험하였다. 시험 전 마우스는 물을 제외한 먹이를 4시간 금식시켰다. 금식 후 마우스의 체중을 측정하고 그 무게에 따라 herbicidin A 투여량을 결정하였다. 시험은 마우스 6마리에 대해 2단계로 나눠 진행되었는데, 1단계 시험에서 마우스 3마리에 herbicidin 2,000 mg/kg b.w을 존대를 이용하여 강제로 1회 경구 투여하였다. 2단계 시험 역시 마우스 3마리에 1단계와 동일한 양으로 강제로 1회 경구투여하였으며 herbicidin 투여 후 1시간까지 금식시켰다. 시험물질 경구투여에 따른 마우스 치사 및 독성증상은 투여 후 30분, 1, 2, 3, 4시간에, 그리고 24시간마다 14일 동안 관찰하였으며, 체중은 투여 후 14일 동안 총 4회 측정하였다.

랫드 급성경피독성시험(고정용량법)

랫드에 대한 급성경피독성시험은 OECD의 가이드라인(OECD, 2017a) 및 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」의 인축독성 시험기준과 방법(RDA, 2019)의 급성경피독성 시험 중 고정용량법에 준하여 시험하였다. 시험 개시 전에 약제 처리를 위해 랫드 등 부위를 전기 이발기 ((주) 조아스, 경기 남양주)를 이용하여 넓게 제모하였다. 시험은 랫드 3마리에 대해 2단계로 진행되었는데, 예비시험에서 랫드 1마리에 약제 처리는 제모한 부분에 herbicidin A 2,000 mg/kg b.w의 농도로 paste 상으로 균일하게 바른 거즈(4 cm × 4 cm)로 덮어 패치화하였다. 시험약제의 유실을 방지하기 위해 Coban™ tape ((주)한국쓰리엠, 서울)로 고정시킨 후 24시간 노출 후에 패치를 제거하였다. 본 시험에서는 2마리를 이용하여 동일한 농도로 herbicidin A를 24시간 동안 부착하였다. 시험물질 처리에 따른 랫드 치사 및 독성증상은 부착 후 30분, 1, 2, 3, 4시간에 그리고 14일 동안 매 24시간마다 관찰하였다. 랫드 체중은 투여 후 14일 동안 총

4회 측정하였다.

토끼 피부자극성시험

토끼에 대한 피부자극성시험은 OECD의 가이드라인 (OECD, 2015) 및 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」의 인축독성 시험기준과 방법(RDA, 2019)의 피부자극성 시험에 준하여 시험하였다. 피부자극성 시험 개시 전에 약제를 처리하기 위해 토끼 등 부위를 전기 이발기(주) 조아스, 경기 남양주)를 이용하여 넓게 제모하였다. 시험은 제모한 부분을 paste 상의 herbicidin A 0.5 g을 균일하게 바른 거즈(2 cm × 3 cm)로 덮고 패치는 피부에 자극성이 없는 테이프(Coban™ tape, (주)한국쓰리엠)로 고정시켰고, 초시 시험에서는 3분, 1, 4시간, 확인 시험에서는 4시간동안 유지한 후에 패치를 제거하였다. 시험은 토끼 3마리를 이용하여 초시시험과 확인시험 2단계로 진행했는데, 초기시험에는 토끼 1마리, 확인시험에는 2마리를 사용하였다. 초기시험에서는 토끼 1마리를 사용하여 등 부위를 제모하여 4개 구역을 지정(각 2 cm × 3 cm)하여 한 곳에는 대조구로 30% EtOH를 처리한 패치를 부착하여 1시간 노출 후 제거하였고, 나머지 3곳에는 herbicidin 0.5 g을 처리한 패치를 부착한 후 3분, 1, 4 시간 동안 노출시킨 다음 제거하고 임상관찰을 하였다. 확인시험에서는 토끼 2마리에 대해 예비시험과 같이 등 부위를 제모하고, 구역(각 2 cm × 3 cm)을 정하여 대조구에는 30% EtOH 패치를, 처리구에는 herbicidin A 0.5 g 패치를 4 시간 동안 고정한 후 제거하고 임상관찰을 하였다. 부착 후 4시간 그리고 매 24시간마다 3일간 치사 및 흥반과 가피형성 그리고 부종의 정도를 관찰하였으며, 2주간 치사를 관찰하였고 8회 체중을 측정하였다.

토끼 안점막자극성시험

토끼에 대한 안점막자극성시험은 OECD의 가이드라인 (OECD, 2017b) 및 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」의 인축독성 시험기준과 방법(RDA, 2019)의 안점막자극성 시험에 준하여 시험하였다. 시험은 토끼 3마리에 대해 2단계로 진행했는데, 초기시험에서는 토끼 1마리, 확인 시험에서는 2마리를 사용하였다. 처리는 토끼 한쪽 눈의 하안검을 가볍게 잡아당겨 herbicidin A 0.1 g의 중량으로 균일하게 넣고 시료손실을 막기위해 양안검을 맞춰잡고 약 1 초간 유지하고, 무처리한 다른쪽 눈을 대조구로 하였다. Herbicidin A를 넣고 1시간, 그리고 24시간마다 3일간 토끼의 치사 및 이상증상(각막, 홍채, 결막, 결막부종)을 관찰하였고, 체중은 2주간 8회 측정하였다.

결과 및 고찰

마우스 급성경구독성평가

7주령 마우스 암컷에 시험물질 herbicidin A를 최고 약량 수준 2,000 mg/kg으로 경구투여 결과, 1단계 및 2단계 시험 모두에서 사망한 개체는 없었고, 시험물질과 관련된 이상 증상은 관찰되지 않았다(Table 1). 그리고 마우스 체중 변화는 1, 2단계 시험에서 14일 후에 각각 3.7 g, 2.5 g의 체중 증가가 있었지만, 특이적인 체중 변화는 없었다(Table 2). 이상과 같이 herbicidin A의 마우스에 대한 급성경구독성 시험에서 시험물질에 기인한 특이한 임상 증상, 체중 변화 등 독성영향이 관찰되지 않았으며, 최대투여용량에서도 사망한 개체는 없었다. 따라서 마우스의 herbicidin A에 대한 급성 경구독성시험에서 독성영향은 없는 것으로 판단되었으며,

Table 1. Number of dead or clinical abnormal female mice in acute oral toxicity experiments using herbicidin A

Test types	Dose level (mg/kg, b.w)	Items	Hours after administration					Days after administration																
			0.5	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1 step test	2,000	Dead mice	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
		Clinical signs	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2 step test	2,000	Dead mice	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Clinical signs	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Table 2. Body weight changes in female mice of acute oral toxicity experiments using herbicidin A

Test types	Dose level (mg/kg, b.w)	Body weight (g) ^{a)} at the indicated time			
		Days 0	Day 1	Day 7	Day 14
1 step test	2,000	25.17 ± 0.26	25.74 ± 0.33	27.68 ± 0.52	28.88 ± 1.23
2 step test	2,000	25.74 ± 0.39	24.68 ± 1.42	25.67 ± 1.83	28.26 ± 1.52

^{a)} Values are presented as mean ± S.D. (n=3).

OECD 가이드라인(OECD, 2001)의 Annex 2d에 의해 GHS (Globally Harmonized classification System for chemical substances and mixtures) Category 중 “Category 5 / Unclassified”에 해당되어 경구독성이 매우 낮은 것으로 판단되었고(United Nations, 2019) LD₅₀치는 5,000 mg/kg b.w 이상으로 평가되었다.

미국 EPA의 농약 독성 분류에 따르면 급성 경구 LD₅₀값이 고독성(high toxicity)은 ≤50, 중간 독성(moderate toxicity)은 51-500, 저독성(low toxicity)은 501-5,000 그리고 매우 낮은 독성(very low toxicity)은 >5,000 mg/kg 으로 구분하고 있는데(Office of the Federal Register, 2009) 이 기준을 적용하면 herbicidin A는 마우스에 대한 급성경구독성은 매우 낮은 것으로 판단된다.

한편, 천연물에 대한 급성경구독성평가에서 라벤다 오일 자체는 마우스에 대해 무독성을 나타냈고(Mekonnen et al., 2019), 라벤다, 레몬 유칼립투스, 계피 오일 각각을 유화제와 3:7의 비율로 혼합한 시험물질 독성시험(Jeong et al., 2010) 및 후추 추출물, 클로브버드, 로즈마리 및 오리가눔 오일 각각을 에탄올과 5:5의 비율로 혼합한 시험물질 독성시험(Jeong et al., 2011)에서 경구 LD₅₀ cut-off가 2,000 mg/kg b.w 이상으로 보고된 바 있다.

랫드 급성경피독성

7주령 랫드 암컷 등 부위에 시험물질 herbicidin A를 최고 약량수준 2,000 mg/kg으로 균일하게 바른 후 관찰 결과, 예비시험에서 2,000 mg/kg b.w로 처리하였을 때 치사 및 이상 증상이 보이지 않아 본시험의 처리 농도로 선택하였으며, 본 시험에서도 랫드의 치사 및 외관상 이상 증상은 없었다 (Table 3). 그리고 시험 전, 중간, 종료 시 랫드의 체중증가

경향이 보였고, 14일 후에는 각각 27.3 g, 33.3 g의 체중 증가가 있었다(Table 4). 이상과 같이 herbicidin A의 랫드에 대한 급성경피독성시험에서 시험 물질에 기인한 특이한 외관상 이상, 체중 변화 등 독성영향이 관찰되지 않았으며, 최대투여용량에서도 치사한 예가 없었다. 따라서 랫드에 대한 GHS Category는 “Category 5 / Unclassified”로 분류되어 독성이 매우 낮으며(United Nations, 2019) LD₅₀치는 2,000 mg/kg b.w이상으로 평가되었다. 이런 결과는 미국 (Office of the Federal Register, 2009)의 독성 분류에 따르면 toxicity category III 단계(약한독성)에 해당되어 herbicidin A의 랫드에 대한 급성경피독성은 약한 것으로 나타났다.

한편 랫드에 대한 급성경피독성이 낮은 경우는 유칼립투스 오일(70%)과 유화제를 섞은 혼합물질(Hu et al., 2014) 및 라벤다 오일(Mekonnen et al., 2019)에서도 보고되었다.

본 연구에서 랫드를 이용한 급성경피독성시험은 마우스를 이용한 급성경구독성시험과 유사한 결과를 얻었는데, Jo et al. (2018)은 500여 개 등록 농약 제품과 원제를 조사하여 이 중 78%가 급성경구독성 등급과 급성경피독성 등급이 동일하다는 결과를 보고하였다. 그 결과 급성경구독성 자료를 이용하여 급성경피독성을 예측하고 농약 제품과 원제의 독성 구분 및 독성을 표시할 수 있다고 확대해석할 수 있지만, 경구와 경피라는 노출경로에 따라 독성 발현 양상이 다르게 나타날 수 있기 때문에 주의를 해야 한다는 의견을 제시하였다(Jo et al., 2018).

토끼 피부자극성시험

초기시험에서 7주령 암컷 토끼의 등 부위에 herbicidin A를 기준 약량(0.5 g)으로 균일하게 바른 거즈 패치를 3분, 1시간, 4시간 부착시킨 후 임상 관찰한 결과, 패치제거 4시간

Table 3. Number of dead or clinical abnormal female rats of acute dermal toxicity experiments using herbicidin A

Test types	Sex	Dose level (mg/kg, b.w)	Items	Hours after administration					Days after administration													
				0.5	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Range-Finding Study	Female	2,000	Dead rats	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
			Clinical signs	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Main study	Female	2,000	Dead rats	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
			Clinical signs	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Table 4. Body weight changes in female rats of acute dermal toxicity experiments using herbicidin A

Test types	Dose level (mg/kg, b.w)	Body weight (g) at the indicated time			
		Day 0	Day 1	Day 7	Day 14
Range-Finding Study	2,000	172.25	168.29	182.78	199.58
Main study	2,000	174.16 ± 6.58 ^{a)}	170.69 ± 11.43	191.04 ± 12.83	207.44 ± 4.72

^{a)} Values are presented as mean ± S.D. (n=2).

Table 5. Clinical signs from the initial test in dermal irritation experiments on rabbits treated with herbicidin A

Treatment duration	Clinical signs	Elapsed time after patch removal					
		3 min.	1 hr	4 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
3 min	Erythema/ Incrustation	0	0	1	0	0	0
1 hr		0	0	1	0	0	0
4 hrs		0	0	1	0	0	0
3 min	Adema	0	0	0	0	0	0
1 hr		0	0	0	0	0	0
4 hrs		0	0	0	0	0	0

Table 6. Clinical signs from the confirmatory tests in dermal irritation experiments on rabbits treated with herbicidin A

Treatments	30% EtOH				Herbicidin 0.5 g			
	Erythema / Incrustation		Adema		Erythema / Incrustation		Adema	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
Elapsed time After patch								
1 hr	0	0	0	0	1	0	0	0
24 hrs	0	0	0	0	0	0	0	0
48 hrs	0	0	0	0	0	0	0	0
72 hrs	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 7. Grading of skin reactions (adapted from OECD TG No.404)

Erythema and Eschar Formation	Grade
No erythema	0
Very slight erythema(barely perceptible)	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beef redness) to eschar formation preventing grading of erythema	4
Maximum possible: 4	

Table 8. Body weight changes in female rabbits after a single dermal administration of herbicidin A

Test types	Body weight (g) at the indicated time							
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 6	Day 8	Day 9	Day 10	Day 13
Initial test	1,810	1,810	1,850	1,900	1,970	2,080	2,070	2,140
Confirmatory test	1,890 ± 141.4 ^{a)}	1,900 ± 127.3	1,900 ± 127.3	1,910 ± 113.1	2,075 ± 162.6	2,180 ± 155.6	2,170 ± 141.4	2,175 ± 134.4

^{a)}Values are presented as mean ± S.D. (n=2).

후 피부에서 홍반 및 가피형성이 일시적으로 보였으나 24시간, 48시간, 72시간 관찰 시에는 보이지 않았다(Table 5). 초기시험에서 부식 영향이 보이지 않아 두 마리를 추가하여 수행 한 확인시험에서 동일한 조건으로 관찰과 채점을 수행 하였다. 대조구로 30% EtOH 처리한 부위에서는 홍반과 가피가 전혀 없었으나, herbicidin A를 처리한 한 마리 토끼의 피부에서 패치제거 1시간 후가피의 형성은 없었으며 일시적인 가벼운 발적이 나타났으나(Grade 1), 그 이후에는 발적 증상이 보이지 않았다(Table 6). 이상 증상의 평가는 OECD 가이드라인(No. 404)의 피부증상 평가표를 기준으로 평가하

였다(Table 7). 시험기간 동안 사망한 토끼는 없었고 시험 전, 중, 종료 시의 체중이 증가하는 경향을 나타냈으며, 초기시험, 확인시험에서 각각 330 g, 285 g의 체중 증가가 있었다(Table 8).

이상의 결과를 볼 때 시험 전체 기간을 통하여 토끼에서 치사 개체는 없었고, 시험물질에 기인한 체중 변화는 관찰 되지 않았다. 또한 약제 도포 부위를 관찰한 결과, 홍반, 부종 및 가피 형성은 일시적으로 관찰되었으나, 특이적인 변화는 인정되지 않았다. 이상의 결과를 볼 때 시험물질은 토끼에서 자극성이 없는 무자극 물질로 판단되었다.

Oh et al. (2013)은 유기농업자재로 사용되는 님 추출물 2종(미안마산, 인도산)과 고삼 추출물 중국산 1종의 토끼 피부자극성평가에서도 피부자극성 없다는 결과를 보고하였는데, Lee et al. (2018)은 국내에 공시된 유기농업자재들이 200종의 병해충관리용 자재에 대해 분석한 결과, 피부자극성이 없음 164개, 경도 5개, 중도 6개, 강도 10개로 독성이 평가되었다고 보고하였다.

토끼 안점막자극성시험

시험물질인 herbicidin A를 안구에 처리한 결과, 초기시험에서는 아무런 증상이 나타나지 않았으나, 확인시험에서 약물을 투입하지 않은 한쪽 눈에 비하여 herbicidin A를 처리한 1마리 토끼에서 처리 1시간 경과 후 각막과 홍채에서는

이상증상이 보이지 않았으며 결막 발적(Grade 1), 결막 부종(Grade 1)이 보였으나 그 이후에는 보이지 않았다(Table 9). 이상 증상의 평가는 OECD 가이드라인(No. 405)의 안구 증상 평가표를 기준으로 평가하였다(Table 10). 그리고 초기 시험, 확인시험에서 토끼 개체들의 체중이 증가하는 경향이 보였고, 각각 330 g, 230 g의 체중 증가가 있었지만(Table 11), 시험물질에 기인한 체중의 증가 또는 감소와 같은 변화는 관찰되지 않았다.

한편 Oh et al. (2013)은 피부자극성이 없었던 님 추출물과 고삼 추출물을 이용한 토끼 안점막자극성평가 결과, 님 추출물의 안점막자극은 약한 반면, 고삼 추출물에서 각막 혼탁, 결막 발적 등의 증상과 많은 양의 배출물을 분비하는 등 극심한 독성증상이 관찰되어 자극성이 있는 것으로 평가

Table 9. The score of eye mucosal reaction in rabbits

Eye mucosal reaction	Elasped time after administration	Initial test		Confirmatory test			
		Control	herbicidin 0.1 g	Control		Herbicidin 0.1 g	
				No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
Cornea	1 hr	0	0	0	0	0	0
	24 hrs	0	0	0	0	0	0
	48 hrs	0	0	0	0	0	0
	72 hrs	0	0	0	0	0	0
Iris	1 hr	0	0	0	0	0	0
	24 hrs	0	0	0	0	0	0
	48 hrs	0	0	0	0	0	0
	72 hrs	0	0	0	0	0	0
Conjunctiva	1 hr	0	0	0	0	0	2
	24 hrs	0	0	0	0	0	0
	48 hrs	0	0	0	0	0	0
	72 hrs	0	0	0	0	0	0

Table 10. Grading of ocular lesions (adapted from OECD TG No.405)

Conjunctivae	Grade
Redness(refers to palpebral and bulbar conjunctivae; excluding cornea and iris)	
Normal	0
Some blood vessels hyperaemic (injected)	1
Diffuse,crimson colour,individual vessels not easily discernible	2
Diffuse beefy red	3
Maximum possible: 3	
Chemosis	
Swelling (refers to lids and/or nictating membranes)	
Normal	0
Some swelling above normal	1
Obvious swelling, with partial eversion of lids	2
Swelling, with lids about half closed	3
Swelling, with lids more than half closed	4
Maximum possible: 4	

Table 11. Body weight changes in female rabbits after a single eye administration of herbicidin A

Test types	Herbicidin (g)	Body weight (g) at the indicated time							
		Day 0	Day 1	Day 3	Day 6	Day 8	Day 9	Day 10	Day 13
Initial test	0.1	1,820	1,890	1,930	1,970	2,020	1,920	2,100	2,150
Confirmatory test	0.1	1,880 ± 198.0 ^{a)}	1,895 ± 219.2	1,905 ± 205.1	1,925 ± 190.9	2,000 ± 183.8	2,100 ± 198.0	2,085 ± 148.5	2,110 ± 169.7

^{a)}Values are presented as mean ± S.D. (n=2).

했고, 안점막자극성이 강한 것으로 평가된 고삼추출물이 유기농업 자재로 사용할 때 농작업자에 대한 표시 문구 및 그림문자 표시가 필요한 것으로 판단된다는 의견을 제시하였다. 그리고 Lee et al. (2018)은 국내에 공시된 유기농업자재의 안점막자극성평가 결과, 200종의 병해충관리용 자재 중 자극성 없음 152개, 경도 19개, 중도 2개, 강도 11개로 독성을 나타냈다고 보고하였다.

본 시험결과 herbicidin은 급성경구 및 경피 독성이 매우 낮으며 피부자극성 및 안점막 자극성이 없는 것으로 판단되었다. Park et al. (2019) 논문에서 herbicidin의 환경생물 급성독성평가 결과에 따르면 herbicidin은 환경생물에도 매우 안전한 것으로 파악이 되어 향후 외래 잡초가 확산되고 있는 댐주변 및 하천뿐만 아니라 생활주변 및 도로변에서도 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 공동연구사업(과제 번호; PJ01347902)에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

Author Information and Contributions

Hong-Hyun Park, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Doctor of Philosophy, Writing & Funding acquisition, <https://orcid.org/0000-0003-1213-0665>

Namseok Kim, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Research assistant, Carrying out experiments, <https://orcid.org/0000-0003-4046-1744>

Are-Sun You, National Institute of Animal Science, Doctor of Philosophy, Experimental design, <https://orcid.org/0000-0001-7258-2626>

Yeon-Ki Park, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Experimental design, <https://orcid.org/0000-0003-2143-2614>

Kyongmi Chon, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Doctor of Philosophy, Review & Editing, <https://orcid.org/0000-0003-2143-2614>

Young-Sook Kim, Eco-friendly and New Materials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Doctor of Philosophy, Preparation of herbicidin, <https://orcid.org/0000-0002-7233-4806>

Joung-Sup Choi, Eco-friendly and New Materials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Doctor of Philosophy, Preparation of herbicidin, <https://orcid.org/0000-0001-7978-8985>

이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다

Literature cited

- Bailey KL, Falk S, 2011. Turning research on microbial bioherbicides into commercial products - a Phoma story. *Pest Technol.* 5(1):73-79.
- Bailey KL, 2014. The bioherbicides approach to weed control using plant pathogens. Pp. 245-266. In: Abrol DP (Eds). *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, Elsevier (Academic Press), USA.
- Chaimovitch D, Abu-Abied M, Belasiv E, Rubin B, Dudai N, et al., 2010. Microtubules are an intracellular target of the plant terpene citral. *Plant J.* 61(3):399-408.
- Choi JS, 2017. Strategy for control of invasive alien weeds based on secondary metabolite(s) from a natural substances. *Weed Turf. Sci.* 37(2):10-12. (In Korean)
- Cox C., 1996. Herbicide factsheet: glufosinate. *Pestic. Reform.* 16(4):15-19.
- Duke SO, Dayan FE, Romando I, Rimando A, 2000. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. *Weed Res.* 40(1):99-111.
- Hu Z, Feng R, Xiang F, Song X, Yin Z, et al., 2014. Acute and subchronic toxicity as well as evaluation of safety pharmacology of eucalyptus oil-water emulsions. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7(12):4835-4845.

- Jeong MH, Hong SS, Park KH, Park JE, Kwak SJ, et al., 2011. Toxicity assessment and establishment acceptable daily intake of lepimectin. *Korean J. Pestic. Sci.* 15(2):218-229. (In Korean)
- Jeong MH, Hong SS, Park KH, Kim CS, Park JE, et al., 2010. Toxicity assessment and establishment acceptable daily intake of penthiopyrad. *Korean J. Pestic. Sci.* 14(4):478-489. (In Korean)
- Jeong MH, Kwon MJ, Park SJ, Hong SS, Park KH, et al., 2010. Evaluation of acute toxicity of plant extracts, lavender, lemon eucalyptus and cassia essential oil. *Korean J. Pestic. Sci.* 14(4):339-346. (In Korean)
- Jeong MH, Park SJ, Kwon MJ, You AS, Park KH, et al., 2011. Evaluation of acute toxicity of black pepper extracts, clove bud, rosemary and origanum essential oils. *Korean J. Pestic. Sci.* 15(3):231-237. (In Korean)
- Jeong MH, Hong SS, Park KH, Park JE, Kwak SJ, et al., 2011. Toxicity assessment and establishment acceptable daily intake of lepimectin. *Korean J. Pestic. Sci.* 15(2):218-229. (In Korean)
- Jo YM, Park SJ, You AS, Oh JA, Lee JB, et al., 2018. Comparison assessment for acute oral and dermal toxicity of plant protection products and active ingredients. *Korean J. Pestic. Sci.* 22(3):225-244. (In Korean)
- Kim CS, Kim JW, Oh YJ, Hong SH, Heo SJ, et al., 2018. Exotic weeds flora in crop fields in Republic of Korea. *Weed Turf. Sci.* 7(1):1-14. (In Korean)
- Kim JD, Sin HT, Kim YS, Ko YK, Cho NK, et al., 2015. The influence of adjuvants on herbicide activity of *Streptomyces scopuliridis* KR-001. *Weed Turf. Sci.* 4(4):288-294. (In Korean)
- Kim JD, Kim YS, Kwak HS, Kim HJ, Lee YM, et al., 2018. Control of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) of mutant N-29 broth filtrate of *Streptomyces scopuliridis* KR-001. *Weed Turf. Sci.* 7(3):219-229. (In Korean)
- Kim PK, Park DJ, Choi JS, Hwang IT, Hong KS, 1997. Biological control by *Penicillium* species. *Agri. Chem & Biotech.* 40(11):65-70. (In Korean)
- Kim PK, Park DJ, Choi SY, Kim CJ, 1996. Screening of *Penicillium* sp. showing herbicidal activity on *Trifolium repens* L. *Applied Biological Chemistry.* 39(6):455-459. (In Korean)
- Koo SJ, Kwon M, Park CB, 2011. Evaluation of acute toxicity of the herbicide methiozolin. *Korean J. Pestic. Sci.* 15(4):383-388. (In Korean)
- Lee BY, Kim JD, Kim YS, Ko YK, Yon GH, et al., 2013. Identification of *Streptomyces scopuliridis* KR-001 and its herbicidal characteristics. *Weed Turf. Sci.* 2(1):38-46. (In Korean)
- Lee JB, Jo YM, You AS, Oh JA, Park SJ, et al., 2018. Toxicity and safety evaluation of organic agricultural materials allowed in Korea. *Korean J. Pestic. Sci.* 22(3):184-191. (In Korean)
- Mekonnen A, Tesfaye S, Christos SG, Dires K, Zenebe T, et al., 2019. Evaluation of skin irritation and acute and subacute oral toxicity of lavandula angustifolia essential oils in rabbit and mice. *J. Toxicol.* <https://doi.org/10.1155/2019/5979546>
- Mitchell GD, Bartlett W, Fraser TEM, Hawkes TR, Holt DC, et al., 2001. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* 57(2):120-128.
- OECD, 2002. OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris, France.
- OECD, 2015. OECD Guideline for Testing of Chemicals; Test Guideline No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. Paris, France.
- OECD, 2017a. OECD Guideline for The Testing Of Chemicals; Test Guideline No. 402: Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure. Paris, France.
- OECD, 2017b. OECD Guideline for Testing Of Chemicals; Test Guideline No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Paris, France.
- Office of the Federal Register, 2009. Code of Federal Regulation. 40CFR156.62.
- Oh JA, Choi JH, Choe MS, Kim JH, Paik MK, et al., 2013. Evaluation of skin & eye irritation of plant extracts, neem and sophora. *Korean J. Pestic. Sci.* 17(4):478-481. (In Korean)
- Park SW, Bae TO, Kim SB, 2012. Isolation and characterization of *Streptomyces* spp. from soil showing broad spectrum antibiotic activity. *Korean J. Microbiol.* 48(4): 270-274. (In Korean)
- Park YK, Chon KM, Lee H, Kim BS, Yang AL, et al., 2019. Acute toxicity of herbicidin to environmental organisms. *Korean J. Pestic. Sci.* 23(3):212-219. (In Korean)
- Pyon JY, Lee JJ, Park KW, 2017. Status and perspective of bioherbicide development for organic weed management. *Weed Turf. Sci.* 6(1):1-10. (In Korean)
- RDA, 2019. Agrochemicals Management Act. Pp. 468-475. Jeonju, Korea. (In Korean)
- Riches CR, Caseley JC, Valverde BE, Down VM, 1996. Resistance of *Echinochloa colona* to ACCase inhibiting herbicides. *Proc. International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides.* EWRS, Cordoba, Spain, Pp. 14-16.
- Suyatna FD, Darmayanti S, 2003. Acute eye irritation study of a mixture of glyphosate isopropylamine salt and 2,4 D-isopropylamine. *Med. J. Indonesia.* 12(3):135-141.
- United Nations, 2019. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS), New York and Geneva, America.
- Won OJ, Kim YT, Kim JD, Choi JS, Ko YK, et al., 2015. Herbicidal activity of herbicidin from a strain of soil actinomycete *Streptomyces scopuliridis*. *Weed Turf. Sci.* 4(3):219-224. (In Korean)

천연제초활성 소재 Herbicidin의 설치류와 토끼에 대한 독성평가

박흥현 · 김남석 · 유아선¹ · 박연기 · 전경미* · 김영숙² · 최정섭²

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과, ¹농촌진흥청 국립축산과학원 가금연구소,
²한국화학연구원 친환경신물질연구센터

요 약 천연제초활성 소재인 herbicidin A의 설치류(마우스, 랫드)와 토끼에 대한 급성 독성을 알아보려고 마우스 급성경구독성시험, 랫드 급성경피독성시험 및 토끼를 이용한 피부 및 안점막자극성 시험을 수행하였다. 마우스 급성경구독성시험에서 기초시험단계의 기준농도인 원제 2,000 mg/kg(체중)를 1회 경구투여 후 14일간 관찰한 결과, 마우스의 치사 및 외관상 이상 증상은 관찰되지 않았다. 랫드 급성경피독성시험 역시 기준농도인 원제 2,000 mg/kg(체중)를 1회 피부에 고르게 바른 후, 14일간 관찰한 결과, 치사 및 경피독성은 관찰되지 않았다. Herbicidin A 원제 0.5 g을 피부에, 0.1 g을 안점막에 처리한 토끼 피부 및 안점막자극성시험 결과 피부나 안구에서 독성증상을 보이지 않았다. 결과적으로 천연물 제초제 소재 herbicidin A는 기초시험단계의 기준농도 처리 수준에서 마우스, 랫드, 그리고 토끼에 대한 독성을 거의 보이지 않았다.

색인어 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안점막자극성, Herbicidin