

【별지 제19호 서식】

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ009950)

주관과제명(한글)
농작업자 농약노출의 시스템독성학적 연구

(주관과제명(영문))

Systemic Toxicological Studies of Pesticide Exposure to Agricultural Workers

주관연구기관명
호서대학교 산학협력단

연구수행기간
2014.01 ~ 2016.12

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “농작업자 농약노출의 시스템독성학적 연구”(개발기간 : 2014. 01. ~ 2016. 12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구

제2세부연구과제 : 시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석

제3세부연구과제 : 급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발교육

2017. 02. 28.

제1세부/협동연구기관명 : 호서대학교 산학협력단

제1세부/협동연구책임자 : 정상희

참여연구원 : 민정란, 김기훈, 김수현, 안혜진, 한소영

제2세부/협동연구기관명 : 호서대학교 산학협력단

제2세부/협동연구책임자 : 정상희

참여연구원 : 이아영, 장윤정

제3세부/협동연구기관명 : 국립농업과학원

제3세부/협동연구책임자 : 백민경

참여연구원 : 박경훈, 전경미, 김아름누리

주관연구책임자 : 정상희

주관연구기관장 : 호서대학교 산학협력단

보고서 요약서

과제번호	PJ009950		연구기간	2014.01~2016.12		
연구사업명	단위사업명	농업공동연구				
	세부사업명	농업정책지원기술개발(R&D)				
	내역사업명	농업인건강노동 및 생활안전 향상연구				
연구과제명	주관과제명	농작업자 농약노출의 시스템독성학적 연구				
	세부(협동) 과제명	(1세부) 농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구 (2세부) 시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석 (1협동) 급만성 농약노출 예측을 위한 생체바이오마커 개발				
	구분	연구기관		소속		
연구책임자	1세부	호서대학교 산학협력단		임상병리학과 정상희		
	2세부	호서대학교 산학협력단		임상병리학과 정상희		
	3세부	국립농업과학원		화학물질안전과 백민경		
총 연구기간 참여연구원 수	총: 34명 내부: 8명 외부: 26명	총 연구개발비		정부: 600 백만원 민간: 0 백만원 계: 600 백만원		
위탁연구기관명 및 연구책임자	해당없음	참여기업명		해당없음		
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:		
요약	본 연구는 농약에 대한 인체노출인자(피부흡수율, 흡입흡수율) 평가방법을 개발 확립하여 농작업자 건강에 대한 위해성평가에 적용하고, 대체시험법을 개발하며, 농작업자에 대한 급만성 농약중독 예측을 위한 생체바이오마커를 개발하여 농작업자의 건강보호에 활용하고자 수행되었다.					
	1세부에서는 농약의 피부흡수율 시험법 구축을 위한 OECD, EU, EFSA 등 시험법을 비교검토하고, 생체외·생체내 피부흡수율, 흡입흡수율 평가를 위해 실험모델을 구축하였으며, 구축한 실험모델에 대한 검증을 위하여 클로르파리포스 및 티오파네이트-메틸에 대한 적용시험을 진행하였다. 적용시험을 통하여 산출된 피부흡수율 및 흡입흡수율 값을 이용하여 농약의 피부 및 흡입을 통한 생체 노출량을 평가하여 농작업자에 대한 위해성을 확인하였으며, 클로르파리포스는 노출된 농약이 주로 피부층에 잔존하여 인체위해성은 크지 않을 것으로 평가되었고, 티오파네이트-메틸은 농작업자에 대한 노출량이 AOEL보다 다소 높을 것으로 평가되었다.					
	또한, 농약 제품 특성별, 노출 조건별 피부노출량 평가모델을 구축하기 위하여 국내 다생산 농약 20종에 대한 농약 성분과 제품별 피부흡수율 조사, 농약 사용조건 비교조사 등을 하였다. 그리고 농약의 흡입 노출량 평가모델을 구축하기 위하여 흡입노출에 의한 농작업자 노출량 평가방법 및 국제적 동향을 조사하였고, 농약 제품의 피부 및 흡입 노출량 평가와 이를 위한 위해성평가 가이드라인을 개발하였다.					
	보고서 면수: 180					

2세부에서는 타겟 장기인 피부와 호흡기의 *in vitro* 대체법 구축 및 독성 기전연구를 위한 사람유래의 세포주(피부, 호흡기)를 선정하여 receptor gene assay를 진행하였고, 농약의 표적장기 독성을 예측하기 위한 *in vitro* High Throughput Screening(HTS) 방법을 개발하였다. 또한 시스템 독성학적 대체기술 개발 및 독성평가지표에 대한 기전 네트워크를 분석하기 위하여 인간유래세포, 호흡기 세포주에서 유전자, 단백질 변화를 연구하였고, 농약독성, 표적장기 질환별 functional guidance bioindicator 발굴을 통한 대체법 및 스크리닝 시험법을 개발하였으며, 화학 분류별로 선정된 농약들의 표적장기세포에서의 HTS 결과에 대한 체계적 자료를 확보하여 발굴된 독성평가지표 및 대체법을 기반으로 기전 네트워크 연구를 진행하였다.

3세부에서는 동물에게 급성 및 반복 농약 노출을 통하여 뇨, 혈액 등 생체시료를 채취하였고, 이를 이용하여 농약의 특이적 바이오마커 분석을 위한 분석법 정립 및 노출량과의 상관성을 분석하였다. 또한 농작업자 대상 단기 농약 노출시험을 통하여 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성을 분석하였다.

결론적으로 본 과제를 통하여 농약에 대한 생체내 피부흡수율 표준시험법이 확립되었고, 농작업자에 대한 농약의 노출에 의한 위해성평가 지침이 도출되었다. 아울러 국내 다생산 농약에 대한 농작업자 노출허용량을 근거로 하여 농작업시 노출되는 양의 위해도가 확인되었다.

또한 농약의 신속 간편하며 시스템적 대체독성시험법으로 피부독성과 흡입 독성 마커가 확립되었고 이들 유전자를 도입한 유전자 전환 인체피부세포 및 폐세포가 개발 확립되어 기전 네트워크 규명에 이용될 수 있음이 확인되었다.

아울러 농약에 대한 급만성 노출지표 바이오마커가 확립되어 농약노출시 신속 간편하게 농약에 대한 농작업자의 노출량·독성·노출여부를 확인할 수 있으며 농약의 농작업자에 대한 안전성 향상 및 보다 과학적인 평가가 가능할 것으로 기대된다.

〈 국 문 요 약 문 〉

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

연구의 목적 및 내용	<p>[연구의 목적]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 농약 피부노출량 평가를 위한 생체외 실험모델 구축 ○ 농약의 피부·흡입 노출을 통한 피부흡수율 및 생체노출량 평가모델 구축 ○ 피부흡수율 및 투과율 산정 실증모델 구축 및 적용 <p>[연구의 내용]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 농약의 성분별 물리화학적 특성조사, 농약 제품별 농작업자의 농약노출조건 및 노출량 조사 ○ 농약 제품의 생체외 및 생체내 피부흡수율 시험법 확립 ○ 농약제품의 피부노출량 평가 및 위해성평가 ○ 농약 제품의 흡입노출량 평가 및 위해성평가 ○ 피부·흡입 노출량 평가 및 위해성평가 가이드라인 개발
	<ul style="list-style-type: none"> ○ OECD, EU, EPA 등의 피부흡수율 시험법 비교조사 ○ 농약제품의 <i>in vitro</i> 피부흡수율 시험방법 확립, 노출량 평가 및 위해성평가 <ul style="list-style-type: none"> - Chlorpyrifos의 <i>in vitro</i> 피부흡수율: 2.91%로 확인 - Chlorpyrifos의 <i>in vitro</i> 피부흡수율을 적용한 인체노출량: 0.012 mg/kg bw/day (수화제, speed sprayer 조건) - Chlorpyrifos의 <i>in vitro</i> 피부흡수율을 적용한 인체노출량 산출시, 농작업자 노출허용량보다 높으나, 대부분 피부층에 잔존하여 인체위해성은 크지 않을 것으로 판단됨 ○ 농약제품의 <i>in vivo</i> 피부흡수율 시험방법 확립, 노출량 평가 및 위해성평가 <ul style="list-style-type: none"> - Chlorpyrifos의 <i>in vivo</i> 피부흡수율: 1.1%로 확인 - Chlorpyrifos의 <i>in vivo</i> 피부흡수율을 적용한 인체노출량: 0.0077 mg/kg bw/day (수화제, speed sprayer 조건) - Chlorpyrifos의 <i>in vivo</i> 피부흡수율을 적용한 인체노출량 산출시, 농작업자 노출허용량보다 높으나, 대부분 피부층에 잔존하여 인체위해성은 크지 않을 것으로 판단됨 ○ 농약 제품의 <i>in vivo</i> 흡입흡수율 시험방법 확립, 노출량 평가 및 위해성평가 <ul style="list-style-type: none"> - Chlorpyrifos의 흡입흡수율: 55.57%로 확인 - Chlorpyrifos의 입자크기: 3 μm 미만, 폐포 부위에 침착되고 폐포벽을 통과하여 흡수됨 <p>⇒ 흡입흡수율 기본치인 100% 적용</p>

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농약의 피부흡수율/흡입흡수율에 근거한 농작업자 노출량 평가방법 구축 및 위해성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 금번 확립 농약의 농작업자 농약의 인체위해성평가 지침을 활용하여 다 생산 농약인 20종에 대한 농작업자 위해성 평가를 실시함 - 실험적 피부흡수율 자료에 근거하여 노출량을 산출하여 농작업자 노출허용량(AOEL)과 비교한 결과 만코제브, 클로로탈로닐, 티오파네이트메틸, 디티아논, 플루아지남 등의 농약이 노출량 대비 AOEL이 1보다 높을 것으로 판단되어 이를 농약에 대한 피부흡수 방지 방안이 강구되어야 할 것으로 판단됨 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 농약의 농작업자에 대한 안전성 평가를 위한 피부흡수율 평가 지침 및 표준시험방법 활용 ○ 농약의 농작업자 흡입흡수율 평가시 표준시험지침으로 활용 ○ 시험 기관에서 농약 시험시 기초자료로 활용 ○ 농약의 인허가 기관에서 농약의 농작업자에 대한 안전성 평가를 위한 기본 지침으로 활용 ○ 농약 안전성에 대한 기초자료로 활용 ○ 본 연구로 개발된 농약의 피부 및 흡입 노출량 예측 기법을 기반으로 농작업자 노출량 예측 ○ 농약 수입 및 제품 개발 시 농약 사용의 안전성 강화를 위한 과학적 근거 자료를 구축하여 이를 농약 허가 지침 설정에 활용할 수 있음 ○ 현재 사용되고 있는 수많은 농약 종류 중 농민의 보건복지상 특히 문제가 되는 농약들을 파악하여 우선적으로 관리해야 할 농약의 우선순위 선정시 활용 ○ 농작업자의 농약 건강 위해성평가의 기초자료로 활용 					
중심어 (5개 이내)	<table border="1"> <tr> <td>농작업자</td> <td>농약</td> <td>위해성평가</td> <td>피부흡수율</td> <td>흡입흡수율</td> </tr> </table>	농작업자	농약	위해성평가	피부흡수율	흡입흡수율
농작업자	농약	위해성평가	피부흡수율	흡입흡수율		

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농약 노출에 따른 독성 기전에 기초한 스크리닝 시험법 개발 및 검증 ○ 표적장기 독성에 대한 독성기전 규명 및 예측기법 개발 ○ 시스템독성학적 대체 기술 개발 및 독성평가지표에 대한 기전 네트워크 분석 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 표적장기 독성에 대한 독성기전 규명 및 예측기법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 농약 독성 마커 선정 및 농약의 주노출 장기인 피부, 호흡기계 세포주를 이용한 reporter gene assay 기법 확립 - 농약의 표적장기 독성 예측을 위한 <i>in vitro</i> high throughput screening (HTS) 방법 개발 ○ 시스템독성학적 대체 기술 개발 및 독성평가지표에 대한 기전 네트워크 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 농약 노출에 의한 인간 유래 피부, 호흡기 세포주에서 유전자, 단백질 변화 연구 - 농약 독성, 표적 장기 질환관련 functional guidance bioindicator 발굴을 통한 대체법 및 스크리닝 시험법 개발 - 화학 분류별로 선정된 농약들의 표적 장기세포에서의 HTS 결과에 대한 체계적 자료 확보 - 발굴된 독성평가지표 및 대체법을 기반으로 기전 네트워크 연구 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농약의 피부, 호흡기 독성 예측 대체법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 대체법 기술 확보에 기여 ○ 농약의 독성 기전 연구 및 종류별 독성평가 자료 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 농약 제품 관리에 과학적 근거 자료로 활용 ○ 빠르고 효율적인 농약 독성 평가 기술 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 과학적 국가경쟁력 향상에 기여 ○ 주 노출장기를 대상으로 한 독성 평가에 신뢰성 있는 연구자료 확보로 피부, 호흡기 질환 <i>in vitro</i> 연구 모델 제시 <ul style="list-style-type: none"> - 농약 외 생활 속에서 주로 노출되는 독성물질에도 적용 가능 					
중심어 (5개 이내)	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">농약</td> <td style="padding: 5px;">리포터유전자 시험법</td> <td style="padding: 5px;">피부 독성</td> <td style="padding: 5px;">호흡기 독성</td> <td style="padding: 5px;">대체법</td> </tr> </table>	농약	리포터유전자 시험법	피부 독성	호흡기 독성	대체법
농약	리포터유전자 시험법	피부 독성	호흡기 독성	대체법		

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농작업자 농약노출에 따른 생체 바이오마커 분석 및 노출상관성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 동물실험 통한 단회 및 반복 농약노출시 뇨 중 대사체 분석 및 노출 상관성 분석 ○ 농작업자 대상 단기 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출상관성 분석 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물실험 통한 chlorpyrifos 및 deltamethrin 단회 및 반복 노출시 뇨를 통한 대사체인 TCP 및 3-PBA 배설량과 높은 상관성 보임 ○ 농작업자를 대상으로 한 단기 deltamethrin 노출에 따른 뇨중 3-PBA 배설량은 상관성이 나타나지 않음 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>가. 활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 농작업자의 생체시료를 통한 농약 및 대사체 분석 ○ 급만성 농약노출 예측을 위한 생체시료 중 바이오마커 활용 <p>나. 기대성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 농작업자의 건강위해수준의 신속한 확보 					
중심어 (5개 이내)	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">농약</td> <td style="padding: 5px;">노출</td> <td style="padding: 5px;">바이오마커</td> <td style="padding: 5px;"></td> <td style="padding: 5px;"></td> </tr> </table>	농약	노출	바이오마커		
농약	노출	바이오마커				

⟨ Summary ⟩

[Study on Human Exposure indicators for the exposure analysis of pesticides]

Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of <i>in vitro</i> model for assessment of pesticide skin exposure ratio ○ Establishment of exposure model for investigation of dermal absorption ratio and internal body exposure amount through dermal and inhalation routes to pesticides ○ Application of skin absorption rate and permeability estimation model for calculation of internal exposure dose
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Comparison research of dermal absorption rate test method (OECD, EU, US, etc.) <ul style="list-style-type: none"> - Comparative analysis of guidelines for dermal absorption and inhalation exposure amount ○ Establishment and application of <i>in vitro</i> dermal absorption test model of pesticides <ul style="list-style-type: none"> - Analysis of dermal absorption rate and exposure assessment of chlorpyrifos using <i>in vitro</i> rat skin tissue - <i>In vitro</i> dermal absorption of chlorpyrifos : 2.91% - Human body dose with <i>in vitro</i> dermal absorption of chlorpyrifos : 0.012 mg/kg bw/day (Wettable powder, speed sprayer condition) - In the calculation of human body exposure using <i>in vitro</i> dermal absorption of Chlorpyrifos, it is higher than exposure dose of operators, but most of it remains in skin layer. So human risk is not expected to high ○ Establishment and application test of <i>in vivo</i> skin absorption rate test of pesticide <ul style="list-style-type: none"> - Analysis of dermal absorption rate of chlorpyrifos through <i>in vivo</i> dermal exposure - <i>In vivo</i> dermal absorption of chlorpyrifos : 1.1% - Human body dose with <i>in vivo</i> dermal absorption of chlorpyrifos : 0.0077 mg/kg bw/day (Wettable powder, speed sprayer condition) - In the calculation of human body exposure using <i>in vitro</i> dermal absorption of Chlorpyrifos, it is higher than exposure dose of operators, but most of it remains in skin layer. So human risk is not expected to high

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of test model of inhalation absorption rate using <i>in vivo</i> rat model and its application to obtain internal exposure dose <ul style="list-style-type: none"> - Analysis of absorption rate of chlorpyrifos through <i>in vivo</i> inhalation exposure - <i>In vivo inhalation</i> absorption of chlorpyrifos: 55.57% - particle size of chlorpyrifos: under 3μm - Attached to alveola and absorbed through the alveoli wall ⇒ Inhalation absorption rate 100% applied ○ Establishment and application of exposure assessment method based on skin and absorption rate of pesticides <ul style="list-style-type: none"> - Comparison research of toxicity value of pesticide ingredients, dermal absorption rate, conditions of use and exposure conditions to operators - Dermal absorption test of thiophanate-methyl using <i>in vivo</i> rat model - Risk assessment of operators by skin and inhalation exposure of highly produced pesticide products 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Internationalization and standardization of pesticide exposure assessment methods by establishment of pesticide skin absorption rate test method ○ Scientific prediction of pesticide exposure amount and improved to pesticides reliability risk assessment result ○ Enhancement of safety pesticides through confirmation of operators' health from exposure ○ Establishment of guidelines for risk assessment of pesticides exposed to operators to prevent intoxication caused by pesticides 					
Keywords	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Operator</td><td style="padding: 2px;">Pesticide</td><td style="padding: 2px;">Risk assessment</td><td style="padding: 2px;">dermal absorption</td><td style="padding: 2px;">inhalation absorption</td></tr> </table>	Operator	Pesticide	Risk assessment	dermal absorption	inhalation absorption
Operator	Pesticide	Risk assessment	dermal absorption	inhalation absorption		

[Development of alternative system toxicological techniques network analysis of toxicological indicators]

Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development and evaluation of screening system based on toxicity mechanism by pesticide exposure ○ Investigation and prediction of target organ toxicity of pesticides ○ Development of alternative test for systemic toxicity and analysis of toxicity mechanism 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of toxicity screening system regarding target organ toxicity <ul style="list-style-type: none"> - Selection of pesticide toxicity marker and reporter gene assay using cell lines of major organs to pesticide exposure, skin and respiratory system - Development of <i>in vitro</i> high throughput screening (HTS) system to screen target organ toxicity of pesticides ○ Development of alternative test for systemic toxicity and analysis of toxicity mechanism <ul style="list-style-type: none"> - Study of gene and protein changes in human-derived cell lines of skin and airway - Development of alternative test and screening test using functional guidance bioindicator regarding pesticide toxicity and target organ disease - Collection of data of the HTS results of selected pesticides in the target organ cell lines - Investigation of toxicity mechanisms of pesticides in the skin and airway cells 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of screening system for pesticide toxicity on skin and respiratory system <ul style="list-style-type: none"> - Contribution to domestic alternative technology ○ Mechanism study and evaluation data of pesticide toxicity <ul style="list-style-type: none"> - Applying for management of pesticides ○ Fast and effective evaluation of pesticide toxicity <ul style="list-style-type: none"> - Contributing to scientific national competitiveness ○ <i>In vitro</i> models for skin and airway diseases based on toxicity evaluation data targeting major exposure organs <ul style="list-style-type: none"> - Available for major exposed materials in life 					
Keywords	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">Pesticides</td><td style="padding: 5px;">Reporter gene assay</td><td style="padding: 5px;">skin toxicity</td><td style="padding: 5px;">respiratory toxicity</td><td style="padding: 5px;">alternative test</td></tr> </table>	Pesticides	Reporter gene assay	skin toxicity	respiratory toxicity	alternative test
Pesticides	Reporter gene assay	skin toxicity	respiratory toxicity	alternative test		

[Study of Predictive Biomarkers for acute and chronic pesticide poisoning]

Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Correlation analysis of pesticide exposure and urinary metabolite for pesticide sprayer <ul style="list-style-type: none"> - Correlation analysis of pesticide exposure and urinary metabolite in rats ○ Correlation analysis of single pesticide exposure and urinary metabolite for pesticide sprayer 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ High correlations with pesticide exposure(chlorpyrifos and deltametrin) and urinary metabolite(TCP and 3-PBA) were observed in single or the repeated pesticide exposure of animal experiment. ○ Correlation with deltemethrin exposure and urinary 3-PBA for pesticide sprayer was not observed. 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Application plan <ul style="list-style-type: none"> - Analysis of pesticide and its urinary metabolite in biosample for pesticide sprayer - Utilization of biomarkers for predicting acute and chronic pesticide exposure ○ Expected performance <ul style="list-style-type: none"> - Rapid assurance of health risk for pesticide sprayer 					
Keywords	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Pesticide</td> <td style="padding: 2px;">Exposure</td> <td style="padding: 2px;">Biomarker</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;"></td> </tr> </table>	Pesticide	Exposure	Biomarker		
Pesticide	Exposure	Biomarker				

〈 목 차 〉

제 1 장	연구개발과제의 개요	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황	22
제 3 장	연구수행 내용 및 결과	33
제 4 장	목표달성을 및 관련분야에의 기여도	147
제 5 장	연구결과의 활용계획 등	153
제 6 장	연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	156
제 7 장	연구개발성과의 보안등급	161
제 8 장	국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황	161
제 9 장	연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	161
제 10장	연구개발과제의 대표적 연구실적	164
제 11장	기타사항	173
제 12장	참고문헌	174

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

농약에 대한 농작업자 노출의 안전성을 평가하기 위하여 농약의 피부흡수율, 흡입흡수율을 아는 것이 매우 중요한 바, 본과제를 통하여 다음의 기술을 구축하고 적용하고자 함.

1. 농약 피부노출량 평가를 위한 생체외 실험모델 구축
2. 농약의 경피/흡입 노출을 통한 피부 흡수율 및 생체 노출량 평가모델 구축
3. 피부흡수율 및 투과율 산정 실증 모델 구축 및 적용

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

피부 및 호흡기 반응에 미치는 특정 농약의 노출에 대한 영향을 빠른 시간 안에 스크리닝하기 위한 방법으로 high throughput screening (HTS) 방법의 개발을 목표로 함.

- 피부/호흡기 질환 관련, 세포 소기관 관련 농약 독성 마커 이용 HTS system 개발
- 농약 종류별 표적 장기세포에서의 HTS 결과에 대한 체계적 농약 독성 자료 확보
- 확보된 농약 독성 평가 자료를 활용한 독성평가지표에 대한 기전 네트워크 분석

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

우리나라는 농작업자의 농약노출 연구로 노출량 산정모델 개발이나 역학조사를 통한 질병과의 연관성 연구 등이 진행되고 있으나, 농작업자의 급만성 중독에 대한 진단연구는 미비하고, 농약의 급만성 중독 예측을 위한 biomarker 개발 연구로서 특히 시료의 채취용이성이 높은 혈액, 뇨 등의 생체시료를 이용하여 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발을 연구 목표로 함.

제2절 연구 개발의 필요성

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1. 화학물질에 대한 노출은 구강, 흡입, 피부 등 여러 경로를 통하여 이루어지지만 농약 작업 환경에서는 주로 흡입과 피부를 통하여 노출되고 있으나 표준화된 노출량 평가법이 미흡한 실정이다.
2. 노출을 최소화하기 위한 기술이 발전함에 따라 흡입을 통한 화학물질의 직업적 노출은 점차 감소하고 있는 반면, 농약, 산업물질, 화장품의 피부를 통한 직업적 노출은 여전히 우려되는 상황이다.
3. 농약에 대한 독성연구는 농·식품을 소비하는 소비자의 건강을 보호하기 위하여 대부분 경구노출을 위주로 평가되고 있으나 농약의 피부 노출과 흡입노출에 대한 독성연구는 미비한 실정이다.
4. 농약의 피부흡수량에 대한 측정은 농약의 직업적 노출에 대한 위해성평가 시 중요한 부분이며, 농약의 피부흡수율에 대한 자료는 농약사용자의 internal exposure의 평가 시에 중요한 결정인자이다.
5. 농작업자들의 직업적 노출에 의한 농약의 위해성평가를 위하여 *in vitro* 또는 *in vivo* 피부·흡입흡수율 시험을 통한 피부·흡입 노출량의 평가방법의 확립이 요구된다.
6. 선진국에서는 농약으로 인한 농업인의 건강관리를 위하여 농약의 직업적 노출량에 대하여 활발한 연구가 진행되고 있으며, 현재 사용되고 있는 작업자 노출모델은 흡입과 피부 노출량을 계산하는 UK-POEM, EURO-POEM, PHED 등이 있으며, 이를 이용하여 도출된 결과는 농약안전관리체계에 반영하고 있다.
7. 농약의 위해성평가는 농약의 활성성분 뿐만 아니라 농약제품에 대한 피부투과성에 대한 결과가 필요하지만, 대부분의 연구는 활성성분의 피부투과성에 대해서만 이루어지고 있는 실정이다.
8. 현재 국내의 농약 및 원제의 등록을 위하여 필요한 피부독성 자료로 급성 경피독성, 피부자극성, 피부 감작성, 21일·28일 반복투여 경피 독성 시험자료가 요구되고 있으며, 피부 흡수율 부재 시 기본 수치로서 10%를 적용하고 있으나, 실제 피부흡수율과 유사한 피부흡수율 기본 값을 설정할 필요가 있다.
9. 현재 국내 GLP 시험기관의 미확립 시험법인 피부흡수율 시험법, 흡입노출량 시험법의 확립 및 표준화를 통하여 농작업자 안전성 확보가 필요하다.
10. 농작업자의 안전성 확보를 위하여 실제 농약 노출량 예측 및 위해수준 확인과 이에 근거한 사전 예방 조치 방안 제시가 요구된다.
11. 농작업자 농약 노출량에 대한 정확한 예측을 통한 농약의 건전한 사용 환경 조성 및 농약의 안전성에 대한 신뢰도 증가로 농약 산업계의 활성화가 요구된다.

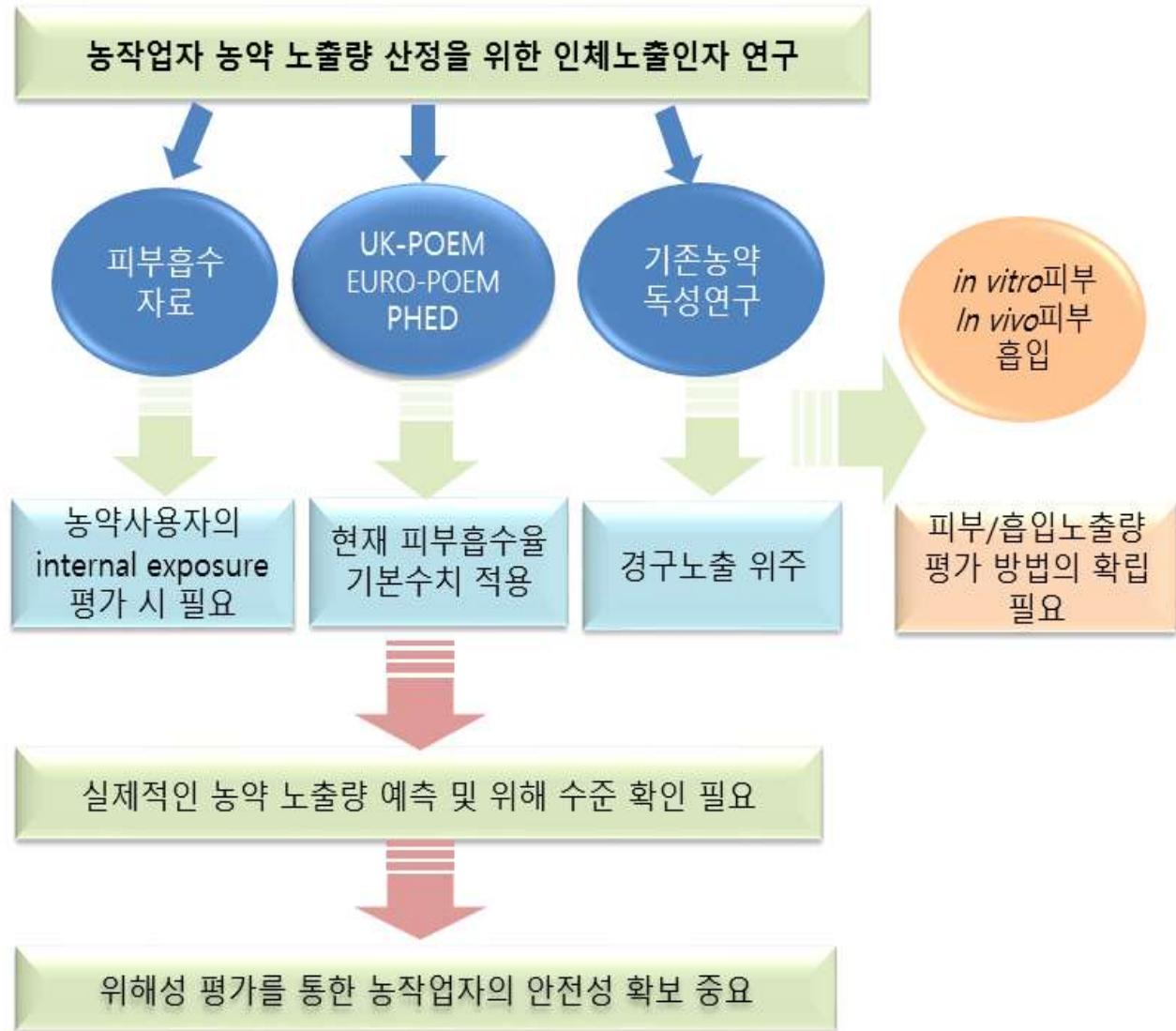


그림1. 연구개발의 필요성

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1. 독성이 큰 농약을 사용하는 농민의 질병이 심각하지만 현황, 기전 등에 대한 체계적 연구가 부족하다. 농약으로 인한 농업인의 건강영향에 대한 연구는 농업인의 복지를 위해서 뿐 아니라 이에 관한 지식 확보를 통해 체계적으로 농약을 관리하여 농약의 노출로 인한 농작업자의 건강안전관리 기술 개발 및 연구에 기여 가능하다.
2. 농약 노출은 농업인 외에도 농약 취급시, 골프장 잔디, 조경수에 농약 살포시, 전염병, 해충 방제위한 농약 사용시 등 농약을 취급하는 다양한 직업군에서 발생할 수 있어 산업적으로 체계적인 농약의 독성 스크리닝이 중요하다.
3. 농약 노출과 관련되어 지금까지 보고된 건강영향으로는 악성종양을 비롯하여, 호흡기 질환 [천식, 만성 폐쇄성 폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 등], 신경계 질환, 피부과 질환 (피부염 등) 등 다양한 부작용이 있다. 그러므로 특히 주 노출 장기인 피부와 호흡기계를 중점으로 한 독성 평가 연구가 필요하다.
4. 농약 사용 후, 피부에 과민반응이 일어나거나 피부염이 유발되며, 농약 노출과 천식 등 호흡기 질환의 관련성이 여러 나라에서 보고되고 있다. 이러한 농약 노출에 의한 피부 및 호흡기 반응에 미치는 영향에 대한 체계적인 시스템 독성학적 연구와 빠른 시간 안에 스크리닝하기 위한 방법의 개발이 중요하다.
5. 근래 융합학문의 필요성과 함께, 농약의 독성평가에서도 새로운 접근이 요구되고 있다. 컴퓨터공학, 세포분자생물학 등 여러 학문을 적절히 적용한 연구를 토대로 한 독성평가 및 위해성평가가 촉구되며 이에 큰 의미가 부여된다.
6. 각 농약의 독성기전에 기초한 첨단 대체시험법, 표적장기 독성 예측을 위한 스크리닝 분야, 주 노출 장기의 세포주를 이용한 세포소기관 수준의 연구가 미비하므로 이들의 체계적 구축이 중요하다.
7. 내분비계 관련 reporter gene assay에 관해서는 연구가 많이 있으나 피부, 호흡기 질환관련 유전자를 이용한 연구는 여전히 미흡한 실정이다. 이를 타겟으로 한 농약 노출의 reporter gene assay 및 high throughput screening system 개발이 요구된다.
8. 농약의 실험동물을 사용한 기존 독성, 안전성평가는 많은 비용이 들고 시간 소모적이며 종간 차이점으로 그 정확성에 논란이 크다. 또한 전세계적으로 동물복지에 대한 관심이 높아지고 독성 시험의 높은 비용을 줄이기 위해 3R원칙에 따른 동물 대체시험법 개발이 활발히 이루어지고 있다. 그러므로 인간세포를 이용한 농약의 독성을 효율적이고 신속하게 탐지할 수 있는 새로운 대체독성시험법의 개발이 절실히 요구된다.

본 연구를 통한 농약 대체 독성 시험법 구축 필요성

1

사회적 측면

- ✓ 농약의 주노출 경로 : 피부, 호흡기
- ✓ 농약 노출에 의해 피부, 호흡기 질환이 유발되어 관련 독성연구 필요
- ✓ 농약 사용으로 인한 불안감 감소 및 안전성 확보

2

과학적 측면

- ✓ 농약 성분의 독성기전에 기초한 첨단 스크리닝 시험법, 표적 장기 독성 예측위한 HTS 방법 등의 연구 미비
- ✓ 농약의 호흡기 독성 및 질환관련 *in vitro* 연구 모델 제시 필요
- ✓ 효율적 독성 평가 기술 확보

3

경제적 측면

- ✓ 독성시험 시간 단축과 효율성 재고를 통한 국가 경쟁력 증진 필요
- ✓ 농약 부작용 및 질병으로 인한 사회적 비용 감소 노력

그림 2. 농약 대체 독성 시험법 구축 필요성

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

1. 농가에서 연간 농약살포일수는 19.3일, 하루 살포시간 3.76시간에 해당하여 농약살포 시 농약 노출로 인한 농업인의 건강보호가 필요하다('12, 국립농업과학원). 농약살포 외에도 농작업자 의 급성 농약중독 사고 발생율이 높은데, 2010년 기준 우리나라 남성 농업인의 급성 농약중 독은 약 209,512명(농업인 100명당 24.7명)으로 추산된다. 우리나라 남성 농업인의 가장 많은 중독농약은 cartap, paraquat, fenobucarb 등으로, 농약중독은 독성이나 사용량보다 사용시간 및 사용빈도가 많은 농약과 밀접한 관련이 있다. 농약중독으로 인한 입원율은 10만명당 17.8 명, '04~'06년 사이 농약중독 입원환자는 25,982명으로 10만명당 17.8(남성)명으로, 우리나라 남성농업인의 연간 농약중독 발생률은 100명당 24.7명으로 외국보다 높은 실정이다.
2. 농작업자의 농약노출로 인한 건강위해를 예방하기 위해 예방차원으로 농약등록 단계의 위해 성확인 뿐 아니라 사후관리로서의 농약중독성 여부의 확인 필요하다. 현행 농작업자 농약노 출량 산정모델도은 단기노출에 따른 평가로 진행되고 있으며, 농작업자의 농약노출 연구는 노출량 산정모델 개발이나 역학조사를 통한 질병과의 연관성 연구 등이 진행되고 있으나 실제 농작업자의 농약살포농도인 저농도노출에 따른 독성영향에 대한 예측 marker개발은 미비하다. 따라서 농작업자의 농약사용조건인 저농도 농약노출시 시료의 채취용이성이 높은 뇨 시료를 이용해 급만성 노출수준을 예측할 수 있는 biomarker를 선정하여 농약노출과의 상관성을 확인 할 필요가 있다.

제3절 연구 개발 범위

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1. 농약의 성분별 물리화학적 특성조사, 농약 제품별 농작업자의 농약노출조건 및 노출량 조사
2. 농약 제품의 생체외 및 생체내 피부흡수율 시험법 확립
3. 농약제품의 피부노출량 평가 및 위해성평가
4. 농약 제품의 흡입노출량 평가 및 위해성평가
5. 피부/흡입 노출량 평가 및 위해성평가 가이드라인 개발

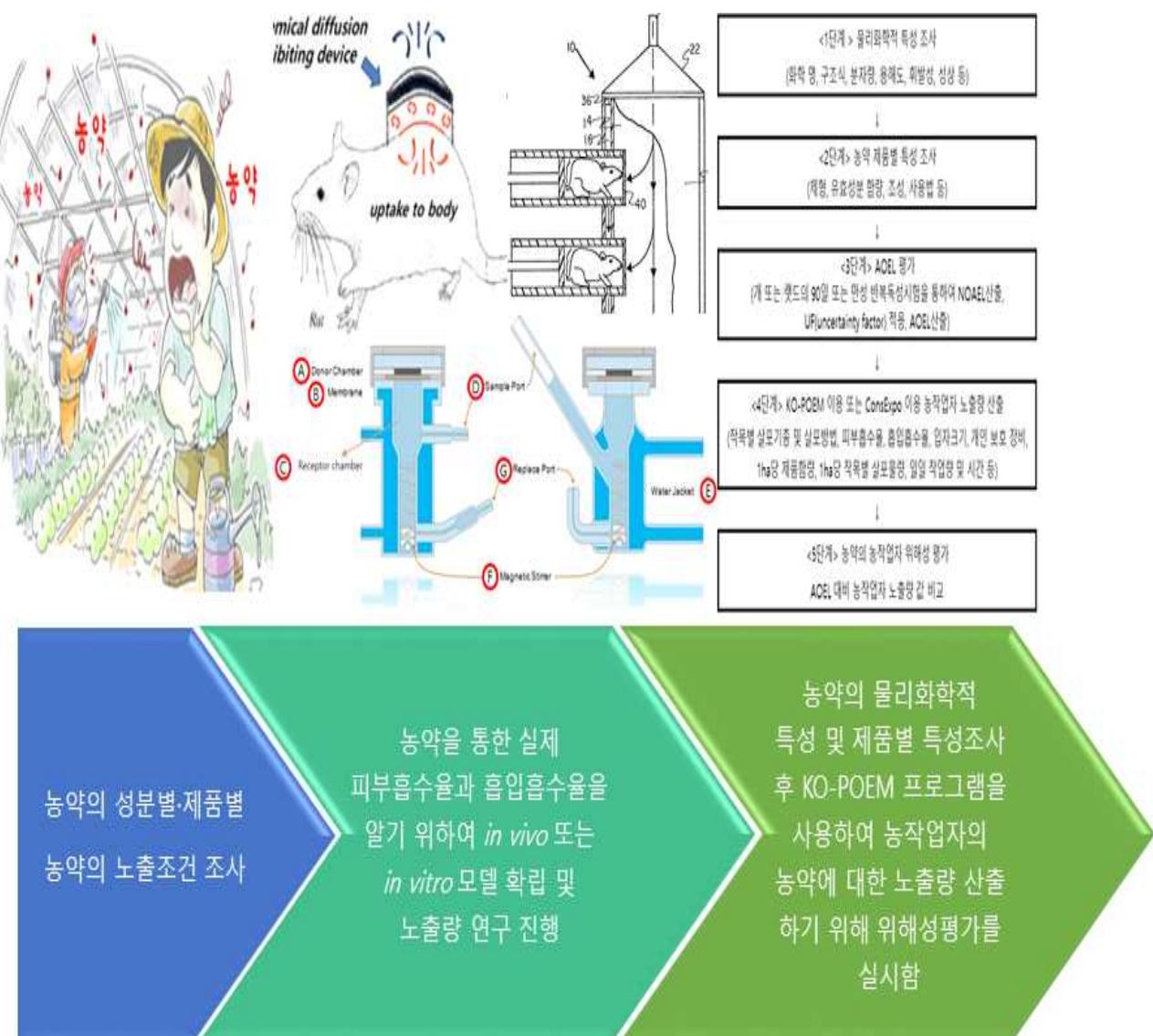


그림3. 연구개발 개요

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

- 본 연구 수행을 위해 피부와 호흡기계 세포 독성관련 대표 유전자를 선정하고 세포 손상에 따라 발현이 변화하는 reporter protein 원리를 이용하여 promoter-luciferase가 삽입된 벡터를 클로닝. 이러한 벡터를 세포에 전달하기 위해 렌티바이러스를 제작하여 세포에 도입 후 promoter-luciferase가 삽입된 stable cell line 구축
- reporter gene assay를 이용하여 농약의 피부/호흡기 독성 *in vitro* HTS system 구축 및 평가
- 각 세포별, 농약별, 농도별 HTS 결과에 대한 체계적 자료 확보 및 이를 활용한 독성평가 지표에 대한 기전 연구



그림 4. 연구 개발 개요

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

우리나라는 농작업자의 농약노출 연구로 노출량 산정모델 개발이나 역학조사를 통한 질병과의 연관성 연구 등이 진행되고 왔으나, 농작업자의 급만성 중독에 대한 진단연구는 미비하여 농약의 급만성 중독 예측을 위한 biomarker 개발을 위하여 시료의 채취 용이성이 높은 높 생체시료를 이용한 연구 수행

제 2 장 국내외 기술개발 현황

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1절 국내 기술개발 현황

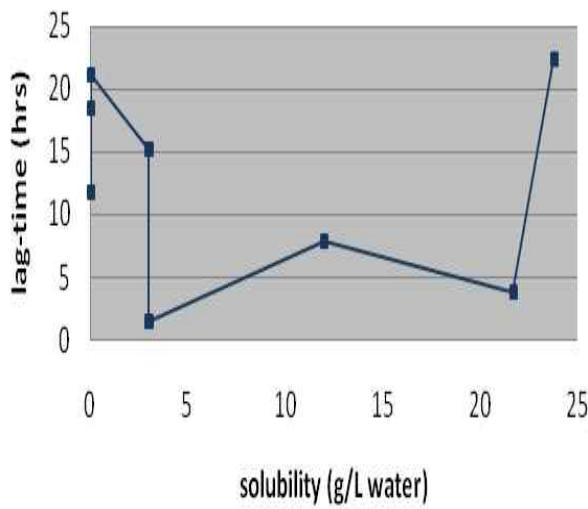
1. 국내 농약 및 원제 등록시 급성피부독성, 피부자극성, 피부감작성, 21일 또는 28일 반복 투여 경구독성 시험성적 등을 요구하며, 농작업자 노출량은 피부노출 기본값인 10% 흡수율을 적용하여 평가하고 있다.
2. 농작업자 노출량이 농작업자노출허용량(AOEL)을 초과시에는 *in vivo*, *in vitro* 피부흡수율 관련자료의 제출이 요구하여 기본 흡수율이 아닌 실제흡수율을 적용하여 농작업자 노출량을 재산정한다.
3. 피부흡수물질로 규정된 디아지논의 공기 중 노출농도와 피부노출농도를 조사하여 노출추정결과를 바탕으로 취급 근로자에 대한 노출 시나리오를 작성하여 건강 위험성을 평가한 바 있다(Jung et al., 2012).
4. 국내에서 골프장의 그린과 훼어웨이 등의 골프코스와 주변지역의 수목에 살포된 살충제 Fenitrothion, 살균제 Thifizamide, Hexaconazol을 대상으로 골프장 골프 코스에서의 공기 중 잔류 농도를 측정하고 이를 바탕으로 인체 노출량을 추정 연구가 수행된바 있다(Lee et al., 2009).
5. 절화장미 시설하우스에서 농약 사용 시 혼합과 살포작업에서의 농약의 피부 노출량을 평가한바 있다(Kim et al., 2007).
6. *In vitro* skin absorption 시험을 통하여 carbofuran, carbosulfan 및 furthiocarb의 피부투과율이 조사된바 있다(Liu et al., 2003).
7. 국내 사용농약의 노출기간과 개의 독성반응에 미치는 영향에 대한 분석이 이루어진 바 있다(Lee et al., 2013).
8. 국내 농작업자에 대한 농약의 노출량평가를 위한 표준화된 시험방법이 없다.

2절 국외 기술개발 현황

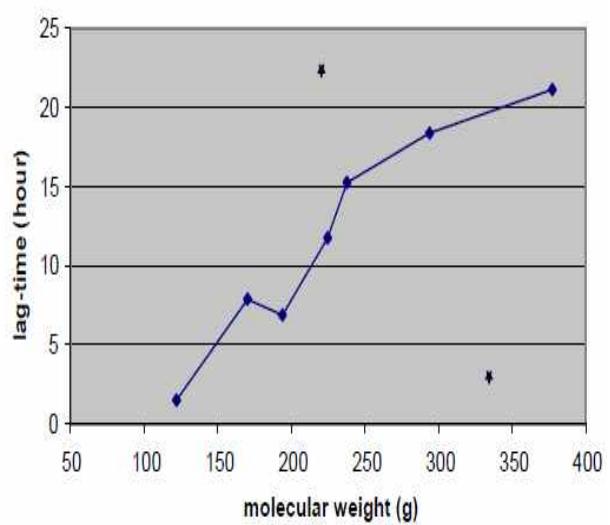
- 덴마크 EPA에서는 농약의 피부흡수가 농약의 용해도, 분자량 등 화학물질의 특성에 따라 달라지므로 농약의 용해도와 분자량 등에 따른 피부투과율의 상관관계를 확인하고자, 농약의 용해도, 분자량, lag-time과의 상관관계를 조사하였다.

표 1. 용해도와 투과율의 상관관계 조사

	Solubility (g/L)	Log Pow	MW (g)	Kp (um/h)	Lag- time (h)	Relative deposition				
						Receptor (%)	Epidermis (%)	Dermis (%)	Donor (%)	Recovery (%)
Glyphosat	12	-1.7	170	0.06	7.9	0.4	0.5	0.2	91.0	92.0
Caffein	21.7	0.16	194	3.8	6.9	18.7	3.4	3.6	72.8	99.6
Dimethoate	23.8	0.7	229	4.9	22.3	5.1	0.4	1.5	104.5	109.4
Pirimicarb	3	1.7	238	22.7	15.2	34.1	1.5	9.7	52.5	96.3
B e n z o i c acid	3	1.83	122	50.6	1.5	93.4	0.4	1.1	4.2	99.0
Malathion	0.15	2.75	330	1.9	2.9	11.6	2.7	5.7	71.4	91.4
Paciobutrazol	0.026	3.2	294	29.2	18.4	23.5	3.7	3.7	41.1	84.1
Methiocarb	0.027	3.34	225	38.6	11.7	50.9	2.4	2.4	17.1	94.4
Prochloraz	0.034	4.4	377	17.8	21.1	13.7	4.2	4.2	58.3	101.7



용해도와 lag-time 상관관계 연구



분자량과 lag-time 상관관계 연구

그림5. 용해도와 분자량과의 lag-time 상관 관계

- 제품 자체와 원재의 lag-time 비교, 여러 농약을 혼합하여 사용 시 피부투과율과

lag-time 비교, 피부 상태에 따른 농약의 피부 투과율 비교 조사연구가 다양하게 수행되었다.

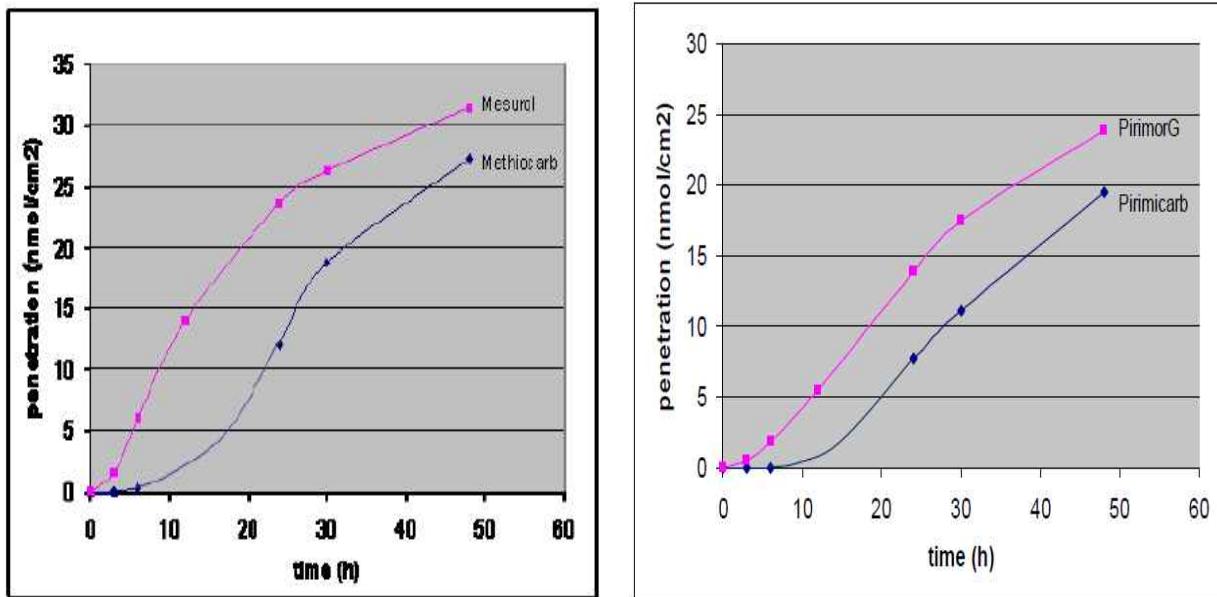


그림6. *In vitro* skin absorption 시험을 통한
Mesurol®, methiocarb, PirimorG®, pirimicarb의 lag-time 비교

3. Mesurol®, PirimorG®의 lag-time은 2시간인 반면 methiocarb, pirimicarb lag-time은 10시간임. 이는 시간당 피부 투과율이 증가되어 제품의 lag-time의 감소가 발생한 것으로 유효성분에 대한 연구 결과를 근거로 하여 작업노출량을 평가한 것보다 정상적인 작업환경에서 농약 제품에 의한 작업노출량이 증가한다는 것을 알 수 있었다.

4. 피부상태에 따라 물질에 따라 피부투과율에 차이가 있으며 일반적으로 손상된 세척하지 않은 피부의 흡수율이 높으나 benzoic acid, caffein의 흡수율은 피부상태에 영향을 받지 않음을 볼 수 있었다.

표 2. 피부상태에 따른 6가지 물질의 피부투과율

	Intact Non-Washed	Damaged Non-Washed	Intact Washed	Damaged Washed	Sales product Intact Non-Washed	Sales product Damaged Non-Washed
Kp (um/h)						
Glyphosate	0.04	0.97	0.04	0.07		
Caffein	4.5	21.7	2.5	14.3		
Dimethoate	0	0	0	0	0	0
Benzoic acid	51.1	53.8	39.5	60.7		
Malathion	4.5	8.4	4.6	11.6		
Methiocarb	39.5	45.5	30.0	35.0	47.0	35.5
Lag-time (h)						
Glyphosate	3.3	8.7	4.2	4.1		
Caffein	6.5	5.9	5.0	4.8		
Dimethoate	-	-	-	-	-	-
Benzoic acid	1.8	1.7	1.7	1.5		
Malathion	2.6	2.2	3.0	2.6		
Methiocarb	15.7	11.7	14.3	8.5	13.8	10.9

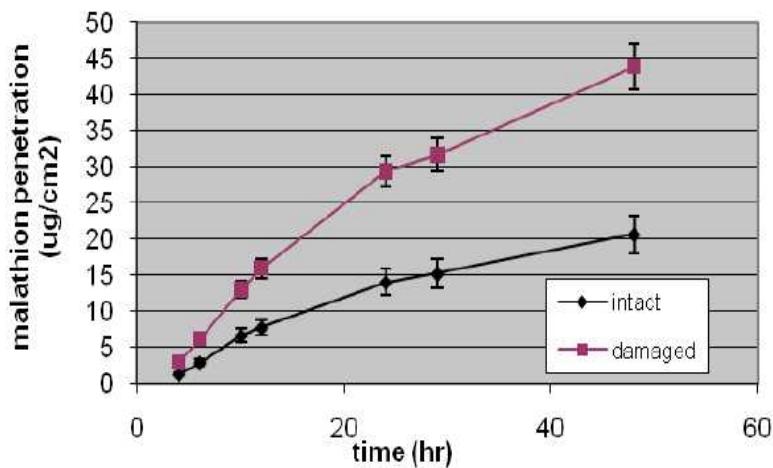


그림7. 피부 상태에 따른 농약의 투과성 비교연구

5. 농약성분의 혼합 시 각각의 제품의 피부투과율에 미치는 영향을 조사한 결과 PirimorG®은 Mesurol®의 methiocarb의 투과율을 증가시키지 못한 반면 Mesurol®은 Pirimicarb의 투과율을 40% 증가시켰다.

6. Paclobutrazol(paclo)에 methiocarb와 pirimicarb를 혼합하여 피부투과성을 비교한 결과 pirimicarb은 paclo의 피부투과율을 증가시키며, 계면활성제 존재시에도 paclo의 피부투과율이 증가하였다.
7. Benzoic acid는 손상 피부에서의 penetration coefficient(K_p)가 증가되지 않았으며, 이는 분자 크기가 작아 정상피부에서도 쉽게 투과가 발생하기 때문이므로 지용성 물질인 malathion과 methiocarb은 손상 피부에서 penetration coefficient(K_p)가 각각 90%와 15%로 증가하였다.

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1절 국내 기술개발 현황

1. 현재는 잔류기준을 위주로 농약 노출량을 산정하고 노출허용기준과 비교하여 단계별로 농약 위해성을 평가하고 있으며, 농약 노출에 의한 독성 기전 및 질병관련 유전자 수준에 노출 위해성을 평가할 수 있는 연구와 자료가 부족하다.
2. *in vitro* 독성예측 기법의 연구, 개발을 위해 농약 노출과 이에 의한 독성 유발을 예측할 수 있는 적절한 세포 내 biomarker의 발굴이 필요하나, 혈액, 뇨 등 생체시료의 잔류농약 검출 및 활성도 변화 연구 등의 정도만 진행되어 왔다.
3. 의약품 안전성 연구에서 실험동물관련 윤리 의식 변화로, 국내에서도 동물 실험 축소화 움직임이 커지고 있다. 이에 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원에서 ‘세포 내 또는 세포 간 이루어지는 여러 형태의 상호작용을 해석하는 분자생물학적 기법을 활용해 식의약품에서 독성이 일어나는 과정을 규명하고, 생명반응을 컴퓨터로 재구성한 가상세포 또는 가상조직을 이용해 독성을 예측·평가’하기 위한 ‘녹색성장기반 첨단 독성평가 기술개발 연구 사업단’이 2010년 출범하였다.
4. 화장품, 의약품 분야에서는 동물 대체 시험법에의 투자 및 개발, 이를 활용한 연구가 활발히 이루어지고 있지만, 농약의 독성 시험법에 대해서는 대체법 연구가 미비하다.
5. *In vitro* 세포 수준 연구로 활성산소종(reactive oxygen species) 증가, mitochondria membrane potential (MMP), ATP 생성의 관찰을 바탕으로 한 독성 평가 연구 등은 있지만, 농약 성분을 이용하여 그 독성 기전과 이를 기반한 *in vitro* 대체법 연구는 많이 부족하다.
6. 세계적으로 동물복지에 대한 관심과 대체 독성 시험법의 활발한 연구, 개발 추세에 맞게 국내에서도 이러한 연구 분위기가 활발히 조장되고 있는 추세이다. 우리나라에서도 2009년 한국동물대체시험법검증센터(Korean Center for the Validation of Alternative Methods, KoCVAM)가 설립되어 국제 조화된 동물대체시험법 가이드라인의 도입 및 개발과 새로운 동물대체시험법 검증, 평가 시스템을 운영하고 있다.
7. 국내에서는 본 농작업자 보호 공동연구 과제를 통해 농약 노출 및 독성 평가에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 농약 노출의 체계적 독성 평가법 분야에 더 향상되고 지속적인 연구, 개발이 요구된다.

2절 국외 기술개발 현황

1. Toxicology 저널에서는 2013년 농약 독성 관련 특집호를 편찬하여, 농약 노출과 파킨슨병과의 관계, 농약 관련 후성유전학, 발암 기전, 유기인계 농약 노출의 바이오마커, 직업적 장기간 농약 노출에 의한 호르몬, 정자 변화, 유전적 감수성, 장기 노출 후 산화적 스트레스, 유전자독성, 유기인계 독성에서 Paraoxonase 연구 등 농약의 만성 독성 연구 진척 상황에 대해 다루었음. 이렇듯 농약 독성기전 연구들이 현재 활발히 진행 중이지만 여전히 정확히 밝혀지지 못한 분야들이 많다 (Colosio et al., 2013).
2. 외부물질의 주노출장기인 피부와 호흡기계 질환 유발에 대한 역학 보고 중 농약 사용 농작업자에 관한 연구가 다수 존재. 농약은 주로 액체 또는 가루 형태로 피부 및 호흡기에 노출이 쉬워 특정 농약에 대한 감작으로 피부염, 호흡기계 염증을 유발함. 또한 유기인계 같은 아세틸콜린에스테라제를 억제하는 농약은 흡수되면 기관지 수축, 천명 등을 유발시켜 관련 농약을 사용한 사람이 천식을 앓고 있다는 역학 연구가 많다.
3. 농약에 의해 발생하는 질환의 가능한 기전에는 DNA 손상, 후성 유전적 변화, 내분비 교란, 미토콘드리아 기능이상, 산화적 스트레스, 손상된 autophagy 등이 있다고 보고되었다(Mostafalou S. et al., 2013).
4. 농약에 대한 생물학적 노출평가로는 혈액이나 소변에서 농약자체 또는 대사물질의 검출 양을 분석하는 방법과 농약 노출에 의한 생물학적 초기 영향지표를 조사하는 방식이 사용되고 있다. 그러나 농약 대사산물 지표 분석은 고가의 장비와 많은 노력이 소요되며, 대부분의 생물학적 지표들에 있어서 건강영향과의 양-반응관계를 확인할 수 없어 노출평가 방법으로 사용하기에 많은 한계를 가지므로 따라서 현재는 주로 잔류성이 강한 유기염소계 농약들 및 주요 유기인계 농약들에 국한되어 생물학적 노출 평가에 활용되고 있다.
5. 유럽연합에서 시행하고 있는 신화학물질 관리제도(REACH)와 관련하여 수출과 경쟁력확보, 환경보호를 위해 현재 사용하고 있는 화학물질들의 독성평가와 위해성평가가 요구되고 있다. 미국, 중국 등 주요국가에서도 이와 유사한 제도의 도입을 추진하는 등 화학물질 관리 강화가 세계적 추세임. 이에 부합하기 위해 현재까지 다양한 동물 대체시험법과 *in vitro* 시험법의 개발과 사용이 활발히 이루어지고 있다.
6. OECD, 미국 FDA 등 세계 대표적인 기관에서 다양한 독성평가기술 프로젝트가 진행되고 있다. 대표적인 예로 OECD의 분자스크리닝 프로젝트, 미국 FDA의 안전성예측시험 컨소시움, 미국 EPA의 ToxCast 프로젝트, 유럽연합의 carcinogenomics 프로젝트 등이 있으며 세계적으로 이와 같은 대형 프로젝트들이 진행되고 있다.

7. 전 세계적으로 동물복지에 대한 관심과 함께 실험동물사용에 대한 우려 및 *in vivo* 독성 시험의 비용 측면을 개선하고자 3R (Reduction, Replacement, Refinement) 원칙에 따른 동물 대체시험법 개발이 활발히 이루어지고 있다. 일본, 유럽연합, 미국 등 선진국에서 다양한 동물 대체시험법의 개발 및 독성 예측평가 기술의 개발과 사용이 진행되고 있으며, 관련 센터를 설립하여 운영하고 있다.

일본에서는 JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)를 설립하여, *in vitro* 독성시험 연구, 새로운 독성시험 검증 및 평가 위원관리, 국내·외 협력 체계를 구축하고 있다. 유럽에서는 ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)에서 동물실험 대체 시험법 개발, validation, DB 구축을 통하여 동물을 이용하지 않은 시험의 규제기관의 과학적 수용 촉진, 적절한 시험법 평가에 대한 유럽 내의 협력 조율 등을 담당하고 있다.

미국에서는 ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)이 새로운 독성시험법을 개발, 검증하여 규제기관에서 인정할 수 있는 시험법 확립을 추진하고, 규제기관에서 대체시험법 사용 채택을 촉진시키며, 사람 및 동물 건강, 환경을 보호하고 과학적인 질을 증진시키는데 기여하고 있다.

8. WHO와 FAO가 공동으로 농약 독성관련 database (www.inchem.org)를 구축하여 각 농약 물질의 이름, 구조식, 성질, 사용법 등 기본 정보와 LD50, Mode of Action, 노출경로에 따른 독성, 각 기관에서의 독성 등 독성 정보, 그리고 사용 주의사항에 대한 정보를 제공한다.
9. 미국에서는 정부의 ‘Pesticide Program’이라는 연구 지원을 통해 다년간 농약의 영향, 위해성 평가 등 체계적인 독성 평가 및 대체법 연구가 이루어지고 있다.

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

1절 국내 기술개발 현황

1. 농작업자 대상 농약노출 바이오모니터링 연구

국립농업과학원은 예 걸쳐서 국내 농작업의 작물별 농약사용실태 및 건강조사 시스템을 구축하였으며('10~'12), 고려대에서 농약품목명, 빈도, 사용량을 통하여 농약과 농작업자의 건강관계 구명 연구와 직업성 농약노출과 만성건강과의 관련성 평가('10~'12)를 통해 직업성 파라콰트 노출과 호흡기 건강영향과의 관련성 등의 평가하였다. 또한 농업과 만성폐쇄성폐질환의 상관성 관련 역학조사와 소변시료 중 유기인계와 pyrethroid계 농약 및 그 대사체 분석 연구를 통해 농약 살포와 질병과의 상관성 규명 및 배설기전을 통한 농작업자 및 일반인의 농약노출 수준을 확인하였다.

2. 생체시료 중 농약과 대사체 분석법 및 바이오마커 연구

계명대 연구진은 흰쥐에서 profenofos의 경구투여 및 피부도포 후 뇨 중 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol의 시간별 배설량을 측정한 결과 경구투여보다 피부도포 후 배설이 지연되는 것을 확인하였으며, 식품의약품안전처는 뇨 중 1-OHP 배설량 분석을 통해 식이를 통한 PAHs 인체노출량과 추가 발암위해도 산정, 식품 중 PAHs 관리를 위한 정책제안 및 기준제안 근거를 제시하였다. 또한, 잔류농약 검출 SPR 바이오센서를 개발하여 국내에서 사용빈도가 높은 카보후란 등 카바메이트계 4가지와 다이아지논, 파라치온메칠, 클로르피리포스 등 유기인계 5가지로 모두 9가지 농약 성분을 1분 40초에 정밀도 최대 1ppb 수준까지 검출능력을 신속, 간편화 하였으며 2006년 민간으로 기술을 이전하여 실용화한 바 있다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
관동대 의대 (서 등, 2007)	<ul style="list-style-type: none"> 농업과 만성폐쇄성폐질환의 상관성 관련 역학조사 소변시료 중 유기인계와 pyrethroid 계 농약 및 그 대사체 분석 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 농약 살포와 질병과의 상관성 규명 및 배설기전을 통한 농작업자 및 일반인의 농약노출 수준 확인
계명대 (조 등, 2002)	<ul style="list-style-type: none"> 동물실험에서 profenofos의 경구투여 및 피부도포 후 뇨 대사물질 (4-bromo-2-chlorophenol)의 시간별 배설량 측정 	<ul style="list-style-type: none"> profenofos의 대사산물은 경구투여보다 피부도포 시 배설이 자연
한양대 의대 (강 등, 2009)	<ul style="list-style-type: none"> fipronil, chlorpyrifos 및 fluazinamrotenone 농약의 도파민신경 세포 독성을 rotenone,paraquat와 비교 	<ul style="list-style-type: none"> fipronil, chlorpyrifos 및 fluazinamrotenone 농약은 도파민 신경세포에 매우 강한 세포독성 보임
순천향대학교 (전 등, 2014)	<ul style="list-style-type: none"> 광양만권 지역주민 환경오염 노출수준 및 생체지표 모니터링(코호트 조사) 	<ul style="list-style-type: none"> 특이적 바이오마커 발굴의 정확도를 높이기 위해서 향후 DNA 칩과 함께 단백체분석(프로테오믹스) 기술의 병행이 필요 외형적 질병이 진행되기 전 발병 가능성 예측 가능
식품의약품 안전처 (강종원, 2004)	<ul style="list-style-type: none"> PAHs 화학물의 뇌 중 생체지표 (1-OHP)를 활용한 내적용량산출과 위해성평가 	<ul style="list-style-type: none"> 해당 집단의 식이를 통한 PAHs 인체노출량과 대상집단의 추가 발암위해도 산정, 식품 중 PAHs 관리를 위한 정책제안 및 기준제안 등에 과학적 근거 제시 가능
농촌진흥청 (심 등, 2009)	<ul style="list-style-type: none"> 고감도 및 고선택성 유기인계/카바메이트계 농약 검출용 바이오칩 센터 표면 플라즈몬 공명(SPR) 방법 이용: 바이오칩에서 일어나는 굴절률 변화 측정 	<ul style="list-style-type: none"> 높은 검출능과 신속성, 간편성으로 2006년 민간으로 기술을 이전하여 실용화 단계

2절 국외 기술개발 현황

생체시료 중 농약과 대사체 분석법 및 바이오마커 연구로서, 대만 Chiang Mai 대학의 연구에서 소변 시료 중 유기인계와 pyrethroid계 농약 및 그 대사체 분석 연구를 수행하였으며, 미국 Emory 대학의 연구에서 채취가 용이하고 비외과적인 생체시료인 타액 중 atrazine, diazinon, chloropyrifos 농약의 분석을 통해 혈장의 농도 예측능을 검증하는 연구를 진행하였다. 심각한 신경계장애와 사망을 초래할 수 있는 유기인계농약과 그 대사체는 혈액 중 분석을 위해 cholinesterase(ChEs) 효소측정법을 주로 사용되어 왔으나(인도 Solapur Institute of Paramedical Science 연구), 농약중독 이외 다른 질환이 있는 경우 판정 오류의 한계가 발생하거나 효소측정법의 단점을 가진다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
대만 Chiang Mai 대학 (Thiphom et al. 2014)	<ul style="list-style-type: none"> 대만 북부의 농부와 소비자의 혈액 및 뇨 시료에서 pyrethroid 살충제의 대사체인 3-PBA 측정 	<ul style="list-style-type: none"> 뇨의 3-PBA는 급성 노출, 혈액의 3-PBA는 누적 노출의 측정방법이므로, 혈중 3-PBA는 뇨 중 결과와 상관성 없었음. 지원자들이 Pyrethroid에 노출 ELIZA 방법이 저렴, 높은 성능
미국 EPA (Kent et al. 2009)	<ul style="list-style-type: none"> chlorpyrifos 살포자의 살포 전후 뇨 중 대사체(TCP)양이 동일하나, 2,4-D 살포자는 살포 전후 뇨 시료 배설 차이 액상 chlorpyrifos제품의 분무방식은 in-furror입체 보다 더 높게 측정되었음 	<ul style="list-style-type: none"> 제형이 영향을 체내 biomarker의 양 차이에 영향을 줌
인도 Kurukshetra대학 (Yadav et al. 2011)	<ul style="list-style-type: none"> 농약 혼합사용에 노출된 농부의 유전적 손상 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 모든 comet 결과는 실험군과 대조군간에 유의적인 차 Tail에 있는 DNA %가 노출기간이 증가할 수록 증가함.
그리스 Crete 대학 (Vasilis et al. 2013)	<ul style="list-style-type: none"> 유기인계 및 유기염소계 농약의 저농도 장기간에 따른 영향 	<ul style="list-style-type: none"> 지방 및 glucose 당 대사에 대한 독성영향을 문자 및 세포수준에서 고찰. 효소저해, 대사, 전사 관계
인도 Solapur Institute of Paramedical Science (Kale 2013)	<ul style="list-style-type: none"> 유기인계 농약에 의해 간내 egasyne-β-glucuronidase(BG) 유리량을 조사 (간에서 혈청으로 β-gulucuronidase의 방출 양 측정) 	<ul style="list-style-type: none"> 혈청 중 BG 활성은 비율적으로 유기인계 농약 중독이 심해질수록 증가하여 그 수준의 상관성이 있음 저농도(온화) 중독에서도 가능성 있는 biomarker로 β-glucuronidase(BG)가 사용될 수 있음 acetylcholinesterase이 있던 없던 유기인계농약의 중독의 진단 및 예측의 가능성 있는 biomarker임

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

1절 연구내용

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1. OECD, EU, 미국 등의 피부 흡수율 시험법 비교 조사
2. 농약의 생체외 피부 흡수율 시험모델 확립 및 적용시험
3. 농약의 생체내 피부흡수율 시험모델 확립 및 적용시험
4. 농약의 생체내 흡입흡수율 시험모델 확립 및 적용시험
5. 농약의 피부흡수율/흡입흡수율에 근거한 노출량 평가 방법 구축 및 적용

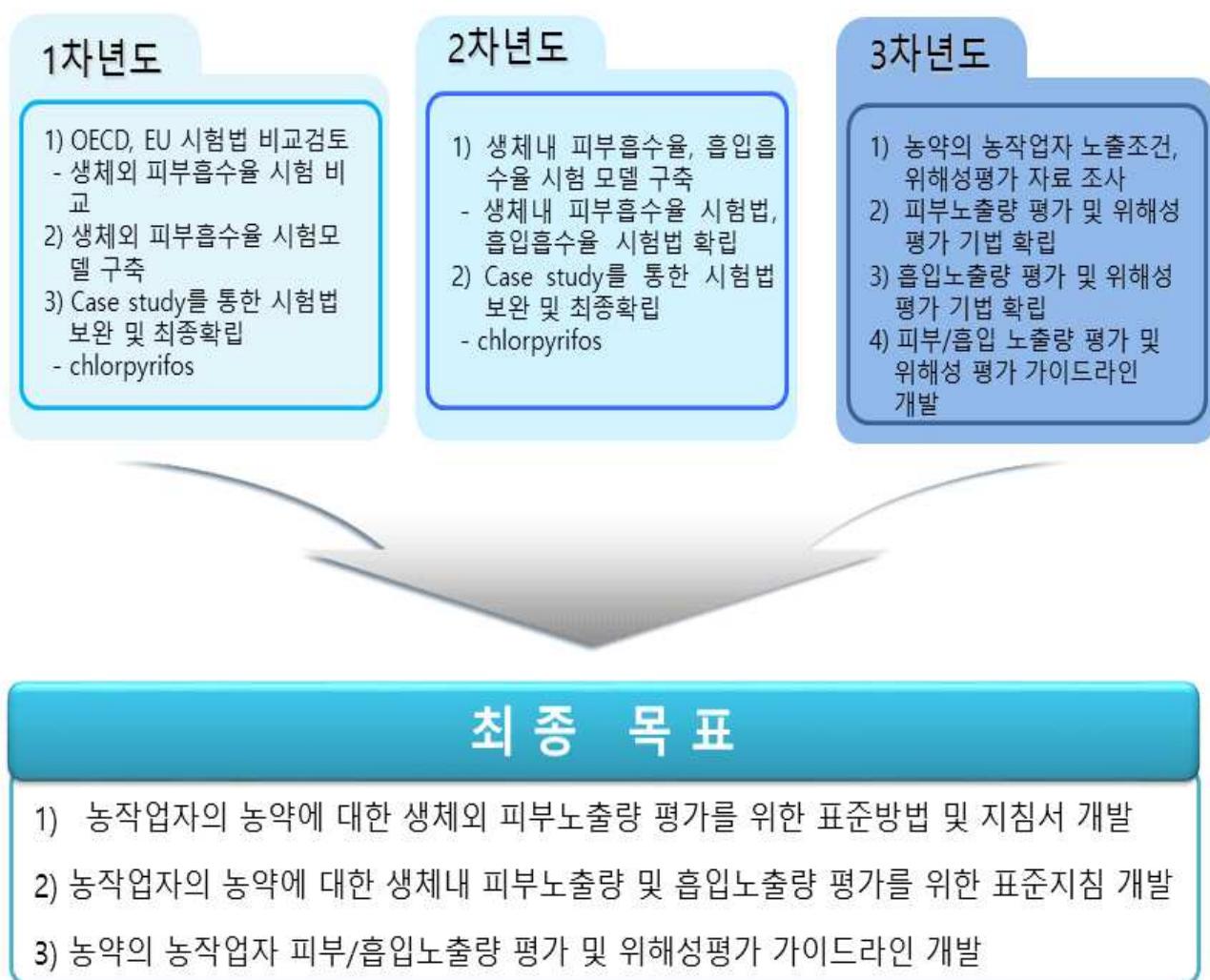


그림8. 연구내용 목표

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1. 농약의 피부독성평가를 위한 세포 및 마커 발굴
2. 피부독성 High-Throughput Screening(HTS) System 구축
3. 농약의 호흡기 독성평가를 위한 세포 및 마커 발굴
4. 호흡기독성 High-Throughput Screening(HTS) System 구축
5. 피부·호흡기에 대한 농약의 *in vitro* HTS 모델 평가
6. 화학분류별로 선정된 농약들의 표적 장기세포에서의 HTS 결과에 대한 체계적 농약 독성자료 확보
7. 확보된 연구결과와 독성평가지표를 활용한 농약의 피부·호흡기 독성 기전 연구

1차년도

- 1) 농약의 피부 독성 평가를 위한 세포 및 마커 발굴
- 2) 피부 독성 high-throughput screening (HTS) system 구축

2차년도

- 1) 농약의 호흡기 독성 평가를 위한 세포 및 마커 발굴
- 2) 호흡기독성 high-throughput screening system 구축

3차년도

- 1) 피부/호흡기에 대한 농약의 *in vitro* HTS 모델 평가
- 2) 화학 분류별로 선정된 농약들의 표적 장기세포에서의 HTS 결과에 대한 체계적 농약 독성 자료 확보
- 3) 확보된 연구 결과와 독성평가지표를 활용한 농약의 피부/호흡기 독성 기전 연구

최종 목표

- 피부/호흡기 질환 관련, 세포 소기관 관련 농약 독성 마커 이용 HTS system 개발
- 농약 종류별 표적 장기세포에서의 HTS 결과에 대한 체계적 농약 독성 자료 확보
- 확보된 농약 독성 평가 자료를 활용한 독성평가지표에 대한 기전 네트워크 분석

그림9. 연구내용 목표

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

1. 동물실험을 통한 급성 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성 분석

가. 대상농약: chlorpyrifos 등 2종 선정

나. 급성 농약노출 시험을 위한 동물시험 및 생체시료 채취

(1) 급성 농약노출의 노출경로, 노출량 등의 시험조건 선정

(2) 급성 농약노출의 동물시험 수행 및 생체시료 채취

다. 급성 농약노출시험의 생체시료 중 바이오마커 분석 및 노출상관성 규명

(1) 대상 농약 및 시료 특이적인 바이오마커 선정과 분석법 정립

(2) 생체시료 중 바이오마커 검출을 통한 급성 농약노출량과의 상관성 분석

2. 동물실험을 통한 반복 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성 분석

가. 대상농약: chlorpyrifos 등 2종 선정

나. 반복 농약노출 시험을 위한 동물시험 및 생체시료 채취

(1) 반복 농약노출의 노출경로, 노출량 등의 시험조건 선정

(2) 반복 농약노출의 동물시험 수행 및 생체시료 채취

다. 반복 농약노출시험의 생체시료 중 바이오마커 분석 및 노출상관성 규명

(1) 대상 농약 및 시료 특이적인 바이오마커 선정과 분석법 정립

(2) 생체시료 중 바이오마커 검출을 통한 반복 만성 농약노출량과의 상관성 분석

3. 농작업자 대상 단기 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성 분석

가. 단기 농약노출 농작업자의 생체시료 채취

(1) 단기 농약노출시험 위한 농작업자 실험군 풀 선정

(2) 실험군의 포장시험을 통한 농약살포시험 실시 및 뇨 등 생체시료 채취

나. 농작업자의 생체시료 중 바이오마커 분석 및 노출상관성 규명

(1) 대상 농약 및 시료 특이적인 바이오마커 선정과 분석법 정립

(2) 생체시료 중 바이오마커 검출을 통한 농작업자의 단기 농약노출량과의 상관성 분석

2절 연구방법

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1. OECD, EU, 미국 등의 피부 흡수율 시험법 비교 조사

- 피부흡수율 및 흡입 노출에 대한 가이드라인 비교 분석

2. 농약의 생체외 피부 흡수율 시험모델 확립 및 적용시험

- 랙드 피부조직에서 Chlorpyrifos의 피부흡수율 분석 및 노출량 평가

3. 농약의 생체내 피부흡수율 시험모델 확립 및 적용시험

- 생체 내 피부노출을 통한 Chlorpyrifos의 피부흡수율 분석

4. 농약의 생체내 흡입흡수율 시험모델 확립 및 적용시험

- 생체 내 흡입노출을 통한 Chlorpyrifos의 흡입흡수율 분석

5. 농약의 피부흡수율/흡입흡수율에 근거한 노출량 평가 방법 구축 및 적용

- 농약성분의 제품별 독성치, 피부흡수율, 사용조건 및 농작업자 노출조건 비교조사

- Thiophanate-methyl의 피부흡수율 시험

- 농약의 흡입 흡수율 평가 방법에 대한 국제 지침 비교조사

- 농약 제품의 피부/흡입 노출에 의한 농작업자 위해성 평가

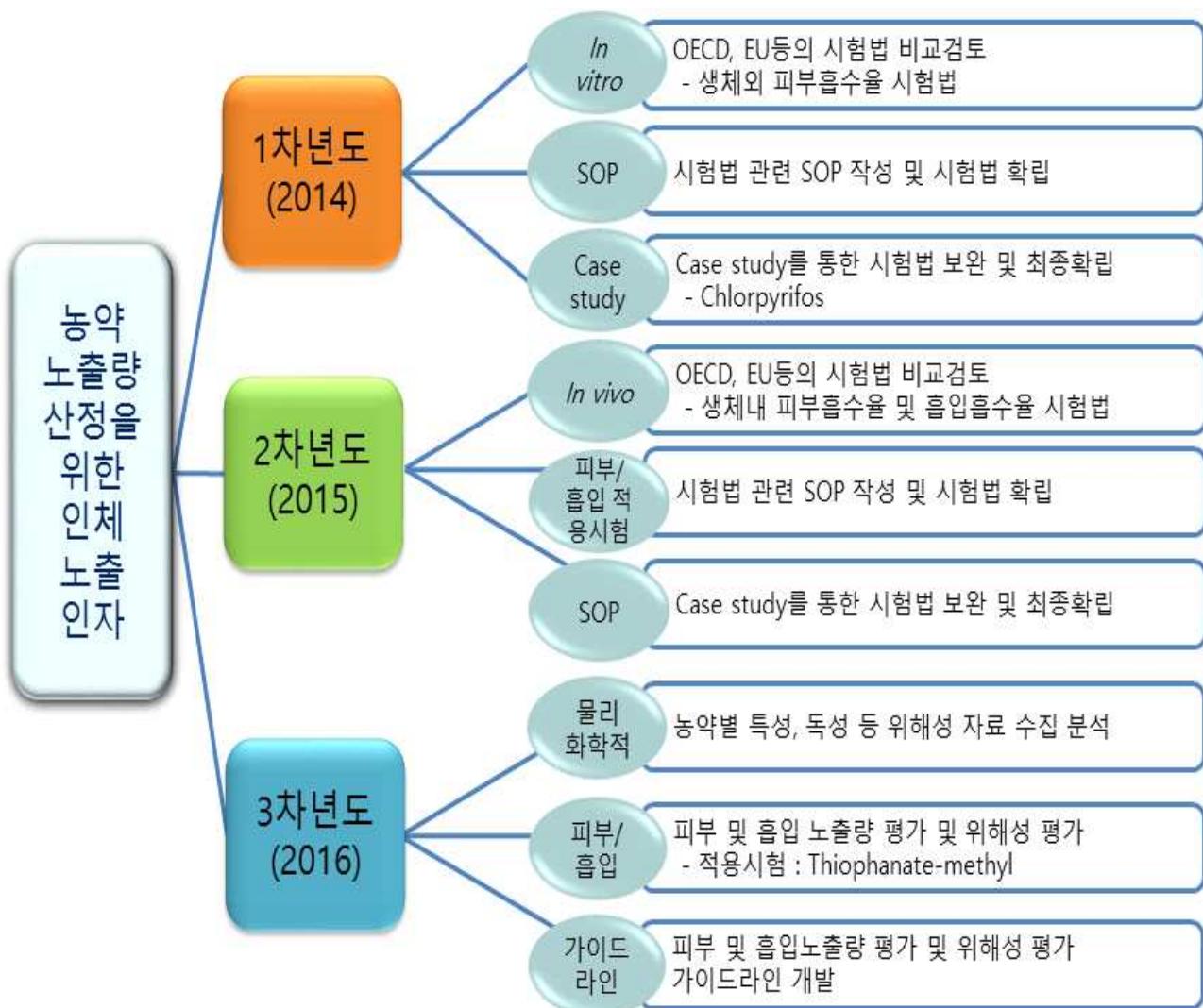


그림10. 연구방법

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1. 타겟 장기인 피부와 호흡기의 *in vitro* 대체법 구축 및 독성 기전 연구를 위한 사람 유래의 세포주 선정
 - 가. 피부 : *in vitro* 상에서 피부관련 연구에 적절한, 인간 피부 상피세포 유래 세포주인 HaCaT을 연구 세포주로 선정하였다.
 - 나. 호흡기 : 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 등 호흡기 질환 주요 발생 부위의 타겟인 기관지 상피세포주로 16HBE14o-를 선정하였는데 이는 *in vivo*와 비슷한 metabolic activity 및 세포간 상호작용을 가진 세포주로, 농약 노출에 의한 기관지의 독성 변화를 예측하는데 유용하다.
2. 피부 염증 관련 유전자를 이용한 대체법 개발

피부염증 반응에 미치는 농약의 영향을 빠른 시간 안에 스크리닝하기 위한 방법으로 대표 유전자를 이용하여 functional guidance molecule을 선정하고 reporter gene assay 원리를 이용해 대체법을 개발하였다.

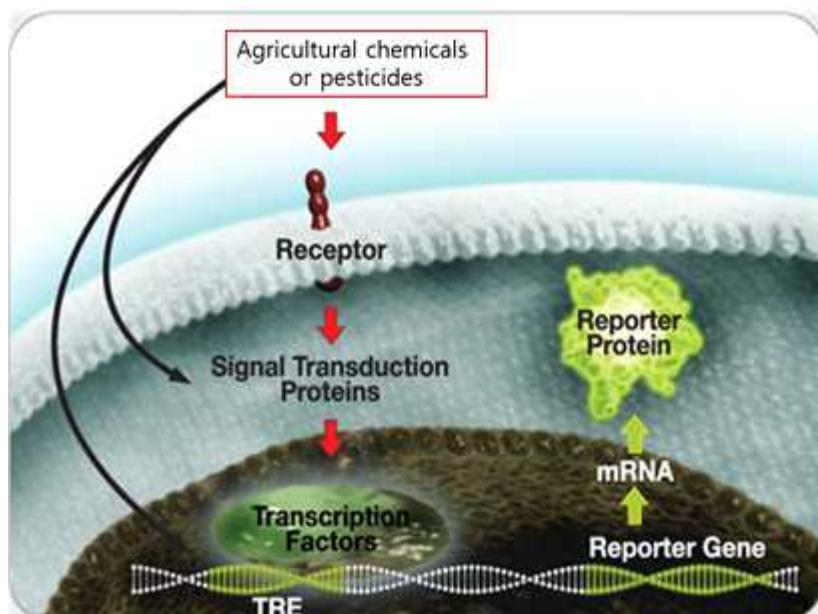


그림 11. 농약 관련 시약 처리 시 발현되는 reporter protein의 모식도
(TRE : Transcription factor responsive element)

가. 타겟 유전자 선정

(1) 약의 잘못된 취급 및 사용상의 부주의에 기인한 농약의 피부 노출 결과 과민반응이나 접촉성 피부염 등이 일어 날 수 있다. 그러므로 피부염 환자에서 발현이 증가되고 피부염증을 진행시키는 유전자에 초점을 두고 탐색하여, 피부 염증 반응시 피부 세포 내 발현이 증가되는 케모카인인 TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) 와 CCL17, CCL27 (Chemokine (C-C motif) ligand 17 and 27)을 선정하였다.

나. Promoter vector 준비

다음의 각 TSLP, CCL17, CCL27 promoter와 luciferase가 삽입된 벡터를 클로닝하였다.

(1) TSLP Promoter Sequence

```
TCTAAGGATTGATGCTGTGCCAGGTCTCTCCAGTGTTTAGATGTTCAAGATGCTATT  
ATTACAGAATATGGTGTACTTGAATTAAACATACAGTAGTAATCATTTCTGAT  
TAACCTAATTCTAGACAGAGTTGCATTCAATGAAATGCCACAGTACAGATGCGGACATCCA  
AAGGATGGCATTATTACTCACAAGCATAGTGCTATGTGCAGTTATGGCTGAGGGAAAGGGAG  
GGGGGAGGTCGCCCTTGAGACCTGAACCTTGGTGTGGTTCAAGCACTAACAGCACTA  
TCTAATGGCTATTCACTGCCTGTCAATGACATAGGAAAAGGTACCTGAGTGGAAACTGT  
TTTCAGGGCACCTTAAAGCCTGGGAGCAAAGGGTGGAGGGATGATTTCTGTGGACTTA  
AAAGTCTTACCCCTTTGCCTATTCTCCAGACCAAAAGTACCGAGTTCAACA  
ACACCGTCTCTGTAGCAATCGGGTAGAGAGAGTTCTAGTGCTGCTGGCTTCTCAGGGA  
GACGCCAGGCATTGGAGAGGGAGTATCCTGCTACGTGCAAGAACTCCGAGAGGTGCCTGGC  
TCCGGGACGCCGCCGGGGAAAGGGGACATCTGGGCTGTCAGAGCGGGCTGCGCCTAGC  
TTGGGACAACACTCTGTTCCAATTAGGGAGAGGAAGTCTCTATCCGGAGGAAAGGCAAAT  
TGGGAACGGGACGAGGGAACGTTGTTAGGGCACCACCTGCTGGGTCCGGCCTCCGCG  
TCGGGCTCGGAATTGGCAGCCTCCGCCACCCCTCGCCACGCCACTGGGAGGAGCGAGCGTGGGTGAC  
AGTCTTTCGCAGAGTGCCTCCGCCACCCCTCGCCACGCCACTGGGAGGAGCGAGCGTGGGTGAC  
TTCCTTGCTACTCAACCTGACCTCTCTGACTCTGACTTGTGTTCCCCGCTCCTCC  
CTGACCTTCCCTCCCTTCACTCAATTCTCACCAA
```

(2) CCL17 Promoter Sequence

```
CATGTCTGTCTGGTTGGTTGAGGCATAGGGAGGAGGCCAGGGTGGCTGGGGCAGAGTGAA  
CCAGGGAAACCAGGAGATAACAGGTGGCAGAGAGCAGGGCACAGAACTCGGGGCCTCGTGG  
CTGCTGGAGGGTCTGGACTTGTCTCTGCGTGAGGTGGAGAGGCCACGGGACGTTCTGAAC  
ACGGGAGATTATGGTCCCTCTGCTGCTGTGAGAATACACTGTAGGGGCAAGGATGG  
AGACAGGGAGAGCACCCAGAAGGCAGTTGTTAGGAAGCCAGGGATTGATGCTGGTTCTGG  
TGTATTGGAAAGCAGAGACATGAGCTACCCAAACAGATGGGAAGTTGGGGCGAGAGGAA  
GAGGCGTCAGGGATAGGCCAGGTTCTGGCCCTAGTAACCGGAAGGAAGGGGCTGGCAGA  
GAAGGAGGAGAGAGCAGGTGTAGGGTGGGAATCAGAAATTCACT
```

(3) CCL27 Promoter Sequence

```
ACAAGGTGCCTGTCTTGTGTTGGTTGTTGTTGAGACGGAGTCTCACT  
CTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCATCTCAGCTCACAGCAACCTCCGCCTCCAGTT  
TCAAGCAATTCTCGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGATTACAGGCCCTGCCACCACGCC  
GGCTAACCTTGATTTAGTAGAGACGGGTTCACCATCTTGGCCAGGCTGGTCTGAA  
CTCCTGAACCTCGTGTACCCACCTCGGCCCTCCAAAGTGTGGGATTAAGGCGTGA  
CCGTGCCGCCACCTGTCTTACTACTACATCCCCATGCCAGCACAGTGCCTGACACA
```

CAGGTGGTCATTCAAGCAAATATTGTTGATTGAATGAATGTAGCAAAAAAAAAAAAAAA
AATCACAAGAAGATAGGTCTCAGACCAGAGAGGAAGGGCAATGACCCCTCGGCCATTCACTG
ACTTAGCCGAGGCCACTCAACTAGGTATTCCGTAGCCTGGCTTTCTAGACTGGACTCTA
TCTGAGGACCTATTCCCTCGGCCAGGGCATACAAGGGGAGGAAGGCAGGCAAGAGAGGC
ACTCGGCAGGGCAGAAGCCCAGGGAGGGTAGAGGAGACGTGGGGATTAAGAAAACAGTACT
GGACTTAGTCCCAACTCTTTCTTGCTGCCTGCTGCGAAGCCTCGGCCCCCAAGGTGTA
GCTCCAAAACCTGACCTGACACCTATAAAAGAGGGCTTGCCCCATCTTAATCAACCGAC
CCCGCCCCCTGGCCTCACCCCGTAAGATGACGTTGACTCCGCCTCTGGGAGACATGAAC
ACCCCACCCCTTCCGGGGACAGGCAAACCTAGTGCGAACGGCATCCCTGTGACGTAATAGT
AACGGTCCGTTCCGGGGTGGAGCCAGGGAGGGAGTTAGGCTGCGCTGACCCCTCTCA
GCCGCCCTCCAGGTGACCCAGCCCCTGAAAATCCTCAC

다. Stable Cell Line 구축

- (1) 상기 promoter와 renilla luciferase 벡터가 들어간 렌티바이러스를 제작하였다.

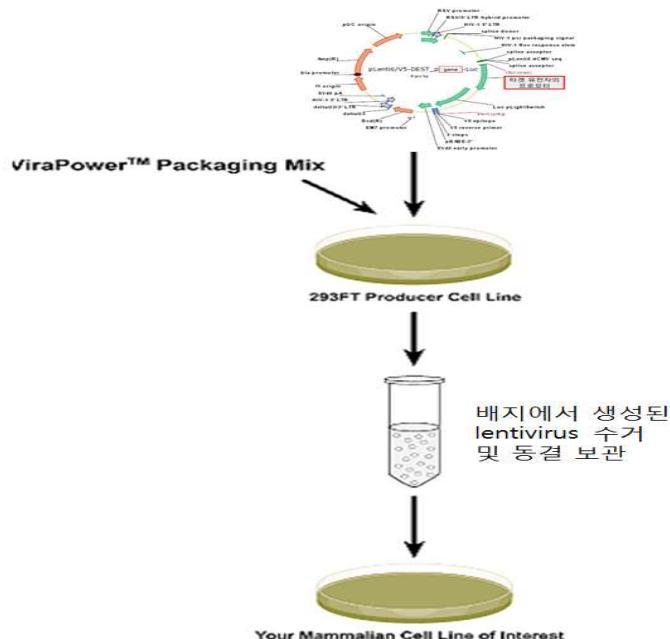


그림 12. ViraPower™ 제품 및 293FT cell line을 이용한 렌티바이러스 제작과정

- (2) 본 렌티바이러스와 internal control로 firefly luciferase를 발현하는 벡터를 가진 렌티바이러스를 세포주에 도입하면 세포 DNA에 삽입되어 들어가 luciferase를 발현하였다. 이를 selection drug (blasticidin과 hygromycin)로 렌티바이러스가 도입된 세포만을 얻어내어 stable cell line을 구축하였다.

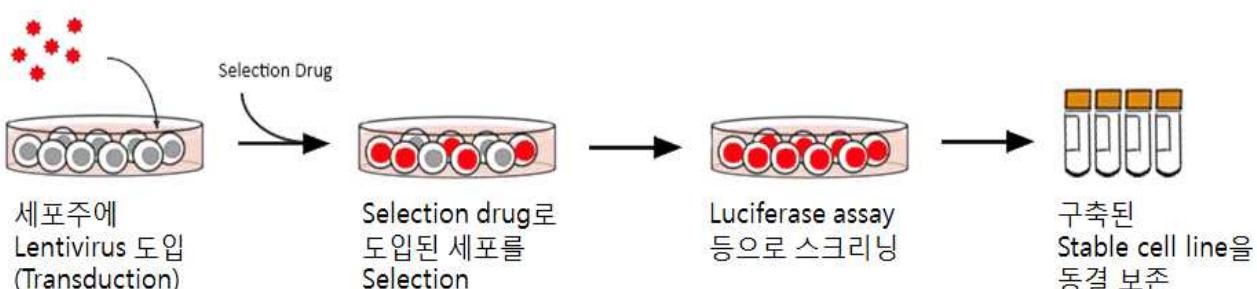


그림 13. Stable cell line 구축 과정

3. 호흡기 질병 관련 유전자를 이용한 대체법 개발

호흡기 질병의 발달 또는 유발에 미치는 농약의 영향을 빠른 시간 안에 스크리닝하기 위한 방법으로 대표 유전자를 이용하여 functional guidance molecule을 선정하고 reporter gene assay 원리를 이용해 대체법 개발하였다.

가. 타켓 유전자 선정

농약 사용상의 부주의 등으로 인한 흡입 노출로 비염, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 알레르기 등의 호흡기 질환의 위험성이 증가되는 것으로 보고되고 있다. 그러므로 농약의 세포 노출에 따른 독성 유발 여부를 지시하는 functional guidance bioindicator로 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 등 호흡기 질환의 유발과 관련된 유전자를 탐색하여 ORMDL3(orosomucoid 1-like 3), RAC1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), ADAM-33 (a disintegrin and metalloprotease-containing protein 33), PER2 (period circadian clock 2)를 선정하였다.

나. Promoter vector 준비

ORMDL3, RAC1, ADAM-33, PER2 promoter와 firefly luciferase가 삽입된 벡터를 클로닝하였다.

(1) ORMDL3 Promoter Sequence

```
AGAATGGGAGTAACCGAGGAGACCTCAAGAGCCATTAGTTAACCTCCTACAGTAATATT
AAGTAGATTCCCTACAATGCAACAGGTGCTTACATACATTCTTGGGTTCCCACAAACCTT
GGAGGTGGGTTTCACAGGTGTGGAATTGGAGATTAAGACAAGTAATTGCCAGGGTCAC
ACTGCCAATAAAGGAGGGCCTACCCATGTCTACCAGGCAGTAAAGTCTGTGCCCTGCCTT
TAGACGATGCAGATGTGAAAATGCAGACCAAGAGCCTCTCATTCAAAGCCACACAAGCTGA
CCTGAGACAGAAACTCAGGCTCCTACTACTGATGGAGGAATCTATGATACGTAGCCTCTT
CTCACGTCAGGTGCGGGCGGCCAAGGATGTGGCCCGGTCCGGGCGAGCCTGGCCAAGCGTG
ACTGAGAAGGAGAAGGCAGGCCTCCGTTCCGGGCCCTCCAGACCCCATCCCAGCCAATGTTG
TGAAAAGCGCTCTCCCAGGAGGGCCCAGCAGGGCAAAGGGCCGGCTAGTCTGTTCTGGAG
GAGCCAATCTGGGCCAGGGCGAGGCAGCCAGGTGCAGTGGAAAAATCCTGCAGTTGGG
CAGAATAATTGGGTTTCGATCCAGTCTAGGACCCAGCAAAGACCTACAGAAAGTTACTTAC
AAGTCCGAGTCTCCTCATCTGCAAAACTGGGCACGGATAAAATACACTTGAAGGGCACAG
AAGCAAAAGTTGGAATTGTTACGCACAAAATTCTATCATCCGATCTGACCATCACGTCAC
GGTACAACCTCCAACCGTGCCTCCCCGAAGAGGCCGGAACGGAGGCCAGGAAAAACTACAA
CTCCAGGAGGCCTGCCGGCGCGGGCGGTGACGTACGGGGACGGCGCGAGCGCTGATTCGGCC
GCGTCGGCGTGCCGGCGCGGGCGGTGACGTACGGGGACGGCGCGAGCGCTGATTCGGCC
GGAGCTGCCAGCGGGAGGCTGCAGCCGGGTTGTTACAGCTGCTGGAGCAGCAGCGGGCCCC
CGCTCCCGGAACCGTTCCCGGGCGTTGATCTCGGCCCCACAC
```

(2) RAC1 Promoter Sequence

```
CAGCCACCACAGGTTCTCTTTTTTTTTTTGAGACGGGGTCTCGCTCTGACTCCA
GGCTGGAGTGCAGTGGGCCATCTGGCTCACTGAAACCACGCCCTCCAGGTTCAAGAGAT
TCTCCTGCCCTCAGGCTCCTGAGTAGCTGAACTACAGGCCGCCCTCCACGCCCTGCTAATC
TAATTGGTATTAGTAGAGACGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGATGGTCTCGATCT
CTTGACCTTGTGATCCGCCCTCCTGGCCTCCAAAGTGCTGGTTACAGGCTTGAGCCAC
CGCGCCCTGTCTGACAGGTTCCCTCGTTTGTGTTTGTGAGACGGAGTTTC
GCTCTTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAATAGCAGGATCTGGCTCACTGCAACCAACTGCCCTCC
CGGGTTGAAGTGATTCACCTGCCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCGCCACCAAC
CACGCCCGTTAATTGGTATTAGAGACAGTGGTACCATGTTGGCCAGGCT
```

GGTCTTGAACTCGTGACCTCAGGTGATCCGCCGCCTCAGCCTCCAAAGTGTGGATTAC
 GGACGTGAGCCACCGCGCCAGCTGACAGGTTCTTAAAGCCCTGAGTCCCAGGGAAAGGG
 ACCTGCAGGCCGCCACGCCAGGCCAGCGCTTAGCGCGCAAGATGGCGCTGCCACGCCCG
 CGGCCGGAGCCGAGTGGGCCAGCGCTCCGAGCATTCCGAAGTCCAGAGAAACTCCGGG
 AGCGGCGCGGGCGGGAGCGCGCGGGAGCGG

(3) ADAM33 Promoter Sequence

ATTTCACCGAGTAGGAAAACAAAAGTTAAAACATGAAACAGATGTTACTGAGGCCGAA
 AGGGTCTCCAGGCCCTGGGAGTCTGCAGCTTTATGCAATTCTGCCCTTGCCACGCCAG
 GGAAGAAAGGTTGTCTCCGTCTGCATCGCCTTGCCCAGCAATGAAGCCCCAAGACAG
 CGGCAGCCGGTTGCCGAACCTTCCTATCCTTGGGGCACCCAGTGCAGGTGGATGACCGA
 CTCAACCTCCGCCAGGGCACCCCTGGGGCAGGACGGTAGCAAGGAGGGACAGAGATCGC
 CCCAGGAGACCACGGAAGATCGCGCTCCTGGGCCAACCTCAGCAGCAGAGAGCGGCC
 CCCACCGCCTCATCCACCACGCCGGTCTCCAAGAACCTCCAGCGGTTCTCTCC
 CTCAGGAGTAGAGGCCCTCTGAGACCGACGGGAGGGACGGCTGGGCCGGTCACTCGAGGG
 GCCGCACGGATTCCCTCCGCCAGCTCCACCCCTCGAGGGCGGCGGTCCGGGAGTGGC
 GACCCGGCTCCCCATGGCGCGCCGTCGGGCCCTGGCCAGGCTCCAGCAGGGTTGGCG
 GGGAGGGAGGCGGGAGCGAGGGCGGGCGGTGGAGGTGGGGCGGGAAAGGTCCGAAGGCG
 CGGCCTGAGGCTGACCGGGCACGGGTCGGGCCAACATCCAGCCTGGCGGAGCCGGAGTGC
 AGCCGCTGCCTAGAGGCCAGGGAGCTCACAGCTATGGGCTGGAGGCCGGAGAGCTGGGG
 GACCCCGTTGCTGCTGCTACTACTGCTGCTCTGGCCAGTGCAGGCCGGGGTGGCT
 TCAAGGTGAGGACGCCGGGGTGCAGGCCCTGAGGGCAGGCTAGGCCGGTGGTGGCG
 GGGATGGGTTCTGCTCAGAGCTC

(4) PER2 Promoter Sequence

AGGTGGAGGTCTCCCTCGTCCGGCTTCGGCGGCCGGTCTGCCAGGCCGGAGGTGCGCA
 GGAGCCCCCGCCCAGCTCCCCCGCCCAATGGTACGCCACTCCGCGCTCCCGAGCTGGCG
 GGCTGAGGGCGTAGTGAATGGAAGGCGCCAGGCCGAAGTGGATGAGACCAACTAGGGAGG
 ACGACGGTAGCAGAACGCCCGCGTCTCCATTGAGGAACCGACGGAGGTAAACATGGAGTTC
 CATGTGCGTCTATGTAAAAAGAGCGACGGCGCCACCAATGGCGCGCCGGCGTCTCGTAG
 GCCCGCCCTCATGTATGCAAGATGAGACGGAGTCGCGGCCAATGGCGAGGCCGGGGCGGG
 CGCGCGCGCGCGCGGTACGTTTCACTATGTGACAGCGCGACTCGGCCGGCGAGGCC
 GGCCTGAGGGATACGTGAGCTGTGGCGGCCGGCGGGCGGGCGGGCGGACAGAG
 CCGCGAGTCGGCGGAGGGACCGCGGACGGGCTGACGCCGGCGGCCGGTAAGTGGCG
 GCGCGGCCGCTGCGCTTACGTAACCGCCGCCGGCGCGCCGGCTCGGGCAGGTGGGGTCC
 CAGCGCCGGCTCGGGCAGCGGAGGCCGGGAAGTCCCTGGGCTGCTGGACTCCTCGGCTT
 GAAACGGCGCCGGCGTGGGGCGTGTGCCCTGGCCCTGTCAGGTGGAGAGTGGTCGAGCC
 GCGCGAGGGTGCCTCGTTGAAGTGCAGGCCGGAGGGCTGGGACTCGAACCCCCGCT
 TCGCAGCTCAGGAGCCTGAGGTCCGAAAGGTGAGGCAGCGTGTGTAGGGCACCGAGCTACCGA
 GTGACTGCCGCCGGCTGCCGTTCCGTGGCGATTCTCTTTGGGAACCCCTCC

다. stable cell line 구축

- (1) 상기 promoter와 firefly luciferase 벡터가 들어간 렌티바이러스를 제작하였다.
- (2) 본 렌티바이러스와 internal control로 renilla luciferase를 발현하는 벡터를 가진 렌티바이러스를 세포주에 도입하면 세포 DNA에 삽입되어 들어가 luciferase를 발현하였다. 이를 selection drug (blasticidin과 hygromycin)로 렌티바이러스가 삽입된 세포만을 얻어내어 stable cell line 구축하였다.

4. 상기 과정으로 개발된 high throughput screening (HTS) 모델 평가.

가. 피부

- (1) Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)는 사이토카인의 일종인 케모카인으로 피부 상피세포에서 분비되어 CD11c⁺ dendritic cell을 활성화하여 helper T cell 등 순차적으로 염증 세포의 활성화 및 분화에 관여하여 proinflammatory cytokine 역할을 한다. 또한 아토피, 알레르기 등 염증 질환의 발달 및 경과에 관여한다. Atopic dermatitis의 피부 상피세포에서 높게 발현된다고 보고되어 피부 염증 반응에서 매우 중요한 유전자이다.
- (2) 이러한 핵심 functional guidance bioindicator의 stable cell line을 이용해, 피부 염증관련 positive chemical인 dibutyl phthalate, Sodium dodecyl sulfate (SDS), xylene 등을 처치하여 luciferase reporter gene assay를 진행하였다. 농약의 독성에 의한 피부 독성을 빠른 시간 안에 진단해 내는 high throughput screening 모델 평가 및 대체 시험법 확립하였다.

나. 호흡기

- (1) Orosomucoid 1-like 3 (ORMDL3)는 소포체(ER)에 위치한 막관통 단백질로, 세포 내 칼슘 조절에 관여한다. ER의 칼슘 조절이 잘못되면 ER stress가 발생하며 ORMDL3 발현 변화에 의한 unfolded protein response는 염증 반응을 시작시켜 이런 기전으로 천식 발병기전에 ORMDL3이 역할을 한다고 보고되었다. 기도에서 천식, 염증 반응이 ORMDL3의 증가와 관련이 있으며 농약이 천식을 유발시킨다는 역학연구가 있어, 농약 노출에 의한 호흡기 질환 관련 매우 중요한 유전자이다.
- (1) 이러한 핵심 functional guidance bioindicator의 stable cell line을 이용해, 호흡기 질환관련 positive chemical인 lipopolysaccharide (LPS), xylene 등을 처치하여 luciferase reporter gene assay를 진행하였다. 농약의 독성에 의한 호흡기 독성을 빠른 시간 안에 진단해 내는 high throughput screening 모델 평가 및 대체 시험법 확립하였다.

5. 피부 질환 또는 호흡기 질환을 유도할 수 있는 후보 농약 물질 탐색 및 선정

- 가. 농약 사용에 기인한 피부 질환과 호흡기 질환에 대한 역학 연구, 화학물질 독성 정보 데이터베이스 등 면밀한 자료 조사를 통하여, 접촉성 피부염 등의 피부 질환 또는 비염, 천식 등의 호흡기 질환 유도와 관련한 농약 물질을 검색하였다.
- 나. 자료를 바탕으로, 본 연구의 농약 독성 대체법을 통해 피부, 호흡기 독성 유발 여부의 스크리닝 및 평가를 위한 주요 농약 종류별 3종 이상씩 선정 및 확보하였다.

6. 선정된 농약들의 각 표적 장기세포에서의 HTS 결과 도출.

- 가. 선정된 농약 물질을 기준에 따라 분류하고, 각 stable cell line에 농약을 처치하여 luciferase reporter gene assay를 진행하였다.
- 나. 실험 결과를 토대로 세포별, 농약종류별, 농도별 연구 결과를 정리한 후, 항목을

정하여 각 항목에 따라 체계적이고 통일된 기준으로 *in vitro* 농약 독성 자료를 확보하였다.

다. 향후 대체독성법을 활용한 지속적인 농약 독성 평가법 마련 및 본격적인 활용, 공유에 대비하여 자료를 축적하였다.

7. 농약의 세포 내 독성 기전 스터디.

- 농약의 피부, 호흡기 질환 유발의 기전 네트워크 연구.
- 농약 노출로 활성산소종이 증가한다는 보고가 있다. 세포내 증가된 활성산소종을 완화시키는 N-Acetylcysteine (NAC)와 미토콘드리아 유래 활성산소종 특이 항산화제인 mitoTEMPO 등의 항산화제를 이용하여 농약과 산화적 손상관련 세포 내 독성학적 기전을 확인하였다.
- 농약 노출에 의해 변화하는 유전자의 siRNA를 이용하여 발현을 억제시킨 후 해당 유전자 관련 세포 내 기전 네트워크 변화를 연구하였다. siRNA에 의해 mRNA가 분해되어 단백질 번역이 되지 않아 그로인한 세포 내 변화를 Western blot, qRT-PCR 등으로 확인하였다.

가. 기본적인 독성 중 하나인 세포사멸관련 기전 스터디.

트리플록시스트로빈 농약의 피부세포(HaCaT)에서 외인성 apoptosis, autophagy 유발 기전 연구.

- (1) 트리플록시스트로빈에 의한 세포 생존률을 MTT assay와 CCK assay로 측정 및 IC₅₀ 산출. 이를 바탕으로 기전스터디 농도를 설정하였다.
- (2) Annexin/PI 염색후 flow cytometry를 이용하여 apoptosis 측정. TUNEL assay로 물질에 의한 apoptosis 유발 현상을 시각화하였다.
- (3) Western blot으로 apoptosis 관련 단백질의 발현양 증가 확인 및 siRNA를 이용해 해당 유전자 관련 세포 내 기전 네트워크 변화를 확인하였다.
- (4) JC-1과 MitoTracker를 이용해 미토콘드리아의 MMP 및 모양 변화 관찰.
- (5) Immunofluorescence와 Western blot을 이용해 autophagy/mitophagy 관련 단백질의 발현 증가 확인 및 mitoTEMPO를 처치하여 세포 내 변화를 관찰하였다.

나. ORMDL3 연관 농약에 의한 천식 유발 기전 스터디

베노밀 농약의 기관지세포(16HBE)에서 ORMDL3 발현 관련 천식 유발 기전 연구.

- (1) 베노밀에 의한 세포 생존률을 MTT assay로 측정 및 IC₅₀ 산출하고 이를 바탕으로 기전스터디 농도를 설정하였다.
- (2) H₂DCFDA assay를 이용해 세포내 ROS 변화 측정.
- (3) Western blot으로 천식관련 단백질의 발현 증가 및 NAC와 mitoTEMPO를 처치하여 세포 내 변화를 관찰하였다.
- (4) siRNA를 이용해 해당 유전자 관련 세포 내 기전 네트워크 변화를 Western blot, qRT-PCR 등으로 확인하였다.

8. 본 연구로 개발 및 구축된 신속한 농약 노출 독성 대체시험법을 바탕으로 산업재산권 출원.

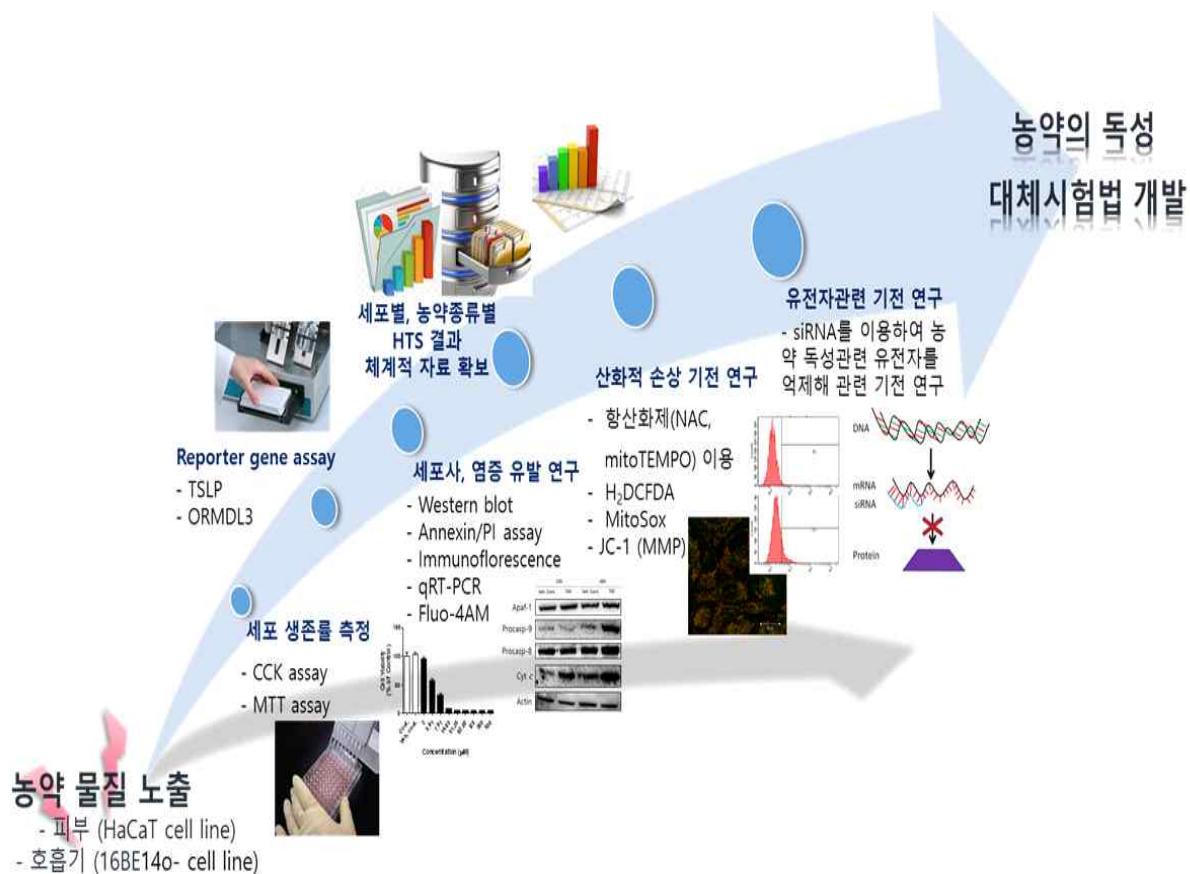


그림 14. 연구 과정

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

1. 동물실험을 통한 급성 및 반복 농약노출 시행

가. 농약 노출수준

- (1) 농작업자 표준살포량 및 표준살포농도의 노출수준에 상응한 동물실험의 농도설정
 - (2) 인체의 노출량의 실험동물 적용을 위해 시험농도 환산 위한 변수 조사: 체중 등
 - (3) 실험동물 노출수준은 표준살포농도에 상응하는 저농도를 포함하는 3처리이상 시험
- ※ 농작업자의 단기노출기간은 1일 6시간 [농작업자 노출량산정모델(농진청 고시)]

나. 동물실험의 시험조건 설정

- (1) 농약의 노출경로, 노출수준, 노출기간, 실험동물 등의 시험조건 선정
- (2) 실험동물의 뇨, 혈액 등 생체시료 채취

2. 생체시료 및 농약 특이적 바이오마커 분석

가. 생체시료 및 농약 특이적 바이오마커 분석법 정립

- (1) 대상 농약 및 시료 특이적인 바이오마커 선정
- (2) 생체시료 중 대사체 등 바이오마커 분석을 위해 분석법 정립

3. 농작업자 대상 단기 농약노출 시험

가. 대상 농약 선정

- (1) 실제 포장시험에서 농약 살포자 대상으로 약제 선별
- (2) 우리나라 농작업자 대상 생체시료 중 검출 이력 있는 농약
- (3) 우리나라 농약사용현황 고려한 대표성 있는 농약

나. 농약 노출수준

- (1) 실제 농약사용 현황을 반영하는 표준살포농도(저농도) 기준
- (2) 농약에 등록된 사용약량 등에 근거한 표준살포량 적용
예) 클로르페리포스 수화제(25%)의 조제시 사용약량 : 물 20L 당 20g (사과)
과수의 표준살포농약량은 $1,000\text{m}^2$ 에 450L로 적용

- (2) 표준살포량 및 사용량에 근거 농작업자 농약노출량 예측(농진청 산정모델 이용)

다. 농작업자의 생체시료 채취

- (1) 대조군 및 실험대조군의 시료채취는 농약살포 전과 살포 24시간 후 시행
- (2) 실험대상자의 생체시료로 뇨시료 채취

4. 생체시료 중 바이오마커 검출수준에 따른 농약노출량과의 상관성 분석

가. 실험동물 대상 농약의 급성 및 반복 투여시험 결과 활용

(1) 뇌 등의 생체시료 중 바이오마커 분석 결과 적용

나. 농약의 급성 및 반복 노출량과 바이오마커와의 상관성 분석

(1) 통계프로그램으로 회귀분석 실시 후 농약 노출과 바이오마커 검출량 상관성 확인

3절 연구결과

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1. 생체외 피부흡수율 시험모델 구축 및 적용연구

가. 농약의 피부노출량 평가를 위한 국제 지침 조사

(1) 국제 지침 조사 내역

OECD	EU	EPA
OECD (2011), Guidance notes on dermal absorpti on, Series on Testing and Assessment, No. 156 <i>ENV/JM/MONO(20 11)36</i>	EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). (2010). Scientific Opinion on Preparati on of a Guidance Document on Pesticide Exposure Assessment for Workers, Operators, Bystanders and Residents. <i>EFSA Journal</i> ,8(2) 1501-1548.	USEPA (1992) Interim Report Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications Exposure Assessment Group Office of Health and Environmen tal Assessment U.S.
	European Commission, Health & Consumer Protection Directorate, Directorate E., (2002) Guidance document on dermal absorption. <i>Sanco/222/2000</i> rev. 6, November 2002.	Environmental Protection Agency, Washington,, <i>EPA/ 600/8 - 91/01B.</i>
OECD (2004), Test Guideline 428 Skin Absorption : <i>in vitro</i> Method	EFSA (2012), Scientific Opinion, Guidance on Dermal Absorption. <i>EFSA Journal</i> 10(4), 2665 EC (2004) Guidance Document on Dermal Absorption. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, <i>Sanco/222/2000 rev. 7</i>	USEPA (1996). Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.7600 Dermal Penetration.
OECD (2004), Test Guideline 427 Skin Absorption : <i>in vivo</i> Method	SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) (2010) Basic criteria for the <i>in vitro</i> assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. Adopted 22, June, 1-14.	
OECD (2004), Guidance document 28	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993).	
OECD (2011), Guidance notes on dermal absorption	Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.	

(2) 각 지침의 세부 내용 비교 분석

		OECD (Triple pack 중심)	EFSA (EU) (단계적 접근법)	NAFTA (triple pack, <i>in vivo</i> 결과 중심)
Animal	동물 종	Rat (다른 종 사용 가능)		
	피부 채취 위치	배 또는 등쪽 피부	배, 등쪽 피부 및 다리 위쪽 피부	배 또는 등쪽 피부
Human	검체의 준비	사람의 가슴 또는 배 피부를 가장 권장, 현실적으로 준비가 가능한 부위 인정		
	인공피부의 사용	사용가능하며 확인 절차필요	적절성이 검토된 피부는 사용가능	-
공통	피부조직의 두께	200~400 또는 500μm		
	나이	영향 없음		
	실험 온도	32.1±1°C		37°C
	피부 무결성	확인 결과 제출		요구
	피부조직 보관	-20°C에서 보관가능 (최대 466일)		
	시험물질 적용	한정용량법		노출환경 고려
	시험물질 농도	농축액, 최대 희석 배율		농축액, 실 사용농도
	시험물질 부피	10 mg or 10 μl/cm ²		1 mg/cm ²
	수용액의 조성	시험물질에 대하여 충분한 용해성을 가지는 1~2종의 예시 제시		
	시험물질 처리기간	실제와 유사하게 6~8시간		실제와 유사하게
	검체 채취	최대 24시간 (6-12회)	최대 24시간(kinetic 확인)	충분히 확인되도록
	각질층 분석	상황에 따라 제외 여부 판단	상황에 따른 흐름도가 작성되어 있음	결론 없음 (상황에 따라 결정)
	회수율	90~110% (경우에 따라 80~120%까지 인정)	95~105%	90~110%
항상	Washing effect	흡수되지 않는 양으로 평가		명확한 판단 없음
	Reference control	non-GLP인 경우에는 포함시킬 것		-
	결과 값 표시	흡수율 %		-
	<i>In vitro</i> 결과의 인정 여부	인정		Triple pack 접근법 권장 10% 또는 100%
기타 사항	동위원소 표지법	가장 이상적 방법		방법 중 하나로 인정
	Default value	결과가 없는 경우 10%	물질의 특성, 제품 중 유효물질 농도에 따라 차등 적용: 10%, 25% 또는 75%	물질의 특성에 따라 구분하여 설정
	Formulation의 유사성	25%이내에서 인정		/

(3) 각 지침의 세부내용 분석

- (가) 피부 흡수와 관련된 OECD, 유럽 EFSA, 미국 EPA 등 각 규정의 내용을 비교 조사한 결과, 전체적으로 유사하나 세부 내용에서만 차이를 보이고 있다. 특이적인 차이점은 OECD, EFSA에서는 단계적 시험법을 채택하고 있기 때문에 *in vitro*시험 결과만으로도 흡수율 평가가 가능하지만 EPA에서는 *in vitro*시험 결과만으로 흡수율을 평가하는 것을 인정하지 않고 있으며 *in vitro*와 *in vivo* 결과가 조합 된 Triple pack 접근법을 권장한다.
- (나) 모든 시험기준에서 시험을 실시하기 전 시험물질의 화학적, 물리학적 특성만으로 흡수율을 예측할 수 있는 Default value를 제시하고 있는데 EPA에서는 물, 옥탄을 분배계수와 분자량을 기준으로 10%와 100%, 두 가지 기준으로 분류하고 있는데 비해, EFSA에서는 추가로 활성성분(active ingredient)의 농도를 기준으로 채택하고 있으며 Default value는 이에 따라 10%, 25% 또는 75%를 적용하고 있다.
- (다) OECD, 유럽 EFSA에서는 사람 피부의 온도인 $32\pm1^{\circ}\text{C}$ 를 기준 온도로 제시하고 있는 반면에 미국 EPA 등 NAFTA에서는 사람 체온을 기준으로 37°C 를 기준 온도로 제시하고 있다.
- (라) OECD, 유럽 EFSA, EPA 모두 지속적인 개정을 통하여 실험의 세세한 부분까지 규정을 마련해 가고 있으며, 실제 실험의 최소화를 위하여 QSAR 등 예측프로그램을 권장하며, 우선 default value를 적용하여 필요한 경우에만 단계적 실험이 이루어지도록 하고 있다.
- (마) EPA 시험기준은 OECD, 유럽 EFSA의 기준과 비교하여 비교적 worst case의 시험기준을 적용하고 있으며, 예측프로그램을 사용하여 가능한 Triple pack 시험을 모두 진행하여 흡수율 확인하도록 권장하며 세세한 부분에 대해서는 논리적 근거를 제시할 수 있다면 시험물질 및 노출 환경의 특성에 따라 상황에 맞는 방법을 적용하도록 하고 있다.

나. 농약 선정을 위한 국내 농약 판매현황 및 농작업자 작업 환경에 대한 기초자료 수집

(1) 국내 농약 중독사례 조사(2010년)

치료 형태	추정환자수	중독률(%) (90% 신뢰구간)
미치료	167,512	19.7 (17.3~22.1)
자가치료	15,430	1.8 (1.1~2.5)
외래	18,319	2.2 (1.5~2.8)
입원	4,278	0.5 (0.2~0.8)
전체	209,512	24.7 (22.1~27.2)

Farming years	NO .(%)	Age group	NO. (%)
<10	92 (4.7)	<50	136 (7.0)
10~19	155 (7.9)	50~54	128 (6.5)
20~29	209 (10.7)	55~59	162 (8.3)
30~39	363 (18.5)	60~64	271 (13.8)
40~49	467 (23.9)	65~69	284 (14.5)
50~59	504 (25.7)	70~74	447 (22.8)
≥60	161 (8.2)	≥75	530 (27.1)

- 총합 1958명의 남성 농업자 (197 마을, 마을 당 약20명)
- 직접 문진에 의한 조사

(2) 국내 농약 판매 현황 및 농작업자 작업현황 기초자료 조사

품 목 명	출 하 톤
기계유 유제	1,792
포레이트 입제	207
터부포스 입제	166
에토프로포스 입제	130
메탐소듐 액제(25%,수)	123
디 메토에이트 유제	76
결정석회황 합제(36%)	75
포스파미돈 액제	52
아세페이트 수화제	49
사이퍼메트린 유제	45
파라핀오일 유제	42
클로르페리포스 수화제	40
다이아지논.포레이트 입제	38
페니트로티온 수화제	35
카두사포스 입제(3%)	30
아조사이클로틴 수화제	29
클로르페리포스.알파사이퍼메 유	27
이미다클로프리드 수화제	26
카바릴 수화제	26
이미다클로프리드 입제	24

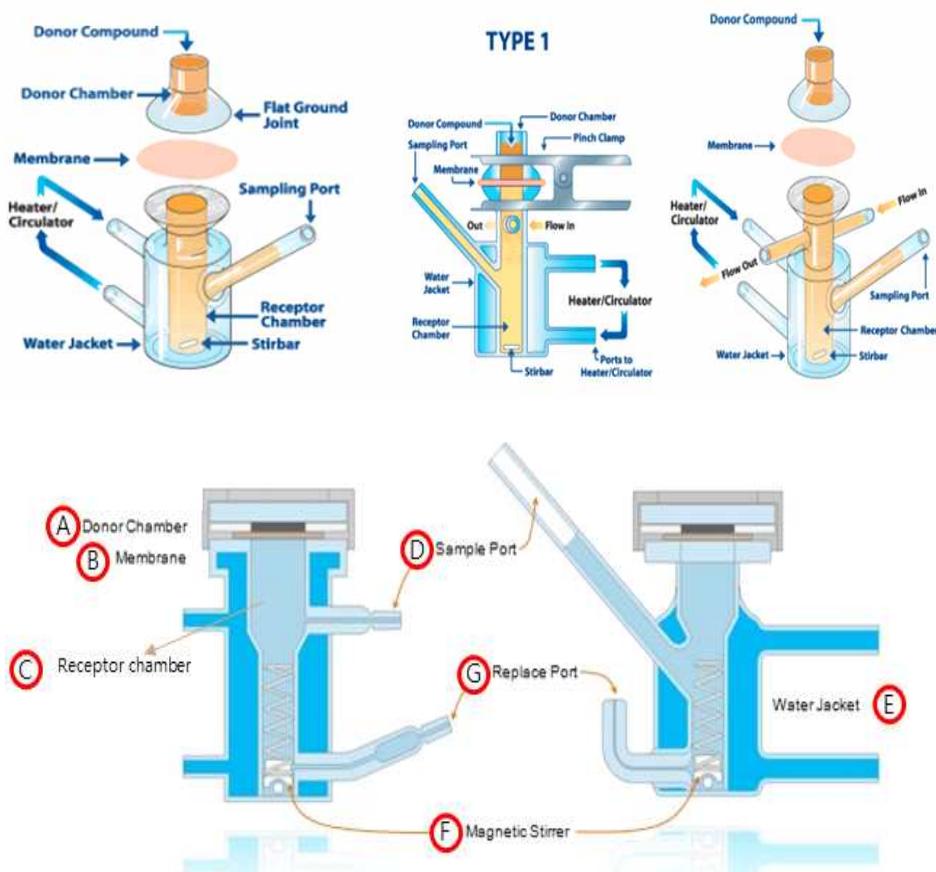
(출처-한국작물보호협회)

다. 생체외 피부흡수율 시험법 확립

(가) 피부흡수율 측정장비 (Diffusion cell)

① 피부흡수율 측정에 사용되는 장비는 다양한 형태가 존재하지만 기본적으로 시험 물질을 처리할 수 있는 Donor chamber와 피부를 투과한 시험물질이 머무를 수 있는 Receptor chamber로 구성되어 있으며, 두 챔버 사이에 피부조직을 단단히 고정할 수 있는 장치가 부착되어 있어야 한다. 이 외에 측정 장비가 갖추어야 할 조건으로는 검체 채취가 쉬워야 하며 채취 과정에서 흡수율에 영향을 줄 수 있는 거품을 가능한 적게 발생시킬 수 있는 형태인 것이 정확한 결과를 얻기 위하여 요구된다.

(나) 피부 흡수율 측정 장비 (Diffusion cell)



Franz cell 구성

- A: Donor chamber : 시험물질 처리 위치
- B: Membrane : 피부검체를 고정시키는 위치
- C: Receptor chamber : 피부를 통과한 시험물질이 담기는 위치로 수용액을 채워 사용함
- D: Sampling port : 시험 중 수용액으로부터 검체를 채취하는 통로
- E: Water jacket : 온도를 조절하기 위한 가운된 물이 순환하는 위치
- F: stirrer : 시험물질이 수용액에 잘 녹을 수 있도록 교반하는 장치
- G: Replace port : 검체 채취 후 새로운 수용액을 채워주는 통로

그림 15. Franz cell의 구성

- ① 피부흡수율 측정에 사용되는 장비는 다양한 형태가 존재하지만 기본적으로 시험물질을 처리할 수 있는 Donor chamber와 피부를 투과한 시험물질이 머무를 수 있는 Receptor chamber로 구성되어 있으며 두 챔버 사이에 피부조직을 단단히 고정할 수 있는 장치가 부착되어 있어야 한다. 이 외에 측정 장비가 갖추어야 할 조건으로는 검체 채취가 쉬워야 하며 채취 과정에서 흡수율에 영향을 줄 수 있는 거품을 가능한 적게 발생시킬 수 있는 형태인 것이 정확한 결과를 얻기 위하여 요구된다.
- ② Donor chamber는 시험물질을 어떠한 방식으로 처리하느냐에 따라 두 가지로 구분될 수 있다. 하나는 제한된 용량의 시험물질을 처리할 수 있도록 고안된 static(정적)방식이고 다른 하나는 지속적인 시험물질 처리가 가능하도록 고안된 flow-throw(동적)방식의 Donor chamber가 있다. 모든 가이드라인에서 가능한 실제 작업현장에서와 유사한 상황을 재현할 수 있는 Donor chamber의 형태를 선택하기만 한다면 어떤 chamber를 사용하는 것도 허용하고 있다.
- ③ Receptor chamber를 채우고 있는 receptor solution은 피부의 아랫면에 접촉될 수 있어야 하며 시험물질이 잘 녹을 수 있도록 교반이 이뤄질 수 있는 장치가 있어야 하며 온도에 따라 피부흡수율이 영향을 받기 때문에 온도가 최소한 $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ (EFSA, OECD, EU 기준) 또는 37°C (EPA)를 유지할 수 있어야 한다.

(다) 피부조직에 시험물질 노출

- ① 용액은 피부조직과 친화성이 있어야 하며, 시험물질의 용해도를 고려하여 선택하여야 한다
- ② 생리활성이 없는 피부를 이용하여 수용성 물질을 평가하는 경우, 수용액을 PBS를 이용하여야 한다
- ③ 소수성 시험물질을 평가하는 경우 물:에탄올 혼합액(1:1) 또는 6% 폴리에틸렌글라이콜-20 올레일 에테르를 사용해야 한다
- ④ 대사적 활성이 있는 피부를 사용하는 경우 세포배양액과 같은 생리학적 수용액을 선택하여야 한다
- ⑤ 비극성 시험물질을 평가하는 경우, 시험물질이 수용액에 용해되지 않을 수 있으므로 6% 폴리에틸렌글라이콜-20 올레일 에테르나 5% 보바인헬청알부민을 생리식염수에 섞어 용해도를 높여 사용할 수 있다.

(라) 피부조직의 선택 및 준비

- ① OECD guidance document 28에 따르면 원숭이, 돼지, 인공피부와 배양피부를 사용한 실험 결과가 제출되지만 실험에 주로 사용되는 피부조직은 사람 또는 랫드임. 실험을 위한 피부조직을 얻을 종(species)을 선택하는 것 외에 대사활성이 있는 조직을 사용할 것인지 대사활성이 없는 조직을 사용할 것인지를 선택해야 한다. 기본적으로 대사활성이 있는 피부가 선호되기는 하지만 항상 쉽게 구하기에는 어렵다는 단점이 있음. 오랜 시간 동안 대사 활성이 없는 피부를 사용하여 얻은 실험 결과가 많이 축적되어 있어 사람과 비교하기에 유리하기 때문에 무결성만 입증된다면 대사활성이 없는 피부를 사용하는 방법이 권장되고 있다.
- ② 사람피부를 사용한 실험은 시신으로부터 얻거나 미용을 위한 수술, 비뇨기과 수술을 통하여 얻어진다. 사람의 피부조직은 채취한 위치에 따라 흡수율의 차이가 크기 때문에 일관성 있는 실험결과를 얻기 위해서는 복부, 등, 가슴 또는 다리 위쪽의 피부만을 사용하는 것이 좋다. 기본적으로 사람의 피부조직을 얻는다는 것은 쉽지 않기 때문에 그 대안으로 reconstructed skin을 사용한다.
피부흡수율 실험에 reconstructed skin이 사용 가능한 가에 대해서는 각 규정마다 다름. OECD guidance document와 EU의 가이드라인에서는 카페인, 테스토스테론, 벤조익엑시드 등의 대표적 기준 물질을 사용한 실험에서 기존의 결과와 유사한 결과를 나타낸다는 것을 입증하면 사용 가능하다는 입장이나 EFSA에서는 세포배양을 통하여 생산된 피부조직의 장벽기능이 종 특징을 잘 반영하지 못 한다는 결과를 바탕으로 추천하지 않는다.
- ③ 성별에 의한 흡수율의 차이는 일반적으로 사람에서는 나타나지 않는 것으로 보고됨. 동물에서는 이러한 차이가 보고된 적이 있는데 이러한 차이는 각질층의 두께차이에 의한 것으로 알려져 있으며 각질층의 두께는 전체피부 두께의 영향을 받음. 따라서 각질층이나 전체 피부의 두께가 같으면 성별에 의한 흡수율 차이는 없는 것으로 판단한다. 랫드의 경우 등쪽 피부는 성별에 따라 전체 표피층의 두께나 각질층의 두께 차이가 있지만 배쪽 피부는 두께 차이가 없으므로 배쪽 피부를 사용한다면 성별 차이를 둘 필요가 없다.
- ④ 피부조직을 분리하는 방법으로는 동물 종과 분리 방식에 따라 다름. 시험물질을 여러 종의 동물을 이용하여 실험하는 경우 동일한 분리 방법을 이용하여 분리하여야 한다. 동물 종에 따른 차이를 고려하지 않고 적용할 수 있는 dermatome을 사용하여 split thickness피부를 제작하고, 이 절단 피부조직을 실험에 사용하는 방법을 사용할 수 있다.
- ⑤ 채취된 피부 조직은 채취 즉시 실험에 사용하지 않을 시 냉동 보관하여야 함. 적

절한 냉동 보관시 피부투과도에 영향을 주지 않는다는 연구가 사람과 동물의 피부를 사용한 실험을 통하여 증명된다. 사람이나 동물의 피부는 영상 10°C에서는 최대 3일간 보관하여도 실험 결과에 큰 영향을 주지 않으며 -80°C에 보관하였을 경우 투과율이 증가함. 피부조직을 보관하기에 가장 적합한 온도인 -20°C에 보관한 피부 조직은 최대 466일까지도 흡수율에 변화가 없다.

- ⑥ 피부를 보관 또는 실험 준비시 가장 중요한 것은 각질층을 비롯한 피부 조직의 무결성 유지임. 피부 조직의 무결성을 평가하는 방법은 다양하다. 실험을 통한 평가방법으로 사용되는 대표적인 방법은 교류 전기 저항 값이 2볼트 이상 인지를 확인하는 방법, 각질의 경피수분손실(trans-epidermal water loss; TEWL) 측정 값이 정상범위 인지를 확인하는 방법, 삼중수(tritiated water)와 같은 표준시험물질의 투과성이 적절한지를 확인하는 방법 등이 있다.

다. 생체외 피부흡수율 시험법 적용 연구

(1) 물질 선정 및 조제

(가) 물질선정: Chlorpyrifos

(나) 물질조제: 선정된 시약을 PBS(pH 7.4)로 완전히 용해

(2) 피부조직 제작

(가) 피부조직 제작방법

SD-rat 의 등쪽 피부 전층을 벗겨낸 후 시험에 적합하도록 Dermatome(Acculan 3 Ti dermatome, Aesculap Inc, USA)을 사용하여 두께 $1000\mu\text{m}$ 이하로 절단하여 진 피층을 대부분 제거함. 피부 조직은 $2.5\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ 으로 절단하여 사용

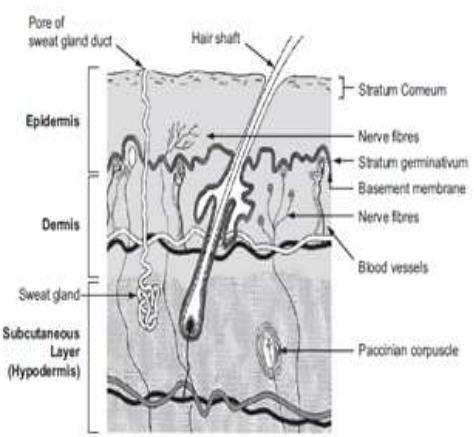
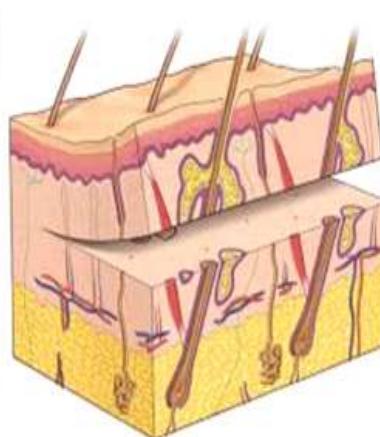


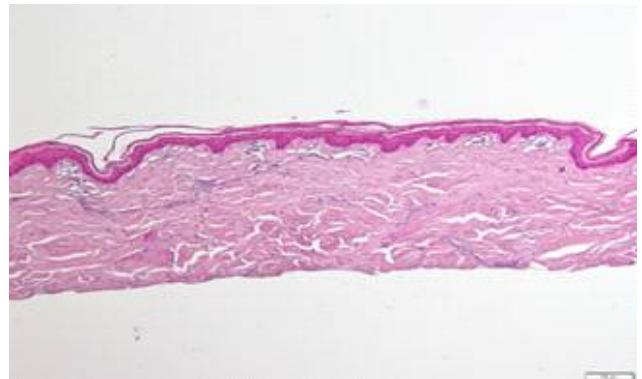
그림16. 피부조직 및 dermatome

(나) 피부조직의 두께 및 무결성 확인

피부조직의 손상여부를 육안으로 확인, 각질층 손상여부 피부두께 측정 및 무결성 확인 : 피부조직의 평균 두께 $525\mu\text{m}$ (피부두께 범위 : $341\sim713\mu\text{m}$), 각질층 손상 부위 없음



Sample 1



Sample 2

그림17. 피부조직의 무결성 확인

(다) 피부흡수율 측정

- ① 시험물질 적용 : 피부조직 1cm² 당 10 μl로 적용
- ② 흡수율 측정 장비

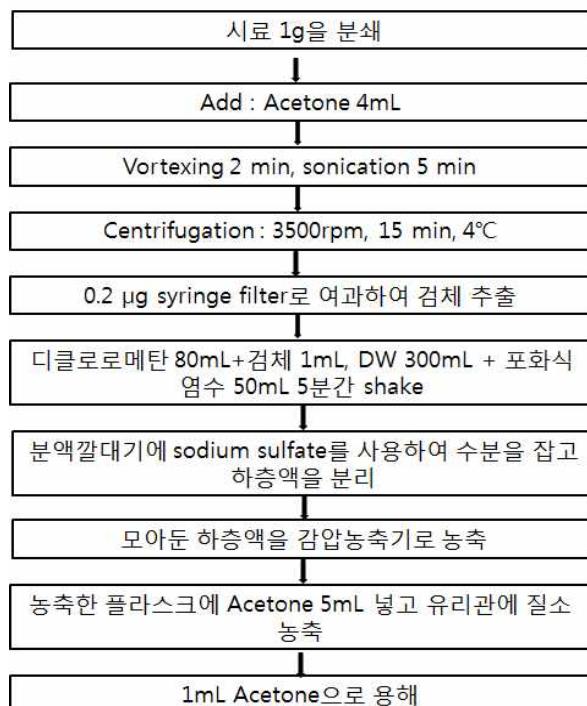
구분	내용
모델명	Diffusion Cell Test Systems (Hanson Research Corporation, USA)
Franze cell size/type	7 ml (Standard size) / 고정 용량
검체 채취 간격	총 5회 (0, 2, 4, 8, 24시간)
채취용량	회당 1.5 mL
시험 온도	32 ± 2°C

(라) 시험물질의 조제

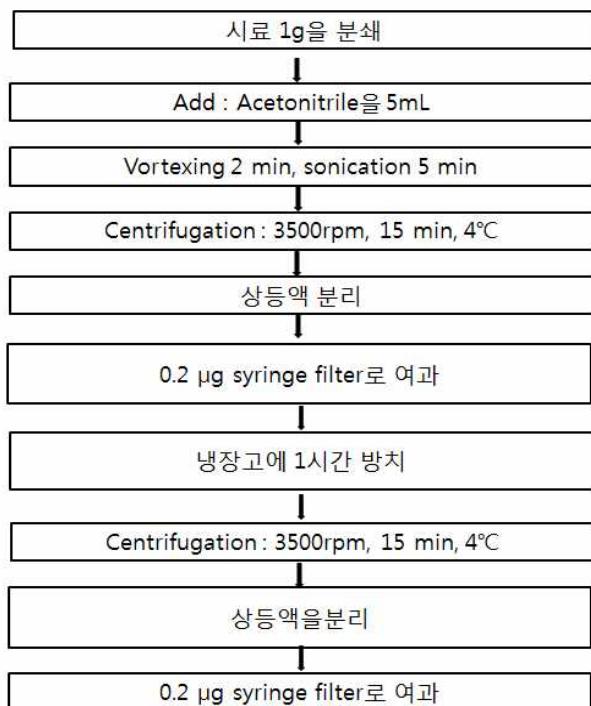
- ① 시험물질 및 농도: Chlorpyrifos 250ppm, 2500ppm
- ② 희석액 : PBS(pH 7.4)
- ③ 투여 시간 : 6시간 투여
- ④ 시료 채취 일 : 투여 후 1, 2, 4, 8, 24시간
- ⑤ 채취 시료 : 피부, 스트립 테이프, 면봉(1차, 2차), Receptor fluid(0, 2, 4, 8, 24시간)등

(마) 분석조건 확립

GC (Gas chromatography)



LC (Liquid chromatography)



(바) 생체 외 피부흡수율 측정 결과

Group	Chlorpyrifos content, $\mu\text{g}/\text{ml}$ (% of application dose)								Re	
	Dermal tissue	Strip 1&2	Dermal surface washing solution and swab	Receptor fluid collected each time after 6 hrs application						
				0hr	2hr	4hr	8hr	24 hrs		
Chlorpyrifos 250ppm	0.105±0.027 (2.36±0.61)	0.039±0.004 (0.88±0.10)	3.893±0.271 (88.0±6.1)	-	-	-	-	-	-	
Chlorpyrifos 500ppb	0.170±0.012 (1.92±0.14)	0.071±0.016 (0.80±0.14)	7.794±0.371 (88.1±4.2)	-	-	-	-	-	-	
Chlorpyrifos 2500ppm	0.679±0.031 (1.53±0.07)	0.220±0.025 (1.53±0.07)	39.417±1.258 (89.1±2.8)	-	-	-	-	-	0.071±0.002 (0.16±0.00)	

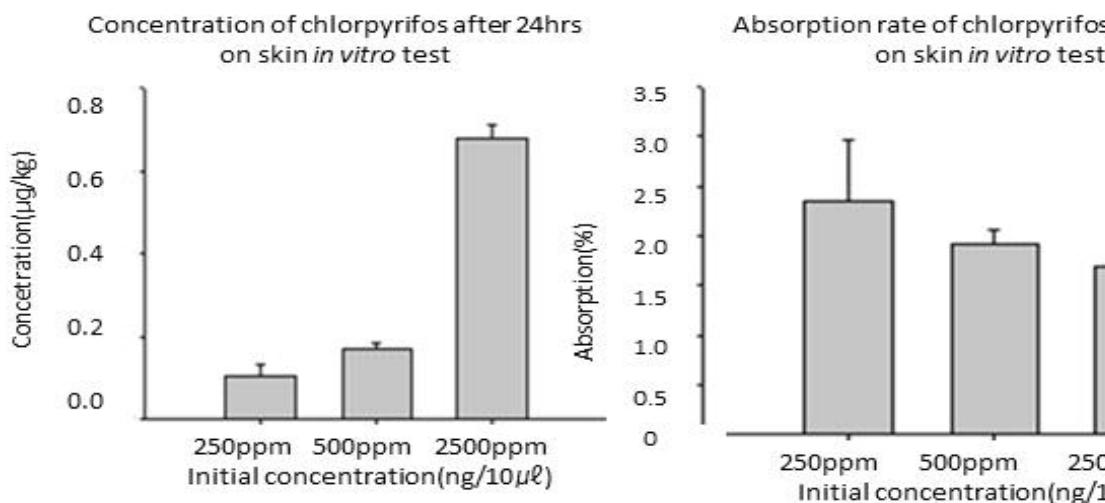


그림18. Clorpyrifos의 피부 및 흡입흡수율

(사) 생체외 피부흡수율을 이용한 위해성평가

① KO-POEM 프로그램을 이용한 chlorpyrifos 노출량 평가

- Chlorpyrifos 유효성분 함량 : 250ppm
- 사용기기 : SS기
- 제형 : 수화제
- 보호장비 : loading and mixing : glove and RPE(FFP3)
spraying : glove
- 피부흡수율 : loading and mixing : 25%
spraying : 2.36%
- Dose : 4.5kg product/ha
- Application volume : 4500L/ha
- Work rate/day : 2ha
- Duration of spraying : 6시간 77
- KO-POEM 노출량 산출 : 0.012
(mg/kg bw/day)

② KO-POEM 프로그램을 이용한 chlorpyrifos 노출량 평가

- KO-POEM 노출량 산출 (mg/kg bw/day) : 0.012
- AOEL (mg/kg bw/day) : 0.001
- 노출량/AOEL : 12

위해성 평가 결과 : Chlorpyrifos 노출량이 AOEL 보다 높으므로
Speed sprayer 조건에서 별도의 흡수방지방법이 강구되어야 함

2. 생체 내 피부 및 흡입흡수율 시험모델 구축 및 적용연구

가. 생체내 농약의 피부흡수율 시험법 구축 및 chlorpyrifos 적용 시험

(1) 국제 지침 조사 내역

(가) 시험개요



- 시험물질 : Chlorpyrifos
- 투여시간 : 6시간 투여
- 채취시료 : 적용덮개, 적용부위의 피부, 비투여 피부, 테이프스트립, 스왑, 세척용액(피부, 대사케이지), 혈장, 소변, 대변, 사체

(나) 물질선정

① 선정 사유

ⓐ 국내사용량 : 만코제브, 글리포세이트, 메틸브로마이드 등 다소비 농약에 해당되는 농약으로 실제 과수용으로 다량 사용되어 농작업자의 노출이 우려되는 농약임

ⓑ Chlorpyrifos의 농작업자 안전기준값(AOEL)은 0.001 mg/kg bw/day이며 주요 급성독성은 구토, 혼란, 어지럼증을 유발하였고 만성독성으로는 중독증상으로 인한 요실금 발생을 유발하여 흡수량을 파악하여 관리가 요구되는 농약임

(다) 물리적 화학적 특성

- 성상 : 연한 황토색 결정
- 화학구조식 : $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$
- 화학구조 :

CCOCOP(=S)(=O)[C@@H]1C(Cl)=C(Cl)N=C1S
- 분자량 : 350.59 g/mol
- 밀도 : 1.398 g/cm³
- 녹는점 : 42°C
- 끓는점 : 160°C
- 용해도 : 2mg/L(water), 147mg/L(Tween 20/DMSO/water 2:3:5), 7900mg/L(benzene), 645mg/L(xylene)
- log Pow : 4.96

(3) 생체내 피부흡수율 측정방법

(가) 시험동물 선정 및 시험군 구성

① 8주령, 수컷($207.3 \pm 8.8\text{g}$)

시험군	시험물질	성	두수	투여농도 (ppm)	투여액량 ($\mu\ell$)
1군 (0h)			4두		
2군 (24h)			4두		
3군 (48h)	Chlorpyrifos	수컷	4두	250	100
4군 (72h)			4두		
5군 (7day)			4두		

② 사육조건

ⓐ 동물실의 온도는 $22^\circ\text{C} (\pm 3^\circ\text{C})$ 습도는 30~70% 이내로 하고 조명은 인공조명을 사용하며 조명의 주기는 12시간 주기로 한다.

ⓑ 먹이급여는 실험실에서 사용하는 먹이 그리고 식수는 제한 없이 자유롭게 공급하였고 순화기간에는 대사케이지 안에서 최소 5일전 개별적으로 사육한다.

③ 시험물질

ⓐ 농약의 원제 및 제품을 사용하며 용매는 시험물질이 물에 녹는 경우에는 물로 녹여 투여하고 그렇지 않을 경우 적당한 용매(예: Tween)에 용해시켜 투여하였다. 이때 사용되는 용매는 종류수 사용을 원칙으로 하되 종류수에 용해 또는 혼탁 되지 않는 약제는 저독성인 적당한 용매를 선정·사용한다.

ⓑ 시험물질의 투여액량은 동물의 피부면적당 고체의 경우 $1\text{--}5\text{mg/cm}^2$, 액체의 경우 $10\mu\ell/\text{cm}^2$ 가 일반적이다. 이와 다를 경우에는 예상되는 사용조건과 시험 목적, 시험 조제 물질의 성질에 따라 이를 타당한 근거가 있어야 한다.

④ 시험 방법

시험동물은 5일 전 대사케이지에서 개별적으로 사육한다.



시험 하루 전 약제처리를 위한 시험동물 등 부위의 체모를 피부에 손상이 가지 않게 제모한다.



제모한 피부에는 표면에 피지를 제거하기 위해 아세톤을 침포한다.



시험물질(Chlorpyrifos)의 증발량을 확인과 시험동물의 삼킴을 방지하기 위하여 활성탄여과기가 들어있는 적용 장치를 만들어 투여부위에 적용한다.

▼활성탄을 넣은 나일론 필터



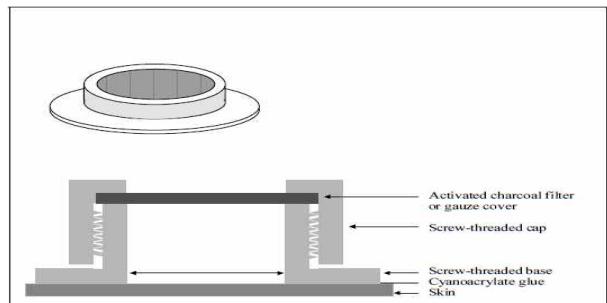
▼동물에 적용한 모습



▼필터를 장착한 실제 적용장치



▼OECD 가이드라인에 소개된 적용장치



적용시간은 6시간으로 하였으며 적용이 끝난 적용 부위 피부는 적절한 스왑을 이용하여 일반적으로 사용되는 수용성 비누 용액 또는 물을 이용하여 3회 세척한다.

▼
세척 후 피부를 건조하고 새로운 덮개를 장착하여 개별 대사케이지로 돌려보내 시료를 채취한다.

▼
노출시간 동안 최초 피부 접촉 후 최대 24시간 후에 배설물을 수집하고 실험이 끝날때까지 매일 수집한다.

▼
노출시간이 종료된 그룹은 적용장치를 제거하고 -80°C에 각각 보관한다.

▼
계획된 시간(투여 후 0, 24, 48, 72, 144시간)에 안락사하고 시료(적용장치, 혈장, 내부장기, 적용 부위 근처의 피부, 비투약 피부, 적용부위에 사용한 스왑, 테이프스트립, 적용부위 피부, 사체)를 채취 및 -80°C에서 보관 한다.

⑤시험기간

- ⓐ 적절한 노출시간(일반적으로 6시간 또는 24시간)을 적용하며, 예상되는 인체 노출시간을 바탕으로 한다.

⑥ 시료채취



피부(침포부위, 침포주변, 그 외)



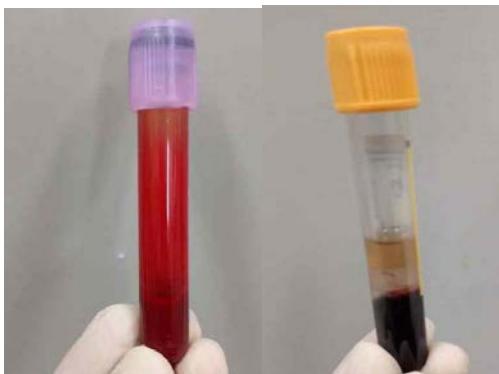
Washing swab



적용장치(침포 중, 노출 중)



Tape strip



혈청



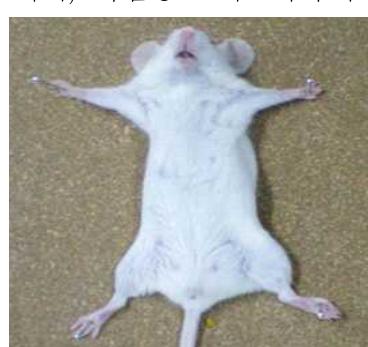
내부장기



세척액, 세척솜
(침포 후 세척, 시험종료 후 대사케이지 세척)



배설물(대변, 소변)



사체

날숨(필요 시)

⑦분석 방법

ⓐ 시료 전처리 방법

- 시료1g에 ACN 10mL을 첨가후 voltex 1min, sonification 1min
- n-Hexane 10mL 첨가후 Voltex 1min, sonification 1min
- 4000 rpm에서 10분간 원심분리 후 중간층 채취
- 채취한 Acetonitrile 층을 0.22 syringe filter로 여과
- Vial에 옮겨 담은 후 LC-MS/MS 기기를 이용하여 분석하였다.

ⓑ Chlorpyrifos 분석기기 조건 확립(LC-MS/MS)

Column	Accucore XL C18 (150X 4.6mm, 4 μ m) (Lot no. 12268)					
Column temp.	20°C					
Mobile phase	20mM Ammonium acetate : MeOH =10 : 90					
Flow rate	0.5 mL / min					
Injection volume	5 μ L					
Autosampler temp.	10°C					
Positive ion mode, MRM mode						
Compound	m/z	Fragment	Collision energy (V)			
Chlorpyrifos	351.9→199.9	70	20			
Capillary voltage : 3500 V						
Gas flow : 10 l/min, Gas Temp : 350°C						
Nebulizer : 40 psi, Nozzle voltage : 450 V						
Sheath gas flow : 10 l/min, Sheath gas Temp : 400°C						
Nebulizing gas : Nitrogen gas, Collision gas : Nitrogen gas						

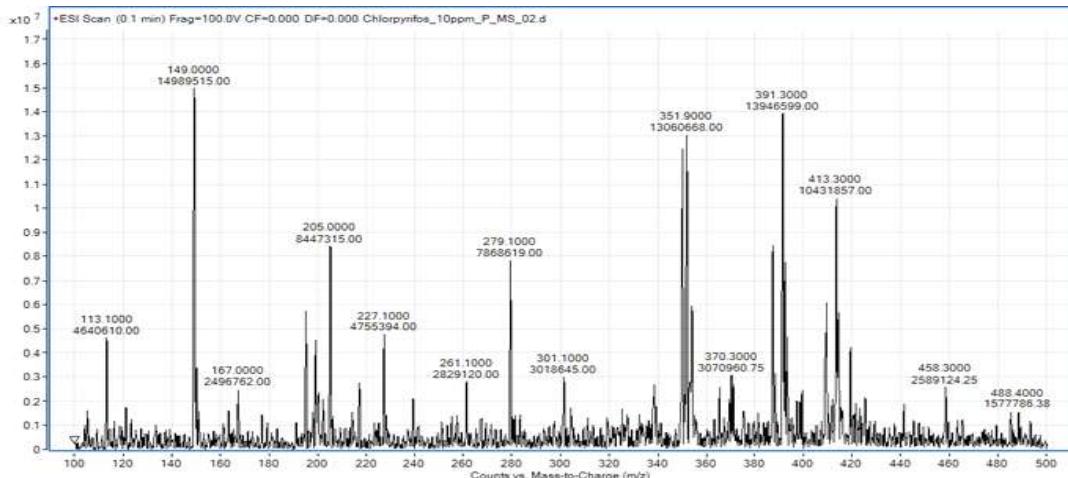


그림 19. ESI mass spectrum of chlorpyrifos (10 ppm)

④ 공시농도에 대한 정밀성 확인

Norminal conc. (ng/mL)	Measured concentration (ng/mL)					Mean conc. (ng/mL)	SD conc. (ng/mL)	RSD (%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5			
6	8.901	5.841	5.836	6.251	6.030	6.572	1.31	19.98
25	19.859	24.435	23.607	23.272	22.924	22.819	1.75	7.66
40	46.722	34.926	36.114	34.286	39.083	38.226	5.09	13.33

⑤ 회수율 확인

Norminal conc. (ng/mL)	Measured concentration (ng/mL)					Mean conc. (ng/mL)	SD conc. (ng/mL)	Recovery (%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5			
6	8.901	5.841	5.836	6.251	6.030	6.572	1.31	109.5
25	19.859	24.435	23.607	23.272	22.924	22.819	1.74	91.3
40	46.722	34.926	36.114	34.286	39.083	38.226	5.09	95.6

⑥ 생체 내 피부 흡수율

Amount applied	Amount absorbed in skin(ug)					Absorption rate(%) ^{a)}	Amount not absorbed(ug)						sum amount not absorbed	Total recovery (%)
	6h	+24h	6+48h	6+72h	6+144h		skin-washed off at 6h	skin-washed off at 24h	Tape stripped at 6h	Tape stripped at 6+24h	Trapped in charcoal filter device at 6h	Trapped in charcoal filter device at 6+24h		
chlorpyrifos 250ppm (100μL, 25μg)	1.461± 0.394	0.257± 0.038	0.206± 0.047	0.109± 0.040	0.022± 0.004	1.09± 0.46	15.743± 1.824	0.772± 0.113	0.379± 0.043	0.131± 0.024	2.637± 0.343	0.285± 0.143	19.947± 2.495	80.9± 10.4

a) : % peak amount found in skin of applied and surrounding area minus amount in washing solution and swab, and charcoal filter device 24hours after the stop of exposure

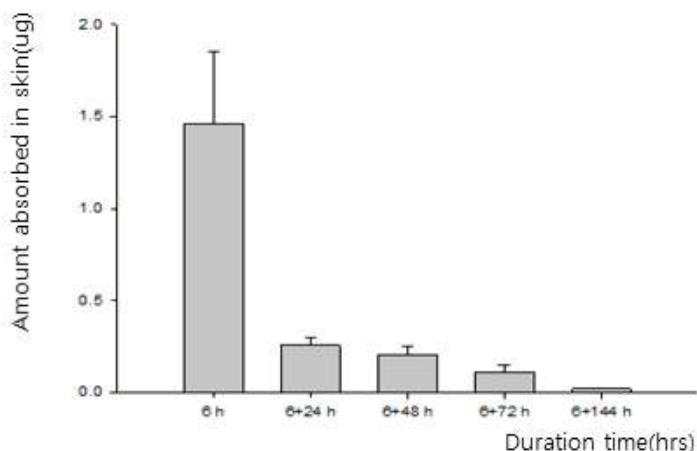


그림20. *in vivo* chlorpyrifos 피부 흡수율

나. Chlorpyrifos의 생체내 피부흡수율을 이용한 위해성 평가

(1) KO-POEM 프로그램을 이용한 Chlorpyrifos 노출량 평가

(가) 노출량 평가 인자

Chlorpyrifos 유효성분 함량	:	250ppm
사용기기	:	SS기
제형	:	수화제
보호장비	:	loading and mixing : glove and RPE(FFP3) spraying : glove
피부흡수율	:	loading and mixing : 25% spraying : 1.1%
Dose	:	4.5kg product/ha
Application volume	:	4500L/ha
Work rate/day	:	2ha
Duration of spraying	:	6시간
KO-POEM 노출량 산출	:	0.0077 mg/kg bw/day

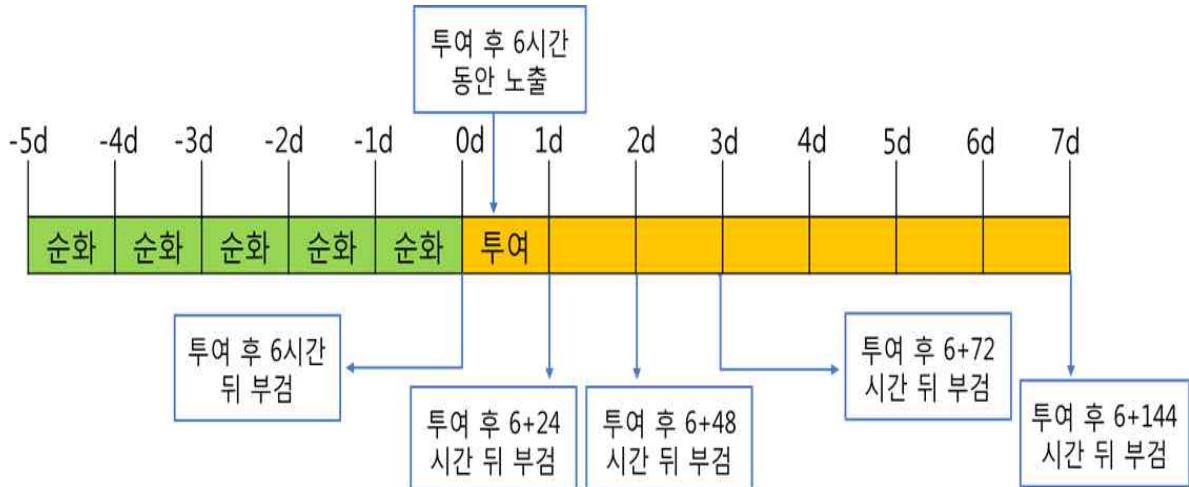
(나) Chlorpyrifos 위해성평가

KO-POEM 노출량 산출 (mg/kg bw/day)	:	0.0077
AOEL (mg/kg bw/day)	:	0.001
노출량/AOEL	:	7.7

위해성 평가 결과 : Chlorpyrifos 노출량이 AOEL 보다 높으므로
Speed sprayer 조건에서 별도의 흡수방지방법이 강구되어야 함

나. 생체내 흡입흡수율 시험모델 확립 및 chlorpyrifos 적용시험

(1) 시험 개요



- 시험물질 : Chlorpyrifos
- 투여시간 : 6시간 투여
- 채취시료 : 폐, 간, 내부 장기, 피부, 혈청, 소변, 대변, 사체

(2) 생체내 흡입흡수율 측정 방법

(가) 시험동물 선정 및 시험군 구성

① 8주령, 수컷(247.3 ± 6.3 g)

시험군	시험물질	성	두수	처리농도 (ppm/6h)	실측농도 (ppm/6h)
1군(0h)			3두		
2군(24h)			3두		
3군(48h)	Chlorpyrifos	수컷	3두	4	0.49
4군(72h)			3두		
5군(7day)			3두		

② 시험 방법

시험동물은 1일 전 대사케이지에서 개별적으로 사육한다.



예비 실험을 통한 휘발량 확인 후 시험물질 조제 : 최종 농도 4mg/6h



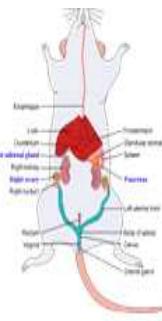
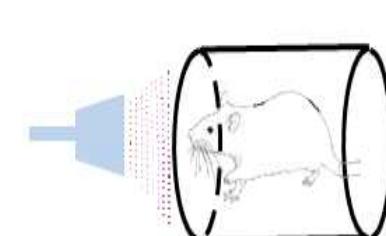
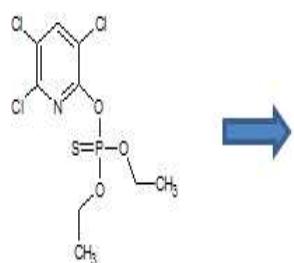
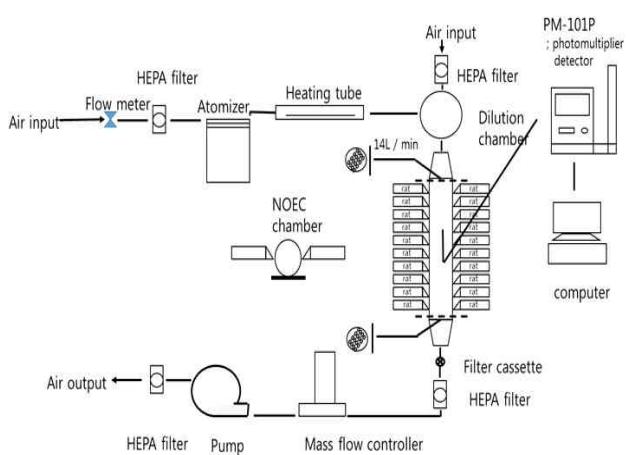
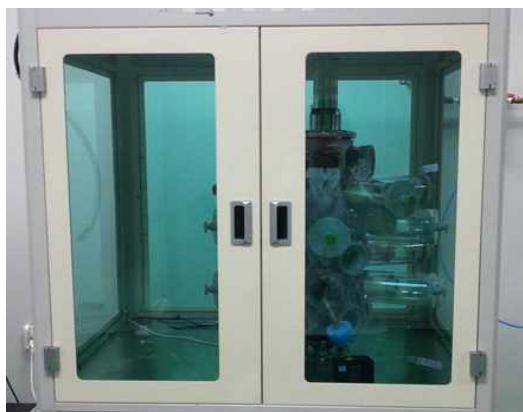
Nose-only inhalation system (NITC-30, HCT)을 사용하여 시험동물의 비강에 1회 6시간 동안 에어로졸 상태로 노출 : 챔버내 유량은 19 LPM, 비강에 노출되는 공기의 유량은 1 LPM (Liter per minute)이다.



계획된 시간(투여 후 0, 24, 48, 72, 144시간)에 안락사하고 시료(적용장치, 혈장, 내부장기, 적용 부위 근처의 피부, 비투약 피부, 적용부위에 사용한 스왑, 테이프스트립, 적용부위 피부, 사체)를 채취 및 -80°C에서 보관한다.



노출시간 동안 최초 피부 접촉 후 최대 24시간 후에 배설물을 수집하고 실험이 끝날 때 까지 매일 수집한다.



(F.W. = 334.52)

그림 21. 생체 내 흡입흡수율 시험법 확립 및 적용방법

(가) 흡입흡수율 계산

① 생체내 흡입흡수율

Duration time (Hrs)		Skin (ng/g)	Liver (ng/g)	Lung (ng/g)	Other Organs (ng/g)	Body (ng/g)	Serum (ng/g)	Feces (ng/g)	Urine (ng/g)	Uptake rate (%)
6h	Average	20.25	0.53	2.01	4.73	5.06	0.32	-	-	55.57
	SD	17.16	0.36	1.02	1.19	2.59	0.55	-	-	33.32
24h	Average	14.84	1.02	1.01	1.34	0.58	0.18	46.15	0.74	21.5
	SD	10.45	0.42	0.60	1.03	0.19	0.31	25.92	0.51	10.02
48h	Average	3.61	0.71	0.62	1.45	0.77	0.28	8.2	0.4	8.48
	SD	3.80	0.89	0.24	1.02	0.28	0.25	10.24	0.35	3.47
72h	Average	1.28	0.56	0.32	1.69	0.16	0.2	2.52	0.2	5.11
	SD	1.28	0.04	0.30	2.26	0.28	0.28	3.47	0.35	5.79
144h	Average	0.65	0.41	0.27	3.55	0.14	0.1	1.87	0.1	5.18
	SD	0.33	0.45	0.24	3.16	0.24	0.17	1.50	0.17	1.21

② Chlorpyrifos 흡입입자 크기

Chlorpyrifos의 particle size (count mean diameter)가 $0.37\mu\text{m}$ 으로 측정됨

→ 입자크기가 $3\mu\text{m}$ 미만이므로 폐포 부위에 침착되고 폐포벽을 통과하여 흡수됨

⇒ 흡입흡수율 기본치인 100% 적용

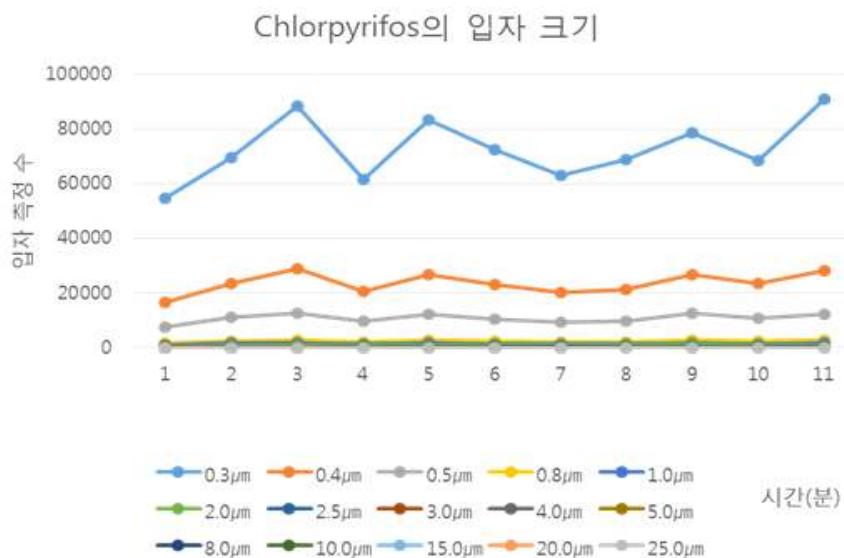


그림22. Chlorpyrifos 입자 크기 분포 양상

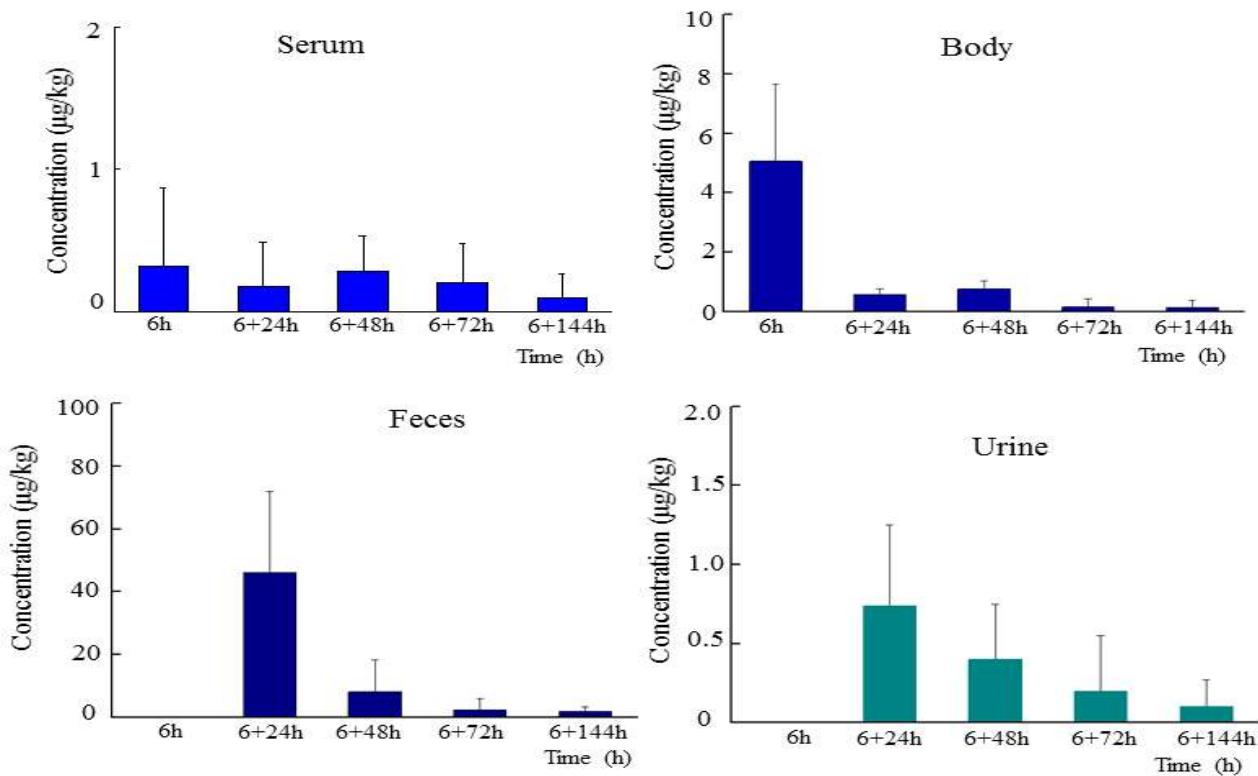


그림23. Chlorpyrifos 흡입 흡수율

- ③ 흡입시험 시, 수컷 SD랫드를 이용하여 6시간동안 개체당 약 4mg의 chloropyrifos를 노출하였으며, 이때의 입자크기는 0.37 μm 이었다. 노출실험이 끝난 0시간부터 경시별로 체내 잔류량과 체외배설량 총량은 감소하는 경향을 띠고 있는 것을 확인함. chloropyrifos의 투과율은 0시간 때 약 55%, 24시간때 약 21% 수준으로 높았다.
- ④ 즉, chloropyrifos를 이용한 농작업시 피부에 닿지 않도록 긴팔, 우비등을 착용하도록 주의하여야 하며, 마스크등의 개인보호장구를 착용하는 것이 중요함을 알 수 있었고 인체영향에 관해서는 흡수와 배설의 메커니즘에 관하여 추가적인 세부연구가 필요함을 알 수 있었다.
- ⑤ Chlorpyrifos의 흡입을 통한 초기 흡수율은 55±33%로 생체 내 피부흡수율 보다 높은 것을 확인 할 수 있었고 체내 흡수된 양의 Chlorpyrifos는 대부분 24시간 이후 뇨를 통하여 배출됨을 알 수 있었다.
- ⑥ 결론적으로 Chlorpyrifos는 분무시 입자 크기는 0.37μm로서 폐포에 부착하고 폐에 도달할 수 있으며, 흡입 시 초기 흡수율이 높은 물질인바, 흡입을 최대한 방지할 수 있는 방법을 강구하여 사용법을 권장하는 것이 필요함을 알 수 있었다.

3. 농작업자의 농약 피부노출량 평가를 위한 실증모델 구축

가 농약 제품의 적용 가능 피부흡수율 시험모델 구축 및 적용 시험

(1) 농약성분의 제품별 독성치 및 피부흡수율 비교 조사

농약의 농작업자 위해성을 평가하기 위하여 국내에서 판매되고 있는 과수용 살균제·살충제 농약 중 다생산(30t 이상)되는 농약 20종의 생산량, 독성치(NOAEL), 농작업자노출허용량(AOEL) 및 피부흡수율을 조사하였다.

(2) 농약 제품별 사용조건 및 농작업자 노출조건 비교 조사

국내 과수용 다 생산되는 농약 20종의 제형, 해당 과수, 물 20L당 사용약량, 안전사용기준에 대하여 비교 조사하였다.

(3) Thiophanate-methyl의 피부흡수율 시험

(가) 물질 선정 이유

국내 과수용 다 생산되는 농약 20종 중 피부흡수율 데이터가 없는 성분(프로피네브, 티오파네이트메틸, 아세페이트, 플루아지남, 메탈락실, 코페옥시클로라이드, 가스가마이신)을 KO-POEM을 통하여 노출량을 산출하고 농작업자노출허용량(AOEL)과 비교하였을 때 노출량이 AOEL보다 큰 성분인 Thiophanate-methyl을 선정하여 피부흡수율 시험을 수행하였다.

(나) 시험 방법

- ① SD rat(수컷, 8주령)을 사용하였고, 동물의 체중은 평균무게의 편차 ± 20%를 넘지 않도록 하였으며, 용량별 시료채취 시간별 최소 4마리 그룹을 사용하였다.
- ② 시험동물은 5일전 대사케이지에서 개별사육하며, 시험 하루 전 약제처리를 위하여 시험동물 등 부위의 체모를 가급적 넓게 제모하되 피부가 손상되지 않도록 주의하고 피부에 아세톤을 발라 피지를 제거하였다.
- ③ 시험물질은 최소 권장 면적인 10cm²에 100μl를 도포하였으며, 증발물질을 포집하고자 활성탄이 들어있는 적용장치를 부착하였다.
- ④ 시험물질 투여 6시간 후 투여피부에 스왑을 이용하여 세척액으로 3회 이상 세척하였고, 세척액은 분석을 위하여 별도로 보관하였다.
- ⑤ 세척을 마친 뒤 피부를 건조하고 새로운 적용장치를 장착하여 개별대사케이지로 돌려보냈다.
- ⑥ 노출시간이 종료된 그룹은 적용장치를 제거하고 계획된 시간에 안락사하여 시료를 채취하고, 제거된 적용장치 또한 분석을 위하여 별도로 보관하였다.

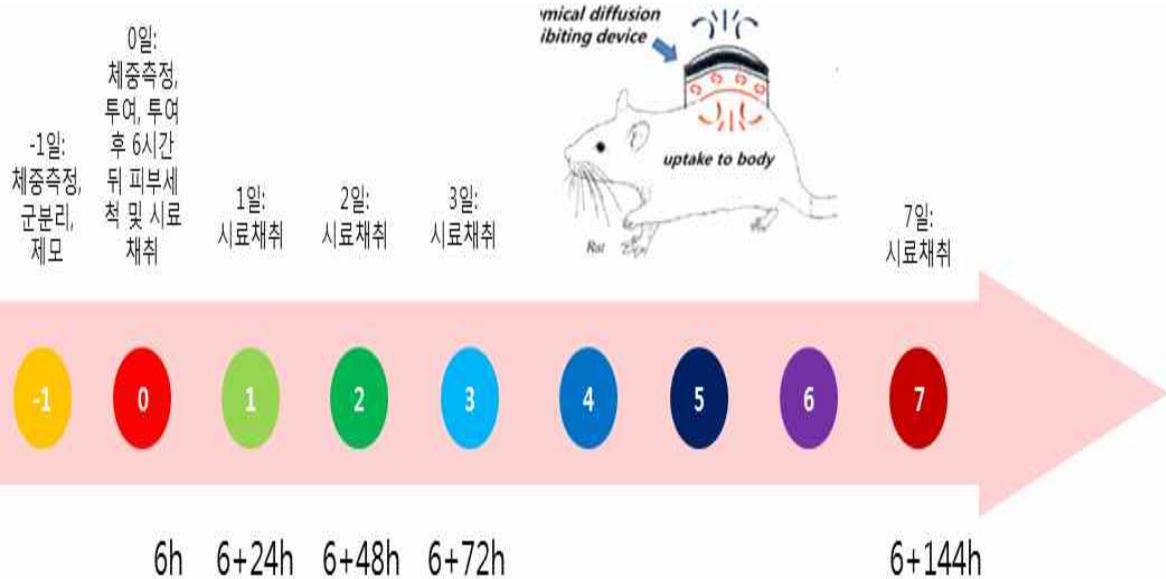


그림24. 랙드에서 Thiophanate-methyl의 피부노출 및 경시별 시료채취

(다) Thiophanate-methyl의 생체 내 피부흡수율 분석법 확립

Column	4 μ Fusion-RP 80Å (50 X 2mm, 4 μ m)				
Column temp.	25°C				
Moblie phase	Methanol / 0.1%formic acid = 70/30(v/v)				
Flow rate	200 mL /min				
Injection volume	5 mL				
Autosampler temp.	25°C				
Detector(MS/MS)	<p>Positive ion mode, MRM mode</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Target Compound(m/z)</th> <th>MBC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>191.9->160.1</td> <td>191.9->192.1</td> </tr> </tbody> </table> <p>DP. 54.12 EP 5.94 CE 24.45/12.8 CXP 9.06</p>	Target Compound(m/z)	MBC	191.9->160.1	191.9->192.1
Target Compound(m/z)	MBC				
191.9->160.1	191.9->192.1				

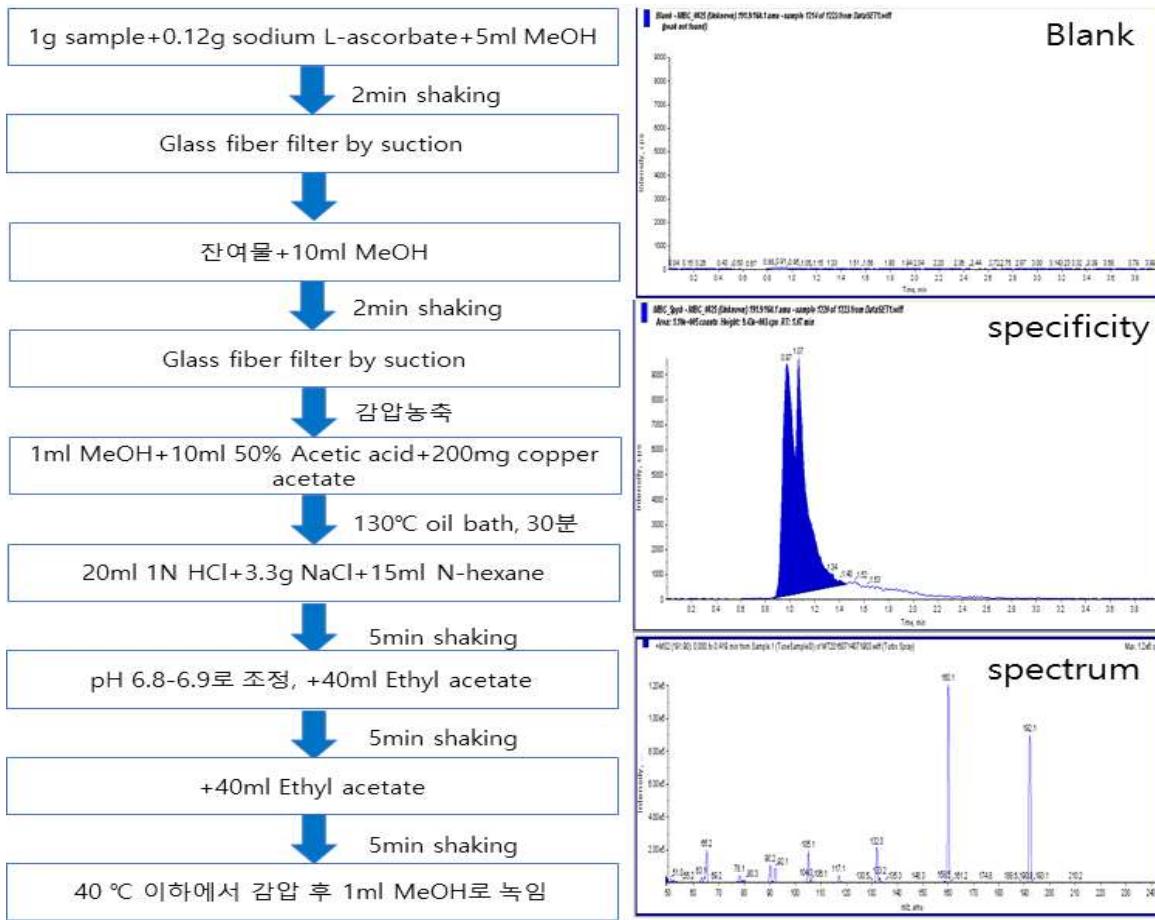


표3. 생체시료 중 Thiophanate-methyl 정밀성 확인

Norminal conc. (ng/ml)	Measured concentration(ng/ml)						Mean conc. (ng/ml)	SD conc. (ng/ml)	RSD (%)
	NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6			
20	19.1	19.0	19.3	19.3	20.4	19.0	19.35	0.53	2.75
25	26.0	25.9	26.0	25.9	25.5	25.9	25.87	0.19	0.72
50	45.0	46.9	46.4	45.0	44.6	44.4	45.38	1.02	2.25

표4. 생체시료 중 Thiophanate-methyl 회수율 확인

Norminal conc. (ng/ml)	Measured concentration(ng/ml)						Mean conc. (ng/ml)	SD conc. (ng/ml)	Recovery (%)
	NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6			
20	19.1	19.0	19.3	19.3	20.4	19.0	19.35	0.53	96.75
25	26.0	25.9	26.0	25.9	25.5	25.9	25.87	0.19	103.47
50	45.0	46.9	46.4	45.0	44.6	44.4	45.38	1.02	90.77

(라) Thiophanate-methyl의 노출량 분석

Thiophanate-methyl 유효성분 함유량 70%인 수화제 제품의 생체 내 피부흡수율을 분석한 결과 650ppm과 1250ppm으로 희석하여 랫드 등 면적 중 10cm²에 100μl를 도포하여 6시간 동안 노출시킨 후 시간별로 시료를 채취하여 분석한 결과 노출 후 6시간 뒤에 650ppm과 1250ppm 투여군에서 각각 23.9%, 20.8% 으로 확인되었다 (표 5).

(마) Thiophanate-methyl의 위해성 평가

시험결과에서 얻은 피부흡수율 중 더 높은값 인 23.9%을 입력하여 산출한 노출량을 이용하여 위해성평가를 실시한 결과 SS기를 사용할 경우 노출량/AOEL 값이 입상수화제의 경우 2.18, 수화제의 경우 0.31과 3.10, 액상수화제의 경우 0.22와 1.77이 산출되었다.

⇒ SS기 사용 시 별도의 흡수 방지에 대한 대안이 요구됨.

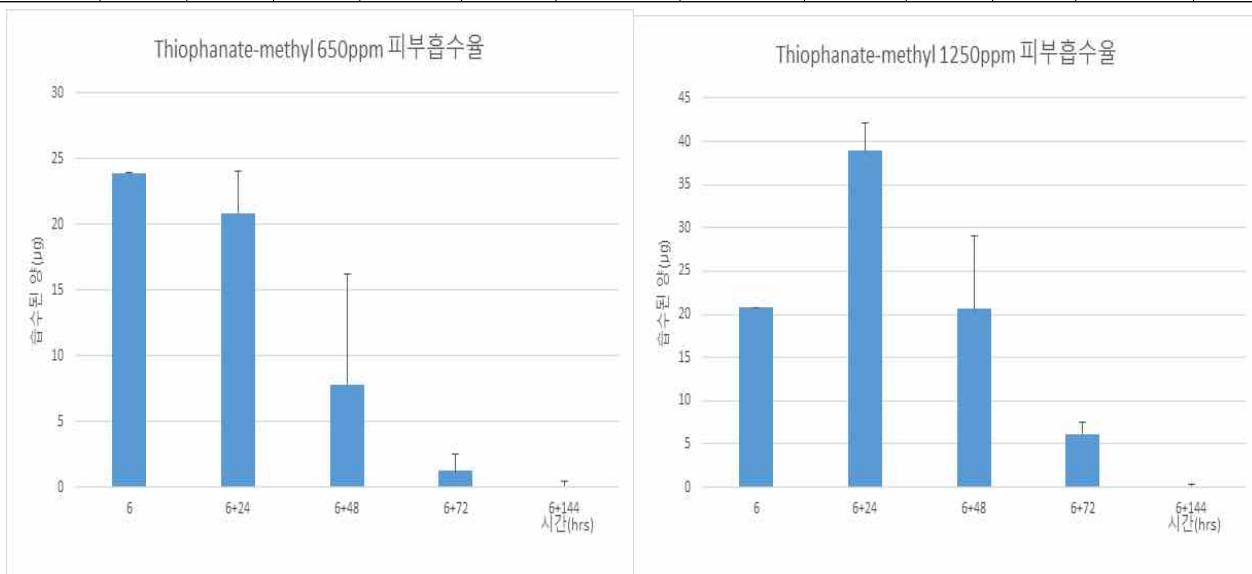
표5. 경시별 생체 시료중 Thiophanate-methyl의 노출량 분석

(SD 랫드, 수컷, 650 ppm, 100 μl/10cm² 도포)

노출 시간	순번	간	신장	내부 장기	사체	투여 피부	주변 피부	소변	대변	혈청	합계	흡수율
		ng/mL									ng/mL	(%)
6시간	mean	34.0	98.9	113.5	68.6	15015.2	592.2	21.6	9.8	46.4	15510.1	23.9
	SD	5.7	35.5	93.0	93.5	2079.0	412.3	7.0	9.6	70.9	2059.5	3.2
6+24 시간	mean	79.5	70.3	133.5	16.2	13062.8	1510.4	135.8	27.9	21.5	13603.8	20.9
	SD	77.4	49.0	25.7	24.2	5490.8	1768.63	169.9	5.8	32.9	5486.0	8.4
6+48 시간	mean	0.0	6.3	37.8	1.4	4933.2	91.2	2.6	8.1	2.0	5056.1	7.8
	SD	0.0	5.5	10.7	2.5	790.8	26.4	4.5	7.6	3.4	845.4	1.3
6+72 시간	mean	0.0	0.0	0.0	0.0	715.4	63.5	0.0	0.0	7.0	785.9	1.2
	SD	0.0	0.0	0.0	0.0	234.0	48.5	0.0	0.0	12.2	176.4	0.3
6+144 시간	mean	0.0	0.0	0.0	0.0	52.5	20.7	0.0	0.0	0.0	73.2	0.1
	SD	0.0	0.0	0.0	0.0	38.8	35.8	0.0	0.0	0.0	25.6	0.0

(SD 랫드, 수컷, 1250 ppm, 100 $\mu\text{l}/10\text{cm}^2$ 도포)

노출 시간	순번	간	신장	내부 장기	사체	투여 피부	주변 피부	소변	대변	혈청	합계	흡수율
		ng/mL										ng/mL
6시간	me an	30.8	62.2	14.4	14.4	25328.6	592.2	2.2	38.5	1.0	25961.3	20.8
	SD	20.4	30.4	5.1	5.1	18501.5	412.3	3.8	33.1	1.8	18017.3	14.4
6+24 시간	me an	30.1	78.4	118.1	118.1	46348.5	9000.6	29.4	76.0	0.0	48615.4	38.9
	SD	38.3	91.0	139.4	139.4	26384.1	4526.0	36.8	73.3	0.0	24528.7	19.6
6+48 시간	me an	14.8	15.0	5.8	5.8	25157.3	502.7	6.0	8.5	0.4	25744.7	20.6
	SD	6.9	11.3	32	3.2	18053.1	623.4	10.4	9.0	0.7	18702.3	15.0
6+72 시간	me an	0.0	8.6	34.2	34.2	3937.4	393.3	0.0	0.0	0.0	7794.1	6.2
	SD	0.0	3.7	36.9	36.9	3795.2	642.8	0.0	0.0	0.0	3828.6	3.1
6+144 시간	me an	0.0	0.0	0.0	0.0	14.7	21.6	0.0	0.0	0.0	36.4	0.0
	SD	0.0	0.0	0.0	0.0	24.5	26.3	0.0	0.0	0.0	18.7	0.0

<그림25. *in vivo* thiophanate-methyl의 피부흡수율>

나. 농약의 흡입노출에 의한 생체노출량 평가모델 구축

(1) 농약의 흡입노출에 의한 농작업자 구체적 동향 도사

(가) 농약의 흡입흡수율 평가 방법에 대한 국제 지침 비교조사

표6. 농약의 흡입흡수율 평가 방법에 대한 국제 지침 규정 및 주요 내용

국가 또는 기구	규정	주요 내용
E F S A	○ Guidance on the Assessment of Exposure for Operators, Workers, Residents and Bystanders in Risk Assessment for Plant Protection Products (2014)	<ul style="list-style-type: none"> • 위해성 평가를 위한 체중, 호흡률, 평균대기농도, 노출기간, 체표면적, 흡수율에 대한 기본 값 설정 • 작업자, 노동자, 거주자 및 행인 각각에 대한 위해성평가 방법 제시
O E C D	○ Guidance Document for the Conduct of Studies of Occupational Exposure to Pesticides During Agricultural Application (OECD/GD(97) 148, 1997)	<ul style="list-style-type: none"> • Personal air sampling method 제시 <ul style="list-style-type: none"> - Personal air sampling method의 주요 이점과 한계 및 방법 제시 - 공기 중 농도 계산방법 제시 - 농약의 물리화학적 성질을 고려하여 샘플 채취 과정에서 샘플 수집방법 고려
E P A	○ Occupational and Residential Exposure Test Guidelines OPPTS 875. 1300 Inhalation Exposure Outdoor (1996)	<ul style="list-style-type: none"> • 현장조사 전 실험연구 필요 사항 제시 • 배터리 파워 펌프를 이용한 개별 샘플링 방법 제시 • 방독면을 사용한 개별 모니터링 방법 제시 • 노동 단계에 따른 표준 호흡률 제시

(2) 농약의 흡입흡수율 평가방법에 대한 외국의 노출평가 모델 개발 현황

표7. 흡입흡수율 평가하기 위한 노출평가 모델 및 장단점 비교

모델명	장점	단점
EUSES (European Union System for Evaluation of Substances)	<ul style="list-style-type: none"> • 모든 제품에 대해 다양하게 사용 가능, 가장 단순한 구조 • 간단한 위해성 평가 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 너무 단순하여 정교성이 떨어져 스크리닝 단계에서만 적용 가능
CONSEXPO (CONSumer Exposure mosel)	<ul style="list-style-type: none"> • 농약류를 포함한 다양한 화학물질 노출량 계산 가능 • 모든 노출경로를 다룸에 따라 총 노출량이 계산됨 • Default database 보유 	<ul style="list-style-type: none"> • 사용이 어렵고 복잡함 • 한 번에 오직 한 시나리오 가능 • 입력변수 많고 복잡하여 사용자마다 다른 값 도출됨 • 많은 변수에 대한 정보 요구 • 입력변수 분포 정의
CEM (Consumer Exposure Module)	<ul style="list-style-type: none"> • 사용 편리 	<ul style="list-style-type: none"> • 불확실성 고려되지 않음 • 균등한 혼합 가정됨

(3) 농약의 흡입노출에 의한 농작업자 위해성평가

(가) 농작업자 흡입 노출량 산정

① 흡입흡수율 위해성 평가를 위한 인체 노출계수 설정

흡입흡수율의 위해성 평가를 위하여 체중, 호흡률, 평균수명, 인구 유동성 등의 인체노출계수를 설정하였다.

표8. 흡입흡수율의 위해성평가를 위한 인체 노출계수

항목	구분		노출계수
체중(kg) ^{a)}	성인 남성		72.3
	성인 여성		56.5
호흡률(L/min) ^{b)}	휴식	남성	7.4
		여성	4.5
	가벼운 작업	남성	29.0
		여성	16.0
	힘든 작업	남성	60.0
		여성	24.0
평균수명(년) ^{c)}	남자		75.1
	여자		81.9
인구유동성(거주기간, 년) ^{c)}			8.8

^{a)} 통계청, 2015; ^{b)} EPA, 1996; ^{c)} 국립환경과학원 고시, 제 2014-48호

표9. 외부상황에서 살포 된 농약에 대한 PHED 모델(EFSA)

PHED(과립형 농약)				
혼합/로딩				
	적재 차량	수동 어플리케이터		
외부 적용			작업률	
차량 적재 : 과립의 살포 적용			10 or 50 ha (작물 유형에 따라 다름)	
차량 적재 : 밭고랑에 과립 살포				
과립 수동 적용			1 or 4 ha	
제형	과립	용량 (kg a.i./ha)	자유 변수	
		작물 유형	다양성	
혼합 중 보호장비			노출량 감소	
호흡기	마스크 - FP1, P1 와 유사품	없음(잠재적 노출)	-	
		흡입 : 75 %; 피부(머리): 20 %		
		흡입 : 90 %; 피부(머리) : 20 %		
	의류	없음(잠재적 노출)	-	
		인증된 보호 작업복	측정됨 (미지정)	
		화학약품 저항성 작업복	측정됨 (미지정)	
살포 시 보호장비			노출량 감소	
호흡기	마스크 - FP1, P1 와 유사품	없음(잠재적 노출)	-	
		흡입 : 75 %; 피부(머리) : 20 %		
		흡입 : 90 %; 피부(머리) : 20 %		
	의류	없음(잠재적 노출)	-	
		인증된 보호 작업복	측정됨 (미지정)	
		화학약품 저항성 작업복	측정됨 (미지정)	
보호장비 없음		= PPE 층에서 잠재적인 노출: 반바지와 티셔츠를 입은 것으로 가정		
데이터베이스로부터 설정된 노출량		75 백분위 (= 75%의 경우 노출량은 25% 노출 예상 값보다 낮을 것으로 추정) (95 백분위 또한 제공)		
체중		60 kg (기본값)		
노출 경로		피부 & 흡입 (혼합 및 살포 모두 적용)		
노출 기간		8 hours/일		
농약 흡수율		피부 = 특정 제품 (100% = default), 흡입 = 100%		

② 외국의 농작업자 노출 모델 시나리오 개발 현황

외부상황에서 살포 된 농약에 대한 AOEM 및 PHED 모델(EFSA)에서 소개된 노출시나리오, 적용 방법 및 농약 매개변수 및 개인 보호 장비에 대한 유형은 표 10, 11에 요약하였다.

표10. 외부상황에서 살포 된 농약에 대한 AOEM 모델(EFSA)

AOEM(살포된 농약)		
혼합/로딩		
	혼합 및 로딩 배낭	혼합 및 로딩 탱크
외부 적용		작업률
	하향 분사 : 차량 장착, 부분집합 : 추진력 감소	10 or 50 ha (작물 유형에 따라 다름)
	하향 분사 : 수동기구 (스프레이 건) or 수동 배낭	1 or 4 ha
	상향 분사 : 차량 장착 부분집합 : 추진력 감소, 닫히거나 열린 차량	8 - 50 ha (작물 유형에 따라 다름)
	상향분사: 수동기구 (스프레이 건) or 수동 배낭	1 or 4 ha
제형	액상수화제, 유제 등	용량 (kg a.i./ha)
	수화제	적용량 (L spray solution/ha)
	입상수화제	작물 유형
	Water soluble bag (혼합)	
혼합 중 보호장비		노출량 감소
호흡기	없음(잠재적 노출)	-
	마스크 - FP1, P1 와 유사품	흡입 : 75 %; 피부(머리): 20 %
	마스크 - FP2, P2 와 유사품	흡입 : 90 %; 피부(머리) : 20 %
의류	없음(잠재적 노출)	-
	작업복: 팔, 다리, 몸이 덮임(면)	피부(전신) : 90%
	보호용 (화학약품 저항성) 작업복	피부(전신) : 95 %
살포 시 보호장비	장갑	액체(손): 90%; 고체(손): 95%
	두건	피부(머리) : 50%
	두건& 마스크	피부(머리) : 95%
호흡기	없음(잠재적 노출)	-
	마스크 - FP1, P1 와 유사품	흡입 : 75 %; 피부(머리) : 20 %
	마스크 - FP2, P2 와 유사품	흡입 : 90 %; 피부(머리) : 20 %
의류	없음(잠재적 노출)	-
	작업복: 팔, 다리, 몸이 덮임(면)	피부(전신) : 90%
	보호용 (화학약품 저항성) 작업복	피부(전신) : 95 %
보호장비 없음	장갑	액체(손): 90%; 고체(손): 95%
	두건	피부(머리) : 50%
	두건& 마스크	피부(머리) : 95%
데이터베이스로부터 설정된 노출량		= PPE 층에서 잠재적인 노출: 반바지와 티셔츠를 입은 것으로 가정
체중		75 백분위 (= 75%의 경우 노출량은 25% 노출 예상 값보다 낮을 것으로 추정) (95 백분위 또한 제공)
노출 경로		피부 & 흡입 (혼합 및 살포 모두 적용)
노출 기간		8 hours/일
농약 흡수율		피부 = 특정 제품 (100% = default), 흡입 = 100%

③ 국내의 상황에 맞는 농작업자 노출 모델 시나리오 설정

외부상황에서 살포 된 농약에 대한 AOEM 및 PHED 모델(EFSA)에서 소개된 노출시나리오, 적용 방법 및 농약 매개변수 및 개인 보호 장비(표8)을 참고하여 국내의 상황에 맞는 농작업자 노출 모델 시나리오를 설정하였다.

표11. 국내의 상황에 맞는 농작업자 노출 모델 시나리오 설정 제안

혼합/로딩				
	Speed sprayer	수동 어플리케이터(Moter sprayer-high level target, Moter sprayer-low level target)		
외부 적용		작업률	작물 유형	
제형	하향분사: 수동 어플리케이터 (Moter sprayer-low level target)	1 ha/day	복분자, 포도 등	
	상향분사: 수동 어플리케이터 (Moter sprayer-high level target)		사과, 복숭아, 감 등	
	상향분사 : 적재차량(Speed sprayer)	2 ha/day	사과, 복숭아, 감 등	
제형	입상수화제, 수화제, Water soluble bag 유제, 액제	용량 (kg a.i./ha)	작물보호협회 책자 참고 (자유 변수)	
혼합 중 보호장비				
제형	입상수화제, 수화제, Water soluble bag	호흡기	없음(잠재적 노출)	
			장갑	
			마스크-FFP 2	
			마스크 - FFP 3	
			장갑과 마스크-FFP 2	
	유제, 액제	의류	장갑과 마스크 - FFP 3	
			없음(잠재적 노출)	
살포 시 보호장비				
제형	입상수화제, 수화제, Water soluble bag	호흡기	없음(잠재적 노출)	
			장갑	
			비보호 작업복	
	유제, 액제	의류	없음(잠재적 노출)	
			장갑	
체중		65kg (기본 값)		
노출 경로		피부 & 흡입 (혼합 및 살포 모두 적용)		
노출 기간		6 hours/일		
농약 흡수율		피부 흡수율 ① log Pow<-1 or >4 and M.W>500인 경우 10% ② 농약의 유효성분 함량 >5%인 경우 25% ③ 농약의 유효성분 함량 ≤5%인 경우 75% 흡입 흡수율 ① 증기인 경우 50% ② 화학물질인 경우 100% ③ <10 microns인 경우 50% ④ >30 microns인 경우 흡수되지 않는 것으로 간주함		

다. 농작업자의 농약에 대한 피부/흡입노출에 의한 농약의 노출량 산정 모델 구축

(1) 농약 제품의 특성별, 용법별 체내노출량 산정방법 확립

(가) 국내 시판되고 있는 농약 중 30톤 이상 생산되는 농약 20종 조사(농약연보, 2015)

표12. 2015년에 30톤 이상 생산된 다생산 농약 조사

성분	연간 생산량(톤/년)	용도
만코제브 (Mancozeb)	1,640	살균제
클로로탈로닐 (Chlorothalonil)	443	살균제
이미다클로프리드 (Imidacloprid)	355	살충제
프로피네브(Propineb)	243	살균제
티오파네이트 메틸 (Thiophanate-methyl)	208	살균제
디티아논 (Dithianon)	93	살균제
마이클로뷰타닐 (Myclobutanil)	64	살균제
다이아지논 (Diazinon)	63	살충제
아시벤졸라-에스 메틸 (Acibenzolar-S-methyl)	55	살균제
아세페이트 (Acephate)	52	살충제
이프로디온 (Iprodione)	49	살균제
플루아지남 (Fluazinam)	49	살균제
메탈락실 (Metalaxyl)	49	살균제
캡탄 (Captan)	47	살균제
코퍼옥시클로라이드 (Copper oxychloride)	44	살균제
가스가마이신 (Kasugamycin)	44	살균제
사이퍼메트린 (Cypermethrin)	43	살충제
코퍼하이드록사이드 (Copper hydroxide)	38	살균제
클로르피리포스 (Chlorpyrifos)	34	살충제
테부코나졸 (Tebuconazole)	34	살균제

(나) 30톤 이상 생산된 농약 20종의 독성치(NOAEL), 농작업자노출허용량(AOEL) 및 피부흡수율 자료조사

표13. 농약 20종의 독성치(NOAEL), 농작업자노출허용량(AOEL) 및 피부흡수율

성분	독성치 (NOAEL, mg/kg bw/day)	농작업자 노출 허용량 (AOEL, mg/kg bw/day)	시험결과 피부흡수율
만코제브	랫드90일 반복/경구-갑상선 억제, 갑상선 과형성(7)	0.035 ^{a)}	C: 1%, D: 4% ^{d)}
클로로탈로닐	랫드1년 반복/경구-신장 및 위장의 종양 전증상(2.7)	0.009 ^{a)}	D: 10% ^{e)}
이미다클로프 리드	토끼 기형독성-모체 체중 및 사료섭취량 감소(8)	0.08 ^{a)}	C: 7.9%, D: 11.4% ^{f)}
프로피네브	랫드90일 반복/경구 - 근섬유 위축(7.6)	0.046 ^{a)}	-
티오파네이트 메틸	개 1년 반복/경구 -간무게 증가, 빈혈(8)	0.08 ^{a)}	-
디티아논	개 90일 반복/경구 -간, 신장독성(3)	0.014 ^{a)}	D: 0.79% ^{g)}
마이클로뷰타닐	개 1년 반복/경구-간무게 증가, 간 종대(3.09)	0.031 ^{a)}	D: 25% ^{h)}
다이아지논	개 90일 반복/경구-콜린에스테라제 저해(0.02)	0.0002 ^{a)}	D: 4.1% ⁱ⁾
아시벤졸라- S-메틸	개 아급성-간중량 증가(10)	0.03 ^{b)}	C: 16%, D: 81% ^{j)}
아세페이트	랫드90일 반복/경구 -콜린에스테라제 저해(0.58)	0.0058 ^{a)}	-
이프로디온	랫드90일 반복/경구 -간, 부신무게변화(31)	0.19 ^{a)}	D: 0.65% ^{k)}
플루아지남	토끼 기형독성-골화 지연(1)	0.0035 ^{a)}	-
메탈락실	개 90일 반복/경구 -간독성, 빈혈(8)	0.08 ^{a)}	-
캡탄	토끼 기형독성(10)	0.1 ^{c)}	D: 0.9% ^{l)}
코퍼옥시클로 라이드	인체-독성영향 없음(0.2)	0.072 ^{a)}	-
가스가마이신	토끼 기형독성-체중감소, 유산(10)	0.01 ^{a)}	-
사이퍼메트린	개 90일 반복/경구-신경계 영향(12.5)	0.063 ^{a)}	D: 25% ^{m)}
코퍼하이드록 사이드	인체-독성영향 없음(0.2)	0.072 ^{a)}	-
클로르피리포스	랫드CCA 반복/경구-콜린에스테라제 저해(0.1)	0.001 ^{a)}	D: 1% ⁿ⁾
테부코나졸	개 1년 반복/경구 -부신 zona fasciculate cell 비대(3)	0.03 ^{a)}	-

C: Original product formulation, D: Diluted product for spraying, -: No data provided

a) National Institute of Agricultural Science KOREA (2016), b) European Commission (2002), c) European Commission (2008), d) INCHEM, mancozeb database, e) California Environment Protection Agency (2005), f) Li et al (2012), g) CTGB (2016), h) California Department of Food and Agriculture Worker Health and Safety Branch (1988), i) NPIC database, j) European Commission (2002), k) EPA (1995), l) EPA(1997), m) EPA (1996), n) European Commission (2005)

(2) 농약 제품의 피부·흡입 노출에 따른 체내노출량 산출 및 농작업자 위해성평가

(가) 위해성평가를 위한 농약의 사용방법 및 조건 설정

농작업자의 농약 노출 위해성 평가를 위한 다생산 농약 20종의 제형, 피부흡수율, 사용방법을 조사하였고, 보호장비, 일일 살포면적 및 일일 살포 시간을 설정하였다 (작물보호제 지침서, 2016).

표14. 농작업자의 위해성평가를 위한 제형, 사용방법, 보호장비, 일일살포면적 및 일일살포시간 설정

농약제형	보호장비		일일 살포면적 (Work rate/day)	일일 살포시간
	제조 시	살포 시		
수화제	장갑 및 마스크(FFP3)	장갑	2 ha	6시간
입상수화제	장갑 및 마스크(FFP3)	장갑	2 ha	6시간
유제	장갑	장갑	2 ha	6시간
액제	장갑	장갑	2 ha	6시간

표15. 위해성평가를 위한 다생산 농약 20종의 제형, 사용방법 조사

성분명	제형	해당 과수	물20L당 사용 약량	안전사용기준	
				시기	횟수
만코제브 (Mancozeb)	수화제	포도, 감귤, 배, 감(단감), 사과	33~40g	수확 14~30일 전까지 사용	3~5회 이내
클로로탈로닐 (Chlorothalonil)	수화제	사과, 감(단감), 배, 감귤	10~40g	수확 14~30일 전까지 사용	3~4회 이내
	액상 수화제	감귤, 복숭아	20ml	수확 20~30일 전까지 사용	4회 이내
	입상 수화제	참외, 포도	13~40g	수확 2~21일 전까지 사용	3회 이내
이미다클로프리드 (Imidacloprid)	수화제	사과, 감귤, 배, 복숭아, 매실	10~20g	수확 7~30일 전까지 사용	2~3회 이내
	액제	사과	20ml	수확 30일 전까지 사용	3회 이내
	액상 수화제	감귤, 사과, 자두, 배, 복숭아, 포도, 감(단감), 참다래	5~10ml	수확 14일 전까지 사용	3회 이내
	입상 수화제	배, 감귤, 사과	1.43g	수확 14일 전까지 사용	3회 이내
프로피네브 (Propineb)	수화제	사과, 포도, 감귤, 멜론, 복숭아, 감(단감)	33~40g	수확 7~30일 전까지 사용	3~5회 이내
티오판네이트 메틸 (Thiophanate-methyl)	수화제	사과, 배, 감(단감), 감귤, 유자, 포도, 떨기,	20~25g	수확 7~21일 전까지 사용	3~5회 이내

		참다래(키위)			
	액상 수화제	포도	20ml	수확 7일 전까지 사용	4회 이내
	입상 수화제	배, 복숭아, 사과, 포도, 감귤, 감(단감)	20g	수확 14~21일 전까지 사용	3~5회 이내
디티아논 (Dithianon)	입상 수화제	감(단감), 감귤, 매실, 배, 복숭아, 사과, 포도, 머루	13~25g	수확 10~45일 전까지 사용	3~5회 이내
마이클로뷰타닐 (Myclobutanil)	수화제	포도, 사과, 감(단감), 배, 멜론, 포도,	13~40g	수확 14~21일 전까지 사용	4회 이내
다이아지논 (Diazinon)	수화제	사과, 감(단감), 포도,	20g	수확 30일 전까지 사용	2~3회 이내
아시벤졸라-S-메틸 (Acibenzolar-S-methyl)	수화제	감(단감), 감귤, 복숭아, 사과, 포도	20g	수확 14~21일 전까지 사용	2~4회 이내
	액상 수화제	사과, 복숭아	10~20ml	수확 14~21일 전까지 사용	3회 이내
아세페이트 (Acephate)	수화제	감(단감), 감귤, 배, 복숭아, 사과, 포도	20g	수확 14~30일 전까지 사용	2~3회 이내
이프로디온 (Iprodione)	수화제	사과, 배, 포도, 감, 딸기, 복숭아, 참다래	17~40g	수확 2~30일 전까지 사용	4~5회 이내
	액상 수화제	사과, 딸기, 포도	20ml	수확 2~14일 전까지 사용	3~4회 이내
플루아지남 (Fluazinam)	수화제	감(단감), 감귤, 복숭아, 사과, 산수유, 포도, 유자	10~40g	수확 21~45일 전까지 사용	3~5회 이내
	액상 수화제	사과, 감귤, 포도, 복숭아, 자두	8~40ml	수확 7~45일 전까지 사용	1~5회 이내
	입상 수화제	감귤	10g	수확 30일 전까지 사용	3회 이내
메탈락실 (Metalaxyl)	수화제	포도, 참외	20~40g	수확 3~14일 전까지 사용	3회 이내
캡탄 (Captan)	수화제	사과, 포도	40g	수확 7~21일 전까지 사용	4회 이내
	입상 수화제	사과, 감(단감)	20g	수확 14~21일 전까지 사용	3~4회 이내
코퍼옥시클로라이드 (Copper oxychloride)	수화제	감귤, 참다래, 배, 사과	20~40g	수확 7~30일 전까지 사용	3~4회 이내
가스가마이신 (Kasugamycin)	수화제	감귤, 참다래, 배, 사과	20~40g	수확 7~30일 전까지 사용	3~4회 이내
사이퍼메트린 (Cypermethrin)	유체	사과, 복숭아, 배, 감귤	20ml	수확 7~14일 전까지 사용	3회 이내
코퍼하이드록사이드 (Copper-hydroxide)	수화제	감귤, 딸기, 배, 사과	20~40g	-	-

	입상 수화제	참다래, 포도, 배, 감귤, 딸기, 사과	10~20g	-	-
클로르피리포스 (Chlorpyrifos)	수화제	사과, 감귤, 배, 복숭아, 매실	20g	수화 7~30일 전까지 사용	2~3회 이내
	유제	감귤, 사과, 배, 감	20ml	수화 7~30일 전까지 사용	2~3회 이내
테부코나졸 (Tebuconazole)	수화제	감(단감), 사과, 포도, 복숭아, 배	10~20g	수화 7~30일 전까지 사용	3~4회 이내
	입상 수화제	사과, 배, 감(단감)	10g	수화 7~30일 전까지 사용	3~4회 이내
	액상 수화제	감(단감), 배, 감귤, 딸기, 복숭아, 포도	6.7ml	수화 14~21일 전까지 사용	4회 이내
	유제	사과	13.3ml	수화 30일 전까지 사용	3회 이내

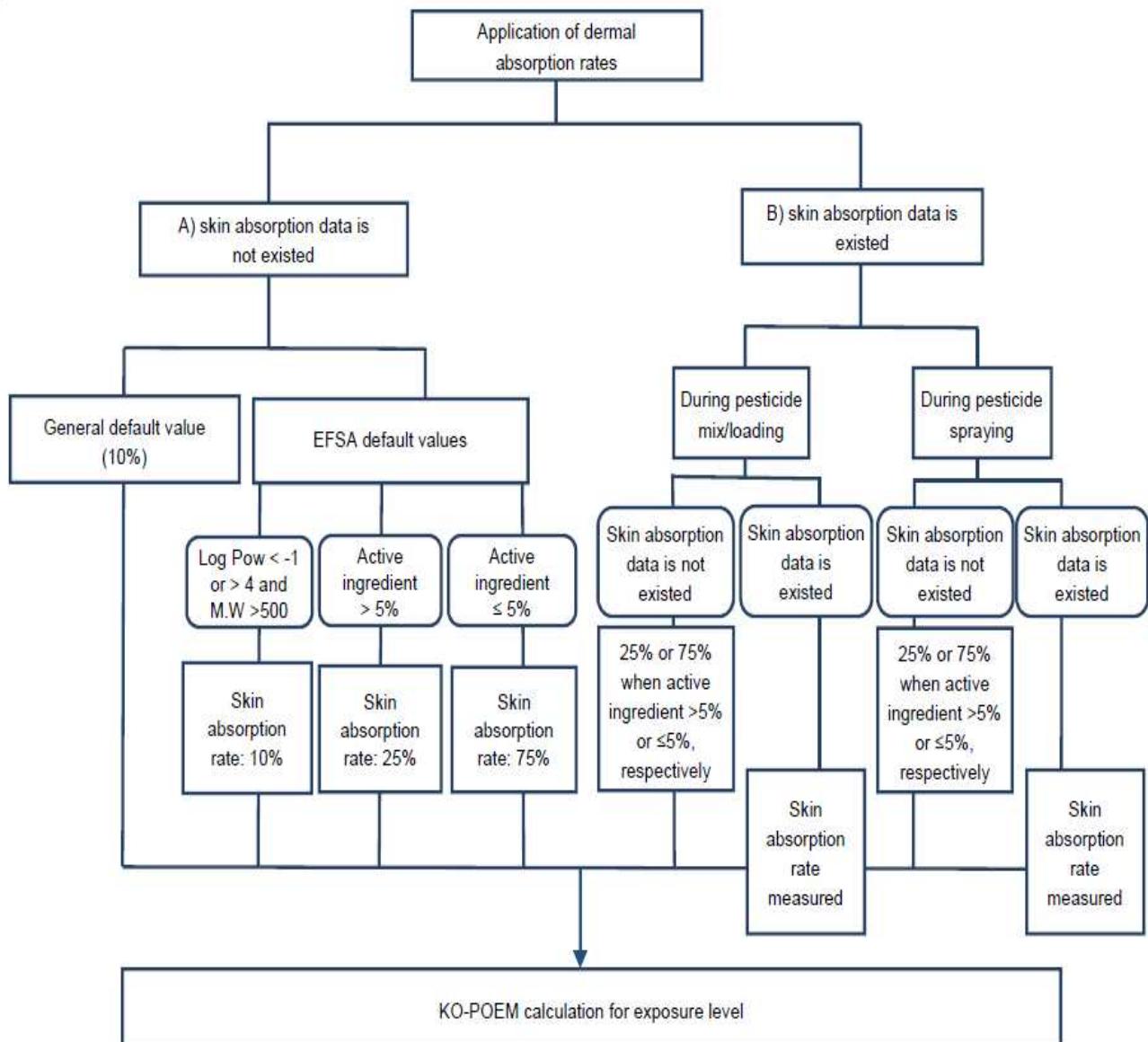


그림26. 농작업자 농약노출량 산출을 위한 피부흡수율의 적용

(나) 농약 제품의 피부·흡입노출에 따른 체내 노출량 산출 및 위해성평가

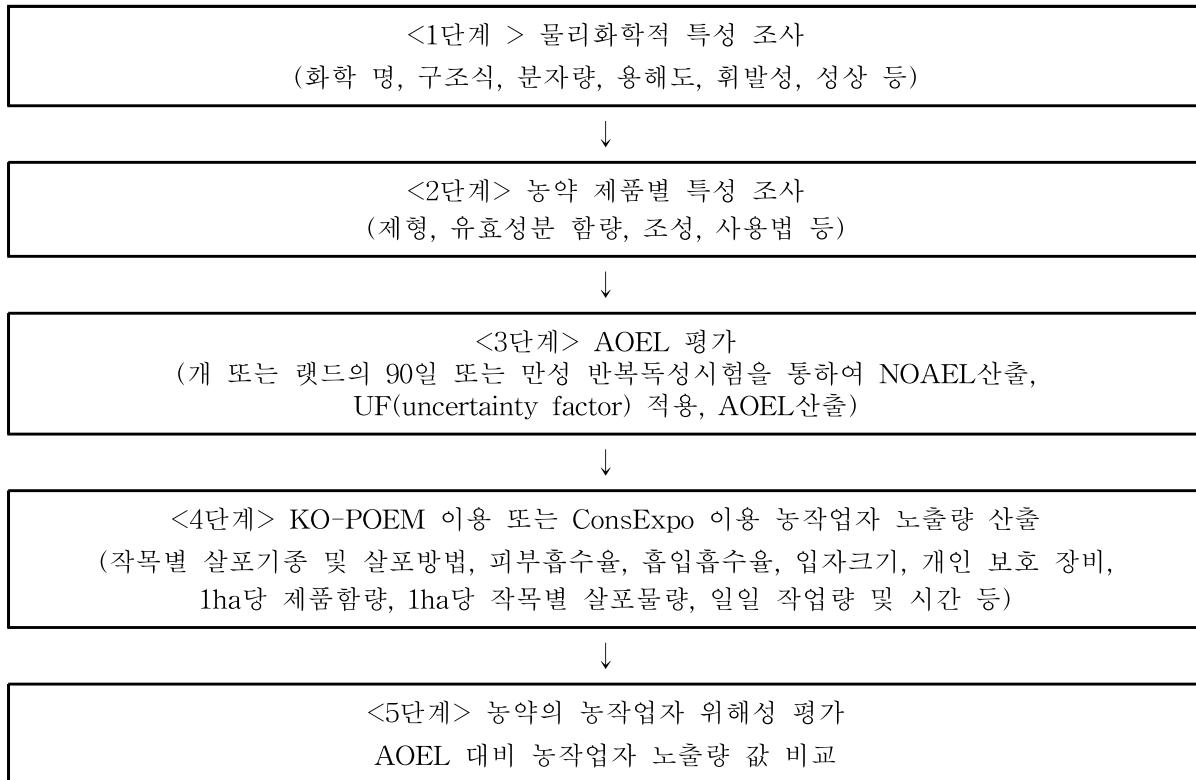
표16. AOEL 대비 농작업자 노출량 값 비교

성분명	AOEL (mg/kg bw/day)	제형	EFSA방식의 피부흡수율 적용시		일반적 화학물질의 피부흡수율 적용시	
			노출량	TER (노출량/AOEL)	노출량	TER (노출량/AOEL)
만코제브 (Mancozeb)	0.035	수화제	0.60~1.62	17.28~46.29	0.07~0.23	2.1~6.6
클로로탈로닐 (Chlorothalonil)	0.009	수화제	0.29~1.62	32.40~180.01	0.04~0.23	4.62~25.66
		액상수화제	0.22~0.57	24.00~63.60	0.03~0.08	3.4~6.1
		입상수화제	0.57	63.88	0.08	8.90
		액제				
이미다클로프리드 (Imidacloprid)	0.08	수화제	0.02~0.05	0.22~0.68	0.004~0.01	0.05~0.10
		입상수화제	0.05	0.65	0.01	0.09
		액상수화제	0.03~0.05	0.03~0.61	0.004~0.01	0.05~0.09
		액제	0.01	0.13	0.05	0.59
프로피네브 (Propineb)	0.046	수화제	1.51	32.87	0.22	4.69
티오파네이트 메틸 (Thiophanate-methyl)	0.08	수화제	0.08~0.76	0.95~9.45	0.01~0.11	0.13~1.35
		액상수화제	0.22~0.54	2.70~6.71	0.03~0.07	0.39~0.94
디티아논 (Dithianon)	0.014	수화제	0.14~0.81	10.03~57.86	0.02~0.12	1.43~8.25
		액상수화제	0.22~0.46	15.43~23.14	0.03~0.07	2.20~4.73
		입상수화제	0.32~0.71	3.21~7.06	0.04~0.10	23.01~50.63
마이클로뷰타닐 (Myclobutanil)	0.031	수화제	0.04~0.06	1.45~2.16	0.01	0.21~0.37
다이아지논 (Diazinon)	0.0002	수화제	0.27	1350.05	0.04	192.48
아시벤졸라-S-메틸 (Acibenzolar-S-methyl)	0.03	수화제	0.01	0.36	0.002	0.05
		액상수화제	0.02	0.51~0.64	0.003	0.07~0.09
아세페이트 (Acephate)	0.0058	수화제	0.22	37.24	0.03	5.31
이프로디온 (Iprodione)	0.19	수화제	0.27~0.54	0.20~0.41	0.04~0.08	1.42~2.84
		액상수화제	0.46	2.44	0.07	0.35
플루아지남 (Fluazinam)	0.0035	수화제	0.17~0.27	49.37~77.15	0.02~0.04	7.04~11.00
		액상수화제	0.16~0.27	44.74~77.15	0.02~0.04	6.38~11.00
		입상수화제	0.27	76.71	0.04	10.69
메탈락실 (Metalaxyl)	0.08	수화제	0.16	2.03	0.02	0.29
캡탄 (Captan)	0.1	수화제	1.08~1.30	10.80~12.96	0.15~0.18	1.54~1.85

		입상수화제	0.54	5.37	0.07	0.75
코퍼옥시클로라이드 (Copper oxychloride)	0.072	수화제	0.25~0.91	3.47~12.60	0.04~0.13	0.49~1.80
가스가마이신 (Kasugamycin)	0.01	수화제	0.04~0.06	3.73~6.21	0.01	0.53~0.89
		액상수화제	0.08~0.11	4.36~8.05	0.01	0.62~1.12
		입상수화제	0.04~0.05	10.74	0.01	1.50
사이퍼메트린 (Cypermethrin)	0.063	유제	0.06	0.91	0.01	0.14
코페하이드록사이드 (Copper-hydroxide)	0.072	수화제	0.54~0.83	7.50~11.55	0.08~0.12	1.07~1.65
		입상수화제	0.50	6.92	0.07	0.96
클로르피리포스 (Chlorpyrifos)	0.001	수화제	0.16~0.34	162.01~337.51	0.02~0.05	23.10~48.12
		액상수화제	0.16	162.01	0.02	23.10
		유제	0.11~0.47	114.50~465.15	0.02~0.07	28.80~68.04
테부코나졸 (Tebuconazole)	0.03	수화제	0.08~0.25	2.70~8.28	0.01~0.04	0.38~1.18
		유제	0.15~0.20	5.08~6.57	0.03	0.86~1.07
		액상수화제	0.04~0.18	1.44~6.00	0.01~0.03	0.21~0.86
		입상수화제	0.13	4.47	0.02	0.62

(3) 농작업자의 농약에 대한 피부·흡입노출량 평가 및 농작업자 위해성평가 기법 확립

(가) 농약의 농작업자에 대한 위해성평가 절차 확립



(나) 단계별 세부평가 방법

- ① 물리화학적 특성 조사: 화학구조식, 분자량, 용해도, 휘발성, 외형, log Pow 등 물리화학적 특성 조사
- ② 농약 제품별 특성 조사: 제형, 유효성분 함량, 조성, 사용법 등 자료 조사
 - Ⓐ) 제형

종류	세부 종류
Soild concentrate formulation	WG or SG
	WP or SP
	WB(Water soluble bag)
Liquid concentrate formulation	Water-based
	Organic Solvent-based

- ③ 유효성분 함량, 조성 및 사용법: 한국작물 보호협회 '작물 보호제 농약지침서' 참조하여 조사

설 중 제

이 품목은 등록회사에 따라 적용대상이 다르므로 반드시 표장자를 확인하십시오.

**클로르피리포스 수화제
유제
입제
계통**

유효성분 : chlorpyrifos (수화제)25%, (유제)20%, (입제)2%
 기 타 : (수화제)계면활성제, ☐안정제, ☐보조제, 증량제 75%
 (유제)유화제, 용제 80%
 (입제)보조제, 안정제, 증량제, 착색제 98%
 계 통 : 유기인계

【적용병해충 및 사용량】

[수화제]상표 : 노모스, 그로포, 케이씨그로포, 그로터스 보통독성 · 생태독성 I 급



작물명	적용병해충	사용적기 및 방법	물 20ℓ 당 사용약량	안전 사용 기준		
				시기	회수	
감귤	귤 귤 나방	여름순과 가을순이 왕성하게 자라는 기간(피해임 발생초) 경엽처리	25g	수확 21일전까지 사용	3회이내	
배	진딧물 (조팝나무진딧물)	발생초기 경엽처리				
사과	잎말이나방 진딧물	꽃이피기전 및 꽃이 진 후 20일부터(6월말~8월초) 경엽처리 발생초기 경엽처리		수확 7일전까지 사용		
소나무	솔나방	월동유충 활동기(4~5월) 및 부화유충 발생기(8월하순~9월중순) 경엽처리	20g	-	-	
양버즘나무 (프라타나스)	미국흰불나방	유충 발생초기 경엽처리		수확 21일전까지 사용	3회이내	
유자	귤 귤 나방	발생초기 7일간격 경엽처리		수확 14일전까지 사용		
율무	조명나방	2회기 발아최성기 10일간격 경엽처리		-		
현사시나무 (이태리포플러)	황철나무 알락하늘소	우화 최성일 직후(5월 상중순) 경엽처리	25g	-	-	
목재	미국흰불나방	부두 밖 이송전 1회 처리	40g(200mL/m ²)			

④ AOEL(Acceptable Operator Exposure Levels) 설정

① 농작업자노출허용량(AOEL)은 농약등록을 위해 제출된 독성시험성적 중 아급성독성이나 기형독성에서 나타난 영향을 근거로 감수성이 가장 높은 시험동물 종에서의 최대무작용량(NOAEL)을 이용하여 해당 농약의 살포양상이나 노출상황을 고려하여 장기독성시험의 NOAEL을 최적의 NOAEL로 선정 할수 있으며, 이 NOAEL을 불확실성 계수(UF)로 나누어 구한다.

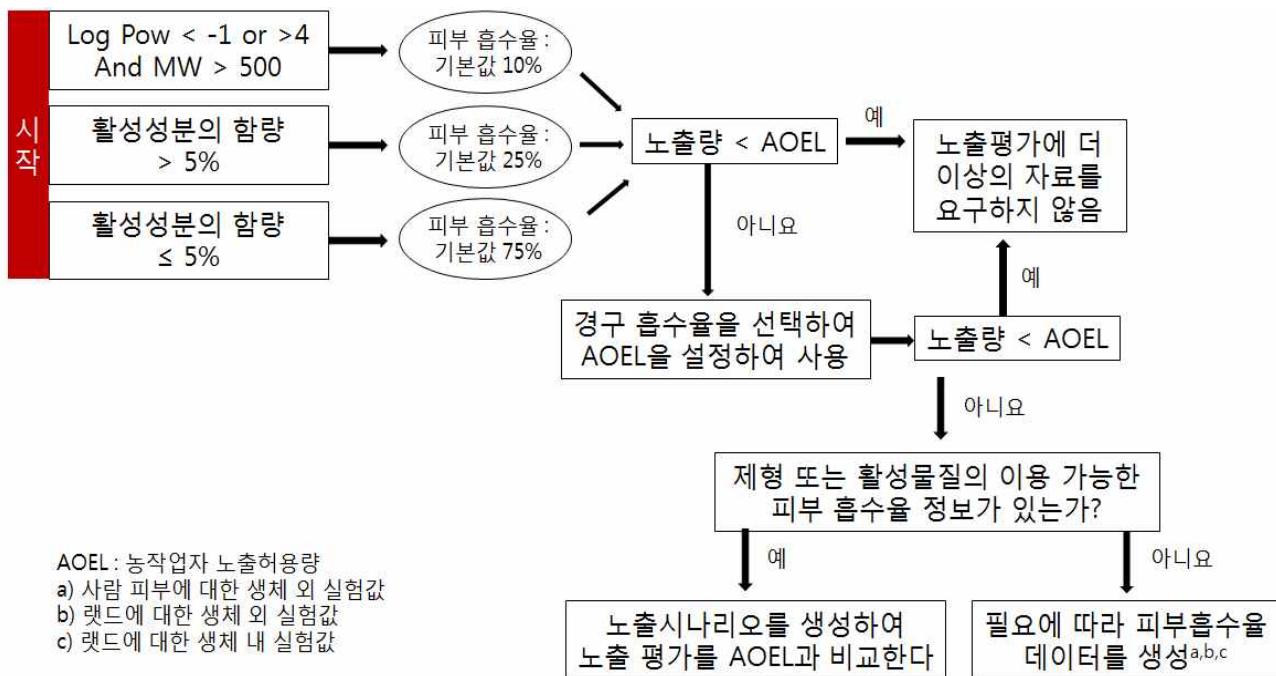
$$\text{농작업자노출허용량(AOEL)} = \frac{\text{최대무작용량(NOAEL)}}{\text{불확실성계수(UF)}}$$

② 안전계수는 농약등록을 위해 제출된 독성시험 성적성의 독성정도와 자료의 충실도에 따라 다음과 같이 설정.

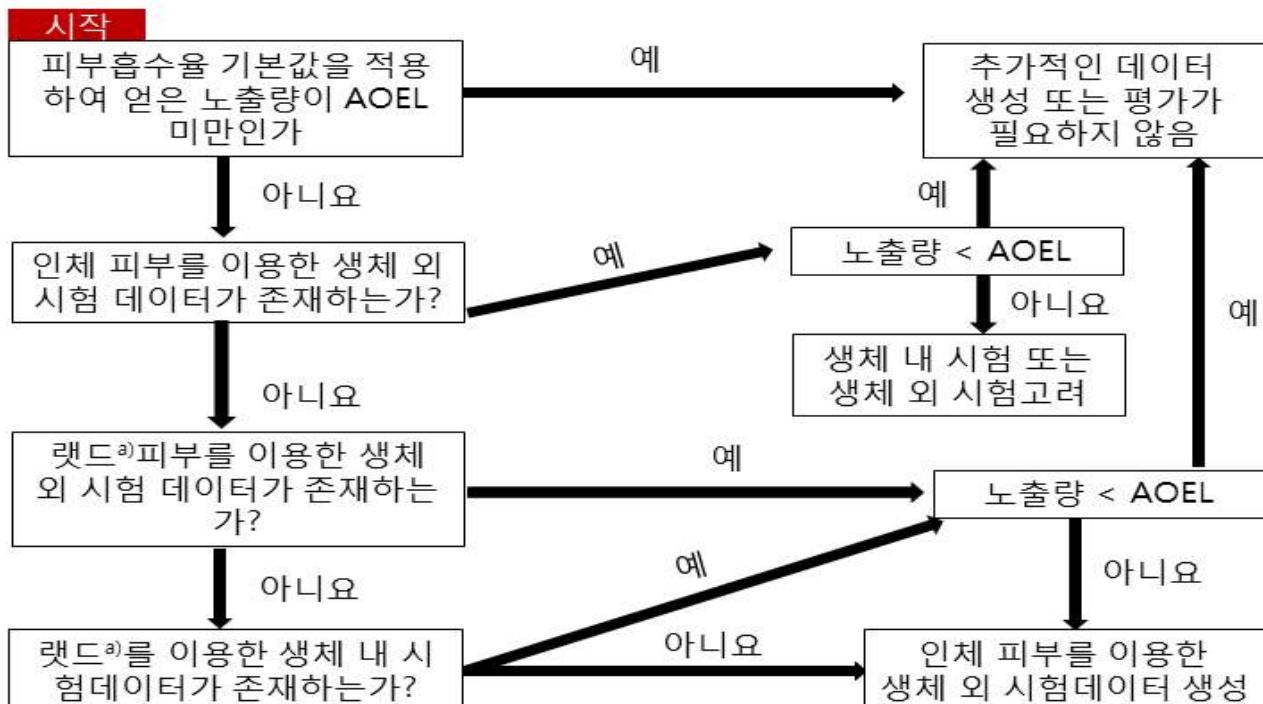
안전계수 산출근거	적용 안전 계수
실험동물로부터 사람으로의 외삽 (interspecies extrapolation)	× 10
사람간의 감수성 차이 (intraspecies variation)	× 10
보정계수	
- 최대무작용량(NOAEL) 대신 최저유해용량(LOAEL)의 사용 -	× 3
- 일부성적의 누락이나 심각한 독성(발암성, 기형성)이 우려되는 경우 -	× 10

⑤ 피부흡수율 시험의 필요성 절차 확립

<1단계> 평가 대상 농약제품의 피부흡수율 정보(시험성적) 부재시의 평가절차

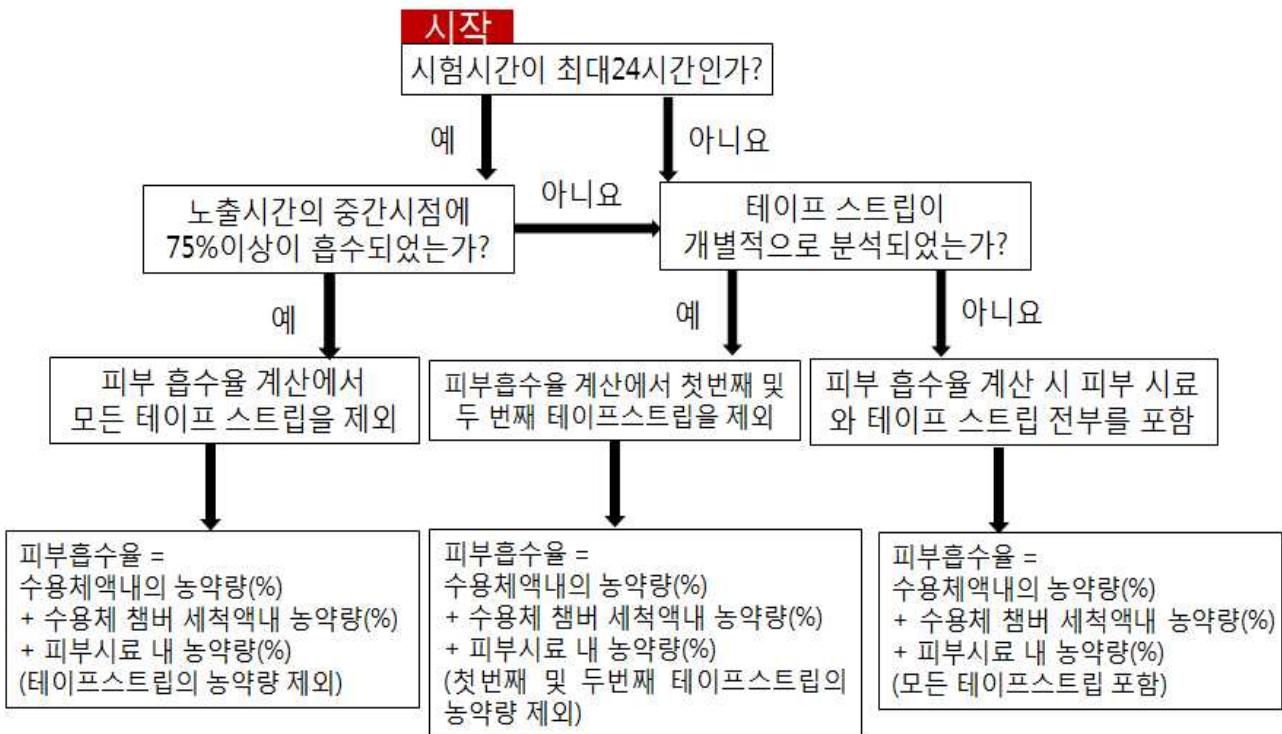


<2단계> 농약제품에 대한 피부흡수율 데이터에 근거한 평가절차

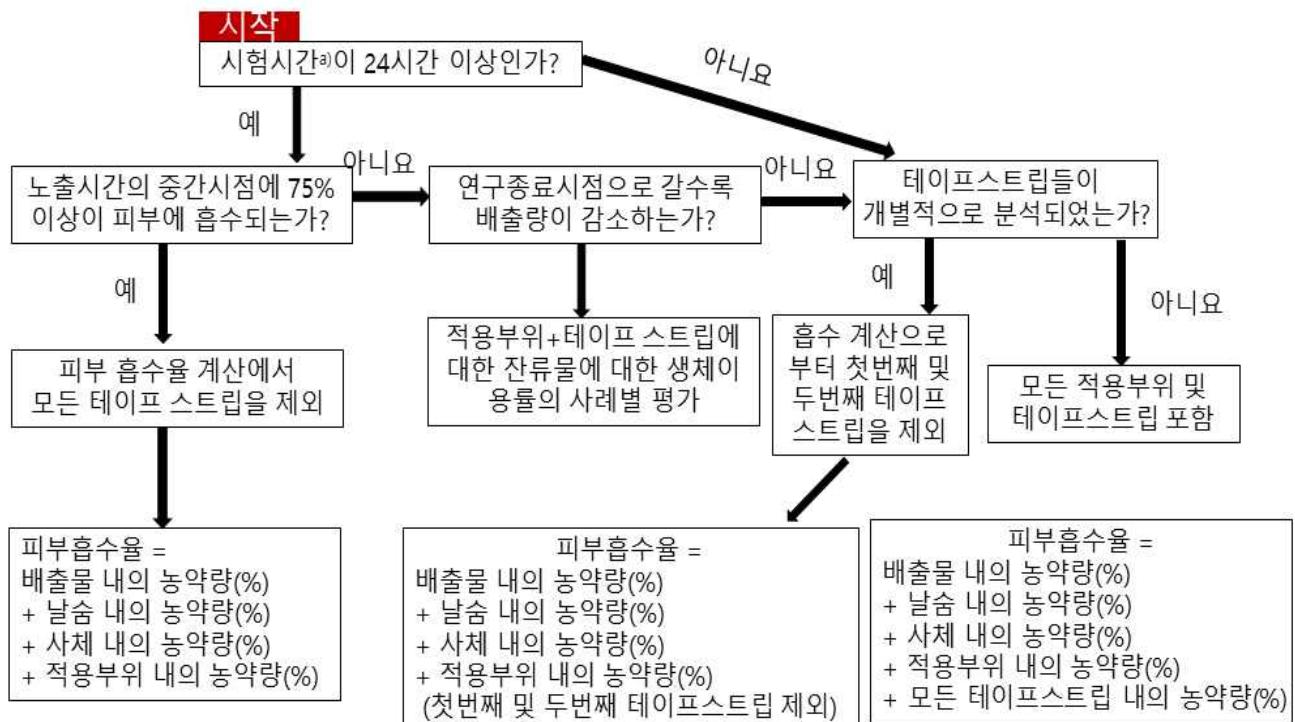


^a : 타당한 근거가 있는 경우 다른 종의 동물 피부 또는 동물사용 가능

<2-1단계> 생체외 피부흡수율 시험에서 농약 적용 후 피부 각질층과 적용부위 잔류물 평가절차



<2-2단계> 생체내 피부흡수율 시험에서 농약 적용 후 피부 각질층과 적용부위 잔류물 평가절차



a) : 전체 시험 시간을 의미하며 노출시간이 아님

⑥ KO-POEM을 이용한 농작업자 피부노출량 산출

THE PREDICTIVE OPERATOR EXPOSURE MODEL (POEM)

Application method	Speed sprayer	Active substance	
Product	water-based	a.s. concentration	mg/ml
Formulation type		Dermal absorption from spray	%
Dermal absorption from product	%		
Container	1 litre any closure		
PPE during mix/loading	None	PPE during application	None
Dose	1ha	Work rate/day	4 ha
Application volume	1ha	Duration of spraying	6 h

- Application method (SS7, Motor sprayer 등)
- Product (제품명칭 입력)
- Active substance (활성성분 함량 입력)
- Formulation type (액제, 고형제)
- a.s. concentration (활성성분의 농도)
- Dermal absorption from product
- Dermal absorption from spray
- PPE during mix/loading
- PPE during application
- Dose (1ha당 사용되는 원료의 양)
- Work rate/day (1일 농약살포 면적)
- Application volume (1ha에 살포되는 물량을 입력)
- Duration of spraying (1일 농약살포 시간)

[흡수율 시험데이터가 없는 경우]

- 기본값 : ① M.W >500 & log Pow<-1 or >4 인 경우 10% 적용
 ② 유효성분 함량이 5% 초과인 경우 25% 적용
 ③ 유효성분 함량이 5% 이하인 경우 75% 적용

[흡수율 시험데이터가 없는 경우]

- 농약 살포 직전 함량에 근거하여 적용함
 기본값 : ① 유효성분 함량이 5% 초과인 경우 25% 적용
 ② 유효성분 함량이 5% 이하인 경우 75% 적용

ⓐ 피부흡수율 적용 방법

- 피부흡수율 시험성적 부재시 피부흡수율 기본값 적용

EFSA 방식		
Log Pow<-1 or >4 & MW>500	활성성분의 함량>5%	활성성분의 함량≤5%
기본값 10%	기본값 25%	기본값 75%

- 피부흡수율 시험성적 적용값

- 측정값의 합은 화학물질의 피부흡수율을 결정하는데 사용
- 이때, 피부흡수율은 분비물(소변, 대변, 케이지 이물질) 내 분량 합계 비율, 호기, 처리대상 피부(또는 피부에 묻은 잔류물)의 합으로 하고 혈액 및 사체 이후 잔류량은 시험 중 손실량을 고려하여 보정함(California Environmental Protection Agency Department of Pesticide Regulation Worker Health and Safety Branch, 1993).

$$\% \text{ 피부흡수율} = \frac{\text{투여 용량} - \text{비흡수 용량}}{\text{투여 용량}} \times 100$$

- 정맥 투여(IV) 및 국소 투여의 합은 원숭이 또는 사람에서 사용될 수 있음

$$\% \text{ 피부흡수율} = \frac{\text{국소투여 } ^{14}\text{C 소변}}{\text{정맥투여 } ^{14}\text{C 소변}} \times 100$$

* ^{14}C 의 대부분이 소변으로 배출되는 경우에 한함

- 인체 피부흡수율 산출방식

• 인체피부 및 실험동물의 생체외와 생체내 피부흡수율 시험결과를 사용할 시에는 아래의 수식을 사용하여 인체피부흡수율을 산출할 수 있다(California Environmental Protection Agency Department of Pesticide Regulation Worker Health and Safety Branch, 1993).

$$\frac{\text{In Vitro Rat Absorption rate}^{\text{a)}}{\text{In Vitro Humans Absorption rate}^{\text{b)}}} = \frac{\text{In Vivo Dermal Absorption}^{\text{c)}}}{\text{In Vivo Human Dermal Absorption}^{\text{d)}}}$$

a), b), c) : 연구를 통해 얻은 값. d) : 사람의 피부흡수율(공지된 값(a, b, c)의 수식에서 산출함)

⑦ 농작업자 흡입노출량 산출 (California Environmental Protection Agency Department of Pesticide Regulation Worker Health and Safety Branch, 1993).

ⓐ 흡입흡수율 설정 방법

- 질량 발생율, 공기 중 분획 초기 입자 크기 분포에 대한 기본값 적용
- 사용 프로그램 : CONS EXPO 등 또는 동급의 프로그램 사용
- 흡입흡수율 부재 시 기본값 산출 방식

분무 크기	Default
증기	50%
화학물질	폐조직에서 100%
<10 microns	50%
>30 microns	흡수되지 않는 것으로 간주

<흡입량 산출시 농약종류별 적용값>

종류	농약 종류	질량 발생율 [g/sec]	F _{airborne} [g/g]	F _{scale} [g/g]	새로운 공기 중 비율 [g/g]	초기 비말 크기 분포 P ₅₀ [μm] (CV)	"F 스케일"와 "초기 비말 크기 분포"에 대한 기본 값 에서의 유래
살균용 농약	• 살균용 스프레이	0.75	0.2	-	-	-	살충제, trigger 사용
살충용 농약	<ul style="list-style-type: none"> • 에어로졸, 목표 지점, 균열 및 틈새 • 에어로졸, 일반 표면 • trigger 스프레이, 사용할 준비, 일반 표면 • trigger 스프레이, 사용할 준비, 균열과 틈새 • trigger 스프레이, 미세한 trigger 살포제(식물) • 공기총, 에어로졸 • 전기 증발기 • (땀띠 등 소독용) 살포제 	0.38 0.75 0.75 0.38 0.38 0.75 2.2E ⁻⁵ 0.2	1 1 0.2 0.2 0.09 1 1 0.2	0.2 0.2 0.04 0.04 0.09 0.3 - -	0.2 0.2 0.008 0.008 0.02 0.3 1 -	3.6 (0.57) 3.6 (0.57) 7.7 (1.9) 7.7 (1.9) 2.0 (0.39) 28.2 (1.6) ** -	해충 제어, 미 세한 trigger 살포제(식물)

- : 계산값 없음

** : 새 기본값 없음, 이전 기본값 적용

표17. 국내의 상황에 맞는 농작업자 노출 모델 시나리오 설정 제안

혼합/로딩					
	Speed sprayer	수동 어플리케이터(Moter sprayer-high level target, Moter sprayer-low level target)			
외부 적용		작업률	작물 유형		
제형	하향분사: 수동 어플리케이터(Moter sprayer-low level target)	1 ha/day	복분자, 포도 등		
	상향분사: 수동 어플리케이터(Moter sprayer-high level target)		사과, 복숭아, 감 등		
	상향분사: 적재차량(Speed sprayer)	2 ha/day	사과, 복숭아, 감 등		
제형	입상수화제, 수화제, Water soluble bag	용량 (kg a.i./ha)	작물보호협회 책자 참고 (자유 변수)		
	유제, 액제				
혼합 중 보호장비					
제형	입상수화제, 수화제, Water soluble bag	호흡기	없음(잠재적 노출)		
			장갑		
			마스크-FFP 2		
			마스크 - FFP 3		
			장갑과 마스크-FFP 2		
	유제, 액제	의류	장갑과 마스크 - FFP 3		
			없음(잠재적 노출)		
살포 시 보호장비					
제형	입상수화제, 수화제, Water soluble bag	호흡기	없음(잠재적 노출)		
			장갑		
			비보호 작업복		
	유제, 액제	의류	없음(잠재적 노출)		
			장갑		
체중					
노출 경로					
노출 기간					
농약 흡수율					

(8) 농약의 농작업자 위해성 평가

AOEL 대비 농작업자 노출량 값 비교: 농작업자 노출량과 AOEL을 비교하여 위해성 지수를 산정하고 그 결과 $\text{값} \leq 1$ 이하이면 위해성 우려가 없는 것으로 평가한다.

⑨ 농약 제품 선정 및 위해성 평가 적용시험

⑦ 시험대상 물질선정

- 시험물질 : Thiophanate-methyl
- 시험물질 선정사유 : 과수 재배 시 사용되는 다소비 농약이며, EFSA방식의 피부흡수율 기본수치 적용 시 인체노출량이 AOEL보다 1.1~9.5배 높고, 국내 기본 흡수율(10%)적용시 AOEL 보다 최대 1.4배 높으므로 선정하였다.
- 용도 : 살균제(간담, 사과, 참다래, 포도, 유자, 감귤, 딸기, 복숭아 등)
- 관련제품 : 신농지오펜, 지오펜, 과채탄, 치호톱, 보람, 도열큐, 논사우, 아싸유황, 바른길, 아끼미, 수리수리마수리, 굳타임, 모도우리, 톱신엠. 톱네이트-엠. 삼공지오펜, 아그로텍지오펜, 성보지오펜, 상그리라, 아리지오펜, 동방지오펜, 지오펜엠, 균지기, 디모스, 바로너, 미드마, 톱신페스트, 치프너, 크네이트, 다스린, 만능타, 가지란, 백작, 대몽 등(작물보호제 지침서, 2016)

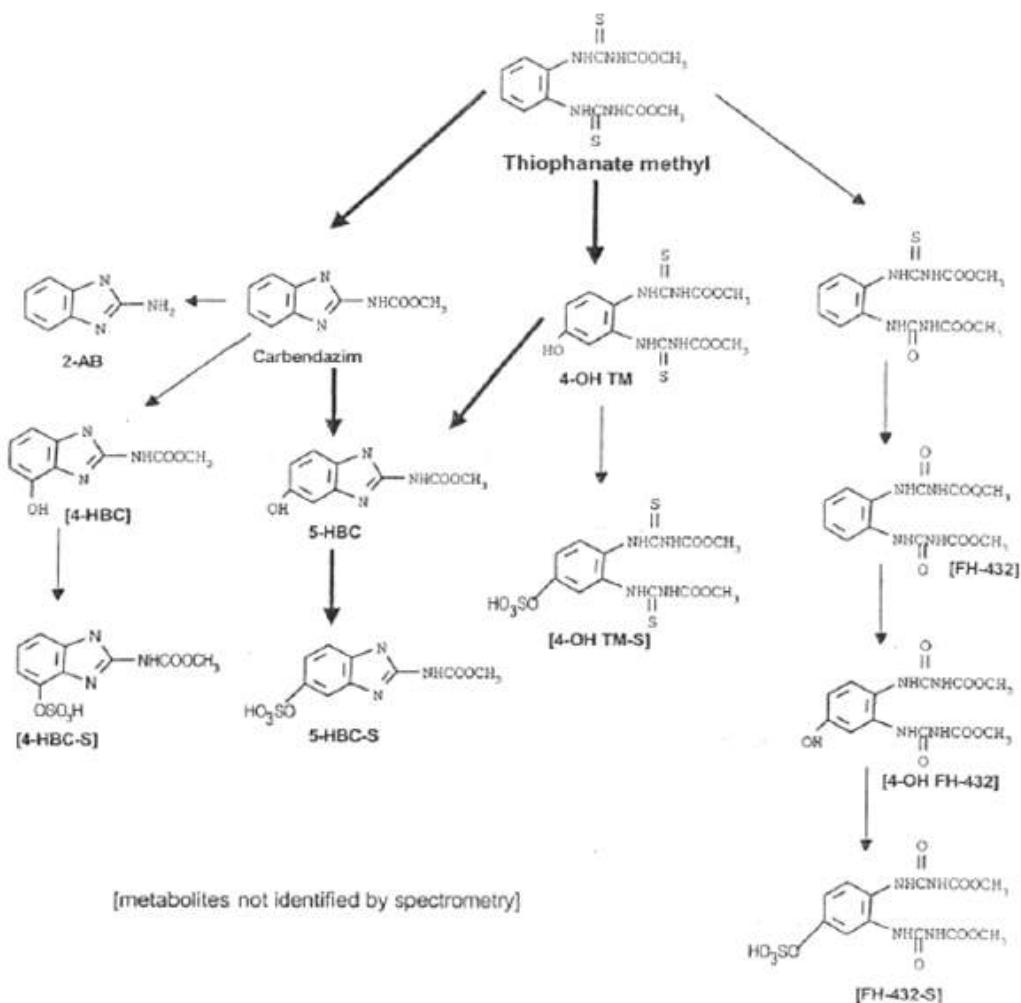


그림27. 랫드에서 Thiophanate-methyl의 대사과정

④ Thiophanate-methyl의 물리화학적 특성 및 독성정보

■ 물리화학적 특성

물질명	Thiophanate-methyl	
용도	Pesticide	
화학 물질명(IUPAC)	methyl N-[2-(methoxycarbonylcarbamothioylamino)phenyl]carbamethiy l]carbamate	
화학 물질명(CA)	Thiophanate-methyl	
CAS NO	23564-05-8	
EC NO	245-740-7	
분자식	C12H14N4O4S2	
분자량	342.4 g/mol	
구조식		
녹는점	172 °C (decomposes)	
끓는점	-	
외형	무색 결정	
밀도	1.537g/cm3	
증기압	7.13X10-8 mm Hg (25 °C)	
용해도(물)	26.6 mg/L (20 °C)	
용해도(유기용매)	Acetone: 2.9 g/100 mL n-Hexane: 4.7X10 ⁻⁵ g/100 mL n-Octanol: 1.8X10 ⁻² g/100 mL	Methanol: 7.8X10 ⁻¹ g/100 mL Ethyl acetate: 8.4X10 ⁻¹ g/100 mL Dichloromethane: 7.3X10 ⁻² g/100 mL
Partition coefficient(log Pow)	1.40	

■ 독성 정보

경구흡수율	빠르게 흡수
피부흡수율	빠르게 흡수
흡입흡수율	빠르게 흡수
체내분포	모든 장기에 분포
배출	96시간 이내에 70%정도가 소변을 통하여 배출됨 71~88% 정도 대사됨
독성학적 주요 대사물질	주요 대사물질 및 비율: 5-HBC(11.8%), 4-OH FH-432(6.2%), 4-OH-thiophanate-methyl(5.8%), MBC(5.3%), FH-432(1.7%), Thiophanate-methyl(2.9%)
LD50(경구)	> 5000 mg/kg bw
Rat LD50(경피)	> 2000 mg/kg bw
Rat LC50(흡입)	1.7 mg/L air
피부자극성	저자극성
반복독성(경구) NOAEL / LOAEL	성장지연 NOAEL: 8 mg/kg bw/day (1년, 개)
반복독성(경피) NOAEL / LOAEL	무독성 NOAEL: 300 mg/kg bw/d (2일, rabbit, 투여 최대용량)
반복독성(흡입) NOAEL / LOAEL	수컷 마우스, 유루, 유연, 비루
유전독성	음성
발암성	비발암성
생식독성(경구) NOAEL / LOAEL	• 새끼의 체중의 감소. NOAEL: 200 ppm (15 mg/kg bw/day) • 미약한 골격이상. NOAEL: 20mg/kg bw/day in Rabbit
AOEL	0.08 mg/kg bw/day

④ 농약 제품별 특성 조사(한국작물보호협회, 2016)

성분명	제형	해당 과수	물 20L당 사용 약량	안전사용기준	
				시기	횟수
티오판네이트 메틸 (Thiophanate-methyl)	수화제	사과, 배, 감(단감), 감귤, 유자, 포도, 딸기, 참다래(키위)	20~25g	수확 7~21일 전까지 사용	3~5회 이내
	액상 수화제	포도	20ml	수확 7일 전까지 사용	4회 이내
	입상 수화제	배, 복숭아, 사과, 포도, 감귤, 감(단감)	20g	수확 14~21일 전까지 사용	3~5회 이내

⑤ 농약의 AOEL 평가

- 개 1년 반복 경구독성시험에서 성장이 지연되어 NOAEL은 8 mg/kg bw/day으로 판단되어 이에 따른 AOEL은 불확실계수 100을 적용하여 0.08 mg/kg bw/day로 설정하였다.
- ④ KO-POEM을 통한 농작업자 농약의 노출량 산출(농약안전성 전문위원회 심의자료, 2016)
 - 선정된 농약의 노출량을 산출하고자 EFSA방식의 피부흡수율, 일반적인 화학물질에 적용하는 피부흡수율 및 앞에서의 시험을 통한 피부흡수율(23.9%)을 각각 적용하여 KO-POEM 프로그램으로 노출량을 산출하였고, 노출량을 AOEL과 비교하였다.

성분명	AOEL (mg/kg bw/day)	제형	EFSA 방식의 피부흡수율 입력 시		일반적인 화학물질 적용 피부흡수율 입력 시		시험결과상의 피부흡수율 입력 시	
			노출량	(노출량/ AOEL)	노출량	(노출량/ AOEL)	노출량	(노출량/ AOEL)
티오판네이트 메틸 (Thiophanate-methyl)	0.08	수화제	0.08~0.76	0.95~9.45	0.01~0.11	0.13~1.35	0.02~0.25	0.31~3.10
		액상 수화제	0.22~0.54	2.70~6.71	0.03~0.07	0.39~0.94	0.02~0.14	0.22~1.77
		입상 수화제	0.54	6.71	0.07	0.94	0.17	2.18

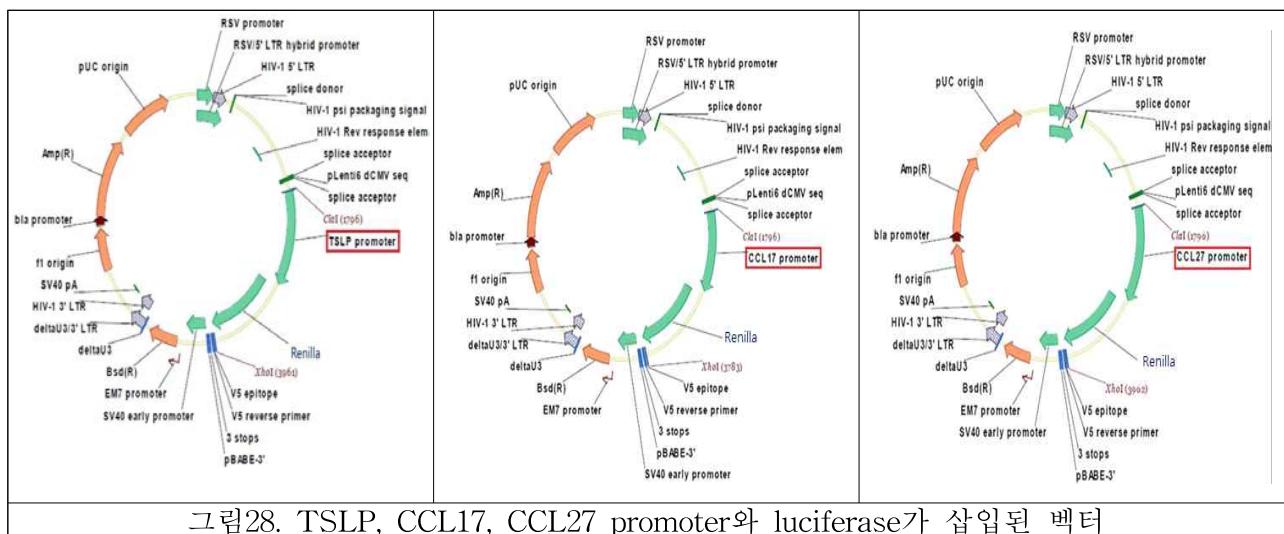
⑥ 농약의 농작업자 위해성 평가

- AOEL 대비 농작업자 노출량 값 비교한 결과 EFSA 방식의 기본 피부흡수율, 일반적인 화학물질 피부흡수율을 적용하여 산출한 노출량/AOEL 값이 1보다 큰 제품이 다수 있어 실제 생체내 피부흡수율 시험을 실시하였다.
- 실제 피부흡수율 시험결과 피부흡수율은 23.5%로 확인되었고 이를 적용하여 노출량을 평가한 결과 일부 제품에서 노출량이 AOEL을 초과하였음. 따라서 이들 초과제품에 대해서는 피부 흡수방지 방안이 강구되어야 할 것이다.

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1. 농약의 호흡기 계통 노출은 농약 사용 전과 후, 직업적 및 비직업적 모두 그 정도가 심각함. 특히 농약 중독의 원인 중 약 1/3 정도가 직업적으로 농약에 노출된 것이 원인이며 농약에 의한 이상 증상을 가지고 있는 농작업자들은 알려진 통계수치보다 훨씬 많을 것으로 예상됨. 농약의 피부 노출은 피부염, 알레르기 등을, 농약의 흡입 노출은 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 등 호흡기 질환의 위험성을 증가시키는 것으로 보고됨. 특히 우리나라는 농약 살포시 보호 장비를 착용하지 않은 채 직접 살포하는 경우가 많으며 약의 잘못된 취급 및 사용상의 부주의로 피부 또는 호흡기 노출이 빈번하여, 우발적인 농약 중독에 따른 질병 발생에 대한 우려가 심각함. 그러므로 사람 피부, 호흡기계 세포를 이용한 농약의 독성 평가법 개발, 독성 기전 탐색 등 체계적인 독성학적 연구가 필요하며 이는 농약 평가에 반영될 수 있다.

2. 선정된 피부염증 관련 functional guidance bioindicator의 프로모터가 삽입된 벡터 클로닝 및 stable cell line을 구축
 - 가. 각 TSLP, CCL17, CCL27 promoter와 renilla luciferase가 삽입된 벡터를 클로닝 후 (그림 7), 각 벡터를 가진 렌티바이러스를 제작하여, internal control로 firefly luciferase를 가진 렌티바이러스와 함께 HaCaT 세포주에 도입. 렌티바이러스의 특성에 의해 세포 DNA에 삽입되어 들어가 와 renilla 와 firefly luciferase를 발현하는 stable cell line을 구축하였다(HaCaT-TSLP, HaCaT-CCL17, HaCaT-CCL27).



- 나. 이와 같이 구축된 stable cell line에서 농약 물질에 의한 promoter activity 변화를 reporter gene assay의 원리로 dual luciferase reporter assay system을 이용해 *in vitro* 대체 독성법을 개발하였다.

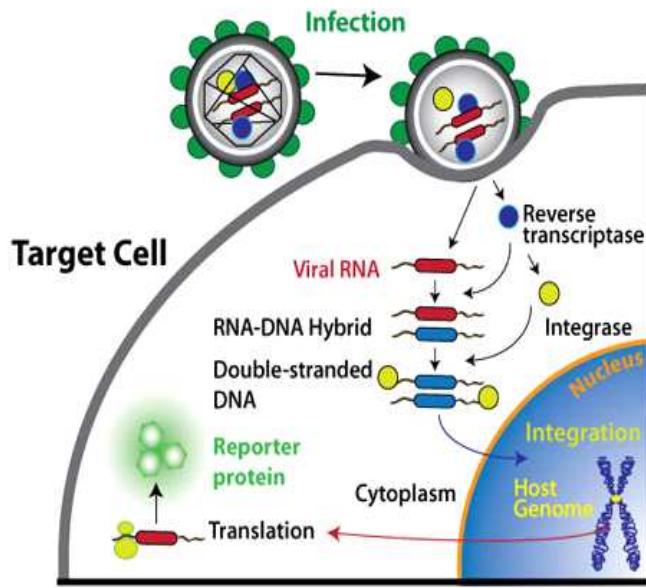


그림 29. 타겟 프로모터를 지닌 렌티바이러스에 의한 reporter protein 발현 과정

3. 선정된 호흡기 질환 관련 functional guidance bioindicator의 프로모터가 삽입된 벡터 클로닝 및 stable cell line을 구축
- 가. 각 ORMDL3, RAC1, ADAM33, PER2 promoter와 firefly luciferase가 삽입된 벡터를 클로닝 후 (그림 9), 각 벡터를 가진 렌티바이러스를 제작하여, internal control로 renilla luciferase를 가진 렌티바이러스와 함께 16HBE14o- 세포주에 도입. 렌티바이러스의 특성에 의해 세포 DNA에 삽입되어 들어가 firefly와 renilla luciferase를 발현하는 stable cell line을 구축하였다(16HBE-ORMDL3, 16HBE-RAC1, 16HBE-ADAM33, 16HBE-PER2).

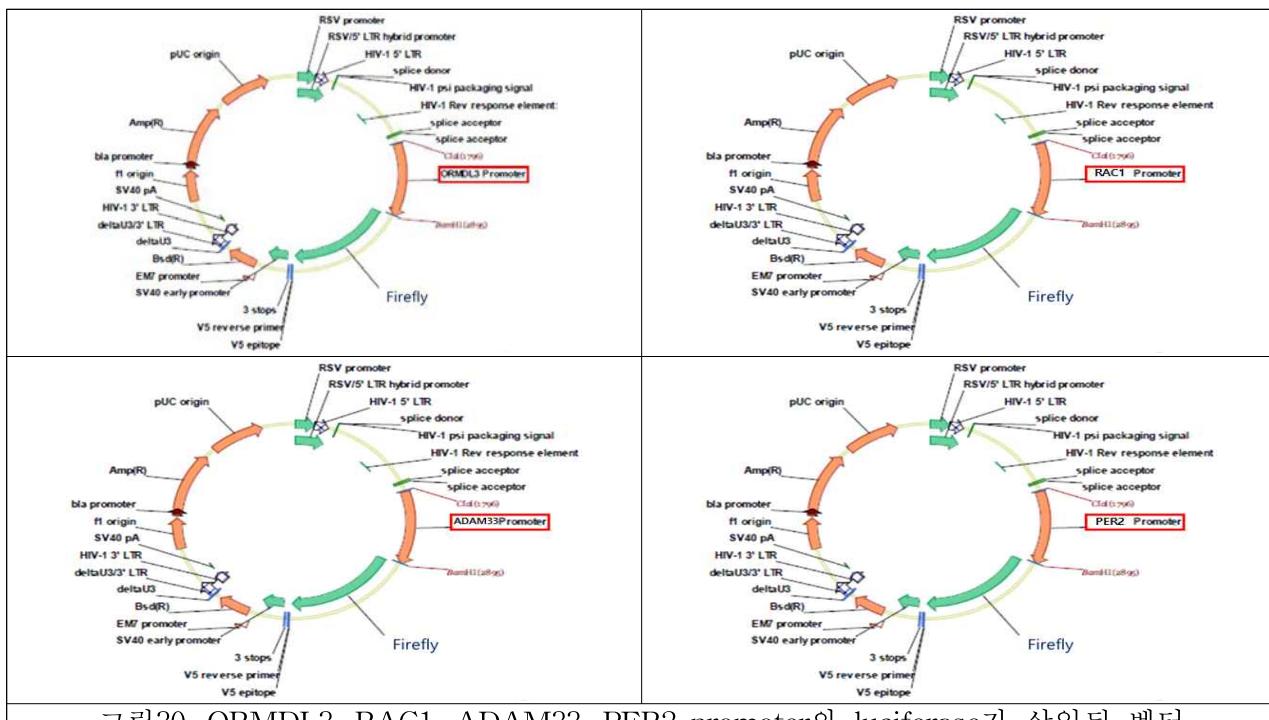


그림30. ORMDL3, RAC1, ADAM33, PER2 promoter와 luciferase가 삽입된 벡터

나. 이와 같이 구축된 stable cell line에서 농약 물질에 의한 promoter activity 변화를 reporter gene assay의 원리로 dual luciferase reporter assay system을 이용해 *in vitro* 대체 독성법을 개발하였다.

4. 상기 개발된 high throughput screening 모델 중 핵심 bioindicator를 선정하여 모델 평가
발굴된 functional guidance bioindicator 중 피부반응에 미치는 농약의 독성 평가를 위한 대표적 유전자로 TSLP와, 농약에 의한 호흡기 질환관련 대표적 유전자로 ORMDL3를 선정하여 이들의 stable cell line을 이용해 positive chemical을 처리하여 luciferase reporter gene assay 진행.

가. 피부

TSLP의 promoter를 이용한 stable cell line (HaCaT-TSLP)에 피부 염증관련 positive chemical인 dibutyl phthalate, SDS, xylene을 처리하여 이에 의한 TSLP의 promoter activity 변화를 dual luciferase reporter gene assay로 확인 (그림 10). renilla와 firefly luciferase 측정 값(Relative Luminescence Units)의 비율이 각 물질에 의한 promoter activity 증가를 의미함. 본 결과로 염증 유발물이 TSLP의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인. 이를 통해 TSLP 유전자의 반응을 통한 피부 염증 관련 독성 여부를 빠르게 스크리닝할 수 있는 대체법을 개발할 수 있을 것으로 전망.

(통계: 대조군(Con.) 대비, Student's *t*-test로 판단 ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$))

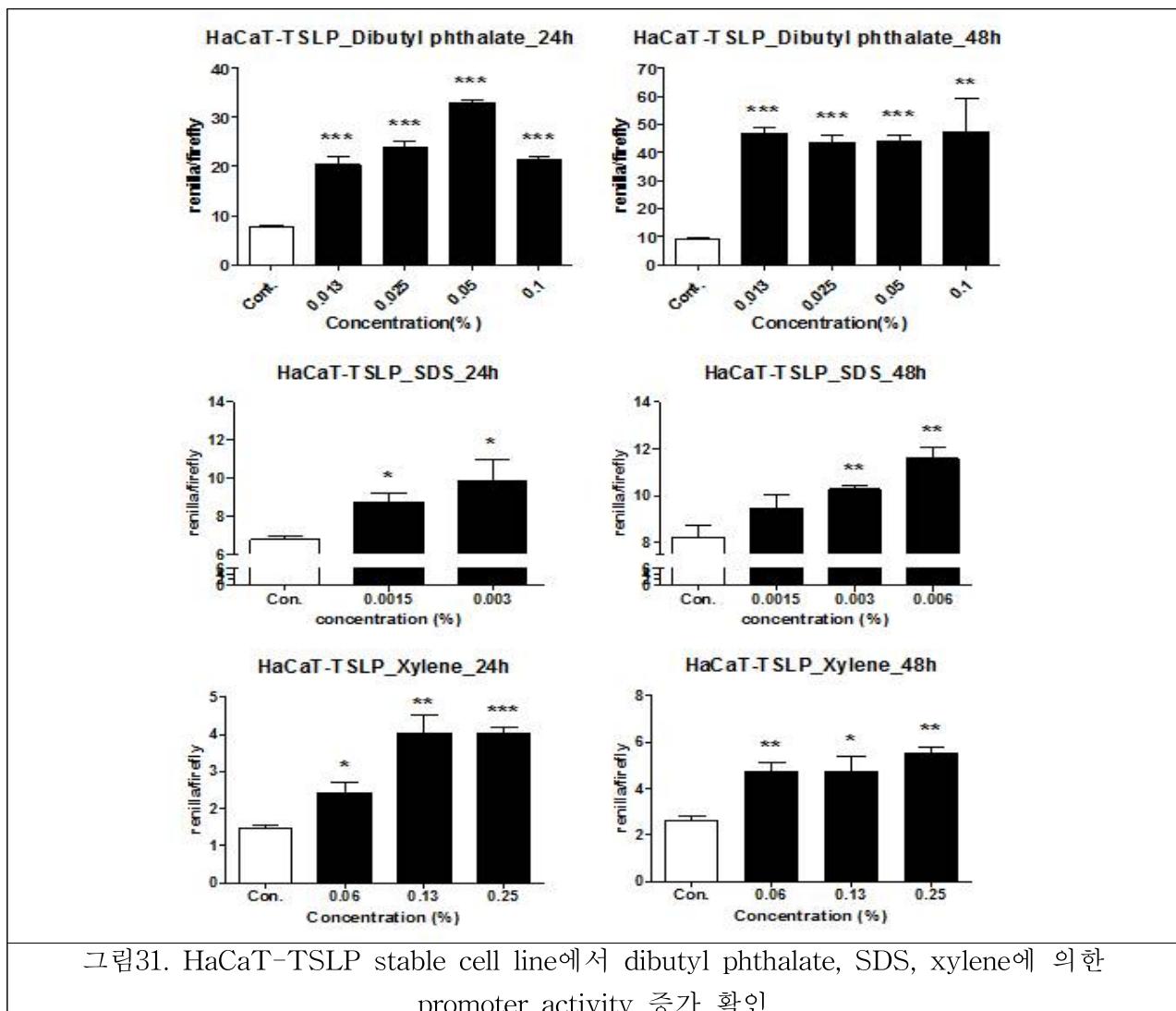
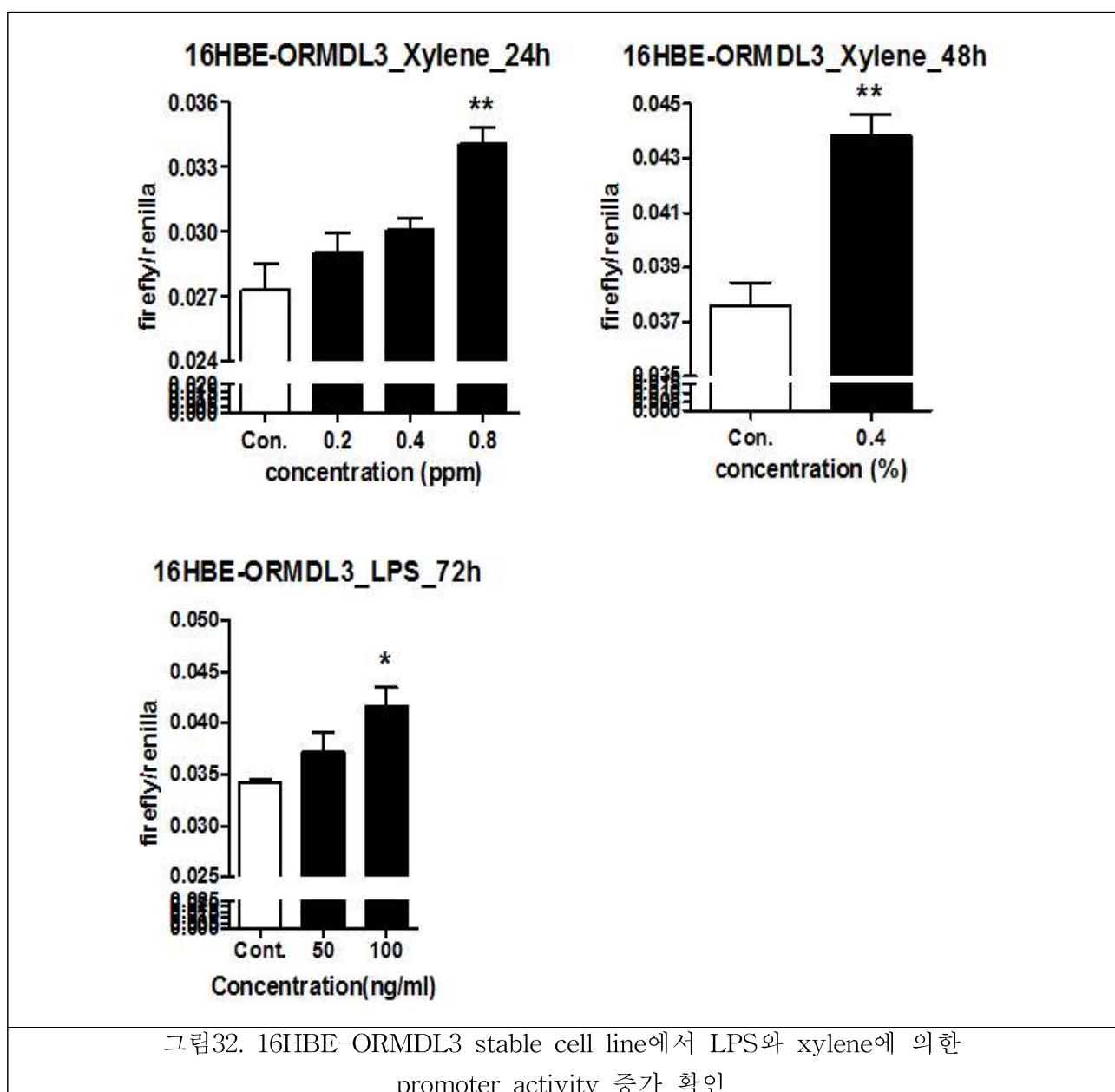


그림31. HaCaT-T SLP stable cell line에서 dibutyl phthalate, SDS, xylene에 의한 promoter activity 증가 확인

나. 호흡기

ORMDL3 promoter를 이용한 stable cell line (16HBE-ORMDL3)에 positive chemical인 LPS와 xylene을 처리하여 이에 의한 ORMDL3의 promoter activity 변화를 luciferase reporter gene assay로 확인하였다. LPS와 xylene에 의해 promoter activity(firefly와 renilla luciferase 측정값의 비율)가 증가 (그림 11). 본 결과로 염증 유발물이 ORMDL3의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. ORMDL3의 발현 변화는 기관지 염증 및 천식의 유발과 관계가 있으므로 이를 통해 호흡기 노출에 의한 호흡기 독성 *in vitro* 스크리닝법 개발할 수 있다.



5. 농약 사용에 기인한 피부 질환과 호흡기 질환에 대한 역학 연구, 화학물질 독성 정보 데이터베이스 등을 활용한 자료조사를 통해 *in vitro* 대체법 및 독성 평가 수행을 위한 농약을 선정하였다.
- 본 연구의 농약 독성 대체법을 통해 피부, 호흡기 독성 유발 여부의 스크리닝 및 평가를 위한 주요 농약 종류별 살균제, 살충제, 제초제 각 3종 이상씩 선정 및 확보하였다(표 1). 이를 구축된 모델에 쳐치하여 농약 노출에 의한 변화 패턴 스크리닝에 활용 및 피부 또는 호흡기 독성 유발 가능 여부를 확인하였다.

구분	계통	성분명	
살균제	스트로빌루린계	아족시스트로빈 azoxystrobin	피부, 호흡기 노출 후 피부 irritation, 기도 통증 등 유발 가능
	트리할로메칠치오계	폴펫 folpet	피부 노출시 접촉성 피부염 유발 보고
	시니믹에시드계	디메토모르프 dimethomorph	피부 노출에 의한 피부 감작 가능
	벤지미다졸계	베노밀 benomyl	흡입 노출시 호흡기 irritation, wheeze 등 유발
	아닐라이드계	티아디닐 tiadinil	흡입시 해로울 수 있으며 기도 irritation 유발 가능
	유기유황계	에트리디아졸 etridiazole	직업적 흡입 노출이 심각하며, 흡입 독성과 exposure data가 필요
		아이소프로티올레인 isoprothiolane	WHO Classification II (Moderately hazardous), US EPA Classification III (Caution - Slightly toxic)에 속하는 물질

구분	계통	성분명	
살충제	카바메이트계	카보퓨란 carbofuran	피부, 호흡기 노출 자료 기반으로 가장 높은 toxic category에 속함
		메치오카브 methiocarb	직업적 피부, 흡입 노출이 심각하며 피부 irritation 유발, 흡입시 mucous membrane irritation 유발 가능
	유기인계	디클로르보스 dichlorvos	농약 사용시 피부 접촉으로 피부통해 흡수되어 독성 나타냄
		말라ти온 malathion	흡입시 코 irritation, wheeze 등 호흡기 독성 유발 가능

구분	성분명	
제초제	알라클로르 alachlor	피부, 흡입 루트로 흡수되어 피부 또는 기도 감작, irritation, 알레르기 유발 가능
	메톨라클로르 metolachlor	노출시 피부, 기도 irritation 유발, 만성 노출시 피부염, 천식, wheeze 등 발생 가능
	몰리네이트 molinate	직업적 피부접촉, aerosol 노출이 주경로이며 노출에 의한 poisoning의 주요 효과는 피부, 호흡기 irritation 임

표18. 농약 종류별 선정 농약

6. 선정된 농약을 처리하여 각 표적 장기세포에서의 HTS 결과 도출.

가. 피부 (HaCaT-TSLP)

(1) HaCaT-TSLP stable cell line에 살균제인 azoxystrobin, dimethomorph, folpet, isoprothiolane을 처리하여 이에 의한 TSLP의 promoter activity 변화를 dual luciferase reporter gene assay로 확인하였다. renilla와 firefly luciferase 측정 값의 비율이 각 물질에 의해 증가 (그림 12). 이를 통해 농약 물질이 TSLP의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인 및 신속한 농약의 피부 독성 스크리닝법 구축하였다.

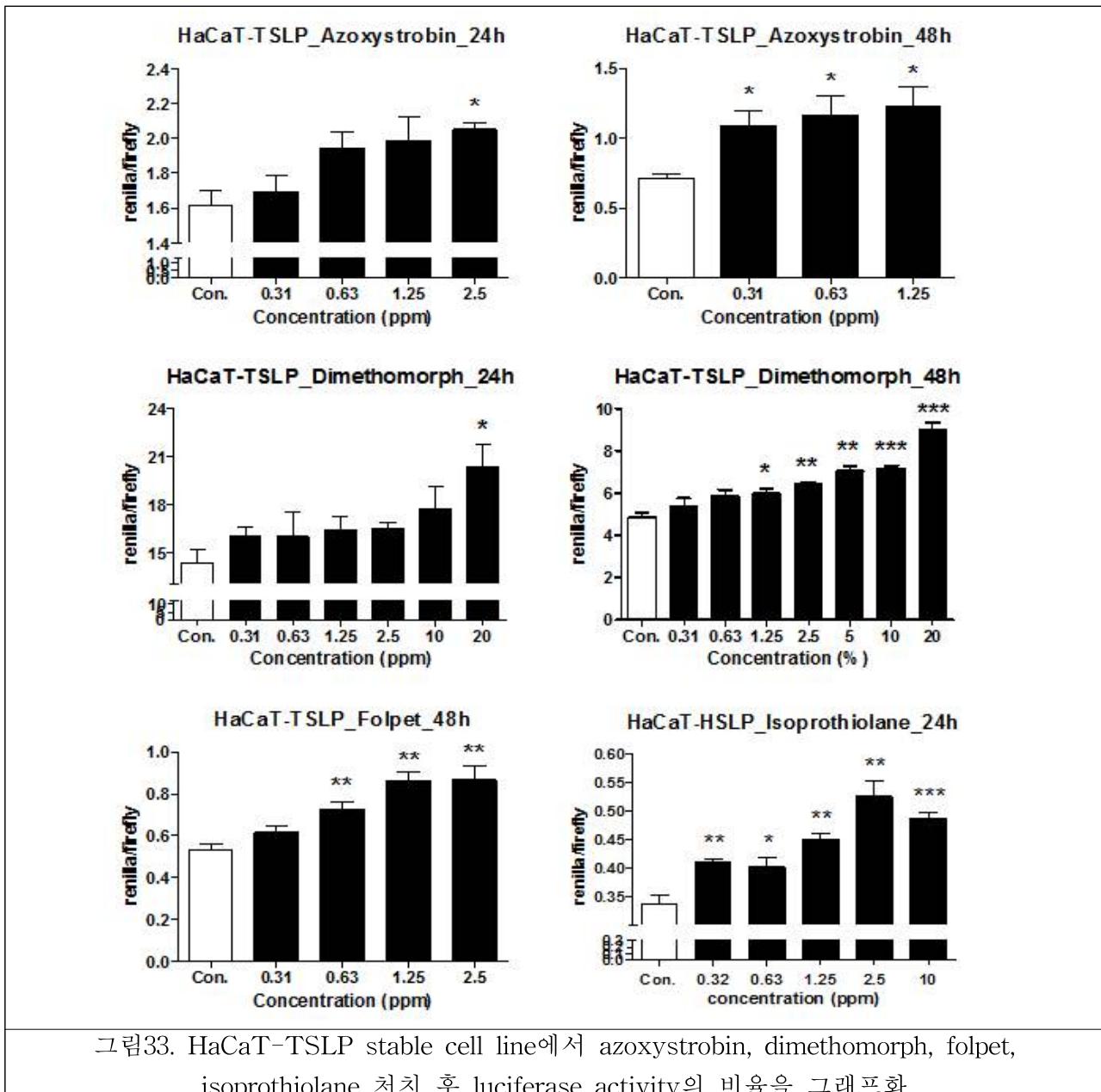


그림33. HaCaT-TSLP stable cell line에서 azoxystrobin, dimethomorph, folpet, isoprothiolane 처리 후 luciferase activity의 비율을 그래프화

(2) HaCaT-TSLP stable cell line에 살충제인 carbofuran, dichlorvos, methiocarb를 처치하여 이에 의한 TSLP의 promoter activity 변화를 dual luciferase reporter gene assay로 확인. renilla와 firefly luciferase 측정 값의 비율이 각 물질에 의해 증가하였다(그림 13).

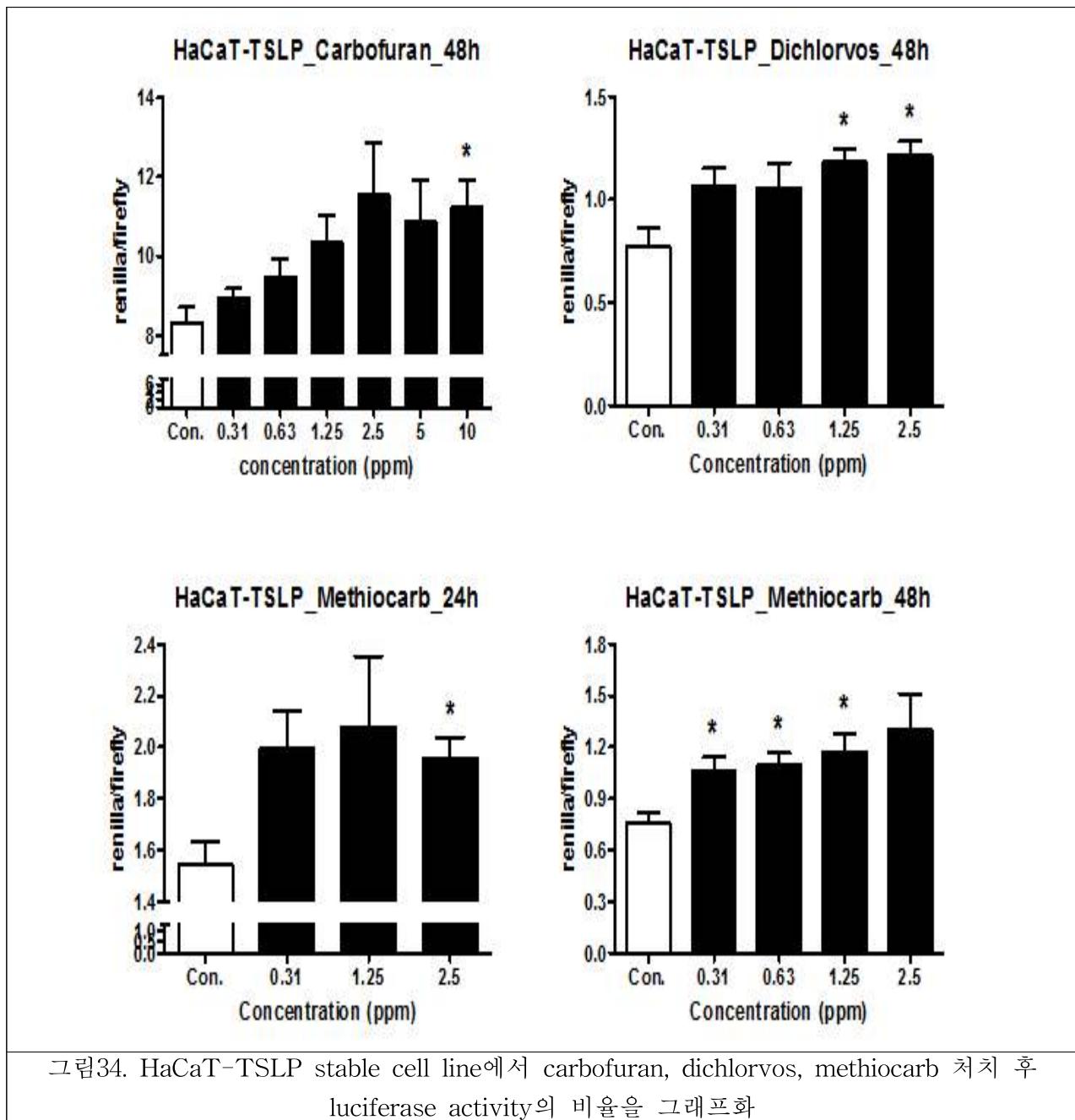


그림34. HaCaT-TSLP stable cell line에서 carbofuran, dichlorvos, methiocarb 처치 후 luciferase activity의 비율을 그래프화

(3) HaCaT-TSLP stable cell line에 제초제인 alachlor, metolachlor, molinate를 처치하여 이에 의한 TSLP의 promoter activity 변화를 dual luciferase reporter gene assay로 확인. renilla와 firefly luciferase 측정 값의 비율이 각 물질에 의해 증가하였다 (그림 14).

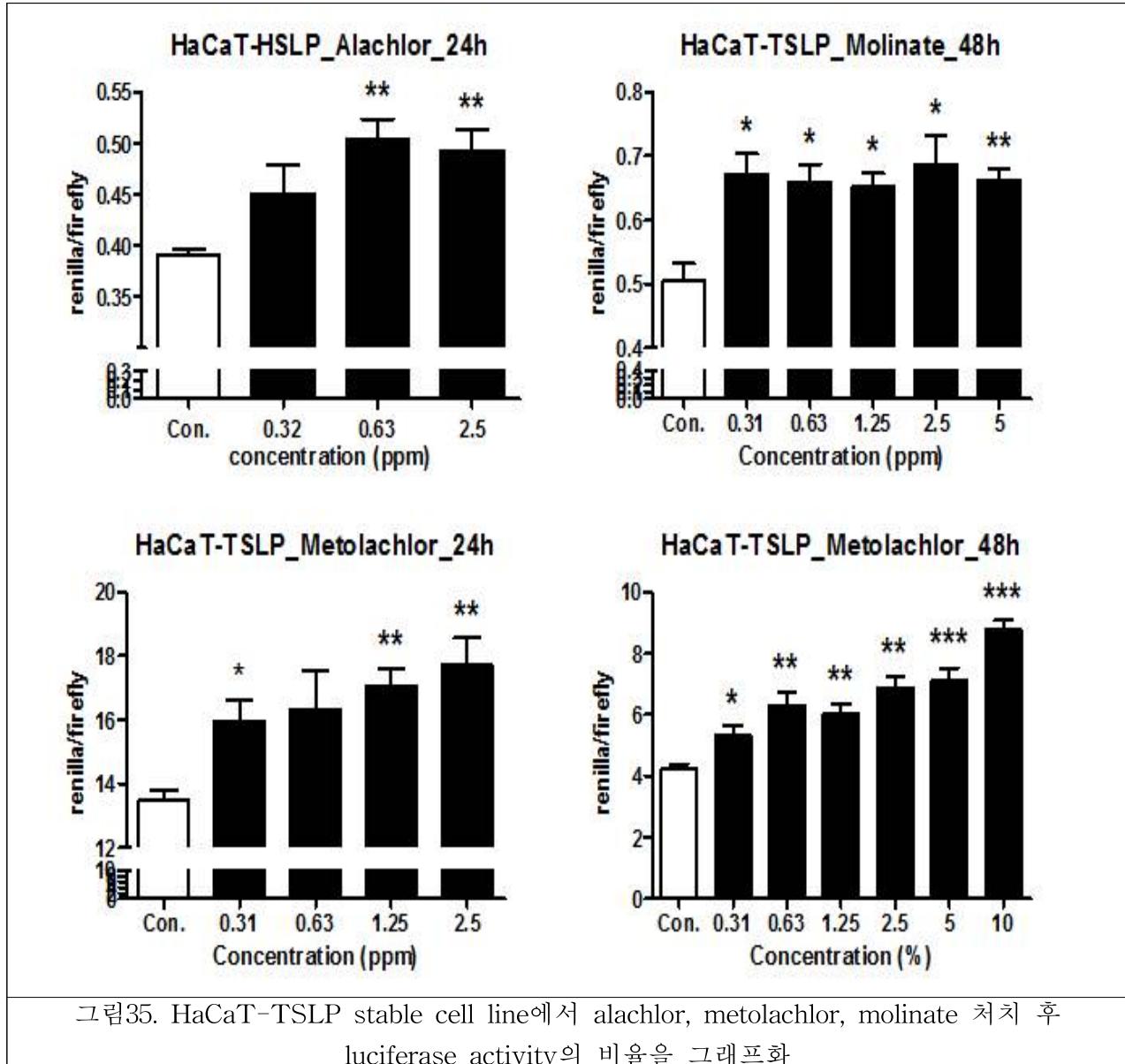


그림35. HaCaT-TSLP stable cell line에서 alachlor, metolachlor, molinate 처치 후 luciferase activity의 비율을 그래프화

나. 호흡기 (16HBE-ORMDL3)

(1) 16HBE-ORMDL3 stable cell line에 살균제인 azoxystrobin, etridiazole, benomyl, isoprothiolane, tiadinil을 처리하여 이에 의한 ORMDL3의 promoter activity 변화를 dual luciferase reporter gene assay로 확인. 각 물질에 의해 firefly와 renilla luciferase 측정값 비율의 증가 패턴을 관찰하였다 (그림 15). 그러므로 본 유전자의 작용 기전과 관련하여, 이를 이용한 reporter gene assay를 통해 농약 노출에 의한 기관지 세포에의 영향을 빠른 시간 안에 진단 및 독성 유발 여부를 스크리닝할 수 있는 대체 시험법을 개발할 수 있을 것으로 전망된다.

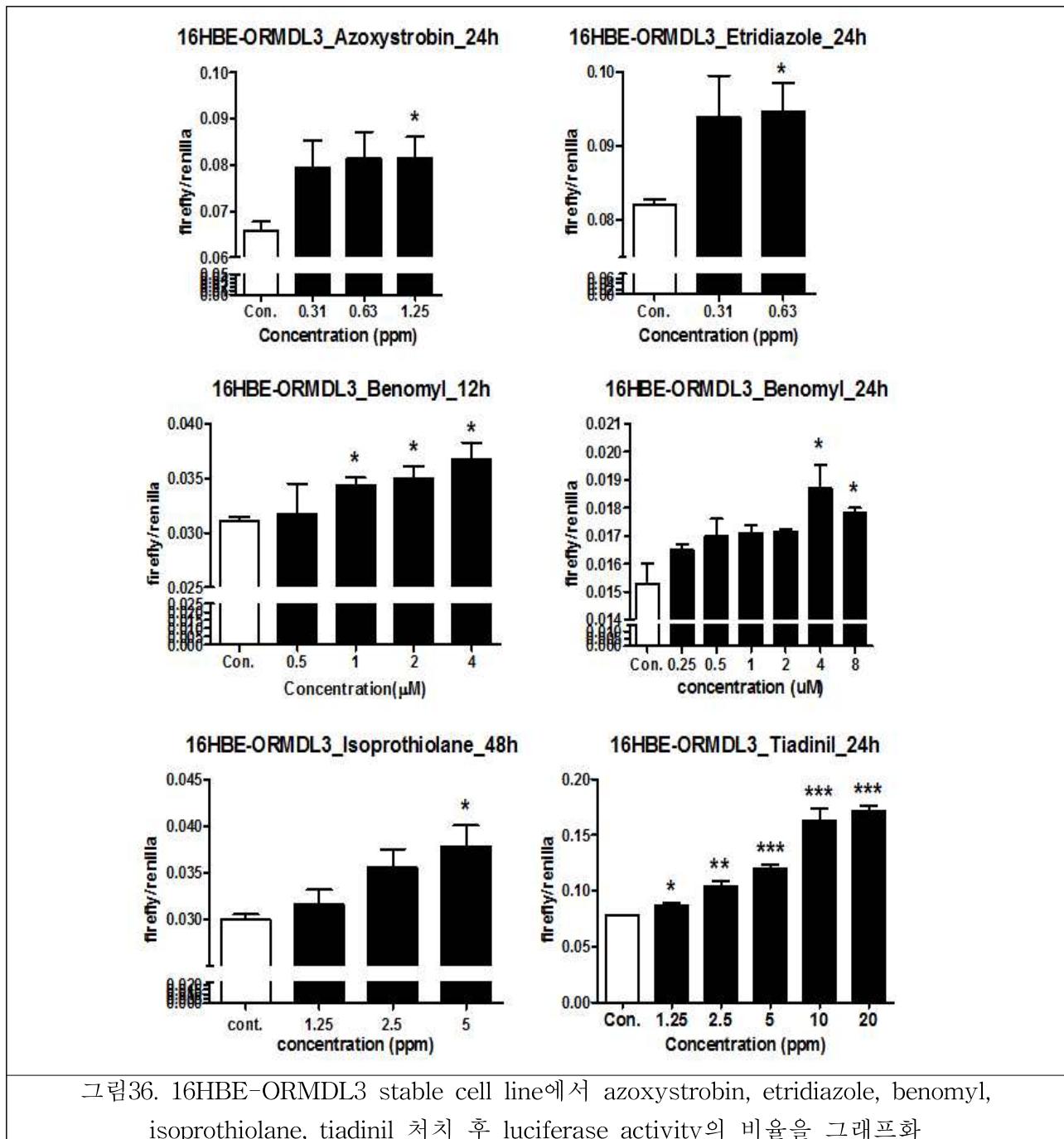


그림36. 16HBE-ORMDL3 stable cell line에서 azoxystrobin, etridiazole, benomyl, isoprothiolane, tiadinil 처리 후 luciferase activity의 비율을 그래프화

(2) 16HBE-ORMDL3 stable cell line에 살충제인 carbofuran, methiocarb, malathion를 처치하여 이에 의한 ORMDL3의 promoter activity 변화를 dual luciferase reporter gene assay로 확인하였다. 각 물질에 의해 firefly와 renilla luciferase 측정값 비율의 증가 패턴을 관찰하였다 (그림 16).

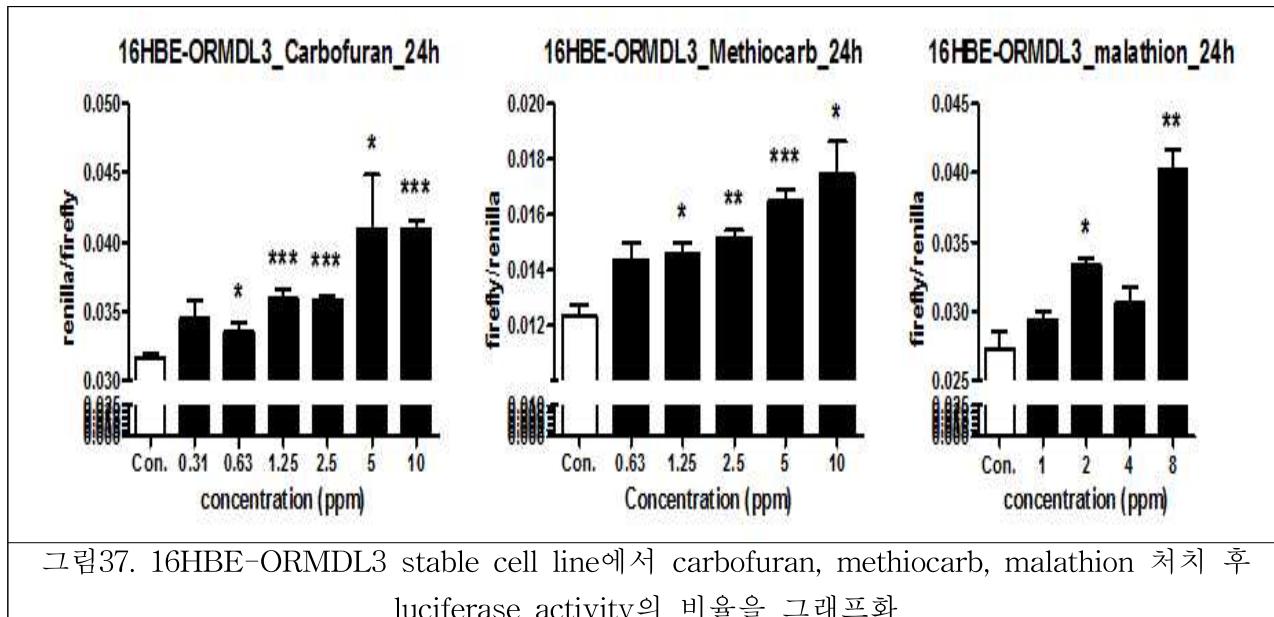


그림37. 16HBE-ORMDL3 stable cell line에서 carbofuran, methiocarb, malathion 처치 후 luciferase activity의 비율을 그래프화

(3) 16HBE-ORMDL3 stable cell line에 제초제인 alachlor, metolachlor, molinate를 처치하여 이에 의한 ORMDL3의 promoter activity 변화를 dual luciferase reporter gene assay로 확인하였다. 각 물질에 의해 firefly와 renilla luciferase 측정값 비율의 증가 패턴을 관찰하였다 (그림 17).

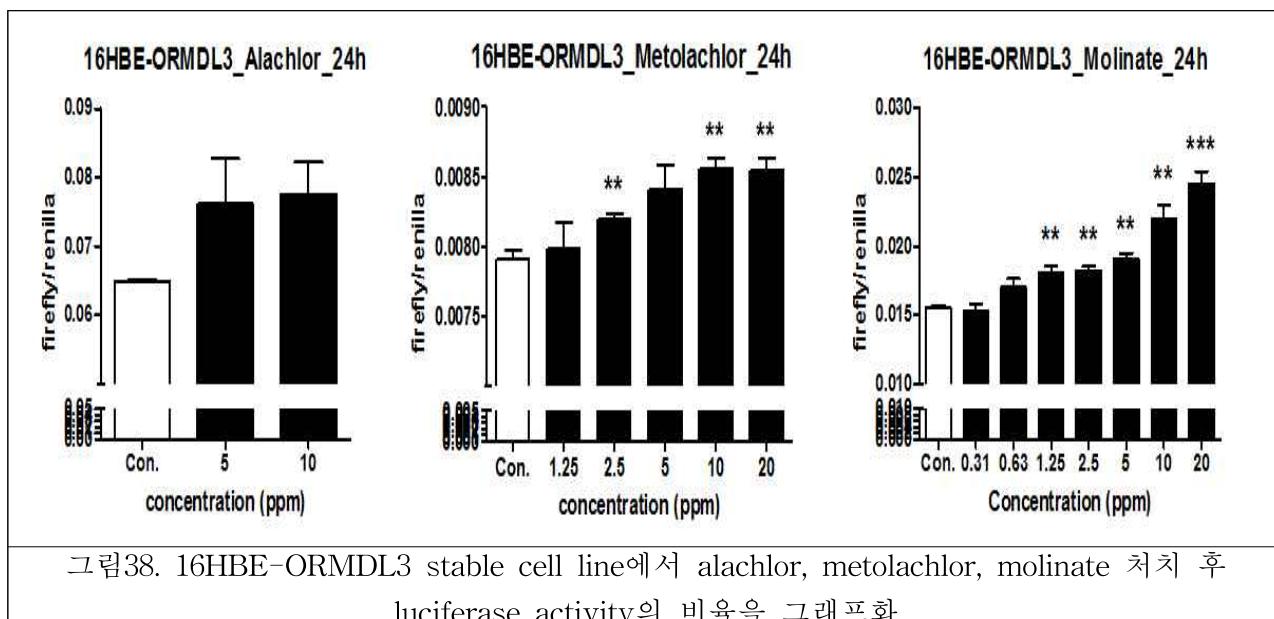


그림38. 16HBE-ORMDL3 stable cell line에서 alachlor, metolachlor, molinate 처치 후 luciferase activity의 비율을 그래프화

다. 실험 고찰

- (1) 본 연구로 구축하고자 한 것은 스크리닝 시스템으로, 실험 결과 농약 물질에 따라, 농도에 따라 다양한 반응성을 보였다. 모든 실험에도 그렇듯 본 모델에도 여러가지 변수가 작용된다. 렌티바이러스의 활성, 벡터의 핵 내 삽입 정도, 위치 등이 그 예이며, 실험 및 결과 도출시 이러한 사항들을 고려해야 한다.
- (2) 특히 세포에 외부 DNA 벡터의 도입에 의해 구축된 시스템으로, 벡터의 도입 정도에 의존해 그 정도에 따라 firefly와 renilla의 비율은 다양성을 보임. 16HBE-ORMDL3 stable cell line의 경우, internal control인 renilla의 발현이 매우 강하여 백만 단위로 나온 반면, firefly는 만 단위로 나와 비율이 소수 둘째자리 값 이하로 도출되었다.
- (3) 3년이 채 되지 않은 짧은 과제 기간과 함께, cell line의 적합성과 반응의 한계가 있을 수 있어 본 시스템은 완벽하다고 할 수 없으며 지속된 관련 연구로 보완이 필요하다. 또한 이 시스템(stable cell line)에 양성반응이 나타나지 않는 농약 물질들도 있었다. 타겟 유전자의 발현(단백질 증가)이 되지만, 본 시스템에서 양성반응을 나타내지 않는 농약 물질이 있을 가능성이 있기 때문에, 모든 농약 물질에 적용되지 않을 수도 있다. 그러므로 물질의 특성에 따라 이 시스템에 반응을 하지 않을 수도 있으며 농약마다 각각 다른 세포내 독성 발현 경로를 가지기 때문에, 본 모델이 스크리닝 기법으로 적용될 수 있지만, 물질 처치 후 반응이 양성으로 나오지 않더라도 그것이 독성이 없음을 의미하는 것이 아니므로 확정짓기 전 다른 여러 실험의 결과들과 종합해 판단하여야 한다.

7. 농약의 세포 내 독성 기전 스터디

농약의 주 노출 경로는 피부와 호흡기이므로, 이러한 피부와 기도에서 농약의 독성 기전 연구가 중요함. 농업 및 주거 환경에서 널리 쓰이는 농약인 트리플록시스트로빈 또는 베노밀을 이용해 피부 또는 기도 세포에서 독성 기전을 밝힌다.

가. 기본적인 독성 중 하나인 세포사멸관련 기전 스터디.

사람 피부 각질세포주인 HaCaT을 이용해 트리플록시스트로빈 농약의 독성 기전을 연구하였다. 농약의 피부 노출시 피부 각질세포에 독성을 나타내어 피부의 장벽 기능과 통합성(integrity)을 저해해 피부 질환을 유발할 수 있어 농약에 의해 가능한 세포사멸 기전을 밝힌다.

- (1) 트리플록시스트로빈(trifloxystrobin, TRF)의 세포 내 독성 기전 연구를 위하여 MTT assay를 이용하여 시간에 따른 세포 생존율을 측정. 시간, 농도에 따른 HaCaT의 세포사 확인 (그림 18). IC₅₀를 산출하여 이를 바탕으로 48시간, 0.5 μM 농도를 설정하여 연구 진행하였다.

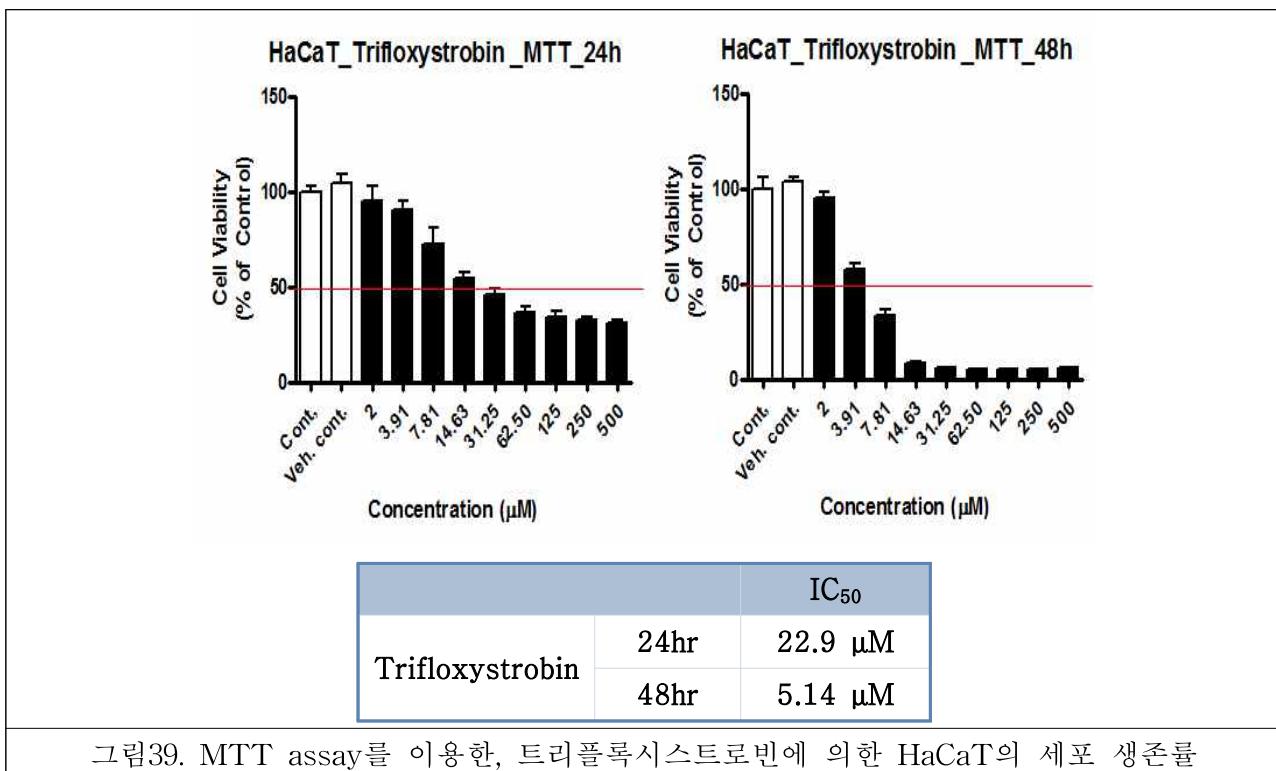


그림39. MTT assay를 이용한, 트리플록시스트로빈에 의한 HaCaT의 세포 생존률

(2) 트리플록시스트로빈에 의한 세포 사멸 기전을 조사하기 위해, HaCaT에 트리플록시스트로빈을 처치한 후, Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) assay를 실시한 결과 리플록시스트로빈에 의해 세포의 apoptosis가 증가하였다 (그림 19).

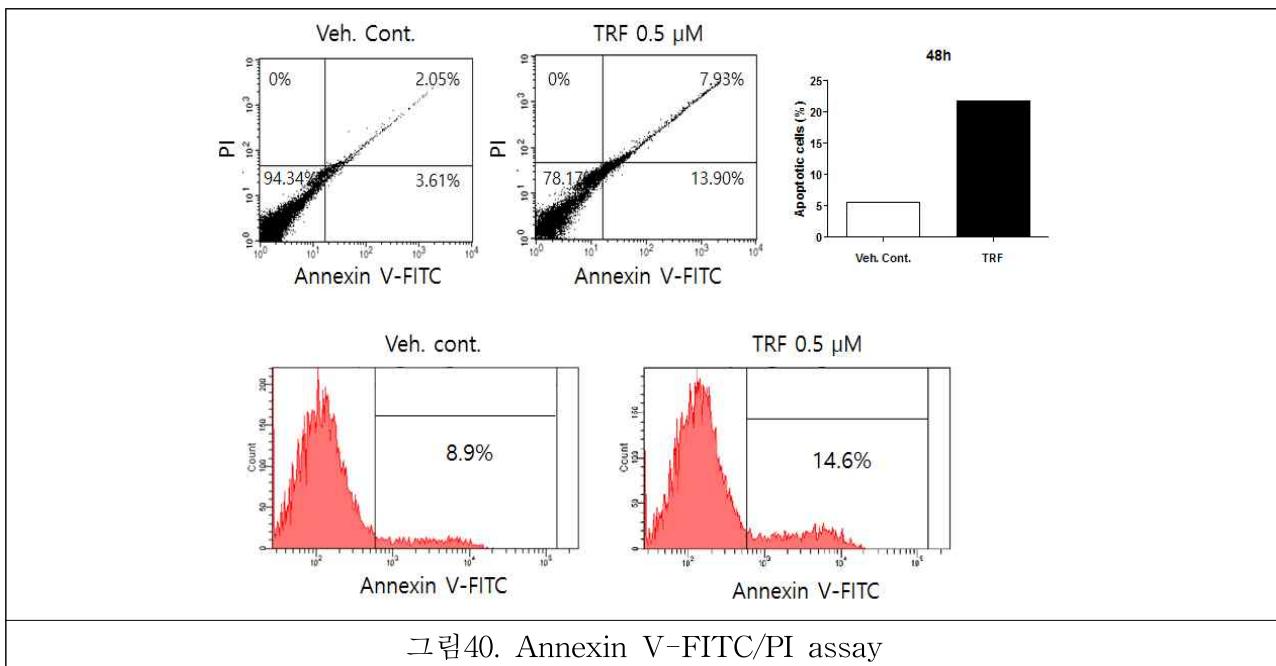


그림40. Annexin V-FITC/PI assay

(3) TUNEL assay로 트리플록시스트로빈에 의한 apoptosis 유발 현상을 시각화 (그림20).

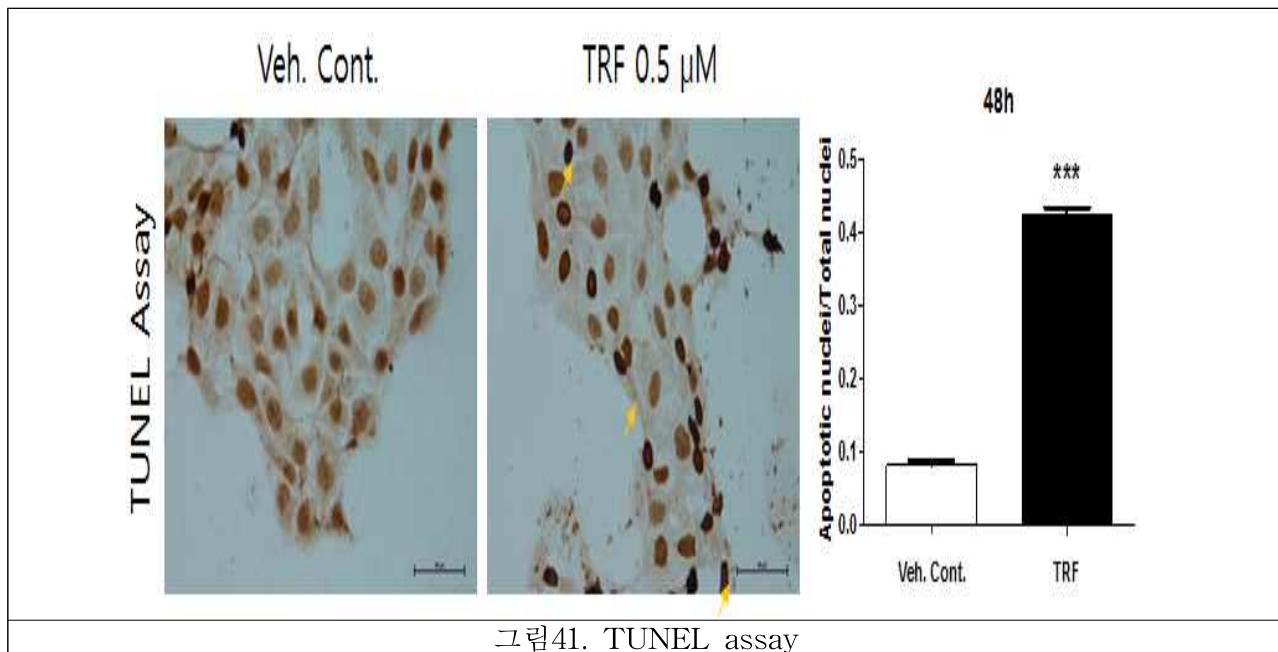


그림41. TUNEL assay

(4) Western blot으로 트리플록시스트로빈에 의한 apoptosis 관련 단백질(apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), procaspase-9, procaspase-8, cytochrome c (Cyt c))의 발현양 증가 확인하였다 (그림 21).

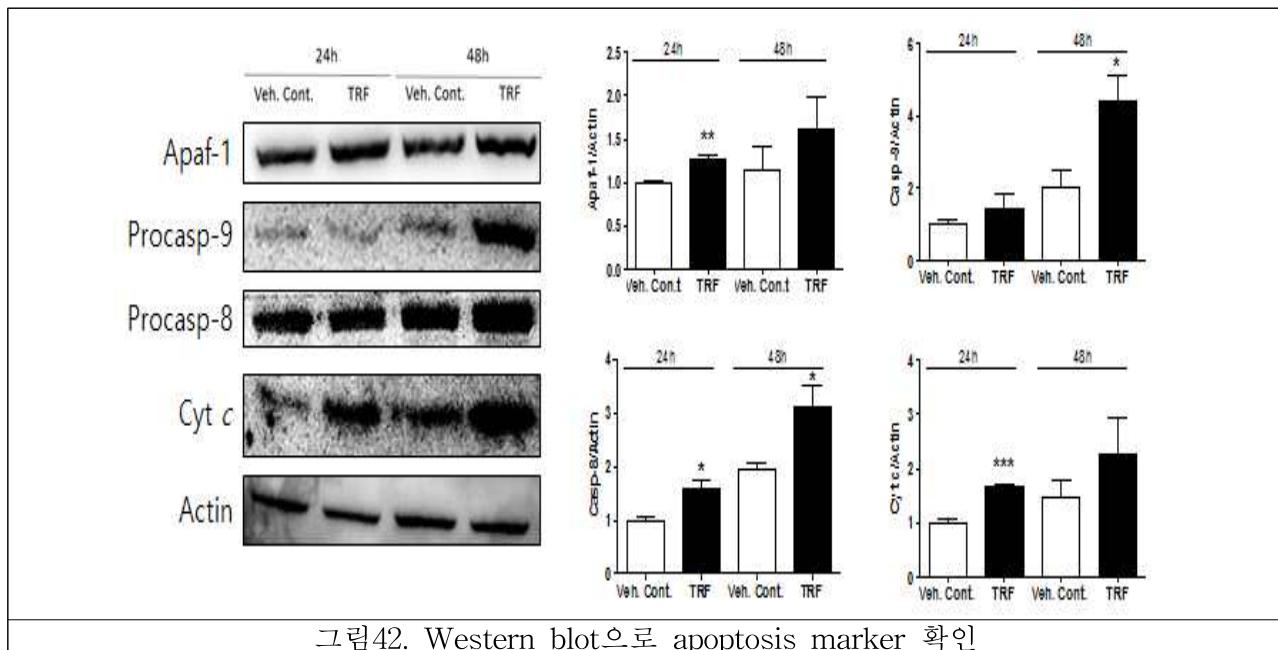


그림42. Western blot으로 apoptosis marker 확인

(5) 외인성 apoptosis 경로에 관여하는 procaspase-8의 증가에 주목해, TRAIL-매개 외인성 apoptosis 유발 여부를 관찰하기 위해 TRAIL receptor의 구성성분인 death receptor 5 (DR5)의 발현을 siRNA (siDR5)로 억제하여 변화를 관찰하였다. DR5의 발현 감소는 트리플록시스트로빈에 의한 apoptosis를 억제함을 Annexin V-FITC/PI assay으로 시각화하였다 (그림 22).

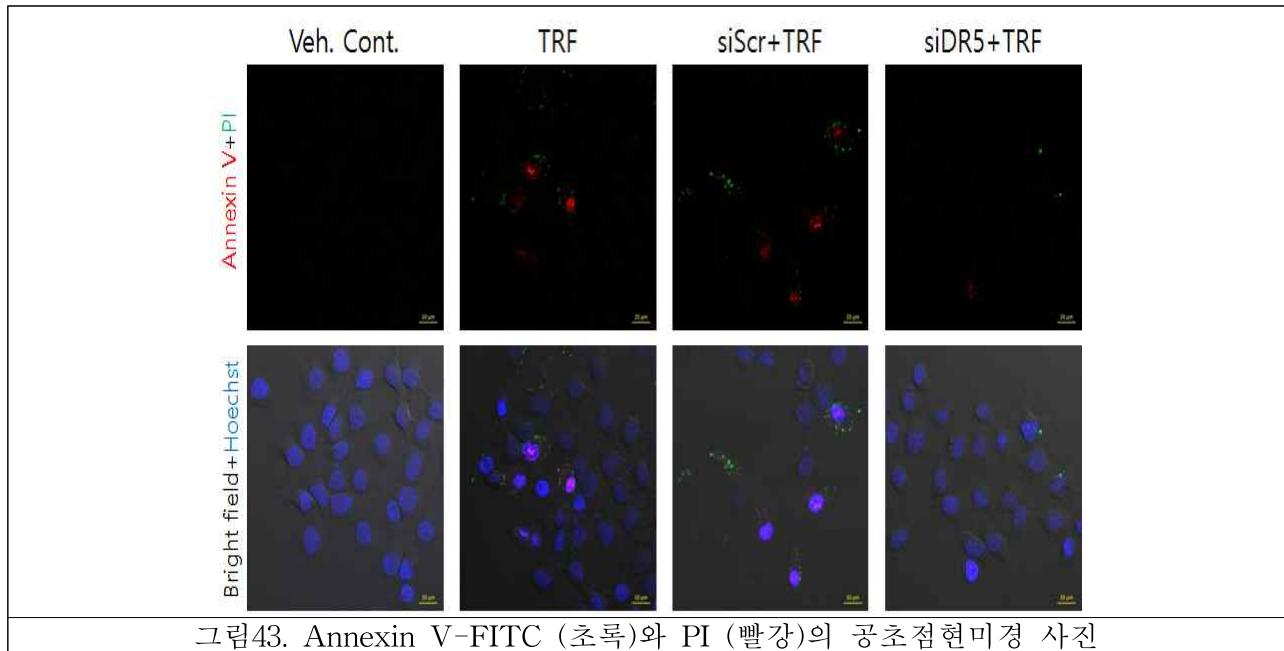


그림43. Annexin V-FITC (초록)와 PI (빨강)의 공초점현미경 사진

(6) SiDR5로 DR5의 발현 억제시, 트리플록시스트로빈에 의한 세포 내 외인성 apoptosis 경로에 있는 단백질들의 변화를 Western blot으로 확인 (그림 23). 트리플록시스트로빈에 의해 DR5의 발현 및 DR5의 downstream pathway인 caspase-8, -3, PARP의 발현과 활성화가 증가하였지만 siRNA로 DR5 억제시, 그 효과가 감소하였다. 이러한 결과는 트리플록시스트로빈이 TRAIL-매개 apoptosis를 유도함을 의미하며 트리플록시스트로빈은 피부 각질세포에 억제 효과를 가지며, 이는 피부의 장벽 기능과 통합성(integrity)을 저해하여 피부 염증 등 피부질환을 유발할 수 있음을 알수 있었다.

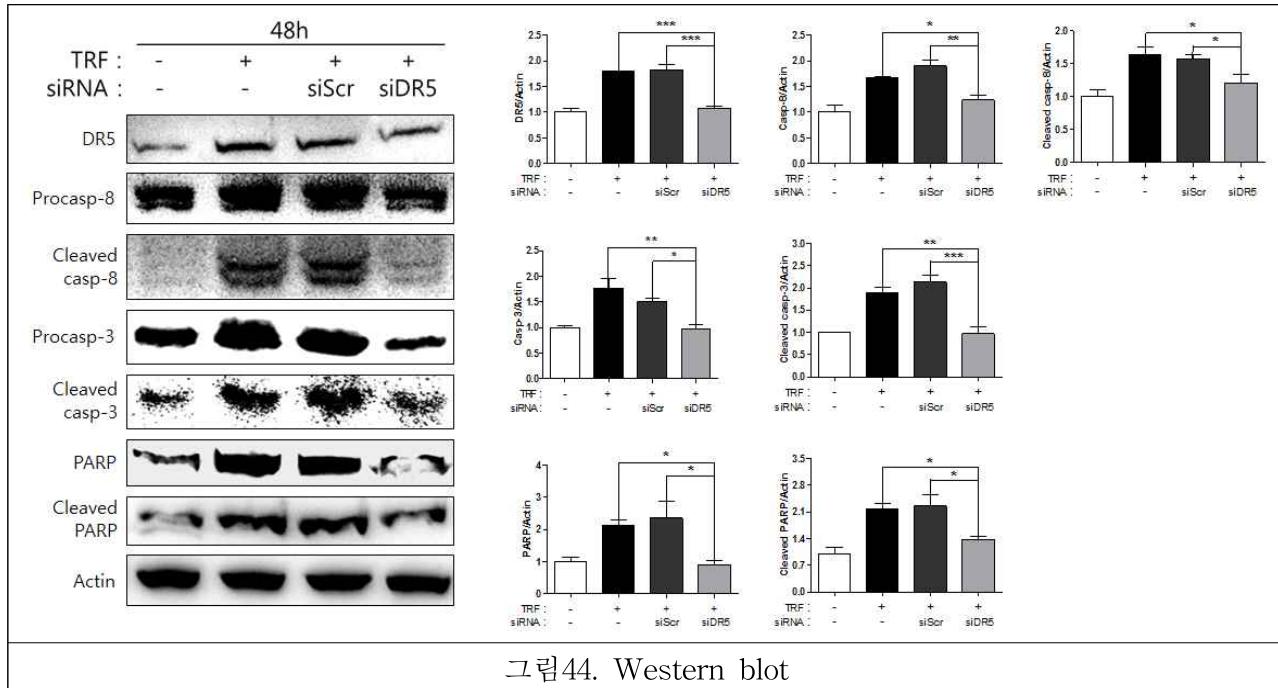


그림44. Western blot

(7) 트리플록시스트로빈은 곰팡이 내 미토콘드리아 전자전달계 complex 3 내 Cytochrome b의 Qo site에 부착하여 전자의 전달을 막는 작용기전 (mode of action)으로 곰팡이를 죽인다. 인간 피부세포에서도 비슷하게 미토콘드리아에 손상을 주는지 확인하기 위하여, JC-1으로 세포를 염색해 미토콘드리아 막전위 변화를 확인. 트리플록시스트로빈에 의해 미토콘드리아 막전위 감소가 관찰되었다 (그림 24).

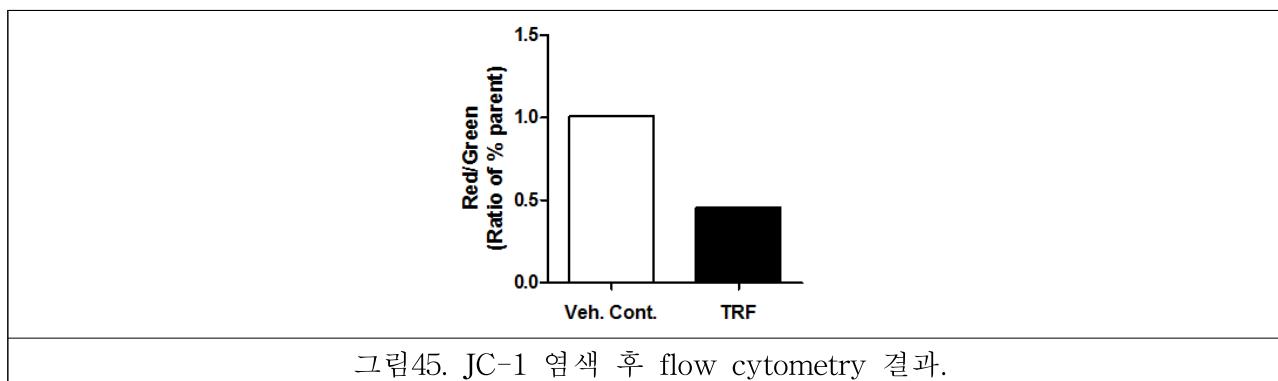


그림45. JC-1 염색 후 flow cytometry 결과.

(8) 또한 막전위에 따라 축적되는 MitoTracker CMXRos로 미토콘드리아를 염색해 형광 변화가 확인되었다. 공초점현미경(CLSM)으로 관찰시 트리플록시스트로빈 처리시 세포에 MitoTracker CMXRos 염색 정도가 감소하였으며, super resolution microscope(SRM)으로 미토콘드리아를 자세히 관찰시 미토콘드리아의 길이 감소(fission) 및 모양이 변화를 관찰하였다 (그림 25). 이를 통해 트리플록시스트로빈이 인간 피부 각질세포 내 미토콘드리아를 손상시킴을 확인하였다.

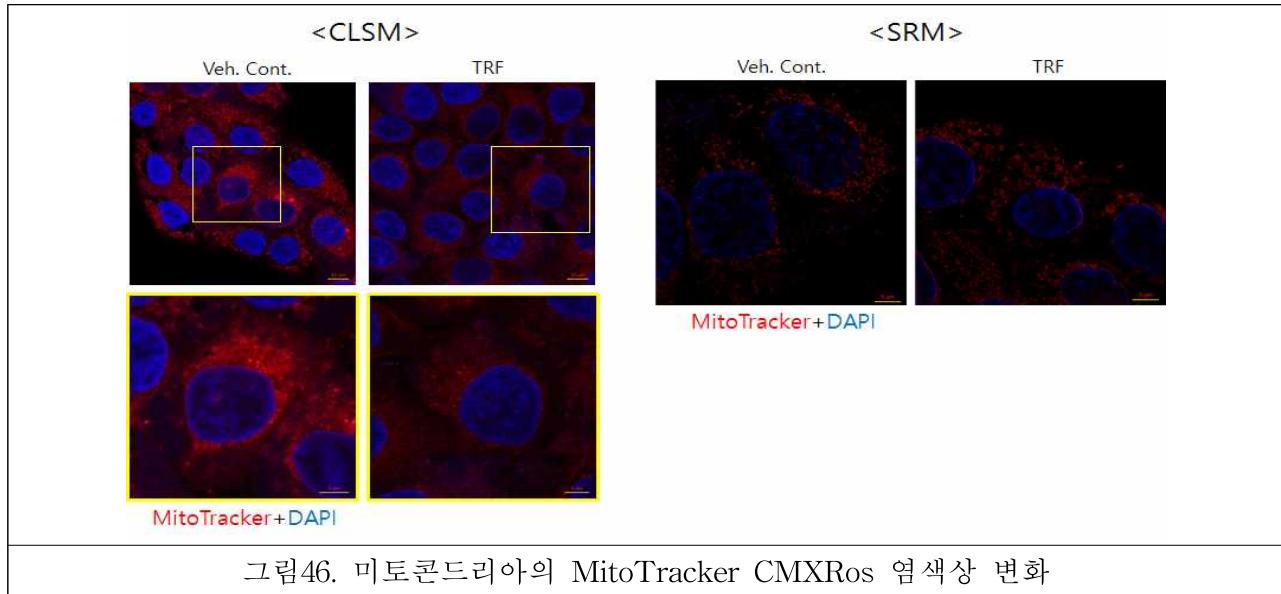


그림46. 미토콘드리아의 MitoTracker CMXRos 염색상 변화

(9) 이러한 손상된 미토콘드리아의 자가소화작용(autophagy)을 확인하기 위해 immunofluorescence와 Western blot을 수행하였다. autophagy 단백질인 autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B)의 항체를 이용한 immunofluorescence를 통해 트리플록시스트로빈에 의한 세포내 LC3B dot 증가를 시각화하고 Western blot을 이용해 트리플록시스트로빈에 의한 autophagy 관련 단백질인 lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP2), beclin 1 (BECN1), LC3B의 발현 증가 관찰하였다 (그림 26).

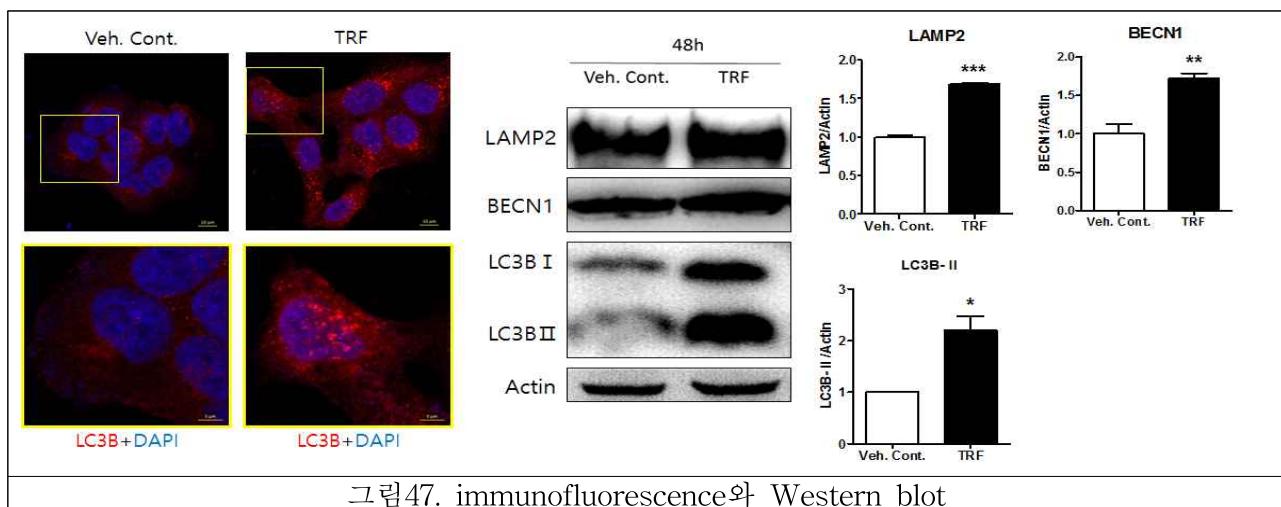


그림47. immunofluorescence와 Western blot

(10) Cyto-ID Green Autophagy detection reagent와 MitoTracker로 세포를 염색해 미토콘드리아의 autophagy 현상인 mitophagy를 시각화하고 Western blot이용해 mitophagy 관련 단백질 (phosphorylated-dynamin related protein 1 (pDRP1/Ser616), PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), Parkin)의 변화 확인하였다. autophagosome을 염색하는 Cyto-ID Green detection reagent와 미토콘드리아를 염색하는 MitoTracker의 merging과 mitophagy 관련 단백질의 발현이 증가하여, mitophagy가 트리플록시스트로빈에 의해 유도됨을 관찰함 (그림 27). 트리플록시스트로빈 매개 mitophagy의 기전을 탐색하기 위해 mitoTEMPO를 세포에 처치하였다. mitoTEMPO는 그림 48에 보이는 바와 같이 mitophagy 유도 효과를 완화시켰음. 이러한 결과들을 통해 농약 노출에 의한 피부 독성 기전 중 하나로 미토콘드리아 손상과 mitophagy가 제안될 수 있다.

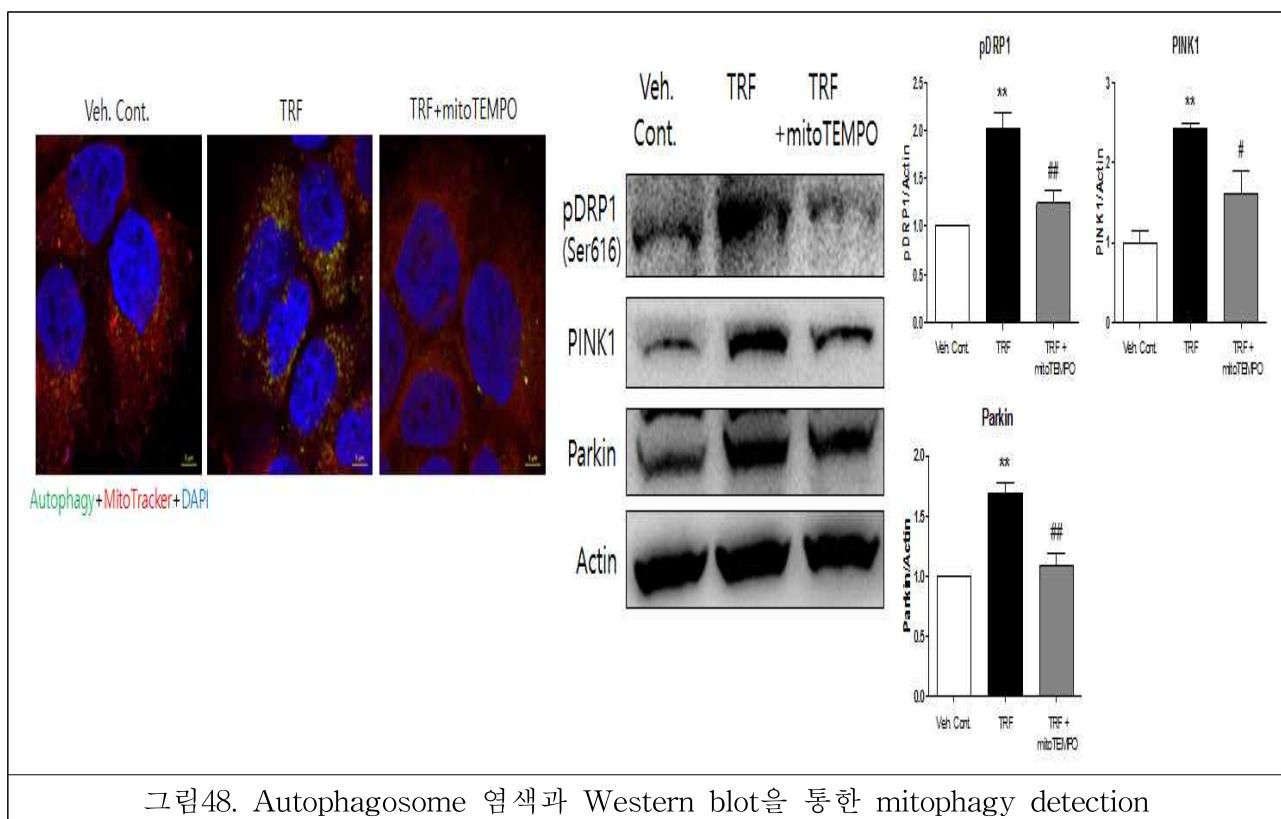
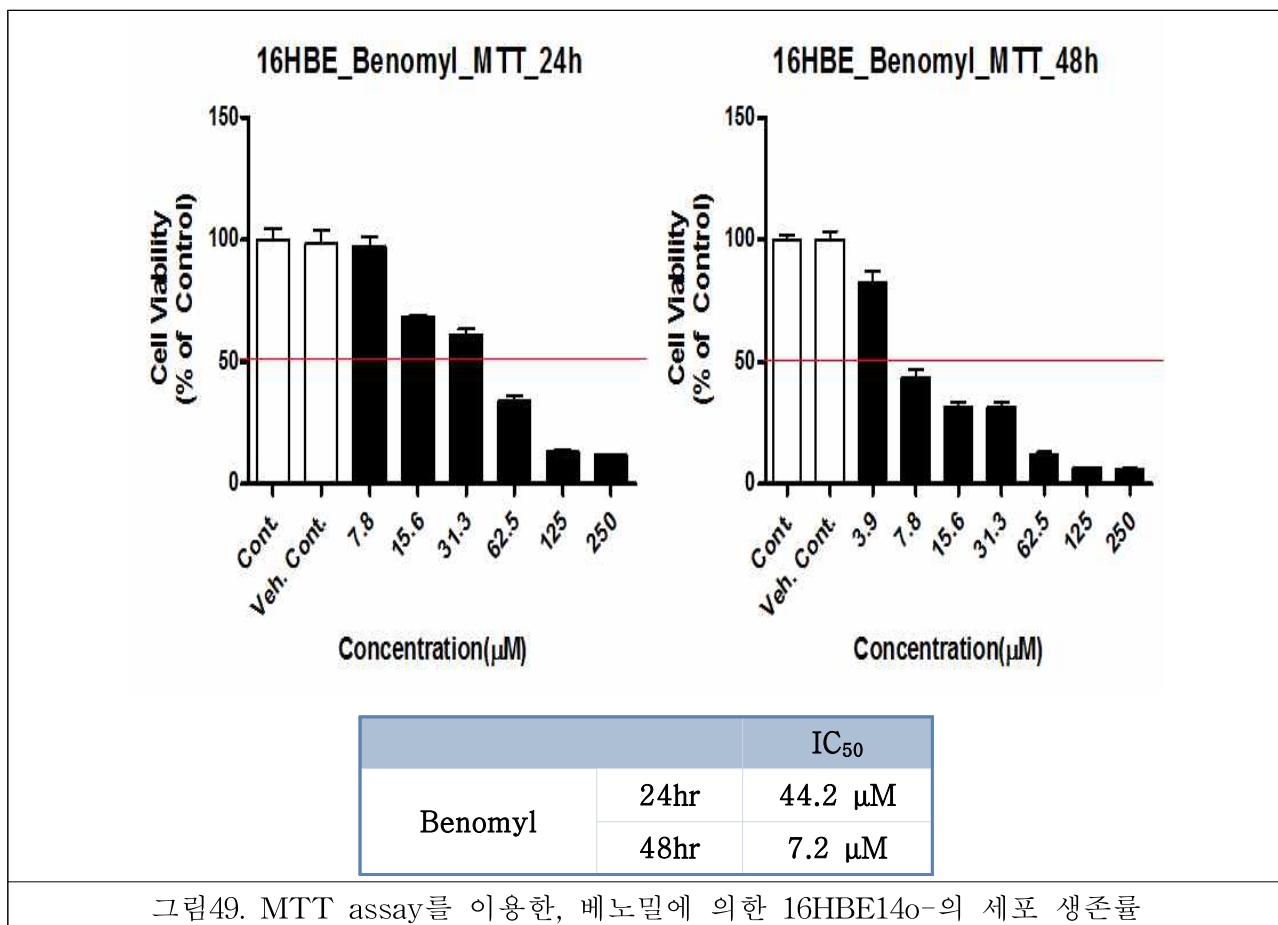


그림48. Autophagosome 염색과 Western blot을 통한 mitophagy detection

나. 발굴된 농약 노출관련 독성평가지표인 ORMDL3를 활용한 기전 스터디

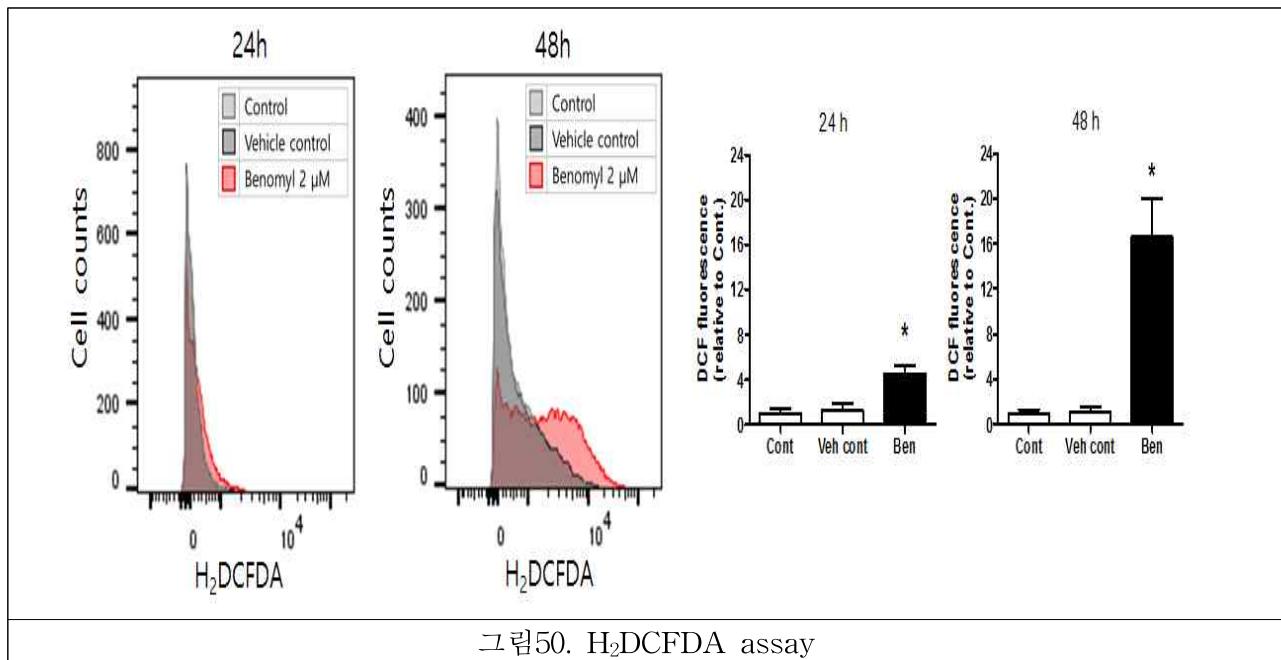
사람 기관지 상피세포주인 16HBE14o-를 이용해 베노밀 농약의 독성 기전 연구. 농약이 천식을 유발시킨다는 역학연구가 있으며, 요즘 주목받고 있는 대표적 환경오염에 의해 증가하고 있는 질환인 천식에 주목하여 ORMDL3 관련 농약 독성 기전을 밝혔다.

- (1) 베노밀의 세포 내 독성 기전 연구를 위하여 MTT assay를 이용하여 시간에 따른 세포 생존율을 측정하고 사람 기관지 상피세포주인 16HBE14o- 세포에 억제 효과 확인하였다 (그림 28). IC₅₀를 산출하여 이를 바탕으로 48시간 2 μM농도를 설정하여 연구를 진행하였다.



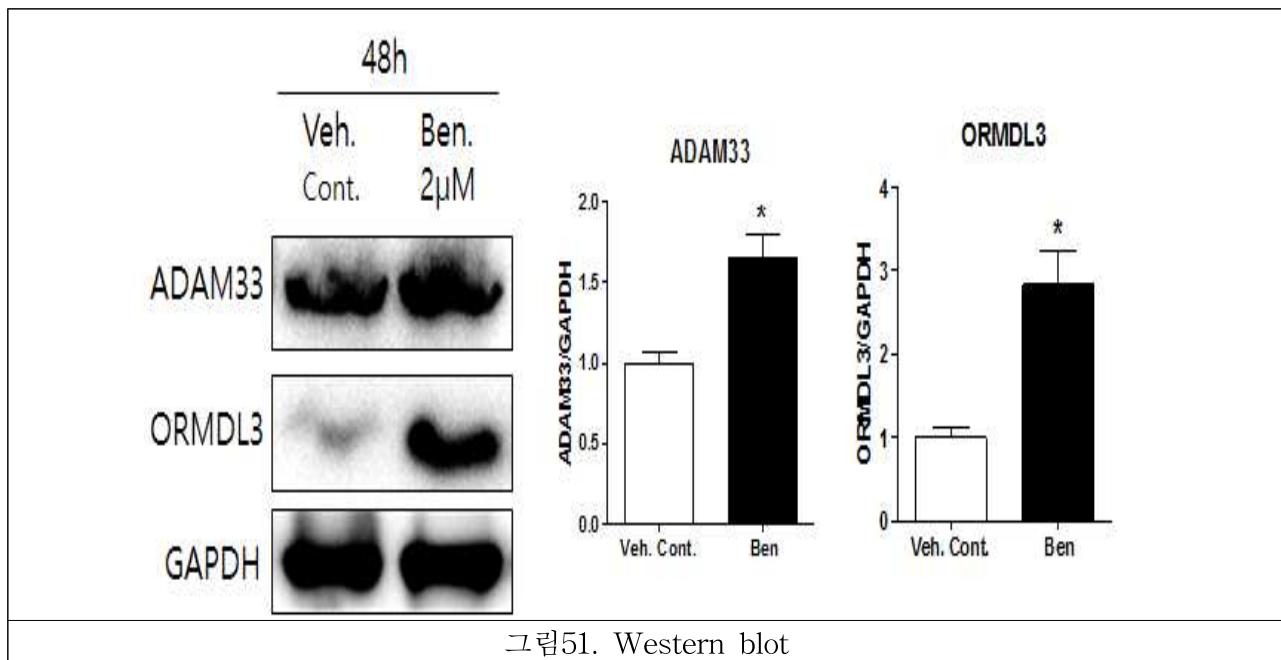
(2) 베노밀(benomyl)에 의한 세포의 산화적 손상 유발 확인.

$H_2\text{DCFDA}$ assay로 flow cytometry를 이용하여 베노밀에 의한 세포내 OH[•] (hydroxyl radical), H_2O_2 (과산화수소), ONOO^- (peroxynitrate), NO (일산화질소) 등의 활성산소종 유도 확인하였다 (그림 29).



(3) 천식 치료 유전자인 ADAM33과 ORMDL3의 발현 확인.

베노밀에 의한 세포 내 ADAM33과 ORMDL3의 단백질 발현 변화를 Western blot으로 확인 (그림 30).



(4) 항산화제 (NAC, mitoTEMPO) 처치에 따라 베노밀에 의해 증가한 세포내 활성산소종이 감소하였다 (그림 31). 이를 통해 베노밀이 기관지상피세포에 산화적 손상을 일으켜 관련 독성학적 기전을 유발함을 확인하였다.

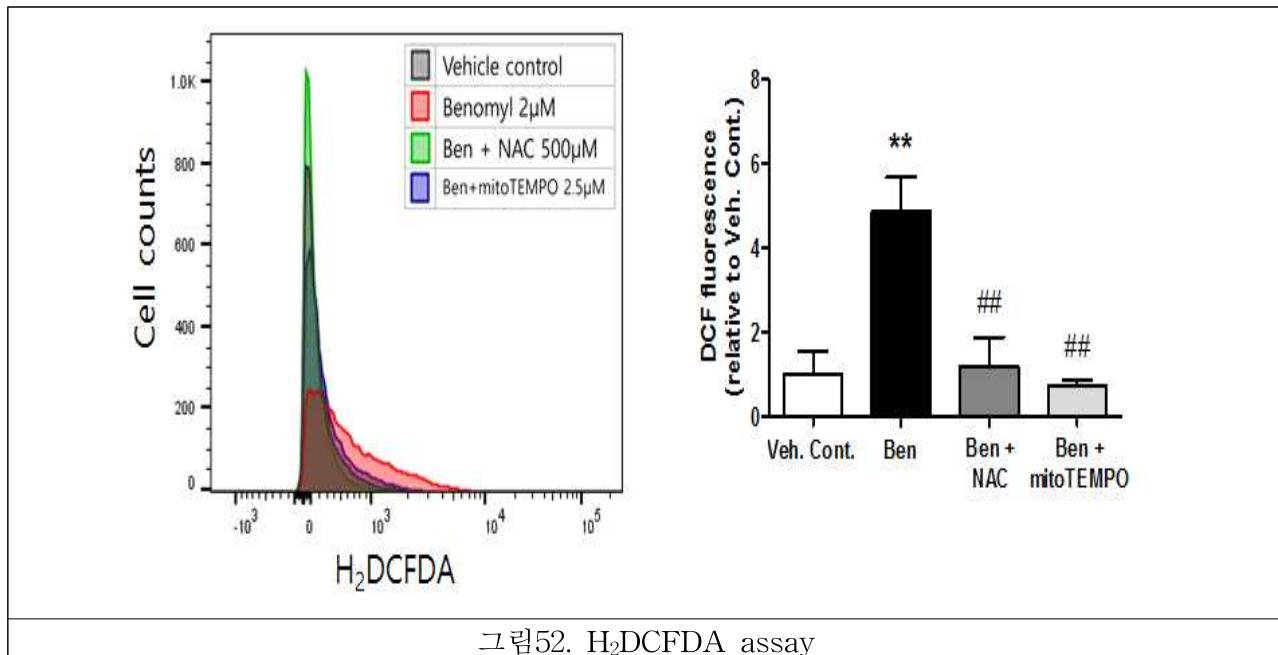


그림52. H₂DCFDA assay

(5) NAC와 mitoTEMPO를 처치한 세포에서 베노밀에 의해 증가한 ORMDL3 발현이 감소하였다 (그림 32). 이를 통해 기관지상피세포에서 베노밀에 의한 산화적 손상에 의해 ORMDL3가 증가함을 보였다.

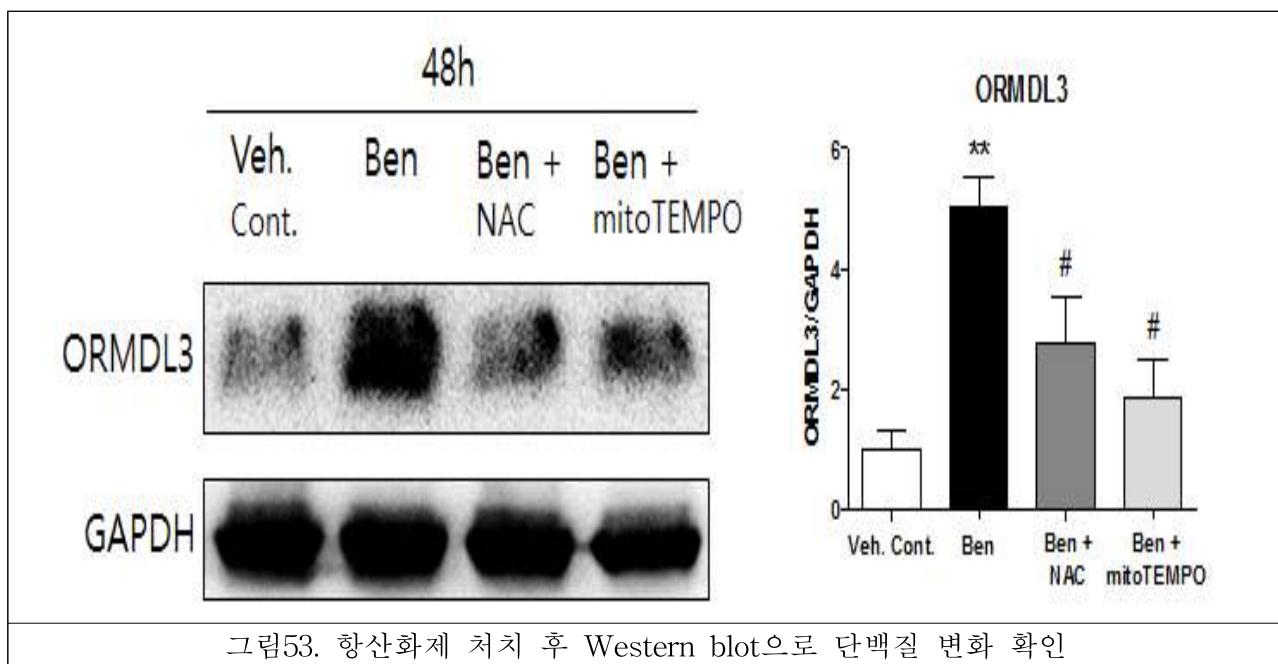


그림53. 항산화제 처치 후 Western blot으로 단백질 변화 확인

(6) 16HBE 세포에 ORMDL3의 siRNA(siORMDL3)를 transfection하여 발현을 억제시킨 후 해당 유전자 관련 세포 내 기전 네트워크 변화 연구하였다. 우선 siRNA의 효능 검정 및 transfection 조건을 확립하였으며, 보유한 두가지 siRNA 중 2번 siRNA를 사용하여 실험을 하였다 (그림 33).

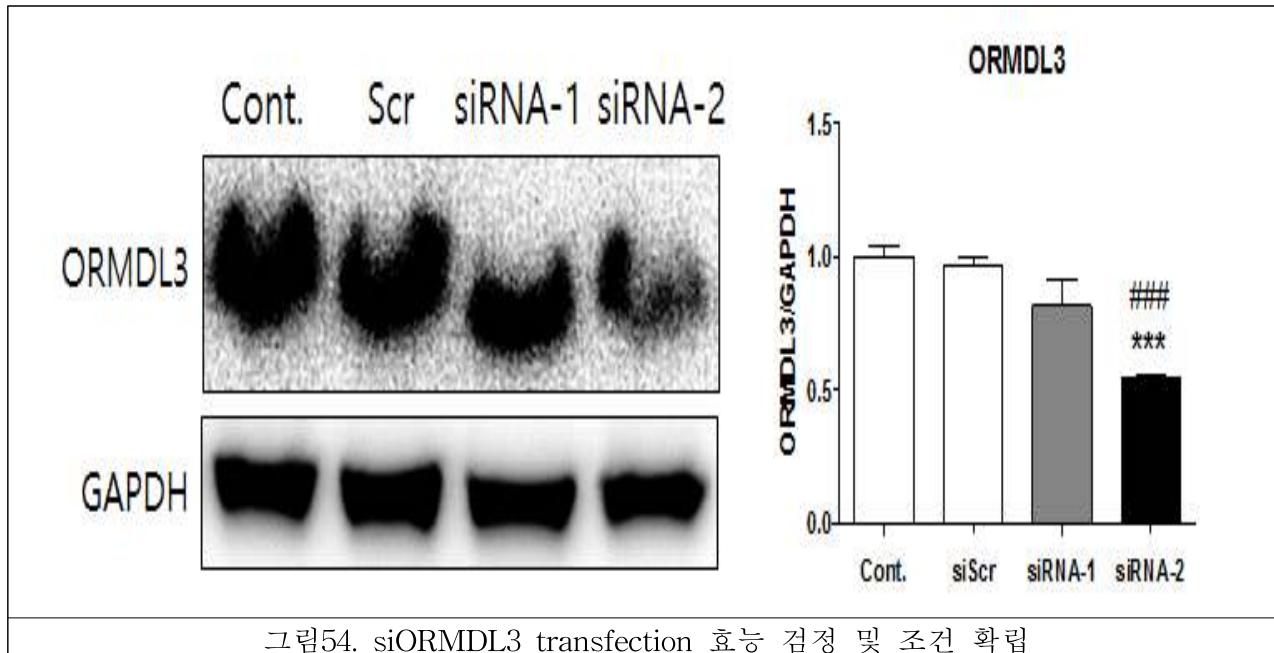


그림54. siORMDL3 transfection 효능 검정 및 조건 확립

(7) siORMDL3 transfection 후 Western blot으로 기관지 염증 및 천식관련 단백질인 MMP2와 ADAM33의 발현 변화를 관찰하였다. siORMDL3로 억제시 benomyl에 의한 두 단백질의 유도 효과가 감소되었다 (그림 34).

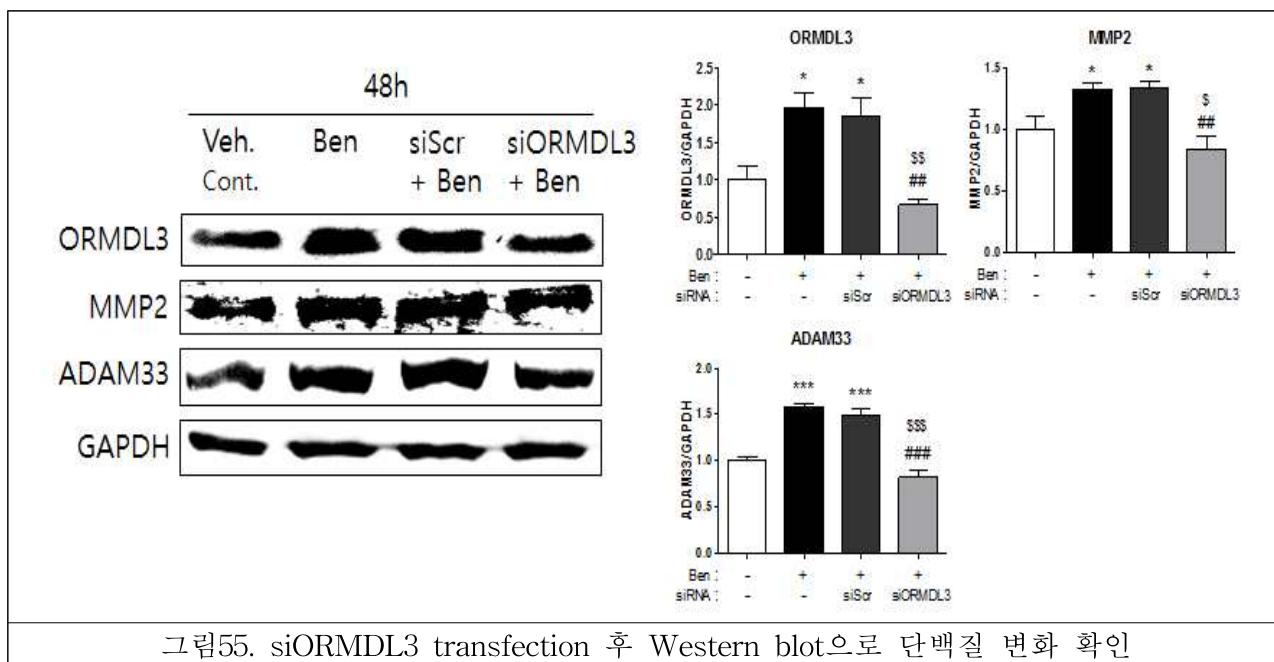


그림55. siORMDL3 transfection 후 Western blot으로 단백질 변화 확인

(8) siORMDL3 transfection 후 기관지 염증 및 천식관련 cytokine인 TSLP, CCL17, IL-8의 mRNA 발현 변화를 qRT-PCR로 관찰하였다. benomyl에 의한 각 cytokine 발현이 siORMDL3을 도입한 세포에서 감소하였다 (그림 35). TSLP와 CCL17는 피부질환 타겟 유전자와 연계된다. 이들은 피부 상피세포 뿐 아니라 다른 상피세포 특히 호흡기계 (기관지) 상피세포에도 많이 합성, 분비되는 염증 연관 주요 cytokine이다. 이를 통해 기관지상피세포에서 베노밀에 의한 ORMDL3 과발현이 기관지 염증 및 천식 유발 기전에 기여함을 보였다. 본 결과들은 농약 노출에 따른 천식 유발 기전으로 제안될 수 있다.

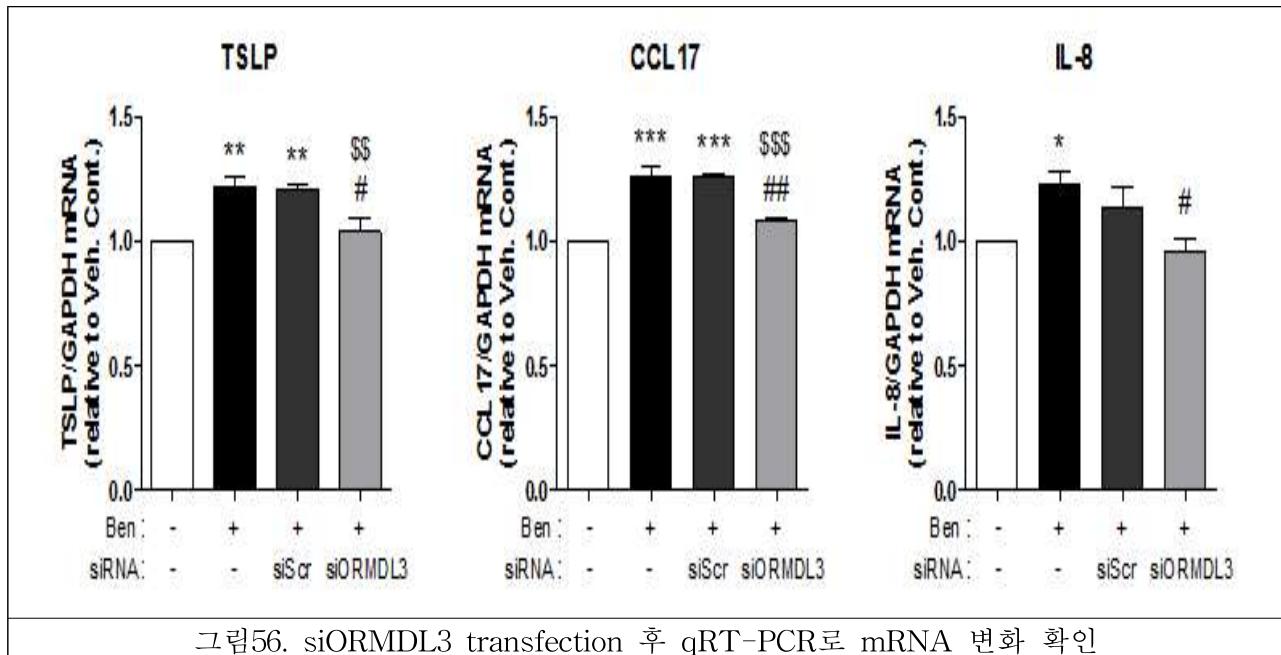


그림56. siORMDL3 transfection 후 qRT-PCR로 mRNA 변화 확인

8. 본 연구로 개발 및 구축된 신속한 농약 노출 독성 대체시험법을 바탕으로 산업재산권 출원
가. HaCaT-TSLP

- 피부 염증 반응 측정용 벡터 및 신규한 세포주, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2015-0159133).

나. 16HBE-ORMDL3

- ORMDL3 측정용 신규한 세포주, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2016-0151142)

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

1. 동물실험을 통한 급성 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성 분석

가. 시험농약 및 농도 선정

(1) 시험농약(약제) 선정: chlorpyrifos 20% 유제 20%, deltamethrin 1% 유제

* 선정 근거: 소과제 내 3개의 세부과제에서 공통적으로 chlorpyrifos과 함께 deltamethrin의 경우 농작업자 포장시험성적이 요구된 물질이며, 제형은 부착량이 가장 높은 유제로 선정하고, 농약 함유율(%)이 시판하는 제품 중 가장 높은 함량 선정

(2) 시험약제 농도 선정

(가) KoPOEM을 이용한 약제별 농약노출량 산정

* 농약별 대해 표준살포량(예:과수 1,000m²에 450L 적용) 및 사용약량에 근거하여 산출

① chlorpyrifos 유제 20%

Application method	Ground sprayer	Active substance	deltamethrin 1%
Product	deltamethrin 유제	a.s. concentration	10 mg/ml
Formulation type	emulsion-based	Dermal absorption from spr.	10 %
Dermal absorption from product	5 %		
Container	1 litre spray bottle	PPE during application	None
PPE during mix/loading		Work rate day	2 ha
Dose	4.5 l/ha	Duration of spraying	6 h
Application volume	4500 l/ha		
EXPOSURE DURING MIXING AND LOADING 계조, 준비 단계 노출			
Container size 용량, 단위	1 litres		
Hand contamination operation 계조 시 손오염량	0.01 ml		
Application dose 계조량	4.5 litres product/ha		
Work rate day 단위	2 ha/day		
Number of operations 단위수	15 /day	단위량*살포량*500	
Hand contamination 손오염량/day	0.15 ml/day	계조 시 손오염량*단위수	
Protective clothing 보호장비	None		
Transmission to skin 피부흡수율	100 %		
Dermal exposure to formulation 피부 노출량	0.15 ml/day	손오염량*피부흡수율/100	
DERMAL EXPOSURE DURING SPRAY APPLICATION 살포 시 노출			
Application technique 사용기기	Speed sprayer		
Application volume 사용량	4500 spray/ha		
Volume of surface contamination 유행면적	400 ml/h		
Distribution 분포도	Hands Truck Legs		
10% 65% 25%			
Clothing 보호장비, 의복	None Permeable Permeable		
Penetration 침투율	100% 2% 5%		
Dermal exposure 피부 노출량	10 3.2 5 ml/h	오염면적*분포도*침투율	
Duration of exposure 노출 시간	6 h		
Work rate day	2 ha		
Total dermal exposure to spray 살포 시 총 피부 노출량	242.4 ml/day	노출 시간*(과 피부노출량의 합)*단위면적	
ABSORBED DERMAL DOSE 피부흡수율			
Dermal exposure 피부 노출량	0.15 ml/day	Mix load	Application
Concen. of a.s. product or spray 활성물질 농도	10 mg/ml	0.01 mg/ml	계조량*활성물질 농도*사용량
Dermal exposure to a.s. 활성물질 피부 노출량	1.5 mg/day	2.424 mg/day	피부노출량*활성성분 농도
Percent absorbed 흡수율	5 %	10 %	
Absorbed dose 흡수량	0.09 mg/day	0.2424 mg/day	활성성분 피부 노출량*흡수율/100
INHALATION EXPOSURE DURING SPRAYING 살포 시 호흡노출량			
Inhalation exposure 호흡노출량	0.05 ml/h		
Duration of exposure 노출 시간	6 h		
Work rate day	2 ha		
살포 시 총 호흡 노출량	0.6 ml/day		
Concentration of a.s. in spray 활성물질 농도	0.01 mg/ml		
Inhalation exposure to a.s. 활성물질 호흡량	0.006 mg/day	호흡노출량*노출시간*활성물질 농도*살포면적	
Percent absorbed 흡수율	100 %		
Absorbed dose 흡수량	0.006 mg/day		활성물질 호흡량*흡수율/100
PREDICTED EXPOSURE 예상 노출량			
Total absorbed dose 총 흡수량	0.3384 mg/day	계조, 준비 피부 흡수량+살포 시 피부 흡수량+살포 시 호흡 흡수량	
Operator body weight 작업자 체중	60 kg		
Operator exposure 작업자 흡수량	0.00564 mg/kg bw/day	총 흡수량 체중	

② deltamethrin 유제 1%

Application method	Speed sprayer	Active substance	chlorpyrifos 20%
Product	chlorpyrifos 유제	a.i. concentration	200 mg/ml
Formulation type	organic solvent-based	Dermal absorption from spray	10 %
Dermal absorption from product	5 %		
Container	1 litre anti-dust	PPE during application	None
PPE during mix/loading	None	Work rate day	2 ha
Dose	4.5 l/ha	Duration of spraying	6 h
Application volume	4500 l/ha		
EXPOSURE DURING MIXING AND LOADING 제조, 운송 및 충전 노출			
Container size 용량, 규격	1 litres		
Hand contamination/operation 제조 시 손 오염량	0.01 ml		
Application dose 제조량	4.5 litres product/ha		
Work rate 작업량	2 ha/day		
Number of operations 작업수	15 day	작업량*설정량/500	
Hand contamination 손 오염량/day	0.18 ml/day	제조 시 손 오염량*작업수	
Protective clothing 보호장비	None		
Transmission to skin 피부 흡수율	100 %		
Dermal exposure to formulation 피부 노출량	0.18 ml/day	손 오염량*피부 흡수율/100	
DERMAL EXPOSURE DURING SPRAY APPLICATION 살포 시 노출			
Application technique 사용기기	Speed sprayer		
Application volume 사용용량	4500 spray/ha		
Volume of surface contamination 오염면적	400 m ² /h		
Distribution 분포도	Hands Trunk Legs 10% 65% 23%		
Clothing 보호장비, 의복	None Permeable Permeable		
Penetration 침투율	100%	2%	5%
Dermal exposure 피부 노출량	10	5.2	5 ml/h
Duration of exposure 노출 시간	6 h		
Work rate/day	2 ha		
Total dermal exposure to spray 살포 시 손 피부 노출량	242.4 ml/day	노출 시간*(1-(피부노출량의 100%)*작업면적)	
ABSORBED DERMAL DOSE 피부 흡수량			
	Mix/load	Application	
Dermal exposure 피부 노출량	0.18 ml/day	242.4 ml/day	
Concen. of a.i. product or spray 활성물질 농도	200 mg/ml	0.2 mg/ml	제조량*활성물질 농도/사용량
Dermal exposure to a.i. 활성물질 피부 노출량	36 mg/day	48.48 mg/day	피부노출량*활성물질 농도
Percent absorbed 흡수율	5 %	10 %	
Absorbed dose 흡수량	1.8 mg/day	4.848 mg/day	활성물질 피부 노출량*흡수율/100
INHALATION EXPOSURE DURING SPRAYING 살포 시 호흡 노출량			
Inhalation exposure 호흡노출량	0.05 ml/h		
Duration of exposure 노출 시간	6 h		
Work rate/day	2 ha		
살포 시 솔루션 노출량	0.6 ml/day		
Concentration of a.i. in spray 활성물질 농도	0.2 mg/ml		
Inhalation exposure to a.i. 활성물질 호흡 노출량	0.12 mg/day	호흡노출량*노출시간*활성물질 농도*살포면적	
Percent absorbed 흡수율	100 %		
Absorbed dose 흡수량	0.12 mg/day	활성물질 호흡량*흡수율/100	
PREDICTED EXPOSURE 예상 노출량			
Total absorbed dose 총 흡수량	6.768 mg/day	제조, 운송 피부 흡수량+살포 시 피부 흡수량+살포 시 호흡 흡수	
Operator body weight 작업자 체중	60 kg		
Operator exposure 작업자 흡수량	0.1128 mg/kg bw/day	총 흡수량 체중	

(나) 동물실험 농도 선정

① chlorpyrifos 유제 20%

제품의 노출량		60kg, 성인남성, 4500L/ha, 2ha, 6h	원체의 노출량	
제조, 준비	피부노출		제조, 준비	피부노출
작업자 노출량	0.18 ml/day (제조 준비 단계의 피부 노출량)		작업자 노출량	0.18 ml/day (제조 준비 단계의 피부 노출량)
작업자 체중	60 kg		온체 노출도	200 mg/ml
작업자 노출량	0.003 ml/kg bw/day (총 노출량/체중)		온체 노출량	36 mg/day (총 노출량*활성물질 농도)
살포 시	피부노출	총 노출량 242.4 ml/day (살포 단계의 피부 노출량)	작업자 체중	60 kg
	작업자 체중	60 kg	작업자 노출량	0.6 ml/kg bw/day (온체 노출량/체중)
	작업자 노출량	0.6 ml/kg bw/day (총 노출량/체중)	살포 시	피부노출
호흡노출	총 노출량 0.6 ml/day (살포 단계의 호흡 노출량)		총 노출수량	242.4 ml/day (살포 단계의 피부 노출량)
작업자 체중	60 kg		온체 노출도	0.1 mg/ml
작업자 노출량	0.01 ml/kg bw/day (총 노출량/체중)		온체 노출량	24.24 mg/day (총 노출량*활성물질 농도)
제품의 작업자 노출량	비율(%)		작업자 체중	60 kg
제조준비	피부노출	0.003 ml/kg bw/day 0.07	작업자 노출량	0.04 ml/kg bw/day (온체 노출량/체중)
살포 시	피부노출	4.04 ml/kg bw/day 99.68	온체 노출수량	0.6 ml/day (살포 단계의 호흡 노출량)
	호흡노출	0.01 ml/kg bw/day 0.25	온체 노출도	0.1 mg/ml
Total	작업자 노출량	4.053 ml/kg bw/day 100	작업자 노출량	0.06 mg/day (총 노출량*활성물질 농도)
*Rat	100g	0.4053 ml/animal/day	작업자 체중	60 kg
	200g	0.8106 ml/animal/day x2	작업자 노출량	0.001 ml/kg bw/day (온체 노출량/체중)
koPOEM	2.031 제품-노출량	4.053 ml/kg bw/day 0.4053 100g	온체의 작업자 노출량	0.6 mg/kg bw/day 59.7
	ai-노출량	1.005 mg/kg bw/day 0.1005 100g	살포 시	피부노출
	0.1614 ai-흡수량	0.1128 mg/kg bw/day 0.01128 100g	호흡노출	0.404 mg/kg bw/day 40.2
			Total	0.001 mg/kg bw/day 100
			*Rat	100g 0.1005 mg/animal/day

3페이지

② deltamethrin 유제 1%

제품의 노출량		60kg, 성인남성, 4500L/ha, 2ha, 6h	원체의 노출량	
제조, 준비	피부노출		제조, 준비	피부노출
작업자 노출량	0.18 ml/day (제조 준비 단계의 피부 노출량)		작업자 노출량	0.18 ml/day (제조 준비 단계의 피부 노출량)
작업자 체중	60 kg		온체 노출도	10 mg/ml
작업자 노출량	0.003 ml/kg bw/day (총 노출량/체중)		온체 노출량	1.8 mg/day (총 노출량*활성물질 농도)
살포 시	피부노출	총 노출량 242.4 ml/day (살포 단계의 피부 노출량)	작업자 체중	60 kg
	작업자 체중	60 kg	작업자 노출량	0.03 ml/kg bw/day (온체 노출량/체중)
	작업자 노출량	4.04 ml/kg bw/day (총 노출량/체중)	살포 시	피부노출
호흡노출	총 노출량 0.6 ml/day (살포 단계의 호흡 노출량)		총 노출수량	242.4 ml/day (살포 단계의 피부 노출량)
작업자 체중	60 kg		온체 노출도	0.01 mg/ml
작업자 노출량	0.01 ml/kg bw/day (총 노출량/체중)		온체 노출량	24.24 mg/day (총 노출량*활성물질 농도)
제품의 작업자 노출량	비율(%)		작업자 체중	60 kg
제조준비	피부노출	0.003 ml/kg bw/day 0.07	작업자 노출량	0.04 ml/kg bw/day (온체 노출량/체중)
살포 시	피부노출	4.04 ml/kg bw/day 99.68	온체 노출수량	0.6 ml/day (살포 단계의 호흡 노출량)
	호흡노출	0.01 ml/kg bw/day 0.25	온체 노출도	0.01 mg/ml
Total	작업자 노출량	4.053 ml/kg bw/day 100	작업자 노출량	0.006 mg/day (총 노출량*활성물질 농도)
*Rat	100g	0.4053 ml/animal/day	작업자 체중	60 kg
	200g	0.8106 ml/animal/day x2	작업자 노출량	1E-04 ml/kg bw/day (온체 노출량/체중)
koPOEM	2.031 제품-노출량	4.053 ml/kg bw/day 0.4053 100g	온체의 작업자 노출량	0.03 mg/kg bw/day 42.6
0.08025 ai-노출량	0.0705 mg/kg bw/day 0.00705 100g	살포 시	피부노출	0.0404 mg/kg bw/day 57.3
0.00357 ai-흡수량	0.006 mg/kg bw/day 0.000564 100g	호흡노출	0.0001 mg/kg bw/day 0.1	
		Total	0.071 mg/kg bw/day 100	
		*Rat	100g 0.00705 mg/animal/day	

나. 급성 농약노출 시험을 위한 동물시험 및 생체시료 채취

(1) 급성 농약노출의 경로, 노출량 등 시험조건 선정

(가) 실험동물 : Sprague-Dawley male 7주령

(나) 노출경로: 경구 및 경피

* 농작업자의 흡입노출경로는 실험조건의 제약상 경구로 대체

(다) 노출농도

* 농작업자 실제 노출농도 산정(저농도) 및 중, 고농도로 3농도 선정

① chlorpyrifos 유제 20%

chlorpyrifos 20% 유제							
저농도	저농도 ai. 노출량	1.005 mg/kg bw/day	0.1005 mg	100g			
			0.201 mg	200g	x10마리	total	2.01 mg
중농도	저농도x10 ai. 노출량	10.05 mg/kg bw/day	1.005 mg	100g			
			2.01 mg	200g	x10마리	total	20.1 mg
고농도	저농도x100 ai. 노출량	100.5 mg/kg bw/day	10.05 mg	100g			
			20.1 mg	200g	x10마리	total	201 mg

② deltamethrin 유제 1%

deltamethrin 1% 유제							
저농도	저농도 ai. 노출량	0.0705 mg/kg bw/day	0.00705 mg	100g			
			0.0141 mg	200g	x10마리	total	0.141 mg
중농도	저농도x10 ai. 노출량	0.705 mg/kg bw/day	0.0705 mg	100g			
			0.141 mg	200g	x10마리	total	1.41 mg
고농도	저농도x100 ai. 노출량	7.05 mg/kg bw/day	0.705 mg	100g			
			1.41 mg	200g	x10마리	total	14.1 mg

(2) 급성 농약노출의 동물시험 수행 및 생체시료 채취

(가) 노출방법 : 실험동물 체중을 고려하되 시험물질은 corn oil에 녹여서 처리하였다.

① 경구노출: 존데를 이용한 위강제투여하였다.

② 경피노출: 농작업자의 KoPOEM 노출량 산정에 이용되는 6h 간 피부노출하였다

(나) 시료채취: 노출 전·후 각각 24시간의 뇨 시료 채취를 하였다.



그림58. 경구노출 시험



그림59. 경피노출 시험



그림60. 뇨 시료 채취

나. 급성 농약노출시험의 뇌시료 중 바이오마커 분석 및 노출상관성 확인

(1) 급성 농약노출시험의 뇌시료 중 바이오마커 선정

* 노출량 예측을 위해서는 정량분석이 가능하여야 하므로 여러 바이오마커 중 대사체로 선정

(가) chlorpyrifos의 대사체로 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP)를 선정하였다.

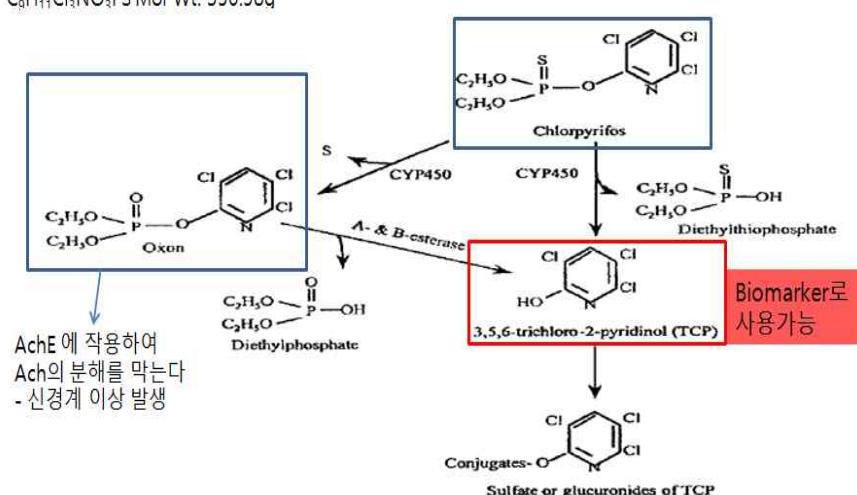


Figure 1. Scheme for the metabolism of CPF to CPF-oxon and TCP.

J. A. Campbell, "Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry for the Analysis of 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol in Saliva of Rats Exposed to Chlorpyrifos", Analytical Letters, 38:6, 939-949

그림61. Scheme for the metabolism of CPF to CPF-oxon and TCP

(나) deltamethrin의 대사체 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) 선정

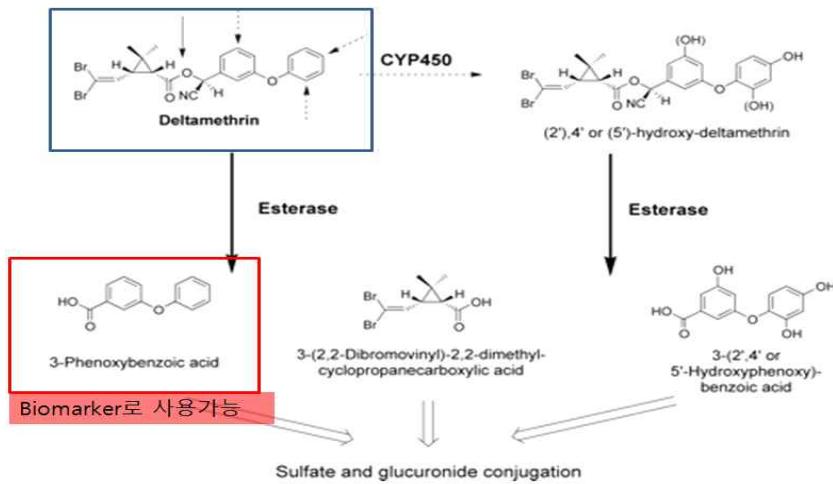


FIG. 1. Metabolism of deltamethrin

Sathanandam S. "ONTOGENY OF HEPATIC AND PLASMA METABOLISM OF DELTAMETHRIN IN VITRO: ROLE IN AGE-DEPENDENT ACUTE NEUROTOXICITY". DRUG METABOLISM AND DISPOSITION. 34 (3) : 389-397

그림62. Metabolism of deltamethrin

(2) 급성 농약노출시험의 뇌시료 중 대사체 분석

(가) chlorpyrifos의 대사체로 TCP 분석법 구축

① 시료 전처리 방법

뇌 시료 1 mL에 내부표준물질(2,6-Dibromophenol) 10 μ L(10 μ g/mL), HCl(12 N) 100 μ L를 첨가 한 뒤 oven에서 80 °C, 1시간 동안 가수분해 시킨 후 상온에서 식힌. 20% NaCl 1mL, chlorobutane 1mL를 첨가 한 뒤 10분간 진탕. 1500 g 10 분간 원심분리한 0.8ml 상층액 질소가스로 완전 농축 한 후 MeCH 40uL, 유도체시약 MTBSTFA 10 μ L 첨가한 뒤 70 °C, 45분 동안 반응시킨다.

② 기기분석: GC/MS 분석

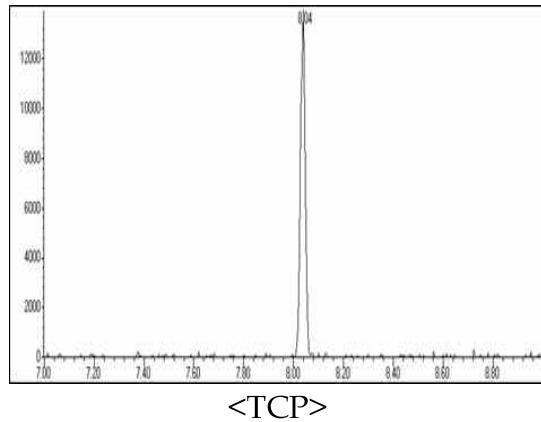
ⓐ GC/MS 기기 조건

Description	Condition
Apparatus	Agilent 6890 GC with 5973 MSD
Column	DB-5 30 m x 0.32 mm x 0.5 um
Injection Temp	280 °C
Injection volume	2 ul
Injection type	Splitless
Oven Temp	Initial 90 °C for 1 min, 25 °C/min to 120 °C, 2.1 °C/min to 240 °C for 1.5 min, 25°C/min to 300 °C for 7 min

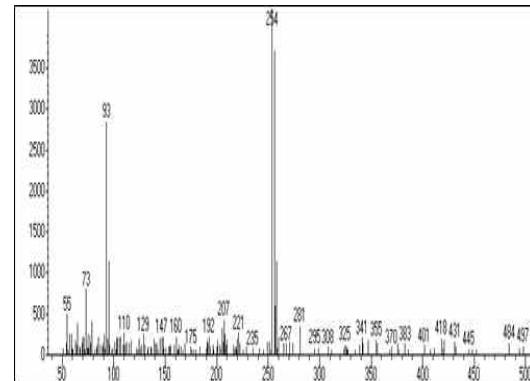
④ 분석물질(TCP)과 내부표준물질(2,6-Dibromophenol)의 Retention time

Compound	RT (min)	Masses
2,6-Dibromophenol (IS)	9.0	309
TCP	8.0	254

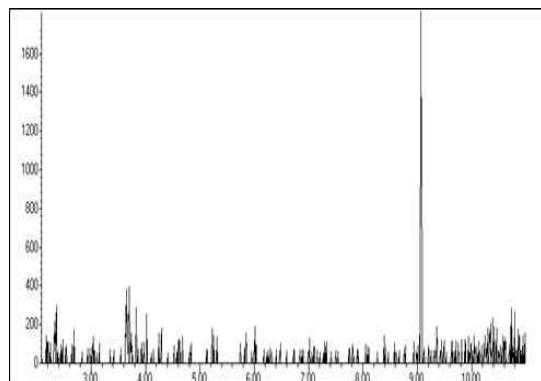
<뇨 중 TCP 및 내부표준물질(2,6-Dibromopheno) chromatogram 및 masses(m/z)>



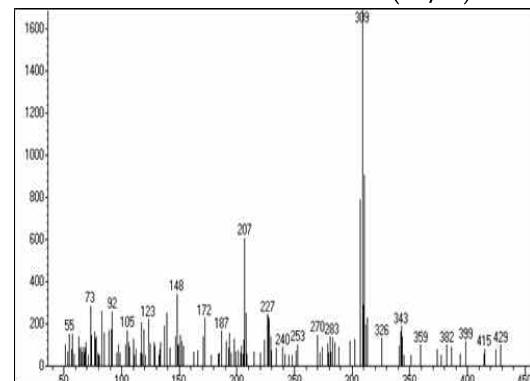
<TCP>



<TCP detected masses(m/z)>



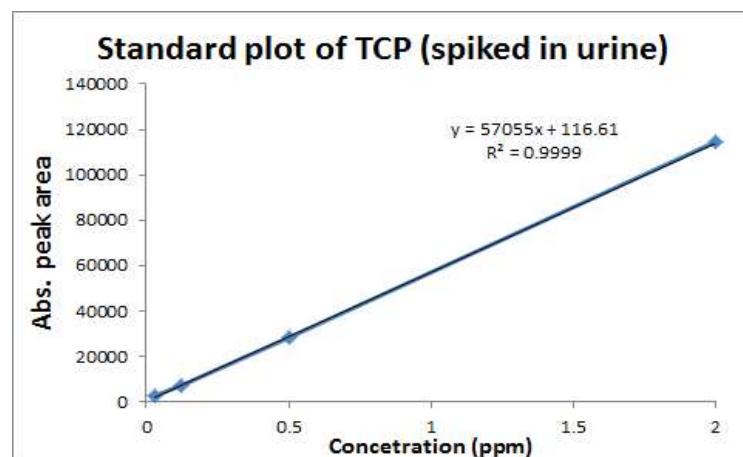
<2,6-Dibromophenol>



<2,6-Dibromopheno detected masses(m/z)>

⑤ 분석법 검증(표준검정곡선 시험)

- 뇨 중 TCP를 정량분석하기 위해 TCP를 4ug/mL까지 Blank 뇨로 희석
- matrix matched 표준검정곡선



(나) deltamethrin의 대사체로 3-PBA 분석법 구축

① 시료 전처리 방법

T. Schettgen 등(2002)의 방법에 따라 뇨 시료 1 mL에 내부표준물질(2-PBA) 10 μ L(10 μ g/mL), HCl(12 N) 100 mL를 첨가 한 뒤 oven에서 90 °C, 1시간 동안 가수분해 시킨 후 상온에서 식힌다. n-hexane 500 mL를 첨가 한 뒤 10분간 진탕. 1500 g 10 분간 원심분리한 상층액 질소가스로 완전 농축 한 후 Toluene 50 μ L, 유도체시약 MTBSTFA 10 μ L 첨가한 뒤 70 °C, 45분 동안 반응시켰다.

② 기기분석: GC/MS에서 2 μ L입

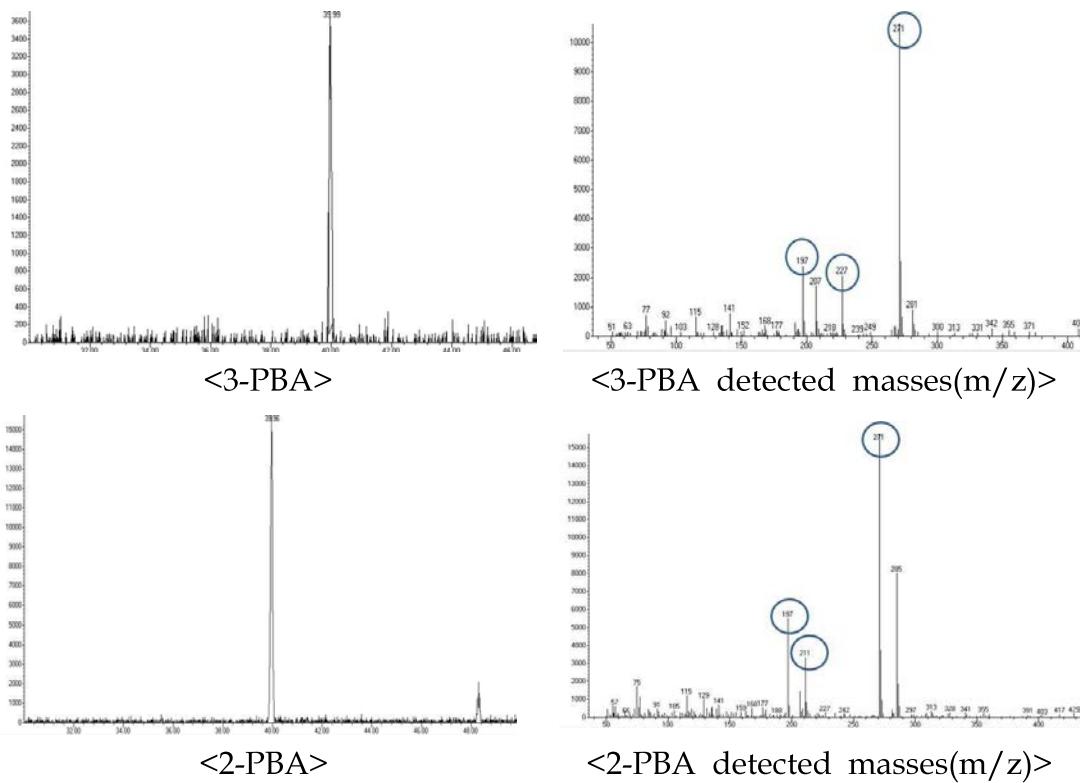
④ GC/MS 기기 조건

Description	Condition
Apparatus	Agilent 6890 GC with 5973 MSD
Column	DB-5 30 m x 0.32 mm x 0.5 μ m
Injection Temp	280 °C
Injection volume	2 μ L
Injection type	Splitless
Oven Temp	Initial 90 °C for 1 min, 25 °C/min to 120 °C, 2.1 °C/min to 240 °C for 1.5 min, 25°C/min to 300 for 7 min

④ 분석물질(3-PBA)와 내부표준물질(2-PBA)의 Retention time

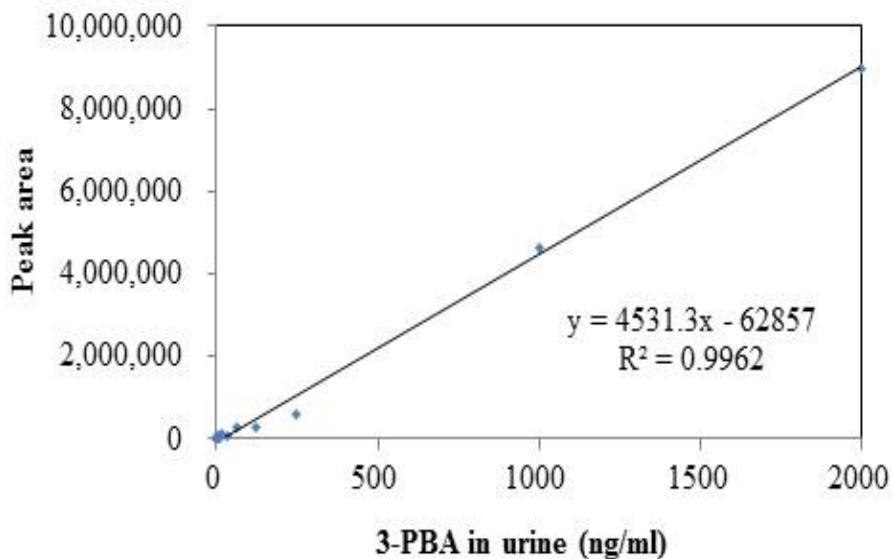
Compound	RT (min)	Masses
2-PBA (IS)	39.85	<u>271</u> , 227, 197
3-PBA	43.86	<u>271</u> , 227, 197

<뇨 중 3-PBA 및 내부표준물질(2-PBA) chromatogram 및 masses(m/z)>



④ 분석법 검증(표준검정곡선 시험)

- 뇨 중 3-PBA를 정량분석 하기 위해서 3-PBA stock 용액(40ug/mL)을 제조하여 2ug/mL~0.98ng/mL까지 Blank 뇨로 희석하였다.
- matrix matched 표준검정곡선



(다) 뇨 중 creatinine 분석

① 분석

크레아티닌은 근육내에서 생성되는 물질로 정상상태에서 뇨 중 배출량이 일정하기 때문에 신장기능의 지표와 함께 뇨 중 대사체 분석의 지표로도 사용된다 (O'Rourke et al.,2000). 본 시료의 뇨 중 크레아틴 분석에는 Jaffe reaction을 기본 원리로 Ahn 등 (2011)의 방법을 따라 측정하였다.

② 결과

모든 시험군에서 Shevock 등(1993)의 문헌상의 정상 범위내의 값을 보여 신장기능에 이상이 없음을 나타내었다.

(3) 급성 농약노출시험의 뇨시료 중 대사체 함량

(가) chlorpyrifos의 뇨 중 대사체인 TCP 함량

Route of administration	Groups	Dose of chlorpyrifos (mg/kg bw)	TCP			
			Mean (μg/ml)	SD (μg/ml)	Mean (μg)	SD (μg)
Oral	control (n=13)	0	ND	ND	ND	ND
	Low (n=8)	1.005	5.3	3.3	28.6	14.3
	Medium (n=9)	10.05	63.8	34.7	432.8	190.9
Dermal	High (n=11)	100.5	556.5	185.9	2769.8	1481.1
	control (n=8)	0	0.1	0.1	0.2	0.3
	Low (n=10)	1.005	0.6	0.5	3.8	2.4
	Medium (n=11)	10.05	9.7	5.0	66.9	48.0
	High (n=12)	10.05	68.2	24.8	469.2	234.0

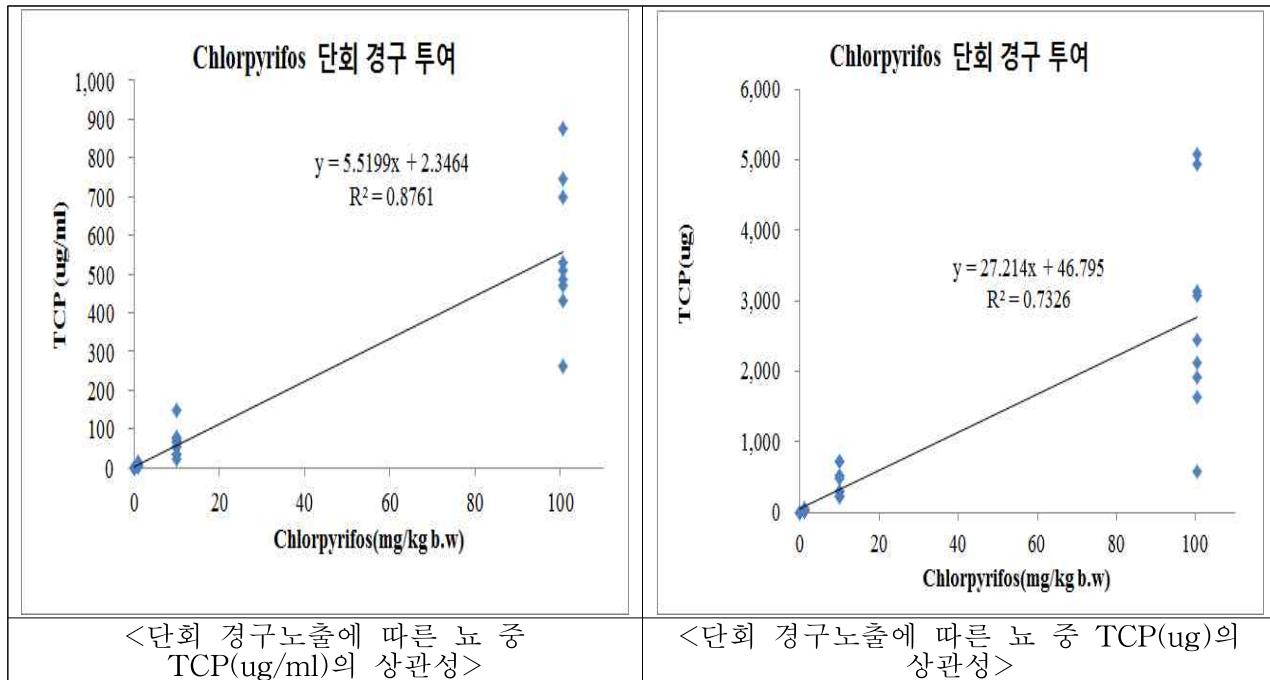
(나) deltamethinr의 뇨 중 대사체인 3-PBA 함량

Route of administration	Groups	Dose of deltamethrin (mg/kg bw)	3-PBA			
			Mean (μg/ml)	SD (μg/ml)	Mean (μg)	SD (μg)
Oral	control (n=13)	0	ND	ND	ND	ND
	Low (n=8)	0.0705	0.019	0.004	0.153	0.034
	Medium (n=9)	0.705	0.086	0.042	0.566	0.331
Dermal	High (n=11)	7.05	1.206	0.860	6.245	2.408
	control (n=8)	0	ND	ND	ND	ND
	Low (n=10)	0.0705	0.004	0.005	0.026	0.030
	Medium (n=11)	0.705	0.027	0.013	0.222	0.106
	High (n=12)	7.05	0.307	0.194	2.982	2.333

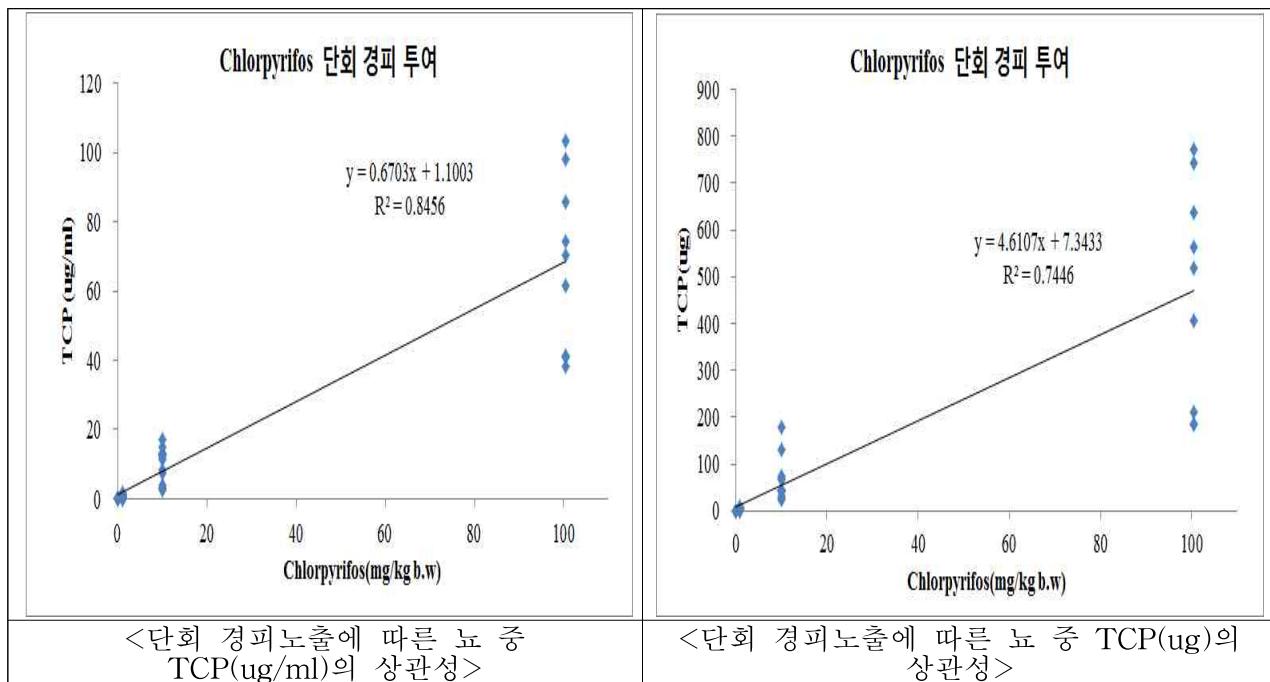
(4) 급성 농약노출과 뇨 중 대사체 배출량의 상관성 확인

(가) 급성 chlorpyrifos 노출과 뇨중 TCP 배출량의 상관성

- ① 경구 노출 : 단회 경구노출에 따른 뇨 중 TCP는 농도(ug/ml)와 함량(ug)에서 각각 0.8761과 0.7326의 상관성을 보였다.

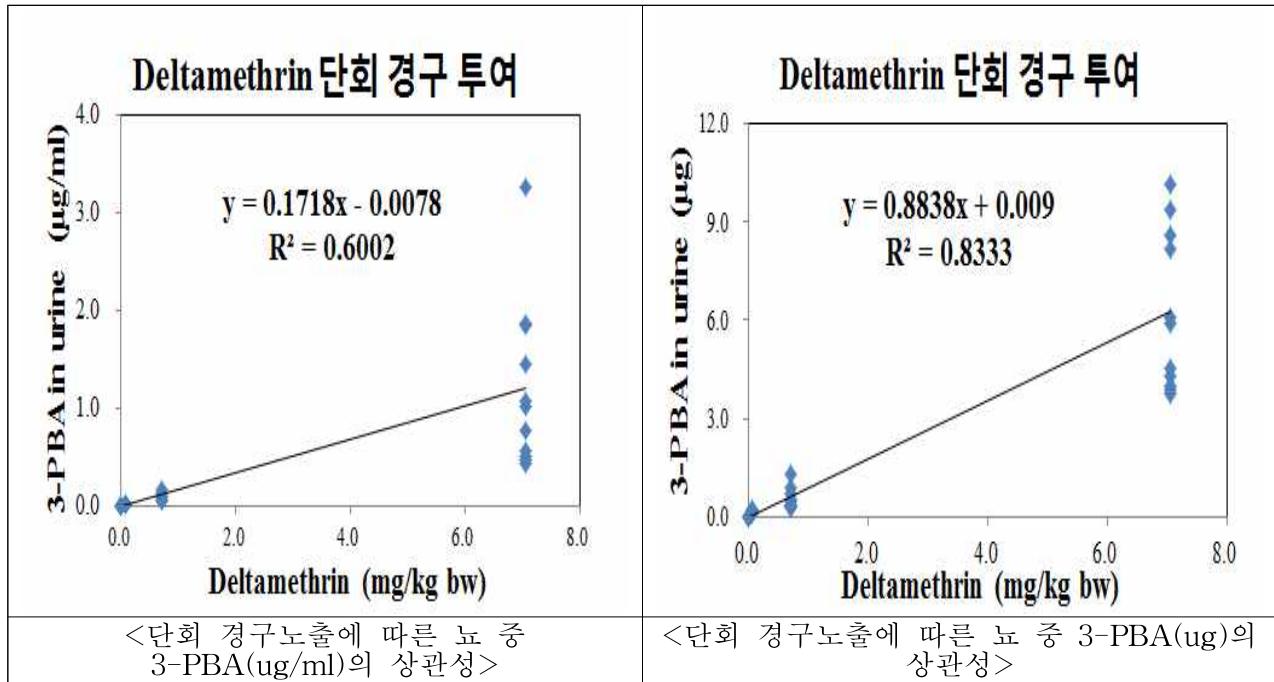


- ② 경피 노출 : 단회 경피노출에 따른 뇨 중 TCP는 농도(ug/ml)와 함량(ug)에서 각각 0.8456과 0.7446의 상관성을 보였다.

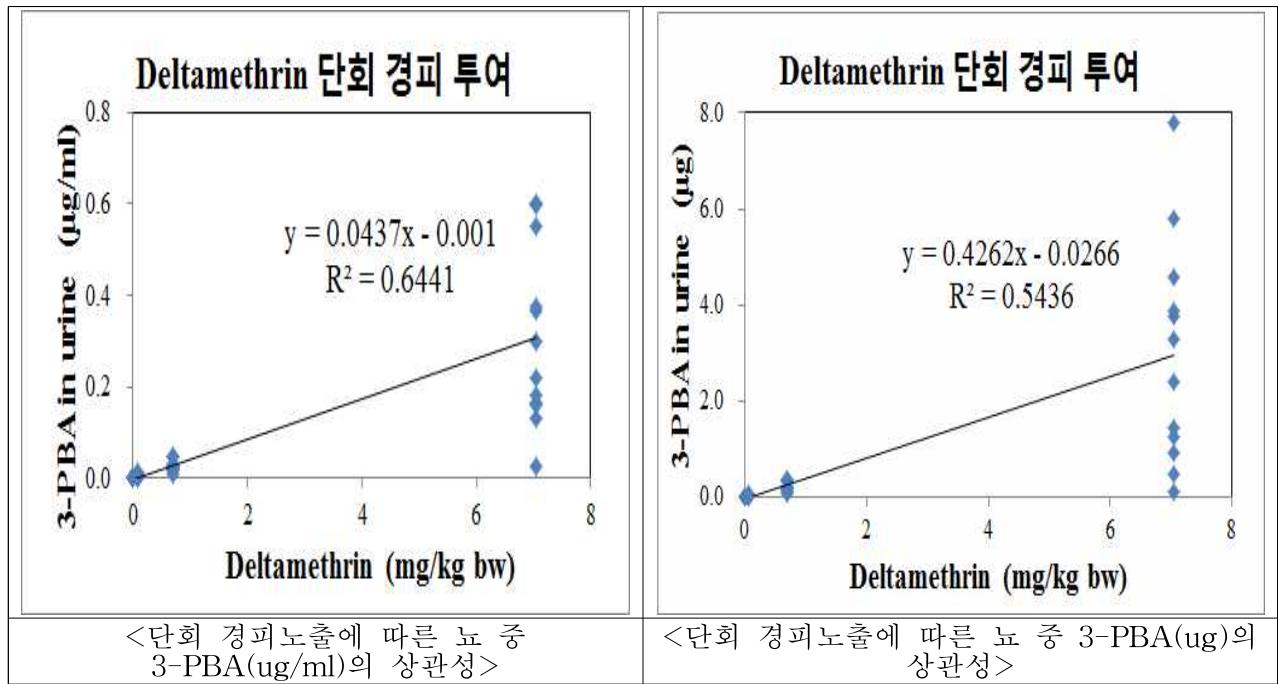


(나) 급성 deltamethrin 노출과 뇨중 3-PBA 배출량의 상관성

- ① 경구 노출 : 단회 경구노출에 따른 뇨 중 3-PBA는 농도(ug/ml)와 함량(ug)에서 각각 0.6002와 0.8333의 상관성을 보였다.



- ② 경피 노출 : 단회 경피노출에 따른 뇨 중 3-PBA는 농도(ug/ml)와 함량(ug)에서 각각 0.6441와 0.5436의 상관성을 보임



2. 동물실험을 통한 반복 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성 분석

가. 시험농약 및 농도 선정

- (1) 시험농약(약제) 선정: chlorpyrifos 20% 유제 20%, deltamethrin 1% 유제
- (2) 시험약제 농도 선정: 1차년의 급성 노출량과 저, 중, 고농도 동일 선정

나. 반복 농약노출 시험을 위한 동물시험 및 생체시료 채취

- (1) 반복 농약노출의 경로, 노출량 등 시험조건 선정

(가) 실험동물 : Sprague-Dawley male 7주령

(나) 노출경로: 경구 및 경피

(다) 노출농도: 1차년의 급성 노출량과 동일 선정

① chlorpyrifos 유제 20%

chlorpyrifos 20% 유제						
저농도	a.i. 노출량	1.005 mg/kg bw/day	0.1005 mg	100g		
			0.201 mg	200g	x10마리	total 2.01 mg
중농도	저농도x10 a.i. 노출량	10.05 mg/kg bw/day	1.005 mg	100g		
			2.01 mg	200g	x10마리	total 20.1 mg
고농도	저농도x100 a.i. 노출량	100.5 mg/kg bw/day	10.05 mg	100g		
			20.1 mg	200g	x10마리	total 201 mg

② deltamethrin 유제 1%

deltamethrin 1% 유제						
저농도	a.i. 노출량	0.0705 mg/kg bw/day	0.00705 mg	100g		
			0.0141 mg	200g	x10마리	total 0.141 mg
중농도	저농도x10 a.i. 노출량	0.705 mg/kg bw/day	0.0705 mg	100g		
			0.141 mg	200g	x10마리	total 1.41 mg
고농도	저농도x100 a.i. 노출량	7.05 mg/kg bw/day	0.705 mg	100g		
			1.41 mg	200g	x10마리	total 14.1 mg

(라) 노출기간 및 노출 횟수: 7일 간격 3회 선정

* 각 약제의 사과 안전사용기준 근거

기준작물 (작물)	적용병해충	사용적기 및 방법	사용량		안전사용		사과글나방 피해일 발생초기, 경엽처리	1,000㎖(30ℓ) 주
			10a당	회석배수	시기	횟수		
감귤	이세리아깍지 벌레	발생초기, 경엽처리		500㎖	21	3		
(감귤)	적용대상 최초등록일	19990624	적용대상 화사등록일	20130221	소위원회 심정회차			
사과	얼말이나방	꽃이 피기 전 및 꽃이 진후 20 일부분(6월말~8월초), 경엽 처리		1,000㎖	7	3		
(사과)	적용대상	~~~~~	적용대상	~~~~~	소위원회			

(2) 반복 농약노출의 동물시험 수행 및 생체시료 채취

(가) 노출방법

① 경피노출: 농작업자의 KoPOEM 노출량 산정에 이용되는 6h 간 피부노출

* 농작업자의 농약살포 시 노출경로인 흡입노출은 실험실의 제약으로 1차년도에 경구 노출로 대체하였으나, 1차년도의 경구노출에 따른 동물의 임상적 상태가 급격히 나빠져 반복노출은 부적절한 것으로 생각되어 반복 농약노출 시험에서는 노출경로를 경피로만 시행

(나) 시료채취: 7일 간격 3회 노출하며, 노출 후 24시간동안의 농시료 채취

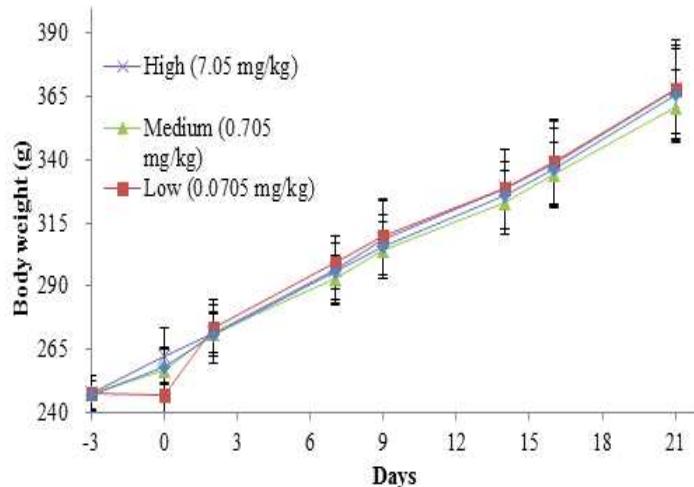


(3) 반복 경피 농약노출시험의 뇨시료 중 대사체 분석 및 노출상관성 확인

(가) 반복 경피 농약노출시험의 뇨시료 중 대사체 분석: 1차년도 방법과 동일

(나) 반복 경피 농약노출시험의 뇨시료 중 대사체 함량

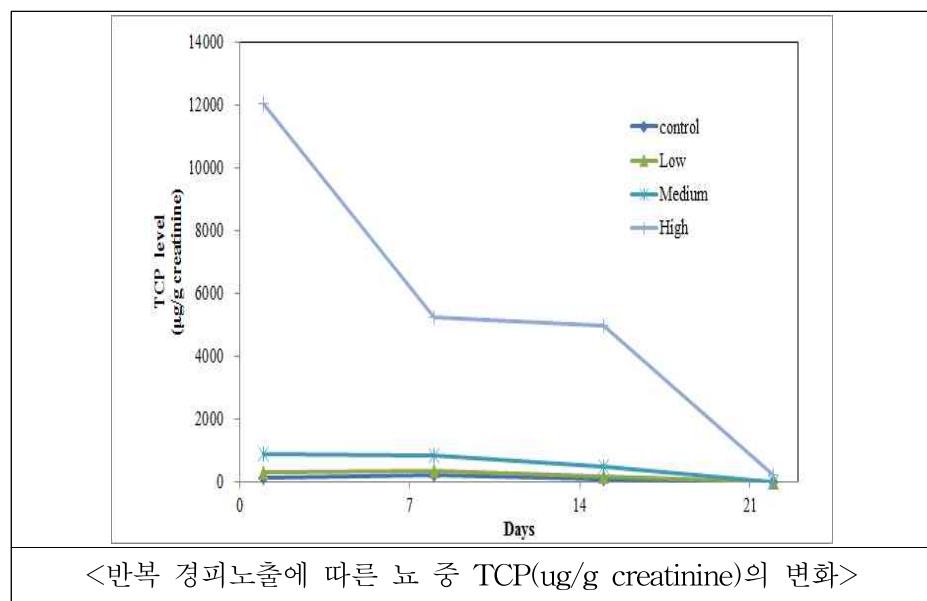
① 체중은 시험 전 기간 중 시험군간 체중변화는 유의적인 차이가 없었다.



(나) chlorpyrifos의 뇨 중 대사체인 TCP 함량(ug/g creatinine)

chlorpyrifos의 반복 경피노출에 따른 뇨 중 TCP의 배설량은 동일한 노출량의 노출 횟수가 증가하더라도 노출 직후 뇨 중 배설량이 점차 감소하는 경향을 보였다.

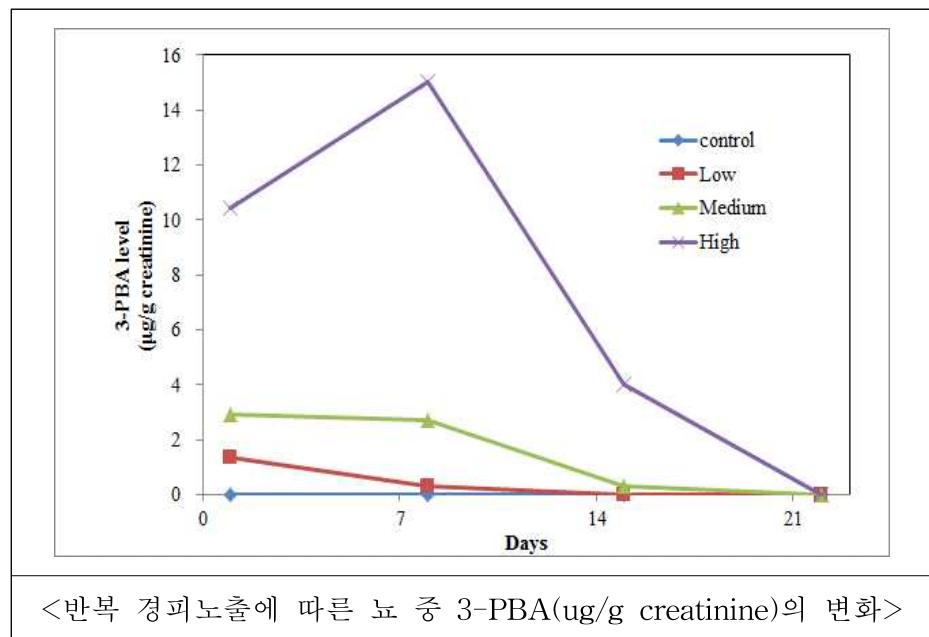
Groups	control		Low		Medium		High		
	days	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
1	137.6	24.9		279.9	60.4	857.3	284.2	12037.7	6060.4
8	229.2	76.0		339.9	53.0	815.9	223.1	5242.2	3196.7
15	86.8	9.0		149.4	20.5	456.0	124.4	4973.3	1802.7
22	0.0	0.0		0.0	0.0	3.2	5.0	224.3	118.7



(다) deltamethrin의 뇨 중 대사체인 3-PBA 함량(ug/g creatinine)

deltamethrin의 반복 경피노출에 따른 뇨 중 3-PBA의 배설량은 고농도시험군에서 2차노출시 뇨 중 배설량이 급격히 증가하였다가 3차 노출시 다시 감소하였다. 반면, 중농도 및 저농도에서는 노출횟수가 증가하더라도 뇨 중 배설량은 계속적으로 감소하는 경향을 보였다.

Groups days	control		Low		Medium		High	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
1	0.0	0.0	1.4	0.4	2.9	1.3	10.4	6.6
8	0.0	0.0	0.3	0.3	2.7	2.1	15.0	8.9
15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.9	4.0	3.1
22	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

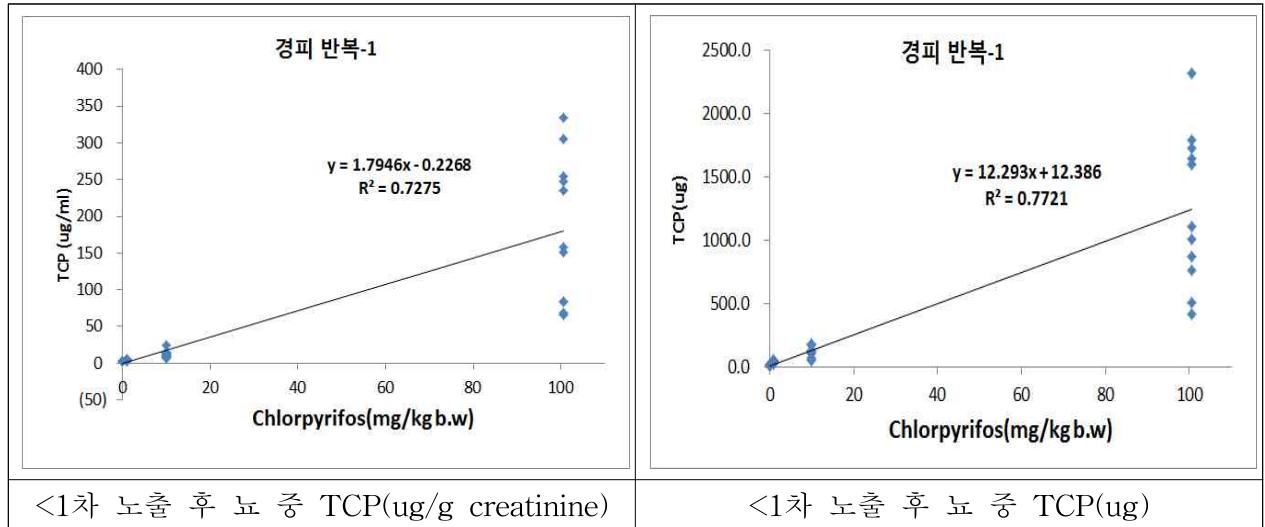


(4) 반복 경피 농약노출과 뇨 중 대사체 배출량의 상관성 확인

(가) 반복 경피 chlorpyrifos 노출과 뇨중 TCP 배출량의 상관성

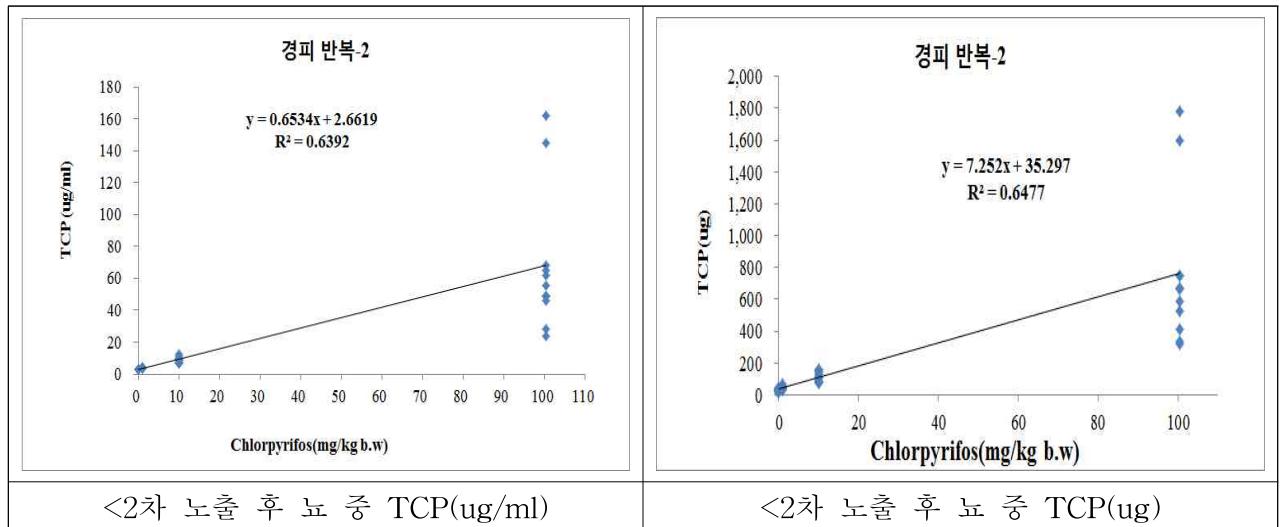
① 1차 노출과 뇨중 TCP 배출량의 상관성

1차 chlorpyrifos 경피노출에 따른 뇨 중 TCP는 농도(ug/ml)와 함량(ug)의 상관성이 0.7275와 0.7721을 나타내었다. 이는 1차년의 단회 경피노출에 따른 상관관계인 0.8456과 0.7446과 유사한 수준이었다.



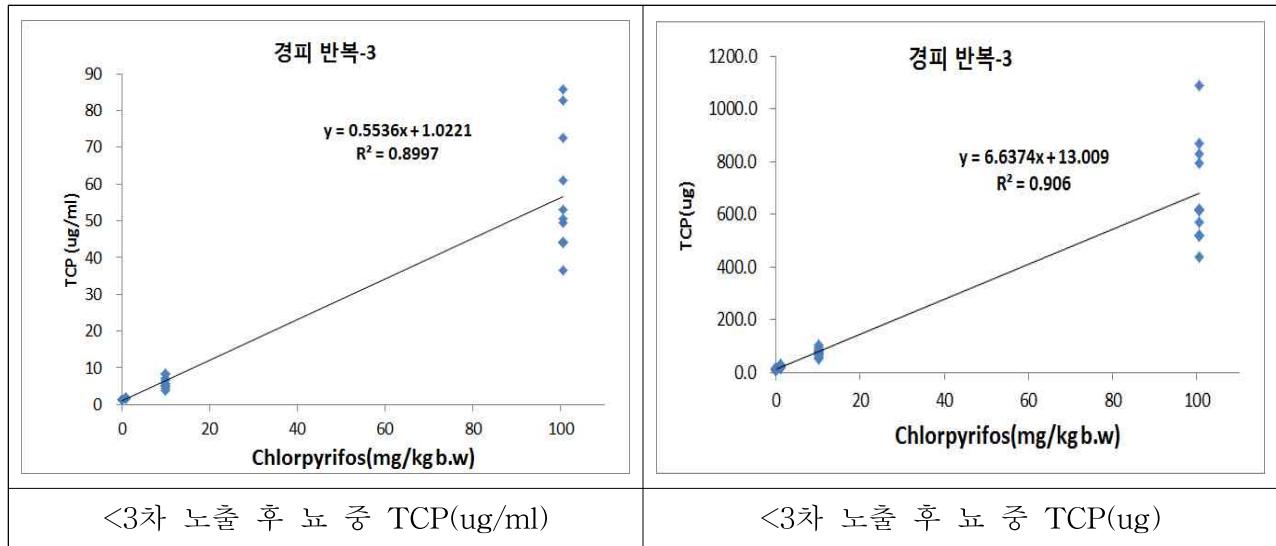
② 2차 노출과 뇨중 TCP 배출량의 상관성

2차 chlorpyrifos 경피노출에 따른 뇨 중 TCP는 농도(ug/ml)와 함량(ug)의 상관성이 0.6392와 0.6477을 나타내었다.



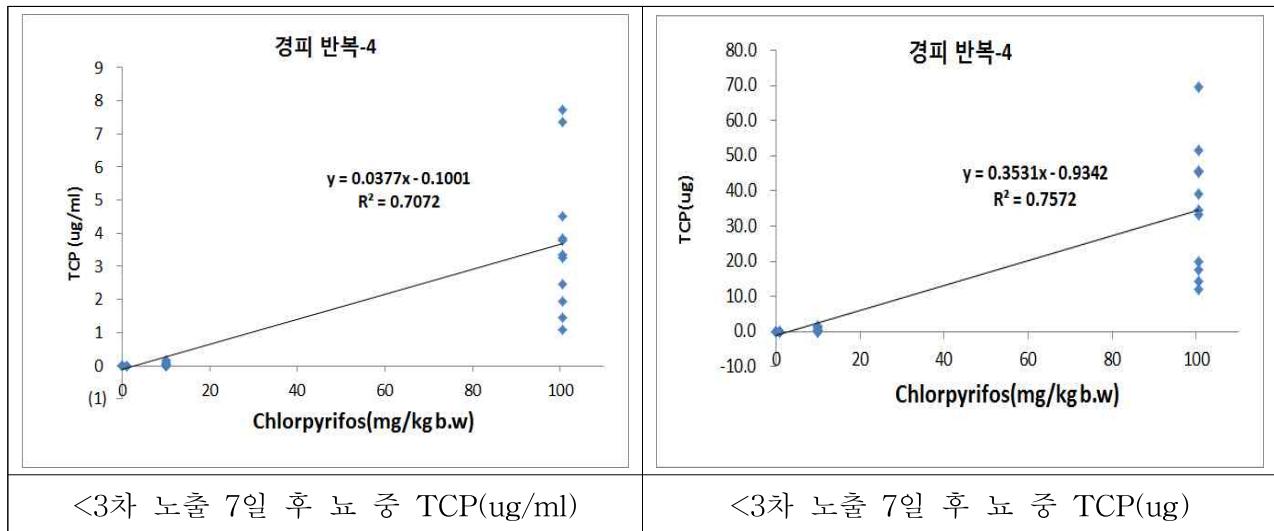
③ 3차 노출과 뇨 중 TCP 배출량의 상관성

3차 chlorpyrifos 경피노출에 따른 뇨 중 TCP는 농도(ug/ml)와 함량(ug)의 상관성이 0.8997와 0.906을 나타내었다.



④ 3차 노출 7일 후 뇌중 TCP 배출량의 상관성

chlorpyrifos의 3차 경피노출 7일 후 뇌 중 TCP는 농도(ug/ml)와 함량(ug)의 상관성이 0.70727와 7572을 나타내었다.



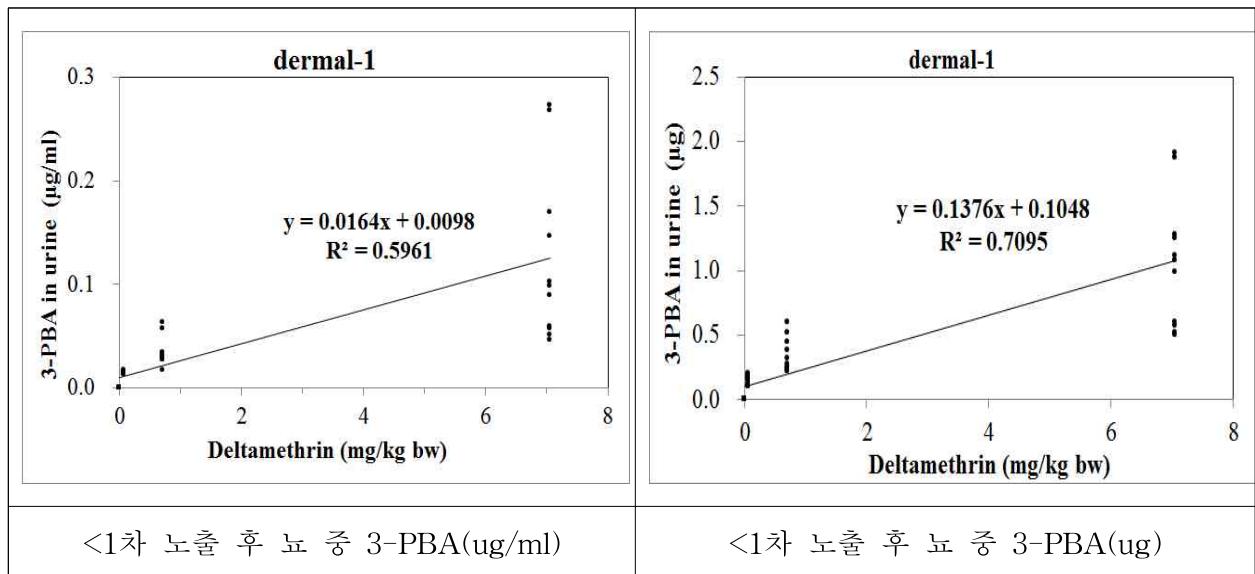
⑤ 결론

chlorpyrifos의 반복 경피 노출시 뇌 중 TCP 배설량의 상관성은 노출횟수 3회차에 더욱 증가하였다가 3차 노출 7일 후부터 감소하는 경향을 보였다.

(나) 반복 경피 deltamethrin 노출과 뇨 중 3-PBA 배출량의 상관성

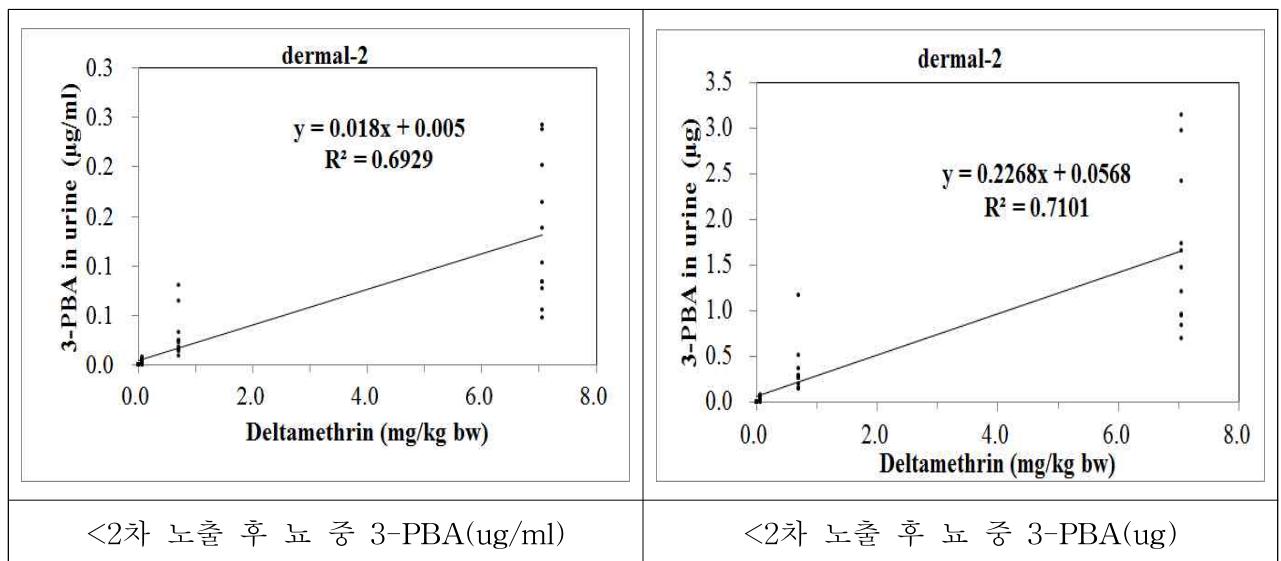
① 1차 노출과 뇨 중 3-PBA 배출량의 상관성

1차 deltamethrin 경피노출에 따른 뇨 중 3-PBA는 농도(ug/ml)와 함량(ug)의 상관성이 0.5961와 0.7095을 나타내었다. 참고로, 1차년의 단회 경피노출에 따른 상관관계은 각각 0.6441과 0.5436 수준이었다.



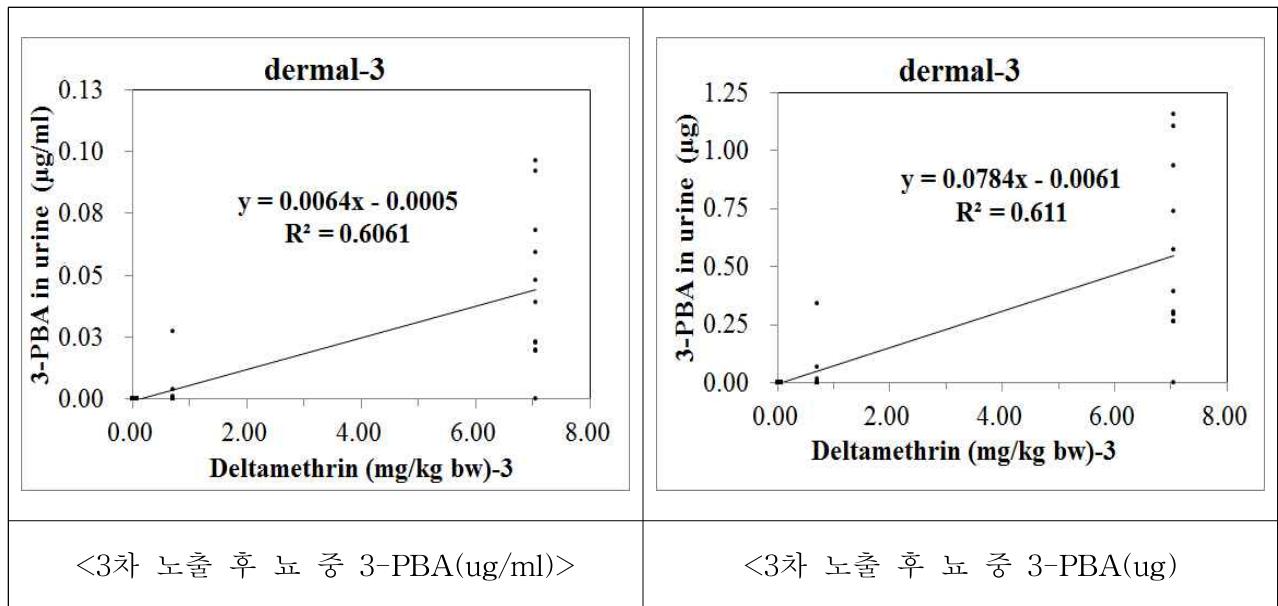
② 2차 노출과 뇨중 3-PBA 배출량의 상관성

2차 deltamethrin 경피노출에 따른 뇨 중 3-PBA는 농도(ug/ml)와 함량(ug)의 상관성이 0.6929와 0.7101을 나타내었다.



③ 3차 노출과 뇨중 3-PBA 배출량의 상관성

3차 deltamethrin 경피노출에 따른 뇨 중 3-PBA는 농도(ug/ml)와 함량(ug)의 상관성이 0.6061과 0.611을 나타내었다.



④ 3차 노출 7일 후 뇨중 3-PBA 배출량의 상관성 : 불검출

⑤ 결론

deltamethrin의 반복된 경피 노출시 뇨 중 3-PBA 배설량의 상관성은 노출횟수가 반복되어도 상관성을 일정하게 유지하였다.

3. 농작업자 단기 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출상관성 분석

가. 시험농약 및 농도 선정

(1) 시험농약 : deltamethrin

(2) 시험약제 ; deltamethrin·thiodicarb(1+30) 액상수화제

나. 단기 deltamethrin 노출 농작업자의 뇨시료 채취

(1) 단기 deltamethrin 노출시험 위한 농작업자 농약살포 실시

* 포도에 deltamethrin·thiodicarb(1+30) 액상수화제 1,000배 살포(10a당)



(2) 단기 deltamethrin 노출시험 위한 농작업자 뇨시료 채취

(가) 대조군 및 시험군의 농약살포 전 및 농약살포 다음날 아침 첫소변 채취

살포 일	H1		H2		H4			
	control	sample	control	sample	control	sample	control	sample
1회	D_H1-1-C	D_H1-1-S	D_H2-1-C	D_H2-1-S	D_H3-1-C	D_H3-1-S	D_H4-1-C	D_H4-1-S
2회	D_H1-2-C	D_H1-2-S	D_H2-2-C	D_H2-2-S	D_H3-2-C	D_H3-2-S	D_H4-2-C	D_H4-2-S
3회	D_H1-3-C	D_H1-3-S	D_H2-3-C	D_H2-3-S	D_H3-3-C	D_H3-3-S	D_H4-3-C	D_H4-3-S
4회	D_H1-4-C	D_H1-4-S	D_H2-4-C	D_H2-4-S	D_H3-4-C	D_H3-4-S	D_H4-4-C	D_H4-4-S

다. 단기 deltamethrin 노출 농작업자의 뇌시료 중 3-PBA 분석 및 노출상관성 확인

- (1) 단기 deltamethrin 노출 농작업자 뇌시료 중 3-PBA 분석: 1차년도 방법과 동일하다.
- (2) 단기 deltamethrin 노출 농작업자의 뇌시료 중 3-PBA 함량
- (3) 단기 deltamethrin 노출 농작업자의 농약 노출량 산정

(가) KoPOEM을 이용한 deltamethrin의 농약노출량 산정 : 0.000833 mg/kg/day
산정하였다. 이는 흡수율 10%를 적용하지 않은 실제 노출량이다.

* deltamethrin · triiodicarb(1+30) 액상수화제의 표준살포량(예: 과수 1,000m²
에 450L 적용) 및 사용약량(1,000배 살포(10g당))에 근거

Application method	Motor sprayer-high level target		deltamethrin 1%
Product			Active substance
Formulation type	water-based	a.s. concentration	10 mg/ml
Dermal absorption from product	5 %	Dermal absorption from spray	10 %
Container	1 litre any closure		
PPE during mix/loading	None	PPE during application	Gloves and impermeable coverall
Dose	5 l/ha	Work rate/day	0.00108 ha
Application volume	5000 l/ha	Duration of spraying	0.034 h
EXPOSURE DURING MIXING AND LOADING 계조, 준비 단계 노출			
Container size 용량, 규격	1 litres		
Hand contamination/operation 계조 시 손오염량	0.01 ml		
Application dose 계조량	5 litres product/ha		
Work rate 작업량	0.00108 ha/day		
Number of operations 작업 수	1 /day	작업량*살포량/500	
Hand contamination 손오염량/day	0.01 ml/day	계조 시 손 오염량*작업 수	
Protective clothing 보호장비	Gloves and im		
Transmission to skin 피부 흡수율	100 %		
Dermal exposure to formulation 피부 노출량	0.01 ml/day	손오염량*피부 흡수율/100	
DERMAL EXPOSURE DURING SPRAY APPLICATION 살포 시 노출			
Application technique 사용기기	Motor sprayer-high level target		
Application volume 사용량	5000 spray/ha		
Volume of surface contamination 오염 면적	50 ml/h		
Distribution 분포도	Hands Trunk Legs		
Clothing 보호장비, 의복	10% Gloves impermeable	65% Impermeable	25%
Penetration 침투율	10% 5%	5% 5%	
Dermal exposure 피부 노출량	0.5	1.6	0.625 ml/h
Duration of exposure 노출 시간	0.034 h		오염 면적*분포도*침투율
Work rate/day	0.00108 ha		
Total dermal exposure to spray 살포 시 총 피부 노출	0.00010098 ml/day	노출 시간*(각 피부노출량의 합)*작업 면적	
ABSORBED DERMAL DOSE 피부 흡수량			
Dermal exposure 피부 노출량	Mix/load Application	0.00010098 ml/day	
Concen. of a.s. product or spray 활성물질 농도	0.01 ml/day	0.01 mg/ml 계조량*활성물질 농도/사용량	
Dermal exposure to a.s. 활성물질 피부 노출량	10 mg/ml	1.0098E-06 mg/day 피부노출량*활성성분 농도	
Percent absorbed 흡수율	0.1 mg/day	5 % 10 %	
Absorbed dose 흡수량	0.005 mg/day	1.0098E-07 mg/day 활성성분 피부 노출량*흡수율/100	
INHALATION EXPOSURE DURING SPRAYING 살포 시 호흡노출량			
Inhalation exposure 호흡노출량	0.01 ml/h		
Duration of exposure 노출 시간	0.034 h		
Work rate/day	0.00108 ha		
살포 시 총 호흡 노출량	3.672E-07 ml/day		
Concentration of a.s. in spray 활성물질 농도	0.01 mg/ml		
Inhalation exposure to a.s. 활성물질 호흡량	3.672E-09 mg/day	호흡노출량*노출시간*활성물질 농도*살포면적	
Percent absorbed 흡수율	100 %		
Absorbed dose 흡수량	3.672E-09 mg/day	활성물질 호흡량*흡수율/100	
PREDICTED EXPOSURE 예상 노출량			
Total absorbed dose 총 흡수량	0.00050001 mg/day	계조, 준비 피부 흡수량+살포 시 피부 흡수량+살포 시 호흡 흡수량	
Operator body weight 작업자 체중	60 kg		
Operator exposure 작업자 흡수량	0.00000833 mg/kg bw/day	총 흡수량/체중	

(4) 단기 deltamethrin 노출 농작업자의 뇨시료 중 3-PBA 배출량의 상관성 확인

(가) 뇨 중 3-PBA 함량

뇨 중 3-PBA의 검출량의 경향이 전혀 나타나지 않았기에, 농업자의 deltamethrin 살포량 대비 뇨중 3-PBA 배설량과의 유의적인 차이는 나타나지 않는 것으로 생각된다.

① 기준단위가 ng/ml 인 경우

<Urinary 3-PBA analysis (ng/ml)>

차수	H1		H2		H3		H4	
	control	sample	control	sample	control	sample	control	sample
1차	N.D	0.806	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
2차	N.D	N.D	0.165	0.542	N.D	0.105	1.101	1.002
3차	N.D	N.D	0.318	N.D	N.D	N.D	N.D	0.173
4차	0.204	N.D	0.237	N.D	0.455	0.140	0.155	0.207

② 기준단위가 ng/g creatinine 인 경우

<Urinary 3-PBA analysis (ng/g creatinine)>

차수	H1		H2		H3		H4	
	control	sample	control	sample	control	sample	control	sample
1차	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
2차	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
3차	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
4차	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 : 목표대비 달성도

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1. 1차년도 연구목표에 따른 연구 성과

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
1) 농약 피부흡수율 시험법 구축을 위한 OECD, EU 등 시험법 비교 검토	30	<ul style="list-style-type: none"> OECD, EFSA, USPEA 등 국제 기구의 가이드라인을 바탕으로 국내 적용 가능한 피부흡수율 시험법을 규정함 	100
2) 농약 피부노출량 평가를 위한 생체 외 실험 모델 구축	40	<ul style="list-style-type: none"> 국제기구의 가이드라인을 바탕으로 생체외 실험모델을 구축함 	100
3) 구축한 생체 외 피부흡수율 시험법의 적용 시 확인 시험	30	<ul style="list-style-type: none"> 대표적 기준물질인 caffeine을 대상으로 한 흡수율 실험을 통하여 이전에 출판된 문헌과 유사한 결과가 도출됨을 확인함 chlorpyrifos를 사용한 피부흡수율 실험을 실시하여 결과 값은 제시함 	100
	100%		100%

2. 2차년도 연구목표에 따른 연구 성과

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
1) 농약의 피부노출을 위한 생체내 흡수율 및 피부 투과율 평가모델 구축	30	<ul style="list-style-type: none"> 구축한 실제 평가모델을 랜드에 적용하여 흡수율을 피부분포도 및 흡수율을 측정함. 	100
2) 농약의 흡입노출을 통한 생체 노출량 평가 모델 구축	30	<ul style="list-style-type: none"> OECD, EFSA, USEPA등 국제기구의 가이드라인을 바탕으로 국내 적용 가능한 피부흡수율 평가모델을 구축함 	100
3) 확립한 시험법을 이용한 농약의 피부 /흡입 노출을 통한 생체 노출량 평가	40	<ul style="list-style-type: none"> 구축한 실제 평가모델을 랜드에 적용함으로써 Chlorpyrifos의 피부 투과율을 확인함 	100
	100%		100%

3. 3차년도 연구목표에 따른 연구 성과

당초 목표	가중 치 (%)	개발 내용	달성 도 (%)
1) 농약 제품 특성별, 노출 조건별 피부노출량 평가모델 구축	30	<ul style="list-style-type: none"> • 농약 성분과 제품별 피부흡수율 비교 조사 • 농약 제품별 농약 사용조건 비교 조사 • 농약 제품에 적용 가능 피부 흡수율 시험모델 구축 및 적용시험 	100
2) 농약 제품별, 노출 조건별 흡입노출량 평가모델 구축	30	<ul style="list-style-type: none"> • 농약의 흡입노출에 의한 농작업자 노출량 평가방법 및 국제적 동향 조사 • 농약 제품의 흡입노출 평가 모델 구축 	100
3) 농약 제품의 피부·흡입 노출량 평가 및 위해성평가 가이드라인 개발	40	<ul style="list-style-type: none"> • 농약 제품의 피부·흡입 노출에 따른 체내 노출량 산출 및 농작업자 위해성평가 • 농약 제품의 특성별, 용법별 체내 노출량 산정 방법 확립 • 농작업자의 농약에 대한 흡입 노출량, 생체 피부노출량 평가 및 농작업자 위해성 평가를 위한 표준 시험법 확립 	100
	100%		100%

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1. 의약품, 화장품의 개발에서는 동물 대체 시험법에 투자 및 연구가 활발히 이루어지고 있지만, 농약 분야에서는 독성 대체법 연구, 개발이 여전히 미비함. 그러므로 농약 성분을 이용하여 그 독성 기전과 이를 기반한 빠르고 효율적인 대체법 개발은 개척이 필요한 부분임. 본 연구는 아직 연구가 미흡한 주 노출 장기를 타겟으로 유전자를 이용한 독성 평가 부분에서 농약의 독성기전에 기초한 대체시험법, 피부와 호흡기 질환 관련 독성 예측을 위한 스크리닝 방법을 개발하여 큰 의미를 가짐.

2. 1차년도 연구목표에 따른 연구 성과

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
농약의 피부 독성 평가를 위한 세포 및 마커 발굴 • <i>in vitro</i> 대체법 독성실험에 사용 될 사람 유래의 피부 세포주 선정 및 자료 조사 • 화학 분류별 농약 선정 및 피부 염증 관련 standard chemical 선정 • 자료 조사, signal pathway, Q-PCR array 등을 응용한 피부 관련 질환, 세포 사멸 기전 또는 세포 소기관 관련 등 농약 독성 마커 발굴	40	<ul style="list-style-type: none"> 피부 세포, 피부 노출에 의한 독성 관련 자료 조사 및 피부 염증관련 standard chemical 확보 조사된 자료를 토대로 사람 피부 상피세포주인 HaCaT을 선정하여 <i>in vitro</i> 대체법 연구에 적용 농약의 세포노출에 따른 functional guidance bioindicator로써 TSLP, CCL17, CCL27을 선정하여 농약 노출에 의한 피부질환의 변화 패턴 스크리닝에 활용 	100
피부 독성 high throughput screening system 구축 • 마커 유전자에 대한 promotor 정보 조사 및 cloning • luciferase reporter gene cloning • 기능 평가 및 stable cell line 구축	60	<ul style="list-style-type: none"> 조사된 자료를 토대로 promoter-luciferase vector를 클로닝하여 렌티바이러스 제작 및 선정된 세포주를 활용하여 stable cell line 구축 농약 물질에 의한 발굴된 유전자의 발현 변화 확인 및 luciferase reporter gene assay로 변화 패턴 스크리닝. 이를 바탕으로 피부 세포주를 이용한 <i>in vitro</i> high throughput system 개발 	100
	100		

3. 2차년도 연구목표에 따른 연구 성과

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
농약의 호흡기 독성 평가를 위한 세포 및 마커 발굴 • <i>in vitro</i> 대체법 독성실험에 사용될 사람 유래의 호흡기 세포주 선정 및 자료 조사 • 화학 분류별 농약 선정 및 호흡기 독성 관련 standard chemical 선정 • 자료 조사, signal pathway, Q-PCR array 등을 응용한 호흡기 관련 질환, 세포 사멸 기전 또는 세포 소기관 관련 등 농약 독성 마커 발굴	40	<ul style="list-style-type: none"> 호흡기계 세포, 호흡기 독성 관련 자료 조사 및 호흡기 질환관련 standard chemical 확보 조사된 자료를 토대로 사람 유래 기관지 상피 세포주인 16HBE14o-를 선정하여 <i>in vitro</i> 대체법 연구에 적용 농약의 세포노출에 따른 functional guidance bioindicator로써 ORMDL3, RAC1, ADAM33, PER2를 선정하여 농약 노출에 의한 호흡기 질환의 변화 패턴 스크리닝에 활용 	100
호흡기 독성 high throughput screening system 구축 • 마커 유전자에 대한 promotor 정보 조사 및 cloning • luciferase reporter gene cloning • 기능 평가 및 stable cell line 구축	60	<ul style="list-style-type: none"> 조사된 자료를 토대로 promoter-luciferase vector를 클로닝하여 렌티바이러스 제작 및 선정된 세포주를 활용하여 stable cell line 구축 농약 물질에 의한 발굴된 유전자의 발현 증가 확인 및 luciferase reporter gene assay로 변화 패턴 스크리닝. 이를 바탕으로 호흡기 세포주를 이용한 <i>in vitro</i> high throughput system 개발 	100
	100		

4. 3차년도 연구목표에 따른 연구 성과

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
피부/호흡기에 대한 농약의 <i>in vitro</i> high throughput screening (HTS) 모델 평가.	40	농약에 의한 피부 및 호흡기 질환관련 대표적 유전자와 각 세포주를 이용해 luciferase reporter gene assay를 통한 <i>in vitro</i> high throughput screening 모델 평가 및 농약 독성 스크리닝에 활용 가능성 확인.	100
화학 분류별로 선정된 농약들의 표적장기세포에서의 HTS 결과에 대한 체계적 농약 독성 자료 확보.	30	종류별로 선정된 농약들을 처치하여 표적 장기세포에서의 HTS 결과에 대한 농약 독성 스크리닝 결과 등 연구 자료 확보.	100
확보된 연구 결과와 독성평가지표를 활용한 농약의 피부/호흡기 독성 기전 연구.	30	확보된 연구 결과를 바탕으로 농약의 피부/호흡기 세포 내 독성 기전 연구.	100
	100		

5. 기술적 측면에서 기대성과

- 가. 동물복지 및 3R 원칙의 중요성이 증가함에 따라, *in vitro* 대체 독성법 개발에 기여.
- 나. 신속한 농약 독성 평가법 개발을 토대로 국내 대체법 기술 선진화에 기여.
- 다. 농약의 주 노출장기를 대상으로 한 독성 평가에 신뢰성 있는 연구자료 확보로 피부, 호흡기 질환 *in vitro* 연구 모델 제시.
- 라. 농약 노출의 영향, 타겟 장기 독성, 농약 위해성 관련 연구 수준 증진 및 국책 기술의 발전에 기여.
- 마. 농약의 안전 사용기준 설정 및 위해성 평가에 일조 가능.
- 바. 국민 보건을 위해 농약 외에 생활 속에서 주로 노출되는 독성물질에도 본 대체법 활용 가능성 제고.

6. 경제적 · 산업적 측면에서 기대성과

- 가. 농약 노출 및 영향을 예측 또는 파악하고 그에 대한 지식을 바탕으로 체계적으로 농약을 관리하여 피부, 호흡기 질환 등의 농약 노출 부작용으로 인한 사회적, 경제적 손실 감소.
- 나. 새로운 농약의 개발 또는 수입 후 등록시, 본 독성 대체법을 농약 등록을 위한 자료 중 하나로 활용 가능.
- 다. 관련 기관에 기술이전시 물질의 독성 평가 분야에서 산업적으로 기여 가능.
- 라. 농약 안전관리를 위한 독성 평가, 분석 결과로 제시하여 농약의 안전사용을 위한 지도 및 교육, 홍보 강화에 활용 가능.

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
1) 동물실험을 통한 급성 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성 분석	40	1) 급성 농약노출 시험을 위한 동물시험 및 생체시료 채취 2) 급성 농약노출시험의 생체시료 중 바이오마커 분석 및 노출 상관성 규명	100
2) 동물실험을 통한 반복 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성 분석	40	3) 반복 농약노출 시험을 위한 동물시험 및 생체시료 채취 4) 반복 농약노출시험의 생체시료 중 바이오마커 분석 및 노출 상관성 규명	100
3) 농작업자 대상 단기 농약노출시 생체 바이오마커 분석 및 노출량과의 상관성 분석	30	5) 단기 농약노출 농작업자의 생체시료 채취 6) 농작업자의 생체시료 중 바이오마커 분석 및 노출상관성 규명	100
	100%		100

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

제1절 : 연구결과의 활용 계획

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1. 본 연구를 통하여 확립된 농작업자의 농약 노출 평가 및 위해성 평가를 통하여 농작업자의 위해성 평가 결과의 신뢰성 제고
2. 농약의 피부흡수율 시험법 확립으로 농작업자 농약 노출 평가의 국제화 및 표준화
3. 농작업자의 농약에 대한 노출량 확인을 통하여 농약의 안전 사용법 제공 및 불안감 해소
4. 농약의 농작업자 안전성 평가 기반 구축으로 농약에 의한 농작업자 위해사고 예방

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1. 본 연구로 개발된 농약의 피부, 호흡기 독성 예측 기법은 국내 대체법 기술 확보에 기여하여 과학적 국가경쟁력을 향상시킬 수 있음.
2. 농약 노출 영향의 측정을 위한 대체시험법 개발로, 산업재산권 출원을 바탕으로 한 산업적인 이용 가치를 가질 수 있음. 하지만 더 정확하고 신뢰성 있는 시스템 및 결과 확보를 위해 추가 연구가 고려됨.
3. 농약 제품 개발 또는 수입시 규제 등 안전성 강화를 위한 과학적 근거 자료로 활용되어 농약 허가 지침 설정에 기여 가능.
4. 현재 사용되고 있는 수많은 농약 종류 중 농민의 보건복지상 특히 문제가 되는 농약들을 파악하여 우선적으로 관리해야 할 농약을 선별에 활용 가능.
5. 농약은 농업에서 뿐 아니라 골프장 잔디용, 가로수 및 조경수, 가축전염병 및 주택가 해충 방역 등에도 많이 쓰여 일반 국민들도 농약에 호흡기적으로 많이 노출되고 있으므로, 이들을 대상으로 한 건강영향 평가에도 본 연구의 적용이 고려될 수 있음.

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

1. 농작업자의 농약노출에 따른 생체 대사체의 신속 검출기술 개발

가. 개발내용: 유기인계 농약의 인체내 대사체인 TCP를 신속검출하기 위한 면역분석법
개발의 선행연구로 TCP의 생체반응물질(합텐) 개발

나. 발명 명칭: TCP의 면역분석적 검출에 이용되는 합텐 제조방법

(출원번호 10-2016-0043491, '16.4.8)



- 다. 선행기술과의 차이: 기존 기술에 비해 공정 단순화 및 수율 높아 제조시간과 비용 절감
라. 후속연구: 토끼 중 항체생산을 기완료하였으며, 현재 뇨시료 중 TCP 검출감도 확인 중
마. 기술활용: 농약노출량 예측가능한 뇨 중 대사체 검출용 kit 개발 및 기술이전 가능

제2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

성과지표명	연도	당초 목표 (전체)	실적	달성을 (%)
논문게재	SCI	2	0	0
	비SCI	3	3	100
산업재산권	출원	1	1	100
	등록	0	1	200
학술발표	국제	3	5	167
	국내	5	4	80
기준/지침/규정 작성		0	3	600
계		14	17	178

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

성과지표명		연도	당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)
논문제재	SCI	2	4	200	
	비SCI	4	1	25	
산업재산권	출원	3	2	67	
	등록	-	-	-	
학술발표	국제	5	4	80	
	국내	4	4	100	
기준/지침/규정 작성		-	-	-	
계		18	15	94	

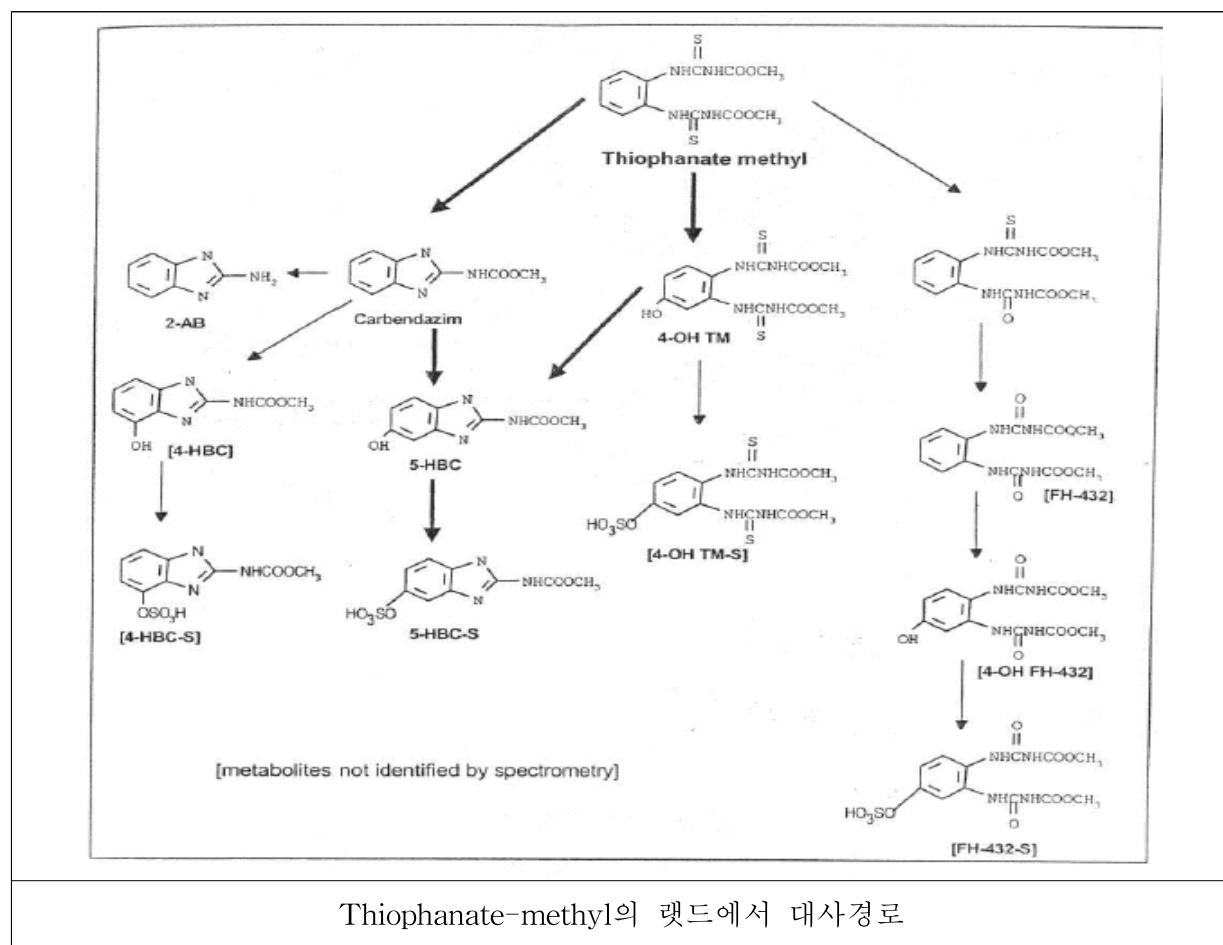
[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

성과지표명		연도	당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)
논문제재	SCI	2	-	-	0
	비SCI	3	4	134	
산업재산권	출원	-	1		
	등록				
학술발표	국제	3	4	134	
	국내	5	5	100	
계		14			92

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

- European Commission, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, FAO, JMPR 등에서는 농약을 통한 소비자 및 농작업자의 건강보호를 위해 농약 성분별 review report를 발간하였다. 대사(흡수, 분포, 대사, 배설), 급성독성, 아만성독성, 유전독성, 만성독성 및 발암성평가, 생식독성, 신경독성, ADI, AOEL, ARfD 및 피부흡수율 등 전반적인 독성에 대한 조사를 통해 농작업자, 근로자 및 구경꾼을 위한 노출시나리오를 설정하여 관리하고 있다.
- FAO 보고서 중 Thiophanate-methyl (077)에 따르면 랫드, 암탉, 염소 등 동물 종에 따른 대사체계 및 분석방법에 대하여 소개하였으며, 랫드에서의 Thiophanate-methyl 대차체는 2-AB, carbendazim 등이 있다(FAO, 1994).



- US-EPA 기준 발암가능 또는 내분비계 장애물질 등으로 phosphamidon, dichlorvos, mancozeb, benomyl 등을 분류하여 사용 중지를 권고하였으며, dichlorvos는 현재 동물에서 쇄장, 유선 및 전립성종양의 발생 빈도 증가의 이유로 인체발암가능물질 (Group B2)로 분류하였다.

4. European Commission의 보고서에 따르면 Chlorpyrifos의 인체 피부흡수율은 1%로 본 연구과제에서 수행한 생체내 피부흡수율인 1.1%와 유사하였다 (European Commission, 2005).
5. 호주직업노출연구(Australian Work Exposures Study)의 조사자료 결과 농약 취급자들이 사용하는 농약 중 2%는 WHO 급성독성기준에서 맹독성으로 분류되었고, 8%는 고독성으로 분류되었다. 또한 IARC 발암성기준에서 group 2A, 2B(인체발암 가능성)로 분류된 농약들도 각각 3%, 2%를 차지하였으며, 제초제 중에서는 IARC group 2A인 글리포세이트가 가장 많이 사용되는 것으로 보고되었다음 (Jomichen J et al., 2016)
6. 농약의 만성노출은 여러 신경계 질환과 관련된 것으로 보고되고 있으며, 그중 특히 파킨슨병은 다른 신경계 질환보다도 가장 연관이 높은 것으로 알려져 있다. 파킨슨병의 위험도를 높이는 농약으로 유기염소제 살충제인 paraquat에 대해 주목하고 있다. 따라서 농약에 의한 신경계 질환의 예방을 위해 역학연구가 필요할 것으로 판단되었다 (Kamel F, 2013)
7. 유럽, 미국 등 선진국에서는 농약으로 인한 농작업자의 건강관리를 위해 농약의 직업적 노출량에 대한 활발한 연구가 진행되고 있으며, 현재 사용되고 있는 농작업자 노출모델은 흡입과 피부노출량을 계산하는 UK-POEM, EURO-POEM, PHED 등이 있으며, 그 밖에 농약 및 세제 등에 따른 노출량 평가하는 프로그램에는 CONSExo, HERA, MCCEM 등이 있다.

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1. 물질의 독성을 평가하기 위해 median lethal dose (LD50)를 산출하거나 skin irritation시험을 하기 위해 많은 실험동물이 사용된다. 요즘, 이러한 기존 독성시험법에 반대하는 윤리적 우려가 증가하고 있다. 1959년 B. Russell과 R. Burch에 의해 3R (Reduction, Replacement, Refinement)개념이 제안된 이래로 (Russell et al., 1959), 동물복지와 윤리적 인식을 기반으로 다양한 독성 대체법이 개발되고 있다. 국제적으로, 배양세포를 사용하는 *in vitro* 시험법과 *in silico* 컴퓨터 분석법 등의 기술적 진보는 실험동물을 사용하는 *in vivo* 시험을 대체하고 있다.
2. 대체 독성 시험법은 크게 *in silico*, *in vivo*, *in vitro* 등 세가지로 분류할 수 있음. *in silico* 시험은 bioinformatics의 출현으로 탄생된 용어로, 컴퓨터 시뮬레이션을 사용하여 생물학적 현상, 약물 디자인 등을 연구하는 방법을 의미한다. 대체법에서 *in vivo* 시험 이란 살아있는 생물체를 사용하되 계통상 더 낮은 종을 사용하거나 수를 줄이거나, 동물복지를 고려하여 최소한의 고통을 주면서 사육 및 실험하는 것을 일컬음. *in vitro* 시험은 인공 조건하에서 조직이나 세포를 이용하여 하는 연구들을 의미. 3R을 충족시키는 *in vitro* 실험들이 농약의 대체 독성법 개발에서 중요한 의미를 지닌다. *in vitro* 시험법은 기존의 *in vivo* 방법들을 넘어, 비용, 노동, 소모품, 폐기물 관리 등에서 다양한 이점을 제공하기 때문이다 (Araújo et al., 2014).
3. 농약 독성 평가를 위해 다양한 독성 연구 분야가 개발되어 왔음. 먼저 농약 노출에 의한 면역체계에의 영향을 평가하기 위한 면역독성법이 있다. 한 예로, Pistl et al은 혈액에서 분리한 phagocyte와 lymphocyte를 이용해 *in vitro* 조건하에서 iodo-nitro-tetrazolium reductase test와 leukocyte migration-inhibition assay를 이용해 농약에 의한 생물학적 변화를 시험하였다. (Pistl et al., 2003)
4. 많이 쓰이는 농약 중 다수는 호르몬 항상성을 교란시켜 생식기계, 내분비기계에 부작용을 유발 시킨다고 알려져 있어 농약의 생식기, 내분비기 영향에 대한 평가가 중요함. Anderson et al은 transactivation assay를 이용해 농약과 estrogen receptor와 androgen receptor간 상호작용에 관해 *in vitro* 실험을 하였다. (Anderson et al, 2003) Chinese hamster ovary cell line을 사용한 *in vitro* reporter gene assay와 CYP19 aromatase activity 억제 시험법이 농약에 의한 생식기계 영향을 스크리닝하기 위한 방법으로 연구된바 있다. (Kojima et al., 2004)
5. 어떤 농약들은 유전독성(genotoxicity)과 돌연변이 유발력(mutagenicity)을 가지고 있다고 보고 된 바 있어 이들에 대한 *in vitro* 평가법도 필요하다. 림프구를 이용한 *in vitro* sister chromatid exchange assay가 농약에 의한 mutagenicity/carcinogenicity를 평가하는데 민감한 방법으로 제안된 바 있다 (Vigfusson and Vyse, 1980). 농약에 의한 DNA damage는 chromosomal aberration 측정과 standard alkaline comet assay로 평가할 수 있으며, 이러한 실험 결과들은 genotoxicity 분석이 직업적, 비직업적 농약 노출 위험성의 중요한 지표로써

- 기능할 수 있음을 제안하였다 (Jamil et al., 2004, Undege and Bacaran, 2005, Das et al., 2007).
6. 또한 genotoxicity 측정법으로, 외부물질에 대한 대사적 활성, 비활성 능력을 가지는 닭 배아 (chicken embryo)가 쓰일 수 있다. 일례로, 닭 배아를 사용한 micronucleus test와 comet assay를 통해 살충제의 genotoxicity 유발 여부를 평가한 연구가 있다 (Vinggaard et al., 2000, Uggini and Suresh, 2013).
 7. 어떤 농약은 agranulocytosis, neutropenia, thrombopenia, 또는 anemia를 유발하는 등 혈액독성을 보이기도 한다. Parent-Massin과 Thouvenot이 사람과 쥐(rat)의 progenitor cells를 사용하여 농약이 혈액 세포에 미치는 독성을 연구하였는데, 혈액독성을 가지고 있다고 알려진 농약이 *in vitro* 상에서도 혈액 세포를 억제하는 결과를 도출하였으며 이는 이러한 기술이 혈액독성을 가진 물질을 예측하거나 평가할 때 유용하게 쓰일 수 있음을 밝혔다 (Parent-Massin and Thouvenot, 1993).
 8. 유기인계와 카바메이트계 등 많은 살충제 계열이 신경독성을 가지고 있다고 알려져 있음. 그러므로 대체 신경독성 평가법은 이러한 농약의 위해 평가에 필수적이다. 신경계 조직 유래 세포의 배양을 통한 *in vitro* 실험은 신경계 발달 및 기능에 대한 세포, 분자적 기전을 밝히고, 신경독성을 가진 농약의 독성 유발 기전을 이해하는데 강력한 방법이 될 수 있다. 세포 배양 시스템을 이용한 *in vitro* model을 통해 농약이 neurite outgrowth, differentiation 등 신경계 발달동안 미칠 수 있는 영향을 평가할 수 있다 (Radio and Mundy, 2008).
 9. 기존의 Draize eye irritancy test를 대체하여, 계란의 chorioallantoic membrane (CAM)에 농약을 노출하여 각 물질의 irritancy를 평가하는 방법이 개발되었다. 이 방법은 대표적인 *in vitro* 대체법으로 시험 시간 및 실험동물 사용의 감소 뿐 아니라 동물 복지 및 윤리관련 문제를 가지지 않는 장점이 있다. 여러 연구를 통해 CAM assay가 *in vivo* Draize eye irritation test 결과와 비슷한 결과를 도출할 수 있다고 밝혀짐 (Kishore et al., 2008). 그러므로 이 방법은 농약에 의한 사람 눈에의 irritation 또는 corrosion 유발 여부를 평가하는데 유용한 방법이 될 수 있다.
 10. 최근 이 개발되어 *in vivo* skin irritation과 sensitization test를 대체하고 있음. nylon mesh 위에 자라는 fibroblast와 keratinocyte를 가진 몇 겹으로 이루어진 3D 인공 인간 피부 모델이 농약의 *in vitro* 피부 독성 평가에 사용된 적 있다 (Triglia et al., 1991). 현재 KeraSkinTM, EpiSkinTM, MelaSkinTM 등 인간 피부 모델이 상용화되어 있다. 화장 품 업계에서는 이 방법이 많이 적용되고 있으며, 농약에서도 향후 새 제품의 허가/출시를 위한 독성 기전 연구 및 위해성 평가를 위한 실험들이 *in vivo* 실험에서 3D 인공 인간 피부 모델의 사용으로 완전히 대체될 것으로 기대된다.
 11. 이러한 실험동물을 사용하지 않은 대체 독성 시험법 접근을 통한 주요한 농약 독성 데이터를 모으는 것이 중요함. 대체 독성 평가법을 개발하려는 과학자들의 끊임없는 노력

이 안전한 농약 개발 및 사용 뿐 아니라 동물과 생태계 보호에도 기여하고 있다.

12. 하지만 여전히 농약의 대체 독성법 관련하여 여러 이슈들에 대한 명확한 대책 및 해결이 필요하다. 대표적인 예가 대체법이 가진 제한점들과 검정 문제이며, 세포 또는 동물에서 노출 농도를 사람 또는 생태계에 적용하는 것에 대한 문제(extrapolation)가 남아있다. 검정된 시스템을 사용한 “me-too” test kit의 개발 및 확보가 시급함. 그러므로 농약 대체독성 평가법의 한계점을 극복하고 확실히 검증된 시스템을 확보하기 위한 노력이 필요하다 (Gupta et al., 2005).

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

해당사항 없음

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

1. 기술적 위험요소 분석

- 농약 또는 실험 시약에 의한 노출 위험을 예방하고자 조제 시 마스크, 장갑, 실험복, 보안경과 같은 개인 보호 장비를 착용하였음

2. 건강검진

- 매년 일반 및 특수 건강 검진을 시행하였음

3. 교육 훈련

- 대학원생, 소속 연구원, 실험 참여 학부생 등을 대상으로 1학기 6시간 온라인과 오프라인으로 안전관리 관련 교육을 이수하였음

4. 정밀 안전진단 실시

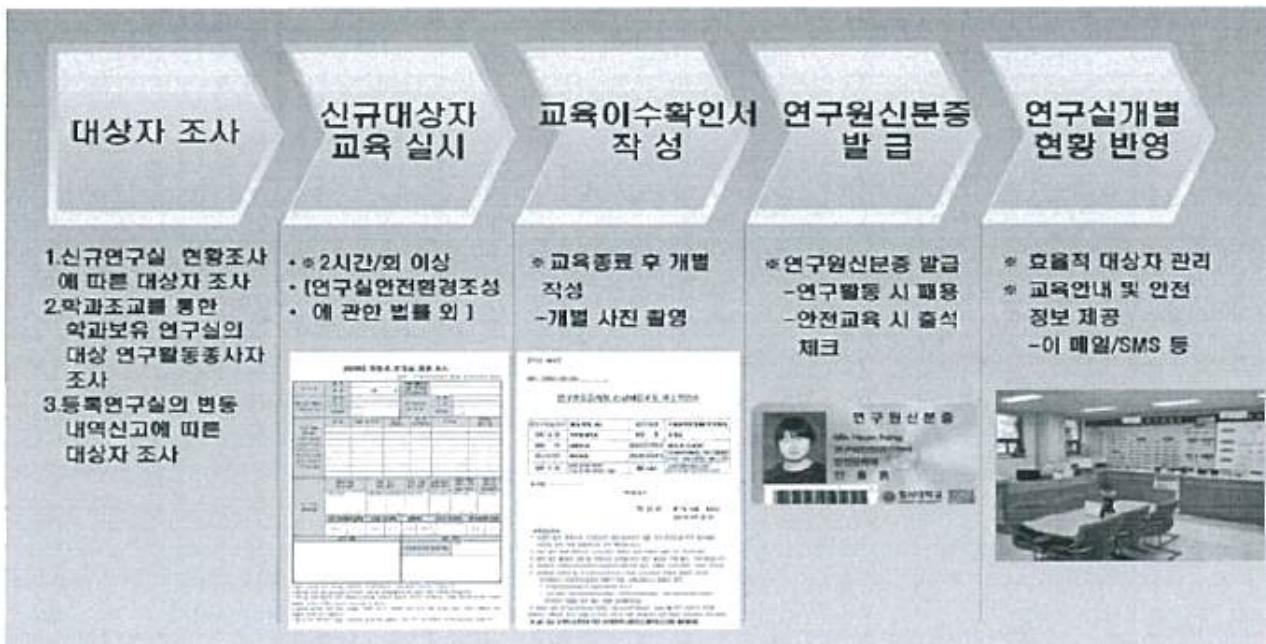
- “연구실 안전 환경 조성에 관한 법률”의 시행으로 전담 부서의 필요성을 인식하고 연구실 안전관리센터를 설치하여 매년 1회+수시로 안전관리를 점검하였음
- 우리대학은 “연구실 안전 환경 조성에 관한 법률”이 시행 되었던 2006년에 교내의 안전 관리학과(안전보건학과, 소방학과)를 중심으로 연구실안전관리를 위한 전담부서의 필요성을 인식하고 2006년 9월 1일 전담부서인 “연구실 안전관리센터‘를 설치하여 대학의 과학기술분야 연구실의 안전 관리업무를 총괄.

<해당 실험실 안전관리 체계도>

	1단계	2단계
담당자	연구책임자	연구실안전관리센터
점검 기준(B등급)	1일 1회	연1회



<우리대학 연구실안전관리 체계도>



<연구종사자 안전관리도>

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

1. biosafety cabinet (생물안전작업대, BSC)를 보유여, 렌티바이러스를 다룰 때 BSC에서 실시하여 생물학적 위험 가능성이 있는 오염된 공기가 작업대 밖으로 누출되지 않도록 하여 연구자에의 노출을 최소화함.
1. 시약을 다룰 때 마스크와 장갑, 실험복 등 개인보호 장비를 착용.
1. 서울대학교 환경안전원을 통해 실험실 안전 관리에 관한 검사를 매년 주기적으로 실시. 실험실 안전 관리 지침에 따라 실험실을 관리를 하며 안전 점검 실시 및 교육 이행.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지/ 특허등록 국가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	특허	외부자극 및 도포 물질 휘산 방지용 보호장치	호서 대학교	발명자	한국	-	2016.11.01	단독사사	특허 등록 등록번호 :10-1673 424
2	기타	농작업자 농약 노출량 산정을 위한 인체 노출인자연구	호서 대학교	제안자	한국	-	2016.11	단독사사	기준/ 규정/ 지침
3	기타	Estimation of Exposure Level of Highly Used Pesticides to Agricultural Operators and Their Risk Assessment	호서 대학교	제안자	한국	-	2016.11	단독사사	국내 학술 발표
4	기타	다소비 과수용 살균 농약의 농작업자 노출량 및 인체 위해성 평가연구	호서 대학교	제안자	한국	-	2016.11	단독사사	국내 학술 발표
5	기타	Estimation of Exposure Level of Highly Used Pesticides to Agriculture Operators and Their Risk Assessment	호서 대학교	제안자	한국	-	2016.11	단독사사	국제 학술 발표
6	기타	Current International Approaches for the Estimation of Dermal Absorption Values of Pesticides for Health Risk Assessment of Agricultural	호서 대학교	발표자	한국	-	2016.10. 27~28	단독사사	국내 강연

		Operators							
7	기타	Dermal Absorption Tests for Determination of Acceptable-Operator-Exposure-Level (AOEL)	호서 대학교	저자	한국	-	2014.10.23~ 24	단독사사	국내 학술 발표
8	기타	Comparison of Dermal Absorption Test Guidelines of OECD, EFSA and EPA for Determination of Acceptable-Operator-Exposure-Level (AOEL) of Pesticides	호서 대학교	저자	한국	-	2014.10.29~ 30	단독사사	국제 학술 발표
9	논문	Comparison of International Guidelines of Dermal Absorption Tests Used in Pesticides Exposure Assessment for Operators	호서 대학교	저자	한국	0.1084	2014.12	단독사사	비SCI
10	기타	농약 및 원제의 피부흡수율 측정시험법	호서 대학교	제안자	한국	-	2015.11	단독사사	기준/지침/규정
11	기타	농약 및 원제의 피부흡수율 평가방법 추가	호서 대학교	제안자	한국	-	2015.11	단독사사	기준/지침/규정
12	기타	SD 랫드에서 Chloropyrifos의 피부흡수율에 관한 연구	호서 대학교	저자	한국	-	2015.11	단독사사	국내 학술 발표
13	기타	Comparision of dermal absorption of chloropyrifos between in vitro rat dermal tissue model and in vivo rat model	호서 대학교	저자	한국	-	2015.11	단독사사	국제 학술 발표
14	기타	외부자극 및 도포물질 휘산 방지용 보호장치	호서 대학교	발명자	한국	-	2015.11	단독사사	특허 출원 출원번호

									10-2015-0159287
15	기타	Comparative in vitro - in vivo dermal absorption of pesticide chloropyrifos	호서 대학교	저자	한국	-	2015.11	단독사사	국제 학술 발표
16	기타	Comparison of Dermal Absorption Test Guidelines of OECD, EFSA and EPA for Determination of Acceptable-Operator-Exposure-Level (AOEL) of Pesticides	호서 대학교	저자	한국	-	2014.10	단독사사	국제 학술 발표
17	기타	Dermal Absorption Tests for Determination of Acceptable-Operator-Exposure-Level (AOEL)	호서 대학교	저자	한국	-	2014.10	단독사사	국내 학술 발표
18	논문	Comparison of International Guidelines of Dermal Absorption Tests Used in Pesticides Exposure Assessment for Operators	호서 대학교	저자	한국	0.1084	2014.10	단독사사	■ SCI

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

번 호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟 수 등)
1	논문	Towards a Strategic Approaches in Alternative Tests for Pesticide Safety	서울대	저자	Toxicological Research	-	2014.09.20	단독사사	비SCI
2	기타	Methylmercury (MeHg) induces caspase-dependent apoptosis and autophagy in human neural stem cells (NSCs), HB1.F3	서울대	저자	Society Of Toxicology 's 53rd Annual Meeting	-	2014.03.23	단독사사	국제학술 발표
3	기타	Towards a strategic approaches in alternative tests for pesticide safety	서울대	저자	한국독성학회/한국환경성돌연변이·발암원학회 제30차 정기 학술대회	-	2014.11.06	단독사사	국내학술 발표
4	논문	Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells	서울대	저자	Toxicology	3.817	2015.12.02	단독사사	SCI
5	특허	피부 염증 반응 측정용 백터 및 신규한 세포주, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도	서울대	개발자	한국	-	2015.11.12	단독사사	-

6	기타	Intratracheal exposure of multi-walled carbon nanotubes induces a nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6J mice	서울대	저자	Society Of Toxicology 's 54th Annual Meeting	-	2015.03.22	단독사사	국제학술 발표
7	기타	Efficient gene delivery for lung cancer therapy using hyperbranched polyspermine as a carrier	서울대	저자	The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology	-	2015.06.23	단독사사	국제학술 발표
8	기타	Chlorpyrifos provokes NLRP3 inflammasome and programmed cell death through mitochondrial oxidative stress in skin keratinocytes	서울대	저자	한국독성학회/한국환경성돌연변이·발암원학회 제31차 정기 학술대회	-	2015.11.12	단독사사	국내학술 발표
9	기타	Trifloxytrobin induces TRAIL-mediated apoptosis in human keratinocytes	서울대	저자	한국독성학회/한국환경성돌연변이·발암원학회 제31차 정기 학술대회	-	2015.11.12	단독사사	국내학술 발표
10	논문	Trifloxytrobin induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in HaCaT, human keratinocyte cells	서울대	저자	Drug and Chemical Toxicology	1.653	2016.05.06	단독사사	SCI

11	논문	Trifloxystrobin-induced mitophagy through mitochondrial damage in human skin keratinocytes	서울대	저자	The Journal of Toxicological Sciences	1.224	2016.11.16	단독사사	SCI
12	논문	Benomyl-induced effects of ORMDL3 overexpression via oxidative stress in human bronchial epithelial cells	서울대	저자	Food and Chemical Toxicology	3.584	2016.10.23	단독사사	SCI
13	특허	ORMDL3 측정용 신규한 세포주, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도	서울대 호서대	개발자	한국	-	2016.11.14	단독사사	-
14	기타	Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and programmed cell death through mitochondrial oxidative stress in HaCaT, human keratinocyte	서울대	저자	Society Of Toxicology 's 55th Annual Meeting	-	2016.03.13	단독사사	국제학술 발표
15	기타	Trifloxystrobin induces mitophagy via mitochondrial damage in HaCaT, human skin keratinocytes	서울대	저자	2016년 한국농약과학회 추계학술발표회	-	2016.10.27	단독사사	국내학술 발표

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

번 호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역 할	논문제재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
1	논문	Chinese Hamster Lung Cell의 소핵시험을 이용한 식물추출물 유기농업자재의 유전독성평가	국립 농업 과학원	교신 저자	한국환경 농학회지	0.6423	2014.06.01	단독사사	비SCI
2	논문	남추출물의 경구투여에 따른 랫드의 신장독성연구	국립 농업 과학원	교신 저자	한국환경 농학회지	0.6423	2014.05.26	단독사사	비SCI
3	논문	Synthesis of hapten for indirect competitive immunoassay for measuring 3,5,6-trichloro-2-pyridinol	국립 농업 과학원	교신 저자	한국환경 농학회지	0.4569	2015.11.2	단독사사	비SCI
4	논문	화분에 다빈도 검출되는 농약성분에 대한 꿀벌유충의 독성영향	국립 농업 과학원	교신 저자	Journal of Apiculture	0.3723	2016.11.31	단독사사	비SCI
5	특허	TCP의 면역분석적 검출에 이용되는 합텐의 제조방법	국립 농업 과학원	저자	-	-	2016.04.08	단독사사	특허 출원
6	기타	In vitro Screening of Inorganic arsenic-contaminated Rice on Micronucleus Frequency using Human Keratinocytes	국립 농업 과학원	주저자	한국응용생명화학회	-	2014.06.19-21	단독사사	국제학술 발표

7	기타	Comet Assay of DNA damage in Chinese Hamster Lung Cells Exposed to Sophorae Radix Extract	국립 농업 과학원	저자	Toxicology letters	-	2015.10.16	단독사사	국제학술 발표
8	기타	Synthesis of hapten for measuring 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, Major metabolite of chlorpyrifos	국립 농업 과학원	저자	Toxicology letters	-	2015.10.16	단독사사	국제학술 발표
9	기타	경피를 통한 Deltamethrin의 반복노출과 흰쥐의 뇨 중 3-PBA 배설량과의 상관성 연구	국립 농업 과학원	저자	한국환경 농학회지	-	2016.07.07	단독사사	국제학술 발표
10	기타	The correlation between deltamethrin exposure and urinary 3-PBA concentrations in rats	국립 농업 과학원	저자	한국환경 농학회지	-	2016.07.07	단독사사	국제학술 발표
11	기타	Genotoxicity of Environment-friend Organic Materials using in vitro Micronucleus test	국립 농업 과학원	주저자	농약과학회	-	2014.04.17-18	단독사사	국내학술 발표
12	기타	Renal Toxicity induced by oral administration of Azadirachta Indica Extract	국립 농업 과학원	저자	농약과학회	-	2014.04.17-18	단독사사	국내학술 발표

13	기타	Synthesis of hapten for indirect competitive immunoassay for measuring 3,5,6-trichloro-2-pyridinol	국립 농업 과학원	저자	농약과학회	-	2014.04.01	단독사사	국내학술 발표
14	기타	Outcomes and Future Prospects of Research Collaboration with Colleges and Institutes on Farmer's Risk Reduction Programme from Pesticides	국립 농업 과학원	저자		-		단독사사	국내학술 발표

제 11 장 기타사항

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

해당사항 없음

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

년도	당초계획	변경사항	변경사유
2015	농약의 신경 독성 연구 (신경계 세포주 이용, 농약의 신경계 독성관련 functional guidance bioindicator발굴)	농약의 호흡기 독성 연구 (호흡기 세포주 이용, 농약의 호흡기 독성관련 functional guidance bioindicator 발굴)	<ul style="list-style-type: none"> - 농약에 의한 신경계 관련 연구는 기존 많은 논문들로 특성화 부족 - 피부 외 주 노출 장소인 호흡기계 독성 연구의 필요성 - 농약 노출 후 독성학적 평가에서 1년차 연구인 피부와 연결 및 1세부 과제와 연계성 고려
2016	당초 책임자: 조명행	변경 책임자: 정상희	<ul style="list-style-type: none"> - 개인 일신상의 이유
2016	database 구축	체계적 농약 독성 평가 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> - 대학교 일반 실험실에서 database의 구축과 운영은 제한되고 비연속적인 대학원생 인력과 역시 본 과제 종료 후 지원되지 않는 유지비 등의 예산 문제 등으로 인하여 현실적으로 어려우므로, 연구 결과 자료를 체계적으로 정리하여 농약의 독성관련 자료로 활용될 수 있는 자료 축적으로 변경

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

해당사항 없음

제 12 장 참고문헌

[농작업자 농약노출량 산정을 위한 인체노출인자 연구]

- 국립농업과학원, 2016, 농약안전성 전문위원회 심의자료: 557-588
- 김효철, 김경란, 이경숙, 김경수, 조경아, 2007, 절화장미 시설하우스에서 방제작업시 농약의 피부노출 특성, 한국산업위생학회지, 17(3):203-211
- 정우진, 김치년, 원종옥, 김기연, 노재훈, 2012, 다이아지논 취급근로자의 건강 위험성 평가, 한국산업위생학회지, 22(2):100-106
- 이제봉, 정미혜, 유아선, 홍순성, 백민경, 오진아, 박경훈, 임양빈, 2013, 국내 사용농약의 노출기간이 개의 독성반응에 미치는 영향, 농약과학회, 17(4): 350-358
- 이준호, 이춘우, 나채근, 이화성, 박순길, 하경태, 김숙찬, 제갈봉창, 2009, 골프장에서 호흡에 의한 농약노출량 조사, 경상북도 보건환경연구원보, 22:105-116
- 한국작물보호협회, 2015, 농약연보
- 한국작물보호협회, 2016, 작물보호제 지침서
- California Department of Food and Agriculture Worker Health and Safety Branch, 1988, Human Exposure Assessment Myclobutanil
- California Environment Protection Agency, 2005, Chlorothalonil risk characterization document for dietary exposure
- California Environmental Protection Agency, 1993, GUIDANCE FOR THE PREPARATION OF HUMAN PESTICIDE EXPOSURE ASSESSMENT DOCUMENTS
- CTGB Netherlands, 2016, Registration report part A risk management dithianon
- EFSA, 2010, Scientific Opinion on Preparation of a Guidance Document on Pesticide Exposure Assessment for Workers, Operators, Bystanders and Residents. EFSA Journal, 8(2): 1401-1548
- EFSA, 2012, Scientific Opinion, Guidance on Dermal Absorption, EFSA Journal 10(4), 2665
- EPA, 1995, Iprodione-mouse micronucleus test, mechanistic studies, and a dermal absorption study
- EPA, 1996, Occupational and residential exposure assessment and recommendations for the reregistration eligibility decision document for cypermethrin
- EPA, 1997, Captan (N-trichlormethylthio-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide): hazard identification committee report
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, 1993, Percutaneous

Absorption, ECETOC, Brussels.

- European Commission, 2002, Guidance document on dermal absorption, sanco/222/2000
- European Commission, 2002, Review report for the active substance acibenzolar-s-methyl
- European commission, 2004, Guidance Document on Dermal Absorption. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Sanco/222/2000 rev. 7
- European Commission, 2005, Review report for the active substance chlorpyrifos
- European Commission, 2008, Review report for the active substance captan
- FAO, 1994, Thiophanate-methyl(077), 1133-1174
- INCHEM mancozeb database: http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v93pr1_1.htm
- Li CX, LI M, Feng XL, Cao P, Wang XD, Liu S, Xu HB. Study on dermal absorption of imidacloprid in vitro. CJIHOD. 2012. 30: 604-607
- Liu KH, Kim JH, 2003, In vitro dermal penetration study of carbofuran, carbosulfan and furthiocarb, Arch Toxicol, 77: 255 - 260
- Jomichen J, Ei-zaemey S, Carey RN Darcey E Reid A, 2016, Australian work exposures studies: occupational exposure to pesticides. Occup Environ Med 10:1136
- Kamel F, 2013, Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's. Science, 341(6147):722-3
- NPIC database: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/diazinontech.-html#references>
- OECD, 2004, Guidance document 28
- OECD, 2004, Test Guideline 427 Skin Absorption : in vivo Method
- OECD, 2004, Test Guideline 428 Skin Absorption : in vitro Method
- OECD, 2011, Guidance notes on dermal absorption
- OECD, 2011, Guidance notes on dermal absorption, Series on Testing and Assessment
- Scientific Committee on Consumer Safety, 2010, Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients: 1-14
- USEPA, 1992, Interim Report Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications Exposure Assessment Group Office of Health and Environmental Assessment
- USEPA, 1996, Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.7600 Dermal Penetration

[시스템독성학적 대체기술개발 및 독성평가지표에 대한 네트워크 분석]

- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M. and Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2002) Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity In Vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 179, 1-12
- Araujo, G.L.D., Campos, M.A.A., Valente, M.A.S., Silva, S.C.T., Franca, F.D., Chaves, M.M. and Tagliati, C.A. (2014) Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 50, 55-62.
- Colosio, C., Alegakis, A.K. and Tsatsakis, A.M. (2013) Emerging health issues from chronic pesticide exposure: Innovative methodologies and effects on molecular cell and tissue level. *Toxicology*, 307, 1-146.
- Das, P.P., Shaik, A.P. and Jamil, K. (2007) Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol. Ind. Health*, 23, 449-458.
- Gupta, K., Rispin, A., Stitzel, K., Coecke, S. and Harbell, J. (2005) Ensuring quality of in vitro alternative test methods: Issues and answers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 43, 219-224.
- Jamil, K., Shaik, A.P., Mahboob, M. and Krishna, D. (2004) Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyriphos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes in-vitro. *Drug Chem. Toxicol.*, 27, 133-144.
- Kishore, A.S., Surekha, P.A., Sekhar, P.V., Srinivas, A. and Murthy, P.B. (2008) Hen egg chorioallantoic membrane bioassay: an in vitro alternative to draize eye irritation test for pesticide screening. *Int. J. Toxicol.*, 27, 449-453.
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niyyama, K. and Kobayashi, K. (2004) Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.*, 112, 524-531.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M. (2013) Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 268(2), 157-177.
- Parent-Massin, D. and Thouvenot, D. (1993) In vitro study of pesticide hematotoxicity in human and rat progenitors. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 30, 203-207.
- Pistl, J., Kovalkovicova, N., Holovska, V., Legath, J. and Mikula, I. (2003)

- Determination of the immunotoxic potential of pesticides on functional activity of sheep leukocytes in vitro. *Toxicology*, 188, 73–81.
- Radio, N.M. and Mundy, W.R. (2008) Developmental neurotoxicity testing in vitro : Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology*, 29, 361–376.
 - Russell, W.M.S., Burch, R.L. and Hume, C.W. (1959) The principles of humane experimental technique, Methuen, London.
 - Triglia, D., Braa, S.S., Yonan, C. and Naughton, G.K. (1991) In vitro toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 27, 239–244.
 - Uggini, G.K. and Suresh, B. (2013) Genotoxic effects of two different classes of insecticide in developing chick embryos. *Toxicol. Environ. Chem.*, 95, 992–1005.
 - Undege, U. and Bacaran, N. (2005) Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.*, 79, 169–176.
 - Vigfusson, N.V. and Vyse, E.R. (1980) The effect of the pesticides, Dexon, Captan and Roundup, on sister-chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.*, 79, 53–57.
 - Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V. and Larsen, J.C. (2000) Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol. In vitro*, 14, 227–234.

[급만성 농약노출 예측을 위한 생체 바이오마커 개발]

- 강종원 (2004) PAHs 화합물의 생체지표(biomarker)를 활용한 내적용량(internal dose) 산출과 위해성평가. 식품의약품안전청
- 강진선, 이정은, 이경숙, 이수진, 고현철 (2009) 농약의 도파민 신경세포 독성에 대한 연구. 대한직업환경의학회 학술대회 논문집. 422-423.
- 서종철, 최홍순, 송재석 (2007) 요중 3-phenoxybenzoic acid 미량 분석 및 pyrethroid 계 살포자 노출 평가. 농약과학회지. 11(2):87-94.
- 심혜림, 김수희, 이재영, 이해진 (2009) 고감도 및 고선택성의 유기인계/카바메이트계 농약 검출용 바이오칩 센서. Journal of the Korean Industrial and Engineering Chemistry. 20(6):571-580.
- 전준민, 양원호, 김종호, 문찬석, 이종대, 윤경옥 (2014) 지역주민 환경오염 노출수준 및 생체지표 모니터링(광양만). 국립환경과학원
- 조영주, 민경진, 이인선, 차춘근 (2002) 흰쥐를 이용한 profenofos 의 경구투여 및 피부 도포 후 뇨 중 대사물질 측정. 한국식품위생안전성학회. 17(1):20-25.
- Abhay Singh Yadav, Gulshan Sehrawat (2011). Evaluation of genetic damage in farmers exposed to pesticide mixtures. Int J Hum Genet. 11(2):105-9.
- Ahn, K.C., Gee, S.J., Kim, H.J., Aronov, P.A., Vega, H., Krieger, R.I., & Hammock, B.D. (2011) Immunochemical analysis of 3-phenoxybenzoic acid, a biomarker of forestry worker exposure to pyrethroid insecticides. Anal Bioanal Chem. 401(4):1285 - 1293.
- Bhagwat Kale (2013) β -Glucuronidase as a new potent biomarker in the biagnosis ane prognosis of organophosphorus toxicity. International Journal of Biological Research, 1(1):5-9
- Rourke,M.K., Lizardi, P.S., Rogan,S.P., Freeman,N.C., Aguirre, A., & Saint,C.G, (2000) Pesticide exposure and creatinine variation among young children. J Exp Anal Env Epi. 10:672 - 681.
- Sarunya Thiphom, Tippawan Prapamontol, Somporn Chantara, Ampica Mangklabruks, Chaisuree Suphavilai, Ki Chang Ahn, Shirley J. Gee, and Bruce D. Hammock (2014)Determination of the pyrethroid insecticide metabolite 3-PBA in plasma and urine samples from farmer and urine samples from farmer and consumer groups in northern Thailand. Journal of Environmental Scence and Health, 49:15-22
- Schettgen, T., Koch, H.M., Drexler, H., & Angerer, J. (2002) New gas chromatographic - mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. Institute Journal of Chromatography B, 778:121 - 130.

- Shevock, P. N., Khan, S.R., & Hackett, R.L. (1993) Urinary chemistry of the normal Sprague-Dawley rat. *Urol Res*, 21:309–312.
- Thomas KW, Dosemeci M, Hoppin JA, Sheldon LS, Croghan CW, Gordon SM, Jones ML, Reynolds SJ, Raymer JH, Akland GG, Lynch CF, Knott CE, Sandler DP, Blair AE, Alavanja MC.(2010). Urinary biomarker, dermal, and air measurement results for 2, 4-D and chlorpyrifos farm applicators in the Agricultural Health Study. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 20(2):119–134.
- Vasilis P. Androutsopoulous, Antonio F. Hernandezb, Jyrki Liesivuoric, Aristidis M. Tsatsakis (2013). A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*, 307:89–94.

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「(농업정책지원기술개발-농업인 건강노동 및 생활안전 향상 연구 사업)」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「(농업정책지원기술개발-농업인 건강노동 및 생활안전 향상 연구 사업)」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.