

<표지>

(옆면)

(앞면)

118024-
3

보안 과제(), 일반 과제() / 공개(), 비공개()발간등록번호()
농축산자재산업화학기술개발사업 2021년도 최종보고서

11-1543000-003483-01

국내
환경을
고려한
친환경
방제제
개발
및
상용화

국내 환경을 고려한 친환경 방제제 개발 및 상용화

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

2021. 02. 08.

주관연구기관 / 경기도경제과학진흥원
협동연구기관 / (주)비오지노키

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 환경을 고려한 친환경 방제제 개발 및 상용화”(개발기간 : 2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 02. 08.

주관연구기관명 : (재)경기도경제과학진흥원 (유승경)



협동연구기관명 : (주)비오지노키 (이도훈)



주관연구책임자 : 최춘환

협동연구책임자 : 양병근

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정
제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118024-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.26 ~ 2020.12.31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농축산자재산업화기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	국내 환경을 고려한 친환경 방제제 개발 및 상용화			
연구책임자	최춘환	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:200,000천원 민간: 66,667천원 계:266,667천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 명	총 연구개발비	정부:550,000천원 민간:183334천원 계:733,334천원
연구기관명 및 소속부서명	(재)경기도경제과학진흥원			참여기업명 (주)비오지노키	
국제공동연구	상대국명: 해당사항 없음			상대국 연구기관명: 해당사항 없음	
위탁연구	연구기관명: 해당사항 없음			연구책임자: 해당사항 없음	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당없음				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		3	1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 국내 농생명소재를 이용, 사회현안인 안전한 먹거리 제공을 위한 기술을 개발
 - 이 과정에서 국내 농생명소재들의 닭진드기 살충활성을 검증하였으며, 그 동안 활용되지 않은 조합을 후보 소재로 발굴 및 유전자 판별기술개발
 - 생리활성 유효성분의 정확한 분리정제 및 구조결정, 살충기전연구를 통해 조합의 살충기전을 세계최초로 밝힘
 - 개발된 기술을 공동연구기관에 기술이전완료
 - 제품화(시제품)를 완료하였으며 추가로 동물용의약외품으로까지 상품화를 진행중임
- 연구개발결과를 이용하여 닭진드기 살충효과를 가지는 친환경방제제를 확보하게 되었으며, 국내 양계농가에서는 닭진드기 방제에 있어 친환경살충제를 추가로 확보 하게 되었음. 국내 닭진드기 방제에 있어 좀더 안전하고 치밀한 종합방제기술(물리적방제+화학적방제+친환경적방제)을 구현 할 수 있는 환경이 구성됨

보고서 면수
235페이지

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구는 닭진드기(와구모) 방제용 천연물 활성소재를 탐색하는 것을 목표로 하고 있으며 이를 위해 1) 닭진드기에 대한 살충활성을 보유한 조합 등 천연물의 탐색, 2) 천연물이 생산하는 살충물질의 분리 및 구명, 3) 살충물질의 닭진드기에 대한 살충기작 구명. ○ 국산 조합 및 고삼 등의 소비촉진 및 닭진드기 살충 홍보를 위한 과학적 입증하여 동물의약품 개발로 조합복합추출물을 주원료로 사용하여 닭진드기 살충에 좋은 제품을 개발하여 산업화.
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정량적 성과 : 본 연구에서는 조합을 활용하여 신규 친환경방제제 개발을 목표로 특허출원 2건, 등록 1건, 정책제안 1건, 교육지도 4건, 우수연구성과를 국제학술발표 3건을 하였으며, 1건의 기술이전으로 유기농업자재로 등록하여 시제품 개발 완료, 언론홍보 47회에 거친 우수연구성과 홍보하여 활발한 연구를 수행함. ○ 정성적 성과 <ol style="list-style-type: none"> 1. 문헌을 통한 기존에 사용되는 방제제의 종류 및 안정성, 잔류성 문제점 분석 완료 2. 닭진드기 감염현황 및 기능성 소재 탐색완료 <ul style="list-style-type: none"> 가. 농장 약제사용실태 및 닭진드기 감염현황 조사 완료 나. 천연물 30종 이상 감수성 검사 완료 (조합 추출물에서 91% 이상 살충효과 확인) 3. 조합 성분 연구 및 표준화완료 <ul style="list-style-type: none"> 가. 산지별, 국가별, 용매별 추출물 수율 및 살비활성 검사완료 나. 산지별, 국가별 HPLC Profiling 완료 다. 주엽나무의 분자분류학적인 유전자 분석 완료 라. 조합의 유효물질 및 지표물질 분리정제 완료 4. 닭진드기 살충력 평가 및 제형개발 완료 <ul style="list-style-type: none"> 가. 기존 방제방법과 조합추출물 제제의 유효성 평가 완료 나. 조합 복합추출물의 소재 및 비율선정 완료 5. 조합복합추출물 유효성 평가 및 안전성 평가 완료 <ul style="list-style-type: none"> 가. 조합복합추출물 유효성 및 지속성 평가 완료 나. 습도와 환경에 따른 유효성 평가 완료 다. 약제 적용방법과 모니터링 완료 라. 조합복합 추출물 혼합제 잔류성, 안전성, 환경안전성 평가 완료 마. 야외 임상 평가 완료 바. 조합복합추출물 혼합제 시제품 개발 (유기농업자재등록, 동물의약품 신청 완료) 6. 닭진드기 살충 기작 규명완료 <ul style="list-style-type: none"> 가. 최초 닭진드기로부터 살비 분자표적 단백질 효소 분리 완료 나. 살비 분자 표적 효소 (GST) 억제 확인 다. 닭진드기 살충기작연구 완료 7. 친환경 살충제 대량 생산 시스템 구축 완료
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 닭진드기 방제용 신규 동물용의약품 개발 및 상용화 2. 동물용의약품 상용화에 의한 서비스 고용 및 수익 창출 3. 닭진드기에 의한 양계산업 위축 방지 4. 닭진드기에 의한 가축질병 및 인수공통질병 방지 5. 유효 동물용의약품으로 약제사용유도 및 내성방지와 대상동물 안전성 확보 6. 계란과 계육에 잔류감소로 인한 식품안전성 향상

국문핵심어 (5개 이내)	닭진드기	동물용 의약외품	살충제	조협	천연물
영문핵심어 (5개 이내)	Poultry red mite	Quasi-drugs for animals	Insecticide	Gleditsiae Fructus	Natural product

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	9
제 1 절 연구개발 목표	9
제 2 절 연구개발의 필요성	9
제 3 절 연구개발의 범위	20
2. 연구수행 내용 및 결과	29
제 1 절 문헌검색을 통한 방제제 현황	29
제 2 절 닭진드기 감염현황 및 기능성 소재 탐색	68
제 3 절 조합 성분 연구 및 표준화	79
제 4 절 닭진드기 살충력 평가 및 제형개발	98
제 5 절 닭진드기 살충기작 규명	105
제 6 절 조합복합추출물 유효성 평가 및 안전성 평가	121
제 7 절 친환경 살충제 대량생산	213
제 8 절 연구개발 성과	215
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	221
4. 연구결과의 활용 계획 등	225
[별첨1] 연구개발보고서 초록	226
[별첨2] 자체평가의견서	229
[별첨3] 연구성과 활용계획서	233

1. 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

- 본 연구는 본 연구는 닭진드기(와구모) 방제용 천연물 활성소재를 탐색하는 것을 목표로 하고 있으며 이를 위해 1) 닭진드기에 대한 살충활성을 보유한 조합 등 천연물소재의 탐색, 2) 천연소재가 생산하는 살충물질의 분리 및 구조결정, 3) 살충물질의 닭진드기에 대한 살충기작 구조결정 등을 주요 연구내용으로 하고 있다.
- 조합 및 고삼 등의 국내 농생명자원의 고부가가치화를 위해 닭진드기에 대한 살충 활성을 확인, 동물의약품으로 개발하고 조합복합추출물을 주원료로 사용하여 닭진드기 살충에 좋은 제품을 개발하여 산업화하고자함.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구배경

- 최근 우리나라의 기후가 아열대성 기후로 변하면서 예전에는 미미하게 발생하던 병충해가 전국적으로 만연하고 이로 인해 축산농가에서도 가축의 생산성이 감소하고 병해충 매개 전염병이 다발하고 있음.(그림 1.)
- 최근 양계나 산란계 농장에서 닭진드기(와구모) 감염이 매우 심각하게 발생하고 있으며 이로 인한 닭의 생산성이 감소하고 있다. 농가에서는 다양한 살충제를 사용하고 동물용의약품으로 허가되지 않은 농약도 사용되고 있어 계육과 계란 등 식품안전성도 크게 우려되고 있음.
- 농가나 방역당국에서는 양계에서 발생이 만연화 되고 있는 닭진드기 질병에 대한 이해가 미비하고 방제대책에 관한 연구부족으로 양계농가의 경제적 손실이 크며, 닭진드기 매개성 전염병 전파가 이루어지고 있음.
- 실제 농가들은 닭진드기에 대한 지식이 전무하고, 올바른 방제체계가 없어 무분별한 약제살포로 구제대상 진드기의 저항성을 유발하여 방제비용을 증가시키고 있는 실정임
- 닭진드기에 대한 사용약제의 안전성이 확보되지 않아 식품오염과 사용자 중독의 위험성이 우려되고 있음.
- 안전성과 유효성이 확인된 약제 개발로 농가 생산성 향상과 식품안전 확보가 절실함
- 농가 감염 실태를 기반으로 예방적 개념과 모니터링 기법, 진드기 방제용 약제의 정확한 사용방법등의 확립이 절실함.

가. 국내 양계산업에서 닭진드기 관리의 중요성

- 현재 산란계와 종계농가에서 가장 문제시 되고 농가들의 최대 고민거리임.
- 연간 농장평균 5~6회이상 약제를 투약하는 상황.
- 무분별한 농약 사용으로 내성이 빈발하며, 농약을 다회처리하는 작업자도 중독의 피해가 예상된다.
- 농약사용방법에 대한 무지로 계란 및 닭에 잔류되는 경우가 많음.

- 덥고 습한 기후로 바뀌면서 3월부터 11월까지 연중 성행하는 질병으로 자리잡고 있음.
- 닭진드기에 대한 연구가 전혀 이루어지지 않음- 수의과대학 및 응용곤충 계열 연구 없음.



에어덕트 안쪽



계란벨트



케이지 윗부분



사료조 밑 연결부위

나. 닭진드기로 인한 피해

- 전 세계적으로 널리 분포하며 산란계 산업에서 가장 큰 문제로 떠오름.
- 피해규모 - EU의 피해액 3300억 추정(수당560 x 6억수, 2005 van emous).
- 닭에게 빈혈, 스트레스를 유발하여 질병 저항성을 약화시킴.
- 질병의 매개체 - 거의 모든 바이러스와 세균성 질병의 벡터.(표 1 & 2)
- 티프스 및 대장균증 감염농장의 경우 질병의 고리가 끊어지지 않음, 대량폐사.
- 종계/산란계에서 흡혈로 인한 스트레스로 산란율 저하.
- 계란품질저하, 진드기가 알에 묻어나오며 혈액반점으로 계란의 품질저하.
- 작업자에게 흡혈로 인한 알러지/피부염을 일으키며 간지러움으로 괴로움 호소.

표 1. 닭 진드기에 의해 매개된 보고사례(세균)

병원체	학명	닭진드기로부터 분리사례	실험적 감염		문헌
			성립	불성립	
파스튜렐라균	<i>Pasteurella miltocida</i>			○	Petrov(1975)
돈단독균	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	○			Chirico et al. (2003)
살모넬라균	<i>Salmonella Gallinarum</i>	○			Zeman et al. (1982)
리스테리아균	<i>Listeria monocytogenes</i>	○			Grebenyuk et al. (1972)
콕시엘라균	<i>Coxiella bumetii</i>			○	Zemskaya & Pchelkina(1967)
스피로헤타	<i>Spirochetes</i>			○	Ciolca et al.(1968)

Claire et al. Exp Appl Acarol 2009에서 인용

전국 '살충제 계란' 검출 지역

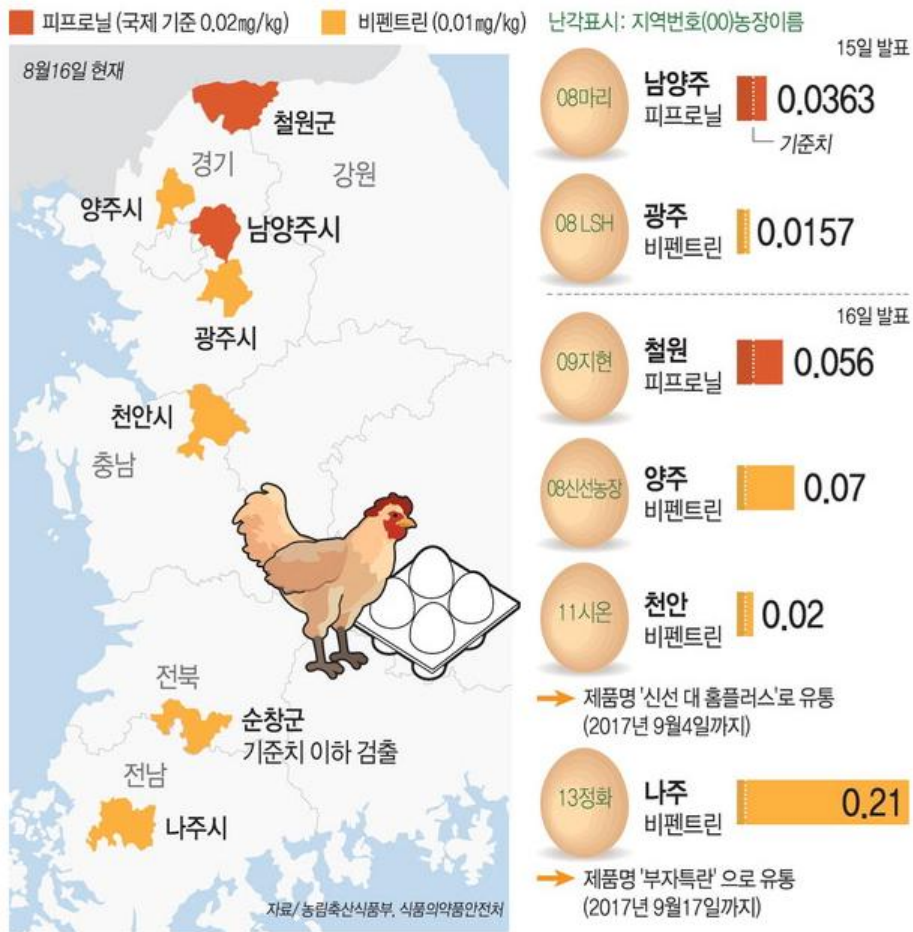


그림 1. 전국 닭진드기의 발생 상황

(연합뉴스_2017.08.16)

표 2. 닭 진드기에 의해 매개된 보고 사례(바이러스)

병원체	학명	닭진드기로부터 분리사례	실험적 감염		문헌
			성립	불성립	
뉴캐슬병 바이러스	<i>Paramyxovirus</i>	○			Arzey(1990)
세인트루이스뇌염 바이러스	<i>Flavivirus</i>			○	Chamberlain et al. (1957)
응애매개성 뇌염	<i>Flavivirus</i>			○	Wegner(1976)
계두 바이러스	<i>Poxvirus</i>		○		Shirinov et al. (1972)
동부말뇌염	<i>Togavirus</i>		○		Durden et al. (1993)
서부말뇌염	<i>Togavirus</i>		○		Chanberlain & Sikes(1955)
베네주엘라말뇌염	<i>Togavirus</i>		○		Durden et al. (1992)

다. 닭진드기란?

- 닭에게 피해를 주는 외부기생충에는 진드기와 이, 벼룩, 모기, 파리, 딱정벌레의 종류로 나뉜다. 그 중 진드기의 종류는 닭진드기/붉은진드기(Poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*), The northern fowl mite (NFM)(*Ornithonyssus sylviarum*), tropical fowl mite(*Ornithonyssus bursa*) 3종류가 있음.(그림 2.)
- Northern fowl mite는 닭의 몸에 상시 기생하며 흡혈을 하나, 닭진드기는 주간에는 틈새에 숨어있다가 야간에 닭의 몸으로 이동하여 흡혈을 하고 다시 자리로 돌아오는 습성을 가진 진드기임.
- Northern fowl mite는 주로 북미에서 문제되며, 닭진드기는 전세계적으로 발병하며 문제가 되고 있음(유럽, 아시아).
- 닭진드기는 한국에서 붉은진드기, 와구모, 곰박사리등의 이름으로 불리우며 주로 오래 키우는 품종(산란계, 종계)의 케이지에 하는 거미강/응애목의 생물임.
- 유럽의 경우 기존 군집형 케이지에서 복지형 케이지로 전환하며 횃대, 모래, 나무등의 시설물이 추가되면서 더더욱 박멸에 어려움을 겪고 있으며 주로 영국등의 국가에서 연구된 논문이 발표되고 있음.
- 전국적으로 진드기가 문제되기 시작한 것은 최소 5년 이상이지만 기후가 고온다습해지며 최근에는 년중 3월부터 10월, 그 이후까지도 지속적으로 문제가 되고 있음.



그림 2. 닭진드기 형태

라. 닭진드기의 특징(형태, 생태, 주기_그림 3.)

- 생태
 - 변태상태에 따라 알, 유충, 제1약충, 제2약충, 성충의 단계를 거침.
 - 색깔은 회색이나 흡혈을 하면 붉은색으로 변함, 성충의 크기는 암/수가 다르며 0.5~1.5mm.
 - 알은 4~8개정도, 8일간격 산란, 일생 총 30개의 알을 낳음.
 - 덥고 습한 여름의 경우 생활사가 7~14일로 단축되어 번식이 빠름.
- 흡혈
 - 1~4일간격으로 한번씩 밤에만 닭으로 이동하여 흡혈함.
 - 알, 유충과 수컷은 보통 흡혈 하지 않고 암컷만이 번식을 위해 흡혈함.
 - 보통 닭 한 마리당 20,000에서 50,000마리 까지 진드기가 흡혈함.
- 생존성
 - 최악의 조건에서 8개월간 생존가능, 닭이 없어도 계사에 잔존.
 - 복잡한 계사에 서식하며 좁고, 어둡고, 습한곳에 서식하여 약제가 잘 도달하지 않아 박멸이 어려움.
 - 내성획득이 매우 빠름.



그림 3. 닭진드기 알과 흡혈상태의 성충

2. 연구개발 중점사항

○ 본 과제를 통해 개발하고자 하는 기술은 조협 등 천연물을 이용한 친환경 닭진드기 살충 원료임. 이를 토대로 향후 추가 연구개발을 통해 안전성 평가 및 동물모델적용시험을 실시하고 궁극적으로 조협 등 천연물을 이용한 닭진드기 방제용 살충 원료 및 제품으로 상용화하는 기반을 다지고자 함.

○ 제품의 장점 및 차별화

- 특허권리가 확보된 닭진드기 방제용 살충 원료 개발.
- 닭진드기 방제를 위해 계사에 적용가능한 제품 개발.
- 원료가 생약성분으로 식용경험이 있고 안전성이 확보되어 있음.
- 효능이 지속적으로 나타나고, 기존 제품에 비해 더 탁월함.
- 유효성분 및 작용기작이 규명된 동물의약외품 원료 개발.

○ 본 기술은 경기도경제과학진흥원과 비오지노키에 의해 국내 특허 출원되었음 (출원번호: 10-2018-0042606).

- 특허명 : 조협추출물을 이용한 닭진드기에 대한 살충살비제 조성물
- 특허권자 : 재단법인 경기도경제과학진흥원, (주)비오지노키
- 발명자 : 최춘환, 최윤혁, 윤종웅, 양병근 외 3인
- 등록 번호 : 대한민국 특허출원번호 : 10-2098858

3. 조협(皂莢, *Gleditsiae Fructus*) 생약소재

○ 대한약전의한약(생약)규격집에 의하면 조협(皂莢)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 조각자나무(*Gleditsia sinensis* Lamark) 또는 주엽나무(*Gleditsia japonica* Miquel)의 열매로서 참조각자나무, 개주엽나무, 중국주엽나무 등의 다양한 이름으로 불리움.

○ 주엽나무속(*Gleditsia*) 식물은 전 세계에 약 16종이 있으며 아시아 중부와 동남부 및 아메리카에 분포한다. 중국산은 6종, 변이종 2종이 있으며 중국의 남북 각 성에 널리 분포한다. 이 속에서 약으로 사용되는 것은 4종임. 조협은 중국의 동북, 화북, 화남 및 사천, 귀주 등지에 분포하며, 가을에 과실이 성숙했을 때 채취하여 말려 사용함. 우리나라에서는 경북, 제주도에 걸쳐 분포하고 있고, 소비량이 없기 때문에 재배하지 않고 있을 뿐 필요시 쉽게 재배가 가능함.

○ 조각자나무의 열매를 조협이라하고, 종자를 조협자, 가시를 조각자라 함. 본 기술에서 수율 및 활성이 가장 좋게 나타나 사업화하고자 하는 부위는 조각자나무의 열매임.

○ 조협의 주요 성분으로는 triterpenoid와 그 배당체 성분으로 gledigenin, gledinin, gleditschia saponin, gleditsiosides A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, N, O, P, Q, gleditsia saponins C' , E' 등이 함유되어 있음. 중국약전에서는 약재의 성상, 현미경 감별 특징, 성미, 박층크로마토그래피법(TLC)을 이용하여 약재를 관리하고 있음. 조각자에는 flavonoid 성분으로 fustin, fisetin과 triterpenoid 성분으로 echinocystic acid, triterpenoid saponin 성분으로 gleditsia saponin C 등이 함유되어 있음. 앞에는 flavonoid 배당체 성분으로 luteolin-7-glucoside, isoquercitrin, vitexin, isovitexin, orientin, homoorientin 등의 성분이 함유되어 있음.

○ 조협의 알려진 생리활성 : 조협은 전통적으로 강한 거담작용이 있어 폐결핵, 폐농양에 쓰며, 종기와 피부궤양, 완고한 변비 등의 치료제로 사용되었음. 현재까지 과학적으로 증명된 조협의 약리작용으로는 기관지염, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 고지혈증, 면신경염, 안면신경마비, 만성 전염성 간염, 음도염, 장경색, 골수암 등의 병증에 사용함.



그림 4. *Gleditsia sinensis* Lamark

가. 성상

(1) 조각자나무 : 이 약은 열매로 꼬투리과이다. 납작하고 긴 칼집모양이며 약간 구부러졌고 길이 15 ~ 20cm, 너비 20 ~ 35mm, 두께 8 ~ 15mm이다. 바깥 면은 짙은 자갈색 ~ 흑갈색이고 회색의 가루가 서리 모양으로 덮여있다. 씨가 있는 부위는 볼록하게 나왔으며 아랫부분은 점점 좁아지고 약간 구부러졌으며 꼬투리자루 또는 열매자루가 붙었던 자국이 있다. 양쪽에는 뚜렷한 세로 능선이 있으며 흔들면 소리가 난다. 질은 단단하고 쪼개서 보면 열매껍질의 자른 면은 노란색이고 섬유성이다. 씨는 많고 납작한 타원형이며 황갈색이고 광택이 나며 매끄럽다.

(2) 주엽나무 : 이 약은 열매로 꼬투리과이다. 조각자나무에 비해 두께는 아주 얇고 심하게 비틀려서 꼬였으며 길이 약 23cm, 너비 약 3cm이고 전체적으로 빈약한 것이 다르다. 이 약은 특유한 냄새가 있고 강렬한 자극성이며 가루로 만들어 냄새를 맡으면 재채기를 일으키고 맛은 아주 맵다.

4. 연구개발의 필요성 및 제품의 용도 및 적용분야

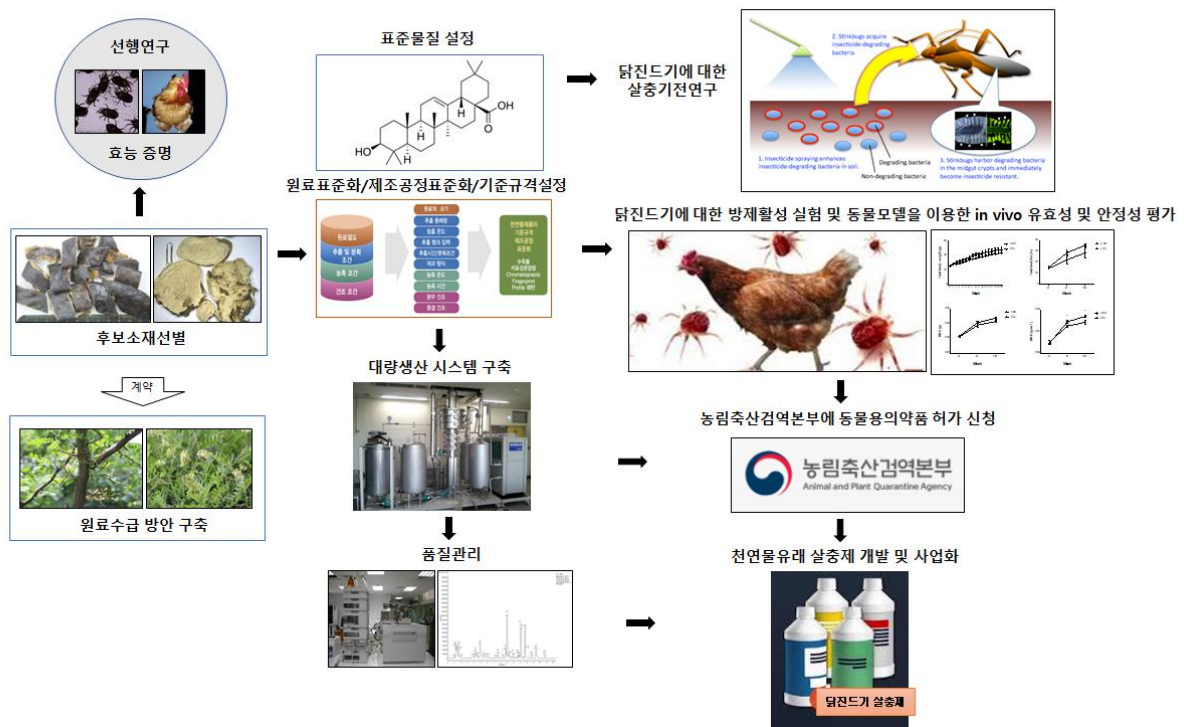
○ 산란계 생산에 있어 가장 큰 영향을 미치고 있는 닭진드기는 닭붉은염 (fowl red mite)이며, 특히 봄부터 가을까지 이 닭진드기는 번식하기 좋은 시기에 문제를 야기하고 있어 농민들은 고민거리고 취급하고 있다. 더불어 잦은 살충제 사용으로 저항성을 발달하여 사용 가능한 약제 수 역시 줄어들고 있는 것이 현실이기 때문에 이들을 보완하고 대체할 수 있는 대체제 개발이

시급한 실정임. 반복적인 농약의 사용으로 인해 약제 내성균의 출현과 농산물의 잔류독성 및 환경오염 등의 증가로 새로운 살균제에 대한 개발이 필요하며, 소득 수준의 향상과 건강에 대한 well-being 문화의 확산으로 유기농 농산물을 선호하는 심리적인 변화가 강하게 일어나고 있고 환경친화형 농약의 개발 또한 필요한 실정이라 할 수 있음.

○ 현재 우리나라의 산림자원에서부터 친환경 저독성 농약활성 물질의 탐색 및 개발에 관한 연구는 미진한 실정으로 천연물로부터 닭진드기 방제용 살충제 개발을 위하여 천연자원의 생리활성에 따른 계통체계 확립에 의한 자원관리, 사육법 및 생물검정법의 확립, 분석기술을 확립함으로써 국내 축산업계의 친환경 저독성 살충제 개발을 위한 국제 경쟁력을 강화하며 천연물 유래의 저독성 물질을 살충제로서 개발하여 산업화함으로써 국제수지 향상에 기여하고자 함.

○ 조합복합추출물은 지표성분으로 조사포닌과 마트린(Matrine)을 지표물질로 설정하였으며, 조사포닌, 마트린(Matrine)을 주성분으로 하는 조합복합추출물을 기능성원료로 사용한다면 안전하면서도 부작용이 적은 동물의약외품의 개발이 가능할 것으로 기대됨.

5. 연구개발 개요의 그래픽 요약



6. 개발목표제품 및 핵심 기술

○ 동물의약외품 허가 승인시 조합복합추출물을 주원료로 사용하여 닭진드기 살충효과에 좋은 동물의약외품을 개발하여 사업화함.



그림 5. 조합복합추출물을 이용한 제품 모식도

7. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

- 방제대책에 관한 연구기관이나 전문가가 없으므로 경제손실 및 피해정도는 조사된 바 없음. 현재 국내 산란계 농장 중 94%이상 진드기에 감염되어 상재할 것으로 예측(연구팀자료).
- 양계협회와 가금수의사회 자료에 따르면 질병과 혼합감염으로 인한 피해가 심각함. 가금티푸스(20%), 대장균증(18%), 이외 계두, 전염성 코라이자 등이 의심되나 연구된 바 없음
- 주로 행하는 방법은 농약을 사용한 화학적 투약법
 - 실제 농가들은 진드기에 대한 지식이 전혀 없고 주변에서 권하는 농약을 무분별하게 사용하여 잔류와 오남용이 되고 있음(주요 사용 농약 - DDVP, 파단, 세빈, 피프로닐, 그 외 무허가 제품 다수).
 - 살비제의 경우 2~3번의 연속사용만으로 내성획득.
 - 더위가 시작되고 계사온도가 30도를 넘어서는 5월부터 10월까지 집중적으로 진드기의 숫자가 증가. 농가당 평균 2개월에 1회이상 투약을 하며 계군당 출하시까지 년 4~6회 정도 투약.
 - 투약비용은 일반 농약을 사용할 경우 1만수 계군당 10만원 ~ 50만원까지 다양함.
 - 치료용 진드기 약제 시장은 공식적 통계를 추정할 수 없으나 50억 이상의 규모로 파악.
 - 팜한농 와구프리의 필드판매량 2013년 12억 규모로 추정.
 - 같은 계열의 약제를 반복사용하며 용량도 설정되어 있지 않아 내성 출현율이 높음.
 - 농가들은 현재 진드기에 대해 처치할 수 있는 약품이라면 효능을 불문하고 구매 의사가 있음.
 - 작업자의 불편함 극심, 특히 진드기로 인한 가금티푸스 상재농장이 증가하고 있는 추세.
- 수의사들은 진드기 문제에 대해 적극적으로 조언하지 않음 - 상세한 지식 및 해결방안에 대해 잘 모르며 판매할 수 있는 약품이 없음. 모니터링 방법도 현행되는 사항이 없음
- 현재 진드기에 대한 동물용 의약외품으로 4개 제품이 등록되어있음(팜한농 - 와구프리 레드(2012년), 블루(2014), 옐로우(2015)), 엘랑코 - 일렉터PSP)

- 이 중 닭이 있을 때 사용할 수 있는 약제는 일렉터(spinosad) 한 제품이며 와구프리 제품은 빈계사에서만 사용하도록 허가된 제품.
- 와구프로 레드, 옐로우와 일렉터는 이미 내성이 생겨 효과가 없음.
- 기존에 허가된 네구본, 불포는 2009년 이후 생산이 중단되었음.
- 몇 국내업체에서는 기존에 허가된 파리와 해충관련 제품을 진드기에 허가된 제품처럼 광고하며 포장하여 판매하고 있음.
- 개인사업자 중 몇 가지 농약과 약제를 혼합한 제형을 불법으로 유통하여 많은 이익을 얻었으며 현재도 불법제조 제품이 성행하고 있음.
- 실리카와 규조토를 이용한 닭진드기 처치방법이 일부 회사에 의해 소개되었으나 정확한 용법과 사용 후 조치와 계사관리에 대한 세부적인 지침은 없는 상태.
- 종합적인 처치(Pest Control Service, Integrated Pest Management)에 대한 개념은 아직 없으며, 일부 청소방역업체에서 농약으로 일부지역 실험하는 실정임.



보도자료



2017년 8월 14일 배포시부터 보도하여 주시기 바랍니다.

농림축산식품부 구제역방역과 김용상 과장, 이동식 사무관(044-201-2541)
축산환경복지과 이상혁 과장, 안규정 서기관(044-201-2352)
식품의약품안전처 농축산물안전과 양창숙 과장, 문성심 사무관(043-719-3248)
국무조정실 농림정책과 송태복 과장, 김동현 사무관(044-200-2231)
/ 제공일 : 8월 14일(총 3매)

농업! 미래성장산업의 새로운 심장!

국내산 계란에서 살충제(피프로닐 등) 검출 - 모든 농장 계란 출하정지, 일제검사 실시 후 합격 계란만 유통 허용 -

□ 농림축산식품부(이하 농식품부)는 국내 친환경 산란계 농장을 대상으로 일제 잔류농약 검사를 실시하던 중, '17.8.14. 1개 산란계 농가에서 피프로닐 살충제가 검출되었고, 1개 산란계 농가**에서는 비펜트린이 기준치를 초과하여 검출되었다고 밝혔다.

* 경기도 남양주시 소재 A농장 피프로닐 검출(8만수 사육, 생산량은 일 25천개)
: 0.0363mg/kg / 0.02mg/kg(코덱스 기준치, 국내에서는 미설정)

Fipronil(피프로닐) : 닭에서 사용 금지되어 있으며, 개·고양이의 벼룩·진드기를 구제하기 위해 사용됨. 미국 및 유럽 등에서도 사용기준은 우리나라와 동일

** 경기도 광주시 소재 B농장 비펜트린 검출(6만수 사육, 생산량은 일 17천개)
: 0.0157mg/kg/ 0.01mg/kg(코덱스 및 국내 기준치 동일)

Bifenthrin(비펜트린) : 닭의 이(와구모)에 사용이 기준치(0.01ppm)허용되어 있음

※ 농식품부는 그 동안 무항생제 인증농가 대상으로 잔류농약 검사를 지속 실시 해 왔으며, 피프로닐이 검출된 사례는 없었음

그림 6. 농림축산식품부 보도자료

표 3. 닭 진드기 방제 약제[동물용의약품외품] 허가 현황

연번	제 품 명	제 조 업체 명	유 효 성 분	대 상	주 의 사 항	판매여부 (2017년)
1	와구프리	팜한농(주)	개미산+피리다벤	빈축사	주 의 사 항	○
2	에소다린유제	(주)한동	날리드	축체, 축사	축체사용 시 도축 2일전까지 사용	X
3	와구프리 블루	팜한농(주)	비펜쓰린	빈축사		○
4	카바린분제	(주)삼우메디안	비피엠씨	빈축사		○
5	바라살-P	한국셈벨(주)	비피엠씨	축체, 축사	축체사용 시 도축 15일전까지 사용	○
6	일렉터 피에스피	한국엘랑코 동물약품(주)	스피노사드	축사, 축사주변		○
7	사이퍼킬-WP	(주)성원	사이퍼메스린	축체, 축사	축체사용 시 도축 7일전까지 사용	X
8	사이퍼킬-골드(액)	(주)성원	사이퍼메스린	축체, 축사	축체사용 시 도축 7일전까지 사용	X
9	사이퍼 킬러	(주)중앙바이오텍	사이퍼메스린	축체, 축사	도살 7일전까지	○
10	사이퍼-30	한국셈벨(주)	사이퍼메스린	축체, 축사	축체사용시 도축 7일전까지 사용	○
11	사이퍼-15EC	한국셈벨(주)	사이퍼메스린	축체, 축사	축체사용시 도축 7일전까지 사용	X
12	와구프리 옐로우	팜한농(주)	클로르피리포 스메틸+클로르 페나피르	빈축사		○
13	볼포(제조, 수입)	바이엘코리아(주)	프로폭서	빈축사		X

* 동물용의약품 살충제 중 용법용량 및 효능효과에 "닭진드기"가 있는 제품('17.12월 현재)

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

- 유럽국가의 진드기 감염률은 무창계사 60~85%, 종계54%(poultry welfare sympo. 2009)
- 유럽국가들의 이병은 주로 유통경로(중추, 난좌 - 농장간의 이동)
- 아시아와 남미국가의 경우는 야조류와 유통경로 둘다 원인
- 유럽의 경우 진드기가 숨을곳이 많은 복지형 케이지로 전환하며 문제가 심각해짐
- 국가별 투약형태가 달라 진드기의 유전적 다양성이 높아진 것으로 보고됨
- 다양한 형태의 방제방법
 - 화학적 방법
 - 살충제 및 살비제 - organo-phosphate, carbamate, pyrethroid 일반적 사용
 - 친환경 기피제 - garlic, neem tree, cinnamon, oregano oil, thyme
 - 등유, 경유, 계면활성제 - suffocation 유발, 부분적 효과
 - 물리적 방법
 - 탈습제(실리카, 규조토, 석회) - dessiccation 유발, 현재 유럽에서 주로적용

- 계사 전체를 60도에서 2시간 유지 - 화재우려, 제한적 방식
- 오존을 이용한 계사소독
- 생물학적 방법
- 백신 - 개발 중, 현재까지 실험된 효과는 50%이하
- 천적이용 - 저밀도에서만 가능
- 점등프로그램 - 닭에게 스트레스 및 산란저하

제 3 절 연구개발의 범위

1. 연구개발의 최종목표

가. 최종목표

- 닭진드기 감염실태, 양계농가 약제사용, 감수성 및 잔류성 실태 조사
- 효과적인 감수성 천연물소재 선발 및 안전성 조사
- 물리적 방제법과 조합복합추출물을 혼합한 닭진드기 구제용 신약개발로 진드기 방제효율 향상 및 내성획득 최소화
- 계란과 양계 축체에서 약제 잔류성 분석 및 적정 휴약기간 선정
- 개발약제의 현장적용 연구를 통한 가축전염병, 인수공통전염병 방제율 제고

나. 세부목표

- 전문가 자문회의 : 동물용의약품 허가 관련 전문가 자문회의를 연구 개시시점에서부터 주기적으로 개최하고 연구 진행단계별 자문을 받아 이를 연구개발에 적극 반영.
- 닭진드기 감염실태, 양계농가 약제사용, 감수성 및 잔류성 실태 조사
- 효과적인 감수성 천연물소재 선발 및 안전성 조사
 - 진드기에 유효한 물리적 방법과 천연물 조합복합추출물을 활용한 닭진드기 방제용 친환경 살충제 개발로 진드기 방제 효율 향상 및 내성획득 최소화
 - 조합복합추출물에 대한 닭진드기의 감수성 및 유효농도 조사
(천연물추출물 감수성 검사(성충, 유충, 알))
 - 후보 약제 혼합물 적정 조성 도출 및 적정 용법용량 실험(희석배율 500배 수준)
 - 후보약물의 닭에서 유효성 시험(3반복 실험, 유효성 방제율 90% 이상)
- 기능성 원료의 원료표준화 및 QC 조건 확립 : 기능성 살충소재의 허가에 적합한 원료표준화와 지표성분 함량결정 및 QC 조건 확립
- 대상동물, 식품, 인체 및 환경 안전성 시험·평가
 - 계란과 양계 축체에서 약제 잔류성 분석 및 적정 휴약기간 선정
 - 용법에 근거한 닭 안전성 평가
 - 사용자 안전성 평가(급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안자극성)
 - 환경 안전성 평가(어류독성 등)
- 효과적인 제품 및 용법 개발
 - 물리적소재와 조합복합추출물 제형화(실리카와 선발약제 혼합)
 - 필드 효능실험(혼합제형 야외 효능평가, 성충 사멸율 95% 이상, 효능유지 90일 이상, 닭체

내 및 계란내 잔류량은 잔류허용범위 이내)

- 약제적용 방법 확립(모니터링, 투약시기, 처치방법, 장비, 처치 후 사후관리, 휴약기간)

○ 효능성분의 작용기전 규명 : 기능성원료 효능성분의 닭진드기 살충효과에 대한 작용기전을 규명하여 동물용의약외품 허가 신청 시와 사업화 시의 과학적 근거 자료로 활용.

○ 동물용의약외품 허가 신청 : 결과종합 및 전문가 컨설팅을 통한 농림축산검역본부에 동물용의약외품 허가 신청 후 승인

○ 원재료 수급방안 구축 : 표준화된 고품질 원료의 수급대책 마련

○ 기능성 원료를 사용한 살충제 개발 및 사업화 : 기능성 원료를 이용한 동물용의약외품 개발 및 사업화

○ 선행연구 결과를 바탕으로 국내 산림자원인 조협, 고삼 등을 이용하여 원료표준화, 모델동물(닭)에 대한 기능성과 안전성 평가를 통하여, 조합복합추출물을 <닭진드기 살충>에 좋은 기능성원료로서 농림축산검역본부로부터 동물용의약외품 허가를 획득하는 것을 목표로 함.

2. 연차별 개발목표 및 내용

가. 연구개발 목표

	주관연구기관(경기도경제과학진흥원)	협동연구기관(비오지노키)
1차년도	원료표준화 추출물의 원료 표준화 및 원료유전형질 판별, 살충기전연구 I	20 농장 닭진드기 감염현황 조사, 약제 사용실태 및 저항성 검사, 천연물추출물 20 종 이상 감수성 검사
2차년도	동물적용시험용 소재의 지표성분 함량 분석, 살충기전연구 II	효과적인 감수성 천연물소재 선별 및 안전성 조사, 독성평가, 안자극성시험 및 잔류성 평가
3차년도	동물적용시험용 소재의 지표성분 함량 분석	필드 유효성 및 지속기간 평가, 약제적용방법과 모니터링, 처치방법, 처치 후 사후관리법 개발, 안전성 평가

나. 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

1) 1차년도

가) 전문가 네트워크 구축 및 전문가 자문회의

- 동물용의약외품 전문가 및 정책 전문가 네트워크 구축
- 연구시작 시점부터 총 5회의 회의 진행
- 성공적인 연구 성과 및 결과물이 발생될 수 있도록, 연구 개시시점에서부터 동물용의약외품 관련 전문가로부터 주기적으로 컨설팅(연구개발, 대량생산, 원료표준화, 사업화, 마케팅, 개발인정, 인허가 관련 등)을 받고 이를 연구개발에 적극 반영할 계획임.

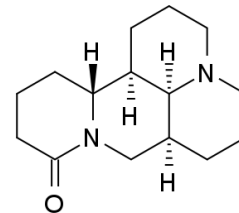
나) 기능성 원료의 개발 및 원료 표준화

- 한·중·일 3국 공정서, 전문서적 및 관련 본초서의 비교 검토를 통해 그 기원식물에

대한 정확한 감별 및 이화학적 규격 분석을 통하여 다음과 같은 내용으로 연구를 진행.

- 국내·외 기원식물의 원산지 및 재배지 환경 등 실태 조사
- 각 생약의 채집시기를 고려하여 되도록 신선한 것을 채취하여 기능성 원료로 사용하는 것으로 함.
- 문헌조사
 - 각국 공정서 규격 비교
 - 기원식물의 확인 및 감별자료 수집 (우리나라 공정서 기원이 2개 이상의 근연식물인 경우에 대하여)
 - 약재의 사용부위를 중심으로 외부 형태학적 특성 분석하고, 채집할 생약의 기원식물에 대한 형태학적 사진과 약용부위에 대한 사진을 첨부
- 채취 및 수집
 - 국내 생산 기원종을 우선 확보 후, 국내 생산하지 않는 약재의 기원은 주요 수출국에서 확보
 - 직접 방문 또는 자문위원단을 통한 확보
- 선행연구 패턴분석
 - 기존의 본 기관에서 선행연구 되어 있는 분석자료를 바탕으로 이미 확보된 샘플들의 패턴 차이를 관찰 (연구방법 란에 구체적으로 제시되어 있음)
- 지표성분 설정 및 표준함량 설정
 - 조협복합추출물을 high performance liquid chromatography-DAD (HPLC-DAD)방법으로 분석하여, 조협복합추출물에서 가장 많은 성분은 조사포닌과 마트린(matrine)을 분리 동정하여 지표물질로 설정하였음.

Gledinin
gledigenin
gleditschia saponin
Gleditsiosides A~Q
gleditsia saponins



Triterpenoid saponins

Matrine

(지표성분 : 조협의 조사포닌과 고삼의 Matrine 구조)

- 원재료 표준화
 - 식물종의 기원, 사용한 식물의 부위, 성장 및 재배조건(재배지역, 기후 및 생육), 채취시기, 저장조건 등을 고려하여 지표를 설정할 것임.
 - 사용부위에 대한 표준화 : 조협은 건조 열매, 고삼은 뿌리를 사용 부위로 한 원료로 표준화를 할 것임.
- 원료 제조공정 표준화
 - 원료 분쇄도에 따른 지표성분 함량비교
 - 추출용매는 선행연구결과에 따라 주정(酒精)추출의 주정의 농도별 지표성분 함량비교 및 다양한 물 추출물을 병행할 것임.

- 추출온도에 따른 지표성분 함량비교



(기능성원료의 표준화)

- 지표성분 설정 및 표준함량 설정
 - 조합, 고삼 등의 지표성분 분리/정제 및 구조를 규명할 것임
 - 각 조건별로 제조된 원료에서 분석을 통해 2가지(조합 추출물 : 조사포닌, 고삼추출물 : 마트린) 지표물질의 함량을 조사.
 - 원료표준화 뿐만 아니라 지표물질의 함량 분석을 통해 완제품의 안정성과 QC를 수행함.
- 유효성분 설정
 - 조합, 고삼 등의 유효성분 분리/정제 및 구조를 규명할 것임
 - 유효 성분을 in vitro에서 효능 평가 후 살충 기전연구 실시

다) 조합복합추출물의 제조공정 표준화 및 기준규격 설정

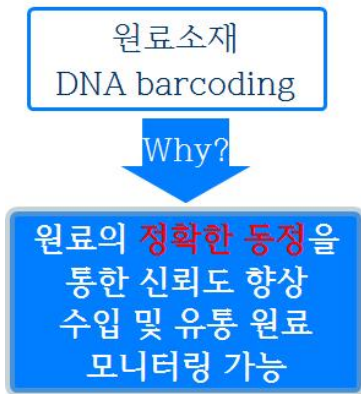


- 원료표준화 자료를 바탕으로 제조공정 표준화시 고려해야 할 사항은 추출법, 추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 건조방법 등이 있음.
- 제품의 기준규격 항목은 성상, 기능/지표성분의 함량, 유해물질에 대한 것으로, 기준규격 설정방법은 표준화 과정의 결과를 각 항목별로 설정함
- 동물용의약품 품목신고를 하여 동물용의약품으로 사업화 할 수 있도록 저장안정성을 위해 안정제나 유화제를 부형제로 사용하고, 효율적인 효과를 위해 계면활성제나 전착제 등을 사용하여 제형화하여 소재화를 완료함.

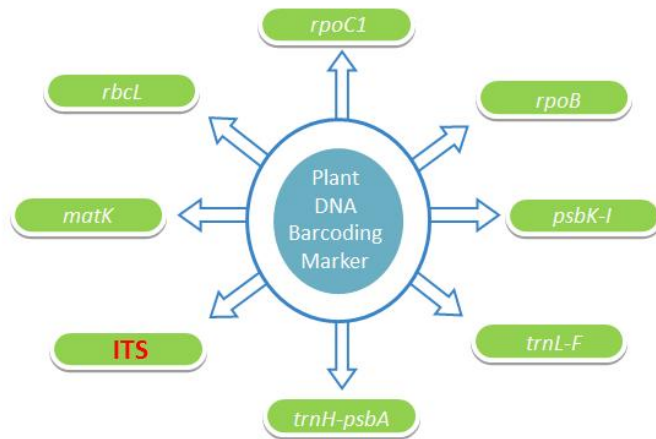
라) 표적유전자 확보 및 유전자감별법 확립

- DNA barcoding : 생물종의 식별에 유의한 DNA 염기서열 조각을 바코드처럼 이용한 생물종을 동정함으로써 유통 원료의 모니터링을 강화함
- DNA 바코딩의 다양한 마커 중 조합과 고삼 등에 적합한 마커로 알려진 ITS(Internal transcribed spacer)마커를 이용할 것임

DNA barcoding을 활용한 원재료의 유전학적 감별



Representative Plant DNA Barcoding Markers



마) 농장 약제사용실태 및 닭진드기 감염현황 조사

- 지역별 농장방문(20농장 이상), 내성 분석을 위한 약제처리농도, 시점 및 처리방법, 잔류성 분석 샘플확보

바) 천연물 30종 이상 감수성 검사(성충, 유충, 알)

- 사멸시간과 관찰 결과기록, 온도 30도, 습도 75% 조건에서 2주간 관찰

사) 안정성, 잔류성 조사 및 문제점 분석

- 국내외 사용허가 제품 유효성분의 안전성 및 잔류성 자료 조사 및 분석

허가제품 (또는 유효성분)		자료 조사
국내	• 와구프리 레드 (피리다벤, Pyridaben)	유효성분에 대한 독성, 잔류성, 닭 및 계란에서의 잔류허용기준 등 자료 조사 (논문, EMEA, WHO 등)
	• 와구프리 블루 (비펜스린, Bifenthrin)	
	• 와구프리 옐로우 (클로르피리포스-메틸, Chlorpyrifos-methyl + 클로르페나피르, Chlorpenapyr)	
	• 일렉터 피에스피 (스피노사드, Spinosad)	
국외	• 폭심 (Phoxim)	
	• 아버멕틴 (Abermectin)	
	• 사이플루쓰린 (Cyfluthrin)	
	• 아미트라즈 (Amitraz)	

아) 국내 사용중인 미허가 제품의 유효성분의 안전성 및 잔류성 자료조사 및 분석

- 조사자료 : 독성, 잔류성, 닭 및 계란에서의 잔류허용기준 등

자) 후보 천연물 추출물의 닭에서의 안전성 및 잔류성, 잔류허용기준 조사

- 안전성 자료 조사 : TOXNET, JMPR, FAO, EPA, EMEA 등의 안전성 평가 자료 조사

- 닭, 계란 등의 잔류성 자료 조사 : FAO, JMPR, 미국 CVM, EFSA 등 잔류성 평가 자료 조사

차) 살충기전연구 I

- 닭진드기의 살비표적 유전자/단백질 및 생물학적 정보 분석
- 닭진드기로부터 살비 분자표적 유전자원 확보 및 선발
- 선발된 유전자원의 재조합 단백질 생산(대장균 및 벡톨로바이러스 제작)
 - 후보 살비 분자표적(들)의 발현 및 정제
 - 순수 정제된 분자표적 단백질의 특성 분석
- 살비효능을 가지는 천연물 추출물을 통한 분자표적 단백질(들)의 생리활성 저해에 대한 평가
- 선별된 분자표적을 통한 살충기전 이해

2) 2차년도

가) 실리카 등 물리적 억제제의 성상분석과 농도별 지속성 및 유효성 파악

- 살비능력, 물리적 성상 규명, 이후 희석 농도별 살비능력과 지속성 파악(3, 6, 9, 12개월)

나) 천연물 추출물의 성상분석과 농도별 지속성 및 닭에서 유효성 파악

- 원제의 성상분석 및 성분분석 자료 확보
- *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 통한 유효성 확보
- 실험실내 닭에 살포 후 유효성 평가(트랩방법을 이용한 밀도 측정, 처치 후 95% 이상 사멸)
- 케이지, 벨트, 플라스틱, 먼지 등의 물질에서 약제 잔류 및 지속시간 측정

다) 조합복합추출물 혼합제에 대한 농도별 실험실 유효성 평가

- 천연물 2종이상 혼합 시의 성상과 시너지효과, 사멸을 관찰

라) 조합복합추출물의 대량생산 제조 시스템 구축

- 원재료의 대량 건조 시설 구축
- 기능성 원료의 대량 생산시설 구축
- 기능성 원료의 보관 안정성 평가

마) 천연물 추출물 억제제의 개별 안전성 자료조사 및 평가

- 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안자극성 등
- TOXNET, JMPR, FAO, EPA, EMEA 등의 안전성 평가 자료 조사
- 안전성 평가 자료가 없는 후보물질에 대하여 “동물용의약품등의 독성시험지침(농림축산검역본부 고시 제 2016-22호)” 또는 OECD 가이드라인에 따른 인축 독성시험 실시
- 급성경구독성시험 : 동물용의약품등의 독성시험지침 또는 OECD TG 420, 423, 425 등에 따른 반수치사량 산출
- 급성경피독성시험 : 동물용의약품등의 독성시험지침 또는 OECD TG 402에 따른 반수치사량 산출
- 피부자극성시험 : 동물용의약품등의 독성시험지침 또는 OECD TG 404에 따른 피부자극성 및 피부 부식성 평가
- 안자극성시험 : 동물용의약품등의 독성시험지침 또는 OECD TG 405에 따른 눈에 대

한 자극성 평가

- 작업자 독성 평가 : 피부노출량, 흡입노출량, 작업자 안전량 등 평가

바) 조합복합추출물제제 개발 환경안전성 자료조사 및 평가

- 어류 독성 등 환경 독성 평가
- TOXNET, JMPR, FAO, EPA, EMEA 등의 환경 안전성 평가 자료 조사
- 환경 안전성 평가 자료가 없는 후보물질에 대하여 또는 OECD 가이드라인에 따른 환경 안전성 평가 실시
- 환경 유입량 등 평가 : VICH Guideline 'Environmental Impact Assessment(EIAS) for Veterinary medical products'에 의거하여 평가

사) 개발 복합제의 안정성 평가

- 개발 복합제의 가속조건 실험
 - 40±2°C 에서 75±5%의 습도조건에서 0, 3, 6, 12개월 실시
- 개발 복합제의 장기보존 실험
 - 25±2°C, 60±5%의 습도조건에서 시험개시 때와 첫 1년간은 3개월 마다, 그 후 2년 까지 6개월 마다, 2년 이후부터는 1년에 1회 시험(0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36개월)

아) 선발 복합제의 개별 잔류성 평가

- 닭에서의 흡수율, 계란에서의 흡수율, 사료에서의 오염을 및 지속성
- “동물용의약품등 잔류성 시험지침(농림축산검역본부 고시 제 2016-23호)”에 따른 후보 약제의 닭, 계란 및 사료에서의 잔류성 평가
 - 각 시료별, 분석물질별 분석 validation 확립
 - 각 시료별, 분석물질별 전처리법 확립
 - 필요시, 유효성분의 닭 가식부위 및 계란 내 잔류허용기준 평가

자) 살충기전연구 II

- 살비 유효화합물에 대한 후보물질과 닭진드기 분자표적 단백질 간의 상호작용에(생리 활성 저해기능) 대한 평가 및 단일 유효화합물 선별

3) 3차년도

가) 기능성원료 효능성분의 닭진드기 살충 및 생체내 대사물 작용기전 규명

- 조합, 고삼 등 성분을 분획 및 분석하여 효능성분을 동정하여서 조합과 고삼 등의 효능성분의 닭진드기 살충활성 분자 기전을 규명하고자 함.
- 효능성분의 닭진드기 살충 작용기전 규명에 대한 데이터는 특허 출원, 논문발표 등의 과학적 근거 제시와 더불어 조합복합추출물의 동물용의약품 허가 신청에도 중요한 효능 근거자료로 활용할 계획임.
- 1차년도에 분리 동정된 유효성분의 생체내 대사물의 작용기전을 규명할 것임.

나) 조합복합추출물에 대한 필드 유효성 및 지속기간 평가

- 야외적용시 유효성 평가(현장의 사전밀도 조사 후 주/격주 단위 모니터링으로 밀도 판정, +, ++, +++, ++++ 밀도에서 약제처치시 사멸을 조사. 트랩에서의 밀도조사)
- 혼합물질의 야외적용시 지속성 파악(3, 6, 9, 12개월)

다) 습도와 환경에 따른 적정 사용조건 평가

- 습도챔버를 사용한 70%, 80%, 90% 습도조건에서 물리적 성상 확인, 사멸을 확인

라) 약제적용방법과 모니터링 및 투약시기 판단, 처치방법, 최적장비, 처치 후 사후관리법 판단

- 투약후 주기적 모니터링 방법 확립
- 혼합물질 투약방법과 관리중점 포인트 확인
- 트랩모니터링 방법을 이용한 밀도관찰로 사후관리 방법 확립

바) 계사타입과 조건에 따른 약제효능 파악

- 처치방법 및 빈발 부위에 대한 지속성 및 발생 측정
- 쫓대, 틈, 접힌부위 및 덕트내부에 대한 사전/사후 조건 평가

사) 개발 복합제의 용법 용량에 따른 계란과 계육에서의 잔류성 검사

- “동물용의약품등 잔류성 시험지침(농림축산검역본부 고시 제 2016-23호)”에 따른 잔류성 시험·평가
- 잔류성 시험후 휴약기간 설정 프로그램을 통한 적정 휴약기간 설정

아) 개발 복합제의 사용자 안전성 평가

- 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안자극성 등 안전성 평가
 - “동물용의약품등의 독성시험지침(농림축산검역본부 고시 제 2016-22호)”와 OECD 가이드라인에 따른 인축 독성시험 실시
 - 급성경구독성시험: 동물용의약품등의 독성시험지침 또는 OECD TG 420, 423, 425 등에 따른 반수치사량 산출
 - 급성경피독성시험: OECD TG 402에 따른 반수치사량 산출
 - 피부자극성시험: 동물용의약품등의 독성시험지침 또는 OECD TG 404에 따른 피부 자극성 및 피부부식성을 평가
 - 안자극성시험: OECD TG 405에 따른 눈에 대한 자극성 평가
- 작업자 독성 평가 : 피부노출량, 흡입노출량, 작업자 안전량 등 평가

자) 개발 복합제의 환경안전성 평가

- 어류 급성독성 등 환경 독성 평가
 - “화학물질의 시험방법에 관한 규정 [별표] 화학물질의 시험방법 제 3장 생태영향 시험분야 (국립환경과학원고시 제 2015-8호)” 또는 OECD 가이드라인에 따라 생태영향평가 수행
- 환경 유입량 등 평가
 - VICH Guideline “Environmental Impact Assessment(EIAS) for Veterinary medical products“에 의거하여 평가

차) 원재료 수급방안 구축

- 원재료 수확 지침 개발과 농가 교육을 통한 양질의 원재료 수급방안 마련
- 조협은 보고약업사에서 원료 수급 및 양해각서 체결 완료
- 원재료 수확에 대한 지침을 개발하여 농가 교육을 통해 양질의 원재료 수급 방안을 마련함.

양해각서

(재)경기도경제과학진흥원과 보고약업사(이하 "양 기관"이라 한다)는 학술교류 및 연구개발 등 사업화분야 전반과 산학연협력의 동반 성과창출을 위한 상호간 업무협력 교류의 필요성을 공동으로 인식하고 다음과 같이 협약을 체결한다.

제1조(목적)
본 협약서는 양 기관 간 상호 발전과 협력증진에 관한 사항을 규정함을 목적으로 한다.

제2조(기본원칙)
가. 본 협약서에 명시된 사항은 상호 신뢰와 성실의 원칙에 입각하여 준수한다.
나. 양 기관은 상호협력에 있어서 평등, 상호주의 및 효능성을 기초로 상대 기관의 제반 규정을 존중한다.

제3조(협력분야)
학술교류, 인적교류 및 연구 개발 등과 관련하여 양 기관이 필요하다고 합의한 내용으로 정한다.
가. 의료현장의 의료수요 충족을 위한 목표지향적 공동연구 추진
나. 개방형 혁신을 통한 신약 연구개발 협력 강화
다. 양 기관의 보유시설, 인적자원, 협력 네트워크 공동 활용
라. 기타 양 기관의 우호증진에 관한 사항

제4조(비밀의 준수)
양 기관은 본 협정에 의거한 연구협력 과정을 통하여 취득한 상대 기관의 기밀사항에 대하여 비밀유지와 유출방지를 위해 상호 협력하며, 상대방의 동의 없이 제3자에게 제공하거나 공개하지 아니한다. 본 협약이 종료 또는 중단되더라도, 양 기관의 본 조항에 따른 의무는 협약 종료 또는 중단일로부터 5년간 지속된다.

제5조(비용의 부담)
양 기관은 합의 사항의 이행에 필요한 제반 경비는 수혜자 부담을 원칙으로 하며, 그 외 필요한 경비는 상호 협의하여 결정한다.

제6조(협약의 구속력)
가. 본 협약은 양 당사자 간에 어떠한 법적인 구속력도 가지지 않는 것을 원칙으로 한다.

나. 본 협약에 의한 상호간 업무협력이 지연되거나 성사되지 않는 경우, 또는 본 협약이 중단 및 종료된 경우에도 양 당사자는 상대방에 대하여 손해배상청구 등 어떠한 법적 문제도 제기하지 않는다.
다. 본 협약서는 각 당사자와 제3자와의 전략적 제휴 및 기타 협약의 체결을 금지하거나 제한하지 않는다.
라. 본 조에도 불구하고 제4조는 양 당사자 간에 구속력이 있으며, 일방이 제4조의 비밀 유지 의무를 위반하여 상대방에게 손해가 발생한 경우, 이에 대한 직접적 손해를 배상하여야 한다.

제7조(협약의 변경 및 중단, 종료)
가. 양 당사자는 본 협약의 효력발생 기간 중 상호 서면 합의에 의해 본 협약내용을 변경할 수 있다.
나. 양 당사자는 상호 서면 합의에 의해 본 협약을 중단 또는 종료할 수 있다.


제8조(효력발생 및 유효기간)
가. 본 협약서는 양 당사자가 서명한 날로부터 효력이 발생한다.
나. 본 협약의 유효기간은 양 당사자의 서명 날인일로부터 제7조에 따른 본 협약 중단 또는 종료 시 까지로 한다.

본 협약이 유효하게 체결되었음을 증명하기 위하여 양 당사자는 본 협약서 2부를 작성한 다음 각각 1부씩 보관한다.

2018. 3. 20

(재)경기도경제과학진흥원
천연물연구팀장 최 춘 환

보고약업사
대표 문종득



(보고약업사와 조협 원료수급 및 양해각서 체결)

2. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 문헌검색을 통한 방제제 현황

1. 문헌연구를 통한 소재선별

가. 연구배경

- 산란계 생산에 있어 가장 큰 영향을 미치고 있는 닭진드기는 닭붉은몸 (fowl red mite)이며 특히 봄부터 가을까지 이 닭진드기는 번식하기 좋은 시기에 문제를 야기하고 있어 농민들은 고민거기로 취급하고 있다. 더불어 잦은 살충제 사용으로 저항성을 발달하여 사용 가능한 약제 수 역시 줄어들고 있는 것이 현실이기 때문에 이들을 보완하고 대체할 수 있는 대체제 개발이 시급한 실정이다. 반복적인 농약의 사용으로 인해 약제 내성균의 출현과 농산물의 잔류독성 및 환경오염 등의 증가로 새로운 살충제에 대한 개발이 필요하며, 친환경 농산물을 선호하는 심리적인 변화가 강하게 일어나고 있어 국내 환경을 고려한 친환경 방제제 개발이 필요한 실정이라 할 수 있다.

- 천연물을 이용한 처방들이 곤충 살충 작용에 많이 활용되고 있다. 처음 인간에게 사용된 살충 화합물은 식물로서 고대기록에 나와있으며 Dioscorides-opium, colchicum, aconite, veratrum 등으로 모두 천연물이다. B.C. 5세기 지중해연안에서는 식물의 수정을 조절하기 위하여 해충약으로 사용되는 식물추출물을 곤충에게 사용하였다. houseleek(돌나물), wild cucumber(오이)의 추출물을 씨에 적시기도 하였다. 이외에 bitter lupin, absint, 썩, 시더, 갈릭, 무화과, 참나무, 아사포에티다, 아카시아, 석류 등을 사용하였다. 17세기까지 사용해 온 것들 중에 sabadilla, nicotine, pyrethrum, rotenone 등이 개발되었으며 nicotine의 경우 미국에서 pyrethrum 및 hellobore의 경우 유럽에서 개발이 되었다. 그러나 큰 규모의 해충 조절약이 연구가 되기 시작한 것은 1920년 경 미국의 농업부 및 영국의 Rothamsted Experimental station에서 시작되었다. 그 결과 등장한 약품이 중국에서 장기간 사용한 Derris근과 Lonchocarpus속 콩과식물 추출물이 상용화 되었다. 현재 2000여종의 식물이 해충박멸효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며(1984, Ahmed 등), 이들은 대부분 지역적으로 인간에게 약으로 사용된 민간약으로 현재도 사용되고 있으며 해충박멸 또는 기피제로서 사용되고 있으며 해충박멸 또는 기피제로서 사용된다. 현재 세계는 기후 온난화 또는 물의 보호로 인한 곤충의 증가로 이들로 인한 질병 또는 환경파괴 등에 대처하는 방법과 약물개발이 매우 필요한 상태이다. 따라서 이런 천연물에 대하여 해충박멸에 대한 새로운 정립과 새로운 방제제로서의 자원개발이 절실한 실정이다.

나. 곤충조절의 모델과 자원으로써 주로 시판되고 있는 천연물

1) Rethrine

- 현재 천연물에서 가장 경제적이고 많이 사용되는 화합물군으로 Chrysanthemum cinerariaefolium과 C. coccineum에 함유되어 있으며, 6개의 ester 화합물이 많이 들어 있고 1971년 일본의 Matsui와 Yamamoto에 의해 상품화 되었다.
- rethrine은 pyrethrolone, cinerolone, jasmolone등의 3개 알코올기를 함유하는

chrysanthemic acid와 pyrethric acid의 2개의 산 유도체로 구성되어 있다. 이들 물질을 pyrethrine I, II 다음으로는 cinerin I,II 이어서 jasmolin I, II로 명명하였다.

- Pyrethrum 꽃은 1800년대 페르시아와 유고슬라비아에서 천연 살충제로 알려져 있었으며, 천연살충제로서 1945년 미국에 1800만 달러정도로 가장 많이 팔렸다.

- rethrin류 하나만으로는 해충조절약으로서 모든 것을 충당하는 것은 불가능하며, 더구나 rethrine 류가 빛과 빠른 대사로 인한 낮은 안전성 때문에 약물의 역가나 적용에 한계가 있었다. 이런 한계점이 활성물질의 이성체 합성에 대한 동기부여를 하였으며 이것이 pyrethroid라고 칭하게 되었다.

- Rethrine은 여러 모델 중에 날아다니는 곤충에 대하여 가장 빠르게 작용하며 rethrine은 곤충의 신경 세포에 작용하고 반복적으로 작용을 둔화시키고 평형감각을 잃게 한다.

- 포유류와 새에게는 이들 작용에 대한 기전이 매우 빠르게 분해되고 독성은 전혀 없었으며, 따라서 상대적으로 긴 시간 사용을 해도 상대적으로 안정하고 효과가 있었다.

2) Rotenoids

- Leguminose의 Derris의 radix로서 열대에 자생하는 식물로 중국의 남쪽지방에서 물고기를 잡을 때, 사냥을 할 때, 그리고 해충약으로서 사용하였다. 다른 유사한 열대지방에서는 Lonchocarpus 속, Tephrosia 속, Mundulea속, Milletia속 식물들이 비슷한 용도로 사용되었다.

- 이들 뿌리의 약효성분은 isoflavonoid화합물로 rotenoid라고하며 처음 분리된 것이 rotenoid(1)이며 1892년 Lonchocarpus nicou에서 1912년 Nagai에 의해 Derris chinensis로부터 분리되고 되었다. 화합물의 이름은 중국의 Derris chinensis를 중국에서는 roten으로 명명하고 있어 어원이 됨

- 근세에 들어 처음으로 해충제거제로서 발표한 것은 1848년 Oxley로 1983년 해충박멸 스프레이로 추출물이 특허로서 영국에서 등재되었으며 1911년 유럽에서 수행되었다.

- 1950년 이미 Derris근(D. elliptica, D. malaccensis, D. utilis, D. urucu) 재품이 7백만 파운드 유통이 되었고 1972년에는 미국에만 15백만 파운드가 유통되었고, 주로 집안 및 정원의 곤충 및 가축기생충에 사용되었다.

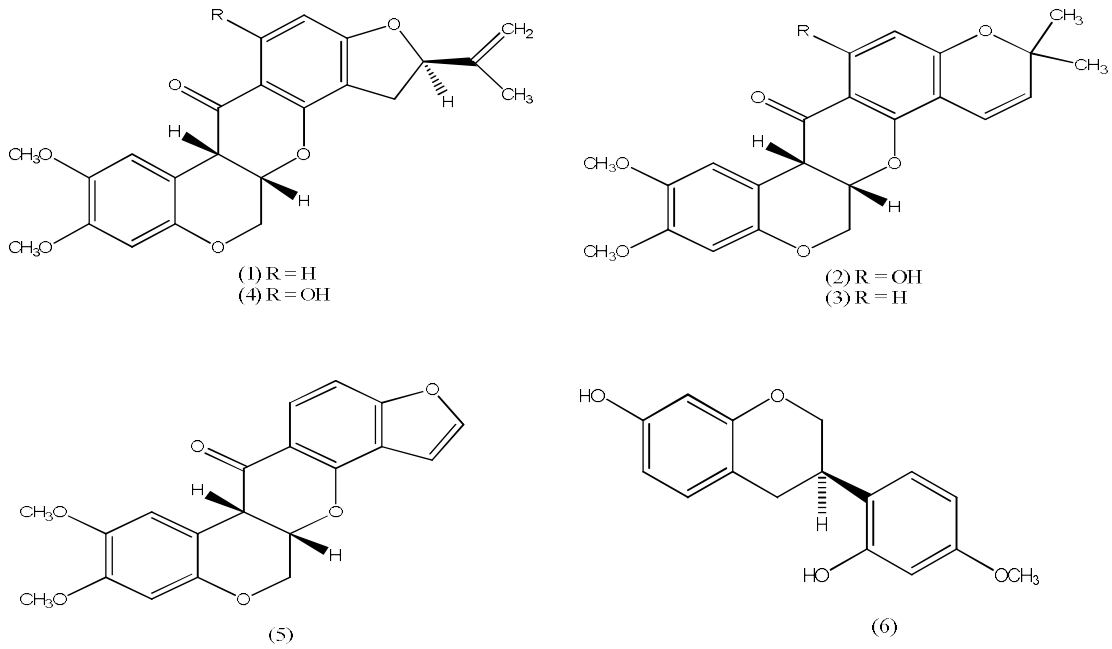
- Rotenone은 물고기 및 곤충에 대해서보다는 포유류에는 급성독성이 적으나 쥐에 대한 암유발 레포트가 발표되어 있으며, 곤충에 대한 접촉 및 위장에 독으로서 작용을 한다.

- 기전은 미토콘드리아호흡체인의 NADH-dependent dehydrogenase 단계를 방해함으로써 산소의 uptake를 감소시키며, 특히 rotenone은 나무 잎을 갉아먹은 풍뎅이 종류 및 췌기벌레에 효과적이다.

- 콩과식물의 여러 근연식물에서 10여종의 구조적으로 유사한 물질이 분리되어 보고되었으며 이것을 rotenoid라고 하였으며 4개의 ring인 chromanochromanone이라 한다.

- Rotenoid의 모든 B 및 C ring은 cis결합을 하고 있으며 D,E ring을 변화시키면 활성이 감소된다. 예를들어 toxicarol(2), deguelin(3), sumatrol(4), elliptene(5)등은 많이 떨어진다.

- 이외에 크게 구조와 활성간의 상관성은 없고 독성에 대한 연구 또는 합성과 관련된 연구가 진행되며 현재 rotenone 구조에서 약간의 구조적인 변화 vestitol(6)의 경우 곤충의 식이를 방해하는 것으로 알려져 있다.

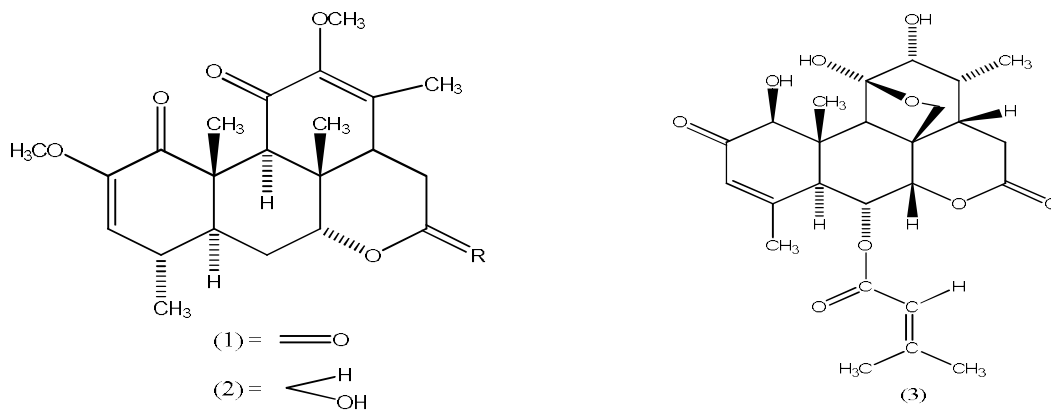


3) Quassinoids

- 미국에서 nicotine을 이용한 살충제는 매우 비싸기 때문에 1900년 초부터 살충효과를 가진 bitter wood(*Quassia amara*)를 연구하기 시작하였으며 열대지방에서는 이미 살충제로 사용하였다. 1939년 줄기를 미국에서 백만파운드 가량 수입을 하였으며 톱날집게벌레 (sawfly)와 진딧물을 제거하기 위하여 사용하였다.

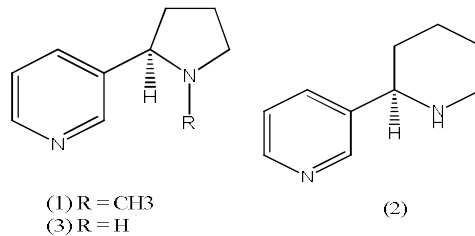
- 그러나 *Quassia*속의 chip은 매우 비싸고 좁은 적용영역을 가지기 때문에 미국에서는 여러 문제점이 있었다.

- 살충 효과의 주 물질은 변형 triterpene인 quassin(1)이로 1961년 구조가 밝혀졌으며 1980년 합성이 완성되었다. 또 하나는 neoquassin(2)으로 이때 관련화합물들을 quassinoid로 명명하였다. 재미있는 것은 최근 quassinoid의 약리 활성이 백혈병에 효과가 있다는 것 외에 항바이러스, 항말라리아, 항염, 항아메바, 곤충의 식이방해등에 효과가 있다는 것이다. 이는 대부분 quassinoid가 여러 암세포주에 활성을 보인다는 것으로 bioassay 결과 6- α -seneciolyloxychaparrinone(3) ring의 A-ring의 keto group과 C-6의 ester 그리고 C-ring의 oxymethylene 가교가 활성을 나타내는 부위이다.



4) Phytoalkaloids

- 식물성 알칼로이드는 한 개 또는 여러 개의 heterocyclic 질소 원소를 함유하는 화합물로 일반적으로 유기산과 salt 형태로 식물에서 발견되었다. 6000여개의 식물성 alkaloid가 보고되어 있으며 주로 동물의 신경계에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.
- 1935년 이미 담배와 Veratrum속 식물의 alkaloid가 살충약으로서 Robinson에 의해 보고가 되어 있고, 이들 알칼로이드를 함유하는 추출물이 이미 세계적으로 상품화되어 있으며 국제적으로 많이 유통되고 있다.
- 담배 잎의 경우 약 300년 이상을 살충제로 사용하고 있으며 추출하여 잎을 깎아먹는 곤충들을 제거할 때 뿌리게 된다. Pyridine 관련구조로는 1828년 분리보고된 nicotine(1)과 anabasin(2) 그리고 nor nicotine(3)등이 있으며, Nicotine 관련은 담배외에 Atropa, Equisetum, Lycopodium에 함유되어 있다.
- 1900년 중반에는 5백만 파운드가 1970년에는 125만 파운드로 감소되었고 이것은 높은 가격, 사람에게 대한 독성, 좋지 않은 냄새, 환경적인 불안정 등이 원인이다.



- Veratrum sabadilla 및 V. album 살충제로서 오랫동안 사용하여 왔으며 16세기 이를 구제하는데 사용한 것으로 알려져 있다. Sabadilla의 경우 1940년경 상품으로 개발되어 1946년까지 12만 파운드가 미국에 수입되었다.
- 오늘날 이 식물은 아주 제한적인 용도로 사용되는데 독성성분인 alkaloid가 30여종이 함유되어 있으며, 골격은 ceveatrum 핵(아래 핵)을 가진 polyol alkalamine ester이며 veratrine이라고 한다.
- veratrine은 cevadine, veratridine, cevadilline, sabadine, cevine의 mixture이며 다른 활성부분에 대하여 연구를 많이 진행하였으며, 이들 alkaloid는 점막세포에 대한 강한 자극 활성을 가지며 배자기형을 발생시킨다. 그러나 학자들은 이에 대한 연구에 대하여 희망의 끈을 놓지 않으며 조금 더 독성이 적고 특정 조직 또는 기관에 작용하지 않는 살충제를 만들 수 있을 것으로 생각된다.

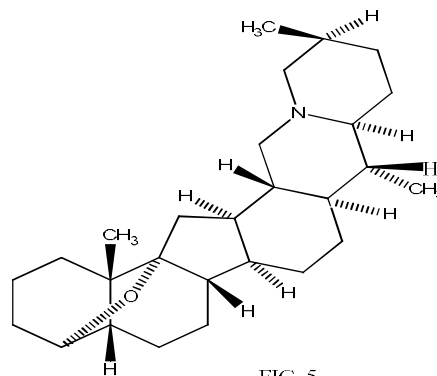


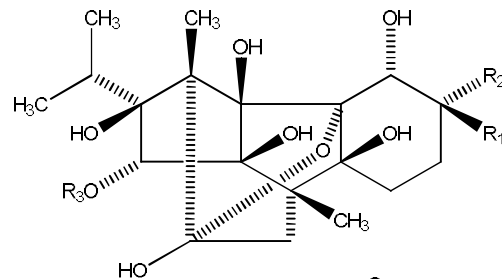
FIG. 5

- Rytania alkaloid는 열대 중남미 식물로 Flacourtiaceae과의 Rytania속 식물에서 분리되

었으며 옥수수나방, 사탕수수나방등의 해충박멸제로 1940년부터 유럽에서 사용한다. 주로 *Ryania speciosa* 지하부 뿌리의 추출물을 Ryanex 또는 Ryanicide등의 상품명으로 시판되고 있다.

- 가정 및 정원용 살충제로서 적게 쓰였지만 약효나 활성 형태적으로는 매우 괄목할만한 것이며, 다른 살충제보다 1헥타당 10g이하가 소요되기때문으로 약효는 근육독으로 마비 또는 이완을 시키거나 식욕을 차단하는 것으로 알려져 있다.

- *Ryania* 식물의 주 활성성분은 ryanodine(1)과 9,21-didehydroryanodine(2)으로 ryanodine의 경우 복합체로 포유류에 매우 독성이 있다. ryanodine은 가수분해되면 ryanodol(3)이 생성되며 매우 낮은 독성을 나타내나 효능에는 문제가 없으며, 현재 합성 및 유도체 연구가 활발하게 진행되고 있다.



- (1) R₁ = CH₃; R₂ = H; R₃ =
- (2) R₁, R₂ = =CH₂; R₃ =
- (3) R₁ = CH₃; R₂, R₃ = H

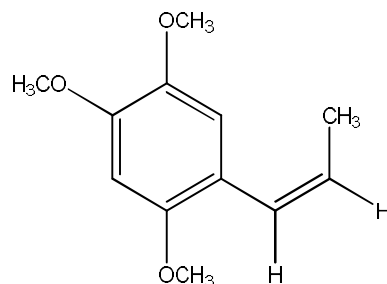
다. 해충을 컨트롤하는 식물소재

1) Acorus

- *Acorus calamus*(Araceae)의 근경은 일본, 인도에서 해충퇴치 및 독성성분으로 사용되었다(Jacobson, 1976). 근경의 정유성분이 나방, 모기, 파리, 이 그 외에 저장 곡식의 벌레에 매우 효과적이다.

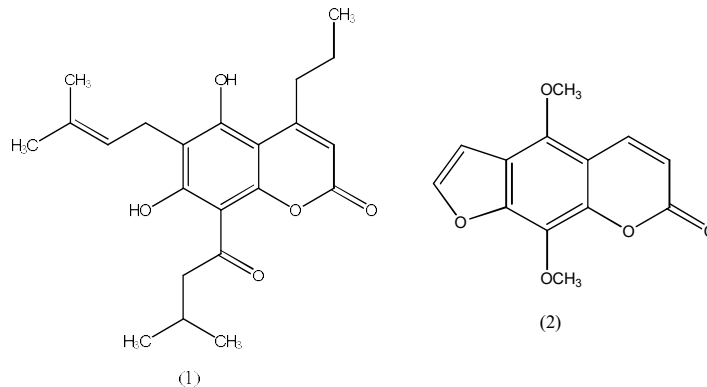
- 주성분 β -asarone은 red cotton bug(풍뎅이 일종)의 화학적 불임제 역할하며 다른 곤충에서도 그 역할을 한다. β -asarone은 여러 종의 곤충을 퇴치하거나 유인제로서 사용되며 이들 부분은 1983년 Labreque에 의해 증명되었다.

- 구조가 간단하므로 합성이 가능하며 특히 훈증제로서 창고 곡식 등에 많이 사용되며, 쌀 벌레가 이 성분에 약한 것으로 알려져 있다.



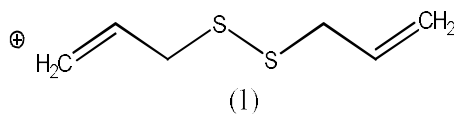
2) Mammea

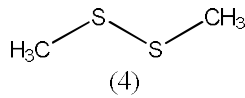
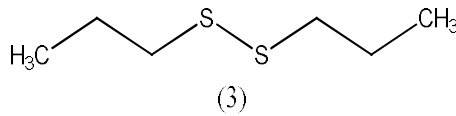
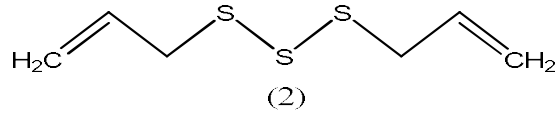
- *Mammea americana*(Guttiferae)의 잎과 종자를 사용하며 인디오들이 오랫동안 사용해 온 것으로 중남미에 자생한다. 예를 들어 Puerto Rico에서는 잎을 이용하여 집 마당의 주위를 둘러싸고 있는 식물의 초식성의 곤충으로부터 보호를 하고, *Mammea*의 종자는 분말 또는 물에 현탁시켜서 사용하며 땅벌레, 돈벌레, 벼룩, 진드기, 이, 모기, 파리 등의 해충의 독 또는 퇴치에 사용한다. 이 나무는 플로리다, 푸에르토리코, 미국의 버진아이랜드 등에서 재배 권장되고 있다.
- 주 활성성분은 mammein(4-n-propyl-5,7-dihydroxy-6-isopentenyl-8-isovalerylcoumarin, 1)로 처음에는 혼합물로 분리되었으며 관련화합물 수종도 분리 보고 되어있다.
- 약리기전은 산화적 인산화의 연결을 방해하는 것으로 다른 쿠마린의 경우 식욕억제효과가 있거나 살충효과가 있는 것으로 나타났다.
- furanocoumarin은 주로 Umbelliferae, Rutaceae에서 발견되며 이들이 해충에 효능이 있는 것으로 보고되며, 또 다른 isopimpinellin(2)의 경우 곤충의 식이를 방해하는 것으로 증명되었으며 역사적으로 보면 일본에서 채을 갇아먹는 곤충에 사용한 것으로 알려져 있다. 그러나 furanocoumarin의 경우 해충퇴치제로서는 그렇게 강력하지 않으며 그 이유는 세포내 단백질전사에 영향을 주어 암을 유발하는 것으로 보고되어지기 때문이다.



3) Allium

- *Allium sativum*과 *A. cepa*(Liliaceae)는 옛날부터 재배되어온 매우 오래된 식물로 각지 역별로 민간약으로 알려져 있다. 마늘과 양파의 추출물이 항진균 및 항박테리아 작용 그리고 혈전용해작용등 다양한 활성을 나타낸다. 또한 이들은 해충박멸효능이 있고 특히 모기의 유충을 죽이는데 매우 효과적이고 또한 망고기생 유충에도 매우 효과적인 것으로 보고되어 있다.
- 마늘 오일의 주 활성물질은 diallyldisulphide (1) 와 diallyltrisulphide (2) 이고 양파의 경우 dipropyldisulfide (3) 가 주물질로 덩기열 모기 유충에도 효과가 있다. 독성이 없고 따라서 고농도로도 사용할 수 있고 천연 및 합성 양쪽을 모두사용이 가능하다.





4) Tagetes

- *Tagetes minuta* (Asteraceae, mexican marigold)의 오일은 가축에 밀생하는 파리에 사용하며 모기에도 사용한다. 이 오일은 α -terthienyl(2,2':5',2''-terthiophen)에 의하여 광독성을 가지며 이것이 모기에 효과가 크며 현재 모기유충박명제로 상품화가 되어 있다.

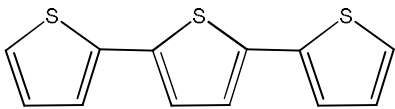
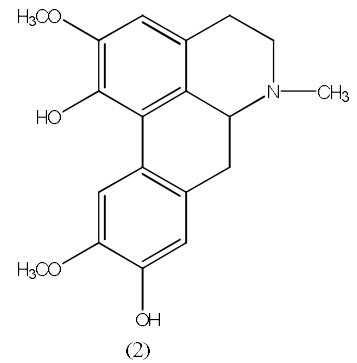
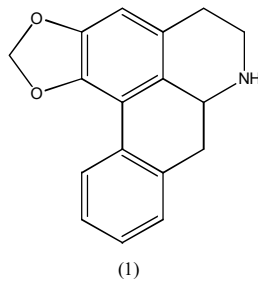


FIG. 11



5) Annona

- *Annona* (Annonaceae)속은 열대지방에서 과일을 식용하는 120여종이상이 재배 또는 자생한다(cherimoya, custard apple). 과실의 종자가 해충약 또는 물고기 독으로서 사용하였으며 *A. cherimola* 및 *A. squamosa*가 이를 박멸하는 것으로 보고되어 있다.

- 주 활성성분은 aporphine type의 alkalid로 anonaine(1), isoboldine(2)등이 활성을 나타낸다.

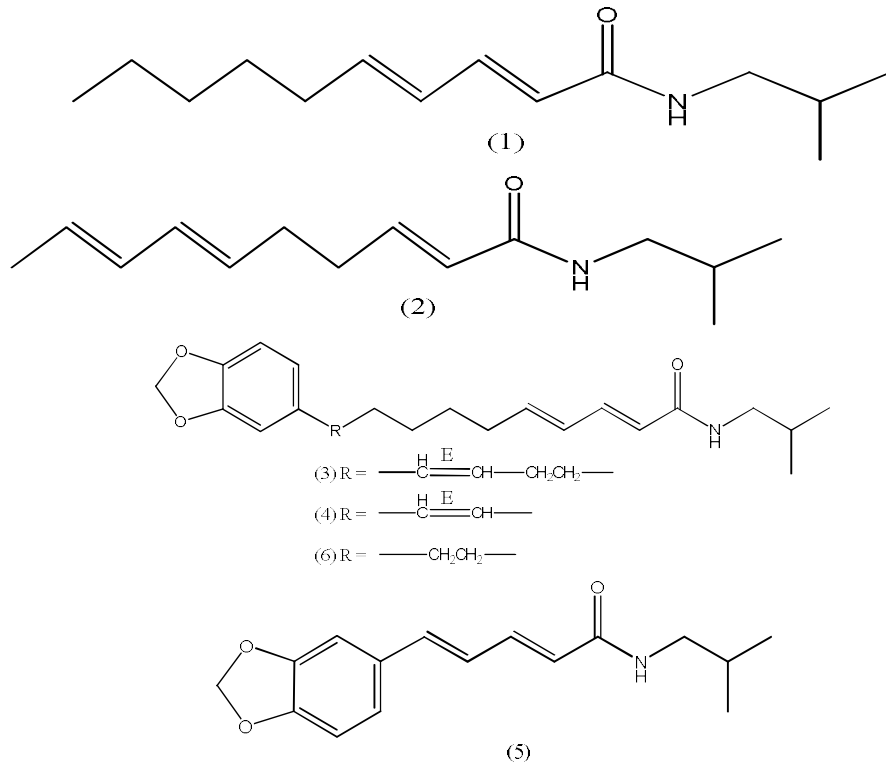
라. 해충살균 효과를 가진 화합물

1) Isobutylamide

- N-(2-methylpropyl)amide의 다가불포화지방족 화합물로 C_8-C_{20} 의 산 화합물이 isobutylamide화합물이다. 주로 Compositae, Piperaceae, Rutaceae 식물에서 분리되며 현재 28여종의 화합물이 분리되어 구조가 규명되었다. *Heliopsis*, *Echinacea*, *Zanthoxylum*, *Anacyclus*, *Spilanthes*, *Fagara*, *Piper*속에 함유되어 있으며 강한 살균효과를 나타낸다.

- 문제는 이런 자연의 해충 박멸제에 대한 다수의 특허가 문제가 된다. 즉 박멸제 또는 상승제로서, 예를 들어 일본의 다수 회사가 guinesine, pipericide, dihydropipericide(6)를 함유하는 처방의 특허 농용살충제로서 팔의 바구미제거에 사용되는 것이다.

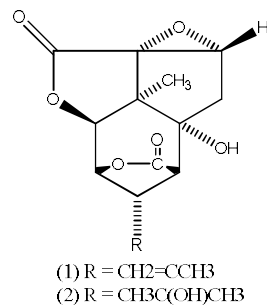
- 현재 isobutylamide 합성에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 자연의 관련 화합물보다도 안정적이고 덜 자극적인 방향으로 연구가 진행되고 있다. 몇 개의 강력한 물질이 개발되었으며 주로 기본골격에 double bond를 증가시키거나 alkyl기를 증가시키는 것이다.



- pellitorine(1)은 관련화합물중 가장 많은 성분으로 다수의 곤충에 활성이 있는 것으로 알려져 있다. affinin(spilanthol,2)은 관련화합물중 가장 안정적인 화합물이고 이외에 guineesin(3), pipericide(4), piperlonguminine(5)등이 규명되었다.

2) Picrotoxin

- Picrotoxin은 Anamirta cocculus(Menispermaceae)의 종자로 부터 분리된 heterocyclic lactone 화합물이다. 16세기 정도에 알려졌으며 1970년정도 물고기를 기절시키거나 인체를 잡을 때 사용하였다. 최근에는 barbiturate 중독을 해독하는데 사용하였으며 주 활성 성분으로는 picrotoxinin(1)이 활성이 크며 조금 낮은 picrotoxin(2) 등이 있다.



- Picrotoxinin은 sesquiterpene epoxy lactone 화합물은 사실상 GABA regulate에 관여한다. Picrotoxinin은 새로운 타입의 박멸제로 신경시냅스의 chloride 전이를 선택적으로 블록킹한다.

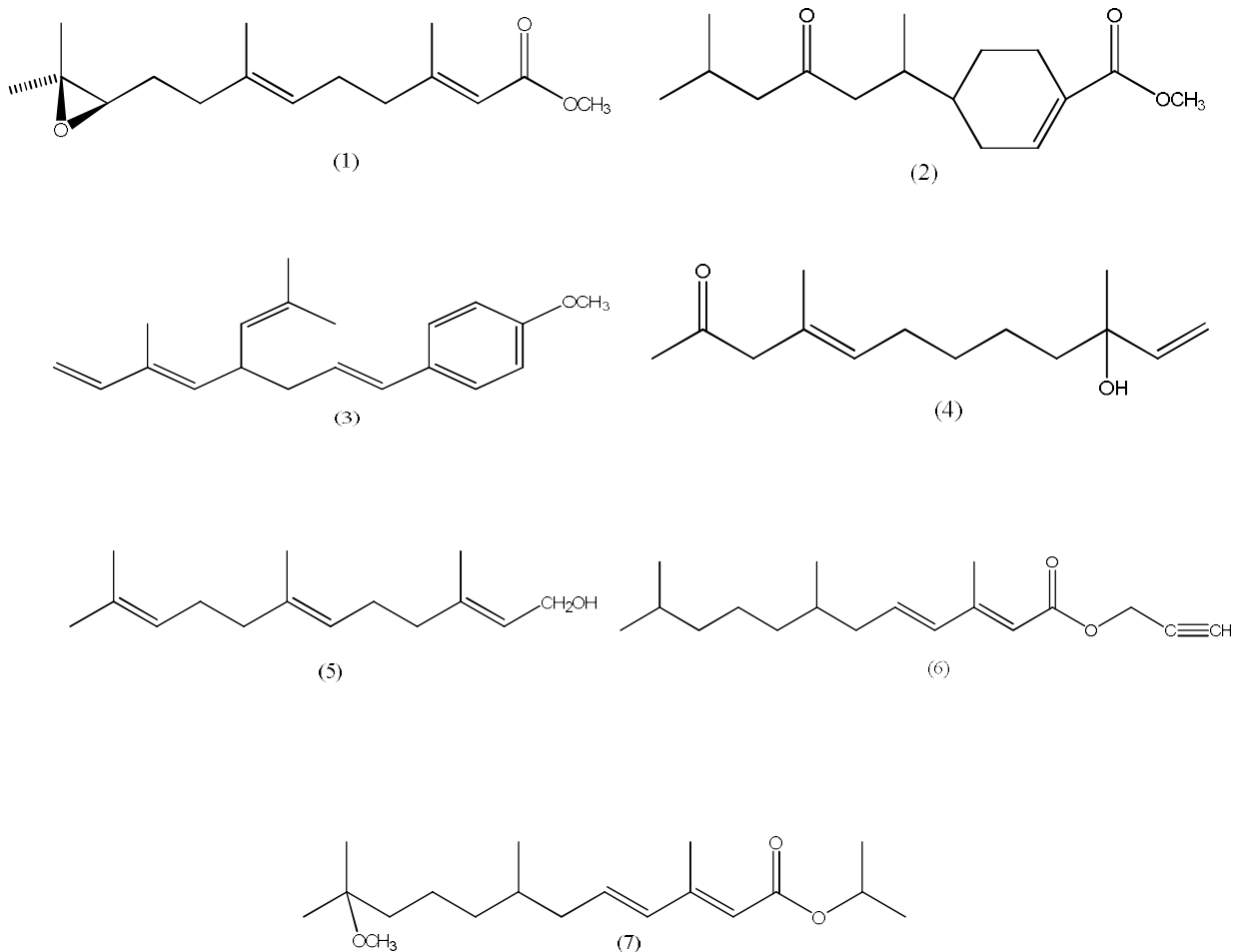
다. 성장을 저해하는 효과를 가진 화합물

- 1983년에 Saxena등이 식물의 화합물 중에 곤충의 성장을 저해하거나 느리게 하는 물질이 있다는 것을 발표하였으며, 유년성 호르몬과 탈피호르몬 두개의 그룹으로 화합물의 유도체 또는 항체로서의 역할을 한다.

1) 유년호르몬 유도체

- 곤충의 5개의 유년 호르몬 epoxy methyl dodecadienoate(1) 는 곤충의 변태, 복제, 휴면 행동 등을 조절한다. 1960년대 williams가 유년 호르몬이 해충을 컨트롤할 수 있다는 것을 제시하였으며 3세대 살충제라고 명명함. 1세대는 전통적인 살충제 2세대는 무기물의 살충제를 말한다.

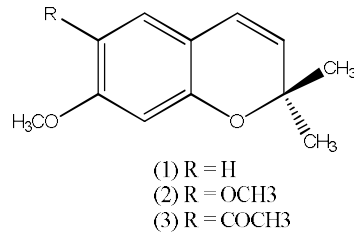
- Phytojuvenoid라고 명명하였으며 juvabione (2, Abies balsamea), jubocimenes (3, Basil), echinolone (4, Echnacea angystifolia), farnesol (5, plant oil) 등이 대표적이다. 주로 방향족화합물을 합성하거나 활성평가에서 phytojuvenoid가 개발되었으며 실질적으로 미국에서 kinoprene (6), methoprene (7)이 모기, 파리 유충박멸제로서 시판되었다.



2) 항 유년호르몬 화합물

- 미성숙상태, 유년호르몬 또는 그 유도체로 유년상태를 유지하도록하는 것으로 곤충을 콘트롤하는 성분으로 파리, 나방, 모기등의 성장에 관여하는 경제적으로 매우 중요한 화합물이다. 주로 성숙기의 변태를 억제하는 성분으로 antijuvenile 화합물을 포함하며 여기에는 precocene I (1)과 II (2)과 같은 chromone 화합물로 *Ageratum houstonianum*에서 분리되었다.

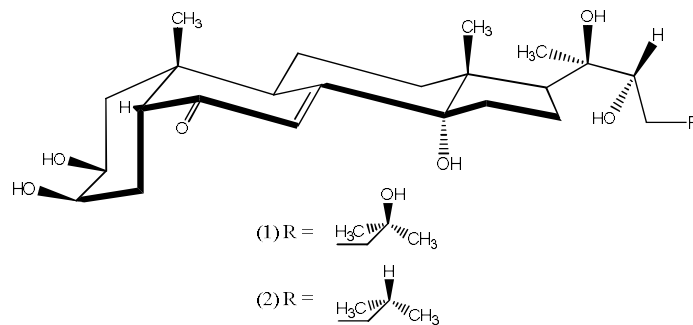
- Ececalin(3)도 분리가되어 상용화가 되었으나 특정한 곤충에 효과가 있어 상대적으로 경제적이지가 못하다.



3) 변태호르몬 유도체

- steroid화합물인 ecdysterone(1)과 ecdysone이 변태에 관여하며 곤충의 정상적인 성장에 필수적인 것이다. 그러나 이런 변태호르몬의 작용은 정상적인 변태를 방해하여 비정상적인변태 그리고 죽음에 이르게 한다.

- 붉은 목화씨벌레의 경우 ponasterone A(2)에 의해 마지막 스테이지에서의 변태를 불가능하게 하여 죽음에 이르게 한다. 하지만 대부분 빠른 시간 내 영향을 받지 않는다. 그 이유는 피부가 극성을 가지기 때문으로 산업적으로는 누에고치의 변태에 이용이 된다.



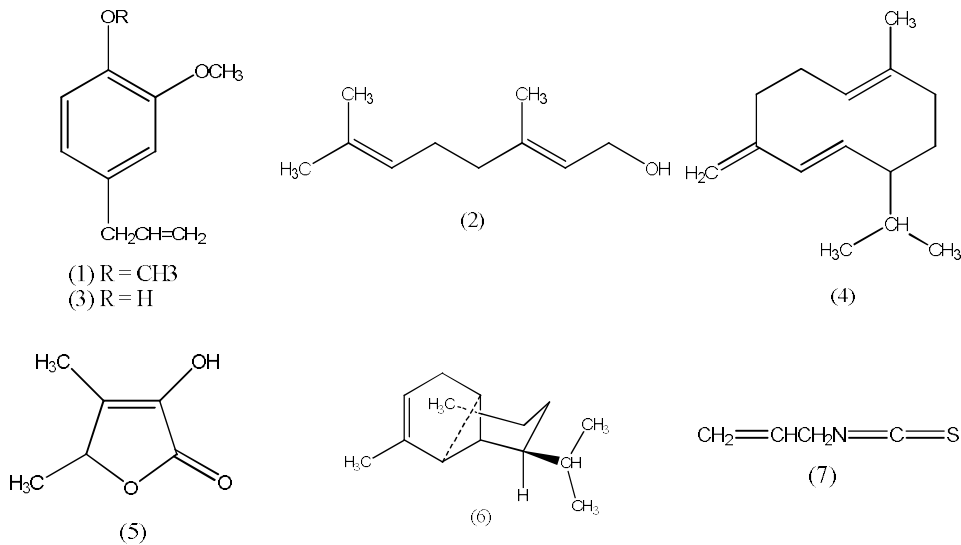
바. 곤충의 행동을 유도하는 화합물

1) Attractants

- attractant라는 것은 source를 향하여 움직이게끔 하는 식물성 화합물을 말하는 것으로 음식쪽으로 유인하거나 산란을 할 수 있도록 유인하는 식이성의 곤충을 유인하는 물질이다. 이런 유인제는 매우 선택적이고 저농도에서는 정상적인 활동을 하게 한다.

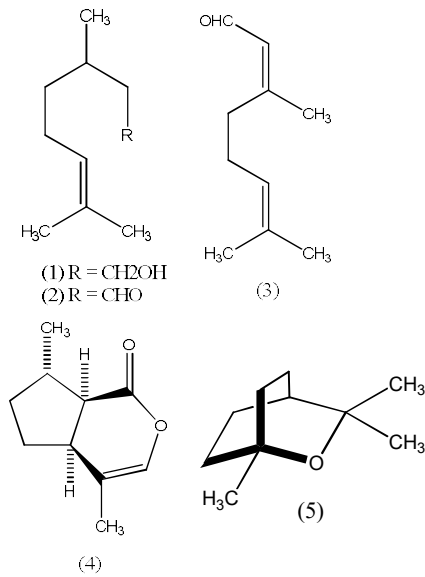
- 이런 식물성의 유인제는 울가미로 유혹하거나 독으로 유혹하여 곤충수를 조절하는 것에 사용한다. 우유나 달콤한 와인안에 들어있는 박새(hellebore) 와 혼합된 독유혹물은 전통적으로 파리나 다른 곤충을 쓰이는데 사용된다. 달콤하거나 기름을 좋아하는 곤충들에 대한 조절제로서 혼합하여 사용하며 이외에도 단백질, peanut butter등에 혼합하여 사용하며 적절한 기제는 곤충에 따라 다르다.

- 최근 식품소스에서 많이 분리되었는데 methyleugenol(1)이 대표적으로 동양과일파리의 수컷에 작용하며 독성을 가지고 있으나 가장 효과적인 유인제이다.
- geraniol(2, rose, lemon grass)과 eugenol의 혼합물은 일본투구풍뎡이의 수를 조절한다. germacrene D(4)는 돈벌레의 성호르몬과 같은 유인제로 수컷을 유혹하며 sotolone(5)은 집파리, 나방, 바퀴등을 유혹하고 당귀 오일 또는 오렌지 오일에서 나오는 copaene(6)은 지중해과일 파리의 수를 조절한다.
- 휘발성 유기유황 화합물은 예를 들어 dimethyldisulfide를 함유하는 양파는 검은 파리의 수를 조절하는 유인 물질이고 allylisothiocyanate(7)은 trap cabbage 파리의 유인제이다. 이외에도 alkaloid, flavonoid, glucosinolate등이 유인제로서 사용될 수 있다.



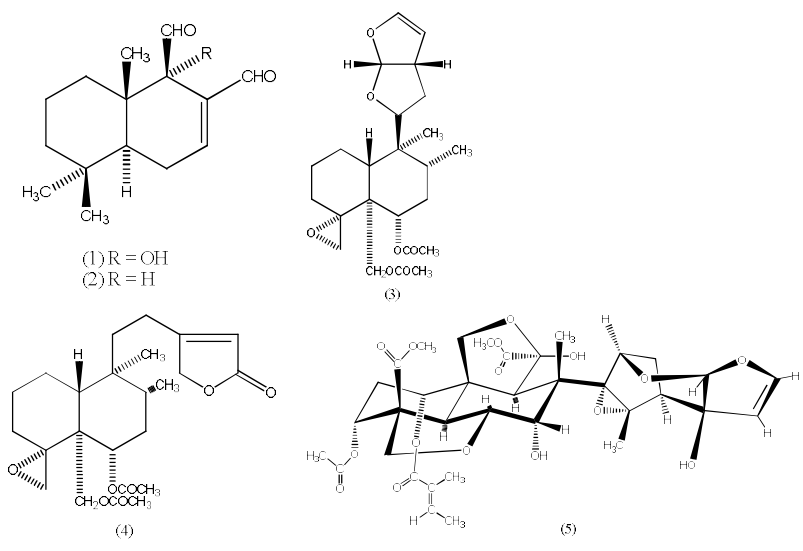
2) 기피제(repellants)

- 기피제란 반응에 대하여 흥분을 시키거나 감소를 시키는 화합물을 말하며 식물과 동물에 대하여 곤충의 손상을 막는 것을 말한다. 식물들이 일부러 수지 등을 분비하여 잎을 낡게 하거나 또는 마늘과 같이 자극적인 맛을 냄으로서 기피하게 한다. 이런 천연 화합물은 피부로부터 피를 흡혈하는 모기, 파리 등으로부터 피부 및 옷에 바름으로서 보호를 할 수 있다.
- Citronella oil(1, citronellol, 2, citronellal), turpentine, pennyroyal, cedarwood, eucalyptus oil이 기피제로서 사용이 되며 많은 정유가 모기 기피제로서 시험이 되고 있다. 현재 citronella oil이 함유된 초가 미국에서 모기기피제로서 가장 많이 이용이 되고 있다.
- Monoterpene중 citral (3)과 geraniol등도 사용되며 Nepeta속 식물에서 분리된 nepetalactone (4)의 경우도 여러 곤충에 기피제로서 사용되기도 한다. 1,8-cineol (5)은 Asteraceae, Magnoliaceae, Rutaceae등지에서 분리된 monoterpene 으로 광범위하게 상품화가 되어 있고 현재는 eucalyptus oil이 가장 중요한 자원으로 되어 있다.



3) 식욕억제제

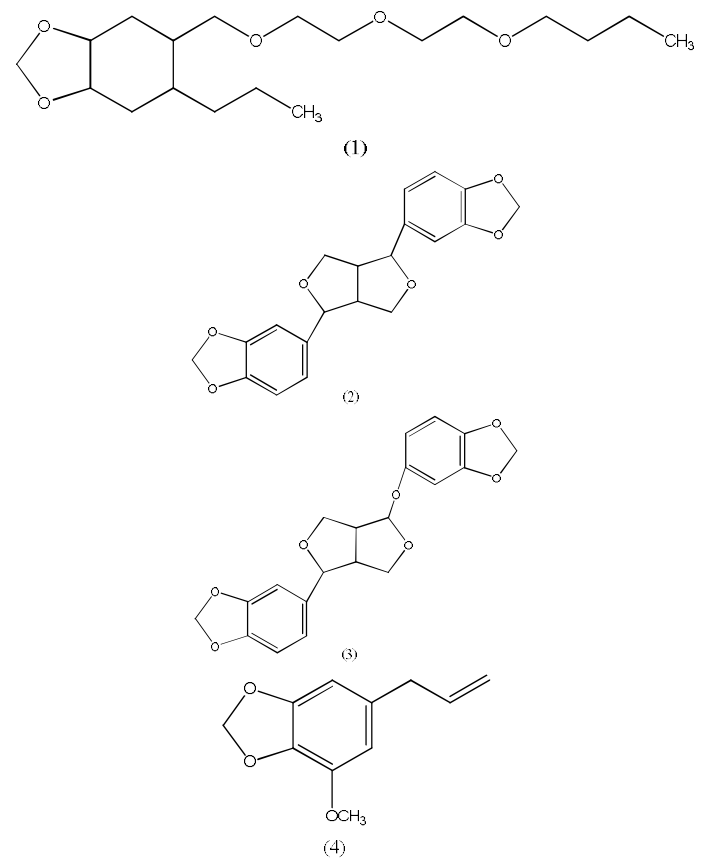
- 식욕억제제란 곤충이 맛을 보고 일시적 또는 연속적으로 식욕이 억제되는 물질을 말한다. 천연물이든 합성물질이든 알려진 것들이 있는데 대표적인 것이 Bordeaux mixture(Copper sulphate, lime, water)로 100년 이상 사용되고 있다.
- 주로 채소나 과일을 먹고사는 곤충에 대한 식욕억제제로 미국에서 많은 연구가 진행되고 있다. 몇 가지 합성화합물이 개발되어 상품화가 되었는데 주로 구조 중 4'-(dimethyltriazeno)acetanilide(triazene)과 triphenyltin acetate(organotin)핵을 가지고 있다.
- 아프리카를 중심으로 상품화되어 사용되고 있으며 여기에 pyrethroid화합물이 식욕억제제로서 사용되기도 한다. 최근에 와서는 합성품이 아닌 식물에서 분리된 화합물에 대한 식욕억제 실험이 Kubo group에 의해 진행되고 있다.
- 그 구조를 보면 drimane sesquiterpene으로 warburganal (1), polygodial (2)등이 곤충에 강한 활성을 보이는 것으로 알려졌으며 Nakanishi에 의해 합성된다. 또한 clerodane diterpene 중 clerodin (3)과 ajugarin I (4)이 활성을 가지는 것으로 알려졌고 그 활성그룹이 구조내의 trans-epoxydiacetate와 furofuran 또는 butenolide가 구조 말단에 결합되어 있다.



사. 곤충에 대한 다른 용도로 사용되는 식물화합물

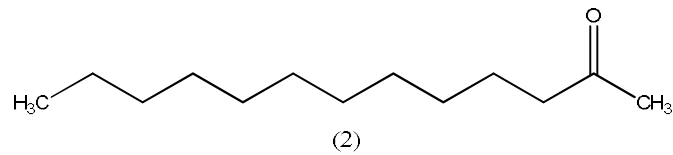
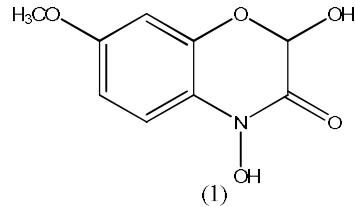
1) Synergist

- 해충박멸작용 화합물에 대한 효능의 상승작용을 하는 첨가 물질을 말하며 자신은 살충작용이 없다.
- 가장 중요한 synergist는 piperonyl butoxide(1)와 methylenedioxyphenil 또는 benzodioxole 화합물을 들 수 있다. sesamin(2), sesamolin(3)은 함께에서 발견된 것으로 pyrethrin의 작용을 상승시킨다. 또한 육두구에서 분리된 myristicin(4)은 앞서 서술한 affinin의 작용을 상승시킨다.



2) Host-Plant Resistance

- 또 하나의 곤충을 모니터링하는 방법으로 HPR을 이용한 식물의 자연적화학적 방어능을 이용하는 것이다.
- HPR은 식물이 곤충에 의한 피해 또는 감염등에 대하여 저항하는 능력을 말하며 여기에는 옥수수에 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one(1)이 주요저항인자이다. 토마토에 있어서는 2-tridecanone(2) 및 methylketone이 주요인자이다.



아. 결론

- 익생양술대전, 동의보감 등 각종 국내외 서적에서 살충에 대한 처방을 검색하였다. 이 처방에 사용된 천연약재에 대하여 처방빈도와 문헌을 검토하여 후보 약재 20여종을 선별하였으며, 추출물을 제조하여 협동연구기관인 (주)비오지노키에 시료를 제공하였다.
- (주)비오지노키에서 닭진드기에 대하여 살비 활성 시험을 실시하였으며, 그 결과 *Gleditsia sinensis* (조각자나무), *Gleditsia japonica* (주엽나무)이 높은 활성을 나타내었고, 조합의 지표성분과 살비활성 물질을 조사하기 위하여 물질분리를 시행하였다.

2. 안정성, 잔류성 조사 및 문제점 분석

가. 국내외 사용허가 제품 유효성분의 안전성 및 잔류성 자료 조사 및 분석

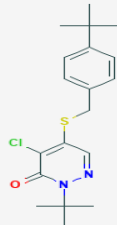
1) 국내 허가제품

- 와구프리 레드 (피리다벤, Pyridaben)
- 와구프리 블루 (비펜스린, Bifenthrin)
- 와구프리 옐로우 (클로르피리포스-메틸, Chlorpyrifos-methyl + 클로르페나피르, Chlorpenapyr)
- 일렉터 피에스피 (스피노세드, Spinosad)

2) 국외 허가제품

- 폭심 (Phoxim)
- 아버멕틴 (Abermectin)
- 사이플루쓰린 (Cyfluthrin)
- 아미트라즈 (Amitraz)

와구프리 레드 - 피리다벤(Pyridaben)

물리적 · 화학적특성	화 합 물 명 : 피리다벤(Pyridaben) 용 도 : 살충제 분 자 식 : C19H25ClN2OS 분 자 량 : 346.932 g/mol log Kow : 6.37 (23°C) C A S N O . : 96489-71-3																								
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Species</th> <th style="width: 10%;">Sex</th> <th style="width: 15%;">Route</th> <th style="width: 20%;">LD50 (mg/kg bw)</th> <th style="width: 20%;">LC50 (mg/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Mouse</td> <td rowspan="2">M, F</td> <td rowspan="2">Oral</td> <td>M: 424 (364-494)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>F: 383 (318-462)</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Rat</td> <td rowspan="2">M, F</td> <td rowspan="2">Dermal</td> <td>M: >2000</td> <td></td> </tr> <tr> <td>F: >2000</td> <td></td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Inhalation</td> <td></td> <td>M: 0.66 (0.56-0.78) F: 0.62 (0.53-0.73)</td> </tr> </tbody> </table>			Species	Sex	Route	LD50 (mg/kg bw)	LC50 (mg/L)	Mouse	M, F	Oral	M: 424 (364-494)		F: 383 (318-462)		Rat	M, F	Dermal	M: >2000		F: >2000		M, F	Inhalation	
Species	Sex	Route	LD50 (mg/kg bw)	LC50 (mg/L)																					
Mouse	M, F	Oral	M: 424 (364-494)																						
			F: 383 (318-462)																						
Rat	M, F	Dermal	M: >2000																						
			F: >2000																						
	M, F	Inhalation		M: 0.66 (0.56-0.78) F: 0.62 (0.53-0.73)																					
안전성	독성	급성	1. 랫드 ○13주간 0, 30, 65, 155, 350 ppm 농도의 Pyridaben을 CD 랫드들에게 식이를 통하여 접촉하였다. 0 과 350 ppm 처치군은 처치되고 난 후 가역능을 연구하기 위하여 4주간 투여하지 않는 실험이 계속해서 진행하였다. 155와 350ppm 처치군의 암컷과 수컷, 그리고 65ppm 처치군의 암컷에서 평균 체중량의 감소가 발견되었다. ○155와 350ppm 군의 수컷과 암컷에서 평균 사료 섭취량이 감소하였고, 65ppm 처치군의 암컷에서 식이 능률이 감소되었다. 155과 350ppm 처치군의 암컷과 수컷에 임상 화학적 지표에 영향을 끼치는 것이 발견되었다. 350ppm 처치군의 암컷의 소변 비중이 감소되었다. 155와 350ppm 처치군의 암컷과 수컷에서 다수 장기의 전체 중량은 감소하였고, 상대 중량은 증가한 것을 토대로 Pyridaben이 성장에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. ○가역능 실험 기간에서, 처치에 관련된 효과로 염기성 다핵질 분해효소의 확연한 증가가 관찰되었고, 350ppm 처치군 수컷과 암컷에서 신장혈액 검사한 결과 단백질, 알부민과 칼슘이 확연하게 감소한 것으로 나타났다. ○NOEL값은 수컷에서 65ppm (4.94mg/kg/day), 암컷에서 30ppm (2.64mg/kg/day)로 설정되었고, 체중량, 사료 섭취량, 식이 능력 및 여러 임상 병리학적 기준의 감소를 토대로 LOEL 값은 수컷에서 155ppm (11.55mg/kg/day)으로 설정되었고, 체중량과 식이 능력 감소를 토대로 암컷에서는 65ppm (5.53mg/kg/day)로 설정되었다.																						
	독성	만성	1. 개 ○비글에게 0, 1.0, 4.0, 16.0 그리고 32.0mg/kg/day의 Pyridaben을 캡슐화 시켜 1년간 지속적인 투여를 하였다. 모든 처치군에서 임상적 징후의 수와 빈도가 증가하였다. 평균 체중은 1.0mg/kg/day 처치군의 수컷을 제외한 나머지 모든 처치군에서 감소하였다. 주당 사료 섭취의 측정하였을 때 다양한 변화를 보여주었으나, 모든 처치군에서의 주간 사료 섭취량이 체중량 감소를 설명할 수 없었다. ○검시결과 32mg/kg/day 처치군의 한 암컷이 수척해지고 두려움에 떨었다. 조직학적으로, 이 동물에서 세포의 비대, 골격근의 경미한 위축, 그리고 대퇴골 및 흉골 골수에서의 세포의 수가 매우 적었다(hypocellularity).																						

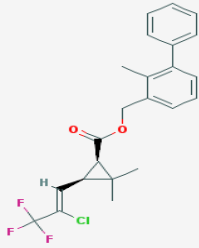
		<p>○암컷과 수컷의 임상적 징후의 빈도의 증가와 암컷에게 1.0mg/kg/day를 투여하였을 때, 체증량의 감소를 기반으로 NOEL 값은 1.0mg/kg/day 미만으로, LOEL 값은 1.0mg/kg/day 이하로 설정되었다.</p> <p>2. 랫드</p> <p>○Wister 랫드에게 104주간 0, 4, 10, 28, 80ppm의 Pyridaben을 식이를 통하여 투여하여 발암성을 실험하였다. 추가적으로 추가군에 104주간 0, 4, 10, 28, 120ppm의 Pyridaben을 투여하여 만성독성을 실험하였다, 실험 53주에 절반을 안락사하여 부검하였다. 만성 독성과 발암성 실험의 고농도 투여군의 암컷과 수컷 모두 10%이상 체증량이 감소하였다. 만성 독성 실험군의 120ppm 투여군의 수컷에서 혈청 ALT의 감소가 보여졌다. 두 실험 모두 양성적 소견과 음성적 소견이 있어 처치량에 관련이 없음으로 보고되었다.</p> <p>○만성독성 실험에서 수컷과 암컷의 체증량 감소와 수컷에서 ALT 값의 감소를 기반으로 하여 NOEL 값은 수컷 28ppm (1.13mg/kg/day), 암컷(1.46mg/kg/day)로 설정되었고, LOEL값은 수컷 120ppm (5.00mg/kg/day), 암컷 120ppm (6.52mg/kg/day)로 설정되었다. 발암성 실험에서 0~13주에서의 체증량 감소를 기반으로 MTD(Maximum tolerated dose)의 값은 수컷 80ppm (3.18mg/kg/day), 암컷 80ppm (4.23mg/kg/day)로 설정되었다.</p>
	생식 / 발달	<p>1. 랫드</p> <p>○Sprague-Dawley 랫드에게 임신 후 6일에서 15일 사이에 0, 2.5, 5.7, 13.0 그리고 30.0mg/kg/day의 Pyridaben을 접종하였다. 모성 독성은 13과 30mg/kg/day 투여군에서의 체증량의 감소와 사료 섭취량의 감소가 발견되었다. 발생 독성은 30mg/kg/day 처치군에서 태아 체중 감소와 일부에서 불완전 골화가 나타났다.</p> <p>○투여 기간 동안 체중/체증량과 사료 섭취량의 감소를 기반으로 하여 모성 NOEL 값은 4.7mg/kg/day (5.7mg/kg/day의 80% 값)으로 설정되었고, LOEL 값은 13.0mg/kg/day로 설정되었다. 태아 체중 감소와 과 일부 뼈 에서 불완전 골화의 증가를 기반으로 하여 발생 NOEL 값은 13.0mg/kg/day, LOEL 값은 30mg/kg/day로 설정되었다.</p>
잔류성	흡수 대사 분포	<p>1. 암탉</p> <p>○BASF 기업은 암탉에서 14C-pyridaben의 대사를 알아보기 위하여 예비실험과 본실험을 진행하여 실험 결과를 수집하였다. 암탉에게 방사선동위원소가 벤젠고리에 부착된 (14C-Bz)과 C-3과 C-6에 위치한 피리다진은 고리에 부착된 (14C-Pz)인 14C-pyridaben을 각각 암탉에게 투여하였다. 예비실험에서 4쌍의 암컷에게 8일 연속으로 (14C-Pz)pyridaben과 (14C-Bz)pyridaben을 저농도(12.5 μg/day)와 고농도 (1mg/day)를 경구로 투여시켰다. 이 투여량에 대한 식이 노출과 사료 섭취에 대한 변화는 보고되지 않았다.</p> <p>○본 실험에서, 군당 10마리로 이루어진 4군의 암탉에 8일 연속으로 (14C-Pz)pyridaben과 (14C-Bz)pyridaben을 저농도(12.5 μg/day)와 고농도(1mg/day)를 경구로 투여시켰다. 조류의 pyridaben 잔류에 대한 식이노출은 이 실험에 대한 결과로 명확해지지 않았다. (14C-Pz)pyridaben을 처치한 암탉의 가슴근육, 지방, 피부와 계란에서 유기용해성 잔류를 확인하기 위하여 TLC 분석을 진행하여 명확하지 않은 가능성있는 대사산물과 알려지지않은 물질의 양을 0.006ppm 이상을 분리하기 위하여 실시하였다.</p> <p>○넓적다리 근육에서 dihydroxy 대사산물인 PB-13이 0.001ppm의 농도가 시험적으로 검출되었다. 유기용해성 14C-Pz를 투여하였을 때 14C의 간 내의 잔류를 확인하기 위하여 HPLC 분석을 진행한 결과 간 내의 주요 잔류인 산 대사산물인 PB-7 (18.3% TRR; 0.022ppm)과 hydroxy 대사산물의 적은 양이 검출되었다. PB-9 (1.8% TRR; 0.002ppm) 또한 검출되었으며, TLC 분석을 통하여 PB-7과 PB-9이 확인되었다.</p> <p>○(14C-Bz)pyridaben을 처치한 암탉의 근육, 지방, 피부와 계란에서 유기용해성 잔류를 확인하기 위하여 TLC 분석을 진행하여 명확하지 않은 모든 물질이 0.01ppm 초과하는 양에 대하여 검출하였다. 대사산물인 PB-11 (21.8% TRR; 0.006ppm)은 1D-TLC 분</p>

석을 통하여 시험적으로 명확하게 분석되었다. PB-7과 PB-9은 2D-TLC 분석을 통하여 지방과 피부 내에서 검출되었으나 정량적으로 확인되지 않았다. 간에서 산 대사산물인 PB-7 (31.5% TRR; 0.028ppm)은 HPLC 분석으로 명확해졌고, TLC 분석을 통하여 확인하였다. 이 대사산물인 PB9는 2D-TLC 분석을 통하여 간 내에서 검출되었으나 정량적으로 확인되지 않았다.

○정량적이지 않은 데이터를 통하여, pyridaben이 배설물 내에서 유기용해성 잔류의 주요물질을 나타내기 위하여 처치된 암탉의 배설물에서 14C-Pz와 14C-Bz를 2D-TLC 분석하였다. 이러한 분석을 통하여 14C-Pz 처치된 암탉의 배설물에서 PB-7, PB-9와 PB-13이 검출되었으며, 14C-Bz 처치된 암탉의 배설물에서 PB-8, B-7, B-11과 B-15가 검출되었다.

위의 데이터를 기반으로, 암탉 내에서 pyridaben의 대사는 염소 내의 대사인 수화를 포함하여 하나 또는 두 개의 tertiary butyl 작용기의 hydroxyl 작용기의 산화로 인하여 산(acid)이 되는 것을 포함되는 것과 비슷하다고 보고하였다.

와구프리 블루 - 비펜스린(Bifenthrin)

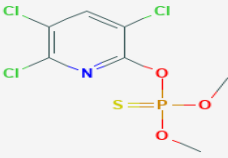
물리적 · 화학적특성	화 합 물 명 : 비펜스린(Bifenthrin) 용 도 : 살충제 분 자 식 : C23H22ClF3O2 분 자 량 : 422.872 g/mol log Kow : 6.00 C A S N O . : 82657-04-3																																																																															
	안 전 성	독 성	급 성																																																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Species</th> <th>Strain</th> <th>Sex</th> <th>Route</th> <th>LD50 (mg/kg bw)</th> <th>LC50 (mg/L)</th> <th>Reference</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">Mouse</td> <td rowspan="2">Swiss-Webster</td> <td>M, F</td> <td>Oral</td> <td>M: 43.5 (36.2-50.7) F: 42.5 (37.1-47.9)</td> <td></td> <td>Rand (1983a)</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Oral</td> <td>M: 55.5 (49.7-61.3) F: 53.4 (46.8-60.0)</td> <td></td> <td>Norvell (1982)</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Sprague-Dawley (Tac:N(SD)fBR)</td> <td>M, F</td> <td>Oral</td> <td>M: 70.1 (44.5-95.6) F: 53.8 (44.2-63.5)</td> <td></td> <td>Freeman (1983)</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Intraperitoneal</td> <td>M: 770.9 (364.5-1177.4)</td> <td></td> <td>Kedderis (1985)</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Rat</td> <td rowspan="2">Sprague-Dawley CD</td> <td>M, F</td> <td>Oral</td> <td>F: 822.4 (432.8-1212.1) M: 168.4 (111.4-225.4) F: 210.4 (129.3-291.6)</td> <td></td> <td>Watt (1997)</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Dermal</td> <td>>2000</td> <td></td> <td>Kedderis (1985)</td> </tr> <tr> <td>Crl:CD(SD)IGS BR</td> <td>M, F</td> <td>Inhalation (4h, nose only)</td> <td></td> <td>M: 1.1 (0.94-1.29) F: 0.8 (0.5-1.5)</td> <td>Kiplinger (2003)</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Rabbit</td> <td rowspan="3">New Zealand White</td> <td>M, F</td> <td>Dermal</td> <td>>2000</td> <td></td> <td>DeProspo (1983a)</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Dermal irritation</td> <td>Non-irritating</td> <td></td> <td>DeProspo (1983b)</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Ocular irritation</td> <td>Non-irritating</td> <td></td> <td>DeProspo (1983c)</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Guinea-pig</td> <td rowspan="2">Dunkin-Hartley Ibm: GOHI; SPF</td> <td>M</td> <td>Dermal sensitization</td> <td>Not sensitizing</td> <td></td> <td>DeProspo (1983d)</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>Dermal sensitization</td> <td>Skin sensitizer</td> <td></td> <td>Arcelin (2003)</td> </tr> </tbody> </table>				Species	Strain	Sex	Route	LD50 (mg/kg bw)	LC50 (mg/L)	Reference	Mouse	Swiss-Webster	M, F	Oral	M: 43.5 (36.2-50.7) F: 42.5 (37.1-47.9)		Rand (1983a)	M, F	Oral	M: 55.5 (49.7-61.3) F: 53.4 (46.8-60.0)		Norvell (1982)	Sprague-Dawley (Tac:N(SD)fBR)	M, F	Oral	M: 70.1 (44.5-95.6) F: 53.8 (44.2-63.5)		Freeman (1983)	M, F	Intraperitoneal	M: 770.9 (364.5-1177.4)		Kedderis (1985)	Rat	Sprague-Dawley CD	M, F	Oral	F: 822.4 (432.8-1212.1) M: 168.4 (111.4-225.4) F: 210.4 (129.3-291.6)		Watt (1997)	M, F	Dermal	>2000		Kedderis (1985)	Crl:CD(SD)IGS BR	M, F	Inhalation (4h, nose only)		M: 1.1 (0.94-1.29) F: 0.8 (0.5-1.5)	Kiplinger (2003)	Rabbit	New Zealand White	M, F	Dermal	>2000		DeProspo (1983a)	M, F	Dermal irritation	Non-irritating		DeProspo (1983b)	M, F	Ocular irritation	Non-irritating		DeProspo (1983c)	Guinea-pig	Dunkin-Hartley Ibm: GOHI; SPF	M	Dermal sensitization	Not sensitizing		DeProspo (1983d)	F	Dermal sensitization	Skin sensitizer		Arcelin (2003)
Species	Strain	Sex	Route	LD50 (mg/kg bw)	LC50 (mg/L)	Reference																																																																										
Mouse	Swiss-Webster	M, F	Oral	M: 43.5 (36.2-50.7) F: 42.5 (37.1-47.9)		Rand (1983a)																																																																										
		M, F	Oral	M: 55.5 (49.7-61.3) F: 53.4 (46.8-60.0)		Norvell (1982)																																																																										
	Sprague-Dawley (Tac:N(SD)fBR)	M, F	Oral	M: 70.1 (44.5-95.6) F: 53.8 (44.2-63.5)		Freeman (1983)																																																																										
		M, F	Intraperitoneal	M: 770.9 (364.5-1177.4)		Kedderis (1985)																																																																										
Rat	Sprague-Dawley CD	M, F	Oral	F: 822.4 (432.8-1212.1) M: 168.4 (111.4-225.4) F: 210.4 (129.3-291.6)		Watt (1997)																																																																										
		M, F	Dermal	>2000		Kedderis (1985)																																																																										
	Crl:CD(SD)IGS BR	M, F	Inhalation (4h, nose only)		M: 1.1 (0.94-1.29) F: 0.8 (0.5-1.5)	Kiplinger (2003)																																																																										
Rabbit	New Zealand White	M, F	Dermal	>2000		DeProspo (1983a)																																																																										
		M, F	Dermal irritation	Non-irritating		DeProspo (1983b)																																																																										
		M, F	Ocular irritation	Non-irritating		DeProspo (1983c)																																																																										
Guinea-pig	Dunkin-Hartley Ibm: GOHI; SPF	M	Dermal sensitization	Not sensitizing		DeProspo (1983d)																																																																										
		F	Dermal sensitization	Skin sensitizer		Arcelin (2003)																																																																										
아 1. 랫드																																																																																

		만 성	<p>○수컷과 암컷 Sprague-Dawley 랫드에게 28일간 0, 50, 100, 200, 300 그리고 400ppm 농도(동량의 0, 5, 10, 20, 30 그리고 40 mg/kg bw/day)의 Bifenthrin이 포함된 식이를 공급하여 독성을 알아보려고 하였다. 살아남은 랫드들에게 육안적인 검사가 진행되었고, 뇌, 심장, 간, 생식선, 부신 및 신장에 대한 장기무게를 측정하였다.</p> <p>○400ppm 처치군의 모든 랫드들은 실험 15일째, 300ppm 처치군에서 수컷 10마리 중 6마리가 실험 12일 째, 암컷 10마리 중 1마리가 실험 20일 째에 죽었다. 사망하기 전에 중독의 가장 일관된 임상 증상은 간질 경련과 떨림이다. 1, 2, 3 그리고 4주간의 실험에서 수컷과 암컷의 평균체중은 감소하였다. 또한, 연구 기간 동안 수컷과 암컷의 체중은 대조군보다 현저히 적었다. 수컷의 부신 무게는 증가하였으나, 고환무게는 감소했다.</p> <p>○암컷의 장기 무게는 대조군의 것과 비슷했다. 체중에 대한 장기의 무게의 비율은 수컷의 부신, 뇌 및 신장에서, 암컷의 뇌, 신장 및 간이 상당히 높았다. 1 주간의 실험에서 200 ppm 처치군의 평균 사료 섭취량은 암컷에서 감소하였고, 수컷의 평균 체중은 감소했다. 수컷과 암컷의 떨림은 처치량과 관련이 있음이 발견되었다. 50 또는 100 ppm 처치량에 의한 이상 징후는 발견되지 않았다.</p> <p>○이 연구의 조건 하에서, 랫드의 bifenthrin에 대한 NOAEL은 하루 20mg / kg bw에 해당하는 200ppm이고 LOAEL (최저 관찰 효과 수준)이 임상 증상 근거로 하루에 10 mg/kg bw에 해당하는 100ppm이라고 결론 지을 수 있었다(Norvell, 1982).</p>
		만 성	<p>1. 랫드</p> <p>○장기 독성과 발암성에 관하여 연구하기 위하여 24개월 간 군당 50마리의 수컷과 암컷 Sprague-Dawley (Tac(SD)fBR) 랫드에게 순도 88.35%의 Bifenthrin을 0, 12, 50, 100, 그리고 200 ppm의 농도(수컷의 경우 동량의 0, 0.6, 2.3, 4.7, 그리고 9.7 mg/kg bw/day를, 암컷의 경우 0, 0.7, 3.0, 6.1, 그리고 12.7 mg/kg bw/day)를 식이를 통하여 투여하였다.</p> <p>○실험이 끝난 후, 수컷 랫드들은 34-48%가, 암컷은 56-70%가 살아남았다. 실험 진행 후 4-28일에서 200ppm 투여군의 모든 수컷에서 떨림이 관찰되었고, 암컷에서는 4-30일과 36-38일에서 200ppm 처치군에서 떨림이 관찰되었다. 100ppm 처치군에서 한 마리의 암컷이 3일간(실험 시작 후 3-5일) 떨림이 관찰되었다. 떨림의 빈도는 실험 중 반부까지는 감소하였고, 이후 실험 종료까지의 기간에서는 증가하였다.</p> <p>○200ppm 투여군의 수컷과 암컷의 다른 임상적 증상은 찰과상과 탈모, 그리고 꼬리의 열상의 빈도가 증가하였다. 200ppm 투여군의 암컷의 평균 체중은 13-96주 기간에 현저하게 감소(↓8-10%, P < 0.05 에서 0.01)하였고, 전체 체중은 현저하게 감소(↓17%)한 것으로 보여졌다. 200ppm 투여군의 수컷의 체중은 1-92주 간의 실험에서 대조군과 비교하여 현저하지 않게 감소한 것을 발견하였다. 모든 처치군의 수컷과 암컷 처치군의 사료 섭취량은 변하였지만, 처치량에 따른 사료 섭취량의 관계는 명확하지 않았다.</p> <p>○임상화학적, 소변검사, 육안검사 시 처치용량과 관계된 변화는 관찰되지 않았다. 혈액학적 기준에 따른 처치용량과 관련있는 변화는 발견되지 않았으나, 24개월 간의 실험에서 200ppm 투여군의 수컷의 적혈구 수는 감소하였다. 적혈구 수의 감소는 독성학적으로 관련되지 않은 것으로 나타나며, 변화에 따른 영향은 작고, 다른 적혈구 기준에는 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다. 200ppm 투여군에서 간(↑11%)과 신장(↑28%)의 중량이 암컷에 비하여 수컷이 더 높았지만 통계적으로 큰 의미를 갖지 않았다.</p> <p>○200ppm과 100ppm 투여군의 암컷과 수컷 모두 간/체중 과 신장/체중의 비율이 대조군과 비교해서 높게 나왔지만 통계적으로 무의미하였다. 다른 투여군과 비교했을 때, 200ppm 투여군의 28마리의 암컷중 3마리에서만 망막의 위축이 발견되었다.</p> <p>○200ppm 투여군의 수컷에서 체장 섬세포의 선종과 섬유 육종 발생 빈도가 증가하였지만 통계적인 의미를 갖진 못하였고, 해부학적 대조 정보로 Bifenthrin이 종양을 유발</p>

		<p>시키는 것으로 예상된다. 이것은 육안 검사에서 처치량에 따른 영향은 관련이 없다고 알 수 있었다. 모든 동물에서 처치에 의한 영향을 육안검사와 조직병리학적으로 검사하였을 때 발견되지 않았다. 좌골신경의 해부학적 결과와 처치군 사이의 명확한 생물학적 차이점은 발견되지 않았다.</p> <p>○암컷의 종양 발생 빈도의 증가를 기반으로 LOEL 값은 100ppm으로 설정되었고, 동량으로 수컷에서 4.7mg/kg bw/day, 암컷에서 6.1mg/kg bw/day로 설정되었다. NOEL 값은 50ppm으로 설정되었고 동량으로 수컷에서 2.3mg/kg bw/day, 암컷에서 3.0mg/kg bw/day로 설정되었다. 이러한 실험 조건에서, 랫드에 있어 Bifenthrin의 발암성에 대한 명확한 증거는 없었다(McCarty, 1986).</p>
	<p>생식 / 발달</p>	<p>1. 랫드</p> <p>○2세대 생식 독성 연구에서, 25 마리의 수컷과 25 마리의 암컷의 Sprague Dawley TAC (SD) fBR 랫드들에게 0, 30, 60 또는 100ppm의 농도 bifenthrin (순도 88.35 %)이 함유된 식이를 주었다. (0, 1.5, 3.0 및 5.0 mg / kg bw / day). 식이에 첨가된 시험 물질의 양은 순도를 고려하여 조정되었다. F1 세대에 교배하기 11주 전, F0 세대와 교배하기 8 주 전에 투여가 시작되었다.</p> <p>○한 배에서 태어난 모든 F1b은 젖을 떼어 낸 후 (LD 21), 수컷 25마리와 암컷 25명에서 무작위로 선택하여 F1 부모로서 계속 연구했다. F0 또는 F1 세대에서 치료와 관련된 사망은 없었다. 떨림은 100ppm에서 두 세대의 암컷에서만 나타났고, F0 세대 랫드는 간질 경련이 관찰되었다.</p> <p>○17 주 (임신과 수유 후)에서 100 ppm의 F0세대 암컷은 평균 체중이 낮았고 (↓4 %, P <0.05) 첫 번째 수유기 (7 일 및 14 일) 기간 동안 상당히 낮은 체중을 가지고, 두 번째 임신 및 수유기 동안 낮은 체중을 얻었다. (LD 14에서 통계적으로 의미했으며, 체중에 대해서는 ↓5%, 체중 증가에 대해서는 ↓34%, P <0.01). 체중의 저하와 떨림의 빈도는 상관관계가 없었다. 통계적으로 중요하지 않지만, 60ppm에서 암컷의 낮은 체중이 종종 100ppm에서 체중 감소와 유사성을 이루었다.</p> <p>○30 ppm에서 체중에 아무런 임상 증상 또는 효과가 없었다. 치료된 F1 동물과 대조군 사이의 평균 체중에는 특별한 차이가 없었다. 고용량의 F0 세대 암컷에서는 과반수 그리고 상대적으로 뇌 무게가 통계적으로 상당히 증가했다. F1 부모 세대에서 평균 절대 난소 무게는 각각 60ppm과 100ppm에서 약간 감소했다 (↓ 9 %, P <0.05, 또는 ↓ 12 %, P <0.01). 그러나 체중에 대한 난소의 비율은 영향을 받지 않았다. 100 ppm군의 F1b 암컷 자손에서 부신 및 심장 무게는 대조군과 비교하면 통계적으로 높았다. 난소와 난소/뇌 의 무게의 비율은 다른 개체에 비해서 상당히 높다는 것이 관찰 되었다.</p> <p>○모체와 새끼 모두 육안 검사와 미세검사에서 처치와 관련된 것은 확인 되지 않았다. F0 또는 F1 세대에서 생식의 파라미터(교미, 수태, 여성 불임 그리고 임신 가능성) 치료와 관련하여 효과가 없으며, 각각 성별에서 총 또는 현미경으로 처치 관련 된다는 것을 발견하지 못하였다. 임신 및 수유 기간 동안 F0 및 F1 세대 암컷에서 떨림과 저체중의 발생률을 기준으로 LOEL 100 ppm (하루에 5.0 mg / kg bw에 해당)으로 설정되었다.</p> <p>○전신 및 발달 독성 NOEL은 60 ppm으로 하루 3.0 mg / kg bw으로 설정되었다. 생식 LOEL은 관찰되지 않았다. 생식 NOEL은 100 ppm으로 하루에 5.0 mg / kg bw으로 설정되었다 (DeProspo, 1986).</p>
<p>잔류성</p>	<p>흡수 대사 분포</p>	<p>1. 닭</p> <p>○암탉(군당 20마리)에게 방사선동위원소 처리된 Bifenthrin을 10일간 40ppm정도를 캡슐화 시켜 투여하였다. 매일 배설물과 계란을 수집하였고, 분석을 진행하였다. 처치군과 대조군으로 나뉜 암탉들은 조직을 수집하기 위하여 최종 투여후 24시간 내에 안락사 시켰다. 모든 처치군들의 조직, 배설물, 계란 흰자와 노른자에서 방사선동위원소인 14C의 잔류를 측정하였다.</p>

		<p>○계란 노른자에서 3ppm, 흰자에서 0.04ppm의 최대 잔류가 검출되었고, 조직 중에서는 지방과 간에서 가장 높은 농도인 2ppm이 검출되었다. 방사선동위원소 처리된 14C-Bifenthrin은 일차적으로 배설물을 통하여 배출되는 것이 확인되었다 (Jameson et al., 1986).</p> <p>○White Leghorn 암탉에게 방사선동위원소가 처리된 14C-Bifenthrin과 alcohol-14C-Bifenthrin을 10일간 2mg/kg bw의 용량을 경구로 투여하였다. Acid-14C-Bifenthrin를 투여한 암탉에서 간에 대한 잔류는 Hydroxymethyl-bifenthrin과 지방산(팔미테이트, 올레이트)의 콘쥬게이트 화합물과 TFP acid1, Hydroxymethyl TFP acid 그리고 본래의 화합물이 주를 이루었다. 이러한 대사 형태는 alcohol-14C-Bifenthrin을 암탉에게 처치하였을 경우에도 비슷하였다.</p> <p>○Cyclopropyl 고리의 2-methyl 작용기의 수화 과정은 조류에게 있어 주요한 대사 경로인데, Hydroxymethyl-Bifenthrin과 지방산과의 콘쥬게이트 화합물은 이 Pyrethroid 제제의 새로운 생체변환의 과정을 보여주었다.</p> <p>○암탉에게 방사선동위원소 처리된 14C-Bifenthrin을 10일간 4mg을 경구로 투여하였다. 처치된 암탉으로부터 조직과 계란을 얻어 분석한 결과, 조직 내의 잔류의 주요한 구성성분은 본래의 Bifenthrin이 40~50%를 차지하고 있었고, 팔미테이트 또는 올레이트 지방산과 콘쥬게이트 화합물을 이룬 것이 20~40%를 차지하고 있었다. 부 대사산물은 콘쥬게이트 화합물이 되지 못한 Hydroxymethyl-Bifenthrin이었다 (Tullman et al., 1987).</p>
--	--	--

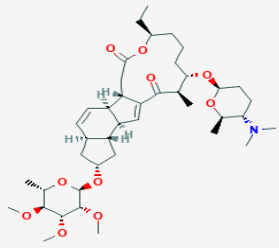
와구프리 엘로우 - 클로로피리포스-메틸(Chlorpyrifos-methyl)

물리적 · 화학적특성	화합물명 : 클로로피리포스-메틸(Chlorpyrifos-methyl) 용도 : 살충제 분자식 : C7H7Cl3NO3PS 분자량 : 322.521 g/mol log Kow : 4.31 CAS NO. : 5598-13-0																																																														
	안전성	독성	급성																																																												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="border: none;">Species</th> <th style="border: none;">Sex</th> <th style="border: none;">Route</th> <th style="border: none;">Solvent</th> <th style="border: none;">LD50 (mg/kg bw)</th> <th style="border: none;">Reference</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">M, F</td> <td style="border: none;">Oral</td> <td style="border: none;">CMC</td> <td style="border: none;">M: 3,733 F: 3,597</td> <td style="border: none;">Hasegawa et al., 1973a</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">M, F</td> <td style="border: none;">Oral</td> <td style="border: none;">CMC</td> <td style="border: none;">M: 2,472 F: 1,828</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">M, F</td> <td style="border: none;">Oral</td> <td style="border: none;">corn oil</td> <td style="border: none;">M & F: 1,700</td> <td style="border: none;">Davis and Collins, 1975</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Rat</td> <td style="border: none;">M, F</td> <td style="border: none;">Oral</td> <td style="border: none;">corn oil</td> <td style="border: none;">M: 2,140 F: 1,090</td> <td style="border: none;">Litchfield and Norris, 1969</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">M, F</td> <td style="border: none;">Oral</td> <td style="border: none;">corn oil</td> <td style="border: none;">M: 2,140 F: 1,630</td> <td style="border: none;">Olson, 1964a</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">Oral</td> <td style="border: none;">corn oil</td> <td style="border: none;">> 1,000</td> <td style="border: none;">Olson et al., 1963</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">Oral</td> <td style="border: none;">corn oil</td> <td style="border: none;">3,600</td> <td style="border: none;">Esaki et al., 1973</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">M, F</td> <td style="border: none;">Dermal</td> <td style="border: none;">CMC</td> <td style="border: none;">> 4,827</td> <td style="border: none;">Hasegawa et al., 1973a</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">M, F</td> <td style="border: none;">Dermal</td> <td style="border: none;">corn oil</td> <td style="border: none;">> 3,713</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </tbody> </table>				Species	Sex	Route	Solvent	LD50 (mg/kg bw)	Reference		M, F	Oral	CMC	M: 3,733 F: 3,597	Hasegawa et al., 1973a		M, F	Oral	CMC	M: 2,472 F: 1,828			M, F	Oral	corn oil	M & F: 1,700	Davis and Collins, 1975	Rat	M, F	Oral	corn oil	M: 2,140 F: 1,090	Litchfield and Norris, 1969		M, F	Oral	corn oil	M: 2,140 F: 1,630	Olson, 1964a		F	Oral	corn oil	> 1,000	Olson et al., 1963		F	Oral	corn oil	3,600	Esaki et al., 1973		M, F	Dermal	CMC	> 4,827	Hasegawa et al., 1973a		M, F	Dermal	corn oil	> 3,713	
Species	Sex	Route	Solvent	LD50 (mg/kg bw)	Reference																																																										
	M, F	Oral	CMC	M: 3,733 F: 3,597	Hasegawa et al., 1973a																																																										
	M, F	Oral	CMC	M: 2,472 F: 1,828																																																											
	M, F	Oral	corn oil	M & F: 1,700	Davis and Collins, 1975																																																										
Rat	M, F	Oral	corn oil	M: 2,140 F: 1,090	Litchfield and Norris, 1969																																																										
	M, F	Oral	corn oil	M: 2,140 F: 1,630	Olson, 1964a																																																										
	F	Oral	corn oil	> 1,000	Olson et al., 1963																																																										
	F	Oral	corn oil	3,600	Esaki et al., 1973																																																										
	M, F	Dermal	CMC	> 4,827	Hasegawa et al., 1973a																																																										
	M, F	Dermal	corn oil	> 3,713																																																											

	<p>1. 토끼</p> <ul style="list-style-type: none"> ○희석하지 않은 chlorpyrifos-methyl을 토끼의 결막낭에 적용시켰다. 결막염의 징후가 나타났지만 24-48시간 이내에 사라졌다. 결막 손상은 일어나지 않았다 (Olson and Taylor, 1964b). ○장기간의 실험에서 토끼의 찰과상을 낸 피부와 면도된 피부에 희석하지 않은 chlorpyrifos-methyl을 적용시켰으나 반응은 일어나지 않았다 (Olson and Taylor, 1964b; United States Army, 1973). <p>2. 랫드</p> <ul style="list-style-type: none"> ○랫드에게 chlorpyrifos-methyl(4g/kg)을 경구로 투여하였을 때와 여러 농도의 아트로핀 황산염을 피부에 자극시켰을 때 24시간 이내에 90%의 가 콜린에스테라제 활성의 저하로 인하여 죽었다. ○랫드에게 치사량에 가까운 경구투여량의 chlorpyrifos-methyl과 함께 아트로핀 황산염을 복강내 주사하였고, PAM(25, 50과 100mg/kg)과 glutathione(100, 300, 500과 700mg/kg)을 함께 처치하였다. 콜린에스테라제의 저하 증상으로 혈액, 적혈구, 혈장과 뇌의 콜린에스테라제가 발견되었다. ○아트로핀 황산염과 PAM 그리고 glutathione을 합친 것은 아트로핀 황산염을 단일로 사용할 때 보다 더욱 효과적이었다 (Hayashi et al., 1973). ○군당 5마리의 랫드에게 chlorpyrifos-methyl의 LD 50인 8.5g/kg을 접종하였다. 항콜린에스테라제 활동 징후가 나타난 한 군에게 근육주사로 아트로핀 황산염 17.5mg/kg을 투여하였고, 나머지 군에는 근육주사로 아트로핀시켰다. 24시간 이내에 처치된 모든 랫드들은 죽었고, 처치받지 못한 대조군은 8시간 이내에 모두 죽었다 (Davies and Collins, 1975).
단기	<p>1. 랫드</p> <ul style="list-style-type: none"> ○14일간 랫드에게 경구로 20, 100과 500mg/kg bw/day의 chlorpyrifos-methyl을 처치하였다. 사망하거나 증체량의 확연한 변화는 보이지 않았다. 500mg/kg 투여군에서 간과 심장의 비대가 발견되었다 (Esaki et al., 1973). ○14일간 식이를 통하여 0, 1.6, 6, 25, 95, 500과 2130mg/kg bw/day에 해당하는 chlorpyrifos-methyl을 암컷 랫드에게 투여하였다. 6mg/kg 투여군에서 혈청과 적혈구의 콜린에스테라제의 저하가 발견되었고, 95mg/kg 투여군에서는 뇌의 콜린에스테라제의 저하도 발견되었다. 간, 신장과 비장의 무게와 체중의 비율은 대조군과 비교하였을 때 확연한 차이가 없었지만, 2130mg/kg 투여군에서 뇌의 무게와 체중의 비율이 증가된 것이 보여졌다. 육안검사와 조직병리학적으로 이 물질과 관련이 없다고 보여졌다 (United States Army, 1973). ○90일간 군당 6마리의 수컷과 암컷 랫드에게 0, 0.08, 0.8, 8.0, 40, 80과 160mg/kg bw/day의 chlorpyrifos-methyl을 식이를 통해 섭취시켰다. 8mg/kg 투여군의 수컷에서 혈청 콜린에스테라제의 활성이 감소되었고, 0.8mg/kg 투여군의 암컷에서도 이와같이 나타났다. 적혈구와 뇌 콜린에스테라제 저하의 빈도는 8.0mg/kg/day 투여군의 수컷과 암컷 모두 확연하게 증가되었다. 40, 80과 160mg/kg 투여군의 수컷에서 간의 중량과 체중의 비율이 증가되었다. 백혈구 수와 간 문맥 주변의 혈청 세포의 작아짐을 제외하고 육안 검사와 조직병리학적인 변화는 없다고 보고되었다 (Steinberg, 1971). ○6달동안 군당 암컷과 수컷으로 이루어진 Wistar 랫드에게 0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40과 100ppm의 chlorpyrifos-methyl이 포함된 식이를 공급하였다. 죽음, 사료 섭취량, 체중 증가, 장기 무게와 소변검사 결과 확연한 차이는 보고되지 않았다. 40ppm 투여군과 그 이하는 혈액 생화학검사와 혈액병리검사에 영향을 끼치지 않았다. 30ppm 투여군과 그 이상 투여군에서 혈청과 적혈구의 콜린에스테라제 활동의 감소가 나타났다 (Hasegawa et al., 1973b). ○6주 간의 실험에서 주중에 6일동안 위관을 통하여 매일 0, 0.2, 1.0과 5.0mg/kg bw/day의 chlorpyrifos-methyl을 군당 5마리의 수컷과 암컷으로 이루어진 랫드에게 투여하였

		<p>다. 5.0mg/kg 투여군의 암컷에서 혈청 콜린에스테라제의 활동이 저하되었다. 적혈구와 뇌의 콜린에스테라제 활동은 확연하게 감소되지 않았다. 성장, 혈액분석, 혈액생화학과의 미소체의 산화 활성에 영향을 끼치지 않았다 (Coulston and Griffin, 1975).</p>
	장기	<p>1. 랫드</p> <ul style="list-style-type: none"> ○104주간 군당 55마리의 수컷과 암컷 랫드에게 각각 0.03, 0.1, 1.0과 3.0mg/kg bw/day의 chlorpyrifos-methyl을 식이를 통하여 투여하였다. 처치 5주 후 군당 5마리의 수컷과 암컷을 안락사하여 콜린에스테라제를 검출하였다. 처치 26주 후 군당 10마리의 수컷과 암컷을 안락사하여 군의 크기를 30마리의 수컷과 암컷으로 줄였다. 1.0과 3.0mg/kg/day 투여군의 수컷과 암컷 모두 적혈구 세포의 콜린에스테라제 활동의 저하되었다. ○1.0과 3.0mg/kg/day 투여군의 암컷에서 혈청 콜린에스테라제 활동이 저하되었고, 3.0mg/kg/day 투여군의 수컷은 처치 1년간 약간의 효과가 보이다가 이후 급격하게 저하되었다. 뇌 콜린에스테라제는 영향을 받지 않았다. Chlorpyrifos-methyl은 행동, 죽음, 체중량, 사료 섭취량과 사료 이용 효율에 확인한 영향을 끼치지 않았다. 혈액분석, 혈액생화학과의 소변검사에서도 비정상 적 변화는 보이지 않았다. 장기무게나 육안검사와 조직병리학 소견에서 처치에 관련된 영향은 보이지 않았다 (Hunter et al., 1974a). ○NOAEL: 0.1 mg/kg
	생식 / 발달	<p>1. 랫드</p> <p>○3세대에 걸친 생식 실험에서, 군당 10마리의 수컷과 20마리의 암컷으로 이루어진 3군의 랫드에게 0, 1.0과 3.0mg/kg bw/day의 chlorpyrifos-methyl을 식이를 통하여 공급하였다. 부모 동물에서 처치와 관련된 효과로 행동, 생존, 체중량과 사료 섭취량의 변화는 보이지 않았다. 생식력, 임신, 수정 능력과 수유 능력의 지표를 대조군의 값과 비교하였다. 산후 0, 4와 21일 째의 2세대의 새끼의 체중과, 3세대의 새끼의 체중은 대조군에 비하여 확연하게 감소하였다. 이것은 성의 비율에 영향을 주지 않았다. 3세대의 성인 개체에서, 투여군 둘 다 양성에서 혈청 콜린에스테라제의 활동이 감소되었다. 1mg/kg 투여군의 암컷과 최고농도 투여군의 양성 모두에서 적혈구 콜린에스테라제가 저하되었다. 뇌 콜린에스테라제의 활동은 영향을 받지 않았다. 육안검사와 조직병리학적으로 대조군과 고농도 투여군의 부모로부터 3세대 까지 처치와 관련된 기형은 보이지 않았다 (Thompson et al., 1975).</p>
잔류성	흡수 대사 분포	<p>1. 암탉</p> <ul style="list-style-type: none"> ○4마리의 암탉에게 방사선동위원소가 있는 [14C]chlorpyrifos-methyl을 매일 투여하였고, 이는 10일간 25mg/kg의 일간 처치량과 동량이었다. 10번째 투여 후 16시간 이후 안락사 시켜 조직을 모았다. 조직과 계란 샘플에서 ACN을 이용하여 추출하였고, TLC와 HPLC로 분석하기 위하여 추출물을 hexane으로 층을 나눴다. 계란 노른자와 신장 내의 추출되지 않은 잔류물은 염기 가수 분해를 하여 추출물을 LSC로 분석하였다. 집중 방사능 대비 방사능 수치는 거의 70%가 배설물에서 검출되었다. 방사능은 조직에서 낮게 측정되었고, 지방은 0.07-0.35mg/kg, 신장 0.09-0.015와 계란 노른자 < 0.01-0.10mg/kg의 chlorpyrifos-methyl과 동량이 검출되었다. 최고 잔류는 근육에서 0.02mg/kg이 검출되었다. 잔류의 주요 위치는 신장 내에서 발견되었고, TCP(거의 77% TRR)과 DEM 대사산물 (22% TRR)로 확인되었다. 지방은 주로 본 시료가 거의 75% TRR으로 존재하였고, 계란 노른자에는 대략적으로 3가지의 물질이 거의 동량(16-23% TRR)으로 존재하였다. ○요약하여, chlorpyrifos-methyl은 염소와 암탉에서 1차적으로 TCP (60% TRR 이상)으로 대사된다.

일렉터 피에스피 - 스피노사드(Spinosad)

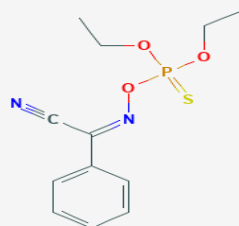
물리적· 화학적특성	화 합 물 명 : 스피노사드(Spinosad) 용 도 : 살충제 분 자 식 : C ₄₁ H ₆₅ N ₁₀ 분 자 량 : 731.968 g/mol log Kow : 2.8 (Spinosyn A; pH 5 buffer) CAS NO. : 131929-63-0																																																							
	안 전 성	독 성	급 성																																																					
1. Spinosad																																																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Species</th> <th style="text-align: left;">Strain</th> <th style="text-align: left;">Purity</th> <th style="text-align: left;">Route</th> <th style="text-align: left;">Vehicle</th> <th style="text-align: left;">LD50 / LC50 (mg/kg bw)</th> <th style="text-align: left;">Reference</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">Mouse</td> <td rowspan="3">CD-1</td> <td rowspan="2">87.9</td> <td rowspan="2">Oral</td> <td>0.5% aqueous methyl cellulose</td> <td>> 5,000</td> <td rowspan="2">Gilbert et al. (1994)</td> </tr> <tr> <td>0.5% aqueous methyl cellulose</td> <td>M: 6,100 F: 7,100</td> </tr> <tr> <td>88.0</td> <td>Oral</td> <td>0.5% aqueous methyl cellulose</td> <td>M: < 5,000 F: > 5,000</td> <td rowspan="2">Gilbert & Yano (1996)</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Rat</td> <td rowspan="3">Fischer 344</td> <td rowspan="2">87.9</td> <td rowspan="2">Oral</td> <td>0.5% aqueous methyl cellulose</td> <td>M: > 7,500 F: 5,300</td> <td rowspan="2">Gilbert et al. (1994)</td> </tr> <tr> <td>88.0</td> <td>Oral</td> <td>10% aqueous acacia</td> <td>> 2,000 (no death)</td> </tr> <tr> <td>88.0</td> <td>Inhalation</td> <td>-</td> <td>> 5.2</td> <td>Wright et al. (1992)</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Rabbit</td> <td rowspan="3">New Zealand white</td> <td rowspan="2">87.9</td> <td rowspan="2">Dermal</td> <td>Water</td> <td>> 2,000 (no death)</td> <td rowspan="2">Gilbert (1994)</td> </tr> <tr> <td>88.2</td> <td>Dermal</td> <td>Water</td> <td>> 5,000 (no death)</td> </tr> <tr> <td>87.9</td> <td>Dermal</td> <td>-</td> <td>> 5,000 (no death)</td> <td>Laska et al. (1992)</td> </tr> </tbody> </table>				Species	Strain	Purity	Route	Vehicle	LD50 / LC50 (mg/kg bw)	Reference	Mouse	CD-1	87.9	Oral	0.5% aqueous methyl cellulose	> 5,000	Gilbert et al. (1994)	0.5% aqueous methyl cellulose	M: 6,100 F: 7,100	88.0	Oral	0.5% aqueous methyl cellulose	M: < 5,000 F: > 5,000	Gilbert & Yano (1996)	Rat	Fischer 344	87.9	Oral	0.5% aqueous methyl cellulose	M: > 7,500 F: 5,300	Gilbert et al. (1994)	88.0	Oral	10% aqueous acacia	> 2,000 (no death)	88.0	Inhalation	-	> 5.2	Wright et al. (1992)	Rabbit	New Zealand white	87.9	Dermal	Water	> 2,000 (no death)	Gilbert (1994)	88.2	Dermal	Water	> 5,000 (no death)	87.9	Dermal	-	> 5,000 (no death)	Laska et al. (1992)
Species	Strain	Purity	Route	Vehicle	LD50 / LC50 (mg/kg bw)	Reference																																																		
Mouse	CD-1	87.9	Oral	0.5% aqueous methyl cellulose	> 5,000	Gilbert et al. (1994)																																																		
				0.5% aqueous methyl cellulose	M: 6,100 F: 7,100																																																			
		88.0	Oral	0.5% aqueous methyl cellulose	M: < 5,000 F: > 5,000	Gilbert & Yano (1996)																																																		
Rat	Fischer 344	87.9	Oral	0.5% aqueous methyl cellulose	M: > 7,500 F: 5,300		Gilbert et al. (1994)																																																	
				88.0	Oral	10% aqueous acacia		> 2,000 (no death)																																																
		88.0	Inhalation	-	> 5.2	Wright et al. (1992)																																																		
Rabbit	New Zealand white	87.9	Dermal	Water	> 2,000 (no death)	Gilbert (1994)																																																		
				88.2	Dermal		Water	> 5,000 (no death)																																																
		87.9	Dermal	-	> 5,000 (no death)	Laska et al. (1992)																																																		
2. Spinosyn A & D																																																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Species</th> <th style="text-align: left;">Strain</th> <th style="text-align: left;">Purity</th> <th style="text-align: left;">Route</th> <th style="text-align: left;">Vehicle</th> <th style="text-align: left;">LD50 / LC50 (mg/kg bw)</th> <th style="text-align: left;">Reference</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Rat</td> <td rowspan="2">Fischer 344</td> <td rowspan="2">96.3</td> <td rowspan="2">Oral</td> <td>0.5% aqueous methyl cellulose</td> <td>M: 4,400 F: > 5,000</td> <td rowspan="2">Stebbins & Brooks (1999)</td> </tr> <tr> <td>0.5% aqueous methyl cellulose</td> <td>> 5,000</td> </tr> <tr> <td>Rabbit</td> <td>New Zealand white</td> <td>96.3</td> <td>Dermal</td> <td>0.5% aqueous methyl cellulose</td> <td>> 5,000</td> <td>Stebbins & Brooks (1999)</td> </tr> </tbody> </table>				Species	Strain	Purity	Route	Vehicle	LD50 / LC50 (mg/kg bw)	Reference	Rat	Fischer 344	96.3	Oral	0.5% aqueous methyl cellulose	M: 4,400 F: > 5,000	Stebbins & Brooks (1999)	0.5% aqueous methyl cellulose	> 5,000	Rabbit	New Zealand white	96.3	Dermal	0.5% aqueous methyl cellulose	> 5,000	Stebbins & Brooks (1999)																														
Species	Strain	Purity	Route	Vehicle	LD50 / LC50 (mg/kg bw)	Reference																																																		
Rat	Fischer 344	96.3	Oral	0.5% aqueous methyl cellulose	M: 4,400 F: > 5,000	Stebbins & Brooks (1999)																																																		
				0.5% aqueous methyl cellulose	> 5,000																																																			
Rabbit	New Zealand white	96.3	Dermal	0.5% aqueous methyl cellulose	> 5,000	Stebbins & Brooks (1999)																																																		
단 기	1. 랫드 ○28일간 군당 5마리의 수컷 Fischer 344 랫드에게 식이를 통하여 0, 1000, 3000ppm의																																																							

	<p>spinosad, spinosyn A 및 spinosyn D를 처치하였다. 이는 86과 229mg/kg bw/day의 spinosad 처치량, 86과 220mg/kg bw/day의 spinosyn A, 그리고 86과 250mg/kg bw/day의 spinosyn D의 처치량과 동량이었다.</p> <p>○죽거나 처치와 관련된 어떠한 임상적 징후나 육안으로 관찰되는 영향은 나타나지 않았다. 3000ppm 투여군의 체중과 체중량이 대조군과 비교하였을 때 낮았다. 통계적으로 spinosad 투여군은 투여 농도별로 19 와 34%가 낮았고, spinosyn A 투여군에서는 17과 32% 그러나 spinosyn D 투여군에서는 5.5와 10% 정도의 차이가 나타났다.</p> <p>○체중량의 감소는 spinosad와 spinosyn A 투여군에서 대조군과 비교하였을 때 각각 32% 와 29% 정도 사료 섭취량이 감소한 것과 연관이 있다고 보고되었다. 통계적 혈액학적 인 변화는 적혈구의 수가 대조군과 비교하였을 때 거의 25% 정도 감소하였고, 헤모글로빈 -50%, 적혈구의 용적 분율 -50%, 평균 적혈구 용적 -30%와 평균 헤모글로빈 입자 수 -30% 그리고 spinosad 및 spinosyn A의 3000ppm 투여군에서 혈소판 수가 대조군에 비하여 거의 2배정도 증가함이 보여졌다.</p> <p>○spinosad 및 spinosyn A의 3000ppm 투여군에서 혈구의 다염성, 저염색성 및 기형 발생 과 혈소판의 비대의 빈도가 증가하는 것으로 보여졌다. 확인한 임상 화학적 변화는 3000ppm의 spinosad 투여군에서 전체 단백질이 -11%, 글로불린 -14%의 감소가 나타났고, 3000ppm의 spinosad 및 spinosyn A 투여군에서 알부민의 농도 -5%, 염기성 인산분해효소의 활성도 -30% 의 감소가 나타났으며 콜레스테롤의 농도가 1.7~2배 가량 상승하였다. 3000ppm의 spinosad 및 spinosyn D 투여군에서 아스파테이트(aspartate) 아미노 전이효소의 활성도가 2~2.5배 가량 증가하였으나 spinosyn A 투여군에서는 80%의 확인하지 않은 증가가 나타났다. 3000ppm의 spinosyn A 투여군에서 K(potassium)의 농도가 11% 증가한 것으로 나타났다.</p> <p>○소변검사 기준에는 영향을 미치지 않은 것으로 보고되었다. 3000ppm의 spinosad 투여군에서 뇌와 신장의 무게와 확인하게 10%정도 감소하였고, spinosyn A 투여군에서 비장의 무게가 확인하게 20%정도 증가하였다. 절대 비장 무게는 3000ppm의 spinosyn A 및 spinosyn D에서 확인하게 증가되는 것이 나타났다. 3000ppm의 spinosad 및 spinosyn A 투여군의 모든 랫드들에서 신장 위 점막의 부종과 위의 루멘에서 혈액의 용혈이 관찰되었다.</p> <p>○임상병리학적 변화로 1000ppm 이상의 모든 화합물 투여군에서 갑상선의 상피세포와 신장의 관형 상피세포에서 심각한 액포 변화의 빈도가 증가되었고, 3000ppm 투여군의 spinosad 와 spinosyn D 투여군에서 림프절과 가슴샘, spinosad 와 spinosyn A 투여군에서 부고환, spinosad 투여군에서 공장관과 정관에서 심각한 액포 변화의 빈도가 증가되었다. 3000ppm 투여군의 다른 영향은 spinosyn A와 spinosyn D 투여군에서 골격근 내의 상피 세포의 응집, 골수와 비장 내의 외골수혈의 증가, 위의 선점막 내의 재생적 변화와 관련이 있는 유사분열의 증가와 spinosad와 spinosyn A 투여군에서 폐포 조직 구증의 증가가 나타났다.</p> <p>○3000ppm 농도의 모든 화합물 투여군에서 신장 관형 상피세포의 물방울 모양 단백질의 발생의 감소 및 선형 위 내의 퇴화 또는 재생이 관찰되었다. 모든 식이 농도에서 병리학적 변화가 나타났기 때문에 NOAEL 값을 설정할 수 없었다.</p>
장기	<p>1. 랫드</p> <p>○24달간 군당 65마리의 Fischer 344의 암컷과 수컷으로 이루어진 군에 0, 50, 200, 500과 1000ppm의 spinosad(순도 88%, spinosyn A 76.1%와 spinosyn D 11.9%)를 식이를 통하여 투여하였고, 이는 수컷에서 0, 2.4, 9.5, 24와 49mg/kg bw/day, 암컷에서 0, 3, 12, 30과 63mg/kg bw/day의 투여량과 동량이다.</p> <p>○1000ppm 투여군에서 수컷의 88% 암컷의 60%가 높은 치사율이 나타났고, 체중량이 10~15% 이상 감소하였고, 이 농도에 대한 전체 독성에 대한 임상 증상으로 회음부의 오염, 가쁜 호흡, 마른 외관과 체지방량의 감소가 나타났다. 최종 평균 체중은 대조군에 비하여 거의 82% 정도 밖에 미치지 못했으나, 이는 사료 섭취량과는 관련이 없었</p>

	<p>다. 통계적인 확연한 변화는 혈액화학 임상 화학 지표에서 보여졌다. 대부분은 영향이 매우 적었고, 일시적인 것과 부수적인 것으로 간주하였다.</p> <p>○염기성 인산분해효소와 아스파테이트 아미노산전이효소 활성도, 혈액 내 요산 농도가 각각의 경우에는 증가가 적었지만 처치와 연관된 가능성있는 변화라고 보여졌으나 이는 안락사 하여 조직학적 변화를 찾아보았지만 상관관계는 찾을 수 없었다.</p> <p>○18달째 500과 1000ppm 투여군의 수컷랫드에서 염기성 인산분해효소의 활성이 확연하게 24%와 43% 정도 증가했고, 실험 6달째와 12달째 1000ppm 투여군의 암컷랫드에서 28%와 32%가 증가하였으나 18달째에서는 26%의 증가로 확연하게 증가되지 않았다. 아스파테이트 아미노산전이효소의 활성은 1000ppm 투여군의 수컷에서 12달째에는 35%와 18달째에는 42%의 확연하게 증가되었다. 암컷에서 18달째에서 54%의 관련된 증거가 나타났지만, 이 농도에서 심장의 장애가 발견되었다. 혈액내 요산의 농도는 1000ppm 투여군의 암컷에서 6달째 16%, 12달째 56%와 18달째 38%가 수컷에서는 6달째 12%와 12달째 24%가 확연하게 증가하였다. 글로불린의 농도는 근소하긴 하나 확연하게 500ppm 투여군의 수컷에서 18달째 11%와 24달째 14%가 암컷에서는 500ppm 투여군에서 6달째 9%, 12달째 17%, 18달째 11%와 24달째 11%가 증가하였고, 1000ppm 투여군의 수컷에서 12달째 9%와 18달째 14%, 암컷에서 12달째 13%와 18달째 8% 증가하였다.</p> <p>○통계적으로 처치와 관련된 확연한 변화는 500ppm 투여군 암컷의 심장 절대/상대 중량이 증가되었고, 신장과 간의 절대중량의 확연한 차이는 암컷에게만 나타났고, 비장과 갑상선은 1000ppm 투여군에서 증가하였다. 500ppm 이상에서 자궁의 절대/상대 중량의 증가는 처치량과 관련이 있고, 부신 중량은 12달째 1000ppm 투여군 암컷에서만 증가하였다.</p> <p>○24달째는 절대/상대 갑상샘의 중량은 암컷과 수컷 모두에서 증가하였고, 심장과 신장의 무게는 500ppm 투여군 암컷에서 증가한 것으로 나타났다. 1000ppm 투여군의 12달째에서 수컷 10마리 중 1마리에서와 암컷 10마리 중 8마리에서 폐의 여러 군데에 엷은 부분이 발견되었다. 병리학적 소견으로 신장과 갑상선의 공포화, 간, 갑상샘과 전립샘의 염증, 비장의 골수 외 조혈과 위의 선상 점막의 퇴화 또는 재생이 관찰되었다. 후두, 간, 림프절과 비장 내의 세망 내피 세포의 심각한 응집의 빈도가 증가하였다.</p> <p>○500ppm 투여군에서 수컷과 암컷 모두 갑상샘 상피세포의 공포화의 빈도가 증가하였다. 아주 근소하거나 중간정도의 심각도의 세망 내피 세포의 응집은 1000ppm 투여군 12달째의 암컷 간, 12달과 24달째 암컷과 수컷 모두 장간막 림프절과 12달째 암컷의 비장에서 발견되었다. 1000ppm 투여군의 실험 종료 후 육안 검사에서 체지방 감소에 제한되었고, 회음부의 오염, 흉강 내 혈청성 유체와 폐의 상당부분이 없어지는 빈도가 증가되었다.</p> <p>○수컷 50마리중 21마리와 암컷 50마리중 11마리의 좌심방의 작은 부분이 얼룩덜룩해졌고, 좌심방에 혈전이 생성되었다. 7마리 중 4마리에서 갑상샘의 크기가 증가하였다. 안락사가 진행되지 않은 남은 개체에서 500ppm 투여군의 암컷에서 심각한 골수의 과분화, 후두, 폐, 갑상샘의 염증과 갑상샘의 괴사 발생 빈도가 증가하였고, 200ppm 투여군의 암컷과 수컷 모두 갑상샘 상피 세포의 공포화 및 암컷에서의 간장 유동층의 경미한 확장의 발생 빈도가 증가하였다. 호산구성 간세포로 변화되는 빈도가 0, 50, 200, 500과 1000ppm 투여군에서 수컷은 0, 4, 7과 2, 암컷은 0, 6, 9와 2로 증가하는 것이 보여졌고, 폐 혈관의 무기물화되는 빈도는 0, 50, 200, 500과 1000ppm 투여군에서 수컷은 0, 11, 13, 0과 0, 암컷은 0, 11, 13, 0과 0으로 증가되는 것이 보였지만, 투여량과 관련된 빈도는 아니며 부수적인 영향이라고 보고되었다.</p> <p>○중앙의 형태, 발병시기 및 발병빈도는 모든 군에서 유사하였다. NOAEL 값은 50ppm으로 설정되었고 이는 2.4mg/kg bw/day와 동량이고 이것은 이 농도보다 높은 농도에서 조직병리학적 영향을 기반으로 설정되었다 (Bond et al., 1995b).</p>
생식	○자료 미비

		/ 발 달	
잔 류 성	흡수 대사 분포		<p>1. 암탉</p> <p>○10마리의 1.4kg무게의 Leghorn 암탉에서 조직, 계란과 배설물 내의 잔류를 확인하기 위하여 0.94mg의 [14C]spinosyn A(동량의 사료내의 10ppm spinosyn A)을 5일간 캡슐화 시켜 경구로 투여하였다 (Magnussen and Castetter, 1994). 사료 섭취량은 94g/bird/day 였다. 계란과 배설물은 실험이 진행되는 동안 수집되었고, 최종 투여 후 24시간 이내에 닭을 안락사 시켰다. 다른 10마리의 암탉에게는 [14C]spinosyn D를 투여하여 유사 실험이 진행되었다. spinosyn A 투여군에서 접종량의 73%가 측정되었고 이를 구성하는 것은 배설물 69%, 계란 0.77%, 지방 1.4%, 간 0.68%, 근육 0.53%와 신장 0.12%으로 측정되었고, spinosyn D 투여군에선 접종량의 82%가 측정되었고 이를 구성하는 것은 배설물 78%, 계란 0.6%, 지방 0.8%, 간 1.2%, 근육 0.5%와 신장 0.2%로 측정되었다.</p> <p>○계란 내의 14C 잔류는 실험이 끝날 때 까지 계속해서 증가되었다. 2일에서 6일차에 spinosyn A가 처치된 계란에서 각각 0.014, 0.082, 0.19, 0.32와 0.38mg/kg으로 나타났고, spinosyn D가 처치된 계란에선 각각 0.019, 0.073, 0.14, 0.22와 0.32mg/kg으로 나타났다. 최고농도의 잔류는 지방에서 나타났으며, 대부분이 본 시료의 잔류로 확인되었다. 또한 주요 또는 중요 부분의 잔류는 근육과 계란에서 나타났다.간에서 대부분의 대사가 이루어지며 N-demethylation, O-demethylation과 furosamine 당의 일부가 손실되는 작용이 일어나 대사산물을 형성한다.</p>

폭심(Phoxim)

물리적 · 화학적특성	화 합 물 명 : 폭심(Phoxim) 용 도 : 살충제 분 자 식 : C12H15N2O3PS 분 자 량 : 298.297 g/mol log Kow : 3.38 CAS NO. : 14816-18-3																																																																							
급 성	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Species</th> <th style="text-align: left;">Sex</th> <th style="text-align: left;">Route</th> <th style="text-align: left;">Solvent</th> <th style="text-align: left;">LD50 / LC50 (mg/kg bw) / (mg/L)</th> <th style="text-align: left;">Reference</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="5">Mouse</td> <td>F</td> <td>Oral</td> <td>-</td> <td>2.53-3.38</td> <td>Flucke 1978</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>Oral</td> <td>-</td> <td>2.50-3.50</td> <td>Flucke 1978</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Oral</td> <td>-</td> <td>M: 2.440 F: 3.240</td> <td>Kimmerle 1968</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>Inhalation (4h)</td> <td>Alcohol + Lutrol (1:1)</td> <td>> 2.06</td> <td>Kimmerle 1968</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>I.V.</td> <td>-</td> <td>950</td> <td>Kimmerle 1968</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">Rat</td> <td>M, F</td> <td>Oral</td> <td>-</td> <td>M: 7,060 F: 5,800</td> <td>Kimmerle and Solmecke 1968</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>I.P.</td> <td>-</td> <td>M: 1,775 F: 1,725</td> <td>Kimmerle and Solmecke 1968</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Inhalation (4h)</td> <td>Alcohol + Lutrol (1:1)</td> <td>M: > 2.23 F: > 2.22</td> <td>Kimmerle and Solmecke 1968</td> </tr> <tr> <td>M</td> <td>Dermal</td> <td>-</td> <td>> 1,000</td> <td>Kimmerle and Solmecke 1970</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Chickens</td> <td>-</td> <td>Oral</td> <td>-</td> <td>37.5</td> <td>Kimmerle 1972</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>I.P.</td> <td>-</td> <td>37.5</td> <td>Kimmerle 1972</td> </tr> <tr> <td>Hen</td> <td>-</td> <td>Oral</td> <td>Water emulsion</td> <td>19.6</td> <td>Thyssen and Kimmerle 1973</td> </tr> </tbody> </table>		Species	Sex	Route	Solvent	LD50 / LC50 (mg/kg bw) / (mg/L)	Reference	Mouse	F	Oral	-	2.53-3.38	Flucke 1978	F	Oral	-	2.50-3.50	Flucke 1978	M, F	Oral	-	M: 2.440 F: 3.240	Kimmerle 1968	F	Inhalation (4h)	Alcohol + Lutrol (1:1)	> 2.06	Kimmerle 1968	F	I.V.	-	950	Kimmerle 1968	Rat	M, F	Oral	-	M: 7,060 F: 5,800	Kimmerle and Solmecke 1968	M, F	I.P.	-	M: 1,775 F: 1,725	Kimmerle and Solmecke 1968	M, F	Inhalation (4h)	Alcohol + Lutrol (1:1)	M: > 2.23 F: > 2.22	Kimmerle and Solmecke 1968	M	Dermal	-	> 1,000	Kimmerle and Solmecke 1970	Chickens	-	Oral	-	37.5	Kimmerle 1972	-	I.P.	-	37.5	Kimmerle 1972	Hen	-	Oral	Water emulsion	19.6	Thyssen and Kimmerle 1973
Species	Sex	Route	Solvent	LD50 / LC50 (mg/kg bw) / (mg/L)	Reference																																																																			
Mouse	F	Oral	-	2.53-3.38	Flucke 1978																																																																			
	F	Oral	-	2.50-3.50	Flucke 1978																																																																			
	M, F	Oral	-	M: 2.440 F: 3.240	Kimmerle 1968																																																																			
	F	Inhalation (4h)	Alcohol + Lutrol (1:1)	> 2.06	Kimmerle 1968																																																																			
	F	I.V.	-	950	Kimmerle 1968																																																																			
Rat	M, F	Oral	-	M: 7,060 F: 5,800	Kimmerle and Solmecke 1968																																																																			
	M, F	I.P.	-	M: 1,775 F: 1,725	Kimmerle and Solmecke 1968																																																																			
	M, F	Inhalation (4h)	Alcohol + Lutrol (1:1)	M: > 2.23 F: > 2.22	Kimmerle and Solmecke 1968																																																																			
	M	Dermal	-	> 1,000	Kimmerle and Solmecke 1970																																																																			
Chickens	-	Oral	-	37.5	Kimmerle 1972																																																																			
	-	I.P.	-	37.5	Kimmerle 1972																																																																			
Hen	-	Oral	Water emulsion	19.6	Thyssen and Kimmerle 1973																																																																			
안 전 성	독 성	1. 랫드 ○해충을 방제하기 위해 저장곡물을 처리할 때 cythion(malathion) 대신 baythion(phoxim)을 사용하는 안전성을 결정하기 위하여 급성 경구 실험을 실시했다. 랫드에게 0, 1, 2, 4, 6과 10ppm baythion과 cythion을 식이에 포함시켜 투여하였다. 이는 성체와 새끼에게 5달간 투여하였다. 처치에 대한 어떠한 영향도 보고되지 않았다. 저장된 곡물과 혼합된 4ppm의 baythion은 cythion의 대체물질로 사용될 수 있으며, 인체에 부작용은 없을 것으로 결론 지었다 (Lin 1974). ○군당 15마리의 수컷과 암컷으로 이루어진 wistar 중 랫드에게 phoxim이 0, 5, 15, 50, 150과 500ppm이 포함된 사료를 3달간 공급하였다. 대조군은 30마리의 수컷과 암컷으로 구성하였다. 혈액학, 임상화학과 소변 기준은 3달간의 실험에서 4주마다 수컷 5마리와 암컷 5마리를 사용하여 검사하였다. 혈청과 적혈구의 콜리넵스테라제 활성도는 1, 4, 8과 13주차에 투여가 진행된 후 5마리의 수컷과 암컷을 통하여 검사하였다. 실험 도중 죽어가는 개체는 부검을 실시하였다. 실험이 종료된 뒤, 모든 개체는 안락사를 진행하였고, 육안 및 조직병리학적으로 확인하였다. ○행동, 사료 및 음수 섭취량과 체중량은 대조군과 처치군 사이의 확연한 차이는 발견되지 않았다. 콜린성 증상은 실험 초반부에 부분적으로 500ppm 투여군에서 관찰되었다. 500ppm 투여군의 수컷랫드에서만 확연하게 감소된 체중이 보여졌다. 이 화합물과 관련된 죽음은 일어나지 않았다. 혈액학, 임상화학 및 소변 기준에서 모든 처치군의 동물은																																																																						
단 기																																																																								

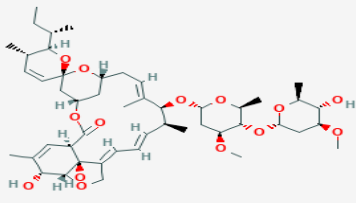
	<p>대조군과 비교하였을 때 확연한 차이는 발견되지 않았다. 50ppm 및 이 이상의 투여군의 수컷랫드에서 혈장과 적혈구의 콜린에스테라제의 투여량에 의한 억제 증가하였다. 암컷에서는 15ppm 및 이 이상의 투여군에서 혈청 콜린에스테라제가, 50ppm 및 그 이상 투여군에서는 적혈구 콜린에스테라제의 투여량에 의한 감소가 보고되었다.</p> <p>○실험이 끝난 뒤, 모든 랫드들을 부검한 결과, phoxim이 포함된 식이를 투여한 주에서 내부 장기의 변화는 보이지 않았다. 500ppm 투여군의 수컷 랫드에서 대조군과 비교하였을 때, 확연하게 높은 갑상샘과 간의 무게가 보여졌다. 상대 장기 무게는 대조군과 비교하였을 때, 50ppm 투여군 까지 투여량과 연관된 확연한 차이는 보이지 않았다. 수컷과 암컷에서 높은 상대 간 중량은 150ppm과 500ppm에서 발견되었다. 이러한 비대증은 간에 대한 영향으로 보이며, 간 기능 검사에서는 모두 정상이었다. 높은 상대 신장 중량은 수컷의 경우 500ppm의 투여군에서, 암컷의 경우 150ppm과 500ppm 투여군에서 발견되었다. 500ppm 투여군의 수컷에서 심장과 부신이 500ppm 투여군의 암컷에서 폐가 대조군과 비교하였을 때, 확연하게 높은 상대 중량이 나타났다. 수컷과 암컷랫드의 혈장과 적혈구 콜린에스테라제 무영향투여량은 15ppm과 5ppm이며, 이는 동량의 1.45mg/kg bw/day와 0.56mg/kg bw/day로 설정되었다 (Löser 1970a).</p> <p>○조직 내에서 화합물과 관련된 조직병리학적 변화는 관찰되지 않았다. (Vince and Spicer 1971).</p>
장기	<p>1. 랫드</p> <p>○24달간 군당 50마리의 수컷과 암컷으로 이루어진 SPF Wistar 종 랫드에게 0, 15, 75와 375ppm 농도의 phoxim이 포함된 식이를 공급하였다. 대조군은 100마리의 수컷과 암컷으로 구성하였다. 추가적으로 3, 6과 12달에 5마리의 수컷과 암컷을 이용하여 임상 실험 소견을 도출해내었다. 실험이 끝난 뒤, 10마리의 수컷과 암컷랫드를 확인하였으나 외면과 행동에는 차이가 없었다.</p> <p>○실험 후반부에 대조군과 비교하였을 때 375 투여군의 수컷에서 낮은 평균 식이섭취량과 암컷에서 낮은 체중량이 보여졌다. 실험 1년째와 2년째에 모든 처치군에서의 죽음은 증가하지 않았다. 실험이 종료된 뒤 대조군대비 처치군의 총 치사율은 수컷에서 24~26%, 암컷에서 14~21%로 확인되었다. 실험 3, 6, 12와 24달째에 실시된 혈액검사에서 대조군과 처치군 사이의 혈액학적으로 확연한 차이는 없었다. 혈액검사로 염기인산분해효소(alkaline phosphatase), GOT, GPT, 글루타믹 탈수소화효소(glutamic dehydrogenase, GLDH), 혈청 bilirubin과 총 혈청 단백질을 검사하였으나 투여량과 관련된 차이는 없었다.</p> <p>○실험 3, 6, 12와 24달째에 소변검사를 실시하여 혈청 요산과 크레아티닌(creatinine)과 소변 단백질을 대조군과 비교한 결과 확연한 차이는 없었다. 소변 단백질은 75ppm 투여군에서 산발적으로 증가하였다. 혈당과 콜레스테롤의 평균값은 대조군과 비교하였을 때 몇몇 특이성이 보여졌지만 이는 투여와 관련이 없었다. 적혈구와 혈장 내의 콜린에스테라제의 활동도는 15ppm 투여군의 수컷과 암컷에서 20% 미만 억제되는 것이 확인되었으나, 확연한 억제는 확인되지 않았다. 75ppm과 375ppm투여군에서 혈장 내 효소의 투여량과 연관된 억제가 확인되었고, 이는 수컷에서 16~42%, 암컷에서 41~64%로 측정되었다. 또한 적혈구 내에서도 수컷 24~54%, 암컷 25~49%의 억제가 확인되었다. 콜린에스테라제 활동도는 375ppm 투여군에서 근소하게 억제되었으며, 이는 수컷에서 18%, 암컷에서 23%정도 억제되는 것이 확인되었다.</p> <p>○실험 도중 죽은 랫드를 육안으로 검사하고, 실험이 끝난 후 투여군의 랫드를 안락사 시켜 부검한 결과 처치와 관련된 피해는 보여지지 않았다.</p> <p>○대조군 대비 모든 처치군의 수컷의 상대 간 중량이 투여량과 관련은 없지만 확연하게 증가하였다. 또한 375ppm 투여군의 암컷의 비장, 폐와 심장의 상대 중량의 증가가 나타났다. 조직병리학적으로 2년간 처치된 모든 랫드의 31개의 조직을 검사한 결과 처치와 관련된 변화는 확인되지 않았다. 상대 장기 무게의 차이는 무작위적으로 나타났으며, 이는 투여와 관련은 없었고, 최종적으로 조직병리학적인 변화는 없었다. 양성 종양</p>

		과 악성 종양의 위치, 유형 및 빈도에 따른 종양 데이터를 분석한 결과, 랫드에서 phoxim의 발암성에 대한 징후는 나타나지 않았다. ○무영향처치량은 혈장과 적혈구의 콜린에스테라제 억제를 기반으로 15ppm으로 설정되었다 (Bombhard and Löser 1977).
	생식 / 발달	○자료 미비
잔류성	흡수 대사 분포	<p>1. 암탉</p> <p>○28마리의 Hisex 암탉 (체중 1332~2028g)으로 잔류 실험하였다. 암탉에게 매일 2g의 phoxim을 피부에 처치하였다. 제형은 분무 노즐과 암탉 사이에서 약 10cm의 거리 내에서 분무되었다. 각각의 암탉에게 10mL 부피를 분무하였고 이는 거의 20mg의 phoxim과 동량이다. 처치는 7일간 반복하여 진행되었다. 7일과 14일에 2번째 처치가 끝난 후 군당 4마리의 암탉을 도살하였다. 남은 암탉 (20마리)는 2번째 처치 21일 후 도살하였다. 각 시점에서 확인된 계란의 수는 9~23개였다.</p> <p>○HPLC-UV 방법으로 간, 근육, 피부/지방과 계란에서 phoxim의 농도를 검출하였다. 신장에서 잔류는 나오지 않았다. 실험 7일째의 2번째 처치한 후 7일째에서 피부/지방에서 가장 높은 잔류(538~1498µg/kg)가 검출되었다. 또한 14일째에서는 95.5~23.5µg/kg가 검출되었다. 가장 낮은 잔류는 근육에서 검출되었고, 7일째에서 7.77~23.5µg/kg이, 14일째에서 3.68~8.79µg/kg가 검출되었고, 21일째에는 N.D~9.73µg/kg이 검출되었다.</p> <p>○모든 시간에서 간에 대한 phoxim의 잔류는 검출되지 않았다. 계란에서의 최대 잔류는 10일째에 12.3µg/kg이 검출되었다. 20일째에서 5.3µg/kg으로 점차적으로 감소하였다. 또한, 이들이 검출가능한 농도는 아니지만, 계란에 사용된 최저 유효성 확인 수준인 30µg/kg으로 정한 정량한계 이하임을 유의하여야 한다.</p>

물리적, 화학적 특징	화합물명	폭심(Phoxim)					
	분자식	C12H15N2O3PS					
	분자량	298.297 g/mol					
	log Kow	3.38					
	Cas NO.	14816-18-3					
요약	안전성	급성	Species	Sex	Route	LD50 (mg/kg bw)	LC50 (mg/L)
			Mouse	M, F	Oral	M: 2,440 F: 3,240	
			Mouse	F	Inhalation		> 2.06
				F	I.V	950	
			Chicken	-	Oral	37.5	
				-	I.P	37.5	
		단기	Species	Sex	Route	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)
			Rat	M, F	Oral	-	M: 1.45

		F: 0.56						
	만성	Species	Sex	Route	Purpose	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
		-	-	-	-	-	-	
	생식/발달	Species	Sex	Route	Purpose	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
		-	-	-	-	-	-	
동태	혈액학	Species	Route	Dose (mg/kg)	Cmax (ng/kg)	Tmax (hr)	T1/2 (hr)	AUC (µg/h/g)
		Sheep	Oral	25	84	192	-	11.8
잔류	잔류허용기준	식품명	국내	EMEA	EU	CODEX	미국GPO	JMPR (FAO)
		닭고기		50	60			
		닭 간		25	-			
		닭 신장	미설정	50	-	미설정	미설정	미설정
		지방/피부		550	-			
계란		60	-					
	잔류성	Species	Route	Egg	Liver / Kidney	Muscle	Fat & Skin	Excreta
		Laying hens	Oral	○	X / ○	○	○	○

아바멕틴 (Abamectin)

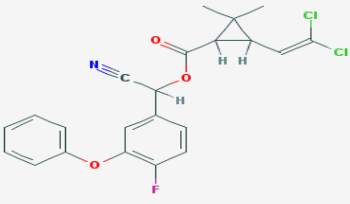
물리적 · 화학적특성	화합물명 : 아바멕틴 (Avermectin B1A) 용도 : 살충제 분자식 : C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄ 분자량 : 873.09 g/mol log Kow : 4.4 CAS NO. : -		
	안전성	독성 급성	
1. 마우스 1) Abamectin ○Abamectin을 참깨 오일에 녹여 군당 5마리의 암컷 마우스에게 0, 10, 20, 40과 80 mg/kg bw를 투여하였다. 40mg/kg bw를 투여한 P-당단백질이 동형 접합(+/+)된 모든 마우스들은 3~6일 이내에 사망하였으며, 80mg/kg bw를 투여한 마우스들은 1~3일 이내에 모두 죽었다. 20mg/kg bw를 투여한 P-당단백질이 이형접합(+/-)된 모든 마우스들은 2~4일 이내에 모두 죽었고, 40과 80mg/kg bw를 투여한 모든 랫드들은 1~2일 이내에 모두 죽었다. ○모든 처치군의 동물에서 처치 후 한시간 이내부터 1~4일 간 떨림, 활동 감소와 수두와 같은 물리적 징후가 발견되었다. 일반적으로 죽기 전에 측면회화위가 발견되었다. Abamectin에 대한 경구 LD50값은 동형접합(+/+) 군의 경우 28mg/kg bw으로 이형접합(+/-) 군의 경우 14mg/kg bw로 설정되었다. 이전의 실험에서 (-/-)의 유전자 형 마우스의 경구 LD50 값은 0.3~0.4mg/kg bw로 설정되었다 (Hall, 1997; Lankas et al., 1997d).			

		<p>2) Abamectin의 8,9-Z 이성질체</p> <p>○군당 3마리의 CD-1 암컷 마우스를 무작위로 선택하여 50, 90, 162, 292와 525mg/kg bw를 투여하였고, 군당 5마리의 CF-1 수컷 랫드를 무작위로 선택하여 10, 20과 30mg/kg bw의 8,9-Z 이성질체를 함께 오일에 녹여 경구로 투여한 후 7일간 관찰하였다. 292mg/kg bw투여군의 CD-1 마우스에서 활동 감소, 수두, 몇몇의 동물에서 죽기전에 떨림이 관찰되었다. 이 투여군의 모든 개체는 처치 5-6시간 내에 사망하였다. 저용량 투여군에서 개체의 죽음은 일어나지 않았지만, 90mg/kg bw투여군의 마우스는 썩은 것처럼 모여졌고, 162mg/kg bw 투여군의 마우스는 공격 자세를 취하고 있었다. 그러나 90mg/kg bw 투여군은 3일과 162mg/kg bw 투여군은 6일째에 정상적으로 돌아왔다.</p> <p>○CF-1 마우스에서는 10mg/kg bw 투여군에서 5마리 중 한 마리가, 20mg/kg bw 투여군에서 5마리 중 세 마리가, 30mg/kg bw 투여군에서 5마리중 2마리가 죽었고, 모두 투여 이후 1일 이내에 죽었다. 살아남은 개체들은 2일 이내에 정상으로 돌아왔다. 독성 징후는 안검염(10mg/kg bw 투여군에서만), 활동감소 및 수두가 나타났다. Abamectin의 8,9-Z 이성질체의 급성 경구 LD50 값은 암컷 CD-1 마우스에서 217mg/kg bw이고, 수컷 CF-1 마우스에서 약 20mg/kg bw로 설정되었다. 모든 Avermectin의 성에 대한 독성의 차이는 보고되지 않았다 (Lynch, 1996).</p>
	단기	<p>1. 마우스</p> <p>○4일간 군당 49마리의 수컷과 50마리의 암컷으로 이루어진 CF-1 마우스와 군당 5마리의 수컷과 암컷의 CD-1 마우스에게 0.8mg/kg bw/day의 Abamectin을 투여하였다. 투여 후 12마리의 암컷과 5마리의 수컷은 빈사상태가 된 채로 심한 떨림 및 운동 실조가 관찰되었다. 이 동물은 처치 후 3-4 시간 안에 사망하였다.</p>
	장기	<p>1) Abamectin</p> <p>1. 마우스 - 2년간의 장기독성 실험 및 발암성에 대한 NOAEL: 4mg/kg bw/day</p> <p>2. 랫드 - 2년간의 장기독성 실험 및 발암성에 대한 NOAEL: 1.5mg/kg bw/day</p> <p>3. 개 - 1년간의 장기독성 실험에 대한 NOAEL: 0.25 mg/kg bw/day</p>
	생식 / 발달	<p>1) Abamectin</p> <p>1. 랫드 - 2세대 간의 생식 독성에 대한 NOAEL: 0.12 mg/kg bw/day</p> <p>2) 8,9-Z 이성질체</p> <p>1. 마우스 - CD-1 마우스의 발달 독성에 대한 NOAEL: 3mg/kg bw/day</p> <p>2. 사람 - ADI: 0-0.002mg/kg bw (Abamectin과 8,9-Z 이성질체의 합)</p>
잔류성	흡수 대사 분포	○자료 미비

요약	물리적·화학적특징	화합물명	아버멕틴 B1A(Abermectin B1A)				
		분자식	C48H72O14				
		분자량	873.09 g/mol				
		log Kow	4.4 (pH 7.1, 25°C)				
		Cas NO.	-				
안전성	급성		Species	Sex	Route	LD50 (mg/kg bw)	LC50 (mg/L)
			Mouse	M, F	Oral	13.6~23.8	
			Rat	M, F	Oral	11	

			Rabbit	M, F	Dermal	> 330			
	단기		Species	Sex	Route	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)		
			-	-	-	-	-		
	만성		Species	Sex	Route	Purpose	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
			Dog	M, F	Oral	Carci.	-	0.25	
			Mouse	M, F	Oral	Carci.	-	0.12	
			Rat	M, F	Oral	Carci.	-	1.5	
			Carci: Carcinogenesis						
	생식/발달		Species	Sex	Route	Purpose	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
			Rat	M, F	Oral	Reprod	-	0.12	
			Mouse	M, F	Oral	Develop	-	3	
			Reprod: Reproduction, Develop: Development						
동태	혈액학		Species	Route	Dose (mg/kg)	Cmax (ng/mL)	Tmax (day)	T1/2 (day)	AUC (µg/h/g)
			Sheep	-	1.25%	28.70 ± 9.54	14 ± 4.04	15.40 ± 11.43	618.05 ± 80.27
잔류	잔류허용기준		식품명	국내	EMEA	EU	CODEX	미국GPO	JMPR (FAO)
			닭고기			10		20	
			닭부산물 계란	미설정	미설정	-	미설정	20	미설정
	잔류성		Species	Route	Egg	Liver / Kidney	Muscle	Fat & Skin	Excreta
			-	-	-	-	-	-	-

사이플루쓰린(Cyfluthrin)

물리적 · 화학적특성	화합물명 : 사이플루쓰린(Cyfluthrin) 용도 : 살충제 분자식 : C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃ 분자량 : 434.288 g/mol log Kow : 5.95 CAS NO. : 68359-37-5															
	안전성	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Species</th> <th>Sex</th> <th>Route</th> <th>Solvent</th> <th>LD50 / LC50 (mg/kg bw) / (mg/L)</th> <th>Reference</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Rat</td> <td>M</td> <td rowspan="2">Oral</td> <td>Acetone:</td> <td>155</td> <td rowspan="2">Heimann (1987)</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>Peanut oil</td> <td>160</td> </tr> </tbody> </table>		Species	Sex	Route	Solvent	LD50 / LC50 (mg/kg bw) / (mg/L)	Reference	Rat	M	Oral	Acetone:	155	Heimann (1987)	F
Species	Sex	Route	Solvent	LD50 / LC50 (mg/kg bw) / (mg/L)	Reference											
Rat	M	Oral	Acetone:	155	Heimann (1987)											
	F		Peanut oil	160												

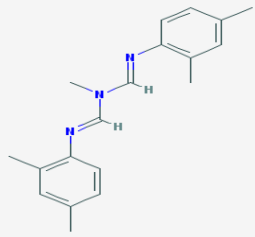
		<table border="1"> <tr> <td>M</td> <td>I.P</td> <td>PEG 400</td> <td>66</td> <td>Flucke &</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td></td> <td></td> <td>104</td> <td>Thyssen (1980)</td> </tr> <tr> <td>M</td> <td>Dermal</td> <td>-</td> <td>> 5000</td> <td>H e i m a n n</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>(1987)</td> </tr> <tr> <td>M, F</td> <td>Inhalation (4h)</td> <td>1:1 ethanol : PEG 400</td> <td>469~592</td> <td>Flucke & Thyssen (1980)</td> </tr> </table>	M	I.P	PEG 400	66	Flucke &	F			104	Thyssen (1980)	M	Dermal	-	> 5000	H e i m a n n	F				(1987)	M, F	Inhalation (4h)	1:1 ethanol : PEG 400	469~592	Flucke & Thyssen (1980)
M	I.P	PEG 400	66	Flucke &																							
F			104	Thyssen (1980)																							
M	Dermal	-	> 5000	H e i m a n n																							
F				(1987)																							
M, F	Inhalation (4h)	1:1 ethanol : PEG 400	469~592	Flucke & Thyssen (1980)																							
단 기	1. 랫드	<p>○군당 20마리의 수컷과 암컷 SPF Wistar 알비노 랫드에게 0, 5, 20과 80mg/kg bw/day의 cyfluthrin(순도, 85%)를 PEG 400에 녹여 4주 동안 매일 1회 투여하였고, 이어서 6주간 관찰기간을 거쳤다. 2주와 4주때 40mg/kg bw/day 투여군의 심각한 중독 때문에 농도를 낮췄다. 물리적인 외관과 행동은 매일 검사하였고, 체중은 주마다 실험 시작할 때 측정하였다. 혈액과 소변 검사는 4주간의 처치기간의 끝과 6주간의 관찰기간의 종료시점에서 각 군당 5마리의 수컷과 암컷 랫드를 이용하여 검사하였다.</p> <p>○대조군과 5와 20mg/kg bw/day의 cyfluthrin이 처치된 랫드는 정상적으로 행동하였으나, 고농도 투여군에서 무관심, 주름진 가죽, 호흡 곤란, 타액 분비, 운동과다, 운동실조와 정상적이지 않은 움직임과 같은 증상이 발생하였다. 증상은 최고 처치량에서 1주 및 3주동안 더 두드러졌다. 고농도 투여군에서만 처치 후 3~21사이에 수컷 20마리 중 6마리가 죽었고, 26일 째에 1마리의 암컷이 죽었다. 회복 기간 동안 죽음은 발생하지 않았다. 고농도 투여군의 체중량은 처치가 진행되는 4주간 10% 감소하였지만, 회복 기간에서 정상적으로 회복되었다. 암컷에 있어 체중과 체중량은 처치에 대하여 영향 받지 않았다.</p> <p>○혈액학적 검사에서 모든 개체들은 정상 범위를 유지하였으며, 독성에 대해 영향을 받지 않았다. 대조군과 군-특이성 또는 투여량과 관련된 차이는 혈청 효소 단백질의 활동도와 전해질 농도에서 나타났다. 글루타메이트 피루브산염 아미노산전이효소(glutamate pyruvate trasaminase)는 대조군보다 고농도 투여군에서 근소하게 증가하였다.</p> <p>○소변검사, 육안 및 조직 병리적으로 검사하였을 때, 대조군에 비해 처치에 관련된 변화는 보여지지 않았다. 마찬가지로, 혈액 화학검사에서도 별다른 차이는 없었다. 부신선의 절대/상대 중량은 최고농도 투여군의 암컷에서 증가하였고, 반면에 고농도 투여군의 수컷에서 간의 상대 중량만이 증가하였다. 상대 부신 중량의 증가는 조직병리학적 변화를 수반하지 않았다.</p> <p>○회복 기간 동안 개체는 죽지 않았다. Cyfluthrin 처치와 관련된 육안적 변화는 없었다. 또한 지연된 신경독성에 대한 징후도 나타나지 않았다. 이로써 NOEL 값은 20mg/kg bw/day로 설정되었다 (Flucke & Schilde, 1980).</p>																									
	장 기	1. 랫드	<p>○2년간 군당 65마리의 수컷과 암컷 SPF BOR:WISW 중 랫드에게 50, 150과 450mg/kg의 cyfluthrin과 Wessalon S가 섞은 것을 포함한 식이를 공급하였다. 대조군은 각각의 성 65마리의 랫드로 구성하였고, 일반 식이를 공급하였다. 모든 랫드들을 2일에 한번 외형, 행동과 활동의 변화를 관찰하였다. 체중은 4주간의 실험에서 주당 한번씩 검사하였다. 처치 7일 후 각 투여군마다 5마리의 수컷과 암컷을 안락사하여 혼합 기능 효소 유도 및 사이토크롬 P450 함량을 측정하였다.</p> <p>○6, 12, 18과 24달째에 군당 10마리의 수컷과 암컷을 사용하여 임상 실험을 하였다. 1년과 2년째에 투여군 당 5마리의 수컷과 암컷을 안락사하여 뼈와 치아 내의 불소 (fluoride) 함량을 검출하였다. 처치 기간동안 죽은 랫드와 실험 1년째의 투여군 당 5마리의 수컷과 암컷을 안락사하여 육안으로 검사하였다. 실험이 끝난 뒤, 모든 남은 랫드는 모두 안락사하여 육안 검사와 조직병리학적으로 검사하였다.</p> <p>○처치와 관련된 외형, 행동, 활동 및 식이 섭취량의 변화는 없었다. 저용량 투여군에서는 체중량에 대한 처치와 관련된 영향은 나타나지 않았으나 150mg/kg이 함유된 식이 처치군에서 근소한 체중량 감소가 나타났다. 고농도의 투여는 확연하게 체중량 감소를 유발하였다. 처치와 관련된 죽음에 대한 효과는 나타나지 않았으며, 또한, 혈액학 및 소</p>																								

		<p>변 검사, 외형에 대한 육안 검사, 장기 무게 및 조직병리학적 결과 상 처치와 관련된 효과는 나타나지 않았다.</p> <p>○고농도 처치군의 7일째에서 N-메틸작용기제거효소(N-demethylase)의 활동이 수컷에서 30%, 암컷에서 20%가량 증가하였으나, 이는 O-메틸작용기제거효소(O-demethylase) 활동 및 P450 효소 유도에 어떠한 영향도 주지 않았다.</p> <p>랫드에서 N-메틸작용기제거효소의 마이크로솜 효소 유도는 조직병리학적 검사에서 간 조직의 특정 형태학적 변형이나 손상이 보이지 않아 독성학적으로 관련이 없는 것으로 간주하였다. 실험 중반부에 안락사된 랫드에서 뼈와 치아 내의 확인한 불소의 축적은 나타나지 않았다고 보고되었다.</p> <p>○확연하게 투여량과 관련된 변화는 2년 동안의 실험 이후 발견되었으나 불소 축적의 최소 변화가 보이고 분석 방법이 큰 실험적 오류를 포함하기 때문에 이 발견의 생물학적 타당성은 저자에 의해 의문을 제기 받았다</p> <p>○최종 검사 결과는 유의하지 않은 차이를 보였는데, 이는 장기 무게의 변화에 기인한 것으로서 용량과 관련이 없었다고 보고되었다. 이 물질은 독성이 크지 않은 물질로 간주하였다. 신장과 간의 절대 중량은 고농도 투여군에서 감소하였다. 그러나, 중량에 대한 용량 의존적 영향은 없었다. 중앙의 빈도는 어떠한 투여량에서도 변하지 않았으며, 조직학적으로 다른 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>○NOEL값은 50mg/kg으로 설정되었으며 이는 2mg/kg bw/day와 동량이다. (Suberg & Loser, 1983b).</p>
	생식 / 발달	<p>1. 랫드</p> <p>○105일간 군당 5~6주령의 10마리의 수컷과 20마리의 암컷 SPF-Cpb 랫드에게 0, 50, 150 과 450mg/kg cyfluthrin이 50% Wessalon S와 섞어 식이에 포함하여 투여하였고, 이 전에 임의로 짝짓기, 임신 및 사육을 진행시켰다. 행동, 성장, 사료 섭취량, 죽음, 생식력, 임신 및 수유 중 생존력, 새끼의 발달, 부모의 체중량과 수/암의 비율을 포함하는 기준을 측정하였다.</p> <p>○이 연구는 3대에 걸쳐 진행되었으며 한 세대에 2마리의 새끼로 대를 이었다. F0 부모가 F1a와 F1b 새끼를 낳았고, F1a부모는 F2a와 F2b의 새끼와 F1b 부모는 F3a와 F3b의 새끼를 낳았다. 평가된 매개 변수에는 임신 능력, 새끼의 크기, 태아 출생 체중, 태아 변이성 및 부모의 체중량을 포함하였다. 육안 및 조직병리학적 검사는 F2b의 부모와 F3b 새끼를 검사하였다.</p> <p>○처치는 외형, 행동 및 생존에 영향을 주지 않았다. 또한 한 마리의 F2a 새끼는 150mg/kg이 포함된 식이를 공급받았고, 나머지는 450mg/kg이 포함된 식이를 섭취한 랫드들은 경련을 일으켰다.</p> <p>○처치는 출생 체중 및 출생 시 태아 크기에 영향을 미치지 않았다. 150 및 450mg/kg이 포함된 사료를 먹인 F3a와 F3b에서 교배 이후 출생에서부터 5일간의 수유까지 새끼의 생존율이 감소한 것이 관찰되었고, 수유 5~28일에 새끼의 생존율이 감소하였다. 비슷하게, 150과 450mg/kg이 포함된 식이가 처치된 F3a와 F3b에서 발생한 새끼에서 수유기간 동안 체중량이 지속적으로 억제되었다. 검사결과 간과 신장의 절대 중량이 150과 450mg/kg이 포함된 식이를 섭취한 랫드에서 감소되는 것이 보여졌다. 이것은 체중량의 감소와 관련있는 것으로 추정하였다.</p> <p>○상대 장기 중량에는 영향을 미치지 않았다. NOEL은 50mg/kg으로 설정되었고, 이는 동량의 3mg/kg bw/day이다 (Loser & Eiben, 1983).</p>
잔류성	흡수 대사 분포	<p>1. 암탉</p> <p>○암탉에게 [phenyl-UL-14C]-cyfluthrin 5mg/kg bw/hen/day를 3일 연속으로 경구로 투여하였다. 도축 전 24시간 동안 채집한 계란내의 방사능 잔류량은 0.05mg/kg의 cyfluthrin 과 동량이었다. 마지막 투여가 진행된 다음 2시간 후 암탉을 도축하여 조직 내의 방사능 잔류를 검사하였다.</p> <p>○신장에서 4.7mg/kg의 최대 잔류가 나타났고, 간에서 3.0mg/kg의 잔류가 나타났고 나머</p>

지 조직에는 낮은 농도의 잔류가 나타났다. 지방 내의 [14C]의 잔류는 0.1~0.2mg/kg 이었고, 반면에 근육에서는 0.2~0.3mg/kg 이었다. 주요 방사능처리된 cyfluthrin의 잔류의 비는 계란 56%, 지방 75%와 근육 21~39%였다. 확실한 대사산물은 FPB산(FPBacid)가 간에서 12%, 신장에서 11%, 근육에서 15~21%의 잔류가 나타났고, OH-FPB산(OH-FPBacid)는 간에서 10%, 신장에서 12%와 근육에서 11~20%의 잔류가 나타났다.

요약	물리적·화학적 특징	화합물명	사이플루쓰린(Cyfluthrin)					
		분자식	C22H18Cl2FNO3					
		분자량	434.288 g/mol					
		log Kow	5.95					
		Cas NO.	68359-37-5					
	안전성	급성	Species	Sex	Route	LD50 (mg/kg bw)	LC50 (mg/L)	
			Rat	M, F	Oral	M: 155 F: 160 M: 66 F: 104		
				M, F	I.P			
				M, F	Dermal	> 5,000		
			M, F	Inhalation		469~592		
	단기	Species	Sex	Route	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)		
Rat		M, F	Oral	-	20			
	만성	Species	Sex	Route	Purpose	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
Rat		M,F	Oral	Carci.	-	50		
Carci: Carcinogenesis								
	생식/발달	Species	Sex	Route	Purpose	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
-		-	-	-	-	-		
	동태	Species	Route	Dose (mg/kg)	Cmax (ng/mL)	Tmax (hr)	T1/2 (hr)	AUC (mg/h/mL)
-		-	-	-	-	-	-	-
	잔류	식품명	국내	EMEA	EU	CODEX	미국GPO	JMPR (FAO)
닭고기		미설정	미설정	10	미설정	미설정	미설정	
계란			10					
	잔류성	Species	Route	Egg	Liver / Kidney	Muscle	Fat & Skin	Excreta
Laying hens		Oral	○	○ / ○	○	○	○	

아미트라즈(Amitraz)

물리적 · 화학적특성	<p>화합물명 : 아미트라즈(Amitraz) 용도 : 살충제 분자식 : C₁₉H₂₃N₃ 분자량 : 293.414 g/mol log Kow : 5.5 CAS NO. : 33089-61-1</p>																																									
안전성	<p>1. 랫드, 마우스 & 개</p> <p>○Amitraz와 대사산물의 급성 독성은 몇몇 종에게 투여하여 확인하였다 (표 1에 정리함). 마우스와 랫드에게 Amitraz를 경구투여하였을 때, 과다홍분, 운동실조, 떨림과 안검하수의 독성 징후가 나타났다. 특히 랫드에서는 장의 자극과 방광의 팽만이 나타났다. 마우스에게 400mg/kg bw를 투여했을 때와 랫드에게 200mg/kg bw를 투여하였을 때 최저치량으로 설정되었다.</p> <p>○랫드에게 1600mg/kg bw를 피부에 처치하였을 때 물질에 의한 다른 영향은 나타나지 않았다. 400mg/kg bw와 그 이상 투여군의 기니피그에서 과민반응이 나타났다. 토끼에게 100mg/kg bw를 처치하였을 때, 중추 신경계의 저하, 직장온도, 심박수, 호흡, 비강 분비물과 수포음의 저하가 나타났으나 48시간 이후 완전히 회복하였다.</p> <p>○개에게 100mg/kg bw와 20mg/kg bw를 투여하였을 때, 중추 신경계의 저하, 운동 기능실조, 근육에 힘이 없어지고, 경련이 있어났으며, 배뇨와 성대 근육을 조절하지 못하며 심박수와 직장의 온도가 낮아지는 영향이 보여졌다. 당, 요산과 칼륨의 농도가 증가하였다. 특정한 병리학적 장애는 보여지지 않았다. 최저농도인 4mg/kg bw 투여군에서 체온과 심박수가 근소하게 영향을 받았다. 시상하부의 기능 저하와 같은 독성 효과가 나타났다. 모든 효과는 가역 가능하였다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Species</th> <th style="text-align: left;">Route</th> <th style="text-align: center;">LD50 or LC50 (mg/kg bw or mg/L air)</th> <th style="text-align: left;">Reference</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Mouse</td> <td>Oral</td> <td style="text-align: center;">>1600</td> <td>Patton & Sutton (1971)</td> </tr> <tr> <td>Oral</td> <td style="text-align: center;">600</td> <td>Patton & Sutton (1971); Shaw (1973a)</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Rat</td> <td>Dermal</td> <td style="text-align: center;">>1600</td> <td>Patton & Sutton (1971)</td> </tr> <tr> <td>Intraperitoneal</td> <td style="text-align: center;">800</td> <td>Shaw (1971, 1973a)</td> </tr> <tr> <td>Inhalation (6h)</td> <td style="text-align: center;">65</td> <td>Berczy et al. (1972)</td> </tr> <tr> <td>Guinea pig</td> <td>Oral</td> <td style="text-align: center;">400-800</td> <td>Patton & Sutton (1971)</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Rabbit</td> <td>Oral</td> <td style="text-align: center;">>100</td> <td>Patton & Sutton (1971)</td> </tr> <tr> <td>Dermal</td> <td style="text-align: center;">>200</td> <td>Sutton & Williams (1972)</td> </tr> <tr> <td>Dog</td> <td>Oral</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td>Patton & Sutton (1971)</td> </tr> <tr> <td>Baboon</td> <td>Oral</td> <td style="text-align: center;">100-250</td> <td>Patton (1973)</td> </tr> </tbody> </table> <p>2. 토끼</p> <p>○Amitraz (순도 99%)에 대한 피부 자극 실험을 하기위해 6마리의 1.9~2.5kg의 New Zealand white 토끼로 실험하였다. 등에 적용 장치를 장착하기 위하여 털을 제모하였다. 0.5g의 Technical 급의 Amitraz를 0.5ml의 증류수로 희석하여 2.5cm 거즈에 적혀 적용한 후 탄성 접착 드레싱을 이용하여 4시간동안 고정시켰다. 노출 시간이 끝난 후 드레싱을 제거하고, 투여 부분을 물로 씻어냈다. 1, 2, 3과 4일 차 실험이 끝난 후 처치된 피부부를</p>		Species	Route	LD50 or LC50 (mg/kg bw or mg/L air)	Reference	Mouse	Oral	>1600	Patton & Sutton (1971)	Oral	600	Patton & Sutton (1971); Shaw (1973a)	Rat	Dermal	>1600	Patton & Sutton (1971)	Intraperitoneal	800	Shaw (1971, 1973a)	Inhalation (6h)	65	Berczy et al. (1972)	Guinea pig	Oral	400-800	Patton & Sutton (1971)	Rabbit	Oral	>100	Patton & Sutton (1971)	Dermal	>200	Sutton & Williams (1972)	Dog	Oral	100	Patton & Sutton (1971)	Baboon	Oral	100-250	Patton (1973)
Species	Route	LD50 or LC50 (mg/kg bw or mg/L air)	Reference																																							
Mouse	Oral	>1600	Patton & Sutton (1971)																																							
	Oral	600	Patton & Sutton (1971); Shaw (1973a)																																							
Rat	Dermal	>1600	Patton & Sutton (1971)																																							
	Intraperitoneal	800	Shaw (1971, 1973a)																																							
	Inhalation (6h)	65	Berczy et al. (1972)																																							
Guinea pig	Oral	400-800	Patton & Sutton (1971)																																							
Rabbit	Oral	>100	Patton & Sutton (1971)																																							
	Dermal	>200	Sutton & Williams (1972)																																							
Dog	Oral	100	Patton & Sutton (1971)																																							
Baboon	Oral	100-250	Patton (1973)																																							

		조사하였다. 처치에 의한 특이 반응은 없었다. (Liggett & Smith, 1987a).
	단기	<p>1. 랫드</p> <p>○7일간 50mg/kg bw/day로 랫드에게 처치한 결과 성장 저하와 행동장애가 나타났고, 200mg/kg bw/day를 처치하였을 때, 과민반응과 쇠약이 나타났다. 12mg/kg bw/day를 랫드에게 투여하였을 때, 전체 체중량(8%), 간의 절대(8%) 및 상대 중량(6%)의 감소가 보여졌다. 이러한 영향을 기반으로 하여 NOEL 값은 3mg/kg bw/day로 설정되었다. (Sutton & Williams, 1971).</p> <p>○군당 12마리의 랫드(중은 알려지지 않음)에게 매일 6시간 씩 Amitraz(순도 불명확)의 증기를 0, 0.01, 0.1, 1mg/L의 공기를 2~3주간 노출시켰다. 0.1mg/L를 노출시켰을 때, 약한 호흡곤란, 약간의 안자극과 소음에 대한 과민반응의 징후가 보고되었다. 노출이 종료된 후 이 랫드들은 만지는 것에 대해 과민적으로 반응하였고, 공격성향으로 되었다. 1mg/L 투여군에서 0.1mg/L 투여군과 비슷하거나, 몇몇은 더 심한영향이 보여졌다.</p> <p>○추가적으로 운동기능 실조, 비강 분비물의 증가, 당뇨증, 신체의 떨림과 혼수상태가 발견되었다. 사료와 식수의 섭취량은 감소되었고, 이로 인하여 체중은 감소하였다. 혈액 내부의 헤모글로빈, 적혈구와 혈청 단백질의 농도의 감소가 처치와 관련이 있다고 보고되었다. 신체의 떨림, 공격적 행동과 혼수상태는 중추 신경계에 영향을 준 것으로 보고되었다. (Berczy et al., 1973).</p>
	장기	<p>1. 랫드</p> <p>○2년간 군당 40마리의 수컷과 암컷으로 이루어진 Ash-Wistar 랫드에게 Amitraz (순도 97.8%)를 0, 15, 50과 200ppm의 식이 농도로 투여하였고, 이는 수컷에서 0, 0.77, 2.5와 10mg/kg bw/day, 암컷에서 0, 0.97, 3.1과 13mg/kg bw/day의 투여량과 동량이었다. 200ppm 투여군의 랫드에서 신경질적이고 흥분되어 있는 공격적 성향이 발견되었고, 사료 섭취량은 일시적으로 감소하였다.</p> <p>○수컷의 전체 체중량은 현저히 감소(10%)하였다. 50과 15ppm 투여군의 랫드에서는 처치에 따른 별다른 영향이 발견되지 않았다. 대조군과 비교하였을 때 처치군의 종양 발생의 빈도, 형태와 시간은 명백하게 다른점이 발견되지 않았다. 수컷에서의 중추신경계에 영향을 끼치는 것과, 전체 체중량의 감소를 기반으로 50ppm, 동량의 2.5mg/kg bw/day로 NOEL 값이 설정되었다 (Sutton & Offer, 1973).</p>
	생식 / 발달	<p>1. 랫드</p> <p>○발달 독성 실험에서, 군당 11~13마리의 암컷 Boots-Wistar 랫드에게 Amitraz(순도 99.8%)를 0, 1, 3과 12mg/kg bw/day를 8~20일간 강제 급여하였다. 실험 21일 째에 모두 안락사 하였다. 투여군에서 죽음과 독성에 대한 임상적 징후는 발견되지 않았다. 사료 섭취량, 체중량, 평균적 새끼의 크기, 태아의 생존능력과 착상에 대한 영향은 없었다. 12mg/kg bw 처치군에서 대조군보다 태아의 무게가 낮았고, 흉골의 석회화의 감소가 보여졌다. 이러한 결과로 모성독성에 대한 NOEL 값은 12mg/kg bw/day로, 태아 체중의 감소와 흉골의 석회화의 감소를 기반으로, 발달 독성에 대한 NOEL 값은 3mg/kg bw/day로 설정되었다 (Sutton, 1973c).</p>
잔류성	흡수 대사 분포	<p>1. 암탉</p> <p>○6마리의 암탉에게 24.5mg의 방사선동위원소 처리된 14C-Amitraz(특정 활동도, 0.14mCi/g: 방사화학적 순도, >99%)를 4일단 날마다 경구로 투여하였고, Amitraz 처리 된 식물에서 추출한 면화를 급여한 조류의 예상 일일 노출량보다 2200배 많은 양을 제공하였다. 마지막 투여가 끝난 후 4시간과 12시간에 암탉을 안락사 하여 조직 내에서 방사능 잔류와 농도를 검출하였다.</p> <p>○이 방사선동위원소는 재빠르게 배출되는데, 0~24시간 내에 68%가 배설물을 통하여 배출되었다. 4-amino-meta-toluic acid를 통한 대사가 주요 경로인데, 이 대사물질의 75%가 배설물 으로부터 추출되었고, 검출된 물질은 이 대사 산물과 산과의 콘주게이트 화합물을 이루고 있다. 마지막 투여 4시간 이후에 조직 내 잔류의 가장 높은 농도는 간과 신장에서 각각 17, 25mg/kg(ppm)이 검출되었으나, 이들의 농도는 투여 후 12시간 이후에는 각각 12, 10mg/kg으로 농도가 떨어진 것으로 나타났다.</p>

	<p>○간에서 발견되는 이 주요 대사산물은 4-amino-meta-toluic acid인데, 이것은 자유산과 방사선동위원소와의 콘쥬게이트 화합물을 이루고 있으며, 전체 잔류중 55% 정도가 확인되었다. 또한, N-Methyl- N'-(2,4-xylyl)formamidine (4%), form-2',4'-xylylide (4%) and 2,4-dimethylaniline (2%)가 각각 발견되었다. 이전의 rats 실험에서 보여준 결과와 비슷하게 mono- 또는 di- 산 형태의 최소 7개의 높은 극성 화합물의 혼합물들의 잔류는 27%가 나타났다. 추출이 되지 않은 섬유와 결합된 물질의 잔류가 2%가 보여졌다.</p> <p>○최종 투여 후 4시간, 12시간 이후의 지방과 근육, 피부에서의 농도는 0.6~2.7mg/kg이었다. 지방에서의 잔류는 form-2',4'-xylylide (42%), N-methyl- N'-(2,4-xylyl)formamidine (24%), 본래의 amitraz (21%), 2,4-dimethylaniline (3%), 그리고 4-amino- meta-toluic acid (3%)로 구성되었다. 근육에서의 잔류는 4-amino-meta-toluic acid 또는 이것과 방사선동위원소간의 콘쥬게이트 화합물이 81%를 이루었고, form-2',4'-xylylide가 7% 정도의 잔류가 보여졌다.</p> <p>○매일 수집한 계란에서의 Amitraz 잔류의 농도는 0.28~0.46mg/kg으로 투여 기간이 증가함에 따라 잔류의 증가는 보여지지 않았으나, 계란 노른자에서 잔류 농도는 실험이 진행되는 동안 0.1~1.4mg/kg으로 증가되었다. N-methyl- N'-(2,4-xylyl)formamidine (54%)과 4-amino- meta-toluic acid (34%)가 주요 대사산물이었다. 달걀 흰자에서 4-Amino-meta-toluic acid의 91%가 검출되었고, 이것은 자유산과 방사선동위원소 처리된 amitraz와 콘쥬게이트 화합물을 이루고 있었다. 그리고 form-2', 4'-xylylide가 4%가 검출되었다. (Needham & Hemmings, 1988).</p>
--	--

요약	물리적·화학적특성	화합물명	아미트라즈(Amitraz)				
		분자식	C19H23N3				
		분자량	293.414 g/mol				
		log Kow	5.5				
		Cas NO.	33089-61-1				
	안전성	급성	Species	Sex	Route	LD50 (mg/kg bw)	LC50 (mg/L)
				M, F	Oral	600	
			Rat	M, F	Dermal	> 1,600	
			M, F	Inhalation		> 65	
	단기	Species	Sex	Route	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
	-	-	-	-	-		
만성	Species	Sex	Route	Purpose	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
	-	-	-	-	-	-	
생식/발달	Species	Sex	Route	Purpose	LOAEL (mg/kg bw/day)	NOAEL (mg/kg bw/day)	
	Rat	M, F	Oral	Reprod	-	12.0	
		M, ,F	Oral	Develp	-	3.0	

		Reprod: Reproduction, Develop: Development						
동태	혈액학	Species	Route	Dose (mg/kg)	Cmax (ng/kg)	Tmax (hr)	T1/2 (hr)	AUC (mg/h/mL)
		Dog	Oral	100	20.7 ± 2.3	5 ± 0.7	23 ± 2.3	265.3 ± 12.3
잔류	잔류허용기준	식품명	국내	EMEA	EU	CODEX	미국GPO	JMPR (FAO)
		닭고기 계란	미설정	미설정	10 10	미설정	미설정	미설정
	잔류성	Species	Route	Egg	Liver / Kidney	Muscle	Fat & Skin	Excreta
	Laying hens	Oral	○	○ / ○	○	○	○	

제 2 절 닭진드기 감염현황 및 기능성 소재 탐색

1. 농장 약제사용실태 및 닭진드기 감염현황 조사

가. 지역별 농장방문 (20농장)

1) 농장별 닭진드기 감염현황 조사

- 경기도지역 6곳
- 충남지역 5곳
- 충북지역 5곳
- 강원도지역 4곳

2) 닭진드기 감염조사 현황

- 닭진드기 감염조사는 농가에서 쉽게 확인할 수 있는 먼지관찰법(dust inspection)과 육안관찰법 (visual inspection) 두 가지 방법을 병행하여 실시하였음. 두 방법은 농장에서 짧은 시간에 높은 민감도를 가지고 관찰하기 용이하므로 현장에서는 자주 사용되는 방법이며, 육안관찰법의 경우 아래와 같은 지표로 모니터링을 수행하였음.

Level 0 : 진드기가 관찰되지 않음.

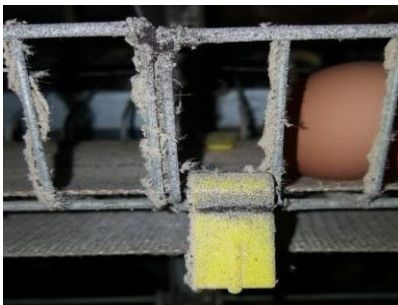
Level + : 개체의 진드기가 관찰됨.

Level ++: 군집의 크기가 새끼손톱 크기 이하.

Level +++: 군집의 크기가 엄지손톱 이상, 냄새 없음, 계란에 혈흔.

Level ++++: 다수의 군집관찰, 특유의 냄새, 계란에 혈흔.

- 동별 수준의 경우 광범위한 오염과 부분적 오염을 5군데 이상 관찰한 평균치를 적용함.



횡성양계



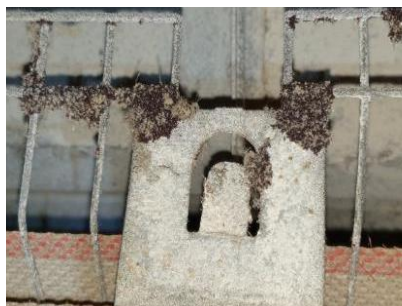
청운농장



대경농장



청산농장



청계농장



석우농장

표 4. 지역별 농장에서 관찰한 닭진드기 감염현황 조사와 약제사용실태 조사

	농장명	조사 지역	사육수수	닭진드기 감염 현황	살충제 사용
경기도 지역	봉골농장	김포시 월곶면	87,000	++++	와구프리, 농약 등
	대경농장	여주시 흥천면	52,000	++++	규조토, 농약 등
	청산농장	안성시 공도읍	100,000	++++	와구프리, 농약 등
	세례농장	용인시 처인구 백암면	55,000	+++	와구방, 농약 등
	영신농장	평택시 동삭동	56,000	+++	충살이, 와구방 등
	영일농장	광주시 곤지암읍	140,000	+++	규조토, 농약 등
충북 지역	청운농장	음성군 생극면	100,000	++++	와구프리, 농약 등
	오란다농장	진천군 덕산면	100,000	+++	규조토, 농약 등
	무지개농장	충주시 소태면	560,000	++	규조토, 농약 등
	알부자농장	음성군 금왕읍	63,000	+++	일렉터PSP, 농약 등
	석우농장	음성군 음성읍	250,000	++	충살이, 와구방 등
충남 지역	재정농장	천안시 동남구 풍세면	70,000	++	와구방, 규조토 등
	윤천농장	청양군 비봉면	90,000	+++	와구프리, 농약 등
	청계농장	홍성군 서부면	80,000	+++++	와구방, 농약 등
	금덕농장	예산군 덕산면	100,000	+++++	충살이, 농약 등
	울곡농장	연기군 전동면	90,000	+++	와구프리, 농약 등
강원도 지역	횡성양계	횡성군 횡성읍	170,000	++	와구방, 규조토 등
	에덴농장	횡성군 공근면	30,000	++	일렉터PSP, 농약 등
	미래농장	원주시 호저면	17,000	+	와구프리, 농약 등
	상록농장	철원군 동송읍	25,000	++++	충살이, 와구방 등

- 국내 20개 농장을 조사한 결과 닭의 인근 케이지 및 먼지에 많은 개체수의 닭진드기가 발생.
- 효과적인 살충제 및 살비제의 부재, 무분별한 살포에 의한 저항성 발현으로 진드기가 발생한 모든 농장에서 방제에 어려움을 겪고 있음.

나. 내성 분석을 위한 약제처리농도, 시점 및 처리방법, 잔류성 분석 샘플확보

1) 20개 농장 닭진드기의 살충제 저항성 실험

가) 실험 재료 및 장비

- Breeding dish (⊙100mm × 40mm, ⊙50mm × 15mm)
- Vortex mixer
- 붓(0호-1호)
- 투명 스프레이 (5 ml)
- Conical tube (15 ml, 50 ml)

- 실제 현미경
- 플라스틱 케이지 (40 × 7 cm)
- 항온 항습기 (온도 27±2℃, 습도 75±5%)

나) 진드기

- 공시충은 채집한지 2일 이내의 진드기를 사용
- 공시충은 성충을 사용

다) 실험 과정

(1) 살충제 준비

- 1:100, 1:200, 1:500 또는 권장희석비가 기준이며 필요시 희석비를 추가
- Conical tube (15ml 혹은 50ml, 주로 15ml 사용)에 물을 이용하여 약제를 희석비율대로 제조
- 희석농도 구간은 3 농도 구간에서 실험
- LC50, LC99 값을 구할 시엔 20, 50, 80, 100%의 Mortality가 나올 때까지 희석비율을 조절하며 실험 수행

(2) 공시충 준비

- 공시충을 breeding dish에 20마리 이상 접종
- 각 농도에서 dish 3개를 준비

(3) 실험 방법

- 작은 breeding dish(○50 × 15mm)를 사용
- 약제를 기준 희석비당 10ml을 만든다 (15ml tube 1ea)
- 제조된 약제 희석비별로 5ml을 작은 스프레이 유리병에 담음
- 진드기 접종을 하면 바로 스프레이로 5회 충체에 직접 분사
- 뚜껑을 덮고 진드기가 기어 나오지 못하게 Para film으로 sealing
- 관찰시간은 24h이 기준이며 필요시 그 이상의 기간에도 관찰

※결과 판정

- 치사율을 정할 때 대조군과 비교하여 움직이지 못하는 개체를 죽은 수로 판단하여 계산
- 대조군의 치사율이 5% 이상일 때는 아보트 공식 (Abbott's formula)을 사용한다. 단, 대조군의 치사율이 20%가 넘으면 재 실험

$$\text{보정살충률} = \frac{\text{처리군의 치사율} - \text{대조군의 치사율}}{100 - \text{대조군의 치사율}} \times 100$$

- 3회의 결과 평균값을 치사율로 사용

2) 닭진드기의 시판 구제제에 대한 저항성 조사결과

- 시판되고 있는 닭진드기 구제제인 충살이, 와구방, 일렉터 PSP, 와구프리, 와구프리블루를 20개 농장에서 저항성을 조사 하였다. 조사결과 충살이에 대한 저항성을 보인 농장이 3곳, 와구방은 2곳, 일렉터PSP는 2곳, 와구프리가 5곳으로 가장 많았으며 와구프리블루는 1곳으로 확인되었다. 농장별로 저항성의 차이가 크게 나타난 것으로 보아, 농장마

다 저항성을 조사하여 농장에 맞는 약제의 처리가 필요할 것으로 판단됨.

- 허가된 동물용의약외품 및 후보약제에 대한 감수성 조사 결과는 Phoxim, Etoxazole, Trichlorfon, Propoxur, Dichlorvos, Fenazaquin, Amitraz, Avermectin, Cyfluthrin은 저항성을 나타내는 농장이 1~5곳으로 확인되었고, Carbaryl의 경우 8곳의 농장에서 저항성이 나타났다.

표 5. 시판 구제제에 대한 감수성 조사

약제명/ 희석배율 농장명	충살이 (%)			와구방 (%)			일렉터 PSP(%)			와구프리 (%)			와구프리블루 (%)		
	1/100	1/200	1/500	1/100	1/200	1/500	1/100	1/200	1/500	1/100	1/200	1/500	1/100	1/200	1/500
봉골농장	100	93	68	100	92	47	100	100	95	75	66	30	100	95	72
대경농장	100	96	51	100	88	65	100	81	53	97	75	41	100	100	87
청산농장	95	82	55	100	87	57	95	82	52	100	95	54	100	100	75
세례농장	100	89	37	95	85	49	87	56	28	82	62	47	100	84	55
영신농장	100	86	37	62	41	24	96	89	46	100	86	41	100	100	95
영일농장	75	53	24	94	75	43	100	91	75	100	95	74	100	87	69
청운농장	93	87	53	100	100	92	100	92	62	91	72	46	100	100	92
오란다농장	100	96	55	100	100	71	100	93	89	100	81	54	100	100	81
무지개농장	95	87	28	100	89	66	100	93	73	100	82	44	100	94	61
알부자농장	100	99	72	100	90	65	96	88	38	95	80	27	100	82	47
석우농장	100	90	56	71	55	25	100	97	49	77	58	26	100	99	89
재정농장	100	89	50	100	93	55	100	86	59	95	64	24	92	53	37
윤천농장	62	32	14	100	96	61	89	67	26	62	49	15	100	100	87
청계농장	71	55	15	82	63	50	66	38	15	100	81	57	100	100	80
금덕농장	97	86	34	87	70	16	88	72	47	53	30	2	100	96	84
울곡농장	100	97	47	100	79	31	100	94	41	84	53	14	100	91	67
황성양계	100	95	44	89	73	59	60	42	12	72	51	29	100	100	89
에덴농장	100	99	45	100	93	86	100	91	54	98	79	57	81	62	27
미래농장	96	83	31	100	87	68	95	79	22	87	60	23	100	91	85
상록농장	100	98	60	72	46	25	91	71	36	100	82	59	100	100	90

표 6. 시판 구제제에 대한 감수성 조사

약제명/ 희석배율 농장명	Phoxim (%)			Etoxazole (%)			Trichlorfon (%)			Propoxur (%)			Carbaryl (%)		
	1/ 100	1/ 200	1/ 500	1/ 100	1/ 200	1/ 500	1/ 100	1/ 200	1/ 500	1/ 100	1/ 200	1/ 500	1/ 100	1/ 200	1/ 500
봉골농장	100	100	87	100	100	91	76	42	20	100	100	91	94	82	57
대경농장	100	100	73	75	42	28	61	39	23	100	100	96	100	100	91
청산농장	84	61	28	100	100	92	100	83	54	100	100	91	65	40	13
세례농장	100	100	74	100	100	97	100	100	88	100	100	97	100	100	98
영신농장	100	100	78	100	100	94	64	36	12	100	100	96	64	31	16
영일농장	100	100	81	63	47	22	100	100	92	100	100	98	100	100	93
청운농장	75	56	24	58	26	5	100	100	89	100	100	85	55	26	16
오란다농장	100	91	62	100	92	73	65	37	16	64	46	21	100	94	80
무지개농장	100	100	95	100	100	95	100	100	89	100	100	85	100	96	79
알부자농장	100	100	95	100	100	93	100	93	61	100	98	80	53	39	21
석우농장	100	94	77	100	100	95	100	100	82	100	97	86	100	100	90
재정농장	72	48	24	69	32	9	100	87	65	100	100	90	100	100	93
윤천농장	100	100	91	100	94	70	100	100	93	100	100	95	57	31	17
청계농장	100	100	87	100	100	98	100	90	61	100	100	90	51	38	18
금덕농장	79	33	14	100	92	82	100	100	83	62	29	15	100	100	95
울곡농장	100	100	90	100	90	77	100	88	55	100	95	83	100	91	80
횡성양계	100	100	92	100	94	69	100	100	94	100	100	93	100	97	82
에덴농장	100	100	83	65	39	12	100	100	86	60	39	13	100	86	68
미래농장	100	100	91	100	91	57	100	89	51	100	100	92	59	29	10
상록농장	100	100	93	100	100	95	100	100	76	60	34	7	55	35	11

표 7. 시판 구제제에 대한 감수성 조사

약제명/ 희석배율 농장명	Dichlorvos (%)			Fenazaquin (%)			Amitraz (%)			Abermectin(%)			Cyfluthrin (%)		
	1/ 100	1/ 200	1/ 500	1/ 100	1/ 200	1/ 500	1/ 100	1/ 200	1/ 500	1/ 100	1/ 200	1/ 500	1/ 100	1/ 200	1/ 500
봉골농장	100	94	87	100	97	76	97	85	69	100	95	76	96	82	54
대경농장	91	86	63	100	91	64	66	50	33	95	88	61	89	81	69
청산농장	100	91	83	100	89	69	100	94	80	100	99	74	99	94	81
세례농장	66	32	10	97	81	54	93	88	61	100	100	86	100	91	73
영신농장	60	29	13	100	98	74	100	100	81	100	100	94	100	98	86
영일농장	96	84	53	91	73	49	100	95	81	100	95	71	87	74	41
청운농장	94	87	69	100	100	91	100	97	85	97	95	81	97	91	72
오란다농장	100	95	86	97	84	58	100	100	90	99	91	73	95	88	69
무지개농장	100	90	63	100	91	74	100	100	91	100	87	55	100	100	85
알부자농장	95	73	52	96	79	69	64	21	13	99	90	75	81	64	25
석우농장	100	98	86	100	100	86	100	97	81	73	54	22	88	79	44
재정농장	100	92	71	100	100	79	91	85	61	100	97	80	75	64	13
윤천농장	99	79	61	65	33	16	85	63	34	100	100	96	91	85	61
청계농장	100	87	68	100	89	73	100	97	73	88	73	51	71	55	8
금덕농장	76	51	29	79	55	24	99	96	81	95	85	50	100	91	80
울곡농장	71	55	13	100	96	85	98	91	70	100	97	80	74	63	31
횡성양계	100	85	63	100	87	63	96	88	67	100	91	67	99	91	79
에텐농장	100	92	74	100	99	81	100	98	86	100	98	72	86	79	45
미래농장	88	70	55	100	97	81	100	99	82	91	84	69	92	88	59
상록농장	94	79	42	100	91	80	99	91	79	93	89	73	88	79	50

2. 천연물 30종 이상 감수성 검사(성충 및 유충, 알)

가. 사멸시간과 관찰 결과기록, 온도 28도, 습도 75% 조건에서 3일간 관찰

1) 실험재료

- 89 x 89 x 25mm 웨딩디쉬
- Tanglefoot® Tangle-Trap® Sticky Coatings
- 붓 (0호-1호)
- 투명 스프레이 (5 ml)
- Vortex mixer
- Conical tube (50 ml, 15 ml)
- 항온 항습기 (온도 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $75\pm 5\%$)

2) 진드기

- 실험실 사육 진드기 사육
- 공시충은 성충, 유충, 알을 사용

3) 실험과정

가) 식물추출물 용해 및 희석

- M100 (MeOH) - 샘플량 10배 용량의 100% 메탄올로 녹인 후 10배 물로 희석
ex) 10mg의 시료에 100uL 메탄올 넣고 녹인 후, 9900uL의 물에 용해된 시료 100uL 넣음.
- A100 (Acetone) - 샘플량 10배 용량의 100% 아세톤으로 녹인 후 10배 물로 희석
ex) 10mg의 시료에 100uL 아세톤 넣고 녹인 후, 9900uL의 물에 용해된 시료 100uL 넣음.
- D100 (DMSO) - 샘플량 5배 용량의 100% DMSO로 녹인 후 20배 물로 희석
ex) 10mg의 시료에 50uL DMSO 넣고 녹인 후, 9950uL의 물에 용해된 시료 50uL 넣음.

나) 공시충 준비

- 공시충을 웨딩디쉬에 성충 30마리, 유충 20마리 접종
- 알 실험 같은 경우에는 알 20개씩 접종
- 각 시료별 웨딩디쉬 3개를 준비

다) 실험 방법

- 89 x 89 x 25mm 웨딩디쉬 모서리에 Tangle-Trap®을 바른다.
- 웨딩디쉬에 필터페이퍼를 깔고 닭진드기(성충, 유충, 알)를 접종한다.
- 제조된 약제 별로 5ml 스프레이병에 담고 12회 충체에 직접 분사 (약 0.5~0.8ml)
- 항온항습기(온도 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $75\pm 5\%$)에 넣는다.
- 관찰시간은 24h이 기준이며 필요시 그 이상의 기간에도 관찰함
(알 같은 경우에는 보통 48h~72h 이후 부화하므로 관찰시간은 72h을 기준으로 함)

※결과 판정

- 치사율을 정할 때 대조군과 비교하여 움직이지 못하는 개체를 죽은 수로 판단하여 계산
- 대조군의 치사율이 5% 이상일 때는 아보트 공식 (Abbott's formula)을 사용한다. 단, 대조군의 치사율이 20%가 넘으면 재 실험

$$\text{보정살충률} = \frac{\text{처리군의 치사율} - \text{대조군의 치사율}}{100 - \text{대조군의 치사율}} \times 100$$

- 3회의 결과 평균값을 치사율로 사용

나. 닭진드기 성충, 유충, 알에 대한 천연물 30종의 감수성 검사 결과

- 성충 및 유충 실험에서의 살충활성 결과, 10,000ppm의 농도에서 조합 추출물에서 94.0%의 살충활성을 확인하였고, 홍황초(노란색) 추출물에서 62.6%로 중간정도의 살충활성을 확인하였다. 토복령, 박하, 어성초, 고추, 쥐오줌풀, 홍황초(주황색) 6종은 약한 살충활성을 보였으며, 나머지 22 종의 추출물에서는 거의 살충활성을 보이지 않았다.
- 알에서의 살란활성 결과, 30종 모두 전혀 살란활성을 보이지 않거나 그 효과가 미미하였다.

표 8. 성충 및 유충에 대한 식물 추출물 감수성 실험 (1차)

No.	식물명	국명	*희석방법, 비율	진드기개체수	사멸율 (%) 평균 ± 표준편차		
					24 h	48 h	72 h
1	<i>Lonicera japonica</i>	금은화	M100	50	46 ± 3.0	46 ± 3.0	46 ± 3.0
2	<i>Smilax glabra</i>	토복령	M100	50	17.3 ± 7.0	24.6 ± 6.1	32.6 ± 7.5
3	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i>	박하	A100	50	43.3 ± 16.7	43.3 ± 16.7	43.3 ± 16.7
4	<i>Campanula takesimana</i>	섬초롱	M100	50	6.0 ± 4.0	6.0 ± 4.0	6.0 ± 4.0
5	<i>Magnolia denudata</i>	백목련	A100	50	10.6 ± 6.1	10.6 ± 6.1	12.0 ± 4.0
6	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> var. <i>alpinum</i>	바위구절초	A100	50	4 ± 3.3	4 ± 3.3	4 ± 3.3
7	<i>Equisetum arvense</i>	쇠뜨기	A100	50	10.6 ± 9.0	10.6 ± 9.0	10.6 ± 9.0
8	<i>Lespedeza cuneata</i>	비수리	M100	50	9.3 ± 5.0	9.3 ± 5.0	9.3 ± 5.0
9	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	담쟁이덩굴	A100	50	18.6 ± 7.0	18.6 ± 7.0	18.6 ± 7.0
10	<i>Houttuynia cordata</i>	어성초	A100	50	30.0 ± 15.8	31.3 ± 16.2	33.3 ± 17.9
11	<i>Pulsatilla koreana</i>	할미꽃	M100	50	6.0 ± 5.2	6.0 ± 5.2	6.0 ± 5.2
12	<i>Tagetes patula</i>	홍황초 (노란색)	A100	50	56.6 ± 17.4	56.6 ± 17.4	62.6 ± 12.2
13	<i>Taraxacum platycarpum</i>	민들레	M100	50	4.6 ± 3.0	4.6 ± 3.0	4.6 ± 3.0
14	<i>Spiraea prunifolia</i> var. <i>simpliciflora</i>	조팝나무	M100	50	9.3 ± 4.1	9.3 ± 4.1	9.3 ± 4.1
15	<i>Phyllostachys nigra</i>	흑죽	M100	50	18.0 ± 13.1	18.0 ± 13.1	18.0 ± 13.1
	Control		M100	50	3.3 ± 1.1	3.3 ± 1.1	3.3 ± 1.1
	Control		A100	50	6.6 ± 2.3	6.6 ± 2.3	8.0 ± 4.0

*M100, 10,000ppm in 10% Methanol (100배 희석), A100, 10,000ppm in 10% Acetone (100배 희석)

표 9. 성충 및 유충에 대한 식물 추출물 감수성 실험 (2차)

No.	식물명	국명	*희석방법, 비율	진드기 개체수	사멸율 (%) 평균 ± 표준편차		
					24 h	48 h	72 h
16	<i>Taraxacum platycarpum</i>	포공영	M100	50	22.6 ± 14.0	22.6 ± 14.0	22.6 ± 14.0
17	<i>Capsicum annuum</i>	고추	M100	50	27.3 ± 13.0	34.6 ± 13.3	40.0 ± 12.4
18	<i>Gleditsiae Fructus</i>	조협	D100	50	91.3 ± 4.1	94.0 ± 2.0	94.0 ± 2.0
19	<i>Ginkgo biloba</i>	은행나무	M100	50	13.3 ± 10.0	13.3 ± 10.0	13.3 ± 10.0
20	<i>Valeriana fauriei</i>	취오좁풀	D100	50	31.3 ± 10.0	32.6 ± 9.0	34.6 ± 6.4
21	<i>Poncirus trifoliata</i>	탱자나무	D100	50	8.0 ± 5.2	8.0 ± 5.2	8.6 ± 4.6
22	<i>Lindera obtusiloba</i>	생강나무	M100	50	9.3 ± 5.0	9.3 ± 5.0	9.3 ± 5.0
23	<i>Phytolacca americana</i>	상옥	M100	50	6.6 ± 3.0	6.6 ± 3.0	10.0 ± 4.0
24	<i>Persicaria hydropiper</i>	여뀌	D100	50	4 ± 3.3	4 ± 3.3	4 ± 3.3
25	<i>Ailanthus altissima</i>	가죽나무	M100	33	3.3 ± 1.1	3.3 ± 1.1	3.3 ± 1.1
26	<i>Liriodendron tulipifera</i>	백합나무	M100	50	15.3 ± 11.0	15.3 ± 11.0	18.0 ± 13.1
27	<i>Sasa borealis</i>	조릿대	M100	50	6.6 ± 1.1	6.6 ± 1.1	6.6 ± 1.1
28	<i>Tagetes patula</i>	홍황초 (주황색)	M100	50	28.0 ± 12.4	30.0 ± 11.1	31.3 ± 11.3
29	<i>Magnolia kobus</i>	목련	D100	50	8.6 ± 6.1	8.6 ± 6.1	10.0 ± 4.0
30	<i>Quercus mongolica</i>	신갈나무	M100	50	7.3 ± 4.1	7.3 ± 4.1	7.3 ± 4.1
	Control		M100	50	6.0 ± 3.4	6.0 ± 3.4	6.0 ± 3.4
	Control		D100	50	7.3 ± 5.0	7.3 ± 5.0	7.3 ± 5.0

*M100, 10,000ppm in 10% Methanol (100배 희석), D100, 10,000ppm in 5% DMSO (100배 희석)

표 10. 알에 대한 식물 추출물 감수성 실험 (1차)

No.	식물명	국명	*희석방법,비율	알개체수	사멸율 (%) 평균 ± 표준편차		
					72 h	96 h	120 h
1	<i>Lonicera japonica</i>	금은화	M100	20	6.6 ± 2.8	6.6 ± 2.8	6.6 ± 2.8
2	<i>Smilax glabra</i>	토복령	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
3	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i>	박하	A100	20	15.0 ± 5.0	15.0 ± 5.0	15.0 ± 5.0
4	<i>Campanula takesimana</i>	섬초롱	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
5	<i>Magnolia denudata</i>	백목련	A100	20	3.3 ± 2.8	3.3 ± 2.8	3.3 ± 2.8
6	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> var. <i>alpinum</i>	바위구절초	A100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
7	<i>Equisetum arvense</i>	쇠뜨기	A100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
8	<i>Lespedeza cuneata</i>	비수리	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
9	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	담쟁이덩굴	A100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
10	<i>Houttuynia cordata</i>	어성초	A100	20	5.0 ± 5.0	5.0 ± 5.0	5.0 ± 5.0
11	<i>Pulsatilla koreana</i>	할미꽃	M100	20	8.3 ± 2.8	8.3 ± 2.8	8.3 ± 2.8
12	<i>Tagetes patula</i>	홍황초 (노란색)	A100	20	1.6 ± 2.8	1.6 ± 2.8	1.6 ± 2.8
13	<i>Taraxacum platycarpum</i>	민들레	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
14	<i>Spiraea prunifolia</i> var. <i>simpliciflora</i>	조팝나무	M100	20	18.3 ± 7.6	18.3 ± 7.6	18.3 ± 7.6
15	<i>phyllostachys nigra</i>	흑죽	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Control		M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Control		A100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

*M100, 10,000ppm in 10% Methanol (100배 희석), A100, 10,000ppm in 10% Acetone (100배 희석)

표 11. 알에 대한 식물 추출물 감수성 실험 (2차)

No.	식물명	국명	*희석방법, 비율	알개체수	사멸율 (%) 평균 ± 표준편차		
					72 h	96 h	120 h
16	<i>Taraxacum platycarpum</i>	포공영	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
17	<i>Capsicum annuum</i>	고추	M100	20	3.3 ± 2.8	3.3 ± 2.8	3.3 ± 2.8
18	<i>Gleditsiae Fructus</i>	조협	D100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
19	<i>Ginkgo biloba</i>	은행나무	M100	20	1.6 ± 2.8	1.6 ± 2.8	1.6 ± 2.8
20	<i>Valerianafauriei</i>	취오줌풀	D100	20	6.6 ± 7.6	6.6 ± 7.6	6.6 ± 7.6
21	<i>Poncirus trifoliata</i>	탱자나무	D100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
22	<i>Lindera obtusiloba</i>	생강나무	M100	20	8.3 ± 2.8	8.3 ± 2.8	8.3 ± 2.8
23	<i>Phytolacca americana</i>	상육	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
24	<i>Persicaria hydropiper</i>	여뀌	D100	20	3.3 ± 2.8	3.3 ± 2.8	3.3 ± 2.8
25	<i>Ailanthus altissima</i>	가죽나무	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
26	<i>Liriodendron tulipifera</i>	백합나무	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
27	<i>Sasa borealis</i>	조릿대	M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
28	<i>Tagetes patula</i>	홍황초 (주황색)	M100	20	1.6 ± 2.8	1.6 ± 2.8	1.6 ± 2.8
29	<i>Magnolia kobus</i>	목련	D100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
30	<i>Quercus mongolica</i>	신갈나무	M100	20	5.0 ± 5.0	5.0 ± 5.0	5.0 ± 5.0
	Control		M100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Control		D100	20	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

*M100, 10,000ppm in 10% Methanol (100배 희석), D100, 10,000ppm in 5% DMSO (100배 희석)

제 3 절 조합 성분 연구 및 표준화

1. 국내산 및 중국산 조합과 조합분획물의 닭진드기 살비활성 검사 결과

No.	Plant species	Extraction solvent	Mortality (%)
1	<i>Gleditsia japonica</i> Miquel	EtOH	80.6
2	<i>Gleditsia japonica</i> Miquel	MeOH	86.4
3	<i>Gleditsia sinensis</i> Lamark	EtOH	89.6
4	<i>Gleditsia sinensis</i> Lamark	MeOH	56.3
5	GS_Hex fraction	-	88.2
6	GS_DCM fraction	-	2.8
7	GS_Ethyl acetate fraction	-	14.9
8	GS_Butanol fraction	-	1.7
9	GS_water fraction	-	4.5

2. 조합복합추출물의 제조공정 표준화 및 기준규격 설정

가. 원산지별 추출물 제조

1) 추출물 제조법을 최적화 하는 연구를 위하여 지역별 시료를 수집하여 건조시킨 후 건조된 시료에 각 10 g을 EtOH과 MeOH로 24 hr 동안 냉침 추출함. 추출액을 감압 농축 후 동결건조 하여 얻어진 각각의 추출물에 수율확인

표 12. 국내외 조합 추출 수율

순번	그림	원산지	Ethanol 추출 수율	Methanol 추출 수율
1		강원도 1	11.5 %	18.2 %
2		경기도 1	4.4 %	9.8 %

3		경기도 2	8.6 %	18.0 %
4		경기도 3	8.0 %	19.2 %
5		충북 1	9.1 %	16.6 %
6		경북 1	10.4 %	22.8 %
7		경북 2	10.0 %	18.6 %
8		경북 3	15.4 %	23.2 %
9		베트남 1	19.6 %	32.5 %
10		베트남 2	19.5 %	29.8 %

나. 원산지별 HPLC profile

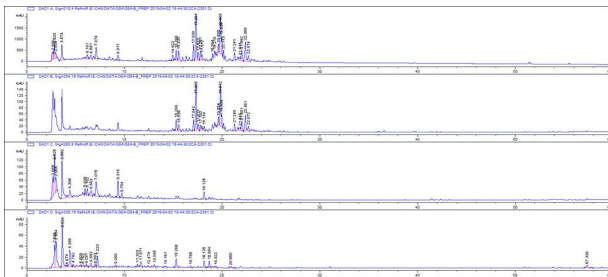
1) H₂O, ACN gradient조건 HPLC profile

- HPLC 분석조건

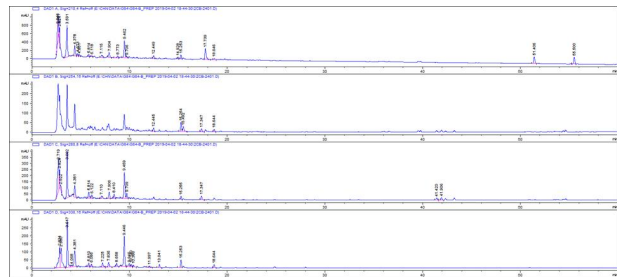
HPLC	Agilent 1200 series
Column	Kromasil 100-5C18 (4.6X250mm, Kromasil)
Detector	UV(210nm, 254nm, 280nm, 330nm)
Flow	1ml/min
Oven	30 °C
Injection	20 µl

Mobie phase	A (0.05% TFA in H ₂ O) %	B (ACN) %
0 min	80	20
60min	0	100
70 min	0	100
71 min	80	20
90 min	80	20

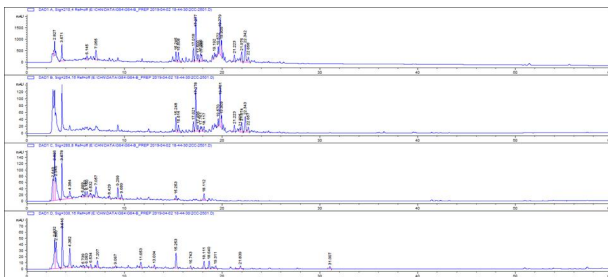
- 확보한 10개의 소재 EtOH 추출물



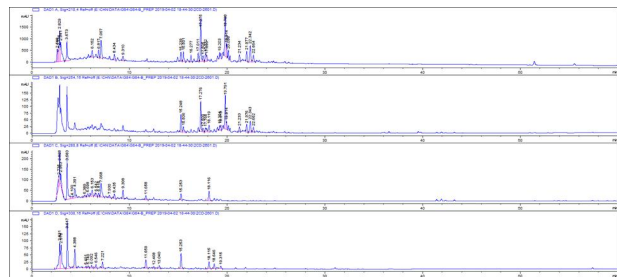
국내산 강원도 EtOH 추출물



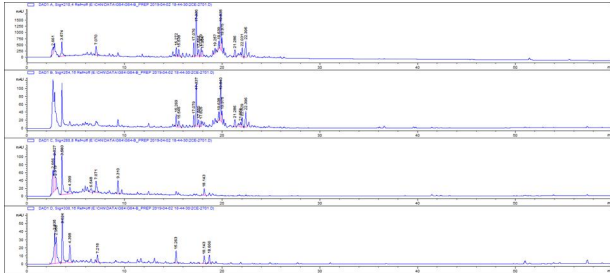
국내산 경기도(가평1) EtOH 추출물



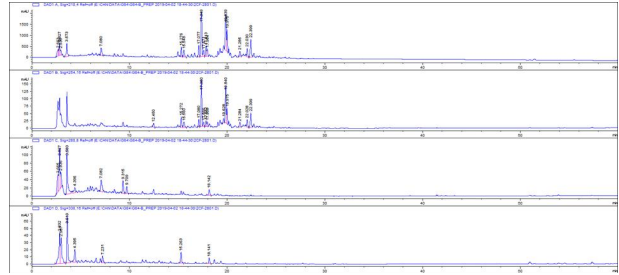
국내산 경기도(가평2) EtOH 추출물



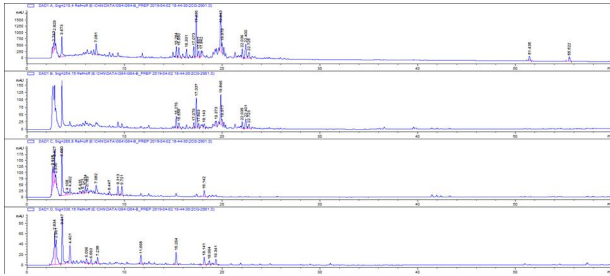
국내산 경기도(이천) EtOH 추출물



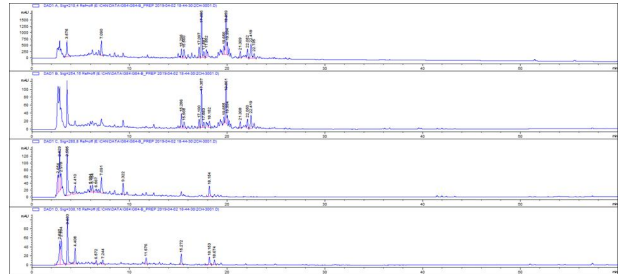
국내산 충청북도 EtOH 추출물



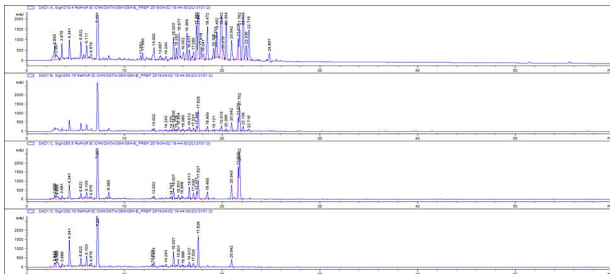
국내산 경상북도(영천) EtOH 추출물



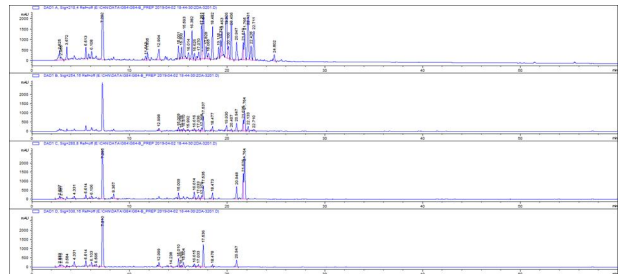
국내산 경상북도(경산) EtOH 추출물



국내산 경상북도(음니허브) EtOH 추출물

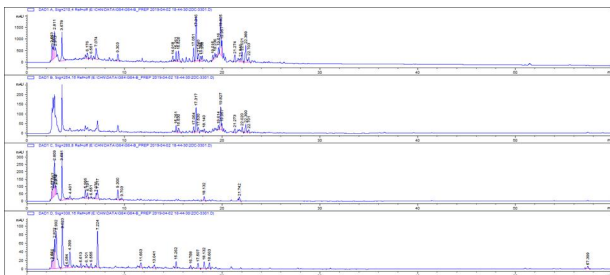


국내산 베트남1 EtOH 추출물

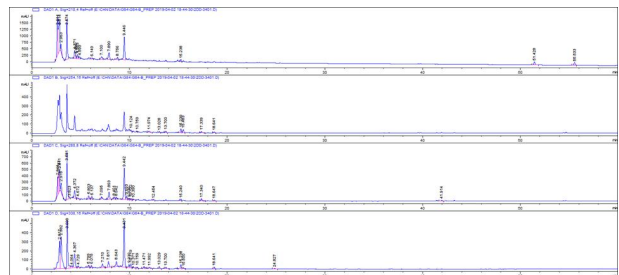


국내산 베트남2 EtOH 추출물

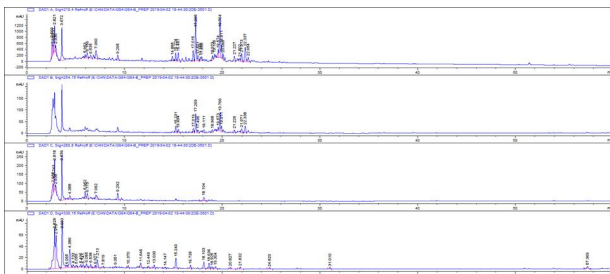
- 확보한 10개의 소재 MeOH 추출물



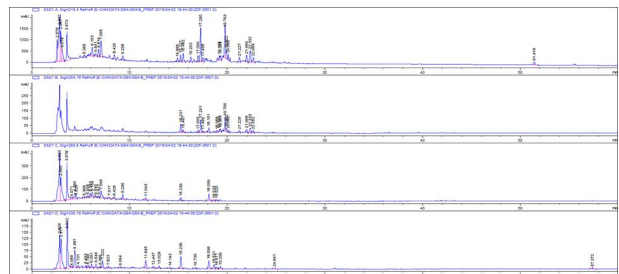
국내산 강원도 MeOH 추출물



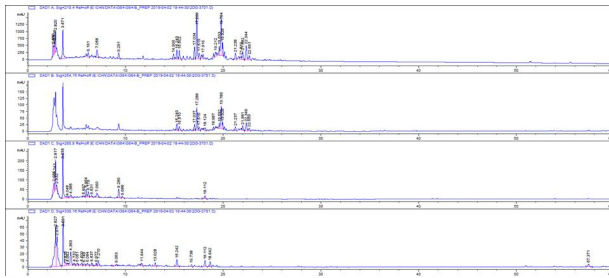
국내산 경기도(가평1) MeOH 추출물



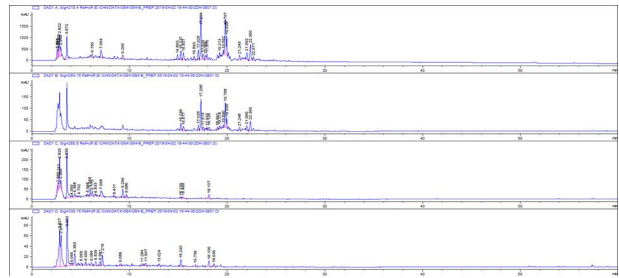
국내산 경기도(가평2) MeOH 추출물



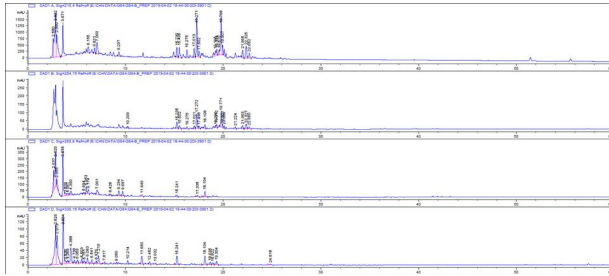
국내산 경기도(이천) MeOH 추출물



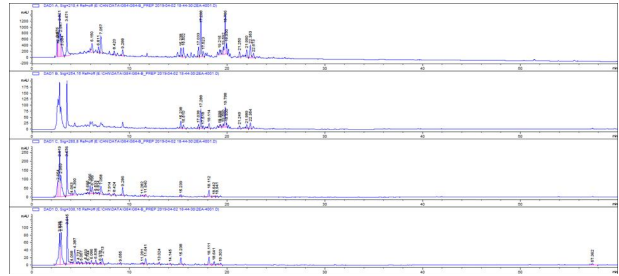
국내산 충청북도 MeOH 추출물



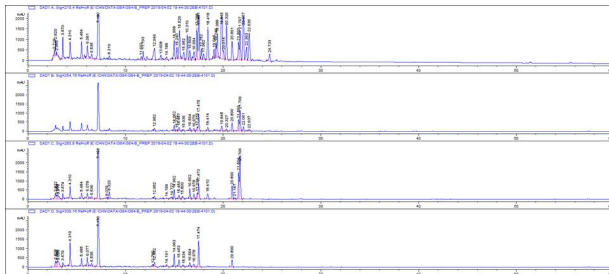
국내산 경상북도(영천) MeOH 추출물



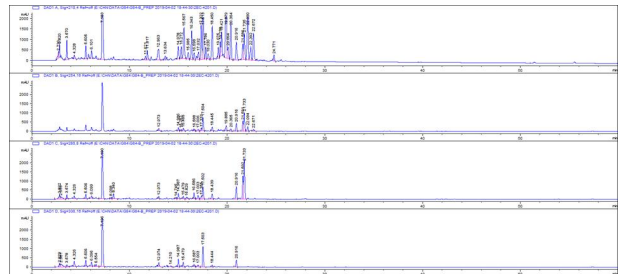
국내산 경상북도(경산) MeOH 추출물



국내산 경상북도(움니허브) MeOH 추출물



국내산 베트남1 MeOH 추출물



국내산 베트남2 MeOH 추출물

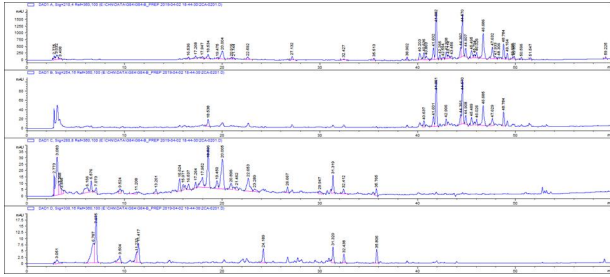
2) H₂O, MeOH gradient조건 HPLC profile

- HPLC 분석조건

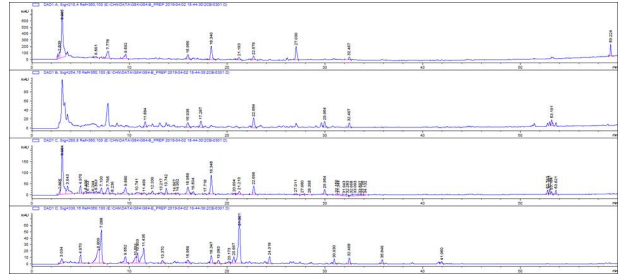
HPLC	Agilent 1200 series
Column	Kromasil 100-5C18 (4.6X250mm, Kromasil)
Detector	UV(210nm, 254nm, 280nm, 330nm)
Flow	1ml/min
Oven	30 °C
Injection	20 µl

Mobile phase	A (0.05% TFA in H ₂ O) %	B (MeOH) %
0 min	80	20
60min	0	100
70 min	0	100
71 min	80	20
90 min	80	20

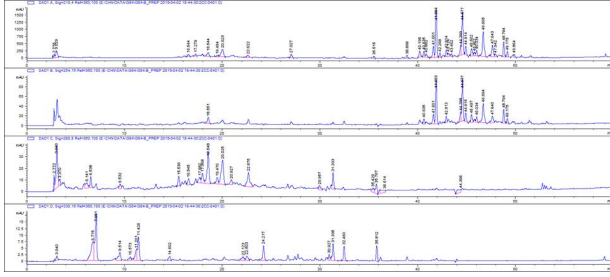
- 확보한 10개의 소재 EtOH 추출물



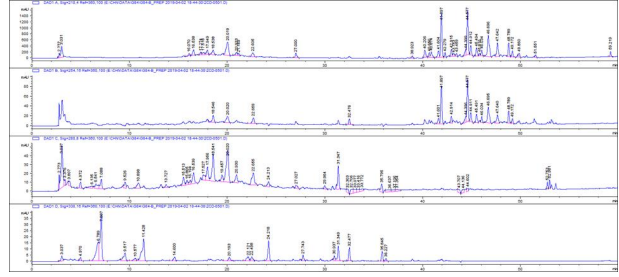
국내산 강원도 EtOH 추출물



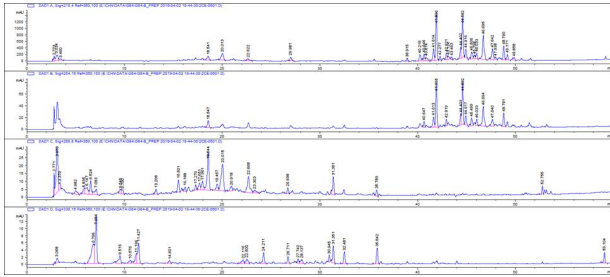
국내산 경기도(가평1) EtOH 추출물



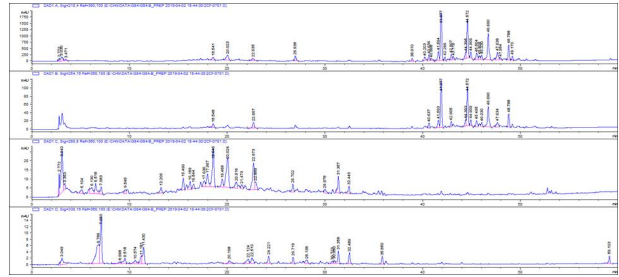
국내산 경기도(가평2) EtOH 추출물



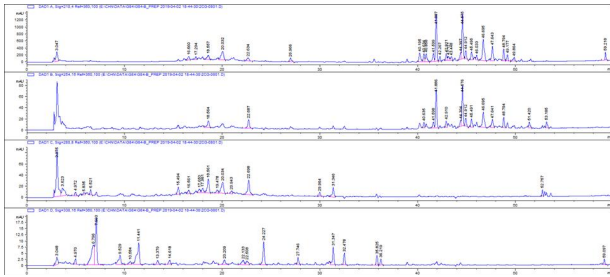
국내산 경기도(이천) EtOH 추출물



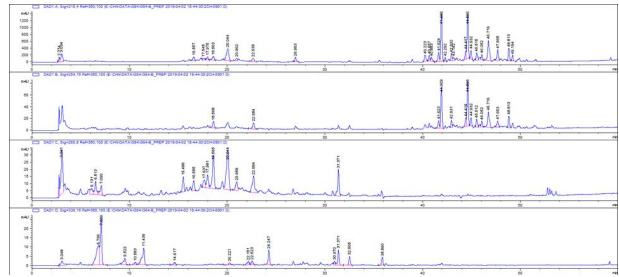
국내산 충청북도 EtOH 추출물



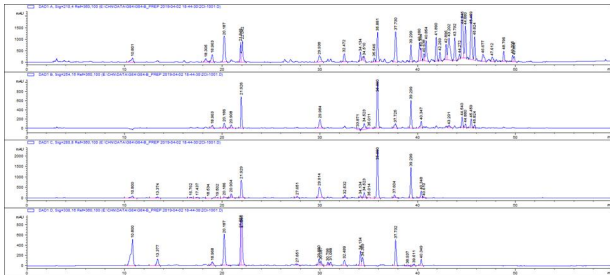
국내산 경상북도(영천) EtOH 추출물



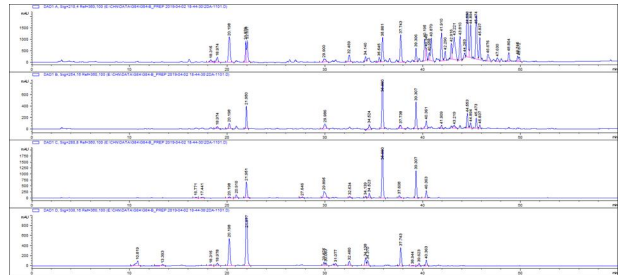
국내산 경상북도(경산) EtOH 추출물



국내산 경상북도(움니허브) EtOH 추출물

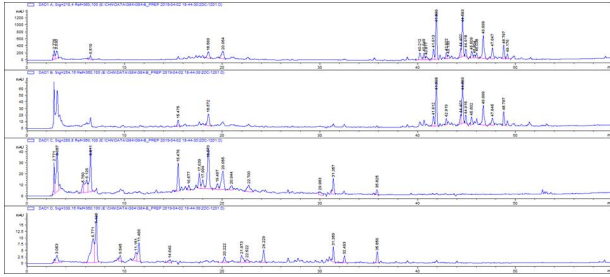


국내산 베트남1 EtOH 추출물

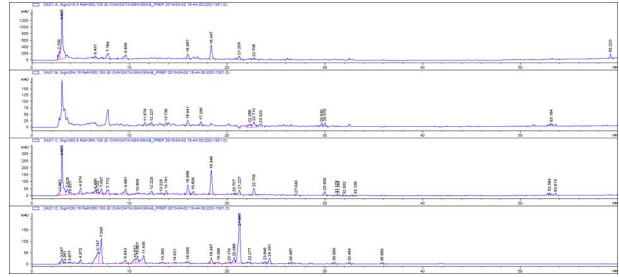


국내산 베트남2 EtOH 추출물

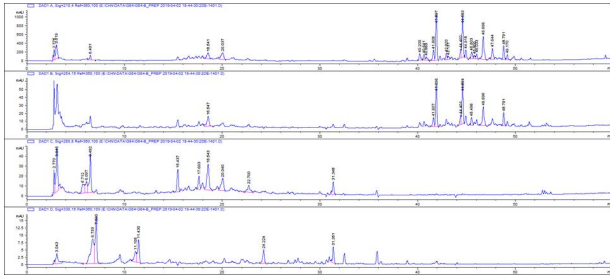
- 확보한 10개의 소재 MeOH 추출물



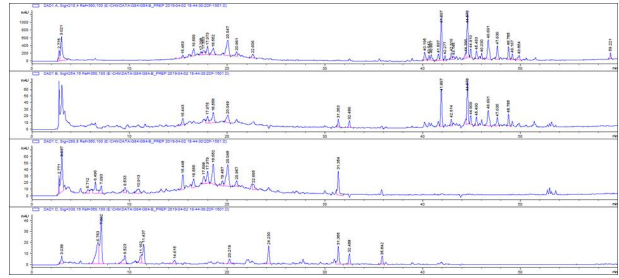
국내산 강원도 EtOH 추출물



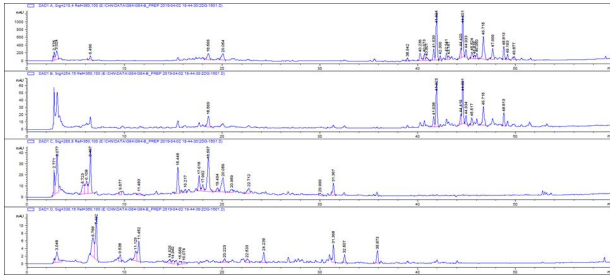
국내산 경기도(가평1) EtOH 추출물



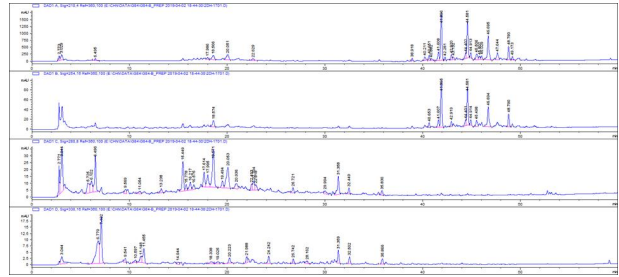
국내산 경기도(가평2) EtOH 추출물



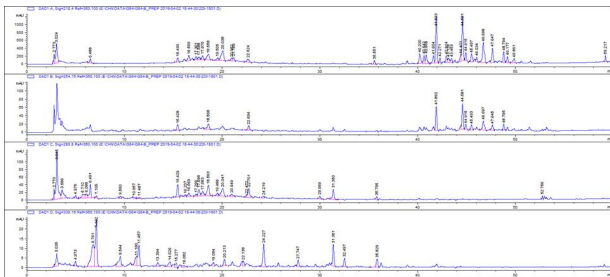
국내산 경기도(이천) EtOH 추출물



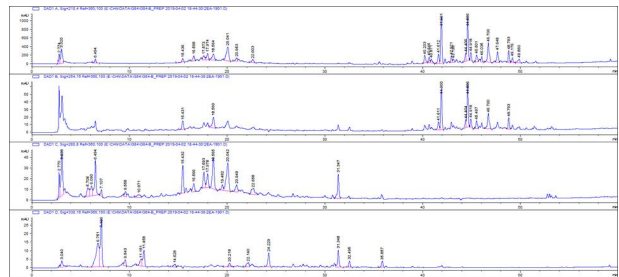
국내산 충청북도 EtOH 추출물



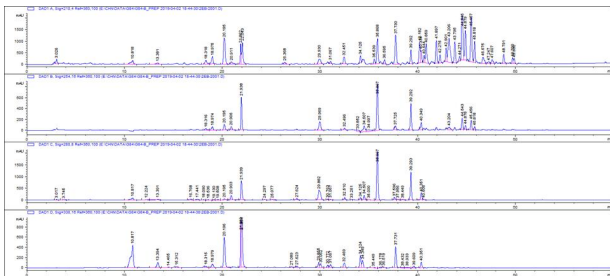
국내산 경상북도(영천) EtOH 추출물



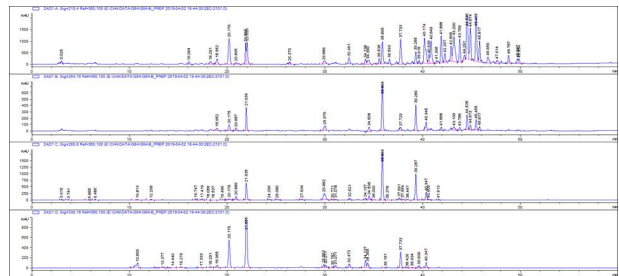
국내산 경상북도(경산) EtOH 추출물



국내산 경상북도(움니허브) EtOH 추출물



국내산 베트남1 EtOH 추출물

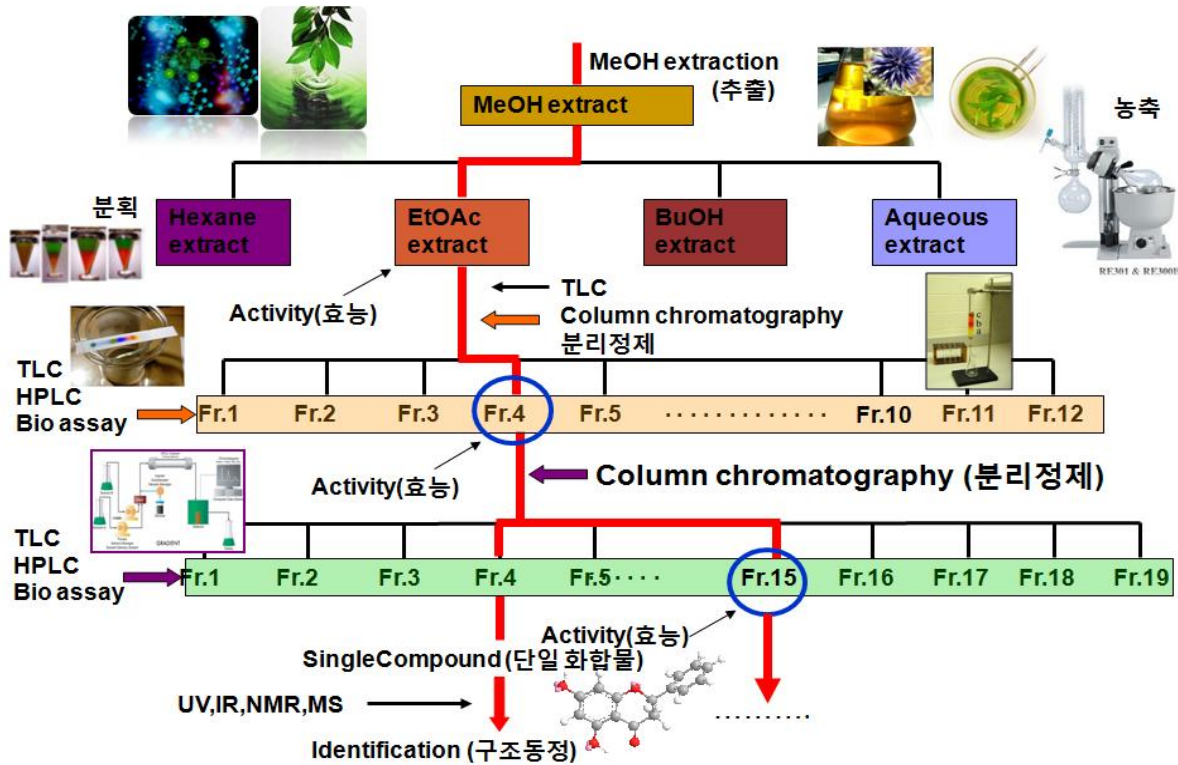


국내산 베트남2 EtOH 추출물

다. 유효 및 지표성분 검색

1) 표준품 확보를 위하여 추출물에 존재하는 지표물질을 HPLC등 분석기기를 이용한 최적 분리 및 분석 조건을 확립함. 지표성분으로는 주위 피크로부터 간섭 없이 양호한 HPLC 분리능과 특이성 및 상대적으로 많은 함유량을 보이는 화합물을 선택함

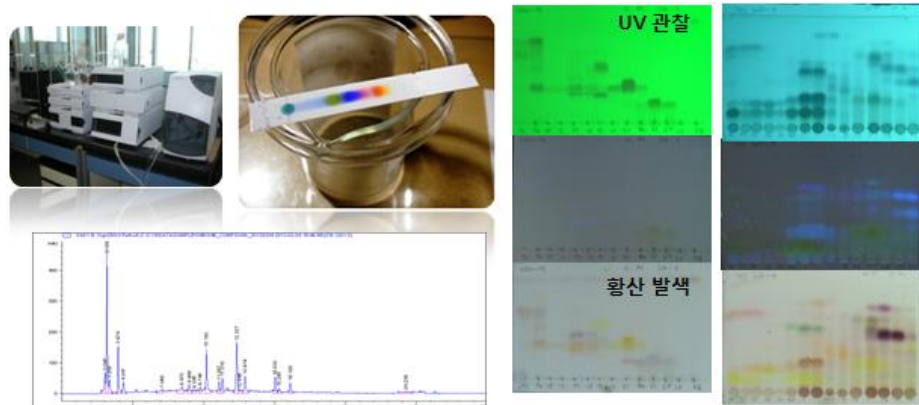
성분 분리정제 및 구조분석 과정 모식도

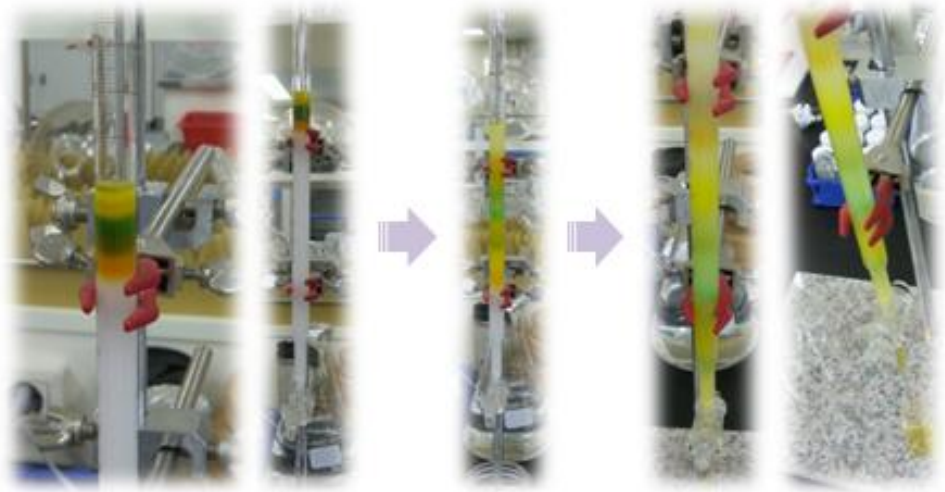


추출물 및
분획물 제조

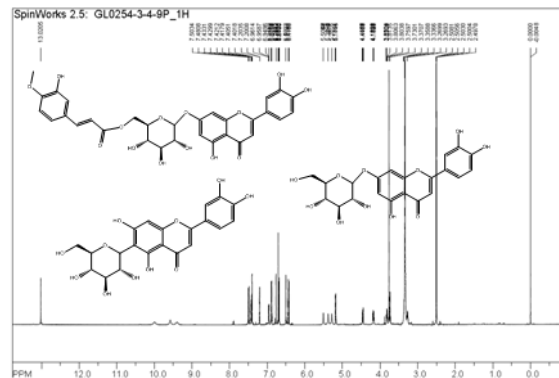


지표 및 기능성
성분의 분석 및
분리정제





기능성 성분의
구조분석



2) 유효 및 지표성분 검색

가) 추출물, 용매 분획물 유효성분의 분리·정제

- 조합 5 kg을 100% EtOH 추출하여, 추출물을 얻음. 이를 Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Butanol로 분획하였음. 이 중 Ethyl acetate 분획을 컬럼크로마토 그래피를 실시하여 5개의 소분획으로 나누어 화합물 1-5를 얻었으며, Hexane 분획을 컬럼크로마토 그래피를 실시하여 화합물 6, 7를 얻었음. 분리한 화합물의 구조결정은 NMR (1D, 2D) 등의 분광데이터와 문헌 분석을 통해 결정함.



국내산 조합시료

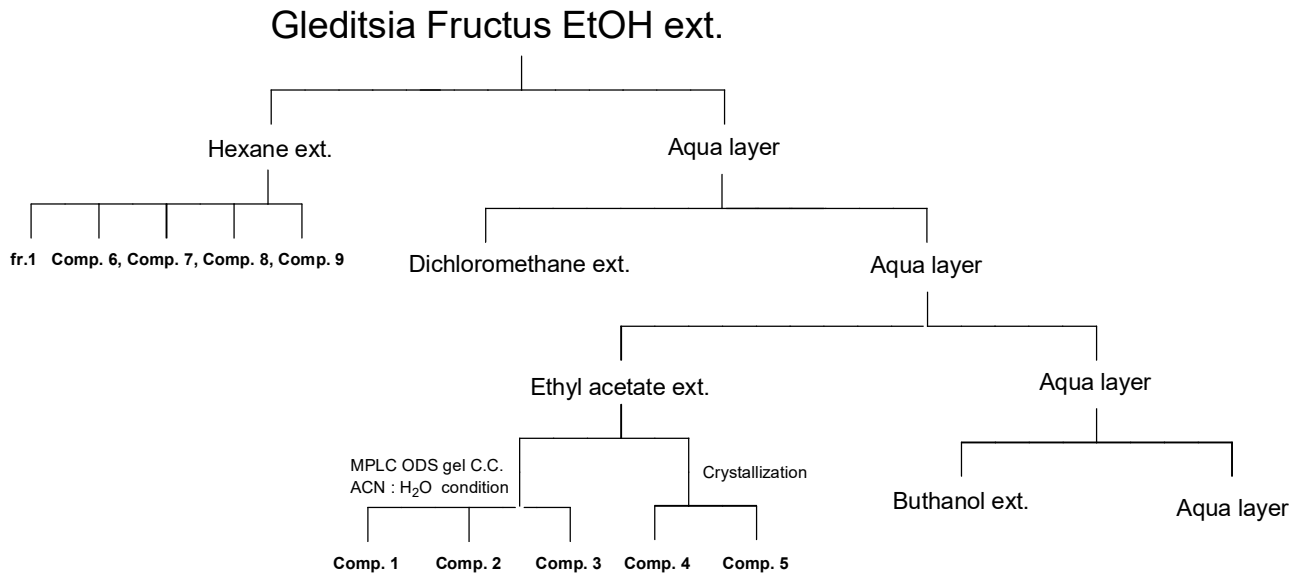


국내산 조합



추출중인 조합

나) 분획 및 분리스킴



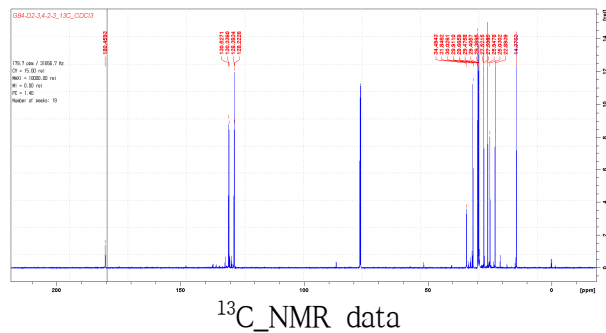
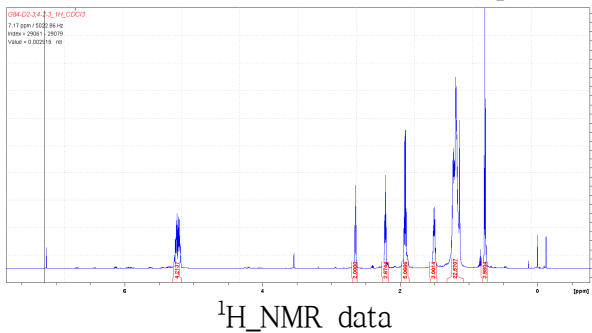
다) 분획 수율

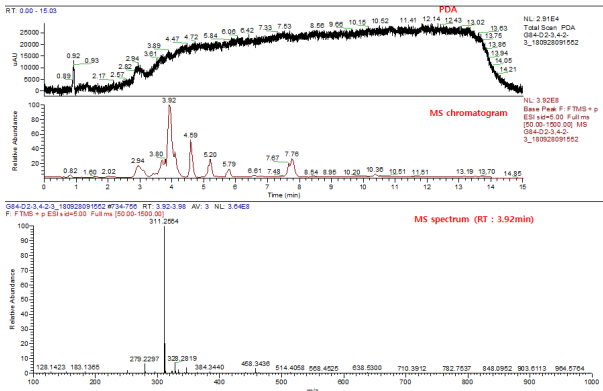
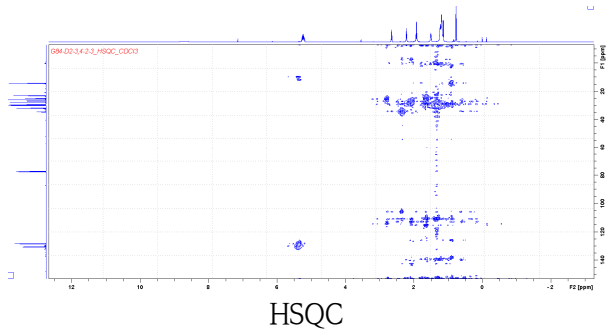
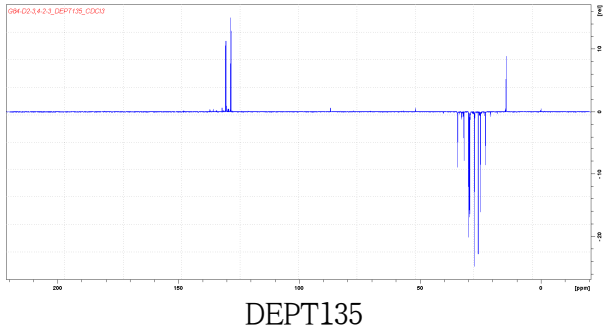
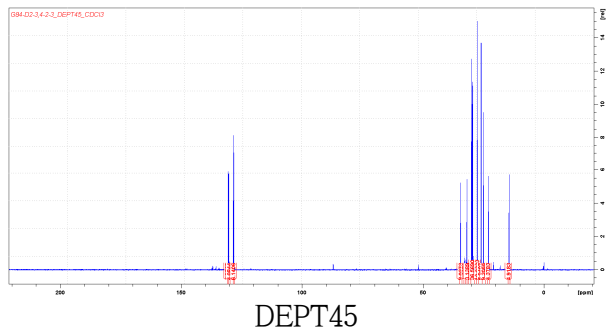
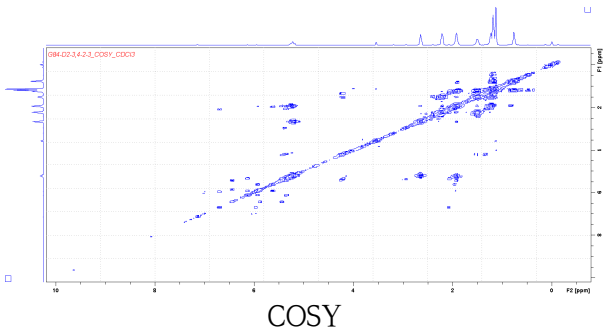
	시료명	원산지	용매	용매량(L)	분획물무게(g)
1	조합	국내산(영천)	Hexane	1.5 * 3회	13.4610
2			MC	1.5 * 3회	5.5809
3			EA	1.5 * 3회	3.4327
4			BuOH	1.5 * 3회	156.521
5			Aqua	-	236.7422

라) 화합물의 분광데이터

- 분리한 화합물들의 분광데이터 측정은 700 MHz NMR을 이용하여 1D, 2D를 측정하였음.
- 분자량은 LC-MS/MS를 통하여 측정함.

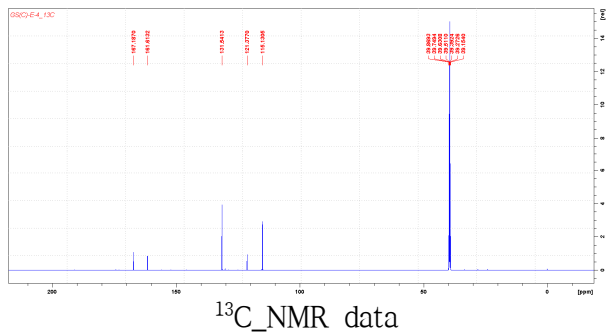
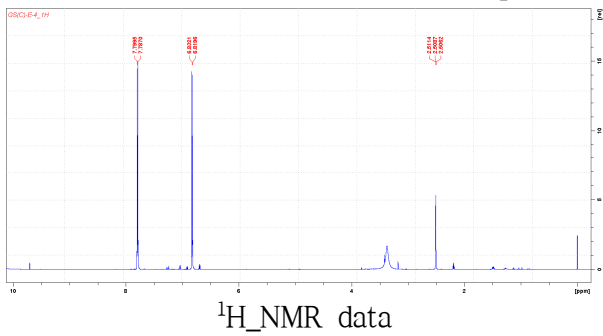
Compound 1의 분광데이터



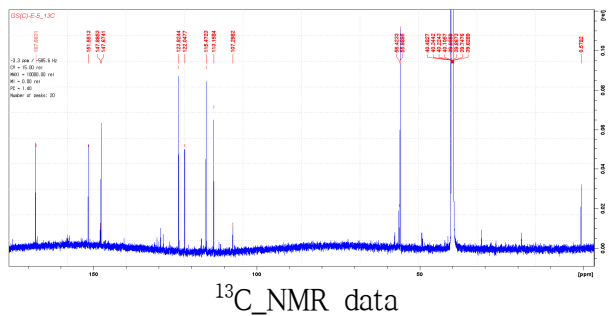
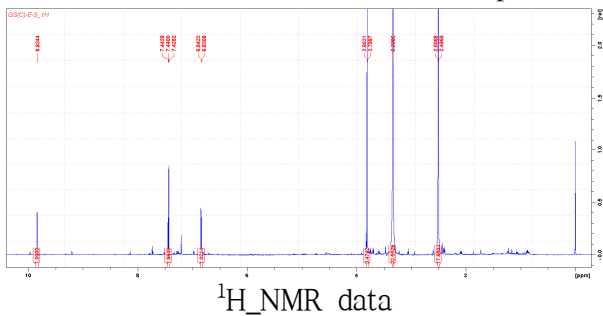


Mass

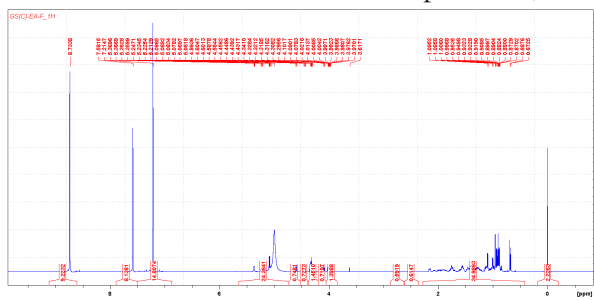
Compound 2의 분광데이터



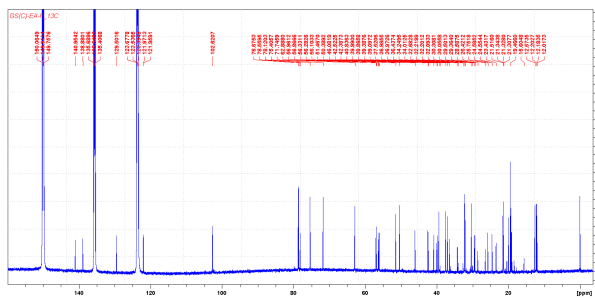
Compound 3의 분광데이터



Compound 4, 5 mixture의 분광데이터

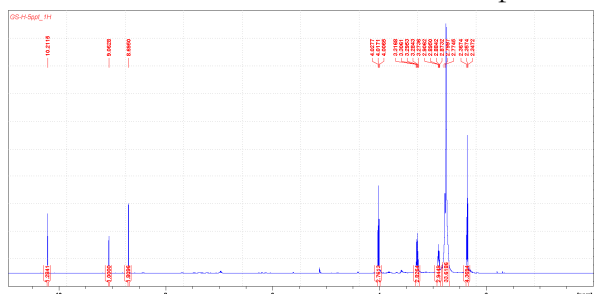


^1H _NMR data

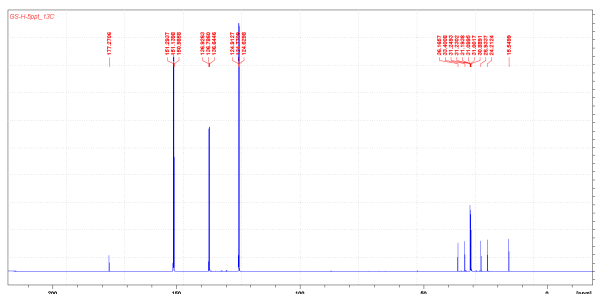


^{13}C _NMR data

Compound 6의 분광데이터

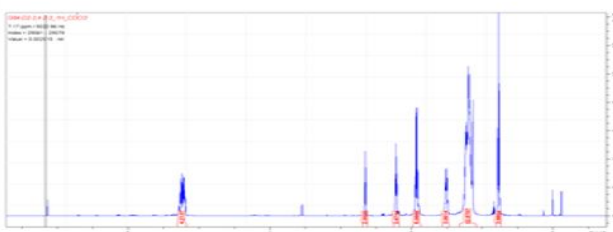


^1H _NMR data

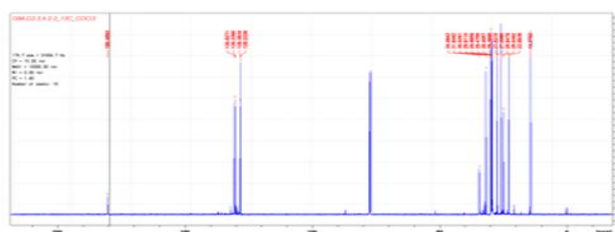


^{13}C _NMR data

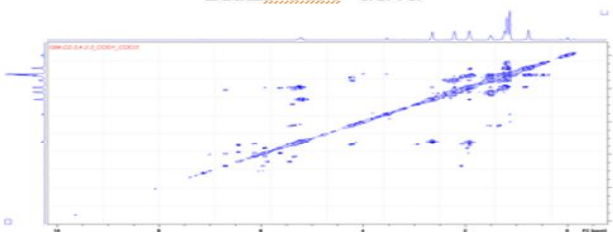
Compound 7의 분광데이터



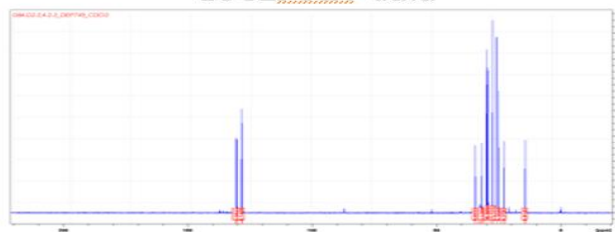
^1H _NMR data



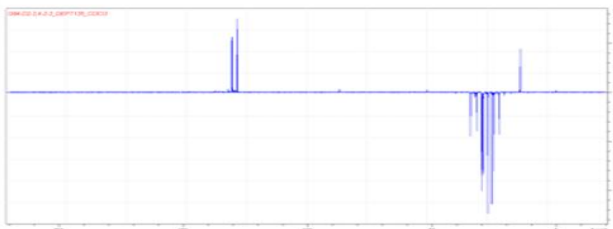
^{13}C _NMR data



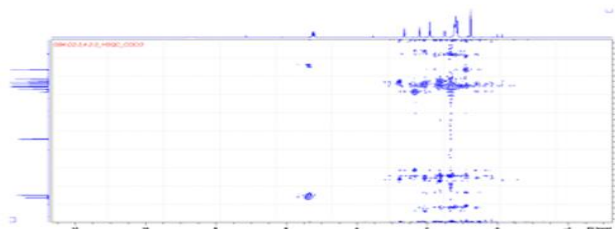
COSY



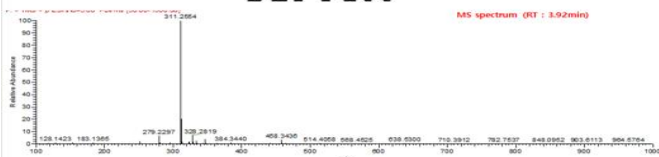
DEPT 45



DEPT 135

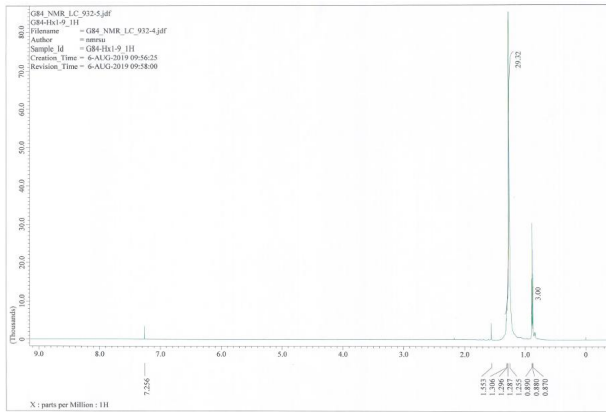


HSQC

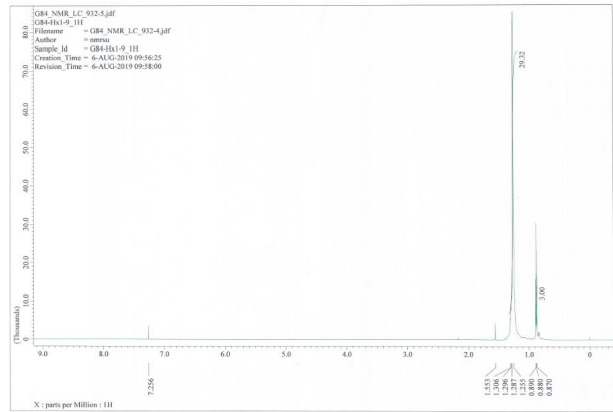


MS spectrum (RT : 3.92min)

Compound 8

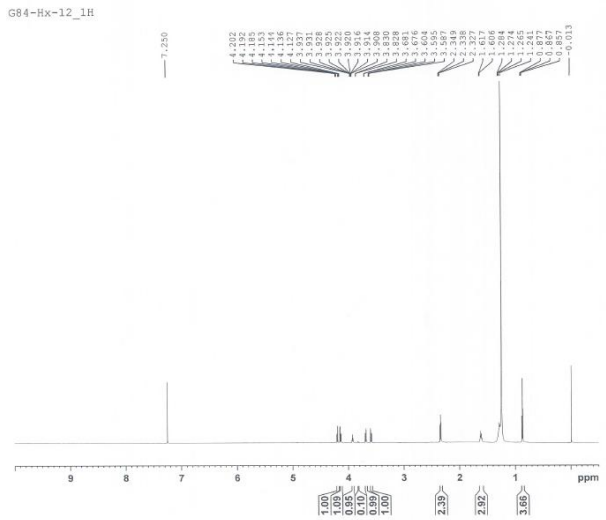


¹H_NMR data

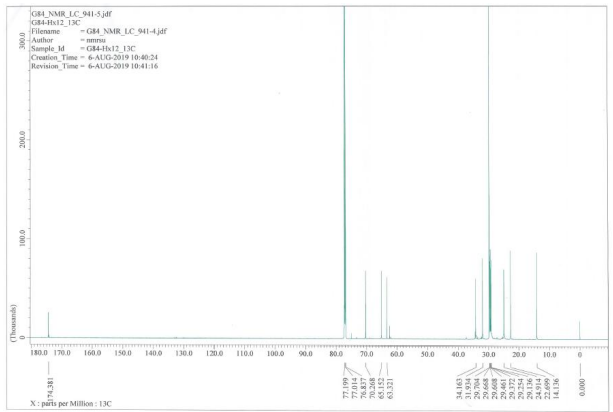


¹³C_NMR data

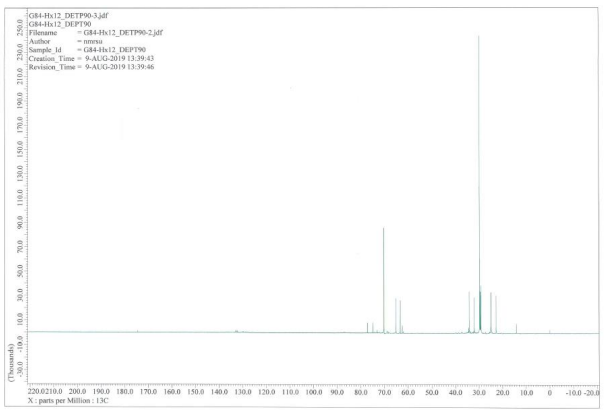
Compound 9



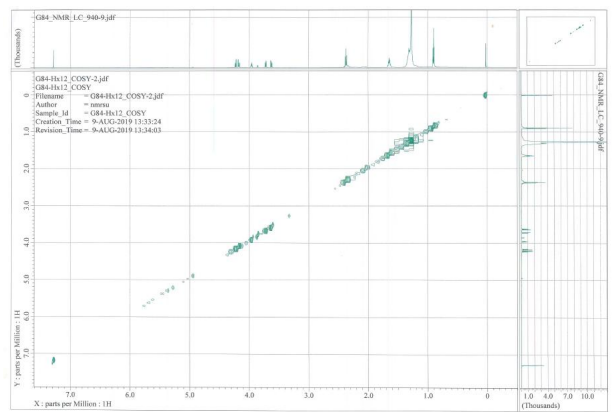
¹H_NMR data



¹³C_NMR data



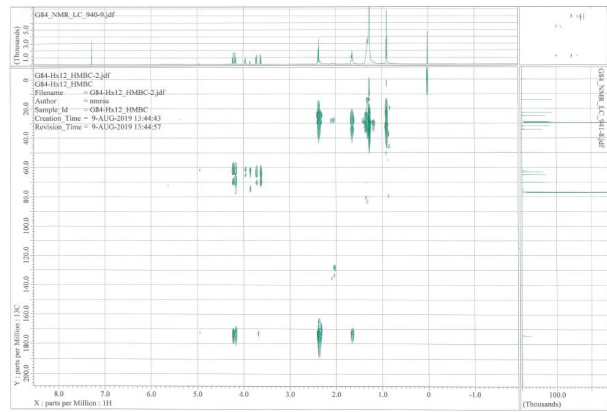
Dept ata



Cosy data

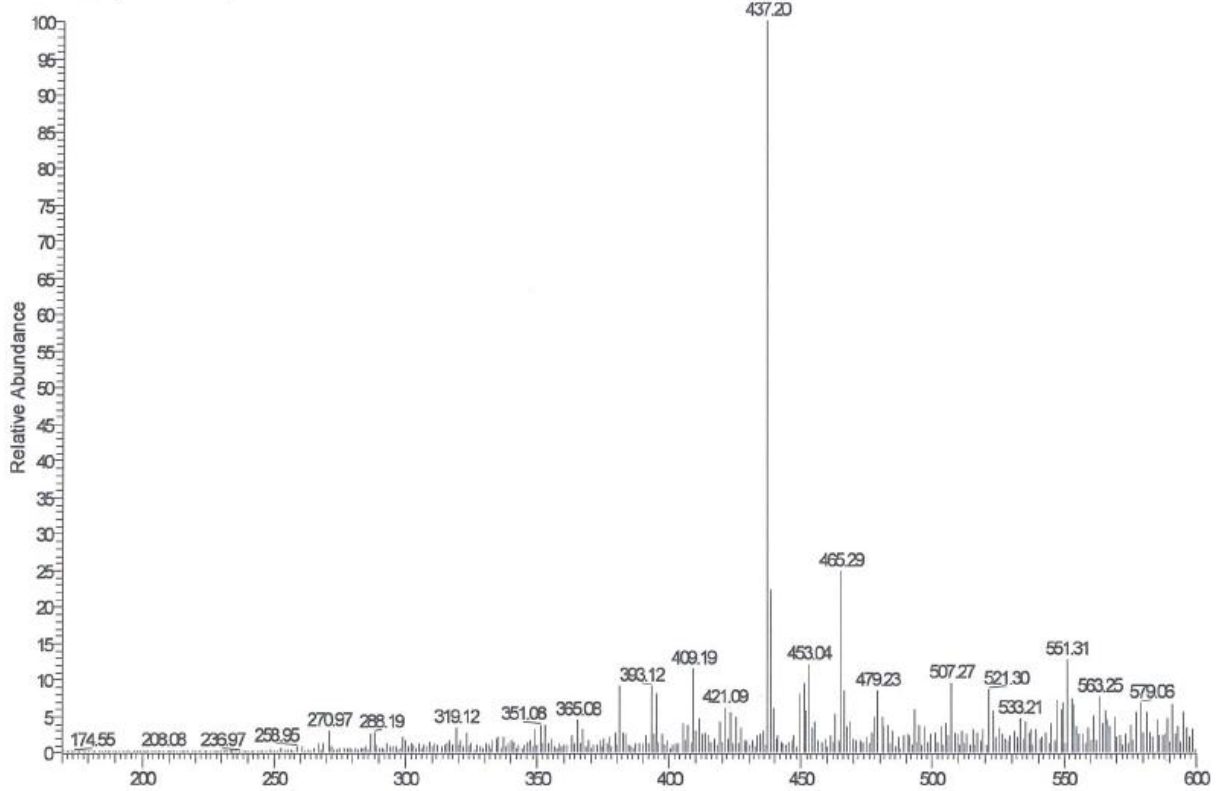


HBQC data



HMBC data

HX12#44 RT: 0.40 AM: 1 NL: 3.47E7
T: +cESI Q1MS[170.000-600.000]



Mass data

3) 분리된 화합물의 구조결정

- 분리한 화합물의 구조결정은 NMR(1D, 2D)등의 분광데이터와 문헌 분석을 통해 결정함.
- 3,4-dihydroxybenzoic acid (1), 4-hydroxybenzoic acid (2), 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester (3), stigmasterol-3-O-β-D-glucoside (4), β-sitosterol-3-O-β-D-glucoside (5), lauric acid (6), linoleic acid (7), nonacosane (8), behenin (9)로 구조규명.

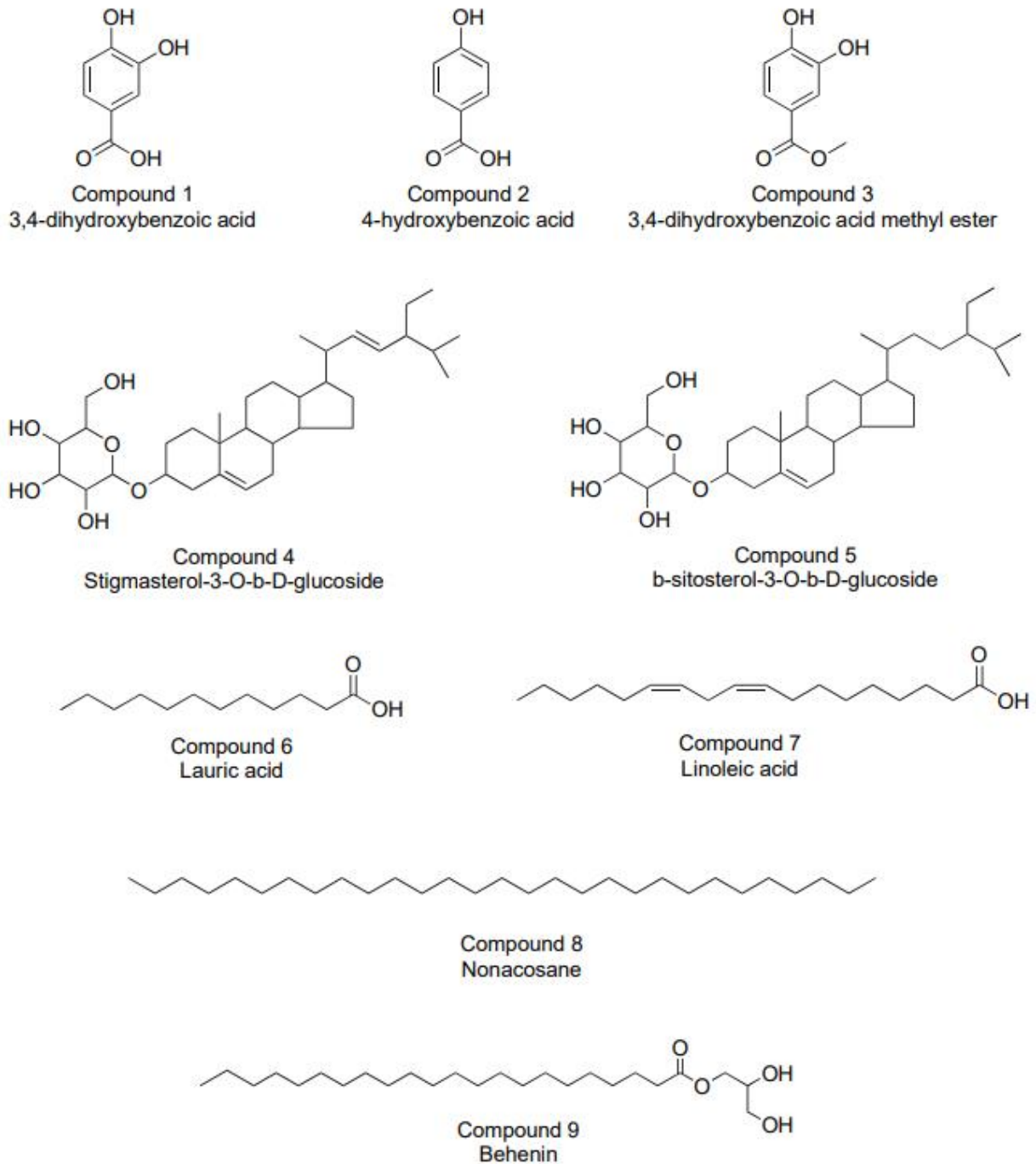


그림 7. 조협 화합물 구조해석

3. 표적유전자 확보 및 유전자감별법 확립

가. 주엽나무의 특징 및 분자분류학적연구 배경

- 주엽나무(*Gleditsia japonica* Miq.)는 콩과(Fabaceae) 실거리나무아과(Caesalpiaceae) 주엽나무속(*Gleditsia*)에 속하는 낙엽활엽교목이다. 식물체의 높이는 20m 정도 까지 자라며 주로 산기슭의 계곡사이나 물가에 자란다. 수피는 흑갈색 또는 암회색으로, 매끈하며 사마귀 모양의 피목이 많고, 가지가 퇴화된 가지가 있으며, 일년생가지와 엽축에 짧은 털이 있다. 잎은 호생하며 길이가 12~22cm로 1~2회 우상복엽이다. 소엽은 5~8쌍이고 긴 타원형으로,

길이와 폭이 각각 3~5.5cm x 3cm이며, 가장자리에 물결모양의 톱니가 있다. 엽축은 표면에 홈이 있고 다소 날개같이 된다. 식물체는 자웅동주이고 꽃은 잡성주이다. 꽃은 6월 총상꽃차례에 연녹색으로 피고, 지름 6mm이며, 꽃받침조각과 꽃잎은 각각 5개이며 수술은 9~10개이고 길이 4~5mm로 녹색이고, 수술대에 털이 있다. 협과는 비틀려서 꼬이며 길이와 폭이 각 23cm~3cm로 10월에 성숙한다. 협과는 한의학에서 조엽으로 부르며 주로 거담개규(祛痰開竅) 즉, 담(痰)을 제거하고 구규(九竅)를 열어주는 효능이 있다고 알려져 있다. 가시는 조각자(皂角刺)로 알려져 있으며 거풍살충(祛風殺蟲) 즉, 풍(風)을 제거하고 살충(殺蟲)하는 효능이 있다고 알려져 있다.

- 전 세계적으로 주엽나무 속에는 13 분류군(*Gleditsia amorphoides*, *G. aquatica*, *G. australis*, *G. caspica*, *G. delavayi*, *G. fera*, *G. ferox*, *G. japonica*, *G. macracantha*, *G. microphylla*, *G. rolfei*, *G. sinensis*, *G. triacanthos*)이 알려져 있다. 다양성이 가장 높은 지역은 아시아 지역으로 베트남 및 중국 서남부에 분포하는 *G. australis*와 한국, 일본 및 중국 동북부에 분포하는 *G. japonica* 그리고 중국 중부 및 동부에 분포하는 *G. sinensis* 등 9 분류군이 분포한다.

- 본 연구는 주엽나무 및 그 근연종들을 대상으로 한 분자분류학적인 연구를 수행함으로써, 주엽나무를 다른 근연분류군과 손쉽게 구분할 수 있는 분자마커를 제안하고자 한다.



주엽나무(잎과 화서)



조협(주엽나무의 열매)



조각자(주엽나무의 가시)

그림 8. 주엽나무의 주요 부위 사진

나. 연구 재료 및 방법

1) 연구재료

- 주엽나무 및 그 근연속에 대한 분자분류학적 연구를 위해 수집된 DNA 염기서열은 전세계에 분포하는 주엽나무속 식물 11개 분류군을 분석에 포함하였으며, 외군으로는 근연속인 *Gymnocladus*의 2개 분류군이 사용되었다. DNA 추출을 위한 시료는 직접 수집 및 약재시장에서 구입하였으며, 그 외 분류군의 경우 Genbank에 공개된 DNA염기서열을 다운로드하여 분석에 사용하였다.

표 13. 분석에 사용된 주엽나무속 식물 및 *Gymnocladus*.

분류군(개체수)	주요 분포지역	비고
<i>Gleditsia amorphoides</i> (2)	남미(브라질, 아르헨티나, 파라과이 등)	Genebank
<i>G. aquatica</i> (19)	미국	Genebank
<i>G. australis</i> (3)	중국(하이난섬), 홍콩, 베트남	Genebank
<i>G. caspica</i> (5)	이란, 아제르바이잔	Genebank
<i>G. delavayi</i> (1)	중국(남서부)	Genebank
<i>G. fera</i> (2)	중국(남부), 베트남, 라오스, 태국	Genebank
<i>G. japonica</i> (7)	한국, 중국(동부), 일본	직접수집(2) Genebank(5)
<i>G. microphylla</i> (3)	중국(동북부)	Genebank
<i>G. rolfei</i> (2)	중국(남동부), 대만, 필리핀, 베트남, 라오스	Genebank
<i>G. sinensis</i> (8)	중국(동부 및 중부)	약재시장(3) Genebank(5)
<i>G. triacanthos</i> (11)	미국	Genebank
<i>Gymnocladus chinensis</i> (2)		외군
<i>G. dioicus</i> (3)		외군

*비고의 괄호안의 숫자는 개체 수를 의미

2) DNA 추출과 PCR, 염기서열결정 및 정렬

- Total DNA 는 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 진행하였으며, 모든 처리과정은 공급자의 안내서를 따랐다. 이를 통해 추출된 DNA 를 PCR 과정에 사용하였다. nrDNA 의 ITS 지역을 PCR 방법을 이용하여 증폭하였다. 모든 PCR 반응 용액은 총 50 μ l 에 주형 DNA 10--20ng 과 Takara 10X Ex Taq buffer(Takara Bio Inc., Japan) 5 μ l, 2.5mMol dNTPs 4 μ l, 10 pmol 의 forward 와 reverse primer 각 0.5 μ l, 5unit/ μ g Taq polymerase(Takara Bio Inc., Japan) 0.25 μ l 및 증류수를 혼합하였다. Nuclear ribosomal DNA의 Internal transcribed spacer (nrDNA ITS) 지역을 증폭하기 위하여 ITS1 과 ITS4(White et al., 1990)를 사용하였다. PCR 반응액은 98 $^{\circ}$ C 에서 5분 동안 Predenaturation 한 후, Denaturation 95 $^{\circ}$ C 1분과 Annealing 55~57 $^{\circ}$ C 1분, Extansion 72 $^{\circ}$ C 1분으로 구성된 반응을 30회 반복한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 에서 10분간 안정화 시켰다 (Applied Biosystems Gene Amp. PCR system 9700). 또한 반응이 완료된 반응액은 QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 정제하였으며, 처리과정은 공급자의 안내서를 따랐다. 이를 통해 얻어진 PCR 산물은 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits 로 반응액을 제작한 뒤, ABI 3730XL 분석기 (Applied Biosystem)을 사용하여 정방향과 역방향을 각각 염기서열을 결정 수행하였다. 결정된 염기서열들은 ClustalX(Thopson et al., 1997)로 1차 정렬 후, 필요할 경우 MUSCLE(Edgar, 2004)로 2차 정렬을 수행 하였으며, 마지막으로 Geneious® ver. 6.1.6.을 통해 수작업으로 수정하였다.

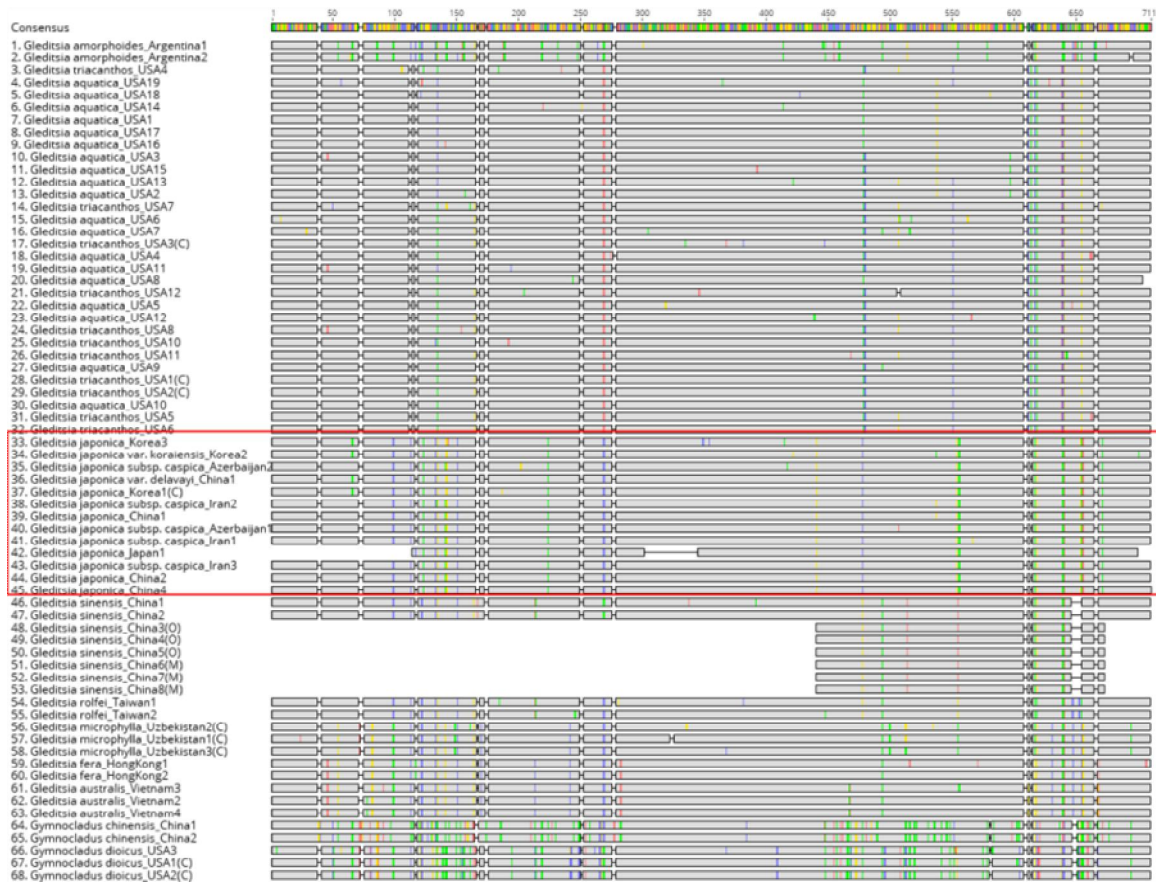


그림 9. 주엽나무속 11개 분류군 68개체의 nrDNA ITS 염기서열 정렬 결과. 붉은 박스는 *G. japonica* 및 그 종내 분류군들을 표시.

다. 분자분류 분석

- 주엽나무속의 유연관계 확인 및 클러스터링을 위하여 Bayesian 추론 분석을 실시하였다. MrBayes ver.3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001)를 사용하여 Bayesian 추론을 수행하였으며, Jmodeltest (Darriba et al., 2012; Guindon & Gascuel, 2003)를 이용하여 데이터에 적합한 model을 선정하였다. 각 Markov chain 은 Random tree 에서 시작 했고, 2,000,000 generation을 반복했으며, 100 generation 마다 sample tree 를 추출하였다. 초기 5000개의 tree 는 burnin 을 통해 제거한 후, Figtree ver.1.4.2. 를 이용하여 트리를 제작하였다.

라. 결과 및 고찰

- 주엽나무속 식물들의 분자분류학적 분석에서 사용된 nrDNA ITS 분자 마커는 각 분류군을 구분하는데 비교적 유용한 마커로 확인되었다. 중국에서 약재로 사용되고 국내에 약재 시장에서 판매되고 있는 조각자나무(*G. sinensis*)는 단계통군을 형성함으로써 다른 분류군들과 명확하게 구분되었다. 그 외에도 *G. rolfei*와 *G. microphylla*가 각각 단계통군을 형성하여 다른 분류군들과 구분되었다. nrDNA ITS 분자 마커 활용한 분자분류학적 분석에 포함된 *G. japonica*의 종내 네 개 분류군 (*G. japonica* var. *japonica*와 *G. japonica* var. *koraiensis*, *G. japonica* subsp. *caspicica*, *G. japonica* var. *delavayi*)을 유집 하기는 하였으나 각각의 분류군을 구별하지는 못하였다. 따라서 *G. japonica*를 구분하는 데는 유용하게 활용 될 수 있으나 종내 분류군 중 하나인 주엽나무 만을 구별하는 데에는 유용성이 없었다. 한편, 이들 종내 분류군을 구분하기 위해서는 차세대염기서열결정법 등 최신 기술을 활용

한 분자 마커 개발이 필요하지만 그에 앞서 이들에 대한 분류학적인 검토 또한 필요하다고 판단된다.

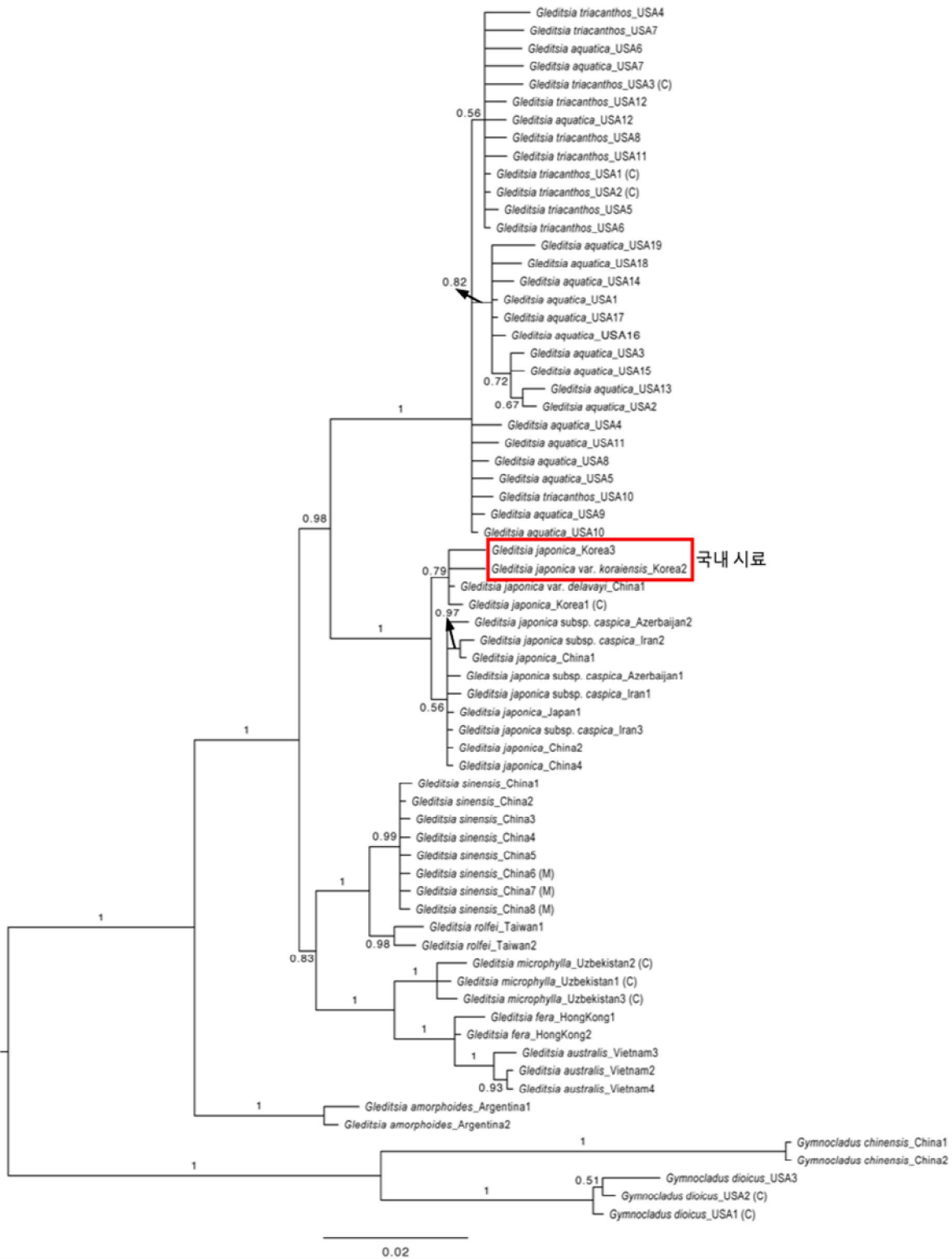


그림 10. 주엽나무 및 그 근연종에 대한 nrDNA ITS 기반 베이지안 추론 분석 계통수. 계통수 가지 위/아래 숫자는 사후확률. 분류군 옆 (M)은 약재시장 시료, (C)는 재배 시료. 붉은색 사각형은 국내 수집 시료를 나타냄.

제 4 절 닭진드기 살충력 평가 및 제형개발

1. 실리카 등 물리적 억제제의 성상분석과 농도별 지속성 및 유효성 파악

가. 실험방법

- 실리카별 지속성 및 유효성 테스트를 위하여 breeding dish (Ø100 mm × 40 mm)에 실리카를 물에 10배로 희석한 액제를 분사기를 사용하여 코팅하였고, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월에 걸쳐 코팅된 실리카를 사용하였다. 대조군은 실리카를 섞지 않은 물을 이용하였음.

- 닭진드기 성충 (20~30마리)을 코팅된 실리카 위에 접종한 뒤, 시간별로 살충률을 확인하여 실험을 수행하였고, 3회의 결과 평균값을 치사율로 사용함.

나. 실험결과

표 14. 물리적 억제제의 성상분석

제품	성상
FSIW	회색의 분말
FS90	회색의 분말
Hemexane	황색의 분말
Silica shield	백색의 분말
Van eck	백색의 분말

표 15. 물리적 억제제의 지속성 및 유효성 파악

제품	살충력 (LT ₅₀ , hour)	지속성(LT ₅₀ , hour)			
		3개월	6개월	9개월	12개월
FSIW	12.8	15.2	15.0	16.0	18
FS90	11.5	13.8	15.2	16.5	18.4
Hemexane	18.8	20.3	21.8	22.3	26.0
Silica shield	8.7	11.4	14.8	19.0	20
Van eck	14.7	15.6	17.4	17.5	18.3

- 제품별 LT₅₀은 8.7~18.8이었음. 시간에 경합에 따라 완만하게 LT₅₀값이 커지면서 살충력이 저하되는 경향을 보였음. 가장 높은 살충력을 보인 것은 Silica shield 제품으로 지속력이 다소 떨어짐. Silica shield 제품을 이용한 조합추출물 혼합 테스트를 진행하고자 한다.

표 16. 물리적 방제법과 조협추출물의 혼합제에 대한 살충테스트

혼합제	조성비	*살충률 (mean ± SD)
Silica shield + 조협추출물	90:10	60.5 ± 5.0
	80:20	50.0 ± 4.5
	70:30	48.5 ± 8.3
Silica shield 조협추출물	단독	76.5 ± 7.8
	단독	88.4 ± 5.7

*관찰시간은 24h 기준

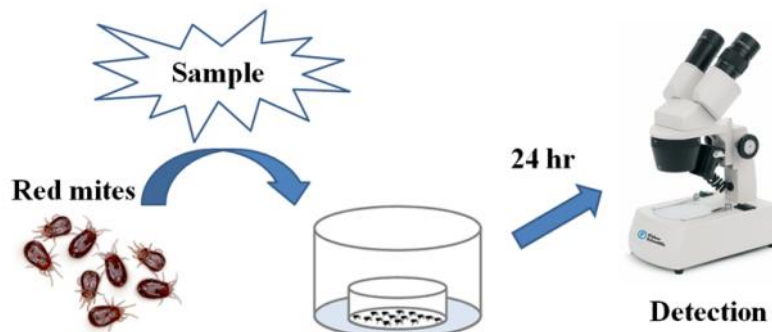
- 닭진드기의 방제효율을 향상시키고 내성획득을 최소화하기 위하여 물리적 방제법과 화학제를 혼합하는 제형을 시도하려고 하였으나, 실리카 계열과 화학제를 혼합할 경우 살충력이 떨어지며, 실리카 제품에서 물성변화가 일어나면서 물리적 살충이 떨어지는 현상이 생긴다. 따라서 물리적 억제제와 조협추출물을 혼합하는 방법은 어려운 것으로 사료됨.

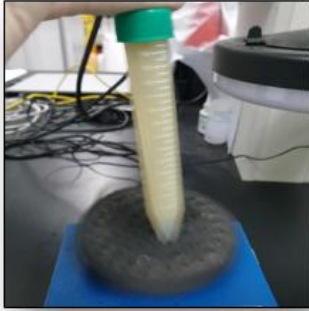
2. 조협추출물 제제에 대한 농도별 실험실 유효성 평가

가. 지역별 조협추출물의 닭진드기 살충력 테스트

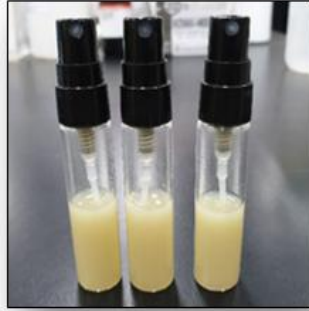
1) 실험방법

- 실험실 사육 닭진드기를 사용하여 테스트를 진행하였고, 각 시료별 웨딩디쉬 3개씩 사용하여 3반복 실험을 진행하였음.
- 89 x 89 x 25mm 웨딩디쉬 모서리에 끈끈이(Tangle-Trap®)을 바른 뒤, 필터페이퍼를 바닥에 깔고 닭진드기 성충 (20~30마리)을 필터페이퍼 위에 접종한다. 5ml 스프레이병에 실험샘플을 담고 12회 충체에 직접 분사 (약 0.8~1.0ml)한 뒤, 항온항습기 (온도 28±2℃, 습도 75±5%)에 넣고 24시간 이후 살충률을 확인함.
- 주관기관 경기바이오센터 천연물 팀으로부터 수령한 지역별 조협추출물로 닭진드기에 대한 살충력 테스트를 진행하였다. 40mg의 조협 샘플에 80% DEF 용제 500μL를 첨가하고 약 2시간동안 vortexing 하여 완전히 용해시켰다. 이후 증류수를 첨가하여 최종 희석농도인 10mg/mL를 살포하였음.





1) 천연물 샘플 용해



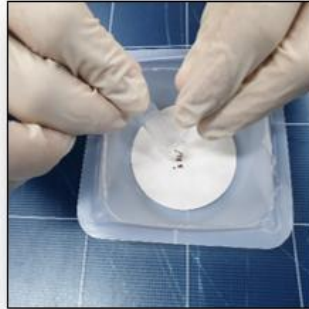
2) 약제 희석



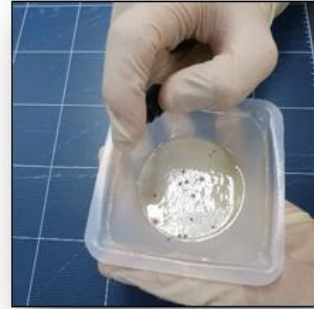
3) 실험실 닭진드기 성충 선별



4) 3~4회 반복실험 준비



5) 닭진드기 접종



6) 약제 살포 (약 1 ml)

2) 지역별 조합추출물의 닭진드기 살충력 테스트 결과

- 총 10개의 지역에서 수급한 조합추출물을 이용하여 닭진드기에 대한 살충효능을 테스트하였다. 지역별 조합추출물 중 EtOH ext.와 MeOH ext.의 닭진드기에 대한 살충력이 동시에 90% 이상인 시료는 경기도 2, 충북 1, 경북 2 지역의 조합추출물로 확인되었다.

표 17. 지역별 조합추출물(EtOH ext.)의 살충률

No.	시료명	살충률 (mean ± SD)
강원도 1	G84-21-1	87 ± 13
경기도 1	G84-21-2	73 ± 25
경기도 2	G84-21-3	93 ± 1
경기도 3	G84-21-4	72 ± 14
충북 1	G84-21-5	96 ± 8
경북 1	G84-21-6	79 ± 13
경북 2	G84-21-7	98 ± 4
경북 3	G84-21-8	70 ± 19
베트남 1	G84-21-9	40 ± 7
베트남 2	G84-21-10	54 ± 4
+	와구방 100배 희석	100 ± 0
-	Control	16 ± 8

표 18. 지역별 조협추출물(MeOH ext.)의 살충률

No.	시료명	살충률 (mean ± SD)
강원도 1	G84-21-12	90 ± 12
경기도 1	G84-21-13	60 ± 9
경기도 2	G84-21-14	91 ± 15
경기도 3	G84-21-15	97 ± 6
충북 1	G84-21-16	92 ± 14
경북 1	G84-21-17	54 ± 34
경북 2	G84-21-18	92 ± 9
경북 3	G84-21-19	85 ± 12
베트남 1	G84-21-20	78 ± 10
베트남 2	G84-21-21	40 ± 6
+	와구방 100배 희석	100 ± 0
-	Control	16 ± 8

3) 조협으로부터 분리한 화합물의 닭진드기 살충력 테스트 결과

- 분리한 화합물 1~9번까지의 화합물을 처리하였으나 활성이 있는 화합물은 7, 8, 9번, 이 화합물들은 소량의 메탄올에 녹인후 물과 유화제인 DEF에 혼합한 후 처리
- 화합물은 모두 1000ppm으로 녹였으며, 판매되는 제품인 에코갈리는 200~400배 희석하여 처리 하였음

	1,000ppm
7	83 ± 14
8	42 ± 0
9	93 ± 12
Control	3 ± 5
에코갈리 200배	82 ± 12
에코갈리 400배	11 ± 7

나. 후보물질 선발을 위한 천연추출물 유효성 테스트

- 조협추출물과 후보물질을 혼합하여 시너지효과를 나타내는지 확인하기 위해, 농업해충에게 살충효과가 있다고 알려져 있는 4가지 천연물을 이용하여 유효성평가 실험을 진행하였다.
- 닭진드기에 대해 살충효과가 가장 높은 물질은 천궁추출물로 91%의 효과를 나타내었고, 고삼추출물이 89%의 효과를 나타내 두 번째로 효과가 좋았다. 고삼추출물이 추후 제조공정에 있어서 공급이 용이하다는 점에서 후보물질로 선발되었고, 고삼추출물을 이용하여

조합추출물과의 시너지효과를 확인하여 조합복합추출물 혼합제를 제조할 것임.

표 19. 식물추출물 4종의 닭진드기 유효성평가

식물명	국명	추출조직	살충률 (mean ± SD)	
			100배 희석액	200배 희석액
<i>Acoris gramineus</i>	석창포	whole plant	75 ± 12	53 ± 15
<i>Cnidium officinale</i>	천궁	root	91 ± 6	67 ± 6
<i>Sophora flavescens</i>	고삼	root	89 ± 8	63 ± 5
<i>Derris elliptica</i>	데리스	root	86 ± 8	68 ± 10
대조군(D.W)		-	0 ± 0	0 ± 0

다. 조합추출물과 고삼추출물의 비율별 실험

- 조합추출물과 고삼추출물의 비율을 조절한 조성물의 살충률 확인 실험의 결과를 나타내는 표이다. 100배 희석 데이터를 기준으로 조합추출물의 비율이 낮아지면서 고삼추출물의 비율이 높아질수록 닭진드기에 대한 살충효과는 점점 증가하였다. 그러나 조합추출물 20%와 고삼추출물 80% 혼합물의 100배 희석 데이터에서부터 점차적으로 감소하는 경향을 보였다.
- 조합추출물 30% + 고삼추출물 70% 혼합물에서 가장 높은 시너지효과를 보이며, 이 데이터는 조합추출물 및 고삼추출물을 단독으로 처리했을 때와 비교하여 혼합물의 살충효과가 유의적으로 증가하였음을 나타낸다.

표 20. 조협추출물과 고삼추출물의 비율별 살충률

추출물명	100배	200배	400배
조협추출물 100% + 고삼추출물 0%	92 ± 4	79 ± 7	35 ± 2
조협추출물 90% + 고삼추출물 10%	91 ± 4	78 ± 6	34 ± 5
조협추출물 80% + 고삼추출물 20%	90 ± 5	73 ± 4	33 ± 2
조협추출물 70% + 고삼추출물 30%	93 ± 4	85 ± 5	41 ± 5
조협추출물 60% + 고삼추출물 40%	92 ± 4	74 ± 4	30 ± 10
조협추출물 50% + 고삼추출물 50%	94 ± 8	83 ± 2	41 ± 3
조협추출물 40% + 고삼추출물 60%	95 ± 6	82 ± 5	45 ± 11
조협추출물 30% + 고삼추출물 70%	97 ± 3	86 ± 4	43 ± 8
조협추출물 20% + 고삼추출물 80%	96 ± 4	84 ± 4	43 ± 7
조협추출물 10% + 고삼추출물 90%	92 ± 3	75 ± 8	33 ± 1
조협추출물 0% + 고삼추출물 100%	87 ± 8	65 ± 5	32 ± 8
대조군(D.W)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

라. 고삼추출물, 조협추출물, 부형제의 비율별 실험

- 고삼추출물의 비율을 60%, 70%, 80%로 고정한 다음 조협추출물과 부형제의 비율을 10% 단위로 변화시킨 혼합물로 닭진드기에 대한 살충력 테스트를 진행하였다. 100배 희석 데이터를 기준으로 비교하였을 때, 고삼추출물 70% 구간에서 높은 살충효과를 보였고, 그 중 고삼추출물 70% + 조협추출물 20% + 부형제 10% 비율의 혼합물에서 높은 시너지 효과를 보임.

- 고삼추출물의 비율을 70%로 고정한 다음 조협추출물과 부형제의 비율을 5% 단위로 변화시킨 혼합물로 닭진드기에 대한 살충력 테스트를 진행함. 100배 희석 데이터를 기준으로 비교하였을 때, 고삼추출물 70% + 조협추출물 20% + 부형제 10% 비율의 혼합물에서 가장 높은 시너지 효과를 보였다. 완제품의 조성비는 고삼추출물 70% + 조협추출물 20% + 부형제 10%로 선정하기로 결정함.

표 21. 조합추출물, 고삼추출물, 부형제의 비율별 살충률

고삼추출물 : 조합추출물 : 부형제	100배	200배	400배
80% + 20% + 0%	93 ± 8	82 ± 4	35 ± 6
80% + 10% + 10%	94 ± 4	84 ± 9	38 ± 6
70% + 30% + 0%	98 ± 2	85 ± 5	40 ± 5
70% + 20% + 10%	100 ± 0	88 ± 2	46 ± 4
70% + 10% + 20%	97 ± 4	83 ± 5	42 ± 8
60% + 40% + 0%	92 ± 7	80 ± 7	42 ± 6
60% + 30% + 10%	95 ± 6	85 ± 6	47 ± 9
60% + 20% + 20%	94 ± 4	79 ± 9	44 ± 3
60% + 10% + 30%	88 ± 11	72 ± 15	34 ± 7
고삼추출물 100%	85 ± 8	64 ± 4	30 ± 12
조합추출물 100%	90 ± 2	73 ± 5	38 ± 4
대조군(D.W)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

표 22. 조합추출물, 고삼추출물, 부형제의 비율별 살충률 (2)

고삼추출물 : 조합추출물 : 부형제	100배	200배	400배
70% + 30% + 0%	96 ± 3	82 ± 7	38 ± 13
70% + 25% + 5%	98 ± 1	85 ± 6	40 ± 9
70% + 20% + 10%	100 ± 0	91 ± 2	43 ± 8
70% + 15% + 15%	96 ± 2	87 ± 6	45 ± 8
70% + 10% + 20%	94 ± 4	80 ± 5	41 ± 11
고삼추출물 100%	87 ± 4	62 ± 8	35 ± 5
조합추출물 100%	91 ± 4	75 ± 9	31 ± 10
대조군(D.W)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

제 5 절 닭진드기 살충기작 규명

1. 살충기작 연구의 필요성

- 닭진드기(Dermanyssus gallinae)는 가금 및 야생조류에 병리학을 유발할 수 있는 혈혈성 외부(체외) 기생충이다. 양계장의 닭 몸에 붙어 흡혈을 통해 빈혈, 가려움, 불안, 불면 등으로 닭에게 큰 스트레스를 주며, 그로 인한 치사율 증가 및 산란율 저하 그리고 심각한 질병 전파 등 세계적으로 가금류 산업에 상당한 경제적 손실을 초래한다. 닭진드기 매개 질병으로 St Louis encephalitis, avian spirochetes, chicken pox, eastern equine encephalitis, Newcastle disease, fowl typhoid, cholera, salmonella 등을 포함한다. 일반적으로 가금류를 흡혈대상으로 삼지만 경우에 따라서 말, 설치류, 인간까지 흡혈대상으로 삼는 것으로 보고되어져 있다. 따라서, 닭진드기 관리를 위한 효과적인 방제대책이 중요한 시점이다. 일반적으로 닭진드기의 방제를 위해 화학 살충제들이 대부분 사용되어지고 있다. 하지만 닭진드기의 화학 살충제에 대한 저항성이 발달하면서 가금사에 등록된 유효 살충제는 상대적으로 낮은 수준이다. 뿐만 아니라, 병해충 관리는 합성 살충제 화학 물질의 대부분에 의해 야기되는 인체 및 환경에 미치는 위험 때문에 전 세계적으로 경제적 및 생태적인 문제에 직면 해 있다. 이러한 살충제의 단점을 극복하기 위한 대안으로 많은 세계의 연구자들은 식물유래 천연물에서 병해충을 방제할 수 있는 물질들을 발굴하기 위한 연구들을 진행 해오고 있다. 새로운 효과적인 살충 화합물을 동정하는 것은 증가하는 살충 저항성에 대항하기 위해 필수적이다. 살충 활성을 가지는 식물성 화학물질을 함유한 천연물의 발굴은 이러한 문제 중 일부를 해결할 것으로 기대되고 있다. 지금까지 향나무, 정향 버드, 라벤더, pennyroyal, 티트리 및 백리향 등이 닭진드기에 살충효과가 있는 것으로 조사되어 있다. 하지만 적용되고 있는 살충제와 달리 천연물에서 살충기전에 대한 정확한 분자표적의 규명은 미흡한 수준에 있다.

- 따라서, 상이한 작용 메커니즘을 가지는 천연물에서 살충제를 위한 새로운 활성분자의 탐색과 작용기전을 규명 할 필요가 있다. 식물체에 존재하는 2차 대사산물은 분명 방어 및 독성 작용을 하며, 이는 닭진드기의 번식 및 기타 과정을 저해할 수 있다. 식물성 화학물질은 경제적 및 생태적 지속가능성을 보장하면서 특정 또는 다중 분자표적을 갖는 미래의 살충제 디자인에서 효과와 특이성을 극대화하기 위해 사용될 수 있을 것이다.

- 식물은 수천 년 동안 침입자에 대한 방어시스템을 진화 시켜 왔고 그 결과 식물들은 선충류와 곤충 등과 같은 많은 초식동물에 대한 방어기작을 가지고 있다. 그러한 식물 방어 중 하나는 단백질 분해효소 저해인자의 생산을 포함하고 있다. 이러한 억제제는 식물의 여러 조직에서 발견되거나 초식동물의 공격에 의해 유도되기도 한다. 닭진드기를 포함하는 무척추동물(기생충 및 곤충 등)의 소화계는 식물 유래 천연 살충제의 탁월한 잠재적 표적이며, 특히 단백질 분해효소인 소화효소는 그 중 하나로 여겨진다. 최근 몇 년 동안 소화효소는 동물 기생충에 대한 백신 생산이나 해충 저항성 형질전환 식물 생산의 기초가 되었다. 최근 닭진드기 소화효소를 표적으로 많은 연구가 이루어지고 있다. 먼저, 닭진드기의 소화효소의 탐색은 새로운 방제 분자표적으로서 필요한 단계이다. McDevitt 등은 항-진드기 인자(anti-mite factors)로서 항응고 저해인자(proteinase inhibitor)인 heparin과 acid citrate glucose를 희석한 혈액을 닭진드기에 섭취시켜 살충효과를 분석한 결과 control(혈액)에 비해 40% 이상의 살충력을 보이는 것을 확인하였다. 이는 가수분해효소를 저해하는 항응고인자들에 의해 혈액 단

백질의 효율적인 가수분해를 방해함으로써 살충효과를 가지는 것으로 시사된다. Alasdair 등은 닭진드기를 포함한 외부기생충의 단백질 추출물을 통해 가수분해 효소를 비교 분석하였다. 닭진드기를 용해시켜 획득한 추출물에서 phosphatase, esterase, aminopeptidase 및 glycosidase 중 β -Glucuronidase와 N-Acetyl-b-glucosaminidase의 효소활성을 가지는 것으로 확인하였다. 상기 가수분해 효소들은 절지동물의 소화기관에서 음식을 소화하는 중요한 역할을 차지하고 있으며, N-Acetyl-b-glucosaminidases는 탈피과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. N-Acetyl-b-glucosaminidases는 탈피효소로서 해충 방제를 위한 중요한 분자표적으로 인식되기 때문에 닭진드기에서도 살충 분자표적으로 가능성이 있을 것으로 추정된다. 닭진드기의 소화효소 중 혈액 헤모글로빈을 가수분해 할 수 있는 소화효소로 aspartic proteinase와 cysteine proteinase로 여겨진다. Bartley (2012) 등은 흡혈성 닭진드기 방제를 위해 잠재적 백신 후보 표적인자(항원)로서 aspartic proteinase (cathepsin D-like proteinase)와 cysteine proteinase (cathepsin L-like proteinase)를 선발하여 항체를 제작하였다. 다음 두 항체(anti-Dg-CatD-1 & anti-Dg-CatL-1)에 대한 닭진드기(섭취)의 살충효능을 테스트한 결과 anti-Dg-CatL-1 보다 anti-Dg-CatD에 대한 살충효능이 큰 것으로 나타났다. 하지만 control에 비해 모두 살충력을 가지고 있는 것으로 나타났기 때문에 두 단백질 효소 모두 살충 분자표적으로서의 가능성을 보여주고 있다. Glutathione S-transferases (GSTs)는 독성의 생체 이물질을 무독화 시키는 중요한 효소로서 약제내성(살충제 저항성)의 기능을 갖는다. Bartley (2015) 등은 닭진드기로부터 3종의 GSTs (Dg-GST-1, Dg-GST-2, Dg-GST-3) 유전자를 동정하였고 재조합단백질 GSTs와 상용화되는 살충제(spinosad, phoxim, permethrin, abamectin)를 이용하여 효소 저해효능을 검정하였다. Phoxim, permethrin, abamectin 모두 Dg-GST-1의 활성을 억제 하였고, Phoxim는 Dg-GST-2와 Dg-GST-3의 활성을 모두 억제하는 것으로 확인되었다. 이는 GST 효소의 약제 내성을 방해함으로써 닭진드기의 살충률을 증가시킬 수 있는 새로운 살충 분자표적으로서 가능성을 제시하였다. Roy 등은 프랑스 여러 지역의 양계장에서 닭진드기를 채집하여 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase, AChE) 억제물질인 diethyl paraoxon(유기 인산 화합물)을 처리하여 각 지역에서 채집된 닭진드기의 아세틸콜린에스테라제 활성 저해능을 비교 분석하였다. 각 지역 닭진드기군에서 계통적다양성(polymorphism)에 의한 효소활성의 억제 차이가 나타났지만 약제내성(저항성)을 가지는 닭진드기군은 확인 할 수 없었다. 이는 닭진드기의 아세틸콜린에스테라제가 살충표적으로서 매우 가능성 있는 분자표적으로 시사된다. 상기 내용을 바탕으로 조합복합추출물의 살충력에 대한 살비기전을 예측하기 위한 분자표적을 선발하기 위해 본 연구에서 glutathione S-transferase, acetylcholinesterase, aspartic proteinase (cathepsin D-like proteinase), cysteine proteinase (cathepsin L-like proteinase), N-Acetyl-b- glucosaminidases 5 가지 중요 효소를 대상으로 활성 억제효과를 확인 하고자 한다.

2. 닭진드기로부터 살비 분자표적(Glutathione S-Transferase(GST)) 선발

가. Glutathione S-transferase (GST)

- Glutathione S-transferase(GST)의 효소 활성 억제 효과를 확인하고자 닭진드기 추출 효소와 닭진드기 살충제로서의 대상 물질인 조합복합추출물을 이용하여 효소 저해능 평가를 수행하였다.

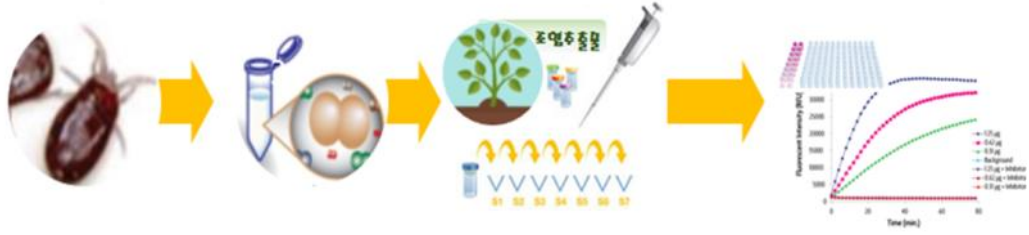


그림 48. 효소 저해능 평가 모식도

1) 닭진드기의 단백질 추출 및 정량

- 참여기업 (주)비오지노키로부터 수령한 닭진드기를 -80°C 에서 동결하였다. 이후 약 70 mg의 닭진드기에 RIPA buffer 400 uL를 첨가하고 homogenizer로 분쇄하였다. 4°C 에서 10분씩 3회 원심분리를 반복하여 상층액만을 회수하였다. 이후 닭진드기로부터 분리한 상층액 내의 단백질 농도를 정량하기 위해 BCA assay를 이용하였다. 먼저 BSA (bovine serum albumin) 단백질을 사용하여 정량을 위한 표준검량선을 작성하였다.

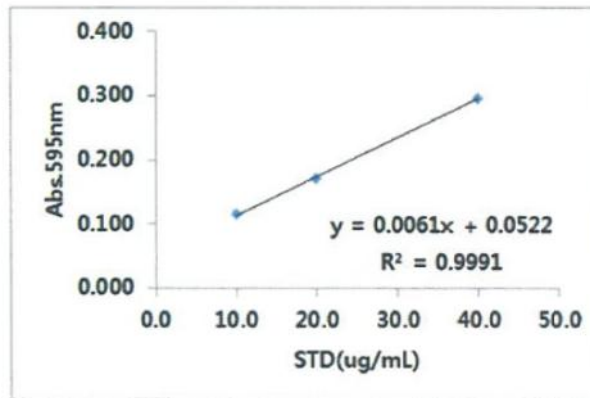


그림 49. BCA assay를 위한 표준검량선

- 이후 표준검량선 수식을 사용해 단백질 농도를 환산하였을 때, 단백질 농도가 약 2.6 mg/mL임을 확인하였다. 전체 닭진드기 복합단백질을 효소 활성 측정에 이용하기 전, 정량한 닭진드기 단백질의 50 ug, 100 ug 농도를 SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 단백질 상태를 육안으로 확인하였다.

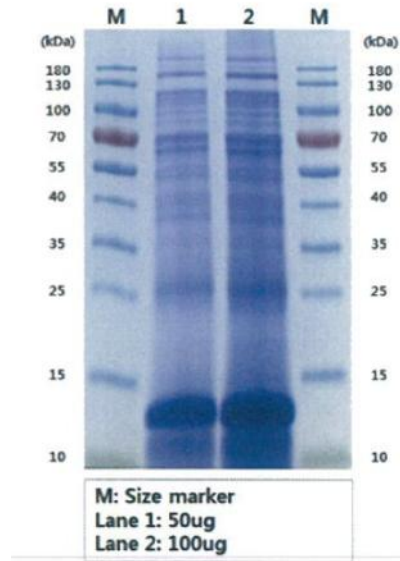


그림 50. SDS-PAGE 분석

2) Glutathione S-Transferase(GST)

- Glutathione S-Transferase(GST)의 기질로 사용하는 L-Glutathione reduced (GSH)와 1-Chloro-2,4 -dinitrobenzene (CDNB)는 각각 증류수와 에탄올에 녹여 200mM GSH와 100 mM CDNB로 준비하고, 최종 농도가 2 mM GSH와 1 mM CDNB가 되게 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)와 혼합해 기질용액을 준비하였다. 기질용액과 GST 효소활성 측정을 위한 닭진드기 추출 단백질 50 ug, 그리고 GST 저해 후보 물질인 조협복합추출물을 혼합하여 총 200 μ L로 96 well plate에서 수행하였고, 340 nm 흡광도를 측정하였다.

- 측정은 매분마다 10분 동안 효소 활성을 측정하였으며, 직선 구간에 해당하는 흡광도를 아래 수식에 따라 계산하여 시료 처리군에 따른 GST specific activity를 비교 분석하였다.

a)

$$(\Delta A_{340})/\text{min} = \frac{A_{340}(\text{final read}) - A_{340}(\text{initial read})}{\text{reaction time}(\text{min})}$$

b)

$$\frac{(\Delta A_{340})/\text{min} \times V(\text{mL}) \times \text{dil}}{\epsilon \text{ mM} \times V_{\text{enz}}(\text{mL})} = \mu\text{mol} / \text{mL} / \text{min}$$

dil = the dilution factor of GST sample

ϵ mM = the extinction coefficient for CDNB conjugate at 340nm \rightarrow 96 well test: 5.3mM $^{-1}$

V = the reaction volume \rightarrow 0.2mL

V_{enz} = the volume of the GST sample tested

3) Glutathione S-Transferase(GST)의 활성 저해능 평가 결과

- GST 효소 활성 평가 확립을 위하여 닭진드기 단백질 추출물 50 ug, 100 g 각각에 해당하는 GST specific activity를 비교 분석하였다. GST 효소 반응 후 340nm에서 측정된 흡광도 결과(그림 51a.)이며, 이에 따른 specific activity를 수식에 따라 수치화하여 농도별로 비교 분석하였다(그림 51b).

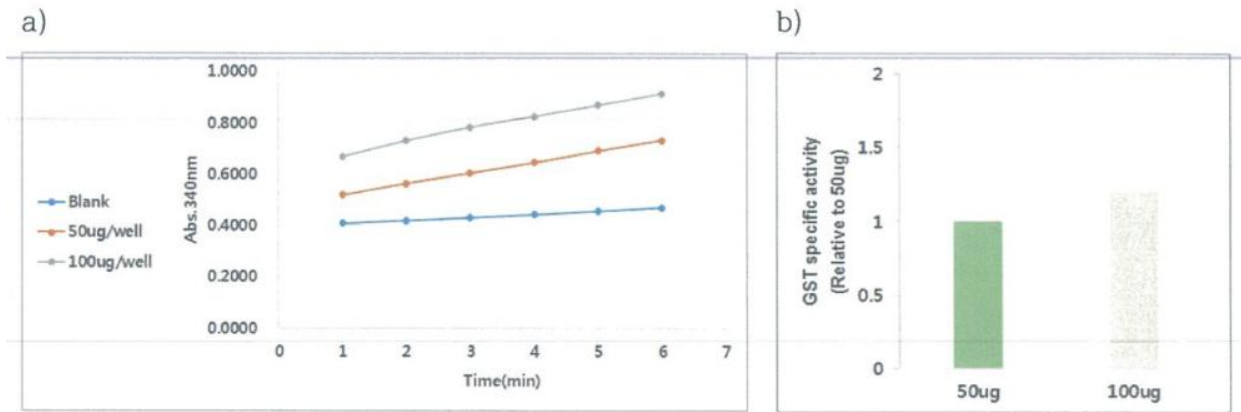


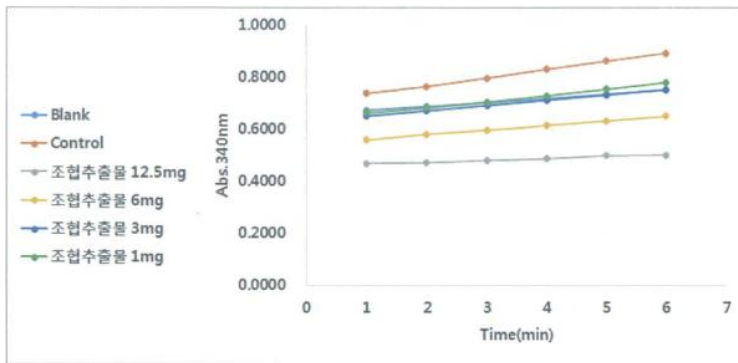
그림 51. GST 효소 활성 평가 확립

- 단백질 농도에 따른 GST 효소 활성을 비교하여보면 50 ug과 100 ug의 닭진드기 단백질 내에 GST 효소 활성의 차이가 크지 않음을 확인하였으며, 따라서 효소 저해능 평가를 위한 닭진드기 단백질 농도를 50 ug으로 결정하였다.

- 닭진드기 GST 활성에 대한 저해능을 확인하기 위해 조협복합추출물을 사용하였으며 조협복합추출물 시료는 중류수와 혼합하여 500 mg/mL로 준비하였다. 닭진드기 GST에 대한 조협복합추출물의 저해능 평가를 위해 농도 의존적으로 1, 3, 6, 12.5 mg으로 사용하였다. GST 기질을 사용하여 닭진드기 단백질 추출물(50 ug)의 GST 효소 활성과 조협복합추출물에 의한 GST 활성 저해능을 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며(그림 52a.), 이에 따른 specific activity를 수식에 따라 수치화하여 조협복합추출물 농도별로 GST 활성 저해능을 비교 분석하였다(그림 52b).

- 조협복합추출물 농도에 따른 GST 효소 활성을 비교하여보면 control(저해제 무처리군) 대비 저농도에서 고농도로 갈수록 저해 효과가 증가하여 닭진드기의 GST 효소 활성이 조협복합추출물의 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 조협 복합추출물 1 mg, 3 mg, 6 mg 처리 시 각각 약 50%, 70%, 83%의 GST 효소 활성이 감소되는 것을 확인하였으며, 12.5 mg에서는 닭진드기 GST 효소의 활성이 완전히 억제됨을 확인하였다.

a)



b)

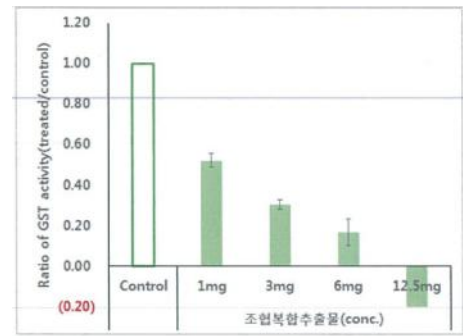


그림 52. 조합복합추출물의 GST 활성 저해능 평가 결과

- 결과적으로 닭진드기의 약제내성(살충제 저항성)과 생명유지에 필수적인 단백질로 알려져 있는 주요 효소인 Glutathione S-transferase(GST)의 효소 활성을 저해할 수 있는 살충 소재로서 조합복합추출물의 살충 효능을 in vitro에서 확인 하였고, GST에 대한 효소 활성 저해율이 약 50%~100%까지 있음을 확인하였다.
- 이후 알려져 있는 닭진드기의 GSTs (Dg-GST-1, Dg-GST-2, Dg-GST-3) 유전정보를 이용하여 재조합발현시 스템 에서 GSTs를 발현·정제한 다음 단일 GST 단백질효소에 대한 조합복합추출물의 저해 능을 확인코자 한다.

3. 닭진드기로부터 살비 분자표적(Glutathione S-Transferase(GST)) 유전자원 확보

가. Glutathione S-transferase(GST)

- 닭진드기의 Glutathione S-transferase(GST)의 유전자 확보를 위해 닭진드기로부터 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고, 이후 PCR 기법을 사용해 GSTs 유전자를 확보하고 재조합발현시스템에 클로닝하였다.

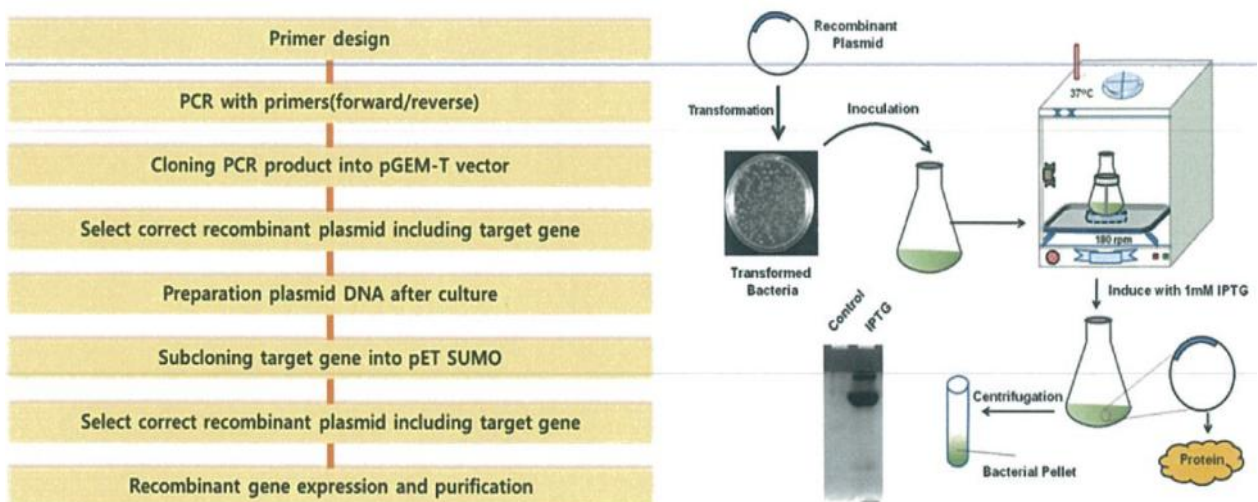


그림 53. 재조합발현시스템에 의한 분자표적 유전자 클로닝 모식도

나. GSTs (Dg-GST-1, Dg-GST-2, Dg-GST-3) 유전정보 및 유전자 클로닝

- PCR 기법을 활용하기 위해 기존에 보고된 닭진드기 GSTs 유전자의 염기서열정보를 확인하고, primer를 제작하였으며 아래 그림과 같다. 이후 PCR 산물은 pGEM-T 벡터와 pET SUMO 벡터에 각각 삽입하였으며, 올바른 재조합플라스미드는 PCR 기법 및 염기서열 분석으로 재확인하였다.

- 먼저 PCR 산물의 지속적이고 안정적인 확보를 위해 닭진드기로부터 합성한 GST-1, 2, 3의 cDNA를 주형으로 PCR한 이후 PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하였다. 올바른 재조합플라스미드 확인을 위하여 아래와 같이 PCR 기법과 염기서열 분석 장비를 활용해 재조합플라스미드를 그림과 같이 선별하였다.

<p>>KR337505.1 glutathione S-transferases-1 (GST-1) [Dermanyssus gallinae]</p> <p>>cDNA ATGGCTCCGTCCACGACGTTCGGTTACTGGAACATCCGCGGCTTAGCGCAACCGATCCGCAATCTGCTTGAGTATGTCGGCGAGGAATACGAGAAATGTCACGTATGACTTCGACACCTCGGACATGCTAACGTGCCTAAAGTCCTGGCAAAGTGGCCAGAAGCAAGACCAGCTGTCCTAAAATAGTGGGTGGAGATGGCGAAGTCGCTATGGACTTCCCTAATCTGCCTTATTTTATCGAGAAGCAGGCCGATGGCACCACGTTAAAAATGACCAGAGCGCTCGCGATACTTAAGCACATCGCTCGAAACACGGTTTGGTCGTCGAAGGCGAGCTCAACGTTGCTCGTATGGAAATGCTCGAAGAGCAGGCTATGGACCTCAAGCAGGCGATTGCAGGTTACTGCTACGATCATCCGATGACGCTCTTCCGCTACCCAAATTACACTGAAGATATTCAGGCCGATTTAAGCAGTGGGACAAGGTACTCGAGGGCCACCGAGTTCGTGATGGGCGACAAGCTTACGTATGTCGACTTCTTCTGTTGCAATTCCTCGACTGGCACCTGCCACTTAAAGCAGATATATTTGATGCTACACCAACGTAAGGCCTTCTCGAGCGCTTTCGGTCGTTGCCAAAGATTGCTGAGTATTTCCGCTCCAGCCGTTACCAGAGCTGGCCGCTCGTTAGTCCGTCGCCAAGAAATTTGGCTGGACCAAGGGCAACTGA</p> <p>Deg-GST-1-Fw: ATGGCTCCGTCCACGACGTT Deg-GST-1-Rv: TCAGTTGCCCTTGGTCCAGC</p>
<p>>KR337506.1 glutathione S-transferases-2 (GST-2) [Dermanyssus gallinae]</p> <p>>cDNA ATGGATCTCTACCATCTCGAAGCATCAGCGCCGCGCGCGCTGTGCGCTAGTCGCGCGCGCTGTTGGCCAACCGCTCAACTTGAAGACGGTCAACCTCTTCGAAAAGGAACAGCTGCAAGACTGGTTCATCAAGCTAAAATCCGCAACACACTATCCCGACTCCTGTTGACCGTGACTTTTGTCTCGCTGAGTCGCGTGCAATCATGTGCTACCTAGTCAACAAGTGCAGGCCGAGCCCGCTTTACCCTAAGTGCACAGGGCAGGGCAGCTAGTCGACAGGTATCTATACTTTGACATGGGCACCCCTCTACAAGTCCCTCGCAGAGTACTTCTACCCAAAATCATGAGTGGAGACACCCTCGATCCTGAGAAGGAGACCAAAGTGAAGGACGCGCTTGGCTTTCTGGAAGCTTTTCTTGGGGATAACGACTACCTCGTCGGCAAGGAGGTGACGCTCGCCGACATAGCGGTTGCCACATCTCTCAAAATGACTGAGGTTGATGAATTACGAGCTGCCAGCCAAGATCGACGCCCACTATAAGCGTGTGCAGAAGTTTCCACACTGGGCAGAGATTAACGATAAAGGTATCGAAGCGATGCGGGCATTCTGAAACAAGAACAGGGCTAA</p> <p>Deg-GST-2-Fw: ATGGATCTCTACCATCTCGAAGCA Deg-GST-2-Rv: TTAGGCCTGTGTTCTTGTTCAGGAA</p>
<p>>KR337507.1 glutathione S-transferases-3 (GST-3) [Dermanyssus gallinae]</p> <p>>cDNA ATGAAGCTCGGATACTGGGACATCCGCGGTCTGGGCCAGTCGATCCGATACGTAAGTACTCGCCTACAAGGAGGTGGACTTCGAGGACAAGAGGTAAGTACTCGTGGCGGGCCGCGCCGACTTCGACACGTCGCAAGTGGCTCGACGAAGAAGTTCACGCTCGGCCCTGGATTTCGCCAACCTGCCCTACCTGATCGACGGGACGTTGAAGCTCACGCAGAGCCTGGCTATTCTTCGGTACTTGGGCCGTAAGTACGATCTGGCCGGCAGCAGCTGCGAGGAGAAGCGGCAGCTCGATCTCGCCGAGCAGAGCTCACCGATTTTCGTGCGGCCTGTGTGCGGCTCTGCTATTTCGCCGACGTTCCGCGATGAACGCGAGCGGTACGAGAAGAAGCTGCCCGACCTGCTCAAGGCGTTCAGTACTTCTCCTCGGAGCGGCCGTTACTTTGCCGCGCAACATCTGACCTACGTCGACTTCTTGGCGTACGAGCTGTTCCGGAATACATCTCGTCTTCAGCAAGGCCAGCTTCGCTGACTTCAAGAACCTGACCGACTTCGTCGAACGGATAGAGGCACTGCCGACGCTCAAGAAGTACCTCGACAGCGACCGCTGTATCAAGTGGCCATTCAACGGAGACATGGCAAGCTATGGAGGACGTTCTACAAGAGAAAACCGTTTTAG</p> <p>Deg-GST-3-Fw: ATGAAGCTCGGATACTGGGAC Deg-GST-3-Rv: CTAAAACGGTTTCTTGTAGACG</p>

그림 54. GSTs의 염기서열 정보 및 primer 제작

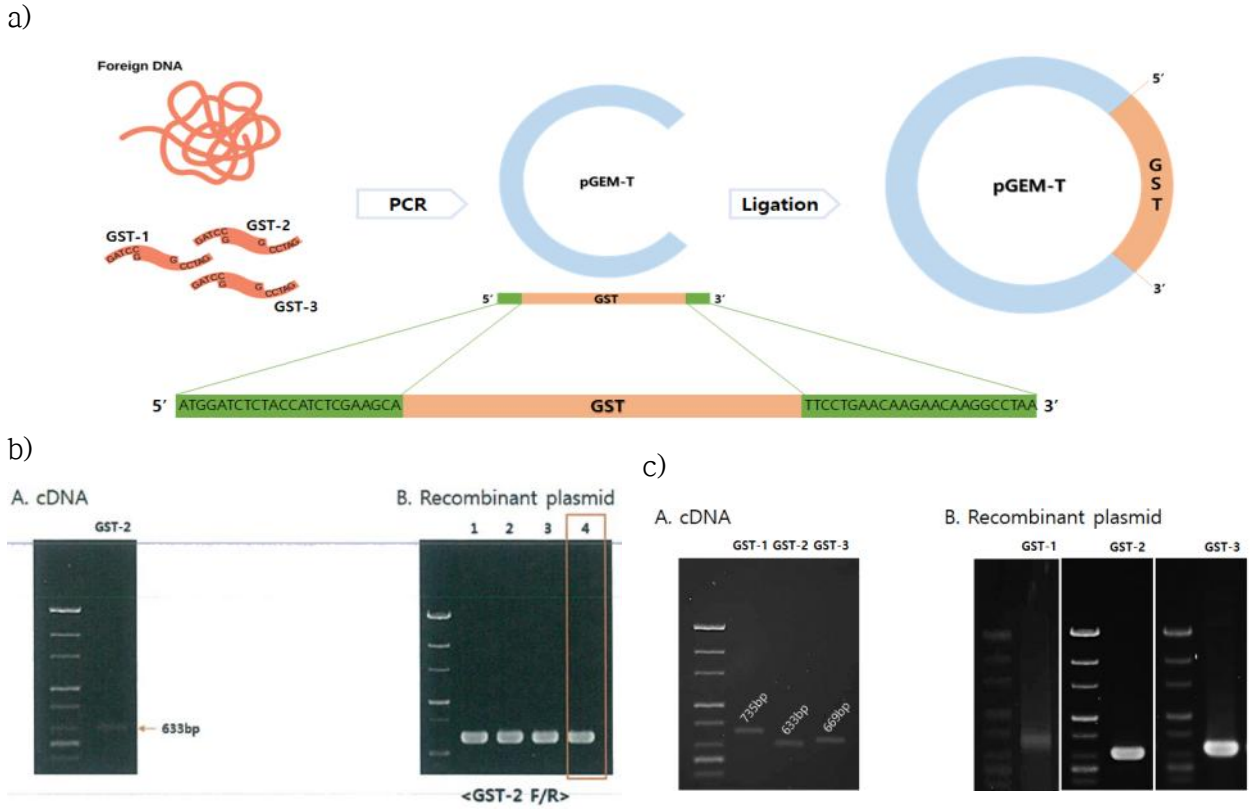


그림 55. GSTs 유전자의 pGEM-T 벡터 클로닝 결과

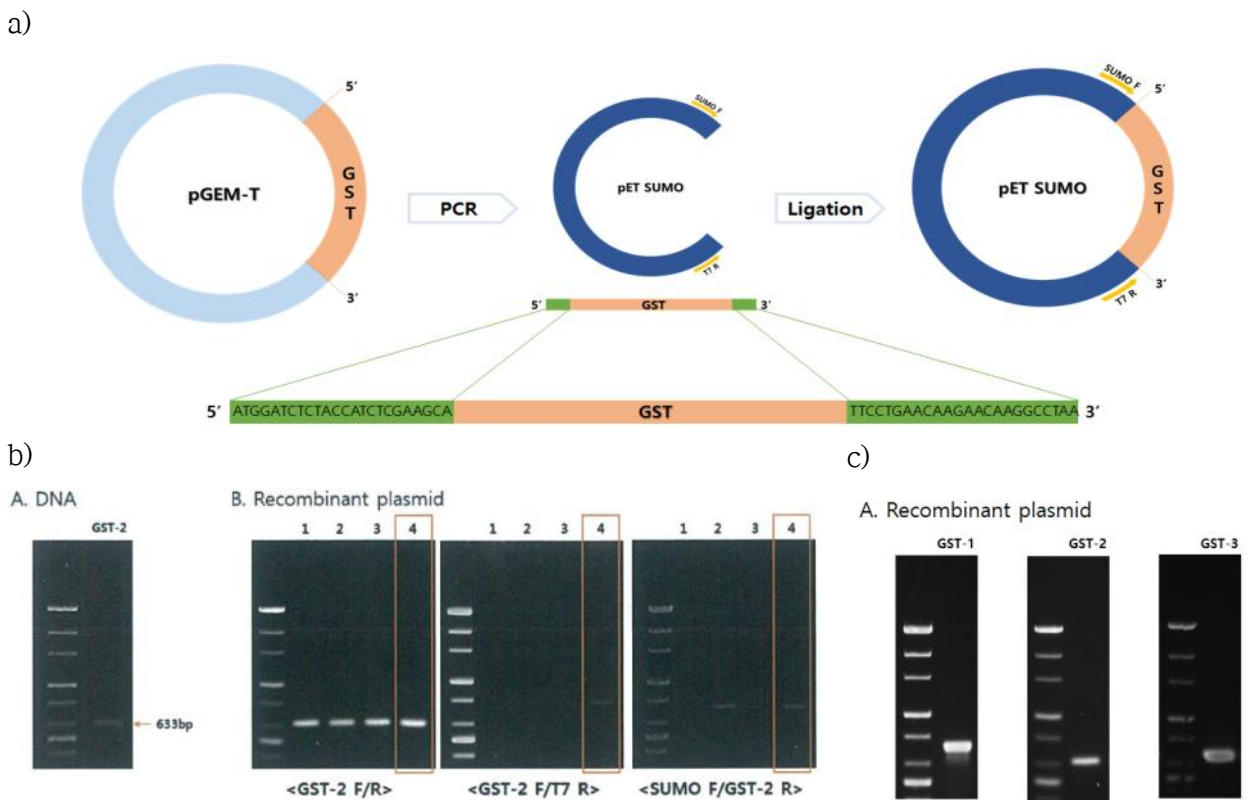


그림 56. GSTs 유전자의 pET SUMO 벡터 클로닝 결과

Ni-NTA Agarose와 혼합하여 컬럼에 부착한 후 버퍼의 Imidazole 조성에 따라 단백질을 분리·정제하였다. 이후 탈염(desalting)과정을 추가적으로 진행하고 GST 효소 활성 평가를 수행하였다.

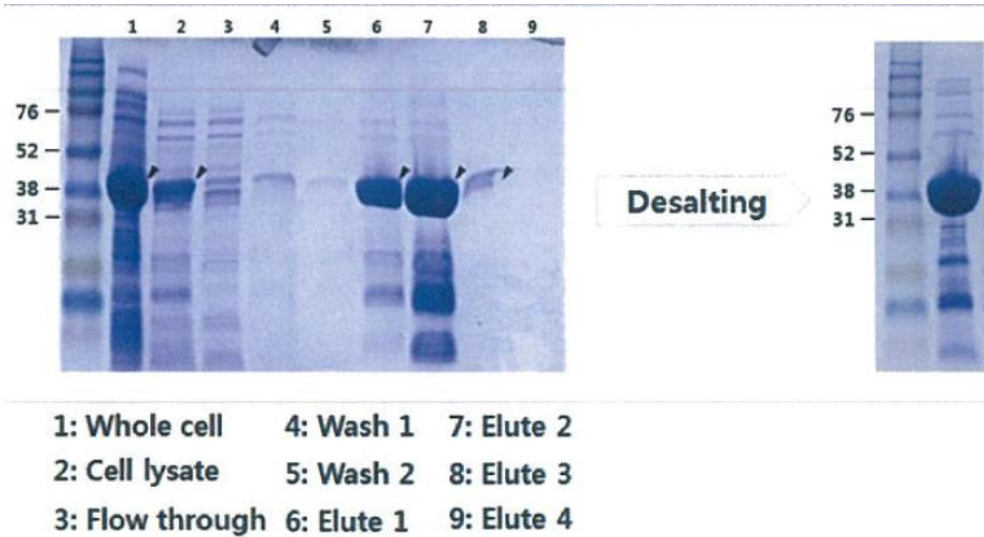


그림 58. GST-2 단백질 분리·정제 결과

라. 닭진드기 살비 분자표적 재조합 단백질의 효소 활성 검증

- 닭진드기의 살비 분자표적으로 재조합된 GST-1, 2, 3의 효소 활성을 검증하기 위하여 상기 결과에서 분리·정제하고 탈염(desalting)과정을 수행한 재조합 단백질을 사용하였다.

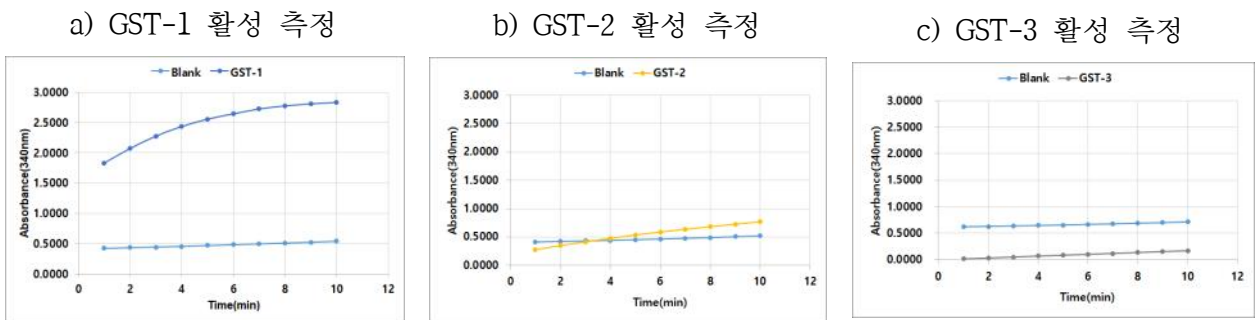


그림 59. GST-1, 2, 3 재조합 단백질의 효소 활성 측정 결과

- 닭진드기 GST-1, 2, 3 재조합 단백질 농도를 BCA 정량법으로 확인하였고, 재조합 단백질 2 μ g에 대한 활성을 측정하였다. GST는 기질인 1-Chloro-2,4-dinitro benzene(CDNB)과 glutathione의 thiol group을 이용하여 L-glutathione의 결합을 유도한다.



- 재조합 GST-1, 2, 3 활성으로 생성된 반응 산물 GS-DNB Conjugate를 340nm에서 1분 간격으로 10분간 측정한 결과는 아래와 같다. 이후 재조합 GST-1, 2, 3의 효소활성을 수식으로

로 확인하여 각각의 재조합 단백질의 GST specific activity를 비교 검증하였다.

a)

$$\text{GST specific activity: } \frac{(\Delta A_{340})/\text{min} \times V(m) \times dil}{\epsilon_{mM} \times V_{enz}(ml)} = \mu\text{mol/ml/min}$$

b)

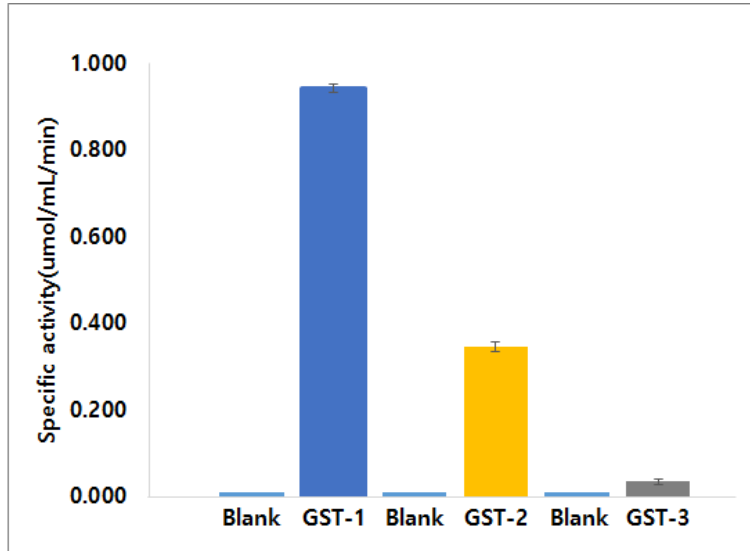


그림 60. GST-1, 2, 3 재조합 단백질의 specific activity 비교

- 재조합 GST 효소 활성을 비교하여보면 GST-1, 2, 3의 재조합 단백질 중에서 GST-1의 활성이 약 1(umol/ml/min)으로 가장 높았고, GST-2는 약 0.35(umol/ml/min)이었고, GST-3의 활성은 거의 확인되지 않았다. 따라서 GST-1, 2의 재조합 단백질을 사용하여 조협복합추출물 및 이의 분획물과 화합물에 대한 효소 활성을 평가하였다.

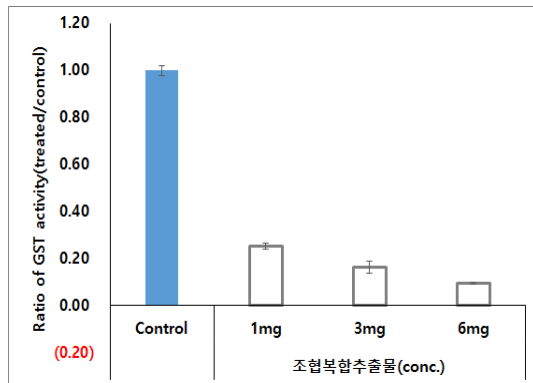
마. 조협복합추출물의 분획물에 대한 재조합 단백질의 효소 활성 저해 평가

- 먼저 GST 효소 활성이 검증된 닭진드기의 GST 재조합 단백질(GST-1, 2)을 이용하여 1차년도에 살비 효과를 확인하였던 조협복합추출물의 GST 효소 활성 저해를 평가하였다. 이후 조협복합추출물의 분획물을 (재)경기도경제과학진흥원으로부터 총 6종 수령하였다. 이를 사용하여 우선 total GST 효소 활성에 대한 분획물과 분획물에서 확보한 화합물의 저해능을 평가하였다. 그리고 재조합 단백질(GST-1, 2)을 이용하여 효소 활성 저해 평가를 진행하였다.

- 조협복합추출물에 대한 닭진드기의 GST 재조합 단백질(GST-1)의 효소 활성 평가 결과 조협복합추출물을 농도 별로 처리하였을 때, 저농도(1mg/mL)에서부터 약 75%의 GST 효소 저해능을 확인 할 수 있었다.

- 조협복합추출물에 대한 닭진드기의 GST 재조합 단백질(GST-2)의 효소 활성 평가 결과 조협복합추출물을 농도 별로 처리하였을 때, 저농도(1mg/mL)에서부터 약 40%의 GST 효소 저해능을 확인 할 수 있었다.

a) GST-1



b) GST-2

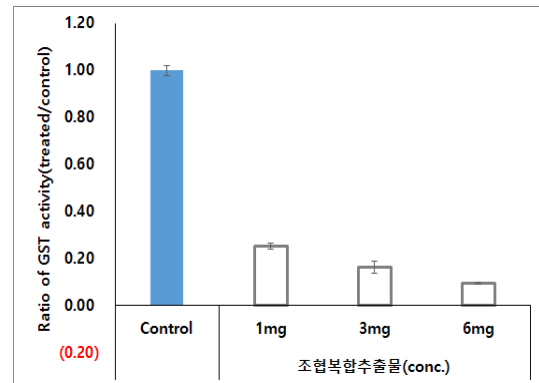


그림 61. 조합복합추출물의 GST-1, 2 재조합 단백질 활성 저해능 평가 결과

- 조합복합추출물 분획은 총 6종(Extract, Hx, MC, EA, BuOH, Water)이었고, total GST에 대한 효소 활성을 평가하기 위해 DMSO에 용해하여 최종 농도 10ug/mL로 각각의 분획물을 처리하였다.

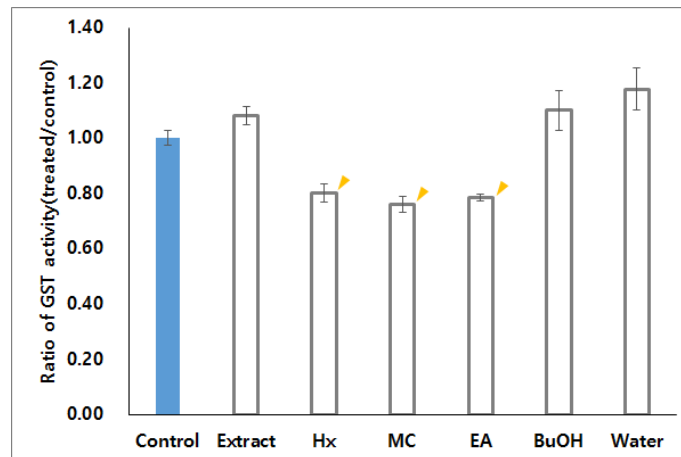


그림 62. 조합복합추출물의 분획물 6종의 total GST 활성 저해능 평가 결과

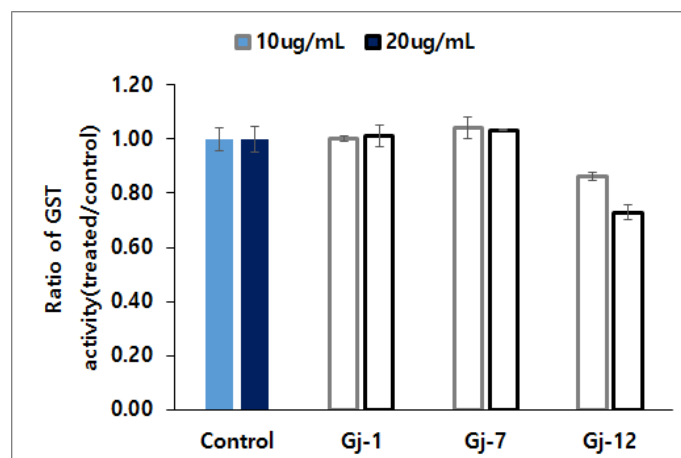


그림 63. 조합복합추출물의 화합물 3종의 total GST 활성 저해능 평가 결과

그림 편집

- GST 활성 저해능이 높은 조협복합추출물의 핵산 분획물(Hx)에서 Gj-1(compound 8), Gj-7(compound 7), Gj-12(compound 9) 화합물을 (재)경기도경제과학진흥원으로부터 전달받았다. 총 3종의 용해도를 달리하여 total GST에 대한 효소 활성을 평가하였으며, 최종 농도 10ug/mL과 20ug/mL로 각각의 화합물을 처리하였다.
- 결과적으로 닭진드기 살비제로서 조협복합추출물은 닭진드기 유래 total GST 단백질과 재조합 단백질 GST-1, 2의 효소 활성을 저해하는 것으로 확인하였다. 또한 상기 결과를 통해 확보한 조협복합추출물의 분획물 중 Hx, MC, EA 분획물에서 total GST 활성 저해능이 가장 좋았고 약 20~25%의 저해능을 확인하였다.
- 이를 토대로 분획물에 대한 화합물을 추가 3종 수령하였으며, DSMO 및 DEF를 이용하여 용해도 평가를 진행하였지만 완전히 용해되지 않아서 잔여물을 제거하고 사용하였다. 또한 일부 화합물의 경우 분획물과 동일한 농도에서 효과를 확인하지 못하여 농도를 더 높여 추가실험을 진행하였다. Gj-1(compound 8), Gj-7(compound 7), Gj-12(compound 9) 화합물 중에서 Gj-12(compound 9)만 total GST 활성 저해능이 확인되었고, 10ug/mL일 때 약 15%, 20ug/mL일 때 약 25%의 저해능을 확인하였다.
- 그러나 조협복합추출물에서의 저해 효과가 검증되었던 닭진드기 유래 GST-1, 2 재조합 단백질을 이용한 저해능 평가 결과에서는 분획물 및 화합물에서 효소 활성 저해가 확인되지 않았다(data not shown). 이는 닭진드기 유래 재조합 단백질 GST-1, 2가 닭진드기의 total GST 중 유전정보가 알려져 있는 일부에 해당하며, 조협복합추출물 또한 일부 분획물 및 화합물에서 닭진드기 내 모든 GST 효소 활성 저해능을 보여주지 못하는 것으로 사료되어진다. 이러한 결과를 바탕으로 추가적인 닭진드기의 GST 유전자원을 연구 개발하고 저해 특이성이 높은 추출 분획물의 추가적인 발굴이 필요할 것이다.

라. 조협복합추출물의 분획물에 대한 Acetylcholinesterase(AChE)의 활성 저해능 평가

- 1차년도에서 닭진드기 AChE에 대한 조협복합추출물의 저해능 평가에 따른 살비 효과를 확인한 바, 조협복합추출물의 분획물 6종에 대해서도 AChE 활성 저해능을 평가하였다.

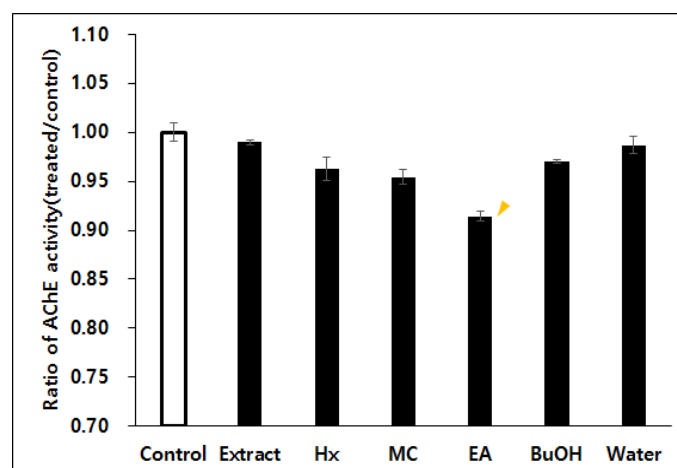


그림 64. 조협복합추출물의 분획물 6종의 AChE 활성 저해능 평가 결과

- 조협복합추출물 분획물은 총 6종(Extract, Hx, MC, EA, BuOH, Water)이었고, 닭진드기의

AChE에 대한 효소 활성을 평가하기 위해 DMSO에 용해하여 최종 농도 10ug/mL로 각각의 분획물을 처리하였다.

- 결과적으로 조합복합추출물의 분획물에 대한 GST 활성 저해능의 결과와는 약간 상이하며, 가장 효과가 좋은 분획물은 약 10%의 AChE 활성 저해능이 있는 EA였다. 이러한 결과를 바탕으로 EA에서 분리한 화합물을 추가 확보 및 연구 진행을 한다면, AChE 효소의 활성 저해 뿐만 아니라 GST 효소 저해능을 갖는 신규 물질을 확보해 결과적으로 닭진드기 살비제로서의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

4. 닭진드기로부터 살비 분자표적(Acetylcholinesterase) 선별

- Roy 등은 프랑스 여러 지역의 양계장에서 닭진드기를 채집하여 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase, AChE) 억제물질인 diethyl paraoxon(유기 인산 화합물)을 처리하여 각 지역에서 채집된 닭진드기의 아세틸콜린에스테라제 활성 저해능을 비교 분석하였다. 각 지역 닭진드기군에서 계통적다양성(polymorphism)에 의한 효소활성의 억제 차이가 나타났지만 아세틸콜린에스테라제 저해인자에 대한 약제내성(저항성)을 가지는 닭진드기군은 확인 할 수 없었다. 이는 닭진드기의 아세틸콜린에스테라제가 살충표적으로서 매우 가능성 있는 분자표적으로 간주된다. 조합추출물의 GST 단백질 저해능과 더불어 아세틸콜린에스테라제에 대한 저해능력을 확인하기 위해 닭진드기 전단백질(닭진드기의 아세틸콜린에스테라제 유전자는 미동정 상태. 따라서 아세틸콜린에스테라제의 활성 저해평가를 위해 전단백질 사용) 추출물을 대상으로 활성 저해평가를 실시하였다.

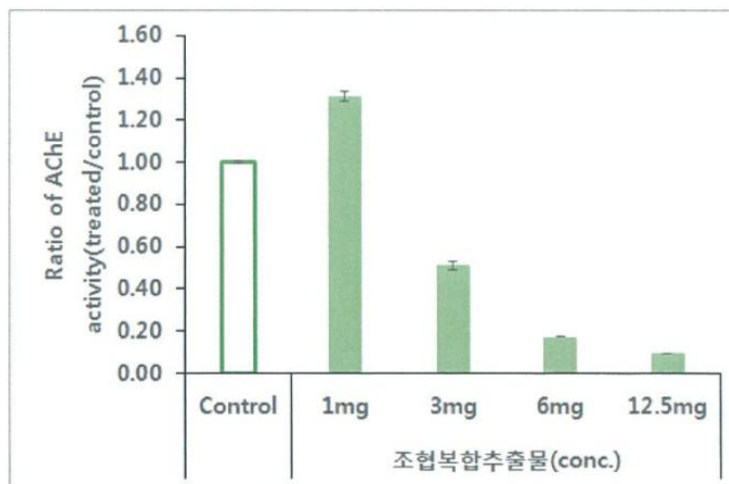


그림 65. 조합복합추출물의 AChE 활성 저해능 평가 결과

5. Acetylcholinesterase(AChE)의 활성 저해능 평가

- 닭진드기 AChE 활성에 대한 저해능을 확인하기 위해 조합복합추출물을 증류수와 혼합하여 500 mg/mL로 준비하였다. 닭진드기 AChE에 대한 조합복합추출물의 저해능 평가를 위해 농도 의존적으로 1, 3, 6, 12.5 mg으로 사용하였다. AChE 기질을 사용하여 닭진드기 단백질 추출물(50 ug)의 AChE 효소 활성과 조합

- 복합추출물에 의한 AChE 활성 저해능을 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이에 따른 specific activity를 수식에 따라 수치화하여 조합복합추출물 농도별로 AChE 활성 저해능을 비교 분석하였다.

- 조협복합추출물 농도에 따른 AChE 효소 활성을 비교하여보면 control(저해제 무처리군) 대비 저농도에서 고농도로 갈수록 저해 효과가 증가하여 닭진드기의 AChE 효소 활성이 조협복합추출물의 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.
- 조협복합추출물 3 mg 처리군부터 12.5 mg 까지 각각 약 45%, 18%, 10%의 AChE 효소 활성이 감소되는 것을 확인하였으며, 12.5 mg에서는 닭진드기 AChE 효소의 활성이 거의 억제됨을 확인하였다.
- 닭진드기의 AChE 활성에 대한 저해능을 확인하기 위해 compound 8, compound 9를 DMSO에 용해하여 농도를 10, 20 µg/mL으로 compound를 처리하였다. AChE 기질을 사용하여 닭진드기 단백질추출물(50µg)의 AChE 효소 활성과 compound 8, compound 9에 AChE의한 활성 저해능을 570nm에서 흡광도를 측정하였다.
- compound 8, compound 9의 농도에 따른 Acetylcholinesterase(AChE) 활성을 비교해보면 compound 8은 control 대비 처리 농도가 높아질수록 저해하는 것을 확인 할수 있었고, compound 9는 10 µg/mL 일 때 효능이 미비했으며 20 µg/mL일 때 약 25%의 저해능을 확인하였다.

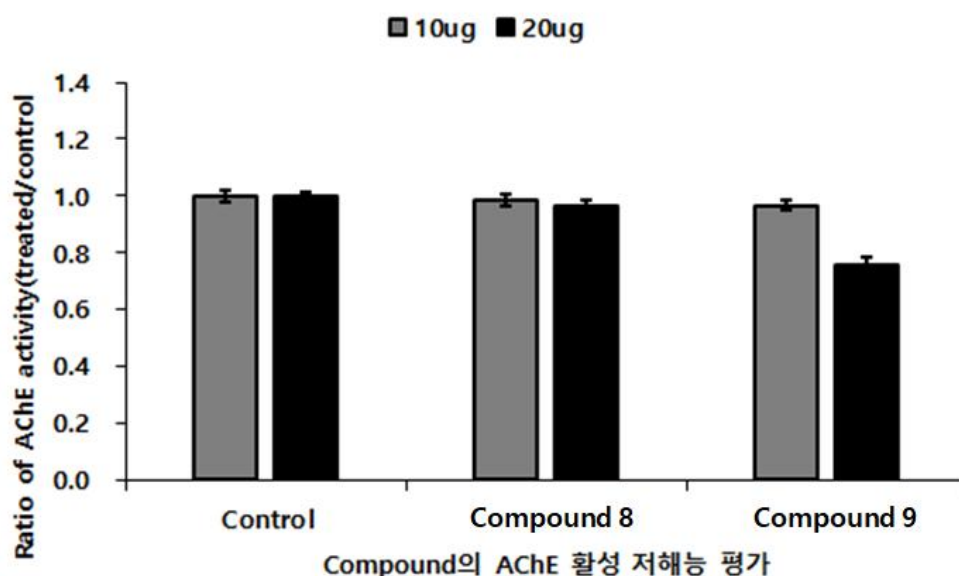


그림 66. compound 8 과 9의 AChE 활성 저해능 평가 결과

- 약제내성 단백질 GST와 신경전달물질 분해효소 AChE의 작용억제는 직간접적인 살충(비)효과를 가져오는 것으로 잘 알려져 있다. 결과적으로, 조협추출물은 닭진드기의 약제내성(살충제 저항성)의 S-transferase(GST)의 효소 활성 뿐 아니라 신경효소 AChE의 작용을 억제함으로써 외래독성에 대한 약제저항성의 감소와 신경근접합부에 분해되지 못하는 아세틸콜린이 과잉 축적되어 결국 신경전달이 마비됨으로서 생리작용의 불균형으로 살충(비)효과를 나타내는 것으로 추정된다.

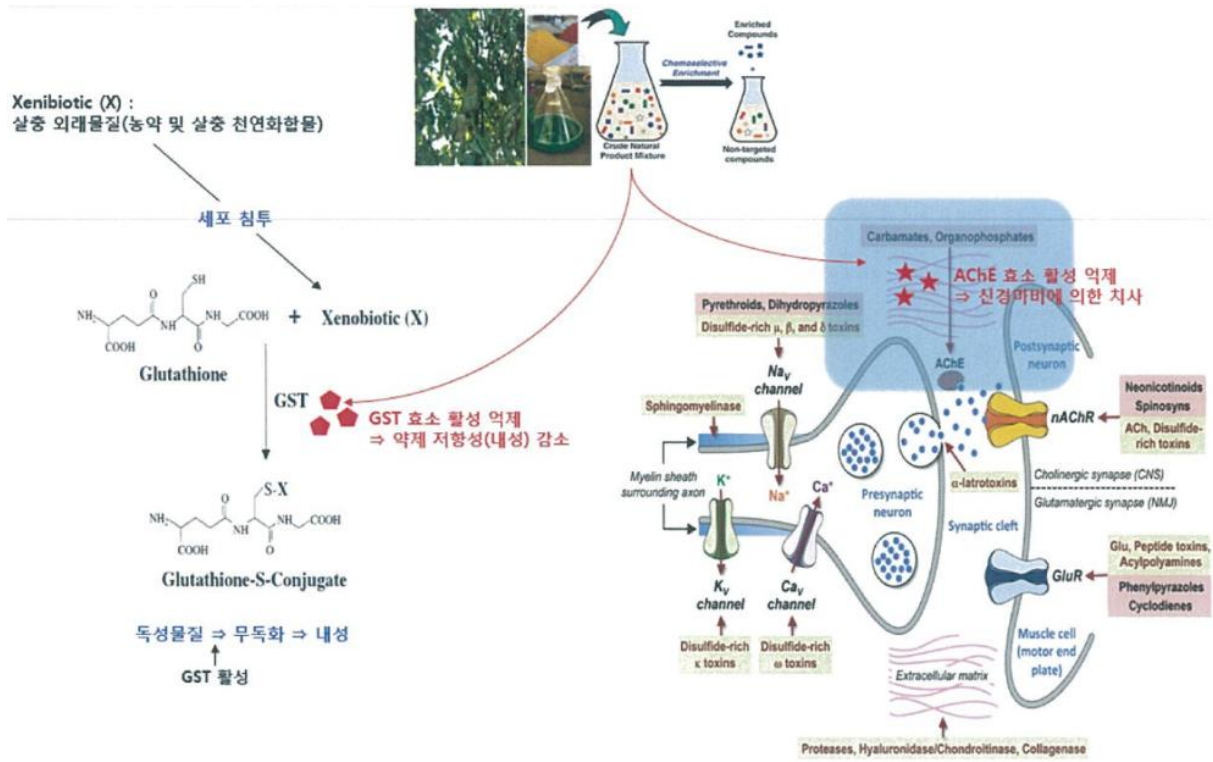


그림 67. 닭진드기 GSTS와 AChEs 활성억제 모식도

제 6 절 조협복합추출물 유효성 평가 및 안전성 평가

1. 조협복합추출물에 대한 필드 유효성 및 지속기간 평가

가. 야외적용시 유효성평가

1) 시험농장

- 남양양계농장/경기도 화성시 남양읍 온석서길 108/ 50,000수

2) 동물 중

- 산란계 3,000수, 36주령

3) 시험군의 구성

표 23. 조협복합추출물 제제 시험군의 구성

시험군	처리내용	동물 수
정상 대조군	무처리군	1,000
조협복합추출물 제제 1배농도 투여군	조협복합추출물 제제 200배 희석액 처리	1,000
조협복합추출물 제제 2배농도 투여군	조협복합추출물 제제 100배 희석액 처리	1,000

4) 시험 방법

가) 약제살포

- 제품 처리는 닭진드기가 감염된 계사 내에 닭이 있는 상태에서 농도별로 계사에 살포하며, 1배 농도와 2배 농도를 닭 10,000수 당 250 L 살포, 7일 간격으로 2회 살포한다. (Meyer-Kühling B, 2007, Field efficacy of phoxim 50% (ByeMite) against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* in battery cages stocked with laying hens).

- 본 제품을 살포시 (주)한일에스피 압축분무기(HS-310)를 이용하며, 살포할 때에는 케이지 바깥부분을 골고루 뿌려주고, 케이지 천장, 바닥, 안쪽, 밥통아래, 케이지 밑부분, 좁은 틈 등 골고루 살포한다.

나) 닭진드기 사멸 수

- 트랩 모니터링 및 계사관찰 스코어링 방법 사용한다. 트랩의 경우 각 실험군별 10개 이상의 트랩을 사용하여 관찰한다. 트랩은 각 동의 집란 벨트 주변, 사료통 아래와 주변, 에어덕트 주변위치에 설치한다. 약제 살포 전 1주간의 트랩설치 후 밀도를 측정한다. 2차 약제 처리 후 2주 간격으로 2개월까지 트랩의 진드기 성충 마리수를 세어 진드기의 숫자를 확인한다.

- 시험농장 실험결과 대조군과 비교하여 진드기 감소율 확인한다.



그림 11. 약제 살포



그림 12. 설치된 닭진드기 트랩



그림 13. 회수한 닭진드기 트랩

5) 시험 결과

가) 조합복합추출물 제제

- 처리 전 설치한 트랩에서 닭진드기의 밀도를 확인한 후, 7일 간격으로 2회 살포 하고 닭진드기의 밀도를 파악하였다. 실험 결과, 처리 직후에 1배 농도 처리군은 평균 169.6 마리, 2배 농도 처리군에서는 평균 65.1마리의 닭진드기를 확인함. 조합복합추출물 제제의 닭진드기 감소율은 96.8~93.3%로 확인하였다.

표 24. 조합복합추출물 제제에 대한 필드 유효성 시험 결과 (닭진드기 수)

	처리 전	처리 직후	처리 후 14일	처리 후 28일	처리 후 42일	처리 후 56일
무처리	1246.3	1399.5	1535.3	1433.7	1518.3	1545.6
조합복합추출물 1배 처리군	1326.0	169.6	104.6	96.5	256.9	634.7
조합복합추출물 2배 처리군	1263.3	65.1	48.5	58.1	118.9	231.7

나. 혼합물질의 야외적용시 지속성 파악

- 약제 처리 42일 후에 닭진드기 밀도가 점점 높아지는 경향을 보인다. 조합복합추출물 제제의 현장에서 지속성은 약제 처리 후 약 28일까지 지속되는 것을 확인하였다.

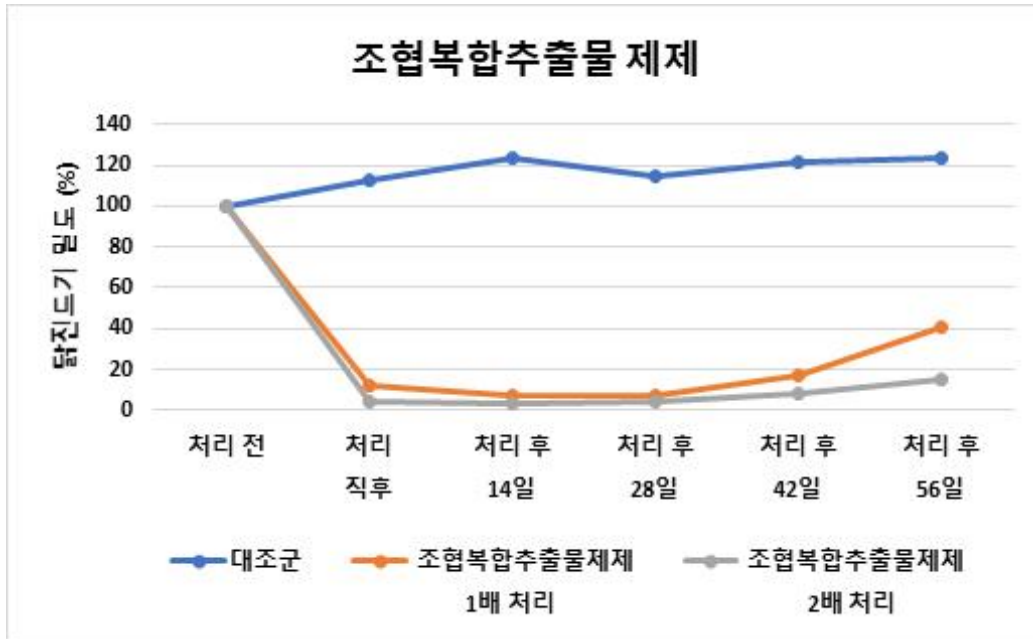


그림 14. 조합복합추출물 제제에 대한 필드 지속성 시험 결과

2. 습도와 환경에 따른 적정 사용조건 평가

가. 항온항습기를 이용한 습도조건에서 물리적 상상 확인 및 유효성 평가

1) 조건

- 균 구성: 3 petri dish (n=40~50)
- 살포방법: 조합복합추출물 제제 100, 200배 희석액을 케이지 당 15~16회 스프레이분사
- 실험 확인: 대상물질을 살포한 후 24시간 뒤 확인
- 온도: 27도
- 습도: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%

2) 실험결과

표 25. 습도조건에서의 담진드기 유효성 평가

	50 %	60 %	70 %	80%	90%
100배 희석액	95.5 ± 8	96.2 ± 3	95.6 ± 4	94.7 ± 6	92.6 ± 8
200배 희석액	83.1 ± 6	81.6 ± 2	83.4 ± 6	82.8 ± 7	81.8 ± 8

- 습도에 따른 살충력 및 정상 확인한 결과, 습도에 따른 성상의 변화는 전혀 없었으며, 습도에 따른 살충력 또한 차이가 없었다.

나. 바람조건에서의 유효성 평가

1) 조건

- 균 구성: 3 petri dish (n=40~50)
- 살포방법: 조합복합추출물 제제 100배, 200배 희석액을 케이지 당 15~16회 스프레이분사
- 실험 확인: 대상물질을 살포한 후 24시간 뒤 확인

- 온도: 27도
- 습도: 50~60%
- 살포 후 미니선풍기를 이용하여 1시간 바람조건

2) 실험결과

표 26. 바람조건에서의 닭진드기 유효성 평가

	100배	200배
조협복합추출물 제제 (바람 X)	96.4 ± 6	82.0 ± 4
조협복합추출물 제제 (바람 O)	84.3 ± 10	51.4 ± 15

- 바람조건에서의 유효성 평가 결과, 바람에 의한 살충력 저하를 확인하였다. 산란계 온도조절으로 인한 공기 순환 시스템으로 인해 바람 발생이 잦다. 이러한 환경으로 닭진드기 방제제의 효력저하를 일으킬 수 있을 가능성이 높아 보인다.

3. 약제 적용방법과 모니터링 및 투약시기 판단, 처치방법, 처치 후 사후관리법 판단

가. 투약 후 주기적 모니터링 방법 확립

- 투약 후 주기적인 관찰로 닭진드기의 밀도를 파악하고, 부분적인 모니터링으로 부분적인 처치가 가능하다. 농가에서 손쉽게 할 수 있는 방법은 먼지 관찰법(dust inspection)이며, 육안 관찰법(night inspection)과 트랩을 사용한 방법이며, 정기적으로 농가 또는 관리수의 사에 의해 지도되어 실행하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

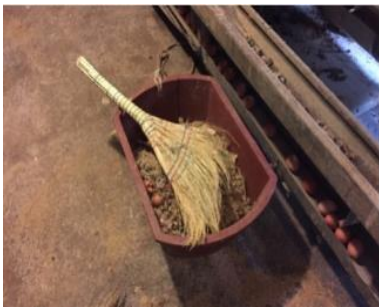


그림 15. 먼지 관찰법 1
계사바닥의 먼지를 모은다.



그림 16. 먼지 관찰법 2
10cm 이상 먼지 위에 종이를 하루 정도 올려두고 관찰한다.



그림 17. 먼지 관찰법 3
종이에 붙은 닭진드기의 마리수를 파악한다.



그림 18. 벨크로 트랩



그림 19. 파이프 트랩



그림 20. 골판지 트랩

나. 혼합물질 투약방법과 관리중점 포인트 확인

1) 혼합물질 투약방법

- 올바른 방제를 위해서는 반드시 사용지침을 지켜야 하는데, 가장 중요한 요소는 처치 시기, 용법·용량, 처치방법이다.
- 처치 시기는 모니터링 이후 진드기가 발견된 가능한 빠른 시기에 처치하는데, 부분처치가 가능하다면 반복적인 부분처치가 모든 면에서 편하고 효과적이다.
- 용법 용량은 국내 농가의 경우 대부분 동력식 분무기를 사용하여 무창계사를 기준으로 10,000수당 300~500리터의 물량을 사용한다. 하지만, 닭이 충분히 젖을 농도의 물량이므로 약해가 우려되며 직립식 계사의 경우 물량이 많아지면 사료통으로 들어갈 확률이 높아지므로 반드시 화학제의 처치 전에는 사료와 계란을 제거한 후 처치해야 한다.
- 처치방법은 대부분 동력식 분무기를 20바 이하의 저압으로 하거나 넓게 퍼지는 단일 노즐을 사용하지만, 권장사항은 계사전용 노즐을 개발하여 중요 처치부위에 맞도록 전용 분무기를 만드는 것이다. 주요한 처치부위는 닭진드기가 숨을 수 있는 사료통의 아래 부분과 덕트 안쪽 면이며, 닭에게 약해가 최소화할 수 있는 노즐 각도를 지켜야 한다.



그림 21. 계사구조에 맞는 전용분무기



그림 22. 계사구조에 맞는 전용노즐

2) 관리중점 포인트

- 가) 닭진드기의 습성 상 모든 곤충은 위쪽으로 올라가는 습성이 있다. 즉, 닭진드기가 계사 아래보다는 윗부분에 있을 가능성이 많다.
- 나) 터널식 환기구조상 앞보다 뒤에 먼지가 많이 집약된다. 계사 앞보다는 뒤에 항상 닭진드기가 많다.
- 다) 닭들의 활동으로 닭진드기가 바닥에 떨어진 후 다시 케이지로 올라간다. 바닥에 진드기 개체들이 존재한다.



그림 23. 닭진드기가 쉽게 살 수 있는 장소

다. 사후 관리 방법 확립

○ 계사 간 출입 시 옷 갈아입기 - 계사 초입에 장화는 반드시 비치한다. 발판소독조 보다는 장화를 갈아 신는 방법이 효과적이며 편리하다. 또한, 동마다 일회용 방역복을 비치하여 그 동에 출입하는 모든 인원은 현재의 복장에 추가로 입도록 교육해야 한다. 일회용 방역복은 세탁한 후 재사용이 가능하므로 여러 벌을 비치해서 사용하면 된다.

○ 에어블로워 가동 - 계분건조용 에어블로워는 24시간 가동해야 한다. 특히, 겨울철 밤에 에어블로워를 끄고 낮에만 가동을 할 경우에 닭진드기는 밤에 에어블로워 안에서 서서히 증식해, 에어블로워를 가동하면 순식간에 계사 전체로 끌고루 퍼져나간다. 날씨가 따뜻해지는 시점에 계사 전체에서 빠른 속도로 닭진드기가 증식한다면 에어블로워 안쪽의 오염을 의심해야 한다.

○ 습도를 가능한 낮게 유지 - 닭은 높은 습도보다는 낮은 습도에서 강한 동물이며 더위 보다는 추위에 강하다. 계사내부는 가능하면 낮은 습도를 유지해야 한다. 물이 누수 되거나 공기가 정체되는 구역을 찾아 습도를 해결해야 한다. 닭진드기는 좁고 습하고 어두운 틈을 가장 선호하기 때문에 습도가 낮을수록 증식이 억제된다.

○ 바닥은 주 2회 청소 - 닭들이 퍼덕이면 닭진드기는 계사에서 바닥으로 자유낙하 한다. 밀도가 높은 계사에 들어가면 바닥에서 닭진드기를 많이 볼 수 있다. 바닥에서 다시 케이지로 전파되며 작업자의 신발과 옷을 통해 다른 계사로 이동한다. 바닥은 주 2회 이상 먼지청소를 해야 하며, 케이지 안쪽부분까지 먼지를 다 꺼내어 청소하기를 권장한다. 물청소 보다는 주기적인 먼지청소가 가장 바람직하다.

○ 쥐와 조류로부터 모든 구역 폐쇄 - 가장 현실화하기 어려운 부분이며, 대부분 유창계사에서는 불가능에 가깝다. 다만, 베이트스테이션(bait station ; 쥐약을 넣는 통)을 두고 정기적으로 점검하면서 밀도를 줄이는 노력을 하지 않으면 농장의 닭 숫자와 비슷한 숫자의 쥐를 함께 사육하게 될 것이다. 설치류 구제는 역시 전략적이고 지속적인 노력을 해야 밀도를 줄일 수 있기 때문에 꾸준한 관리와 전문가의 조언이 필요하다.

4. 조합복합추출물 혼합제의 개별 잔류성 평가

- [농림축산검역본부고시 제2018-5호, 고시, 2018. 2. 22.]에 의거하여 동물용의약품등 안전성·유효성 심사에 관한 규정의 제 2장 6조 첨부자료의 생략의 내용에 따라 동물의 체내에 남아 사람의 건강에 위해를 끼칠 가능성이 없는 별표6의 동물용의약품 중 사용방법 등이 적정하게 설정되어 안전성이 인정되는 경우에는 잔류에 관한 자료를 면제할 수 있다.

- 본 제품의 주성분인 고삼추출물, 조협추출물은 생약제로 구분되므로, 사람이 섭취하거나 의약품의 원료로 사용되는 생약이며, 잔류에 관한 자료를 면제하는 동물용의약품 목록에 포함되어 있다.

5. 조협복합추출물 혼합제의 개별 안전성 평가

가. 공시 제품

- 명 칭 : 조협추출물 (가칭)
- 성상 및 제형 : 어두운 갈색의 반투명 액
- 조 성 : 고삼추출물 ----- 700g
 : 조협추출물 ----- 200g
 (본제 1L 중) : 부형제 ----- 100g
- 용법 및 용량 : 물 200 L 당 본제 1 L를 (200배 희석) 혼합하여 진드기가 있는 계사에 살포한다. 닭 10,000수 당 희석액 250 L 수준으로 살포 (1m² 당 500 mL)하며, 7일 간격으로 2회 투여하여야 효과적으로 진드기의 밀도를 낮출 수 있다.

나. 안전성 평가 (독성시험)

1) 급성 경구 독성 시험

가) 시험계

- 계통 및 종 : NTac:Sprague-Dawley Rat, SPF
- 생산업체 : 대한바이오링크
충북 음성군 삼성면 덕호로 277
- 공급업체 : 하나바이오
경기도 수원시 팔달구 덕영대로 697번길 47
- 동물 주령 및 수 : 7주령, 암컷 27마리
(입수시) 7주령, 수컷 27마리
- 동물 주령 및 수 : 8주령, 암컷 25마리
(투여시) 8주령, 수컷 25마리
- 시험계 선택이유 : 본 시험에 사용할 SD 랫드는 단회 및 반복투여 독성시험 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 본 계통에 관한 풍부한 시험 기초 자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

나) 시험군의 구성

- 시험군의 구성은 아래와 같이 구성하였다.

표 27. 안전성(급성 경구 독성) 평가 시험군

시험군	시험물질	성	동물번호 (두수)	투여용량 (mg/kg bw ^a)	투여액량 (mL/kg bw ^b)
1군 (용매대조군)	멸균증류수	수컷	1101 ~ 1105 (5)	0	20
		암컷	2101 ~ 2105 (5)		
2군	조합추출물제제 (에코와구)	수컷	1206 ~ 1210 (5)	250	20
		암컷	2206 ~ 2210 (5)		
3군	조합추출물제제 (에코와구)	수컷	1311 ~ 1315 (5)	500	20
		암컷	2311 ~ 2315 (5)		
4군	조합추출물제제 (에코와구)	수컷	1416 ~ 1420 (5)	1,000	20
		암컷	2416 ~ 2420 (5)		
5군	조합추출물제제 (에코와구)	수컷	1521 ~ 1525 (5)	2,000	20
		암컷	2521 ~ 2525 (5)		

^a: 체중 kg 당 투여한 제품용량, ^b: 체중 kg 당 투여한 용액량

다) 투여용량 설정근거

- 시험군은 투여한계용량인 2000 mg/kg bw을 최고용량으로 공비 2로 하여 1000 mg/kg bw, 500 mg/kg bw, 250 mg/kg bw으로 용량단계를 설정하였다. 용매대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제(멸균 증류수)를 투여하였다.

라) 투여방법

- 투여 경로 : 경구
- 투여 횟수 : 1회/일, 단회투여
- 투여액량 산출 : 투여액량은 20 mL/kg bw으로 하고, 투여 당일 체중을 기준으로 투여액량을 산출하였다.
- 투여 방법 : 투여 전날 12~13시간 절식시킨(음수 제외) 동물에 조제물질을 경구 투여용 주사기(존데)를 이용하여 위내에 1회 강제 투여한 후 4시간 후부터 사료를 재공급 하였다.

마) 관찰 항목

- 일반증상 관찰 (사망률 및 임상증상), 체중측정, 사료 및 음수 섭취량 측정 및 부검 소견
- 반수치사량(Lethal Dose 50, LD₅₀) 산출

바) 결과

- 조합추출물제제(에코와구)의 급성 경구노출에 의한 독성양상 및 독성강도를 알고자 SD 랫드 암컷과 수컷 모두에 조합추출물제제(에코와구)을 단회 경구 투여한 후 14일간 사망, 빈사동물 발생여부, 임상증상, 체중변화, 사료 및 음수 섭취량을 관찰하고, 관찰 기간 종료 후 부검하여 개체 별로 이상 여부를 검사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

(1) 사망률

- 조협추출물제제(에코와구) 투여 후 1시간내에 1000 mg/kg bw 투여군 수컷 1마리와 2000 mg/kg bw 투여군 수컷 1마리, 암컷 1마리가 사망하였고, 투여 후 4시간이내에 2000 mg/kg bw 투여군 암수 각각 2마리가 사망하였다.

표 28. Mortality after the treatment of test substance

Dose group	Sex	No. of Animals	Number of death						Mortality (%)
			D0	D1	D 2	D 3	D 4	D7 ~ 14	
VC	Male	5	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
조협추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Male	5	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
조협추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Male	5	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
조협추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Male	5	1	0	0	0	0	0	1/5 (20)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
조협추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Male	5	3	0	0	0	0	0	3/5 (60)
	Female	5	3	0	0	0	0	0	3/5 (60)

VC: Vehicle Control (Sterilized DW)

∴ death

(2) 임상증상

- 조협추출물제제(에코와구)투여 후 30분 이내에 500 mg/kg bw, 1000 mg/kg bw 및 2000 mg/kg bw 투여군의 입모, 진전 또는 경련 등이 관찰되었으며, 투여 후 1시간 이내에 100 mg/kg bw 투여군 수컷 1마리와 2000 mg/kg bw 투여군 암수 각각 1마리가 사망하였다.
- 조협추출물제제(에코와구) 500 mg/kg bw 투여군의 경우 투여 후 2시간째까지 일부개체에서 진전이 관찰되다가 3시간 이후부터는 모든 개체에서 진전이 관찰되지 않았으며, 1일째에 입모가 관찰된 것 외에는 실험종료시까지 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다.
- 1000 mg/kg bw 투여군에서는 투여 후 2~4시간째에 암컷 1마리에서 경련이 관찰되었고, 1일째에는 입모가 관찰되었으며, 2일째부터는 생존한 모든 개체에서 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다.
- 2000 mg/kg bw 투여군은 투여 후 2~4시간째에 입모, 진전 또는 경련 등이 관찰되었으며, 투여 후 4시간째에 암수 각각 2마리가 사망하였으며, 생존한 개체는 투

여 후 1일째에 입모가 관찰된 것 외에는 실험종료시까지 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다.

표 29. Clinical signs induced by the treatment of test substance

Dose group	Sex	Number of death					
		30min	1hr	2~4hr	Day 1	Day 2	Day 3~14
VC	M	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	F	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	M	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	F	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	M	Piloerection(5) Tremor(2)	Piloerection(5)	Piloerection(5)	Piloerection(5)	Piloerecti on (5)	NCS NCS
	F	Piloerection(5) Tremor(3)	Piloerection(5) Tremor(2)	Piloerection(5) Tremor(2)	Piloerection(5)	Piloerecti on (5)	NCS NCS
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	M	Piloerection(5) Tremor(4) Convulsion(1)	Piloerection(5) Crawlingposition(1) Tremor(2) Convulsion(1) Death(1)	Piloerection(5)	Piloerection(4)	Piloerecti on (4)	NCS NCS
	F	Piloerection(5) Tremor(4) Convulsion(1)	Piloerection(5) Convulsion(2)	Piloerection(5) Convulsion(1)	Piloerection(5)	Piloerecti on (5)	NCS NCS
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	M	Piloerection(5) Convulsion(5)	Piloerection(5) Crawlingposition(1) Convulsion(5) Death(1)	Piloerection(5) Convulsion(4) Tremor(1) Death(2)	Piloerection(4)	Piloerecti on (2)	NCS NCS
	F	Piloerection(5) Convulsion(5)	Piloerection(5) Convulsion(5) Death(1)	Piloerection(5) Convulsion(1) Death(2)	Piloerection(4) Tremor(3) Convulsion(1) Death(2)	Piloerecti on (2)	NCS NCS

VC: Vehicle Control (Sterilized DW)

NCS: No clinical signs

(3) 체중변화

- 조협추출물제제(에코와구) 투여 후 생존한 250 mg/kg bw, 500 mg/kg bw, 1000 mg/kg bw 및 2000 mg/kg bw 투여군의 수컷 및 암컷 체중은 시험기간 동안 용매대조군과 비교시 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

표 30. Body weight changes of male rats treated with test substance

Dose group		Body weights (g)					
		Day 0 ^a	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	249.51	282.10	304.32	324.46	345.87	372.49
	SD	7.36	11.30	13.13	9.52	11.08	10.72
	n	5	5	5	5	5	5
조협추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	249.63	280.40	304.05	324.41	340.42	364.89
	SD	9.08	10.19	11.21	13.27	13.17	17.57
	n	5	5	5	5	5	5
조협추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	249.32	275.17	296.84	316.82	335.97	358.97
	SD	9.83	11.59	8.10	7.63	7.70	8.33
	n	5	5	5	5	5	5
조협추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	251.88	274.46	298.55	318.88	336.27	357.81
	SD	9.31	8.18	6.56	6.64	7.09	7.95
	n	5	4	4	4	4	4
조협추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	249.66	271.24	294.90	314.53	334.44	359.12
	SD	8.04	13.68	14.21	17.11	17.77	21.47
	n	5	2	2	2	2	2

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

^a: Data after fasting for 14 hrs before the treatment

표 31. Body weight changes of female rats treated with test substance

Dose group		Body weights (g)					
		Day 0 ^a	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	170.58	188.93	197.66	210.17	220.00	232.25
	SD	5.41	9.11	10.12	10.50	8.58	7.65
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	170.51	190.66	199.26	212.58	221.71	234.38
	SD	7.00	7.47	7.16	12.08	9.27	11.95
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	170.34	186.51	198.15	208.41	219.32	232.23
	SD	5.70	7.54	8.83	6.43	9.34	11.19
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	170.72	180.09	199.94	212.49	220.42	231.20
	SD	5.76	12.10	13.98	11.07	9.64	9.12
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	172.98	185.76	199.30	212.23	221.01	230.78
	SD	5.24	5.93	8.30	3.94	4.33	6.34
	n	5	2	2	2	2	2

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

^a: Data after fasting for 14 hrs before the treatment

(4) 사료 섭취량 측정

- 조합추출물제제(에코와구) 250 mg/kg 투여군 수컷의 사료 섭취량은 투여 후 14일째에 용매대조군 보다 유의하게 낮았으나, 그 외 기간 동안은 용매대조군과의 차이는 관찰되지 않았다. 500 mg/kg 및 2000 mg/kg 투여군 수컷의 사료 섭취량은 투여 후 1일, 4일, 10일 및 14일째에 용매대조군 보다 유의하게 낮았으며, 1000 mg/kg bw 투여군에서는 1일, 10일 및 14일째에 용매대조군 보다 유의하게 낮았다.
- 암컷의 사료 섭취량의 경우 250 mg/kg 투여군에서 투여 후 7일째를 용매대조군 보다 유의하게 낮았으나, 그 외 기간 동안은 용매대조군과의 차이는 관찰되지 않았으며, 500 mg/kg bw 투여군의 사료 섭취량은 투여 후 4일, 7일 및 14일째에 용매대조군에 비하여 유의하게 높았고, 1000 mg/kg bw 투여군에서는 투여 후 1일, 4일 및 7일째에 용매대조군에 비하여 유의하게 높거나 낮았으며, 2000 mg/kg bw 투여군의 경우 투여 후 1일째와 7일째에 용매대조군에 비하여 유의하게 높거나 낮았다.

표 32. Food consumption of male rats treated with test substance

Dose group		Daily mean food consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	33.98	27.25	27.36	28.51	29.86
	SD	0.48	0.08	1.36	0.17	0.24
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	35.18	27.29	28.18	28.31	28.44**
	SD	2.14	1.88	1.60	1.96	0.90
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	31.48***	25.62***	25.83	25.42***	27.04***
	SD	0.61	0.38	0.85	0.53	0.40
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	30.19***	26.72	26.80	26.52***	27.41***
	SD	0.95	0.88	0.18	0.74	0.24
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	28.09***	27.92***	27.94	27.64**	29.31*
	SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001, significantly different from vehicle control group

표 33. Food consumption of female rats treated with test substance

Dose group		Daily mean food consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	22.57	17.46	18.88	18.48	19.65
	SD	1.46	0.08	0.13	0.75	0.05
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	23.74	17.86	19.84**	18.13	19.82
	SD	0.28	0.43	0.62	0.42	0.31
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	21.26	18.85***	19.42***	19.31	20.10**
	SD	1.43	0.48	0.07	0.34	0.21
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	17.36**	20.28***	20.28*	18.73	19.76
	SD	2.27	1.01	0.96	0.62	1.47
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	17.64**	17.68	20.41*	17.84	19.43
	SD	0.49	0.17	1.44	1.46	0.55

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001, significantly different from vehicle control group

(5) 음수 섭취량 측정

- 조합추출물제제(에코와구) 250 mg/kg 투여군 수컷의 음수 섭취량은 용매대조군과 차이가 없었으나, 500 mg/kg bw 투여군의 경우 투여 후 1일, 4일 및 7일째에 음수 섭취량이 용매대조군 보다 유의하게 낮았으며, 1000 mg/kg bw과 2000 mg/kg bw 투여군에서는 투여 후 1일째에 용매대조군에 비하여 유의하게 낮았다.
- 암컷의 음수 섭취량의 경우 모든 시험군에서 일부 시점을 제외하고 대부분의 시점에서 용매대조군과 비교하여 유의하게 높거나 낮았다.

표 34. Water consumption of male rats treated with test substance

Dose group		Daily mean water consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	40.63	29.69	30.96	34.90	34.62
	SD	1.50	1.90	1.98	7.73	5.63
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	41.46	29.80	29.85	30.30	32.25
	SD	1.95	0.54	0.52	0.87	1.37
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	36.99**	26.96*	28.48*	28.34	29.66
	SD	1.52	1.04	0.65	2.30	1.84
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	38.16*	27.93	31.48	29.23	30.23
	SD	0.59	0.67	1.33	1.85	1.95
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	33.28**	29.22	29.02	28.36	30.33
	SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, significantly different from vehicle control group

표 35. Water consumption of female rats treated with test substance

Dose group		Daily mean water consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	28.01	19.61	22.04	21.86	28.87
	SD	2.36	0.42	1.05	0.11	1.92
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	30.82*	23.30***	26.96**	27.86	37.56*
	SD	0.76	0.05	2.75	6.00	5.65
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	25.16*	21.37*	22.73	21.58	24.53**
	SD	1.28	1.16	0.86	0.55	0.02
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	20.45**	23.69***	23.61	20.79*	22.41***
	SD	3.47	1.10	1.37	0.77	0.05
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	24.55	23.07***	23.99	21.62*	22.48**
	SD	1.29	0.60	0.99	0.06	0.94

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, significantly different from vehicle control group

(6) 부검소견

- 투여당일 사망한 개체와 실험종료 시 생존한 개체에 대하여 육안적 병리검사를 실시한 결과, 모든 개체에서 특이한 이상소견이 관찰되지 않았다.

표 36. Gross necropsy findings in rats treated with a test substance

Dose group	Sex	No. of examined at terminal kill	Gross findings (internal and external)
VC	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
조협추출물(에코와구) 250 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
조협추출물(에코와구) 500 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
조협추출물(에코와구) 1,000 mg/kg bw	Male	4	NGF
	Female	5	NGF
조협추출물(에코와구) 2,000 mg/kg bw	Male	2	NGF
	Female	2	NGF

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

NGF: No gross findings

(7) 반수치사량

- 랫드에서 조협추출물제제(에코와구)의 단회 경구투여에 의한 수컷 및 암컷의 반수치사량(LD₅₀)은 각각 1772.209 mg/kg bw와 1930.914 mg/kg bw 이었다.

사) 결 론

- 본 시험은 조협추출물제제(에코와구)의 단회 경구 노출에 의한 독성양상 및 독성강도를 확인하고자 본 시험을 실시하였다.
- 조협추출물제제(에코와구)를 SD 암수 랫드 모두에 250 mg/kg bw, 500 mg/kg bw, 1,000 mg/kg bw, 2,000 mg/kg bw 용량으로 단회 경구 투여 후 14일간 관찰한 결과, 투여 후 1시간 이내에 1,000 mg/kg bw 투여군 수컷 1마리와 2,000 mg/kg bw 투여군 암수 각각 1마리가 사망하였으며, 투여 후 4시간 이내에 2,000 mg/kg bw 투여군 암수 각각 2마리가 사망하였다.
- 생존한 개체에서는 투여 후 30~4시간째에 입모, 진전, 경련 등이 관찰되었고, 투여 후 1일째에 입모가 관찰된 것 외에는 실험종료시까지 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다. 조협추출물제제(에코와구) 투여 후 생존한 250 mg/kg bw, 500 mg/kg bw, 1000 mg/kg bw 및 2000 mg/kg bw 투여군의 수컷 및 암컷 체중은 시험기간 동안 용매대조군과 비교 시 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 시험기간 동안 수컷 및 암컷의 사료 섭취량 및 음수 섭취량은 일부 시점에서 용매대조군과 비교 시 유의하게 낮거나 높았다. 투여 당일 사망한 개체와 관찰기간 종료 후 생존한 모든 랫드에 대하여 육안적 병리검사를 실시한 결과, 모든 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

- 조협추출물제제(에코와구)의 단회 경구 투여에 의한 반수치사량(LD₅₀) 1772.209mg/kg bw(수컷)와 1930.914 mg/kg bw(암컷)이므로 조협추출물제제(에코와구)의 급성경구독성은 GHS Category 4에 해당하여 삼킬 경우 위험한 물질로 확인되었다.

2) 급성 경피 독성 시험

가) 시험계

- 계통 및 종 : NTac:Sprague-Dawley Rat, SPF
 생산업체 : 대한바이오링크
 충북 음성군 삼성면 덕호로 277
 공급업체 : 하나바이오
 경기도 수원시 팔달구 덕영대로 697번길 47
- 동물 주령 및 수 : 7주령, 암컷 27마리
 (입수시) 7주령, 수컷 27마리
- 동물 주령 및 수 : 8주령, 암컷 25마리
 (투여시) 8주령, 수컷 25마리
- 시험계 선택이유 : 본 시험에 사용할 SD 랫드는 단회 및 반복투여 독성시험 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 본 계통에 관한 풍부한 시험 기초 자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

나) 시험군의 구성

- 시험군의 구성은 아래와 같이 구성하였다.

표 37. 안전성(급성 경피 독성) 평가 시험군

시험군	시험물질	성	동물번호 (두수)	투여용량 (mg/kg bw ^a)	투여액량 (mL/kg bw ^b)
1군 (용매대조군)	멸균증류수	수컷	1101 ~ 1105 (5)	0	2
		암컷	2101 ~ 2105 (5)		
2군	조협추출물제제 (에코와구)	수컷	1206 ~ 1210 (5)	250	2
		암컷	2206 ~ 2210 (5)		
3군	조협추출물제제 (에코와구)	수컷	1311 ~ 1315 (5)	500	2
		암컷	2311 ~ 2315 (5)		
4군	조협추출물제제 (에코와구)	수컷	1416 ~ 1420 (5)	1,000	2
		암컷	2416 ~ 2420 (5)		
5군	조협추출물제제 (에코와구)	수컷	1521 ~ 1525 (5)	2,000	2
		암컷	2521 ~ 2525 (5)		

^a: 체중 kg 당 투여한 제품용량, ^b: 체중 kg 당 투여한 용액량

다) 투여용량 설정근거

- 2000 mg/kg bw을 최고용량으로 공비 2로 하여 1000 mg/kg bw, 500 mg/kg bw, 250 mg/kg bw으로 용량단계를 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

라) 투여방법

- 투여 경로 : 경피
 투여 횟수 : 1회/일, 단회투여
 투여액량 산출 : 투여액량은 2 mL/kg bw으로 하고, 투여 당일 체중을 기준으로 투여액량을 산출하였다.
 투여 방법 : 투여 전날 약제처리를 위해 시험동물의 등부위를 제모한 후, 전체 표면적의 약 10% 범위(4cm4cm)에 다공성 거즈(4cm4cm)에 시험물질을 도포한 후 피부에 흡착시킨 상태에서 비자극성 테이프로 고정시켜 24시간 노출시킨 후 노출기간 종료 시 남아있는 시험물질은 물을 사용하여 제거하였다.

마) 관찰 항목

- 일반증상 관찰 (사망률 및 임상증상), 체중측정, 사료 및 음수 섭취량 측정 및 부검 소견
- 반수치사량(Lethal Dose 50, LD50) 산출

바) 결과

- 조협추출물제제(에코와구)의 경피노출에 의한 독성양상 및 독성강도를 알고자 SD 랫드 암컷과 수컷 모두에 본 제품을 단회 경피 노출한 후 14일간 사망, 빈사동물 발생여부, 임상증상, 체중변화, 사료 및 음수 섭취량을 관찰하고, 관찰기간 종료 후 부검하여 개체 별로 이상 여부를 검사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

(1) 사망률

- 모든 시험군에서 사망동물이 관찰되지 않았다.

표 38. Mortality after the treatment of test substance

Dose group	Sex	No. of Animals	Number of death					Mortality (%)
			D0	D1	D2	D3	D4 ~ 14	
VC	Male	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
조협추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Male	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
조협추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Male	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
조협추출물제제 (에코와구) 1000 mg/kg bw	Male	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
조협추출물제제 (에코와구) 2000 mg/kg bw	Male	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0/5 (0)

VC: Vehicle Control (Sterilized DW)

(2) 임상증상

- 시험기간 동안 모든 시험군에서 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다.

표 39. Clinical signs induced by the treatment of test substance

Dose group	Sex	Number of death				
		30min~4hr	1 day	2 day	3 day	4~14 day
VC	Male	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	Female	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Male	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	Female	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Male	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	Female	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
조합추출물제제 (에코와구) 1000 mg/kg bw	Male	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	Female	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
조합추출물제제 (에코와구) 2000 mg/kg bw	Male	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	Female	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS

VC: Vehicle Control (Sterilized DW)

NCS: No clinical signs

(3) 체중변화

- 조합추출물제제(에코와구) 250, 500, 1000 및 2000 mg/kg bw 투여군의 암수 체중은 시험기간 동안 용매대조군과 비교 시 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

표 40. Body weight changes of male rats treated with test substance

Dose group		Body weights (g)					
		Day 0 ^a	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	255.19	241.34	273.59	297.16	313.79	340.02
	SD	6.72	11.54	8.54	10.32	12.21	12.73
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	254.35	232.34	267.97	289.37	306.05	330.57
	SD	7.21	15.52	10.69	12.63	15.87	17.44
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	257.55	231.37	269.01	292.79	310.55	336.87
	SD	3.94	4.03	2.35	4.13	1.97	3.83
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 1000 mg/kg bw	Mean	248.25	230.19	268.54	292.02	308.23	337.11
	SD	0.79	11.82	10.82	10.50	10.74	12.15
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 2000 mg/kg bw	Mean	256.27	236.24	273.69	295.32	311.61	337.06
	SD	11.87	17.21	16.01	15.89	16.09	17.31
	n	5	5	5	5	5	5

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

^a: Data after fasting for 14 hrs before the treatment

표 41. Body weight changes of female rats treated with test substance

Dose group		Body weights (g)					
		Day 0 ^a	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	193.45	183.32	200.07	205.71	208.92	217.76
	SD	10.52	5.84	9.87	12.06	12.74	13.55
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	195.53	179.96	200.82	215.29	220.06	230.97
	SD	13.35	11.15	13.39	12.66	13.62	14.49
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	196.33	184.53	201.57	212.81	209.21	217.80
	SD	9.49	9.53	11.33	21.65	14.20	14.86
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 1000 mg/kg bw	Mean	194.96	183.62	205.29	214.62	222.44	233.72
	SD	13.04	12.28	14.64	17.72	21.96	23.52
	n	5	5	5	5	5	5
조합추출물제제 (에코와구) 2000 mg/kg bw	Mean	191.14	182.19	198.14	207.37	213.05	223.29
	SD	15.18	15.04	15.45	13.33	15.28	14.51
	n	5	5	5	5	5	5

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

^a: Data after fasting for 14 hrs before the treatment

(4) 사료 섭취량 측정

- 조합추출물제제(에코와구) 250, 500, 1000 및 2000 mg/kg bw 투여군 암수의 사료 섭취량은 시험기간 동안 용매대조군과 비교 시 차이가 관찰되지 않았다.

표 42. Food consumption of male rats treated with test substance

Dose group		Daily mean food consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	3.62	26.40	28.49	29.87	30.73
	SD	1.52	1.48	2.59	2.16	3.91
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	3.10	24.44	28.98	29.09	30.61
	SD	1.44	4.43	1.76	3.15	3.52
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	4.79	26.95	29.47	30.52	30.01
	SD	1.98	0.41	0.79	0.38	1.31
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	2.94	26.86	28.35	29.06	30.21
	SD	1.48	0.68	1.05	0.42	2.44
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	3.43	26.01	28.94	30.26	31.07
	SD	0.23	0.11	1.70	1.99	2.42

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

표 43. Food consumption of female rats treated with test substance

Dose group	Daily mean food consumption (g/animal/day)					
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	1.72	18.92	19.32	20.79	20.84
	SD	0.59	0.09	0.50	0.59	1.38
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	1.67	19.32	18.91	20.83	21.80
	SD	1.88	0.68	0.62	1.26	0.45
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	1.13	18.71	18.87	21.19	21.32
	SD	1.13	0.53	0.43	0.93	2.36
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	1.48	19.30	18.15	20.80	21.60
	SD	0.18	0.77	2.92	0.26	2.45
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	1.99	19.31	19.51	20.57	20.73
	SD	0.69	3.94	3.11	1.28	2.40

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

(5) 음수 섭취량 측정

- 조합추출물제제(에코와구) 250, 500, 1000 및 2000 mg/kg bw 투여군 암수의 사료 섭취량은 시험기간 동안 용매대조군과 비교 시 차이가 관찰되지 않았다.

표 44. Water consumption of male rats treated with test substance

Dose group	Daily mean water consumption (g/animal/day)					
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	0.87	31.01	34.90	32.82	30.62
	SD	0.32	1.13	2.33	1.54	3.35
조합추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	0.99	31.79	34.25	33.41	31.99
	SD	0.04	0.64	2.45	0.74	2.70
조합추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	1.02	32.03	35.19	33.77	30.23
	SD	0.27	2.09	1.97	2.14	2.87
조합추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	0.72	32.00	34.41	32.26	30.82
	SD	0.72	1.73	1.66	0.25	0.86
조합추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	1.07	31.66	35.99	32.28	31.33
	SD	0.60	2.58	2.32	1.18	2.85

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

표 45. Water consumption of female rats treated with test substance

Dose group		Daily mean water consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	0.82	26.85	25.42	24.46	22.04
	SD	0.35	0.47	1.23	2.88	0.48
조협추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Mean	1.13	27.05	26.82	24.47	22.95
	SD	0.62	1.74	1.90	1.00	1.59
조협추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Mean	0.84	26.66	25.37	24.47	22.38
	SD	0.62	1.83	0.95	1.97	0.30
조협추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Mean	1.18	26.98	26.97	24.88	23.81
	SD	0.72	0.75	3.99	2.11	2.81
조협추출물제제 (에코와구) 2,000 mg/kg bw	Mean	0.68	26.54	22.61	24.86	23.43
	SD	0.28	0.61	7.93	0.33	2.39

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

(6) 부검소견

- 관찰기간 종료 후 육안적 병리검사를 실시한 결과, 모든 개체에서 이상소견이 관찰되지 않았다(Table 9).

표 46. Gross necropsy findings in rats treated with a test substance

Dose group	Sex	No. of examined at terminal kill	Gross findings (internal and external)
VC	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
VC	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
조협추출물제제 (에코와구) 250 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
조협추출물제제 (에코와구) 500 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
조협추출물제제 (에코와구) 1,000 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF

VC: Vehicle control (Sterilized DW)

NGF: No gross findings

(7) 반수치사량

- 조협추출물제제(에코와구)의 경피 노출에 따른 반수치사량(LD50)은 2,000 mg/kg bw 보다 높았다.

사) 결 론

- 본 시험은 조협추출물제제(에코와구)의 경피 노출에 의한 독성양상 및 독성강도를 확인하고자 본 시험을 실시하였다.
- 조협추출물제제(에코와구)를 단회 경피 노출 후 14일간 관찰한 결과 사망동물과 임상증상, 체중 변화, 사료 섭취량 및 음수섭취량의 특이적인 변화가 없었으며, 관찰기간 종료 후에 육안적 병리검사를 실시한 결과 이상소견이 관찰되지 않았다.
- 결론적으로 조협추출물제제(에코와구)의 단회 경피 노출시 반수치사량(LD50)은 2,000 mg/kg bw 이상이었으며, 본 제품은 GHS Category 5에 해당하는 피부 접촉 시 위험할 수 있는 물질로 확인되었다.

3) 피부자극성 시험

가) 시험계

- 계통 및 종 : NZW-Rabbit (Clean animal)
산양 토끼 농장
- 생산업체 : 경기도 화성시 팔탄면 동막골길 35-5
하나바이오
- 공급업체 : 경기도 수원시 팔달구 덕영대로 697번길 47
- 성별 및 연령 : 암컷, 4개월령
- 동물 주령 및 수 : 5마리
(입수시)
- 동물 주령 및 수 : 3마리
(투여시)
- 투여 시 체중범위 : 2.1~3.0kg
- 시험계 선택이유 : NZW 토끼는 피부자극성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 본 계통에 관한 풍부한 독성시험 및 생리학적 기초 자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

나) 시험군의 구성

- 시험군의 구성은 아래와 같이 구성하였다.

표 47. 피부자극성 시험 시험군

시험군	동물번호 (두수)	적용 물질	구획	투여량 (mL)
G1	2101 ~2103 (3)	멸균증류수	찰과	0.5
			비찰과	0.5
		조협추출물제제(에코와구)	찰과	0.5
			비찰과	0.5

다) 투여용량 설정근거

- 시험물질 투여량은 농림축산검역본부고시(제2016-22호, 2016.03.09) 및 OECD Acute Dermal Irritation/Corrosion (OECD 404, 2015. 06. 28)에서 권장하는 액체 투여량인 0.5 mL로 하였다.

라) 투여방법

- 시험물질 적용 24시간 전에 등 부위의 털을 동물용 전기 제모기를 사용하여 넓이 15×15cm가 되도록 제모하여, 건강하고 깨끗한 피부를 지닌 동물만을 선택하였다.
- 투여 당일 제모한 부위를 상하로 나누어 하측을 시험물질 투여구획, 상측을 대조구획으로 하였다.
- 투여구획과 대조구획은 다시 비찰과 부위와 찰과 부위로 구분하였으며, 같은 찰과 부위는 서로 대각선으로 분포하도록 하였다. 각 구역은 3×2 cm의 넓이로 하였고 유성펜으로 구역의 경계를 표시하였다. 찰과 부위에는 주사기 바늘 끝을 이용하여 표피는 손상되나 진피는 손상되지 않을 정도의 손상을 입혔으며 출혈이 발생하지 않도록 하였다.
- 상측(대조구획)에는 멸균증류수(0.5mL)를 도포한 3×2 cm의 거즈를 적용하였고, 하측에는 시험물질(0.5 mL)을 도포한 거즈를 피부에 적용하였다. 거즈 위에는 시험물질의 유실을 막기 위해 비자극성 테이프(Tegaderm, 3M)로 덮은 후 의료용 반창고로 피부에 고정하였으며, 4시간 경과 후 제거하였다. 이때 투여부위에 시험결과에 영향을 끼치지 않는 범위에서 미온수의 멸균증류수를 사용하여 시험물질이 남아 있지 않도록 세척하였으며, 투여 당일을 Day 0으로 하였다.

마) 관찰 항목

- 일반증상 관찰 (사망률 및 임상증상), 체중측정, 피부반응의 관찰, 피부자극성판정

바) 결과

- 본 연구는 조협추출물제제(에코와구)에 대한 피부 자극성 또는 부식성의 정도를 조사하기 위하여, 암컷 백색 토끼 피부에 시험물질을 4시간 동안 적용한 후 24, 48 및 72시간째까지 관찰하면서 시험물질의 피부자극에 대한 정보를 확보하였다

(1) 사망률

- 시험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 임상증상

- 시험기간 동안 시험물질에 의한 특이적인 증상은 관찰되지 않았다(Table 1).

표 48. Clinical signs induced by the treatment of test substance

Group	Animal No.	Clinical signs
조협추출물제제 (에코와구) (0.5 mL/site)	2101	NCS
	2102	NCS
	2103	NCS

NCS: No Clinical Signs until the end of test

(3) 체중변화

- 시험물질에 의한 체중 변화는 관찰되지 않았다.

표 49. Body weight changes of animals treated with test substance

Group	Animal No.	Body weights (kg)			
		Day 0	Day 1	Day 3	Day 7
조협추출물제제 (에코와구) (0.5 mL/site)	2101	2.176	2.171	2.285	2.431
	2102	3.003	3.006	3.190	3.368
	2103	2.475	2.486	2.514	2.603
	Mean±SD	2.551±0.419	2.554±0.422	2.663±0.471	2.801±0.499

(4) 피부반응

- 멸균증류수 0.5 mL과 조협추출물제제(에코와구) 0.5 mL를 각각의 부위에 4시간 적용 후 적용부위 피부의 홍반, 가피 및 부종 형성 여부를 관찰하였다.
- 대조물질(멸균 증류수) 적용 비찰과 및 찰과 부위에서는 피부 반응이 관찰되지 않았다.
- 조협추출물제제(에코와구) 적용 비찰과 부위에서는 피부 반응이 관찰되지 않았고, 찰과 부위에서는 24시간째부터 72시간째까지 아주 가벼운 홍반(2마리)과 분명한 홍반(1마리)이 관찰되었고, 4일째에는 1마리에서만 아주 가벼운 홍반이 관찰되었으며, 5일째부터 모든 개체에서 홍반이 관찰되지 않았다. 시험물질 적용 후 4일째에 2마리의 찰과 부위에서 각질이 관찰되기 시작하였으며, 7일째에는 소량이 각질이 관찰되었다.

(5) 피부자극성 평가

- 시험물질 적용 후 72시간 동안 관찰된 일차피부자극지수는(P.I.I.)가 0.998로 산출되어 약한 피부자극성 물질로 판단되었다.

표 50. Grade of skin reactions (Control)

Group	Applicatio n site	Intact						Abraded					
	Reactions	Erythema & Eschar formation			Oedema			Erythema & Eschar formation			Oedema		
	Time	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
	Ani.No.												
Control (sterile DW) (0.5mL/site)	2101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P.I.S.							0					
P.I.I.							0						

P.I.S. (Primary Irritation Score) = sum of mean irritation grade

P.I.I. (Primary Irritation Index) = total P.I.S./4

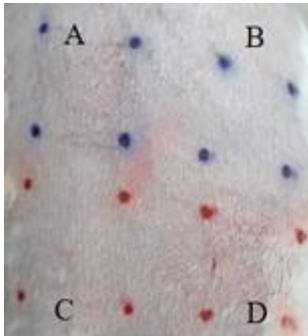
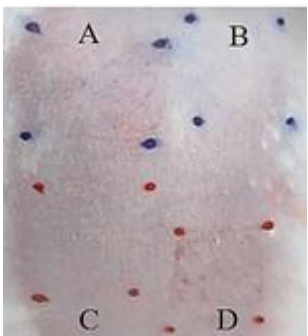
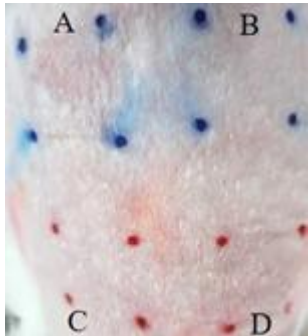
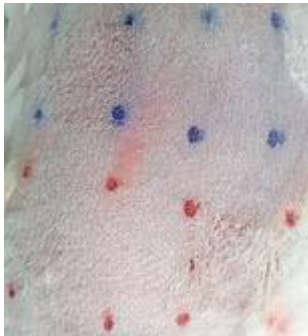
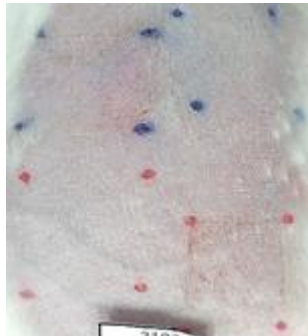

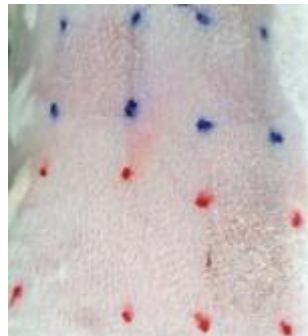
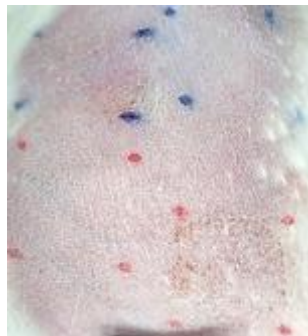

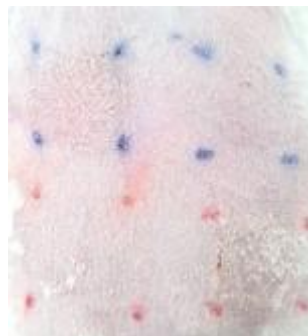
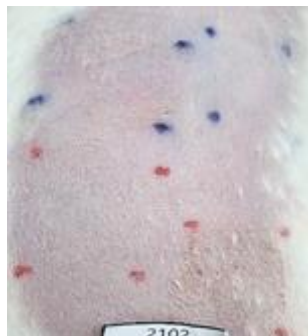
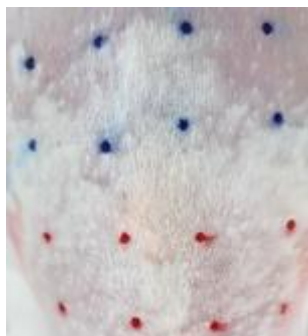
표 51. Grade of skin reactions (Test substance)

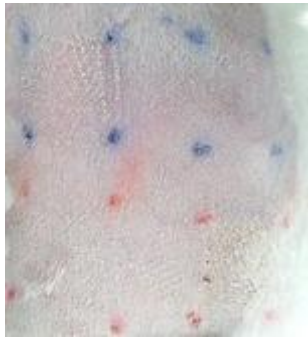
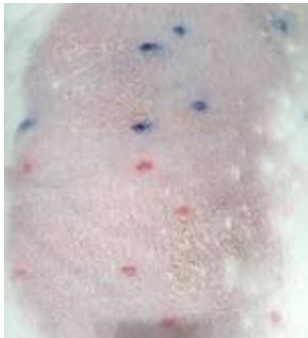
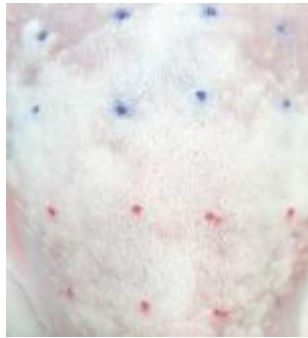
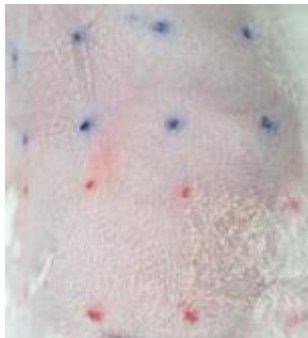
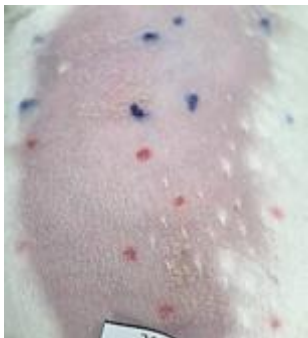

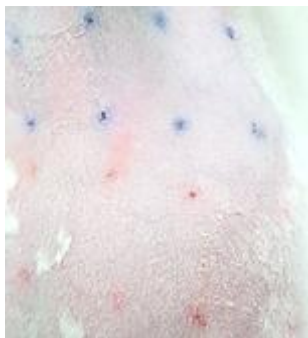
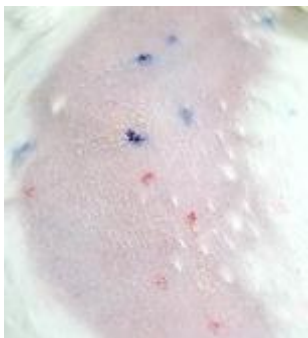

Group	Applicatio n site	Intact						Abraded					
	Reactions	Erythema & Eschar formation			Oedema			Erythema & Eschar formation			Oedema		
	Time	24h	48h	72h	24h	48h	72 h	24h	48h	72 h	24h	48h	72 h
	Ani.No.												
조협추출물 제제 (에코와구) (0.5mL/site)	2101	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	2102	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0
	2103	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	Sum	0	0	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0
	Mean	0	0	0	0	0	0	1.33	1.33	1.33	0	0	0
	P.I.S.							3.99					
P.I.I.							0.998						

P.I.S. (Primary Irritation Score) = sum of mean irritation grade

P.I.I. (Primary Irritation Index) = total P.I.S./4

㉟ 52. Dermal irritation change after treatment of test substance

Ani.No.	2101	2102	2103
Time			
24h			
48h			
72h			
Day 4			

Ani.No.	2101	2102	2103
Time			
Day 5			
Day 6			
Day 7			

A, D: abraded site, B, C: intact site, A, B: deionized sterile dw treatment, C, D: test substance treatment

사) 결 론

- 본 시험은 조협추출물제제(에코와구)의 피부 자극성 또는 부식성을 조사하기 위하여 암컷 백색 토끼의 피부에 시험물질을 4시간 적용한 후 24, 48 및 72시간 간격으로 피부반응을 관찰하여 조협추출물제제(에코와구)의 피부자극성을 평가하였다.
- 피부자극성 시험기간 동안 조협추출물제제(에코와구)에 의한 사망, 임상증상 및 체중변화는 관찰되지 않았다.
- 조협추출물제제(에코와구) 0.5 mL를 피부에 4시간 적용 후 피부의 홍반, 가피 및 부종 형성 여부를 관찰한 결과, 시험물질 적용 후 24시간째부터 72시간째까지 찰과 부위에서 아주 가벼운 홍반(2마리)과 분명한 홍반(1마리)이 관찰되었다. 시험물질 적용 후 4일째에는 1마리에서만 아주 가벼운 홍반이 관찰되었으며, 5일째부터 모든 개체에서

홍반이 관찰되지 않았다.

- 피부자극성시험 결과, 조협추출물제제(에코와구)의 일차피부자극지수는 0.998로 산출되어 조협추출물제제(에코와구)는 GHS Category 3에 해당하는 약한 피부자극성 물질로 평가되었으므로, 조협추출물제제(에코와구) 사용시에는 보호장구를 착용하여 피부, 특히 상처가 있는 피부에 닿지 않도록 주의하는 것이 필요한 것으로 판단되었다.

4) 안 자극 시험

가) 시험계

계통 및 종 : NZW-Rabbit (Clean animal)
 산양 토끼 농장
 생산업체 : 경기도 화성시 팔탄면 동막골길 35-5
 하나바이오
 공급업체 : 경기도 수원시 팔달구 덕영대로 697번길 47

성별 및 연령 : 암컷, 4개월령

동물 주령 및 수 : 3마리
 (입수시)

동물 주령 및 수 : 3마리
 (투여시)

투여 시 체중범위 : 2.2~2.5kg

시험계 선택이유 : NZW 토끼는 피부자극성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 본 계통에 관한 풍부한 독성시험 및 생리학적 기초 자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

나) 시험군의 구성

- 시험군의 구성은 아래와 같이 구성하였다.

표 53. 안 자극시험 시험군

시험군	동물 번호 (두수)	적용부위	적용 물질	투여량(mL)
초기시험	2101 (1마리)	좌안	조협추출물제제(에코와구)	0.1
		우안	무처리	-
확인시험	2102~2103 (2마리)	좌안	조협추출물제제(에코와구)	0.1
		우안	무처리	-

다) 투여용량 설정근거

- 투여량은 농촌진흥청 고시(제2019-14호, 2019.05.29), 국립환경과학원 고시(제2019-23호, 2019.06.13), 및 OECD Test Guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion

(2017.10.09) 에서 권장하는 액체 투여량인 0.1 mL로 설정하였다.

라) 투여방법

투여 경로 : 경구

투여 횟수 : 1회/일, 단회투여

투여량 : 마리 당 0.1 mL씩 투여하였다.

투여동물 수 : 3마리

- 초기시험은 1마리 동물에 시험물질을 1회 적용한 후 이상을 관찰한 결과, 안자극성이 확인되어, 추가로 2마리의 동물을 사용하여 확인시험을 실시하였다.

투여 방법

- 실험개시 24시간 전에 토끼의 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는지 확인하였다.
- 시험물질의 점안은 토끼 좌측 눈의 하안점을 가볍게 잡아당기고 그 결막낭 내에 시험물질 0.1mL을 한번에 넣어 처리하였다.
- 시험물질의 손실을 막기 위해 양안점을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다.
- 토끼 우측 눈은 아무런 처리도 하지 않은 상태로 두어 비적용 대조안으로 하였다.

마) 관찰 항목

- 일반증상 관찰 (사망률 및 임상증상), 체중측정, 안반응의 관찰

표 54. 안 자극 반응 평가표

부위	관찰 항목	증상	평점
각 막	(A)혼탁	안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점 관찰)	
		-화농이나 혼탁이 없음	0
		-혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나 홍채의 말단이 명확히 관찰됨 (정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 구분)	1
		-반투명한 부분이 쉽게 관측되나, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
		-진주 색깔을 나타내고 홍채의 말단이 관찰되지 않으며 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
		-각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨	4
	(B)혼탁된 각막의 범위	-혼탁이 없음	0
		-1/4이하	1
		-1/4이상 1/2 미만	2
		-1/2이상 3/4미만	3
-3/4이상 1까지		4	
점수 = A×B×5		최고점=80	
홍채	(C)반응치	-정상	0
		-현저한 주름 형성, 충혈, 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈이 단독 혹은 혼합되어 나타나고 홍채는 빛에 대해 반응함 (둔한 반응은 양성)	1
		-빛에 대해 반응 없으며, 출혈되고 대부분 파괴됨 (이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부)	2
점수 = C×5		최고점=10	
(안검결막 및 안구결막에 한함)	(D)발적	-혈관 정상	0
		-일부 혈관 충혈	1
		-얇은 심홍색을 띠거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨	2
		-짙은 선홍색(넓은 범위의 쇠고기색조의 붉은색)	3
		-부풀지 않음	0
결막	(E)부종 (안검/순막)	-정상보다 약간 종창(순막 포함)	1
		-안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
		-눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창	3
		-눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창	4
		-배출물 없음	0
(F)배출물	-약간의 배출물 (정상 동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은 양은 제외)	1	
	-속눈썹과 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물	2	
	-눈 주위의 상당한 부위와 속눈썹 및 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물	3	
점수 = (D+E+F)×2		최고점=20	

바) 안자극성 판정

- 안반응의 평점은 증상의 정도와 자극성 여부를 함께 고려하여 평가하였으며, 관찰 기간 중 급성안점막자극지수(A.O.I.: Acute ocular irritation index), 평균안점막자극지수(M.O.I.: Mean ocular irritation index) 및 7일차 개체별 안점막자극지수(I.O.I.: Individual ocular irritation index)등의 값을 검토하여 안점막 자극성의 강도를 안점막 자극표에 의해 평가하였다.

표 55. 안점막 자극표

급성안점막자극지수(A.O.I.)	구 분
≤ 10	없 음
10.1~ 30.0	경 도
30.1~ 60.0	중 도
≥ 60.1	강 도

사) 결과

- 본 연구는 조협추출물제제(에코와구)의 안자극성 또는 부식성 정도를 확인하기 위하여 수행하였으며, 암컷 백색토끼의 안구에 시험물질을 1회 0.1mL 점안 후 1, 24, 48, 72시간 및 8일째까지 관찰하면서 시험물질의 안자극에 대한 정보를 확보하였다.

- 조협추출물제제(에코와구)의 안자극성 시험의 주요결과는 다음과 같다.

(1) 사망률

- 시험기간 동안 사망한 동물이 관찰되지 않았다.

(2) 임상증상

- 시험기간 동안 특이적인 임상증상은 관찰되지 않았다(Table 1).

표 56. Clinical signs observed by the treatment of test substance

Group	Animal No..	Clinical signs
조협추출물제제(에코와구) (0.1 mL/site)	2101	NCS
	2102	NCS
	2103	NCS

NCS: No Clinical Signs until the end of test

(3) 체중변화

- 시험물질에 의한 체중 변화는 관찰되지 않았다(Table 2).

표 57. Body weight changes of animals treated with test substance

Group	Animal No.	Body weights (kg)				
		Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 8
조협추출물제제 (에코와구) (0.1 mL/site)	2101	2.754	2.701	2.795	2.876	2.880
	2102	2.417	2.419	2.509	2.560	2.709
	2103	2.221	2.254	2.309	2.377	2.482
	Mean±	2.460±	2.458±	2.538±	2.604±	2.690±
	SD	0.270	0.226	0.244	0.252	0.200

^a Body weights were not measured because the animals were euthanized for none clinical signs of eyes.

(4) 안반응의 변화

- 조합추출물제제(에코와구) 적용 후 각막 혼탁, 홍채 반응, 결막 발적 및 부종 등의 변화를 관찰하였다.
- 초기시험 및 확인시험의 모든 토끼에서 각막 혼탁 및 홍채 반응 이상은 관찰되지 않았다.
- 초기시험 토끼에서는 시험물질 적용 후 1시간부터 4일째까지 옅은 심홍색을 띠는 결막 발적을 보였고, 5일째부터 7일째까지는 일부 혈관에서 충혈이 관찰되었으나, 8일째에는 결막 발적이 관찰되지 않았다. 시험물질 적용 후 1시간과 24시간째에는 눈이 반쯤 감길 정도의 안검 종창이 관찰되었으며, 48시간째부터 5일째까지 경미한 종창이 관찰되었고, 6일째에는 결막 부종이 관찰되지 않았다. 또한, 눈 주위 주변을 적시는 배출물이 48시간째까지 관찰되었으며, 72시간부터는 배출물이 감소되다가 7일째에는 관찰되지 않았다.
- 확인시험 토끼 2마리 중 1마리는 시험물질 적용 후 1시간째에 옅은 심홍색의 결막 발적이 관찰되었고, 24시간째에는 짙은 선홍색의 발적이, 48시간째부터 72시간째까지 심홍색의 결막 발적이, 4일째부터 7일째까지 혈관 일부에서 충혈이 관찰되었으나 8일째에는 결막 발적이 관찰되지 않았다. 또한, 부종은 4일째까지 관찰되었으며, 배출물은 5일째까지 관찰되었다.
- 확인시험의 나머지 토끼 1마리에서는 시험물질 적용 후 1시간째부터 48시간째까지 옅은 심홍색 또는 짙은 선홍색의 결막 발적이 관찰되었고, 72시간째부터 7일째까지 몇몇 혈관이 충혈이 관찰되었으나, 8일째에는 결막 발적이 관찰되지 않았다. 눈이 반쯤 감길 정도의 종창이 1시간째에 관찰되었으며, 24시간째에 현저한 종창이 관찰된 후 48시간째부터 6일째까지 경미한 종창이 관찰된 후 7일째에는 부종이 관찰되지 않았다. 배출물은 24시간째에만 관찰되었다.

㉟ 58. Score of ocular irritation

Ocular Lesions		Hours after treatment	Initial test		Confirmatory test	
			2101	2102	2103	
Cornea	Degree of opacity(A)	1h	0	0	0	
		24h	0	0	0	
		48h	0	0	0	
		72h	0	0	0	
		Day 7	0	0	0	
	Diffuse areas of opacity(B)	1h	0	0	0	
		24h	0	0	0	
		48h	0	0	0	
		72h	0	0	0	
		Day 7	0	0	0	
Iris	Response(C)	1h	0	0	0	
		24h	0	0	0	
		48h	0	0	0	
		72h	0	0	0	
		Day 7	0	0	0	
Conjunctivae	Redness(D)	1h	2	2	2	
		24h	2	3	3	
		48h	2	2	2	
		72h	2	2	1	
		Day 7	1	1	1	
	Edema(E)	1h	3	2	3	
		24h	1	2	2	
		48h	1	2	1	
		72h	1	1	1	
		Day 7	0	0	0	
Secreta(F)	1h	0	0	0		
	24h	2	1	2		
	48h	2	1	0		
	72h	1	1	0		
	Day 7	0	0	0		

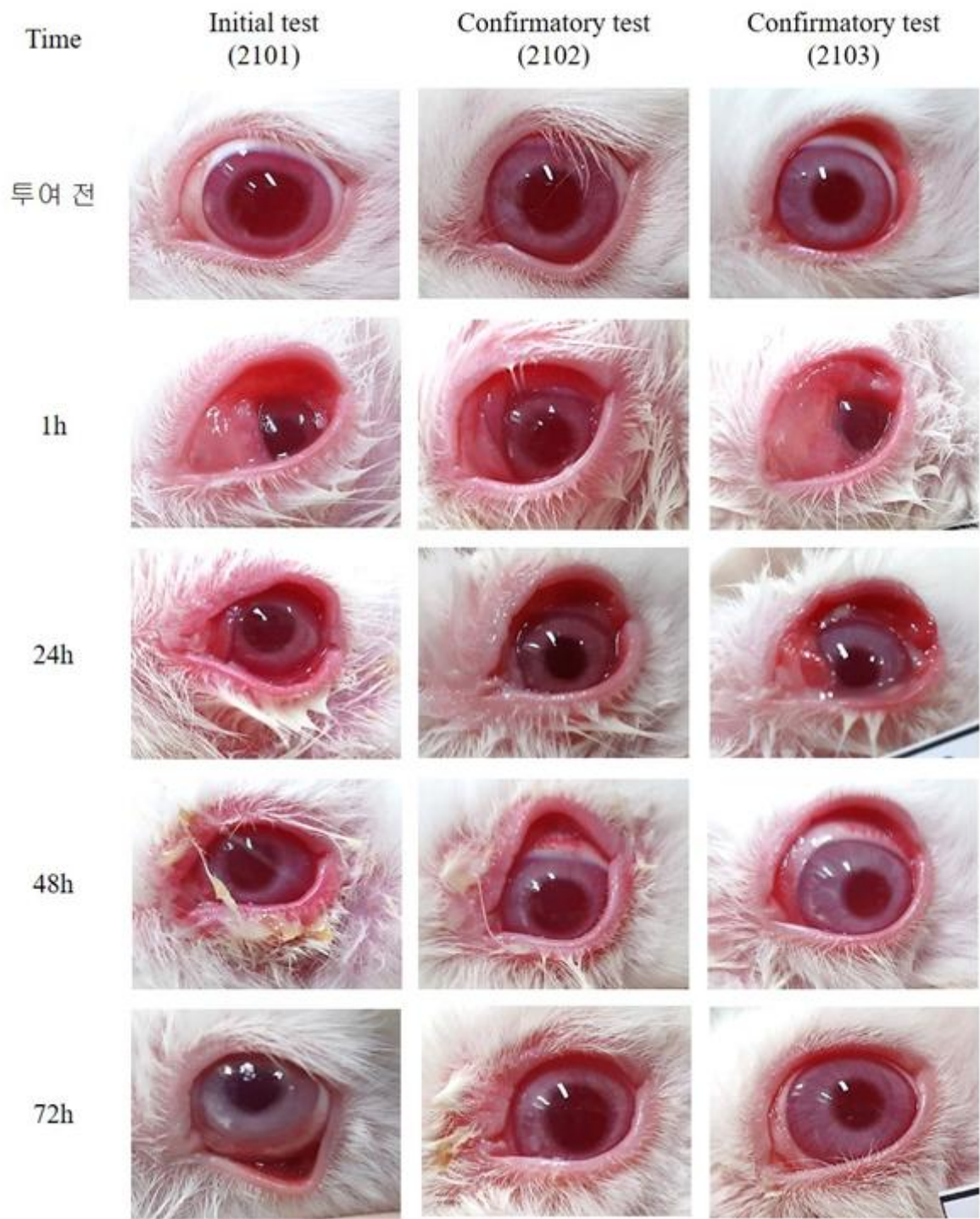


그림 24. Changes of ocular irritation after test substance treatment (from 1 hour to 72 hour)

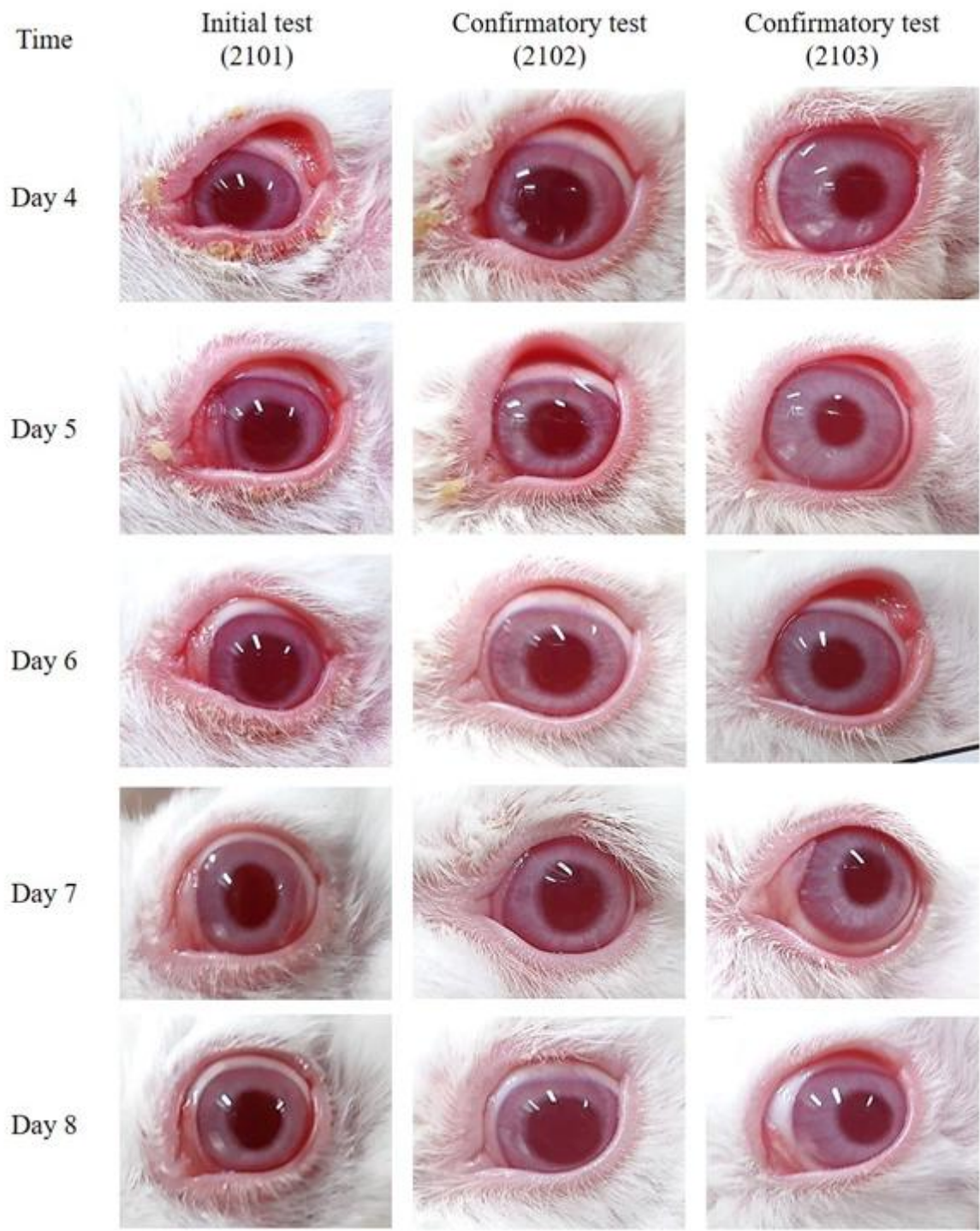


그림 25. Changes of ocular irritation after test substance treatment (from Day 4 to Day 8)

(5) 안자극성 평가

- 시험물질 적용 후 안반응을 관찰하여 평균안점막자극지수(M.O.I)를 확인한 결과, 24시간과 48시간째의 M.O.I는 각각 12.0과 8.7이었고, 72시간째와 7일째의 M.O.I는 각각 6.7과 2.0으로 확인되었다.
- 조협추출물제제(에코와구)의 급성안점막자극지수(A.O.I)는 12.0이므로, 조협추출물제제(에코와구)는 경도의 안자극 물질로 평가되었다.
- 또한, 3마리 모두에서 24, 48 및 72시간째에 산출한 결막 발적 및 결막 부종의 평점이 2이상이고, 8일째에 정상으로 회복되어 조협추출물제제(에코와구)의 안자극에 대한 GHS Category는 Category 2A에 해당되는 것으로 확인 되었다.

표 59. Grading of ocular irritation

Grade of ocular irritation	Group	Initial test		Confirmatory test	
	Animal I.D	2101	2102	2103	
	Observation time				
I.O.I	1h	10	8	10	
	24h	10	12	14	
	48h	10	10	6	
	72h	8	8	4	
	Day 7	2	2	2	
	M.O.I	1h		9.3	
	24h		12.0		
	48h		8.7		
	72h		6.7		
	Day 7		2.0		
	A.O.I		12.0		

I.O.I. (Individual ocular irritation index) = (AxBx5)+(Cx5)+2(D+E+F)

M.O.I. (mean ocular irritation index) = Sum of I.O.I./number of animal

A.O.I (Acute ocular irritation index) = Maximum of M.O.I

아) 결 론

- 본 시험은 조협추출물제제(에코와구)의 안자극성 또는 부식성을 조사하기 위하여 암컷 백색 토끼의 안점막에 시험물질을 적용한 후 안반응을 관찰하여 조협추출물 제제(에코와구)의 안자극성을 평가하였다.
- 안자극성 시험기간 동안 조협추출물제제(에코와구)에 의한 사망, 임상증상 및 체중 감소는 관찰되지 않았다.
- 시험물질 적용 후 각막 혼탁, 홍채의 반응, 결막의 발적 및 부종 등의 변화를 관찰한 결과, 모든 개체에서 각막 혼탁과 홍채반응 이상은 관찰되지 않았다.
- 시험물질 0.1 mL를 눈에 적용 후 각막 혼탁, 홍채 반응, 결막 발적 및 부종 등의 변화를 관찰한 결과, 각막 혼탁 및 홍채 반응 이상은 관찰되지 않았다. 조협추출물 제제(에코와구) 적용 후 1시간째부터 모든 개체에서 결막 발적이 관찰되었으나, 8일째에는 결막이 정상으로 회복되었다. 또한, 부종은 시험물질 적용 후 1시간째부터 관찰되었고, 5~7일째에는 회복하였다.
- 안자극성 시험결과, 조협추출물제제(에코와구)의 급성안점막자극지수(A.O.I)는 12.0으로 경도의 안자극성 물질로 평가되었다.
- 또한, 조협추출물제제(에코와구)에 의한 안자극이 8일째에 회복되어 GHS Category 2A에 해당하며, 눈에 자극성을 유발하므로 조협추출물제제(에코와구) 살포 시 사용자가 보호경 등의 보호장구를 착용하는 것이 권장되는 것으로 판단되었다.

5) 피부 감작성 시험

가) 시험계

계통 및 종	:	Mouse, CBA/JCrHsd, SPF
생산업체	:	(주)코아텍
공급업체	:	경기도 평택시 진위면 진위로 181-21 (주)코아텍
동물 주령 및 수	:	7주령, 암컷 16마리
(입수시)	:	
동물 주령 및 수	:	8주령, 암컷 16마리
(투여시)	:	
시험계 선택이유	:	본 시험에 사용할 CBA/JCrHsd 마우스는 기니픽 대체 알레르기성 접촉 피부염 연구 및 면역 연구 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있어 선택하였다.

나) 시험군의 구성

- 시험군의 구성은 아래와 같이 구성하였다.

표 60. 피부 감각성 시험군

시험군	시험물질	성	동물번호 (두수)	투여액량 (μ L)
1군 (음성대조군)	AOO	암컷	1101 ~ 1104 (4)	25
2군 (양성대조군)	1% DNCB	암컷	1201 ~ 1204 (4)	25
3군 (시험물질 투여군)	조합추출물제제(에코와구) 원액	암컷	1301 ~ 1304 (4)	25
4군 (시험물질 투여군)	조합추출물제제(에코와구) 200배 희석액	암컷	1401 ~ 1404 (4)	25

다) 투여용량 설정근거

- 투여액량은 농림축산검역본부 고시(제2016-22호), 농촌진흥청 고시(제2020-4호, 2020.02.28)와 OECD Guideline 442A(2010.07.22)에서 권장하는 투여액량인 25 μ L로 하였다.

라) 투여방법

투여 경로 : 귓등 피부에 도포

투여 횟수 : 1일, 2일, 3일 및 7일째에 투여

투여 액량 : 25 μ L

투여 방법

- 1일, 2일, 3일 및 7일차에 1% SLS (Sodium Lauryl Sulfate)용액에 붓을 담근 후 마우스 양쪽 귓등에 각각 5회 붓질하여 귓등 전체에 도포하였다. 1% SLS 용액 도포 후 1시간 뒤 음성대조물질, 양성대조물질 및 시험물질을 각각 25 μ L씩 마우스 양쪽 귓등에 도포하였다.
- 4일, 5일, 6일차에는 시험물질을 처치하지 않았다.

마) 관찰 항목

- 일반증상 관찰 (사망여부 및 임상증상, 흥반 여부), 체중측정, 귀 두께 측정, 세포수 측정, 세포증식성 조사

표 61. 흥반 평가 점수표

평가기준 및 점수	
• 흥반이 전혀 없음	0
• 매우 가벼운 정도의 흥반(거의 인지하기 어려움)	1
• 명확이 나타나는 흥반	2
• 중등도 이상의 흥반	3
• 가피가 형성되어 흥반 수준을 결정하기 어려운 심한 흥반(홍당무색 발적)	4
총 가능한 흥반 점수	4

<세포수 측정>

- 적출된 귀 림프절(auricular lymph node)을 12 well에 넣고 1 mL의 PBS (GIBCO, pH 7.2)로 세척하여 cell scraper로 조심스럽게 으깨어 단일세포(LNC; lymph node cell)를 균질화하였다. 림프절의 막을 제거하기 위해 100 μ m 필터(Coning)를 이용하여 세포 균질액을 여과시켰다. 여과된 세포균질액 중 10 μ L를 취하여 세포 수를 측정하였다.

<세포증식성 조사>

- ATP Bioluminescence Assay Kit HS II(Roche 11699706001)를 이용한 luciferin/luciferase 방법으로 림프절 내 ATP 함량을 측정하였다. 준비된 세포현탁액 25 μ L에 25 μ L lysis reagent를 추가하여 실온에서 5분 동안 세포 lysis 반응을 시킨 후 50 μ L luciferase reagent를 첨가하고, 즉시 Luminometer(Hidex Sense)를 이용하여 생물발광(relative light units, RLU)을 측정하였다. 이때 ATP 함량이 안락사 이후 시간이 경과함에 따라 점차적으로 감소하는 것으로 알려져 있어 각 동물에 대한 안락사부터 ATP 측정 분석 시간은 약 30분 이내에 완료하였다.

바) 결과

- 조협추출물제제(에코와구)의 피부감작성 또는 과민성을 알고자 CBA/J 마우스의 귓등에 조협추출물제제(에코와구) 원액 및 200배 희석액을 적용하고, 8일간 사망, 빈사동물 발생여부, 임상증상, 체중변화, 귀 두께 및 홍반 여부를 관찰하고, 관찰기간 종료 후 부검하여 개체 별로 이상 여부 검사 및 귀 림프절을 채취하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

(1) 사망률

- 시험기간동안 사망 개체가 관찰되지 않았다(Table 1).

표 62. Mortality after the treatment of test substance

Dose group	No. of Animals	Number of death					Mortality (%)
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5 ~ 8	
NC (AOO)	4	0	0	0	0	0	0
PC (1% DNCB)	4	0	0	0	0	0	0
조협추출물제제(에코와구) 원액	4	0	0	0	0	0	0
조협추출물제제(에코와구) 200배 희석액	4	0	0	0	0	0	0

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

(2) 체중변화

- 조협추출물제제(에코와구) 원액 시험군은 투여 후 3일째에 음성대조군과 양성 대

조군에 비하여 유의하게 낮았으며, 조협추출물 제제(에코와구) 200배 희석액 시험군은 투여 후 7일째에 양성대조군 보다 유의하게 높았고, 8일째에는 음성 대조군과 양성대조군에 비하여 유의하게 높았다.

표 63. Body weight changes in CBA/J mice treated with test substance

Dose group		Body weights (g)			
		Day 1	Day 3	Day 7	Day 8
NC (AOO)	Mean	22.45	22.77	23.39	23.75
	SD	0.64	0.60	0.84	0.72
PC (1% DNCB)	Mean	22.44	22.37	22.83	23.00
	SD	1.62	0.77	0.73	0.69
조협추출물제제 (에코와구) 원액	Mean	21.84	21.05 [*] , #	22.68	23.01
	SD	1.23	0.85	0.15	0.13
조협추출물제제 (에코와구) 200배 희석액	Mean	22.87	23.28	24.13 [#]	24.83 [*] , #
	SD	1.03	0.76	0.56	0.55

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

* $p < 0.05$ significantly different from negative control group

$p < 0.05$ significantly different from positive control group

(3) 임상증상

- 음성대조군과 조협추출물제제(에코와구) 200배 희석액 시험군에서는 특이적인 임상 증상이 관찰되지 않았으나, 양성대조군의 경우 7일째에 2마리에서 탈모가 관찰되었다. 조협추출물 제제(에코와구) 원액 시험군의 경우 1일째에 모든 개체에서 흥분과 경련이 관찰되었고, 2일째까지 흥분이 지속되었으며, 3일째에는 과민 반응이 관찰되었으며, 4일째부터는 임상증상이 관찰되지 않았다.

표 64. Clinical signs induced by the treatment of test substance

Dose group	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
NC (AOO)	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
PC (1% DNCB)	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	Hairless (2)	Hairless (2)
조협추출물 제제 (에코와구) 원액	Excitement (4) Convulsion (4)	Excitement (4)	Hypersensitivity (4)	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
조협추출물 제제 (에코와구) 200배 희석액	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

NCS: No clinical signs

(4) 홍반여부

- 양성대조군에서는 4일째부터 매우 가벼운 홍반이 관찰되다가 7일째와 8일째에는 중등도의 홍반이 관찰되었으며, 조협추출물제제(에코와구) 원액 시험군에서는 매우 가벼운 홍반이 4일째부터 관찰되어 5일째부터 8일째까지 뚜렷한 홍반이 관찰되었다.

표 65. Erythema & eschar formation induced by the treatment of test substance

Dose group		Erythema & Eschar formation							
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
NC (AOO)	Mean	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PC (1% DNCB)	Mean	0.00	0.00	0.00	1.00	2.00	2.00	2.75***	2.75***
	SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50
조협추출물제제 (에코와구) 원액	Mean	0.00	0.00	0.00	1.00	2.00	2.00	2.00***	2.00***
	SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
조협추출물제제 (에코와구) 200배 희석액	Mean	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

*** $p < 0.001$ significantly different from negative control group

(5) 귀 두께 변화

- 양성대조군과 조협추출물제제(에코와구)의 3일, 7일 및 8일째의 귀 두께는 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였으나, 조협추출물제제(에코와구)의 귀 두께는 음성대조군과 차이가 관찰되지 않았다.

표 66. Ear thickness changes in CBA/J mice treated with test substance

Dose	group	Ear thickness changes (mm)							
		Day 1		Day 3		Day 7		Day 8	
		Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
NC (AOO)	Mean	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08
	SD	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
PC (1% DNCB)	Mean	0.08	0.08	0.11 ^{***}	0.10	0.15 ^{**}	0.14 ^{***}	0.22 ^{***}	0.18 ^{***}
	SD	0.01	0.01	0.00	0.01	0.04	0.02	0.03	0.02
조합추출물 제제(에코와구) 원액	Mean	0.08	0.08	0.10 ^{**}	0.10 ^{**}	0.12 ^{***}	0.11 ^{***}	0.13 ^{***}	0.13 ^{***}
	SD	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01
조합추출물 제제(에코와구) 200배 희석액	Mean	0.09	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
	SD	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: significantly different from negative control group

(6) 부검소견

- 관찰기간 종료 후 모든 동물에 대하여 육안적 병리검사를 실시 한 결과, 모든 개체에서 특이적인 이상소견은 관찰되지 않았다.

표 67. Gross necropsy findings in CBA/J mice treated with a test substance

Dose group	No. of examined at terminal kill	Gross findings (internal and external)
NC (AOO)	4	NGF
PC (1% DNCB)	4	NGF
조합추출물제제(에코와구) 원액	4	NGF
조합추출물제제(에코와구) 200배 희석액	4	NGF

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

NGF: No gross findings

(7) 귀 림프절 중량

- 실험종료 후 채취된 귀 림프절 무게를 측정 한 결과, 양성대조군과 조합추출물제제(에코와구) 원액 시험군의 귀 림프절 중량은 음성대조군에 비교 시 유의하게 증가 하였으나, 조합추출물제제(에코와구) 200배 희석액 시험군의 귀 림프절 중량은 음성대조군과 차이가 없었다.

표 68. Lymph node weight in CBA/J mice treated with test substance

Dose group	Lymph node weight (mg)
NC (AOO)	3.7±0.3
PC (1% DNCB)	17.5±5.7***
조합추출물 제제(에코와구) 원액	7.2±1.1***
조합추출물 제제(에코와구) 200배 희석액	3.3±0.5

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

*** $p < 0.001$: significantly different from negative control group

(8) 세포수 변화

- 양성대조군과 조합추출물제제(에코와구) 원액 시험군의 세포수는 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.

표 69. Cell number measurement of lymph node cells

Dose group	Cell number (10^6 cell/ml)
NC (AOO)	2.63±0.54
PC (1% DNCB)	33.40±8.13***
조합추출물 제제(에코와구) 원액	13.70±3.60***
조합추출물 제제(에코와구) 200배 희석액	3.45±1.25

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

*** $p < 0.001$: significantly different from negative control

(9) 세포증식성(ATP 함량)

- 양성대조군과 조합추출물제제(에코와구) 원액 시험군의 ATP 함량은 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.

표 70. ATP content of lymph node cell

Dose group	ATP content (RLU, 10 ⁵)
NC (AOO)	14.56±1.10
PC (1% DNCB)	80.79±8.01***
조합추출물 제제(에코와구) 원액	42.31±4.24***
조합추출물 제제(에코와구) 200배 희석액	16.30±2.08

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

*** $p < 0.001$: significantly different from negative control

(10) 자극지수(SI) 평가

- 양성대조군과 시험물질 투여군의 평균 RLU를 음성대조군의 평균 RLU로 나누어 자극지수(SI)를 산출하였으며, 음성대조군의 SI 값을 1로 설정하였고 SI 값이 1.8 이상인 경우 양성으로 평가하였다.

- 양성대조군의 SI 값은 5.55으로, 조합추출물제제(에코와구) 원액 시험군의 SI값은 2.91으로 양성으로 판정되었으나, 조합추출물제제(에코와구) 200배 희석액 시험군의 SI값은 1.12로 음성으로 판정되었다.

표 71. Mean SI of test substance

Dose group	SI
NC (AOO)	1.00
PC (1% DNCB)	5.55
조합추출물 제제(에코와구) 원액	2.91
조합추출물 제제(에코와구) 200배 희석액	1.12

NC: Negative Control (AOO: Acetone: olive oil (4:1, v/v))

PC: Positive Control (1% DNCB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene)

사) 결 론

- 본 연구는 조합추출물 제제(에코와구)의 피부감작성 또는 과민성 여부를 확인하기 위하여 CBA/J 마우스에 조합추출물 제제(에코와구)을 피부 감각하여 제품의 독성정보를 확보하였다.

- 1일, 2일, 3일 및 7일째에 음성대조물질(Acetone: olive oil (4:1, v/v)), 양성대조물질 (1% DNCB) 및 시험물질(조협추출물 제제(에코와구) 원액 및 200배 희석액)을 각각 마우스 귓등에 도포하였으며, 8일 동안 사망 및 빈사동물의 발생여부, 임상증상, 체중변화, 흥반 여부 및 귀 두께 변화 등을 관찰하고, 관찰기간 종료시점인 8일째에 부검하여 귀 림프절 중량, 세포수 및 ATP 함량을 측정하여 세포증식성을 확인하였다.
- 조협추출물제제(에코와구) 원액 시험군은 시험물질 적용 직후 흥분 및 경련이 관찰되었으며, 2~3일째까지 흥분 또는 과민 반응이 관찰되었으며, 4일째부터 경미한 흥반이 관찰되다가 5일째부터 8일째까지 뚜렷한 흥반이 관찰되었다. 양성대조군에서는 4일째에 매우 가벼운 흥반이 관찰되다가 5일째부터 8일째까지 뚜렷한 흥반 또는 중등도의 흥반이 관찰되었으며 7일째에는 2마리에서 탈모가 관찰되었다. 음성대조군과 조협추출물제제(에코와구) 200배 희석액 시험군에서는 임상증상 및 흥반이 관찰되지 않았다.
- 조협추출물제제(에코와구) 200배 희석액 시험군을 제외한 양성대조군과 조협추출물제제 (에코와구) 원액 시험군의 귀 두께는 3일째부터 8일째까지 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 양성대조군과 조협추출물제제(에코와구) 원액 시험군의 귀 두께는 음성대조군 귀 두께 대비 25% 이상 증가하여 자극성이 확인되었다.
- 양성대조군과 조협추출물제제(에코와구) 원액 시험군의 귀 림프절 중량은 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였고, 양성대조군과 조협추출물제제(에코와구) 원액 시험군의 세포수와 ATP 함량은 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.
- 조협추출물제제(에코와구) 200배 희석액 시험군의 귀 중량, 세포수 및 ATP 함량은 음성대조군과 유의한 차이가 관찰되지 않았다.
- 양성대조군과 조협추출물제제(에코와구) 원액 시험군의 자극지수(SI)는 각각 5.55와 2.91으로 피부감작성 양성으로 판정되었으나, 조협추출물제제(에코와구) 200배 희석액의 자극지수(SI)값은 1.12로 피부감작성이 없는 것으로 판정되었다.
- 결론적으로 조협추출물제제(에코와구)의 피부감작성 시험결과, 조협추출물제제(에코와구) 원액의 SI 값이 2.91으로 피부감작이 유발되는 물질로 확인되어 사용시 주의가 필요한 물질로 확인되었다. 그러나 실제 현장에서의 사용 권장 농도인 조협추출물제제(에코와구) 200배 희석액은 SI 값이 1.12로서 피부감작이 유발되지 않는 것으로 확인되었다.
- 따라서 본 제품의 사용상의 주의사항에 「본 제품 원액은 직접피부접촉시 피부감작성이 유발할 수 있으므로 희석 시 장갑을 착용하는 등 피부 직접 접촉을 피하십시오」 라는 문구 추가가 필요한 것으로 평가되었다.

6. 조합복합추출물 혼합제의 개별 환경안전성 평가

가. 어류

1) 시험 방법

- 시험 개체 : 잉어 (*Cyprinus carpio*)
- 노출 방법 및 시간 : 지수식으로 96시간 동안 노출
- 시험 생물의 수 : 시험생물의 수는 반복구 없이 농도 당 10 마리 사용
광주기 16시간, 암주기 8시간을 유지하였으며, 시험기간 중 수온은 20 ~ 24℃ (최소 수온과 최대 수온의 차이가 2℃ 이내) 용존산소는 60% 이상을 유지하였다. 시험개시 24시간 전부터 시험종료시까지 먹이공급은 중단하였으며, 11 L의 유리재질의 원통형수조에 5 L의 시험용액을 사용하여 노출
- 노출 조건 : 예비시험 결과에 따라 대조군 및 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 및 10.0 mg/L 로 조제하여 지수식으로 96시간 동안 실시

2) 관찰 항목

- 치사, 이상증상 (평형상실, 유평이상, 출혈, 비정상적 호흡, 색소침착, 척추변형), 전장 및 전중 관찰 등

3) 독성 시험 결과

- 치사율 및 이상증상: 24시간 경과 시 0.63 및 1.25 mg/L에서는 치사가 관찰되지 않았고, 2.5, 5.0 및 10.0 mg/L에서는 20, 70 및 100%의 치사가 관찰되었다. 노출 후 48시간 경과시 0.63 및 1.25 mg/L에서는 치사가 관찰되지 않았고, 2.5, 5.0 및 10.0 mg/L에서는 30, 90 및 100%의 치사가 관찰되었다. 노출 후 72시간 경과 시 0.63 mg/L에서는 치사가 관찰되지 않았고, 1.25, 2.5, 5.0 및 10.0 mg/L에서는 10, 50, 100 및 100%의 치사가 관찰되었다. 노출 후 96시간 경과 시 0.63 mg/L에서는 치사가 관찰되지 않았고, 1.25, 2.5, 5.0 및 10.0 mg/L에서는 30, 70, 100 및 100%의 치사가 관찰되었다. 대조군에서는 시험 종료시까지 치사개체가 관찰되지 않았다

표 72. Cumulative lethal of *Cyprinus carpio*

Nominal concentration (mg/L) ¹⁾	Number of fish	Number of dead fish					
		3 hours	6 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	10	0	0	0	0	0	0
0.63	10	0	0	0	0	0	0
1.25	10	0	0	0	0	1	3
2.5	10	0	0	2	3	5	7
5.0	10	0	5	7	9	10	10
10.0	10	0	10	10	10	10	10

표 73. Cumulative mortality of *Cyprinus carpio*

Nominal concentration (mg/L) ¹⁾	Number of fish	Number of dead fish					
		3 hours	6 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	100	0	0	0	0	0	0
0.63	100	0	0	0	0	0	0
1.25	100	0	0	0	0	10	30
2.5	100	0	0	20	30	50	70
5.0	100	0	50	70	90	100	100
10.0	100	0	100	100	100	100	100

표 74. Observation on the abnormal response of the test substance for *Cyprinus carpio*

Nominal concentration (mg/L) ¹⁾	Abnormal response					
	3 hours	6 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	NOR(10) ²⁾	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)
0.63	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)
1.25	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(9)	NOR(7)
2.5	NOR(10)	NOR(10)	NOR(8)	NOR(7)	NOR(5)	NOR(3)
5.0	NOR(10)	NOR(5) LOE(5)	NOR(3)	NOR(1)	-	-
10.0	LOE(10)	LOE(7)	-	-	-	-

1) Active ingredient

2) Number of fish

Abbreviation of observable symptoms of intoxication

NOR : Normal

LOE : Loss of Equilibrium

- 전장 및 전중: 시험어의 전장 및 전중은 시험종료 후 대조군에서 10마리, 모든 처리군에서 무작위로 10마리를 취하여 조사하였고, 결과는 평균 및 표준편차로 나타내었다.
 - 대조군 시험어의 전장 및 전중: 3.62 cm ± 0.30 cm, 0.58 g ± 0.23 g
 - 처리군 시험어의 전장 및 전중: 3.56 cm ± 0.30 cm, 0.54 g ± 0.18 g

3) 독성 시험 판정

- 반수치사농도: 조협추출물제제(에코와구)에 대해 어류(*Cyprinus carpio*)를 이용하여 급성 독성을 지수식으로 평가한 결과 96 시간 반수치사농도(LC50)는 설정농도를 기준으로 1.970 mg/L로 나타났으며, 무영향농도(NOEC)는 0.63 mg/L 이었다.
 - LC50 및 무영향농도는 설정농도로 표기하였다.
 - 시험기간 중 결과에 영향을 미칠 수 있는 요인은 발생하지 않았다.

㉟ 75. Change of pH during the test periods

Nominal concentration (mg/L)	0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	7.84	7.28	7.11	7.57	7.67
0.63	8.00	7.19	7.04	7.57	7.54
1.25	8.04	7.12	6.99	7.53	7.51
2.5	7.94	7.03	6.86	7.56	7.49
5.0	7.94	6.92	6.81	-	-
10.0	7.98	6.88	-	-	-

㉟ 76. Change of water temperature during the test periods (Unit : °C)

Nominal concentration (mg/L)	0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	21.5	21.7	21.6	21.5	21.3
0.63	21.5	21.6	21.5	21.4	21.1
1.25	21.5	21.6	21.5	21.3	21.3
2.5	21.5	21.6	21.6	21.3	21.2
5.0	21.5	21.6	21.6	-	-
10.0	21.4	21.5	-	-	-

㉟ 77. Change of DO during test periods (Unit : mg/L)

Measured concentration (mg/L)	0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	8.26	7.68	7.20	6.55	5.77
0.63	8.46	7.68	7.13	6.52	5.68
1.25	8.06	7.67	7.09	6.56	5.81
2.5	8.36	7.57	7.16	6.61	5.62
5.0	8.17	7.72	6.89	-	-
10.0	8.12	7.62	-	-	-

㉟ 78. Change of % of air saturation value during test periods (Unit : %)

Measured concentration (mg/L)	0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	93.8	87.5	81.6	74.9	65.8
0.63	96.3	87.4	80.7	74.6	64.7
1.25	91.7	87.2	80.3	74.8	66.4
2.5	95.2	86.0	81.2	75.3	64.1
5.0	93.0	87.8	78.7	-	-
10.0	92.5	86.8	-	-	-

7. 조합복합추출물 혼합제의 안정성 평가

가. 제품의 기준

- 1) 성 상 : 직사광선을 피하여 백지를 배경으로 육안 관찰할 때 어두운 갈색의 반투명 액이어야 한다.
- 2) 확인시험 : 고속액체크로마토그래피 분석법으로 검액과 표준액을 HPLC에 의한 정량법에 따라 시험할 때, 검액의 피크는 표준품의 피크와 유지시간이 일치하여야 한다.
- 3) pH 확인: 동물용의약품공정서 일반시험법 중 pH측정법으로 시험 할 때 pH가 6.0~7.5 이어야 한다.
- 4) 내용량시험 : 동물용의약품 공정서 일반시험법 중 내용량 시험법으로 시험할 때 내용량이 표시량의 100% 이상이어야 한다.
- 5) 함량시험 : 고속액체크로마토그래피 분석법으로 유효성분의 함량이 적합하여야 한다.
- 6) 미생물한도시험 : 다음의 시험방법으로 시험시 생균수 허용기준 중 세균은 1×10^3 개/ml 이하, 진균 1×10^2 개/ml 이하, 특정미생물(대장균, 살모넬라, 녹농균, 황색포도상구균)은 불검출되어야 한다.

나. 시험기관의 명칭 소재지

- 1) 경기도 수원시 권선구 서둔동 서호로 89 (주)비오지노키

다. 책임자의 직책 성명

직책	이름
품질관리책임자 (연구소장)	양병근
시험자 (선임연구원)	김종욱

라. 구분

- (1) 제 품 명 : 에코와구 (고삼추출물+조합추출물)
- (2) 용량 규격 : 500 mL HDPE 기밀용기
- (3) 제조년월일

제조번호	제조일자	비고
ECO-190923	2019.09.23.	
ECO-190924	2019.09.24	
ECO-190929	2019.09.29	

마. 보존조건

- 1) 장기보존시험 : 온도 25 ± 2 °C, 습도 $60 \pm 5\%$ RH
- 2) 가속시험 : 온도 40 ± 2 °C, 습도 $75 \pm 5\%$ RH

바. 시공검체수 및 시험방법

- 1) 1롯트에 3회식 시험의 기준으로 한다. [3 Lot (1Lot :3검체)]

사. 시험실시일 및 시험항목

1) 장기보존시험

1-1. 제조시

2019년 10월 05일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

1-2. 3개월

2020년 01월 08일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

1-3. 6개월

2020년 04월 07일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

1-4. 9개월

2020년 07월 05일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

1-5. 12개월

2020년 10월 11일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

2) 가속시험

2-1. 제조시

2019년 10월 12일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

2-2. 2개월

2019년 12월 16일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

2-3. 4개월

2020년 02월 11일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

2-4. 6개월

2020년 04월 13일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

2-5. 12개월

2020년 10월 18일	-	정상	확인	내용량	pH	함량	미생물
---------------	---	----	----	-----	----	----	-----

◆ 정상시험 (장기보존시험)

시험법 : 투명한 종이위에 제품을 놓고 관찰한다.

시험항목		어두운 갈색 반투명, 마늘냄새					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2°C	ECO-1 90923	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합
습도 60±5% RH	ECO-1 90924	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합
	ECO-1 90929	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합

◆ 확인시험 (장기보존시험)

각각의 확인시험법에 따라 확인한다.

시험항목		확인시험법					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2°C	ECO-1 90923	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합
습도 60±5% RH	ECO-1 90924	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합
	ECO-1 90929	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합

◆ 내용량시험 (장기보존시험)

그램단위를 백분율로 환산한 %값

시험항목			저울을 사용하여 100% 이상이어야 한다.					
보존 조건	경시 제조번호		최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
			2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2 °C 습도 60±5% RH	ECO-1 90923	1	101.8%	101.6%	101.1%	101.4%	101.7%	
		2	102.1%	102.2%	101.5%	101.4%	101.5%	
		3	102.0%	101.1%	100.9%	100.5%	100.4%	
	평균			101.97%	101.63%	101.17%	101.15%	101.20%
	ECO-1 90924	1	103.3%	102.0%	103.6%	103.5%	103.3%	
		2	100.4%	101.2%	101.3%	101.4%	101.7%	
		3	100.9%	102.9%	103.1%	102.4%	100.6%	
	평균			101.53%	102.03%	102.67%	102.43%	101.87%
	ECO-1 90929	1	101.1%	100.8%	102.8%	101.6%	102.1%	
		2	101.4%	101.7%	101.2%	101.5%	100.8%	
		3	103.2%	102.7%	102.4%	101.6%	101.6%	
	평균			101.90%	101.73%	102.13%	101.56%	101.50%

◆ pH시험 (장기보존시험)

시험법 : 표준완충액 pH 6.0 ~ 7.5에서 각각 pH=1.0마다 59.2mV씩 변화하는가를 확인한다.

시험항목			pH 시험에 준하여 시험한다.					
보존 조건	경시 제조번호		최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
			2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2 °C 습도 60±5% RH	ECO-1 90923	1	6.52	6.52	6.56	6.55	6.57	
		2	6.56	6.52	6.53	6.53	6.53	
		3	6.51	6.55	6.55	6.55	6.52	
	평균			6.53	6.53	6.54	6.54	6.54
	ECO-1 90924	1	6.50	6.53	6.51	6.52	6.51	
		2	6.56	6.56	6.52	6.54	6.45	
		3	6.53	6.52	6.51	6.56	6.57	
	평균			6.53	6.54	6.51	6.54	6.51
	ECO-1 90929	1	6.57	6.56	6.55	6.61	6.54	
		2	6.54	6.56	6.60	6.53	6.56	
		3	6.56	6.56	6.59	6.54	6.52	
	평균			6.56	6.56	6.58	6.56	6.54

◆ 함량 시험성적표 (장기보존시험)

1. 마트린 (Matrine, 0.3% 이상)

시험항목		함량시험법					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2 °C 습도 60±5% RH	ECO-1 90923	1	0.35%	0.34%	0.34%	0.34%	0.33%
		2	0.34%	0.35%	0.35%	0.35%	0.35%
		3	0.35%	0.35%	0.33%	0.33%	0.35%
	평균		0.35%	0.35%	0.34%	0.34%	0.34%
	ECO-1 90924	1	0.36%	0.36%	0.35%	0.35%	0.34%
		2	0.36%	0.35%	0.35%	0.35%	0.33%
		3	0.37%	0.36%	0.37%	0.35%	0.34%
	평균		0.36%	0.36%	0.36%	0.35%	0.34%
	ECO-1 90929	1	0.35%	0.33%	0.33%	0.34%	0.34%
		2	0.33%	0.32%	0.34%	0.33%	0.33%
		3	0.34%	0.35%	0.35%	0.35%	0.34%
	평균		0.34%	0.33%	0.34%	0.34%	0.34%

2. 사포닌 (Saponin, 10.0% 이상)

시험항목		함량시험법					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2 °C 습도 60±5% RH	ECO-1 90923	1	11.5%	11.4%	11.5%	11.4%	11.3%
		2	11.4%	11.5%	11.4%	11.5%	11.2%
		3	11.5%	11.5%	11.5%	11.4%	11.4%
	평균		11.47%	11.47%	11.47%	11.43%	11.30%
	ECO-1 90924	1	11.5%	11.4%	11.5%	11.3%	11.3%
		2	11.4%	11.4%	11.5%	11.5%	11.2%
		3	11.4%	11.5%	11.4%	11.4%	11.3%
	평균		11.43%	11.43%	11.47%	11.40%	11.27%
	ECO-1 90929	1	11.5%	11.5%	11.4%	11.5%	11.5%
		2	11.4%	11.5%	11.5%	11.4%	11.3%
		3	11.6%	11.6%	11.5%	11.3%	11.3%
	평균		11.50%	11.53%	11.47%	11.40%	11.37%

◆ 미생물한도시험

1. 총세균수 1,000 CFU/ml 이하

시험항목		총세균수 1,000 CFU/ml 이하					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2 °C 습도 60±5% RH	ECO-1 90923	1	89 CFU/ml	31 CFU/ml	25 CFU/ml	7 CFU/ml	14 CFU/ml
		2	92 CFU/ml	41 CFU/ml	37 CFU/ml	12 CFU/ml	9 CFU/ml
		3	49 CFU/ml	29 CFU/ml	18 CFU/ml	23 CFU/ml	12 CFU/ml
		평균	77 CFU/ml	34 CFU/ml	27 CFU/ml	14 CFU/ml	12 CFU/ml
	ECO-1 90924	1	78 CFU/ml	50 CFU/ml	32 CFU/ml	5 CFU/ml	10 CFU/ml
		2	93 CFU/ml	27 CFU/ml	30 CFU/ml	13 CFU/ml	2 CFU/ml
		3	59 CFU/ml	34 CFU/ml	17 CFU/ml	6 CFU/ml	9 CFU/ml
		평균	77 CFU/ml	37 CFU/ml	26 CFU/ml	8 CFU/ml	7 CFU/ml
	ECO-1 90929	1	87 CFU/ml	27 CFU/ml	13 CFU/ml	16 CFU/ml	4 CFU/ml
		2	58 CFU/ml	50 CFU/ml	29 CFU/ml	6 CFU/ml	16 CFU/ml
		3	76 CFU/ml	32 CFU/ml	18 CFU/ml	13 CFU/ml	11 CFU/ml
		평균	74 CFU/ml	36 CFU/ml	20 CFU/ml	12 CFU/ml	10 CFU/ml

2. 총진균수 100 CFU/ml 이하

시험항목		총진균수 100 CFU/ml 이하					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2 °C 습도 60±5% RH	ECO-1 90923	1	50 CFU/ml	22 CFU/ml	12 CFU/ml	2 CFU/ml	0 CFU/ml
		2	21 CFU/ml	16 CFU/ml	10 CFU/ml	5 CFU/ml	1 CFU/ml
		3	47 CFU/ml	12 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
		평균	39 CFU/ml	17 CFU/ml	8 CFU/ml	2 CFU/ml	0 CFU/ml
	ECO-1 90924	1	50 CFU/ml	12 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml
		2	25 CFU/ml	23 CFU/ml	10 CFU/ml	2 CFU/ml	0 CFU/ml
		3	65 CFU/ml	6 CFU/ml	2 CFU/ml	3 CFU/ml	2 CFU/ml
		평균	47 CFU/ml	14 CFU/ml	4 CFU/ml	2 CFU/ml	1 CFU/ml
	ECO-1 90929	1	36 CFU/ml	23 CFU/ml	16 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml
		2	42 CFU/ml	14 CFU/ml	8 CFU/ml	0 CFU/ml	2 CFU/ml
		3	67 CFU/ml	14 CFU/ml	12 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml
		평균	48 CFU/ml	17 CFU/ml	12 CFU/ml	1 CFU/ml	1 CFU/ml

3. 특정미생물(대장균, 살모넬라, 녹농균, 황색포도상구균) 불검출

시험항목		특정미생물 불검출(음성)					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	3 개 월	6 개 월	9 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 05일	2020년 01월 08일	2020년 04월 07일	2020년 07월 05일	2020년 10월 11일	
온도 25±2 °C 습도 60±5% RH	ECO-1 90923	1	음성	음성	음성	음성	음성
		2	음성	음성	음성	음성	음성
		3	음성	음성	음성	음성	음성
	ECO-1 90924	1	음성	음성	음성	음성	음성
		2	음성	음성	음성	음성	음성
		3	음성	음성	음성	음성	음성
	ECO-1 90929	1	음성	음성	음성	음성	음성
		2	음성	음성	음성	음성	음성
		3	음성	음성	음성	음성	음성

◆ 정상시험 (가속시험)

시험법 : 투명한 종이위에 제품을 놓고 관찰한다.

시험항목		어두운 갈색 반투명, 마늘냄새					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일	
온도 40±2°C	ECO-1 90923	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합
습도 75±5% RH	ECO-1 90924	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합
	ECO-1 90929	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합

◆ 확인시험 (가속시험)

각각의 확인시험법에 따라 확인한다.

시험항목		확인시험법					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일	
온도 40±2°C	ECO-1 90923	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합
습도 75±5% RH	ECO-1 90924	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합
	ECO-1 90929	1	적합	적합	적합	적합	적합
		2	적합	적합	적합	적합	적합
		3	적합	적합	적합	적합	적합

◆ 내용량시험 (가속시험)

그램단위를 백분율로 환산한 %값

시험항목			저울을 사용하여 100% 이상이어야 한다.				
보존 조건	경시		최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월
	제조번호		2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일
온도 40±2 °C 습도 75±5% RH	ECO-1 90923	1	101.4%	103.5%	102.6%	103.6%	101.5%
		2	100.3%	102.9%	100.1%	103.2%	102.4%
		3	102.5%	102.9%	103.4%	102.2%	100.6%
	평균		101.40%	103.10%	102.03%	103.00%	101.50%
	ECO-1 90924	1	100.3%	101.0%	100.8%	103.3%	103.6%
		2	102.7%	103.1%	101.4%	101.4%	101.7%
		3	102.7%	102.4%	102.9%	101.8%	100.1%
	평균		101.90%	102.17%	101.70%	102.17%	101.80%
	ECO-1 90929	1	100.5%	100.1%	100.0%	102.5%	101.8%
		2	100.5%	100.3%	102.0%	100.7%	100.5%
		3	101.1%	100.8%	102.6%	101.4%	102.5%
	평균		100.70%	100.40%	101.53%	101.53%	101.60%

◆ pH시험 (가속시험)

시험법 : 표준완충액 pH 6.0 ~ 7.5에서 각각 pH=1.0마다 59.2mV씩 변화하는가를 확인한다.

시험항목			pH 시험에 준하여 시험한다.				
보존 조건	경시		최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월
	제조번호		2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일
온도 40±2 °C 습도 75±5% RH	ECO-1 90923	1	6.56	6.57	6.66	6.64	6.6
		2	6.55	6.56	6.55	6.58	6.71
		3	6.56	6.51	6.56	6.66	6.74
	평균		6.56	6.55	6.59	6.63	6.68
	ECO-1 90924	1	6.53	6.56	6.65	6.68	6.72
		2	6.55	6.61	6.56	6.55	6.63
		3	6.57	6.53	6.57	6.57	6.57
	평균		6.55	6.57	6.59	6.60	6.64
	ECO-1 90929	1	6.54	6.62	6.58	6.59	6.73
		2	6.57	6.56	6.57	6.58	6.67
		3	6.57	6.57	6.59	6.66	6.71
	평균		6.56	6.58	6.58	6.61	6.70

◆ 함량 시험성적표 (가속시험)

1. 마트린 (Matrine, 0.3% 이상)

시험항목		함량시험법					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일	
온도 40±2 °C 습도 75±5% RH	ECO-1 90923	1	0.35%	0.35%	0.35%	0.34%	0.33%
		2	0.36%	0.35%	0.33%	0.33%	0.33%
		3	0.34%	0.34%	0.34%	0.33%	0.32%
	평균		0.35%	0.35%	0.34%	0.33%	0.33%
	ECO-1 90924	1	0.35%	0.35%	0.34%	0.35%	0.33%
		2	0.35%	0.35%	0.33%	0.35%	0.34%
		3	0.36%	0.35%	0.36%	0.36%	0.32%
	평균		0.35%	0.35%	0.34%	0.35%	0.33%
	ECO-1 90929	1	0.37%	0.36%	0.36%	0.37%	0.35%
		2	0.36%	0.37%	0.36%	0.36%	0.36%
		3	0.35%	0.33%	0.34%	0.35%	0.34%
	평균		0.36%	0.35%	0.35%	0.36%	0.35%

1. 사포닌 (Saponin, 10.0% 이상)

시험항목		함량시험법					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일	
온도 40±2 °C 습도 75±5% RH	ECO-1 90923	1	11.5%	11.5%	11.5%	11.4%	11.2%
		2	11.5%	11.5%	11.4%	11.3%	11.2%
		3	11.5%	11.5%	11.4%	11.4%	11.1%
	평균		11.50%	11.50%	11.43%	11.37%	11.17%
	ECO-1 90924	1	11.6%	11.4%	11.5%	11.3%	11.1%
		2	11.5%	11.5%	11.4%	11.5%	11.2%
		3	11.4%	11.5%	11.4%	11.3%	11.2%
	평균		11.50%	11.47%	11.43%	11.37%	11.17%
	ECO-1 90929	1	11.5%	11.5%	11.5%	11.3%	11.3%
		2	11.5%	11.5%	11.4%	11.4%	11.3%
		3	11.6%	11.5%	11.5%	11.4%	11.2%
	평균		11.53%	11.50%	11.47%	11.37%	11.27%

◆ 미생물한도시험

1. 총세균수 1,000 CFU/ml 이하

시험항목			총세균수 1,000 CFU/ml 이하				
보존 조건	경시 제조번호		최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월
			2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일
온도 40±2 °C 습도 75±5% RH	ECO-1 90923	1	76 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
		2	71 CFU/ml	2 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml
		3	57 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
	평균		68 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
	ECO-1 90924	1	87 CFU/ml	0 CFU/ml	3 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
		2	74 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
		3	61 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	2 CFU/ml
	평균		74 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml
	ECO-1 90929	1	47 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml
		2	71 CFU/ml	2 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
		3	70 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
	평균		63 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml

2. 총진균수 100 CFU/ml 이하

시험항목			총진균수 100 CFU/ml 이하				
보존 조건	경시 제조번호		최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월
			2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일
온도 40±2 °C 습도 75±5% RH	ECO-1 90923	1	17 CFU/ml	4 CFU/ml	2 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml
		2	32 CFU/ml	2 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml
		3	27 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml
	평균		25 CFU/ml	2 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml
	ECO-1 90924	1	21 CFU/ml	6 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
		2	40 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
		3	37 CFU/ml	4 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml
	평균		33 CFU/ml	4 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
	ECO-1 90929	1	55 CFU/ml	6 CFU/ml	0 CFU/ml	2 CFU/ml	0 CFU/ml
		2	62 CFU/ml	2 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
		3	38 CFU/ml	5 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
	평균		52 CFU/ml	4 CFU/ml	0 CFU/ml	1 CFU/ml	0 CFU/ml

3. 특정미생물(대장균, 살모넬라, 녹농균, 황색포도상구균) 불검출

시험항목		특정미생물 불검출(음성)					
보존 조건	경시 제조번호	최초 시험	2 개 월	4 개 월	6 개 월	12 개 월	
		2019년 10월 12일	2019년 12월 08일	2020년 02월 11일	2020년 04월 13일	2020년 10월 11일	
온도 40±2 °C 습도 75±5% RH	ECO-1 90923	1	음성	음성	음성	음성	음성
		2	음성	음성	음성	음성	음성
		3	음성	음성	음성	음성	음성
	ECO-1 90924	1	음성	음성	음성	음성	음성
		2	음성	음성	음성	음성	음성
		3	음성	음성	음성	음성	음성
	ECO-1 90929	1	음성	음성	음성	음성	음성
		2	음성	음성	음성	음성	음성
		3	음성	음성	음성	음성	음성

아. 시험결과에 대한 시험 책임자의 종합 의견

- 12개월 동안 장기보존(25±2°C, 60±5%RH) 상태에서 성장, 확인, 함량, 내용량, pH, 미생물에 대하여 보존상태에서 큰 변화가 없었고, 함량에도 아무런 영향을 미치지 않았다.
- 12개월 동안 가속시험(40±2°C, 75±5%RH)에서 성장, 확인, 함량, 내용량, pH, 미생물에 대하여 보존상태에서 큰 변화가 없었고, 함량에도 아무런 영향을 미치지 않았다.

8. 개발 복합제의 야외임상효능 평가

가. 닭 진드기에 대한 in vitro 효능 시험

1) 공시충

- *Dermanyssus gallinae*, 성충

2) 시험물질의 조제 및 희석

- 조합추출물제제(에코와구) 희석농도 1:100, 1:200 및 1:500는 시험당일 희석하여 희석액을 투명 스프레이병에 넣어 준비하였다.

3) 시험방법

- 닭진드기에 감염되어 있는 농가 3곳에서 각각 채집된 닭진드기를 각 희석농도별로 breeding dish (⊙50mm×15mm)의 55 mm filter paper 위에 약 50마리씩 3반복 준비한 후, 각 희석 농도별로 준비된 스프레이를 층체에 5회(0.5mL) 분사하였다. 농도별 노출시간은 1분, 5분, 10분, 30분 및 1시간을 기준으로 하였으며, 노출 후 새로운 breeding dish에 닭진드기를 옮기고 탈출을 방지하기 위하여 뚜껑을 덮고 파라필름으로 감싼 후 항온항습기(온도 20°C, 습도 60%)에 넣고 1시간, 2시간, 4시간, 8시간 및 24시간째에 닭진드

기 사멸수를 확인하였다.

4) 살충률 평가

- 무처치군과 비교하여 움직임이 없는 개체를 죽은 개체로 판단하여 치사율을 계산하였다.
- 무처치군의 치사율이 5% 이상일 때는 슈나이더오렐리 공식(Schneider-Orelli's formula)을 사용하며, 무처치군의 치사율이 20%를 넘으면 재시험하였다.

$$\text{Corrected Mortality} = \frac{\text{처리군의 치사율} - \text{대조군의 치사율}}{100 - \text{대조군의 치사율}} \times 100 (\%)$$

$$\text{Mortality} = \frac{\text{죽은 기생충 수}}{\text{공시 기생충 수}} \times 100 (\%)$$

나. 임상효능 및 안전성 시험

- 야외임상효능시험은 호서대학교 동물실험윤리위원회의 심의절차를 거쳐 승인을 득한 후 실시하였다 (승인번호: HSIACUC-20-78(1)).

1) 시험농장

- 본 실험은 야외 농가 3곳에서 진행하였으며 농장정보는 다음과 같다.

표 79. 농장정보

농장 기호	농장명 (농장주)	주소	사육시스템	품종	사육규모 (사육수)	주령
A	성주농장	경기도 평택시	무창계사	하이라인	70,000	28주령
		팽성읍 대추길 10	직립식 케이지	브라운		
B	남양양계	경기도 화성시	무창계사	하이라인	50,000	36주령
		남양읍 온석서길 108	직립식 케이지	브라운		
C	봉황농장	경기도 화성시	무창계사	하이라인	50,000	30주령
		신남동 906-16	직립식 케이지	브라운		



A 농장

B 농장

C 농장

그림 26. Farming system for laying hens breeding

2) 시험군 구성 및 물질 살포 방법

가) 시험군의 구성

- 각 농장별 시험군의 구성은 아래와 같다. 즉, A농장, B농장, C농장 모두 음성대조군, 1배용량 살포군 및 2배용량 살포군을 설정하여 시험하였다.

표 80. 농장별 시험군의 구성

농장	시험군 구성	주령	개체수	처리방법
A	음성대조군	28주령	10,000	무처리
	1배용량 살포군 (효능시험)	28주령	10,000	200배 희석액을 계사면적 1m ² 당 약 500mL의 양으로 살포, 7일간격으로 2회 살포
	2배용량 살포군 (안전성)	28주령	10,000	10배 희석액을 계사면적 1m ² 당 약 500mL의 양으로 살포, 7일간격으로 2회 살포
B	음성대조군	36주령	10,000	무처리
	1배용량 살포군 (효능시험)	36주령	10,000	200배 희석액을 계사면적 1m ² 당 약 500mL의 양으로 살포, 7일간격으로 2회 살포
	2배용량 살포군 (안전성)	36주령	10,000	10배 희석액을 계사면적 1m ² 당 약 500mL의 양으로 살포, 7일간격으로 2회 살포
C	음성대조군	30주령	10,000	무처리
	1배용량 살포군 (효능시험)	30주령	10,000	200배 희석액을 계사면적 1m ² 당 약 500mL의 양으로 살포, 7일간격으로 2회 살포
	2배용량 살포군 (안전성)	30주령	10,000	10배 희석액을 계사면적 1m ² 당 약 500mL의 양으로 살포, 7일간격으로 2회 살포

나) 시험물질 살포 방법

- 1배용량 살포군에서는 닭진드기가 감염된 계사 내에 닭이 있는 상태에서 200배 희석액을 계사면적 1m²당 희석액 약 500 mL를 분무하였으며, 7일 후에 2차 분무하였다.
- 2배용량 살포군에는 계사 내에 닭이 있는 상태에서 100배 희석액을 계사면적 1m²당 희석액 약 500 mL를 분무하였으며, 7일 후에 2차 분무하였다. 살포 시 시험물질을 케이지 바깥 부분, 케이지 천장, 바닥, 안쪽, 밥통 아래, 케이지 밑부분, 좁은 틈 등에 골고루 살포하였다.



그림 27. Spraying test substances on the cage of laying hens

3) 트랩 설치 및 회수

- 각 시험군별 10개 이상의 닭진드기 트랩(폴리에틸렌 튜브, 외경은 22mm, 내경은 19mm이고, 80×50mm 길이의 골판지 포함)을 사용하였으며, 시험물질 살포 7일전(D-7), 시험물질 1차 살포 당일(D0), 2차 살포일(D7), 1차 살포 후 14일, 21일 및 28일에 트랩을 설치한 후 48시간 이내에 수거하였다. 트랩 설치 위치는 집란 벨트 주변, 사료통 아래와 주변, 에어덕트 주변위치에 설치하였다.

표 81. 농장별 트랩 설치 일정

농장	살포전 7일	1차 살포(D0) (24시간이내 설치)	1차 살포 후			
			7일 (2차 살포)	14일	21일	28일
A	O	O	O	O	O	O
B	O	O	O	O	O	O
C	O	O	O	O	O	O



그림 28. Mite traps used experiment

- A white polyethylene tubes with outer and inner diameters of 22 mm and 19 mm, respectively, containing rolled corrugated 80×50mm cardboard.



그림 29. Placement of traps in hen house

4) 관찰항목

가) 체중측정

- 시험물질 살포 전(Day 0), 2차 살포 당일(Day 7), 2차 살포 후 1일(Day 8), 4일(Day 11), 7일(Day 14) 및 14일(Day 21)째에 각 농장 군당 무작위로 30수 내외의 닭을 선발하여 체중을 측정해 시험물질 살포로 인한 군별 체중변화를 조사하였다.

나) 임상증상 관찰

- 시험물질 살포 개시시점부터 28일간 임상증상을 관찰하였다.

표 82. 약물 살포 후 안전성 증상 별 임상 지수

	임상증상	임상지수
행동이상	정상	0
	소리에 반응	1
	소리에 둔감	2
	무관심, 눈이 감김, 균형소실	3
	무관심, 소리에 무반응, 눈이 감김, 의식 없음(졸음), 기립불능	4
외관	정상	0
	깃털 조강	1
	벼슬 이상 (청색증, 어둡게 보임)	2
분변	정상	0
	항문이 지저분함	1
	황녹색변	2
	녹색변	3
폐사	폐사	20

다) 산란율 및 난중 측정

- 시험물질 살포 7일 전부터 시험 종료일까지 7일 간격으로 산란율과 난중을 측정하

였다.

라) 혈액학치 및 혈액화학치 분석

- 시험물질 살포 전(Day 0), 1차 살포 후 1일(Day 1), 7일(2차 살포 전, Day 7), 10일(Day 10) 및 14일(Day 14)째에 각 농장 군당 무작위로 닭 10마리를 선발하여 혈액학치 및 혈액화학치 분석을 실시하였다.

- 혈액학치 분석을 위해 날개정맥에서 혈액을 채취하여 혈액 1 mL를 potassium EDTA tube에 넣어 섞은 후 혈액학치를 분석하였다. 혈액학치 분석장비(Urit-3000 Vet plus Hematology analyzer, Urit medical electronic)를 이용하여 헤모글로빈(HGB), 적혈구용적(HCT)를 측정하였으며, RBC는 멸균 생리식염수로 전혈을 200배 희석하여 hemocytometer를 이용하여 측정하였다. RBC, HCT 및 HGB를 이용하여 적혈구 평균용적(mean corpuscular volume, MCV), 적혈구 평균혈색소(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 적혈구혈색소 평균농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)를 계산하였다.

- 전혈 0.1mL를 RBC cell lysis buffer(1% ammonium oxalate) 1.9mL에 첨가하여 3분간 혼합하여 적혈구를 용혈시킨 후 hemocytometer를 이용하여 총 백혈구수를 측정하였다.

- 혈액화학적 검사를 위하여 산란계를 보정한 후 날개정맥을 통하여 혈액을 채취하여 응고시킨 후 상층액을 분리한 후 원심분리하여 상층액을 -80°C에 보관하였다. 혈액화학치 분석은 혈액화학치 분석장비(COBAS C702)를 이용하여 Alanine aminotransaminase (ALT), Aspartate transaminase (AST), Alkaline phosphatase (ALP), 총 단백질 (Total protein, T-PRO), Albumin (ALB), 총 빌리루빈 (Total bilirubin, T-BIL), Glucose (GLU), 총 콜레스테롤(Total cholesterol, T-CHO), 중성지방(TG), 혈중 요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN), Creatinine (CREA)을 측정하였다.

마) 닭진드기(Red mites) 무게 및 수 측정

- 수거된 트랩을 -80°C에 즉시 냉동시켜 닭진드기를 동결한 후 약점시에 트랩의 카톤 층(carton-layers)에 있는 진드기들을 붓으로 분리하여 저울로 무게를 측정하였다. 무게 측정이 끝난 시료는 실체 현미경(OLYMPUS-SZ61)을 통해 진드기(성충) 수를 측정하였다.



그림 30. Red mites observed under astereomicroscope

5) 닭진드기 구제 효과 평가

- 시험물질 살포 후 각각의 시점에 대한 계사의 총 닭진드기 감소 비율(성충)을 Hender-Tilton 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Efficacy \%} = \left(1 - \frac{nCo_{before\ treat} \times nT_{after\ treat}}{nCo_{before\ treat} \times nT_{after\ treat}} \right) \times 100$$

(n = Insect population, T = treated, Co = control)

다. 통계 처리

- 통계처리는 STATISTICA 프로그램을 이용하여 F-test를 실시하였다. 즉, LSD를 이용한 One-way ANOVA 분석을 하였고, 이후 Duncan 분석에 의하여 사후 검정을 실시하였다.

라. 결과

1) 닭진드기에 대한 in vitro 효능 시험 결과

가) in vitro 살충률 평가

- 대조군의 치사율은 5% 이하로 확인되었으며, 각 농장에서 채집된 닭진드기에 대한 각 희석농도(100배, 200배 및 500배 희석액)별 노출시간(1분, 5분, 10분, 30분 및 60분)에 따른 살충률을 확인하였다.

- A 농장의 경우 100배 희석액에서는 1분 및 5분 노출 후 24시간째까지 살충률이 50% 미만이었으며, 10분 노출 후 4시간째에 살충률이 59.7% 이었고, 24시간째에는 79.5%이었다. 100배 희석액 30분 노출 후 1시간째에 살충률이 80.7%이었고, 4시간째에는 92.0%, 24시간째에는 97.3%이었으며, 60분 노출시에는 노출 후 1시간째에 살충률이 97.3% 이었으며, 24시간째에는 99.3%의 살충률을 보였다. 200배 희석액의 경우 10분 노출 후 24시간째에 51.6% 살충률이 확인되었으며, 30분 노출에 따른 살충률은 1시간째 60.0%, 24시간째에 78.0%이었으며, 60분 노출 시 살충률은 1시간째에 70.7%, 24시간째에 88.7%이었다. 500배 희석액은 1분, 5분, 10 분 및 30분 노출 후 24시간째까지 살충률이 50% 미만이었으며, 60분 노출 후 24시간째에 54.0%의 살충률을 보였다.

- B 농장 닭진드기의 경우 100배 희석액에 1분 및 5분 노출 시 24시간째까지 살충률이 50% 미만이었으며, 10분 노출 후 8시간째와 24시간째의 살충률이 각각 51.3%와 68.0%이었다. 100배 희석액 30분 노출 후 1시간째에 67.3%의 살충률이 확인되었으며, 시간이 경과할수록 살충률이 증가하여, 24시간째에는 살충률이 90.7%이다. 100배 희석액에 60분 노출시에는 노출 후 1시간째에 살충률이 78.7%이었으며, 24시간째에는 94.0%의 살충률을 보였다. 200배 희석액의 경우 1분, 5분 및 10분 노출 후 24시간째까지 살충률이 50% 미만이었으며, 30분 노출시에는 노출 후 4시간째부터 50% 이상의 살충률이 확인되었고, 60분 노출 시 살충률은 2시간째에 52.7%, 24시간째에 75.3%이었다. 500배 희석액은 1분, 5분, 10 분, 30분 및 60분 노출 후 24시간째까지 살충률이 50% 미만이었다.

- C 농장에서 채집한 닭진드기의 경우 100배 희석액에서는 1분 및 5분 노출 후 24시간째까지 살충률이 50% 미만이었으며, 10분 노출 후 2시간째부터 24시간째까지 살충률이 54.9~78.2%이었고, 30분 노출시에는 1시간째에 살충률이 68.0%이었고, 24시간째에는 92.7%이었으며, 60분 노출시에는 노출 후 1시간째에 살충률이 92.7% 이었으며, 24시간째에는 100%의 살충률을 보였다. 200배 희석액의 경우 1분 및 5분 노출시에는 관찰시간 동안 살충률이 50% 미만이었고, 10분 노출 후 8시간째, 24시간째의 살충률이 각각 50.7%와 55.3%이었으며, 30분 노출시에는 살충률이 2시간째에 56.4%, 24시간째에 76.0%이었으며, 60분 노출 시 살충률은 1시간째에 69.7%, 24시간째에 85.5%이었다. 500배 희석액은 1분, 5분, 10 분 및 30분 노출 후 24시간째까지 살충률이 50% 미만이었으며, 60분 노출 후 8시간째부터 24시간째까지 50% 이상의 살충률을 보였다.

표 83. A 농장 닭진드기(red mite)에 대한 *in vitro* 살충률 (단위: %)

희석배수	노출시간 (min)	관찰 시간(hr)					
		0	1	2	4	8	24
음성대조군	1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	10	0.0±0.0	0.7±1.2	0.7±1.2	0.7±1.2	0.7±1.2	0.7±1.2
	30	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	60	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
100배 희석액	1	0.0±0.0	5.3±4.1	5.3±4.1	5.9±3.4	8.6±2.3	9.3±3.0
	5	0.0±0.0	12.0±2.0	20.0±5.3	21.3±4.2	36.0±7.2	47.3±8.3
	10	0.0±0.0	21.8±5.0	40.4±8.5	59.7±31.4	62.9±6.4	79.5±7.0
	30	0.0±0.0	80.7±3.1	87.3±3.1	92.0±2.0	96.0±4.0	97.3±3.1
	60	0.0±0.0	97.3±3.1	97.3±3.1	98.0±2.0	98.0±2.0	99.3±1.2
200배 희석액	1	0.0±0.0	2.7±2.3	3.3±1.2	4.7±1.2	5.3±2.3	5.3±2.3
	5	0.0±0.0	5.3±3.1	10.0±2.0	10.0±2.0	13.3±1.2	27.3±7.0
	10	0.0±0.0	9.1±1.0	14.9±8.9	17.5±7.5	33.9±11.4	51.6±7.4
	30	0.0±0.0	60.0±7.2	68.7±4.2	74.0±9.2	75.3±9.0	78.0±8.0
	60	0.0±0.0	70.7±10.3	72.7±10.3	78.0±7.2	82.7±6.4	88.7±4.2
500배 희석액	1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.3±1.2	2.7±1.2
	5	0.0±0.0	2.0±2.0	2.7±1.2	2.7±1.2	3.3±2.3	9.3±1.2
	10	0.0±0.0	5.4±1.1	5.4±1.1	9.4±1.2	10.7±1.3	22.1±5.1
	30	0.0±0.0	20.7±3.1	24.7±6.1	26.0±6.0	30.0±2.0	38.7±3.1
	60	0.0±0.0	17.3±7.0	24.7±6.4	26.0±5.3	33.3±4.6	54.0±9.2

표 84. B 농장 닭진드기(red mite)에 대한 *in vitro* 살충률

(단위: %)

희석배수	노출시간 (min)	관찰 시간(hr)					
		0	1	2	4	8	24
음성대조군	1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±1.2	1.3±1.2	2.0±2.0	2.0±2.0
	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	10	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	30	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±1.2
	60	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.3±1.2	1.3±1.2	1.3±1.2
100배 희석액	1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.3±1.2	2.7±2.3	5.4±4.3
	5	0.0±0.0	6.8±2.3	12.9±5.7	18.2±10.4	23.7±9.0	34.0±8.1
	10	0.0±0.0	20.7±10.1	36.0±10.6	41.3±8.1	51.3±11.0	68.0±12.5
	30	0.0±0.0	67.3±6.1	75.3±5.0	77.3±3.1	78.7±4.2	90.7±6.1
	60	0.0±0.0	78.7±13.3	80.0±11.1	84.0±6.0	86.7±6.1	94.0±8.7
200배 희석액	1	0.0±0.0	0.7±1.2	0.7±1.2	0.7±1.2	2.0±2.0	4.0±4.0
	5	0.0±0.0	1.3±1.2	2.7±1.2	4.7±1.2	6.7±3.1	12.7±3.1
	10	0.0±0.0	14.7±7.6	22.0±3.5	23.3±5.0	32.7±6.4	39.3±8.3
	30	0.0±0.0	40.9±7.7	47.0±7.8	57.1±14.7	61.8±14.2	67.2±9.8
	60	0.0±0.0	48.7±11.7	52.7±10.3	59.3±8.1	69.3±8.1	75.3±11.0
500배 희석액	1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	2.0±0.0
	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±1.2	0.7±1.2	1.3±2.3	5.3±2.3
	10	0.0±0.0	2.0±2.0	4.0±4.0	4.0±4.0	7.3±5.0	18.7±9.2
	30	0.0±0.0	11.2±4.0	12.6±2.9	13.2 ±2.1	15.2±2.9	25.8±2.2
	60	0.0±0.0	24.7±6.4	26.7±5.0	30.0±8.7	35.3±16.3	43.3±13.0

표 85. C 농장 닭진드기(red mite)에 대한 *in vitro* 살충률

(단위: %)

희석배수	노출시간 (min)	관찰 시간(hr)					
		0	1	2	4	8	24
음성대조군	1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	10	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	30	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±1.2	3.3±3.1
	60	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
100배 희석액	1	0.0±0.0	0.7±1.2	3.3±1.2	5.3±2.3	5.3±2.3	11.3±4.2
	5	0.0±0.0	5.3±2.2	7.3±3.0	17.3±7.1	25.8±3.7	39.1±13.0
	10	0.0±0.0	42.3±7.8	54.9±6.0	55.6±6.7	60.9±2.6	78.2±3.7
	30	0.0±0.0	68.0±15.9	82.7±16.3	86.0±14.0	86.0±14.0	92.7±9.2
	60	0.0±0.0	92.7±6.1	92.7±6.1	96.0±2.0	98.0±2.0	100.0±0.0
200배 희석액	1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.3±1.2	1.3±1.2	4.7±2.3
	5	0.0±0.0	0.0±0.0	1.3±1.2	2.7±1.2	6.0±2.0	13.3±2.3
	10	0.0±0.0	24.7±5.0	32.0±4.0	47.3±7.0	50.7±6.1	55.3±6.4
	30	0.0±0.0	45.1±5.0	56.4±6.6	64.2±6.9	67.5±6.8	76.0±8.0
	60	0.0±0.0	69.7±9.9	71.7±9.9	71.7±9.9	79.6±3.0	85.8±2.4
500배 희석액	1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±1.2	2.0±2.0	2.7±1.1
	5	0.0±0.0	0.7±1.2	0.7±1.2	1.3±1.1	2.6±1.1	9.3±2.4
	10	0.0±0.0	5.9±1.9	6.5±2.3	6.5±2.3	14.4±4.5	23.5±5.7
	30	0.0±0.0	20.7±3.1	34.0±9.2	42.7±6.4	44.0±7.2	45.3±8.1
	60	0.0±0.0	31.5±6.1	39.6±6.3	45.7±3.5	53.1±5.7	58.4±4.6

2) 안전성 시험 결과

가) 체중 변화

- 조협추출물제제(에코와구)을 2배 농도로 살포하였을 경우 시험물질에 의한 체중변화를 확인하기 위하여 시험물질 살포 전(D0), 1차 살포 후 7일(Day 7), 14일(Day 14), 21일(Day 21) 및 28일(Day 28)째에 무작위로 군별로 30수(농장 당 10수) 내외를 추출하여 체중을 측정하였다.
- 시험물질 1차 살포 전 각 농장의 음성대조군과 2배용량 살포군의 평균 체중은 각각 1.735±0.102kg와 1.728±0.113 kg이었다.
- 시험물질 1차 살포 후 7일째의 음성대조군 및 2배용량 살포군의 평균 체중은 각각 1.748±0.104kg 및 1.747±0.096kg이었으며, 1차 살포 후 28일째의 음성대조군과 2배용량 살포군의 체중은 각각 1.808±0.093kg 및 1.830±0.097kg이었으며, 각 시험군간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

표 86. A, B, C 농장 음성대조군 및 2배용량 살포군의 체중 변화

농장	시험군	체중 (kg)				
		Day 0 (1차 살포 전)	Day 7 (2차 살포 전)	Day 14 (2차살포 후 7일)	Day 21 (2차살포 후 14일)	Day 28 (2차살포 후 21일)
A	음성 대조군	1.755±0.085	1.780±0.105	1.806±0.091	1.819±0.134	1.839±0.069
	2배용량 살포군	1.772±0.103	1.776±0.118	1.791±0.126	1.834±0.100	1.846±0.112
B	음성 대조군	1.695±0.106	1.728±0.118	1.775±0.096	1.789±0.072	1.789±0.106
	2배용량 살포군	1.715±0.087	1.758±0.087	1.785±0.113	1.805±0.078	1.800±0.094
C	음성 대조군	1.755±0.113	1.738±0.092	1.756±0.105	1.769±0.073	1.796±0.101
	2배용량 살포군	1.698±0.141	1.707±0.073	1.745±0.073	1.807±0.081	1.843±0.086
평균	음성 대조군	1.735±0.102	1.748±0.104	1.779±0.096	1.792±0.096	1.808±0.093
	2배용량 살포군	1.728±0.113	1.747±0.096	1.774±0.105	1.815±0.085	1.830±0.097

나) 임상증상

- 모든 농장의 2배용량 살포군에서 약물에 의한 특이적인 임상증상이 관찰되지 않았다.

다) 산란율 및 난중 측정

- 농장 A의 2배용량 살포군의 시험물질 살포 전 산란율은 82.4±1.8%이었으며, 1차 살포 후 35일째까지 2배용량 살포군의 산란율은 82.5~89.2%이었으며, 시험물질 살포 후 일부 시점의 산란율이 살포전 보다 유의하게 높았으며, 주간 난중에서도 일부 시점에서 시험물질 살포 전 난중 보다 유의하게 높았다.

- 농장 B의 2배용량 살포군의 살포전 산란율은 89.3±1.6%이었으며, 1차 살포 후 35일째까지 2배용량 살포군의 산란율은 85.4~88.7%이었으며, 시험물질 살포 후 일부 시점의 산란율이 살포전 보다 유의하게 높거나 낮았으며, 주간 난중의 경우 시험물질 살포 후 일부 시점에서 시험물질 살포 전 난중 보다 유의하게 높았다.

- 농장 C의 2배용량 살포군의 살포전 산란율은 80.4±1.8%이었으며, 1차 살포 후 35일째까지 2배용량 살포군의 산란율은 82.5~88.3%이었으며, 시험물질 살포 후 일부 시점의 산란율이 살포전 보다 유의하게 높았으며, 주간 난중의 경우 시험물질 살포 후 일부 시점에서 시험물질 살포 전 난중 보다 유의하게 높았다.

표 87. A 농장 음성대조군 및 2배용량 살포군의 산란율 및 난중 변화

시행군	산란율 (%)		난중(g)	
	음성대조군	2배용량 살포군	음성대조군	2배용량 살포군
살포 전 W0 (D -6~D 0)	81.9±2.3	82.4±1.8	58.2±1.4	57.6±0.6
1차 살포 후 W1 (D1~D7)	81.2±2.0	82.5±1.6	58.4±0.9	58.4±0.6 [#]
2차 살포 후 W2 (D8~D14)	85.0±2.3 [#]	85.5±2.0 [#]	59.5±0.7	58.5±0.2 ^{**.#}
3차 살포 후 W3 (D15~D21)	85.4±1.2 ^{##}	85.7±2.4 [#]	58.7±0.5	59.8±0.8 ^{**.,###}
4차 살포 후 W4 (D21~D28)	86.0±1.8 ^{##}	87.4±3.0 ^{##}	60.1±0.7 ^{##}	60.3±0.5 ^{###}
5차 살포 후 W5 (D29~D35)	87.3±1.9 ^{###}	89.2±2.8 ^{###}	60.5±0.6 ^{##}	60.5±0.7 ^{###}

** p <0.01: significantly different from the control group.

p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001: significantly different from the day before treatment.

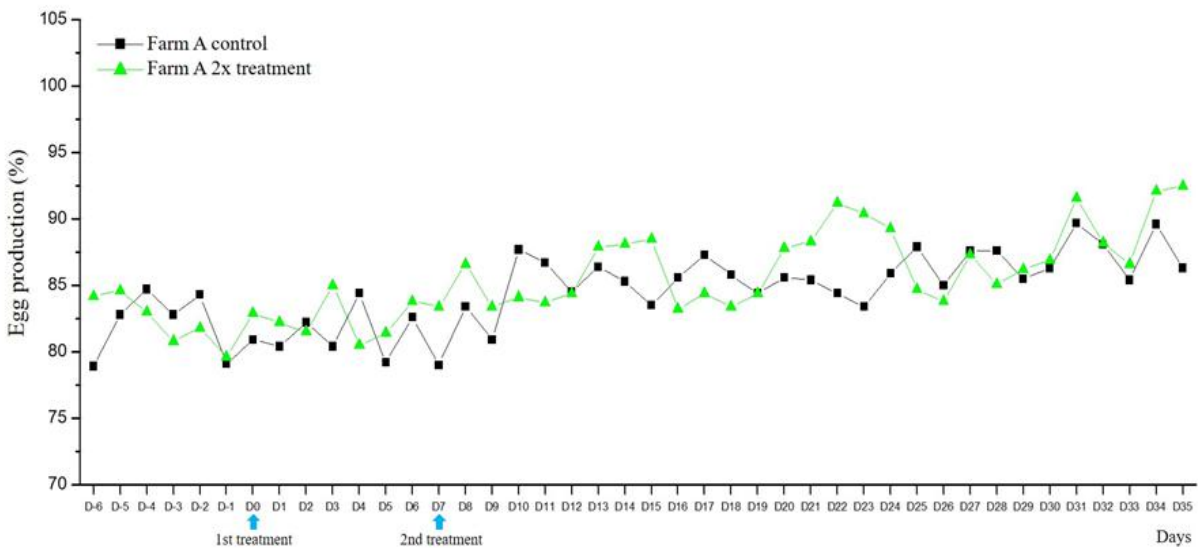


그림 31. Egg production change of control and 2x treatment groups in farm A during the experimental period

표 88. B 농장 음성대조군 및 2배용량 살포군의 산란율 및 난중 변화

시험군		산란율 (%)		난중(g)	
		음성대조군	2배용량 살포군	음성대조군	2배용량 살포군
관찰 기간	살포 전 W0 (D -6~D 0)	86.2±1.4	89.3±1.6	58.2±0.6	58.0±0.5
	1 W1 (D1~D7)	87.7±1.7	88.8±3.1	58.6±0.4	59.1±0.2 ^{*,###}
	차 W2 (D8~D14)	87.0±2.5	89.7±2.5	59.2±0.5 ^{##}	59.5±0.6 ^{###}
	살 W3 (D15 ~D21)	86.0±3.6	86.4±3.5	59.3±0.8 [#]	59.8±0.3 ^{###}
	포 W4 (D21~D28)	86.5±2.6	85.4±2.7 ^{##}	60.0±0.4 ^{###}	60.4±0.6 ^{###}
	후 W5 (D29~D35)	85.9±3.5	86.7±2.9	60.8±0.9 ^{###}	61.1±0.8 ^{###}

* p <0.05: significantly different from the control group.

p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001: significantly different from the day before treatment.

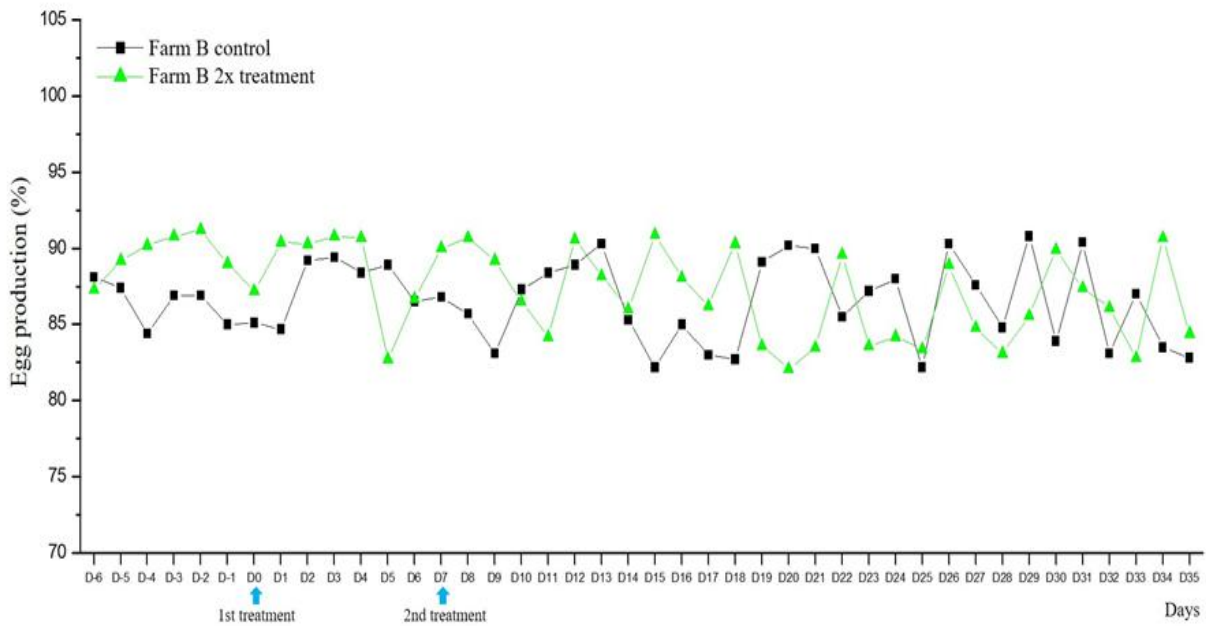


그림 32. Egg production change of control and 2x treatment groups in farm B during the experimental period

표 89. C 농장 음성대조군 및 2배용량 살포군의 산란율 및 난중 변화

시행군	산란율 (%)		난중(g)	
	음성대조군	2배용량 살포군	음성대조군	2배용량 살포군
살포 전 W0 (D -6~D 0)	79.9±1.3	80.4±1.8	58.1±0.5	58.8±0.4*
1차 W1 (D1~D7)	83.2±2.6 [#]	82.7±2.4	58.6±0.5	58.9±0.6
2차 W2 (D8~D14)	83.0±2.0 ^{##}	82.5±1.9	59.1±0.5 ^{##}	59.5±1.0
3차 W3 (D15 ~D21)	85.6±1.0 ^{###}	86.2±1.0 ^{###}	59.4±0.7 ^{##}	60.4±0.6 ^{*,###}
4차 W4 (D21~D28)	87.2±1.4 ^{###}	87.0±1.6 ^{###}	60.1±0.4 ^{###}	60.2±0.5 ^{###}
5차 W5 (D29~D35)	88.4±1.6 ^{###}	88.3±1.6 ^{###}	60.3±0.4 ^{###}	61.0±0.5 ^{*,###}

* $p < 0.05$: significantly different from the control group.

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$: significantly different from the day before treatment.

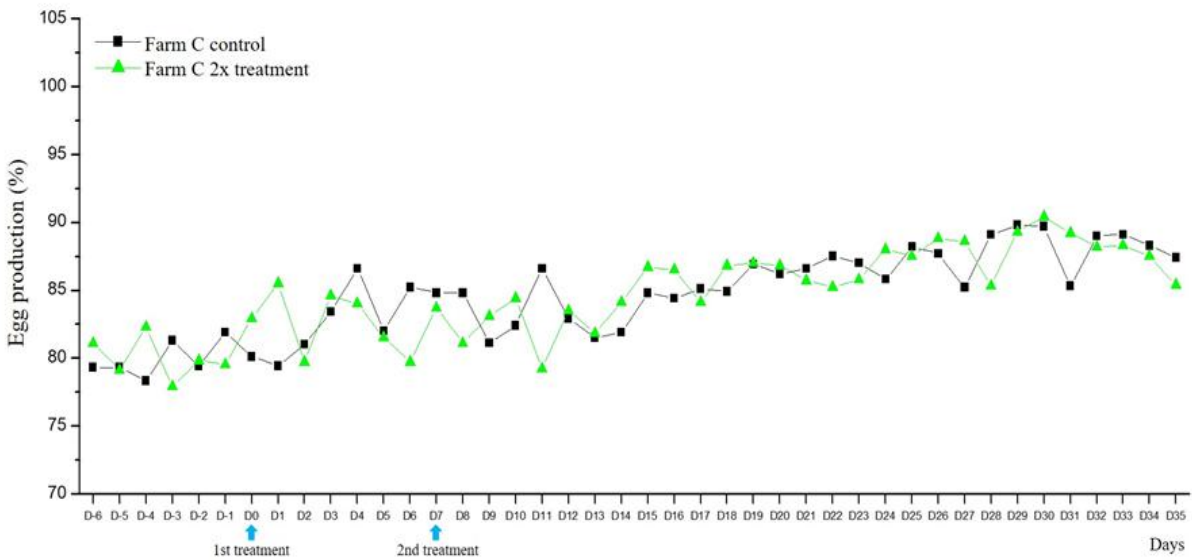


그림 33. Egg production change of control and 2x treatment groups in farm C during the experimental period

라) 혈액학치 변화 및 혈액화학치

- 조혈추출물제제(에코와구) 100배 희석액(2배용량) 살포에 따른 산란기에 대한 부작용 유발 등을 확인하기 위하여 혈액학 및 혈액화학적 검사를 실시하였다.
- A농장, B농장 및 C농장의 혈액학적 검사 결과 음성대조군 및 2배용량 살포군간의 차이는 관찰되지 않았다.
- 또한, A, B 및 C농장의 혈액화학적 검사에서도 음성대조군과 2배용량 살포군간의 차이는 관찰되지 않았다.

표 90. 농장 A 산란계의 혈액학치 변화

Parameters (Reference range)	Group	살포전		1차 살포 후		
		Day0	Day 1	Day 7	Day 10	Day 14
WBC ($\times 10^9/L$) (5~22)	음성대조군	12.4 \pm 2.6	11.5 \pm 1.3	11.3 \pm 1.5	11.7 \pm 2.2	10.5 \pm 2.0
	2배용량 살포군	12.9 \pm 1.9	12.1 \pm 1.4	10.6 \pm 1.8	11.6 \pm 1.4	11.7 \pm 2.2
RBC ($\times 10^{12}/L$) (1.8~3.9)	음성대조군	2.6 \pm 0.4	2.8 \pm 0.4	2.6 \pm 0.3	2.8 \pm 0.4	2.7 \pm 0.4
	2배용량 살포군	2.6 \pm 0.3	2.8 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3	2.7 \pm 0.5
HGB (g/dL) (10~15)	음성대조군	12.4 \pm 0.8	12.3 \pm 1.2	12.5 \pm 1.3	11.2 \pm 2.1	12.1 \pm 0.9
	2배용량 살포군	12.5 \pm 1.6	12.7 \pm 0.9	12.4 \pm 1.1	11.1 \pm 1.1	12.2 \pm 0.4
HCT (%) (25~50)	음성대조군	37.1 \pm 2.7	35.7 \pm 2.5	36.4 \pm 4.4	34.3 \pm 3.0	33.8 \pm 2.5
	2배용량 살포군	37.0 \pm 5.7	35.9 \pm 2.5	34.0 \pm 1.8	33.2 \pm 2.1	34.3 \pm 2.4
MCV (fL) (100~200)	음성대조군	148.2 \pm 27.0	130.9 \pm 18.5	139.3 \pm 18.9	125.8 \pm 14.8	126.7 \pm 14.4
	2배용량 살포군	141.6 \pm 25.4	131.8 \pm 15.9	139.3 \pm 19.5	131.2 \pm 15.4	133.2 \pm 23.4
MCH (pg) (32~65)	음성대조군	49.6 \pm 9.8	45.3 \pm 8.6	47.7 \pm 5.2	40.7 \pm 7.3	45.3 \pm 5.8
	2배용량 살포군	48.1 \pm 8.1	46.5 \pm 3.6	50.5 \pm 7.2	43.7 \pm 5.2	47.5 \pm 9.6
MCHC (g/dL) (30~37)	음성대조군	33.5 \pm 2.6	34.5 \pm 3.4	34.4 \pm 2.1	32.4 \pm 4.3	35.8 \pm 2.7
	2배용량 살포군	34.0 \pm 1.3	35.5 \pm 2.9	36.4 \pm 3.6	33.3 \pm 2.2	35.6 \pm 2.5

표 91. 농장 B 산란계의 혈액학치 변화

Parameters (Reference range)	Group	살포전		1차 살포 후		
		Day0	Day 1	Day 7	Day 10	Day 14
WBC ($\times 10^9/L$) (5~22)	음성대조군	11.9 \pm 2.4	11.3 \pm 2.2	11.6 \pm 1.7	12.0 \pm 2.6	13.1 \pm 2.0
	2배용량 살포군	12.2 \pm 1.5	12.7 \pm 2.1	12.4 \pm 2.6	12.2 \pm 1.2	12.8 \pm 1.5
RBC ($\times 10^{12}/L$) (1.8~3.9)	음성대조군	2.7 \pm 0.4	2.9 \pm 0.4	2.8 \pm 0.3	2.7 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3
	2배용량 살포군	2.7 \pm 0.4	2.7 \pm 0.4	2.8 \pm 0.4	2.9 \pm 0.5	2.5 \pm 0.2
HGB (g/dL) (10~15)	음성대조군	12.8 \pm 0.9	13.0 \pm 1.1	12.9 \pm 1.3	12.7 \pm 1.0	12.5 \pm 1.4
	2배용량 살포군	12.1 \pm 0.8	12.6 \pm 0.8	13.2 \pm 0.7	13.2 \pm 0.5	12.1 \pm 1.0
HCT (%) (25~50)	음성대조군	36.7 \pm 5.8	37.9 \pm 4.8	36.7 \pm 1.4	36.4 \pm 3.4	36.0 \pm 2.0
	2배용량 살포군	34.7 \pm 2.2	36.8 \pm 1.8	36.4 \pm 3.3	36.6 \pm 3.1	35.6 \pm 2.8
MCV (fL) (100~200)	음성대조군	139.2 \pm 31.4	134.4 \pm 23.5	130.8 \pm 13.5	137.2 \pm 18.1	144.9 \pm 12.4
	2배용량	131.6 \pm 16.5	135.9 \pm 14.5	136.3 \pm 29.1	131.8 \pm 29.2	143.3 \pm 15.8

		살포군				
MCH (pg) (32~65)	음성대조군	48.3±7.3	45.9±6.0	46.2±6.5	48.1±6.6	50.2±6.1
	2배용량 살포군	45.9±6.7	46.5±6.0	49.3±9.7	47.1±7.5	48.6±5.0
MCHC (g/dL) (30~37)	음성대조군	35.3±5.0	34.5±3.0	35.3±3.2	35.0±1.4	34.7±3.6
	2배용량 살포군	34.8±1.5	34.2±2.6	36.4±3.3	36.3±3.3	34.0±1.6

표 92. 농장 C 산란계의 혈액학치 변화

Parameters (Reference range)	Group	살포전		1차 살포 후		
		Day0	Day 1	Day 7	Day 10	Day 14
WBC (×10 ⁹ /L) (5~22)	음성대조군	12.2±2.2	13.2±2.1	13.4±1.9	12.9±1.4	11.8±1.3
	2배용량 살포군	13.0±1.3	13.9±2.0	15.8±4.1	13.1±2.3	12.6±1.5
RBC (×10 ¹² /L) (1.8~3.9)	음성대조군	2.5±0.4	2.5±0.4	2.4±0.3	2.6±0.4	2.6±0.4
	2배용량 살포군	2.6±0.4	2.5±0.3	2.5±0.4	2.6±0.3	2.5±0.3
HGB (g/dL) (10~15)	음성대조군	12.3±0.5	12.1±0.8	12.2±0.8	11.7±1.1	12.8±0.6
	2배용량 살포군	12.5±0.6	12.0±0.8	12.9±0.7	11.3±0.8	12.7±0.6
HCT (%) (25~50)	음성대조군	34.3±2.8	35.2±3.2	34.7±3.5	35.7±3.1	35.1±1.5
	2배용량 살포군	34.3±3.2	34.7±2.2	34.2±2.8	34.5±2.5	34.3±0.8
MCV (fL) (100~200)	음성대조군	142.3±24.6	143.7±27.1	144.8±22.8	140.5±13.9	138.5±19.5
	2배용량 살포군	135.5±18.4	142.4±15.4	137.6±17.9	135.7±10.1	140.6±15.4
MCH (pg) (32~65)	음성대조군	50.8±6.4	49.4±9.4	50.9±6.4	46.0±6.0	50.6±7.3
	2배용량 살포군	49.6±5.6	49.1±5.8	52.0±8.3	44.4±3.3	51.9±6.3
MCHC (g/dL) (30~37)	음성대조군	36.1±3.1	34.4±1.6	35.4±2.1	32.7±1.5	36.6±2.8
	2배용량 살포군	36.8±3.5	34.5±2.2	37.8±3.4	32.7±0.8	36.9±2.2

표 93. 농장 A 산란계의 혈액화학치 변화

Parameters (Reference range)	Group	살포전		1차 살포 후		
		Day0	Day 1	Day 7	Day 10	Day 14
ALT (U/L) (1.8~10)	음성대조 군	5.70±1.06	5.20±0.42	5.30±0.67	5.40±0.70	5.00±0.00
	2배용량 살포군	5.80±1.32	5.60±1.07	5.30±0.48	5.50±0.85	5.10±0.32
AST	음성대조	175.90±22.4	167.20±25.4	157.70±18.0	168.00±23.4	169.40±17.3

(U/L) (120~300)	군	3	8	5	4	5
	2배용량 살포군	180.10±31.9	170.20±17.7	157.00±16.2	158.30±29.5	150.80±23.0
ALP (U/L)	음성대조	455.90±133.	424.40±128.	496.80±138.	410.40±124.	445.40±93.8
	군	80	83	79	91	1
(3.5~6.7)	2배용량 살포군	439.50±116.	451.70±188.	457.10±115.	415.00±138.	409.00±91.7
		16	21	07	66	4
T-PRO (g/dL)	음성대조	4.84±0.87	5.04±0.48	4.71±0.72	4.74±0.56	4.82±0.46
	군					
(1.1~3.5)	2배용량 살포군	4.87±0.37	5.28±0.54	4.66±0.83	4.53±0.52	5.02±0.36
ALB (g/dL)	음성대조	1.87±0.41	1.77±0.21	1.73±0.23	1.84±0.23	1.76±0.45
	군					
(1.1~3.5)	2배용량 살포군	1.88±0.21	1.88±0.20	1.87±0.27	1.79±0.26	1.97±0.13
T-BIL (mg/dL)	음성대조	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00
	군					
	2배용량 살포군	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00
GLU (mg/dL)	음성대조	157.50±27.0	170.00±38.3	144.70±34.0	168.40±24.7	180.70±42.8
	군	4	2	1	2	7
	2배용량 살포군	160.00±38.8	167.10±23.0	159.00±29.6	168.60±34.2	181.00±45.8
		2	3	5	4	9
T-CHO (mg/dL)	음성대조	113.30±16.6	110.00±11.2	104.60±22.7	102.00±22.3	114.10±20.6
	군	0	4	5	2	4
(58~550)	2배용량 살포군	121.20±22.8	118.60±22.8	114.10±30.1	111.70±35.2	112.70±21.7
		2	7	9	1	8
TG (mg/dL)	음성대조	1083.40±26	1171.50±28	1024.00±28	1066.30±18	1051.80±28
	군	9.95	6.62	1.10	0.12	3.68
(550~2200)	2배용량 살포군	1284.20±23	1228.30±23	1040.30±21	1164.70±28	1160.40±28
		7.05	5.00	6.11	3.01	3.35
BUN (mg/dL)	음성대조	1.57±0.18	1.60±0.16	1.63±0.26	1.70±0.24	1.50±0.15
	군					
(0.5~1.8)	2배용량 살포군	1.49±0.14	1.57±0.22	1.51±0.19	1.53±0.19	1.51±0.19
CREA (mg/dL)	음성대조	0.17±0.01	0.17±0.01	0.17±0.00	0.17±0.01	0.18±0.02
	군					
(0.1~0.3)	2배용량 살포군	0.18±0.01	0.17±0.00	0.18±0.02	0.18±0.01	0.18±0.01

표 94. 농장 B 산란계의 혈액화학치 변화

Parameters (Reference range)	Group	1차 살포 후				
		살포전 Day0	Day 1	Day 7	Day 10	Day 14
ALT (U/L) (1.8~10)	음성대조군	5.30±0.67	5.60±0.97	5.50±0.85	5.00±0.00	5.70±1.06
	2배용량 살포군	5.50±0.85	5.20±0.42	5.10±0.32	5.40±0.70	5.50±0.85
AST (U/L) (120~300)	음성대조군	162.90±23.5 2	165.80±17.7 3	172.70±27.6 4	166.30±20.7 5	153.70±27.3 1
	2배용량 살포군	160.50±20.3 4	170.90±24.2 1	168.30±22.2 8	168.80±30.1 9	162.60±23.5 5
ALP (U/L)	음성대조군	446.70±174. 00	415.10±82.3 1	409.00±111. 46	475.60±174. 29	376.60±115. 61
	2배용량 살포군	455.40±169. 62	435.70±70.7 6	436.90±116. 11	417.10±181. 68	380.80±184. 47
T-PRO (g/dL) (3.5~6.7)	음성대조군	4.95±0.24	4.97±0.61	4.73±0.72	4.80±0.30	4.79±0.62
	2배용량 살포군	4.88±0.36	4.96±0.35	4.90±0.52	5.03±0.21	4.75±0.53
ALB (g/dL) (1.1~3.5)	음성대조군	1.96±0.13	1.92±0.30	1.83±0.24	1.96±0.22	1.86±0.20
	2배용량 살포군	1.94±0.16	1.90±0.14	1.89±0.19	2.03±0.19	1.85±0.23
T-BIL (mg/dL)	음성대조군	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00
	2배용량 살포군	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00
GLU (mg/dL)	음성대조군	184.80±29.7 5	151.20±42.2 6	132.10±42.7 7	171.00±55.4 9	169.40±39.1 4
	2배용량 살포군	184.70±24.4 1	155.40±53.0 5	138.00±41.5 1	154.10±38.6 8	168.10±48.3 4
T-CHO (mg/dL) (58~550)	음성대조군	119.90±14.0 8	125.50±29.1 4	119.40±18.1 5	105.70±36.7 7	111.70±31.5 2
	2배용량 살포군	130.60±34.4 0	125.90±21.3 3	107.10±26.5 7	108.70±21.5 5	107.40±31.0 9
TG (mg/dL) (550~2200)	음성대조군	1260.50±21 6.27	1210.40±21 5.37	1032.60±18 1.47	1041.80±18 9.51	1218.00±31 0.94
	2배용량 살포군	1169.70±25 3.47	1220.70±24 2.74	1096.60±19 4.25	1146.20±32 4.38	1201.40±23 6.78
BUN (mg/dL) (0.5~1.8)	음성대조군	1.55±0.19	1.67±0.28	1.72±0.26	1.53±0.35	1.55±0.24
	2배용량 살포군	1.60±0.18	1.64±0.21	1.61±0.19	1.53±0.14	1.50±0.15
CREA (mg/dL) (0.1~0.3)	음성대조군	0.18±0.02	0.17±0.00	0.17±0.01	0.18±0.01	0.18±0.02
	2배용량 살포군	0.18±0.01	0.17±0.00	0.17±0.00	0.18±0.01	0.17±0.00

표 95. 농장 C 산란계의 혈액화학치 변화

Parameters (Reference range)	Group	1차 살포 후				
		살포전	Day 0	Day 1	Day 7	Day 10
ALT (U/L) (1.8~10)	음성대조군	5.40±0.97	5.50±0.71	5.30±0.95	5.30±0.48	5.50±0.71
	2배용량 살포군	5.50±0.97	5.40±0.70	5.10±0.32	5.40±0.70	5.50±0.97
AST (U/L) (120~300)	음성대조군	147.50±21.6 9	154.40±20.7 1	159.00±25.5 6	142.30±20.1 4	156.60±17.6 4
	2배용량 살포군	157.20±23.7 8	157.10±22.2 5	148.20±24.7 7	152.80±30.1 5	157.60±21.2 4
ALP (U/L)	음성대조군	502.90±115.5 56	475.40±125.5 06	457.60±82.0 7	416.40±103.5 60	490.50±66.9 3
	2배용량 살포군	503.50±106.5 16	487.60±95.7 1	402.90±77.4 8	421.80±82.8 8	481.30±75.3 7
T-PRO (g/dL) (3.5~6.7)	음성대조군	5.03±0.81	4.25±0.70	5.03±0.20	4.53±0.71	4.69±0.49
	2배용량 살포군	4.77±1.04	4.59±0.88	4.86±0.47	4.92±0.42	4.89±0.44
ALB (g/dL) (1.1~3.5)	음성대조군	1.90±0.49	1.65±0.36	1.94±0.32	1.73±0.25	1.90±0.28
	2배용량 살포군	1.79±0.57	1.66±0.33	1.87±0.33	1.86±0.29	2.00±0.24
T-BIL (mg/dL)	음성대조군	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00
	2배용량 살포군	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00
GLU (mg/dL)	음성대조군	182.90±31.8 4	179.30±33.3 2	163.80±34.1 7	147.60±42.1 3	170.70±33.0 1
	2배용량 살포군	192.20±14.7 0	181.60±28.6 5	162.10±37.8 1	138.40±49.5 3	187.60±28.0 3
T-CHO (mg/dL) (58~550)	음성대조군	124.50±17.4 8	123.70±11.2 9	115.80±12.9 8	113.10±17.7 9	134.90±25.0 2
	2배용량 살포군	119.50±32.8 1	128.80±16.6 4	123.40±17.7 3	123.80±17.1 1	122.50±20.1 2
TG (mg/dL) (550~2200)	음성대조군	1208.90±25 7.14	1159.40±13 4.91	1231.00±20 2.90	1153.90±16 4.22	1243.40±24 5.85
	2배용량 살포군	1063.20±19 6.95	1272.90±17 9.88	1212.10±10 8.34	1279.50±27 1.36	1040.30±29 5.36
BUN (mg/dL) (0.5~1.8)	음성대조군	1.47±0.13	1.60±0.24	1.41±0.03	1.52±0.16	1.56±0.29
	2배용량 살포군	1.56±0.35	1.54±0.16	1.44±0.07	1.62±0.37	1.50±0.19
CREA (mg/dL) (0.1~0.3)	음성대조군	0.19±0.03	0.17±0.00	0.17±0.00	0.17±0.00	0.17±0.00
	2배용량 살포군	0.18±0.01	0.17±0.01	0.18±0.02	0.17±0.00	0.18±0.02

마) 닭진드기 수 변화

- 조협추출물제제(에코와구)에 의한 닭진드기의 구제효과를 확인하기 위하여, 조협추출물제제(에코와구) 100배 희석액(2배용량)을 7일 간격으로 2회 살포하였다. 조협추출물제제(에코와구) 희석액 살포 전(D-7), 1차 살포당일(0일), 2차 살포당일(7일), 1차 살포 후 14일, 21일 및 28일째에 닭진드기 트랩을 설치하고 48시간 후에 회수하여 닭진드기 성충수를 측정하였다.
- A 농장의 경우 약물 살포 전 음성대조군과 2배용량 살포군의 닭진드기 수는 각각 2067.1±222.0 마리와 2071.4±294.6 마리였다. 음성대조군의 경우 1차 살포 후 28일째에 진드기가 1954.7±323.1 마리가 관찰되었다. 2배용량 살포군의 경우 1차 살포 후 닭진드기 수가 147.2±81.4 마리로 감소하였으며, 2차 살포 당일(Day 7)에는 68.5±51.7 마리가 관찰되었으며, 2차 살포 후 7일(Day 14), 14일(Day 21) 및 21일째(Day 28)에는 각각 94.6±57.6, 99.0±53.0 및 141.9±75.1의 닭진드기가 관찰되었고, 음성대조군에 비하여 유의하게 낮았다.
- B 농장의 음성대조군과 2배용량 살포군의 약물 살포전 닭진드기수는 각각 1246.3±254.8와 1263.3±604.3마리였다. 음성대조군의 닭진드기 수가 지속적으로 많은 수의 진드기가 관찰되어 1차 살포 후 28일째의 진드기수가 1868.3±309.9 마리로 관찰되었다. 2배용량 살포군의 닭진드기 수는 1차 살포 후 59.2±45.8 마리만 관찰되었고, 2차 살포 당일(Day 7), 2차 살포 후 7일(Day 14), 14일(Day 21) 및 21일째(Day 28)의 닭진드기 수는 각각 39.1±32.3, 61.5±29.7, 64.1±39.6 및 121.3±47.9마리가 관찰되었으며, 음성대조군에 비하여 유의하게 낮았다.
- 약물 살포 전 C 농장의 2배용량 살포군의 닭진드기 수는 1988.3±306.0마리였으나, 1차 살포 후 99.0±61.4 마리로 감소하였고, 2차 살포 당일, 2차 살포 후 7일(Day 14), 14일(Day 21) 및 21일째(Day 28)의 평균 닭진드기 수가 각각 58.5±57.9, 69.8±47.2, 79.3±58.5 및 116.1±52.6이었으며, 음성대조군에 비하여 유의하게 낮았다.

표 96. 농장별 닭진드기 수 변화 (단위: 마리)

시점	A농장(성주농장)		B농장(남양양계)		C농장(봉황농장)	
	음성대조군	2배용량 살포군	음성대조군	2배용량 살포군	음성대조군	2배용량 살포군
약물살포 전	2067.1±222.0	2071.4±294.6	1246.3±254.8	1263.3±604.3	1833.4±237.7	1988.3±306.0
1차 살포 후 Day 0~2	2093.9±264.9	147.2±81.4***	1399.5±264.8	59.2±45.8***	1938.6±264.7	99.0±61.4***
2차 살포 후 Day 7~9	2175.5±252.5	68.5±51.7***	1535.3±352.2	39.1±32.3***	1989.7±316.2	58.5±57.9***
1차 살포 후 Day 14~16	1981.4±273.2	94.6±57.6***	1376.9±339.7	61.5±29.7***	2014.6±508.9	69.8±47.2***
2차 살포 후 Day 21~23	2050.0±405.7	99.0±53.0***	1424.2±482.3	64.1±39.6***	1899.5±289.8	79.3±58.5***
3차 살포 후 Day 28~30	1954.7±323.1	141.9±75.1***	1868.3±309.9	121.3±47.9***	2059.9±362.6	116.1±52.6***

*** p <0.001: significantly different from control group

바) 닭진드기 살충률

- 무창계사에서 조합추출물제제(에코와구) 100배 희석액(2배용량) 살포에 의한 닭진드기 살충률을 확인하였다.
- 2배용량인 조합추출물제제(에코와구) 100배 희석액 1차 살포(Day 0) 후 A 농장, B농장 및 C 농장의 닭진드기 살충률은 각각 92.98%, 95.83% 및 95.29%이었으며, 2차 살포(Day 7) 후에는 96.86%, 97.49% 와 97.29%의 살충률이 나타났다. 1차 살포 후 14일, 21 및 28일째의 각 농장의 닭진드기 살충률이 90% 이상이었다.

표 97. 2배용량 살포군의 닭진드기(red mite) 살충률 (단위: %)

농장명	1차 살포 후				
	D0~D2 (D0: 1차 살포)	D7~D9 (D7: 2차 살포)	D14~D16	D21~D23	D28~D30
A 농장	92.98	96.86	95.24	95.18	92.76
B 농장	95.83	97.49	95.59	95.56	93.59
C 농장	95.29	97.29	96.81	96.15	94.80
Mean±SD	94.70±1.51	97.21±0.32	95.88±0.82	95.63±0.49	93.72±1.03

2) 임상효능 및 안전성 시험 결과

가) 체중 변화

- 조합추출물제제(에코와구)을 1배용량(200배 희석액)으로 살포하였을 경우 시험물질에 의한 체중변화를 확인하기 위하여 시험물질 살포 전(D0), 1차 살포 후 7일(Day 7), 14일(Day 14), 21일(Day 21) 및 28일(Day 28)째에 무작위로 군별로 30수(농장 당 10수) 내외를 추출하여 체중을 측정하였다.
- 시험물질 1차 살포 전 각 농장의 음성대조군과 1배용량 살포군의 평균 체중은 각각 $1.735 \pm 0.102\text{kg}$ 와 $1.722 \pm 0.110\text{kg}$ 이었다.
- 시험물질 1차 살포 후 7일째의 음성대조군과 1배용량 살포군의 평균 체중은 각각 $1.748 \pm 0.104\text{kg}$ 및 $1.748 \pm 0.105\text{kg}$ 이었으며, 1차 살포 후 28일째의 음성대조군과 1배용량 살포군의 체중은 각각 $1.808 \pm 0.093\text{kg}$ 와 $1.837 \pm 0.095\text{kg}$ 이었으며, 각 시험군간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

표 98. 농장별 음성대조군 및 1배용량 살포군 산란계의 체중변화

농장	시험군	체중 (kg)				
		Day 0 (1차 살포 전)	Day 7 (2차 살포 전)	Day 14 (2차살포 후 7일)	Day 21 (2차살포 후 14일)	Day 28 (2차살포 후 21일)
A	음성대조군	1.755±0.085	1.780±0.105	1.806±0.091	1.819±0.134	1.839±0.069
	1배용량 살포군	1.743±0.085	1.763±0.120	1.798±0.098	1.835±0.091	1.861±0.093
B	음성대조군	1.695±0.106	1.728±0.118	1.775±0.096	1.789±0.072	1.789±0.106
	1배용량 살포군	1.691±0.127	1.739±0.115	1.752±0.102	1.792±0.121	1.821±0.084
C	음성대조군	1.755±0.113	1.738±0.092	1.756±0.105	1.769±0.073	1.796±0.101
	1배용량 살포군	1.733±0.120	1.743±0.087	1.769±0.073	1.793±0.087	1.829±0.111
평균	음성대조군	1.735±0.102	1.748±0.104	1.779±0.096	1.792±0.096	1.808±0.093
	1배용량 살포군	1.722±0.110	1.748±0.105	1.773±0.091	1.807±0.100	1.837±0.095

나) 임상증상

- 모든 농장의 1배용량 살포군 및 2배용량 살포군에서 약물에 의한 특이적인 임상증상이 관찰되지 않았다.

다) 산란율 및 난중 측정

- 농장 A의 1배용량 살포군의 살포 전 산란율은 81.3±1.5%이었으며, 1차 살포 후 35일째까지 1배용량 살포군의 산란율은 82.5~88.3%으로, 시험물질 살포 후 일부 시점의 산란율이 살포전 보다 유의하게 높았으며, 주간 난중에서도 일부 시점에서 시험물질 살포 전 난중 보다 유의하게 높았다.

- 농장 B의 1배용량 살포군의 살포전 산란율은 86.0±2.7%이었고, 1차 살포 후 35일째까지 1배용량 살포군의 산란율은 85.4~88.7%이었으며, 시험물질 살포 후 일부 시점의 산란율이 살포전 보다 유의하게 높거나 낮았으며, 주간 난중의 경우 시험물질 살포 후 일부 시점에서 시험물질 살포 전 난중 보다 유의하게 높았다.

- 농장 C의 1배용량 살포군의 살포전 산란율은 각각 80.4±2.5%이었으며, 1차 살포 후 35일째까지 1배용량 살포군의 산란율은 81.1~89.7%으로, 시험물질 살포 후 일부 시점의 산란율이 살포전 보다 유의하게 높았으며, 주간 난중의 경우 시험물질 살포 후 일부 시점에서 시험물질 살포 전 난중 보다 유의하게 높았다.

표 99. A 농장 음성대조군 및 1배용량 살포군의 산란율 및 난중 변화

시행군	산란율 (%)		난중(g)	
	음성대조군	1배용량 살포군	음성대조군	1배용량 살포군
살포 전 W0 (D -6~D 0)	81.9±2.3	81.3±1.5	58.2±1.4	57.9±0.8
1차 살포 후 W1 (D1~D7)	81.2±2.0	82.5±1.7	58.4±0.9	58.9±0.7 [#]
2차 살포 후 W2 (D8~D14)	85.0±2.3 [#]	83.7±2.7	59.5±0.7	59.5±0.4 ^{###}
3차 살포 후 W3 (D15 ~D21)	85.4±1.2 ^{##}	86.0±2.4 ^{##}	58.7±0.5	60.3±0.6 ^{***,###}
4차 살포 후 W4 (D21~D28)	86.0±1.8 ^{##}	85.3±3.6 [#]	60.1±0.7 ^{##}	60.7±0.4 ^{###}
5차 살포 후 W5 (D29~D35)	87.3±1.9 ^{###}	88.3±2.2 ^{###}	60.5±0.6 ^{##}	60.8±0.6 ^{###}

*** p <0.001: significantly different from the control group.

p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001: significantly different from the day before treatment.

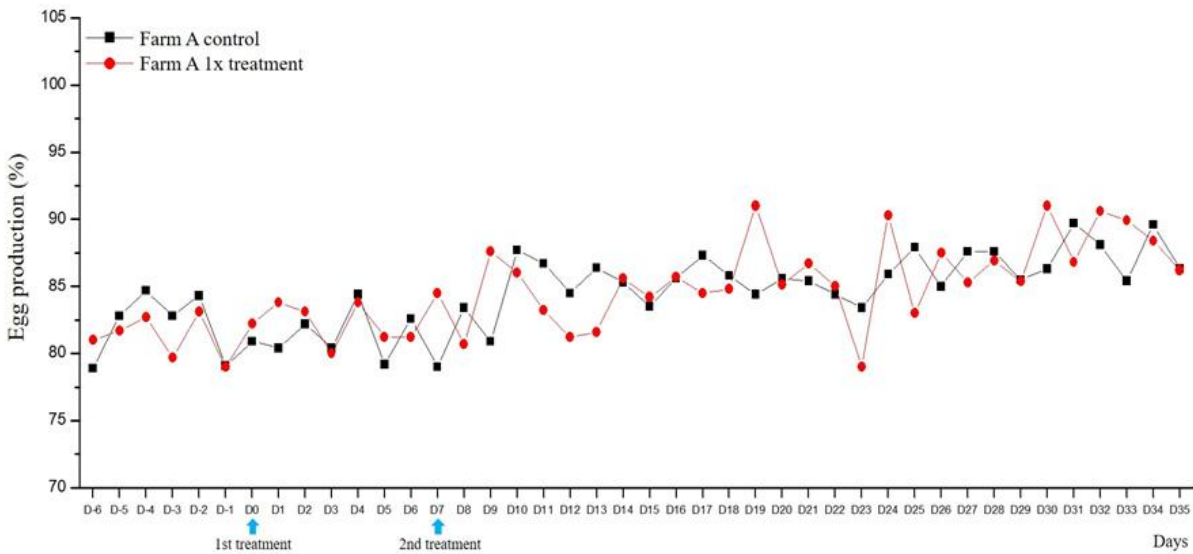


그림 34. Egg production change of 1x treatment group in farm A during the experimental period

표 100. B 농장 음성대조군 및 1배용량 살포군의 산란율 및 난중 변화

시험군	산란율 (%)		난중(g)	
	음성대조군	1배용량 살포군	음성대조군	1배용량 살포군
살포 전 W0	86.2±1.4	86.0±2.7	58.2±0.6	58.4±0.5
(D -6~D 0)	-----			
1 차 살포 후 W1	87.7±1.7	88.7±1.6 [#]	58.6±0.4	59.1±0.5 [#]
(D1~D7)	-----			
1 차 살포 후 W2	87.0±2.5	85.4±3.2	59.2±0.5 ^{##}	59.4±0.5 ^{##}
(D8~D14)	-----			
1 차 살포 후 W3	86.0±3.6	86.0±1.4	59.3±0.8 [#]	59.5±0.6 ^{##}
(D15 ~D21)	-----			
1 차 살포 후 W4	86.5±2.6	86.6±3.2	60.0±0.4 ^{###}	60.9±0.4 ^{***,###}
(D21~D28)	-----			
1 차 살포 후 W5	85.9±3.5	85.5±1.8	60.8±0.9 ^{###}	60.9±0.6 ^{###}
(D29~D35)	-----			

*** p <0.001: significantly different from the control group.

p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001: significantly different from the day before treatment.

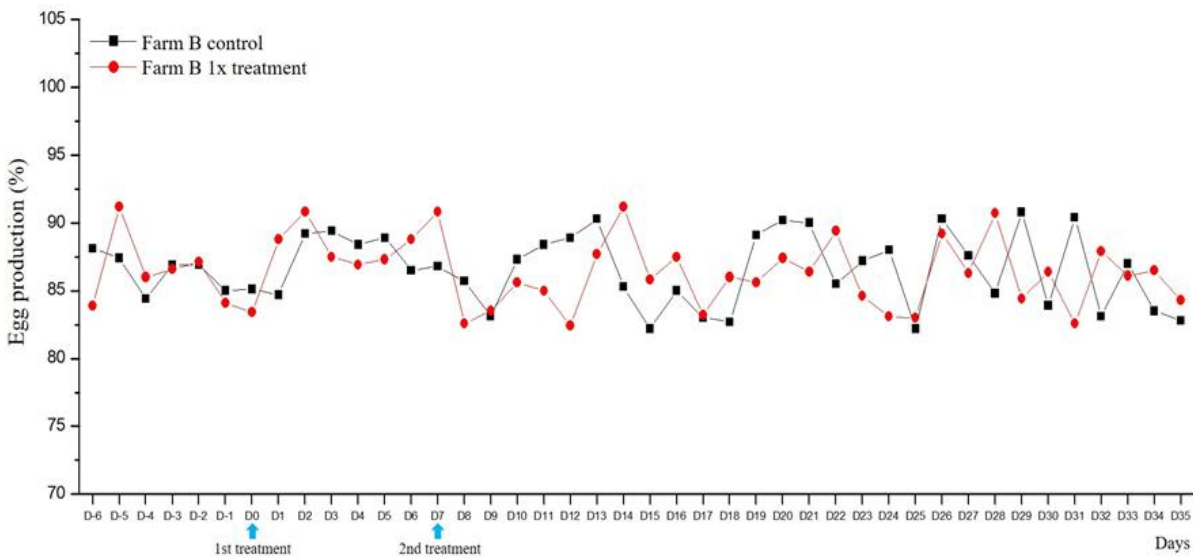


그림 35. Egg production change of 1x treatment group of farm B during the experimental period

표 101. C 농장 음성대조군 및 1배용량 살포군의 산란율 및 난중 변화

시행군	산란율 (%)		난중(g)	
	음성대조군	1배용량 살포군	음성대조군	1배용량 살포군
살포 전 W0 (D -6~D 0)	79.9±1.3	80.4±2.5	58.1±0.5	58.6±0.5
1차 W1 (D1~D7)	83.2±2.6 [#]	82.0±3.6	58.6±0.5	59.2±0.6
2차 W2 (D8~D14)	83.0±2.0 ^{##}	81.1±1.5	59.1±0.5 ^{##}	59.3±0.8
3차 W3 (D15 ~D21)	85.6±1.0 ^{###}	83.0±2.5 ^{*,#}	59.4±0.7 ^{##}	60.4±0.7 ^{*,###}
4차 W4 (D21~D28)	87.2±1.4 ^{###}	88.0±2.0 ^{###}	60.1±0.4 ^{###}	60.4±0.3 ^{###}
5차 W5 (D29~D35)	88.4±1.6 ^{###}	89.7±1.8 ^{###}	60.3±0.4 ^{###}	60.5±0.6 ^{###}

* p <0.05: significantly different from the control group.

p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001: significantly different from the day before treatment.

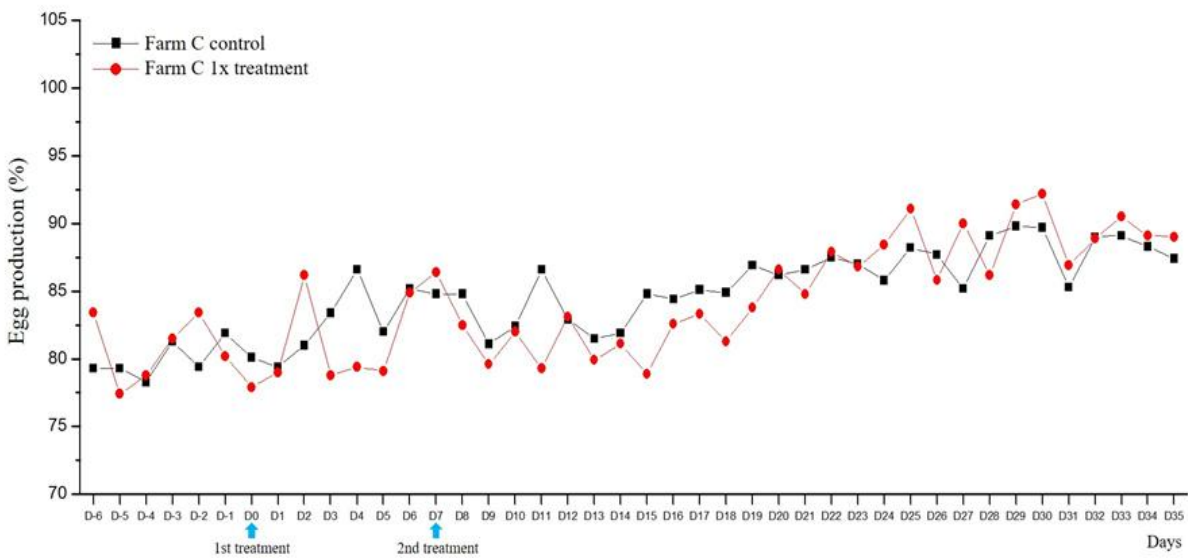


그림 36. Egg production change of 1x treatment in farm C during the experimental period

마) 닭진드기 수 변화

- 조협추출물제제(에코와구)에 의한 닭진드기의 구제효과를 확인하기 위하여, 조협추출물제제(에코와구) 200배 희석액(1배용량)을 7일 간격으로 2회 살포하였다. 조협추출물제제(에코와구) 희석액 살포 전(D-7), 1차 살포당일(0일), 2차 살포당일(7일), 1차 살포 후 14일, 21일 및 28일째에 닭진드기 트랩을 설치하고 48시간 후에 회수하여 닭진드기 성충수를 측정하였다.

- A 농장의 경우 약물 살포 전 1배용량 살포군의 닭진드기 수는 2086.3 ± 308.6 마리였으나, 1차 살포 후 닭진드기수가 244.6 ± 152.3 마리로 감소하였고, 2차 살포(Day 7) 후에는 168.4 ± 85.3 마리가 관찰되었으며, 2차 살포 후 7일(Day 14), 14일(Day 21) 및 21일째(Day 28)의 닭진드기수는 각각 161.1 ± 71.2 , 198.7 ± 92.4 및 178.2 ± 96.0 마리였으며, 음성대조군에 비하여 유의하게 낮았다.

- B 농장의 약물 살포전 1배용량 살포군의 닭진드기 수는 1326.0 ± 408.4 마리였으나, 1차 살포 후 124.4 ± 58.7 마리만 관찰되었고, 2차 살포 당일(Day 7), 2차 살포 후 7일(Day 14), 14일(Day 21) 및 21일째(Day 28)의 닭진드기수는 각각 87.2 ± 67.3 , 113.3 ± 51.7 , 110.7 ± 77.5 및 179.5 ± 82.5 의 닭진드기가 관찰되었으며, 음성대조군에 비하여 유의하게 낮았다.

- 약물 살포 전 C 농장의 1배용량 살포군의 닭진드기수는 1847.0 ± 351.9 마리였으나, 1차 살포 후 156.6 ± 66.3 마리로 감소하였고, 2차 살포 당일, 7일, 14일 및 21일째의 평균 닭진드기수가 각각 137.4 ± 52.3 , 138.6 ± 81.8 , 132.9 ± 76.8 및 148.5 ± 86.3 이었으며, 음성대조군에 비하여 유의하게 낮았다.

표 102. 농장별 닭진드기 수 변화 (단위: 마리)

시점	A농장(성주농장)		B농장(남양양계)		C농장(봉황농장)	
	음성대조군	1배용량 살포군	음성대조군	1배용량 살포군	음성대조군	1배용량 살포군
약물살포 전	2067.1±222.0	2086.3±308.6	1246.3±254.8	1326.0±408.4	1833.4±237.7	1847.0±351.9
1차 Day 0~2	2093.9±264.9	244.6±152.3***	1399.5±264.8	124.4±58.7***	1938.6±264.7	156.6±66.3***
2차 Day 7~9	2175.5±252.5	168.4±85.3***	1535.3±352.2	87.2±67.3**	1989.7±316.2	137.4±52.3***
살포 Day 14~16	1981.4±273.2	161.1±71.2***	1376.9±339.7	113.3±51.7***	2014.6±508.9	138.6±81.8***
포 Day 21-23	2050.0±405.7	198.7±92.4***	1424.2±482.3	110.7±77.5***	1899.5±289.8	132.9±76.8***
후 Day 28~30	1954.7±323.1	178.2±96.0***	1868.3±309.9	179.5±82.5***	2059.9±362.6	148.5±86.3***

*** p <0.001: significantly different from control group

바) 닭진드기 살충률

- 무창계사에서 조합추출물제제(에코와구) 살포에 의한 닭진드기 살충률을 확인하였다.
- 1배용량인 조합추출물제제(에코와구) 200배 희석액 1차 살포(Day 0) 후 A 농장, B농장 및 C 농장의 닭진드기 살충률은 각각 88.43%, 91.65% 및 91.98%이었으며, 2차 살포(Day 7) 후에는 92.33%, 94.66% 와 93.15%의 살충률이 나타났다. 1차 살포 후 14일, 21 및 28일째의 각 농장의 닭진드기 살충률이 90% 이상이였다.

표 103. 1배용량 살포군의 닭진드기(red mite) 살충률 (단위: %)

농장명	1차 살포 후				
	D0~D2 (D0: 1차 살포)	D7~D9 (D7: 2차 살포)	D14~D16	D21~D23	D28~D30
A 농장	88.43	92.33	91.94	90.40	90.97
B 농장	91.65	94.66	92.27	92.69	90.97
C 농장	91.98	93.15	93.17	93.05	92.84
Mean±SD	90.69±1.96	93.38±1.18	92.46±0.64	92.05±1.44	91.59±1.08

3) 고찰 및 결론

- 본 연구에서는 조합추출물과 고삼추출물을 유효성분으로 하는 조합추출물제제(에코와구)의 국내 닭진드기(red-mite)에 대한 구제 효과와 닭진드기의 제어기간을 조사하여 조합추출물제제(에코와구)의 효능을 평가하였다.
- 무창계사 3농장에서 조합추출물제제(에코와구) 200배 희석액(1배용량)과 100배 희석액(2배 용량)을 각각 7일 간격으로 2회 살포하였다.
- 약물 살포 전 및 1차 살포 당일(0일), 2차 살포 당일(7일), 1차 살포 후 14일, 21일 및 28일에 계사에 트랩을 설치하여 48시간 뒤에 회수한 후 닭진드기 수를 측정하여 진드기 살충률을 확인하였다.
- A 농장의 약물 살포 전 1배용량(200배 희석액) 살포군과 2배용량(100배 희석액) 살포군의 닭진드기 수는 각각 2086.3±308.6마리와 2071.4±294.6마리였으며, 1차 약물 살포 후 닭진드기 수가 244.6±152.3마리와 147.2±81.4마리로 감소하였으며, 88.43%와 92.98%의 살충률을 보였고, 2차 약물 살포(Day 7)에는 닭진드기수가 161.1±71.2마리와 68.5±51.7마리로, 살충률은 92.33%와 96.86%이었다. 1배용량 살포군과 2배용량 살포군의 살충률은 1차 살포 후 28일째까지 90% 이상의 살충률을 보였다.
- B 농장의 경우 1배용량 살포군과 2배용량 살포군의 닭진드기 수가 각각 1326.0±408.4마리와 1263.3±604.3마리이었으나, 1차 살포 후 각 시험군의 닭진드기 수가 124.4±58.7마리와 59.2±45.8마리로 약물 살포 전 대비 90% 이상 감소하여 살충률이 91.65%와 95.83%이었다. 1배용량 살포군과 2배용량 살포군에서 2차 살포(Day 7) 후부터 2차 살포 후 3주째(Day 28)까지 닭진드기가 50~200마리 정도 관찰되었으며, 닭진드기 살충률은 90% 이상 유지되었다.
- 농장 C에서는 약물 살포 전 1배용량 살포군과 2배용량 살포군의 닭진드기수가

- 에코와구 (조합추출물+고삼추출물) 유기농업자재 등록
 - 고삼추출물 35% + 조합추출물 20% + 보조제 45%
 - 독성시험, 약해시험 완료
 - 유기농업자재 현장심사 완료
 - 유기농업자재 2021년 02월 03일 제품 출시 예정

에코와구의 독성시험 요약보고서

제출일: 2021.01.05

1. 시험의뢰자

명칭 (주)비오지노키
소재지 경기도 수원시 권선구 서호로 89, 41동 1층 (서둔동)

2. 시험기관

명칭 (주)한국생물안전성연구소
소재지 충청북도 음성군 감곡면 성주로 362-20
연락처 Tel: 043-882-0297, Fax: 043-882-0298

3. 시험물질정보

물질명 에코와구 (입수일-2020/09/24, 입수량-200mL, No. 20-1-112)
성상 및 외관 액상, 갈색
주원료투입비 55% (고삼추출물 35%+조합추출물 20%)

4. 에코와구의 독성시험결과 요약자료

시험번호	시험항목	시험결과	비고
ATO-20081	경구독성	LD ₅₀ 값 > 2000 mg/kg bw 급성독성 IV급 (저독성, 농약관리법)	실험동물 : SD 랫드
ATP-20071	경피독성	LD ₅₀ 값 > 4000 mg/kg bw 급성독성 IV급 (저독성, 농약관리법)	실험동물 : SD 랫드
ATE-20072	안점막자극	안반응평가표에 따라 평가시 자극 "강도"	실험동물 : 토끼 (New Zealand White)
ATD-20072	피부자극	피부반응평가표에 따라 평가시 자극 "없음"	실험동물 : 토끼 (New Zealand White)
ETF-20081	어류급성	48hr & 96hr LC ₅₀ 값 17.237 mg/L 어독성 III급 (저독성, 농약관리법)	시험어종 : 송사리 (<i>Oryzias latipes</i>)
ETBC-20065	꿀벌급성접촉독성	24hr & 48hr LD ₅₀ 값 > 100.0 µg/bee 꿀벌에 저독성	시험생물 : 꿀벌 (<i>Apis mellifera</i>)

(주)한국생물안전성연구소



우 27600 충북 음성군 감곡면 성주로 362-20 / www.kbsi.or.kr
전화 043)882-0297 / Fax 043)882-0298 / safe9119@hotmail.com

1/1

그림 39. 에코와구 유기농업자재 독성시험 요약보고서

항 목 명 : 에코와구 고추 약해시험

T.N: PT2009-12

- 시험 기관: ㈜한국생물안전연구소
- 시험 년도: 2020년
- 시험책임자: 강성영
- 담당 자: 박철순
- 실험개시일: 2020. 10. 20
- 실험종료일: 2020. 10. 30
- 시험장소: 충북 음성군 갈곡면
- 시험일지조건(토성): 시설하우스(상도)

1. 시험목적

에코와구의 고추에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

2. 시험방법

- 가. 시험약제 : 에코와구
- 나. 시험작물 (품종) : 고추(독야청청)
- 다. 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	약해시험		처리시기 및 방법	외회회사
		희석배수 및 사용량	기온량		
에코와구	고삼추출물 35 조림추출물 20	1,000배 (20ml/20ℓ)	500배 (40ml/20ℓ)	생육기 정엽차리 (10/25)	㈜비오지노키
무 처 리	-	-	-	-	-

라. 경종개요

- 9월 25일 파종하였으며, 파종 25일 후 입포드에 정식하였음(10/20).
- 시험약제는 정식 3일후, 고추 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

마. 시험구 배치 및 면적 : 완전임의배치법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당pot	소요pot
약해	3	3	9	5 pot	45 pot

3. 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	10/26, 10/28, 10/30	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 달관조사

1/2



T.N: PT2009-12

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0-5)		비고
		기온량	배양	
에코와구	고추 (독야청청)	0	0	약해없음

5. 결과요약

- 에코와구의 고추에 대한 약해시험 결과 기온량 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

6. 시험담당자 의견

- 에코와구는 고추에 대하여 기온량 및 배양에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.
- 업체의 요청으로 제품명 『월드오일』을 『에코와구』로 변경하였음.

본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였으며, 시험결과는 생성된 모든 시험기초 자료를 토대로 작성되었다.

2020년 12월 17일

시험책임자 강성영



(주)한국생물안전연구소

2/2



그림 40. 에코와구 유기농업자재 약해시험보고서 (고추)

항 목 명 : 에코와구 배추 약해시험

T.N: PT2009-12

- 시험 기관: ㈜한국생물안전연구소
- 시험 년도: 2020년
- 시험책임자: 강성영
- 담당 자: 박철순
- 실험개시일: 2020. 10. 20
- 실험종료일: 2020. 10. 30
- 시험장소: 충북 음성군 갈곡면
- 시험일지조건(토성): 시설하우스(상도)

1. 시험목적

에코와구의 배추에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

2. 시험방법

- 가. 시험약제 : 에코와구
- 나. 시험작물 (품종) : 배추(물양3호)
- 다. 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	약해시험		처리시기 및 방법	외회회사
		희석배수 및 사용량	기온량		
에코와구	고삼추출물 35 조림추출물 20	1,000배 (20ml/20ℓ)	500배 (40ml/20ℓ)	생육기 정엽차리 (10/25)	㈜비오지노키
무 처 리	-	-	-	-	-

라. 경종개요

- 9월 28일 파종하였으며, 파종 22일 후 입포드에 정식하였음(10/20).
- 시험약제는 정식 3일후, 배추 본엽이 2~3엽(온실 조건)시 처리하였음.

마. 시험구 배치 및 면적 : 완전임의배치법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당pot	소요pot
약해	3	3	9	5 pot	45 pot

3. 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	10/26, 10/28, 10/30	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 달관조사

1/2



T.N: PT2009-12

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0-5)		비고
		기온량	배양	
에코와구	배추 (물양3호)	0	0	약해없음

5. 결과요약

- 에코와구의 배추에 대한 약해시험 결과 기온량 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

6. 시험담당자 의견

- 에코와구는 배추에 대하여 기온량 및 배양에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.
- 업체의 요청으로 제품명 『월드오일』을 『에코와구』로 변경하였음.

본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였으며, 시험결과는 생성된 모든 시험기초 자료를 토대로 작성되었다.

2020년 12월 17일

시험책임자 강성영



(주)한국생물안전연구소

2/2



그림 41. 에코와구 유기농업자재 약해시험보고서 (배추)

항 목 명 : 에코와구 상수 약해시험

T.N: PT2009-12

- 시험기관: ㈜한국생물안전성연구소
- 시험년도: 2020년
- 시험책임자: 강성영
- 담당자: 박철순
- 실험개시일: 2020. 10. 20
- 실험종료일: 2020. 10. 30
- 시험장소: 충북 음성군 갈곡면
- 시험일지조건(토성): 시설하우스(상도)

1. 시험목적

에코와구의 상수에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

2. 시험방법

- 가. 시험약제: 에코와구
- 나. 시험작물(품종): 상수(도말린)
- 다. 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	약해시험			의뢰회사
		희석배수 및 사용량		처리시기 및 방법	
		기준량	배양		
에코와구	고상추출물 35 조형추출물 20	1,000배 (20ml/20ℓ)	500배 (40ml/20ℓ)	생육기 경엽처리 (10/25)	㈜비오지노키
무 처 리	-	-	-	-	-

라. 경종개요

- 9월 28일 파종하였으며, 파종 22일 후 컵포트에 정식하였음(10/20).
- 시험약제는 정식 3일후, 상수 본엽이 2-3엽(온실 조건)시 처리하였음.

마. 시험구 배치 및 면적: 원전임의배치법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당pot	소요pot
약해	3	3	9	5 pot	45 pot

3. 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	10/26, 10/28, 10/30	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 달권조사

1/2



T.N: PT2009-12

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0-5)		비고
		기준량	배양	
에코와구	상수 (도말린)	0	0	약해없음

5. 결과요약

- 에코와구의 상수에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

6. 시험담당자 의견

- 에코와구는 상수에 대하여 기준량 및 배양에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.
- 업체의 요청으로 제품명 「원드오일」을 「에코와구」로 변경하였음.

본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였으며, 시험결과에 생성된 모든 시험기록 자료를 토대로 작성되었다.

2020년 12월 17일

시험책임자 강성영



2/2



그림 42. 에코와구 유기농업자재 약해시험보고서 (상추)

항 목 명 : 에코와구 오이 약해시험

T.N: PT2009-12

- 시험기관: ㈜한국생물안전성연구소
- 시험년도: 2020년
- 시험책임자: 강성영
- 담당자: 박철순
- 실험개시일: 2020. 10. 20
- 실험종료일: 2020. 10. 30
- 시험장소: 충북 음성군 갈곡면
- 시험일지조건(토성): 시설하우스(상도)

1. 시험목적

에코와구의 오이에 대한 약해시험을 통하여 유기농업자재 공시 기초자료로 활용코자 함.

2. 시험방법

- 가. 시험약제: 에코와구
- 나. 시험작물(품종): 오이(네박자)
- 다. 처리내용

시험약제	원료투입율(%)	약해시험			의뢰회사
		희석배수 및 사용량		처리시기 및 방법	
		기준량	배양		
에코와구	고상추출물 35 조형추출물 30	1,000배 (20ml/20ℓ)	500배 (40ml/20ℓ)	생육기 경엽처리 (10/25)	㈜비오지노키
무 처 리	-	-	-	-	-

라. 경종개요

- 9월 25일 파종하였으며, 파종 25일 후 컵포트에 정식하였음(10/20).
- 시험약제는 정식 3일후, 오이 본엽이 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

마. 시험구 배치 및 면적: 원전임의배치법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당pot	소요pot
약해	3	3	9	5 pot	45 pot

3. 조사 방법

조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해유무	3	10/26, 10/28, 10/30	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 달권조사

1/2



T.N: PT2009-12

4. 시험성적(약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0-5)		비고
		기준량	배양	
에코와구	오이 (네박자)	0	0	약해없음

5. 결과요약

- 에코와구의 오이에 대한 약해시험 결과 기준량 및 배양에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

6. 시험담당자 의견

- 에코와구는 오이에 대하여 기준량 및 배양에서 약해가 없어 유기농업자재로 실용성이 있을 것으로 판단됨.
- 업체의 요청으로 제품명 「원드오일」을 「에코와구」로 변경하였음.

본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였으며, 시험결과에 생성된 모든 시험기록 자료를 토대로 작성되었다.

2020년 12월 17일

시험책임자 강성영



2/2



그림 43. 에코와구 유기농업자재 약해시험보고서 (오이)

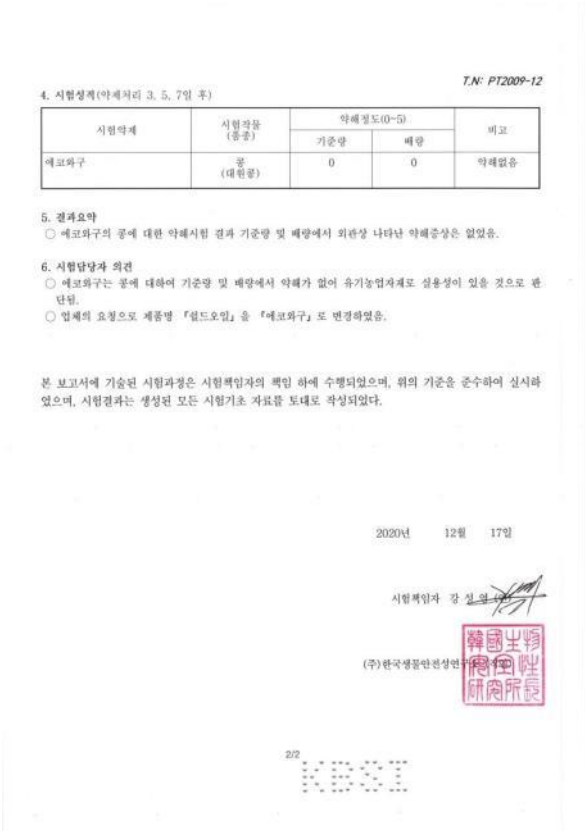
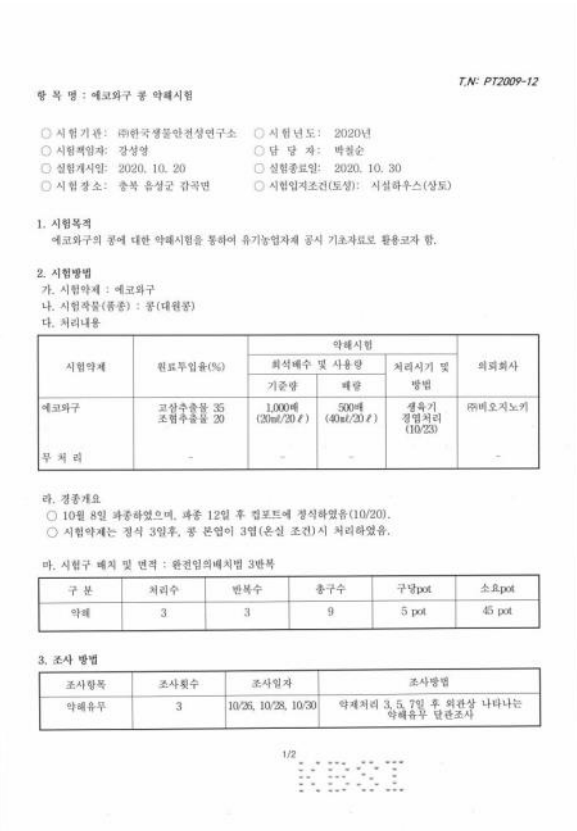


그림 44. 에코와구 유기농업자재 약해시험보고서 (콩)



순 천 대 학 교



순천대학교 의과대학 설립! 200만 전남 도민의 숙원!

수신자 ㈜비오지노키 대표 (경유)

제 목 유기농업자재 보완자료 제출 및 현장심사 일정 통보

- 귀 사의 무궁한 발전을 기원합니다.
- 유기농업자재 공시 신청 건에 관하여 귀사의 신청서류를 접수하고 검토한 결과를 알립니다.
- 아울러 현장심사 일정에 원활한 심사가 이루어질 수 있도록 준비하여 주시기 바랍니다.

업체명	제품명	신청 구분	접수일	서류보완 제출기한	현장심사일	업무처리 완료일	비고
㈜비오지노키	에코와구	신규	'21.01.06	'21.01.15	'21.01.20	'21.04.05	
	에코갈리2						

끝.

순천대학교 친환경농업센터장



실무관 **한건선** 인공됨장 **이재영** 센터장 **조주식**
 2021.01.13
 협조자

시행 친환경농업센터 농자재-011 (2021.01.13) 접수 ()
 우 57922 전남 순천시 중앙로 255(석현동) / http://www.친환경농업센터.kr
 전화 061-750-5345 / 전수 061-750-3890 / sunchon03@sunchon.ac.kr / 공개

그림 45. 에코와구 유기농업자재 현장심사 통보 공문

○ 에코와구 (고삼추출물+조협추출물) 시제품

(일쪽)

공시번호: 제 공시-3-5-049 호

유기농업자재 공시서

1. 업체명: ㈜비오지노키
2. 대표자 성명: 이 도 훈
3. 사업장 소재지: 경기 수원시 권선구 서호로89, 41동 1층
4. 자재의 명칭: 식물추출물
5. 자재의 구분: 총해관리용
6. 상표명: 에코와구
7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%)
 - 주 성 분: Matrine, 사포닌
 - 원료함량: 고삼추출물 35, 조협추출물 20, 보조제 45
8. 유효기간: 2021.01.29. ~ 2024.01.28.
9. 제조장 주소 또는 수입원산지(국가, 제조사)
 - : 충남 금산군 추부면 추풍로 150
10. 최초 공시일: 2021.01.29
11. 최초 공시기관: 순천대학교 산학협력단

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제63조제3항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2021년 01월 29일




순천대학교 산학협력단


그림 46. 에코와구 유기농업자재 공시서



그림 47. 에코와구 시제품

제 7 절 친환경 살충제 대량생산

1. 조합복합추출물의 대량생산 제조 시스템 구축

가. 원재료의 대량 건조 시설 구축

- 충청남도 금산군 추부면에 위치한 비오지노키 금산공장에 대량 생산제조 시스템을 구축 하였음.



그림 68. 비오지노키 금산공장

나. 기능성 원료의 대량 생산시설 구축

- 600L tank * 4ea, 250L~100L tank, 액상충진기, 대형멸균기 등 대량 생산시설 구축완료



그림 69. 600L tank * 4ea



그림 70. 대형멸균기



그림 71. 액상충진기

제 8 절 연구개발 성과

1. 특허

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	조합 추출물을 이용한 닭진드기에 대한 살충·살비제 조성물	대한민국	재단법인 경기도경제과학진흥원, 비오지노키	2018.04.12.	10-2018-0042606	재단법인 경기도경제과학진흥원, 비오지노키	2020.04.02.	10-2098858	100
2	주엽나무의 식별 방법	대한민국	재단법인 경기도경제과학진흥원	2019.10.31.	10-2019-0137607				100
3	2,3-디하이드록시프로필도코노에이트를 이용한 닭진드기에 대한 살충·살비제 조성물	대한민국	재단법인 경기도경제과학진흥원	2020.12.17.	10-2020-0177113				100

2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Society for Medicinal Plant and Natural Product Research	이지은, 김진아, 최윤희, 양병근, 윤종웅, 최춘환	2018.08.25.~30.	상하이	중국
2	제30회 천연물화학 국제심포지엄	김진아, 최윤희, 이지은, 정연우, 정원식, 서찬곤, 권진관, 김진규, 홍성수, 최춘환	2018.11.24.~12.01.	아테네	그리스
3	WVPAC 2019	최윤희, 정연우, 정원식, 양병근, 윤종웅, 홍성수, 최춘환	2019.09.16.~20.	방콕	태국

3. 언론 홍보

No	홍보유형	매체명	제목	일시	승인여부
1	지방일간지	경기신문	'살충제 계란' 원인 닭진드기 퇴치 본격화	2018-12-23	등록
2	중앙일간지	아시아경제	경기경제과학원 '닭진드기' 퇴치 천연물질 개...	2018-12-23	등록
3	중앙일간지	서울경제	경기경제과학원, '닭진드기' 방제 천연물질 '개...	2018-12-23	등록
4	Internet/PC통신	GIKJNEWS	경기도경제과학진흥원 "'계란' 화학살충제로 ...	2018-12-23	등록
5	Internet/PC통신	이뉴스투데이	경과원, '닭진드기' 방제 천연물질 '개발' 박차	2018-12-23	등록
6	지방일간지	중부일보	경과원 '살충제 계란' 주범 닭진드기 퇴치 ...	2018-12-23	등록
7	Internet/PC통신	NEWS SIS	경기도 '닭진드기 살충' 천연물질 개발 착수	2018-12-23	등록
8	Internet/PC통신	일간투데이	경기도경제과학진흥원, '닭진드기' 방제 천연...	2018-12-23	등록
9	Internet/PC통신	news 1	경기과학진흥원, '닭진드기 살충 천연물질'...	2018-12-23	등록
10	Internet/PC통신	매일일보	경과원 바이오센터, '닭진드기' 방제 천연물질...	2018-12-23	등록
11	Internet/PC통신	아시아투데이	"국민 식재료 '계란' 화학살충제로부터 지킨...	2018-12-23	등록
12	Internet/PC통신	마주경제	경과원 바이오센터, '닭진드기' 방제 천연물질...	2018-12-23	등록
13	주간잡지	머니투데이	경기도경제과학진흥원, 닭진드기 방제천연물...	2018-12-24	등록
14	지방일간지	경기일보	경과원 바이오센터, 정부 지원받아 3년간 '...	2018-12-24	등록
15	중앙일간지	헤럴드경제	경과원, 닭 진드기 살충제 개발 기술이전	2019-10-28	등록
16	중앙일간지	한국일보	"더 이상 살충제 계란 파동은 없다"...경기...	2019-10-28	등록
17	중앙일간지	아시아경제	경기경제과학원, 닭진드기 살충 천연물질 민...	2019-10-28	등록
18	Internet/PC통신	GUKJNEWS	경과원, '살충제 계란' 없앨 닭 진드기 박멸...	2019-10-28	등록
19	Internet/PC통신	일요서울	경기도경제과학진흥원-(주)비오지노카, '기술...	2019-10-28	등록
20	Internet/PC통신	일간경기	경과원, 닭 진드기 방제 기술 개발	2019-10-28	등록
21	Internet/PC통신	아시아투데이	경과원, 식물추출물 이용한 닭 진드기 방제...	2019-10-28	등록
22	Internet/PC통신	신아일보	경기경제과학진흥원, 비오지노카와 미전 체...	2019-10-28	등록
23	Internet/PC통신	비전21뉴스	경과원, 국내식물자원에서 닭 진드기 방제제...	2019-10-28	등록
24	Internet/PC통신	경기IN	경과원, 닭 진드기 방제제 개발..중순 기술...	2019-10-28	등록
25	Internet/PC통신	NEWS SIS	흡혈 닭진드기, 주업나무 추출물로 박멸.....	2019-10-28	등록
26	Internet/PC통신	cnbNEWS	경기도경제과학진흥원, '조엽 추출물' 이용한...	2019-10-28	등록
27	주간잡지	MoneyS	경과원, '조엽 추출물' 닭 진드기 방제제 기...	2019-10-28	등록
28	지방일간지	경인일보	'살충제 계란' 걱정없는 천연물질 약품 개발	2019-10-29	등록
29	지방일간지	경기일보	경과원, 국내 식물자원에서 닭 진드기 방제...	2019-10-29	등록
30	Internet/PC통신	국제뉴스	경기도, 닭 진드기 천연 살충제 상용 임박....	2020-10-29	등록
31	Internet/PC통신	LG헬로비전	경기도 개발 '친환경 닭 진드기 살충제' 내년...	2020-10-29	등록
32	Internet/PC통신	MoneyS	경기도 개발 '닭 진드기 살충제' 내년 상용화...	2020-10-29	등록
33	Internet/PC통신	NEWS 1	경기도 자체 개발 '닭 진드기 살충제' 내년...	2020-10-29	등록
34	Internet/PC통신	NEWS SIS	경기도 개발 닭진드기 살충제 효율 93%... ..	2020-10-29	등록
35	Internet/PC통신	e대한경제	닭 진드기 살충효율 93% 주업나무 열매 추출...	2020-10-29	등록
36	Internet/PC통신	BBS New	경기도, 주업나무 열매 이용, 닭 진드기 살...	2020-10-29	등록
37	Internet/PC통신	뉴스웍스	경기도 개발, 주업나무 열매 추출물 '닭 진...	2020-10-29	등록
38	Internet/PC통신	데일리한국	경기도 주업나무 추출물 이용한 '닭 진드기...	2020-10-29	등록
39	Internet/PC통신	브릿지경제	경기도 개발, 주업나무 열매 추출물을 이용...	2020-10-29	등록
40	Internet/PC통신	충청리뷰	경기도 개발, 주업나무 열매 추출물 이용 닭...	2020-10-29	등록
41	Internet/PC통신	정밀뉴스경기	경기도 개발 '닭 진드기 천연 살충제' 상...	2020-10-29	등록
42	Internet/PC통신	인천일보	경기도, 닭 진드기 살충제 내년 상용화 예정	2020-10-29	등록
43	Internet/PC통신	이뉴스투데이	경기도 개발 '닭 진드기 살충제'..내년 상용...	2020-10-29	등록
44	Internet/PC통신	서울경제	경기도, 주업나무 열매 추출물 이용 닭 진드...	2020-10-29	등록
45	Internet/PC통신	기호일보	도 자체개발 '천연 닭 진드기 살충제, 평균...	2020-10-30	등록
46	Internet/PC통신	한국농어민신문	경기도 '닭 진드기 살충제' 내년 상용화	2020-11-03	등록
47	Internet/PC통신	농민신문	주업나무 열매 추출물 이용 닭 진드기 살충...	2020-11-06	등록

4. 정책제안



(주)비오지노키

수신 농림축산식품부(조류인플루엔자방역과장)

제목 닭진드기 공동방제 시범사업 수행업체 관련 정책건의

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 첨부와 같이 농식품부의 지원을 받아 수행중인 농축산자재산업화기술개발사업 연구과제와 관련하여 '닭진드기 공동방제 시범사업 수행업체 관련 정책건의'에 대한 정책을 제안드립니다.

붙임1. 경기바이오센터 과제 정책제안용 공문_직인 .pdf

붙임2. 정책건의_공동방제 시범사업 수행업체 관련 .hwp

(주)비오지노키



제출자 2019-11-12
윤종용

시행 M00001-748339 (2019-11-12) 접수

우 16614 경기도 수원시 권선구 서호로 89 (서문동) 41동 1층 / <http://biogenicgroup.com/>

전화번호 031-227-8570 팩스번호 02-0000-0000 / biogenoci@gmail.com / 비공개(6)

5. 교육지도

닭진드기 및 농장위생관리 교육 실시내역

□ 교육 목적

- 산란계 농가에서 발생하는 전염병(가금티푸스)과 닭진드기에 대한 교육을 통하여 정확한 이해를 돕고, 예방을 위한 기본적인 농장위생 관리법 소개
- 닭진드기 생활사와 예방 및 구제를 위한 올바른 약제선택 및 사용방법 소개
- '닭진드기 방역관리지침' 교육을 통해 부분별한 약제 사용 최소화 및 농장의 위생향상에 기여

□ 개최일시 및 장소

일시	장소	참석인원	비고
2019년 09월 23일 (화)	(주)비오지노키 부설연구소 (경기도 수원시 권선구 서호로 89)	10명	산란계농가 종사자

□ 참석대상 : 경기도 화성시, 평택시 지역의 산란계 사육농가

□ 시행기관

- 주최 : (주)비오지노키



「대만 닭진드기 관련 교육지도 보고서」

□ 교육 목적

- 닭진드기 질병에 대한 이해가 미비하고, 방제대책에 관한 이해가 필요함
- 천연물 제제의 시장조사와 제품수출에 대한 상호협력
- 천연물 생물제제 및 농장 현장 테스트
- 닭진드기 관리에 대한 예방적 개념과 모니터링 기법, 사용 약제의 정확한 사용방법 교육

□ 개최일시 및 장소

일시	장소	참석인원	비고
2019년 10월 15일 (화)	대만 가오슝시	5명	

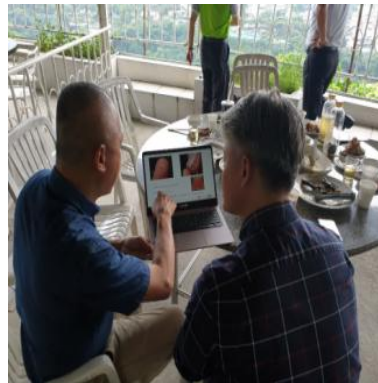
□ 참석대상 : 대만 가오슝시 인근 산란계 농가 종사자

□ 시행기관

- 주최 : 피드메이트 (Feedmate), jaritec industrial co.,Ltd

□ 주요내용

- 방제산업에서 닭진드기 관리의 중요성 소개
- 농가 감염 실태를 기반으로 예방적 개념과 모니터링 기법, 진드기 방제를 약제의 정확한 사용방법 교육



닭진드기 모니터링 방법 교육 실시내역

□ 교육 목적

- 다양한 닭진드기 모니터링 방법으로 계사 내 닭진드기의 밀도를 주기적으로 관찰 및 파악
- 닭진드기 모니터링 방법에 대한 정확한 이해를 돕고, 약제 처치시기 및 약제처리방법 소개

□ 개최일시 및 장소

일시	장소	참석인원	비고
2020년 10월 30일 (화)	(주)비오지노키 부설연구소 (경기도 수원시 권선구 서호로 89)	5명	산란계농가 종사자

□ 참석대상 : 경기도 화성시, 평택시 지역의 산란계 사육농가

□ 시행기관

- 주최 : (주)비오지노키

□ 주요내용

- 닭진드기 감염유무를 파악하는 방법과 입식계군 평가 방법 설명
- 처치시기를 결정하는 방법 및 처치 후 닭진드기 밀도 확인 방법 소개
- 손쉽게 만들 수 있는 닭진드기 트랩 종류에 대한 소개 및 닭진드기 증식속도나 패턴을 파악하는 농장 방제 전략 수립 기법
- 약제 처치 후 모니터링의 중요성 설명



닭진드기 방제를 위한 계사 관리방법 교육 실시내역

□ 교육 목적

- 예방방법과 처치법을 기반으로 한 기본적인 계사 관리방법 및 운영방법에 대한 소개
- 계사관리에 대한 이해가 미비하고, 사육증 및 빈계사에 대한 정확한 계사관리에 대한 지문

□ 개최일시 및 장소

일시	장소	참석인원	비고
2020년 11월 09일 (화)	(주)비오지노키 부설연구소 (경기도 수원시 권선구 서호로 89)	5명	산란계농가 종사자

□ 참석대상 : 경기도 화성시, 평택시 지역의 산란계 사육농가

□ 시행기관

- 주최 : (주)비오지노키

□ 주요내용


- 무알계사의 에어플로워 덕트 내부에 대한 청소법 설명
- 소독에 대한 기본개념과 계사 소독과 약제사용에 대한 주의점 설명
- 계사 출입시 알아야할 개념과 덕트가동, 계분관리법, 계절별 계사관리, 바닥면지제거 방법, 쥐·포유류에 대한 주의점 설명
- 예방적 방법과 치료적 방법의 차이에 대한 교육



6. 제품화

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	국내 환경을 고려한 친환경 방제제 개발 및 상용화			
주관연구기관	경기도경제과학진흥원	참여기관	(주)비오지노키	
연구책임자	최춘환	연구기간	2018. 04. 26 - 2020. 12. 31 (33 개월)	
총 정부출연금	550,000 천원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	(O)	기존 제품 공정개선	()	
신제품(제품출시 완료)	()	기 타	()	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
에코와구		달진드기 방제제	2020.12.31. (예정)	90 %
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2020년 11월 30일

연구책임자 : 최 춘 환 (서명 또는 인)

7. 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	3 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	2 억원	
			향후 3년간 매출	6 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 0 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 5 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 15 % 국외 : 0 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			-
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			-

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3년		
	소요예산(백만원)		500 (백만원)		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0 억원	3 억원	6 억원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0 %	5 %	10 %
국외		0 %	0 %	0 %	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		천연추출물을 이용한 닭진드기 알 방제 기술개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	-	-	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 닭진드기 감염실태, 양계농가 약제사용, 감수성 및 잔류성 실태 조사
- 효과적인 감수성 천연물소재 선발 및 안전성 조사
- 물리적 방제법과 조합복합추출물을 혼합한 닭진드기 구제용 신약개발로 진드기 방제효율 향상 및 내성획득 최소화
- 계란과 양계 축체에서 약제 잔류성 분석 및 적정 휴약기간 선정
- 개발약제의 현장적용 연구를 통한 가축전염병, 인수공통전염병 방제를 제고

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	수행 기관	연구개발 목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2018)	경기도경제과학 진흥원 (주관)	문헌연구를 통한 소 재선별	100	- 국내 및 해외 공정서를 바탕으로 각 종 문헌 조사를 통해 생약의 외형적인 특징 파악 및 성분 조사, 기원식물을 파 악하는데 있어 기초자료로 함
		기능성 원료에 대한 효능/지표성분 분리 및 함량 결정	100	- 본 연구진의 축적된 분리/분석 기술을 활용하여 유효 지표성분 2종 이상 연구 기간 내에 효율적으로 분리정제 확보
		살충 기전연구 I	100	- 닭진드기 살비 분자표적(단백질 효소) 탐색 및 생물학적 정보 분석 - 닭진드기로부터 살비 분자표적 선발 및 유전자원 확보
	비오지노키(협동)	농장 약제사용실태 및 닭진드기 감염현 황 조사	100	- 농장별 닭진드기 감염현황 조사 (경기 도 6곳, 충남 6곳, 충북 5곳, 강원도 4 곳 - 국내 20개 농장을 조사한 결과 닭의 인근 케이지 및 먼지에 많은 개체수의 닭진드기가 발생하고 있음 - 효과적인 살충제 및 살비제의 부재, 무분별한 살포에 의한 저항성 발현으로 진드기가 발생한 모든 농장에서 방제에 어려움을 겪고 있음 - 시판되고 있는 닭진드기 구제제인 충 살이, 와구방, 일렉터 PSP, 와구프리, 와 구프리블루를 20개 농장에서 저항성을 조사 하였다(표 2). 조사결과 충살이에 대한 저항성을 보인 농장이 3곳, 와구방 은 2곳, 일렉터PSP는 2곳, 와구프리가 5

				<p>곳으로 가장 많았으며 와구프리블루는 1곳으로 확인되었다. 농장별로 저항성의 차이가 크게 나타난 것으로 보아, 농장마다 저항성을 조사하여 농장에 맞는 약제의 처리가 필요할 것으로 판단됨</p> <ul style="list-style-type: none"> - 허가된 동물용의약외품 및 후보약제에 대한 감수성 조사 결과는 표 3-4에 나타난 것처럼 Phoxim, Etoxazole, Trichlorfon, Propoxur, Dichlorvos, Fenazaquin, Amitraz, Avermectin, Cyfluthrin은 저항성을 나타내는 농장이 1~5곳으로 확인되었고, Carbaryl의 경우 8곳의 농장에서 저항성이 나타남
		천연물 30종 이상 감수성 검사(성충, 유충, 알)	100	<ul style="list-style-type: none"> - 닭진드기 성충과 유충에 대한 천연물 감수성 검사 결과, 살충 활성은 10,000ppm의 농도에서 조합 추출물에서 94.0%의 살충활성을 확인하였고, 홍황초(노란색) 추출물에서 62.6%로 중간정도의 살충활성을 확인하였다. 토복령, 박하, 어성초, 고추, 쥐오줌풀, 홍황초(주황색) 6종은 약한 살충활성을 보였으며, 나머지 22종의 추출물에서는 거의 살충활성이 미비함 - 닭진드기알에 대한 천연물 감수성 검사 결과, 살란활성은 30종 모두 전혀 살란활성을 보이지 않거나 그 효과가 미비함
		안정성, 잔류성 조사 및 문제점 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 사용허가 제품으로는 와구프리 레드(피리다벤, Pyridaben), 와구프리 블루(비펜스린, Bifenthrin), 와구프리 엘로우 (클로르피리포스-메틸, Chlorpyrifos-methyl + 클로르페나피르, Chlorpenapyr), 일렉터 피에스피(스피노사드, Spinosad)를 조사 - 국외 사용허가 제품으로는 폭심(Phoxim), 아버멕틴(Abermectin), 사이플루쓰린(Cyfluthrin), 아미트라즈(Amitraz)을 조사
2차년도	경기도경계과학진흥원 (주관)	조합복합추출물의 제조공정 표준화 및	100	<ul style="list-style-type: none"> - 국내외조합을 이용한 추출용매별 수율 확인

(2019)		기준규격 설정		- 표준화를 위한 성분연구
		표적유전자 확보 및 유전자감별법 확립	100	- 국내외 조협 및 근연종에 대한 nrDNA ITS 분자 마커를 활용한 분자분류학적 분석
		조협복합추출물의 대량생산 제조 시스템 구축	100	- 국내외 조협 추출 수율과 살충력을 고려하여 대량추출법 확립
		살충기전연구 II	100	- 닭진드기로부터 살비 분자표적 선발 (GST, AChE) 및 활성 저해능 평가 - 닭진드기의 살비 분자표적으로 제조 합된 GST-1, 2, 3의 효소 활성을 검증 및 조협복합추출물의 분획물 활성 저해 평가
	비오지노키(협동)	효과적인 감수성 천연물소재 선발	100	- 실리카 등 물리적 억제제의 성상분석과 농도별 지속성 및 유효성 파악 - 천연물 추출물의 성상분석과 농도별 지속성 및 닭에서 유효성 파악 - 조협복합추출물 혼합제에 대한 농도별 실험실 유효성 평가
		안전성 조사, 독성 평가, 안자극성시험 및 잔류성 평가	100	- 천연물 추출물 억제제의 개별 안전성 자료조사 및 평가 - 조협복합추출물제제 개발 환경안전성 자료조사 및 평가 - 개발 복합제의 안정성 평가 - 선발 복합제의 개별 잔류성 평가
		조협복합추출물의 대량생산 제조 시스템 구축	100	- 비오지노키 금산공장에 대량 생산 제조 시스템 구축완료
3차 년도 (2020)	경기도경제과학진흥원 (주관)	기능성원료 효능성분의 닭진드기 살충 및 생체내 대사물 작용기전 규명	100	- 조협 복합 추출물, 분획물, 분리된 화합물의 닭진드기 GST, AChE 활성 억제능 확인.
		원재료 수급방안 구축	100	- 보고약업사와 원료수급 및 양해각서를 통한 지속적인 원재료 수급 방안 확인.
	비오지노키(협동)	조협복합추출물에 대한 필드 유효성 및 지속기간 평가	100	- 조협복합추출물 제제 야외 유효성평가 결과, 닭진드기 감소율 96~93.3% 확인함 - 약제 처리 42일 후에 닭진드기 밀도가 점점 증가하면서, 약 28일간 조협복합추출물제제가 지속되는 것을 확인함
		습도와 환경에 따른	100	- 항온항습기, 바람조건에서의 유효성평가

		적정 사용조건 평가		가에서 습도에 따른 살충력 변화는 없었으나, 바람이 부는 조건에서는 살충력이 저하되는 것을 확인함
		약제적용방법과 모니터링 및 투약시기 판단, 처치방법, 최적장비, 처치 후 사후관리법 판단	100	- 먼지관찰법, 육안 관찰법, 트랩확인법 등 - 혼합물질 투약방법 및 관리중점 포인트 확인 - 사후관리 방법 확립
		계사타입과 조건에 따른 약제효능 파악	100	- 무창계사 및 직립식 케이지로 3개의 농가에 대하여 약제효능을 파악함.
		개발 복합제의 용법 용량에 따른 계란과 계육에서의 잔류성 검사	100	- 본 제품의 주성분인 고삼추출물, 조협추출물은 생약제로 구분되므로, 사람이 섭취하거나 의약품의 원료로 사용되는 생약이며, 잔류에 관한 자료를 면제하는 동물용의약품 목록에 포함되어 있다.
		개발 복합제의 사용자 안전성 평가	100	- 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안 자극 시험, 피부감작성 시험 평가
		개발 복합제의 환경 안전성 평가	100	- 잉어에 대한 급성독성평가

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 해당없음

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구개발 결과의 활용방안

- 동물용의약품 제품 허가 등록
- 불법 농약 사용 규제 법안 마련
- 동물용의약품 자체 생산 또는 기술이전
- 친환경 기술을 이용한 주변국가 홍보 및 제품수출

4-2. 기대성과 및 파급효과

- 기술적 측면
 - 친환경 천연물소재를 이용한 방제방법 도입으로 화학약제사용량 감소를 유도하여 내성 획득 경감
 - 유효성 있는 천연물소재 개발과 로테이션식 투약 홍보로 내성획득 방지
 - 동물용의약품으로 약제 등록하고 관리하여 무허가 약제 사용과 오남용 방지
- 경제적 · 산업적 측면
 - 진드기 피해와 전염성질병 동시감염으로 인한 피해를 방지하여 지속가능한 산업 유지와 생산성에 공헌
 - 안전성 있는 약제를 사용한 안전한 식품생산

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내 환경을 고려한 친환경 방제제 개발 및 상용화						
	(영문) Development and application of eco-friendly control agent considering our environment						
주 관 연 구 기 관	경기도경제과학진흥원		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 경기도경제과학진흥원			
참 여 기 업	(주)비오지노기			(성명) 최 춘 환			
총 연구개발비 (733,334천원)	계	733,334천원	총 연 구 기 간	2018.04.26. ~ 2020.12.31.(2년 9월)			
	정부출연 연구개발비	550,000천원		총 인 원	17명		
	기업부담금	183,334천원		총 참 여 수 연 구 원	내부인원	17명	
	연구기관부담금	-			외부인원	0명	

○ 연구개발 목표 및 성과

○ 본 연구는 닭진드기(와구모) 방제용 천연물 활성소재를 탐색하는 것을 목표로 하고 있으며 이를 위해 1) 닭진드기에 대한 살충활성을 보유한 조합 등 천연물의 탐색, 2) 천연물이 생산하는 살충물질의 분리 및 구명, 3) 살충물질의 닭진드기에 대한 살충기작 구명 등을 주요 연구내용으로 하고 있다.

○ 조합 및 고삼 등의 국내 농생명자원의 고부가가치화를 위해 닭진드기에 대한 살충 활성을 확인, 동물의약외품으로 개발하고 조합복합추출물을 주원료로 사용하여 닭진드기 살충에 좋은 제품을 개발하여 산업화하고자함.

○ 정량적 성과 : 본 연구에서는 조합을 활용하여 신규 친환경방제제 개발을 목표로 특허출원 2건, 등록 1건, 정책제안 1건, 교육지도 4건, 우수연구성과를 국제학술발표 3건을 하였으며, 1건의 기술이전으로 유기농업자재로 등록하여 시제품 개발 완료, 언론홍보 47회에 거친 우수 연구성과 홍보하여 활발한 연구를 수행함.

○ 정성적 성과

1. 문헌을 통한 기존에 사용되는 방제제의 종류 및 안정성, 잔류성 문제점 분석 완료
2. 닭진드기 감염현황 및 기능성 소재 탐색완료
 - 가. 농장 약제사용실태 및 닭진드기 감염현황 조사 완료
 - 나. 천연물 30종 이상 감수성 검사 완료 (조합 추출물에서 91% 이상 살충효과 확인)
3. 조합 성분 연구 및 표준화완료
 - 가. 산지별, 국가별, 용매별 추출물 수율 및 살비활성 검사완료
 - 나. 산지별, 국가별 HPLC Profiling 완료
 - 다. 주엽나무의 분자분류학적인 유전자 분석 완료
 - 라. 조합의 유효물질 및 지표물질 분리정제 완료
4. 닭진드기 살충력 평가 및 제형개발 완료

- 가. 기존 방제방법과 조합추출물 제제의 유효성 평가 완료
- 나. 조합 복합추출물의 소재 및 비율선정 완료
- 5. 조합복합추출물 유효성 평가 및 안전성 평가 완료
 - 가. 조합복합추출물 유효성 및 지속성 평가 완료
 - 나. 습도와 환경에 따른 유효성 평가 완료
 - 다. 약제 적용방법과 모니터링 완료
 - 라. 조합복합 추출물 혼합제 잔류성, 안전성, 환경안전성 평가 완료
 - 마. 야외 임상 평가 완료
 - 바. 조합복합추출물 혼합제제 시제품 개발 (유기농업자재등록, 동물 의약외품 신청 완료)
- 6. 닭진드기 살충 기작 규명완료
 - 가. 최초 닭진드기로부터 살비 분자표적 단백질 효소 분리 완료
 - 나. 살비 분자 표적 효소 (GST) 억제 확인
 - 다. 닭진드기 살충기작연구 완료
- 7. 친환경 살충제 대량 생산 시스템 구축 완료

○ 연구내용 및 결과

- 전문가 자문회의: 동물용의약외품 관련 전문가 자문회의를 연구 개시시점에서부터 주기적으로 개최하고 연구 진행단계별 자문을 받아 이를 연구개발에 적극 반영
- 효과적인 감수성 천연물 소재 선발
 - 진드기에 유효한 물리적 억제제 및 천연물 억제제 선발
 - 천연물 추출물에 대한 닭진드기의 감수성 및 유효농도 조사
 - 후보 소재 혼합물의 적정 조성 도출 및 적정 용법용량 실험
 - 후보약물의 닭에서 유효성 시험
- 대상동물, 식품, 인체 및 환경 안전성 조사
 - 계란과 계육에서의 약제 잔류성 및 적정 휴약기간 평가
 - 용법에 근거한 대상동물(닭) 안전성 평가
 - 사용자 안전성 평가(급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안자극성, 작업자 독성평가)
 - 환경 안전성 평가(어류독성, 환경유입량 평가)
- 효과적인 제품 및 적용방법 개발
 - 물리적소재와 조합복합추출물 제형화
 - 필드 효능실험
 - 약제적용 방법 확립(모니터링, 투약시기, 처치방법, 장비, 처치 후 사후관리)
 - 적정 휴약기간 및 잔류방지 실험
- 기능성 원료의 원료표준화 및 QC 조건 확립: 동물용의약외품 허가에 적합한 원료표준화와 지표성분 함량결정 및 QC 조건 확립
- 효능성분의 작용기전 규명: 기능성원료 효능성분의 닭진드기 살충 효과에 대한 작용기전을 규명하여 동물용의약외품 허가 신청 시와 사업화 시의 과학적 근거 자료로 활용
- 동물용의약외품 허가 : 결과종합 및 전문가 컨설팅을 통한 농림축산검역본부에 동물용의약외품 허가 신청 후 승인
- 원재료 수급방안 구축: 표준화된 고품질 원료의 수급대책 마련
- 기능성 원료를 사용한 식품 개발 및 사업화: 기능성 원료를 이용한 동물용의약외품 개발 및 사업화

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 닭진드기 방제용 신규 동물용의약품 개발 및 상용화
- 동물용의약품 상용화에 의한 서비스 고용 및 수익 창출
- 닭진드기에 의한 양계산업 위축 방지
- 닭진드기에 의한 가축질병 및 인수공통질병 방제
- 유효 동물용의약품으로 약제사용유도 및 내성방지와 대상동물 안전성 확보
- 계란과 계육에 잔류감소로 인한 식품안전성 향상

[별첨 2]

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	118024-3		
사업구분	농축산자재산업화기술개발사업				
연구분야	수의(수의과학_수의기생생물)		과제구분	단위	
사업명	농축산자재산업화기술사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	국내 환경을 고려한 친환경 방제제 개발 및 상용화		과제유형	개발	
연구기관	2018. 04. 26 - 2020. 12. 31 (33 개월)		연구책임자	최춘환	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	9개월	150,000	50,000	200,000
	2차연도	12개월	200,000	66,667	266,667
	3차연도	12개월	200,000	66,667	266,667
	계		550,000	183,334	733,334
참여기업	(주)비오지노키				
상대국	해당없음	상대국연구기관	해당없음		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

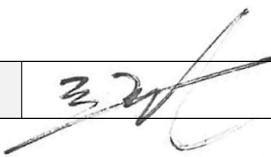
2. 평가일 : 2021.02.08

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경기도경제과학진흥원	책임연구원	최춘환

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 최춘환

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 국내 농생명소재를 이용, 사회현안인 안전한 먹거리 제공을 위한 기술을 개발
 - 이 과정에서 국내 농생명소재들의 닭진드기 살충활성을 검증하였으며, 그 동안 활용되지 않은 조합을 후보 소재로 발굴 및 유전자 판별기술개발
 - 또한 생리활성 유효성분의 정확한 분리정제 및 구조결정 해냈으며, 살충기전연구를 통해 조합의 살충기전을 세계최초로 밝힘
 - 개발된 기술을 공동연구기관에 기술이전하였음.
 - 제품화를 완료하였으며 추가로 동물용의약외품으로 상품화를 진행중임

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

- 연구개발결과를 이용하여 닭진드기 살충효과를 가지는 친환경방제제를 확보하게 되었으며, 국내 양계농가에서는 닭진드기 방제에 있어 친환경살충제를 추가로 확보 하게 되었음. 닭진드기 방제에 있어 좀더 안전하고 완벽한 종합방제기술(물리적방제+화학적방제+친환경적방제)을 구현 할 수 있는 환경이 구성됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

- 닭진드기 방제용 신규 동물용의약외품 개발 및 상용화
- 동물용의약외품 상용화에 의한 서비스 고용 및 수익 창출
- 닭진드기에 의한 양계산업 위축 방지
- 닭진드기에 의한 가축질병 및 인수공통질병 방제
- 유효 동물용의약외품으로 약제사용유도 및 내성방지와 대상동물 안전성 확보
- 계란과 계육에 잔류감소로 인한 식품안전성 향상

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

- 2년 9개월이라는 기간에 천연소재의 발굴, 후보소재(조합)유전자 판별기술개발, 지표 및 유효물질 분리정제 및 구조결정, 생리활성검증 및 독성연구, 살충기전연구, in vivo 실험등을 모두 성공적으로 완료하고 제품을 출시

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (보통)

특허출원 2건, 등록 1건, 정책제안 1건, 교육지도 4건, 우수연구성과를 국제학술발표 3건을 하였으며, 1건의 기술이전으로 유기농업자재로 등록하여 시제품 개발 완료, 언론홍보 47회에 거친 우수연구성과 홍보하여 활발한 연구를 수행함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
전문가 자문회의	10	100	전문가자문을 통해 연구의 방향성 설정 및 완결성을 높였음
닭진드기 감염실태, 양계농가 약제사용, 감수성 및 잔류성 실태 조사	10	100	제대로된 실태조사가 없었으며, 이번 사업을 통해 실태조사완료
효과적인 감수성 천연물소재 선별 및 안전성 조사	10	100	30여종 이상의 천연소재를 이용하여, 알, 유충, 성충에 이르기까지 조사함
기능성 원료의 원료표준화 및 QC 조건 확립	20	100	지표물질 및 유효물질 분리정제 및 구조결정, 원료의 유전자판별기술확립
대상동물, 식품, 인체 및 환경 안전성 시험·평가	10	100	인허가에 필요한 안전성실험을 모두 완료하였음
효과적인 제품 및 용법 개발	10	100	In vivo 실험을 통해 효과적인 제품의 용법을 개발완료함
효능성분의 작용기전 규명	15	100	유효물질과 작용기전을 세계최초로 밝힘
동물용의약외품 허가 신청	5	100	인허가 절차 진행중
원재료 수급방안 구축	10	100	원료 수급방안 확보함
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 국내 농생명소재를 이용, 사회현안인 안전한 먹거리 제공을 위한 기술을 개발
 - 이 과정에서 국내 농생명소재들의 닭진드기 살충활성을 검증하였으며, 그 동안 활용되지 않은 조합을 후보 소재로 발굴 및 유전자 판별기술개발
 - 또한 생리활성 유효성분의 정확한 분리정제 및 구조결정 해냈으며, 살충기전연구를 통해 조합의 살충기전을 세계최초로 밝힘
 - 개발된 기술을 공동연구기관에 기술이전하였음.
 - 제품화를 완료하였으며 추가로 동물용의약외품으로 상품화를 진행중임
- 연구개발결과를 이용하여 닭진드기 살충효과를 가지는 친환경방제제를 확보하게 되었

으며, 국내 양계농가에서는 닭진드기 방제에 있어 친환경살충제를 추가로 확보 하게 되었음. 닭진드기 방제에 있어 좀 더 안전하고 완벽한 종합방제기술(물리적방제+화학적방제+친환경적방제)을 구현 할 수 있는 환경이 구성됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

○ 2년 9개월이라는 기간에 천연소재의 발굴, 후보소재(조합)유전자 판별기술개발, 지표 및 유효물질 분리정제 및 구조결정, 생리활성검증 및 독성연구, 살충기전연구, in vivo 실험등을 모두 성공적으로 완료하고 기술이전 및 제품출시를 완료함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 닭진드기 방제용 신규 동물용의약외품 개발 및 상용화
- 동물용의약외품 상용화에 의한 서비스 고용 및 수익 창출
- 닭진드기에 의한 양계산업 위축 방지
- 닭진드기에 의한 가축질병 및 인수공통질병 방제
- 유효 동물용의약외품으로 약제사용유도 및 내성방지와 대상동물 안전성 확보
- 계란과 계육에 잔류감소로 인한 식품안전성 향상

IV. 보안성 검토

○ 해당없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

○ 해당없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

○ 해당없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	수의(수의과학_수의기생생물)	
연구과제명	국내 환경을 고려한 친환경 방제제 개발 및 상용화			
주관연구기관	경기도경제과학진흥원	주관연구책임자	최춘환	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	550,000,000	183,334,000	0	733,334,000
연구개발기간	2018.04.26 ~ 2020.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 전문가 자문회의	전문가자문을 통해 연구의 방향성 설정 및 완결성을 높였음
② 닭진드기 감염실태, 양계농가 약제사용, 감수성 및 잔류성 실태 조사	우리나라에 제대로된 실태조사가 없었으며, 이번 사업을 통해 실태조사완료
③ 효과적인 감수성 천연물소재 선별 및 안전성 조사	30여종이상의 천연소재를 이용하여, 알, 유충, 성충을 대상으로 살충효과를 연구함
④ 기능성 원료의 원료표준화 및 QC 조건 확립	지표물질 및 유효물질 분리정제 및 구조결정, 원료의 유전자 판별 기술 확립
⑤ 대상동물, 식품, 인체 및 환경 안전성 시험·평가	인허가에 필요한 안전성실험을 모두 완료하였음
⑥ 효과적인 제품 및 용법 개발	In vivo 실험을 통해 효과적인 제품의 용법을 개발 완료함
⑦ 효능성분의 작용기전 규명	유효물질과 작용기전을 세계최초로 밝힘
⑧ 동물용의약외품 허가 신청	인허가 절차 진행중
⑨원재료 수급방안 구축	원료 수급방안 확보함

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	20		40		5			5				5	5		5	5			
최종목표	2	1		1		1			1		1	2	2	4		1	5			
연구기간내 달성실적	2	1		1		1			2		0	0	3	4		1	47			
달성율(%)	100	100		100		100			200		0	0	150	100		100	940			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	국내 농생명소재(조합)를 활용 닭진드기 살충제 소재발굴
②	조합추출물로부터 닭진드기 살충기전 확인
③	조합복합추출물로부터 닭진드기 살충 유효성 및 환경안전성 평가
④	DNA마커를 이용한 조합근연종의 유전자판별기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		V				V	V			
②의 기술	V							V		
③의 기술	V					V	V			
④의 기술		V				V				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	○국내 농생명 소재(조협)를 활용 닭진드기 살충제 소재발굴기술을 이미 기술이전을 완료 하였으며, 인허가를 통한 제품의 출시로 관련기업 및 산업 성장건인 ○친환경방제제개발을 통해, 사회현안이었던 '살충제 달걀'과 같은 이슈를 극복을 통해 국민에게 안전한 먹거리 제공
②의 기술	○세계최초 조협의 닭진드기 살충기전 밝힘, 우수기술력 해외 우수저널에 등재 진행 중 ○살충제 내성에 의해 필요이상으로 많은 살충제 살포로 발생하는 '살충제 달걀과동'과 같은 이슈를 해결 할 수 있는 친환경 방제제의 기전을 밝혔으며, 이를 통해 다양한 기전을 가지는 방제기법을 활용하여 다수의 종합방제기법(물리+화학+친환경방제) 확립가능.
③의 기술	○개발제품의 적정사용량 확인 및 내성방지 ○대상동물 안전성 확보 및 사용자의 안전성 확보 ○계란과 계육에 잔류감소로 인한 식품안전성 향상
④의 기술	○생물다양성 협약대비, 국내 기능성 농생명소재 판별기술개발을 통해 생물주권확보 및 제품화이후 소비되는 농생명소재의 정확한 판별기술확립으로 생산시 혼입을 방지

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치						100													
최종목표						9,000					1	2							
연구기간내 달성실적						-					0	0							
연구종료후 성과창출 계획						9,000					1	2							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산자재산업화 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산자재산업화 기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.