

마우스를 이용한 Clean Natural에 대한 소핵시험

조윤희* · 김의경 · 임영윤** · 김곤섭 · 이후장†

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소, *전북대학교 수의과대학,
**서남해수어류양식수산업협동조합

The Micronucleus Test of Clean Natural with Mice

Yoon-Hee, Cho* · Eui-Gyung Kim · Yeong-Yun, Lim** · Gon-Sup, Kim · Hu-Jang Lee†

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 600-701, Korea

*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

**Southwest Marine Fish-Culture Co-op., Yeosu 550-818, Korea

(Received August 12, 2005; Accepted October 18, 2005)

ABSTRACT

Clean Natural is a new disinfectant of which main components are propolis and wood vinegar from *Quercus mongolica*. The mutagenicity of Clean Natural was studied by a micronucleus test in male ICR mice. The maximally tolerated dose (MTD) of Clean Natural was determined to >2.0 g/kg body weight. Therefore, the doses adopted for the micronucleus test was 2.0 g/kg as a high dose, 1.0 g/kg as a medium and 0.5 g/kg as a low of dose, respectively. Each of group was consisted of three doses of Clean Natural, positive control 2 mg/kg of mitomycin C and negative control 20 ml/kg of saline. A slide preparation was made at 24 hours following administration. No significant induction of micronuclei was observed in any of the three doses of Clean Natural orally administered. No cytotoxicity such as inhibition of hemopoiesis was observed in any group of test agent as the rate of polychromatic erythrocytes to total erythrocytes was over 40%. These results indicate that Clean Natural is not capable of inducing micronuclei in *in vivo* mouse cells and thus has no genotoxicity in micronucleus test.

Keywords: Clean Natural, disinfectant, micronucleus test, mutagenicity

I. 서 론

최근 들어, 천연물질을 이용한 각종 항균제 및 항산화제의 개발에 관심이 고조되고 있다. 오래 전부터, 구미지역에서는, 목초액을 항균, 살균, 보존성 향상, 항산화 효과, 가공식품의 향취개선 등을 목적으로 사용하여 왔다.¹⁻³⁾ 또한, 일본에서는 농업, 축산 및 환경분야에서 목초액의 활용성에 관한 연구가 수행되어 토양살균, 축산분뇨의 탈취, 작물의 해충 기피, 식물생장 촉진효과 등이 있는 것으로 밝혀져 있다.^{4,6)} 국내에서도, 목초액을 이용한 다양한 연구가 진행되어 왔던 바, 식물생장 및 병원균 방제, 축산분뇨의 탈취, 산란계의 사료첨가제, 항균성, 항산화 활성 등에 관한 효과가 보고되어

있다.⁷⁻¹¹⁾ 특히, 축산분뇨 등과 같은 폐기물의 처리과정에서 발생하는 악취는 2차 공해를 유발할 가능성이 있으므로 이의 처리는 매우 중요하다.¹²⁾

국내에서는 목초액 제조를 위한 원료로서 주로 참나무류를 사용하고 있으며 일부는 삼나무 등의 침엽수를 사용하여 제조된 목초액이 시판되고 있다.¹³⁾ 목초액은 목탄 제조 시에 발생하는 증기를 냉각·응축시킨 액체로서, 80~90%가 물이며, 나머지 10~20%가 유기화합물이며 이 속에는 유기산류 12종, phenol류 13종, carbonyl 화합물류 19종, alcohol류 9종 등을 포함하여 약 200여종의 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.^{14,15)}

한편, 천연 항균성물질로 알려진 프로폴리스는 벌들이 다양한 식물의 진액물질을 채취하여 효소를 첨가시켜, 밀납 등을 넣어 몇 개월간 숙성시켜 놓은 물질로서 우수한 항균, 살균, 항염 작용을 하는 성질을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 프로폴리스 성분으로는 지

†Corresponding author : Southwest Marine Fish-Culture Co-op.
Tel: 82-55-751-6642, Fax: 82-55-751-5803
E-mail : hujang@gsnu.ac.kr

금까지 약 150종 이상의 화합물이 알려져 있으며 주성분은 polyphenol이며 polyphenol로서는 flavonoid, phenolic acid 등이 있다.¹⁷⁾

Clean Natural은 (주)성원에서 천연물질을 이용해서 제조한 살균소독제로서, 주성분으로는 목초액과 프로폴리스로서 야외시험에서 수산용 병원성 세균인 *Vibrio anguillarum* 등에 강력한 효과가 있음이 확인되었다.

세포유전독성을 확인하기 위한 실험으로는 cytokinesis-blocked method를 사용하기도 한다.¹⁸⁾ 그러나, 본 실험에서는 (주)성원에서 의뢰한 시험물질 Clean Natural의 유전독성을 평가하고자 수의과학검역원 예규 제 8호 “동물용의약품 등의 독성시험지침” 및 OECD guideline에 따라 마우스의 말초혈액을 이용한 Supravital micro-nucleus assay로 소핵시험을 실시하였다.^{19,20)}

II. 재료 및 방법

1. 시험물질 및 대조물질

Clean Natural은 (주)성원에서 입수하여 시험에 사용하였으며, 양성대조물질인 Mitomycin C(Sigma, M-0503)는 Sigma Chem. Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시험물질의 조제 및 투여

Clean Natural 원액을 증류수를 이용하여 균질하게 현탁조제하여 마우스 체중 kg당 20 ml의 용량이 되도록 1회 강제 경구투여하였다. 양성대조물질인 Mitomycin C는 체중 kg당 2 mg/10 ml이 되도록 saline에 용해하여 1회 복강투여하였다.

2) 시험동물

(주)양성(경기도 용인시)으로부터 공급받은 ICR계 4주령 수컷 마우스를 온도 23±2°C, 상대습도 50±10%, 환기회수 13-18회/hr, 형광등 조명(12/12시간 명암, 조도 200-300 lux)의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(400 W×250 L×180 H mm)에 1군씩(6마리) 사육하였다. 순화 사육기간동안 관찰하여 건강한 동물만 시험에 사용하였으며, 실험동물용 고품사료((주)삼양사료)와 상수도를 자유공급하였다. 순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 소정의 범위에 속하는 동물을 선별하여 무작위로 각군에 배분하였다. 개체의 식별은 색소에 의한 부위별 피모염색법과 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다.

3) 투여용량 및 시험군의 구성

급성독성시험 결과를 통하여 얻어진 LD₅₀를 고려하

여, 2,000 mg/kg를 최고용량으로 설정한 다음, 공비를 1/2로 하여 3단계의 농도로 시험군을 설정하였다. 용매 대조군으로는 saline을 사용하였으며, 양성대조군으로는 Mitomycin C를 2 mg/kg body weight로 사용하였다.

4) 혈액채취 및 표본제작

혈액표본은 OECD guideline에 따라 제작하였다.²⁰⁾ 약 제투여 24시간 후, 마우스의 말초혈액을 꼬리를 절단하여 채취한 다음, 미리 제작된 슬라이드(Acridine orange 용액(1 mg/ml) 처리)에 혈액(10-20 μl)을 떨어뜨린 후, cover glass를 덮는다. 이때, 너무 많은 혈액을 도말할 경우 적혈구들이 서로 겹쳐서 데이터의 해독이 용이하지 않을 수 있으므로 cover glass를 덮은 후에 휴지 등을 이용하여 살살 문질러서 너무 두껍게 혈액이 도말 되지 않도록 하였다. 표본은 각 동물 당 3매씩을 제작하였다.

5) 표본의 관찰 및 검사항목

시험동물을 투여한 동물에 대하여 외관관찰을 실시하여 사망동물 및 이상징후의 발생여부를 관찰하였다. 제작된 슬라이드는 4°C에서 2시간 동안 반응을 시킨 후, 3매 중 염색상태가 가장 양호한 슬라이드 1매를 선택하여, 1,000배의 현미경 하에서 검경하였다. 현미경은 450 nm 파장의 Fluorescein Isohiocyanate(FITC)에서 검경하였다. 마우스 개체 당 1,000개의 적혈구에서 다염성 적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성 적혈구(Normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 1,000개의 다염성 적혈구 중에서 소핵을 가진 다염성 적혈구의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별 가능한 범위까지 하였으며, 주변 유헤세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

6) 통계처리 및 결과의 관찰

Hayashi 등²¹⁾의 방법에 따라 3단계 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1. 2단계의 비교자료 활용에 의한 검정을 거쳐, 3단계에는 음성대조군과 시험물질 투여군과의 소핵적혈구의 출현빈도에 관한 유의성을 Cochran armitage 경향검정을 수행하였다(p<0.05).

III. 결과 및 고찰

시험물질 및 양성대조물질을 투여한 후 혈액을 채취하기까지 실험동물에서는 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 소핵다염성 적혈구수와 총적혈구 대비 다염성 적혈구수의 현미경 검경 결과를 Table 1에 나타내었다. 식염수를 투여한 용매대조군에서의 소핵다염성 적혈구의 관찰빈도는 1.0±1.0이었고, Mitomycin C를 투

Table 1. Results of micronucleus test in ICR male mice treated orally with Clean Natural

Compound	Route	Dose (mg/kg)	No. of mice	Sex	Time (hr)	MNPCE ^a (% _e , Mean ± S.D.)	PCE/(PCE+NCE) ^b (% _e , Mean ± S.D.)
Saline	oral		6	♂	24	1.0 ± 1.0	50.9 ± 3.7
Clean Natural	oral	500	6	♂	24	0.8 ± 0.6	46.0 ± 7.0*
	oral	1,000	6	♂	24	0.7 ± 0.9	44.7 ± 4.7*
	oral	2,000	6	♂	24	0.9 ± 0.8	49.4 ± 3.4*
Mitomycin C	i.p.	2	6	♂	24	65.8 ± 23.6*	47.3 ± 2.7*

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes. PCE : Polychromatic erythrocyte. NCE : Normochromatic erythrocyte.

^aThe number of MNPCE was calculated from 1000 PCEs per animal.

^bThe percentage of PCE in 1000 erythrocytes per animal.

*: Statistically significant from vehicle control (p<0.05)

여한 양성대조군에서는 65.8±23.6로서 용매대조군에 비해 유의성있는 증가를 보였다(p<0.05). 그러나, 시험물질 투여군(저용량군; 0.8±0.6, 중간 용량군; 0.7±0.9, 고용량군; 0.9±0.8)에서는 모두 용매대조군에 대해 통계학적으로 유의성 있는 변화를 관찰 할 수 없었다. 또한, 총적혈구 대비 다염성 적혈구의 관찰빈도(%)는 용매대조군 50.9±3.7, 저용량투여군 46.0±7.0, 중간 용량 투여군 44.7±4.7, 고용량투여군 49.4±3.4, 그리고 양성 대조군 47.3±2.7로서 용매투여군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 낮게 관찰되었다(p<0.05). 이러한 결과는, Clean Natural의 랫드와 개에 대한 경구투여 독성시험에서 독성이 매우 낮은 것으로 확인된 결과와도 일치 하였으며,²²⁾ 또한, 변이원성시험의 하나인 *Salmonella typhimurium*에 대한 복귀돌연변이시험에서 Clean Natural이 복귀돌연변이를 유발할 가능성이 없는 것으로 평가된 결과와도 일치하였다.²³⁾

IV. 결 론

시험물질 Clean Natural에 대하여 마우스를 이용한 소핵시험을 실시한 바, 시험용량에서 투여 후, 혈액을 채취할 때까지의 24시간 동안 사망동물은 없었으며 특이한 임상증상도 관찰되지 않았다.

시험물질을 2,000 mg/kg까지 투여한 결과 소핵다염성 적혈구의 관찰빈도는 용매대조군에 비해 시험물질 투여군 모두에서 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰 되지 않아 소핵유발성이 없는 것으로 판단된다. 또한, 세포독성의 지표로서 총적혈구(정염성 적혈구와 다염성 적혈구의 합)중 다염성 적혈구의 관찰빈도를 계수하였던 바, 시험물질투여군 모두에서 용매대조군에 비하여 유의성있게 감소하였으나, 40% 이상으로 세포독성을 나타내지 않는 것으로 판단된다.

이상의 결과로 볼 때 본 시험조건 하에서 Clean

Natural은 마우스의 말초혈액에서 소핵시험에 의한 유전독성은 없는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Tóth, L. and Potthast, K. : Chemical aspects of the smoking of meat and meat products. *Adv. Food Research*, **29**, 87-158, 1984.
2. Pszczola, D. E. : Tour highlights production and uses of smoke-based flavors. *Food Technol.*, **49**, 70-74, 1995.
3. Guillén, M. D. and Manzanos, M. J. : Study of the components of an aqueous smoke flavoring by means of Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography with mass spectrometry and flame ionization detectors. *Adv. Food Sci.*, **18**, 121-127, 1996.
4. Guillén, M. D. and Ibargoitia, M. L. : New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *J. Agric. Food Chem.*, **46**(4), 1276-1285, 1998.
5. Yatagai, M., Unrimin, G. and Sugiura, G. : By-products of wood carbonization. Tars from mangrove, sugi ogalite, wheat straw and chishima-sasa. *Mokuzai Gakkaishi*, **32**, 467-471, 1986.
6. Sugiura, G. : In *Mokuzai Kokyo Handbook*. Forestry and Forest Res. Inst.(ed). Maruzen, Tokyo. 930-932, 1972.
7. 이상용, 이종규, 이선근, 예상길, 정주해, 황병호 : 신갈나무 목초액이 식물병원균 및 무 실생묘의 생육에 미치는 영향. *한국임학회지*, **93**(5), 380-386, 2004.
8. 박정호, 전기일, 정창훈 : 축산농가에서 목초액을 이용한 암모니아 가스의 제거 특성에 관한 연구. *한국환경과학회지*, **12**(12), 1309-1313, 2003.
9. 이경민, 정귀택, 박돈희 : 목초액의 항균 및 DPPH 라디칼 소거 활성에 관한 연구. *한국생물공학회지*, **19**(5), 381-384, 2004.
10. 류경선, 이홍룡 : 산란계 사료에 목초액의 첨가, 급여가 생산성 및 계란품질에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지*, **43**(5), 655-662, 2001.

11. 허광선, 정의덕, 백우현 : 목초액을 이용한 쓰레기 매립지 침출수의 악취 제거에 관한 연구. 한국환경과학회지, **8(5)**, 607-610, 1999.
12. 김영식, 손병현, 조상원, 정종현 : 지과공장의 폐수처리장에서 발생하는 악취 저감. 한국환경위생학회지, **24(1)**, 62-69, 1998.
13. 김영희, 김삼곤, 김근수, 이윤환 : 시판 목초액의 성분 조성. 한국응용생명화학회지, **44(4)**, 262-268, 2001.
14. 김진석, 최정섭, 김태준, 김성문, 조광연, 김진철 : 목초액으로부터 제조활성물질의 분리 및 동정. 한국잡초학회지, **21(4)**, 357-365, 2001.
15. Yatagai, M., Unrinine, G. and Ohira, T. : By-products of wood carbonization IV. Components of wood winegars. *Mokuzai Gakkaishi*, **34**, 184-188, 1988.
16. 박형기 : 천연항생물질 프로폴리스의 특성과 효용에 대한 고찰. 한국양봉학회지, **9(3)**, 168-177, 1994.
17. 라정찬, 이종은, 송대섭, 권남훈, 박봉균, 박용호 : 천연물을 이용한 살균 및 살바이러스 효과에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지, **18(4)**, 183-188, 2003.
18. 이종빈, 나명석, 황영진, 위성욱, 최진희, 김선희, 유춘만, 김재민 : 생쥐 배양섬유 모세포주 L929에 미치는 중금속(Cd, Ni, Zn)류의 세포독성에 관한 연구. 한국환경위생학회지, **23(2)**, 98-105, 1997.
19. 국립수의과학검역원 : 동물용의약품등의 독성시험지침, 예규 제 8호, 335-350, 1996.
20. OECD : OECD guideline for the testing of chemicals: mammalian erythrocyte micronucleus test. 474: 1-10, 1997.
21. Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. : A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ. Mol. Mutagen.*, **13(4)**, 347-356, 1989.
22. 김준영, 천명선, 이후장 : 천연 살균소독제 Clean Natural의 랫드와 개에 대한 단회 경구투여 독성시험 연구. 한국실험동물학회지, **21(2)**, 164-169, 2005.
23. 천명선, 한상욱, 조윤희, 임영윤, 김의경, 이후장 : 천연소독제 Clean Natural의 *Salmonella typhimurium*에 대한 복귀돌연변이시험. 한국식품위생안전성학회지, **20(3)**, 175-178, 2005.