

붉은곰팡이병에 감염된 맥류의 실험동물에 대한 안전성 평가

이재봉* · 정미혜 · 성하정 · 이해근 · 오병렬

농업과학기술원 농약안전성과

요약 : 붉은곰팡이병에 감염된 곡물의 인축에 대한 안전성평가를 위하여 붉은곰팡이병에 30%감염된 밀, 쌀보리 및 겉보리를 마우스먹이에 섞어 먹이는 식이혼입시험을 수행하였다. 붉은곰팡이병에 30% 감염된 밀, 쌀보리 및 겉보리에 대하여 밀은 밀가루로서, 쌀보리와 겉보리는 도정수율을 각각 68% 및 58%로 도정한 것을 마우스사료 중 10, 30, 및 50% 함유되게 사료와 동일한 형태로 조제하여 5주령의 마우스에 2개월 동안 섭식시키면서 영향을 조사하였다. 곡물을 먹이 중 혼입비율별로 투여한 모든 군에서 사료섭취량, 음수섭취량 및 체중 등에 영향은 없었다. 또한 임상관찰, 육안적 부검소견, 장기중량 변화, 혈구분별측정 및 혈액생화적 검사 등에서도 모든 투여군에서 이상이 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 본시험에 사용된 가공곡류 중 곰팡이 독소함량으로는 마우스에 대한 영향이 없는 것으로 판단되었다.(2001년 11월 26일 접수, 2001년 12월 26일 수리)

Key words : *Fusarium*, mycotoxin, safety evaluation.

서 론

붉은곰팡이병의 병원균은 *Fusarium graminearum*으로서 이들이 생성하는 미생물 독소는 trichothecenes, zearalene(ZEA), fumonisin 등이 대표적이며, 유럽, 아시아, 뉴질랜드 및 아메리카 등 전세계적으로 발생되나 주로 온대지방에서 발생이 많으며, 인축에 만성적으로 노출되어 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다(D'Mello 등, 1999). Trichothecene의 대사산물인 T-2 toxin은 실험동물의 면역계에 다양한 영향을 보였으며, 임신된 마우스에 만성적으로 투여한 후 차세대의 간세포를 적출하여 배양하였을 때 생존율이 현저하게 저하되었고 약물에 대한 감수성도 더 예민하게 되었다(Holladay 등, 1997). 또한 T-2 toxin이 감염된 사료를 먹은 동물에서 뇌신경계의 이상과 식이섭성의 변화가 관찰되었으며, 2mg/kg을 투여한 랫드에서 아미노산 대사계에서 중성 및 기본 아미노산의 함량 비율이 상이하게 나타났다(Meloche와 Smith, 1995). ZEA는 포유동물에서 임신율 및 태아의 생존을 감소시키는 등 내분비장애물질로 알려져있으며, DNA에 손상을 유발하는 것으로 보고되었다(Pfohl-Leszkowicz 등, 1995). Vomitoxin으로도 잘 알려져있는 deoxynivalenol(DON), moniliformin(MON) 및 fumonisin B1(FB1)의 유전독성시험에서 DON은 100 µg/ml에서 강한 세포독성을 보였으며, 세가지 독소의 소핵시험 및 염색체이상시험에서 농도의존적인 양성을 보였다(Siegfrid 등, 1997). DON을 IL-6KO, WT 및 B6C3F₁ 등 3개 계통의 마우스에 90일동안 10 ppm으로 사료에 처리하여 투여한 결과 심한 체중감소가 있었으며, 고환의 무게와 정자수에 변화가 관찰되었으나 병리조직학적 유의성은 없었다(Sprando 등, 1999). 우리나라에서도 맥류 붉은곰팡이병이 1963년 남부지방에서 대량 발병하여 맥류 수확량이 40~80%의 감소로 사회적인 문제가 되었으며,

1980년대 중반에는 우리나라에서 생산된 맥류가 DON, nivalenol(NIV) 및 ZEA에 심하게 오염되었다는 보고가 있었다(이 등, 1995). *Fusarium*독소의 규제는 US/ FDA에서는 DON의 식품기준으로 밀가루 및 가공제품에 1.0 ppm, 사료기준으로는 가축에 따라 5~10 ppm으로 정해놓고 있으며(Brian, 1998), 그밖에 캐나다에서 미선별 강력분 밀은 2.0 ppm, 유아식품용 미선별 강력분 밀은 1.0 ppm 및 비주식품은 1.2 ppm으로 설정해 놓고있다. 또한 ZEA에 관해서는 브라질(옥수수 0.2 ppm), 루마니아(전식품 30 ppb) 및 소련(곡류 및 유지 1.0 ppm)등에서 규제하고 있다(이 등, 1995). 본 시험의 목적은 1998년 봄의 기후가 고온 다습하여 전국적으로 맥류 붉은곰팡이병이 발병하여, 이들 수확물에 대한 안전성을 확인함으로써 곡물로서의 이용 가치를 평가하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질 및 조제

농촌진흥청 작물시험장 전작과로부터 이병율 30%의 밀, 쌀보리 및 겉보리를 분양받아 밀은 재래가공형태의 밀가루로, 쌀보리 및 겉보리는 도정수율 68%, 59%로 도정된 것을 분말로 만들어서 실험동물용 가루사료에 10%, 30%, 및 50%로 혼합하여 시험물질을 조제하였다.

실험동물 및 사육환경

생후 4주령의 specific pathogen free(SPF) ICR계 마우스를 대한실험동물로부터 구입하여 일주일간 순화시켜 동물의 건강유무를 확인한 후 5주령의 선발된 동물에 시험물질 투여를 시작하였다. 사육환경은 온도 23±2°C, 습도 55±5%, 배기 10~15/hr, 조명 12시간 및 조도 200~300 Lux에서 폴리카보네이트 마우스용 사육상자(명진기계상사, 한국)에 넣어 사육하였으며, 시험기간동안 사용한 사료(삼양사, 한국) 및 깔짚(한림실험동물, 한국)은 방사선으로 멸

*연락처

균된 것을 구입하여 사용하였다. 음용수는 멸균수를 자유로이 공급하였다.

시험군의 구성 및 용량설정

순화기간동안 일반관찰 등을 수행하여 건강한 동물을 선발하고 무작위추출법에 따라 시험군을 분리하였다. 시험군은 실험동물용 사료만 급이한 음성대조군과 각 3가지 이병곡물로 조제된 시험물질을 10%, 30% 및 50%씩 넣어 만든 사료를 급여한 시험물질투여군 및 이들에 대한 건전곡물대조군을 성별로 설정한 18개군 등 총 19개군을 군당 10마리씩 배치하였다.

시험방법

국립보건안전연구원고시 제 94-3호 '의약품등의 독성시험기준(1994. 4. 14)에 따라 수행하였으며, 투여기간은 8주로 하였고, 사료 및 음수섭취량, 체중변화 및 장기무게 등 통계학적 분석은 DUNCAN'S test로 대조군과 비교하여 유의성을 검정하였다.

임상증상관찰

모든 시험동물에 대하여 매일 1회 일정시간에 임상증상, 증독유무 및 사망발생 등을 관찰하였다.

사료 및 음수 섭취량 측정

주1회 사료 및 음수 섭취량을 5마리 평균섭취량으로 측정하였다.

체중측정

시험에 사용된 시험동물의 체중측정은 주1회 측정하였으며, 투여전 및 부검당일에도 체중을 측정하였다.

부검 및 장기무게 측정

군당 암수 각 10마리씩 8주간 투여한 후 부검을 실시하여 모든 장기에 대한 육안적 이상유무를 확인하여 간장, 신장, 폐장 등 주요장기에 대하여 중량을 측정하였다.

혈액학적 검사

부검전 12시간 절식시킨 후 부검일에 에테르로 마취시켜 심장에서부터 혈액을 채취하였다. 혈액은 EDTA로 항응고 처리하여 자동혈구측정기(Semo 9118+, BIOCHEM IMMUNO-

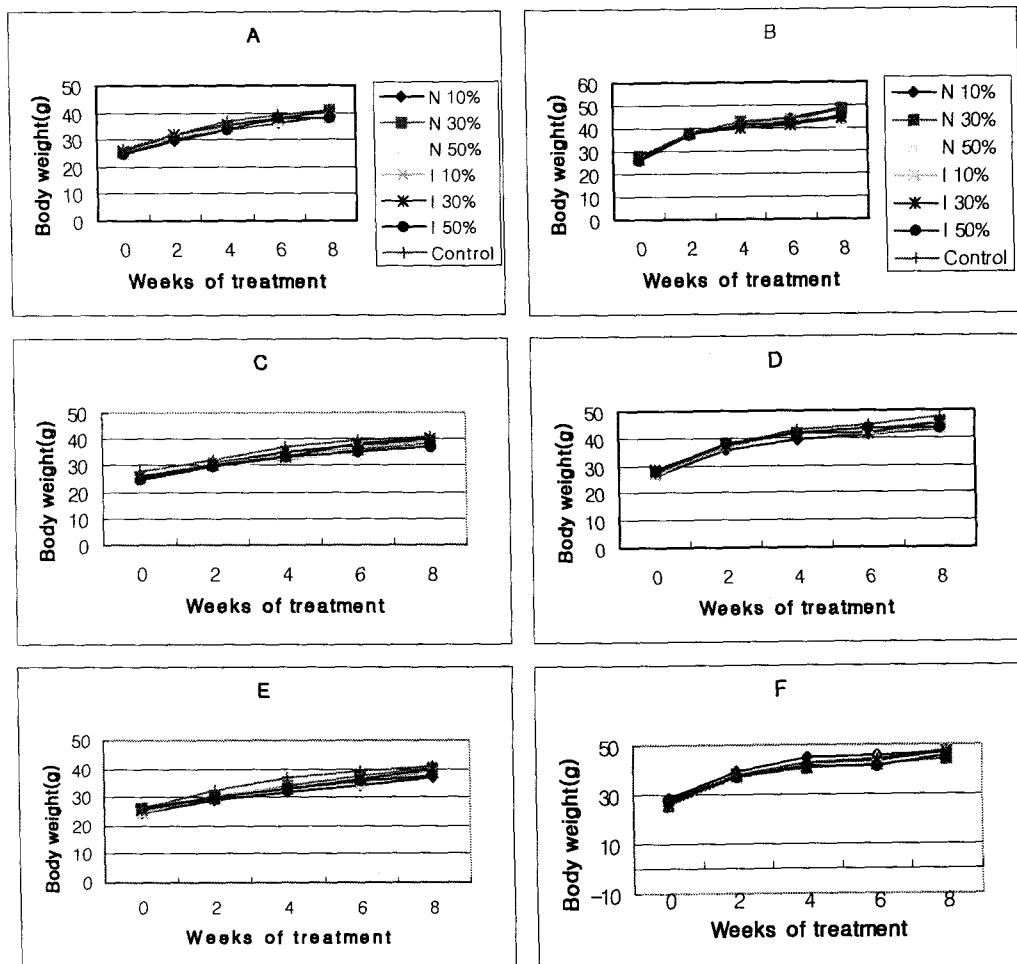


Fig 1. Body weight changes of mice fed with different source of cereals.
 A:Female, wheat, B:Male, wheat, C:Female, Nepal barley
 D:Male, Nepal barley, E:Female,barley, F:Male, barley

Table 1. Relative organ weights of mice fed with the 50% mixture of infected wheat flour for 2 months

Organ	Relative organ weight of total body (%)			
	Female		Male	
	healthy	Infected ^{a)}	healthy	Infected
Liver	5.10±0.66 ^{b)}	5.79±0.76*	5.74±0.41	5.26±0.37*
Spleen	0.43±0.11	0.54±0.12*	0.43±0.14	0.33±0.06*
Kidney(L)	0.65±0.08	0.69±0.09	0.98±0.14	0.95±0.07
Kidney(R)	0.63±0.13	0.68±0.10	1.05±0.18	0.99±0.07
Uterus/testes	0.67±0.38	0.46±0.15**	0.64±0.13	0.64±0.07

*p < 0.05, **p < 0.01

^{a)}Tested wheat was infected with *Fusarium* 30% and processed conventional method.^{b)}Values were expressed as mean±S.D. from 10 animals.

Table 2. Relative organ weight in mice fed with the 50% mixture of infected Nepal barley for 2 months

Organ	Relative organ weight of total body (%)			
	Female		Male	
	Healthy	Infected ^{a)}	Healthy	Infected
Liver	4.87±0.28 ^{b)}	4.69±0.71	5.79±0.68	5.19±0.16*
Spleen	0.51±0.10	0.55±0.16	0.38±0.12	0.35±0.04
Kidney(L)	0.66±0.07	0.61±0.14	1.02±0.18	1.02±0.22
Kidney(R)	0.68±0.04	0.62±0.13	1.06±0.13	1.04±0.23
Uterus/testes	0.58±0.17	0.56±0.25	0.72±0.07	0.68±0.10

*p < 0.05

^{a)}Tested Nepal barley was infected with *Fusarium* 30% and processed at the milling rate of 68%.^{b)}Values were expressed as mean±S.D. from 10 animals.

Table 3. Relative organ weight in mice fed with the 50% mixture of infected barley for 2 months

Organ	Relative organ weight of total body (%)			
	Female		Male	
	Healthy	Infected ^{a)}	Healthy	Infected
Liver	4.85±0.68 ^{b)}	4.95±0.36	5.15±0.44	5.24±0.24
Spleen	0.52±0.09	0.53±0.14	0.35±0.04	0.32±0.06
Kidney(L)	0.65±0.06	0.69±0.09	0.87±0.11	0.88±0.12
Kidney(R)	0.63±0.08	0.69±0.05	0.78±0.13	0.97±0.18*
Uterus/testes	0.62±0.28	0.61±0.13	0.64±0.13	0.71±0.09

*p < 0.05

^{a)}Tested barley was infected with *Fusarium* 30% and processed at the milling rate of 59%^{b)}Values were expressed as mean±S.D. from 10 animals

SYSTEMS, USA)를 이용하여 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 혈색소(HGB) 및 혈소판(PLT)등을 측정하였다.

혈액생화학적 검사

채취된 혈액을 상온에서 3000 rpm 20분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 자동 혈청생화학측정기(Gilford 103 system, CIBA-CORNING, USA)에서 혈청내 alanine amino-

transferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 및 blood urea nitrogen(BUN)등을 조사하였다.

조직병리학적 검사

부검한 동물의 조직을 육안적으로 관찰하고 간장, 신장 및 폐장 등의 조직을 10% 중성 포르말린으로 고정하고 일반적인 조직처리과정을 거쳐 염색한 후 검경하였다.

결과 및 고찰

임상증상, 사료 및 음수 섭취량

시험물질 투여에 의한 임상증상은 관찰되지 않았으며 사료 및 음수 섭취량의 경향은 시험물질의 배합율이 증가할수록 섭취량이 일부 군에서 다소 감소하였으나 대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 없었다. 이와 같은 결과는 사료섭취량의 경우 시험물질 중에 미생물 독소가 포함되어 있으므로 사료 섭취가 감소하였는지 시험물질 자체가 시험동물의 기호에 맞지 않아서 감소하였는지는 분명하지 않았다. 음수섭취량은 시험물질 중에 함유된 수분이 실험동물용 사료보다 많은 것이 원인이라 추정되었다. 그러나 Prelusky(1997)는 DON을 돼지 먹이 중 4 ppm 투여하였을 때 사료섭취량이 16%, 9 ppm 처리되었을 경우는 46%가 감소하였다고 보고하였고, Rotter등(1996)은 낮은 농도로 투여하였을 때는 사료섭취가 감소하였고 고농도일 경우에는 구토를 일으켰다고 보고하였다. 특히 *Fusarium* 미생물 독소의 대표적인 임상증상이 사료섭취 감소에 대한 연구(D'Mello 등, 1999)로서 이들 미생물독소로는 DON, NIV 및 T-2 toxin등이 알려져 있다. 이와 같은 연구결과와 비교해 볼 때 본시험에 이용된 시험물질은 훨씬 낮은 농도의 독소를 함유한 것으로 판단된다.

체중변화

투여기간동안 체중변화는 이병곡물의 함량이 증가할수록 사료대조군이나 건전곡물대조군에 비하여 다소 감소하는 경향이 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다(그림 1).

Ohtsubo 등(1989)은 SPF C57BL/6CrSlc 마우스에 NIV를 6, 12 및 30 ppm을 2년 동안 투여한 결과 전투여군에서 심각한 체중감소가 관찰되었으며, Ryu 등(1988)도 ddy 및 SPF C57BL/6CrSlc 마우스를 이용한 급성 및 만성독성시험 결과 사료이용을 저하, 체중감소 등의 이상을 보고하였다. 그러나 본 시험에서는 위와 같은 결과가 보이지 않아서 인축에 영향을 미칠 수 있는 미생물독소 함량이 낮기 때문이라 판단된다(권 등, 1999).

육안적 부검소견 및 장기중량 변화

육안적 부검소견 결과 붉은곰팡이병 독소에 의한 특이증상은 관찰되지 않았으며, 밀가루, 겉보리 및 쌀보리를 50%까지 처리한 군에서 장기중량을 조사한 결과 밀가루투여군 암컷에서 간장 및 비장의 체중에 대한 상대중량이 대조군에 비하여 114, 126% 증가하였으며, 자궁은 대조군보다 69% 감소하였다. 수컷에서는 간장 및 비장의 체중에 대한 상대중량이 92, 77%로 감소하였으나, 용량 의존적인 경향은 보이지 않았으며, 이외의 장기에 대한 영향은 관찰되지

Table 4 . Hematological values in mice fed with the 50% mixture of infected cereals for 2 months

Sex	Item	Wheat		N. Barley		Barley	
		Healthy	Infected	Healthy	Infected	Healthy	Infected
F	WBC ^{a)} 10 ³ /μl	3.9±0.7	3.0±0.5	3.4±1.4	4.1±0.3	4.0±1.3	3.4±0.5
	RBC ^{b)} 10 ⁶ /μl	7.8±0.5	8.6±0.5	7.7±1.9	8.9±1.0	9.0±1.2	8.6±0.4
	HGB ^{c)} g/dl	13.4±0.4	14.4±1.0	12.5±2.7	14.2±0.8	14.8±1.9	14.3±1.0
	PLT ^{d)} 10 ³ /μl	1152±230	971±111	1202±369	1170±459	1452±196	1304±33
M	WBC10 ³ /μl	2.7±0.8	3.7±0.4	4.8±0.7	3.9±1.7	4.7±0.6	2.8±0.6
	RBC10 ⁶ /μl	6.6±0.1	8.0±1.0	9.4±0.2	8.9±0.7	8.7±0.6	8.7±1.2
	HGB g/dl	11.6±1.1	12.8±1.2	14.8±0.3	13.9±1.1	13.4±1.0	13.9±1.5
	PLT10 ³ /μl	1227±48	1075±95	975±21	1191±73	1562±229	1690±304

*p < 0.05, **p < 0.01

^{a)}WBC:White blood cell, ^{b)}RBC:Red blood cell, ^{c)}HGB:Hemoglobin, ^{d)}PLT:Platelet.

Table 5. Blood biochemistry values in mice fed with the 50% mixture of infected cereals for 2 months

Sex	Item	Wheat		N. Barley		Barley	
		Healthy	Infected	Healthy	Infected	Healthy	Infected
F	AST ^{a)} (u/ l)	48.0±15.6	55.1±33.6	65.1±17.4	47.6±11.8	43.6±15.5	42.0±3.0
	ALT ^{b)} (u/ l)	19.2±4.3	43.7±17.9	16.2±3.7	29.4±14.6	25.1±5.6	14.0±6.0
	BUN ^{c)} (mg/dl)	17.4±4.9	18.7±3.6	17.7±2.4	14.8±3.3	18.9±3.3	16.2±5.2
M	AST(u/ l)	58.5±14.7	60.4±15.4	44.5±20.9	47.4±17.4	44.3±9.1	41.0±10.2
	ALT(u/ l)	29.0±11.1	34.8±14.4	21.7±16.8	23.8±11.7	23.0±3.86	30.1±14.9
	BUN(mg/dl)	22.3±4.4	21.4±4.8	19.2±6.4	16.2±1.1	19.8±3.9	23.2±4.4

*p < 0.05, **p < 0.01

^{a)}ALT:Alanine aminotransferase, ^{b)}AST:Asparate aminotransferase, ^{c)}BUN:Blood urea nitrogen.

않았다(표 1, 2, 3). Ohtsubo 등(1989)이 SPF C57BL/6CrSlc 마우스에 NIV를 6, 12 및 30 ppm을 2년 동안 투여한 결과 12ppm 이상의 농도에서 슛컷의 간장 및 신장 중량이 현저하게 감소하였다는 것과 유사한 경향이 있었고, Ryu 등(1988)이 ddy 및 SPF C57BL/6CrSlc 마우스를 이용한 급성 및 만성독성시험 결과 절대장기중량은 감소했으나 상대장기중량은 증가하였다는 것과는 차이가 있었으나, 이것은 권 등(1999)이 국내산 밀, 보리 및 쌀보리(감염율 30%)에 대한 주요 미생물독소를 분석한 결과 밀 0.2, 쌀보리 0.4, 걸보리 0.9ppm으로 대부분의 경우 낮은 수준으로 시험동물에 영향을 주지 않은 것으로 판단되었다.

혈액 및 혈액생화학적 검사

혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사 결과 표 4와 표 5에서 보는 바와 같이 특별한 이상은 관찰되지 않았으나 밀가루투여군에서 암컷의 ALT가 약간 증가하였다. 정(1996)이 조사한 가축과 실험동물의 생리자료 중 마우스의 혈액 분석치와 비교한 결과 모두 정상범위 내에 있었으며, Harrison 등(1978)에 의한 혈장성분 조사와 비교에서도 정상범위 내의 수치로 이상이 발견되지 않았다.

조직병리학적 검사

조직병리학적검사 결과 사료대조군, 건전대조군 및 이병곡물투여군에서 조직학적 이상은 관찰되지 않았다. 이 결과는 Ohtsubo 등(1989)와 Ryu 등(1988)이 마우스를 이용한 nivalenol의 급성 및 만성독성 시험결과 조직병리학적인 변화는 관찰되지 않았다는 보고와 유사하였으며, 또한 *fusarium*이 생성하는 미생물독소에 상대적으로 낮은 농도로 노출되었을 것으로 추정된다(권 등, 1999).

인용문헌

- Brian Richert (1998) Feeding DON(Vomitoxin) infested Grain to Swine, Purdue University Cooperative Extension Service, <http://www.agcom.purdue.edu/AgCom/Pubs/CL/CL-3.html>.
- D'Mello, J.P.F., C.M Placinta and A.M.C Macdonald (1999) Fusarium mycotoxins : a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80:183~205.
- Harrion, S. D. J., J. A. Burdeshaw, R. G. Crosby, A. M. Cusic and E. R. Denine (1978) Hematology and clinical chemistry reference value. *Cancer Res.*, 38: 2636
- Holladay, S. D., B. J. Smith and M. I. Luster (1995) B lymphocyte precursor cells represent sensitive targets of T2 mycotoxin exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 131:309~315.
- Meloche, J. L. and T.K. Smith (1995) Altered tissue amino acid metabolism in acute T2 toxicosis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 210:260~265.
- Ohtsubo, K., J. C. Ryu, N. Lzumiya, K. Nakamura, T. Tanaka, H. Yamamura, T. Kobayashi and Y. Ueno (1989) Chronic toxicity of nivalenol in female mice : a 2-year feeding study with fusarium nivale Fn 2B-moulded rice. *Food and Chemical Toxicology* 27:591~598.
- Pfohl-Leszkowicz A., L. Chekir-Ghedira and H. Bacha(1995) Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin : DNA adduct formation in female mouse tissue. *Carcinogenesis*, 16:2315~2320.
- Prelusky, D. B. (1997) Effects of intraperitoneal infusion of deoxynivalenol on feed consumption and weight gain in the pig. *Nat. Toxins* 5:121~125.
- Rotter, B. A., D. B. Prelusky, J. J. Pestka (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicology Environ Health* 48:1~34
- Ryu, J. C., K. Ohtsubo, N. Lzumiya, K. Nakamura, T. Tanaka, H. Yamamura and Y. Ueno (1988) The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. *Fundam Appl Toxicol* 11:38~48
- Siegfried, K., B. Nikolaus, K. Fekadu, M. S. Volker, G. Wentzel, Z. Edith and M.E. Peter (1997) Genotoxic effects of three Fusarium mycotoxins, fumonisin B1, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mutation Research* 391:39~48.
- Sprando, R. L., J. Pestka, T. E. X. Collins, J. Rorie, M. O'donnell, D. Hinton and S. Chirtel (1999) The effects of vomitoxin(deoxynivalenol) on testicular morphology, testicular spermatid counts and epididymal sperm counts in IL-6KO mice. *Food and Chemical Toxicology* 37:1073~1079.
- 권오경, 홍수명, 최달순, 오병렬 (1999) 한국맥류붉은곰팡이 병 독소의 안전성평가를 위한 정량분석. *춘계한국환경농학회발표자료*.
- 정순동 (1996) 가축과 실험동물의 생리자료, pp.745~779, 도서출판 광일문화사.
- 이인원 (1995) 농산물의 Fusarium곰팡이독소 오염, 식물병균학연구, pp.95~121, 도서출판 한림원.

Safety Evaluation in Mice of Cereals Infected with *Fusarium graminearum*

Je-Bong Lee · Mi-Hye Jeong · Ha-Jung Sung · Hae-Keun Lee · Byung-Youl Oh(Pesticide Safety Division, NIAST, Suwon, Korea)

Abstract : In order to investigate the harmful effects of *Fusarium*, producing mycotoxins, contaminated cereals, two months feeding study was carried out in SPF-ICR mice. Mice diets were incorporated with 30% *Fusarium* infected wheat, nepal barley or barley. The wheat was processed to flour. The nepal barley and barley were polished by 68% and 58%, respectively. The cereal incorporating amount in mice diet were 0, 10, 30 and 50% for each processed cereal. Five week-old mice were fed with the prepared diet for 2 months. The effects of *Fusarium* contaminated cereals on the mice were observed after the feeding. The rates of body weight gain, diet and water consumption were not changed. There were no significant changes on hematology, blood biochemistry, gross and histopathological evaluation, organ weights in all treatment groups. These results suggest that the diets have no deleterious effects to ICR mice.

*Corresponding author (Fax : +82-31-290-0521, E-mail : jblee@rda.go.kr)