

마우스를 이용한 공액리놀레산 함유 디글리세라이드 조성물에 대한 소핵시험

홍순기¹ · 정신교² · 현선희^{1*}

¹KT&G 중앙연구원

²경북대학교 농업생명과학대학

The Micronucleus Test of the Diglyceride Preparation with Conjugated Linoleic Acid by Using Mice

Soon Gi Hong¹, Shin Gyo Chung², and Sun Hee Hyun^{1*}

¹KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea

²College of Agriculture & Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

To assess the clastogenic effects of the diglyceride preparation containing conjugated linoleic acid (DG+CLA) *in vivo* micronucleus test was performed using ICR mice. Each of the groups consisted of three doses of DG+CLA (500, 1,000 and 2,000 mg/kg, p.o.), Mitomycin C (positive control, 2 mg/kg, i.p.) and negative control (olive oil, 10 mL/kg, p.o.). A slide preparation was made at 24 hours after 1st treatment with DG+CLA. As a result of counting the micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) of 2,000 polychromatic erythrocyte (PCE), the number of aberrant cells was not increased in any of the three doses of DG+CLA orally administered. There was no clinical sign connected with administration of DG+CLA. These results indicate that DG+CLA is not capable of inducing micronuclei *in vivo* mice cells and thus has no genotoxicity in micronucleus.

Key words: diglyceride preparation containing conjugated linoleic acid, micronucleus, micronucleated polychromatic erythrocyte, polychromatic erythrocyte

서 론

CLA는 필수지방산인 리놀레산(linoleic acid, LA)의 공액화 이성체로, 반추동물의 젖이나 근육에서 미량으로 발견되는 천연 지방산 성분이다. CLA란 cis 혹은 trans 배열(configuration)에 공액화 이중결합(conjugated double bonds)을 가지고 있는 리놀레산의 위치적 및 형태적 이성체(positional and geometric isomer)를 일컫는 일반적인 명칭을 의미하며, 여기서는 CLA 이성체 중 생리적인 기능성을 나타내는 cis-9, trans-11 옥타데카디에노인산(octadecadienoic acid) 및 trans-10, cis-12 옥타데카디에노인산을 CLA라 일컫는다(1-3). 또한 CLA는 동맥경화증의 발생저하(4), 면역기능 향상(5), 항암작용(6,7), 성장촉진(8), 항산화 및 고혈당 등의 증상에 대해 우수한 효과를 나타내며, 체지방감소(9)를 통해 비만을 억제한다고도 알려져 있다. 이러한 특성으로 인해 CLA는 기능성 식품 및 의약품의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

따라서 본 연구는 제조방법이 간단하고 생산성이 우수할 뿐만 아니라, 동시에 항암, 인체 체지방 감소, 면역 증강, 또

는 당뇨병 예방 및 치료의 효과를 가지는 공액리놀레산 또는 이의 이성체를 결합시켜 기능성을 부여할 수 있는 공액리놀레산을 포함하는 고순도 디글리세라이드 식용유지 조성물(DG+CLA)에 대한 안전성시험을 실시하였다. 유전 독성 여부를 검사하는 연구 방법 중 소핵(micronucleus) 시험은 시험물질을 마우스 복강 내에 주사하거나 강제 경구투여하고 24시간 후 골수를 채취하여 소핵 유발 유무를 관찰하는 *in vivo* 독성실험법의 하나이다. 소핵 생성 원리는 마우스 골수 내에서 erythroblast가 최종 분열한 후 탈핵 과정을 거쳐 미성숙 적혈구인 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)가 되고 이 PCE는 약 10시간 후 성숙적혈구가 되어 혈관으로 가게 되는데 핵이 있는 erythrocyte 상태에서 돌연변이 물질의 영향을 받으면 염색체가 깨어져 더 이상 분화하지 못하고 파편으로 남아 PCE내에 있게 된다(10). 이를 소핵이라고 하며 소핵이 많이 관찰될수록 돌연변이 물질의 영향을 많이 받은 것이라 할 수 있다.

본 연구는 DG+CLA에 대한 안전성시험의 일환으로서 마우스를 이용한 소핵시험을 “의약품등의 독성시험기준”(식품의약품안전청 고시 제 5005-60호, 2005)에 따라 실시하였다.

*Corresponding author. E-mail: shhyun@ktng.com
Phone: 82-42-866-5676, Fax: 82-42-866-5426

재료 및 방법

재료

공액리놀렌산이 함유된 디글리세라이드 식용유지 조성물(DG+CLA)은 86.6% 디글리세라이드와 60% 공액리놀렌산을 화학적으로 합성한 원료를 (주)일신웰스로부터 공급받아 본 실험에 사용하였다. 양성대조물질인 Mitomycin C(MMC, Lot No. 075K0478)와 시험물질(DG+CLA)의 부형제로 사용한 olive oil(Lot No. 115K6046)은 Sigma Chem. Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

동물

6주령 ICR 마우스를 Orientbio Inc.에서 구입하여, 온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 3\%$ 의 항온, 항습 장치가 되어 있는 실험실 환경에서 고형사료로 1주일 동안 순화 및 검역기간을 거쳤다. 그 후 체중을 측정하여 체중 증가량 및 일반상태에 이상이 없는 건강한 동물만을 사용하여 시험을 수행하였다. 독성예비시험 15마리, 소핵유발빈도 시험 9마리, 소핵시험 25마리를 선발한 후, 각 군간 균등성 여부를 확인하여 군 분리하였다.

독성예비시험

본시험에 앞서 최고용량을 2,000 mg/kg을 기준으로 1,000, 500, 250, 125 mg/kg 용량으로 각 용량당 3마리의 마우스를 이용하여 독성예비시험을 실시하였다. 투여직후(0), 24, 45 및 72시간에 각 용량별 사망수 및 일반상태의 변화를 관찰하여 소핵시험의 최고용량을 설정하였다.

소핵유발빈도 시험

독성예비시험에서 결정한 최고용량 2,000 mg/kg을 투여하여, 24, 48 및 72시간째에 동물로부터 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도가 증가하는 시간대를 소핵시험에서의 골수세포 채취시간으로 결정하였다. 투여액량은 10 mL/kg으로 하여, 군 분리 시의 체중으로부터 투여액량을 산출하였다. 전체의 시간대에 있어 소핵유발빈도의 증가가 관찰되지 않을 경우는 통상적으로 사용하는 24시간을 골수세포채취 시간으로 한다.

소핵시험

독성예비시험 결과, 일반상태의 변화 및 사망동물이 관찰되지 않은 최고용량인 2,000 mg/kg을 소핵시험의 최고용량으로 정하였다. 이하 공비 2로서 최고용량을 포함한 3용량의 시험물질군(2,000, 1,000, 500 mg/kg)과 음성대조군은 시험물질의 부형제로 사용한 olive oil을, 양성대조군은 Mitomycin C(2 mg/kg)로 설정하였다. DG+CLA군은 존대를 이용하여 1회 경구투여 하였으며, 음성대조군은 시험물질군과 동등한 방법으로 olive oil을 경구투여 하였다. 양성대조군은 1회 복강 내 투여하였다. 투여액량은 10 mL/kg으로 하여, 군 분리 시의 체중으로부터 투여액량을 산출하였다.

일반상태 관찰 및 체중측정

시험물질 투여 후 일반상태의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 체중측정은 투여개시 전 1회 및 골수채취직전에 1회 측정하였다.

골수세포의 채취 및 검체 제작

골수세포의 채취는 시험물질 투여 후, 본시험에 앞서 수행된 소핵유발 빈도시험에서 결정된 골수세포 채취시간에 경추탈골법으로 마우스를 도살하고 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 μL 의 우태아 혈청을 관류시켜 채취하였다. 채취한 골수를 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글래스에 낙하하고 도말하여 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 충분히 건조시킨 골수도말표본을 메탄올로 고정한 후, 5% Giemsa 액으로 30분간 염색하였다. 0.01 M sorensen 인산완충액(pH 6.8)을 이용하여 수세하여 0.004% citric acid 수용액에 세정하고, 수세하여 건조시킨 후, 제작한 검체표본에 코드화하는 맹검법으로 검체에 번호를 부여하였다.

검체표본의 관찰

코드화된 검체를 1,000배의 배율로 검경하였다. 골수에 대한 영향을 평가하기 위해 동물개체별로 다염성적혈구(PCE, Polychromatic erythrocyte)와 정염성적혈구(NCE, Normochromatic erythrocyte)의 합이 500개가 되도록 계수하여 총적혈구 중 다염성적혈구의 비율 $[PCE/(PCE+NCE)]$ 을 산출하였다. 이어서 다염성적혈구가 2,000개가 되도록 계수하여 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구(MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 비율 $(MNPCE/2000PCE)$ 을 구하여 세포독성의 지표로 삼았다.

결과의 판정

소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군 또는 historical control data와 비교하여 시험물질군에서 통계적으로 유의하게 상승하고, 용량의존성이 인정되는 경우, 양성으로 판정하였다.

통계처리

소핵다염성적혈구의 출현빈도는 음성대조군과 다른 군에 있어 Kastenbaum & Bowman의 추정학적 통계방법(11)을 이용하여 검증하였다. 다염성적혈구의 출현빈도에 대해서는 t-test 법을 이용하여 5% 유의수준에서 통계적 유의성을 검증하였고, 체중의 변화는 ANOVA test를 실시하여 5% 유의수준에서 통계적인 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

독성예비시험

소핵시험의 용량을 설정하고자 독성예비시험을 실시하였

다. DG+CLA의 최고 농도를 2,000 mg/kg으로 하여 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 5용량의 시험물질을 경구투여 하였다. 투여 직후(0), 24, 48 및 72시간에 사망수 및 일반상태의 변화를 관찰한 결과, 사망동물은 없었으며 독성징후도 관찰되지 않았다(Table 1). 이는 시험동물에서 DG+CLA 2,000, 1,000, 500, 250, 125 mg/kg의 투여는 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 독성예비시험 결과로 소핵시험의 최고 투여 용량을 2,000 mg/kg으로 정하였다.

소핵유발빈도시험

독성예비시험에서 결정한 최고용량인 DG+CLA 2,000 mg/kg을 경구투여 하였다. 경구투여 후 24, 48 및 72시간에 시험동물로부터 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한 결과, 모든 시간대에서 소핵의 증가가 관찰되지 않았다(Table 2). 따라서 72시간 동안 소핵 증가가 나타나지 않아서 통상적으로 사용하는 24시간을 골수세포채취시간으로 정하였다.

일반 증상 및 체중 변화

본 시험에서는 소핵시험에 앞서 25마리의 ICR 마우스 수

컷에게 시험물질인 DG+CLA 500, 1,000 및 2,000 mg/kg과 양성대조물질을 경구투여한 후, 투여로 인한 사망동물 및 일반증상을 관찰한 결과, 모든 시험군에서 투여로 인한 사망동물은 없었으며, 특이한 임상증상도 관찰되지 않았다. 체중 변화를 관찰한 결과, 시험 전 기간을 통하여 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 3).

소핵유발 빈도 및 세포독성

독성예비시험 및 소핵유발빈도시험의 결과로부터 소핵시험은 2,000 mg/kg을 최고용량으로 하고 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 3용량의 DG+CLA군과 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 시험물질을 1일 1회 1일간 경구투여 하고, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵유발과 세포독성을 평가하였다.

본 시험에서 설정한 용량범위 내에서 개체 당 2,000개의 PCE를 대상으로 소핵을 계수한 결과, 개체 당 2,000개의 PCE에서 관찰된 소핵을 가진 PCE의 빈도는 음성대조군,

Table 1. Preliminary toxicity test of diglyceride preparation containing conjugated linoleic acid (DG+CLA) in male ICR mice

Treatment groups	Dose (mg/kg)	Route	Mortality	Clinical signs
DG+CLA	125	P.O. ¹⁾	0/3	None
DG+CLA	250	P.O.	0/3	None
DG+CLA	500	P.O.	0/3	None
DG+CLA	1000	P.O.	0/3	None
DG+CLA	2000	P.O.	0/3	None

¹⁾P.O.: per orally administration.

Table 2. Preliminary micronucleus test of diglyceride preparation containing conjugated linoleic acid (DG+CLA) in male ICR mice

Treatment groups	Dose (mg/kg)	Sampling time (hr)	MNPCE ¹⁾ /PCE ²⁾
DG+CLA	2000	24	1/2000
			2/2000
			0/2000
			3/6000
			1.00±1.00 ³⁾
DG+CLA	2000	48	0/2000
			1/2000
			2/2000
			3/6000
			1.00±1.00
DG+CLA	2000	72	0/2000
			1/2000
			0/2000
			1/6000
			0.33±0.58

¹⁾MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte.

²⁾PCE: Polychromatic erythrocyte.

³⁾Mean±standard deviation.

Table 3. Body weight of male ICR mice

Treatment groups	Dose (mg/kg)	Animal No.	Body weight (g) at the time of	
			1st Admin.	Sacrifice
Vehicle	0	1	38.45	37.58
		2	34.89	32.55
		3	34.88	34.31
		4	33.45	32.05
		5	33.42	32.58
		Mean±SD	35.02±2.05	33.81±2.27
DG+CLA ¹⁾	500	6	36.41	36.10
		7	34.95	34.44
		8	34.86	34.00
		9	34.31	34.17
		10	33.26	32.86
		Mean±SD	34.76±1.14	34.31±1.17
DG+CLA	1000	11	36.05	35.87
		12	35.41	34.49
		13	34.80	33.64
		14	34.31	33.71
		15	33.17	32.09
		Mean±SD	34.75±1.10	33.96±1.38
DG+CLA	2000	16	35.99	34.82
		17	35.54	34.91
		18	34.56	34.48
		19	34.34	34.40
		20	33.11	32.37
		Mean±SD	34.71±1.12	34.20±1.04
MMC ²⁾	2	21	35.95	35.26
		22	35.67	35.07
		23	34.44	33.75
		24	34.43	33.34
		25	32.92	32.74
		Mean±SD	34.68±1.21	34.03±1.10

¹⁾DG+CLA: Diglyceride preparation containing conjugated linoleic acid.

²⁾MMC: Mitomycin C.

Table 4. Micronucleus test of diglyceride preparation containing conjugated linoleic acid (DG+CLA) in male ICR mice

Group	Dose (mg/kg)	Animal No.	Counted PCE ²⁾ : NCE ³⁾	MNPCE ⁴⁾ /PCE	PCE/(PCE+NCE)
Vehicle	0	1	225:275	1/2000	0.450
		2	238:262	0/2000	0.476
		3	210:290	0/2000	0.420
		4	240:260	0/2000	0.480
		5	230:270	2/2000	0.460
		Total	-	3/10000	-
		Mean ± SD	-	0.60 ± 0.89	0.46 ± 0.02
DG + CLA	500	6	258:242	1/2000	0.516
		7	235:265	1/2000	0.470
		8	220:280	2/2000	0.440
		9	215:285	0/2000	0.430
		10	222:278	1/2000	0.444
		Total	-	5/10000	-
		Mean ± SD	-	1.00 ± 0.71	0.46 ± 0.04
DG + CLA	1000	11	230:270	2/2000	0.460
		12	205:295	3/2000	0.410
		13	232:268	0/2000	0.464
		14	223:277	0/2000	0.446
		15	211:289	1/2000	0.422
		Total	-	6/10000	-
		Mean ± SD	-	1.20 ± 1.30	0.44 ± 0.02
DG + CLA	2000	16	205:295	1/2000	0.410
		17	260:240	0/2000	0.520
		18	227:273	2/2000	0.454
		19	252:248	0/2000	0.504
		20	210:290	0/2000	0.420
		Total	-	3/10000	-
		Mean ± SD	-	0.60 ± 0.89	0.46 ± 0.05
MMC ¹⁾	2	21	208:292	179/2000	0.416
		22	220:280	178/2000	0.440
		23	206:294	187/2000	0.412
		24	204:296	181/2000	0.408
		25	200:300	184/2000	0.400
		Total	-	909/10000	-
		Mean ± SD	-	181.80 ± 3.70*	0.42 ± 0.02

¹⁾MMC: Mitomycin C.

²⁾PCE: Polychromatic erythrocyte.

³⁾NCE: Normochromatic erythrocyte.

⁴⁾MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte.

*Significantly different from the vehicle group at $p < 0.01$.

DG+CLA 500 mg/kg 투여군, DG+CLA 1,000 mg/kg 투여군, DG+CLA 2,000 mg/kg 투여군 및 양성대조군의 순으로 평균 0.60 ± 0.89 , 1.00 ± 0.71 , 1.20 ± 1.30 , 0.60 ± 0.89 , 181.80 ± 3.70 을 나타내었다(Table 4). 따라서 DG+CLA를 투여한 어느 군에서도 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 한편 양성대조군에서는 소핵 빈도에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 증가를 나타내었다($p < 0.01$).

PCE/(PCE+NCE) 비율은 음성 대조군, DG+CLA 500 mg/kg 투여군, DG+CLA 1,000 mg/kg 투여군, DG+CLA 2,000 mg/kg 투여군 및 양성대조군의 순으로 평균 $0.46 \pm$

0.02 , 0.46 ± 0.04 , 0.44 ± 0.02 , 0.46 ± 0.05 , 0.42 ± 0.02 를 나타내었다(Table 4). 따라서 시험물질에 의해 세포 독성 수치가 뚜렷하게 증가하거나 감소하는 경향이 없었으며 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

음성대조군 및 양성대조군의 소핵유발빈도는 historical control date의 정상범위에 있었기 때문에 본 시험은 적절한 조건하에서 실시되었음이 확인되었다. 이상의 결과로 본 시험 조건하에서 시험물질인 공액리놀렌산이 함유된 디글리세라이드 조성물은 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

요 약

시험물질 공액리놀렌산이 함유된 디글리세라이드 식용유 지 조성물의 마우스에 대한 소핵유발시험을 실시하였다. 시험물질 500, 1,000, 2,000 mg/kg의 용량과 음성대조군 및 양성대조군인 Mitomycin C 2 mg/kg 투여군을 설정한 후, 음성대조군과 시험물질군은 경구투여 하였고, 양성대조군은 복강투여 하여 최종 투여 후 24시간 후에 대퇴골로부터 골수세포를 채취, 도말하였다. 골수검체는 5% Giemsa액으로 염색하며 소핵유발빈도를 검경하였다. 시험결과 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서, 모든 시험물질군의 다염성적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현율은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성 있는 증가는 관찰되지 않았다. 한편, 양성대조군의 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현율은 음성대조군과 비교하여 현저한 증가가 인정되었다. PCE/(PCE+NCE)의 비는 시험물질군과 음성대조군을 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 음성대조군 및 양성대조군의 소핵유발빈도는 historical control date의 정상범위에 있었기 때문에 본시험은 적절한 조건하에서 실시되었음이 확인되었다. 따라서 본 시험 조건하에서 시험물질인 공액리놀렌산이 함유된 디글리세라이드 조성물은 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

문 헌

- Lee J, Joo ST, Choi BD, Ha YL, Ha JK, Park GB. 1999. The effect of conjugated linoleic acid (CLA) feeding period on CLA content and fatty acid composition of chicken. *Korean J Anim Sci* 41: 375-386.
- Joseph AS, Miller GD. 2000. Potential health benefits of conjugated linoleic acid. *J Nutr* 19: 470S-471S.
- Lin TY. 1999. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem* 67: 1-3.
- Gniwotta C, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Kühn H. 1997. Prostaglandin F₂-like compounds, F₂-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic

- lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3236-3241.
5. Pariza MW, Ha YL, Benjamin H, Sword JT, Grüter A, Chin SF, Storkson J, Faith N, Albright K. 1991. Formation and action of anticarcinogenic fatty acids. *Adv Exp Med Biol* 289: 269-272.
 6. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: Heataltered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887.
 7. Macdonald HB. 2000. Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. *J Nutr* 19: 111S-118S.
 8. Sugano M, Tsujita A, Yamasaki M, Yamada K, Ikeda I, Kritchevsky D. 1997. Lymphatic recovery, tissue distribution and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats. *J Nutr Biochem* 8: 38-43.
 9. Yurawecz MP, Hood JK, Pariza MW. 1995. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108: 19-25.
 10. Alder ID. 1984. Cytogenetic tests in mammals. In *Mutagenicity testing a practical approach*. Venitt S, Parry JM, eds. IRL Press, Oxford. p 275-306.
 11. Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9: 527-549.

(2008년 5월 21일 접수; 2008년 7월 2일 채택)