

## SD 랫드에서 베타카로틴강화미의 90일 반복투여 경구독성시험

박수진 · 정미혜\* · 이시명<sup>1</sup> · 김미경 · 박경훈 · 박재읍

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 생물안전성과  
(2011년 8월 19일 접수, 2011년 9월 6일 수리)

### A 90-day Safety Study (Repeated-Dose Oral Toxicity Study) of Genetically Modified $\beta$ -Carotene Biofortified rice in Sprague-Dawley Rats

Soo Jin Park, Mihye Jeong\*, Si Myoung Lee<sup>1</sup>, Mi Kyoung Kim, Kyung-Hun Park and Jae-Yup Park

Agro-Material Safety Evaluating Division, Department of Agro-Food Safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea, <sup>1</sup>Biosafety Division, Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration Suwon 441-707, Korea

#### Abstract

This study was conducted to evaluate the safety of  $\beta$ -carotene biofortified rice, a genetically modified organism (GMO) developed by Rural Development Administration.  $\beta$ -carotene biofortified rice were exposed on Sprague-Dawley rats for 13 weeks. All rats survived until the end of the exposure period. There were no biologically significant differences in body weight, feed and water consumption, weight gains and feed efficiency. There were no clinical signs of toxicity attributable to exposure to GM rice. Mild decreases in AST, ALT, TG levels were observed in Group II (25% GM rice (w/w)) and Group III (50% GM rice (w/w)), both in females and males. Results of histopathological changes treated with the  $\beta$ -carotene biofortified rice had no significant differences between the control and treatment groups. Based on these results, we deemed that genetically modified  $\beta$ -carotene biofortified rice was as safe as conventional rice.

**Key words**  $\beta$ -carotene biofortified rice, GMO, subchronic, repeated oral toxicity

#### 서론

황금쌀이라 불리는 ‘베타카로틴강화미’는 카로티노이드를 생산하도록 개발되었으며 노란색을 띤다. 베타카로틴은 관상동맥질환, 만성질환과 암 등의 성인병 치유에 도움을 주고, 간에서 비타민 A로 전환된다. 또한 대표적인 항산화영양소로 당근, 호박 등의 녹황색채소에 함유되어 있고, 결핍 시 야맹증 등 시력의 이상증상을 야기할 수 있다(Buu, 2003).

최초의 베타카로틴 강화미는 수선화의 phytoene synthase (PSY)유전자와 세균 *Erwinia uredovora*의 phytone desaturase

(Ctrl) 유전자를 삽입함으로써 재조합되었고, 2세대는 옥수수 PSY 유전자를 삽입하여 carotenoid 함량이 보다 높게 개발되었으며, 필리핀 국제벼연구소(IRRI)에서는 2013년 인도에서 상업적 재배를 위해 황금쌀의 출시를 준비 중이라고 밝혔다(Ye 등, 2000; Paine 등, 2005).

농촌진흥청 국립농업과학원에서 또한 다중유전자 동시발현기술에 의해 베타카로틴강화벼를 개발하였으며(Ha, 2009), 일반 현미의 호분층에 미량의 베타카로틴이 도정과정 중에 제거되는 것과는 달리(Sautter 등, 2006), 베타카로틴 강화 현미와 백미의 베타카로틴 함량은 각각 2.35, 2.03  $\mu\text{g/g}$ 으로 분석되어 현미 뿐 아니라 도정한 백미의 배유에서도 비슷한 함량의 베타카로틴이 생합성되었음을 보고하였다(Ha, 2009; Lee 등, 2010).

\*연락처 : Tel. +82-31-290-0593, Fax. +82-290-0508  
E-mail: mhjeong@korea.kr

국제적으로 개발된 GM 작물로는 제초제내성, 해충저항성 및 질병저항성 등 농업적 특성이 강화된 농산물과 베타카로틴과 루테인 함량이 높은 감자 및 카로티노이드와 플라보노이드 함량이 높은 계통의 토마토, 베타카로틴 강화쌀 등 영양 성분이 강화된 유전자재조합 농산물이 있다. 국내에는 농촌진흥청을 주축으로 해충 저항성 및 제초제 내성 작물 등이 개발되었으며, 현재 국내에서는 GM작물은 16품목 48여종 개발되어 시험재배 및 안전성 연구가 진행 중에 있다(Woo 등, 2006; 식품의약품안전청, 2009). 중국은 2009년 11월 GM 쌀과 옥수수의 상업적 생산을 승인한 바 있으며, 필리핀은 2011년 초에 GM쌀(비타민 A가 강화된 황금쌀)의 재배를 승인할 것으로 예상되어 향후 GM 작물을 채택할 국가는 점점 증가추세로 분석된다(Jeon 등, 2007).

GM작물은 전 세계적으로 가중되고 있는 ‘식량·기아문제’ 해소측면에서 긍정적인 평가를 받아왔으나, 인체 및 환경에 미치는 부정적인 측면에 대한 논란이 끊임없이 제기되어 왔고, 또한 2008년 1월부터 ‘유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(LMO법)’의 시행으로 엄격한 위해성 평가와 심사 및 안전성을 입증의 중요시되고 있다(질병관리본부, 2009; James, 2007).

베타카로틴 강화미에 대한 연구로는 앞도열병과 잎집무늬 마름병의 병방제는 유의적인 차이가 없다고 보고한 이 등의 농업특성검증연구와(Lee 등, 2010), 영양성분 분석연구가 있으나(Lee 등, 2010), 안전성에 대한 연구는 미비한 실정이다.

GM 작물의 폭넓은 활용 및 안전성 문제를 해결하기 위해서는 인체 및 환경에 대한 안전성 검증이 필요하며(Paparini과 Romano-Spica, 2004; Moseley, 2002), 국내 GM 작물의 안전성 평가는 발현 물질, 주요성분의 조성분석, 대사산물의 평가, 식품가공, 영양학적인 변화 등 크게 다섯 부분으로 나뉜다. 또한, GM 작물의 영양소조성이 종래의 식품과 다른 경우 동물시험이 요구되고, 건강증진을 목적으로 하는 식품에서는 독성학적 시험 등을 필요로 한다(식품의약품안전청, 2009).

따라서, 본 연구에서는 랫드에서 베타카로틴강화미에 대한 90일 반복투여경구독성시험을 수행하였고, 그 안전성 입증하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 사료

시험에 사용한 베타카로틴강화미는 농촌진흥청 국립농업과학원 생물안전성과에서 제공받아 사용하였으며, 대조군

**Table 1.** Composition of diet

Ingredients (%)		C	G1	G2	G3
No. of animals	Male	10	10	10	10
	Female	10	10	10	10
Golden rice <sup>a)</sup>		0	0	25	50
Mild rice <sup>b)</sup>		0	50	25	0
Feed		100	50	50	50
Total		100	100	100	100

<sup>a)</sup>Mild rice : Nak-Dong rice

<sup>b)</sup>Golden rice :  $\beta$ -carotene biofortified rice

으로는 낙동미를 사용하였다. 군 별 사료의 조성은 Table 1과 같다.

### 사료 영양성분 분석

시험에 사용된 사료의 영양성분(조단백질, 조지방, 섬유소, 조회분, 탄수화물)함량은 AOAC 방법으로 측정하였다(AOAC, 1990).

### 90일 반복투여경구독성시험

생후 5주령의 Specific Pathogen Free(SPF) rat을 (주)한림실험동물연구소로부터 구입하여 일주일간 순화시켜 건강상태를 확인한 후 한 군당 암·수 각 10마리씩 무작위로 분리하여 제조된 사료를 급여하였다. 투여기간은 90일(13주)로 하였고, 사료 및 음수섭취량, 체중은 주 1회 측정하였으며, 투여 전 및 부검당일에도 측정하였다.

사육환경은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$  배기 10-15/hr, 조명 12시간 및 조도 200-300 Lux이었고, 음용수는 자유롭게 공급하였다.

### 소변분석

부검 24시간 전 metabolic cage에 각 한 마리씩 넣고 12시간 이상 소변을 채취하여 volume 측정 후 SHD Reagent Strips for Urinalysis Test Kit(Multistix 10 SG Reagent Strips for Urinalysis. SIEMENS Healthcare Diagnostics Inc., USA: Kimball Electronics(Wales) Ltd., Bridgend)를 사용하여 Glucose, Bilirubin, Ketone, Specific Gravity, Blood, pH, Protein, Urobilinogen, Nitrite, Leucocytes를 측정하였다.

### 부검

12시간 절식 후 CO<sub>2</sub>로 마취 한 다음 복대정맥에서 채혈

하였고, 각종 장기(뇌, 안구, 간, 신장, 비장, 심장, 폐, 방광, 고환 등) 채취 후 장기무게를 측정하였으며, 절대·상대무게를 계산하였다.

**혈액분석**

복대정맥에서 채혈한 혈액을 혈액분석기(Baker system 9118 Hematology Analyzer, Biochem Immunosystems Inc., U.S.)을 사용하여 WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT 등을 분석하였다.

**생화학분석**

각 랫드에서 채취한 혈액을 12시간 냉장에서 방치 후 4℃, 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였으며, 상등액을 분리하여 시험에 사용하였다. 생화학분석은 생화학분석기(Express plus, Bayer Diagnostics Inc., U.S.)를 사용하였으며, Albumin, Alk. Phos, ALT, AST, Total Bilirubin, Cholesterol, Triglycerides 등을 분석하였다.

**병리조직학적 검사**

부검한 동물을 육안적으로 관찰한 후 주요장기(간장, 신장, 비장, 부신, 폐장, 뇌, 심장, 뇌하수체, 고환/난소, 가슴샘)를 적출하여 절대중량과 상대중량을 측정하였고 다른 장기도 적출하여 포르말린에 고정하였다. 안구는 Davidson 고정액으로 처리하였으며, 골조직은 탈회한 후 포르말린으로 고정하였다. 고정한 조직들의 일정한 부위를 두께 3-5 mm 정도로 삭정

(trimming)한 후 일정한 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 3-5 um로 박절하고, hematoxylin과 eosin염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

**통계처리**

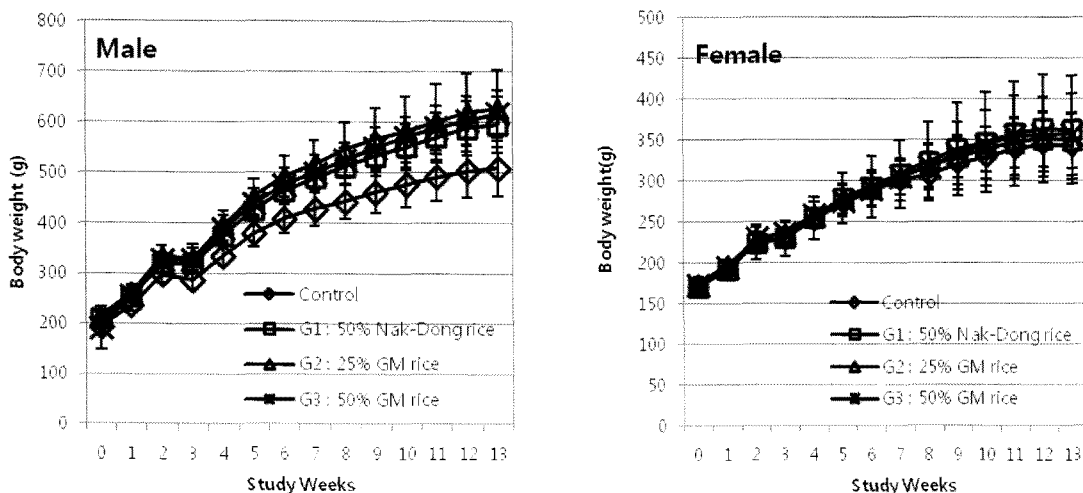
병리조직을 제외한 다른 시험값들은 Mean ± SD로 나타냈으며, t-test로 유의성을 검증하였다. 병리조직에 관련된 자료는 체중 장기중량의 자료에 대해 분산의 동질성을 평가하기 위해 Levene's 검사를 실시한 후, one way ANOVA 검사를 하여 유의성을 조사하였다. 분산의 동질성 및 시험군간 유의성이 인정된 경우, 사후검정으로 Scheffe 다중검정을 실시하였고, 분산이 이질적이며 시험군간 유의성이 인정된 경우 사후검정으로 Dunnett's T3 다중검사를 실시하였다. 통계분석은 SPSS(Ver 12.0) 통계프로그램을 이용하여 수행하였다.

**결 과**

**체중 및 사료섭취량**

체중은 독성유무를 판단할 수 있는 중요한 요소이다(Kwon 등, 2004). 각 시험군의 체중 증가량을 비교한 결과, 대조군에 비해 시험군의 체중 증가량이 높게 측정되었으나, 암·수컷 모두에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며(Fig. 1), 독성으로 인한 임상증상은 관찰되지 않았다.

시험사료 성분 분석결과 각 시험식이의 당질함량은 68.38-68.85%로 대조군에 비해 약 16% 높게 함유되어 있었으며,



**Fig. 1.** Body weight of rats given GM rice for 13 weeks. G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% golden rice, G3 : 50% golden rice Mild rice : Nak-Dong rice, golden rice : *β-carotene biofortified rice* Values are presented as mean ± SD (g)

**Table 2.** Compositions of manufactured experimental feed from  $\beta$ -carotene biofortified GM rice (%)

Composition (%)	C	G1	G2	G3
Moisture	8.89	10.52	11.03	10.62
Starch	52.24	68.85	68.38	68.73
Crude protein	21.24	13.18	13.24	13.28
Crude lipids	5.49	1.89	1.88	1.96
Crude Ash	6.34	3.03	3.09	3.00
Total fiber	5.80	2.53	2.38	2.41

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% golden rice, G3 : 50% golden rice  
Mild rice : Nak-Dong rice, golden rice :  $\beta$ -carotene biofortified rice

**Table 3.** Daily feed and water consumption and food efficiency ratio of rats

Group	Feed				Water				FER <sup>a)</sup>	
	Female		Male		Female		Male		Female	Male
	Week									
2-7	8-13	2-7	8-13	2-7	8-13	2-7	8-13			
C	22.1 ± 1.6	20.2 ± 1.7	30.9 ± 6.8	27.5 ± 1.5	41.8 ± 4.3	43.1 ± 3.9	26.4 ± 5.5	32.3 ± 5.1	0.048 ± 0.02	0.072 ± 0.01
G1	21.4 ± 3.9	18.6 ± 1.4	28.2 ± 4.1	25.9 ± 1.5	31.0 ± 4.7	36.9 ± 7.9	21.4 ± 6.2	22.2 ± 2.5	0.057 ± 0.02	0.088 ± 0.01
G2	21.9 ± 2.4	19.2 ± 3.8	33.8 ± 10.5	28.4 ± 16.2	34.9 ± 4.8	46.2 ± 12.7	24.1 ± 2.8	27.7 ± 3.2	0.051 ± 0.01	0.076 ± 0.01
G3	22.2 ± 2.8	19.3 ± 2.5	30.2 ± 2.7	27.1 ± 1.2	32.8 ± 5.8	48.7 ± 9.4	20.6 ± 4.5	22.8 ± 4.2	0.052 ± 0.01	0.093 ± 0.01*

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% golden rice, G3 : 50% golden rice  
Mild rice : Nak-Dong rice, golden rice :  $\beta$ -carotene biofortified rice

Values are presented as mean ± SD (g)

<sup>a)</sup>FER (Food efficiency ratio): [Body Weight gain / Feed intake]

\* $p < 0.05$ ; Significantly different from Control

조단백질함량은 13.18-13.28%로 대조군에 비해 약 8% 낮게 측정되었다(Table 3). 시험군 식이의 탄수화물 범위가 대조군에 비해 높았고, 단백질함량은 적게 함유된 것으로 측정되었으나, 한국인영양소섭취기준(Dietary Reference Intakes)에서 제시한 에너지적정비율은 탄수화물 : 단백질 : 지방 = 55-70 : 7-20 : 15-25로(한국영양학회, 2010), 식이의 에너지비율이 적정비율 범위 내에 포함되며, 대조군 식이조성과 큰 차이는 없어 식이로 인한 문제는 없는 것으로 판단된다.

또한, 각 군의 식이 및 음수섭취량은 암·수컷 모두에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 식이효율의 측정결과 베타카로틴강화미 50%투여군 수컷에서 식이효율이 높게 측정되어 식이에 의한 영향이 다른 군에 비해 큰 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ).

### 소변분석

대조군 및 시험군의 소변분석결과는 Table 4와 Table 5에 나타내었다.

모든 시험군의 소변에서 혈액 및 당은 검출되지 않았고, 베타카로틴강화미 25%투여군 수컷과 베타카로틴강화미를 투

여한 모든 군의 암컷 소변 pH가 다소 낮게 측정되었으나, 큰 차이는 없었다.

### 장기무게

베타카로틴강화미 25%투여군 수컷 간의 절대장기중량이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 수컷의 장기무게 측정결과, 일반미 50%투여군의 좌·우 부신의 절대·상대무게가 유의적으로 낮았고, 베타카로틴강화미 25%투여군 우측 부고환과 베타카로틴강화미 50%투여군 좌측 부고환의 절대무게도 낮게 측정되었다. 또한 대조군을 제외한 모든 군에서 좌측 부신의 절대·상대무게가 감소하는 경향을 나타냈다(Table 5, 6).

### 혈액분석

비타민 A 강화미 혼합식이를 투여한 랫드의 혈액분석결과 는 Table 8과 Table 9에 나타냈다.

일반미 50%투여군 수컷 평균혈구 내 헤모글로빈 농도(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, MCHC)는 감소,

**Table 4.** Urine volume and urinalysis of male rate

		Control	G1	G2	G3
Volume	(mL)	14.3 ± 1.64	12.5 ± 2.76	11.6 ± 4.01	13.50 ± 2.29
Leucocytes	(Leu/μL)	—	—	—	—
Nitrite	+	8 <sup>a)</sup>	7	4	7
	—	2 <sup>a)</sup>	3	6	3
Urobilinogen	(mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Protein	(mg/dL)	34.44 ± 26.51	31.00 ± 27.26	31.00 ± 27.26	27.78 ± 30.73
pH		7.8 ± 0.71	7.5 ± 0.69	7.1 ± 0.61**	7.7 ± 0.63
Blood	(Ery/μL)	—	—	—	—
Specific gravity		1.0135 ± 0.006	1.0185 ± 0.004**	1.017 ± 0.006	1.0125 ± 0.005
Ketone	(mg/dL)	11.67 ± 5.00	22.00 ± 16.02	23.89 ± 15.77	10.63 ± 3.78
Bilirubin		—	—	—	—
Glucose	(mg/dL)	—	—	—	—

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice

Mild rice : Nak-Dong rice, Golden rice : *β-carotene biofortified rice*

‘+’ : Positive, ‘—’ : Negative

<sup>a)</sup>Number of animals

Values are presented as mean ± SD (g).

\*\**p*<0.01; Significantly different from control

**Table 5.** Urine volume and urinalysis of female rate

		Control	G1	G2	G3
Volume	(mL)	10 ± 2.36	7.50 ± 4.03	9.45 ± 4.39	8.50 ± 3.61
Leucocytes	(Leu/μL)	—	—	—	—
Nitrite	+	6 <sup>a)</sup>	8	6	4
	—	4 <sup>a)</sup>	2	4	6
Urobilinogen	(mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Protein	(mg/dL)	102 ± 40.62	102.22 ± 38.66	86 ± 31.30	31 ± 13.29
pH		7.6 ± 0.77	7.4 ± 0.74***	7.1 ± 0.61***	6.45 ± 0.37***
Blood	(Ery/μL)	—	—	—	—
Specific gravity		1.0175 ± 0.01	1.015 ± 0.01	1.017 ± 0.01	1.0225 ± 0.01
Ketone	(mg/dL)	—	—	—	—
Bilirubin		—	—	—	—
Glucose	(mg/dL)	—	—	—	—

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice

Mild rice : Nak-Dong rice, Golden rice : *β-carotene biofortified rice*

‘+’ : Positive, ‘—’ : Negative

<sup>a)</sup>Number of animals

Values are presented as mean ± SD (g).

\*\*\**p*<0.001; Significantly different from control

RDW(Red blood cell distribution width)증가하였고, 베타 카로틴강화미 25% 투여군의 RDW는 증가하였다. 베타카로틴강화미 50% 투여군의 경우 백혈구(White Blood Cell, WBC)와 MCHC가 감소하였고, RDW는 증가하였다.

또한, 평균혈구헤모글로빈(Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH)는 베타카로틴 강화미의 혼합농도에 의존적으로 감소

하는 경향을 나타냈다.

암컷의 경우 일반미 50%투여군의 MCH와 MCHC가 감소하였고, 베타카로틴강화미 25% 투여군의 적혈구(Red Blood Cell, RBC)와 헤마토크릿(Hematocrit, HCT)수치는 증가하였고, MCH와 MCHC가 감소하였다. 베타카로틴강화미 50% 투여군의 WBC는 감소하였다.

**Table 6.** Relative organ weight in male rat

	C	G1	G2	G3
Brain	0.356 ± 0.055	0.366 ± 0.034	0.307 ± 0.129	0.352 ± 0.028
Pituitary gland	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0
Liver	2.61 ± 0.516	2.439 ± 0.108	2.23 ± 0.916	2.591 ± 0.138
Spleen	0.13 ± 0.057	0.156 ± 0.023	0.124 ± 0.054	0.144 ± 0.015
Adrenals	0.011 ± 0.002	0.010 ± 0.002*	0.016 ± 0.022	0.01 ± 0.003
Kidney	0.591 ± 0.073	0.559 ± 0.085	0.477 ± 0.2	0.551 ± 0.087
Testes	0.594 ± 0.06	0.592 ± 0.063	0.478 ± 0.098	0.561 ± 0.048
Epididymis	0.252 ± 0.032	0.239 ± 0.038	0.204 ± 0.118	0.228 ± 0.022
Heart	0.284 ± 0.027	0.299 ± 0.036	0.228 ± 0.095	0.272 ± 0.013
Lung	0.343 ± 0.132	0.299 ± 0.024	0.265 ± 0.115	0.301 ± 0.032
Thymus	0.117 ± 0.052	0.124 ± 0.019	0.09 ± 0.05	0.091 ± 0.025

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice, Mild rice : Nak-Dong rice, Golden rice :  $\beta$ -carotene biofortified rice

Relative Tissue Weight (%) : [Tissue Weight/ final body weight] × 100, Values are presented as mean ± SD (g).

\* $p$ <0.05; Significantly different from control

**Table 7.** Relative organ weight in female rat

	C	G1	G2	G3
Brain	0.592 ± 0.076	0.595 ± 0.113	0.588 ± 0.065	0.577 ± 0.065
Pituitary gland	0.008 ± 0.005	0.005 ± 0.002	0.005 ± 0.002	0.006 ± 0.002
Liver	2.786 ± 0.29	2.693 ± 0.38	2.878 ± 0.311	2.636 ± 0.169
Spleen	0.173 ± 0.02	0.16 ± 0.027	0.157 ± 0.024	0.157 ± 0.027
Adrenals	0.025 ± 0.005	0.021 ± 0.004*	0.020 ± 0.002**	0.02 ± 0.003*
Kidney	0.638 ± 0.089	0.583 ± 0.06	0.578 ± 0.071*	0.572 ± 0.056*
Ovaries	0.027 ± 0.014	0.028 ± 0.012	0.027 ± 0.007	0.026 ± 0.008
Uterus	0.203 ± 0.088	0.184 ± 0.041	0.211 ± 0.061	0.214 ± 0.062
Heart	0.286 ± 0.104	0.326 ± 0.048	0.305 ± 0.015	0.319 ± 0.028
Lung	0.358 ± 0.137	0.404 ± 0.08	0.372 ± 0.053	0.38 ± 0.046
Thymus	0.102 ± 0.04	0.126 ± 0.026	0.105 ± 0.026	0.098 ± 0.023

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice

Mild rice : Nak-Dong rice, Golden rice :  $\beta$ -carotene biofortified rice

Relative Tissue Weight (%) : [Tissue Weight/ final body weight] × 100

Values are presented as mean ± SD (g).

\* $p$ <0.05; Significantly different from control

\*\* $p$ <0.01; Significantly different from control

또한, PLT 수치는 베타카로틴 강화미의 혼합농도에 의존적으로 감소하는 경향을 나타냈으나, 유의성은 없었다.

### 혈액생화학분석

생화학분석결과는 Table 10와 Table 11에 나타났다. 일반미 50%투여군 수컷의 creatinine, LDH(Lactic dehydrogenase)가 낮았고, 베타카로틴강화미 25%투여군의 albumin, ALP(Alkaline Phosphatase), creatinine, LDH, AST가 유의적으로 낮았으며, ALT와 AST의 경우 농도의존적으로 감소하였으나, 유의적이진 않았다.

암컷의 경우 일반미 50%투여군의 ALT는 감소하였고, 베타카로틴강화미 25%투여군의 LHD 및 glucose함유량이 증가하였으며, 베타카로틴강화미 50%투여군의 ALT, total bilirubin이 감소하였고, glucose함량이 증가하였으며, triglycerides 수치는 감소하였다.

### 현미경관찰소견

적출한 장기의 병리조직학적 소견은 Table 12 및 13과 같다. 현미경으로 관찰한 각 군의 병리조직소견에서 대조군과 시험물질 투여군 간의 유의적인 소견은 관찰되지 않았다.

**Table 8.** Hematology values for male rats

Parameter	Control	G1	G2	G3
WBC (THSN/CU MM)	9.60 ± 2.56	10.17 ± 3.22	9.97 ± 5.04	9.99 ± 1.36*
RBC (MILL/CU MM)	8.99 ± 0.47	9.03 ± 0.64	8.02 ± 3.27	8.79 ± 1.02
HGB (GRAMS/DL)	15.26 ± 0.84	14.49 ± 0.78	12.69 ± 4.99	13.71 ± 1.51
HCT (%)	45.94 ± 3.14	45.74 ± 2.92	40.19 ± 16.38	43.45 ± 4.87
MCV (CU MICRONS)	51.09 ± 1.78	50.75 ± 2.80	49.76 ± 2.28	49.46 ± 1.38
MCH (PICO GRAMS)	16.99 ± 0.43	16.09 ± 0.90	16.09 ± 1.15	15.61 ± 0.50***
MCHC (%)	33.24 ± 0.91	31.69 ± 0.87***	32.39 ± 2.49	31.56 ± 0.73***
RDW (%)	14.60 ± 1.41	16.29 ± 1.31***	17.81 ± 1.01***	17.78 ± 0.89***
PLT (THSN/CU MM)	991.86 ± 179.92	986.40 ± 296.69	940.57 ± 392.38	1,106.00 ± 172.85
MPV (CU MICRONS)	7.3 ± 1.7	9.53 ± 5.12	10.4 ± 5.4	8.2 ± 1.7
%LYMPH (%)	7.30 ± 1.73	9.53 ± 5.08	10.41 ± 5.42	8.16 ± 1.69
%MID (%)	87.69 ± 5.58	82.69 ± 7.43	90.37 ± 2.52	86.00 ± 6.53
%GRAN (%)	8.01 ± 2.53	10.13 ± 2.75	6.61 ± 1.51	9.45 ± 3.17
LYMPH (THSN/CU MM)	4.30 ± 3.20	7.18 ± 4.88	2.96 ± 2.14	4.55 ± 3.56
MID (THSN/CU MM)	8.40 ± 2.40	8.33 ± 2.30	9.06 ± 4.55	8.59 ± 1.25
GRAN (THSN/CU MM)	0.77 ± 0.30	1.04 ± 0.48	0.67 ± 0.40	0.95 ± 0.37

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice

Mild rice : Nak-Dong rice, Golden rice :  $\beta$ -carotene biofortified rice

Values are presented as mean ± SD (g).

\*  $p < 0.05$ ; Significantly different from control

\*\*\*  $p < 0.001$ ; Significantly different from control

**Table 9.** Hematology values for female rats

Parameter	Control	G1	G2	G3
WBC (THSN/CU MM)	6.82 ± 2.30	6.17 ± 2.12	7.30 ± 3.35	5.11 ± 1.48*
RBC (MILL/CU MM)	7.21 ± 1.01	7.80 ± 1.40	9.09 ± 0.91***	6.89 ± 0.79
HGB (GRAMS/DL)	14.77 ± 1.80	14.75 ± 1.52	16.11 ± 1.16	14.27 ± 1.31
HCT (%)	38.75 ± 5.07	41.87 ± 7.14	48.28 ± 5.01***	37.39 ± 3.94
MCV (CU MICRONS)	53.82 ± 0.68	53.76 ± 1.36	53.12 ± 1.57	54.33 ± 1.48
MCH (PICO GRAMS)	20.53 ± 0.43	19.20 ± 1.74***	17.80 ± 0.95***	20.77 ± 0.92
MCHC (%)	38.17 ± 0.65	35.68 ± 2.88***	33.52 ± 1.70***	38.23 ± 0.94
RDW (%)	14.36 ± 1.08	13.84 ± 0.71	14.89 ± 1.86	13.71 ± 0.51
PLT (THSN/CU MM)	1,079.10 ± 207.92	1,085.90 ± 130.89	1,076.38 ± 85.90	942.70 ± 87.64
MPV (CU MICRONS)	7.8 ± 4.4	6.2 ± 0.5	6.3 ± 1.0	6.7 ± 0.4
%LYMPH (%)	7.84 ± 4.39	6.16 ± 0.48	6.32 ± 0.99	6.70 ± 0.41
%MID (%)	81.70 ± 5.98	81.84 ± 6.70	87.40 ± 6.39	76.39 ± 5.40
%GRAN (%)	9.23 ± 2.62	9.77 ± 3.06	7.01 ± 3.03	11.14 ± 2.98*
LYMPH (THSN/CU MM)	9.07 ± 3.60	8.39 ± 3.84	5.59 ± 3.43	12.47 ± 2.47***
MID (THSN/CU MM)	5.57 ± 1.87	5.12 ± 2.05	6.83 ± 3.09	3.93 ± 1.29
GRAN (THSN/CU MM)	0.65 ± 0.31	0.58 ± 0.17	0.50 ± 0.21	0.53 ± 0.17

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice

Mild rice : Nak-Dong rice, Golden rice :  $\beta$ -carotene biofortified rice

Values are presented as mean ± SD (g).

\*  $p < 0.05$ ; Significantly different from control

\*\*\*  $p < 0.001$ ; Significantly different from control

**Table 10.** Biochemical serum values of male rats

	C (n=10)	G1 (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=10)
Albumin (g/dL)	4.37 ± 0.24	4.50 ± 0.20	4.66 ± 0.21	4.46 ± 0.16 <sup>***</sup>
ALP (U/L)	100.29 ± 12.30	90.20 ± 11.76	94.29 ± 18.16	81.00 ± 13.90 <sup>*</sup>
ALT (U/L)	32.86 ± 6.69	27.30 ± 7.39	26.57 ± 8.81	21.88 ± 3.52
AST (U/L)	155.00 ± 33.89	113.30 ± 29.75	115.71 ± 19.40	93.75 ± 11.36 <sup>*</sup>
Total Bili. (mg/dL)	0.19 ± 0.20	0.20 ± 0.16	0.17 ± 0.21	0.13 ± 0.12
BUN (mg/dL)	16.81 ± 1.72	14.34 ± 2.42	16.30 ± 2.99	14.73 ± 1.96
Cholesterol (mg/dL)	85.57 ± 35.85	77.20 ± 19.81	78.00 ± 20.81	60.63 ± 15.29
Creatinine (mg/dL)	0.54 ± 0.05	0.49 ± 0.07 <sup>*</sup>	0.51 ± 0.04	0.44 ± 0.05 <sup>*</sup>
GGT (U/L)	1.29 ± 0.76	1.10 ± 0.88	1.57 ± 1.27	1.00 ± 1.20
Glucose (mg/dL)	183.71 ± 32.97	181.60 ± 35.78	216.86 ± 28.57	212.25 ± 40.53
Phosphorus (mg/dL)	10.11 ± 0.67	10.55 ± 1.23	10.09 ± 0.68	9.25 ± 0.95
LDH (U/L)	1,493.71 ± 742.48	684.10 ± 532.16 <sup>*</sup>	710.29 ± 400.84	395.38 ± 160.88 <sup>*</sup>
Total Protein (g/dL)	7.50 ± 0.46	7.70 ± 0.41	7.67 ± 0.26	7.40 ± 0.20
Triglycerides (mg/dL)	126.81 ± 86.37	141.92 ± 40.01	116.83 ± 39.34	114.21 ± 26.86

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice

Mild rice : Nak-Dong rice, Golden rice : *β-carotene biofortified rice*

Values are presented as mean ± SD (g). <sup>\*</sup>*p*<0.05; Significantly different from control, <sup>\*\*\*</sup>*p*<0.001; Significantly different from control

**Table 11.** Biochemical serum values of female rats

	C (n=10)	G1 (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=10)
Albumin (g/dL)	5.10 ± 0.30	5.25 ± 0.25	5.19 ± 0.26	5.03 ± 0.38
ALP (U/L)	42.00 ± 10.36	36.30 ± 21.70	40.20 ± 7.00	38.30 ± 9.25
ALT (U/L)	30.10 ± 10.27	19.40 ± 5.38 <sup>*</sup>	23.50 ± 14.04	15.00 ± 3.80 <sup>***</sup>
AST (U/L)	118.90 ± 50.73	82.50 ± 32.12	146.10 ± 52.45	104.70 ± 48.63
Total Bili. (mg/dL)	0.36 ± 0.28	0.71 ± 0.84	1.02 ± 1.14	0.16 ± 0.12 <sup>**</sup>
BUN (mg/dL)	17.91 ± 2.43	17.24 ± 4.33	19.66 ± 3.29	17.81 ± 5.16
Cholesterol (mg/dL)	132.30 ± 31.72	118.60 ± 40.52	117.90 ± 29.01	111.20 ± 23.35
Creatinine (mg/dL)	0.49 ± 0.09	0.50 ± 0.08	0.52 ± 0.12	0.53 ± 0.09
GGT (U/L)	1.84 ± 2.41	0.95 ± 0.77	1.30 ± 0.95	2.80 ± 2.78
Glucose (mg/dL)	171.50 ± 26.55	174.00 ± 40.47	219.90 ± 63.67	219.90 ± 35.23 <sup>**</sup>
Phosphorus (mg/dL)	8.28 ± 1.88	9.08 ± 1.28	9.18 ± 1.97	8.95 ± 1.03
LDH (U/L)	645.50 ± 380.81	518.50 ± 469.06	1441.60 ± 835.44 <sup>*</sup>	546.00 ± 254.45
Total Protein (g/dL)	8.62 ± 0.67	9.18 ± 0.96	8.52 ± 0.36	8.59 ± 0.50
Triglycerides (mg/dL)	136.95 ± 81.07	197.45 ± 146.86	87.55 ± 30.61	63.43 ± 15.23 <sup>*</sup>

C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice

Mild rice : Nak-Dong rice, Golden rice : *β-carotene biofortified rice*

Values are presented as mean ± SD (g).

<sup>\*</sup>*p*<0.05; Significantly different from control, <sup>\*\*</sup>*p*<0.01; Significantly different from control

<sup>\*\*\*</sup>*p*<0.001; Significantly different from control



**Table 12.** Histopathological findings of male rats treated with GM rice for 90 days

Organ	C	G1	G2	G3
Pituitary gland				
vacuolation	1		1	
cyst, pars distalis		1		
Harderian gland				
hyperpigmentation				1
Thyroid gland				
ectopic thymus	1			
Heart				
myocarditis, focal			2	1
myocarditis, multifocal	1			
cardiomyopathy		1	1	
Lung				
perivasculitis, focal	2			
interstitial pneumonia	1			
mineralization				1
Liver				
hydropic degeneration, focal	1			
inflammatory cell foci, focal	1	1	3	1
inclusion body, cytoplasmic, focal			1	
fatty change				2
Kidney				
hyaline cast, focal	1			
inflammatory cell foci, focal	1	4	1	
Adrenal gland				
cyst				1
fat vacuolation				1
Prostate gland				
chronic inflammation, interstitial	1			
inflammatory cell foci, interstitial			1	1
Pancreas				
atrophy	1			1
islet cell hyperplasia		1		
chronic inflammation		1		
focal necrosis with hemorrhage			1	
Thymus				
hemorrhage	1	1		2
hyperplasia, epithelial component				1

Number in parentheses represent number of animal  
 C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice  
 Mild rice : Nak-Dong rice  
 Golden rice : *β-carotene biofortified rice*

**Table 13.** Histopathological findings of female rats treated with GM rice for 90 days

Organ	C	G1	G2	G3
Harderian gland				
inflammatory cell foci, focal	2			1
hyperpigmentation		1	1	2
Thyroid gland				
hyperplasia, parathyroid gland			1	
Heart				
myocarditis, focal				1
myocarditis, multifocal		1		
cardiomyopathy	1			
Lung				
inflammatory cell foci, focal			1	
Liver				
inflammatory cell foci, focal	1	1		1
fatty change		2	1	
Kidney				
hyaline cast, focal	1	1		
cyst	1			
interstitial nephritis, renal pelvis		1		
pyelonephritis			1	
Adrenal gland				
mineralization	1			
Pancreas				
atrophy		1		2
periarteritis, focal				1
Thymus				
hemorrhage		1	2	

Number in parentheses represent number of animal  
 C: Control, G1 : 50% Mild rice, G2 : 25% Golden rice, G3 : 50% Golden rice  
 Mild rice : Nak-Dong rice  
 Golden rice : *β-carotene biofortified rice*

## 고 찰

세계보건기구(WHO)에서는 전 세계적으로 2억 3천만명 아 이들이 비타민 A결핍으로, 그 중 1년에 백만명이 실명 또는 사 망에까지 이르는 것으로 파악된다(Buu, 2003). 개발도상국 등 다수 나라에서는 쌀이 열량공급원으로 대중적으로 소비되 며, 쌀만 섭취하고 다양한 채소를 섭취하지 못할 경우, 미량 영양성분 등 영양소결핍이 생길 수 있어(식품의약품안전청, 2009), 개발된 베타카로틴강화미 품종들이 가난한 사람들 사 이에서 비타민 A결핍을 극복하는 도구가 될 것이란 기대를

모으고 있다(Buu, 2003).

이처럼 GM 작물은 생산량증대와 고품질의 작물을 수확할 수 있다는 큰 장점이 있지만, 새로운 유전자 이입이란 관점에서 안전성입증이 가장 큰 과제라 할 수 있다(Reis 등, 2006).

따라서 본 연구에서는 농촌진흥청 국립농업과학원에서 개발된 베타카로틴강화미를 25%, 50%로 사료에 혼합 후 랫드에 90일간 투여하여 그 안전성을 살펴보았다. 그 결과 사망개체가 관찰되지 않았고, 식이 및 음용수 섭취량에도 차이를 보이지 않았다. 베타카로틴강화미를 투여한 모든 암컷의 소변 pH가 다소 낮게 측정되었으나, 식이에 의한 영향은 아니었다. 혈액분석결과 베타카로틴강화미를 투여한 수컷에서는 MCH가, 암컷에서는 PLT가 농도의존적으로 감소하였고, AST, ALT, TG함량이 베타카로틴강화미 25%투여군과 베타카로틴강화미 50%투여군 암수컷에서 다소 감소하였으나, 식이에 의한 영향은 아닌 것으로 사료된다. 또한, 대조군과 베타카로틴강화미 투여군에서 병리조직학적 변화를 나타내지 않아 베타카로틴강화미 투여 시 독성은 관찰되지 않는 것으로 판단된다.

베타카로틴은 대표적인 항산화영양소로 다양한 성인병 등 억제작용 외에도 마우스 피부에서 UV-B로 발생될 수 있는 발암 억제작용(Sweetman, 2002)이 보고되었고, 베타카로틴 과잉섭취는 피부를 노란색으로 변색되는 카로틴혈증을 일으킬 수 있으나 그 반응은 가역적이며, 베타카로틴 과다섭취로 인해 비타민 A 독성 사례는 보고된 바 없다(Mukherjee 등, 1991).

1985년 Heywood와 Palmer는 베타카로틴의 독성연구에서 생식독성, 랫드에서의 다세대번식독성, 랫드와 토끼에서의 배아독성 및 돌연변이성은 없다고 하였고, 개2년 만성/발암성시험 및 랫드와 마우스 기형독성시험결과 개의 간 문맥 주변에서 지방이 축적된 세포가 관찰되었음을 보고하였다(Heywood와 Palmer, 1985).

현재까지 베타카로틴강화미의 환경 및 인체 내 발생 위험성은 보고되지 않고 있으며(Potrykus, 2000), 본 시험결과에서 또한 일반미투여와 차이를 나타내지 않아 독성여부는 판단할 수 없었다. 그러나 다양한 유전자들의 삽입으로 인한 생체 내 반응은 개체 및 개별 간 차이를 나타낼 수 있고(Ye 등, 2000), 장기간 섭취 및 섭취량정도에 따른 연구 또한 미비하므로, 베타카로틴강화미에 대한 더 다양한 안전성연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2010년도 농촌진흥청 국립농업과학원 박사후 연구과정 지원사업에 의해 이루어진 것이며(과제번호 : PJ006835072011), 이에 감사드립니다.

## >> 인 / 용 / 문 / 헌

- AOAC. (1990) Official methods of analysis. 15th ed. pp788. Association of official analytical chemists. Washington DC. USA.
- Buu, M.M. (2003) Golden Rice: Genetically Modified to Reduce Vitamin A Deficiency, Benefit or Hazard?. *Nutrition Byes.* 9:1-5.
- Ha, S.H. (2009) Recombinant PIC gene including internal ribosome entry site sequence of crucifer-infecting Tobamovirus for beta-carotene biosynthesis, expression vector comprising thereof and a transformant cell. Korean Patent 10-2009-0084137.
- Heywood, R. and A.K. Palmer (1985) Gregson and H. Hummler. The toxicity of beta-carotene. 36:91-100.
- James, C. (2007) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crop. ISAAA briefs No.32, pp.12. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jeong, M.H., A.S. You, J.B. Lee, J.S. Shin, J.H. Kim and J.S. Han (2004) Mutagenicity studies of the herbicide-resistance phosphinotricin acetyltransferase (PAT). *The Korean Journal of Pesticide Science.* 8:22-29.
- Kwon, T.S., J.Y. Shin, S.C. Park and K.H. Kim (2004) Acute toxicity evaluation of Oregano oil in rats. *The Korean Journal of Laboratory Animal Science.* 20:419-425.
- Lee, Y.T., J.K. Kim, S.H. Ha, H.S. Cho and S.C. Suh (2010) Analyses of nutrient composition in genetically modified  $\beta$ -catotene biofortified rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 39:105-109.
- Lee, H.S., T.H. Ryu, H.Y. Jung, S.K. Park, G.H. Park, J.K. Sohn and K.M. Kim (2010) Characteristics of agronomy to vitamin A strengthening rice at large scale GMO field. *Korean J. Breed Sci.* 42:56-60.
- Moseley, B.E. (2002) Safety assessment and public concern for genetically modified food products: the European view. *Toxicol. Pathol.*, 30:129-131.
- Mukherjee, A., K. Agarwal, M.A. Aguilar and A. Sharma (1991) Anticlastogenic activity of b-carotene against cyclophosphamide in mice in vivo. *Mutat. Res.* 263:41-46.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 1998). Guidelines for the Testing of Chemicals (Sep 21, 1998) TG No. 408 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodent. OECD Paris.

- Paine, J.A., C.A. Shipton, S. Chaggar, R.M. Howells, M.J. Kennedy, G. Vernon, S.Y. Wright, E. Hinchliffe, J.L. Adams, A.L. Silverstone and R. Drake (2005) Improving the nutritional value of golden rice through increased provitamin A content. *Nat. Biotechnol.* 23:482-487.
- Paparini, A. and V. Romano-Spica (2004) Public health issues related with the consumption of food obtained from genetically modified organism. *Biotechnol. Ann.* 10:85-122.
- Potrykus, I. (2000) Response to Golden Rice Critics, *Ag. Bio World* dated 28 June 2000, accessed through the web at <http://www.biotechknowledge.com>
- Reis, L.F., M.A. Van Sluys, R.C. Garratt, H.M. Pereira and M.M. Teixeira (2006) GMOs: building the future on the basis of past experience. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 78:667-686.
- Sautter, C., S. Poletti, P. Zhang and W. Gruissem (2006) Biofortification of essential nutritional compounds and trace elements in rice and cassava. *Proc. Nutr. Soc.* 65:153-159.
- Sweetman, S.C. (2002) Martindale, The complete Drug Reference, 33rd edition, Pharmaceutical press, London, Chicago. pp1355.
- Woo, H.J., S.H. Lim, K.J. Lee, S.Y. Won, T.S. Kim, H.S. Cho and Y.M. Jin (2006) Current development status on the genetically modified crops in Korea. *Korean J. Intl. Agri.* 18:221-229.
- Ye, X., S. Al-Babili, A. Klott, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer and I. Potrykus (2000) Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free)rice endosperm. *Science.* 5:287-303.
- 식품의약품안전청. (2009) 유전자재조합식품 담당자 전문교육. pp. 28-31. 식품의약품안전청 신소재식품과. 대한민국.

## SD 랫드에서 베타카로틴강화미의 90일 반복투여 경구독성시험

박수진 · 정미혜\* · 이시명<sup>1</sup> · 김미경 · 박경훈 · 박재음

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 생물안전성과

**요 약** 본 연구는 농촌진흥청에서 개발된 베타카로틴강화미를 Sprague-Dawley rats에 13주동안 투여하여 안전성을 입증하기 위해 수행되었다. 그 결과, 투여기간동안 모든 동물이 생존했다. 체중, 식이·음수 섭취량 및 식이섭취량에서 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 베타카로틴강화미의 투여가 독성에 기인하는 임상증상 또한 나타나지 않았다. AST, ALT, TG합량이 베타카로틴강화미 25%투여군과 베타카로틴강화미 50%투여군 암·수컷에서 다소 감소하였다. 또한, 대조군과 베타카로틴강화미 투여군에서 병리조직학적 변화를 나타내지 않았다. 따라서, 베타카로틴강화미는 일반미와 마찬가지로 안전하다고 판단된다.

**색인어** 베타카로틴강화미, GMO, 반복투여 경구독성시험