

Chick Embryo를 이용한 식품첨가물의 독성에 관한 연구

최재준·이영순*·안희열**

Eli Lilly Asia Inc. 한국지사

*서울대학교수의과대학

**충북대학교 의과대학

Studies on the Teratogenicity of Food Additives in the Developing Chick Embryo

Jai-Joon Choi, Yong-Soon Lee* and Hee-Yul Ahn**

Eli Lilly Asia Inc. Korea Branch

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University

**College of Medicine, Chung Buk National University

ABSTRACT-To evaluate possible teratogenicity of food additives such as sorbic acid and butylated hydroxy toluene, 190 hatching eggs were subjected to potential mutagenicity assay by administration of low and high doses of the materials via air sac.

The results were summarized as follows:

1. The body length and body weight were increased by dose related proportionally in the treatment groups of sorbic acid when compare to untreated controls and the increase of body length were significant in 1.0 ml/egg treatment group and 5.0 ml/egg treatment group and the increase of body weight was significant in 0.5 mg/egg treatment group.
2. BHT treatment group with the level of 2.5 ml/egg showed significant decrease in body weight, body length, fore-limb and hind-limb when compare to untreated controls and vehicle control group.
3. There were no specific malformations appeared in sorbic acid treatment groups, but hydrocephalus was noted in the treatment group of 1.0 ml/egg.
4. The frequencies of embryos with malformations in BHT treatment group were not significant, but malformation of fore-limb, hematoma and hydrocephalus were appeared.

Keyword □ Teratogenicity, Food Additives, Chick Embryo

국민 생활수준의 향상에 따라 식생활은 다양해 지고 있으며 특히 가공식품에 대한 수요는 크게 증가되어 각종 새로운 가공식품이 대량으로 생산 공급되고 있다. 또한 식품공업이 발달됨에 따라 가공식품에는 식품의 영양적 가치향상, 보존, 영양 강화, 식욕증진 등 여러 가지 목적에 의해 다양한

식품첨가물이 사용되고 있다. 따라서 국민 개개인 이 하루에 섭취하는 식품첨가물의 양은 증가추세 에 있다. 아울러 기형아의 출생률이 증가일로에 있는 경향이어서 식품 및 의약품의 복용 또는 섭취 에 의한 기형 유발 가능성에 대하여도 많은 연구가 진행 중에 있다.」 이에 따라 현재까지 안전하다고 생각되어 사용되어온 많은 식품첨가물에 대해 기 형 유발 가능성을 재평가하여 이에 대한 안정성을

Received for publication 13 November, 1989
Reprint request; Dr. Y.S. Lee at above address

확보하여 소비자들로 하여금 식품에 대한 신뢰감을 높일 필요가 있다.

기형독성을 검색하기 위한 실험모델로 계태아는 이용하기 쉽고 또한 취급이 간편한 이유로 약리학 적, 독성학적연구에 널리 쓰이며, 시험대상물질에 대한 계태아의 반응의 대부분은 다른 실험동물을 이용한 독성평가시험에 전초적인 여러 자료를 제공하기 때문에 많이 사용되고 있다. 계태아를 이용한 독성시험의 이점은 (1) 이용 및 조작이 간편하다. (2) 적은 비용으로 많은 수의 공시동물을 이용할 수 있다. (3) 광범위한 화학적, 물리적 요인에 감수성이 높다. (4) 형태학적 발육이 포유동물의 경우와 유사하다. 이런 이유로 해서 계태아는 특히 기형독성시험에 널리 이용되는데, 기형 유발 가능성이 큰 물질이나 그의 길항체를 같이 계태아 발달과정 중의 특정시기에 투여하여 형태학적, 생리학적, 생화학적 반응을 지속적으로 관찰하게 된다.^{2,3)} 계태아를 이용한 기형독성시험의 대상물질에는 농약, 의약품, 화장품, 식품첨가물 등 많은 화학물질들이 포함될 수 있는데⁴⁾ 특히 식품첨가물의 기형 유발 가능성을 평가하는 데에 유용한 까닭에 FDA에서는 10여년 전부터 GRAS (Generally Recognized As Safe)의 첨가물들을 대상으로 광범위한 기형독성시험 프로그램을 설정하여 실시하고 있다.¹⁾

본 연구의 목적은 계태아를 이용하여 현재 국내에서 식품첨가물로 그 사용이 허가되고 있으며 또한 많이 사용되고 있는 식품첨가물 중에서 다른 나

라의 연구발표에 의해 기형 유발 가능성을 지녔다고 평가되고 있는 식품첨가물을 대상으로 기형독성 유무를 시험하여 국내에서 사용되는 식품첨가물의 기형독성 유발능의 정도를 파악하여 국민보건향상에 이바지하고자 한다.

재료 및 방법

시험용 수정란—국내의 SPF 계란 생산장인 천호 SPF 계란농장으로부터 모든 수정란을 구입하였다. 수정률과 부화율이 90% 이상으로서 품종은 White Leghorn이며 대형란과 소형란을 골라낸 52~63g의 것을 사용하였다.

시험물질—과자류, 음료, 버터 가공품 등에 보존재로서 널리 사용되고 있는 Sorbic acid와 유지나 버터에 산화방지제로서 사용되고 있는 Butylated hydroxy toluene(BHT)의 2가지를 사용하였다.

시험군 설정 및 투여—실험설계와 각군의 처치내용 및 수정란의 수는 Table 1과 같다. 무처리대조군은 Sorbic acid와 BHT에 공통으로 두었으며 Sorbic acid는 propylene glycol을, BHT는 corn oil을 각각 용매로 사용하여 실험설계에 맞는 용량을 녹여 3일간 발육시킨 부화계란의 혈관 분포가 왕성히 일어날 때 기실(air sac)로 투여하였다.

Sorbic acid의 투여용량은 저용량(0.2ml/egg), 중간용량(1.0ml/egg) 그리고 고용량(5.0

Table 1. Experimental groups & each treatment.

Test Material		Sorbic Acid				Butylated Hydroxy Toluene			
Groups	Untreated control	Vehicle control	Low dose	Middle dose	High dose	Vehicle control	Low dose	Middle dose	High dose
Number of eggs	30	20	20	20	20	20	20	20	20
Treatment	untreated	propylene glycol 0.1 ml/egg	0.2 ml/egg	1.0 ml/egg	5.0 ml/egg	corn oil 0.1 ml/egg	0.1 ml/egg	0.5 ml/egg	2.5 ml/egg
Administration Time (hrs)		72				72			
Administration Route		air sac				air sac			

ml/egg)으로 나누었으며, BHT 투여용량은 저용량(0.1 ml/egg), 중간용량(0.5 ml/egg) 그리고 고용량(2.5 ml/egg)으로 나누어 각각의 용매에 녹인 다음 검란하여 기실로 투여용량이 0.1 ml 씩 되도록 조제하여 각각 투여하였다. 용매대조군은 동량의 용매를 air sac에다 투여량 0.1 ml 씩 투여하였다.

부란기의 조건—상대습도, 온도, 공기순환 등을 조절할 수 있는 것으로 난좌를 회전시키는 교반시설이 갖추어진 부란기로서, 발육조건은 37.8°C의 온도와 상대습도 61%를 유지하도록 하였다.

검란—검란은 매일 같은 시각에 행하였으며, 검란 시 발육정리란 및 사란을 수거하여 태아의 발육정도를 검사하였고, 실체현미경으로 기형발생을 검색하였다.⁵⁾ 발육이 계속된 태아는 부란 22일까지 자연부화시켰으며 부화하지 않은 태아는 폐사된 것으로 간주하여 난각을 제거시킨 후 외형검사와 골격검사를 실시하였다.

검사와 통계학적 처리—부화된 병아리는 육안적으로 외형검사를 한 후 ether로 마취시켜 체중, 체장, 전지와 후지의 길이, 부리의 길이 등을 측정하고 부검을 하여 장기검사를 하였으며⁶⁾ 각 군마다 5마리씩을 Alizarin red S와 Alcian blue로 이중염색하여 실체현미경으로 골격검사를 하였다.⁷⁾ 대조군과 실험군, 그리고 각 실험군 간의 유의성 검정은 Student's T-test로 하였다.

결 과

육안적인 외형검사—Sorbic acid와 BHT의 투여가 부화한 병아리의 체중, 체장, 전·후지길이, 발톱길이 및 부리길이에 미치는 영향은 Table 2, 3에 나타나 있다. Sorbic acid 투여실험에서 체중에 미치는 영향을 살펴보면, 용량의존적으로 약간씩의 체중증가를 보이다가 무처리대조군에 비해 Sorbic acid 고용량(5.0 ml/egg) 투여군에서 유

Table 2. Effects of sorbic acid on the body weight and body length of hatchlings (Mean±S.D.).

	Untreated Control	Vehicle Control	Low Dose	Middle Dose	High Dose
Body weight (g)	40.92 ± 2.30	41.50 ± 2.97	38.85 ± 2.33	41.47 ± 3.06	43.00 ± 3.18 ^{a)}
Body length (cm)	10.58 ± 0.25	9.82 ± 0.38	10.09 ± 0.55	10.27 ± 0.47 ^{b)}	10.33 ± 0.24 ^{a,b)}
Fore-limb length (cm)	4.26 ± 0.27	3.99 ± 0.24	4.03 ± 0.21	4.14 ± 0.37	3.72 ± 0.16
Hind-limb length (cm)	7.27 ± 0.28	7.18 ± 0.22	7.09 ± 0.26	7.29 ± 0.31	7.22 ± 0.45
Claw length (mm)	3.42 ± 0.10	3.37 ± 0.09	3.49 ± 0.11	3.44 ± 0.15	3.26 ± 0.13
Beak length (cm)	1.30 ± 0.12	1.31 ± 0.08	1.34 ± 0.10	1.31 ± 0.07	1.31 ± 0.11

a: significantly different from the untreated control group (p<0.05).

b: significantly different from the vehicle control group (p<0.05).

Table 3. Effects of butylated hydroxy toluene (BHT) on the body weight and body length of hatchlings (Mean±S.D.).

	Untreated Control	Vehicle Control	Low Dose	Middle Dose	High Dose
Body weight (g)	40.92 ± 2.30	40.37 ± 2.08	39.61 ± 1.32	41.20 ± 3.75	39.00 ± 2.20 ^{a)}
Body length (cm)	10.58 ± 0.25	9.85 ± 0.15	9.74 ± 0.32	9.78 ± 0.53	9.58 ± 0.29 ^{b,c)}
Fore-limb length (cm)	4.26 ± 0.27	3.84 ± 0.09	3.82 ± 0.24	3.80 ± 0.25	3.75 ± 0.23 ^{d)}
Hind-limb length (cm)	7.27 ± 0.28	6.83 ± 0.28 ^{a)}	6.70 ± 0.24 ^{a)}	6.82 ± 0.28 ^{a)}	6.71 ± 0.21 ^{a)}
Claw length (mm)	3.42 ± 0.10	3.39 ± 0.08	3.33 ± 0.12	3.34 ± 0.13	3.45 ± 0.12
Beak length (cm)	1.30 ± 0.12	1.29 ± 0.04	1.30 ± 0.18	1.29 ± 0.06	1.29 ± 0.11

a: significantly different from the untreated control group (p<0.05).

b: significantly different from the vehicle control group (p<0.05).

c: significantly different from the untreated control group (p<0.01).

의성 있는 증가를 보였다($p < 0.05$). 또한 체장에 대한 영향은 대조군에 비해 각각 중간용량(1.0 ml/egg)과 고용량(5.0 ml/egg) 투여군에서 유의성 있는 증가를 보이고 있다($p < 0.05$). 이로 미루어 볼 때 Sorbic acid의 기실내 투여로 Embryo의 체중과 체장이 용량의존적으로 증가하고 있음을 알 수 있다.

BHT 투여실험에서 체중, 체장, 전지 그리고 후지에 미치는 영향을 살펴보면 BHT 고용량(2.5 ml/egg) 투여군은 무처치대조군과의 비교에서 유의성 있는 감소를 보이고 있다($p < 0.05$). 한편 BHT 고용량(2.5 ml/egg) 투여군에서 체중, 체장, 전지 그리고 후지에서 무처치대조군과 용매대조군에 비해 볼 때 유의성 있는 감소를 보이고 있다(Table 3). BHT의 고용량 투여가 계태아의 여러 측정항목에서 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 특히 후지의 길이는 용매대조군을 포함한 BHT 투여 전 실험군에서 무처치대조군과 비교해

볼 때 유의성 있는 감소를 보였다($p < 0.05$).

폐사율과 기형발생 정도—각 군의 폐사율과 기형발생수 및 종류는 Table 4, 5와 같다. Sorbic acid와 BHT를 투여한 계태아의 폐사율은 용량의존성으로 증가되었으나, 기형발생률은 무처치대조군과 용매대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보이지 않았다.

기형발생 양상은 특기할만한 사항이 없이 전신적 수종이 전 실험군에서 보이는 등 서로 비슷한 경향을 보였다. 주로 관찰되는 기형은 Sorbic acid 중간용량 투여군에서 수두(hydrocephalus)를 가지고 있는 개체를 볼 수 있었다. BHT 실험군에서는 전지이상, 혈종 그리고 수두 등의 병변을 관찰할 수 있었다. 전지 이상은 고용량 투여군에서 발육 16일에 폐사한 개체에서 발견되었는데 우측전지가 정상의 좌측전지 보다 짧았으며, 끝부분이 몽톡하게 나타나 형성부전된 모습을 하고 있었다. 혈종과 수두의 병변을 가진 개체가 BHT

Table 4. Experimental data demonstrating mortality rates and frequencies of embryos with malformations following treatment of sorbic acid (%).

	Untreated Control	Vehicle Control	Low Dose	Middle Dose	High Dose
Total No. of embryos	30	20	20	20	20
No. of dead embryos	3 (10.0)	2 (10.0)	2 (10.0)	4 (20.0)	5 (25.0)
*No. E. with fore-limb malformation
No. E. with wryneck and extremity
No. E. with hind-limb malformation
No. E. with beak malformation
No. E. with eye defect
No. E. with generalized edema	1 (3.3)	1 (5.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	2 (10.0)
No. E. with hematoma
No. E. with hygroma of the neck
No. E. with brain malformation	.	.	.	2 (10.0)	.
No. E. affected	1 (3.3)	1 (5.0)	1 (5.0)	2 (10.0)	1 (10.0)
No. E. affected including death	3 (10.0)	2 (10.0)	3 (15.0)	4 (20.0)	6 (30.0)

*: Number of embryos

Table 5. Experimental data demonstrating mortality rates and frequencies of embryos with malformations following treatment of butylated hydroxy toluene (%).

	Untreated Control	Vehicle Control	Low Dose	Middle Dose	High Dose
Total No. of embryos	30	20	20	20	20
No. of dead embryos	3 (10.0)	5 (20.0)	6 (30.0)	9 (45.0)	13 (65.0)
*No. E. with fore-limb malformation	1 (5.0)
No. E. with wryneck and extremity
No. E. with hind-limb malformation	.	.	.	1 (5.0)	.
No. E. with beak malformation
No. E. with eye defect	.	.	1 (5.0)	.	.
No. E. with generalized edema	1 (3.3)	2 (10.0)	1 (5.0)	2 (10.0)	1 (5.0)
No. E. with hematoma	.	.	1 (5.0)	1 (5.0)	2 (10.0)
No. E. with hygroma of the neck
No. E. with brain malformation	.	.	1 (5.0)	.	2 (10.0)
No. E. affected	1 (3.3)	2 (10.0)	4 (20.0)	3 (15.0)	5 (25.0)
No. E. affected including death	3 (10.0)	6 (30.0)	9 (45.0)	8 (40.0)	13 (65.0)

*: Number of embryos

중간용량 투여군에서 발견되었으나, 용매대조군과 무처리대조군과의 통계적 유의차는 인정되지 않았다. Sorbic acid와 BHT 전 실험군에서 공통적으로 발견할 수 있었던 병변은 전신적 수종이었다. 전신적 수종을 보인 총 13마리 중 77%에 해당하는 10마리가 부란 17일 이전에 폐사하였고 나머지 3마리는 부검일까지 살아있었으나 부화하지 못하고 폐사직전의 쇠약한 상태였다. 전신적 수종을 보인 개체 중 54%에 해당하는 6마리가 전신적 충혈을 동반한 상태로 부란 13일 이전에 이러한 개체들은 모두 폐사하였다. 이외에 부검시 약물투여의 영향으로 보여지는 쇠약, 위축, 탈수상태의 개체들은 비교적 BHT 실험군에서 용량의존적으로 많이 나타났으나, 외형검사에서 기형 및 이상

은 발견되지 않았다. 한편 각군마다 외형검사를 마친 후 이상이 의심되는 개체를 포함하여 5마리씩 선별하여 Alizarin red S와 Alcian blue로 이중염색하여 실체현미경으로 골격검사를 수행하였던 바 모두 정상이었다.

고 찰

서론에서 설명하였듯이 계태아 법은 한꺼번에 대량의 계란으로 많은 실험을 할 수 있는 장점이 있다. 그러나 계태아를 이용한 시험결과는 다른 동물에서 보다 다소 차이가 있다는 단점이 있다. 투여시간과 경로, 발육의 정도, 실험자의 기술, 관찰능력, 분석의 방법에 따라 차이를 나타낼 수

있으며, 또 계란의 영양상태, 시험물질의 특성과 형태, 분포와 대사특성 등에 의한 다소의 차이가 발생할 수 있으므로 이러한 사항들을 고려하여 알맞는 실험방법을 선택해야 할 것이며, 그에 따르는 충분한 기술의 습득이 요망된다.

본 실험에서는 우리나라에서 유일하게 SPF (Specific Pathogen Free) egg를 생산하는 천호농장으로부터 종란을 구입하였는데, 이곳은 수정율과 부화율이 90% 이상으로 되었으며, 이밖에도 transovarian transmission 할 수 있는 바이러스나 기타 세균들도 없는 상태이기 때문에 비교적 잠복해 있어서 실험에 영향을 주는 요인은 없다고 보아야 한다. 이밖에도 온도, 습도 등의 실험에 직접적인 영향을 미치는 인자들도 일단은 콘트

롤하였다. 이와 같은 상태에서 Sorbic acid 투여 계태아에서는 체중이나 체장이 오히려 증가하는 경향이였으며, 전·후지길이 및 발톱이나 부리의 길이에 유의성 있는 변화가 별로 없었다. 그러나 용량의존적으로 계태아의 폐사가 증가되는 경향을 나타내었다. 이 시험의 목적인 기형발생에는 대조군에 비하여 유의성이 없었다.

BHT 투여 계태아에서는 체중이 대조군에 비하여 감소되었으며 고농도 투여군에서는 체장과 전지의 길이도 짧아졌다. 한편 용량의존적으로 계태아 사망율이 증가되었으며 전지의 기형과 후지의 기형이 고농도 투여군과 중간농도 투여군에서 관찰되었다. 그러나 이것은 대조군에 비하여 유의성 있는 차이는 아니었다.

국문요약

1. Sorbic acid 투여군은 무처치대조군에 비하여 embryo의 체장과 체중이 용량의존적으로 증가를 나타내었는데 체장에 있어서는 1.0ml/egg 및 5.0ml/egg 투여군이, 체중에 있어서는 0.5ml/egg 투여군에서 유의성이 있었다.
2. 2.5ml/egg 수준으로 BHT를 투여한 실험군은 무처치대조군 및 용매대조군에 비하여 체중, 체장, 전지 및 후지에 있어서 유의성 있는 감소를 나타내었다.
3. Sorbic acid 투여군의 기형발생은 뚜렷한 것은 나타나지 않았으나 1.0ml/egg 투여군에서는 hydrocephalus를 가지고 있는 embryo를 볼 수 있었다.
4. BHT 투여군의 기형발생률은 무처치대조군에 비하여 유의성은 없었으나 전지이상, 혈종 및 hydrocephalus가 나타났다.

참고문헌

1. Verrett, M.J., et al., Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **56**, 265-273 (1980).
2. Hoffman, D.J., Embryotoxic effects of crude oil in mallard ducks and chicks *toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 183 (1978).
3. McLaughlin, J., et al., The injection of chemicals into yolk sac of fertile eggs prior to incubation as a toxicity test. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 230-241 (1963).
4. Gebhardt, D.O.E., The teratogenic action of propylene glycol (propanediol-1,2) and propanediol-1,3 in the chick embryo. *Teratol.*, **1**, 153-161 (1968).
5. Romanoff, A.L. and Bauernfeind, J.C., Influence of Riboflavin-def in eggs on embryonic development (Gallus Domesticus). *Anat. Res.*, **82**, 11 (1942).
6. Faherty, J.F., et al., Surface staining of 1 ml (Wilson) slices of fetuses for internal visceral examination. *Stain Technol.*, **47**, 53-58 (1972).
7. Simons, E.V. and Vanhorn, J.R. A New procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure on potassium hydroxide. *Acta Morphol. Neerl.-scand.* **8**, 281-292 (1971).