한국가축위생학회지 제34권 제1호 (2011)
Korean J Vet Serv 34(1) : 75~79 (2011)

멜라민과 cyanuric acid의 농도별 혼합투여에 따른 메기(*Silurus asotus*) 신장에서의 조직병리학적 소견

한세희 · 허강준*

충북대학교 수의과대학

(접수 2011. 1. 15, 게재승인 2011. 3. 26)

Renal effect of experimental feeding of melamine and cyanuric acid in different concentrations on Japanese catfish (*Silurus asotus*)

Se-Hee Han, Gang-Joon Heo*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received 15 January 2011, accepted in revised from 26 March 2011)

Abstract

The recent outbreak of renal failure in infants in China and in animals in USA and Europe has been determined to be caused by melamine adulterated in the food. In the course of the investigation, cyanuric acid was identified in addition to melamine in the offending food. Fish feeds were also recently found to be contaminated with melamine. The purpose of this study was to characterize the histopathological effect and toxicity potential of different concentrations of melamine and cyanuric acid in the kidney of Japanese catfish (*Silurus asotus*). The fish were administered melamine and cyanuric acid in combination at the concentrations of 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/kg/day for 3 days by single oral administration dissolved in carboxymethyl cellulose. The results showed that renal crystals were observed in renal tubules and collecting ducts at the concentration over 25 mg/kg dose group and the number of crystals in kidney were in proportion to the concentrations of melamine and cyanuric acid.

Key words : Melamine, Cyanuric acid, Renal crystal, Japanese catfish

서 론

멜라민은 66%의 질소로 구성된 질소 유기 화합물로 플라스틱 용기, 세제, 접착제, 색소나 코팅 재질을 만드는 합성수지의 원료로 사용되며(Lipschitz와 Stokey, 1945; Weil과 Choudhary, 1995), 높은 질소 함량 때문에 최근까지 유제품 및 동물 사료 등의 단백질 함량을 인위적으로 높이기 위해 첨가되어 세계적으로 많은 문제를 일으켰다(Hauck와 Stephenson, 1964). 최근 미국과 유럽, 아시아에서 멜라민과 멜라민의 유도체인 cyanuric acid에 오염된 사료를 섭취한 동물에서 급성신부전이 발생하였고(Brown 등, 2007; Puschner 등, 2007), 중국에서는 멜라민과 cyanuric acid에 오염된 분유를 먹은 어린이들에게서 신장결석과 요로결석이 발생하였으며, 심한 경우 신장 질환으로 사망하였다. 이어 우리나라에서도 중국산 유제품을 원료로 한 식료품에서 멜라민이 검출되는 등 멜라민 파동이 일어나, 식품의 안전성에 대한 경각심

*Corresponding author: Gang-Joon Heo, Tel. +82-43-261-2617, Fax. +82-43-267-3150, E-mail. gjheo@cbu.ac.kr

을 불러일으킨 바 있다(Chen, 2009; 강, 2009; Wu 등, 2009).

동물이 섭취한 멜라민은 대사되지 않고 대부분이 24시간 내에 빠르게 소변으로 배설되며(Lipschitz와 Stokey, 1945), 멜라민과 cyanuric acid에 함께 노출되는 경우에는 옅은 농도에서도 신장에서 황갈색 결정을 형성한다(Cianciolo 등, 2008; Dobson 등, 2008; Hodge 등, 1965). 멜라민과 cyanuric acid를 돼지에 실험적으로 혼합 투여한 경우, 신장 표면에서 부종, 피질에서 반점과 혈변이 관찰되었으며, 고양이에서는 세뇨관 확장과 세뇨관 내의 결정 침착, 식욕부진, 구토, 졸음증, 다뇨, 다음 등의 임상증상이 나타났다(Puschner 등, 2007; Reimschuessel 등, 2008). 또한 랫드에서는 멜라민과 cyanuric acid를 400 mg/kg의 농도로 투여하면 신장의 무게 증가, 종창, 출혈, 집합관 내의 결정 침착, 신장 간질의 염증, 원위세뇨관의 확장과 출혈이 관찰되었고, 혈중요소질소(blood urea nitrogen, BUN)과 creatinine 수치가 증가하였다(Xie 등, 2010).

한편 어류에서는 찬넬메기(*Ictalurus punctatus*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 및 대서양연어(*Salmo sala*)에서 멜라민과 cyanuric acid를 멜라민과 cyanuric acid를 400 mg/kg의 농도로 혼합 투여한 경우, 신장의 세뇨관에 길게 배열된 황갈색 결정들이 관찰되었으며, 이로 인해 세뇨관의 폐색과 확장이 일어났다(Reimschuessel 등, 2008).

현재 반려동물의 사료뿐만 아니라 어류의 양식용 사료에서도 멜라민 오염이 알려져 있는데, 최근 우리나라에서도 멜라민이 첨가된 사료를 먹은 메기(*Silurus asotus*)가 대량 유통되어 문제가 되었는데, 이러한 사료를 섭취한 물고기는 근육을 비롯한 식용조직에는 멜라민이 잔류하며, 사람이 이러한 물고기를 섭취하게 되면 멜라민이 체내에 축적되어 문제를 일으킬 수 있기 때문에 식용으로 사용되는 어류에 대한 멜라민의 독성에 관한 연구가 시급하다(Reimschuessel 등, 2009). 그러나 대부분의 멜라민 독성 관련 연구는 포유류에 집중되어 있고, 어류를 대상으로 한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 실험에서는 우리나라의 하천에 널리 분포하며 중요한 양식 어종 중의 하나인 메기(*Silurus asotus*)를 사용하여(이 등, 2008) 멜라민과 cyanuric acid의 단계별 농도에 따른 혼합 투여가 메기(*Silurus asotus*)의 신장에 미치는 독성을 조직병리학적으로 평가하여, 어류에서 사료에 멜라민 첨가 시 안전 용량을 알고자 하였다.

재료 및 방법

공시약제

공시약제로는 melamine (1,3,5-triazine-2,4,6-triamine, $C_3H_6N_6$) (Sigma, MO, USA)과 cyanuric acid (1,3,5- triazine-2,4,6-triol, $C_3H_3N_3O_3$) (Sigma, MO, USA)를 사용하였다.

공시어종 및 실험수조

2009년도에 부화한 메기(*Silurus asotus*)의 수컷 성어(평균 전체장 : 35.0 ± 2.5 cm, 평균체중 : 250.0 ± 50.25 g) 56마리를 충북 진천의 관상어 양식조합에서 분양받아 수조 내에서 일주일간 적응시켰다. 또한, 적응기간 동안 사료는 담수어용 사료(EP 6호; 대한사료, 대한민국)를 1일 1회 투여하였고, 시험을 시작하기 24시간 전부터 절식시켜서 사용하였다. 모든 물고기는 공기주입장치와 순환여과장치, 온도조절기, 그리고 형광등이 설치된 120리터의 유리수조에서 사육하였으며, 수조의 수온은 24.2 ± 1.5°C로 유지하였다.

약제투여

총 56마리 공시어를 7개의 유리수조에 8마리씩 넣어, 무처치군(blank group)과 대조군(control group), 그리고 5군의 실험군(experimental group)으로 나누어 실험하였다. 약제의 투여는 모든 군의 물고기를 benzocaine ($C_9H_{11}NO_2$, FW 165.19, mp 88°C; Sigma, MO, USA)으로 3분간 마취시킨 후, 구강투여 존대를 이용하여 실험군의 물고기에 각각 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/kg의 농도의 melamine과 cyanuric acid를 1% carboxymethyl cellulose(CH_2CO_2H) (Sigma, MO, USA)에 녹인 제제를 매일 1회 3일간 투여하였고, 대조군의 물고기는 1% carboxymethyl cellulose만을 투여하였다. 투여를 마친 물고기는 회복수조에서 마취에서 깨어나게 한 후 원래의 수조로 이동하여 사육하였다.

병리조직학적 관찰

실험 종료 후 모든 공시어는 부검하고 신장 조직을 적출하여 10% 중성 완충 포르말린 용액에 24시간 동안 고정한 후 통상적인 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였다. 4~5 μm의 파라핀 조직절편을 제작하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

각 공시어마다 5장의 신장 조직 절편을 만들어 광학현미경을 이용하여 200배의 배율로 절편마다 5군데를 관찰한 결과, 25 mg/kg 실험군에서는 평균 1.0개, 50 mg/kg 실험군에서는 평균 3.2개, 100 mg/kg 실험군에서는 평균 6.0개, 200 mg/kg 실험군에서는 평균 9.6개의 황갈색의 구형 또는 타원형의 결정이 세뇨관과 집합관 내에서 관찰되었다(Fig. 1). 한편, 무처치군, 대조군, 12.5 mg/kg 실험군에서는 이러한 결정들이 관찰되지 않았다(Table 1).

광학현미경을 이용하여 조직 절편을 400배의 배율로 관찰한 결과 25, 50, 100 및 200 mg/kg 실험군에서는 원위세뇨관과 집합관 내에서 몇 개씩 덩어리진 황갈색의 구형 또는 타원형의 결정이 관찰되었으며, 이 결정들에 의해 집합관과 원위세뇨관의 관강이 심하게 확장되고, 사구체의 확장도 관찰되었다. 그리고

Table 1. Average number of crystals were detected by microscopic examination of histologic preparations of kidney sections

Experimental group (mg/kg)	Average number of crystals
Blank	0
Control	0
12.5	0
25	1.0 ± 0.2
50	3.2 ± 1.3
100	6.0 ± 2.5
200	9.6 ± 2.8

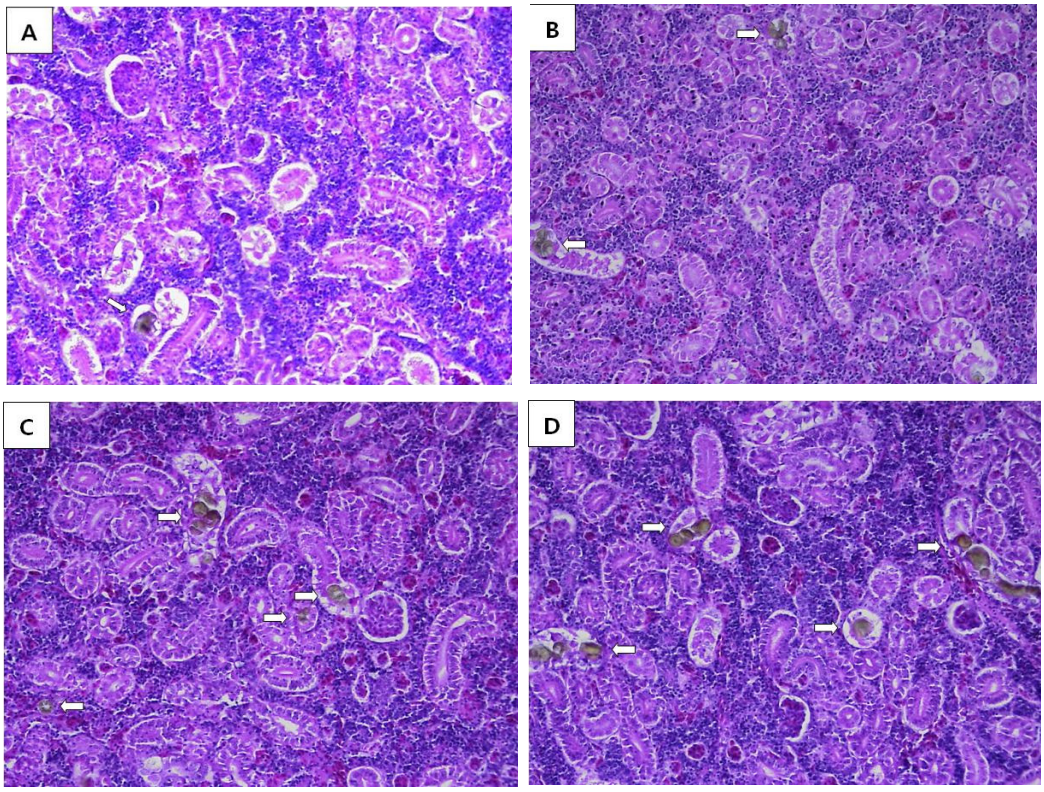

Fig. 1. Histopathological findings of kidneys from catfish in experimental group. The typical renal crystals (arrows) are observed in renal tubules and collecting ducts at 25 mg/kg dose group (A), 50 mg/kg dose group (B), 100 mg/kg dose group (C), and 200 mg/kg dose group (D). The number of crystals in kidney were in proportion to the concentrations of melamine and cyanuric acid. H&E stain, ×200.

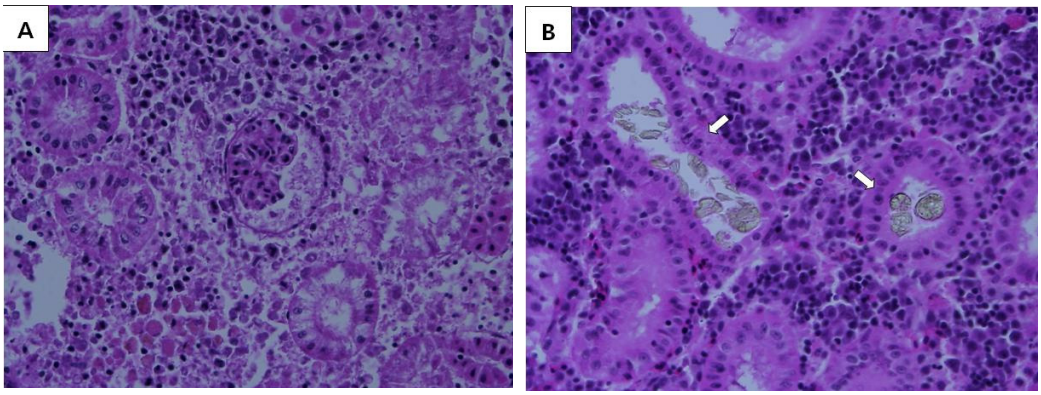

Fig. 2. Photomicrographs of histologic preparations of kidneys from catfish. Glomerula distention is observed in 100 mg/kg melamine and 100 mg/kg cyanuric acid dose group (A). Dilated tubules and collecting duct contain many fragmented or globular gold-brown crystals(arrows) in 200 mg/kg melamine and 200 mg/kg cyanuric acid dose group (B). H&E stain, ×400.

관강 내의 기저막과 편평상피세포의 변형과 결정을 갖는 관강 내에 다수의 호중구 침윤 및 사구체의 확장성 변형이 확인되었다(data not shown). 특히 100 mg/kg 실험군과 200 mg/kg 실험군에서 이러한 소견이 뚜렷하게 나타났다(Fig. 2). 한편, 무처치군, 대조군, 12.5 mg/kg 실험군에서는 특이적인 조직병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

고 찰

멜라민과 cyanuric acid는 수소결합하여 결정의 형태로 섭취되어 위 내에서 낮은 pH의 환경에서 해리된다(Xu 등, 2007). 멜라민은 pKa가 5이고 cyanuric acid는 pKa가 6.9로 두 물질 사이 pKa는 서로 달라서 멜라민은 대부분 위에서 흡수되고, cyanuric acid는 소장에서 흡수된다. 멜라민과 cyanuric acid는 신장을 통과하고 세뇨관에서는 불용성의 결정이 침착된다. 신장에 생긴 결정 때문에 신장 내 압력이 증가되고, 신장의 혈류량은 감소하여 사구체의 여과율도 감소한다. 이 때문에 신장의 손상이 나타나게 된다(Ejaz 등, 2007).

125 mg/kg 이상의 농도의 멜라민과 멜라민 유도체 때문에 나트륨의 배설이 증가하여 신전성 질소혈증(prerenal azotemia)이 발생하여. 임상병리학적으로 혈중 BUN과 creatinine 수치가 증가한다(Lipschitz와 Stokey, 1945). 이와 같이 동물의 신장 조직을 손상시키는 것으로 알려진 멜라민과 cyanuric acid는 냉혈동물인 어류에서는 포유류보다 화학물질의 흡수와 배설 속도가 느리며 반감기도 더 길어서 어류가 멜라민에 오염된 사료를 섭취하게 되면 멜라민이 어류의 조직에 오래 남게 되어 인간에게 미치는 영향이 크다(Reimschuessel 등, 2009; Reimschuessel 등, 2005).

본 실험에서 멜라민과 cyanuric acid를 각각 12.5, 25, 50, 100 및 200 mg/kg의 농도로 매일 3일간 1회씩 메기에게 경구 투여하였을 때, 농도가 증가할수록 신장의 세뇨관과 집합관내에서 관찰되는 결정의 수가 비례적으로 증가하였고, 특히 25, 50, 100 및 200 mg/kg 실험군에서는 이 결정들에 의한 세뇨관과 집합관, 사구체의 확장과 관강 내의 기저막과 편평상피세포의 변형과 같은 조직병리학적 병변이 관찰되었다. 또한, 결정을 갖는 관강 내에 다수의 호중구 침윤 및 사구체의 확장성 변형이 확인되었다. 이러한 결과들은 개와 고양이가 멜라민에 오염된 사료를 섭취했을 때의 신장의 병변과 유사하였다(Brown 등, 2007; Reimschuessel 등, 2008). 이상에서 멜라민과 cyanuric acid를 짙은 농도로 투여할수록 메기의 신장에 더 많은 독성 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

결 론

이상의 결과들을 요약하면 1일 1회씩 3일 동안 멜라민과 cyanuric acid를 25 mg/kg 이상의 농도로 1 : 1 비율로 혼합 투여하면 농도가 짙어질수록 형성되는 결정의 수가 증가하고, 특히 고농도 투여군에서는 세뇨관과 집합관 및 사구체의 확장이 관찰되는 것으로 보아 멜라민과 cyanuric acid을 25 mg/kg 이상의 농도

로 투여 시 어류의 신장 손상을 유발할 위험이 크다고 사료된다. 따라서 앞으로 어종과 농도, 그리고 투여 기간에 따라 다양한 연구가 수행된다면 멜라민과 cyanuric acid가 어류에 미치는 영향에 대하여 더 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

강희경. 2009. Mini-review: 멜라닌에 의한 신요로계 결석. 대한소아신장학회지 13(1): 21-25.

이정열, 허준욱, 김선규. 2008. 기아에 따른 양식 메기, Silurus asotus의 성장 및 생리적 반응. 한국어류학회지 20(2): 81-89.

Brown CA, Jeong KS, Poppenga RH, Puschner B, Miller DM, Ellis AE, Kang KI, Sum S, Cistola AM, Brown SA. 2007. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. J Vet Diagn Invest 19(5): 525-531.

Chen JS. 2009. A worldwide food safety concern in 2008-melamine-contaminated infant formula in China caused urinary tract stone in 290,000 children in China. Chin Med J 122(3): 243-244.

Cianciolo RE, Bischoff K, Ebel JG, Van Winkle TJ, Goldstein RE, Serfilippi LM. 2008. Clinicopathologic, histologic, and toxicologic findings in 70 cats inadverrtently exposed to pet food contaminated with melamine and cyanuric acid. J Am Vet Med Assoc 233(5): 729-737.

Dobson RL, Motlagh S, Quijano M, Cambron RT, Baker TR, Pullen AM, Regg BT, Bigalow-Kern AS, Vennard T, Fix A, Reimschuessel R, Overmann G, Shan Y, Daston GP. 2008. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. Toxicol Sci 106(1): 251-262.

Ejaz AA, Mu W, Kang DH, Roncal C, Sautin YY, Henderson G, Tabah-Fisch I, Keller B, Beaver TM, Nakagawa T, Johnson RJ. 2007. Could uric acid have a role in acute renal failure? Clin J Am Soc Nephrol 2(1): 16-21.

Hauck RD, Stephenson HF. 1964. Fertilizer nitrogen source, nitrification of triazine nitrogen. J Agric Food Chem 12(2): 147-151.

Hodge HC, Panner BJ, Downs WL, Maynard EA. 1965. Toxicity of sodium cyanurate. Toxicol Appl Pharmacol 7(5): 667-674.

Lipschitz WL, Stokey E. 1945. The mode of action of three new diuretics: melamine, adenine and formoguanamine. J Pharmacol Exp Ther 83(3): 235-249.

Puschner B, Poppenga RH, Lownsteirn LJ, Filigenzi MS, Pesavento PA. 2007. Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats. J Vet Diagn Invest 19(6): 616-624.

Reimschuessel R, Evans E, Andersen WC, Turnipseed SB, Karbiwnyk CM, Mayer TD, Nochetto C, Rummel NG, Gieseker CM. 2009. Residue depletion of melamine and cyanuric acid in catfish and rainbow trout following oral administration. J Vet Pharmacol Ther 33(2): 172-182.

Reimschuessel R, Gieseker CM, Miller RA, Ward J, Boehmer J, Rummel N, Heller DN, Nochetto C, de Alwis GK, Bataller N, Andersen WC, Turnipseed SB, Karbiwnyk CM, Satzger RD, Crowe JB, Wilber NR, Reinhard MK, Roberts JF, Witkowski MR. 2008. Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fish and pigs. Am J Vet Res 69(9): 1217-1228.

Reimschuessel R, Stewart L, Squibb E, Hirokawa K, Brady T, Brooks D, Shaikh B, Hodsdon C. 2005. Fish drug analysis-Phishpharm: A searchable database of pharmacokinetics data in fish. AAPS J 7(2): E288-327.

Weil ED, Choudhary V. 1995. Flame-retarding plastics and elastomers with melamine. J Fire Sci 13(2): 104-126.

Wu YN, Zhao YF, Li JG, Melamine Analysis Group. 2009. A survey on occurrence of melamine and its analogues in tainted infant formula in China. Biomed Environ Sci 22(2): 95-99.

Xie G, Zheng X, Qi X, Cao Y, Chi Y, Su M, Ni Y, Qiu Y, Liu Y, Li H, Zhao A, Jia W. 2010. Metabonomic evaluation of melamine-induced acute renal toxicity in rats. J Proteome Res 9(1): 125-133.

Xu W, Dong M, Gersen H, Rauls E, Vazquez-Campos S, Crego-Calama M, Reinhoudt DN, Stensgaard I, Laegsgaard E, Linderoth TR, Besenbacher F. 2007. Cyanuric acid and melamine on Au(111): Structure and energetics of hydrogen bonded networks. Small 5: 854-858.