

랫트에서 한국형유산균인 *Bifidobacterium breve* K-110, K-111 및 *B. infantis* K-525 균주제제의 경구투여 급성독성

이영경 · 한명주 · 최응칠¹ · 김동현^{2*}

경희대학교 식품영양학과, ¹서울대학교 약학대학, ²경희대학교 약학대학

Acute Oral Toxicity of *Bifidobacterium breve* K-110, K-111 and *B. infantis* K-525 Isolated from Korean Intestine in Rats

Young-Kyoung RHEE, Myung Joo HAN, Eung-Chil CHOI¹ and Dong-Hyun KIM^{2*}

Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University,
Hoegi-dong, Dongdaemun-ku, Seoul 130-701, Korea

¹College of Pharmacy, Seoul National University, 56-1, Shillim-dong,
Kwanak-ku, Seoul, 151-742 Korea

²College of Pharmacy, Kyung Hee University, 1, Hoegi-dong,
Dongdaemun-ku, Seoul, 130-701, Korea

(Received August 2, 1998; accepted October 2, 1998)

Abstract – Acute oral toxicity of *Bifidobacterium breve* K-110, *Bifidobacterium breve* K-111, *Bifidobacterium infantis* K-525 were studied in Sprague-Dawley rats of both sexes. In this study, we examined number of deaths, clinical signs, body weight and gross findings for 14 days after single oral administration of *B. breve* K-110, *B. breve* K-111 or *B. infantis* K-525 with different levels. They did not show any toxic effect in rats and oral LD₅₀ value was over 5 g/kg in rats.

Keywords □ acute toxicity, LD₅₀ values, *Bifidobacterium spp.*

최근 건강에 대한 관심이 많아지면서 유산균약품 및 유산균제제에 대한 인식이 높아지고 있을 뿐만 아니라 시장이 급격하게 커지고 있다. 유산균제제는 첫째 장내유해균의 성장을 억제하고, 둘째 변비를 개선하고, 셋째 유당불내증을 개선하고, 넷째 항암활성을 나타내고, 다섯째 비타민 등을 합성하는 활성을 갖고 있다(Huges and Hoover, 1990; Ishibashi and Shimamura, 1993; Salminen *et al.*, 1974; Tomoko *et al.*, 1996). 그러나 이러한 것은 대부분 일본과 캐나다 등을 중심으로 연구된 결과이며 아직 한국인의 장내에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없다. 또한 한국인에게 가장 이상적인 유산균제제는 건강한 한국인의 장내로부터 분리하는 것이 바람직하며 이러한 유산균이 한국인의 장내에서 효율적인 생리활성을 발휘할 것으로 생각되어오고 있다. 그래서 저자 등은 건강한 한국인으로부터 장내환경을 개선할 수 있으면서 장내세균이 생산하는 유해효소의 생산성을

억제하고 소아의 바이러스성 설사를 예방할 수 있으면서 항설사 및 변비치료가 있고 면역증강효과(IgA의 생산성이 우수하고 복수암모델동물에 대한 항암효과)가 우수한 한국형유산균을 분리하였다(Kim *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1998).

본 연구에서는 저자 등이 한국사람의 장내세균총으로부터 분리한 유산균에 대한 안전성평가의 일환으로 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하여 급성독성시험을 실시하였다.

실험방법

시험계와 사육환경

시험시설역은 경희대학교 약학대학의 청정시험동물시설 (environmental safety cabinet, Myung-Jin Model)에서 실시하였으며 청정구역에서 생산된 SPF Sprague-Dawley계 흰쥐를 식품의약품안전청 독성연구소에서 분양받아 온도 22±0.5℃, 습도 55±5%, 배기 10~20회/h, 조도 300~500 Lux의 형광등을 12시간 간격으로 명암을 조절하는 사육환경에서 1주일 이

* To whom correspondence should be addressed.

상 순화시킨후 증상을 관찰하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사)를 자유로이 공급하였으며, 음수는 멸균 상수도수를 섭취시켰다.

군분리와 투여용량의 설정

순화기간중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위로 군을 분리하였다. 동물의 개체식별을 위해 사육상자별로 표시하여 실험하였다. 유산균은 랫트 Kg당 투여 가능한 최대용량인 습중량 5 g을 2% tween 80용제에 현탁한 것을 최고 농도로하여 공비×0.66으로 3.3, 2.2, 1.5, 1.0 g/kg의 모두 5개의 투여용량군으로 설정하였다.

시험물질의 조제와 투여

저자 등이 이미 보고한 한국사람의 장내세균총으로부터 분리한 한국형유산균인 *Bifidobacterium breve* K-110, K-111 및 *Bifidobacterium infantis* K-525를 TS배지(환원제첨가)에

서 배양한 후 집균하고 3회 생리식염수로 세척한 신선한 균체를 시험에 사용하였다(Park et al., 1998). 시험물질의 조제는 2% tween 80용제에 균일하게 현탁되도록 시험당일에 제조하여 사용하였으며, 투여는 랫트용 존데를 사용하여 경구 투여하였다. 투여용량은 투여직전 체중당 변화에 따라 산출하였다. 대조군에는 2% tween 80 용제만을 투여하였다.

관찰 및 검사항목

증상관찰

모든 시험동물에 대하여 투여일에는 투여후 6시간동안 매 시간마다, 투여익일부터는 1일 1회 14일간 동물의 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망발현 유무를 관찰하였다(식품의약품청, 1998).

체중측정

체중은 시험물질투여직전, 투여후 4, 8, 12, 14일에 측정하였다.

Table I. Mortality of rats orally treated with each *Bifidobacterium* spp.

Sex	Dose (g/kg)	Days after treatment					Final mortality	
		0	4	8	12	14		
Male	Control	0/5 ^a	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	K-110	5.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		3.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		2.2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	K-111	5.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		3.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		2.2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	K-525	5.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		3.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		2.2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1.0		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Female	Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	K-110	5.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		3.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		2.2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	K-111	5.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		3.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		2.2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	K-525	5.0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		3.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		2.2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		1.5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1.0		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

^aValues are expressed as dead number/total number of animals.

부검

시험종료후 ether로 마취시키고 부검하여 외관 및 내부장기의 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

LD₅₀치의 측정

LD₅₀치 및 95% 신뢰한계는 14일간의 누적사망율로부터 Litchfield와 Wilcoxon법에 따라 산출하였다.

통계학적 분석

모든 실험에 관한 유의성 검정은 one way analysis of variance(ANOVA)에 의한 다중분산비교법인 Dunnett's test에 의해 실시하였다.

실험결과

사망에 및 임상증상

각각의 한국형유산균인 *B. breve* K-110, K-111, *B. infantis* K-525 균체를 최저농도 투여군에서부터 최고농도(5 g/kg) 투여군까지 모든 실험군과 대조군에서 14일간 관찰시 사망에는 없었다(Table I). 또한 시험군체 투여군에서 대조군에 비해 특이적으로 관찰된 일반증상의 변화는 없었다(Table II).

체중측정결과

모든 K-110, K-111, K-525 한국형 유산균체의 최저농도에서부터 최고농도(5 g/kg)까지의 모든 투여군의 수컷, 암컷에서 대조군에 비해 체중의 변화에 유의한 차이는 없었다(Table III).

육안적 해부소견

한국형유산균을 투여한 수컷과 암컷의 장기에서 이상유무를 관찰한 결과 장기의 이상소견은 관찰되지 않았다

Table II. Clinical signs in rats orally treated with each *Bifidobacterium* spp.

Sex	Dose (g/kg)	Hours after treatment						Days after treatment				
		1	2	3	4	5	6	4	8	12	14	
Male	Control	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	K-110	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	K-111	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	K-525	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Female	Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	K-110	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	K-111	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	K-525	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

^aNo abnormality detected.

Table III. Body weight of rats orally treated with each *Bifidobacterium spp.**

Sex	Dose (g/kg)	Days after treatment						
		0	4	8	12	14		
Male	Control	128±2.74	171±8.22	206±8.22	248±5.74	264±5.48		
	K-110	5.0	131±2.24	165±7.91	204±4.18	247±5.70	262±5.00	
		3.3	129±4.36	168±7.00	203±7.00	245±8.54	261±9.00	
		2.2	131±2.08	171±4.16	204±5.29	246±7.00	263±10.58	
		1.5	128±3.11	170±6.32	207±4.73	249±5.48	264±6.13	
		1.0	127±4.32	172±5.11	208±6.65	250±7.36	265±7.26	
	K-111	5.0	129±4.18	169±4.18	203±10.37	239±8.22	253±8.74	
		3.3	132±6.80	166±9.29	204±7.81	246±11.85	266±13.05	
		2.2	131±3.21	167±6.03	203±8.74	250±8.96	264±14.57	
		1.5	129±3.73	169±6.27	205±4.42	247±5.28	263±6.42	
		1.0	130±4.16	173±4.45	204±6.24	246±7.41	262±7.16	
	K-525	5.0	125±3.54	162±8.37	196±9.12	237±9.62	248±9.61	
		3.3	125±5.57	168±6.51	201±4.16	246±6.56	259±6.43	
		2.2	125±3.61	169±4.04	202±3.06	247±5.57	260±7.37	
		1.5	127±3.77	171±6.25	207±4.55	248±5.11	265±6.48	
		1.0	129±4.16	172±4.71	205±6.63	249±7.23	263±5.32	
	Female	Control	118±2.74	141±6.52	153±4.47	181±5.48	192±4.80	
		K-110	5.0	119±5.48	146±8.22	153±7.58	177±13.01	188±8.57
			3.3	117±5.86	138±4.58	153±5.86	178±6.66	186±8.72
2.2			116±3.79	140±5.96	155±10.02	173±10.15	189±10.02	
1.5			119±4.12	142±7.54	152±5.14	180±7.41	191±5.21	
1.0			119±3.38	143±6.77	151±6.32	179±8.32	190±6.36	
K-111		5.0	113±4.47	140±3.54	157±4.47	173±13.96	183±6.61	
		3.3	116±5.86	139±15.28	153±14.57	178±12.53	188±8.54	
		2.2	119±3.00	142±9.54	155±9.54	174±8.14	188±5.66	
		1.5	117±4.69	140±7.41	154±5.71	178±7.75	189±5.72	
		1.0	116±3.71	135±6.44	155±6.42	179±8.43	188±6.43	
K-525		5.0	115±5.00	143±6.45	160±12.50	175±4.08	186±6.51	
		3.3	117±3.51	139±8.74	149±9.00	175±8.89	188±8.02	
		2.2	119±6.81	144±6.74	158±18.15	179±15.28	186±7.81	
		1.5	118±4.88	141±7.31	152±5.16	181±7.43	184±5.01	
		1.0	116±3.54	142±6.15	154±6.71	182±8.52	187±6.48	

*Each value represents the mean ± S.D. (gram) of 5 rats.

Table IV. Gross findings of necropsy in rats orally treated with each *Bifidobacterium spp.*

Sex	Dose (g/kg)	K-110 administration		K-111 administration		K-525 administration	
		Observation	Frequency	Observation	Frequency	Observation	Frequency
Male	0	N.G.L. ^a	5/5 ^b	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	1.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	1.5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	2.2	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	3.3	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	5.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
Female	0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	1.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	1.5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	2.2	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	3.3	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5
	5.0	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5	N.G.L.	5/5

^aNo gross lesions. ^bValues are expressed as animal numbers.

(Table IV).

고 찰

한국형 유산균인 *Bifiobacterium breve* K-110, K-111, *Bifidobacterium infantis* K-525에 대한 급성독성시험을 SD계 랫트에서 실시한 결과 대조군, 투여군 암수 모두에서 폐사 및 비정상적인 임상증상이 관찰되지 않았으며 해부학적 소견에서도 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 랫트에서 실험 군체의 투여에 의한 영향으로 평가되는 일반적인 독성증상은 없었다. 이상 같이 한국형유산균들은 시험에 적용된 5 g/kg 이하에서 독성이 나타나지 않았으며 LD₅₀은 5 g/kg 이상으로 추정된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(HMP-96-D-1-1026)에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

식품의약품청. (1998). 의약품등의 독성기준-급성독성시험. 식

의약품안전청 고시 제 1998-56호.

- Huges, D. B. and Hoover, D. G. (1990). Bifidobacteria-their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* **45**, 74-81.
- Ishibashi, N. and Shimamura, S. (1993). Bifidobacteria-research and development. *Food Technol.* **47**, 128-135.
- Kim, D.-H., Lee, J.-H., Bae, E.-A. and Han, M. J. (1995). Induction and inhibition of indole of intestinal bacteria. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 351-355.
- Park, H.-Y., Bae, E.-A., Han, M. J., Choi, E.-C. and Kim, D.-H. (1998) Inhibitory effects of *Bifidobacterium spp.* isolated from a healthy Korean on harmful enzymes of human intestinal microflora. *Arch. Pharm Res.* **21**, 54-61.
- Salminen, S., Deighton, M. and Gorbach, S. (1974). Lactic acid bacteria in health and disease, In Salminen, S. and von Wright, A. (Eds). *Lactic acid bacteria*. pp. 199-226 Marcel Dekker, Inc., New York.
- Tomoko, A. K., Tomoko, Y. and Ishibashi, N. (1996). Inhibitory effect of human-derived *Bifidobacterium* on pathogenic *Eshcherichia coli* serotype O-111. *Biosci. Microflora* **15**, 17-22.