

수용성 키토산의 SD 랫드에 대한 4 주 반복 경구 투여 독성시험

장범수, 임중환, 윤효인*

충남대학교 수의과대학 수의약리독성학교실
(게재승인: 2003년 6월 17일)

A 4-week Oral Toxicity Study of Water-soluble Chitosan in Sprague-Dawley Rats

Beom-su Jang, Jong-hwan Lim and Hyo-in Yun*

Division of Veterinary Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine,
Chungnam National University, Daejeon, Korea

(Accepted: June 17, 2003)

Abstract: Chitosan is known to have antibacterial, antitumorogenic, hypolipidemic and immunopotentiating activities, hence finding diverse uses as a component in varying functional foodstuffs. However, some investigators reported it caused mineral absorption inhibition and excess coagulation. From the chemical viewpoint, conventional chitosans are high-molecule polymers lacking water solubility, which could be related with their possible toxicity. A newly developed low- molecule water soluble chitosan is thought to have low toxicity compared to conventional chitosans. But no investigation was carried out to evaluate its toxicity.

In this study, a 28-day subacute oral toxicity study of the water-soluble chitosan was performed in Sprague-Dawley rats of both sexes. Each 36 male and female rats were orally administered with 500, 1,000 and 2,000 mg/kg/day for 28 consecutive days, respectively.

Clinical parameters (growth rate, feed and water consumption, daily inspection, urine analysis) during the 28 days indicated the water-soluble chitosan did not induce any abnormal changes.

There were no abnormal findings due to the administration of the test substance in gross and microscopic findings. We had not found alteration in absolute and relative organ weight between the control and treated groups, with only exception in the liver but lacking dose-dependency. The results of hematology and serum biochemistry examination revealed that no treatment related changes were between control and all dose groups.

In conclusion, it was suggested that subacute toxicity of the water-soluble chitosan was low and the no-observed adverse effect level was considered to be over 2,000 mg/kg in rats.

Key words: water-soluble chitosan, bioactive material, subacute oral toxicity

서 론

키토산은 N-acetyl- β -D-글루코사민이 β -1, 4 결합한 호모 염기성의 (아미노) 다당류로 새우, 갑각류, 조개, 오징어 등의 골격질과 곤충이나 균류에서 주로 발견되며 셀룰로스 다음으로 자연에 많이 존재하는 다당류이다. 특히, 게, 새우, 바닷가재 등의 갑각류나 동물성 플랑크톤인 크릴에 많이 함유되어 있다. 키토산은 키틴을 탈

키토산은 키틴을 탈

* Corresponding author: Hyo-in Yun

Division of Veterinary Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

Tel: +82-42-821-6759, Fax: +82-42-822-5780, E-mail: hiyun@cnu.ac.kr

아세틸화시킨 것으로 β -(1 \rightarrow 4)-2-아세타미도-D-글루코스와 β -(1 \rightarrow 4)-2-아미노-D-글루코스가 같이 중합되어 구성되는데 후자가 80%를 차지한다 [3]. 예전부터 우리나라의 식탁에는 버섯류, 계장, 새우젓 등에는 다량 함유되어 있었고 이미 키틴·키토산 및 그 올리고당을 식품첨가물로 승인하고 있다.

키틴·키토산의 항균작용 [17], 항염작용 [14], 면역증강작용[18], 항암작용 [13], 콜레스테롤 저하작용 [11], 칼슘흡수촉진효과 [5] 등이 밝혀짐에 따라 의약품 또는 기능성 식품의 소재로서 각광을 받고 있다 [10]. 키토산은 다양한 생리활성을 지니고 있으나, 낮은 체내 흡수율로 인해 단지 식품보존제로서의 이용에 제한될 수밖에 없었다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 최근 키토산에 대한 관심은 올리고당으로 옮겨옴에 따라 올리고당의 제조에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 지금까지 올리고당은 키토산 다량체를 염산 처리하여 만들었으나 [4], 생리활성이 낮은 저분자 올리고당 및 단당류인 글루코사민의 생성량이 높고 인체유해성 환경오염 등의 문제가 지적되어 왔다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 키틴·키토산분해효소를 이용한 방법에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다 [2, 6, 11, 12]. 전과 김 등 [5, 6]은 고정화효소 반응기 및 한외여과막 반응기를 이용하여 3종의 분자량을 가진 키토산 올리고당 (1,000 이하, 1,000~5,000, 5,000~10,000)을 효율적이고 연속적으로 다량 생성시켰음을 보고한 바 있다. 그러나, 키틴·키토산 다량체에서 보고되었던 미량원소의 흡수 저해나 응고작용에 기인된 독성작용이 [8, 16, 19] 이러한 새로운 방법에 의해 생성된 키토산 올리고당에도 나타나는지를 확인을 통해 안전성을 확보할 필요가 있다.

본 연구에서는 상기 키토산 올리고당 중 체내 흡수가 용이한 수용성 키토산 (분자량이 1,000 이하)의 아급성경구독성을 평가하기 위하여 랫드를 이용하여 4주간 반복 경구투여하였다 [1].

재료 및 방법

시험물질

본 시험에 사용한 수용성 키토산은 부경대학교 화학과에서 고정화효소 반응기를 이용하여 제조한 분자량 1,000 이하의 올리고당으로서 냉장보관하였고 (4°C), 투여 직전에 멸균증류수로 용해시킨 후, 투여 농도로 희석하여 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

본 연구에 사용한 실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley

랫드 (암컷 50 마리; 수컷 50 마리)로 바이오제노믹스 (서울)로부터 구입하여 일주일간의 순화기간을 거치는 동안 체중이 전체 동물 평균에 가까우면서 건강한 동물만 실험에 공여하였다. 본 시험은 충남대학교 수의과대학 수의약리독성학실험실에서 실시하였으며 사육환경은 항온 (온도, $23\pm 3^\circ\text{C}$), 항습 (상대습도, $50\pm 10\%$), 환기횟수 10~20 회/시간 그리고 무진·무균의 청정공기가 공급되는 동물환경제어사육장치 (GOG Environmental Control Unit, 명진기계상사, 서울)에서 암수별 각각 3 마리씩 스테인레스 망사육상자 (345W \times 195L \times 180H mm)에 배치하여 실시하였다. 사료는 랫드용 고형사료 (천호제일, 제일사료주식회사, 대전)를 그리고 음수는 상수도수를 자유섭취 시켰다.

시험군의 구성 및 처치 방법

투여량의 산출은 수용성 키토산의 최대용해 농도를 고려하여 투여직전 랫드의 체중을 기준으로 하여 고용량군 (2,000 mg/kg)으로 설정한 후, 이 용량을 기준으로 일정공비($\times 0.5$)를 산정한 중간용량군 (1,000 mg/kg), 저용량군 (500 mg/kg)과 멸균증류수만을 투여한 용매대조군으로 설정하였다. 시험군의 구성은 선발된 암수 각각 36 마리의 동물을 군간 체중분포는 균일하도록 군당 암수 각각 9 마리씩 배치하였다. 이 때 평균체중은 수컷은 161.5 ± 12.8 g, 암컷은 148.6 ± 7.7 g이었다. 시험물질의 투여경로는 식품으로 사용가능성을 고려하여 경구로 하였으며, 투여용액량의 차이를 배제하기 위하여 각 시험물질 용액을 동물 체중 kg당 10 ml에 매일 투여하였다. 4주간 시험물질을 1일 1회 28일간 연속으로 투여하여 4주 아급성독성시험을 수행하였다.

관찰 및 검사항목

1. 일반증상 및 폐사의 관찰

모든 시험동물에 대하여 매일 1회 이상 사망 유무 확인과 함께 일반상태의 변화, 중독증상 발현 유무를 조사하였다. 일반증상은 식욕부진, 타액분비, 설사, 구토, 다뇨 및 무뇨, 분변의 변화를 중심으로 관찰하였다 [9].

2. 체중측정

모든 실험동물에 대하여 투여개시전, 투여개시후 일주일 간격으로 측정하였다.

3. 사료섭취량 및 음수량

1일당 사료섭취량 및 음수량은 주 1회 측정하였으며 하루 전에 공급한 양에서 1일이 경과하였을 때의 잔량과의 차이에 의해 구하였다.

4. 요검사

시험 최종일에 각 군당 압수 각 4 마리에서 뇨를 채취하여 요시험지 (Combur 9 Test RL, Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 백혈구, 아질산염, pH, 요단백, 요당, 케톤체, 우로빌리노겐, 빌리루빈, 잠혈에 관하여 검사하였다.

5. 혈액학적 및 혈액생화학적 검사

부검시에 모든 동물을 에테르로 마취한 후 후대정맥으로부터 채혈한 혈액 중에서 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈, 헤마토크리트, 평균적혈구용적, 혈소판, 평균혈소판용적, 임파구, 중정도 백혈구 (MID, mid range population in leucocyte), 과립구 등을 Serono System 9118+ (Serono Co., Ltd, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다. 혈액생화학치는 알부민, 총단백, ALP, ALT, AST, BUN, 혈당, 트리글리세라이드를 대상으로 550 Express (Ciba Corning Co., U.S.A.)을 이용하여 분석하였다.

6. 육안소견 및 장기 중량

전 실험동물에 대하여 관찰기간이 종료된 후 에테르 마취하에 방혈하여 부검하였으며 흉선, 부신, 정소, 난소, 심장, 폐, 신장 비장, 간장을 포함한 주요 장기를 육안으로 관찰하였다. 정소, 난소, 신장, 비장, 간장, 폐는 장기 중량을 측정하였으며 이를 체중에 대한 상대중량으로 나타내었다.

7. 병리조직검사

전 동물에 대하여 다음 장기를 10% 중성 포르말린에 2 주 이상 충분히 고정시킨 다음 통상적인 절차에 의해 조직을 처리한 후 파라핀 포매기를 이용하여 포매하였다. 마이크로톰을 이용하여 포매조직을 5 μ m의 두께로 절편한 다음 hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. 고정장기는 신장, 비장, 간장, 심장, 부신, 정소 (난소), 폐, 부신 등이었다.

자료의 통계학적 해석

본 실험에서 얻은 체중, 사료섭취량, 음수량, 혈액학적, 혈액생화학치 등 모든 자료는 평균±표준편차로 나타내었으며, 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 $p < 0.05$ 로 Duncans *t*-test를 이용하여 비교하였다.

결 과

사망동물 및 일반증상

시험 전 기간 동안 대조군을 포함한 수용성 키토산 투여군 모두에서 사망한 동물은 없었고, 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았다.

체중변화

시험물질을 투여한 후 4 주 동안 체중 변화를 관찰하였을 때, 대조군 및 모든 수용성 키토산 투여군에서 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하였다. 시험물질 투여에 의한 유의할 만한 체중의 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

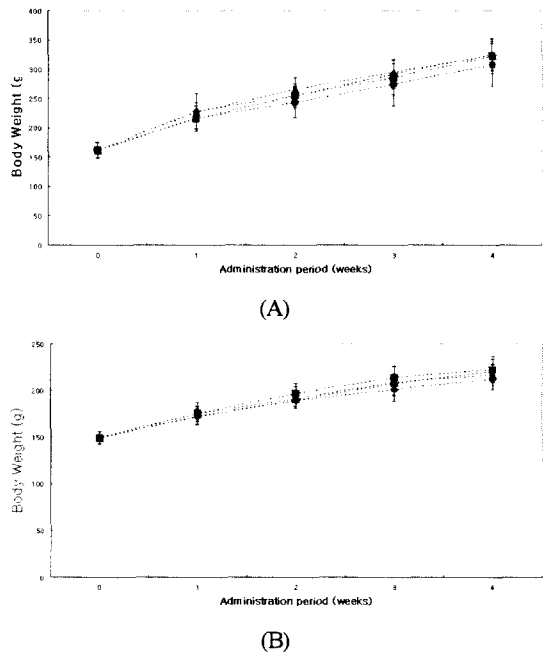


Fig. 1. Body weight changes in male (A) and female (B) rats during a 4-week period of orally administration of water soluble chitosan. ■, Control; ▲, 500; ◆, 1,000; ●, 2,000 mg/kg. Each value represents mean \pm SD (n=9).

사료섭취량 및 음수량

케이지당 3 마리가 배치된 3 개의 케이지에 시험물질을 투여한 후 4 주 동안 일주일 간격으로 측정하였으며 측정 시점의 동물 1 마리당 1 일 사료섭취량 및 음수량의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 압수 모두 어떤 투여군도 동일 시점의 대조군에 비하여 유의성 있는 사료섭취량 및 음수량의 증가 또는 감소를 보이지 않았다.

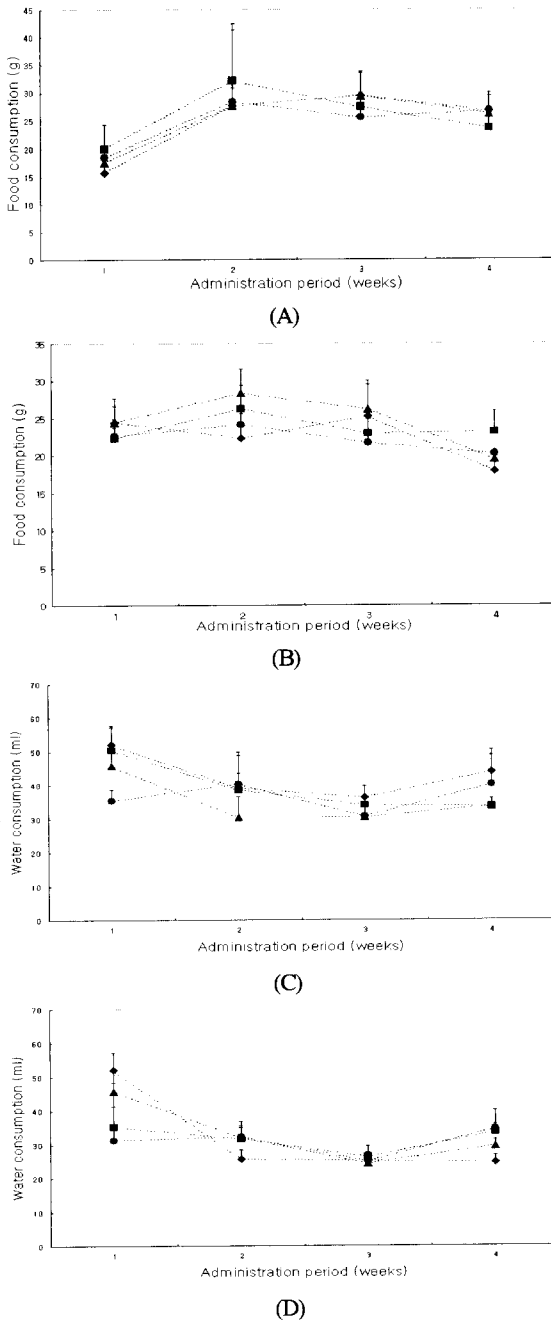


Fig. 2. Feed consumption in male (A) and female (B) rats and water consumption in male (C) and female (D) rats during a 4-week period of orally administration of water soluble chitosan. ■, Control; ▲, 500; ◆, 1,000; ●, 2,000 mg/kg. Each value represents mean \pm SD (n=9).

요검사

시험물질에 의한 요검사상의 이상은 발견되지 아니하였 다 (Table 1). 모든 시험물질 투여군과 대조군에서 요의 색도 는 정상적이었다. 요중 글루코스, 케톤체, 우로빌리노겐, 빌 리투빈은 대조군 및 시험군 모두에서 음성 또는 정상 반응을 보였다. 시험물질 수컷 저용량군 한 마리의 요에서 백혈구가 측정되었으나, 중용량군 및 고용량군에서는 모두 음성을 나 타내어 시험물질에 의한 것이라고 볼 수 없었다. 암컷의 모 든 투여군에서 백혈구는 발견되지 않았다. 아질산염의 경우 대조군과 투여군 모두 동일한 반응을 보였다. 대조군 및 투 여군 모두에서 요의 pH는 7~8에 분포하였다.

Table 1. Urinalysis in rats treated orally with chitosan oligo-saccharide for 28 days

	Dose (mg/kg)	0		500		1,000		2,000	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
1) Leucocyte	0	4	4	3	4	4	4	4	4
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	1	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
2) Nitrite	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	4	4	4	4	4	4	4	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
3) pH	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	3	1	0	0	0	2
	2	4	4	1	3	4	4	4	2
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
4) Protein	0	0	4	0	1	0	2	2	1
	1	4	0	4	3	4	2	2	3
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
5) Glucose	0	4	4	4	4	4	4	4	4
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
6) Ketone	0	4	4	4	4	4	4	4	4
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
7) Urobilinogen	0	4	4	4	4	4	4	4	4
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
8) Bilirubin	0	4	4	4	4	4	4	4	4
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
9) Occult blood	0	3	4	3	4	2	4	4	4
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	1	0	1	0	2	0	0	0

- 1) 0: negative
- 1: 10-25 leucocytes/ μ l
- 2: 75 leucocytes/ μ l
- 3: 500 leucocytes/ μ l
- 4) 0: negative
- 1: 30 mg/dl
- 2: 100 mg/dl
- 3: 300 mg/dl
- 4: 1000 mg/dl
- 5) 0: normal
- 1: 50 mg/dl
- 2: 100 mg/dl
- 3: 300 mg/dl
- 4: 1000 mg/dl
- 6) 0: negative
- 1: +/x/, mmbcxz
- 2: ++
- 3: +++
- 7) 0: normal
- 1: 1 mg/dl
- 2: 4 mg/dl
- 3: 8 mg/dl
- 4: 12 mg/dl
- 8) 0: negative
- 1: +
- 2: ++
- 3: +++
- 9) 0: negative
- 1: 5-10 erythrocytes/ μ l
- 2: 50 erythrocytes/ μ l
- 3: 250 erythrocytes/ μ l

혈액학적 검사

혈액학적 검사 결과를 Table 2에 요약하였다. 암수 모두에서 모든 혈액학적 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

혈액생화학적 검사

시험물질에 의한 혈액생화학적 검사 결과를 Table 3에 요약하였다. 암컷과 수컷 모두에서 모든 혈액생화학적 항목에서 대조군과 투여군간 통계학적 차이를 나타내지 않았다.

육안소견 및 상대장기중량

육안 소견상 이상이 있는 개체는 관찰되지 않았다. 체중 100 g 당 장기 중량 (상대 중량, %)을 Table 4에 나타내었다. 수컷의 간의 상대장기중량이 one-way ANOVA에서 유의한 수준의 F값을 나타내었으며 ($p < 0.05$), 대조군에 비해 증용량군의 간의 상대장기중량이 ($0.01 < p < 0.05$) 유의하게 증가되어 있었다. 수컷의 다른 장기에 대한 상대장기중량의 경우 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 암컷의 경우, 전장기에서 유의한 차이가 상대장기중량의 변화는 인정되지 않았다.

Table 2. Levels of hematological analysis in rats treated orally with chitosan for 28 days

Dose (mg/kg)	0		500		1,000		2,000	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Sex								
WBC	8.3±0.6	7.4±2.1	7.3±1.1	6.9±0.6	7.1±1.7	10.3±4.5	10.1±1.6	7.0±0.8
RBC	6.5±0.4	5.6±0.5	6.3±0.3	6.0±0.1	6.3±0.4	5.6±0.5	6.1±0.1	5.4±0.4
HGB	15.2±0.6	13.7±0.9	15.4±0.4	13.5±0.4	15.2±0.5	14.2±1.4	15.5±2.8	13.8±1.0
HCT	38.8±2.4	31.0±4.4	37.2±0.5	35.8±0.1	36.7±3.0	31.3±2.9	36.2±1.7	30.3±1.3
MCV	59.6±2.4	59.6±2.4	59.3±1.9	59.8±0.7	58.0±2.7	55.5±0.8	59.8±3.8	55.7±1.6
PLT	0.9±0.1	0.7±0.1	0.9±0.1	1.0±0.3	0.9±0.1	0.8±0.1	0.8±0.0	0.8±0.1
MPV	18.5±0.5	19.3±0.6	18.6±1.0	18.1±0.6	19.6±0.9	20.2±0.8	19.1±0.8	19.9±0.8
LYM	93.1±4.9	81.9±2.3	92.0±7.5	85.0±9.3	89.2±6.8	90.8±3.9	92.5±8.7	85.3±2.4
MID	3.9±2.6	8.9±2.3	4.8±4.2	6.5±3.5	5.4±3.6	4.8±1.4	4.1±4.6	7.5±0.8
GRAN	3.0±2.6	9.2±3.9	3.3±3.3	8.5±5.8	5.4±3.3	4.4±2.7	3.4±4.1	7.3±1.6

All values are expressed as mean ± S.D.

WBC, white blood cell count ($10^3/\text{mm}^3$); RBC, red blood cell count ($10^6/\text{mm}^3$); HGB, hemoglobin (g/dl); HCT, hematocrit (%); MCV, mean corpuscular volume (fl); PLT, platelet ($10^6/\text{mm}^3$); MPV, mean platelet volume (fl); LYM, lymphocyte in leucocyte (%); MID, mid-range population leucocyte (%); GRAN, granulocyte in leucocyte (%).

Table 3. Levels of serum biochemical analysis in rats treated orally with chitosan oligosaccharide for 28 days

Dose (mg/kg)	0		500		1,000		2,000	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Sex								
ALB	4.3± 0.2	4.9± 0.6	3.9± 0.3	4.8± 0.5	4.0± 0.4	4.5± 0.5	4.1± 0.6	4.3± 0.5
TP	9.6± 0.5	10.0± 1.3	8.9± 0.3	10.1± 0.4	9.1± 0.9	9.2± 0.7	9.3± 1.2	9.7± 0.5
ALP	404.3±113.9	246.2±57.4	356.0±41.4	243.2±104.6	354.7±90.0	188.3±28.3	372.0±73.3	203.2±34.8
ALT	57.5± 6.1	49.7± 8.7	54.3± 6.0	47.5± 11.9	54.5± 5.8	38.7± 6.9	54.5±10.9	42.9± 5.2
AST	112.7± 18.1	113.4±27.4	125.3±28.3	109.7± 15.7	100.0±31.0	109.6±25.2	122.2±10.6	98.2±15.4
BUN	14.0± 2.6	14.6± 2.9	13.4± 1.7	13.1± 6.4	13.6± 0.8	15.5± 4.0	15.4± 3.6	15.0± 2.0
GLU	299.7±101.5	244.8±59.5	282.7±18.9	212.8± 45.1	304.0±49.7	210.3±55.4	225.5±68.6	225.8±93.1
TRG	86.5± 67.5	45.6±30.3	50.8±20.4	44.2± 15.4	60.5±36.0	41.5±15.7	48.7±34.0	33.3±15.7

All values are expressed as mean ± S.D.

ALB, albumin (g/dl); TP, total protein (g/dl); ALP, alkaline phosphatase (IU/ l); ALT, alanine aminotransferase (IU/ l); AST, aspartate aminotransferase (IU/ l); BUN, blood urea nitrogen (mg/dl); GLU, glucose (mg/dl); TRG, triglyceride (mg/dl).

Table 4. Relative organ weights of rats treated orally with chitosan oligosaccharide for 28 days

Dose(mg/kg)	0		500		1,000		2,000	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Testis or Ovary R	0.47±0.04	0.03±0.01	0.46±0.08	0.02±0.01	0.48±0.05	0.02±0.003	0.48±0.05	0.03±0.01
L.	0.47±0.03	0.03±0.01	0.46±0.08	0.02±0.01	0.48±0.05	0.02±0.01	0.48±0.05	0.03±0.01
Kidney R.	0.35±0.03	0.40±0.03	0.38±0.02	0.37±0.02	0.38±0.02	0.39±0.02	0.35±0.03	0.41±0.02
L.	0.36±0.03	0.39±0.02	0.38±0.03	0.38±0.02	0.38±0.02	0.38±0.04	0.34±0.02	0.39±0.03
Spleen	0.20±0.01	0.26±0.03	0.20±0.01	0.23±0.06	0.20±0.03	0.23±0.04	0.21±0.05	0.24±0.05
Liver ^a	3.38±0.10	3.54±0.23	3.54±0.21	3.33±0.23	3.72±0.21 ^b	3.22±0.22	3.29±0.18	3.52±0.36
Lung	0.46±0.03	0.60±0.04	0.50±0.03	0.58±0.09	0.49±0.02	0.60±0.04	0.49±0.04	0.63±0.09

Unit: g/100 g B.W. All values are expressed as mean ± S.D. ^aSignificantly variant by one-way analysis of variance (ANOVA). ^bSignificantly different from the control group (0.01<p<0.05) using Duncans *t*-test.

Table 5. Histopathological findings in rats treated orally with chitosan oligosaccharide for 28 days

Organ	Dose (mg/kg)	Control		500		1,000		2,000	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Thymus									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	9
Adrenal R.									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	9
Adrenal L.									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	9
Testis R									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	8	9
Atrophy								1	
Testis L									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	9
Heart									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	9
Lung									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	8
Pneumonia		0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney R									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	8
Nephrosis		0	1	0	0	0	0	0	1
Hydronephrosis		0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney L									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	9
Spleen									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	9
Liver									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	7	9	8	9	8	9	6
Granuloma		0	2	0	1	0	1	0	3
Other organs									
No.		9	9	9	9	9	9	9	9
NF		9	9	9	9	9	9	9	8
Pleuritis		0	0	0	0	0	0	0	1

No.: Number of observations. NF: Normal findings.

병리조직검사

병리조직학적 검사 결과 수컷의 경우, 고용량군에서 정소위축이 1례 있었고, 나머지 동물 및 그 밖의 모든 모든 장기에서 병리조직학적 이상 소견을 나타내지 않았다 (Table 5). 암컷의 경우, 모든 장기에서 병리조직학적 이상 소견을 나타내지 않았다.

고찰

키토산은 자연계에서 존재하는 폴리머 중 셀룰로스 다음으로 많이 존재하는 키틴으로부터 손쉽게 얻을 수 있으며, 이를 활용하는 연구가 다양한 분야에서 이루어지고 있다. 특히, 수용성 키토산은 생리활성능에 [11, 13, 14, 17, 18] 초점을 맞추어 의약품 또는 기능성 식품의 소재로 폭넓은 활용이 예상되는 바 이에 대한 반복 경구 투여 독성시험은 매우 필요하다. 본 시험에서는 수용성 키토산 올리고당 (분자량 1,000 이하)을 SD 랫드에 500, 1,000, 2,000 mg/kg으로 1 일 1 회 (주 7 회) 4 주간 경구 투여하고, 사망 여부, 체중 변화, 일반증상 관찰, 사료섭취량, 음수량, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 검사, 장기중량 및 병리조직학적 검사를 실시하여 시험물질의 독성을 평가하였다.

전 시험기간 동안 시험물질 투여에 의해 치사된 동물은 한 마리도 발생하지 않았다. 전 시험군은 28 일간의 시험기간 중 지속적인 체중 증가를 보였는데 이는 6 주령에 가까운 동물이 해당되는 성장 속도를 반영하고 있음이 확인되었다 [15]. 대조군과 투여군 사이, 그리고 투여군 상호간에 체중의 차이는 인정되지 아니하였다. 시험물질 투여에 따른 외견상의 임상소견은 발견되지 않았으며 사료섭취량과 음수량도 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 요분석 결과에서 시험물질 수컷 저용량군의 한 마리에서 백혈구가 μ 당 75 개가 측정되었으나 중용량군과 고용량군의 모든 동물에서

음성을 나타내어 시험물질에 의한 것이라고 볼 수 없었으며 이러한 사실은 암컷의 모든 동물이 음성 반응을 보인 것으로 확인할 수 있다 하겠다. 시험 전 동물의 요의 pH가 7~8을 나타내어 정상 범위에 들었다 [7]. 요단백의 경우 암컷 대조군을 제외하고 모든 시험군에서 측정되었는데, 수컷의 경우 대조군, 저용량군, 중용량군은 전례에서 30 mg/dl의 수치를 나타내었으나 고용량군은 측정 동물의 반수에서 음성을 나타내어 용량-상관성이 없었으며 암컷 또한 용량-상관성이 결여되었다. 특히 정상 SD 랫드에서 요단백이 발견되는 것을 고려하면 시험물질에 의해 요단백이 증가되는 것을 인정할 수 없었다 [15]. 요중 잠혈은 수컷의 경우 대조군에서 한 마리, 저용량군에서 한 마리, 중용량군에서 두 마리가 관찰되었으나 고용량군에서는 한 마리도 발견되지 않았으며 암컷의 경우 대조군 및 투여군 모든 동물에서 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향으로 판단되지 않았다. 그 밖의 요분석 항목인 글루코스, 케톤체, 우로빌리노겐, 빌리루빈은 대조군 및 시험군 모두에서 음성 또는 정상 반응을 보여 시험물질이 요검사 성적에 영향을 미치지 않는다고 사료되었다. 모든 혈액학적 검사 항목 및 혈액생화학적 성적에 대하여 대조군과 투여군을 비교하였으나 통계학적으로 유의성 있는 차이를 볼 수 없었다. 따라서 시험물질은 혈액학적 성적에 영향을 미치지 않는다고 사료되었다. 시험물질을 28 일간 투여한 후 관찰한 육안적 해부조건에서 이상 소견은 관찰되지 않았다. 시험물질에 의하여 상대장기 중량검사에서 중용량군 수컷의 간장이 대조군에 비해 유의하게 비대되어 있는 것으로 나타났으나, 고용량군에서는 그러한 변화가 관찰되지 않아 용량-상관성이 결여되어 시험물질의 투여에 의한 영향으로 판정하기는 어려웠고 암컷에서도 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 그 외에 다른 장기에 대한 상대장기중량에서 유의한 차이는 관찰되지 않아 시험물질 투여에 의한 장기중량에 대한 변화는 없는 것으로 나타났다. 전 시험 동물을 대상으로 실시한 병리조직소견 중, 수컷의 경우 검사 전 장기 중 고용량군 1례에서만 정소위축이 관찰되었으나 그 정도가 경미하였으며 자연발생적으로 나타날 수 있는 수준의 병변이었다 [15]. 암컷의 경우, 간장에서 소육아종이 대조군 및 투여군 모두에서 발생되었으나, 그 정도가 경미하였을 뿐 아니라 용량에 따른 상관성이 결여되었다. 신장의 경우, 대조군과 고용량군에서 병변이 각 1례 발생되었으나 모두 자연발생적으로 나타나는 병변의 수준이었으며 용량-상관성도 없었기 때문에 시험물질의 투여에 의한다고 볼 수 없었다.

결 론

키토산은 항균, 항종양, 지혈제하 및 면역증가능을 가지고 있어 다양한 기능성 식품의 재료로 사용되고 있다. 그러나, 몇몇 연구에서 키토산이 미네랄의 흡수를 억제하고 과도한 응고를 일으키는 것으로 보고하고 있다. 화학적 관점에서부터 상용되고 있는 키토산은 고분자의 다당체로 수용성이 낮으며, 이러한 낮은 용해성이 독성의 유발과 연계되어 있을 것으로 사료되었다. 새로이 개발된 저분자량의 수용성 키토산은 기존의 키토산에 비해 낮은 독성을 나타낼 것으로 사료되나 아직 이에 대한 독성연구는 수행되지 않았다. 본 연구에서는 고정확효소 반응기 및 환의여과막 반응기를 이용하여 만들어진 수용성 키토산 올리고당 (분자량 1,000 이하)을 SD 랫드에 500, 1,000, 2,000 mg/kg으로 1 일 1 회 (주 7 회) 28 일간 경구 투여하고, 사망 여부, 체중 변화, 일반증상 관찰, 사료섭취량, 음수량, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 검사, 장기중량 및 병리조직학적 검사를 실시하여 키토산 올리고당의 아급성 독성을 평가하였다.

체중 · 일반증상 · 사료섭취량 · 음수량 · 요검사 · 혈액학적 검사 · 혈액생화학적 검사 · 육안적 소견 · 장기중량 · 병리조직학적 소견 등에서 시험물질투여에 따른 이상은 관찰되지 않았다. 결론적으로 시험물질인 수용성 키토산의 SD 랫드에 대한 4 주간 반복 경구 투여시 무관찰부작용량 (No observed adverse effect level)은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청 국립독성연구소. 의약품의 독성시험 기준해설, 1999, 28-34.
2. Aiba, S. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation. *Carbohydr. Res.* 1994, **265**(2), 323-328.
3. Andradý, A. L. and Xu, P. Elastic behavior of chitosan films. *J. Poly. Sci.: Part B: Poly. Phys.* 1997, **35**, 517-521.
4. Horowitz, S. T., Roseman, S. and Blumenthal, H. J. The preparation of glucosamine oligosaccharide. I. Separation. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, **79**, 5046-5049.
5. Jeon, Y. J., Kim, G. H., Park, P. J. and Kim, S. K. Calcium absorption accelerating effect of chitosan oligosaccharides prepared by ultrafiltration membrane enzyme reactor. *J. Korean Fish Soc.* 1999, **32**(3), 247- 251.

6. Jeon, Y. J. and Kim, S. K. Continuous production of chitosan oligosaccharides using a dual reactor system, *Process Biochemistry*, 2000, **35**, 623-632.
7. Kim, H. C., Kang, B. H., Ha, C. S., Han, S. S. and Roh, J. K. A 4-week subcutaneous toxicity of recombinant human interferon A (LBD-007) in Sprague Dawley rats. *J. Toxicol. Sci.* 1993, **18**, 43-56.
8. Landes, D. R. and Bough, W. A. Effect of chitin - a coagulating agent for food processing wastes in the diets of rats on growth and liver and blood composition. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 1976, **15**, 555-563.
9. Lorke, D. A new approach to practical toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 1983, **54**, 275-287.
10. Macleod, G. S., Fell, J. T., Collett, J. H., Sharma, H. L. and Smith, A. M. Selective drug delivery to the colon using pectin:chitosan:hydroxypropyl methylcellulose film coated tablets. *Int. J. Pharm.* 1999, **187**, 251-257.
11. Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, H. and Mitsuoka, T. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993, **57**, 1439-1444.
12. Pae, H. O., Seo, W. G., Kim, N. Y., Oh, G. S., Kim, G. E., Kim, Y. H., Kwak, H. J., Yun, Y. G., Jun, C. D. and Chung, H. T. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leuk. Res.* 2001, **25**(4), 339-346.
13. Qin, C., Du, Y., Xiao, L., Li, Z. and Gao, X. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 2002, **31**(1-3), 111-117.
14. Seo, S. B., Jeong, H. J., Chung, H. S., Lee, J. D., You, Y. O., Kajiuchi, T. and Kim, H. M. Inhibitory effect of high molecular weight water-soluble chitosan on hypoxia-induced inflammatory cytokine production. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, **26**(5), 717-721.
15. Song, C. W., Hwang, H. S., and Han, H. S. Studies on the basic data of ktc: SD rats with age. *Kor. J. Ani. Sci.* 1990, **6**, 33-43.
16. Tanaka, Y., Tanioka, S., Tanaka, M., Tanigawa, T., Kitamura, Y., Minami, S., Okamoto, Y., Miyashita, M. and Nanno, M. Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials.* 1997, **18**(8), 591-595.
17. Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. Protective effect of N-acetyl chitohexaacose on *Listeria monocytogens* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 1989, **33**, 357-367.
18. Tokura, S., Tamura, H. and Azuma, I. Immunological aspects of chitin and chitin derivatives administered to animals. *EXS.* 1999, **87**, 279-292.
19. Wada, M., Nishimura, Y., Watanabe, Y., Takita, T. and Innami, S. Accelerating effect of chitosan intake on urinary calcium excretion by rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997, **61**, 1206-1208.