



Difructose Dianhydrides(DFA IV)의 랫드를 이용한 단회 및 4주간 반복 경구투여 독성시험

이창우 · 이명렬 · 김환복 · 윤원기 · 김승환¹ · 손화영² · 김형진

한국생명공학연구원 생물활성평가연구소, ¹리얼바이오텍(주), ²충남대학교 수의과 대학

Single and Four-Week Oral Toxicity Studies of Difructose Dianhydrides (DFA IV) in Sprague-Dawley Rats

Chang-Woo Lee, Myong-Lyoll Lee, Hwan-Mook Kim, Won-Kee Yoon, Seung-Hwan Kim¹,
Hwa-Young Son² and Hyoung-Chin Kim

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, PO Box 115, Yusong, Taejeon 305-600

¹Realbiotech Co., Ltd., Yeongigun, Chungnam 339-824

²College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received March 17, 2004; Accepted June 21, 2004

ABSTRACT. This study was to investigate single and repeated-dose toxicities of DFA IV, a new candidate of nutraceutical which has preventive effect on anemia and osteoporosis. In single-dose oral toxicity study, the test article were administered once by gavage to rats at dose level of 0, 2,000 and 5,000 mg/kg. No dead animal, abnormal sign and abnormal necropsy finding was found in control and treated groups. Thus the approximate lethal dose of DFA IV was considered to be higher than 5,000 mg/kg in rats. In four week repeated dose oral toxicity study, the test article was administered once daily by gavage to rats at dose levels of 0, 500, 1,000 and 2,000 mg/kg. No abnormality was observed in mortality, clinical findings, body weight changes, food and water consumptions, ophthalmoscopic findings, hematological findings, necropsy findings, organ weights and histopathological findings. In urinalysis, specific gravity was increased in 2,000 mg/kg groups of male rats. In serum biochemical analysis, creatine phosphokinase was increased in all treatment groups of male rats. These increases in urine specific gravity and serum creatine phosphokinase activity were not accompanied with related signs such as histopathological changes or clinical findings. In conclusion, four week repeated oral dose of DFA IV to rats did not cause apparent toxicological change at the dose of 500, 1,000 or 2000 mg/kg body weight. Thus it is suggested that no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of DFA IV in rats would be 2,000 mg/kg/day body weight.

Keywords: Difructose dianhydride (DFA IV), 4-Week repeated dose toxicity, Nutraceuticals, Anemia, Osteoporosis, Preclinical toxicity.

서 론

현재 빈혈 및 골다공증예방에 필요한 치료제로는 ferrous dextran sulfate 위주로 경구투여용 철분제제(세계시장 50

억불/년) 및 칼슘제제 시장이 전세계적으로 거대하게 형성되어 있다. 칼슘은 체내 무기질 중 가장 양이 많은 원소로 인체 내 총 칼슘의 양은 체중의 약 2% 정도이다. 인체는 생애를 통해서 칼슘을 필요로 하며, 매일 700 mg 정도의 칼슘이 뼈와 혈액 사이를 이동하고, 식이중에 인(P)이 많으면 칼슘의 흡수가 어렵다. 흡수감소요인으로는 pH가 높을수록 즉 알칼리성일수록 감소되며, 시금치·근대·비트 등의 야채나 과일은 수산(oxalic acid)을 많이 함유하고 있어서 많이 섭취하면 수산이 소화관에서 칼슘과 결합하여 배설시키

Correspondence to: Hyoung-Chin Kim, Laboratory of Animal Model Evaluation, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), PO Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea
E-mail: hckim@kribb.re.kr

므로 칼슘 부족증이 되기 쉽다. 또한 현재의 가공식품, 청량 음료 중에는 인이 과다하게 함유되어 있으므로 칼슘의 흡수를 방해한다. 또한 인체에는 약 42 g의 철분이 있는데, 그 중 4분의 3은 헤모글로빈의 구성요소로서 적혈구 속에 함유되어서 전신을 순환하고 있다. 철분이 부족되면 헤모글로빈을 만들 수 없어서 적혈구도 보통보다 작아지게 되며 안색이 나빠지고, 신체도 쉽게 피로해지며, 저녁이 되면 발이 붓게 된다. 어른은 1일 약 1 mg의 철이 노나 땀과 함께 배설된다. 또 여성 생리에 의하여 소실되는 철을 1일당으로 환산하게 되면 0.5~1.0 mg에 상당한다. 철의 결핍은 서서히 진행되기 때문에 좀처럼 빈혈을 인지하지 못하여 악화되는 경우가 많다. 빈혈은 철 결핍 이외에도 여러 가지로 중대한 질병의 원인이 되므로 매우 중요한 질환중 하나이다.

이상에서 살펴본 바와 같이 칼슘 및 철은 우리 인체내에서 없어서는 안될 필수 성분으로 이러한 금속이온들의 체내 흡수율을 증진시켜 줄 수 있는 새로운 기능성 제품의 개발이 요구되고 있다. DFA IV는 현재 리얼바이오텍(주)에서 개발 중에 있는 생체내 금속 이온(철분, 칼슘, 아연 등)의 흡수 촉진인자로 인간의 빈혈 및 골다공증 예방 및 치료제와 자돈 빈혈치료제로서의 가능성이 입증된 물질이다(Saito *et al.*, 1999, 2000; Song *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2002). DFA는 Jackson *et al.*(1929)이 처음 발견한 것으로 이눌린(inulin)에 황산을 처리하여 프룩토스시럽 제조중에 생성된 부산물의 분석에 의하여 밝혀졌으며 2개의 프룩토스의 환원형 말단이 서로 다른 프룩토스 말단의 비환원성 수산기에 결합된 환상2당으로 현재까지 DFA I, II, III, IV, V로 5종이 밝혀져 있다. DFA는 칼슘이나 철 등과 복합체를 쉽게 형성하고 이들 금속이온 복합체를 동물에 투여하였을 때 금속이온의 흡수가 촉진되는 것으로 최근 밝혀지고 있으나 제조원료의 수급문제나 당 환상체의 대량생산이 어려웠던 관계로 그 기능 및 생체활용에 관한 연구는 아직 활발하게 이루어지지 않는 실정이다. DFA의 제조에 사용될 수 있는 원료물질로는 폴리프락탄(polyfructan, fructose homopolymer)인 이눌린과 레반이 대표적이며(Han, 1990) 이들로부터 화학적 또는 효소적으로 difructose anhydride를 합성할 수 있다. 그러나 폴리프락탄으로부터 화학합성방법으로 DFA를 합성하는 기술은 낮은 반응선택성과 이에 따른 복잡한 분리정제과정이 요구되어 경제적인 생산수단을 저해하는 요인이 되고 있어 이에 대한 대안으로 레반을 분해하여 DFA IV를 생산하는 미생물인 아스로박타 유레아취션스로부터 유래된 신규 레반 후룩토티랜스퍼라제(levan fructotransferase)의 유전자를 대장균에서 대량 발현시키고 이 고발현된 레반 후룩토티랜스퍼라제를 이용하여 레반으로부터 DFA IV를 대량생산할 수 있게 되었다(Lee *et al.*, 2001;

Jang *et al.*, 2003). DFA IV는 동물의 체내에서 분해되지 않는 비소화성, 비발효성 이당류라는 특성을 갖고 있으며, 저칼로리 감미료, 충치발생 저해 및 Bifidus균 증식인자로 이용될 수 있다(Sakurai *et al.*, 1997). 또한 식음료 및 유제품에 첨가하여 철분 및 칼슘흡수를 촉진하는 기능성 식품개발에 활용할 수 있다.

본 연구에서는 β -2,6:2,6'-difructose dianhydride(DFA) IV의 안전성 평가의 일환으로 단회 투여시와 반복투여시 나타날 수 있는 독성을 평가하고자 DFA IV의 SD 계통 암수 랫드에 대한 단회 및 4주 반복투여 경구독성시험을 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품 안전청고시, 제 1999-61호)에 준하여 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질

시험물질로 사용한 DFA IV의 성상은 백색의 단맛을 가진 결정성 분말이며, 순도 98% 이상의 것으로 멸균증류수(중외제약 주식회사)로 용해하여 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

SD(Sprague Dawley) 계통의 특정병원균 부재 암수컷 랫드 각각 5주령 50마리를 (주)대한바이오링크에서 입수하여 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참고로 하여 입수동물의 검수검역을 실시하였다. 동물 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰다. 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물 40마리를 시험에 사용하였다. 실험은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 15\%$, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국생명공학연구원 유전자원동 실험동물실에서 수행되었다. 시험자들은 모두 고압증기멸균(121°C, 20분)된 작업복과 보호장구를 착용하고 작업을 실시하였다. 동물은 폴리카보네이트제 사육상자(260W × 410L × 200H mm)에 순화기간 및 검역기간 중에는 각각 5마리 이하/사육상자로 사육하였고, 투여기간 중에는 2마리 이하/사육상자로 사육하였다. 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 라벨 지를 부착하여 식별하였다. 사료는 (주)대한바이오링크로부터 공급받은 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(PicoLab Co. Ltd, USA)를 자유섭취 시켰다. 물은 수도물을 고압증기멸균한 후 물병을 이용하여 자유섭취 시켰다.

투여량 및 시험군의 구성

단회투여 독성시험. 본 시험의 용량은 앞서 실시한 예비급성독성시험 결과 최고용량 5000 mg/kg까지 독성학

적인 변화를 야기 시키지 않았다. 따라서 본 단회투여 독성시험에서는 5000 mg/kg를 고용량군으로 하고, 공비 2.5를 두어 2000 mg/kg를 저용량군으로 설정하였다. 용매대조군에는 생리식염수만을 투여하였다. 시험군의 구성은 선발된 암수 각각 20마리의 동물을 군간 체중이 고르게 2개의 용량군과 1개의 대조군으로 하여 군당 암수 각각 5마리씩 배치하였다. 평균체중은 수컷은 192.9~216.2 g, 암컷은 146.8~165.8 g 범위였다.

4주 반복투여 독성시험. 본 시험물질은 철, 칼슘과 같은 금속이온의 체내 흡수율을 증진시켜주는 물질로서 본시험에 앞서서 실시한 단회투여급성독성시험에서 5000 mg/kg까지 어떠한 독성학적인 변화도 관찰되지 않았다. 일반적인 독성시험 가이드라인에서는 2000 mg/kg를 반복투여시험에서의 한계용량으로 정하고 있다. 따라서 본 4주간 반복투여 독성시험에서는 2000 mg/kg를 최고용량으로 설정하였고, 공비 2를 두어 아래로 2개의 군을 추가하였다. 대조군으로는 매체인 멸균중류수를 투여하는 매체대조군을 설정하였다. 동물들은 군별 10마리씩 균등하게 분배되도록 순위화 한 체중을 이용하여 무작위 법으로 분배하였다.

시험물질의 조제, 투여 방법 및 투여기간

시험물질을 측정하여 용매인 멸균중류수에 용해하여 최고용량군의 시험물질 투여액을 조제하고, 이를 단계별로 희석하여 저용량군들의 투여액을 조제하였다. 조제는 매일 투여직전에 실시하였다. 투여 방법은 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하고 금속제 경구 투여용 존대를 이용하여 위내에 직접 주입하였다. 조제된 시험물질은 투여개시 직전에 tube mixer를 이용하여 잘 혼합 시킨 후에 투여하였다. 투여횟수 및 기간은 단회투여 독성시험에서는 시험물질을 시험개시시 1회 투여하였고, 4주 반복투여 독성시험에서는 1회/일, 7일/주로 하여 4주간 투여하였다. 투여액량은 투여 직전의 체중을 측정하고 이를 기준으로 투여 액량을 계산하였으며, 10 ml/kg으로 산출하였다.

관찰 및 검사항목

단회투여 독성시험.

일반증상 및 폐사의 관찰: 투여 당일은 최종 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간 마다, 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

체중변화: 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시전과 투여 후 1, 3, 7 및 14일에 체중을 측정하였다.

부검: 투여 후 14일째에 모든 생존동물을 CO₂ 가스를 이용하여 마취한 후 개복 하여 복대동정맥 절단으로 방혈 처사 시킨 후 육안적으로 모든 내부 장기를 관찰하였다.

4주 반복투여 독성시험.

일반증상 및 폐사의 관찰: 시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 일반상태, 중독증상 및 사망의 유무를 관찰하였고, 이상이 있었던 경우 증상의 종류, 발견일 및 증상의 정도를 개별적으로 기록하였다.

체중변화: 모든 동물에 대하여 투여개시시 및 시험기간 중 주 1회와 부검일에 체중을 측정하였다.

사료 및 물 섭취량 측정: 시험기간 중에 주 1회 사료 및 물 섭취량을 측정하였다. 측정방법은 체중측정 일에 사료 및 물의 정량을 급여한 후 익일에 잔량을 측정하여 마리 당 평균 섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

안과학적 검사: 군 분리 전 순환기간 중에 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 관찰하였다. 투여 후에는 투여 최종 주에 모든 동물의 눈의 외관을 육안적으로 관찰하였다. 특히 대조군과 최고용량군의 경우 안저 카메라(Genesis, Kowa, 일본)를 이용하여 눈의 안저를 검사하였다. 안저검사는 산동제(OcuHomapine, 삼일제약 주식회사)를 이용하여 동공을 확장 시킨 후 검사하였다.

노검사: 노 검사용 시험지(Bayer)와 요자동분석장치(Uriscan optima plus, 영동제약)를 이용하여 요비중, pH, 요단백(protein), 케톤체(ketone body), 잠혈(occult blood), 요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 아질산염(nitrite) 및 유로빌리노겐(urobilinogen)에 관하여 검사하였다. 요침사검사는 적혈구, 백혈구, 상피세포 및 원주를 관찰하였다. 채뇨는 대사케이지를 이용하여 실시하였고 정성분석, 요색조검사 및 요침사 검사를 위해서 3~4시간 동안 채뇨된 신선뇨를 사용하였고, 노량은 24시간 동안의 축뇨를 이용하여 측정하였다.

혈액학적 검사: 시험종료 후 생존한 모든 동물에 대하여 부검 전에 하룻밤 절식시킨 후, 에테르를 이용한 마취 상태에서 개복하여 후대정맥에서 채혈하고 혈액 응고방지제인 K3 EDTA가 들어있는 CBC 채혈병(MiniCollect)에 혈액을 취한 후 coulter mixer기 위에서 5분 이상 혼합한 뒤 혈구자동계측장치(HEMAVET 3500R, USA)를 사용하여 백혈구수(white blood cell count; WBC), 적혈구수(red blood cell count; RBC), 헤모글로빈 농도(hemoglobin conc.; HGB), 헤마토크리트(hematocrit; Hct), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume; MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin; MCH), 적혈구평균혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin conc.; MCHC), 혈소판수(platelet count; Plt)를 측정하였으며, differential leucocyte count는 혈액도말표본을 육안적으로 검경하여 검사하였다. 또한 부검일에 혈액응고시간 검사를 위해 항 응고제로 3.2% sodium citrate 용액이 0.1 ml 들어 있는 시험관에 혈액 0.9 ml을 취하여 잘

섞은 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻어진 혈장을 이용하여 측정하였다. 혈장은 분리한 후 -70°C deep freezer(8417S/N85075-2084, Forma Scientific)에 6 또는 7일간 보관 하였다가 37°C 수조에서 녹인 후 혈액응고시간 검사장치(CA-50, Sysmex, 일본)를 사용하여 PT (prothrombin time)를 측정하였다.

혈액생화학적 검사: 부검시에 모든 시험동물들에 대하여 혈액학적검사와 같은 방법으로 후대정맥에서 채혈한 혈액을 혈청분리관(Estar vac.)에 넣고 15~20분 동안 상온에 방치하여 응고시켰다. 이후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 획득한 혈청으로 자동분석장치(AU400, Olympus, 일본)를 이용하여 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), blood urea nitrogen(BUN), creatinine (CREA), glucose(GLU), total cholesterol(TCHO), total protein(TP), creatine phosphokinase(CPK), albumin (ALB), total bilirubin(TBIL), triglyceride(TG), calcium (Ca), inorganic phosphorus(IP)을 측정하였고, 전해질 자동분석장치(644 Na, K, Cl Analyzer, Ciba-Corning, USA)를 이용하여 염소(chloride; Cl), 나트륨(sodium; Na), 칼륨(potassium; K)을 측정하였다.

부검 및 장기중량 측정: 시험종료 후 모든 생존동물에 대하여 에테르 마취 하에 후대정맥에서 혈액검사를 위한 채혈을 실시한 후, 복대동맥을 절단하여 방혈·치사 시켜 육안적으로 외부소견, 피하, 복강장기, 흉강장기 및 뇌에 대하여 검사하였다. 또한, 뇌, 흉선, 폐, 심장, 간장, 비장, 신장, 부신, 정소, 정소상체, 난소 및 자궁의 장기에 대하여 절대장기 중량을 전자저울(AND, GR-200)을 이용하여 측정하였고, 부검전 절식된 체중에 대한 상대장기 중량을 산출하였다.

병리조직학적인 검사: 투여한 모든 동물의 육안적 병변, 피부(유선포함), 저정낭, 전립선, 방광, 고환, 부고환, 난소, 자궁, 질, 비장, 췌장, 장간막립프절, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 신장, 부신, 간장, 타액선, 악하림프절, 갑상선(부갑상선 포함), 대동맥, 흉선, 심장, 폐장, 기관, 식도, 좌골신경, 골격근, 흉골, 척, 흉척수, 안구, 하더리안선, 뇌 및 뇌하수체중 안구는 제외하고 10% 중성포르말린 용액에 고정하였으며, 안구는 Davidson 용액에 고정하였다. 이렇게 고정된 장기를 이용하여 매체대조군과 최고용량군에서 아래의 모든 장기를 파라핀 포매하고, 5 µm로 박절하여 H&E 염색 표본을 만들어 검경하였다.

통계학적 분석

단회투여 독성시험에서는 측정항목중 체중결과에 대해

서 대조군과 시험군간의 유의성 검증을 위해 t-test 검정법을 사용하였으며, 4주 반복투여 독성시험에서 얻어진 자료에 대한 매체대조군과 시험물질 투여군간의 비교는 일반적으로 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였다. 이러한 모든 통계학적인 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS10K를 이용하였다. 연속인 자료의 분석항목은 체중, 사료섭취량, 물섭취량, 혈액학적 검사, 혈액응고시간, 혈액생화학적 검사 및 장기중량이며, 통계분석 1단계는 정규성검정인 Kolmogorov-Smirnov 검정을 실시하였고, 정규성을 만족하지 않는 경우에는 비모수적인 검정방법을 사용하였다. 2단계는 정규성을 만족하는 경우에 등분산성을 검정하는 Bartlett 검정을 실시하였으며, 마지막 3단계로는 모수적인 다중비교(Dunnett's test) 혹은 비모수적인 다중비교를 실시하였다. 비연속인 자료의 분석항목은 요분석이며, 통계분석방법으로는 1단계는 척도변환을 통하여 데이터를 재입력하였고, 2단계로 비모수적인 다중비교(Kruskal-Wallis test)를 실시하였다.

결 과

단회투여 독성시험

일반증상 및 사망률. 시험기간 동안 암수 모두에서 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 특기할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 폐사 및 빈사동물 또한 시험 전기간을 통하여 관찰되지 않았다(Table 1).

체중의 측정. 시험 전기간을 통한 경구투여에 있어서 암컷 2000 mg/kg 투여군에서 매체대조군에 비해 유의한 체중증가($p < 0.01$)가 관찰되었을 뿐, 그 밖의 암수 모든 군에서 유의성 있는 체중변화는 없었다(Fig. 1).

부검소견. 부검결과, 모든 생존동물에서 본 시험물질의 투여에 기인한 것으로 사료되는 어떠한 유의할 만한 육안 병변은 관찰되지 않았다(Table 2):

Table 1. Mortality and clinical signs in rats treated orally once with DFA IV

Items	Dose (mg/kg B.W)	Final mortality		Clinical signs	
		Male	Female	Male	Female
Groups	0	0/5	0/5	-	-
	2000	0/5	0/5	-	-
	5000	0/5	0/5	-	-

Values are expressed as number of dead animal/total number of animals.

- : no clinical signs.

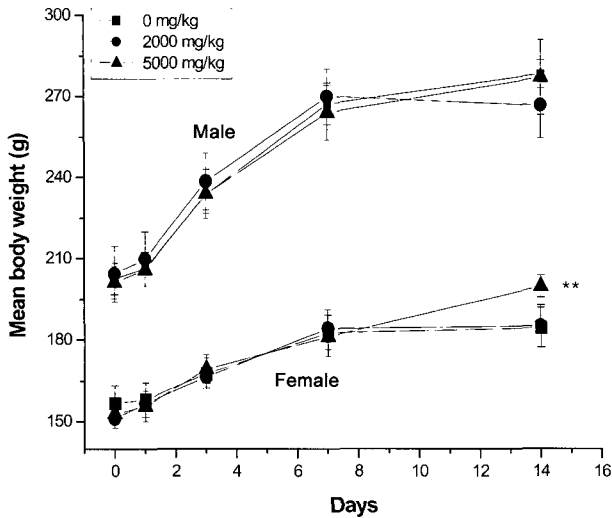


Fig. 1. Body weight changes in rats treated orally once with DFA IV. Data are mean \pm S.D. (n=5). Significantly different from control group (0 mg/kg) at ** $p<0.01$.

Table 2. Gross findings of necropsy in rats treated orally once with DFA IV

Items	Dose (mg/kg B.W)	No. of animals with abnormal gross findng	
		Male	Female
Groups	0	0/5	0/5
	2000	0/5	0/5
	5000	0/5	0/5

Values are expressed as number of abnormal animal/total number of animals.

4주 반복투여 독성시험

일반증상 및 사망률. 시험물질의 투여와 관련된 일반 증상 및 사망동물은 암수의 모든 투여군에서 관찰되지 않았다. 다만 숫컷 매체대조군 및 2000 mg/kg 투여군에서 각각 1례씩 투여 24일째 및 15일째에 사망동물이 관찰되었다. 사망동물의 경우 투여시 식도가 아닌 기도로 잘못 투여됨에 따라 사망한 것으로 판단되었다(Table 3).

체중변화. 시험 전기간을 통한 경구투여에 있어서의

Table 3. Mortality and clinical signs in rats treated orally with DFA IV for 4 weeks

Items	Dose (mg/kg B.W)	Final mortality		Clinical signs	
		Male	Female	Male	Female
Groups	0	1/10	0/10	-	-
	500	0/10	0/10	-	-
	1000	0/10	0/10	-	-
	2000	1/10	0/10	-	-

Values are expressed as number of dead animal/total number of animals.

- : no clinical signs.

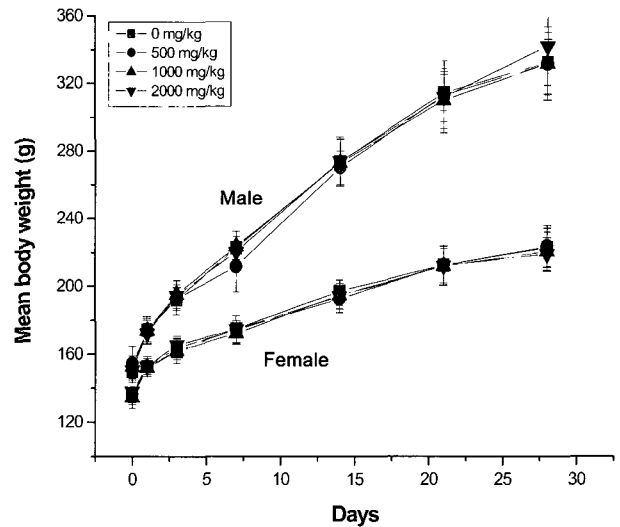


Fig. 2. Body weight changes in rats treated orally once with DFA IV for 4 weeks. Data are mean \pm S.D. (n=9 or 10).

암수 모두에 있어서 각 군간에 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다(Fig. 2).

장기중량변화. 장기중량에서도 시험물질의 투여에 의한 어떠한 통계학적으로 유의한 변화도 관찰되지 않았다 (Table 4).

사료섭취량과 음수량의 변화. 군당 사료섭취량과 음수 소비량에 있어서 암수 모든 처치군과 대조군 사이에 시험 기간 동안 유의성 있는 변화는 인정되지 않았다.

안과학적 검사소견. 시험 전기간을 통하여 모든 시험 물질 투여군에서 대조군에 비해 시험물질의 투여에 기인한 특기할 만한 변화는 인정되지 않았다.

노검사 소견. 노검사에서는 수컷의 요 비중이 2000 mg/kg 투여군에서 통계학적으로 유의하게 증가하였고 ($p<0.05$), 암컷 2000 mg/kg 투여군에서도 유의성은 인정되지 않았으나 다소 증가하는 경향이 관찰되었다. Protein 과 WBC의 경우에도 암수 2000 mg/kg 투여군에서 증가하는 경향이 관찰되었으나 통계학적 유의성은 없었다 (Table 5).

혈액학적 검사소견. 암수 모든 시험물질투여군은 대조군에 비해 시험물질 투여후의 혈액학적 검사에서 시험물질의 투여에 의한 어떠한 변화도 관찰되지 않았다(Table 6).

혈액생화학적 검사소견. 혈액생화학적인 검사에서는 수컷의 시험물질 500, 1000, 2000 mg/kg 투여군에서 매체대조군에 비해 glucose(GLU)및 albumin(ALB)의 감소와 creatine phosphokinase(CPK)의 증가가 통계학적으로 유의하게 관찰되었다. 암컷의 시험물질 투여군에서는 1000 및 2000 mg/kg 투여군에서 Ca의 증가와 Cl의 감소, 전투여군에서 Na의 감소가, 200 mg/kg 투여군에

Table 4. Absolute and relative organ weights (g) of rats treated orally with DFA IV for 4 weeks

Absolute weight (g) Relative weight (%)	Male				Female			
	0 mg/kg ^a	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg ^a	0 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
Brain (%)	1.73 ± 0.08 0.52 ± 0.03	1.74 ± 0.09 0.53 ± 0.03	1.75 ± 0.03 0.53 ± 0.04	1.78 ± 0.06 0.52 ± 0.04	1.66 ± 0.08 0.75 ± 0.05	1.66 ± 0.06 0.74 ± 0.05	1.67 ± 0.10 0.76 ± 0.06	1.65 ± 0.06 0.75 ± 0.03
Thymus (%)	0.44 ± 0.07 0.13 ± 0.02	0.49 ± 0.09 0.15 ± 0.06	0.48 ± 0.09 0.14 ± 0.02	0.50 ± 0.09 0.15 ± 0.03	0.33 ± 0.05 0.15 ± 0.02	0.36 ± 0.06 0.16 ± 0.03	0.35 ± 0.06 0.16 ± 0.02	0.31 ± 0.06 0.14 ± 0.03
Heart (%)	1.18 ± 0.06 0.45 ± 0.02	1.14 ± 0.08 0.49 ± 0.07	1.10 ± 0.14 0.48 ± 0.04	1.19 ± 0.23 0.47 ± 0.07	0.81 ± 0.07 0.36 ± 0.03	0.79 ± 0.06 0.36 ± 0.02	0.80 ± 0.05 0.37 ± 0.01	0.83 ± 0.08 0.38 ± 0.03
Lung (%)	1.48 ± 0.07 0.35 ± 0.01	1.61 ± 0.24 0.35 ± 0.02	1.55 ± 0.10 0.33 ± 0.04	1.60 ± 0.22 0.35 ± 0.07	1.33 ± 0.10 0.60 ± 0.04	1.26 ± 0.10 0.56 ± 0.04	1.34 ± 0.28 0.61 ± 0.12	1.25 ± 0.12 0.57 ± 0.06
Liver (%)	9.68 ± 1.16 2.91 ± 0.30	9.52 ± 0.80 2.87 ± 0.11	9.33 ± 0.70 2.81 ± 0.09	9.74 ± 1.18 2.86 ± 0.33	6.39 ± 0.54 2.87 ± 0.14	6.47 ± 0.66 2.89 ± 0.20	6.26 ± 0.64 2.84 ± 0.19	6.19 ± 0.50 2.82 ± 0.19
Spleen (%)	0.70 ± 0.06 0.21 ± 0.02	0.73 ± 0.07 0.22 ± 0.01	0.69 ± 0.10 0.21 ± 0.03	0.72 ± 0.08 0.21 ± 0.02	0.64 ± 0.07 0.29 ± 0.02	0.58 ± 0.06 0.26 ± 0.02	0.60 ± 0.08 0.27 ± 0.04	0.62 ± 0.07 0.28 ± 0.03
Testis (%)	3.64 ± 0.27 1.10 ± 0.08	3.46 ± 0.31 1.04 ± 0.09	3.43 ± 0.21 1.04 ± 0.07	3.60 ± 0.31 1.06 ± 0.13	- -	- -	- -	- -
Ovary (%)	- -	- -	- -	- -	0.10 ± 0.02 0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.03 0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.03 0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.02 0.05 ± 0.02
Kidney (%)	2.35 ± 0.13 0.71 ± 0.05	2.37 ± 0.18 0.72 ± 0.03	2.33 ± 0.17 0.70 ± 0.02	2.40 ± 0.19 0.70 ± 0.06	1.48 ± 0.10 0.67 ± 0.04	1.55 ± 0.11 0.69 ± 0.04	1.52 ± 0.13 0.69 ± 0.05	1.54 ± 0.15 0.70 ± 0.06
Adrenal gland (x10) (%) (x10)	0.50 ± 0.04 0.15 ± 0.01	0.50 ± 0.05 0.16 ± 0.02	0.50 ± 0.06 0.15 ± 0.02	0.50 ± 0.06 0.15 ± 0.02	0.70 ± 0.08 0.31 ± 0.04	0.70 ± 0.10 0.31 ± 0.04	0.70 ± 0.07 0.30 ± 0.03	0.70 ± 0.06 0.33 ± 0.03
Epididymis (%)	0.88 ± 0.07 0.27 ± 0.02	0.85 ± 0.07 0.26 ± 0.03	0.87 ± 0.05 0.26 ± 0.02	0.91 ± 0.06 0.27 ± 0.03	- -	- -	- -	- -
Uterus (%)	- -	- -	- -	- -	0.43 ± 0.16 0.19 ± 0.08	0.38 ± 0.07 0.17 ± 0.04	0.50 ± 0.11 0.23 ± 0.05	0.48 ± 0.26 0.22 ± 0.12

^aEach value represents the mean ± SD of nine animals.
Each value represents the mean ± SD of ten animals.

서 blood urea nitrogen(BUN)의 증가가 관찰되었다 (Table 7).

부검소견. 시험물질의 투여와 관련된 변화로 생각되는 특이한 변화는 관찰되지 않았다. 사망동물의 부검소견에서는 수컷 매체대조군 및 2000 mg/kg 투여군에서 사망한 1례씩의 경우 폐의 암적색조 및 경도가 단단해졌고 흉수가 있는 것이 관찰되었다. 이는 시험물질의 투여에 의한 변화는 아니었다.

병리조직학적 소견. 신장에서 만성진행성 신증(chronic progressive nephropathy), 신세뇨관에 광물질 침착(mineralization/tubule)이 암·수 모두에서 처치군 및 대조군에서 공히 매우 미약하게 관찰되었다. 방광에서 호산성 물질(eosinophilic material), 갑상선의 ultimobranchial cyst, 안구의 안검염(inflammation/eyelid)이 수컷 고농도군 2례, 암컷 대조군 및 고농도군에서 각각 1례씩 관찰되었다. 심장의 염증(inflammation) 소견이 수컷의 고농도군 1례에서 관찰되었다(Table 8).

고찰 및 결론

본 연구에서는 리얼바이오텍(주)에서 개발한 DFA IV의 임상 적용을 위한 비임상 안전성 평가의 일환으로 경구투

여에 의한 단회투여시 독성유무의 확인 및 반복투여시의 독성을 조사하기 위하여 랫드를 이용하여 단회 및 4주간 반복경구독성시험을 실시하였다.

단회투여 독성시험에 있어서 최고용량은 예비급성독성 시험결과를 토대로 5000 mg/kg으로 설정하고 공비 2.5를 두어 그 아래로 1개의 용량군을 추가하였다. DFA IV를 매일 1회 경구 투여하여 14일간 관찰한 결과, 모든 투여용량군에서 사망에는 전혀 관찰되지 않아 개략의 치사량의 산출은 불가능 하였고, 일반적인 임상증상에서도 아무런 이상이 발견되지 않았으며, 대조군과 비교하여 체중 변화나 모든 생존동물의 부검소견에서도 이상이 관찰되지 않았다.

4주간 반복경구투여독성시험에 있어서도 SD 계통 암·수 랫드에 공히 매체 대조군과 시험물질을 각각 2000, 1000 및 500 mg/kg의 용량으로 주 7회, 4주간 총 28회 반복 경구투여 임상증상, 체중변화, 사료섭취량, 음수소비량, 안검사, 뇨검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사, 부검 및 장기중량 측정, 병리조직학적검사 등을 수행한 결과, 시험종류시 까지 암·수 모두 시험물질에 기인한 사망 동물은 없었으며, 음수 및 사료섭취량에서 산발적으로 관찰된 통계학적으로 유의한 섭취량의 저하는 일시적이거나 용량상관성이 없는 변화로서 시험물질의 투여에 의한

Table 5. Urinalysis of male and female rats treated orally with DFA IV for 4 weeks

Parameters	Sex Dose (mg/kg)	Male				Female			
		0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
Specific Gravity	≤ 1.005	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.010	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.015	3	3	0	0	3	4	3	1
	1.020	1	0	1	0	2	1	1	1
	1.025	1	0	2	2	0	0	0	1
	≥ 1.030	0	2	2	3**	0	0	1	2
pH	6.0	0	0	0	1	0	0	0	1
	6.5	1	0	2	3	0	0	0	0
	7.0	1	0	0	1	0	0	0	0
	7.5	2	3	1	0	1	1	1	1
	8.0	1	2	1	0	1	0	1	2
	8.5	0	0	0	0	2	4	3	1
	≥ 9.0	0	0	0	0	1	0	0	0
Glucose	-	5	5	5	5	5	5	5	4
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	1
	1+	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	5	5	5	5	5	5	5	4
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	1
	1+	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	-	5	5	3	1	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	4	0	0	0	0
	1+	0	0	2	0	0	0	0	0
Protein	-	0	1	0	0	3	3	2	0
	+/-	1	0	0	0	1	1	1	0
	1+	1	0	0	0	1	0	1	1
	2+	2	2	3	1	0	1	1	2
	3+	1	1	0	2	0	0	0	2
	4+	0	1	2	2	0	0	0	0
Urobilinogen	+/-	5	5	5	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrite	-	5	5	5	5	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	5	4	5	5	5	4	5	5
	+/-	0	1	0	0	0	1	0	0
WBC	-	0	0	0	0	4	0	1	0
	+/-	0	0	0	0	0	2	2	0
	1+	1	0	1	0	0	2	0	0
	2+	2	1	2	0	1	0	2	4
	3+	2	4	3	5	0	1	0	1
RBC ^a	-	5	5	5	5	5	5	5	5
	+/(4 개 이하)	0	0	0	0	0	0	0	0
WBC ^a	-	5	5	5	5	5	4	2	3
	+/(5 개 이하)	0	0	0	0	0	1	2	2
	+	0	0	0	0	0	0	1	0
Epithelial cell ^a	-	5	5	4	5	4	2	2	3
	+/(전시야에 수개)	0	0	1	0	1	2	1	2
	+	0	0	0	0	0	0	1	0
	2+	0	0	0	0	0	1	1	0
Casts ^a	-	5	5	5	5	5	5	4	4
	+/(1 개)	0	0	0	0	0	0	1	1

^aUrine sediment parameters.

** : significantly different from control group (p<0.01) by Wilcoxon and Wilcox test.

Each value represents the mean ± SD of five animals.

Table 6. Hematological values of rats treated orally with DFA IV for 4 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	Male				Female			
		0 ^a	500	1000	2000 ^a	0	500	1000	2000
	WBC (K/ul)	8.36 ± 1.58	8.32 ± 1.93	8.73 ± 1.56	9.08 ± 2.11	5.74 ± 1.83	5.49 ± 2.31	4.81 ± 1.22	6.44 ± 1.89
	RBC (M/ul)	7.90 ± 0.42	8.12 ± 0.80	8.51 ± 0.45	8.48 ± 0.60	7.75 ± 0.86	7.91 ± 1.27	8.10 ± 0.68	8.22 ± 0.57
	HGB (g/dl)	13.86 ± 0.43	14.28 ± 0.54	14.30 ± 0.47	14.12 ± 0.42	13.40 ± 0.87	13.27 ± 1.71	13.88 ± 0.51	13.74 ± 0.78
	HCT (%)	45.17 ± 2.78	48.07 ± 4.62	48.91 ± 2.20	48.71 ± 3.25	43.95 ± 4.84	44.47 ± 6.73	45.42 ± 3.79	46.07 ± 3.18
	MCV (fl)	57.20 ± 2.39	57.50 ± 0.95	57.82 ± 0.94	57.46 ± 1.49	56.75 ± 1.52	56.34 ± 1.08	56.11 ± 0.92	56.04 ± 1.67
	MCH (pg)	20.90 ± 10.38	17.50 ± 1.29	16.91 ± 0.80	16.70 ± 0.80	17.42 ± 1.18	16.91 ± 0.90	17.23 ± 1.20	16.73 ± 0.44
	MCHC (g/dl)	30.74 ± 1.58	30.45 ± 1.97	29.26 ± 0.93	29.09 ± 1.47	30.66 ± 2.03	29.98 ± 1.24	30.71 ± 2.13	29.89 ± 0.62
	PLT (K/ul)	467.89 ± 372.60	392.40 ± 285.63	311.80 ± 62.32	400.67 ± 254.24	290.30 ± 88.66	332.80 ± 34.89	361.50 ± 303.87	316.00 ± 27.24
	NEU (%N)	5.53 ± 2.25	5.91 ± 2.37	4.75 ± 1.58	4.27 ± 1.63	5.09 ± 1.31	5.40 ± 1.65	4.12 ± 1.46	5.18 ± 2.51
	LYM (%)	91.12 ± 2.96	91.06 ± 2.43	91.95 ± 2.04	93.07 ± 1.82	91.41 ± 1.66	90.84 ± 3.00	92.43 ± 1.82	91.25 ± 4.08
	MONO (%M)	3.05 ± 0.72	2.90 ± 0.54	2.96 ± 0.72	2.53 ± 0.28	3.19 ± 0.65	3.42 ± 1.23	3.27 ± 0.48	3.10 ± 0.62
	ESO (%E)	0.27 ± 0.26	0.12 ± 0.09	0.12 ± 0.07	3.19 ± 0.65	0.25 ± 0.23	0.30 ± 0.58	0.16 ± 0.16	0.49 ± 1.03
	BASO (%B)	0.04 ± 0.04	0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.02	0.25 ± 0.23	0.06 ± 0.08	0.04 ± 0.06	0.02 ± 0.02	0.16 ± 0.30
	PLASMA coagulation	10.10 ± 0.93	10.22 ± 1.43	9.42 ± 0.50	9.80 ± 1.87	8.30 ± 0.32	8.06 ± 0.32	8.36 ± 0.31	8.27 ± 0.52

^aEach value represents the mean ± SD of nine animals.

Each value represents the mean ± SD of ten animals.

WBC : white blood cell count; RBC : red blood cell count; HGB : hemoglobin; HCT : hematocrit; MCV : mean corpuscular volume; MCH : mean corpuscular hemoglobin; MCHC : mean corpuscular hemoglobin conc; PLT : platelet; NEU : neutrophil; LYM : lymphocyte; MONO : monocyte; EOS : eosinophil; BASO : basophil.

Table 7. Serum biochemical values of rats treated orally with DFA IV for 4 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	Male				Female			
		0 ^a	500	1000	2000 ^a	0	500	1000	2000
	AST (IU/l)	135.11 ± 31.25	138.70 ± 30.10	127.10 ± 24.38	127.11 ± 24.14	90.60 ± 20.36	90.10 ± 16.17	495.60 ± 23.64	100.20 ± 24.47
	ALT (IU/l)	32.60 ± 5.95	32.52 ± 5.68	34.20 ± 4.78	33.03 ± 4.39	25.41 ± 3.88	27.11 ± 4.47	27.89 ± 4.69	30.02 ± 3.70
	ALP (IU/l)	116.12 ± 18.94	114.32 ± 10.11	115.31 ± 21.96	126.57 ± 22.98	78.51 ± 13.27	88.84 ± 14.99	93.76 ± 28.68	89.18 ± 20.46
	BUN (mg/dl)	19.46 ± 2.30	18.68 ± 1.79	18.37 ± 1.24	18.33 ± 1.76	16.04 ± 2.84	17.52 ± 2.82	17.51 ± 1.56	20.17 ± 4.12*
	CRE (mg/dl)	0.52 ± 0.08	0.52 ± 0.04	0.51 ± 0.03	0.53 ± 0.05	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.05	0.49 ± 0.03	0.52 ± 0.06
	GLU (mg/dl)	137.79 ± 23.26	83.94 ± 15.55**	82.12 ± 12.60**	91.06 ± 13.64**	98.12 ± 13.02	110.83 ± 23.52	106.03 ± 17.80	105.43 ± 14.38
	CHO (mg/dl)	94.16 ± 12.46	89.62 ± 6.52	90.37 ± 9.47	87.28 ± 11.68	86.62 ± 13.84	85.62 ± 18.94	86.89 ± 12.09	84.71 ± 16.09
	PRO (g/dl)	6.43 ± 0.29	6.17 ± 0.12	6.12 ± 0.40	6.16 ± 0.25	5.72 ± 0.30	5.97 ± 0.25	6.04 ± 0.21*	5.79 ± 0.19
	CPK (IU/l)	184.27 ± 128.07	453.93 ± 160.99**	370.17 ± 163.40*	398.70 ± 169.81**	173.73 ± 121.79	163.09 ± 105.72	200.59 ± 131.30	244.76 ± 159.52
	ALB (g/dl)	3.58 ± 0.13	3.39 ± 0.07*	3.32 ± 0.20*	3.37 ± 0.11*	3.22 ± 1.15	3.35 ± 0.13	3.38 ± 0.08*	3.32 ± 0.10
	TBIL (mg/dl)	0.16 ± 0.05	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.03
	TG (mg/dl)	41.74 ± 12.62	32.53 ± 4.34	32.66 ± 7.64	35.14 ± 9.90	27.65 ± 5.82	28.11 ± 11.86	26.95 ± 8.37	31.91 ± 7.21
	Ca (mg/dl)	10.51 ± 0.54	10.04 ± 0.40	10.01 ± 0.77	10.10 ± 0.44	9.20 ± 0.41	9.57 ± 0.40	9.86 ± 0.30**	9.79 ± 0.46**
	IP (mg/dl)	9.16 ± 1.20	9.89 ± 0.99	10.15 ± 1.20	10.52 ± 1.00	8.17 ± 0.75	8.86 ± 0.92	9.05 ± 0.86	8.73 ± 0.84
	Na (mmol/l)	144.11 ± 1.45	143.40 ± 2.01	146.80 ± 7.18	146.56 ± 2.40	175.00 ± 24.54	148.60 ± 10.97*	138.90 ± 5.07**	134.60 ± 9.00**
	K (mmol/l)	5.05 ± 0.82	4.85 ± 1.08	5.21 ± 1.44	4.90 ± 0.72	6.35 ± 1.57	6.29 ± 1.21	5.58 ± 0.74	5.31 ± 0.51
	Cl (mmol/l)	102.00 ± 1.00	100.80 ± 2.70	103.00 ± 3.80	102.11 ± 1.90	126.20 ± 18.44	108.00 ± 6.46	101.50 ± 2.12*	98.30 ± 4.11**

^aEach value represents the mean and SD of nine animals.

^bEach value represents the mean and SD of ten animals.

*Significantly different from control group (p<0.05) by Dunnett's test.

**Significantly different from control group (p<0.01) by Dunnett's test.

Table 8. Histopathological changes of testis in rats treated orally with DFA IV for 4 weeks

Organs	Sex	Male		Female	
		Dose (mg/kg)		Dose (mg/kg)	
	Number of animals		9	9	10
Kidney					
Chronic progressive nephropathy		6	6	2	1
Mineralization		1	0	7	8
Urinary bladder					
Eosinophilic material		2	0	0	0
Heart					
Inflammation		0	1	0	0
Eye					
Inflammation/eyelid		0	2	1	1
Thyroid gland					
Ultimobranchial cyst		1	2	1	0

변화로는 인정되지 않았다. 또한 장기중량에서도 시험물질의 투여에 의한 어떠한 통계학적으로 유의한 변화도 없었다.

노검사에서 있어서 암·수 2000 mg/kg 투여군에서 관찰된 요 비중 증가 및 protein과 WBC의 증가경향은 시험물질의 투여와 관련된 변화로 사료되나 병리 조직 검사에서는 이와 관련된 뚜렷한 소견의 차이가 관찰되지 않아 독성학적으로 의미 있는 변화로 판단하기는 어렵다.

혈액생화학적인 검사에서 수컷 전 투여군에서 관찰된 creatine phosphokinase(CPK)의 증가는 횡문근의 괴사나 변성, 뇌질환시 관찰되나 본시험의 병리조직 검사에서는 관련 장기조직의 변화는 관찰되지 않았다. 병리조직학적 변화를 동반하지 않은 이러한 혈청 CPK의 증가가 일과성인 변화인지 아니면 병리조직학적 변화에 선행하는 변화인지 현재로서는 판단하기 어렵다. CPK는 체혈시 용혈이 있는 경우에도 상당히 증가하며 따라서 정상범위도 그 폭이 매우 크다. 또한 암컷에서는 이러한 변화가 관찰되지 않았고 관련 병리학적/임상학적 변화가 관찰되지 않은 것으로 보아 수컷에서의 CPK의 증가는 독성학적으로 의미 있는 변화로 판단되지 않는다. 그 밖에 관찰된 혈액생화학적인 변화들은 그 변화의 폭이 크지 않았고 정상적인 범위 내에서의 변화이며 이와 관련된 다른 변화가 관찰되지 않았던 바 시험물질 투여에 의한 독성학적인 부작용으로 생각되지 않았다.

병리조직학적인 검사에서 신장의 만성진행성 신증과 신세뇨관에 광물질 침착은 암·수 모두에서 처치군 및 대조군에서 공히 매우 미약하게 관찰되었다. 이는 Sprague-Dawley 랫드에서 흔히 관찰되는 자연발생적 병변으로서 암컷보다 수컷에서 흔히 관찰되며, 신세뇨관에 단백질 원주, 신세뇨관의 확장 및 상피의 재생소견, 사구체 기저막의 비후, 혈철소 또는 lipochrome 색소 침착, 광물질 침

착 등을 특징으로 한다. 본 시험에서 관찰된 병변은 severity가 매우 경미하고 대조군에서도 투여군과 같은 빈도로 발생하여 약물에 의한 변화가 아닌 자연적으로 흔히 발생하는 소견으로 판단하였다. 방광의 내강에서는 호산성 물질(eosinophilic material)이 관찰되었는데 이는 부속생식선의 분비물(coagulated seminal fluid)로서 독성 병변과는 무관하다. 또한 갑상선의 ultimobranchial cyst도 발생과정 중에 ultimobranchial body의 잔존에 의해 생기는 선천적인 소견(congenital lesion)으로서 독성 변화와는 무관하다. 심장의 염증 소견이 수컷 고농도군에서 1례 관찰되었으나 severity가 매우 경미하고 발생빈도가 1례로서 적어 시험물질에 의한 변화는 아니라고 판단된다. 이외에 안구의 안검염이 수컷 고농도군 2례, 암컷 대조군 및 고농도군에서 각각 1례 씩 관찰되었으나, 이 병변도 국소적으로 severity가 매우 경미하고, 대조군에서도 관찰된 변화로서 시험물질과는 무관하다. 결론적으로 본 시험에서 시험물질과 관련된 병리조직학적 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 본 시험조건하에서 리얼바이오텍(주)의 DFA IV는 랫드 암·수에 있어서 단회경구투여시 시험물질과 연관된 특기할만한 임상증상이 관찰되지 않았고, LD₅₀치는 암·수 모두 5000 mg/kg 이상일 것으로 판단되었으며, 또한 4주간 반복 경구투여 시험결과, 2000 mg/kg의 용량으로 4주 연속 경구 투여시에도 명백한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다. 단, 수컷 2000 mg/kg 투여군에서의 노비중의 증가와 수컷 전투여군에서 혈청 creatine phosphokinase의 증가가 통계적으로 유의하게 관찰되었으나 병리조직학적 변화 및 관련된 타증상을 동반하지 않아 독성학적으로 의미있는 변화로 판단되지 않았다. 따라서 DFA IV의 랫드에서의 무해용량은(NOAEL)은 체중 kg당 2000 mg 이상일 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발사업 및 KRIBB 기관고유사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 식품의약품안전청 (1999): 의약품등의 독성시험기준. 식품의약품안전청고시 제 1999-61호.
 Han, Y. W. (1990): Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol.*, **35**, 171-194.
 Jang, E.K., Jang, K.H., Koh, I., Kim, I.H., Kim, S.H., Kang,

- S.A., Kim, C.H., Ha, S.D. and Rhee, S.K. (2002): Molecular characterization of levansucrase gene from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 and its expression in *Escherchia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 603-609.
- Jang, K.H., Ryu, E.J., Park, B.S., Song, K.B., Kang, S.A., Kim, C.H., Uhm, T.B., Park, Y.I. and Rhee, S.K. (2003): Levan fructotransferase from *Arthrobacter oxydans* J17-21 catalyzes the formation of the di-D-fructose dianhydride IV from levan. *J. Agric. Food Hem.*, **51**, 2632-2636.
- Lee, J., Saraswat, V., Koh, I., Song, K.B., Park, Y.H. and Rhee, S.K. (2001): Secretory production of *Arthrobacter* levan fructotransferase from recombinant *Escherchia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **195**, 127-132.
- Saito, K. and Tomita, F. (2000): Difuctose anhydrides: Their mass-production and physiological functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1321-1327.
- Saito, K., Hira, T. Suzuki, T., Hara, H., Yokota, A. and Tomita, F. (1999): Effects of DFA IV in rats: Calcium absorption and metabolism of DFA IV by intestinal microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 655-651.
- Sakurai, H., Yokota, A. and Tomita, F. (1997): Molecular cloning of an inulin fructotransferase (depolymerizing) gene from *Arthrobacter* sp. H65-7 and its expression in *Escherchia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 87-92.
- Song, K.B., Bae, K.S., Lee, Y.B., Lee, K.Y. and Rhee, S.K. (2000): Characteristics of levan fructotransferase from *Arthrobacter ureafaciens* K2032 and difuctose anhydride IV formation from levan. *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 212-218.