



Clean Natural의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주 반복경구투여 독성시험

김의경 · 김준영¹ · 이후장

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소, ¹강원대학교 수의학과

Four-Week Repeated Oral Toxicity Study of Clean Natural in Sprague-Dawley Rats

Eui-Kyung Kim, Jun-Young Kim¹ and Hu-Jang Lee

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 600-701

¹Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Received June 10, 2005; Accepted August 16, 2005

ABSTRACT. This study was performed to investigate repeated-dose toxicities of Clean Natural, a new disinfectant, in Sprague-Dawley (SD) rats. In the 4-week repeated oral toxicity study, Clean Natural was orally administered once daily via gavage to male and female rats at dose levels of 0, 500, 1,000 and 2,000 mg/kg body weight for 4-weeks. There were no deaths and clinical signs during the dosing period. In both sexes, there were no statistically significant differences between the administered and control groups in urinalysis indicators and hematological parameters. In serum biochemistry, aspartate aminotransferase (AST) was significantly decreased and sodium content was increased in the 2,000 mg/kg male group, while chlorine was significantly decreased in the 2,000 mg/kg female group. Also, albumin, total cholesterol and total bilirubin were significantly increased in the 2,000 mg/kg male and female group. In histopathological examinations, centrilobular hepatocellular hypertrophy in the liver was observed in the 2,000 mg/kg male and female groups. And pigmentation in the spleen was observed in the 2,000 mg/kg male group. In conclusion, four-week repeated oral dose of Clean Natural to rats did not cause apparent toxicological change at the dose less than 2,000 mg/kg body weight. Thus it is suggested that no-observed adverse-effect level (NOAEL) for Clean Natural in rats was considered to be 1,000 mg/kg/day.

Keywords: Clean Natural, disinfectant, repeated-dose toxicity, NOAEL, rats.

서 론

천연 살균소독제인 Clean Natural은 목초액과 프로폴리스가 주요 성분으로 구성되어 있으며, 수산용 병원성 세균과 그와 관련된 용구들의 소독을 목적으로 생산된 제품이다.

오래 전부터, 목초액은 항균, 살균, 식품의 보존성 향상, 항산화 효과, 가공식품의 향취개선 등을 목적으로 사용되어 왔다(Tóth and Potthast, 1984; Pszczola, 1995;

Lee *et al.*, 2004). 또한, 농업, 축산 및 환경분야에서 목초액의 활용성에 관한 많은 연구가 수행되어 왔는데, 작물의 해충 기피, 식물생장 촉진, 축산분뇨의 탈취, 사료효율증진, 매립지 침출수의 악취제거 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Lee *et al.*, 1999; Li and Ryu, 2001; Huh *et al.*, 1999).

목초액의 주요성분은 대부분(80~90%)이 물이며, 나머지 10~20%가 유기화합물인데, 이 속에는 유기산류 12종, phenol류 13종, carbonyl 화합물류 19종, alcohol류 9종 등을 포함하여 약 200여종의 성분이 함유되어 강력한 살균력이 있는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2001; Yatagai *et al.*, 1988).

한편, 프로폴리스는 벌들이 다양한 식물의 진액물질을

Correspondence to: Hu-Jang Lee, Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 600-701, Korea
E-mail: hujang@gsnu.ac.kr

채취하여 효소를 첨가시켜, 밀납 등을 넣어 수 개월간 숙성시켜 놓은 물질로서 우수한 항균, 살균, 항염 작용을 하는 성질을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Lee *et al.*, 2002). 프로폴리스 성분으로는 지금까지 약 150종 이상의 화합물이 알려져 있으며 주성분은 polyphenol이며 polyphenol로서는 flavonoid, phenolic acid 등이 있는 것으로 보고되고 있다(Ra *et al.*, 2003).

Clean Natural은 천연물질인 목초액과 프로폴리스를 주성분으로 하는 살균소독제로서, 사용시 어체 및 그 가공식품 등에 영향을 줄 수 있으나, 그에 따른 안전성 여부가 확인되지 않은 상태이다. 따라서, 본 연구에서는 천연성분을 이용하여 생산된 살균소독제, Clean Natural의 안전성을 평가하기 위하여, Sprague-Dawley 랫드에 4주 반복경구투여 독성시험을 비임상시험 관리기준(식품의약품안전청 고시, 제 2000-63호)과 동물용의약품등의 독성시험지침(국립수의과학검역원예규, 제 8호)에 준하여 실시하였다.

재료 및 방법

실험물질

본 시험에 사용된 실험물질은 (주)성원에서 공급받은 주성분이 목초액과 프로폴리스인 Clean Natural 용액을 사용하였다. 물질은 담갈색이며 사용기간동안 실온에 보관하였고, 투여 시, 멸균증류수로 희석하여 조제하였다.

실험동물 및 사육환경

본 시험에 사용된 실험동물은 SD계 랫드 암수 각각 50 마리씩(6 주령)을 (주)양성(용인시)에서 구입하여 1주일간 순화기간을 거친 다음 그 중 건강한 동물 40마리씩을 실험동물로 사용하였다. 검역, 순화, 사육기간 및 시험기간 중 동물은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(오전 7시 점등 오후 7시 소등), 환기횟수 13~18회/hr 및 조도 200~300 Lux로 설정된 경상대학교 부설 중앙동물실험실에서 사육하였다. 사육환경 모니터링을 위하여 온·습도는 매시간 측정하였으며, 기타 환경은 정기적으로 측정하였다. 실험동물은 폴리카보네이트 사육상자(400W × 250L × 180H)에서 사육상자 당 5마리씩 사육하였다. 사료는 랫드는 실험동물용 고형사료((주)삼양사)를 자유급식 시켰으며, 물은 상수도수를 살균기로 소독시킨 후 자유급여 하였다.

투여량 설정

실험물질의 투여용량은 예비실험을 통하여, 중독량이 모두 2,000 mg/kg 이상으로 판단되어, 500, 1,000, 2,000 mg/kg의 투여용량군을 설정하였다. 대조군은 실험물질을

희석 조제한 멸균증류수를 투여하였다. 시험군의 구성은 암수 각 40마리를 무작위법으로 군을 분리한 후, 각군간의 체중을 고르게 하여 대조군과 시험물질 투여군 3 용량군으로 하여 실시하였다. 투여 개시시 체중은 수컷은 185~195 g, 암컷은 160~173 g으로 각군당 암수 각각 10마리씩을 배정하였다.

투여방법 및 투여기간

투여경로는 경구투여를 선택하였으며, 투여기간은 시험물질을 1일 1회 주당 7회 4주 연속으로 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였다. 대조군은 멸균증류수를 대조군과 동일한 용량, 기간 및 방법으로 경구투여 하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상관찰. 험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 일정한 시간에 일반증상의 변화, 빈사 및 사망유무를 관찰하였다.

체중, 사료섭취량 및 음수량 측정. 시험기간 중 모든 동물의 체중은 투여 개시 전, 투여 후 매일 1회 실시하였으며, 사료섭취량은 주 2회 측정하였다.

안검사. 투여개시전에 모든 동물에 대하여 외안검사를 실시하였다.

뇨검사. 모든 시험동물에 대하여 투여최종일에 뇨검사를 실시하였다. 뇨검사는 specific gravity, pH, protein, glucose, ketone, urobilinogen, blood 및 침사를 검사하였다.

혈액학적 검사. 혈액학적 검사를 위해 투여최종일에 심장천공법으로 혈액을 채혈하여 자동혈구계산기(Advia 120 hematology analyzer, Bayer, USA)를 이용하여 적혈구수(RBC, red blood cell count), 망상적혈구(RETIC, reticulocyte), 혈색소량(HGB, hemoglobin concentration), 헤마토크리트치(HCT, hematocrit), 평균적혈구용적(MCH, mean corpuscular hemoglobin), 평균적혈구혈색소농도(MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), 혈소판(PLT, platelet), 백혈구수(WBC, white blood cell count), 호중구(NEUT, neutrophils), 림프구(LYMPH, lymphocytes), 단핵구(MONO, monocytes), 호산구(EOSIN, eosinophils) 및 호염기구(BASO, basophils)를 측정하였다.

혈액생화학적 검사. 혈액생화학적 검사를 위해 투여최종일에 심장천공법으로 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 자동생화학분석기(Hitachi 911 chemistry analyzer, Hitachi, Japan)를 이용하여 포도당(glucose), 요소질소(urea nitrogen), 크레아티닌(creatinine),

총 콜레스테롤(total cholesterol), AST(aspartate amino-transferase), ALT(alanine aminotransferase), 총 단백 질(total protein), 알부민(albumin), 글로불린(globulin), 알부민/글로불린 비(albumin/globulin ratio), 칼슘(cal-cium), 총 빌리루빈(total bilirubin), 중성지방(triglyceride), 무기인(IN PHOS, inorganic phosphorus), GGT(gamma-glutamyltransferase), 나트륨(sodium), 칼륨(potassium), 염소(chloride)를 측정하였다.

장기중량 측정. 시험종료 후 모든 동물을 부검 하루전에 절식시킨 다음 부검직전에 체중을 측정하였다. 에테르 마취 후 방혈 치사시킨 다음 모든 장기에 대하여 육안검사를 실시하였다. 모든 실험동물에 대하여 심장, 간장, 신장, 폐, 부신, 뇌, 고환, 난소의 중량을 측정하였다.

병리조직학적 검사. 모든 동물의 실질장기를 10% 중성완충포르말린 용액에 고정시킨 후, 통상적인 절차에 따라 자동조직처리기로 조직을 처리한 후, 파라핀에 포맷하였다. 파라핀 포맷조직을 박절한 후 Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 실시하여 광학현미경 하에서 병리 조직학적 검사를 실시하였다.

통계학적 방법

체중, 사료섭취량, 혈액학치, 혈액생화학치 및 장기중량은 평균값 및 표준편차로 나타내었다. Levence's test에서 분산이 균일하게 나온 검사 항목은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 하였으며, 분석결과 군간 차이가 인정되면 Dunnett's test의 다중비교법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

일반증상 및 사망률

암·수 모두 대조군과 전 실험물질 투여군에서 사망이 관찰되지 않았다(Table 1). 모든 군에서 소수의 예가 간헐적인 식욕부진을 보였으나, 특이한 임상증상은 관찰되지

Table 1. Mortality and clinical signs in rats treated orally with Clean Natural for 4 weeks

Items	Dose (mg/kg B.W)	Final mortality		Clinical signs	
		Male	Female	Male	Female
Groups	0	0/10	0/10	-	-
	500	0/10	0/10	-	-
	1,000	0/10	0/10	-	-
	2,000	0/10	0/10	-	-

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

-: No clinical signs.

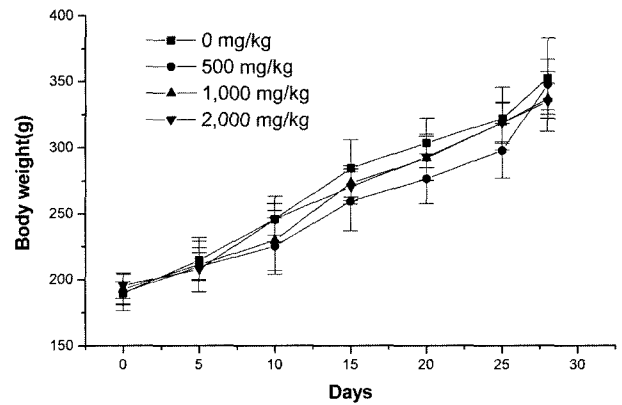


Fig. 1. Body weight changes in Sprague-Dawley male rats administered orally once with Clean Natural (CN) for 4 weeks. Data are mean ± S.D. (n=10).

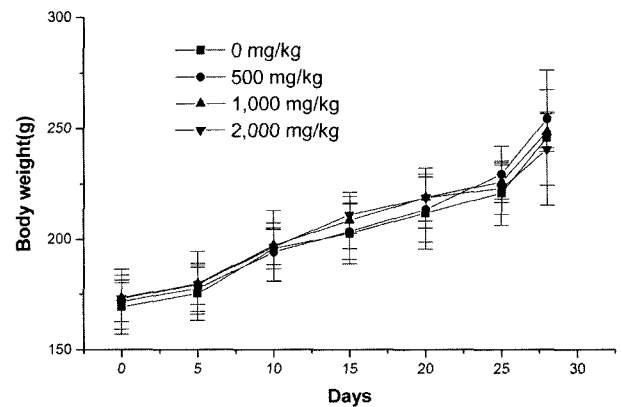


Fig. 2. Body weight changes in Sprague-Dawley female rats administered orally once with Clean Natural for 4 weeks. Data are mean ± S.D. (n=10).

않았다. 이러한 간헐적인 식욕부진은 개체에 따른 감수성의 차이로부터 지속적인 투여에 따른 스트레스가 원인인 것으로 사료된다.

체중변화

암·수 모두 대조군과 전 실험물질 투여군에서 순조로운 체중증가 경향이 관찰되었다(Fig. 1~2). 그러나, 수컷 500 mg/kg 투여군의 경우, 대조군에 비해 투여 25일째까지 상대적으로 체중감소가 관찰되었으나, 통계학적으로 유의성이 인정되지는 않았다. 따라서, 암·수 모두 전 실험물질 투여군 사이에 용량상관성이 인정되지 않았으며, 이는 실험물질이 체중의 변화에 영향을 미칠 만큼의 독성을 갖고 있지 않는 것으로 사료된다.

사료섭취량

전 시험기간 동안에 걸쳐 대조군에 비하여 암·수 모두

전 실험물질 투여군에서 사료섭취량의 감소가 관찰되었으나, 통계학적으로 유의성 있는 감소는 관찰되지 않았다. 암·수 모두 전 실험물질 투여군에서 단발성의 사료섭취량의 감소가 관찰되고, 대조군에 비해 사료섭취량의 감소가 관찰되었던 것은, 시험물질에 의한 용량상관성은 인정되

지 않으나, 시험물질에 의한 영향으로 판단되었다.

안검사 및 뇨검사

안검사에 있어서, 암·수 모든 실험물질 투여군에서 시험물질 투여와 관련한 특이 이상소견이 관찰되지 않았다

Table 2. Urinalysis of male and female rats treated orally with Clean Natural for 4 weeks

Parameters	Range	Male				Female			
		0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
Gravity	≤ 1.005	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.006~1.015	9	7	8	8	8	8	8	7
	1.016~1.020	1	2	0	1	1	2	1	1
	1.021~1.025	0	1	2	1	1	0	1	2
	≥ 1.030	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	6.0 ≤	10	10	9	8	9	8	7	4
	6.1~6.5	0	0	1	1	1	2	2	4
	6.6~7.0	0	0	0	1	0	0	1	2
Protein (mg/dl)	25 ≤	10	10	10	10	10	10	9	10
	26~50	0	0	0	0	0	0	1	0
Glucose (mg/dl)	0.25 ≤	10	10	10	10	10	10	10	10
Ketone	-	10	8	9	10	10	2	8	10
	+/-	0	0	1	0	0	8	2	0
	+	0	2	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen (mg/dl)	0.1~1.0	10	10	10	10	10	10	10	10
Occult blood	-	10	10	10	10	10	10	10	10
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0

Values are number of animals.

Table 3. Hematological values of rats treated orally with Clean Natural for 4 weeks

Sex	Item	Unit	Groups			
			0	500	1,000	2,000
Male	WBC	10 ³ /mm ³	15.50 ± 2.81	15.26 ± 3.78	16.48 ± 6.24	17.12 ± 1.05
	RBC	10 ⁶ /mm ³	7.25 ± 0.43	7.98 ± 0.37	7.22 ± 0.53	7.68 ± 0.74
	Hb	g/dl	14.96 ± 1.01	15.12 ± 0.43	15.06 ± 0.86	14.75 ± 1.34
	HCT	%	42.25 ± 4.30	43.36 ± 2.21	43.19 ± 1.72	43.53 ± 3.23
	MCV	fl	61.45 ± 8.26	56.24 ± 2.78	58.46 ± 1.63	60.01 ± 4.25
	MCH	Pg	18.95 ± 1.74	17.52 ± 0.65	19.08 ± 0.67	18.64 ± 0.83
	MCHC	g/dl	35.21 ± 0.81	34.75 ± 0.39	34.16 ± 0.84	34.65 ± 0.47
	PLT	10 ³ /mm ³	691.3 ± 110.2	724.5 ± 125.3	714.6 ± 140.9	695.9 ± 109.2
	Lymp	%	90.32 ± 5.42	85.65 ± 4.75	88.47 ± 2.05	87.21 ± 3.11
Female	WBC	10 ³ /mm ³	16.25 ± 4.24	16.15 ± 3.25	17.32 ± 5.61	18.01 ± 1.56
	RBC	10 ⁶ /mm ³	7.22 ± 0.36	7.57 ± 0.64	8.11 ± 0.71	7.10 ± 0.44
	Hb	g/dl	14.68 ± 1.23	15.11 ± 0.79	15.34 ± 0.58	14.03 ± 0.81
	HCT	%	44.15 ± 3.27	45.01 ± 2.55	45.43 ± 3.27	41.95 ± 2.32
	MCV	fl	61.08 ± 6.31	58.40 ± 4.77	57.84 ± 2.61	60.25 ± 1.89
	MCH	Pg	18.85 ± 0.97	19.13 ± 2.47	19.86 ± 1.62	19.69 ± 0.76
	MCHC	g/dl	31.28 ± 3.62	33.72 ± 2.03	35.13 ± 1.89	33.41 ± 0.54
	PLT	10 ³ /mm ³	798.7 ± 93.2	693.3 ± 291.4	634.5 ± 129.7	620.8 ± 113.5
	Lymp	%	85.61 ± 3.78	85.45 ± 2.81	86.21 ± 2.41	87.54 ± 3.22

Each value represents the mean ± SD of ten animals.

WBC : white blood cell count; RBC : red blood cell count; Hb : hemoglobin; HCT : hematocrit; MCV : mean corpuscular volume; MCH : mean corpuscular hemoglobin; MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT : platelet; Lym : lymphocyte.

Table 4. Serum biochemical values of rats treated orally with Clean Natural for 4 weeks

Sex	Item	Unit	Groups			
			0	500	1,000	2,000
Male	TP	g/dl	7.46 ± 0.27	7.86 ± 0.34	7.83 ± 0.30	7.25 ± 0.56
	ALB	g/dl	2.92 ± 0.16	3.12 ± 0.34	3.16 ± 0.11	3.62 ± 0.31*
	AST	IU/l	122.1 ± 15.2	115.3 ± 18.5	104.4 ± 18.2	95 ± 9.7*
	ALT	IU/l	41.7 ± 7.5	44.7 ± 3.7	41.3 ± 9.3	40.1 ± 7.5
	LDH	IU/l	672.3 ± 167.1	668.4 ± 123.1	645.6 ± 207.4	587.5 ± 196.7
	ALP	IU/l	157.2 ± 16.4	159.1 ± 17.8	145.1 ± 25.6	159.7 ± 37.7
	CHOL	g/dl	55.1 ± 7.3	54.8 ± 8.5	60.4 ± 7.1	67.8 ± 3.6*
	TBIL	g/dl	0.20 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.26 ± 0.05*
	BUN	mg/dl	21.9 ± 3.6	19.2 ± 3.1	21.2 ± 3.3	20.2 ± 2.7
	CREAT	mg/dl	0.47 ± 0.15	0.39 ± 0.15	0.41 ± 0.12	0.40 ± 0.08
	TG	mg/dl	84.1 ± 17.5	91.7 ± 18.5	74.6 ± 21.5	90.5 ± 27.4
	Cl	mmol/l	107.3 ± 3.7	106.2 ± 1.6	105.2 ± 1.9	107.2 ± 1.6
	Na	mmol/l	145.2 ± 6.7	144.3 ± 2.7	147.1 ± 1.4	156.5 ± 3.6*
Female	TP	g/dl	6.65 ± 0.41	7.37 ± 0.13*	7.15 ± 0.39	7.36 ± 0.23*
	ALB	g/dl	2.90 ± 0.15	3.07 ± 0.23	3.12 ± 0.20	3.26 ± 0.25*
	AST	IU/l	119.2 ± 16.7	93.4 ± 24.4	99.7 ± 27.4	114.3 ± 14.9
	ALT	IU/l	41.6 ± 8.3	37.5 ± 4.7	36.9 ± 7.4	39.7 ± 3.1
	LDH	IU/l	435.5 ± 167.2	487.2 ± 136.5	478.4 ± 139.2	479.6 ± 145.1
	ALP	IU/L	161.1 ± 32.4	143.7 ± 22.3	140.9 ± 29.1	137.3 ± 19.5
	CHOL	g/dl	58.8 ± 6.2	54.3 ± 8.7	56.3 ± 7.8	69.6 ± 3.4*
	TBIL	g/dl	0.20 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.04*
	BUN	mg/dl	17.8 ± 1.6	18.3 ± 2.9	17.1 ± 3.7	14.9 ± 3.7
	CREAT	mg/dl	0.36 ± 0.07	0.36 ± 0.08	0.47 ± 0.11	0.46 ± 0.09
	TG	mg/dl	54.3 ± 14.7	54.6 ± 12.4	53.8 ± 17.5	49.4 ± 7.8
	Cl	mmol/l	105.7 ± 2.8	105.6 ± 2.2	106.5 ± 2.3	100.7 ± 1.9*
	Na	mmol/l	140.5 ± 7.5	143.2 ± 3.2	142.2 ± 5.4	146.7 ± 5.1

Each value represents the mean ± SD of ten animals.

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

TP : total protein; ALB : albumin; AST : aspartate aminotransferase; ALT : alanine transaminase; LDH : lactate dehydrogenase; ALP : alkaline phosphatase; CHOL : cholesterol; GLU : glucose; TBIL : total bilirubin; BUN : blood urea nitrogen; CREAT : creatinine; TG : triglyceride; Cl : chlorine; Na : sodium.

(결과를 보이지 않았습). 뇨검사에 있어서, 암·수 모든 실험물질 투여군에서 시험물질 투여와 관련한 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 2).

혈액학적 검사

암·수 모두 2,000 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 백혈구수(WBC)의 상대적인 증가가 있었으나, 통계학적으로 유의성있는 증가는 관찰되지 않았다. 마찬가지로, 다른 지표들 역시 대조군과 시험물질 투여군 사이에 유의성있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 3).

혈액생화학적 검사

수컷의 경우, 대조군에 비해 2,000 mg/kg 투여군에서 AST가 통계학적으로 유의성 있게 감소한 반면, 알부민, 총 콜레스테롤, 총 빌리루빈 및 나트륨이 유의성있게 증가하였다. 암컷의 경우, 대조군에 비해 2,000 mg/kg 투여군에서 염소가 통계학적으로 유의성 있게 감소한 반면, 500 및 2,000 mg/kg 투여군에서 총 단백질, 2,000 mg/

kg 투여군에서 알부민, 총 단백질, 총 콜레스테롤 및 총 빌리루빈이 유의성있게 증가하였다(Table 4).

본 시험에 있어서, 2,000 mg/kg 투여군에서 관찰된 알부민, 총 콜레스테롤 및 AST의 유의성 있는 변화들은 간의 대사이상 및 적혈구이상 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2004; Walter and Fred, 1989). 이러한 변화들은, 장기중량 중 암·수 모두 2,000 mg/kg 투여군의 간의 중량이 대조군에 비해, 통계학적인 유의성은 없으나, 상대적으로 감소한 결과와도 부합하는 것으로서, 모두 시험물질에 의한 영향으로 기인한 것으로 사료된다.

장기중량

수컷의 장기중량 측정결과, 흉선과 비장의 중량은 대조군에 비해 전 시험물질 투여군에서 상대적으로 감소하였으며, 2,000 mg/kg 투여군에서 간 중량이 대조군에 비해 상대적으로 감소하였으나, 통계학적인 유의성은 관찰되지 않았다. 암컷의 경우, 흉선과 신장(좌, 우)의 중량은 대조

Table 5. Absolute organ weights (g) of rats treated orally with Clean Natural for 4 weeks

Sex	Orgnas	Groups			
		0	500	1,000	2,000
Male	Adrenal gland R	0.023 ± 0.04	0.022 ± 0.02	0.023 ± 0.003	0.025 ± 0.15
	L	0.019 ± 0.04	0.023 ± 0.11	0.022 ± 0.032	0.023 ± 0.01
	Thymus	0.249 ± 0.33	0.234 ± 0.27	0.227 ± 0.042	0.231 ± 0.035
	Brain	2.046 ± 0.04	2.201 ± 0.13	2.124 ± 0.017	2.344 ± 0.05
	Stomach	1.34 ± 0.21	1.24 ± 0.15	1.37 ± 0.20	1.27 ± 0.16
	Heart	1.05 ± 0.14	1.09 ± 0.08	1.11 ± 0.15	1.06 ± 0.07
	Liver	8.45 ± 1.02	8.56 ± 0.91	8.78 ± 0.86	8.39 ± 1.54
	Kidney R.	1.11 ± 0.12	1.06 ± 0.14	1.09 ± 0.09	1.06 ± 0.07
	L.	1.13 ± 0.13	1.21 ± 0.09	1.10 ± 0.08	1.09 ± 0.10
	Lung	1.79 ± 0.32	1.65 ± 0.20	1.59 ± 0.37	1.80 ± 0.31
	Spleen	1.31 ± 0.69	1.25 ± 0.77	1.11 ± 0.58	1.03 ± 0.56
	Testis R.	1.58 ± 0.14	1.59 ± 0.17	1.63 ± 0.11	1.65 ± 0.09
	L.	1.62 ± 0.10	1.57 ± 0.19	1.61 ± 0.07	1.66 ± 0.13
	Female	AG R.	0.033 ± 0.07	0.031 ± 0.04	0.043 ± 0.012
L.		0.035 ± 0.06	0.029 ± 0.21	0.042 ± 0.013	0.026 ± 0.07
Thymus		0.247 ± 0.027	0.241 ± 0.06	0.239 ± 0.03	0.224 ± 0.032
Brain		2.033 ± 0.05	2.041 ± 0.07	1.997 ± 0.08	2.003 ± 0.06
Stomach		1.11 ± 0.16	1.07 ± 0.15	1.17 ± 0.19	1.10 ± 0.15
Heart		0.97 ± 0.06	0.95 ± 0.07	1.04 ± 0.12	1.02 ± 0.11
Liver		6.47 ± 0.88	6.36 ± 0.69	7.04 ± 0.58	6.40 ± 0.45
Kidney R.		0.78 ± 0.08	0.76 ± 0.08	0.75 ± 0.09	0.71 ± 0.06
L.		0.79 ± 0.06	0.75 ± 0.09	0.76 ± 0.08	0.71 ± 0.05
Lung		1.65 ± 0.30	2.03 ± 0.97	2.01 ± 0.87	1.79 ± 0.73
Spleen		1.07 ± 0.23	1.24 ± 0.36	1.26 ± 0.32	1.07 ± 0.41
Ovary R.		0.078 ± 0.06	0.075 ± 0.04	0.080 ± 0.09	0.077 ± 0.08
L.		0.075 ± 0.07	0.074 ± 0.09	0.076 ± 0.08	0.074 ± 0.07

Each value represents the mean ± SD of ten animals.

군에 비해 전 시험물질 투여군에서 상대적으로 감소하였으며, 2,000 mg/kg 투여군에서 간 및 부신(좌, 우)의 중량이 대조군에 비해 상대적으로 감소하였으나, 통계학적인 유의성은 관찰되지 않았다(Table 5).

병리조직학적 검사

병리조직학 검사 결과, 암·수 모든 실험물질 투여군에서 시험물질 투여와 관련한 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(결과를 보이지 않았음). 다만, 암·수 모두 2,000 mg/kg 투여군의 간에서 암컷은 3례, 수컷은 4례에서, 소엽중심부가 다소 창백하고 간세포가 확장된 모습이 관찰되었다. 이러한 변화는 혈액생화학적 변화 및 장기중량 변화와 부합된 결과이며, 또한, 일부 간세포의 확장은 시험물질 투여와 관련되어 나타난 효소유도와 관련된 변화로 판단된다(Kim *et al.*, 2004).

비장의 경우, 색소침착이 수컷의 2,000 mg/kg 투여군에서 3례 관찰되었다. 색소침착은 모두 적수(red pulp)에서 관찰되었는데, 적수는 적혈구 탐식이 일어나는 주요부위이며, 적혈구 탐식은 대식세포내에 hemosiderin의 축적을 일으키는 것으로 보고 되어 있다(Gopinath *et al.*,

1987). 총혈의 경우, 대조군과 실험물질 투여군 사이에서의 빈도는 크게 차이가 없었다.

이외의 장기에서 관찰된 이상들은 일반적으로 흔히 관찰되는 것들이었으며, 신장, 폐 및 간에서 관찰된 염증소견들은 용량상관성을 보이지 않거나 발생빈도가 매우 낮고 자연발생적으로 흔히 관찰되는 증상들로서, 시험물질과는 관련이 없는 것으로 사료된다(Greaves, 2000).

결 론

Clean Natural의 경구투여에 의한 독성발현정도를 조사하기 위해 SD계 랫드에 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 용량으로 4주간 반복 경구 투여하였다. 독성시험결과, Clean Natural은 랫드에서, 특이한 임상증상 및 사망은 관찰되지 않았다. 또한, 암·수 모든 실험물질 투여군에서 대조군과 비교하여 상대적으로 사료섭취량이 저하하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의성을 보이지는 않았다. 고농도 투여군(2,000 mg/kg)에서, AST(수컷)와 염소(암컷)의 유의성 있는 감소, 알부민, 총 콜레스테롤 및 총 빌리루빈의 유의성 있는 증가, 그리고 간에서는 소엽중심부가

다소 창백하고 간세포가 확장된 모습이 암컷은 3례, 수컷은 4례에서 관찰되어, 본 시험에서 표적장기는 간으로 판단되었다.

이상과 같이, Clean Natural의 랫드에 대한 반복투여독성시험에서 상기의 일반증상, 체중변화 및 사료섭취량 등에 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 혈액생화학적 검사에서는, 2,000 mg/kg의 투여군에서, 대조군에 비해 알부민, 총 콜레스테롤 및 AST 등의 유의성 있는 변화가 관찰되었다. 병리조직학적검사 등에서 명확한 장기독성을 나타내는 소견은 관찰되지 않았으며, 2,000 mg/kg의 투여군을 제외한 모든 시험물질 투여군에서는 독성학적으로 중요한 변화 역시 관찰되지 않았다.

따라서, 본 시험조건에서의 Clean Natural의 무독성량은 약 1,000 mg/kg인 것으로 판단되었다.

참고문헌

- 식품의약품안전청 (2000): 고시 제 2000-63호, 비임상시험관리 기준.
- 국립수의과학검역원 (1999): 예규 제 8호, 동물용의약품 등의 독성시험지침.
- Gopinath, C., Prentice, D.E. and Lewis, D.J. (1987): Atlas of experimental toxicological pathology, MTP Press, 135.
- Greaves, P. (2000): Histopathology of preclinical toxicity studies: Interpretation and relevance in drug evaluation, Second Edition, Elsevier, 114-850.
- Huh, K.S., Jeong, E.D. and Park, U.H. (1999): A study on odor removal of landfill site leachate by Pyrolytic liquid. *J. Korean Environmental Sciences Society*, **8**, 607-610.
- Kim, J.K., Kim, J.C., Choi, J.S., Kim, T.J., Kim, S.M. and Cho, K.Y. (2001): Isolation and identification of herbicidal substances from wood vinegars. *Kor. J. Weed Sci.*, **21**, 357-365.
- Kim, I.H., Lee, S.H., Choi, J.M., Park, J.E., Kim, D.Y., Noh, H.J., Kim, T.R., Lee, S.H., Kim, Y.H., Kim, J.W., Chang, J.H. and Kot, K. (2004): Single and four-week repeated oral toxicity study of CJ-11555 in Sprague-Dawley rat. *J. Toxicol. Pub. Health*, **20**, 143-151.
- Lee, K.M., Jeong, G.T. and Park, D.H. (2004): Study of antimicrobial and DPPH radical scavenger activity of wood vinegar. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 381-384.
- Lee, S.W., Hwangbo, S. and Kim, H.J. (2002): Antimicrobial activities of Korean propolis. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.*, **22**, 66-71.
- Lee, Y.S., Kim, K.S., Kim, H.J., Kim, J.W., Chung, S.H. and Lee, S.J. (1999): Effects of charcoal and charcoal wood extracts on the population change of bacteria and hot pepper plant growth, and root and fruit development. *J. Agr. Sci.*, **10**, 78-81.
- Li, H.L. and Ryu, K.S. (2001): Effect of feeding various wood vinegar on performance and egg quality of laying hens. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor)*, **43**, 655-662.
- Pszczola, D.E. (1995): Tour highlights production and uses of smoke-based flavors. *Food Technol.*, **49**, 70-74.
- Ra, J.C., Lee, J.E., Song, D.S., Kwon, N.H., Park, B.K. and Park, Y.H. (2003): A study of antimicrobial & antiviral effect of natural product. *J. Food Hyg. Safety*, **18**, 183-188.
- Tóth, L. and Potthast, K. (1984): Chemical aspects of the smoking of meat and meat products. *Adv. Food Research*, **29**, 87-158.
- Walter, F.L. and Fred, W.Q. (1989): The clinical chemistry of laboratory animals, Pergamon Press, 179-182, 260.
- Yatagai, M., Unrine, G. and Ohira, T. (1988): By-products of wood carbonization IV. Components of wood vinegars. *Mokuzai Gakkaishi*, **34**, 184-188.