



건강기능성 식품의 유효성 및 안전성 평가에 있어서의 고려사항

Practice in the Evaluation of Efficacy and Safety of Health Functional Food

김 윤 배
Yun-Bae Kim

충북대학교 수의과대학
College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

들어가는 말

건강기능성 식품의 개발은 국민의 건강증진뿐만 아니라 국제 경쟁력 강화에도 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 이는 현대사회에서 많은 수를 차지하고 있는 질환 위험군의 건강을 증진시킴으로써 의약품 사용 이전에 질병발생을 예방할 수 있으며, 윤택한 삶(Well-being)의 추구에도 절대적인 역할을 할 것이기 때문이다.

이러한 인식에 따라 국내에서는 천연물로부터 새로운 기능성 소재의 탐색은 물론 다양한 형태의 건강기능성 식품개발에 관심이 집중되고 있다. 하지만 [의약품 등의 독성시험법]의 정립에 따른 건강기능성 식품의 안전성 평가기술은 상당히 갖추어져 있는 반면, 정확한 건강기능성의 입증에 위한 기술 및 절차에 있어서는 많은 오류와 시행착오를 겪고 있는 게 사실이다.

특히 건강기능성 평가를 위한 시험모델이 정립되지 않아 의약품 유효성 평가모델을 준용함으로써 약에 버금가는 효능을 제시해야 하는 실정이다. 많은 연구자들이 건강기능성 시험을 수행하는 과정에서 용량설정 근거를 명확히 하지 않음으로써 임상적용 가능성이 소

홀히 취급되는 경향이 있다. 또한 투여방식, 암·수성별 및 연령에 따른 차이 등 실험동물에 대한 이해와 실험방식의 적합성이 간과되고 있기도 하다. 더욱이 분석지표가 비교적 간편한 생화학적 지표에 국한됨으로써 실제로 목표로 하고자 하는 형태학(조직검사) 및 기능학(행동변화)적 현상을 놓치는 경우 또한 적지 않으며, 제출된 시험보고서 및 논문으로부터 정확한 기능성과 안전성을 결론내리는 데에 어려움이 따르기도 한다.

동물실험을 통한 기능성 및 안전성의 입증은 적정용량에서 적합모델을 통해 이루어져야 한다. 따라서 본고에서는 건강기능성시험의 개요를 설명하고, 동물실험의 설계시부터 동물실험윤리의 준수, 시험모델의 선정, 용량의 설정, 시험군 및 대조군의 구성, 동물실험의 진행, 분석시기 및 지표의 선정 등 시험과정에서 발생할 수 있는 전반적인 문제들을 짚어보고, 합리적인 방안을 제시해 보고자 한다.

건강기능성 식품의 기능성 분류 및 시험법

인체에서의 건강과 기능은 너무 다양하여 이를 증진

Corresponding author: Yun-Bae Kim
College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 410 Seongbongro (Gaeshin-dong), Heungdeok-gu, Cheongju 361-763, Korea
Tel: 82-43-261-3358
Fax: 82-43-271-3246
E-mail: solar93@cbu.ac.kr



시키는 식품에 대한 건강기능성의 부여는 특정분야만으로 한정되기 어렵다. 하지만 식품의약품안전청의 분류체계에서는 편의상 표 1에서 보는 바와 같이 크게 10개의 영역으로 나누고 있다. 그럼에도 불구하고 이러한 분류는 최소한의 영역을 나누기 위한 수단일 뿐 각 영역마다 수많은 항목이 존재할 수 있으며, 또한 신물질 탐색과정에서 새로운 영역이 추가될 수도 있다. 예를 들어, “유해물질로부터의 보호” 항목에는 알콜, 담배, 농약 등은 물론 날로 심각해져 가는 각종 환경오염물질에 의한 신체손상에 대한 보호효과가 망라될 것이다. 그러므로 다양한 기능성을 평가하는 데에 있어 시험모델과 방법의 표준화가 이루어지기 어려우며, 이에 따라 적합모델의 선정 및 개발을 위한 노력이 요구되고 있다. 따라서 식품의약품안전청은 한국보건정책서연구회 등을 통해 국내의 분야별 전문가로 하여금 기능성 시험법을 소개하고 가이드를 제시하기도 하였다.

그러나 제시된 시험법들은 의약품 등의 효능을 평가하기 위한 동물모델에 가깝기 때문에 환자가 아닌 질 환위험군을 대상으로 하는 기능성 식품의 모델로는 적합하지 않으며, 의약품에 버금가는 효능을 발휘하지 않는 한 통계적으로 유의한 결과를 나타내기 어렵다는 문제점이 있다.

표 1. 건강기능성 식품의 기능성 분류

성장, 발달 및 분화 조절	1. 성장조절 2. 골성장 3. 신경기능 및 행동발달
물질대사 (내분비대사조절)	1. 비만조절 2. 성기능 향상 3. 혈당조절 4. 골밀도 개선 5. 에너지 생산
유해물질로부터의 보호	1. 알콜, 담배, 방사선, 환경오염물질 2. 화학물질(의약품, 농약 등), 항산화
심장혈관계의 기능유지	1. 콜레스테롤(지질) 2. 혈압조절 3. 혈전(혈행개선)
소화관 생리와 기능조절	1. 장내 세균총 건강유지 2. 위장관 기능(변비, 소화기능, 장기능)
행동 및 심리 조절	1. 수면촉진 2. 스트레스 완화 3. 집중력, 기억력 촉진
면역 기능 조절	1. 면역기능 증진 2. 면역기능 저하(알레르기) 3. 자가면역 조절
치아, 구강 건강 유지	1. 치아우식 방지 2. 치아미백 3. 잇몸건강 유지
미백효과	1. 미백효과 2. 상처회복(창상, 화상) 3. 주름개선
종양억제	1. 세포고사 2. 전이방지 3. 면역증강작용 4. 발암위해도 감소
기타	근 골격계 기능조절 등

1. 성장, 발달 및 분화 조절

성장, 발달 및 분화조절에 관한 기능성 평가로는 신체의 성장과 발육 및 두뇌활성을 측정하는 등의 방법이 제시되고 있는데, 성장 및 발달시험에서는 설치류를 대상으로 체중과 체장을 측정함은 물론, 혈액 내 지표로 plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), alkaline phosphatase (ALP), 단백질, 칼슘 등의 농도를 분석함으로써 골 성장을 간접적으로 측정한다. 또 두뇌활성 측정 시험에서는 설치류를 대상으로 뇌 중량의 변화, open field test를 이용한 정서상태의 변화, 그리고 maze test 등을 이용한 학습능력의 변화 등을 관찰한다.

2. 물질대사 (내분비 대사) 조절

비만조절 효능평가지험은 설치류를 대상으로 사료섭취량, 체중, 체지방 중량, 혈중 triglycerides, cholesterol, leptin 유전자 발현 등을 측정하고, 혈당조절시험에서는 설치류에 streptozotocin이나 alloxan을 투여하여 유도한 I형 당뇨병모델과 db/db 마우스 등 II형 당뇨병동물모델을 이용하여 혈당 강하효과와 더불어 내당능 (glucose tolerance)을 확인한다. 또 성기능향상 효능평가를 위해서는 organ bath 상에서의 토끼 음경해면체 이완효과를 확인한 후, 랫드, 토끼, 개 등을 대상으로 정상 및 척수손상 상태에서 성행동, 해면체 압, 발기, 사정 등에 대한 증진 및 치유효과를 관찰한다. 한

편 골밀도개선 효능평가를 위해서는 난소절제(ovariectomy) 설치류에서의 골의 밀도, 강도, 두께 등을 측정함으로써 골다공증 개선 효과를 제시하고 있다.

3. 유해물질로부터의 보호

우리 생활주변의 유해물질로는 알콜, 담배, 방사선, 환경오염물질 등이 대표적이다. 따라서 설치류를 대상으로 알콜 대사효소 활성도 증진 및 혈중 알콜농도 저감효과, 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄) 등으로 유도한 급성간손상

및 만성 간경화 개선효과, 니코틴 분해효과, 방사능에 노출된 마우스에 대한 생존율 증대효과, 에스트로젠성 내분비계장애물질(estrogenic endocrine disruptors)에 반응하는 MCF-7 세포에 대한 증식 억제효과 등 다양한 방법으로 유효성을 평가하고 있다. 또한 의약품이나 농약 등의 화학물질에 대한 보호효과로써 의약품의 과도한 투여에 따른 장기손상에 대한 보호 및 농약중독 동물에서의 생존율 증진 해독효과를 평가하기도 한다. 한편 보편적인 보호효과의 하나로써 시험물질의 항산화 효과를 제시하기도 하는데, 동물에 대한 직접적인 보호효과와 더불어 지질과산화반응(lipid peroxidation) 억제능과 항산화효소의 활성도를 측정한다.

4. 심장혈관계 기능의 유지

심장혈관계 기능 유지를 위한 항목으로 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia) 및 동맥경화(atherosclerosis) 개선효과에서는 고콜레스테롤 사료를 급여한 마우스, 랫드 또는 토끼를 대상으로 혈중 cholesterol, 저밀도지단백질(low-density lipoproteins, LDL) 및 고밀도지단백질(high-density lipoproteins, HDL) 함량, LDL의 산화, 동맥경화반(atheromatous plaque)의 생성 등에 대한 억제효과를 측정한다. 혈압 조절 효과에서는 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 angiotensin-converting enzyme (ACE) 억제효과와 더불어 자연발증 고혈압 랫드(spontaneously-hypertensive rats, SHR) 또는 angiotensin II 투여동물에서의 혈압 강하효과를 측정한다. 또 혈행 개선효과를 평가하기 위해서는 혈소판응집(platelet aggregation) 억제, 혈전(thrombosis)유발 모델을 이용한 혈류 개선, 혈중 지질 저하효과 등을 측정함으로써 그 유효성을 제시하고 있다.

5. 소화관 생리와 기능 조절

소화관기능 유지시험 중 위궤양개선 효과는 스트레스, 알콜, 위산과다(HCl), aspirin이나 indomethacin과 같은 비스테로이드성 소염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID), 유문부 결찰(pyloic ligation) 등으로 유발한 위궤양

에 대한 완화 정도로 평가하며, 장내 세균총개선 효능은 *Helicobacter pylori* 감염 마우스에서의 세균 사멸효과와 장내 유익균의 생균수 증진효과로 평가하고 있다. 또한 위장관 기능은 장운동을 평가하기 위한 소화관 내 활성탄(charcoal) 이동속도, 정장 및 변비개선,식이섬유 함량 및 소화관 내 세포수를 측정하는 방식으로 이루어지고 있다.

6. 행동 및 심리 조절

수면촉진 효과는 설치류를 이용하여 pentobarbital에 의한 수면 개시 및 지속시간에 미치는 영향으로 평가하고 있으며, 스트레스 완화효과는 설치류에 인위적인 스트레스(침수, 열, 과도한 운동 등)를 가한 다음, 혈중 lactic acid의 변화, 근이완 정도, 운동량 등을 관찰하여 그 개선 정도를 측정한다. 또 집중력 및 기억력 촉진효과는 passive avoidance test, T-maze test, water-maze test 등의 다양한 방법으로 학습/기억력 개선 및 증진효과를 제시한다.

7. 면역기능 조절

면역기능의 증진효과는 체액성 면역과 세포성 면역의 활성화를 측정하는 것을 바탕으로 하는데, 세포성 면역는 주로 대식세포(macrophages), T세포, NK 세포 등의 활성도를 측정하고, 체액성 면역는 보체의 활성화 및 항원-항체 반응의 변화를 관찰한다. 또한 최근 관심이 높아지고 있는 접촉성 및 아토피 피부염(contact and atopic dermatitis) 및 천식(asthma)에 대한 완화효과는 알러지 유발물질에 의한 IgE 및 histamine 유리, 가려움증 개선, cytokines 변화, 기관지 이완 등의 지표로 평가하고 있다. 한편, 자가면역(autoimmunity) 조절능은 설치류를 이용한 병원체 저항성과 항원-항체반응 정도로 평가한다.

8. 치아 및 구강건강 유지

치아우식 방지효능은 치아의 석회화 강화효과, 충치 발생 방지효과, 치아발육 촉진효과 등을 통해 확인하며, 치아 미백효과는 일차적으로 미백의 정도를 관찰하고, 더 나아가 치태형성 억제효과를 측정하는 방식으로 진행되고 있다. 또 잇몸건강 유지효과는 치조골



강화, 구강점막 강화, 조직재생 검증 등을 통하여 평가된다.

9. 미용 효과

미용 중 미백효능은 *in vitro* tyrosinase activity와 melanin 생성 억제효과에 이어 갈색 기니피그(brown guinea pigs)을 이용한 *in vivo* 미백효과로 판정하며, 상처(창상 및 화상) 회복효과는 랫드나 토끼에 1×1 cm 크기의 전층 창상이나 2도의 열화상을 인위적으로 유발시킨 후 혈관보호, 발적 및 부종의 정도, 피사조직의 면적, 치유속도(상처봉합 및 가피탈락) 등으로 평가한다. 피부노화 및 주름 개선효과는 배양한 피부세포의 증식, 피부세포 내 collagen 및 elastin 단백질 증진효과를 확인한 다음, hairless mouse를 자외선에 노출시켜 노화 및 주름을 촉진시킨 후 피부표면 및 조직표본상의 주름개선 정도로 평가한다. 또 피부노화를 억제하기 위한 항산화 활성 시험법으로는 electrospin resonance (ESR)기기를 이용한 radicals 측정법, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical소거능, 지질과산화반응 억제능, superoxide radical 소거능 등이 잘 알려져 있다. 한편 보습효능 평가에서는 설치류를 대상으로 Tewameter를 이용하여 경피 수분손실을 측정하는 방법이 이용되고 있다.

10. 종양억제 효과

종양억제 효과 중 apoptosis는 암세포의 chromatin condensation 및 apoptotic body 형성, DNA의 함량 및 ladder-type fragmentation, caspases 활성화 등을 전기영동, 면역화학염색, 유전자 발현 등의 방법으로 확인한다. 종양의 전이(metastasis) 억제효과는 설치류의 정맥에 암세포를 이식하고 허파와 간에 전이된 암세포의 colony 수로 평가하며, 또 S-180 등의 종양 이식 마우스에서 동물의 생존율을 관찰함으로써 수명 연장 효과를 측정하기도 한다. 특히 가장 널리 사용되고 있는 종양성장 억제효과는 nude mouse에 고형암을 형성하는 암세포주를 이식한 후 일정기간 시험물질 투여하면서 종양의 크기를 측정함으로써 유효성을 확인하고 있다.

동물실험 윤리

동물을 이용한 유효성 및 안전성 평가를 위해서는 동물복지 차원에서 시험계획서에 대한 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인을 얻어야 한다. 이는 2008년부터 발효되는 동물보호법에 따라 각 기관마다 동물실험에 적합한 시설과 인력을 갖추고, 위원회를 설치하여 무분별한 동물실험이 이루어지지 않도록 해야 한다.

IACUC에서는 시험 프로토콜이 3R에 충실하게 작성되었는지를 심사하게 된다. 즉, 실험동물의 고귀한 희생이 헛되지 않도록 생명과학에 종사하는 실험자들은 가능한 한 사용하고자 하는 동물의 숫자를 줄이도록 노력하고(reduction), 동물실험을 계획하기에 앞서 수치모델, 컴퓨터 시뮬레이션, 생체 이외의 생물학적 기법 등 동물실험의 대체법을 충분히 고려하여야 하며(replacement), 동물실험기법을 숙련되고 세련되게 익혀서 동물의 고통과 불안을 덜어 주는(refinement) 동물실험 정신을 이해하고 실천해야 한다는 것이 그것이다. 이러한 법규와 연구자 정신에 따라 국제저명 학술지는 물론 국내의 관련 학회지에서도 IACUC 승인서를 제출하지 않은 논문은 게재하지 않는 제도가 마련되어 있기도 하다.

안전성시험 항목

개별인증형 건강기능성 식품이나 원료에 대한 안전성 시험항목은 설치류 단회투여독성시험(single-dose toxicity test), 설치류 반복투여독성시험(repeated-dose toxicity test, 3개월 이상), 비설치류 단회투여독성시험, 비설치류 반복투여독성시험(3개월 이상), 생식독성시험(reproductive toxicity test), 발생독성시험(developmental toxicity test), 발암성시험(carcinogenicity test), 면역독성시험(immunotoxicity test), 유전독성시험(genotoxicity test), 의존성시험(dependency test) 등으로 의약품 등의 안전성 평가항목과 크게 다르지 않다. 단, 건강기능성 식품의 경우 설치류 단회투여독성시험, 설치류 반복투여독성시험(3개월 이상) 및 유전독성시험을 기본 항목으로 하

고, 비설치류 단회투여독성시험을 권장사항으로 하고 있으며, 기본 항목에서의 독성발현 여부에 따라 다른 관련 시험을 추가하는 것으로 한다. 또 반복투여독성 시험은 장기간 복용하는 경우가 대부분이므로 3개월 이상의 기간을 요한다.

그러나 고시형인 경우와 식품이나 식품소재로 등록되어 오래 전부터 사용되어 왔거나 식품첨가물로 분류되어 있을 때는 독성시험 항목을 상당부분 또는 모두 면제받을 수 있다. 또 일반식품에 기능성을 부여하고자 하는 경우에도 기능성 제시를 위한 유효성 평가 외에 독성시험은 면제사항이다. 그럼에도 불구하고 추출용매가 물이나 주정(에탄올)이 아닌 유기용매이거나 초임계 추출방식 등으로 일반식품으로 장기간 섭취되던 것과 다른 조성을 가질 경우 안전성 평가는 실시되어야 한다.

독성시험 기본항목으로 단회투여독성시험은 16시간 이상 절식시킨 동물에 1회 투여하고 14일간 관찰하면서 동물의 사망여부, 일반증상, 체중변화, 종료 후의 부검조건 등을 기록한다. 시험결과로 설치류인 경우 개략의 치사량(투여동물의 약 10%가 사망할 수 있는 용량)을, 비설치류인 경우 확실중독량(독성이 명확히 나타나지만 사망하지는 않는 용량)을 제시함을 원칙으로 하나, 5g/kg을 한계용량(upper-limit dose)으로 하여 그 이상 투여하지 않는다.

반복투여독성시험은 절식시키지 않은 동물에 최소한 3개월간 투여하면서 체중변화, 일반증상, 사료 및 음수섭취량, 혈액학, 혈액생화학, 장기중량, 부검 및 현미경조건 등등 모든 영향을 측정하고 분석한다. 투여용량은 용량설정 예비시험(dose-range finding study)으로부터 설정하는데, 무관찰 부작용량(no-observed adverse effect level, NOAEL)을 저용량으로, 최대내성용량(maximum-tolerable dose, MTD; 10% 이내의 체중변화를 가져오면서 독성증상이 나타날 수 있으나 시험기간동안 사망에 이르지 않는 용량)을 고용량으로, 그리고 저용량과 고용량의 등비중향을 중간용량으로 한다. 반복투여독성시험에서는 한계용량을 2g/kg으로 설정하고 있으므로 최대내성용량이 이 용량을 초과하더라도 더 이상 높이지 않는다.

또 유전독성시험은 *Salmonella Typhimurium*,

Escherichia coli 등의 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험(reverse mutagenicity test, 일명 Ames test), Chinese hamster ovary (CHO) cells 또는 Chinese hamster lung (CHL) fibroblasts 등을 이용한 염색체 이상시험(chromosome aberration test), 그리고 마우스를 이용한 소핵시험(micronucleus test)로 구성된다. 따라서 유전독성은 prokaryotic cells (bacteria), eukaryotic cells (mammalia) 및 마우스를 이용한 *in vivo* tests로써 입체적으로 평가하고 있다.

시험모델의 선정

앞에서도 언급했듯이 기능성 식품은 질환을 치료하기 위한 의약품이 아니기 때문에 정상인의 건강을 더욱 증진시키거나 질환위험군의 건강을 개선하기 위한 것이다. 따라서 시험모델 역시 심각한 질환상태보다는 상대적으로 덜 중증인 신체손상모델을 사용하는 것이 합당하다. 그러나 효능은 통계학적 유의성으로 제시되어야 하므로 실제로는 의약품의 효능평가와 같은 동물 모델을 선정할 수 밖에 없는 실정이다.

시험방법은 가능하면 향후 사람에게 적용하기에 적합한 모델을 선정하는 것이 바람직하다. 즉, 간기능 개성을 위한 시험모델로는 사람에서의 노출가능성이 희박한 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)보다는 사람에서 간염의 대부분을 차지하는 hepatitis virus 감염모델이 더 유용하다. 당뇨모델 역시 streptozotocin 유도 I형 당뇨보다는 사람에서 빈발하는 II형당뇨모델로서 *db/db* 마우스가 적합하다 할 수 있다. 이에 비해 비만 및 고지혈증모델로는 형질전환 *ob/ob* 마우스도 유용하지만 식이성 비만이 많은 비증을 차지하므로 고지방 또는 고콜레스테롤사료 급여를 사용하는 방법이 선호되고 있다. 한편 고혈압 유도에 있어서도 nitric oxide 생성억제, angiotensin II 투여, 자연발증고혈압 랫드 등 다양한 방법이 있어 시험물질의 작용기전에 따라 선별하여야 함은 물론, angiotensin II로 유도하는 경우에라도 반복적인 주사보다는 osmotic minipumps를 이용하여 지속적이고 안정적인 고혈압을 유도하는 등 기술적인 방법을 채택하여 실제 동물이나 인체에서 일어나는 현상을 재현하려는 노력이 요



구된다.

실험동물의 성별과 연령의 선택에 있어서도 허혈성 뇌졸중모델(ischemic stroke)이나 남성형 탈모모델에는 수컷을, MK-801을 사용하는 정신분열증(schizophrenia) 모델로는 암컷을 사용해야 하는데, 이는 성호르몬이 효능에 영향을 미치기 때문이다. 더욱이 체내 호르몬의 역할이 중요시되는 골다공증 개선효능 평가를 위해서는 내재적인 estrogen을 제거하기 위한 난소제거수술이 요구된다. 한편 독성시험에서는 시험개시 연령을 성적 성숙이 갖 이루어진 young adult (설치류에서는 6주령 이상)를 사용하도록 권장하고 있는데, 이는 미숙한 경우 신체기능이 충분히 갖추어져 있지 않아 동물체 및 특정 장기에 예기치 않은 독성이 발현될 수 있기 때문이다. 따라서 소아비만, 노화방지 등 특정 목적의 시험 외에 일반적인 유효성 및 안전성 평가에는 젊고 건강한 동물을 사용해야 한다.

용량 설정

건강기능성 식품의 유효성(기능성)이나 안전성(독성) 평가에 있어서 용량설정은 가장 어렵고도 민감한 부분 중의 하나이다. 용량은 예비시험을 통해 적절하게 설정되어야 하며, 그 설정근거가 명확해야 한다. 유효성 평가는 개발자나 수탁기관에서 연구자 나름대로의 실험설계에 따라 이루어지고, 그 결과가 과학적(통계적)으로 타당하면 유효성이 인정된다.

하지만 위에서 설명된 기능성 평가법은 기존의 연구 논문과 집필자의 경험에 바탕을 두고 있을 뿐 표준시험법이 제시되지는 못한다. 용량 또한 규정되어 있지 않다. 이에 반해 안전성시험은 우수비임상시험(Good Laboratory Practice, GLP)기관에서 표준 프로토콜에 따라 진행된다. 즉, 모든 시험절차가 규정되어 있고, 용량설정 방식도 제시되어 있다. 예를 들어 단회 투여독성시험에서는 동물을 절식시켜 위를 공복으로 만든 다음 최대 5g/kg까지, 반복투여독성시험에서는 절식을 시키지 않은 상태에서 2g/kg까지의 한계를 정하고 있다. 또 시험물질을 사료나 음수에 혼합하여 급여할 경우에도 5% (50,000ppm)을 넘지 않도록 하고 있다. 한계용량 이상의 과도한 시험물질 투여는 물리

적인 영향에 의해 위장관의 정상적인 활동을 방해할 수 있고, 정상사료 및 음수 섭취량 측정에 혼란을 초래하기도 하며, 높은 농도의 시험물질이 함유된 사료는 동물이 기피하거나 너무 선호하여 대조군과 다른 측정치를 보여 줌으로써 독성이 있는 물질로 해석될 수도 있다. 더 나아가 과도한 용량의 설정은 사람을 대상으로 하는 임상시험에서 적용 불가능한 상황을 초래할 가능성이 크다.

동물윤리의 준수와 반수치사량(median lethal dose, LD₅₀)의 필요성 소멸에 따라 독성시험 기준이 오래 전에 개정되어 반수치사량을 요구하지 않으며, 개략의 치사량이나 확실중독량 또한 한계용량 이상에서는 제시할 필요가 없다. 그럼에도 불구하고 아직도 식품관련 학술지에 한계용량을 초과하는 시험결과와 반수치사량을 제시한 논문이 게재되고 있어 안타까움을 금할 수 없다. 더욱이 반복투여독성시험에서는 2g/kg을 한계용량으로 설정하고 있으므로 그 이상의 용량을 투여하여 유효성을 제시할 경우 유효용량이 독성시험 용량을 초과하는 문제점을 야기하게 된다. 즉, 이는 효과를 나타낼 수 있는 용량에서의 안전성이 확인되지 않았다는 의미를 가지며, 이 경우 소비자의 안전이 확보되지 못한다.

그러나 주지해야 할 사실은 식품의약품안전청에서는 일반식품에 기능성을 부여할 방침이다. 이 경우 안전성 평가는 필요치 않으나, 유효성 평가를 위한 용량 설정은 오히려 더 난해해진다. 즉, 독성시험 한계용량에 의해 제한되었던 유효성시험 용량제한이 소멸됨으로써 사료나 음수 내 무제한 혼합급여(강제 경구투여는 여전히 제한됨)가 가능하다. 그러나 이 경우 정상 사료를 급여하는 대조군과의 비교해석이 어려운 문제점을 가지고 있다. 예를 들어 두유를 시험물질로 하여 음수 대신 공급할 경우 대부분의 동물은 먹기가 불편한 고형사료를 기피하고 이들 사료만을 섭취하게 된다. 따라서 사료섭취량은 급감하고, 음수(사료) 섭취량을 크게 상승하며, 체중과 장기중량, 혈액학적 지표 등 신체기능이 변하고, 송곳니가 마모되지 않아 과도하게 자라게 된다. 결국 시험물질의 기능성 해석에 논란이 예상되며, 이러한 물질의 효능평가를 위한 실험설계가 수월하지 않거나 불가능한 경우도 있음을 본 저자는

여러 번 경험한 바 있다.

이러한 경우에는 사료와 시험물질의 공급비율을 정하여 정상사료 섭취가 이루어지도록 배려할 수도 있으나 이 경우 충분한 효능을 얻을 수 없어 좋은 방안이 되지는 못한다. 더욱이 식품은 의약품에 비해 유효성이 눈에 띄게 좋다고 할 수 없으므로 유효성분의 농축 및 정제가 고려될 경우 결국 축소된 제형으로 변형될 수도 있다 하겠다.

대조군의 설정

대조군(control)이란 시험실시에 있어서 기준이 되는 군으로, 시험결과와 해석과 시험의 신뢰성을 위해 적절한 대조군의 설정이 요구된다. 정상대조군(normal control)은 아무런 처리를 가하지 않은 군으로 무처치(non-treatment) 또는 비투여(untreated)대조군이라고도 한다. 정상대조군은 분석치를 비교할 때 정상범위를 제공해 준다. 또 시험물질을 용해할 때 쓰이는 용매만을 투여하는 용매대조군(vehicle control)을 두게 되는데, 용매가 증류수나 생리식염수(saline)와 같이 통상적으로 시험결과에 영향을 미치지 않는다고 인정되는 경우에는 정상대조군을 대신할 수 있으나 알콜이나 유기용매와 같이 시험결과에 영향을 미칠 경우에는 정상대조군과 용매대조군이 모두 필요하다. 한편 효력이나 독성을 나타내지 않는 무효한 물질군으로 음성대조군(negative control)을 두기도 하는데, 음성대조물질이 아무런 처리를 하지 않는 경우(정상대조군)이거나 용매인 경우 정상대조군이나 용매대조군을 음성대조군이라 칭하기도 한다.

이에 반해 해당시험에서 이미 독성을 유발하는 것으로 알려져 있는 물질군을 참고치로 두는 경우와 유효성 평가를 위해 손상을 유발하거나 시험처치의 대상이 되는 비정상한 군을 양성대조군(positive control)이라 한다. 또 시험물질의 투여가 심리적인 효과를 유발하거나 시험물질이 특정 제형인 경우 음성대조군에도 시험물질이 함유되어 있지 않은 동일한 모양의 부형제(base)를 같은 시험절차에 따라 투여해야 하는데 이를 위약대조군(placebo control)이라 하며, 반대로 효능이 잘 알려진 물질을 동시에 시험해 봄으로써 시

험물질의 효력을 비교평가해 보기 위한 비교물질군(reference control)을 두기도 한다.

또한 필요에 따라 동물에 수술적 조작을 가하고 시험물질을 투여하는 경우 이와 같은 수술조작이 시험결과에 영향을 미칠 수 있으므로 모의(동일처치)대조군(sham [operation] control)을 두어야 한다. 한편 영장류나 큰 동물을 사용할 경우와 같이 군당 동물수가 적은 수로 제한되거나 개체차이가 큰 시험의 경우 시험결과와 해석에 있어 대조군과의 비교보다는 시험물질 투여 전 해당 군 자체의 분석치를 기준으로 통계처리를 하는 것이 바람직한데, 이를 투여전대조치(predosing [pretreatment] value)라 한다.

동물의 일반증상, 체중 및 사료/음수 섭취량 측정

동물실험에 있어서 일반증상과 체중의 기록 및 측정은 간과되기 쉬우나 가장 중요한 필수항목이다. 왜냐하면 사람에서와 마찬가지로 신체에 이상이 생기면 다양한 증상으로 나타나고, 이는 사료나 음수 섭취에 영향을 미치며, 결국 체중의 변화를 초래하기 때문이다. 따라서 독성시험에서는 체중변화를 신체적 이상의 가장 중요하고 민감한 지표로 여긴다. 특히 연구자들이 주의해야 할 것은 설치류의 경우 체중측정 시각을 엄수해야 하는데, 이는 마우스의 경우 일간 변동이 20%, 랫드의 경우 10-15%에 달하기 때문이다. 즉, 마우스는 야간에 체중의 약 20%에 해당하는 물과 사료를 섭취함으로써 아침에는 36g이었다면 소화가 끝난 오후에는 오히려 30g 정도로 감소하기 때문에 같은 시각에 측정하지 않으면 잘못된 결과를 얻게 된다.

또한 장기간 진행되는 시험에서의 체중변화는 매주 또는 1주에 2회 정도 측정하여 time-course로 제시해야 한다. 이렇게 함으로써 시험진행과정에서의 변동을 확인할 수 있다. 예를 들어 1개월간의 시험에서 시험 개시와 종료시점에서만 체중을 측정하여 제시할 경우 만일 체중변화나 동물의 사망이 관찰되었다면 얼마간의 시험물질 투여시부터 문제가 발생했는지에 대한 정보를 얻을 수 없다. 특히 대부분의 실험동물은 시험물질 투여 초기의 스트레스와 부적응으로 체중이 떨어졌다가 점차 적응하는 경향을 보



이는데, 심한 경우 초기의 체중저하가 시험종료시까지 지속됨으로써 완전히 회복되지 못하는 경우도 있어 초기 투여나 시험물질 함유 사료급여 후의 체중 변화를 주목해야 한다.

한편 사료나 음수 내에 시험물질을 혼합급여하는 경우의 사료 및 음수 섭취량 측정은 매우 중요한데, 이들 섭취량이 시험물질 투여량을 반영하기 때문이다. 따라서 시험물질이 함유된 사료나 음수의 섭취량을 측정하여 함유농도를 환산함으로써 시험물질 섭취량을 제시하는 것이 원칙이다. 더욱이 사료나 음수섭취량은 동물이 계속 성장하고 있어 매주 1회 정도 측정하여 동물 체중에 대한 하루 동량의 섭취량(daily intake/kg)으로 제시해야 하며, 시험 전 기간동안 time-course로 제시하는 것이 바람직하다. 특히 음수섭취 곤란은 사료섭취량에 절대적인 영향을 미치며, 사료섭취량의 변화는 체중변화를 초래하므로 체중에 이상이 생긴 경우 음수나 사료섭취에 문제가 없었는지 필히 확인해야만 체중변화의 원인이 시험물질 의한 효과인지 시험상의 오류인지를 명확히 규명할 수 있다.

시험물질의 투여 및 생체시료의 분석

동물시험에 대한 충분한 경험이 없는 연구자들은 분석시료의 적절한 채취시기를 놓치는 경우가 적지 않다. 간기능 개선효능 평가를 예로 들면, 전반적인 간기능 저하의 지표로는 혈액 내 bromosulphalein (BSP) clearance가, 간세포 손상의 지표로는 alanine transaminase (ALT)와 aspartate transaminase (AST)가, 담즙정체의 지표로는 alkaline phosphatase (ALP), g-glutamyltranspeptidase (g-GTP) 및 total bilirubin이, 지질대사의 지표로는 glycerides, total cholesterol, low-density lipoproteins (LDL), high-density lipoproteins (HDL), very low-density lipoproteins (VLDL) 등이, 그리고 단백질 합성장애의 지표로는 total proteins, albumin/globulin ratio, coagulating factors 등이 대표적이다. 그럼에도 많은 연구자들이 수월한 기기분석을 통해 시험물질의 용도와 일치하지 않는 지표를 분석하여 제시하는 경우가 종종 있다. 일례로 CCl₄로 유발한 간손상모델에서 간

세포 손상이 5 - 48시간까지 일어나고, 회복은 36시간 후부터 진행되는 점을 감안하면, 간세포 보호제의 효능을 검증하기 위한 시험이라면 시험물질이 CCl₄ 공격 전이나 늦어도 공격 후 36시간까지는 투여되어야 하고, 혈액 내 ALT와 AST의 분석은 이들 지표가 최고점에 달하는 24 - 48시간에 이루어져야 한다. 따라서 36시간 이후에 시험물질이 투여되거나 48시간 이후에 이들 지표를 분석하는 것은 간세포 보호를 평가하기 위한 시험목적에 부합하지 않음을 알 수 있다.

시험물질 투여방식에 있어서도 고지방식으로 유도하는 비만모델의 경우 설치류가 야간에 사료를 섭취한다는 점을 잊어서는 안된다. 만일 orlistat와 같이 췌장에서 분비되는 lipase를 억제하여 지방흡수를 줄이는 물질을 지질 소화 및 흡수가 완료된 낮에 투여한다면 원하는 효과를 얻을 수 없다. 따라서 식이성 비만이나 동맥경화 유발모델이라면 시험물질의 사료 또는 음수 내 혼합급여를 고려해야 한다. 시험결과를 제시할 때에도 비만모델에서는 체지방량, 고콜레스테롤 혈중에 따른 동맥경화 모델에서는 동맥경화반이 추구하고자 하는 시험의 실제적인 목표임에도 이들을 간과한 채 혈액 내 지질함량만을 제시하는 우를 범하기도 한다. 조직병리 검사결과 역시 가능하면 정량화할 필요가 있으며, 분석수치의 평균치에 해당하는 조직사진을 제시해야 함에도 시험물질 투여군의 대표 사진으로 실제보다 개선된 사진을 제출하는 경우를 쉽게 볼 수 있다.

따라서 연구자들의 주도면밀한 실험설계가 요구되는 바, 동물실험의 다양성을 고려하여 많은 경험을 가진 전문가의 자문을 활용하는 것이 잘못된 결과를 얻을 가능성을 줄일 수 있는 방안이라 여겨진다.

결 어

Well-being을 추구하는 시대에 접어들면서 건강기능성 식품에 대한 국민의 관심이 크게 증대되었다. 따라서 다양한 목적의 기능성 소재 탐색과 개발이 학계와 산업계에서 활발히 이루어지고 있다. 더욱이 일반 식품에 대한 기능성 부여 방침에 따라 유효성 및 안전성 확인을 위한 동물시험이 붐몰을 이루고 있다.

하지만 국내의 식품관련 학술지에 게재된 논문을 살펴보면 실험설계는 물론 결과의 제시에 있어 많은 잘못된 부분을 발견하게 된다. 이는 연구자와 마찬가지로 논문의 심사자 역시 동물실험에 대한 경험이 부족한 탓도 있지만 규정을 준수하지 않는 관습에서 기인하기도 한다는 느낌을 지울 수 있다. 즉, 이미 오래 전에 개정된 식품의약품안전청의 독성시험 기준을 인용하는가 하면 구 기준에도 없는 내용을 기술하는 경우도 없지 않다.

특히 동물보호법의 발효를 눈앞에 두고 있음에도 동물실험시설의 구비나 개선은 물론 대학이나 기관 내에 윤리적인 동물실험을 위한 위원회를 구성하고 있지 않은 경우가 대다수이다. 그럼에도 일명 국제저명 학술지(science citation index [SCI] 등재지)에 투고된 국내 연구자의 논문에 쓰여진 “동물실험윤리위원회 승인” 문구가 모두 거짓이 아닌지 의구심을 떨칠

수 없다.

동물실험 결과는 바로 인체를 대상으로 하는 유효성 및 안전성시험에 직접 적용된다. 충분한 효능이 확인되지 않은 시험물질을 가지고 임상시험에 들어갈 경우 막대한 예산을 낭비하고도 효능이 없는 것으로 결론나면, 결국 그나마 영세한 업체에 큰 어려움을 안겨 줄 것이다. 더 나아가 동물에서의 안전성이 제대로 검증되지 않은 물질의 인체적용은 돌이킬 수 없는 부작용을 초래할 수도 있다.

주지하는 바와 같이 새로운 기능성 소재의 개발은 관련 업계의 활성화와 국가 경쟁력 강화에 절대적인 목표임에 틀림없지만 소재의 탐색에서부터 제품화에 이르기까지 한치의 소홀함도 없어야 할 것이다. 그 과정의 중간에 효능과 부작용을 확인시켜 주는 동물시험의 중요한 단계가 있다. 동물시험 결과가 명확하지 않다면 업계의 꿈과 국가 경쟁력은 요원한 일이 될 것이다.