

해양심층수 미네랄추출물의 랫드를 이용한 반복 투여 독성시험

지 호¹ · 백성진² · 문덕수^{3,†}

¹선박해양플랜트연구소 해수에너지연구센터 연구원

²(주)크로엔 CI-바이오융합연구소 책임연구원

³선박해양플랜트연구소 해수에너지연구센터 책임연구원

Repeated Dose Toxicity Test Using Rats of Deep Sea Mineral Extract

Ho Ji¹, Seong Jin Baek², and Deok Soo Moon^{3,†}

¹Researcher, Seawater Energy Plant Research Center, Korea Research Institute of Ships and Ocean Engineering, Goseong 24747, Korea

²Principal Researcher, CRI Bio Convergence Institute, Croen Inc., Suwon 16229, Korea

³Principal Researcher, Seawater Energy Plant Research Center, Korea Research Institute of Ships and Ocean Engineering, Goseong 24747, Korea

요 약

지속적인 경작으로 인한 토양의 미네랄 결핍과 식품의 가공 과정에 일어나는 손실 등으로 인해 5대 영양소 중의 하나인 미네랄이 현대인들에게 충분히 공급되지 않아 결핍되어 있다. 해양심층수에서 추출한 활성미네랄은 높은 농도의 미네랄을 섭취할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 용도로 사용하여 현대인에게 양질의 미네랄을 제공할 수 있다. 해양심층수 미네랄을 건강식품 미네랄 보충제로 사용을 활성화시키고, 고부가가치를 창출하기 위해서는 과학적인 검증을 통한 안전성 확보가 무엇보다 중요하다. 안전성 확보를 위하여 식품의약품안전처에서 규정한 가이드라인에 따라 동물독성시험을 GLP 기관에서 시행하였다. 사전시험으로 설치류·비설치류에 대하여 단회투여 독성시험을 진행하여 안전성을 확보했으며, 4주 반복투여 독성시험을 통하여 13주 반복투여 독성시험의 용량결정 및 시험을 진행하였으며, 이상반응을 확인하였다.

Abstract – Due to the deficiency of minerals in the soil due to continuous cultivation and losses in the processing of food, minerals, one of the five nutrients, are lacking due to insufficient supply to modern people. Activated minerals extracted from deep seawater can not only consume high concentrations of minerals, but can also be used for various purposes to provide high-quality minerals to modern people. In order to promote the use of deep seawater minerals as a mineral supplement for healthy foods and to create high added value, it is most important to secure safety through scientific verification. To ensure safety, the animal toxicity test was conducted by the GLP organization according to the guidelines prescribed by the Ministry of Food and Drug Safety. As a preliminary test, the single-dose toxicity test was conducted for rodents and non-rodents to ensure safety. Through the 4-week repeated-dose toxicity test, the dose determination and testing of the 13-week repeated-dose toxicity test were conducted and adverse reactions were confirmed.

Keywords: Deep seawater mineral(해양심층수 미네랄), Repeated dose toxicity test(반복투여 독성시험), Ministry of food and drug safety(식품의약품안전처), GLP(비임상 시험 기준 실험실), No Observed Adverse Effect Level, NOAEL(무독성량)

1. 서 론

해수는 무궁무진한 자원으로 육상 자원 고갈로 인한 그 중요성이 증대되고 있다. 특히 육상 담수가 부족한 경우 해수담수가 육상

담수를 대신할 수 있다. 국내에서는 대표적으로 해수담수화 사업이 해양심층수로 이뤄지고 있다. 해양심층수는 태양광이 도달하지 않는 수심 200 m 이상의 깊은 곳에 존재하는 유기물이나 병원균 등이 거의 없을 뿐 아니라 해양식물의 성장에 필수적인 영양염류가 풍부하여 인체의 구성원소와 유사한 조성을 하고 있다(Ji *et al.*[2014]). 수심 200 m 이상에 부존하는 해양심층수는 저온 안정성, 부영양성, 청

†Corresponding author: dsmoon@kriso.re.kr

정성 등의 자원적 특성을 가지고 있어, 이러한 해양심층수를 활용하여 먹는 물로 만들어 상품화하는 사업이 활발히 이뤄지고 있다 (Moon *et al.*[2004]). 또한 먹는 물을 생산하고 부수적으로 생성되는 농축수를 응용한 여러 제품들이 개발 되고 있는 실정이다. 이러한 농축수는 인체에 필요한 무기성분의 여러 미네랄들을 다량 함유하고 있다. 최근에는 고경도 먹는 해양심층수를 활용하여 고지혈, 당뇨, 콜레스테롤 등의 개선방안을 위한 동물실험 결과도 유의미하게 나오고 있으며(Ha *et al.*[2016]; Lee *et al.*[2016]), 당뇨 진단계의 사람을 대상으로 실시한 혈당 및 지질 지표의 개선 효과를 평가하는 임상시험 결과, 8주간 해양심층수 고경도 미네랄탈염수 섭취가 체내 인슐린 저항성을 개선시키는 효과를 확인할 수 있었다. 더불어 혈중 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤이 감소되는 효과도 확인되었다(Ham and Shon[2020]). 이러한 고경도 먹는 해양심층수의 시험결과를 바탕으로 고경도 해양심층수 농축수를 증발 건조시켜 분말형태로 만든 해양심층수 미네랄 추출물의 기능성이 대두되어지고 있다. 해양심층수 미네랄추출물은 해수담수화 과정에서 나오는 농축수를 증발시켜 얻는 방법, 전기분해 방법 등으로 얻을 수 있으며, 최근에는 막 분리, 전기투석, 이온교환 등을 이용한 방법들도 소개되어지고 있다(Ji *et al.*[2014]; Ji *et al.*[2015]).

해양심층수 미네랄추출물을 식품원료로 쓰이기 위해서는 기능성과 더불어 안전성이 확보되어야 사용되어질 수 있다. 이러한 안전성검사 절차는 식품의약품안전처에서 규정한 가이드라인에 따라 GLP(Good Laboratory Practice) 인증기관에서 진행되어야한다(NIFDS[2019]). 본 연구에서는 해양심층수 미네랄추출물(마그네슘염)을 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반복 경구 투여하였을 때, 시험물질이 전신노출에 의한 표적장기, 무독성량(NOAEL; No Observed Adverse Effect Level) 등의 독성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 해양심층수 미네랄추출물의 제법 및 성분

본 연구에서는 강원도 고성 앞바다의 해안가로부터 약 3 km, 해수면으로부터 약 300 m 지점에서 취수한 해양심층수를 사용하여 실험을 수행하였다. 사용한 해양심층수의 초기 염도는 3.4 wt%이

며, 역삼투 공정과 감압증발공정을 걸쳐 마그네슘염을 추출하였으며, 제조한 미네랄추출물은 해양수산부 고시 제 2015-112호 ‘해양심층수 미네랄추출물의 정의, 원료기준, 제조·가공기준, 제품규격 및 시험방법’에 적합하며, 미네랄추출물의 정보는 Table 1과 같다.

2.2 해양심층수 미네랄추출물의 설치류 반복투여 독성시험 방법

독성시험은 GLP인증기관인 (주)크로엔에서 진행하였으며, 시험군으로 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 랫드는 다양한 종류의 물질에 대한 독성을 평가하는데 널리 사용되고 있으며, 풍부한 시험 기초자료가 있으므로 본 시험의 실험동물로 선택하였다. 사전시험으로 해양심층수 미네랄추출물(마그네슘염)의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경구투여에서 독성학적 변화를 관찰 할 수 없었다. 이에 향후 13 주 반복독성시험의 용량으로 5,000 mg/kg/day 를 최고농도로 하여 설정하는 것이 적절하다고 판단되었다. 시험군은 부형제인 멸균주사용수를 투여하는 대조군, 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여하는 저용량군, 중용량군 및 고용량군으로 설정하였다. 사용 동물수는 각 투여군 별로 암수 각 10 마리씩 설정하였다(Table 2참조). 관찰기간 동안 일반증상관찰, 체중 측정, 사료소비량 측정, 안검사 및 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 절대 장기중량, 상대 장기중량, 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다(NIFDS[2019]).

시험물질은 전자저울로 칭량하여 용기에 넣고, 부형제를 추가하여 규정농도로 조제하였으며, 조제물의 분석은 한국식품과학연구원에서 Inductively Coupled Plasma Spectrometer, ICP(USA)로 수행

Table 2. Rat gender, number of animals, age and weight range

	성별	수컷	암컷
동물 수	입수 시	44	44
	투여개시 시	40	40
주령	입수 시	6	6
	투여개시 시	7	7
체중범위	입수 시	168.69 ~ 200.93 g	121.05 ~ 137.19 g
	투여개시 시	229.47 ~ 256.72 g	153.98 ~ 175.49 g

Table 1. Deep seawater magnesium salt information

명칭	해양심층수 미네랄추출물 (마그네슘염)
화학명	염화마그네슘 + 황산마그네슘 + 산화마그네슘
제공일	2017년06월16일, 2017년11월10일, 2017년11월14일(3회)
제공량	3076.5649 g, 791.89 g, 5820.88 g
외관 및 색상	흰색 고체분말
제조일	2016년 04월
유효기간	제조일로부터 3년
순도	79%
보관조건	상온, 제습
공급	선박해양플랜트연구소
취급시 주의사항	건조 보관

하였다. 해양심층수 미네랄추출물(마그네슘염)의 조제물 분석법 벨리테이션 및 안정성 확인시험을 통하여 125 mg/ml 및 500 mg/ml 조제물에 대한 균질성을 확인하였고, 실온 4 시간, 실온 24 시간과 실온 8 일간의 안정성을 확인하였다. 농도 분석은 투여개시전 및 투여 13 주차에 각각의 조제물에 대하여 중층에서 3 회 샘플을 취하여 측정하였다. 농도분석은 한국식품과학연구원에서 실시하였다. 사료는 방사선 멸균된 실험동물용 쥐 사료 Charles River Rat and Mouse 18%(5L79, LabDiet, USA, Lot No.: JUN16171, JUN12173, JUL04173, JUL10173)를 ㈜오리엔트 바이오로부터 공급받아 자유섭취 시켰으며, 제조업체로부터 사료성분 분석 성적서 및 미생물검사 성적서를 받아 시험에 적합인지 확인하였다. 실험동물에 공급되는 물은 폴리카보네이트제 급수병에 넣고 자유섭취 시켰다. (주)신성생명환경연구원를 통한 정기적 검사(년 1 회)로 “먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙(환경부령 제 684 호 2016 년 12 월 30 일 일부개정)”에 적합인지 확인하였다.

랫드의 검역은 입수 시 모든 동물의 수와 상태를 관찰하였고, 동물공급업체에서 제공한 검사성적서 등을 시험기초자료로 보관하였다. 모든 동물은 동물실 환경에 적응하기 위해 6일의 순화기간을 두었다. 순화기간 동안 모든 동물은 매일 1 회 순화기간 증상을 관찰하였으며, 입수 시와 군분리시 체중을 비교하여 이상이 없고, 순화기간 동안 이상증상이 없는 동물만 시험에 사용하였다. 동물의 군분리는 먼저, 순화기간 중 건강한 개체로 판정한 동물의 체중을 측정하였고, 평균체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하는 동물은 제외하였다. 그리고 선택한 동물들은 순위화 한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포되도록 지그재그로 분배하여 군분리 하였다. 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰으며, 이후 해당 SOP 에 따라 처리하였다. 랫드는 Table 3와 같은 사육환경에서 관리 하였다.

시험물질의 투여경로는 임상예정경로인 경구투여를 선택하였으며, 총 투여량을 1 회/일, 7 회/주, 13 주간 진행하였으며, 15:00 이전에 투여 하였다. 개체별 투여액은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 산출하였다. 관찰, 측정 및 검사일은 투여개시일을 Day 1(1 일)로 하고 투여개시일부터 7 일간을 Week 1(1 주)로 계산하였다. 모든 동물에 대하여 1 일 2 회(1 일 2 회: 오전 및 오후) 일반증상을 관찰하였다. 관찰은 투여기간동안 모든 동물에 대하여 투여 1 일부터

13 주간 실시하였으며, 관찰기간 중 사망동물은 발견 시 체중을 측정 후 부검을 실시하였다. 부검 시 장기중량 측정하고 필요 시 조직병리학적 검사를 위해 장기 고정을 실시하였다. 각 측정결과는 통계처리 시 제외하였다. 모든 동물에 대하여, 입수, 군분리시, 투여개시일(투여 전), 투여 개시 후 주 1 회 및 부검일에 체중을 전자저울(GF-2000, AND, Korea)을 사용하여 측정하였다. 투여 13 주차에 군당 각 5 마리의 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후 양쪽 안구에 산동제(미드리아실 1% 점안액: 트로픽아미드, Alcon a Novartis company, 벨기에, Lot No.: 16B04DN)를 점적하여 동공확장을 유도한 다음, 안저사진기로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다. 투여 13 주차에 군당 각 5 마리의 동물에 신선노(배설 후 약 3 시간 이내의 뇨) 및 축노(배설 후 약 24 시간 뇨)를 수거하여 노화학분석기(CLINITEK Advantus, SIEMENS, Germany)로 검사를 실시하였다. 신선노 채취 중에는 투여 및 사료급여를 실시하지 않고, 음수는 자유섭취 시켰다. 뇨량은 주사기 또는 기타 측정도구를 이용하여 육안으로 측정하였으며, 침사는 현미경을 이용하여 하였다. 모든 계획 부검동물은 채혈 전에 하룻밤(약 12 시간 이상) 동안 절식(물은 제공)하였다. 부검일에 동물을 Isoflurane (Troikaa Pharmaceuticals Ltd., Lot No.: N0106B17)으로 흡입마취 하였고, 복대동맥에서 주사기를 이용하여 채혈하였다. 모든 계획부검 동물을 대상으로 채혈 후 항응고제(EDTA-2K)가 담긴 채혈 튜브에 넣고, 아래와 같은 항목을 일반혈액분석기(ADVIA 120, SIEMENS, Germany)로 측정하였다. 응고검사는 채취한 혈액 약 1.0 mL을 3.2% sodium citrate 함유 tube에 넣고, 원심분리(3,000 rpm, 10 분, 4°C)한 후 혈장을 채취하여 응고시간분석기(CA 620, SYSMEX, Japan)로 측정하였다. 모든 계획부검 동물을 대상으로 약 1 mL을 채혈하여 항응고제가 없는 튜브에 담고 상온에서 최소 90 분 이상 방치시킨 후 원심분리(3,000 rpm, 10 분, 4°C)하여 혈청을 분리하여 아래와 같은 항목을 혈액생화학 분석기(HITACHI 7180, HITACHI, Japan) 및 전해질 분석기(EasyLyte[®] PLUS Na/K/Cl ANALYZER, Medica Corporation, U.S.A.)로 측정하였다. 임상병리를 위한 채혈을 실시한 모든 개체는 부검을 위하여 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사 시켰으며, 이후 부검소견을 확인하기 위하여 외관, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기 및 조직을 육안으로 관찰하였다. 대조군, 고용량군 및 사망동물의 고정장기와 부검 시 이상소견이 관찰된 장

Table 3. Rat breeding environment

동물실번호	동물실 1
사육상자 정보	철망 사육상자(W 180 × L 400 × H 200 mm)
사육밀도	순화기간: 2마리 이하 / 사육상자 관찰기간: 1마리 이하 / 사육상자
온도	20.07 ~ 23.37 °C
상대습도	40.06 ~ 56.31%
환기횟수	20회 이상/시간
조명주기	12시간(Am 8 ~ Pm 8)
조도	150 ~ 300 lx
사육관리	사육상자 및 급이기 1회 이상 / 2주, 급수병 1회 이상 / 1주 교환

Table 4. Test group and dosage

군	투여량(mg/kg/day)	투여액량(mL/kg)	동물 수 (동물번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	10 (1101 ~ 1110)	10 (2101 ~ 2110)
G2 저용량군	1,250	10	10 (1201 ~ 1210)	10 (2201 ~ 2210)
G3 중용량군	2,500	10	10 (1301 ~ 1310)	10 (2301 ~ 2310)
G4 고용량군	5,000	10	10 (1401 ~ 1410)	10 (2401 ~ 2410)

기 또는 부위에 대하여 조직 슬라이드를 제작하였다. 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures)의 경우에는 Levene test 로 등분산성을 검정한 후, one-way ANOVA test 로 유의성을 확인하였으며, 사후검정 시 등분산인 경우에는 Scheffe multiple range test 를, 이분산인 경우에는 Dunnett’s T3-test를 이용하여 대조군과의 유의성을 검정하였다. 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS(IBM® SPSS Statistics, ver. 24)를 이용하여 실시하였으며, P<0.05 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

본 시험에서는 투여량 설정을 위해 4 주 반복 용량결정시험을 실시한 결과. 고용량인 5,000 mg/kg에서 시험물질에 의한 독성증상이 관찰되지 않아 5,000 mg/kg을 고용량군으로 설정하고 2,500 mg/kg를 중용량군 그리고 1,250 mg/kg를 저용량군으로 설정하였다. 또한 비교를 위하여 대조군을 추가로 설정하였으며, 시험군 및 투여량은 Table 4과 같이 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 시험결과

3.1.1 임상증상

임상증상 결과 수컷 고용량 투여군에서 투여 후 55 일과 75 일에 각 1 마리씩 사망이 확인되었으며, 암컷 고용량 투여군에서 투여 후 66 일과 73 일에 각 1 마리씩 사망이 확인되었다. 수컷 저용량 투여군에서는 투여 후 24일부터 일부 개체에서 연변(soft stool)이 관찰되었고, 30일부터 투여 종료 시까지 거의 모든 개체에서 연변이 관찰되었다. 중용량 투여군에서는 투여 후 9일부터 일부 개체에서 연변이 관찰되었고, 11일부터 투여 종료 시까지 모든 개체에서 연변과 점액변(mucous stool)이 관찰되었으며, 투여 후 57일부터 투여 종료 시까지 일부 개체에서 설사가 관찰되었다. 고용량 투여군에서는 투여 후 2일부터 거의 모든 개체에서 연변과 점액변이 관찰되었고, 53일부터 투여 종료 시까지 일부 개체에서 설사

(diarrhea), 하복부의 오염(soiled perineal region), 음수 섭취량의 증가(increase of water consumption), 식욕부진(anorexia), 야윈(emaciation), 거식(refusal to feed), 무변(no stool), 안검하수(ptosis), 자발운동의 저하(decrease of locomotor activity), 그리고 입주위의 더러움(staining around mouth)이 부분적으로 관찰되었다. 암컷 저용량 투여군에서는 투여 후 24일부터 일부 개체에서 연변(soft stool)이 관찰되었고, 36일부터 투여 종료 시까지 거의 모든 개체에서 연변이 관찰되었다. 중용량 투여군에서는 투여 후 10일부터 일부 개체에서 연변이 관찰되었고, 12일부터 투여 종료 시까지 모든 개체에서 연변과 점액변(mucous stool)이 관찰되었으며, 투여 후 57일부터 투여 종료 시까지 일부 개체에서 설사가 관찰되었다. 고용량 투여군에서는 투여 후 2일부터 거의 모든 개체에서 연변과 점액변이 관찰되었고, 54일부터 투여 종료 시까지 일부 개체에서 설사, 하복부의 오염이 부분적으로 관찰되었다(Table 5참조).

3.1.2 체중

체중 관찰 결과, 시험물질 투여기간 중 수컷 고용량 투여군에서 투여 후 5 주부터 대조군 대비 유의적인 감소(p<0.05)가 관찰되었으며, 암컷 고용량 투여군에서 투여 후 3 주부터 대조군 대비 유의적인 감소(p<0.05)가 관찰되었다.

3.1.3 사료소비량

사료소비량 관찰 결과, 시험물질 투여기간 중 수컷 모든 투여군에서 대조군 대비 유의적인 감소가 관찰되지 않았으며, 암컷 고용량 투여군에서 투여 후 2 주와 6 주에 일시적으로 대조군 대비 유의적인 감소(p<0.05)가 관찰되었다.

3.1.4 안과학적 검사 / 뇨 검사

시험물질 투여기간 중 모든 투여군에서 안과학적 검사 및 뇨검사 결과 이상변화가 관찰되지 않았다.

Table 5. Major clinical symptoms in the 13-week repeated dose toxicity study

군	투여량(mg/kg/day)	결과
G1 대조군	0	증상 없음
G2 저용량군	1,250	연변
G3 중용량군	2,500	연변, 점액변, 일부개체에서 설사가 관찰됨
G4 고용량군	5,000	연변, 점액변, 설사, 하복부의 오염, 물 섭취량 증가, 사망개체발생(수컷2마리, 암컷 2마리)

3.1.5 혈액학적 검사

혈액학적 검사 결과, 시험물질 투여기간 중 수컷 고용량 투여군에서 WBC에서 대조군 대비 유의적인 감소(p<0.05)가 관찰되었으며, 암컷 모든 투여군에서는 대조군 대비 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

3.1.6 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사 결과, 시험물질 투여기간 중 수컷 중용량 투여군에서 IP와 Cl에서 각각 대조군 대비 유의적인 증가(p<0.05)와 감소(p<0.05)가 관찰되었다. 수컷 고용량 투여군에서 ALP, IP, 그리고 A/G ratio에서 대조군 대비 유의적인 증가(p<0.05)가 관찰되었다. 암컷 중용량 투여군에서 TP와 Ca에서 각각 대조군 대비 유의적인 감소(p<0.05)가 관찰되었으며, 고용량 투여군에서 ALP와 IP는 대조군 대비 유의적인 증가(p<0.05)가 그리고 TP와 Ca는 대조군 대비 유의적인 감소(p<0.05)가 관찰되었다.

3.1.7 장기중량

장기중량 측정 결과, 시험물질 투여기간 중 수컷 고용량 투여군에서 심장과 간에서 대조군 대비 유의적인 감소(p<0.05)가 관찰되었으며, 암컷 고용량 투여군에서 흉선과 자궁에서 각각 대조군 대비 유의적인 감소(p<0.05)와 증가(p<0.05)가 관찰되었다.

3.1.8 부검소견

부검 결과, 암컷 고용량 투여군 중 1 마리의 위, 십이지장, 공장, 회장, 결장, 직장, 그리고 맹장에서 팽창이 관찰되었으며, 그 외 시험군에서는 특이적인 부검소견이 관찰되지 않았다.

3.1.9 조직병리학적 검사

먼저 수컷은, 대조군에서는 신장에서 간질성 신염(interstitial nephritis)이 1/10 레에서 관찰되었고, 간에서 지방변성(fatty change)이 2/10 레에서 관찰되었다. 고용량군에서는 맹장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 1/10 레에서, 결장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 1/10 레에서, 십이지장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 2/10 레에서, 회장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 2/10 레에서, 직장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 1/10 레에서, 위에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 1/10 레에서 관찰되었고, 간에서 지방변성(fatty change)이 1/10 레에서 관찰되었다.

암컷은, 대조군에서는 폐에서 폐포벽의 비후(alveolar wall thickness)가 1/10 레에서 관찰되었다. 고용량군에서는 결장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 1/10 레에서, 십이지장에서

상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 1/10 레에서, 회장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 2/10 레에서, 공장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 1/10 레에서, 직장에서 상피세포괴사(epithelial cells necrosis)가 1/10 레에서 관찰되었고, 간에서 단핵구의 침윤(mononuclear cells infiltration)이 1/10 레에서 관찰되었고, 폐에서 폐포벽의 비후(alveolar wall thickness)가 2/10 레에서 관찰되었다.

3.2 고찰

랫드에 대한 13주 반복 투여 독성시험 주요 임상증상을 Table 5와 같이 요약할 수 있었다. 또한 모든 시험군에서 특이적인 부검소견은 관찰되지 않았으며, 사망한 암수 각 2 마리의 사망개체에서 장조직의 상피세포 괴사소견은 투여물질에 의한 일부개체에서의 소견으로 사료되지만, 기타 암수 대조군과 고용량군의 간과 폐 및 신장에서 관찰된 소견은 랫드에서 자연발생적으로 발생하는 변화이거나, 우발적 또는 산발적으로 나타나는 소견으로 시험물질 투여와 무관한 변화라 사료되어진다. 그리고 해양심층수 미네랄추출물과 원료의 기원이 같은 소금의 경우, 반치사량(LD50, lethal dose for 50% kill) 값이 3,000 mg/kg/day 임을 감안할 때 시험물질의 고용량군인 5,000 mg/kg/day에서 발생한 사망개체 수는 일정부분 안전성을 확보했다고 사료되어진다.

제안된 미네랄추출물의 유해 우려항목 위해평가 시 고려한 안전지수는 섭취량 5,000 mg/kg/day에서 일부 독성을 보였으므로 섭취용량 산정에서 제외하고, 그 다음 섭취량 농도인 2,500 mg/kg/day을 사용하여, 2,500 mg/kg/day ÷ 6.17(rat의 지수) = 405.2 mg/kg/day 이며, 안전계수 10을 고려하면 허용수준은 405.2 mg/kg/day ÷ 10 = 40.52 mg/kg/day이며, 한국인 평균체중 60 kg 기준으로 하루 섭취 허용량은 40.52 * 60 kg = 2431.2 mg/day으로 산정 되었다. 기준 설정 시 참고한 값은 WHO(World Health Organization)와 EPA(Environmental Protection Agency) 먹는 물 기준 설정 시 사용한 것들을 이용하였다(Table 6참조).

4. 결 론

본 연구에서는 시험물질 해양심층수 미네랄추출물(마그네슘염)을 Sprague-Dawley 랫드에 13주 반복 경구투여 하였을 때의 무독성량(NOEL)을 알아보기 위하여 수행하였다. 시험결과 모든 시험군에서 특이적인 부검소견은 관찰되지 않았으며, 수컷 고용량 투여군의 2 마리의 사망개체에서 관찰된 위장조직의 상피세포 괴사 소견과 암컷 고용량 투여군의 사망개체에서 관찰된 장조직의 상피세포 괴사소견은 투여물질에 의한 일부개체에서의 소견으로 사료

Table 6. Safety indexes considered in risk assessment of hazardous substances of mineral extracts

항목	표적영향	악영향 무관찰 섭취량 (mg/day)	기준수준지표 (mg/kg-day) (Rat)	안전계수	일일 허용섭취량 (mg/kg-day)	제안 섭취 용량 (mg/일)
마그네슘 염	설사	2,500	NOAEL 6.17	10	40.52	2,431

되지만, 기타 암수 대조군과 고용량군의 간과 폐 및 신장에서 관찰된 소견은 랫드에서 자연발생적으로 발생하는 변화이거나, 유발적 또는 산발적으로 나타나는 소견으로 시험물질 투여와 무관한 변화라 사료된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 시험 조건하에서 시험물질 해양심층수 미네랄추출물(마그네슘염)을 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반복 경구투여 하였을 때 무독성량(NOAEL)은 암수 2,500 mg/kg/day 으로 안전하게 설정하였다. 이러한 결과들을 바탕으로 해양심층수 미네랄추출물의 무독성량 값을 설정할 수 있었으며, 추후 식품섭취량 평가 자료에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

후 기

본 연구는 해양수산부 국가 R&D사업 “해수추출 미네랄 활용 글로벌 건강기능식품 개발 및 수출(PMS4560)”과 “해양심층수 활용 다단계 복합양식 기술개발(PES4340)”에 의해 수행된 연구 결과입니다.

References

- [1] Ha, B.G., Moon, D.S., Kim, H.J. and Shon, Y.H., 2016, Magnesium and calcium-enriched deep-sea water promotes mitochondrial biogenesis by AMPK-activated signals pathway in 3T3-L1 preadipocytes, *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, 83(1), 477-484.
- [2] Ham, J.Y. and Shon, Y.H., 2020, Natural Magnesium-Enriched Deep-Sea Water Improves Insulin Resistance and the Lipid Profile of Prediabetic Adults: A Randomized, Double-Blinded Crossover Trial, *Nutrients*, 12(2), 515-529.
- [3] Ji, H., Kim, K.S., Moon, D.S., Kim, H.J., and Lee, H.S., 2015, Production of High Hardness Concentrated Seawater Using NF Membrane, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 18(1), 9-14.
- [4] Ji, H., Moon, D.S., Choi, M.Y., Kim, K.S., Lee, H.S. and Kim, H.J., 2014, Production of High Hardness Concentrated Seawater Using NF Membrane, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 17(4), 333-337.
- [5] Lee, K.S., Kwon, Y.S., Kim, S.Y., Moon, D.S., Kim, H.J. and Shon, Y.H., 2016, Regulatory mechanism of mineral-balanced deep sea water on, *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, 86(1), 405-413.
- [6] Moon, D.S., Jung, D.H., Kim, H.J. and Shin, P.K., 2004, Features of deep ocean water and underground salt water, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 7(1), 42-46.
- [7] National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS), 2019, *KNTP Toxicity Test Manual*.

Received 15 July 2020

Revised 13 August 2020

Accepted 1 September 2020