



## Sialic Acid를 지표성분으로 하는 유청가수분해단백분말의 기능성식품 개발연구

### - II. 효소분리 용매정제로 고농도 Sialic Acid가 함유된 유청가수분해단백분말(23%)의 랫드를 이용한 90일 반복경구투여 독성시험 평가 연구 -

노혜지<sup>1</sup> · 조향현<sup>1</sup> · 김희경<sup>1\*</sup> · 고희범<sup>2</sup>

<sup>1</sup>한일바이오메드, <sup>2</sup>전남대학교 수의과대학

## Development and Research on a Functional Hydrolyzed Whey Protein Powder Product with Sialic Acid as a Marker Compound

### - II. Repeated 90-day Oral Administration Toxicity Test using Rats Administered Whey Protein Powder containing Highly Concentrated Sialic Acid (23%) produced by Enzyme Separation and Solvent Enrichment Method -

Hye-Ji Noh<sup>1</sup>, Hyang-Hyun Cho<sup>1</sup>, Hee-Kyong Kim<sup>1\*</sup> and Hong-Bum Koh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>HANILBIOMED Co., Gwangju 67024, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

#### Abstract

The present study was performed to develop a functional raw food material from hydrolyzed whey protein powder (23%-GNANA) medication containing sialic acid as a marker compound that is naturally occurring at 7% concentration in GMP (glycomacropeptide). GMP is used worldwide in foodstuffs for babies and infants and is obtained from the milk protein as safe food. While the purpose of our detailed evaluation was aimed to assess preliminary NOAEL values for and above 2,000 mg/kg/day, a clinical dose allowance for 23%-GNANA (as per characteristic of a functional health product, a highly refined test substance of 23% (v/v) sialic acid combined in GMP), at the same time we also wanted to assess the safety of GMP hydrolyzate lacking sialic acid but with identical properties as GMP. Animal safety evaluation was conducted using 23%-GNANA as the test substance, produced from hydrolyzed whey protein powder (product name: HELICOBACTROL-23; provided by Medinutrol Inc. [Korea]; composed of 23% sialic acid and GMP protein) after isolating the sialic acid using enzymes approved as food additives, with GMP as a raw material, and subsequently increasing the content of xx up to 23% through 80% (v/v) ethanol soaking and concentrating, in accordance with GLP Guideline. The animal safety evaluation mentioned above was made on the basis of toxicity in SPF Sprague-Dawley female and male rats dosed with 10 mL of the test substance diluted to 0, 1,250, 2,500, and 5,000 mg/kg directly into their stomachs for 90 d. This was determined

in terms of the general symptoms and animal viability, weight and amount of feed intake, eye examination, uracrasia tests, hematological and blood biochemical disorder tests,

\* Corresponding author: Hee-Kyong Kim, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea. Tel: +82-61-352-2166, Fax:+82-61-352-2167, E-mail: mulsambong@naver.com

blood coagulation test, abnormal intestine weight, abnormalities during postmortem and histopathological examinations. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Based on the toxicity determination, a certain minor effect associated with the test substance was observed in male rats with no major effects of the tested substance, in comparison with the control group dosed with sterilized water. Nevertheless, the NOAEL value, evaluated as per toxicity criteria, was verified as 5,000 mg/kg/day ( $P < 0.05$ ). Similarly, for female rats, a certain minor effect associated with the test substance was observed in 5,000 mg/kg/day dosed group, with no major effect, yet the NOAEL value (as assessed as per toxicity criteria) was determined to be 5,000 mg/kg/day ( $P < 0.05$ ), which was the same as for male rats. Accordingly, the NOAEL values of the test substances for all female and male rats were finally verified as 5,000 mg/kg/day ( $P < 0.05$ ). In conclusion, it was determined that the 23%-GNANA test substance exceeds 2,000 mg/kg/day, the clinical allowance characteristic for functional health food, and was finally evaluated to cause no safety concerns when used as a raw material in functional health food production, which was the ultimate goal of the present study.

**Keywords:** Glycomacropeptide (GMP), sialic acid evaluation on animal safety and development of raw material for functional health food per the GLP guideline

## 서론

Glycomacropeptide(이하 GMP)는 치즈 제조 과정에서 rennet (Chymosin)의 반응에 의하여 105번 Phe와 106번 Me 사이의 펩타이드 결합이 절단되어 para- $\kappa$ -casein과 GMP는 두 개의 부분으로 나누어진다. GMP는 C-terminal의 친수성 casein-peptide이며, sialic acid가 제조법에 따라 다소 차이는 있지만 6~7%가 결합되어 있다. 분자량은 6.8~8.0 KDa인 물성을 보유하고 있으며, 현재 식품 및 식품첨가제로 국내외적으로 사용되고 있다(Yoon *et al.*, 2000; Brody, 2000). 최근 연구에 따르면 치즈 제조 후 생성되는 GMP는 과거에는 제조 공정 시 폐기되었지만, 최근에는 영양분 및 기능성 물질이 풍부한 유청에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Brody, 2000). 유청액 내 GMP는 1.2~1.5 g/L가 함유되어 있으며, 건조 분말 시는 10~25%로 함량이 높아진다고 보고되고 있으며, 또한 생리활성 펩타이드로서 기능식품 개발 가능성이 높은 소재로서 주목을 받고 있다(Brody, 2000). GMP는 *Vibrio cholera*와 *E. coli*의 enterotoxins과 부착하는 능력을 가지고 있고, *Bifidobacterium*의 성장을 촉

진하며, 박테리아와 바이러스의 장기와의 접촉을 억제하는 효능을 가지고 있다(Moon *et al.*, 2005). 친수성 GMP는 N-acetylneuraminic acid(sialic acid), galactose(gal)와 N-acetylgalactosamine (GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 연결된 형태로 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있는데, 이때 말단에 위치한 sialic acid를 자르는 효소를 neuraminidase라고 한다(Fig. 1)(Wang and Brand-Miller, 2003). Neuraminidase는 *Vibrio cholera*와 *Clostridium perfringens*와 같은 병원성 세균으로부터 생산하여 사용되어 사용됨에 따라 비병원성 및 식품첨가물로 허용된 종균 및 효소를 이용한 연구가 진행되고 있다(Springer-Verlag, 1984). Sialic acid는 nine-carbon sugar family에 속하는 단당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형태로 부착되어 있으며, 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다(Wang *et al.*, 2001). Sialic acid는 우리 몸 속의 수용기의 인지, 신경 신호전달 등에 역할을 하며, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고(Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Wang, 2009), 뇌의 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학

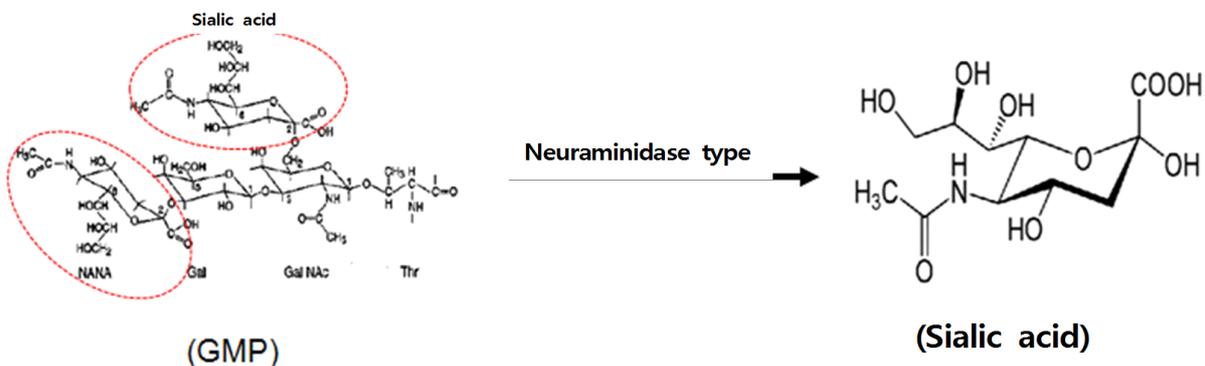


Fig. 1. Sialic acid production from GMP by a Alcalase 2.4FL (Neuraminidase type)

습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang *et al.*, 2007; Gorog and Kovacs, 1978; Iijima *et al.*, 2004). 이밖에도 항염증 효과나 몸속의 과산화수소 제거에 역할을 한다고 알려져 있어, 현재 기능성 식품 개발간 지표성분으로 주목을 받고 있다(Ishikawa and Koizumi, 2010; Zimmermann *et al.*, 2007; Organization for Economic Co-operation and Development(OECD), 2008). Sialic acid는 현재 대부분 제조업 *E. coli*에서 합성되거나, *E. coli*로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로 부터 합성되며, 일부가 화학적 합성방법으로 생산되고 있다(Ishikawa and Koizumi, 2010; Zimmermann *et al.*, 2007; OECD, 2008; United States of Food and Drug Administration (USFDA), 2005). Sialic acid는 대부분 의약품 소재로 활용되고 있으며, 유청 단백질에서 분리한 sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다. Sialic acid는 생리 및 약리적 효능을 나타내며, 활용도를 증가시키기 위한 효능 연구가 진행되고 있다고 할지라도 소재에 대한 안전성 자료 확보는 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다.

특히 Sialic acid를 분리 및 정제과정을 거쳐 제조한 유청가수분해단백분말을 식품원료로 사용하거나, 식품공전이나 기능성식품공전에 등록을 위해서는 독성시험을 통한 안전성 자료가 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 시험물질인 23%-GNANA의 안정성 평가의 일환으로 반복투여 시 나타날 수 있는 독성의 질적, 양적인 평가를 위해 “의약품 등의 독성시험관리기준(식품의약품안전처 고시 제2014-136호)(Ministry of Food and Drug Safety(KFDA), 2014)”과 “OECD test guideline(OECD, 2008)”에 준하여 90일 반복경구투여 독성시험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험물질준비

GMP는 sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPep GMP(Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 원료로 사용하였다. 시험물질 제조를 위하여, 정제수에 7% (w/v)되게 GMP를 용해시킨 후 효소 Alcalase 2.4FL(Novozymes Co., Denmark)를 기질 대비 0.24%(w/v)로 혼합하여 7시간 (57°C) 동안 가수분해를 시켰다(Fig. 1). 그리고 가수분해 용액 2와 에탄올의 비율이 8이 되도록 혼합하였다. 다음으로 에탄올 혼합에 따라 생성된 침전물을 제거한 후 이중 상등액만을 동결 건조시켜 제조한 HELICOBACTROL 제품(23%-GNANA)을 한일바이오메드사(한국)로 공여 받아 시험물질로 사용하였다(Fig. 2).

### 2. 시험물질 내 지표성분 Sialic acid 검정

시험물질 내 Sialic acid의 분리효율 및 함유량을 확인을 위

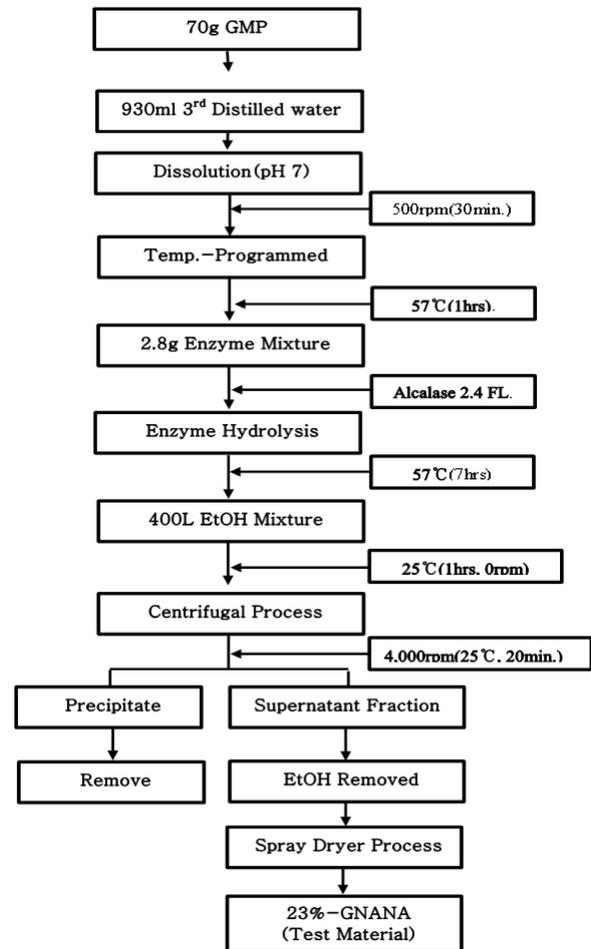


Fig. 2. Content evaluation results of sialic acid in hydrolyzed whey protein (23%-GNANA), a test substance, applying the HPLC analysis method compared to standard sialic acid. A: Standard sialic acid (10 ppm), B: Sialic acid content in 23%-GNANA (10 ppm)

하여, 10 mM sodium acetate buffer 용액에 시험물질을 용해시킨 후, 에탄올 8 mL에 희석액 2 mL를 혼합한 후, 이를 30분 동안 Sonication(25°C) 및 원심분리(3,000 rpm × 20 min, 25°C) 과정을 실시하였다. 그리고, 상등액만을 0.22 μm membrane으로 여과하여 이를 HPLC System(Agilent 1260, USA) 분석을 위한 시료로 사용하였다(Table 1). 시험물질 내 sialic acid의 분리효율 및 함유량 검정을 위한 표준체는 Sigma-Aldrich 사(A2090)을 구입하여 0.1 ppm(w/w), 1 ppm 및 10 ppm 되게 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 지표성분인 sialic acid의 검출허용오차는 90~110% 범위 내에서 평가하였다.

### 3. 실험동물 및 시험방법

#### 1) 시험법 및 동물복지와 IACUC

Table 1. HPLC operation conditions for analysis of sialic acid

HPLC system (Agilent 1260)	2. Analysis conditions
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Pump: G1311C</li> <li>· Auto sampler: G1329B</li> <li>· Column: G1316A</li> <li>· UV detector: G1314F</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Wavelength: 205 nm</li> <li>· Column: Aminex<sup>®</sup> HPX-87H Ion Exclusion Column (300×7.8 mm, 9 μm, Bio-Rad Co.)</li> <li>· Mobile phase: 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>· Running time: 20 min</li> <li>· Flow rate: 0.5 mL/min</li> <li>· Injection volume: 10 μL</li> <li>· Temperature: 40°C</li> <li>· Standard sol.(w/w): Sialic acid 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm</li> </ul>

본 시험은 OECD(2008), US FDA(2005) 및 의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전처 고시 제2014-136호)(KFDA, 2014)에 따라 실시되었으며, 동물보호법(법률 제11737호, 2013, 한국)을 근거한 대구가톨릭대학교 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee) 심의를 통과 후 실시하였다.

## 2) 실험동물 및 시험방법

시험동물은 미국 Taconic 사에서 생산 및 제공하고 있는 특정병원체 부재(specific pathogen-free, SPF) Sprague-Dawley 계통의 랫드를 사용하였고, 반복투여독성시험을 위해서 암·수 5주령 48마리를 대한바이오링크(한국)로부터 입수하였다. 입수 및 검수 후 7일간의 검역과 순화 과정을 거쳐 건강한 동물 암·수 각각 40마리를 선발하여 암·수 4 군에 군 당 10마리를 시험에 사용하였다. 사육환경은 시험의 전체 기간 동안 온도 23±3°C, 상대습도 50±20%, 환기횟수 10~20회/시간, 조명 12시간(08:00 점등~20:00 소등), 조도 150~300 Lux, 소음 60 dB 이하, 암모니아 농도 20 ppm 이하로 설정되었다. 순화, 투여 및 관찰기간 중 Polysulfone 사육상자(260 W×420 L×150 Hmm)에 2~3마리씩 수용하였으며, 사육상자 및 급수병은 주 1회 교환하였고, 모든 사육기자재는 고압증기멸균기(121°C, 20 min)로 멸균하여 사용하였다. 실험동물용 고흡사료는 방사선 멸균사료(Zeigler Bros. Inc., USA)를 자유로 섭취시켰으며, 여과 살균된 정제수를 자유섭취 시켰다

## 3) 시험군 구성 및 투여용량

순화 후 각 군의 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군을 구성하였고, 총 20마리를 시험에 사용하였다. 90일 반복 투여 독성시험에 있어서 용량설정은 4주 반복경구투여 용량범위설정(dose-range finding, DRF) 독성시험의 결과인 암수 랫드의 NOEL(최대비형량용량) 5,000 mg/kg/day를 참고하여 결정되었다. 대조군과 더불어 투여군

은 5,000 mg/kg/day(고용량군)를 최고용량으로, 2,500(중용량군) 및 1,250(저용량군) mg/kg/day로 설정되었다. 시험물질인 7%-GNANA의 투여는 임상 적용 경로인 경구로 이루어졌다.

## 4) 일반증상 및 사망률

투여 당일은 투여 후 1시간부터 6시간까지 관찰하였고, 투여 다음날부터 투여 및 관찰기간 동안 매일 2회 모든 동물에 대해 일정한 시간에 사망 여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개별적으로 관찰하여 기록하였다.

## 5) 체중 변화

투여개시 전에 체중을 측정하였고, 이후에는 주 1회, 부검 전날 및 부검일에 측정하였다. 부검일의 체중은 부검 전날에 하룻밤 절식시킨 후의 체중을 측정하였다. 사료섭취량 측정 주기는 체중측정과 시기적으로 일치하게 이루어졌다.

## 6) 사료섭취량

투여개시 전의 사료섭취량은 군분리 일부터 투여개시 일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

## 7) 요검사

요검사는 시험물질의 투여 마지막 주에 각 군당 5마리에 대하여 실시하였다. 동물을 대사 케이지에 수용하여 3~4 시간 동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1 mL를 취하여 요자동분석기(CliniTek Advantus<sup>™</sup>, SIEMENS, USA) 및 요침사 검사로 분석하였다. 또한 24시간 동안 계속 채집한 요로 요총량을 측정하였다. 요분석 항목은 요당(GLU), 빌리루빈(BIL), 케톤체(KET), 요비중(SG), 잠혈(OB), pH, 단백질(PRO), 유로빌리노겐(URO), 아질산염(NIT) 및 백혈구(LEU) 등을 검사하였다.

## 4. 요침사 검사

일반검사 후 남은 요를 1,500 rpm으로 5분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)한 후, 그 침전물을 S.M(Sternheimer-Malbin) 법으로 염색하여 RBC(red blood cell), WBC(white blood cell), Epithelial cell 및 Casts를 관찰하였다.

## 1) 안검사

동물 도입 시 모든 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰하였다. 투여 마지막 주에는 모든 동물을 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후, 각 군당 5마리에 대해서는 안구에 산동제(한국알콘, Lot No.: 13C07K)를 점적하여 안저사진기(Genesis,

Gowa Co. Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

## 2) 혈액학적 검사

부검 시까지 생존한 모든 동물에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액학적 검사는 랫드를 하룻밤 절식시킨 후, 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle (Vacutainer 3 mL, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기 (ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 통해 이루어졌다. 분석항목은 백혈구(WBC)의 수, 적혈구(RBC)의 수, 혈색소량(HGB), 적혈구 백분율(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 적혈구 분포폭(RDW), 혈액소 분포폭(HDW), 망상적혈구(RET), 백혈구 백분비(NEU), LYM(Lymphocyte), MONO(Monocyte), EOS(Eosinophil) BASO(Basophil) 그리고 LUC(Large unstained cells) 등이었다.

## 3) 혈액생화학학적 검사

혈액생화학학적 검사를 위해 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube(BD, USA)에 주입하고, 15~20분간 상온에 방치하여 응고시켰다. 이후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(KONELAB 20XT, Thermo, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정항목은 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), blood urea nitrogen(BUN), creatinine(CRE), glucose(GLU), total cholesterol(CHO), total protein(PRO), creatine phosphokinase(CPK), albumin(ALB), total bilirubin(BIL), albumin/globulin ratio(A/G), triglyceride(TG), inorganic phosphorus(IP),  $Ca^{2+}$  등이었다. 또한  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  등의 함량은 전해질 분석기(744  $Na^+/K^+/Cl^-$  Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정하였다.

## 4) 혈액응고시간 검사

부검 시 채혈한 혈액 중 1.8 mL를 3.2% sodium citrate 0.2 mL가 들어있는 vacutainer tube(Vacutainer 1.8 mL, BD, UK)에 주입한 후, 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리(MF80, Hanil, Korea)하여 얻은 혈장으로 PT(prothrombin time), APTT(activated partial thromboplastin time)를 측정하였다. 혈액응고시간검사기: K-98(ACL 7000 Instrumentation Laboratory, USA)을 사용하여 Nephelometric Analysis 방법으로 초(sec) 단위로 측정하였다.

## 5) 부검

부검 전날 절식한 랫드를 부검 당일에 Isofluran으로 흡입마취하여 복대동맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학학적 검

사를 위한 채혈을 실시하였다. 이후 복대동맥 및 복대정맥을 절단하여 방혈 치사시킨 다음, 모든 장기를 관찰하였다.

## 6) 장기중량 측정

부검 시 장기를 적출한 후 전자저울(CP-64, Sartorius, Ger)을 이용하여 중량을 측정하였다. 양측성 장기는 양측 장기 모두를 측정하였다. 측정 장기는 난소(ovary), 부신(adrenal gland), 뇌하수체(pituitary), 가슴샘(thymus), 전립샘(prostate), 고환(testis), 부고환(epididymis), 비장(spleen), 신장(kidney), 심장(heart), 폐(lung), 뇌(brain) 및 간(liver) 등이었다.

## 7) 병리조직학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 장기를 적출하여 10% 중성완충포르말린용액에 고정하였으며, 또한 안구는 Davidson 용액에, 고환과 부고환은 Bouin 용액에 고정하였다. 고정 장기는 고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막 림프절, 부신, 신장, 간, 대퇴골, 턱밑림프절, 침샘, 흉골, 가슴샘, 심장, 폐, 대동맥, 흉척수, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 하더샘, 뇌, 뇌하수체, 피부(젓샘) 등이었다. 고정된 장기 조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 이후 박절하여 Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 실시하였다. 대조군 및 고용량군(5,000 mg/kg/day)의 모든 고정 장기 조직에 대하여 검경하였다.

## 5. 통계학적 분석

대조군과 투여군 간의 평균비교에는 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였으며, 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 14.0을 이용하였다. 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학학적 검사, 장기중량 등과 같은 연속적인 자료는 one-way ANOVA test로 평균치에 대한 유의성을 검정하였다. 유의성이 있으면 Levene test로 등분산성을 검정하여 등분산일 경우에는 Duncan multiple range test, 이분산일 경우에는 Dunnett's T-test를 이용하였다. 요검사 결과와 같이 불연속인 자료의 분석 척도변환을 통해 중증도(severity)로 나타내어 통계분석이 이루어졌다 (Table 3).

## 6. 독성판정기준

시험물질의 반복투여독성시험을 통해 얻어진 변화 또는 독성은 독성의 정도와 양상에 따라 weight-based classification (Park and Cho, 2011)에 따라 평가하였다(Table 2).

Table 2. Definitions of LOAEL, NOAEL and NOEL by three steps of weight-based classification in toxicity test

Weight-based classification	Definitions of criteria	Criteria of toxicity	Evaluation endpoints
Important compound-related changes	• The lowest exposure level at which there are statistically or biologically significant increases in the frequency or severity of adverse effects between the exposed population and its appropriate control.	Criteria of toxicity	LOAEL
Minor compound-related changes	• The highest exposure level at which there are no statistically or biologically significant increases in the frequency or severity of adverse effects between the exposed population and its appropriate control. • Some effects may be produced at this level, but they are not considered to be adverse or precursors to adverse effects.	Non-adverse effect	NOAEL
Noncompound-related changes	• The highest exposure level at which there are no effects (adverse or nonadverse) observed in the exposed population, when compared with its appropriate control.	No effect	NOEL

Table 3. Table of severity values for statistical analysis by item of urinalysis signs during the 90 days oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the rats

Severity	0	1	2	3	4	5
GLU	-	+/-	1+	2+	3+	4+
BIL	-	+/-	1+	2+	3+	
KET	-	+/-	1+	2+	3+	4+
SG (Specific gravity)	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030
PRO	-	+/-	1+	2+	3+	4+
pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	>=9.0
URO (EU/dL)	0.2	1	2	4	>=8	
NIT	-	+				
OB (µmol/L)	-	+/-	1+	2+	3+	
LEU	-	+/-	1+	2+	3+	
RBC	0	+/-	1+	2+	3+	
WBC	0	+/-	1+	2+	3+	
Epithelial cell	0	+/-	1+	2+	3+	
Cast	0	+/-	1+	2+	3+	

GLU (glucose), BIL (bilirubin), KET (ketone body), LEU (leukocyte), OB (occult blood), PRO (protein), URO (urobilinogen), NIT (nitrite), SG (specific gravity)

Weight-based Classification은 시험물질 유래 중요한 변화(important compound-related changes), 시험물질 유래 경미한 변화(minor compound-related changes)와 비시험물질 유래 변화(noncompound-related changes)로 3단계로 구분하여 평가하였다. 시험물질이 비시험물질 유래변화(noncompound-related changes)로 평가되면, 시험의 목적인 NOEL(No Observed Effect Level), NOAEL(No Observed Adverse Effect Level) 및 LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level)로 구분하였다. 독성 지표는 시험물질-유래 중요한 변화는 adverse 그리고 시험물

질-유래 경미한 변화는 시험물질에 의한 non-adverse effect로 분류하였다. 일반적으로 NOAEL은 시험물질에 의해 심각한 독성(adverse effect)을 유발하지 않는 최대독성영향이지만, 경미한 영향인 non-adverse effect를 나타내는 최대무독성용량이며, LOAEL은 adverse effect를 유발하는 최소독성용량을 의미한다. NOEL은 시험물질에 의한 경미한 변화도 없는 최대무영향용량을 의미한다(USFDA, 2005). 이러한 독성지표의 정의에 따라 최종 독성판정은 NOAEL과 NOEL로 구분하여 실시하였다.

## 결 과

### 1. 시험물질 내 지표성분 Sialic acid 검정

Fig. 3은 시험물질인 23%-NANA 내 지표성분인 sialic acid의 함유량을 분석한 결과이다. 시험물질인 23%-GNANA 내 지표성분인 sialic acid 함유량을 확인결과, GMP 내 결합되어 있던 sialic acid는 100% 효율로 분리되었으며, 23%(v/v)의 sialic acid와 GMP 단백질 84%와 수분이 3%로 구성된 물성을 보유하고 있었다. 따라서, 시험물질로 사용에 있어 적합함을 확인하였다.

### 2. 실험물질의 동물안전성 평가

#### 1) 일반증상 및 사망동물

Table 1, 18 그리고 19는 시험물질인 23%-GNANA를 90일 동안 투여 시 일반증상변화 및 사망동물의 발생 여부를 인한 결과로서, 전체 실험기간 중 대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망동물은 없었으며, 투여 기간 중 일반증상 관찰결과 이상 소견은 없었다.

#### 2) 체중 변화

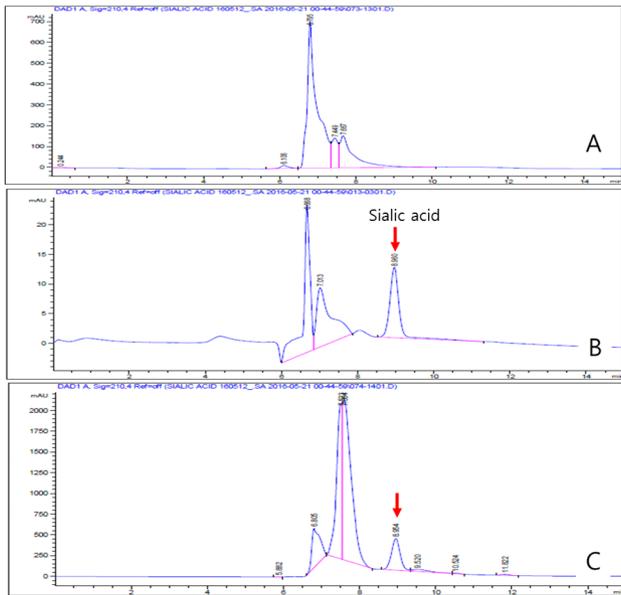


Fig. 3. Manufacturing process diagram for 23%-GNANA, a test substance containing 23% sialic acid, through the enzyme (Alcalase 2.4 FL) separation mechanism of sialic acid, the marker compound having the glycomacropeptide (GMP) as a substrate, and the ethanol refining process.

Table 5, 18 및 19는 90일간 경구투여 과정에서 일정별 체중 변화를 대조군과 비교한 결과, 암컷 증체량(weight gains)이 고용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만( $p < 0.05$ ), 시험물질의 독성보다는 약리적 변화로 판단되어 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

### 3) 사료섭취량

Table 6, 18 그리고 19는 23%-GNANA를 투여한 암수 랫드의 일정별 사료섭취량을 대조군과 비교결과, 암컷 사료섭취량이 고용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만( $p < 0.05$ ), 시험물질의 독성보다는 과용량의 투여로 인한 사료섭취량의 감소 및 약리적 변화로 판단되어 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

### 4) 안검사

Table 7, 18 그리고 19는 23%-GNANA를 투여한 암수 랫드의 눈에 대하여 피해를 유발하는지를 대조군과 비교결과, 시험군 분리 시 외안검사와 투여 마지막 주에 수행된 안저검사 결과에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.

Table 4. Investigation results of clinical signs through the autopsy after the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Days	Signs	Groups (mg/kg/day) <sup>b)</sup>							
		G1 (0) <sup>%</sup>		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0	No finding	0 / 10 <sup>a)</sup> *	0 / 10 <sup>a)</sup> *	0 / 10 <sup>a)</sup>					
1~7	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
8~14	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
15~21	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
22~28	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
29~35	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
36~42	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
43~49	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
50~56	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
57~63	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
64~70	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
71~77	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
78~84	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
85~91	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
91	Terminal sacrifice	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10

<sup>a)</sup> Number of animals with the sign / Number of animals examined.

\*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control

%: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

Table 5. Weekly investigation results of the effects on the body weight changes during the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Weeks**	Groups (mg/kg/day) <sup>b)</sup>							
	G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0	163.2± 6.48	163.2± 6.48	162.4± 7.48	162.4± 7.48	162.0± 5.65	162.0± 5.65	161.4± 5.65	161.4± 5.65
1	184.0± 7.85	184.0± 7.85	185.6± 8.94	185.6± 8.94	187.0± 9.86	187.0± 9.86	180.0± 8.72	180.0± 8.72*
2	203.2± 6.64	203.2± 6.64	197.7±12.74	197.7±12.74	200.4±10.52	200.4±10.52	202.1± 8.52	202.1± 8.52*
3	223.9±13.43	223.9±13.43	220.9±12.49	220.9±12.49	223.3±11.73	223.3±11.73	217.6± 9.62	217.6± 9.62**
4	241.8±13.53	241.8±13.53	239.9±17.28	239.9±17.28	246.9±19.15	246.9±19.15	239.3±11.89	239.3±11.89*
5	252.5±12.26	252.5±12.26	246.0±18.38	246.0±18.38	250.9±16.43	250.9±16.43	245.5±10.94	245.5±10.94*
6	264.4±16.91	264.4±16.91	259.8±22.00	259.8±22.00	262.4±20.53	262.4±20.53	250.9±11.08	250.9±11.08*
7	275.2±20.03	275.2±20.03	271.2±17.61	271.2±17.61	275.6±19.91	275.6±19.91	259.5± 8.92	259.5± 8.92*
8	280.6±18.71	280.6±18.71	277.0±23.89	277.0±23.89	287.8±18.53	287.8±18.53	266.3± 7.02	266.3± 7.02*
9	284.3±19.34	284.3±19.34	280.8±22.31	280.8±22.31	287.0±15.51	287.0±15.51	273.5±12.14	273.5±12.14*
10	292.9±19.40	292.9±19.40	289.4±26.02	289.4±26.02	291.3±22.50	291.3±22.50	285.3±12.33	285.3±12.33*
11	295.8±22.07	295.8±22.07	296.1±25.72	296.1±25.72	298.1±22.29	298.1±22.29	285.8±10.15	285.8±10.15*
12	304.8±19.49	304.8±19.49	302.6±27.63	302.6±27.63	300.7±29.65	300.7±29.65	287.6± 8.06	287.6± 8.06*
13	305.3±22.73	305.3±22.73	304.1±25.58	304.1±25.58	304.6±25.87	304.6±25.87	289.7±10.31	289.7±10.31*
Gains <sup>a)</sup>	142.1±18.56	142.1±18.56	141.7±22.10	141.7±22.10	142.6±21.62	142.6±21.62	128.3±10.48	128.3±10.48*

\*: Represents a significant difference at  $p<0.05$  level compared with the vehicle control

\*\*: Weight gains are body weight difference between week 13 and week 0

%: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

Table 6. An assessment of the food consumption changes affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Weeks	Groups (mg/kg/day) <sup>a)</sup>							
	G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0	21.7±1.16	16.9±1.20	21.7±1.13	16.9±2.12	21.9±1.21	16.3±0.75	21.7±1.01	16.0±0.98*
1	21.0±0.85	15.2±0.91	21.6±0.98	14.5±0.85	21.5±0.58	14.7±1.24	20.1±1.26	13.7±0.92
2	22.4±1.22	15.9±0.76	22.9±1.30	14.5±1.07	22.5±0.51	14.5±1.17	21.8±1.02	14.2±0.61
3	22.6±1.02	16.9±1.14	23.9±1.45	16.0±0.63	23.6±0.91	15.7±1.51	22.6±1.35	14.9±0.96
4	23.2±1.60	17.0±1.93	23.9±1.46	16.5±1.65	23.6±0.70	17.3±2.30	22.7±1.36	16.0±1.50
5	22.7±1.69	17.2±0.87	23.9±1.52	15.7±1.09	23.9±0.56	15.5±1.17	23.1±1.77	14.4±0.90
6	23.7±1.06	17.3±1.20	24.4±1.64	16.9±1.29	24.0±0.89	15.9±1.62	23.6±1.71	14.0±0.75
7	23.6±1.49	17.7±1.32	24.6±1.57	17.1±0.82	24.9±1.01	17.0±1.15	24.2±1.89	14.4±0.40
8	23.9±1.54	16.9±1.79	24.7±1.23	16.2±2.04	24.8±1.43	17.6±1.52	23.7±1.72	14.7±0.43
9	23.5±1.68	15.6±1.66	24.4±1.59	15.5±1.18	24.7±1.01	15.0±1.13	22.6±1.69	14.3±0.72
10	23.2±1.58	16.5±1.31	24.1±1.79	16.8±1.99	24.2±0.98	15.0±2.40	22.6±1.55	15.8±2.01
11	23.7±1.37	16.4±1.53	24.0±1.71	16.3±1.19	24.0±1.19	15.5±1.40	22.4±1.20	14.1±0.65
12	23.4±1.37	17.2±1.30	23.9±1.85	16.5±1.87	23.7±1.46	15.3±2.90	22.1±1.55	13.1±0.98
13	23.5±1.84	15.6±1.29	23.8±1.93	16.4±2.50	23.2±1.49	15.5±1.94	21.2±1.65	13.5±0.64
Average	23.0±1.27	16.6±1.01*	23.7±1.45	16.1±1.12	23.6±0.81	15.8±1.05	22.5±1.39	14.5±0.37

\*: Represents a significant difference at  $p<0.05$  level compared with the vehicle control

%: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

Table 7. A clinical investigation of the ophthalmic findings affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Sites <sup>a</sup>	Findings	Groups (mg/kg/day) <sup>b</sup>							
		G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Left eye	Normal	0 / 5*	0 / 5*	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Right eye	Normal	0 / 5*	0 / 5*	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	/ 5

<sup>a</sup>: Number of animals with the finding / Number of animals examined

\*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control.

%; Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

5) 장기중량

Table 14, 15, 18 및 19는 23%-GNANA를 투여한 암수 랫드의 장기절대중량(absolute weight) 및 상대중량(relative weight)을 대조군과 비교한 결과이다. 수컷의 고환(우측)의 절대중량이 저용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하였지만( $p < 0.05$ ), 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 수컷 신장(좌, 우측)의 절대중량 및 상대중량(% body weight)이 고용량군에서 증가하였다( $p < 0.05$ ). 저용량군 및 중용량군에서는 유의성이 없고, 고용량군에서만 발생할 가능성이 있어 독성 판정기준에 따라 non-adverse effect로 판정하여 시험물질-경미한 변화로 판단하였다. 수컷 부고환(좌측)의 상대중량(% body weight)이 중용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만( $p < 0.05$ ) 고용량에서 발생하지 않고, 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷 신장(좌, 우측)의 상대중량(% body weight)이 고용량군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 저용량군 및 중용량군

에서는 유의성이 없고 고용량군에서만 발생할 가능성이 있어 판정기준에 따라 non-adverse effect로 판정하여 시험물질-경미한 변화로 판단하였다.

6) 요검사

Table 8, 10, 18 그리고 19는 23%-GNANA를 투여한 암수 랫드에 대한 요검사 결과를 나타낸 것이다. 수컷에서 SG (specific gravity, 요비중) 증증도가 대조군과 비교하여 모든 투여군에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), PRO 증증도에서는 저용량군에서만 증가되었다( $p < 0.05$ ). 보통 신장의 기능이 이상이 있을 때 요비중은 낮아지는데 요비중이 증가하는 것은 신장의 이상보다 시험물질에 의한 가벼운 탈수에 기인하는 것으로 판단되었다. 따라서 모든 군에서 요비중이 증가되었지만, 신장의 이상이 아니라 약리작용 또는 가벼운 탈수로 판단되어 시험물질-유래 경미한 변화로 판정하였다. 저용량군에서의 PRO 증증도는 용량의존성이 없는 산

Table 8. An assessment of the urinalysis changes affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Tests**	Result	Severity	Groups (mg/kg/day)								
			Male				Female				
			G1%	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	
			0	1,250	2,500	5,000	0	1,250	2,500	5,000	
GLU	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
BIL	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
KET	+/-	1	5	1	4	4	5	5	5	5	5
	1+	2	5	3							
SG	≤1.005	0	5	1				4	4		
	1.010	1	5	4							
	1.015	2	5	1*	1*	1*	1		4*	3*	
	1.020	3	5	3*	2*	2*		1*		1*	

Table 8. Continued

Tests**	Result	Severity	Groups (mg/kg/day)							
			Male				Female			
			G1%	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
			0	1,250	2,500	5,000	0	1,250	2,500	5,000
pH	1.025	4		1	2	2			1	
	1.030	5								1
	≤7.0	1		1						
	7.5	2	2	2	3	4	1	1	2	1
	8.0	3	3	2	1	1	1	2	3	3
PRO	8.5	4			1*		3	2		1
	-	0	1				4	2	3	
	+/-	1	3		1	1	1	3*		1
	1+	2	1	3*		1			1*	3*
	2+	3		2*	3	2			1*	1*
URO <sup>a)</sup>	3+	4			1	1				
	0.2	0	5	5	4	5	5	4	4	4
NIT	1	1			1			1	1	1
OB	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	-	0	1	4	4	5	5	5	5	5
	+/-	1	3	1	1					
	1+	2	1							
LEU	-	0					4	3	2	
	+/-	1	3	1	1	2	1	1		4
	1+	2	1	3	1	2		1	2	
	2+	3	1	1	2				1	1
	3+	4			1	1				
No. of animals			5	5	5	5	5	5	5	5

a) The unit of urobilinogen is ehrlich unit/dL, \*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control, \*\*: GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, LEU: Leukocyte, %: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High -dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

발적 발생으로 판단되어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷의 고용량군에서 PRO 및 LEU 증증도가 통계적으로 유의하게 증가되었지만( $p < 0.05$ ), 정상범위(historical data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

### 3. 요침사 검사

Table 9, 18 그리고 19는 23%-GNANA를 투여한 암수 랫드에 대한 요침사 검사 결과를 나타낸 것이다. 결과로서, 암컷 및 수컷 모두에서 대조군과 비교하여 이상소견이 관찰되지 않았다.

#### 1) 혈액학적 검사

Table 11, 18 그리고 19는 23%-GNANA를 투여한 수컷 및 암컷 랫드에 대한 혈액학적 검사를 나타낸 것이다. 수컷 RBC 수치가 대조군과 비교하여 저용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였고( $p < 0.05$ ), 암컷 HDW가 중용량군에서 증가하였지만( $p < 0.05$ ) 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

#### 2) 혈액생화학적 검사

Table 12, 18 및 19는 23%-GNANA를 투여한 수컷 및 암컷 랫드에 대한 혈액생화학적 이상여부를 대조군과 비교한 결과이다. 수컷의 ALB 및 AST 수치가 저용량군 및 중용량군에

Table 9. An assessment of the changes in urine sediments affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Tests	Result	Severity	Groups (mg/kg/day) <sup>a)</sup>							
			Male				Female			
			G1 <sup>%</sup>	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
			0	1,250	2,500	5,000	0	1,250	2,500	5,000
RBC	-	0	4*	4	4	5	5*	5	5	5
	+/-	1	1*	1	1					
WBC	-	0	5*	5	4	5	5*	5	5	5
	+/-	1			1					
Epithelial cell	-	0	5*	5	5	5	5*	5	5	5
	+/-	1								
Casts	-	0	2*	1	3	4	4*	5	5	4
	+/-	1	3*	4	2	1	1*			1
No. of animals			5	5	5	5	5	5	5	5

" " = no finding

\*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control.

%; Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

Grade	RBC (mean/field)	WBC (mean/field)	Epithelial cell	Casts (mean/field)
-	0	0	0 / 20 fields	0
+/-	≤4	≤5	Few / 20 fields	1
1+	5~8	6~20	Around 1 / few field	2~5

Table 10. An assessment of the changes in urine volume and color affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Tests	Groups (mg/kg/day) <sup>a)</sup>							
	G1 (0) <sup>%</sup>		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Volume (mL)	12.8±1.89*	9.0±2.24*	11.4±3.23	9.2±4.34	12±2.74	7.8±4.15	17.1±2.25	9.8±3.98
Color-yellow	5*	5*	5	5	5	5	5	5
No. of animals	5*	5*	5	5	5	5	5	5

\*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control.

%; Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

서 통계적으로 유의하게 감소하였지만( $p < 0.05$ ), 고용량군에서 발생하는 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷은 ALB 수치가 고용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만( $p < 0.05$ ), 용량의존성이 없고 정상범위(historical data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

### 3) 혈액응고 검사

Table 13, 18 및 19는 23%-GNANA를 투여한 수컷 및 암컷 랫드의 혈액응고시간에 미치는 결과를 대조군과 비교한 결

과로서, 수컷 PT 수치가 저용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만( $p < 0.05$ ), 중용량군 및 고용량군에서 나타나는 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

### 4) 부검소견

Table 16, 18 및 19는 23%-GNANA를 투여한 암수 랫드에 대한 부검결과를 나타낸 것이다.

수컷에서 중용량군의 1레에서 가슴샘의 발적(redness)이 나타났지만, 대조군에서도 확인되어 비시험물질-유래 변화로 관

Table 11. An assessment of the changes in hematological values affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Tests**	Units	Groups (mg/kg/day)							
		G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
WBC	10 <sup>3</sup> /μL	3.87±1.392 <sup>#</sup>	1.57±0.501	3.88±1.060	1.92±0.664	3.77±0.837	1.62±0.382	3.59±0.968	1.98±0.871
RBC	10 <sup>6</sup> /μL	8.94±0.231	7.89±0.311	8.66±0.253*	7.97±0.315	8.75±0.285	7.96±0.348	8.71±0.241	7.92±0.305
HGB	g/dL	15.55±0.378	14.60±0.506	15.49±0.448	14.88±0.326	15.35±0.455	14.78±0.630	15.27±0.343	14.72±0.442
HCT	%	47.07±1.117	43.36±1.089	46.44±1.551	43.96±1.177	46.22±1.167	44.02±1.532	46.20±1.112	44.31±1.215
MCV	fL	52.70±1.815	55.03±1.650	53.62±1.673	55.21±1.523	52.85±1.189	55.30±1.333	53.07±1.487	56.00±1.988
MCH	pg	17.44±0.688	18.52±0.725	17.88±0.531	18.67±0.566	17.54±0.508	18.54±0.544	17.54±0.499	18.61±0.854
MCHC	g/dL	33.08±0.525	33.67±0.673	33.33±0.462	33.86±0.467	33.18±0.406	33.53±0.706	33.04±0.324	33.21±0.762
RDW	%	12.45±0.477	10.93±0.306	12.17±0.430	10.98±0.382	12.37±0.406	11.25±0.528	12.30±0.503	11.12±0.382
HDW	g/dL	2.67±0.171	2.41±0.072	2.61±0.080	2.46±0.084	2.65±0.143	2.52±0.098*	2.66±0.109	2.44±0.090
PLT	10 <sup>3</sup> /μL	1,052±109	1,097±161	1,037±118	1,051±111	1,069.40±113	1,122±131	1,032±98	1,1300±159
MPV	fL	8.25±0.350	8.20±0.371	8.27±0.236	8.10±0.271	8.42±0.459	8.02±0.442	8.27±0.327	8.30±0.508
RET	%	1.46±0.195	1.53±0.409	1.57±0.249	1.68±0.394	1.59±0.194	1.77±0.431	1.65±0.199	1.86±0.382
NEU	%	18.60±8.957	18.50±10.137	17.63±8.236	16.31±7.734	15.02±4.128	18.96±8.410	14.79±5.314	13.38±4.041
	10 <sup>3</sup> /μL	0.73±0.477	0.30±0.215	0.69±0.394	0.30±0.148	0.55±0.129	0.30±0.143	0.51±0.140	0.25±0.095
LYM	%	76.18±10.136	75.13±9.721	76.58±9.327	77.53±7.858	79.59±4.891	74.70±7.555	79.48±5.646	80.41±5.029
	10 <sup>3</sup> /μL	2.95±1.154	1.18±0.381	2.96±0.845	1.51±0.619	3.02±0.785	1.21±0.319	2.88±0.862	1.62±0.780
MONO	%	2.54±1.023	2.24±0.331	2.75±1.113	2.12±0.418	2.43±0.678	2.30±0.849	2.53±0.747	2.24±0.795
EOS	%	2.08±0.968	3.59±1.848	2.25±1.023	3.55±0.871	2.21±0.592	3.59±0.888	2.48±0.684	3.26±1.397
BASO	%	0.11±0.074	0.15±0.118	0.08±0.063	0.07±0.067	0.12±0.063	0.13±0.106	0.13±0.095	0.09±0.057
LUC	%	0.51±0.260	0.15±0.118	0.72±0.394	0.07±0.067	0.65±0.354	0.13±0.106	0.56±0.227	0.09±0.057
No. of animals		10	10	10	10	10	10	10	10

\*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control, \*\*: WBC (White blood cell count), RBC (Red blood cell count), HGB (Hemoglobin conc.), HCT (Hematocrit), MCV (Mean corpuscular volume), MCH (Mean corpuscular hemoglobin), MCHC (Mean corpuscular Hb conc.), RDW (Red cell distribution width), HDW (Hb conc. distribution width), PLT (Platelet), MPV (Mean platelet volume), RET (Reticulocyte), #: The data shown represent means±S.D. (n=10), %: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

단하였다. 암컷 고용량군의 2레에서 자궁 내 맑은 액체 저류 (retention of clear fluid)가 관찰되었지만, 성주기와 관련하여 암컷에서 흔히 나타나는 증상이며, 조직병리 소견이 나타나지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷 고용량군의 1레에서 우축부신 왜소, 수컷 고용량군의 1레에서 우측고환 왜소가 관찰되었지만 용량-의존성이 없고, 산발적으로 1레씩 발생하였기 때문에 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

##### 5) 조직병리학적 검사

Table 17, 18과 19는 23%-GNANA를 투여한 암수 랫드에 대한 조직병리학적 검사 결과를 나타낸 것이다. 수컷에서의 결과는 다음과 같다. 조직병리학적 검사는 결과의 중증도에

따라 minimal(미약한), slight(약한), moderate(보통), severe(심한) 등의 4단계로 구분하여 나타났다. 암컷 뇌하수체(pituitary gland) 대조군 1레에서 뇌하수체 원위부(pars distalis) 내 낭포(cyst)가 약하게(slight) 확인되었다. 수컷 고용량군 1레에서 고환의 위축(atrophy)과 변성(degeneration)이 severe 양상으로 확인되었다. 최소한 군당 2레 이상이 확인되어야 시험물질의 영향으로 판단되어 1레의 고환에서 조직병리학적 변화는 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 전립선(prostate) 고용량군 1레에서 전립선내 염증세포 침윤(Inflammatory cells infiltration)이 minimal하게 나타났으나, 대조군 2레에서도 각각 minimal 및 slight로 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 수컷 신장(kidney) 고용량군 2레에서 protein cast가 minimal하게 나

Table 12. An assessment of the changes in serum biochemical values affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Tests**	Units	Groups (mg/kg/day)							
		G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
ALB	g/dL	3.23±0.073 <sup>#</sup>	3.36±0.118	3.16±0.064*	3.26±0.125	3.14±0.057*	3.25±0.110	3.10±0.121	3.24±0.112*
ALP	U/L	505.5±590.67	135.0±33.56	337.8±394.75	233.3±298.67	200.3±34.29	122.3±23.23	349.6±469.79	114.4±19.96
ALT	U/L	31.1±5.89	22.1±4.36	28.9±2.77	20.6±3.79	30.6±3.75	22.4±3.42	29.9±2.12	21.1±2.50
AST	U/L	94.3±10.47	93.1±15.293	83.9±5.48	83.6±9.54	90.8±11.13	82.0±11.68	89.7±13.09	82.7±9.02
BIL	mg/dL	0.06±0.011	0.10±0.035	0.06±0.009	0.08±0.017	0.07±0.020	0.09±0.024	0.05±0.008	0.07±0.014
BUN	mg/dL	12.78±1.107	14.17±2.440	14.09±2.113	16.41±1.998	14.36±2.369	15.71±3.182	14.12±2.029	16.20±3.202
CHO	mg/dL	64.9±10.68	68.5±10.07	68.8±9.43	76.3±16.43	66.2±15.95	72.1±16.64	82.6±17.09	76.2±10.69
CPK	U/L	339.0±219	226.0±183.48	225±124	224.8±155.42	257.5±139	214.9±137.53	274.0±294	212.1±153.31
CRE	mg/dL	0.39±0.064	0.45±0.087	0.42±0.056	0.47±0.081	0.41±0.091	0.42±0.042	0.35±0.104	0.40±0.116
GLU	mg/dL	157.4±22.83	136.6±16.98	172.3±22.45	147.3±29.44	173.8±26.29	141.0±19.80	175.7±26.37	133.5±19.84
IP	mg/dL	5.59±0.524	4.87±0.431	5.66±0.414	5.25±0.928	5.60±0.299	5.07±0.602	5.39±0.516	5.04±0.689
PRO	g/dL	6.0±0.15	6.0±0.15	5.9±0.17	5.9±0.22	5.9±0.18	5.9±0.29	5.9±0.24	5.8±0.28
TG	mg/dL	66.6±23.8	37.30±9.174	81.5±30.6	41.97±9.738	70.82±22.5	46.53±20.842	74.92±30.6	39.51±8.008
A/G	ratio	1.15±0.038	1.28±0.064	1.15±0.072	1.24±0.049	1.13±0.061	1.23±0.090	1.12±0.079	1.28±0.085
Ca <sup>2+</sup>	mg/dL	9.94±0.167	9.73±0.133	9.93±0.156	9.72±0.177	9.85±0.152	9.78±0.154	9.88±0.175	9.68±0.278
Na <sup>+</sup>	mg/dL	139.28±1.396	138.31±1.324	138.44±1.042	137.33±1.345	137.82±0.861	137.51±1.135	137.07±1.001	136.60±1.350
K <sup>+</sup>	mmol/L	4.17±0.337	4.04±0.178	4.40±0.246	4.07±0.217	4.31±0.137	4.09±0.186	4.36±0.229	4.01±0.279
Cl <sup>-</sup>	mmol/L	106.20±1.77	108.56±1.34	105.81±0.997	107.05±1.18	104.96±1.08	107.41±1.42	105.34±1.21	106.66±1.65
No. of animals		10	10	10	10	10	10	10	10

\*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control

\*\* : AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase), ALP (Alkaline phosphatase), BUN (Blood urea nitrogen), CRE (Creatinine), GLU (Glucose), CHO (Total cholesterol), PRO (Total protein), CPK (Creatine phosphokinase), ALB (Albumin), BIL (Total bilirubin), TG (Triglyceride), IP (Inorganic phosphorus), A/Gratio (Albumin/Globulin ratio), Ca<sup>2+</sup> (Calcium ion), Na<sup>+</sup> (Sodium ion), K<sup>+</sup> (Potassium ion), Cl<sup>-</sup> (Chloride ion)

%: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

<sup>#</sup>: The data shown represent means±S.D. (n=10)

Table 13. An assessment of the changes in plasma coagulation values affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Tests	Groups (mg/kg/day) <sup>a)</sup>							
	G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
PT(sec)	10.30±0.461 <sup>#</sup>	9.11±0.425*	9.52±0.546*	8.99±0.409	9.67±0.709	9.14±0.694	9.42±1.074	8.81±0.394
APTT(sec)	18.10±1.073	16.64±0.703*	18.36±1.645	16.78±1.266	17.80±1.733	17.50±1.121	18.85±0.908	17.13±1.365
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10

\*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control

%: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

<sup>#</sup>: The data shown represent means±S.D. (n=10)

Table 14. An assessment of the changes in absolute organ weights affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Organ weight (g)**	Groups (mg/kg/day) <sup>§</sup>							
	G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Adrenal(L)	0.0273±0.00330 <sup>#</sup>	0.0398±0.00213	0.0269±0.00282	0.0386±0.00492	0.0266±0.00562	0.0397±0.00718	0.0272±0.00424	0.0372±0.00482
Adrenal(R)	0.0259±0.00336	0.0392±0.00542	0.0263±0.00440	0.0408±0.00456	0.0255±0.00397	0.0392±0.00661	0.0261±0.00456	0.0333±0.01054
Pituitary	0.0130±0.00174	0.0165±0.0326	0.0143±0.00189	0.0182±0.00325	0.0139±0.00157	0.0163±0.00206	0.0143±0.00190	0.0167±0.00218
Thymus	0.4569±0.08093	0.3370±0.10573	0.5105±0.18627	0.3872±0.09727	0.4871±0.10775	0.3435±0.09169	0.4909±0.10473	0.3074±0.03914
Ovary(L)		0.0688±0.01771		0.0780±0.01468		0.0715±0.01331		0.0737±0.01449
Ovary(R)		0.0673±0.00615		0.0764±0.01492		0.0754±0.01141		0.0693±0.00932
Prostate	0.6315±0.16339		0.6204±0.15144		0.6155±0.14804		0.5403±0.14546	
Testis(L)	1.8639±0.20540		1.9584±0.15974		1.7444±0.17545*		1.8240±0.17074	
Testis(R)	1.8120±0.14054		1.9679±0.11373		1.7764±0.17716		1.7498±0.35661	
Epididymis(L)	0.6863±0.03698		0.7116±0.09057		0.6431±0.05631		0.6816±0.06143	
Epididymis(R)	0.6731±0.04870		0.6982±0.05782		0.6639±0.08136		0.6498±0.10270	
Spleen	0.9194±0.08364	0.6297±0.07729	0.9994±0.16638	0.6790±0.08400	1.0320±0.13502	0.6413±0.08946	1.0008±0.12714	0.6498±0.07385
Kidney(L)	1.4725±0.11574	0.8769±0.07588	1.5403±0.15726	0.9061±0.11011	1.6328±0.14390	0.9367±0.06745	1.6871±0.12453*	0.9664±0.06190*
Kidney(R)	1.4922±0.11461	0.9028±0.07541	1.5300±0.17386	0.9351±0.10183	1.6126±0.16372	0.9415±0.09486	1.7091±0.15882*	0.9592±0.06163*
Heart	1.4217±0.12557	0.9516±0.11100	1.4918±0.13270	0.9804±0.10498	1.4916±0.06865	0.9969±0.10816	1.4854±0.15590	0.9284±0.06195
Lung	1.6958±0.16983	1.2930±0.07141	1.8385±0.18201	1.3479±0.11882	1.8472±0.20741	1.3290±0.12040	1.7812±0.13207	1.2547±0.06234
Brain	2.1491±0.07594	1.9802±0.08832	2.1776±0.06963	2.0075±0.08400	2.1359±0.11050	2.0020±0.07200	2.1519±0.15218	1.9543±0.06489
Liver	12.3151±1.23092	7.0642±0.90601	13.5804±1.56510	7.4692±0.74168	13.1876±1.38006	7.2520±1.15298	13.5080±1.31425	6.9651±0.54964
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10

\*: Represents a significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the vehicle control.

\*\* : Weight (g): unit of absolute weight of organ

%: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

<sup>#</sup>: The data shown represent means ± S.D. (n=10).

타나고, 4레에서는 slight로 나타났다. 또한 중용량군에서도 3레가 minimal로 나타나고, 1레에서 slight로 나타나는 것이 확인되었다. 저용량군에서도 2레에서 minimal로 나타났다. 그러나 대조군에서도 5레에서 minimal로 나타난 것이 확인되었다. 따라서 protein cast가 대조군과 비교해 시험물질 투여군에서 발생빈도 및 증증도가 증가되었지만, 대조군에도 발생하여 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 암컷 신장(kidney)에서 protein cast가 고용량군의 1레에서 minimal로, 1레에서 slight로 나타난 것이 확인되었다. 중용량군에서는 2레에서 minimal로 나타났으며, 저용량군에서는 2레에서 slight로 나타났다. 하지만 대조군에서도 3레가 minimal로 나타나고, 1레에서는 slight로 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷 신장(kidney)에서 mineralization이 암컷 고용량군 1레에서 minimal로 나타났다. 중용량군의 3레에서 minimal로 나타나고, 1레에서 moderate, 2레에서 severe, 저용량군의 6레에서 minimal, 1레에서 slight로 나타났다. 그러나 대조군에서도 1레가 minimal로 나타나고, 용량비의존성이 확인하여 비

시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷 간장(liver)에서 공포 변성(vacuolation)이 고용량군의 1레에서 minimal 정도의 나타났지만, 암컷 대조군 1레에서도 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 수컷 대조군 1레에서 Bile duct hyperplasia가 minimal 정도로 나타나, 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 수컷 폐(lung)에서 골화생(Osseous metaplasia)이 고용량군의 1레에서 minimal로 나타났지만, 대조군에서 1레로 확인되어 자연발생적인 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 심장(heart)을 관찰한 결과, 수컷 고용량군의 1레에서 심근염(myocarditis)이 minimal 정도로 나타났지만, 대조군 2레에서도 minima로 확인되어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(Table 12). 수컷 위장(stomach)에서 선위 궤양(ulcer of the glandular stomach)이 대조군 1레에서 나타났지만, 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

4. 독성판정(Result summary and Toxicity evaluation)

Table 18과 19는 23%-GNANA를 90일 동안 반복경구투여

Table 15. An assessment of the changes in relative organ weights (% of body weight) affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Organ weight (g)**	Groups (mg/kg/day) <sup>a)</sup>							
	G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Adrenal(L)	0.0058±0.00099 <sup>#</sup>	0.0139±0.00082 <sup>*</sup>	0.0054±0.00075	0.0137±0.00238	0.0053±0.00105	0.0139±0.00223	0.0055±0.00093	0.0137±0.00193
Adrenal(R)	0.0055±0.00084	0.0136±0.00158	0.0052±0.00094	0.0143±0.00173	0.0050±0.00074	0.0138±0.00257	0.0053±0.00094	0.0123±0.00401
Pituitary	0.0027±0.00028	0.0057±0.00089	0.0028±0.00038	0.0064±0.00111	0.0027±0.00027	0.0057±0.00044	0.0029±0.00034	0.0061±0.00081
Thymus	0.0964±0.01332	0.1164±0.03328	0.1012±0.03337	0.1348±0.02560	0.0961±0.02014	0.1210±0.03353	0.0994±0.01883	0.1128±0.01433
Ovary(L)		0.0240±0.00612		0.0272±0.00335		0.0249±0.00309		0.0270±0.00520
Ovary(R)		0.0235±0.00247		0.0267±0.00387		0.0263±0.00318		0.0254±0.00351
Prostate	0.1324±0.02611		0.1246±0.03393		0.1216±0.02939		0.1102±0.02977	
Testis(L)	0.3970±0.05812		0.3894±0.03277		0.3446±0.03651		0.3723±0.04046	
Testis(R)	0.3855±0.04401		0.3913±0.02503 <sup>*</sup>		0.3510±0.03787		0.3553±0.07024	
Epididymis(L)	0.1459±0.01275		0.1415±0.01863		0.1269±0.00942		0.1389±0.01249	
Epididymis(R)	0.1427±0.00921		0.1390±0.01379		0.1311±0.01601		0.1320±0.01853	
Spleen	0.1955±0.02298	0.2184±0.01555	0.1975±0.02275	0.2385±0.02467	0.2036±0.02518	0.2238±0.02465	0.2039±0.02465	0.2382±0.02306
Kidney(L)	0.3124±0.02644	0.3052±0.02049	0.3054±0.02044	0.3172±0.01894	0.3220±0.02211	0.3279±0.02182	0.3433±0.01698 <sup>*</sup>	0.3552±0.02969
Kidney(R)	0.3165±0.02627	0.3141±0.01792	0.3028±0.01658	0.3282±0.02604	0.3178±0.02394	0.3288±0.02064	0.3475±0.02013 <sup>*</sup>	0.3524±0.02757
Heart	0.3010±0.01901	0.3304±0.02344	0.2960±0.01977	0.3444±0.03115	0.2944±0.00938	0.3476±0.01720	0.3018±0.01996	0.3411±0.02683
Lung	0.3589±0.02657	0.4505±0.02360	0.3660±0.04420	0.4737±0.03612	0.3641±0.03218	0.4642±0.02097	0.3626±0.01963	0.4606±0.02191
Brain	0.4566±0.03374	0.6917±0.05948	0.4336±0.03112	0.7079±0.05932	0.4222±0.02796	0.7027±0.05721	0.4383±0.02912	0.7182±0.04178
Liver	2.6053±0.18891	2.4522±0.21604	2.6860±0.13358	2.6201±0.15563	2.5971±0.17412	2.5198±0.22710	2.7464±0.17145	2.5577±0.21390
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10

\*: Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.

\*\* : Ratio (%): Relative ratio of organ weight against body weight

<sup>#</sup>: The data shown represent means±S.D. (n=10).

%: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

Table 16. An assessment of the changes in necropsy findings affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Organs	Observed signs	Groups (mg/kg/day) <sup>a)</sup>							
		G1 (0)%		G2 (1,250)		G3 (2,500)		G4 (5,000)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Thymus	Redness	1		1		0		0	
Testis(R)	Aatropy	0		0		0		1	
Uterus	Retention of clear fluid		0		0		0		2
Adrenal(R)	Aatropy		0		0		0		1
No. of animals		10	10	10	10	10	10	10	10

%: Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10 mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

시 시험물질에 대한 암수 랫드에서 독성관정을 위한 종합결과이다. 수컷에서 시험물질-유래 중요한 변화 없이 시험물질-유래 경미한 변화가 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day에서 확인되었다. 이를 근거로 본 시험의 독성관정 기준에 따라 수컷

랫드에 있어서 sialic acid의 NOAEL(no observed adverse effect level)은 5,000 mg/kg/day로 확인되었다. 암컷에서 시험물질-유래 중요한 변화가 없었으며, 시험물질-유래 경미한 변화가 5,000 mg/kg/day로 확인되었다. 이를 근거로 독성관정 기준

Table 17. An assessment of the changes in histopathological findings affected by the 90-day oral administration of 23%-GNANA, a test substance to the male and female rats (n=10)

Organs	Observed signs	Male groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)%	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Testis	Atropy degeneration	-			1
Prostate	Inflammatory cells infiltration	2			1
Kidney	Protein casts	5	2	4	6
Liver	Bile duct hyperplasia	1			-
Lung	Osseous metaplasia	-			1
Heart	Focal myocarditis	2			1
Stomach	Ulcer of the glandular stomach	1			-
No. of animals		10	10	10	10

" - " = no finding , " " = no slide

Organs	Observed signs	Female groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Pituitary gland	Cyst in pars distalis	1			-
Kidney	Protein casts	4	2	2	2
	Mineralization	1	7	6	1
Liver	Vacuolization of hepatocytes	2			2
No. of animals		10	10	10	10

%. Control group (G1), Low-dose group (G2: 1,250 mg/10mL/day), Medium-dose group (G3: 2,500 mg/10 mL/day), High-dose group (G4: 5,000 mg/10 mL/day)

Table 18. Result of toxicity test by weight-based classification in SD rats (male) administrated orally with 23%-GNANA for 90 days

Weight-based classification		Finding	Dose (mg/kg/day)
Important compound-related changes	Not detected		
	Urinalysis (SG)		1,250, 2,500, 5,000
Minour compound-related changes	Relative weight of organs (kidney)		5,000
	Absolute of organs (kidney)		5,000
	Histological examination of organ (kidney: protein casts)		0(5/10), 5,000(6/10)
	Urinalysis (PRO)		1,250
Noncompound-related changes	Hematological values (RBC)		1250
	Serum biochemical values (ALB)		1,250
	Serum biochemical values (AST)		2,500
	Plasma coagulation values (PT)		1,250
	Relative weight of organs (testis)		1,250
	Absolute weight of organs (left testis)		2,500
	Necropsy findings (redness of thymus)		0, 1,250
	Necropsy findings (right testis, atropy)		5,000
	Histological examination of organ (testis)		5,000
	Histological examination of organ (inflammatory cells infiltration)		0, 5,000
	Histological examination of organ (kidney: bile duct hyperplasia)		0(1/10)
	Histological examination of organ (lung: osseous metaplasia)		5,000(1/10)
	Histological examination of organ (heart: myocarditis)		0(2/10), 5,000(1/10)
Histological examination of organ (stomach: ulcer of the glandular stomach)		0(1/10)	

Table 19. Result of toxicity test by weight-based classification in SD rats (female) administrated orally with 23%-GNANA for 90 days

Weight-based classification		Finding	Dose (mg/kg/day)
Important compound-related changes	Not detected		
Minour compound-related changes	Absolute weight of organ (kidney)		5,000
	Body weight		5,000
	Food consumption decrease		5,000
Noncompound-related changes	Urinalysis (PRO, LEU)		5,000
	Hematological values (HDW)		2,500
	Serum biochemical values (ALB)		5,000
	Necropsy findings (right adrenal, atropy)		5,000
	Necropsy findings (uterus)		5,000
	Histological examination of organ (kidney: protein casts)		0(4/10), 1,250(2/10), 2,500(2/10), 5,000(2/10)
	Histological examination of organ (kidney: mineralization)		0(1/10), 1,250(7/10), 2,500(6/10), 5,000(1/10)
	Histological examination of organ (kidney: vacuolation)		0(1/10), 5,000(1/10)

에 따라 암컷 랫드에 있어서 sialic acid의 NOAEL (no observed adverse effect level)은 5,000 mg/kg/day로 확인되었다. 따라서 랫드의 암수 모두에 대한 23%-GNANA의 NOAEL은 5,000 mg/kg/day로 평가되었다.

### 고 찰

본 시험은 안전식품인 우유 단백질에서 분리한 GMP를 원료로 효소처리를 통하여 지표성분인 sialic acid 분리과정을 거쳐 sialic acid가 23%가 함유된 유청가수분해단백을 제조하고, 이를 시험물질로 하여 Sprague-Dawley 랫드에 90일 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성 정도를 알아보기 위해 수행하였다. 시험결과에서 시험물질 투여 및 관찰기간 동안 사망동물, 일반증상조건에서 시험물질의 영향으로 보이는 특이 소견이 관찰되지 않았다(Table 1, 18). 암컷 증체량(weight gains) 및 사료섭취량에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 감소가 확인되었으나, 시험물질에 기인하기보다는 과용량(5,000 mg/kg/day)의 투여로 인한 스트레스 및 사료섭취량의 감소, 약리적 변화에 기인한 것으로 판단되어 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다(Table 6, 19). 체중 변화(body weight changes)에서 암컷의 일시적인 체중감소가 산발적으로 나타났으나, 1~2주 후 체중이 회복되는 것이 관찰되어 시험물질의 영향은 아닌 것으로 판단되었다. 또한 투여 마지막 주에 암수 모두에서 체중감소가 대조군을 포함하여 시험물질 투여군에서 부분적으로 나타난 것은 요검사 및 안검사로 인한 스트레스에 기인하는 것으로 판단된다(Table 5, 18, 19). 혈액학적 검사결과, 수컷 RBC 수치가 저용량군에서 감소하고, 암

컷 HDW 수치가 중용량군에서 증가하였지만 변화폭이 미약하고, 정상범위(historical data)내의 범위의 수치를 보여 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(Table 11, 18, 19). 혈액생화학적 검사결과, 수컷의 ALB 수치가 대조군과 비교하여 중용량군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만, 용량의존성이 없는 정상범위 내의 변화로 판단하여 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷의 ALB 수치가 대조군과 비교하여 고용량군에서 유의하게 감소하였지만, 정상범위내의 변화로 확인되어 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(Table 12, 18, 19). 장기중량 측정결과, 수컷 신장무게(좌, 우)가 절대중량, 상대중량 모두 고용량군에서 유의하게 증가하였다. 그러나 용량의존성이 없고 상대중량의 저용량 및 중용량군에서는 유의성이 없어 시험물질 유래-경미한 변화로 판단하였다. 또한 암컷 신장도 상대중량에서 고용량군에서만 유의성 있게 증가하였지만, 시험물질 유래-경미한 변화로 판단하였다. 이와 같이 암컷 모두에서 시험물질에 의한 신장의 무게 증가는 고용량에서만 확인되어 시험물질 유래-경미한 변화로 판단되었지만, 더 높은 용량을 투여하면 본 시험물질에 의한 독성 표적기관이 될 수 있는 가능성이 있다고 판단되었다(Table 14, 18, 19). 부검소견 결과, 암컷 고용량군 1례에서 우측부신이 기형적으로 작은 것이 관찰되었다. 부신에 대한 독성판단을 위해 병리표본을 제작을 하였으나, 우측부신은 크기가 작아 불가능하였으며, 좌측부신은 관찰 결과 이상소견이 없었다. 동일군의 시험계에서 부신에 대한 다른 증상이 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 수컷 고용량군 1례에서 우측고환이 좌측과 비교해 왜소한 것이 관찰되었고, 조직병리 검사결과 위축(atropy)과 변성(degeneration)이 심하게

(severe) 나타났으나, 좌측고환 및 동일군의 시험계에서 다른 증상이 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단되었다 (Table 16, 18, 19). 조직병리 검사결과, 대조군에서 암컷 뇌하수체(pituitary gland), 원위부(pars distalis)와 내 낭포(cyst)가 약하게(slight) 확인되었다. 수컷 신장(kidney)에서 protein casts 가 저, 중, 고용량군에서 각각 2레, 4레, 6레씩 미약하게(minimal) 또는 약하게(slight) 관찰되었지만, 대조군에서도 미약하게(minimal) 5레가 관찰되었다. 암컷에서도 protein cast가 대조군에서 미약하게(minimal) 3레, 약하게(slight) 1레, 고용량군에서 미약하게(minimal) 및 약하게(slight) 각 1레씩, 중용량군에서는 미약하게(minimal) 2레, 저용량군에서는 약하게(slight) 2레가 확인되었다(Table 17, 18, 19). 본 시험에서 나타난 신장의 protein cast는 F344 랫드에서는 5개월 정도가 되면 자연발생적으로 나타나는 증상으로 암컷보다는 수컷에서 자연발생적으로 많이 나타난다. 본 시험에서도 암컷에서는 시험동물 40레 중 10레에서 나타났으며, 수컷에서는 40레 중 17레에서 나타났다. 그러나 본 시험에서는 수컷 대조군에서 5레에서 미약하게 나타났으나, 수컷에서는 저농도군 2레, 중농도군 4레, 고농도군 6레 등 시험물질 용량의존적으로 발생 빈도수가 증가하고, 대조군에 비하여 증상의 정도도 심하게 나타나, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 암컷에서는 저농도군 4레, 중농도군 2레, 고농도군 2레에서 나타났으나 용량의존성이 없었으며, 대조군 4레에서도 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷 신장(kidney)에서 mineralization 이 대조군에서 1레, 고용량군에서 1레, 중용량군에서 5레, 저용량군에서 7레 나타났다. 이는 랫드 신장에서 자연발생적으로 나타나는 증상으로, 본 시험에서는 수컷에서는 나타나지 않고 암컷에서만 나타났다(KFDA, 2014). 또한 대조군에서도 관찰되었고, 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 간장(liver) 암컷 고용량군 1레에서 미약한(minimal) 공포변성(vacuolation)이 나타났지만, 대조군에서도 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 수컷 고용량군에서 1레에서 심근염(myocarditis)이 미약하게(minimal) 나타났지만, 대조군의 2레에서도 미약하게(minimal) 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단되었다. 암수 모두에서 시험물질-유래 경미한 변화가 5,000 mg/kg/day로 확인됨에 따라 시험의 독성 판정기준에 따라 암수 모두에 대한 23% G-NANA의 NOAEL (no observed adverse effect level, 최대무독성용량)은 5,000 mg/kg/day로 확인되었다(Table 18, 19). 안전식품인 우유 단백질의 일종인 GMP는 유청액에는 1.2~1.5 g/L 그리고 유청분말에는 10~25%가 함유되어 있는데, 생리활성 펩타이드로서 기능식품 개발 가능성이 높은 소재로서 주목을 받고 있다 (Yoon *et al.*, 2000; Brody, 2000). GMP 내에는 6~7%의 sialic acid가 결합되어 있으며, 이들은 우리 몸 속의 수용기의 인지,

신경 신호전달 등에 역할을 하며, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고(Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Wang, 2009), 뇌의 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang *et al.*, 2007; Gorog and Kovacs, 1978; Iijima *et al.*, 2004). 이 밖에도 항염증 효과나 몸속의 과산화수소 제거에 역할을 한다고 알려져 있어, 현재 기능성 식품 개발간 지표성분으로 주목 받고 있다 (Ishikawa and Koizumi, 2010; Zimmermann *et al.*, 2007). 그러나, sialic acid가 GMP 내 결합되어 있는 경우, 기능성분으로 역할을 수행함에 있어 목표효능이 감소되리라 생각되어 효소분리 후 23%까지 함유량을 증가시킨 경우에서 독성을 유발할 수 있다는 가정으로 실시한 안전성 평가결과, 식품첨가물로서 최대 허용범위치 2,000 mg/kg/day 이상에서 안전성이 확인되었다. 따라서, GMP의 안전성이 단지 sialic acid를 분해 및 농도를 높여서 제조한 경우에서도 독성이 없는 것으로 최종 확인되었다.

## 요 약

본 시험은 sialic acid가 23%를 함유하도록 제조한 유청가수 분해단백분말제(wey protein of hydrolysis)의 기능성 식품 원료로 개발을 위한 동물안전성을 평가에 연구목표를 두었다. 시험물질은 sialic acid 23%(v/v)와 원료인 GMP(glycomacropeptide)가수분해 단백질이 87%(v/v)로 구성되어 있었다(시험명: 23%-GNANA). 시험물질의 독성 유무는 한국식품의약품안전청(KFDA, 2014)과 OECD(2008)의 의약품 등의 독성시험 기준에 따라 실시하였다. 평가방법으로서, 시험물질의 투여용량을 0, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day하여 SPF Sprague-Dawley 계열 암수 랫드에 90일 동안 반복경구투여하였을 때 나타나는 독성 여부를 평가하였다. 평가항목으로는 사망률, 일반증상 관찰, 체중 변화, 사료섭취량 측정, 안검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검 시 장기의 중량 측정, 부검 시 육안적 및 조직병리학적 검사 등을 평가하였다. 결과로서, 시험물질로 인한 일반증상 및 사망동물은 발생하지 않았다. 또한, 안과학적 검사, 요검사 그리고 혈액학적 및 혈액이화학적 이상 여부와 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사에서 대조군 대비 특이한 변화는 관찰되지 않았다( $P < 0.05$ ). 이외의 평가 항목에서, 암컷은 사료섭취량과 증체율이 다소 감소하였고, 그리고 수컷에서는 요의 SG와 PRO 및 고환 무게가 다소 증가하는 경향을 보였지만, 시험물질-유래 경미한 변화(non-adverse effect)가 고용량군(5,000 mg/kg/day)만 확인되었다. Weight-based classification(독성 강도에 따른 분류)를 적용한 최종 독성평가 결과는 다음과 같다. 수컷의 경우, NOEL(No Observed Effect Level)은

5,000 mg/kg/day 그리고 암컷의 경우는 NOAEL(No Observed Adverse Effect Level)은 5,000 mg/kg/day로 최종 확인되었다. 따라서, 암수 모두에서 시험물질의 NOAEL은 투여최대용량인 5,000 mg/kg/day로 확인되었다. 결론적으로, 시험물질인 유청가수분해단백분말 제제는 건강기능식품의 특성상 임상허용용량인 1,000 mg/kg/day의 5배 수준에서 안전함을 확인되었다.

### 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부(기질 특이적 유기태화-미네랄류 제조법 확립을 통한 다기능성 사료첨가제 개발 및 수출용 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립, 고부가가치식품개발산업, 제 113024-3호)에 의해 이루어진 것임.

### 참고문헌

1. Brody, E. P. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*. 84:S39-S46.
2. Boorman, G. A. et al. 2006. Pathology of the fischer rat. Academic Press, INC., pp.132-134.
3. Gikins, Mary L. A. 2006. Clinical laboratory parameters for CrI:CD (SD) rats. Charles River Laboratories.
4. Gorog, P. and Kovacs, I. B. 1978. Anti-inflammatory effect of sialic acid. *Agents and Actions*. 8:543-545.
5. Iijima, R., Takahashi, H., Namme, R., Ikegami, S. and Yamazaki, M. 2004. Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. *FEBS Letters* 561:163-166.
6. Ishikawa, M. and Koizumi, S. 2010. Microbial production of N-acetylneuraminic acid by genetically engineered *Escherichia coli*. *Carbohydrate Research* 345:2605-2609.
7. Keenan, C., Elmore, S., Francke-Carroll, S., Kemp, R., Kerlin, R., Peddada, S. and Pletcher, J. 2009. Best practices for use of historical control data of proliferative rodent lesions. *Toxicol. Pathol.* 37:679-693.
8. Lewis, R. W., Billington, R., Debryune, E., Gamer, A., Lang, B. and Carpanini, F. 2002. Recognition of adverse and nonadverse-effects in toxicity studies. *Toxicologic Pathology* 30:66-74.
9. Ministry of Food and Drug Safety (KFDA) Notice No. 2014-136 (Jul. 30, 2014) 'Guidelines for toxicity tests in drugs, etc.' KFDA Notice No. 2014-67 (Feb. 12, 2015).
10. Moon, Y. I., Lee, W. J. and Oh, S. 2005. Glycomacropeptide hydrolysed from bovine  $\kappa$ -casein: II. Chromatographic changes of  $\kappa$ -casein macropeptide as related to trichloroacetic acid concentration. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 17(1): 478-482.
11. Oh, S. J., Kim, S. H., Jeon, W. M., Kim, B. C. and Ki, Y. K. 1997. Glycomacropeptide hydrolysed from bovin  $\kappa$ -casein: I. The fractionation of glycomacropeptide. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 17(1):51-57.
12. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2008. OECD guidelines 408 for the testing of chemicals: Repeated Dose 90 day oral toxicity study in rodents Organization for Economic Co-operation and Development. Paris, France. pp.1-10.
13. Park, Y. C. and Cho, M. H. 2011. A new way in deciding NOAEL based on the findings from GLP-toxicity test. *Toxicology Research* 27:133-135.
14. Springer-Verlag, R. S. 1984. Sialic acids: Chemistry, metabolism and function. *Carbohydrate Research* 129:5-7.
15. United States of Food and Drug Administration (USFDA). 2005. Guidance for industry estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. *Pharmacology and Toxicology*. United States of Food and Drug Administration. Rockville. MD, USA. pp.5-6.
16. Wang, B. 2009. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu. Rev. Nutr.* 29:177-222.
17. Wang, B. and Brand-Miller, J. 2003. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57:1351-1369.
18. Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P. and Petocz, P. 2001. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas 1-3. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:510-515.
19. Wang, B., Yu, B., Karim, M., Hu, H. S., McGreevy, Y., Petocz, H. P., Held, S. and Miller, J. B. 2007. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets 1-3. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:561-569.
20. Yoon, Y. C., Cho, J. K., Song, C. H., Lee, S. and Chung, C. I. 2000. Purification of the glycomacropeptide from cheese whey. *Korean J. Food SCI. ANI. Resour.* 20:159-165.
21. Zimmermann, V., Hennemann, H. G., Daußmann, D. and Kragl, U. 2007. Modelling the reaction course of N-acetylneuraminic acid synthesis from N-acetyl-D-glucosamine new strategies for the optimisation of neuraminic acid synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:597-605.

Received June 1, 2016  
 Revised June 19, 2016  
 Accepted June 22, 2016