J of Oriental Neuropsychiatry 2012:23(2):99-120
Original article
http://dx.doi.org/10.7231/JON.2012.23.2.099

LMK02의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험

강형원, 장현호, 박장호, 김태헌, 류영수

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과교실

13 weeks repeated oral dose toxicity studies with LMK02-Jangwonhwan in SD rats

Hyung-Won Kang, Hyun-Ho Jang, Jang-Ho Park, Tae-Heon Kim, Yeoung-Su Lyu

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

Abstract

Objectives :

The oriental medicine Jangwonhwan, a boiled extract of 12 medicinal herbs/mushrooms, has been prescribed to patients with cognitive dysfunction, as originally described in the Korean medical text, DonguiBogam(amnesia chapter). Recently, a modified formula of Jangwonhwan (LMK02-Jangwonhwan) consisting of seven medicinal plants/mushrooms, was shown to reduce the β-amyloid deposition in the brain of Tg-APPswe/PS1dE9 mouse model for Alzheimer's disease.
The toxicity of LMK02-Jangwonhwan was investigated in SD rats, by a daily oral administration for 13 weeks and NOAEL(No observed adverse effect dose), a definite toxic dose and target organ, as well.

Methods :

Quality control of the tablet form of LMK02-Jangwonhwan was established by estimating the indicative components, Ginsenoside Rg3 of Red Ginseng and Decursin of Angelicagigas Nakai.
The toxicity of LMK02-Jangwonhwan was investigated in 6 week old, specific pathogen free (SPF), Sprageu-Dawley rats by oral administration. Each test group consisted of 10 male and 10 female rats. The groups received doses of 500, 1,000 or 2,000 mg/kg/day of test substance for 13 weeks. The clinical signs, death rate, body weight, food consumption, ophthalmic examination, urinalysis, hematological and serum biochemistry, organ weight and pathological changes were examined and compared with those of the control group.

Results :

The 13- week repeated oral treatment doses didn't result in any specific symptoms or death. There were no significant changes in the rat's weight and food consumption. Further, ophthalmic examination, urinalysis, hematological, serum biochemistry test and organ weight revealed no significant differences.

Conclusions :

The no-observed-adverse-effect level(NOAEL) of LMK02 for male and female Sprague-Dawley rats was determined as 2,000mg/kg/day and the target organ wasn't confirmed. Because no significant adverse effects were observed, the target organ could not be determined.

Key Words:

Alzheimer disease, LMK02-Jangwonhwan, toxicity test

Received : May 21, 2012; Revised : May 25, 2012; Accepted : May 29, 2012

Correspondence : Yeoung Su Lyu, Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Republic of Korea
Tel : 031-270-1021, E-mail : yslyu@wonkwang.ac.kr

Ⅰ. 서론

LMK02는 『東醫寶鑑 · 神門』[1]에서 건망증에 활용되던 壯元丸 處方에서 시작하여 실험과 임상적 선별 과정을 걸쳐 紅蔘, 當歸 등의 7가지로 구성된 補腎益氣醒腦 효능의 복합한약제제이다.

LMK02는 홍삼 중 Ginsenoside Rg3와 당귀중 총데쿠르신를 지표물질로 설정하여 품질규격화된 정제형태의 제품[2]으로, 실험적 연구에서 Aβ oligomer에 의해 유도된 해마세포주 H19-7에서[2]와, 알츠하이머병 마우스모델인 Tg-APPswe/PS1dE9에서[3] 항치매 효과를 확인하였고, 또한 oxidative stress 유발 손상에 대한 壯元丸加減方의 비교에서 LMK02가 壯元丸原方보다 항산화적 효과가 더 우수한 것으로 보고되었다[4].

또한 안정성 평가에서 단회독성평가[5]와 4주간의 반복 경구투여 DRF 독성평가 연구[6]에서 안정성을 입증하였으나 아직 13주간의 독성평가에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

이제 저자는 특정병원균 부재(SPF) Sprague-Dawley 계통의 랫드 6주령을 사용하여 LMK02 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로, 군당 20마리(암수 각10마리)에 13주간 투여한 후 일반증상 및 사망, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 부검소견 및 장기중량, 조직병리학적 검사 소견을 관찰한 후 부형제 대조군과 비교하여 안전성을 평가하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 특정병원체부재(specific pathogen-free SPF) HsdKoat Psrague Dawley 랫드를 코아텍(경기도 평택)으로부터 구입하여 사용하였다. 성 성숙이 완료된 5주령의 암수를 48마리를 입수한 후 1주일간 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판단된 40마리를 선발하여 시험에 공시하였다. 동물실의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시 점등~오후8시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 시설에서 수행하였다. 검역, 순화 및 투여, 관찰기간 중 동물은 적량의 깔개를 담은 폴리카보네이트 사육상자(W 235 x L 380 x H 175 mm) 에서 2마리씩 수용하였고, 균일한 조건을 유지하기 위하여 사육상자대는 매월 1회 시계방향으로 순환 배치하였다. 시험기간 중 실험동물용 사료(Harian Co. Ltd., USA, 폴라스 인터내셔날 공급)와 자외선 살균기 및 미세 여과장치로 소독한 수질 검사 결과 '먹는물수질기준'에 적합한 지하수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험에 사용된 모든 동물은 (주)켐온의 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다.

2. 시험물질

본 실험에 사용한 LMK02의 처방에 사용된 약재는 유일제약(주)에서 최상품으로 인정된 약재를 엄선하여 한풍제약(주)에서 다음과 같은 제조공정을 걸쳐 얻은 건조엑스 95 g를 사용 전 -80℃에 보관하여 3차 증류수로 1 mg/mL 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

(1) LMK02 단미 총 312 g를 정선하여 약전통칙 중 절도 및 분말도에 따라 조절로 하고
(2) 추출기에 넣은 다음
(3) 정제수(약전) 약2.5 L 가량 넣고
(4) 95~100℃에서 3시간 가온 추출한 후
(5) 25 ㎛필터를 사용하여 여과하고 여액을 농축기를 이용하여 50~60℃에서 감압 농축한다.
(6) 한약 잔류물에 (3)~(6) 과정을 1회 반복하

여 농축액을 전부 합한다.

(7) 합한 농축액을 건조기에 넣고 60℃이하에서 건조한다.

(8) 건조물을 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분말화한다

(9) 건조엑스 95 g를 얻는다.(수득률 약30.4%)

3. 시험물질 처치

시험물질의 조제본 시험물질은 생약추출물로서 습기에 약하므로 데시케이터에 보관하였으며, 순도에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 먼저 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁하여 고용량군 투여액을 조제하였으며, 중간용량군 및 저용량군에 투여할 시험물질은 먼저 조제한 고용량군 투여액을 동일한 부형제로 단계별 희석하여 조제하였으며, 투여 직전에 매일 조제하였다. 시험물질의 투여는 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 1회/일, 7회/주, 13주간 반복 경구투여 하였다. 투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 하여 10ml/kg/day로 계산하였으며, 부형제대조군 동물은 멸균증류수만을 투여하였다.

4. 실험방법

1) 시험군의 구성

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하고, 평균 체중에 가까운 동물들을 암수 각각 40마리씩 선택하여, 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 '시험군의 구성'표에 지정된 수가 되도록 하였다. '시험군의 구성'표에 따른 군분리 후 잔여동물은 연습동물로 사용하였다.

2) 투여용량의 설정

본 시험의 용량을 설정하기 위해 본 시험물질을 이용하여 Up & Down 법(UDP)으로 실시한 단회 경구투여 독성시험에서 5,000 mg/10 ml/kg 용량으로 암컷 3 마리에 투여한 결과, 사망이나 특이소견이 관찰되지 않았으며, 암수 랫드에 4주간 반복 경구투여하였을 때에도 특기할만한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, OECD 가이드라인에서는 반복 경구투여 독성시험 한계용량을 1,000 mg/kg/day으로 권장하고 있으나, 본 시험물질이 생략성분이므로 독성이 적을 것으로 예상되어 2,000 mg/kg/day를 고용량으로 하고, 공비를 2 로 하여 아래로 2 군을 두었으며, 멸균주사용수를 투여하는 부형제대조군을 두었다.

3) 일반증상 관찰

투여 및 관찰기간동안에는 1일 1회씩 동물의 일반상태, 중독증상 및 사망유무에 대해서 관찰하였고, 이상이 있으면 증상의 종류, 발현일과 시각, 지속시간, 증상의 정도를 개체별로 기록하였다.

Table 1. Constitution of experimental Groups

GROUP	SEX	The number of animals	The Numbers	Fluid administration (ml/kg/day)	Dose(mg/kg/day)
G1	M / F	10 / 10	1~10 / 41~50	10	0
G2	M / F	10 / 10	11~20 / 51~60	10	500
G3	M / F	10 / 10	21~30 / 61~70	10	1,000
G4	M / F	10 / 10	31~40 / 71~80	10	2,000

G1: Vehicle control

4) 체중측정

모든 동물의 체중을 투여개시일에 측정하고, 이후에는 주 1회 및 부검일에 측정하였다. 부검일의 체중은 부검 전일 하룻밤 절식시킨 후의 체중을 측정하였다.

5) 사료섭취량의 산출

사료섭취량 산출은 투여 개시일과 시험기간 중 주 1 회 실시하였으며, 그 방법은 사료를 정량급여한 후, 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하였고, 마리당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

6) 물섭취량 산정

물섭취량 측정은 사료섭취량 측정과 같은 주기로 실시하였으며, 물을 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하는 방법으로 산정하였다. 물섭취량은 마리당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

7) 안검사

관찰 최종 주에 모든 동물을 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후, 암수 모든 군 5 마리의 양쪽 안구에 산동제(오큐호마핀, 삼일제약, Lot 016360)를 점적하여 동공확장을 유도한 다음, 안저사진기(Genesis, Gowa Co. Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

8) 요검사

투여 마지막 주에 군당 5 마리를 대사 케이지에 수용하여 3~4 시간동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1 ml를 취하여 다음 항목을 검사하였으며, 24 시간의 요량을 측정하였다.

가) 일반검사

약 0.3 ml의 요를 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, USA)에 묻힌 후, 요자동분석기(CliniTek 100, SIEMENS, USA)를 이용하여 아래의 항목을 측정하였다.

요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 요비중(specific gravity), 잠혈(occult blood), pH, 요단백(protein), 유로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite) 및 백혈구(leukocyte)

나) 요색조 검사

동물실에서 관찰한 결과를 요자동분석기에 입력하였다.

다) 요침사 검사

일반검사 후 남은 약 0.7 ml의 요를 1,500 rpm (408 RCF)으로 5 분간 원심분리(MF300, Hanil, Korea)한 후, 그 침전물을 S.M (Sternheimer-Malbin)법으로 염색한 다음, 현미경으로 관찰하여 적혈구, 백혈구, 상피세포 및 원주(cast)를 관찰하였다.

9) 부검

부검 전날 절식한 계획부검 동물에 대하여 부검 당일에 Ether로 흡입마취하여, 마취가 확인되면 개복하여 후대정맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 그 후 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰하여 부검소견기록지에 기록하고, 장기중량 측정 및 조직 고정을 실시하였다.

10) 혈액학적 검사

부검시 채혈한 혈액 일부를 항응고제인 EDTA-2K

가 들어있는 CBC bottle(Vacutainer 3 ml, BD, USA 에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)로 다음 항목을 측정하였다.

11) 혈액생화학적 검사

부검시 채혈한 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (IMPROVE, IMPROVE, Germany)에 주입하고 15~20 분간 상온에 방치하여 응고시킨 후, 3,000 rpm (1,630 RCF)으로 10 분간 원심분리(MF300, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(AU400, Olympus, Japan)를 활용하여 아래 항목에 대하여 측정하였으며, 전해질은 전해질 분석기(RAPIDCHEM 744 Na+/K+/Cl- Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정하였다. 주요 검사항목으로는 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), Triglyceride(TG), Inorganic phosphorus(IP), Calcium ion(Ca2+), Albumin/ Globulin ratio(A/G ratio), Sodium ion(Na+), Potassium ion(K+), Chloride ion(Cl-) 등이다.

12) 혈액응고시간 검사

부검시 채혈한 혈액 중 1.8 ml을 3.2 % sodium citrate 0.2 ml이 들어있는 microtube에 주입한 후, 3,000 rpm (735 RCF) 으로 10 분간 원심분리(5402, Eppendorf, Germany) 하여 얻은 혈장으로 PT (prothrombin time), APTT (activated partial thromboplastin time)를 측정하였다. 혈액응고시간검사기(ACL 100, Instrumentation Laboratory, USA.)를 사용하여 Nephelometric Analysis 방법으로 초(sec) 단위로 측정하였다.

13) 장기중량 측정

부검시 아래의 장기를 적출한 후 전자저울을 이용하여 난소, 부신, 뇌하수체, 가슴샘, 전립샘, 고환, 부고환, 비장, 신장, 심장, 폐, 뇌 및 간장의 중량을 측정하였다.

14) 기관 및 조직의 보존

모든 동물의 아래 장기는 10% 중성완충포르말린용액에 고정하되, 안구는 Davidson's 용액에, 고환과 부고환은 Bouin's 액에 고정하였다.

고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막림프절, 부신, 신장, 간장, 골격근, 좌골신경, 대퇴골, 턱밑림프절, 침샘, 흉골, 가슴샘, 심장, 폐, 대동맥, 흉척수, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 뇌, 뇌하수체, 피부(젖샘)

15) 조직병리학적 검사

부형제대조군 및 고용량군의 모든 동물의 고정 장기를 삭정, 파라핀 포매하고, 4~5 ㎛ 두께로 박절 및 H&E 염색과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작하였으며, 저용량 및 중간용량군에서는 육안적 부검소견이 인정되는 장기에 대하여 검체를 제작하였다. 부형제대조군과 고용량군 검사결과, 시험물질에 의한 변화가 인정되는 장기는 발견되지 않았으므로 모든 투여군에 대한 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

5. 통계학적 분석

체중, 사료소비량, 물소비량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량의 모수적 자료는 일원배치분산분석(one-way analysis of variance test)로 유의성을 확인한 다음, 유의성이 있으면 Levene test로 등분산성을 검정하여 등분산일 경우에는 Duncan multiple range test를, 이분산일

경우에는 Dunnett's T-test를 이용하여 부형제대조군과 비교하였다.

비모수검사인 요검사 결과 자료는 아래 표같이 척도변환을 실시한 후, Kruskal-Wallis'H-test를 실시한 후, 유의성이 인정되면 Mann-Whitney U-test를 적용하여 부형제대조군과의 유의성을 확인하였다. 일반증상 및 요색조는 Fisher's exact test를 적용하였다. 모든 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용하고 있는 통계패키지인 SPSS 10.1을 이용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 일반증상 및 사망동물

13 주간의 일반증상 관찰결과, 부형제대조군 1례에서 관찰된 이빨결손(loss of teeth) 외에는 어떠한 증상이나 사망동물도 관찰되지 않았다.

Table 2. Body weight changes of female and male rats

SEX	WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
FEMALE	0	186.25± 6.21#(10)	185.25± 6.32(10)	186.59± 5.32(10)	184.56± 6.56(10)
	1	238.14± 6.97(10)	236.02±10.16(10)	242.23± 8.78(10)	238.07± 8.91(10)
	2	277.14± 7.93(10)	277.72±11.30(10)	284.12±13.38(10)	277.28±11.09(10)
	3	308.02±10.58(10)	309.10±13.83(10)	315.41±13.78(10)	307.63±14.13(10)
	4	330.21±14.01(10)	332.51±17.09(10)	342.80±16.96(10)	333.98±18.93(10)
	5	349.58±15.83(10)	349.89±20.70(10)	361.17±19.26(10)	352.70±19.93(10)
	6	365.65±15.41(10)	363.90±21.31(10)	376.54±20.34(10)	370.63±22.52(10)
	7	377.09±19.38(10)	379.08±23.01(10)	390.04±19.56(10)	382.02±23.16(10)
	8	387.45±21.51(10)	388.31±23.74(10)	401.13±17.36(10)	393.69±25.73(10)
	9	395.21±23.39(10)	398.54±24.62(10)	404.02±7.47(10)	402.00±27.45(10)
	10	406.15±23.69(10)	409.57±24.83(10)	420.39±13.73(10)	412.27±30.08(10)
	11	415.20±24.41(10)	416.12±27.30(10)	430.18±16.97(10)	423.14±32.77(10)
	12	421.06±24.08(10)	422.58±26.41(10)	434.91±20.48(10)	426.74±35.82(10)
	13	425.73±24.48(10)	427.41±28.65(10)	441.57±21.97(10)	431.67±37.96(10)
	Weight gains[a)]	239.48±21.54(10)	242.17±23.52(10)	254.98±17.96(10)	247.11±33.20(10)
MALE	0	127.24± 3.98(10)	128.41± 4.90(10)	128.99± 4.81(10)	128.77± 4.56(10)
	1	153.89± 6.00(10)	151.53± 6.96(10)	151.50± 6.37(10)	156.38± 6.51(10)
	2	175.13± 6.11(10)	172.84± 9.43(10)	172.89± 8.21(10)	177.17± 7.79(10)
	3	190.63± 8.00(10)	188.13±12.04(10)	186.43±10.48(10)	196.15±10.80(10)
	4	205.12± 8.84(10)	200.27± 8.94(10)	200.17± 9.94(10)	211.23±13.16(10)
	5	217.27±10.98(10)	210.82±10.03(10)	211.48±11.26(10)	221.48±14.12(10)
	6	227.95±10.62(10)	220.51±13.24(10)	220.13±11.64(10)	230.16±15.53(10)
	7	232.25±10.46(10)	225.93±12.95(10)	228.62±11.98(10)	240.97±16.07(10)
	8	237.26±11.49(10)	228.23±11.74(10)	231.26±12.02(10)	242.95±15.06(10)
	9	240.09±11.21(10)	235.57±13.57(10)	237.46±12.56(10)	249.40±15.99(10)
	10	247.77±16.33(10)	242.75±13.76(10)	243.38±14.70(10)	254.97±16.07(10)
	11	248.01±12.09(10)	243.23±13.14(10)	245.90±13.60(10)	255.80±15.41(10)
	12	251.00±14.02(10)	247.31±15.53(10)	250.73±15.20(10)	262.37±18.23(10)
	13	254.30±11.72(10)	247.94±15.19(10)	252.60±15.32(10)	262.37±18.28(10)
	Weight gains[a)]	127.06±10.01(10)	119.53±12.00(10)	123.61±12.29(10)	133.61±16.28(10)

[a)]Weight gains are body weight difference between week 13 and the 1st dosed day.
#Number of animals examined

2. 체중

시험기간 중에 측정된 각 시험군 동물의 체중은 Table 2.에 제시하였다. 체중변화(body weight changes) 및 증체량(Body weight gains)을 관찰한 결과, 모든 시험물질투여군 수컷의 증체량이 부형제대조군에 비해 다소 증가경향을 보였으나, 유의성이 인정되지 않았을 뿐 아니라 용량에 따른 변화가 아니었으며, 암컷에서는 차이가 관찰되지 않았다.

3. 사료 섭취량

투여 및 관찰기간 13 주간의 사료섭취량을 관찰한 결과(Table 3.), 투여 13 주째에 500 mg/kg/day 투여군 암컷의 사료섭취량이 부형제대조군에 비해 감소하였으나($p<0.05$), 용량상관성이 없었으며, 수컷에서는 변화가 관찰되지 않았다.

Table 3-1. Food consumptions of female and male rats

SEX	WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
FEMALE	0	14.63±0.56#(10)	14.55±1.12(10)	14.36±1.22(10)	14.62±0.89(10)
	1	14.18±0.68(10)	13.73±1.72(10)	13.56±1.28(10)	14.36±1.41(10)
	2	11.73±0.90(10)	11.95±1.57(10)	11.04±1.68(10)	11.63±1.03(10)
	3	12.99±1.03(10)	11.77±1.71(10)	11.39±1.81(10)	12.30±0.93(10)
	4	13.60±0.24(10)	13.86±2.48(10)	14.19±1.91(10)	14.26±1.14(10)
	5	11.74±0.96(10)	11.79±1.04(10)	10.21±1.26(10)	10.92±0.39(10)
	6	11.30±0.32(10)	10.90±1.34(10)	11.89±0.83(10)	11.70±1.33(10)
	7	12.72±1.21(10)	11.90±1.46(10)	12.67±1.00(10)	12.71±1.51(10)
	8	12.85±0.65(10)	11.69±1.43(10)	12.02±0.76(10)	12.95±1.47(10)
	9	11.64±1.58(10)	11.08±1.10(10)	12.36±1.30(10)	12.49±0.72(10)
	10	11.99±1.41(10)	11.56±0.91(10)	11.39±0.57(10)	11.71±1.14(10)
	11	12.33±0.88(10)	11.47±0.86(10)	12.55±1.16(10)	11.60±0.68(10)
	12	11.51±1.18(10)	10.89±1.15(10)	11.20±0.70(10)	11.83±0.30(10)
	13	14.55±0.75(10)	12.92±1.20*(10)	14.65±1.12(10)	13.38±0.88(10)
MALE	0	19.41±1.17(10(9)a))	18.64±2.84(10)	19.59±1.42(10)	19.90±1.60(10)
	1	19.08±1.70(10(9)a))	20.27±1.60(10)	19.07±1.99(10)	20.00±1.38(10)
	2	20.10±1.01(10(9)a))	19.59±1.51(10)	20.28±0.78(10)	19.82±1.16(10)
	3	18.47±1.33(10(9)a))	19.08±0.74(10)	18.07±0.94(10)	18.84±1.20(10)
	4	19.50±1.58(10(9)a))	19.54±1.62(10)	19.38±1.03(10)	20.31±2.13(10)
	5	18.39±1.13(10(9)a))	18.20±1.20(10)	17.40±1.09(10)	18.31±1.66(10)
	6	18.32±1.25(10(9)a))	18.63±1.43(10)	18.22±0.45(10)	18.78±0.73(10)
	7	19.54±1.58(10(9)a))	20.25±1.61(10)	19.29±1.04(10)	19.35±2.14(10)
	8	17.29±1.13(10(9)a))	17.17±2.37(10)	18.49±1.72(10)	18.46±2.02(10)
	9	17.85±0.96(10(9)a))	18.63±1.19(10)	19.17±1.54(10)	17.75±1.88(10)
	10	17.34±1.68(10(9)a))	16.25±1.67(10)	17.25±1.05(10)	16.48±1.08(10)
	11	17.74±0.69(10(9)a))	18.18±1.61(10)	18.52±0.38(10)	18.29±1.43(10)
	12	16.76±0.81(10(9)a))	16.43±1.30(10)	17.23±1.90(10)	16.43±2.34(10)
	13	18.88±1.25(10(9)a))	19.28±1.59(10)	19.12±1.29(10)	19.05±1.56(10)

*Represents a significant difference at $p<0.05$ level compared with the vehicle control.
#Number of animals examined

4. 물 섭취량

투여 및 관찰기간 13 주간의 물섭취량을 관찰한 결과(Table 4.), 수컷에서의 물섭취량이 부형제대조군에 비해 전반적으로 증가경향을 보이다가 투여 7 주째에 2,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 유의성이 인정되었으나($p<0.05$), 암컷에서는 변화가 관찰되지 않았다.

5. 안검사

투여 마지막 주의 외안 및 안저검사결과, 모든 시험군에서 어떠한 증상도 관찰되지 않았다.(Table 5.)

Table 4. Water consumptions of female and male rats

SEX	WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
FEMALE	0	20.26±0.71[#](10)	19.94±0.42(10)	20.48±0.44(10)	19.92±0.57(10)
	1	22.30±1.83(10)	22.95±2.73(10)	24.91±4.70(10)	21.24±2.19(10)
	2	18.78±2.74(10)	19.44±2.61(10)	20.47±4.55(10)	19.60±1.55(10)
	3	21.37±2.96(10)	19.44±1.92(10)	22.96±5.27(10)	19.72±2.10(10)
	4	22.33±1.77(10)	22.04±4.01(10)	24.39±7.27(10)	21.21±3.01(10)
	5	21.76±2.81(10)	19.30±2.32(10)	21.89±4.32(10)	19.08±1.09(10)
	6	22.77±4.07(10)	21.25±3.89(10)	25.50±6.62(10)	22.34±0.98(10)
	7	25.75±4.88(10)	19.32±2.96(10)	23.39±5.45(10)	20.87±1.58(10)
	8	26.53±4.23(10)	21.59±2.50(10)	25.67±4.92(10)	20.97±1.72(10)
	9	26.01±3.37(10)	19.78±2.76(10)	26.85±7.61(10)	21.91±1.06(10)
	10	22.75±5.51(10)	21.41±1.10(10)	26.02±6.58(10)	22.35±2.96(10)
	11	27.20±3.67(10)	22.85±2.34(10)	28.78±7.81(10)	25.25±1.49(10)
	12	25.03±3.29(10)	22.58±3.51(10)	25.82±8.98(10)	20.89±1.21(10)
	13	29.11±5.30(10)	25.55±3.78(10)	33.15±10.79(10)	26.15±2.23(10)
MALE	0	25.00±0.48(10(9)[a)])	25.04±0.68(10)	25.21±0.81(10)	25.27±0.60(10)
	1	28.05±4.84(10(9)[a)])	28.02±1.40(10)	30.52±3.75(10)	30.60±3.39(10)
	2	25.01±1.91(10(9)[a)])	24.48±2.29(10)	27.84±2.52(10)	27.63±3.24(10)
	3	25.04±1.61(10(9)[a)])	24.39±1.58(10)	28.54±3.68(10)	28.81±3.39(10)
	4	24.88±2.59(10(9)[a)])	25.37±2.66(10)	28.72±2.86(10)	28.24±3.51(10)
	5	23.39±1.73(10(9)[a)])	22.95±2.39(10)	26.33±2.56(10)	27.25±4.10(10)
	6	25.00±2.43(10(9)[a)])	26.34±1.77(10)	29.24±2.28(10)	28.03±3.35(10)
	7	24.02±1.68(10(9)[a)])	24.72±1.26(10)	26.79±1.81(10)	28.08±3.43[*](10)
	8	24.97±2.32(10(9)[a)])	22.46±1.92(10)	26.70±1.76(10)	26.85±3.78(10)
	9	23.00±1.99(10(9)[a)])	23.04±0.62(10)	26.69±3.64(10)	25.51±4.16(10)
	10	19.76±2.13(10(9)[a)])	20.75±2.88(10)	23.63±2.12(10)	22.95±3.52(10)
	11	23.12±2.29(10(9)[a)])	25.52±3.09(10)	27.46±1.64(10)	26.80±2.55(10)
	12	22.12±1.94(10(9)[a)])	20.45±1.92(10)	24.22±1.11(10)	22.22±3.75(10)
	13	25.39±2.14(10(9)[a)])	23.52±4.62(10)	26.52±2.04(10)	25.95±6.59(10)

*Represents a significant difference at $p<0.05$ level compared with the vehicle control.
[#]Number of animals examined

Table 5. Ophthalmic findings in female and male rats after treatment

	SITES	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
			G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
MALE	Left eye	No ophthalmic findings	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Right eye	No ophthalmic findings	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
FEMALE	Left eye	No ophthalmic findings	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Right eye	No ophthalmic findings	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10

6. 요검사

요검사 결과(Table 6-1~6-3), 요단백(PRO), 케톤(KET) 및 요량은 암수에서, BIL과 SG는 수컷에서 증가경향이 관찰되었으며, OB는 모든 시험물질투여군 수컷에서 감소경향을 보였으나, 유의성이 인정되지 않았다. 요색조 및 요침사검사에서는 군간에 차이가 확인되지 않았다.

Table 6-1. Urinalysis of male and female rats

TEST[a)] ITEMS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)							
			MALE				FEMALE			
			G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
			0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
GLU	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
BIL	-	0	5	5	5	3	5	5	5	5
	+/-	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1+	2	0	0	0	2	0	0	0	0
KET	-	0	2	1	1	0	5	5	5	4
	+/-	1	3	4	3	3	0	0	0	1
	1+	2	0	0	1	2	0	0	0	0
SG	≤1.005	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	1.010	1	4	1	0	0	2	3	2	2
	1.015	2	0	1	2	3	1	1	2	2
	1.020	3	1	2	2	1	1	1	0	0
	1.025	4	0	1	1	1	0	0	0	0
pH	6.5	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	7.0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	7.5	2	0	0	1	0	0	0	1	0
	8.0	3	4	2	2	3	4	3	3	4
	8.5	4	1	3	1	2	0	2	1	1
	≥9.0	5	0	0	1	0	0	0	0	0

PRO	-	0	0	0	0	0	2	2	2	1
	+/-	1	0	0	0	0	2	2	0	1
	1+	2	0	0	0	0	1	1	1	2
	2+	3	3	2	1	1	0	0	2	1
	3+	4	2	3	4	4	0	0	0	0
URO	0.1	0	5	5	5	5	5	5	5	5
NIT	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
OB	-	0	2	4	4	4	4	4	4	5
	+/-	1	1	0	1	1	1	0	0	0
	1+	2	2	1	0	0	0	0	0	0
	2+	3	0	0	0	0	0	1	0	0
	3+	4	0	0	0	0	0	0	1	0
WBC	-	0	0	0	0	0	2	2	1	0
	+/-	1	1	0	0	0	2	1	1	2
	1+	2	1	1	1	2	1	2	1	3
	2+	3	3	4	3	3	0	0	2	0
	3+	4	0	0	1	0	0	0	0	0
	N		5	5	5	5	5	5	5	5

a) GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, WBC: Leukocyte

Table 6-2. Urine sediments of male and female rats

TEST ITEMS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)							
			MALE				FEMALE			
			G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
			0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
RBC	-	0	5	4	5	4	5	5	4	5
	+/-	1	0	0	0	1	0	0	1	0
	1+	2	0	1	0	0	0	0	0	0
WBC	-	0	4	3	3	4	5	4	5	5
	+/-	1	1	2	1	0	0	1	0	0
	1+	2	0	0	1	1	0	0	0	0
EPITHELIAL CELL	-	0	5	5	3	5	5	5	5	4
	+/-	1	0	0	2	0	0	0	0	1
CASTS	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
N			5	5	5	5	5	5	5	5

Table 6-3. Urine volume and color of male and female rats

TEST ITEMS	GROUPS (mg/kg/day)							
	SEX: MALE				SEX: FEMALE			
	G1 (0)	G2 (500)	G3(1,000)	G4(2,000)	G1 (0)	G2 (500)	G3(1,000)	G4(2,000)
VOLUME (*ml*)	11.6±1.9	9.6±2.4	11.8±2.6	12.4±1.7	10.6±3.0	13.6±3.4	16.0±5.7	14.8±0.8
COLOR - Yellow	5	5	5	5	5	5	5	5
N	5	5	5	5	5	5	5	5

7. 혈액학적 검사

부검시 채혈한 혈액으로 혈액학적 검사를 실시한 결과(Table 7-1, 7-2), 호중구(NEU), 단구(MONO) 및 호산구(EOS)는 암수에서, RET, LUC, PLT는 수컷에서 증가경향을, LYM은 암수 모두에서 감소경향이 관찰되었으나, 유의성이 인정되지 않았다.

Table 7-1. Hematological values of male and female rats

TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)							
		SEX: MALE				SEX: FEMALE			
		G1 (0)	G2 (500)	G3(1,000)	G4 (2,000)	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
WBC	$10^3/\mu L$	9.63±2.16	8.72±1.72	10.19±2.45	9.91±2.68	5.80±1.40	6.03±1.41	5.99±1.86	6.36±1.69
RBC	$10^6/\mu L$	8.99±0.19	8.87±0.26	9.05±0.37	9.15±0.27	8.18±0.25	8.13±0.28	8.06±0.12	7.99±0.30
HGB	g/dL	16.4±0.6	16.0±0.2	16.6±0.6	16.4±0.4	15.3±0.4	15.3±0.4	15.2±0.2	15.2±0.5
HCT	%	47.5±1.5	46.9±1.1	48.1±1.6	47.9±1.8	44.4±1.5	44.0±0.9	43.9±0.8	43.9±1.5
MCV	fL	52.8±1.2	52.9±1.7	53.2±1.4	52.4±1.3	54.3±1.0	54.1±1.2	54.5±0.9	54.9±1.9
MCH	pg	18.2±0.5	18.1±0.6	18.3±0.8	18.0±0.3	18.7±0.3	18.8±0.6	18.8±0.4	19.0±0.7
MCHC	g/dL	34.6±0.7	34.2±0.6	34.5±0.8	34.3±0.9	34.5±0.5	34.8±0.6	34.5±0.6	34.6±0.6
RDW	%	12.6±0.2	12.5±0.4	12.4±0.4	12.4±0.3	11.2±0.3	11.1±0.4	11.1±0.3	11.3±0.3
HDW	g/dL	2.62±0.10	2.59±0.14	2.61±0.13	2.63±0.14	2.50±0.08	2.46±0.15	2.43±0.16	2.51±0.16
PLT	$10^3/\mu L$	1031.5±107.5	1008.5±77.3	1108.5±102.2	1113.2±97.7	1144.5±88.5	1116.4±93.3	1078.8±92.9	1103.7±93.8
MPV	fL	6.7±0.4	7.1±0.7	6.9±0.6	7.0±0.8	6.6±0.4	6.4±0.3	6.4±0.3	6.5±0.2
RET	%	1.84±0.25	1.89±0.22	1.91±0.23	2.06±0.21	2.15±0.47	1.76±0.37	1.98±0.44	2.17±0.39
N		10	10	10	10	10	10	10	10

Table 7-2. Differential leukocyte counts of male and female rats

TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)							
		SEX: MALE				SEX: FEMALE			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
NEU	%	14.7±4.2	18.1±6.9	20.4±9.2	19.5±7.0	10.9±4.1	10.7±3.5	14.5±8.3	13.8±4.0
LYM	%	80.4±4.4	76.8±7.0	74.3±9.6	74.7±6.7	84.3±4.2	84.4±3.4	79.9±8.5	81.0±5.0
MONO	%	3.2±0.5	3.1±0.8	3.2±1.1	3.6±0.8	2.7±0.6	2.7±0.7	3.1±0.7	2.9±1.0
EOS	%	1.1±0.3	1.1±0.4	1.2±0.5	1.3±0.4	1.2±0.5	1.3±0.5	1.4±0.7	1.3±0.6
BASO	%	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.0	0.2±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1
LUC	%	0.5±0.1	0.7±0.2	0.7±0.2	0.8±0.3	0.8±0.3	0.7±0.2	1.0±0.5	0.9±0.4
N		10	10	10	10	10	10	9	10

8. 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사 결과(Table 8.), Na+가 모든 시험물질투여군 암수에서 부형제대조군에 비해 감소경향을 보였으며, 그 중 1,000 mg/kg/day 용량 이상의 수컷과($p<0.01$) 모든 시험물질투여군 암컷에서 유의성이 인정되었다($p<0.05$ 또는 $p<0.01$). CPK는 1,000 mg/kg/day 용량 이상의 암수에서 부형제대조군에 비해 감소경향을 보여 그 중 동일 용량의 암컷에서 유의성이 인정되었다($p<0.05$). PRO는 2,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 부형제대조군에 비해 증가경향을 보여 그 중 수컷에서 유의성이 인정되었다($p<0.05$). BIL은 암수 모두에서, CHO과 ALB는 수컷에서 부형제대조군에 비해 증가경향을 보였으나, 유의성이 인정되지 않았다.

9. 혈액응고시간 검사

혈액응고시간을 확인한 결과(Table 9.), PT와 APTT 모두 수컷에서는 증가경향을, 암컷에서는 감소경향을 보였으나, 유의성도 인정되지 않았을 뿐 아니라 용량에 따른 변화도 아니었다.

10. 장기중량

장기중량 측정결과(Table 10.), 암수간에 공통적인 변화를 보인 항목은 관찰되지 않았다. 간장의 절대 및 상대중량이 모든 시험물질투여군 수컷에서 부형제대조군에 비해 증가경향을 보였으며, 그 중 2,000 mg/kg/day 투여군에서의 상대중량에서 유의성이 인정되었으나($p<0.05$), 암컷에서는 변화가 관찰되지 않았다.

11. 부검소견

투여 13 주 후 실시한 부검결과(Table 11.), 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 양측성 고환 왜소(small) 1 례, 간장 중간엽의 돌출 (protruded median lobe) 및 횡격막 유착(adhesion to diaphragm)이 1 례 관찰되었으며, 암컷에서는 자궁내 맑은 액체 저류(retention of clear fluid)가 부형제대조군에서부터 각각 3, 0, 1, 1 례 관찰되었다.

12. 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사결과(Table 12.), 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 암수 고용

량군에서만 관찰된 소견은 폐의 혈관주위에서 암수 각각 2, 1 례 관찰된 단핵세포침윤(mononucleal cell infiltration)이었으며, 간질성폐렴(interstitial pneumonitis)은 수컷에서는 고용량군에서만 1 례, 암컷에서는 부형제대조군 및 고용량군에서 각각 3 및 5 례 관찰되었다. 또한 갑상샘의 아가미끝소체낭(ultimobranchial cyst)은 수컷에서는 부형제대조군 및 고용량군에서 2, 1 례, 암컷에서는 1, 3 례 관찰되었다. 고용량군 수컷에서만 관찰된 소견은 뇌하수체전엽 낭포(cyst) 2 례와 간장의 문맥부위에서 관찰된 국소성 세포침윤(cellular infiltration, focal) 및 심근염(myocarditis) 각 1 례였으며, 고용량군 암컷에서의 소견은 난소의 황체낭포(luteal cyst) 2 례와 폐의 육아종성염증(granulomatous inflammation) 1 례였다. 기타, 수컷에서는 전립샘 간질 림프구침윤(lymphocytic infiltration), 신장의 사구체세뇨관신증((glomerulo)nephropathy), 간장의 동맥염(arteritis), 침샘의 위축(atrophy), 하더샘의 림프양세포침윤(lymphoid cell infiltration)이, 암컷에서는 부신의 덧부신피질조직(accessory adrenocortical tissue), 자궁의 자궁수종(hydrometra), 신장의 신우신염(pyelonephritis)과 피질수질연결부의 무기질침착(corticomedullary mineralization) 등이 1~4 례 관찰되었으나, 용량에 따른 변화가 관찰되지 않았으며, 유의성도 인정되지 않았다.

부검 중 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서의 고환 및 간장소견은 각각 양측성 고환의 정세관 위축(tubular atrophy)과 간장횡격막면결절(hepatodiaphragmatic nodule)로 확인되었다.

Table 8. Serum biochemical values of male and female rats

TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)							
		SEX: MALE				SEX: FEMALE			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
AST	U/L	98.6±16.4	102.7±15.8	94.3±13.8	89.8±8.8	117.7±45.1	102.7±14.1	102.1±18.2	98.9±10.5
ALT	U/L	43.9±7.3	45.2±4.3	43.6±6.3	47.3±4.7	39.9±24.6	33.9±6.1	34.8±2.5	34.6±3.8
ALP	U/L	82.7±9.5	88.2±19.7	85.0±10.2	92.1±13.8	65.9±14.1	62.5±13.4	69.7±12.7	63.4±13.7
BUN	mg/dL	17.4±1.6	17.3±1.9	18.2±2.4	17.7±1.3	19.3±2.6	18.8±2.8	19.3±2.0	18.3±2.2
CRE	mg/dL	0.55±0.02	0.55±0.05	0.56±0.04	0.57±0.04	0.62±0.05	0.60±0.04	0.63±0.03	0.61±0.05
GLU	mg/dL	114.8±9.8	112.9±7.2	115.5±11.4	120.8±12.2	102.4±10.9	103.8±8.0	102.4±6.7	106.7±11.6
CHO	mg/dL	110.7±15.7	112.1±32.3	115.8±19.3	117.8±21.8	115.4±14.7	115.3±9.8	112.1±18.1	118.7±28.5
PRO	g/dL	6.24±0.17	6.21±0.11	6.37±0.23	6.45±0.15*	6.26±0.28	6.25±0.22	6.25±0.21	6.37±0.29
CPK	U/L	200.1±93.1	204.6±97.0	170.7±82.0	143.1±72.7	233.1±100.1	201.0±80.1	152.2±87.1*	142.5±28.6*
ALB	g/dL	3.01±0.08	2.97±0.11	3.03±0.11	3.10±0.09	3.17±0.12	3.21±0.10	3.17±0.14	3.28±0.13
BIL	mg/dL	0.18±0.01	0.19±0.01	0.20±0.02	0.20±0.02	0.21±0.04	0.20±0.02	0.20±0.04	0.23±0.03
TG	mg/dL	55.8±7.1	49.9±9.6	53.8±9.7	51.0±6.7	42.0±11.9	44.1±8.0	41.1±11.2	42.7±10.8
IP	mg/dL	6.85±0.43	7.12±0.57	7.01±0.49	6.89±0.45	7.04±0.95	7.00±1.02	6.81±1.45	7.05±1.02
Ca^{2+}	mg/dL	10.08±0.33	10.10±0.35	10.14±0.44	10.17±0.37	9.92±0.29	10.02±0.28	9.93±0.39	10.05±0.28
A/G	ratio	0.93±0.04	0.92±0.06	0.91±0.06	0.93±0.05	1.02±0.04	1.06±0.05	1.03±0.07	1.07±0.08
Na^{+}	mmol/L	144.6±0.9	143.9±1.3	142.2±1.0**	142.9±1.2**	142.9±2.2	141.4±1.1*	140.9±1.5*	139.9±1.8**
K^{+}	mmol/L	4.49±0.23	4.61±0.13	4.52±0.16	4.59±0.18	4.99±0.85	5.13±0.58	5.18±1.41	5.20±0.88
Cl^{-}	mmol/L	103.8±0.8	103.9±1.1	103.7±0.9	104.4±1.0	105.4±2.2	104.7±1.5	104.6±1.5	103.5±1.8
N		10	10	10	10	10	10	10	10

*/** Represents a significant difference at $p<0.05$ / 0.01 level compared with the vehicle control.

Table 9. Plasma coagulation values of male rats

		GROUPS (mg/kg/day)							
		SEX: MALE				SEX: FEMALE			
TESTS	UNITS	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
PT	Sec	15.6±1.5	16.3±1.0	16.7±1.2	16.8±1.3	15.9±0.6	15.4±0.6	15.2±0.5	15.3±0.9
APTT	Sec	17.4±1.7	17.6±0.9	17.8±1.4	17.6±1.0	15.1±1.1	14.2±1.3	13.9±0.9	14.6±1.5
N		10	10	10	10	10	10	9	10

Table 10. Absolute & relative organ weights of male and female rats

	GROUPS (mg/kg/day)							
	SEX: MALE				SEX: FEMALE			
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)	G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
BODY WEIGHT[a)]	403.43±24.12	403.83±27.35	417.78±20.92	406.28±35.77	237.33±11.15	233.30±12.67	235.30±14.31	246.99±16.72
ADRENAL GLAND-Lt.	0.0230±0.0027	0.0239±0.0028	0.0243±0.0023	0.0234±0.0036	0.0294±0.0045	0.0281±0.0025	0.0277±0.0030	0.0300±0.0041
% to BODY WEIGHT	0.0057±0.0005	0.0059±0.0007	0.0058±0.0005	0.0058±0.0007	0.0123±0.0013	0.0121±0.0011	0.0118±0.0016	0.0122±0.0023
ADRENAL GLAND-Rt.	0.0225±0.0023	0.0235±0.0018	0.0245±0.0028	0.0213±0.0026	0.0282±0.0026	0.0264±0.0033	0.0275±0.0027	0.0285±0.0037
% to BODY WEIGHT	0.0056±0.0004	0.0059±0.0007	0.0059±0.0007	0.0052±0.0004	0.0119±0.0008	0.0113±0.0014	0.0117±0.0014	0.0116±0.0017
PITUITARY GLAND	0.0113±0.0012	0.0116±0.0012	0.0114±0.0012	0.0116±0.0027	0.0135±0.0020	0.0127±0.0015	0.0131±0.0011	0.0133±0.0024
% to BODY WEIGHT	0.0028±0.0002	0.0029±0.0003	0.0027±0.0003	0.0029±0.0006	0.0057±0.0007	0.0054±0.0006	0.0056±0.0005	0.0054±0.0009
THYMUS	0.2697±0.0437	0.2754±0.0530	0.2896±0.0503	0.2581±0.0477	0.2301±0.0521	0.2262±0.0334	0.2380±0.0538	0.2377±0.0362
% to BODY WEIGHT	0.0670±0.0103	0.0681±0.0116	0.0692±0.0107	0.0638±0.0122	0.0972±0.0229	0.0971±0.0146	0.1009±0.0203	0.0969±0.0177
PROSTATE(male)/ UTERUS(female)	0.4927±0.0863	0.5430±0.1532	0.5487±0.1186	0.4706±0.0703	0.0419±0.0077	0.0378±0.0051	0.0398±0.0054	0.0390±0.0058
% to BODY WEIGHT	0.1225±0.0229	0.1334±0.0313	0.1317±0.0297	0.1161±0.0167	0.0176±0.0027	0.0162±0.0026	0.0170±0.0024	0.0159±0.0025
TESTIS(male)/ OVARY(female)-Lt.	1.8854±0.1226	1.9067±0.1677	1.8137±0.4696	1.8320±0.1257	0.0387±0.0048	0.0405±0.0068	0.0401±0.0067	0.0379±0.0045
% to BODY WEIGHT	0.4676±0.0187	0.4724±0.0313	0.4331±0.1101	0.4527±0.0341	0.0163±0.0016	0.0173±0.0026	0.0170±0.0022	0.0154±0.0020
TESTIS(male)/ OVARY(female)-Rt.(g)	1.8040±0.3268	1.9320±0.1489	1.7699±0.4588	1.8781±0.1492	0.5980±0.1243	0.5396±0.1169	0.5862±0.1765	0.5315±0.1723
% to BODY WEIGHT	0.4471±0.0766	0.4789±0.0286	0.4226±0.1076	0.4628±0.0174	0.2519±0.0515	0.2309±0.0466	0.2480±0.0690	0.2147±0.0638

EPIDIDYMIS-Lt.	0.6098±0.0503	0.6104±0.0506	0.6357±0.0737	0.5817±0.0583				
% to BODY WEIGHT	0.1515±0.0140	0.1515±0.0129	0.1523±0.0181	0.1435±0.0125				
EPIDIDYMIS-Rt.	0.6190±0.0436	0.6276±0.0451	0.7054±0.2310	0.5915±0.0545				
% to BODY WEIGHT	0.1535±0.0073	0.1559±0.0131	0.1683±0.0512	0.1456±0.0058				
SPLEEN	0.7159±0.0697	0.7433±0.0947	0.7567±0.1222	0.7034±0.1044	0.5756±0.0438	0.5280±0.0542	0.5626±0.0731	0.5611±0.0967
% to BODY WEIGHT	0.1777±0.0166	0.1844±0.0236	0.1804±0.0205	0.1727±0.0134	0.2427±0.0180	0.2263±0.0192	0.2386±0.0236	0.2260±0.0267
KIDNEY-Lt.	1.1582±0.1030	1.1922±0.1161	1.2365±0.0909	1.2543±0.1669	0.7352±0.0711	0.7149±0.0537	0.7410±0.0606	0.7503±0.0563
% to BODY WEIGHT	0.2870±0.0165	0.2953±0.0205	0.2959±0.0148	0.3080±0.0192	0.3093±0.0190	0.3064±0.0148	0.3148±0.0149	0.3040±0.0144
KIDNEY-Rt.	1.1954±0.0997	1.2397±0.1005	1.2403±0.0910	1.2585±0.1357	0.7611±0.0627	0.7211±0.0567	0.7450±0.0560	0.7820±0.0486
% to BODY WEIGHT	0.2964±0.0184	0.3072±0.0174	0.2968±0.0145	0.3096±0.0144	0.3204±0.0167	0.3089±0.0147	0.3165±0.0109	0.3169±0.0103
HEART	1.3301±0.0446	1.3885±0.1551	1.3460±0.1297	1.3664±0.1747	0.8680±0.0609	0.8809±0.0446	0.8897±0.0559	0.8970±0.0923
% to BODY WEIGHT	0.3304±0.0164	0.3435±0.0258	0.3218±0.0212	0.3360±0.0260	0.3655±0.0121	0.3785±0.0278	0.3789±0.0272	0.3630±0.0243
LUNG	1.6972±0.1216	1.7261±0.1332	1.7242±0.1840	1.6915±0.2343	1.2949±0.1115	1.2980±0.0909	1.3302±0.1666	1.4118±0.1661
% to BODY WEIGHT	0.4206±0.0124	0.4275±0.0166	0.4122±0.0312	0.4156±0.0334	0.5451±0.0308	0.5563±0.0224	0.5642±0.0473	0.5738±0.0756
BRAIN	1.8831±0.0569	1.8964±0.0810	1.9346±0.0423	1.9037±0.0845	1.7511±0.0755	1.7277±0.0576	1.7470±0.0781	1.7497±0.0628
% to BODY WEIGHT	0.4682±0.0299	0.4707±0.0242	0.4639±0.0209	0.4711±0.0378	0.7381±0.0159	0.7422±0.0420	0.7437±0.0330	0.7107±0.0431
LIVER	9.5578±0.6255	10.4339±1.4307	10.4141±0.8515	10.3531±1.3031	5.8097±0.7055	5.7208±0.5145	5.8055±0.5053	6.1882±0.8909
% to BODY WEIGHT	2.3690±0.0604	2.5774±0.2264	2.4906±0.1179	2.5431±0.1434*	2.4422±0.1999	2.4491±0.1164	2.4644±0.0890	2.4983±0.2344
N	10	10	10	10	10	10	10	10

a) Represents body weights right before necropsy, after fasting.

*/** Represents a significant difference at $p<0.05$ / 0.01 level compared with the vehicle control.

Table 11. Necropsy findings of male and female rats

SEX	ORGANS	GROSS FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)				SEX	ORGANS	GROSS FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
			G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)				G1 (0)	G2 (500)	G3 (1,000)	G4 (2,000)
MALE	Testis	Small	-	-	1(10)	-	FEMALE	Uterus	Retention of clear fluid	3 (30)	-	1 (10)	1 (10)
	Liver	Protruded median lobe	-	-	1(10)	-							
		Adhesion to diaphragm	-	-	1(10)	-							
N			10	10	10	10	N			10	10	10	10

Data are the Number of animals with the sign (%),

-: No necropsy finding was found.

Table 12. Histopathological findings of male and female rats

ORGANS	SEX: MALE MICROSCOPIC FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day) G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)	SEX: FEMALE MICROSCOPIC FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day) G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Pituitary gl.(male)/ Adrenal gl.(female)	Cyst	-			2(20)	Accessory adrenocortical tissue	1(10)			1(10)
Testis(male)/ Ovary(female)	Tubular atrophy	-		1/1(100)	-	Luteal cyst	-			2(20)
Prostate(male)/ Uterus(female)	Lymphocytic infiltration	3(30)			2(20)	Hydrometra	3(30)			1(10)
Kidney	(Glomerulo)nephropathy	4(40)			4(40)	Corticomedullary mineralization	3(30)			1(10)
						Pyelonephritis	2(20)			-
Liver	Arteritis	1(10)			-					
	Cellular infiltration, focal	-			1(10)					
	Hepatodiaphragmatic nodule	-		1/1(100)	-					
Lung	Mononuclear cell infiltration	-			1(10)	Mononuclear cell infiltration	-			2(20)
	Interstitial pneumonitis	-			1(10)	Interstitial pneumonitis	3(30)			5(50)
						Granulomatous inflammation	-			1 (10)
Heart	Myocarditis	-			1(10)					
Thyroid gl.	Ultimobranchial cyst	2(20)			1 (10)	Ultimobranchial cyst	1 (10)			3(30)
Salivary gl.	Atrophy	1(10)			-					
Haderian gl.	Lymphoid cell infiltration	1(10)			2(20)					
	N	10	0	2	10		10	0	0	10

Data are the number of animals with the sign (%)

Organs with no histopathological findings: Skin, Epididymis, Seminal vesicle, Vagina, Urinary bladder, Tongue, Spleen, Pancreas, Aorta, Thymus, Trachea, Esophagus, Mandibular lymph node, Mesenteric lymph node, Stomach, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon, Rectum, Brain, Thoracic spinal cord, Sciatic nerve, Femoral muscle, Eye, Sternum, Femur, - : No histopathological findings

Ⅳ. 고 찰

한방 치매치료에서 氣血虛弱證의 대표적 治方인 壯元丸은 『東醫寶鑑 · 神門』[1]에서 補心生血, 寧神定志하는 효능이 있다고 하였으며 건망증에 활용하는 처방이다. 壯元丸은 12가지 한약재와 소수의 무기질, 황화수은이 주성분인 朱砂로 구성되어 있다. 朱砂는 신경독성이 있어 朱砂를 제외한 다른 장원환의 구성성분이 쓰여져 왔다.

본 시험에 사용된 LMK02는 장원환가감방[2]으로 紅蔘, 石菖蒲, 白茯神, 柏子仁, 當歸, 麥門冬, 玄蔘의 7가지 약재로 이루어진 처방이다. 紅蔘은 大補元氣, 補脾益氣, 生津止渴, 寧神益智하는 효능이 있고, 石菖蒲는 開竅安神하는 작용이 있으며 백복신과 백자인은 寧心安神하는 효능이 있으며, 當歸, 麥門冬, 玄蔘은 심혈관계를 補하고 체내의 陰을 補하는데 사용한다[7].

또한 壯元丸加減方의 실험적 연구에서 Aβ oligomer에 의해 유도된 해마세포주 H19-7를 이용하여 세포 생존률, LDH활성도, NO content, Neutrite outgrowth, ROS 농도를 정상군, 대조군 및 LMK02투여 그룹과 비교 관찰하여 LMK02군이 정상군과 같은 유의한 회복을 보여 LMK02가 신경 세포사멸을 억제하는 효능이 있음을 밝혔고[2] 알츠하이머병 마우스모델인 Tg-APPswe/PS1dE9에서[3] 항치매 효과를 확인하였고, 장원환가감방인 LMK01과 LMK02가 H_2O_2 유발 산화독성에 의한 PC-12세포주에서 세포생존율, 산화 스트레스 손상정도, 세포 자사 억제정도 등을 측정하여 항산화능력 활성화를 통한 신경세포 보호효과를 비교 조사한 결과 壯元丸加減方의 비교에서 LMK02가 壯元丸原方보다 항산화적 효과가 더 우수한 것으로 보고되었다.[4]

이상과 같이 장원환가감방을 비롯한 기존 한약 제재의 효능이나 치료효과에 관한 실험적 연구는 위와 같이 꾸준히 이루어진 편이나 독성평가는 이에 비해 부족한 실정이다.

그러나 최근 한약 자체의 독성 평가가 폭넓게 진행되어 半夏[8], 竹瀝[9], 麻黃[10], 大茴香[11], 漢防己[12], 人蔘[13,14], 玉竹[15], 桑葉추출물[16]등 단미제에 대한 독성연구가 이루어지고 있다. 또한 단미제에 대한 독성연구 뿐만 아니라 Ninomiya 등은[17]八味地黃丸, Ryu 등은[18] 補中治濕湯, 황 등은[19] 加味歸脾湯, 배 등은[20] 補中益氣湯合大七氣湯, 그리고 麻黃潤肺湯에 대하여 마우스 및 Rats의 경구 단회독성, 반복투여 및 유전독성에 대한 실험[21-23], 성 등은[24] 麻黃附子細辛湯 의 마우스 단회 경구투여, 독성 및 골수세포를 이용한 유전독성 평가, 등 복합 처방에 대한 독성연구도 이루어지고 있다.

壯元丸加減方인 LMK02가 AD에 유력한 치료제가 될 수 있음을 시사하는 연구는[2-4] 위와 같이 이루어 졌으나, 독성연구는 2주[6], 4주[7]간의 연구만 이루어진 실정이다. LMK02의 독성평가는 의약품등의 품목허가, 신고, 심사규정(2009.6.30 식품의약품안전청 고시 제 2009-42호)에 따라 Sprague- Dawley 계통의 암컷 랫드에 Up & Down 법(UDP)으로 단회 경구 투여하여 최소치사량(MLD: Minimum Lethal Dose)이 5000mg/kg을 상회함을 밝혔고[6], OECD 가이드라인에서는 반복 경구투여 독성시험 한계용량을 1000mg/kg/day으로 권장하고 있으나 본 실험 물질이 생약성분이므로 독성이 적을 것으로 예상하여 2000mg/kg/day를 고용량으로 하고 4주간 반복 경구투여 DRF 독성시험을 시행한 결과 13주 반복경구투여 독성시험에서는 어느 정도의 독성이 관찰될 것으로 보이는 2000mg/kg/day을 고용량으로 하고 그 아래로 공비 2로 2군을 두는 것이 적절한 것으로 판단내렸다[7].

위와 같은 독성연구를 토대로 LMK02를 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 13 주간 반복 경구투여하였을 때의 독성을 조사하였다.

시험물질을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로, 군당 20 마리(암수 각 10 마리)에 13주간 투여한 후의 일반증상 및 사망, 체중, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생

화학적 검사, 장기중량, 부검소견, 조직병리학적 검사 소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였다.

관찰기간에 일반증상이나 사망동물은 관찰되지 않았으며, 체중, 사료 및 물 섭취량, 안검사 요량, 요색조 및 요침사검사를 포함한 요검사, 혈액학 검사 및 백혈구감별계수, 전해질 및 혈액응고시간검사 포함한 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리학적 검사결과, 시험물질에 의한 변화로 판단되는 소견이 관찰되지 않았다.

체중관찰결과, 증체량이 부형제대조군에 비해 다소 증가경향을 보였으나, 유의성이 인정되지 않았을 뿐 아니라 용량에 따른 변화가 아니었으며, 암컷에서는 관찰되지 않은 변화였으므로 시험물질에 의한 영향으로 판단할 수 없었다. 사료섭취량은 투여 13 주째에 저용량군 암컷의 사료섭취량이 부형제대조군에 비해 감소하였으나 용량상관성이 없었으며, 수컷에서는 변화가 관찰되지 않았으므로 시험물질에 의한 것으로 판단되지 않았다.

수컷에서의 물섭취량이 부형제대조군에 비해 전반적으로 증가경향을 보이다가 투여 7 주째에 고용량군 수컷에서 유의성이 인정되었으나, 암컷에서는 변화가 관찰되지 않아 시험물질에 의한 것으로 판단되지 않았다. 요검사 결과, 요단백(PRO), 케톤(KET) 및 요량은 암수에서, BIL과 SG는 수컷에서 증가경향이 관찰되었으나, 유의성이 인정되지 않았으므로 시험물질에 의한 것으로 판단되지 않았다. 그 중 KET과 요량의 증가경향은 수컷에서 증가한 혈청 PRO 및 간장중량과 연계될 수 있으나, 기타 항목의 변화가 관찰되지 않았으므로 시험물질에 의한 것으로 판단되지 않았다. 수컷에서 관찰된 OB의 감소는 모든 시험물질투여군 수컷에서 감소경향을 보였으나, 독성변화와는 반대되는 소견이었다.

혈액생화학적 검사 결과, 중간용량 이상의 수컷과 모든 시험물질투여군 암컷에서 관찰된 Na+ 감소는 요단백(PRO), 요량 및 혈청 EOS의 증가경향과 연계될 수 있으나, 요 및 혈액검사, 장기중량 및 조직병리학적 검사의 지지가 약했으므로 시험물질에 의한 영향으로 보기 어려웠다. CPK는 중간용량 이상의 암수에서 부형제대조군에 비해 감소 또는 감소경향을 보였으나, 기타 항목들의 지지가 없었으므로 시험물질에 의한 영향으로 판단되지 않았다. PRO 또한 고용량군 암수에서 증가 또는 증가경향을 보였으나, 연관되는 항목들의 변화가 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사결과, 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 암수 고용량군에서만 관찰된 폐 혈관주위의 단핵세포침윤 및 간질성폐렴은 SPF 구역에서 사육된 2~5 개월령 랫드에서 자연발생적으로 관찰되는 있는 소견이다[25]. 암수 갑상샘에서 관찰된 아가미끝소체낭은 중층편평상피(stratified squamous epithelium)로 피복된 내강에 케라틴과 세포탈락물로 차 있는 소견으로서, 태생기에 인두낭(주로 V 분지부)으로부터 생기는 파생체의 잔존에 의한 선천적 이상이며[26,27] 시험물질과는 무관한 것이다. 고용량군 수컷에서만 관찰된 뇌하수체전엽의 낭포는 자연발생적으로 나타날 수 있는 두개인두관(craniopharyngeal duct)의 잔유물 또는 뇌하수체 전엽의 소포성상세포(folliculostellate cells)에 의해 형성된 것으로 사료되며[26], 간장 문맥부위의 국소성 세포침윤, 전립샘의 간질에서 관찰된 림프구침윤, 심근염, 침샘 위축 역시 투여물질과는 무관한 것으로 생각된다. 고용량군 암컷의 난소에서 관찰된 황체낭포는 낭포벽이 황체세포(lutein cell)로 피복된 벽과 황체내강에 액체가 가득 찬 균질한 호산성 공간을 가지고 있는 것이 특징이며, LH surge의 부족 등의 호르몬 불균형 때문에 배란되지 않은 성숙난포(Graffian follicle)에서 발생하는 것이지만, 발생빈도가 낮아 자연발생적으로 판단하였다[26-28]. 자궁내강의 확장소견인 자궁수종 또한 발정전기에 샘의 분비활동이 왕성해짐과 동시에 액체의 저류가 일어나는 자연적인 변화로 판단된다

[28]. 중간용량군 수컷 1 례에서 양측성으로 관찰된 고환의 위축은 잠복고환(cryptorchidism)에 의한 자연위축으로 판단되며[26], 동일용량 수컷 1 례에서 관찰된 간장 횡격막면결절은 랫드에서 자주 관찰되는 자연발생할 수 있는 병변으로 유전적 요인에 의한 것으로 추측된다. 기타 소견은 빈도가 낮거나 용량에 따른 변화가 아니므로 자연발생인 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합한 결과, LMK02의 랫드에 대한 13 주간의 반복 경구투여는 특이증상 및 사망을 유발하지 않았으며, 체중, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리학적 검사결과 모두에서 어떠한 변화도 유발하지 않았다. 따라서, 본 시험물질의 무독성량(NOAEL: no observed adverse effect level)은 암수 모두 2,000 mg/kg/day로 판단되며, 표적장기는 확인되지 않아, LMK02가 매우 안전한 약물임을 확인할 수 있었다.

V. 결 론

본 시험은 LMK02를 랫드에 13 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하고 무독성량, 확실중독량 및 표적장기를 알아보기 위하여 수행하였다.

시험물질을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로, 군당 20 마리(암수 각 10 마리)에 13 주간 투여한 후 일반증상 및 사망, 체중, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리학적 검사 소견을 관찰한 후 부형제대조군과 비교하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 체중, 사료 및 물섭취량, 안검사, 요검사, 혈액관련 검사, 장기중량, 부검 및 조직병리학적 검사결과, 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합한 결과, LMK02의 랫드에 대한 13 주간의 반복 경구투여는 특이증상 및 사망을 유발하지 않았으며, 체중, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리학적 검사결과 모두에서 어떠한 변화도 유발하지 않았다. 따라서, 본 시험물질의 무독성량(NOAEL: no observed adverse effect level)은 암수 모두 2,000 mg/kg/day로 판단되며, 표적장기는 확인되지 않았다.

ACKNOWLGEMENTS

This work was supported by a grant (B070030) from the Korean Health R&D project from the Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea.

References

1. Huh, J, Donguibogam. Seoul:Namsandang 1994:1610.
2. Kang HW, Kim ST, Son HJ, Han PL, Cho HK, Lee YJ, Lyu YS. Specification of quality and inhibitory effect of Alzheimer in Aβ oligomer-induced H19-7 cells by LMK02. Korean J. Orienal Physiology & Pathology 2009;23(2):397-404.
3. Seo JS, Yun JH, Baek IS, Leem YH, Kang HW, Cho HK, Lyu YS, Son HJ, Han PL : Oriental medicine Jangwonhwan reduces Abeta(1-42) level and beta-amyloid deposition in the brain of Tg-APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. J Ethnopharmacoloy. 2010;

128(1):206-12.

4. Park YH, Son IH, Lee SW, Lim JH, Kim TH, Lyu YS, Kang HW. Antioxidant Effects of *Gagam-Jangwon-hwan (jiajianzhuangyuanwan)* on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in PC 12 Cell Lines. J. of Oriental Neuropsychiatry. 2009;20(2):19-29.
5. Kang HW, Kwon YM, Lee SW, Kim JH, Jang HH, Park BR, Lyu YS. Up-and-Down Procedure (UDP) Determinations of Acute Oral Toxicity of LMK02-Jangwonhwan in SD Rats. J. of Oriental Neuropsychiatry. 2010;21(3):87-93.
6. Lyu YS, Kim JH, Park HJ, Yi KH, Lee JH, Kang HW. 4 weeks repeated oral dose toxicity studies with LMK02-Jangwonhwan in SD rats. Korean J. Orienal Physiology & Pathology. 2010;24(6):1034-1041.
7. Text compilation committee of the Herbology. Bonchohak. Seoul:Yonglimsa. 2010:233-234, 345-347, 532-533, 563-564, 573-576, 630-633, 645-647.
8. Lee, JE., Kim, HJ, Choi, EK, Chai HY, Yun YW, Kim, DJ. et al: Four-week repeated-dose toxicity study on Pinellia Extract, The korean journal of laboratory animal science, 2003;19:127-141.
9. Jang IG, Hong ND. Experimental studies on the acute toxicity and the efficacy of phyllostachys juice. Korean J. Orient. Int. Med. 1985; 2:83-101.
10. Theoharides, T.C. : Sudden death of a healthy college student related to ephedrine toxicity from a mahuang-containing drink, J Clin Psychopharmacol, 17:437-439, 1997.
11. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa, Phytother Res 2003;17:299-305.
12. Chen J, Tong Y, Zhang X, Tian H, Chang Z. Acute toxicity of Stephania cepharantha, Zhong Yao Cai. 1999;22:468-469.
13. Kitts D, Hu C. Efficacy and safety of ginseng, Public Health Nutr 2000;3:473-485.
14. Lee HJ. Study for the Toxicity of Kinds of Ginseng Radix Aqua - acupuncture Extract. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 1993;10(1):167-173.
15. Chen H, Feng R, Guo Y, Sun L, Zhou Y, Jiang J. Toxicity studies of Rhizoma Polygonati Odorati, J Ethnopharmacol, 2001;74:221-224.
16. Hwang SY, Kwon W, Chae HY, Cho YM, Lyu JM, Lee NJ 외 6인. Four-Week Repeated-Dose Toxicity Study on Mori folium. The korean journal of laboratory animal science, 2004;20(3) :274-282.
17. Ninomiya H, Kato S, Okuda H. Effects of Hachimi- jio-gan in aged rats, J Altern Complement Med, 2001;7:355-359.
18. Ryu JC, Kim KR, Kim HJ, Youn JY, Myung SW, Kim GH, Lee MJ, Chang IM. Genotoxicity study of bojungchisup-tang, an oriental herbal decoction-in vitro chromosome aberration assay in Chinese hamster lung cells and in vivo supravital-staining micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes, Arch Pharm Res. 1998;21:391-397.
19. Hwang SY, Kwon W, Chae HY, Cho YM, Lyu JM, Kim DG 외 6인. Four-Week Repeated-Dose Toxicity Study on Kamigui bitang. The korean journal of laboratory animal science, 2004;20(3) :267-273.
20. Bae YC, Choi BH, Kim DW, Hur JI, Byun JS, Kim DJ. Single Dose Toxicity Test of Bojungikkeehapdaehilkitang water extract in Male and Female ICR Mice. Korean J. Orient. Int. Med 2005;26(2):369-378.
21. Jung WS, Jeon KO, Cho DH, Park MY, Choi HY, Kim JD. Single Dose Toxicity Test of 'Mahwangyounpae- tang' Extract in Male ICR Mouse. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 2006;20(2):442-448.
22. Jeon KO, Cho DH, Park MY, Choi HY, Kim JD. Single Dose Toxicity Test of Mahwangyounpae-tang Extract in Male SD Rats. Korean J. Orient. Int. Med 2006;27(1):102-113.
23. Jeng-Yim, S., Mee-Yepn, P., Tae-Young, J., Hae-Yun, C. Jong-Dae, K., Hyeung-Sik, L., et al : Genotoxicity testing of aqueous extracts of Mahwangypunpae-tang, a polyherbal formula, Food and Chemical Toxicology, 2008;46: 3827-3831.
24. Sung IJ, Park MY, Kim JD. Mouse Single Oral Dose Toxicity Test and Bone Marrow Micronucleus Test of Mahwangbu jaseshin-tang

Extracts. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 2010;24(1):124-133.
25. Farrar P, LaRegina M. Diagnostic: Interstitial Pneumonia in Viral and Mycoplasmal Antibody-Free Sprague Dawley Rats. ACLDA NEWSLETTER (American Committee on Laboratory Animal Diseases), Fall 1997;18(1):5-9.
26. Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA Jr, Mackenzie WF. Pathology of the Fischer Rat. Academic Press Inc 1990.
27. Makoto Enomoto, Kaneyoshi Akazaki. Color atlas of Toxicological Pathology- Fundamental of Morphological Observation. Soft Science Publications 1987.
28. Greaves, P. Histopathology of preclinical toxicity studies; Interpretation and relevance in drug safety evaluation. Elsevier. 2000.