J of Oriental Neuropsychiatry 2012:23(2):121-128
Original article
http://dx.doi.org/10.7231/JON.2012.23.2.021

ACM의 Sprague-Dawley Rat 경구 단회 투여 독성시험

최우창, 정인철, 임종순*, 김승형†, 이상룡*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실, 대전대학교 한의과대학 생명예방과학교실*,
대전대학교 동서생명과학연구원†

Single Oral Dose Toxicity Test of ACM*(Added Chongmyung-tang)* in Sprague-Dawley Rat

Woo-Chang Choi, In-Chul Jung, Jong-Soon Lim*, Seung-Hyung Kim†, Sang-Ryong Lee*

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University
*Dept. of Life Science and Preventative Medicine College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University**
Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Dae-Jeon University†

Abstract

Objectives :

This research investigates the single oral dose toxicity of ACM in SD rats.

Methods :

ACMs were administered to female and male SD rats, as an oral dose of 5000 ㎎/㎏. Animals were monitored for the mortality and changes in the body weight, clinical signs and gross observation during the 14 days after dosing, upon necropsy.

Results :

We could not find any mortality. Compared with the control group, significant weight change was not observed in the experimental group. First day after administration, compound-colored stool was observed in all rats. After the second day of administration, **the more common symptoms were not observed**. There were no gross abnormalities in all cases. [ED NOTE: highlight: given the context, this is very vague]

Conclusions :

The results obtained in this study suggest that the approximate lethal dose of ACM in both female and male rats were considered as over 5000 ㎎/㎏.

Key Words:

ACM, Added Chongmyung-Tang, single oral dose toxicity, SD rats

Received : May 25, 2012; Revised : June 07, 2012; Accepted : June 21, 2012

Correspondence : Sang-Ryong Lee, Address : Daejon Univ. College of Oriental Medicine, Yongun-dong, Dong-gu, Daejeon, Korea
Tel : 043-229-3726, Fax : 043-253-8757, E-mail : 7575np@dju.kr

*This study was supported by a grant of the Traditional Korean Medicine R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (Task-specific number: B090020)

Ⅰ. 서론

치매는 뇌의 후천적인 대뇌피질 기능저하에 따른 지적능력, 인지 및 정신기능의 쇠퇴와 나아가 인격 및 정서 변화까지 발전하는 질환이다[1,2]. 치매는 알츠하이머 치매, 뇌혈관성치매, 그리고 기타 여러 가지로 구분되는데[3,4], 치매 원인 중 가장 큰 비율을 차지하는 것은 알츠하이머병으로 전체 치매 중 50~60%의 비율을 차지한다[5].

한의학에서 痴呆는 '痴獃', '呆病', 등으로 언급된 기록[6-8]을 찾아볼 수 있고, 精氣不足, 脾腎虧虛, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 氣血虛弱 등으로 辨證하고 있다[5].

聰明湯은 『東醫寶鑑』[9]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 하여 건망을 치료하는데 사용한다고 기술되어 있고, 健忘및 痴呆 등의 병증에 활용되고 있다[10].

김[11] 등이 건망유도백서에 대한 연구에서 聰明湯이 학습과 기억에 유의한 효과가 있음을 보고한 이래, 최근 한의학계에서 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方이 치매의 치료와 예방에 응용될 수 있다는 가능성을 제시한 연구[12-16]가 진행되었다.

巴戟天과 山査肉은 Alzheimer's Disease 병태모델에 대한 연구[17,18]에서 항콜린작용과 APP발현 억제효과를 보여 두 약물이 치매의 예방과 치료에 활용될 수 있음을 실험적으로 확인된 바 있고, 聰明湯과 巴戟天 또는 山査肉을 加味한 巴戟天聰明湯, 山査聰明湯에 대한 추가적 연구에서 모두 기억력 감퇴 억제 효과, 항염증효과, 뇌세포 보호효과, 행동개선효과를 확인한 바 있다[19,20].

한편, 최근 안전성이 확보되지 않은 식품 및 의약품의 오남용으로 인한 독성 및 부작용이 늘어나고 있어 이에 대한 철저한 규제 및 관리가 필요한 실정이다[21]. 한약 자체의 독성평가로 단미제에 대한 최근 독성연구로는 麻黃[22], 猪苓[22], 金銀花[23], 蒲公英[24] 등에서 독성 연구가 수행되어져 왔고, 복합 처방에 대한 최근 연구로는 麻黃附子細辛湯[25], 二陳湯加味方[26], 六味地黃湯加味方[27], 補中益氣湯[28] 등에서 독성연구가 수행되어져 왔다.

이에 본 연구팀은 聰明湯에 巴戟天, 山査肉을 加한 처방을 ACM으로 命名하고 한약제제개발 연구를 진행한 바 있고, 안전성에 대한 연구의 일환으로 GLP기관에서 암수 SD Rat를 이용하여 단회 경구투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위한 시험을 실시한 바, 약간의 지견을 얻어 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시험기관

GLP기관인 (주)바이오톡스텍에서 시험의 전 과정을 진행하였다.

본 동물보호법에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호 09940).

2. 시험 동물 및 사육환경

1) 시험 동물

본 시험에서는 Sprague-Dawley Rat를 사용하였다. Sprague-Dawley Rat는 의약품 등의 안정성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다. 5주령의 수컷(체중 122.6~138.8 g), 암컷(체중 106.1~115.6 g) 각각 12마리의 Sprague-Dawley Rat를 입수하여, 7일간의 순화기간을 거쳐 각각 10마리를 선발하여 6주령의 수컷(체중 160.4~176.0 g), 암컷(체중 127.7~140.4 g)을 시험에 사용하였다. 반입시 외관 검사를 실시하고 전자저울(CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

2) 사육환경

순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도(19.0~22.9℃), 상대습도(37.7~61.9%), 환기횟수(10~15회/시간), 명암주기(12시간/일, 오전 7시부터 오후 7시), 조도(150~300 lx)가 조절된 사육실에서, 스테인레스 철망 사육상자(260W×350D×210H㎜)에 검역, 순화기간에는 3마리, 관찰기간에는 1마리씩 수용하여 사육하였다. 사육상자 및 급이기는 1회/2주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

사료는 실험동물용 고형사료(Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.)를 급이기에 넣어 자유섭취 시켰다. 사료의 분석 및 확인은 Harlan Laboratories,Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 허용범위 내에 속하는지 확인하였다. 음수는 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하고, 자동급수장치로 자유섭취 시켰다. 음수의 분석 및 확인은 충청북도 보건환경연구원에 의뢰하여 '먹는 물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙'의 전 항목에 대하여 허용범위 내에 속하는지 확인하였다.

3. 시험물질 및 투여

1) 시험물질

본 실험에 사용한 ACM은 (주)경방신약에서 표준화하여 공급받았고, 한 첩당 약재구성은 다음과 같다(Table Ⅰ). 시험물질은 전자저울(CP323S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 용기에 넣고 일부의 부형제를 가한 후 균질화기(ARE-250, THINKY, Japan)를 이용하여 현탁시켰다. 조제병에 조제물을 옮긴 후, 부형제를 가하여 규정농도(500 ㎎/㎖)로 조제하였다. 부형제는 주사용수(GBA9003, Choongwae Pharma Corp., Korea)를 사용하였다. 조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

Table Ⅰ. Amount and Composition of ACM(Added Chonhmyung-Tang)

Herb	Scientific Name	Amount (g)
白茯神	*Poria cocos Walf*	4
遠志	*Polygala tenuifolia*	2
石菖蒲	*Acori Gramineus Soland*	4
巴戟天	*Morinda officinalis*	2
山査	*Crataegus pinnatifida*	2
Total		14

2) 투여절차

시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 시험 투여경로를 경구투여로 선택하였다. 투여액량은 10 ㎖/㎏으로 하고, 개체별 투여액량은 투여당일 절식 후 체중을 기준으로 산출하였고, 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위내에 단회 강제투여 하였다. 모든 동물은 투여전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

3) 군 분리 및 투여용량 설정

군 분리는 모든 동물에 대하여 순화종료일에 실시하였고, 군 분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 10마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군 분리 하였다.

본시험의 예비시험으로 5000 ㎎/10 ㎖/㎏을 암컷 2마리에 단회 경구투여한 결과 사망 례가 관찰되지 않아, 5000 ㎎/㎏의 단일 시험물질 투여군을 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ. Composition of Group

Group	Dose (㎎/㎏)	Administered fluid volume(㎖/㎏)	Number of animals(Object Numbers)	
			Male	Female
G1 Control group	0	10	5(1101~1105)	5(2101~2105)
G2 Experimental group	5000	10	5(1201~1205)	5(2201~2205)

4. 관찰 및 검사

1) 일반증상 관찰

투여당일에는 투여 후 30분까지는 빈번하게, 1,2,4, 및 6시간째에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

2) 체중 측정

체중은 투여당일 투여 전, 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일(부검일)에 측정하였다.

3) 부검

관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO_2 가스 마취하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다.

4) 조직병리학적 검사

부검 시 수컷 대조군에서 육안소견이 관찰되었으나, 대조군에서 우발적으로 관찰된 것으로 판단하여 조직병리학적 검사를 실시하지 않았다.

5) 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS(version 9.1.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 5%). 등분산성인 경우 Student t-test 를, 등분산성이 기각되면 Aspin-Welch t-test 를 실시하여 유의성을 확인하였다(유의수준: 양측 5% 및 1%).

Ⅲ. 결 과

1. 사망유무

관찰기간동안, 암수 5000 ㎎/㎏ 투여군에서 사망례는 없었다(Table Ⅲ).

Table Ⅲ. Mortality and Approximate Lethal Dose of Single Oral Dose Toxicity Study in SD Rats

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Day after dosing														Mortality (dead/total)	Approximate lethal dose (mg/kg)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 % (0/5)	> 5000
	G2 5000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 % (0/5)	
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 % (0/5)	> 5000
	G2 5000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 % (0/5)	

2. 일반증상

수컷 대조군에서 투여 후 10일부터 어깨의 상처(wound)와 가피형성(crust formation)이 1례에서 관찰되었다.

암수 5000 ㎎/㎏ 투여군에서 투여 후 1일에 약물혼입변(compound-colored stool)이 전례에서 관찰되었다. 투여 후 2 일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다(Table Ⅳ).

Table Ⅳ. Clinical Signs of Single Oral Dose Toxicity Study in SD Rats

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Hour (Day 0) after dosing				
				0.5	1	2	4	6
Male	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5
	G2 5000	5	NAD	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5
	G2 5000	5	NAD	5	5	5	5	5

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Day after dosing													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4
			Wound (shoulder)										1				
			Crust formation (shoulder)										1	1	1	1	1
	G2 5000	5	NAD		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Compound-colored stool	5													
Female	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5000	5	NAD		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Compound-colored stool	5													

NAD: No Abnormalities Detected

3. 체중변화

관찰기간동안, 암수 5000 ㎎/㎏ 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다(Fig. 1,2, Table Ⅴ).

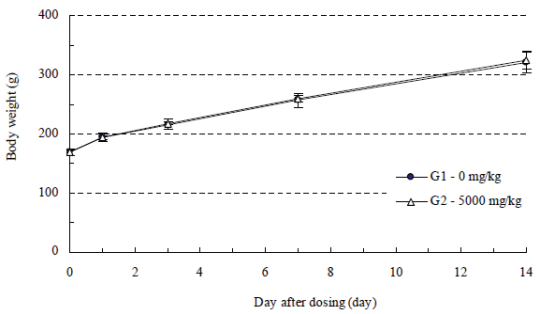


Fig. 1. Body Weights of Single Oral Dose Toxicity Study in Male SD Rats

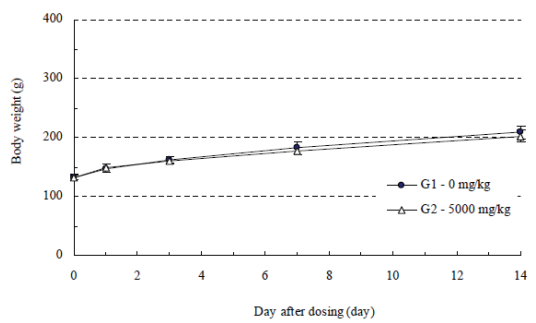


Fig. 2. Body Weights of Single Oral Dose Toxicity Study in Female SD Rats

Table Ⅴ. Body Weights of Single Oral Dose Toxicity Study in SD Rats

(g)

Sex	Group / Dose (mg/kg)		Day after dosing 0	1	3	7	14	Gain 0~14
Male	G1	Mean	168.5	194.3	215.9	257.1	320.9	152.5
	0	S.D.	5.0	7.0	9.0	12.0	17.6	13.7
		N	5	5	5	5	5	5
	G2	Mean	169.3	193.5	217.7	259.7	324.4	155.1
	5000	S.D.	5.4	2.8	2.5	5.0	15.1	18.8
		N	5	5	5	5	5	5
Female	G1	Mean	132.2	147.5	162.5	182.2	208.8	76.6
	0	S.D.	3.5	6.7	6.1	9.9	10.7	9.1
		N	5	5	5	5	5	5
	G2	Mean	132.7	148.5	161.3	177.3	202.5	69.8
	5000	S.D.	4.9	7.0	6.6	6.4	10.8	7.5
		N	5	5	5	5	5	5

4. 육안적 부검소견

부검시, 수컷 대조군 1례에서 어깨의 가피(crust)가 관찰되었으나, 대조군에서 우발적으로 관찰된 것으로 판단하여 조직병리학적 검사를 실시하지 않았다. 암수 5000 ㎎/㎏ 투여군 전례에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다(Table Ⅵ).

Table Ⅵ. Necropsy Findings of Single Oral Dose Toxicity Study in SD Rats

Organ / Findings	Sex	Male		Female	
	Group	G1	G2	G1	G2
	Dose (mg/kg)	0	5000	0	5000
	No. of animals	5	5	5	5
	No remarkable findings	4	5	5	5
	No. of examined	5	5	5	5
Skin	-Crust, shoulder	1	0	0	0

External surface and organs in body cavity were not remarkable.

Ⅳ. 고 찰

치매는 WHO가 지정한 21세기 3대 질환 중 하나로[29], 미국의 경우 사망요인의 네 번째, 단일 질환으로는 첫 번째를 차지한다고 보고되고 있고[30,31], 우리나라 역시 이미 심각한 사회문제로 대두되어 있으며[2], 노인인구의 증가[1]와 더불어 2020년에는 치매 환자 수가 72만 명에 이를 전망이다[32].

치매는 뇌의 퇴행성 변화에 의한 AD와 뇌혈관성 치매, 두가지가 혼재된 혼합형 치매 등으로 나눌 수 있다[5,33].

이중 가장 큰 비율을 차지하는 AD[5]는 언어 장애[33], 지남력의 저하[33], 지각능력의 장애[34] 등의 임상 증상을 보이며, 뇌신경세포의 전체적인 위축[35], 뇌실의 확대[33], 피질 및 회백질에서의 베타 아밀로이드 단백질 침착[36], 뇌세포 내 알루미늄과 망간농도 증가로 인한 신경세포의 손상[31], 콜린성 신경전달장애[1] 등의 병리적 소견을 보인다. 현재로서는 확실한 원인적 치료약은 없는 실정이다[36].

본 연구팀은 보건복지부의 지원을 받아 한의약 선도기술개발사업 중 치매치료 한방신약 ACM 개발 연구를 진행하였다.

본 연구에 사용된 ACM은 聰明湯에 실험적으로 치매치료 효과가 입증된 山査肉과 巴戟天이 加味된 처방으로, 聰明湯은 『東醫寶鑑』[9]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술되어 있고, 痰濁 및 心虛로 인한 痴呆 및 健忘 등의 병증을 치료하는데 활용되고 있다[10].

최근 한의학계에서는 치매의 치료와 예방에 聰明湯 및 여러 가지 聰明湯加味方을 활용하는 연구[12-16]와, 巴戟天[17]과 山査肉[18]을 활용하는 연구가 진행되었다. 聰明湯에 巴戟天 또는 山査肉을 加味한 巴戟天聰明湯[19], 山査聰明湯[20]에 관한 연구에서는 IL-1β, TNF-α 발현 억제 및 생산량 감소, AChe 활성 억제 등의 효과가 확인되어 ACM의 AD 예방 및 치료에 대한 가능성이 제시 되었다고 할 수 있다.

본 연구에서는 ACM의 안정성에 대한 객관적 근거를 확보하기 위하여 ACM을 Sprague-Dawley계 암수 6주령 Rat에 단회 경구투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 시험을 실시하였다.

군 구성은 시험물질 5000㎎/㎏의 용량과 대조군(주사용수)의 2군으로 하고, 군당 암수 각각 5마리씩 단회 경구투여 하였다.

ACM에 대한 급성독성 시험을 실시한 결과, 대조군 및 5000㎎/㎏의 용량으로 투여한 모든 Rat가 사망하지 않았으며, 또한 시험기간 중 ACM 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다. 암수 5000 ㎎/㎏ 투여군에서 투여 후 1일에 약물혼입변(compound-colored stool)이 전례에서 관찰되었으며, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 부검소견 결과 부검시, 수컷 대조군 1례에서 어깨의 가피(crust)가 관찰되었으며 암수 5000 ㎎/㎏ 투여군 전례에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다. OECD 시험물질의 급성독성시험에 대한 guideline[37]에서는 시험시 2000 ㎎/㎏을 한계용량으로 추천한다. 본 시험 결과, Rat의 ACM에 대한 개략의 치사량은 암수 모두에서 이보다 높은 5000 ㎎/㎏ 용량을 상회하는 것으로 판단되므로 ACM은 비교적 안전 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

ACM을 5000 ㎎/㎏ 용량으로 Rat에 단회투여 독성시험을 수행한 결과, 다음의 결과를 얻었다. 암수 5000 ㎎/㎏ 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 암수 5000 ㎎/㎏ 투여군에서 투여 후 1일에 약물혼입변이 관찰되었다. 체중 및 부검에서는 암수 5000 ㎎/㎏ 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다. 따라서 Rat의 ACM에 대한 개략의 치사량은 암수 모두 5000 ㎎/㎏을 상회하는 것으로 판단된다.

References

1. Byun YS, Lee JI. A Study on Snile Dementia. Nursing Science. 1997;9(2):63-75.
2. Shine YJ, Choi YG, Jang WS. The Effect of Moxibustion Therapy on Dementia Patients; Evaluated by K-BNT. The Journal of East-West Medicines. 2011;36(2):51-61.
3. Eom HS. Effects of Gamisinsunbulo-dan on Learning and Memory Function in the Dementia Rat by Ibotenic acid Damage. Korean Journal Of Oriental Medical Pathology. 2002;16(6):1151-6.
4. Ann TW, Hong S, Kim HC. The literatual study on the cerebral vascular dementia in oriental and occidental medicine. Korean journal of oriental medicine. 1996;2(1):40-70.
5. The Textbook compilation Committee of Neuropsychiatry of oriental medical schools in nation. Oriental Neuropsychiatry. Gyeonggi:

Jipmoondang. 2007:324-33.
6. Zhang Jie Bin. Jing Yue Quan Shu. Seoul: Hansungsa. 1978:610-1.
7. Chen Shi Duo. Shi shi mi lu. Beijing:China Press of Traditional Chinese Medicine. 1991:125
8. Qian Jing Hu. Bian zheng qi wen quan shu. Taipei:Gandhi Press. 1990:222-5, 233-5.
9. Huh J. Dong ui bo gam. Seoul:Dong ui bo gam publisher. 2005:98-100.
10. Lee SI. Clinical applications of herbal medicine. Seoul:Seongbosa. 1990:151-3, 308-13, 419-20, 426-8.
11. Kim YW, Song TW, Oh MS. Effect of Chong myungtang on learning and memory in normal and scopolamine-induced amnestic mice. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine. 1998;8(2): 464-79.
12. Lim JH, Lee SR. The Effects of PalMihapChong MungTang(PMCMT) Hot Water Extract & Ultra-fine Powder on the Alzheimer's Disease Model. Journal of oriental neuropsychiatry. 2008; 19(2):95-110.
13. Kim HJ, Lee SR. The Effects of KakamBoyang Hwanoh-Tang(KBHT) and PalMihapChongMung-Tang(PMCMT) on Protecting Microglia and Inhibiting Acetylcholinesterase and Oxidants. Journal of oriental neuropsychiatry. 2008;19(2): 65-75.
14. Lee SH, Jung IC, Lee SR. Effect of KwyBi ChongMung-Tang Hot Water Extract & Ultra-fine Powder on the Alzheimer's Disease Model. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2007;21(4):921-33.
15. Choi KW, Lee SR, Jung IC. Effects of ChongMyung-Tang and ChongMyung-Tang added Hibiscus syriacus Hot water extract & Ultra-fine Powder on Microglia and Memory Deficit Model. Journal of oriental neuropsychiatry. 2006;20(5):1200-10.
16. Park JU, Jung IC, Lee SR. The Effects of Chong MyungTang(CMT) and ChongMyungTang added Hibiscus syriacus(MCMT) Extract on the Alzheimer`s Disease Model Induced by CT-105 and βA. Journal of oriental neuropsychiatry. 2006;17(1): 37-5.
17. Kim HS, Jung IC, Lee SR. Effects of Morinda officinalis (MDOF) on Inhibition of Impairment of Learning and Memory, and Acetylcholinesterase in Amnesia Mice. Journal of oriental neuropsy chiatry. 2003;14(1):45-58.
18. Chae JG, Jung IC, Lee SR. The Effects of Crataegus prinnatiflora BGE. var. major N.E. BR(CPVM) Extract on the the Alzheimer's Disease Model Induced by CT105. Journal of oriental neuropsychiatry. 2002;13(1):79-115.
19. Lim JH, Jung IC, Lee SR. The Effects of ChongMyungTang(CMT) and ChongMyungTang added Moutan Cortex(PCMT) Hot water extract & Ultra-fine Powder on Microglia and Memory Deficit Model. Journal of oriental neuro psychiatry. 2006;20(4):997-1008.
20. Ha SY, Jung IC, Lee SR. The Effects of ChongMyungTang(CMT) and SanSaChongMyung Tang(SCMT) on the Alzheimer`s Disease Model. Journal of oriental neuropsychiatry. 2006;17(1): 59-78.
21. Kyung Hee University College of Pharmacy. Studies on establishment of functional food evaluation standard system. Seoul:Korea Food&Drug Administration. 2002.
22. Nguyen Thi Phuong Thao, Tran Manh Hung, To Dao Cuong, Huh JI, Kwack SJ, Kim JM, Kang TS, Lee JH, Woo MH, Choi JS, Kang SS, Bae KH. Min BS. Analysis and Stability Test of the Extract from Ephedrae Herba, Phytolaccae Radix and Polyporus for Toxicity Study. Korean Journal of Pharmacognosy. 2010. 41(2):141-6.
23. Yoo HJ, Park MY, Choi HY, Kim JD. Mouse Single Oral Dose Toxicity Test of Lonicerae Flos Aqueous Extracts. Journal of korean oriental internal medicine. 2010;l31(3):539-53.
24. Gu JH, Kim SR, Lee JW, Park MY, Choi HY, Kim JD. Mouse Single Oral Dose Toxicity Test of Taraxaci Herba Aqueous Extracts. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2011; 25(4):650-7.
25. Sung IJ, Park MY, Kim JD. Mouse Single Oral Dose Toxicity Test and Bone Marrow Micronucleus Test of Mahwangbujaseshin-tang Extracts. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2010;24(1):124-33.
26. Kim DJ. Single Oral Dose Toxicity Test of

Iijintanggami-bang a Polyherbal Formula in ICR Mice. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2010;24(6):1019-26.

27. Park MY. Single Oral Dose Toxicity Test of Yukmijihwangtanggamibang, a Polyherbal Formula in ICR Mice. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2011;25(1):122-31.
28. Kim JD. Single Oral Dose Toxicity Test of Bojungikkitang(Buzhongyiqi-tang) Aqueous Extract in ICR Mice. Korean Journal of Oriental Preventive Medical Society. 2011 ; 15(2) : 21-38.
29. Um SY, Kwak YS. Effects of one Year Exercise on ADL & Lipid Profiles in Male Patients with Dementia. Journal of life science. 2005;15(5): 763-6.
30. Han SH. Borders between Alzheimer's disease and vascular dementia: Vascular factors in Alzheimer's disease. Korean Journal of Stroke. 2000;2(2):134-6.
31. Bae OS. A constitutional medical research on senile dementia. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine. 1992;13(2):101-6.
32. Kim HG. Living and Behavioral Differentials of the Elderly's Dementia in Daegu. Korea journal of population studies. 2005;28(2):165-82.
33. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature. 1999;402:537-40.
34. Cho HS, Chae EB. Factors Associated with Functional Dependence in Alzheimer's Disease. Academic journal of Kwandong university college of medicine. 1999;3(1):113-23.
35. Lee AY, Sohn EH, Park HJ. Differentiation of Alzheimer`s Disease from Vascular Dementia Using the Modified Mini- Mental State Examination. Journal of the Korean neurological association. 2002;20(6):624-9.
36. Kim SR. A literature study on Alzheimer. The New medical journal. 1997;40(10):88-102.9-56.
37. OECD. OECD Guidelines for Testing of Chemical No. 423. Acute Oral Toxicity-Acute Class Method, Line 23 (Limit test). 2001. Available from: URL:http://www.oecd.org/dataoecd/17/50/1948370.pdf