J of Oriental Neuropsychiatry 2012:23(3):143-160
Original article http://dx.doi.org/10.7231/JON.2012.23.3.143

ACM의 Rat를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

박대명, 이상룡, 임종순*, 김승형†, 정인철

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

A Thirteen Week Repeated Oral Dose Toxicity Test and A Four Week Recovery Test of ACM(*Added Chongmyung-tang*) in Sprague-Dawley Rats

Dae-Myung Park, Sang-Ryong Lee, Jong-Soon Lim*, Seung-Hyung Kim†, In-Chul Jung

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea
*Dept. of Life Science and Preventative Medicine College of Oriental Medicine, DaeJeon University**
Institute of Traditional Medicine and Bioscience, DaeJeon University†

Abstract

Objectives :

To provide information on the safety of ACM, we carried out a 13-week repeated oral dose toxicity and a 4-week recovery test of ACM in Sprague-Dawley rats.

Methods :

Female and male rats were treated with ACM with oral doses of 800, 2000, and 5000 ㎎/㎏. The ACM was administered for 13 weeks. Mortality, clinical signs, body weight changes, food consumption, ophthalmologic findings, urinalysis, hematological and biochemical parameters, gross findings, organ weights and histological markers were monitored during the study period. Moreover, the rats were monitored for 4 extra weeks to determine recovery time after the study period.

Results :

We found no mortality and no abnormalities in clinical signs, body weight, food consumption, ophthalmologic findings, urinalysis, hematological and biochemical parameters, gross findings, organ weights and histological markers in any of the rats tested.

Conclusions :

The no-observed adverse effects level (NOAEL) was considered as over 5000 mg/kg for male and female rats.

Key Words :

ACM, Added Chongmyung-Tang, 13 week repeated oral dose toxicity test, 4 week recovery test, SD rats.

Received : August 17, 2012; Revised : September 13, 2012; Accepted : September 13, 2012

Correspondence : In-Chul Jung, Address : Daejon Univ. College of Oriental Medicine, Yongun-dong, Dong-gu, Daejeon, Korea.
Tel : +82-42-470-9129, Fax : +82-42-470-9006, E-mail : npjeong@dju.ac.kr

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

I. 서론

알츠하이머병(Alzheimer's Disease; AD)은 대표적인 퇴행성 신경질환으로 노인성 치매를 야기하며 지적 황폐화뿐만 아니라 행동 이상 및 인격 변화를 초래하게 되는 상태이다[1]. 노인반점(senile plaques)과 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangle)가 병리학적 특징으로 나타나며[2] 원인으로 β-amyloid(βA)로 유발된 신경독성[3]과 산화적 손상[4], 콜린성 신경원의 소실[5] 등이 제시된다. AD는 60세 이후로는 나이가 듦에 따라 발생 빈도가 점진적으로 증가하므로 노인 인구가 증가하고 있는 나라에서는 중대한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다[6].

한의학에서 치매는 呆病, 健忘, 癲狂, 虛勞 등에서 유사한 증상이 언급되고 주요 원인은 年老體虛, 情志失調, 飮食失調, 中毒外傷이며 치법은 補益精氣, 補腎健脾, 豁痰化濁, 行氣活血, 淸熱解毒, 益氣養血 등이다[1].

ACM은 聰明湯에 山査肉, 巴戟天을 가한 처방으로 聰明湯은 『東醫寶鑑』[7]에 "治多忘, 久服能日誦千言"이라 기술되어 있고 이후 健忘 및 痴呆 병증 치료에 사용되고 있으며[8] 최근 聰明湯과 여러 聰明湯加味方이 치매에 효과적인 치료제로 활용 될 수 있다는 다양한 연구 결과가 발표되었다[9-13].

巴戟天은 補陽藥으로 분류되고 補腎陽, 壯筋骨, 祛風濕하는 효능으로 陽痿遺精, 宮冷不孕, 風濕痺痛, 腰膝酸軟 등을 치료하며 腎陽의 부족으로 인한 제 증상에 활용되고 있고[14], 김[15] 등은 巴戟天이 항콜린작용과 아밀로이드 전구단백질(amyloid precursor protein; APP)과 PS-1, PS-2 발현 억제능력을 보여 치매 치료에 활용될 수 있다는 결과를 확인하였다.

山査肉은 行氣消食, 健脾開胃 하는 효능으로 食積不消, 脘腹脹滿을 치료하며[14], 채[16] 등은 山査肉이 PC-12 cell의 IL-1β, IL-6, APP, AChE,gFAP mRNA의 발현을 억제하고 microglial cell에서 IL-1β, TNF-α의 발현과 ROS, NO의 생성을 억제하여 치매의 치료에 활용될 수 있다고 보고하였다.

추가적인 연구를 통해 山査聰明湯과 巴戟天聰明湯의 항염증효과, 기억력 감퇴 억제 효과, 뇌세포 보호효과, 행동개선효과가 확인되었고[17,18] 聰明湯에 巴戟天, 山査肉을 가한 聰明湯加味方이 BACE 효소활성과 βA의 과다 생성을 억제하는 효과로 치매 치료에 효과가 있음이 확인되었다[19].

이에 본 연구팀은 현재까지 이루어진 聰明湯, 巴戟天, 山査肉 및 聰明湯에 巴戟天, 山査肉을 가한 聰明湯加味方이 치매 치료에 효과적으로 활용될 수 있다는 이전의 연구 결과를 바탕으로, 치매 치료 한방신약 개발의 일환으로 聰明湯에 巴戟天, 山査肉을 가한 ACM의 안정성에 대한 연구를 수행하였다. 본 연구에서는GLP기관에서 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 ACM을 13 주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안정성을 평가하고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하였다.

II. 방법

1. 시험기관

시험의 전 과정을 GLP기관인 (주)바이오톡스텍에서 진행하였다.

본 시험은 동물보호법에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호 100208).

2. 시험 동물 및 사육환경

1) 시험 동물

본 시험에서는 SPF(specific pathogen-free) Sprague-Dawley계 랫드를 사용하였으며 Sprague-

Dawley계 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다. 입수 시에는 5주령 수컷 56마리, 111.4~132.4g, 5주령 암컷 56마리, 97.1~114.4g 이었으며 투여개시 시에는 6주령 수컷 50마리, 176.7~204.0g, 6주령 암컷 50마리, 140.8~170.4g 이었다. 반입 시 동물의 외관 검사, 체중 측정을 하였고 7~8일간의 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 일반증상 및 체중변화를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

2) 사육환경

스테인리스 철망 사육상자(260W × 305D × 210H mm)에 검역, 순화기간 동안 2~3마리, 관찰기간 동안 1마리를 사육하였다. 온도는 21.5~23.5℃, 상대습도 34.9~65.5%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간/일(오전 7시~오후 7시), 조도 150~300 Lux로 설정하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(Harlan Laboratories, Inc., USA)를 사용하였고 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시켰다. 음수는 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과한 후 자외선을 조사하였고, 자동급수장치로 자유섭취 시켰다. 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 '먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙' 의 전 항목에 대하여 실시하여 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다.

3. 시험물질 및 투여

1) 시험물질

본 실험에 사용한 ACM은 (주)경방신약에서 표준화하여 공급받았으며 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(80, 200, 500 ㎎/㎖)로 조제하였다. 한 첩당 약재구성은 다음과 같다(Table 1).

2) 투여절차

시험물질의 임상적용 예상경로가 경구이므로 경구투여를 선택하였고, 투여액량은 10 ㎖/㎏으로 하였으며 개체별 투여액량은 매주 1회의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 매일 오전에 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기(3, 5, 10 ㎖)를 이용하여 13주간 1일 1회 위내에 강제투여하였다.

3) 군 분리 및 투여용량 설정

군 분리는 순화 종료일에 실시하였고 평균 체중에 가까운 암수 각 50마리를 선발하였다. 선발한 동물은 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 대조군 및 고용량군은 군당 15마리, 저용량군 및 중용량군은 군당 10마리로 군 분리 하였다(Table 2).

Table 1. Prescription 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	*Acorigramineus Soland*	4
巴戟天	*Morinda officinalis*	2
山査	*Crataegus pinnatifida*	2
Total		14

Table 2. Composition of group

Group	Dose (mg/kg)	Administered fluid volume (㎖/kg)	Number of animals(Objective numbers)	
			Male	Female
G1 Controlgroup	0	10	10 (1101~1110)	10 (2101~2110)
			+5* (1111~1115)	+5* (2111~2115)
G2 Low dosegroup	800	10	10 (1201~1210)	10 (2201~2210)
G3 Medium dosegroup	2,000	10	10 (1301~1310)	10 (2301~2310)
G4 High dosegroup	5,000	10	10 (1401~1410)	10 (2401~2410)
			+5* (1411~1415)	+5* (2411~2415)

* : Recoverygroup

반복투여 용량결정시험(Biotoxtech Study No.: M09008) 결과 5,000 mg/kg 용량에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화가 관찰되지 않았다. 따라서 임상적용 예정용량(약 3,181 ㎎/human/day, 성인 60 ㎏ 기준시 약 53 mg/kg)의 약 94 배인 5,000 mg/kg 을 고용량으로 설정하고, 공비 2.5를 적용하여 2,000 및 800 mg/kg을 각각 중용량 및 저용량의 투여용량으로 설정하였다. 대조군에는 부형제인 주사용수를 투여하였다.

4. 관찰 및 검사

이하의 관찰, 측정 및 검사일은 투여 개시일을 0일로 하여, 투여 개시일로부터 7일간을 투여 1주로 계산하고, 회복 개시(투여 종료 후 익일)부터 7일간을 회복 1주로 하였다.

1) 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하고, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 관찰은 투여 기간 동안 모든 동물에 대하여 투여 0일부터 13주간 실시하고, 13주간의 투여 종료 후 회복군에 대하여 4주간 실시하였다.

2) 체중 측정

모든 동물에 대하여, 투여 개시일(투여 전), 투여 개시 후 및 회복기간에 주 1회, 부검일에 체중을 측정하였다. 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로 체중 평가에서 제외하였다. 회복군의 경우 투여 종료 후 익일 체중을 측정하였다.

3) 사료섭취량 측정

투여 개시 전의 사료섭취량은 군 분리 일로부터 투여 개시 일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 관찰기간(투여기간 및 회복기간)에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균 섭취량을 산출하였다. 투여 13주 및 회복 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균 섭취량을 산출하였다.

4) 안과학적 검사

주시험군은 각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에, 회복군 모든 동물에 대하여 회복 4주에 실시하였다. 안과학적 검사는 산동제(Ocutropic ophthalmic drops, Samil pharma. Co., Ltd., Lot No. 019196, Korea)를 점안한 후, 육안 및 검안경(ALL PUPIL IL, Keeler, U.K)으로 전안부, 중간투광체, 안저에 대해서 실시하였다.

5) 뇨검사

주시험군은 각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에, 회복군 모든 동물에 대하여 회복 4주에 뇨검사를 실시하였다. 신선뇨(배설 후 약 3시간 이내

의 뇨) 및 축뇨(배설 후 약 24시간 뇨)를 수거하여 검사를 실시하였다. 신선뇨 채취 중에는 투여 및 사료급여를 실시하지 않고 음수는 자유섭취 시켰다. 검사항목은 pH, protein,glucose, ketone body, bilirubin, occult blood, 색상 및 투명도, 침사, 뇨량, 뇨비중 등이다.

6) 혈액학적 검사

모든 동물에 대하여 부검 전 약 18시간 이상 절식시킨 후 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1 ㎖를 EDTA 함유 tube에 넣은 후 혈구 분석기(ADVIA 120, SIEMENS, germany)로 측정하였다. 응고검사는 채취한 혈액 약 2 ㎖를 3.2% sodium citrate 함유 tube에 넣고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 혈장을 채취하였다. 응고시간 분석기(ACL 7000, Instrumentation Laboratory, U.S.A)로 측정하였다. 검사항목은 RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, WBC, WBC differential counting, reticulocytes, PT, APTT 등이다.

7) 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기(7080, HITACHI, Japan) 및 전해질 분석기(AVL9181, Roche,germany)로 측정하였다. 검사 항목은 ALT, AST, ALP,gGT, BUN, Crea, T-Bili, TP, Alb, A/G ratio, T-chol, TG, P,glu, Ca, Cl, Na, K 등이다.

8) 부검

모든 동물에 대해서 전신의 장기, 조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

9) 장기중량 측정

모든 동물에 대하여 뇌, 뇌하수체, 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 부신, 고환, 전립선, 난소, 자궁에 대한 습중량을 측정하고 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다. 신장, 부신, 고환, 난소는 좌, 우를 합하여 무게를 측정하였다.

10) 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 뇌, 뇌하수체, 갑상선, 부갑상선, 흉선, 폐, 기관지, 기관, 심장, 간, 비장, 신장, 부신, 타액선, 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 췌장, 고환, 부고환, 전립선, 정낭, 난소, 자궁, 질, 방광, 악하림프절, 장간막 림프절, 안구 및 하더리안선, 유선, 피부, 골수(대퇴골 및 흉골), 혀, 척수, 육안소견이 관찰된 장기, 조직(피부, 꼬리)의 장기, 조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정하고, 그 중 고환 및 안구는 Davidson 고정액에 고정하였다.

고정한 장기, 조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하여 박절한 후, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다. 골조직은 Calci-Clear-Rapid™ 액(National diagnostics, U.S.A)을 사용하여 탈회하였다. 잔여 장기, 조직은 10% 중성완충 포르말린용액에 보존하였다.

조직병리학적 검사는 대조군과 고용량군의 모든 개체, 중용량군과 저용량군의 육안소견이 관찰된 장기 및 조직(수컷 2,000 mg/kg 투여군의 고환, 암컷 800 mg/kg 투여군의 피부, 암컷 2,000 mg/kg 투여군의 자궁), 고용량군에서 시험물질에 의한 영향으로 사료되는 변화가 관찰된 경우, 중용량 및 저용량군의 해당 장기, 조직(암컷 난소)에 대하여 검경하였다.

11) 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 뇨량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 결과는 SAS(version 9.1.3, SAS Institute Inc., U.S.A)를 사용하여 검정하였다.

투여기간 및 주시험군의 측정치에 대해서 Bartlett test를 실시하여 유의수준 5%에서 등분산성을 검정하였다. 등분산성인 경우 One-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하여 유의수준 5%에서 유의성이 관찰되면 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다(유의수준 : 양측 5% 및 1%). 등분산성이 기각되면 Kruskal-Wallis test를 실시하여 유의수준 5%에서 유의성이 관찰되면 Steel's test의 다중검정을 실시하였다(유의수준 : 양측 5% 및 1%).

회복군의 측정치에 대해서, Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 유의수준 5%에서 검정하였다. 등분산성인 경우 Student t-test를, 등분산성이 기각되면 Aspin-Welch t-test를 실시하여 유의성을 확인하였다(유의수준 : 양측 5% 및 1%).

III. 결과

1. 일반 증상

관찰기간동안, 암수 대조군 및 시험물질투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

약물혼입변(compound-colored stool)이 800 mg/kg 투여군에서 수컷은 투여 1~4일부터, 암컷은 1~5일부터 투여기간동안 모든 동물에서 관찰되었고, 2,000 mg/kg 및 5,000 mg/kg 투여군은 모든 동물에서 투여 1일부터 투여기간동안 관찰되었다. 회복군 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 약물혼입변이 수컷은 투여 93일(회복 3일)까지, 암컷은 투여 92일(회복 2일)까지 관찰된 후 회복되었다. 따라서 약물혼입변은 투여기간동안 관찰되는 증상으로 시험물질 배설에 따른 착색변으로 판단되어, 시험물질의 독성변화는 아닌 것으로 사료된다. 그 외, 투여기간동안, 수컷 대조군 1마리에서 전지에 상처(wound) 및 가피형성(crust formation)이 관찰되었고, 800 mg/kg 투여군의 1마

Table 3. Summary of Clinical Signs

Group / Dose(㎎/kg)	No. of animals	Clinical signs	No. of animals affected
Sex : Male			
G1 / 0	15	Crust formation(right forelimb)	1
		Wound(left forelimb)	1
G2 / 800	10	Compound-colored stool	10
		Loss of teeth(upper teeth)	1
G3 / 2,000	10	Compound-colored stool	10
G4 / 5,000	15	Compound-colored stool	15
Sex : Female			
G1 / 0	15	Loss of teeth(upper teeth)	1
G2 / 8,00	10	Compound-colored stool	10
		Mass(left shoulder)	1
G3 / 2,000	10	Compound-colored stool	10
		Bloody stool	1
G4 / 5,000	15	Compound-colored stool	15

Table 4. Summary of Clinical Signs (Recovery period)

Sex : Male			
Group / Dose(㎎/㎏)	No. of animals	Clinical signs	No. of animals affected
G4 / 5,000	5	Compound-colored stool	5
Sex : Female			
G1 / 0	5	Exfoliation(tail)	1
G4 / 5,000	5	Compound-colored stool	5

리에서 이의 결손(loss of teeth)이 관찰되었다. 암컷 대조군 1마리에서 이의 결손이 관찰되었고, 800 mg/kg 투여군의 1마리에서 좌측 겨드랑이에 종양(mass)이 투여 70일부터 관찰되었으며 2,000 mg/kg 투여군의 1마리에서 혈변(bloody stool)이 투여 36, 37 및 39일에 관찰되었다. 회복기간 동안, 암컷 대조군 1마리에서 꼬리에 표피박리(exfoliation)가 투여 93일부터 관찰되었다. 이러한 증상은 일시적으로 관찰되거나, 1마리씩만 관찰되어 시험물질 투여에 기인한 영향은 아닌 것으로 사료된다(Table 3, 4).

2. 체중 변화

투여기간 동안 수컷 시험물질 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다. 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 9 및 10주에 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중증가가 관찰되었으나, 일시적인 것으로 시험물질에 의한 독성변화는 아닌 것으로 사료된다. 회복기간 동안 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1, 2).

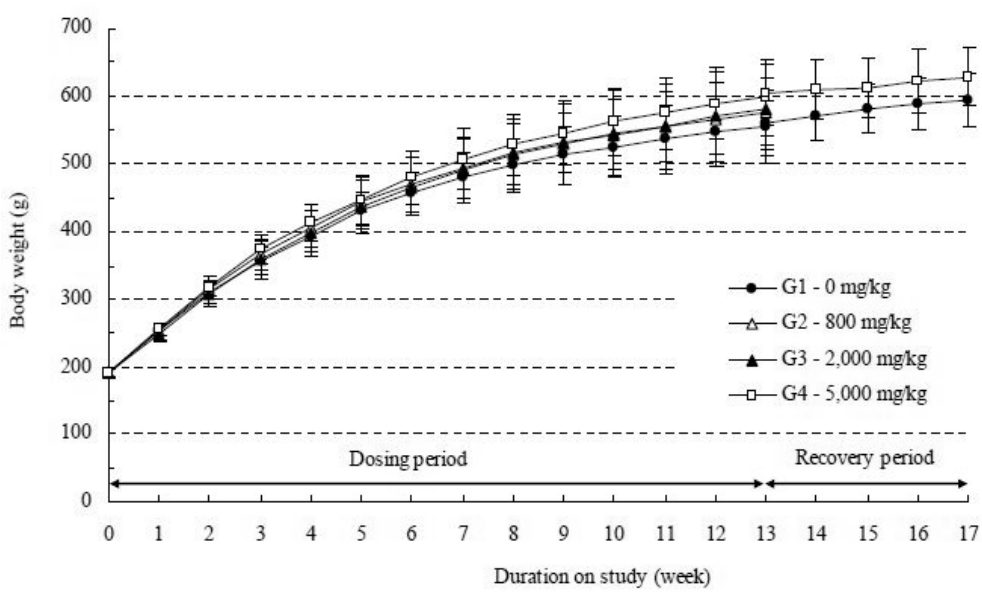


Fig. 1. Body Weights in Male SD Rats.

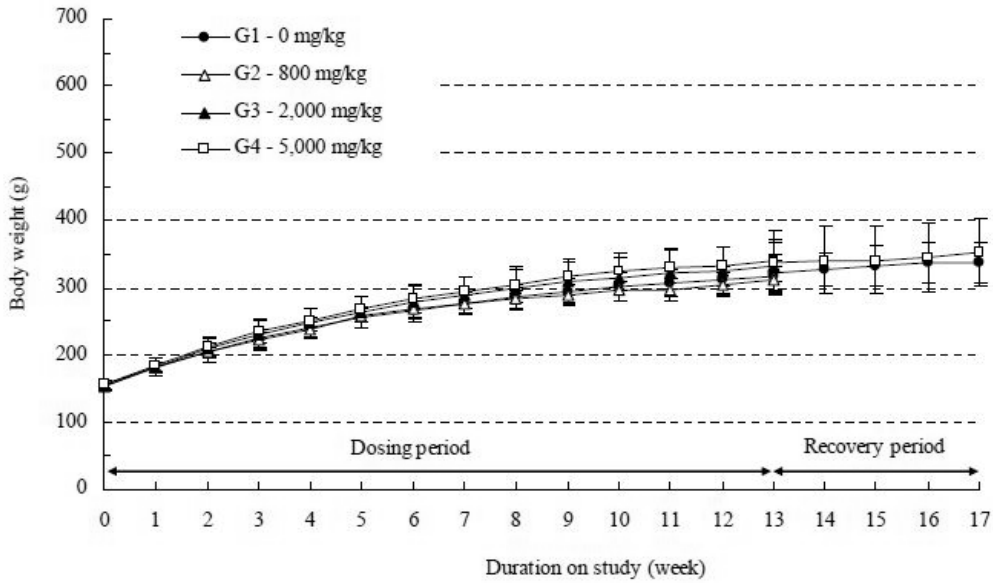


Fig. 2. Body Weights in Female SD Rats.

3. 사료섭취량

투여기간 동안, 암수 시험물질 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 사료섭취량 변화는 관찰되지 않았다. 회복기간 동안 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교 시 유의성 있는 사료섭취량 변화는 관찰되지 않았다.

4. 안과학적 검사

주시험군의 암수 시험물질 투여군과 회복군의 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 이상 소견은 관찰되지 않았다.

5. 뇨검사

주시험군의 암수 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외, 뇨의 투명도(transparency)의 변화, 뇨단백(protein), 케톤체(ketone body)가 관찰되었으나, 모두 미량의 검출로서 용량의존성이 없거나 신장의 형태학적 변화가 관찰되지 않았으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다.

회복군의 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외, 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 뇨량의 증가가 관찰되었으나 비교적 경미한 변동으로서, 주시험군에서 시험물질에 의한 영향이 인정되지 않았으며 신장의 형태학적인 변화도 관찰되지 않았으므로 독성학적인 의미는 없다고 사료된다. 또한, 뇨의 투명도의 변화, 뇨단백 및 케톤체가 관찰되었으나 대조군에서도 관찰되었거나 신장의 형태학적 변화가 관찰되지 않았으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다.

6. 혈액학적 검사

주시험군의 암수 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 수컷 800, 2,000 및 5,000 mg/kg 투여군 및 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서의 적혈구수(RBC)의 감소가 관찰되었으나 모두 경미한 변동으로서 망상

Table 5. Summary of Hematological Parameters (Maingroup)

Sex : Male

Group / Dose (㎎/kg)		RBC ($x10^6$ cells/㎕)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/dL)	PLT ($x10^3$cells/㎕)	Reti (%)
G1 0	Mean	9.12	15.3	45.8	50.3	16.8	33.4	1056	2.2
	S.D.	0.29	0.4	1.3	1.3	0.5	0.4	107	0.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 800	Mean	8.79*	14.6*	44.1*	50.2	16.7	33.2	1153	2.6
	S.D.	0.26	0.5	1.1	1.8	0.8	0.5	163	0.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,000	Mean	8.67**	15.0	44.9	51.8	17.3	33.4	1111	2.7
	S.D.	0.32	0.6	1.7	1.2	0.5	0.7	117	0.3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	8.71**	14.8	44.4	51.0	17.0	33.4	1067	2.4
	S.D.	0.19	0.5	1.3	1.5	0.6	0.4	126	0.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (㎎/kg)		WBC ($x10^3$ cells/㎕)	WBC Differential Counting(%) NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	PT (sec)	APTT (sec)
G1 0	Mean	8.13	22.9	70.9	3.8	1.3	0.1	14.9	17.2
	S.D.	1.37	9.7	9.7	0.7	0.3	0.0	0.5	1.1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 800	Mean	9.17	20.6	74.5	2.9	1.3	0.2	14.8	16.3
	S.D.	1.96	6.5	7.5	0.9	0.5	0.1	0.4	1.0
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,000	Mean	10.54	18.9	76.4	2.7*	1.3	0.2	14.5	15.5
	S.D.	3.68	5.5	6.3	1.0	0.4	0.1	0.5	2.1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	9.23	19.0	76.8	2.4**	1.1	0.2	14.8	15.8
	S.D.	1.13	6.9	7.2	0.6	0.3	0.1	0.6	2.0
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Sex : Female

Group / Dose (㎎/kg)		RBC ($x10^6$ cells/㎕)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/dL)	PLT ($x10^3$ cells/㎕)	Reti (%)
G1 0	Mean	8.10	14.6	43.0	53.1	18.0	34.0	1082	2.0
	S.D.	0.29	0.4	1.3	1.3	0.5	0.3	139	0.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 800	Mean	8.09	14.6	42.9	53.0	18.0	33.9	1071	2.1
	S.D.	0.31	0.5	1.7	1.5	0.5	0.5	76	0.3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,000	Mean	7.85	14.2	41.9	53.5	18.2	34.0	1018	2.3
	S.D.	0.47	0.5	1.6	1.9	0.6	0.4	336	0.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	7.72*	14.3	41.9	54.3	18.5	34.1	1122	2.5
	S.D.	0.27	0.5	1.2	2.1	0.8	0.5	133	1.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (㎎/kg)		WBC ($x10^3$ cells/㎕)	WBC Differential Counting(%) NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	PT (sec)	APTT (sec)
G1 0	Mean	4.21	15.8	79.4	2.2	2.0	0.2	14.5	14.3
	S.D.	1.08	5.3	4.7	0.7	0.7	0.1	0.8	1.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 800	Mean	4.40	18.5	76.9	2.5	1.6	0.1	14.8	15.5
	S.D.	1.94	5.9	6.8	1.1	0.6	0.1	0.5	0.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,000	Mean	4.24	18.6	77.1	2.1	1.6	0.1	15.0	15.6
	S.D.	0.59	6.0	6.5	0.6	0.7	0.1	0.6	1.1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	4.69	17.6	77.5	2.4	1.4	0.2	14.8	15.7
	S.D.	1.33	6.9	7.3	0.9	0.3	0.1	0.6	1.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test : * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

적혈구수(Reti) 등 빈혈과 연관된 다른 적혈구 관련 항목의 변동이 없고 비장 및 간에서 조혈과 관련된 형태학적 변화가 관찰되지 않았으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다.

수컷 2,000 및 5,000 mg/kg 투여군에서의 백혈구 백분율중 단핵구(MONO)의 감소가 관찰되었으나 경미한 변동으로 총백혈구수(WBC)의 변동도 동반하지 않았으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다. 그 외, 수컷 800 mg/kg 투여군에서 혈색소량(HGB) 및 헤마토크리트치(HCT)의 감소가 관찰되었으나 모두 경미한 변동으로서 용량의존성이 없었으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다(Table 5). 회복군의 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는

Table 6. Summary of Hematological Parameters (Recoverygroup)

Sex : Male									
Group / Dose(mg/kg)		RBC ($x10^6$ cells/μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($x10^3$ cells/μL)	Reti (%)
					MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/dL)		
G1 0	Mean	8.99	15.1	44.3	49.3	16.8	34.1	1107	2.3
	S.D.	0.35	0.6	1.7	1.2	0.6	0.5	77	0.2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	8.56	14.8	42.9	50.2	17.3	34.4	1243	2.5
	S.D.	0.33	0.4	1.4	0.7	0.5	0.8	326	0.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
Group / Dose(mg/kg)		WBC ($x10^3$ cells/μL)	WBC Differential Counting(%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	8.51	21.7	73.4	3.2	1.2	0.1	14.5	16.9
	S.D.	1.52	8.9	9.7	1.1	0.4	0.1	0.4	0.9
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	8.06	19.3	75.2	3.5	1.2	0.2	14.2	15.0*
	S.D.	1.25	8.6	10.8	1.8	0.5	0.1	0.6	1.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
Sex : Female									
Group / Dose(mg/kg)		RBC ($x10^6$ cells/μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($x10^3$ cells/μL)	Reti (%)
					MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/dL)		
G1 0	Mean	7.52	13.8	40.5	54.0	18.4	34.1	1079	2.3
	S.D.	0.26	0.4	0.8	2.4	0.9	0.5	155	0.7
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	7.95	14.6	42.7	53.7	18.3	34.1	993	2.7
	S.D.	0.48	0.9	3.0	1.0	0.3	0.3	121	0.6
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
Group / Dose(mg/kg)		WBC ($x10^3$ cells/μL)	WBC Differential Counting(%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	4.98	18.3	76.9	2.5	1.4	0.2	14.3	14.5
	S.D.	1.71	3.9	5.0	1.1	0.1	0.1	0.9	0.8
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	5.64	13.8	82.5	2.2	0.9**	0.1	14.3	14.5
	S.D.	1.58	3.9	4.3	0.7	0.2	0.0	0.6	1.1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test : * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Table 7. Summary of Clinical Chemistry (Maingroup)

Sex : Male										
Group / Dose(㎎/㎏)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	30.3	91.4	297.9	0.90	158	12.7	0.48	0.05	84
	S.D.	2.0	21.5	56.2	0.34	19	1.7	0.07	0.02	21
	N	10	10	10	9^	10	10	10	10	10
G2 800	Mean	29.8	79.8	289.5	0.64	174	13.0	0.47	0.05	99
	S.D.	5.8	17.1	34.5	0.40	20	1.3	0.04	0.02	24
	N	10	10	10	7^	10	10	10	10	10
G3 2,000	Mean	27.7	77.5	308.5	0.89	168	13.0	0.48	0.05	92
	S.D.	2.7	13.6	65.7	0.43	15	2.2	0.04	0.02	24
	N	10	10	10	9^	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	28.7	85.5	266.8	1.03	165	12.9	0.50	0.05	81
	S.D.	9.9	24.7	79.2	0.48	12	1.7	0.04	0.02	14
	N	10	10	10	9^	10	10	10	10	10
Group / Dose(㎎/㎏)		TG (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	75	6.2	2.5	0.69	5.95	10.4	141	4.5	104
	S.D.	30	0.2	0.1	0.04	0.59	0.3	1	0.4	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 800	Mean	75	6.2	2.5	0.66	6.05	10.4	141	4.6	104
	S.D.	37	0.2	0.1	0.04	0.51	0.3	1	0.4	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,000	Mean	96	6.2	2.5	0.69	5.76	10.5	141	4.6	104
	S.D.	42	0.3	0.1	0.07	0.40	0.4	1	0.4	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	72	6.2	2.4	0.65	6.14	10.5	140	4.7	103*
	S.D.	27	0.3	0.1	0.04	0.33	0.3	1	0.5	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Sex : Female										
Group / Dose(㎎/㎏)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	38.7	102.5	160.9	0.54	146	13.4	0.52	0.09	101
	S.D.	36.1	83	65.0	0.37	12	1.3	0.06	0.02	22
	N	10	10	10	8^	10	10	10	10	10
G2 800	Mean	40.8	112.3	130.8	0.37	148	13.8	0.51	0.08	109
	S.D.	20.0	43.9	43.7	0.28	15	2.2	0.06	0.01	21
	N	10	10	10	6^	10	10	10	10	10
G3 2,000	Mean	28.3	86.8	155.7	0.50	150	12.9	0.52	0.08	99
	S.D.	13.8	21.3	53.9	0.23	13	1.4	0.05	0.02	17
	N	10	10	10	6^	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	34.9	95.8	121.8	0.60	148	14.1	0.49	0.07	109
	S.D.	20.9	42.4	45.8	0.32	20	2.8	0.07	0.01	25
	N	10	10	10	6^	10	10	10	10	10
Group / Dose(㎎/㎏)		TG (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	39	6.6	3.0	0.86	4.47	10.3	141	4.1	106
	S.D.	38	0.4	0.3	0.08	0.54	0.4	1	0.2	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 800	Mean	30	6.5	2.9	0.81	4.32	10.3	141	4.1	106
	S.D.	16	0.4	0.2	0.05	0.89	0.4	1	0.3	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,000	Mean	36	6.4	2.9	0.84	4.50	10.3	140	4.0	106
	S.D.	26	0.3	0.2	0.07	0.71	0.3	1	0.2	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	57	6.8	3.1	0.84	5.09	10.7*	140	4.2	103**
	S.D.	39	0.6	0.4	0.09	0.76	0.5	1	0.4	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

^ : Values below(above) the level of detection were excluded from statistics. Significantly different from control by Dunnett's t-test : * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

없었다. 그 외, 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 부분활성트롬보플라스틴시간(APTT)의 단축 및 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서 백혈구백분율중의 산호성 백혈구(EOS)의 감소가 관찰되었으나 경미한 변동으로서 주시험에서 시험물질에 의한 영향이 인정되지 않았으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다(Table 6).

7. 혈액생화학적 검사

주시험군의 암수 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 염소(Cl)의 감소, 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서 염소의 감소 및 칼슘(Ca)의 증가가 관찰되었으나 모두 경미한 변동으로 인(P), 나트륨(Na), 칼륨(K)의 연관된 항목의 일정한 증가 또는 감소 경향도 동반되지 않았으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다(Table 7).

회복군의 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서 칼륨(K)의 감소가 관찰되었으나 주시험군에서 시험물질에 의한 영향이 인정되지 않았으며 비교적 경미한 변동으로 독성학적 의미는 없다고 사료된다(Table 8).

8. 장기중량

주시험군의 암수 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서 난소의 상대중량의 감소가 관찰되었으나 비교적 경미한 변동으로 생물학적 변동범위(암컷 - ovary - relative: 0.0140 ~ 0.0439g/100g body weight) 내에 속하였으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다. 그 외 수컷 800 mg/kg 투여군에서 뇌의 절대장기중량의 증가가 관찰되었으나 용량의존성이 없었으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다. 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 간의 상대장기중량의 증가가 관찰되었으나 용량증가에 따른 일정한 증가경향이 보이지 않았으며, 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서 간의 절대장기중량의 증가가 관찰되었으나 상대장기중량에서는 변화를 보이지 않았다. 그리고 간에 대한 형태학적 변화를 동반하지 않았으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다.

회복군의 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 암컷 5,000 mg/kg 투여군에서 난소의 절대 및 상대중량의 증가가 관찰되었으나 비교적 경미한 변동으로 생물학적 변동범위(암컷 - ovary - absolute : 0.0382 ~ 0.1001g, ovary - relative: 0.0115 ~ 0.0323g/100g body weight) 내에 속하였으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다. 반면 대조군에서 1마리에서는 난소 중량이 생물학적 변동범위에 속하지 않았으나 부검결과 난소의 소형화가 동반하였으므로 장기중량이 감소된 것으로 판단하였다. 그 외 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 비장의 절대장기중량의 증가가 관찰되었으나 상대장기중량에서는 변화를 보이지 않았다.

9. 부검

주시험군의 암수 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외 수컷 대조군에서 양측 앞발 피부에 가피(crust)가 1례, 2,000 mg/kg 투여군에서 양측 고환의 소형화(small)가 1례, 암컷 대조군에서 좌측 신장에 암갈색의 변색부위(discolored area, dark brown)가 1례, 800 mg/kg 투여군에서 피하에 종괴(mass)가 1례, 2,000 mg/kg 투여군에서 자궁에 암적색의 병소(focus, dark red)가 1례 관찰되었다. 회복군의 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외 암컷 대조군에서 좌측 난소의 소형화 및 꼬리의 인설(exfoliation)이 각 1례씩 관찰되었다(Table 9, 10).

Table 8. Summary of Clinical Chemistry (Recovery group)

Sex : Male										
Group / Dose(mg/kg)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	29.1	84.1	226.2	0.55	154	13.1	0.45	0.06	94
	S.D.	3.6	14.8	47.2	0.31	15	1.4	0.02	0.02	22
	N	5	5	5	4	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	64.0	112.5	323.4	0.48	150	12.3	0.45	0.06	118
	S.D.	80.6	96.9	95.3	0.22	13	1.1	0.07	0.02	47
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Group / Dose(mg/kg)		TG (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	75	6.1	2.4	0.67	5.39	10.3	140	4.5	104
	S.D.	14	0.2	0.1	0.04	0.34	0.2	2	0.3	2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	93	6.2	2.5	0.68	5.63	10.4	140	4.5	104
	S.D.	3.5	0.3	0.2	0.04	0.40	0.4	1	0.3	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sex : Female										
Group / Dose(mg/kg)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)
G1 0	Mean	40.4	106.9	115.7	0.27	148	15.5	0.48	0.12	117
	S.D.	9.6	33.2	41.9	0.36	17	2.2	0.09	0.03	41
	N	5	5	5	2	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	33.2	78.9	128.8	0.44	153	13.3	0.48	0.11	114
	S.D.	8.8	23.6	48.5	0.02	10	1.5	0.07	0.04	35
	N	5	5	5	2	5	5	5	5	5
Group / Dose(mg/kg)		TG (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	46	6.6	3.0	0.82	4.22	10.4	140	4.2	103
	S.D.	22	0.6	0.4	0.07	0.60	0.5	1	0.3	2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	95	6.6	3.0	0.86	4.37	10.4	140	3.9*	103
	S.D.	48	0.6	0.4	0.09	0.39	0.5	1	0.1	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * $p<0.05$.

10. 조직병리학적 검사

주시험군의 암수 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 암컷 5,000 mg/kg 투여군의 난소에서 난소낭을 동반한 위축(atrophy with cystic follicles) 소견이 미미하게 2례 관찰되었는데 난소의 장기중량의 감소와 연관성이 있었다. 그러나 2개체를 제외한 난소에서는 그러한 변화가 인정되지 않은

Table 9. Summary of Necropsy Findings (Maingroup)

Organ / Findings	Sex	Male				Female			
	Group	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
	Dose (mg/kg)	0	800	2,000	5,000	0	800	2,000	5,000
	No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10
Unremarkable findings		9	10	9	10	9	9	9	10
No. of examined		10	10	10	10	10	10	10	10
Kidney	-Discolored area, dark brown, left	0	0	0	0	1	0	0	0
Skin	-Crust, right and left forelimb	1	0	0	0	0	0	0	0
	-Mass, subcutaneus	0	0	0	0	0	1	0	0
Testis	-Small, bilateral	0	0	1	0				
Uterus	-Focus, dark red					0	0	1	0

External surface and other organs in body cavity (cranial, thoracic and abdominal) were unremarkable.

Table 10. Summary of Necropsy Findings (Recoverygroup)

Organ / Findings	Sex	Male		Female	
	Group	G1	G4	G1	G4
	Dose (mg/kg)	0	5,000	0	5,000
	No. of animals	5	5	5	5
	Unremarkable findings	5	5	3	5
	No. of examined	5	5	5	5
Ovary	-Small, left			1	0
Tail	-Exfoliation	0	0	1	0

External surface and other organs in body cavity (cranial, thoracic and abdominal) were unremarkable.

반면 암컷 800 mg/kg 투여군의 난소에서 경도의 난소낭을 동반한 위축이 1례 관찰되었으므로 시험물질 투여에 의한 일정한 증가경향이나 정도(severity)의 경향이 보이지 않아 시험물질과의 관련성은 찾을 수 없었다. 난소의 위축소견은 SD 랫드에서 가령성 소견으로 흔히 알려져 있으므로 우발적 분포에 기인한 변화로서 독성학적 의미는 없다고 사료된다. 부검 시 관찰된 소견에 대한 조직병리학적 검사 결과 수컷 대조군에서의 앞발 피부의 가피는 표피의 비후를 동반한 가피(crust, with thickening), 2,000 mg/kg 투여군에서의 양측 고환의 소형화는 위축(atrophy), 암컷 800 mg/kg 투여군에서의 피하 종괴는 유선의 선암종(adenocarcinoma), 2,000 mg/kg 투여군에서의 자궁의 암적색 병소는 혈종(hematoma)으로 확인되었으나 모두 단 1례씩으로서 자연발생적이거나, 우발적으로 분포하였으므로 독성학적 의미는 없다고 사료된다. 암컷 대조군에서의 좌측 신장의 암갈색의 변색부위는 형태학적 변화가 관찰되지 않았다. 그 외 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 부고환, 안구, 하더리안선, 심장, 신장, 간, 폐 및 기관지, 췌장, 뇌하수체, 전립선, 갑상선에서 관찰된 소견은 모두 자연발생성으로서 해당 주령의 SD 랫드에서 흔히 관찰되는 병변으로 우발적 또는 산발적으로 분포하였으므로 모두 독성학적인 의미는 없다고 사료된다.

회복군의 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 암

컷 5,000 mg/kg 투여군에서 경도의 난소의 위축 소견이 1례 관찰된 반면 대조군에서 경도로 2례가 관찰되었다. 주시험군 및 회복시험에서 연속적으로 관찰된 난소의 위축소견의 발생례에서 시험물질 투여와의 명확한 연관성은 보이지 않았다. 따라서 난소의 위축소견은 모두 우발적 분포에 따른 것으로서 독성학적 의미는 없다고 사료된다. 부검 시 관찰된 소견에 대한 조직병리학적 검사 결과, 암컷 대조군에서의 좌측 난소의 소형화는 난포낭, 꼬리의 인설은 각화과다증(hyperkeratosis)으로 확인되었으나 모두 대조군에서 관찰된례로서 독성학적 의미는 없다고 사료된다. 그 외 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 하더리안선, 심장, 신장, 간, 폐 및 기관지, 난소, 췌장, 뇌하수체, 갑상선에서 관찰된 소견은 모두 자연발생성으로서 해당 주령의 SD 랫드에서 흔히 관찰되는 병변으로 우발적 또는 산발적으로 분포하였으므로 모두 독성학적인 의미는 없다고 사료된다.

IV. 고찰

치매는 만성, 진행성 뇌질환과 같은 병적인 노화로 기억력, 사고력, 지남력, 이해, 학습, 판단 등 다수의 고위대뇌기능장애로 정의할 수 있다[20]. 우리나라 65세 이상 노인인구의 약 8.3%인 31만명 정도가 치매노인으로 추정되며 80세 이상 노인인구에서는 약 25% 정도로 추정된다[21].

AD의 주요 병리학적 소견은 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle)와 신경반(neuritic plaque)으로[22], 신경반은 아밀로이드 전구단백질(amyloid precursor protein; APP)로 알려진 큰 막단백질의 가수분해에 의해 생긴 4kDa Aβ peptide로 구성되어 있으며[23] 축적된 Aβ peptide는 주변 세포들에 염증반응을 일으켜 신경세포가 손상되고 뇌의 정상적인 기능을 유지하는 신경회로망을 훼손한다[24].

현재 AD의 원인과 병리기전을 밝히기 위한 연구는 진행 중이며 아직 명확한 원인과 치료약물은 없는 상황이다. 이에 본 연구팀은 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 지원을 받아 치매치료 한방신약 ACM 개발 연구를 진행하였다.

ACM은 白茯神, 遠志, 石菖蒲로 이루어진 聰明湯에 山査肉, 巴戟天을 가미한 처방으로 이전의 연구에서 遠志는 microglial cells에서 염증성 매개인자 억제를 통하여 퇴행성 신경 질환의 치료에 효능이 있고[25], 遠志, 石菖蒲, 聰明湯 추출물은 각각 MAP2와 MAP-Tau 단백질의 조절 기전에 관여하여 신경세포 손상에 방어작용이 있음[26]이 보고되었다. 또한 다양한 聰明湯加味方이 치매 치료에 효과적으로 활용 될 수 있다는 다수의 연구결과가 발표되었다[9-13]. 巴戟天이 항콜린작용과 APP와 PS-1, PS-2 발현 억제능력을 가져 치매 치료에 활용될 수 있다는 연구 결과와[15] 山査肉이 IL-1β, IL-6, APP, AChE,gFAP mRNA, TNF-α의 발현을 억제하고 ROS, NO의 생성을 억제하여 치매 치료에 활용될 수 있다는 연구 결과[16], 山査聰明湯[17]과 巴戟天聰明湯[18]의 항염증효과, 기억력 감퇴 억제 효과, 뇌세포 보호효과, 행동개선효과로 치매 치료에 활용될 수 있다는 연구 결과, 聰明湯에 巴戟天, 山査肉을 가한 聰明湯加味方이 BACE 효소활성과 βA의 과다 생성을 억제하여 치매 치료에 효과가 있다는 연구 결과[19]등이 보고되었다. 본 연구팀은 이러한 연구 결과들을 근거로 ACM을 연구개발 중이며, 연구의 일환으로 ACM의 안전성을 평가하기 위하여GLP기관인 바이오톡스텍(주)에 의뢰하여 ACM의 rat를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험을 진행하였다.

ACM의 rat를 이용한 단회 경구투여 독성시험 결과 암수 5000 mg/kg 투여군의 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않아 치사량은 암수 각 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었고[27], 4주 반복 경구투여 용량결정시험

결과 암수 5000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 기인한 독성변화는 인정되지 않았다. 따라서 13주 반복투여 독성시험의 고용량은 5000 mg/kg, 저용량은 1000 mg/kg 이하로 설정하였다.

총명탕가감 한방신약 ACM을 Sprague-Dawley (Crl:CD(SD))계 암수 랫드에 13 주간 반복투여시에 대한 안전성을 평가하고자한 본 시험에서 시험물질은 800, 2,000 및 5,000 mg/kg 의 3 개의 용량으로 암수 각각 군당 10, 10 및 15 마리에 13 주간 경구 투여하였다. 또한 대조군(주사용수)을 설정하여 군당 15 마리에 13 주간 경구 투여하였다. 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에는 암수 각 5 마리씩 독성의 가역성을 평가하기 위해 4 주간의 회복기간을 두었다. 관찰기간동안 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사, 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다. 관찰기간동안 암수 시험물질 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 주시험군 및 회복군 일부에서 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량, 조직병리학적 검사 등에서 변화가 관찰되었으나, 모두 경미한 변동인점, 생물학적 변동범위 이내인점, 용량의존성이 없는점, 장기의 형태학적 변화가 관찰되지 않은점, 대조군에서도 관찰된점, SD 랫드에서 흔히 관찰되는 병변으로 우발적 또는 산발적으로 분포한점 등을 근거로 독성학적 의미는 없다고 사료된다.

투여기간동안 암수 시험물질 투여군에서 약물혼입변이 관찰되었고, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 회복 2~3 일까지 관찰된 후 관찰되지 않았다. 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검에 있어서, 암수 시험물질 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화는 관찰되지 않았다. 조직병리학적 검사결과, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화는 관찰되지 않았다.

V. 결론

이상으로 본 시험 조건 하에서의 치매치료 한방신약 개발을 위한 총명탕가감 ACM에 대한 암수 랫드를 이용한 13 주 경구 반복투여 독성시험, 4주 회복시험을 실시한 결과, 암수 5,000 mg/kg 용량에서 독성변화가 관찰되지 않아 무독성량(NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.

References

1. The Korean society of oriental neuropsychiatry. Oriental neuropsychiatry. Seoul:Jipmundang. 2007:324-33.
2. Oide T, Kinoshita T, Arima K. Regression stage senile plaques in the natural course of alzheimer's disease. Neuropathology appl neurobiology. 2006;32(5):539-56.
3. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, BasigS, Caccavello R, Davis D, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature. 1999;402:537-40.
4. McGrath LT. Increased oxidative stress in alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. Q J medicin. 2001;94:485-90.
5. David S. Treatmentguidelines for alzheimer's disease - redefinding perceptions in primary care. Primary care companion J clinic psychiatry. 2007;9(2):113-21.
6. Cheng, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, et al. A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer' disease. Nature.

2000;408:975 - 9.
7. Heo J. Dongeuibogam. Seoul : Dongeuibogam publisher. 2005:98-100.
8. Lee SI. Clinical applications of herbal medicine. Seoul:Seongbosa. 1990:151-3, 308-13, 419-20, 426-8.
9. Kim YW, Song TW, Oh MS. Effect of Chongmyungtang on learning and memory in normal and scopolamine-induced amnestic mice. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine. 1998;8(2):464-79.
10. Lim JH, Lee SR. The Effects of PalMihapChongMungTang(PMCMT) hot water extract & ultra-fine powder on the Alzheimer's disease model. Journal of oriental neuropsychiatry. 2008;19(2):95-110.
11. Kim HJ, Lee SR. The Effects of KakamBoyangHwanoh-Tang(KBHT) and PalMihapChongMung-Tang(PMCMT) on protecting microglia and inhibiting acetylcholinesterase and oxidants. Journal of oriental neuropsychiatry. 2008;19(2):65-75.
12. Lee SH, Jung IC, Lee SR. Effect of KwyBiChongMung-Tang hot water extract & ultra-fine powder on the Alzheimer's disease model. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2007;21(4):921-33.
13. 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(2):1200-10.
14. Department of the national association of Herbalogy. Herbalogy. Seoul:Youngrimsa. 2008:411-2,594-5.
15. 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 neuropsychiatry. 2003; 14(1):45-58.
16. 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.
17. Ha SY, Jung IC, Lee SR. The effects of ChongMyungTang(CMT) and SanSaChongMyungTang (SCMT) on the Alzheimer`s disease model. Journal of oriental neuropsychiatry. 2006; 17(1):59-78.
18. 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. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2006;20(4): 997-1008.
19. Lim JH, Jung IC, Lim JS, Kim SH, Lee SR. Effect of Chongmyung-Tang prescription combination on the production of amyloid β protein and β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme activity in vitro. Journal of oriental neuropsychiatry. 2010; 21(2):191-200.
20. Lee KW. Clinical neurology. Seoul: Beommunsa. 2003:203-15.
21. Byeon YC. The mapping development research of dementia management. Korea Institute for Health and Social Affairs. 1997.
22. Citron M, Diehl TS,gordong, Biere AL, Seubert P, Selkoe DJ. Evidence that the 42-

and 40-amino acid forms of amyloid beta protein aregenerated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93:13170 - 5.

23. John V, Beck JP, Bienkowski MJ, Sinha S, Heinrikson RL. Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors. J. Med. Chem. 2003;46(22):4625-30.
24. Je JY, Kim SK. Water-soluble chitosan derivatives as a BACE1 inhibitor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005;13:6551-5.
25. Cheong MH, Lee SR, Yoo HS, Jeong JW, KimgY, Kim WJ, Jung IC, Choi YH. Anti-inflammatory effects of Polygala tenuifolia root through inhibition of NF-κB activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. Journal of ethnopharmacology. 2011;137(3):1402-8.
26. Park EK, Shim ES, Jung HS, Sohn NW, Sohn YJ. Effects of chongmyung-tang, polygalae radix and acorigraminei rhizoma on Aβ toxicity and memory dysfunction in mice. Korean J. Orient. Int. Med. 2008;29(3):608-20.
27. Choi WC, Jung IC, Lim JS, Kim SH, Lee SR. Single oral dose toxicity test of ACM(Added Chongmyung-tang) in Sprague-Dawley rat. Journal of oriental neuropsychiatry. 2012; 23(2):121-8.