

# 약침용 홍삼추출액의 면역독성, 발열성 및 용혈성시험에 관한 연구

남 윤석 · 이 윤호\*

## Studies on the Safety Assessment of Red-ginseng Radix Extract Solution for Herb-acupuncture (III)

Nam, Yun Seok, O.M.D., Ph.D, Lee, Yun Ho, O.M.D., Ph.D.

Dept. of acupuncture and moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyunghee Univ.

According to the Medical Product Safety Administration Guidelines for safety assessment, guinea pigs, mice and rats were used for antigenicity test, rabbits for pyrogenic test and hemolytic test.

The results were summarized as follows;

1. The antigenicity test of Red-ginseng radix extract solution for herb-acupuncture did not show any anaphylactic shock but produced IgE in high dose group.
2. The result of the pyrogen test of Red-ginseng radix extract solution for herb-acupuncture was negative.
3. The result of the hemolytic test of Red-ginseng radix extract solution for herb-acupuncture were negative in low and middle dose group but was positive in high dose group.

【Key word】 Safety Assessment, Red ginseng Radix, Herb-Acupuncture

### I. 緒 論

藥鍼療法은 一般的으로 經穴이나 敏感點에 일정한 方法으로 製劑된 韓藥抽出液을 刺入하여 藥物效果와 刺鍼의 效果를 同時에 얻도록 하는 新鍼療法中的 하나이다<sup>8)</sup>. 藥鍼療法은 근래에 임상적 관찰을 통해 높은 치료효과가 보고되고 있으며 실제 임상에서 다양한 질환에 이용되고 있다. 그러나 臨床에서 藥鍼施術時에 心悸, 血壓降下, 呼吸困難, 消化障礙, 頭痛, 昏迷, 蕁麻疹, 末梢神經炎 및 shock 등의 副作用이 各種藥物들을 注入했을 때 나타났다는 臨床的 報告<sup>40)</sup>가 있으므로 藥鍼製劑를 臨床에 應用하기 위해서는 藥鍼製劑의 安全性檢討가 必要하다. 그러나 臨床試驗에 適用하기 위하여 必要한 藥鍼製劑의 安定性에 관한 研究는 鹿茸<sup>33,34)</sup>, 當歸<sup>37)</sup>, 靈芝<sup>33)</sup>, 人蔘<sup>16)</sup>, 丹蔘<sup>21)</sup>, 蜂毒液<sup>27)</sup>, 黃芪<sup>35)</sup> 및 數種 藥材<sup>36)</sup>와 局所組織에 미치는 影響에 대한 研究<sup>24)</sup>에 不過하며 一部

\* 경희대학교 한의과대학

藥材를 除外하고는 大部分 品質의 規格化가 先行되어 있지 않다.

人蔘은 오가피과에 속한 蔘의 根으로 大補元氣, 固脫生津, 安精神, 除邪氣 등의 効能이 있으며, 勞傷虛損, 食少倦怠 등에 廣範圍하게 使用되는 滋補強壯與奮劑이다<sup>6,39)</sup>.

人蔘藥鍼에 관한 연구는 人蔘藥鍼의 製劑別 및 種類別 研究와 鎮痛<sup>28)</sup>, 免疫<sup>20,38)</sup>, 糖尿<sup>18,29,30)</sup>, 血壓降下<sup>28)</sup>, 甲狀腺障礙<sup>17)</sup>, 抗 알레르기<sup>31)</sup> 및 肝, 胃機能恢復<sup>19,25)</sup>, 血栓<sup>32)</sup> 등에 유의하다고 보고되었으며, 製法別 人蔘藥鍼液을 대상으로 TLC 및 HPLC를 통하여 그 유효성분을 분석하였다<sup>30)</sup>.

紅蔘은 6년동안 栽培한 水蔘을 蒸蔘, 乾燥 등의 過程을 거쳐 水分量이 12.5 - 13.5%가 되도록 加工하는중 非酵素的으로 褐色反應이 促進되어 농다갈색의 色相을 가지며, 매우 단단한 形態로 加工하여 原形을 維持시킨 人蔘製品이다<sup>7)</sup>.

이에 著者는 紅蔘抽出液이 動物實驗을 통하여 効能이 檢討되어있고 한국담배인삼공사가 管理하는 工產品으로써 紅蔘製品이 藥鍼製劑로서의 臨床的 活用に 適合하다고 判斷되어 急性毒性試驗에 관한 보고<sup>22)</sup>를 한 후 免疫毒性試驗, 發熱性試驗 및 溶血性試驗을 실시한 결과, 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗

### 1. 免疫毒性試驗

#### 1-1. 材料 및 方法

##### 1-1-1. 試驗動物

試驗動物은 3個月齡의 기니픽(Hartley系, 280-300g), 3週齡의 마우스(C57 BL/6 系, 15-25g), 그리고 4週齡의 랫드(SD系, 150-200g)를 모두 수컷으로 서울대학교 실험동물사육장에서 分讓받아 約 1週日間 試驗이 實施되는 實驗室에서 馴化시킨 다음, 馴化期間중 一般狀態를 觀察하여 健康한 기니픽(300-350g) 24마리, 마우스(20-25g) 24마리와 랫드(200-300g) 12마리만을 試驗에 使用하였다.

##### 1-1-2. 飼育環境

飼育 및 試驗期間동안 實驗室環境은 溫度  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 相對濕度  $50 \pm 10\%$ , 換氣횟수 10-12회/hr., 螢光燈照明 12時間(07:00-09:00), 照度 150-300Lux로 設定된 서울대학교 수의과대학 소동물실험실에서 實施되었으며, 馴化期間 및 試驗期間 중에 기니픽은 3단 飼育箱子대에 配列된 스테인레스 飼育箱子(42×50×31 cm, 명진기계제작)에 5마리/飼育箱子, 마우스는 폴리카보네이트 飼育箱子(26×42×18 cm, 명진기계제작)에 6마리/飼育箱子 그리고 랫드는 폴리카보네이트 飼育箱子(26×42×18 cm, 명진기계제작)에 3마리/飼育箱子로 飼育하였으며, 飼育箱子에는 試驗番號, 動物番號 및 投與量을 기입한 tag를 붙였다. 飼料는 마우스와 랫드에게는 마우스, 랫드용 固形飼料(삼양사료 (주)), 기니픽은 토끼용 固形飼料(푸리나 사료 (주))와 Vitamine C를 飲水에 녹여 自由攝取시켰다.

### 1-1-3. 投與量 및 試驗群의 構成

本 試驗物質 10g을 생리식염수 100ml에 溶解하여 高用量(Guinea pig: 0.2ml/300g 投與, Mouse: 0.1ml/animal)으로 하고, 1g을 생리식염수 100ml에 溶解하여 低用量(Guinea pig: 0.2ml/300g 投與, Mouse: 0.1ml/animal)으로 하여 投與하였다. 群分離는 기니피과 마우스 모두 馴化期間중에 健康하다고 判斷된 動物을 體重測定을 하여 平均體重에 가까운 個體들이 골고루 들어가도록 無作爲法으로 하였고, 動物個體識別은 皮毛着色 마킹법과 Tag표시법으로 하였다.(Table 1-4)

### 1-1-4. 試驗方法

“醫藥品 등의 毒性試驗基準”등<sup>11,26,41)</sup>에 準하여 實行하였고, 投與液을 抗原感作 및 抗原-抗體反應 誘發을 위해 注射器(24-25G., 녹십자 (주))를 利用하여 기니피에서 感作時는 肩胛間部(interscapular region)에 皮下로 投與하고, 誘發時는 足靜脈(tarsal vein)內로 投與하며, 마우스는 皮下注射하였고 랫드는 피내투여와 정맥투여를 하였다. 投與時間은 10:00-12:00時 사이에 투여전의 體重을 基準로 投與量을 정해 實施하였다.

#### 1) Active Systemic Anaphylaxis (ASA) 試驗

기니피를 암수 各各 5마리씩 4個群으로 나뉘어 第1群은 紅蔘抽出液 低用量(1g/100ml로 溶解하여 0.2ml/300g), 第2群은 紅蔘抽出液 高用量(10g/100ml로 녹여 0.2ml/300g), 第3群은 陽性 對照群으로서 血清 알부민 (bovine serum albumin, BSA, Sigma Co.)을 0.1ml/animal, 第4群은 陰性 對照群으로 0.9%(w/v) saline液을 0.1ml/animal을 第0日과 4日에 各 試驗物質과 complete Freund's adjuvant와 같은 약을 섞어 皮下로 感作投與하고, 第14日과 24日에 足靜脈(tarsal vein)內 注射로 誘發投與하여 anaphylactic shock를 觀察하였다(Table 1).

#### 2) Passive Systemic Anaphylaxis (PSA) 試驗

C<sub>57</sub>BL/6 마우스를 각군당 6마리씩 4개군으로 나누어 제1군은 紅蔘抽出液 低用量을, 제2군은 紅蔘抽出液 高用量을, 제3군은 BSA를 각각 0.9%(w/v) saline에 溶解하여 complete Freund's adjuvant(CFA)와 같은 양을 섞어 조제하여 皮下로 感作시켰다. 제4군은 0.9%(w/v) saline에 CFA를 동량섞어 피하감작시켰다. 投與回數는 2주에 1회, 4주간(3회)投與하였으며, 조제빈도는 매 투여시마다 조제하여 投與하고, 最終感作投與後 10일 경과 후에 剖檢하여 腹大靜脈에서 採血하고 室溫에서 3시간 凝固시킨 후 遠心分離하여 血清을 얻고, 分離한 血清은 -20℃에서 保管하여 두었다가 PSA test시에 抗血清을 靜脈注射한 후 18시간 經過하였을 때 各 試驗物質을 靜脈內注射하여 anaphylatic shock를 觀察하였다.

#### 3) Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 試驗

이 試驗은 IgE 抗體의 生産與否 및 能力을 觀察하기 위한 試驗으로 C<sub>57</sub>BL/6로 抗原感作시켜 얻은 抗血清을 0.9%(w/v)saline로 階段稀釋하여 皮內로 注射하고24시간후에 各 抗原과 Evan's blue혼합액을 各々 尾靜脈內로 注射한 다음 15분 經過後에 皮膚를 剝離하여 注射部位에 生成된 靑色斑點을 確認하였다.

#### 4) 間接 赤血球 凝集反應 (IHA) 試驗

##### ① 抗血清生産

PCA Test실험에서 사용한 C<sub>57</sub>BL/6 mouse의 항혈청을 이용하였다.

## ② 間接 赤血球 凝集反應

### 가. Bleeding procedure

마지막 感作시킨 다음, 10日 정도 後에 剖檢하여 cardiac puncture를 통해 1.0ml정도의 血液을 採取하여, 2-4時間 정도 室溫에서 clot시킨 後, 4℃에서 放置하고, 遠心을 통해 얻어진 serum은 -20℃에서 保管해 두었다가 antibody analysis에 利用하였다.

### 나. 赤血球 凝集反應

Sheep RBC를 40倍의 saline液으로 3回 洗滌(300g×10分)한 後, PBS에 5%되게 浮遊시키고, 0.005% tannic acid를 添加 後, 37℃에서 15分間 加熱한다. 細胞들을 PBS로 3번 washing하고, PBS로 5%되게 浮遊(suspension)시킨다. suspension된 Tanned cell을 ㉠ tanned cell + test drug(low dose), ㉡ tanned cell + test drug(high dose), ㉢ tanned cell + BSA(陽性 對照郡), ㉣ tanned cell + 0.9%(w/v) slaine(陰性 對照群) 등으로 나누어 37℃에서 30分間 抗原과 섞으면서 感作시켰다. 感作된 細胞를 PBS로 두번 washing하고 2%되게 PBS에 浮遊시켰다. 血清을 96 well HA plate에  $2^1-2^{11}$  범위내의 稀釋 倍率로 0.1ml의 volume이 되도록 階段 稀釋하였다. 이 dilution set에 抗原으로 感作시킨 Sheep RBC를 同量 添加한 後, 이 混合物을 37℃에서 15分間 培養하였다(㉠+1群에서 生産된 mouse의 抗血清, ㉡+2群에서 生産된 마우스 抗血清, ㉢+3群에서 生産된 마우스의 抗血清, ㉣+4群에서 生産된 마우스의 抗血清). 室溫에서 12時間 放置한 後 血球 凝集定度를 判讀하였다.

### 5) 觀察 및 評價

① ASA 試驗: Anaphylaxis의 有無를 不安(restlessness), 起毛(piloerection), 震顫(trembling), 코를 문지르거나 핥음(rubbing nose), 재채기(sneezing), 咳嗽(coughing), 過呼吸(hyperpnea), 排尿(urination), 排便(evacuation), 流淚(lacrimation), 呼吸困難(dyspnea), 짹짹거리는 소리(rhonchus), 青色症(cyanosis), 步行不安(staggering gate), 跳躍(jumping), 혈떡거리고 몸부림침(gasping & writhing), 痙攣(convulsion), 橫臥(side-position), Cheyne-Stokes 呼吸, 死亡(death) 등을 觀察하고, 綜合的으로 shock 정도에 따라 陰性(0)은 아무런 臨床症狀이 觀察되지 않을 때, 輕症(A)은 不安, 전신떨림, 코비비기, 재채기 등이 나타날 때, 中等度(B)는 排尿, 呼吸困難, 跳躍 및 突進 등이 觀察될 때, 重症(C)은 비틀기, 痙攣, 死亡이 觀察된 境遇로 判定하였다<sup>25)</sup>

② PSA 試驗: ASA와 同一한 方法으로 觀察 및 判定하였다.

③ PCA 試驗: 注射部位에 觀察되는 青色斑點의 生成與否를 觀察하여 青色斑點의 直徑(長徑+短徑/2)이 5mm以上の 크기일 때 Anaphylaxis와 關聯이 있는 IgE가 生成되어진 것으로 判定하였다.

④ IHA 試驗: 混合物을 37℃에서 15分間 培養하고, 室溫에서 12時間 放置한後, 血球 凝集程度를 判定하였다.

## 1-2. 成績 및 結果

### 1-2-1. Active Systemic Anaphylaxis (ASA) 試驗

各 群의 기니픽을 第0日과 第4日에 2回 感作시키고, 第14日, 第24日 2回에 걸쳐 靜脈注射

(tarsal vein)로 誘發 投與한 결과는, BSA 投與群에서는 첫번째 靜脈注射時 不安, 震顫, 咳嗽, rubbing nose, 痙攣 등 보통의 anaphylatic shock를 보였고 두번째 靜脈注射時에는 심한 anaphylatic shock를 보이다가 1마리가 斃死하였다. 紅蔘抽出液 投與群에서는 제14日째의 첫번째 投與時와 第24日째의 두번째 投與時에 anaphylatic shock로 보여지는 症狀를 전혀 나타내지 않았다(Table 5, 6).

### 1-2-2. Passive Systemic Anaphylaxis (PSA) 試驗

PSA 試驗結果, sensitized antiserum에 대한 Anaphylaxis는 觀察할 수 없었다(Table 7).

### 1-2-3. Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 試驗

ASA 試驗中 實際 形成된 IgE 量을 測定하기 위해 PCA 試驗을 하였다. 各 抗血清을 稀釋하여 皮內注射하고, 抗原과 Evan's Blue 混合溶液을 靜脈注射한 結果는 Table 8과 같다.

BSA 投與群(12mg/animal-120mg/ml로 조제하여 0.1ml/animal)에의 경우 2<sup>4</sup>배 稀釋倍率까지 5mm이상크기의 青色斑點을 나타내었으나, 紅蔘抽出液은 高用量 投與群(10g/100ml로 溶解하여 0.2ml/300g)의 경우는 2<sup>5</sup>배 稀釋倍率까지 5mm이상크기의 青色斑點을 관찰할 수 있었다. 그러므로 紅蔘抽出液은 特異的인 IgE를 形成하는것으로 思慮되어진다.

### 1-2-4. 間接 赤血球 凝集 反應 (IHA) 試驗

紅蔘抽出液에 의한 마우스의 抗血清이 Sheep RBC에 대한 血球凝集能이 있는지를 살펴 보았을 때, 陽性對照인 BSA投與群(12mg/animal-120mg/ml)로 調製하여 0.1ml/animal)의 抗血清은 2<sup>3</sup> 血清 稀釋까지 血球凝集을 觀察할 수 있었으며 紅蔘抽出液의 低用量 投與群(1g/100ml로 溶解하여 0.1ml/animal 投與)은 血球凝集을 觀察할 수 없었으며, 紅蔘抽出液의 高用量 投與群 (10g/100ml로 溶解하여 0.1ml/animal)은 血球의 溶血로 因하여 血球凝集을 觀察할 수 없었다 (Table 9).

## 2. 發熱性 試驗

### 2-1. 材料 및 方法

#### 2-1-1. 試驗動物

New Zealand White 種 수컷 토끼 (3-4個月齡, 體重 2.0-3.0kg)를 삼육실험동물연구센터에서 分讓받아, 約 1週日間 Coccidium 感染與否 등 動物檢疫과 馴化期間을 거친 뒤, 健康한 動物 9마리를 試驗에 使用하였다.

#### 2-1-2. 飼育環境

飼育 및 試驗期間동안 實驗室環境은 溫度 20±3℃, 相對濕度 50±10%, 換氣횟수 10-12회/hr., 螢光燈照明 12時間(07:00-09:00), 照度 150-300Lux로 設定된 서울대학교 수의과대학 소동물실험실에서 實施되었으며, 馴化期間 및 試驗期間 중에 토끼는 3단 飼育箱子대에 配列된 스테인레스 飼育箱子(42×50×31 cm, 명진기계제작)에 個體別로 1마리씩 收容하고, 토끼용 固形飼料(푸리나 사료 (주))와 上水道水를 自由 攝取시켰다. 飼育箱子에는 試驗番號, 動物番號등을 記入한 tag를 붙였다.

### 2-1-3. 試驗方法

大韓藥典<sup>3,9)</sup> 및 生物學的 製劑基準<sup>14)</sup> 등에 準하여 實施하였고, 滅菌된 注射器(3ml, 23G., pyrogen free, 녹십자 의료공업 (주))를 使用하였고, 溫度測定은 thermo-probe가 연결된 自動 體溫 測定計인 pyrogen-tester type APT 75 (Ellb Co.)를 使用하였다.

試驗 3日前에 6時間동안 試驗時와 같이 고정틀에서 姿勢를 馴化시킨 다음, 試驗 하루전에 絶食 시켜 試驗 當日 토끼를 고정틀에 固定시키고, thermo-probe를 約 6-9 cm 정도로 直腸內에 挿入하고 自動 體溫 記錄計를 作動 시킨 後, 3時間동안 12分 間隔으로 溫度를 調査하여 體溫의 範圍가 38.0 - 39.8°C 以內에서 溫度變化의 絶對值가 0.2°C 以下인 토끼만을 9마리 選別하였다. 3 個群으로 나누어 高用量投與群, 低用量投與群, 對照群으로 各 3마리씩 配置하여, 高用量投與群은 臨床適用用量인 0.2ml/300g(33.3ug/kg)을 1ml/kg씩, 低用量投與群은 0.5ml/kg씩 耳介靜脈 (marginal ear vein)을 통하여 注射하였으며, 對照群은 pyrogen free 注射用 saline液을 注射하였으며, 檢體는 投與前에 37°C 로 維持되도록 恒溫 水槽에 넣었다. 注射 後 15分 間隔으로 溫度變化를 12回 記錄하여 試驗物質 投與前 溫度를 對照體溫으로 하여 最高體溫과의 差를 溫度上昇으로 計算하였다.

### 2-1-4. 觀察 및 評價

注射 後의 體溫上昇이 0.6°C 以上の 動物이 2마리 또는 3마리인 때에는 發熱性物質로 判定된다. 體溫上昇이 0.6°C 以上の 試驗動物이 1마리이거나 3마리 體溫上昇 合計가 1.4°C 以上일 때에는 再試驗을 한다.

## 2-2. 成績 및 結果

高用量 投與群에서 3마리가 0, 0.2, 0.2°C로 나타났으며, 低用量投與群은 0.1, 0.1, 0°C로 나타나 試驗物質은 發熱性 物質이 아닌 것으로 判定되었다(Table 10).

## 3. 溶血性 試驗

### 3-1. 材料 및 方法

#### 3-1-1. 試驗物質 製造

試驗物質을 注射用 蒸溜水((주)중외제약)에 1g/100ml, 5g/100ml, 10g/100ml로 溶解시켜 各 低用量, 中間用量, 高用量으로 하고, 陽性 對照群으로는 蒸溜水を, 陰性 對照群으로는 phosphate buffered saline을 使用하였다.

#### 3-1-2. 試驗方法

陰性 對照群과 試驗群은 Petri dish에 phosphate buffered saline 10ml씩을, 陽性 對照群에는 蒸溜水 10ml 넣은 후, 탈섬유 토끼 血液 0.1ml을 添加하고, 試驗群에는 各 用量別로 紅蔘抽出液 0.1ml씩을 첨가한 후 37°C에서 24時間 培養하였다. 이를 1,500rpm에서 5分間 遠心分離하여 그 上層液을 取해 576nm에서 吸光度를 測定하였다. %溶血性(% hemolysis)를 다음과 같이 計算하

여 0.2%未滿은 陰性, 5%以上은 陽性으로 判定하였다.

% Hemolysis =

$$\frac{(\text{Absorbance of test sample}) - (\text{Absorbance of negative control})}{(\text{Absorbance of positive control}) - (\text{Absorbance of negative control})} \times 100$$

### 3-1-3. 試驗群의 構成

Phosphate buffered saline을 利用한 陰性 對照群, 蒸溜水를 移用한 陽性 對照群, 그리고 紅蔘抽出液 1g/100ml, 5g/100ml, 10g/100ml을 各各 低用量群, 中間 用量群, 高用量群으로 定하였다. 各 群當 3개씩의 plate를 試驗하였다.

### 3-2. 成績 및 結果

紅蔘抽出液에 대한 溶血性 試驗을 한 결과, 紅蔘抽出液 低用量群(1g/100ml), 中間用量群(5g/100ml), 高用量群(10g/100ml)의 吸光度는 各各 0.507, 0.612, 0.912였으며, 陰性 對照群과 陽性 對照群은 各各 0.614, 0.932였다(Table 11). 이를 %溶血性(% hemolysis)으로 나타내면 低用量과 中間 用量은 陰性 對照群보다 吸光度가 낮기 때문에 算出할 수 없었으며 高用量은 93.71%로 産出되었다(Table 12). 따라서, 紅蔘抽出液 1g/100ml과 5g/100ml은 陰性 對照群인 phosphate buffered saline의 溶血性 以下이나 紅蔘抽出液 10g/100ml은 溶血性이 陽性 對照群에 가까운 溶血性 陽性인 것으로 思慮된다.

Table 1. Experimental Design of Active Systemic Anaphylaxis in Guinea pig.

Test	Group	Sex	No	Serial No.	Sensitization	Challenge
ASA	1	M	5	ASAM 1-5	Red-ginseng radix solution(H) (sc)	Red-ginseng radix solution(H) (iv)
	2	M	5	ASAM 6-10	Red-ginseng radix solution(L) (sc)	Red-ginseng radix solution(L) (iv)
	3	M	5	ASAM 11-15	BSA (sc)	BSA (iv)
	4	M	5	ASAM 16-20	0.9%(w/v) saline (sc)	0.9%(w/v) saline (iv)

L, Red-ginseng radix solution low dose(1g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여);

H, Red-ginseng radix solution high dose(10g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여);

BSA, Bovine Serum Albumin(12mg/animal - 120mg/ml로 조제하여 0.1ml/animal);

0.9%(w/v) saline(0.1ml/animal)sc, subcutaneous injection; iv, intravenous injection.

Table 2. Experimental Design of Passive Systemic Anaphylaxis in Guinea pig.

Test Group	Sex	No.	Serial No.	Sensitization	Challenge	
PSA	1	M	2	PSAM1-2	Mouse anti-R-g radix solution(L) (0.2ml, iv)	Red-ginseng radix solution(L) (0.2ml, iv)
	2	M	2	PSAM3-4	Mouse anti-R-g radix solution(H) (0.2ml, iv)	Red-ginseng radix solution(H) (0.2ml, iv)

L, Red-ginseng radix solution low dose(1g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여);

H, Red-ginseng radix solution high dose(10g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여);

sc, subcutaneous injection; iv, intravenous injection.

Table 3. Anti-serum Groups Made of Using Mice

Group	Sex	No.	Serial No.	Dose
1	M	6	M1-6	Red-ginseng radix solution low dose + FCA, sc
2	M	6	M7-12	Red-ginseng radix solution high dose + FCA, sc
3	M	6	M13-18	BSA 12 mg/animal + FCA, sc
4	M	6	M19-24	0.9%(w/v) saline + FCA, sc

L, Red-ginseng radix solution low dose(1g/100ml로 용해하여 0.1ml/animal 투여);

H, Red-ginseng radix solution high dose(10g/100ml로 용해하여 0.1ml/animal 투여);

BSA, Bovine Serum Albumin(12mg/animal - 120mg/ml로 조제하여 0.1ml/animal);

0.9%(w/v) saline(0.1ml/animal)

sc, subcutaneous injection; CFA, Complete Freund's Adjuvant

Table 4. Experimental Design of Passive Cutaneous Anaphylaxis in Rat.

Test Group	Sex	No.	Serial No.	Sensitization	Challenge	
PCA	1	F	3	PCAF1-3	Mouse Anti-R-g radix solution(L) (0.1ml, id)	Red-ginseng radix solution L + EB (1ml, iv)
	2	F	3	PCAF4-6	Mouse Anti-R-g radix solution(H) (0.1ml, id)	Red-ginseng radix solution L + EB (1ml, iv)
	3	F	3	PCAF7-9	Mouse Anti-BSA. (0.1ml, id)	BSA + EB (1ml, iv)
	4	F	3	PCAF10-12	Mouse Anti-saline (0.1ml, id)	Saline + EB (1ml, iv)



L, Red-ginseng radix solution low dose(1g/100ml로 용해하여 1ml/300g 투여) ; H, Red-ginseng radix solution high dose(10g/100ml로 용해하여 1ml/300g 투여); BSA, Bovine Serum Albumin(12mg/animal-12mg/ml로 조제하여 1ml/animal); 0.9%(w/v) saline(1ml/animal); EB, Evan's blue(10 mg/ml); id, intradermal injection; iv, intravenous injection.

Table 5. Active Systemic Anaphylaxis Symptoms of Each Groups of Male Guinea pigs after First Challenge with Test Material.

Symptoms	1(Low)		2(High)		3(BSA)		4(Saline)	
	5		5		5		5	
	±	+	±	+	±	+	±	+
Restlessness	0	0	0	0	2	3	0	0
Piloerection	0	0	0	0	4	1	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	5	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	0	0	0	0	0	0
Sneezing	0	0	0	0	0	0	0	0
Coughing	0	0	0	0	0	4	0	0
Hyperpnea	0	0	0	0	0	5	0	0
Urination	0	0	0	0	0	0	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	0	0	4	0	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	0	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	5	0	0
Convulsion	0	0	0	0	0	0	0	0
Side position	0	0	0	0	0	0	0	0
Cheyne-Stokes respiration	0	0	0	0	0	0	0	0
Death	0		0		0		0	
Evaluation of the intensity	0		0		B		0	

Low, Red-ginseng radix solution low dose(1g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여) ; High, Red-ginseng radix solution high dose(10g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여) ; BSA, Bovine Serum Albumin(12mg/animal-120mg/ml로 조제하여 0.1ml/animal) ; 0.9%(w/v) saline(0.1ml/animal) sc, subcutaneous injection; iv, intravenous injection. 0, normal ; A, weak ; B, moderate ; C, severe

Table 6. Active Systemic Anaphylaxis Symptoms of Each Groups of Male guinea pigs after Second Challenge with Test Chemical.

Group No. of animal	1(Low)		2(High)		3(BSA)		4(Saline)	
	5		5		5		5	
Symptoms	±	+	±	+	±	+	±	+
Restlessness	0	0	0	0	0	5	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0	1	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	5	0	0
Rubbing or licking nose	0	0	0	0	0	0	0	0
Sneezing	0	0	0	0	0	0	0	0
Coughing	0	0	0	0	0	4	0	0
Hyperpnea	0	0	0	0	0	5	0	0
Urination	0	0	0	0	0	0	0	0
Evacuation	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhonchus	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Staggering gait	0	0	0	0	0	5	0	0
Jumping	0	0	0	0	0	3	0	0
Gasping and writhing	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	0	0	0	1	0	0
Side position	0	0	0	0	0	1	0	0
Cheyne-Stokes respiration	0	0	0	0	0	1	0	0
Death	0		0		1		0	
Evaluation of the intensity	0		0		C		0	

Low, Red-ginseng radix solution low dose(1g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여); High, Red-ginseng radix solution high dose(10g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여); BSA, Bovine Serum Albumin(12mg/animal - 120mg/ml로 조제하여 0.1ml/animal); 0.9%(w/v) saline(0.1ml/animal) sc, subcutaneous injection; iv, intravenous injection.

0, normal ; A, weak ; B, moderate ; C, severe

Table 7. Experimental Results of PSA Test

Group	Antiserum	Antigen	Results
1	mouse anti-Red-ginseng radix solution(L)	Red-ginseng radix solution(L)	normal
2	mouse anti-Red-ginseng radix solution(H)	Red-ginseng radix solution(H)	normal

L, Red-ginseng radix solution low dose(1g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여); H, Red-ginseng radix solution high dose(10g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g 투여); sc, subcutaneous injection; iv, intravenous injection.

Table 8. Heterologous Passive Cutaneous Anaphyaxis Test in Rats with Sera of Sensitized Mice

Sensitized Antigen (0.1ml, id)	Challenged Antigen (1ml, iv)	No. of animal		Dilution of antisera in sensitized mice									
		Mouse	Rat	x2	x4	x8	x16	x32	x64	x128	x256	saline	
Mouse Anti Red-g radix solution(L)	Red-g radix solution L	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Red-g radix solution(L) + Evan's blue	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Evan's blue	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mouse Anti Red-g radix solution(H)	Red-g radix solution H	4	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	Red-g radix solution(H) + Evan's blue	5	5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
	Evan's blue	6	6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Mouse Anti Bovine Serum albumin	Bovine Serum Albumin	7	7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	Bovine Serum Albumin + Evan's blue	8	8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Evan's blue	9	9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Mouse Anti Saline	Saline	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Saline + Evan's blue	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Evan's blue	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

[-] : less than 5mm of PCA titer      [±] : approximately equal 5mm of PCA titer  
 [+] : more 5mm of PCA titer

L, Red-ginseng radix solution low dose(1g/100ml로 용해하여 1ml/300g 투여); H, Red-ginseng radix solution high dose(10g/100ml로 용해하여 1ml/300g 투여); BSA, Bovine Serum Albumin (12mg/animal - 120mg/ml로 조제하여 1ml/animal); 0.9%(w/v) saline(1ml/animal); EB, Evan's blue(10 mg/ml); id, intradermal injection; iv, intravenous injection.

Table 9. Indirect Haemagglutination(IHA) Induced by Test Chemical in C<sub>57</sub>BL/6 Mice

Antisera	SRBC	IHA Reaction											
		Dilution of antisera											
		x2 <sup>1</sup>	x2 <sup>2</sup>	x2 <sup>3</sup>	x2 <sup>4</sup>	x2 <sup>5</sup>	x2 <sup>6</sup>	x2 <sup>7</sup>	x2 <sup>8</sup>	x2 <sup>9</sup>	x2 <sup>10</sup>	x2 <sup>11</sup>	x2 <sup>12</sup>
Anti-①	SRBC-①	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-②	SRBC-②	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-③	SRBC-③	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-④	SRBC-④												

①, bovine serum albumin; ②, saline; ③, Red-ginseng radix solution(low dose);  
 ④, Red-ginseng radix solution(high dose); SRBC, Sheep RBC.

Table 10. The Temperature Increase of Rabbits Intravenously Treated with Red-ginseng Radix Solution

Test solution	Dose (ml/kg)	Temperature increase(°C)			
		Rabbit1	Rabbit2	Rabbit3	Total
Red-ginseng(H) radix sol.	1	0	0.2	0.2	0.4
red ginseng(L) radix sol.	0.5	0.1	0.1	0.1	0.3
Saline	1	0.1	0.2	0.1	0.4

Table 11. Absorbance of Supernatant of Red-ginseng Radix Solution Mixures added Defibrinated Rabbit Blood.

Group No. of plate	Negative control <sup>1)</sup>	Low (1mg/100ml)	Middle (5mg/100ml)	High (10mg/100ml)	Positive control <sup>2)</sup>
I	0.592	0.484	0.568	0.879	0.832
II	0.622	0.489	0.628	0.915	0.906
III	0.627	0.547	0.639	0.943	1.058
Mean	0.614	0.507	0.612	0.912	0.932

1), Phosphate buffered saline ;  
 2), Distilled water.

Table 12. Percentage of Hemolysis of Red-ginseng Radix Solution Mixures

	Negative control	Low (1mg/100ml)	Middle (5mg/100ml)	High (10mg/100ml)	Positive control
% Hemolysis <sup>1)</sup>	0	-*	-*	93.71	100

$$1), \frac{(\text{Absorbance of test sample}) - (\text{Absorbance of negative control})}{(\text{Absorbance of positive control}) - (\text{Absorbance of negative control})} \times 100 ;$$

\*, The absorbance is lower than the absorbance of negative control.

### III. 考 察

免疫機能은 生理的 機能으로 防禦機能, 恒常性 維持機能, 監督機能이 있는데 이러한 機能의 亢進은 알레르기, 自家免疫疾患 등을 惹起하며, 따라서 免疫機能低下는 防禦機能低下, 惡性腫瘍疾患 등을 誘發한다. 그중 生體의 防禦機轉은 크게 先天性 防禦機轉과 後天性 防禦機轉으로 區分되며, 後天性 防禦機轉이 免疫의 實體로서 이는 특이하게 刺戟되기 以前까지는 조용히 대기상태에 있다가 적당한 刺戟이 있으면 이에 대비하여 活性化 될 수 있는 준비상태에 있게 된다<sup>5)</sup>.

過敏性 反應이란 어떤 抗原에 感作된 개체에서 다시 같은 抗原이 再導入되었을 때, 抗原-抗體 結合으로 조직손상을 惹起시킬 수 있는 면역반응이 일어나는 것을 말한다. 이는 면역반응이 平滑筋 및 血管壁에 작용하는 혈관작용성 물질들을 遊離하여, 이들 조직의 기능적 변화를 야기시키는 1型(anaphylactic type)과 體液性 抗體들이 세포들을 大食 또는 融解되기 쉽게 함으로써 그 세포들을 손상하는 데에 직접 참여하는 2型, 體液性 抗體들이 抗原과 결합하여 保體系를 活性化하고 保體의 分割들이 中性球를 誘引하여 부분적으로 中性球性 리소솜 효소의 遊離를 통하여 조직손상을 惹起하는 3型, 感作된 淋巴球들에 의한 細胞 媒介性 免疫反應이 조직손상을 惹起하는 4型으로 분류할 수 있다. 사람에게 있어서 1型 반응은 IgE 抗體들에 의하여 媒介된다. IgE는 정상 血清내에 대단히 낮은 농도로 유지하다가 抗原에 반응하여 IgE 생산이 증가하고 IgE 抗體들을 형성하여 過敏反應에 관여한다<sup>4)</sup>.

免疫毒性試驗은 醫藥品 原體 및 蛋白質과의 結合體가 抗原으로서 작용하여 체내의 면역계에 미치는 毒性에 대한 시험<sup>10)</sup>으로, 免疫毒性(immunotoxicology)을 측정하는 것이다. 免疫毒性을 측정하기 위하여 미국의 National Institute of Environmental Health Science의 보고를 보면, ① 病理毒性學: 血液學, 肝, 化學, 血清蛋白質, 淋巴器官 무게 및 組織學的 研究, ② 基主抵抗性: 腫瘍發生 및 感染物質 侵入, ③ 放射線測定 遲延性 過敏症, ④ 淋巴球增殖反應: phytohemagglutin, concanvaline A, lymphopolysaccharide 및 mixed lymphocyte culture, ⑤ 體液性 免疫: Ig 수준, 特異抗體力價, 斑點形成 細胞 檢定, ⑥ 巨食細胞 機能 檢定, ⑦ 骨髓電球細胞 檢定을 우선 順位化된 대로 실시한 후, 자료를 평가하여 陽性免疫反應을 判定하는 것을 제시하고 있다.<sup>10)</sup> 그러나 이러한 것을 검색하는데는 많은 시간과 노력이 요구되므로 본 실험에서는 上記 예규 10호 기준에 따

르고 白須泰彦<sup>41)</sup> 등의 방법으로 免疫毒性試驗을 하였다.

試驗項目으로는 anaphylactic shock, passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反應, 間接 赤血球 凝集反應 및 기타의 免疫 試驗으로 되어 있으나, 本 試驗에서는 기니피과 토끼를 利用하여 anaphylactic shock는 active systemic anaphylaxis (ASA)와 passive systemic anaphylaxis(PSA)로 나누어 實施하고, IgE生成與否를 確認하기 위하여 PCA 및 間接 赤血球 凝集反應을 實施하였으며, 기타의 免疫試驗은 省略하였다.

기니피과 New Zealand White Rabbit에서 試驗物質에 대한 免疫毒性試驗을 국립안전연구원 “毒性試驗標準作業 指針書”<sup>12-15)</sup>에 따라 기니피과를 利用한 1) Active Systemic Anaphylaxis (ASA), 2) Passive Systemic Anaphylaxis (PSA)와 생쥐, 흰쥐를 利用한 3) Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 및 생쥐 血清을 利用한 4) Indirect Haemoagglutination (IHA) 試驗을 實施한 結果, ASA시험에서는 紅蔘抽出液의 高用量 投與群(10g/100ml로 용해하여 0.2ml/300g)과 低用量 投與群(1g/100ml로 溶解하여 0.2ml/300g)에 있어서 14일과, 24일 두번의 야기실험결과 모든개체에서 anaphylaxis와 관련된 特異的인 臨床症狀을 나타내지 않았다. PSA 실험에서는 紅蔘抽出液의 高用量 投與群(10g/100ml로 溶解하여 0.2ml/300g)과 低用量 投與群(1g/100ml로 溶解하여 0.2ml/300g)에 있어서의 實驗結果 모든 個體에서 anaphylaxis와 관련된 特異的인 臨床症狀을 나타내지 않았다. 마우스, 랫드를 利用한 PCA 實驗에서는, 紅蔘抽出液의 高用量(10g/100ml로 溶解하여 0.2ml/300g)으로 感作시켜 얻은 抗血清을 皮內感作(0.1ml, id)한 후 抗原(+Evan's blue)을 注入時, 紅蔘抽出液의 高用量(10g/100ml로 溶解하여 1ml)을 投與한 群에서 2<sup>5</sup>倍 稀釋倍率까지 5mm以上 크기의 青色斑點을 觀察할 수 있었다. 그러나 紅蔘抽出液의 低用量을 投與한 群(1g/100ml로 溶解하여 1ml/300g)에서는 有意한 青色斑點을 觀察할 수 없었다. 抗原을 感作시켜 얻어진 마우스 抗血清을 利用한 HA test의 경우에는 BSA 投與群(12mg/animal-120mg/ml)로 調製하여 0.1ml/animal)의 경우 2<sup>1</sup> - 2<sup>3</sup>의 稀釋倍率에서 血球凝集을 보였으며, 低用量 投與群(1g/100ml로 溶解하여 0.1ml/animal 投與)의 경우 血球凝集이 觀察되지 않았으며, 高用量 投與群(10g/100ml로 溶解하여 0.1ml/animal 投與)의 경우에는 血球가 溶血되었다.

따라서, 紅蔘抽出液은 ASA, PSA에서 보여지는 것처럼 anaphylactic shock를 誘發하지 않는 것으로 思慮되나, PCA의 結果를 따르면 特異的인 IgE를 形成하는 것으로 思慮되며, 低用量에서는 血球凝集이 일어나지 않으나 高用量에서는 血球가 溶血되는것으로 思慮된다.

사람이나 動物에서 發熱反應을 일으키는 發熱因子는 endotoxin, chemicals, particulated materials 등이 있으며, 이러한 物質들의 發熱反應으로 因하여 高熱, 淋巴球의 移動, 補體結合, histamine 遊離, 血管 透過性的 變更 등을 惹起시킨다.<sup>23)</sup> 發熱性 物質은 이러한 理由로 注射用 醫藥品에서 安全性에 대한 많은 問題가 提起되어, 이에 대한 評價 方法으로 rabbit pyrogen test가 開發되었으며,<sup>43)</sup> 1942년 미국약전<sup>42)</sup>에 처음으로 試驗方法이 規定된 이래 國內에서도 대한약전<sup>3,14)</sup> 등에서도 이에 대한 規定을 하고 있다.

發熱性物質에 대한 感受性은 사람, 토끼에서 높고, 개나 침팬지에서는 낮아 토끼를 使用하도록 하고 있으며, 또한 토끼 3마리의 反應의 合計가 1.3℃ 以下이며, 發熱性物質試驗에서 陰性, 2.5℃ 以上이면 陽性으로 判定하고, 中間이면 反復試驗하여 累積動物 6마리의 合計가 3.0℃ 以下이면

陰性, 4.2℃ 以上이면 陽性, 中間이면 反復하여 累積動物 9마리의 合計가 5.0℃ 未滿이면 陰性, 5.0℃ 以上이면 陽性의 評價를 하도록 規定하고 있다.

이에 따라 New Zealand White種 Rabbit에 대한 試驗物質의 發熱性을 대한약전<sup>39,14)</sup> 및 미국약전<sup>42)</sup>에 따라 試驗한 結果, 試驗物質을 耳靜脈으로 臨床適用濃度인 0.2ml/300g(33.3ug/kg)을 高用量投與(1ml/kg)와 低用量投與(0.5ml/kg)하여 보았을때, 投與前의 體溫에 比하여 最高 0.3℃ 以下였으며, 最高上昇溫度 合計도 0.6℃ 以下로 모두 陰性으로 判斷되므로 紅蔘抽出液은 發熱性 物質이 아닌 것으로 判定되었다.

溶血反應은 外因性 抗原에 대한 過敏性 反應중의 하나인 細胞毒性反應으로 免疫性 溶血性 貧血 등을 誘發시킨다<sup>1,2,10)</sup>. 紅蔘抽出液에 대한 溶血性 試驗을 各 群當 3個의 plate로 나누어 제1군은 紅蔘抽出液 低用量群(1g/100ml), 제2군은 中間用量群(5g/100ml), 제3군은 高用量群(10mg/100ml)으로 나누어 試驗에 使用하였고, 陰性 對照群으로는 phosphate buffered saline, 陽性 對照群으로는 蒸溜水를 使用하였다. 各各에 脫纖維 토끼 血液 0.1ml씩을 添加하고 37℃에서 24시간동안 培養한 후 1,500rpm에서 5分間 遠心分離하여 그 上層液을 576nm에서 吸光度를 측정한 結果 低用量群과 中間用量群에서는 吸光度值가 陰性 對照群의 吸光度인 0.614보다 낮은 0.507과 0.612였으나 高用量群에서는 0.912로 陽性 對照群의 吸光度인 0.932에 가까웠다. 따라서, 紅蔘抽出液 1g/100ml과 5g/ml은 脫纖維 토끼 血液에서 溶血性 試驗結果 陰性이나 紅蔘抽出液 10g/100ml은 陽性으로 溶血性이 있는 것으로 思慮된다.

以上에서 紅蔘抽出液에 대한 研究結果를 살펴보면, 紅蔘抽出液은 免疫毒性試驗時 高用量 投與群에서만 特異的인 IgE가 形成되었고, 溶血性 試驗에서도 高用量 投與群에서만 陽性으로 나타났으므로, 安全하게 活用하기 위해서는 亞急性 과 慢性毒性試驗 및 過敏反應 등 持續的인 研究가 必要하며 臨床適用의 適切한 投與量 算定과 長期間 投與時 細心한 注意가 要求된다.

## IV. 結 論

紅蔘抽出液의 安全性 評價를 위하여 의약품안전성 관리기준에 따라 免疫毒性試驗은 마우스, 랫드 및 기니피그를 實驗動物로 試驗한 結果 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 紅蔘抽出液은 免疫毒性試驗에서 Anaphylatic shock는 나타나지 않았으나 高用量投與群에서만 IgE가 형성되었다.
2. 紅蔘抽出液은 發熱性 試驗에서 陰性으로 나타났다.
3. 紅蔘抽出液은 溶血性 試驗에서 低用量과 中間用量은 陰性으로 나타났으나, 高用量은 陽性으로 나타났다.

## 參考文獻

1. 金良垣: 독성학 - 원리와 시험방법, 서울, 綠苑出版社, PP.15-57,271-310, 699-715,1986.
2. 金良垣: 毒性學, 서울, 同和技術, p.210, 559, pp.569-570, 1988.
3. 대한공정서 협회: 大韓藥典, 서울, 세문사, pp.1154~1155, 1982.

4. 서울대학교 의과대학: 免疫學, 서울, 서울대학교출판부, pp.2~6,135~152, 1988.
5. 서울대학교 의과대학: 腫瘍學, 서울, 서울대학교출판부, pp.1~4,10~14, 32~43, 1988.
6. 李尙仁, 安德均: 한약임상응용, 서울, 성보사 pp.345-350, 1982.
7. 정기택의 12인: 고려인삼, 한국인삼연초연구원, p.44, 1993.
8. 崔容泰 外: 鍼灸學, 서울, 集文堂, PP. 382-384, PP.1457-1458, 1991.
9. 한국약학대학협의회 약전분과회: 대한약전제5개정 1, 2부해설, 서울, 문성사, pp.1211~1212, 1987.
10. 허인회: 독성학, 서울, 신일상사, pp.35-42, 153-172, 219-269, 1993.
11. 국립보건안전연구원: 의약품등의 독성시험기준, 국립안전연구원예규 10호, 1988.
12. 국립보건원: 일반독성에 관한 규정, 국립보건원예규 제 222호, 1982.
13. 국립보건원: 특수독성에 관한 규정, 국립보건원예규 제 267호, 1985.
14. 보건사회부: 발열성물질 시험법: 생화학적 제재기준 및 시험방법개정, pp.562-564, 1987.
15. 보건사회부: 의약품등 제조업 및 제조품목 허가지침, 보건사회부고시 제90-70호, 1990.
16. 姜成吉, 李惠貞: 인삼수침액이 제제방법에 따른 안전도 검사 및 규격화 연구, 대한한의학회지 15(1): 282-305, 1994.
17. 金容奭, 姜成吉: 人蔘水鍼이 흰쥐의 甲狀腺機能低下에 미치는 影響, 慶熙醫學 6(2):202-210, 1990.
18. 金雄時, 高炯均, 姜成吉: 水蔘, 白蔘 및 紅蔘水鍼이 Alloxan 糖尿病 흰쥐에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌 6(1):1-13, 1989.
19. 金昌一, 李惠貞: 濃度別 人蔘水鍼이 hydrocortisone acetate를 투여한 흰쥐의 體內代謝에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集 13:103-111, 1990.
20. 金泰潤, 姜成吉: 人蔘水鍼前處置가 發癌豫防에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌 9(2):33-44,1988.
21. 金炫秀, 李潤浩: 丹蔘抽出液의 급성독성시험, 안점막자극시험 및 발열성시험에 관한 연구, 경희한의대논문집 16(1):199-228, 1993.
22. 남윤석, 이운호: 약침용 홍삼추출액의 급성독성시험에 관한 연구, 대한한의학회지 17(1):478-493, 1996.
23. 보건사회부: 醫藥品安全性 試驗管理 基準 解說書, 대한보건공정서협회, PP.489-500,1987.
24. 李東寧, 李潤浩: 荏油 및 草龍膽水鍼이 흰쥐의 局所組織에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌 8(2):64-65, 1987.
25. 李山明, 李潤浩: 人蔘, 鹿茸 및 木香水鍼이 흰쥐의 體重 및 消化管호르몬 分泌에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌 5(1):1-13, 1988.
26. 이영순, 강경선, 신동진, 김형욱, 조재진, 김배환, 남기환, 서광원: 기니피그 및 마우스에 cis-Malonato [(4R,5R)-4, 5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1, 3-dioxolane]platinum(II)(SKI-2053R)의 항원성 시험, Korean J.Toxicol.8(2):255-263, 1992.
27. 李宗錫, 高炯均, 金昌煥: 蜂毒液의 安全性에 관한 研究, 大韓鍼灸學會誌 11(1):177-196, 1994.
28. 李弼雄, 姜成吉: 人蔘水鍼이 鎮痛 및 血壓에 미치는 影響, 東洋醫學 11(2):66-75, 1985.



29. 李惠貞, 崔容泰: Alloxan 糖尿病家兔에 對한 人蔘水鍼의 效果 및 Horseradish Peroxidase의 軸突逆輸性에 關한 研究, 慶熙韓醫大論文集 10:169-187, 1987.
30. 李惠貞: 降血糖作用에 依據한 種類別 人蔘水鍼액기스 製法研究, 大韓韓醫學會誌 13(1):23-40, 1992.
31. 林夏燮, 姜成吉: 人蔘水鍼이 抗 알레르기에 미치는 影響, 慶熙醫學 7(1):63-72, 1991.
32. 全在煜, 姜成吉: 人蔘水鍼이 Endotoxin으로 誘發된 血栓動物模型에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集 13:219-233, 1990.
33. 曹珣鄉, 朴英培, 李潤浩: 鹿茸 및 靈芝水鍼의 急性 毒性에 關한 實驗的 研究, 大韓鍼灸學會誌 9(1):71-83, 1992.
34. 崔圭圭, 李潤浩: 水鍼用 鹿茸抽出液의 安定性 評價에 關한 研究, 慶熙韓醫大論文集 15:203-229, 1993.
35. 崔旼燮, 高炯均, 金昌煥: 藥鍼用 黃耆抽出液의 急性 毒性에 關한 研究, 大韓鍼灸學會誌 12(1):179-187, 1995.
36. 崔容泰, 李潤浩, 姜成吉, 金昌煥, 朴東錫, 安秉哲, 高炯均, 金在圭, 朴英培, 李惠貞, 崔道永: 數種 藥鍼刺戟이 急性 毒性 및 效能에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌 14(2):106-132, 1993.
37. 崔俊培, 崔道永, 李潤浩: 藥鍼用當歸抽出液의 皮下 및 筋肉刺戟試驗에 關한 研究, 大韓鍼灸學會誌 10(1):33-49, 1992.
38. 黃敬愛, 高炯均, 金昌煥: 人蔘 및 鹿茸水鍼의 時間經過에 따른 免疫效果研究, 慶熙醫學 4(2):150-157, 1988.
39. 上海中醫學院: 中草藥學, 香港, 商務印書館, pp.511-515, 1975.
40. 朱天忠: 中草藥鍼劑不良反應的防治, 中西醫結合雜誌, 7(3):136-137, 1987.
41. 白須泰彦 吐山豊秋: 新毒性試驗法, 東京,リアライズ社, pp.352-374, 1988.
42. The United States of Pharmacopoeial convention: Pyrogen test ; Pharmacopoeia of the United States Pharmacopoeial convention Inc.,pp.1181-1182, 1985.
43. Seibert, F.B.: Fever-producing substance found in some distilled water, Am. J. Physical. 67:90-104, 1923.