

애엽추출물 항궤양제 DA-9601의 랫드에 대한 4주 경구 반복투여 독성연구

김옥진 · 강경구 · 김동환 · 백남기 · 안병욱 · 김원배* · 양중익
동아제약(주) 연구소

Four-week Oral Toxicity Study of DA-9601, an Antiulcer Agent of *Artemisia* spp. Extract, in Rats

Ok Jin KIM, Kyung Koo KANG, Dong Hwan KIM, Nam Gi BAIK,
Byoung Ok AHN, Won Bae KIM* and Junnick YANG

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd.,
47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-shi, Kyunggi-do 449-900, Korea

(Received September 5, 1996; accepted November 1, 1996)

Abstract-This study was conducted to investigate the repeated dose toxicity of DA-9601, an antiulcer agent of *Artemisia* spp. extract, in rats. DA-9601 was administered orally once a day for 4 weeks to 10 males and 10 females per group at doses of 0(vehicle control), 125, 500 or 2000 mg/kg/day. Throughout the study, no treatment-related deaths and clinical signs were observed. In female rats receiving 125 mg/kg of DA-9601, water consumption increased slightly on day 4, 11 and 25. Hematological examination showed a decrease of MCV and an increase of PLT in male rats at the doses of 500 and 2000 mg/kg groups. Blood biochemistry revealed slight decreases of cholesterol, BUN and Na in male rats and decreases of total bilirubin and creatinine and slight increases of globulin and Cl in female rats. The organ weights at the end of 4 weeks showed slight changes in some organs of treated groups. But, all these changes were not considered to be of toxicological importance, because they did not show dose-response relationship and relevance to gross and microscopic findings. Histopathologically, abnormal treatment-related changes were not observed in any organ and target organs were not detected. On the basis of these results, the NOAEL(no-observed-adverse-effect level) of DA-9601 was estimated to be more than 2000 mg/kg/day under the conditions tested.

Keywords □ DA-9601, *Artemisia* spp. extract, antiulcer agent, repeated dose toxicity, rat

DA-9601은 애엽추출물로서 위염 및 위궤양치료제로의 개발이 기대되는 물질이다. 애엽은 약썩의 건조잎으로서 한방에서는 지혈, 강장보혈의 목적으로 이용되며 부인병약과 건위제, 설사치료제, 뜸썩의 원료로 사용되어 왔다(陳存仁, 1984). 또한, 최근에는 애엽의 성분으로부터 flavonoid 화합물인 유파틸린(eupatilin)이 분리되어졌고 이 물질이 강한 항궤양작용을 갖는 것으로 보고되어졌다(Lee, 1995). 동아제약(주) 연구소에서는 애엽추출물을 항궤양제로 개발하기 위하여 여러 동물모델에서 효력시험을 실시한 결과 기존의 타약제에 비하여 보다 우수한 항궤양 효과를 보이는 것을 확인하였다(오 등, 1996). 위궤양은 소화기질환중 발생빈도가 높은 질병으로 공격인자와 방어인자의 불균형에

의해 야기되는 것으로 알려져 있으며, 공격인자의 증가로는 산(HCl)과 pepsin의 분비증가, 위점막의 허혈상태(ischemia), 비스테로이드계소염진통제(NSAIDs)와 같은 약물의 장기복용, 흡연에 의한 nicotine의 유입, 알콜섭취 및 *Helicobacter pylori* 감염 등이 있고 방어인자의 약화로는 점액분비의 감소, 위점막순환혈류량의 감소, 중탄산이온의 분비감소, 위상피세포 재생력의 변화 등이 있다(Herfindal 등, 1992). 또한 최근에는 산소라디칼이 중요한 공격인자로서 고려되어지고 있으며, 산소라디칼의 주요 생성기전은 스트레스로 인한 위장혈관의 반복적인 수축 및 확장에 의한 허혈-재관류시 또는 *Helicobacter pylori* 감염시 활성화된 호중구로부터 생성되는 것으로 알려져 있다(Perry 등, 1986; Feldman과 Peterson, 1993). 애엽추출분획인 DA-9601의 항궤양작용은 주로 위점막 상피세포의 점액분비(mucus secre-

* To whom correspondence should be addressed.

tion) 촉진작용과 산소라디칼 생성억제작용에 의하여 위점막보호와 손상된 조직의 재생촉진이 이루어지는 것으로 추정되고 있다. 본 시험은 안전성평가의 일환으로 DA-9601을 랫드에 경구로 4주간 반복투여하였을때 발현가능한 독성을 평가하기 위하여 실시하였다.

실험방법

본 시험은 '의약품 등의 독성시험기준'(국립보건안전연구원, 1994)에 준하여 실시하였다.

시험물질

시험물질인 DA-9601(Lot No. DA-9601-L-03)은 동아제약(주) 약리연구실에서 약썩의 일종인 *Artemisia asiatica Nakai*를 주원료로 하여 생산한 추출물로서 황갈색의 과립물질로 시험기간 중 냉장, 차광상태로 보관하였다. 시험물질은 매일 투여직전에 조제하였으며 각각의 용량별로 DA-9601과 hydroxy propyl methyl cellulose(HPMC)를 평량한 후 생리식염수를 사용하여 고르게 현탁시켜 사용하였다. 이때 사용된 HPMC는 2910 약전품을 사용하였고 DA-9601의 각 용량군에서 HPMC의 농도는 5%로 조제하여 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

4주령의 SPF Sprague-Dawley계 랫드 암수 각 45마리를 Charles River(Japan)로 부터 구입하여 12일간 청정구역내에서 검역 및 순화사육한 다음 6주령의 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 검역순화사육기간 및 시험기간중 동물은 온도 23±2℃, 습도 55±15%, 환기횟수 15-20회/시간, 조도 150-300 Lux, 조명시간 12시간(07:00-19:00)의 조건으로 유지하였다. 동물의 수용은 랫드용 스테인레스제 wire 사육상자(W222×L325×H130 mm)를 사용하여 순화검역 기간에는 케이지당 5마리씩, 시험기간중에는 2마리씩 각각 암수 분리하여 수용하였다. 사료는 마우스 랫드용 고형사료(2.0 M rad 방사선멸균품, 제일사료)를, 음수는 자외선멸균 수도수를 자유섭취시켰다.

투여용량의 설정

DA-9601은 물에 용해되지 않으므로 5% HPMC에 현탁

하여 경구로 투여하여야 하는데 투여량설정을 위한 예비시험에서 투여약물의 부피증가로 2,000 mg/kg 이상을 연속투여하는 것이 불가능하였다. 따라서 투여가능한 최대용량으로 2,000 mg/kg을 본시험의 고용량으로 설정하고 이하 공비 4로 500, 125 mg/kg/day를 설정하였으며, 대조군은 매체 대조물질로 5% HPMC 용액을 투여하였다. 투여약물의 부피는 대조군을 포함하여 모두 10 ml/kg으로 하였다.

시험군의 구성

시험군의 구성은 Table I과 같다. 검역 및 순화사육 후 건강한 동물을 선발하여 체중을 측정후 전체평균에서 2 S.D.를 넘는 동물은 제외시키고 나머지 동물을 이용하여 무작위법으로 군분리를 실시하였으며 군분리 후 체중의 구간 유의차가 인정될 경우에는 유의차가 없을 때까지 반복하여 균일하게 군분리하였다. 군구성은 DA-9601 3개 투여군과 매체대조물질 투여군인 대조군을 포함하여 모두 4개군으로 구성하였으며 각 투여군의 사용동물수는 대조군 및 DA-9601 125, 500 및 2,000 mg/kg/day 투여군 모두 암수 각각 10마리씩으로 구성하였다.

투여방법

투여는 임상적용경로인 경구로 하였으며 랫드용 경구투여침을 이용하여 1일 1회 4주간(28일) 반복투여 하였다. 각 개체의 투여량은 주 2회 측정하는 체중을 근거로 산출하였다.

검사항목

폐사율 및 임상증상

투여개시일부터 투여종료일까지 1일 2회, 오전과 오후에 각 개체의 사망유무와 일반상태를 관찰하였다.

체중, 사료섭취량 및 음수섭취량

투여기간 동안 전군에 대하여 매주 2회씩 체중, 사료섭취량 및 음수섭취량을 측정하였다. 사료와 음수섭취량은 케이지별로 측정하여 마리당 1일 평균소비량을 산출하였다.

안검사

투여종료 후 모든 동물에 대하여 육안 및 안검사용 검안경(mini miroflex II, Heine)을 이용하여 좌우안의 각막 및 홍채 등의 이상유무를 관찰하고 fundus camera(zenesis, Kowa)를 이용하여 안저의 이상유무를 관찰하였다.

혈액학적 검사

Table I. Experimental design for a 4-week repeated dose toxicity study of DA-9601 in rats

Group	Dose (mg/kg)	Sex	No. of animal	Animal number	Admini. Vol.(ml/kg)
Control	0	male	10	11001-11010	10
		female	10	12001-12010	10
T1	125	male	10	21001-21010	10
		female	10	22001-22010	10
T2	500	male	10	31001-31010	10
		female	10	32001-32010	10
T3	2,000	male	10	41001-41010	10
		female	10	42001-42010	10

투여종료 후 각군의 동물 전례에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액은 ether 마취한 동물의 복대동맥으로부터 채취하여 EDTA와 구연산나트륨 등의 항응고제를 이용하여 각각 혈액학적검사와 혈액응고시간의 측정에 이용하였다. 혈액학적검사에서는 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(Hb), 헤마토크리트치(Ht), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT) 등에 대하여 혈구자동측정기(Minos Vet, Minos)를 이용하여 측정하였으며, 혈액응고시간 측정은 자동응고시간측정기(Automated Coagulation Laboratory, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(APTT)을 측정하였다. 한편, 백혈구분율을 조사하기 위하여 혈액을 슬라이드에 도말하여 건조시킨 후 0.5% Modified Giemsa 염색액으로 50분간 염색하여 광학현미경으로 400배의 배율에서 혈구의 형태를 관찰하고 백혈구감별계수를 실시하여 백분율을 구하였다.

혈청생화학적 검사

혈액학적검사를 위하여 채취한 혈액의 잔여혈액을 응고시킨 후 혈청을 분리하여 혈청생화학적검사를 실시하였다. 혈청생화학적 검사는 혈액자동분석기(Spectrum, Abbott)를 이용하여 albumin, globulin, A/G ratio, total protein, glucose, cholesterol, calcium, triglyceride, total bilirubin, urea nitrogen(BUN), creatinine, alkaline phosphatase(ALP), alanine transferase(ALT), aspartate transaminase(AST), inorganic phosphorus를 측정하고 자동이온측정기(Lytening system 30, Baxter Diagnostic Inc.)를 이용하여 chloride, calcium, potassium을 측정하였다.

뇨검사

투여종료 후 랫드용 metabolic cage에 한마리씩 분리수용하여 검사전일 오후 4시부터 16시간 채뇨하였다. 채취한 뇨에 대해서 외관과 뇨량을 관찰한 후 뇨검사용시험지(Multistix, Ames)를 사용하여 pH, 단백(protein), urobilinogen, bilirubin, 포도당(glucose), 케톤체(ketone body), 잠혈(blood), 침사에 관하여 검사하였다. 평가는 뇨검사용시험지의 평가표에 의해 평점하였으며, urobilinogen은 <2, 2, 4, 8 Ehrlich units/dL을 각각 -, +, ++, +++ 등으로, 케톤체는 <5, 5-15, 40, 80, 160 mg/dL을 각각 -, ±, +, ++, +++ 등으로, 포도당은 <100, 100, 250, 500, 1000 mg/dL을 각각 -, ±, +, ++, +++ 등으로 평점하였다. 뇨침사가 인정된 개체에 대하여는 시료를 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 남은 여액과 침전물을 잘 섞고 slide glass에 한 방울 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 검체를 준비하고 광학현미경을 이용하여 200배의 시야에서 뇨침사의 결정형태를 관찰하였다.

부검 및 장기중량측정

투여종료 후 각군의 동물을 ether로 마취시켜 외관의 이상유무를 육안적으로 관찰하고 채혈을 실시하였다. 채혈후 방혈치사시킨 동물에 대해 부검을 실시하여 체강과 각 실질장기에 대해 육안적검사를 하였다. 각각의 병변을 관찰, 기록한 후 뇌, 뇌하수체, 심장, 폐장, 비장, 간장, 신장, 부신, 흉선, 타액선, 갑상선, 고환, 정낭, 전립선, 난소 등을 주위 조직과 분리하여 각 장기의 절대중량을 측정하였으며, 상대중량은 각 개체의 체중에 대한 비율의 1,000배로 산출하였다.

병리조직학적검사

중량을 측정한 장기들과 위, 소장, 대장, 장간막입파절, 방광, 안구 등의 장기를 10% 중성포르말린에 1주이상 고정시킨 다음 통상적인 방법을 거쳐 조직절편을 제작하였으며, 골 및 골수검사를 위해 각 동물의 흉골을 절제하여 10% 중성포르말린에 1주이상 고정시키고 다시 탈회용액(10% formic acid in 10% formalin)에 2주이상 넣어 탈회시킨 후 통상적인 방법으로 조직절편을 제작하였다. 제작된 조직절편은 hematoxylin-eosin염색을 한 후 광학현미경으로 병리조직학적 검사를 대조군과 고용량군에 대하여 실시하였으며, 고용량군에서 이상을 나타내는 장기와 육안병변이 인정된 장기에 대해서는 다른 용량군에 대해서도 병리조직학적 검사를 실시하였다.

통계학적분석

본 시험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적 분석은 Bartlett test로 분산검정을 실시하여 등분산일 경우 일원배치 분산분석법으로, 부등분산일 경우 Kruskal-Wallis법으로 유의성검정을 하였다. 일원배치 분산분석법에서 유의한 경우 Scheffe법을, Kruskal-Wallis법에서 유의성이 인정되는 경우에는 distribution-free multiple comparison법에 의해 대조군과 각 투여군간의 다중비교를 실시하였다. 분산검정의 통계처리는 SAS(Statistical Analysis System) 통계프로그램을 이용하였다.

실험결과

폐사율 및 일반증상

투여기간중 폐사에는 나타나지 않았다.

관찰된 일반증상은 Table II와 같다. 투여 직후 침울, 피모거침, 수척, 비강주위 적색착색, 등부위의 찰과상과 피모손실 및 가피형성 등의 증상이 소수에서 관찰되었으나 이는 대조군을 포함하여 고르게 나타났으며 용량상관성을 보이지도 않아 약물투여와 관련된 변화로는 볼 수 없었다. 그외 투약과 관련한 유의한 변화는 인정되지 않았다.

체중변화, 사료섭취량 및 음수량

각 군의 암수 모든 동물에서 투약기간중 대조군과 비교하여 유의성있는 체중의 변화는 인정되지 않았다(Fig 1, 2).

Table II. Clinical signs in rats orally treated with DA-9601 for 4 weeks

Test materials	Vehicle				DA-9601				
	Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Dosage (mg/kg/day)				125		500		2000	
Observations	n	10	10	10	10	10	10	10	10
Behavior/activity									
Transient depress after inoculation		0	0	1	0	0	0	0	0
Appearance & condition									
Rough hair coat		1	0	0	0	0	1	0	0
Emaciation		0	0	0	0	0	1	0	0
Body surface									
Abrasion		0	0	0	0	0	0	1	0
Hair loss		0	0	0	0	0	0	1	0
Scabbed area		0	0	0	0	0	0	2	0
Oral/nasal									
Red stains around the nose		1	0	0	1	0	0	1	0

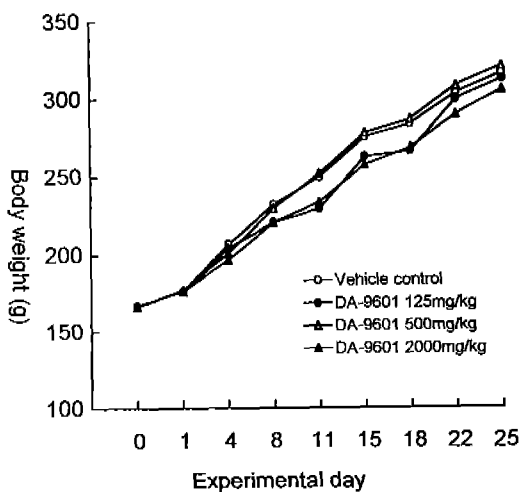


Fig. 1. Body weight changes in male rats orally treated with DA-9601 for 4 weeks.

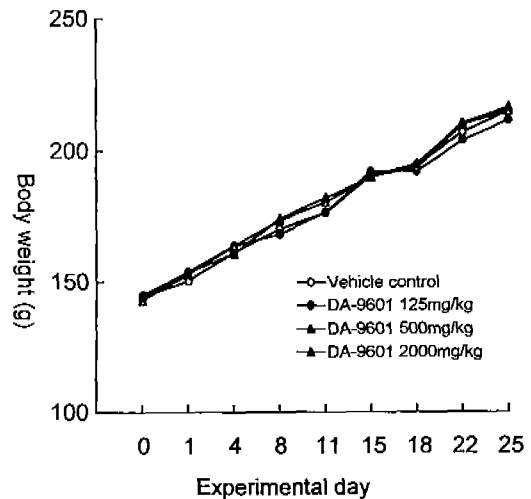


Fig. 2. Body weight changes in female rats orally treated with DA-9601 for 4 weeks.

Table III. Food consumption (g/day/animal) in the rats administered orally with DA-9601

Sex	Dose (mg/kg/day)	Days of administration						
		4	8	11	15	18	22	25
Male	Control	29.9±0.65	29.9±3.25	33.4±2.04	30.1±3.03	28.9±6.01	32.1±2.56	34.0±3.10
	DA-9601 125	28.5±1.70	24.7±3.90	24.6±5.99	26.6±1.78	23.3±2.97	29.1±2.41	30.7±2.64
	DA-9601 500	29.4±1.14	29.6±1.85	33.1±2.70	30.9±3.49	27.2±1.35	29.1±3.58	31.7±3.51
	DA-9601 2000	26.1±6.41	27.2±2.75	28.7±4.78	28.3±2.28	30.3±9.66	28.1±3.40	31.1±2.88
Female	Control	22.9±1.52	21.2±2.17	19.0±1.50	19.8±2.02	20.5±2.96	21.9±2.77	23.8±2.56
	DA-9601 125	24.0±1.37	20.6±4.99	23.2±5.79	19.2±3.42	19.8±2.33	20.3±2.84	26.5±3.54
	DA-9601 500	24.0±2.89	22.3±1.89	22.9±4.52	20.7±2.54	20.1±2.56	23.8±3.37	25.3±3.42
	DA-9601 2000	21.0±1.37	20.3±1.35	21.5±2.65	19.2±2.99	18.4±2.68	20.5±3.54	21.7±2.20

Each value represents the mean ± SD.

사료섭취량은 각 군의 암수 모든 동물에서 투약기간중 대조군과 비교하여 유의성있는 변화는 인정되지 않았다 (Table III). 음수섭취량은 DA-9601 125 mg/kg을 투여한 자

성 동물군이 투여 4일, 11일 및 25일째 대조군에 비하여 유의성있는 증기를 보였으나 용량상관성은 인정되지 않았으며 그외 각 군의 암수 모든 동물에서 투약기간중 대조군과

Table IV. Water consumption (ml/day/animal) in the rats administered orally with DA-9601

Sex	Dose (mg/kg/day)	Days of administration							
		4	8	11	15	18	22	25	
Male	Control	±37.0±3.71	41.5±11.6	42.0±8.37	38.5±4.87	32.5±6.85	37.0±6.71	38.0±9.59	
	DA-9601	125	35.3±3.60	33.0±4.81	34.0±5.48	38.5±4.54	31.0±5.48	40.0±7.07	34.0±4.54
		500	35.0±2.74	37.0±3.71	38.0±4.11	42.0±2.09	38.0±4.47	41.5±2.24	39.0±2.85
	2000	33.0±8.37	39.0±5.18	39.5±7.58	35.5±9.42	33.5±6.02	41.5±3.35	38.0±6.71	
Female	Control	27.0±2.09	27.5±1.77	20.0±3.54	27.5±2.50	28.5±3.35	28.0±2.09	30.0±1.77	
	DA-9601	125	31.0±2.85*	33.5±6.98	36.0±8.22*	30.5±6.22	30.0±5.30	28.0±5.70	34.0±2.24*
		500	27.2±2.93	26.5±1.37	21.0±4.18	24.5±1.12	26.0±2.24	30.0±5.86	29.2±2.75
	2000	24.5±3.26	28.5±2.85	27.0±2.74	27.5±5.00	27.5±4.68	32.5±7.71	29.5±3.71	

Each value represents the mean±SD. *Significantly different from the control (P<0.05).

Table V. Hematologic parameters in the rats administered orally with DA-9601 for 4 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	N	WBC (10 ³ /mm ³)	Lymph. (%)	Mono. (%)	Baso. (%)	Eosin. (%)	Neut. (%)	RBC (10 ⁶ /mm ³)	HB (g/dl)	
Male	Control	10	5.96±4.35	78.4±4.3	1.7±1.4	0.1±0.3	0±0	19.8±4.2	7.42±0.34	15.2±0.67	
	DA-9601	125	10	6.52±4.28	82.0±3.4	1.0±0.8	0.1±0.3	0.2±0.5	16.8±2.8	7.28±0.43	14.5±0.84
		500	10	6.27±0.98	80.2±3.6	0.8±1.0	0.1±0.3	0.4±0.5	18.6±3.9	7.53±0.28	15.0±0.72
		2000	10	8.37±3.39	80.3±4.2	0.9±0.8	0.0±0.0	0.1±0.3	18.7±4.0	7.61±0.26	15.5±0.37
Female	Control	10	4.57±2.47	77.2±2.9	1.1±0.8	0.1±0.3	0.5±0.7	21.1±2.4	6.90±0.42	14.5±0.91	
	DA-9601	125	10	5.25±3.33	79.3±3.6	0.4±0.7	0.1±0.3	0.1±0.3	20.1±3.4	7.21±0.25	14.7±0.71
		500	10	5.48±2.30	80.1±2.3	0.6±0.7	0.7±0.9	0.2±0.4	18.4±1.9	7.07±0.35	14.5±0.47
		2000	10	6.21±3.07	79.1±3.4	1.0±0.7	0.4±0.8	0.2±0.4	19.4±2.6	7.11±0.25	14.7±0.51

Each value represents the mean±SD. WBC: White blood cell, Lymph.: lymphocyte, Baso.; basophil, Eosin.; eosinophil, Neut.; neutrophil, RBC; Red blood cell, HB; Hemoglobin, HCT; Hematocrit, HCV; Mean corpuscular volume, MCH; Mean corpuscular hemoglobin, MCHC; Mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT; Platelet, PT; Prothrombin time, APTT; Activated partial thromboplastin time.

Table V. Continued.

Sex	Dose (mg/kg)	N	HCT (%)	MCV (μ ³)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT (10 ³ /mm ³)	PT (sec)	APTT (sec)	
Male	Control	10	39.9±1.76	53.7±1.57	20.5±0.63	38.2±0.71	621±41.3	12.0±0.80	26.0±5.67	
	DA-9601	125	10	38.4±2.09	52.8±1.75	19.9±0.80	37.9±0.92	677±89.0	11.7±0.31	21.7±3.31
		500	10	39.2±1.84	52.1±1.10*	19.8±0.41	38.2±0.33	745±66.7*	11.4±0.48	25.2±6.06
	2000	10	40.2±1.08	52.9±1.29	20.3±0.61	38.5±0.46	726±100.7*	11.5±0.55	22.2±3.34	
Female	Control	10	37.4±2.18	54.2±1.03	20.9±0.63	38.7±0.81	616±55.9	10.7±0.27	21.4±3.83	
	DA-9601	125	10	38.5±1.53	53.4±1.07	20.4±0.64	38.3±0.65	629±60.9	10.7±0.38	28.8±28.4
		500	10	37.8±1.15	53.6±2.01	20.5±0.80	38.3±0.37	646±45.9	10.5±0.40	27.0±16.0
	2000	10	38.0±1.31	53.7±1.25	20.6±0.65	38.6±0.39	635±126.7	10.8±0.62	20.7±3.24	

Each value represents the mean±SD. *Significantly different from the control (P<0.05). WBC: White blood cell, Lymph.: lymphocyte, Mono.; monocyte, Baso.; basophil, Eosin.; eosinophil, Neut.; neutrophil, RBC; Red blood cell, HB; Hemoglobin, HCT; Hematocrit, MCV; Mean corpuscular volume, MCH; Mean corpuscular hemoglobin, MCHC; Mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT; Platelet, PT; Prothrombin time, APTT; Activated partial thromboplastin time.

비교하여 유의성있는 변화는 인정되지 않았다(Table IV).

안검사

투여종료후 실시한 안과학적검사결과 모든 투여군에서 시험물질의 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다.

혈액학적검사

혈액학적검사결과는 Table V와 같다. 4주 최종도살 검사

결과 유의성있는 변화로는 수컷 500 mg/kg군에서는 MCV의 감소 및 PLT의 증가가 관찰되었고, 2,000 mg/kg투여군에서는 PLT의 증가가 관찰되었으나 이들 변화에 대한 용량상관성은 관찰되지 않았다(p<0.05).

혈청생화학적검사

투약기간종료후의 검사결과는 Table VI과 같다. 유의성

Table VI. Biochemical parameters in the rats administered orally with DA-9601 for 4 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	N	Albumin (g/dl)	ALP (IU/l)	ALT (IU/l)	AST (IU/l)	A/G (%)	T. Biliru. (mg/dl)	Calcium (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	Creat. (mg/dl)
Male	Control	10	4.7±0.3	170.8±73.0	28.3±9.2	277.0±60.1	2.7±0.7	0.64±0.19	10.5±0.6	116.5±25.4	0.40±0.08
		125	4.1±0.9	211.5±88.5	35.2±18.0	211.7±90.7	2.6±1.0	0.58±0.35	9.7±2.1	76.8±20.3*	0.34±0.11
		500	4.7±0.2	137.1±28.9	24.1±3.7	262.3±38.0	2.9±0.3	0.54±0.22	10.0±0.3	88.4±11.3*	0.36±0.05
Female		2000	4.6±0.2	184.0±68.3	26.5±12.7	171.2±48.1	3.2±0.7	0.41±0.26	10.1±0.2	72.7±8.6*	0.36±0.03
	Control	10	5.2±0.4	120.5±28.2	32.2±6.8	201.3±22.8	3.6±0.6	0.73±0.34	10.9±0.3	110.3±16.0	0.51±0.08
		125	4.8±0.2	140.1±42.4	32.3±7.5	186.4±44.8	3.1±0.6	0.73±0.26	10.5±0.3	100.3±18.0	0.45±0.06*
DA-9601		500	5.1±0.2	107.8±24.5	27.4±4.6	145.6±20.0	3.8±0.5	0.38±0.11*	10.4±0.6	97.1±13.7	0.43±0.04*
		2000	4.9±0.2	113.9±48.6	31.6±9.8	126.1±33.1	3.0±0.7*	0.43±0.14*	10.6±0.7	96.2±11.5	0.39±0.04*

Each value represents the mean ± SD.

*Significantly different from the control (P<0.05).

ALP; Alkaline phosphatase, ALT; Alanine transferase, AST; aspartate transaminase, A/G; Albumin/globulin ratio, T.Biliru; Total bilirubin, Creat.; Creatinine, T.Protein; Total protein, BUN; Blood urea nitrogen.

Table VII. Urinalysis of rats administered orally with DA-9601 once a day for 4 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Volume (ml)	Glucose	Bilirubin	Ketone	Occult	pH	Protein	Urobilinogen	Sediment							
Male	Control	10	5.35±2.78	10	10	7	3	9	1	5	6.0	6.5	7.0	-	±	+		
		125	7.40±1.07*	10	10	9	1	9	1	3	5	2	10	0	0	0	4	
		500	6.05±0.83	10	10	4	6	10	0	2	5	3	2	8	0	10	4	6
Female		2000	5.25±1.18	10	10	10	0	10	0	0	9	1	2	8	0	10	5	5
	Control	10	3.90±1.10	10	10	10	0	10	0	9	1	0	1	9	0	10	6	4
		125	4.05±1.53	10	10	10	0	9	1	6	4	0	2	8	0	10	7	3
DA-9601		500	3.80±1.13	10	10	10	0	10	0	8	2	0	1	8	1	10	7	3
		2000	3.40±0.77	10	10	10	0	10	0	7	3	0	3	6	1	10	4	6

Urine volume are expressed as mean ± SD.

*Significantly different from the control (P<0.05).

있는 변화로는 수컷 125 mg/kg군에서 cholesterol, Na치의 감소가 인정되었으며 500 mg/kg투여군에서 cholesterol, BUN, Na치의 감소가 관찰되었고, 2,000 mg/kg투여군에서 cholesterol, BUN, Na의 감소가 인정되었으나(p<0.05) 이들 변화에 대한 용량상관성은 관찰되지 않았다. 한편, 암컷 125 mg/kg투여의 경우에 creatinine의 감소가 인정되었으며, 500 mg/kg투여군에서 total bilirubin, creatinine의 감소와 Na, Cl의 증가가 관찰되었고, 2,000 mg/kg투여군에서 A/G ratio, total bilirubin, creatinine의 감소와 globulin, Cl의 증가가 인정되었으나(p<0.05) 이들 변화에 대한 용량상관성은 관찰되지 않았다. 그외 각 군의 암수 모든 동물에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 변화는 인정되지 않았다.

노검사

투약종료후 실시한 노검사 결과 수컷 DA-9601 125 mg/kg투여군에서 노량의 유의성있는 증가가 인정되었으나 용량상관성은 관찰되지 않았으며, 그외 약물투여와 관련하여 대조군과 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Table VII). 노침사는 대조군과 약물투여군에서 고르게 관찰되었으며, 현미경적 검사결과 프리즘상, 판상 혹은 침상의 결정모양을 보이는 마뇨산(hippuric acid)으로 확인되었다.

병리학적검사

부검소견

수컷의 경우 대조군 1예와 125 mg/kg투여군 1예, 그리고 500 mg/kg 2예에서 흉선의 발적이 관찰되었고, 500 mg/kg 투여군의 1예와 2,000 mg/kg 1예에서 폐장의 발적이 인지되었다. 암컷의 경우 대조군 1예와 500 mg/kg 2예에서 흉선의 발적이 인지되었고, 125 mg/kg투여군의 1예에서 폐장

의 발적이 관찰되었다. 그외의 동물에서는 약물의 영향으로 생각되는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

장기중량

부검후 장기중량을 측정된 결과 수컷의 경우에 뇌하수체와 갑상선은 저용량군에서 절대중량과 상대중량 모두에서 유의성있는 증가를 보였다(p<0.05). 저용량과 중간용량투여군의 심장중량은 절대 및 상대중량 모두에서 유의성있는 증가를 보였으며, 고용량군의 경우에 절대중량에서는 유의성이 인정되지 않았으나 상대중량에서 유의성있는 증가가 인정되었다(p<0.05). 수컷의 중간용량투여군의 타액선은 절대중량의 유의성있는 증가를 보였으나 상대중량에서는 유의성이 인정되지 않았으며, 전립선은 저용량군에서 절대중량과 상대중량의 유의성있는 증가를 보였고 중간용량군에서는 상대장기중량에서만 유의성이 인정되었다(p<0.05). 암컷에서는 고용량군의 심장이 절대중량과 상대중량의 유의성있는 증가를 보였으며, 부신은 고용량군에서 절대중량의 유의성있는 증가를 보였으나 상대중량에서는 유의성이 인정되지 않았다(p<0.05). 그외 각 군의 암수 모든 동물에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성있는 변화는 인정되지 않았다(Table VIII, IX, X, XI).

병리조직학적소견

병리조직학적 검사결과는 Table XII와 같다. 매체대조군을 포함하여 소수의 예에서 폐장에 경도의 총혈(congestion)과 폐기종(emphysema) 및 경도의 폐포벽 비후소견이 인정되었고 흉선에서 경도의 총혈 및 간장의 문맥부(portal area) 주변에 미약한 염증세포침윤 병소가 드물게 관찰되었으나 약물과 관련된 병변은 관찰되지 않았으며 그외 다른 장기에서도 매체대조군에 비교하여 특이한 병변은 관찰되

Table VIII. Absolute organ weight of male rats administered orally with DA-9601 for 4 weeks

Parameters	Control	DA-9601 (mg/kg)		
		125	500	2000
No. of animals	10	10	10	10
Brain	2.05±0.13	2.10±0.15	2.01±0.11	1.89±0.14
Pituitary	10.59±2.69	13.54±2.25*	11.04±3.42	10.59±1.87
Thyroid gl.	27.63±5.62	31.69±4.23	35.13±8.47*	31.06±5.90
Thymus	0.53±0.20	0.60±0.19	0.58±0.05	0.55±0.13
Heart	0.97±0.16	1.09±0.09*	1.13±0.10*	1.06±0.35
Lung	1.30±0.19	1.57±0.39	1.39±0.18	1.52±0.35
Liver	9.01±2.33	9.37±0.85	9.33±0.82	9.37±1.27
Spleen	0.56±0.15	0.66±0.10	0.63±0.08	0.59±0.11
Kidney	2.61±0.33	2.74±0.44	2.72±0.29	2.57±0.19
Adrenal gl.	57.4±12.8	61.0±10.9	62.6±11.7	62.2±16.2
Testis	2.80±0.39	2.83±0.40	2.94±0.19	2.88±0.43
Seminal Ves.	0.57±0.32	0.61±0.23	0.59±0.20	0.67±0.19
Salivary gl.	0.53±0.08	0.67±0.25	0.77±0.23*	0.58±0.17
Prostate	0.55±0.15	0.69±0.10*	0.65±0.07	0.60±0.08

Each value represents the mean±SD. *Significantly different from the control (P<0.05).

Table IX. Absolute organ weight of female rats administered orally with DA-9601 for 4 weeks

Parameters	Control	DA-9601 (mg/kg)		
		125	500	2000
No. of animals	10	10	10	10
Brain	1.94±0.08	1.94±0.13	1.88±0.12	1.91±0.11
Pituitary	16.67±4.95	13.96±6.10	14.60±2.40	17.37±1.69
Thyroid gl.	27.90±2.30	31.44±8.38	32.71±5.79	28.87±4.19
Thymus	0.51±0.12	0.49±0.09	0.60±0.13	0.59±0.08
Heart	0.76±0.04	0.78±0.04	0.79±0.08	0.85±0.07*
Lung	1.36±0.24	1.46±0.30	1.31±0.18	1.30±0.11
Liver	7.24±0.85	7.07±0.80	6.76±0.85	7.12±0.47
Spleen	0.53±0.04	0.51±0.06	0.51±0.07	0.48±0.07
Kidney	1.92±0.21	1.99±0.22	1.84±0.21	2.01±0.16
Adrenal gl.	77.4±1.2	83.3±8.7	85.0±8.9	89.5±12.5*
Ovary	0.13±0.02	0.15±0.02	0.14±0.01	0.13±0.01
Salivary gl.	0.50±0.07	0.52±0.07	0.46±0.07	0.46±0.04

Each value represents the mean ±SD. *Significantly different form the control (P<0.05).

Table X. Relative organ weight^{a)} of male rats administered orally with DA-9601 for 4 weeks

Parameters	Control	DA-9601 (mg/kg)		
		125	500	2000
No. of animals	10	10	10	10
Brain	6.53±0.55	6.75±0.61	6.29±0.32	6.23±0.62
Pituitary	0.034±0.009	0.043±0.007*	0.034±0.010	0.035±0.006
Thyroid gl.	0.088±0.018	0.102±0.014	0.110±0.028*	0.102±0.020
Thymus	1.68±0.54	1.96±0.66	1.83±0.15	1.82±0.39
Heart	3.08±0.33	3.51±0.36*	3.56±0.33*	3.51±0.39*
Lung	4.15±0.66	5.09±1.42	4.36±0.54	5.06±1.28
Liver	28.3±5.7	30.0±2.7	29.1±2.1	30.7±3.6
Spleen	1.78±0.38	2.13±0.39*	1.99±0.25	1.96±0.34
Kidney	8.30±0.75	8.89±1.65	8.52±1.00	8.48±0.92
Adrenal gl.	0.18±0.04	0.20±0.04	0.18±0.07	0.21±0.06
Testis	8.97±1.54	9.09±1.38	8.20±2.91	9.55±1.80
Seminal Ves.	1.79±0.90	1.99±0.74	1.86±0.60	2.24±0.71
Salivary gl.	1.71±0.37	2.17±0.85	2.24±0.62	1.91±0.50
Prostate	1.74±0.37	2.25±0.40*	2.15±0.50*	2.00±0.34

Each value represents the mean ±SD. ^{a)} $\frac{\text{Absolute organ weight}}{\text{Body weight}} \times 100$. *Significantly different form the control (P<0.05).

Table XI. Relative organ weight^{a)} of female rats administered orally with DA-9601 for 4 weeks

Parameters	Control	DA-9601 (mg/kg)		
		125	500	2000
No. of animals	10	10	10	10
Brain	9.11±0.74	9.22±0.81	8.81±0.71	8.92±1.20
Pituitary	0.077±0.021	0.065±0.027	0.068±0.09	0.081±0.011
Thyroid gl.	0.13±0.01	0.15±0.04	0.15±0.03	0.13±0.02
Thymus	2.40±0.48	2.37±0.44	2.80±0.56	2.78±0.39
Heart	3.57±0.28	3.75±0.43	3.69±0.31	4.01±0.62*
Lung	6.45±1.58	6.97±1.81	6.14±0.83	6.07±0.74
Liver	3.37±0.32	3.36±0.50	3.15±0.35	3.31±0.29
Spleen	2.48±0.29	2.46±0.35	2.45±0.33	2.25±0.47
Kidney	8.99±1.06	9.44±1.03	8.59±0.82	9.37±0.82
Adrenal gl.	0.36±0.07	0.39±0.04	0.40±0.05	0.42±0.07
Ovary	0.64±0.11	0.71±0.13	0.69±0.09	0.64±0.10
Salivary gl.	2.35±0.34	2.48±0.36	2.17±0.36	2.17±0.21

Each value represents the mean ±SD. ^{a)} $\frac{\text{Absolute organ weight}}{\text{Body weight}} \times 100$. *Significantly different form the control (P<0.05).

Table XII. Microscopic observations in rats orally treated with DA-9601 for 4 weeks

Test materials		Vehicle				DA-9601			
Dosage (mg/kg/day)		-		125 ^{b)}		500 ^{b)}		2000	
Organs ^{a)}	Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Findings, grading	n	10	10	10	10	10	10	10	10
Lung		(10)	(10)	(2)	(0)	(1)	(1)	(10)	(10)
Congestion, mild		8	7	2	0	1	1	5	6
Emphysema, mild		8	9	1	0	1	1	5	6
Thickening of alveolar wall, mild		4	2	1	0	0	0	2	6
Liver		(10)	(10)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)
Focal cellular infiltration, slight		2	2	0	0	0	0	0	1
Thymus		(10)	(10)	(1)	(0)	(2)	(2)	(10)	(10)
Congestion, mild		1	0	1	0	2	1	1	0

Code: ()=Number of animals examined.

^{a)}The histopathological findings of other organs were within normal limits.

^{b)}Animals of this group were examined only on the organs with macroscopic abnormality.

지 않았다.

고 찰

쑥(*Artemisia herb*)은 오래전부터 식용으로 사용되어 왔으며, 민간요법 및 한방에서는 여러 질병의 치료 및 예방 목적으로 이용하여 왔다. 애엽에서 추출하여 제조된 DA-9601은 급성독성시험의 결과 랫드 및 개에서 경구로 5 g/kg의 투여에 의해서도 독성을 나타내지 않는 독성이 약한 물질로 판단되고 있다. 본 시험에서는 위염 및 위궤양치료제로 개발중인 DA-9601의 반복투여에 의해 발현 가능한 독성을 알아보기로 랫드에 4주간 경구투여 아급성독성시험을 실시하였다.

시험결과 암컷의 저용량군에서 음수섭취량의 변화가 관찰되었으나 일시적인 변화로 곧 회복되었고 용량상관성도 인정되지 않아 약물의 투여에 의한 변화보다는 투여 및 보정시 스트레스로 인한 변화로 판단되었다. 또한 혈액학적 검사결과에서는 수컷의 중간용량 투여군에서 MCV의 변화가 관찰되었으나 용량상관성이 없고, 같은 용량군에서 RBC와 MCHC의 변화가 없어 임상적인 의의는 없는 것으로 판단되었다(韓 등, 1985). 한방에서 약쑥의 줄기와 잎이 지혈약으로서 자궁출혈, 임신중의 출혈, 코피 등의 지혈에 효과가 있다고 알려져 왔으며(허준 원저, 1984), 본시험에서 애엽추출물인 DA-9601 500 mg/kg이상 투여군에서 PT의 감소경향과 혈소판수의 유의한 증가 변화가 관찰되었으나 용량상관성이 없고 그 정도가 미약하여 애엽의 지혈작용과 연관된 변화로 판단하기 어려웠으며 향후 이러한 약리작용의 확인이 필요할 것으로 생각되었다.

*Artemisia*속 식물들은 전세계적으로 많은 종류가 서식하고 있으며, 종류에 따라 다양한 약리작용을 가지고 있는 것

으로 알려져 있다. 이러한 약리작용으로는 소화성궤양에 대한 세포보호(Piezzi 등, 1992), 간보호(Gilani와 Janbaz, 1994; 1995), 담즙분비와 배설촉진(Nieschulz와 Schmersahl, 1968; Zhang 등, 1993), 내피세포의 증식촉진(Kaji 등, 1990), 혈당강하(Al-Shamaony 등, 1994), 항경련 및 진정유도(Lima 등, 1993), 항염증(Tariq 등, 1987), 살균작용(Moran 등, 1989), 살충(Sherif 등, 1987), 말라리아 치료(White, 1994) 및 항종양(Xu 등, 1989) 등이 보고되고 있다. 이중 애엽은 기성 한의서에 수재되어 있는 약리효과와 항궤양작용(오 등, 1996) 이외에 현대과학적으로 입증된 약리작용에 대해서는 충분한 자료가 확보되어 있지 않은 실정이다. 본시험에서 애엽의 추출물인 DA-9601을 4주간 경구투여한 후 검사한 혈액생화학치들은 수컷의 항목에서 통계학적으로 유의한 변화가 관찰되었으나, 대부분이 임상적 의의가 없는 변화였으며 암수결과가 상반되거나 용량상관성도 보이지 않아 약물의 투여와 연관된 독성학적 변화로 보기는 어려웠다.

약물투여종료 후 실시한 병리학적검사 결과 장기중량은 DA-9601 투여군의 일부 용량군에서 뇌하수체, 갑상선, 타액선, 비장, 부신 또는 전립선 등의 장기에서 대조군과 통계학적으로 유의한 변화가 인정되었지만 암수의 결과가 상반되거나, 절대장기중량과 상대장기중량의 변화가 일치하지 않았으며 용량상관성도 없어 독성변화로 생각되지 않았으며 심장은 DA-9601 투여군의 암수 일부 용량군에서 유의한 장기중량의 증가가 관찰되었으나 육안 및 병리조직검사서 특기할 만한 병변이 관찰되지 않아 약물의 투여로 인한 독성변화로는 판단되지 않았다. 병리조직검사서 관찰된 폐장 및 갑상선의 경도 총혈과 폐기종 및 미약한 폐포벽 비후는 대조군에서도 관찰되며 그 정도가 미약하여 에테르 마취에 의하여 유발된 것으로 판단되었으며, 간장의 일부

문맥부에 경미한 세포침윤은 아급성시험과 같은 동물의 장기사육시 간혹 관찰되는 소견으로 관찰예가 소수이고 대조군에서도 관찰되어 약물의 영향으로 인한 변화는 아닌 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 종합하면, 본 시험물질 DA-9601을 고용량인 2,000 mg/kg까지 경구로 4주간 랫드에 반복투여시 사망동물은 관찰되지 않았으며, 약물의 투여에 의한 독성소견으로 사료되는 임상증상도 인정되지 않았다. 또한, 체중 변화와 사료 및 음수섭취량, 혈액학적검사, 혈액생화학검사, 뇨검사 및 장기중량의 측정결과 통계학적으로 유의성 있는 변화가 일부 나타났으나 변동의 폭이 적고 용량상관성도 인정되지 않아 임상적 의의가 없는 변화로서 약물에 의한 독성변화로 판단되지 않았으며, 병리조직검사에서도 독성을 보이는 표적장기는 관찰되지 않았다. 따라서 DA-9601의 랫드에 대한 4주 경구 반복투여에 의한 무독성량 (NOAEL, no-observed-adverse-effect level)은 2,000 mg/kg/day 이상으로 판단되었다.

참고문헌

- Al-Shamaony, L., Al-Khazraji, S. M. and Twaij, H. A. (1994). Hypoglycemic effect of *Artemisia herba alba*. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. *J. Ethnopharmacol.* **43**, 167-171.
- Feldman, M. and Peterson, W. L. (1993). *Helicobacter pylori* & peptic ulcer disease. *West. J. Med.* **159**, 555-559.
- Gilani, A. H. and Janbaz, K. H. (1994). Hepatoprotective effects of *Artemisia scoparia* against carbon tetrachloride: an environmental contaminant. *J. Pak. Med. Assoc.* **44**, 65-68.
- Gilani, A. H. and Janbaz, K. H. (1995). preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity. *Gen. Pharmacol.* **26**, 309-315
- Herfindal, E. T., Gourley, D. R. and Hart, L. L. (1992). Acid peptic disorder. In *Clinical pharmacy & therapeutics*, 5th Ed., Wiliams & Wilkins Co., pp. 393-405.
- Kaji, T., Kaga, K., miezi, N., Hayashi, T., Ejiri, N. and Sakuragawa, N. (1990). Possible mechanism of the stimulatory effect of *Artemisia* leaf extract on the proliferation of cultured endothelial cells; involvement of basic fibroblast growth factor. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 2494-2497.
- Lee, E. B. (1995). The effect of *Artemisia* Herba on gastric lesion and ulcers in rats with isolation of eupatilin. In *Unesco Resional Semina on the chemistry, pharmacology and clinical use of flavonoid compounds*. pp 13-20, Oct. 11-15, Chugnam National Univ. Taejon, Korea.
- Lima, T. C., Morato, G. S., and Takahashi, R. N. (1993). Evaluation of the central properties of *Artemisia verlotorum*. *Planta. Med.* **59**, 326-329.
- Moran, A., Montero, M. J., Martin, M. L. and San Roman, L. (1989). Pharmacological screening and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia caerulea* Subsp. *gallica*. *J. Ethnopharmacol.* **26**, 197-203.
- Nieschulz, O. and Schmersahl, P. (1968). On choleric agents from *Artemisia abrotanum* L. *Arzneimittelforschung.* **18**, 1330-1336.
- Perry, M. A., Wadhwa, S., Parks, D. A., Pickard, W. and Granger, D. N. (1986). Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesion in the cat stomach. *Gastroenterol.* **90**, 362-367.
- Piezzi, R. S., Guzman, J. A., Guardia, T. and Pestchanker, M. J. (1992). Dehydroleucodine prevents ethanol-induced necrosis in the rat gastric mucosa. A histological study. *Microssc. Electron. Biol. Celular.* **16**, 45-55.
- Sherif, A., Hall, R. G. and El-Amamy, M. (1987). Drugs, insecticides and other agents from *Artemisia*. *Med. Hypotheses.* **23**, 187-193.
- Tariq, M., Mossa, J. S., Al-Yahya, M. A., Parmar, N. S. and Ageel, A. M. (1987). Evaluation of *Artemisia inculta* for anti-inflammatory activity in rats. *Am. J. Chin. Med.* **15**, 127-132.
- White, N. J. (1994). Artemisinin: current status. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**(Suppl 1), S3-4.
- Xu, Q., Mori, H., Sakamoto, O., Koda, A., Nishioka, I., Ogawa, Y. and Hosaka, K. (1989). Antitumor principle of *Artemisia capillaris* Herba and its related compound. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU.* **6**, 1-7.
- Zhang, L. H., Wang, J. Z., Zhou, X. B. and Wu, B. J. (1993). A comparative study on cholagogic effect of *Artemisia*. *Chung. Kuo. Chung. Yao. Tsa. Chih.* **18**, 560-561, 575.
- 陳存仁 (1984). *한방의학대사전*. 동도문화사, pp 332.
- 韓弘栗, 李政吉, 李昌雨 (1985) 改正 獸醫臨床病理. 機電研究社, pp 134-137.
- 오태영, 김원배, 류명권, 박정배, 이상득, 양중익, 이은방 (1996). 애엽추출물(DA-9601)의 실험적 위궤양 모델에 대한 항궤양효과 및 기전연구. *응용약물학회지* **4**, 게재예정.
- 의약품 등의 독성시험기준 (1994). 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호.
- 허준 원저 (1984) 동의보감 국역증보판. 남산당, pp 1197.