

한약 단미제 분획의 Influenza virus type A 활성화에 관한 연구

정재득* 박인호* 이광희** 김호경*** 고병섭*** 박갑주*

1. 서론

毒性이 없으면서도 탁월한 豫防과 治療效果를 주는 Influenza virus에 대한 항바이러스제 開發의 필요성은 오래 전부터 人類의 宿怨이 되어 왔는데 이는 보통 成人의 경우 1년에 한, 두 차례 또는 두, 세차례 이들 바이러스의 攻撃을 받으며 이들 바이러스에 感染될 경우, 이 바이러스에 의해 유발되는 감기나 유행성 독감 그 자체보다 이 질환으로부터 야기되는 합병증에 의해 많은 사망자가 발생하고 또한 이들 질환이 만병의 원인이 되기 때문이다.¹⁾ 역사적으로 인플루엔자의 중요성은 격심한 합병증에 대한 피해로부터 유래되고 있다. 이와 같은 사실은 1918-1919년에 있었던 유행으로 세계적으로 2천만명 이상이 희생된 “스페인 인플루엔자”의 피해에서 너무나 잘 인식되어 왔던 것이다.²⁾ 인플루엔자의 주요 합병증은 폐와 관련된 하기도·순환계·신경계에 영향을 미친다. 이중 폐와 관련된 합병증이 가장 중요한 부분을 차지하게 된다. 인플루엔자 유행의 크기는 범세계적 유행·일시적 유행·국지적 유행·산발적 발생등으로 구분할 수 있으며 과거 90년간 범세계적 대유행은 5회에 이르고 이때마다 바이러스의 항원 변이가 크게 일어났었다. 통상 바이러스의 小變異(Antigenic Drift)시 집단 인구의 10-20%, 大變異(Antigenic Shift)시 40-50% 이상 감염을 일으키기도 한다.²⁾ 인플루엔자 바이러스는 A·B·C로 분류되는데 그 중 인플루엔자 바이러스는 소변이와 대변이를 일으킨다. 따라서 美國·日本 등 선진국에서는 오래전 부터 상기 疾病에 대한 治療研究과 더불어 새로운 醫藥品 개발에 많은 투자를 해 왔다. 이러한 연구 활동 결과 몇몇 化學療法劑 및 抗生物質들이 개발되었으나 이들 抗生劑 및 化學療法劑들은 정도의 差異가 있을 뿐 그들 자신이 지닌 藥理學의 特徵으로 일어나는 毒作用(toxic reaction)과 抗原性的 獲得으로 誘發되는 過敏反應 등 여러 가지 副作用과 呼吸器 疾患에 관여하는 바이러스 자체가 가지는 多樣한 내성기작으로 말미암아 사용에 制限을 받고 있고 많은 경우 아직도 毒性이 많거나 效能이 滿足할 만한 水準에 이르진 못하고 있다.³⁾ 따라서 凡 世界的으로 副作用이 最小化되고 사용상 安全性이 보장되는 새로운 항인플루엔자 바이러스제의 探索 및 開發에 박차를 가하고 있으나 化學 合成劑나 抗生劑 자체가 가지고 있는 限界性으로 말미암아 큰 효과를 보지 못하고 있는 실정이며 효능이 탁월한 無毒性 藥品의 개

* 한국한의학연구원 기초연구부

** 건국대학교 의과대학

*** 한국한의학연구원 한약연구부

발이 切實히 要請되고 있다.³⁾

다행히, 국내의 한의학계는 일찌기 고려초 때부터 국산 약초연구를 포함한 본초학이 발달하였고 조선시대에 이르러서는 『의방유취』, 『동의보감』, 『동의임상방제학』 같은 훌륭한 저술도 많이 남겼으며 이를 기초로 한 전래처방 및 한의사 각자가 가지고 있는 특수한 처방에 의해 많은 난치성 질병을 치료하고 있다. 특히 우리 韓醫學界에는 상풍, 상한 또는 감모라고 불리운⁵⁾ 이들 호흡기 바이러스성 疾患에 대해 수십년 또는 수백 년간 전해져 내려오는 특수한 處方(秘方)들이 많이 있고 실제 이들 처방을 이용하여 병원이나 약국에서 빠른 치료 효과를 볼 수 없는 감기 또는 유행성 독감들을 효과적으로 치료하고 있으므로 이 處方들을 現代 科學의 集約的 技術을 도입하여 잘 糾明한다면 새롭고 高附加價值가 있는 호흡기 바이러스성 치료제제를 개발할 수 있을 것으로 思料된다. 이러한 기저에서 본 연구팀은 이미 한약 단미제의 항인플루엔자 바이러스 활성을 탐색하여 다수의 한약재가 강한 항인플루엔자 바이러스 활성을 나타내는 것을 보고한 바 있다.⁶⁾ 따라서 금번 연구에서는 이들 다수의 항인플루엔자 바이러스 활성을 갖는 단미제를 분획·분석하여 항인플루엔자 바이러스 활성을 조사하였으며, 또한 이들의 항바이러스 활성을 *in vivo*에서 확인하기 위하여 인플루엔자 바이러스에 적용된 마우스 동물모형 제작연구를 실시하여 항인플루엔자 바이러스 제제 개발의 초석으로 삼고자 한다.

2. 연구방법

바이러스

본 연구에서는 influenza virus [A/Taiwan/1/86(H₁N₁)]형을 국립보건원 호흡기 바이러스과로부터 분양받아 사용하였다.

숙주세포와 배지

본 실험에 사용한 influenza virus에 대한 숙주세포로 Madin-Darby Canine Kidney(MDCK) 계대 세포주를 국립보건원 호흡기 바이러스과로부터 분양 받아 사용하였고 MDCK 세포주의 세포 배양액은 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Inc, Grand Island, YN USA), 0.22% sodium bicarbonate (Sigma, St. Louis, MO USA), 50µg/ml의 gentamicin (Gibco, Inc, Grand Island, YN USA)을 첨가하여 사용하고 세포가 완전히 자라 세포단층을 이루면 이를 유지하기 위하여서는 2% FBS가 함유된 배지를 사용하였다.

세포배양

분양받은 인플루엔자 바이러스를 증식시키기 위해 MDCK 세포를 배양 했다. 계대 세포주들의 증식을 위해서는 조직배양용 플라스크 (75cm²)에 2% sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, gentamicin (50µg/ml)을 첨가한 EMEM 배지를 넣어 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 세포단층 (monolayer)이 될 때까지 배양하였다. 계대배양을 위해서는 조직배양용 플라스크 (75cm²)에 배양한 세포를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 0.05% 되

게 트립신을 넣어 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리시켜 조직배양용 플라스크 (75cm²)에 1 : 3 으로 분주하여 10% EMEM 배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.¹³⁾

적혈구 용액 준비

닭의 익하정맥에서 혈액을 채취하여 혈액응고를 방지하기 위하여 Alsever 용액(pH6.1)에 모은 후 1800xg에서 5분간 원심분리하여 적혈구만을 모은 후 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)으로 현탁시키고 4°C에서 5일간 보관하면서 적혈구응집시험 (Haemagglutination assay) 및 적혈구응집억제시험 (Haemagglutination Inhibition Test: HIT)에 이용하였다.

바이러스의 증식

바이러스를 증식시키기 위하여 SPF 수정계란 (Specific pathogen free embryonated hen's egg)을 37°C 부란기에서 10일간 부화시킨 후 오염된 란과 무정란을 제외한 수정계란을 이용하였다. 수정계란의 장노액 (allantoic fluid)에 바이러스를 0.1ml씩 접종 후 paraffin wax로 구멍을 막았다. 접종 후 37°C에서 바이러스를 2일간 증식시킨 후 4°C에서 18시간 동안 방치시키고 장노액을 얻었다. 바이러스가 들어있는 장노액을 4°C, 8000xg에서 10분간 원심분리한 후 배양상층액을 사용하였다.⁷⁾

바이러스의 역가 측정

장노액에서 증식된 바이러스의 역가를 측정하기 위하여 Haemagglutination assay를 실시하였다. 장노액에서 분리된 바이러스 배양원액을 PBS로 2배 계단 희석하여 96 well plate에 0.05 ml씩 분주하였다. PBS를 이용하여 0.5%로 희석된 RBC용액을 0.05ml씩 각 well에 넣고 흔들어 준 후 25°C에서 60분 동안 반응시킨 후 음성대조군과 비교하여 응집역가를 측정하였다.⁸⁾

국내, 국외 한방 엑기스제 및 amantadine·HCl의 항인플루엔자 바이러스 활성화

국내에서 시판중인 4종의 한약 엑기스제제 및 일본에서 시판중인 2종의 한약 엑기스제제, 중국에서 시판중인 3종의 한약 엑기스제 및 Influenza virus type A 저해제인 amantadine·HCl의 항인플루엔자 바이러스 활성을 측정하기 위해 적혈구응집억제 (haemagglutination inhibition)시험을 시행하였다. 원액시료 (100mg/ml)를 각각 2배 계단 희석하여 각 well에 0.025 ml씩 분주하였다. 적혈구응집억제시험에서 측정된 바이러스 용액을 4 haemagglutination units (HA units)/0.025ml로 희석시켜 각 well에 0.025ml씩 넣어 잘 섞어 준 후 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 0.5%로 희석된 RBC용액을 각 well에 0.05ml씩 분주하고 가볍게 흔들어 준 후 60분 동안 25°C에서 반응시켰다. 반응시킨 후 음성대조군과 비교하여 시판중인 한약 엑기스제제가 바이러스와 RBC가 흡착하는 과정을 저지하는 효과를 검색하였다.

국내·국외 한방 엑기스제 및 amantadine·HCl의 적혈구에 대한 세포독성 시험

국내에서 시판중인 4종의 한약 엑기스제제 및 일본에서 시판중인 2종의 한약 엑기스제제, 중국에서 시판중인 3종의 한약 엑기스제 및 Influenza virus type A 저해제인 amantadine·HCl의 원액시료 (100mg/ml)를 각각 2배 계단 희석하여 각 well에 0.025ml씩 분주하였다. 각

well에 PBS (pH 7.4)를 0.025ml씩 넣어 잘 섞어준 후 0.5%로 희석된 RBC용액을 각 well에 0.05 ml씩 분주하고 가볍게 흔들어 준 후 60분 동안 25℃에서 반응시켰다. 반응시킨 후 음성대조군과 비교하여 시판중인 한약 엑기스제제가 적혈구세포 (RBC)에 미치는 세포독성을 조사하였다.

활성 단미제 분획의 항바이러스 활성 및 세포독성 평가

100종의 단미제를 메탄올 추출한 100종의 시료들 중에서 influenza virus type A 저해제인 amantadine. HCl, 국내, 국외에서 시판되는 한방 감기 엑기스제보다 강한 활성을 나타내고 약제로써 개발 가능성이 있는 단미제인 No. 40, 55, 63을 각각 5kg씩 80% methanol 3L에 넣고 3일간 침출(1차)한 후 methanol층을 분리하고, 다시 잔사에 80% methanol 3L을 넣고 재침출(2차)하여 추출한 후 여과하였다. 1차와 2차 추출액을 감압농축하였다. 농축한 잔사에 증류수 1L을 넣고 현탁시키고, 분리플라스크에 옮긴후 ether 500ml로 3회 세척하여 물(극성)층과 ether (비극성)층으로 나누었다. 분리된 각층을 감압농축한 후, 물층은 흡착제 Amberlite XAD-4를 사용하여 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, 100% MeOH에 의해 순차적으로 용매를 교환하면서 크로마토그래피를 하여 분리하였다. 분리의 전과정을 TLC에 의해 확인하였고, ether층 및 분리된 각 용매층을 항바이러스활성 시험에 시료로 사용하였다.^{9)·10)} No. 110에 대해서는 수층·에테르·수층의 용해되지 않은 침전물·클로르포름·헥산분획구등으로 나누었고 이들 각각의 용매층을 항바이러스활성 시험에 시료로 사용하였다. No. 40, 55, 63, 110을 위의 방법으로 분획한 각각의 원액시료 (100mg/ml)를 각각 2배 계단 희석하여 각 well에 0.025ml씩 분주하였다. 각 well에 PBS (pH 7.4)를 0.025ml씩 넣어 잘 섞어준 후 0.5%로 희석된 RBC용액을 각 well에 0.05ml씩 분주하고 가볍게 흔들어 준 후 60분 동안 25℃에서 반응시켰다. 반응시킨 후 음성대조군과 비교하여 시판중인 한약 엑기스제제가 적혈구세포 (RBC)에 미치는 세포독성을 조사하였다.

마우스에 적용된 인플루엔자 바이러스 준비

마우스에서의 항바이러스 활성을 평가하기 위해서는 마우스에 적용된 인플루엔자 바이러스가 요구된다. 바이러스를 Balb/C 마우스에 adaptation 시키기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 진행하였다. 수정란에서 증식한 인플루엔자 바이러스를 초원심 분리기로 100,000×g, 4℃에서 2시간 원심분리시켜 농축시켰다. 농축된 바이러스를 haemagglutination test를 통하여 역가를 확인하고 20μl씩 마우스의 비강을 통해 연속적으로 계대감염시켰다. 계대감염한 마우스는 각 계대마다 5일 또는 7일간 감염시켰으며, 그후 이들 5일 내지 7일 감염시킨 마우스의 폐를 적출하여 homogenizer와 sonicator를 이용하여 적출액을 만들었다. 그 적출액을 4,000×g에서 15분간 원심분리한후 상층액을 0.45μm filter로 여과하여 haemagglutination test를 통해 역가를 평가하였다.^{11)·12)·13)}

3. 연구결과

SPF 수정계란에 증식된 인플루엔자 바이러스의 역가 측정

10일 된 SPF 수정계란 3개에 바이러스를 증식시켜 각각의 장노액을 얻은 후 적혈구응집반응을 통해 역가를 측정한 결과 A SPF 수정계란에서 증식된 바이러스의 역가는 4HA units/0.025ml로 나타났고 B SPF 수정계란에서 증식된 바이러스는 역가가 나타나지 않았으며 C SPF 수정계란에서 증식된 바이러스의 역가는 256 HA units/0.025ml로 나타났다. 이 중 C SPF 수정계란에서 증식된 바이러스를 적혈구응집시험(haemagglutination assay) 및 적혈구응집억제시험(haemagglutination inhibition test)에 사용하였다.

국내외 한방 엑기스제 및 amantadine·HCl의 항바이러스 활성 및 세포독성 평가

국내에서 시판중인 4종의 한약 엑기스제, 일본에서 시판중인 2종의 한약 엑기스제, 중국에서 시판중인 3종의 한약 엑기스제, influenza virus type A 저해제인 amantadine·HCl에 대한 항바이러스 활성을 측정하기 위해 장노액에서 분리된 바이러스를 4 HA units/0.025ml로 희석하여 적혈구응집억제시험을 시행한 결과, amantadine·HCl은 12.5mg/ml에서만 항바이러스 활성을 보였고, 국내에서 시판 중인 한약엑기스 제제인 K-1은 3.13mg/ml-100mg/ml 사이에서 항바이러스 활성을 나타냈으며 K-2는 12.5mg/ml-100mg/ml 사이에서, K-3는 12.5mg/ml-100mg/ml 사이에서, K-4는 25mg/ml-100mg/ml 사이에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났으며, 특히 일본에서 시판 중인 한약엑기스 제제인 J-1은 6.25mg/ml-100mg/ml 사이에서 강한 항바이러스 활성을 갖고 1.56mg/ml-3.13mg/ml 사이에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났다. 중국에서 시판 중인 한약엑기스 제제인 C-1과 C-3는 6.25mg/ml-100mg/ml 농도구간에서 약한 항바이러스 활성을 갖고 C-2는 100mg/ml에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났다(Table 1). 국내에서 시판중인 4종의 한약 엑기스제, 일본에서 시판중인 2종의 한약 엑기스제와 중국에서 시판중인 3종의 한약 엑기스제, 화학합성 약제인 amantadine·HCl의 RBC에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 적혈구응집시험(haemagglutination test)을 실시 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 2). Amantadine·HCl은 25mg/ml-200mg/ml 농도 구간에서 세포독성을 보였고 국내 및 일본에서 판매되는 한방 감기 엑기스제들은 RBC에 세포독성을 전혀 나타내지 않아 화학요법제에 비해 한방감기 엑기스제들이 훨씬 세포에 대한 세포독성이 적은 것으로 나타났다.

활성 단미제 분획의 항바이러스 활성실험 및 세포독성 평가

100종의 단미제를 메탄을 추출한 100종의 시료들 중에서 influenza virus type A 저해제인 amantadine·HCl, 국내, 국외에서 시판되는 한방 감기 엑기스제보다 강한 활성을 나타내고 약제로써 개발 가능성이 있는 MM-40, MM-55, MM-63에 대해 극성 분획과 비극성 분획을 나누고, Amberlite XAD-4로 분획을 실시하였다. 메탄을 추출시료는 흡착크로마토그래피에 의해

분리하였고, 비극성인 ether층과 극성분획인 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, 100% MeOH층으로 나누었다. MM-110에 대해서는 수층, 에테르, 수층의 용해되지 않은 침전물·클로르포름·헥산의 분획등으로 나누었고 이들 각각의 항바이러스 활성을 살펴본 결과는 다음과 같다. 메탄올로 추출한 MM-40의 경우 에테르층을 제외한 H₂O의 분획에서는 5mg/ml-10mg/ml, 60% MeOH의 분획에서는 313 μ g/ml-1.25mg/ml, 40% MeOH의 분획에서는 78 μ g/ml-156 μ g/ml, 20% MeOH의 분획에서는 156 μ g/ml-313 μ g/ml에서 농도구간에서 각각 항바이러스 활성을 나타냈다(Table 3). MM-55의 경우는 H₂O 분획의 1.56mg/ml-100mg/ml 농도구간에서 현저하게 강한 항바이러스 활성을 나타냈고, 20% MeOH의 분획에서 100mg/ml, 에테르의 분획에서는 12.5mg/ml-100mg/ml 농도구간에서 각각 항바이러스 활성을 나타냈다(Table 4). MM-63의 경우는 에테르층을 제외한 H₂O의 분획에서는 250mg/ml-100mg/ml, 60% MeOH와 40% MeOH의 분획에서는 동일하게 100mg/ml, 20% MeOH의 분획에서는 6.25mg/ml-50mg/ml 농도구간에서 각각 항바이러스 활성을 나타냈다(Table 5). MM-110의 경우는 수층의 분획에서는 48.7 μ g/ml-780 μ g/ml 농도구간에서 현저하게 강한 항바이러스 활성을 나타냈고, 수층의 분획물중 용해되지않은 침전물, 에테르의 분획에서는 1.56mg/ml-3.13mg/ml, 1.56mg/ml-6.25mg/ml 농도에서 각각 항바이러스 활성을 나타냈으나 클로르포름, 헥산의 분획에서는 항바이러스 활성을 나타내지않았다(Table 6).

항바이러스 활성을 갖는 단미제로부터 분리된 각각 분획의 RBC에 대한 세포독성을 살펴보기 위하여 적혈구응집반응을 통하여 살펴본 결과, 메탄올로 추출한 MM-40의 경우 H₂O 분획에서는 2.5mg/ml-10mg/ml, 60% MeOH의 분획에서는 625 μ g/ml-10mg/ml, 40% MeOH 분획에서는 78 μ g/ml-10mg/ml, 20% MeOH의 분획에서는 156 μ g/ml-100mg/ml, 에테르층의 분획에서는 10mg/ml 농도에서 세포독성을 보였다(Table 7). MM-55의 경우는 H₂O, 60% MeOH, 40% MeOH, 20% MeOH의 분획에서는 세포독성이 나타나지않은 반면에 에테르의 분획에서는 50mg/ml-100mg/ml 세포독성이 나타났다(Table 8). MM-63의 경우는 H₂O, 60% MeOH, 40% MeOH의 분획에서는 전혀 세포독성이 나타나지 않은 반면에 40% MeOH, 에테르의 분획에서는 50mg/ml-100mg/ml 농도구간에서 약하게 세포독성을 나타내었다(Table 9). MM-110의 경우는 수층, 에테르의 분획에서는 195 μ g/ml-100mg/ml, 3.13mg/ml-100mg/ml 농도구간에서 각각 현저하게 강한 항바이러스 활성을 나타냈고, 수층의 분획물중 용해되지않은 침전물과 에테르의 헥산의 분획에서는 1.56mg/ml-100mg/ml 농도구간에서 동일하게 세포독성이 나타났고, 클로르포름의 분획에서는 50mg/ml-100mg/ml 농도구간에서 세포독성이 나타났다(Table 10).

In vivo에서 약제활성평가를 위한 실험동물 모델 개발

바이러스에 4회째 계대 감염된 마우스를 5일째와 7일째 희생시켜 기관지를 적출하여 해부한 후 관찰한 결과, 7일째 희생된 마우스에서 바이러스에 감염시키지 않은 음성대조군에 비해 기관지가 현저하게 충혈되어 있는 것을 볼수 있었고 이는 바이러스 감염에 의한 것으로 보였다(Figure 1). 충혈된 마우스의 폐와 기관지를 homogenizer와 sonicator를 이용하여 파쇄한 후

정재득·박인호·이광희·김호경·고병섭·박갑주 : 한약 단미제 분획의 Influenza virus type A 활성화에 관한 연구

적출된 바이러스를 획득하여 적혈구응집시험을 실시한 결과 4회에 걸쳐 인플루엔자 바이러스를 마우스에 감염시킨 후 7일째 적출된 폐의 상층액에서 4 HA unit로 역가가 가장 높게 나타났다(Table 11, Figure 2). 따라서 이와 같은 조건으로 condition을 setting 하여 10회 정도 마우스에 적용시킨 후 항바이러스 활성이 강하게 나타난 단미제 및 단미제분획에 대해 마우스를 이용한 동물실험을 곧 착수 할 예정이다.

Table 1. Inhibitory effects of control drugs on influenza virus type A

No\Con (mg)	-1 (200)	-2 (100)	-3 (50)	-4 (25)	-5 (12.5)	-6 (6.25)	-7 (3.13)	-8 (1.56)	-9 (0.78)	-10 (0.39)	-11 (0.195)	-12 (0.0975)
A	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
No\Con (mg)	-1 (100)	-2 (50)	-3 (25)	-4 (12.5)	-5 (6.25)	-6 (3.13)	-7 (1.56)	-8 (0.78)	-9 (0.39)	-10 (0.195)	-11 (0.0975)	-12 (0.0487)
K-1	+	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-
K-2	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K-3	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-1	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
J-2	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
C-1	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-3	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-influenza virus effects of each control drug determined by haemagglutination inhibition test. A: amantadine·HCl, K-1, K-2, K-3 and K-4: control drug 1, 2, 3, and 4 which were made in Korea, respectively, J-1 and J-2: control drug 1 and 2 which were made in Japan, respectively, C-1, C-2, and C-3: control drug 1, 2, and 3 which were made in China, respectively, Con.: concentration of each extract, strong positive, positive and negative: ++, +, and -, respectively.

Table 2. Cytotoxic effects of control drugs against influenza virus type A

No\Con (mg)	-1 (200)	-2 (100)	-3 (50)	-4 (25)	-5 (12.5)	-6 (6.25)	-7 (3.13)	-8 (1.56)	-9 (0.78)	-10 (0.39)	-11 (0.195)	-12 (0.0975)
A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
No\Con (mg)	-1 (100)	-2 (50)	-3 (25)	-4 (12.5)	-5 (6.25)	-6 (3.13)	-7 (1.56)	-8 (0.78)	-9 (0.39)	-10 (0.195)	-11 (0.0975)	-12 (0.0487)
K-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity test to red blood cells with each control drug. A: amantadine. HCl, K-1, K-2, K-3, and K-4: control drug 1, 2, 3, and 4 which were made in Korea, respectively, J-1 and J-2: control drug 1 and 2 which were made in Japan, respectively, C-1, C-2, and C-3: control drug 1, 2, and 3 which were made in China, respectively, Con. : concentration of each extract, positive and negative: + and -, respectively.

Table 3. Inhibitory effects of fractions of MM-40 on influenza virus type A

No\Con (mg)	-1 (10)	-2 (5)	-3 (2.5)	-4 (1.25)	-5 (0.625)	-6 (0.313)	-7 (0.156)	-8 (0.078)	-9 (0.039)	-10 (0.0195)	-11 (0.00975)	-12 (0.00487)
1	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Fractions of MM-40, which were extracted by MeOH, were separated by adsorption chromatography. The fractions were dissolved in 0.8% MeOH. Inhibitory effects of fractions on influenza virus type A were determined by HIT(haemagglutination inhibition test). Con. : concentration of each fraction, 1: H₂O fraction, 2: 60% fraction of MeOH, 3: 40% fraction of MeOH, 4: 20% fraction of MeOH, 5: ether fraction, strong positive, positive, and negative: ++, + and -, respectively.

Table 4. Inhibitory effects of fractions of MM-55 on influenza virus type A

No\Con (mg)	-1 (100)	-2 (50)	-3 (25)	-4 (12.5)	-5 (6.25)	-6 (3.13)	-7 (1.56)	-8 (0.78)	-9 (0.39)	-10 (0.195)	-11 (0.0975)	-12 (0.0487)
1	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Fractions of MM-55, which were extracted by MeOH, were separated by adsorption chromatography. The fractions were dissolved in dissolved in 10% DMSO. Inhibitory effects of fractions on influenza virus type A were determined by HIT(haemagglutination inhibition test). Con. : concentration of each fraction, 1: H₂O fraction, 2: 60% fraction of MeOH, 3: 40% fraction of MeOH, 4: 20% fraction of MeOH, 5: ether fraction, strong positive, positive, and negative: ++, +, and -, respectively.

Table 5. Inhibitory effects of fractions of MM-63 on influenza virus type A

No\Con (mg)	-1 (100)	-2 (50)	-3 (25)	-4 (12.5)	-5 (6.25)	-6 (3.13)	-7 (1.56)	-8 (0.78)	-9 (0.39)	-10 (0.195)	-11 (0.0975)	-12 (0.0487)
1	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Fractions of MM-63, which were extracted by MeOH, were separated by adsorption chromatography. The fractions were dissolved in 0.8% MeOH. Inhibitory effects of fractions on influenza virus type A were determined by HIT(haemagglutination inhibition test). Con. : concentration of each fraction, 1: H₂O fraction, 2: 60% fraction of MeOH, 3: 40% fraction of MeOH, 4: 20% fraction of MeOH, 5: ether fraction, strong positive, positive, and negative: ++, +, and -, respectively.

Table 6. Inhibitory effects of fractions of MM-110 on influenza virus type A

No\Con (mg)	-1 (100)	-2 (50)	-3 (25)	-4 (12.5)	-5 (6.25)	-6 (3.13)	-7 (1.56)	-8 (0.78)	-9 (0.39)	-10 (0.195)	-11 (0.0975)	-12 (0.0487)
1	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Fractions of MM-110, which were extracted by MeOH, were separated by adsorption chromatography. The fractions were dissolved in 0.8% MeOH. Inhibitory effects of fractions on influenza virus type A were determined by HIT(haemagglutination inhibition test). Con. : concentration of each fraction, 1: H₂O fraction, 2: ether fraction, 3: undissolved pellet of H₂O fraction, 4: chloroform fraction, 5: hexane fraction, strong positive, positive, and negative: ++, +, and -, respectively.

Table 7. Cytotoxicity of fractions of MM-40 against red blood cells

No\Con (mg)	-1 (10)	-2 (5)	-3 (2.5)	-4 (1.25)	-5 (0.625)	-6 (0.313)	-7 (0.156)	-8 (0.078)	-9 (0.039)	-10 (0.0195)	-11 (0.00975)	-12 (0.00487)
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Fractions of MM-40, which were extracted by MeOH, were separated by adsorption chromatography. The fractions were dissolved in 0.8% MeOH. Cytotoxicity of fractions against influenza virus type A were determined by HA(haemagglutination assay). Con. : concentration of each fraction, 1: H₂O fraction, 2: 60% fraction of MeOH, 3: 40% fraction of MeOH, 4: 20% fraction of MeOH, 5: ether fraction, positive and negative: + and -, respectively.

Table 8. Cytotoxicity of fractions of MM-55 against red blood cells

No\Con (mg)	-1 (100)	-2 (50)	-3 (25)	-4 (12.5)	-5 (6.25)	-6 (3.13)	-7 (1.56)	-8 (0.78)	-9 (0.39)	-10 (0.195)	-11 (0.0975)	-12 (0.0487)
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Fractions of MM-55, which were extracted by MeOH, were separated by adsorption chromatography. The fractions were dissolved in 10% DMSO. Cytotoxicity of fractions against influenza virus type A were determined by HA(haemagglutination assay). Con. : concentration of each fraction, 1: H₂O fraction, 2: 60% fraction of MeOH, 3: 40% fraction of MeOH, 4: 20% fraction of MeOH, 5: ether fraction, positive and negative: + and -.

Table 9. Cytotoxicity of fractions of MM-63 against red blood cells

No\Con (mg)	-1 (100)	-2 (50)	-3 (25)	-4 (12.5)	-5 (6.25)	-6 (3.13)	-7 (1.56)	-8 (0.78)	-9 (0.39)	-10 (0.195)	-11 (0.0975)	-12 (0.0487)
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	△	△	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	△	△	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Fractions of MM-63, which were extracted by MeOH, were separated by adsorption chromatography. The fractions were dissolved in 0.8% MeOH. Cytotoxicity of fractions against influenza virus type A were determined by HA(haemagglutination assay). Con. : concentration of each fraction, 1: H₂O fraction, 2: 60% fraction of MeOH, 3: 40% fraction of MeOH, 4: 20% fraction of MeOH, 5: ether fraction, very weak positive and negative: △ and -, respectively.

Table 10. Cytotoxicity of fractions of MM-110 against red blood cells

No\Con (mg)	-1 (100)	-2 (50)	-3 (25)	-4 (12.5)	-5 (6.25)	-6 (3.13)	-7 (1.56)	-8 (0.78)	-9 (0.39)	-10 (0.195)	-11 (0.0975)	-12 (0.0487)
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Note. Fractions of MM-110, which were extracted by MeOH, were separated by adsorption chromatography. The fractions was dissolved in 0.8% MeOH. Cytotoxicity of fractions against influenza virus type A were determined by HA(haemagglutination assay). Con. : concentration of each fraction, 1: H₂O fraction, 2: ether fraction, 3: undissolved pellet of H₂O fraction, 4: chloroform fraction, 5: hexane fraction, positive and negative: + and -, respectively.

Table 11. Titration of mouse-adapted influenza virus type A determined by haemagglutination test

No\Titer (HAunit)	1	2	4	8	16	32	64	128
1st-5d	++	+	-	-	-	-	-	-
2nd-5d	+	-	-	-	-	-	-	-
2nd-7d	-	-	-	-	-	-	-	-
3rd-5d	++	++	+	-	-	-	-	-
3rd-7d	+	+	+	-	-	-	-	-
4th-5d	-	-	-	-	-	-	-	-
4th-7d	++	++	+	-	-	-	-	-
NC	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Titers of virus extracted in lung and bronchia homogenate of mouse 5days and 7days after infection of influenza virus. Balb/C mice were infected intranasally by dropping 20 μ l of influenza virus.

4. 결 론

가. 양성대조구로 사용된 시료들 가운데 amantadine·HCl은 12.5mg/ml, K-1은 3.13mg/ml-100mg/ml 사이에서 항바이러스 활성을 나타냈으며 K-2는 12.5mg/ml-100mg/ml 사이에서, K-3는 12.5mg/ml-100mg/ml 사이에서, K-4는 25mg/ml-100mg/ml 사이에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났으며, J-1은 1.56mg/ml-100mg/ml 사이에서 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났고 J-2는 3.13mg/ml-100mg/ml, C-1과 C-3는 6.25mg/ml-100mg/ml, C-2는 100mg/ml 농도에서 비교적 약한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타났고, 국내, 일본 및 중국에서 판매되는 한방감기 액 기스제들은 RBC에 대해 세포독성을 나타내지않은 반면에 amantadine·HCl은 25mg/ml-200mg/ml 농도구간에서 세포독성을 나타내었다.

나. 100종의 단미제 중 항바이러스 활성이 강하고 약제로 개발가능성이 있는 MM-40, MM-55, MM-63, MM-110으로부터 홉착크로마토그래피에 의해 각각 분획을 나누어 적혈구응집억제반응을 통해 활성 효과를 살펴 본 결과 MM-40은 40%메탄올, MM-55는 수층, MM-63은 20% 메탄올, MM-110은 수층분획등에서는 각각 78 μ g/ml-156 μ g/ml, 1.56mg/ml-100mg/ml, 6.25mg/ml-50mg/ml, 48.7 μ g/ml-780 μ g/ml 농도구간에서 각각 강한 항바이러스 활성을 보였다.

다. 항바이러스 활성을 지닌 MM-40, MM-55, MM-63으로부터 홉착크로마토그래피에 의해 각각 분획을 나누어 RBC에 대한 세포독성을 살펴 본 결과 MM-40은 강한 활성효과를 보인 40%메탄올 분획에서는 78 μ g/ml-10mg/ml 농도구간에서 세포독성을 보였고, MM-55는 강한 활성효과를 보인 수층 분획에서는 전혀 세포독성이 나타나지 않았다. MM-63은 강한 활성효과를 보인 20% 메탄올 분획에서는 50mg/ml-100mg/ml 농도구간에서 세포독성을 나타냈고, MM-110

은 강한 활성효과를 보인 수층분획에서는 195 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -100 mg/ml 농도구간에서 세포독성이 나타났다.

라. *In vivo*에서 약제활성평가를 위한 실험동물 모델개발에서는, 4회 계대감염시켜 7일째 감염된 마우스의 폐와 기관지에서 적출된 바이러스의 역가가 4 HA unit로 결정되어, 이 바이러스를 반복하여 Balb/C 마우스에 적용시키는 과정에 있다.

5. 참고문헌

1. Ballew H. C, Forrester F. T, Lyerla H. C. 『Basic laboratory methods in virology course #8200-C』. 『C. D. C.』 1981.
2. 『세균(바이러스) 검사요원 과정』. 국립보건원, 1993.
3. WHO. 『Manual for rapid laboratory viral diagnosis』. WHO offset publication No. 47. WHO Geneva, 1979.
4. 정장현. 『감기에 대한 한의학과 서양의학의 인식비교』. 1995.
5. 정재득·고병섭·이형환·최환수·박갑주. 『한약처방(복합제)의 Influenza virus type A에 대한 항바이러스활성효과』. 『대한바이러스학회지』 1996: 26(2): 273-283.
6. Chung, Hey-Kyung·Seong-Hun Lee·Hyung Hoan Lee·Dae-Sil Lee·Yong-Sung Kim. 『Nucleotide sequence analysis of genome segment A of Infectious Pancreatic Necrosis Virus DRT strain』. 『Mol Cell』 1994: 4: 349-354.
7. Mogabgab W. J, Simson G. Z, Green I. J. 『Growth characteristics and cytopathogenic effects of influenza A and B in cultures of human embryo tissues』. 『Proc Soc Exper Biol and Med』 1955: 76: 314-327.
8. McLaren, L. C. 『Hemagglutination inhibition and hemadsorption in Clinical』. 『Virology Manual(Specter S, Lancz, G, eds)』. New York: Elsevier science publishing, 1992: 243-249.
9. Clausen, S., Olsen, O and Sorensen, H. 『4-Hydroxybenzoylcholine: a natural product present in *Sinapis alba*』. 『Phytochemistry』 1982: 21(4): 917-922.
10. Schmidt, J., Yokota, T., Adam, G and Takahashi, N. 『Casterone and brassinolide in *Raphanus sativus* seeds』. 『Phytochemistry』 1991: 30(1): 364-365.
11. Ball, M. A., Utsunomiya, T., Ikemoto, K. 『The antiviral effect of keishi-ni-eppi-ichi-to, a traditional chinese herval medicine, on influenza A2(H₂N₂) virus infection in mice』. 『Experientia』 1994: 50: 774-779.
12. Nagai,T. and Yamada, H. 『*In vivo* anti-influenza virus activity of kampo(Japanese herbal) medicine "Sho-seiryu-to" and its mode of action』. 『Int J Immunoparmac』 1994:

정재득·박인호·이광희·김호경·고병섭·박갑주 : 한약 단미제 분획의 Influenza virus type A 활성화에 관한 연구

16(8): 605-613.

13. Nagai, T., Miyachi, Y., Tomimori, T., Suzuki, Y. and Yamada, H. 'Inhibition of Influenza virus sialidase and antiinfluenza virus activity by plant flavonoids.'. 『Chem pharm. Bull.』 1990: 38(5): 1329-1332.

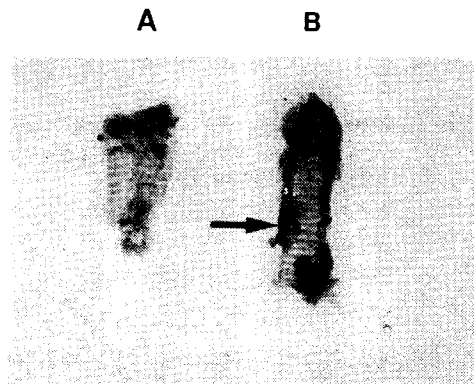


Figure 1. Morphology of bronchi from mouse infected by influenza virus type A for 7days.

A: Normal control, B: Bronchus of infected mouse. Arrow indicate congested bronchia of infected mouse.

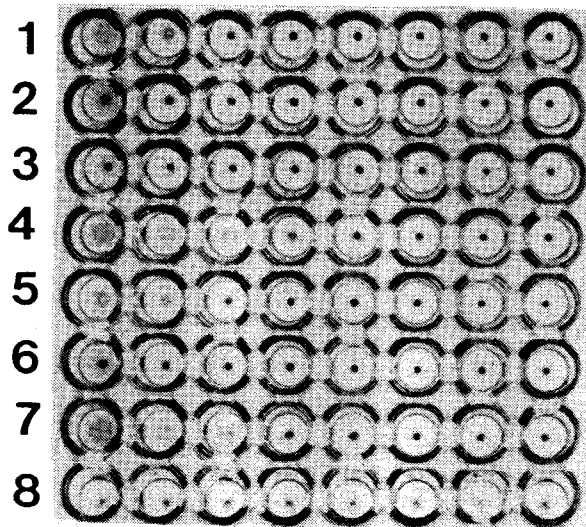


Figure 2. Haemagglutination assay of bronchial fluid of mouse which was adapted with influenza virus type A.

= ABSTRACT =

Study on the Influenza Type A Activity of Fractions of Korean Medicinal Herbs

Jung Jae-Deuk, PhD* Park In-Ho* Park Kap-Joo, PhD* Lee Kwang-Hee**
Kim Ho-Kyoung, PhD*** Ko Byung-Seob, PhD***

In order to search for anti-influenza virus type A agents from Korean medicinal herbs,

* Dept. of Basic Research, KIOM, 135-100 Seoul, Korea

** Dept. of Otorhinolaryngology, Medical school, Konkuk University

*** Dept. of Herbal Medicine, KIOM

we selected 100 medicinal herbs, based on a review of the Korean traditional medicine books. Four of 100 Korean medicinal herbs, MM-40, MM-55, MM-63, MM-110, exhibited very strong anti-influenza virus activity. The fractions of four medicinal herbs, which had very strong anti-influenza virus activity, were tested for antiviral activity by means of Haemagglutination inhibition test(HIT), 40% MeOH fraction of MM-40, H₂O fraction of MM-55, 20% fraction of MM-63 and H₂O fraction of MM-110 had strong anti-influenza virus activity at the range of 78 μ g/ml to 156 μ g/ml, 1.56mg/ml to 100mg/ml, 6.25mg/ml to 50 mg/ml and 48.7 μ g/ml to 780 μ g/ml, respectively. These results of HIT indicated that fractions of Korean medicinal herbs might inhibit either attachment of virus to cell surface receptor or penetration of virus into cell during the initial stage of infection. In the cytotoxicity of fractions against red blood cells, 40% MeOH fraction of MM-40, 20% fraction of MM-63 and H₂O fraction of MM-110 showed cytotoxicity at the range of 78 μ g/ml to 10mg/ml, 50mg/ml to 100mg/ml and 195 μ g/ml to 100mg/ml, respectively, whereas H₂O fraction of MM-55 did not show cytotoxicity. In order to establish influenza virus adapted animal model, influenza virus type A were passaged 3 and 4 times successively in Balb/c mouse. As a result, we had 4 HA unit titers on the 5 days of 3rd passages and 7 days of 4th passages after infection, respectively.

【Key words】 Influenza virus type A, Haemagglutination inhibition test(HIT), Haemagglutination assay(HA), Korean medicinal herbs.

Abbreviations: MM-methanol extracts of Korean medicinal herbs; MW-water extracts of Korean medicinal herbs.