



랫드에서 CONP01에 대한 4주 반복투여 독성연구

홍동호 · 장호송 · 김광호 · 길기현 · 김재민 · 한명규 · 배진숙 · 김남두 · 이현걸 · 이정숙 · 이선경 · 박찬구 · 송시환
(주)켄온 전임상 연구센터

Four-Week Repeated-Dose Toxicity Studies of CONP01 in Rats

Dong Ho Hong, Hu-Song Zhang, Kwang-Ho Kim, Gi Hyun Gil, Jae Min Kim, Myong Kyu Han, Jin-Sook Bae,
Nam Du Kim, Hyun Kul Lee, Jung Suk Lee, Sun Kyung Lee, Chan Koo Park and Si Whan Song

Preclinical Research Center, Chemon Inc., Gyeonggi-do 449-826, Korea

Received November 5, 2004; Accepted December 2, 2004

ABSTRACT. This study was performed to evaluate repeated-dose toxicities of CONP01 in Sprague-Dawley rats. CONP01, a new antiarthritic agent was administered orally to rats at dose levels of 0, 125, 500 and 2,000 mg/kg/day for 4 weeks. In present study, there were no dose response changes in mortality, clinical signs, body weight changes, food and water consumption, ophthalmoscopy, organ weights, urine analysis, hematological findings, and biochemical examination of all animals treated with CONP01. Gross and histopathological findings revealed no evidence of specific toxicity related to CONP01. These result suggest that no observed adverse effect level (NOAEL) of CONP01 may be over 2,000 mg/kg in rats.

Keywords: CONP01, Repeated-dose toxicity, Rat.

서 론

류머티즘 관절염은 일종의 자가면역질환으로서, 환경오염, 유전적 요인 등으로 인해 아이들의 저항력이 약해지면서 최근 어린이 환자도 급증하고 있다(Adorini, 2004). 미국인은 1000명당 1명꼴로 이 병을 앓고 있다. 류머티즘 관절염 환자의 경우 이 질환이 직접적인 사인이 되는 비율이 정상인보다 2~2.5배 정도 높다. 관절염은 노인성 질환으로 가장 많은 빈도를 보이는 질환으로써 외국의 경

우 전 인구의 20% 이상이 질환을 앓고 있고, 그 중 10% 이상이 심각한 노동력 손실을 보이고 있다(전과 이 등, 2003). 관절염의 발생은 일단 면역체계가 혼란을 일으키면 관절 부위에서 염증을 일으켜 연골과 뼈를 파괴해 활동장애를 일으키며, 이를 방치하면 아예 걷지 못하게 되거나 최악의 경우 죽음에 이르기도 한다(안과 김, 2003). 면역증강제를 투여하여 체내의 면역을 증강시킴으로서 치료효과를 증가시키는 방법도 관절염 치료법중의 하나이다(Dalal *et al.*, 1990; Nissinen *et al.*, 2004; Child *et al.*, 2004).

CONP01은 노나무, 골담초, 우슬, 오가피의 혼합물에 대한(이 등, 1999) 물추출물과 찹쌀을 누룩으로부터 분리된 균주 및 주모의 혼합물을 가한 후 발효시켜 얻은 것이다. 이 물질의 면역작용은 TNF- α , IL-1 및 IL-6의 생성을 억제함으로써 관절염과 같은 만성염증 질환에 예방 및 치료제로서의 효능을 나타낸다고 한다(김과 홍, 2004).

따라서 본 연구에서는 (주)켄온 및 명주가에서 공동개발한 CONP01에 대한 안전성 평가의 일환으로 반복투여시 나타날 수 있는 독성을 질적·양적으로 평가하고자 랫드에 대한 4주 반복 경구투여 독성시험을 의약품 등의 독성시

Correspondence to: Si Whan Song, Preclinical Research Center, Chemon Inc., 334 Jaeli-ri, Yangji-myeon, Yongin-si, Gyeonggi-do 449-826, South Korea
E-mail: swansong@chemon.co.kr

List of abbreviations: SD, Sprague-Dawley; WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; HGB, 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; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; ALP, alkaline phosphatase; TG, triglyceride; T-protein, total protein; BUN, blood urea nitrogen; CK, creatinine kinase; T-bilirubin, total bilirubin; GGT, γ glutamyl transpeptidase; LDH, lactate dehydrogenase.

협기준(식품의약품안전청고시, 제1999-61호, 1999)에 준하여 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질

본 시험에 사용한 CONP01의 조제는 다음과 같이 행하였다. 감초, 우슬, 골담초, 노나무 및 황정의 열수추출물을 만들고 이 추출물에 찹쌀 및 누룩 또는 누룩으로부터 분리된 균주 및 주모위 혼합물을 가하고 발효시켜 약술을 제조하였다. 이렇게 조제된 약술의 알코올을 증발시킨 후 동결건조하여 얻은 고형성분을 CONP01로 명명하였고, 밀폐용기에 넣어 냉장 보관하였다. 투여직전 주사용 멸균 증류수에 용해시킨 후 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

바이오링크(충청북도 음성군)로부터 5~6주령의 Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 입수한 후 1주일간의 검역과 순화, 사육기간을 거쳐 건강한 동물 암·수 각각 40마리씩을 선발하여 실험에 사용하였다. 순화 및 시험 전기간 동안 동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 15\%$, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12 hrs, 조도 150~300 lux로 설정된 (주)켄온의 전임상연구소 실험동물실에 수용하였으며, 사료는 실험동물용 고형사료(Harlan Co. Ltd., 미국)를 자유 급이하였고, 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유섭취시켰다.

투여용량 설정 및 시험군의 구성

랫드에서 CONP01에 대한 이전에 단회 투여독성시험에서 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 따라서 반복투여 독성시험에서도 독성이 미미할 것으로 생각되어 일반적으로 반복경구투여 한계량으로 사용하고 있는 2,000 mg/kg을 최고용량군으로 설정하였고, 공비를 4로하여 2개의 군(125 및 500 mg/kg)을 추가하여 총 3군으로 용량을 설정하였다.

시험군은 선발된 암·수 각각 40마리의 동물을 군간 체중이 고르게 3개의 용량군과 1개의 대조군으로 하여 군당 암·수 각각 10마리씩 배치하였다. 평균체중은 수컷은 192.0 ± 8.0 g, 암컷은 138.0 ± 5.0 g 범위였다.

투여방법 및 투여기간

투여경로는 인체 적용경로가 경구이므로 강제 경구투여하였다. 투여기간은 시험물질을 1일 1회, 주 7회, 4주 연속으로 투여하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상 및 사망동물의 관찰. 시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 투여전 및 투여 후의 일반상태 증독증상 및 사망의 유무를 관찰하였고, 이상이 있는 경우 증상의 종류, 발견일 및 증상의 정도를 개별적으로 기록하였다.

체중변화, 사료섭취량 및 물섭취량 측정. 모든 동물에 대하여 시험기간 중 주 1회와 부검일에 절식된 체중을 측정하였고, 투여당일 및 전 시험기간 중에 주 1회 사료 및 물 섭취량을 측정하였다. 측정방법은 체중측정일에 사료 및 물의 정량을 급여한 후 익일에 잔량을 측정하여 마리당 평균 섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

안과학적 검사. 군분리 전 순화기간 중에 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 관찰하였다. 투여 후에는 투여 최종주에 모든 동물의 눈의 외관을 육안적으로 관찰하였다. 특히 대조군과 최고용량군의 경우 안저 사진기(Genesis, Kowa, 일본)를 이용하여 눈의 안저를 검사하였다. 안저검사는 산동제 (Mydrin-P)를 이용하여 동공을 확장시킨 후 검사하였다.

요검사. 요 검사용 시험지(Bayer)와 요자동분석장치(CliniTek 100, Bayer)를 이용하여 요비중, pH, 요단백(protein), 케톤체(ketone body), 잠혈(occult blood), 요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 아질산염(nitrite) 및 유로빌리노겐(urobilinogen)에 관하여 검사하였다. 요침사검사는 적혈구, 백혈구, 상피세포 및 원주를 관찰하였다. 채뇨는 대사케이지를 이용하여 실시하였고 정성분석, 요색조검사 및 요침사 검사를 위해서 3-4시간 동안 채뇨한 신선뇨를 사용하였고 요량은 24시간 동안의 축뇨를 이용하여 측정하였다.

부검 및 장기중량 측정. 시험종료 후 모든 생존동물에 대하여 에테르 마취하에 방혈·치사시켜 육안적으로 장기를 검사하였다. 또한 모든 실험동물에 대하여 심장, 간장, 비장, 신장(좌, 우), 부신(좌, 우), 고환(좌, 우), 난소(좌, 우), 뇌 및 뇌하수체, 폐장, 갑상샘, 전립샘, 췌장, 정낭샘 및 자궁의 중량을 측정하였다.

혈액학적 검사. 부검시에 모든 실험동물에 대하여 혈액학적인 검사를 실시하였다. 계획도살 시까지 생존한 모든 동물에 대하여 부검 전에 하룻밤 절식시킨 후, 에테르를 이용한 마취 상태에서 회복하여 후대정맥에서 채혈한 혈액으로 다음의 항목을 측정하였다. Coulter counting을 위한 채혈은 혈액 응고방지제로 EDTA-2K가 들어있는 CBC 채혈병(주식회사 녹십자에 0.5 ml)을 취한 후 coulter mixer기 위에서 5분 이상 혼합하였다. 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤마토크리트치(HCT), 혈색소량(HGB), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC) 적혈구분포대(RDW), 혈소판수

(PLT) 및 평균혈소판용적(MPV)를 혈구자동계측장치 (Cell dyn 3700, Abbot, USA)를 이용하여 측정하였다. 백혈구 백분율은 혈액도말 표본을 제작한 후 Wright-Giemsa 염색하여 호중구(neutrophil), 호산구(eosinophil), 호염기구(basophil), 림프구(lymphocyte), 단핵구(monocyte)의 백분율을 현미경하에서 산정하였다. 망상적혈구검사는 methylene blue 염색을 한 후 광학현미경으로 검정하였다. 혈액응고시간에 있어서 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(APTT)치를 측정하기 위하여 일부의 혈액을 sodium citrate로 항응고 처리한 다음 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 얻은 혈장으로 혈액응고시간 검사장치(CA-50, Sysmex, 일본)를 이용하여 측정하였다.

혈액생화학적 검사. 부검전 동물을 20~24시간 절식시킨 다음 에테르 마취하에 후대정맥에서 채혈해서 얻은 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리(3,000 rpm, 15분) 해서 얻은 혈청에 대해서 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), alkaline phosphatase(ALP), triglyceride(TG), cholesterol, glucose, total protein(PRO), albumin, blood urea nitrogen(BUN), creatine kinase(CPK), creatinine, total bilirubin(T-bilirubin), phosphorous(IP), lactate dehydrogenase(LDH), A/G ratio, calcium치를 자동분석장치(AU400, Olympus, 일본)를 이용하여 측정하였고, 전해질 자동분석장치(644 Na, K, Cl Analyzer, Ciba-Corning, USA)를 이용하여 sodium (Na⁺), potassium(K⁺), chloride (Cl⁻)를 측정하였다.

병리조직학적 검사. 중량을 측정한 장기와 위, 소장, 대장, 식도, 기관 등 장기 그리고 안구 및 한쪽 대퇴골을 10% 중성포르말린용액에 고정하였다. 골수검사를 위해 대퇴골은 다시 탈회용액(10% formic acid in 10% formalin)에 넣어 침전시켰다. 충분한 고정을 거친 모든 장기 조직은 파라핀 포매기에서 포매하여 마이크로톰(Leica 820, Sweden)으로 4 μm 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색을 하여 광학현미경으로 검사하였다.

Table 1. Mortality and clinical signs in rats treated orally with CONP01 for 4 weeks

Items	Dose (mg/kg B.W)	Final mortality		Clinical signs	
		Male	Female	Male	Female
Groups	0	0/10	0/10	-	-
	125	0/10	0/10	-	-
	500	0/10	0/10	-	-
	2000	0/10	1/10	-	-

Values are expressed as the number of dead animal/total number of animals.
- : no clinical signs.

통계학적 분석

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적분석은 one-way analysis of variance(ANOVA)에서 유의차가 인정되는 F 값이 관찰될 때, 대조군과 각 시험군을 비교하기 위하여 Dunnett's *t*-test를 하였으며, 발생병변의 빈도는 χ^2 (Chi-square) 검정을 실시하였다.

결 과

일반증상 및 사망률

시험물질의 투여와 관련된 사망동물은 암수의 모든 투여군에서 관찰되지 않았다. 일반증상에서도 시험물질의 투여와 관련된 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. 다만 암컷 2000 mg/kg 투여군에서 1마리의 사망이 관찰되었다. 사망동물의 경우에도 특이한 증상이 없다가 갑자기 사망하였다(Table 1).

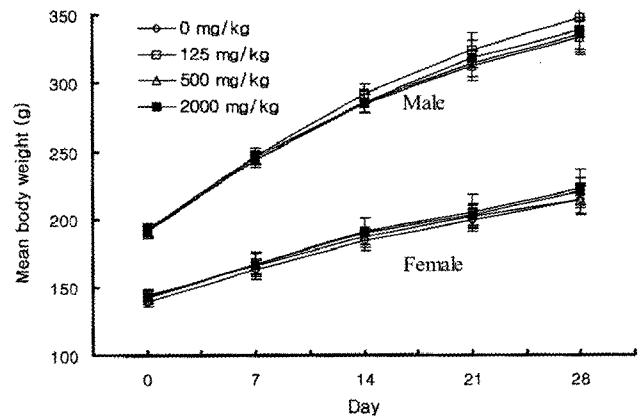


Fig. 1. Body weight changes in rats treated orally with CONP01 for 4 weeks. Data are mean ± S.D. (n=9 or n=10).

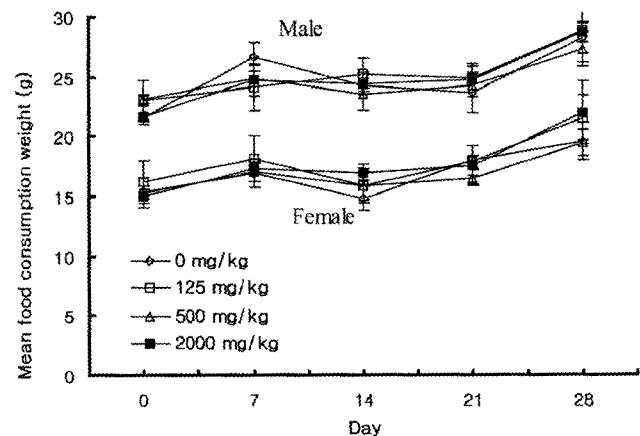


Fig. 2. Food consumption changes in rats treated orally with CONP01 for 4 weeks. Data are mean ± S.D. (n=9 or n=10).

체중, 사료섭취량 및 물섭취량의 변화

체중의 변화에서는 통계학적으로 유의한 어떠한 변화도 인정되지 않았다(Fig 1). 사료 섭취량에서는 수컷에서 투

여 1일째에 125 및 500 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였고, 1주째에 모든 시험물질 투여군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의하

Table 2. Urinalysis of male and female rats treated orally with CONP01 for 4 weeks

	Sex	Male				Female			
		Dose (mg/kg)	0	125	500	2000	0	125	500
Specific gravity	≤ 1.005	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.010	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.015	1	0	0	0	1	0	0	0
	1.020	2	3	2	1	2	2	1	2
	1.025	2	0	1	1	2	0	2	3
	≥ 1.030	0	2	2	3	0	3	2	0
pH	6.0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	7.0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7.5	1	0	0	0	0	2	1	1
	8.0	1	3	5	4	4	3	3	3
	8.5	3	2	0	1	1	0	1	1
	≥ 9.0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucose	-	5	5	5	5	5	5	5	5
	-/+	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	5	5	5	5	5	5	5	5
	-/+	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	-	3	2	1	0	5	4	3	5
	-/+	2	2	3	4	0	1	2	0
	+	0	1	1	10	0	0	0	0
Protein	-	0	0	0	0	1	1	0	2
	-/+	0	0	0	0	2	0	1	0
	+	2	0	2	0	0	1	2	2
	++	2	3	1	4	0	1	1	0
	+++	1	2	2	1	2	2	1	1
Urobilinogen	0.1	5	5	5	5	5	5	5	5
	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrite	-	4	5	5	5	5	5	5	5
	+	1	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	5	4	4	5	5	5	5	5
	-/+	0	1	1	0	0	0	0	0
WBC	-	0	0	0	0	1	1	2	2
	-/+	1	0	1	1	2	1	1	2
	+	2	2	3	3	0	3	2	1
	++	1	3	1	1	2	0	0	0
	+++	1	0	0	0	0	0	0	0
RBC ^a	-	5	5	5	5	5	5	5	5
	+/- (lower than 4)	0	0	0	0	0	0	0	0
WBC ^a	-	4	1	3	4	4	5	5	5
	+/- (lower than 5)	1	4	2	1	1	0	0	0
Epithelial cell ^a	-	4	4	3	3	2	3	3	3
	+/- (whole scope)	1	1	2	2	3	2	2	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Cast	-	5	5	5	5	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0

^aUrine sediment parameters. Each value represents incidence of five animals.

Table 3. Absolute and relative organ weights (g) of rats treated orally with CONP01 for 4 weeks

Absolute weight (g)	Male					Female				
	0 mg/kg	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg	2000 mg/kg	0 mg/kg	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg	2000 mg/kg
Brain (g)	1.850 ± 0.090	1.850 ± 0.090	1.770 ± 0.050	1.850 ± 0.080	1.850 ± 0.080	1.650 ± 0.060	1.680 ± 0.080	1.690 ± 0.050	1.670 ± 0.040	1.670 ± 0.040
Brain (%)	0.589 ± 0.033	0.560 ± 0.030	0.561 ± 0.023	0.577 ± 0.021	0.577 ± 0.021	0.822 ± 0.058	0.809 ± 0.049	0.845 ± 0.026	0.812 ± 0.039	0.812 ± 0.039
Hypophysis (g)	0.011 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.010 ± 0.003	0.012 ± 0.007	0.012 ± 0.007	0.012 ± 0.003	0.013 ± 0.002	0.012 ± 0.005	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.003
Hypophysis (%)	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.002	0.004 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.002	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001
Thymus (g)	0.540 ± 0.100	0.560 ± 0.100	0.490 ± 0.110	0.520 ± 0.090	0.520 ± 0.090	0.390 ± 0.050	0.370 ± 0.070	0.360 ± 0.050	0.410 ± 0.080	0.410 ± 0.080
Thymus (%)	0.170 ± 0.03	0.169 ± 0.028	0.157 ± 0.033	0.162 ± 0.026	0.162 ± 0.026	0.195 ± 0.028	0.179 ± 0.032	0.180 ± 0.027	0.200 ± 0.038	0.200 ± 0.038
Lung (g)	1.470 ± 0.150	1.690 ± 0.490	1.400 ± 0.130	1.430 ± 0.130	1.430 ± 0.130	1.110 ± 0.050	1.210 ± 0.150	1.080 ± 0.050	1.130 ± 0.050	1.130 ± 0.050
Lung (%)	0.466 ± 0.046	0.515 ± 0.138	0.443 ± 0.041	0.445 ± 0.033	0.445 ± 0.033	0.580 ± 0.021	0.582 ± 0.052	0.54 ± 0.025	0.548 ± 0.024	0.548 ± 0.024
Heart (g)	1.170 ± 0.080	1.220 ± 0.100	1.320 ± 0.510	1.170 ± 0.040	1.170 ± 0.040	0.790 ± 0.070	0.840 ± 0.070	0.790 ± 0.050	0.850 ± 0.050	0.850 ± 0.050
Heart (%)	0.372 ± 0.025	0.374 ± 0.028	0.419 ± 0.161	0.365 ± 0.023	0.365 ± 0.023	0.392 ± 0.028	0.405 ± 0.040	0.394 ± 0.024	0.413 ± 0.030	0.413 ± 0.030
Liver (g)	9.290 ± 0.610	10.100 ± 1.030	8.990 ± 0.830	9.540 ± 1.020	9.540 ± 1.020	5.570 ± 0.500	5.590 ± 0.490	5.410 ± 0.380	5.510 ± 0.340	5.510 ± 0.340
Liver (%)	2.954 ± 0.132	3.081 ± 0.252	2.849 ± 0.161	2.973 ± 0.187	2.973 ± 0.187	2.766 ± 0.149	2.683 ± 0.145	2.702 ± 0.137	2.676 ± 0.099	2.676 ± 0.099
Spleen (g)	0.660 ± 0.080	0.760 ± 0.090	0.690 ± 0.100	0.690 ± 0.080	0.690 ± 0.080	0.610 ± 0.060	0.550 ± 0.070	0.530 ± 0.070	0.540 ± 0.060	0.540 ± 0.060
Spleen (%)	0.211 ± 0.020	0.232 ± 0.025	0.217 ± 0.025	0.215 ± 0.023	0.215 ± 0.023	0.301 ± 0.021	0.265 ± 0.027	0.264 ± 0.030	0.261 ± 0.027	0.261 ± 0.027
Kidney-right (g)	1.200 ± 0.190	1.190 ± 0.050	1.100 ± 0.080	1.184 ± 0.110	1.184 ± 0.110	0.690 ± 0.070	0.700 ± 0.050	0.670 ± 0.050	0.730 ± 0.060	0.730 ± 0.060
Kidney-right (%)	0.382 ± 0.066	0.362 ± 0.018	0.347 ± 0.018	0.369 ± 0.019	0.369 ± 0.019	0.340 ± 0.021	0.338 ± 0.017	0.336 ± 0.015	0.353 ± 0.032	0.353 ± 0.032
Kidney-left (g)	1.120 ± 0.080	1.130 ± 0.110	1.100 ± 0.080	1.170 ± 0.110	1.170 ± 0.110	0.660 ± 0.060	0.690 ± 0.040	0.670 ± 0.050	0.690 ± 0.040	0.690 ± 0.040
Kidney-left (%)	0.358 ± 0.022	0.347 ± 0.032	0.348 ± 0.018	0.367 ± 0.025	0.367 ± 0.025	0.329 ± 0.022	0.332 ± 0.016	0.335 ± 0.015	0.335 ± 0.024	0.335 ± 0.024
Adrenal gland-right (g)	0.024 ± 0.005	0.029 ± 0.006	0.026 ± 0.004	0.027 ± 0.004	0.027 ± 0.004	0.033 ± 0.003	0.032 ± 0.004	0.033 ± 0.006	0.032 ± 0.006	0.032 ± 0.006
Adrenal gland-right (%)	0.008 ± 0.002	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.016 ± 0.002	0.016 ± 0.002	0.016 ± 0.003	0.016 ± 0.003	0.016 ± 0.003
Adrenal gland-left (g)	0.027 ± 0.004	0.030 ± 0.005	0.026 ± 0.004	0.028 ± 0.005	0.028 ± 0.005	0.032 ± 0.006	0.033 ± 0.004	0.035 ± 0.003	0.032 ± 0.005	0.032 ± 0.005
Adrenal gland-left (%)	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.016 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.016 ± 0.003	0.016 ± 0.003
Testis-right (g)	1.811 ± 0.104	1.864 ± 0.121	1.868 ± 0.105	1.822 ± 0.109	1.822 ± 0.109	-	-	-	-	-
Testis-right (%)	0.576 ± 0.035	0.571 ± 0.049	0.593 ± 0.031	0.571 ± 0.047	0.571 ± 0.047	-	-	-	-	-
Ovary-right (g)	-	-	-	-	-	0.056 ± 0.011	0.055 ± 0.012	0.057 ± 0.014	0.049 ± 0.012	0.049 ± 0.012
Ovary-right (%)	-	-	-	-	-	0.028 ± 0.005	0.027 ± 0.005	0.028 ± 0.007	0.024 ± 0.006	0.024 ± 0.006
Testis-left (g)	1.980 ± 0.540	1.880 ± 0.060	1.870 ± 0.100	1.800 ± 0.130	1.800 ± 0.130	-	-	-	-	-
Testis-left (%)	0.633 ± 0.189	0.575 ± 0.031	0.595 ± 0.028	0.564 ± 0.054	0.564 ± 0.054	-	-	-	-	-
Ovary-left (g)	-	-	-	-	-	0.060 ± 0.010	0.060 ± 0.010	0.050 ± 0.010	0.050 ± 0.020	0.050 ± 0.020
Ovary-left (%)	-	-	-	-	-	0.027 ± 0.006	0.027 ± 0.005	0.024 ± 0.005	0.025 ± 0.008	0.025 ± 0.008

^aEach value represents mean ± SD of nine animals.

Each value represents mean ± SD of ten animals.

게 감소한 것이 관찰되었으나 용량상관성이 결여되었거나 일관성이 없는 변화였다(Fig. 2).

안과학적 검사조건

암수의 모든 투여군에서 어떠한 이상 증상도 관찰되지 않았다.

요검사 조건

시험물질의 투여와 관련된 어떠한 변화도 인정되지 않았다. 수컷의 모든 투여군에서 비중, 케톤 및 단백질의 증가가 관찰되었고, 수컷의 125 mg/kg과 500 mg/kg의 투여군에서 잠혈과 백혈구의 증가가 관찰되었다. 125와 500 mg/kg 투여군의 암컷에서 비중의 증가가 관찰되었고, 요 중 단백질이 모든 투여군에서 감소 경향을 보였다(Table 2).

장기중량

모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table 3)

혈액학적 검사조건

시험물질 투여에 의한 어떠한 변화도 관찰되지 않았다(Table 4, Table 5).

혈액생화학적 검사조건

시험물질 투여에 의한 어떠한 변화도 관찰되지 않았다(Table 6).

육안적인 부검조건

시험물질 투여와 관련된 변화로 생각되는 특이한 변화는 관찰되지 않았다. 다만, 사망동물의 부검조건에서는 폐의 짙은 암적색조(dark red discoloration)가 관찰되었다.

병리조직학적 소견

시험물질의 투여에 의한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 다만 대조군과 2000 mg/kg 투여군의 암수 각각 2~3례의 동물에서 신장의 피질과 수질의 경계부위에 세뇨관의 호산성 내용물, 내강의 확장 및 일부 세뇨관 상피의 핵이 호염기성과 주위의 간질에는 소수의 림프구 침윤이 관찰되었고 암수 모든 동물의 폐에서 기관지, 기관 및 혈관주위의 lymphoid follicle의 증생(hyperplasia)이 관찰되었다. 또한 수컷 매체대조군의 1례에서는 부갑상선의 선상피세포의 증생과 주위 간질에 림프구의 침윤이 관찰되었다. 수컷 2000 mg/kg 투여군의 1례에서 심장의 우측심실벽의 림프구 침윤을 동반하는 소상 비화농성 심근염(focally infiltration of lymphocyte at the myocardium) 소견이 관찰되었다. 2000 mg/kg 투여군 암컷에서 사망동물의 소견에서는 전신 혈관의 충혈, 수종 및 일부 혈전 소견을 보였다(Table 7).

고찰 및 결론

본 연구에서는 (주)캠온에서 새롭게 개발한 한방약술의

Table 4. Hematological values of rats treated orally with CONP01 for 4 weeks

Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0 mg/kg	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg	0 mg/kg	125 mg/kg	500 mg/kg
WBC (K/ul)	10.48 ± 2.81	11.54 ± 2.42	11.45 ± 3.75	11.46 ± 3.31	8.68 ± 2.63	7.51 ± 1.59	6.92 ± 2.22	8.50 ± 3.70
RBC (M/ul)	8.24 ± 0.24	8.08 ± 0.43	8.04 ± 0.29	8.35 ± 0.30	8.06 ± 0.32	8.07 ± 0.21	8.12 ± 0.37	7.95 ± 0.26
HGB (g/dl)	15.94 ± 0.50	15.95 ± 0.66	15.82 ± 0.55	16.15 ± 0.44	15.71 ± 0.67	15.38 ± 0.42	15.61 ± 0.57	15.39 ± 0.55
HCT (%)	42.45 ± 1.30	42.51 ± 1.89	42.19 ± 1.42	43.27 ± 1.16	42.39 ± 1.37	41.65 ± 1.48	42.58 ± 1.60	42.02 ± 1.34
MCV (fl)	51.50 ± 0.84	52.60 ± 1.44	52.49 ± 1.70	51.86 ± 1.22	52.64 ± 1.09	51.64 ± 1.50	52.50 ± 1.60	52.82 ± 1.41
MCH (pg)	19.36 ± 0.44	19.74 ± 0.47	19.69 ± 0.69	19.33 ± 0.45	19.47 ± 0.20	19.05 ± 0.62	19.24 ± 0.57	19.34 ± 0.47
MCHC (g/dl)	37.55 ± 0.60	37.54 ± 0.51	37.48 ± 0.53	37.30 ± 0.66	37.02 ± 0.65	36.88 ± 1.21	36.65 ± 0.48	36.62 ± 0.48
RDW (%)	15.77 ± 0.78	15.48 ± 0.97	15.21 ± 0.64	15.50 ± 0.72	14.59 ± 0.55	15.43 ± 1.11	15.07 ± 0.72	14.63 ± 0.53
PLT (K/ul)	915 ± 266	941 ± 94.4	945 ± 73.4	831 ± 322	989 ± 120	1051 ± 73.2	859 ± 305	1013 ± 196
MPV (fl)	5.84 ± 0.37	5.79 ± 0.27	5.75 ± 0.36	5.76 ± 0.22	5.75 ± 0.45	5.86 ± 0.36	5.82 ± 0.26	5.60 ± 0.16
NEU (%N)	10.88 ± 3.80	12.16 ± 4.02	9.65 ± 3.04	10.98 ± 4.93	8.52 ± 4.24	8.08 ± 2.84	8.98 ± 2.10	9.17 ± 3.21
LYM (%)	78.58 ± 6.24	74.52 ± 7.27	79.17 ± 3.00	79.81 ± 6.15	83.55 ± 4.78	82.77 ± 3.74	81.86 ± 3.85	82.31 ± 5.10
MONO (%M)	3.71 ± 1.56	4.69 ± 1.58	4.23 ± 1.63	3.58 ± 1.56	3.14 ± 0.52	4.07 ± 1.79	3.85 ± 1.32	3.46 ± 1.49
ESO (%E)	1.18 ± 0.55	0.98 ± 0.55	1.22 ± 0.67	1.04 ± 0.35	1.27 ± 0.45	1.24 ± 0.45	1.43 ± 0.69	1.66 ± 0.56
BASO (%B)	5.64 ± 3.78	7.64 ± 3.85	5.72 ± 1.19	4.57 ± 1.26	3.52 ± 1.37	3.83 ± 1.27	3.88 ± 2.32	3.39 ± 1.03

^aEach value represents mean ± SD of nine animals.

Each value represents mean ± SD of ten animals.

WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, hemoglobin; HCT, hemocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin conc; RDW, RBC Distribution Width; PLT, platelet; MPV, mean platelet volume; LYM, Lymphocyte; NEU, neutrophil; MONO, monocyte; EOS, eosinophil; BASO, basophil.

Table 5. Serum biochemical values of rats treated orally with CONP01 for 4 weeks

Sex	Male					Female				
	Dose (mg/kg)	0 mg/kg	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg	0 mg/kg	125 mg/kg	500 mg/kg	2000 mg/kg	
AST (IU/l)	89.10 ± 13.08	87.60 ± 13.14	87.60 ± 13.14	92.60 ± 9.75	87.7 ± 15.49	101.70 ± 18.26	86.10 ± 14.23	95.20 ± 16.82	93.78 ± 27.46	
ALT (IU/l)	28.57 ± 4.21	29.98 ± 6.12	29.98 ± 6.12	30.37 ± 4.80	32.10 ± 6.42	27.31 ± 3.81	26.33 ± 5.53	25.80 ± 4.52	25.92 ± 4.32	
ALP (IU/l)	108.03 ± 13.92	108.69 ± 16.07	108.69 ± 16.07	110.77 ± 13.68	120.35 ± 20.37	81.26 ± 14.88	81.46 ± 11.95	79.71 ± 7.75	74.72 ± 12.59	
BUN (mg/dl)	16.68 ± 2.54	17.88 ± 1.61	17.88 ± 1.61	16.00 ± 1.57	16.91 ± 1.83	26.69 ± 3.56	24.85 ± 4.07	25.38 ± 2.41	24.80 ± 2.58	
CRE (mg/dl)	0.45 ± 0.05	0.45 ± 0.07	0.45 ± 0.07	0.43 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.50 ± 0.05	0.57 ± 0.08	0.58 ± 0.04	
GLU (mg/dl)	137.07 ± 20.98	131.57 ± 13.76	131.57 ± 13.76	129.84 ± 18.11	136.36 ± 21.03	95.35 ± 8.35	100.71 ± 10.19	99.68 ± 15.80	95.93 ± 14.34	
CHO (mg/dl)	92.96 ± 9.81	87.26 ± 11.91	87.26 ± 11.91	90.90 ± 8.55	84.19 ± 10.00	93.60 ± 11.28	84.24 ± 12.06	88.93 ± 11.23	97.77 ± 10.17	
PRO (g/dl)	6.13 ± 0.17	6.06 ± 0.23	6.06 ± 0.23	6.01 ± 0.17	6.03 ± 0.27	5.80 ± 0.23	5.72 ± 0.28	5.96 ± 0.24	5.77 ± 0.23	
CPK (IU/l)	399 ± 154	410 ± 181	410 ± 181	394 ± 104	351 ± 203	506 ± 214	310 ± 164	385 ± 177	291 ± 141	
ALB (g/dl)	3.44 ± 0.08	3.43 ± 0.13	3.43 ± 0.13	3.43 ± 0.07	3.41 ± 0.11	3.40 ± 0.09	3.40 ± 0.11	3.49 ± 0.10	3.40 ± 0.11	
TBIL (mg/dl)	0.17 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.16 ± 0.05	0.18 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.16 ± 0.05	
TG (mg/dl)	51.45 ± 13.86	55.63 ± 18.57	55.63 ± 18.57	48.15 ± 14.54	50.55 ± 17.32	40.60 ± 12.80	34.72 ± 8.75	44.09 ± 12.20	44.00 ± 9.53	
Ca (mg/dl)	10.47 ± 0.65	10.46 ± 0.55	10.46 ± 0.55	10.15 ± 0.24	10.29 ± 0.61	9.84 ± 0.29	9.69 ± 0.86	10.08 ± 0.48	10.02 ± 0.30	
IP (mg/dl)	9.43 ± 0.53	9.43 ± 1.16	9.43 ± 1.16	8.88 ± 0.54	9.58 ± 0.81	8.59 ± 0.53	8.61 ± 0.61	8.96 ± 1.07	8.78 ± 0.57	
PL (mg/dl)	131.87 ± 10.15	130.56 ± 12.27	130.56 ± 12.27	129.58 ± 7.37	128.68 ± 9.50	149.93 ± 10.42	137.08 ± 14.52	147.93 ± 11.59	151.62 ± 11.56	
A/G (mg/dl)	1.30 ± 0.05	1.30 ± 0.05	1.30 ± 0.05	1.35 ± 0.05	1.30 ± 0.08	1.43 ± 0.08	1.47 ± 0.11	1.42 ± 0.08	1.44 ± 0.07	
Na (mmol/l)	142 ± 0.92	141 ± 1.77	141 ± 1.77	142 ± 1.77	144 ± 6.36	143 ± 1.15	142 ± 1.65	143 ± 1.89	142 ± 1.74	
K (mmol/l)	5.144 ± 0.92	5.195 ± 1.37	5.195 ± 1.37	4.615 ± 0.17	5.445 ± 1.69	4.55 ± 0.38	4.638 ± 0.43	4.813 ± 0.89	4.70 ± 0.39	
Cl (mmol/l)	101.4 ± 1.58	101.5 ± 1.43	101.5 ± 1.43	102.8 ± 1.81	103.0 ± 4.03	103.9 ± 0.88	104.4 ± 0.97	104.2 ± 1.75	103.0 ± 1.73	

^aEach value represents mean ± SD of nine animals.

Each value represents mean ± SD of ten animals.

AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; ALP, Alkaline phosphatase; BUN, Blood urea nitrogen; CRE, Creatinine; GLU, Glucose; CHO, Total cholesterol; PRO, Total protein; CPK, Creatine phosphokinase; ALB, Albumin; TBIL, Total bilirubin; TG, Triglyceride; Ca, Calcium; IP, Inorganic phosphorous; PL, Platelet; A/G, A/G ratio; Na, Sodium; K, Potassium; Cl, Chloride.

Table 6. Plasma coagulation values of rats treated orally with CONP01 for 4 weeks

Items	Dose (mg/kg B.W)	PT		APTT	
		Male	Female	Male	Female
Groups	0	8.09 ± 0.33	8.33 ± 0.48	13.23 ± 2.19	14.30 ± 3.37
	125	8.30 ± 0.58	8.26 ± 0.28	15.10 ± 4.05	15.34 ± 5.49
	500	8.13 ± 0.69	8.07 ± 0.97	13.38 ± 3.99	15.47 ± 1.37
	2000	8.35 ± 0.31	8.43 ± 0.51 ^a	15.17 ± 3.90	14.88 ± 2.86 ^a

^aEach value represents mean ± SD of nine animals.

Each value represents mean ± SD of ten animals.

PT, prothrombin time; APTT, Activated partial thromboplastin time.

Table 7. Histopathological changes in male and female rats treated orally with CONP01 for 4 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	Male		Female	
		0	2000	0	2000
Liver (No microscopic findings)		10/10	10/10	10/10	10/10
Kidney		10/10	10/10	10	10/10
Regeneration of tubular epithelial cells		7/10	6/10	5/10	5/10
Calcification of tubular epithelial cell		1/10	1/10	1/10	0/10
Eosinophilic body at the tubule		9/10	8/10	5/10	2/10
Infiltration of lymphocytes at the interstitium		2/10	3/10	3/10	5/10
Hyperplasia of interstitium		2/10	3/10	2/10	2/10
Heart (No microscopic findings)		10/10	10/10	10/10	10/10
Infiltration of lymphocytes at the myocardia			1/10		
Lung		9/10	10/10	10/10	10/10
Spleen		10/10	10/10	8/10	10/10
Thymus		10/10	10/10	10/10	10/10
Tongue		10/10	10/10	10/10	10/10
Salivary gland		10/10	10/10	10/10	10/10
Trachea		10/10	10/10	10/10	8/10
Eosphagus		10/10	10/10	10/10	9/10
Thyroid gland		10/10	9/10	10/10	9/10
Stomach		10/10	10/10	10/10	10/10
Duodenum		10/10	10/10	10/10	10/10
Jejunum		10/10	10/10	10/10	10/10
Ileum		10/10	10/10	10/10	10/10
Cecum		10/10	10/10	10/10	10/10
Colon		10/10	10/10	10/10	10/10
Mesenteric lymphnode		10/10	10/10	10/10	10/10
Pancreas		10/10	10/10	10/10	10/10
Adrenal gland		9/10	10/10	10/10	10/10
Hypophysis		7/10	9/10	8/10	9/10
Ovary		-	-	9/10	9/10
Uterus		-	-	10/10	10/10
Vagina		-	-	10/10	10/10
Testis		10/10	9/10	-	-
Epididymis		10/10	10/10	-	-
Prostate		9/10	10/10	-	-
Seminal vesicle		10/10	10/10	-	-
Urinary bladder		10/10	10/10	9/10	10/10
Skin		10/10	10/10	10/10	10/10
Aorta		8/10	10/10	10/10	10/10
Brain		10/10	7/10	10/10	10/10
Spinal code		9/10	10/10	10/10	9/10
Skeletal muscle		10/10	10/10	10/10	10/10
Eye		10/10	10/10	10/10	10/10
Harderian gland		10/10	10/10	10/10	10/10
Femur		9/10	10/10	10/10	10/10

동결건조물인 CONP01에 대한 안전성 평가의 일환으로 반복투여시 발현될 수 있는 독성을 질적·양적으로 평가하기 위하여 4주 반복 경구투여 독성시험을 식품의약품 안전청고시 제1999-61호 "의약품 등의 독성시험기준(1999년 12월 22일 제정)"에 준하여 실시하였다.

암수 공히 매체 대조군과 시험물질을 각각 2000, 500 및 125 mg/kg의 용량으로 10마리의 SD 계통 랫드에 4주간 반복 경구투여 하였다.

본 시험의 모든 검사항목에서 시험물질의 투여와 관련된 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다. 암, 수컷의 사료 및 물 섭취량에서 산발적으로 관찰된 통계학적으로 유의한 섭취량의 저하는 체중의 변화가 없었으며, 일시적으로 용량상관성이 없는 변화로 시험물질의 투여에 의한 변화는 아니라고 판단되었다. 요검사에서 관찰된 수컷의 모든 투여군과 암컷의 125 mg/kg과 250 mg/kg 투여군에서의 요 비중 증가는, 다른 측정 및 검사항목에서 이와 관련된 변화는 관찰되지 않았고 요검사의 다른 항목(케톤, 단백질, 잠혈, 백혈구수)에서도 용량상관성이 없는 우발적 변화로 시험물질의 투여에 의한 독성학적인 변화는 아니라고 생각되었다.

병리조직학적인 검사에서 관찰된 신장에서의 호산성물질과 핵의 호염기성변화 및 소수의 림프구 침윤 및 폐에서의 기관지, 기관 및 혈관주위의 림프조직의 증생은 매체대조군과 2000 mg/kg 투여군에서 공히 관찰되어 시험물질의 투여에 의한 변화는 아니라고 판단 되었다. 폐장의 변화의 경우 mycoplasma에 감염되었을 때 관찰되는 변화와 유사하였으나 다른 관찰항목에서는 변화가 없었고 (Patricia, 1997) 관련된 다른 조직소견은 관찰되지 않아 질병에 의한 변화는 아니라고 판단되었고, SPF구역에서 나타나는 폐장의 원인모를 변화와 유사한 변화였다. 사망동물의 경우 일반증상에서의 변화가 없었고, 부검소견에서 폐의 암갈색조의 변화와 흉강의 흉수, 병리조직소견에서 전신 장기에 분포된 혈관의 충혈, 수종, 및 일부 혈전의 소견이 관찰되어 갑자기 사망한 것은 이는 투여 실수에 의해 흉강으로 시험물질이 투여 되었기 때문에 발생한 것으로 판단되었다.

이상의 결과로 보아 본 시험에서 CONP01의 랫드에서의 4주간 반복 경구투여에 의한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 무해용량(NOAEL)은 2000 mg/kg/day 이상으로 판단되었다

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김형민, 홍승협 (2004): 생약추출물을 함유하는 면역증강용 조성물 및 그를 이용한 항방약술. 대한민국특허청 공개번호 10-2004-0004822.
- 안형중, 김갑성 (2003): 생쥐에서 녹용약침액이 자가항원제시형 Cathepsin S 활성의 저해와 류마티스 관절염 억제에 미치는 효과. 대한침구학회지, **20**, 104-116.
- 이승덕, 김갑성 (1999): 우슬 및 봉독약침이 생쥐의 LPS 유발관절염의 세포성면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지, **16**, 287-315.
- 전정호 이해정 김명희 신재신 (2003): 퇴행성관절염 노인환자의 우울과 삶의 질 예측요인. 성인간호학회지, **15**, 650-659.
- 식품의약품안전청 (1999): 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품 안전청고시 제1999-61호, pp. 42-45, pp. 74-76.
- Adorini, L. (2004): Antigen-based immunointervention in human autoimmune diseases. *Trends Biotechnol.*, **22**, 547-549.
- Childs, S.G. (2004): Reactive arthritis. Immune-mediated synovitis or joint infection. *Orthop Nurs.*, **23**, 267-273.
- Dalal, N., Roman, S. and Levinson, A.I. (1990): *In vitro* secretion of human IgM rheumatoid factor. Evidence for distinct rheumatoid factor populations in health and disease. *Arthritis Rheum.*, **33**, 1340-1346.
- Nissinen, R., Leirisalo-Repo, M., Nieminen, A.M., Halme, L., Farkkila, M., Palosuo, T. and Vaarala, O. (2004): Immune activation in the small intestine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **63**, 1327-1330.
- Patrica, L.F. (1997): Diagnostic: Interstitial Pneumonia in viral and Mycoplasmal Antibody-Free Sprague Dawley Rats. Newsletter (American Committee on Laboratory Animal Diseases), Fall Vol 18. No. 1.