대한한의학 방제학회지 제14권 1호 THE KOREAN JOURNAL OF ORIENTAL MEDICAL PRESCRIPTION 14(1):141~167, 2006

補中益氣合大七氣湯 추출물의 유전독성 평가

황희정, 변준석, 허진일
대구한의대학교 비계내과학 교실

ABSTRACT

Genotoxicity Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* water extract

Hui-Jeung Hwang, Joon-Seok Byun
Daegu Haany University, Kyungpook, Korea

The genotoxicity of water extract of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* was tested by *In Vitro* Chromosome Aberration Test, Bacterial Reverse Mutation Assay and Micronucleus test according to OECD Guidelines and KFDA Guidelines.

The obtained results were as follows : 1. Chromosome Aberration Test: *In Vitro* Chromosome Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extracts was carried out using cultured Chinese hamster lung cells in the presence and absence of metabolic activation system(S-9 mix). No significant changes in the number of aberrant metaphases having structural and number of aberrations were detected in *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extracts treated groups.

2. Bacterial Reveres Mutation Assay: *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extracts was evaluated for its potential to induce reverse mutation in the histidine auxotroph strains of *Salmonella typhimurium* such as TA100, TA1535, TA98 and TA1537 and the tryptophan auxotroph strain of *Escherichia coli* WP2 uvrA. No significant changes in the number of revertant colonies compared

• 교신저자 : 허진일.
• 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대부속 대구한방병원 비계내과
• Tel : 053-770-2176, Fax : 053-770-2169, E-Mail : dandj@hanmail.net
• 접수 : 2006/ 4/ 17 수정 : 2006/ 6/ 7 채택 : 2005/ 6/ 12

to its negative control were detected in *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extracts treated groups against all 5 strains.

3. Micronucleus test: Micronucleus test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extracts were performed using specific pathogen free 7-week old male ICR mouse. No significant changes in the number of micronucleated polychromatic erythrocytes among 2000 polychromatic erythrocytes compared to negative control were detected in all *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extracts treated groups.

In summarized above-mentioned results, it is concluded that *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extracts have not genotoxicity against *In Vitro* Chromosome Aberration Test, Bacterial Reverse Mutation Assay and Micronucleus test.

Ⅰ. 緖 論

최근 중국산 한약재의 수입과 대량 생산에 따른 농약 등의 오염에 의한 독성문제가 심각한 사회문제로 대두됨에 따라 근래에 들어 한약 자체의 독성평가가 폭넓게 진행되어 왔으나, 잔류 가능성이 있는 잠재적인 독성평가는 현재 거의 이루어지지 않고 있다[1-3]. 이는 한약이 한약복합물이기 때문에 실험의 진행이 매우 어렵다는 문제점과 또 동물의 생체 내에서 약물의 동태를 파악하기 어려움이 있으나 이 역시 양방의학에서 말하는 의약품의 독성평가에 준하여 한의학의 처방을 적용시켜 안전성 평가가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

유전독성(genotoxicity)이란 원래, 세포 또는 개체수준에서 돌연변이(mutation)를 유발하는 성질을 가리키나 현재는 세포유전물질(DNA)에 상해성을 나타내는 성질(genotoxicity)을 포함하는 광범위한 의미로 이용되고 있다[4]. 현재 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성기준에 명시된 시험법은 크게 3가지로 대별된다. 즉, 유전자 돌연변이(gene mutation)을 지표로 하는 것, 염색체이상(chromosomal aberration)을 지표로 하는 것 및 DNA에 대한 상해성 또는 수복성(DNA damage 또는 repair)을 지표로 하는 것이다[4]. 따라서 일반적으로 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준 및 OECD Guidelines(TG No. 471, 473, 474)에 따르면 Chinese hamster lung(CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험(In Vitro Chromosome Aberration test using cultured Chinese Hamster Lung Cells), 세균을 이용한 복귀돌연변이시험(Bacterial Reverse Mutation Assay using the Plate Incorporation Method) 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험(Micronucleus Test in Bone Marrow Cells of Mice)의 세 가지로 진행된다.

일반적으로 한약재의 유전독성적 연구는 화합물이나 방사선과 같은 유전독성을 유발하는 물질에 대한 보호 또는 예방 효과와 같은 약효연구의 일환으로 진행되어 왔으며[5], 추출물 또는 복합물 자체의 유전독성시험은 비교적 드문 실정이다. 우리나라에서는 주로 현재 한약제의 가공, 저장 유통을 안전하고 위생적으로 처리하기 위하여 감마선을 처리한 경우에 나타날 수 있는 유전독성의 여부를 판단하기 위한 실험논문[6-9]이 대부분이었으며 복합처방에 관한 연구는 없었다.

이에 논자는 대표적인 補氣藥인 補中益氣湯과 瘀血과 濕痰을 제거하는 大七氣湯 合方의 유전독

성 시험을 하고자 한다. 補中益氣湯은 면역 활성, 항독성, 항암, 항산화, 항알러지 등의 효과에 관하여 연구된 바 있으며[10-2], 또한 大七氣湯은 항암, 면역조절작용 효과 등이 있음이 밝혀져 있으나[13-4] 유전 독성에 관한 연구는 아직 발표된 바 없다. 이 두 처방을 合方할 경우 기력을 보충해 주면서 몸의 鬱症을 해소시킬 수 있어 현대인의 과도한 스트레스, 불규칙한 식습관, 운동 부족 등으로 인한 각 증상에 유용하게 쓰일 수 있을 것이며 이러한 처방을 임상적으로 활용함에 있어서 안전성 확보를 위해 자체의 유전독성 연구도 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 이러한 補中益氣合大七氣湯의 유전독성 실험 중 현재 식품의약품안전청고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준에 명시되어 있는 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험, 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 통해 補中益氣合大七氣湯의 유전독성을 규명하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

본 실험은 식품의약품안전청(KFDA) 고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험 기준 및 OECD Guidelines(TG No. 471, 473, 474)에 준하여 실험을 실시하였다[4].

1. 재 료

1) 補中益氣合大七氣湯의 조성

본 실험에 사용된 약재는 시중에서 매입한 것을 선정하여 사용하였으며, 본 실험에 사용된 補中益氣合大七氣湯 1貼의 조성은 補中益氣湯 1첩 분량 合 大七氣湯 半貼 분량으로 〈Table 1〉과 같다[15-6].

Table 1. Composition of Bojungikkeehapdaechilki-tang used in this study

構成藥材	生藥名	用量(g)
黃芪	*Astragali Radix*	5.62
人蔘	*Ginseng Radix*	3.75
白朮	*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*	3.75
甘草	*Glycyrrhizae Radix*	3.75
當歸	*Angelicae gigantis Radix*	1.85
陳皮	*Aurantii nobilis Pericarpium*	1.85
三稜	*Scirpi Tuber*	1.85
蓬朮	*Zedoariae Rhizoma*	1.85
靑皮	*Aurantii pericarpium*	1.85
香附子	*Cyperi Rhizoma*	1.85
桔梗	*Platycodi Radix*	1.85
藿香	*Agastachis Herba*	1.85
益智仁	*Amomi Amari Fructus*	1.85
肉桂	*Cinnamomi Cortex*	1.85
柴胡	*Bupleuri Radix*	1.12
升麻	*Cimicifugae Rhizoma*	1.12
Total	16 types	37.61

2) 補中益氣合大七氣湯의 추출

선정된 약제 10貼 분량(376.10g)을 취하여 정제수 4000ml로 가열 추출한 후 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator(N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer(PVTFD10A; ilShin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 1貼 당 4.998g, 총 49.98g (수율 13.29%)의 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다.

2. 방 법

1) 補中益氣合大七氣湯 추출물의 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험(*In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Cultured Chinese Hamster Lung Cells of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* Extract)

(1) 시험기준

시험은 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준 및 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals(July 21, 1997) TG No. 473 "In Vitro Mammalian chromosomal aberration test"에 제시된 방법에 따랐으며, 시험의 방법은 Ishidate 등 및 Dean과 Danford의 방법[17-8]을 응용하여 실시하였다.

(2) 세포주

식품의약품안전청 국립독성연구소로부터 분양받은 Chinese hamster 유래 폐섬유아세포를 사용하였다[19]. 본 세포의 염색체 수(modal chromosome number)는 25, 분열주기는 11 - 16시간으로 확인되었다. 세포는 액체질소에 보관한 세포주를 해동하여 7일 이상 배양한 후 도립현미경으로 미생물의 오염 여부와 형태를 확인하고 실험에 사용하였다.

(3) 배양 방법

① 배양액

Minimum Essential Medium(GIBCO BRL)을 적량의 주사용 멸균증류수로 용해하여 sodium bicabonate(2.2g), L-glutamine(292mg), streptomycin sulfate(0.1mg/ml) 및 penicillin G·Na(10^5 units)를 첨가, 증류수로 총액량을 1000ml로 조정하였다. 이를 구경 0.22μm의 membrane filter로 여과한 후 우태아혈청(FBS, GIBCO BRL) 100ml를 첨가해 사용하였다.

② 배양조건

세포는 포화수증기와 이산화탄소 농도를 5%를 유지하는 37℃ 항온배양기(Forma 3110)에서 세포배양용 플라스크(Falcon, 75cm^2)를 사용하여 단층배양하였으며, 매 2-3일 마다 0.1% 트립신액으로 세포를 분리하여 계대 배양하였다. 계대 중인 세포를 트립신으로 처리하여 수거한 다음, 25cm^2 플라스크 당 4×10^4 세포를 5ml의 배양액으로 파종하여 약 3일간 배양하고 실험물질을 처리하였다.

(4) 대사활성계(S-9 mix)

S-9 mix 1ml의 조성은 8μmol $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 33μmol KCl, 5μmol G-6-P, 4μmol NADPH, 4μmol NADH, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 0.3ml S-9(Molecular Toxicology Inc., Boone, NC)이다.

조제한 S-9 mix는 얼음에 채워 사용하였고, 0.5ml/5ml/T-25 플라스크로 처리하였으며, 그 활성은 cyclophosphamide에 의한 염색체이상 유발로 확인하였다.

(5) 시험물질의 처리

① 처리농도의 결정

본 실험의 처리 농도는 예비실험을 실시하여 결정하였다. 예비실험은 식품의약품안전청 고시 및 OECD Guidelines에 따라 5mg/ml을 최고농도로 본 실험과 동일한 방법으로 실험물질을 처리한 후, 처리 개시일로부터 약 24시간 후 각 플라스크의 세포를 분리 계수하여 실험물질 처리군에서 얻은 세포수에 대하여 음성대조군에 대한 상대세포수(Relative Cell Count, RCC)를 산출하였다. 예비실험의 결과 5mg/ml의 補中益氣合大七氣湯 추출물의 RCC가 50% 이하로 관찰되어 처리군은 1mg/ml을 최고농도로 결정하였으며, 공비 2 또는 10으로 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005 및 0.00005mg/ml의 6단계의 농도군을 설정하였다. 한 농도군 당 2개의 플라스크를 사용하였다(Table 2).

Table 2. Results of preliminary range-finding test in Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in this studya).

Conc.(mg/ml)	S-9 mix	Time[b]	Viable Cells[c]	Relative cell count[d]
0	+	6-18	10313.75 ± 691.66	100.00
0.000005	+	6-18	9838.25 ± 567.26	95.39
0.0005	+	6-18	10009.75 ± 280.58	97.05
0.005	+	6-18	9947.00 ± 1050.89	96.44
0.05	+	6-18	10186.25 ± 1005.30	98.76
0.5	+	6-18	10640.75 ± 723.58	103.17
1	+	6-18	9518.75 ± 1281.46	92.29
5	+	6-18	4334.50 ± 1171.77	42.03
CPA[1] 6	+	6-18	7610.25 ± 540.81	73.79
0	-	6-18	10780.50 ± 706.37	100.00
0.000005	-	6-18	10297.00 ± 374.19	95.52
0.0005	-	6-18	10292.00 ± 2185.98	95.47
0.005	-	6-18	10429.75 ± 1602.71	96.75
0.05	-	6-18	11033.75 ± 3022.03	102.35
0.5	-	6-18	10028.50 ± 1159.66	93.02
1	-	6-18	9549.00 ± 1530.64	88.58
5	-	6-18	4907.50 ± 820.84	45.52
EMS[2] 800	-	6-18	7356.75 ± 1326.15	68.24
0	-	24-0	11112.25 ± 512.96	100.00
0.000005	-	24-0	11579.00 ± 1568.28	104.20
0.0005	-	24-0	10507.25 ± 1843.25	94.56
0.005	-	24-0	10434.25 ± 1257.39	93.90
0.05	-	24-0	11274.75 ± 1131.99	101.46
0.5	-	24-0	11069.25 ± 1655.72	99.61
1	-	24-0	9560.00 ± 1206.14	86.03
5	-	24-0	5028.75 ± 485.26	45.25
EMS[2] 600	-	24-0	6481.25 ± 731.24	58.33

a) Each culture was trypsinized and suspended with 0.5ml of 0.1% trypsin and 5 ml of culture medium. The cell suspensions of 0.4ml/culture was diluted 50 times with 19.6ml of Isoton sol. The cells in 0.5ml Isoton sol. were counted five/culture using Coulter Counter. Actual number of cells per flask = Mean Count × 550; b) Treatment time - Recovery time, hrs; c) Mean ± S.D. cells, n=4; d) Relative Cell Counts = {(Cell counts of treated flask/Cell counts of control flask) × 100}(%); 1) Cyclophosphamide H2O; 2) Ethylmethanesulfonate.

② 시험군의 구분

시험은 S-9 mix 적용군(Test I)과 미적용군(Test II 및 III)으로 대별하였으며, S-9 mix 미적용군은 다시 6시간 처리 후 18시간 회복기를 둔 Test II와 실험물질을 24시간 처리한 Test III로 세분하여 실시하였다. 대조물질은 식품의약품안전청 고시에 따라 Test I에서는 cyclophosphamide · H_2O(CPA, Sigma) 0.006mg/ml을 사용하였으며, Test II 및 III에서는 각각 0.8 및 0.6mg/ml의 Ethylmethanesulfonate(EMS, Sigma)를 사용하였다(Table 3).

Table 3. Experimental designs used in Chromosomal Aberration Test of Bojungikkeehapdaechilki-tang extract in this study.

Groups	S-9 mix	Concentration(mg/ml)	Treatment time - Recovery time(hrs)
Test I(6+S)			6-18
Negative control	+	0	6-18
test item 01	+	0.00005	6-18
test item 02	+	0.0005	6-18
test item 03	+	0.005	6-18
test item 04	+	0.05	6-18
test item 05	+	0.5	6-18
test item 06	+	1	6-18
Positive control	+	CPA 6	6-18
Test II(6-S)	-		6-18
Negative control	-	0	6-18
test item 01	-	0.00005	6-18
test item 02	-	0.0005	6-18
test item 03	-	0.005	6-18
test item 04	-	0.05	6-18
test item 05	-	0.5	6-18
test item 06	-	1	6-18
Positive control		EMS 800	6-18
Test III(24-S)	-		24-0
Negative control	-	0	24-0
test item 01	-	0.00005	24-0
test item 02	-	0.0005	24-0
test item 03	-	0.005	24-0
test item 04	-	0.05	24-0
test item 05	-	0.5	24-0
test item 06	-	1	24-0
Positive control	-	EMS 600	24-0

Test item: *Bojungikkeehapdaechilkitang* Extract
Negative Control: Minimum Essential Medium(MEM) containg Distilled water
CPA: Cyclophosphamide H2O
EMS: Ethylmethanesulfonate

③ 시험물질의 처리

실험물질은 멸균증류수(중외제약)에 용해하여 처리하였으며, 대조물질은 배양액에 용해하여 조제하였다. 실험물질 및 대조물질은 조제 즉시 처리하였으며, 시험물질 처리를 위한 세포는 Test I, II 및 III으로 나누어 준비하고, 시험물질 처리 전 미리 각 플라스크의 배양액을 모두 제거하였다. 처리액의 조성은 합계액량은 모두 5.0ml로 맞추어 Test I 계열은 배양액을 4.0, 시험물질을 0.5, S-9 mix 는 0.5ml 로 하였고, Test II, Test III는 배양액을 4.5, 시험물질을 0.5ml로 하였다. 음성대조군의 경우는 부형제(멸균증류수)만을 처리하였다.

S-9 mix 적용(Test I) 및 미적용 6시간 처리군(Test II)은 처리시작으로부터 약 6시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5ml의 CMF D-PBS(Ca^{2+} 및 Mg^{2+} free Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세포층을 1회 세척한 후 신선한 배양액 5ml을 가해 중기세포 수거시까지 계속 배양하였으며, S-9 mix 미적용 24시간 처리군(Test III)의 경우 세척없이 중기세포 수거시까지 계속 처리하였다. 모든 플라스크에 대하여 시험물질 처리 시작으로부터 약 22시간 후에 각각 배양액의 1%에 해당하는 100μM 콜히친 용액(colchicine solution)을 각 플라스크에 처리해 최종 농도 가 1μM이 되도록 하여 2시간 경과한 후 중기세포를 수거하였다.

(6) 검체의 제작

중기세포를 분리, 수거하여 150 × g으로 5분간 원심분리해 세포를 모은 다은 75mM KCl 용액 5ml을 가하여 10분간 실온에서 저장액 처리하였다. 저장액 처리 후 고정액(메틸 알콜 : 빙초산 = 3 : 1) 5ml을 기존 75mM KCl 용액에 혼합하여 20분간 전고정을 실시한 다음 300 × g으로 원심분리하여 고정액을 2회 교환해 준 다음 공기건조법으로 검체를 제작하고 3% Giemsa액으로 염색하였다. 검체는 각 플라스크 당 2 매씩 제작하였으며, 염색, 수세, 건조 및 봉입을 마친 검체는 계수시까지 상온에 보관하였다.

(7) 염색체이상의 계수

염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경돌연변이학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS)의 "염색체이상 아틀라스[20]"에 따랐다. 이상은 염색체형(Chromosome type) 절단 및 교환과 염색분체형(Chromatid type) 절단 및 교환으로 대별하여 계수하였으며, 이상을 가진 중기상(이상중기상)의 빈도 및 염색체이상의 수는 gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 동시에 표시하였다.

① 구조적 이상의 계수

각 검체당 100 중기상(23-27 동원체)에 대하여 염색체 수 및 염색체이상의 유무를 관찰하고, 염색체이상이 관찰되면 이상의 종류와 수를 기록하였다.

② 숫적 이상의 계수

염색체이상의 유무에 관계없이 염색체 수에 따라 diploid(DP, 23-36 동원체), polypoid(PP, 37≤ 동원체) 및 핵내배화(ER, endoreduplication)로 분류, 100 중기상당 관찰되는 빈도를 기록하였다.

(8) 통계처리 및 판정

모든 수치는 평균 ± 표준편차(n=4)로 표시하였으며, OECD Guidelines에 따라 gap을 제외한 숫자만을 대상으로 양성 판정을 실시하였다. 양성 판정은 Richardson 등의 방법[23]을 응용하였다. 즉, 먼저 중기상을 염색체이상이 없는 것(normal metaphase, 정기 중기상)과 1개 이상의 이상을 포함한 것(aberrant metaphase, 이상중기상)으로 나누고, 이상중기상의 빈도를 매체대조군과 비교하였다. 숫적이상에 대해서는 중기상을 DP, PP 및 ER로 분류하고 PP 및 ER의 빈도에 대해 매체대조군과 비교하였다. 시험물질 처리군에 있어서 염색체이상을 가진 분열중기상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성 반응을 나타낼 경우를 양성으로 판정하였다. 모든 수치는 SPSS for Windows(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 이

용하여, 매체대조군과 비교하여 Mann-Whitney Wilcoxon's Rank Sum(M-W) test로 유의성을 검증하였다.

2) 補中益氣合大七氣湯 추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험(Bacterial Mutation Assay Using the Plate Incorporation Methods of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* Extract)

(1) 시험기준

시험은 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준 및 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG No. 471 "Bacterial Reverse Mutation Test"에 제시된 방법에 따랐으며, 시험의 방법은 Maron과 Ames의 방법[22]에 준하여 실시하였다.

(2) 시험균주 및 배지

① 균 주

시험균주는 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준 및 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals(July 21, 1997) TG No. 471 "Bacterial Reverse Mutation Test"에 제시된 것으로, 복귀돌연변이에 널리 사용되며 변이원성 물질에 감수성이 높은 것으로 알려져 있는 균주를 사용하였다. 염기쌍치환형(base-pair substitution type) 돌연변이 검색을 위해서는 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 및 *Escherichia coli* WP2 uvrA를 사용하였으며, frame-shift형 돌연변이 검색을 위해서는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA1537을 사용하는 5개의 균주를 사용하였다. 모든 시험균주는 형질 확인 후 계대배양한 것을 사용하였다.

② 배 지

시험균주들은 각각 master plate로부터 25ml의 액체배지(2.5% Oxoid Nutrient broth No. 2)에 접종하여 Shaking incubator(37℃, 200rpm)에서 약 10시간 전배양하고, 최소배지(minimal glucose agar plate)는 1.5% Bacto agar(Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 패트리디쉬(Falcon #1029)에 25ml씩 분주하여 사용하였으며, *E. coli*를 이용한 시험에는 위와 동일한 최소배지에 0.1% tryptophan 액 0.25ml/L를 첨가한 것을 사용하였다. Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl로 조제하였으며, 살모넬리 균주용 Top agar에만 0.05mM histidine-biotine을 첨가하였다.

③ 균주의 형질확인

균주의 유전자형 확인을 위해 *S. typhimurium* 균주들의 경우에는 histidine 요구성의 여부, uvrB mutation 유지 여부, R-factor 유지 여부, rfa 돌연변이의 유지여부, spontaneous revertant의 수 등을 검사하였고, *E. coli* WP2 uvrA 균주에 있어서는 tryptophan 요구성 여부, uvrA mutation 유지여부, spontaneous revertant의 수 등을 Maron과 Ames에 준하여 확인하였다[22].

(3) 대사활성계(S-9 mix)

S-9 mix 1ml의 조성은 다음과 같다. 8μmol $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 33μmol KCl, 5μmol G-6-P, 4μmol NADPH, 4μmol NADH, 100μmol sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 50μl S-9(Molecular Toxicology Inc., Boone, NC).

조제한 S-9 mix는 얼음에 채워 사용하였고, 0.5ml/plate로 처리하였으며, 활성은 2-Aminoanthracene(Sigma)의 돌연변이 유발로 확인하였다.

(4) 시험물질의 처리

① 처리농도의 결정

본 실험의 처리 농도는 예비실험을 실시하여 결정하였다(Table 4). 예비실험은 식품의약품안전청 고시 및 OECD Guidelines에서 복귀돌연변이 실험 시 최고농도로 제시한 5mg/plate을 최고농도로 1, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005mg/plate의 7 단계 농도군과 음성대조군 및 양성대조군으로 농도군당 1 plate를 사용하여 실험을 수행하였다. 예비실험의 결과 5mg/ml의 補中益氣合大七氣湯 추출물 처리군에서 모든 균주에 대한 강한 항균성이 관찰되어 처리군은 Table 5에서와 같이 1mg/ml을 최고

농도로 결정하였으며, 공비 2 또는 10으로, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005 및 0.00005μg/ml의 6 단계의 농도군을 설정하였다. 한 농도군 당 4 매의 plate를 사용하였다(Table 4).

Table 4. Results of preliminary range-finding test in Bacterial Reverse Mutation Assay of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in this study.

Tester Strain Concentration (mg/ml)	Colonies/plate[Factor][a]			
	without S-9 mix		with S-9 mix	
	Colony	Factor	Colony	Factor
Salmonella typhimurium TA100				
0	131	1.00	121	1.00
0.00005	121	0.92	120	0.99
0.0005	119	0.91	119	0.98
0.005	111	0.85	136	1.12
0.05	142	1.08	120	0.99
0.5	136	1.04	119	0.98
1	108	0.82	108	0.89
5[b]	5	0.04	6	0.05
SA[1] 0.5	573	4.37	NT*	NT
2-AA[2] 0.4	NT	NT	278	2.32
Salmonella typhimurium TA1535				
0	11	1.00	10	1.00
0.00005	13	1.18	9	0.90
0.0005	12	1.09	10	1.00
0.005	15	1.36	10	1.00
0.05	14	1.27	11	1.10
0.5	9	0.82	12	1.20
1	10	0.91	9	0.90
5[b]	3	0.27	0	0.00
SA[1] 0.5	508	46.18	NT	NT
2-AA[2] 2	NT	NT	321	35.67
Salmonella typhimurium TA98				
0	26	1.00	32	1.00
0.00005	22	0.85	27	0.84
0.0005	23	0.88	37	1.16
0.005	21	0.81	30	0.94
0.05	27	1.04	30	0.94
0.5	30	1.15	29	0.91
1	21	0.81	28	0.88
5[b]	1	0.04	2	0.06
4NQO[3] 0.5	297	11.42	NT	NT
2-AA[2] 0.4	NT	NT	338	12.52

Salmonella typhimurium TA1537				
0	11	1.00	13	1.00
0.00005	16	1.45	14	1.08
0.0005	12	1.09	11	0.85
0.005	9	0.82	12	0.92
0.05	11	1.00	15	1.15
0.5	11	1.00	11	0.85
1	10	0.91	13	1.00
5[b)]	0	0.00	0	0.00
9-AA[4)] 50	338	30.73	NT	NT
2-AA[2)] 2	NT	NT	311	22.21
Escherichia coli WP2 uvrA				
0	16	1.00	14	1.00
0.00005	17	1.06	12	0.86
0.0005	13	0.81	13	0.93
0.005	12	0.75	14	1.00
0.05	14	0.88	14	1.00
0.5	15	0.94	16	1.14
1	13	0.81	11	0.79
5[b)]	1	0.06	2	0.14
4NQO[3)] 0.5	120	7.50	NT	NT
2-AA[2)] 4	NT	NT	199	16.58

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate: b) Growth inhibition(decrease in number of colonies and/or formation of micro-colonies): * NT: Not tested: 1) Sodium azide: 2) 2-Aminoanthracene: 3) 4-Nitroquinolone-1-oxide: 4) 9-Aminoacridine.

② 실험군의 구분

실험은 *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 uvrA, *S. typhimurium* TA98 및 TA1537의 5개 균주에 대하여 각각 S-9 mix 적용군과 미적용군으로 대별하였으며, 대조물질은 식품의약품안전청 고시에 따라 Sodium azide(SA), 4-Nitroquinolone-1-oxice(4NQO), 9-Aminoacridine (9-AA) 및 2-AA를 사용하였다. S-9 mix 미처리군의 경우, *S. typhimurium* TA100, TA1535에 대해서는 SA를, TA98에 대해서는 4NQO를, TA1537에 대해서는 9-AA를 각각 사용하였으며, *E. coli* WP2 uvrA에 대해서는 4NQO를 사용하였다. S-9 mix 적용군에서는 각각의 균주에 대하여 2-AA를 사용하였다(Table 5).

Table 5. Experimental designs used in Bacterial Reverse Mutation Assay of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in this study.

Tester Strain Groups	S-9 mix	Concentration (mg/ml)
Test I : *Salmonella typhimurium* TA100		
Negative control	+/-	0
test item 01	+/-	0.00005
test item 02	+/-	0.0005
test item 03	+/-	0.005
test item 04	+/-	0.05
test item 05	+/-	0.5
test item 06	+/-	1

Positive control I	-	SA 0.5
Positive control II	+	2-AA 0.4
Test II : *Salmonella typhimurium* TA1535		
Negative control	+/-	0
test item 01	+/-	0.00005
test item 02	+/-	0.0005
test item 03	+/-	0.005
test item 04	+/-	0.05
test item 05	+/-	0.5
test item 06	+/-	1
Positive control I	-	SA 0.5
Positive control II	+	2-AA 2
Test III : *Salmonella typhimurium* TA98		
Negative control	+/-	0
test item 01	+/-	0.00005
test item 02	+/-	0.0005
test item 03	+/-	0.005
test item 04	+/-	0.05
test item 05	+/-	0.5
test item 06	+/-	1
Positive control I	-	4NQO 0.5
Positive control II	+	2-AA 0.4
Test IV : *Salmonella typhimurium* TA1537		
Negative control	+/-	0
test item 01	+/-	0.00005
test item 02	+/-	0.0005
test item 03	+/-	0.005
test item 04	+/-	0.05
test item 05	+/-	0.5
test item 06	+/-	1
Positive control I	-	9-AA 50
Positive control II	+	2-AA 2
Test V : *Escherichia coli* WP2 uvrA		
Negative control	+/-	0
test item 01	+/-	0.00005
test item 02	+/-	0.0005
test item 03	+/-	0.005
test item 04	+/-	0.05
test item 05	+/-	0.5
test item 06	+/-	1
Positive control I	-	4NQO 0.5
Positive control II	+	2-AA 4

Test item: Bojungikkeehapdaechilkitang Extract
SA: Sodium azide
2-AA: 2-Aminoanthracene
4NQO: 4-Nitroquinolone-1-oxide
9-AA: 9-Aminoacridine.

③ 시험물질의 처리

실험물질은 멸균증류수(중외제약)에 용해하여 direct plate incorporation 방법으로 처리하였으며, 대조물질인 SA는 멸균증류수(중외제약)에 용해하여 사용하였으며, 2-AA, 9-AA 및 4NQO는 각각 DMSO에 용해하여 조제하였다. 고압증기멸균한 top agar를 dry bath에서 45℃로 예열한 멸균 tube(Falcon #2058)에 2ml씩 분주한 다음 시험물질 용액 0.1ml, S-9 mix(또는 pH 7.4의 Sodium-phosphate buffer) 0.5ml, 균배양액 0.1ml을 top agar에 혼합하고 즉시 vortex mix로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고르게 퍼지게 하여 굳게 하였다. 음성대조군은 시험물질 대신 부형제인 멸균증류수 0.1ml을, 양성대조군은 각각의 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 첨가하였다. 시험물질 및 S-9 mix의 무균성을 확인하기 위하여 균주가 없는 상태에서 시험물질 최고농도액 0.1ml과 S-9 mix 0.5ml을 각각 2ml의 top agar에 혼합하여 plate를 제작하였다. 처리가 종료된 후 top agar가 굳으면 plate를 뒤집어 37℃에서 약 48 시간 배양 후 집락을 계수하였다.

(5) 통계처리 및 판정

모든 수치는 평균 ± 표준편차(n=4)로 표시하였으며, 집락 계수시 각 plate의 background lawn의 형성 여부를 검사하였으며, 오염 또는 기타 이상의 발생 여부를 점검하였다. 무균성 확인을 위한 plate에서는 미생물의 성장으로 인한 집락 형성 유무를 확인하였다. 시험물질을 처리한 plate에서 S-9 mix 적용 여부에 상관없이 최소 1개 균주에서 평판당

복귀돌연변이 집락 수가 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 항균성 또는 세포독성은 background lawn이 엷어지거나 미세집락의 출현 혹은 집락 수가 음성대조군에 비해 현저히 감소하는 것으로 판단하였다. 또한 음성대조군에 대한 처리군의 집락수를 Factor로 환산하여 0.5이하로 감소한 경우를 항균성으로 판단하였다. 각 결과표에 Factor를 동시에 표시하였다. 모든 수치는 SPSS for Windows(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 이용하여, 음성대조군과 비교하여 Mann-Whitney Wilcoxon's Rank Sum(M-W) test로 유의성을 검증하였다.

3) 補中益氣合大七氣湯 추출물의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험 (Micronucleus Test in Bone Marrow Cells of Male ICR Mouse of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* Extract)

(1) 실험기준

시험은 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준 및 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals(July 21, 1997) TG No. 474 "Mammalian Erythrocyte Micronucleus test"에 제시된 방법에 따랐으며, 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals(1996)"에 준하여 취급하였다.

(2) 실험동물

성숙한 수컷 ICR mouse(6wks old upon receipt, Charles River, Japan)를 사료(삼양사, 서울)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주일간 적응시킨 후, 총 6개 군으로 구분하고, 각 그룹 당 5마리씩 사용하여 총 30마리를 사용하였다. 실험동물은 온도(20-25℃)와 습도(30-35%)가 조절된 사육실에서 사육하였으며, 환기횟수는 11-12회/hr, 조명은 10분/1회, 12회/day를 유지하였다. 사료는 고형사료를 자유롭게 공급하였으며, 물은 수도수를 자유롭게 공급하였다.

(3) 투여 경로 및 방법

시험물질의 임상예정 경로인 경구투여로 선택하였다(단, 양성대조물질인 CPA는 복강내 투여를 선택하였다). 시험물질의 개체당 투여액량은 투여 직전에 측정한 체중에 따라 Kg 당 10ml로 산출하여 투여하였다. 경구투여는 살균한 금속제 존데를 이용하여 강제투여 하였다.

(4) 투여용량의 설정 및 시험군의 구성

① 투여용량의 결정

본 실험의 처리 농도는 補中益氣合大七氣湯 추출물의 마우스에서 단회경구투여독성 시험(미발표자료)에서 결정하였다. 단회경구투여독성 시험결과 수컷 마우스에서 최고 투여용량인 2000mg/kg 투여군의 경우, 투여 초기 심한 설사 및 軟便과 같은 소화기 증상이 인정되었으며, 이로 인한 체중의 감소가 인정되었다. 따라서 본 실험에서는 〈Table 6〉에서와 같이 1000mg/kg을 최고 용량으로 결정하였으며, 공비 2로 500, 250 및 125mg/kg의 4 단계의 용량군을 설정하였다. 한 용량군 당 5 마리의 수컷 마우스를 사용하였다.

Table 6. Experimental grouping used in Micronucleus Test in Bone Marrow Cells of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in this study.

Group ID	Treatment	Dosage	Total Dosing	Dosing Route
G0	Distilled water	0	2	Oral
G1	Test Item 01	1000mg/kg	2	Oral
G2	Test Item 02	500mg/kg	2	Oral
G3	Test Item 03	250mg/kg	2	Oral
G4	Test Item 04	125mg/kg	2	Oral
G5	CPA	70mg/kg	1	IP

Test item: Bojungikkeehapdaechilk-itang Extract
G0: Vehicle negative Control group
G5: Positive Control group
CPA: Cyclophosphamide H2O
Test item and CPA were dosed at 10ml/kg.

② 실험군의 구분

본 실험은 10ml/kg의 멸균증류수를 매일 1회씩 2일간 투여한 매체대조군(G0), 각각 1000, 500, 250 및 125mg/kg의 補中益氣合大七氣湯 추출물을 매일 1회씩 2일간 투여한 G1, G2, G3 및 G4 군으로 구별하였다. 또한 CPA 70mg/kg을 1회 복강투여한 양성대조군(G5)을 별도로 구분하였다(Table 6).

③ 시험물질 및 양성대조물질의 조제

補中益氣合大七氣湯 추출물(시험물질)을 멸균증류수에 희석하여 최고농도군(100mg/1ml)을 조제하고 이를 단계별로 희석하여 저농도군(50, 25 및 12.5mg/ml)을 조제하였다. 양성대조물질은 생리식염수(중외제약)에 용해하여 조제하였다.

(5) 골수 검체의 제작

최종투여 약 24시간 후 모든 실험동물을 Ethyl ether 마취하에 방혈한 다음 양쪽 대퇴골을 적출하였다. 골수검체의 제작은 Schmid의 방법[23]에 따랐다. 즉, 개체당 2매의 도말검체를 제작하였다. 각 동물로부터 적출한 대퇴골로부터 23 Gauge 주사침을 이용하여, 3ml 우태아혈청(GIBCO BRL #26140-079)으로 골수를 세척하여 현탁하고 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전된 골수세포를 슬라이드 글라스에 도말, 실온에서 충분히 건조한 후 메틸알코올에 5분간 침적하여 세포를 고정하였다. 고정 및 건조가 끝난 검체는 May-Grunwald 염색액 원액 3min, May-Grunwald 염색액 1:1 희석액 2min, Giemsa 염색액 1:6 희석액 10min 순서로 염색하여 1000배의 배율로 검경하였다.

(6) 소핵의 계수

각 동물로부터 제작한 검체 중 염색상태가 양호한 1매를 선택하여 무작위 검경하였다. 시험결과는 개체당 2000개의 다염성적혈구(Polychromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵다염적혈구(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)를 계수하여 평균 ± 표준편차(n=5)로 표시하였으며, 이를 소핵유발 빈도로 하였다. 계수시 세포 직경의 1/5-1/20의 크기로 주변 유핵세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형과 타원형의 소체를 소핵으로 계수하였으며, 소핵과 이물질을 구별하였다. 소핵계수 후 소핵 유무에 상관없이 합계 500개의 PCE와 정상적혈구(Normochromatic Erythrocyte, NCE)를 계수하고, PCE의 수를 500으로 나누어 PCE/(PCE + NCE)의 비율을 산출하여 세포독성의 지표로 결정하였다.

(7) 일반증상의 관찰

1차 투여 후에는 1회, 2차투여 후에는 1, 3, 5시간 경과시 및 골수 채취시에 외관 관찰을 실시해 사망동물 및 이상 징후의 발생여부를 관찰하였다.

(8) 체중의 측정

동물의 체중은 시험물질 투여시와 골수 채취시에 실시하였다.

(9) 통계처리 및 판정

모든 수치는 평균 ± 표준편차(n=5)로 표시하였으며, SPSS for Windows(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 이용하여, 음성대조군과 비교하여 Mann-Whitney Wilcoxon's Rank Sum(M-W) test로 유의성을 검증하였다. Heddle 등의 방법[24]에 따라 모든 동물에 있어서 PCE/(PCE + NCE) 비율이 0.1 이상인 경우 시험이 타당한 것으로 하고, MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며 용량의존성으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성을 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

III. 結 果

1. CHL 세포를 이용한 염색체이상시험

1) 용량설정 실험

(1) S-9 mix 적용 6시간 처리군(Table 2)

(2) S-9 mix 미적용 6시간 처리군(Table 2)

(3) S-9 mix 미적용 24시간 처리군(Table 2)

2) 염색체이상 빈도

(1) S-9 mix 적용 6시간 처리군(Test I)(Table 7)

Table 7. Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 6 hrs treatment group under presence of S-9 mix(Test I).

Conc.(mg/ml)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberration	Mean of PP	Mean of ER
Gap Included				
Control	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
0.00005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.0005	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58
0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50
CPA 6	14.25 ± 0.50*	18.25 ± 2.06*	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58
Gap Excluded				
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
0.00005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.58
0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50
CPA 6	13.00 ± 0.82*	17.00 ± 2.16*	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs: Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4: CPA: Cyclophosphamide H2O: * $p<0.05$ vs Control

(2) S-9 mix 미적용 6시간 처리군(Test II)(Table 8)

Table 8. Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 6 hrs treatment group under absence of S-9 mix(Test II).

Conc.(mg/ml)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberration	Mean of PP	Mean of ER
Gap Included				
Control	0.50 ± 0.58	0.75 ± 0.96	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50
0.00005	0.25 ± 0.50	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.05	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00
1	0.25 ± 0.50	0.50 ± 1.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
EMS 800	18.00 ± 2.16*	24.00 ± 0.82*	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Gap Excluded				
Control	0.25 ± 0.50	0.50 ± 1.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50

0.00005	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.05	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00
1	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
EMS 800	15.00 ± 2.83*	21.00 ± 1.41*	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs: Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4: EMS: *Ethylmethanesulfonate*: * p<0.05 vs ControlTreatment time - Recovery time: 6-18 hrs: Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4: CPA: Cyclophosphamide H2O: * p<0.05 vs Control

(3) S-9 mix 미적용 24시간 처리군(Test III)(Table 9)

Table 9. Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 24 hrs treatment group under absence of S-9 mix(Test III).

Conc.(mg/ml)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberration	Mean of PP	Mean of ER
Gap Included				
Control	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.00005	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.05	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50
0.5	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
EMS 600	25.25 ± 2.75*	34.50 ± 3.70*	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
Gap Excluded				
Control	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.00005	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50
0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
EMS 600	20.25 ± 2.99*	29.50 ± 4.12*	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00

Treatment time - Recovery time: 24-0 hrs: Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4: EMS: Ethylmethanesulfonate: * p<0.05 vs Control

3) Gap 및 염색체형 이상 빈도

(1) S-9 mix 적용 6시간 처리군(Test I)(Table 10)

Table 10. Changes of Chromosome types and Gap in Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 6 hrs treatment group under present of S-9 mix(Test I).

Conc.(mg/ml)	Gap	Chromosome type	
		Deletion	Exchanges
Control	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.00005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.0005	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
CPA 6	1.25 ± 0.50*	1.25 ± 0.50*	0.50 ± 0.58

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; CPA: Cyclophosphamide H2O: * p<0.05 vs Control

(2) S-9 mix 미적용 6시간 처리군(Test II)(Table 11)

Table 11. Changes of Chromosome types and Gap in Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 6 hrs treatment group under absence of S-9 mix(Test II).

Conc.(mg/ml)	Gap	Chromosome type	
		Deletion	Exchanges
Control	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
0.00005	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.05	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.5	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
1	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
EMS 800	3.00 ± 0.82*	0.75 ± 0.96	1.25 ± 1.26

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate: * p<0.05 vs Control

(3) S-9 mix 미적용 24시간 처리군(Test III)(Table 12).

Table 12. Changes of Chromosome types and Gap in Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 24 hrs treatment group under absence of S-9 mix(Test III).

Conc.(mg/ml)	Gap	Chromosome type	
		Deletion	Exchanges
Control	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
0.00005	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.05	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
EMS 600	5.00 ± 0.82*	3.25 ± 1.50*	0.50 ± 0.58

Treatment time - Recovery time: 24-0 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * $p<0.05$ vs Control

4) 염색분체형 이상 및 기타 이상 빈도

(1) S-9 mix 적용 6시간 처리군(Test I)(Table 13)

Table 13. Changes of Chromatid types and others(Shortening) in Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 6 hrs treatment group under present of S-9 mix(Test I).

Conc.(mg/ml)	Others	Chromatid type	
		Deletion	Exchanges
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.00005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
1	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
CPA 6	0.00 ± 0.00	4.75 ± 1.50*	10.50 ± 1.29*

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; CPA: Cyclophosphamide H2O; * $p<0.05$ vs Control

(2) S-9 mix 미적용 6시간 처리군(Test II)(Table 14)

Table 14. Changes of Chromatid types and others(Shortening) in Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 6 hrs treatment group under absence of S-9 mix(Test II).

Conc.(mg/ml)	Others	Chromatid type	
		Deletion	Exchanges
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
0.00005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
EMS 800	0.00 ± 0.00	2.50 ± 0.58*	16.50 ± 1.73*

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs ControlTreatment time - Recovery time: 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; CPA: Cyclophosphamide H2O; * p<0.05 vs Control

(3) S-9 mix 미적용 24시간 처리군(Test III)(Table 15).

Table 15. Changes of Chromatid types and others(Shortening) in Chromosomal Aberration Test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in 24 hrs treatment group under absence of S-9 mix(Test III).

Conc.(mg/ml)	Others	Chromatid type	
		Deletion	Exchanges
Control	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.00005	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.0005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.005	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
EMS 600	0.50 ± 0.58	5.50 ± 1.29*	20.25 ± 3.86*

Treatment time - Recovery time: 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

2. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

1) 용량설정 실험

(1) *Salmonella typhimurium* TA100(Table 4).

(2) *Salmonella typhimurium* TA1535(Table 4)

(3) *Salmonella typhimurium* TA98(Table 4)

(4) *Salmonella typhimurium* TA1537(Table 4)

(5) *Escherichia coli* WP2 uvrA(Table 4)

2) 복귀돌연변이 집락수

(1) *Salmonella typhimurium* TA100(Test I)(Table 16)

Table 16. Results of Bacterial Reverse Mutation Assay of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in Salmonella typhimurium TA100(Test I).

Conc.(mg/ml)	Without S-9 mix		With S-9 mix	
	Colonies	[Factor][a)]	Colonies	[Factor]
Control	131.75 ± 9.67	[1.00]	130.50 ± 4.20	[1.00]
0.00005	122.25 ± 13.28	[0.93]	126.00 ± 12.81	[0.97]
0.0005	118.00 ± 10.13	[0.90]	120.00 ± 10.00	[0.92]
0.005	124.50 ± 5.07	[0.94]	120.00 ± 1.83	[0.92]
0.05	121.50 ± 9.85	[0.92]	127.75 ± 5.38	[0.98]
0.5	122.25 ± 15.82	[0.93]	112.25 ± 5.97	[0.86]
1	130.00 ± 13.69	[0.99]	123.50 ± 7.14	[0.95]
SA[1)] 0.5	496.50 ± 44.98*	[3.77]	NT[b)]	NT
2-AA[2)] 0.4	NT	NT	304.00 ± 16.99*	[2.33]

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; * $p<0.05$ vs ControlTreatment time - Recovery time: 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * $p<0.05$ vs Control

(2) *Salmonella typhimurium* TA1535(Test II)(Table 17)

Table 17. Results of Bacterial Reverse Mutation Assay of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in Salmonella typhimurium TA1535(Test II).

Conc.(mg/ml)	Without S-9 mix		With S-9 mix	
	Colonies	[Factor][a)]	Colonies	[Factor]
Control	13.75 ± 3.10	[1.00]	11.50 ± 1.29	[1.00]
0.00005	11.75 ± 0.96	[0.85]	10.50 ± 1.73	[0.91]
0.0005	12.25 ± 1.26	[0.89]	11.00 ± 1.63	[0.96]
0.005	12.50 ± 1.29	[0.91]	12.00 ± 0.82	[1.04]
0.05	12.75 ± 1.50	[0.93]	10.00 ± 1.83	[0.87]
0.5	14.50 ± 1.73	[1.05]	11.75 ± 0.96	[1.02]
1	12.50 ± 1.29	[0.91]	11.75 ± 1.50	[1.02]
SA[1)] 0.5	459.25 ± 27.37*	[33.40]	NT[b)]	NT
2-AA[2)] 2	NT	NT	257.75 ± 24.92*	[22.41]

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; * $p<0.05$ vs ControlTreatment time - Recovery time: 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: *Ethylmethanesulfonate*; * $p<0.05$ vs Control

(3) *Salmonella typhimurium* TA98(Test III)(Table 18)

Table 18. Results of Bacterial Reverse Mutation Assay of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in Salmonella typhimurium TA98(Test III).

Conc.(mg/ml)	Without S-9 mix		With S-9 mix	
	Colonies	[Factor][a)]	Colonies	[Factor]
Control	23.25 ± 5.32	[1.00]	34.50 ± 3.32	[1.00]
0.00005	21.50 ± 3.70	[0.92]	31.50 ± 2.65	[0.91]
0.0005	21.25 ± 1.89	[0.91]	32.00 ± 4.08	[0.93]
0.005	21.00 ± 1.41	[0.90]	32.25 ± 3.59	[0.93]
0.05	21.50 ± 2.08	[0.92]	35.00 ± 1.41	[1.01]
0.5	21.25 ± 3.20	[0.91]	32.25 ± 2.63	[0.93]
1	21.50 ± 1.91	[0.92]	32.00 ± 1.83	[0.93]
4NQO[1)] 0.5	305.50 ± 13.43*	[13.14]	NT[b)]	NT
2-AA[2)] 0.4	NT	NT	308.50 ± 20.14*	[8.94]

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs ControlTreatment time - Recovery time; 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

(4) *Salmonella typhimurium* TA1537(Table 19)

Table 19. Results of Bacterial Reverse Mutation Assay of *Bojungikkeehapdaechilki-tang extract in Salmonella* typhimurium TA1537(Test IV).

Conc.(mg/ml)	Without S-9 mix		With S-9 mix	
	Colonies	[Factor][a)]	Colonies	[Factor]
Control	9.25 ± 0.50	[1.00]	16.25 ± 0.50	[1.00]
0.00005	8.50 ± 1.00	[0.92]	15.25 ± 1.71	[0.94]
0.0005	9.50 ± 1.29	[1.03]	16.50 ± 1.00	[1.02]
0.005	8.75 ± 0.50	[0.95]	15.75 ± 1.50	[0.97]
0.05	9.25 ± 0.96	[1.00]	16.75 ± 2.06	[1.03]
0.5	9.00 ± 0.00	[0.97]	15.50 ± 3.51	[0.95]
1	9.75 ± 0.96	[1.05]	16.25 ± 2.63	[1.00]
9-AA[1)] 50	268.50 ± 32.72*	[29.03]	NT[b)]	NT
2-AA[2)] 2	NT	NT	321.00 ± 16.75*	[19.75]

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) 9-Aminoacridine; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs Controla) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs ControlTreatment time - Recovery time; 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

(5) *Escherichia coli* WP2 uvrA(Table 20)

Table 20. Results of Bacterial Reverse Mutation Assay of Bojungikkeehapdaechilki-tang extract in Escherichia coli WP2 uvrA(Test V).

Conc.(mg/ml)	Without S-9 mix		With S-9 mix	
	Colonies	[Factor][a]	Colonies	[Factor]
Control	14.00 ± 2.16	[1.00]	15.00 ± 0.82	[1.00]
0.00005	13.50 ± 1.00	[0.96]	14.00 ± 1.15	[0.93]
0.0005	13.75 ± 1.50	[0.98]	14.75 ± 0.96	[0.98]
0.005	12.75 ± 2.87	[0.91]	14.50 ± 1.00	[0.97]
0.05	12.25 ± 0.96	[0.88]	14.75 ± 0.96	[0.98]
0.5	15.00 ± 2.83	[1.07]	15.75 ± 0.50	[1.05]
1	13.50 ± 1.73	[0.96]	15.75 ± 1.26	[1.05]
4NQO[1] 0.5	113.25 ± 5.44*	[8.09]	NT[b]	NT
2-AA[2] 4	NT	NT	280.00 ± 11.69*	[18.67]

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) 9-Aminoacridine; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs Controla) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs ControlTreatment time - Recovery time; 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

3. 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

1) 체중의 변화에 따른 증체량의 변화(Table 21).

Table 21. Body weigh changes and gains in Micronucleus test of *Bojungikkeehapdaechilki-tang* extract in ICR mouse.

Group ID[a]	Day -1	Day 0	Day 1	Day 2	Gains[b]
G0	31.82 ± 0.87	31.92 ± 1.20	31.20 ± 1.32	32.56 ± 0.82	0.64 ± 0.60
G1	31.74 ± 1.34	32.00 ± 1.58	32.32 ± 1.16	32.72 ± 1.11	0.72 ± 0.80
G2	31.92 ± 1.43	32.24 ± 1.06	32.72 ± 0.76	32.62 ± 1.14	0.38 ± 0.37
G3	31.48 ± 1.32	31.80 ± 0.64	32.30 ± 0.52	32.36 ± 0.49	0.56 ± 0.62
G4	32.02 ± 0.95	32.34 ± 0.62	32.56 ± 0.69	32.94 ± 0.61	0.60 ± 0.76
G5	31.84 ± 0.80	32.32 ± 0.94	32.48 ± 0.58	32.44 ± 0.50	0.12 ± 0.69

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) 9-Aminoacridine; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs Controla) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs ControlTreatment time - Recovery time; 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

2) 소핵다염적혈구(MNPCE)의 수적 변화(Table 22).

3) PCE 및 NCE 비율의 변화(Table 22).

Table 22. Results of Micronucleus Test of Bojungikkeehapdaechilki-tang extract in ICR mouse.

Group ID[a)]	MNPCE/2000 PCEs	Number of Erythrocytes		
		PCE	NCE	Ratio[b)]
G0	1.60 ± 0.89	244.20 ± 23.74	255.80 ± 23.74	0.49 ± 0.05
G1	2.00 ± 0.71	242.60 ± 50.10	257.40 ± 50.10	0.49 ± 0.10
G2	1.40 ± 1.14	240.20 ± 42.16	259.80 ± 42.16	0.48 ± 0.08
G3	1.80 ± 0.84	249.60 ± 34.59	250.40 ± 34.59	0.50 ± 0.07
G4	1.20 ± 0.45	250.40 ± 41.46	249.60 ± 41.46	0.50 ± 0.08
G5	62.80 ± 14.45*	231.00 ± 31.76	269.00 ± 31.76	0.46 ± 0.06

a) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) 9-Aminoacridine; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs Controla) Number of colonies of treated plate/Number of colonies of negative control plate; b) NT: Not tested; 1) Sodium azide; 2) 2-Aminoanthracene; * p<0.05 vs ControlTreatment time - Recovery time; 6-18 hrs; Mean ± S.D. cell/100 metaphase cells, n=4; EMS: Ethylmethanesulfonate; * p<0.05 vs Control

Ⅳ. 考 察

천연물 추출물의 유전독성학적 평가는 주로 다른 화합물이나 방사선과 같은 독성물질에 대한 예방 차원 즉 유전독성 차단 효과를 실험하는 것으로 이루어져 왔는데 약용식물인 *Toxicodendron quercifolium*(poison ivy)[5], *Terminalia arjuna* 추출물[25], 겨자과 식물들과 아카시아 나무 추출물[26], 버섯인 *Lactarius vellereus* 추출물[27] 등이 유전독성 차단효과가 있는 것으로 밝혀졌다.

그러나 이러한 천연물 유래 추출물 역시 유전독성으로부터 자유롭지 못하다는 연구들이 다수 보고되어 짐에 따라 현재 천연물 추출물 자체에 대한 유전독성의 평가 역시 활발히 진행되고 있다. 근래에 들어 pepper tree 추출물[28]이나 브라질 약용식물 Stryphnodendron adstringens 추출물[29]의 유전독성을 평가한 것은 이러한 연구의 한 일환이라고 볼 수 있다. 한편 일부 추출물에 의한 독성 증상이 다른 추출물의 조합에 의해 현저히 감소되는 것으로 알려져 있어[31], 처방 자체의 독성을 짐작하기에는 어려운 점이 많다. 따라서 근래에 들어서는 한약복합 처방인 한의학적 처방 자체에 대한 독성측면의 검사가 진행되고 있다[32-4]. 이러한 한약복합 처방인 한약처방 자체에 대한 독성 평가가 한약 처방 자체의 안전성 확립을 위해서도 필요한 일이라고 생각된다.

補中益氣湯은 李東垣이 〈脾胃論〉중 '飮食勞倦所傷 始爲熱中論'에 소개된 처방이다. 李東垣은 陰火가 上衝하면 氣高喘以煩熱, 頭痛, 渴, 脈洪한 증상이 나타나는데 脾胃의 氣가 하류하여 穀氣가 升浮하지 못하여 春生之令이 不行한 것이라 風寒에 견디지 못하고 寒熱을 발생하게 되는 것으로 모두 脾胃가 부족한 것이 원인이라 하였다. 따라서 이러한 경우에 "勞者溫之, 虛者益之"에 근거하여 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草 등 甘溫한 약으로 補中하고 "陷者擧之"에 근거하여 升麻와 柴胡로 乘陽하였는데 氣虛發熱을 치료하기 위해 甘溫한 약물을 이용, 補中乘陽함으로써 병의 근원을 제거하려는 목적으로

補中益氣湯으로 창안하였다[15),35)]. 근래에는 면역 활성, 항독성, 항암, 항산화, 항알러지[10-2)] 등의 효과에 관하여 실험, 발표된 바 있다. 또한 大七氣湯은 〈東醫寶鑑[16)]〉에 五積六聚, 心腹痛脹, 二便不利에 적용하는 것으로 소개되어 있으며 破血祛瘀, 理氣健脾, 燥濕化痰, 健脾溫腎, 緩和解毒하는 약재인 三陵, 蓬朮, 靑皮, 陳皮, 桔梗, 藿香, 益智仁, 香附子, 肉桂, 甘草, 生薑, 大棗로 구성되어 있다. 근래의 연구 결과로는 항암, 면역조절작용 효과 등이 있음이 밝혀져 있다[13-4)].

補中益氣合大七氣湯의 경우 몸의 원기를 보충해 주면서 瘀血이나 濕痰을 제거하는 효과를 동시에 낼 수 있으므로 불규칙적인 식사와 과중한 스트레스, 운동부족의 상태에서 생활을 하는 현대인의 피로허약과 心身의 鬱症으로 인한 증상을 해소시킬 있는 처방으로 생각되며 이러한 처방을 임상적으로 활용함에 있어서 자체의 유전독성 연구도 필요할 것으로 생각된다.

우리나라에서는 최근에 들어 양약제제의 유전독성연구가 활발히 이루어 지고 있으며 일반 음식물 및 한약제제에 대한 유전독성 연구 역시 서서히 시작되고 있다. 한약제의 유전독성 연구는 〈식품영양학회지〉에서 감마선 조사 처리한 한약 단미의 유전독성학적 안전성을 평가한 것이 대부분인데 人蔘, 當歸, 黃芪, 柴胡, 甘草 등이 그 대상이었다. 이들 논문은 약재를 오랫동안 보관, 유통하면서도 질적인 저하를 방지하기 위해 처리한 감마선 조사 후에 특별한 유전독성이 검출되는지의 여부에 대한 연구로 염색체이상시험, 복위돌연변이시험 및 소핵 실험 중에서 한 가지를 택하여 시행한 것으로[6-9)] 식품의학안전청의 기준에 완전히 부합하는 실험논문이라고 보기에는 어려웠다.

본 연구에서는 이러한 補中益氣合大七氣湯의 유전독성 실험 중 현재 의약품 등의 독성시험기준에 명시되어 있는 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험, 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 통해 補中益氣合大七氣湯의 유전독성을 규명하고자 하였다.

첫째, 염색체이상시험에 대한 천연물 유래 물질의 보고는 드무나, Nie 등은 우슬(Radix Achyranthis bidentatae)에 대하여 CHL 세포를 이용한 염색체이상 시험을 실시한 결과 별 다른 유전독성이 인정되지 않았다고 보고하였으[36)]. Heidemann 등은 센나 열매 추출물을 역시 차이니즈 햄스터 난소세포(CHO)를 이용한 염색체이상 시험을 실시한 결과 유전독성이 인정되지 않았다고 보고하였다[37)]. 본 실험에서는 補中益氣合大七氣湯 추출물의 유전독성을 평가하기 위해 CHL 세포를 이용하여 대사활성계(S-9 mix) 적용 및 미적용하에 염색체이상 시험을 수행하였다. 補中益氣合大七氣湯 추출물은 예비실험에서 5mg/ml 농도에서 강한 세포독성이 유발되어 본 실험에서는 1mg/ml 농도를 최고농도로 실험을 수행하였다. 본 실험의 결과 모든 補中益氣合大七氣湯 추출물 투여군에서 매체대조군에 비해 유의성 있는 염색체이상 빈도의 증가가 인정되지 않아, 補中益氣合大七氣湯 추출물은 CHL 세포에 대해 염색체이상을 일으키지 않는 것으로 판단된다. 한편 cyclophosphamide·H_2O(CPA)와 ethylmethanesulfonate(EMS)를 사용한 양성대조군의 경우 매체대조군에 비해 유의성 있는 염색체이상 빈도 증가가 인정되었다.

둘째, 천연물 추출물의 복귀돌연변이 실험 역시 화합물 또는 방사선에 의한 유전독성을 예방하는 측면에서 실험이 수행되어져 왔다. Minaric 등은 버섯 *Lactarius vellereus* 추출물의 4NQO로 유발된 복귀돌연변이 집락수를 감소시키므로 유전독성에 대한 예방효과가 있다고 보고하였다[27)] 본 실험에서는 補中益氣合大七氣湯 추출물의 유전독성 검색을 위해 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주인 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2 uvrA 균주를 이용해 대사활성효소계 미적용 및 적용하에 복귀돌연변이 실험을 실시하였다. 예비실험의 결과 5mg/ml의 농도에서 강한 항균력이

유발되어 본 실험에서는 1mg/ml 농도를 최고농도로 실험을 수행하였다. 본 실험의 결과 모든 균주에서 대사활성효소계 미적용/적용시 시험물질을 처리한 어떤 농도군에서도 유의성 있는 복귀돌연변이 집락 수의 증가현상이 관찰되지 않았으므로 본 실험의 조건하에서 補中益氣合大七氣湯 추출물이 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 생각된다. 한편 본 실험에 양성대조물질로 사용한 Sodium azide, 9-Aminoacridine, 4NQO, 2-Aminoanthrancene는 모든 균주에 대해 매체대조군에 비해 유의성 있는 복귀돌연변이 집락 수의 증가를 일으켰다.

셋째, 천연물 추출물의 소핵실험 역시 방사선 또는 화학물질에 의해 초래되는 유전독성의 예방 효과를 위주로 진행되어져 poison ivy 및 인삼 추출물의 효과가 마우스 소핵실험을 통해 보고되었다[5,38]. 한편 최근 천연물 자체의 유전독성에 대한 소핵실험이 실시되어져 사과 추출 polyphenol[30], 옥죽 추출물[39], 우슬[40] 등의 유전독성을 마우스 소핵실험을 통해 보고하였다. 본 실험에서는 補中益氣合大七氣湯 추출물의 유전독성을 평가하기 위하여 수컷 마우스 골수세포를 이용한 소핵실험을 실시하였다. 본 실험의 투여용량은 마우스 단회투여독성 실험에서의 결과를 바탕으로 현저한 독성 증상이 초래되지 않은 1000mg/kg을 최고 용량으로 설정하였다. 본 실험의 결과 2000개의 PCE로부터 소핵을 계수한 결과, 補中益氣合大七氣湯 추출물을 투여한 모든 군에서 소핵의 빈도가 매체대조군에 비해 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 체중 및 PCE/(PCE + NCE)의 비율 역시 매체대조군과 별 다른 차이를 나타내지 않아 본 실험의 결과 補中益氣合大七氣湯은 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다. 한편 양성대조군인 CPA 투여군에서는 매체대조군에 비해 유의성 있는 소핵 세포의 수적 증가가 인정되었다.

이상에서 補中益氣合大七氣湯 추출물의 유전독성 실험 중 현재 식품의약품안전청고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준에 의거하여 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험, 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험 결과 補中益氣合大七氣湯 추출물은 유전독성을 일으키지 않는 것으로 판단되었다. 향후 한약재 자체의 안정성 검증을 요하는 일이 많아질 것인바 한약 처방 자체에 대한 유전독성연구가 더욱 활발해져 임상적 응용에 안전을 기할 수 있으리라 생각된다.

V. 結 論

補中益氣合大七氣湯 추출물의 유전독성 실험 중 현재 한국의약품안전청고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준에 의거하여 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험, 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 염색체이상시험 : 본 실험의 결과 모든 補中益氣合大七氣湯 추출물 투여군에서 매체대조군에 비해 유의성 있는 염색체이상 빈도의 증가가 인정되지 않아, 補中益氣合大七氣湯 추출물은 CHL 세포에 대해 염색체이상을 일으키지 않는 것으로 판단된다. 한편 cyclophosphamide · H_2O (CPA)와 ethylmethanesulfonate (EMS)를 사용한 양성대조군의 경우 매체대조군에 비해 유의성 있는 현저한 염색체이상 빈도의 증가가 인정되었다.
2. 복귀돌연변이실험 : 본 실험의 결과 모든 균주에서 대사활성효소계 미적용/적용시 시험물질을 처리한 어떤 농도군에서도 유의성 있는 복귀돌연변이 집락 수의 증가현상이 관찰되지 않았으므로 본 실험의 조건하에서 補中益氣合大七氣湯 추출물이 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 생각된다. 한편 본 실험에 양성대조물질로 사용한 Sodium azide, 9-Aminoacridine, 4NQO,

2-Aminoanthrancene는 모든 균주에 대해 매체대조군에 비해 유의성 있는 복귀돌연변이 집락수의 증가가 인정되었다.

3. 마우스 소핵실험 : 본 실험의 결과 2000개의 PCE로부터 소핵을 계수한 결과, 補中益氣合大七氣湯 추출물을 투여한 모든 군에서 소핵의 빈도가 매체대조군에 비해 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 체중 및 PCE/(PCE + NCE)의 비율 역시 매체대조군과 별 다른 차이를 나타내지 않아 본 실험의 결과 補中益氣合大七氣湯은 아우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다. 한편 양성대조군인 CPA 투여군에서는 매체대조군에 비해 유의성 있는 소핵 세포의 수적 증가가 인정되었다.

이상에서 補中益氣合大七氣湯 추출물의 유전독성 실험 중 현재 식품의약품안전청고시 제 1999-61호 의약품 등의 독성시험기준에 의거하여 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험, 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시한 결과 補中益氣合大七氣湯 추출물은 유전독성을 일으키지 않는 것으로 판단되었다.

參考文獻

1. 식품의약품안전청. 기능성 식품의 합리적 관리체계 구축을 위한 연구. 서울. 2002.
2. 식품의학안전청. 21세기 신약개발 중심국가로 가는 한약·생약제제 및 천연물 신약 신제품 개발 지원 설명회. 서울. 2002.
3. 식품의약품안전청. 건강기능식품의 기능성평가체계 구축에 대한 연구. 서울. 경희대학교. 2002.
4. 식품의학안정청. 고시 의약품 등의 독성기준. 제 1999-61호. 1999.
5. Mersch-Sundermann, V., Kassie, F., Bohmer, S., Lu, W. Q., Wohlfahrth. R., Sobel, R., Brunn, H. E., ElSohly, M. A., Ross, S. A. and Stahl, T. Extract of *Toxicodendron quercifolium* caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice. Food Chem. Toxicol., 2004:42:1611-7.
6. 함연호, 육홍선, 조성기. Ames test를 이용한 감마선 조사 황기, 감초 및 진피의 유전독성학적 안전성 평가. 한국식품영양과학회지 2001:8(1):54-9.
7. 조성기, 육홍선, 변명우. 감마선 조사 홍삼의 안전성에 관한 유전독성학적 연구. 한국식품영양과학회지 1996:25(3)491-6.
8. 박혜란, 함연호, 정우희. 감마선 조사 황기, 백출, 및 승마 열수 추출물의 in vitro 유전독성학적 안전성 평가. 한국식품영양과학회지. 2002:31(5):910-6
9. 유영법, 조성기. 감마선 조사 당귀의 유효성분 안정성 및 유전독성학적 안전성 연구. 한국식품영양과학회지 2000:7(1):300-6.
10. 강필구, 강윤경, 박동일. 보중익기탕 가 신이가 폐혈전한전 및 지연형 allergy 반응에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2000:21(3):487-94.
11. 이능기, 최승훈. 방사선 조사후의 NiGP(S) mouse 비장세포 증식에 미치는 보중익기탕과 사육탕의 효과. 대한한방종양학회지 1996:2(1):91-100.
12. 이상훈, 이승언, 이시형. 補中益氣湯加味方이 면역기능 증진 효과. 동의생리병리학회지 2004:18(2):528-33.
13. 하지용, 정병억, 이선구. 대칠기탕이 항암, 면역조절작용 및 apoptosis에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2001:15(1):111-24.
14. 우홍정, 이장훈, 김영철. 大七氣湯의 항암효과에 관한 연구. 대한한방내과학회지 1999:20(2):182-95.
15. 이찬범, 유봉하, 박동원, 장인규, 유기원, 李東垣

의 脾胃論에 나타난 處方 및 用藥特性에 관한 考察. 대한한의학회지 1987;8(2):47-8.
16. 許浚. 東醫寶鑑 雜病篇. 1. 서울. 大成出版社. 1992:302.
17. Ishidate, M. Jr., Sofuni, T. and Yoshikawa, K.. Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. GANN Monograph on Cancer Res. 1981;27:95-107.
18. Dean, B. J., and Danford, N.. Assays for the detection of chemically-induced chromosomal damage in cultured mammalian cells. In: Mutagenicity testing - a practical approach(Venitt, S. and Parry, J. M., eds). 1. England:Oxford. IRL press. 1984:187-232.
19. Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T.. A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. GANN. 1970;61:161-7.
20. JEMS-MMS. Atlas of chromosome aberration by chemicals. Japanese Environmental Mutagen Society-Mammalian Mutagenicity Study Group, Tokyo. 1988.
21. Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B.. Analysis of data from in vitro cytogenetics assays. In: Statistical evaluation of mutagenicity test data(Kirkland, D. J., ed.). U.K.:Cambridge Cambridge University Press 1989:141-154.
22. Maron, D. M. and Ames, B. N.. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 1983:113:173-215.
23. Schmid, W..The micronucleus test. Mutat. Res. 1985;31:9-15.
24. Heddle, J. A., Stuart, E. and Salamone, M. F.. The bone marrow micronucleus test. In: Handbook of mutagenicity test procedures, 2nd ed.(Kilbey B. J., Legator M., Nichols, W. and Ramel, C., eds). 1. New-York, USA. Elsevier 1984:441-57.
25. Scassellati-Sforzolini, G., Villarini, L. M., Moretti, L. M., Marcarelli, L. M., Pasquini, R., Fatigoni, C. etc. Antigenotoxic properties of *Terminalia arjuna* bark extracts. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 1999;18:119-25.
26. Gill, C. I., Haldar, S., Porter, S., Matthews, S., Sullivan, S., Coulter, J., etc. The effect of cruciferous and *leguminous sprouts* on genotoxicity, in vitro and in vivo. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2004;13:1199-205.
27. Mlinaric, A., Kac, J., Fatur, T. and Filipic, M.. Anti-genotoxic activity of the mushroom *Lactarius vellereus* extract in bacteria and in mammalian cells in vitro. Pharmazie 2004;59:217-21.
28. de Carvalho, M. C., Barca, F. N., Agnez-Lima, L. F. and de Medeiros, S. R.. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark(*Schinus terebinthifolius Raddi*). Environ. Mol. Mutagen 2003;42:185-191.
29. de Sousa, N. C., de Carvalho, S., Spano, M. A. and Graf, U. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens*(Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen 2003;41:293-9.
30. Awasthy, K. S., Chaurasia, O. P., Sinha, S. P. and Khan, P. K.. Differential genotoxicity of the crude leaf extract of a medicinal plant, *Casearia tomentosa*. Biomed. Environ. Sci. 2000;13:12-8.
31. Akiba, K., Onodera, K., Kisara, K. and Fujikura, H.. Interaction of d-pseudoephedrine with water soluble extracts of Platycodi Radix

on acute toxicity. Nippon Yakurigaku Zasshi 1979;75:201-6.

32. Ryu, J. C., Kim, K. R., Kim, H. J., Youn, J. Y., Myung, S. W., Kim, G. H. etc. Genotoxicity study of bojungchisup-tang, an oriental herbal decoction-in vitro chromosome aberration assay in Chinese hamster lung cells and in vivo supravital-staining micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes. Arch. Pharm. Res. 1989;21:391-7.
33. Ninomiya, H., Kato, S. and Okuda, H.. Effects of Hachimi-jio-gan in aged rats. J. Altern. Complement Med. 2001;7:355-9.
34. Keyler, D. E., Baker, J. I., Lee, D. Y., Overstreet, D. H., Boucher, T. A. and Lenz, S. K.. Toxicity study of an antidipsotropic Chinese herbal mixture in rats: NPI-028. J. Altern. Complement Med. 2002;8:175-83.
35. 李潤熙. 東垣〈脾胃論〉收錄 處方의 治法에 대한 文獻的 考察. 대구한의대학교 대학원. 2001.
36. Nie, S., Xue, B., Liang, A., Li, G. and Li, Z.. Effect of processing on specific toxicity of Radix Achyranthis Bidentatae. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 1995;20:275-8, 318.
37. Heidemann, A., Miltenburger, H. G. and Mengs, U.. The genotoxici55. Obaseiki-Ebor, E. E., Odukoya, K., Telikepalli, H., Mitscher, L. A. and Shankel, D. M.. Antimutagenic activity of extracts of leaves of four common edible vegetable plants in Nigeria(west Africa). Mutat. Res. 1993;302:109-17.
38. Lee, T. K., Allison, R. R., O'Brien, K. F., Khazanie, P. G., Johnke, R. M., Brown, R.. Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. Mutat Res. 2004;557:75-84.
39. Shoji, T., Akazome, Y., Kanda, T. and Ikeda, M.. The toxicology and safety of apple polyphenol extract. Food Chem. Toxicol. 2004;42:959-67.
40. Chen, H., Feng, R., Guo, Y., Sun, L., Zhou, Y. and Jiang, J.. Toxicity studies of Rhizoma Polygonati Odorati. J. Ethnopharmacol. 2001;74:221-4.