

Chinese hamster lung cell(CHL)에서 십전대보탕 염색체 이상 시험

마진열, 황대선, 이남현, 하혜경, 유영범, 신현규
한국한의학연구원

ABSTRACT

Chromosomal anomaly test of *Sipjeondaebotang* extract using the Chinese hamster lung

Jin-Yeul Ma, Dae-Sun Huang, Nam-Hun Lee, Hye-Kyung Ha, Young-Beob Yu, Hyun-Kyoo Shin
Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives : This study was to assessment the toxicity of *Sipjeondaebotang*(*Shiquan dabu-decoction*) by Chromosomal anomaly test.

Methods : *Sipjeondaebotang*(*Shiquan dabu-decoction*) water-extract *in vivo* Chromosomal anomaly test was performed using chinese hamster lung cell line.

Results : *Sipjeondaebotang* water extract was negative in Chromosomal anomaly test at the doses of 0, 625, 1250 and 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 6h and 24h.(S9- fraction). Chromosomal anomaly test(S+ fraction) was also negative at the doses of 0, 1250, 2500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Conclusions : It was concluded that *Sipjeondaebotang* extract did not induce Chromosomal anomaly in the chinese hamster lung cell.

-
- 교신저자 : 신현규
 - 대전 유성구 전민동 엑스포로 483 한국한의학연구원, 한약제제연구부
 - Tel : 042-868-9464 Fax : 042-868-9471 E-mail: hkshin@kiom.re.kr
 - 접수 : 2008/ 12/ 04 수정 : 2008/ 12/ 10 채택 : 2008/ 12/ 18

Key word : Sipjeondaebo-tang, Shiquan dabu-decoction, Chromosomal anomaly, -S9 Mix, +S9 Mix

I. 서 론

十全大補湯은 補藥의 일종으로 補氣의 四君子湯과 補血의 四物湯을 合方하여 溫陽祛寒의 性質이 있는 黃芪와 肉桂를 加味하여 위로 固表하고 아래로 引火歸元하게 함을 뜻하며 左血右氣와 음양의 쇠함을 온전케 함을 의미한다고 알려져 있다.

十全大補湯은 오랫동안 암 치료에 응용되어 왔는데, 항암 화학요법과 방사선치료 및 수술 후의 부작용을 줄이고 전이를 억제시키는 것으로 알려져 왔다¹⁻³⁾. 그 외 NK cell 및 NKT cell을 활성화시키고 IFN- γ 생성을 늘려서 항암효과를 가진다는 연구보고가 있었다⁴⁻⁶⁾. 또한 동물실험모델에서 이식된 종양세포의 성장을 억제시킴을 관찰하였고⁷⁾, 그 기전으로는 macrophage, T cell⁸⁻⁹⁾ 및 NKT cell¹⁰⁻¹¹⁾이 관여하는 것으로 알려져 있다. 면역학 관련 연구도 많이 이루어졌는데 hematopoietic stem cell 성장을 촉진하고¹²⁾ melanocytic tumor cell 성장의 T cell 매개 억제를 촉진한다는¹³⁾ 연구 결과도 보고되었다. 또한 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ 등의 사이토카인 활성화에 영향을 미친다는 보고가 있었다¹⁴⁻¹⁶⁾.

최근에 효능 평가와 별개로 근래 논쟁이 되고 있는 복용 한약의 毒性和 安全性 問題를 해결하고자, 十全大補湯에 대한 유전독성 시험중 염색체 이상시

험¹⁷⁻¹⁸⁾을 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호 “비임상시험 관리기준¹⁹⁾” 및 OECD guidelines²⁰⁾에 따라 수행하여 十全大補湯의 독성 유무를 판단하고자 본 실험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

十全大補湯의 韓藥材 구성은 人蔘(Ginseng Radix Alba), 白朮(Atractylodes Rhizome White), 白茯苓(Poria cocos Wolf), 甘草(Glycyrrhizae Radix), 當歸(Angelica Gigas Root), 川芎(Cnidium Rhizome), 熟地黃(Steamed Rehmannia Root), 芍藥(Peony Root), 黃芪(Astragali Radix), 肉桂(Cinnamomi Cortex)로 생산자 및 재배지역이 명확한 韓藥材를 구입하였다(Table 1). 본 연구에서는 전탕 추출법(한국, 경서추출기 cosmos-600)에 의한 시험물질 조제를 실시하였으며 각 韓藥材 100g을 8000ml의 증류수에 넣어 120분간 열탕 추출한 후, 건조분무기(Japan, Eyela SD-1000)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다(수율 16.5%). 이를 투여 직전에 3차 증류수에 용해하여 실험에 공시하였다(Table 1).

Table 1. Origins of ten constituent herbs of *Sipjeondaebo-tang*.

약재명	생산자(수입자)	제조사	소매자
인삼	충청남도 금산군	충남 금산군 금산읍 하옥리 386-22	대전 동구 중동 23-4번지 백제건재도매
백출	강원도 영월군 읍덕포 5리 화림백출	부산광역시 남구 용호 3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)	부산광역시 남구 용호 3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)
백복령	강원도 고성군 거진읍 거진 7리 2반 구강물산	경북 영주시 하망동 548-3 감초당 약업사	서울 동대문구 제기동 837번지 농림생약
감초(炙)	중국	전남여수시 오천동 174-1 신흥제약	전남여수시 오천동 174-1 신흥제약
당귀	강원도 평창군	강원 평창진부 하진부 681-1	강원 평창진부 하진부 681-1
천궁	전북 무주군 설천면 삼거리 226	전북 무주읍 가옥리 631-2 남영제약	전북 무주군 무주읍 가옥리 631-2 남영제약
숙지황	전북 정읍시	전북 정읍시 옥동면 칠석리 150-2 칠보 농협 옥동제약사	전북 정읍시 옥동면 칠석리 150-2 칠보 농협 옥동제약사
작약	전라남도 화순군	전남 화순군 능주면 백암리 871-1	전남 화순군 화순읍 교리 243-5 전남생약농업협동조합
황기	강원도 정선군	강원도 정선군 정선읍 봉양리 354-1 정선농협	강원도 정선군 정선읍 봉양리 354-1 정선농협
육계	베트남	부산광역시 남구 용호3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)	부산광역시 남구 용호3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)

2. 방법

1) 시험물질의 조제

시험 물질 적량을 용매에 50 mg/ml로 용액을 조제한 것과 이들 동일한 용매로 1:1 희석하여 각 처리군의 10배 농축액을 조제하였다. 양성대조 물질은 멸균증류수에 녹여 조제하였다. 시험물질 및 양성대조물질은 조제 즉시 처리하였다

2) 양성대조물질

양성대조물질은 OECD 가이드라인에 예시되어 있는 물질을 선택하였다.

(1) 양성대조물질 I (S9-, Mitomycin C (MMC), Sigma Chemical Co.)

(2) 양성대조물질 II (S9+, Cyclophosphamide (CPA), Sigma Chemical Co.)

(3) 대사활성효소계 (S-9 Mix, 기원 : Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫트의 간, Molecular Toxicology Inc, 11-01L)

3) 시험 세포주

시험에 사용한 세포는 CHL (Chinese hamster Lung) 유래의 배양세포를 이용하였다. 이 세포 주는 염색체이상시험에서 널리 사용하고 있으며 기초 데이터가 풍부하기 때문에 선정하였다. 세포 주는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 입수 한 후 계대 중 액체질소에 보관한 세포를 해동하여 2~3회 계대 배양한 후 시험에 사용하였다. 배양액은 시판되는 Minimum Essential Medium (Gibco, 61100-061) 500 ml에 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Lot No. 1215188) 50 ml을 첨가해 사용하였다. 배양조건 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 3~4일 마다 계대 배양하였다.

4) 시험물질 농도 결정

예비시험에서 물질을 5000 µg/ml을 최고농도로 하고 공비 0.5로(5000, 2500, 1250, 625, 312.5 µg/ml) 설정하였다. 6 well culture용 plate를 사용하여 본

시험과 동일한 방법으로 시험물질을 처리하였다. 시험물질을 각 군별로 6시간 및 24시간 처리한 다음 각 dish에 MTT 용액을 넣고 2시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음 DMSO를 넣고 ELISA Reader를 이용하여 490 nm에서 측정된 값을 세포증식 억제의 지표로 하였다. 그 결과 시험물질은 직접법 I (6시간 처리) 및 대사활성화법

적용시 최고농도에서도 50% 미만의 세포증식저해가 나타나지 않았다. 직접법 II (24시간 처리)의 경우는 대략 2500 µg/ml에서 50% 미만의 세포증식저해가 나타났다. 따라서 예비 시험 결과를 토대로 하여 본시험에서의 최고 농도는 5000 µg/ml, 확인시험에서의 최고농도는 2500 µg/ml로 설정하였다(Table 2).

Table 2. Result of preliminary range-finding test

Concentration of Test item (mg/mL)	S9 Mix	Treatment Times(h)	OD 490 nm		Mean	Relative Cell Counts(%)
			Dish A	Dish B		
0	-	6	2.180	2.177	2.1785	100
0.3	-	6	2.177	2.191	2.1840	100
0.6	-	6	2.137	2.118	2.1275	98
1.3	-	6	2.164	2.160	2.1620	99
2.5	-	6	1.992	2.001	1.9965	92
5	-	6	1.810	1.813	1.8115	83
0	+	6	2.116	2.117	2.1165	100
0.3	+	6	1.989	2.086	2.0375	96
0.6	+	6	2.132	2.115	2.1235	100
1.3	+	6	2.099	2.073	2.0860	99
2.5	+	6	2.108	2.100	2.1040	99
5	+	6	2.056	2.059	2.0575	94
0	-	24	2.094	2.129	2.1115	100
0.3	-	24	1.927	2.073	2.0000	92
0.6	-	24	1.868	1.924	1.8960	87
1.3	-	24	1.641	1.700	1.6705	77
2.5	-	24	1.269	1.455	1.3620	65
5	-	24	0.519	0.539	0.5290	25

* NC = not counted

5) 시험방법

시험은 원칙적으로 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호(2005. 10. 21.)을 기준으로 실시하였다 (Table 3).

(1) 직접법 I

지름이 25 cm²인 Plate에 4000 cells/ml의 세포를 5 ml씩 분주하여 약 3일간 배양하였다. 시험물질을 6시간 처리하며, 시험물질을 투여시 기존 배양

액을 제거하고 신선한 배양액 (37 °C) 을 4.5 ml 을 각 Flask에 분주한 후 시험물질용액 (500 µl) 을 분주하여 5 ml이 되도록 처리하였다. 6시간 후 배양액을 제거하고 5 ml의 신선한 배양액 (37°C) 으로 세포층을 1회 세척한 후 제거하고 다시 배양액을 5 ml을 분주하여 18시간 동안 추가 배양을 시작하였다.

(2) 직접법 II

면적이 25cm²인 Flask에 4000 cells/ml의 세포를 5 ml씩 분주하여 약 3일간 배양하였다. 시험물질 을 투여 시 기존 배양액을 제거하고 신선한 배양 액 (37°C) 을 4.5 ml을 각 Flask에 분주한 후 시험 물질용액 (500 μl) 을 분주하여 5 ml이 되도록 처 리하였다. 처리 후 24시간 배양하였다.

(3) 대사활성화법

지름이 25 cm²인 Flask에 4000 cells/ml의 세포를 5 ml씩 분주하여 약 3일간 배양하였다. 시험물질 을 6시간 처리하며, 시험물질 투여시 기존 배양액 을 제거하고 신선한 배양액 (37°C) 을 4.0 ml을 분주한 후 시험물질용액 (500 μl) 및 S 9 Mix (500 μl)를 분주하여 5 ml이 되도록 하였다. 6시간 후 배양액을 제거하고 5 ml의 신선한 배양액 (3 7°C) 으로 세포층을 1회 세척한 후 제거하고 다시 배양액을 5 ml을 분주하여 18시간 동안 추가 배양 을 시작하였다.

Table 3. Constituent of experimental groups

구분	세포접종수 /25 cm ² Flask	시험물질 투여시기	시험물질 노출시간	추가 배양시간
직접법	20,000	접종후 4일째	6 and 24시간	18 and 0시간
대사활 성화법	20,000	접종후 4일째	6시간	18시간

Administration Concentration and Dose, *Sipjeondaebotang*: 500 μl, Negative control: 500 μl Positive control: 500 μl.

6) 염색체 표본의 제작

모든 Flask에 대해 시험물질 처리 개시로부터 약 24시간 후에 Colcemid를 100 μl씩 각각의 Flask에 처리하여 2시간 경과 후 중기세포를 수거 하여 염색체 표본을 제작하고, 5% giemsa액으로 염색한 후 염색체 이상을 계수하였다.

7) 염색체 이상의 관찰

(1) 관찰방법

각 Flask 당 100개의 분열중기세포를 관찰하여 다음의 종류별로 분류하였다. 이상의 유발율은 염 색체에 이상을 갖는 세포의 출현율을 나타낸다. 관찰은 코드화한 표본을 이용한 맹검법으로 행하 였다.

(2) 구조이상

- ① gap (염색분체형, 염색체형) : g
- ② 절단 (염색분체형) : ctb
- ③ 교환 (염색분체형) : cte
- ④ 절단 (염색체형) : csb
- ⑤ 교환 (염색체형) : cse

(3) 수적이상

- ① 수적이상 : po

(4) 관찰기준

① gap

염색되지 않은 부분이 염색분체의 종축위에 있 어 그 폭이 염색분체의 두께정도로 그 구분이 명 확한 것.

② 절 단

절단은 염색분체의 종축으로 부터 떨어져 있는 것. 동일선상에 있어도 그 폭이 염색분체의 께의 2배를 넘는 것. 염색체형의 절단은 동원체를 갖지 않는 염색체가 있기 때문에 명확 하게 판정할 수 있는 것만을 헤아렸다.

③ 교 환

1개 또는 여러 개의 염색체의 2부위 사이에서 생긴 절단이 서로 결합한 것. 염색체형에 관 하여는 환상, 이동원체 등 명확하게 판정할 수 있 는 것만을 헤아렸다.

④ 수적이상

CHL과 같은 세포주 세포에서는 어느정도 염색 체에 변이가 있으므로 이수성(aneuploidy) 의 검 색은 하지 않았다. 배수성 (polyploidy) 만 검색하 였다. CHL세포에서의 mode는 25개이며 4배수체 인 경우 50개가 되나 3배수체를 포함하는 37개 이 상을 배수체로 간주하였다. 또한 핵내 배가 (endoreduplication)를 나타내는 것은 배수체로 분

류되나 다수 관찰되는 경우는 그 점을 명시해 두었다.

⑤ 기 타

fragmentation : 교환형을 갖지 않고, 많은 염색체에 gap, 절단 등이 있는 것.

8) 시험결과 판정

Chinese Hamster 섬유아세포의 경우 일반적으로 음성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현율이 3%를 초과하는 일이 거의 없다. 따라서 다음의 기준에 따라 염색체이상을 최종 판단한다.

- ① 5 % 미만 -
- ② 5 % 이상 ~ 10% 미만 ±
- ③ 10 % 이상 +

단, 용량의존성이 확인되지 않는 경우, 용매대조군에서 염색체이상 출현율이 이상적으로 높은 경우에는 재시험을 실시한다.

III. 결 과

1. 직접법(-S9 Mix)

6시간 시험물질처리에서의 염색체이상빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 µg/ml의 처리 농도에서 각각 1.0 %, 1.5 %, 0.5 % 및 1.0 %의 빈도를 나타내었다(Table 4).

24시간 시험물질처리 후의 염색체이상빈도는 음성대조군, 625, 1250 및 2500 µg/ml의 처리 농도에서 각각 1.0 %, 1.0 %, 1.0 % 및 1.5 %의 빈도를 보였다(Table 5).

위의 결과로 보아 시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상 빈도는 판정치로 볼 때 모두 5 %미만이였다.

Table 4. Result of Chromosome aberration test - Without Metabolic Activation(-S9, 6 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (µg/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent(%) of cells showing structural aberration									
						Gap		Chromatid type		Chromosome type		Others	Total		Judgement
						g	ctb	cte	csb	cse	-g		+g		
Negative Control	6	0	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			100	0		1	1	0	0	1	2				
			200	0(0.0)		1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)				
Test item	6	1250	100	0	-	0	1	1	0	0	0	2	2	-	
			100	0		0	1	0	0	1	1				
			200	0(0.0)		0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)				
		2500	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	1	-
			100	0		0	1	0	0	1	1				
			200	0(0.0)		1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)				
5000	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	1	-		
	100	0		1	1	0	0	1	2						
	200	0(0.0)		1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	3(1.5)						
Positive Control (MMC)	6	0.5 (µg/mL)	100	3	-	29	41	64	1	0	0	106	135	+	
			100	2		32	41	53	1	0	95	127			
			200	5(2.5)		61(30.5)	82(41.0)	117(58.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	201(100.5)	262(131.0)		

g, gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; MMC, mitomycin C; (), 평균치

Table 5. Result of Chromosome aberration test - Without Metabolic Activation(-S9, 24 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (µg/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent(%) of cells showing structural aberration									
						Gap		Chromatid type		Chromosome type		Others	Total		Judgement
						g	ctb	cte	csb	cse	-g		+g		
Negative Control	24	0	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			100	0		1	1	0	0	0	1	2			
			200	0(0.0)		2(1.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	4(2.0)			
Test item	24	625	100	0	-	2	1	0	0	0	0	1	3	-	
			100	0		1	1	0	0	0	1	2			
			200	0(0.0)		3(1.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	5(2.5)			
		1250	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			100	1		1	1	0	0	1	2				
			200	1(0.5)		2(1.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	4(2.0)			
2500	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-			
	100	0		1	2	0	0	2	3						
	200	0(0.0)		2(1.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	5(2.5)					
Positive Control (MMC)	24	0.05 (µg/mL)	100	1	-	19	42	57	0	0	0	99	118	+	
			100	1		22	39	61	1	0	0	101	123		
			200	2(1.0)		41(20.5)	81(40.5)	118(59.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	200(100.0)	241(120.5)		

g, gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; CPA, cyclophosphamide; (), 평균치

2. 대사활성화법(+S9 Mix)

대사활성화법에서의 염색체이상 빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 µg/ml의 처리 농도에서

각각 1.0 %, 1.0 %, 0.5 % 및 0.5 %로 판정치와 비교하여 볼 때 시험물질 투여군은 모두 5 % 미만의 염색체이상 빈도를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Result of Chromosome aberration test - With Metabolic Activation(+S9, 6 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (µg/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent(%) of cells showing structural aberration									
						Gap		Chromatid type		Chromosome type		Others	Total		Judgement
						g	ctb	cte	csb	cse	-g		+g		
Negative Control	6	0	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			100	0		0	1	0	0	1	1				
			200	0(0.0)		1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	3(1.5)			
Test item	6	1250	100	1	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			100	0		0	1	0	0	1	1				
			200	1(0.5)		1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	3(1.5)			
		2500	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			100	0		1	0	0	0	0	1				
			200	0(0.0)		2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	3(1.5)			
5000	100	1	-	1	0	0	0	0	0	0	1	2	-		
	100	0		1	0	0	0	1	2						
	200	1(0.5)		2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	3(1.5)					
Positive Control (CPA)	6	10 (µg/mL)	100	2	-	21	34	61	0	0	0	95	116	+	
			100	1		27	29	42	1	0	0	72	99		
			200	3(1.5)		48(24.0)	63(31.5)	103(51.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	167(83.5)	215(107.5)		

g, gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; CPA, cyclophosphamide; (), 평균치

IV. 고 찰

시험물질 십전대보탕의 염색체 이상을 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 Lung Cell (CHL) 을 이용하여 직접법 (S9 Mix)과 대사활성화법 (+S9 Mix) 의 염색체 이상 시험을 실시하였다. 시험물질은 멸균증류수에 희석하여 사용하였다. 시험물질의 투여농도는 세포 증식의 약 50 % 억제율 기준으로 결정하였으며, 시험물질의 최대 농도는 직접법과 대사활성화법의 경우 모두 5000 µg/ml을 최고 농도로 하여 시험하였다. 즉 본 시험에서 사용한 시험물질의 농도는 1250, 2500 및 5000 µg/ml의 3단계 시험농도와 음성 및 양성대조시험을 포함하여 총 5군의 시험 군에 대해 염색체이상을 직접법과 대사활성화법에서 관찰 계수하였다. 직접법에서는 6시간 시험물질처리에서의 염색체 이상빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 µg/ml의 처리 농도에서 각각 1.0 %, 1.5 %, 0.5 % 및 1.0 %의 빈도를 나타내었고, 24시간 시험물질처리 후의 염색체이상빈도는 음성대조군, 625, 1250 및 2500 µg/ml의 처리 농도에서 각각 1.0 %, 1.0 %, 1.0 % 및 1.5 %의 빈도를 보였다. 대사활성화법에서의 염색체이상 빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 µg/ml의 처리 농도에서 각각 1.0 %, 1.0 %, 0.5 % 및 0.5 %의 빈도를 나타내었다.

위의 결과로 보아 시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상 빈도는 판정치로 볼 때 모두 5 %미만이였다.

V. 결 론

십전대보탕을 처리한 모든 군에서 염색체 이상을 가진 중기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 따라서 시험물질 십전대보탕은 본 시험조건 하에서 CHL 세포의 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로

사료된다.

참고문헌

1. Saiki I. A Kampo medicine "Juzen-taiho-to" -prevention of malignant progression and metastasis of tumor cells and the mechanism of action. *Biol Pharm Bull* 2000;23:677-688.
2. Ohnishi Y. Fujii H. Hayakawa Y. Yamamura T. Sakamoto T. Tsukada K. Fujimaki M. Nunome S. Komatsu Y. Saiki I. Oral administration of a Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res*:1998;89:206-213.
3. Saiki I. Yamamura T. Ohnishi Y. Hayakawa Y. Komatsu Y. Nunome S. HPLC analysis of juzen-taiho-to and its variant formulations and their antimetastatic efficacies. *Chem. Pharm. Bull*:1999;47:1170-1174.
4. Matsumoto T. Sakurai M. H. Kiyohara H. Yamada H. Immunopharmacol. Orally administered decoction of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To" modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. *Immunopharmacol*:2000;46:149-161.
5. Miyagami M. Katayama Y. Improvement of host-immunity by adjuvant therapy with juzen-taiho-to for patients with brain tumors. *No Shinkei Geka*:2003;31:401-409.
6. Utsuyama M. Seidler H. Kitagawa M. Hirokawa K. Immunological restoration and anti-tumor effect by Japanese herbal medicine in aged mice. *Mech. Ageing Dev*:2001;122:341-352.
7. Ohnishi Y, Fujil H, Kimura F, et al. Inhibitory

- effect of traditional Chinese medicine Juzentailio-to on progressive growth of weakly malignant clone cells derived from murine fibrosarcoma. *Jpn J Cancer Res*: 1996;87:1039-1044.
8. Maruyama H, Takemoto N, Maruyama N, Kornatsu Y, Kawamura H. Antitumor effect of Juzen-taiho-to, a kampo medicine, combined with surgical excision of transplanted Meth-A fibrosarcoma. *Int J Immunother*:1993;9:117-125.
 9. Zhang YH, Kato M, Isobe K, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes. *Cell Immunol*. 1995;162:97-104.
 10. Ohnishi Y, Fujil H, Kimura F, et al: Inhibitory effect of traditional Chinese medicine Juzentailio-to on progressive growth of weakly malignant clone cells derived from murine fibrosarcoma. *Jpn J Cancer Res*.1996;87; 1039-1044.
 11. Hisha H, Yamada H, Sakurai MH, Kiyohara H, Li Y, Yu C, Takemoto N, Kawamura H, Yamaura K, Shinohara S, Komatsu Y, Aburada M, Ikehara S. Isolation and identification of hematopoietic stem cell-stimulating substances from Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-taiho-to. *Blood*:1997; 90:1022-1030.
 12. Dai Y, Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Akhand AA, Hossain K, Suzuki H, Nakashima I. T-cell-immunity-based inhibitory effects of orally administered herbal medicine juzen-taiho-to on the growth of primarily developed melanocytic tumors in RET-transgenic mice. *J Invest Dermatol*:2001;117: 694-701.
 13. Kiyohara H, Yamada H, Takemoto N, Kawamura H, Komatsu Y, Oyama T. Characterization of in vitro IL-2-production-enhancing and anticomplementary pectic polysaccharides from Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to. *Phytotherapy Res*: 1993;7:367-375.
 14. Iijima K, Sun S, Cyong JC, Jyonouchi H: Juzen-taiho-to, a Japanese herbal medicine, modulates type-1 and type-2 T cell responses in old BALB/c mice. *Am J Chin Med*:1999 ;27:191-203.
 15. Matsumoto T, Yamada H: Orally administered kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to modulates cytokine secretion in gut associated lymphoreticular tissues in mice. *Phytomedicine*:2000;6:425-430.
 16. Matsumoto T, Matsumi H, Sakurai H, Kiyohara H, Yamada H. Orally administered decoction of kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. *Immunopharmacology*:2000;46:149-161.
 17. Ishidate. M. Jr, Data book of chromosomal aberration test in vitro, revised edition, Life Science Information Center, 1987;pp31-46.
 18. Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, and K.Yohsikawa, 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.
 19. 의약품등의 독성시험방법(식품의약품안전청고시 제 2005-60호, 2005).
 20. OECD guidelines for the testing of chemicals, No. 473 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test' (1997).