

Mouse(ICR)에 있어서 시험물질 熱多寒少湯 추출액의 급성독성 시험

마진열* · 황대선** · 이시우[†] · 김종열[†] · 신현규**

한국한의학연구원

*한의학융합연구본부, **표준화연구본부, [†]체질의학연구본부

Abstract

Acute Toxicity Study on Yeoldahanso-tang in Mice

Ma Jin-Yeul Ma* · Huang Dae Sun** · Lee Siwoo[†] · Kim jong-Yeol[†] · Shin Hyeun-Kyoo**

Korea Institute of Oriental Medicine

*TKM Converging Research Division **Standard Research Division [†]Constitutional Medicine Research Division

1. Objectives

This study was designed to analyze the acute toxicity and safety of Yeoldahanso-tang.

2. Methods

We investigated the acute toxicity for water-extracted Yeoldahanso-tang. 25 male and 25 female mice were observed for 14 days after one day oral administration of Yeoldahanso-tang at the respective doses of 0(control group), 2560, 3200, 4000 and 5000 mg/kg.

3. Results

We observed survival rates, general toxicity, change of body weight and autopsy.

4. Conclusions

The data confirmed that Yeoldahanso-tang is free from the toxicity and safety problems in oral route respectively. Compared with the control group, we could not find any toxic alteration in all treated groups(2560, 3200, 4000 and 5000 mg/kg). In conclusion, LD50 of Yeoldahanso-tang was over 5000 mg/kg and it is very safe to mice.

Key Words : Yeoldahanso-tang, acute toxicity, safety, LD50

I. 緒 論

熱多寒少湯은 중국의 고문헌¹⁾에서는 그 용례를 찾을 수가 없고 사상의학에서 太陰人의 肝燥熱證의 裏症에 해당하는 각종 질환을 치료하는 처방으로 『東醫壽世保元』 갑오본에서는 사용례가 나타나지 않으며 『東醫壽世保元』 신축본에서 熱多寒少湯의 사용례가 나오는데 大黃을 더하여 사용하기도 하였다²⁾. 熱多寒少湯은 葛根, 黃芩, 蘘本, 蘿菘子, 桔梗, 升麻, 白芷의 7종 약재로 구성된 처방으로 임상에서는 太陰人의 증풍 등 성인병에 다용되고 있다³⁾. 熱多寒少湯에 관한 연구로는 베타 glucuronidase을 억제하는 간 보호 효과⁴⁾, 간 기능에 미치는 영향⁵⁾, Balb/c rat에서 allergy성 접촉피부염을 유발하여 손상피부에 미치는 영향⁶⁾, 熱多寒少湯과 淸肺瀉肝湯의 활용에 대한 임상적 연구⁷⁾, Hydrogen Peroxide에 의해 손상된 배양 해마신경세포에 미치는 영향⁸⁾, 저산소성 대뇌신경세포 손상에 미치는 영향⁹⁾, 인간뇌성상세포에서 세포활성물질생성 조절에 관한 연구¹⁰⁾, XO/HX에 의해 손상된 배양척수감각신경세포에 미치는 효과¹¹⁾ 등이 있고 熱多寒少湯을 응용한 연구로는 아토피 피부염 환자의 임상 변화에 대한 연구¹²⁾가 있다.

한약처방은 안전성에 관한 문제가 항상 대두되어 왔다. 최근의 한의학계에서는 근거중심의학에 대한 소비자의 욕구를 충족시키기 위한 연구로 사군자탕, 사물탕, 팔물탕, 십전대보탕 등의 급성독성¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾과 아급성독성¹⁷⁾¹⁸⁾에 대한 실험 등의 연구가 활발하게 진행되고 있으나 사상처방에 대한 급성독성 실험은 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구자는

太陰人의 대표 처방인 熱多寒少湯으로 한약의 일반적인 복용형태인 경구 투여에 의한 급성독성시험에 대한 연구로 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II 試驗方法

1. 검액의 제조

熱多寒少湯의 급성독성시험을 하기 위하여 식품의약품안전청고시 제1999-61호(1999년 12월 22일)의 '의약품등의독성시험기준'을 변형하여 실시하였다.

한약처방 熱多寒少湯의 한약재는 대한약전 및 대한약전외한약(생약)규격집을 기준으로 다음과 같이 구매하여 전탕하였다(Table 1).

熱多寒少湯의 구성은 『東醫壽世保元』¹⁹⁾을 참고하였으며 추출은 경서기계산업의 열수추출기(COSMOS 660)를 사용하여 100℃에서 120분간 전탕*한 후 여과하여 농축기(Eyela N-11)로 농축 후 동결건조기(일신립 PVTFD100R)를 사용하여 실험에 사용하여 29.0%의 수율로 분말 시료를 얻었다.

시료의 보관은 -20℃에서 냉동보관하여 실험전에 해동하여 사용하였고 사용 후 남은 시료는 한국한의학연구원에 보관 중이다.

2. 실험동물 및 사육환경

4주령의 ICR Mouse(오리엔트, 서울시 금천구가 산동 459-24)를 사용하였다. 3주령의 마우스를 입

Table 1 Prescription of Yeoldahanso-tang.

No	Herbal name	Scientific name ¹³⁾	Ratio(%)
1	葛根	Puerariae Radix	33.3
2	黃芩	Scutellariae Radix	16.7
3	蘘本	Angelicae Tenuissimae Radix	16.7
4	蘿菘子	Raphani Semen	8.3
5	桔梗	Platycodonis Radix	8.3
6	升麻	Cimicifugae Rhizoma	8.3
7	白芷	Angelicae Dahuricae Radix	8.3
Total			100%

Table 2 Experimental Groups.

Sex	Group	Number of animals	No.	Volume of Medication (ml/kg)	Dose (mg/kg)
Male	C	5	1~5	10	0
	T1	5	6~10	10	2560
	T2	5	11~15	10	3200
	T3	5	16~20	10	4000
	T4	5	21~25	10	5000
Female	C	5	26~30	10	0
	T1	5	31~35	10	2560
	T2	5	36~40	10	3200
	T3	5	41~45	10	4000
	T4	5	46~50	10	5000

수하여 7일간 실험동물실에서 순화하고 마우스의 체중을 측정 한 후 2 g 간격으로 구분하여 암·수 각각 25마리씩 건강한 동물을 선정하여 각 군에 5마리씩 균등한 체중으로 분배되도록 순위화한 체중과 난수를 이용한 무작위법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모의 색소염색법과 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 환기횟수 10~20회/hr. 및 조도 150~300 Lux로 조정하여 일정한 사육환경을 유지하였으며 실험동물용 고품사료(삼양사료주식회사)와 물은 자유섭취 조건으로 한국한의학연구원 실험동물실에서 시험하였다.

3. 실험 군 및 한약재 투여

4주령 마우스에 대한 단회 투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 암·수 마우스를 각각 5개의 용량군으로 나누었다.

투여 경로는 한방 임상에서 사용하는 경구 투여법을 사용하였으며 경구 투여 가능 최대용량인 5000 mg/kg/day을 기준으로 공비 0.8로 하여 0, 2560, 3200, 4000 및 5000 mg/kg의 용량으로 단회 경구 투여하고 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및

부검소견을 관찰하였다(Table 2).

4. 시험물질의 투여

熱多寒少湯 추출 분말 10 g을 멸균증류수 20 ml에 녹여 고농도(T4군)로 사용하였으며, 나머지군은 주사용 멸균 증류수를 첨가하여 차례로 희석하여 투여 물질로 사용하였다.

투여방법은 피부 고정법으로 고정하고 경구 투여용 금속제 sonde와 주사관을 이용하여 투여 당일 투여당일의 측정된 체중을 기준으로 하여 각각의 군별 투여량에 맞게 투여액량을 계산하여 오전에 개체별로 1회 위내에 강제 경구 투여하였다.

5. 임상증상 및 부검

실험동물의 임상 증상관찰은 투여당일은 최종 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고, 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

6. 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 경구 투여 개시 전과 투여 후 1, 3, 7일과 부검 직전인 14일에 체중 측정을 하였다.

* 식품의약품안전청고시 제 2003-17호, 의약품유효성안전성심의규정.

Table 3 Mortality of male and female ICR mice treated orally with Yeoldahanso-tang.

SEX	Dose (mg/kg)	Days after treatment					Final Mortality	LD50 (mg/kg)
		0	1	3	7	14		
Male	C Vehicle	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T1 2560	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T2 3200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T3 4000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T4 5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	C Vehicle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T1 2560	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T2 3200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T3 4000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	T4 5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* Values are expressed as number of dead animals/number of animals examined.

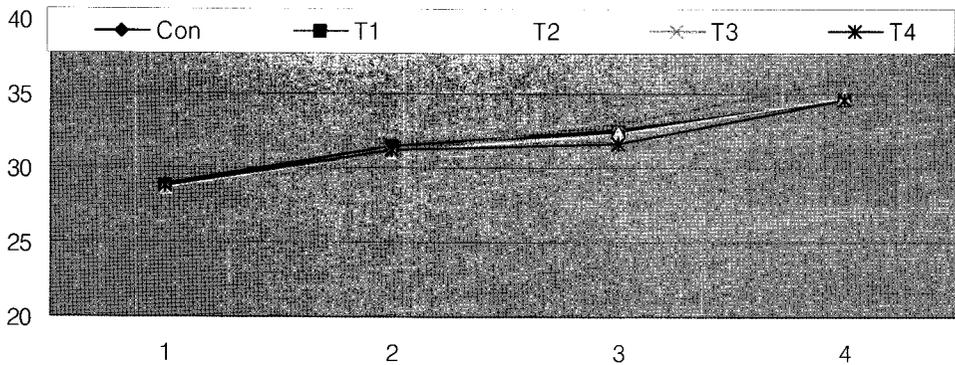


Fig. 1. Mean body weight changes of male ICR mouse orally treated with Yeoldahanso-tang(**p<0.01). Con; Control group, T1; Extraction of Yeoldahanso-tang 2560mg/kg(day) medication group, T2; Extraction of Yeoldahanso-tang 3200mg/kg(day) medication group, T3; Extraction of Yeoldahanso-tang 4000mg/kg(day) medication group, T4; Extraction of Yeoldahanso-tang 5000mg/kg(day) medication group.

7. 부검소견관찰

투여 후 14 일째에 모든 생존동물의 외관 이상 유무를 관찰하였으며, 내부 장기의 이상 유무는 Ether 마취 하에서 개복한 후에 복대동맥을 절단하여 방혈 처사 시킨 후 육안으로 관찰하였다.

8. 통계학적 방법

모든 실험군에서 동물측정용 저울을 이용하여 체중을 측정하여 평균과 표준 편차를 구하였다. 용매 대조군과 처치군 사이의 통계학적 유의차는 Dunnett

test에 의하여 검정하였고, p<0.05를 실험군간의 유의성 있는 차이로 판정하였다. 그리고 사망동물이 관찰되지 않아 LD50 값의 산출은 실시하지 않았다.

III. 結 果

(1) 사망률 및 LD50값

熱多寒少湯을 경구 투여한 후 암수 ICR 마우스를 14일 동안 관찰한 결과 사망동물과 LD50 값은 Table

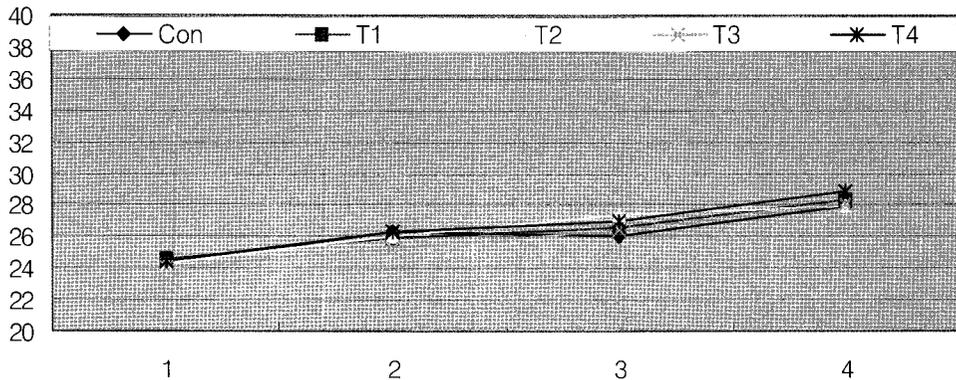


Fig. 2. Mean body weight changes of female ICR mouse orally treated with Yeoldahanso-tang(**p<0.01). Con; Control group, T1; Extraction of Yeoldahanso-tang 2560mg/kg(day) medication group, T2; Extraction of Yeoldahanso-tang 3200mg/kg(day) medication group, T3; Extraction of Yeoldahanso-tang 4000mg/kg(day) medication group, T4; Extraction of Yeoldahanso-tang 5000mg/kg(day) medication group.

3과 같다. 본 시험에서 경구 투여의 최대용량인 5000 mg/kg까지 투여하여도 ICR 마우스의 사망은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 LD₅₀값은 암수 모두 5000 mg/kg 이상으로 사료된다(Table 3).

(2) 체중변화

熱多寒少湯을 경구로 단회투여한 후 체중 증감의 변화는 암컷(Fig. 1.)과 수컷(Fig. 2.) 모두 대조군과 시료투여군간의 차이 없이 정상적인 체중의 증가가 관찰되었다.

(3) 일반증상

熱多寒少湯을 투여한 경구 투여급성독성시험의 일반증상을 관찰한 결과는 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았다(Table 4).

(4) 부검조건

부검조건에서는 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견이 관찰되지 않았다(Table 5).

5. 고찰 및 결론

한약은 많은 연구에서 간독성이나 중금속 등의 문제에서 안전하다는 결과²⁰⁾는 물론 한방병원 입원환자의 한약 복용에 의한 간보호 효과²¹⁾ 등의 유효한 연구 결과가 나왔지만 한약의 안전성에 대한 끊임 없는 문제제기가 되고 있다.

본 연구는 熱多寒少湯 추출 분말가루에 대한 단회 경구 투여 독성시험을 ICR 계통의 Mouse 암수컷에 각각 0, 2560, 3200, 4000 및 5000 mg/kg 용량으로 경구 투여하고 14일간의 사망률, 일반증상, 체중의 변화 및 부검소견을 관찰하여 독성증상 발현 여부를 관찰하였다. 본 시험에서 시험물질 熱多寒少湯 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD₅₀값은 5000 mg/kg을 훨씬 상회할 것으로 사료된다.

체중변화에 있어서 모든 실험군에서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으며, 외관 및 부검결과 내부장기의 육안적 이상소견도 관찰되지 않았으며, 시험동물에서 사망례가 없어서 평균치사량 산출은 불가능하였다.

이상의 실험결과에서 熱多寒少湯 추출 분말약의 LD₅₀은 실험동물 마우스 암수컷에 경구 투여가 5000 mg/kg 이상으로 저독성인 안전한 물질로 사료되나 임상에서는 原方을 기준으로 加減된 것이 많이 사용되므로 앞으로 포괄적인 연구가 필요하다.

IV. 感謝의 글

본 연구는 한의학연구원에서 지원한 '표준한방처방 EBM 구축사업에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Table 5 Autopsy finding in ICR Mouse orally treated with Yeoldahanso-tang

Dose(mg/kg)	C(Vehicle)		T1(2560)		T2(3200)		T3(4000)		T4(5000)	
	male	female	male	female	male	female	male	female	male	female
Liver	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Heart	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Spleen	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Lung	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Kidney	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Stomach	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* Values are expressed as number of animals with the sign/number of animals examined.

Table4 Clinica signs in male and female ICR mice treated orally with Yeoldahanso-tang.

SEX	Dose (mg/kg)	Signs							
		Loss of Fur	Diarrhea	Polyuria	Soft Stool	Decreased Motor Activity	Tremor	Edema	
Male	C Vehicle	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T1 2560	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T2 3200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T3 4000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T4 5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Female	C Vehicle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T1 2560	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T2 3200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T3 4000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	T4 5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

* Values are expressed as number of animals with the sign/number of animals examined.

V. 参考文献

1. 文淵閣四庫全書電子版, 原文及全文檢索板 上海人民衛生出版社. 1999. 中國, 迪志文化出版有限公司.
2. 김달래. 동의수세보원갑오구분. 도서출판목과토, 서울, 2002:214-215, 218.
3. 김형태. 신편동의수세보원. 도서출판 정담, 서울, 1999:74-75, 81.
4. Bae HS, Km YS, Cho KH, Kim JJ, Lee HU, Kim DH. Hepatoprotective activity of re duo-hanxiao-tang (Yeoldahanso-tang) is related to the inhibition of beta-glucuronidase. Am

5. j Chin Med. 2003;31(1):111-7.
5. 김태환, 홍솔이, 한다님, 임은철. 열다한소탕이 간기능에 미치는 영향. 사상체질의학회지. 2007;19(3):217-226.
6. 김만식, 박성식. Allergy성 접촉피부염이 유발된 백서의 손상피부에 열다한소탕 전탕액이 미치는 영향. 사상체질의학회지. 2002;14(3):97-113.
7. 황지호, 장은수, 유중향, 이시우. 열다한소탕과 청폐사간탕의 활용에 대한 임상적 연구. 한국한의학 연구원논문집. 2008;14(2):101-106.
8. 이재홍, 박혜선, 김경오, 고기덕, 김일환. 열다한소탕 전탕액이 Hydrogen Peroxide에 의해 손상된

- 배양 해마 신경세포에 미치는 영향. 사상체질학회지. 2002;14(1):79-89.
9. 박수정, 김형순, 배영춘, 이상민, 김경요, 원경숙, 김규현. 열다한소탕이 저산소성 대뇌신경세포 손상에 미치는 영향. 사상체질학회지. 2003;15(1):72-89.
 10. 최지숙, 김경요, 김형민, 주종천. 인간 뇌성상세포에서 열다한소탕에 의한 세포활성물질 생성 조절에 관한 연구. 사상체질의학회지. 2001;13(1):61-69.
 11. 홍정아, 김경요, 유도곤, 박혜선, 김형순. 열다한소탕 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양척수 감각신경세포에 미치는 효과. 사상체질의학회지. 2001;13(1):88-96.
 12. 정환수, 이진용. 가미열다한소탕 투여후 아토피 피부염 환자의 임상상 변화에 대한 연구. 대한한방소아과학회지. 2001;15(2):177-188.
 13. 대한약전 제2007-89호 및 대한약전외한약(생약)규격집 2007-90호, <http://kfda.go.kr/>
 14. 마진열, 황대선, 유영법, 하혜경, 신현규. ICR 마우스를 이용하여 사물탕의 급성 독성에 관한 연구. 대한방제학회지. 2007;15(2):113-117.
 15. 마진열, 황대선, 이남현, 하혜경, 유영법, 신현규. SD 랫트를 이용한 십전대보탕의 급성독성연구. 한의학연구원논문집. 2008;22(5):1192-1195.
 16. 마진열, 황대선, 유영법, 하혜경, 신현규. ICR 마우스를 이용하여 팔물탕의 급성독성에 관한 연구. 대한본초학회지. 2007;22(2):13-16.
 17. 마진열, 유영법, 하혜경, 황대선, 신현규. SD 랫트를 이용하여 사군자탕의 아급성 독성에 관한 연구. 한국한의학연구원논문집. 2007;13(3):151-156.
 18. 마진열, 유영법, 하혜경, 황대선, 신현규. SD Rat를 이용하여 팔물탕의 4주 반복투여 독성에 관한 연구. 대한본초학회지. 2007;22(4):59-64.
 19. 이제마. 동의수세보원. 행림출판, 서울, 1996:123.
 20. 이시형, 박정섭, 여현수, 최유경, 전찬용, 박종형, 김동우. 입원환자 한약투여와 약인성 간손상과의 관계. 대한한방내과학회지. 2006;27(3):572-578.
 21. 김재관. 청폐사간탕과 구성약물의 CCl4 유발에 의한 간독성 및 β -glucuronidase 억제 효과. 경희대학교 대학원 박사학위 논문. 2001.