

Original Article

유산균 발효 쌍화탕에 대한 단회 투여 경구 독성 및 유전 독성 연구

정태호, 심기석, 김동선, 이재훈, 마진열*

한국한의학회연구원 신한방제제연구센터

Single Dose Oral Toxicity and Genotoxicological Safety Study of *Ssanghwa-tang* Fermented with *Lactobacillus acidophyllus*

Tae-Ho Chung, Ki-Shuk Shim, Dong-Seon Kim, Jae-Hoon Lee, Jin-Yeul Ma*

Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Expo-ro, Yuseong-gu, DaeJeon, 305-811, Korea

Objectives: The purpose of this study was to examine the single dose toxicity with oral administration and genotoxicities of *Ssanghwa-tang* fermented with *Lactobacillus acidophyllus*.

Materials and Methods: Clinical signs, weight changes, lethal doses(LD₅₀), and postmortem evaluation were determined by Globally Harmonized Classification System(GHCS) in a single-dose oral toxicity study. *In vitro* mammalian chromosomal aberration test was conducted with Ames test by cell proliferation suppression assessment using the cultivated CHO-K1(Chinese hamster ovary fibroblast) origins. Bacterial reversion assay was performed using *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and *Escherichia coli* (WP2uvrA). *In vivo* micronucleus test was performed using ICR mouse bone marrow.

Results: No clinical sign was observed and none of the groups with doses up to 2000 mg/kg showed significant acute oral toxicity in the single dose oral administration. None of the sample doses taken during the 6 to 18 hour groups showed significant aberrant metaphases comparing to the negative control group in the *in vitro* mammalian chromosomal aberration test. No evidence of mutagenicity was seen for *Escherichia coli* (WP2uvrA) or *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, and TA1537). No significant increase in the frequency of micronuclei was seen in the micronucleus test.

Conclusion: These results indicate that the LD₅₀ value of *Ssanghwa-Tang* fermented with *Lactobacillus acidophyllus* may be over 2000 mg/kg and it have no acute oral toxicity and genotoxicity.

Key Words : *Ssanghwa-Tang*, fermentation, *Lactobacillus acidophyllus*, acute oral toxicity, genotoxicity

서론

전통 처방의 하나인 쌍화탕은 그 본방이 동의보감 처방서인 방약합편에 수재되어 있는 약재로 그 조성생약은 백작약, 숙지황, 황기, 당귀, 천궁, 계피

및 감초의 7가지로 되어 있다^{1,2)}. 방약합편에 의하면, 기혈을 보하고 피로회복과 허한 것을 다스리는 것으로 알려져 있어 한방에서는 일반적으로 심력이 피로하고 기와 혈이 모두 손상되었거나, 큰 병 후 보혈을 위해 사용하고 있다. 최근 쌍화탕의 주요 효능으

• Received : 11 October 2010

• Revised : 3 January 2011

• Accepted : 5 January 2011

• Correspondence to : 마진열(Jin Yeul Ma)

대전광역시 유성구 엑스포로 483 한국한의학회연구원 신한방제제연구센터

Tel : +82-42-868-9466, Fax : +82-42-868-9573, E-mail : jyama@kiom.re.kr

로 간보호 효과^{2,3)}, 항 피로효과⁴⁾, 항 염증효과^{5,6)}, 항 경련효과⁷⁾ 등이 증명된 바 있어 쌍화탕 처방을 활용한 신약 및 기능성 식품으로의 응용 연구의 가능성을 제시하고 있다.

한약재(韓藥材), 또는 생약재(生藥材)는 전통의학의 치료수단인 동시에 우리나라의 대표적인 신도불이 농산물이라 할 수 있으며, 이러한 한약재를 신약 개발에 응용함으로써 특정 생리작용을 통한 상승효과를 가져올 수 있다. 최근 전 세계적으로 현대 의학을 보완하는 대체의학에 대한 관심이 높아짐에 따라 부작용이 적은 천연물 소재의 의약대체품이 주목받고 있다^{8,9)}. 한방 약재의 경우 한국의 전통 의학 분야는 외국과 비교하여 상대적 우위를 확보하고 있어, 국제 경쟁력 확보가 가능한 원천기술의 보고로 주목받고 있다⁸⁾.

생물전환(Bio-transformation)법^{10,11)}은 *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* 등의 미생물을 이용하여 의도적으로 생합성을 통한 새로운 구조의 신물질을 개발하고자 하는 방법으로, 최근 한방 처방을 응용하여 과학적인 표준화를 이루어 냄과 동시에, 천연 생리활성물질 탐색 및 효능 강화 연구의 일환으로 효소나 유산균 등을 이용한 생물전환 신소재가 개발되고 있어 한방 처방을 응용한 신약 개발 연구에 힘을 실어주고 있다¹⁰⁾. 특히 미생물 유래의 생물 전환 기법을 응용한 천연 생리활성물질의 개발은 전통 의학 분야에서 사용되어온 발효 기법을 응용하여 한방 처방약재를 통해 국가 경쟁력 향상에 이바지하는 선도 물질을 확보할 수 있다는 장점이 있다^{8,11)}.

최근 한방처방에 대한 독성 평가가 활발하여 위경탕¹²⁾, 형개연교탕¹³⁾, 당귀보혈탕¹⁴⁾, 태음조위탕¹⁵⁾ 등에 대해 각종 독성 실험이 수행되었다. 쌍화탕의 경우 잠재적 활용도 및 연구가 무궁무진함에도 불구하고, 가미쌍화탕¹⁾에서만 급성 및 아급성 독성 실험이 수행되었을 뿐, 쌍화탕의 발효 산물의 경우는 안전성에 대한 연구가 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 최근 제기되고 있는 한방처방의 오남용으로 인한 독성과 안전성 문제에 대한 자료를 확보하기 위하여 유산균 발효 쌍화탕에 대해 급성 경구 투여 독성 평가 및

유전 독성평가의 일환으로 염색체 이상 시험, 미생물 복귀 돌연변이 시험, 소핵시험을 실시하였다.

실 험

본 시험은 식품의약품안전청 고시 제2009-183호(2009년 12월 22일) ‘비임상시험관리기준’, 고시 제2009-116호(2009년 08월 24일) ‘의약품등의 독성시험기준’, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 471 ‘Bacterial Reverse Mutation Test’(Adopted: 21st July 1997), No. 473. ‘in vitro Mammalian Chromosome Aberration Test’ (Adopted: 21st July 1997), No.474 , 그리고 ‘한국건설생활환경시험연구원 표준작업지침서(KCL/MIC)’에 준하여 실시하였다.

1. 시험물질의 조제 및 발효

쌍화탕은 백작약, 숙지황, 황기, 당귀, 천궁, 계피, 감초, 생강 및 대추를 추출하여 제조되는 한방 제제로서 1첩을 기준으로 하여 50첩을 제조하여 실험에 사용하였다. 총 한약재 50첩의 함량은 1,674 g 으로의 10배량인 16.74 l의 증류수에 넣어 150분간 열탕 추출한 후(한국, 경서추출기 cosmos-600), 표준 시험용 체(standard testing sieve, Aperture 500 μm와 150 μm)를 이용하여 탕제를 여과하여 쌍화탕을 제조하였다. 또한, 여과한 탕제에 1% 불륨(v/v)의 유산균(*Lactobacillus acidophyllus*, 1-5×10⁸ CFU/ml)을 첨가하고 37℃에서 48시간 동안 발효시킨 뒤 상기 표준 시험용 체로 여과하여 쌍화탕의 유산균 발효물을 제조하였다. 발효 한약재는 동결 건조한 후 사용하기 전까지 4℃에 보관하였으며, 각 실험에서는 동결건조 분말을 정량하여 시험에 적정한 용매로 용해시킨 후 각각의 농도단계에 맞게 동일 용매를 사용하여 희석 조제하였다.

2. 단회 투여 경구 독성 시험

7주령된 Sprague-Dawley(SD) 계통의 특정병원균

부재(SPF) 랫드를 (주)코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)에서 암수 각각 22마리씩을 구입하였다. 1주일간의 적응기를 둔 다음 수컷 194.17~207.69 g, 암컷 166.56~216.52 g의 체중의 SD 랫드를 각각 20마리씩 실험에 투입하였다. 본 시험은 온도 20.4~22.0°C, 상대습도 55.1~58.5%, 환기횟수 10~15회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 269 Lux 조건하에 수행되었다. 사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고품사료(Harlan, 미국)를 급이기를 이용하여 자유 섭취시켰다.

경구투여시의 독성을 알아보기 위하여 실시한 본 실험에서, 투여 전 하루 밤 동안 절식시켜 위 내용을 비운 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였으며, 약 4시간 후 사료를 재 급여 하였다. 투여 당일 측정한 체중을 기준으로 10ml/kg으로 투여액량을 계산하였으며 1회/일 투여하였다. 고전적인 단회 경구투여 한계용량으로 가장 많이 사용되는 2000mg/kg의 용량을 설정하여 2배수 간격으로 시험군을 설정하였다. 모든 동물에 대하여 매일 1회 일반 증상관찰을 실시하였으며, 투여 당일에는 투여 직후 및 이후 6시간까지 매시간 마다 관찰하였다. 일반증상관찰은 투여 후 14일까지 실시하였다. 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 1,3,7 및 14일에 체중을 측정하였다. 시험물질을 노출시킨 모든 시험동물은 투여 후 14일째에 부검을 실시하였다. CO₂ 가스를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대동맥을 절단하여 방혈 치사 시킨 후 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

자료의 통계처리에 있어, 체중변화는 일원배치 분산 분석을 이용하여 군간 비교 하였다. 반수치사량 산출은 사망동물이 관찰되지 않아 실시하지 않았다. 단, 암컷 대조군 1마리(23번)에서 투여일에 측정된 체중(216.52g)이 군분리시 체중(188.86g)과 투여1일 체중(188.56g)과 비교했을 때, 측정오류로 판단되어 투여일 체중은 삭제한 후 통계처리 하였다.

3. 염색체 이상 시험

시험에 사용한 세포는 Chinese hamster 유래의 난

소유아세포(CHO-k1)를 이용하였으며, 사용한 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 구입하여 사용하였다. 배양액으로 10% Fetal Bovine Serum(GIBCO, Lot No. 679707)을 포함한 F-12 Nutrient Mixture(GIBCO, Lot No. 750333)를 사용하였으며, 5% CO₂, 37°C 배양조건에서 배양하여 3-4일마다 계대배양 하였다. 배가시간(Doubling time)은 약15시간, 염색체 수(mode)는 22개로 설정하였다. 10% Dimethylsulfoxide(DMSO)를 혼합한 배양액에 현탁시킨 세포를 냉동용 바이알에 넣어 -196°C(액체질소)에 보관하였다.

염색체이상시험에 있어서 적용할 시험물질의 처리농도를 결정하기 위한 세포 독성을 확인하기 위해 세포증식억제시험을 실시하였다. 시험물질은 5000 µg/ml를 최고농도로 하고 공비를 2로 하여 8개의 농도단계(39.06, 78.13 156.25, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/ml)를 적용하여 본시험 수행을 위한 최고농도를 결정하였다. 세포증식억제는 혈구계수기를 이용하여 세포생존수를 측정하고, 배양용기 당 세포수를 산출하였다. 용매대조군의 세포수를 100%로 하여 다음과 같이 세포증식률을 산출하였다.

$$RCC(\text{Relative Cell Count}) = (\text{No. of treated cells} / \text{No. of control cells}) \times 100 (\%)$$

염색체이상 시험은 세포증식억제시험에 의해 설정한 농도단계에 따라 실시하였으며, 각 처리농도에 따라 두 개의 plate를 사용하였다. 직접법(6 시간 처리 및 24 시간 처리방법)에서는 지름이 60 mm인 plate에 2×10⁴- 4×10⁴개의 세포를 분주하여 약 3일간 배양하였다. 6시간 처리군의 경우 시험물질 처리 개시로부터 6시간 경과 후 시험물질을 함유한 배양액을 제거하고 세포층을 PBS(Ca²⁺ & Mg²⁺ free Dulbecco's phosphate buffered saline)로 1회 세척한 후 미리 37°C로 가온한 신선한 배지 5ml를 가해 중기세포 수거 시까지 18시간 동안 추가 배양을 하여 염색체표본을 작성하였으며, 대사활성화법(6 시간 처리방법)에서는 지름이 60 mm인 plate에 2×10⁴-4×10⁴

개의 세포를 분주하여 약 3일간 배양하였다. 6시간 배양 후 배양액을 제거하고 세포층을 PBS(Ca^{2+} & Mg^{2+} free Dulbecco's phosphate buffered saline)로 1회 세척한 후 미리 37°C로 가온한 신선한 배지 5 ml를 가해 증기세포 수거 시 까지 18시간 동안 추가 배양을 하여 염색체표본을 작성하였다.

모든 Plate에 대해 시험물질 처리 개시로부터 약 22시간 후에 세포를 수거하였다. 세포들은 Carnoy's 고정액(acetic acid : methanol = 1 : 3)에 3회 고정한 후 염색체 표본을 제작하고 5% Giemsa(Merck, HX944140)액으로 5분간 염색한 후 염색체 이상을 계수하였다. 각 플레이트 당 100개의 분열중기세포를 관찰하여 다음의 종류별로 분류하여 계수하였다. 관찰은 코드화한 표본을 이용한 BLIND방법으로 행하였으며 염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본 환경돌연변이학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS) 판 "염색체이상 아틀라스(1988)"에 따라 다음과 같이 분류하였다. 염색체이상은 염색체형 절단(csb) 및 교환(cse)과 염색분체형 절단(ctb) 및 교환(cte)으로 구분하여 계수하였으며, 이상중기상(Aberrant metaphases)의 빈도 및 염색체이상의 수(Total aberration)는 gap을 포함한 경우(+gap)와 제외한 경우(-gap)를 구분하여 표시하였다. 염색체형의 절단은 동원체를 갖지 않는 염색체가 있기 때문에 명확하게 판정할 수 있는 것만을 헤아렸다. CHO-K1과 같은 세포주에서는 어느 정도 염색체에 변이가 있으므로 이수성(aneuploidy)의 검색은 하지 않았으며, 배수성(polyploidy)만 검색하였다. CHO-K1 세포에서의 mode는 22개이며 4배수체인 경우 44개가 되나 3배수체를 포함하는 37개 이상을 배수체로 간주하였다. 또한 핵내 배가(endoreduplication)를 나타내는 것은 배수체로 분류되나 다수 관찰되는 경우는 그 점을 명시해 두었다.

이상중기상(aberrant metaphases)의 빈도에 대한 통계처리는 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 473 등을 참조하여 gap을 제외한 숫자만을 대상으로 실시하였다. 먼저 각각의 중기상(metaphase)을 염색체이상이 없는 것(normal metaphase)과 1개 이상의 이상을 포함한 것(aberrant metaphases)

으로 나누고, 이상중기상의 빈도에 대해 다음과 같이 통계처리를 실시하였다. 또한 수적이 상에 대해서는 각 중기상을 배수체(PP, polyploidy) 및 핵내 배화(ER, endoreduplication)를 계수하여 그 빈도에 대하여 이상중기상과 동일한 방법으로 통계처리를 실시하였다. 음성대조군과 처리군의 비교는 Chi-square test를 실시하였으며, $p < 0.05$ 인 경우, 용량상 관성 검증 : Linear logistic regression test을 실시하였다. 음성대조군과 양성대조군의 비교 역시 Chi-square test를 실시하였으며, 시험물질 처리군에 있어서 염색체이상을 가진 이상중기상의 빈도가 음성대조군에 비해 확실히 증가하고, 그 작용에 재현성이 있으며 용량의존성을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다. 통계처리는 SPSS 12.1 program을 이용하였으며, $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

4. 미생물 복귀 돌연변이 시험

시험물질(KIOM-S164)의 복귀돌연변이원성 유무를 히스티딘 요구성 균주인 살모넬라균과 트립토판 요구성 균주인 대장균을 직접법과 대사활성화법을 이용하여 검색하였다. 시험에는 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA의 5균주를 이용하였다. 전 배양 시간은 10시간으로, 선회수 180회/분의 조건으로 진탕 배양하였다. 배양액량은 15ml이었으며, 접종균량은 30 μ l로 설정하였다. TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주의 경우 Bactor agar에 0.5mM Histidine/Biotin을 첨가한 배지를 사용하였으며, WP2uvrA 균주의 경우 Bactor agar에 0.5mM Tryptophan을 첨가한 배지를 사용하였다. S9 mixture는 필요량을 사용시 조제하였다.

시험의 실시는 preincubation법으로써 대사활성화계를 이용하는 방법과 대사활성화계를 이용하지 않는 방법을 병행하여 실시하였다. 콜로니 수의 측정에는 90mm직경의 plate(내경 86mm)에 생성된콜로니를 콜로니카운터(Suntex Model 570)를 사용하여 계수하였다. 생육저해유무의 확인은 육안으로 모든

plate를 관찰하여 확인하였으며, 단계회석법에 의한 생균수 측정방법에 의하여 균 농도를 측정하였다. S9 mix 및 시험물질용매를 0.1 ml씩 최소글루코즈 한천배지에 top agar를 증층시켜 37°C에서 48시간 배양 후 균이 자라지 않았음을 확인함으로써 무균적으로 시험이 수행되었음을 확인하였다.

시험의 결과는 각 플레이트의 복귀돌연변이 콜로니 수에 대한 실측값과 평균값 및 표준편차를 표시하였다. 결과의 판정은 대사활성계 존재 유·무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트 당 복귀된 집락 수에 있어서 농도 의존적이거나 하나 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 단, 음성대조군에 비해 2배 이상 명확히 증가함을 보여야 양성으로 판정하였다.

5. 소핵시험

소핵시험에 널리 사용되고 있는 7주령된 ICR 계통의 특정병원균 부재(SPF) 마우스를 코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)으로부터 공급받아 시험에 사용하였다. 예비시험과 본실험에서 각각 수컷 30 마리를 사용하였으며, 사육 환경 및 조건은 상동하게 설정하였다.

본시험에서의 투여농도와 골수채취시기를 결정하기 위하여 시험군을 용매대조군 1군, 투여군 3군(1250 mg/kg, 2500 mg/kg, 5000 mg/kg 투여군) 및 양성대조군 1군(Mitomycin C(MMC) 2.0 mg/kg)으로 구성된 5군에 대해 각 군당 3마리의 동물을 사용하였으며 이를 각각 투여 후 골수채취까지의 시간에 따라 24시간 군, 48시간 군으로 나누어 시험동물의 간이급성독성과 골수에서의 세포독성시험을 실시하였다.

예비시험 결과 모든 투여군에서 시험물질 독성에 의한 시험동물의 사망이 관찰되지 않았으며, 투여농도(1250 mg/kg, 2500 mg/kg, 5000 mg/kg) 및 투여 후 도살시기(24시간, 48시간)에 따라 관찰시, 뚜렷한 골수세포 증식억제는 보이지 않았으므로 본실험에서는 최고농도를 5000 mg/kg으로 하여, 용매대조군 1군, 투여군 3군(1250 mg/kg, 2500 mg/kg, 5000 mg/kg

투여군) 및 양성대조군(Mitomycin C(MMC) 2.0 mg/kg)으로 구성하고 각 군당 6마리의 마우스를 사용하였다.

골수 검체제작은 개체 당 3매의 슬라이드를 이용하여 제작하였다. 예비시험의 경우 시험물질 투여 24, 48시간 후, 본시험은 시험물질 투여 24시간 후 경추 탈골하고 되도록 혈액이 묻지 않게 하여 대퇴골을 적출하였다. FBS(Gibco, Lot No. 679707, Hyclone, Lot No. DVC0359)를 사용하여 골수세포를 원심관에 씻어 모았다. 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액은 버리고 소량의 FBS로 세포를 다시 현탁시켰다. 세포 현탁액을 슬라이드 글라스에 도말하여 실온에서 건조시킨 후 메탄올로 5분간 고정하였다.

골수세포증식을 관찰하기 위해, 즉 전체적혈구 중 다염성 적혈구의 비율을 관찰하기 위해 메탄올 고정시킨 표본을 4% Giemsa 액에 염색하였으며, 다염성 적혈구에 생성된 소핵을 관찰하기 위해서는 메탄올 고정시킨 표본에 acridine orange(40 µg/ml)로 점적하여 커버글라스를 덮어 염색하였다.

표본의 관찰은 맹검법(blind method)에 의해 실시하였다. 골수세포증식은 400배 이상 배율에서 광학현미경으로 관찰하였고, 다염성 적혈구에서의 소핵은 FITC filter가 장착된 형광현미경으로 관찰하였다. 골수세포의 증식현상을 관찰하기 위해서 세포의 도말상태가 좋은 곳을 선택하여 약 200개의 다염성 적혈구(PCE)와 정염성적혈구(NCE)를 관찰하여 그 중 다염성 적혈구의 비율, PCE/(PCE+NCE)을 측정하였다. 소핵빈도를 관찰하기 위해서는 다염성 적혈구(Polychromatic erythrocytes, PCE) 약 2,000개에서 소핵을 갖는 세포를 계수하였다. Giemsa 염색한 표본에서는 핵이 없이 열린 청색 빛을 나타내는 적혈구를 다염성 적혈구로 하였으며, acridine 염색한 표본에서는 관찰시야에서 핵이 없이 적색 형광빛을 나타내는 것을 다염성 적혈구로 하였다. 또한 Giemsa 염색한 표본에서 핵이 없이 열린 붉은 색 혹은 분홍색을 나타내는 적혈구를 정염성 적혈구로 하였으며, acridine 염색한 표본에서 정염성 적혈구는 형광빛

을 나타내지 않고 음영으로만 구분되는 것으로 하였다. 소핵의 판정기준은 제일 큰 것은 적혈구 직경의 1/2 크기의 것, 제일 작은 것은 식별이 가능한 것까지로 하였으며 주변 유핵세포의 핵과 동일하게 녹색 형광빛을 띠는 것으로 주로 원형이나 기타 도너츠형, 반원형 등의 형태의 것을 계수하였다.

시험물질을 투여한 동물에 대하여 투여당일 및 부검 시 각 1회 외관 관찰을 실시해 사망동물 및 이상 징후의 발생여부를 관찰하였으며, 동물의 체중 측정은 시험물질 투여 전과 부검 전에 실시하였다. 통계처리 및 판정에 있어, 소핵 유발빈도, PCE/(PCE+NCE) 비율은 음성대조군과 처리군의 비교를 위해 ANOVA test를, $p < 0.05$ 인 경우, 용량상관성 검증은 Linear logistic regression을, 음성대조군과 양성대조군의 비교는 ANOVA test를 실시하였다. 부검시 각 개체의 체중은 ANOVA test를, 유의한 경우 Dunnett T3 또는 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 양성판정의 기준은 모든 동물에 있어서 PCE/(PCE+NCE) 비율(Mean±SD)이 0.1 이상인 경우 시험이 타당한 것으로 하고, 소핵 유발빈도(MNPCE/2000PCEs, Mean±SD, %)가 통계학적으로 유의하며, 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다. 통계처리 결과 $P < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였으며, SPSS 12.1 통계프로그램을 이용하여 실시하였다.

결 과

1. 단회 투여 경구 독성 시험

단회 경구 투여 독성 시험 결과 실험기간 동안 사망동물이 관찰되지 않았으며, 특이한 일반 증상 역시 관찰되지 않았다. 체중측정결과 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 투여 후 14일에 500mg/kg 시험군의 평균체중이 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 그 외 군간 유의한 체중 변화는 관찰되지 않았다(Figure 1-2, Table 1-2). 실험종료 시 모든 생존 동물에 대하

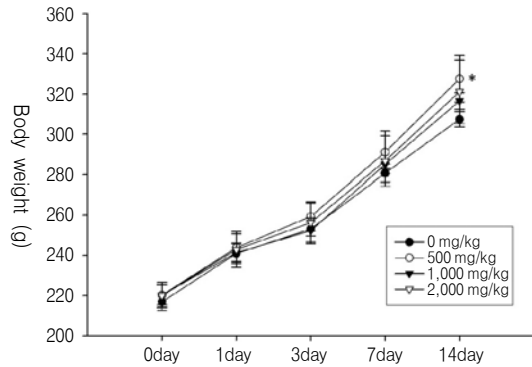


Fig. 1. Body weight changes of male rats in single dose toxicity study

*Represents a significant difference at $P < 0.05$ level compared with the vehicle control.

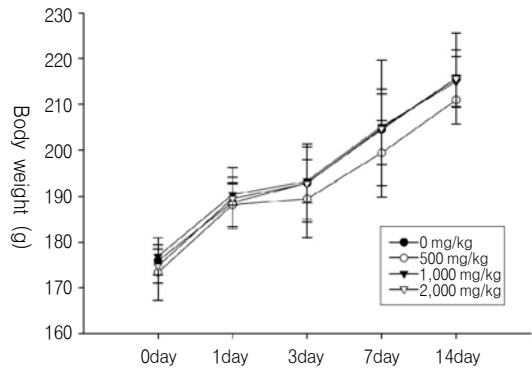


Fig. 2. Body weight changes of female rats in single dose toxicity study

여 부검을 실시하였으며, 부검 결과 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다.

2. 염색체 이상 시험

염색체이상 유발성 유무를 검색하기 위하여 Chinese hamster 유래의 난소유아세포(CHO-K1 cell)를 이용하여 직접법(-S9 mix)과 대사활성화법(+S9 mix)하에서 염색체이상시험을 실시하였다. 투여농도를 결정하기 위해 5000 $\mu\text{g/ml}$ 를 최고농도로 하여 8개의 농도단계(39.06, 78.13, 156.25, 312.5, 625, 1250,

Table 1. Body Weight Changes of Male Rats in Single Dose Toxicity Study

		Summary of body weights (Grams)					
Study : GT10-00059 Group Dose	Animal No.	Sex : Male					
		0-day	1-day	3-day	7-day	14-day	
G1 (0 mg/kg)	1	213.46	237.00	250.00	277.93	308.59	
	2	212.36	238.06	250.89	276.90	311.99	
	3	216.81	237.09	251.03	277.68	309.77	
	4	222.53	247.22	256.35	285.26	303.26	
	5	219.31	245.47	257.80	285.97	303.77	
	Mean	216.89	240.97	253.21	280.75	307.48	
	S.D.	4.18	4.96	3.58	4.47	3.82	
	N	5	5	5	5	5	
	G2 (500 mg/kg)	6	220.45	248.81	266.13	302.84	342.80
		7	214.10	240.87	256.75	285.02	321.77
8		216.65	234.77	249.28	278.70	313.42	
9		224.27	242.93	257.83	287.89	324.76	
10		225.78	252.06	266.99	301.40	335.56	
Mean		220.25	243.89	259.40	291.17	327.66	
S.D.		4.94	6.79	7.33	10.55	11.59	
N		5	5	5	5	5	
G3 (1,000 mg/kg)		11	215.89	239.39	249.30	282.44	313.67
		12	214.91	237.84	245.41	284.19	320.73
	13	216.54	238.60	249.02	285.75	321.50	
	14	225.31	241.92	257.14	284.27	312.97	
	15	228.68	249.23	260.94	288.77	314.10	
	Mean	220.27	241.40	252.36	285.08	316.59	
	S.D.	6.28	4.64	6.43	2.37	4.16	
	N	5	5	5	5	5	
	G4 (2,000 mg/kg)	16	218.15	241.08	250.07	278.15	313.73
		17	217.30	235.58	250.45	277.13	308.49
18		217.55	236.29	249.13	279.50	307.66	
19		216.85	244.44	260.55	293.92	333.81	
20		230.17	257.52	271.57	305.40	342.22	
Mean		220.00	242.98	256.35	286.82	321.18	
S.D.		5.70	8.90	9.69	12.43	15.82	
N		5	5	5	5	5	

Table 2. Body Weight Changes of Female Rats in Single Dose Toxicity Study

Summary of body weights (Grams)						
Study : GT10-00059 Group Dose	Sex : Female					
	Animal No.	0-day	1-day	3-day	7-day	14-day
G1 (0 mg/kg)	21	168.65	180.09	181.21	198.51	222.21
	22	176.97	191.37	197.18	203.53	208.25
	23	-	188.56	186.62	195.83	218.28
	24	177.97	189.20	199.17	213.04	209.64
	25	180.25	194.37	200.33	211.70	219.69
	Mean	175.96	188.72	192.90	204.52	215.61
	S.D.	5.06	5.33	8.50	7.69	6.27
	N	5	5	5	5	5
	G2 (500 mg/kg)	26	166.64	179.83	180.00	191.91
27		169.29	189.15	186.87	197.51	212.59
28		172.23	189.67	183.87	193.98	207.23
29		177.42	191.85	198.18	205.94	206.91
30		181.47	190.62	198.56	207.46	219.57
Mean		173.41	188.22	189.50	199.36	210.97
S.D.		6.03	4.80	8.46	7.01	5.31
N		5	5	5	5	5
G3 (1,000 mg/kg)		31	174.73	189.84	186.19	192.41
	32	176.15	188.31	195.39	214.64	220.34
	33	171.80	188.70	194.26	203.61	218.06
	34	179.78	191.28	191.90	205.82	209.05
	35	182.14	193.96	198.63	209.33	218.27
	Mean	176.92	190.42	193.27	205.16	214.96
	S.D.	4.09	2.29	4.64	8.26	5.46
	N	5	5	5	5	5
	G4 (2,000 mg/kg)	36	173.13	189.40	191.73	201.86
37		171.10	181.48	185.32	190.57	208.14
38		173.37	187.14	189.75	202.12	210.75
39		176.01	190.22	191.41	199.17	210.29
40		180.47	199.63	205.97	230.03	232.48
Mean		174.82	189.57	192.84	204.75	215.66
S.D.		3.61	6.58	7.77	14.89	9.92
N		5	5	5	5	5

- : Error of measurement

2500, 5000 $\mu\text{g/ml}$)를 적용하여 세포증식억제시험을 실시하였으며, 각각의 농도에서 생존세포수를 측정한 다음 음성대조군의 세포수를 100%로 하여 세포증식률(RCC)을 산출하였다.

직접법의 경우 24시간 처리군에서는 처리농도 2500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 29.82% 및 47.95%의 세포생존율을 나타내었으며, 6시간 처리군에서는 5000 $\mu\text{g/ml}$ 과 2500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 20.73% 및 51.22%의 세포생존율을 나타내었다. 24시간 처리군 및 6시간 처리군에 있어서 세포증식률을 고려해 24시간 연속처리군은 1250 $\mu\text{g/ml}$ 를 본시험의 최고농도로 선정하였으며, 6시간처리 18시간 회복군은 2500 $\mu\text{g/ml}$ 을 본시험의 최고농도로 선정 하였다.

대사활성법을 이용하여 6시간 시험물질을 처리한 경우, 처리농도 312.5 $\mu\text{g/ml}$ 과 156.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 46.56% 및 49.62%의 세포생존율을 나타내었다. 대사활성법을 이용한 6시간 처리 18시간 회복군에 있어서 세포증식률을 고려해 156.25 $\mu\text{g/ml}$ 를 본시험의 최고 농도로 선정하였다. 세포증식억제시험 결과를 고려해 최고농도를 결정하여 공비2의 3단계로 본시험의 농도를 다음과 같이 설정하였다.

직접법(-S9 mix, 24시간 연속처리군) : 312.5, 625, 1250 $\mu\text{g/ml}$

직접법(-S9 mix, 6시간 처리 18시간 회복군) : 625, 1250, 2500 $\mu\text{g/ml}$

대사활성법(+S9 mix, 6시간 처리 18시간 회복군) : 39.06, 78.13, 156.25 $\mu\text{g/ml}$

염색체이상시험 결과, 직접법에서의 이상중기상(aberrant metaphase, gap-)의 빈도는 24시간 처리군의 음성대조군, 312.5, 625, 1250 $\mu\text{g/ml}$ 농도단계에서 각각 0.5, 0.5, 0.5, 1.0의 빈도를 나타내었으며, 6시간 처리 18시간 회복군에서는 음성대조군, 625, 1250, 2500 $\mu\text{g/ml}$ 농도단계에서 각각 0.5, 0.5, 0.5, 0.0의 빈도를 나타내었다(Figure 3-4, Table 3). 대사활성화법에서의 이상중기상(aberrant metaphases, gap-)의 빈도는 음성대조군, 39.06, 78.13, 156.25 $\mu\text{g/ml}$

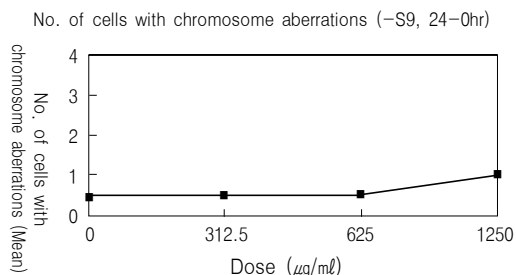


Fig. 3. The number of cells with chromosome aberrations in the absence of S9 mix (24 hours treatment)

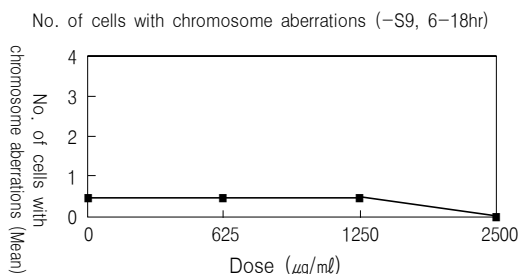


Fig. 4. The number of cells with chromosome aberrations in the absence of S9 mix (6 hours treatment)

ml 농도단계에서 각각 0.0, 0.0, 0.5, 1.5의 빈도를 나타내었다. 배수성(PP) 및 핵내배화(ER)는 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다(Figure 5, Table 4).

3. 미생물복귀돌연변이 시험

발암성 유발 유·무 판단을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 미생물복귀돌연변이 시험을 실시하였으며, 시험에는 *Salmonella typhimurium*의 히스틴인 요구성 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA를 이용하였다. 본시험에서의 적용농도의 결정을 위하여 5000 $\mu\text{g/plate}$ 를 최고농도로 하여 공비2의 5단계 농도군으로 농도결정시험을 실시한 결과, 대사활성계를 적용에 관계없이 모든 균주에서 생육저해는 관찰되지 않았다. 농도결정시험 결

Table 3. The Number of Cells with Chromosome Aberrations in the Absence of S9 Mix

Exposure ^{a)}	S9 mix	Dose c	No. of total chromosome aberrations (Mean)		No. of cells with chromosome aberrations (Mean)		PP+ER (Mean)
			(-)Gap	(+)Gap	(-)Gap	(+)Gap	
24-0	-	Negative control	0.5	0.5	0.5	0.5	0
	-	312.5	0.5	1	0.5	1	0
	-	625	0.5	1	0.5	1	0
	-	1250	1	2	1	2	0
-	MMC (0.04)	29	30	28*	29	0	
6-18	-	Negative control	0.5	0.5	0.5	0.5	0
	-	625	0.5	0.5	0.5	0.5	0
	-	1250	0.5	0.5	0.5	0.5	0
	-	2500	0	0	0	0	0
-	MMC (0.04)	25.5	27	23.5*	24.5	0	

* Significantly different from the negative control at $P < 0.05$

^{a)} Treatment time-recovery time

MMC: Mitomycin C (0.04 μ g/ml)

PP: Polyploidy

ER: Endoreduplication

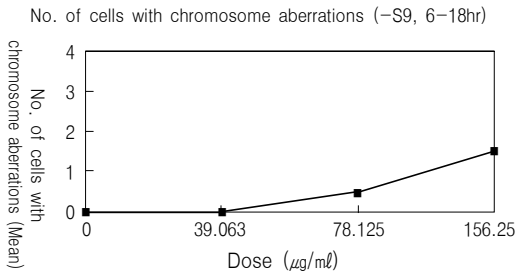


Fig. 5. The number of cells with chromosome aberrations in the presence of S9 mix (6 hours treatment)

과를 바탕으로 실시된 본시험 결과, 대사활성계 적용에 관계없이 모든 군주에서 생육저해는 관찰되지 않았으며 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가도 관찰되지 않았다(Figure 6-7, Table 5). 시험물질 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위한 무균시험 결과 미생물에 의한 오염은 없었다. 한편, 양성대조군 및 음성대조군에서는 각각의 군주에서 양성 및 음성으로 판단한 수치범위에서 복귀집락수가 유발되었

으므로 본 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다.

4. 소핵시험

소핵 유발빈도 및 세포독성에 있어, 개체 당 약 2,000개의 PCE에서 관찰된 MNPCE의 유발빈도는 용매대조군, 1250, 2500, 5000 mg/kg 및 양성대조군의 순으로 평균 0.08%, 0.09%, 0.17%, 0.17% 및 4.81%를 나타내었다. 즉 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 용매대조군에 비해 모든 투여군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 양성대조군인 Mitomycin C 투여군의 소핵유발빈도는 용매대조군에 비해 통계적으로 유의성을 나타내었다 ($p < 0.01$). 세포독성의 지표인 개체 당 약 200개의 전적혈구(PCE+NCE)에서 관찰된 다염성적혈구(PCE)의 비율은 용매대조군, 1250, 2500, 5000 mg/kg 및 양성대조군의 순으로 평균 0.44, 0.43, 0.46, 0.50 및 0.42로 용매대조군과 비교하여 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았다(Table 4). 동물실험 결

Table 4. The Number of Cells with Chromosome Aberrations in the Presence of S9 Mix

Exposure ^{a)}	S9 mix	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of total chromosome aberrations (Mean)		No. of cells with chromosome aberrations (Mean)		PP+ER (Mean)
			(-)Gap	(+)Gap	(-)Gap	(+)Gap	
	+	Negative control	0	0	0	0	0
	+	39.06	0	0	0	0	0
6-18	+	78.13	0.5	1	0.5	1	0
	+	156.25	1.5	2.5	1.5	2.5	0
	+	CPA(10)	27.5	28.5	26.5*	27.5	0

* Significantly different from the negative control at $P < 0.05$

^{a)} Treatment time-recovery time

CPA: Cyclophosphamide · H₂O (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

PP: Polyploidy

ER: Endoreduplication

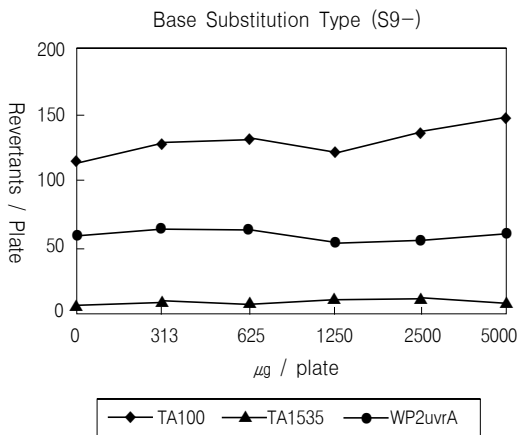


Fig. 6. Dose-response curve of revertant colonies in differential bacterial strains with S-9 mix (TA100, TA1535, WP2uvrA)

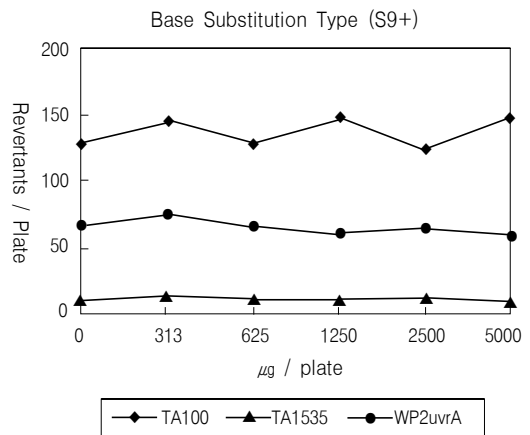


Fig. 7. Dose-response curve of revertant colonies in differential bacterial strains without S-9 mix (TA100, TA1535, WP2uvrA)

과, 모든 시험물질 투여군에서는 용매대조군과 비교하여 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다. 또한 각 군의 투여후의 체중을 비교한 결과 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 6).

고 찰

최근 중국산 한약재의 수입과 대량 생산으로 오

염에 대한 독성 문제가 심각한 사회문제로 대두됨에 따라 한약재 및 한방 제제의 독성에 대한 문제가 폭 넓게 제기되어 한의학계 스스로의 독성평가에 대한 실험연구가 요구되고 있다. 전통 처방의 하나인 쌍화탕은 그 분방이 동의보감 처방서인 방약합편에 수재되어 있는 약재로 그 조성생약은 백작약, 숙지황, 황기, 당귀, 천궁, 계피 및 감초의 7가지로 되어 있다. 최근 쌍화탕의 여러 효능이 증명된 바 있으며, 쌍화탕 원방의 안전성이 밝혀진 바 있다. 그러나 최

Table 5. Results of Bacterial Reverse Mutation Test

Metabolic activation	Dose (ug/plate)	Number of colony / plate				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix(-)	0	108	8	47	9	5
		124	6	61	15	5
		110	6	69	10	4
	Mean±SD	114±8.7	7±1.2	59±11.1	11±3.2	5±0.6
	313	126	8	67	13	4
		127	7	65	17	6
		131	8	61	18	6
	Mean±SD	128±2.6	8±0.6	64±3.1	16±2.6	5±1.2
	625	137	7	70	11	3
		137	9	61	12	5
		121	4	57	10	2
	Mean±SD	132±9.2	7±2.5	63±6.7	11±1.0	3±1.5
	1250	134	15	50	12	4
		125	7	57	13	4
		106	7	54	14	6
	Mean±SD	122±14.3	10±4.6	54±3.5	13±1.0	5±1.2
	2500	143	10	59	10	9
		150	15	54	18	8
119		12	53	16	3	
Mean±SD	137±16.3	12±2.5	55±3.2	15±4.2	7±3.2	
5000	151	9	67	14	7	
	148	7	54	10	11	
	145	7	61	20	5	
Mean±SD	148±3.0	8±1.2	61±6.5	15±5.0	8±3.1	
S9Mix(+)	0	96	18	58	23	3
		130	8	66	31	2
		160	8	75	15	7
	Mean±SD	129±32.0	11±5.8	66±8.5	23±8.0	4±2.6
	313	142	14	75	21	8
		158	17	73	15	5
		139	11	76	8	3
	Mean±SD	146±10.2	14±3.0	75±1.5	15±6.5	5±2.5
	625	125	10	65	16	4
		142	12	61	16	3
		122	10	73	18	7
	Mean±SD	130±10.8	11±1.2	66±6.1	17±1.2	5±2.1
	1250	147	9	62	28	4
		147	13	60	24	5
		149	11	60	16	6
	Mean±SD	148±1.2	11±2.0	61±1.2	23±6.1	5±1.0

Metabolic activation	Dose (ug/plate)	Number of colony / plate				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix(+)	2500	124	12	56	19	4
		131	13	81	19	9
		116	10	56	20	4
	Mean±SD	124±7.5	12±1.5	64±14.4	19±0.6	6±2.9
	5000	151	9	53	15	5
148		10	48	23	8	
145		10	77	25	6	
Mean±SD	148±3.0	10±0.6	59±15.5	21±5.3	6±1.5	
S9Mix(-)	Positive controls	AF-2	NaN3	AF-2	AF-2	9-AA
	Dose (ug/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colony	481	312	482	458	2110
		510	333	586	533	2056
		530	290	454	482	2162
Mean±SD	507±24.6	312±21.5	507±69.6	491±38.3	2109±53.0	
Positive controls	Positive controls	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose (ug/plate)	1	2	10	1	2
	Number of colony	722	170	389	310	114
		774	178	395	365	172
		636	183	408	331	148
Mean±SD	711±69.7	177±6.6	397±9.7	335±27.8	145±29.1	

근 미생물 유래의 생물 전환 기법의 일환으로 전통 의학 분야에서 사용되어온 발효 기법을 응용하여 한 방 처방약재를 발효를 통해 효능을 강화하고 복용을 용이하게 하려는 시도가 이루어지고 있음에도 불구하고, 아직 발효 쌍화탕의 안전성 연구 데이터는 전무한 실정이다. 이에, 본 실험에서는 단회투여 경구 독성 실험과 유전독성실험으로서의 염색체이상 시험, 미생물복귀 돌연변이 시험, 소핵시험을 통해 유산균 발효 쌍화탕의 안전성을 확보하고자 하였다.

단회투여 경구 독성시험 결과, 모든 시험군에서 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 체중측정결과 모든 시험동물에서 정상적인 체중증

가가 관찰되었고, 투여 후 14일에 500mg/kg 시험군의 평균체중이 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였으나, 용량의존성 및 성별 상관성을 보이지 않아 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단되었다. 그 외 군간 유의한 체중변화는 관찰되지 않았으며, 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견이 관찰되지 않아 유산균 발효 쌍화탕의 반수치사량(LD50, Lethal Dose 50)은 2,000mg/kg 이상으로 사료된다.

유산균 발효 쌍화탕의 염색체이상 유발성 유무를 검색하기 위하여 Chinese hamster 유래의 난소유아 세포(CHO-K1 cell)를 이용하여 직접법(-S9 mix)과

Table 6. Results of Micronucleus Assay

Sampling time(hrs)	Groups	Dose (mg/kg)	Animal No.	MNPCE/2000 PCEs (Mean±SD,%)	PCE/(PCE+NCE) (Mean±SD)
24	Vehicle control	0	1	0.05	0.43
			2	0.10	0.39
			3	0.00	0.46
			4	0.10	0.50
			5	0.05	0.40
			6	0.20(0.08±0.07)	0.45(0.44±0.04)
	KIOM-S164	1250	7	0.10	0.49
			8	0.10	0.33
			9	0.05	0.38
			10	0.10	0.45
			11	0.05	0.47
			12	0.15(0.09±0.04)	0.48(0.43±0.06)
		2500	13	0.30	0.51
			14	0.20	0.46
			15	0.10	0.44
			16	0.05	0.42
			17	0.30	0.47
			18	0.05(0.17±0.12)	0.48(0.46±0.03)
	5000	19	0.10	0.51	
		20	0.10	0.50	
		21	0.30	0.48	
		22	0.10	0.49	
		23	0.25	0.51	
		24	0.15(0.17±0.09)	0.50(0.50±0.01)	
	MMC	2.0	25	4.90	0.43
			26	5.75	0.40
			27	5.00	0.40
			28	4.60	0.36
			29	4.10	0.47
			30	4.50(4.81±0.56)**	0.45(0.42±0.04)_

Vehicle : Saline

** Significantly different from the control at P<0.01(One-way ANOVA)

Abbreviations

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MMC : Mitomycin C

Table 7. Body Weights of Animals in Micronucleus Assay

Sampling time(hrs)	Groups	Dose (mg/kg)	Animal No.	Body weight (gram, Mean±S.D)	
				Administration	Sacrifice
24	Vehicle control	0	6	32.98±1.01	37.27±0.83
		1250	6	31.99±1.33	35.52±2.55
	KIOM-S164	2500	6	32.21±.71	36.92±1.02
		5000	6	33.30±0.80	37.08±1.26
	MMC	2.0	6	32.54±0.83	36.36±0.79

Vehicle : Saline

MMC : Mitomycin C

대사활성화법(+S9 mix)하에서 염색체이상시험을 실시하였다. 예비시험을 통해 본 시험의 처리농도를 결정한 다음, 본시험에서 시험물질에 의한 염색체의 구조적 및 수적이상을 알아보기 위해 시험물질을 처리하여 이상중기상(aberrant metaphases)을 계수한 결과, 직접법의 24시간의 모든 처리군(312.5, 625, 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 있어서 이상중기상(aberrant metaphases)의 빈도가 음성대조군과 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었으며, 직접법의 6시간 처리군(625, 1250, 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 있어서도 이상중기상(aberrant metaphases)의 빈도가 음성대조군과 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다. 또한, 대사활성화법(+S9 mix) 적용군의 모든 처리군(9.06, 78.13, 156.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 이상중기상(aberrant metaphases)의 빈도가 음성대조군과 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없어 CHO-K1 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

발암성 유발 유·무 판단을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 미생물복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 시험에는 Salmonella typhimurium의 히스티딘 요구성 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 Escherichia coli의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA를 이용하였다. 시험물질은 멸균증류수에 용해하여 사용하였으며, 대사활성에 의한 경우와 대사활성에 의하지 않은 경우를 적용하였다. 본

시험에서의 적용농도의 결정을 위하여 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고농도로 하여 공비2의 5단계 농도군으로 농도결정시험을 실시한 결과, 대사활성계를 적용에 관계없이 모든 균주에서 생육저해는 관찰되지 않았다. 농도결정시험 결과를 바탕으로 본 시험에서 대사활성화에 의하지 않은 경우와 대사활성화에 의한 경우 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도를 최고농도로 하고 공비를 2로 하여 5 단계 농도군으로 본시험을 실시하였다. 본시험 결과, 대사활성계 적용에 관계없이 모든 균주에서 생육저해는 관찰되지 않았으며 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가도 관찰되지 않았다. 시험물질 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위한 무균시험 결과 미생물에 의한 오염은 없었다. 한편, 양성대조군 및 음성대조군에서는 각각의 균주에서 양성 및 음성으로 판단한 수치범위에서 복귀집락수가 유발되었으므로 본 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있으며, 이상의 결과를 종합하여 판단하였을 때, 유산균 발효 쌍화탕은 본 시험조건 하에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

유전독성을 평가하기 위하여 수컷 마우스(ICR mouse) 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였으며, 예비시험 결과, 모든 시험물질 투여군에서 용매대조군과 비교하여 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 투여농도(1250 mg/kg, 2500 mg/kg, 5000 mg/kg) 및 투여 후 도살시기(24시간, 48시간)에 따라 관찰 시, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 수는 용매대조

군과 비교해 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았다. 예비시험의 결과를 기초로 5000 mg/kg를 최고 투여농도로 하고 부검 및 검체제작시기를 투여 후 24시간으로 본시험을 실시하였다. 그 결과 시험물질 투여군(1250 mg/kg, 2500 mg/kg, 5000 mg/kg)에서 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 수는 용매대조군과 비교하여 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았다. 개체 당 약 2,000개의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵유발빈도는 모든 시험물질투여군(1250 mg/kg, 2500 mg/kg, 5000 mg/kg)에서 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다. 한편 양성대조군은 소핵유발빈도에서 용매대조군에 비해 통계적으로 유의하며 현저한 증가를 보였다($P<0.01$). 시험물질 투여 후 모든 투여군에서 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았으며, 이상의 결과를 종합하여 볼 때 유산균 발효 쌍화탕은 본 시험의 조건하에서 마우스의 골수세포의 소핵형성에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

결론적으로, 전통 처방의 하나인 쌍화탕을 발효 기법을 응용하여 발효시킨 유산균 발효 쌍화탕은 단회투여 경구시험, 염색체 이상시험, 미생물 복귀 돌연변이 시험 및 소핵 시험 모든 결과에서 안전성이 뒷받침된 우수한 발효 한방 탕제라 할 수 있다.

감사의 말씀

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 K10050의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

1. Shin KH, Lee EB, Chung MS, Kim OJ, Yoon KY. The acute and subacute toxicities and pharmacobgical actions of *Gami Ssanghwa* Tang preparations. Korean Journal of Pharmacognosy. 1990;21(2):179-185.
2. Lee JH, Ma CJ, Ha HK, Jeon WK, Park HY, Ma JY. Efficacy of fungus-fermentated Ssanghwatang on liver protection in SD male rats treated with CCl4. Korean Journal of Oriental Medicine. 2008;14(1):137-143.
3. Sohn NW. Histochemical Study for the Effect of Ssanghwatang on the Glycogen Contents in Liver and Muscle of Rats. Journal of Herbology. 1994;9(1):115-125.
4. Park WK, Park SD. Effects of Ssanghwa-tang on the Antifatigue Action and Brain Levels of Norepinephrine, Serotonin, 5-hydroxyindole-acetic acid and Dopamine. The Journal of Jaehan Oriental Medical Academy. 1995;1(1):130-145.
5. Kim IH, Hwang GJ. Studies on the Anti-inflammatory Activities of "Ssangwha-Tang". Korean Journal of Pharmacognosy. 1981;12(3): 131-135.
6. Jung JC, Park DK. Studies on CNS-Depression and Antiinflammatory Action of Ssangwhatang. Journal of Pharmaceutical Investigation. 1986; 16(1):24-30.
7. Han DS, Lee HK, Cho HJ. Analgesic and Anticonvulsionary Effects of "Ssanghwa-Tang". Koreaqn Journal of Phamacognosy. 1983;14(2): 60-63.
8. Min SK. Korean traditional medicines as novel drugs for neuropsychiatric disorders. Korean Journal of Psychopharmacology. 2007;18(1): 5-17.
9. Lee MK, Lee JS, Kwack SJ, Kim JM, Kang TS, Lee JH, et al. Analysis and Stability test of the Extract of Coptidis Rhizoma and Salviae Miltiorrhizae Radix for Toxicity Study. Korean Journal of Pharmacognosy. 2009;40(3):184-189.
10. Moon SW, Park MS, Ahn JB, Ji GE. (2003) Quality characteristics of chocolate blended with Bifidobacterium-fermented isoflavone powder. Korean Journal of Food Science Technology. 6: 1162-1168.
11. Choi HJ, Kim EJ, Han MJ, Baek NI, Kim DH,

- Jung HG, et al. Hepatoprotective Effect of Fermented *Artemisia princeps* PAMPANINI by Lactic Acid Bacteria. Korean Journal of Pharmacognosy. 2007;38(3):245-253.
12. Park KS, Park JH, Kim DH, Kim SH. Antitumor Activity, Cytotoxic effect of Wekyungtang and Kami - Wekyungtang against A549 and Anticancer effect on S-180 of Wekyungtang and Kami - Wekyungtang. Korean Journal of Oriental Medical Pathology. 1995;9(2):217-245.
 13. Hwang SY, Lee JR, Kim SC, Jee SY. A study on Genotoxicity Test of Hyeong-gae-yeon-gyo-tang extract. Journal of Herbology. 2007;22(4): 287-300.
 14. Kang SA, Chang MS, Oh MS, Park WS, Kim WN, Yang WM, et al. 4-weeks Oral Toxicity of Dangguibohysel-tang in Sprague-Dawley Rats. Journal of Herbology. 2006;21(2):159-163.
 15. Yoon JH, Ryu SH, Chung KH, Choi DG, Jeong IG, Lee HH, et al. Effects of 12 Weeks Taeyeumjoweeatang Administration on Enzymes and Fat Accumulation in Rat Liver Cells. Official Journal of the Korea Exercise Science Academy. 2002;11(1):53-65.