

## 한약제제 KOB03의 랫드에서의 4주 반복 경구투여에 의한 독성 연구

정진기, 박용기\*

동국대학교 한의과대학 본초학교실

Dose range finding study of KOB03, a new polyherbal medicine for the treatment of allergic rhinitis, by oral administration for four weeks in Sprague-Dawley rats

Jin Ki Jung, Yong-Ki Park\*

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : To evaluate the toxicity of KOB03, polyherbal medicine for the treatment of allergic rhinitis, we performed the dose-range finding test of KOB03 by oral supplementation for 4 weeks in Sprague-Dawley rats.

**Methods** : The water extract of KOB03 consisting of five different herbs was supplied from GLP company. KOB03 was supplemented by gavage at 0, 500, 2,500 and 5,000 mg/kg/day for 4-week consecutive days. We recorded the clinical signs of toxicity, body weight, organ weights, hematology, gross and histological changes in target organs of rats, and clinical chemistry analysis.

**Results** : KOB03 at all doses was shown no mortality or abnormal clinical signs in rats during at the observation period. Furthermore, there was no difference in body weight and food-take consumption, organ weight, gross pathological findings, and urine analysis among the groups of rats treated with different doses of KOB03. The hematological analysis and clinical blood chemistry data were revealed no toxic effects from KOB03-supplemented rats.

**Conclusions** : The results suggest that KOB03 is a wide margin of safety on dose-range toxicity in rats. The no observable adverse effect level (NOAEL) of the test, KOB03 in rats is no less than 5,000 mg/kg/day.

**Key words** : KOB03, safety, dose and pilot toxicity test, rat

### 서론

현대사회는 의학의 발달과 인구 고령화로 당뇨, 고혈압, 알레르기, 노화 등에 따른 만성 질환 증가로 화학합성의약품 보다는 생약이나 한약과 같이 오랜 임상 경험을 바탕으로 그 효능이 인정되고 비교적 안전한 천연약물의 사용이 증가하고 있으며 천연물의약품에 대한 관심도 높아지고 있다. 천연물의약품들 중 특히 전통의학, 한약, 한약제제는 그 소비량이 계속 증가함에 따라 국제무역 규모도 증가하고 있다<sup>1)</sup>. 미국의 경우 천연물추출물은 의약품으로 인정하지 않고 단순한 식품 소재로 취급하던 기존 체제에서 벗어나 2004년 botanical product에 대한 가이드라인을 제정하면서 천연물의약품 개발과 허가 규정을 제시하였으며, 의약품과 동등한 수준에서 천연물의약품 관리체계를 구축하였다. 또한 독일의 경우도 이미

1976년에 독일약품법을 공포하면서 천연물의약품은 식물의약품으로 보고 현재 합성의약품과 천연물의약품을 동등하게 간주하고 있다<sup>2)</sup>. 최근 전 세계적으로 대체의학(alternative medicine) 또는 보완의학(complementary medicine)에 대한 관심이 고조되면서 한약제제 시장이 확대되고 있으며, 한약재와 같은 천연약물로부터 신약 또는 신약기초물질을 개발하는 것이 경제적 부가가치 창출을 위한 국가 전략산업으로 대두되고 있다<sup>3,4)</sup>. 최근 국내에서는 한약재추출물 유래 천연물신약인 동아 제약의 스티렌이 연간 800억원대 처방실적으로 국산 개발 전문의약품들 중 가장 큰 매출을 올리고 있으며 천연물 의약품에 대한 관심이 고조되고 있다. 특히 우리나라는 오랫동안 한약재를 사용해 온 임상적 사용근거를 통해 안전성이 이미 검증되었다는 점에서 제품화 성공 시 시장성을 확보한다는 장점이 있으나, 실제 의약품으로 제품화된 사례나 일류 제품은 소

\*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학

· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

· 접수 : 2012년 4월 18일 · 수정 : 2012년 4월 23일 · 채택 : 2012년 4월 23일

수에 불과하다<sup>2)</sup>. 이는 한약의 안전성이나 효능에 대한 과학적 검증과 우수한 후보물질 발굴을 위한 기초 한약자원 확보가 부족하고 천연물의 유효활성 탐색기술과 약리작용 및 독성작용에 대한 기초 연구가 미흡하기 때문이며 한약과 원료 한약재의 독성에 대한 체계적인 검증으로 안전성을 확보하는 것은 우수한 한약제제 및 의약품 개발에 매우 중요하다.

KOB03은 옥병풍산과 창이자산으로부터 유래된 복합천연약물로 5가지 한약재로 구성되어 있으며 현재 알레르기 비염 한약제제 개발 중에 있다. KOB03의 기본처방인 玉屏風散은 白朮, 防風, 黃芪로 이루어진 처방으로 益氣固表 작용에 의해 外邪의 체내 침입을 방지하고 면역력을 증강시키며 알레르기 체질을 개선시킴으로서 그 증상의 발현을 억제하는 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 또한 기본처방인 창이자산은 蒼耳子, 白芷, 辛夷, 薄荷로 구성된 發散風寒藥으로 일체의 風濕邪를 제거함으로써 風濕이 위로 鬱滯하여 된 頭痛鼻淵과 근골에 침습하여 된 風濕痺痛 및 피부에 음습하여 된 瘡疹癢癩 등의 증상에 사용하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 최근 KOB03의 기본 처방인 玉屏風散과 玉屏風散合蒼耳子散에 대한 실험연구로 본 연구진에 의한 비만세포 매개 알레르기 염증반응에 대한 억제에 대한 효과가 보고된 바 있다<sup>7,8)</sup>.

본 연구에서는 알레르기 비염 한약제제로 개발 중인 KOB03을 사람에게 적용할 때나 독성 유무를 정확하게 예측하고 안전한 투여용량 범위를 결정하기 위해서 4주 반복 용량 결정(Dose-Range Finding, DRF) 독성시험을 수행하였으며 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용된 KOB03의 구성 한약재는 (주)광명당 제약(울산, 한국)으로부터 원료성적서가 첨부된 규격화된 약재를 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 대한약전에 따라 검정한 후 약물제조를 위해 사용하였다.

#### 2) 실험동물

실험동물로는 5주령 수컷 Sprague-Dawley(SD) 계통의 랫드(SPF)를 (주)대한바이오파크(충청북도, 한국)로부터 구입하여 사용하였으며 일주일 동안 순화시킨 후 일반증상에서 이상이 관찰되지 않은 랫드 중 체중이 유사한 것을 선별하여 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±20%, 조명시간 12시간(오전8시~오후8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정하였으며, 방사선 조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(Zeigler Bros, Gardners, PA, USA)와 정수된 물을 자유 섭식하도록 하였다.

### 2. 방법

#### 1) KOB03 추출물 제조

규격화된 KOB03 추출물을 제조하기 위해서 GLP시설업체인 (주)한풍제약(전주, 한국)으로부터 50 kg 구성약재에 물 1000 L를 넣고 98℃에서 3시간 추출하여 연조엑스를 수득한 후, 다

시 700 mmHg, 55℃에서 15시간 감압 건조하여 건조엑스(수득율: 41.1%)를 제조하였다. KOB03엑스는 냉장 보관하면서 실험 전 멸균된 증류수에 용해하여 시험약물로 사용하였다.

#### 2) 투여용량 및 시험군 설정

KOB03은 저용량(G2; 500 mg/kg/bw), 중용량(G3; 2,500 mg/kg/bw), 고용량(G4; 5,000 mg/kg/bw)을 투여용량으로 하여 4주간 매일 1회 일정 시간에 일정 투여량(10 ml)을 경구로 투여하였다. 대조군(G1; 0 mg/kg/bw)은 KOB03을 용해할 때 사용한 멸균증류수를 동일한 방법으로 투여하였으며, 각 군 당 5마리를 사용하였고, 경구투여는 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위 내로 강제 투여하였다.

#### 3) 일반증상 및 폐사 관찰

일반증상과 폐사 정도는 투여 당일에는 1시간에서 6시간 동안 확인하였고, 이후로는 하루에 1회 4주 동안 관찰하였다. 즉, 일정시간 일반 상태의 변화, 중독 증상의 발현, 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 일반 증상에 대하여 관찰하였으며, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무, 이상증상 및 정도를 처리군 개별적으로 기록하였다.

#### 4) 체중변화 및 사료 섭취량 측정

모든 동물에 대하여 체중은 투여 개시 일에 실시하였으며 투여 개시 후에는 시험 기간 중 매주 1회 체중을 측정하였고, 사료 섭취량 역시 주 1회 측정하였다. 또한 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였으며, 투여 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 측정방법은 체중 측정 일에 사료를 정량 급여한 후 일정 시간 후 잔량을 측정하여 각 처리군당 평균 섭취량(g)을 산출하였다.

#### 5) 안과학적 검사 및 요검사

모든 동물에 대하여 안과학적 검사는 KOB03 투여 4주 후에 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후 산동제(Octropic ophthalmic drop)를 점적하여 동공확장을 유도한 다음 안저 사진기(Genesis, Gowa Co, Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저에 대한 검사를 실시하였다. 또한 요검사를 위해 배설 후 3시간 이내의 신선뇨를 수거하여 당, 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 비중, pH, 단백, 우로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite), 잠혈(occult blood), 백혈구(leukocyte) 등의 검사를 실시하였으며, 배설 후 24시간 이내의 축뇨를 수거하여 노비중을 검사하였다.

#### 6) 장기중량 측정

KOB03 투여 4주 후 생존 및 사망한 모든 동물의 장기무게를 측정하였다. 즉, 부검 전 약 18시간 이상 절식 시킨 후 isoflurane으로 흡입마취하여 치사시킨 후 장기를 적출하고, 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안 검사하였으며 체중, 뇌, 뇌하수체, 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 부신, 고환, 부고환, 전립선 및 흉선의 중량을 측정하였다.

#### 7) 혈액학적 검사

복대 동맥으로부터 혈액 3 ml을 항응고제 EDTA-2K가 처

리된 혈액수집관에 수집하여 잘 섞은 후 자동혈액분석기 (ADVIA 2120, SIEMENS Inc., USA)를 이용하여 적혈구수, 헤마토크리치(hematocrit), 혈색소량(Hemoglobin conc), 평균혈구용적(mean corpuscular volume), 평균 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin), 평균 혈구 내 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration), 적혈구크기분포(Red cell distribution width), 혈색소크기분포 (Hb conc, distribution width), 혈소판수(Platelet), 백혈구수, 호중구수(neutrophils), 림프구수(lymphocyte), 단핵구수(monocyte), 호산구수(eosinophil), 호염구수(basophil), large unstained cell(LUC)를 측정하였다.

8) 혈액생화학적 검사

복대 동맥으로부터 얻은 혈액 중 일부를 실온에서 15~20 분간 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈액생화학 분석기 (KONELAB 20XT, Thermo)를 이용하여 혈청 내 아스파라진산 아미노전이효소(aspartate aminotransferase), 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase), 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase), 요소(BUN), 크레아티닌(Creatinine), 당(Glucose), 총 콜레스테롤, 총 단백, 크레아티닌 포스포키나제(Creatine phosphokinase), 알부민(ALB), 총 빌리루빈(total bilirubin), 중성지방(Triglyceride), 무기인산(Inorganic phosphorus), 알부민 글로부린 레시오(Albumin/Globulin ratio), 나트륨이온(Na<sup>+</sup>), 칼륨이온(K<sup>+</sup>), 염소이온(Cl<sup>-</sup>)을 측정하였다.

9) 통계처리

모든 동물에서 시험 기간 동안 사망이 관찰되지 않아 치사량에 대한 통계는 실시하지 않았으며, 기타 자료에 대한 통계학적인 분석은 SPSS 14.0을 사용하여 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였고, Levene test를 실시하여 등분산성(homogeneity of variance test)을 검증하였다. 또한 등분산성인 경우에는 ANOVA를 실시하여 Dunnett's T-test의 다중검정을 하였으며, 등분산성이 기각된 경우에는 Kruskal-wallis test를 실시하였다. 유의성 검정은 Student's t-test를 통해 p<0.05 수준에서 유의적인 것으로 결정하였다.

결 과

1. 일반증상 및 사망률

모든 동물에 대하여 전 시험기간 동안 매일 한번 일반증상 및 사망 유무를 관찰한 결과, 증류수를 투여한 대조군과 KOB03을 투여한 군 모두에서 특이한 증상이나 사망한 동물은 관찰되지 않았다(Table 1). 따라서 KOB03는 랫드에서 경구투여 최고용량인 5,000 mg/kg까지 독성이 나타나지 않았다.

Table 1. Clinical signs of rats

Days	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	No finding	0 / 5a	0 / 5	0 / 5	0 / 5
1-7	No finding	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
8-14	No finding	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
15-21	No finding	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

22-28	No finding	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
29	Terminal Sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

<sup>a</sup>Number of animals with the sign / Number of animals examined.

2. 체중변화 및 사료 섭취량

4주 동안의 체중 변화를 관찰한 결과, 대조군과 KOB03 투여군에서 시간이 경과함에 따라 정상적으로 체중이 증가되어 KOB03은 체중 변화에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Table 2). 또한, 전 시험기간 동안 모든 동물의 하루 사료 섭취량을 조사한 결과, 대조군과 KOB03 투여군 사이 유의성 있는 사료 섭취량의 변화는 관찰되지 않았다(Table 3).

Table 2. Body weight changes of rats

WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	179.2 ± 6.01	183.2 ± 7.69	181.3 ± 4.93	179.2 ± 7.61
1	235.1 ± 8.71	244.4 ± 13.98	240.9 ± 8.52	237.2 ± 4.42
2	288.6 ± 10.79	297.4 ± 16.37	297.0 ± 10.91	291.5 ± 4.78
3	329.5 ± 16.92	340.0 ± 19.86	340.5 ± 16.17	332.7 ± 4.97
4	355.6 ± 22.36	372.3 ± 22.31	370.6 ± 18.52	361.3 ± 8.21
gainsa	176.4 ± 20.43	189.1 ± 17.66	189.3 ± 15.00	182.2 ± 8.72
N	5	5	5	5

<sup>a</sup>Weight gains in the main groups are body weight difference between week 4 and 1stdosed day.

Table 3. Food consumptions of rats

WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (500)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	23.9 ± 0.50	25.9 ± 2.47	24.1 ± 0.85	21.2 ± 1.00
1	21.5 ± 1.46	24.6 ± 2.37	22.9 ± 1.59	21.6 ± 0.71
2	23.3 ± 2.14	23.2 ± 4.06	24.1 ± 1.42	23.5 ± 0.75
3	24.9 ± 2.10	25.7 ± 2.20	25.8 ± 2.08	24.9 ± 1.15
4	24.6 ± 2.40	26.1 ± 1.56	25.7 ± 1.79	25.2 ± 1.47
N	5	5	5	5

3. 안과학적 검사 소견 및 요 검사

4주 후 모든 동물에서 육안 및 안저사진기를 통해 전안부(anterior segment), 중간투광체(transparent media), 안저(Fundus) 등의 안과학적 검사를 실시한 결과, 대조군과 KOB03 투여군 모두에서 특이한 증상이 관찰되지 않았다(Table 4). 또한 요 검사에서는 대조군과 KOB03 투여군 간 모든 검사 항목(glucose, bilirubin, specific gravity, pH, protein, urobilinogen, nitrite, occult blood, leukocyte)에서 차이가 없었으며, 케톤체(ketone body)의 경우 KOB03 중용량 및 고용량 투여군이 대조군에 비해 수치가 증가하는 경향을 나타내었으며, 이는 용량의존성이 있어서 시험물질 유래 경미한 변화로 판단되나 체중 및 혈액생화학적 검사 항목에서의 변화와 연관성이 없었으며, 케톤체가 특정 장기의 손상 지표가 되지 않으므로 독성학적 의미는 없다(Table 5).

Table 4. Ophthalmic findings of rats

SITES	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Left eye	No observed signs	5 / 5a	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	No observed signs	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Table 5. Urinalysis of rats

TESTS <sup>a)</sup>	No. of animals		GROUPS (mg/kg/day)			
	RESULT	GRADE	5	5	5	5
			G1 (0)	G2 (500)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
GLU	-	0	5	5	5	5
BIL	-	0	5	5	4	3
	1+	2	0	0	1	2
KET	-	0	4	3	0	0
	+/-	1	1	1	2	0
	1+	2	0	1	3	5
SG	≤1.005	0	0	0	0	0
	1.010	1	1	3	0	0
	1.015	2	1	1	1	0
	1.020	3	1	0	1	2
	1.025	4	1	1	1	1
	≥1.030	5	1	0	2	2
pH	≤6.5	0	1	2	1	2
	7.0	1	2	0	2	2
	7.5	2	0	2	2	0
	8.0	3	0	1	0	1
	8.5	4	1	0	0	0
PRO	-	0	0	2	0	0
	+/-	1	1	3	1	0
	1+	2	4	0	2	4
	2+	3	0	0	2	1
URO	0.1	0	5	5	4	5
	1	1	0	0	1	0
NIT	-	0	5	5	5	5
	+	2	0	0	0	0
OB	-	0	4	5	5	5
	+/-	1	1	0	0	0
WBC	-	0	0	0	0	0
	+/-	1	3	5	4	4
	1+	2	2	0	1	0

<sup>a)</sup> GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, WBC: Leukocyte

4. 혈액학적 검사

복대 동맥으로부터 혈액을 수집하여 자동혈액분석기를 통해 적혈구수(RBC), 헤마토크리트치(HCT), 혈색소량(HGB), 평균적혈구용적(MCV), 평균 혈색소 농도(MCH), 평균 혈구 내 혈색소 농도(MCHC), 적혈구크기분포(RDW), 혈색소크기분포(HDW), 혈소판수(PLT), 평균혈소판용적(MPV), 백혈구수(WBC), 호중구수(NEU), 림프구수(LYM), 단핵구수(MONO), 호산구수(EOS), 호염구수(BASO), large unstained cell(LUC)을 측정하여 결과, 대조군과 KOB03 투여군의 동물에서 정상 수치를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Hematological values of rats

No. of animals	TESTS UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		5	5	5	5
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
RBC	10 <sup>8</sup> /μL	8.11±0.485	7.83±0.231	7.99±0.238	7.99±0.253
HCT	%	47.5±2.43	46.0±0.84	46.4±1.60	46.7±1.26
HGB	g/dL	16.5±0.95	15.9±0.46	16.1±0.50	16.2±0.53
MCV	fL	58.5±0.73	58.7±1.08	58.1±1.39	58.5±0.58
MCH	pg	20.3±0.23	20.3±0.62	20.2±0.34	20.2±0.24
MCHC	g/dL	34.7±0.52	34.6±0.54	34.8±0.59	34.7±0.30
RDW	%	10.9±0.40	10.7±0.15	10.5±0.11	10.7±0.38
HDW	g/dL	2.65±0.113	2.56±0.160	2.52±0.163	2.52±0.070
PLT	fL	1141±124.6	1136±87.7	1082±40.4	1083±82.6
MPV	10 <sup>3</sup> /μL	7.3±0.26	7.3±0.22	7.3±0.32	7.3±0.13
WBC	%	4.93±1.527	4.60±1.444	5.19±0.725	4.99±0.917
NEU	%	7.8±2.65	8.0 ±1.04	7.5±1.12	7.2±1.03
LYM	%	88.6±2.88	88.9±1.17	86.8±2.92	88.4±1.75
MONO	%	1.6±0.18	1.7 ±0.11	2.7±1.16	1.9±0.44
EOS	%	1.4±0.45	0.9±0.11	2.5±2.51	2.0±1.62

BASO	%	0.2±0.05	0.1±0.04	0.1±0.07	0.2±0.09
LUC	%	0.4±0.16	0.4±0.12	0.4±0.12	0.4±0.21

5. 혈액생화학적 검사

복대동맥 혈액으로부터 분리한 혈장으로부터 혈액생화학 분석기를 이용하여 혈액생화학적 지표인 아스파라진산 아미노 전이효소(AST), 알라닌 아미노전이효소(ALT), 알칼리성 인산 분해효소(ALP), 요소(BUN), 크레아티닌(CRE), 당(GLU), 총 콜레스테롤(CHO), 총 단백질(PRO), 크레아티닌 포스포키나제(CPK), 알부민(ALB), 총 빌리루빈(BIL), 중성지방(TG), 무기인산(IP), 알부민 글로부린 레시오(A/G), 나트륨이온(Na<sup>+</sup>), 칼륨이온(K<sup>+</sup>), 염소이온(Cl<sup>-</sup>)의 양을 측정하여 결과, 대조군과 KOB03 투여군의 모든 동물에서 정상 수치를 나타내었다(Table 7). 한편, 염소이온(Cl<sup>-</sup>)은 KOB03 중용량과 고용량을 투여한 동물에서 감소하였으나, 용량의존성이 없어서 비시험 물질 유래 변화로 판단되었다. 또한, 나트륨은 KOB03 고용량을 투여한 동물에서만 감소하였는데 이는 경미한 용량의존성이 있었지만 정상범위내의 변화이므로 비시험물질 유래변화로 판단되었다.

Table 7. Serum biochemical values of rats

No. of animals	TESTS UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		5	5	5	5
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
AST	U/L	78.86±11.649	74.94±2.334	77.76±10.321	75.42±9.890
ALT	U/L	21.46±1.853	23.72±1.130	23.34±3.253	23.40±2.337
ALP	U/L	764.56±740.451	332.24±71.833	717.56±791.641	413.32±158.224
BUN	mg/dL	13.88±1.116	13.70±2.213	13.32±1.641	14.63±1.968
CRE	mg/dL	0.30±0.064	0.26±0.016	0.26±0.045	0.24±0.025
GLU	mg/dL	150.24±35.455	154.46±33.800	147.18±35.026	147.80±9.568
CHO	mg/dL	68.18±25.887	66.10±1.158	60.20±9.899	61.76±8.801
PRO	g/dL	6.00±0.280	6.01±0.137	5.81±0.274	5.75±0.259
CPK	U/L	297.54±192.546	262.60±56.147	225.34±91.088	217.62±55.679
ALB	g/dL	3.29±0.088	3.30±0.079	3.26±0.059	3.22±0.090
BIL	mg/dL	0.10±0.016	0.11±0.007	0.10±0.013	0.10±0.023
TG	mg/dL	53.24±19.249	71.98±14.015	68.22±36.717	62.72±13.078
IP	mg/dL	8.32±0.488	8.81±0.406	8.29±0.540	8.14±0.186
A/G	ratio	0.55±0.024	0.55±0.007	0.56±0.017	0.56±0.013
Na <sup>+</sup>	mg/dL	142.2±0.61	141.8±1.05	141.5±0.70	140.7±0.94
K <sup>+</sup>	mmol/L	4.5±0.09	4.4±0.25	4.4±0.16	4.4±0.13
Cl <sup>-</sup>	mmol/L	105.0±1.13	102.7±0.54	103.7±0.68	103.1±0.45

6. 부검 및 장기중량 검사

시험 기간 중 사망한 동물이 없었으므로 4주 반복 투여 후 부검을 실시한 결과, 대조군과 KOB03 투여군 모든 동물의 뇌(brain), 뇌하수체(pituitary), 심장(heart), 폐(lung), 간(liver), 비장(spleen), 신장(kidney), 부신(adrenal), 고환(testis), 부고환(epididymis), 전립선(prostate gland), 흉선(thymus) 등 장기에서 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(Table 8).

Table 8. Absolute organ weights of rats

No. of animals	ORGAN WEIGHT (g)	GROUPS (mg/kg/day)			
		5	5	5	5
		G1 (0)	G2 (500)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
B.W		327.1±19.62	344.0±21.64	341.9±16.09	333.6±6.68

Brain	2,0062±0,08833	1,9848±0,06315	1,9987±0,09517	1,9499±0,16682
Pituitary	0,0140±0,00183	0,0120±0,00144	0,0160±0,00209	0,0127±0,00153
Heart	1,4664±0,59963	1,2282±0,14327	1,2605±0,13367	1,1939±0,12773
Lung	1,5555±0,15570	1,6192±0,14069	1,5890±0,17657	1,6320±0,08389
Liver	10,0021±1,11174	10,4611±0,75996	10,7616±0,66546	10,4982±0,35631
Spleen	0,8329±0,09800	1,2322±0,89469	0,9506±0,21177	0,8883±0,07073
Kidney (Lt.)	1,2735±0,13376	1,4001±0,18259	1,3221±0,07090	1,3316±0,09765
Kidney (Rt.)	1,2574±0,15296	1,3675±0,19348	1,2556±0,12297	1,3221±0,09529
Adrenal (Lt.)	0,0266±0,00207	0,0265±0,00388	0,0247±0,00094	0,0257±0,00338
Adrenal (Rt.)	0,0260±0,00093	0,0245±0,00286	0,0270±0,00162	0,0236±0,00378
Testis (Lt.)	1,6508±0,14486	1,6152±0,19161	1,7610±0,06701	1,7582±0,07833
Testis (Rt.)	1,6270±0,17096	1,6092±0,21729	1,7885±0,07256	1,7255±0,07470
Epididymis (Lt.)	0,4124±0,02442	0,4037±0,02075	0,4299±0,02973	0,4382±0,03639
Epididymis (Rt.)	0,4110±0,02257	0,4210±0,01884	0,4386±0,02548	0,4196±0,02711
Prostate gland	0,3765±0,10028	0,3432±0,06151	0,3635±0,07692	0,354±0,05507
Thymus	0,7251±0,06965	0,7181±0,14732	0,7895±0,16814	0,7365±0,17510

## 고찰

한약은 수천 년에 걸쳐서 인류가 사용하였고, 그 의학적 효과와 문화적 신념으로 현대에도 전 세계적으로 계속 사용되고 있으며 발전해 오고 있다<sup>9)</sup>. 또한 최근 생활수준의 향상과 의료기술의 발달로 국내외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품 개발에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 한약재와 한약은 현대의약과 더불어 한약제제와 천연물의약품의 원료소재로서 뿐만 아니라 건강기능성 식품의 재료나 민간요법용으로 널리 사용되고 있다<sup>10)</sup>. 그러나 한약과 한약재 사용에 대한 안전성 문제는 끊임없이 제기되고 있으며 상대적으로 한약 자체의 독성에 대한 연구는 주목받지 못하고 있는 실정으로 한약 자체의 독성에 의한 간, 신장, 심장 등의 장기독성과 더불어 알레르기 유발 등의 오해를 받고 있다. 한약재들 중 일부는 잠재적 독성을 가지고 있어 사용 시 주의를 요하며 건강에 영향을 초래할 수도 있고 독성에 대해 정확히 알지 못한 채 사용하게 됨으로써 여러 가지 문제를 유발할 수 있다<sup>11)</sup>. 또한 독성이 강한 일부 한약재들이 무분별한 판매를 통해 국민에게 무방비로 노출되면서 한약의 독성 및 안전성에 대한 문제 해결이 필요한 실정이다. 따라서 한약을 통한 의약품 개발 또는 기능성 식품 등의 개발을 위해서는 독성시험을 통한 안전성 확보가 필수적이다.

일반 독성시험 분야는 농약, 의약, 산업용 화학물질 및 기타 환경오염물질 등의 화학물질이 인체에 미치는 유해성을 조사하기 위하여 실험동물을 통해 소화기계, 호흡기계, 비뇨기계, 생식기계 및 신경계 등을 포함하는 모든 장기조직에 미치는 유해성 정도를 단회 및 반복투여 독성시험으로 평가하게 된다. 약물의 독성시험은 단회투여독성시험, 반복투여독성시험, 생식발생독성시험, 유전독성시험, 면역독성시험, 발암성시험, 국소독성시험, 독성동태시험 등이 있으며, 주로 랫드와 마우스를 이용한 단회투여독성시험과 2주 또는 4주 반복투여 DRF 독성시험, 1개월, 3개월, 6개월, 12개월 반복투여독성시험이 사용되며 이때 투여 경로로는 경구, 경피, 정맥 투여를 사용하고 있다. 이 중 4주 반복 DRF독성시험은 용량범위 설정을 위한 시험으로 시험물질을 시험동물에 반복적으로 투

여한 후 나타나는 독성변화를 용량 및 시간의 경과에 따라 파악하는 것이다. 으로 4주 반복 DRF독성시험에서 용량 단계는 명확하게 독성변화가 나타나는 용량(독성량)과 독성변화가 나타나지 않는 용량(무독성량)을 포함해야 하는데 독성변화는 본래 약리작용의 일부라 생각되고 약리작용 중에 약효로서 이해되는 작용과 그 외의 작용이 있으며 발현된 변화를 독성으로 받아들일지 또는 약효로 판단할지 어려운 경우가 많다. 따라서 발현된 변화가 시험물질에 특이적인 생물학적 변화인지, 약리작용 관련 변화인지, 가역적 변화인지, 그 중등도는 어떠한지 등을 충분히 고려하여 사용 동물 중에 있어 참고자료나 유사약물에서 보고된 소견과 비교하는 것이 중요하다<sup>12)</sup>.

본 연구에서는 알레르기 비염의 한약제제로 KOB03을 개발하기 위해 유효성을 검증하면서 향후 사람에서의 안전성을 확보하기 위해 식품의약품안전청의 독성시험가이드라인<sup>13)</sup>에 따라 랫드에서 4주간 반복 경구투여함으로써 용량결정(DRF) 독성시험을 수행하였다. 그 결과 KOB03은 모든 동물에서 모든 시험 항목에서 독성이 관찰되지 않아 경구 독성투여 한계용량은 5,000 mg/kg 이상을 상회하는 것으로 확인되었다. 즉, KOB03 투여군은 대조군과 마찬가지로 체중을 정상적으로 증가시켰으며, 사료섭취량에 변화를 주지 않았고, 안과학적 검사, 요 검사, 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사에서 정상수치를 나타내었다. 다만, 요 검사 항목 중 케톤톤은 KOB03을 중용량(2,500 mg/kg)과 고용량(5,000 mg/kg)으로 투여한 군에서 대조군에 비해 경미하게 용량의존적으로 증가하는 것으로 나타났지만 검출 양이 매우 낮고, 체중 및 혈액생화학적 검사 항목에서의 변화와 연관성이 없으며, 케톤체가 특정 장기의 손상 지표가 되지 않기 때문에 독성학적 의미는 없는 것으로 사료되었다. 또한 염소이온(Cl<sup>-</sup>)이 KOB03 중용량과 고용량을 투여한 군에서 약하게 감소하였으나, 용량의존성이 없어 비시험물질 유래 변화로 사료되었으며, 나트륨은 KOB03 고용량을 투여한 동물에서 감소하였으나 경미한 용량의존성이 있었으나 정상범위내의 변화이므로 비시험물질 유래변화로 사료되었다.

따라서 본 연구결과를 통해 알레르기 비염 한약제제 KOB03은 랫드에 대한 4주 반복 DRF독성시험에서 투여 무독성량이 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 나타났다.

## 결론

본 연구에서는 알레르기 비염 한약제제로 개발 중인 KOB03의 랫드에서의 4주간 반복 경구투여 DRF독성시험에 의한 안전성을 평가하였다.

1. KOB03은 전 시험기간 동안 모든 시험동물에서 일반 증상 및 사망한 동물이 관찰되지 않았다.
2. KOB03은 전 시험기간 동안 모든 시험동물의 체중을 정상적으로 증가시켰으며, 사료섭취량에 변화를 주지 않았다.
3. KOB03은 전 시험기간 동안 모든 시험동물에서 부검에 따른 이상소견을 나타내지 않았으며, 안과학적 검사에서도 특이적인 변화를 보이지 않았다.
4. KOB03은 전 시험기간 동안 2,500 mg/kg과 5,000 mg/kg 투여군에서 ketone body 수치를 경미하게 증가시켰으나 KOB03에 의한 변화로 보이지 않았다.

5. KOB03은 전 시험기간 동안 모든 시험 동물에서 혈액학적 및 혈액생화학적 지표에 영향을 주지 않았다.
6. KOB03은 전 시험기간 동안 모든 시험동물의 장기중량에 변화를 주지 않았다.

이상의 결과로 보아 KOB03은 4주간 반복 경구투여 DRF 독성시험에서 최대무독성용량(NOEL)이 5,000 mg/kg를 상회하는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지가족부의 한의약산업육성 제품화지원 연구개발사업 연구비(F090002)의 지원받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Ministry of Health & Welfare, Investment strategies for Korean traditional medicine R&D. Ministry of Health & Welfare, 2002.
2. Sung SH, Park JH. Status and Prospects of Natural Medicines. Health Ventures reports the latest trends and issues. 2007 : 14-23.
3. Shin HK, Kim YK, Choi SM, Kang CH. A Study on the attitudes toward Research and Development of herbal products. Kor J Oriental Medicine, 2001 ; 7(1) : 77-84.
4. Korea Institute of Oriental Medicine. A study on the development plan and research and development herbal medicine. Ministry of Health & Welfare, 2002.
5. Ahn DK, Nac HS. Oriental medicine and immunology. Paju : openbooks, 1994 : 15-48.
6. Bae JH, Yoo JH, Kil GJ. Effects of NR on production levels of cytokines and distribution of BAL cells in allergic asthma. Kor J Herbology, 2010 ; 25(1) : 33-8.
7. Jung JK, Park YK. Anti-allergic effect of okbyungpoongsan-hap-changijasan. Kor J Herbology, 2010 ; 25(2) : 55-63.
8. Jung JK, Park YK. Effect of modified -okbyungpoongsan on mast cell-mediated allergic responses in RBL-2H3 mast cell. Kor J Herbology, 2011 ; 26(4) : 1-7.
9. Shin CH, Noh BU. Safety and efficacy of herbal medicine research guidelines. Seoul : Daihak publishing company, 1997.
10. Kim DH, Zhang HS, Kim KH, Kang SC, Kim HS, Gil KH, Kong KH, Ahn TH, Bae JS, Go HK, Kim KH, Park CK, Lee HY, Song SW, Han ZZ. A 90-day repeated-dose oral toxicity study on Chelidonium majus extract in Fischer 344/N rats. Korean J Vet Res, 2009 ; 49(1) : 23-34.
11. Kwon GT. Study on control and management of poisonous medicinal herbs. Kyunghee University, 2009.
12. Korea Food & Durg Administration, Based on toxicity testing of pharmaceuticals. Notification No. 2005-60 of the Korea Food & Drug Administration, 2005.
13. Han ZZ, Zhang HS, Kang SC, Gil KH, Kong KH, Kim DH, Ahn TH, Bae JS, Go HK, Han MK, Kim HS, Heo HS, Park EM, Song SW, Kim KH, Park CK, Lee HK. A 90-day repeated-dose oral toxicity study on Flos Lonicerae extract in Fischer 344/N rats. Korean J Vet Res, 2008 ; 48(4) : 401-11.