

알러지성 비염 한약제제 KOB의 랫드에서의 13주 반복 경구투여에 의한 독성 연구

강석용^{1#}, 박영철², 박용기^{1,3*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 대구가톨릭대학교 GLP 센터, 3 : 동국대학교 한방신약개발센터

Thirteen-week repeated-dose oral toxicity study of KOB03, a polyherbal medicine for allergic rhinitis, in rats

Seok Yong Kang^{1#}, Yeong-Chul Park², Yong-Ki Park^{1,3*}

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

2 : GLP Center, Catholic University of Daegu

3 : Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : To evaluate the safety of KOB, a polyherbal medicine for allergic rhinitis, we conducted a subchronic toxicology study.

Methods : Dried extract of KOB(Lot. No. 11003, yield : 41.1%) was prepared from GLP company (Hanpoong Pharm & Food Co., Ltd). KOB was repeatedly administrated orally of male SD rats at daily dose levels of 500 (G2), 1250 (G3) and 5000 (G4) mg/kg/day for 13 weeks. We recorded the clinical signs of toxicity, body weight, food intake/consumption, optometry, urine analysis, organ weights, hematology, and conducted serum biochemical analysis, necropsy, gross and histological changes in target organs of Sprague-Dawley rats, and clinical chemistry analysis.

Results : Neither death nor any toxicological signs were observed in KOB at all doses of 500, 1250 and 5000 mg/kg/day during the administration period for thirteen-week. Furthermore, there was no difference in body weight and food-take consumption, optometry, necropsy, organ weight, gross pathological findings, and urine analysis among the groups of rats treated with different doses of KOB, during at the observation period for thirteen-week. The hematological analysis and clinical blood chemistry data were revealed no toxic effects from repeated-dose administration of KOB in rats during the observation period.

Conclusions : Based on these results, the no observable adverse effect level (NOAEL) of KOB was considered to be 5000 mg/kg/day for male rats under these study conditions.

Key words : KOB, polyherbal medicine, safety, thirteen-week repeated-dose oral toxicity

서론

최근 현대의학과 더불어 의료기술이 발전했음에도 불구하고 수많은 질병들은 여전히 근본적인 치료가 어려운 실정이며, 인구 고령화에 따른 당뇨병, 고혈압, 알레르기 질환, 퇴행성 질환 등 만성 질환이 증가하는 추세이다. 이러한 만성 질환의 치료를 위해서는 약물의 장기 복용이 불가피하며 이에

따른 부작용과 독성문제는 치료적 한계로 지적되고 있다. 따라서 장기 복용에도 안전하고 보다 효과적인 약물 개발에 대한 연구가 활발해지면서 식품이나 천연물 소재로부터 약물을 발굴하려는 노력 또한 활발히 이루어지고 있으며 특히 한약과 한약재의 활용에 관심이 증폭되고 있다¹⁻³⁾. 한약은 오랫동안 사용해 온 한방 임상적 사용근거를 기반으로 합성의약품에 비해 안전성과 효능이 이미 검증됐다는 강점이 있어 최근 의학

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

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

#제1저자 : 강석용, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 054-770-2647 · E-mail : seokppo2@hanmail.net

· 접수 : 2012년 12월 18일 · 수정 : 2013년 1월 7일 · 채택 : 2013년 1월 16일

품 개발 약물로 연구개발이 확대되고 있으나, 아직은 소수의 약물만이 의약품으로써 제품화에 성공하고 있을 뿐 대부분은 제품화로 연계되고 있지 못한 실정이다. 또한 장기간에 걸쳐 약물투여를 해야 하는 만성질환에는 합성의약품 보다 천연의약품이 부작용면에서 매우 유리할 수 있다. 그러나 천연물들의 약효는 고전적인 대중요법과 경험에 근거한 것이므로, 현대 약물학적관점으로는 해석이 어려운 경우가 많다. 특히, 일부 한약재들은 잠재적 독성을 가지고 있어 장기간 복용하는 경우 건강에 치명적인 영향을 초래할 수 있음이 보고되고 있다⁴⁾. 따라서 한약과 같은 천연복합추출물이 의약품으로 인정받기 위해서는 무엇보다 규격화된 약물제조와 체계적인 품질관리, 일반 의약품과 동등한 수준에서의 임상시험을 통한 효능의 증명과 안전성이 보장된 표준화된 약물로서의 개발이 필요하다⁵⁾.

현재 국내에서 규격을 설정하여 관리하는 생약은 대한약전에 130종과 생약 규격집에 385종으로 총 515종의 한약재가 수재되고 관리 되고 있으나, 이들의 인체에 대한 안전성 연구는 매우 미흡한 실정이다⁶⁾. 또한 한약의 안전성에 대한 논란은 여전히 제기되고 있으며, 주로 잔류농약, 불순물, 중금속 등에 의한 오염, 간이나 신장에 대한 독성 유발, 특정 성분 등에 의한 중독, 알레르기 유발 등이 문제점으로 제기되고 있다. 이는 한약의 안전성이나 효능에 대한 과학적인 검증과 우수한 후보약물 발굴을 위한 기초 한약자원 확보와 관리가 부족하고, 유효활성 탐색기술과 약리작용 및 독성작용에 대한 기초 연구도 미흡하기 때문에 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 한약과 원료 한약재의 독성에 대한 과학적인 검증으로 안전성을 검증하는 것이 필요하다^{2,3)}.

KOB는 한방임상에서 益氣固表 작용에 의해 外邪의 체내 침입을 방지하고 발한시키는 효능이 있는 옥병풍산⁷⁾을 기본으로 창방된 한약제제로써 최근 본 연구진에 의해 비만세포-매개 알레르기 염증반응에 대한 억제효과와 급만성 알레르기 비염 동물에서의 면역반응 조절을 통한 비염 개선효과를 확인한 바 있다^{8,9)}.

본 연구에서는 기존의 용량범위설정시험(dose-range finding, DRF)²⁾ 결과를 바탕으로 KOB의 안전성을 확보하고 인체 적용에서의 독성 유무를 예측하기 위해서 GLP기관으로부터 Sprague-Dawley 계통 랫드에 대한 13주 반복경구투여 독성시험을 수행함으로써 KOB의 설치류에서의 최대 무독성 용량(NOAEI)¹⁰⁾ 범위를 설정하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시험약물

본 실험에서 사용된 KOB 건조엑스는 GMP시설업체인 (주)한풍제약(전주, 한국)으로부터 규격화된 건조엑스(KOB 조성물: Lot No. 11003)를 시험지시 및 기록서와 함께 공급받아서 사용하였다(수득율: 20 kg, 40%). KOB 건조엑스는 냉장보관하면서 실험 직전 멸균 증류수에 완전히 용해하여 시험약물로 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 5주령 수컷 Sprague-Dawley(SD) 계통의 랫드(SPF)를 (주)대한바이오파마(충청북도, 한국)로부터 구입하여 사용하였으며 일주일 동안 순화시킨 후 일반증상에서 이상이 관찰되지 않은 랫드 중 투여전일 및 투여일에 체중을 측정하고 유사한 체중의 랫드를 선별하여 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 명암 cycle 12시간 및 조도 150~300 Lux로 설정하였으며, 방사선 멸균 실험동물용 고행사료(Zeigler Bros, Gardners, PA, USA)와 필터유수살균기로 여과 후 자외선으로 조사된 물을 자유 섭식하도록 하였다.

2. 방법

1) 투여용량 및 시험군 설정

KOB 건조엑스는 저용량(G2; 1,250 mg/kg/day), 중용량(G3; 2,500 mg/kg/day), 고용량(G4; 5,000 mg/kg/day)을 투여용량으로 하여 13주간 매일 1회 일정 시간에 일정 투여량(10 ml/kg/day)을 경구로 투여하였다. 대조군(G1; 0 mg/kg/day)은 KOB03을 용해할 때 사용한 멸균증류수를 동일한 방법으로 투여하였으며, 각 군 당 10마리를 사용하였고, 경구투여용 존대를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위 내로 강제 경구 투여하였다.

2) 일반증상 및 폐사 관찰

모든 동물에 대해서 일정시간 일반 상태의 변화, 중독 증상의 발현 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상의 정도를 1일 1회 관찰하였다. 또한 1일 2회 사망 및 빈사동물의 유무, 이상증상 및 정도를 처리군 개별적으로 기록하였으며 관찰은 0일부터 90일까지 13주간 실시하였다.

3) 체중변화 및 사료 섭취량 측정

모든 동물에 대하여 체중은 투여 개시 일에 실시하였으며 투여 개시 후에는 시험 기간 중 매주 1회, 부검전일 및 부검일에 체중을 측정하였고, 부검일 체중은 절식을 실시하였으므로 체중평가에서 제외하고 부검전일 체중을 평가하였다. 사료 섭취량 역시 주 1회 측정하였다. 또한 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였으며, 투여 13주째에는 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.

4) 안과학적 검사 및 요검사

모든 동물에 대하여 안과학적 검사는 KOB03 투여 13주 후에 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후 산동제(Octropic ophthalmic drop, Samilpharma, Co., Ltd, Korea)를 점적하여 동공확장을 유도한 다음 안저사진기(Genesis, Gowa Co, Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저에 대한 검사를 실시하였다. 또한 요검사를 위해 배설 후 3~4시간 동안의 채뇨한 신선뇨 중 약 1ml의 취하여 당, 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 비중, pH, 단백질, 우로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite), 잠혈(occult

blood), 백혈구(leukocyte) 등의 검사를 실시하였으며, 일반 검사 후 남은 요를 1,500 rpm으로 5분간 원심분리(MF80, Hanil, Korea)한 후, 그 침전물을 S.M(Sternheimer-Malbin)법으로 염색하여 RBC(red blood cell), WBC(white blood cell), Epithelial cell 및 Casts를 관찰하였으며, 24시간동안 계속 채집한 요로 요총량을 측정하였다.

5) 혈액학적 검사

부검 시 복대 동맥으로부터 채혈한 혈액 3 mL을 항응고제 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle(Vacutainer 3ml, SEKISUI, JAPAN)에 주입하여 잘 섞은 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 이용하여 적혈구수, 헤마토크리트치(hematocrit), 혈색소량(hemoglobin conc), 평균혈구용적(mean corpuscular volume), 평균 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin), 평균 혈구 내 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration), 적혈구 크기분포(Red cell distribution width), 혈색소크기분포(Hb conc, distribution width), 혈소판수(platelet), 평균 혈소판 용적(mean platelet volume), 망상적혈구수(reticulocyte), 백혈구수, 호중구수(neutrophils), 림프구수(lymphocyte), 단핵구수(monocyte), 호산구수(eosinophil), 호염구수(basophil), large unstained cell(LUC)를 측정하였다.

6) 혈액생화학적 검사

부검 시 복대 동맥으로부터 채혈한 혈액 중 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (SEKISUI, JAPAN)에 주입하고 실온에서 15~20분간 방치하여 응고시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈액생화학 분석기 (KONELAB 20XT, Thermo, USA)를 이용하여 혈청 내 아스파라진산 아미노전이효소(aspartate aminotransferase), 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase), 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase), 요소(blood urea nitrogen), 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^+), 칼륨이온(K^+), 염소이온(Cl^-)을 측정하였다.

7) 장기중량 측정

KOB 투여 13주 후 모든 동물의 장기무게를 측정하였다. 즉, 부검 전 약 18시간 이상 절식 시킨 후 이소플루란으로 흡입마취하여 치사시킨 후 장기를 적출하고, 외관 및 내부장기의 이상 유무를 육안 검사하였으며 부신, 뇌하수체, 가슴샘, 전립샘, 고환, 부고환, 비장, 신장, 심장, 폐, 뇌 및 간장을 적출한 후 전자저울을 이용하여 중량을 측정하였고, 양측성 장기는 양측 장기를 각각 측정하였다.

8) 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 비장, 위, 췌장, 십이지장, 부신, 신장, 간, 침샘, 흉골,

심장, 폐, 대동맥, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 뇌, 뇌하수체, 피부(젖샘) 등의 장기를 적출하여 10% 중성완충포르말린 용액에 고정하였으며 안구는 Davidson 용액에, 고환과 부고환은 Bouin 용액에 고정하였다. 고정한 장기 및 조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다.

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 검정하였다. 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 KOB를 경구투여 최고용량인 5000 mg/kg까지 투여한 군 모두에서 특이한 증상이나 사망한 동물은 관찰되지 않았다(표 1).

Table 1. Clinical signs of rats

Days	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	No finding	0 / 10 ^{a)}	0 / 10	0 / 10	0 / 10
1-7	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
8-14	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
15-21	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
22-28	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
29-35	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
36-43	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
44-49	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
50-55	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
56-63	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
64-70	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
71-77	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
78-84	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
85-91	No finding	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
91	Terminal Sacrifice	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10

a) Number of animals with the sign / Number of animals examined.

2. 체중변화 및 사료 섭취량

13주 동안의 체중 변화를 관찰한 결과, 대조군과 KOB03 투여군에서 시간이 경과함에 따라 정상적으로 체중이 증가되어 KOB는 체중 변화에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(표 2). 또한, 전 시험기간 동안 모든 동물의 하루 사료 섭취량을 조사한 결과, 체중 변화와 마찬가지로 대조군과 KOB 투여군 사이 유의성 있는 사료 섭취량의 변화는 관

찰되지 않았다(표 3).

Table 2. Body weight changes of rats

WEEKS	Body weight (g)			
	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	200.0±4.95	198.9±7.69	199.4±5.86	199.3±6.01
1	254.9±7.72	256.3±8.85	256.7±6.66	254.4±9.79
2	304.7±13.51	308.7±13.83	311.3±12.00	304.0±15.11
3	341.5±18.76	345.2±21.26	349.7±19.42	338.6±20.74
4	370.9±23.73	378.5±24.54	382.0±22.40	370.7±24.40
5	391.1±27.44	401.1±28.43	402.6±25.92	386.9±26.41
6	417.8±28.07	431.0±32.02	433.5±28.70	414.8±28.98
7	435.5±34.76	451.8±34.58	452.5±31.52	433.0±31.51
8	450.9±36.94	468.4±39.18	466.1±40.70	445.7±34.91
9	467.5±40.53	485.5±39.20	481.7±42.08	460.9±36.05
10	481.4±42.77	500.3±42.00	495.8±43.41	473.2±38.13
11	492.1±43.75	513.1±45.24	509.8±46.47	481.9±39.44
12	502.8±46.38	522.8±47.94	520.7±48.28	491.1±40.15
13	506.1±48.39	528.7±51.77	526.1±47.19	497.7±42.87
gains ^{a)}	306.1±44.32	329.8±47.52	326.7±44.93	298.4±37.66
No. of animals	10	10	10	10

a) Weight gains are body weight difference between week 13 and week 0.

Table 3. Food consumptions of rats

WEEKS	Food consumptions (g)			
	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
0	21.9±1.88	19.8±1.55	25.6±1.40	23.7±1.63
1	21.4±1.04	21.6±1.00	22.2±0.83	21.2±1.25
2	23.3±1.09	23.2±1.07	23.6±0.98	21.9±1.23
3	23.7±1.12	23.6±1.92	24.5±1.88	22.4±1.56
4	23.4±1.12	23.8±1.58	24.5±1.32	22.2±1.40
5	22.8±1.49	23.8±1.26	24.1±1.24	22.2±1.34
6	22.7±1.63	23.4±1.48	24.3±1.54	22.7±1.72
7	22.8±1.72	23.9±1.49	24.1±1.66	21.9±1.42
8	22.8±2.04	24.1±1.53	23.6±2.32	21.6±1.80
9	23.4±2.28	24.2±1.53	24.3±2.33	22.3±1.77
10	22.8±2.27	24.0±1.55	24.2±1.93	22.3±1.74
11	23.2±2.00	24.4±1.61	24.5±2.20	21.5±1.77
12	22.7±2.12	23.1±1.58	23.9±2.13	21.4±1.93
13	22.5±2.05	23.2±1.99	23.9±1.94	21.9±1.51
MEAN±S.D.	22.8±0.46	23.3±0.27	24.1±0.49	22.1±0.22
No. of animals	10	10	10	10

3. 안과학적 검사 소견 및 요 검사

13주 후 모든 동물에서 군 분리 시 외안검사와 투여 마지막 주에 수행된 육안 및 안저사진기를 통해 전안부(anterior segment), 중간투광체(transparent media), 안저(Fundus) 등의 안과학적 검사를 실시한 결과, 대조군과 KOB 투여군 모두에서 특이한 증상이 관찰되지 않았다(표 4). 또한 요 검사에서는 대조군과 KOB 투여군 간 모든 검사 항목(glucose, bilirubin, specific gravity, pH, urobilinogen, nitrite, occult blood, leukocyte)에서 차이가 없었으며, 케톤체(ketone body)와 단백질(protein)의 경우 중증도가 KOB 투여군이 대조군에 비해 수치가 경미하게 증가하는 경향을 나타

내었으며, 이는 시험물질 유래 경미한 변화로 추정되고, pH 및 LEU 중증도 역시 대조군과 비교하여 KOB 투여군에서 높게 나타났지만 용량의존성이 없어 시험물질 유래 경미한 변화로 추정된다(표 5).

Table 4. Ophthalmic findings of rats

SITES	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Left eye	Normal	0 / 5 ^{a)}	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Right eye	Normal	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

a) Number of animals with the finding / Number of animals examined.

Table 5. Urinalysis of rats

TESTS	RESULT	SEVERITY	G1	G2	G3	G4
			0	1,250	2,500	5,000
GLU	-	0	5	5	5	5
BIL	-	0	5	5	5	3
	+	1	-	-	-	2
KET	-	0	5	3	-	-
	+/-	1	-	1	3	1
	1+	2	-	1	2	4
	≤1.005	0	3	-	-	-
	1.010	1	2	4	2	3
	1.015	2	-	1	3	-
	1.020	3	-	-	-	2
	1.025	4	-	-	-	-
	≥1.030	5	-	-	-	-
	≤7.0	1	1	-	-	-
	7.5	2	2	-	-	-
	8.0	3	2	-	-	1
	8.8	4	-	5	5	4
PRO	-	0	3	-	-	-
	+/-	1	1	1	-	-
	1+	2	1	3	2	1
	2+	3	-	1	3	4
URO ^{a)}	0.2	0	5	5	5	4
	1	1	-	-	-	1
NIT	-	0	2	2	2	4
	+	1	3	3	3	1
OB	-	0	1	3	4	5
	+/-	1	4	2	1	-
	-	0	3	-	-	-
	+/-	1	1	-	1	1
	1+	2	1	5	2	2
	2+	3	-	-	2	2
No. of animals			5	5	5	5

a) The unit of Urobilinogen is Ehrlich unit /dl
 * Represents a significant difference at p<0.05 level compared with the vehicle control.
 GLU: Glucose BIL: Bilirubin KET: Ketone body
 SG: Specific gravity PRO: Protein URO: Urobilinogen
 NIT: Nitrite OB: Occult blood LEU: 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), 혈색소크기 분포(HDW), 혈소판수(PLT), 평균혈소판용적(MPV), 망상적혈구수(RET), 백혈구수(WBC), 호중구수(NEU), 림프구수(LYM), 단핵구수(MONO), 호산구수(EOS), 호염구수(BASO), large unstained cell(LUC)을 측정하여, 대조군과 KOB 투여군의 동물에서 정상 수치를 나타내었다(표 6).

Table 6. Hematological values of rats

TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
WBC	10 ³ /μL	2.39±0.832	3.18±1.136	3.19±0.769	2.80±0.867
RBC	10 ⁶ /μL	8.89±0.290	8.73±0.402	8.78±0.299	8.88±0.227
HGB	g/dL	15.05±0.662	14.93±0.680	14.94±0.417	15.12±0.447
HCT	%	47.42±2.298	47.06±2.489	47.63±1.395	48.29±1.488
MCV	fL	53.35±1.549	53.89±1.136	54.29±1.300	54.38±1.189
MCH	pg	16.94±0.453	17.08±0.235	17.02±0.492	17.03±0.343
MCHC	g/dL	31.77±0.729	31.72±0.557	31.35±0.299	31.31±0.360
RDW	%	11.96±0.486	11.99±0.612	11.88±0.371	11.81±0.370
HDW	g/dL	2.45±0.101	2.46±0.139	2.45±0.091	2.43±0.080
PLT	10 ³ /μL	924.90±67.616	909.70±63.536	991.80±82.373	933.80±52.611
MPV	fL	7.57±0.359	7.76±0.288	7.74±0.084	7.74±0.344
RET	%	1.56±0.237	1.67±0.282	1.69±0.210	1.53±0.197
NEU	%	19.63±3.588	21.25±6.362	21.88±11.667	19.20±4.449
	10 ³ /μL	0.46±0.125	0.70±0.366	0.68±0.297	0.54±0.244
	%	74.48±4.364	73.01±6.735	72.02±10.987	75.37±4.793
LYM	10 ³ /μL	1.79±0.704	2.30±0.779	2.31±0.691	2.10±0.626
	%	2.46±0.532	2.69±0.816	2.64±0.540	2.74±0.814
MONO	10 ³ /μL	0.06±0.023	0.09±0.055	0.09±0.033	0.08±0.040
	%	2.57±1.301	2.08±0.625	2.41±0.540	1.86±0.395
EOS	10 ³ /μL	0.06±0.031	0.06±0.015	0.08±0.027	0.05±0.023
	%	0.14±0.178	0.11±0.057	0.14±0.052	0.15±0.085
BASO	10 ³ /μL	0.00±0.003	0.00±0.002	0.00±0.002	0.00±0.003
	%	0.71±0.269	0.85±0.428	0.89±0.538	0.68±0.382
LUC	10 ³ /μL	0.02±0.009	0.03±0.020	0.03±0.020	0.02±0.014
No. of animals		10	10	10	10

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 단백(PRO), 크레아티닌 포스포키나제(CPK), 알부민(ALB), 총 빌리루빈(BIL), 중성지방(TG), 무기 인산(IP), 알부민 글로부린 레시오(A/G), 나트륨이온(Na⁺), 칼륨이온(K⁺), 염소이온(Cl⁻)의 양을 측정된 결과, 대조군과 KOB 투여군의 모든 동물에서 정상 수치를 나타내었다(표 7).

Table 7. Serum biochemical values of rats

TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
ALB	g/dl	3.41±0.173	3.33±0.158	3.36±0.121	3.38±0.118
ALP	U/l	184.15±33.492	192.68±18.437	184.50±13.797	178.65±25.769
ALT	U/l	27.60±3.766	27.34±4.560	28.86±5.615	26.09±4.495
AST	U/l	76.08±7.652	75.58±5.952	82.32±9.111	75.46±9.951
BIL	mg/dl	0.10±0.018	0.11±0.013	0.11±0.012	0.11±0.028
BUN	mg/dl	16.84±4.110	18.32±4.067	16.40±2.634	17.27±2.440
CHO	mg/dl	66.38±9.981	73.72±24.560	70.53±10.706	60.32±7.711
CPK	U/l	114.94±53.773	107.65±45.190	106.75±38.905	115.62±77.426
CRE	mg/dl	0.49±0.092	0.45±0.046	0.45±0.058	0.49±0.032
GLU	mg/dl	185.94±50.325	176.34±12.795	172.96±21.570	178.36±40.536
IP	mg/dl	4.58±1.085	4.55±0.782	4.57±0.613	4.42±0.601
PRO	g/dl	6.25±0.336	6.08±0.251	6.12±0.335	6.13±0.316
TG	mg/dl	98.40±34.626	77.00±14.667	70.81±33.621	80.66±22.598
A/G	ratio	0.55±0.013	0.55±0.020	0.55±0.013	0.55±0.014
Na ⁺	mg/dl	143.6±0.56	143.1±0.76	143.8±0.79	143.2±1.05
K ⁺	mmol/L	4.0±0.15	4.1±0.13	4.0±0.29	4.0±0.19
Cl ⁻	mmol/L	104.2±0.89	103.8±0.94	104.1±1.24	103.6±1.06
No. of animals		10	10	10	10

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

6. 장기중량 검사

시험 기간 중 사망한 동물이 없었으므로 13주 반복 투여 후 부검을 실시한 결과, 대조군과 KOB 투여군 모든 동물의 뇌(brain), 뇌하수체(pituitary), 심장(heart), 폐(lung), 간(liver), 비장(spleen), 부신(adrenal), 고환(testis), 부고환(epididymis), 전립선(prostate gland), 흉선(thymus) 등 장기에서 유의적인 변화는 관찰되지 않았고, 신장(spleen)의 좌,우 및 비장 무게가 대조군과 비교하여 중용량군에서 증가하였지만 용량의존성이 없어 시험물질 유래 경미한 변화로 판단된다(표 8).

Table 8. Absolute organ weights of rats

ORGAN WEIGHT (g)	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Adrenal(L)	0.0284±0.00310	0.0292±0.00529	0.0293±0.00389	0.0292±0.00383
Adrenal(R)	0.0276±0.00610	0.0289±0.00545	0.0301±0.00386	0.0294±0.00537
Pituitary	0.0154±0.00263	0.0168±0.00257	0.0164±0.00175	0.0151±0.00211
Testis(L)	1.8249±0.22011	1.8108±0.15503	1.8409±0.15746	1.8760±0.10692
Testis(R)	1.7991±0.21725	1.8137±0.16189	1.8450±0.17480	1.8643±0.13295
Epididymis(L)	0.6753±0.06454	0.6879±0.05855	0.6940±0.05299	0.7083±0.03254
Epididymis(R)	0.6809±0.07477	0.6851±0.05923	0.6842±0.05323	0.7016±0.03206
Thymus	0.5350±0.12605	0.5192±0.12433	0.5155±0.14294	0.4498±0.11410
Prostate	0.7047±0.13647	0.7504±0.14280	0.6774±0.16054	0.7211±0.15391
spleen	0.9732±0.12717	1.0528±0.13579	1.1364±0.16116	1.0156±0.10889
kidney(L)	1.4130±0.18090	1.5251±0.22496	1.6606±0.18695	1.4923±0.14808
kidney(R)	1.4549±0.20734	1.5207±0.19143	1.6710±0.16938	1.5126±0.16337
Heart	1.4814±0.13906	1.5546±0.16171	1.6158±0.10324	1.6258±0.28147
Lung	2.0854±0.18221	2.1278±0.25559	2.1155±0.17840	2.0544±0.28802
Brain	2.1996±0.08670	2.2331±0.13668	2.2390±0.10533	2.1968±0.10092
Liver	13.3259±1.84978	14.1119±2.02647	14.7113±1.56712	13.7994±1.94460
No. of animals	10	10	10	10

7. 부검소견

KOB 투여 13주 후 모든 동물을 부검 전 약 18시간 이상 절식 시킨 후 isoflurane으로 흡입마취하여 치사시킨 후 이상 유무를 육안 검사를 실시한 부검결과에서 대조군과 중용량군에서 각각 1레씩 가슴색의 발적(redness)이 발견되었다. 이는 마취 시 흔히 나타날 수 있는 소견이며 낮은 발생 빈도로 관찰되어 비시험물질 유래 변화로 추정된다(표 9).

Table 9. Necropsy findings of rat

ORGANS	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Thymus	Redness	1	·	1	·
No. of animals		10	10	10	10

8. 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사 결과, 대조군의 신장에서 세뇨관 공포 변성(vacuolization of the tubules)이 2레 관찰되었으나 고용량군에서는 나타나지 않았다. 또한 간에서는 microgranuloma와 공포변성이 대조군 및 고용량군에서 각 1레 관찰되었다. 이는 대조군만 관찰되거나 혹은 대조군과 시험군에서 동일한 병변이 관찰되어 비시험물질 유래 변화로 추정된다(표 10).

Table 10. Histopathological findings of rat

ORGANS	OBSERVED SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)	
		G1 (0)	G4 (5,000)
KIDNEY	Vac ¹	2	.
	Gra	1	1
LIVER	Vac ²	1	1
	Bdh	1	.
No. of animals		10	10

Vac¹- vacuolization of the tubules

Vac²- vacuolization of the hepatocytes

Gra- microgranuloma in the liver

Bdh- bile duct hyperplasia

고찰

최근 생활수준의 향상과 의료기술의 발달로 전 세계적으로 천연물에 대한 관심이 많아지면서 천연물 소재를 이용한 식품이나 의약품 개발에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다^{11,12}. 한약은 질병의 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방을 목적으로 사용되는 천연약물로서 의약품 개발 시 질환에 대한 임상연구결과 및 안전성과 유효성을 입증할 만한 객관적인 자료의 제시가 요구되고 있다. 한약의 효능과 안전성에 대한 과학적 근거 확보는 한약과 원료약재 사용에 대한 독성과 부작용 문제 등 부정적인 인식이나 오해를 없애고 국민 신뢰를 향상시키는데 매우 중요하다. 현대 의학에서도 합성 의약품의 장기 사용에 따른 부작용과 독성 문제가 대두되고 있지만 한약에 비해 상대적으로 이에 대한 객관적 근거가 잘 마련되어 있다. 반면, 한약은 최근 효능에 대한 실험적 연구가 활발히 이루어지고 있으나 안전성에 대해서는 여전히 근거 제시가 미흡하고, 인체 장기에 대한 독성과 알레르기 유발 등에 대한 오해를 받고 있는 실정이다^{3,13}. 또한 독성이 강한 일부 한약재들의 무분별한 판매로 한약의 안전성에 대한 부정적 이미지가 강하게 심어지고 있어서 과학적이고 체계적인 독성시험에 따른 한약의 안전성 확보가 무엇보다 필요한 실정이다^{2,3}.

독성시험은 새로운 물질의 독성을 미리 예측할 수 있는 시험으로 농약, 의약, 산업용 화학물질 및 기타 환경오염물질 등 대상 물질이 인체에 미치는 유해성을 조사하기 위해 설치류 등의 실험동물을 이용하여 소화기계, 호흡기계, 비뇨기계, 생식기계 및 신경계 등을 포함하는 모든 장기조직에 미치는 유해성 정도를 단회 및 반복투여에 따라 독성정도를 평가하는 것이다. 일반적으로 독성시험은 단회투여독성시험, 반복투여독성시험, 생식발생독성시험, 유전독성시험, 항원성시험, 면역독성시험, 발암성시험, 국소독성시험, 국소내성시험, 흡입독성시험 등으로 분류되며, 천연약물을 의약품으로 개발할 경우에는 주로 랫드와 마우스 등의 설치류를 대상으로 단회투여독성시험과 2주 또는 4주 반복투여독성시험(DRF) 및 1개월, 3개월, 6개월, 12개월 반복투여독성시험을 실시하게 된다. 또한 독성시험의 투여 경로로 경구, 경피, 정맥 투여를 사용하며, 한약의 경우는 일반적으로 임상적용 경로인 경구투여를 많이 사용하고 있다. 여러 독성시험 중 반복투여독성시험은 시험물질을 시험동물에 반복 투여하여 증장기간 내에 나타나는 독성을 질적, 양적으로 검사하는 시험으로 단회투여독성시험이나 4주반복DRF독성시험 등 초기 독성검사를 통해 용량을 설정한 후 용량 단계는 적어도 3단계의 실험물질 투여군으로 하여 최대 내성용량 및 무해용량 등을 포함하여 용량-반응 관계가 나타날 수 있도록 설정해야 한다. 또한 반복투여

독성시험에는 일반증상, 체중, 사료섭취량, 물섭취량, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사와 같은 혈액검사, 뇨검사, 안과학적 검사, 병리조직학적 검사 및 기타 필요에 따라 심전도, 시각, 청각, 신기능 등 검사를 실시하게 된다.

본 연구에서 수행한 13주 반복 경구투여에 의한 독성시험에서는 시험물질인 KOB에 의해 독성학적 및 약리학적 변화를 유발하지 않는 최대무영향용량(No Observed Effect Level, NOEL)과 KOB에 의한 부작용(adverse effect, toxicity)을 유발하지 않거나 명확히 질환과 연관되지 않는 무독성(non-adverse effect)을 유발하는 최대무독성용량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL), 그리고 KOB에 의해 부작용을 유발하는 최소독성용량(Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL)을 예측할 수 있으며, NOEL, NOAEL, LOAEL로 구분하는 핵심 판단기준은 시험물질에 의한 부작용(adverse effect)과 무독성 작용(non-adverse effect)이 된다. 그러나, 시험물질에 의한 결과물을 부작용과 무독성 작용으로 판정하여 독성지표를 얻기에는 포괄적이며 또한 추상적인 측면이 있어서 생물학적 및 통계적 유의성, historical data와의 용량의존성 강도의 기준을 바탕 등을 토대로 시험의 결과를 구분할 수 있는 분류체계가 필요하다고 보고 있다^{10,14,15}.

본 연구에서는 임상처방 유래 알려지지 않은 한약제제로 개발 중에 있는 한약제제인 KOB의 안전성을 평가하고 임상시험에서의 사용 범위를 설정하기 위해서 식품의약품안전청의 독성시험가이드라인에 따라 GLP기관으로부터 랫드에서의 13주반복경구투여 독성시험을 실시하였다. 본 독성시험에서는 기존 용량범위설정시험(dose-range finding, DRF) 결과를 기준으로 최고투여농도(5000 mg/kg/day), 중간투여농도(2500 mg/kg/day) 및 저용량투여농도(1250 mg/kg/day)를 설정하였으며, 13주 반복 경구투여 후 KOB의 최대무독성용량(NOAEL)은 5000 mg/kg/day로 예측되었다. 본 독성시험결과로부터 인체에게 적용하는 MRSD(maximum recommended starting dose)를 계산해 보면 성인 60 kg 기준으로 4839 mg/60kg/day로 나타났다. 본 독성시험결과에서 KOB에 의한 사망, 체중변화, 식이변화 및 일반증상조건은 나타나지 않았으며, 임상병리적 지표인 혈액학, 혈액생화학, 혈액응고, 전해질검사에서도 아무런 변화가 관찰되지 않았다. KOB는 요검사에서 KET, PRO, pH 및 LEU 수치에 경미한 변화를 나타내었으나 대조군과 비교하여 모든 시험군에서 용량의존성이 나타나지 않았고, 시험계의 체중변화, 요침사 및 병리 검사에서도 염증관련 지표에서 KOB의 독성작용에 의해서가 아닌 약리적 변화로 판단되었다. 또한 KOB는 PRO 검사에서 아무런 이상을 나타내지 않았으며, 사구체 및 세뇨관의 조직병리학적 검사에서도 어떠한 독성 소견이 보이지 않았다. KOB는 장기중량 검사에서 신장 및 비장의 중량이 대조군과 비교하여 KOB의 중용량군(2500 mg/kg/day)에서 다소 증가하는 경향을 나타내었으나 용량의존성이 나타나지 않아서 조직병리학적 소견에서와 마찬가지로 이상 소견이 나타나지 않았다. 대조군과 KOB의 고용량군(5000 mg/kg/day)의 조직병리학적 검사 결과에서는 신장조직 세뇨관에서의 공포변성(vacuolization of the tubules)과 담관증대(bile duct hyperplasia)이 대조군에서 각각 2례와 1차례 관찰되었으나, KOB 시험군에서는 나타나지 않았으며, 간에서는 microgranuloma와 공포변성이

대조군과 KOB 시험군에서 각 1례씩 관찰되었으나 비시험물질 유래 변화로 추정되었다. 조직병리검사에서 신장과 간의 경우 KOB에 대한 이상 소견이 일부 관찰되어 동료평가(peer review) 검사를 실시하다.

결론적으로, KOB는 만성독성검사인 랫드에서 13주 반복경구투여독성시험에서 유해한 영향이 관찰되지 않는 최대무작용량(NOEL)은 5000 mg/kg/day를 상회하는 것으로 추정되었다.

결론

본 연구에서는 알러지성 비염 한약제제인 KOB의 랫드에서의 13주반복경구투여독성시험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. KOB는 전 시험기간 동안 모든 시험동물에서 일반 증상 및 사망한 동물이 관찰되지 않았다.
2. KOB는 전 시험기간 동안 모든 시험동물의 체중을 정상적으로 증가시켰으며, 사료섭취량에 변화를 주지 않았다.
3. KOB는 전 시험기간 동안 모든 시험동물에서 안과학적 검사에서 특이적인 변화를 보이지 않았다.
4. KOB는 전 시험기간 동안 모든 시험 동물에서 혈액학적 및 혈액생화학적 지표에 영향을 주지 않았다.
5. KOB는 전 시험기간 동안 모든 시험 동물에서 요검사를 통한 특이적인 변화를 보이지 않았다.
6. KOB는 전 시험기간 동안 모든 시험 동물에서 부검시 이상 소견을 보이지 않았으며, 장기중량에서도 변화를 보이지 않았다.
7. KOB는 전 시험기간 동안 모든 시험 동물에서 조직병리학적 검사에서 특이적인 변화를 보이지 않았다.

이상의 결과로 보아 KOB는 13주간 반복경구투여독성시험에서 최대무독성용량(NOEL)은 5,000 mg/kg/day로 추정되었다.

감사의 글

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

참고문헌

1. Kim TH, Jang S, Lee AR, Lee AY, Choi GY, Kim HK. The analysis of Residual Pesticides and Sulfur Dioxide in Commercial Medicinal Plants. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(6) : 43-8.
2. Jung JK, Park YK. 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. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(3) : 101-6.
3. Oh TW, Bae HS, Yoon CH, Park YK. Thirteen-week repeated-dose oral toxicity study of the Modified Wenpitang-Hab-Wulingsan (WHW®) in Sprague-Dawley rats. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(3) : 43-51.
 4. Chang BY, Kim YC, Kang DG, Lee HS, Kim SY. Thirteen-week Repeated Oral Dose Toxicity Study of WK-38 in Rats. *J Fd Hyg Safety*. 2008 ; 23(2) : 169-76.
 5. Sung SH, Park JH. Status and Prospects of Natural Medicine. *Health Ventures reports the latest trends and issues*. 2007 : 14-23.
 6. Kim SH, Choi EJ, Kim DH, Lee KY, Lee M, Baek SW, Kwak SJ, Kang TS, Kim YC, Sung SH. Stability test of the extracts of Cimicifugae Rhizoma, Achyranthis Radix, Artemisia Capillaris Herba, Moutan Cortex Radicis and Arecae Semen for toxicity study. *Kor J Pharmacogn*. 2008 ; 39 : 241-5.
 7. Ahn DK, Nac HS. *Oriental medicine and immunology*. Paju : openbooks. 1994 : 15-48.
 8. Jung JK, Park YK. Anti-allergic effect of okbyungpoongsan-hap-changijasan. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(2) : 55-63.
 9. 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.
 10. Park YC, Cho MH. A New Way in Deciding NOEL Based on the Findings from GLP-Toxicity Test. *Toxicol Res*. 2011 ; 27(3) :133-5.
 11. Chinese pharmacopoeia commission. *The People's Republic of China pharmacopoeia*. Beijing : Chemistry industry publishing house. 2005 : 237.
 12. 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.
 13. Kwon GT. *Study on control and management of poisonous medicinal herbs*. Kyunghee University. 2009.
 14. Lewis RW, Billington R, Debryune E, Gamer A, Lang B, Carpanini F. Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. *Toxicol Pathol*. 2002 ; 30(1) : 66-74.
 15. Ness D. *Writing the non clinical study final report: A focus on compliance, accuracy, and scientific soundness*. 2006 : 7, 36-41.