

GST 추출물의 Sprague-Dawley Rat를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

김윤하¹, 김준영¹, 한종민¹, 이혜영², 정인철³, 진미림^{4,5}, 김승형⁵, 박양춘^{1,5}

¹대전대학교 한의과대학 내과학교실, ²(주)바이오텍스텍, ³대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실
⁴대전대학교 한의과대학 약리학교실, ⁵대전대학교 동서생명과학연구원

A Thirteen Week Repeated Oral Dose Toxicity Test and A Four Week Recovery Test of GST in Sprague-Dawley Rats

Yoon-ha Kim¹, Jun-young Kim¹, Jong-min Han¹, Hye-yeong Lee²
In-chul Jung³, Mi-rim Jin^{4,5}, Seong-hyeong Kim⁵, Yang-chun Park^{1,5}

¹Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dae-Jeon University, ²Biotoxtech

³Dept. of Neuropsychology, College of Korean Medicine, Dae-Jeon University

⁴Dept. of Pharmacology, College of Korean Medicine, Dae-Jeon University

⁵Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Dae-Jeon University

ABSTRACT

Objectives: To provide information on the safety of GST (*GamiSasangja-tang*: CnidiiFructus, Sophora Root, Angelica Gigas Root, Clematidis Radix, Stemonae Radix, Spirodela Herba), we carried out a 13-week repeated oral dose toxicity and a 4-week recovery test of GST in Sprague-Dawley rats.

Methods: Female and male rats were treated with GST at oral doses of 1,250, 2,500, and 5000 mg/kg. The GST was administered for 13 weeks. Mortality, clinical signs, body weight changes, food consumption, ophthalmologic findings, urinalysis, hematological and biochemical parameters, gross findings, organ weights and histological markers were monitored during the study period. The rats were then monitored for 4 extra weeks to determine recovery time after the study period.

Results: We found no mortality or abnormalities among clinical signs, body weight, food consumption, ophthalmologic findings, urinalysis, hematological and biochemical parameters, gross findings, organ weights or histological markers in any of the rats tested.

Conclusions: The no-observed adverse effects level (NOAEL) is considered as over 5000 mg/kg for male and female rats.

Key words: GST, safety, 13 week repeated oral dose toxicity test, 4 week recovery test, SD rats

1. 서 론

아토피 피부염은 전세계적으로 8-20% 유병률을

보이는¹ 만성 재발성 피부질환이다². 국민건강보험공단 자료에 의하면 2008년-2012년 연평균 진료인원이 104만 명으로 전체 진료인원 수는 경도 감소하는 경향을 보이나, 입원 환자의 수는 2008년에는 896명, 2012년에는 1,367명으로 1.5배 증가하여 중증 환자의 비율이 증가하는 추세이다³. 아토피 피부염은 수면장애에 의한 집중력 저하 및 만성적인

· 교신저자: 박양춘 대전광역시 중구 대흥로 170
대전대학교대전한방병원 한방내과
TEL: 042-229-6919 FAX: 042-254-3403
E-mail: omdpyc@dju.kr

피곤함, 외모 변화에 의한 정서장애, 자신감 상실을 일으켜 환자가 겪는 고통이 매우 큰 질환이라고 할 수 있다⁴.

아토피 피부염에서 기본적인 치료는 악화요인을 회피하고, 피부가 건조해지지 않게 보습제를 사용하며, 국소 또는 전신 스테로이드와 같은 항염증제로 피부 염증을 완화시키는 것이다^{5,6}. 이러한 치료로 증상을 완화시킬 수는 있으나 일부 중증의 환자에서는 치료에 잘 반응하지 않는 경우도 많으며, 스테로이드의 지속적 사용으로 인한 피부위축 등의 여러 가지 부작용을 초래할 수 있다⁷. 이러한 이유로 보다 안전하면서도 효과적인 치료제의 개발이 요구되고 있다.

《外科正宗·卷四》에서 사상자탕(*Sasangja-tang*, *Shechuangzi-tang*; 蛇床子(*Cnidii Fructus*), 威靈仙(*Clematidis Radix*), 當歸(*Angelica Gigas Root*), 苦蔘(*Sophora Root*))⁸은 肝經의 濕熱로 인한 腎囊風에 사용하는 처방이다. 腎囊風은 음부에 생기는 瘡瘍으로 가려움이 심하고, 심하면 잡목처럼 우둘투둘하며, 터지면 끈끈한 짓물이 스며 나와 짓무르면서 딱지가 붙으며, 오래되면 살갓이 두터워지고 비늘이 벗겨지면서 가려움이 더욱 심해진다고 하였다. 서술된 증상이 현대의 아토피 증상과 매우 유사하다. 이러한 질환에 사용하는 사상자탕에 潤肺止咳하고 殺蟲滅蟲하는 百部根(*Stemonae Radix*)⁸과 宣散風熱 透疹하는 浮萍草(*Spirodela Herba*)를 더하여 가미사상자탕(*Gami Sasangja-tang*, 이하 GST)을 구성하여 대전대학교부속한방병원 폐계내과학교실에서 아토피 피부염을 비롯한 가려움증에 다양하게 활용하고 있다.

이에 GST의 아토피 피부염에 대한 효능을 평가하기 위한 임상연구의 예비연구로서 암수 Sprague-Dawley rat(이하 SD rat)를 이용하여 시험물질인 GST 추출물을 13주간 반복 경구투여하여 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하였고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험기관

시험의 전과정을 GLP(Good Laboratory Practice, 비임상시험관리기준)기관인 (주)바이오톡스텍에서 진행하였다.

본 시험은 동물보호법에 의거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인 번호: 130353).

2. 시험 동물 및 사육환경

1) 시험 동물

본 시험에서 모두 SPF(specific pathogen-free) SD (Sprague-Dawley)계 rat를 사용하였다. SD계 rat는 의약품 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다⁹. 입수 시에는 5주령 수컷 56마리, 118.2~141.3 g, 5주령 암컷 56마리, 101.2~119.0 g이었으며 투여개시 시에는 6주령 수컷 50마리 187.2~213.0 g, 6주령 암컷 50마리, 144.7~175.5 g이었다. 반입시 동물의 외관 검사, 체중 측정을 하였고 7~8일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화를 확인하였다.

2) 사육환경

스테인리스 철망 사육상자(260 W×350 D×210 H (mm))에 검역, 순화기간동안 2~3마리, 관찰기간 동안 1마리를 사육하였다. 온도는 20.9~24.0 °C, 상대습도 44.1~77.3%로 유지하였다. 환기횟수 10~15 회/시간, 조명시간 12시간/일(오전 7시~오후 7시), 조도 150~300 lux로 같은 조건으로 설정하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)를 사용하였고, 고품사료를 자유섭취 시켰다. 음수는 필터유수살균기로 여과한 청주시 수도물을 자외선 조사하여 자유섭취 시켰다. 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 '먹는 물 수질기준 및 검사 등에 관

한 규칙'의 전 항목에 대하여 실시하여 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다.

3. 시험물질 및 투여

1) 시험물질

본 실험에 사용한 GST 추출물은 (주)한국신약에서 짙은 갈색의 점액 형태로 공급받았으며, 전자저울(CP323S, BP3100S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 유리 조제병에 넣고, 부형제를 일부 넣어 stirrer로 현탁시키고, 부형제를 가하여 규정농도(125, 250 및 500 mg/ml)로 조제하였다. 성인(60 kg) 기준 1일 용량에 해당하는 약제의 구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Composition of GST

Herbal name (Korean)	Herbal name	Amount (g)
사상자	<i>Cnidi Fructus</i>	2.56
백부근	<i>Stemonae Radix</i>	2.56
부평초	<i>Spirodela Herba</i>	2.56
고삼	<i>Sophora Root</i>	2.56
당귀	<i>Angelica Gigas Root</i>	1.28
위령선	<i>Clematidis Radix</i>	1.28
Total		12.80

Table 2. The Composition of Group

Group	Dose (mg/kg/day)	Administered fluid volume (ml/kg)	Number of animals (Objective numbers)	
			Male	Female
G1 Control group	0	10	10 (1101 ~ 1110) +5* (1111 ~ 1115)	10 (2101 ~ 2110) +5* (2111 ~ 2115)
G2 Low dose group	1,250	10	10 (1201 ~ 1210)	10 (2201 ~ 2210)
G3 Medium dose group	2,500	10	10 (1301 ~ 1310)	10 (2301 ~ 2310)
G4 High dose group	5,000	10	10 (1401 ~ 1410) +5* (1411 ~ 1415)	10 (2401 ~ 2410) +5* (2411 ~ 2415)

* : Recovery group

4. 관찰 및 검사

1) 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하

2) 투여절차

시험물질의 임상적용 예상경로가 경구이므로 경구투여를 선택하였고, 투여액량은 10 ml/kg으로 하고, 개체별 투여액량은 최근의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 매일 오전 경구투여용 존테를 부착한 일회용 주사기(3, 5 및 10 ml)를 이용하여 13주간 1일 1회 위내에 강제투여 하였다.

3) 군 분리 및 투여용량 설정

군 분리는 순화종료일에 실시하였고 평균 체중에 가까운 암수 각 50마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 대조군 및 고용량군은 군당 15마리, 저용량군 및 중용량군은 군당 10마리로 군 분리하였다.

반복투여 용량결정시험(Biototech Study No.: B13182)의 결과¹⁰, 5,000 mg/kg 용량에서 시험물질에 의한 간중량 증가, 수컷의 체중감소, 암컷의 T-chol (Total Cholesterol)의 증가가 관찰되어, 본 시험에서는 5,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비2를 적용한 2,500 및 1,250 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 부형제인 주사용수를 투여하였다(Table 2).

고, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 관찰은 투여기간 동안 모든 동물에 대하여 투여 1일부터 13주간 실시하고, 13주간의 투여 종료

후 회복군에 대하여 4주간 실시하였다.

2) 체중측정

모든 동물에 대하여 투여개시일(투여전), 투여개시 후 및 회복기간에 주 1회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하였다. 회복군의 경우, 투여종료 후 익일 체중을 측정하였다.

3) 사료섭취량 측정

모든 동물에 대하여 투여개시 전의 사료섭취량은 군 분리 일부터 투여 개시 일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 관찰기간(투여기간 및 회복기간)에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13주 및 회복 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

4) 안과학적 검사

주시험군은 각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에, 회복군 모든 동물에 대하여 회복 4주에 실시하였다. 안과학적 검사는 산동제(이속토 아트로핀 1% 점안제, 한국알콘, Lot No.: 12K21B)를 점안하기 전에 육안으로 동공대광반사 및 전안부 관찰을 실시하고, 산동제 점안 후에 검안경(ALL PUPIL II, Keeler, U.K.)으로 전안부, 중간투광체, 안저에 대해서 실시하였다.

5) 요검사

주시험군은 각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에, 회복군 모든 동물에 대하여 회복 4주에 요검사를 실시하였다. 신선뇨(배설 후 약 3시간 이내의 뇨) 및 축뇨(배설 후 약 24시간 요)를 수거하여 검사를 실시하였다. 신선뇨 채취 중에는 투여 및 사료급여를 실시하지 않고, 음수는 자유섭취 시켰다. 검사항목은 pH, protein, glucose, ketone body, bilirubin, occult blood, 색상 및 투명도, 침사, 요량, 요비중 등이다.

6) 혈액학적 검사

모든 동물에 대하여 부검 전 약 18시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대

동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1 ml를 EDTA 함유 tube에 넣은 후, 혈구 분석기(ADVIA 2120i, SIEMENS, Germany)로 측정하였다. 응고검사는 채취한 혈액 약 2 ml를 3.2% sodium citrate 함유 tube에 넣고, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 혈장을 채취하였다. 응고 시간 분석기(Coapresta 2000, SEKISUI, Japan)로 측정하였다. 검사항목은 RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), HCT(hematocrit), MCV(mean cell volume), MCH(mean cell hemoglobin), MCHC(mean cell hemoglobin concentration), PLT(platelet), WBC(white blood cell), WBC differential counting, reticulocytes, PT(protrombin time), aPTT(activated partial thromboplastin time) 등이다.

7) 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기(7180, HITACHI, Japan) 및 전해질 분석기(AVL 9181, Roche, Germany)로 측정하였다. 검사 항목은 ALT, AST, ALP, GGT, BUN, Crea, T-Bili, TP, Alb, A/G ratio, T-Chol, TG, P, Glu, Ca, Cl, Na, K 등이다.

8) 부검

모든 동물에 대해서 주시험군은 투여 92일에, 회복군은 투여 120일에 isoflurane 마취 하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사 시키고 부검하였다. 부검을 실시한 모든 동물에 대해서 전신의 장기, 조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

9) 장기중량 측정

모든 동물에 대하여 뇌, 뇌하수체, 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 부신, 고환, 전립선, 난소, 자궁에 대한 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다. 신장, 부신, 고환, 난소는 좌우를 합하여 무게를 측정하였다.

10) 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 뇌, 뇌하수

체, 갑상선, 부갑상선, 흉선, 폐, 기관지, 기관, 심장, 간, 비장, 신장, 부신, 타액선, 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 췌장, 고환, 부고환, 전립선, 정낭, 난소, 자궁, 질, 방광, 악하 림프절, 장간막 림프절, 안구 및 하더리안선, 유선, 피부, 골수(대퇴골 및 흉골), 혀, 척수, 육안소견이 관찰된 장기, 조직(피부, 꼬리)의 장기, 조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정하였다.

고정한 장기, 조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하여 박절한 후, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다. 골조직은 Calci-Clear-Rapid™액(National diagnostics, USA)을 사용하여 탈회하였다. 잔여 장기, 조직은 10% 중성완충 포르말린용액에 보존하였다. 조직병리학적 검사는 대조군과 고용량군의 모든 개체, 중용량군과 저용량군의 육안소견이 관찰된 장기 및 조직, 고용량군에서 시험물질에 의한 영향으로 사료되는 변화가 관찰된 경우, 중용량 및 저용량군의 해당 장기, 조직(간)에 대하여 검경하였다.

11) 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 요량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 결과는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., USA)를 사용하여 검정하였다.

투여기간 및 주시험군의 측정치에 대해서, Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준 : 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성(유의수준 : 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다(유의수준 : 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면 Kruskal-Wallis test를 실시하여 유의성(유의수준 : 0.05)이 관찰되면 Steel test의 다중검정을 실시하였다(유의수준 : 양측 0.05 및 0.01).

회복군의 측정치에 대해서, Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정하였다(유의수준 : 0.05).

등분산인 경우 Student t-test를, 등분산이 기각되면 Aspin-Welch t-test를 실시하여 유의성을 확인하였다(유의수준 : 양측 0.05 및 0.01).

II. 결 과

1. 일반 증상

투여기간 및 회복기간 동안, 암수 대조군 및 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

투여기간 동안, 시험물질색변(compound-colored stool)이 1,250 mg/kg/day 투여군은 수컷 1마리에서 일시적으로 관찰되었고, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 암수 모두에서 투여 2일부터 투여기간 동안 관찰되었다. 회복기간 동안, 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색변이 암수 모두 회복 2일까지 관찰되었다. 시험물질색변은 시험물질에 의한 착색변으로 사료되어 시험물질에 의한 독성변화는 아닌 것으로 판단된다.

유연(salivation)이 투여 전후에 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여기간 동안 산발적으로 관찰되었다. 유연은 투여 전후 모두 관찰되어 시험물질의 물리화학적 특성에 기인한 증상으로 사료되어 시험물질에 의한 독성변화는 아닌 것으로 판단된다.

회복기간 동안, 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군의 1마리에서 우측 복부의 종양(mass)이 투여 113일부터 관찰되었다. 조직병리학적 검사에서 유선의 선종으로 확인되었다.

그 외, 암컷 대조군에서 발가락 꺾임(folding toe), 발톱 손상에 따른 열린 상처(open wound of toe with damage to nail), 출혈(hemorrhage) 및 가피형성(crust formation)이 관찰되었고, 수컷 1,250 mg/kg 투여군에서 꼬리의 가피형성이 관찰되었으나, 사육기간 중 우발적으로 관찰된 증상으로 사료된다(Table 3, 4).

Table 3. Clinical Signs of SD Rats in 13-Week Oral Repeated Administration Toxicity Study of GST during Dosing Period

Sex	Group/Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected	
Male	G2/1,250	10	Compound-colored stool	1	
			Salivation (after dosing)	2	
			Salivation (before dosing)	1	
			Crust formation (tail)	1	
	G3/2,500	10	Compound-colored stool	10	
			Salivation (after dosing)	6	
			Salivation (before dosing)	2	
	G4/5,000	15	Compound-colored stool	15	
			Salivation (after dosing)	11	
			Salivation (before dosing)	7	
	Female	G1/0	15	Folding toe (right forelimb)	1
				Open sound of toe with damage to nail (right hindlimb)	1
Hemorrhage (toe, right hindlimb)				1	
Crust formation (toe, right hindlimb)				1	
G2/1,250		10	Salivation (after dosing)	8	
G3/2,500	10	Salivation (before dosing)	5		
		Compound-colored stool	10		
		Salivation (after dosing)	7		
G4/5,000	15	Salivation (before dosing)	5		
		Compound-colored stool	15		
		Salivation (after dosing)	15		
			Salivation (before dosing)	9	

Table 4. Clinical Signs of SD Rats in 13-Week Oral Repeated Administration Toxicity Study of GST during Recovery Period

Sex	Group/Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	No. of animals affected
Male	G4/5,000	5	Compound-colored stool	5
	G1/0	5	Crust formation (toe, right hindlimb)	1
Female	G4/5,000	5	Compound-colored stool	5
			Mass (right abdominal region)	1

2. 체중변화

투여기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는

관찰되지 않았다. 회복기간 동안, 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

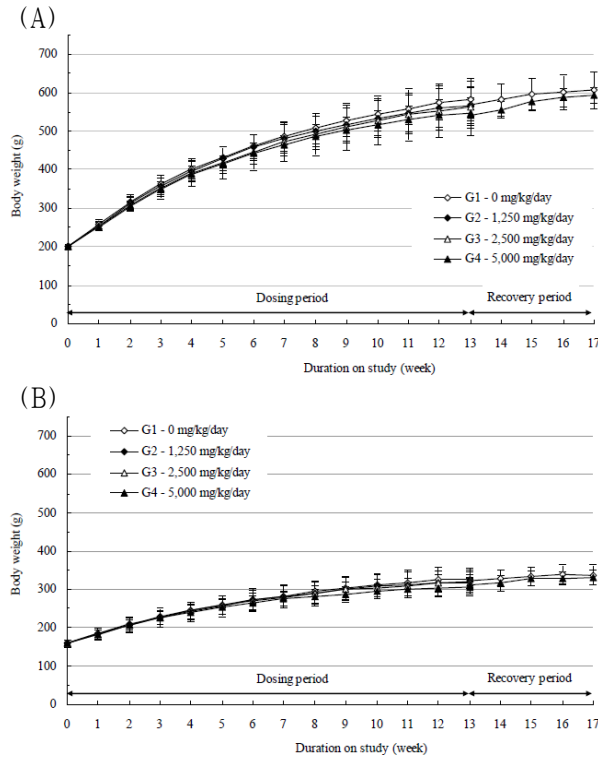


Fig. 1. Body weight (g) changes of male (A), female (B) rats in 13-weeks oral repeated administration toxicity study of GST. Values are expressed as mean±SD (n=10).

G1 : sterile water administration group, G2 : GST extract 1,250 mg/kg administration group, G3 : GST extract 2,500 mg/kg administration group, G4 : GST extract 5,000 mg/kg administration group.

3. 사료섭취량

투여기간 동안, 수컷 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 1주에 대조군과 비교시 유의성 있는 사료섭취량의 감소가 관찰되었으나, 일시적인 변화로 독성학적 변화는 아닌 것으로 판단된다. 암컷 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 사료섭취량 변화는 관찰되지 않았다.

회복기간 동안, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 수컷은 회복 1주~4주, 암컷은 회복 1주에 대조군과 비교시 유의성 있는 사료섭취량의 증가가 관찰되었으나, 체중과의 연관성이 없으며, 투여기간 종료 이후의 변화로 시험물질에 의한 독성변화는 아닌 것으로 판단되었다.

4. 안과학적 검사

주시험군의 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 이상 소견은 관찰되지 않았다.

5. 요검사

주시험군의 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 주시험군 및 회복군의 요에서 관찰된 다른 변화들은 미량이고 관련된 다른 변화를 동반하지 않았거나, 대조군에서도 관찰되었으므로 독성학적 의미는 없었다(Table 5, 6).

Table 5. Summary of Urinalysis Results in Main Group

Sex		Male				Female			
Group/Dose (mg/kg/day)		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5
Volume (mL)	Mean±SD	10.3±2.8	10.6±2.1	13.3±4.4	18.4*±6.0	4.8±3.3	4.7±2.4	5.7±3.4	8.2±1.0
Color	Pale yellow	1	1			1		1	1
	Yellow	4	4	5	5	4	5	4	4
Transparency	Clear	5	3	2	4	4	4	5	4
	Mild turbidity		2	2		1			1
	Turbidity			1	1		1		
pH	5						1		
	6					1	2	2	
	6.5					2		1	1
	7	1	1			1	1	2	1
	8	3	3	4	4	1	1		3
Protein (mg/dL)	9	1	1	1	1				
	-		1		1	1			4
	25	3	2	5	3	3	4	4	1
	75	2	2		1	1	1	1	
Glucose (mg/dL)	150								
	500								
Ketone body (mg/dL)	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
	-								
	5	3	3		2	4	3	4	5
	15	2	2	4	1	1	2	1	
Bilirubin (mg/dL)	50			1	2				
	150								
	-	5	5	5	5	4	5	5	5
Occult blood (Ery/μL)	1					1			
	3								
	6								
Cast [†]	-	4	5	5	5	5	5	5	5
	10	1							
Epithelial cell [†]	0	5	5	5	5	5	5	5	
Leukocyte [†]	0	5	5	5	5	5	5	5	
Erythrocyte [†]	0	5	5	5	5	5	5	5	
Specific gravity	1.031 ~ 1.040			1	3		1	2	1
	1.041 ~ 1.050	1	2	1	1	1	1	2	4
	1.051 ~ 1.060	3	3	3		4	3		
	>1.060	1			1			1	

Significantly different from control by Dunnett's t-test : *p<0.05.

† : Sediment

Table 6. Summary of Urinalysis Results in Recovery Group

Sex		Male		Female		
Group/Dose (mg/kg/day)		G1 0	G4 5,000	G1 0	G4 5,000	
No. of animals		5	5	5	5	
Volume (mL)	Mean±SD	8.9±1.8	11.1±4.4	5.1±1.8	11.3±5.7	
Color	Pale yellow	3	1	1	2	
	Yellow	2	4	4	3	
Transparency	Clear	4	5	5	3	
	Mild turbidity	1			2	
pH	Turbidity			1		
	5					
	6				1	
	6.5		1		1	
	7	1		1	2	
Protein (mg/dL)	8	4	4	3	1	
	9					
	-			3	3	
	25	5	3	2	2	
	75		2			
Glucose (mg/dL)	150					
	500					
Ketone body (mg/dL)	Normal	5	5	5	5	
	-	1		2	3	
	5	3	2	3	2	
	15	1	3			
	50					
Bilirubin (mg/dL)	150					
	-	5	4	5	5	
	1		1			
	3					
Occult blood (Ery/μL)	6					
	-	2	5	5	5	
Cast [†]	10	3				
	0	5	5	5	5	
	Epithelial cell [†]	0	5	5	5	5
	Leukocyte [†]	0	5	5	5	5
	Erythrocyte [†]	0	5	5	5	5
Specific gravity	1.021 ~ 1.030				1	
	1.031 ~ 1.040		1		2	
	1.041 ~ 1.050		1	2		
	1.051 ~ 1.060	3	1	1	2	
	>1.060	2	2	2		

† : Sediment

6. 혈액학적 검사

주시험군의 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 RBC의 감소가 관찰되었으나, 연관된 항목의 변화

를 동반하지 않았으므로 현시점에서는 독성학적인 의미가 없었다. 회복군의 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 측정항목에서 p<0.05 수준에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 7, 8).

Table 7. Haematological Values of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Main Group

Sex	Group/Dose (mg/kg/day)					
	G1/0	G2/1,250	G3/2,500	G4/5,000		
Male	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ l)	8.36 \pm 0.46	8.58 \pm 0.20	8.55 \pm 0.24	8.27 \pm 0.21	
	HGB (g/dL)	14.9 \pm 0.5	14.9 \pm 0.4	15.1 \pm 0.6	14.7 \pm 0.4	
	HCT (%)	41.0 \pm 1.5	41.8 \pm 1.2	41.8 \pm 1.4	40.9 \pm 0.7	
	RBC Indices	MCV (fL)	49.1 \pm 1.5	48.7 \pm 1.6	48.9 \pm 0.9	49.4 \pm 1.0
		MCH (pg)	17.8 \pm 0.8	17.4 \pm 0.5	17.6 \pm 0.4	17.8 \pm 0.4
		MCHC (g/dL)	36.3 \pm 0.7	35.7 \pm 0.6	36.1 \pm 0.3	36.1 \pm 0.4
	PLT ($\times 10^3$ cells/ μ l)	973 \pm 122	1045 \pm 341	933 \pm 115	945 \pm 126	
	Reti (%)	2.39 \pm 0.40	2.17 \pm 0.32	2.16 \pm 0.37	2.26 \pm 0.42	
	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)	8.16 \pm 1.15	9.06 \pm 3.03	7.74 \pm 1.58	8.88 \pm 2.73	
	WBC differential counting (%)	NEU	19.7 \pm 5.9	17.5 \pm 6.4	20.9 \pm 8.5	20.7 \pm 4.9
		LYM	76.1 \pm 6.4	77.7 \pm 6.8	75.2 \pm 8.6	74.7 \pm 4.8
		MONO	2.1 \pm 0.6	2.3 \pm 0.7	1.8 \pm 0.7	2.1 \pm 0.3
		EOS	1.2 \pm 0.4	1.3 \pm 0.6	1.2 \pm 0.5	1.0 \pm 0.4
		BASO	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0
	PT (sec)	18.1 \pm 0.8	18.6 \pm 0.9	18.1 \pm 0.8	18.1 \pm 0.7	
	aPTT (sec)	16.6 \pm 1.1	17.7 \pm 0.5	16.8 \pm 1.3	16.5 \pm 2.1	
	Female	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ l)	7.95 \pm 0.36	7.83 \pm 0.26	7.76 \pm 0.50	7.38 \pm 0.51
HGB (g/dL)		14.8 \pm 0.6	14.8 \pm 0.5	14.7 \pm 0.7	14.1 \pm 0.6	
HCT (%)		40.0 \pm 1.6	40.0 \pm 1.4	39.8 \pm 1.8	38.5 \pm 1.5	
RBC Indices		MCV (fL)	50.3 \pm 1.1	51.1 \pm 0.9	51.4 \pm 1.5	52.3 \pm 2.2
		MCH (pg)	18.6 \pm 0.4	19.0 \pm 0.6	18.9 \pm 0.4	19.2 \pm 0.8
		MCHC (g/dL)	36.9 \pm 0.4	37.1 \pm 0.6	36.8 \pm 0.6	36.7 \pm 0.4
PLT ($\times 10^3$ cells/ μ l)		849 \pm 82	886 \pm 93	909 \pm 105	886 \pm 68	
Reti (%)		1.84 \pm 0.57	2.01 \pm 0.22	2.02 \pm 0.47	2.29 \pm 0.45	
WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)		4.55 \pm 1.30	4.24 \pm 0.55	4.44 \pm 1.10	5.25 \pm 1.18	
WBC differential counting (%)		NEU	12.5 \pm 2.8	16.8 \pm 4.3	15.9 \pm 5.5	15.0 \pm 5.8
		LYM	83.0 \pm 3.4	79.0 \pm 4.2	79.6 \pm 6.2	80.6 \pm 6.3
		MONO	2.2 \pm 0.7	2.0 \pm 0.6	2.1 \pm 0.9	2.0 \pm 0.7
		EOS	1.4 \pm 0.6	1.3 \pm 0.3	1.4 \pm 0.6	1.1 \pm 0.4
		BASO	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1
PT (sec)		18.0 \pm 0.8	17.8 \pm 0.7	18.0 \pm 0.6	17.7 \pm 0.8	
aPTT (sec)		15.1 \pm 1.1	14.4 \pm 1.3	14.9 \pm 1.2	14.5 \pm 0.7	

Values are expressed by mean \pm SD (n=10).

Significantly different from control by Dunnett's t-test : *p<0.05.

Table 8. Haematological Values of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Recovery Group

Sex	Group/Dose (mg/kg/day)			
	G1/0	G4/5,000		
Male	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ l)	8.67 \pm 0.30	8.29 \pm 0.29	
	HGB (g/dL)	15.2 \pm 0.4	14.9 \pm 0.5	
	HCT (%)	42.7 \pm 0.6	41.3 \pm 1.1	
	RBC Indices	MCV (fL)	49.2 \pm 1.4	50.2 \pm 1.8
		MCH (pg)	17.6 \pm 0.7	17.9 \pm 0.8
		MCHC (g/dL)	35.7 \pm 0.7	35.7 \pm 0.6
	PLT ($\times 10^3$ cells/ μ l)	930 \pm 166	957 \pm 80	
	Reti (%)	2.57 \pm 0.51	2.77 \pm 0.31	
	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)	9.55 \pm 1.16	8.17 \pm 1.37	
	WBC differential counting (%)	NEU	19.8 \pm 4.0	19.3 \pm 10.6
		LYM	75.0 \pm 3.9	75.1 \pm 11.7
		MONO	2.8 \pm 0.6	3.3 \pm 0.9
		EOS	1.2 \pm 0.4	1.5 \pm 0.7
		BASO	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
	PT (sec)	18.1 \pm 0.5	17.8 \pm 0.6	
	aPTT (sec)	15.7 \pm 0.9	14.6 \pm 1.3	
Female	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ l)	7.80 \pm 0.26	7.73 \pm 0.43	
	HGB (g/dL)	14.9 \pm 0.3	14.6 \pm 0.8	
	HCT (%)	40.0 \pm 1.3	39.5 \pm 2.5	
	RBC Indices	MCV (fL)	51.2 \pm 1.4	51.0 \pm 1.3
		MCH (pg)	19.1 \pm 0.4	18.9 \pm 0.1
		MCHC (g/dL)	37.2 \pm 0.8	37.0 \pm 0.7
	PLT ($\times 10^3$ cells/ μ l)	776 \pm 105	858 \pm 118	
	Reti (%)	2.02 \pm 0.46	1.92 \pm 0.28	
	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)	4.56 \pm 0.29	3.81 \pm 1.63	
	WBC differential counting (%)	NEU	14.2 \pm 4.5	17.1 \pm 6.1
		LYM	81.9 \pm 4.6	78.5 \pm 7.1
		MONO	1.9 \pm 0.7	1.9 \pm 0.5
		EOS	1.1 \pm 0.5	1.6 \pm 0.7
		BASO	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1
	PT (sec)	17.7 \pm 0.6	17.7 \pm 0.8	
	aPTT (sec)	14.5 \pm 1.1	14.6 \pm 1.1	

Values are expressed by mean \pm SD (n=5).

7. 혈액생화학적 검사

주시험군의 5,000 mg/kg/day 투여군에서 T-Chol의 증가가 시험물질의 영향으로 판단되었다. 콜레스테롤 수치 변화는 회복군에서는 관찰되지 않았으며, 간에서 적응성 변화로 간세포 비대가 있는 경우 콜레스테롤 수치가 증가할 수 있는 것으로 알려져 있다¹¹.

수컷 5,000 mg/kg/day, 암컷 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 AST의 감소가 관찰되었으나, ALT의 변화를 동반하지 않았으며, 용량의존성이 명확하지 않았고, 그 변화량이 매우 경미하였다. 한편 microsomal enzyme induction에 의한 간세포 비대가 있는 경우 AST의 감소가 나타날 수 있는 것으로 알려져 있다¹².

주시험에서 관찰된 다른 변화들은 경미한 변동

으로 생물학적인 변동 범위내의 변화이며, 연관된 다른 항목의 변화가 관찰되지 않았으므로 독성학적인 의미는 없었다. 회복군의 암수 5,000 mg/kg/day

투여군에서 대조군과 비교시 모든 측정항목에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 9, 10).

Table 9. Biochemical Serum Values of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Main Group

Sex	Group/Dose (mg/kg/day)				
	G1/0	G2/1,250	G3/2,500	G4/5,000	
Male	ALT (U/L)	29.9±5.4	27.4±4.2	31.9±5.8	29.1±3.8
	AST (U/L)	88.2±16.2	92.9±26.3	82.3±16.7	63.0*±11.8
	ALP (U/L)	289.3±47.4	261.5±50.8	283.2±59.7	246.3±52.6
	GGT (U/L)	0.40±0.13	0.57±0.26	0.51±0.15	0.55*±0.08
	Glu (mg/dL)	158±10	155±26	153±16	148±11
	BUN (mg/dL)	13.1±1.5	13.1±2.0	13.1±1.1	13.4±1.2
	Crea (mg/dL)	0.43±0.03	0.43±0.03	0.42±0.04	0.40±0.02
	T-Bili (mg/dL)	0.04±0.02	0.04±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01
	T-Chol (mg/dL)	84±17	82±21	87±15	104*±18
	TG (mg/dL)	75±52	63±34	59±29	66±28
	TP (g/dL)	5.8±0.2	5.9±0.3	5.9±0.2	6.1±0.3
	Alb (g/dL)	2.4±0.1	2.4±0.1	2.4±0.1	2.4±0.1
	A/G ratio	0.69±0.05	0.67±0.05	0.68±0.04	0.66±0.03
	P (mg/dL)	6.08±0.42	6.37±0.80	6.12±0.41	6.76*±0.51
	Ca (mg/dL)	9.3±0.2	9.5±0.3	9.6*±0.2	10.0**±0.3
	Na (mmol/L)	141±1	141±1	141±1	140*±1
	K (mmol/L)	4.9±0.2	4.7±0.4	4.8±0.3	4.8±0.3
Cl (mmol/L)	106±1	105±1	105±2	104±1	
Female	ALT (U/L)	29.2±6.9	28.8±3.6	28.6±5.5	34.3±7.1
	AST (U/L)	93.1±24.2	79.1±13.3	66.4**±9.5	71.0*±18.7
	ALP (U/L)	124.6±27.1	145.1±35.8	146.6±24.0	140.1±43.4
	GGT (U/L)	0.63±0.27	0.73±0.14	0.63±0.17	0.96±0.56
	Glu (mg/dL)	139±10	135±12	129±11	125*±11
	BUN (mg/dL)	15.3±2.4	13.7±1.1	14.8±2.7	19.5±5.1
	Crea (mg/dL)	0.50±0.03	0.48±0.04	0.48±0.03	0.49±0.10
	T-Bili (mg/dL)	0.09±0.01	0.05**±0.02	0.05**±0.01	0.04**±0.01
	T-Chol (mg/dL)	92±27	110±23	115±15	139**±21
	TG (mg/dL)	38±22	30±10	30±11	30±14
	TP (g/dL)	6.7±0.7	6.4±0.3	6.5±0.3	6.6±0.5
	Alb (g/dL)	3.0±0.4	2.8±0.1	2.9±0.1	2.9±0.3
	A/G ratio	0.79±0.06	0.79±0.04	0.79±0.05	0.80±0.09
	P (mg/dL)	4.77±0.73	5.23±0.49	5.39±0.70	5.84**±0.50
	Ca (mg/dL)	10.1±0.5	10.0±0.2	10.2±0.3	10.5*±0.4
	Na (mmol/L)	140±2	139±2	139±2	139±2
	K (mmol/L)	4.1±0.2	4.4**±0.1	4.4**±0.3	4.5**±0.1
Cl (mmol/L)	105±2	106±1	105±1	105±1	

Values are expressed by mean±SD (n=10).
 Significantly different from control by Dunnett's t-test : *p<0.05, **p<0.01.
 Significantly different from control by Steel test : *p<0.05, **p<0.01.

Table 10. Biochemical Serum Values of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Recovery Group

Sex	Group/Dose (mg/kg/day)		
	G1/0	G4/5,000	
Male	ALT (U/L)	32.7±12.3	24.5±2.9
	AST (U/L)	75.9±22.4	58.2±10.2
	ALP (U/L)	233.6±50.0	222.0±62.0
	GGT (U/L)	0.49±0.08	0.41±0.05
	Glu (mg/dL)	171±10	164±3
	BUN (mg/dL)	13.3±1.0	13.3±2.0
	Crea (mg/dL)	0.50±0.02	0.48±0.05
	T-Bili (mg/dL)	0.06±0.03	0.05±0.02
	T-Chol (mg/dL)	74±5	86±20
	TG (mg/dL)	57±24	74±28
	TP (g/dL)	5.7±0.3	5.9±0.1
	Alb (g/dL)	2.3±0.1	2.3±0.1
	A/G ratio	0.66±0.05	0.65±0.03
	P (mg/dL)	6.05±0.16	6.00±0.42
	Ca (mg/dL)	10.0±0.4	10.2±0.1
	Na (mmol/L)	141±1	142±1
	K (mmol/L)	4.6±0.3	4.7±0.0
Cl (mmol/L)	106±1	106±1	
Female	ALT (U/L)	35.3±21.5	43.8±41.1
	AST (U/L)	77.3±29.1	104.3±83.4
	ALP (U/L)	103.4±23.0	98.1±21.6
	GGT (U/L)	0.38±0.23	0.40±0.16
	Glu (mg/dL)	145±9	139±11
	BUN (mg/dL)	13.6±1.7	15.2±2.2
	Crea (mg/dL)	0.48±0.02	0.47±0.02
	T-Bili (mg/dL)	0.09±0.03	0.10±0.03
	T-Chol (mg/dL)	91±19	101±26
	TG (mg/dL)	35±5	71±33
	TP (g/dL)	6.2±0.5	6.3±0.5
	Alb (g/dL)	2.9±0.3	2.8±0.4
	A/G ratio	0.86±0.03	0.79±0.09
	P (mg/dL)	4.52±0.67	4.36±0.44
	Ca (mg/dL)	10.0±0.3	10.1±0.4
	Na (mmol/L)	140±1	140±2
	K (mmol/L)	4.2±0.3	4.4±0.2
Cl (mmol/L)	107±25	107±2	

Values are expressed by mean±SD (n=5).

8. 장기중량

주시험군의 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 절대중량 증가 및 암수 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 상대중량 증가가 인정되었다. 간의 장기중량 변화는 회복군에서는 관찰되지 않았다.

암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 신장 및 부신의 절대 및 상대 장기중량 증가가 관찰되었으나, 수컷과 경향이 다르거나 노검사, 혈액생화학적 검

사 및 조직병리학적 검사에서 관련된 변화를 동반하지 않았으므로 독성학적 의미는 없었다.

주시험군 및 회복군에서 통계학적 유의성이 관찰된 다른 변화들은 경미한 변동으로 용량의존성이 없거나 절식체중의 변동과 연관된 변화로서 해당 장기의 형태학적 변화도 동반되지 않았으므로 독성학적 의미는 없었다(Table 11-14).

Table 11. Absolute Organ Weights of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Main Group

Sex	Organ (g)	Group/Dose (mg/kg/day)			
		G1/0	G2/1,250	G3/2,500	G4/5,000
Male	BW	556.3±47.2	533.5±48.1	530.7±70.5	518.9±44.6
	Brain	2.13±0.06	2.12±0.10	2.09±0.06	2.08±0.10
	Pituitary	0.0118±0.0010	0.0124±0.0019	0.0115±0.0021	0.0115±0.0017
	Heart	1.51±0.13	1.47±0.13	1.46±0.08	1.46±0.12
	Lung	1.65±0.15	1.61±0.11	1.67±0.12	1.69±0.14
	Liver	15.15±1.97	15.23±2.27	15.98±2.38	17.63*±1.81
	Spleen	0.91±0.14	0.83±0.12	0.80±0.10	0.81±0.08
	Kidney	3.33±0.26	3.21±0.27	3.32±0.31	3.62±0.32
	Adrenal	0.0633±0.0117	0.0631±0.0102	0.0554±0.0102	0.0559±0.0104
	Testis	3.61±0.25	3.54±0.29	3.41±0.28	3.46±0.18
	Prostate	0.75±0.15	0.56±0.14	0.60±0.18	0.61±0.16
Female	BW	304.6±33.7	299.7±28.4	295.2±20.6	277.9±20.9
	Brain	1.96±0.07	2.02±0.09	1.98±0.08	1.97±0.12
	Pituitary	0.0183±0.0043	0.0174±0.029	0.0177±0.0042	0.0174±0.0026
	Heart	0.98±0.12	0.99±0.05	1.04±0.10	1.08±0.14
	Lung	1.25±0.09	1.24±0.09	1.28±0.13	1.29±0.11
	Liver	7.80±1.34	8.16±0.43	8.74±0.80	9.97*±1.49
	Spleen	0.57±0.08	0.57±0.08	0.59±0.12	0.60±0.08
	Kidney	1.93±0.16	2.00±0.12	2.13±0.29	2.27±0.26*
	Adrenal	0.0696±0.0049	0.0753±0.0098	0.0748±0.0094	0.0917**±0.0099
	Ovary	0.0836±0.0174	0.0847±0.0127	0.0991±0.0204	0.0955±0.0276
	Uterus	0.69±0.22	0.96*±0.33	0.64±0.13	0.88±0.20

Values are expressed by mean±SD (n=10).

Significantly different from control by Dunnett's t-test : *p<0.05, **p<0.01.

Significantly different from control by Steel test : †p<0.05.

BW : body weight

Table 12. Absolute Organ Weights of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Recovery Group

Sex	Organ (g)	Group/Dose (mg/kg/day)	
		G1/0	G4/5,000
Male	BW	577.9±46.6	560.7±21.4
	Brain	2.01±0.06	2.05±0.10
	Pituitary	0.0126±0.0015	0.0148±0.0031
	Heart	1.46±0.06	1.62±0.29
	Lung	1.55±0.06	1.69*±0.09
	Liver	15.14±1.44	16.62±1.36
	Spleen	0.83±0.04	0.93**±0.05
	Kidney	3.29±0.17	3.66*±0.19
	Adrenal	0.0614±0.0098	0.0643±0.0053
	Testis	3.36±0.32	3.71±0.40
	Prostate	0.60±0.11	0.70±0.15
Female	BW	317.8±29.2	305.2±17.7
	Brain	1.98±0.11	1.95±0.17
	Pituitary	0.0189±0.0013	0.0174±0.0033
	Heart	0.97±0.10	0.99±0.12
	Lung	1.23±0.10	1.20±0.08
	Liver	7.26±0.95	8.43±0.72
	Spleen	0.51±0.07	0.54±0.10
	Kidney	1.87±0.13	2.07±0.25
	Adrenal	0.0689±0.0057	0.0758±0.0123
	Ovary	0.0778±0.0220	0.0736±0.0166
	Uterus	0.67±0.14	2.31**±0.82

Values are expressed by mean±SD (n=5).

Significantly different from control by Dunnett's t-test : *p<0.05, **p<0.01.

Table 13. Relative Organ Weights of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Main Group (g/100 g body weight)

Sex	Organ (g)	Group/Dose (mg/kg/day)			
		G1/0	G2/1,250	G3/2,500	G4/5,000
Male	BW	556.3±47.2	533.5±48.1	530.7±70.5	518.9±44.6
	Brain	0.38±0.04	0.40±0.04	0.40±0.05	0.40±0.04
	Pituitary	0.0021±0.0002	0.0023±0.0003	0.0022±0.0004	0.0022±0.0003
	Heart	0.27±0.01	0.28±0.02	0.28±0.03	0.28±0.01
	Lung	0.30±0.02	0.30±0.03	0.32±0.03	0.33*±0.02
	Liver	2.27±0.22	2.85±0.24	3.01**±0.12	3.40**±0.14
	Spleen	0.16±0.02	0.16±0.02	0.15±0.02	0.16±0.02
	Kidney	0.60±0.04	0.60±0.04	0.63±0.07	0.70**±0.03
	Adrenal	0.0115±0.0025	0.0119±0.0018	0.0106±0.0020	0.0107±0.0017
	Testis	0.65±0.05	0.67±0.08	0.65±0.09	0.67±0.06
	Prostate	0.14±0.03	0.11±0.03	0.12±0.04	0.12±0.03

	BW	304.6±33.7	299.7±28.4	295.2±20.6	277.9±20.9
	Brain	0.65±0.07	0.68±0.04	0.68±0.05	0.71±0.08
	Pituitary	0.0060±0.0012	0.0058±0.0010	0.0060±0.0012	0.0062±0.0008
	Heart	0.32±0.01	0.33±0.03	0.35*±0.03	0.39**±0.04
	Lung	0.41±0.04	0.42±0.02	0.44±0.03	0.46**±0.03
Female	Liver	2.55±0.26	2.74±0.26	2.96**±0.17	3.58**±0.37
	Spleen	0.19±0.02	0.19±0.03	0.20±0.04	0.22±0.02
	Kidney	0.64±0.06	0.67±0.05	0.72**±0.06	0.82**±0.06
	Adrenal	0.0230±0.0023	0.0254±0.0050	0.0254±0.0028	0.0331**±0.0040
	Ovary	0.0277±0.0061	0.0283±0.0041	0.0337±0.0074	0.0344±0.0098
	Uterus	0.23±0.07	0.32*±0.10	0.22±0.04	0.32*±0.08

Values are expressed by mean±SD (n=10).

Significantly different from control by Dunnett's t-test : *p<0.05, **p<0.01.

Significantly different from control by Steel test : †p<0.05, **p<0.01.

Table 14. Relative Organ Weights of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Recovery Group (g/100 g body weight)

Sex	Organ (g)	Group/Dose (mg/kg/day)	
		G1/0	G4/5,000
Male	BW	577.9±46.6	560.7±21.4
	Brain	0.35±0.04	0.37±0.03
	Pituitary	0.0022±0.0001	0.0027±0.0006
	Heart	0.25±0.02	0.29±0.04
	Lung	0.27±0.02	0.30*±0.01
	Liver	2.62±0.09	2.96*±0.22
	Spleen	0.14±0.02	0.16*±0.01
	Kidney	0.57±0.05	0.65*±0.05
	Adrenal	0.0106±0.0011	0.0115±0.0009
	Testis	0.58±0.06	0.66±0.07
	Prostate	0.10±0.02	0.12±0.03
	Female	BW	317.8±29.2
Brain		0.63±0.07	0.64±0.07
Pituitary		0.0060±0.0006	0.0057±0.0011
Heart		0.31±0.03	0.32±0.03
Lung		0.39±0.03	0.39±0.03
Liver		2.28±0.21	2.76**±0.14
Spleen		0.16±0.02	0.17±0.03
Kidney		0.59±0.02	0.68±0.09
Adrenal		0.0218±0.0026	0.0249±0.0044
Ovary		0.0242±0.0050	0.0243±0.0064
	Uterus	0.21±0.05	0.77*±0.29

Values are expressed by mean±SD (n=5).

Significantly different from control by Dunnett's t-test : *p<0.05, **p<0.01.

9. 부 검

주시험군의 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 회복군의 암컷 5,000 mg/kg/day 투여

군의 1례(개체번호 : 2415)에서 우측 복부피하의 종괴(mass)가 관찰되었다. 주시험군 및 회복군에서 관찰된 소견들은 단 1례이거나 대조군에서도 관찰된 것으로 우발적인 소견으로 판단되었다(Table 15, 16).

Table 15. Necropsy Findings of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Main Group

Sex	Organ/Findings	Group/Dose (mg/kg/day)				
		G1 0	G2 1,250	G3 2,500	G4 5,000	
Male	No. of examined	10	10	10	10	
	Unremarkable findings	9	10	9	9	
	Eye including optic nerve	-Discoloration, red, left	0	0	1	0
	Stomach	-Focus, white, glandular stomach	1	0	0	1
Female	No. of examined	10	10	10	10	
	Unremarkable findings	9	10	10	9	
	Salivary gland, submandibular	-Enlargement, bilateral	0	0	0	1
	Uterus	-Hypoplasia, right horn	1	0	0	0

External surface and other organs in body cavity were unremarkable.

Table 16. Necropsy Findings of SD Rats Treated Orally with GST for 13 Weeks in Recovery Group

Organ/Findings	Sex Group/Dose (mg/kg/day)	Male		Female	
		G1 0	G4 5,000	G1 0	G4 5,000
No. of examined		10	10	10	10
Unremarkable findings		9	10	9	9
Stomach	-Focus, black, glandular stomach	0	0	1	0
Subcutaneous tissue	-Mass, right abdomen	1	0	0	1

External surface and other organs in body cavity were unremarkable.

10. 조직병리학적 검사

주시험군의 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 중심소엽성 간세포 비대(centrilobular hypertrophy, hepatocyte)가 시험물질의 영향으로 관찰되었다. 4주

간의 회복기간 후에는 중심소엽성 간세포 비대가 관찰되지 않았다. 발생 빈도 및 소견의 정도는 다음의 표에 나타내었다(Table 17).

Table 17. Incidence and Severity of Test Substance-Related Microscopic Findings in Main Group

Tissue/Findings	Sex	Female			
	Group/Dose (mg/kg/day)	G1/0	G2/1,250	G3/2,500	G4/5,000
	Number examined	10	10	10	10
Liver/Centrilobular hypertrophy, hepatocyte	Minimal	0	0	0	2
	Mild	0	0	0	2
	Total Number of affected	0	0	0	4

There were unremarkable changes in other organs.

간에서 관찰된 중심소엽성 간세포 비대는 간의 절대중량 및 상대중량 증가와 연관되어 있으며, 다른 변화를 동반하지 않았으므로 적응성 변화로 독성은 없는 것으로 판단하였다.

회복군의 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군의 1례 (개체번호 : 2415)에서 관찰된 우측 복부 피하의 종괴는 조직병리학적 검사결과, 유선의 선종(Adenoma)으로 확인되었으나, 단 1례이며, 유선 종양은 암컷 SD rat에서 흔한 종양으로 비교적 어린 주령에서도 관찰되는 것으로 알려져 있어¹³ 시험물질 투여와는 무관한 것으로 판단되었다.

암수 대조군 및 시험물질 투여군에서 관찰된 다른 소견들은 모두 자연발생성으로 해당 주령의 SD rat에서 흔히 관찰되는 병변이며, 우발적 또는 산발적으로 분포하였으므로 모두 독성학적인 의미는 없었다.

III. 고 찰

아토피 피부염은 심한 소양증과 피부발진을 주 소로 하며, 가족력이 있거나 천식이나 알레르기 비염 등과 같은 다른 알레르기 질환과 동반되기도 한다¹⁴. 대부분의 아토피 피부염은 소아기에 나타나기 시작하고, 학동기 무렵에는 많은 수의 환자들이 저절로 호전이 되나 중등도 이상의 증상을 보이는 경우 30% 정도에서 평생 동안 이 질환을 지니게 되어 학업이나 직장 등 사회생활에 많은 지장을 받게 된다¹⁵.

아토피 피부염 환자들에게 실제 임상에서 많이 시행되고 있는 약물치료는 항히스타민제와 국소 스테로이드 외용제, 스테로이드 경구제, 국소 면역조절 외용제이다. 중증 아토피 피부염에서는 외용제 치료만으로는 증상이 조절되지 않는 경우도 있으며, 중증의 아토피 피부염 환자들에게 국제적인 치료지침들¹⁶에서 권장하고 있는 전신 면역억제 약물요법(cyclosporin, mycophenolate), 광선요법, 알레르겐-면역요법 등의 약물치료는 효과가 불완전하거나 부작용 발생의 우려가 있어 적극적으로 시행되지 못하고 있다¹⁷.

대전대학교부속한방병원 폐계내과학교실에서 사용하는 GST는 사상자(蛇床子), 위령선(威靈仙), 당귀(當歸), 고삼(苦參)으로 이루어진 사상자탕에 백부근(百部根), 부평초(浮萍草)를 가미한 처방으로 이전의 연구에서 사상자는 Itokawa 등이 에탄올 추출물에서 히스타민 등에 의해 야기되는 회장 수축을 억제하여 진경작용이 있음을 보고하였고¹⁸, 김등은 torilin을 분리하여 진통소염작용이 있음을 밝혔다¹⁹. 위령선의 주성분으로 saponin, clematoside A, anemonol 등이 보고되었으며, 최근 연구결과 면역증강 작용, 항염증 작용, 관절염 치료작용 등이 보고되었다²⁰. 당귀는 항암효과, T세포와 B세포의 면역활성²¹, 백혈구수, 적혈구 용적(hematocrit, Hct)에 대하여 유의한 효과가 있다고 하였으며²², 항균활성²³, cytokine, chemokine, growth factor 등의 염증매개물질 생성증가를 억제한다고 하였다²⁴. 고삼은 항염²⁵, 항균 작용²⁶이 있고, 대식세포의 hydrogen

peroxide 생성을 증가시키고, NO 생성을 감소시키며, TNF- α 와 IL-6 생성을 억제하는 등 유의한 면역활성을 가진다고 하였다²⁷. 백부근은 일부 교감신 경계에 대하여 작용이 있고, 히스타민에 의해 유발된 기관지 수축에 효과가 있으며²⁸, 천식 억제 및 면역증진에도 효과가 있다고 하였다²⁹. 부평초는 히스타민의 유리를 억제하고, 면역학적 자극에 의한 피부 알레르기 반응에도 영향을 준다고 하였다³⁰.

본 연구는 이러한 결과들을 근거로 GST를 아토피 피부염의 치료제로 연구중이며, 연구의 일환으로 GST의 안전성을 평가하기 위하여 GLP 기관인 바이오독스텍(주)에 의뢰하여 GST의 SD rat를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험을 진행하였다.

GST 추출물의 SD rat를 이용한 단회 경구투여 독성시험 결과 암수 5,000 mg/kg 투여군의 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않아 치사량은 암수 각 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었고, 4주 반복 경구투여 용량결정시험 결과 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질에 기인한 독성변화는 인정되지 않았다¹⁰. 따라서 13주 반복투여 독성시험의 고용량은 5,000 mg/kg, 저용량은 1,250 mg/kg으로 설정하였다.

GST를 SD 암수 rat에 13주간 반복투여시에 대한 안전성을 평가하고자한 본 시험에서 시험물질은 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg의 3개의 용량으로 암수 각각 군당 10, 10 및 15마리에 13주간 경구 투여하였다. 또한 대조군(주사용수)을 설정하여 군당 15마리에 13주간 경구 투여하였다. 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에는 암수 각 5마리씩 독성의 가역성을 평가하기 위해 4주간의 회복기간을 두었다. 관찰기간동안 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사, 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량 측정, 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다. 관찰기간동안 암수 시험물질 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 주시험군 및 회

복군 일부에서 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량, 조직병리학적 검사 등에서 변화가 관찰되었으나, 모두 경미한 변동이면서 생물학적 변동범위 이내였고, 용량의존성이 없었으며, 장기의 형태학적 변화가 관찰되지 않았고, 대조군에서도 동일한 변화가 관찰되었으며, SD rat에서 흔히 관찰되는 병변으로 우발적 또는 산발적으로 분포한 점 등을 근거로 독성학적 의미는 없다고 사료되었다.

투여기간동안 암수 시험물질 투여군에서 약물혼입변이 관찰되었고, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 회복 2일까지 관찰된 후 관찰되지 않았다. 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검에 있어서, 암수 시험물질 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화는 관찰되지 않았다. 조직병리학적 검사결과, 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군의 1례에서 유선 종양이 확인되었으나 시험물질 투여와는 무관한 것으로 판단되어, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화는 관찰되지 않았다.

IV. 결 론

본 시험 조건하에서 GST 추출물에 대한 암수 rat를 이용한 13주 경구 반복투여 독성시험 및 4주 회복시험을 실시한 결과, 암수 5,000 mg/kg/day 용량에서 시험물질에 의한 독성이 관찰되지 않아, 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day을 상회하는 것으로 판단되었다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 지원(과제번호 : H112C1954)과 2012년도 정부

(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 (NRF-2012R1A1A2041904)을 받아 수행되었음.

참고문헌

1. Williams H, Stewart A, von Mutius E, Cookson W, Anderson HR. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase One and Three Study Groups. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(4):947-54.
2. Laughter D, Istvan JA, Tofte SJ, Hanifin JM. The prevalence of atopic dermatitis in Oregon schoolchildren. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:649-55.
3. 건강보험정책연구원. 국민건강보험 보도자료[cited 2014-03-26] Available from: <http://www.nhic.or.kr/cms/board/board/Board.jsp?act=VIEW&communityKey=B0039&boardId=22846>
4. 김진혜, 김혜원, 박천욱, 이철현, 성인 아토피 피부염 환자의 삶의 질. *대한피부과학회지* 2011;49(11):983-92.
5. McKenna SP, Doward LC. Quality of life of children with atopic dermatitis and their families. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:228-31.
6. Watson W, Kapur S. Atopic dermatitis. *Allergy Asthma & Clinical Immunology* 2011;7(Suppl 1):S4.
7. 김태윤. 아토피 피부염 치료의 최신 경향. *소아 알레르기 및 호흡기 학회지* 2009;19(3):209-19.
8. 진실공. *외과정중*. 북경: 인민위생출판사; 1964. p. 244.
9. 황화선, 송창우, 한상섭. Ktc:SD 랫트의 주령에 따른 기초 연구. *한국실험동물학회지* 1990;6(1):33-43.
10. 한종민, 홍지희, 이혜영, 정인철, 진미림, 김승형, 박양춘. GST의 Sprague-Dawley Rat를 이용한 단회 경구투여 독성시험 및 4주 반복 경구투여 용량결정시험. *Korean J Orient Int Med* 2013;34(4):349-61.
11. Amacher DE, Schomaker SJ, Burkhardt JE. The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight and histological change in rat toxicology studies. *Food and chemical toxicology* 1998;36(9):831-9.
12. Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, Harada T, Kaufmann W, Knippel A, et al. Liver Hypertrophy A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes - Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic pathology* 2012;40(7):971-94.
13. Ikezaki S, Takagi M, Tamura K. Natural occurrence of neoplastic lesions in young sprague-dawley rats. *Journal of toxicologic pathology* 2011;24(1):37.
14. Kim BE, Leung DY. Epidermal barrier in atopic dermatitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012;4:12-6.
15. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004;113:651-7.
16. Hanifin JM, Cooper KD, Ho VC, Kang S, Krafchik BR, Margolis DJ, et al. Guidelines of care for atopic dermatitis, developed in accordance with the American Academy of Dermatology (AAD)/American Academy of Dermatology Association "Administrative Regulations for Evidence-Based Clinical Practice Guidelines". *J Am Acad Dermatol* 2004;50:391-404.
17. 박양. 한국에서 아토피피부염 진단과 치료의 임상적 실태 조사. *Allergy Asthma Respir Dis September* 2013;1(3):257-65.
18. Itokawa H, Minashi S, Watanabe K, Natsumoto H, Hamanaka T. Studies on the constituents of crude drugs having inhibitory activity against contraction of the ileum caused by histamine

- of barium chloride. *Shoyakugaku Zasshi* 1983;37:223-8.
19. Lee EB, Kim SH, Kim TH. Anti-inflammatory activities of *Torilis japonica* fruit. *Kor J Pharm* 1998;29:384-90.
 20. 한방약리학교재편찬위원회. 한방약리학. 서울: 신일상사; 2005, p. 201-2.
 21. Ham MS, Kim SS, Hong JS, Lee JH, Chung EK, Park YS, Lee HY. Screening and Comparison of Active Substances of *Angelica gigas* Nakai Produced in Kangwon and *Angelica acutiloba* Kitogawa Produced in Japan. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 1996;24(5):624-9.
 22. Kang SA, Jang KH, Lee JE, Ahn DK, Park SK. Differences of Hematopoietic Effects of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* Extract on Cyclophosphamide-induced Anemic Rats. *Korean J Food Sci Technol* 2003;35(6):1204-8.
 23. Yun KW, Choi SC. Antimicrobial Activity in *Angelica* Species Extracts. *Korean J Plant Res* 2004;17(3):278-82.
 24. Han HS. Anti-inflammatory Effect of *Angelicae acutilobae* Radix Water Extract on LPS-stimulated Mouse Macrophages. *Kor J Herbology* 2013;28(6):129-33.
 25. Yamaguchi-Miyamoto T, Kawasuji T, Kuraishi Y, Suzuki H. Antipruritic Effects of *Sophora flavescens* on Acute Chronic Itch-Related Responses in Mice. *Biol Pharm Bull* 2003;26:722-4.
 26. Ahn EY, Shin DH, Baek NI, Oh JA. Isolation and Identification of Antimicrobial Active Substance from *Sophora flavescens* Ait. *Korean journal of food science and technology* 1998;30(3):672-9.
 27. 김형석, 한효상, 이영중. 고삼 발효 추출물의 면역활성에 관한 연구. *大韓本草學會誌* 2011;26(2):17-23.
 28. 김성규, 우원홍, 류도근, 한종현. 기관지 평활근에 미치는 백부근의 효과. *Korean Journal of Acupuncture* 2000;17(1):67-73.
 29. 허민, 오영선, 조현경, 유호룡, 김윤식, 설인찬. 백부근 약침의 천식억제 및 면역조절 효과에 대한 실험적 연구. *동의생리병리학회지* 2006;20(3):609-16.
 30. 노태석, 노석선. 수종의 한약 추출물의 항알레르기 반응에 미치는 영향. *한방안이비인후피부과학회지* 2002;15(1):1-30.