

삼정환의 랫드를 이용한 90일 반복 경구투여 독성시험

김민지 · 이명종 · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study of Modified Samjung-Hwan in Sprague-Dawley Rats

Min-Jee Kim, Myeong-Jong Lee, Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University

Received: May 13, 2018

Revised: June 5, 2018

Accepted: June 14, 2018

Correspondence to: Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital, 27 Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10326, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2018 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: The study is aimed at evaluating the possible toxicity in 90-day repeated oral administration of modified Samjung-hwan (mSJH) in Sprague-Dawley (SD) rats. This study was conducted to detect the no-observed adverse effect level (NOAEL).

Methods: Modified SJH extract was administered orally in male and female SD rats at dose of 0, 1,000, 2,000, 4,000 mg/kg. Each group consisted of 10 rats of each gender. The modified SJH extract was given once a day for 90 days. We monitored the changes of mortalities, clinical signs, body weight changes, food consumption, ophthalmologic findings, urine analysis, hematology, serum biochemistry, necropsy findings, organ weights, histological markers of all animals treated with modified SJH extract during the study period.

Results: There were no toxicologically significant changes in mortalities, clinical signs, body weight gains, food consumption, ophthalmologic findings, urine analysis, hematology, serum biochemistry, necropsy findings, organ weights, histological markers in any of rats tested.

Conclusions: The NOAEL of the modified SJH extract in male rats and no observed effect level (NOEL) in female rats are considered 4,000 mg/kg.

Key Words: No-observed-adverse-effect Level, Safety, Toxicity tests

서론

이상지질혈증(dyslipidemia)은 총콜레스테롤과 low-density lipoprotein 콜레스테롤, 중성지방 농도의 증가와 high-density lipoprotein 콜레스테롤의 농도가 감소되는 비정상적인 혈중 지질 상태이다¹⁾. 이는 남녀 모두에게 심혈관질환의 위험요소로 알려져 있으며²⁾, 최근 서구화된 식습관과 운동부족과 같은 생활습관에 따라 증가하는 추세이다³⁾. 2014년 질병관리본부 통계에 따르면, 만 30세 이상 성인의 이상지질혈증 중 고콜레스테롤혈증의 유병률은 남성의 경우 2005년 7.2%에서 2013년 13.6%로, 여성의 경우 2005년 8.4%에서 2013년 15.9%로 성별에 관계없이 약 2배 정도 증가하였으며, 7명 중 1명이 고콜레스테롤혈증에

이환된 것으로 나타났다. 이상지질혈증의 위험요인으로 는 연령과 성별, 체질량지수⁴⁾, 주거지역⁵⁾, 고혈압, 당뇨병의 만성질환, 흡연과 음주, 경제상태, 교육수준⁶⁾이 있다.

이상지질혈증의 치료는 식이요법, 운동, 금연 등의 생활습관 개선이 우선시되어야 하며 생활요법 개선 후에도 조절이 잘 되지 않으면 약물요법을 병행하고 있다³⁾. 하지만 간 독성, 소화장애와 같은 부작용 가능성이 있어 이를 보완하기 위해 천연 한약물에서의 연구도 활발히 이루어지고 있다⁷⁾. 최근 삼정환의 지질대사 개선 효과에 관한 연구에서 고지방식이 유도 비만 마우스에 삼정환 추출물을 투여한 결과 세포 내 지질 축적을 유의하게 감소시켰으며 체중, 간 중량 및 체지방량 증가가 감소되었다. 또한 adenosine monophosphate-activated protein kinase와 ace-

tylcoenzyme A carboxylase의 인산화를 촉발시켰을 뿐만 아니라 렙틴(leptin)의 발현이 증가되는 것으로 보고된 바 있다⁸⁾.

동의보감 신형문⁹⁾에서 삼정환(Samjung-hwan)은 “오랫 동안 먹으면 몸이 가벼워지고 오래 살게 되며, 얼굴이 어린 아이처럼 된다(久服輕身 延年益壽 面如童子).”고 기록 되어 있다. 선행 연구에서 삼정환의 항우울 효과가 밝혀졌는데, stress군에 비해 삼정환 투여군에서 혈청 corticosterone, adrenocorticotrophic hormone 수치의 감소가 나타났다¹⁰⁾. 이외에도 신경보호효과¹¹⁾, 항산화 효과¹²⁾, 면역개선효과¹³⁾가 있다고 알려졌다. 그리고 삼정환의 제조과정에 숙성과정(발효)이 포함되어 있는 발효 삼정환에 관한 연구도 있었는데, 체중 감소와 총콜레스테롤 및 혈당 수치 감소 효과가 밝혀졌다¹⁴⁾. 또한 삼정환의 구성 약재인 창출(*Atractylodes japonica*)의 지질대사 개선 효과¹⁵⁾, 지골피(*Cortex lycii radices*)의 혈당강하, 혈압강압 효과^{16,17)}, 상삼자(*Morus alba Linne*)의 항산화 효과^{18,19)} 등에 관한 연구도 있다. 이에 삼정환을 비만, 지방간을 비롯한 대사질환과 관련하여 지질대사 개선에 적용할 수 있을 것이라 판단된다.

본 시험은 삼정환 추출물의 독성반응과 그 안전성을 평가하고자 식품의약품안전처에서 고시한 제2015-82호 의약품 등의 독성시험기준(2015)과 OECD guideline (2008)²⁰⁾에 따라 90일간 암수 랫드(Sprague-Dawley)에 반복 경구투여 시 중장기간 내에 발현되는 독성적 특성을 질적, 양적으로 검사하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 투여

1) 시험물질

본 시험에 사용한 삼정환 추출물은 (주)대평(Daepyung, Busan, Korea)에서 갈색의 분말 형태로 공급받아 사용하였으며, 각 약재 모두 지표물질 기준함량을 준수하였다(창출의 Atractylodin 0.00034%, 상삼자의 Rutin 0.02137%, 지골피의 Betaine 0.85764%). 상삼자, 지골피, 창출을 3:1:1 비율로 섞은 후 중량의 5배에 달하는 30% 에탄올을 투입하여²¹⁾ 75~80°C에서 4시간 가열 추출하여 40°C 이하에서 냉각 후 여과하였다. 그리고 다시 중량의 2.5배에 달하는 30% 에탄올을 투입하여 75~80°C에서 2시간 추출하

여 40°C 이하 냉각 후 여과하였다. 이후 50±5°C에서 감압 농축하여 농축액 건조물과 텍스트린을 7:3 비율로 혼합, 용해하여 Spray dryer로 건조하였다(수율 21.9%).

조제 후 1~2시간 내에 투여하는 것을 원칙으로 하며, 90일간(투여 전 기간) 매일 조제하였다. 고용량군은 멸균 증류수(KAI5038; JW Pharmaceutical Corporation, Seoul, Korea)를 이용하여 4,000 mg/10 mL (40%)로 조제하였고, 중, 저용량군은 동일한 멸균증류수로 단계 희석하여 각각 2,000 mg /10 mL (20%), 1,000 mg/10 mL (10%)로 조제하였다. 투여 시 침전물이 없도록 magnetic stirrer로 충분히 섞어 사용하였다.

2) 투여절차

시험물질의 임상 예정 경로로서 경구투여를 선택하였으며, 경구투여용 존테를 장착한 주사관을 이용하여 매일 90일간 1일 1회 08:00~12:00에 위내에 직접 투여하였다. 투여량은 최근 체중 측정일의 체중을 기준으로 10 mL/kg으로 산출하였다.

3) 군 분리 및 투여용량 설정

순화 후 평균체중에 가장 가까운 암수 각 40마리를 선택하였다. 선택한 동물들은 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 군당 10마리로 군 분리하였다.

투여용량 설정은 본 시험물질을 이용한 28일간의 반복 경구투여 용량설정시험의 결과인 암수 랫드의 no observed adverse effect level (NOAEL, 최대무독성용량) 4,000 mg/kg/day를 참고하여 결정되었다. 본 시험에서는 4,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고 공비 2를 적용한 2,000 및 1,000 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에서는 부형제인 멸균증류수를 투여하였다.

2. 시험동물 및 사육환경

1) 시험동물

시험동물의 이용은 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 승인하에 이루어졌다(제IACUC-2016-005호). 시험동물은 모두 특정병원균 부재(specific pathogen free, [SPF]) Sprague-Dawley (SD)계 랫드(Daehanbiolink, Eumseong Gun, Korea)를 사용하였다. SPF Sprague Dawley (SD)계 랫드는 일반독성시험에 널리 사용되고 있어 시험기초자료가 풍부하여, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 활용

할 수 있어 선택하였다²¹⁾. 입수 시에는 5주령 수컷 48마리, 134.0~160.8 g, 5주령 암컷 48마리, 115.8~140.3 g이었으며 투여개시에는 6주령 수컷 40마리, 193.5~220.0 g, 6주령 암컷 40마리, 148.5~183.7 g이었다. 동물 입수 시 검수 및 검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 수컷 7일, 암컷 8일간 해당 동물실 내에서 실시하였다. 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 투여전일 및 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

2) 사육환경

사육환경은 시험의 전 기간 동안 온도 22±3℃, 상대습도 30~70%, 환기횟수 시간당 10~20회, 조명 12시간 명암주기 (점등 8:00, 소등 20:00), 조도 150~300 Lux, 소음 60 dB 이하, 암모니아농도 20 ppm 이하로 설정되었다. 순화검역, 투여 및 관찰기간에는 Polysulfone 사육상자(280 [width, W]×420 [length, L]×200 [height, H] mm)에, 절식 및 요검사 기간에는 대사케이지(310 W×450 L×210 H mm)에서 수용하였다. 검역, 순화기간에는 1~3마리, 관찰기간에는 2마리 사육하였다. 사육상자는 주 1회, 급수병은 주 2회 교환하였으며, 모든 사육기자재는 멸균하여 사용하였다. 실험동물용 고품사료는 감마선 멸균사료(Harlan Laboratories, Inc., Itingen, Switzerland)를 자유섭취시켰으며 음수는 자외선 유수살균기로 여과 후 자유섭취시켰다.

3. 관찰 및 검사

1) 일반증상관찰

모든 동물에 대해서 1일 1회 일반증상의 종류, 발현 및 증상의 정도를 관찰하였으며, 1일 2회 사망 및 빈사동물을 관찰하였다. 관찰은 모든 동물에 대하여 투여일로부터 90일간 실시하였다.

2) 체중측정

모든 동물의 체중을 투여개시일에 측정하고, 이후에는 주 1회, 부검전일 및 부검일에 측정하였다. 부검일 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하고 부검전일 체중을 평가하였다.

3) 사료섭취량 산정

투여개시 전의 사료섭취량은 군 분리 일부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하였다. 투여기간에는 7일

간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균 섭취량을 산출하였다.

4) 안과학적 검사

동물 도입 시 모든 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관 및 전안부를 관찰하였다. 투여 마지막 주에는 모든 동물을 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후, 각 군당 5마리에 대해서는 안구에 산동제(이슈토 아트로필, Alcon, Seoul, Korea; Lot No.: 14K19AF)를 점적하여 안저사진기(Genesis, Kowa Co. Ltd., Aichi, Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

5) 요검사

각 군당 5마리에 대하여 투여 13주에 요검사를 실시하였다. 동물을 대사케이지에 수용하여 3~4시간 동안 채뇨한 신선뇨 중 약 1 mL를 취하여 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, New Orleans, LA, USA), 요자동분석기(CliniTek Advantus™, SIEMENS, New Orleans, LA, USA) 및 요침사 검사로 분석하였다. 또한 24시간 동안 계속 채집한 요로 요총량을 측정하였다. 요분석 항목은 요당(glucose [GLU]), 빌리루빈(total bilirubin [BIL]), 케톤체(ketone body, KET), 백혈구(leukocyte [LEU]), 잠혈(occult blood [OB]), pH, 단백질(protein [PRO]), 유로빌리노젠(urobilinogen [URO]), 아질산염(nitrite [NIT]) 및 요비중(specific gravity [SG]) 등을 검사하였다. 요침사검사는 적혈구(red blood cell [RBC]), 백혈구(white blood cell [WBC]), 상피세포 및 원주(casts)를 관찰하였다.

6) 혈액학적 검사

부검 시까지 생존한 모든 동물에 대하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 혈액학적 검사는 팻드를 하룻밤 절식시킨 후 채혈한 혈액을 항응고제인 ethylene diamine tetraacetic acid-2K가 들어있는 vacutainer tube (Vacutainer 3 mL, Franklin Lakes, NJ, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, New Orleans, LA, USA)를 통해 이루어졌다. 분석항목은 백혈구(WBC)의 수, 적혈구(RBC)의 수, 혈색소량(hemoglobin [HGB]), 적혈구백분율(hematocrit [HCT]), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume [MCV]), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin [MCH]),

평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration [MCHC]), 적혈구분포폭(red cell distribution [RDW]), 혈액소분포폭(hemoglobin distribution width [HDW]), 혈소판 수(platelet [PLT]), 평균혈소판용적(mean platelet volume [MPV]), 망상적혈구(reticulocyte [RET]), 백혈구 백분비 neutrophil (NEU), lymphocyte (LYM), monocyte (MONO), eosinophil (EOS), basophil (BASO), large unstained cells (LUC) 등이었다.

7) 혈액생화학학적 검사

혈액생화학학적 검사를 위해 혈액 일부를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (Vacutainer 3.5 mL, Franklin Lakes, NJ, USA)에 주입하고 10~15분간 상온에 방치하여 응고시켰다. 이후 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리(MF80, Hanil, Gimpo, Korea)하여 얻은 혈청으로 혈액생화학분석기(KONELAB 20XT, Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정항목은 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), γ -GTP (γ -Glutamyl transpeptidase), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), glucose (GLU), total cholesterol (CHO), total protein (PRO), creatine phosphokinase (CPK), albumin (ALB), total bilirubin (BIL), triglyceride (TG), inorganic phosphorus (IP), albumin/globulin ratio (A/G), Ca²⁺였다. 또한 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 함량은 전해질 분석기(744 Na⁺/K⁺/Cl⁻-Analyzer, SIEMENS, New Orleans, LA, USA)로 측정하였다.

8) 혈액응고시간 검사

부검 시 채혈한 혈액 중 1.8 mL를 3.2% sodium citrate 0.2 mL가 들어있는 vacutainer tube (Vacutainer 1.8 mL, Franklin Lakes, NJ, USA)에 주입한 후, 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리(MF80, Hanil, Gimpo, Korea)하여 얻은 혈청으로 protrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT)를 측정하였다. 혈액응고시간검사기 (ACL 7000 Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA)를 사용하여 Nephelometric Analysis 방법으로 초(sec) 단위로 측정하였다.

9) 부검 및 채혈

부검 전날 17시간 이상 절식한 랫드를 부검 당일에

Isoflurane으로 흡입마취하여 복대동맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 이후 복대동맥 및 복대정맥을 절단하여 방혈 치사시킨 다음, 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰하였다.

10) 장기중량 측정

부검 시 장기를 적출한 후 정밀저울을 이용하여 중량을 측정하였다. 양측성 장기는 양측 장기를 각각 측정하였다. 측정 장기는 난소(ovary), 부신(adrenal gland), 뇌하수체(pituitary), 가슴샘(thymus), 전립샘(prostate), 고환(testis), 부고환(epididymis), 비장(spleen), 신장(kidney), 심장(heart), 폐(lung), 뇌(brain) 및 간(liver) 등이었다.

11) 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 장기를 적출하여 10% 중성완충포르말린용액에 고정하였으며 또한 안구는 Davidson 용액에, 고환과 부고환은 Boulin 용액에 고정하였다. 고정 장기는 고환, 부고환, 정낭, 전립샘, 난소, 자궁, 질, 방광, 비장, 위, 췌장, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 장간막림프절, 부신, 신장, 간, 대퇴골, 턱밑림프절, 침샘, 흉골, 가슴샘, 심장, 폐, 대동맥, 흉척수, 혀, 기관, 식도, 갑상샘, 안구, 하더샘, 뇌, 뇌하수체, 피부(젖샘)이었다. 고정 장기·조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 이후 박절하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 대조군, 고용량군 (4,000 mg/kg/day)의 모든 고정 장기·조직에 대하여 검경하였고, 이상이 있는 장기에 대해서 저용량군(1,000 mg/kg/day) 및 중용량군(2,000 mg/kg/day)을 추가 검경하였다.

12) 통계학적 방법

대조군과 투여군 간의 평균비교에는 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였으며, 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS ver 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하였다. 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 등과 같은 연속적인 자료는 one-way analysis of variance (ANOVA) test로 평균치에 대한 유의성을 검정하였다. 유의성이 있으면

Levene test로 등분산성을 검정하여 등분산일 경우에는 Duncan multiple range test, 이분산일 경우에는 Dunnett's T-test를 이용하였다. 요검사 결과와 같이 불연속인 자료의 분석 척도변환을 통해 중증도(severity)로 나타내어 통계분석이 이루어졌다. Kruskal-Wallis' H-test를 실시한 후, 유의성이 있으면 Mann-Whitney U-test를 적용하여 대조군과의 유의성을 확인하였다. 요색조는 Fisher's exact test를 적용하였다.

13) 독성판정기준

삼정환 추출물의 반복투여 독성시험을 통해 얻은 변화 또는 독성은 독성의 정도와 양상에 따라 Weight-based classification (결과-경중에 따른 분류)로 이루어졌다. Weight-based classification은 이전 연구²²⁻²⁴⁾를 참고하여 시험물질-유래 중요한 변화(Important compound-related changes), 시험물질-유래 경미한 변화(Minor compound-related changes) 및 비시험물질-유래 변화(Noncompound-related changes)의 3단계로 분류된다. Weight-based classification의 3단계는 본 시험의 목적인 no observed effect level (NOEL, 최대무영향용량), no observed adverse effect level (NOAEL, 최대무독성용량) 및 lowest observed adverse effect level (LOAEL, 최소독성용량) 등의 독성지표를 얻기 위해 이들 각각의 정의에 따라 시험물질-유래 중요한 변화는 시험물

질에 의한 adverse effect로, 시험물질-유래 경미한 변화는 시험물질에 의한 non-adverse effect로, 비시험물질-유래 변화는 시험물질에 의한 no effect로 분류되었다. 일반적으로 NOEL은 시험물질에 의한 독성학적 및 약리학적 변화를 유발하지 않는 최대무영향용량이다. NOAEL은 시험물질에 의한 adverse effect를 유발하지 않거나 명확한 질환과 연계되지 않는 non-adverse effect를 나타내는 최대무독성용량이며 LOAEL은 adverse effect를 유발하는 최소독성용량을 말한다²⁴⁾. 이러한 독성지표의 정의에 따라 weight-based classification에 의한 독성지표를 Table 1과 같이 도출하였다.

결과

1. 일반증상 및 사망동물

삼정환 추출물 투여에 의해 대조군을 포함한 모든 시험군에서 전 시험기간 동안 사망동물은 없었다. 투여 기간 중 일반증상 관찰 결과, 이상증상은 관찰되지 않았다.

2. 체중변화

삼정환 추출물 투여에 의한 체중변화(weight changes) 및 증체량(weight gains) 측정 결과, 대조군과 비교하여 모든 시험군에서 이상소견은 관찰되지 않았다(Fig. 1, 2).

Table 1. Definitions of Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL), No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) and No Observed Effect Level (NOEL) by Three Steps of Weight-based Classification in Toxicity Test

Weight-based classification	Definitions of criteria	Criteria of toxicity	Evaluation endpoints
Important compound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> Statistically and biologically significant* histopathological changes that are dose-dependent at all doses, Though not dose-dependent, histopathological changes that are statistically significant and that do not occur in the control group. 	Adverse effect	LOAEL
Minor compound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> Clinic pathological and histopathological changes that are dose-dependent in certain doses or are not dose-dependent at a certain administered dose, Reversibility is anticipated or there is a histopathological change in the control group, Dose-dependent or non-dose-dependent change that is statistically and biologically significant and is thought to be due to the pharmacological effects of the test substance. 	Non-adverse effect	NOAEL
Noncompound-related changes	<ul style="list-style-type: none"> Statistically significant change that is obtained through comparison with the control group results that are beyond historical data[†]. Changes due to mistakes in the test process or spurious changes. 	No effect	NOEL

*Biological significance: statistical significance of the difference between outcomes in a test and historical data; †Historical data: mean±standard deviation (SD) of controls from other Repeated Dose 90 days Oral Toxicity Study.

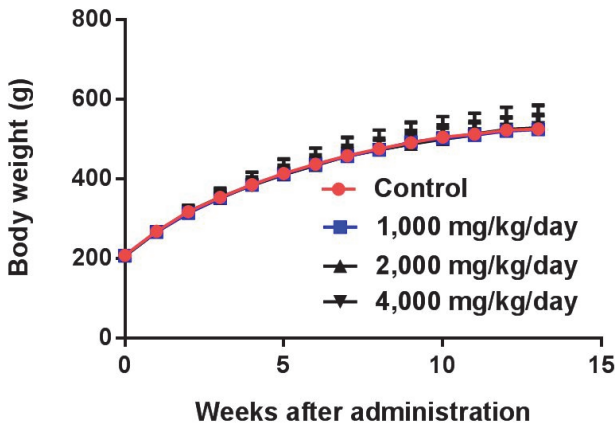


Fig. 1. modified Samjung-hwan (mSJH) was administered orally for 90days. There were no significant differences between any of the groups. Body changes in male Sprague-Dawley rat after once oral administration of modified Samjung-hwan (SJH). Values are presented as mean±standard deviation (n=10).

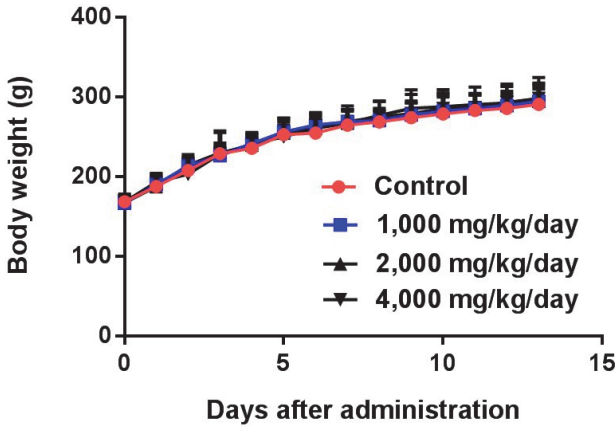


Fig. 2. modified Samjung-hwan (mSJH) was administered orally for 90days. There were no significant differences between any of the groups. Body changes in female Sprague-Dawley rat after once oral administration of modified Samjung-hwan (SJH). Values are presented as mean±standard deviation (n=10).

3. 사료섭취량

암수 평균 사료섭취량에서 대조군과 비교하여 모든 시험군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

4. 안과학적 검사

군 분리 시 외안검사와 투여 마지막 주에 수행된 안저 검사 결과에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

5. 요검사

요검사 결과, 수컷 KET 및 PRO 수치가 고용량군(4,000 mg/kg/day)에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하여, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다(P<0.05)

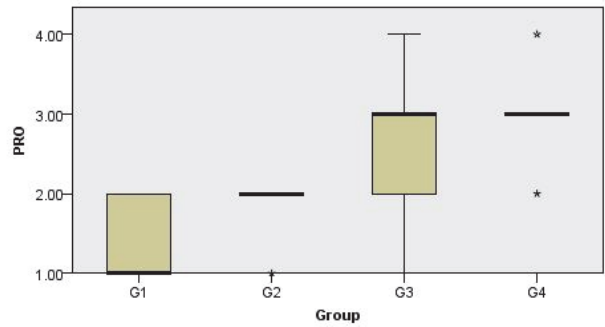


Fig. 3. Kruskal-Wallis' H-test for urine protein in male Sprague-Dawley rat after once oral administration of modified Samjung-hwan (SJH). Values are presented as severity (n=20). *Represents a significant difference at P<0,05 level compared with the vehicle control. PRO: protein, G1: sterile water administration group, G2: modified Samjung-hwan (mSJH) extract 1,000 mg/kg/day administration group, G3: mSJH extract 2,000 mg/kg/day administration group, G4: mSJH extract 4,000 mg/kg/day administration group.

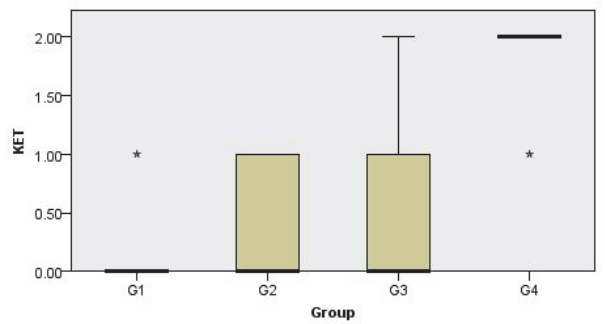


Fig. 4. Kruskal-Wallis' H-test for urine ketone in male Sprague-Dawley rat after once oral administration of modified Samjung-hwan (SJH). Values are presented as severity (n=20). *Represents a significant difference at P<0,05 level compared with the vehicle control. KET: ketone body, G1: sterile water administration group, G2: modified Samjung-hwan (mSJH) extract 1,000 mg/kg/day administration group, G3: mSJH extract 2,000 mg/kg/day administration group, G4: mSJH extract 4,000 mg/kg/day administration group.

(Table 2, Fig. 3, 4).

6. 혈액학적 검사

암수 모두에서 대조군과 비교하여 이상소견이 관찰되지 않았다(Table 3, 4).

7. 혈액생화학적 검사

수컷에서 CHO 수치가 대조군과 비교하여 고용량군(4,000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소하여, 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다(P<0.05) (Table 5).

Table 2. Urinalysis of Male and Female Standard Deviation Rats Treated Orally with Modified Samjung-Hwan for 90 Days

Items	Values	Severity	Groups (mg/kg/day)								
			Male				Female				
			G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)	
GLU	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
BIL	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
KET	-	0	4	3	3			5	5	5	5
	+/-	1	1	2	1	1					
	1+	2			1	4					
SG	≤1,010	1	4	3	3			5	4	4	3
	1,015	2		2	1	2			1	1	2
	1,020	3	1			1					
	1,025	4			1	2					
pH	6,5	0									
	7,0	1									
	7,5	2	2				1				
	8,0	3		1	3	5	1		2	3	
	8,5	4	3	4	2		3	5	3	2	
	≥9,0	5									
PRO	-	0					5	5	3	2	
	+/-	1	3	1	1				1	3	
	1+	2	2	4	1	1					
	2+	3			2	3			1		
	3+	4			1	1					
URO	0,2	0	5	5	5	4	5	5	5	5	
	1	1				1					
NIT	-	0	5	5	5	5	5	4	5	5	
	+	1						1			
OB	-	0	1	2	3	4	5	5	5	5	
	+/-	1	4	3	2						
	1+	2									
	2+	3									
	3+	4				1					
LEU	-	0		1			5	5	2	2	
	+/-	1	3	2	2	1			1	3	
	1+	2	1	1	1	2			1		
	2+	3	1	1	2	1			1		
	3+	4				1					
RBC ⁺	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	
WBC ⁺	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	
Epithelial cell ⁺	-	0	4	5	4	5	4	5	4	5	
	+/-	1	1		1		1		1		
Casts ⁺	-	0	4	5	5	4	5	4	5	5	
	+/-	1	1			1		1			

G1: sterile water administration group, G2: modified Samjung-hwan (mSJH) extract 1,000 mg/kg/day administration group, G3: mSJH extract 2,000 mg/kg/day administration group, G4: mSJH extract 4,000 mg/kg/day administration group. GLU: glucose, BIL: bilirubin, KET: ketone body, SG: specific gravity, PRO: protein, URO: urobilinogen, NIT: nitrite, OB: occult blood, LEU: leukocyte, RBC: red blood cell, WBC: white blood cell, -: negative, +: positive.

[†]The unit of Urobilinogen is Ehrlich unit/dL; [†]Urine sediments.

Table 3. Hematological Values in Male and Female Standard Deviation Rats Treated Orally with Modified Samjung-Hwan for 90 Days

Tests [*]	Groups (mg/kg/day)							
	Male				Female			
	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)
RBC (10 ⁶ /μL)	8.73±0.345	8.71±0.341	8.45±0.380	8.58±0.470	8.00±0.353	8.10±0.429	7.75±0.781	8.03±0.215
HGB (g/dL)	14.79±0.428	14.53±0.907	14.25±0.406	14.37±0.738	14.29±0.498	14.46±0.448	13.91±1.294	14.55±0.538
HCT (%)	44.51±1.165	44.73±1.360	43.22±1.149	43.93±2.247	42.42±1.702	42.90±1.532	41.16±4.002	43.34±1.470
MCV (fL)	51.03±1.634	51.37±1.296	51.20±2.012	51.30±2.298	53.04±0.763	53.05±1.631	53.15±1.333	53.99±1.683
MCH (pg)	16.93±0.572	16.70±0.932	16.91±0.895	16.79±0.998	17.87±0.416	17.89±0.547	17.95±0.613	18.13±0.668
MCHC (g/dL)	33.21±0.433	32.51±2.028	33.00±0.583	32.72±0.627	33.70±0.447	33.72±0.413	33.77±0.469	33.61±0.517
RDW (%)	12.98±0.731	12.56±0.470	13.21±0.788	13.13±0.869	11.41±0.814	11.34±0.420	11.92±1.923	11.44±0.474
HDW (g/dL)	2.71±0.136	2.68±0.139	2.76±0.289	2.81±0.359	2.37±0.127	2.42±0.108	2.46±0.246	2.44±0.146
PLT (10 ³ /μL)	928.50±176.477	986.30±153.770	986.40±85.004	955.60±119.821	1044.90±99.430	995.40±93.385	991.20±156.818	1026.80±109.274
MPV (fL)	7.35±0.513	7.21±0.285	7.33±0.267	7.32±0.257	7.24±0.267	7.24±0.255	7.32±0.439	7.24±0.201
RET (%)	1.46±0.192	1.40±0.285	1.70±0.414	1.81±0.505	1.46±0.329	1.52±0.543	1.44±0.335	1.64±0.538

G1: sterile water administration group, G2: modified Samjung-hwan (mSJH) extract 1,000 mg/kg/day administration group, G3: mSJH extract 2,000 mg/kg/day administration group, G4: mSJH extract 4,000 mg/kg/day administration group, RBC: red blood cell, HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red cell distribution, HDW: hemoglobin distribution width, PLT: platelet, MPV: mean platelet volume, RET: reticulocyte.

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

Table 4. Changes of White Blood Cell Number in Male and Female Standard Deviation Rats Treated Orally with Modified Samjung-Hwan for 90 Days

Tests	Unit	Groups (mg/kg/day)							
		Male				Female			
		G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)
WBC	10 ³ /μL	3.65±1.647	3.44±1.573	3.62±0.931	3.53±0.869	1.52±0.517	1.68±0.592	2.15±1.623	1.88±0.534
NEU	%	24.62±11.811	24.80±18.972	22.78±7.356	22.82±3.878	16.69±4.956	20.12±8.055	16.80±6.584	17.16±5.787
	10 ³ /μL	0.82±0.329	0.87±0.896	0.82±0.330	0.82±0.275	0.25±0.118	0.32±0.128	0.29±0.138	0.32±0.151
LYM	%	68.95±13.738	69.34±22.744	72.42±7.612	72.43±4.718	77.55±6.078	74.11±7.938	78.03±7.986	76.93±5.981
	10 ³ /μL	2.60±1.413	2.37±1.506	2.62±0.764	2.55±0.628	1.18±0.433	1.26±0.518	1.76±1.613	1.45±0.447
MONO	%	2.59±1.145	3.53±4.809	2.42±0.700	2.30±0.724	2.42±0.977	2.66±0.715	2.24±1.239	2.19±0.479
EOS	%	3.03±2.093	1.84±0.836	1.55±0.334	1.81±0.872	2.59±1.478	2.44±1.270	2.13±1.067	2.95±2.530
BASO	%	0.19±0.074	0.17±0.116	0.17±0.095	0.17±0.095	0.20±0.141	0.15±0.118	0.21±0.120	0.19±0.099
LUC	%	0.63±0.510	0.32±0.253	0.64±0.327	0.49±0.238	0.55±0.284	0.55±0.317	0.59±0.296	0.55±0.314

G1: sterile water administration group, G2: modified Samjung-hwan (mSJH) extract 1,000 mg/kg/day administration group, G3: mSJH extract 2,000 mg/kg/day administration group, G4: mSJH extract 4,000 mg/kg/day administration group, WBC: white blood cell, NEU: neutrophils, LYM: lymphocytes, MONO: monocytes, EOS: eosinophils, BASO: basophils, LUC: large unstained cells.

8. 혈액응고시간 검사

암수 모두에서 대조군과 비교하여 이상소견이 관찰되지 않았다(Table 6).

9. 부검소견

암컷 중용량군(2,000 mg/kg/day)의 1예에서 자궁(uterus) 내 맑은 액체 저류(retention of clear fluid)가 관찰되었지만,

다른 개체에서는 관찰되지 않아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

10. 장기중량

장기중량 결과는 절대중량(absolute organ weights)과 부검 전 체중 대비 상대중량(relative organ weights)을 바탕으로 판정하였다. 수컷의 왼쪽 고환(testis)의 절대중량에

Table 5. Blood Chemistry Values in Male and Female Standard Deviation Rats Treated Orally with Modified Samjung-Hwan for 90 Days

Tests [*]	Groups (mg/kg/day)							
	Male				Female			
	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)
ALB (g/dL)	3.1±0.09	3.1±0.03	3.1±0.09	3.2±0.10	3.4±0.15	3.4±0.13	3.4±0.21	3.4±0.14
ALP (U/L)	204.1±29.56	205.5±50.69	206.9±18.86	476.7±809.51	132.3±26.64	127.2±21.49	141.6±31.04	141.4±34.77
ALT (U/L)	26.1±6.17	27.0±5.79	25.3±3.98	29.2±7.35	20.8±4.07	18.8±3.49	21.8±5.04	21.9±3.03
AST (U/L)	88.0±12.98	97.5±21.98	83.0±19.18	94.1±24.27	82.3±19.13	75.7±14.28	83.2±21.11	80.7±13.22
BIL (mg/dL)	0.1±0.02	0.1±0.04	0.1±0.02	0.1±0.02	0.2±0.02	0.1±0.03	0.2±0.08	0.5±0.06
BUN (mg/dL)	15.2±2.52	15.6±1.61	15.8±2.39	16.3±3.06	19.38±5.45	19.3±4.21	15.2±3.28	14.8±2.35
CHO (mg/dL)	106.7±20.23	91.2±12.76	99.0±17.05	86.85±15.30	92.9±21.17	80.2±22.22	82.8±18.46	87.2±14.66
CPK (U/L)	195.2±168.57	290.8±190.00	203.4±146.03	256.6±214.43	181.1±141.75	162.4±66.03	202.5±192.81	185.3±133.51
CRE (mg/dL)	0.6±0.06	0.6±0.04	0.6±0.04	0.6±0.04	0.8±0.28	0.7±0.18	0.6±0.09	0.7±0.06
GGT (U/L)	3.7±0.65	3.2±0.48	3.2±0.73	3.3±0.74	3.6±0.58	3.7±0.74	3.6±0.41	3.8±0.50
GLU (mg/dL)	199.9±23.14	188.3±16.92	187.2±11.48	191.6±18.04	142.0±26.34	135.7±21.83	155.1±20.32	129.0±15.93
IP (mg/dL)	6.0±0.44	6.0±0.87	6.1±0.31	6.1±0.55	5.2±0.62	5.4±0.66	5.0±0.72	5.1±0.64
PRO (g/dL)	5.6±0.19	5.7±0.22	5.8±0.19	5.8±0.31	5.8±0.26	5.7±0.31	5.8±0.43	5.8±0.27
TG (mg/dL)	39.6±10.99	36.9±12.06	44.4±15.09	44.5±15.47	31.2±4.11	30.9±10.14	34.2±6.12	35.1±7.34
A/G ratio	1.2±0.06	1.2±0.10	1.1±0.07	1.2±0.08	1.5±0.11	1.5±0.09	1.5±0.09	1.4±0.07
Ca ²⁺ (mg/dL)	9.7±0.26	9.5±0.22	9.7±0.27	9.8±0.24	10.2±0.14	10.1±0.32	10.1±0.27	10.3±0.26
Na ⁺ (mg/dL)	141.2±0.67	141.5±0.64	142.1±0.60	141.7±1.11	141.2±1.66	140.7±1.25	140.4±1.16	140.5±1.11
K ⁺ (mmol/L)	4.7±0.37	4.8±0.49	4.7±0.30	4.8±0.28	4.3±0.28	4.3±0.30	4.1±0.31	4.2±0.21
Cl ⁻ (mmol/L)	105.1±0.72	105.3±1.42	106.2±1.35	105.7±1.39	106.8±1.714	106.9±1.30	106.6±1.69	106.6±1.40

G1: sterile water administration group, G2: modified Samjung-hwan (mSJH) extract 1,000 mg/kg/day administration group, G3: mSJH extract 2,000 mg/kg/day administration group, G4: mSJH extract 4,000 mg/kg/day administration group, ALB: albumin, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, BIL: total bilirubin, BUN: blood urea nitrogen, CHO: total cholesterol, CPK: creatine phosphokinase, CRE: creatinine, GGT: gamma-glutamyltransferase, GLU: glucose, IP: inorganic phosphorus, PRO: total protein, TG: triglyceride, A/G ratio: albumin/globulin ratio, Ca²⁺: calcium ion, Na⁺: sodium ion, K⁺: potassium ion, Cl⁻: chloride ion.

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

Table 6. Plasma Coagulation Values in Male and Female Standard Deviation Rats Treated Orally with Modified Samjung-Hwan for 90 Days

Tests	Groups (mg/kg/day)							
	Male				Female			
	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)
PT (sec)	9.47±0.501	9.66±0.454	9.40±0.473	9.43±0.449	9.36±0.531	9.55±0.751	9.45±0.561	9.26±0.494
APTT (sec)	20.3±1.03	1.92±2.93	18.8±1.48	19.1±1.77	20.0±1.40	19.2±1.78	19.2±1.37	18.5±2.54

G1: 0 mg/kg/day, G2:1,000 mg/kg/day, G3: 2,000 mg/kg/day, G4: 4,000 mg/kg/day, PT: protrombin time, APTT: activated partial thromboplastin time.

서 대조군과 비교하여 저용량군(1,000 mg/kg/day) 및 중용량군(2,000 mg/kg/day)에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나 용량의존성 및 좌측고환에 영향이 없는 정상범위 (historical data) 내의 변화로 비시험물질-유래 변화로 판단하였다(P<0.05) (Table 7). 반면 암컷에서는 장기중량의 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 8).

11. 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사에서 나타나는 결과는 중등도(severity)에 따라 “minimal (아주 경증)”, “slight (경증)”, “moderate (중증)”, “severe (상당한 중증)” 의 4단계로 구분하여 나타났다. 암컷 피부(skin)에서 낭포(cyst)가 고용량군(4,000 mg/kg/day)에서 “minimal”로 1예가 나타났으나 발생빈도가 낮아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

Table 7. Absolute (g) and Relative (%) Organ Weights in Male Standard Deviation Rats (n=40) Treated Orally with Modified Samjung-Hwan for 90 Days

Organs	Groups (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)
Adrenal (L) (g)	0,0277±0,00433	0,0277±0,00506	0,0264±0,00399	0,0281±0,00603
Percentage (%)	0,0055±0,00079	0,0056±0,00118	0,0053±0,00061	0,0056±0,00114
Adrenal (R) (g)	0,273±0,00601	0,0299±0,00592	0,0282±0,00314	0,0281±0,00558
Percentage (%)	0,0054±0,00101	0,00859±0,00069	0,0056±0,00064	0,0056±0,00101
Pituitary (g)	0,0146±0,00152	0,0151±0,00213	0,0144±0,00083	0,0140±0,00155
Percentage (%)	0,0029±0,00033	0,0031±0,00052	0,0029±0,00029	0,0028±0,00026
Testis (L) (g)	2,2532±0,19915	2,0690±0,17673 [†]	2,0751±0,16925 [†]	2,1223±0,13738
Percentage (%)	0,4488±0,03414	0,4164±0,04098	0,4158±0,03249	0,4236±0,03511
Testis (R) (g)	2,1901±0,22137	2,0382±0,19586	2,0953±0,17746	2,0809±0,13745
Percentage (%)	0,4362±0,03766	0,4098±0,03944	0,4197±0,03113	0,4153±0,03466
Epididymis (L) (g)	0,7345±0,06676	0,7440±0,06412	0,7229±0,07862	0,6977±0,05935
Percentage (%)	0,1464±0,01336	0,01501±0,01750	0,1447±0,01406	0,1391±0,01256
Epididymis (R) (g)	0,7197±0,06118	0,7445±0,06761	0,7055±0,07411	0,7232±0,08201
Percentage (%)	0,1435±0,01196	0,1500±0,01662	0,1410±0,01081	0,1445±0,01963
Thymus (g)	0,4385±0,12049	0,4968±0,16093	0,4729±0,11082	0,4837±0,09800
Percentage (%)	0,0873±0,02307	0,0979±0,02287	0,0947±0,02323	0,0961±0,01710
Prostate (g)	0,6929±0,16213	0,6640±0,15732	0,5854±0,09933	0,6941±0,15308
Percentage (%)	0,1395±0,03990	0,1345±0,03475	0,1168±0,01602	0,14383±0,02982
Spleen (g)	0,9145±0,13154	0,9041±0,19825	0,9694±0,11095	0,9272±0,14224
Percentage (%)	0,1813±0,01705	0,1796±0,02346	0,1935±0,01351	0,1844±0,02460
Kidney (L) (g)	1,5566±0,13740	1,5130±0,18088	1,5819±0,16563	1,5507±0,12337
Percentage (%)	0,3099±0,02272	0,3027±0,01690	0,3160±0,02160	0,3085±0,01382
Kidney (R) (g)	1,5331±0,10402	1,5358±0,17972	1,5851±0,15875	1,5689±0,14416
Percentage (%)	0,3055±0,01939	0,3077±0,02299	0,3166±0,01762	0,3122±0,02127
Heart (g)	1,4444±0,13072	1,4335±0,20866	1,4578±0,14844	1,4587±0,07729
Percentage (%)	0,2872±0,01643	0,2860±0,01574	0,2912±0,01520	0,2911±0,02095
Lung (g)	1,8800±0,12812	1,8491±0,14987	1,8970±0,16929	1,8573±0,09562
Percentage (%)	0,3742±0,01463	0,3718±0,03303	0,3797±0,02777	0,3768±0,01776
Brain (g)	2,1926±0,05457	2,1889±0,09843	2,1985±0,10363	2,2194±0,08003
Percentage (%)	0,4378±0,02955	0,4416±0,04197	0,4425±0,04748	0,4432±0,03201
Liver (g)	13,4832±0,99265	13,0017±1,67276	13,8935±1,97693	14,3159±1,32183
Percentage (%)	2,6855±0,15655	2,5989±0,12716	2,7658±0,17128	2,8483±0,19245

G1: sterile water administration group, G2: modified Samjung-hwan (mSJH) extract 1,000 mg/kg/day administration group, G3: mSJH extract 2,000 mg/kg/day administration group, G4: mSJH extract 4,000 mg/kg/day administration group, L: left, R: right.
[†]Represents a significant difference at P<0,05 level compared with the vehicle control.

수컷 뇌하수체(pituitary)에서 낭포(cyst)가 고용량군에서 “minimal”로 1예가 나타났으나 대조군에서도 “minimal”로 1예가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷 뇌하수체 에서도 낭포가 고용량군에서 “minimal”로 1예가 나타났으나 대조군에서도 “minimal”로 2예가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

수컷 전립샘(prostate)에서 염증세포침윤(infiltration of

inflammatory cells)이 고용량군에서 “minimal”로 1예가 나타났지만 대조군에서도 “minimal”로 1예가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

수컷 신장(kidney)에서 세뇨관(renal tubule) 재생(regeneration)이 고용량군에서 “minimal”로 1예, 염증세포침윤이 고용량군에서 “minimal”로 1예가 나타났으나 대조군에서도 염증세포침윤이 “minimal”로 2예가 나타나 비시험물질-유래

Table 8. Absolute (g) and Relative (%) Organ Weights in Female Standard Deviation Rats (n=40) Treated Orally with Modified Samjung-Hwan for 90 Days

Organs	Groups (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (1,000)	G3 (2,000)	G4 (4,000)
Adrenal (L) (g)	0,0341±0,00482	0,0334±0,00344	0,0327±0,00222	0,0323±0,00429
Percentage (%)	0,0126±0,00178	0,0122±0,00133	0,0118±0,00067	0,0117±0,00171
Adrenal (R) (g)	0,0332±0,00360	0,0346±0,0047	0,0318±0,00145	0,0337±0,00417
Percentage (%)	0,0123±0,00175	0,0126±0,00131	0,0115±0,00103	0,0122±0,00162
Pituitary (g)	0,0167±0,00200	0,0153±0,00211	0,0155±0,00235	0,0157±0,00166
Percentage (%)	0,0062±0,00073	0,0056±0,00093	0,0056±0,00092	0,0057±0,00058
Ovary (L) (g)	0,0676±0,00858	0,0682±0,00836	0,0619±0,01038	0,0654±0,00834
Percentage (%)	0,0251±0,00437	0,0249±0,00324	0,0223±0,00346	0,0236±0,00310
Ovary (R) (g)	0,0679±0,00782	0,0726±0,01004	0,0631±0,00980	0,0689±0,00868
Percentage (%)	0,0251±0,00374	0,30265±0,00311	0,0227±0,00329	0,0248±0,00247
Thymus (g)	0,3255±0,08114	0,3288±0,06143	0,3318±0,08951	0,3141±0,03945
Percentage (%)	0,1190±0,03015	0,1198±0,02206	0,1194±0,03138	0,1142±0,02016
Spleen (g)	0,5778±0,06290	0,5815±0,07877	0,6360±0,19500	0,5620±0,05106
Percentage (%)	0,2125±0,01788	0,2120±0,02698	0,2308±0,07951	0,2029±0,01648
Kidney (L) (g)	0,8849±0,08610	0,8686±0,05604	0,8803±0,07593	0,8669±0,07386
Percentage (%)	0,3260±0,02907	0,3173±0,02393	0,3179±0,03144	0,3130±0,02300
Kidney (R) (g)	0,8791±0,08162	0,8863±0,0554	0,8971±0,08354	0,8792±0,06333
Percentage (%)	0,3237±0,02558	0,3240±0,02563	0,3240±0,03473	0,3175±0,01831
Heart (g)	0,8953±0,06342	0,9222±0,07450	0,9120±0,12305	0,8943±0,04516
Percentage (%)	0,3300±0,002265	0,3364±0,02231	0,3286±0,04188	0,3238±0,02637
Lung (g)	1,3573±0,08748	1,4178±0,09770	1,3853±0,10071	1,3612±0,10099
Percentage (%)	0,5002±0,02873	0,5178±0,03793	0,4997±0,03603	0,4931±0,05025
Brain (g)	1,9584±0,08726	2,0014±0,06540	2,0037±0,07336	1,9997±0,04320
Percentage (%)	0,7236±0,06209	0,7323±0,05821	0,7252±0,06681	0,7248±0,06168
Liver (g)	6,9063±0,84855	7,0742±1,07608	7,1424±0,56172	6,8777±0,84140
Percentage (%)	2,5402±0,24859	2,5860±0,42754	2,5747±0,17181	2,4743±0,17757

Represents a significant difference at P<0,05 level compared with the vehicle control.

G1: sterile water administration group, G2: modified Samjung-hwan (mSJH) extract 1,000 mg/kg/day administration group, G3: mSJH extract 2,000 mg/kg/day administration group, G4: mSJH extract 4,000 mg/kg/day administration group, L: left, R: right.

변화로 판단하였다.

암컷 장막간 림프절(lymph node)에서 장간막림프절의 색소(pigment)와 임파동적혈구증다증(sinus erythrocytosis)이 고용량군에서 “minimal”로 1예가 나타났으나 발생빈도가 낮아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

수컷 폐(lung)에서 무기질침착(mineralization)이 고용량군에서 “minimal”로 1예가 나타났으나 발생빈도가 낮아 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 암컷 폐에서는 무기질침착이 대조군(0 mg/kg/day)에서만 “minimal”로 2예가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다. 수컷 심장(heart)에서 염증세포침윤이 고용량군에서 “minimal”로 2

예가 나타났지만 대조군에서도 “minimal”로 2예가 나타나 비시험물질-유래 변화로 판단하였다.

고찰

본 시험은 시험물질인 삼정환 추출물의 반복투여에 따른 독성을 평가하기 위하여 6주령 Sprague-Dawley계 랫드에 시험물질을 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg의 용량으로 군당 암수 각 10마리에 90일간 경구투여하였다. 독성지표를 위해 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 요검사, 전해질, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검

시 장기의 중량측정, 육안적 검사 및 조직병리학적 검사 등이 수행되었다. 이때 본 독성시험으로부터 정량적 지표의 정확한 설정을 위해 반복투여 독성시험을 위한 독성평가기준이 응용되었다. 관찰기간 동안 암수 시험물질 투여에 의한 사망에는 관찰되지 않았다.

시험의 결과, 독성판정기준에 따라 삼정환 추출물은 수컷의 NOEL, 암컷의 NOEL이 모두 4,000 mg/kg/day로 판단되었다. 수컷에서 NOEL의 판단기준이 되는 시험물질-유래 경미한 변화가 관찰되었는데, 요검사에서 KET 및 PRO 수치 증가와 생화학검사에서 CHO 수치 감소이다. 우선 KET 및 PRO 수치가 고용량군에서 증가하였는데, KET 이상의 원인으로는 당뇨병 또는 식이섭취 저하로 인한 기아 등이 있으며, 요검사 및 생화학 결과에서 Glucose 수치가 정상으로 나타났고, 체중 및 사료섭취량에서도 이상이 관찰되지 않았다. PRO 수치 이상의 원인은 신장 및 요로의 이상 시 나타날 수 있는데, 이러한 증상을 뒷받침해 줄 혈액학 및 생화학 검사의 이상과 조직병리검사의 결과에서 신장 및 요로의 이상이 관찰되지 않았다. 따라서 요검사의 KET 및 PRO 수치 증가는 시험물질의 약리적 변화에 의한 Non-adverse effect로 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다. 또한 CHO 수치가 대조군과 비교하여 고용량군에서 18.7% 감소하였다. 이러한 변화는 간의 이상과 관련 있는데, 생화학 분석 결과 및 조직병리 소견에서 이상이 관찰되지 않아 독성으로 판단하기는 힘들며, 시험물질의 약리적 변화에 의한 non-adverse effect로 시험물질-유래 경미한 변화로 판단하였다.

암컷에서 NOEL의 판단기준이 되는 비시험물질-유래 변화가 관찰되었는데, 부검소견에서 중용량군의 1예에서 자궁내 액체저류의 관찰이다. 이는 나이든 암컷의 성주기와 관련된 증상으로 비시험물질-유래변화로 판단하였다. 조직병리 검사에서 피부에서 낭포가 고용량군에서 1예가 나타났으나 발생 빈도수가 적어 시험물질 영향이 아니라고 판단하였다. 뇌하수체 낭포가 고용량군에서 1예가 나타났지만, 뇌하수체 낭포는 나이가 들어감에 따라 나타나는 자연발생증상으로²⁵⁾ 고용량군에서 나타난 낭포는 시험물질에 의한 영향은 아니라고 판단되었다. 장간막 림프절에서 장간막 림프절의 색소와 임파동 적혈구증다증이 고용량군에서 1예가 나타났으나 발생 빈도수가 적어 시험물질 영향이 아니라고 판단하였다. 폐에서 무기질침착이 대조군에서만 2예가 나타나 시험물질에 의한 영향은 아

니라고 판단되었다.

수컷에서도 비시험물질-유래 변화가 관찰되었는데, 장기중량에서 왼쪽 고환의 절대중량에서 대조군과 비교하여 저, 중용량군에서 통계적으로 유의하게 각각 7.2%, 7.5% 감소하였으나 용량의존성 및 좌측고환에 영향이 없는 정상범위 내의 변화로 시험물질 영향이 아닌 것으로 판단하였다. 뇌하수체 낭포가 고용량군에서 1예가 나타났지만 뇌하수체 낭포는 나이가 들어감에 따라 나타나는 자연발생증상으로²⁵⁾ 고용량군에서 나타난 낭포는 시험물질에 의한 영향은 아니라고 판단되었다. 전립샘에서 염증세포침윤이 고용량군에서 1예가 나타났으나 대조군에서도 1예가 나타났으며, 전립선의 미약한 염증은 나이가 들어감에 따라 나타나는 자연발생증상으로²⁵⁾ 고농도군에서 나타난 국소적인 염증은 시험물질에 의한 영향은 아니라고 판단되었다. 신장에서 세뇨관 재생과 염증세포침윤이 고용량군에서 각각 1예가 나타났지만, 세뇨관 재생과 염증세포침윤은 자연발생적으로 나타나는 증상으로²⁵⁾ 대조군에서도 나타나고 빈도가 낮아 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단되었다. 폐에서 무기질침착이 고용량군에서 1예가 있으나 발생빈도가 낮고, 암컷 대조군에서도 나타나 시험물질 영향이 아닌 것으로 판단하였다. 심장에서 염증세포침윤이 고용량군에서 2예가 나타났지만 대조군에서도 2예가 나타나 시험물질 영향이 아닌 것으로 판단하였다. 즉 시험물질을 투여한 시험군의 피부, 뇌하수체, 전립선, 신장, 림프관, 폐, 심장 등에서 병변이 나타났으나 대조군에서도 나타나는 개체 특이적 현상이거나 나이가 많아짐에 따라 나타나는 자연 발생적 병변으로 판단되어 시험물질의 영향이 아닌 것으로 판단하였으며, 본 시험에서 시험물질에 의한 뚜렷한 표적 장기는 없었다.

물론 이전 연구와는 달리 암컷, 수컷 모두 삼정환의 체중감소 및 혈당 수치 감소에 대한 효과는 본 시험에서 유의하게 관찰되지 않았으며 CHO 수치는 수컷에서만 유의하게 감소하였다. 선행연구에서는 고지방식이 한 점, 삼정환을 상온에서 혹은 유산균과 함께 발효하였다는 점이 본 연구와 차이가 있다. 따라서 고지방식을 한 군에서 발효하지 않은 삼정환을 복용하였을 때 나타나는 지질대사 개선 효과에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

삼정환 추출물의 90일 반복독성시험 결과를 바탕으로 시험의 독성판정 기준에 따라 판정할 때, 수컷은 NOEL, 암컷은 NOEL이 4,000 mg/kg/day로 판단된다. 그러나 식약처 고시 제2015-82호(2015.11.11.) “의약품 등의 독성시험기준”에 따라 판정할 경우 암수 모두 NOEL이 4,000 mg/kg/day로 추정할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원을 통해 보건복지부 ‘한약 선도기술개발사업’의 재정 지원을 받아 수행된 연구임(과제고유번호: HI14C0556).

References

1. Ballantyne CM, O'Keefe JH, Gotto AM. Dyslipidemia & Atherosclerosis Essentials 2009. 4th ed. Burlington, Massachusetts : Jones & Bartlett Publishers. 2009 : 5.
2. Jee SH, Jang Y, Oh DJ, Oh BH, Lee SH, Park SW, et al. A coronary heart disease prediction model: the Korean Heart Study. *BMJ Open*. 2014 ; 4(5) : e005025.
3. Committee for Guidelines for Management of Dyslipidemia. 2015 Korean guidelines for management of dyslipidemia. *J Lipid Atheroscler*. 2015 ; 4(1) : 61-92.
4. Khader YS, Batiha A, El-Khateeb M, Al Omari M, Ajlouni K. Prevalence of dyslipidemia and its associated factors among Jordanian adults. *J Clin Lipidol*. 2010 ; 4(1) : 53-8.
5. Wang S, Xu L, Jonas JB, You QS, Wang YX, Yang H. Prevalence and associated factors of dyslipidemia in the adult Chinese population. *PLoS One*. 2011 ; 6(3) : e17326.
6. Sun GZ, Li Z, Guo L, Zhou Y, Yang HM, Sun YX. High prevalence of dyslipidemia and associated risk factors among rural Chinese adults. *Lipids Health Dis*. 2014 ; 13 : 189.
7. Jang WS, Kim YS, Seol IC. Antioxidant and lipid-lowering effects of *artemisia capillaris* on a rat model of hyperlipidemia. *The Journal of Korean Oriental Medicine*. 2012 ; 33(2) : 11-24.
8. Lim DW, Bose S, Wang JH, Choi HS, Kim YM, Chin YW, et al. Modified SJH alleviates FFAs-induced hepatic steatosis through leptin signaling pathways. *Sci Rep*. 2017 ; 7 : 45425.
9. Huh J. *Dongyibogam*. 2nd ed. Seoul : Bubin Press. 2012 : 221.
10. Lee DJ, Jeong JC. Peroxynitrite scavenging activity of Samjungwan. *Korean J Orient Intern Med*. 2006 ; 27(1) : 178-87.
11. Kim HG, Ju MS, Park H, Seo Y, Jang YP, Hong J, et al. Evaluation of Samjungwan, a traditional medicine, for neuroprotection against damage by amyloid-beta in rat cortical neurons. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 130(3) : 625-30.
12. Han KS, Wang J, Lim D, Chin YW, Choi YH, Choi HS, et al. Anti-oxidative and anti-obesity effect of combined extract and individual extract of samjungwan. *J Korean Med Obes Res*. 2014 ; 14(2) : 47-54.
13. Kim SY, Jeong JC. Effects of samjungwan on the IL-1 gene expression in the macrophage. *Korean J Orient Intern Med*. 2006 ; 27(1) : 228-36.
14. Song MY, Bose S, Kim HJ. Anti-Obesity Effects of Fermented Samjung-hwan in High Fat Diet Rats. *J Korean Med Obes Res*. 2013 ; 13(1) : 17-23.
15. Kim AJ, Park SJ, Rho JO. Mulberry fruit extract consumption is inversely associated with hyperlipidemia in middle-aged men. *Korean J Food Nutr*. 2008 ; 21(2) : 121-6.
16. Han Y, Park YK. The comparisons of lycii radicis cortex and corni fructus water extract effects on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Korea J Herbol*. 2013 ; 28(6) : 71-7.
17. Jung YS, Park CH, Shin HC. Antioxidative effects of *Lycium chinense* Miller on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Korean J Orient Int Med*. 2014 ; 35(1) : 92-105.
18. Lee EJ, Bae JH. Study on the alleviation of an alcohol induced hangover and the antioxidant activity by mul-

- berry fruit. Korean J Food Nutr. 2011 ; 24(2) : 204-9.
19. Jun HI, Kim Y, Kim YS. Antioxidant activities of Rubus coreanus and Morus alba L. fruits. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2014 ; 43(3) : 381-8.
20. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4: Health Effects. Test No. 408 Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. OECD Publishing. 2008 : 1-10.
21. Song CW, Hwang HS, Han SS. Studies on the basic data of Krc: SD rats with age-(1)-body weight, hematology, serum chemistry and urine analysis. Korean J Laboratory Animal Science. 1990 ; 6(1) : 33-43.
22. Park YC, Cho MH. A new way in deciding NOAEL based on the findings from GLP-toxicity test. Toxicol Res. 2011 ; 27(3) : 133-5.
23. Park YC, Lee JS, Kim DY, Son HY, Lee JW, Cheoi YS, et al. A 90 day repeated dose-oral toxicity study of extracts from Astragalus membranaceus-aboveground parts in rats. Kor J Med Crop Sci. 2013 ; 21(6) : 474-85.
24. 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.
25. Gary AB, Scot LE, Michael RE, Charles A. Pathology of the Fischer rat. 2nd ed. Academic Press : Academic Press, Inc. 1993 : 132-4, 423-4, 490-1.