



ICR 마우스를 이용한 소핵시험을 통한 TA 약침의 안전성 평가

황지혜¹ · 정효원² · 정 철³

¹가천대학교 한의과대학 침구의학과, ²동국대학교 한의과대학 본초학교실, ³남상천 한의원

Toxicity Evaluation of TA, a Pharmacopuncture Medicine, in an in Vivo Micronucleus Test

Ji Hye Hwang¹, Hyo Won Jung², Chul Jung³

¹Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University,

²Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University,

³Namsangcheon Korean Medicine Clinic

Objectives : TA, a polyherbal extract, typically is used for pharmacopuncture therapy on patients with traffic accident-related injuries and musculoskeletal diseases. This study was performed to evaluate the safety of the TA extract, using a micronucleus test. **Methods :** The dose range and sampling time were first established. An in vivo micronucleus test was then performed to determine the induction of micronuclei in mouse bone marrow cells after a single intramuscular administration of TA to 7-week-old ICR mice (0.2 ml/animal, at 24 hours post-dosing). **Results :** The incidence of micro-nucleated polychromatic erythrocytes (PCEs) in PCEs in the TA group was similar to that in the negative-control group, while that in the positive-control group was significantly greater. The positive- and negative-control groups did not differ in the ratio of PCEs to total erythrocytes. **Conclusions :** Our toxicity study indicates that the TA extract does not induce micronucleus formation in mouse bone marrow cells.

Key words : micronucleus, pharmacopuncture, safety, TA extract, toxicity test

서 론

한약재 및 한약제제는 오랜 임상 경험에 의해 안전성과 그 효능이 입증된 천연물 의약품이지만, 간독성이나 신독성 등을 유발하는 주요 원인이 되는 것으로 오인되는 경우가 많고, 이로 인하여 환자들로 하여금 한의 진료를 기피하게 하는 경향이 있다. 그러므로 비록 오랜 임상 경험 축적을 통한 안전성이 입증된 천연 의약품일지라도 과학적 독성 평가를 통하여 안전성을 입증할 필요성이 지속적으로 있어왔다.

면역약침은 부작용이 거의 없으며, 신속, 정확하고 과학적인 효과로 동통(疼痛) 치료에 탁월한 장점이 있으며, 인체의 내부 장기와 모든 조직 및 기관을 임의로 움직일 수 있게 하고, 또한 면역을 증강시켜 난치병에 대처할 수 있게 하는 우수한 한의학 치료방법이다¹⁻³⁾. 실제 한의학 임상에서 거의 모든 분야의 병증에 면역약침이 활용되고 있으며, 특히 근골격계 질환과 교통사고 상해 증후군 환자의 급성 또는 만성 염증 및 동통 치료에 V 약침, OK 약침, 그리고 V 약침을 개량한 TA 약침 등이 사용되고 있다^{2,4,5)}.

TA 약침은 근육경결 해소, 통증 완화 및 항염증 작용이 있어

Received February 12, 2019, Revised March 14, 2019, Accepted March 19, 2019

Corresponding author: **Chul Jung**

Namsangcheon Korean Medicine Clinic, Banpodaero 109, Seocho-gu, Seoul 06656, Korea

Tel: +82-2-583-0325, Fax: +82-2-523-6319, E-mail: jcnu2000@hanmail.net

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. 2017R1C1B5076224). This work was also supported by the Gachon University research fund of 2018 (GCU-2018-0299).

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

근골격계 질환 특히 교통사고(Traffic Accident, TA) 상해 증후군에 주로 사용하기 위해 개발된 약침이다⁴⁻⁶⁾. TA 약침은 안정적인 공급이 어려운 V약침을 대체할 목적으로 개발된 약침으로 황금, 황백, 백두옹, 산두근, 목향, 홍화자로 구성되어 있다. 임상에서 근골격계 질환 및 교통사고 상해 증후군에 유의한 치료효과를 나타낸다고 알려져 있으며, 이에 대한 임상보고는 아직 많지 않다^{5,6)}. IL-6, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 생성을 억제하여 항염증 효과를 가지고 있음이 실험적으로 증명되었다³⁾. TA 약침을 한의학 임상에서 널리 활용하기 위해서는 다양한 임상적 및 실험적 방법을 이용한 TA 약침의 효능 평가와 안전성 평가가 필요하다.

TA 약침액은 이미 제조 과정에서 여러 검증과 오랜 임상경험을 통해 안전성이 확인되었으며, 이전 연구에서 세균을 이용한 복귀돌연변이(reverse mutation) 시험⁷⁾, 유류 배양세포를 이용한 염색체이상(in vitro) 시험⁸⁾을 통해 안전성을 확인하였다. 하지만, 보다 안전한 한약제제로 인정받기 위해서는 여러 가지 실험적인 독성평가 자료가 요구되는 실정하기에, TA 약침의 안전성에 대한 과학적인 근거를 확보하기 위한 추가적 연구로 본 연구에서는 ICR 마우스를 이용한 소핵시험을 GLP 독성시험 기관인 (주)바이오톡스텍(충북, 한국)에 의뢰하였다. 시험은 <비임상시험 관리기준>⁹⁾, <Good Laboratory Practice Regulation for Non-Clinical Laboratory Studies of Drug>¹⁰⁾, <OECD Principles of Good Laboratory Practice>¹¹⁾ 등을 준수하고, 식품의약품안전처 고시 <의약품 등의 독성시험 기준>¹²⁾에 따라 실시되었다. 시험 결과 TA 약침액의 안전성에 대한 근거가 확보됨에 따라 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시험물질: TA 약침액 조제를 위해 사용한 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*), 백두옹(*Pulsatilla koreana*), 산두근(*Sophora tonkinensis*), 목향(*Aucklandia lappa*), 홍화자(*Carthamus tinctorius L*) 6가지 원료약재를 모두 (주)자연담은(양주시, 경기도, 한국)에서 구입하여 남상천원의탕전실(용인, 한국)에서 감별, 정선한 후 사용하였다. 추출은 KGMP에 준하는 시설을 갖춘 남상천원의탕전실에서 수행하였다. 먼저 주사용 정제수와 주정알코올을 1:1로 혼합한 추출용매 1 L에 황금, 황백, 백두옹, 산두근 각각 10 g, 목향 5 g, 홍화자 15 g을 넣어 50 L 저온진공추출기를 사용하여 추출하였다. 완성된 추출물을 정제수로 희석하여

Watman No.2 filter paper, 5 μ m 0.45 μ m, 0.2 μ m Cellulose acetate filter로 순차적으로 필터(filteration)한 후, 정제식염(99.9%) 0.9% (w/v)을 이용하여 pH 적정을 마친 약침액은 Clean booth로 반입하고 약침액을 자동충진기에 넣고 일정 용량(2 ml/vial)씩 충전 및 실링을 하여 121°C에 25분간 습식 멸균을 하였다. 본 실험에 사용된 시험약 TA 약침액(60 mg/ml)은 갈색의 투명한 액체로 남상천원의탕전실에서 상기와 같은 방법으로 조제하여 공급받아 4.2~5.4°C에서 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 음성대조물질: 음성대조물질로는 본 시험의 부형제인 생리식염수(염주사약(JW Pharmaceutical Co., Ltd., Korea)을 사용하였다.

3) 양성대조 물질: 양성대조물질로는 Mitomycin C (MMC, Lot No. SLBN5647V)를 Sigma-Aldrich, Co., (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

4) 실험동물 및 사육환경: ICR 마우스는 설치류로서, 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있고, 비교할 수 있는 많은 기초자료가 축적되어 있으며, 또한 가이드라인에서 추천하는 동물종이기 때문에 ORIENTBIO INC. (성남, 한국)로부터 구입한 ICR계통 특정 병원균 부재(SPF) 수컷 7주령 마우스를 본 연구에 사용하였다. 용량설정시험의 결과, 암수 모두 사망동물은 관찰되지 않았으며, 검체제작시간 설정시험 및 본시험에서는 수컷 마우스만 사용하였다.

입수시 마우스의 체중 범위는 28.3~31.2 g이었다. 반입시 동물들의 외관 검사를 실시한 후, 체중을 측정하였다(BP410S, Sartorius, Germany). 1주일의 순화기간 중, 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물 입수시 검역실에서 일반증상을 3일동안 관찰한 후에 동물실로 이동시켰다. 검역 및 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화 확인함으로써 동물들의 건강상태에 이상이 없음을 확인하였다. 동물사육실은 온도 21.1~24.3°C, 상대습도 49.4~56.6%, 환기횟수 10~15 회/hr, 조명시간 12시간(오전 7시 점등~오후 7시 소등) 및 150~300 Lux의 조도로 유지하였고, 실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)와 물은 충분히 공급하였다.

모든 실험은 식품의약품안전처 <비임상시험 관리기준> (Good Laboratory Practices, GLP) 규정⁹⁾ 및 OECD의 GLP 규정¹¹⁾을 준수하여 (주)바이오톡스텍(청원군, 한국)에서 실시되었으며, 실험 방법은 동물보호법(제정 1991년 5월 31일 법률 제4379호, 일부개정 2015년 1월 20일 법률 제130236호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었고(승인번호: 170574), 실험의 전 과정은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어진 상태에서 진행되었다.

2. 방법

1) **용량설정시험:** 일반 경구투여 제제의 경우 가이드라인에서 최고 투여량을 2,000 mg/kg/body weight로 설정하고 있으나, TA 약침은 경락 근육투여 제제로 마우스의 근육 내 최대 투여량인 0.2 ml/animal (≒400 mg/kg)를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 0.1 및 0.05 ml/animal로 설정하였으며, 음성대조군으로 normal saline을 설정하여 용량설정 독성시험을 실시하였다. 1용량당 암수 각 3마리로 하여, 일회용 주사기(0.3 ml, 31G)를 이용하여 저용량 및 중용량은 시험계의 좌측 대퇴부의 근육내에 0.05 및 0.1 ml/site를, 고용량 및 음성대조물질은 시험계의 좌우측 대퇴부의 근육내에 각각 0.1 ml/site를 투여하여 투여직후, 투여 후 2시간, 투여 후 1, 2, 3일에 각 용량별 일반증상 및 사망동물을 관찰하였다. 그 결과, 모든 용량에 있어서, 시험물질에 의한 일반증상이 관찰되지 않았으며, 사망동물은 발견되지 않았다.

따라서, 본시험에서는 0.2 ml/animal를 최고용량으로 설정하고, 이하 공비 2로 0.1 및 0.05 ml/animal의 시험물질군을 설정하였으며, 음성대조군(normal saline) 및 양성대조군(Mitomycin C)을 설정하였다. 사망동물에서 암수성차가 관찰되지 않았기 때문에, 검체 제작시간 설정시험 및 본시험은 소핵 유발에 대해 감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷 마우스를 사용하였다.

2) **검체제작시간 설정시험:** 검체 제작 기간을 설정하기 위하여 용량설정시험의 결과에 따라 설정한 본시험의 고용량(0.2 ml/animal)을 1회 근육내 투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간에 골수세포를 채취하여 각 시간당 동물은 3마리로 하여, 소핵유발빈도를 확인하였으며, 각 시간당 동물은 3마리로 하였다. 그 결과, 모든 관찰시간대에서 소핵 유발의 증가가 확인되지 않았기 때문에 (Table 1) 일반적으로 사용하는 투여 후 24시간을 본시험의 검체제작시간으로 설정하였다.

3) **본시험**

(1) **군 구성(군 분리):** 군 분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이

없는 동물을 이용하여 일주일간의 순화종료일(군분리일)에 실시하였다. 군 분리일의 체중 측정 후, 평균체중 ±20% 범위를 벗어난 동물들을 제외한 후, 필요 동물 수(용량설정시험: 암수 각각 12마리, 검체제작시간 설정시험: 수컷 9마리, 본시험: 수컷 25마리)를 선별하였다. 선별된 동물들은 각 군의 평균체중이 균등하도록 분리하였다. 각 군은 무작위로 분리하여 각각 5마리가 되도록 하였다. 각 군의 평균 체중의 차이는 유의성이 없었다(Table 2).

(2) **시험물질의 투여:** 시험물질의 임상적용예정경로가 근육이므로 근육투여를 선택하였다. 시험물질은 일회용 주사기(0.3 ml, 31G)를 이용하여 1회 근육내 투여하였다. 음성대조군은 시험물질과 동일한 방법으로 좌우측 대퇴부 근육내 투여하였다. 양성대조물질 MMC는 일반적인 투여방법인 복강내 투여를 선택하여, 일회용 주사침(26 G)과 주사기(1 ml)를 이용하여 투여액량을 10 ml/kg으로 하여 1회 복강내 투여하였다. 일반증상 관찰은 투여직후, 투여 후 2 시간 및 투여 후 1일에 실시하였으며 체중은 검체제작 직전에 측정하였다(ENTRIS4202I-1S, Sartorius, Germany).

(3) **검체 제작:** 시험물질 투여 후 24시간 후에 각 군의 검체제작 시간에 동물을 경추탈골한 후에 대퇴골 적출하고 깨끗이 근육질을 제거 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 μL의 우태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS, Lot No.: 1862843, Gibco, U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포부유액은 1,000 rpm,

Table 2. Group designation of micronucleus test in mice

Group	Dose (ml/animal)	Dose amount (ml/animal)	Number of animals
G1 Negative control	0	0.2	5
G2 Low-dose	0.05	0.05	5
G3 Mid-dose	0.1	0.1	5
G4 High-dose	0.2	0.2	5
G5 Positive control	2 mg/kg	10 ml/kg	5

I.M. : Intramuscular, I.P. : Intraperitoneal.

Table 1. Results of sampling time determining study in male ICR mice

Group	Dose (ml/animal)	Hours after dosing (hr)	Number of animals	PCE (PCE+NCE)	MNPCE/PCE
TA	0.2	24	3	Total	517/1,500
				% (Mean±S.D.)	34.5±1.80
		48	3	Total	491/1,500
				% (Mean±S.D.)	32.7±2.41
		72	3	Total	390/1,500
				% (Mean±S.D.)	26.0±3.47
				2/6,000	
				0.03±0	

MNPCE : Micro nucleated polychromatic erythrocytes, PCE : Polychromatic erythrocytes, NCE : Nomochromatic erythrocytes, S.D. : Standard Deviation.

4°C에서 5분간 원심분리(Micro17TR, Hanil Science Industrial Co., Ltd., 인천, 한국)하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 슬라이드글라스에 코드번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 3% Giemsa 염색액(0.01 mol/L Sörenson 인산완충액(pH 6.8)으로 조제)으로 30분간 염색하였다. 염색된 슬라이드는 0.01 mol/L Sörenson 인산완충액(pH 6.8) 및 0.004% citric acid 수용액에 세정하고 건조시킨 후, 봉입제(Entellan[®]new, Merck, Germany)로 봉입하였다.

(4) 관찰(소핵의 계수): 코드화된 검체슬라이드를 현미경(600배 배율, BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 검체 1장당 다염성적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)를 1,000개씩 관찰하고, 1개체당 2,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 골수세포 증식억제의 지표로서, 검체 1장당 총 적혈구 250개를 관찰하여, 1개체당 500개의 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하였다.

(5) 시험의 성립조건: “음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 범위 내에 있을 것”의 조건을 만족하는 경우 성립하는 것으로 설정하였다.

(6) 결과의 판정: “소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman의 추정학적 통계 방법¹²⁾을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가할 것”의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

4) 통계처리: 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman의 추정학적 통계방법¹²⁾을 이용하여 검증하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계해석을 실시하였다. Bartlett test를 실시하

여 음성대조군과 시험물질군간의 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산이 인정되어, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성을 확인하였다(유의수준: 0.05). 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도에서 유의성이 확인되어, 음성대조군과의 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위하여 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 음성대조군과 양성대조군의 비교에 대해서는 Folded-F test를 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산이 인정되어, Student t-test를 실시하여 유의성을 확인하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

결 과

1. 일반증상

관찰기간 동안, 시험물질군의 모든 용량에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다(Table 3).

2. 체중변화

관찰기간 동안, 시험물질군의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 체중변화는 확인되지 않았다(Table 4).

3. 소핵 유발 출현빈도

시험물질군에서는 다염성적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 비율이 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 유의한 통계적 차이가 확인되지 않았다. 또한, 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율 역시 음성대조군과 비교했을 때 유의한 차이는 확인되지 않았다. 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈

Table 3. Clinical signs of main study in male ICR mice

Group	Dose (ml/animal)	Number of animals	Route	Hours after dosing (hr)	Clinical signs		
					Days after dosing		
					0		1
					Immediately after dosing	2 hours after dosing	
Normal saline TA	0	5	I.M.	24	-	-	-
	0.05	5	I.M.	24	-	-	-
	0.1	5	I.M.	24	-	-	-
	0.2	5	I.M.	24	-	-	-
MMC	2 mg/kg	5	I.P.	24	-	-	-

I.M. : Intramuscular, I.P. : Intraperitoneal, MMC : mitomycin C, - : No observavle abnormality.

구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 증가가 확인되었다($p < 0.01$). 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과

비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다(Table 5).

Table 4. Changes in body weight of mice in the in vivo micro-nucleus test

Group	Dose (ml/animal)	Route	Days after dosing (g)	
			0	1
Normal saline (n=5)	0	I.M.	33.9±0.80	33.2±0.84
TA (n=5)	0.05	I.M.	33.9±0.72	33.9±0.80
	0.1	I.M.	33.8±0.80	33.9±1.08
	0.2	I.M.	33.8±1.04	32.8±0.88
MMC (n=5)	2 mg/kg	I.P.	33.8±1.10	32.8±0.83

I.M. : Intramuscular, I.P. : Intraperitoneal, MMC : mitomycin C. Data are presented as mean±S.D. (Standard Deviation).

4. 시험의 성립

음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 historical control data (Table 6)의 범위 내에 있었기 때문에 본 시험은 적절한 시험조건 하에서 실시된 것으로 판단하였다.

고찰 및 결론

식품의약품안전처는 한약제제의 임상시험 승인을 위한 기본 자료로, 유효성에 대한 비임상 시험자료 외에 유전독성, 단회투여 독

Table 5. The ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to total erythrocytes in male mice in vivo micronucleus test

Group	Dose (ml/animal)	Number of animals	Route	Hours after dosing (hr)		PCE (PCE+NCE)	MNPCE/PCE
Normal saline	0	5	I.M.	24	Total	780/2,500	8/10,000
					% (Mean±S.D.)	31.2±4	0.08±0
TA	0.05	5	I.M.	24	Total	764/2,500	7/10,000
					% (Mean±S.D.)	30.6±6	0.07±0
	0.1	5	I.M.	24	Total	865/2,500	11/10,000
					% (Mean±S.D.)	34.6±2	0.11±0
0.2	5	I.M.	24	Total	649/2,500	9/10,000	
				% (Mean±S.D.)	26.0±4	0.09±0	
MMC	2 mg/kg	5	I.P.	24	Total	698/2,500	682 ^{††} /10,000
					% (Mean±S.D.)	27.9±5	6.82±1

I.M. : Intramuscular, I.P. : Intraperitoneal, MNPCE : Micro nucleated polychromatic erythrocytes, PCE : Polychromatic erythrocytes, NCE : Nomochromatic erythrocytes, MMC : mitomycin C, S.D. : Standard Deviation. Significant difference from negative control by Kastenbaum&Bowman : ^{††} $p < 0.01$.

Table 6. Historical control data

Historical control values of micro nucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE)							
Group	Hours after dosing (hr)	Dose (ml/kg)	N	MNPCE/PCE (%) (Mean±S.D.)	Range [MNPCE/PCE] (%)		
					MIN	MAX	
Negative control	24	0	185	0.03±0.03	0	0.11*	
Positive control	24	2	185	5.87±1.45	1.51*	10.23*	
Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to total erythrocytes							
Group	Hours after dosing (hr)	Dose (ml/kg)	N	PCE/(NCE+PCE) (%) (Mean±S.D.)	Range [PCE/ (NCE+PCE)] (%)		
					MIN	MAX	
Negative control	24	0	185	33.74±4.92	18.99*	48.49*	
Positive control	24	2	185	31.41±4.85	16.85*	45.98*	

Negative control: Water for injection, Normal saline injection, Corn oil, 0.5% methyl cellulose 1500centipoise solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution, Phosphate buffered saline, etc.

N : The total number of micronucleus test.

Positive control: Mitomycin C (2 mg.kg, I.P., single dosing).

The above historical control values were obtained from the data pooled from Dec. 9, 2009 to Apr. 6, 2017.

*The range was calculated by the control limit from Mean±3×S.D.

성 또는 반복투여 독성 등 안전성에 대한 비임상 시험 자료들 또한 요구하고 있다^{9,12,14}. 현재 한방 임상에서는 다양한 종류의 약침제제들이 사용되고 있으며, 여러 문헌적 근거와 임상적 경험을 토대로 많은 수의 약침제제들이 개발되고 있는 실정이다. 이러한 약침제제들과 약침치료기술에 대한 과학적 근거를 마련하기 위해서는 유효성과 안전성에 대한 비임상 및 임상 시험 결과들이 반드시 필요하다고 사료된다.

TA 약침의 구성 한약재들을 살펴보면, 황금, 황백은 <대한민국 약전 제11개정>에 수록되어 있고, 백두옹, 산두근, 목향, 홍화자 등은 <대한민국약전외한약규격집 제4개정>에 수록되어 있다. 이로 인해 TA 약침에 대한 이러한 안전성 자료들이 면제될 수도 있어 보이지만, 투여 경로가 경구가 아닌 약침요법에 의한 경혈부위 투여이고, 새로 개발되는 약침제제의 안전성에 대한 과학적 근거와 신뢰를 확보한다는 측면에서 독성평가 연구를 수행해야 한다고 사료된다.

TA 약침액의 안전성을 평가하기 위하여 본 연구에서는 유전독성 평가 방법 중 하나인 소핵시험을 수행하였다. 소핵시험법은 골수 세포 중 다염성적혈구에 출현하는 소핵을 지표로 하여 소핵을 가진 다염성 적혈구의 빈도를 측정하여 시험물질의 염색체 이상 유발을 *in vivo*에서 평가하는 방법이다^{12,14-16}. 소핵은 염색체가 절단된 후 절단이 수복되지 않아 동원체를 갖지 않는 염색체 단편이 형성되고 이 단편이 세포 분열 시에 잔존하여 형성되는 것으로, 염색체의 구조 이상을 반영하는 물질이며, 또한 세포 분열기전의 장애로 세포 분열 시 염색체가 잔존하게 되어 소핵화하기도 하므로 염색체의 수적 이상도 반영하는 물질이다¹⁴⁻¹⁶.

본 연구는 7주령의 수컷 마우스(ICR) 골수세포를 이용하여 소핵 시험을 시행하였다. 소핵시험 용량 설정을 위하여 0.2, 0.1 및 0.05 ml/animal의 용량으로 TA약침을 마우스의 근육 내에 투여한 결과 모든 용량에서 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았으며, 최고 용량인 0.2 ml/animal을 투여한 후 24, 48 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵 유발빈도는 증가되지 않았다. 따라서 TA약침의 소핵시험 용량군을 0.2, 0.1 및 0.05 ml/animal로 설정하여 마우스의 근육에 투여하였으며, 투여 24시간 후 골수를 채취함으로써 소핵다염성적혈구의 빈도를 측정하였다. 그 결과, 모든 시험군에서의 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 normal saline을 투여한 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 나타나지 않았고, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율 역시 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 Mitomycin C를 투여한 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 유의하게 증가

하였으며, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다.

이상의 결과를 통하여, 본 시험조건 하에서 시험물질 TA의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성은 음성으로 판단하였다. TA약침은 대개 임상에서 60 kg 성인 기준으로 1회에 1 ml를 사용하고 있으며, 이는 약 1 mg/kg으로 본 연구에서 사용한 0.2 ml/animal 용량은 400 mg/kg 정도로 실제 TA의 임상 사용량 보다 400배 높은 용량에서 안전함이 확인된 것이며, 이는 TA 약침액이 임상에서 안전하게 사용되고 있음을 의미한다. 다만 일정 품질관리를 위한 기준시험법 설정 등을 위해서 수득물과 표준물질의 정량, 정성 분석 등이 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 향후 체외염색체 이상시험, 체외마우스립포마 TK시험 등의 추가적 안정성 관련 연구가 진행된다면 TA 약침이 임상에서 보다 안전하게 사용할 수 있는 약침제제로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. 2017R1C1B5076224). This work was also supported by the Gachon University research fund of 2018 (GCU-2018-0299).

References

1. Jung C, Jung JH, Lee MS. A clinical study of immune pharmacopuncturology. Kyungrak medical publishing co. Chungnam 2011 : 127-33.
2. Nam SC. Immune Pharmacopuncturology. Kyungrak medical publishing co. Chungnam, 2009.
3. Korean Acupuncture & Moxibustion Society: Pharmacopuncture therapy. In: Acupuncture Medicine. Kim JH (ed.) Hanmi Medical Publishing Co., Paju, 2016.
4. Im WH, Jeong SH, Lim YH, Jung C, Kim HJ. Anti-inflammatory activities of V, TA and SH Yakchim on LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokines production in Raw 264.7 macrophages. Journal of Korea Immuno-Yakchim Society. 2016 ; 5 : 19-25. <http://kiss.kstudy.com/thesis/thesis-view->

- .asp?key=3480386.
5. Chung YH, Lee YK, Lee HJ, Kim JS. A case report of thoracic pain which was occurred by seat belt with additional TA pharmacopuncture. *Journal of Korea Immuno-Yakchim Society*. 2017 ; 6 : 39-48. <http://kiss.kstudy.com/thesis/thesis-view.asp?key=3587739>.
 6. Hwang JH, Jung HW. TA pharmacopuncture as a primary and independent treatment for frequent sprains occurring over 9 months in a patient with needle sickness: Case report. *Medicine*. 2018 ; 7 : 45. doi: 10.1097/md.00000000000013123.
 7. Jung C, Hwang JH. Safety study of TA pharmacopuncture: Bacterial reverse mutation test. *Journal of Korea Immuno-Yakchim Society*. 2017 ; 6 : 1-11. <http://kiss.kstudy.com/thesis/thesis-view.asp?key=3587735>.
 8. Jung C, Hwang JH. Safety study of TA pharmacopuncture: In vitro chromosome aberration test using mammalian cultured cells. *Journal of Korea Immuno-Yakchim Society*. 2017 ; 6 : 13-20. <http://kiss.kstudy.com/thesis/thesis-view.asp?key=3587736>.
 9. Korea Food and Drug Administration (KFDA). Good Laboratory Practice (GLP), 2017. <http://www.law.go.kr/admRulInfoP.do?admRulSeq=2100000086689>.
 10. China Food and Drug Administration (CFDA). Good Laboratory Practice for Non-Clinical Laboratory Studies of Drug: Notification No. 214. 2007.
 11. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Principles of Good Laboratory Practice. OECD ENV/MC/CHEM(98)17. 1997.
 12. Korea Food and Drug Administration (KFDA). Toxicity test standard of drugs. 2015.
 13. Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*. 1970 ; 9 : 527-49. doi: 10.1016/0027-5107(70)90038-2.
 14. National Institute of food and drug safety evaluation. Explanation of toxicity test standard of drugs. 2012.
 15. Lee MY, Seo CS, Kim JY, Shin HK. Genotoxicity evaluation of Guibi-Tang extract using an in vitro bacterial reverse mutation assay, chromosome aberration assay, and in vivo micronucleus test. *BMC Complement Altern Med*. 2014 ; 14 : 215. doi: 10.1186/1472-6882-14-215.
 16. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Kirchner S, Lorge E, Morita T, et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res*. 2003 ; 540 : 153-63. doi: 10.1016/j.mrgentox.2003.07.005