

Antiviral and Therapeutic Effects of Extracts (PB-81) of *Daphne Genkwa* (Siebold & Zucc.) on Bovine Rotavirus

Mi Young Lee¹, Yeon Seong Kim¹, Jae Myung Park² and Jae Chan Song^{1*}

¹Division of Research, Philiabio Co. Ltd, Daejeon 34324, Korea

²Hoein Veterinary Clinic, Chungcheongbuk-Do 28929, Korea

Received June 3, 2024 / Revised June 21, 2024 / Accepted June 24, 2024

It was confirmed whether PB-81, a 50% ethanol extract of *Daphne genkwa* (Siebold & Zucc), had an inhibitory effect on virus proliferation in bovine rotavirus and a therapeutic effect on bovine diarrhea disease. The results showed that PB-81 induced the interferon beta in A549 cells, an epithelial cell line and interferon gamma in NK92 cells, a blood cell line. Furthermore, to confirm the viral proliferation inhibitory effect of PB-81, PB-81 was administered to MBDK cell line before, during, and after infection. Result shows that the virus was suppressed in all cases where PB-81 was administered, and the best virus suppression effect was achieved when PB-81 was administered before virus infection. In the toxicity test in mice, no side effects due to toxicity were observed, even at a maximum dose of 20 mg/mL. To verify the therapeutic effect on 16 cattle with bovine rotavirus diarrhea and 4 cattle in the control group, PB-81 was administered at a dose of 20 mg/5 mL, and No fatality was observed during the treatment. The average recovery duration from the initial administration of PB-81 was 2.25 days in the PB-81 administration group and 6.5 days in the control group without PB-81 administration. No side effects were observed from the tested cattle with rotavirus diarrhea.

Key words : Antiviral agent, bovine diarrhea, bovine rotavirus, host directed antiviral drug, interferon

서 론

소의 주요 바이러스성 설사의 원인체는 소 로타바이러스, 소 코로나바이러스 및 소 바이러스성 설사병 바이러스(BVDV)로 주로 1년 미만의 어린 송아지에서 많이 발생하는 설사병으로 알려져 있다[4, 22]. 최근에 가장 많은 농가를 대상으로 송아지 설사병에 대해서 조사를 실시한 “소 설사병 진단키트 사업”(충청북도 방역과 2020)에서 사육중인 21,770두 중 1년 미만 송아지 6,396두를 대상으로 분석한 결과에 따르면 소 로타바이러스가 원인균인 설사병은 전체의 55.5%로 다른 바이러스성 설사병에 비해 가장 많이 발생하고 있다. 소 로타바이러스 설사병은 주로 1개월령 이하의 어린 송아지에서 가장 피해가 심한 소화기 질병으로 폐사율은 평균 10% 정도이나, 목장의 여건에 따라 3-30% 정도로 큰 차이를 나타내고 있으며, 추위에 의한 스트레스, 다른 미생물과의 혼합감염, 농장

간 이동, 초유 섭취부족 등의 외부요인이 복합될 경우에는 폐사율이 90%까지 상승한다[3, 11]. 소 로타바이러스에 의한 설사병의 전염성은 법정전염병보다 약하나 소 로타바이러스 설사병이 발생한 축사를 중심으로 매년 지속적으로 발생하고 있어 축산농가에 피해가 심한 가축질병이다. 치료 대책은 탈수를 예방하기 위한 수액공급, 2차 감염을 예방하기 위한 항생제 투여 등의 대응요법과 함께 난황항체, 초유급유, 면역증강제 등의 면역증강 보조제를 [12] 사용하여 송아지의 면역력을 높여 치료효과를 기대하고 있으나 효과가 미미하다. 소 로타바이러스 설사병이 치료가 되기 어려운 가장 중요한 원인은 원인체인 로타바이러스를 제거할 수 있는 항바이러스제가 없어 근본적인 치료대책이 수립되지 않기 때문으로 매년 지속적인 발생으로 인해 축산농가에 많은 경제적 피해를 주고 있다.

팔꽃나무(*Daphne genkwa* (Siebold & Zucc.))는 Magnoliophyta (피자식물문) > Magnoliopsida (목련강) > Rosidae (장미아강) > Myrtales (도금양목) > Thymelaeaceae (팔꽃나무과) > *Daphne* (팔꽃나무속) > *genkwa* (팔꽃나무)에 속하는 다년생 식물로 우리나라의 전라남북도와 충청남도의 해안을 따라 넓은 지역에서 자생하고 있으며, 중국, 티벳, 유럽 및 북아프리카 지역에서 전통의학에서 이노제, 진해제, 거담제 및 부종을 치료하는데 사용되어 왔다 [17]. 팔꽃나무의 꽃은 ‘원화’, 뿌리는 ‘원화근’이라하며 모두 약으로 쓰고 있으나 대한민국 약전에는 팔꽃나무

*Corresponding author

Tel : +82-42-721-8657, Fax : +82-42-721-8567

E-mail : songjach4295@gmail.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

꽃인 원화가 생약으로 등록되어 있다.

원화의 추출물에는 쿠마린, 플라보노이드, 리그난, 스테로이드 및 다양한 등급의 디테르펜과 같은 생물학적 및 약리학적 화합물이 포함되어 있어[26] 항균, 항진균, 항산화, 진통, 항염증, 세포독성, 항바이러스제 및 지혈 효과를 포함한 광범위한 생물학적 활성을 가지고 있어 [25] 원화 추출물은 다양한 질병의 치료를 위한 치료제로써 중요한 공급원이 될 수 있다. 원화 추출물의 질병치료에 대한 연구는 항암효과에 대해서 연구되고 있으며[7, 9] 최근에 원화추출물이 NK 세포에서 NF- κ B를 활성화시켜 항바이러스 효과를 나타내는 IFN- γ 를 유도하는 것이 보고되었다[8].

인터페론(IFN)은[6] 숙주세포로부터 바이러스의 침입에 반응하여 유도되는 신호전달 단백질[2]들로 항바이러스 작용과 관련된 IFN은[1, 19] 상피세포에서 유도되는 I형 IFN (IFN- α 및 IFN- β)과 NK 세포를 포함한 면역세포-CD4⁺ T 헬퍼 1(Th1) 세포 및 CD8⁺ 세포독성 T 세포에서 발현되는 II형 IFN (IFN- γ)이 알려져 있다[21]. IFN의 항바이러스작용에 있어서 I형 IFN은 ISG (Interferon-stimulated gene)의 유도에 의해 발현되는 단백질에 의해 세포 내에서 바이러스의 복제를 차단하는 작용[20]을 하며, IFN- γ 는 세포 신호 전달을 통해 항바이러스효과를 담당하는 세포의 면역 반응을 조절하는 역할을 하는 사이토카인으로 [16] 대식세포, B 세포 및 CD8⁺ 세포독성 T 세포와 같은 세포에서 신호 전달 경로를 활성화함으로써 탐식작용에 의한 항바이러스 또는 항균 활성을 나타내며 또한 이러한 작용에 관련된 세포 증식 및 분화를 통하여 항바이러스 작용을 촉진시키는 역할을 한다[10].

본 논문에서는 원화의 추출물이 IFN- γ 를 유도하는 활성을 이용하여 세포실험에서 항바이러스 효과를 확인하였으며, 소 로타바이러스 설사병 환축에 적용하여 임상에서의 항바이러스 효과 및 설사병의 치료효과에 대해서 검토하였다.

재료 및 방법

원화 추출물

원화의 유기용매 추출을 위하여 원화분말에 대해 30배 용량의 주정(50% ethanol) (v/w)을 혼합하여 10시간동안 초음파 분쇄(Bandelin, berlin, Germany)를 실시한 다음, 실온에서 3,000 rpm, 20분간 원심분리를 하여 상층액을 회수하였다. 이 과정을 2회 반복하여 회수한 상층액을 40 $^{\circ}$ C 수욕 상에서 회전농축기(SH-Scientific, Wonju, Korea)로 농축한 후, 동결건조(Mareuda, Gangju, Korea)하여 원화추출물을 얻었다. 이후, 추출물에 대해서 A549 세포 및 NK 세포에서 원화 추출물에 의한 IFN- β 와 IFN- γ 의 발현의 유도 여부를 PCR로 확인하였으며, NK 세포에서 Human IFN

gamma ELISA kit (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 세포외로 분비되는 IFN- γ 의 양을 확인하였다.

지표물질 측정

대한민국 약전에서 제시하는 원화 검정시험은 (주)동의한약분석센터에 의뢰하여 지표물질인 genkwanin의 유무를 확인하였으며, 효능을 측정하기 위한 지표 물질로는 하이드록시겐과닌(Hydroxygenkwanin)과 아피제닌(Api-genin)을 지표물질로 사용하여 동물용의약품공정서의 일반시험법 중 ‘액체크로마토그래프법’에 따라 실시하였다. HPLC (Agilent Technologies 1200 series, CA, USA)의 분석은 C18 column 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m 컬럼(Dikma Inspire, CA, USA)을 사용하였고 이동상으로는 methanol과 0.2% 아세트산이 첨가된 3차 증류수를 70/30(v/v)의 비율로 사용하여 유속 1.0 mL/min, 컬럼온도 30 $^{\circ}$ C로 분리하여 338 nm의 파장에서 측정하였다.

세포배양

시험에 사용한 NK 세포는 500 mL의 MyeloCult H5100 (StemCell Technologies, Vancouver, Canada)에 63 mL Horse Serum (Gibco, New York, USA)과 10 μ g human recombinant IL-2 (Miltenyi Biotec, San Diego, USA)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. A549 세포는 10% FCS가 포함된 F-12K Medium (Gibco, USA)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. MDBK 세포는 10% FCS가 포함된 EMEM 배지(Gibco, USA)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

바이러스 배양

1 \times 10⁵ MDBK 세포를 세포배양용 T25 플라스크에서 48시간 배양한 후 바이러스를 접종하였고, 바이러스를 접종한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 90분 동안 배양하여 바이러스가 세포에 침투하도록 하였다. 이때 바이러스가 세포에 골고루 침투할 수 있도록 15분마다 1번씩 약하게 흔들어 주었다. 이 후 3일간 배양한 후, 플라스크를 freezing / thawing과정을 2회 반복하고, 사용 전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 시험을 수행하기 전 -80 $^{\circ}$ C에 보관한 바이러스 배양액을 녹여 원심분리 후, 바이러스가 포함된 상층액을 회수하여 사용직전까지 얼음물에 보관하였다. 시험에 사용하는 바이러스는 10 μ g/mL trypsin type IX (sigma-Aldrich, USA)가 포함된 DMEM배지에서 37 $^{\circ}$ C, 60분간 활성화시킨 후 사용하였다.

인터페론 측정(ELISA)

IFN- γ 의 측정은 Human IFN gamma ELISA kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 제조사가 제시한 방법에 따라 Spectra Max (Molecular, USA)를 사용하여 흡광도를 측정

하였다.

인터페론 측정(PCR)

Oligo-dT 프라이머가 포함된 역전사 효소와 특정 프라이머 쌍이 포함된 M-MLV 역전사 효소(Promega, WI, USA)를 사용하여 2단계 RT-PCR 반응을 수행하였다. 제조사가 제시한 방법에 따라 M-MLV 역전사 효소(Promega, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

PCR 조건은 IFN- γ mRNA: forward 5'TCCATGGGGTTGTTTA3', reverse 5'GAAGCACAGGCATGAAATC3', IFN- β mRNA forward 5'CTTGATTCTACAAAG AAGCAGC3' reverse 5'TCCTCCTTCTGGAAGCTGCTGCA3' GAPDH mRNA forward, 5'CCATCATCTCTCCAGGAG3', reverse, 5'ACAGTCTTCTGGGGCAGT3'를 이용하여 pre-incubation 95°C, 5분, 1 cycle, denaturation 95°C, 45초, annealing 56°C 45초, extension 72°C, 60초, 40 cycle, elongation 72°C, 7분으로 실시하였다.

소 로타바이러스 PCR

MBDK 세포 1×10^4 cells/mL에 1×10^3 TCID₅₀/well의 소 로타 바이러스를 접종한 후, 시험물질을 각각 25, 50, 75, 100 mg/L 및 125 mg/L로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 세포 상층액을 회수하여 freezing/thawing과정을 2회 반복하여 total RNA를 추출하여 PCR (GreenStar™ qPCR Master Mix (Bioneer, Daejeon, Korea))을 실시하였다.

PCR 조건은 Bovine rota virus gene: forward 5'GTAGATAAGTATGTATGGACGAGA TGGTT3', reverse 5'TGGCTTATGAAATGTGAAACCCGTTCTTTG3', probe (FAM) 5'TTGCACCACAATCAGATTCAGAAAGT3' (BHQ 1), Bovine p-actin gene forward AGC GCAAGTACTCCGTGT, reverse CGGACTCATCGTACTCTGCT, probe (Cyanine5) TCG CTGTTACCTTCCAGCAGATGT (BHQ 1)를 이용하여 pre-incubation 95°C, 10분, 1 cycle, denaturation 95°C, 10초, annealing 58°C, 60초, extension 72°C, 30초, 45 cycle로 실행하였다.

PB-81의 독성시험

PB-81의 단 회 정맥투여 독성시험은 대구경북첨단의료산업진흥재단 실험동물센터에 의뢰하였다(실험번호: N21059 PB-81:ICR마우스를 이용한 단 회 정맥투여 독성시험).

환축에 투여

환축에 투여하기 위한 약물은 원화 추출물을 4 mg/mL의 농도로 10% ethanol (Sigma, USA), 0.1% Tween 20 (Sigma, USA) 용액에 녹인 후 클린벤치에서 필터멸균하여 멸균된 주사병에 5 mL (20 mg)씩 제조하여 경정맥을 통해

주사하였다. 환축에 투여하기 전 환축의 항문에서 분변을 채취하여 진단 키트(송아지설사병 5종 진단 키트, 바이오 노트)를 사용하여 바이러스의 감염여부 및 종류를 확인하였으며 약물투여 후 바이러스의 검출에도 동일한 진단 키트를 사용하였다.

통계분석

SPSS (Statistical Package for Social Science, version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 사용하여 유의성 검증을 실시하였다. 각 시험군의 측정 항목의 결과는 평균값±표준편차(mean ± SD)로 표시하였으며, 시험군간 평균차이를 one-way ANOVA로 확인한 후 그룹 간의 통계적 유의성을 Student's t-test와 Duncan's multiple range test®를 이용하여 실시하였다. 시험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결 과

원화 추출물(PB-81)의 지표물질 함량

PB-81이 약전에서 제시한 원화의 정상과 동일한지의 여부를 확인하기 위해서 대한민국 약전에서 제시한 원화의 검정법에 따라 박층크로마토그래프 방법으로 원화 추출물을 검정하였다(Fig. 1). 대한민국 약전에 제시된 원화 추출물의 검증은 '검액에서 얻은 여러 개의 반점 중 1개의 반점은 표준액에서 얻은 반점과 Rf값이 일치'하는 것으로 정의 되어 있다. PB-81의 원화추출물 검증을 위한 박층크로마토그래프분석에서 genkwaniin 표준품 밴드의 Rf값은 0.44로 측정되었다(Fig. 1B). PB-81의 경우에 박층크로마토그래프에서 다수의 밴드가 자외선 및 발색에서 확인되었으며(Fig. 1A), 그 중 표준품과 Rf값이 동일한 밴드가 확인되어(Fig. 1B) PB-81은 대한민국 약전에서 제시한 원화의 정상과 동일한 것임을 확인하였으며 재료 및 방법에 제시된 방법으로 추출한 원화 추출물을 PB-81로 명명하였다.

PB-81에서 IFN- γ 를 유도하는 유효성분은 genkwadaphnin으로 보고되었으나[10] genkwadaphnin의 표준품이 시판되고 있지 않아, PB-81에 포함된 genkwadaphnin의 함량을 측정할 수 없었으며, genkwadaphnin의 활성을 측정하기 위해 원화의 추출성분인 하이드록시젠과닌(hydroxygenkwaniin)과 아피제닌(apigenin)을 지표물질로 하여 HPLC로 함량을 측정하였다(Fig. 2). PB-81의 IFN- γ 유도활성은 apigenin 30 μ g/g과 hydroxygenkwaniin 120 μ g/g을 함유하는 PB-81 조성액을 기준으로 하여 IFN- γ 의 활성을 측정하였다.

PB-81에 의한 인터페론의 유도

PB-81에 의한 인터페론의 유도 여부를 상피세포주인 A549 세포와 NK 세포주인 NK92 세포 1×10^5 세포를 6-well

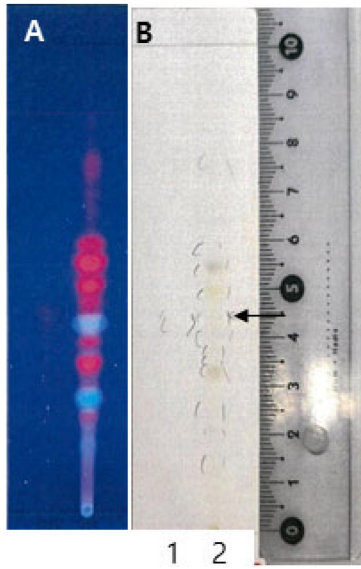


Fig. 1. In thin layer chromatography, PB-81 showed the same RF value (0.44) as Daphne genkwa, indicating the identity suitable for the criteria presented by the Korean Ministry of Food and Drug Safety. 1. Standard solution (genkwainin) 2. Sample solution (PB-81). Five μL of the standard solution and the sample solution were dropped on a thin-layer plate made of silica gel for a thin-layer chromatograph with fluorescent agent, spread 10 cm, and dried to check the band in ultraviolet ray (365 nm), and then color-development was performed to measure the Rf (distance from the circle to the center of the spot / distance from the circle to the solvent tip) of the standard solution and the sample solution. (A) Development pattern of the sample confirmed by ultraviolet rays (365 nm) after development of the sample. (B) Separation pattern by color development of the sample.

배양접시에 배양하고 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PB-81을 투여하여, I형 인터페론(IFN- β)과 II형 인터페론(IFN- γ)의 유도를 확인하였다(Fig. 3). 측정된 시간 내에서 시간이 경과함에 따라 상피세포인 A549 세포에서는 IFN- β 만 유도되는 것이 확인되었으며(Fig. 3) 반면 면역세포인 NK92 세포에서는 IFN- γ 만 유도되는 것이 확인되었다(Fig. 3). 각 세포에서 IFN- β 및 IFN- γ 는 PB-81로 처리한지 30분 이내의 시간에서 유도되는 것으로 나타났으며, A549 세포 및 NK92 세포에서 처리 시간이 증가함에 따라 발현양도 증가하여, PB-81에 의한 각 세포에서 IFN의 유도량은 시간의존성의 양상을 보였다.

PB-81의 투여량에 따라 분비되는 IFN- γ 의 유도 변화를 확인하기 위해 NK92 세포 $1 \times 10^6/10 \text{ mL}$ 세포농도에 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PB-81을 1/2배씩 희석하여 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지 희석한 후, 배지에 첨가하여 8시간 동안 세포를 배양하여 배지로 분비되는 IFN- γ 의 양을 ELISA로 측정하였다(Fig. 4). NK 세포에서 PB-81에 의한 IFN- γ 의 유도는 PB-81의 농도가 증가함에 따라 IFN- γ 가 유도되는 양도 증가하는 농도의존형 양상을 보였으며, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서는 IFN- γ 의 유도량이 포화가 되어 나타나며 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서는 급격한 감소를 보였다.

PB-81의 세포독성

PB-81의 세포독성을 확인하기 위해 PB-81을 각각 0.49 mg/L - 1,000 mg/L의 농도로 MBDK 세포에 24시간 동안 처리하였다. MBDK 세포에서 세포의 생존율을 측정할 결과 처리농도 7.81 mg/L까지 세포생존율은 90% 이상이었으며, 50% 세포독성농도(Cytotoxic Concentration, CC_{50})는 100.35 mg/L였다(Fig. 5).

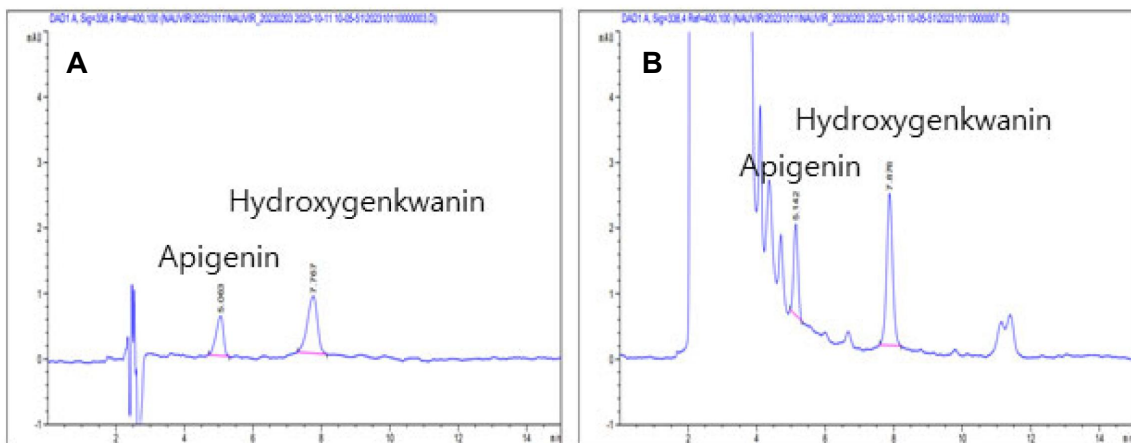


Fig. 2. Measurement of the content of apigenin and hydroxygenkwainin, indicators of the effective substances contained in PB-81. The comparative analysis of the peak of the standard material and the peak of apigenin and hydroxygenkwainin included in PB-81 was analyzed with the Agilent chemistry for LC&LC/MS system. (A) The retention time of apigenin and hydroxygenkwainin standard chemicals. (B) Retention time of apigenin and Hydroxygenkwainin in PB-81.

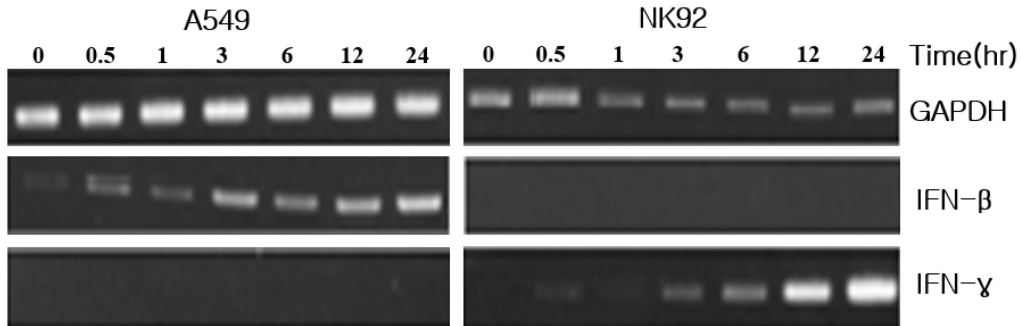


Fig. 3. PB-81 induces IFN-β secretion in A549, epithelial cell line and IFN-γ secretion in NK92. A549 and NK-92 cells were treated with 40 µg/mL of PB-81 for 24 hr. During incubation, the culture supernatants was recovered at the specified time and assayed by PCR to measure the transcriptional levels of IFN mRNA. Time means the time elapsed after administration of PB-81.

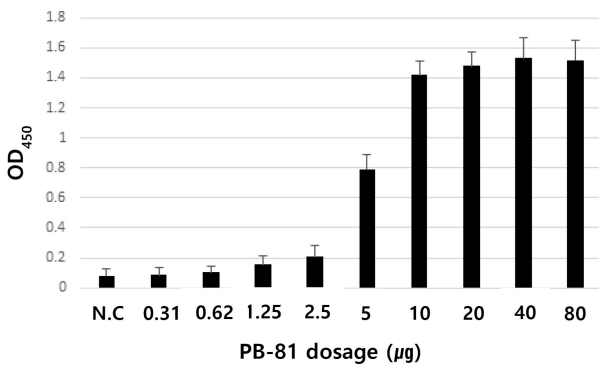


Fig. 4. The secretion of IFN-γ in NK cells increases in proportion to the dose of PB-81. The amount of IFN-γ is proportional to the absorbance at OD₄₅₀. PB-81, sequentially diluted 1/2 at a concentration of 80 µg/mL, was administered to 1×10⁶/10 mL of NK cells to measure the concentration of IFN-γ secreted into the medium according to the PB-81 dosage.

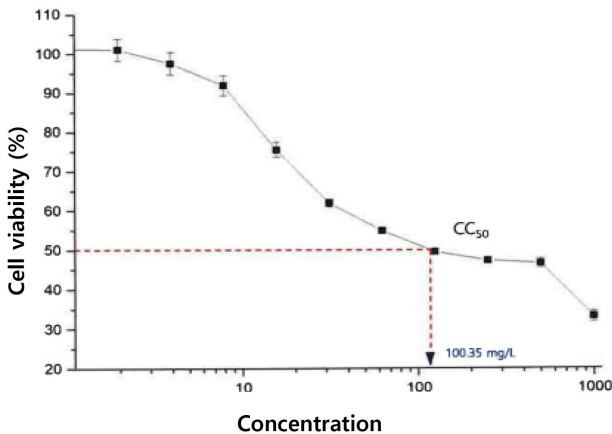


Fig. 5. Cell viability decreases as the concentration of PB-81 increases. The concentration with a cell survival rate of more than 90% was 7.81 mg/L or less, and the 50% cytotoxic concentration (Cytotoxic Concentration 50%, CC50) was 100.35 mg/L.

PB-81의 바이러스 세포에 침투 및 증식 억제 효과

바이러스가 세포에 침투하는 시기에 따라 PB-81의 다양한 항바이러스 효과를 검증하기 위해 세포에 바이러스 감염을 기준으로 바이러스 감염 전, 바이러스 감염과 동시, 바이러스 감염 후의 세 가지 상황에 대해 항바이러스 효과를 검증하였다.

세포에 소 로타바이러스를 감염시키기 전에 PB-81을 투여한 시험군(Pre-treatment effect)에서는 PB-81의 용량이 증가함에 따라 소 로타바이러스 증식이 억제되는 비율이 증가하는 것이 확인 되었다. PB-81 처리군에서 대조군에 비하여 유의미하게 용량 의존적으로 바이러스의 증식이 억제되었으며 EC₅₀은 32.64 mg/L였다(Fig. 6).

PB-81과 소 로타 바이러스를 세포에 동시 투여하였을 경우(Co-treatment effect)에 소 로타 바이러스의 억제능을 분석하기 위해서 각 농도의 PB-81을 1×10⁴ TCID₅₀/well의 소 로타바이러스와 동시에 투여하여 2시간 동안 배양한 후 바이러스 RNA 증식억제능을 조사한 결과, PB-81 투여군에서 소 로타 바이러스 증식이 시험물질을 투여하지 않은 군에 비하여 용량 의존적으로 억제되었다. EC₅₀은

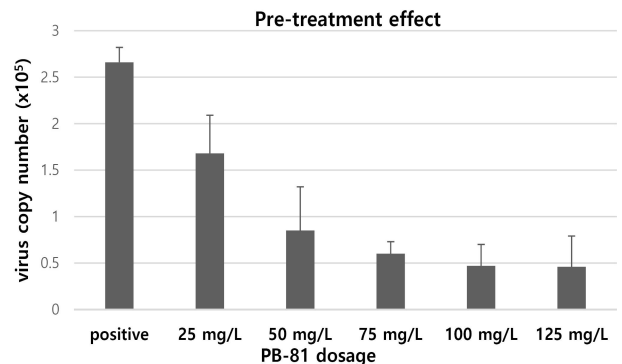


Fig. 6. The ability of PB-81 to suppress the virus in a pre-treatment experiment. When PB-81 was administered prior to infection of the virus, PB-81 inhibits the proliferation of the virus in proportion to the concentration.

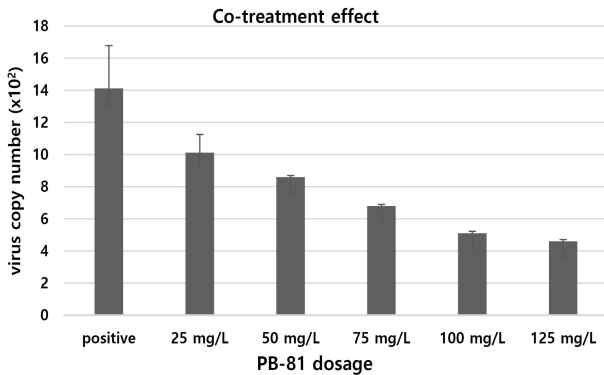


Fig. 7. The ability of PB-81 to suppress the virus in a co-treatment experiment. When PB-81 is administered at the same time as infecting the virus, PB-81 inhibits the proliferation of the virus in proportion to the concentration.

52.27 mg/L였다(Fig. 7).

세포에 소 로타바이러스를 먼저 감염시킨 후 PB-81을 투여한 경우(Post-treatment effect)에서 소 로타바이러스에 대한 증식 억제능을 조사한 결과 소 로타바이러스만 감염시킨 양성대조군에 비하여 바이러스 증식능이 용량 의존적으로 억제되었으며 EC₅₀은 85.63mg/L이었다(Fig. 8).

PB-81을 세포에 바이러스 감염 전 처리조건, 바이러스와 동시 처리조건 및 바이러스 감염 후 처리조건에서의 바이러스 증식 억제능 농도를 세포독성 농도와 비교하여 시험물질의 선택적 치료지수(Selectivity index S, CC₅₀/EC₅₀)를 산출한 결과, 시험물질의 SI값은 각각의 조건(바이러스 감염 전 처리, 바이러스 동시처리, 바이러스 감염 후 처리)에서 각각 3.07, 1.92, 1.17로 산출되었다(Table 1). 실험 결과에 의하면 PB-81은 바이러스가 감염된 이후보다 바이러스 감염 전 또는 동시 처리 시에 바이러스 억제 효과가 더 우수함이 확인되었다.

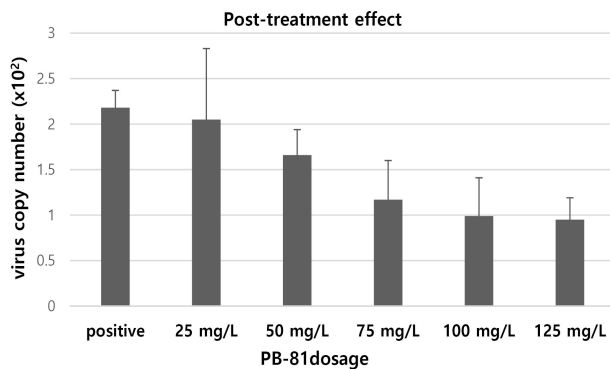


Fig. 8. The ability of PB-81 to suppress the virus in a Post-treatment experiment. When PB-81 is administered after infecting the virus to cell, PB-81 inhibits the proliferation of the virus in proportion to the concentration.

Table 1. Selectivity index according to administration of PB-81 to virus infected cell

Category	CC ₅₀	EC ₅₀	SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)
Pre-treatment		32.64 mg/L	3.07
Co-treatment	100.35 mg/L	52.27 mg/L	1.92
Post-treatment		85.63 mg/L	1.17

PB-81의 독성시험

PB-81의 정맥투여 시 독성을 확인하기 위해서 PB-81을 Sprague-Dawley계 랫드에 단 회 정맥투여 했을 때 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 확인하였다. PB-81을 20, 10, 5 및 2.5 mg/kg body weight의 용량으로 군당 암수 각 5 마리의 동물에 단 회 정맥투여하여, 생리식염수를 투여한 음성대조군과 비교하였다. 관찰기간 동안 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 14일간 관찰 후 부검하여 장기에 대한 육안소견 관찰을 실시한 결과는 다음과 같다.

- 1) 사망동물: 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 2) 일반증상: 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 3) 체중변화: 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 4) 부검소견: 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

따라서, 본 시험조건 하에서 PB-81을 Sprague-Dawley계 랫드에 단 회 정맥투여 했을 때 정맥투여가 가능한 최대량인 체중 kg당 원화 20 mg은 어떠한 독성도 나타나지 않았다.

환축을 대상으로한 임상효과

소 로타바이러스 설사병 환축에 대한 임상효과는 2021년 11월부터 2023년 1월 사이에 안동, 화인, 보은 지역에서 발생한 환축 20두를 대상으로 실험하였으며, 선별된 모든 설사병 환축은 PB-81을 투여하기 전에 송아지설사병 5중 진단 키트로 로타바이러스 감염을 확인하였다(Fig. 9).

로타바이러스의 감염에 의한 설사병으로 확인된 환축만을 대상으로 PB-81 20 mg/5 mL를 투여하였으며, 20두의 로타바이러스 설사병 환축 중 16두에는 PB-81의 투여와 함께 대증요법을 동시에 치치하였으며, 4두에는 PB-81을 투여하지 않고 대증요법만으로 치치하였다. 대증요법은 수액을 통한 전해질 공급과 2차 감염을 예방하기 위한 항생제를 투여하였다. 임상증상의 관찰은 진단 키트에 의해 로타바이러스 감염에 의한 설사병이 확인된 날 이후부터 소 로타바이러스가 검출되지 않는 기간 동안 관찰하여 임상지수(Table 2)를 측정하였다. 임상효과는 PB-81투여 전후에 있어서 행동이상 여부, 설사증세의 완화여부, 직장체온의 변화와 섭식 정도 변화를 관찰하였다.

PB-81을 투여하여 치치한 환축군과 투여하지 않은 대

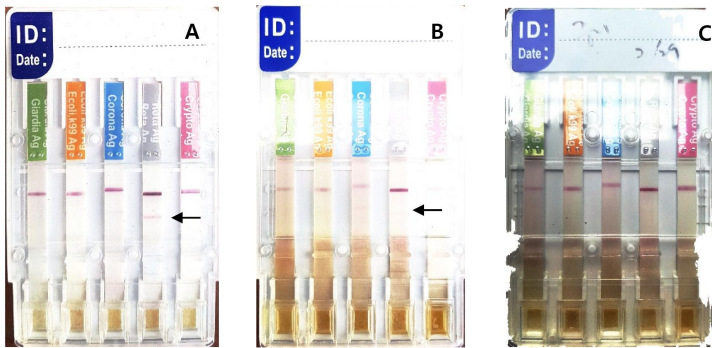


Fig. 9. Infections of rotavirus were confirmed in feces of diarrhea disease patients using '5 types of calf diarrhea diagnostic kits'. A. After confirming the diarrhea caused by rotavirus, PB-81 was administered. B. One day after PB-81 administration, a weak rotavirus-positive band was identified. C. Two days after the PB-81 administration, no positive band of rotavirus was identified, and clinical symptoms were recovered.

Table 2. Classification of clinical indices to determine the effectiveness of treatment according to clinical recovery after administration of PB-81

Clinical sign	Clinical Index	
Abnormal behavior	Normal	0
	Dull	1
	Depression	2
	Crossbones	3
Rectal temperature	Normal (37.5-39.0°C)	0
	39.1-40.5°C	1
	>37.5°C	2
	<40.5°C	3
Fecal excrement	Normal feces	0
	Soft feces	1
	Watery feces	2
	Bloody feces	3
Eating	Normal	0
	Insufficient	1
	Refusal	2
Total		15

조처치군의 임상지수의 변화는 Fig. 10과 같이 나타났다. 임상지수의 변화는 PB-81 처치군에서는 PB-81을 처치 후부터 임상지수가 감소하여 치료효과가 나타나는데 비하여 PB-81을 처치하지 않은 대조 처치군에서는 로타바이러스의 감염이 확인된 이후에 임상지수가 증가하고, 2-3일 후에 임상지수가 낮아지는 것이 확인되어 PB-81의 투여는 로타바이러스 설사병 환축에 투여 후 빠른 시간 내에 효과가 나타나는 것으로 확인되었다.

모든 환축에 대해서 PB-81을 20 mg/5 mL용량을 1회 투여하였으며, 바이러스의 제거와 설사증세의 회복을 포함한 임상회복에 있어서 PB-81 처치군에서는 최단기간인 투여 1일 후에 임상회복 환축이 2두, 최장기간인 5일 후에 임상회복 환축이 1두로 평균 치료일수는 2.25일이었다. 임상회복 된 환축의 16두 중 15두에서 임상회복과 동시에 바이러스가 검출이 되지 않았으며 1두에서 임상회복 후 1일까지 바이러스가 검출되었다. 반면 PB-81을 투여하지 않은 대조처치군의 임상회복기간이 6-7일로 평균 6.5일이었으며(Table 3) 임상회복과 더불어 바이러스가 검출되지 않아 PB-81의 투여가 소 로타바이러스의 제거 및 로타바

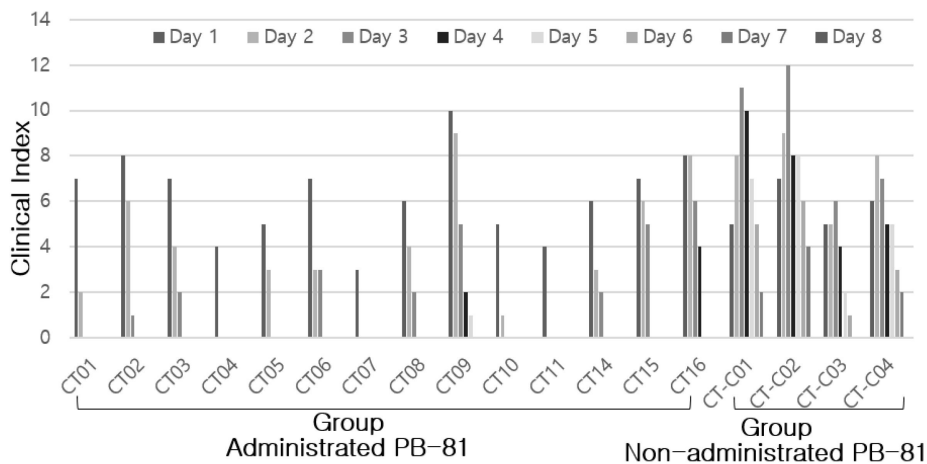


Fig. 10. Clinical recovery in the PB-81 administration group was faster than in the control group that did not administer PB-81. In the group administered PB-81, symptoms of diarrhea were treated within 2-5 days after PB-81 administration, and the virus was removed from most axons. The duration of clinical recovery was different for each individual. In the control group that did not administer PB-81, the clinical recovery period was 6-7 days.

Table 3. Comparison of the therapeutic effects of the administration and non-administration groups on rotavirus diarrhea reduction by the administration of PB-81

PB-81	No. of patient	No. of cured	No. of dead	average days cured	Detection of a virus after cured
Group administered	16	16	0	2.25	1
Group Non-administered	4	4	0	6.5	0

이러스 설사병의 치료에 유효한 것으로 나타났다.

고 찰

본 연구에서는 PB-81이 식품의약품안전처에서 고시한 원화검정법에 의해 동일한 성상을 나타내는 것을 확인하였으며, 상피세포에서 IFN- β , NK 세포에서 IFN- γ 를 유도하며, 소 로타바이러스를 감염시킨 MBDK 세포에서 바이러스의 증식을 억제시키는 것을 확인하였다. PB-81의 이러한 세포실험결과를 임상에 적용하기 위해서 마우스를 대상으로 한 독성검사에서 최대 투여량인 20 mg/kg에서 PB-81의 안전성이 확인되어 로타바이러스 설사병환축에 PB-81을 투여하였으며, PB-81을 20 mg/50 kg의 용량으로 소 로타바이러스 설사병환축을 대상으로 투여하여 소 로타바이러스 감염에 의한 설사병의 치료효과를 확인하였다.

최근에 원화로부터 약용성분을 추출하여 각종항암효과를 가지는 신약으로 개발하기 위한 연구가 지속적으로 보고되고 있다[18]. Yuanhuacine은 topoisomerase-DNA 복합체에 작용하여 DNA의 손상을 유발함으로써 다양한 암세포주에 대해 증식억제 효과를 나타내는 것이 보고되었으며[24], hydroxygenkwanin은 EGFR (Epidermal growth factor receptor)의 분해를 촉진하여 폐암세포의 성장을 억제하는 연구가 보고되었다[13]. 또한 genkwadaphnin은 편평세포암 세포에서 활성산소의 매개에 의한 apoptosis를 유도하여 암세포의 증식을 억제하는 것이 보고되었다[15].

Genkwadaphnin은 항암효과 이외에 NK 세포에서 PKC 계열의 구성체인 PKD1, MEK 및 ERK의 인산화를 통해서 I κ B 분해를 유도하는 IKK 활성화와 NF- κ B 소단위인 p65의 핵 국소화를 유도하여 IFN- γ 의 전사를 유도하는 것이 보고되었다[23].

IFN- γ 는 염증작용을 활성화시키는 면역작용을 증가시켜 병원성 세균 또는 바이러스의 감염을 제거하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으나[21] 원화의 성분인 genkwadaphnin의 IFN- γ 를 유도하는 특성을 활용하여 세포 및 임상에서 항바이러스 효과를 검증한 예는 아직 보고되지 않았다.

이전 연구에서 원화의 성분인 genkwadaphnin에 의한 IFN- γ 유도 효과는 NK-92 세포와 수지상 세포에서 확인되었으며, 유도된 IFN- γ 에 의해 호중구가 군집되는 현상도

확인되었다[8]. 본 연구에서는 임상실험에 앞서 세포실험을 통해 PB-81의 항바이러스 효과에 대한 분석에서 항바이러스 효과는 바이러스를 감염시키기 전에 PB-81을 투여하는 경우(pre-treatment)가 바이러스 감염 후(post-treatment)보다 높은 항바이러스 효과가 나타났다.

Pre-treatment에서 상피세포인 MBDK 세포에 바이러스 감염 후에 투여한 경우보다 낮은 농도에서 EC₅₀이 나타나는 것은 PB-81에 의해 상피 세포에서 바이러스의 감염 전에 IFN- β 가 유도됨에 따라 바이러스의 증식을 억제하는 ISG가 유도되어 바이러스의 세포 침입을 억제하거나 세포에 침투한다 하여도 바이러스의 감염 초기에 증식을 억제시키기 때문인 것으로 추측된다. Post-treatment의 경우에는 이미 감염된 바이러스가 증식을 시작한 후에 PB-81 및 바이러스에 의해 IFN- β 가 유도되고 이에 따른 ISG가 유도되기 때문에 pre-treatment보다 상대적으로 많은 양의 바이러스에 대해 작용하기 위해서 많은 양의 PB-81이 요구되기 때문인 것으로 판단된다.

PB-81은 상피세포에서 인터페론 베타를 유도하며 동시에 NK 세포에서 IFN- γ 를 유도한다. IFN- γ 는 이미 알려진 바와 같이 대식세포나 세포독성 T 세포를 활성화시켜 탐식작용에 의해 바이러스를 비롯한 외부침입 미생물을 제거하는 작용을 한다[10]. 이러한 사이토카인의 작용의 특징은 케스케이드반응(cascade reaction)으로 초기의 미세한 반응이 증폭되어 반응이 진행될수록 반응의 결과가 확대되어 나타나는 반응[14]으로 IFN- β 나 IFN- γ 의 작용에 의해 일어나는 면역반응은 빠른 시간에 케스케이드반응을 일으키는 것을 특징으로 한다. 이러한 면역계의 특성에 의해 세포실험보다는 *in vivo*에서 IFN- γ 에 의한 면역계의 케스케이드반응에 의해 면역세포의 활성화가 확대되어 바이러스의 억제 및 제거의 효율이 증폭되어 나타날 것으로 추정된다. 즉, PB-81의 투여에 의해 상피세포에 대해서는 IFN- β 에 의한 바이러스 증식억제를 나타내고 면역세포에 대해서는 IFN- γ 의 활성화에 의한 바이러스 제거 작용이 동시에 일어나게 되어 항바이러스 효과가 촉진될 것으로 추측된다.

소 로타바이러스 설사병 환축에 PB-81의 적절한 투여량을 결정하기 위해서 정맥투여 독성실험에서 확인된 치사량(20 mg/kg)과 세포실험에서 IFN- γ 를 유도할 수 있는 최소량(40 μ g/10 mL) (Fig. 4)을 송아지 50 kg에 대해서 Bergmann법칙[5]에 따라 환산하여 투여하였다. 독성시험

에서는 투여 최대용량인 20 mg/kg으로도 독성이 나타나지 않아 PB-81의 투여 시 부작용을 나타내지 않는 최저용량으로 설정하였고, 이 용량을 체중 50 kg의 송아지에 적용하여 환산할 경우 81 mg/50 kg으로 환산되며, IFN- γ 를 유도할 수 있는 최저 유효량은 NK 세포에서 측정된 최소 용량을 체중 50 kg의 송아지의 혈액량을 기준으로 환산하였을 경우 15.2 mg/50 kg으로 환산되었다. 따라서 PB-81의 투여량 20 mg/50 kg은 부작용이 예상되는 최저 용량의 1/4정도의 용량으로 안전성이 예상되며, 동시에 충분히 IFN- γ 를 유도할 수 있는 양으로 판단되어 본격적인 임상 실험 전에 4두의 소 로타바이러스 설사병환축에 PB-81 20 mg/50 kg을 투여하여 부작용 및 임상증상의 변화를 관찰하였다. 소 로타바이러스 설사병환축에 20 mg/5 mL의 용량으로 투여하였을 때, 투여한 모든 환축에서 부작용이 확인되지 않았으며, 바이러스의 제거 및 설사증세가 완화되는 것이 확인되어 이후의 모든 환축에 동일한 용량으로 투여하였다.

임상실험의 결과 PB-81의 소 로타바이러스 설사병 환축에 대한 치료효과는 PB-81 투여군이 평균 2.25일이었고, PB-81을 투여하지 않은 대조군이 6.5일로 PB-81의 투여에 의한 소 로타바이러스 설사병의 치료를 약 4일 단축하는 효과가 나타났다. PB-81의 투여에 의해 소 로타바이러스 설사병에서 회복한 치료군 16두 중 15두에서 송아지 설사병 5종 진단 키트에서 사용하여 바이러스의 잔존이 확인되지 않았으나, 1두에서 회복 후 1일 후까지 바이러스가 검출되었다. 치료 후에도 바이러스가 잔존하는 것은 정확한 원인은 알 수 없으나 임상수의사들에 의하면 일반적으로 로타바이러스 설사병의 경우에는 소 코로나바이러스 설사병이나 BVD 설사병보다 바이러스의 존재에도 예후가 좋은 치료경험을 보고하고 있으나 아직 문헌으로 보고된 바는 없으며 또한 진단키트의 사용미숙으로 인한 오진일 가능성을 배제할 수 없어 이에 대한 추론은 향후 더 연구를 진행해야 할 것으로 판단된다. 이러한 PB-81의 투여에 의한 빠른 치료효과는 주로 어린 환축의 성장에 있어서 회복을 빠르게 하여 증체에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단되나 회복 일수에 따른 증체의 영향은 추후 장기간의 연구가 더 필요하다. PB-81 투여군의 치료과정에서 부작용이 나타나지 않은 것은 독성시험에서도 확인된 바와 같이 최대 투여량을 투여하여도 독성이 나타나지 않는 독성시험결과를 반영하는 것으로 PB-81이 안전한 소 로타바이러스 설사병 치료제로써의 가능성을 시사하는 것으로 판단된다.

원화추출물인 PB-81의 소 로타바이러스 설사병 환축을 대상으로 한 치료효과 검증에서 우수한 치료효과를 보이고 있으며, 부작용이 관찰되지 않아 앞으로 PB-81의 작용 기전을 해석하고 자세한 독성시험 및 임상시험을 통해 소 로타바이러스 설사병 치료제로 활용이 기대된다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Andrea, M. D., Ravera, R., Gioia, D., Gariglio, M. and Landolfo, S. 2002. The interferon system: An overview. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **6**, doi: 10.1053/ejpn.2002.0573.
2. Bhat, M. Y., Solanki, H. S., Advani, J., Khan, A. A., Prasad, T. S. K., Gowda, H., Thiyagarajan, S. and Chatterjee, A. 2018. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. *J. Cell Commun. Signal.* **12**, 745-751.
3. Brunauer, M., Roch, F. F. and Conrady, B. 2021. Prevalence of worldwide neonatal calf diarrhoea caused by bovine rotavirus in combination with bovine coronavirus, *Escherichia coli* K99 and *Cryptosporidium* spp. A Meta-analysis. *Animals.* **11**, doi: 10.3390/ani11041014
4. Dhama, K., Chauhan, R. S., Mahendran, M. and Malik, S. V. S. 2009. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* **33**, 1-23.
5. Fröhlich, A., Kotowska, D., Martyka, R. and Symonds, M. R. E. 2023. Allometry reveals trade-offs between Bergmann's and Allen's rules, and different avian adaptive strategies for thermoregulation. *Nat. Commun.* **14**, doi: 10.1038/s41467-023-36676-w
6. Gray, P. W. and Goeddel, D. V. 1982. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* **298**, 859-863.
7. Han, B. S., Minh, N. V., Choi, H. Y., Byun, J. S. and Kim, W. G. 2017. Daphnane and phorbol diterpenes, anti-neuroinflammatory compounds with nurr1 activation from the roots and stems of *Daphne genkwa*. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 2205-2211.
8. Kang, H. B., Ahn, K. S., Oh, S. R. and Kim, J. W. 2014. Genkwadaphnin induces IFN- γ via PKD1/NF- κ B/STAT1 dependent pathway in NK-92 Cells. *PLoS. One.* **9**, 1-16.
9. Kang, J. I., Hong, J. Y., Lee, H. J., Bae, S. Y., Jung, C. L. M., Park, H. J. and Lee, S. K. 2015. Anti-tumor activity of yuanhuacine by regulating AMPK/mTOR signaling pathway and actin cytoskeleton organization in non-small cell lung cancer cells. *PLoS. One.* **10**, 1-17.
10. Kang, S. W., Brown, H. M. and Hwang, S. M. 2018. Direct antiviral mechanisms of interferon-gamma. *Immune. Net.* **18**, doi: 10.4110/in.2018.18.e33
11. Lee, H. G., Cho, A., Oh, S. I., Roh, J. H., Jung, Y. H., Choe, C. Y., Yoon, J. D., Oem, J. K., Son, D. S. and Yoo, J. G. 2020. A ten-year retrospective study of bovine infectious disease agents occurred in Korea from 2010 to 2019. *Kor. J. Vet. Serv.* **43**, 113-128.
12. Lee, S., Woo, S. E., Lee, S. R. and Kim, J. W. 2009. Immuno-specificity of egg yolk antibodies against bovine rotavirus and bovine coronavirus causing calf diarrhea. *J. Anim. Sci. Tech.* **51**, 407-412.
13. Leu, Y. L., Wang, T. H., Wu, C. C., Huang, K. Y., Jiang,

- Y. W., Hsu, Y. C. and Chen, C. Y. 2020. Hydroxygenkwanin suppresses non-small cell lung cancer progression by enhancing EGFR degradation. *Molecules*. **25**, 941-953.
14. Li, Y., Yang, G., Ren, Y., Shi, L., Ma, R., Mei, H. C. and Busscher, H. J. 2020. Applications and perspectives of cascade reactions in bacterial infection control. *Front. Chem.* **7**, 861-874.
 15. Li, Z. J., Li, X. M., Piao, Y. J., Choi, D. K., Kim, S. J., Kim, J. W., Sohn, K. C., Kim, C. D. and Lee, J. H. 2014. Genkwadaphnin induces reactive oxygen species (ROS)-mediated apoptosis of squamous cell carcinoma (SCC) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 1115-1119.
 16. Miller, H. T. C., Maher, G. S. and Young, A. H. 2009. Clinical use of interferon- γ . *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1182**, 69-79.
 17. Moshivshvili, G., Tabatadze, N. and Mshvildadze, V. 2020. The genus *Daphne* A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Fitoterapia*. **143**, 104540-104551.
 18. Park, B. Y., Min, B. S., Ahn, K. S., Kwon, O. K., Joung, H., Bae, K. H., Lee, H. K. and Oh, S. R. 2007. Daphnane diterpene esters isolated from flower buds of *Daphne genkwa* induce apoptosis in human myelocytic HL-60 cells and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma (LLC)-inoculated mouse model. *J. Ethnopharmacol.* **111**, 496-503.
 19. Platanius, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 375-386.
 20. Schoggins, J. W. 2019. Interferon-stimulated genes: What Do They All Do? *Annu. Rev. Virol.* **29**, 567-584.
 21. Tau, G. and Rothman, P. 1999. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy*. **54**, 1233-1251.
 22. Vesikari, T. 1997. Rotavirus vaccines against diarrheal disease. *Lancet*. **350**, 1538-1541.
 23. Yoo, N. N., Lee, H. R., Son, J. M., Kang, H. B., Lee, H. G., Yoon, S. R., Yoon, S. Y. and Kim, J. W. 2016. Genkwadaphnin promotes leukocyte migration by increasing CD44 expression via PKD1/NF- κ B signaling pathway. *Immunol. Lett.* **173**, 69-76.
 24. Zhang, S., Li, X., Zhang, F., Yang, P., Gao, X. and Song, Q. 2006. Preparation of yuanhuacine and relative daphne diterpene esters from *Daphne genkwa* and structure-activity relationship of potent inhibitory activity against DNA topoisomerase I. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 3888-3895.
 25. Zhang, S., Zhang, F., Li, X., Dong, W., Wen, L. and Wang, S. 2007. Evaluation of *Daphne genkwa* diterpenes: fingerprint and quantitative analysis by high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **18**, 91-97.
 26. Zhang, Y., Zhang, R., Yuan, Y., Geng, L., Zhao, X., Meng, X., Zhuang, H., Bi, K. and Chen, X. 2014. Simultaneous determination of eight active components in chloroform extracts from raw and vinegar-processed *Genkwa Flos*. using HPLC-MS and identification of the hepatotoxic ingredients with HL-7702 cell. *Anal. Methods*. **6**, 7022-7029.

초록 : 원화추출물(PB-81)의 소 로타바이러스 설사병에 대한 항바이러스 및 치료효과

이미영¹ · 김연성¹ · 박재명² · 송재찬^{1*}

(¹필리아바이오(주) 연구개발부, ²회인동물병원)

원화(*Daphne genkwa* (Siebold & Zucc))의 50% 에탄올 추출물인 PB-81이 소 로타바이러스 설사병 환축에서 설사병의 치료효과와 바이러스 증식 억제 효과가 나타나는가를 확인하였다. PB-81에 의해 상피세포주인 A549 세포와 혈액세포주인 NK92 세포에서 각각 IFN- β 와 IFN- γ 가 유도되는 것을 확인하였다. PB-81의 바이러스의 증식억제 효과를 확인하기 위해 PB-81을 MBDK 세포에 바이러스의 감염 전, 동시, 감염 후에 투여하는 세 가지 경우에서 바이러스 억제효과를 확인한 결과 PB-81을 투여한 모든 경우에서 바이러스가 억제되었으며, 바이러스 감염 전에서 투여하는 경우에서 가장 좋은 바이러스 억제효과가 나타났다. 마우스에서의 독성검사에서는 투여최대용량인 20 mg/mL에서도 독성에 따른 부작용이 나타나지 않았다. 소 로타바이러스 설사병 환축 16두와 대조군 4두를 대상으로 한 치료효과 검증에는 20 mg/5 mL 용량의 PB-81을 투여한 결과, PB-81을 투여한 모든 소 로타바이러스 설사병 환축이 완치되었으며 PB-81의 투여 후에 완치까지 소요된 기간은 PB-81투여군이 평균 2.25일이었고, PB-81을 투여하지 않은 대조군이 6.5일로 PB-81의 투여에 의한 소 로타바이러스 설사병의 치료효과가 나타나는 것을 확인하였으며 PB-81을 투여한 모든 환축에서 부작용이 검출되지 않았다.