



항당뇨 한약추출고형물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 및 4주 반복투여 독성시험

김영철¹ · 김혜정¹ · 공민규¹ · 임애경¹ · 권미화¹ · 김길수² · 이기동³

¹계명대학교 공중보건학과, ²경북대학교 수의과대학, ³대구바이오산업화센터

Single and Four-Week Repeated Oral Toxicity Study of Antidiabetic Herb Extract Microcapsule in Sprague-Dawley Rats

Young Chul Kim¹, Hye Jeong Kim¹, Min Kyu Kong¹, Ae Kyoung Lim¹,
Mi Hwa Kwon¹, Kil Soo Kim² and Gee Dong Lee³

¹Department of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701

²Department of Veterinary Toxicology, College of Veterinary Medicine,
Kyungpook National University, Daegu 702-701

³Daegu Bio Industry Center, Daegu 704-230, Korea

Received March 12, 2007; Accepted March 19, 2007

Single and repeated-dose toxicity of anti-diabetic herb extract microcapsule (ADHEM) were evaluated according to Toxicity Test Guidelines of Korea Food and Drug Administration using Sprague-Dawley rats. For single-dose toxicity test, kneading ADHEM with sterilized water were administered orally once at dose levels of 0 and 2,000 mg/kg and examined for 14 days. No dead animals, clinical signs and abnormal necropsy findings were observed and also no significant difference in body weights was found. Therefore, the LD₅₀ of ADHEM was considered to be higher than 2,000 mg/kg in both male and female rats. For repeated-dose toxicity test, ADHEM were mixed with powder fodder and administered orally for 28 days at dose levels of 0, 500, 1000 and 2000 mg/kg/day. No dead animals, clinical signs and significant difference in body weights were found. In hematology and serum biochemistry, all values were included within the normal ranges. In relative organ weights, kidney or liver were significantly increased in the 500, 1000 or 2000 mg/kg/day male groups, uterus was significantly increased in the 500 mg/kg/day female group and left adrenal glands were significantly decreased in the 2000 mg/kg/day female group. In histopathological examinations, vacuolation and microgranuloma in the liver, chronic progressive nephropathy and inflammation in the kidney were observed in the 500, 1000 or 2000 mg/kg/day both male and female groups. Therefore, the no observed adverse effect level (NOAEL) of ADHEM was considered to be lower than 500 mg/kg/day in both male and female rats.

Key words: Single and repeated-dose toxicity, Antidiabetic herb extract, NOAEL, Rats.

서 론

산업사회의 발달과 경제수준의 향상으로 인한 급격한 사회구조의 변모는 개인이나 집단의 식생활에 많은 영향을 주고 있으며, 특히 부적절한 식습관으로 인한 영양상

태의 불균형으로 당뇨병, 고혈압, 심장병, 동맥경화증, 암 등의 각종 만성 퇴행성 질환의 발병률이 높아지고 있다. 세계보건기구(WHO)는 세계적으로 당뇨병 유병률이 2000년도에 2.8%에서 2030년도에 4.4%로 예측하고 있으며, 국제 당뇨병연맹(IDF)은 당뇨병 환자의 수가 전세계적으로 1억 9400만 명에 달하는 것으로 추정하고 있다. 우리나라에서도 당뇨병에 의한 사망률은 1990년 인구 십만 명당 11.8명에서 2001년에는 23.8명으로 10년 동안 배

Correspondence to: Young-Chul Kim, Dept. of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
E-mail: yckim@kmu.ac.kr

로 늘어났으며 지속적인 증가추세에 있는 실정이다(통계청, 2002).

당뇨병의 치료 및 합병증 예방에는 여러 방법이 있으나 최근에는 전통적인 천연물로 한약재나 천연 기능성식품을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있으며(Lee et al., 1981; Kim, 2002), 천연물 의약품은 물론 전통적인 천연물을 이용한 건강기능식품이라는 새로운 분야를 만드는 계기를 가져왔다. 그러나 일부 한약재들은 식품으로 오용되어 독성과 부작용이 나타나는 경우도 있고 최근에는 독성간염의 원인의 61.7%가 한약과 한약재에 있다는 보고(안 등, 2002)와 논문도 발표되고 있으며 한약재의 잔류농약, 중금속 함유 문제도 거론되고 있는 실정이다(Vanherweghem et al., 1993; 이 등, 2002).

이에 식품의약품 안전청에서는 개별인증형 기능성 식품 소재에 대해서도 설치류를 이용한 단회 및 반복투여독성 시험 자료를 요구하고 있다. 이에 따라 이 연구에서는 전통적으로 당뇨병 치료에 사용되어온 천연물 35가지를 *in vitro*에서 스크리닝 하여 최종 선택된 한방 천연물 복합제를 다양한 식품소재로 활용이 가능하도록 부형제 starch를 사용하여 동결건조 분말로 제조하여 마이크로캡슐화(69.27~96.84 μm) 한 시험물질의 안전성을 평가하고자 하였다. 시험물질은 (재)대구테크노파크에서 의뢰한 것으로 전 임상 안전성평가시험의 일환으로 SD계통의 암수 랫드에 대한 단회 및 4주 반복투여 경구독성시험을 의약품 독성시험기준(식품의약품안전청고시, 제 1999-61호)에 준하여 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질. 시험에 사용한 한약추출고형물 마이크로캡슐은 생지황, 황정, 단삼, 오미자, 갈근, 감초 생약성분으로 구성되어 있으며 분말상태로 (재)대구테크노파크에서 제공받아 사용하였다(Table 1). 마이크로캡슐 350 g에 생약성분 180 g을 함유하고 있으며 부형제 100 g, 코팅제

70 g으로 이루어져 있다. 코팅제의 소재인 제인은 함수에 탄올에서 추출되는 소수성이 강한 옥수수 단백질 성분으로 물에서는 녹지 않지만, 미생물이나 장에서 효소 분해되는 생분해성 소재로 피막형성 능력이 우수하며 최적화한 조건(분무속도: 0.7 ml/min, 공기유입온도: 70°C, 분무압력: 1.9 kg/cm²)으로 제조된 한약추출고형물 마이크로캡슐은 pH 1.2의 산에서는 안정하고 pH 6.8에서 저장 4시간 이후에 용출율이 크게 증가되었으며, 수분활성도가 증가함에 따라 수분함량이 0.1~10%로 상대적으로 흡수에 안정한 분말이었다.

실험동물 및 사육환경.

단회투여 독성시험: 실험동물은 5주령 Sprague-Dawley계 랫드 암수 각각 10마리씩을 (주)오리엔트바이오로부터 분양 받아 1주일 순화기간을 거친 다음 난괴법을 이용하여 4군으로 나누어 각 군당 5마리씩 2주간 사육 시험하였다. 순화 및 시험 전 기간 동안 동물은 온도 22~24°C, 상대습도 45~55%, 환기횟수 15회/시간 및 조명시간 12시간의 환경에서 사육하였다. 동물의 수용은 polycarbonate제 실험동물용 cage(정도 B&P(주))를 사용하여 cage당 2마리씩 넣어 시험하였고, 사료는 실험동물용 분말사료(샘타코(주))를 자유로 섭취시켰고, 물은 살균·소독하여 자유로 섭취시켰다.

4주 반복투여 독성시험: 실험동물은 5주령 Sprague-Dawley계 랫드 암수 각각 40마리씩을 (주)오리엔트바이오로부터 분양 받아 1주일 순화기간을 거친 다음 난괴법을 이용하여 항당뇨 시험에 각 8군으로 나누어 각 군당 10마리씩 4주간 사육 시험하였다. 순화 및 시험 전 기간 동안 동물은 온도 22~24°C, 상대습도 45~55%, 환기횟수 15회/시간 및 조명시간 12시간의 환경에서 사육하였다. 동물의 수용은 polycarbonate제 실험동물용 cage(정도 B&P(주))를 사용하여 cage당 2마리씩 넣어 시험하였고, 사료는 실험동물용 분말사료(샘타코(주))를 자유로 섭취시켰고, 물은 살균·소독하여 자유로 섭취시켰다.

투여량 설정.

단회투여 독성시험: 예비시험결과, 독성징후가 관찰되지 않아 식약청 고시에 명시된 최고농도인 2,000 mg/kg B.W을 투여량으로 설정하였다. 한약추출고형물 마이크로캡슐의 한약재 성분 함량이 51.4% 이므로 2000 mg/kg B.W의 농도에서 3892 mg/kg B.W을 투여하였다.

4주 반복투여 독성시험: 투여량은 0 mg/kg B.W, 500 mg/kg B.W, 1000 mg/kg B.W, 2000 mg/kg B.W으로 설정하였고, 한약추출고형물 마이크로캡슐의 한약재 성분 함량이 51.4% 이므로 500 mg/kg B.W의 농도에서 973

Table 1. Composition and contents of antidiabetic herb extract microcapsule (100 g*)

Herbal name	Pharmaceutical name	Content(g)
黃精	<i>Polygonatum falcatum</i> A. Gray	12.24
生地黃	<i>Rhemanniae Radix</i> Crudus	12.24
丹蔘	<i>Salvia miltriorrhiza</i> Bunge	12.24
五味子	<i>Schizandra chiensis</i> Baillon	6.12
葛根	<i>Pueraria thunbergiana</i>	6.12
甘草	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	2.45
	Total amount	51.41

*The others included 28.59 g of additive and 20.00 g of coating material.

mg/kg B.W을 1000 mg/kg B.W의 농도에서 1946 mg/kg B.W을 2000 mg/kg B.W의 농도에서 3892 mg/kg B.W을 투여하였다.

투여방법 및 투여기간: 투여경로는 인체적용경로인 경구투여를 선택하였으며 단회투여 독성시험은 시험물질에 멸균수를 가하여 반죽하여 시험개시 시 1회 투여하였고, 4주 반복투여 독성시험의 경우 시험물질을 식이섭취량을 고려하여 분말사료(샘타코(주))에 투여용량에 따라 혼합하여 1일 1회, 주 7회, 4주 동안 연속 투여하였다.

관찰 및 검사항목

단회투여 독성시험

일반증상 및 사망동물의 관찰: 투여당일은 8시간까지 매시간 일반증상을 관찰하였고, 투여 다음날부터 14일까지는 매일 1회씩 일반 증상의 변화, 운동성, 외관 및 사망동물의 유무를 주의 깊게 관찰하였다.

체중측정: 모든 동물에 대하여 투여직전과 투여 1, 3, 7, 10일 후 그리고 부검 직전인 14일에 총 6회 체중을 측정하였다.

부검: 시험 종료시 생존동물은 에테르 마취로 안락사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

4주 반복투여 독성시험

일반증상 및 사망동물의 관찰: 시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 2회 일정한 시간에 일반증상의 변화, 빈사 및 사망유무를 관찰하였다.

체중, 사료섭취량 및 음수량 측정: 시험기간 중 모든 동물의 체중은 투여개시 전 및 주 1회 실시하였으며, 사료섭취량 및 음수량 측정은 주 1회 실시하였다.

안검사: 투여 개시전에 모든 동물에 대하여 외안 검사를 실시하였고 투여후에는 최종 주에 모든 동물의 외관을 육안적으로 관찰하였다. 특히 대조군과 최고용량군의 경우 검안기(Riostar, Germany)를 이용하여 눈의 안저를 검사하였다. 안저검사는 산동제(오큐트로핀, 삼일제약(주))를 이용하여 동공을 확장 시킨 후 검사하였다.

노검사: 대사케이지를 이용하여 신선노(3시간이내)를 채취하여 1 ml 주사기를 사용하여 1 ml의 요를 채취한 후 0.3 ml은 요 일반검사 중 stick검사에 이용하고, 나머지 0.7 ml은 요침사검사에 사용하였다. 노검사는 노분석기(AJ-4270, Japan)를 이용하여 glucose, bilirubin, ketone, protein, nitrite, occult blood, WBC 및 침사를 검사하였다.

혈액학적 검사: 혈액학적 검사를 위해 부검 전에 하룻밤 절식시킨 후, 에테르를 이용한 마취상태에서 개복하여

복대동맥으로부터 혈액을 채혈하고 혈액응고 방지제인 K₂EDTA가 들어있는 CBC 채혈병에 혈액을 취한 후 coulter mixer기 위에서 5분 이상 혼합한 뒤 자동혈구분석기(HEMAVET HV-950FS, USA)를 이용하여 백혈구수(WBC, white blood cell count), 호중구수(NEUT, neutrophil count), 림프구수(LYMPH, lymphocyte count), 단핵구수(MONO, monocyte count), 호산구수(EOSIN, eosinophil count), 호염기구수(BASO, basophil count), 적혈구수(RBC, red blood cell count), 혈색소농도(HGB, hemoglobin concentration), 적혈구용적(HCT, hematocrit), 평균적혈구용적(MCV, mean corpuscular volume), 평균적혈구혈색소량(MCH, mean corpuscular hemoglobin), 평균적혈구혈색소농도(MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), 적혈구분포폭(RDW, red cell distribution width), 혈소판수(PLT, plate count)를 측정하였다.

혈액생화학적 검사: 혈액생화학적 검사를 위해 부검 전에 하룻밤 절식시킨 후, 에테르를 이용한 마취상태에서 개복하여 복대동맥으로부터 혈액을 채혈하여 원심분리기에 넣어 3000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 자동생화학분석기(KONELAB 20XT, Finland)를 이용하여 알부민(albumin), ALP(alkaline phosphatase), ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), BUN(blood urea nitrogen), 총 콜레스테롤(total cholesterol), 크레아티닌(creatinine), GGT(gamma glutamyl transpeptidase), 포도당(glucose), IP(inorganic phosphorus), LDH(lactate dehydrogenase), 총 빌리루빈(total bilirubin), 총 단백질(total protein), 중성지방(triglyceride)을 측정하였다. 전해질 분석 검사는 분리한 혈청으로 전해질 자동 분석장치(AVL 9180, USA)를 이용하여 염소(Cl, chloride), 나트륨(Na, sodium), 칼륨(K, potassium)을 측정하였다.

조직병리학적 검사: 투여한 모든 동물의 육안적 병변을 관찰하고 고환, 부고환, 난소, 전립선, 자궁, 비장, 간장, 신장, 부신, 갑상선, 가슴샘, 심장, 폐, 뇌, 뇌하수체 중 고환 및 부고환을 제외한 나머지는 10% 중성포르말린 용액에 고정하였으며, 고환 및 부고환은 Bouin 용액에 고정하였다. 모든 장기와 조직은 충분한 고정을 거친 후 파라핀 포매하고 4로 박절하여 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 실시하여 광학 현미경하에서 조직병리학적 검사를 실시하였다.

장기중량 측정: 시험종료 후 모든 동물을 부검 하루 전에 절식시킨 다음 부검 직 전에 체중을 측정하였다. 에테르 마취 후 방혈 치사시킨 다음 모든 장기에 대하여 육안검사를 실시하였다. 전 실험동물에 대하여 뇌, 뇌하수체,

심장, 간, 폐, 비장, 흉선, 신장, 부신, 전립선, 자궁, 고환, 부고환, 난소의 중량을 측정하였고, 부검 전 절식된 체중에 대한 상대장기중량을 산출하였다.

통계처리. 체중, 사료섭취량, 혈액학치, 혈액생화학치 및 장기중량은 평균값 및 표준편차로 나타내었다. 사료섭취량과 음수량은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 하였으며, Dunnett's test의 다중비교법으로 분석하였고 그 외 대조군과 실험물질 투여군간의 비교는 Student's t-test를 이용하여 유의성여부를 검사하였다. 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계패키지인 SPSSWIN(v12.0)를 이용하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결과 및 고찰

단회투여 독성시험.

일반증상 및 사망률: 모든 시험군에서 시험물질 투여로 인한 특기할 만한 일반증상 및 사망동물은 시험 전 기간 동안 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 2. Mortality and clinical signs in SD rats for 2 weeks after single oral administration with antidiabetic herb extract microcapsule

Dose (mg/kg B.W)	Final mortality		Clinical signs	
	Male	Female	Male	Female
0	0/5	0/5	-	-
2000	0/5	0/5	-	-

Values are expressed as number of dead animals/total number of animals.
-: no clinical signs.

체중변화: 암수 대조, 실험 모든 군에서 지속적인 증가 추세를 보였으며 통계학적으로 유의성 있는 변화는 보이지 않았다(Fig. 1).

부검소견: 부검 결과 모든 생존동물에서 본 시험물질 투여와 관련한 어떠한 육안 병변도 관찰되지 않았다.

4주 반복투여 독성시험.

일반증상 및 사망률: 모든 시험군에서 시험 전 기간 동안 시험물질 투여로 인한 특기할 만한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 3).

체중변화: 암수 대조, 실험 모든 군에서 지속적인 증가 추세를 보였으며 통계학적으로 유의성 있는 변화는 보이지 않았다(Fig. 2).

사료 섭취량 및 물섭취량의 변화: 대조군에 비하여 암컷 수컷 모든 실험군에서 시험물질 투여와 관련된 유의성 있는 식이섭취량 변화는 관찰되지 않았다(Table 4). 물섭취량은 대조군에 비하여 암컷 500 mg/kg/day 투여군에서 3주째에 약 25.8% 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 다른 실험군에서는 시험물질 투여와 관련된 물섭취량의

Table 3. Mortality and clinical signs in SD rats administered orally with antidiabetic herb extract microcapsule for 4 weeks

Dose (mg/kg/day)	Final mortality		Clinical signs	
	Male	Female	Male	Female
0	0/10	0/10	-	-
500	0/10	0/10	-	-
1,000	0/10	0/10	-	-
2,000	0/10	0/10	-	-

Values are expressed as number of dead animals/total number of animals.
-: no clinical signs.

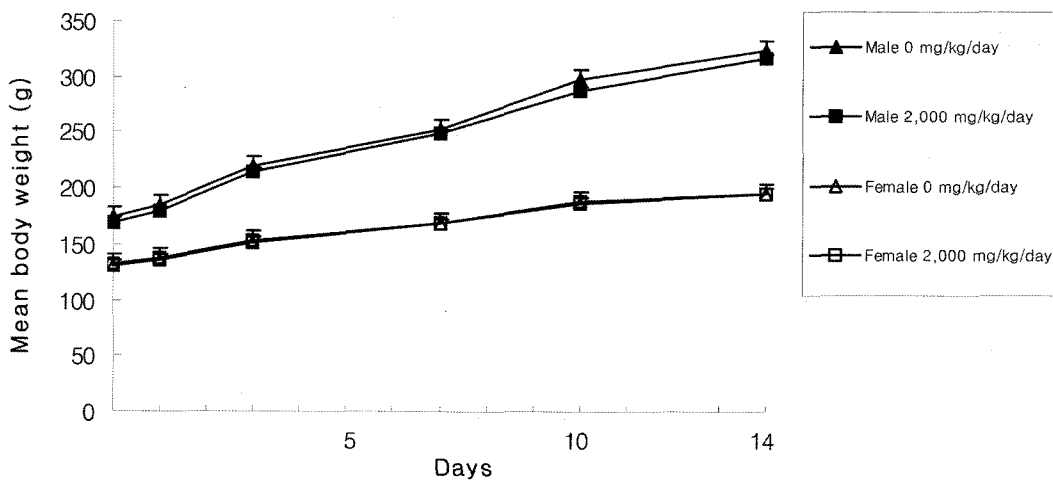


Fig. 1. Body weight changes in SD rats for 2 weeks after single oral administration with antidiabetic herb extract microcapsule.

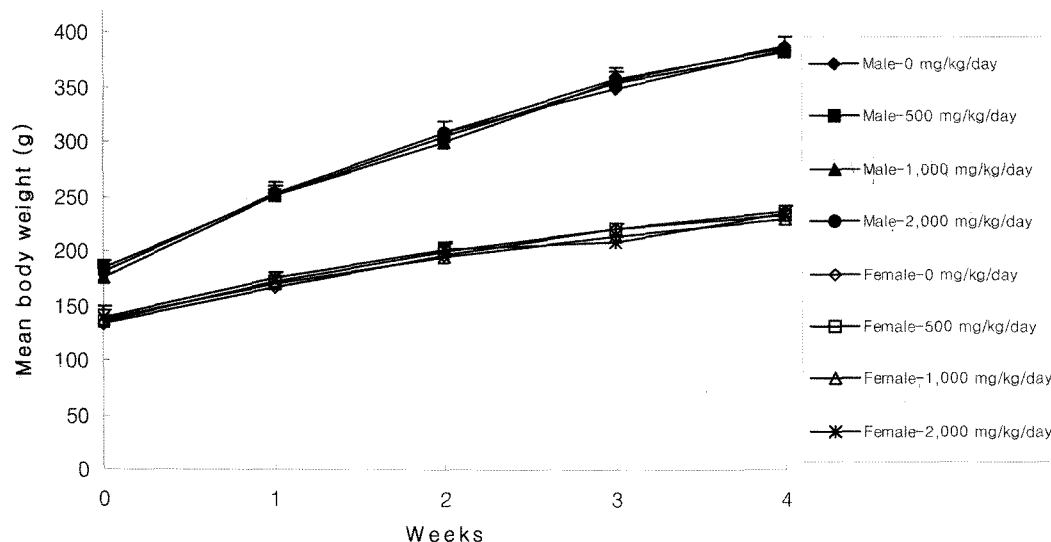


Fig. 2. Body weight changes in SD rats administered orally with antidiabetic herb extract microcapsule for 4 weeks.

Table 4. Food consumption in SD rats administered orally with antidiabetic herb extract microcapsule for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (mg/kg/day)	0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
1 week		21.9 ± 1.3	21.4 ± 1.4	22.2 ± 2.0	22.4 ± 1.54	15.4 ± 2.9	15.2 ± 1.6	14.5 ± 1.1	15.0 ± 2.0
2 weeks		23.2 ± 1.2	23.7 ± 1.2	24.3 ± 0.9	24.7 ± 0.3	14.8 ± 0.3	14.5 ± 0.6	14.0 ± 1.0	14.4 ± 0.6
3 weeks		22.4 ± 1.9	22.8 ± 2.7	23.4 ± 2.3	23.4 ± 4.3	17.5 ± 2.6	18.2 ± 2.2	16.3 ± 2.5	17.8 ± 1.5
4 weeks		24.9 ± 1.0	23.1 ± 1.5	25.6 ± 3.6	25.0 ± 1.3	17.5 ± 5.8	18.8 ± 5.3	20.2 ± 2.1	16.7 ± 3.2

Values are mean ± SD of 10 rats. Unit: g/day.

Table 5. Water consumption in SD rats administered orally with antidiabetic herb extract microcapsule for 4 weeks

Sex	Male				Female				
	Dose (mg/kg/day)	0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
1 week		39.0 ± 3.3	39.5 ± 4.5	43.5 ± 1.4	41.0 ± 2.9	32.0 ± 7.6	27.0 ± 2.7	30.5 ± 3.3	28.5 ± 2.9
2 weeks		46.0 ± 5.8	52.5 ± 5.0	51.0 ± 6.0	55.5 ± 3.7	31.5 ± 3.4	34.5 ± 3.3	37.5 ± 3.5	36.0 ± 5.2
3 weeks		40.5 ± 6.0	42.0 ± 9.7	41.0 ± 4.5	43.5 ± 8.0	31.0 ± 6.5	39.0 ± 5.8*	32.0 ± 2.1	33.0 ± 2.7
4 weeks		52.5 ± 7.5	52.5 ± 8.3	56.5 ± 6.0	50.0 ± 8.8	26.0 ± 5.8	32.0 ± 8.6	29.5 ± 6.9	26.0 ± 8.5

Values are mean ± SD of 10 rats. Unit: ml/day.

The value with an asterisk is significantly different from vehicle control group (*; p < 0.05).

유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 5).

안검사 및 뇨검사: 모든 실험군에서 대조군에 비하여 시험물질 투여와 관련된 유의성 있는 변화 및 특이 이상 소견이 관찰되지 않았다(Table 6).

혈액학적 검사: 수컷의 경우 대조군에 비하여 500 mg/kg/day 투여군에서 혈소판의 수가 16.1% 유의적으로 증가하였고(p<0.05), 1000 mg/kg/day 투여군에서 단핵구의 수가 136.8% 유의적으로 증가하였다(p<0.01). 2000 mg/kg/day 투여군에서 단핵구수(p<0.01), 평균적혈구용적(p<0.05), 평균적혈구혈색소량(p<0.05)이 각각 110.5%, 4.6%, 4.7% 유의적으로 증가하였다. 암컷의

경우 대조군에 비하여 2000 mg/kg/day 투여군에서 적혈구의 수가 11.4% 유의적으로 감소하였다(Table 7). 이와 같은 혈액학적 수치는 모두 정상범위내의 변화로 용량 상관성이 결여되며 시험물질 투여로 인한 독성학적 변화로는 판단되지 않는다(Wolford *et al.*, 1986).

혈액 생화학적 검사: 수컷의 경우 1000 mg/kg/day 투여군에서 albumin수치가 대조군에 비하여 3.8% 유의적으로 감소하였고(p<0.05), ALT수치가 대조군에 비하여 17.7% 증가하였으나 유의하지 않았으며 정상범위안의 변화이다. 암컷의 경우 1000 mg/kg/day 투여군에서 ALP수치가 대조군에 비하여 26.6% 증가하였고 2000 mg/kg/

Table 6. Urinary values in SD rats administered orally with antidiabetic herb extract microcapsule for 4 weeks

Item	Sex	Male				Female				
	Dose(mg/kg/day)	0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000	
Specific gravity	≤ 1.005	0	0	1	0	0	0	0	0	
	1.010	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1.015	0	0	0	1	0	0	0	0	
	1.020	1	3	2	2	0	0	0	0	
	1.025	1	0	0	0	0	0	0	0	
	≥ 1.030	1	0	0	0	3	3	3	3	
pH	6.0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6.5	0	0	0	0	1	1	0	0	
	7.0	2	0	1	0	0	0	0	1	
	7.5	0	0	0	0	1	1	0	0	
	8.0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	8.5	1	2	0	0	1	0	2	1	
Glucose	9.0	0	1	2	3	0	1	0	1	
	-	3	3	3	3	0	1	3	3	
	-/+	0	0	0	0	3	2	0	0	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bilirubin	-	3	3	3	3	1	1	2	3
		-/+	0	0	0	0	0	0	0	0
+		0	0	0	0	2	2	1	0	
Ketone	-	1	0	1	2	2	3	3	3	
	-/+	1	1	1	1	0	0	0	0	
	+	1	2	1	0	1	0	0	0	
Protein	-	0	0	0	0	0	0	1	0	
	-/+	1	0	0	0	1	2	0	2	
	+	2	3	3	3	2	1	2	1	
	++	0	0	0	0	0	0	0	0	
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nitrite	-	3	2	3	3	3	3	3	3	
	+	0	1	0	0	0	0	0	0	
Occult blood	-	3	3	3	3	3	3	2	3	
	-/+	0	0	0	0	0	0	1	0	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	
WBC	-	2	2	2	3	0	0	1	2	
	-/+	0	1	1	0	1	1	1	1	
	+	1	0	0	0	2	2	0	0	
	++	0	0	0	0	0	0	1	0	
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	
RBC ^a	-	3	3	3	3	3	3	3	3	
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	
WBC ^a	-	2	3	3	3	1	3	2	3	
	+/-	1	0	0	0	2	0	0	0	
	+	0	0	0	0	0	0	1	0	
Epithelial cell ^a	-	2	3	3	3	3	3	3	2	
	+/-	1	0	0	0	0	0	0	1	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cast ^a	-	3	3	3	3	3	3	3	3	
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	

Values are mean±SD of 3 rats.

^aUrine sediment parameters.

day 투여군에서 총 콜레스테롤이 대조군에 비하여 14.0% 증가하였으나 유의하지 않았다(Table 8). 이와 같은 혈액 생화학적 변화들은 간의 장기증량변화 및 조직병리검사결

과와 부합되는 결과이나 정상범위안의 변화로 용량상관성이 결여되며 독성학적 변화로는 판단되지 않는다(Wolford *et al.*, 1986).

Table 7. Hematological values in SD rats administered orally with antidiabetic herb extract microcapsule for 4 weeks

Dose (mg/kg/day)	Sex							
	Male		Female					
	0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
WBC ($\times 10^9/l$)	8.97 \pm 3.55	8.87 \pm 1.88	10.50 \pm 1.98	9.70 \pm 2.78	8.07 \pm 3.65	6.49 \pm 1.70	7.51 \pm 3.40	7.14 \pm 2.23
NEUT ($\times 10^9/l$)	2.13 \pm 0.94	2.38 \pm 0.88	3.15 \pm 1.20	2.51 \pm 0.95	1.87 \pm 1.04	1.46 \pm 0.61	1.83 \pm 0.78	1.78 \pm 0.57
LYMPH ($\times 10^9/l$)	6.59 \pm 2.66	6.16 \pm 1.14	6.85 \pm 1.01	6.70 \pm 1.84	5.92 \pm 2.56	4.74 \pm 1.39	5.32 \pm 2.50	5.01 \pm 1.72
MONO ($\times 10^9/l$)	0.19 \pm 0.10	0.26 \pm 0.11	0.45 \pm 0.25**	0.40 \pm 0.17**	0.24 \pm 0.10	0.25 \pm 0.09	0.33 \pm 0.17	0.29 \pm 0.09
EOSIN ($\times 10^9/l$)	0.05 \pm 0.04	0.06 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03	0.08 \pm 0.06	0.05 \pm 0.04	0.02 \pm 0.03	0.02 \pm 0.02	0.04 \pm 0.04
BASO ($\times 10^9/l$)	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.02	0.00 \pm 0.01	0.01 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.01
RBC ($\times 10^{12}/l$)	7.36 \pm 0.59	7.40 \pm 0.68	7.29 \pm 0.42	7.24 \pm 0.35	7.19 \pm 0.34	6.81 \pm 0.86	7.30 \pm 0.74	6.37 \pm 1.05*
HGB (g/dl)	16.76 \pm 1.34	17.11 \pm 1.77	16.47 \pm 1.39	17.27 \pm 1.01	16.12 \pm 1.12	15.68 \pm 2.16	16.94 \pm 2.31	14.48 \pm 2.56
HCT (%)	47.87 \pm 4.11	48.44 \pm 4.65	47.60 \pm 3.57	49.24 \pm 2.82	46.79 \pm 3.09	45.33 \pm 5.54	48.09 \pm 5.43	42.54 \pm 7.34
MCV (fl)	65.05 \pm 3.10	65.46 \pm 1.82	65.30 \pm 2.65	68.06 \pm 1.49*	65.34 \pm 2.64	66.61 \pm 1.97	65.80 \pm 1.96	66.74 \pm 2.54
MCH (pg)	22.81 \pm 1.16	23.12 \pm 0.57	22.57 \pm 1.04	23.89 \pm 0.68*	22.53 \pm 1.06	22.99 \pm 0.78	23.16 \pm 1.11	22.70 \pm 0.62
MCHC (g/dl)	35.05 \pm 1.42	35.32 \pm 1.20	39.60 \pm 11.99	35.08 \pm 1.08	34.45 \pm 0.85	34.51 \pm 1.04	35.15 \pm 1.24	34.03 \pm 1.01
RDW (%)	14.94 \pm 0.81	15.03 \pm 0.70	15.15 \pm 0.32	15.58 \pm 0.50	14.64 \pm 0.93	14.46 \pm 0.58	14.54 \pm 0.71	15.13 \pm 0.27
PLT ($\times 10^9/l$)	938.10 \pm 119.05	1089.56 \pm 119.52*	1034.17 \pm 103.20	1141.40 \pm 221.54	1012.40 \pm 279.41	872.22 \pm 79.69	865.90 \pm 285.28	816.00 \pm 167.54

Values are mean \pm SD of 10 rats.

The value with an asterisk is significantly different from vehicle control group by t-test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Table 8. Serum biochemical values in SD rats administered orally with antidiabetic herb extract microcapsule for 4 weeks

Dose (mg/kg/day)	Sex							
	Male		Female					
	0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
Albumin (g/dl)	3.42 \pm 0.13	3.32 \pm 0.09	3.29 \pm 0.10*	3.34 \pm 0.09	3.70 \pm 0.43	3.73 \pm 0.19	3.74 \pm 0.16	3.75 \pm 0.17
Alkaline phosphatase (U/l)	443.42 \pm 125.12	453.54 \pm 55.52	444.89 \pm 80.63	447.08 \pm 60.54	350.26 \pm 97.29	391.59 \pm 98.08	443.49 \pm 121.17	363.73 \pm 111.72
ALT (U/l)	34.13 \pm 5.99	33.21 \pm 6.71	40.16 \pm 13.86	36.73 \pm 7.45	33.31 \pm 6.14	32.48 \pm 5.11	34.29 \pm 9.31	32.99 \pm 7.78
AST (U/l)	128.62 \pm 28.82	125.27 \pm 33.56	115.46 \pm 23.20	119.94 \pm 36.75	129.94 \pm 38.87	125.81 \pm 25.06	124.74 \pm 30.59	121.28 \pm 26.24
BUN (mg/dl)	16.60 \pm 2.50	17.06 \pm 3.50	16.86 \pm 3.54	16.80 \pm 3.14	20.02 \pm 3.09	18.50 \pm 2.54	22.03 \pm 4.85	18.13 \pm 2.80
Total cholesterol (mg/dl)	72.94 \pm 13.62	62.96 \pm 10.27	70.02 \pm 9.48	68.73 \pm 11.98	88.76 \pm 14.94	81.95 \pm 7.40	86.48 \pm 12.95	101.22 \pm 18.63
Creatinine (mg/dl)	0.44 \pm 0.06	0.46 \pm 0.09	0.42 \pm 0.06	0.40 \pm 0.06	0.50 \pm 0.05	0.48 \pm 0.05	0.53 \pm 0.08	0.48 \pm 0.05
GGT	6.36 \pm 1.03	5.39 \pm 1.17	6.72 \pm 0.80	6.69 \pm 1.20	6.62 \pm 0.99	6.08 \pm 1.08	6.31 \pm 1.12	6.32 \pm 0.98
Glucose (mg/dl)	139.71 \pm 24.46	126.77 \pm 12.75	147.33 \pm 29.92	146.20 \pm 25.37	174.54 \pm 47.95	192.22 \pm 32.18	189.75 \pm 42.63	192.41 \pm 32.19
IP	10.19 \pm 1.41	10.04 \pm 1.01	9.57 \pm 0.54	9.60 \pm 0.72	9.39 \pm 1.79	9.70 \pm 1.29	10.19 \pm 2.03	9.58 \pm 1.65
LDH (mg/dl)	2764.65 \pm 1540.93	2204.46 \pm 1383.83	2137.58 \pm 978.84	2232.91 \pm 1436.10	2849.93 \pm 1349.05	2454.69 \pm 1097.75	2358.08 \pm 1324.41	2335.36 \pm 1077.32
Total bilirubin (mg/dl)	0.16 \pm 0.04	0.15 \pm 0.03	0.15 \pm 0.04	0.17 \pm 0.04	0.23 \pm 0.24	0.19 \pm 0.07	0.17 \pm 0.02	0.17 \pm 0.03
Total protein (g/dl)	5.69 \pm 0.34	5.73 \pm 0.27	5.67 \pm 0.28	5.87 \pm 0.31	6.58 \pm 0.64	6.29 \pm 0.37	6.65 \pm 0.32	6.45 \pm 0.41
Triglyceride (mg/dl)	76.22 \pm 39.85	50.21 \pm 22.73	66.04 \pm 32.71	84.18 \pm 44.66	67.59 \pm 38.00	61.07 \pm 45.64	70.40 \pm 28.85	54.93 \pm 19.73
Na (mmol/l)	165.56 \pm 18.52	164.70 \pm 16.81	164.89 \pm 12.14	157.63 \pm 16.55	146.30 \pm 10.58	144.30 \pm 5.31	138.20 \pm 7.69	147.22 \pm 11.33
K (mmol/l)	4.59 \pm 0.59	4.80 \pm 0.54	4.82 \pm 0.35	4.65 \pm 0.28	4.26 \pm 0.71	3.84 \pm 0.75	3.90 \pm 0.65	3.98 \pm 0.57
Cl (mmol/l)	116.11 \pm 12.61	117.20 \pm 10.50	116.33 \pm 6.56	112.75 \pm 12.38	106.20 \pm 6.56	105.60 \pm 4.45	103.40 \pm 3.60	105.56 \pm 5.59

Values are mean \pm SD of 10 rats.

The value with an asterisk is significantly different from vehicle control group by t-test (*: $p < 0.05$).

Table 9. Organ weight values in SD rats administered orally with antidiabetic herb extract microcapsule for 4 weeks

Sex	Dose (g/kg/day)	Male					Female				
		0	0.5	1	2	0	0.5	1	2		
Spleen	0.662 ± 0.092 ¹⁾	0.674 ± 0.099	0.717 ± 0.085	0.710 ± 0.101	0.513 ± 0.073	0.500 ± 0.101	0.516 ± 0.165	0.537 ± 0.146			
	0.183 ± 0.021 ²⁾	0.187 ± 0.024	0.197 ± 0.027	0.195 ± 0.024	0.231 ± 0.029	0.226 ± 0.035	0.239 ± 0.078	0.240 ± 0.051			
Liver	10.853 ± 0.739	11.204 ± 0.844	11.880 ± 1.496	12.431 ± 1.299*	8.162 ± 1.147	8.530 ± 0.713	8.053 ± 0.601	8.117 ± 0.873			
	3.006 ± 0.142	3.117 ± 0.189	3.250 ± 0.302*	3.434 ± 0.466*	3.672 ± 0.436	3.880 ± 0.304	3.741 ± 0.383	3.668 ± 0.340			
Kidney (L)	1.269 ± 0.112	1.363 ± 0.091	1.409 ± 0.145	1.432 ± 0.093*	0.788 ± 0.102	0.825 ± 0.080	0.810 ± 0.050	0.826 ± 0.110			
	0.352 ± 0.029	0.379 ± 0.016*	0.387 ± 0.042*	0.396 ± 0.046*	0.354 ± 0.036	0.374 ± 0.023	0.377 ± 0.038	0.372 ± 0.031			
Kidney (R)	1.299 ± 0.118	1.363 ± 0.111	1.414 ± 0.133	1.473 ± 0.129	0.807 ± 0.119	0.838 ± 0.099	0.817 ± 0.062	0.842 ± 0.126			
	0.360 ± 0.030	0.380 ± 0.025	0.388 ± 0.039	0.407 ± 0.053*	0.363 ± 0.045	0.380 ± 0.026	0.379 ± 0.034	0.379 ± 0.037			
Adrenal glands (L)	0.027 ± 0.005	0.027 ± 0.006	0.030 ± 0.003	0.029 ± 0.005	0.031 ± 0.005	0.043 ± 0.034	0.030 ± 0.002	0.027 ± 0.004*			
	0.008 ± 0.001	0.007 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.020 ± 0.019	0.014 ± 0.001	0.012 ± 0.002*			
Adrenal glands (R)	0.027 ± 0.005	0.028 ± 0.006	0.028 ± 0.009	0.060 ± 0.098	0.029 ± 0.005	0.037 ± 0.033	0.028 ± 0.005	0.025 ± 0.006			
	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.017 ± 0.028	0.013 ± 0.002	0.018 ± 0.018	0.013 ± 0.003	0.011 ± 0.003			
Thymus	0.544 ± 0.080	0.495 ± 0.098	0.548 ± 0.107	0.525 ± 0.069	0.537 ± 0.083	0.543 ± 0.099	0.543 ± 0.076	0.602 ± 0.143			
	0.151 ± 0.024	0.139 ± 0.032	0.150 ± 0.024	0.145 ± 0.023	0.242 ± 0.039	0.248 ± 0.049	0.252 ± 0.037	0.271 ± 0.062			
Heart	1.167 ± 0.059	1.138 ± 0.073	1.189 ± 0.078	1.219 ± 0.116	0.753 ± 0.069	0.733 ± 0.232	0.751 ± 0.085	0.754 ± 0.074			
	0.324 ± 0.015	0.317 ± 0.015	0.326 ± 0.019	0.335 ± 0.020	0.339 ± 0.028	0.339 ± 0.110	0.347 ± 0.027	0.340 ± 0.021			
Lung	1.328 ± 0.105	1.303 ± 0.121	1.349 ± 0.091	1.387 ± 0.103	1.090 ± 0.114	1.142 ± 0.103	1.054 ± 0.065	1.100 ± 0.142			
	0.368 ± 0.027	0.362 ± 0.020	0.370 ± 0.027	0.384 ± 0.048	0.491 ± 0.050	0.520 ± 0.058	0.488 ± 0.031	0.495 ± 0.040			
Brain	1.889 ± 0.100	1.928 ± 0.074	1.908 ± 0.095	1.899 ± 0.153	1.793 ± 0.102	2.382 ± 1.894	1.681 ± 0.072*	1.840 ± 0.130			
	0.525 ± 0.050	0.537 ± 0.025	0.525 ± 0.049	0.524 ± 0.055	0.809 ± 0.064	1.082 ± 0.843	0.781 ± 0.065	0.833 ± 0.074			
Pituitary	0.010 ± 0.002	0.021 ± 0.032	0.011 ± 0.003	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.002	0.011 ± 0.002	0.012 ± 0.003	0.012 ± 0.003			
	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0.008	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.001			
Testis (L)	1.518 ± 0.062	1.494 ± 0.128	1.591 ± 0.114	1.514 ± 0.092	0.417 ± 0.027	0.060 ± 0.008	0.052 ± 0.003	0.055 ± 0.008			
	0.422 ± 0.028	0.416 ± 0.029	0.437 ± 0.040	0.417 ± 0.092	0.417 ± 0.092	0.027 ± 0.003	0.024 ± 0.002	0.025 ± 0.003			
Testis (R)	1.493 ± 0.092	1.477 ± 0.134	1.560 ± 0.099	1.518 ± 0.083	1.518 ± 0.083	0.058 ± 0.011	0.056 ± 0.005	0.054 ± 0.008			
	0.414 ± 0.034	0.411 ± 0.030	0.428 ± 0.029	0.418 ± 0.023	0.418 ± 0.023	0.055 ± 0.009	0.026 ± 0.002	0.024 ± 0.003			
Prostate	0.948 ± 0.217	0.953 ± 0.195	0.977 ± 0.123	0.982 ± 0.117	0.982 ± 0.117	0.026 ± 0.005	0.026 ± 0.002	0.024 ± 0.003			
	0.261 ± 0.053	0.265 ± 0.050	0.268 ± 0.032	0.271 ± 0.038	0.271 ± 0.038	0.580 ± 0.225*	0.042 ± 0.16	0.433 ± 0.101			
Epididymis (L)	0.444 ± 0.042	0.433 ± 0.030	0.445 ± 0.019	0.437 ± 0.026	0.437 ± 0.026	0.175 ± 0.035	0.214 ± 0.070	0.197 ± 0.051			
	0.123 ± 0.011	0.121 ± 0.012	0.120 ± 0.005	0.121 ± 0.011	0.121 ± 0.011	0.058 ± 0.010	0.052 ± 0.003	0.055 ± 0.008			
Epididymis (R)	0.459 ± 0.035	0.413 ± 0.057	0.444 ± 0.023	0.449 ± 0.037	0.449 ± 0.037	0.026 ± 0.005	0.026 ± 0.002	0.024 ± 0.003			
	0.127 ± 0.011	0.115 ± 0.016	0.120 ± 0.006	0.124 ± 0.014	0.124 ± 0.014	0.381 ± 0.062	0.042 ± 0.16	0.433 ± 0.101			
Ovary (L)						0.175 ± 0.035	0.214 ± 0.070	0.197 ± 0.051			
						0.060 ± 0.008	0.052 ± 0.003	0.055 ± 0.008			
Ovary (R)						0.026 ± 0.005	0.024 ± 0.002	0.025 ± 0.003			
						0.058 ± 0.011	0.056 ± 0.005	0.054 ± 0.008			
Uterus						0.026 ± 0.005	0.026 ± 0.002	0.024 ± 0.003			
						0.381 ± 0.062	0.042 ± 0.16	0.433 ± 0.101			

¹⁾Absolute organ weight: g.²⁾Relative organ weight: g/100 g body weight.

Values are mean ± SD of 10 rats.

The value with an asterisk is significantly different from vehicle control group by t-test (*; p < 0.05).

무의 확인 및 반복투여시의 독성을 조사하기 위하여 SD 랫드에 0 및 2000 mg/kg/day의 용량으로 단회경구투여하였고, 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg/day의 용량으로 4주간 반복적으로 경구투여하였다. 단회투여독성시험결과, 본 시험조건하에서 사망동물은 관찰되지 않았으며 시험물질과 연관된 특기할만한 임상증상, 체중변화 및 부검 시 육안적 소견이 관찰되지 않았기에 LD₅₀치는 2000 mg/kg 이상일 것으로 판단된다.

4주 반복투여독성시험결과, 모든 시험군에서 시험기간 동안 시험물질로 인한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 체중의 변화는 지속적인 증가 추세를 보였으며 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 안검사 및 뇨검사에서 모든 투여군에서 대조군에 비하여 시험물질 투여와 관련된 유의성 있는 변화 및 특이 이상 소견이 관찰되지 않았으며 혈액학적 검사에서 모든 투여군에서 정상범위의 수치를 보였다. 사료섭취량은 모든 투여군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 대조군과의 상대중량 비교에서 수컷 500 mg/kg/day 투여군에서 좌측 신장의 유의적인 증가, 1000 mg/kg/day 투여군에서 간장과 좌측신장의 유의적인 증가, 2000 mg/kg/day 투여군에서 간장, 좌우측 신장의 유의적인 증가는 간장과 신장의 조직병리학적 소견을 고려해 볼 때 시험물질의 투여와 관련된 독성학적인 변화로 사료된다. 암컷의 경우 물섭취량은 대조군에 비해 3주째에 500 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 증가하였다. 대조군과의 상대중량 비교에서 500 mg/kg/day 투여군에서 자궁의 유의적인 증가, 2000 mg/kg/day 투여군에서 좌측부신의 유의적인 감소가 있었으며 간장과 신장의 조직병리학적 소견을 고려해 볼 때 시험물질의 투여와 관련된 독성학적인 변화가 있는 것으로 사료된다.

이상의 시험결과로 보아 본 시험조건하에서 한약추출고형물의 랫드에 대한 무해용량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 암컷 수컷 모두 500 mg/kg/day 이하인 것으로 사료된다.

참고문헌

- 식품의약품안전청 (1999). 의약품등의 독성시험기준. 식품의약품안전청고시 제 1999-61호.
- 안병민, 이동수, 백종태, 장성희, 장이선 (2002). 식물제제에 의한 간 손상의 빈도. 식품의약품안전청연구보고서, **6**, 1045-1046.
- 이영자, 김우성, 이창희, 허문희, 정지윤, 이선화, 김재이, 진종성, 김미경, 진선경, 이편자, 박영채, 홍기형 (2002). 유통 한약재의 잔류농약 및 잔류이산화황에 대한 모니터링. 식품의약품안전청보고서, **6**, 678-693.
- 통계청 (2002). 사인통계. 서울, 통계청.
- Farrar, P.L. (1997). Diagnostic Exercise: Interstitial Pneumonia in Viral and Mycoplasma Antibody-Free Sprague Dawley Rats. *ACLAD NEWSLETTER (American Committee on Laboratory Animal Diseases)*, Fall Vol. 18, No. 1.
- Greaves, P. (2000). Histopathology of preclinical toxicity studies; Interpretation and relevance in drug evaluation. Elsevier, Amsterdam.
- Kim, S.Y., Yoo, S.H. and Chung, S.H. (2002). Antidiabetic effects of ginseng radix alba (GRA) and mori folium (MF) on multiple low dose streptozotocin-induced diabetic rats. *Yakhak Hoeji*, **46**, 411-415.
- Lee, H.S., Km, S.T. and Cho, K.C. (1981). Effects of *Rhemanniae Radix* water extract on the renal function and renin secretion rate in unanesthetized rabbits. *American Journal of Chinese Medicine*, **111**, 179-186.
- Mogensen, C.E. and Anderson, M.J.F. (1973). Increase kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes*, **22**, 706-712.
- Vanherweghem, J.L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R. and Vanhaelen, M. (1993). Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet*, **341**, 387-391.
- Wolford, S.T., Schroer, R.A. and Gohs, F.X. (1986). Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J. Tox. Env. Health*, **18**, 161-188.