

Original Article

세균을 이용한 십전대보탕 복귀돌연변이 시험

마진열, 황대선, 이남현, 하혜경, 유영범, 신현규

한국한의학연구원

Bacterial Reverse Mutation Test of *Sipjeondaebo-tang*

Jin-Yeul Ma, Dae-Sun Huang, Nam-Hun Lee, Hye-Kyung Ha, Young-Beob Yu, Hyun-Kyoo Shin

Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives: This study was to assess the toxicity of *Sipjeondaebo-tang* by bacterial reverse mutation test.

Methods: In this study, to evaluate the bacterial reverse mutation of *Sipjeondaebo-tang* water-extract, the *in vitro* Ames test using *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1,535, TA1,537) and *Escherichia coli*(WP2uvrA) were performed with *Sipjeondaebo-tang* water extract at the concentrations 0, 312, 625, 1250, 2500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$.

Results: *Sipjeondaebo-tang* water extract was negative in Ames test with both *Salmonella typhimurium* or *Escherichia coli* with and without rat liver microsomal enzyme (S9- fraction and S+ fraction).

Conclusions: According to these results, we concluded that a *Sipjeondaebo-tang* water extract did not cause bacterial reverse mutation.

Key Words : *Sipjeondaebo-tang*, reverse mutation, Ames test, *Escherichia coli*, Shiquan dabu-decoction

서론

한의학에서 십전대보탕은 보약의 일종으로 보기의 사군자탕과 보혈의 사물탕을 합방하여 온양거한의 성질이 있는 황기와 육계를 가미하여 위로 고표하고 아래로 인화귀원하게 함을 뜻하며 좌혈우기와 음양의 쇠함을 온전케 함을 의미한다고 알려져 있다.

십전대보탕은 오랫동안 면역기능 향진요법 등에 응용되어 왔는데, 항암 화학요법과 방사선치료 및 수술후의 부작용을 줄이고 전이를 억제시키는 것으로 알려져 왔다¹⁻³⁾. 그 외 NK cell 및 NKT

cell을 활성화시키고 IFN- γ 생성을 늘려서 항암효과를 가진다는 연구보고가 있었다⁴⁻⁶⁾. 또한 동물 실험모델에서 이식된 종양세포의 성장을 억제시킴을 관찰하였고⁷⁾, 그 기전으로는 macrophage, T cell⁸⁻⁹⁾ 및 NKT cell¹⁰⁻¹¹⁾ 이 관여하는 것으로 알려져 있다.

면역학 관련 연구도 많이 이루어졌는데 hematopoietic stem cell 성장을 촉진하고¹²⁾ melanocytic tumor cell 성장의 T cell 매개 억제를 촉진한다는¹³⁾ 연구 결과도 보고되었다. 또한 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ 등의 사이토카인 활성화에 영향을 미친다는 보고가 있었다¹⁴⁻¹⁶⁾.

최근에 효능평가와 별개로 근래 논쟁이 되고 있는 한약처방의 독성과 안전성 문제에 대한 자료를 확보하기 위하여, 본 연구팀에서는 십전대보탕의 급성독성 및 아급성 독성을 실험동물 rat(SD)

· 접수 : 2008년 3월 7일 · 채택 : 2008년 5월 7일
· 교신저자 : 신현규, 한국한의학연구원 한약제제연구부
(Tel : +82-42-868-9464, Fax : +82-42-868-9471,
E-mail : hkshin@kiom.re.kr)

를 이용하여 안전성 평가를 실시하였다. 그 결과 일반독성 시험에서 아무런 독성증상이 관찰되지 않았다. 그리고 유전독성 자료를 확보하기 위하여 유전독성 시험 중 복귀돌연변이시험¹⁷⁻¹⁸⁾을 식품의약품 안전청 고시 제 2005-60호 “비 임상시험 관리기준¹⁹⁾” 및 OECD guidelines²⁰⁾에 따라 수행함으로써 십전대보탕의 안전성 평가를 실험적으로 증명하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재료

十全大補湯의 한약재 구성은 人蔘(Ginseng Radix

Alba), 白朮(Atractylodes Rhizome White), 白茯苓(Poria), 甘草(Glycyrrhizae Radix), 當歸(Angelicae gigantis Radix), 川芎(Cnidii Rhizome), 熟地黄(Rehmannia Radix), 芍藥(Paeoniae Radix), 黃芪(Astragali Radix), 肉桂(Cinnamomi Cortex)로 생산자 및 재배지역이 명확한 한약재를 구입하였다 (Table 1). 본 연구에서는 전탕 추출법(한국, 경서 추출기 cosmos-600)에 의한 시험물질 조제를 실시하였으며 각 한약재 100g(Table 1)을 8000ml의 증류수에 넣어 120분간 열탕 추출한 후, 건조분무기(Japan, Eyela SD-1000)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다. 이를 투여 직전에 3차 증류수에 용해하여 실험에 공시하였다(수율 16.5%).

Table 1. Origins of ten constituent herbs of *Sipjeondaebo-tang*(shiquan dabu decoction)

약재명	생산자(수입자)	제조사	소매자
인삼	충청남도 금산군	충남 금산군 금산읍 하옥리 386-22	대전 동구 중동 23-4번지백제건재도매
백출	강원도 영월군 읍덕포 5리 화림백출	부산광역시 남구 용호 3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)	부산광역시 남구 용호 3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)
백복령	강원도 고성군 거진읍 거진7리 2반 구강물산	경북 영주시 하망동 548-3 감초당 약업사	서울 동대문구 제기동 837번지 농림생약
감초(炙)	중국	전남여수시 오천동 174-1 신흥제약	전남여수시 오천동 174-1 신흥제약
당귀	강원도 평창군	강원 평창진부 하진부 681-1	강원 평창진부 하진부 681-1
천궁	전북 무주군 설천면 삼거리 226	전북 무주읍 가옥리 631-2 남영제약	전북 무주군 무주읍 가옥리 631-2 남영제약
숙지황	전북 정읍시	전북 정읍시 용동면 칠석리 150-2 칠보 농협 용동제약사	전북 정읍시 용동면 칠석리 150-2 칠보 농협 용동제약사
작약	전라남도 화순군	전남 화순군 능주면 백암리 871-1	전남 화순군 화순읍 교리 243-5 전남생약 농업협동조합
황기	강원도 정선군	강원도 정선군 정선읍 봉양리 354-1 정선농협	강원도 정선군 정선읍 봉양리 354-1 정선농협
육계	베트남	부산광역시 남구 용호3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)	부산광역시 남구 용호3동 377-3 시범공단내 화림제약(주)

2. 방법

1) 균주 및 배지

(1) 균주: 시험에 사용한 균주는 OECD 가이드 라인에 명기된 균주에서 선택하였고, 이 균주들은 미생물복귀돌연변이시험에서 널리 사용하고 있으며 기초 데이터가 풍부하기 때문에 선정하였다. 모든 균주는 Molecular Toxicology Inc.에서 입수하고 형질을 확인한 후 계대증인 것을 사용하였다.

염기쌍치환형: *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 and *Escherichia coli* WP2uvrA

Frame-shift 형: *Salmonella typhimurium* TA98, TA1537

(2) 배지: 시험균주들은 각각의 master plate로부터 15mL의 전배양액 (2.5% Oxoid nutrient broth NO.2) 에 접종해 Shaking incubator (37°C, 180rpm) 에서 약 10시간 배양하여 사용하였다. 최소배지 (minimal glucose agar plate) 는 1.5% Bacto agar (Difco) 와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유한 것을 25mL씩 분주하여 사용하였다. Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 4개 균주용 top agar에는 0.5mM histidine-biotin, 대장균용 균주에는 0.5mM tryptophan을 각각 100mL당 10mL씩 첨가하였다.

2) 시험물질 및 양성대조물질

시험물질은 수용성이기 때문에 증류수를 용매로 선택하여 희석하였다. 양성대조물질은 OECD 가이드라인에 명기되어 있는 물질을 선택하였으며 양성 대조물질로는¹⁾ (S9-) Sodium azide (NaN₃, Wako Pure Chem)적용: TA1535 (0.5µg/plate),²⁾ (S9-), 9-aminoacridine (9-AA, Sigma Chemical Co.) 적용: TA1537 (80µg/plate),³⁾ (S9-), 2-(2-furyl)-3-

(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2, Wako Pure Chem. Ind. Ltd) 적용: TA98 (0.1µg/plate), TA100 (0.01 µg/plate) and *E. coli* WP2uvrA (0.01µg/plate),⁴⁾ (S9+), 2-aminoanthracene (2-AA, Wako Pure Chem. Ind. Ltd) 적용: TA98 (0.5µg/plate), TA100 (1.0µg/plate), TA1535 (2.0µg/plate), TA1537 (2.0µg/plate) and *E. coli* WP2uvrA (10 µg/plate) 4종 사용하였다.

3) 균주의 보관 및 형질확인

(1) 균주의 보관: 배양한 균배양액 0.8mL당 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.07mL을 가하여 냉동보관용 tube에 채워 dry ice에서 동결시킨 후 초저온 냉동고내에 보관하였으며, 형질이 확인된 균주의 master plate를 제작, 시험에 사용하였다.

(2) 균주의 형질확인: 균주의 형질확인을 위해 *Salmonella typhimurium* 균주들의 경우 histidine 요구성 여부, uvrB mutation 유지 여부, R-factor 유지 여부, rfa 돌연변이의 유지 여부 및 spontaneous revertant의 수 등을 검사하였고, *Escherichia coli* WP2uvrA 균주에 있어서는 tryptophan 요구성 여부, uvrA mutation 유지 여부 및 spontaneous revertant의 수 등을 검사하였다.

4) 대사활성계 (S9 Mix)

(1) S9의 기원은 Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫트의 간(Molecular Toxicology Inc.)를 사용하였고 단백질함량은 40.8mg/ml, -80°C에서 보관하였다.

(2) Cofactor는 Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)을 사용하였으며 명칭은 Cofactor-I로 냉장 보관하였다.

(3) S9 Mix의 1mL 중의 조성은

- S-9 : 0.1mL
- MgCl : 8 μ mol
- KCl : 33 μ mol
- Glucose-6-phosphate : 5 μ mol
- NADPH : 4 μ mol
- NADH : 4 μ mol
- Sodium phosphate buffer (pH 7.4) : 100 μ mol

5) 시험물질 및 양성대조물질의 조제

(1) 시험물질 조제: 시험물질은 농도 설정 시험에는 최고 농도를 5000 μ g/plate (100mg/mL)로 하여 1000, 500, 100 및 50 μ g/plate로 단계 희석하여 5단계 농도를 조제하였고, 본 시험에서는 5000 μ g/plate를 최고농도로 하여 공비 2로 단계 희석하여 5단계 농도로 시험물질을 조제하였다.

(2) 양성대조물질 조제: Sodium azide는 증류수에 용해하였으며 나머지 3개의 물질은 DMSO에 용해하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 양성대조물질은 사용하기 바로 전에 녹여서 사용하였다.

6) 시험방법

(1) 시험물질처리: 시험물질의 처리는 pre-incubation 방법으로 하였다. 건열 멸균한 tube에 시험물질용액 50 μ L, S-9mix (또는 pH7.4의 0.1M sodium-phosphate buffer) 0.5mL, 균 배양액 0.1mL을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 진탕 (180rpm) 시킨 후 top agar를 2mL씩 분주한 다음 혼합하고 즉시 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳게 하였다. 음성대조군은 시험물질 용액 대신 용매 50 μ L를, 양성대조군은 양성대조물질용액을 같은 방법으로

가하여 실시하였다. 시험물질 및 S9mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고 농도액 0.1mL과 S9mix 0.1mL을 각각 2mL의 top agar에 혼합하여 플레이트를 제작하였다.

처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 플레이트를 뒤집어 37 $^{\circ}$ C에서 약 48시간 배양 후 복귀돌연변이 집락을 계수했으며, 농도군 당 3개의 플레이트를 사용하였다.

(2) 농도결정시험: 본 시험의 처리 최고농도를 결정하기 위해 농도를 0, 50, 100, 500, 1000 및 5000 μ g/plate의 범위로 대사활성계 적용 (S9+) 및 미적용(S9-) 하에 5균주로 시험을 하였다. 그 결과 농도 5000 μ g/plate 에서 모든 균주에서 복귀돌연변이 집락 수의 감소 경향이 보이지 않았다.

(3) 본시험: 농도결정시험을 근거로 5000 μ g/plate를 최고농도로 하고 공비 0.5로 5단계 농도군(312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 μ g/plate)으로 설정하고 각 농도당 3개의 plate를 사용하여 본시험을 실시하였다.

(4) 확인시험: 시험의 재현성을 확인하기 위하여 본시험과 같은 방법으로 시험을 실시하였다.

결 과

시험결과는 각 시험군 당 3플레이트로부터 얻은 집락 수의 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.(Table 2-4)

결과의 판정은 대사활성계 존재 유, 무에 관계없이 최소 1개의 균주에서 plate 당 복귀된 colony 수가 음성대조군에 비해 명확히 2배 이상이면서, 용량 의존성을 가지며, 그 작용에 재현성이 인정될 경우 양성으로 판정하였다.

Table 2. Result of preliminary range-finding test (group summary)

Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.)[Factor] ^{a)}	
			Without S-9 mix	With S-9 mix
TA98	Test	0	18 \pm 3	27 \pm 3
	Item	50	22 \pm 2 [1.2]	21 \pm 2 [0.8]
		100	18 \pm 6 [1.0]	20 \pm 1 [0.7]
		500	21 \pm 6 [1.2]	27 \pm 2 [1.0]
		1000	20 \pm 3 [1.1]	26 \pm 3 [1.0]
		5000	25 \pm 4 [1.4]	31 \pm 1 [1.1]
TA100	Test	0	101 \pm 12	95 \pm 12
	Item	50	107 \pm 19 [1.1]	97 \pm 9 [1.0]
		100	104 \pm 8 [1.0]	93 \pm 10 [1.0]
		500	102 \pm 8 [1.0]	92 \pm 7 [1.0]
		1000	107 \pm 11 [1.1]	101 \pm 12 [1.1]
		5000	129 \pm 9 [1.3]	105 \pm 12 [1.1]
TA1535	Test	0	9 \pm 2	9 \pm 1
	Item	50	8 \pm 2 [0.9]	8 \pm 2 [0.9]
		100	8 \pm 2 [1.0]	8 \pm 2 [0.9]
		500	7 \pm 1 [0.8]	8 \pm 4 [0.8]
		1000	11 \pm 1 [1.3]	7 \pm 2 [0.8]
		5000	13 \pm 3 [1.5]	7 \pm 4 [0.8]
TA1537	Test	0	11 \pm 2	12 \pm 4
	Item	50	9 \pm 1 [0.8]	20 \pm 3 [1.6]
		100	11 \pm 5 [1.0]	14 \pm 4 [1.2]
		500	10 \pm 5 [0.9]	17 \pm 2 [1.4]
		1000	10 \pm 3 [0.9]	17 \pm 3 [1.4]
		5000	9 \pm 3 [0.8]	11 \pm 3 [0.9]
WP2uvrA	Test	0	41 \pm 5	59 \pm 3
	Item	50	49 \pm 8 [1.2]	62 \pm 10 [1.1]
		100	56 \pm 5 [1.3]	65 \pm 6 [1.1]
		500	56 \pm 7 [1.4]	64 \pm 4 [1.1]
		1000	52 \pm 10 [1.3]	74 \pm 7 [1.2]
		5000	56 \pm 14 [1.4]	73 \pm 8 [1.2]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	390 \pm 23 [22.1]	
TA100	AF-2	0.01	474 \pm 17 [4.7]	
TA1535	NaN3	0.5	202 \pm 43 [23.3]	
TA1537	9-AA	80.0	654 \pm 52 [59.5]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	394 \pm 57 [9.5]	
TA98	2-AA	0.5		371 \pm 39 [13.6]
TA100	2-AA	1.0		503 \pm 20 [5.3]
TA1535	2-AA	2.0		184 \pm 21 [19.7]
TA1537	2-AA	2.0		271 \pm 20 [22.6]
WP2uvrA	2-AA	10.0		427 \pm 29 [7.2]

a) No. colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate
 NaN3 : sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

Table 3. Reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium* treated with *Sipjeondaebo-tang* water extract.

Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.)(Factor) ^{a)}	
			Without S-9 mix	With S-9 mix
TA98	Test	0	21 \pm 4	28 \pm 10
	Item	312.5	18 \pm 3 [0.9]	27 \pm 3 [1.0]
		625	21 \pm 3 [1.0]	23 \pm 2 [0.8]
		1250	20 \pm 3 [1.0]	24 \pm 6 [0.9]
		2500	25 \pm 5 [1.2]	26 \pm 7 [0.9]
		5000	30 \pm 1 [1.5]	28 \pm 5 [1.0]
TA100	Test	0	106 \pm 18	96 \pm 13
	Item	312.5	110 \pm 11 [1.0]	97 \pm 9 [1.0]
		625	108 \pm 6 [1.0]	92 \pm 19 [1.0]
		1250	92 \pm 9 [0.9]	91 \pm 16 [0.9]
		2500	109 \pm 6 [1.0]	99 \pm 30 [1.0]
		5000	116 \pm 20 [1.1]	100 \pm 22 [1.0]
TA1535	Test	0	11 \pm 1	19 \pm 5
	Item	312.5	13 \pm 1 [1.2]	13 \pm 1 [0.7]
		625	11 \pm 3 [1.0]	18 \pm 3 [0.9]
		1250	11 \pm 5 [1.0]	13 \pm 2 [0.7]
		2500	10 \pm 2 [0.9]	14 \pm 2 [0.7]
		5000	11 \pm 1 [1.0]	15 \pm 3 [0.8]
TA1537	Test	0	10 \pm 1	9 \pm 4
	Item	312.5	6 \pm 3 [0.6]	9 \pm 2 [1.1]
		625	5 \pm 3 [0.5]	8 \pm 2 [0.9]
		1250	5 \pm 2 [0.5]	8 \pm 3 [0.9]
		2500	5 \pm 2 [0.5]	10 \pm 1 [1.2]
		5000	8 \pm 4 [0.8]	4 \pm 1 [0.5]
WP2uvrA	Test	0	32 \pm 7	39 \pm 4
	Item	312.5	29 \pm 6 [0.9]	44 \pm 4 [1.1]
		625	39 \pm 11 [1.2]	50 \pm 9 [1.3]
		1250	39 \pm 5 [1.2]	37 \pm 1 [0.9]
		2500	31 \pm 3 [1.0]	37 \pm 4 [1.0]
		5000	34 \pm 5 [1.1]	41 \pm 13 [1.1]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	503 \pm 28 [24.4]	
TA100	AF-2	0.01	521 \pm 39 [4.9]	
TA1535	NaN3	0.5	201 \pm 35 [18.2]	
TA1537	9-AA	80.0	765 \pm 39 [76.5]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	416 \pm 32 [13.0]	
TA98	2-AA	0.5		367 \pm 8 [13.3]
TA100	2-AA	1.0		658 \pm 41 [6.8]
TA1535	2-AA	2.0		214 \pm 13 [11.1]
TA1537	2-AA	2.0		218 \pm 23 [25.2]
WP2uvrA	2-AA	10.0		222 \pm 31 [5.7]

a) No. colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

NaN3 : sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

Table 4. Reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium* treated with *Sipjeondaebo-tang* water extract(reproducibility test).

Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.)(Factor) ^{a)}	
			Without S-9 mix	With S-9 mix
TA98	Test	0	18 \pm 5	24 \pm 3
	Item	312.5	16 \pm 3 [0.9]	24 \pm 3 [1.0]
		625	20 \pm 7 [1.1]	18 \pm 9 [0.8]
		1250	14 \pm 3 [0.8]	23 \pm 4 [1.0]
		2500	20 \pm 3 [1.1]	22 \pm 8 [0.9]
		5000	22 \pm 7 [1.2]	26 \pm 6 [1.1]
TA100	Test	0	101 \pm 10	89 \pm 8
	Item	312.5	106 \pm 13 [1.0]	95 \pm 10 [1.1]
		625	107 \pm 21 [1.1]	85 \pm 12 [1.0]
		1250	93 \pm 9 [0.9]	90 \pm 14 [1.0]
		2500	104 \pm 9 [1.0]	100 \pm 7 [1.1]
		5000	124 \pm 24 [1.2]	115 \pm 13 [1.3]
TA1535	Test	0	15 \pm 6	14 \pm 2
	Item	312.5	18 \pm 2 [1.2]	13 \pm 4 [0.9]
		625	13 \pm 8 [0.9]	16 \pm 5 [1.1]
		1250	19 \pm 6 [1.3]	14 \pm 7 [1.0]
		2500	17 \pm 6 [1.2]	19 \pm 2 [1.3]
		5000	16 \pm 2 [1.1]	19 \pm 1 [1.3]
TA1537	Test	0	7 \pm 3	9 \pm 1
	Item	312.5	6 \pm 3 [0.9]	9 \pm 0 [1.0]
		625	7 \pm 2 [1.1]	7 \pm 5 [0.8]
		1250	5 \pm 1 [0.8]	9 \pm 3 [1.0]
		2500	5 \pm 2 [0.8]	10 \pm 2 [1.1]
		5000	4 \pm 1 [0.6]	10 \pm 3 [1.1]
WP2uvrA	Test	0	34 \pm 4	37 \pm 4
	Item	312.5	34 \pm 8 [1.0]	45 \pm 5 [1.2]
		625	42 \pm 10 [1.2]	41 \pm 2 [1.1]
		1250	33 \pm 4 [1.0]	43 \pm 4 [1.2]
		2500	38 \pm 10 [1.1]	40 \pm 8 [1.1]
		5000	40 \pm 10 [1.2]	39 \pm 4 [1.1]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	388 \pm 22 [21.2]	
TA100	AF-2	0.01	472 \pm 52 [4.7]	
TA1535	NaN3	0.5	182 \pm 32 [12.4]	
TA1537	9-AA	80.0	707 \pm 16 [106.0]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	371 \pm 30 [10.9]	
TA98	2-AA	0.5		393 \pm 12 [16.6]
TA100	2-AA	1.0		577 \pm 41 [6.5]
TA1535	2-AA	2.0		181 \pm 10 [12.6]
TA1537	2-AA	2.0		222 \pm 41 [25.6]
WP2uvrA	2-AA	10.0		392 \pm 53 [10.6]

a) No. colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate
 NaN3 : sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

고 찰

십전대보탕의 안전성 평가를 확인하기 위하여 본 연구팀에서는 십전대보탕의 급성독성 및 아급성 독성을 실험동물 rat(SD)를 이용하여 안전성 평가를 실시하였다. 그 결과 일반독성 시험에서 아무런 독성증상이 관찰되지 않았다. 그리고 유전독성 자료를 확보하기 위하여 십전대보탕 추출물의 세균에 있어서의 유전자 돌연변이 유발성 여부를 검색하기 위하여 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537의 4개의 균주와 대장균 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA 균주를 이용하여 복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 시험물질은 증류수에 용해하여 처리하였으며, 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)하에 0, 312, 625, 1250, 2500 및 5000µg/plate의 농도군과 음성 및 양성대조군으로 시험군을 구성해 본 시험을 실시하였다. 시험물질 용액 및 S9 Mix의 무균성을 확인하기 위한 무균시험에서 플레이트에 미생물의 오염에 의한 콜로니는 나타나지 않았다. 시험에 사용한 5개 균주의 생균수는 단계희석법을 통하여 측정된 결과 1.0~9.9×10⁹ CFU/mL로 적정 수준이었다. 본시험 결과 시험물질을 처리한 균주에서 용매 대조군보다 콜로니 생성수의 증가는 관찰되지 않았다. 또한 양성 대조군에서는 각각의 균주에 대해 용매 대조군의 콜로니 수 보다 복귀돌연변이 colony수가 현격히 증가되었다. 이상의 시험결과를 종합할 때, 시험물질 십전대보탕은 본 시험조건 하에 사용한 시험균주들의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 물질로 사료된다.

결 론

1. 조제한 시험물질, 용매 및 S9 Mix에 대한 무균 시험결과 균은 관찰되지 않았다.

2. 농도 설정시험(예비시험) 중, 5000µg/plate의 모든 균주에서 생육 저해가 관찰되지 않았으며, 시험에 사용된 모든 균주에서 음성대조군과 차이가 없음이 나타났다.
3. 본 연구에서 설정된 투여 용량은 고농도 5000 µg/plate를 기준으로 하여, 아래로 공비 0.5로 2500, 1250, 625 및 312.5µg/plate로서 음성 및 양성대조군과 함께 대사활성화법 미적용(S9-) 및 적용(S9+) 시험을 함께 실시하였다.
4. 십전대보탕 추출물의 세균에 대한 돌연변이 유발성 검토를 위해 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA98, TA100, TA1535, TA1537의 4개 균주와 대장균 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA 균주를 이용한 복귀돌연변이 집락수를 조사하였다. 그 결과 시험물질을 처리한 모든 단계별 농도에서 콜로니 수는 음성 대조군에 비해 증가되지 않았다. 그러나 모든 양성대조군에서는 콜로니수가 음성대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다.
5. 십전대보탕 추출물은 5개의 시험 균주 모두에게 복귀돌연변이시험은 음성으로 작용하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Saiki I. A Kampo medicine "Juzen-taiho-to"-prevention of malignant progression and metastasis of tumor cells and the mechanism of action. *Biol Pharm Bull* 2000;23:677-688.
2. Ohnishi Y. Fujii H. Hayakawa Y. Yamamura T. Sakamoto T. Tsukada K. Fujimaki M. Nunome S. Komatsu Y. Saiki I. Oral administration of a Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer*

- Res:1998;89:206-213.
3. Saiki I, Yamamura T, Ohnishi Y, Hayakawa Y, Komatsu Y, Nunome S. HPLC analysis of juzen-taiho-to and its variant formulations and their antimetastatic efficacies. *Chem. Pharm. Bull.*:1999;47:1170-1174.
 4. Matsumoto T, Sakurai M, H. Kiyohara H, Yamada H. Immunopharmacol. Orally administered decoction of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To" modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. *Immunopharmacol*:2000;46:149-161.
 5. Miyagami M, Katayama Y. Improvement of host-immunity by adjuvant therapy with juzen-taiho-to for patients with brain tumors. *No Shinkei Geka*:2003;31:401-409.
 6. Utsuyama M, Seidler H, Kitagawa M, Hirokawa K. Immunological restoration and anti-tumor effect by Japanese herbal medicine in aged mice. *Mech. Ageing Dev*:2001;122:341-352.
 7. Ohnishi Y, Fujil H, Kimura F, et al. Inhibitory effect of traditional Chinese medicine Juzentailio-to on progressive growth of weakly malignant clone cells derived from murine fibrosarcoma. *Jpn J Cancer Res*:1996;87:1039-1044.
 8. Maruyama H, Takemoto N, Maruyama N, Kornatsu Y, Kawamura H. Antitumor effect of Juzen-taiho-to, a kampo medicine, combined with surgical excision of transplanted Meth-A fibrosarcoma. *Int J Immunother*:1993;9:117-125.
 9. Zhang YH, Kato M, Isobe K, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes. *Cell Immunol*.1995;162;97-104.
 10. Ohnishi Y, Fujil H, Kimura F, et al: Inhibitory effect of traditional Chinese medicine Juzentailio-to on progressive growth of weakly malignant clone cells derived from murine fibrosarcoma. *Jpn J Cancer Res*.1996;87:1039-1044.
 11. Hisha H, Yamada H, Sakurai MH, Kiyohara H, Li Y, Yu C, Takemoto N, Kawamura H, Yamaura K, Shinohara S, Komatsu Y, Aburada M, Ikehara S. Isolation and identification of hematopoietic stem cell-stimulating substances from Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-taiho-to. *Blood*:1997;90:1022-1030.
 12. Dai Y, Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Akhand AA, Hossain K, Suzuki H, Nakashima I. T-cell-immunity-based inhibitory effects of orally administered herbal medicine juzen-taiho-to on the growth of primarily developed melanocytic tumors in RET-transgenic mice. *J Invest Dermatol*:2001;117:694-701.
 13. Kiyohara H, Yamada H, Takemoto N, Kawamura H, Komatsu Y, Oyama T. Characterization of *in vitro* IL-2-production-enhancing and anticomplementary pectic polysaccharides from Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to. *Phytotherapy Res*:1993;7:367-375.
 14. Iijima K, Sun S, Cyong JC, Jyonouchi H: Juzen-taiho-to, a Japanese herbal medicine, modulates type-1 and type-2 T cell responses in old BALB/c mice. *Am J Chin Med*:1999; 27:191-203.
 15. Matsumoto T, Yamada H: Orally administered kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to modulates cytokine secretion in gut associated lymphoreticular tissues in mice. *Phytomedicine*:2000;6:425-430.
 16. Matsumoto T, Matsumi H, Sakurai H, Kiyohara H, Yamada H. Orally administered decoction of kampo (Japanese herbal) medicine

(424) 대한한의학회지 제29권 제3호 (2008년 7월)

- Juzen-taiho-to modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. Immunopharmacology:2000;46:149-161.
17. 송시환, 양덕춘, 정세영. 산삼배양추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험. J.Fd Hyg. Safety 2004;19(4),193-107
 18. Maron, D.M. and Ames, B.N., Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res. 1983;113, 173-215
 19. 비임상시험관리기준(식품의약품안전청고시 제 2005-60호, 2005)
 20. OECD guidelines for the testing of chemicals, No. 471 'Bacterial Reverse Mutation Test' (1997)