

## WHW<sup>®</sup>의 랫드에서의 반복경구투여 독성에 관한 연구

오탈우<sup>1</sup>, 배효상<sup>2</sup>, 윤철호<sup>3</sup>, 박용기<sup>1,\*</sup>

1: 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교부속 일산한방병원 사상체질과,  
3 : 동국대학교 분당한방병원

### Thirteen-week repeated-dose oral toxicity study of the Modified Wenpitang-Hab-Wulingsan (WHW<sup>®</sup>) in Sprague-Dawley rats

Tae-Woo Oh<sup>1</sup>, Bae-Hyo Sang<sup>2</sup>, Cheol-Ho Yoon<sup>3</sup>, Yong-Ki Park<sup>1,\*</sup>

1: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea  
2 : Department of Sassang Constitutional Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital, Goyang 410-773, Republic of Korea  
3 : Department of Internal Medicine, Orient Medical College, Dongguk University Bundang Oriental Hospital, Seongnam 463-865, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : We investigated the repeated-dose toxicity of Wenpitang-Hab-Wulingsan(WHW), a Korean traditional medicine prescribed with twelve herbs, which has been used for the treatment of renal disease.

**Methods** : WHW extract prepared by GLP company. WHW was supplemented by gavage at 0, 100, 500 and 1000 mg/kg/day for 13-week consecutive days. We recorded the clinical signs of toxicity, body weight, organ weights, hematology, gross and histological changes in target organs rats and clinical chemistry analysis for all rats.

**Results** : WHW extract at all doses was shown no mortality or abnormal clinical signs in rats during at the observation period. Furthermore, there was no difference in body weight and food-take consumption, organ weight, gross pathological findings, and urine analysis among the groups of rats treated with different doses of WHW extract. The hematological analysis and clinical blood chemistry data were revealed no toxic effects from WHW-treated rats.

**Conclusions** : The results suggest that WHW extract in rats is a wide margin of safety on a acute toxicity.

**Key words** : WHW, rat, safety, repeated-dose oral toxicity, acute toxicity.

## 서론

최근 의료기술과 현대의학의 발전에도 불구하고 많은 질병들이 여전히 근본적인 치료가 어려우며, 장기간에 걸쳐 약물투여를 해야 하는 만성질환에는 합성의약품을 통한 약물요법이 심각한 부작용을 유발하여 치료에 한계가 있다. 따라서 최근 국내외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품 개발에 관한 관심이 증가되고 있으며, 합성의약품에 비해 부작용이 적고 개발기간 및 비용이 절감된다는 장점 때문에 활발한 연구가 진행되고 있다. 한편, 한약재와 같은 천연물에서 발효, 정제, 추출과정으로 얻는 의약품들은 천연물 고유의 부작용이 있는 경우도 있지만, 내성발현, 약효, 농약이나 중금속, 고의적

약물 첨가에 의한 독성이나 대량생산의 문제점 등으로 그 수가 한정되어 있어 아직은 많은 의약품들이 합성의약품으로 개발되고 있다<sup>1,2)</sup>.

현재 한약재들은 한약제제, 생약제제, 천연물 의약품의 원료로서 뿐만 아니라, 건강기능성 식품 등의 재료로 일반인들의 민간요법에서부터 의약품에 이르기까지 다양하게 사용되고 있다<sup>2-4)</sup>. 그러나 한약재를 통한 천연물 의약품이 의약품으로 인정받기 위해서는 체계적인 품질관리, 일반 의약품과 동등한 수준의 임상시험을 통한 약효의 증명, 안전성이 보장된 표준화된 약물이어야 한다<sup>2)</sup>.

한편, 한약의 안전성에 대한 논란은 여전히 제기되고 있으며, 주로 잔류농약, 불순물, 중금속 등에 의한 오염, 간이나

\*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실.  
· Tel : 054-770-2661, · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr  
· 접수 : 2010년 8월 6일 · 수정 : 2010년 8월 31일 · 채택 : 2010년 9월 13일

신장에 독성 유발, 특정 성분에 의한 중독, 알레르기 유발 등이 주요 문제점으로 지적되고 있다<sup>5,6)</sup>. 이의 문제점을 극복하고 한약에 대한 잘못된 인식을 바로 잡으려면 한약과 원료 한약재의 독성에 대한 체계적인 검증으로 안전성을 입증하는 것이 반드시 필요한데 한약이나 한약재 자체의 독성에 관한 연구는 상대적으로 주목을 받지 못하고 있는 실정이다.

만성신부전(chronic renal failure; CRF)은 신장이 수개월에서 수년에 걸쳐 서서히 점차적으로 망가져서 배설기능이 정상상의 25% 이하로 떨어지고, 사구체여과 기능이 영구적으로 감소되어 신장 기능의 회복이 거의 불가능한 상태를 의미하며, 현재 치료방법으로는 혈당과 혈압 조절약물, 식이요법 등이 이용되고 있으나 모두 신장의 기능을 원래대로 회복시킬 수는 없으며 결국 혈액투석이나 복막투석, 신장이식 등의 대체요법 단계로 가게 되고 이에 따른 부작용이 심각한 만성적인 난치성 질환이다. 따라서 부작용은 적고, 효과가 우수한 새로운 치료제 개발이 절실한 상황이다.

WHW(加減溫脾湯合五苓散, modified Wenpitang-Hab-Wulingsan)은 五苓散에 溫脾湯을 加減한 처방으로서 한방임상에서 慢性腎不全患者의 요독증 증상이 脾腎陽虛로 濁陰이 上逆하여 발생하는 것에 기초하여 利水劑인 五苓散에 脾腎陽虛를 도우는 溫脾湯을 가미한 것이다<sup>7)</sup>. WHW에 대한 실험 연구로 신장 세뇨관세포에서 TGF- $\beta$ 에 의해 유도되는 섬유화(fibrosis) 억제<sup>8)</sup>, 허혈·재관류<sup>9,10)</sup>와 요관폐쇄<sup>11)</sup>에 의한 만성신부전 생쥐에서의 신장 섬유화 억제, 크레아티닌 감소, 항산화효과를 통한 산화적 손상으로부터 신장조직 보호, 항염증<sup>12)</sup>, 당뇨병성 신부전 흰쥐에서의 혈당감소 및 크레아티닌과 요소질소 감소 등의 효과<sup>13)</sup>가 보고되었다. 또한 WHW는 랫드에서의 단회경구투여 독성시험에서 1000 mg/kg을 상회 것으로 평가되었다.

따라서 본 연구에서는 WHW의 반복경구투여에 따른 안전성을 평가하기 위해 암수 랫드를 이용하여 WHW를 13주간 반복 독성시험을 식품의약품안전청고시 제2005-60호(2005년 10월 21일) '의약품 등의 독성시험기준' 및 식품의약품안전청고시 제2005-79호(2005년 12월 21일) '비임상시험관리기준'에 준하여 독성반응과 그 안전성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용된 처방은 WHW(加減溫脾湯合五苓散, modified Wenpitang-Hab-Wulingsan)으로서 구성약재는 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 원료성적서가 첨부된 규격화된 약재를 구입하였으며, 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 대한약전에 따라 검증한 후 사용하였다.

Table 1. Prescription of WHW

藥劑名	所屬
蔓萆	radices of <i>Codonopsis pilosula</i> NANNF
丹萆	radices of <i>Salvia miltiorrhiza</i> BGE
半夏	rhizome of <i>Pinellia ternata</i> BREIT.
川黃連	rhizome of <i>Coptis chinensis</i> FRANCH.
吳茱萸	fructus of <i>Evodia rutaecarpa</i> Benth.
淫羊藿	leaves of <i>Epimedium koreanum</i> NAKAI
大黃	rhizome of <i>Rheum palmatum</i> L.
蘇葉	leaves of <i>Perilla frutescens</i> BRITT.
甘草	radices of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.
茵陳	leaves of <i>Artemisia capillaris</i> THUNB.
澤瀉	rhizome of <i>Alisma plantago-aquatica</i> var. orientale SAMUELS.
白茯苓	whole fungi of <i>Poria cocos</i> (SCHW.)
白朮	rhizome of <i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ.
豬苓	whole fungi of <i>Polyporus umbellatus</i> (PERS.) FRIES.
桂枝	branches of <i>Cinnamomum cassia</i> PRESL.

### 2) 실험동물

실험동물로는 단회 및 반복투여독성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있는 5주령 암수 Sprague-Dawley(SD)계통의 랫드(SPF)를 (주)오리엔트(경기도, 한국)로부터 구입하였으며, 1주일 간 적응시킨 후 일반증상의 이상이 관찰되지 않은 랫드 중 체중이 유사한 것만 선별하여 사용하였다.

실험환경은 온도 20±3℃, 상대습도 52±15%, 조명시간 12시간(오전7시~오후7시) 및 조도 150~300 Lux로 설정하였으며, 방사선 조사로 멸균된 실험동물용 고품사료(Harlan TEKLAD, 코아텍, 경기도, 한국)와 정수된 물을 자유섭취 시켰다.

## 2. 방법

### 1) WHW 추출물 제조

WHW 추출물을 제조하기 위해서 GLP 시설을 갖춘 (주)한풍제약(서울, 한국)로부터 50 kg 구성약재에 물 1000 L를 넣고 98℃에서 3시간 추출하여 연조엑스(수득량: 19.1 kg)를 수득한 후, 다시 700 mmHg, 55℃에서 15시간 감압 건조하여 건조엑스(수득율: 23.7%)를 제조하여 (WHW-Ex) 본 연구에 사용하였다. WHW-Ex는 냉장 보관하였으며, 실험직전 멸균된 증류수에 용해하여 실험동물 투여에 사용하였다.

### 2) 투여용량 및 시험군 설정

시험물질인 WHW-Ex는 이전 단회 경구투여 독성시험에서 한체치사량이 1,000 mg/kg/bw을 상회하는 것으로 나타났다. 따라서 반복 경구투여 독성시험에서는 100, 500, 1000 mg/kg/bw를 실험용량으로 하여 13주간 매일 1회 일정 투여량(5 ml)을 일정 시간에 경구 투여하였다. 대조군으로는 WHW-Ex를 용해할 때 사용한 증류수를 동일한 방법으로 투여하였으며, 시험동물은 각 군에 암수 각 40마리를 사용하였고, 경구투여는 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위 내로 강제 투여하였다.

### 3) 일반증상 및 폐사 관찰

일반증상과 폐사 정도는 투여 당일에는 1시간에서 6시간 동안 확인하였고, 이후로는 하루에 1회 13주 동안 관찰하였다. 즉, 일정시간 일반 상태의 변화, 중독 증상의 발

현, 시험물질투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 일반 증상에 대하여 관찰하였으며, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무, 이상증상 및 정도를 처리군 개별적으로 기록하였다.

#### 4) 체중변화 및 사료 섭취량 측정

모든 동물에 대하여 체중은 투여개시 전에 실시하였으며 투여 개시 후에는 시험 기간 중 매주 1회 체중을 측정하였고, 사료 섭취량 역시 주1회 측정하였다. 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였으며 투여 13주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 측정방법은 체중 측정 일에 사료를 정량 급여한 후 일정 시간 후 잔량을 측정하여 각 처리군당 평균 섭취량(g)을 산출하였다.

#### 5) 안과학적 검사 및 뇨 검사

모든 동물에 대하여 안과학적 검사는 WHW-Ex 투여 13주 후에 산동제(Ocutropic ophthalmic drop)를 점안한 후 육안 및 검안경으로 전안부, 중간투광체, 안저에 대한 검사를 실시하였다. 또한 뇨검사를 위해 배설 후 3시간 이내의 신선 뇨를 수거하여 뇨량, pH, 비중, 단백, 당, 케톤체(ketone body), 빌리루빈(bilirubin), 잠혈(occult blood), 색상 및 투명도, 침사 등의 검사를 실시하였으며, 배설 후 24시간 이내의 축뇨를 수거하여 뇨비중을 검사하였다.

#### 6) 장기중량 측정

WHW-Ex 투여 13주 후 생존 및 사망한 모든 동물의 장기무게를 측정하였다. 즉, 부검 전 약 18시간 이상 절식 시킨 후 isoflurane으로 마취하여 치사 시킨 후 장기를 적출하고, 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안 검사하였으며, 심장, 간장, 폐, 비장, 신장, 부신, 전립선, 고환, 난소, 뇌 및 뇌하수체, 자궁의 중량을 측정하였다.

#### 7) 혈액학적 검사

배대동맥(abdominal aorta)으로부터 혈액(1 ml)을 채집 한 후 EDTA가 처리된 혈액수집관에 넣고 잘 섞은 후 4 °C에 보관하고, 48시간 이내에 자동혈구계측기(ADVIA 120, SIEMENS Inc., Germany)를 이용하여 백혈구수, 적혈구수, 혈색소량, 혈소판수(PLT), 헤마토크리트치(hematocrit, HCT), 평균혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균 혈구 내 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 호중구수(neutrophils), 림프구수(lymphocyte), 단핵구수(monocyte), 호산구수(eosinophil), 호염구수(basophil)를 측정하였다.

혈액 응고계 검사를 위해 혈액(2 ml)을 3.2% sodium citrate가 처리된 튜브에 넣고, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였으며, 응고시간 분석기(ACL 7000, Instrumentation Lab, USA)를 이용하여 혈장 내 프로트롬빈 시간(prothrombin time, PT)과 부분 트롬보플라스틴 시

간(activated partial thromboplastin time, aPTT)을 측정하였다.

#### 8) 혈액생화학적 검사

배대동맥으로부터 얻은 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 실온에서 30분간 방치하여 응고시킨 후 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 혈액생화학 분석기 (7080, Hitachi, Japan)를 이용하여 혈장 내 알부민(ALB), 요소(BUN), 콜레스테롤, 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP), 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT), 아스파라진산 아미노전이효소(aspartate aminotransferase, AST), 크레아티닌(CREA), 총 빌리루빈(total bilirubin, T-Bili), 인(P), 당(Glu), 칼슘(Ca), 염소(Cl), 나트륨(Na), 칼륨(K), 중성지방(TG), 총 단백(TP)을 측정하였다.

#### 9) 통계처리

모든 동물에서 시험 기간 동안 사망이 관찰되지 않아 치사량에 대한 통계는 실시하지 않았으며, 기타 자료에 대한 통계학적인 분석은 SAS(version 9.3.1, SAS Institute Inc., USA)를 사용하여 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였고, Bartlett test를 실시하여 등분산성(homogeneity of variance test)을 검정하였다. 또한 등분산성인 경우에는 ANOVA를 실시하여 Dunnett's t-test의 다중검정을 하였으며, 등분산성이 기각된 경우에는 Kruskal-wallis test를 실시하였다. 유의성 검정은 Student's t-test를 통해 p<0.05 수준에서 유의적인 것으로 결정하였다.

## 결 과

### 1. 일반증상 및 사망률

식품의약품안전청의 독성시험기준을 참고하여 모든 동물에 대하여 전 시험기간 동안 매일 한번 일반증상 및 사망 유무를 관찰한 결과, 증류수를 투여한 대조군 및 WHW-Ex 투여군 모두에서 사망한 동물은 관찰되지 않았다. 따라서 WHW-Ex는 랫드에서 경구투여 한계용량인 1,000 mg/kg까지 독성이 나타나지 않았으며, 이는 WHW-Ex의 최소치사량(minimal lethal dose)이 암수 모두 1,000 mg/kg이상을 상회함을 의미한다.

### 2. 체중변화 및 사료 섭취량

13주 동안의 체중 변화를 관찰한 결과, 대조군 및 WHW-Ex 투여군에서 시간이 경과함에 따라 정상적인 체중 증가가 관찰되었으며, WHW-Ex는 체중 변화에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1).

또한 전 시험기간 동안 모든 동물의 하루 사료 섭취량을 측정한 결과, WHW-Ex 투여군과 대조군 간에 유의성 있는 사료 섭취량의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 2).

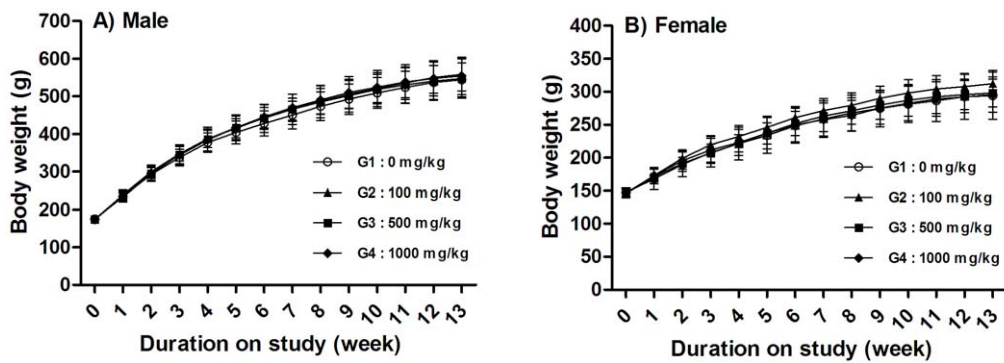


Fig. 1. Body weights of 13-week oral repeated dose toxicity study in A) male and B) female rats.

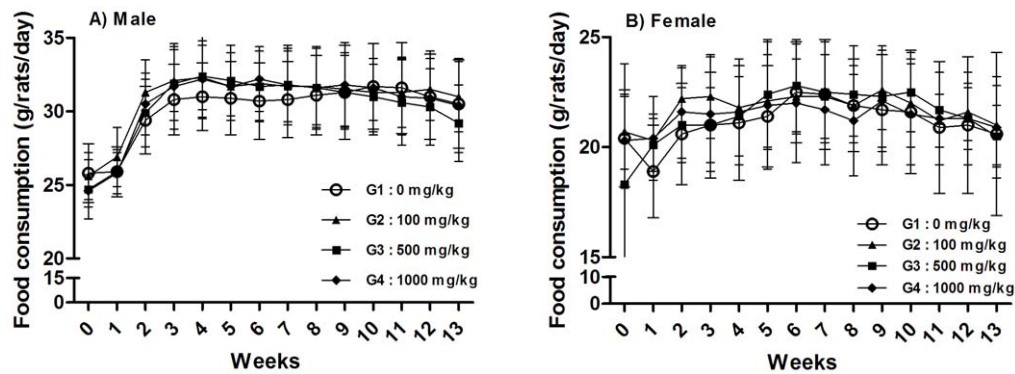


Fig. 2. Food consumption changes of 13-week oral repeated dose toxicity study in A) male and B) female rats.

### 3. 안과학적 검사 소견 및 뇨 검사

13주 후 모든 동물에서 육안 및 검안경을 통해 동공대광 반사(pupillary light reflex), 전안부(anterior segment),

중간투광체(transparent media), 안저(Fundus) 등의 안과학적 검사를 실시한 결과, 대조군과 WHW-Ex 투여군 모두에서 특이한 증상이 관찰되지 않았다 (Table 2).

Table 2. Ophthalmic examination of 13-weeks oral repeated dose toxicity in SD rats

Sex	Group/Dose (mg/kg)	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
Male	G1 (n=5)	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (n=5)	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (n=5)	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (n=5)	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 (n=5)	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (n=5)	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (n=5)	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (n=5)	5	5	5	5	5	5	5	5

또한 뇨 검사에서는 대조군과 WHW-Ex 투여군 간 모든 검사 항목(color, transparency, pH, protein, glucose, bilirubin, occult blood, epithelial cells, leukocyte, specific gravity)에서 차이가 없었으며, 케톤톤의 경우 WHW-Ex 투여군이 대조군에 비해 수치

가 증가하는 경향을 나타내었으나, 5~15 mg/dL로 검출 양이 매우 낮았고, 체중 및 혈액생화학적 검사 항목에서의 변화와 연관성이 없었으며, 케톤체가 특정 장기의 손상 지표가 되지 않으므로 독성학적 의미는 없다 (Table 3).

Table 3. Urinalysis results of 13-week oral repeated dose toxicity study in SD rats

Parameter	Sex		Male				Female			
	Group	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	
	Dose (mg/kg)	0	100	500	1000	0	100	500	1000	
Color	Yellow	5	5	2	0	5	5	4	4	
	Amber	0	0	3	5	0	0	1	1	
Transparency	Clear	4	4	3	5	5	5	5	3	
	Mild turbidity	1	0	1	0	0	0	0	1	
	Turbidity	0	1	1	0	0	0	0	1	
pH	6	0	0	0	0	0	1	1	0	
	6.5	1	0	0	0	0	0	0	0	
	7	0	2	0	0	3	1	1	1	
	8	2	1	0	1	2	2	0	3	
	9	2	2	5	4	0	1	3	1	
Protein (mg/dL)	-	3	1	2	5	3	2	3	3	
	25	1	4	3		2	3	2	2	
	75	1	0	0	0	0	0	0	0	
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucose (mg/dL)	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ketone body (mg/dL)	-	5	4	3	3	5	4	3	2	
	5	0	1	2	2	0	1	2	2	
	15	0	0	0	0	0	0	0	1	
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bilirubin (mg/dL)	-	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	
Occult blood (Ery/μL)	-	5	5	5	5	5	5	5	5	
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cast*	0	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1~5	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6~10	0	0	0	0	0	0	0	0	
Epithelial cell*	0	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1~5	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6~10	0	0	0	0	0	0	0	0	
Leukocyte*	0	0	5	5	5	5	5	5	5	
	1~10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	11~50	0	0	0	0	0	0	0	0	
Erythrocyte*	0	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1~10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	11~50	0	0	0	0	0	0	0	0	
Specific gravity	1,000~1,010	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,011~1,020	0	0	0	0	0	1	0	0	
	1,021~1,030	0	0	0	0	0	1	0	0	
	1,031~1,040	0	1	1	2	0	0	0	1	
	1,041~1,050	2	1	0	1	5	2	1	1	
	1,051~1,060	2	0	0	1	0	1	3	2	
	>1,060	1	3	4	1	0	0	1	1	

\* Sediment

#### 4. 혈액학적 검사

배대동맥으로부터 혈액을 수집하여 자동혈구계측기를 통해 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 헤마토크리트치(HCT), 평균혈색소 농도(MCH), 평균 혈구 내 혈색소 농도(MCHC), 혈소

판수(PLT), 혈액응고(Reti), 백혈구수(WBC), 호중구수(NEU), 림프구수(LYM), 단핵구수(MONO), 호산구수(EOS), 호염구수(BASO), 프로트롬빈 시간(PT), 부분트롬보플라스틴 시간(APTT)을 측정하여 결과를 대조군과 WHW-Ex 투여군의 모든 암수 동물에서 정상 수치를 나타내었다(Table 4).

Table 4. Hematological parameters of 13-week oral repeated dose toxicity study in SD rats

Item <sup>2)</sup>	Sex	Male				Female			
	Group	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
	Dose (mg/kg)	0	100	500	1000	0	100	500	1000
RBC (M/ml)		8.75±0.28 <sup>1)</sup>	8.67±0.31	8.64±0.29	8.73±0.38	7.69±0.14	7.75±0.26	7.80±0.35	7.75±0.41
HGB (g/dL)		15.4±0.7	15.3±0.7	15.5±0.6	15.6±0.7	14.7±0.3	14.9±0.9	14.7±0.6	14.9±0.4
HCT (%)		45.2±2.0	44.7±1.7	45.3±1.5	46.1±2.1	42.4±1.0	42.8±0.9	42.8±1.6	42.9±0.9
MCV (fL)		51.8±1.7	51.6±1.0	52.4±1.4	52.8±1.7 <sup>**</sup>	55.1±1.5	55.3±1.4	54.9±1.8	55.5±2.9
MCH (pg)		17.6±0.5	17.6±0.5	17.9±0.6	17.9±0.6	19.1±0.4	19.2±0.6	18.9±0.6	19.3±0.7
MCHC (g/dL)		34.1±0.6	34.1±0.7	34.1±0.7	33.9±1.0	34.6±0.5	34.8±0.4	34.4±0.5	34.8±0.6
PLT (K/ml)		1192±142	1104±68	1113±151	1131±147	1150±97	1138±95	1087±118	1168±142
Reti (%)		1.6±0.4	1.7±0.3	1.7±0.3	1.6±0.3	1.6±0.4	1.5±0.3	1.5±0.4	1.7±1.1
WBC (K/ml)		8.47±1.16	8.64±1.63	10.3±2.49	8.39±1.99	4.14±1.78	3.82±1.68	3.52±1.44	4.88±1.56
NEU (K/ml)		18.3±4.7	20.8±8.7	80.8±7.5	25.3±9.1	17.8±5.2	19.1±7.4	18.6±8.0	19.6±8.1
LYM (K/ml)		76.0±4.5	72.9±9.4	73.3±7.3	68.2±10.0	77.0±5.4	75.6±7.6	76.6±7.1	75.2±7.5
MONO (K/μl)		3.0±0.8	3.3±1.0	2.9±1.1	3.4±1.1	2.3±1.1	2.7±1.2	2.2±1.1	2.3±0.8
EOS (K/ml)		1.2±0.4	1.1±0.5	1.3±0.7	1.2±0.5	1.4±0.5	1.4±0.5	1.2±0.4	1.1±0.3
BASO (K/μl)		0.2±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
PT (sec)		15.4±0.7	15.1±0.8	15.5±0.8	15.6±0.4	15.2±0.5	15.8±0.6	15.5±0.6	15.6±0.9
APTT (sec)		18.9±1.9	18.8±1.0	18.8±1.1	18.5±1.3	18.0±0.9	17.6±1.8	17.5±1.3	18.2±0.8

<sup>1)</sup>Values are presented as meas±standard deviation (SD) of 10 mice 13 weeks after treatment.

<sup>2)</sup>WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

\*Significantly difference from control by steel test(\*\*; P<0.01).

한편, 평균혈구용적(MCV)이 WHW-Ex 1000 mg/kg를 투여한 수컷 동물에서 52.8±1.71 fL (fentoliter)로 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나(p<0.01), 이는 정상 범위내의 농도로써 WHW- Ex의 독성에 의한 것은 아닌 것으로 나타났다.

## 5. 혈액생화학적 검사

배대동맥 혈액으로부터 분리한 혈장으로부터 혈액생화학 분석기를 이용하여 혈액생화학적 지표인 알라닌 아미노전이효

소(ALT), 아스파라진산 아미노전이효소(AST), 알칼리성 인산 분해효소(ALP), 당(Glu), 요소(BUN), 크레아티닌(Crea), 총 빌리루빈(T-Bili), 총 콜레스테롤(T-Chol), 중성지방(TG), 총 단백질(TP), 알부민(Alb), 인(P), 칼슘(Ca), 나트륨(Na), 칼륨(K), 염소(Cl)의 양을 측정된 결과, 대조군과 WHW-Ex 투여군의 모든 암수 동물에서 정상 수치를 나타내었다(Table 5).

한편, 혈당이 WHW-Ex 500 mg/kg를 투여한 수컷 동물에서 163±27 mg/dL로 대조군에 비해 다소 증가하였으나, 유의성은 없었다.

Table 5. Blood chemistry values of 13-week oral repeated dose toxicity study in SD rats

Item <sup>2)</sup>	Sex	Male				Female			
	Group	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
	Dose (mg/kg)	0	100	500	1000	0	100	500	1000
ALT (U/L)		30.4±4.6 <sup>1)</sup>	29.6±4.0	34.8±13.3	30.4±4.9	29.5±8.9	26.9±9.4	30.3±14.6	29.6±5.2
AST (U/L)		84.5±14.6	91.3±28.2	87.3±23.6	85.3±19.7	65.2±13.7	67.7±13.7	69.3±15.8	72.8±12.7
ALP (U/L)		297.2±37.5	269.0±46.3	303.5±35.5	294.0±32.6	161.2±40.4	185.2±61.1	159.4±59.1	166.2±62.4
Glu (mg/dL)		150±12	152±22	163±27	146±10	150±11	153±13	146±15	144±13
BUN (mg/dL)		12.8±1.8	11.9±1.8	12.1±1.9	12.8±1.7	15.2±1.6	14.3±1.7	15.3±3.0	15.2±3.0
Crea (mg/dL)		0.44±0.05	0.40±0.04	0.43±0.06	0.43±0.05	0.53±0.06	0.55±0.05	0.55±0.05	0.53±0.07
T-Bili (mg/dL)		0.06±0.02	0.06±0.03	0.06±0.01	0.06±0.03	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.02	0.06±0.01
T-Chol (mg/dL)		92±14	86±30	86±25	84±21	96±14	92±18	85±9	86±18
TG (mg/dL)		46±17	61±45	68±44	57±40	24±12	29±11	23±9	39±48
TP (g/dL)		6.0±0.2	5.9±0.2	6.1±0.2	6.1±0.2	6.4±0.5	6.2±0.2	6.3±0.2	6.4±0.4
Alb (g/dL)		2.7±0.2	2.7±0.1	2.8±0.1	2.7±0.2	3.4±0.3	3.1±0.2	3.2±0.1	3.2±0.3
A/G ratio		0.84±0.07	0.85±0.06	0.84±0.04	0.81±0.07	1.09±0.07	1.02±0.11	1.02±0.06	1.01±0.06
P (mg/dL)		5.92±0.69	5.90±0.54	5.82±0.61	6.21±0.66	4.53±0.75	4.36±0.91	4.38±0.63	4.65±0.95
Ca (mg/dL)		10.1±0.2	10.1±0.3	10.2±0.3	10.2±0.3	10.1±0.3	10.1±0.3	10.1±0.3	10.2±0.3
Na (mmol/L)		140±1	140±1	140±1	141±1	140±1	140±1	141±1	140±1
K (mmol/L)		4.8±0.2	4.6±0.3	4.6±0.4	4.9±0.5	3.9±0.3	4.0±0.3	3.9±0.2	4.0±0.2
Cl (mmol/L)		105±1	105±1	104±1	105±2	106±1	107±1	106±1	106±1

<sup>1)</sup>Values are presented as meas±standard deviation (SD) of 10 mice 13 weeks after treatment.

<sup>2)</sup>ALT; alanine aminotransferase, AST; aspartate aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, Glu; glucose, BUN; blood urea nitrogen, CREA; creatinine, T-Bili; total bilirubin, TG; triglyceride, TP; total protein

### 6. 부검 및 장기중량 검사

시험 기간 중 사망한 동물이 없었으므로 13주 반복 투여 후 부검을 실시한 결과, 모든 동물의 장기즉 뇌(brain), 뇌하수체(pituitary), 심장(heart), 폐(lung), 간(liver), 비장(spleen), 신장(kidney), 부신(adrenal), 고환(testis), 전립선(prostate), 난소(ovary), 자궁(uterus)

에서 유의성 있는 변화나 WHW-Ex의 투여에 의하여 발생되었다고 인정되는 조직이나 장기의 변화는 관찰되지 않았다.

한편, 모든 장기의 절대 장기중량(absolute organ weight)과 상대 장기중량(relative organ weight)을 측정된 결과, 대조군과 WHW-Ex 투여군 모두 암, 수 동물에서 변화가 없는 것으로 나타났다(Table 6, 7).

Table 6. Absolute organ weight of 13-week oral repeated dose toxicity study in SD rats

Organs (g)	Sex		Male				Female			
	Group		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
	Dose (mg/kg)		0	100	500	1000	0	100	500	1000
Body weight			515.3±43 <sup>1)</sup>	529±44.5	518.9±52	524.6±49	276.1±32	292.6±20	280.2±19	275.9±24
Brain			2.08±0.1	2.01±0.1	2.02±0.1	2.07±0.1	1.91±0.08	1.89±0.08	1.93±0.06	1.89±0.06
Pituitary(mg)			12.7±1.4	11.7±1.6	12.2±0.7	12.0±2.3	16.4±2.3	15.8±2.1	16.3±3.3	15.6±2.2
Heart			1.45±0.14	1.44±0.1	1.41±0.11	1.43±0.16	0.9±0.09	0.89±0.08	0.87±0.07	0.9±0.1
Lung			1.62±0.14	1.62±0.12	1.55±0.13	1.59±0.15	1.13±0.11	0.14±0.05	1.14±0.08	1.15±0.1
Liver			13.1±1.77	13.7±1.9	13.5±1.78	13.4±1.77	7.04±0.88	6.93±0.44	6.81±0.63	6.97±0.79
Spleen			0.79±0.14	0.8±0.11	0.79±0.15	0.84±0.12	0.48±0.1	0.5±0.07	0.45±0.08	0.45±0.09
Kidney			3.13±0.4	3.07±0.26	3.15±0.32	3.20±0.48	1.77±0.17	1.79±0.14	1.71±0.13	1.83±0.18
Adrenal(mg)			60.2±11.8	56.5±7.2	59.5±11.4	57.7±5.3	64.4±8.0	70.0±6.8	65.9±7.3	63.9±11.4
Testis			3.46±0.12	3.34±0.25	3.27±0.33	3.47±0.26				
Prostate			0.69±0.21	0.61±0.11	0.64±0.14	0.63±0.16				
Ovary(mg)							76.6±12.5	83.3±10.1	74.3±11.6	73.6±11.6
Uterus							0.65±0.1	0.78±0.26	0.67±0.26	0.86±0.31

<sup>1)</sup>Values are presented as meas±standard deviation (SD) of 10 mice 13 weeks after treatment.

Table 7. Relative organ weight of 13-week oral repeated dose toxicity study in SD rats

Organs (g)	Sex		Male				Female			
	Group		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
	Dose (mg/kg)		0	100	500	1000	0	100	500	1000
Body weight			515.3±43 <sup>1)</sup>	529±44.5	518.9±52	524.6±49	276.1±32	292.6±20	280.2±19	275.9±24
Brain			0.41±0.04	0.38±0.02	0.39±0.03	0.40±0.04	0.70±0.08	0.65±0.07	0.69±0.06	0.69±0.06
Pituitary (mg)			2.5±0.2	2.2±0.2	2.3±0.2	2.3±0.4	6.0±0.9	5.4±0.7	5.8±1.0	5.7±0.9
Heart			0.28±0.01	0.27±0.02	0.27±0.02	0.28±0.03	0.33±0.01	0.30±0.02**	0.31±0.03	0.32±0.02
Lung			0.32±0.03	0.31±0.02	0.30±0.03	0.30±0.03	0.41±0.03	0.39±0.04	0.41±0.04	0.42±0.02
Liver			2.55±0.2	2.59±0.2	2.61±0.17	2.57±0.27	2.55±0.1	2.37±0.06**	2.43±0.16	2.53±0.17
Spleen			0.15±0.02	0.15±0.02	0.15±0.02	0.16±0.02	0.17±0.03	0.17±0.02	0.16±0.02	0.17±0.03
Kidney			0.61±0.06	0.58±0.03	0.61±0.04	0.62±0.1	0.65±0.04	0.61±0.04	0.61±0.04	0.66±0.04
Adrenal (mg)			11.7±1.9	10.8±2.1	11.7±2.9	11.1±1.3	23.5±2.9	24.0±2.6	23.6±2.5	23.2±4.0
Testis			0.68±0.06	0.64±0.06	0.64±0.09	0.67±0.09				
Prostate			0.13±0.04	0.11±0.02	0.12±0.03	0.12±0.03				
Ovary (mg)							27.9±4.8	28.5±2.7	26.6±4.6	26.6±2.9
Uterus							0.24±0.07	0.27±0.11	0.24±0.09	0.31±0.11

<sup>1)</sup>Values are presented as meas±standard deviation (SD) of 10 mice 13 weeks after treatment.

\*Significantly difference from control by steel test(\*\*; P<0.01).

한편, 심장과 간의 상대 장기중량에서 대조군에 비해 WHW-Ex 100 mg/kg을 투여한 암컷 동물에서 유의적으로 감소하였으나(p<0.01), 용량 의존성이 없어 독성학적 의미는 없는 것으로 나타났다.

### 고찰

현재 한약재들은 한약제제, 생약제제, 천연물 의약품의 원료로서 뿐만 아니라, 건강기능성 식품 등의 재료로 일반인들의 민간요법에서부터 의약품에 이르기까지 다양하게 사용되고 있다<sup>2-4)</sup>. 한약제제는 질병의 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방을 목적으로 사용되는 의약품으로서 시장에서 사용을 허가

받기 전에 질병의 진단, 치료, 경감, 처치, 예방에 대한 임상 연구결과 등의 안전성과 유효성을 입증할 만한 객관적인 증거가 필요하다. 이런 객관적인 증거가 없다면 한약제제가 안전하고 효과적인지 판단할 수 없으며 환자들에게 한약제제에 대한 신뢰를 얻기가 어렵게 된다.

아직까지도 근거 없이 한약에 대한 부정적인 인식과 더불어 한약재의 안전성과 부작용에 대한 논의가 제기되고 있다. 현대 의약 역시 부작용과 독성을 가지고 있지만 현대의약은 부작용과 독성 연구를 통해 잘 알려져 있는 것이고, 한약은 현대의약에 비해 그렇지 않아 문제가 되는 것이다. 따라서 비임상시험 관리기준(KGLP) 안전성(독성)시험기준 등에 따라 과학적으로 한약재의 독성과 안전성을 평가하여 한약재의 안전성을 확보하는 것은 한약재를 이용한 의약품 개발에 필수적이다.

일반 독성시험 분야는 새로운 시험물질의 독성을 미리 예측할 수 있는 가장 기본적인 독성시험 영역이며, 농약, 의약, 산업용 화학물질 및 기타 환경오염물질 등의 화학물질이 인체에 미치는 유해성을 조사하기 위하여 실험동물을 통해 소화기계, 호흡기계, 비뇨기계, 생식기계 및 신경계 등을 포함하는 모든 장기조직에 미치는 위해성 정도를 단회 및 반복투여 독성시험으로 평가한다<sup>14)</sup>.

최근 들어 한약재와 한약에 대한 독성시험 연구가 보고되고 있으며 다빈도로 투약되는 십전대보탕, 육미지황탕, 오적산 등의 처방에 대한 한약 KGLP 안전성 시험<sup>15)</sup>이 진행 중이고, 당귀보혈탕<sup>16)</sup>, 독혈<sup>17)</sup>, 금은화<sup>18)</sup>, 승마, 우슬, 인진호, 목단피, 빈랑자<sup>19)</sup>, 백굴채<sup>20)</sup>, 황련, 단삼<sup>21)</sup>, 마황, 상륙, 저령<sup>22)</sup> 등에 대한 안전성시험에 대한 보고가 있다.

본 연구에서는 WHW의 안전성을 확보하기 위해서 WHW-Ex를 시험물질로 식품의약품 안전청의 독성 시험기준<sup>18)</sup>에 근거하여 랫드에서의 반복 경구투여 독성시험을 수행하였다. 전 시험기간 동안 WHW-Ex를 투여한 모든 시험군에서 일반 증상과 사망한 동물이 관찰되지 않았으며, 경구 독성투여 한계용량인 1,000 mg/kg에서 WHW-Ex에 의한 독성은 나타나지 않아서 WHW-Ex의 랫드에서의 최소치사량이 암수 모두 1,000 mg/kg 이상을 상회하는 것으로 나타났다. 또한 WHW-Ex는 대조군과 마찬가지로 실험동물의 체중을 정상적으로 증가시켰으며, 사료섭취량에 변화를 주지 않았다. 안과학적 검사, 뇨 검사, 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사에서도 WHW-Ex는 암수 모두에서 대조군과 같이 모든 항목에 정상수치를 나타내었다. 다만, 케톤톤의 경우 WHW-Ex 투여군이 대조군에 비해 수치가 증가하는 경향을 나타내었으나, 검출 양이 매우 낮고, 체중 및 혈액생화학적 검사 항목에서의 변화와 연관성이 없으며, 케톤체가 특정 장기의 손상 지표가 되지 않기 때문에 독성학적 의미는 없는 것으로 사료된다. 또한 평균혈구용적이 WHW-Ex 1000 mg/kg를 투여한 수컷 동물에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나, 이는 정상 범위내의 농도로서 WHW-Ex의 독성에 의한 것은 아닌 것으로 사료된다. 한편, 혈당의 경우 WHW-Ex 500 mg/kg를 투여한 수컷 동물에서 대조군에 비해 다소 증가하였으나 유의적이지 않아 의미가 없는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구결과를 통해 WHW는 랫드에 대한 13주 반복 경구투여 시험에서 투여 가능 최대 용량에서 독성학적 이상변화가 관찰되지 않아 독성이 없는 안전한 한약제제인 것으로 확인되었다. 현재 WHW의 사람에게 적용할 때나 유사한 조건일 때의 독성 유무를 좀 더 명확하게 판단하기 위하여 4주 반복 용량결정 (Dose-Range Finding, DRF) 시험을 진행 중에 있다.

## 결 론

본 연구에서는 만성신부전의 예방과 치료를 목적으로 개발된 한약제제인 WHW의 랫드에서의 13주 경구 반복투여독성 시험에 따른 안전성을 평가하였다.

1. WHW는 전 시험기간 동안 암·수 모든 군에서 일반 증상 및 사망한 동물이 관찰되지 않았다.

2. WHW는 전 시험기간 동안 암·수 모든 군에서 정상적으로 체중을 증가시켰으며 사료섭취량에 변화를 주지 않았다.
3. WHW는 전 시험기간 동안 암·수 모든 군에서 부검 시 이상소견을 보이지 않았으며, 안과학적 검사와 뇨 검사에서도 유의적인 변화를 나타내지 않았다.
4. WHW는 전 시험기간 동안 암·수 모든 군에서 혈액학적 및 혈액생화학적 지표에 변화를 주지 않았다.
5. WHW는 전 시험기간 동안 암·수 모든 군에서 장기중량에 변화를 주지 않았다.

이상의 결과로 보아 WHW는 13주 반복 경구투여 독성시험에서 무독성량(NOEL)이 1000 mg/kg를 상회하며, 별 다른 독성이 없이 안전한 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지가족부의 한의약선도기술개발사업 (B090075)의 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Jang SI, Kim BH, Lee SD, Han CH. A review of herbal medicinal products associated with toxic events in Korea. *J Kor Oriental Med* 2007;28:1-10.
2. 성상현, 박진호, 천연물 의약품의 현황과 전망. 보건벤처 최신 동향 및 이슈리포트. 2007:14-23.
3. Wolf BW, Weisbrode SE. Safety evaluation of an extract from *Salacia oblonga*. *Food Chem Toxicol*. 2003;41:867-74.
4. Flood MT, Kondo M. Safety evaluation of lipase produced from *Rhizopus oryzae*: summary of toxicological data. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2003;37:293-304.
5. Wirth JH, Hudgins JC, Paice JA. Use of herbal therapeutics to relieve pain: a review of efficacy and adverse effects. *Pain Manag Nurs*. 2005;6:145-67.
6. Mak RH, Cheung W. Therapeutic strategy for cachexia in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007;16:542-6.
7. 이경열. 加減溫脾湯合五苓散이 만성腎不全에 미치는 영향 - 加減溫脾湯合五苓散의 LPS로 유도된 Raw264.7 cell에서 TNF- $\alpha$  및 nitric oxide생성에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2006.
8. Lee SI, Kim HJ, Baek MC, Park KM, Park Y, Yoon CH et al. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san, an oriental herbal prescription, attenuates epithelial-mesenchymal transdifferentiation stimulated by



- TGF- $\beta$ 1 in kidney cells. *Phytother Res.* 2007;21:548-53.
9. Seok YM, Kim J, Choi KC, Yoon CH, Boo YC, Park Y et al. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney ischemia/reperfusion injury in mice. A role for antioxidant enzymes and heat-shock proteins. *J Ethnopharmacol.* 2007;112:333-40.
  10. Seok YM, Kim J, Park MJ, Boo YC, Park YK, Park KM. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney fibrosis induced by ischemia/reperfusion in mice. *Phytother Res.* 2008;22:1057-63.
  11. Jung KJ, Kim J, Park YK, Yoon YR, Park KM. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san reduces ureteral obstructive renal fibrosis by the reduction of oxidative stress, inflammation, and TGF- $\beta$ /Smad2/3 signaling. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(2):522-9.
  12. Jung HW, Yoon CH, Kim YH, Boo YC, Park KM, Park YK. Wen-Pi-Tang-Hab-Wu-Ling-San extract inhibits the release of inflammatory mediators from LPS-stimulated mouse macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2007;114:439-45.
  13. Bae HS, Nam JS, Jung JK, Oh SY, Park YK. Anti-diabetic effect of Wen-Pi-Tang-Hab-Wu-Ling-San extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J Herbology* 2008;3:85-91.
  14. 식품의약품안전청. 의약품 등의 독성시험기준. 식품의약품안전청고시 제2005-60호 (2005).
  15. 한국한의학회연구원. 표준한방처방 EBM(근거중심의학) 구축사업. 2008.
  16. 강순아, 장문석, 오명숙, 박완수, 김원남, 양용모 외 2명. 당귀보혈탕(當歸補血湯)의 SD계 흰쥐에 대한 아급성 경구독성시험. *대한본초학회지.* 2006;21(2):159-63.
  17. 권혁세, 김대환, 신현경, 유창연, 김명조, 임정대 외 2명. 흰쥐에서 맞두릅 에탄올 추출물의 14일 반복경구투여에 의한 독성시험. *한국식품과학회지.* 2007;39(4):470-75.
  18. 한충택, 장호송, 강상철, 길기현, 공광한, 김도형 외 5명. 금은화(Flos Lonicerae) 추출물의 Fischer 344/N 랫드를 이용한 90일간 반복 경구투여 독성시험. *대한수의학회지.* 2008;48(4):401-11.
  19. 김승현, 최은정, 김대현, 이기용, 이민아, 백사왕 외 4명. 승마, 우슬, 인진호, 목단피 및 빈랑자의 독성연구를 위한 안정성 시험. *생약학회지.* 2008;39(3):241-5.
  20. 김도형, 장호송, 김광호, 강상철, 김학수, 길기현, 공광한, 안태환, 배진숙, 고현규, 김갑호. 백골채(Chelidonium majus) 추출물의 Fischer 344/N 랫드를 이용한 90일간 반복 경구투여 독성시험. *대한수의학회지.* 2009;49(1):23-34.
  21. 이미경, 이준석, 곽승준, 김지명, 강태석, 이제현 외 4명. 황련과 단삼의 독성평가를 위한 성분분석 및 안정성 시험. *생약학회지.* 2009;40(3):184-9.
  22. 뉴엔티풍타오, 트란만홍, 토다오콩, 허정임, 곽승준, 김지명 외 5명. 마황, 상륙 및 저령의 독성평가를 위한 성분 분석 및 안정성 시험. *생약학회지.* 2010;41(2):141-6.