생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
50(3) : 205 ~ 218 (2019)

Sprague-Dawley 랫드를 이용한 땃두릅나무 열수추출물 분말의 단회 경구투여 독성시험 및 4주 반복 경구투여 용량 결정 시험

유남호[1] · 권용수[2] · 천현수[3] · 안규섭[4] · 김혜진[4] · 류현열[4] · 이소민[4] · 송경석[4] · 박병준[1] · 김명조[1*]
[1]강원대학교 농업생명과학대학, [2]강원대학교 약학대학, [3]㈜에이치티오라이프, [4]한국건설생활환경시험연구원

Single Oral Dose Toxicity Test and Four Weeks Repeated Oral Dose Determination Test of *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai Hydrothermal Extract Powder in Sprague-Dawley Rats

Nam Ho Yoo[1], Yongsoo Kwon[2], Hyeon Soo Chun[3], Kyu Sup An[4], Hye Jin Kim[4], Hyeon Yeol Ryu[4], So Min Lee[4], Kyung Seuk Song[4], Byung Jun Park[1] and Myong Jo Kim[1*]
[1]College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
[2]College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon, 24341, Korea
[3]HtO Life Incorporated, Wanju 77243, Korea
[4]Korea Conformity Laboratories, Incheon 21999, Korea

Abstract – This study was conducted to investigate the toxicity symptoms and approximate lethal dose (ALD) of *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai hydrothermal extract powder by single oral dose toxicity and 4 weeks of repeated oral dose determination. The Sprague-Dawley (SD) male and female rats were treated with 1,250 (low- dosage group), 2,500 (medium- dosage group) and 5,000 (high- dosage group) mg/kg. In the single oral dose toxicity test, no dead animals and toxic symptoms were observed during the experiment. And there were no related with anomalies in normal weight changes and autopsy results. In the four-week repeated oral dose determination test, no death animals and toxicity symptoms were observed during the experiment, and there were no abnormal results in weight changes, feed and negative intake measurements. Results of eye examination, urinalysis, hematological values and serum biochemical values, gross findings and absolute organ were not of singularity. These result demonstrated that no toxic symptoms were observed by the test substance *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai hydrothermal extract powder under this test condition, and the non-toxic content is determined to be 5,000 mg/kg/day.

Keywords – Four weeks repeated, *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai, Sprague-Dawley Rat, Single oral dose toxicity

여러 가지 만성 질환 중 관절염의 경우, 관절 내 염증으로 인해 관절이 붓고 통증이 유발되는 질환으로 건강보험심사평가원에 따르면 2012년 3,276,590명에서 2016년 3,679,900명으로 계속 증가하고 있는 추세이다. 하지만 현재까지 관절염의 근본적인 치료제는 없으며 증상완화와 같은 대증요법으로 염증과 통증을 완화시키고 질병의 진행을 지연시키는 기능을 하게한다. 이러한 관절염 질환에는 염증완화를 위해 보전적 방법으로 염증과 통증을 저해하는 약물 치료가 반드시 동반된다. 특히 초기 관절염 경우 진통소염제와 hyaluronic acid 치료제가 주된 치료법이다. 하지만 NSAID 약물은 장기 복용에 따른 위장관계 부작용, 신기능 감소 등이 있으며, 반복적으로 투약 시 오히려 관절이 악화될 수 있다.[1)] 따라서 지속적인 염증으로 인한 증상과 통증을 호전시키거나 완화를 위해 장기간 복용해도 안전한 소재를 개발하기 위해 부작용을 최소화한 천연물 소재의 의약품이 필요하다. 현재 천연물을 이용한 관절염 치료제는 위령선, 괄루근, 하고초 등이 천연물 신약의 원료로써 사용되어지고 있으며, 건강기능식품으로 오메가 3, 글루코사민, 콘드로이틴 등이 초기 관절염에 효과를 보인다고 알려져 있다.

이처럼, 최근 천연물을 이용한 건강기능 식품이나 의약품 개발에 많은 관심이 증가하고 있으며, 많은 약용작물들이 원료로써, 주재료 혹은 부 재료로 사용되고 있다.[2)] 그러나

*교신저자(E-mail) : kimmjo@kangwon.ac.kr
(Tel) : +82-33-250-6413

일부 천연물들은 잠재적 독성을 가지고 있기 때문에 잘못 복용하는 경우에 치명적인 영향을 건강에 초래할 수 있다.[3] 따라서 천연물 유래의 건강기능식품이나 의약품을 사용하기 위해서는 독성에 관한 연구가 필수적이다.

따라서 본 연구진들이 관절염 개선에 효과적인 천연물을 연구하던 중 땃두릅 나무가 효과가 있는 것을 확인하였다. 땃두릅나무(*Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai)는 미나리목(Apiales) 두릅나무과(*Araliaceae*)에 속하는 낙엽관목으로, 높이는 2-3 m로 자라며, 원줄기는 긴 가시가 많고, 갈라지지 않으며, 줄기에 긴 가시가 많다.[4] 땃두릅나무의 독성증상과 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)을 조사하기 위해 단회 경구투여 용량증가 독성시험 및 4주 반복 경구투여 용량결정 시험을 진행하였다.

단회 경구투여 용량증가 독성시험은 식품의약품안전처 고시 제 2017-32 호(2017 년 05 월 01 일) '비임상시험관리기준'[5] 및 식품의약품안전처 고시 제 2015-82 호(2015 년 11 월 11 일) '의약품등의 독성 시험기준'[6]을 참고하여 진행되었으며. 4주 반복 경구투여 용량결정 시험은 식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 08 월 30 일) '의약품등의 독성 시험기준'[7] 및 OECD guideline for testing of chemical NO. 409 'Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents'(Adopted 3 October, 2008)[8]을 참고하여 실시하였다.

재료 및 방법

실험 재료 – 땃두릅 나무의 줄기는 2012년도에 화악산에서 채집하여 강원대학교 약학대학 권용수교수가 감정 및 동정하였고, 강원대학교 약학대학 표본실(KNUPH-S-12-2)에 보관하고 있다.

시험물질 제조 – 건조된 땃두릅나무 줄기를 파쇄한 후 칭량하여 distilled water에 85°C, 7시간 환류 추출하였다. 추출물을 filter paper(Whatman Co., Buckinghamshire, UK) grade 2로 여과한 후 동결 건조하여 분말을 얻었다.

시험기관 – GLP기관인 한국 건설 생활 환경 시험 연구원(Seoul, Korea)에서 단회 경구투여 용량증가 독성시험 및 4주 반복 경구투여 용량결정 시험을 진행하였다.

동물실험윤리규정의 준수 – 단회 경구 투여 독성 시험은 본 시험기관 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: IA17-00509)을 거쳐 수행되었으며, 4주 반복 경구투여 용량 결정 시험은 본 시험기관 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: IA17-00639)을 거쳐 수행되었다.

시험동물 및 사육환경 – 단회 경구투여 용량증가 독성시험 및 4주 반복 경구투여 용량결정 시험에 사용된 랫드는 specific pathogen-free(SPF) sprague-dawley(SD)계 랫드를 사용했으며, 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 공급 받았다. 암컷은 과거에 새끼를 낳은 적이 없고 현재 임신 중이지 않은 것을 사용하였다. 단회 경구투여 용량증가 독성시험의 경우, 입수 시에는 7주령 수컷 22마리, 암컷 22마리로써 수컷의 체중 범위는 193.19~205.11 g이였으며, 암컷은 169.89~183.35 g이였다. 투여개시 시에는 8주령 암컷 20마리, 수컷 20마리로써 수컷의 체중 범위는 221.61~236.96 g, 암컷의 체중 범위는 174.96~193.68 g이였다. 4주 반복 경구투여 용량 결정시험의 경우, 입수 시에는 5주령 수컷 22마리, 암컷 22마리로써 수컷의 체중 범위는 137.71~153.15 g이였으며, 암컷은 119.81~130.95 g이였다. 투여개시 시에는 6주령 암컷 20마리, 수컷 20마리로써 수컷의 체중 범위는 197.90~222.07 g, 암컷의 체중 범위는 153.97~176.03 g 이였다. 입수 당일 날, 미생물 검사성적서와 동물의 외관을 검사하였으며 입수 후 6일간 순화기간을 둔 후 일반증상을 관찰을 통해 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

사육환경은 스테인레스제 망사육상자(250W × 350L × 180H mm)에 검역, 순화, 투여 및 관찰기간 동안 3 마리 이하로 수용하였다. 단회 경구투여 독성 시험에서는 온도 22.0 ± 0.6°C, 상대습도 56.1 ± 5.1% RH, 조도 274 Lux, 소음 53.2 dB로 유지하였으며, 4주 반복 경구투여 용량 결정시험에서는 온도 22.9 ± 0.5°C, 상대습도 48.7 ± 5.4% RH, 조도 288 Lux, 소음 53.7 dB로 유지하였다. 두 실험 모두 환기횟수 10~15 회/hr, 형광등조명은 08:00 점등~20:00 소등, 암모니아 농도 5 ppm 이하로 유지되었다.

사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet, Envigo, Huntingdon, UK)는 두열바이오텍(Seoul, Korea)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유 섭취시켰다. 물은 정수 시킨 음용 상수도수를 폴리카보네이트제 물병에 넣고 자유 섭취시켰다.

시험물질 및 투여 – 단회 경구투여 용량증가 독성시험에서는 투여 당일 측정한 체중을 기준으로하여 10 ml/kg의 투여액량을 계산하여 물에 녹인 후 오전 중에 단회 투여하였다. 투여 전 하루 밤 동안 절식을 통해 위의 내용물을 비운 후 경구투여용 존데를 사용하여 강제 경구투여 하였으며, 절식 중에 음수는 공급하였다. 그 후로부터 약 3~4 시간 후에 사료를 재 공급하였다. 투여 용량은 식품의약품안전처 고시 제 2015-82 호(2015 년 11 월 11 일) '의약품등의 독성시험기준'에 의거하였다. 시험물질이 천연물인 것과 시험물질의 용도를 고려하여 5,000 mg/kg을 고용량군으로 설정하고 공비를 2로 두어 중용량군 및 저용량군을 설정하였다. 또한 부형제 대조군을 두었다.

4주 반복 경구투여 용량결정 시험에서는 가장 최근에 측정한 체중을 기준으로 10 ml/kg으로 투여액량을 계산하여 물에 녹여 4주 동안 1 회/일, 7 일/주로 매일 오전 중에 시험동물의 두경배부 피부를 잡아 보정한 후 경구투여용 존데를 이용하여 위 내로 강제 경구투여 하였다. 투여용량은

본 시험의 예비시험으로 진행된 단회 경구투여 독성시험 결과를 토대로 5,000 mg/kg의 투여용량에서 땃두릅 열수추출물 분말로 인한 독성학적 변화가 관찰되지 않는 것으로 판단되었기 때문에 본 시험에서는 5,000 mg/kg을 고용량군으로 설정하고 공비를 2로 두어 중용량군 및 저용량군을 설정하였고, 분말을 녹일 때 사용했던 멸균증류수를 섭취하는 대조군을 두었다.

관찰 및 검사 항목 – 단회 경구투여 용량증가 독성시험에서는 일반증상관찰, 체중측정 그리고 부검을 진행하였다. 일반증상관찰에서는 모든 동물을 매일 1 회 이상증상관찰을 하였다. 투여 당일에는 투여 후 30 분까지 1 회, 이후 6 시간까지 매 시간마다 관찰하였고 이후 투여 후 14 일까지 매일 1 회 일반증상관찰을 실시하였다. 체중측정은 입수 시, 군 분리 시, 투여일(투여 전), 투여 후 1, 7 및 14 일째(부검 전)에 측정하였다. 부검은 투여 후 14 일째에 CO_2 가스를 흡입시켜 마취시킨 후 개복하여 복대동맥과 후대정맥을 절단하여 방혈 치사시킨 후에 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 4주 반복 경구투여 용량결정 시험은 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 음수섭취량 측정, 안검사, 임상병리검사(채뇨, 채혈, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사),[9,10] 부검, 장기중량측정을 시험하였다. 일반증상관찰은 1 일 1 회 투여 직후의 일반증상을 사망여부와 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도에 관하여 개체 별로 기록하였다. 체중측정은 모든 동물에 입수 시와 군 분리 시, 투여개시 시, 투여 후 주 1 회 및 부검 일에 측정하였다. 사료섭취량 측정은 투여개시부터 주 1 회 사료섭취량을 측정하였으며, 측정방법은 체중측정일 전날의 사료급여량과 체중측정일 당일 잔량을 측정하여 1 일간의 사료섭취량 측정을 통해 마리 당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다. 음수섭취량 측정은 투여개시 시와 주 1 회 음수섭취량을 측정하였다. 측정방법 및 섭취량 산출은 사료섭취량 측정방법에 준하여 실시하였다. 안검사는 투여 마지막 주에 모든 시험군의 시험동물 양안에 대하여 눈의 외관을 육안적으로 상세히 관찰하였다. 임상병리검사 첫 번째로 채뇨는 투여 마지막 주에 시험군당 암·수 각 5 마리의 동물의 신선뇨를 채집한 후 요검사를 실시하였다. 두 번째로, 채혈은 모든 동물에 대하여 실시하며, 계획부검 동물을 하룻밤 절식한 후(단, 음수는 제공) 부검당일 동물을 Isoflurane으로 흡입 마취하였다. 마취가 확인되면 개복하여 복대동맥으로부터 채혈을 실시한 후 EDTA-K2 Tube(Microtainer, BD, NJ, USA), Serum separating Tube(Insepack, Sekisui, Tokyo, Japan)에 넣어 검사에 사용하였다. 세 번째로, 요검사[11]는 채집한 신선뇨를 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, Berlin, Germany)에 묻힌 후, 요자동분석장치(Clinitek Advantus, SIEMENS, Berlin, Germany)를 이용하여 측정하였으며, 측정 항목은 Table I에 정리하였다. 네번째로 혈액학적 검사는 EDTA-K2 Tube의 전혈로 혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, Berlin, Germany)를 이용하여 측정하였다. 검사항목은 Table II에 정리하였다. 혈액생화학적 검사는 원심분리(3,000 rpm, 10 분)하여 얻어진 serum separating tube의 혈액의 혈청으로 혈액생화학검사기(Hitachi 7180, HITACHI, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 검사항목은 Table III에 정리하였다. 부검에서는 투여종료 후에 최종계획부검을 실시하여 내부장기의 소견을 관찰하였다. 장기중량측정은 투여 종료 후 부검 시 고환, 전립선, 난소, 자궁, 신장, 비장, 간, 흉선, 부신, 심장, 폐, 뇌, 뇌하수체의 장기를 적출하여 전자저울을 이용하여 측정하였다.

Table I. Inspection item of urinalysis

Glucose	pH
Bilirubin	Protein
Ketone body	Urobilinogen
Specific gravity	Nitrite
Occult blood	Leukocyte

Table II. Inspection item of hematological values

WBC (White blood cell count)	LUP (Percent of large unstained cell)
NE (Neutrophil)	RBC (Red blood cell count)
EO (Eosinophil)	Hb (Hemoglobin conc.)
BA (Basophil)	RDW (Red cell distribution width)
Ly (Lymphocyte)	HCT (Hematocrit)
MO (Monocyte)	MCV (Mean corpuscular volume)
LUC (Large unstained cells)	MCH (Mean corpuscular hemoglobin)
NEP (Percent of Neutrophil)	MCHC (Mean corpuscular hemoglobin conc.)
EOP (Percent of Eosinophil)	Reti (Reticulocyte)
BAP (Percent of Basophil)	PLT (Platelet)
LYP (Percent of Lymphocyte)	MPV (Mean Platelet Volume)
MOP (Percent of Monocyte)	

Table III. Inspection item of serum biochemical values

AST (Aspartate aminotransferase)	ALB (Albumin)
ALT (Alanine aminotransferase)	A/G ratio
ALP (Alkaline phosphatase)	LDH (Lactate dehydrogenase)
BIL (Total bilirubin)	CPK (Creatine phosphokinase)
BUN (Blood urea nitrogen)	Ca (Calcium)
CRE (Creatinine)	IP (Inorganic phosphorus)
UA (Uric acid)	Mg (Magnesium)
GLU (Glucose)	Na (Sodium)
CHO (Total cholesterol)	K (Potassium)
TG (Triglyceride)	Cl (Chloride)
PRO (Total protein)	

통계 – 부형제 대조군과 시험물질 투여군 간의 체중, 사료섭취량, 음수섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량는 일원배치 분산분석(One-way ANOVA test)으로 유의성을 확인하고 등분산을 검정하였다. 요검사, 요색조는 증상의 정도로 데이터를 척도변환을 실시하여 카이제곱검정(chi-square test)을 실시하였다. 통계학적으로 $p<0.05$인 경우에 유의하다고 판정하였다. 통계학적인 분석은 SPSS 12.0 K 프로그램(SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

결 과

단회 경구투여 용량증가 독성시험 – 사망동물 및 일반증상, 체중변화, 부검에 관하여 시험을 진행하였다.

사망동물 및 일반증상 – 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 5,000 mg/kg 투여군의 수컷 2례(G4-16, G4-20 번) 및 암컷 2 례(G4-36, G4-38번)에서 시험물질 투여 후 30 분째에 유연(salivation)이 관찰되었다. 그 외 기간 및 시험동물에서는 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다(Table IV).

체중변화 – 체중측정결과, 모든 시험동물에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. 통계학적 검정결과, 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군 간 유의한 체중차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

부검소견 – 실험종료 시 부검결과, 모든 시험동물에서 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다(Table V).

4주 반복 경구투여 용량결정 시험 – 일반증상 및 사망률, 체중변화, 사료섭취량, 음수섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 부검, 장기중량에 관하여 시험

Table IV. Mortalities and clinical signs of rats

		Sex: male Group (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
MORTALITIES	No. of dead animals	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	%	0	0	0	0
CLINICAL SIGNS	No abnormalities detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
		Sex: female Group (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
MORTALITIES	No. of dead animals	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	%	0	0	0	0
CLINICAL SIGNS	No abnormalities detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

Number of animals with the signs / Number of animals examined

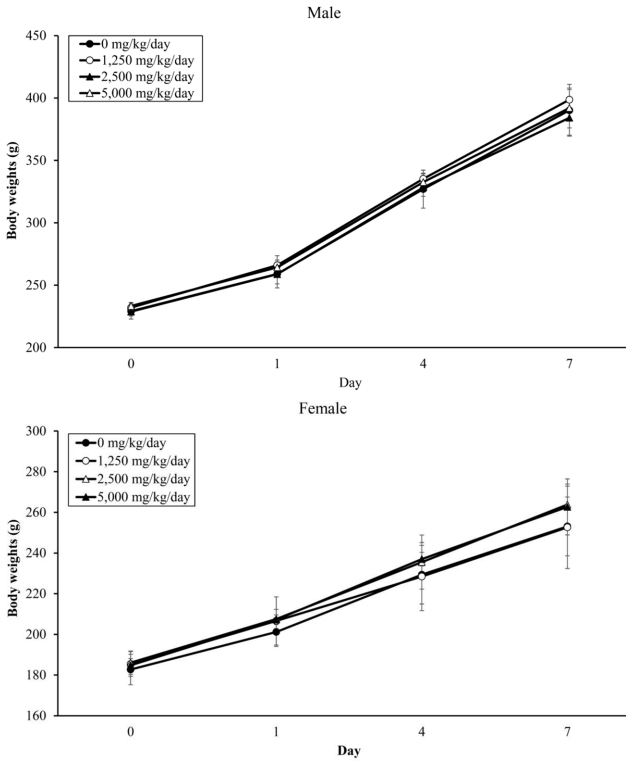

Fig. 1. Body weights of rats. (A) male, (B) female. Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.

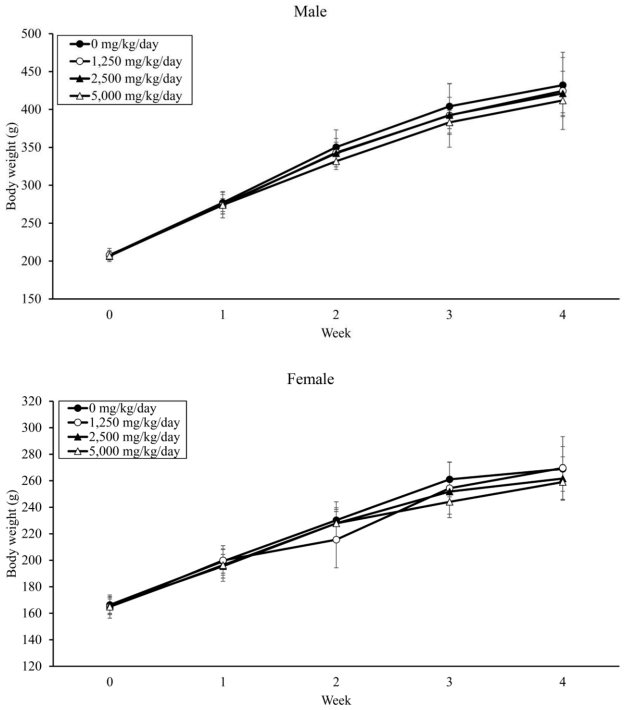

Fig. 2. Body weights of rats. (A) male, (B) female. Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.

을 진행하였다.

일반증상 및 사망률 – 실험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았으나, 시험물질 투여 직후 유연(salivation)이 암컷 1,250 mg/kg/day 투여군 및 암·수 2,500 mg/kg/day 투여군의 일부 시험동물에서 단발성 또는 간헐적으로, 암·수 5,000 mg/kg/day 투여군의 모든 시험동물에서 지속적으로 관찰되었다. 그 외 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다(Table VI).

체중변화 – 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 2).

사료섭취량 – 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

음수섭취량 – 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

안검사 – 안검사를 실시한 암·수 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다(Table VII).

요검사 – 수컷 시험군의 빌리루빈(bilirubin) 및 요비중(specific gravity) 항목과 암컷 시험 군의 케톤체(ketone body) 항목이 군간 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다(빌리루빈; $p<0.05$, 요비중, 케톤체; $p<0.01$). 빌리루빈은 5,000 mg/kg/day 투여군에서, 케톤체는 2,500 및 5,000 mg/

Table V. Gross findings of rats

		Sex: male Group (mg/kg)			
ORGANS	SIGNS	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
All organs	No gross finding detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
		Sex: female Group (mg/kg)			
ORGANS	SIGNS	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
All organs	No gross finding detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the signs / Number of animals examined

Table VI. Mortalities and clinical signs of rats

Sex	Group/DOSe (mg/kg)	Signs	Day													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	G1 (0)	NAO*	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2 (1,250)	NAO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G3 (2,500)	NAO	4	5	5	5	4	5	5	5	3	4	4	4	5	4
		SA	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	1	1	0	1
	G4 (5,000)	NAO	5	4	3	1	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0
		SA	0	1	2	4	5	5	5	4	3	4	5	5	5	5
Female	G1 (0)	NAO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2 (1,250)	NAO	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G3 (2,500)	NAO	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
		SA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	G4 (5,000)	NAO	5	3	1	3	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0
		SA	0	2	4	2	5	5	5	3	4	5	5	5	5	5
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Male	G1 (0)	NAO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2 (1,250)	NAO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G3 (2,500)	NAO	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G4 (5,000)	NAO	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SA	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	NAO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2 (1,250)	NAO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		SA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G3 (2,500)	NAO	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
		SA	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	G4 (5,000)	NAO	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SA	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5

*NAO: No abnormalities observed
**SA: Salivation

kg/day 투여군에서 검출빈도의 증가경향을 나타 내었다. 그 외 검사항목에서 군간 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table VIII-1,2).

혈액학적 검사 – 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군의 LUC (large unstained cells) 수치가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 그 외 검사항목에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table IX-1,2).

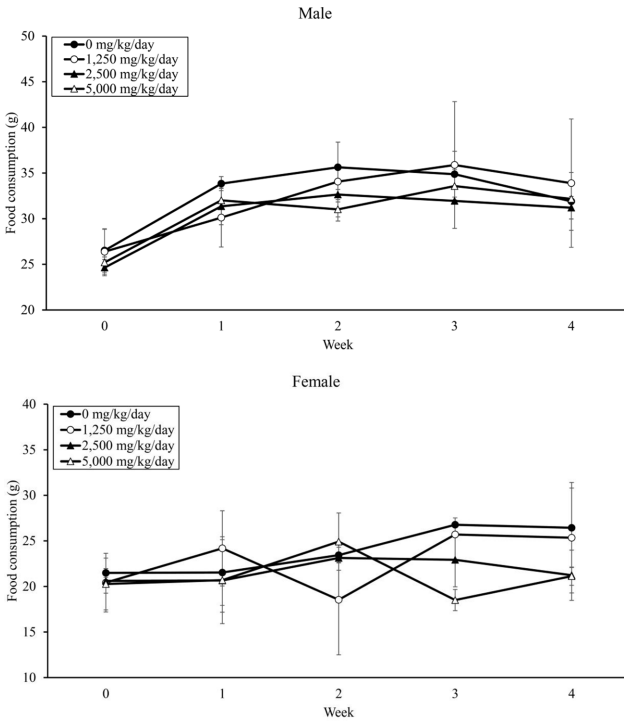

Fig. 3. Food consumption of rats. (A) male, (B) female. Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.

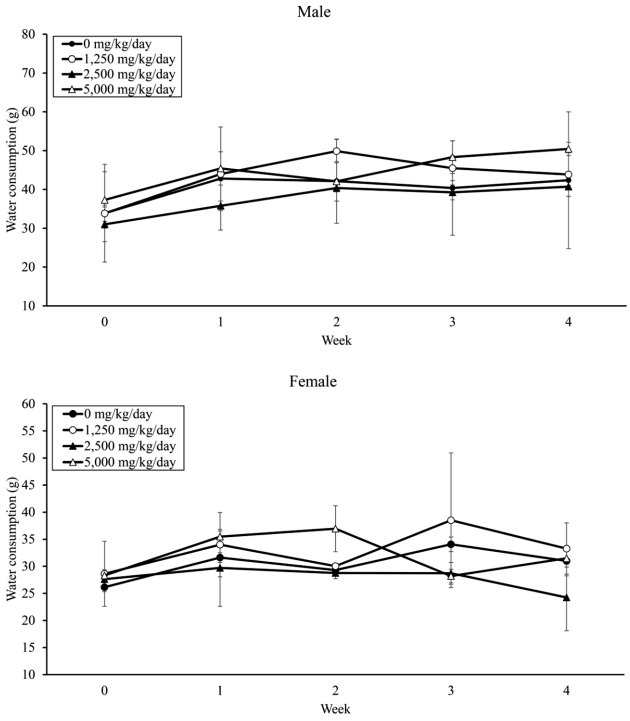

Fig. 4. Water consumption of rats. (A) male, (B) female. Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.

혈액생화학적 검사 – 수컷 시험군에서 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군의 LDH(lactate dehydrogenase), 5,000 mg/kg/day 투여군의 AST(aspartate aminotransferase) 및 CPK(creatine phosphokinase) 수치가 용량-반응 상관성을 보이며 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다(LDH; $p<0.01$, AST 및 CPK; $p<0.05$). 암컷 시험군에서는 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군의 CRE (creatinine) 수치가 감소하였고, 5,000 mg/kg/day 투여군의 CHO(total cholesterol) 수치는 증가하였다($p<0.05$). 그 외 검사항목에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table X-1,2).

부검소견 – 계획부검 결과, 암·수 모든 시험동물에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다(Table XI).

장기중량 – 상대장기중량 측정결과, 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군의 간 중량이 부형제 대조군 에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 그 외 절대 및 상대장기중량에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table XII-1,2).

Table VII. Eye examination of rats

		Sex: male			
		Group (mg/kg)			
ORGANS	SIGNS	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Right eye	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Left eye	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
		Sex: female			
		Group (mg/kg)			
ORGANS	SIGNS	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Right eye	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Left eye	No abnormalities observed	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Table VIII-1. Urinalysis of male rats

TEST ITEM		Group (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Glucose	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Bilirubin*	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	2 / 5
	1+	0 / 5	0 / 5	0 / 5	3 / 5
Ketone body	Negative	1 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5
	Trace	1 / 5	2 / 5	0 / 5	0 / 5
	1+	3 / 5	2 / 5	5 / 5	5 / 5
Specific gravity**	1.010	2 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5
	1.015	0 / 5	2 / 5	0 / 5	0 / 5
	1.020	1 / 5	2 / 5	5 / 5	0 / 5
	1.025	2 / 5	0 / 5	0 / 5	4 / 5
	≥1.030	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
Occult blood	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
pH	7.0	2 / 5	1 / 5	0 / 5	3 / 5
	7.5	0 / 5	0 / 5	2 / 5	2 / 5
	8.0	1 / 5	1 / 5	1 / 5	0 / 5
	8.5	2 / 5	3 / 5	2 / 5	0 / 5
Protein	Negative	2 / 5	1 / 5	1 / 5	0 / 5
	Trace	2 / 5	3 / 5	1 / 5	0 / 5
	1+	1 / 5	1 / 5	3 / 5	5 / 5
Urobilinogen	0.2	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Nitrite	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Leukocyte	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Trace	0 / 5	2 / 5	1 / 5	1 / 5
Color	Straw	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the sign / Number of animals examined
*: Significant difference among groups, $p<0.05$
**: Significant difference among groups, $p<0.01$

Table VIII-2. Urinalysis of female rats

TEST ITEM		Group (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Glucose	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Bilirubin	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Ketone body**	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	1 / 5
	Trace	0 / 5	0 / 5	0 / 5	4 / 5
Specific gravity	≤1.005	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	1.010	3 / 5	3 / 5	2 / 5	1 / 5
	1.015	1 / 5	2 / 5	2 / 5	3 / 5
	1.025	0 / 5	0 / 5	1 / 5	1 / 5
Occult blood	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Table VIII-2. Continued

TEST ITEM		Group (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
pH	7.0	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5
	7.5	4 / 5	1 / 5	1 / 5	0 / 5
	8.0	1 / 5	1 / 5	0 / 5	1 / 5
	8.5	0 / 5	2 / 5	4 / 5	4 / 5
Protein	Negative	5 / 5	5 / 5	4 / 5	4 / 5
	Trace	0 / 5	0 / 5	1 / 5	1 / 5
Urobilinogen	0.2	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Nitrite	Negative	2 / 5	2 / 5	5 / 5	4 / 5
	Positive	3 / 5	3 / 5	0 / 5	1 / 5
Leukocyte	Negative	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Color	Straw	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the sign / Number of animals examined
**: Significant difference among groups, $p<0.01$

Table IX-1. Hematological values of male rats

TEST ITEM	Group (mg/kg)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
WBC[1](K/μl)	10.08 ± 1.97	7.96 ± 2.86	7.40 ± 1.48	7.78 ± 0.73
NE[2](K/μl)	1.27 ± 0.33	1.19 ± 0.50	1.04 ± 0.23	1.18 ± 0.49
EO[3](K/μl)	0.07 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.03
BA[4](K/μl)	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
LY[5](K/μl)	8.37 ± 1.75	6.45 ± 2.30	6.01 ± 1.43	6.25 ± 0.64
MO[6](K/μl)	0.24 ± 0.08	0.15 ± 0.05	0.17 ± 0.06	0.18 ± 0.11
LUC[7](K/μl)	0.12 ± 0.04	0.08 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.10 ± 0.05
NEP[8](%)	12.8 ± 3.0	14.7 ± 2.9	14.5 ± 4.0	15.0 ± 5.6
EOP[9](%)	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.5	0.9 ± 0.6	0.9 ± 0.3
BAP[10](%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
LYP[11](%)	82.8 ± 3.1	81.4 ± 3.4	80.7 ± 4.8	80.4 ± 6.8
MOP[12](%)	2.4 ± 0.4	1.9 ± 0.3	2.3 ± 0.7	2.4 ± 1.5
LUP[13](%)	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.4	1.6 ± 0.8	1.2 ± 0.6
RBC[14](M/μl)	7.72 ± 0.20	7.65 ± 0.46	7.42 ± 0.22	7.72 ± 0.39
Hb[15](g/dl)	13.0 ± 4.7	15.3 ± 0.6	14.8 ± 0.4	15.1 ± 0.6
RDW[16](%)	11.3 ± 0.1	11.3 ± 0.7	11.5 ± 0.3	11.3 ± 0.7
HCT[17](%)	47.5 ± 0.9	47.7 ± 1.7	46.2 ± 0.6	47.3 ± 2.0
MCV[18](fL)	61.4 ± 0.8	62.5 ± 2.3	62.3 ± 1.2	61.4 ± 3.2
MCH[19](pg)	16.8 ± 6.0	20.0 ± 0.9	19.9 ± 0.3	19.6 ± 1.1
MCHC[20](g/dl)	27.3 ± 9.8	32.0 ± 0.5	31.9 ± 0.5	31.9 ± 0.3
Reti[21](%)	2.84 ± 0.35	3.00 ± 0.83	2.69 ± 0.65	3.02 ± 0.46
PLT[22](K/μl)	1078 ± 140	984 ± 128	965 ± 292	1049 ± 107
MPV[23](fL)	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.3	5.6 ± 0.2	5.8 ± 0.2

[1]:White blood cell, [2]: Neutrophil, [3]: Eosinophil, [4]: Basophil, [5]: Lymphocyte, [6]: Monocyte, [7]: Large unstained cell, [8]: Percent of neutrophil, [9]: Percent of eosinophil, [10]: Percent of basophil, [11]: Percent of lymphocyte, [12]: Percent of monocyte, [13]: Percent of large unstained cell, [14]: Red blood cell, [15]: Hemoglobin, [16]: Red cell distribution width, [17]: Hematocrit, [18]: Mean corpuscular volume, [19]: Mean corpuscular hemoglobin, [20]: Mean corpuscular hemoglobin concentration, [21]: Reticulocyte, [22]: Platelet, [23]: Mean platelet volume. Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.

Table IX-2. Hematological values of female rats

	Group (mg/kg)			
TEST ITEM	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
WBC[1](K/μl)	6.39 ± 2.00	5.88 ± 2.09	5.58 ± 1.24	8.33 ± 2.04
NE[2](K/μl)	0.73 ± 0.34	0.71 ± 0.38	0.65 ± 0.15	0.74 ± 0.23
EO[3](K/μl)	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02
BA[4](K/μl)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
LY[5](K/μl)	5.36 ± 1.81	4.90 ± 2.06	4.64 ± 1.13	7.26 ± 2.02
MO[6](K/μl)	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.06
LUC[7](K/μl)	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.11* ± 0.03
NEP[8](%)	11.8 ± 4.5	13.1 ± 7.2	11.9 ± 2.9	9.3 ± 3.6
EOP[9](%)	1.4 ± 0.3	1.7 ± 0.9	1.5 ± 0.6	0.9 ± 0.3
BAP[10](%)	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
LYP[11](%)	83.5 ± 4.6	82.1 ± 6.9	82.8 ± 2.4	86.7 ± 4.0
MOP[12]((%)	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.7	2.6 ± 0.5	1.7 ± 0.7
LUP[13](%)	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.4	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.3
RBC[14](M/μl)	7.41 ± 0.19	7.48 ± 0.25	7.44 ± 0.24	7.50 ± 0.30
Hb[15](g/dl)	14.7 ± 0.5	14.8 ± 0.4	14.7 ± 0.4	14.9 ± 0.3
RDW[16](%)	10.4 ± 0.3	10.6 ± 0.4	10.2 ± 0.2	10.3 ± 0.2
HCT[17](%)	44.5 ± 1.5	44.4 ± 1.3	44.8 ± 1.3	45.4 ± 1.5
MCV[18](fL)	60.2 ± 1.5	59.4 ± 2.5	60.1 ± 1.0	60.5 ± 2.5
MCH[19](pg)	19.8 ± 0.5	19.8 ± 0.6	19.8 ± 0.3	19.8 ± 0.7
MCHC[20](g/dl)	32.9 ± 0.2	33.4 ± 0.8	32.9 ± 0.2	32.8 ± 0.4
Reti[21](%)	2.21 ± 0.24	2.24 ± 0.33	2.27 ± 0.56	2.09 ± 0.70
PLT[22](K/μl)	1051 ± 128	1149 ± 307	1213 ± 64	1154 ± 154
MPV[23](fL)	5.7 ± 0.2	6.1 ± 0.7	5.5 ± 0.1	5.6 ± 0.2

[1]:White blood cell, [2]: Neutrophil, [3]: Eosinophil, [4]: Basophil, [5]: Lymphocyte, [6]: Monocyte, [7]: Large unstained cell, [8]: Percent of neutrophil, [9]: Percent of eosinophil, [10]: Percent of basophil, [11]: Percent of lymphocyte, [12]: Percent of monocyte, [13]: Percent of large unstained cell, [14]: Red blood cell, [15]: Hemoglobin, [16]: Red cell distribution width, [17]: Hematocrit, [18]: Mean corpuscular volume, [19]: Mean corpuscular hemoglobin, [20]: Mean corpuscular hemoglobin concentration, [21]: Reticulocyte, [22]: Platelet, [23]: Mean platelet volume. Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.
*: Significant difference compared with control group value, $p<0.05$

Table X-1. Serum biochemical values of male rats

	Group (mg/kg)			
TEST ITEM	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
AST[1](IU/L)	167 ± 22	146 ± 15	145 ± 16	130* ± 10
ALT[2](IU/L)	37 ± 4	39 ± 3	62 ± 59	40 ± 7
GGT[3](IU/L)	1.00 ± 0.00	0.40 ± 0.55	1.00 ± 0.00	0.40 ± 0.55
ALP[4](IU/L)	481 ± 116	454 ± 58	470 ± 63	495 ± 98
BIL[5](mg/dl)	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02
BUN[6](mg/dl)	16.2 ± 2.3	17.1 ± 1.0	15.0 ± 2.1	15.6 ± 1.9
CRE[7](mg/dl)	0.43 ± 0.05	0.45 ± 0.02	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.03
UA[8](mg/dl)	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.4
GLU[9](mg/dl)	146 ± 21	129 ± 4	137 ± 13	126 ± 14
CHO[10](mg/dl)	68 ± 9	79 ± 6	78 ± 7	69 ± 10
TG[11](mg/dl)	79 ± 41	41 ± 7	69 ± 22	46 ± 14

Table X-1. Continued

	Group (mg/kg)			
TEST ITEM	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
PRO[12](g/dl)	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.1
ALB[13](g/dl)	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1
A/Gratio[14]	0.69 ± 0.02	0.68 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.70 ± 0.02
LDH[15](IU/L)	2391 ± 615	1637** ± 336	1613** ± 548	1148** ± 170
CPK[16](U/L)	1157 ± 300	924 ± 305	827 ± 197	638* ± 118
Ca[17](mg/dl)	9.4 ± 0.2	9.4 ± 0.2	9.4 ± 0.1	9.4 ± 0.2
IP[18](mg/dl)	8.0 ± 0.7	7.8 ± 0.5	7.6 ± 0.5	7.7 ± 0.2
Mg[19](mg/dl)	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.1
Na[20](mmol/L)	140 ± 1	141 ± 1	139 ± 3	140 ± 1
K[21](mmol/L)	5.0 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2
Cl[22](mmol/L)	100 ± 1	99 ± 2	100 ± 1	99 ± 2

[1]: Aspartate aminotransferase, [2]: Alanine aminotransferase, [3]: Gamma(γ)-glutamyl transferase, [4]: Alkaline phosphatase, [5]: Total bilirubin, [6]: Blood urea nitrogen, [7]: Creatinine, [8]: Uric acid, [9]: Glucose, [10]: Total cholesterol, [11]: Triglyceride, [12]: Total protein, [13]: Albumin, [14]: Albumin/Globulin ratio, [15]: Lactate dehydrogenase, [16]: Creatine phosphokinase, [17]: Calcium, [18]: Inorganic phosphorus, [19]: Magnesium, [20]: Sodium, [21]: Potassium, [22]: Chloride. Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.
*: Significant difference compared with control group value, $p<0.05$
**: Significant difference compared with control group value, $p<0.01$

Table X-2. Serum biochemical values of female rats

	Group (mg/kg)			
TEST ITEM	G1(0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
AST[1](IU/L)	119 ± 9	133 ± 40	116 ± 22	116 ± 16
ALT[2](IU/L)	34 ± 8	28 ± 4	27 ± 3	31 ± 5
GGT[3](IU/L)	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.4
ALP[4](IU/L)	246 ± 59	313 ± 26	330 ± 107	295 ± 47
BIL[5](mg/dl)	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02
BUN[6](mg/dl)	18.2 ± 1.1	15.2 ± 2.6	16.3 ± 3.0	16.9 ± 2.4
CRE[7](mg/dl)	0.49 ± 0.03	0.44* ± 0.04	0.41* ± 0.04	0.44* ± 0.04
UA[8](mg/dl)	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.6	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3
GLU[9](mg/dl)	123 ± 7	123 ± 8	124 ± 21	118 ± 8
CHO[10](mg/dl)	83 ± 11	80 ± 16	95 ± 13	105* ± 8
TG[11](mg/dl)	21 ± 8	20 ± 15	19 ± 4	25 ± 10
PRO[12](g/dl)	6.7 ± 0.1	6.5 ± 0.2	6.7 ± 0.2	6.9 ± 0.3
ALB[13](g/dl)	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.3
A/Gratio[14]	0.81 ± 0.07	0.84 ± 0.04	0.81 ± 0.09	0.83 ± 0.08
LDH[15](IU/L)	894 ± 324	1350 ± 870	1033 ± 404	1057 ± 434
CPK[16](U/L)	483 ± 178	670 ± 401	597 ± 299	576 ± 240
Ca[17](mg/dl)	9.5 ± 0.2	9.3 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.7 ± 0.3
IP[18](mg/dl)	6.4 ± 0.6	6.8 ± 0.5	6.6 ± 0.4	7.0 ± 0.4
Mg[19](mg/dl)	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1
Na[20](mmol/L)	138 ± 2	139 ± 2	138 ± 2	138 ± 2
K[21](mmol/L)	4.0 ± 0.3	3.9 ± 0.7	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Cl[22](mmol/L)	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1

[1]: Aspartate aminotransferase, [2]: Alanine aminotransferase, [3]: Gamma(γ)-glutamyl transferase, [4]: Alkaline phosphatase, [5]: Total bilirubin, [6]: Blood urea nitrogen, [7]: Creatinine, [8]: Uric acid, [9]: Glucose, [10]: Total cholesterol, [11]: Triglyceride, [12]: Total protein, [13]: Albumin, [14]: Albumin/Globulin ratio, [15]: Lactate dehydrogenase, [16]: Creatine phosphokinase, [17]: Calcium, [18]: Inorganic phosphorus, [19]: Magnesium, [20]: Sodium, [21]: Potassium, [22]: Chloride. Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.
*: Significant difference compared with control group value, $p<0.05$

Table XI. Gross findings of rats

		Sex: male			
		Group (mg/kg)			
ORGANS	SIGNS	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
All organs	No gross finding detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
		Sex: female			
		Group (mg/kg)			
ORGANS	SIGNS	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
All organs	No gross finding detected	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the signs / Number of animals examined

Table XII-1. Absolute organ weight of male rats

	Group (mg/kg)			
ORGANS	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Body weight	401.82 ± 31.8	392.52 ± 46.1	390.81 ± 26.7	378.26 ± 17.0
Testis(Lt.)	1.7547 ± 0.1131	1.6650 ± 0.0946	1.6892 ± 0.2383	1.6638 ± 0.0957
Testis(Rt.)	1.7395 ± 0.0933	1.6740 ± 0.0974	1.7527 ± 0.2373	1.6599 ± 0.0783
Prostate	0.5308 ± 0.0714	0.6044 ± 0.1012	0.6263 ± 0.1633	0.5483 ± 0.0635
Spleen	0.8039 ± 0.1601	0.8557 ± 0.1295	0.7730 ± 0.1149	0.7010 ± 0.1572
Liver	11.7922 ± 1.9415	11.6793 ± 2.0461	12.1710 ± 1.5140	11.4559 ± 1.0282
Adrenal gland(Lt.)	0.0309 ± 0.0059	0.0302 ± 0.0044	0.0284 ± 0.0030	0.0291 ± 0.0019
Adrenal gland(Rt.)	0.0289 ± 0.0055	0.0320 ± 0.0072	0.0283 ± 0.0048	0.0269 ± 0.0029
Kidney(Lt.)	1.5327 ± 0.1370	1.5606 ± 0.1057	1.4876 ± 0.2194	1.5154 ± 0.0737
Kidney(Rt.)	1.5316 ± 0.1447	1.5891 ± 0.1022	1.5899 ± 0.2384	1.5518 ± 0.0933
Heart	1.4981 ± 0.1121	1.5111 ± 0.1317	1.3672 ± 0.1372	1.3318 ± 0.1161
Lung	1.5760 ± 0.0862	1.5899 ± 0.1335	1.5373 ± 0.1674	1.4850 ± 0.0623
Brain	2.0875 ± 0.1169	2.0422 ± 0.0542	2.0494 ± 0.0697	2.0086 ± 0.1025
Pituitary gland	0.0130 ± 0.0036	0.0118 ± 0.0011	0.0108 ± 0.0012	0.0111 ± 0.0016
Thymus	0.5755 ± 0.1095	0.5465 ± 0.0795	0.5954 ± 0.0708	0.5632 ± 0.1429

Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.
Lt.: Left, Rt.: Right

Table XII-2. Absolute organ weight of female rats

	Group (mg/kg)			
ORGANS	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
Body weight	250.53 ± 15.4	249.32 ± 21.3	246.88 ± 13.3	238.45 ± 11.6
Testis(Lt.)	0.0560 ± 0.0118	0.0518 ± 0.0097	0.0525 ± 0.0084	0.0405 ± 0.0079
Testis(Rt.)	0.0543 ± 0.0084	0.0547 ± 0.0077	0.0523 ± 0.0076	0.0429 ± 0.0073
Prostate	0.4193 ± 0.0460	0.4914 ± 0.1023	0.5404 ± 0.2047	0.5612 ± 0.1707
Spleen	0.5441 ± 0.0432	0.6071 ± 0.0582	0.5800 ± 0.0762	0.5957 ± 0.0883
Liver	7.1699 ± 0.5424	7.4146 ± 0.2698	7.5556 ± 0.7628	7.5662 ± 0.4174
Adrenal gland(Lt.)	0.0325 ± 0.0022	0.0351 ± 0.0049	0.0347 ± 0.0058	0.0350 ± 0.0026
Adrenal gland(Rt.)	0.0320 ± 0.0022	0.0370 ± 0.0060	0.0340 ± 0.0049	0.0355 ± 0.0051
Kidney(Lt.)	0.9810 ± 0.1226	1.0382 ± 0.0624	0.9904 ± 0.1071	0.9993 ± 0.0798
Kidney(Rt.)	1.0096 ± 0.1048	1.0421 ± 0.0818	1.0229 ± 0.0938	1.0025 ± 0.0495
Heart	0.9997 ± 0.0605	1.0062 ± 0.0519	1.0133 ± 0.0576	0.9621 ± 0.0688
Lung	1.2346 ± 0.1132	1.2978 ± 0.0627	1.2417 ± 0.0821	1.2213 ± 0.0804
Brain	1.9116 ± 0.0723	2.0046 ± 0.1209	1.9370 ± 0.0387	1.9869 ± 0.1122
Pituitary gland	0.0151 ± 0.0025	0.0137 ± 0.0026	0.0144 ± 0.0022	0.0152 ± 0.0031
Thymus	0.5856 ± 0.0892	0.5740 ± 0.1182	0.5101 ± 0.0889	0.5546 ± 0.1304

Each Data is means ± standard deviation of five replicate tests.
Lt.: Left, Rt.: Right

고 찰

단회 경구투여 용량증가 독성시험은 시험물질 땃두릅나무 열수추출물 분말의 단회 경구투여에 의한 독성증상과 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)을 조사하기 위하여 실시되었다.[12] Sprague-Dawley(SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 1,250(저용량군), 2,500(중용량군) 및 5,000(고용량군) mg/kg의 용량으로 시험군을 설정하고 부형제 대조군과 비교하였으며, 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 실험종료시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다. 실험기간 동안 사망동물은 발생하지 않았고 암·수 5,000 mg/kg 투여군의 각 2/5 례에서 시험물질 투여 직후 유연이 관찰되었다. 그러나 다른 이상증상을 나타내지 않았고 일시적으로 타액분비가 촉진된 것으로 보여 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다. 체중측정 결과, 모든 시험동물에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. 실험종료 시 부검결과, 모든 시험동물에서 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 보아 본 시험조건에서 시험물질 땃두릅나무 열수추출물 분말에 의한 독성증상은 관찰되지 않았으며, 개략의 치사량은 >5,000 mg/kg로 판단된다.

4주 반복 경구투여 용량결정 시험은 땃두릅나무 열수추출물 분말의 4주 반복 경구투여에 의한 독성증상 및 무독성량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)[13]을 조사하고 13주 반복 경구투여독성시험의 투여용량을 설정하기 위하여 실시되었다. Sprague-Dawley(SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 1,250(저용량군), 2,500(중용량군) 및 5,000(고용량군) mg/kg/day의 용량으로 시험군을 설정하고 부형제 대조군과 비교하였으며, 실험기간 동안 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 음수섭취량, 안검사, 요검사, 임상병리검사, 장기중량, 부검 시 육안소견 및 조직병리학적 소견을 관찰하였다. 실험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았고 암컷 1,250 mg/kg/day 투여군, 암·수 2,500 및 5,000 mg/kg/day의 투여군에서 시험물질 투여직후 간헐적 또는 지속적인 유연이 관찰되었으나, 일시적인 타액분비 촉진에 의한 것으로 판단되어 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다. 체중측정 결과, 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 사료섭취량 측정결과, 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 음수섭취량 측정결과, 실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 안검사 결과, 안검사를 실시한 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 요검사 결과, 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 빌리루빈 항목의 검출빈도와 암컷 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 케톤체 항목의 검출빈도가 증가경향을 보이며 군간 유의한 차이를 나타내었다. 그러나 검출빈도의 차이가 경미하고 암·수 상관성 또는 다른 검사 항목에서 이와 상응하는 변화가 관찰되지 않아 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다. 수컷 시험군의 요비중 항목의 유의한 차이는 용량-반응 상관성이 뚜렷하지 않고 다른 시험항목에서 신장과 관련된 이상변화가 동반되지 않아 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다. 혈액학적 검사결과, 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 LUC 수치가 증가하였으나, 생물학적 변동범위에 속하고 용량-반응 상관성도 뚜렷하지 않아 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 혈액생화학적 검사결과, 수컷 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군의 LDH 수치, 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군의 AST 및 CPK 수치가 용량-반응 상관성을 나타내며 감소하였다. 그러나 암컷 투여군에서 상관성 있는 변화가 관찰되지 않았으며, 일반적으로 해당 수치의 감소는 임상학적 의의를 지니지 않으므로 독성학적 의미는 없는 것으로 판단된다. 암컷 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군의 CRE 수치 감소 및 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군의 CHO 수치 증가는 뚜렷한 용량-반응상관성을 보이지 않았거나, 그 정도가 경미하여 생물학적 변동 범위에 속하여 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 계획부검 결과, 암·수 모든 시험동물에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다. 장기중량 측정결과, 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군간의 상대장기중량이 증가하였으나, 그 정도의 차이가 경미하여 생물학적 변동범위에 속하므로 독성학적 의미는 없었다. 이상의 결과로 보아 본 시험 조건에서 시험물질 땃두릅나무 열수추출물 분말을 설치류인 SD 랫드에 4 주간 반복 경구투여한 결과, 시험물질에 의한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 시험물질 땃두릅나무 열수추출물 분말의 무독성량은 5,000 mg/kg/day로 판단된다.

같은 두릅나무과(*Araliaceae*)에 속하는 식물인 두릅나무(*Aralia elata* Seem) 추출물의 단회 경구투여 독성시험[14] 및 4주 반복 투여 독성시험[15]의 결과에서도 단발적으로 일어나는 증상에 관해서는 독성과 연관시키지 않았으며, 독성이 없음을 확인하였다. 두릅나무 추출물의 4주 반복 투여 독성시험의 경우 1,000 mg/kg/day 이상이 무해용량으로 확인하였지만, 땃두릅 나무 열수추출물은 5,000 mg/kg/day로 무해용량을 확인하였으므로 독성이 없음을 확인할 수 있었다.

결 론

SD 랫드를 이용한 땃두릅나무 열수추출물 분말의 단회 경구투여는 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다. 4주 반복 경구투여는 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 음수섭취량, 안검사, 요검사, 임상병리검사, 장기중량, 부검 시 육안소견 및 조직병리학적 소견을 관찰하였다. 시험 결과 사망동물이

발생하지 않았고, 어떠한 독성에 의한 영향도 유발되지 않았다. 본 시험을 통하여 땃두릅나무 열수추출물 분말의 최소 치사량은 5,000 mg/kg/day라는 것으로 나타났다. 따라서 땃두릅 열수추출물 분말은 독성이 없는 안전한 천연물로 기능성 식품 및 의약품으로써의 개발 가능성을 시사한다.

사 사

본 논문의 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술연구개발사업(과제번호: 2017038B10- 1819-BA01)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

인 용 문 헌

1. Kim, H. Y. and Sung, Y. K. (2018) Pharmacological treatment of osteoarthritis. *J. Korean Med Assoc*. **61**: 623-629.
2. Wolf, B. W. and Weisbrode, S. E. (2003) Safety evaluation of an extract from *Salacia oblonga*. *Food Chem. Toxicol*. **41**: 867-874.
3. Mei, N., Arlt, V. M., Phillips, D. H., Heflich, R. H. and Chen T. (2006) DNA adduct formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver. *Mutat. Res*. **602**: 83-91.
4. 이우철 (1996) 원색한국기준식물도감 251. 아카데미서적, 서울.
5. 식품의약품안전청 (2017) 비임상시험관리기준. 식품의약품안전처고시 제 2017-32호.
6. 식품의약품안전청 (2015) 의약품 등의 독성 시험 기준. 식품의약품안전처고시 제 2015-82 호.
7. 식품의약품안전청 (2017) 의약품 등의 독성시험 기준. 식품의약품안전처고시 제2017-71 호
8. Organization for Economic Cooperation and Development (2008) Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 407
9. Gary, A. B., Scot, L. E., Michael, R. E. and William, F. M. (1990) Pathology of the Fischer rat; Reference and Atlas, 4th edit. Academic Press, Inc., UK
10. Sahota, P. S., James, A. P. and Jerry, F. H. (2013) Toxicologic pathology: nonclinical safety assessment, CRC press, USA.
11. 추상규 (2001) 요 검사학, 1st ed. 고려의학, 서울.
12. 식품의약품안전청 (2012) 의약품 등의 독성 시험 기준 해설서.
13. Greaves P. (2007) Histopathology of preclinical toxicity studies; Interpretation and relevance in drug safety evaluation, 3rd edit., Elsevier science. USA.
14. Yang, H. K., Jin, J. Y., Kim, J. M., Ko, M. S., Hong, H. J., Kim, S. C. and Lee, Y. J. (2006) Single oral dose toxicity study of the extract of *Aralia elata* in mce. *J. Toxicol. Pub. Health*. **22**: 439-443.
15. Jin, J. Y., Yang, H. K., Kim, J. M., Ko, M. S., Hong, H. J., Jin, Y. G., Kim, D. G., Kim, S. C., Lee, I., Hyon, M. K. and Kang, S. C. (2006) Four-week repeated oral toxicity study of the extract of *Aralia elata* in rats. *J. Toxicol. Pub. Health*. **22**: 445-452.

(2019. 8. 16 접수; 2019. 9. 4 심사; 2019. 9. 10 게재확정)