

荊芥連翹湯 抽出物의 SD Rats에서 28일 經口 반복투여 독성시험

안현주^{1,2}, 황순이^{1,2}, 이종록¹, 김상찬^{1,3}, 지선영^{1,2}

대구한의대학교 ¹한의과대학, ²안이비인후피부과, ³한방신약개발연구팀(BK21)

ABSTRACT

28days Repeat Oral Dose Toxicity Test of “Hyeonggaeyeongyangtang” extract in SD Rats

Hyun-Jue An^{1,2}, Sun-Yi Hwang^{1,2}, Jong-Rok Lee¹, Sang-Chan Kim^{1,3}, Seon-Young Jee^{1,2}

¹College of Oriental Medicine, ²Dept. of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology,

³Development Team for The New Drug of Oriental Medicine (BK21 program) Daegu Haany University

Objectives : HYTE (Hyeonggaeyeongyangtang Extract), a polyherbal formula has been used as folk medicine, 28days repeat oral dose toxicity was tested in SD rats according to KFDA Guideline[2005-60].

Methods : In this study, mortality, clinical signs, body weight and gains, food and water consumption, ophthalmologic observation, urinalysis, hematology, serum biochemistry, gross findings, organ weight and histopathological observations were conducted during 28days of dosing periods.

Results :

1. No HYTE treatment-related mortalities and clinical signs were detected in all dosing levels

-
- 교신저자 : 지선영
 - 대구 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속 대구한방병원 안이비인후피부과교실
 - Tel : 053-770-2118 Fax : 053-768-6340 E-mail : jeesy@dhu.ac.kr
 - 접수 : 2008/ 05/ 08 수정 : 2008/ 06 /11 채택 : 2008/ 06/ 17

tested in male and female rats during the whole experimental periods.

2. No HYTE treatment-related changes on body weight, gains and food consumption were detected in all dosing levels tested in male and female rats during the whole experimental periods except for 2000mg/kg-dosing female groups in which significantly increase of body weight, gains, food and water consumption were detected compared to that of vehicle control in some points.

3. No HYTE treatment-related changes on ophthalmologic examination were detected in all dosing levels tested in male and female rats.

4. No HYTE treatment-related changes on urinalysis were detected in all dosing levels tested in male and female rats except for 2000mg/kg-dosing female groups in which, significantly increase of urine volume and related decrease on the urine specific gravity were detected as secondary effects of increase on the water consumptions not HYTE treatment-related toxicological signs.

5. No HYTE treatment-related changes on hematology were detected in all dosing levels tested in male and female rats except for increases in the total WBC count and lymphocytes of 2000mg/kg-dosing male and female groups with decrease of large unstained cells as pharmacological effects of immune enhancements not HYTE treatment-related toxicological signs.

6. No HYTE treatment-related changes on serum biochemistry were detected in all dosing levels tested in male and female rats.

7. No HYTE treatment-related changes on gross findings, organ weight and histopathology were detected in all dosing levels tested in male and female rats except for 2000mg/kg-dosing male and female groups in which, spleen and thymus organ weights, hypertrophy at gross observation and hyperpalsia of lymphoid cells and follicles at histopathological observation in spleen and thymus were detected as pharmacological effects of immune enhancements not HYTE treatment-related toxicological signs.

Conclusions : Based on these results, the NOAEL and MTD of HYTE in SD rats were considered as over 2000mg/kg, respectively at 28days repeat oral dose toxicity test because most of these findings were considered as results of pharmacological effects of immune enhancements not HYTE treatment-related toxicological signs or secondary effects.

Key word : HYT (Hyeonggaeyeongyangtang), 4 week, toxicity

I. 서 론

의료기술은 하루가 다르게 발달하지만 인간의 삶의 환경은 갈수록 나빠져 건강 기능성 식품 및 천연물 의약품에 관심이 높아지고 있다. 그러나 안전성이 확보되지 않은 식품 및 의약품의 오·남용으로 인한 독성 및 부작용이 늘어나게 됨으로써 사회문제화 되고 있어 이에 대한 철저한 규제 및 관리가 요구되고 있다^{1,2)}. 최근 생약 성분을 함유한 기능성 식품에 대한 독성 검사 기준이 점점 강화되고 있는 실정이며, 이들 역시 의약품 등과 동일한 독성평가가 수행되고 있다³⁾.

荊芥連翹湯은 龔⁴⁾의 《萬病回春》에 처음 수록된 방제로 風熱이 上發하여 頭上諸症을 惹起시킨 것을 다스린다. 上焦風熱을 다스리는 대표적인 방제로 中耳炎, 副鼻洞炎, 鼻炎, 扁桃腺炎 등의 耳鼻咽喉疾患에 많이 활용되어온 방제이다⁵⁾.

荊芥連翹湯에 관한 연구는 孫⁶⁾의 腫耳에 관한 문헌적 연구와 金⁷⁾의 解熱, 鎮痛 및 消炎作用에 미치는 영향, 飴 등⁸⁾의 항알레르기 작용에 대한 실험적 효과, 吳 등⁹⁾의 *Klebsiella pneumoniae*에 대한 항균효과에 관한 연구가 있으나, 아직까지 荊芥連翹湯 추출물의 일반 독성학적 보고는 없다.

따라서 본 연구에서는 荊芥連翹湯 추출물을 rats에서 28일간 경구투여한 후 사망률, 임상증상, 사료 및 물섭취량, 체중 및 중체량, 안저검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액 생화학적 검사, 부검소견, 장기중량 및 조직병리학적 검사를 실시하여 荊芥連翹湯 추출물의 독성상태를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

본 실험은 식품의약품안전청고시 의약품등독성시험기준[제 2005-60호¹⁰⁾]에 준하여 실험을 실시하였으며, 모든 실험동물은 《Guide for the Care and Use of Laboratory Animals¹¹⁾》에 준하여 취급하였다.

1. 실험동물

성숙한 암수 Sprague-Dawley계 rats(6wks old upon receipt, Charles River, Japan)를 사료(삼양사, 서울)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주일간 적응시킨 후, 총 8개의 군으로 구분하고, 각 그룹당 10마리씩 사용하여 총 80마리를 사용하였다. 체중은 수컷의 경우 132.20-135.10g, 암컷의 경우 101.90-103.30g의 rats를 사용하였다. 실험동물은 온도 20-25°C와 습도 40-45%가 조절된 사육실에서 사육하였으며, 환기횟수는 11-12회/hr, 조명은 12hr/day를 유지하였다. 사료는 고형사료를 자유롭게 공급하였으며, 물은 수도수를 자유롭게 공급하였다. 실험동물은 개체별 사육상자에 사육하였다.

2. 실험군의 구분

실험물질인 荊芥連翹湯은 식품의약품안전청고시 의약품등독성시험기준¹⁰⁾에 따라 설치류 최대 투여 한계용량인 2000mg/kg을 최고 농도로 설정하였으며, 공비 2를 이용하여 1000 및 500mg/kg의 농도를 중간 및 저용량군으로 설정하였다¹²⁾.

Table 1. Experimental grouping used in this study

Group ID	Treatment	Dosage	Number of animal	Sex of animal
G0M	DW	10ml/kg	10	Male
G1M	HYTE	2000mg/kg	10	Male
G2M	HYTE	1000mg/kg	10	Male
G3M	HYTE	500mg/kg	10	Male
G0F	DW	10ml/kg	10	Female
G1F	HYTE	2000mg/kg	10	Female
G2F	HYTE	1000mg/kg	10	Female
G3F	HYTE	500mg/kg	10	Female

HYTE: Hyeonggaeyeongytang Extract.

DW: Distilled Water.

HYTE were suspended in DW and dosed by gastric gavage at 10ml/kg levels daily for 28days.

G0M: Vehicle, negative control group male.

G0F: Vehicle, negative control group female.

3. 荊芥連翹湯의 조성 및 추출

1) 조 성

본 실험에 사용된 약재는 대구한의대학교 부속

대구한방병원 약제과에서 구입하여 엄선하여 사용하였으며, 본 실험에 사용된 荊芥連翹湯 1첩 분량의 조성은 <Table 2>와 같다.

Table 2. Composition of HYTE used in this study

藥物名	生藥名	用量 (g)
荆芥	Schizonepetae Herba	2.63
連翹	Forsythiae Fructus	2.63
防風	Ledebouriellae Radix	2.63
當歸	Angelicae gigantis Radix	2.63
川芎	Cnidii Rhizoma	2.63
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	2.63
柴胡	Bupleuri Radix	2.63
枳殼	Aurantii Fructus	2.63
黃芩	Scutellariae Radix	2.63
梔子	Gardeniae Fructus	2.63
白芷	Angelicae dahuricae Radix	2.63
桔梗	Platycodi Radix	2.63
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.88
總量		33.44

HYTE: Hyeonggaeyeongyangtang Extract.

2) 추 출

선정된 약제 15첩 분량(501.60g)을 취하여 정제수 5000ml로 3시간 동안 가열 추출한 후 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator(N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer(PVTFD10A; ilShin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 1첩당 3.70g, 총 55.53g(수율 약 11.07%)의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다.

4. 투여

암수 각각 2000, 1000 또는 500mg/kg의 荊芥連翹湯 추출물을 멸균 증류수에 혼탁시켜 10ml/kg의 용량으로 매일 1회씩 08:30-10:30 사이에 28일간 경구 투여하였다. 매체대조군에서는 동일한 용량의

멸균 증류수를 동일한 방법으로 경구 투여하였다.

5. 임상증상 및 사망례의 관찰

모든 실험동물에 대하여 실험 전 기간(투여일로부터 28일간) 중 매일 폐사나 빈사상태를 관찰하였으며, 실험기간 중의 사망례는 즉시 부검하여 사인을 규명하였다.

실험기간 중 매일 functional observational battery(FOB) test¹³⁻⁴⁾에 기초하여 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에 관한 임상증상을 관찰하였다.

6. 체중의 변화

매체대조군을 포함한 모든 실험동물은 실험기간 동안 매일 체중을 측정하였으며, 이 중 투여 전 1일, 투여일, 투여 후 1, 7, 14, 21, 27 및 최

종 희생일(투여 후 28일)의 체중을 기록하였다. 또한 투여에 따른 체중의 변화를 명확히 하기 위하여 투여일에서 투여 14일 후, 투여 14일 후에서 투여 27일 후 및 투여일에서 투여 후 27일 간의 체중 변화인 증체량을 각각 기록하였다. 모든 실험동물은 사료섭취에 따른 체중의 변화를 최소화하기 위하여 투여일과 최종 부검일에 18시간 이상 절식시켰다(음수는 제한하지 않았다).

7. 사료섭취량의 측정

매체대조군을 포함한 모든 실험동물의 사료섭취량을 투여 후 1 및 2일에 측정하였으며, 이후 주 1회의 빈도로 측정하였다. 사육상자별로 측정일에 정량을 급여하고 익일에 사료 잔량을 측정하여 개체별 일일 사료섭취량(daily food consumption; g/rat/day)을 계산하였다.

8. 물섭취량의 측정

매체대조군을 포함한 모든 실험동물의 물섭취량을 투여일 및 1일에 측정하였으며, 이후 주 1회의 빈도로 측정하였다. 사육상자별로 측정일에 정량을 급여하고 익일에 물 잔량을 측정하여 개체별 일일 물섭취량(daily water consumption; g/rat/day)을 계산하였다.

9. 안저검사

투여 개시 전에 매체대조군을 포함한 모든 실험동물에 대해 안저검사를 실시하고 이상이 있는 실험동물은 배제시켰다. 최종 희생일(투여 후 28일)에 모든 실험동물에 대하여 외안검사를 실시한 후 양안 간접 안저검사기(IO -H, Nietz instrument, Japan)와 산동제를 이용하여 안저검사를 실시하였다.

10. 요검사

부검 전 1주일 이내에 매체대조군을 포함한 암

수 모든 실험동물에 대하여 신선뇨를 채취하여, 비중, 색조, pH, 당, 단백질, 케톤체, 잠혈, 빌리루빈, 유로빌리노겐 및 아질산염을 요 시험지(N-Multistix SG, USA) 및 요 자동분석장치(CliniTek-100, USA)를 이용하여 측정하였다. 요 침사검사는 채취 후 3시간 이내에 원심 분리하여 얻은 침사를 S-M염색을 실시한 후 광학현미경하에서 상피세포, 원주세포, 백혈구 및 적혈구를 정성적으로 관찰하였다. 요량 검사는 요와 변이 분리되는 대사 cage에서 17시간 동안 동물을 개체별로 수용하여 채취한 요를 이용하여 측정하였다.

11. 혈액학적 검사

혈액검체는 ethyl ether 마취하에 24gauge 주사침을 이용하여 후대정맥에서 채혈하였다. 동물은 부검 및 채혈 전 18시간 이상 절식시켰으며, 혈액검체는 혈액 응고 방지제로 EDTA-2K를 사용하였다. 채혈된 혈액에 대하여 <Table 3>에 기록되어 있는 방법으로 백혈구 수, 적혈구 수, Hemoglobin 농도, Hematocrit, Mean corpuscular volume(MCV), Mean corpuscular hemoglobin(MCH), Mean corpuscular hemoglobin concentration(MCHC), 혈소판 수, 백혈구 분별카운트, 망상 적혈구(Reticulocyte) 수, Prothrombin time 및 fibrinogen 양을 혈구자동계측장치(ADVIA120, Bayer, USA) 및 프로트롬빈 시간측정기(ACL 300 plus, Instrumentation Lab., Italy)를 이용하여 측정하였다.

12. 혈액 생화학적 검사

혈액 생화학적 검체는 ethyl ether 마취하에 24gauge 주사침을 이용하여 후대정맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 혈청분리관에 넣은 다음 1시간 이내에 3,000rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고, 분리된 혈청에 대하여 <Table 4>에 기록되어 있는 방법으로 측정하였다.

Table 3. Hematological index used in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Item	Unit	Methods
1) WBC(White blood cell count)	$\times 10^3/\text{mm}^3$	Laser optical with cytochemical reaction
2) RBC(Red blood cell count)	$\times 10^6/\text{mm}^3$	Laser optical (Flow cytometry)
3) HGB(Hemoglobin concentration)	g/ml	Cyanmetemoglobin method
4) HCT(Hematocrit)	%	Calculated using 2) and 5)
5) MCV(Mean corpuscular volume)	fL	Laser optical (Flow cytometry)
6) MCH(Mean corpuscular hemoglobin)	pg	Calculated using 2) and 3)
7) MCHC(Mean corpuscular hemoglobin concentration)	g/ml	Calculated using 3) and 4)
8) Platelet	$10^3/\text{mm}^3$	Laser optical (Flow cytometry)
9) Differential leukocyte count	%	Laser optical with chemical reaction
10) Reticulocyte count	%	Laser optical with cytochemical reaction
11) Prothrombin time	sec	Clotting time method
12) Fibrinogen	mg/ml	Automatically

Items 1) to 10) and 12) were measured by a hematological autoanalyzer (ADVIA120, Bayer, USA).

Item 11) was carried out with blood samples treated with 3.2% sodium citrate using a blood clotting analyzer(ACL 300 plus, Instrumentation Lab., Italy).

Table 4. Serum biochemical index used in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Item	Unit	Methods
1) AST(Aspartate aminotransferase)	IU/L	UV-rate method
2) ALT(Alanine aminotransferase)	IU/L	UV-rate method
3) ALP(Akaline phosphatase)	IU/L	P-NPP method
4) CPK(Creatinine phosphokinase)	IU/L	UV-rate method
5) GLU(Glucose)	mg/ml	Enzyme method
6) TP(Total protein)	g/dl	Biuret method
7) ALB(Albumin)	g/dl	BCG method
8) A/G ratio(Albumin/Globulin ratio)	ratio	Using 6) and 7)
9) BUN(Blood urea nitrogen)	mg/ml	Urease-UV method
10) Creatinine	mg/ml	Jaffe method
11) Triglyceride	mg/ml	Enzyme method
12) Phospholipid	mg/ml	Enzyme method
13) Total cholesterol	mg/ml	Enzyme method
14) Total bilirubin	mg/ml	Jendrassik-cleghorn method
15) Ca(Calcium)	mg/ml	OCPC method
16) P(Inorganic phosphorous)	mg/ml	UV method
17) Cl(Chloride)	nmol/L	Electrode method
18) Na(Sodium)	nmol/L	Electrode method
19) K(Potassium)	nmol/L	Electrode method

Items 1) to 16) were measured by an autoanalyzer(Shimadzu CL-7200, Shimadzu, Japan) and Item 17) to 19) were measured using an ion auto-analyzer(644 NA/K/Cl Analyzer, Ciba-Corning, USA).

13. 부검 및 육안검사

투여 28일 후 최종 부검일에 모든 실험동물의 장기 및 생식기에 대한 육안검사를 통하여 병변의 유무를 검사하였다.

14. 장기중량의 측정

모든 실험동물을 최종 부검일(투여 후 28일)에 부검 및 육안검사를 실시한 후, 폐, 간, 심장, 신장, 비장, 고환 또는 난소, 뇌 및 가슴샘을 적출하여 절대 중량치를 측정하고, 하기의 공식을 이용하여 각각 장기의 체중에 대한 상대 중량치를 계산하였다. 이때 신장과 생식기는 원쪽만 적출하여 중량을 측정하였다.

Relative organ weights(%) = (Absolute organ weight/body weight at sacrifice) × 100

15. 조직병리학적 검사

모든 실험동물을 최종 부검일(투여 후 28일)에 부검 및 육안검사를 실시한 후, 폐, 간, 심장, 신장, 비장, 고환 또는 난소, 부고환, 뇌, 가슴샘, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 췌장, 부신, 타액선,

임파절, 대퇴근, 좌골신경, 피부, 전립샘 등을 적출하여 고환, 부고환, 소화기 및 안구를 제외한 나머지 장기는 10% 중성 formalin에 고정하였으며, 고환, 부고환 및 소화기 각 부위는 Bouin액에 고정하였다. 또한 안구는 Davidson액에 고정하였다. 이후 일반적인 방법으로 파라핀 포매를 실시하고 3-4 μm 의 절편을 준비하여 Hematoxylin & Eosin염색을 실시하였다.

16. 통계처리

모든 수치는 암수 각각의 대조군과 비교하여 Mann-Whitney Wilcoxon's Rank Sum(MW) test로 유의성을 검증하였으며, 모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 이용하였다. 또한 임상증상, 육안적 병변 및 조직병리학적 병변은 그 정도에 따라, ND(not detected), 1+(slight), 2+(moderate) 및 3+(severe)로 구분하였다.

III. 결 과

1. 사망례(Mortality)

Table 5. Mortality observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male SD Rats

Group ID ¹⁾	Days after dosing								Total [#] (Death/total)(%)
	0*	1	2	3	4	5	6-14	14-27	
G0M	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10(0%)
G1M	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10(0%)
G2M	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10(0%)
G3M	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10(0%)

Number of death animals/total observed animals. 1) Group ID was listed in Table 1. *at dosing. #death animals/total observed animals(percentages of death animals).

Table 6. Mortality observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in female SD Rats

Group ID ¹⁾	Days after dosing								Total [#] (Death/total)(%)
	0*	1	2	3	4	5	6-14	14-27	
G0F	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10(0%)
G1F	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10(0%)
G2F	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10(0%)
G3F	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10(0%)

Number of death animals/total observed animals. 1) Group ID was listed in Table 1. *at dosing. #death animals/total observed animals(percentages of death animals).

2. 임상증상(Clinical signs)

실험기간 동안 암수 荊芥連翹湯 추출물 투여

군 및 매체대조군에서 관찰된 임상증상으로는 流涎, 脫毛 및 軟便 등이 있었다(Table 7-10).

Table 7. Clinical signs observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0M	G1M	G2M	G3M	G0F	G1F	G2F	G3F
Normal	4/10(40%)	8/10(80%)	7/10(80%)	8/10(90%)	2/10(20%)	5/10(50%)	6/10(60%)	6/10(60%)
Hair loss	2/10(20%)	1/10(10%)	1/10(70%)	1/10(10%)	6/10(60%)	2/10(20%)	1/10(10%)	2/10(20%)
Soft Stool	2/10(20%)	1/10(10%)	1/10(10%)	0/10(0%)	2/10(20%)	2/10(20%)	1/10(10%)	2/10(20%)
Salivation	3/10(30%)	2/10(20%)	2/10(20%)	1/10(10%)	3/10(30%)	2/10(20%)	3/10(30%)	2/10(20%)

Number of animals showing clinical signs/total observed animals(percentage). 1) Group ID was listed in Table 1. All animals showed slight[1+] degrees regardless of types of clinical signs.

Table 8. Hair loss observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹⁾	Days after dosing								Total ²⁾ (Freq/total) (%)
	0-14	15-17	18	19	20	21	22	23-27	
G0M	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	2/10(20%)
G1M	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	1/10(10%)
G2M	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	1/10(10%)
G3M	0/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	0/10	0/10	1/10(10%)

Group ID ¹⁾	Days after dosing								Total ²⁾ (Freq/total)(%)
	0-12	13	14-16	17-20	21	22	23,24	25-27	
G0F	0/10	1/10	0/10	0/10	4/10	2/10	1/10	0/10	6/10(60%)
G1F	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	2/10	0/10	2/10(20%)
G2F	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	1/10(10%)
G3F	0/10	0/10	1/10	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	2/10(20%)

1) Group ID was listed in Table 1.

2) Number of animals showing hair loss/total observed animals(percentages of death animals)

Table 9. Soft stools observed in this study 28days repeat oral dose of HYTF in male and female SD Rats

Group ID ¹⁾	Days after dosing								Total ²⁾ (Freq/total)(%)
	0	1	2	3	4	5	6-20	21-27	
G0F	0/10	0/10	1/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10(20%)
G1F	0/10	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10(20%)
G2F	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10	0/10	0/10	1/10(10%)
G3F	0/10	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10(20%)

1) Group ID was listed in Table 1.

2) Number of animals showing soft stools/total observed animals(percentages of death animals).

Table 10. Salivation observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹⁾	Days after dosing								Total ²⁾ (Freq/total)(%)
	0	1	2	3	4	5-10	11-20	21-27	
G0M	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10(30%)
G1M	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10(20%)
G2M	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10(20%)
G3M	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10(10%)
G0F	0/10	0/10	3/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	3/10(30%)
G1F	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10(20%)
G2F	0/10	0/10	3/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10(30%)
G3F	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10(20%)

1) Group ID was listed in Table 1.

2) Number of animals showing salivation/total observed animals(percentages of death animals).

3. 체중 및 증체량의 변화

1) 체중의 변화(Table 11-12)

Table 11. Body weight changes in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male SD Rats

Group ID ¹⁾	G0M	G1M	G2M	G3M
Day-1	156.60±7.11	156.10±7.82	155.90±6.95	156.40±5.64
Day 0 ^{2,a)}	132.20±8.66	134.00±9.46	135.10±7.36	134.80±7.70
Day 1	153.64±7.63	157.60±5.64	155.90±6.03	156.90±3.78
Day 7	211.30±10.95	213.30±12.26	213.00±8.87	213.10±8.75
Day 14	265.10±13.28	267.50±12.76	267.60±15.08	261.90±11.84
Day 21	317.00±13.39	319.20±11.24	316.90±15.50	321.40±15.61
Day 27	361.00±18.37	360.10±16.99	357.70±20.12	357.00±16.85
Day 28 ^{2,b)}	329.30±18.66	330.40±15.41	328.60±24.65	323.90±19.10

Mean±SD, g. 1) Group ID was listedA in Table 1. 2) Overnight fasted. a) At dosing. b) At sacrifice.

Table 12. Body weight changes in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0F	G1F	G2F	G3F
Day-1	123.10±9.35	122.10±7.31	122.60±9.92	122.30±7.63
Day 0 ^{2,a)}	103.30±10.81	102.40±10.49	102.40±12.80	101.90±9.65
Day 1	123.80±9.39	122.40±7.11	122.00±7.59	122.70±5.48
Day 7	161.30±9.33	170.90±11.45	160.00±13.90	163.30±7.60
Day 14	193.00±12.81	204.80±12.12	192.00±14.35	191.30±8.34
Day 21	221.60±14.09	248.80±10.95*	224.80±16.55	223.20±7.79
Day 27	253.20±13.54	279.40±15.07*	255.70±18.56	257.00±11.69
Day 28 ^{2,b)}	228.90±15.44	255.30±15.66*	232.00±19.07	234.20±12.55

Mean±SD, g. * p<0.01 compared to that of G0F by MW test. 1) Group ID was listed in Table 1. 2) Overnight fasted. a) At dosing. b) At sacrifice.

2) 증체량의 변화(Table 13)

Table 13. Body weight gains in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male, female SD Rats

Group ID ¹⁾	Periods of body weight gains		
	Day 0 - Day 14	Day 14 - Day 27	Day 0 - Day 27
male	G0M	132.90 ± 16.20	95.90 ± 16.15
	G1M	133.50 ± 14.40	92.60 ± 14.87
	G2M	132.50 ± 13.64	90.10 ± 11.87
	G3M	127.10 ± 10.86	95.10 ± 8.45
female	G0F	89.70 ± 9.10	60.20 ± 5.29
	G1F	102.40 ± 8.30*	74.60 ± 17.67*
	G2F	89.60 ± 9.64	63.70 ± 7.99
	G3F	89.40 ± 5.83	65.70 ± 8.59

Mean±SD, g. 1) Group ID was listed in Table 1. * p<0.01 compared to that of G0F by MW test.

4. 사료섭취량의 변화(Table 14-15)

Table 14. Food consumption detected in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male SD Rats

Group ID ¹⁾	G0M	G1M	G2M	G3M
Day 1	21.68±0.94	21.94±1.42	21.62±1.65	21.76±1.83
Day 2	23.73±1.24	23.65±1.48	23.37±1.64	23.63±2.21
Day 7	27.08±2.65	27.57±2.41	26.69±2.09	26.96±2.03
Day 14	31.62±1.92	31.63±1.43	31.92±2.55	31.90±2.50
Day 21	34.20±2.43	33.91±3.31	33.40±4.51	34.41±2.07
Day 27	33.63±1.26	33.66±2.94	33.12±2.08	33.36±2.45

Mean±SD, g/rat/day. 1) Group ID was listed in Table 1.

Table 15. Food consumption detected in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0F	G1F	G2F	G3F
Day 1	17.43±1.89	17.91±2.07	17.58±1.94	17.82±1.38
Day 2	21.89±1.17	21.79±1.28	21.76±1.36	21.36±1.63
Day 7	20.88±1.38	26.04±3.05*	21.27±1.62	21.72±3.39
Day 14	21.98±1.62	27.46±4.40**	21.48±2.08	22.06±1.24
Day 21	21.63±1.30	26.30±2.35*	22.14±1.65	21.11±1.96
Day 27	22.36±1.28	26.19±3.46*	22.05±2.63	22.54±1.92

Mean±SD, g/rat/day. 1) Group ID was listed in Table 1. * p<0.01 compared to that of G0F by MW test. ** p<0.05 compared to tMW test. hat of G0F by MW test.

5. 물섭취량의 변화

실험기간 동안 암수 荊芥連翹湯 추출물 투여군

및 매체대조군에서의 물섭취량의 변화는 아래와 같다(Table 16-17).

Table 16. Water consumption detected in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male SD Rats

Group ID ¹⁾	G0M	G1M	G2M	G3M
Day 0	29.85±2.14	29.41±1.52	29.58±2.71	31.14±2.86
Day 1	33.23±2.07	33.15±2.62	33.50±3.24	32.97±4.25
Day 7	38.33±4.09	38.70±3.18	38.64±4.91	35.58±2.71
Day 14	42.72±2.82	42.61±1.70	42.30±2.13	42.93±3.78
Day 21	50.98±4.82	50.34±5.72	50.55±4.20	48.94±6.68
Day 27	53.12±3.45	53.92±3.96	52.65±6.68	54.41±7.18

Mean±SD, g/rat/day. 1) Group ID was listed in Table 1.

Table 17. Water consumption detected in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0F	G1F	G2F	G3F
Day 0	25.52±3.51	26.70±5.61	25.03±4.20	25.33±3.51
Day 1	28.60±2.53	28.09±3.79	27.96±4.93	28.80±5.09
Day 7	35.03±3.84	41.47±2.61*	35.47±3.00	34.97±3.86
Day 14	39.37±1.98	44.93±3.93*	39.60±3.67	39.51±6.37
Day 21	42.97±5.48	45.98±6.72**	43.58±5.09	44.03±7.20
Day 27	48.69±7.28	55.38±4.17**	47.95±6.43	48.05±5.92

Mean±SD, g/rat/day. 1) Group ID was listed in Table 1. * p<0.01 compared to that of G0F by MW test. ** p<0.05 compared to that of G0F by MW test.

6. 안저검사 소견의 변화(Table 18)

Table 18. Ophthalmologic findings observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0M	G1M	G2M	G3M	G0F	G1F	G2F	G3F
Normal	9/10(90%)	10/10(100%)	9/10(90%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	9/10(100%)
Opaque 1+	1/10(10%)	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)	0/10(0%)	0/10(0%)	1/10(10%)

Number of animals showing normal appearance in Ophthalmologic observation /total observed animals(percentage). 1) Group ID was listed in Table 1.

7. 요검사 소견의 변화(Table 19)

Table 19. Urinalysis: changes on the urine volume, glucose, bilirubin urine ketone, specific gravity, pH, urine protein, urobilinogen, nitrite, urine occult blood, color, turbidity and sediments in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0M	G1M	G2M	G3M	G0F	G1F	G2F	G3F
Volume (ml/17hrs)	29.78±1.75	30.12±1.71	29.77±2.59	30.43±1.76	13.35±1.77	15.36±1.65*	13.82±1.95	13.89±2.22
Glucose (0-4; degree)	0.50±0.71	0.20±0.42	0.30±0.67	0.40±0.87	0.40±0.70	0.30±0.67	0.30±0.67	0.30±0.48
Bilirubin (0-3; degree)	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ketone (0-4; degree)	0.40±0.70	0.40±0.70	0.40±0.70	0.30±0.67	0.30±0.48	0.40±0.70	0.10±0.32	0.40±0.84
Specific gravity (0-4; degree)	1.011±0.007	1.008±0.006	1.011±0.007	1.010±0.008	1.010±0.004	1.006±0.004*	1.012±0.006	1.010±0.007
pH(degree)	8.00±0.47	8.15±0.53	8.10±0.39	8.10±0.57	8.20±0.54	8.10±0.39	8.00±0.62	8.10±0.57
Protein (0-4; degree)	0.60±0.70	0.60±0.52	0.50±0.71	0.40±0.70	0.50±0.85	0.60±0.52	0.40±0.70	0.40±0.70
Urobilinogen (Eu/dl)	0.4±0.6	0.3±0.4	0.3±0.6	0.5±0.8	0.4±0.6	0.5±0.7	0.3±0.4	0.3±0.6
Nitrite (0-1; degree)	ND ²⁾	0.10±0.32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Occult blood (0-4; degree)	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Color Yellow Yellowish [*]	10/10(100%) 0/10(0%)	10/10(100%) 0/10(0%)	8/10(80%) 2/10(20%)	9/10(90%) 1/10(10%)	9/10(90%) 1/10(10%)	10/10(100%) 0/10(0%)	8/10(80%) 2/10(20%)	10/10(100%) 0/10(0%)
Turbidity Clear Translucent	10/10(100%) 0/10(0%)	10/10(100%) 0/10(0%)	9/10(90%) 1/10(10%)	9/10(90%) 1/10(10%)	9/10(90%) 1/10(10%)	10/10(100%) 0/10(0%)	8/10(80%) 2/10(20%)	10/10(100%) 0/10(0%)
Cast (0-3; degree)	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Epithelial cell (0-3; degree)	1.20±0.63	1.30±0.48	1.00±0.47	1.10±0.57	1.10±0.32	1.20±0.42	1.10±0.88	1.20±0.63
WBC (0-2; degree)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RBC (0-2; degree)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Mean±SD(n=10). * p<0.05 compared to that of G0F by MW test. 1) Group ID was listed in Table 1. 2) Not detected.

8. 혈액학적 검사 소견의 변화(Table 20)

Table 20. Hematology: changes on the WBC, RBC number, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT reticulocyte, PT and fibrinogen and differential count on neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil and large unstained cell in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹¹	G0M	G1M	G2M	G3M	G0F	G1F	G2F	G3F
WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)	10.58±2.19	12.42±0.95**	10.68±1.24	10.76±1.89	7.42±1.48	9.94±0.81*	7.47±1.81	7.68±2.26
RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7.81±1.39	7.95±2.08	7.71±1.63	7.71±2.60	7.43±1.45	7.53±1.53	7.38±1.31	7.46±1.67
HGB(g/dl)	14.47±1.59	14.54±2.12	14.24±2.08	14.46±1.83	14.04±1.90	14.12±1.80	14.33±1.72	14.41±2.03
HCT(%)	46.76±4.97	47.56±5.83	46.77±6.16	46.85±5.01	45.18±3.99	46.29±6.14	46.12±5.05	44.95±4.01
MCV(fL)	61.02±4.94	60.53±3.45	59.99±5.84	60.00±3.09	61.33±3.68	60.88±3.81	61.09±4.70	60.27±3.89
MCH(pg)	19.39±0.50	19.33±0.54	19.33±0.49	19.54±0.82	19.97±0.75	19.95±0.62	19.89±0.91	19.98±0.90
MCHC(g/dl)	31.72±1.22	31.60±1.50	31.23±1.59	31.54±1.30	32.01±1.40	31.95±1.71	32.03±1.57	32.13±2.09
PLT($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1324.50±144.03	1315.20±149.57	1326.50±173.74	1314.60±124.78	1260.10±115.97	1267.30±150.93	1260.40±120.56	1269.90±129.23
Neutrophil(%)	8.84±1.27	7.99±1.31	8.94±1.53	8.97±1.54	7.71±1.52	7.01±1.27	7.90±1.77	7.70±1.74
Lymphocyte(%)	86.45±1.37	88.26±1.17*	86.30±1.93	86.36±1.73	88.54±1.81	89.71±1.41	88.31±1.72	88.58±1.92
Monocyte(%)	1.88±0.72	1.53±0.42	1.83±0.65	1.90±0.40	1.37±0.42	1.35±0.57	1.35±0.42	1.36±0.37
Eosinophil(%)	0.86±0.22	0.73±0.39	0.93±0.60	0.85±0.43	0.80±0.21	0.66±0.30	0.82±0.26	0.79±0.28
Basophil(%)	1.19±0.19	1.04±0.30	1.18±0.36	1.15±0.38	1.10±0.21	0.93±0.27	1.11±0.30	1.11±0.26
Large unstained cell(%)	0.78±0.32	0.45±0.30*	0.82±0.24	0.77±0.27	0.48±0.41	0.34±0.30	0.51±0.32	0.46±0.28
Reticulocyte(%)	3.07±0.80	3.12±0.20	3.11±0.25	3.06±0.46	2.55±0.55	2.57±0.56	2.54±0.44	2.69±0.27
PT(Sec)	13.67±1.21	13.52±1.51	13.66±1.05	13.78±1.12	14.39±0.85	14.30±1.01	14.21±1.18	14.37±1.16
Fibrinogen(mg/dl)	315.00±51.19	320.70±35.05	316.30±53.64	320.20±42.16	251.80±37.15	253.40±46.57	247.90±37.09	255.90±39.69

Mean±SD(n=10). 1) Group ID was listed in Table 1 and Hematological index were listed in Table 3. * p<0.01 compared to that of G0F by MW test. ** p<0.05 compared to that of G0M by MW test.

9. 혈액 생화학적 검사 소견의 변화(Table 21)

Table 21. Serum biochemistry: changes on the AST, ALT, ALP, BUN, Creatinine, glucose Total cholesterol, A/G Ratio, Total protein, albumin, CPK, triglyceride, Ca, P, phospholipid, Na, K and Cl in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹¹	G0M	G1M	G2M	G3M	G0F	G1F	G2F	G3F
AST(IU/L)	121.57±10.85	120.99±10.88	120.82±10.05	123.21±6.88	115.45±14.59	113.63±10.57	114.88±14.45	113.66±12.76
ALT(IU/L)	34.81±7.36	35.46±6.05	33.77±4.22	33.62±6.85	32.29±7.35	31.51±6.42	31.72±3.28	33.50±4.32
ALP(IU/L)	869.89±159.82	880.28±159.02	867.50±203.27	913.79±158.07	475.20±107.97	456.50±159.19	450.33±89.80	480.39±129.14
BUN(mg/dl)	14.56±2.10	14.30±1.47	14.67±1.62	14.61±3.30	17.04±2.69	17.81±2.12	16.67±1.90	17.71±2.96
Creatinine(mg/dl)	0.43±0.11	0.45±0.09	0.42±0.13	0.43±0.10	0.48±0.04	0.47±0.08	0.47±0.09	0.50±0.11
Glucose(mg/dl)	125.60±15.61	120.60±14.66	130.80±21.95	128.30±20.62	115.20±12.96	118.50±13.47	111.30±12.12	113.69±10.29
Total Chol.(mg/dl)	62.23±10.47	62.20±6.76	64.50±9.20	61.92±10.29	64.80±8.10	64.60±4.95	63.02±7.61	63.40±8.84
A/G Ratio(Ratio)	3.05±1.85	2.90±0.98	2.91±1.29	3.06±1.59	2.71±0.72	2.65±0.51	2.58±0.68	2.81±1.17
Total protein(g/dl)	5.89±0.50	5.81±0.50	5.91±0.49	5.87±0.47	5.97±0.38	5.84±0.52	5.98±0.37	5.94±0.46

Albumin(g/dl)	4.23±0.14	4.22±0.16	4.25±0.19	4.23±0.22	4.30±0.21	4.19±0.25	4.25±0.13	4.26±0.17
CPK(IU/L)	840.10±187.35	854.00±182.60	867.80±170.37	839.30±177.01	813.20±193.61	823.40±144.16	816.90±137.59	817.80±169.64
Triglyceride(mg/dl)	38.24±12.50	37.02±5.91	37.21±6.91	35.73±12.03	15.64±2.92	15.97±3.54	15.96±1.64	15.61±2.62
Ca(mg/dl)	10.01±1.30	9.84±0.80	9.89±0.99	9.96±1.26	9.29±0.68	9.47±0.68	9.36±0.43	9.36±0.63
P(mg/dl)	9.50±0.95	9.59±0.70	9.35±0.72	9.40±1.18	7.99±0.72	8.06±1.07	8.30±0.66	7.97±1.09
Phospholipid(mg/dl)	86.60±10.09	85.10±14.03	87.50±9.41	85.60±4.92	99.30±10.32	95.60±14.42	99.10±16.10	97.40±11.22
Na(mmol/L)	142.10±2.60	142.00±5.29	141.40±5.23	141.80±6.53	142.00±2.26	141.00±2.16	141.80±4.64	143.20±4.59
K(mmol/L)	5.14±0.78	5.09±0.78	5.20±0.60	5.20±0.71	4.47±0.59	4.48±0.49	4.55±0.77	4.41±0.60
Cl(mmol/L)	103.10±3.90	105.30±9.81	105.20±9.48	104.80±6.96	103.40±4.97	102.60±4.40	104.20±4.37	102.20±9.21

Mean±SD(n=10). 1) Group ID was listed in Table 1 and Serum biochemical index were listed in Table 4.

10. 부검소견(Table 22, 23)

Table 22. Gross findings observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male SD Rats

Group ID ¹⁾	G0M	G1M	G2M	G3M
Lung				
Normal	7/10(70%)	7/10(70%)	8/10(80%)	9/10(90%)
CG				
1+	2/10(20%)	1/10(10%)	2/10(20%)	0/10(0%)
2+	1/10(10%)	2/10(20%)	0/10(0%)	1/10(10%)
Liver				
Normal	8/10(80%)	9/10(90%)	9/10(90%)	8/10(80%)
AF 1+	1/10(10%)	1/10(10%)	0/10(0%)	1/10(10%)
DC 1+	1/10(10%)	0/10(0%)	1/10(10%)	1/10(10%)
Heart				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Kidney				
Normal	8/10(80%)	10/10(100%)	8/10(80%)	8/10(80%)
CY				
1+	2/10(20%)	0/10(0%)	1/10(10%)	1/10(10%)
2+	0/10(0%)	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)
SW 1+	0/10(0%)	0/10(0%)	0/10(0%)	1/10(10%)
Spleen				
Normal	7/10(70%)	5/10(50%)	8/10(80%)	9/10(90%)
AT 1+	3/10(30%)	0/10(0%)	1/10(10%)	1/10(10%)
HT				
1+	0/10(0%)	3/10(30%)	1/10(10%)	0/10(0%)
2+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
3+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
Testis				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Brain				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Thymus				
Normal	7/10(70%)	6/10(60%)	6/10(60%)	8/10(80%)
AT 1+	3/10(30%)	0/10(0%)	3/10(30%)	2/10(20%)

HT 1+ 2+	0/10(0%) 0/10(0%)	3/10(30%) 1/10(10%)	1/10(10%) 0/10(0%)	0/10(0%) 0/10(0%)
LN ²⁾ Normal HT 1+ 2+	9/10(90%) 1/10(10%) 0/10(0%)	3/10(30%) 5/10(50%) 2/10(20%)	9/10(90%) 1/10(10%) 0/10(0%)	8/10(80%) 2/10(20%) 0/10(0%)
Others Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)

Number of observed animals showing gross findings/total observed animals(percentage). 1) Group ID was listed in Table 1. 2) Popliteal lymph nodes. Abbreviation: CG(Congestion), AF(Atypical foci), DC(Discoloration), CY(Cyst), SW(Swelling), AT(Atrophy), HT(Hypertrophy). degrees: 1+(Slight), 2+(Moderate), 3+(Severe).

Table 23. Gross findings observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0F	G1F	G2F	G3F
Lung Normal CG 1+ 2+	7/10(70%) 2/10(20%) 1/10(10%)	6/10(60%) 4/10(40%) 0/10(0%)	8/10(80%) 2/10(20%) 0/10(0%)	9/10(90%) 1/10(10%) 0/10(0%)
Liver Normal AF 1+ DC 1+	7/10(70%) 2/10(20%) 1/10(10%)	10/10(100%) 0/10(0%) 0/10(0%)	7/10(70%) 2/10(20%) 1/10(10%)	9/10(90%) 1/10(10%) 0/10(0%)
Heart Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Kidney Normal CY 1+ SW 1+ DC 1+	7/10(70%) 1/10(10%) 1/10(10%) 1/10(10%)	8/10(90%) 2/10(20%) 0/10(0%) 0/10(0%)	8/10(90%) 1/10(10%) 0/10(0%) 1/10(10%)	9/10(90%) 1/10(10%) 0/10(0%) 0/10(0%)
Spleen Normal AT 1+ 2+ HT 1+ 2+	7/10(70%) 2/10(20%) 1/10(10%) 0/10(0%) 0/10(0%)	5/10(50%) 0/10(0%) 0/10(0%) 3/10(30%) 2/10(20%)	8/10(80%) 1/10(10%) 0/10(0%) 1/10(10%) 0/10(0%)	7/10(70%) 3/10(30%) 0/10(0%) 0/10(0%) 0/10(0%)
Ovary Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Brain Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Thymus Normal AT 1+	7/10(70%) 2/10(20%)	6/10(60%) 0/10(0%)	8/10(80%) 2/10(20%)	7/10(70%) 3/10(30%)

2+ HT 1+ 2+	1/10(10%) 0/10(0%) 0/10(0%)	0/10(0%) 3/10(30%) 1/10(10%)	0/10(0%) 0/10(0%) 0/10(0%)	0/10(0%) 0/10(0%) 0/10(0%)
LN ²⁾ Normal HT 1+ 2+ 3+	9/10(90%) 1/10(10%) 0/10(0%) 0/10(0%)	2/10(20%) 4/10(40%) 2/10(20%) 2/10(20%)	9/10(90%) 1/10(10%) 0/10(0%) 0/10(0%)	10/10(100%) 0/10(0%) 0/10(0%) 0/10(0%)
Others Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)

Number of observed animals showing gross findings/total observed animals(percentage). 1) Group ID was listed in

Table 1. 2) Popliteal lymph nodes. Abbreviation: CG(Congestion), AF(Atypical foci), DC(Discoloration), CY(Cyst), SW(Swelling), AT(Atrophy), HT(Hypertrophy). degrees: 1+(Slight), 2+(Moderate), 3+(Severe).

11. 장기중량

1) 절대 장기중량의 변화(Table 24)

Table 24. Absolute organ weights in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0M	G1M	G2M	G3M	G0F	G1F	G2F	G3F
Lung	1.459±0.096	1.464±0.055	1.437±0.138	1.465±0.101	1.136±0.081	1.294±0.156**	1.150±0.133	1.175±0.141
Liver	11.533±1.106	11.570±1.059	11.701±1.115	11.717±1.092	6.829±0.699	7.009±0.873	6.812±0.960	6.995±0.725
Heart	1.239±0.125	1.290±0.119	1.230±0.092	1.212±0.135	0.862±0.116	0.922±0.128	0.851±0.128	0.871±0.171
Kidney ^{a)}	2.669±0.308	2.675±0.241	2.701±0.259	2.613±0.371	1.816±0.166	1.923±0.120	1.817±0.163	1.855±0.119
Spleen	0.691±0.073	0.804±0.080*	0.688±0.127	0.683±0.061	0.512±0.119	0.734±0.191**	0.534±0.119	0.517±0.123
Testis ^{a)}	3.177±0.212	3.174±0.270	3.143±0.230	3.135±0.184	0.085±0.050	0.083±0.034	0.082±0.031	0.087±0.036
Brain	2.068±0.155	2.059±0.139	2.132±0.196	2.064±0.115	1.816±0.106	1.923±0.167**	1.813±0.111	1.860±0.108
Thymus	0.620±0.124	0.910±0.163*	0.666±0.140	0.714±0.225	0.643±0.111	0.942±0.180*	0.733±0.196	0.677±0.207

Mean±SD, g. 1) Group ID was listed in Table 1. a) Sum of bilateral sides of organs. * p<0.01 compared to that of G0M by MW test. ** p<0.05 compared to that of G0F by MW test.

2) 상대 장기중량의 변화(Table 25)

Table 25. Relative organ weights in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0	G1	G2	G3	
m a l e	Lung	0.445±0.042	0.444±0.031	0.439±0.047	0.453±0.033
	Liver	3.521±0.465	3.510±0.369	3.587±0.504	3.621±0.301
	Heart	0.377±0.043	0.391±0.037	0.375±0.030	0.376±0.050
	Kidney ^{a)}	0.815±0.123	0.810±0.074	0.827±0.109	0.811±0.135
	Spleen	0.211±0.028	0.244±0.028**	0.209±0.032	0.212±0.026

	Testis ^{a)}	0.969±0.095	0.963±0.097	0.962±0.112	0.971±0.084
	Brain	0.629±0.052	0.624±0.042	0.651±0.066	0.638±0.035
	Thymus	0.189±0.039	0.276±0.054*	0.204±0.045	0.221±0.068
f e m a l e	Lung	0.499±0.053	0.507±0.057	0.501±0.088	0.502±0.059
	Liver	3.000±0.406	2.767±0.485	2.940±0.357	2.994±0.333
	Heart	0.378±0.053	0.361±0.043	0.368±0.053	0.372±0.071
	Kidney ^{a)}	0.796±0.085	0.755±0.056	0.789±0.108	0.794±0.066
	Spleen	0.224±0.051	0.286±0.066*	0.230±0.046	0.221±0.054
	Testis ^{a)}	0.037±0.021	0.033±0.015	0.036±0.014	0.037±0.016
	Brain	0.797±0.080	0.756±0.084	0.786±0.070	0.796±0.059
	Thymus	0.284±0.062	0.372±0.083*	0.319±0.093	0.288±0.085

Mean±SD, %. 1) Group ID was listed in Table 1. a) Sum of bilateral sides of organs. * p<0.01 compared to that of G0M by MW test. ** p<0.05 compared to that of G0M by MW test.

12. 조직병리학적 소견(Table 26, 27).

Table 26. Histopathological findings observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male SD Rats

Group ID ^{b)}	G0M	G1M	G2M	G3M
Lung				
Normal	7/10(70%)	8/10(80%)	8/10(80%)	9/10(90%)
CG				
1+	3/10(30%)	1/10(10%)	2/10(20%)	1/10(10%)
2+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
Liver				
Normal	7/10(70%)	9/10(90%)	9/10(90%)	7/10(70%)
IF 1+	1/10(10%)	1/10(10%)	0/10(0%)	1/10(10%)
FC				
1+	1/10(10%)	0/10(0%)	1/10(10%)	1/10(10%)
2+	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)	1/10(10%)
Heart				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Kidney				
Normal	8/10(80%)	10/10(100%)	8/10(80%)	10/10(100%)
CF 1+	2/10(20%)	0/10(0%)	2/10(20%)	0/10(0%)
Spleen				
Normal	10/10(100%)	4/10(40%)	9/10(90%)	10/10(100%)
HP				
1+	0/10(0%)	3/10(30%)	1/10(10%)	0/10(0%)
2+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
3+	0/10(0%)	2/10(20%)	0/10(0%)	0/10(0%)
Testis				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Brain				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Thymus				

Normal	7/10(70%)	6/10(60%)	8/10(80%)	8/10(80%)
AC				
1+	2/10(20%)	0/10(0%)	1/10(10%)	2/10(20%)
2+	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)	0/10(0%)
HP				
1+	0/10(0%)	3/10(30%)	1/10(10%)	0/10(0%)
3+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
LN ²⁾				
Normal	10/10(100%)	3/10(30%)	9/10(90%)	10/10(100%)
HP				
1+	0/10(0%)	4/10(40%)	1/10(10%)	0/10(0%)
2+	0/10(0%)	2/10(20%)	0/10(0%)	0/10(0%)
3+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
Others				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)

Number of observed animals showing gross findings/total observed animals(percentage). 1) Group ID was listed in Table 1. 2) Popliteal lymph nodes. Abbreviation: CG(Congestion spots), IF(Focal inflammatory cell infiltrations), FC(Fatty changes), CF(Cyst formation), AC(Atrophy of cortex), HP(Hyperplasia of lymphoid cells or follicles). degrees: 1+(Slight), 2+(Moderate), 3+(Severe).

Table 27. Histopathological findings observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in female SD Rats

Group ID ¹⁾	G0F	G1F	G2F	G3F
Lung				
Normal	7/10(70%)	8/10(80%)	8/10(80%)	9/10(90%)
CG				
1+	2/10(20%)	2/10(20%)	2/10(20%)	1/10(10%)
2+	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)	0/10(0%)
Liver				
Normal	6/10(60%)	10/10(100%)	7/10(70%)	8/10(80%)
IF 1+	2/10(20%)	0/10(0%)	2/10(20%)	1/10(10%)
FC				
1+	1/10(10%)	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)
2+	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)	1/10(10%)
Heart				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Kidney				
Normal	8/10(80%)	9/10(90%)	9/10(90%)	9/10(90%)
CF 1+	2/10(20%)	1/10(10%)	1/10(10%)	1/10(10%)
Spleen				
Normal	10/10(100%)	4/10(40%)	10/10(100%)	10/10(100%)
HP				
1+	0/10(0%)	3/10(30%)	0/10(0%)	0/10(0%)
2+	0/10(0%)	2/10(20%)	0/10(0%)	0/10(0%)
3+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
Ovary				
Normal	8/10(80%)	10/10(100%)	10/10(100%)	9/10(90%)
HS 1+	2/10(20%)	0/10(0%)	0/10(0%)	1/10(10%)

Brain Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)
Thymus				
Normal	7/10(70%)	4/10(40%)	7/10(70%)	8/10(80%)
AC				
1+	2/10(20%)	0/10(0%)	3/10(30%)	2/10(20%)
2+	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)	0/10(0%)
HP				
1+	0/10(0%)	3/10(30%)	0/10(0%)	0/10(0%)
2+	0/10(0%)	2/10(20%)	0/10(0%)	0/10(0%)
3+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
LN ²⁾				
Normal	10/10(100%)	2/10(20%)	10/10(100%)	10/10(100%)
HP				
1+	0/10(0%)	3/10(30%)	0/10(0%)	0/10(0%)
2+	0/10(0%)	4/10(40%)	0/10(0%)	0/10(0%)
3+	0/10(0%)	1/10(10%)	0/10(0%)	0/10(0%)
Others				
Normal	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)	10/10(100%)

Number of observed animals showing gross findings/total observed animals(percentage). 1) Group ID was listed in Table 1. 2) Popliteal lymph nodes. Abbreviation: CG(Congestion spots), IF(Focal inflammatory cell infiltrations), FC(Fatty changes), CF(Cyst formation), AC(Atrophy of cortex), HS(Hemorrhage spots), HP(Hyperplasia of lymphoid cells or follicles). degrees: 1+(Slight), 2+(Moderate), 3+(Severe).

13) 분석(Table 28).

Table 28. NOAEL, ATD, MTD and Target organs observed in this study after 28days repeat oral dose of HYTE in male and female SD Rats

INDEX ¹⁾	NOAEL	ATD	MTD	Target
Male	> 2000mg/kg	> 2000mg/kg	> 2000mg/kg	Not detected
Female				

1) NOAEL: No-observed-adverse-effect level. ATD: Absolute toxic dose. MTD: Maximum tolerable dose.

IV. 고 칠

현재까지 한약 및 생약 추출물의 독성은 비교적 경미한 것으로 판단되어 왔으며, 오래 전부터 한의임상에서 사용되어져 왔다는 근거로 그 안전성이 충분히 검토되지 않았다. 그러나 최근 雷公藤¹⁵⁾의 추출물에서 어느 정도의 독성이 검출되기도 하여, 한약에 대한 독성연구의 관심이 높아지고 있다.

현재까지 한약 및 천연물 추출물 자체에 대한 독성연구로는 麻黃¹⁶⁾, 人蔘¹⁷⁻⁸⁾ 등에서 수행되어져 왔으며, 근래에 복합처방인 八味地黃丸¹⁹⁾, 補中治濕湯²⁰⁾ 등에 대한 독성시험이 각각 수행되었다.

荊芥連翹湯은 龔⁴⁾의 《萬病回春》에 처음 수록된 방제로 腎經風熱에 의한 耳腫, 耳痛, 耳膿을 치료하는 방제로 사용되어 왔으며²¹⁾, 최근에는 부비동염 등에도 응용되고 있다²²⁾.

荊芥連翹湯의 구성약물의 효능을 살펴보면, 荊芥는 性溫味辛하고 發表散風, 透疹理血하고, 防風

은 性溫味辛甘하며 解表祛風, 勝濕, 止痛한다. 白芷는 性溫味辛하고 散風除濕, 通竅止痛, 消腫排膿하는 효능이 있고, 桔梗은 性平味苦辛하며 宣肺利咽, 祛痰排膿하는 작용이 있다. 薄荷는 性涼味辛하고 清頭目, 透疹하고, 柴胡는 性涼味辛하여 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣하는 효능이 있으며, 黃芩은 性寒味苦하고 滌實火, 除濕熱, 止血, 安胎하는 효능이 있다. 連翹는 性涼味苦하여 清熱解毒, 消腫散結하는 효능이 있으며, 桔子는 性寒味苦하고 清熱, 滌火, 凉血, 解毒하는 작용이 있다. 當歸는 性溫味甘辛하며 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸하며, 川芎은 性溫味辛苦하며 活血行氣, 祛風止痛, 消腫排膿한다. 白芍藥은 性微寒味苦酸하며 養血柔肝, 緩中止痛, 敗陰收汗하고, 甘草는 性平味甘하여 百藥의 毒을 解하는 작용이 있다.²³⁾

이와 같이 莉芥連翹湯은 오랫동안 사용되어 왔으나, 아직까지 명백한 독성징후가 보고되지 않았다. 따라서 식품의약품안전청고시 의약품등독성시험기준¹⁰⁾에 따라 설치류 최대 투여 한계용량인 2000mg/kg을 최고용량으로 설정하였으며, 공비 2를 적용하여 1000 및 500mg/kg을 중간 및 저용량으로 설정하고¹²⁾, 매일 1회씩 28일간 경구투여한 다음, 사망률, 임상증상, 사료 및 물섭취량, 체중 및 중체량, 안저검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액 생화학적 검사, 부검소견, 장기중량 및 조직병리학적 검사를 실시하여 莉芥連翹湯 추출물의 독성상태를 확인하였다.

본 연구의 결과, 莉芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 사망례가 암수 모두 최고용량 투여군인 2000mg/kg 투여군까지 관찰되지 않아 최대 내성용량은 암수 모두 2000mg/kg으로 판단되었다. 한편 본 실험에서 관찰된 流涎, 軟便 및 脫毛 등의 임상증상 중, 脫毛증상은 각각의 매체대조군에서도 일부 관찰되었으며, 비교적 실험 후기에 고빈도로 관찰되었다. 또한 流涎증상도 투여 초기 일부기간에 국한되어 관찰되었으며, 각각의 매체대조군에서 투여군보다 더 높은 빈도로 관찰되었고, 軟便증상

역시 모든 매체대조군을 포함 전 실험군에서 산발적으로 투여 초기에 국한되어 관찰되었다.

암수 모두 최고용량 투여군인 2000mg/kg 투여군에 국한하여 투여 21일 후부터 실험 전 기간에 걸쳐 매체대조군에 비해 유의성 있는 체중증가가 관찰되었으며, 실험 전 기간 동안의 증체량의 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 또한 안저검사 결과 일부 실험동물에 국한되어 각막흔탁이 관찰되었으나, 용량 의존성 없이 산발적인 출현빈도를 나타내었다.

한편 莉芥連翹湯 추출물 28일간 경구투여 후, 요량, 비중, 색조, pH, 당, 단백질, 케톤체, 잠혈, 빌리루빈, 유로빌리노겐, 아질산염 및 요 침사검사와 같은 요검사 결과, 암컷 최고용량 투여군인 2000mg/kg 투여군에 국한되어 요량의 증가 및 요비중의 감소가 관찰되었다. 이러한 요량의 증가는 음수섭취량의 증가에 따른 이차적 변화로, 요 비중의 감소 역시 요량 증가에 따른 이차적 변화로 판단된다. 또한 일부 실험동물에 국한되어 관찰된 요 탁도 및 색조의 변화는 용량 의존성 없이 산발적인 출현빈도를 나타내었고 일부 매체대조군에서도 관찰되었다.

莉芥連翹湯 추출물 28일간 경구투여 후, 백혈구 수, 적혈구 수, hemoglobin 농도, hematocrit, MCV, MCH, MCHC, 혈소판 수, 백혈구 분별카운트, 망상 적혈구 수, prothrombin time 및 fibrinogen 양과 같은 혈액학적 검사 결과, 암수 최고 투여용량군인 2000mg/kg 투여군에 국한되어 혈중 백혈구 총수의 유의성 있는 증가와, 수컷 2000mg/kg 투여군에 국한되어 혈액 중 임파구 비율의 증가 및 large unstained cells 비율의 감소가 관찰되었다. 이러한 혈액학적 변화는 부검 및 조직병리학적 검사에서 관찰된 임파 장기의 중량증가, 비대 및 임파구 증생 등과 직접 관련있는 것으로 판단되며, 이러한 임파 장기 및 혈액학적 변화는 면역활성물질 투여 시 관찰되는 전형적인 면역활성 소견이다. 일반적으로 면역계가 활성된 실험동

물에서는 비장, 가슴샘 등의 중량증가와 함께 혈중 백혈구의 증가가 관찰되며, 조직병리학적으로 임파구 및 임파 소절의 증생이 관찰되는 것으로 알려져 있다²⁴⁻⁶⁾.

또한 large unstained cells 비율의 감소는 임파구 비율의 증가에 따른 이차적인 변화로 판단된다. 따라서 본 실험의 결과 관찰된 혈중 백혈구 총수 증가와, 혈액 중 임파구 비율의 증가 및 large unstained cells 비율의 감소, 임파 장기의 중량증가, 비대 및 임파구 증생 등의 소견은 면역증강 등과 같은 약리작용에 의한 변화로 판단된다.

한편 荊芥連翹湯 추출물 28일간 경구투여 후, AST, ALT, ALP, CPK, GLU, TP, ALB, A/G ratio, BUN, creatinine, triglyceride, phospholipid, total cholesterol, total bilirubin, Ca, P, Cl, Na 및 K와 같은 혈액 생화학적 검사 시 암수 모든 투여군에서 각각의 매체대조군과 유사한 소견이 관찰되었다.

부검 시 폐의 울혈, 간의 비정형성 병소 및 변색, 신장의 종창, 낭포형성 및 변색, 가슴샘의 위축 등은 각각의 매체대조군에서 일부 관찰되었으며, 출현빈도 역시 낮고, 용량 의존성이 관찰되지 않았다. 또한 조직병리학적 검사에서 관찰된 폐의 울혈, 간의 지방변성과 국소성 염증세포 침윤, 신장의 낭포형성, 난소 출혈반점, 가슴샘의 피질 위축 등도 역시 우발성 소견으로 판단된다. 한편 부검 시 육안적으로 관찰된 간의 비정형성 병소는 국소성 염증견으로 관찰되었고, 간의 변색은 지방변성에 의한 변화로 판단되었다.

V. 결 론

본 실험의 결과 모든 암수 투여군에서 실험 전 기간 동안 사망례가 관찰되지 않았으므로, 荊芥連翹湯 추출물의 SD rats에서 28일간 경구 반복투여 독성시험의 최대 내성용량(Maximum tolerable

dose: MTD)은 2000mg/kg 이하로 판단되며, 荊芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 임상증상, 사료 및 물섭취량, 체중 및 중체량의 변화, 부검소견, 안저검사, 요검사, 혈액 및 혈액생화학적 검사, 육안부검소견, 장기중량 및 조직병리학적 변화를 관찰한 결과 임파 장기내 임파구 증생을 주징으로 하는 면역활성소견 등 약리 작용에서 기인한 변화와 사료 및 음수섭취량 증가에 의한 체중의 증가, 요비중의 감소와 요량 증가 이외에 荊芥連翹湯 추출물 투여와 관련된 독성증상은 관찰되지 않아, 荊芥連翹湯 추출물의 SD rats에서 28일간 경구 반복투여 독성시험의 무해용량은 2000mg/kg 이하로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원 한방바이오풍전 연구지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다(B05-0035-AM0815-05N1-00020B)

참고문헌

1. 김대병, 박혜경, 박건상, 최윤주, 장재희, 구용의, 김보영, 이재진, 권우정. 기능성식품의 합리적 관리체계 구축을 위한 연구. 식품의약품안전청 연구보고서. 2002;6:1174.
2. 정세영, 황인경, 김형민, 성현제, 남재현. 건강기능식품의 기능성평가체계 구축에 대한 연구. 식품의약품안전청연구보고서. 2002;6:892-3.
3. 장인규, 홍남두. 죽력의 독성시험 및 약효학적 연구. 내과학회지. 1985;2: 83-101.
4. 龔廷賢. 增補 萬病回春(下卷). 서울. 一中社. 1994:12.
5. 申載鏞. 方藥合編解說(제4판). 서울. 신광문화사. 1993:169.
6. 孫炯宰. 聰耳, 耳疳, 腫耳에 대한 문헌적 고찰.

- 경희대대학원. 1987.
7. 金東一. 莉芥連翹湯과 加味莉芥連翹湯의 解熱, 鎮痛 및 消炎 作用에 미치는 영향. 경희대대학원. 1986.
 8. 爾太燮, 陳永相, 丁圭萬. 莉芥連翹湯의 항알레르기 작용에 대한 실험적 효과. 대한한방소아과학회지. 1990;4(1):19-30.
 9. 오은영, 지선영, 서부일. 莉芥連翹湯 및 구성약물의 Klebsiella pneumoniae에 대한 항균 효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 2003;18(2):109-119.
 10. 식품의약품안전청. 의약품등독성시험기준. 서울. 식품의약품안전청. 제 2005-60호. 2005.
 11. Department of Health, Education, and Welfare Publication(National Institute of Health). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC. National Academy Press. 1985.
 12. 식품의약품안전청. 의약품등독성시험기준 해설서. 서울. 식품의약품안전청. 1999.
 13. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systemic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiological state of the mouse. *Psychopharmacology*. 1968;13:222-57.
 14. Dourish CT. Effects of drugs on spontaneous motor activity In Experimental Psychopharmacology. Greenshaw AJ, Dourish CT(eds). Clifton. Humana Press. 1987:325-34.
 15. Chan WY, Ng TB. Adverse effect of *Tripterygium wilfordii* extract on mouse embryonic development. *Contraception*. 1995;51:65-71.
 16. Theoharides TC. Sudden death of a healthy college student related to ephedrine toxicity from a mahuang-containing drink. *J Clin Psychopharmacol*. 1997;17:437-9.
 17. Kitts D, Hu C. Efficacy and safety of ginseng. *Public Health Nutr*. 2000;3:473-85.
 18. 이혜정. 종류별 인삼수침엑기스의 독성연구. 침구과학회지. 1993;10:167-73.
 19. Ninomiya H, Kato S, Okuda H. Effects of Hachimi-jio-gan in aged Rats. *J Altern Complement Med*. 2001;7:355-9.
 20. Ryu JC, Kim KR, Kim HJ, Youn JY, Myung SW, Kim GH, Lee MJ, Chang IM. Genotoxicity study of bojungchisup-tang, an oriental herbal decoction-*in vitro* chromosome aberration assay in Chinese hamster lung cells and *in vivo* supravital-staining micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes. *Arch Pharm Res*. 1998;21:391-7.
 21. 許浚. 原本東醫寶鑑. 서울. 南山堂. 2004:236.
 22. 盧石善. 原色眼耳鼻咽喉科學: 鼻科學. 서울. 一中社. 1999:73.
 23. 전국한의과대학 본초학 교수 공편저. 본초학. 서울. 영림사. 1999:127-8, 129-30, 131-2, 149-50, 167-8, 178-9, 199-201, 351-2, 409-10, 460-1, 540-1, 578-80, 581-3.
 24. Klein HO, Kreysch HG, Coerpe C, Voigt P, Ruff I. Preclinical and early clinical trial with mafosfamide as immune modulator. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1987;9:427-40.
 25. Iqbal MP, Sultana F, Mehboobali N, Pervez S. Folinic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. *Biopharm Drug Dispos*. 2001;22:169-78.
 26. Lee JH, Yang KJ, Shin HD, Park BR, Son CW, Jang HJ, Park DC, Lee HS, Ku SK. Single subcutaneous dose toxicity of Polycan®, a β-Glucan originated from *Aureobasidium* in mice. *Lab Anim Res*. 2005;21:299-305.