

Spargue-Dawley 랫드를 이용한 방풍통성산의 급성독성 연구

신인식 · 김정훈 · 하혜경 · 서창섭 · 이미영 · 허정임* · 신현규
한국한의학연구원 한약EBM연구센터
*안전성평가연구소

Acute Toxicity Study on Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*) in Sprague-Dawley Rats

*In-Sik Shin · Jung-Hoon Kim · Hye-Kyung Ha · Chang-Seob Seo · Mee-Young Lee
Jung-Im Huh* · Hyeun-Kyoo Shin*

Objectives : This study was conducted to evaluate the acute toxicity and safety of Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*) in Sprague-Dawley rat though the current regulatory guideline.

Methods : The preliminary study showed that the single oral administration of Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*) did not induce any toxic effect at a dose level of 2000 mg/kg. Based on the results, 2000 mg/kg was selected as the limited dose. In this study, 10 rats of each sex were randomly assigned to two groups of 5 rats each and were administrated singly by gavage at dose levels of 0 and 2000 mg/kg. Mortalities, clinical signs, and body weight changes were monitored for the 15-day period following administration. At the end of observation period, all animals were sacrificed and complete gross postmortem examinations were performed.

Results : Throughout the study period, no treatment-related deaths were observed. There were no adverse effects on clinical signs, body weight, and gross findings at all treatment groups.

Conclusions : These results showed that the single oral administration of Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*) did not cause any toxic effect at the dose levels of 2000 mg/kg in rats. In conclusion, the LD₅₀ of Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*) was considered to be over 2000 mg/kg body for both sexes.

Key words : Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*), Acute toxicity, Safety, LD₅₀, Rats

교신저자 : 신현규, 대전광역시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구
원 한약EBM연구센터 (Tel: 042-868-9164,
Fax: 042-864-2120, E-mail: hkshin@kiom.re.kr)

• 접수 2010/02/18 • 수정 2010/03/26 • 채택 2010/04/02

* 이 논문은 한국한의학연구원에서 지원한 '표준한방처방 EBM 구축 사업'에 의해 수행되었음

서 론

防風通聖散은 《宣明方論》에 처음 기술되었으며, 이는 체내에 울체된 열이 배출되지 못하여 발생하는 여러 질환을 치료하는 대표적 처방이다¹⁾. 최근 연구보고에 따르면, 防風通聖散은 진통, 소염, 항균효과, 항알레르기 및 면역효과, 혈압강하 등의 효능이 보고되었으며, 특히 피부질환에 있어, 방풍통성산은 피부장벽의 회복을 통한 아토피 피부염의 진행차단과 전사인자 NF- κ B 활성조절을 통해 피부 손상을 완화 시키는 효과가 보고되었다^{2,5)}. 또한, 피부질환인 만성두드러기, 대상포진 대한 임상증례 보고가 실시되고 있어 防風通聖散의 피부질환 치료에 있어 효능이 입증되고 있다^{6,7)}. 그러나 이와 같이 防風通聖散의 효능에 대한 연구는 지속적으로 실시되고 있는 반면, 防風通聖散의 독성 및 안전성 검증에 대한 연구가 상대적으로 미흡하다.

防風通聖散의 안전성 자료를 확보하기 위해 본 연구소에서는 우선 한약재 및 처방에 포함된 위해 물질의 농도를 측정하였으며, 시험결과 防風通聖散은 전탕 전과 후의 잔류농약 및 이산화황이 검출되지 않았고, 중금속 함량은 식약청 기준인 30 mg/kg보다 훨씬 낮게 검출되어, 본 처방이 유해물질에 대하여 안전하다는 결과를 얻을 수 있었다⁸⁾. 그러나 보다 객관적인 안전성 자료를 확립하기 위해서는, 국제적으로 인증된 독성시험기준에 의거한 독성시험이 병행되어야 한다. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)와 식품의약품안전청에서는 이러한 독성시험 항목으로 급성, 아급성, 아만성 등의 투여기간에 따른 독성시험을 규정하고 있으며, 또한 유전독성 관련하여 염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험 등이 실시하여, 각 시험물질의 안전성을 평가하도록 명시되어 있다.

따라서, 본 연구는 防風通聖散의 객관적인 안전

성 자료를 구축하기 위하여 KGLP 시설인 한국화학연구원 부설 안전성평가 연구소에서 독성시험기준의 규정에 따라 한약의 일반적 복용형태인 경구투여에 의한 급성독성시험을 수행하여, 防風通聖散에 대한 신뢰성 있는 독성 및 안전성 자료를 얻었기에 보고하는 바이다^{9,11)}.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육환경

본 시험은 KGLP 시설인 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소에서 실시하였다. 5주령의 특정병원체 부재(Specific Pathogen Free) Spargue-Dawley 랫드(오리엔트, 경기도 성남)를 사용하였다. 동물 입수시, 외관을 육안으로 검사한 후, 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판단되는 동물을 선발하여 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(08:00 점등~20:00 소등), 환기횟수 10~20회/시간 및 조도 150~300 Lux로 유지하도록 설정되었으며, 실험동물용 고품사료(PMI Nutrition International: 505 North 4th Street, Richmond IN 47374, USA)를 방사선조사로 멸균하여 자유 섭취시켰다. 또한 물은 미세여과기와 자외선유수살균기를 통과시켜 살균, 소독한 상수도를 자유 섭취시켰다. 본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하여 실시하였으며(AAALAC International 인증 획득, 1998), 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 동물관리사용위원회(IACUC)에 의해 검토되었다.

2. 시험물질의 조제

본 연구에서는 전탕 추출법(cosmos-660, 경서추출기, 한국)에 의한 시험물질조제를 실시하였으며, 처방구성(Table 1)에 따른 각 한약재들을 중량의

10배에 해당하는 생수(화이트, 무학)에 넣어 180분간 열탕 추출한 후, 동결건조기(PVTFD 100R, 일신, 한국)를 사용하여 분말형태로 조제하였다(수율:17.7%).

Table 1. The Combination of Crude Drugs in Bangpungtongsung-san (Fangfengtongsheng-san).

약재명	1첩 분량(g)
마황 <i>Ephedrae Herba</i>	1,6875
작약 <i>Paeoniae Radix</i>	1,6875
천궁 <i>Cnidii Rhizoma</i>	1,6875
박하 <i>Menthae Herba</i>	1,6875
방풍 <i>Saposhnikoviae Radix</i>	1,6875
당귀 <i>Angelicae Gigantis Radix</i>	1,6875
대황 <i>Rhei Rhizoma</i>	1,6875
연교 <i>Forsythiae Frucus</i>	1,6875
망초 <i>Natrii Sulfas</i>	1,6875
백출 <i>Atractylodis Rhizoma</i>	1,3125
치자 <i>Gardeniae Fructus</i>	1,3125
형개 <i>Schizonepetae Spica</i>	1,3125
감초 <i>Glycyrrhizae Radix</i>	4,5
길경 <i>Platycodonis Radix</i>	2,625
생강 <i>Zingiberis Rhizoma</i>	6,25
황금 <i>Scutellariae Radix</i>	2,625
활석 <i>Talcum</i>	6,375
석고 <i>Gypsum</i>	2,625
Total weight	44,125

3. 투여용량의 설정 및 시험군의 구성

용량설정을 위한 예비시험에서 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg의 용량으로 각각 2마리의 암수 랫드에 대해 단회 경구투여한 결과, 모든 투여군에서 어떠한 독성소견도 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 2000 mg/kg을 시험물질 투여군으로 한계용량군을 설정하였으며, 주사용 멸균 증류수를 투여하는 부형제대조군을 두어 시험을 실시하였다¹²⁾. 동물의 군분리는 GLP 독성시험용 전산프로그램인 Path/Tox System (Version 4.2.2, Xybion Medical Systems

Corporation, USA)을 이용하여 검역 및 순화기간 후에 측정된 체중에 따라서 각 시험군에 체중이 균등히 분배되도록 체중순위에 의한 무작위법으로 군분리 하였다.

4. 시험물질의 투여

투여 경로는 임상에서 가장 널리 이용되고 있는 경구투여법을 사용하였다. 모든 동물은 투여 전에 하룻밤 절식시킨 후 경구투여용 소식자(sonde)를 장착한 주사기를 이용하여 위내에 강제 경구투여를 하였고, 투여 후 3~4 시간 후에 다시 사료를 급여하였다. 투여 당일에 절식된 체중을 기준으로 kg당 10 ml로 투여액량을 계산하였다.

5. 일반증상의 관찰

투여 당일에는 투여 후 1시간부터 6시간까지 매 시간마다, 투여 익일부터 15일까지는 매일 1회씩 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 단, 이상 증상이 발견되면 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개체별로 기록하였다.

6. 체중측정

모든 동물에 대하여 투여개시 직전(1일)과 투여 후 2, 4, 8 및 15일째에 측정하였다.

7. 부검

투여 후 15일째에 모든 동물을 CO₂ 가스 마취 하에서 개복한 후에 복대동맥과 복대정맥을 절단하여 방혈 치사시킨 후, 육안적으로 내부 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

8. 통계처리

시험기간 중의 일반증상 및 체중변화의 결과는 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소의 표준작업

순서에 따라 Path/Tox System (Version 4.2.2, Xybion Medical System Corporation, USA)을 이용하여 검증하였고, P < 0.05를 실험군간의 유의성 있는 차이로 판정하였다.

결 과

1. 치사율

시험물질을 투여한 후 15일간 사망유무를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암·수 동물에서 시험물질의 투여에 기인된 사망은 관찰되지 않았다(Table 2). 따라서 랫드에서 본 시험물질의 치사량은 암수

모두 2000 mg/kg을 훨씬 상회하는 것으로 나타났다.

2. 일반증상

시험기간 중 일반증상을 관찰한 결과, 암수 모든 동물에서 있어서 시험물질의 투여에 의한 독성 증상은 관찰되지 않았다(Table 3).

3. 체중변화

체중 측정 결과, 모든 투여군의 암·수 동물에 있어 시험물질의 투여에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

Table 2. Mortality in Male and Female Rats after Single Oral Administration of Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*).

Dose (mg/kg)	No. of rats examined	Days after treatment														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Male																
0	5	0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female																
0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^{a)}Number of dead animals

Table 3. Clinical Signs in Male and Female Rats after Single Oral Administration of Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*).

Dose (mg/kg)	No. of rats examined	Days after treatment														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Male																
0	5	0 ^{a)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female																
0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^{a)}Number of rats with the clinical signs

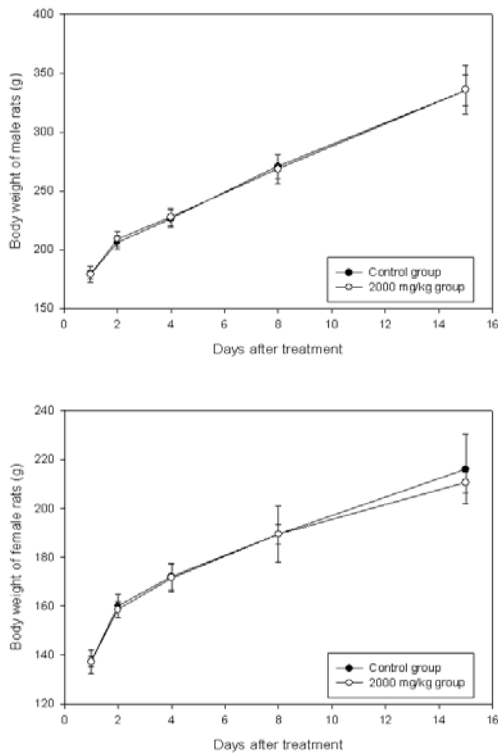


Fig. 1. Body weight changes in male and female rats after single oral administration of Bangpungtongsung-san(*Fangfengtongsheng-san*).

4. 부검소견

시험물질 투여 후 15일째의 부검시 육안적인 부검소견을 관찰한 결과, 모든 시험군의 암수 동물에서 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다(Table 4).

5. LD₅₀값

본 시험에서 최대용량인 2000 mg/kg 투여시 암수 동물의 사망은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 LD₅₀값은 암수 모두 2000 mg/kg 이상으로 판단된다.

결론 및 고찰

防風通聖散은 많은 연구를 통해 아토피성 피부염 치료 및 여러 임상 증례가 발표되었지만, 防風通聖散에 대한 신뢰성 있는 독성 및 안전성 자료는 확립되어 있지 않다⁵⁻⁷⁾. 본 연구는 시험물질인 防風通聖散의 신뢰할 수 있는 독성 및 안전성 자료를 확보하기 위하여 독성시험기준에 따라 防風通聖散의 독성 및 안전성을 평가하였다⁹⁻¹¹⁾.

식품의약품안전청의 ‘의약품등의 독성시험기준’에 의하면 급성독성시험시 시험동물은 2종 이상의 설치류나 비설치류로 설정하여 최소한 1종에 대하여 암수 모두에서 조사하며, 군 당 동물 수는 시험결과를 해석할 수 있는 충분한 수로 한다고 기록되어 있다⁹⁾. 또한 관찰기간은 통상 2주간으로 실시하며, 시험결과에 있어서는 개략의 치사량, 일반증상의 매일 관찰기록, 시험기간 중 최소 3회 이상의 체중 측정, 부검시 육안적 해부소견을 기술하고 육안적 이상소견이 관찰된 장기나 조직에 대해서는 필요시 병리조직학적 검사를 실시한다고 명

Table 4. Gross Findings in Male and Female Rats after Single Oral Administration of Bangpungtongsung-san (*Fangfengtongsheng-san*).

	Male		Female	
	0	2000	0	2000
No. of rats examined	5	5	5	5
Appears normal	5	5	5	5
No. of rats examined	5	5	5	5
Appears normal	5	5	5	5

시되어 있다. 투여용량은 한계용량이 명확히 명시되어 있지 않기 때문에 본 시험에서는 식품의약품안전청의 '비임상시험기준'에 명시되어 있는 OECD guideline에 의거하여 급성독성시험시 추천하는 2000 mg/kg 용량을 한계용량으로 설정하였다¹⁰⁻¹²⁾.

식품의약품안전청의 시험기준과 동일하게 OECD guideline에서도 급성독성시험시 체중, 사료섭취량, 시험기간 중 일반증상, 부검시 주요장기의 육안적 소견관찰을 기준으로 정하고 있다^{11,12)}. 체중 및 사료섭취량은 최소 일주일 1회 이상 측정하며, 일반증상 관찰시에는 피부, 털, 눈, 점막, 호흡 및 운동상태 등을 관찰하며, 또한 유연(salivation), 설사(diarrhoea), 경련(convulsion) 등의 상태를 면밀하게 관찰하여 기록한다. 투여기간 중 심각한 임상 증상이 보이는 경우 실험자가 판단하여 실험동물의 증상을 기록하고 안락사를 시킬 수 있으며, 부검시 주요 장기의 육안적 소견을 각 동물에 대해 명확히 기록하고, 이상 소견 관찰시 해당 장기에 대해 조직표본을 제작하여 병리조직학적 검사를 실시할 수 있다고 명시되어 있다.

본 시험에 앞서 용량설정을 위한 예비시험에서 Spargue-Dawley 계통의 암수 랫드에 각각 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg 용량으로 단회 경구투여의 결과, 2000 mg/kg 이하의 용량에서 어떠한 독성 영향도 관찰되지 않았다. 그러므로 본 시험에서는 급성독성에서 추천하는 2000 mg/kg을 한계용량으로 설정하여 암수 랫드에 각각 0 및 2000 mg/kg 용량으로 단회 경구투여 후 15일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하여 독성증상 발현여부를 관찰하였다¹²⁾. 防風通聖散에 대한 급성독성 시험을 실시한 결과 0, 2000 mg/kg 용량으로 투여한 모든 암수 랫드에 대하여 사망이 관찰되지 않았으며, 이로 인해 防風通聖散의 LD₅₀은 산출할 수 없었다. 또한 시험기간 중 암수 防風通聖散 투여군에서 부형제 대조군과 비교하여 유의성 있는

체중변화가 관찰되지 않았고, 防風通聖散 투여와 관련된 임상 증상 및 부검시 내부 장기의 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다.

본 시험결과, 본 시험기간 중 모든 동물에서 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견 관찰시 防風通聖散 투여와 관련된 어떠한 독성영향도 유발하지 않는 것으로 확인되었다. 그러므로 본 실험조건하 防風通聖散의 암수 랫드에 대한 LD₅₀값은 2000 mg/kg을 훨씬 상회하는 것으로 판단되며, 防風通聖散은 암수 랫드에 대한 단회 경구 투여시 체내에 안전한 물질로 작용되는 것으로 판단되며, 이러한 防風通聖散의 시험결과는 인체위해성 평가에 있어 매우 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

현재 한약처방은 많은 효능연구는 실시되고 있는 반면에 각 처방의 독성 및 안전성 관련 시험은 미비하여 한약처방의 안전성 문제가 대두되고 있다. 이에 따라, 본 연구소에서는 각 처방의 효능평가와 더불어 안전성 자료를 확보하기 위하여 한약재 및 처방에 포함된 위해물질 검출 시험을 실시하였으며, 또한 본 실험을 통해 防風通聖散의 급성독성에 대한 자료를 확보하였다^{8,13-16)}. 그러나 대부분의 한약처방이 1회 복용이 아닌 장기간 복용을 하기 때문에 장기적인 독성 및 안전성 자료의 확보가 필요할 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구소에서는 급성독성 시험을 시작으로, 추후 4주 및 13주 반복투여 독성시험을 수행하여 장기적인 독성 및 안전성 자료를 확보하고 또한 유전독성시험을 수행하여, 현대인에게 있어서 본 한약처방이 매우 안전하다는 것을 알리고자 한다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원한 '표준한방처방 EBM 구축사업'에 의해 수행되었으며, 이에

감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 劉完素. 宣明方論. 서울:여강출판사. 1998;卷十二:76.
2. 성현제. 방풍통성산의 진통 소염 해열 및 항균작용에 대한 실험적 연구. 경희대학교대학원. 1984.
3. 이동현. 방풍통성산 및 방풍통성산 가미방이 항알레르기 및 면역반응에 미치는 영향. 경희대학교대학원. 1990.
4. 이남훈. 防風通聖散이 고혈압 고지혈에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1991.
5. 손정민, 홍승욱. 防風通聖散이 아토피 피부염을 유발한 동물모델의 피부 손상에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지 2007;20(1):99-114.
6. 윤준철, 김홍준, 김유경, 정상수, 백은기, 김진만, 원진희. 만성 두드러기 환자 치험 4례. 동의생리병리학회지. 2003;17(6):1564-7.
7. 신정인, 김미량, 서운교. 대상포진 환자 치험 1례. 대한한방내과학회. 2002;23(1):147-52.
8. 서창섭, 황대선, 이준경, 하혜경, 천진미, 엄영란, 장설, 신현규. 전탕 전과 후의 중금속, 잔류농약 및 잔류이산화황의 농도변화 - 다빈도한약 처방을 중심으로 -. 대한본초학회지. 2009;24(2):13-20.
9. 식품의약품안전청. 식품의약품안전청고시 제 2005-60호(2005년 10월 21일) '의약품등의독성시험기준'. 2005.
10. 식품의약품안전청. 식품의약품안전청고시 제 2009-19호(2009년 5월 10일) '비임상시험관리기준'. 2009.
11. OECD. OECD Principles of Good Laboratory Practice, 1997. Available from: URL:[http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/\\$FILE/01E88455.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/$FILE/01E88455.PDF).
12. OECD. OECD Guidelines for Testing of Chemical No. 423. Acute Oral Toxicity-Acute Class Method, Line 23 (Limit test), 2001. Available from: URL:<http://www.oecd.org/dataoecd/17/50/1948370.pdf>.
13. 서창섭, 황대선, 이준경, 하혜경, 천진미, 엄영란, 장설, 신현규. 전탕 전과 후의 중금속, 잔류농약 및 잔류이산화황의 농도변화 - 감기약을 중심으로 -. 대한본초학회지. 2008;23(4):51-8.
14. 서창섭, 황대선, 이준경, 하혜경, 천진미, 엄영란, 장설, 신현규. 전탕 전과 후의 중금속, 잔류농약 및 잔류이산화황의 농도변화 - 십전대보탕 구성처방을 중심으로 -. 대한한의학회지. 2009;30(4):108-17.
15. 서창섭, 황대선, 이준경, 하혜경, 천진미, 엄영란, 장설, 김종열, 이시우, 신현규. 중금속, 잔류농약 및 잔류이산화황의 전탕 전, 후의 농도변화 - 다빈도 태음인 사상처방을 중심으로 -. 사상체질의학회지. 2009;21(1):237-46.
16. 서창섭, 황대선, 이준경, 하혜경, 천진미, 엄영란, 장설, 신현규. 전탕 전과 후의 중금속, 잔류농약 및 잔류 이산화황의 농도 변화 - 소화기계 약을 중심으로 -. 대한본초학회지. 2009; 24(1):111-9.