

麻黃附子細辛湯의 마우스 단회 경구투여 독성 및 골수세포를 이용한 유전독성 평가

성익재 · 박미연 · 김종대*

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

Mouse Single Oral Dose Toxicity Test and Bone Marrow Micronucleus Test of *Mahwangbujaseshin-tang* Extracts

Ik Jae Sung, Mee Yeon Park, Jong Dae Kim*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

The object of this study was to obtain acute information single oral dose toxicity of *Mahwangbujaseshin-tang* extracts, with mouse bone marrow cell micronucleus test for detecting possible genotoxicity. In order to observe the 50% lethal dose, approximate lethal dosage, maximum tolerance dosage and target organs, test articles were once orally administered to ICR mice at dose levels of 2000, 1000, 50 mg/kg according to the recommendation of KFDA Guidelines. The mortality and changes on body weight, clinical signs and gross observation were monitored during 14 days after dosing according to KFDA Guidelines with organ weights of 12 types of principle organs. In addition, after twice oral treatment of *Mahwangbujaseshin-tang* extracts 2000, 1000 and 500 mg/kg, we checked the changes on the number of MNPCE. We could not find any mortality, clinical signs, changes in the body weight and gross findings upto 2000 mg/kg treated group. The limited dosages in rodents except for increases of lymphoid organ weights and hypertrophy encountered as results from pharmacological effects of *Mahwangbujaseshin-tang* extracts, immune modulator effects with some sporadic accidental findings not toxicological signs. No evidence of increases of MNPCE numbers were also detected in all three different dosages of *Mahwangbujaseshin-tang* extracts treated mice. The results obtained in this study suggest that the LD50 and ALD of *Mahwangbujaseshin-tang* extracts in mice were considered as over 2000 mg/kg because no mortalities were detected upto 2000 mg/kg that was the highest dose recommended by KFDA and OECD. And the results of mouse bone marrow micronucleus test of *Mahwangbujaseshin-tang* extracts is negative results.

Key words : *Mahwangbujaseshin-tang*(麻黃附子細辛湯), single oral dose toxicity, genotoxicity

서 론

최근 중국산 한약재의 수입과 대량 생산에 따른 농약 등의 오염에 의한 독성 및 약물 자체의 안전성에 대하여 국민들의 관심이 높아지고 있다.

근래에 들어 한약 자체의 독성 평가가 폭넓게 진행되고 있는데 단미제에 대한 독성연구로는 半夏¹⁾, 竹瀝²⁾, 麻黃³⁾, 大茴香⁴⁾, 漢防己⁵⁾, 人蔘^{6,7)}, 玉竹⁸⁾, 桑葉 추출물⁹⁾ 등에서 수행되어져 왔으며,

* 교신저자 : 김종대, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대한방병원

· E-mail : omendoim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2122

· 접수 : 2009/08/12 · 수정 : 2009/10/25 · 채택 : 2009/12/01

복합 처방에 대한 연구로는 Ninomiya 등¹⁰⁾은 八味地黃丸의 독성을, Ryu 등¹¹⁾은 補中治濕湯의 독성을, 황 등¹²⁾은 加味歸脾湯의 독성을, 배 등¹³⁾은 補中益氣湯合大七氣湯의 독성실험을 각각 수행하였다. 그리고 麻黃潤肺湯에 대하여 마우스 및 Rats의 경구 단회 독성, 반복투여 및 유전독성에 대한 실험이 각각 수행되었다¹⁴⁻¹⁷⁾.

麻黃附子細辛湯은 장중경¹⁸⁾의 傷寒論에 처음 소개된 이후 역대 의서들에 인용되어져 온 처방으로¹⁹⁾ 麻黃, 附子 및 細辛으로 구성되어 助陽解表의 대표방이며, 溫中發汗, 強心, 鎮痛, 利水作用의 작용이 있다고 알려져 있다²⁰⁻²³⁾.

현재까지 麻黃附子細辛湯의 약효에 관하여, 장 등²⁴⁾은 실험동물의 심혈관계에 미치는 영향에 대해 보고하였으며, 고 등²⁵⁾은

endotoxin 으로 유발된 혈전 용해 효과를 관찰하는 등, 주로 호흡기계에 매우 유용한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나, 독성학적 측면에 대한 보고가 없었다.

이에 저자는 한약이 장기복용 약물이므로, 또한 잔류 가능성이 있어 잠재성에 대한 독성 평가가 필요할 것으로 생각되어 麻黃附子細辛湯을 일반적인 독성시험 중 현재 의약품 등의 독성실험 기준²⁰⁾에 명시되어 있는 마우스 경구 단회투여독성 시험과 유전독성을 평가하는 골수세포를 이용한 소핵실험을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 약재는 약업사(조흥약업사, 대구)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용 하였으며, 본 실험에 사용된 麻黃附子細辛湯¹⁹⁾ 1첩 분량의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. The Amount and Composition of *Mahwangbujaseshin-tang*

藥物名	生藥名	用量(g)
麻 黃	<i>Ephedrae Herba</i>	6
附 子	<i>Aconiti tuba</i>	6
細 辛	<i>Asiasari Radix</i>	3
Total		15

2) 麻黃附子細辛湯 추출

선정된 약제 10첩 분량(150 g)을 취하여 정제수 2000 ml로 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 3.26 g, 총 32.62 g(수율 약 16.31%)의 갈색의 물추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 麻黃附子細辛湯 추출물은 -20℃의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 100 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었다.

2. 마우스 경구 단회투여독성 실험

1) 실험동물 및 사양관리

암수 각 20마리의 ICR 마우스(6-weeks old upon receipt, SLC, Japan)를 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간동안 온도(20-25℃)와 습도(30-35%)가 조절된 사육실에서 마우스용 polycarbonate 사육상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기(light: dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 모든 실험동물은 투여일 및 최종 부검일 18시간전 절식을 실시하였으며, picric acid로 개체를 식별하였다.

2) 군분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 5마리씩 Table 2에 기록한 8그룹으로 구분

하였다. 한국식품의약품 안전청 고시 제 200-60호²⁶⁾와 OECD 실험기준^{27,28)}에 의거하여, 설치류 최고 한계투여용량인 2000 mg/kg을 최고 용량으로 설정하였으며, 공비 2로 1000 및 500 mg/kg을 중간 및 저용량 투여군으로 설정하였다. 또한 암수 각각에 대한 매체 대조군을 추가 하였다. 모든 투여군에서는 麻黃附子細辛湯을 멸균 증류수에 용해시켜 20 ml/kg의 용량으로 overnight 절식 후 존데(sonde)가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 경구 투여하였다. 식이와 음수에 따른 약물의 흡수 변화를 최소화하기 위해, 투여 후 대략 3시간 동안 사료와 음수 공급을 제한하였다.

Table 2. Experimental Design Used in Single Dose Toxicity Test

Group	Sex	No. of animals	Animal No.	Dosage (ml/kg)	Total Dose (ml/kg)
G0M**	Male	5	G0M-01 ~ G0M-05	10	0
G1M	Male	5	G1M-01 ~ G1M-05	10	2000
G2M	Male	5	G2M-01 ~ G2M-05	10	1000
G3M	Male	5	G3M-01 ~ G3M-05	10	500
G0F**	Female	5	G0F-01 ~ G0F-05	10	0
G1F	Female	5	G1F-01 ~ G1F-05	10	2000
G2F	Female	5	G2F-01 ~ G2F-05	10	1000
G3F	Female	5	G3F-01 ~ G3F-05	10	500

** : Vehicle control: distilled water 20 ml/kg as vehicle in this study; All test articles in vehicle were once orally dosed

3) 임상증상의 관찰

모든 실험동물의 임상증상을 투여 전후에 각각 functional observational battery test^{29,30)}를 기초하여 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에 관한 일관증상을 관찰 기록하였으며, 투여일 이후에도 하루에 최소한 2번씩 모든 실험동물의 임상증상을 관찰기록 하였다.

4) 체중의 측정

모든 실험동물의 체중을 투여전 1일, 투여직전, 투여 후 1, 2, 7, 13 및 14일에 각각 측정하였으며, 실험 시작시 개체차이에 따른 체중의 변화를 최소화하기 위하여, 투여일 부터 투여후 7일, 투여후 7일부터 13일 및 투여일부터 투여후 13일간의 체중 증량인 증체량을 각각의 체중을 이용하여 산출하였다.

5) 육안부검

투여 14일 후 모든 실험동물은 overnight 절식을 실시하였으며, ethyl ether (덕산공업주식회사, Korea) 마취하에 부검을 실시하고, 폐(Lung), 심장(Heart), 가슴샘(Thymus), 신장(Kidney), 부신(Adrenal gland), 비장(Spleen), 고환(Testis), 간(Liver), 췌장(Pancreas), 뇌(Brain), 부고환 (Epididymis), 슬와 임파절(Popliteal lymph node), 난소(Ovary) 및 자궁(Uterus) 등 12개의 주요 장기를 위주로 이상 육안소견을 각각 관찰 기록하였다.

6) 장기 중량의 측정

모든 실험동물은 육안부검 소견을 관찰 기록한 후 폐, 심장, 가슴샘, 신장, 부신, 비장, 고환, 간, 췌장, 뇌, 부고환, 슬와 임파절, 난소 및 자궁에 대한 절대 중량을 각각 측정하였으며, 체중의 변화에 수반된 이차적 변화를 최소화하기 위해 체중에 대한 각각의 장기 절대중량의 비율인 상대 중량을 산출하였다.

3. 마우스 골수세포를 이용한 소핵실험

1) 실험동물 및 사양관리

50마리의 수컷 ICR 마우스(6-weeks old upon receipt, SLC, J메우)를 14일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간동안 온도(20-25℃)와 습도(30-35%)가 조절된 사육실에서 마우스용 polycarbonate 사육상자에 5마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기(light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 모든 실험동물은 picric acid로 개체를 식별하였다.

2) 군분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 10마리씩 Table 3에 기록한 5그룹으로 구분하였다. 앞의 단회 경구투여 독성실험에서 설치류 투여 한계용량²⁶⁾인 2000 mg/kg까지 사망률이 인정되지 않았고 별 다른 독성증상인 인정되지 않아 한국식품의약품 안전청 고시 제 200-60호²⁶⁾와 OECD 실험기준³¹⁾에 의거하여, 2000 mg/kg을 최고 용량으로 설정하였으며, 공비 2로 1000 및 500 mg/kg을 중간 및 저용량 투여군으로 설정하였다. 또한 수컷에 대한 매체 대조군을 추가하였으며, 양성 대조물질로 Cyclophosphamide · H₂O (Sigma, MO, USA)를 사용하였다. 麻黃附子細辛湯은 멸균 증류수에 용해시켜 20 ml/kg의 용량으로 하루에 1회씩 2번 존데가 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 경구 투여하였으며, 음성 대조군에서는 麻黃附子細辛湯 대신 멸균 증류수만 동일한 방법으로 두번 경구 투여하였다. 또한 양성 대조군에서는 Cyclophosphamide 70 mg을 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 10 ml의 용량으로 麻黃附子細辛湯 또는 멸균 증류수 2회 투여시 26 gauge 의 주사침이 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 단회 복강투여 하였다.

Table 3. Experimental Design Used in Micronucleus Test

Group	Animal No.	Dose (mg/kg/day)
G0:Vehicle control	M01-M10	Distilled water 20 ml/kg
G1:Positive control	M11-M20	Cyclophosphamide (70 mg/kg), once
G2:The highest dosage group	M21-M30	Mahwangbujaseshin-tang extracts (2000 mg/kg), twice
G3:Middle dosage group	M31-M40	Mahwangbujaseshin-tang extracts (1000 mg/kg), twice
G4:The lowest dosage group	M41-M50	Mahwangbujaseshin-tang extracts (500 mg/kg), twice

Mahwangbujaseshin-tang extracts were orally administered, once a day for 2 days in a volume of 20 ml/kg of distilled water; Cyclophosphamide was once intraperitoneally dosed at second dose of Mahwangbujaseshin-tang extracts: Total 5 groups, 10 mice per group were used in the present study

3) 임상증상의 관찰

모든 실험동물은 단회투여 독성실험에서와 동일하게 functional observational battery test^{29,30)}에 기초하여 하루에 최소한 두번씩 임상증상을 각각 관찰 기록하였다.

4) 체중의 측정

실험동물 각각의 체중을 투여 시작 1일전, 1회 및 2회 투여 일과 최종 희생일에 측정하였으며, 투여시작시의 실험동물 개체 차이에 의한 체중의 변화를 최소화하기 위하여 투여 시작일부터 최종희생일 동안의 증체량을 계산하였다.

5) 골수세포 표본 제작

최종투여 약 24시간후 모든 실험동물을 ethyl ether 마취하

에 방혈한 다음 양쪽 대퇴골을 적출하였다. 골수검체의 제작은 Schmid³²⁾의 방법에 따랐다. 즉, 개체당 2매의 도말검체를 제작하였다. 각 동물로부터 적출한 대퇴골로부터 23 gauge 주사침을 이용하여, 3 ml 우테아 혈청(GIBCO BRL 26140-079, MO, USA)으로 골수를 세척하여 헤파타하고 1000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 침전된 골수세포를 슬라이드 글라스에 도말, 실온에서 충분히 건조한 후 메틸알코올에 5분간 침적하여 세포를 고정하였다. 고정 및 건조가 끝난 검체는 다음 순서로 염색하여 1000배의 배율로 검경하였다. 각 동물로부터 제작한 검체 중 염색 상태가 양호한 1매를 선택하여 무작위 검경하였다. 시험결과는 개체당 2000개의 다염성 적혈구(Polychromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵다염적혈구(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)를 계수하여 평균 ± 표준편차 (n=10)로 표시하였으며, 이를 소핵유발 빈도로 하였다. 계수 시 세포 직경의 1/5-1/20의 크기로 주변 유허세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형과 타원형의 소체를 소핵으로 계수하였으며, 소핵과 이물질의 구별하였다. 소핵계수 후 소핵 유무에 상관없이 합계 1000개의 PCE와 정상적혈구(Normochromatic Erythrocyte, NCE)를 계수하고, PCE의 수를 1000으로 나누어 PCE/(PCE + NCE)의 비율을 산출하여 세포독성의 지표로 결정하였다³³⁾.

4. 통계 처리

모든 수치는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 Scheffe test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 단회 투여독성시험의 경우, 반수치사량 및 95% 신뢰한계(confidence limits)를 Probit 방법으로 측정하였으며, 임상 증상 및 육안부검 소견은 각각 그 정도에 따라 0(normal), 1+(slight), 2+(moderate) 및 3+(severe)로 구분하였다. 소핵실험의 경우, PCE/(PCE + NCE)의 비율이 0.20 이상인 경우에 개체의 결과를 인정하였고, 단회 투여독성 실험에서와 같이 임상증상은 그 정도에 따라 0(normal), 1+(slight), 2+(moderate) 및 3+(severe)로 구분하였다. 통계처리 및 Probit 방법은 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc, USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 마우스 경구 단회 투여독성 실험

1) 사망률

麻黃附子細辛湯 투여와 관련 있는 사망률은 실험 전 기간동안 관찰되지 않아, 모든 실험동물(5/5 ; 100%)을 최종부검을 실시하였다(Table 4).

Table 4. Mortalities Observed in Female and Male Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b	Day after dosing														Total	
	0 ^c	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
M G0M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
A G1M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
L G2M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
E G3M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
G0F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
FEM G1F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
ALE G2F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)
G3F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5(0%)

a ; number of died animals, b ; Group ID was listed in Table 2, c ; Dosing day, **, total mortalities during 14 days of observation periods - died animals/total observed animals (n = 5) (percentages)

2) 임상증상

수컷 매체 대조군, 2000 및 1000 mg/kg 수컷 투여군에서 경미한 연변소견이 투여 1일 후에 국한되어 1례(1/5 ; 20%) 인정되었으며, 암컷 매체 대조군 및 2000 mg/kg 투여군에서 2례(2/5 ; 40%) 인정되었다. 경미한 탈모 소견 역시 1000 mg/kg 암컷 투여군에 국한되어 투여 후 10일에 1례 (1/5 ; 20%) 인정되었다 (Table 5).

Table 5. Clinical Signs Observed in Female and Male Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b	Clinical signs			
		Normal	Soft feces	Hair losses
MALE	G0M	4/5 (80%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
	G1M	4/5 (80%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
	G2M	4/5 (80%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
	G3M	5/5 (100%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
FEMALE	G0F	3/5 (60%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)
	G1F	3/5 (60%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)
	G2F	4/5 (80%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)
	G3F	5/5 (100%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

a ; Observed animals/total observed animals of five mice (percentages), b ; GroupID was listed in Table 2.

3) 체중의 변화

1000 mg/kg 암컷 투여군에 국한되어 암컷 매체 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.05) 체중의 증가가 각각 투여 2일후에 관찰된 이외에 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 체중 및 증체량의 변화는 인정되지 않았다(Table 6).

Table 6. Body Weight Gains in Female and Male Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b	Interval			
	Day 0 ^c -7	Day 7-13	Day 0 -13	
MALE	G0M	5.82±0.87	1.04±0.36	6.86±0.88
	G1M	6.38±1.66	0.76±0.53	7.14±1.60
	G2M	5.90±1.53	1.10±0.30	7.00±1.81
	G3M	6.06±1.87	1.48±0.48	7.54±1.72
FEMALE	G0F	4.28±0.66	0.66±0.48	4.94±0.94
	G1F	4.28±1.03	0.76±0.44	4.86±0.67
	G2F	5.12±0.95	0.90±0.98	6.02±1.13
	G3F	4.74±1.26	0.76±0.44	5.50±1.61

a ; Values are expressed as mean ± SD of five mice g, b ; Group ID was listed in Table 2, c ; Day of dosing after overnight fasting.

4) 장기증량의 변화

麻黃附子細辛湯 2000 mg/kg 수컷 투여군, 2000 및 1000 mg/kg 암컷 투여군에서 각각의 암수 매체 대조군에 비하여 가슴샘, 비장 및 슬와임파절의 상대 및 절대 중량치의 유의성 있는(p<0.05 또는 p<0.01) 증가가 인정되었다. 100 mg/kg 암컷 투여군에서만 유의성 있는(p<0.01) 난소 절대 및 상대 중량의 감소가 관찰된 이외에, 매체 대조군에 비하여 의미 있는 장기증량의 변화는 인정되지 않았다(Table 7-10).

5) 부검소견

각각의 매체 대조군에 비해 비장 및 임파절 종대 소견에 대한 관찰빈도 증가가 麻黃附子細辛湯 2000 mg/kg 수컷 투여군, 암컷 2000 및 1000 mg/kg 투여군에서 각각 인정되었으며, 폐 충·출혈, 비장 위축, 신장 낭포 및 자궁 부종 소견이 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에 걸쳐 산발적으로 관찰된 이외에 의미 있는 육안 부검소견은 인정되지 않았다(Table 11-12).

2. 마우스 골수세포를 이용한 소핵실험

1) 사망률

본 실험의 결과 양성 대조군인 Cyclophosphamide 투여군을 포함한 모든 실험군에서 사망률이 인정되지 않아, 모든 실험동물 (10/10 ; 100%)을 골수세포 수집에 이용하였다.

2) 임상증상

麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 임상증상은 인정되지 않았다.

3) 체중의 변화

양성 대조군인 Cyclophosphamide 투여군에서 투여 후 매체 대조군에 비해 유의성 없는 체중의 감소와 이에 따른 증체량의 감소가 인정된 이외, 의미 있는 체중 및 증체량의 변화는 인정되지 않았다(Fig. 1).

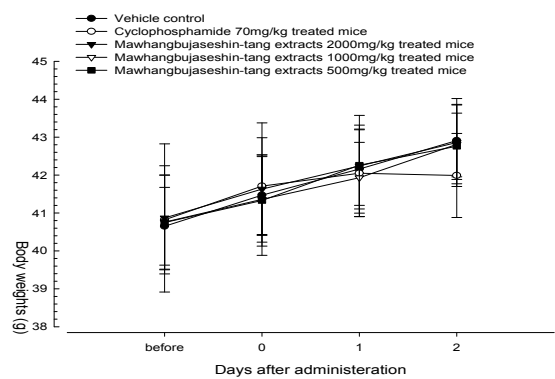


Fig. 1. Body Weight Changes in Mouse Bone Marrow Cell Micronucleus Test. No meaningful changes were detected in all Mawhangbujaseshin-tang extract treated groups as compared with vehicle control except for non-significant (arrow) decreases of body weights at 2 days after administration (1 day after Cyclophosphamide injection) detected in Cyclophosphamide treated group. Before means 1 day before administration; Day 0 means at first administration.

4) MNPCE의 수적 변화

매체 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 2000개의 PCE 중 MNPCE의 수적 증가가 양성 대조군인 Cyclophosphamide 투여

Table 7. Changes on the Absolute Organ Weights Observed in Male Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b	Principal Organs I					
	Lung	Heart	Thymus	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
G0M	0.193±0.014	0.155±0.007	0.047±0.009	0.324±0.045	0.009±0.003	0.115±0.005
G1M	0.193±0.014	0.157±0.011	0.069±0.010*	0.322±0.021	0.009±0.002	0.138±0.009**
G2M	0.187±0.011	0.154±0.005	0.051±0.011	0.334±0.047	0.008±0.002	0.116±0.009
G3M	0.201±0.010	0.157±0.009	0.048±0.010	0.322±0.023	0.009±0.003	0.119±0.009
Group ID ^b	Principal Organs II					
	Testis L	Liver	Pancreas S	Brain	Epididymis L	Lymph node L ^c
G0M	0.124±0.006	1.565±0.120	0.222±0.026	0.466±0.022	0.054±0.004	0.006±0.001
G1M	0.122±0.011	1.549±0.127	0.223±0.028	0.463±0.012	0.054±0.001	0.015±0.005**
G2M	0.125±0.006	1.529±0.162	0.222±0.048	0.468±0.029	0.054±0.004	0.007±0.002
G3M	0.125±0.006	1.608±0.033	0.206±0.033	0.470±0.026	0.056±0.004	0.009±0.004

a : Values are expressed as mean ± SD of five mice, g, b : Group ID was listed in Table 2, L: left sides, S: splenic lobes, c : Popliteal lymph node, * : p<0.05, ** : p<0.01 as compared with male vehicle control (G0M).

Table 8. Changes on the Absolute Organ Weights Observed in Female Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b	Principal Organs I					
	Lung	Heart	Thymus	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
G0F	0.186±0.010	0.144±0.007	0.059±0.006	0.202±0.006	0.009±0.001	0.132±0.016
G1F	0.187±0.012	0.146±0.007	0.092±0.017**	0.203±0.017	0.008±0.002	0.206±0.016**
G2F	0.189±0.009	0.144±0.005	0.093±0.013**	0.210±0.016	0.008±0.003	0.192±0.019**
G3F	0.187±0.010	0.146±0.007	0.059±0.014	0.203±0.013	0.005±0.002	0.142±0.015
Group ID ^b	Principal Organs II					
	Ovary L	Liver	Pancreas S	Brain	Uterus	Lymph node L ^c
G0F	0.036±0.007	1.429±0.119	0.189±0.020	0.459±0.021	0.191±0.025	0.006±0.002
G1F	0.031±0.010	1.426±0.151	0.199±0.019	0.459±0.019	0.180±0.039	0.034±0.017**
G2F	0.020±0.002**	1.442±0.111	0.200±0.025	0.453±0.023	0.152±0.038	0.012±0.002**
G3F	0.031±0.016	1.405±0.115	0.184±0.008	0.460±0.022	0.176±0.061	0.009±0.004

a : Values are expressed as mean ± SD of five mice, g, b : Group ID was listed in Table 2, L : left sides, S : splenic lobes, c : Popliteal lymph node, * : p<0.05, ** : p<0.01 as compared with female vehicle control (G0F).

Table 9. Changes on the Relative Organ Weights Observed in Male Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b	Principal Organs I					
	Lung	Heart	Thymus	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
G0M	0.515±0.052	0.413±0.015	0.125±0.030	0.860±0.109	0.023±0.006	0.305±0.018
G1M	0.510±0.059	0.414±0.019	0.181±0.023*	0.847±0.033	0.024±0.006	0.364±0.026**
G2M	0.505±0.046	0.416±0.028	0.137±0.024	0.907±0.173	0.020±0.005	0.314±0.013
G3M	0.526±0.025	0.413±0.035	0.125±0.025	0.844±0.070	0.023±0.008	0.312±0.021
Group ID ^b	Principal Organs II					
	Testis L	Liver	Pancreas S	Brain	Epididymis L	Lymph node L ^c
G0M	0.330±0.018	4.163±0.438	0.588±0.065	1.239±0.086	0.145±0.017	0.016±0.003
G1M	0.320±0.020	4.093±0.452	0.591±0.100	1.222±0.048	0.142±0.004	0.038±0.012**
G2M	0.337±0.029	4.148±0.658	0.596±0.108	1.267±0.136	0.145±0.011	0.020±0.006
G3M	0.326±0.013	4.221±0.418	0.539±0.082	1.232±0.079	0.146±0.017	0.023±0.010

a : Values are expressed as mean ± SD of five mice, g, b : Group ID was listed in Table 2, L: left sides, S: splenic lobes, c : Popliteal lymph node, * : p<0.05, ** : p<0.01 as compared with vehicle control (G0M).

Table 10. Changes on the Relative Organ Weights Observed in Female Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b	Principal Organs I					
	Lung	Heart	Thymus	Kidney L	Adrenal gland L	Spleen
G0F	0.612±0.030	0.473±0.019	0.193±0.019	0.665±0.016	0.028±0.004	0.433±0.045
G1F	0.606±0.056	0.473±0.038	0.298±0.054*	0.654±0.059	0.027±0.007	0.665±0.068**
G2F	0.601±0.044	0.457±0.016	0.295±0.040*	0.666±0.047	0.026±0.008	0.611±0.071**
G3F	0.606±0.037	0.475±0.030	0.192±0.048	0.659±0.054	0.016±0.005	0.461±0.054
Group ID ^b	Principal Organs II					
	Testis L	Liver	Pancreas S	Brain	Epididymis L	Lymph node L ^c
G0F	0.119±0.021	4.694±0.329	0.623±0.072	1.511±0.084	0.628±0.095	0.019±0.008
G1F	0.100±0.032	4.602±0.485	0.645±0.075	1.482±0.051	0.583±0.139	0.110±0.055**
G2F	0.065±0.009**	4.579±0.453	0.633±0.077	1.434±0.067	0.483±0.130	0.039±0.007*
G3F	0.099±0.048	4.551±0.395	0.596±0.025	1.488±0.062	0.570±0.202	0.031±0.013

a : Values are expressed as mean ± SD of five mice, g, b : Group ID was listed in Table 2, L: left sides, * : p<0.05, ** : p<0.01 compared to that of vehicle control (G0F) by MW test.

군에서 인정되었으나, 2000, 1000 및 500 mg/kg의 麻黃附子細辛湯 투여군에서는 매체 대조군과 유사한 MNPCE의 수를 각각 나타내었다(Table 13).

5) PCE/(PCE+NCE) 비율의 변화

매체 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) PCE 수 및 PCE/(PCE+NCE) 비율의 감소가 양성 대조군인 Cyclophosphamide 투여군에서 인정되었으나, 0.42 이상의 PCE/(PCE+NCE) 비율을 나타내었으며, 모든 麻黃附子細辛湯 투여군에서는 매체 대조군과 유사한 PCE 수 및 PCE/(PCE+NCE) 비율을 각각 나타내었다 (Table 13).

Table 11. Necropsy Findings Observed Male Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b		MALE			
		G0M	G1M	G2M	G3M
Lung	Normal	4/5	5/5	4/5	5/5
	Congestion	1/5	0/5	1/5	0/5
Heart	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
	Thymus	Normal	4/5	5/5	4/5
Kidney	Normal	4/5	5/5	5/5	4/5
	Cyst	1/5	0/5	0/5	1/5
Adrenal gland	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
	Spleen	Normal	3/5	0/5	3/5
		Atrophy	1/5	0/5	1/5
	Hypertrophy	1/5	5/5	1/5	2/5
Testis	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Liver	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Pancreas	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Brain	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Epididymis	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
	Lymph node ^c	Normal	5/5	0/5	4/5
		Hypertrophy	0/5	5/5	1/5
Others	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

a ; Observed animals/total observed animals of five mice b ; Group ID was listed in Table 2 c ; Bilateral popliteal lymph node.

Table 12. Necropsy Findings Observed Female Mice of Single Dose Toxicity Test^a

Group ID ^b		MALE			
		G0M	G1M	G2M	G3M
Lung	Normal	3/5	4/5	3/5	5/5
	Congestion	2/5	1/5	2/5	0/5
Heart	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
	Thymus	Normal	4/5	5/5	5/5
Kidney	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
	Adrenal gland	Normal	5/5	5/5	5/5
Spleen		Normal	4/5	0/5	0/5
		Atrophy	1/5	0/5	0/5
	Hypertrophy	0/5	5/5	5/5	0/5
Ovary	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Liver	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Pancreas	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Brain	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
Uterus	Normal	2/5	2/5	4/5	2/5
	Edematous	3/5	3/5	1/5	3/5
Lymph node ^c	Normal	4/5	0/5	0/5	3/5
	Hypertrophy	1/5	5/5	5/5	2/5
Others	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

a ; Observed animals/total observed animals of five mice b ; Group ID was listed in Table 2; c ; Bilateral popliteal lymph node.

Table 13. Changes on the Bone Marrow Cells: MNPCE Numbers and PCE(PCE+NCE) Ratio Observed in Micronucleus Test^a

Group ID ^b	MNPCEs/2000 PCEs	PCE(PCE+NCE) ratio/1000 erythrocytes
G0	1.30±0.95	0.46±0.02
G1	69.70±13.27**	0.42±0.02**
G2	1.20±1.69	0.46±0.02
G3	1.50±2.22	0.46±0.02
G4	0.90±0.99	0.46±0.02

a ; Values are expressed as mean ± SD of 10 mice; b ; Group ID was listed in Table 3 MNPCE, PCE with one or more nuclei PCE, Polychromatic erythrocyte NCE, Normochromatic erythrocyte ** p<0.01 as compared with intact control

고찰

각종 질환이나 스트레스에 대한 관심이 높아지면서 건강 기능성 식품 및 천연물 의약품에 관심도 높아지고 있는데 이에 따른 안전성이 확보되지 않은 식품 및 의약품의 오남용으로 인한 독성 및 부작용이 늘어남으로써 사회문제화 되고 있어 이에 대한 철저한 규제 및 관리가 요구되고 있다.^{34,35)}

한약의 안전성에 대한 논란은 잔류농약과 중금속 등 약재의 오염과 관련된 문제와 함께, 한약 자체의 독성에 의한 간손상이나 신손상 등이 주로 제기되고 있다. 독성은 사용량과 사용 방법이 매우 중요하며, 최근에는 진품 약재가 아닌 대체 약물의 부적절한 사용으로 인한 경우도 적지 않다.³⁶⁾

일반적으로 한약의 유전독성 연구는 화합물이나 방사선과 같은 유전독성을 유발하는 물질에 대한 보호 또는 예방 효과와 같은 약효 연구의 일환으로 진행되어 왔다.³⁷⁾ 최근에 추출물 또는 복합물 자체의 유전독성 실험으로 de Carvalho 등³⁸⁾이 pepper tree 추출물의 유전독성을 평가하였으며, de Sousa 등³⁹⁾은 브라질 약용식물 Stryphnodendron adstringens 추출물의 유전독성을 평가하였고 황 등⁴⁰⁾이 補中益氣合大七氣湯에 대한 유전독성을 평가하였다. 국내에서는 현재 한약재의 가공, 저장, 유통을 안전하고 위생적으로 처리하기 위하여 감마선을 처리한 경우에 나타날 수 있는 유전독성의 여부를 판단하기 위한 실험논문⁴¹⁻⁴⁴⁾이 대부분이었으며 복합처방에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

麻黃附子細辛湯은 장중경¹⁸⁾의 상한론에 "少陰病 始得之 反發熱 脈沈者 麻黃附子細辛湯"이라 하여 처음 소개되었으며 麻黃, 附子 및 細辛으로 구성되어 이중 麻黃은 發汗解表, 宣肺定喘 및 利水消腫의 효능이 있으며, 附子は 回陽求逆, 補火助陽, 溫經散寒, 除濕止痛 및 散寒痛經의 효능이 있고, 細辛은 祛風散寒, 通竅止痛 및 溫肺化痰하는 효능이 있어, 助陽解表의 대표방이며, 溫中發汗, 強心, 鎮痛, 利水作用을 겸하고 있다.²⁰⁻²³⁾

본 연구에서는 麻黃附子細辛湯의 일반적인 독성시험 중 현재 한국식품의약품안전청 고시 제 2005-60호 "의약품 등의 독성 시험기준"²⁶⁾에 명시되어 있는 마우스 경구 단회투여독성 시험과 골수세포를 이용한 소핵실험을 실시하여, 장기투여 독성 시험과 생식·발생독성 시험을 위시한 특수 독성시험에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

경구 단회투여독성 시험에서는 반수치사율, 개략적 치사량, 최대 내성 용량 및 표적장기를 산출하기 위하여, 한국식품의약품안전청 고시²⁶⁾에 따라 麻黃附子細辛湯 2000, 1000 및 500 mg/kg을

단회 경구 투여한 다음 14일간 체중 및 임상증상을 관찰하였으며, 14일 후 최종 부검을 통하여 12개의 주요 장기에 대한 장기 중량 및 육안 부검을 실시하였다. 또한 유전독성을 평가하기 위하여, 한국식품의약품안전청 고시²⁶⁾에 의거하여, 마우스 경구단회투여 독성에서 사망례가 인정되지 않은 2000 mg/kg을 최고 용량으로 설정한 다음 공비 2로 1000 및 500 mg/kg의 용량을 중간 및 저용량 투여군으로 설정하고, 2회 경구투여한 다음 골수 세포를 수거하여 소핵을 나타내는 다염적혈구(PCE) 수를 평가하였다.

본 실험의 결과, 단회투여 독성 시험에서 설치류 최대 한계 투여 용량인 2000 mg/kg까지 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 사망례가 인정되지 않았다.

본 실험 결과 투여 후 1일에 국한되어 일부 실험동물에서 산발적으로 경미한 연변 소견은 매체 대조군에서 유사한 빈도로 관찰되었으나, 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 독성증상으로 간주하기는 어렵고, 과량의 용매를 일시적으로 투여한 결과 초래된 증상으로 판단된다.

또한 탈모 증상 역시 麻黃附子細辛湯 1000 mg/kg 암컷 투여군에 국한되어 투여 후 10일에 1례(1/5; 20%) 인정되었으나, 투여 용량 의존성이 인정되지 않아 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 독성증상으로 보기 어렵다.

麻黃附子細辛湯 1000 mg/kg 암컷 투여군에 국한되어 관찰된 체중의 증가 인정되었으나 투여 용량에 따른 의존적인 변화가 전혀 인정되지 않아 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 독성증상으로 보기는 어렵고, 면역활성과 관련된 이차적인 변화로 생각된다.

麻黃附子細辛湯 2000 또는 1000 mg/kg 암수 투여군에서 인정된 가슴샘, 비장 및 슬와 임파절 종대 소견의 빈도 증가와 이들 임파장기 중량의 증가는 역시 麻黃附子細辛湯의 면역활성 등의 약리 작용에 기인한 이차적 변화로 생각된다. 일반적으로 면역활성 물질을 투여시 임파장기의 종대 및 중량의 증가가 관찰되는 것으로 알려져 있다^{45,46)}. 麻黃附子細辛湯 1000 mg/kg 암컷 투여군에 국한되어 유의성 있는 ($p < 0.01$) 난소절대 및 상대 중량의 감소가 관찰된 점 역시 용량 의존성이 전혀 인정되지 않아 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 독성 증상으로 간주하기 어렵고, 난소의 중량은 estrus cycle에 따라 쉽게 변화할 수 있어^{47,48)}, estrus cycle에 따른 이차적 변화로 판단된다. 이외 본 실험에 사용한 실험동물의 체중 및 장기중량은 동일한 주령의 마우스들의 정상 범주에 포함되어 관찰되었다^{49,50)}.

또한 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 육안 부검시 인정된 폐 충·출혈, 비장 위축, 신장 낭포 및 자궁 부종 소견들이 산발적으로 관찰되었으나, 용량 의존성이 전혀 인정되지 않아 麻黃附子細辛湯 투여와 관련 없는 우발적 병소로 판단되고, 이들 병소들은 정상 마우스에서 드물게 인정되는 소견으로 알려져 있다^{51,52)}.

US Environmental Protection Agency OPPTS 870.10053에 따르면 일반적으로 반수 치사량이 5000~15000 mg/kg인 물질을 무독성물질로, 500~5000 mg/kg을 비교적 저독성(Class III) 물질로 규정하고 있으나, 한국식품의약품 안전청 고시 제 2005-60호²⁶⁾ 및 OECD 기준^{27,28)}에 따르면, 설치류에서 투여한계 농도를

2000 mg/kg으로 제한하고 있다. 따라서 본 실험의 마우스 단회 경구투여 독성실험에서 麻黃附子細辛湯의 반수치사량 및 개략적 치사량은 각각 2000 mg/kg이상으로 관찰되었으며, 설치류에서 투여한계 농도인 2000 mg/kg까지 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 체중, 임상 증상, 장기중량 및 육안부검 소견의 변화가 인정되지 않았다.

골수 세포를 이용한 소핵실험은 실험물질의 유전독성을 평가하는데 있어서 가장 빠르고 확실한 방법 중 하나로 알려져 있으며, 유전독성물질은 소핵다염적혈구, MNPCE의 현저한 수적 이상을 나타내는 것으로 알려져 있다⁵⁴⁾. 단회 투여독성 실험에서 2000 mg/kg의 농도까지 별 다른 독성 증상이 인정되지 않아 마우스 골수 세포를 이용한 소핵실험에서도 2000 mg/kg을 최고 농도로 설정하였고, 각각 공비 2로 희석하여 1000 및 500 mg/kg을 중간 및 저농도 투여군으로 설정하였다.

Cyclophosphamide는 현재 흔히 사용되는 항암제로, 조혈장기와 임파기계에 현저한 독성을 초래하여 심한 백혈구 감소를 일으킨다⁵⁵⁾. Cyclophosphamide 자체는 무독성 물질이나, 체내에서 마이크로솜 효소의 영향에 의해 독성을 나타내는 대사산물을 형성하고 이 대사산물이 DNA에 손상을 입혀 유전독성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{56,57)}. 현재 한국식품의약품 안전청 고시 제 2005-60호²⁶⁾에서는 마우스 골수 세포를 이용한 소핵 유전독성 평가에 양성 대조물질로 Cyclophosphamide의 사용을 권고하고 있다. 본 실험에서도 Cyclophosphamide를 양성 대조물질로 사용하여, 매체 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) MNPCE의 증가가 인정되었다. 따라서 본 실험의 결과를 신뢰할 수 있을 것으로 판단된다.

PCE/(PCE+NCE)비율은 세포독성을 평가하는 지표로, PCE/(PCE+NCE) 비율이 0.20 이상일 때 세포독성에 의한 실험적 오류가 없는 것으로 받아들여지고 있다³³⁾. 본 실험에서 매체 대조군에 비해 양성 대조물질인 Cyclophosphamide 투여군에서 유의성 있는($p < 0.01$) PCE 수 및 PCE/(PCE+NCE) 비율의 감소가 각각 인정되고 PCE/(PCE+NCE) 비율이 0.42 이상으로 관찰되었으므로 모든 麻黃附子細辛湯 투여군에서는 매체 대조군과 유사하게 관찰되어, 세포 독성에 의한 오류는 없을 것으로 판단된다.

또한 MNPCE 수는 양성 대조군인 Cyclophosphamide 투여군에서 이전의 실험과 유사하게 관찰되었다⁵⁸⁾. 그러나 본 실험 결과 麻黃附子細辛湯에서는 매체 대조군에 비해 별 다른 MNPCE의 증가를 초래하지 않아 유전독성을 나타내지 않는 음성 물질로 판단된다.

이상에서 살펴본바 본 실험의 마우스 단회 경구투여 독성실험에서 麻黃附子細辛湯의 반수치사량 및 개략적 치사량은 각각 2000 mg/kg 이상으로 관찰되었으며, 설치류에서 투여한계 농도인 2000 mg/kg까지 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 체중, 임상 증상, 장기중량 및 육안부검소견의 변화가 인정되지 않았고, 마우스 골수세포를 이용한 소핵실험에서 음성을 나타내었다.

그러므로 설치류 투여한계인 2000 mg/kg까지의 麻黃附子細辛湯의 투여는 비교적 안전할 것으로 생각되며, 2000 mg/kg 이상의 투여시 각별한 주의가 요구될 것으로 생각된다.

결 론

麻黃附子細辛湯의 마우스 경구단회투여 독성 실험과 골수 세포를 이용한 소핵실험을 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

麻黃附子細辛湯 투여와 관련 있는 사망례는 실험 전 기간동안 관찰되지 않았으며 경미한 연변 및 탈모조건이 암수 매체 대조군을 포함하여 산발적으로 관찰된 이외에 麻黃附子細辛湯 투여와 관련된 임상증상은 실험은 실험 전 기간동안 인정되지 않았다. 체중 및 체중 증가량의 변화는 麻黃附子細辛湯 1000 mg/kg 암컷 투여군에만 각각의 매체 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 체중 증가량이 관찰되었다. 麻黃附子細辛湯 2000 mg/kg 수컷 투여군, 2000 및 1000 mg/kg 암컷 투여군에서 각각의 암수 매체 대조군에 비해 가슴샘, 비장 및 슬와 임파절의 상대 및 절대 중량치의 유의성 있는 증가가 인정되었으며, 1000 mg/kg 암컷 투여군에 국한되어 유의성 있는 난소 절대 및 상대 중량의 감소가 관찰되었다. 부검소견상 麻黃附子細辛湯 2000 mg/kg 수컷 투여군, 암컷 2000 및 1000 mg/kg 투여군에서 비장 및 임파절 종대 소견에 대한 관찰빈도 증가가 인정되었으며, 폐 충·출혈, 비장 위축, 신장 낭포 및 자궁 부종 소견이 암수 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에 걸쳐 산발적으로 관찰된 것 이외에 의미 있는 육안 부검소견은 인정되지 않았다. 소핵실험시 麻黃附子細辛湯 투여와 관련있는 사망례, 임상증상, 체중의 변화는 실험 전 기간동안 관찰되지 않았다. 소핵실험 MNPCE의 수적 변화·PCE/(PCE+NCE) 비율의 변화는 모든 麻黃附子細辛湯 투여군에서 매체 대조군과 유사한 결과를 나타내었다.

참고문헌

1. Lee, J.E., Kim, H.J., Choi, E.K., Chai, H.Y., Yun, Y.W., Kim, D.J., et al. Four-week repeated-dose toxicity study on Pinellia Extract. The Korean journal of laboratory animal science. 19: 127-141, 2003.
2. 장인규, 홍남두. 죽력(竹瀝)의 독성시험 및 약효학적 연구. 대한한방내과학회지 2: 83-101, 1985.
3. Theoharides, T.C. Sudden death of a healthy college student related to ephedrine toxicity from a mahuang-containing drink. J Clin Psychopharmacol. 17: 437-439, 1997.
4. Ali, B.H., Blunden, G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res. 17: 299-305, 2003.
5. Chen, J., Tong, Y., Zhang, X., Tian, H., Chang, Z. Acute toxicity of Stephania cepharantha. Zhong Yao Cai. 22: 468-469, 1999.
6. Kitts, D., Hu, C. Efficacy and safety of ginseng. Public Health Nutr. 3: 473-485, 2000.
7. 이해정. 종류별 인삼수침액기스의 독성 연구. 대한침구학회,

- 10: 167-173, 1993.
8. Chen, H., Feng, R., Guo, Y., Sun, L., Zhou, Y., Jiang, J. Toxicity studies of Rhizoma Polygonati Odorati. J Ethnopharmacol. 74: 221-224, 2001.
9. 황석연, 권 운, 채희열, 조영민, 류재면, 이남진 외 6인. 상업의 4주 반복투여독성 평가. The Korean journal of laboratory animal science. 20(3):274-282, 2004.
10. Ninomiya, H., Kato, S., Okuda, H. Effects of Hachimi-jio-gan in aged rats. J Altern Complement Med. 7: 355-359, 2001.
11. Ryu, J.C., Kim, K.R., Kim, H.J., Youn, J.Y., Myung, S.W., Kim, G.H., Lee, M.J., Chang, I.M. 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. 21: 391-397, 1998.
12. 황석연, 권 운, 채희열, 조영민, 류재면, 김동규 외 6인. 加味歸脾湯의 4주 반복투여독성 평가. The Korean journal of laboratory animal science. 20(3):267-273, 2004.
13. 배열철, 최빈혜, 김동우, 허진일, 변준석, 김대준. 補中益氣湯合大七氣湯 추출물의 ICR 마우스에서 경구단회투여 독성 평가. 대한한방내과학회지, 26(2):369-378, 2005.
14. 정우식, 전귀옥, 조동희, 서영호, 박미연, 최해운, 김종대. 麻黃潤肺湯추출물의 수컷 ICR마우스에서 경구 단회투여 독성 평가. 동의생리병리학회지 20(2):442-448, 2006.
15. 전귀옥, 조동희, 서영호, 박미연, 최해운, 김종대. 麻黃潤肺湯추출물의 수컷 SD Rats에서 경구 단회투여 독성평가. 대한한방내과학회지 27(1):102-113, 2006.
16. 박미연. 麻黃潤肺湯 추출물의 SD계 Rats에 28일 경구 반복투여 독성실험. 대구한의대학교, 박사학위 논문, 2006.
17. Jeng-Yim, S., Mee-Yepn, P., Tae-Young, J., Hae-Yun, C., Jong-Dae, K., Hyeung-Sik, L., et al. Genotoxicity testing of aqueous extracts of Mahwangypunpae-tang, a polyherbal formula. Food and Chemical Toxicology. 46: 3827-3831, 2008.
18. 장중경. 中景全書. 서울, 한림사, p 245, 251, 1975.
19. 한의과 대학 방제학 교수 편저. 방제학. 영림사, 서울, p 99, 1995.
20. 郭子光. 傷寒論湯證新編. 上海, 上海科學技術出版社, pp 84-88, 1983.
21. 李槌. 원본 한의학입문. 서울, 대성문화사, pp 29-30, 59-61, 234-236, 1990.
22. 朴憲在. 상한론개론. 서울, 약업신문사출판국, pp 190-191, 1991.
23. 김동현, 김형민, 류종훈, 엄제영, 김상찬, 양재하 외 3명. 한방약리학. 서울, 신일상사, p 268, 298, 430, 2006.
24. 장재호, 김세길. 麻黃附子細辛湯이 실험동물의 심혈관계에

- 미치는 영향. 원광의학, 5: 331-349, 1995.
25. 고평석, 최성훈, 안규석, 문준진. 麻黃附子細辛湯 및 처방구성 약제가 Endotoxin으로 유발된 혈전증에 미치는 영향. 동의 병리학회지 5: 1-14, 1990.
 26. 식품의약품안전청. 의약품 등의 독성시험기준. 서울: 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호, 2005.
 27. Organization for Economic Co-Operation and Development (Ed.). OECD guideline (401) for testing of chemicals, acute oral toxicity (deleted 2002). 1987.
 28. Organization for Economic Co-Operation and Development (Ed.). OECD guideline (423) for testing of chemicals-acute oral toxicity-acute toxic class method. 2001.
 29. Irwin, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 13: 222-257, 1968.
 30. Dourish, C.T. Effects of drugs on spontaneous motor activity. In: Experimental Psychopharmacology. Greenshaw AJ. and Dourish, CT. (Eds). Clifton, Humana Press pp 325-334, 1987.
 31. Organization for Economic Co-Operation and Development (Ed.). Guideline for the testing of Chemicals TG NO. 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, July 21, 1997.
 32. Schmid, W. The Micronucleus Test. Mutat. Res. 31: 9-15, 1975.
 33. Heddle, J.A., Stuart, E., Salamone, M.F. The Bone Marrow Micronucleus Test. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures (Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., Eds). 2nd Edition, Elsevier. pp 441-457, 1984.
 34. 식품의약품안전청. 건강기능식품의 기능성 평가 체계 구축에 대한 연구. 서울, 경희대학교 약학대학, 2002.
 35. 식품의약품안전청. 기능성 식품의 합리적 관리체계 구축을 위한 연구. 서울, 식품의약품안전청, 2002.
 36. 박해모, 장인수, 이선동. 국내에서 보고된 한약 및 민간요법, 건강식품 관련 약인성 간손상에 대한 체계적 고찰. 대한한의학회지 26(2):152-165, 2005.
 37. Mersch-Sundermann, V., Kassie, F., Bohmer, S., Lu, W.Q., Wohlfahrth, R., Sobel, R., et al. Extract of Toxicodendron quercifolium caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice. Food Chem Toxicol. 42: 1611-1617, 2004.
 38. Carvalho, M.C., Barca, F.N., Agnez-Lima, L.F., de Medeiros, S.R. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Environ Mol Mutagen. 42: 185-191, 2003.
 39. Sousa, N.C., de Carvalho, S., Spano, M.A., Graf, U. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. Environ Mol Mutagen. 41: 293-299, 2003.
 40. 황희정. 補中益氣合大七氣湯 추출물의 유전독성 평가. 대구한의대학교 대학원 박사학위 논문, 2005.
 41. 함연호, 육홍선, 조성기. Ames test를 이용한 감마선 조사 黃芪, 甘草 및 陳皮의 유전독성학적 안전성 평가. 한국식품영양과학회지 8(1):54-59, 2001.
 42. 조성기, 육홍선, 변명우. 감마선 조사 紅蓼의 안전성에 관한 유전독성학적 연구. 한국식품영양과학회지 25(3):491-496, 1996.
 43. 박혜란, 함연호, 정우희. 감마선 조사 黃芪, 白朮 및 升麻 열수 추출물의 in vitro 유전독성학적 안전성 평가. 한국식품영양과학회지 31(5):910-916, 2002.
 44. 유명법, 조성기. 감마선 조사 當歸의 유효성분 안정성 및 유전독성학적 안전성 연구. 한국식품영양과학회지 7(1):300-306, 2000.
 45. Klein, H.O., Kreysch, H.G., Coerper, C., Voigt, P., Ruff, I. Preclinical and early clinical trial with mafosfamide as immune modulator. Methods Find Exp. Clin. Pharmacol. 9: 627-640, 1987.
 46. Iqbal, M.P., Sultana, F., Mehboobali, N., Pervez, S. Folic acid protects against suppression of growth by methotrexate in mice. Biopharm Drug Dispos. 22: 169-178, 2001.
 47. Banks, W.J. Female reproductive system. In: Banks WJ (Ed). Applied veterinary histology, 2nd ed. Williams & Wilkins: Baltimore. pp 506-526, 1986.
 48. Pineda, M.H. Female reproductive system. In: McDonald LE and Pineda MH (Eds). Veterinary endocrinology and reproduction, Lea & Febiger: Philadelphia. pp 303-354, 1989.
 49. Plata, E.J., Murphy, W.H.. Growth and hematologic properties of the BALB/wm strain of inbred mice. Lab Anim Sci. 22: 712-720, 1972.
 50. Yamaguchi, C., Fujita, S., Obara, T., Ueda, T. Effects of room temperature on reproduction, body weight and organ weights, food and water intakes, and hematology in mice. Exp Anim. 32: 1-11, 1983.
 51. Lee, J.H., Yang, K.J., Shin, H.D., Park, B.R., Son, C.W., Jang, H.J., et al. Single subcutaneous dose toxicity of Polycan®, a β -glucan originated from *Aureobasidium* in mice. Lab. Anim. Res. 21: 299-305, 2005.
 52. Lee, H.S., Lee, I.G., Ku, S.K. Single oral dose toxicity study of water extracts of *Picrorrhiza Rhizoma* in mice. J Toxicol Pub Health. 22: 117-126, 2006.
 53. US Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.100, Acute Toxicity Testing Background. US EPA August, Washington, USA. 1998.

54. Renner, H.W. In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutat Res.* 244: 185-188, 1990.
55. Angulo, I., Las Heras, F.G., Garcia-Bustos, J.F., Gargallo, D., Munoz-Fernandez, M.A., Fresno, M. Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ER-MP12)(+) cells in the spleen of cyclophosphamide-treated mice: implications for T-cell responses in immunosuppressed mice. *Blood.* 95: 212-220, 2000.
56. Miyauchi, A., Hiramane, C., Tanaka, S., Hojo, K. Differential effects of a single dose of cyclophosphamide on T cell subsets of the thymus and spleen in mice: flow cytofluorometry analysis. *Tohoku J Exp Med.* 162: 147-167, 1990.
57. El-Bayoumy, K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat. Res.* 475: 123-139, 2001.
58. Lee, H.S., Cho, H.R., Yang, K.J., Moon, S.B., Park, B.R., Shin, H.D., et al. Micronucleus test of polycanTM, β -glucan originated from *Aureobasidium*, in bone marrow cells of male ICR mice. *Toxicol Res.* 24: 11-15, 2008.