

발간등록번호

11-1543000-000195-01

**무독성 옷나무 추출물을 이용한
개별인정형 건강기능식품 개발**

(Health supplementary food development for immune
stimulation from detoxified lacquer tree extract)

(주)에이지아이

농림축산식품자료실



0018279

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “무독성 옷나무 추출물을 이용한 개별인정형 건강기능식품 개발” 과제
의 보고서로 제출합니다.

2013 년 7 월 30 일

주관연구기관명 : (주)에이지아이

주관연구책임자 : 박상재

협동연구기관명 : (주)켄온

협동연구책임자 : 이현걸

협동연구기관명 : 한림대학교

협동연구책임자 : 전성호

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황

제 8 장 참고문헌

[부록] 독성시험자료 첨부

요 약 문

I. 제 목 : 무독성 옷나무 추출물을 이용한 개별인정형 건강기능식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구 개발의 목적

: 옷나무 추출물을 이용한 혈행개선 및 면역증강 효과가 있는 건강기능식품을 개발하여 국내 및 해외 시장에 진출하고자 함.

2. 필요성

- 옷나무 추출물을 이용하여 알러지 제거기술 확보 및 기능성 물질의 동정으로 천연물 신약의 기반기술 확보와 함께 해외 시장 진출의 중요한 자료가 될 수 있다.
- 옷나무의 칠액 외의 나무 자체에 대한 이용도를 높임으로써 자원의 효율적인 이용과 농가의 고부가가치 제품에 대한 소득 증대의 역할을 할 수 있다.
- 근거없이 제조되고 있는 옷나무 관련 제품들을 근절하고, 알러지 유발 물질을 제거함으로써 국민의 건강을 증진 시킬 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 지표성분의 적합성 규명 (벨리테이션)
2. 지역별, 시기별, 원료의 성분 차이를 실험적으로 접근하여 자료 확보
3. 면역활성 효능평가와 생체작용기전을 분석하여 유효물질의 생체 작용기전을 규명
4. 옷나무 추출물의 독성에 대한 자료 확보 (복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험, 13주 경구반복투여독성, 설치류 단회 독성)
5. 옷나무 추출물의 인체효능자료의 확보

IV. 연구개발결과

1. 옷나무 추출물의 알러지 유발물질의 제거법 개발 및 공정 확립
2. 독성 및 안전성 시험을 통한 추출물의 안전성 확인
3. 옷나무 추출물의 혈행개선 활성의 평가 - 동물시험 및 인체임상시험
4. 옷나무 추출물의 면역증강 활성의 평가 - 동물시험 및 인체임상시험
5. 알러지 유발성분이 제거된 옷나무 추출물의 대량생산공정의 확립

V. 연구성과 및 성과활용 계획

관련 기술 이전 : 향후 글로벌 시장으로의 진입을 위하여 관련 기술을 일체 기술이전함. 주관 기관인 (주)에이지아이는 관련분야에서 기술료 수입을 확보하며, 사업화는 기술인수사에서 추진하기로 함.

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

옷나무 추출물을 이용한 혈행개선 및 면역증강 효과가 있는 건강기능식품을 개발하여 국내 및 해외 시장에 진출하고자 함.

제 2절 연구개발의 필요성

- 국내 옷나무 재배 본수는 거의 1,000만 그루 이상에 육박하고 있으며, 일제시대 칠액의 생산을 위하여 심은 야산의 옷나무까지 합한다면 10년생 이상만을 기준으로 할 때 1,000만 그루 이상이라고 볼 수 있다.
- 옷나무는 지금까지는 칠액의 생산, 옷담용 등이 주된 용도였으나, 그 약리효과는 항암, 혈행개선, 면역증강 등 다양한 방면에서 널리 알려져 있어 용도개발 및 효능에 대한 인증이 주된 과제로 남아 있었다.
- 옷나무를 이용한 건강기능식품의 개발은 농가소득의 향상, 기능성 식품의 개발로 농산물의 고부가가치화, 세계시장에 한국의 기능성 식품 진출 등 1차산업, 2차 산업을 연결하는 독특한 고부가가치 기능성 제품의 개발로 연결될 수 있다.
- 기능성 식품의 개발은 유기농식품의 시장규모를 초과하는 것으로 예측되고 있는 세계시장에서 새로운 식품시장의 기회요인이 되고 있다.

1. 기술적 측면

- 가. 옷나무 추출물을 이용한 개별인증형 건강기능식품 소재의 개발은 알리지 제거기술 확보 및 기능성 물질의 동정 측면에서 추후 천연물 신약으로 개발 할 수 있는 기반기술이 될 수 있음.
- 나. 천연물 유래 추출물의 제조에 있어 일관된 품질관리 기술은 단순 추출기술을 벗어나 노하우에 해당되는 것으로 다양한 천연물에 응용할 수 있는 기반기술이 될 수 있음.
- 다. 천연물의 지역적, 기후적, 시기적 차이에 따른 특성차이에 대한 자료의 확보는 국내 천연물 소재추출물을 이용한 해외시장 진출에 있어 중요한 자료가 될 수 있음.
- 라. 선별된 기능성 물질은 그 효능 정도에 따라 개별 합성신약으로 개발할 수 있는 가능성을 가지고 있어 추가적인 개발 가능성을 보유하고 있음.
- 마. Small molecules에 기반을 둔 유효성 물질의 발굴은 전형적인 신약시장에 진출 할 수 있는 기초가 될 수 있음.

2. 경제적, 산업적 측면

- 가. 전국에 식재된 옷나무의 기능성을 법적 테두리 내에서 적절하게 부여함으로써 기존의 불법적인 옷 관련 제품의 양성화가 가능하다.
- 나. 옷나무에서 칠액을 얻고 난 후 나무 자체에 대한 이용도를 높임으로써 자원의 효율적인 이용이 가능하다.
- 라. 옷나무 재배 농가의 소득향상 및 추출물을 기능성화 하여 고부가가치 제품화에 대한 농민과의 협조체제의 모델을 만들 수 있다.
- 마. 국내 건강기능식품 시장에 진출하여 매출을 확대 가능하며, 미국, 일본, 중국, 대만 등 해외 건강기능식품 시장으로의 진출로 외화획득이 가능하다.

3. 사회적 측면

- 가. 불법적이고 근거없이 제조되는 옷 관련 제품의 양성화로 국민의 안전을 도모.
- 나. 알러지 유발에 대한 안전 불감증을 사전에 해소하여 국민의 건강을 증진.
- 다. 기능성 제품의 개발로 국민 건강 유지 및 증진에 기여할 수 있다.

제3절 연구개발의 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
지표성분의 적합성	지표성분의 적합성 규명	- 벨리테이션
원료 성분에 대한 연구	지역별, 시기별, 원료의 성분 차이를 실험적으로 접근하여 자료 확보	- 지역별, 시기별, 수령별 시료를 구하고 이를 추출물로 제조하여 성분관련 자료를 확보
효능에 대한 연구	유효물질의 생체 작용기전 규명	- 혈행개선 효능평가 - 면역활성 효능평가 - 생체작용기전 분석
독성에 대한 연구	추출물의 유전독성 및 일반독성 자료 확보	- 복귀돌연변이 - 염색체이상 - 소핵시험 - 13주 경구반복투여 독성 - 설치류 단회 독성
인체효능자료의 확보	옷나무 추출물의 임상 시험 수행	- 임상시험 Protocol작성 - 임상시험 수행

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절. 3P(특허, 논문, 제품)분석을 통한 연구 현황

1. 특허분석 측면 - “옷나무 유래 천연물 항암제”에 관한 특허기술동향 보고서 분석사업 최종보고서 참조

가. 옷나무의 경우 관련특허가 1981년 출원되기 시작하였으며, 현재까지 출원건수 및 출원인수가 증가하고 있는 것으로 조사되어 옷나무 추출물 관련 분야는 발전기에 해당하는 것으로 판단됨.

나. 알러지 유발 특성의 제거 방법

알러지를 완벽하게 제거하는 방법은 옷나무 추출물의 안전성을 위하여 반드시 필요하며 결정적인 기술적 수준을 요구한다. 기존의 방법은 균체를 접종하여 발효하는 방법, 산소를 이용하는 방법, 고온(150도 이상), 고압하에서 처리하는 방법 등이 있었으나, 본 연구진은 광선을 이용한 매우 간단하고 실용적인 방법을 고안하고 있으며, 그 가능성을 이미 확인하고 특허를 준비 중에 있어, 알러지 유발 특성 관련 기술은 세계 최고가 될 수 있다.

다. 추출물의 제조 관련

옷나무 추출물의 제조에는 원료가 나무를 사용하는 관계로 적절한 MSDS(물질안전자료)가 필요하며, 기존의 추출물과의 차별화를 위하여 나무의 수령별 기준물질을 추출, 분리 및 정제하여 신규의 활성물질을 찾아내고 이를 기준으로 용도특허를 획득하여 차별화한다.

주관기관은 지금 천연물 항암제의 개발을 추진하여 식약청으로부터 임상 2상을 허가 받아 진행하여 오고 있는 기술적인 연구능력을 보유하고 있으며, 이러한 경험을 바탕으로 추출물의 개발, 성분의 분리, 기준 및 시험방법의 작성, 대량생산공정의 개발 등 관련 부분에 있어 국내 및 세계 최고의 노하우로 차별화된 조성물을 얻을 수 있다.

라. 기능성 관련

현재 본 연구과제에서 추진하고 있는 기능성은 정확한 물질에 대한 정의 없이 단순한 추출물 등을 대상으로 진행하여 온 것이 대부분이며 그나마도 1~2건에 불과한 실정이다. 따라서, 협동연구기관인 한림대학교의 연구경험을 바탕으로 기전연구 및 효능관련 연구를 수행하여 자료화 한다면 옷나무 추출물을 이용한 자료로는 세계 최초의 자료가 될 것으로 보며 이는 관련 추출물을 특허화하고, 이를 바탕으로 제품화 하여 세계시장 진출에 크게 기여할 수 있다.

2. 논문분석 측면

가. 지금까지의 발표 논문




지금까지 발표된 옷나무 추출물을 이용한 논문 중 본 연구과제에서 추진하고 있는 면역증강, 혈행개선 관련 연구결과가 기재된 논문은 없으며, 대부분의 논문은 추출물의 용

매 분획을 이용한 암세포에 대한 Cytotoxic Effect를 확인하는 것이 대부분 이었고, 주요 성분으로는 flavonoids인 푸스틴, 피세틴, 부테인, 설푸레틴, 부틴 등을 주로 대상으로 하고 있다.

- 나. 혈행개선 및 면역증강 관련 논문은 옷나무 추출물의 성분을 분리, 정제 및 동정하여 새로운 물질을 대상으로 할 경우 SCI 논문에 발표되기에 충분하다고 본다.
- 다. 이러한 결과는 건강기능식품의 개발을 넘어 천연물 신약으로 개발하는 좋은 근거 자료가 될 수 있다.

3. 제품 및 시장분석 측면

가. 옷나무 추출물을 이용한 기존의 제품은 앞에서 언급된 바와 같이 단순한 옷나무 추출물로서 용도는 옷담조리용으로 한정되어 있었다.

	제품명	유형(용도)	원료조성
	참옷쌈	기타가공식품(조리용)	옷나무20%,정제수 80%
	참옷발효진액	기타가공식품(조리용)	참옷나무100% (참옷나무80%,참옷겉질20%)
	천하무적	기타가공식품(조리용)	옷나무40.32%,녹차22.18%,기타혼합 추출물37.5%

- 나. 상기의 제품들은 용도가 모두 옷담의 조리용이지만, 실제로는 항암, 위장, 간 등에 좋은 제품으로 선전되면서 불법적으로 판매되고 있는 것이 현실이다.
- 다. 이 외에 옷된장, 옷간장, 옷 고추장 등의 제품도 일부 판매되고 있으나 이들은 모두 불법적으로 제조 판매되는 것이다. 이는 옷나무 추출물의 용도가 옷담 조리용으로 한정되어 있기 때문이며, 따라서 이러한 요인을 해소하여 법적으로 안전한 건강기능식품으로의 개발이 절실한 실정이다.
- 라. 개별인정형 건강기능식품의 개발은 원료인증을 받을 경우 다양한 첨가재를 혼합하여 제품화가 가능하며, 이는 제품의 제형이 분말, 페이스트, 액상 등 기존의 불법적으로 제조 유통, 판매되었던 가공품을 양성화 할 수 있는 방법을 제공하며,
- 마. 시장의 확대 측면에서는 불법적 시장 진출 제품이 개척한 시장이 자연스럽게 기능성 제품시장으로 유도될 수 있어 시장의 진입과 성장을 매우 손쉽게 가져올 수 있는 Blue Ocean이 될 수 있다.

바. 현재 혈행개선 및 면역증강 관련 시장의 규모는 인구의 노령화에 따라 지속적으로 성장할 수 있는 떠오르는 시장의 하나이다. 개별인정형 제품으로 출시 할 경우 현재로서는 관련 기능성을 인정받은 제품이 1~2개에 불과하여 시장의 진입이 매우 용이하다.

제2절. 국내외 생산 및 시장현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

국내 건강기능식품 총 생산액은 2008년을 기준으로 8,000억원에 달하며, 실제 제품판매액은 약 2조4천억원 규모로 추정된다.

표1. 2008년 건강기능식품 총 생산액

(단위 : 억원)

No.	품목	총생산액	No.	품목	총생산액
1	홍삼	4,184	11	식이섭유(보충용)	145
2	알로에 겔	639	13	키토산/키토올리고당	86
3	비타민 및 무기질	531	14	스쿠알렌	75
4	개별인정형	416	15	효소	58
5	인삼	413	16	프로폴리스 추출물	49
6	오메가-3 지방산 함유 유지	266	17	자라	36
7	글루코사민	201	18	스피루리나	34
8	프로바이오틱스	190	19	단백질	34
9	효모	179	20	버섯	23
10	클로렐라	166	21	기타	162
11	감마리놀렌산 함유유지	145	합계		8,031

출처 : 식품의약품 안전청, 건강기능식품팀(2009)

상기의 표1에 따르면 개별인정형 건강기능식품 시장은 2008년을 기준으로 생산액이 416억원이며 이를 최종 완제품으로 환산하면 약 1,300억원의 규모로 추정할 수 있다. 특히, 개별인정형 건강기능식품은 지속적으로 증가하고 있는 추세이므로 연간 10% 이상의 고속성장을 할 것으로 예상되고 있다. 2009년의 경우 공액리놀렌산이 공전의 히트를 기록하면서 시장을 확대하였다.

국내 건강기능식품의 소비자 매출액 기준 유통채널을 분석한 결과를 표2에 나타내었다.

표2. 소비자 매출액 기준 유통채널

유통채널	다단계	방문판매	매장판매	약국/병원	홈쇼핑/인포머셜	인터넷	기타
2008년	25.3	40.1	20.8	3.8	8.1	0.8	1.0
2007년	25.9	36.5	22.7	3.3	8.2	1.4	2.0

출처 : 한국건강기능식품 협회 발표자료(2009)

상기 표2에 나타난 바와 같이 주요 판매루트는 다단계, 방문판매, 매장판매를 들 수 있다. 이들은 대부분 조직을 바탕으로 하는 것으로 대기업이 주를 이루고 있다. 아직은 인터넷을 통한 판매가 차지하는 비중이 상대적으로 매우 낮다는 것을 알 수 있다.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

해외 시장 중 가장 규모가 큰 시장으로는 미국과 일본시장을 들 수 있다.

미국 시장의 경우 2007년을 기준으로 88조원 시장을 형성하고 있으며, 세계시장은 3,771억불의 규모를 형성하고 있다(Nutrition Business Journal, 건강기능식품 신문).

일본 시장의 경우 2007년 15조원의 규모를 형성하고 있으며,

중국시장의 경우 생활수준의 향상으로 매년 40~50%의 높은 성장률을 보이고 있으며, 그에 따라 수입물량도 연간 50% 증가하고 있고, 판매량도 10% 이상 증가하고 있다. 소비수준 및 보건의식의 향상으로 시장의 잠재력은 매우 크다고 할 수 있다. 시장의 규모는 2002년을 기준으로 2.3조원 규모이다. 중국시장의 경우 수입물량이 많고 수입품에 대한 선호도가 있어 잠재력 측면에서 가장 큰 시장이라고 볼 수 있으나, 제품의 등록이 용이하지 않다는 점에서는 난이도가 있다고 보아야 한다.(출처 : 바이오네트워크 사업단 자료 “ 국외 건강기능식품 시장 문헌조사”)

3. 개발기술의 기술 수준

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
알러지 제거 기술	대한민국	100%	80%	100%	관련특허 최다보유 -주관기관
면역증강 및 혈행개선용 기능성 개발기술	미국	70%	30%	95%	
기능성분의 분리정제기술	미국/일본	65%	50%	95%	

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절. 알러지를 유발하는 성분의 제거방법 확립 및 이를 활용한
옷나무 추출물 개발 및 유효 활성성분의 분리, 정제, 구조동정

I. 실험 재료 및 방법

1. 지역별 옷나무 조사

옷나무는 중국이 원산지이며, 우리나라 기후에서는 전국 어디에서나 식재가 가능하다. 과거 우리나라에서 옷나무 생산이 많았던 곳은 경상북도 칠곡, 전라북도 남원, 충청북도 옥천, 강원도 원주, 경기도 부평이다. 현재 옷나무가 많이 생산되는 곳은 강원도 원주, 강원도 횡성, 충청북도 옥천, 전라북도 남원, 경상남도 함양으로 총 5곳이다.

2. 기후 특성별 옷나무 생산지의 구분

우리나라의 산림기후대는 한대, 온대북부, 온대중부, 온대남부, 난대로 나누어진다(그림 1).

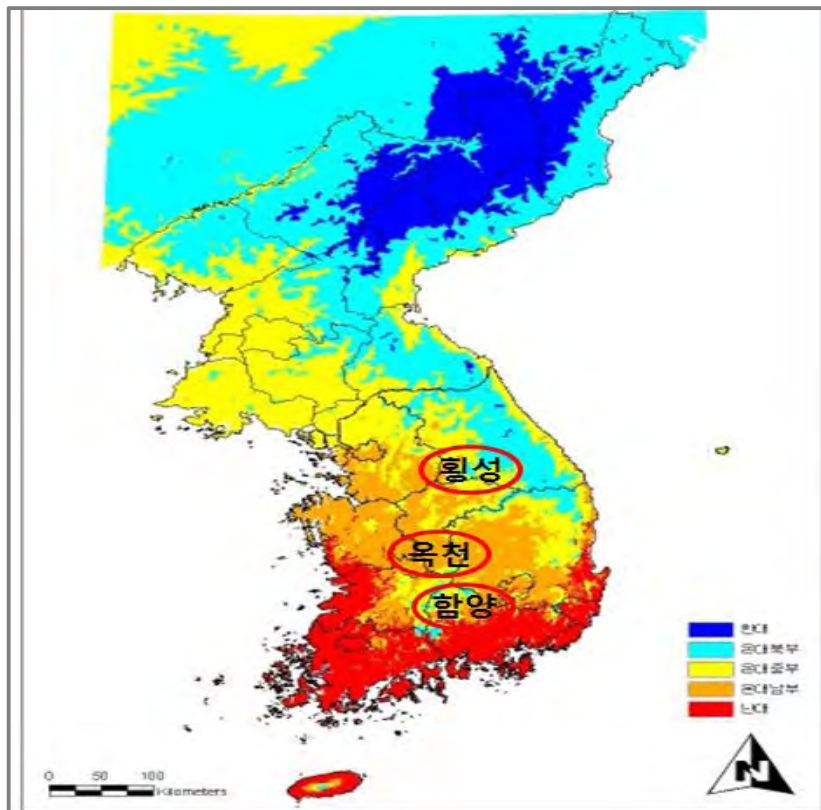


그림 1. 대한민국의 산림기후대 구분

웃나무가 식재되어 있는 곳을 산림기후대에 의해서 구분하면 다음과 같다 (표 1).

표 1. 산림기후대에 의해 구분한 웃나무 식재지

강원도 횡성, 강원도 원주	온대북부, 중부, 남부가 겹치는 곳
충청북도 옥천	온대남부
경상남도 함양, 전라북도 남원	온대북부, 중부, 남부, 난대가 겹치는 곳

3. 지역별, 연생별 웃나무의 채취

표 1.과 같이 산림기후대에 의해 웃나무 식재지를 구분한 후 각 한곳씩을 선정하기로 하였다. 온대북부, 중부, 남부가 겹치는 곳인 강원도 횡성, 온대 남부지역인 충청북도 옥천, 온대북부, 중부, 남부, 난대가 겹치는 곳인 경상남도 함양으로 채취 지역을 선정하였다.

선정된 지역에서 웃나무 채취 샘플은 10년생 조림된 참웃나무로 설정하였다. 조사지에서 20 m × 20 m 내에서 표준적인 참웃나무 1그룹을 채취하였다. 샘플 채취 방법은 최대한 나무의 밑동을 베어내어 원줄기는 1 m 간격으로 나누어 번호를 매겨 비닐에 넣어서 운반하였다. 향후 나무의 원형을 복원을 위하여 번호를 부여하였다. 채취한 웃나무를 연구실로 운반하고, 번호표에 의해 원형을 복원한 후 나이테를 확인하여 5년생 이상, 5년생 이하, 원줄기, 가지 등으로 나누어 구분하였다 (표 2). 각각 구분한 시료는 톱밥을 내어 실험에 사용하였다.

4. 웃나무의 추출방법 및 추출수율 확인

채취한 웃나무의 정확한 추출 수율을 확인하기 위하여 각 시료의 수분을 채취하였다. 시료 10 g을 덜어 105 °C 오븐에서 12시간 이상 건조 후 수분량을 측정하였다.

웃나무 시료의 추출을 위해 시료는 80 g을 사용하였으며, 추출 온도는 90 °C, 추출 용매는 물을 사용하였다. 1차 추출은 12시간, 2차 추출은 6시간으로 하였다. 추출 후 여과하여 추출액을 회수하여 진공농축기로 완전히 농축하여 고형분을 회수하였다. 회수한 추출물의 무게를 측정하여 추출 수율을 확인하였으며, 회수한 추출물은 HPLC를 이용하여 flavonoid 성분을 분석하였다.

표2. 지역별, 연생별 옷나무 시료 구분

	전체사진	5년생 미만 줄기	5년생 미만 가지	5년생 줄기	5년생 가지	6년생 이상 줄기
옥천						
함양						
횡성						

* 본 사진은 연령별 굵기 등에 대한 참고용임.

5. 옷나무 추출물의 flavonoid 성분 분석방법

옷나무추출물의 flavonoid (fustin(chromadexASB-00013006),fisetin (fluka 46340), sulfuretin(wako), butein(sigma B178)의 분석은 HPLC를 이용하였다. 분석조건은 아래와 같다.

- 컬럼: ODS, 250 * 4.6 mm
- 검출기 종류 및 파장: U.V 254 nm, 1 AUFS
- 오븐 온도: 50 °C
- 주입량: 10 μ l
- 이동상: 5 % acetic acid in D.W : Methanol : acetonitrile
= 70 : 20 :10

표준 용액은 모두 methanol에 용해하였으며, 20 ~ 100 μ g/ml 의 농도로 분석하여 표준곡선을 얻었다.

분석시액은 시료 0.02 g을 50 ml의 methanol에 용해하여, 원액 그대로 사용하였다. 표준 곡선으로부터 시료에 함유된 flavonoid 성분의 양을 계산하였다.

6. 우루시올 표준물질의 준비

옻나무(*Rhus vernicifera*)의 칠액 200 ml을 아세톤 400 ml와 혼합하여 1시간 방치하고 우루시올 성분과 다른 칠액성분이 분리되면 아세톤층을 여과지로 여과하였다. 여과된 아세톤 추출물은 감압농축하여 아세톤 농축액의 2배량의 헥산을 첨가하고 상층의 헥산층을 여과지로 여과한 후 감압농축 하였다. 여기에 다시 헥산농축액의 2배량의 아세토니트릴을 첨가하여 상층액을 여과한 후 감압농축 하였다. 농축액은 실리카겔 40 g을 헥산으로 습식충진시킨 유리칼럼에 가하여 헥산/아세톤 (9:1) 혼합액으로 충분히 용출시킨 후 감압농축하고 이를 아세토니트릴에 용해하여 표준원액으로 하였다.

7. 우루시올 분석방법

옻나무에 있는 우루시올의 양을 분석하기 위해서는 GC/MS를 사용하였다. 분석조건은 아래와 같다.

- 컬럼: Alltech AT-5 (5 % phenyl-95 % methylpolysiloxane)
- 주입구 온도: 225 °C
- interface 온도: 250 °C
- column flow : 1.5 ml/min
- 컬럼 온도: 90 °C → (10 °C/min) → 250 °C (20 min)
- split ratio : 20
- 주입량: 1 µl

분석 시료는 옻나무 50 g을 비커에 담고 클로로포름 400 ml을 넣어 상온에서 2시간 추출하였다. 여과 후 클로로포름을 진공농축기 40 °C에서 완전히 제거한 후 methanol 2 ml에 재용해하여 분석하였다. 즉, 우루시올 분석은 원재료를 25배 농축하여 분석하였다.

준비한 시료를 GC/MS로 분석한 후 MS spectrum을 확인하여 우루시올 피크를 확인하였다.

8. Gallic acid의 분석

옻나무 추출물의 gallic acid 분석은 HPLC를 이용하여 아래의 조건으로 수행하였다.

- 표준품: gallic acid (Sigma G7384)
- 분석기기:HPLC
- 컬럼: ODS-AQ 250 * 4.6 mm
- Detector: U.V 210 nm
- 오븐 온도: 40 °C
- 이동상: 10 mM Phosphoric acid 용액 / MeOH = 9 : 1
- flow rate : 1 ml/min
- 주입량: 10 µl

표준용액은 gallic acid (sigma G7384)를 물에 용해하여 20 ~ 100 µg/ml으로 분석하여 표준

곡선을 얻었다. 분석시액은 시료 0.02 g을 50 ml의 물에 용해하여 원액으로 분석하였다. 표준용액의 표준곡선으로부터 gallic acid의 함량을 구하였다.

9. 폴리페놀의 함량 분석

추출물의 농도를 1 mg/ml로 희석하여 folin-ciocalteu's phenol 용액을 이용하여 측정하였다. 희석된 시료 0.2 ml에 증류수 1.8 ml, 0.2 ml의 folin-ciocalteu's phenol 용액 0.2 ml을 혼합한다. 3 분간 실온 방치 후 포화 Na₂CO₃ 용액 0.4 ml를 넣은 후 증류수로 총 4 ml로 맞춘다. 실온에서 1시간 방치 후 상정액을 725 nm에서 흡광도를 측정한다. Tannic acid (sigma, 16201)를 표준용액으로 하여 표준곡선을 구하고 이로부터 함량을 구한다.

10. 항산화도의 분석

항산화 활성은 DPPH법을 이용하여 전자공여능을 측정하는 방법을 이용하였다. DPPH는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl로 라디칼을 가지고 있어 라디칼 제거능을 측정할 때 주로 이용되는 방법이다.

- 1) 에탄올에 용해한 0.1 mM DPPH(Sigma, D-9132) 2 ml을 에탄올에 용해한 시료 2 ml에 가한다.
- 2) 10 분간 혼합하여 주고, 30 분간 어두운 곳에 방치한다.
- 3) 520 nm에서 흡광도를 측정한다.
- 4) 항산화도(전자공여능)의 계산 방법

$$\text{EDA}(\text{electron donating ability}) = (\text{Cabs} - \text{Sabs}) / \text{Cabs} * 100$$

-Cabs : Negative control(시료대신 에탄올만을 첨가)의 흡광도

-Sabs : Sample 시료의 흡광도

-Positive control : Vitamin E(Fluka, 95240)를 시료로 하여 사용하였다.

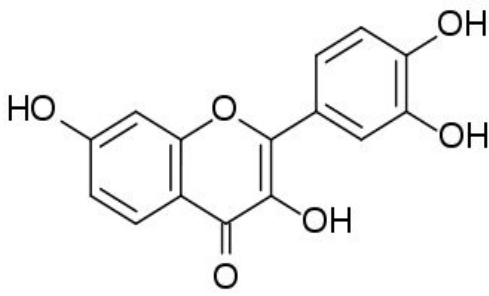
II. 시험 결과

1. 옷나무 가지 추출물의 flavonoid 조성 확인

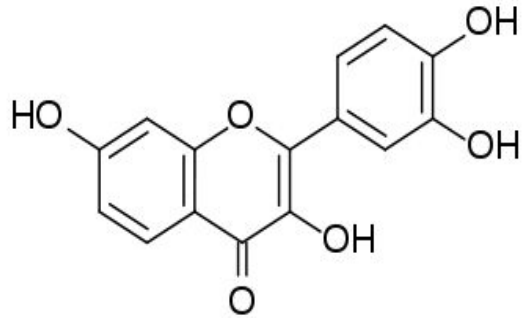
옷나무 추출물에 함유되어 있는 flavonoid 성분을 확인하고자 하였다.

Flavonoid인 fustin, fisetin, sulfuretin, butein, kaempferol, quercetin, genistin, genistein, myricetin을 대상으로 조사하였다.

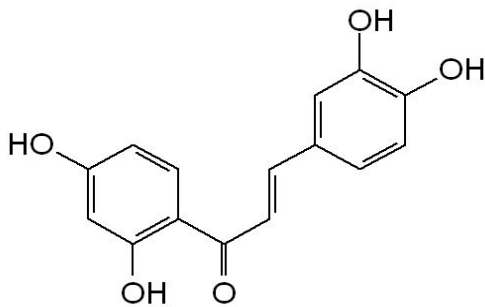
flavonoid 조성확인을 위한 시료는 10년생 이상의 옷나무 추출물을 제조하여 분석해본 결과 위 물질 중 fustin과 fisetin이 가장 많은 양으로 존재하며 sulfuretin과 butein이 미량으로 존재함을 확인할 수 있었다 (크로마토그램 생략). 옷나무 추출물에 많은 양으로 존재하는 fustin과 fisetin은 옷나무 추출물의 지표성분으로 사용하기로 하였다.



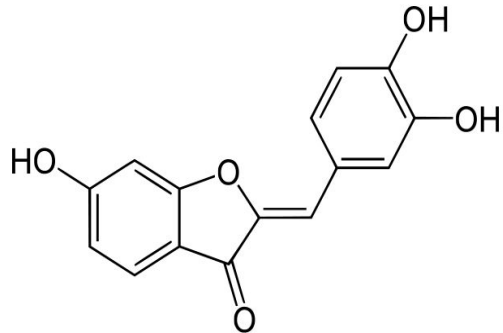
fustin (분자량: 288)



fisetin (분자량: 286)



sulfuretin (분자량: 270)



butein (분자량: 272)

그림 2. 옷나무 추출물에 존재하는 flavonoid 종류

2. Fustin, fisetin HPLC 분석 방법 개선

기존 옷나무 추출물에서 fustin과 fisetin을 분석하기 위해 사용했던 방법은 fustin과 주변물질과의 분리능이 좋지 않아 정확한 분석을 할 수 없었다(그림 3).

	기존 분석법	신규 분석법
기기	HPLC	
검출기	U.V 254 nm	
이동상 조성	20mM 인산염 완충액: Methanol: Tetrahydrofuran = 5: 2: 3	5% acetic acid : Methanol: Acetonitrile = 7: 2 : 1

표 3. fustin, fisetin HPLC 분석 조건 비교

이를 해결하고자 이동상 조건을 표 3과 같이 변경하였다. 신규 이동상 조건으로 분석할 경우 fustin과 주변 피크와의 분리능이 개선되어 보다 정확한 분석이 가능해졌고, 이 분석법을 이용하여 옷나무 추출물 관련 연구를 진행하였다.

3. 우루시올 성분의 확인

옷나무에 존재하는 알려지 유발 물질이다. 지용성이며 catechol ring을 기본구조로 가지며, side chain의 종류가 다른 4가지 물질의 혼합물이다 (그림 4)

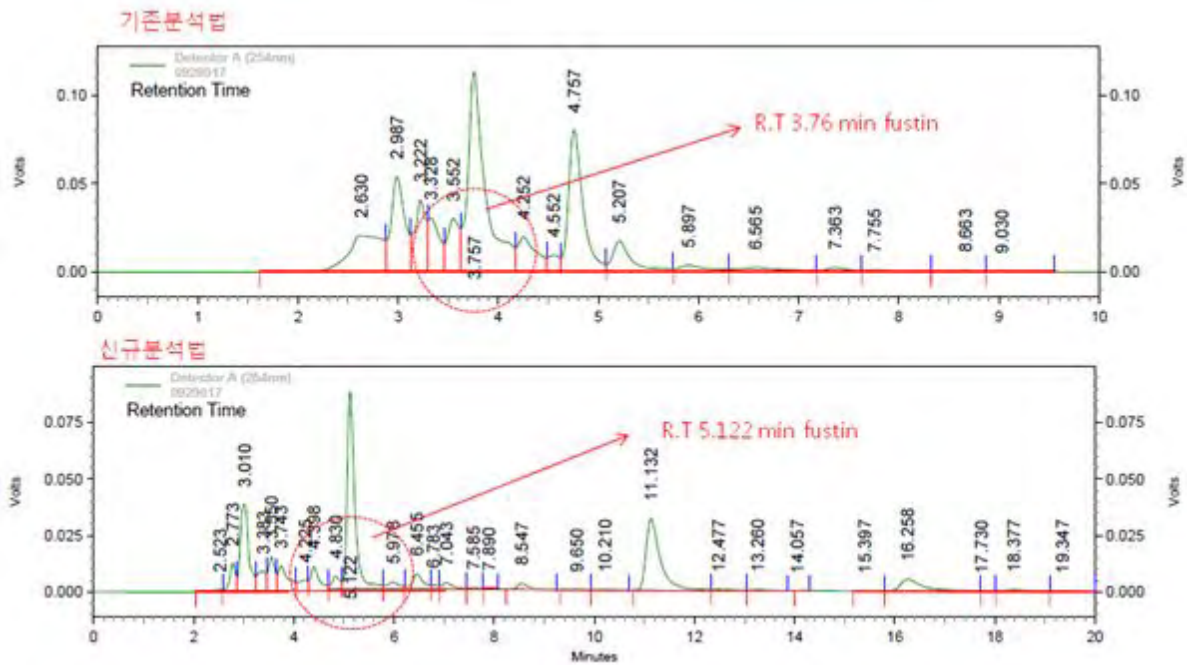
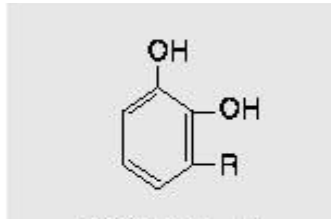


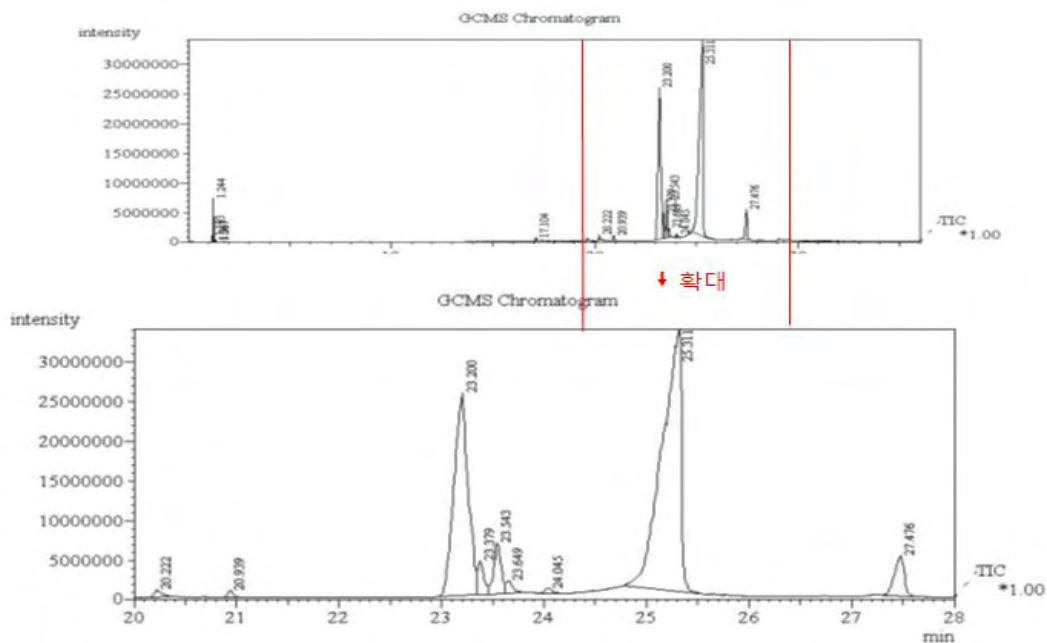
그림 3. 분석법에 따른 크로마토그램 비교



Compound	R	M.W
C15 saturated (C15:0)	$(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$	320
C15 monoene (C15:1)	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}$	318
C15 diene (C15:2)	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2$	316
C15 triene (C15:3)	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{C}$	314

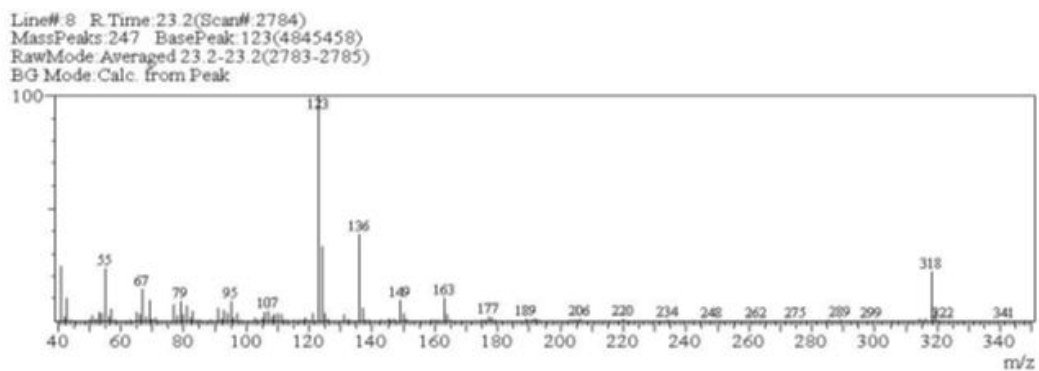
그림 4. 우루시올 구조

옷나무의 칠액으로부터 우루시올 성분을 정제하여 GC/MS로 분석할 경우 그림 5.와 같은 크로마토그램과 MS spectrum을 얻을 수 있다.

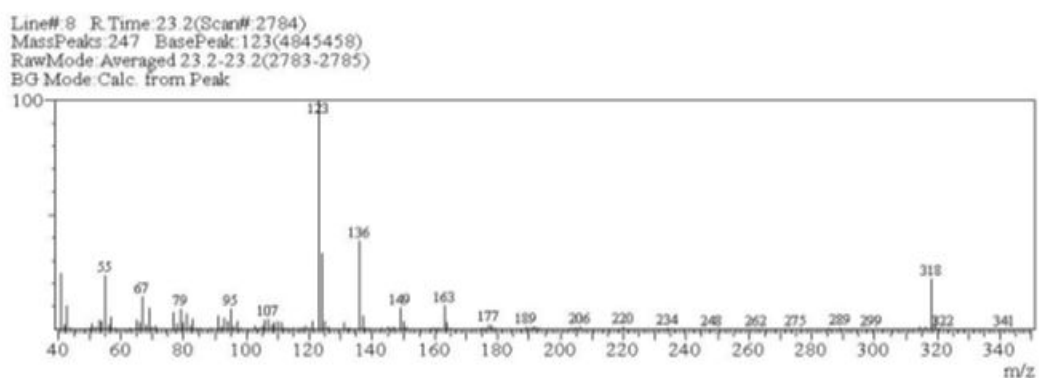


1) M.W 318, C15:1

① R.T 23.20 min

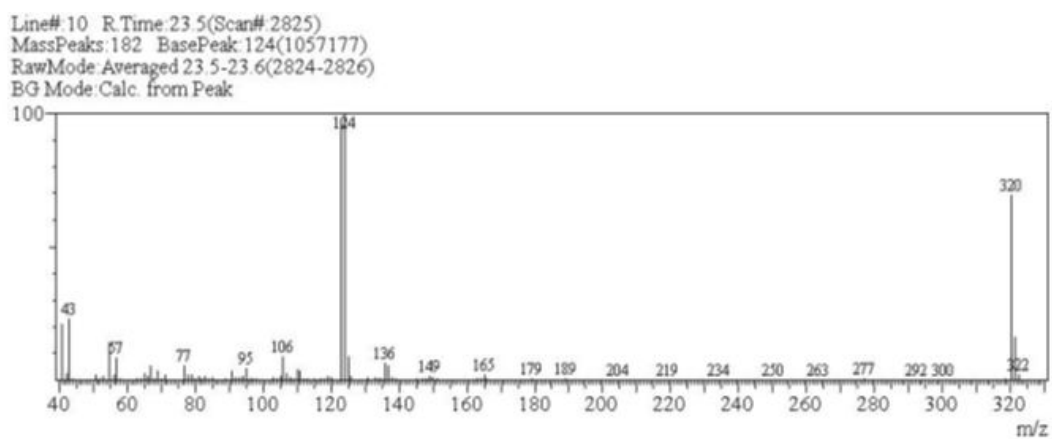


② R.T 23.37 min



2) M.W 320, C15:0

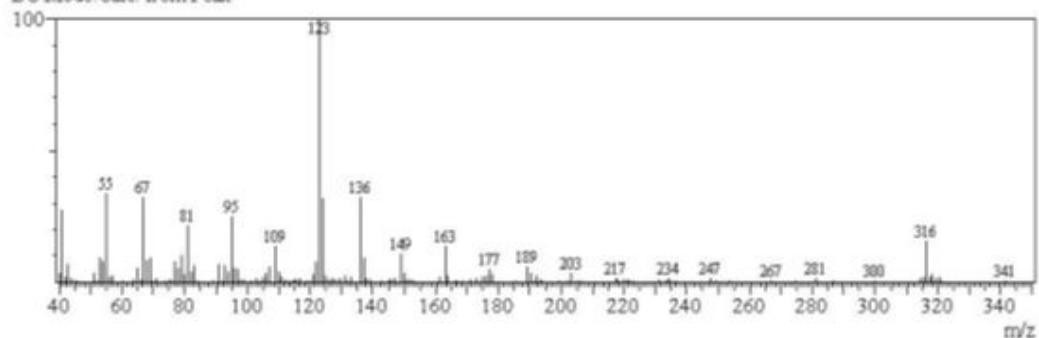
① R.T 23.54 min



3) M.W 316, C15:2

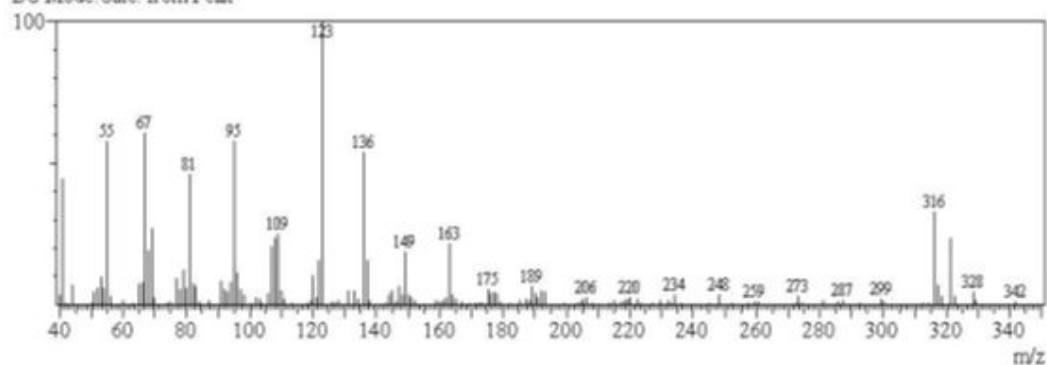
① R.T 23.64 min

Line# 12 R.Time 24.0(Scan# 2885)
MassPeaks: 147 BasePeak: 123(100787)
RawMode: Averaged 24.0-24.1(2884-2886)
BG Mode: Calc. from Peak



② 24.04 min

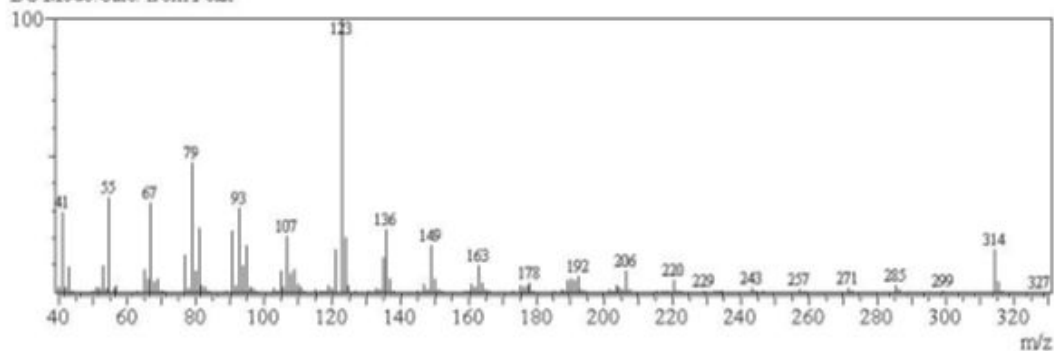
Line# 11 R.Time 23.7(Scan# 2838)
MassPeaks: 155 BasePeak: 123(62028)
RawMode: Averaged 23.6-23.7(2837-2839)
BG Mode: Calc. from Peak



4) M.W 314, C15:3

① R.T 25.31 min

Line# 14 R.Time 27.5(Scan# 3297)
MassPeaks: 180 BasePeak: 123(681875)
RawMode: Averaged 27.5-27.5(3296-3298)
BG Mode: Calc. from Peak



② R,T 27.47 min

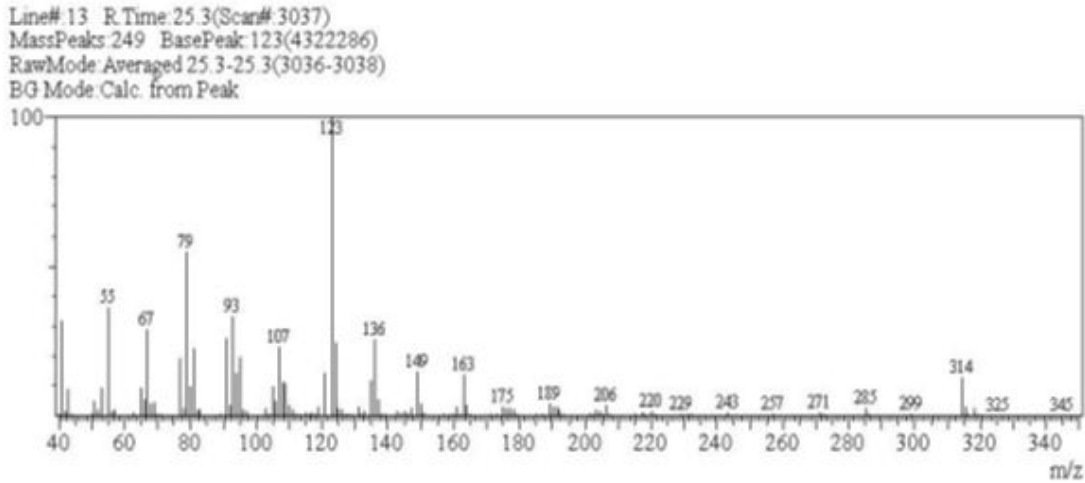


그림 5. 정제 우루시올의 GC/MS 분석 크로마토그램과 MS spectrum

그림 5와 같이, 분자량 320 우루시올을 제외하고는 모두 한 분자량당 두 개의 피크를 확인할 수 있다. 이는 우루시올의 구조 상 산화에 의해 cis, trans형이 존재하는 것으로 예측된다.

따라서, 시료의 우루시올 분석 시 MS spectrum 결과를 참고하여 모든 우루시올 피크를 확인하였다.

4. 옷나무 추출물의 fustin, fisetin 분석 용매에 따른 함량 차이 확인

옷나무 추출물의 기준물질인 fustin과 fisetin은 용해되는 용매가 서로 다르다. fustin 같은 경우는 물과 메탄올에 모두 잘 용해되지만, fisetin 같은 경우는 물에 거의 녹지 않는다. 따라서 옷나무 추출물에 함유되어 있는 두 가지 물질을 정확히 분석하기 위해서는 분석 용매의 선택이 매우 중요하다.

용매 비교 실험을 위해 10년산 이상 옷나무 추출물(A)와 fisetin을 고함량으로 함유하고 있는 시료 (B) 두개를 준비하였다. 시료를 분석하기 위한 용매는 50 % methanol, 70 % methanol, 100 % methanol을 사용하였으며, 시료 0.02 g을 각각의 용매 50 ml에 충분히 녹여 분석 후 결과를 비교해보았다 (표 4)

표 4. 옷나무 추출물 분석 시 용매에 따른 함량 차이 비교

	용매 종류	fustin (%)	fisetin (%)
시료 A	50 % methanol	4.7	10.0
	70 % methanol	4.6	10.3
	100 % methanol	4.7	10.4
시료 B	50 % methanol	1.9	4.2
	70 % methanol	2.2	16.3
	100 % methanol	2.4	27.7

실험 결과, fustin과 fisetin의 함량이 높지 않을 경우에는 용매 종류에 따른 함량차이가 크게 나타나지 않았다. 하지만 물이 녹지 않는 fisetin의 함량이 높은 시료의 경우에는 용매의 methanol 함량이 낮을수록 부정확한 결과를 보였다. 따라서 두 가지 성분을 한 번에 정확하게 분석하기 위해서는 100 % methanol을 사용하기로 결정하였다.

5. 지역별, 연생별 옷나무 추출물의 flavonoid 성분 함량 비교

천연물을 이용한 소재 개발의 경우, 원산지와 연생에 따라 기준물질의 함량이 상이하여 원료 표준화에 어려움이 있다. 옷나무의 다른 식물 추출물과 달리 1~2년 안에 재배되는 것이 아니기 때문에 원산지와 연생에 따른 비교 연구가 반드시 필요하다.

옷나무 서식지의 산림기후대에 따라 구분하여 채취한 강원도 횡성 옷나무, 충청북도 옥천 옷나무, 경상남도 함양 옷나무를 추출하여 추출물을 회수하고 추출물의 flavonoid 함량을 비교하였다 (표 5)

표 5. 지역별, 연생별 옷나무 추출물의 추출 수율 및 flavonoid 함량 비교

			추출 수율 (%)	fustin (%)	fisetin (%)
함양	가지	5년 미만	5.2	1.1	0.8
		5년생	5.7	0.3	0.6
		6년 이상	4.6	3.9	1.9
	줄기	5년미만	5.5	0.5	0.7
		5년생	4.4	3.9	1.1
		6년 이상	5.3	4	1.6
옥천	가지	5년 미만	5.7	3.5	1.3
		5년생	5.7	9.1	2.2
	줄기	5년 미만	5	6.5	3.6
		5년생	5.5	5.9	3.7
		6년 이상	4.8	10.9	2.2
횡성	가지	5년 미만	4.5	1.1	0.6
		5년생	5.7	0.2	0.4
	줄기	5년미만	5.9	9.1	2.2
		5년생	5.4	10.1	1.4
		6년 이상	3.9	17.9	1.3

지역별, 연생별 옷나무들의 추출수율은 큰 차이를 보이지 않으며, 대체로 약 5 %의 추출수율을 보였다. 세 지역 모두 가지보다는 줄기추출물의 flavonoid 함량이 높게 존재하였다. 세 지역 모두 6년 이상 된 옷나무 추출물에서 fustin과 fisetin의 함량이 크게 증가함을 확인하였다.

지역에 따른 비교를 해보면, 함양 < 옥천 < 횡성 순으로 추출물의 함량이 높음을 확인할 수 있다. 산림기후대로는 온대 북부, 중부, 남부가 겹쳐져 있는 곳이며, 지리적으로는 북쪽으로 갈수록 옷나무 추출물의 flavonoid 함량이 높아짐을 알 수 있다.

하지만, 이 결과는 한 개의 나무만 비교한 것이므로 대표성을 나타내지는 못하며, 지속적인 연구로 데이터 확보가 반드시 필요하겠다.

6. 지역별, 연생별 옷나무의 우루시올 양의 비교

지역별, 연생별 옷나무 톱밥에서 우루시올의 양을 비교해보고자 클로로포름으로 추출 후 GC/MS로 분석하였다. MS spectrum을 확인하여, 우루시올에 해당하는 피크의 면적을 비교해 보았다

1) 황성 옷나무

황성 옷나무	
연생	우루시올 피크 합
5년생 가지	17475951
5년 미만 줄기	23753165
5년생 줄기	13452517
6년이상 줄기	274894441



그림 6. 황성 옷나무의 우루시올 피크 면적의 합 비교 표 및 그래프

횡성 옷나무				
우루시올 분자량	5년생 가지	5년미만줄기	5년생줄기	6년이상줄기
318-a	12375149	23753165	13452517	185604042
318-b	0	0	0	18854253
320	5100802	0	0	12530214
316-a	0	0	0	24492280
316-b	0	0	0	9693039
314	0	0	0	23720613

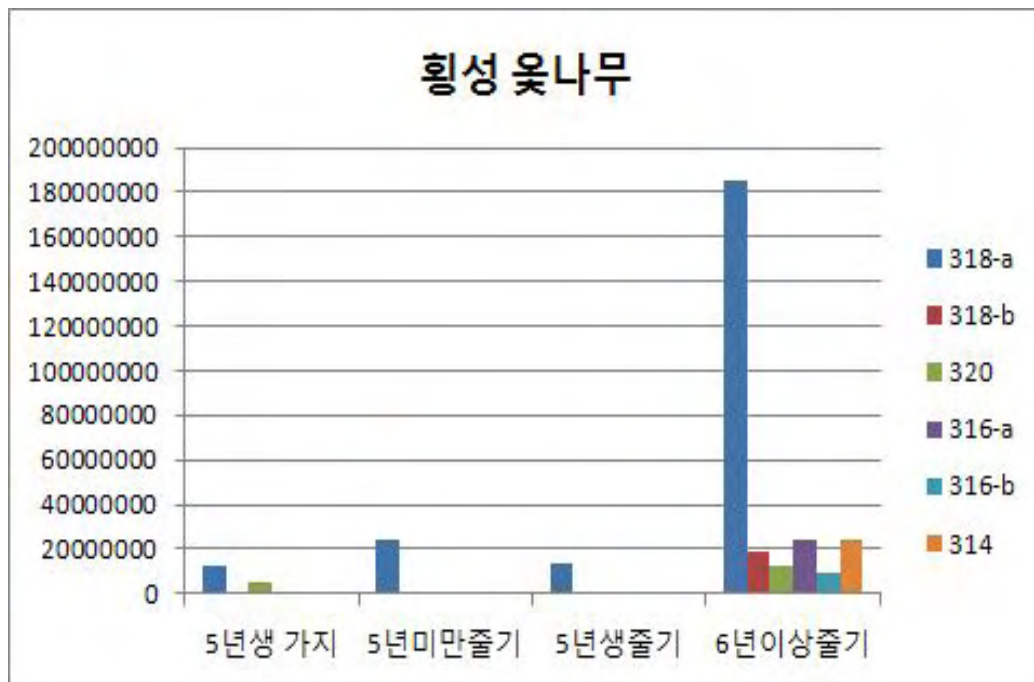


그림 7. 횡성 옷나무의 우루시올 분자량별 피크 면적 표 및 그래프

2) 옥천 옷나무

옥천 옷나무	
연생	우루시울 피크 합
5년미만 가지	51756202
5년생 가지	49165865
5년 미만 줄기	24641847
5년생 줄기	31811594
6년이상 줄기	176104865

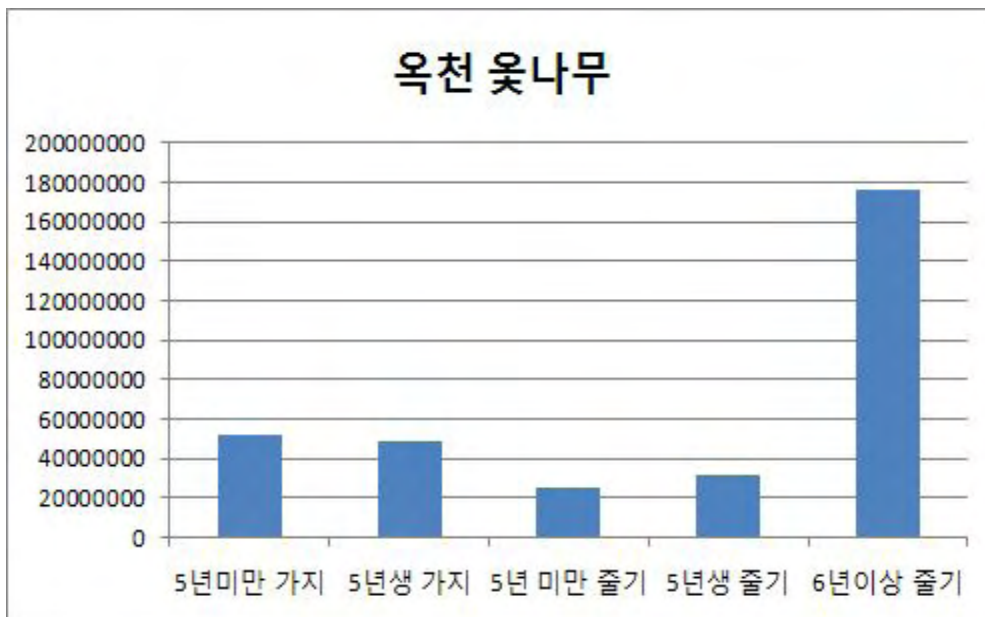


그림 8. 옥천 옷나무의 우루시울 피크 면적의 합 비교 표 및 그래프

옥천 옷나무					
우루시 을 분자량	5년미만 가지	5년생 가지	5년 미만 줄기	5년생 줄기	6년이상 줄기
318-a	51756202	15250099	17443453	31811594	127538695
318-b	0	9127503	7198394	0	0
320	0	7585255	0	0	0
316-a	0	9673053	0	0	0
316-b	0	0	0	0	0
314	0	7529955	0	0	48566170

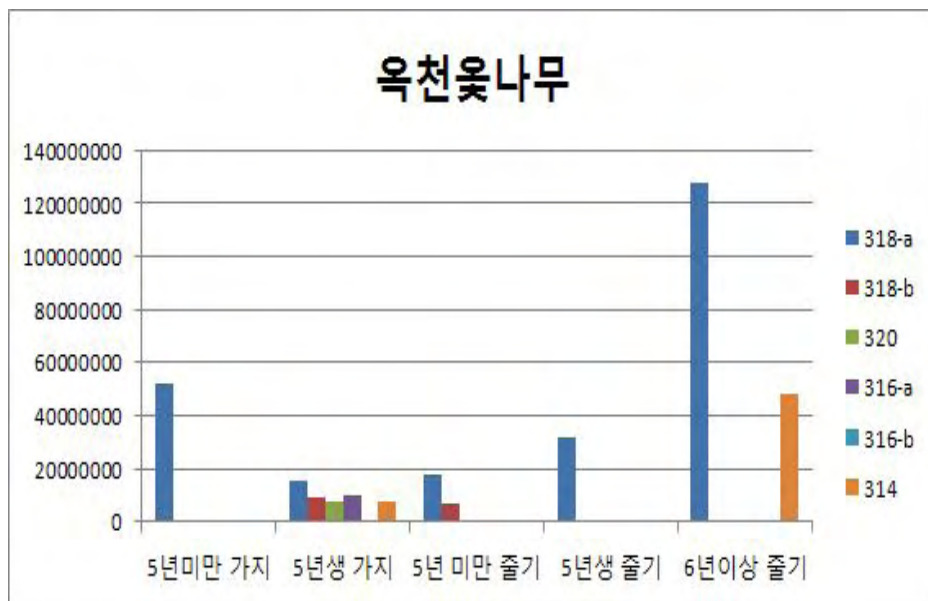


그림 9. 옥천 옷나무의 우루시을 분자량별 피크 면적 표 및 그래프

3) 함양 옷나무

함양 옷나무	
연생	우루시올 피크 합
5년미만 가지	49838452
5년생 가지	88722652
5년 미만 줄기	19623882
5년생 줄기	15553516
6년이상 줄기	283626878

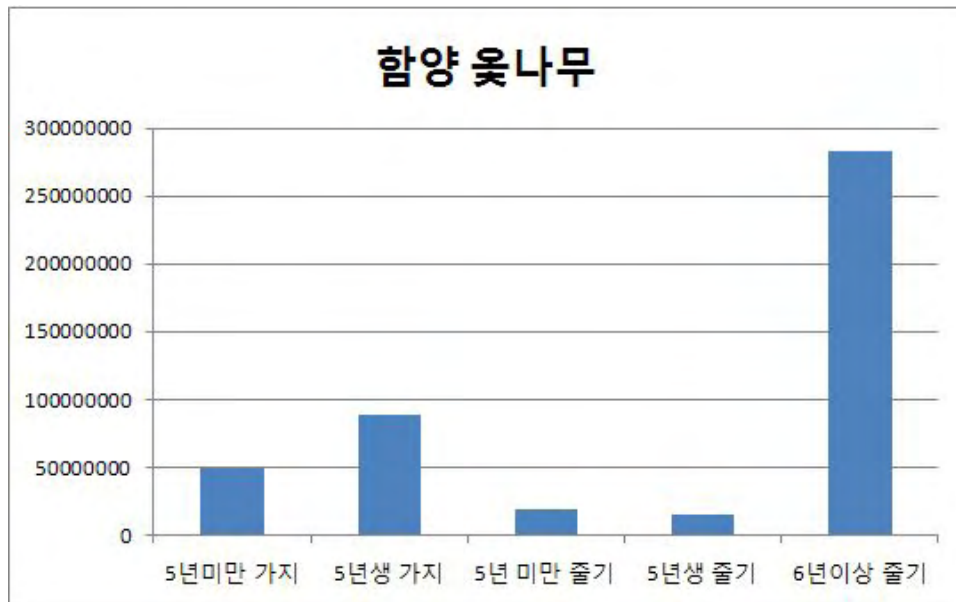


그림 10. 함양 옷나무의 우루시올 피크 면적의 합 비교 표 및 그래프

함양 옷나무					
우루시올 분자량	5년미만 가지	5년생 가지	5년미만 줄기	5년생 줄기	6년이상 줄기
318-a	42548432	56515895	19623882	15553516	178579710
318-b	0	0	0	0	0
320	2894007	6607546	0	0	50503960
316-a	0	9092109	0	0	0
316-b	0	0	0	0	0
314	4396013	16507102	0	0	54543208

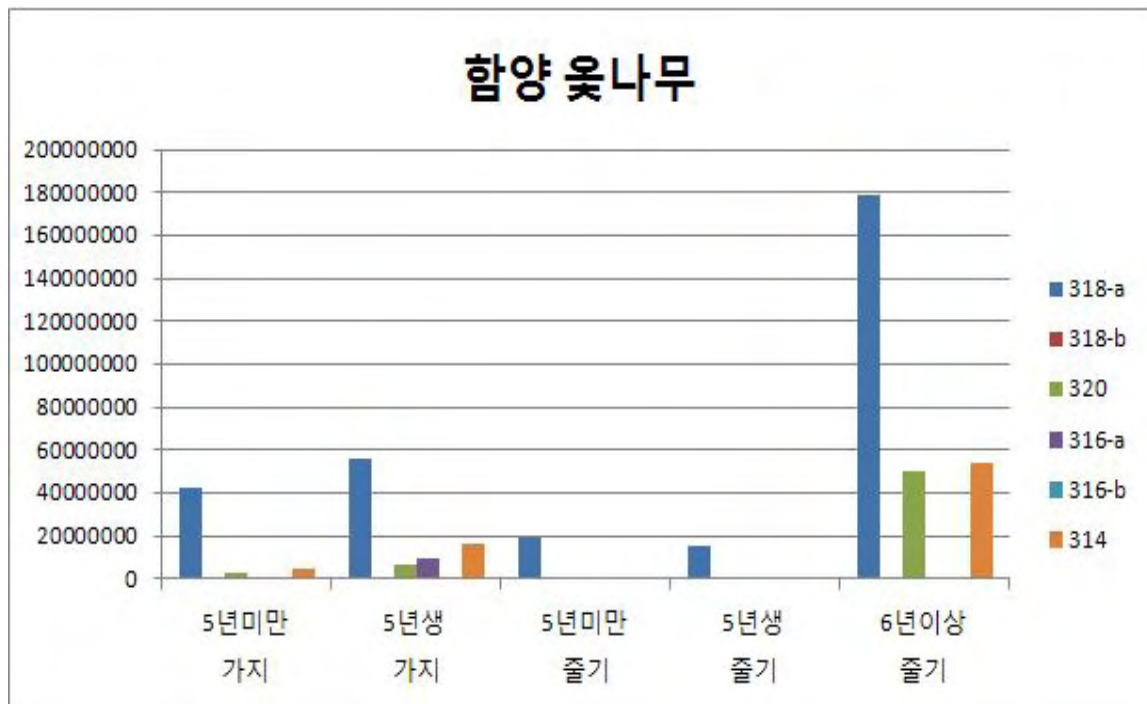


그림 11. 함양 옷나무의 우루시올 분자량별 피크 면적 표 및 그래프

세 지역 옷나무 모두 우루시올이 검출 됐으며, 분자량 318의 우루시올은 연생에 관계없이 모두 검출되었고, 검출된 우루시올 중 가장 큰 비중을 차지하는 성분임을 확인하였다. 우루시올은 옷나무가 6년 이상이 성장할 경우 그 양이 크게 증가함을 확인 할 수 있었다. 또한 5년 미만으로 성장했을 경우에는 줄기보다는 가지에 우루시올 함량이 높게 나타났다. 옷나무에 함유되어 있는 우루시올의 양은 지역차이보다는 연생이 가장 큰 요인이 될 것으로 사료된다. 또한 이 결과 역시 지역별, 연생별 옷나무에 함유된 우루시올의 양을 대표하지는 못한다.

7. 함양 하옷의 박피로 인한 우루시올 양의 변화

옷나무를 재배하는 가장 큰 이유는 칠액을 얻기 위해서이다. 옷나무에서 칠액을 채취하는 방법은 두 가지로 나눌 수 있다. 한 가지는 성장하고 있는 옷나무에 상처를 내어 수액을 받는 방

법이며, 다른 한 가지는 7년 정도 재배한 옷나무를 잘라낸 후 상처를 내고 불에 직접 구우면서 수액을 채취하는 하옷이다. 하옷의 경우는 칠액을 채취할 목적으로 잘라내고, 채취 후에는 멸감으로 사용한다. 즉 폐기하는 재료로서 이를 활용할 경우 생산원가를 감소시킬 수 있으며 연생도 7년 정도로 flavonoid 함량도 높을 것으로 예상된다.

칠액을 채취하고 남은 하옷을 구하여 우루시올의 양을 확인해 보았다. 하옷은 6년생과 10년생, 그리고 10년생 옷나무의 껍질을 제거한 박피 옷나무의 우루시올 양을 비교해보았다.



그림 12. 박피한 하옷과 10년생 하옷의 톱밥

시료	우루시올 피크 합
하옷-6년생	98320906
하옷-10년생	365453184
10년생 박피 옷나무	70037974

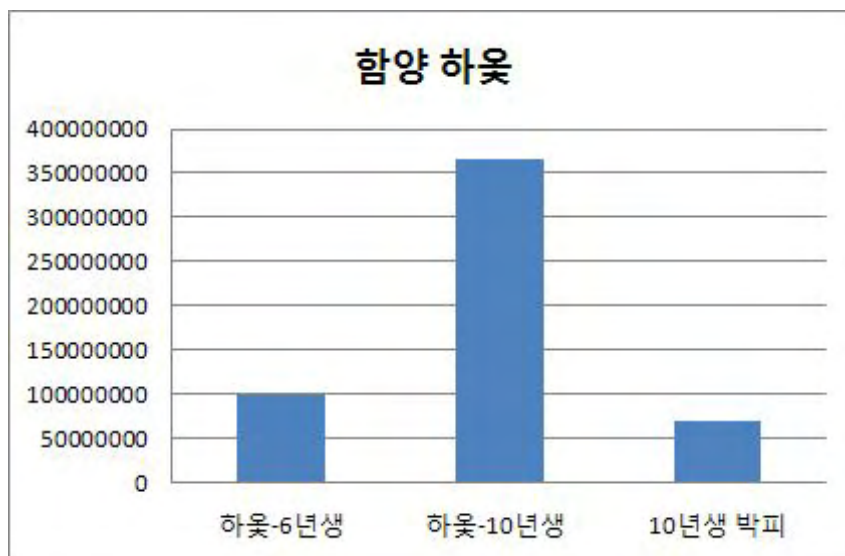


그림 13. 하옷과 박피 옷나무의 우루시올 피크 면적의 합 비교

우루시올 분자량	하웃 -6년생	하웃- 10년생	10년생박피
318-a	79914342	239140264	56049407
318-b	0	20492938	0
320	8715535	20003980	5622045
316-a	0	8814448	0
316-b	0	0	0
314	9691029	77001554	8366522

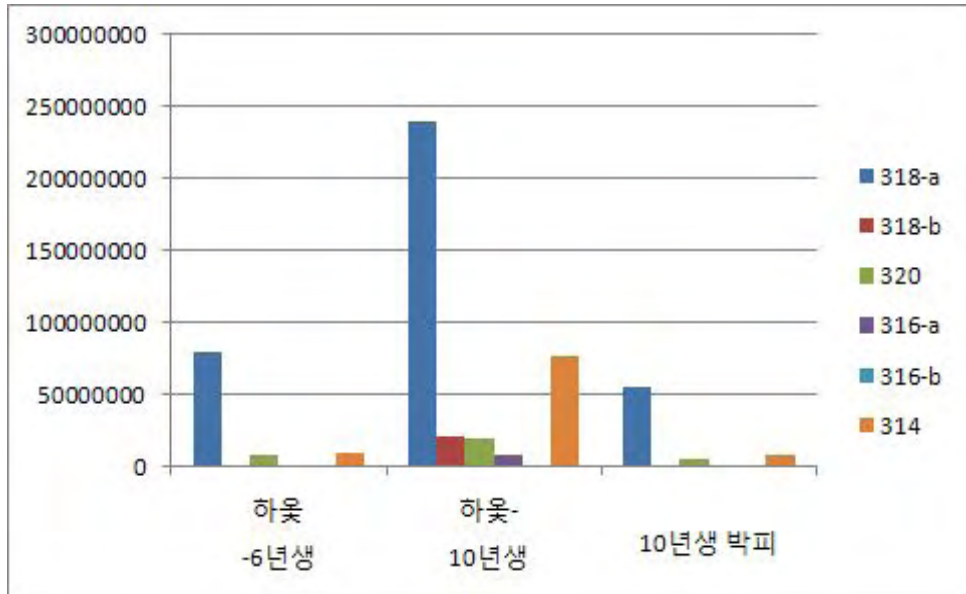


그림 14. 하웃과 박피 옷나무의 우루시올 분자량별 피크 면적 표 및 그래프

하웃은 칠액 채취에 의해 많은 양이 제거 될 것으로 예상했지만, 여전히 많은 양으로 존재하며 옷나무의 연생이 증가할수록 그 양도 비례하여 증가한다. 10년생 옷나무의 껍질을 제거할 경우 총 우루시올의 양이 약 5배 정도로 감소하며, 그 양은 6년생보다 낮은 양으로 잔존함을 확인하였다.

무독성 옷나무 추출물을 개발하기 위해서는 추후 알려지 물질 제거하는 공정도 필요하지만, 원료 물질에서 많은 양을 제거하고 사용하는 것도 해결책이 될 수 있을 것이라 생각한다.

8. 하웃의 추출 온도에 따른 추출 수율 및 flavonoid 함량 비교

상기 결과에서 박피된 옷나무는 우루시올의 양이 상당히 제거됨을 확인 하였다. 껍질을 제거하지 않은 10년생 하웃 톱밥과 박피된 옷나무 톱밥을 추출하여 추출물을 비교해보고자 하였다.

추출 온도는 70, 80, 90 °C 세 조건으로, 용매는 물을 사용하여 12시간, 6시간 총 2회 추출하였다.

표 6. 박피 옷나무와 10년생 하옷의 추출 온도에 따른 추출 수율 비교

시료	추출 온도 (°C)	추출 수율 (%)
박피	70	5.8
	80	4.5
	90	6
10년생 하옷	70	6.4
	80	6.1
	90	5.9

두 가지 원료 모두 추출 온도가 증가할수록 추출 수율은 증가하는 경향을 보였으며, 박피 옷나무보다는 일반 옷나무의 수율이 더 높게 나타났다(표 6). 이는 박피 옷나무에 껍질이 제거됨에 따른 결과이다.

추출 온도에 따른 추출물의 flavonoid 함량을 비교해 본 결과 (표 7), 두 가지 원료 모두 80 °C에서 가장 높은 함량을 보였다. 80 °C보다 추출 온도가 낮을 경우에는 flavonoid 성분들이 제대로 추출 되지 못하였고, 90 °C로 추출 할 경우에는 추출 수율이 증가함에 따라 flavonoid 함량이 감소됨을 알 수 있다. 그리고 박피 옷나무의 경우에는 껍질이 제거됨에 의해 추출물에서의 flavonoid 함량이 증가됨을 알 수 있다.

표 7. 박피 옷나무와 10년생 하옷의 추출물의 flavonoid 함량 비교

시료명	추출 온도 (°C)	fustin (%)	fisetin (%)
박피 옷나무	70	8.4	0.7
	80	13.5	1.1
	90	8.5	1.7
10년생 하옷	70	6.8	0.9
	80	10.2	1.0
	90	8.5	1.7

9. 연생별 옷나무의 내피와 외피의 추출물 비교 시험

경기도 가평에 자생하는 옷나무를 대상으로 하여 4년생, 7년생, 10년생, 15년생, 20년생 옷나무를 채취하여 내피와 외피를 구분하여 추출물을 제조하고 비교해보고자 하였다.

각 연생별 옷나무를 내피와 외피를 구분하여 무게 비를 측정 후(표 8), 톱밥형태로 잘게 잘라내었다. 또한 7년생 외피를 이용하여 90 °C에서 물로 추출하면서, 1시간마다 흡광도(450 nm)를 측정하였다. 이 결과 (표9)에 따라 추출시간을 4시간으로 결정하였다.

표8. 연생별 옷나무의 외피와 내피의 무게 비

연생	시료 전체 무게 (g)	외피 무게 (g)	내피 무게 (g)	외피:내피 무게비	총무게 대비	
					외피 함량 (%)	내피 함량 (%)
4년	98	10	88	1:8.8	10.2	89.8
7년	105	10	95	1:9.5	9.5	90.5
10년	109	11	98	1:8.9	10.1	89.9
15년	162	14	148	1:10.6	8.6	91.4
20년	160	12	148	1:12.3	7.5	92.5

표 9. 7년생 옷나무 추출 시간에 따른 흡광도 변화 확인

추출 회수	흡광도 (450 nm)
1	2.6987
2	0.709
3	0.602
4	0.192
5	0.115

외피, 내피 50 g을 덜어 90 °C에서 10배수의 물로 4시간 추출하여 각 시료의 추출 수율과 추출물에서의 fustin, fisetin 함량을 측정하였다(표 10). 추출 수율의 경우는 내피보다는 외피에서 높은 수율을 보였다. 하지만 flavonoid인 fustin과 fisetin은 외피의 경우 높은 연생의 나무에서도 매우 낮은 함량을 나타내었다. 내피의 경우는 추출 수율은 낮지만 7년 이상 성장한 옷나무의 경우 fustin, fisetin 함량이 매우 높으며 특히 20년 성장한 나무에서 fisetin 함량이 크게 증가함을 확인 할 수 있다.

이와 같이 옷나무 추출물은 연생이나 외피나 내피의 비율 조절에 의해 flavonoid 함량을 조절할 수 있을 것이라 생각한다.

표10. 외피, 내피 연생에 따른 추출수율 및 추출물의 flavonoid 함량 비교

부위	연생	추출 수율 (%)	추출물에서의	
			fustin 함량 (%)	fisetin 함량 (%)
외피	4년	14.2	1.6	0.2
	7년	11.5	2.0	0.2
	10년	10.8	2.6	0.3
	15년	8.7	2.0	0.2
	20년	10.8	2.1	0.9
내피	4년	4.6	6.3	0.8
	7년	4.3	18.0	1.78
	10년	4.2	19.0	2.1
	15년	4.1	16.1	1.57
	20년	60.2	18.6	2.3

10. 옷나무 잔가지 추출물의 제조

옷나무에서 가지부위는 산업분야에서 활용되지 못하고 주로 폐기되는 원료이다. 본 연구에서는 잔가지만을 수거하여 추출물을 제조해보았다.

사용한 가지의 직경은 3 ~ 4 cm로 약 4년생 정도 성장한 것이다. 추출 온도는 80 °C, 60 °C 두 조건에서 10배수의 물을 사용하였다. 1차 추출은 6시간, 2차 추출은 4시간 동안 수행하였다.

표 11. 잔가지 추출물의 추출수율 및 유효성분 함량 확인

	추출 온도	
	80 °C	60 °C
추출 수율 (%)	4.3	2.4
추출물의 fustin 함량 (%)	9.3	3.6
추출물의 fisetin 함량 (%)	3.63	0

잔가지 추출물의 경우 함유된 flavonoid의 함량이 높지 않기 때문에 추출 온도는 매우 중요한 인자로 작용한다. 상기 결과에서도 확인했듯이, 특정 온도보다 높거나 낮을 경우 그 결과값의 차이는 매우 크게 나타남을 확인 하류 수 있다.

즉, 옷나무의 잔가지를 이용한 추출물 생산의 경우 추출온도 80 ℃가 최적온도임을 확인하였다.

11. 옷나무 추출물의 gallic acid 함량 확인

떫은맛을 내게 하는 tannin은 자연계 polyhydroxyl phenol로서 gallic acid(그림 15)로 에스테르화되며, 식물 및 과일, 녹차 등에서 많이 볼 수 있는 유기화합물이다. 알칼리성인 수용액은 환원력이 강하여 공기 중의 산소를 흡수하여 갈변하고, 또한 수렴성이 있다. 이러한 gallic acid는 옷나무에 함유되어 있다. 본 연구에서는 추출물에서의 gallic acid의 함량을 확인해보고자 하였다.

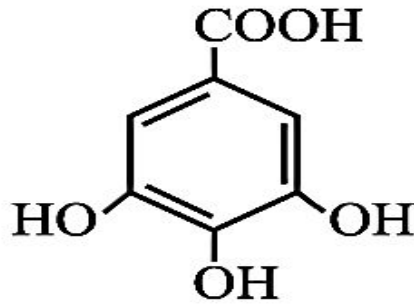
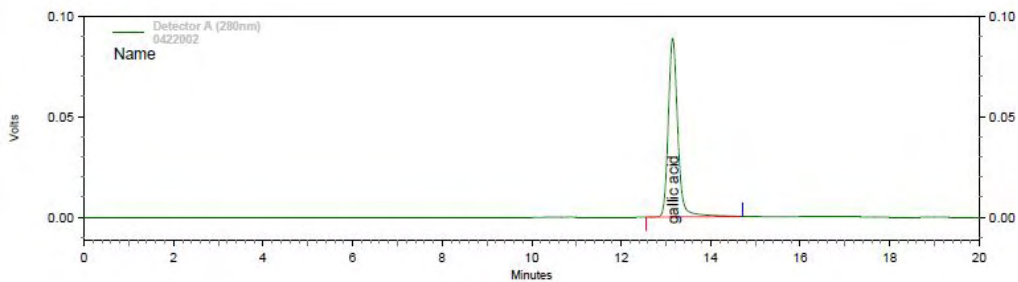


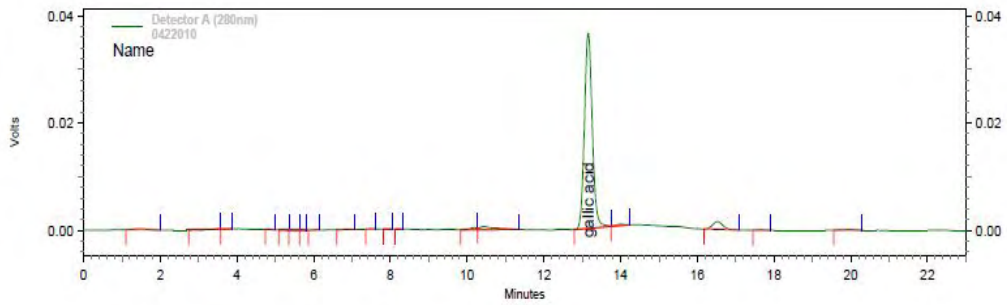
그림 15. gallic acid의 구조

본 연구에서는 10년생 이상 옷나무 추출물, 옷나무 잔가지 추출물, 10년생 박피 옷나무 추출물과 10년생 하얗 추출물에서의 gallic acid 함량을 확인해보았다 (그림 16, 표 12).

① gallic acid 표준용액 100 µg/ml의 HPLC 크로마토그램



② 옷나무 추출물에서의 gallic acid 함량 분석 HPLC 크로마토그램



③ gallic acid 표준 곡선

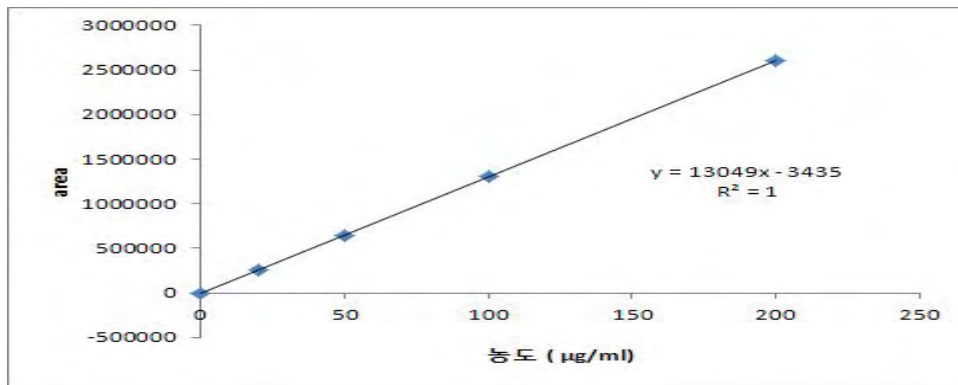


그림 16. gallic acid 분석 크로마토그램 및 표준곡선

표 12. 옷나무 추출물에서의 gallic acid 함량

시료	Gallic acid (%)	Fustin (%)	Fisetin (%)
10년생 이상 옷나무 추출물	7.9	8.6	8.3
잔가지 추출물 1	2.3	1.7	0.1
잔가지 추출물 2	1.9	0.5	4.6
10년생 박피 옷나무 추출물	2.3	13.5	1.1
10년생 하웃 추출물	2.3	10.2	1.0

옷나무 추출물에서 gallic acid의 함량은 10년생 이상과 10년 이하의 옷나무에 의해 크게 달라

진다. 10년생 이하의 경우는 잔가지 추출물이나 10년생 옷나무에서의 gallic acid의 함량 차이가 크게 나지 않음을 알 수 있다. 하지만 10년생 이상으로 성장한 옷나무 추출물에서 gallic acid의 함량은 3배 정도 증가하는 것을 확인하였다.

또한 gallic acid는 겉껍질보다는 내피 쪽에 주로 존재함을 위 결과로부터 알 수 있다. 그리고 gallic acid는 향후 추출물의 기준물질로 설정이 가능할 것이라 생각한다.

12. 고함량의 fisetin 함유 옷나무 추출물의 제조

옷나무 추출물에 주로 함유되어 있는 fustin과 fisetin의 용매에 대한 용해도는 매우 다르다. 즉, fustin은 물에 잘 용해되지만 fisetin은 물에 거의 녹지 않는 점을 이용하여 고함량 fisetin 함유 추출물을 제조해보기로 하였다.

fustin과 fisetin의 함량이 높은 옷나무 추출물 100 g을 D.W 2 L에 1시간동안 용해시킨 후 여과하였다. 여과 후 얻은 불용성물질을 건조하여 flavonoid 함량을 측정해보았다(표 13).

위 정제공정을 거쳐 얻은 추출물의 수율은 35 %이며, 기존 추출물에 fustin은 매우 낮고 고함량의 fisetin이 함유된 새로운 조성물을 얻을 수 있었다. Flavonoid의 조성비가 변함에 따라 생리활성효과도 달라질 것으로 예상된다.

표 13. 고함량 fisetin 함유 추출물 분석 결과

	옷나무 추출물	정제 후
fustin 함량 (%)	6.7 %	14 %
fisetin 함량 (%)	2.1 %	20.9 %
고함량 fisetin 함유 추출물의 수득율 (%)		35 %

13. 옷나무 추출물과 flavonoid의 항산화도 비교

flavonoid는 항산화효과가 우수한 것으로 알려져 있다. 옷나무에 함유되어 있는 flavonoid, fisetin, 함량이 다른 옷나무 추출물, 인위적으로 fisetin 함량을 높인 추출물의 항산화능을 확인해보고자 DPPH법을 수행하였다.

그 결과 (표 14), fisetin의 항산화능은 fustin에 비해 4배 정도 우수함을 알 수 있다. 옷나무 추출물의 경우에는 두 종류의 flavonoid의 함량이 높을수록 항산화능이 증가함을 알 수 있다. fisetin의 우수한 항산화능에 의해 fustin은 없고 fisetin은 고함량으로 존재하는 추출물의 항산화능이 표준물질과 유사할 정도로 크게 증가함을 알 수 있다.

표 14. flavonoid와 옷나무 추출물의 항산화능 비교시험

시료	전자공여능 (IC ₅₀) μg/ml
fustin	32
fisetin	8
옷나무 추출물 A (fustin 18 %, fisetin 9.6 %)	10
옷나무 추출물 B (fustin 13.2 %, fisetin 7.1 %)	18
고함량 fisetin 함유 추출물 (fustin 0 %, fisetin 22 %)	12

14. 산소 처리에 의한 우루시올 성분의 감소 확인

우루시올은 산소나 라케이즈 효소에 의해 중합되어 고분자물질로 되어 체내에 흡수되지 못하여 알러지를 유발하지 않는 것으로 알려져 있다. 효소처리의 경우는 비용과 효율성의 문제로 실제 산업화가 쉽지 않은 부분이 있다.

우루시올 제거의 효율성을 직접적으로 확인하기 위하여 우루시올을 다량 함유하고 있는 칠액에 직접 산소를 처리해보기로 하였다. 성장하고 있는 나무에 상처를 내어 채취하는 일반 칠액과 나무를 잘라내어 불에 구우면서 채취하는 하옷 두 종류를 사용하였다.

각각의 칠액의 무게 대비 부형제인 MCC를 1.5배 첨가하여 분말화 한 후 동결건조 하여 칠액분말을 얻었다.

칠액 분말 20 g을 증류수 20 ml에 분산시킨 후 95 °C 수욕 상에서 가온하며 산소를 7.5 L/min으로 4시간 동안 처리하였다. 고온에 의해 증발되는 수분량을 수시로 첨가하여 물이 증발하는 것을 막아주었다 (그림 17). 4시간 동안 처리 후 시료를 상온으로 냉각한 후 hexane으로 추출하여 농축 한 후 GC/MS로 분석하였다.



그림 17. 칠액 분말에 산소 처리 실험 사진

표 15. 산소처리 전 후 우루시올 피크 면적 비교

하옷 칠액 분말			
분자량	산소 처리 전	산소처리 후	area 감소율(%)
	분자량별 area 합	분자량별 area 합	
318	1030235605	605246171	41.3
320	58589728	33929910	42.1
316	47125608	26223214	44.4
314	975187297	456605883	53.2
평균 감소율			45.2

일반 칠액 분말			
분자량	산소 처리 전	산소처리 후	area 감소율 (%)
	분자량별 area 합	분자량별 area 합	
318	674214550	416782684	38.2
320	87933395	54601764	37.9
316	24875511	17836743	28.3
314	1754678702	956933448	45.5
평균 감소율			37.5

시험 결과, 산소 4시간 처리 시 우루시올의 평균 감소율은 약 40% 이다. 칠액은 우루시올이 다량 함유되어 있기 때문에 산소에 의한 감소율이 40% 정도이지만, 실제 옷나무 추출물에 함

유되어 있는 우루시올의 양은 매우 미량이기 때문에 추출물에 있는 우루시올을 제거하기 위한 효과적인 방법이 될 수 있을 것이라 생각한다. 향후 추출물을 대상으로 이를 확인할 예정이다.

15. U.V 처리에 의한 우루시올 제거 방법 확인

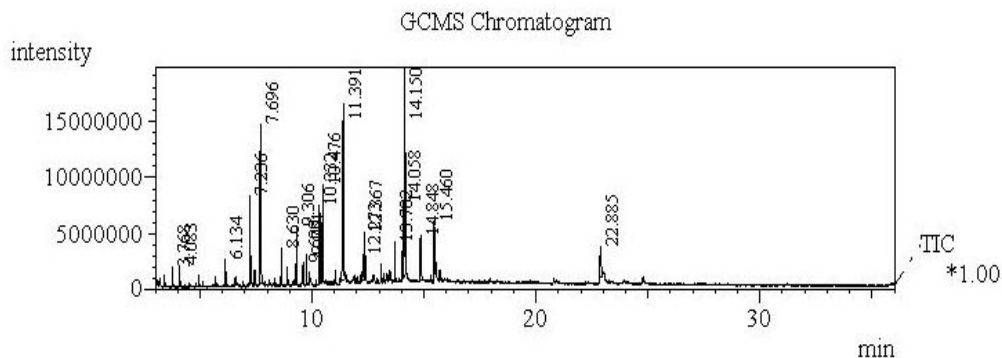
옷나무 추출물에는 아주 미량의 우루시올 성분이 잔존하며, 이를 제거하지 않을 수 옷에 민감한 사람의 경우 피부 접촉이나 섭취에 의하여 알러지를 유발하기도 한다. 따라서 반드시 우루시올을 완전히 제거하도록 해야 한다. U.V 처리에 의하여 우루시올이 제거되는지 여부를 확인해보고자 하였다.

옷나무 추출물 25 g을 U.V에 한 시간 가량 노출 시킨 후 hexane에 추출하여 1 ml로 농축하여 잔존하는 우루시올의 양 GC/MS로 확인해보았다.

옷나무 추출물을 25배 농축하여 분석해본 결과 분자량 318의 우루시올이 잔존하는 것을 확인할 수 있다. 하지만 U.V에 한 시간 노출시킨 경우 잔존하는 우루시올이 완전히 제거됨을 확인하였다(그림 18).

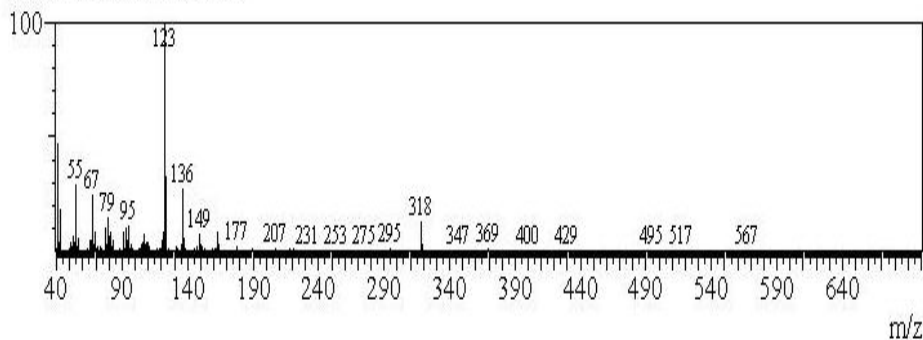
즉, U.V 처리는 미량으로 잔존하는 우루시올을 제거하는 효율적인 방법이 될 수 있다.

① 옷나무 추출물의 우루시올 분석 크로마토그램



② retention time 22.8 분 피크의 Mass spectrum 확인 (분자량 318)

Line#:20 R.Time:22.9(Scan#:2387)
 MassPeaks:212 BasePeak:123(495009)
 RawMode:Averaged 22.9-22.9(2386-2388)
 BG Mode:Calc. from Peak



③ U.V 1시간 처리 후 옷나무 추출물의 우루시올 분석 크로마토그램

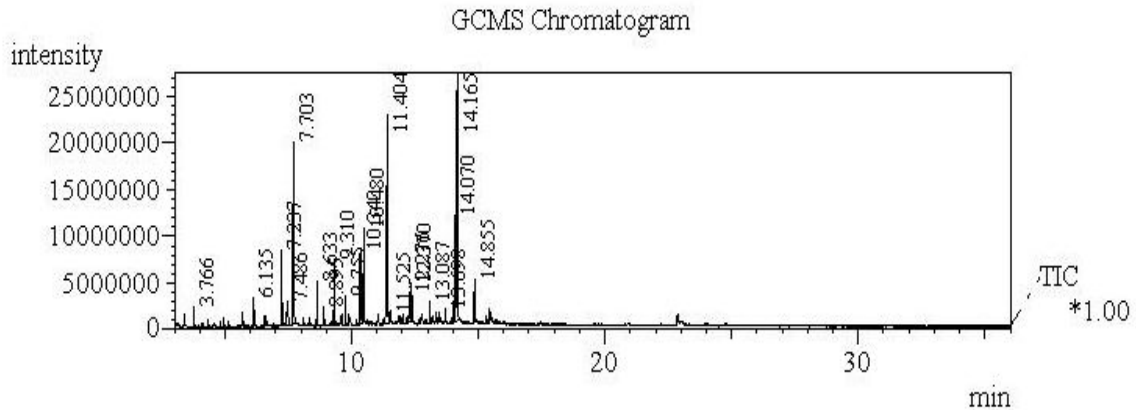


그림 18. U.V 처리에 의한 우루시올 제거 효과

16. 옷나무의 연생, 부위별 추출물의 유효성분 함량 비교

옷나무 추출물의 기준물질을 선정하기 위한 연구로서, 옷나무의 연생과 부위에 따라 함량의 차이를 보이는지 확인하고자 하였다. 옷나무 목질부에서 하얀 부분과 노란부분, 껍질 부분을 나누어 90 °C에서 열수 추출하여 추출물을 준비하였다. 또한 5년 미만의 잔가지, 7~ 10년생, 10년생 이상으로 나누어 열수 추출물을 준비하였다. 추출물에 함유된 2 종의 flavonoid 성분과 유기산인 gallic acid의 함량, 폴리페놀 함량을 비교해보았다 (표 16 ~ 17).

표 16. 옷나무 부위별 추출물에서의 성분 함량의 비교

	Flavonoid		유기산	폴리페놀
	fustin	fisetin	gallic acid	
껍질 부위	0.53 %	0.29 %	2.33 %	3.6 %
목질부의 하얀 부위 (껍질 제외)	0.11 %	0.04 %	0.65 %	6.3 %
목질부의 노란 부위 (껍질 제외)	30 %	2.4 %	6.7 %	65 %

표 17. 옷나무 연생별 추출물에서의 성분 함량의 비교

	Flavonoid		유기산	폴리페놀
	fustin	fisetin	gallic acid	
1 ~ 2 년생	1.7 %	0.13 %	2.0 %	15.9 %
5 년 미만	3.4 %	0.2 %	3.45 %	19.8 %
7 ~ 10 년	6.5 %	0.3 %	3.5%	25 %
10 년 이상	16.5 %	2.3 %	6.9 %	62 %

전체적으로 플라보노이드 함량에 비례하여 유기산 함량도 증가하는 양상을 보이며, 부위의 경우 목질부의 노란색 부분에 가장 많은 성분이 함유되어 있다. 연생이 증가할수록 플라보노이드 함량과 gallic acid 함량, 총 페놀함량이 증가함을 확인하였다. 옷나무 추출물에서 gallic acid도 지표성분으로 적합함을 확인하였다.

17. Gallic acid의 항산화효과 확인

기준물질 후보성분인 gallic acid의 항산화효과를 확인해보고자 DPPH 실험을 수행하였다 (그림 19).

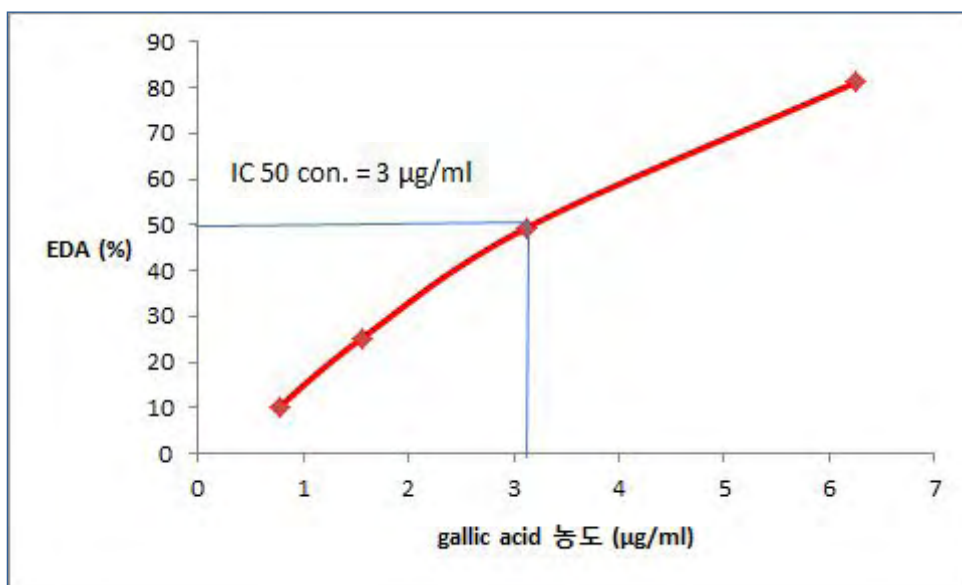


그림 19. Gallic acid DPPH test 결과

Gallic acid의 EDA(%)에 대한 IC50 농도는 약 3 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 이는 항산화효과가 우수하다고 알려진 Vitamin E보다 높았다. Gallic acid는 생리활성이 우수한 유기산이며, 옷나무 추출물에 함유량이 높으므로 기준물질로 적합하다고 판단된다.

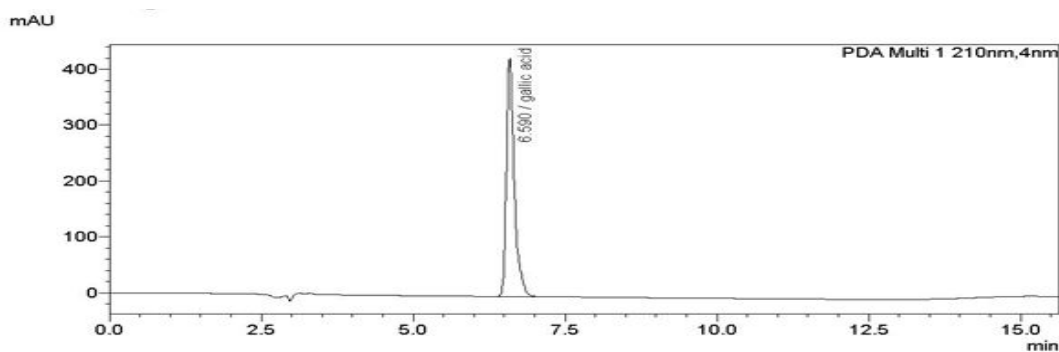
18. Gallic acid 분석법의 밸리테이션

Gallic acid를 옷나무 추출물의 기준물질로 하여 정량시험을 하기 위해서는 개발한 분석법에 대한 밸리테이션이 필요하다. 정량시험에서의 밸리테이션 수행 항목으로 정확성 (Accuracy), 정밀성 (Precision), 특이성 (specificity), 직선성 (linearity), 범위 (range) 에 대한 결과를 아래와 같이 제시한다.

(1) 특이성 (Specificity)

특이성 검증을 위하여 gallic acid 표준용액과 옷나무 추출물의 분석 크로마토그램 및 PDA 스펙트럼을 비교하여 동일 물질 분석여부를 확인하였다.

< 표준용액 >



< 시험용액(옷나무 추출물) >

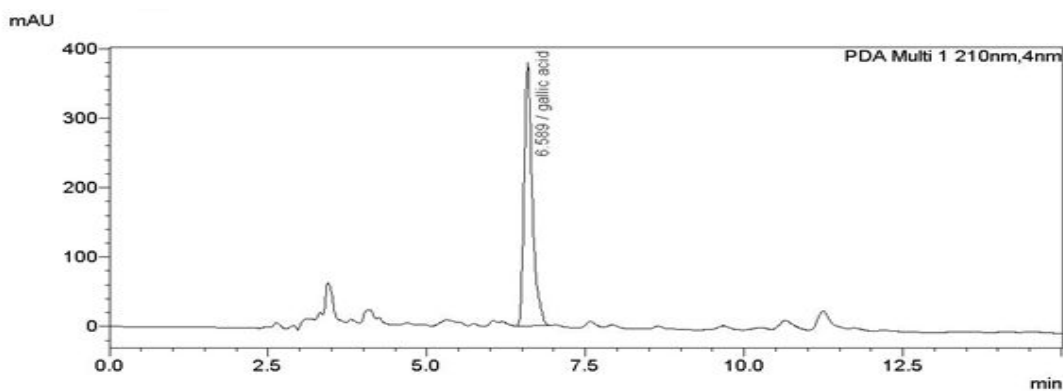
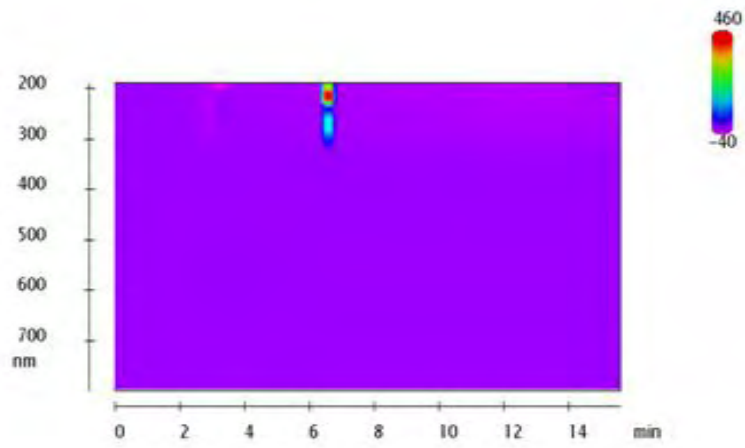


그림 20. 표준용액과 시험용액의 분석크로마토그램의 retention time 비교

< 표준용액 >



< 시험용액(옷나무 추출물) >

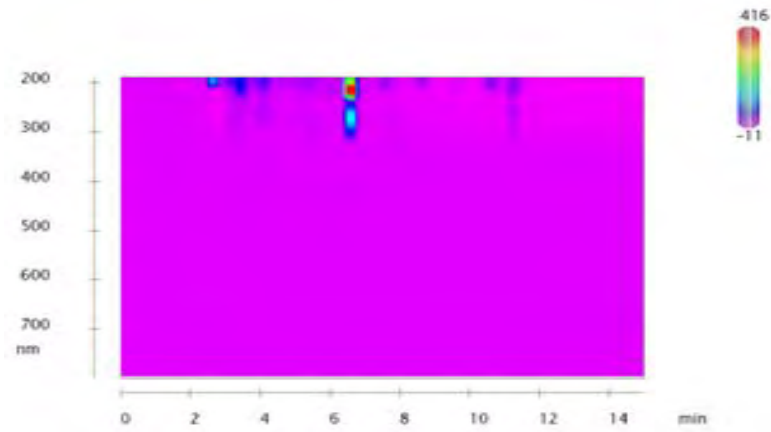
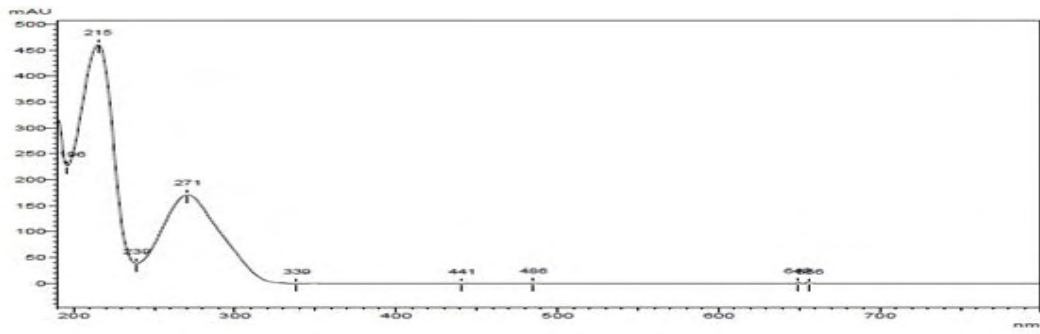


그림 21. 표준용액과 시험용액의 PDA 스펙트럼 비교

< 표준용액 >



< 시험용액(웃나무 추출물) >

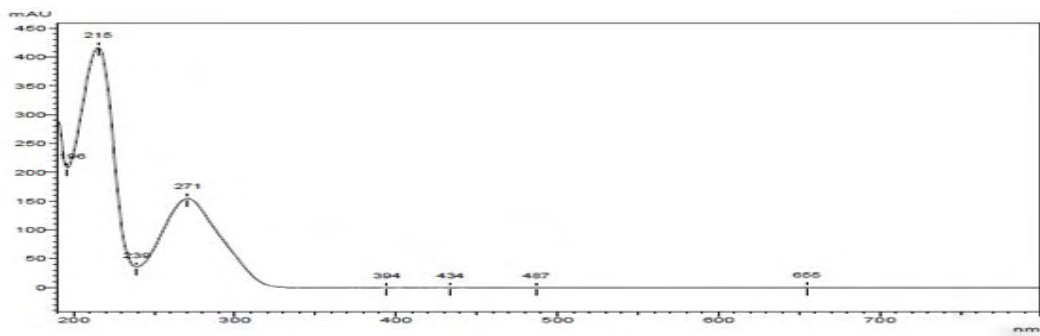


그림 22. 표준용액과 시험용액의 U.V spectrum 비교

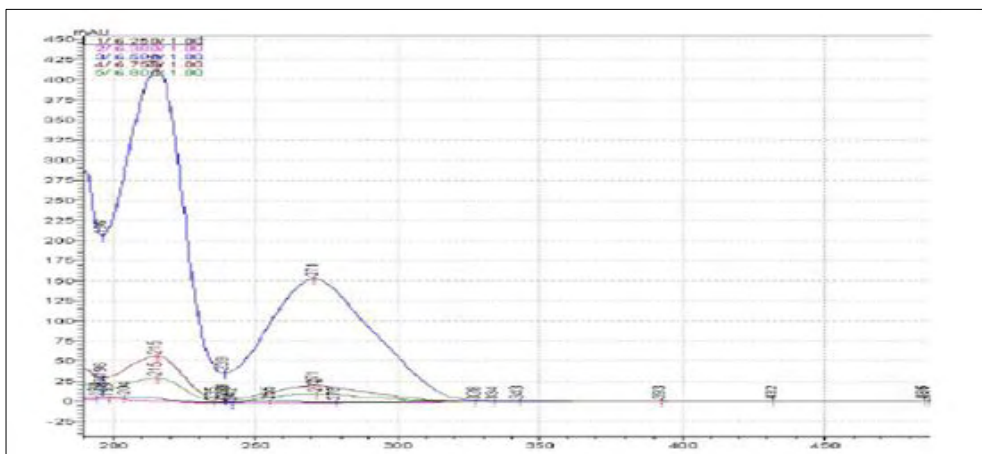


그림 23. 시험용액 중 gallic acid 피크의 5 point의 U.V 스펙트럼 비교

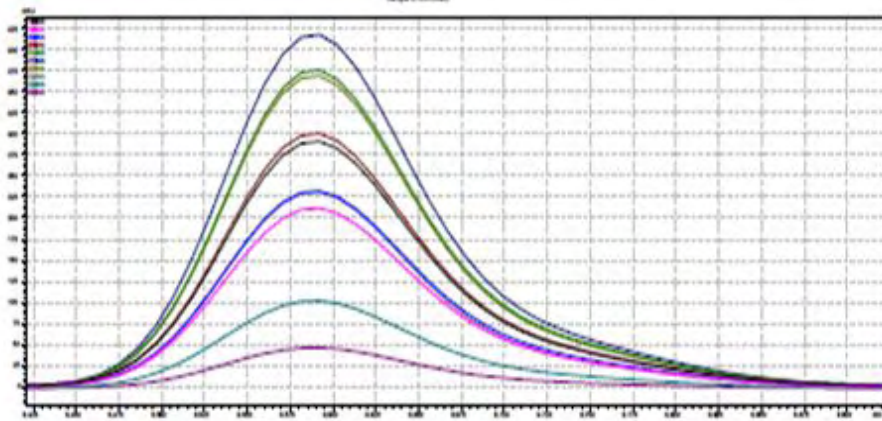


그림 24. 시료용액 중 gallic acid 피크에 대한 다파장 스펙트럼 비교

(2) 직선성 (Linearity)

gallic acid 표준용액과 옷나무 추출물을 다양한 농도별로 분석하였을 때 면적값에 대한 직선성을 확인하였다.

표 18. 표준용액과 옷나무 추출물에 대한 직선성

표준물질			직선성
농도 (µg/ml)	area		
1	20	455072	기울기: 28085 y-절편: 71852 상관계수 (R ²) : 0.9995
2	50	1582841	
3	100	2965288	
4	150	4325951	
5	200	5772408	
6	500	14047828	

옷나무 추출물 시료			
옷나무 추출물 농도		Gallic acid 농도	직선성
1	0.01 g/10 ml	19.65 µg/ml	기울기: 0.0218 y-절편: 2.767 상관계수 (R^2) : 0.9997
2	0.02 g/10 ml	40.72 µg/ml	
3	0.03 g/10 ml	61.71 µg/ml	
4	0.04 g/10 ml	84.45 µg/ml	
5	0.05 g/10 ml	106.86 µg/ml	

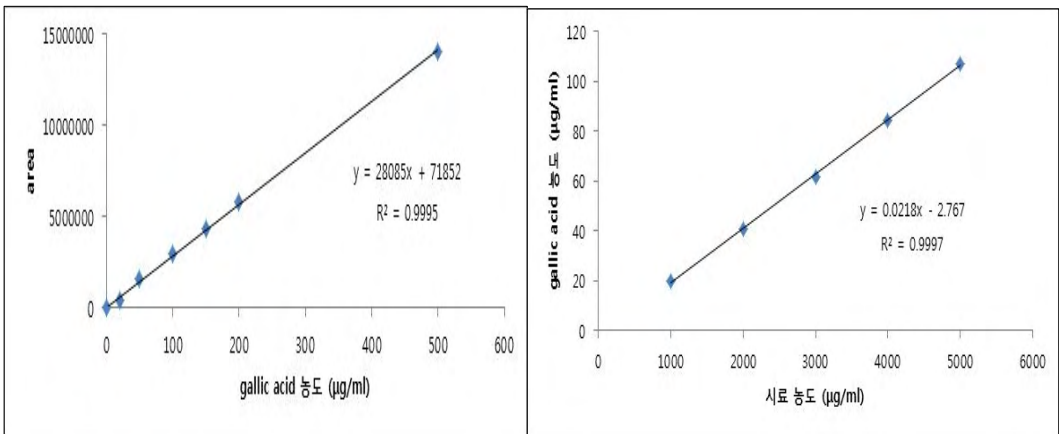


그림 25. 표준용액과 옷나무 추출물의 농도에 따른 직선성 확인

(3) 정밀성 (Precision)

① 반복 정밀성 (Repeatabily)

옷나무 추출물을 3 가지 다른 농도의 시료를 3반복으로 분석 후 그 결과값의 평균, 표준편차 (SD), 상대표준편차 (% RSD) 값을 확인하였다.

표 19. 반복 정밀성 실험 결과

시료 농도	반복	Gallic acid 함량 (%)	평균	표준편차 (SD)	상대표준편차 (RSD %)
0.02 g/10 ml	1	1.90	1.96	0.060	3.06
	2	2.01			
	3	1.99			
0.03 g/10 ml	1	2.08	2.06	0.058	2.80
	2	1.99			
	3	2.10			
0.04 g/10 ml	1	2.11	2.11	0.031	1.45
	2	2.14			
	3	2.08			
평균		2.04			
표준편차 (SD)		0.08			
상대표준편차 (RSD %)		3.82			

② 실험실내 정밀성 (Intramediate precision)

실험실내 정밀성 확인은 같은 시료의 분석 결과를 실험자를 달리하여 확인하였다.

표 20. 실험실내 정밀성 실험 결과

시험자	시료농도	반복	Gallic acid 함량 (%)	평균	표준편차 (SD)	상대표준편차 (RSD%)
연구원 1	0.02 g /10 ml	1	1.90	1.96	0.060	3.06
		2	2.01			
		3	1.99			
연구원 2		1	1.92	1.90	0.029	1.54
		2	1.87			
		3	1.93			

③ 일간 반복성

3 일간 동일 농도의 시료를 반복하여 분석하여 평균값, 표준편차, 상대표준편차 값을 비교하였다.

표 21. 일간 반복성 실험 결과

Day	시료	반복	Gallic acid 함량 (%)	평균 (%)	표준편차 (SD)	상대표준편차 (RSD%)
1	0.02 g /10 ml	1	1.92	1.90	0.029	1.54
		2	1.87			
		3	1.93			
2		1	2.02	2.04	0.017	0.85
		2	2.06			
		3	2.03			
3		1	1.92	2.00	0.071	3.56
		2	2.06			
		3	2.03			

(4) 정확성 (Accuracy)

이 실험은 시료의 농도를 알고 있는 옷나무 추출물과 gallic acid 표준용액을 섞어 이론적 예상 농도와 실제 분석 농도를 비교하여 회수율을 확인하였다.

표 22. 옷나무 추출물 분석의 정확성 확인 결과

시료	이론적 농도 (µg/ml)	반복	실제 농도 (µg/ml)	회수율 (%)
옷나무 추출물 5 ml(0.02 g/10ml) + gallic acid 5 ml (40 ppm)	39.64	1	38.34	99.97
		2	39.66	100.00
		3	39.46	100.00
옷나무 추출물 5 ml(0.02 g/10ml) + gallic acid 5 ml (80 ppm)	59.64	1	59.85	100.00
		2	61.07	100.02
		3	60.73	100.02
옷나무 추출물 5 ml(0.02 g/10ml) + gallic acid 5 ml (100 ppm)	69.64	1	70.69	100.02
		2	70.98	100.02
		3	70.46	100.01
평균 회수율 (%)				100.01
상대표준편차 (% RSD)				0.017

(5) 범위

이 분석법으로 옷나무 추출물의 gallic acid 분석의 적절한 농도를 확인하기 위해 분석의 하한선과 용해도를 확인하는 실험을 수행하였다.

표 23. 시료에서 gallic acid 분석의 하한선 확인 실험 결과

시료농도	area	농도	함량	결과
0.01 g/10 ml	647540	20.711	2.07	적합
0.005 g/10 ml	317739	9.589	1.92	
0.002 g/10 ml	111790	2.644	1.32	부적합
0.001 g/10 ml	45157	0.397	0.40	
0.0002g/10ml	7044	-0.889	-4.44	
0.0001 g/10 ml	4635	-0.970	-0.88	

옷나무 추출물을 물에 용해할 경우 최대 용해도는 0.5 %이며, 최대 용해도인 0.05 g/10 ml에서의 gallic acid 함량은 106.86 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

따라서 이 분석법에 의한 옷나무 추출물에서의 gallic acid 분석의 적절한 범위는 10 ~ 110 $\mu\text{g/ml}$ 로 생각된다.

19. 무독성 옷나무 추출물의 대량생산 및 분석 결과


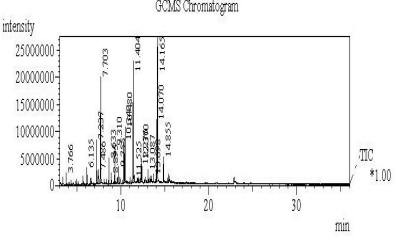
무독성 옷나무 추출물의 원료로 1차년도 연구 결과에 따라 박피 옷나무로 결정을 하였다. 박피 옷나무를 칩상형 (그림 26)으로 400 Kg을 준비하여 대량생산하였다. 대량 생산 조건은 표 28 과 같이 수행하였다.

추출 수율은 약 3 %로 400Kg의 원료로부터 회수한 추출물은 약 12 Kg이다. 제조한 무독성 옷나무 추출물에 대한 분석 결과는 표 24에 나타내었다.



그림 26. 칩상형의 박피 옷나무

표 24. 대량생산한 옷나무 추출물의 시험항목 및 분석 결과

	결과	비고
성상	암갈색의 분말	
수분	1.8 %	
Gallic acid 함량	1.5 %	
우루시올 유무	없음	

20. 인체적용시험수행을 위한 수행기관 IRB 심사제출 자료

1). 제조방법 및 그에 관한 자료

ㄱ. 원재료

원재료	옷나무
학명	<i>Rhus Verniciflua Stokes</i>
원산지	국내산
사용부위	가지, 줄기

ㄴ. 원재료 조성비

: 옷나무 100 %

2) 개요

- 10년생 미만의 옷나무의 가지와 줄기의 열수 추출물이며, 알러지 유발 물질인 우루시올 제거 공정을 거쳐 무독화함.

3) 제조공정표

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표 성분 함량변화(mg/g)	(4) 수율(kg)
원재료	웃나무 가지 또는 줄기		100 Kg
↓ 추출	추출용매: 물 추출 온도: 90도 추출 용매 배수 :10배수 1차 추출시간: 6시간 2차 추출시간: O/N		
↓ 여과	사용한 여과장치, 여과 조건 등		
↓ 농축	160 Torr에서 감압농축하여 40배정도 농축한다.		
↓ 무독화공정	알러지 유발 물질인 우루시올 제거하는 공정으로 별도의 첨가물은 없음.		
↓ 건조	SD 건조		
↓ 원료		지표성분: gallic acid <u>10 mg/g이상</u> 함유함	5 Kg

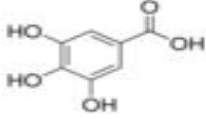
4) 원료에 대한 특성

ㄱ. 원료를 특정 지을 수 있는 성상, 물성 등

- 암갈색의 특유의 향이 있는 분말

나. 기능성분(또는 지표성분) 및 근거

○ 지표 성분

지표성분 :	갈산 (gallic acid) 10 mg/g 이상
구조	
일반명	갈산 (gallic acid)
분자식	C ₇ H ₆ O ₅
분자량	170.12
CAS No.	149-91-7

○ 설정 근거

: 율나무에 특이적으로 함유되어 있는 성분이며, 항산화효과가 매우 뛰어나다.

5) 기능성분 (또는 지표성분), 율해물질 등 규격 및 시험방법에 관한 자료

ㄱ. 지표성분의 규격 및 근거

○ 지표성분의 규격: 갈산 (gallic acid) 10 mg/g 이상

○ 설정 근거: 율나무에 특이적으로 함유되어 있으면서 함유량이 높은편이다.

ㄴ. 기능성분 (또는 지표성분) 표준품 정보

■ 시판되는 표준품	표준품명	gallic acid
	제조·판매회사명	시그마 알드리치
	구조식	C ₇ H ₆ O ₅
	CAS No.	149-91-7

ㄷ. 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

■ 자사시험방법

1. 장비와 재료

1.1 실험실 장비 및 소모품

- 1.1.1 부피플라스크(10mL, 100 mL)
- 1.1.2 HPLC용 유리병
- 1.1.3 용매용 일회용 실린지
- 1.1.4 여과용 멤브레인필터(PTFE, 0.2 μm)
- 1.1.5 진탕기(Vortex)

1.2 분석 장비

- 1.2.1 고속액체크로마토그래프
- 1.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector) 또는 다이오드어레이 검출기(Diode Array Detector)
- 1.2.3 YMC-pack ODS-AQ(4.6mm I.D. × 250mm, 5μm) 또는 이와 동등한 것

2. 표준물질 및 일반시약

2.1. 표준물질

2.1.1. 갈산 (gallic acid)

분자식: $C_7H_6O_5$, 분자량: 170.12, CAS No. 149-91-7

2.2 일반시약

- 2.2.1. 인산(Phosphoric acid, HPLC grade)
- 2.2.2. 메탄올(Methanol, HPLC grade)
- 2.2.3. 증류수(Distilled water)

3. 시험과정

3.1. 표준용액 제조

3.1.1. 표준물질을 1.0 mg/mL가 되도록 증류수에 녹여 표준원액으로 한다.

3.1.2. 상기 용액을 진탕하여 녹인 후 증류수로 희석하여 표준용액으로 한다.

3.2. 시험용액 제조

3.2.1. 검체 약 1g을 취한 후 적량의 증류수로를 넣고 진탕기로 충분히 녹인다.

3.2.2. 상기용액을 100 mL 부피플라스크에 넣고 증류수로 표선까지 맞춘다.

3.2.3. 상기용액 1 mL을 10ml 부피플라스크에 넣고 표선까지 맞춘 후 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4. 분석 및 계산

4.1. 기기분석

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	10 µl
칼럼온도	30 °C
이동상	10 mM 인산용액 : 메탄올 = 9: 1
유속	1 mL/분
검출기 파장	210 nm

4.2. 계산

$$\text{갈산(gallic acid) 함량(mg/g)} = C \times V / w$$

C : 시험용액중의 gallic acid 농도 (mg/mL)

V : 시험용액의 전량 (mL)

w : 시료채취량 (g)

르. 유해물질의 규격 및 근거

○ 지표성분의 규격: 우루시올 불검출

○ 설정 근거: 우루시올은 알러지유발 물질이므로, 반드시 불검출이어야 한다.

ㄷ. 유해물질의 정보

	표준품명	우루시올 표준용액	
<p>■ 자사 표준품</p>	<p>구조식</p>		R=(CH ₂) ₁₄ CH ₃ (C15 saturated), M.W = 320
			R=(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₅ CH ₃ (C15 monoene), MW=318
			R=(CH ₂)CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₂ CH ₃ (C15 diene), MW=316
			R=(CH ₂) ₇ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH ₂ (C15 triene), MW=314

ㄹ. 유해물질의 시험방법

<p>■ 자사시험방법</p>
<p>1. 장비와 재료</p> <p>1.1 실험실 장비 및 소모품</p> <p>1.1.1 분액깔때기(500 mL, 1000 mL)</p> <p>1.1.2 유리칼럼 (2.9 x 45 cm)</p> <p>1.1.3 여과지</p> <p>1.1.4 여과용 멤브레인필터(PTFE, 0.2 μm)</p> <p>1.1.5 진탕기(Vortex)</p> <p>1.1.6. 감압농축기</p> <p>1.1.7. 오븐</p> <p>1.1.8. 데시케이터</p> <p>1.2 분석 장비</p> <p>1.2.1 가스크로마토그래프-질량분석기</p> <p>1.2.2 컬럼: 5% Diphenyl-95%Dimethylpolysiloxane (30m x 0.25mm, 0.25 μm) 또는 이와 동등한 것</p> <p>2. 일반시약 및 표준원액</p> <p>2.1. 일반시약</p> <p>2.1.1. 아세톤 (Acetone, Extra grade)</p> <p>2.1.2. 헥산 (Hexane, Extra grade)</p> <p>2.1.3. 아세토니트릴 (Acetonitrile, Extra grade)</p>

2.1.4. 디클로로메탄 (Dichloromethane, Extra grade)

2.1.5. 에탄올 95% (Ethanol, Extra grade)

2.1.6. 실리카겔 60 (silica gel)

2.1.7. 염화나트륨 (NaCl, Extra grade)

2.2. 표준원액

웃나무(*Rhus vernicifera*)로 부터의 추출액인 칠액 200 mL을 아세톤 400 mL와 혼합하여 1시간 방치하고 우루시올 성분과 다른 칠액성분이 분리되면 여과지로 여과한다. 여과된 아세톤 추출물은 감압농축하여 아세톤 농축액의 2배량의 헥산을 첨가하고 상층의 헥산층을 여과지로 여과한 후 감압농축한다. 여기에 다시 헥산농축액의 2배량의 아세토니트릴을 첨가하여 상층액을 여과한 후 감압농축한다.

다. 농축액은 실리카겔 40 g을 헥산으로 습식충진시킨 유리컬럼에 가하여 헥산/아세톤(9:1) 혼합액으로 충분히 용출시킨 후 감압농축하고 이를 아세토니트릴에 용해 하여 표준원액으로 한다.

2.3. 표준용액

표준원액을 아세토니트릴로 400~800배 희석하여 표준용액을 만든다.

3. 시험과정

3.1. 시험용액 제조

3.2.1. 추출

검체 50 g을 95 % 에탄올에 검체가 잠기도록 하여 3시간 이상 교반추출하고 이를 여과한 후 감압농축하여 농축잔류물을 25 mL 디클로로메탄에 녹인 후, 포화염화나트륨 용액 400 mL를 이용하여 2회 진탕세척한다. 회수한 디클로로메탄층을 5 mL까지 감압농축하여 시험용액으로 한다.

3.2.2. 정제

컬럼크로마토그래피용 실리카겔을 130 °C에서 3시간동안 가열한 후 데시케이터에서 냉각시킨다. 이 실리카겔 40 g을 디클로로메탄으로 유리컬럼(2.9 x 45cm)에 습식 충진시킨 후 추출농축액을 5 mL 주입하고 디클로로메탄 120 mL로 용출시켜 용출액을 감압농축한다. 농축잔류물을 헥산 20 mL에 녹인 후 분액깔대기에 옮겨 아세토니트릴 20 mL를 사용하여 3회 진탕추출하여 아세토니트릴층을 회수한다. 아세토니트릴 층을 감압농축한 후 아세토니트릴 2 mL에

녹여 시험용액으로 한다.

4. 분석 및 계산

4.1. 기기분석

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

표 1. 가스크로마토그래프-질량분석기 조건

항목	조건
주입부	split mode(20:1), 225 °C
칼럼온도	90 °C ~ 250 °C (90 °C에서 시료 주입 후 10 °C/분으로 250°C까지 승온하여 15분간 유지한다.)
이온화모드	EI (Electron impact)
이온화에너지	70 eV
캐리어가스 및 유량	헬륨 1.0 mL/min
이온질량(m/z)	0~500 m/z

4.2. 정성시험

표준용액과 시험용액을 표 1의 조건에 따라 가스크로마토그래프-질량분석기로 시험하여 표준용액에서 분리 확인되는 4종의 우루시올의 피크가 시험용액에서 존재하는지 확인한다.

21. 우루시올 불검출의 검증

옷나무에서 우루시올은 알러지를 유발하는 성분으로서, 개인에 따라 민감도가 다르게 나타난다. 식품공전에서 우루시올은 불검출로 되어있으며, 시험법은 시중에 나와 있는 옷담용 옷물을 대상으로 하는 시험법이다. 액상 시료의 경우, 시료 500 ml를 시험액으로 하여 시험하도록 되어있다. 식품 공전의 우루시올 시험법 중 고체분말 시료의 경우 정확한 시험양이 제시되어 있지 않다.

액체시료의 대상인 시판중인 옷담용 옷물의 경우 대부분 고형분이 약 1 % 정도로서, 실제 시험에 사용되는 검체의 양은 고형분으로서 약 5 g 내외가 된다.

본 연구진이 사용하는 무독화한 옷나무 추출물에 우루시올 성분 존재 유무를 정확히 보고자 하였다. 산소 처리를 통해 무독화한 옷나무 추출물을 식품공전의 시험법 기준으로 한 것과 시료 농도를 높임에 따라 우루시올 검출 여부를 확인하였다 (표 25, 26). 시료 무게를 최대 50배

까지 증가시켰음에도 우루시올 불검출임을 확인하였다. 시료무게 100 g 이상 사용할 경우, 크로마토그램 상에 검출 피크가 나타나지만, MS spectrum을 확인해본 결과 우루시올 표준물질의 MS spectrum과는 다름을 확인하였다. 즉 본 연구진이 개발한 무독화한 옷나무 추출물에 우루시올이 없음을 재확인하였다.

시료무게	우루시올 검출 결과
10 g	불검출
25 g	불검출
50 g	불검출
100 g	불검출
250 g	불검출

표 25. 검체량에 따른 우루시올 분석 결과 비교

시료	우루시올 분석 GCMS 크로마토그램
우루시올 표준물질	
옷나무 추출물 10 g	
옷나무 추출물 25 g	
옷나무 추출물 50 g	
옷나무 추출물 100 g	
옷나무 추출물 250 g	

표 26. 검체량에 따른 우루시올 분석 GC-MS 크로마토그램

22. 우루시올 분석 방법의 간소화

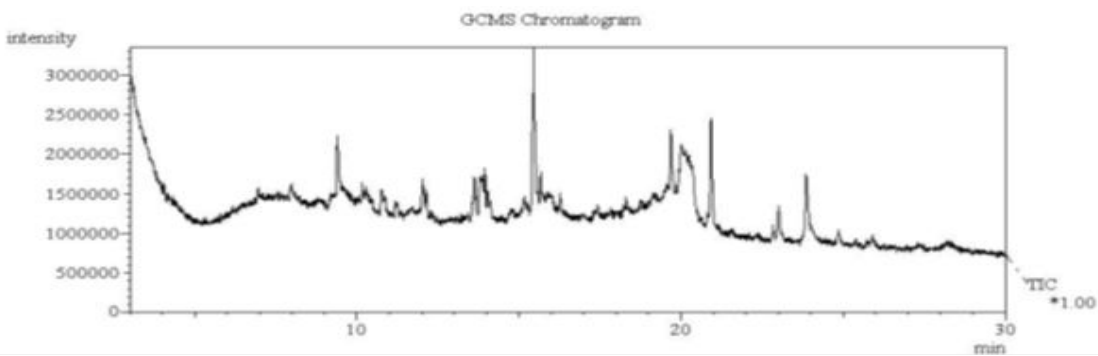
무독화 옷나무추출물을 제조함에 있어서 무독화공정은 매우 중요하다. 옷나무 추출물을 제조

하는 공정은 크게 추출→농축→무독화→건조의 단계를 거치게 된다. 무독화 공정을 수행한 후 우루시올이 완벽하게 제거되었는지를 확인한 후 건조공정을 수행해야 한다. 식품 공전의 우루시올 분석방법은 HPLC 분석을 거친 후 시료를 에탄올로 추출 후 dimethylene chloride 추출·농축 후 silica gel 통과 시킨 후 농축 한 후 TMS 유도체화 하여 GC/MS 분석하도록 되어 있다. 이 분석법은 실제 산업현장에서 사용하기에는 시간과 비용이 많이 소요된다. 따라서 우루시올 분석 방법을 간소화하여 생산 공정 중 우루시올 검출 결과를 비교해보았다.

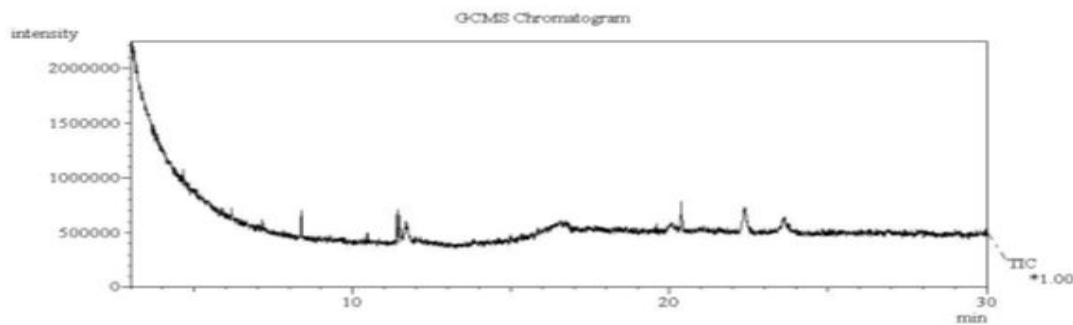
본 연구진은 안전성의 확보를 위해 분석에 사용하는 검체농도를 식품공전에 비해 5배 높은 25g을 사용하였으며, 첫 번째 방법으로는 EtOH 추출, Dimehtylene chlorid 추출농축, silica gel 정제 후 GC/MS 분석하는 방법, 두 번째 방법은 methylene chloride 추출, 농축 후 silica gel 정제하여 분석하는 방법, 세 번째는 methylene chloride로 추출, 농축 후 분석하는 방법으로 하여 결과를 비교해보았다(그림 28). 세 가지 분석방법에서 모두 우루시올 불검출을 확인할 수 있었다.

대량 생산 제조 공정 중 우루시올 잔존여부 확인은 가장 간단한 3번째 방법을 사용하기로 하였으며, 최종 완제품에서는 식품 공전의 방법으로 우루시올 잔존 여부를 확인하기로 하였다.

① 식품 공전- 우루시올 분석 방법



② methylene chloride 추출 후 silica gel 정제 시료



③ methylene chloride 분석 방법

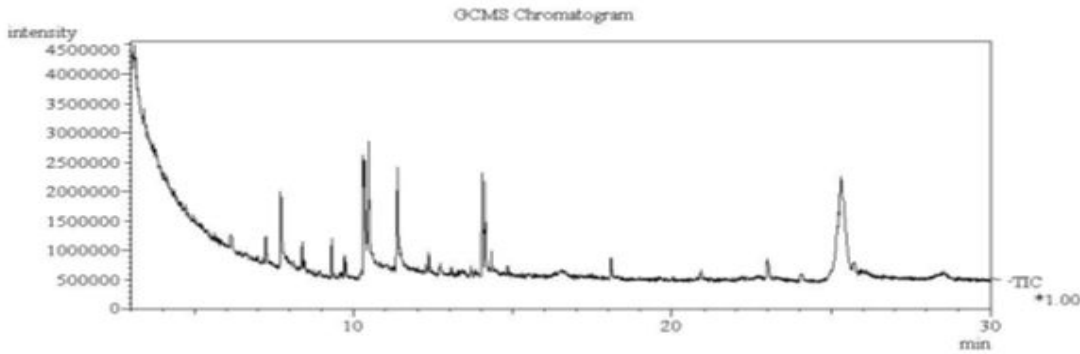


그림 28. 우루시올 시험 방법에 따른 결과 비교

23. 기준물질 성분 결정 및 표준화

건강기능식품 개발을 위해서 가장 먼저 이루어져야 하는 부분이 표준화이다. 즉 제조 공정을 확립하여 지표성분을 결정하고 이 지표성분의 함량을 결정해야 한다. 옷나무에는 플라보노이드인 fustin과 fisetin, 유기산인 gallic acid가 많이 함유되어 있다. 플라보노이드는 연생에 따라 함량 차이가 크게 나기 때문에 향후 원료수급에 어려움이 발생할 수 있다. 즉 원료마다 함량 차이가 크게 나기 때문에 설정해 놓은 함량 범위에 들어오는 원료를 정확히 수급하기 어려울 수 있어 지표성분으로 사용하지 않기로 하였다. 하지만 gallic acid는 연생이 늘어날수록 함량이 증가하지만, 증가폭이 플라보노이드에 비해 크지 않아 원료 수급이 수월할 수 있다. 본 연구진은 옷나무를 이용한 기능식품 개발을 위해 10년생 이하의 원료를 사용하기로 하였고, 여러 번의 제조를 통해 지표성분의 함량을 결정하기였다.

지표성분의 표준화를 위해 10년생 이하의 옷나무를 5회에 걸쳐 50 kg씩 구입하여 실제 생산 공정과 동일하게 제조하여 수율과 지표성분인 gallic acid 함량을 확인하였다.

	Batch No.					평균
	1	2	3	4	5	
추출 수율	2.9 %	2.4 %	2.3 %	2.5 %	2.6 %	2.54 %
gallic acid 함량	1.24 %	1.16 %	1.38 %	1.25 %	1.18 %	1.24 %

표 27. 무독화옷나무 추출물의 5 batch 생산 결과

그 결과 추출 수율을 약 2.5% 정도이며, gallic acid 함량은 1.2 % 내외였다. 따라서 gallic acid 기준을 1.2 %로 설정하였다. 지표성분의 함량의 허용범위는 일반적인 수준인 80~120 %인 0.96~1.44 %이다.

24. 인체적용시험용 시료의 제조

혈행개선 효능을 확인하는 인체적용시험에 사용할 시료는 표 3의 공정으로 제조하였다. 100 kg의 원료를 사용하였으며, 2시간동안 산소를 처리하여 무독화를 하였으며 SD 건조를 하여 최종적으로 2.6 kg를 얻었다. 지표성분인 gallic acid는 1.04 %로 확인하였다.

표 28. 무독화 옷나무 추출물 제조

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 분 함량변화(mg/g)	(4) 수율(kg)
원재료	옷나무 가지		100 Kg
↓ 추출	추출용매: 물 추출 온도: 90도 추출 용매 배수 :10배수 1차 추출시간: 6시간 2차 추출시간: O/N		
↓ 여과	사용한 여과장치, 여과 조건 등		
↓ 농축	160 Torr에서 감압농축하여 40배정도 농축한다.		
↓ 무독화공정	순수 산소를 90℃로 온도를 올린 농축액에 2시간동안 주입한다.		
↓ 건조	SD 건조		
↓ 제품		지표성분: gallic acid <u>10.4 mg/g</u>	2.6 Kg

상기의 공정으로 제조한 무독화한 옷나무 추출물은 경질캡슐에 350 mg씩 충전하였다. 또한 인체적용시험에서 대조군에서 사용할 위약은 말토덱스트린과 미세결정셀룰로오스 혼합분말에 카카오색소와 가시오가피향을 혼합하여 제조한 분말을 시험약과 마찬가지로 경질캡슐에 350 mg씩 충전하였다. 충전한 시험약과 위약은 각각 병에 담아 무작위배정을 위한 코드명과 배정번호를 기재한 라벨(그림 29)을 부착한 후 인체적용시험기관에 전달하였다.

제품 CODE 명 : RIS (NO.33-a)

1. 제조원 : (주) 에이지아이
2. 내용량 : 350 mg X 100 캡슐, 25일 분량
3. 섭취량 : 1일 2회, 1일 2캡슐 (총 1일 4캡슐)을 식 후 물과 함께 섭취하십시오.
4. 섭취 시 주의사항
 - 섭취 시 충분한 물과 함께 섭취하시기 바랍니다.
 - 고농축 성분이라 위를 자극할 수도 있으니 **반드시 식후에 섭취** 바랍니다.
5. 보존 : 개봉 후 습기가 적고 직사광선을 받지 않는 서늘한 곳에 보관하시고, 어린이의 손에 닿지 않도록 주의하시기 바랍니다.
이 제품은 건강기능식품 인체적용시험용입니다.

그림 29. 인체적용시험용 시료 라벨

25. 무독화 옷나무 추출물의 안정성 시험 결과

무독화 옷나무 추출물의 유통기한 설정을 위해 6개월간 -20℃, 25℃, 40℃, 50℃에서 가속시험을 수행하였다. 기준 항목은 지표성분인 gallic acid로 최소 허용 함량인 0.96 % 이상으로 결과를 분석하였다. 본 실험 결과는 식약처에서 제공하고 있는 유통기한설정프로그램을 이용하였다.

표 29. 보관 온도, 기간에 따른 gallic acid의 함량 (%)

저장기간(개월)	-20℃	25℃	40℃	50℃
0	1.2000	1.2000	1.2000	1.2000
1	1.2267	1.2267	1.2200	1.2067
2	1.2133	1.2067	1.1900	1.1933
3	1.2233	1.2333	1.2133	1.1700
4	1.2067	1.1800	1.1800	1.1900
5	1.1800	1.2000	1.2267	1.1567
6	1.2133	1.2200	1.1467	1.0733

표 30. 품질지표에 대한 반응차수 결과

1) 반응차수 0차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25	-0.0007	1.2117	0.0070
40	-0.0056	1.2135	0.1924
50	-0.0173	1.2218	0.6564

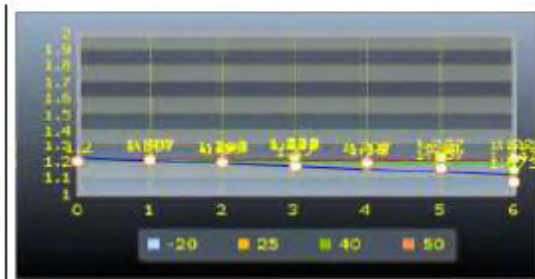
2) 반응차수 1차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25	-0.0006	0.1919	0.0072
40	-0.0048	0.1937	0.1981
50	-0.0151	0.2015	0.6470

표 31. 품질지표에 대한 활성화에너지와 반응식차트

1) 반응차수 0차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R ²	Ea
-12314.50	34.10	0.9991	-24468.92
Storage-Con.(%) regression		1/T-ln(K) regression	



2) 반응차수 1차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R ²	Ea
-12480.40	34.48	0.9992	-24798.55
Storage-Con.(%) regression		1/T-ln(K) regression	

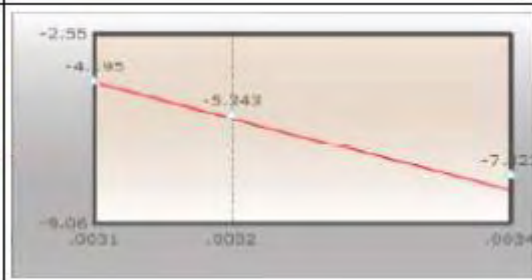


표 32. 유통기한 산출 결과

치수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	0.2400	0.01	15142.51	497.84
1	0.2231	0.00	16850.99	554.01

시험 결과, 지표성분인 gallic acid는 본 시험조건에서 높은 안정성을 나타냈으며, 프로그램을 통한 유통기한 설정 결과 최소 497개월이 예측되었다.

통상적으로, 식품에서 설정하는 유통기한인 48개월은 전혀 문제되지 않는다.

III. 결론

1. 옷나무추출물에는 플라보노이드 종류인 fustin과 fisetin이, 유기산인 gallic acid가 주요 성분으로 존재하며, 이들 성분 함량은 연생이 증가할수록 증가한다. 특히 10년생 이상 옷나무 추출물의 gallic acid 함량은 어린연생의 옷나무 추출물보다 3배 이상 높다. 또한 gallic acid는 높은 항산화효과를 나타내는 생리활성물질이며 함유량도 높은 편으로 옷나무 추출물에서 기준물질로 사용하기 적합하다.
2. 알리지 유발 성분인 우루시올은 연생이 증가할수록 비례하여 증가하며, 추출물에서 우루시올을 제거하기 위한 효과적인 방법은 순수산소처리 또한 U.V 처리에 의해 가능하다.
3. 옷나무를 내피와 외피를 구분하여 추출해 본 결과, 외피의 경우 추출수율은 증가하지만 플라보노이드함량은 낮고, 내피의 경우 추출수율은 낮지만 고함량의 플라보노이드 함유 추출물의 제조가 가능하다.
4. 옷나무 추출물의 정제 공정에 따라 고함량 fisetin 함유 옷나무 추출물의 제조가 가능하며, 이 추출물의 생리활성은 일반 옷나무추출물과는 다를 것으로 예상되어 추후 지속적인 연구가 필요하다.
5. gallic acid를 지표성분으로 사용하기 위해 적합한 분석법을 개발하였으며, 분석법에 대한 벨리데이션을 수행하여 분석법으로서 적합성을 확인하였다.
6. 칩상형의 박피 옷나무를 원료로 하여 대량 생산한 결과 추출수율은 약 3 %이며, gallic acid 함량은 1.5 %, 우루시올 불검출을 확인하였다.
7. 생산 공정 중 우루시올의 잔존 여부를 빠르게 분석하고자 분석법을 간소화하였으며, 간소화한 분석법이 식품공전의 분석법 결과와 같음을 확인하였다.
8. 무독화옷나무 추출물의 gallic acid 함량 기준을 1.2 %로 결정하였다.
9. 무독화옷나무 추출물의 가속시험 결과 안정성이 매우 높은 것을 확인하였다.

제2절. 혈행 개선 및 면역조절 유효성 평가

목 표 : 옷나무 추출물의 혈행개선 및 면역증강 유효성 평가와 생체 작용기전 규명

1. 서론

1) 과제명

옷나무 추출물을 이용한 개별인정형 건강기능식품의 개발

2) 연구의 필요성

주관과제에서 독성을 제거한 옷나무 추출물 유래 후보물질의 혈행개선과 면역활성 기능에 대한 유효성을 평가하고, 그에 따른 세포 내 신호 전달 및 생리활성의 작용기전을 분석하여 개발 중인 천연물의 혈행개선 및 면역활성 효과의 근거를 과학적으로 제시하고자 함.

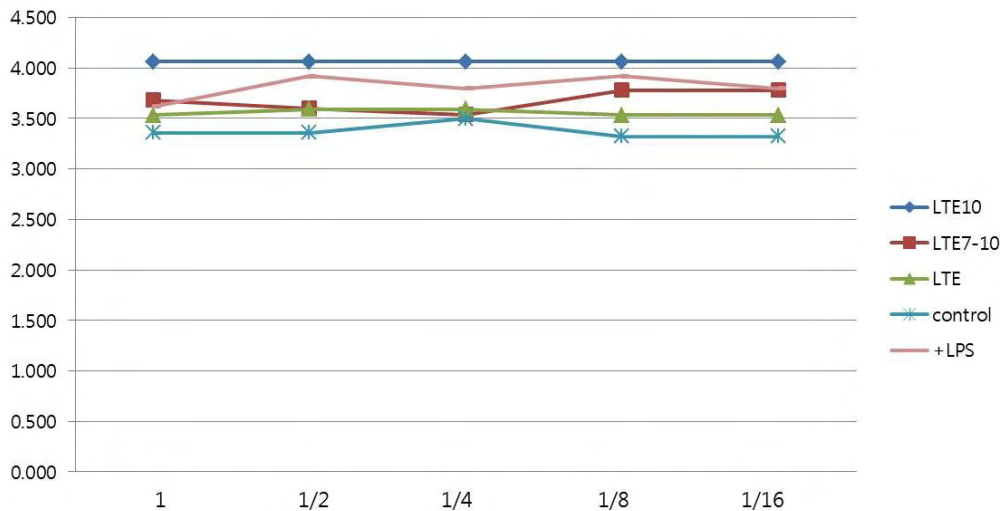
3) 목표

주관과제에서 옷나무 추출물 유래 후보물질의 혈행개선과 면역활성 효과를 규명하고, 이에 따른 근거를 분자적 수준에서 제공하고자 함.

2. 면역증강 유효성 평가의 방법 및 결과

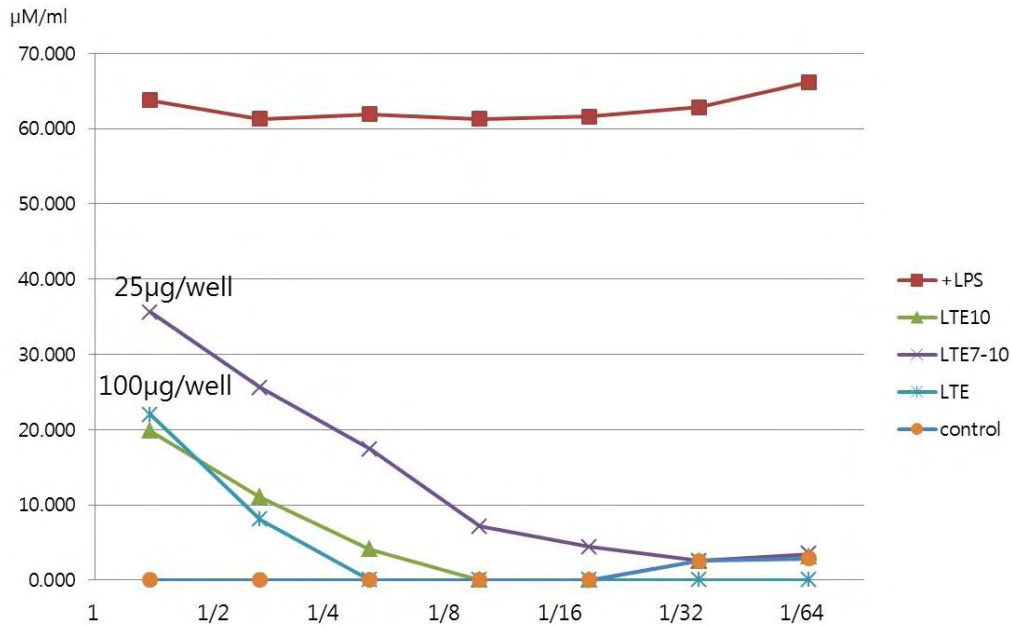
1) 면역활성 기능에 대한 유효성 평가 및 세포 내 작용기전 분석

- 옷나무 추출물(Detoxified Lacquer Tree Extract, DLTE)은 (주)에이지아이에서 공급한 옷나무 10년산(LTE10), 옷나무 7-10년산(LTE7-10) 및 옷나무 잔가지(LTE)에서 추출한 시료를 증류수에 10 mg/ml 농도로 녹여서 사용함
- 먼저 옷나무 추출물의 세포독성에 의한 세포 사멸 여부를 확인하기 위하여 생쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포에 위의 옷나무 추출액 시료를 25 μ g/well로 2배씩 희석하여 처리하고 24시간 배양한 후, MTT assay를 수행하였음
- CellTiter 96[®] AQuecus ONE Solution Assay Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 40 μ l/well씩 2시간 처리하고 490 nm에서 microplate reader (Thermo)를 이용하여 OD값을 측정하였음(그림 1)



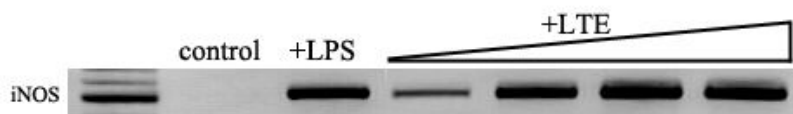
<그림 1> 옷나무 추출액에 의한 대식 세포의 세포 독성 분석(MTT assay)

- 위의 실험결과 옷나무 추출물 시료들은 세포에 대해 독성을 나타내지 않음을 확인하였음
- LTE10, LTE7-10 및 LTE의 상대적인 면역 활성 효과를 분석하기 위해 RAW264.7 세포에 각각의 시료를 처리한 후 대식세포 활성 시 분비되는 Nitric Oxide (NO)의 양을 측정하였음
- 이를 위하여 RAW264.7 세포를 96 well plate에 분주 후 배양하면서 옷나무 시료를 농도별로 희석하여 처리(LTE7-10 : 25 μ g/well, LTE10, LTE : 100 μ g/well, 2배씩 희석하여 처리)하고 24시간 배양하였음
- 배양세포의 상층액 50 μ l를 취하여 Griess reagent (sulfanilamide Solution 50 μ l 처리 후 10분, NED Solution 50 μ l 처리 후 10분, PROMEGA)와 실온에서 반응시키고 microplate reader(Thermo)를 이용하여 490 nm에서 NO의 양을 측정하였음
- 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군 (control)과 lipopolysaccharide (LPS)를 5 μ g/ml의 농도로 처리한 양성 대조군 (LPS)을 사용하였음



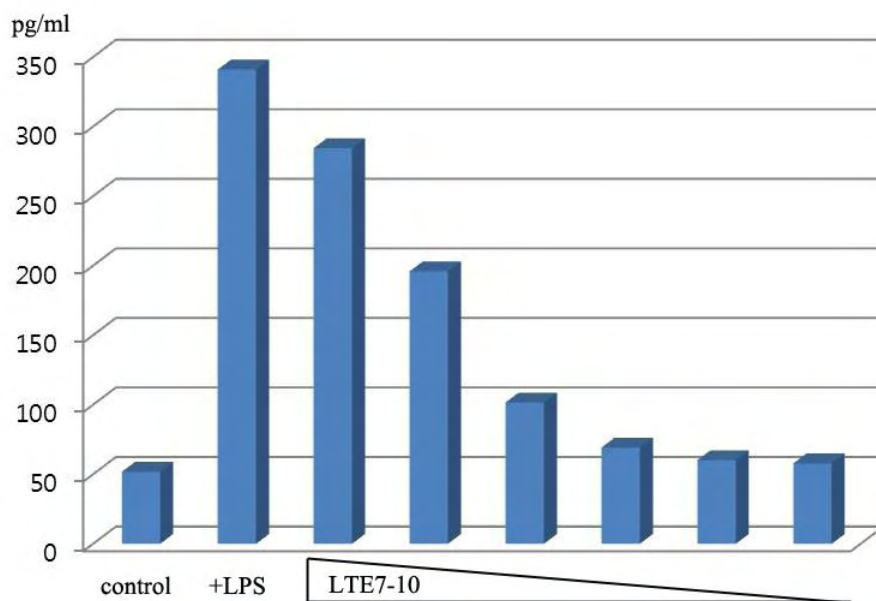
<그림 2> 율나무 추출액에 의한 대식 세포의 NO 생성능 분석

- 그림 2에서와 같이 LTE7-10을 25 - 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 세포주에서 유의할 만한 수준의 NO가 생성된 반면, LTE 및 LTE10의 경우는 100 - 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 효과가 나타났음
- 따라서 이후의 면역활성 효능평가 실험은 LTE7-10을 이용하여 수행하였음
- LTE7-10에 의한 NO 생성의 유도를 확인하기 위하여, 인터페론이나 TNF 등에 의해 유도되어 NO를 합성하는 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 유전자의 발현의 변화를 RT-PCR로 확인하였음 (그림 3)
- 이를 위하여 LTE7-10을 RAW264.7 세포에 25 $\mu\text{g/well}$ 농도를 시작으로 1/16까지 희석하여 처리 후 24시간 배양하여 각각의 세포를 회수하여 RNeasy[®] Plus Mini Kit(Qiagen)로 RNA를 추출하였음
- 추출된 RNA로부터 PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, iNOS 5'primer(CCC TTC GAA GTT TCT GGC AGC AGC) 및 iNOS 3'primer(GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G)로 20사이클, β -actin 5'primer(CAT GTT TGA GAC CTT CAA CAC CCC), β -actin 3'primer (GCC ATC TCC TGC TCG AAG TCT AG)로 30사이클 PCR (Bioneer)반응을 수행하여 전기영동 후 밴드를 확인하였음



<그림 3> RT-PCR. LET7-10 농도별 처리에 의한 iNOS의 발현 증가

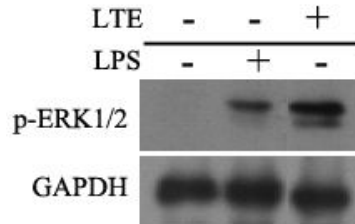
- 그림 3에서와 같이 iNOS의 발현은 처리한 LTE7-10의 농도에 비례하여 증가하였음
- 따라서 LTE는 대식세포를 자극하여 iNOS의 발현을 유도함으로써 NO의 분비를 증가시켰음
- 대식세포에서 분비되는 NO는 면역반응을 활성화시키는 다양한 사이토카인의 생성을 유도함
- 특히 IL-6은 면역세포인 T 세포 및 대식세포에서 분비되는 면역 조절자로 손상된 조직의 염증반응 및 항균작용을 나타내며, 혈구세포의 분화와 증식, 혈소판 생성, 근육의 수축 및 혈관 평활근의 작용 등에도 영향을 줌
- 따라서 LTE7-10 처리에 의해 유도되는 사이토카인 IL-6의 생성을 Mouse IL-6 ELISA Kit, pink-ONE (KOMA biotech)를 사용하여 조사하였음
- 이를 위하여 양성 대조군으로 LPS를 처리한 것과 LTE7-10을 단독으로 회석하여 처리한 후 배양 상층액을 분석한 결과 처리한 LTE에 농도 의존적으로 IL-6의 생성이 증가하는 것을 확인하였음 (그림 4)



<그림 4> LTE7-10처리에 의한 IL-6 사이토카인 생성 확인(ELISA)

- RAW264.7 세포에 LPS를 처리하면 ERK1/2의 인산화를 통해 iNOS의 발현이 유도된다는 보고가 있음
- 이를 바탕으로 LTE7-10 처리에 의해 ERK1/2의 인산화를 증가되는 지 여부를 분석하였음
- 이를 위해 RAW264.7 세포에 LTE7-10을 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양 후 세포를 회수하여 CytoBuster™ Protein Extraction Reagent(Novagen)으로 단백질을 추출 후 면역블롯을 수행하였음
- 1차 항체는 rabbit anti-phospho ERK1/2 (1:1,000: Cell Signaling), 대조군으로 rabbit anti-GAPDH (1:3,000: Cell Signaling)으로 처리하였고, 2차 항체는 goat anti-rabbit IgG

HRP-conjugated (1:10,000: Rockland)를 처리하였음



<그림 5> LPS와 LTE7-10처리에 의한 ERK1/2의 인산화 영향

- 그림 5에서와 같이 LTE를 처리한 경우 LPS를 처리한 세포와 마찬가지로 ERK1/2의 인산화가 증가하는 것을 확인하였음
- 하지만 p38 MAPK의 인산화는 큰 변화가 없었음
- 이러한 현상은 LTE7-10 처리는 대식세포의 ERK1/2의 인산화를 통한 세포 내 신호 전달을 통해 NO 및 염증성 사이토카인의 분비를 촉진하고 이를 통해 면역활성이 증가한다는 것을 제시함

2) *In vivo* 생체 실험을 통한 옷나무 추출액의 면역활성 및 혈행 개선능 분석

- 실험동물과 시험물질의 투여
 - 실험동물은 6주령의 암컷 BALB/c 생쥐를 (주)오리엔트로부터 공급받아 한림대학교 실험동물 제2분소에서 7일간 사육, 순화 시킨 후 사용하였음
 - 사육실의 온도는 20.9-22.6℃, 상대습도는 50-55%, 조명주기 12시간(80:00 - 20:00)으로 조절하였고, 물과 식이는 자유 급여시켰음
 - 7일간 순화기간을 걸친 생쥐를 4개의 실험군으로 분리하여, 각 실험군은 2마리 생쥐로 구성함
 - LTE7-10을 각각 5-25 mg/kg body weight (B.W.)의 농도로, 14 일간 연속적으로 경구투여 하고, 대조군은 아무처리를 하지 않았음
 - 실험군은 각각 100 (5mg/kg : 100µg/20g), 250 (12.5 mg/kg : 250µg/20g), 500 (25 mg/kg : 500µg/20g, 두당 평균 20g)으로 처리 하였음
- 2주간 경구투여 한 생쥐의 눈에서 혈액을 채취한 후, Blood analyzer (Hemavet 950, Drew scientific company, USA)를 이용하여 혈구세포의 구성비를 측정하였음
- 혈구 내 leukocytes의 구성 비율은 표 1에, erythrocytes의 구성 비율은 표 2에 나타내었음

<표 1> 혈구 내 Leukocytes 조성 비율

	(Units)	Normal range	Control	100	250	500
WBC	(K/ μ l)	1.8 - 10.7	8.04	4.89	6.95	5.37
NE	(K/ μ l)	0.1 - 2.4	0.95	1.25	2.05	1.45
LY	(K/ μ l)	0.9 - 9.3	5.46	3.43	4.08	3.50
MO	(K/ μ l)	0.0 - 0.4	1.53	0.14	0.65	0.38
EO	(K/ μ l)	0.0 - 0.2	0.09	0.05	0.12	0.04
BA	(K/ μ l)	0.0 - 0.2	0.02	0.03	0.06	0.01
NRBC	(K/ μ l)	RARE	-			

WBC (white blood cell, 백혈구), NE (neutrophil, 호중구), LY (lymphocyte, 림프구), MO (monocyte, 단핵구), EO (eosinophil, 호산구), BA(basophil, 호염구)

- 전체적인 Leukocyte의 조성비는 대체적으로 정상적인 범위에 속했으나, 대조군에 비해 백혈구의 수가 14 - 39 % 감소되어 있었으며 림프구도 비슷한 수준으로 감소하는 경향을 보였으나, 호중구의 비율은 증가되어 나타났음
- 대식세포의 전구세포인 단핵구는 대조군에 비해 시료를 주입한 실험군 모두에서 그 수치가 낮아진 것을 확인할 수 있었지만, 대조군이 정상범위보다 높은 수치를 나타내고 있으므로 명확한 결론을 내릴 수 없었음
- 이 실험은 각 그룹의 생쥐의 수 및 대조군 실험의 보완을 통해 추후 다시 분석할 것임

<표 2> 혈구 내 Erythrocytes 조성 비율

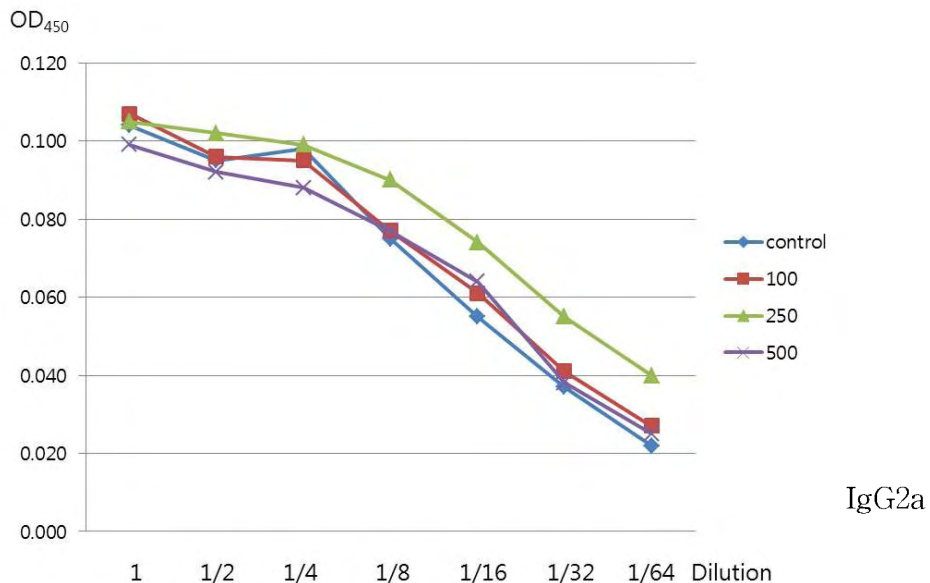
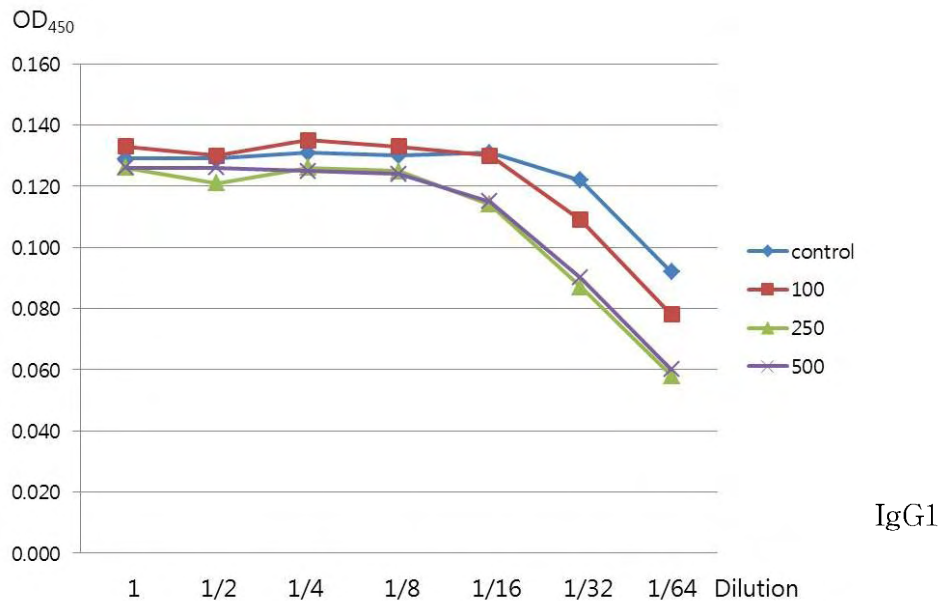
	(Units)	Normal range	Control	100	250	500
RBC	(M/ μ l)	6.36 - 9.42	13.94	12.46	11.97	11.30
Hb	(g/dL)	11.0 - 15.1	19.80	18.20	18.65	16.65
HCT	(%)	35.1 - 45.4	83.10	63.60	61.80	59.65
MCV	(fL)	45.4 - 60.3	59.60	51.05	51.60	52.95
MCH	(pg)	14.1 - 19.3	14.20	14.60	15.55	14.75
MCHC	(g/dL)	30.2 - 34.2	23.80	28.60	30.20	27.95
RDW	(%)	12.4 - 27.0	27.00	19.70	19.85	18.60

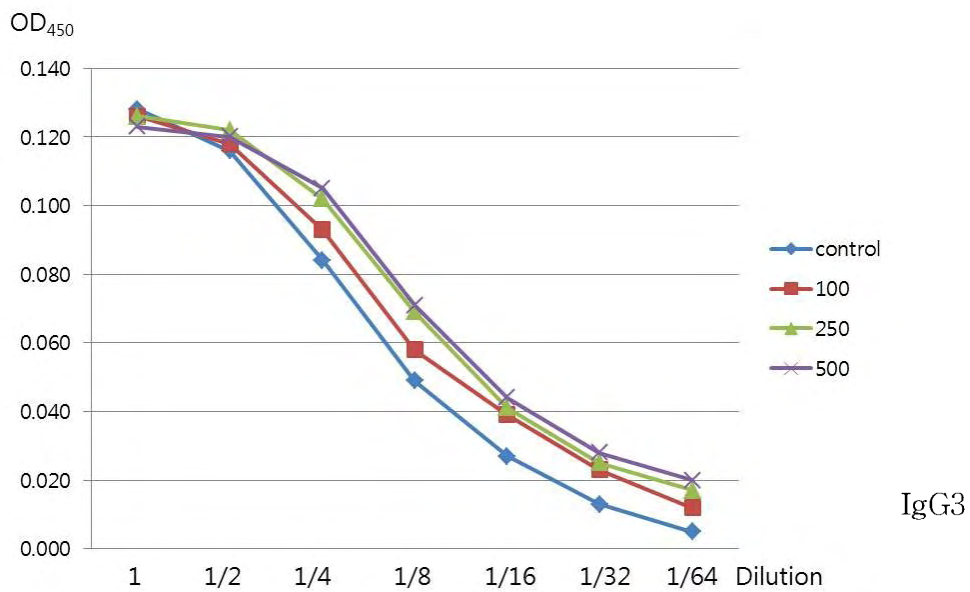
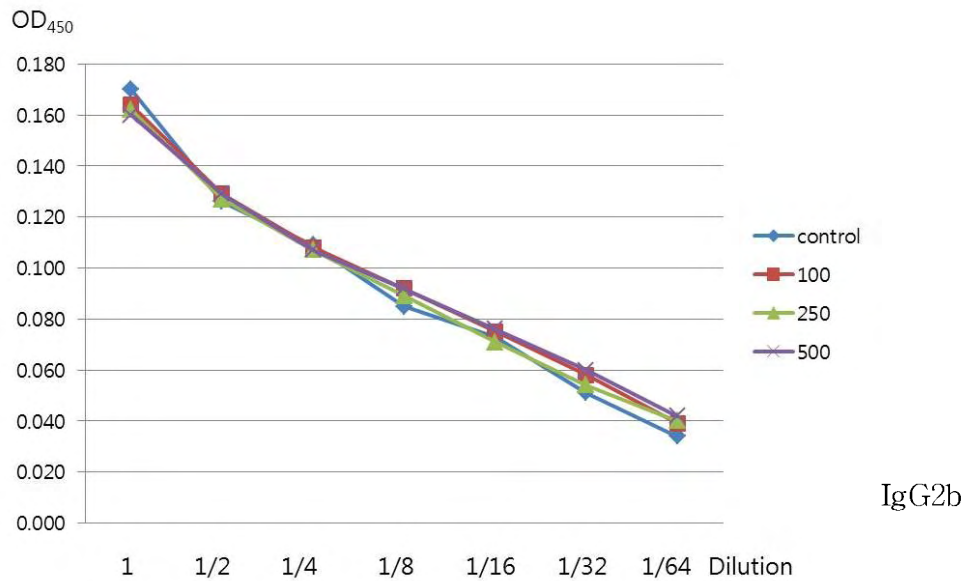
RBC (red blood cell, 적혈구), Hb (hemoglobin, 헤모글로빈), HCT (hematocrit, 혈중 적혈구 비율), MCV (mean corpuscular volume, 평균 적혈구 용적), MCH (mean corpuscular Hb, 평균 헤모글로빈 함유량), MCHC (mean corpuscular Hb concentration, 평균 헤모글로빈 농도), RDW (red blood cell distribution width, 적혈구 크기 분포폭)

- Erythrocyte의 조성 비율은 적혈구와 헤모글로빈, 혈중 적혈구 비율 등이 대조군 및 실험군 모두에서 정상범위보다 높게 나타났으나, 시료를 주입한 실험군 모두에서 대조군에 비해 수치가 낮아진 것을 확인할 수 있었음
- 한편, 대조군 및 시료 투여에 따른 실험동물 체내의 혈청 면역글로불린 아집단 (IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)의 변화를 ELISA로 조사하였음
- 이를 위하여 채혈한 혈액을 상온에서 1시간 동안 반응 시킨 후 4°C에서 15시간 반응하여 혈구세포를 응집시킨 후, 원심분리하여 상층의 혈청을 얻은 후 Mouse IgG ELISA

Quantitation Set(Bethyl Laboratories)로 ELISA를 통해 분석하였음 (그림 6)

- 실험결과, 면역글로불린 아집단의 구성비는 대조군과 비교하여 IgG1이 감소하고 IgG2a 및 IgG3가 약간 증가하는 경향을 보였으나, IgG2b는 변화가 없었음
- IgG2a의 증가는 바이러스 감염이나 암세포의 살상에 관여하는 대식세포 및 NK 세포 등을 활성화시키는 Th1 세포의 활성화와 관련이 있으므로 이러한 변화는 주목할 필요가 있음
- 특히, Th2와 관련이 있는 IgG1이 감소하는 것으로 보아, 전체적으로 Th2 대비 Th1의 증가를 통한 세포매개성 면역반응을 유도할 것으로 기대됨
- 하지만 이러한 변화가 실제 항체의 구성비나 면역체계의 변화를 유의할 수준으로 유도하였는지에 대해서는 추후 더 많은 실험과 자료를 분석하여야 할 것으로 여겨짐

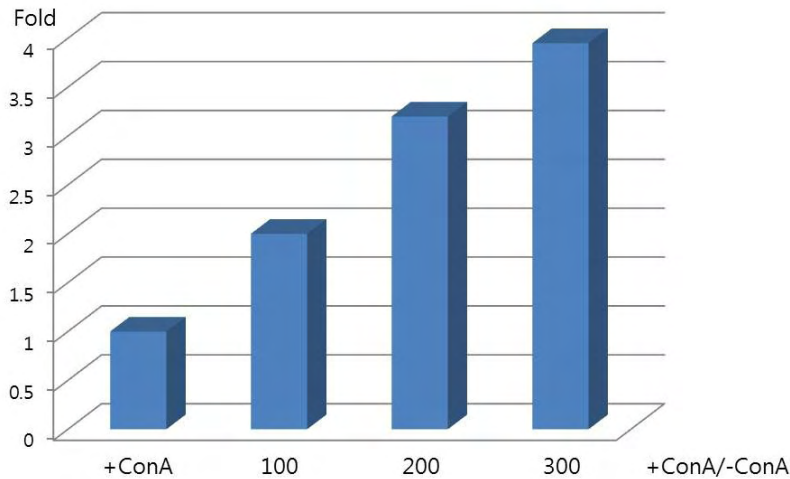




<그림 6> 면역글로불린 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 아집단 변화

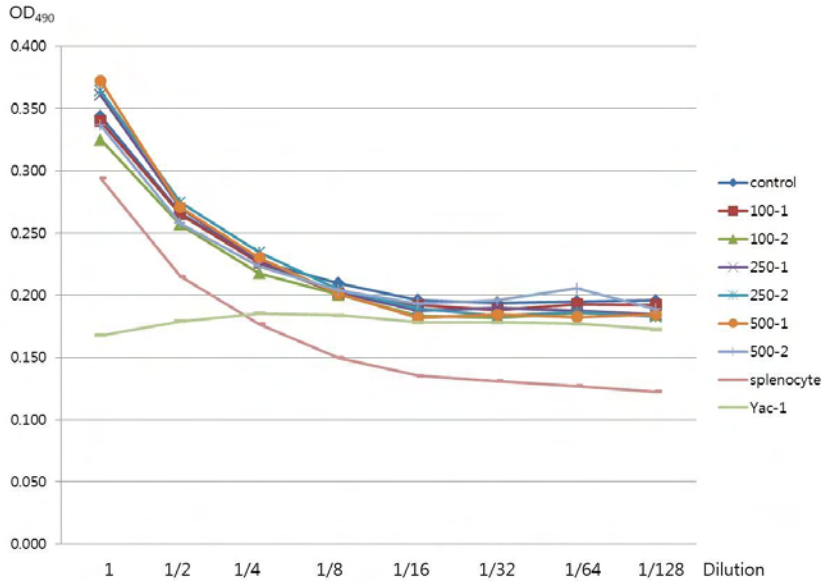
- 옷나무 추출액을 섭취한 생쥐의 면역 활성을 분석하기 위하여, 비장세포 (splenocyte)의 증식능 및 활성과 복강 대식세포의 암세포 살해능을 조사하였음
- 비장 세포의 분리:
 - 실험동물을 경추탈구 하여 비장을 적출하였음
 - 비장은 PBS내에서 분쇄하여 단일세포로 만들고 4°C, 1,500 rpm에서 5분간 원심침전 후 RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA)로 적혈구를 제거하였음
 - 원심분리후 얻은 비장세포는 RPMI 1640 (1% FBS) 배지에 현탁하여 Scepter Handheld Automated Cell Counter (Millipore)로 계수하였음

- 비장 세포의 증식능을 측정하기 위하여, 분리한 비장세포를 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주한 후, concanavalin A (ConA, 2.5 mg/ml)를 첨가한 RPMI1640 (10% FBS) 배지에 48시간 동안 배양하였음
- 각 well에 CellTiter 96[®] AQuecus ONE Solution Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) 용액을 $40 \mu\text{l}$ /well씩 첨가하여 2시간 동안 추가배양 후, Microplate reader (Thermo, CA, USA)로 490 nm에서 O.D. 값을 측정하여 비장세포의 증식능을 측정하였음 (그림 7)



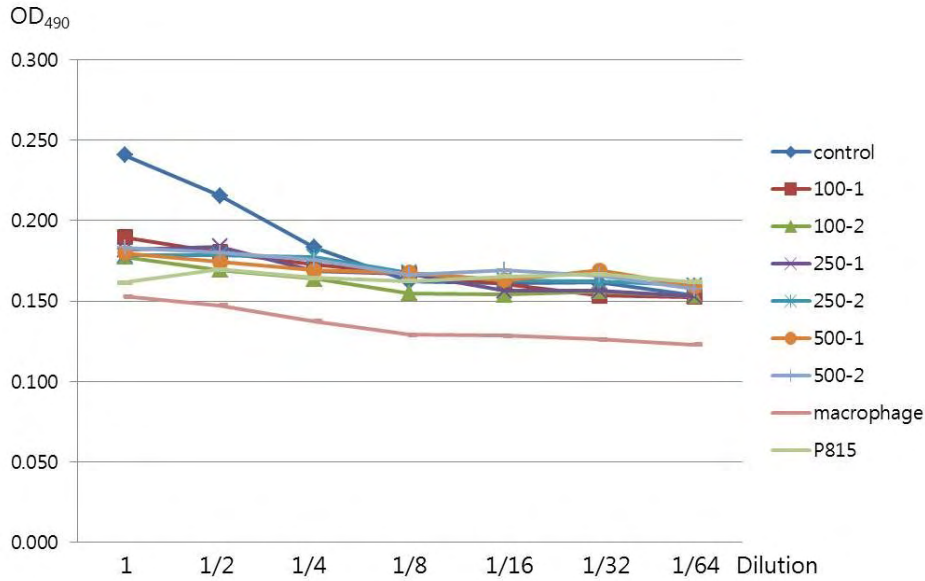
<그림 7> ConA 처리에 대한 100, 250 및 500의 비장세포의 증식능 (MTT) (ConA를 처리한 대조군 - ConA를 처리하지 않은 대조군)/ConA를 처리하지 않은 대조군에 대한 각 시료 처리군의 상대 값을 나타내었음

- 실험군 (100: 5mg/kg, 250: 12.5mg/kg, 500: 25mg/kg)의 비장에서 분리한 비장세포의 ConA 처리에 의한 증식능을 확인한 결과, 100, 250 및 500 실험군에서 대조군에 비해 증식능이 각각 2배, 3.2배 및 3.9배 증가되었음
- 한편, 비장세포의 표적세포의 살해능을 측정을 위하여 비장의 림프구를 RPMI 1640 (1% FBS)에 현탁시켜 작동세포(effector cell)로 사용하였음
- 표적세포로는 YAC-1 세포를 이용하여 작동세포와 표적세포를 25:1의 비율로 96 well round bottom plate에 분주하고 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 비장세포 활성을 LDH Cytotoxicity Detection Kit(Takara)로 측정하여 확인하였음 (그림 8)



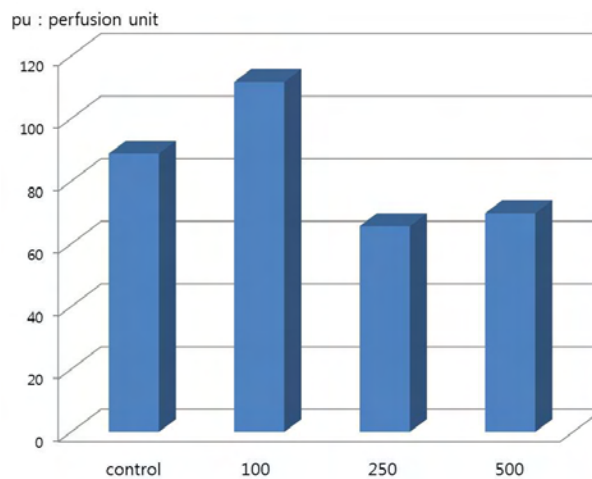
<그림 8> 비장세포에 의한 YAC-1 암세포의 세포 살해율. 대조군, 실험군(100-1, 100-2, 250-1, 250-2, 500-1, 500-2)은 YAC-1과 동시 배양, 비장세포와 YAC-1은 단독 처리군임

- 그림 8에서와 같이 전체적으로 실험군과 대조군의 세포 살해율 정도의 차이가 없었으나, 컨트롤로 사용한 비장립프구(작동세포)의 LDH 값이 높은 것으로 보아 비장세포 자체의 배양 조건이 안 맞았을 가능성이 있음
- 따라서 이 실험은 2차년도에 다시 수행 할 예정임
- 한편 대식세포의 활성을 조사하기 위하여 옷나무 추출물을 섭취한 생쥐의 복강으로부터 다음의 방법으로 대식세포를 분리하고 배양하였음
 - 실험동물을 경추탈구 하여 복강에 0.34M sucrose 용액 10ml을 주사기를 이용하여 넣고 다시 주사기를 이용하여 대식세포가 포함된 용액을 회수하였음
 - 회수된 복강 대식세포는 얼음에 보관하고 4°C DMEM (serum free)배지를 1:1로 섞어준 다음 1,500rpm에서 5분간 원심분리하였음
 - 원심분리후 배지를 제거하고 DMEM(1% FBS)에 현탁하여 Scepter Handheld Automated Cell Counter(Millipore)로 계수하였음
- 복강 대식세포의 세포살해율 분석을 위하여, 생쥐에서 분리한 복강 대식세포를 DMEM(1% FBS)배지로 24시간 배양 후 표적세포인 P815 세포와 18시간 혼합 배양(복강대식세포 : P815 = 25 : 1)한 후, 배지 내로 유출된 LDH를 LDH Cytotoxicity Detection Kit(Takara)로 측정하여 복강 대식세포의 암세포 살해율을 측정하였음 (그림 9)



<그림 9> 복강 대식세포에 의한 P815 암세포의 세포 살해율. 대조군, 실험군(100-1, 100-2, 250-1, 250-2, 500-1, 500-2)은 P815와 동시 배양, macrophage와 P815는 단독 처리 군임

- 그림 9에서와 같이 복강 대식세포의 암세포 살해능도 비장세포의 경우와 같이 전체적으로 실험군의 세포살해율은 대조군에 비해 차이가 없거나 오히려 낮았으나 유의할 수준은 아니었음
- 옷나무 추출액을 먹인 생쥐의 혈행 개선 효과를 분석하기 위하여 혈류량을 측정하였음 (그림 10)



<그림 10> 혈류량 측정. 실험군 (100: 5mg/kg; 250: 12.5mg/kg; 500: 25mg/kg) control: non-treated.

- 14일간 경구투여 후 각각의 생쥐를 고정하고 Skin Probe Laser Doppler Flowmeter MP2 (Moor Instruments)를 이용하여 혈류량을 측정하였음
- 그림 10에서와 같이 실험군 100 에서 약 25%의 혈류량이 증가되었으나, 250 및 500 군에서

는 오히려 각각 -26% 및 -21% 감소하였음)

- 하지만 이 실험은 생쥐의 상태 및 각 실험군의 개체별 변이가 심할 가능성이 많으므로, 통계적 유의성을 갖기 위해서는 향후 각 실험군의 개체수를 늘리고, 실험군의 개체 간 변이가 적은 개체를 선별해서 실험을 하고 실험 자체의 수도 늘려야 할 것으로 사료됨
- 따라서 2차년도에는 위의 실험을 보강하여 각 실험군의 개체별 변이의 폭을 줄이기 위해 우선 각 실험군에서 10마리 이상의 생쥐 중 혈류량의 변이 차이가 적은 생쥐를 선별하여 실험할 예정임

제3절. 유효물질의 생체 작용기전 규명

I. 윗나무 추출물(DLTE)의 유효성 평가 및 생체 작용기전 규명

1. 실험 재료 및 방법

- 세포주, 실험동물 및 시료
 - 실험에 사용한 생쥐의 대식세포주, RAW264.7 및 비만세포주, P815는 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 림프구인 YAC-1 세포주 및 생쥐에서 추출한 림프구 세포와 CD11c 수지상 세포는 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.
 - 실험동물은 6주령의 암컷 BALB/c 생쥐를 (주)오리엔트로부터 공급받아 한림대학교 실험동물 제2분소에서 7일간 사육, 순화 시킨 후 사용하였다.
 - 사이토카인 IL-12-YFP 형질전환 생쥐(Yet40)는 세종대학교 홍석만 교수팀에서 공급받았다.
 - 사육실의 온도는 20.9 - 22.6°C, 상대습도는 50-55%, 조명주기 12시간(8:00 - 20:00)으로 조절하였고, 물과 식이는 자유 급여하였다.
 - 고지방사료식이(High-fat diet-fed, HFD) 군의 식이는 OpenSource diets #D12492(Rodent Diet with 60kcal% Fat, Research Diets Inc.)을 3주 또는 10주간 자유 급여 하였다.
 - 7일간 순화기간을 걸친 생쥐를 4개의 실험군(대조군, DLTE 투여군, 고지방식이군 및 고지방식이+DLTE 투여군)으로 나누고, 각 실험군은 5마리 생쥐로 구성하였다.
 - 무독성 윗나무 추출물(Detoxified Lacquer Tree Extract, DLTE)은 (주)에이지아이에서 공급한 7-10년산 윗나무 줄기에서 물-추출한 시료를 증류수에 10 mg/ml 농도로 녹여서 사용하였다.
 - DLTE는 5-25 mg/kg body weight(B.W.)의 농도로, 각각 2주, 3주 및 10주간 연속적으로 매일 1회씩 위내투여 하고, 대조군은 아무처리를 하지 않았다.
- Nitric Oxide (NO) 생성능 분석
 - RAW264.7 세포에 DLTE를 처리한 후 대식세포 활성 시 분비되는 NO의 양을 측정하였다.
 - 96 well plate에 세포를 분주 후 배양하면서 DLTE를 농도별로 희석하여 처리하였으며, 대조군으로는 강력한 염증면역 유발물질인 lipopolysaccharide(LPS)를 5µg/ml의 농도로 처리하였다.
 - 24시간 배양후, 세포의 상층액 50µl를 취하여 Griess reagent(sulfanilamide Solution 50µl 처리 후 10분, NED Solution 50µl 처리 후 10분, PROMEGA)와 실온에서 반응시키고 microplate reader(Thermo)를 이용하여 490 nm에서 분비된 NO의 양을 측정하였다.
- RT-PCR
 - Inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2) 유전자 발현의 변화를 조사하기 위하여, 대조군 및 DLTE 처리 세포에서 RNA를 추출한 후 역전사를 수행

하여 cDNA를 합성하고, 이들에 대해 각각 iNOS; 5'-CCCTTCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' 및 5'-GGCTGTCAGAGCCTC GTGGCTTTGG-3', COX-2; 5'-GGAGAGACTATCAAGATAGT-3' 및 5'-ATGGTCAGTAGACTTTTACA-3'의 프라이머를 이용하여 PCR을 통한 유전자 증폭을 하였다.

- 대조군으로는 β -actin 유전자 산물의 양을 5'-CATGTTTGAGACCTTCAAC ACCCC-3' 및 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG-3'의 프라이머를 이용하여 정량하였다.
- 증폭 단계의 PCR 산물은 아가로즈 겔에서 전기영동하여 양을 확인 하였다.

● 사이토카인 및 프로스타글란딘 양의 정량

- DLTE 처리에 의해 유도되는 사이토카인 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 와 프로스타글란딘 E2(PGE2)의 생성을 각각 Mouse IL-6 ELISA Kit, pink-ONE (KOMA biotech), Mouse IL-1 beta ELISA Kit, pink-ONE (KOMA biotech), Mouse TNF- α ELISA Kit, pink-ONE (KOMA biotech)와 PGE₂ ELISA Kit (Thermo Scientific)를 사용하여 조사하였다.

● 단백질의 인산화 측정

- 세포 신호전달과정의 단백질의 인산화 측정을 위하여, RAW264.7 세포에 DLTE를 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양 후 세포를 회수하여 CytoBusterTM Protein Extraction Reagent(Novagen)으로 단백질을 추출 후 면역블롯을 수행하였다.
- 1차 항체는 rabbit anti-phospho ERK1/2 (1:1,000: Cell Signaling)과 anti-phospho-ATF, 대조군으로는 anti-bactin을 처리하였고, 2차 항체로는 goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated (1:10,000: Rockland)를 처리하였다.
- ERK 신호전달과정의 inhibitor인 PD98059는 최종 농도 20nM로 처리하였다.

● 항-혈전능 측정

- 항-응고제인 2.2% sodium citrate 1 ml을 포함하는 15 ml tube 에 흰쥐(SD rat, 7주령 female)에서 추출한 혈액을 9 ml 넣고 섞어준 후 5 ml씩 두 tube로 나누었다.
- 상온에서 1,000 rpm으로 원심분리하여 혈소판풍부 혈장(Platelet Rich Plasma, PRP)을 얻거나, 2,500 rpm으로 원심분리하여 혈소판을 포함하지 않는 혈(Platelet Poor Plasma, PPP)을 얻었다.
- 각 혈장에 DLTE를 1/100의 비율로 첨가하고 96well plate(U-형)에 분주 후 37°C에서 30초간 반응 시킨 후, 응집원을 5 μ l 첨가하고 3분간 반응을 aggregometer(Chrono-log, 490-2D)를 이용하여 측정하였다.
- 응집원으로는 콜라겐을 2 μ g/ml의 농도로 처리하였으며, 대조 약물로 아스피린을 0.25-1 mM로 첨가하였다.

● 혈소판 응집능 변화 분석

- DLTE를 0.5mg/kg/day로 10주간 위내 투여한 SD Rat의 전혈을 채혈하여 PRP를 분리하여 전문업체에 의뢰하여 aPTT와 PT를 측정하였다.

- 혈구 세포 및 혈청 면역글로불린의 구성비 측정
 - 생쥐의 눈에서 혈액을 채취한 후, Blood analyzer(Hemavet 950, Drew scientific company, USA)를 이용하여 혈구세포의 구성비를 측정하였다.
 - 채혈한 혈액을 상온에서 1시간 동안 반응 시킨 후 4℃에서 15시간 반응하여 혈구세포를 응집시킨 후, 원심분리하여 상층의 혈청을 얻었다.
 - 혈청 면역글로불린 아집단(IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)의 변화는 Mouse IgG ELISA Quantitation Set(Bethyl Laboratories)를 통해 조사하였다.

- 비장 림프구세포(splenocyte)의 증식능 및 활성 분석
 - 실험동물을 경추탈구 하여 비장을 적출한 후, PBS내에서 분쇄하여 단일세포로 만들고 4℃, 1,500 rpm에서 5분간 원심침전 후 RBC lysis buffer(eBIOSCIENCE, San Diego, CA, USA)로 적혈구를 제거하였다.
 - 원심분리 후 얻은 세포는 RPMI 1640(1% FBS) 배지에 현탁하여 Scepter Handheld Automated Cell Counter (Millipore)로 계수하였다.
 - 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주한 후, concanavalin A(ConA, 2.5 mg/ml)를 첨가한 RPMI1640(10% FBS) 배지에 48시간 동안 배양하였다.
 - 각 well에 CellTiter 96[®] AQuecus ONE Solution Assay Kit(Promega, Madison, WI, USA) 용액을 40 μ l/well씩 첨가하여 2시간 동안 추가배양 후, Microplate reader(Thermo, CA, USA)로 490 nm에서 O.D. 값을 측정하여 비장세포의 증식능을 측정하였다.
 - 표적세포의 살해능을 측정하기 위하여 비장의 림프구를 RPMI 1640(1% FBS)에 현탁시켜 작동세포(effector cell)로 사용하였다.
 - 표적세포로는 YAC-1 세포를 이용하여 작동세포와 표적세포를 25:1의 비율로 96 well round bottom plate에 분주하고 37℃에서 4시간 동안 배양한 후 비장세포 활성을 LDHCytotoxicity Detection Kit(Takara)로 측정하여 확인하였다.

- 복강 대식세포의 암세포 살해능 분석
 - 실험동물을 경추탈구 하여 복강에 0.34M sucrose 용액 10ml을 주사기를 이용하여 넣고 다시 주사기를 이용하여 대식세포가 포함된 용액을 회수하였다.
 - 회수된 복강 대식세포는 얼음에 보관하고 4℃ DMEM(serum free)배지를 1:1로 섞어준 다음 1,500rpm에서 5분간 원심분리하였다.
 - 원심분리후 배지를 제거하고 DMEM(1% FBS)에 현탁하여 Scepter Handheld Automated Cell Counter(Millipore)로 계수하였다.
 - 세포를 DMEM(1% FBS)배지로 24시간 배양 후 표적세포인 P815 세포와 18시간 혼합 배양(복강대식세포 : P815 = 25 : 1)한 후, 배지 내로 유출된 LDH를 LDH Cytotoxicity Detection Kit(Takara)로 측정하여 복강 대식세포의 암세포 살해능을 측정하였다.

- IL-12p40 프로모터-YFP 발현 분석
 - IL-12p40 프로모터-YFP를 발현하는 형질전환 생쥐(Yet40 B6)의 비장에서 유래한 수지상 세포(CD11c+ 세포)를 MACS를 이용하여 분리하여 96 well plate에 분주하였다.
 - 옷나무 추출액을 62.5-500 μ g/ml의 농도를 처리하고 18시간 배양한 후, CD11c 항체로 염

색하고 FACS를 이용하여 YFP+ 세포를 분석하였다.

- 혈류변화량의 측정

- 시료 투여 3주 후에 각 실험군의 혈류변화량을 Skin Probe Laser Doppler Flowmeter MP2(Moor Instruments)를 이용하여 확인하였다.
- 혈류변화량은 생쥐를 고정하고 단위시간(0.02s) 당 피하 1mm 깊이에서 780nm의 파장의 레이저가 지나가는 적혈구의 수를 측정된 값(perfusion unit, PU)으로 나타내었다.

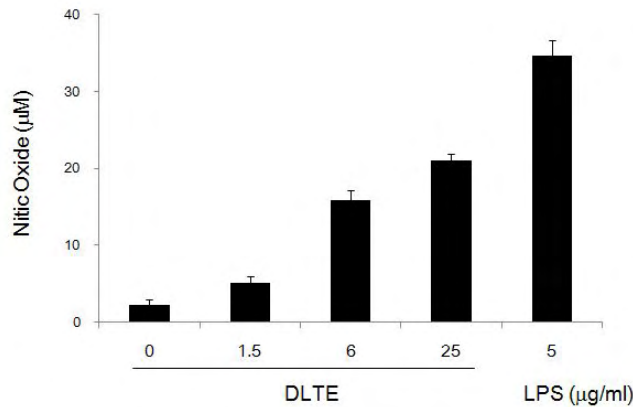
- 통계학적 분석

- 모든 실험의 통계적 유의성 여부는 Microsoft사의 Excel 2007 *t* test 프로그램을 이용하여 분석하였다.
- *P* values를 계산하여 $P < 0.01$ 및 $P < 0.05$ 를 통계적으로 유의성 있다고 간주하였다.

2. 실험 결과 및 고찰

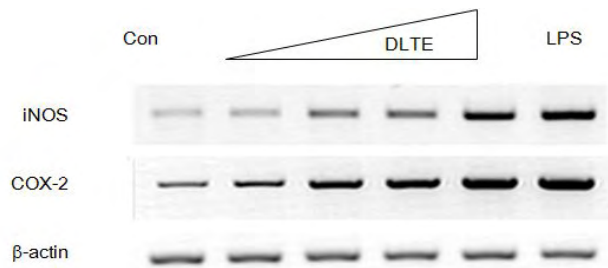
1) DLTE 투여에 의한 대식세포의 NO 생성 변화

- RAW264.7 세포에 DLTE를 처리한 후 대식세포 활성화 시 분비되는 염증 유발 유도성 일산화 질소(nitric oxide, NO)의 양을 측정된 결과 농도 의존적으로 NO의 생성이 증가하는 것을 확인하였다(그림 1).



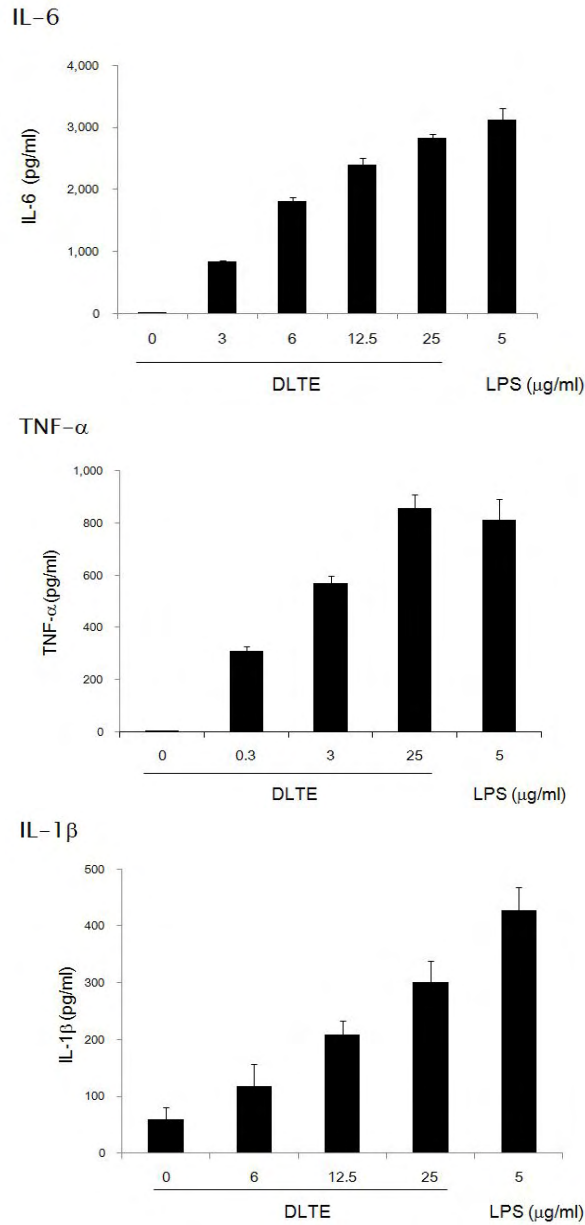
<그림 1> DLTE 처리에 의한 NO 생성량 변화. RAW264.7 세포에 DLTE를 각각 10, 5, 25 µg/ml의 농도로 24시간 처리 후, 생성되는 NO의 양을 ELISA로 분석하였다. 대조군으로는 LPS를 5 µg/ml 처리하였다.

- 이와 더불어, NO 합성 효소인 nitric oxide synthase(iNOS)의 양과 다른 염증성 인자인 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현도 증가하였다(그림 2).



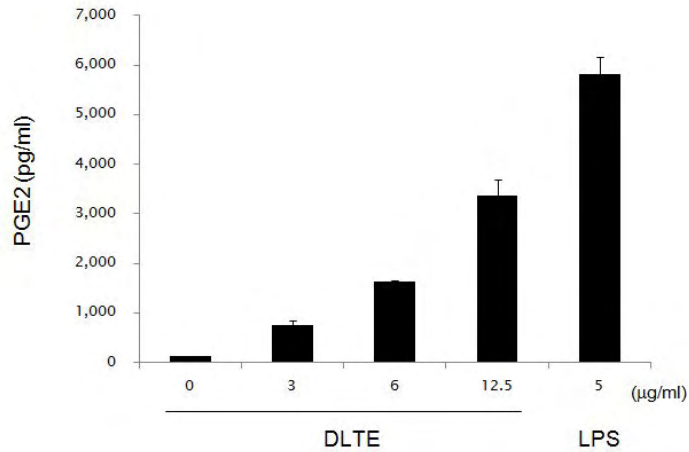
<그림 2> DLTE 처리에 의한 iNOS 및 COX-2 유전자의 발현 변화. DLTE의 농도 증가에 따라 단백질 발현이 증가하였다. 각 유전자 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR로 확인하였다.

- 염증 반응 유도 사이토카인인 IL-6, IL-1β 및 TNFα의 생성도 DLTE의 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(그림3)



<그림 3> DLTE 처리에 의한 염증성 사이토카인의 생성 변화. DLTE의 농도 증가에 따라 사이토카인, IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 발현이 증가하였다.

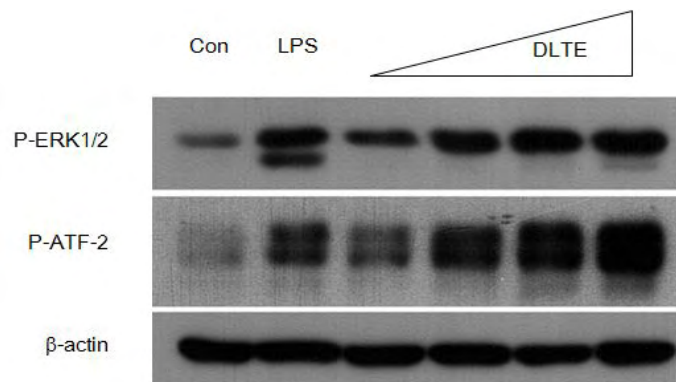
- 또한 Cox-2의 발현에 의해 유도되는 것으로 알려진 프로스타글란딘 E2(PGE2)의 생성이 증가되는 것도 확인하였다(그림 4).
- 이러한 결과들을 종합해 보면 DLTE은 강력한 pro-inflammation의 유도인자로 작동하며, DLTE 처리에 의한 대식세포의 활성이 염증과 관련된 전반적인 세포매개성 면역반응을 활성화 시킬 가능성을 강력히 시사한다.



<그림 4> DLTE 처리에 의한 프로스타글란딘 E2(PGE2)의 생성변화. DLTE의 농도 증가에 따라 PGE2의 양이 증가하였다.

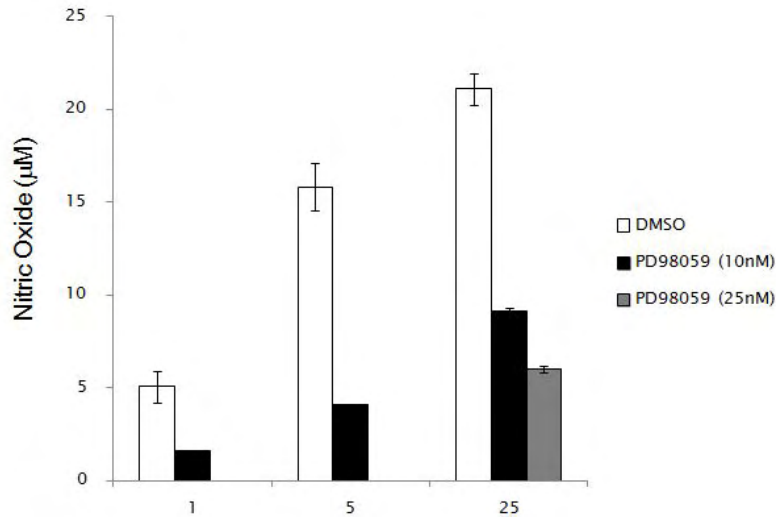
2) ERK 신호전달을 통한 염증성 사이토카인의 발현 조절

- 염증성 사이토 카인 및 NO 생성의 상위 단계의 조절을 확인하기 위하여 세포 신호 전달 계의 MAP 인산화 효소의 활성을 조사하였다.
- 그 결과 ERK1/2 의 인산화가 DLTE 처리에 의해 증가하였고, 이와 더불어, ATF-2의 인산화도 증가하는 것을 확인하였다(그림 5).
- 반면, p38 인산화 효소의 활성은 큰 차이를 보이지 않거나 오히려 감소하는 경향을 나타 내었다.



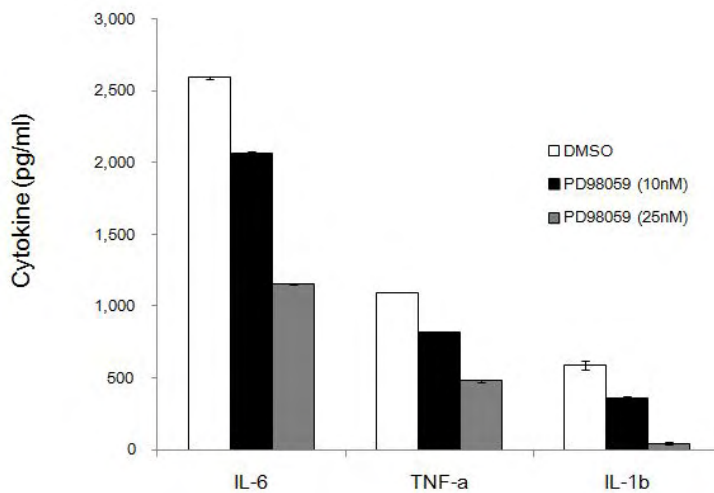
<그림 5> DLTE 처리에 의한 ERK1/2 및 ATF-2 단백질의 인산화.

- 이러한 ERK1/2의 인산화는 이 경로에 특이적 저해제인 PD98059에 의해 억제되었으며, 이로 인한 NO 생성량(그림 6)도 농도 의존적으로 감소하였다.



<그림 6> PD98059 처리에 의한 DLTE-유도 NO 생성의 억제. 20, 50nM의 PD98059를 DLTE와 함께 처리 한 후, NO 생성량을 ELISA로 확인하였다.

- 이러한 감소는 DLTE 처리에 의한 NO 생성이 ERK1/2 신호전달 경로에 의존한다는 것을 의미한다.
- 한편, PD98059 처리에 의한 염증성 사이토카인의 분비 변화를 조사한 결과, 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 7).



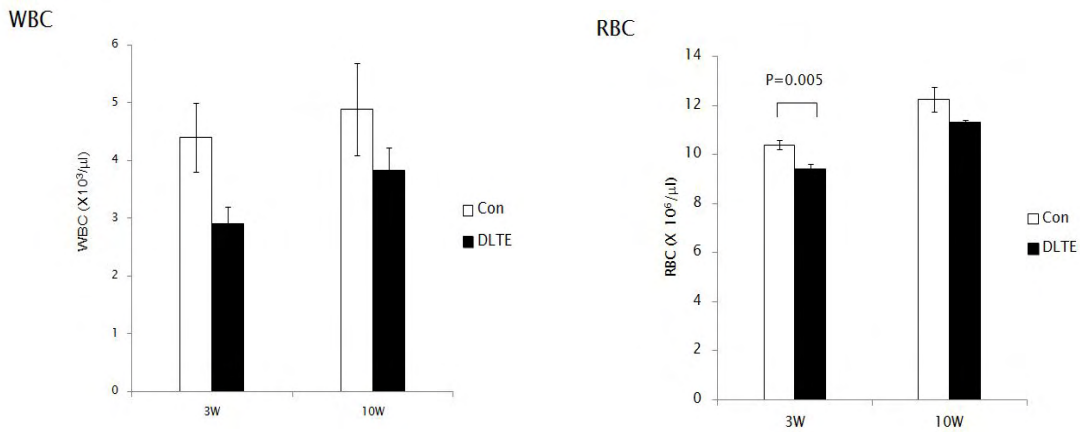
<그림 7> PD98059 처리에 의한 DLTE-유도 사이토카인 생성의 억제.

- 이상의 결과들은 DLTE가 ERK1/2 의존적 신호 전달경로를 통해 대식 세포의 활성화 이 로 인한 염증성 면역반응에 관여함을 강력히 시사한다.

3) DLTE를 먹인 생쥐의 면역 활성화 분석-I : 혈구 및 항체 서브타입 분석

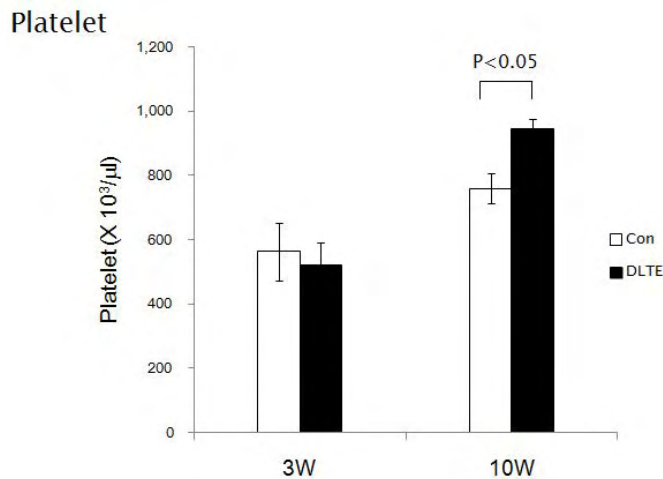
- DLTE를 5-25 mg/kg의 농도로 매일 3주 또는 10주간 위내 투여한 생쥐의 혈액을 채취 하여 혈액 내 혈구의 조성 및 혈청 내 항체의 서브타입을 분석하였다.
- 전반적으로 DLTE를 투여한 생쥐의 절대적인 백혈구 및 적혈구의 수가 감소하는 경향을

나타내었고(그림 8), 이러한 경향은 고농도의 DLTE를 투여한 경우 더 뚜렷하게 나타났다.



<그림 8> DLTE 섭취 후 생쥐의 혈구 변화. 3주 및 10주간 매일 5 mg/kg의 DLTE를 위내 투여한 생쥐의 백혈구 및 적혈구 수를 자동 혈구분석기로 측정하였다.

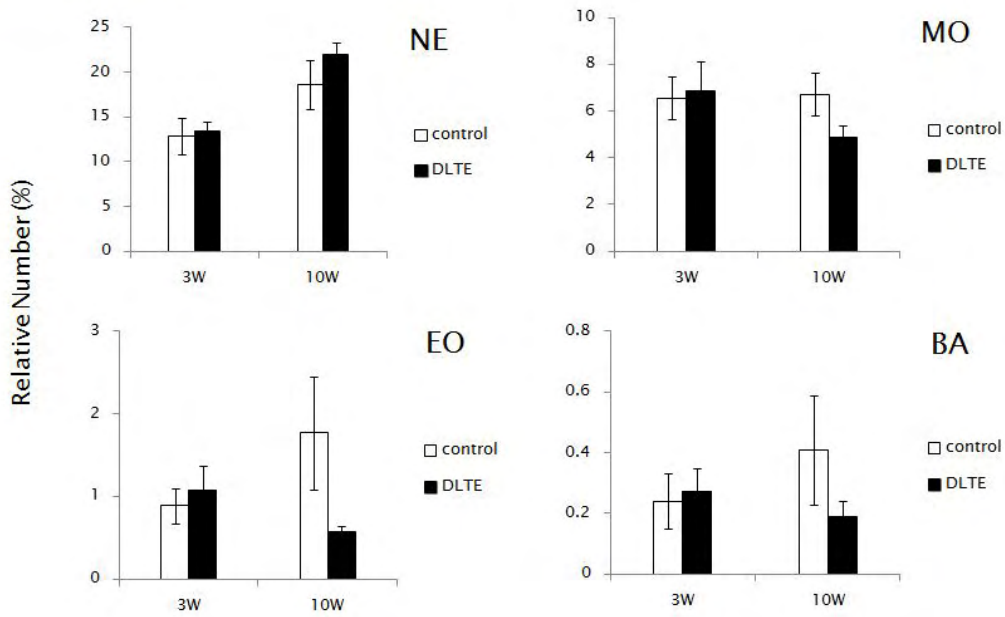
- 이에 비해, 혈소판의 수는 10주 섭취한 실험군에서 오히려 증가하여 나타났다(그림 9).



<그림 9> DLTE 섭취 후 생쥐의 혈소판 변화.

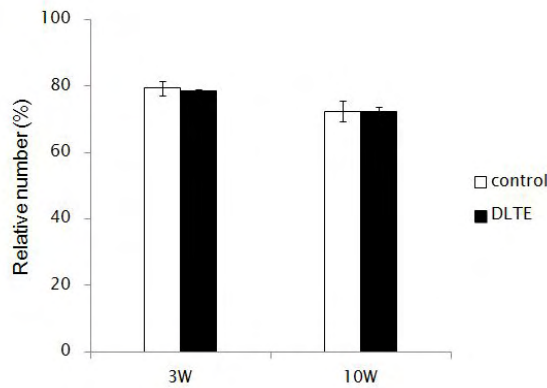
- 하지만 백혈구 내에서 전체적인 백혈구 세포들의 구성비는 통계적으로 유의할 수준의 변화를 보이지 않았다(그림 10, 11).

Non-lymphocyte



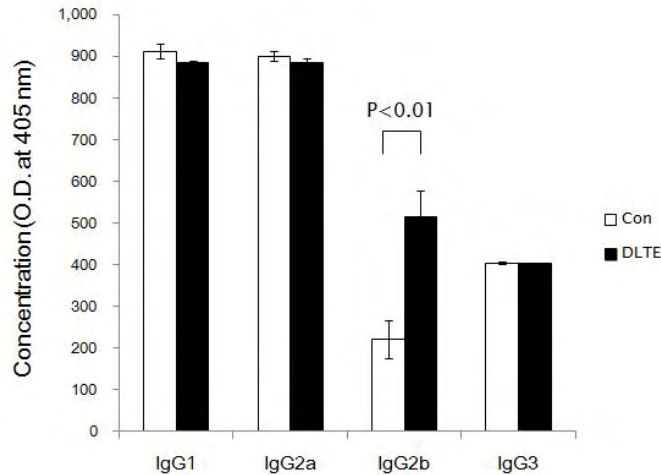
<그림 10> DLTE 섭취 후 생쥐의 백혈구 세포들의 구성비 변화. NE, 호중구(neutrophil); MO, 단핵구(monocyte); EO, 호산구(eosinophil); BA, 호염구(basophil).

Lymphocyte



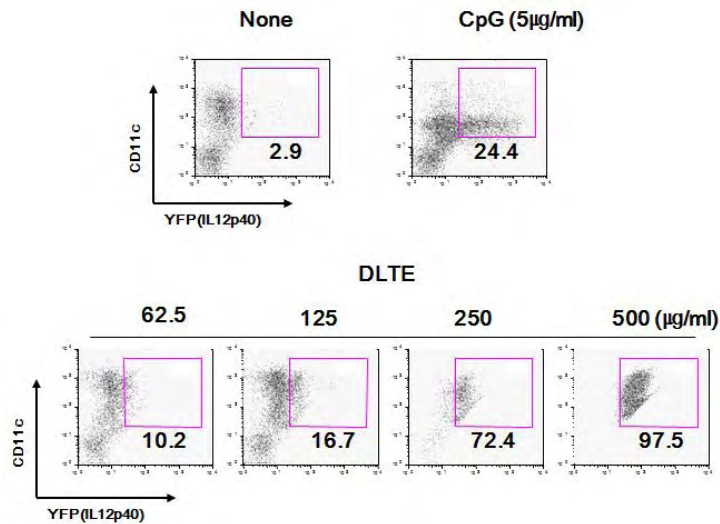
<그림 11> DLTE 섭취 후 생쥐의 림프구 구성의 변화.

- 한편, 대조군 및 시료 투여에 따른 실험동물 체내의 혈청 면역글로불린 아집단 (IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)의 변화를 ELISA로 조사하였다.
- 이 중, DLTE를 투여한 실험군에서 IgG2b의 증가가 관측되었다(그림 12).



<그림 12> DLTE 섭취 후 생쥐의 혈청내 면역글로불린 서브타입의 변화. IgG1, IgG2a 및 IgG2b는 $0.3\mu\text{l}$, IgG3는 $3\mu\text{l}$ 의 혈청을 사용하여, ELISA로 측정하였다.

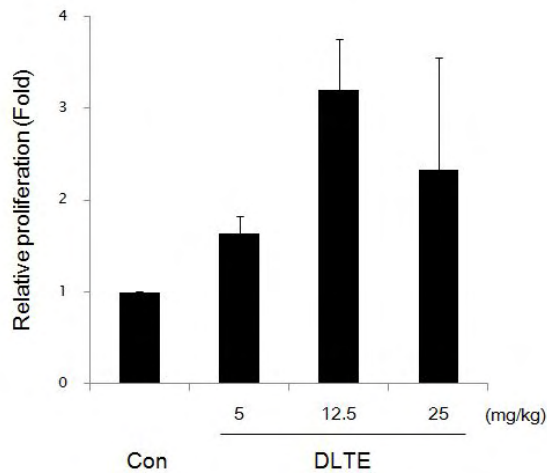
- IgG2b의 증가는 바이러스 감염이나 암세포의 살상에 관여하는 대식세포 및 NK 세포 등을 활성화시키는 Th1 세포의 활성화와 관련이 있으므로 이러한 변화는 주목할 가치가 있다.
- 또한, 통계적으로 유의하지는 않지만, 고농도(12.5 및 25 mg/kg)의 DLTE 투여 생쥐에서 IgG1는 감소하고, IgG2a 및 IgG3는 증가하는 경향을 관찰하였다.
- 이러한 경향성은 전체적으로 Th2 대비 Th1의 증가를 통한 세포매개성 면역반응을 유도할 것으로 기대한다.
- 이러한 결과를 바탕으로 DLTE가 실제로 생쥐의 세포매개성 면역반응의 활성을 위한 사이토카인 분비를 유도하는 지 조사하였다.
- 수지상세포(dendritic cell, DC)는 항원제시세포로 작용하여 면역반응의 조절에 필수적인 T 세포의 활성을 직접 조절한다.
- DC에서 분비되는 사이토카인인 IL-12는 CD4 helper T세포가 Th1 반응을 수행하도록 유도한다.
- IL-12 p40 단백질의 프로모터 하에서 YFP 단백질을 리포터로 발현하는 형질전환 생쥐의 비장에서 추출한 수지상 세포에 DLTE를 처리하고 YFP를 발현하는 지 여부를 조사하였다(그림 13).
- DLTE 농도의 증가에 따라 YFP를 발현하는 수지상세포가 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 IL-12 프로모터가 활성화된다는 증거가 된다.
- 이러한 결과는 IL-12에 의해 대식세포가 활성화되고 이를 통해 염증성 사이토카인 및 NO 생성이 증가될 것이라는 가정과 일치한다.



<그림 13> DLTE 농도에 따른 DC의 YFP 발현 변화. 비장에서 추출한 수지상 세포 (CD11c⁺)에 DLTE를 농도별로 처리하고 배양한 후, YFP의 발현을 FACS로 분석하였다. 양성 대조군으로는 CpG를 처리하였다.

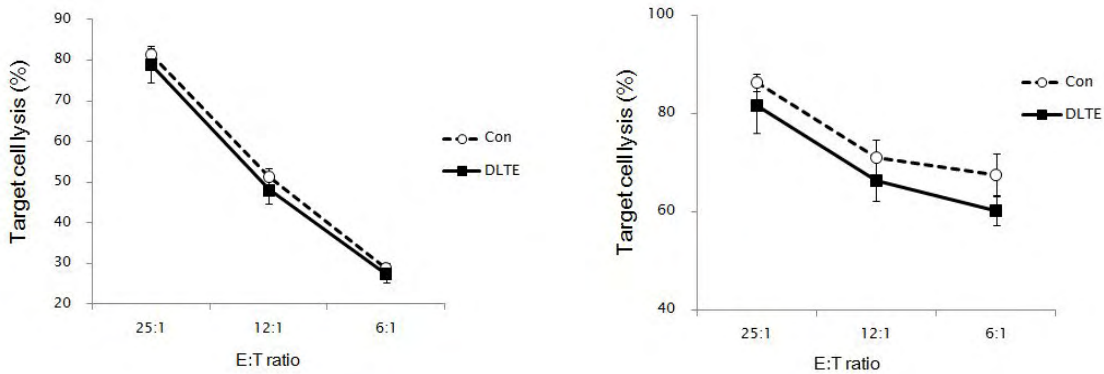
4) DLTE를 먹인 생쥐의 면역 활성화 분석-I : 세포매개성 면역반응의 분석

- DLTE를 섭취한 생쥐의 면역 활성을 분석하기 위하여, 비장세포(splenocyte)의 증식능 및 활성화와 복강 대식세포의 암세포 살해능을 조사하였다.
- 먼저, ConA 처리에 의해 유도되는 비장 림프구의 증식능에 미치는 영향을 조사하였다 (그림 14).



<그림 14> ConA 처리에 의한 비장림프구의 증식능(MTT assay). 세로축은 각 시료 처리군의 변화량(ConA를 처리한 값 - ConA를 처리하지 않은 값)을 대조군(Con)의 변화량에 대한 상대값으로 나타내었다.

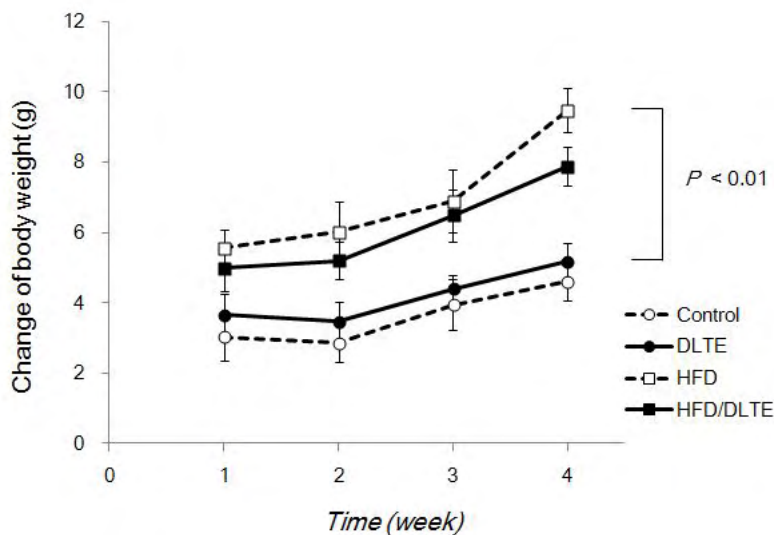
- 그 결과, 고농도(12.5mg/kg 및 25mg/kg)의 DLTE를 섭취한 생쥐에서 ConA활성에 의한 비장세포의 증식능이 3배 이상 증가하였다.
- 하지만, 이 비장 림프구의 표적세포(Yac-1) 살해능 및 복강 대식세포의 표적세포(p815) 살해능을 조사해 본 결과, 유의할 수준의 차이는 발견되지 않았다(그림 15).



<그림 15> 비장 림프구(왼쪽) 및 복강대식세포(오른쪽)의 암세포 살해능.

5) DLTE 섭취 생쥐의 혈행 개선능 분석

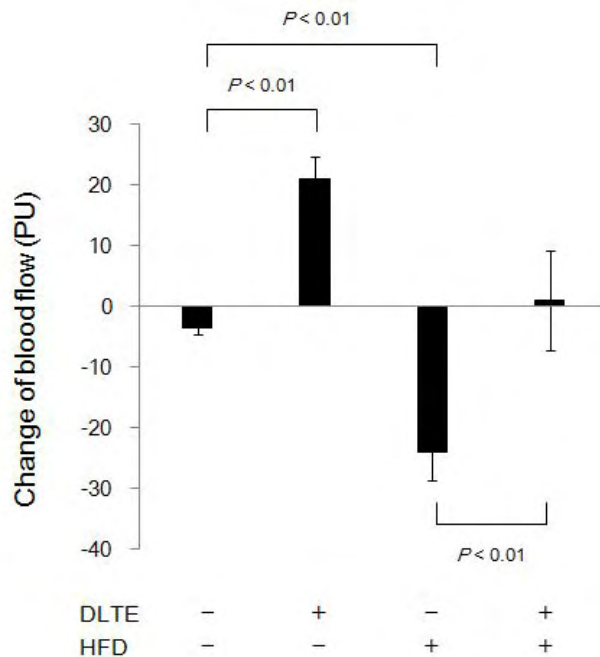
- DLTE를 섭취한 생쥐의 혈행 개선 효과 여부를 분석하기 위하여, 정상적인 식이를 한 실험군과 고지방 식이(HFD)를 시행한 실험군으로 나누고, 각각 DLTE 처리의 효과를 식이 1주 후부터 3주까지 조사하였다(그림 16).



<그림 16> 정상 식이 및 고지방 식이군에서 DLTE 처리에 의한 4주간 체중변화량 분석. 정상 식이군(con)에 비해 고지방 식이군(HFD)의 체중 변화량이 유의성 있게 변화하였다.

- 예상대로 고지방 식이를 한 실험군은 정상 식이군에 비해 체중 변화량이 증가하였다 ($p < 0.01$).
- 하지만, 정상 식이 및 고지방 식이군 모두에서, DLTE 처리에 의한 유의성 있는 체중변화는 나타나지 않았다.

- 한편, 각 실험군의 혈당량을 측정된 결과, DLTE를 처리한 그룹에서 유의성 있는 혈당량의 감소를 확인하였다(그림 17).
- 실제로, 각 그룹의 개체들에 대한 혈류량을 조사한 결과, DLTE 처리군은 대조군에 비해 혈류량이 유의성 있게($p < 0.01$) 증가되었음을 확인하였다(그림 17).
- 이러한 DLTE 처리에 의한 혈류량 개선의 효과는 고지방 식이군에서도 마찬가지로 나타났다($p < 0.01$).
- 즉, 고지방 식이군에서는 예상대로 정상 식이군에 비해 혈류량이 저하되는 경향을 나타내었으며($p < 0.01$), 이러한 저하는 DLTE 처리에 의해 다시 정상 수준으로 회복되었다.

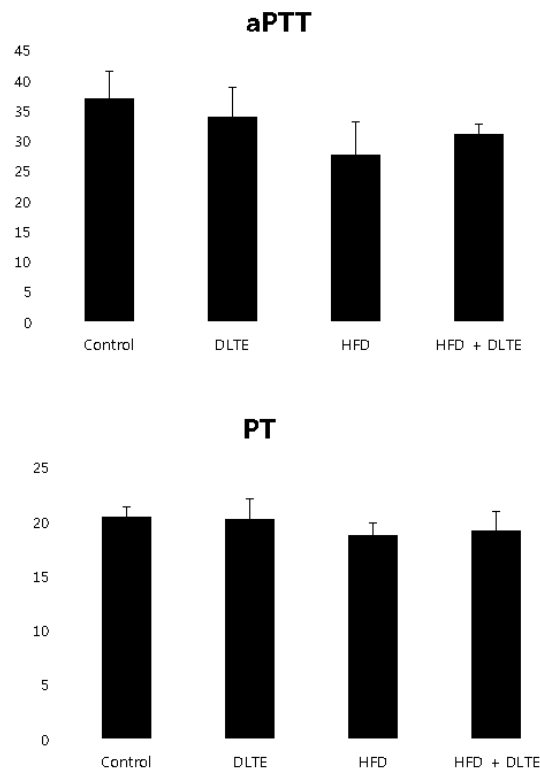


<그림 17> DLTE 처리에 의한 혈류량 개선효과. 정상 식이 및 고지방 식이군에서 4주간 DLTE 처리에 의한 혈류량 개선 효과가 나타났다.

- 이상의 결과들은 DLTE 처리가 NO 및 사이토카인의 생성 촉진을 통해 면역기능 강화에 중요한 역할을 하며, 혈행 개선에 효과적으로 작용할 가능성을 제시한다.

6) DLTE에 의한 혈소판 응집능 변화 및 항-혈전능 분석

- DLTE를 섭취한 SD Rat의 혈소판 응집능을 분석하기 위하여, 전혈에서 분리한 PRP에 대해, 각각 aPTT(activated partial thromboplastin time)와 PT(prothrombin time)를 혈액 응고계를 이용하여 측정하였다(그림 18).
- 내인성 경로의 영향을 받는 aPTT는 옷나무 추출액을 투여한 집단의 경우 대조군과 큰 차이가 없고 정상수치 안에 모두 포함되어 나타났다.
- 하지만, 고지방식을 한 집단에서는 aPTT가 다소 감소하였고, 이는 DLTE 처리에 의해 다시 정상 수치로 회복되었다.
- 외인성 경로의 영향을 받는 PT의 경우는 4집단 모두에서 큰 차이를 보이지 않았다.
- 이러한 결과는 옷나무 추출액이 내인성 원인(고지방 식이에 의한 비만, 고지혈증 등)에 의한 혈소판 응집능의 증가를 억제하여 동맥경화 등의 예방에 있어 긍정적 영향을 미칠 가능성을 제시한다.



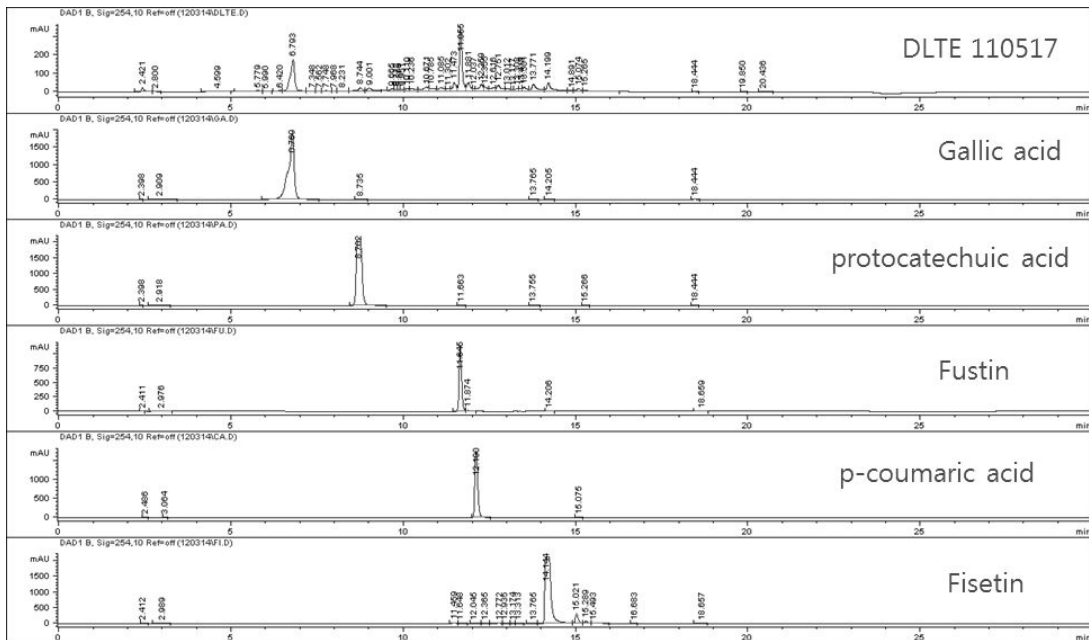
<그림 18> DLTE 처리에 의한 Rat 혈소판의 응집능(aPPT, PT) 측정. DLTE를 0.5mg/kg/day로 먹인 SD Rat의 복대동맥에서 전혈을 채혈하여 원심분리 후 상층액인 PRP(platelet rich plasma)를 얻어 응고실험에 사용하였다.

- 한편, Rat의 전혈에서 얻은 혈소판에 DLTE를 직접 처리하여 항-혈전능을 측정하였다.

- Rat 혈액중의 PRP(platelet rich plasma)의 경우는 collagen등의 agonist의 영향을 거의 받지 않아 WP(washed platelet)의 형태로 중간과정을 거쳐서 실험에 수행하였고, 응집에 대한 negative control은 aspirin을 사용하였다.
- 그 결과 DLTE가 직접적으로 혈전에 따른 응집 변화를 유도하지는 않았다.

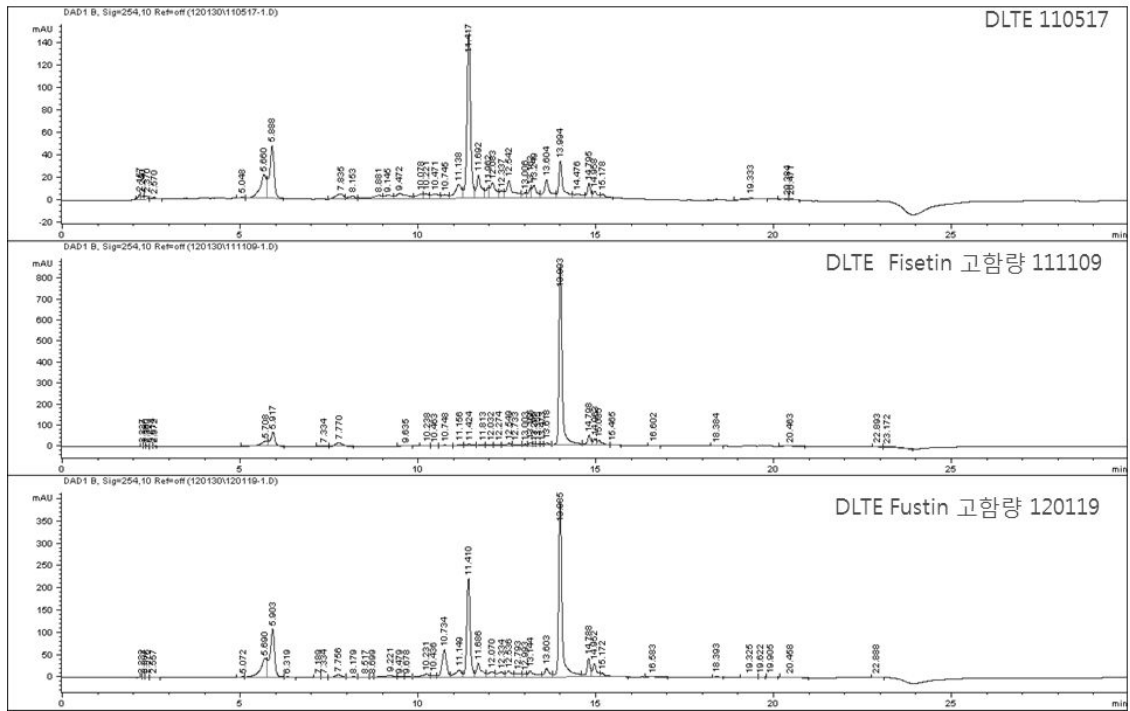
7) DLTE의 면역활성 조절 물질의 성분 분석

- 최근 다른 연구 그룹의 보고에 의하면 옷나무의 부탄을 추출물에서 분리한 Flavonoid (fisetin, butein, sulfuretin, gallic acid 등)들은 LPS에 의해 유도되는 대식세포의 활성을 억제하는 것으로 나타났다.
- DLTE시료의 Flavonoid 함량에 따른 면역활성을 비교하기 위하여, 먼저 구성성분의 차이를 HPLC로 분석하였다.
- 이를 위하여, 옷나무 주요 지표물질들에 대한 표준물질을 준비하여 그림 20과 같은 크로마토그램을 얻었다. 주요 지표물질은 Gallic acid, Fustin, Fisetin와 protocatechuic acid 및 *p*-coumaric acid를 사용하였다.



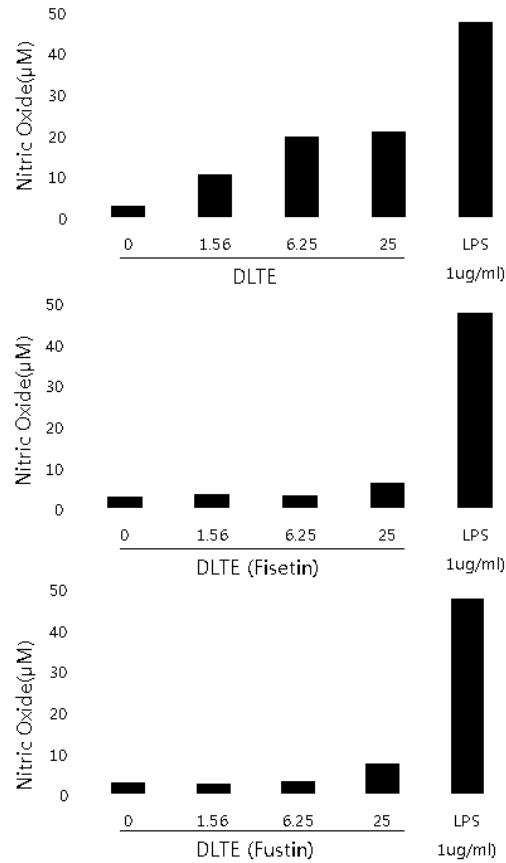
<그림 19> DLTE와 주요지표물질의 HPLC 크로마토그램. 시료는 1mg/ml의 농도로 MeOH(HPLC grade)에 녹여서 10 μ l씩 injection 하였다.

- 면역활성을 확인한 DLTE에는 Gallic acid와 Fustin의 함량이 높게 나타났다.
- 이렇게 얻은 기존의 DLTE 외에 Flavonoid의 성분비가 다른 DLTE 시료 2가지 (DLTE-Fisetin 고함량 및 DLTE-Fustin 고함량, 그림 20)를 더 확보하여 각각의 면역활성을 조사하였다.



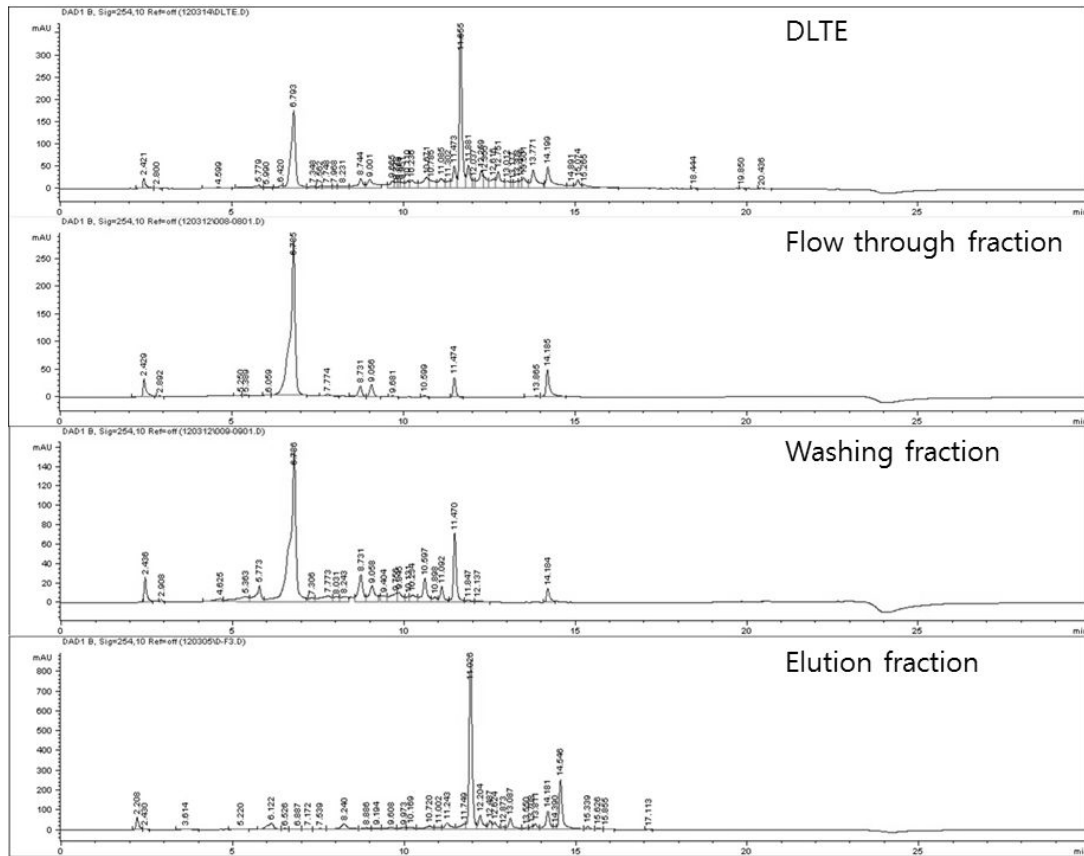
<그림 20> 무독성웃나무 추출물 중 추출방법에 따른 시료에서 Fisetin과 Fustin의 각각의 고탐량 시료의 HPLC 크로마토그램 분석. 시료는 1mg/ml의 농도로 MeOH(HPLC grade)에 녹여서 10 μ l씩 injection 하였다.

- 면역활성의 분석을 위해 DLTE, DLTE(Fisetin), DLTE(Fustin)를 각각 RAW 264.7 대식 세포에 처리하고, 활성시에 나타나는 NO의 양을 측정하였다(그림 21).



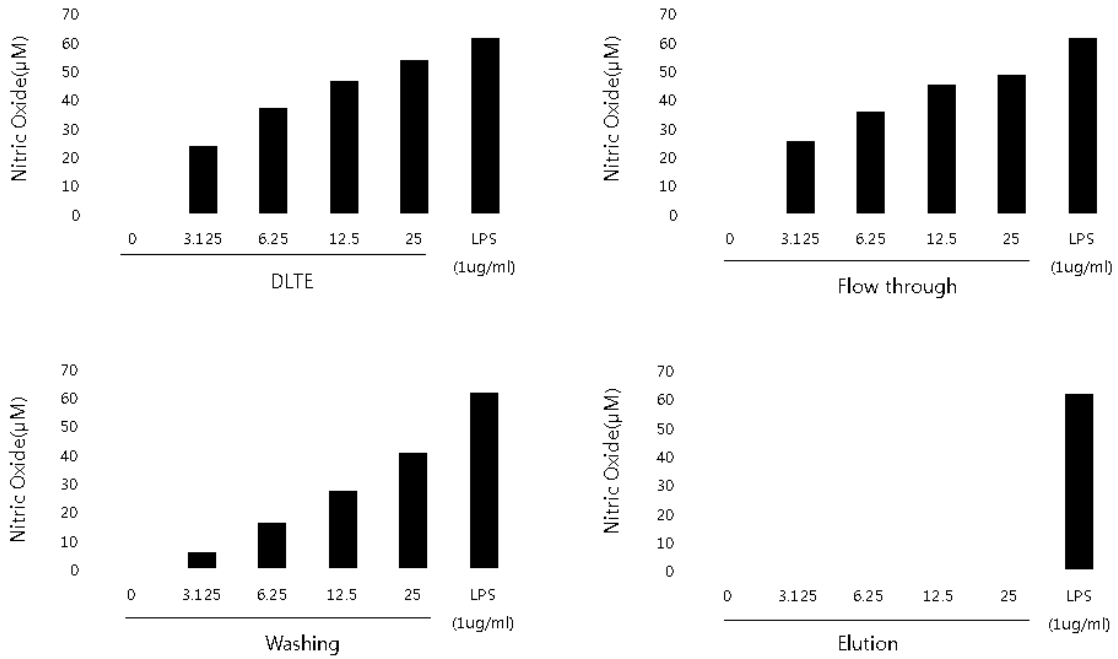
<그림 21> DLTE 처리에 의한 NO 생성량 변화. RAW264.7 대식세포에 1.56-25 μ g의 농도로 DLTE, DLTE(Fisetin), DLTE(Fustin)을 24시간 처리하였다.

- Fisetin 및 Fustin의 고함량 DLTE 시료는 높은 농도에서 NO의 생성량을 다소 증가시키기는 하나 DLTE에 비해서 효과가 매우 적게 나타났다.
- 특히, 이들 Flavonoid 고함유 DLTE 들은 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제하였다.
- 위와 같은 결과는 비록 DLTE이 면역활성 효과를 나타내나, 여기에 Flavonoid 계열의 성분이 다량 포함되면 오히려 면역억제 효과를 나타낼 가능성을 제시한다.
- 이러한 가정을 확인하기 위하여, DLTE를 C18 open column을 이용하여 분리한 후 각 분획의 면역 활성을 조사하였다.
- Flow through fraction은 C18 컬럼에 흡착되지 않은 물질들을 받았고, Washing fraction은 C18 컬럼에 흡착하지 못하거나, 약하게 흡착하는 물질들을 분리하였다.
- 이 두 개의 분획은 물에 녹아있는 시료와 물 세척을 통해 얻었고, C18에 결합하고 있는 시료는 1% HCl MeOH를 통해서 분리하였다(그림 22).



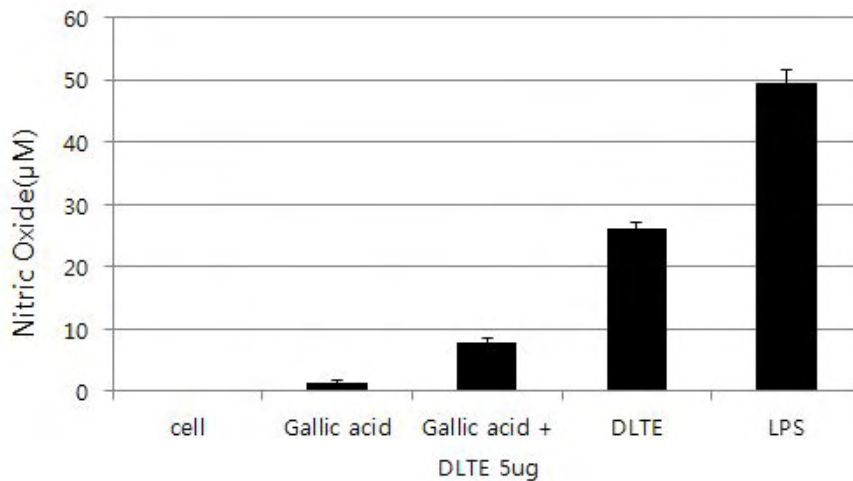
<그림 22> HPLC를 통한 C18 컬럼 분획의 확인. 분획을 농축하여 MeOH(HPLC grade)에 녹여서 10 μ l씩 injection 하여 크로마토그램을 얻었다.

- Flow through fraction은 Fustin peak의 앞쪽을 분리하였으며, 여기에는 주요지표물질인 gallic acid를 포함되어 있었다.
- Washing fraction의 경우는 Gallic acid를 포함하고 있지만 일부 Fustin에 해당되는 peak를 포함하고 있고, Elution에는 Flavonoid로 알려진 Fisetin의 peak가 나타났다.
- 이렇게 나누어진 분획들의 NO 생성능을 비교해 보았다(그림 23).
- Flow through의 경우는 DLTE와 거의 같은 NO 생성능을 보여주고 있고, Washing의 경우도 농도를 높이면 NO 생성이 증가하였다.
- 하지만 Elution fraction의 경우에는 NO의 생성이 증가하지 않았다.
- 위와 같은 결과로 보아 C18 컬럼에 흡착하지 않은 특정 물질이 NO의 생성을 증가시키는 것으로 보여진다.

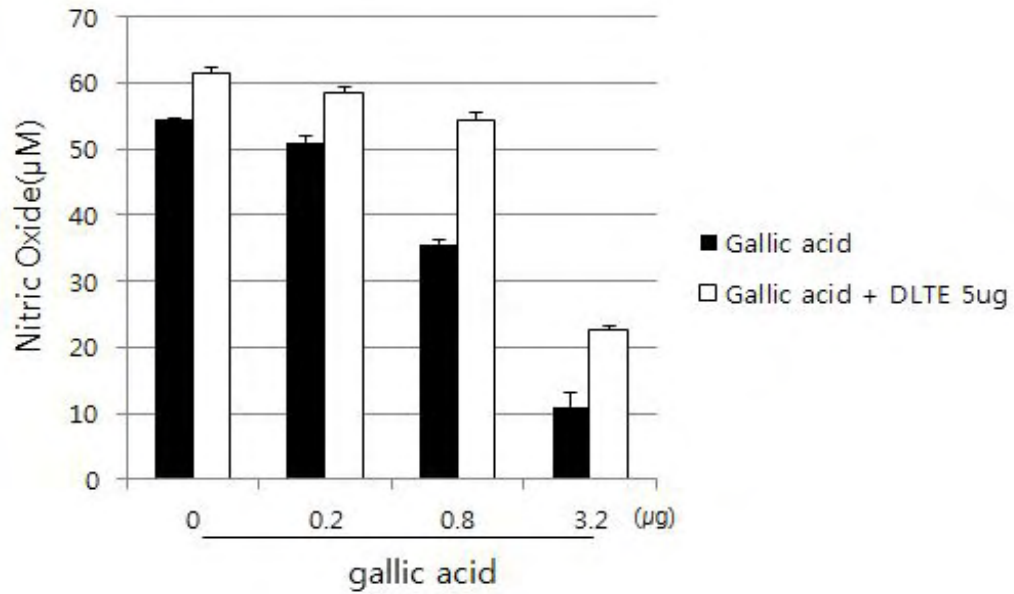


<그림 23> DLTE 분획의 NO 생성변화. RAW264.7 대식세포에 각 fraction을 3.125-25µg의 농도로 24시간 처리하였다.

- Flavonoid의 대부분은 C18 컬럼을 통해 제거 되고, Flow through와 Washing 분획에 남아 있는 것은 gallic acid 뿐이었으므로, gallic acid에 의한 면역활성을 조사하였다.
- 하지만, 정제한 gallic acid 및 정제한 gallic acid를 첨가한 DLTE는 NO 생성에 영향을 주지 않았고(그림 24), 오히려 LPS에 의해 유도 되는 면역활성을 억제하였다(그림 25).



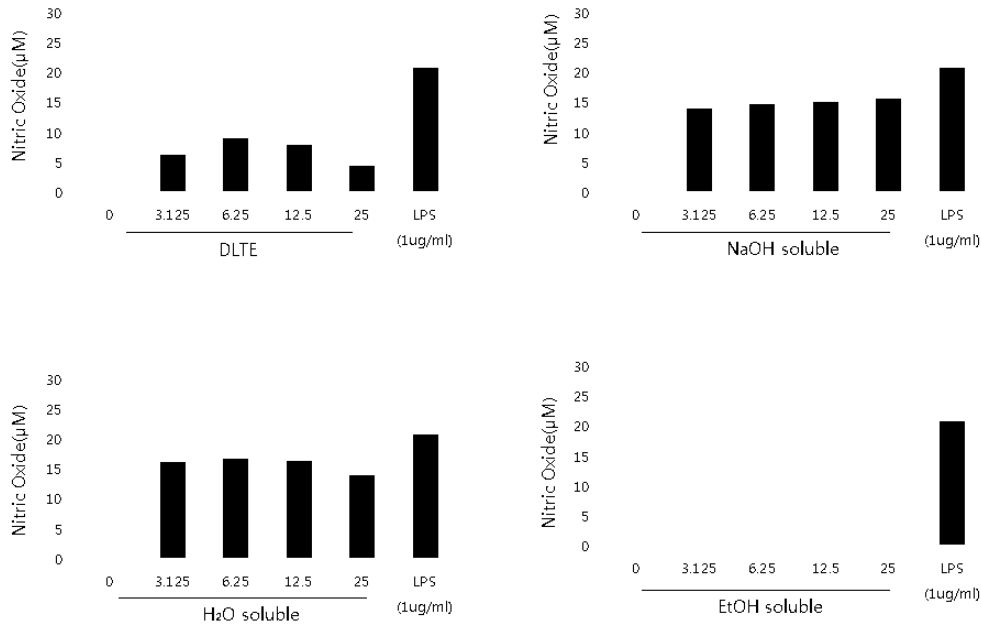
<그림 24> Gallic acid에 의한 NO 생성 변화. RAW264.7 대식세포에 0.2-3.2µg의 gallic acid를 DLTE(5µg/ml)의 존재 또는 부재 조건에서 24시간 처리하였다.



<그림 25> gallic acid가 LPS에 의한 NO 생성 유도에 미치는 효과. RAW264.7 대식세포에 1µg/ml의 LPS와 0.2-3.2µg의gallic acid를 DLTE(5µg/ml)의 존재 또는 부재 조건에서 24 시간 처리하였다.

- 이러한 결과들은 옷나무 추출액에 포함된 Flavonoid 성분에 의해 DLTE의 면역활성 효과가 상쇄되는 것이라는 앞선 가정을 뒷받침한다.

- 이에 우리는 DLTE에 포함된 면역활성증가 유도 물질을 (산성)다당체라 가정하고, DLTE를 Sephadex를 이용하여 NaOH soluble, H₂O soluble, EtOH soluble의 3개의 분획으로 분리한 후, RAW264.7 대식세포에서 NO 생성변화를 조사하였다(그림 26).



<그림 26> 용매별 추출 분획에 따른 NO 생성 분석. RAW264.7 대식세포에 DLTE와 DLTE를 Sephadex로 분획한 3개의 시료를 3.125-25µg의 농도로 24시간 처리하였다.

- NaOH는 산성다당체를 함유하고, H₂O는 고분자인 다당체, EtOH는 저분자인 Flavonoid 계열의 성분을 포함한다.
- 이때, NaOH, H₂O 분획은 같은 양의 DLTE와 비교하여 더 높은 수준의 NO 생성을 유도하였다.
- 반면, EtOH 추출물은 아무런 영향을 주지 않았다.
- 따라서, 옷나무 추출액의 면역 활성화는 다당체 성분의 물질에 의해 유도된다는 것을 알 수 있다.

제4절. 혈행개선 효능 평가

1. 혈행개선 효능 평가 (혈소판 응집 억제능) 실험

1.1. 연구목표

오틀나무 추출물과 추출물의 단일성분의 혈소판 응집 억제능 실험을 진행하고, 그 효능을 분석하고 효능물질의 기전을 규명하고자 한다.

1.2. 실험재료 및 방법

1.2.1 시약 조제

- Collagen (Chronolog # 385)

3 ~ 5 μ g/mL collagen에서 보통 WP의 최대 응집을 보인다. 실험 당일 ice에 보관하여 사용한다.

- ACD제조

Trisodium citrate 2.5 g (85mM), citric acid 1.4 g (71mM), D-Glucose 2.0g (111mM)을 beaker에 넣고 증류수를 조금 넣은 후 magnetic bar를 넣고 교반한다. 이 용액을 volumetric flask에 넣고 증류수로 100mL를 맞춘다.

- Saline (0.9% NaCl)

NaCl 0.9g을 증류수 100mL에 희석하여 4°C 보관한다.

- Suspension buffer

보통 10배 Stock을 제조하여 놓고 사용 시 10배 희석하여 사용한다. Bovine serum albumin (BSA)은 volumetric flask에 100mL를 맞춘 후 다시 이 buffer를 비커에 옮긴 후 BSA를 넣어 섞는다. NaCl 7.83 g (134mM), KCl 0.22 g (2.9mM), MgCl₂ 6H₂O 0.2 mL (1.0mM), HEPES 2.38 g (10.0mM), D-glucose 0.9 g (5.0mM), NaHCO₃ 1.01 g (12.0mM), Na₂HPO₄ 0.09 g (0.34mM), BSA 3.0 g을 가한다. 이것은 원래 1L 기준이며 따라서 100 mL에 위에 해당하는 시약의 양을 넣으면

10배 Stock이 된다. 단 Stock 제조시 BSA는 넣지 않는다. Stock을 제조한 후 실험 전에 10mL의 Stock과 70mL의 DW를 비커에 넣고 PH meter를 이용하여 PH를 7.4로 맞춘 후 100mL volumetric flask에서 증류수로 100mL를 맞춘다. 그 후 다시 비커로 옮겨 BSA를 0.3g 넣고 잘 교반하여 실험에 사용한다.

- Washing buffer

Stock을 이용하여 10mL의 Stock과 60mL의 증류수 그리고 10mL ACD를 비커에 넣고 pH meter를 이용하여 pH를 7.4로 맞춘 후 100 mL volumetric flask에서 증류수로 100mL를 맞춘다. 그 후 다시 비커로 옮겨 BSA를 0.3g 넣고 잘 교반하여 실험에 사용한다.

- CaCl₂ 용액

CaCl₂ 2.94g를 증류수 50mL에 녹여 제조한다.

1.2.2 Washed Platelet 분리

혈액원에서 구입한 혈액을 test tube에 옮긴 다음, 저울을 이용하여 평형을 맞춘다. 먼저 1800rpm에서 10분 간 원심분리 한다. 혈소판수를 세기 (cell counting)위하여 eppendorf (EP) tube에 미리 saline을 적정량 넣어둔다. 보통 100 배로 희석하여 혈소판 수를 센다. 원심분리가 끝나면 원심분리기에서 조심스럽게 꺼내서 상등액만을 취하여 또다른 test tube에 옮겨 담는다. 만일에 적혈구가 함께 올라오거나, tip속에 공기가 들어갔을 경우 즉시 폐기 처분한다. 상등액만 취하여 1800 rpm 으로 10 분간 원심분리한다. 원심분리가 끝나면 pellet을 제외한 상층액은 버리고 Washing buffer를 5 mL 정도 pellet이 들어있는 test tube의 기벽을 통하여 넣고 transfer pipette을 이용하여 buffer를 반복하여 가하여 pellet을 풀어준다. 다 풀리면 transfer pipette으로 취하여 또 다른 test tube로 옮긴다. 다시 원심분리기에 넣고 1800 rpm 으로 10 분간 원심분리한다. 원심분리가 끝나면 pellet을 제외한 상층액은 버리고 suspension buffer를 1.5mL 정도 pellet이 들어있는 Test tube의 기벽을 통하여 넣고 transfer pipette을 이용하여 pellet을 풀어준다. 다 풀었으면 전체의 액을 transfer pipette으로 취하여 또다른 test tube로 옮긴다.

1.2.3 혈소판 응집 작용 측정

혈소판 형태의 변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 자동투과 응집 특정 장치 (Chrono-Log Co., USA)를 사용하였다. 제조한 WP에서 500ul를 취하여 37°C에서 pre-incubation 후 1,200 rpm으로 교반하며 각각의 시료를 5분간 전처리한다. 이후 agonist를 투여하여 혈소판 응집을 유도하여 응집정도를 측정하여 실험을 진행하였다. 혈소판 응집 작용은 agonist로 유도된 aggregation (%)을 대조군으로 , 추출물로 전처리한 후 유도된 aggregation (%)을 시료군으로 하여 다음 계산식에 따라 나타내었다.

$$\text{Aggregation (\%)} = \frac{\text{sample aggregation (\%)}}{\text{control aggregation (\%)}} \times 100$$

1.2.4 혈소판 분리 및 물질의 Granule secretion 억제효과

제조한 WP를 hemacytometer를 이용해서, 혈소판수를 counting하여 4.8 x 10⁸ 개/ml 로 맞추어주고, 혈소판 200 μl에 실험할 물질을 농도에 따라서 처리해주고 5분 동안 37°C에서 incubation 한다. 그 뒤 collagen, Thrombin, ADP를 실험조건에 맞게(collagen 5 μg/ml, Thrombin 0.1 U/ml, ADP 10 μM)처리하고, 5분 동안 37°C에서 incubation 한다. 그 후에, 37°C에서 12000 x g로 2분동안 원심분리를 해주고, 상층액 100μl는 Serotonin ELIAS kit well에 넣어주고, 50 μl는 Thromboxane B₂ ELISA kit well에 넣어주었다. Serotonin ELIAS kit well에 conjugate 50 μl, antibody 50 μl를 처리해준 뒤, 빛을 차단하고, 필름으로 덮어준 상태로 shaker에서 2시간동안 incubation 한다. 그 뒤 well을 suction해주고, washing buffer 200 μl로

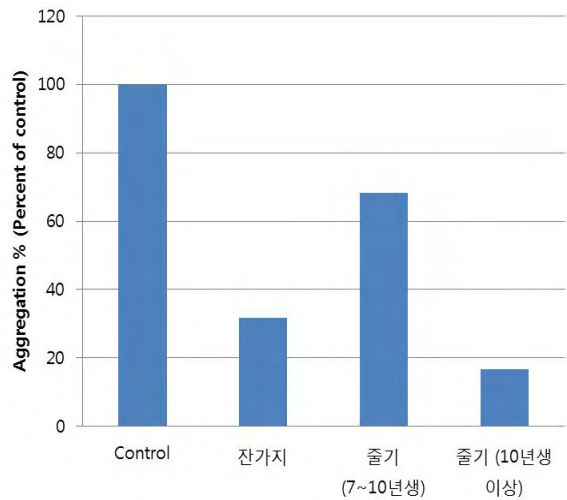
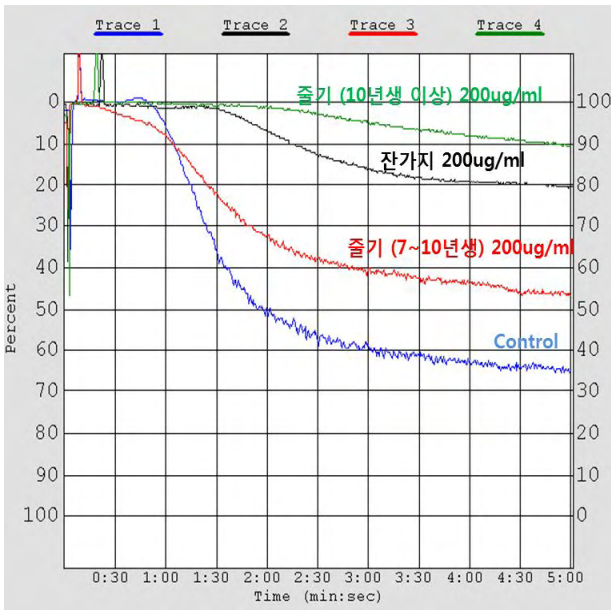
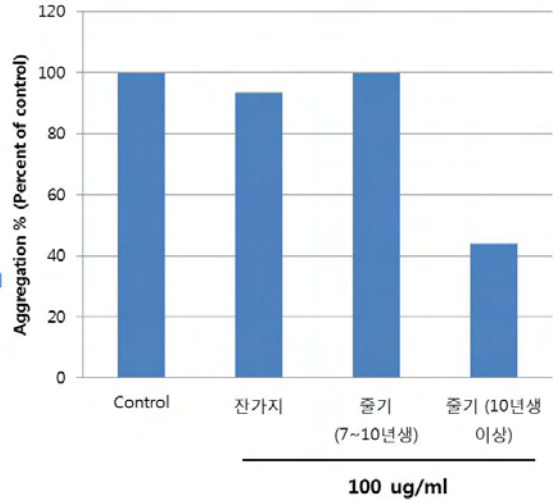
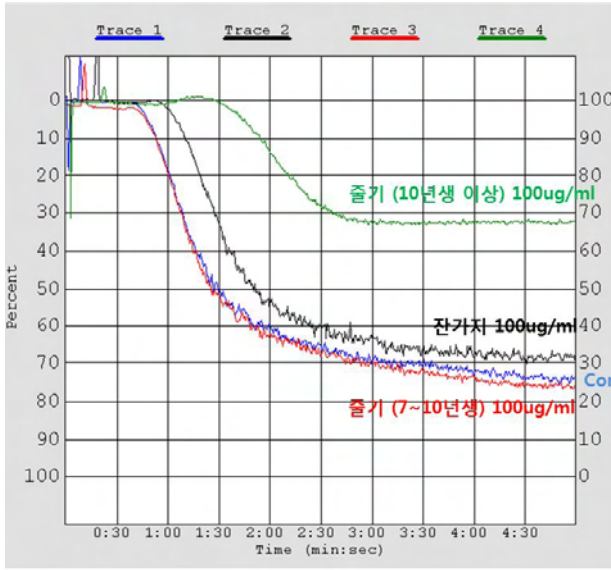
3번 washing해주고, p-NPP 200 μ l를 처리하고 1시간동안 shaker에서 incubation 한다. 계속해서 stop solution 50 μ l를 처리하고 405 nm에서 흡광값을 측정한다. Thromboxane B₂ ELISA kit의 측정방법은, well에 AchE Tracer 50 μ l, anti serum 50 μ l를 처리하고 빛을 차단하고, 필름으로 덮어준 상태로 18시간동안 incubation시켜준다. well을 suction해주고, washing buffer 200 μ l로 5번 washing해준뒤 Elliman's Reagent 200 μ l를 well에 처리하고, 빛을 차단하고, 필름으로 덮어준 상태로 1시간동안 shaker에서 incubation시켜주었다. 그리고 405nm에서 흡광값을 측정하였다.

1.3 실험결과

동맥경화, 뇌졸중 등의 혈행 장애로 발생하는 심혈관계 질환은 미국, 유럽, 아시아 등 전세계적으로 주요한 사망 원인이 되고 있음. 우리나라에서도 심혈관계 질환이 사망원인의 1위를 차지하고 있는 것이 각종 조사결과 보고되어있음. 혈액은 혈장 및 혈구세포로 구성되어 있으며, 혈장은 혈액응고와 밀접한 관련이 있음. 그 중 혈소판은 골수의 거대세포인 거핵세포의 세포질이 떨어져서 혈액으로 방출된 작은 세포로서 수명이 5~7일 정도로 짧음. 혈소판은 활성화되면서 serotonin, Ca²⁺, thromboxane A₂ 등을 유리하여 주위의 다른 혈소판의 응집을 증폭시키고, 혈장에 존재하는 coagulation factor와 반응하여 혈피를 형성함으로써 지혈이 더 신속하고 효과적으로 일어날 수 있도록 함. 그러나 과도한 지혈작용 및 혈피의 생성은 혈액의 흐름을 방해하며 혈행 이상을 초래하며 혈전 (thrombus)과 같은 병변을 유발한다. 혈전이 생성되면 정맥에서는 혈액순환장애가 야기되어 부종이나 염증 등이 발생하고 동맥에서는 허혈이나 경색을 유발하여 심근경색증, 뇌졸중, 폐동맥 경색증 등의 질환을 초래하게 됨. 이와 더불어 혈소판 활성화시 여러 가지 혈관조절 인자들 (serotonin, TXA₂, PAF, 등)이 유리되어 혈관을 수축시킬 수 있음. 혈관이 수축되면 혈류의 흐름을 막아 혈류 속도가 변화되어 혈소판 활성화가 증폭되며 혈관내피손상이 진행되어 심혈관의 정상적인 기능이 저해됨. 이러한 혈행 이상이 동맥경화, 심근경색, 심허혈질환 및 뇌혈관질환과 같은 혈관계질환 발병의 원인이 되는 것으로 알려져 있음. 이같은 내용을 토대로 옷나무의 혈행개선의 기능성은 혈소판 응집에 대한 효능 연구로 포커스를 맞춤.

옷나무 추출물의 혈소판 응집 억제 효능을 확인하기 위하여 사람의 혈소판을 이용하여 실험 방법에 기재된 방법으로 washed platelet을 제조하여 진행함. 옷나무 목질 (7~10년, 10년 이상), 옷나무 잔가지, 옷나무 추출물의 주요성분인 fustin, fisetin, ARW, gallic acid, protocatechuic acid를 5분간 전처리한 다음, 혈소판 응집원인 collagen을 처리하여 5분간 응집정도를 관찰함.

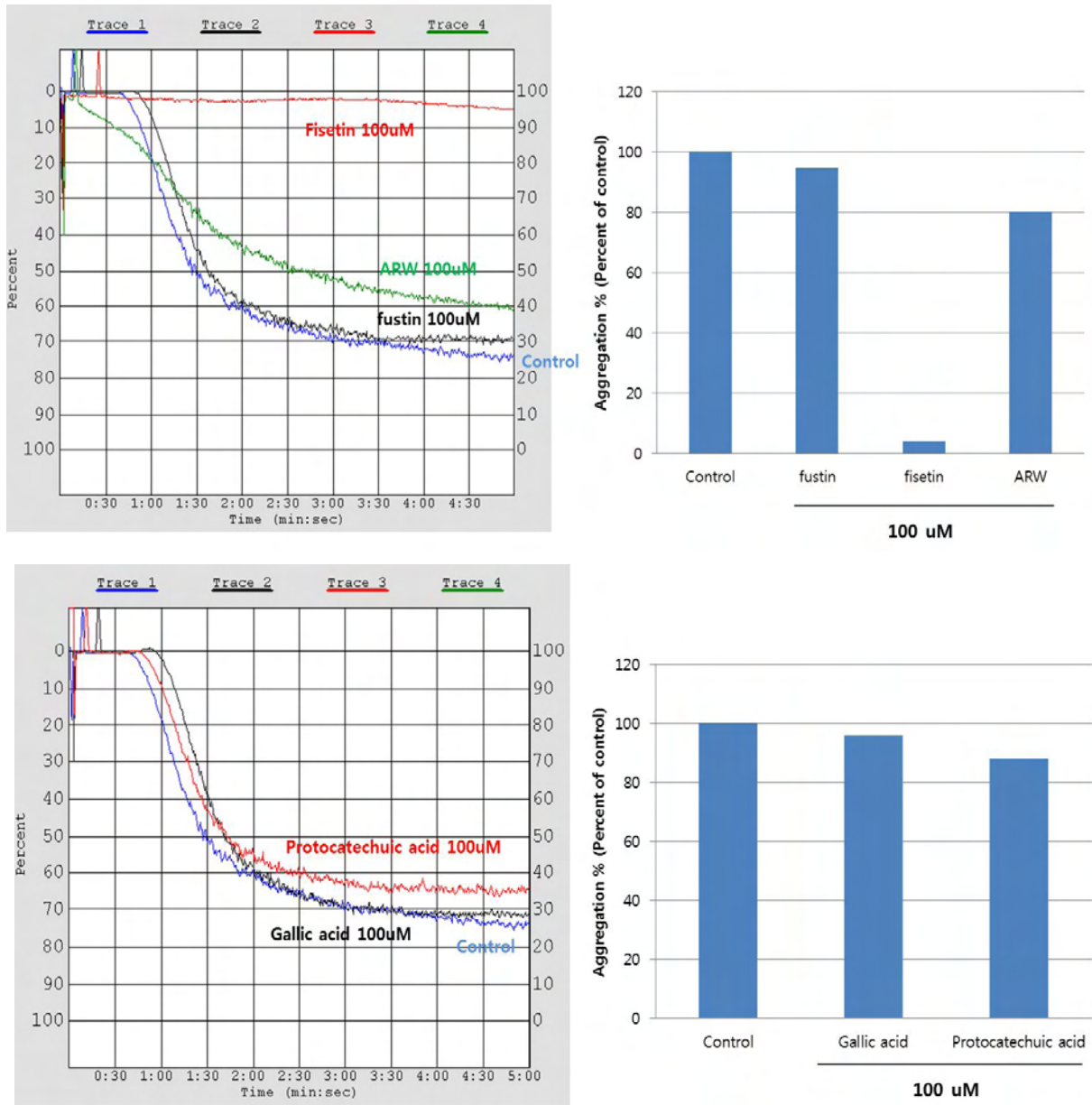
① 혈소판 응집에 대한 옷나무 추출물의 부위별, 년생에 따른 효과



< 그림 1 > 옷나무 추출물의 부위별, 년생별 혈소판 응집 효능

- 제조한 washed platelet을 이용하여 실험을 진행한 결과, 추출물을 각각 100ug/ml의 농도로 처리시 10년생 이상의 즐기 부분 추출물이 대조군에 비해 약 56%가량 혈소판 응집을 억제하는 것을 관찰함.
- 또한 200ug/ml 농도로 처리하였을 때에는 잔가지가 약 68%, 7~10년생 즐기는 약 32%, 10년생 이상 즐기는 약 83%의 혈소판 응집 억제 효능을 나타냄. 같은 부위에서는 년생이 오래될수록 억제효과가 증가했으며, 잔가지보다는 즐기에서 좀 더 나은 효과를 나타내는 것으로 관찰됨.
- 잔가지, 즐기 (7~10년생) 추출물은 100ug/ml 농도에서 유의적인 효과를 나타내지 않았음.

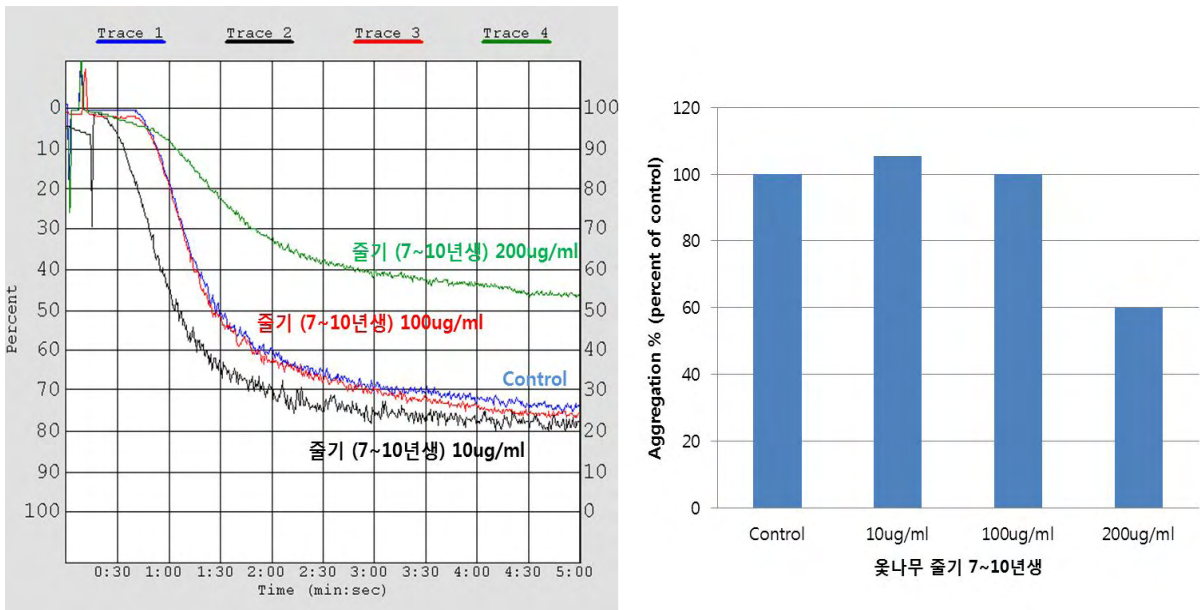
② 혈소판 응집에 대한 옷나무 추출물의 구성 성분의 효과



< 그림 2 > 옷나무 추출물 주요성분에 대한 혈소판 응집 효능

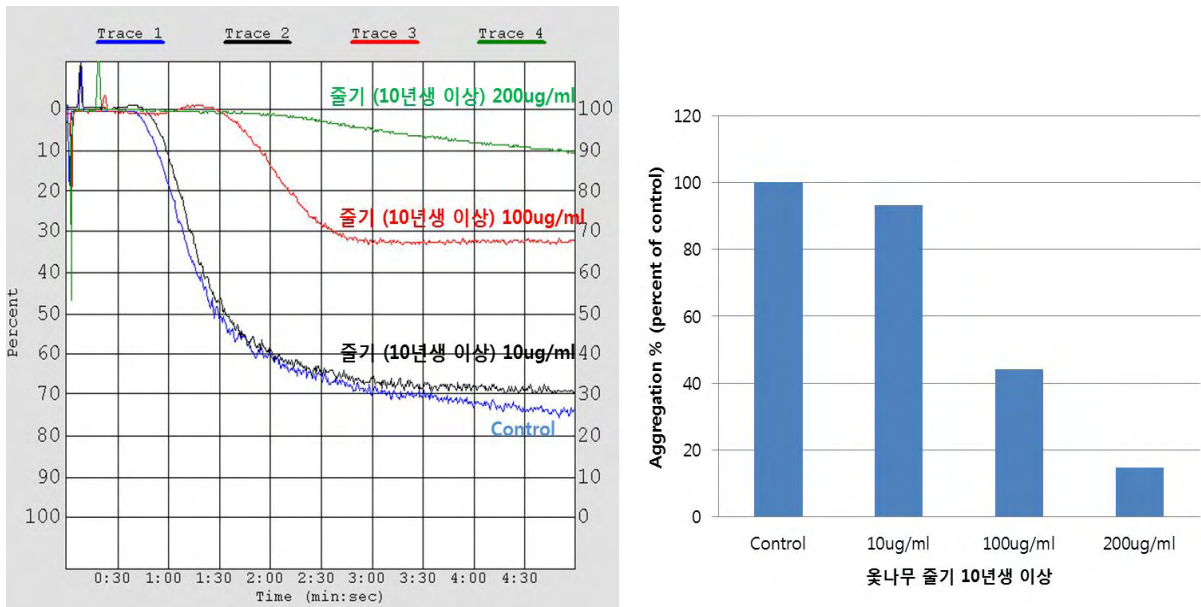
- 앞선 결과와 마찬가지로 옷나무 추출물의 단일 구성성분들을 100μM의 농도로 처리한 결과, ARW는 약 20%, fisetin은 약 96% 가량의 혈소판 응집 억제 효과가 나타남. 다른 구성 성분에 비해 fisetin은 매우 강력한 효과를 나타냄. 또한 옷나무 줄기의 년생이 길어질수록 fustin과 fisetin의 함량이 증가한다는 실험결과가 있음 (1차년도 결과에 기재).
- 그 외에 fustin, gallic acid, protocatechuic acid는 유의적인 차이가 없었음.

③ 혈소판 응집에 대한 옷나무 추출물의 농도에 따른 효과



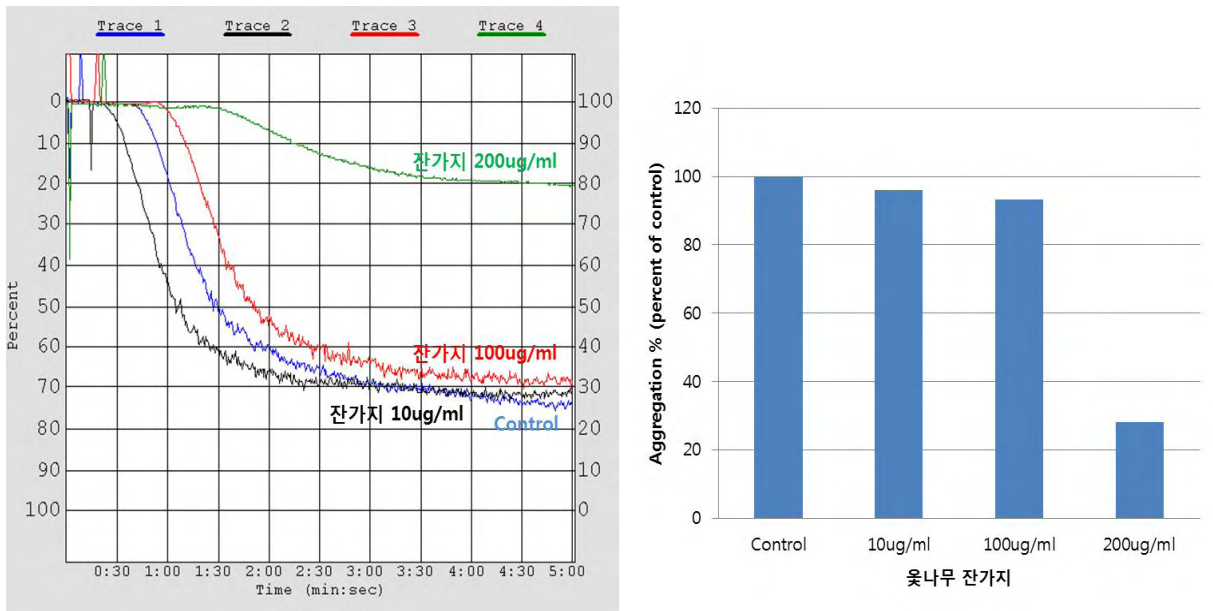
< 그림 3 > 7~10년생 줄기의 농도별 혈소판 응집 효능

- 7~10년생 줄기를 농도별로 처리하여 실험을 진행한 결과, 200ug/ml 에서만 약 40% 정도의 억제 효능이 나타났고, 그 외의 농도에서는 유의적인 효과가 관찰되지 않음.



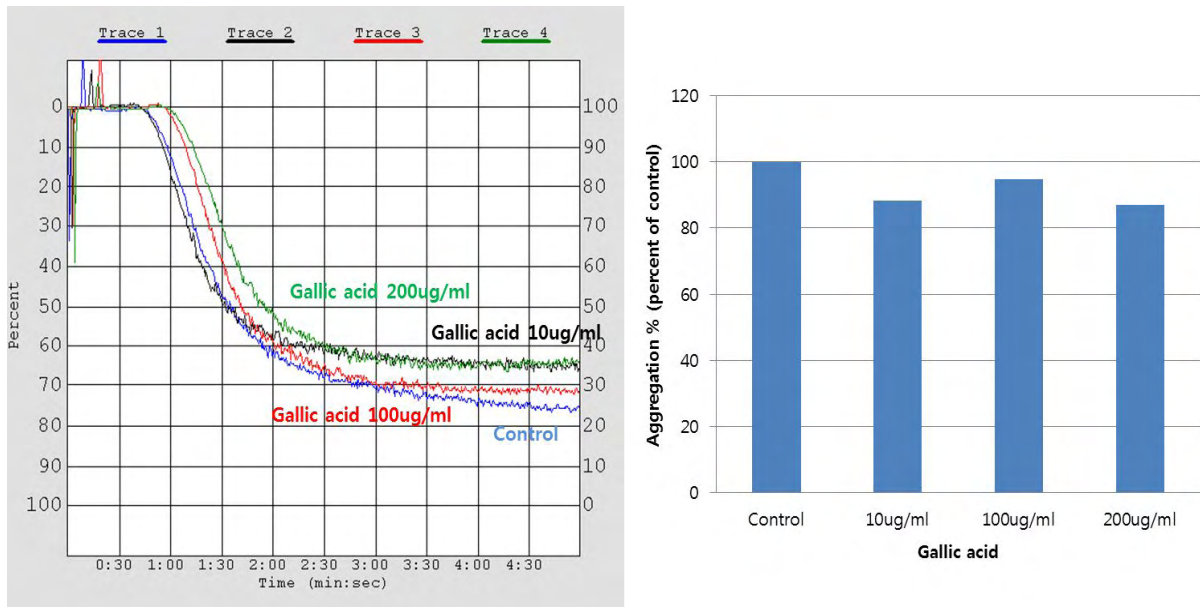
< 그림 4 > 10년생 이상 줄기의 농도별 혈소판 응집 효능

- 10년생 이상 줄기를 농도별로 처리한 결과, 10ug/ml은 약 7%, 100ug/ml은 약 56%, 200ug/ml은 85% 가량 혈소판의 응집 억제 효능을 나타내어 농도의존적인 양상을 보임.



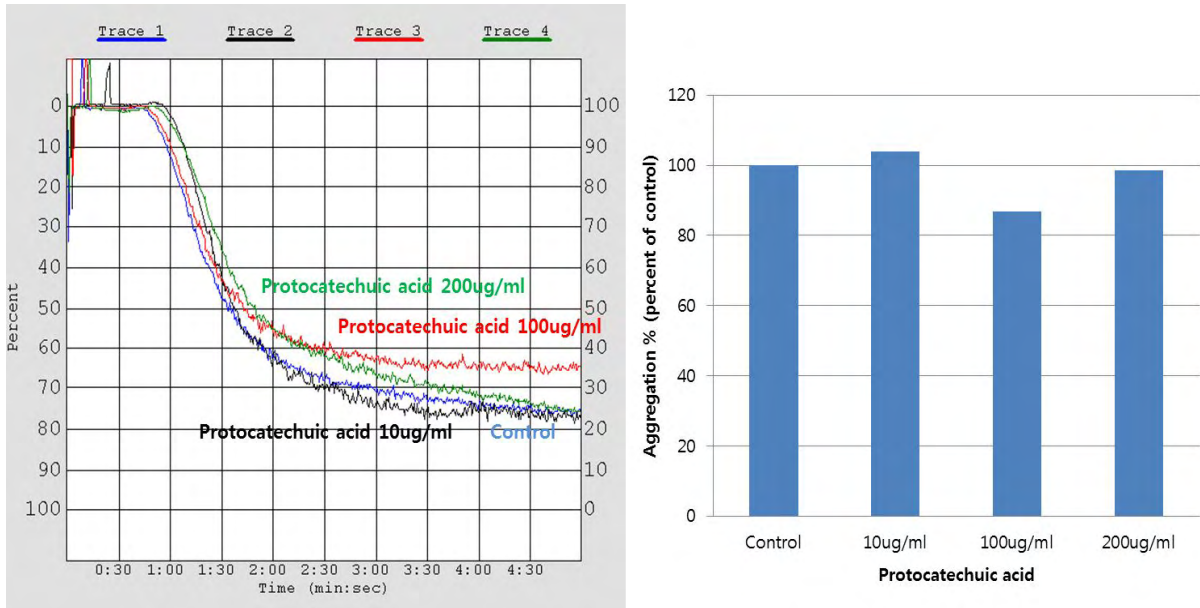
< 그림 5 > 율나무 잔가지 부위의 농도별 혈소판 응집 효능

- 잔가지 부위는 10ug/ml 농도는 4%, 100ug/ml 농도는 7%로 억제 효능이 미비하였으나 200ug/ml 농도에서는 72%가량으로 매우 강력한 억제 효능을 나타냄.



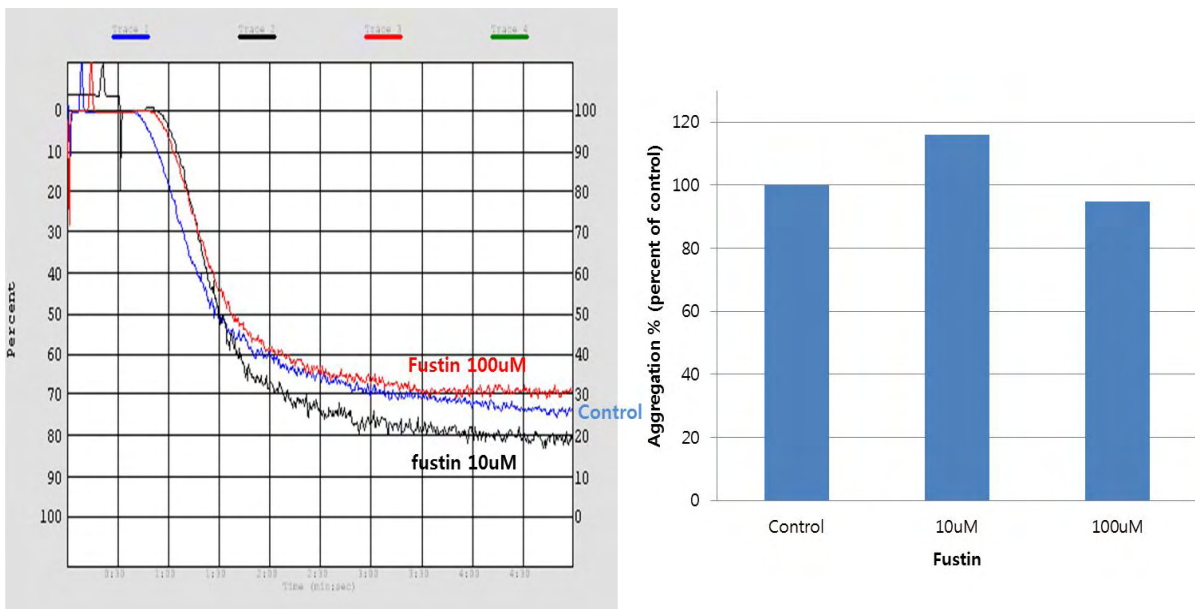
< 그림 6 > Gallic acid의 농도별 혈소판 응집 효능

- 율나무 추출물에 함유된 gallic acid를 농도별로 처리한 결과, 3가지 농도 모두 효과가 매우 미비한 것으로 나타남.



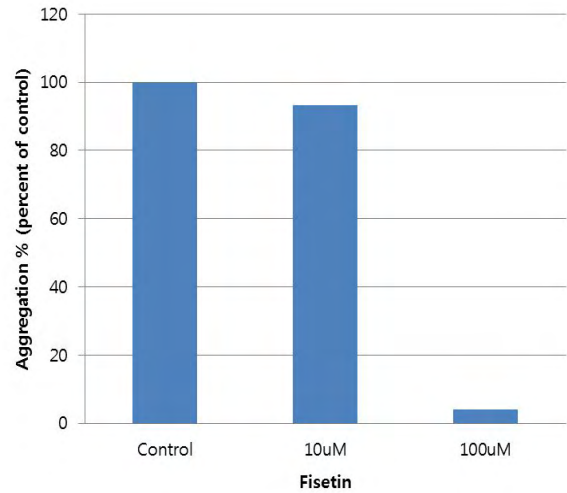
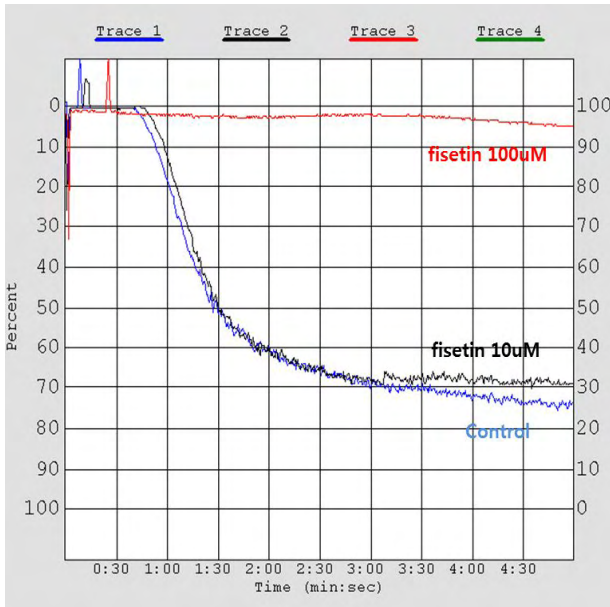
< 그림 7 > Protocatechuic acid의 농도별 혈소판 응집 효능

- Protocatechuic acid도 농도별로 처리한 결과, 농도가 증가함에 따라 억제 효능이 증가하는 양상이 나타나지 않음.
- 이에 따라 gallic acid와 protocatechuic acid는 혈소판의 응집에 별다른 관여를 하지않는 것으로 사료됨



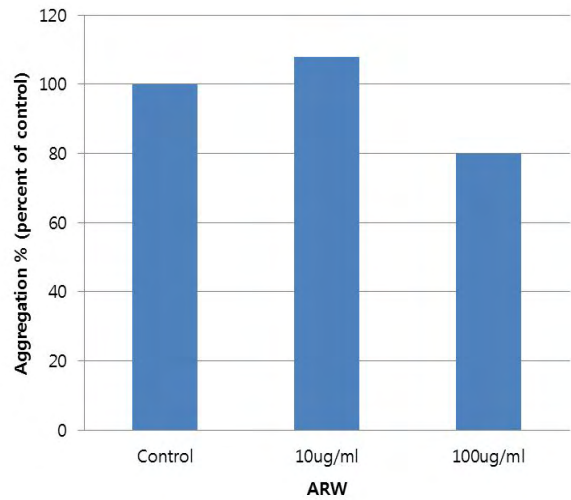
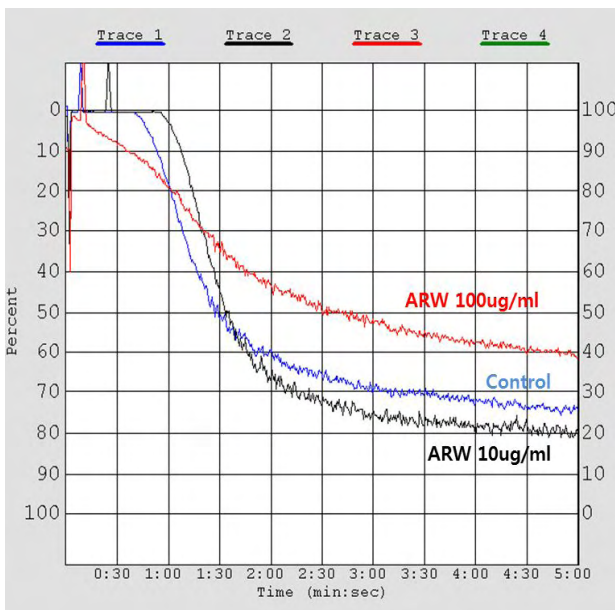
< 그림 8 > Fustin의 농도별 혈소판 응집 효능

- 옷나무의 주요한 성분 중에 하나인 fustin을 두가지 농도를 처리하여 실험을 진행하였는데, 그결과 혈소판 응집에 대한 효과가 거의 없는 것으로 나타남



< 그림 9 > Fisetin의 농도별 혈소판 응집 효능

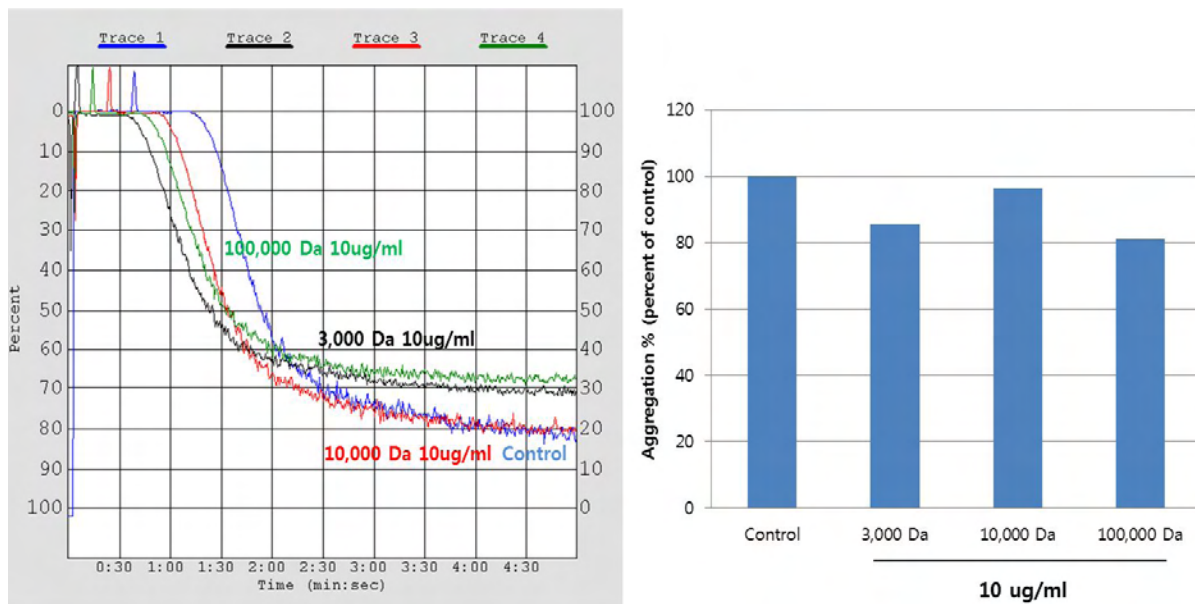
- Fisetin의 농도별 혈소판 응집효능을 살펴본 결과, 10uM에서는 별다른 효과를 나타내지 않았으나 100uM 농도에서는 약 96%가량의 강력한 응집억제 효능을 나타냄.



< 그림 10 > ARW의 농도별 혈소판 응집 효능

- ARW는 옷나무 추출물에서 flavonoid를 대부분 제거한 분획물로 위와 같은 방법으로 실험 진행하였음. 10ug/ml의 농도에서는 효과가 없었으나 100ug/ml농도에서는 약 20%가량의 억제 효능을 보임.
- 옷나무의 줄기와 잔가지는 모두 혈소판 응집 억제 효능을 나타내었고 줄기부분은 년생이 오래될수록 효과가 증가함. 또한 옷나무 추출물의 주요단일성분들을 처리한 결과 fustin, gallic

acid, protocatechuic acid는 별다른 효과를 나타내지 않았고, ARW와 fisetin은 억제 효과를 나타냄. 특히 fisetin은 매우 강력한 효과를 나타내어 옷나무 줄기의 강력한 혈소판 응집 억제 효과는 fisetin에 기인한 것으로 사료됨. 이에 따라 fisetin 및 fisetin 함유 옷나무 추출물은 혈소판 응집 유래의 혈행개선 기능성 소재로서의 가능성을 나타냄.



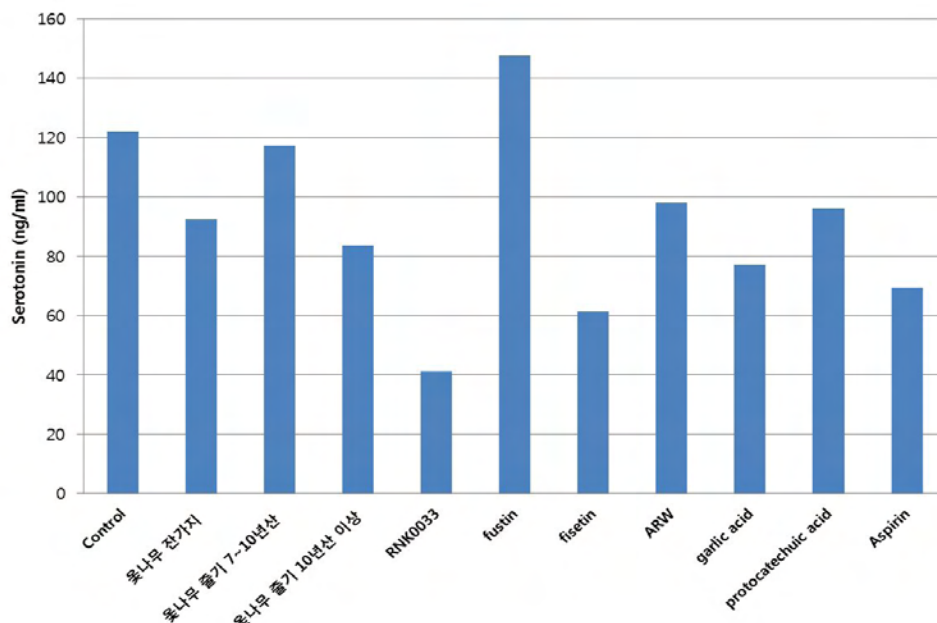
< 그림 11 > 옷나무 추출물의 분자량별 혈소판 응집 효과

- 옷나무 추출물을 ultrafiltration을 통해 분자량 별로 분획하여 혈소판 응집에 대한 효과를 살펴봄. 그 결과 3,000 Da에서는 약 14%, 100,000 Da에서는 19% 가량 혈소판 응집 억제 효과가 나타남. 하지만 10,000 Da에서는 응집 억제 효과가 유의적으로 나타나지 않음. 이 실험은 좀 더 다양한 농도를 통해 응집 억제 효과를 살펴봐야 할 필요성이 있음.

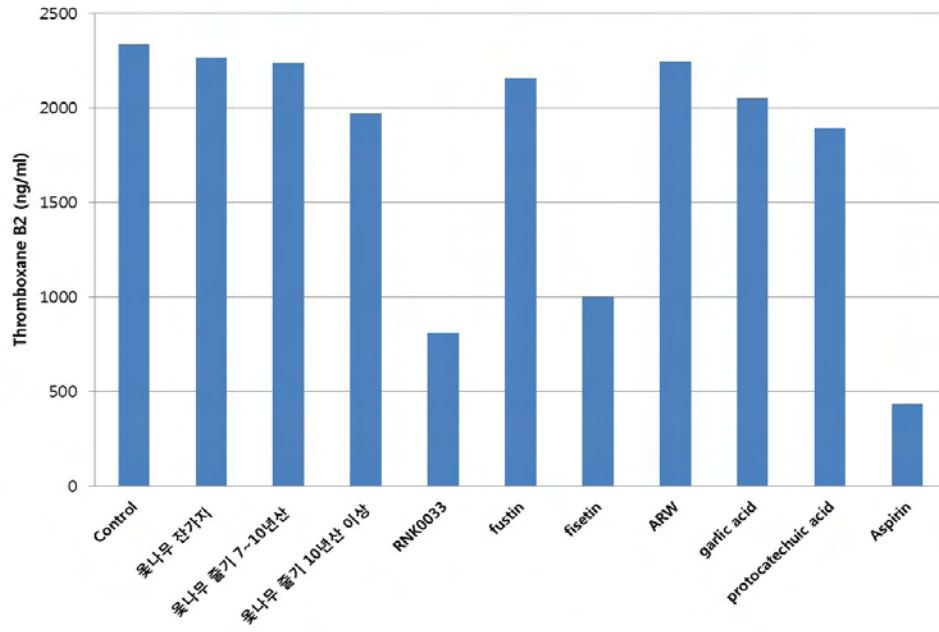
④ 혈소판 분리 및 물질의 Granule secretion 억제효과

혈액의 혈소판 등은 활성화되면 혈액 내 serotonin을 분비하며 이는 인접세포를 자극하여 혈행을 저하시킴. 혈소판에 존재하는 serotonin은 세포 내 칼슘 농도 상승에 의해 자가분비 혹은 주변분비 기전으로 분비되어 혈소판을 활성화시키는 작용하게 되는데 이 때 phospholipase C에 의한 inositol phosphate계통을 활성화시킴. Serotonin은 inositol phosphate에 의한 세포 내 칼슘 농도를 상승시켜 혈소판 활성화에 있어서 중요한 역할을 한다. 또한 혈소판이 활성화되면, phospholipid membrane으로부터 arachidonic acid를 기질로 cyclooxygenase에 의해 생성되는 PGH2로부터 thromboxane A2 (TxA2)가 만들어짐. TxA2는 불안정한 물질로서 반감기가 짧기 때문에, 안정한 대사체인 thromboxane B2를 정량함으로써 간접적으로 측정함. 옷나무 추출물과 단일물질을 WP에 100 ug/ml 농도로 5분간 전처리 한 다음 collagen을 처리하여 5분 동안 유리되는 serotonin과 thromboxane B2를 정량하였음. 실험 결과 옷나무 잔가지는

collagen에 의해 유리된 serotonin의 양을 약 29.7 ng/ml 감소시켰고, thromboxane B2의 양은 약 69 ng/ml 감소시켰음. 10년산 이상 옷나무 줄기는 serotonin의 분비를 38.5 ng/ml가량 감소시켰고, thromboxane B2의 양도 역시 약 365 ng/ml 가량 억제하였음. 특히 옷나무를 추출한 뒤 무독화과정에서 특수한 공법을 처리하여 fisetin의 함량을 비약적으로 높인 RNK0033은 약 80 ng/ml, fisetin은 60.8 ng/ml 가량 serotonin의 분비를 감소시켰고, thromboxane B2 역시 각각 1525 ng/ml, 1335 ng/ml 가량의 큰 억제 효과를 나타냄. 그 외에 ARW, gallic acid와 protocatechuic acid도 serotonin에서는 감소하는 효과를 보였지만, thromboxane B2는 유의적인 변화를 나타내지 않았음. 이 결과를 토대로 fisetin과 fisetin을 함유한 잔가지와 줄기는 혈소판의 응집을 억제하며, 혈소판의 활성이 증가될 때 serotonin과 thromboxane B2의 분비를 억제시킴으로써 혈행개선 가능성을 가진 원료로서의 가능성을 제시함. 또한 ARW, gallic acid와 protocatechuic acid는 serotonin는 억제하지만 thromboxane B2의 분비에는 큰 영향이 없는 것으로 보아 collagen 특이적인 경로를 억제하기는 하나 혈소판의 활성경로에는 별다른 영향을 주지않는 것으로 보여짐.



< 그림 13 > 옷나무 추출물 및 구성성분의 serotonin 분비 억제 효능



< 그림 14 > 울나무 추출물 및 구성성분의 thromboxane B2 분비 억제 효능

5절. 옷나무 추출물의 인체적용시험

연구제목

(국문) 정상성인에서 옷나무 추출물(DLTE)에 의한 항산화효과 및 혈행개선효과 스크린 - 무작위, 이중맹검, 실험군-대조군 임상중재 연구

(영문) Screening the effects of *Allium Rhus verniciflua Stokes* extract (DLTE) on anti-oxidant effect and coagulation effect in normal adult - randomized, double-blind, placebo-controlled trials

연구책임자 : 강원대병원 / 겸직교수 / 서인범 / 011-340-1329

의뢰자 : (주)에이지아이 / 대표 박상재 / 담당 이희환 / 033-258-6365

작성일 : 2012. 9. 5. 20120905 V1.0

	9. 현재 임신 중 또는 예정인 자	
피험자 모집 및 등록 절차	강원대학교병원에서 포스터 광고를 보고 참여를 원하는 30세 이상 60세 미만의 성인 본 연구의 참여에 동의하는 자에게 피험자 동의를 받은 후, 선정기준에 부합하며 제외기준에 해당하지 않는 피험자를 선별하여 모집	
스크리닝방법	체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며 제외기준에 해당되지 않을 것	
대상 질환의 표준 치료 방법	해당사항 없음.	
연구 방법	시험 전 그리고 시험 시작 6 주 후에 신체검사 (키, 몸무게, 혈압)를 시행하고 일반혈액검사 (full CBC with differential count), 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT, PAT), 공복시 혈당, 지방(total cholesterol, total lipid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride) 지표의 변화를 알아보고, 항산화 지표인 혈중 D-ROM의 변화를 검사하여 양 군에서 윗나무 잔가지 추출물(DRF)의 섭취 전, 후에 차이가 있는 지 분석.	
유효성 평가항목	1) 일차 유효성 평가 변수 ① 기본 검사 - 키, 몸무게, 혈압, 혈당, full CBC with differential count, 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT, PAT), 공복시 혈당 ② total cholesterol, total lipid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride 수치의 변화 2) 이차 유효성 평가 변수 ① 혈중 D-ROM 지표의 변화 ② 혈액응고검사 (PAT)의 변화	
통계분석방법	임상시험과 관련된 모든 피험자의 자료를 각 군별로 평가하고, 연속형 자료는 평균과 표준편차로 나타내고 범주형 자료는 빈도와 비율을 구한다. 두 군 간의 차이는 연속형 변수는 Student's t-test로 비교하였으며, 범주형 변수는 Fisher's exact를 이용하여 비교한다. 섭취 전후의 변화 분석에는 선형대 선형결합분석 (linear by linear association)을 이용하고, 유효성의 평가분석을 위해서 섭취 전, 후 평균점수의 영향을 통제하기 위해 공분산분석 (analysis of covariance; ANCOVA)을 시행하여 양군 간에 섭취 전, 후의 평균점수를 비교 분석한다. p 값이 0.05미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하고, 통계프로그램은 SPSS (SPSS Inc, Chicago, USA)를 이용	
동의취득절차	누가 연구를 설명하고, 동의를 받는가? (중복체크 가능)	<input checked="" type="checkbox"/> 연구책임자 <input checked="" type="checkbox"/> 연구담당자 → 성명 : 김주연, 남유정, 이슬 <input type="checkbox"/> 연구코디네이터 → 성명 :
	동의 절차가 이루어지는 장소는 어디인가?	<input type="checkbox"/> 외래(사무실) <input type="checkbox"/> 병실 <input type="checkbox"/> 수술실/시술실 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 : 진단검사의학과
	정보 전달을 위해 충분한 노력을 하는가?	설명과 동의 취득간의 시간 간격은? <input checked="" type="checkbox"/> 다음 날 또는 다음 방문 시 <input type="checkbox"/> 기타 () ※ 참여 여부를 결정할 수 있는 충분한 시간을 제공해야 함
		동의 설명을 위해 추가 자료를 사용하는가?
피험자 중 동의를 읽을 수 없는 자가 포함되는 경우	<input type="checkbox"/> 예 ※ 공정한 입회인이 동의 취득 과정에 포함되어야 함. <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 ※ 피험자 선정/제외기준에 해당 내용이 명시되어야 함.	

	(예 : 문맹, 외국인)	
	연구에 동의하고 최종 서명하는 사람은?	<input checked="" type="checkbox"/> 피험자 본인 <input type="checkbox"/> 피험자 본인 + 부모/법정대리인(미성년자, 인지장애자 등) <input type="checkbox"/> 부모 / 법정대리인(태아, 신생아 등) <input type="checkbox"/> 양쪽 부모 <input type="checkbox"/> 한쪽 부모
위험 / 이익 평가 (신체적, 정신적, 사회적 요인 포함)	연구의 잠재적 위험	미미함. (소화흡수 부작용)
	연구의 잠재적 이익	실험군은 실험제제에 의한 개선 기대
	위험/이익 분석 결과	본 시험에 이용되는 추출액은 이미 건강식품에 많이 이용되는 성분으로 부작용은 거의 없으며, 항산화 및 혈행 개선 효과를 기대할 수 있음.

연구 계획서 요약

1. 임상시험의 제목

(국문) 정상성인에서 옷나무 추출물(DLTE)에 의한 항산화효과 및 혈행개선효과 스크린 - 무작위, 이중맹검, 실험군-대조군 임상중재연구

(영문) Screening the effects of Allium Rhus Verniciflua Stokes extract (DLTE) on anti-oxidant effect and coagulation effect in normal adult - randomized, double-blind, placebo-controlled trials

2. 임상시험의 목적

정상성인에서 옷나무 추출물(DLTE)을 섭취하는 임상 중재 연구를 시행하여 항산화 효과 및 혈행개선효과를 알아보고자 한다.

3. 임상시험 연구자

임상시험 책임자 : 서인범 강원대병원 진단검사의학과 교수

임상시험 담당자 : 김주연 강원대병원 진단검사의학과 전임의
남유정 강원대병원 진단검사의학과 연구원
이슬 강원대병원 진단검사의학과 연구원

4. 임상시험의 대상

- 1) 상품명 : 옷나무 추출물(DLTE) 지표성분: gallic acid (10 mg/g이상 함유)
- 2) 분량 : 1일 2회, 1회 2 tablet, 일 2.4g
- 3) 제형 : 1 tablet은 600mg (** 자세한 함량은 식약청 고시 기준 기술서 참조)
- 4) 제제 준비 : (주)에이지아이

5. 임상시험 내용 및 방법

1) 연구내용의 개요

고혈압, 당뇨, 대사증후군 등 성인병과 관련된 질병들의 유병률이 최근 증가되고 있으며 이로 인한 의료비 지출이 급증하고 있는 실정으로 국가적 대책마련이 요구되고 있으며, 이와 관련하여 항산화 효과 및 혈액 순환 개선 효과가 있는 건강식품에 대한 관심이 높아지고 있다.

최근 옷나무 추출물과 관련된 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 대해 동물 실험 및 임상 실험이 보고되고 있다. 이에 옷나무 추출물(DLTE)이 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 미치는 효과를 임상중재연구를 통하여 검증해 보고자 함.

2) 연구내용의 구성

정상성인에서 윗나무 추출물(DLTE)에 의한 항산화효과 및 혈행개선효과 스크린 - 무작위, 이중맹검, 실험군-대조군 임상중재연구

① 한국인 30세 이상 60세 미만의 성인 중, 체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며, 현재 질환이나 특이 증상이 없는 성인 70명을 대상으로 제조된 윗나무 추출물(DLTE) (지표성분: gallic acid 10 mg/g이상 함유) tablet 600mg을 1회 2정씩, 1일 2회 총 2.4g을 경구 투여하게 되는데 단일맹검, 무작위 배정한 투여군 35명과 대조군 35명으로 나누어 6주간 섭취하도록 하여 연구를 진행함. 모든 피험자에게 시험 시작 전, 기본 생활습관 교육, 운동, 식사 교육을 시행함.

② 시험 전 그리고 시험 시작 6 주 후에 신체검사 (키, 몸무게, 혈압)를 시행하고 일반혈액 검사 (full CBC with differential count), 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT, PAT), 공복시 혈당, 지방(total cholesterol, tota lipid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride) 지표의 변화를 알아보고, 항산화 지표인 혈중 D-ROM의 변화를 검사하여 양군에서 윗나무 추출물(DLTE)의 섭취 전, 후에 차이가 있는 지 분석.

A. 선정 기준

1. 30세 이상 60세 미만의 성인
2. 체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며, 현재 질환이나 특이 증상이 없는 자.

B. 제외기준 (다음 중 한 가지 이상에 해당)

1. 윗나무 또는 윗나무 추출물에 대한 알레르기 또는 소화장애의 과거력이 있는 자.
2. 부정맥, 관상동맥 질환, 판막 질환, 심부전, 뇌졸중 등 심혈관계 질환 병력 있는 자.
3. 진단받은 지 5년 이내인 암환자, 신부전, 간경화 또는 의사의 판단에 따라 연구에 참여하기 어려운 조절되고 있지 않은 만성 질환이나 중독성 질환을 가진 자 (예, 갑상선 기능 항진증, 알코올 중독, 혈압 160/100mmHg이상 등)
4. 당뇨병으로 혈당강하제를 투약하고 있는 자
5. 최근 8주 이내에 수술 또는 지질관련 투약을 받은 적이 있는 자
6. 지난 3개월 간 몸무게가 5% 이상 변화된 자
7. 최근 3개월 이내 혈고판 응집에 영향을 주는 약물, 항산화제 혹은 스테로이드 제제 사용자.
9. 현재 임신 중 또는 예정인 자

3) 목표하는 피험자의 수: 시험군 35 명 / 대조군 35명

4) 대상:

1. 30세 이상 60세 미만의 성인
2. 체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며, 현재 질환이

나 특이 증상이 없는 자.

5) 시기: 2012년 IRB 승인후 약 6개월간

6. 평가기준, 평가방법 및 해석방법:

1) 일차 유효성 평가 변수

① 기본 검사 - 키, 몸무게, 혈압, 혈당, full CBC with differential count, 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT, PAT), 공복시 혈당

② total cholesterol, total lipid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride 수치의 변화

2) 이차 유효성 평가 변수

① 혈중 D-ROM 지표의 변화

② 혈액응고검사 (PAT)의 변화

3) 통계 분석

임상시험과 관련된 모든 피험자의 자료를 각 군별로 평가하고, 연속형 자료는 평균과 표준편차로 나타내고 범주형 자료는 빈도와 비율을 구한다. 두 군 간의 차이는 연속형 변수는 Student's t-test로 비교하였으며, 범주형 변수는 Fisher's exact를 이용하여 비교한다. 섭취 전후의 변화 분석에는 선형대 선형결합분석 (linear by linear association)을 이용하고, 유효성의 평가분석을 위해서 섭취 전, 후 평균점수의 영향을 통제하기 위해 공분산분석 (analysis of covariance; ANCOVA)을 시행하여 양군 간에 섭취 전, 후의 평균점수를 비교 분석한다. p값이 0.05미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하고, 통계프로그램은 SPSS (SPSS Inc, Chicago, USA)를 이용한다.

7. 임상시험의 안전대책

1) 시험군, 대조군 양군 모두에게 시험 시작 전 기본 생활습관 교육, 운동, 식사 교육을 시행한다.

2) 이상 반응 발생시 즉시 담당의사로부터 필요 검사 및 치료를 받을 수 있도록 관리함.

3) 이상 반응이 발생한 피험자에 대해서는 증상이 치료 될 때까지 연구자의 전화 또는 피험자의 외래방문으로 이상반응에 대해 계속 모니터링하여 피험자의 안전을 확인하도록 함.

4) 본 연구에 참여함으로써 생기는 피해에 대해서는 피해자보상규약에 의해 보상하도록 함.

8. 임상시험 진행일정표

월별	(연구기간: IRB 승인 - IRB 승인후 6개월)				
	1	2	3	4	5, 6
IRB등록 및 승인	○				
피험자 모집 및 시험 시작	○	○			
연구진행상황 중간 점검		○	○		
시험 종료			○	○	
검사결과 분석 및 통계				○	○
최종보고서 작성					○

9. 시험에 사용되는 시설 및 기기

특수 혈액 검사에 필요한 시약 및 기기는 (주)대한임상의학센터에서 제공하고 검사를 시행할 예정이며 일반혈액검사는 (주)녹십자검사센터 등 검사 수탁기관에 위탁 검사할 예정.

제출일: 2012년 9월 7일 연구책임자(의뢰자) 성명 : 서인범 (서 명)

임상실험계획서

1. 연구 제목

(국문) 정상성인에서 옷나무 추출물(DLTE)에 의한 항산화효과 및 혈행개선효과 스크린 - 무작위, 이중맹검, 실험군-대조군 임상중재연구

(영문) Screening the effects of Allium Rhus Verniciflua Stokes extract (DLTE) on anti-oxidant effect and coagulation effect in normal adult - randomized, double-blind, placebo-controlled trials

2. 요약문

고혈압, 당뇨, 대사증후군 등 성인병과 관련된 질병들의 유병률이 최근 증가되고 있으며 이로 인한 의료비 지출이 급증하고 있는 실정으로 국가적 대책마련이 요구되고 있으며, 이와 관련하여 항산화 효과 및 혈액 순환 개선 효과가 있는 건강식품에 대한 관심이 높아지고 있다.

최근 옷나무 추출물과 관련된 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 대해 동물 실험 및 임상 실험이 보고되고 있다. 이에 옷나무 추출물(DLTE)이 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 미치는 효과를 임상중재연구를 통하여 검증해 보고자 함.

3. 연구목적 및 필요성

옷나무는 옷나무과에 속하는 낙엽 활엽소 교목으로 관련된 재료는 오래전부터 옷담과 같은 건강보조식품으로 이용되어 왔으며, 한약 보조제로도 많이 이용되고 있다. 옷나무에 함유하고 있는 garlic acid 및 flavonoid는 일반식물에서도 존재하여 생체 내에서 각종 생리활성 물질로서 작용을 하며, 특히 지방산화와 암세포 성장을 유효하게 억제시키는 작용을 한다. 옷나무의 garlic acid 및 flavonoids 화합물로서 목질부에 fisetin과 fustin으로 존재하며, 생체 내에서 항암, 간보호, 혈압강아, 항균 및 항산화, 혈류개선 효과 등이 보고되고 있다. 옷나무 목질부에서 분리된 물질은 알레르기 작용을 일으키지 않는 동시에 강력한 항산화 활성을 가지므로 건강음료, 강장, 강정 등의 기능성 식음료로 이용될 수 있다고 하였다.

옷나무 추출물은 cyclooxygenase의 활성을 직접 억제함으로써 혈소판 응집을 억제하고 혈전 형성을 감소시켜 준다. 또한 AAF (ADP-activating factor)와 PAF (platelet activating factor)를 억제하여 혈소판 응집을 억제하여 혈전 또는 혈병의 용해가 잘 되어 혈류의 개선에 작용을 한다고 보고되고 있다.

현재까지 옷나무 추출물에 대한 수많은 연구가 보고 되고 있다. 본 연구에서는 한국인에서 옷나무 추출물(DLTE)을 섭취하는 임상 중재 연구를 시행하여 항산화효과 및 혈행개선효과를 알아보고자 하며, 이에 관여하는 기전이 무엇인지를 분석함으로써 심혈관 질환, 항산화 관련 질환의 예방 및 치료 방법으로서 옷나무 및 옷나무 추출혼합물 보충 섭취의 사용 가능성을 타진하고자 한다.

4. 연구내용

4.1. 연구내용의 개요

본 연구는 한국 성인이 옷나무 추출물(DLTE)이 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과가 있는지 평가하기 위한 임상 중재 연구임.

고혈압, 당뇨, 대사증후군 등 성인병과 관련된 질병들의 유병률이 최근 증가되고 있으며 이로 인한 의료비 지출이 급증하고 있는 실정으로 국가적 대책마련이 요구되고 있으며, 이와 관련하여 항산화 효과 및 혈액 순환 개선 효과가 있는 건강식품에 대한 관심이 높아지고 있다.

최근 옷나무 추출물과 관련된 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 대해 동물 실험 및 임상실험이 보고되고 있다. 이에 옷나무 추출물(DLTE)이 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 미치는 효과를 임상중재연구를 통하여 검증해 보고자 함.

4.2. 연구내용의 구성

1) 한국인 30세 이상 60세 미만의 성인 중, 체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며, 현재 질환이나 특이 증상이 없는 성인 70명을 대상으로 제조된 옷나무 추출물(DLTE) (지표성분: gallic acid 10 mg/g이상 함유) tablet 600mg을 1회 2정씩, 1일 2회 총 2.4g을 경구 투여하게 되는데 단일맹검, 무작위 배정한 투여군 35명과 대조군 35명으로 나누어 6주간 섭취하도록 하여 연구를 진행함. 모든 피험자에게 시험 시작 전, 기본 생활습관 교육, 운동, 식사 교육을 시행함.

무작위 배정 방법은 한림대 통계학과에서 50/70, 50/50의 비율로 제작되어 제공받은 난수표를 이용한 단순 무작위 배정법을 이용한다.

2) 시험 전 그리고 시험 시작 6 주 후에 신체검사 (키, 몸무게, 혈압)를 시행하고 일반 혈액검사 (full CBC with differential count), 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT, PAT), 공복시 혈당, 지방(total cholesterol, tota lipid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride) 지표의 변화를 알아보고, 항산화 지표인 혈중 D-ROM의 변화를 검사하여 양 군에서 옷나무 추출물(DLTE)의 섭취 전, 후에 차이가 있는 지 분석.

3) 연구내용과 관련된 국내외 연구동향

옷나무는 옷나무과에 속하는 낙엽 활엽소 교목으로 관련된 재료는 오래전부터 옷닭과 같은 건강보조식품으로 이용되어 왔으며, 한약 보조제로도 많이 이용되고 있다. 옷나무에 함유하고 있는 garlic acid 및 flavonoid는 일반식물에서도 존재하여 생체 내에서 각종 생리활성 물질로서 작용을 하며, 특히 지방산화와 암세포 성장을 유효하게 억제시키는 작용을 한다. 옷나무의 garlic acid 및 flavonoids 화합물로서 목질부에 fisetin과 fustin으로 존재하며, 생체 내에서 항암, 간보호, 혈압강하, 항균 및 항산화, 혈류개선 효과 등이 보고되

고 있다. 옷나무 목질부에서 분리된 물질은 알레르기 작용을 일으키지 않는 동시에 강력한 항산화 활성을 가지므로 건강음료, 강장, 강정 등의 기능성 식음료로 이용될 수 있다고 하였다.

옷나무 추출물은 cyclooxygenase의 활성을 직접 억제함으로써 혈소판 응집을 억제하고 혈전 형성을 감소시켜 준다. 또한 AAF (ADP-activating factor)와 PAF (platelet activating factor)를 억제하여 혈소판 응집을 억제하여 혈전 또는 혈병의 용해가 잘 되어 혈류의 개선에 작용을 한다고 보고되고 있다.

현재까지 옷나무 추출물에 대한 수많은 연구가 보고 되고 있다. 본 연구에서는 한국인에서 옷나무 추출물(DLTE)을 섭취하는 임상 중재 연구를 시행하여 항산화효과 및 혈행개선효과를 알아보려고 하며, 이에 관여하는 기전이 무엇인지를 분석함으로써 심혈관 질환, 항산화 관련 질환의 예방 및 치료 방법으로서 옷나무 및 옷나무 추출혼합물 보충 섭취의 사용 가능성을 타진하고자 한다.

5. 연구방법

5.1. 대상자 선정 및 모집

강원대학교병원에서 포스터 광고를 보고 참여를 원하는 30세 이상 60세 미만의 성인 중 본 연구의 참여에 동의하는 자에게 피험자 동의서를 받은 후, 체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며, 현재 질환이나 특이 증상이 없는 성인 70명을 대상으로 선정기준에 부합하며 제외기준에 해당하지 않는 피험자를 선별하여 모집할 예정이다.

A. 임상 시험 제목

(국문) 정상성인에서 옷나무 추출물(DLTE)에 의한 항산화효과 및 혈행개선효과 스크린 - 무작위, 이중맹검, 실험군-대조군 임상중재연구

(영문) Screening the effects of Allium Rhus Verniciflua Stokes extract (DLTE) on anti-oxidant effect and coagulation effect in normal adult - randomized, double-blind, placebo-controlled trials

B. 선정 기준 (1, 2 모두 만족해야 함)

1. 30세 이상 60세 미만의 성인
2. 체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며, 현재 질환이나 특이 증상이 없는 자.

C. 제외기준 (다음 중 한 가지 이상에 해당)

1. 옷나무 또는 옷나무 추출물에 대한 알레르기 또는 소화장애의 과거력이 있는 자.

2. 부정맥, 관상동맥 질환, 판막 질환, 심부전, 뇌졸중 등 심혈관계 질환 병력 있는 자.
3. 진단받은 지 5년 이내인 암환자, 신부전, 간경화 또는 의사의 판단에 따라 연구에 참여하기 어려운 조절되고 있지 않은 만성 질환이나 중독성 질환을 가진 자 (예, 갑상선 기능 항진증, 알코올 중독, 혈압 160/100mmHg이상 등)
4. 당뇨병으로 혈당강하제를 투약하고 있는 자
5. 최근 8주 이내에 수술 또는 지질관련 투약을 받은 적이 있는 자
6. 지난 3개월 간 몸무게가 5% 이상 변화된 자
7. 최근 3개월 이내 혈소판 응집에 영향을 주는 약물, 항산화제 혹은 스테로이드 제제 사용자.
9. 현재 임신 중 또는 예정인 자

D. Sample number calculation 및 군의 할당

예비 임상 중재 연구로서 power calculation 은 시행하지 않음. 목표하는 피험자의 수는 시험군 35 명, 대조군 35명임. 양군 모두에게 시험 시작 전 기본 생활습관 교육, 운동, 식사 교육을 시행한다.

5.2. 실험

1) 선별 검사

- ① 키, 몸무게, 체온, 혈압, 맥박 측정
- ② 공복혈당, 일반혈액검사 (full CBC with differential count), electrolyte, LFT
- ③ 제외 기준에 해당하는 병력 확인

** 한 달 이내의 검사결과가 있는 건강검진 수험자의 경우 검사② 생략 가능

2) 시험 시작 0주

- ① 기본 검사 - 키, 몸무게, 혈압, 혈당, full CBC with differential count, 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT, PAT), 공복시 혈당
- ② total cholesterol, total lipid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride 수치
- ③ 혈중 D-ROM 지표
- ④ 혈액응고검사 (PAT)

3) 추출혼합물 제공 및 순응도 평가 방법

추출혼합물 제공- (주)에이지아이에서 제공 (별첨. 기술서)

순응도 평가- 섭취 여부 기록 일지 제공

4) 환자 방문

선별 검사 방문

시험 시작 방문

전화 인터뷰: 시험 시작 후 첫 1주간 주 3회, 이후 주 1회

시험 종료 방문 (6주(± 3일))

5) 유효성 변수 및 통계 분석

(1) 일차 유효성 평가 변수

① 기본 검사 - 키, 몸무게, 혈압, 혈당, full CBC with differential count, 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT, PAT), 공복시 혈당

② total cholesterol, total lipid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride 수치의 변화

(2) 이차 유효성 평가 변수

① 혈중 D-ROM 지표의 변화

② 혈액응고검사 (PAT)의 변화

(3) 통계 분석

임상시험과 관련된 모든 피험자의 자료를 각 군별로 평가하고, 연속형 자료는 평균과 표준편차로 나타내고 범주형 자료는 빈도와 비율을 구한다. 두 군 간의 차이는 연속형 변수는 Student's t-test로 비교하였으며, 범주형 변수는 Fisher's exact를 이용하여 비교한다. 섭취 전후의 변화 분석에는 선형대 선형결합분석 (linear by linear association)을 이용하고, 유효성의 평가분석을 위해서 섭취 전, 후 평균점수의 영향을 통제하기 위해 공분산분석 (analysis of covariance; ANCOVA)을 시행하여 양군 간에 섭취 전, 후의 평균점수를 비교 분석한다. p값이 0.05미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하고, 통계프로그램은 SPSS (SPSS Inc, Chicago, USA)를 이용한다.

본 임상시험의 endpoint 기준은 기존 문헌에서 4주에서 24주까지 보고되고 있으며, 4주 이상 복용시 혈액학적 지표의 변화를 대부분 관찰할 수 있으며 본 의뢰자의 동물실험 결과에서도 4주 이상 복용시 혈액학적 지표의 변화를 관찰할 수 있어 복용 기간은 6주를 기준으로 복용 전, 후에 대해 측정가능한 지표의 변화에 대해 통계학적으로 유의한 차이가 있는지를 분석하고자 하였다.

6) 중도 탈락

- ① 시험대상물 섭취에 대하여 급성 반응(알러지 과민반응)을 보이는 환자
- ② 이상 반응이 발생되어 시험책임자가 중지가 필요하다고 판단한 경우
- ③ 시험 개시 후 피험자가 섭취 및 검사를 거부하거나 동의를 철회하는 경우
- ④ 시험 개시 후 대상환자로 부적절하다고 판단한 경우
- ⑤ 시험 개시 후 피험자의 사정상 검사 또는 조사가 실시가 불가능 하다고 판단한 경우

7) 피험자 동의서

- (1) 시험자 혹은 시험자가 지명한 사람은, 시험자의 책임 하에, 임상시험심사 위원회 /윤리위원회(IRB/IEC)가 서면으로 승인한 정보를 포함하여 본 임상시험과 관련된 모든 사항에 대하여 환자에게 충분히 정보를 제공함.
- (2) 본 임상시험에 환자가 참여하기에 앞서, 환자 혹은 환자의 법적 대리인, 그리고 피험자 동의절차를 수행한 사람이 직접 서면으로 된 피험자 동의서에 서명을 하고, 이름 및 서명 날짜를 기입함. 서명 및 날짜가 기입된 서면 동의서의 사본을 환자에게 제공함.

8) 피험자의 안전보호에 관한 대책 및 피해자12.7 보상에 대한 규약

(1) 피험자의 비밀 유지

- ① 피험자의 신원을 파악할 수 있는 기록은 비밀로 보장 될 것이며, 임상시험의 결과가 출판될 경우에도 피험자의 신원을 비밀 상태로 유지함.
- ② 증례 기록서 등 임상시험에 관련된 모든 서류에는 환자이름이 아닌 피험자 식별코드 (일반적으로 환자의 이니셜)로 기록하고 구분함.

(2) 이상반응 발생시 조치와 피해자 보상에 대한 규약

- ① 이상 반응 발생시 즉시 담당의사로부터 필요 검사 및 치료를 받을 수 있도록 관리함.
- ② 이상 반응이 발생한 피험자에 대해서는 증상이 치료 될 때까지 연구자의 전화 또는 피험자의 외래방문으로 이상반응에 대해 계속 모니터링하여 피험자의 안전을 확인하도록 함.
- ③ 본 연구에 참여함으로써 생기는 피해에 대해서는 피해자보상규약에 의해 보상하도록 함.

6. 연구에 필요한 재료

신체검사 및 특수 혈액 검사에 필요한 시약 및 기기는 (주)대한임상의학센터에서 제공하고 검사를 시행할 예정이며, 일반혈액검사는 (주)녹십자검사센터에 위탁 검사할 예정.

7. 기대효과 및 활용방안

본 연구를 통해 옷나무 추출물(DLTE)에 의한 항산화효과 및 혈행개선효과가 있는 것으로 확인된다면, 본 추출물의 개선 효과에 대한 홍보 및 다양한 식품개발 연구 활성화, 영양교육 프로그램 보급에 큰 도움이 될 것이고 국민 건강 증진에 기여할 것임. 또한 후속 연구로서 옷나무 추출물(DLTE)의 종류 및 양, 조리형태에 따른 효과의 차이가 있는지, 대사증후군 개선 효과의 상세 기전이 무엇인지에 대한 대규모 연구가 진행될 수 있을 것임.

8. 연구추진 일정

(연구기간: IRB 승인 - IRB 승인후 6개월)					
월별	1	2	3	4	5,6
IRB등록 및 승인	○				
피험자 모집 및 시험 시작	○	○			
연구진행상황 중간 점검		○	○		
시험 종료			○	○	
검사결과 분석 및 통계				○	○
최종보고서 작성					○

9. 참고문헌

- 1: Kang SY, Kang JY, Oh MJ. Antiviral activities of flavonoids isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes against fish pathogenic viruses In Vitro. J Microbiol. 2012 Apr;50(2):293-300.
- 2: Cho N, Choi JH, Yang H, Jeong EJ, Lee KY, Kim YC, Sung SH. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of flavonoids isolated from *Rhus verniciflua* in neuronal HT22 and microglial BV2 cell lines. Food Chem Toxicol. 2012 Jun;50(6):1940-5.
- 3: Lee S, Kim K, Jung H, Lee S, Cheon S, Kim S, Eo W, Choi W. Efficacy and safety of standardized allergen-removed *Rhus verniciflua* Stokes extract in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer: a Korean single-center experience. Oncology. 2011;81(5-6):312-8.
- 4: Choi W, Jung H, Kim K, Lee S, Yoon S, Park J, Kim S, Cheon S, Eo W, Lee S. *Rhus verniciflua* Stokes against advanced cancer: a perspective from the Korean Integrative Cancer Center. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:874276. Epub 2011 Nov 17.

Review.

- 5: Suk KT, Baik SK, Kim HS, Park SM, Paeng KJ, Uh Y, Jang IH, Cho MY, Choi EH, Kim MJ, Ham YL. Antibacterial effects of the urushiol component in the sap of the lacquer tree (*Rhus verniciflua* Stokes) on *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2011 Dec;16(6):434-43.
- 6: Kim S, Park SE, Sapkota K, Kim MK, Kim SJ. Leaf extract of *Rhus verniciflua* Stokes protects dopaminergic neuronal cells in a rotenone model of Parkinson's disease. *J Pharm Pharmacol*. 2011 Oct;63(10):1358-67.
- 7: Cheon SH, Kim KS, Kim S, Jung HS, Choi WC, Eo WK. Efficacy and safety of *Rhus verniciflua* stokes extracts in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Forsch Komplementmed*. 2011;18(2):77-83.
- 8: Jung CH, Kim JH, Kim JH, Chung JH, Choi HS, Seo JB, Shin YC, Kim SH, Ko SG. Anti-inflammatory effect of *Rhus verniviflua* Stokes by suppression of iNOS-mediated Akt and ERK pathways: in-vitro and in-vivo studies. *J Pharm Pharmacol*. 2011 May;63(5):679-87.
- 9: Sapkota K, Kim S, Park SE, Kim SJ. Detoxified extract of *Rhus verniciflua* stokes inhibits rotenone-induced apoptosis in human dopaminergic cells, SH-SY5Y. *Cell Mol Neurobiol*. 2011 Mar;31(2):213-23.
- 10: Sapkota K, Kim S, Kim MK, Kim SJ. A detoxified extract of *Rhus verniciflua* Stokes upregulated the expression of BDNF and GDNF in the rat brain and the human dopaminergic cell line SH-SY5Y. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(10):1997-2004.
- 11: Song DG, Lee JY, Lee EH, Jung SH, Nho CW, Cha KH, Koo SY, Pan CH. Inhibitory effects of polyphenols isolated from *Rhus verniciflua* on Aldo-keto reductase family 1 B10. *BMB Rep*. 2010 Apr;43(4):268-72.
- 12: Lee SH, Choi WC, Kim KS, Park JW, Lee SH, Yoon SW. Shrinkage of gastric cancer in an elderly patient who received *Rhus verniciflua* Stokes extract. *J Altern Complement Med*. 2010 Apr;16(4):497-500.
- 13: Lee SK, Jung HS, Eo WK, Lee SY, Kim SH, Shim BS. *Rhus verniciflua* Stokes extract as a potential option for treatment of metastatic renal cell carcinoma: report

- of two cases. *Ann Oncol.* 2010 Jun;21(6):1383-5.
- 14: Kim KS, Jung HS, Choi WC, Eo WK, Cheon SH. A case of recurred hepatocellular carcinoma refractory to doxorubicin after liver transplantation showing response to herbal medicine product, *Rhus verniciflua* Stokes extract. *Integr Cancer Ther.* 2010 Mar;9(1):100-4.
- 15: Lee SH, Choi WC, Yoon SW. Impact of standardized *Rhus verniciflua* stokes extract as complementary therapy on metastatic colorectal cancer: a Korean single-center experience. *Integr Cancer Ther.* 2009 Jun;8(2):148-52.
- 16: Lee SH, Kim KS, Choi WC, Yoon SW. Successful outcome of advanced pulmonary adenocarcinoma with malignant pleural effusion by the standardized *Rhus verniciflua* stokes extract: a case study. *Explore (NY).* 2009 Jul-Aug;5(4):242-4.
- 17: Kim JH, Jung CH, Jang BH, Go HY, Park JH, Choi YK, Hong SI, Shin YC, Ko SG. Selective cytotoxic effects on human cancer cell lines of phenolic-rich ethyl-acetate fraction from *Rhus verniciflua* Stokes. *Am J Chin Med.* 2009;37(3):609-20.
- 18: Kim JH, Go HY, Jin DH, Kim HP, Hong MH, Chung WY, Park JH, Jang JB, Jung H, Shin YC, Kim SH, Ko SG. Inhibition of the PI3K-Akt/PKB survival pathway enhanced an ethanol extract of *Rhus verniciflua* Stokes-induced apoptosis via a mitochondrial pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2008 Jul 8;265(2):197-205. Epub 2008 Apr 18. Pu
- 19: Jung CH, Jun CY, Lee S, Park CH, Cho K, Ko SG. *Rhus verniciflua* stokesextract: radical scavenging activities and protective effects on H₂O₂-induced cytotoxicity in macrophage RAW 264.7 cell lines. *Biol Pharm Bull.* 2006 Aug;29(8):1603-7.
- 20: Kim JH, Kim HP, Jung CH, Hong MH, Hong MC, Bae HS, Lee SD, Park SY, Park JH, Ko SG. Inhibition of cell cycle progression via p27Kip1 upregulation and apoptosis induction by an ethanol extract of *Rhus verniciflua* Stokes in AGS gastric cancer cells. *Int J Mol Med.* 2006 Jul;18(1):201-8. P
- 21: Jang HS, Kook SH, Son YO, Kim JG, Jeon YM, Jang YS, Choi KC, Kim J, Han SK, Lee KY, Park BK, Cho NP, Lee JC. Flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Nov 30;1726(3):309-16.

- 22: Son YO, Lee KY, Lee JC, Jang HS, Kim JG, Jeon YM, Jang YS. Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. *Toxicol Lett.* 2005 Jan 15;155(1):115-25.
- 23: Lee JC, Lee KY, Kim J, Na CS, Jung NC, Chung GH, Jang YS. Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food Chem Toxicol.* 2004 Sep;42(9):1383-8.
- 24: Lee JC, Kim J, Jang YS. Ethanol-eluted extract of *Rhus verniciflua* stokes inhibits cell growth and induces apoptosis in human lymphoma cells. *J Biochem Mol Biol.* 2003 Jul 31;36(4):337-43.
- 25: Lee JC, Lim KT, Jang YS. Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Apr 15;1570(3):181-91.
- 26: Kitts DD, Lim KT. Antitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS). *J Toxicol Environ Health A.* 2001 Oct 26;64(4):357-71.
- 27: Lim KT, Hu C, Kitts DD. Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. *Food Chem Toxicol.* 2001 Mar;39(3):229-37.

임상실험 결과 보고서

(국문) 정상성인에서 옷나무 추출물(DLTE)에 의한 항산화효과 및
혈행개선효과 스크린 - 무작위, 이중맹검, 실험군-대조군 임상중재
연구

(영문) Screening the effects of Allium Rhus verniciflua
Stokes extract (DLTE) on anti-oxidant effect and
coagulation effect in normal adult - randomized, double-blind,
placebo-controlled trials

IRB No. 강원대학교병원 IRB 2012-09-007 (2012.09.25)

연구승인기간 : 2012.09.18 - 2013.09.17 (최종 protocol No. V2.0, 2012.04.01)

연구기간 : 2012.09.06 - 2013.03.31

연구책임자 : 강원대병원 / 겸직교수 / 서인범 / 비공개용

의뢰자 : (주)에이지아이 / 대표 박상재 / 담당 이희환 / 033-258-6365

2013. 05. 29

지원의뢰기관	기관명	(주)에이치아이	대표(직위)	성명	최원철, 박상재
제출서류목록	(첨부) 연구계획서 [] [] (첨부) 임상시험자 자료집(IRB) [] [] (첨부) 피험자 설명문 및 동의서 [] [] (첨부) 연구자 준수 서약서 [] [] (첨부) 연구비 산정 내역서 [] [] (첨부) 이력서 [] [] (첨부) 교육 이수증 [] [] (첨부) 임상시험 품목의 개요 [] [] (첨부) 피험자 모집 공고문 [] [] (첨부) 피험자 보상 규약 [] [] (첨부) 이해상충 보고서 [] [] (첨부) 연구과제 정검리스트 [] [] (첨부) 제조(수입)품목 허가증 [] [] (첨부) 연구계획서 요약 [] [] (첨부) 연구기술서 [] [] (첨부) 첨1 [] [] (첨부) 첨2 [] [] (첨부) 첨3 [] [] (첨부) 첨4 [] [] (첨부) 첨5 [] []				
관련근거	심사회의록	2012년 09월 18일			
중간보고시기	2013년 07월 17일까지	비고	승인유효기간 만료 2-9개월 전까지		
심사결과	● 승인 ○ 시정승인 ○ 보완 ○ 반려 1. 본 과제의 과학적 측면, 윤리적 측면, 학술적 측면에서 이의가 없습니다. 2. 피험자에 대한 Risk와 Benefit에 대한 판단 결과 12개월의 승인유효기간동안 연구진행을 승인합니다. 3. 연구의 지속을 위하여 승인유효기간 만료 2개월 전인 2013년 7월 17일까지 연구의 진행상황에 대한 지속심사를 진행하시기 바랍니다. 4. 피험자 설명문 및 동의서에 IRB 인증도장을 날인 후 사용하시기 바랍니다. 5. 연구는 승인하되 아래 사항에 대하여 수정한 사항이 반영된 서류를 추가적으로 제출하여 주시기 바랍니다.				
심사결과	5.1. 증례기록서에 피험자 개인 정보의 '생년월일(YYYY.MM.DD)'을 '생년월(YYYY.MM)' 까지 기입하거나 불필요한 정보라면 삭제하여 주시기 바랍니다. 5.2. 연구분류의 분류 1에 '건강기능식품' 을 추가하시기 바랍니다.				

본 통보서에 기재된 사항은 강원대학교병원 생명의학연구윤리심의위원회의 기록된 내용과 동일합니다.
 본 생명의학연구윤리심의위원회는 KGCP 및 ICH - GCP를 준수하며 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련 법규를 준수합니다.
 시정 승인, 보완 후 재심사 판정된 연구계획서 및 보고서는 해당 답변서를 제출함으로써 위원회의 재심사를 받을 수 있습니다.
 심사 결과에 이의가 있을 경우에는 본 통보서를 받은 일주일 이내로 이의신청서를 작성하여 본 IRB에 제출하여 주시기 바랍니다.

강원대학교병원 생명의학연구윤리심의위원장



1. 연구 제목

(국문) 정상성인에서 윗나무 추출물(DLTE)에 의한 항산화효과 및 혈행개선효과 스크린 - 무작위, 이중맹검, 실험군-대조군 임상중재연구

(영문) Screening the effects of *Allium Rhus verniciflua* Stokes extract (DLTE) on anti-oxidant effect and coagulation effect in normal adult - randomized, double-blind, placebo-controlled trials

2. 연구 개요

고혈압, 당뇨, 대사증후군 등 성인병과 관련된 질병들의 유병률이 최근 증가되고 있으며 이로 인한 의료비 지출이 급증하고 있는 실정으로 국가적 대책마련이 요구되고 있으며, 이와 관련하여 항산화 효과 및 혈액 순환 개선 효과가 있는 건강식품에 대한 관심이 높아지고 있다.

최근 윗나무 추출물과 관련된 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 대해 동물 실험 및 임상실험이 보고되고 있다. 이에 윗나무 추출물에 대해 항산화효과 및 혈액순환 개선 효과에 미치는 효과를 임상중재연구를 통하여 검증해 보고자 하였다.

3. 연구목적 및 필요성

윗나무는 윗나무과에 속하는 낙엽 활엽소 교목으로 관련된 재료는 오래전부터 윗담과 같은 건강보조식품으로 이용되어 왔으며, 한약 보조제로도 많이 이용되고 있다. 윗나무에 함유하고 있는 garlic acid 및 flavonoid는 일반식물에서도 존재하여 생체 내에서 각종 생리활성 물질로서 작용을 하며, 특히 지방산화와 암세포 성장을 유효하게 억제시키는 작용을 한다. 윗나무의 garlic acid 및 flavonoids 화합물로서 목질부에 fisetin과 fustin으로 존재하며, 생체 내에서 항암, 간보호, 혈압강하, 항균 및 항산화, 혈류개선 효과 등이 보고되고 있다. 윗나무 목질부에서 분리된 물질은 알레르기 작용을 일으키지 않는 동시에 강력한 항산화 활성을 갖고 있어 건강음료, 강장, 강정 등의 기능성 식음료로 이용될 수 있다.

윗나무 추출물은 cyclooxygenase의 활성을 직접 억제함으로써 혈소판 응집을 억제하고 혈전 형성을 감소시켜 준다. 또한 AAF (ADP-activating factor)와 PAF (platelet activating factor)를 억제하여 혈소판 응집을 억제하여 혈전 또는 혈병의 용해가 잘 되어 혈류의 개선에 작용을 한다고 보고되고 있다.

본 연구에서는 혈소판의 기능을 간단하고 정확하게 스크린할 수 있는 혈소판 부착 및 응집능 검사 (PFA-100)를 이용하여 혈류 개선에 대한 작용을 평가 하고자 하였다.

현재까지 윗나무 추출물에 대한 수많은 연구가 보고 되고 있는데 본 연구에서는 한국인에서 윗나무 추출물(DLTE)을 섭취하는 임상 중재 연구를 시행하여 항산화효과 및 혈행개선효과를 알아보고자 하며, 이에 관여하는 기전이 무엇인지를 분석함으로써 심혈관

질환, 항산화 관련 질환의 예방 및 치료 방법으로서 옷나무 및 옷나무 추출물 보충 섭취의 사용 가능성을 타진하고자 한다.

4. 연구방법

4.1. 연구방법의 개요

본 연구는 한국 성인이 옷나무 추출물(DLTE)이 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과가 있는지 평가하기 위한 임상 중재 연구이다.

고혈압, 당뇨, 대사증후군 등 성인병과 관련된 질병들의 유병률이 최근 증가되고 있으며 이로 인한 의료비 지출이 급증하고 있는 실정으로 국가적 대책마련이 요구되고 있으며, 이와 관련하여 항산화 효과 및 혈액 순환 개선 효과가 있는 건강식품에 대한 관심이 높아지고 있다.

최근 옷나무 추출물과 관련된 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 대해 동물 실험 및 임상실험이 보고되고 있다. 이에 옷나무 추출물(DLTE)이 항산화 효과 및 혈액 순환 개선효과에 미치는 효과를 임상중재연구를 통하여 검증해 보고자 하였다.

4.2. 연구방법의 구성

1) 한국인 30세 이상 60세 미만의 성인 중, 체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며, 현재 질환이나 특이 증상이 없는 성인 70명을 대상으로 제조된 옷나무 추출물(DLTE) (지표성분: gallic acid 10 mg/g이상 함유) tablet 600mg을 1회 2정씩, 1일 2회 총 2.4g을 경구 투여하게 되는데 단일맹검, 무작위 배정한 시험군 35명과 대조군 35명으로 나누어 6주간 섭취하도록 하여 연구를 진행함. 모든 피험자에게 시험 시작 전, 기본 생활습관 교육, 운동, 식사 교육을 시행함. 무작위 배정 방법은 한림대 통계학과에서 50/50의 비율로 제작되어 제공받은 난수표를 이용한 단순 무작위 배정법을 이용한다.

2) 시험 전 그리고 시험 시작 6주 후에 신체검사 (키, 몸무게, 혈압)를 시행하고 일반혈액검사 (full CBC with differential count), 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT), 혈소판 기능 선별검사, 공복시 혈당, 지방(total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride) 지표의 변화를 알아보고, 항산화 지표인 혈중 D-ROM과 BAP의 변화를 검사하여 양 군에서 옷나무 추출물(DLTE)의 섭취 전, 후에 차이가 있는지 분석하였다.

4.3. 대상자 선정 및 모집

강원대학교병원에서 포스터 광고를 보고 참여를 원하는 30세 이상 60세 미만의 성인 중 본 연구의 참여에 동의하는 자에게 피험자 동의서를 받은 후, 체온, 혈압, 맥박, CBC, electrolyte, LFT, glucose가 참고치 범위에 있으며, 현재 질환이나 특이 증상이 없는 성

인 70명을 대상으로 선정기준에 부합하며 제외기준에 해당하지 않는 피험자를 선별하여 모집하였다.

4.4. 검사 방법

일반혈액검사는 EDTA 진공시험관에 채혈하고 냉장 보관하여 2시간 이내에 자동혈액분석기 Sysmex XE-2200 (Japan)을 이용하여 분석하였으며, 간기능검사, 전해질검사 및 지질관련 검사는 SST 진공시험관에 채혈한 후, 30분 이내에 원심분리하여 혈청을 분리한 후, 자동생화학분석기(Beckman coulter DXC 800, USA) 및 자동면역분석기(Beckman coulter DXI 800, USA)를 이용하였다. 혈액응고 검사는 Na Citrate 진공시험관에 채혈하고 30분 이내에 원심분리하여 혈장을 분리한 후, 자동혈액응고분석기(STA-R Evolution, Stago)를 이용하여 분석하였다. 혈소판의 부착 및 응집능 검사는 NaCitrate 시험관을 이용하여 검체를 채취한 후, PFA-100 (Dade Behring)를 이용하여 측정하였다.

4.5. 통계 및 결과 분석

결과의 통계분석에는 SPSS (Ver 18.0) 프로그램을 이용하였으며, 대조군과 시험군에서 전, 후의 차이를 보기 위해 대응표본 t-test (paired t-test)를 이용하였으며 대조군과 시험군간의 차이를 분석하기 위해 독립표본 t-test (independent t-test)를 이용하였다. 각 통계치의 유의수준은 $P < 0.05$ 를 기준으로 하여 값이 0.05 이하일 때 차이가 유의한 것으로 판정하였다.

5. 연구결과

5.1. 연구 대상

강원대학교병원에서 건강검진 및 외래진료를 받은 피험자 또는 포스터 광고를 보고 참여를 원하는 30세 이상 60세 미만의 성인 중 본 연구의 참여에 동의하는 자에게 피험자 동의서를 받은 후, 선정기준에 부합된 성인 70명을 대상으로 무작위 배정한 투여군 35명과 대조군 35명으로 나누어 6주간 섭취하도록 하여 연구를 진행하였으며, 시험군과 대조군에서 각각 1명이 중도 탈락하여 시험군 34명 및 대조군 34명, 총 68명을 대상으로 분석하였다. 중도 탈락자는 개인 사정상 복용을 중간에 포기한 대상자였다.

연구대상자의 평균 나이는 49.1 ± 9.7 (평균 \pm 표준편차)세였으며 시험군은 48.1 ± 10.1 세 대조군은 50.3 ± 9.4 세, 남녀의 비율은 1:3 (남 17명, 여 51명)였다.

5.2. 연구 결과

5.2.1. 일반 신체 검사

옫나무 추출물 섭취 전, 후에 측정된 키, 몸무게, 허리 둘레 및 혈압은 유의한 차이를 보이지 않았으며, 시험군과 대조군에서도 유의한 차이를 보이지 않았다. (표 1.)

표 1. 일반 신체 검사 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 34명, Pre; 복용전, post; 복용 후)

	Height (cm)		Body weight (kg)		Waist (cm)		Blood pr (bpm)	
	C	T	C	T	C	T	C	T
Pre	162.1 (8.1)	161.3 (8.1)	62.3 (12.3)	62.4 (9.9)	82.4 (10.0)	82.2 (7.4)	124/76 (19/13)	123/76 (12/12)
Post	161.9 (8.1)	160.9 (8.3)	63.1 (12.4)	63.4 (9.9)	80.4 (9.6)	81.4 (7.4)	122/77 (19/15)	122/76 (13/8)

5.2.2. 일반 혈액 검사

웃나무 추출물 섭취 전, 후에 검사한 백혈구수, 적혈구수, 혈색소(Hgb, hemoglobin), 적혈구 용적율(Hct, hematocrit), 혈소판수, 평균 적혈구 용적(MCV, mean corpuscular volume), 평균 적혈구 혈색소량 (MCH, mean corpuscular hemoglobin), 평균 혈구내 혈색소 농도 (MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), 적혈구 용적 분포 (RDW, red cell volume distribution width), 혈소판 분포 계수(PDW, platelet distribution width), 평균 혈소판 용적(MPV, mean platelet volume)는 유의한 차이를 보이지 않았으며, 시험군과 대조군에서도 유의한 차이를 보이지 않았다. (표 2.)

표 2. 일반 혈액 검사 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 34명, Pre; 복용전, post; 복용 후)

	WBC ($10^3/\mu\ell$)		RBC ($10^6/\mu\ell$)		HGB (g/dL)		HCT (%)		PLT ($10^3/\mu\ell$)	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Pre	6.3 (1.8)	5.9 (0.9)	4.5 (0.4)	4.7 (0.6)	13.6 (1.5)	13.9 (1.4)	39.9 (4.0)	40.7 (3.3)	253.0 (47.9)	267.2 (58.8)
Post	6.3 (1.6)	5.9 (1.2)	4.5 (0.4)	4.6 (0.3)	13.7 (1.5)	13.7 (1.4)	40.8 (4.7)	41.6 (4.4)	246.4 (52.9)	268.9 (72.2)

	MCV (fL)		MCH (pg)		MCHC (%)		RDW-SD (fL)	
	C	T	C	T	C	T	C	T
Pre	88.9 (3.5)	87.9 (4.2)	30.3 (1.5)	29.9 (2.1)	34.1 (0.9)	33.9 (1.1)	40.6 (2.3)	40.9 (1.7)
Post	90.2 (5.1)	90.6 (6.9)	30.3 (1.5)	29.8 (2.3)	33.5 (1.5)	32.9 (1.7)	41.5 (3.2)	42.7 (3.2)

	PDW (fL)		MPV (fL)		P-LCR (%)		PCT (%)	
	C	T	C	T	C	T	C	T
Pre	11.6 (1.2)	11.8 (1.6)	10.2 (0.6)	10.3 (0.8)	26.2 (5.7)	26.8 (7.1)	0.26 (0.04)	0.27 (0.05)
Post	12.9 (2.2)	13.0 (2.3)	10.8 (1.0)	10.9 (1.1)	31.2 (8.4)	31.9 (9.5)	0.26 (0.05)	0.29 (0.06)

5.2.3. 백혈구 감별계수 (WBC differential count)

웃나무 추출물 섭취 전, 후에 검사한 백혈구수상, 중성구는 대조군에서 섭취 전, 후에 53.7±8.0%에서 56.6±9.8% 시험군에서는 52.8±7.6%에서 54.8±8.5%였으나 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 그 외에 림프구, 단핵구, 호산구 호염기구에서도 시험군과 대조군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. (표 3.)

표 3. 백혈구 감별계수 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 34명, Pre; 복용전, post; 복용후)

	Neutrophil (%)		Lymphocyte (%)		Monocyte (%)		Eosinophil(%)		Basophil (%)	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Pre	53.7 (8.0)	52.8 (7.6)	36.7 (7.8)	37.4 (7.9)	6.6 (1.2)	6.6 (1.2)	2.6 (1.5)	2.7 (1.8)	0.49 (0.27)	0.51 (0.29)
Post	56.6 (9.8)	54.8 (8.5)	33.7 (9.4)	35.6 (7.9)	6.8 (1.6)	6.5 (1.8)	2.8 (3.3)	2.5 (1.6)	0.48 (0.25)	0.48 (0.27)

5.2.4. 간기능 검사 (Liver function test)

웃나무 추출물 섭취 전, 후에 검사한 간기능 검사상, 총단백, 알부민, AST(GOT), ALT(GPT), GGT, LDH, ALP의 변화에서는 시험군의 GGT가 18.4±7.4에서 17.2±7.8으로 전, 후 감소하였지만 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.(표 4.) 웃나무 추출물의 복용에 의해 간기능의 변화가 없음을 알 수 있었다.

표 4. 간기능 검사 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 34명, Pre; 복용전, post; 복용후)

	T.P		ALB		AST		ALT		GGT	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Pre	7.2 (0.4)	7.3 (0.4)	4.1 (0.2)	4.1 (0.2)	25.3 (9.8)	22.4 (4.5)	24.5 (18.1)	24.7 (10.7)	22.8 (14.2)	18.4 (7.4)
Post	7.2 (0.4)	7.2 (0.5)	4.2 (0.2)	4.2 (0.2)	27.7 (10.6)	24.2 (6.1)	29.2 (18.5)	23.9 (9.6)	23.7 (17.4)	17.2 (7.8)

T.P(g/dL), ALB(g/dL), AST(IU/L), ALT(IU/L), ALP(IU/L), GGT(IU/L), LDH(IU/L)

LDH		ALP	
C	T	C	T
149.6 (39.4)	140.7 (21.7)	59.4 (18.2)	64.9 (15.6)
156.0 (36.1)	146.1 (23.4)	59.9 (19.1)	65.7 (19.1)

5.2.5 전해질 검사 (Electrolytes test)

웃나무 추출물 섭취 전, 후에 검사한 혈중 나트륨(Na⁺), 칼륨(K⁺), 염소(Cl⁻), 마그네슘(Mg⁺), 칼슘(Ca⁺), 당(glucose)의 변화는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.(표 5)

표 5. 전해질 검사 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 34명, Pre; 복용전, post; 복용후)

	Na		K		Cl		Mg		Ca		Glucose	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Pre	139.3 (1.5)	140.2 (1.6)	4.3 (0.4)	4.4 (0.3)	104.7 (2.0)	105.3 (2.3)	2.2 (0.1)	2.1 (0.1)	9.0 (0.3)	11.9 (16.8)	97.9 (20.1)	95.4 (11.8)
Post	141.0 (2.1)	142.5 (4.8)	4.4 (0.3)	4.5 (0.3)	104.9 (2.7)	106.4 (3.9)	2.2 (0.1)	2.2 (0.2)	9.1 (0.3)	9.2 (0.5)	97.4 (18.6)	103.3 (37.2)

Na(mmol/L), K(mmol/L), Cl(mmol/L), Mg(mg/dL), Ca(mg/dL), Glucose(mg/dL)

5.2.6 혈액 응고 검사 (Blood coagulation test) 및 혈소판기능 선별 검사 (Platelet function screen test)

웃나무 추출물 섭취 전, 후에 검사한 혈액응고 검사상, PT, aPTT 의 변화는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.(표 6.)

웃나무 추출물 섭취 전, 후에 검사한 혈소판기능 선별 검사 결과, PFA-collagen/Epinephrine 및 PFA-collagen/ADP 값이 모두 참고치(84-160, 68-121)내에 있었으며 섭취 후 closure time이 증가하는 결과를 관찰할 수 있었다. (표 7.)

표 6. 혈액 응고 검사 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 34명, Pre; 복용전, post; 복용후)

	PT		aPTT	
	C	T	C	T
Pre	115.0 (11.0)	116.0 (11.0)	36.8 (3.2)	37.5 (4.4)
Post	111.0 (12.0)	113.0 (9.3)	36.3 (3.5)	37.9 (4.1)

PT(%), aPTT(sec)

표 7. 혈소판기능 선별 검사 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 34명, Pre; 복용전, post; 복용후)

	PFA-collagen/Epi		PFA-collagen/ADP	
	C	T	C	T
Pre	131.1 (23.1)	127.4 (21.6)	95.6 (23.5)	93.7 (22.1)
Post	128.6 (21.7)	137.2 (21.9)	93.3 (21.7)	98.4 (20.9)

PFA-collagen/Epinephrine (sec), PFA-collagen/ADP (sec),

5.2.7 지질 검사 (Lipid profile test)

웃나무 추출물 섭취 전, 후에 검사한 지질 검사 검사상, 총 콜레스테롤 (total cholesterol), 중성지방(TG, triglyceride), 고밀도지단백 콜레스테롤(HDL cholesterol) 및 저밀도지단백 콜레스테롤(LDL-cholesterol)의 변화는 대조군과 시험군간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.(표 8.)

표 8. 지질 검사 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 34명, Pre; 복용전, post; 복용후)

	T.Chol		LDL		TG		HDL	
	C	T	C	T	C	T	C	T
Pre	200.9 (32.5)	208.0 (40.8)	124.7 (28.5)	133.4 (36.7)	140.7 (74.8)	124.8 (57.6)	50.9 (9.6)	51.2 (10.3)
Post	202.9 (33.1)	205.2 (36.3)	129.9 (30.3)	132.3 (32.5)	108.8 (54.1)	123.9 (48.1)	50.7 (10.8)	50.9 (12.3)

T.Chol(mg/dL), LDL(mg/dL), TG(mg/dL), LDL(mg/dL)

5.2.8 활성산소(Free Radical)와 항산화(Anti-oxidant) 검사

웃나무 추출물 섭취 전, 후에 검사한 활성산소(Free Radical, dROMs)와 항산화 (Anti-oxidant, BAP)검사의 변화는 대조군과 시험군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. (표 9.)

표 9. 활성산소와 항산화 검사 (n=68, C; 대조군 34명, T; 시험군 35명, Pre; 복용전, post; 복용후)

	d-ROMs		BAP	
	C	T	C	T
Pre	310.6 (76.3)	301.9 (80.6)	2276.0 (297.9)	2273.9 (299.9)
Post	361.9 (75.4)	352.7 (61.4)	2375.6 (207.3)	2303.8 (254.8)
p	0.000	0.000	0.089	0.428
P	0.975		0.327	

6. 결론

웃나무 추출물에 의한 항산화 효과 및 혈행 개선효과에 미치는 효과를 임상 실험을 통해 혈액 분석지표를 분석하였다. 웃나무 추출물을 6주간 섭취하여 대조군과 시험군간에 차이를 분석한 결과, 신체검사 (키, 몸무게, 허리둘레, 혈압), 일반혈액검사 (full CBC with differential count) 및 백혈구 감별계수(WBC differential count), 간기능검사 (total protein, albumin, GOT/GPT, GGT, ALP, LDH), 신기능 검사, 당화혈색소, 전해질검사 (Na, K, Cl, Mg, Ca), 혈액응고검사 (PT, aPTT), 혈소판 기능 선별검사, 총 콜레스테롤 (total cholesterol), 중성지방(TG, triglyceride), 활성산소와 항산화 검사에서는 대조군과 시험군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

시험군과 대조군 간에 대부분 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았지만, 시험군에서 대조군에 비해 혈소판수의 증가, GGT의 감소, ALT의 감소를 보였고, 혈소판 기능 스크린 검사인 PFA-collagen/Epinephrine 결과값이 증가를 보이는 환자가 시험군에서 8.8% (3/34) 많았다.

통계학적으로는 차이를 보이지 않았지만, 시험군에서 GGT의 감소 및 ALT의 감소는 간기능에 긍정적인 효과를 보일 수 있으며, 혈소판의 증가와 시험군에서 상대적으로 PFA-collagen/Epinephrine값 증가된 대상이 많은 것은 혈행개선 효과와의 연관성을 배제 할 수 없다.

추후 시험군과 대조군에 대해 웃나무 추출물(DLTE)의 종류 및 섭취량 및 기간 등에 따른 효과의 차이가 있는지, 대사증후군 개선 효과의 상세 기전이 무엇인지에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 연차별 목표달성도

1. 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	제1세부 (주)에이지아이	알러지를 유발하는 성분의 제거방법 확립 및 이를 활용한 옷나무 추출물의 개발 및 유효 활성성분의 분리,정제, 구조동정	100	자료 및 문헌 연구
			100	알러지 유발 우루시올의 정량법 확립
			100	알러젠 제거 공정별 경제성 및 편의성 분석
			100	알러젠 제거 추출물의 추출공정 확립(알러젠 잔량 목표치 불검출->공인기관분석)
			100	용매별 분획물의 제조
			100	크로마토그래피를 이용한 개발 성분의 분획 및 동정
			100	항산화 활성의 분석
			100	분자량 분획별 항산화 활성 분석
	제1협동 (주)캠온	시험물질의 안전성평가	80	-유전독성 • 복귀돌연변이시험 • 염색체이상시험 • 소핵시험
			50	- 일반독성 • 설치류 단회독성시험 • 13주 반복투여 독성 및 회복 시험
제2협동 한림대학교	혈행개선 및 면역 조절 유효성 평가	100	-혈행개선 효능평가 (<i>in vitro</i>) • 혈소판 활성 억제능 분석 • 혈소판 응집 억제능 분석 • 적혈구의 procoagulant 활성 측정 • 혈액의 응고 억제능 평가혈행 개선 효능평가(<i>in vitro</i>)	
		100	- 면역활성 효능평가 (<i>in vitro</i>) • 대식세포의 활성 조절 분석 • 사이토카인 분비 조절 분석	

2. 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2011)	제1세부 (주)에이지아이	쑥나무 추출물의 임상시험을 통한 인체효능자료의 확보	100	임상시험용 Protocol의 작성
			0	임상시험 수행
			100	시험용 물질의 대량생산
			100	기준물질의 장기 안정성 연구
	제1협동 (주)캠온	시험물질의 안전성평가	100	설치류 13주 반복 경구투여 독성시험
			100	염색체이상시험
	제2협동 한림대학교	유효물질의 생체 작용기전 규 명	100	- 면역활성 효능평가 (<i>in vivo</i>) • 비장 및 림프절 면역세포 의 증식 및 사이토카인 분 비능분석 • 대식세포 및 NK세포의 활성 분석
			100	- 생체 작용기전 분석 • 세포내 신호전달 경로 분 석 • 사이토카인 유전자의 발 현 분석 • 유효물질의 세포내 작용 타깃 규명

3. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2012)	제1세부 (주)에이지아이	쑥나무 추출물의 임상시험	100	IRB승인
			100	임상시험 수행
		개별인정 획득		기술이전으로 이전된 회사 에서 진행
			100	건강기능식품 시제품 제작
			100	기준물질의 장기 안정성 연구

2절. 관련 분야의 기여도

1. 국외 여건의 변화

현재로서는 옷나무 관련 개발 중인 나라가 극히 소수에 불과하고 특히 식품용으로 사용하는 곳은 한국 밖에 없으며, 특허출원 분석을 통하여 조사한 결과 해외 특이 동향은 없음.

2. 국내 여건

국내에서 옷나무 추출물을 이용한 항암제의 개발이 현재 이상2상 연구가 추진되고 있으며, 이를 감안하여 식품용으로 적절한 조성을 결정하여야 할 필요가 있음.

원료의 확보, 성분의 분석 및 차이에 대한 자료의 확보를 지속적으로 하여 의약품, 한약, 식품 간의 성분의 차이 및 효능차이를 명백히 할 경우 차후에 제품화 되어 출시될 때 뛰어난 홍보 효과를 얻을 수 있을 것으로 봄.

최근 옷나무 추출물에 대한 식품용으로서의 허용분야를 기존의 옷담 및 옷오리용에서 장수버섯으로 무독화한 옷나무 추출물에 대하여 옷된장, 옷간장, 옷막걸리 등으로의 용도를 확대하였음. 따라서 향후 일반식품소재로서의 옷나무 추출물의 용도는 지속적으로 확대될 것으로 예상함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절. 연구개발 성과

* 특허 성과

출원된 특허			
출원연도	특허명	출원국	출원번호
2011	옷나무 추출물의 분획방법	대한민국	2011-0038693
2011	활성형 플라보노이드 화합물의 함량이 증가된 옷나무 추출물 및 그의 제조 방법	대한민국	2011-0106530
2012	항암 조성물의 제조방법	대한민국	2012-0012399
등록된 특허			
등록연도	특허명	등록국	등록번호
2011	활성형 플라보노이드 화합물의 함량이 증가된 옷나무 추출물 및 그의 제조 방법	대한민국	10-1103040
2012	옷나무의 알러지를 제거하는 방법	대한민국	10-1181408
2012	Process for preparing extract from Rhus ver. And pharmaceutical composition containing the same.	일본	5114199

2절. 성과 활용 계획

* 사업화

본 과제를 통한 연구결과는 주관기관인 (주)에이지아이가 기존의 사업영역인 식품, 건강기능식품 분야를 정리하게 되고 신약개발 분야에 집중하는 것으로 사업방향을 설정하면서 본 연구결과를 기술이전하게 되었음. 기술이전에 따른 조건은 기술료를 바탕으로 해외시장으로의 진출을 추진함.

따라서, 주된 사업화는 본 과제의 연구결과를 바탕으로 기술을 인수한 회사에서 진행하기로 하며, (주)에이지아이는 향후 지속적인 기술지원을 진행하기로 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항없음

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당사항없음

제 8 장 참고문헌

[부록]

1. 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험
2. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험
3. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2주간 반복 경구투여 DRF 독성시험
4. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주간 반복 경구투여 독성시험
5. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

최종보고서(안)

RIS의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여
소핵시험

시험번호: 11-MG-080

시험의뢰기관: (주)에이지아이

(주)켄온 전임상연구센터



Preclinical Research Center, Chemon Inc.
334, Jeil-Ri, Yangji-Myeon, Cheoin-Gu, Yongin-Si, Gyeonggi-Do,
449-826, Korea

진 술 서

RIS의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2009-183호, KFDA, 2009년 12월 22일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서의 일정과 (주)켄온 전임상연구센터의 SOP에 따라 수행되었고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험 수행에 있어 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

이 우 주, B.S.

날 짜

시험책임자

주 소 : (주)켄온 전임상연구센터

경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826

경기도 수원시 영통구 이의동 864-1 경기바이오센터 내, 443-766

연 락 처 : 031-329-6659 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E - m a i l : wjoo923@chemon.co.kr

김 갑 호, M.S.

날 짜

운영책임자

(주)켄온 전임상연구센터

신뢰성보증확인서

시험개요

시험제목	RIS의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험	
시험목적	RIS의 생체내 염색체이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 ICR 마우스의 골수세포에서의 소핵 유발성을 지표로 하여 평가하기 위하여 실시하였다.	
시험지침	의약품등의독성시험기준 (2009-116호, KFDA, 2009 년 08 월 24 일) OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG 474 (1997) 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test'	
시험의뢰자	(주)에이지아이 강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160 033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX) 의뢰책임자: 박 상 재	
시험기관	(주)캠온 전임상연구센터 경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826 경기도 수원시 영통구 이의동 864-1 경기바이오센터 내, 443-766 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX) 운영책임자: 김 갑 호	
시험일정	2011 년 05 월 06 일	시험계획서승인(시험개시일)
	2011 년 05 월 11 일	동물입수(실험개시일)
	2011 년 05 월 18, 19 일	시험물질 투여
	2011 년 05 월 20 일	검체제작
	2011 년 06 월 13 일	판독완료(실험종료일)
	2011 년 06 월 24 일	최종보고서(안) 제출
주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	허 현 숙
	동물관리:	이 주 영
	통계분석:	이 민 행
	자료보관:	이 유 나

기록과 재료의 보관 시험계획서, 시험계획서 수정기록지, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 시험종료 후 해당물질의 관리 당국에 의한 시험성적서의 신뢰성 평가가 가능한 기간동안 보관하고, 자료보관실에 따로 규정이 없는 한 3 년간 (주)캠온 전임상연구센터의 자료보관실에 보관한다.

이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

목 차

진 술 서	i
신뢰성보증확인서.....	ii
시험개요.....	iii
요 약.....	1
재료 및 방법.....	2
결 과.....	8
고찰 및 결론.....	8
참고문헌.....	9
단위 및 약호.....	10
 TABLES	
Table 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – summary	12
Table 2. Body weights of mice – summary	13
Table 3. Observations of mice	14
 APPENDICES	
Appendix 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – individual animal data	16
Appendix 2. Body weights of mice – individual animal data	17
Appendix 3. Historical control data	18
Appendix 4. Protocol and amendment	19
Appendix 5. Certificate of analysis	29

요 약

본 시험은 RIS의 생체내 염색체이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 특정병원체 부재 ICR 마우스의 골수세포에서 소핵 유발성을 지표로 하여 평가하기 위하여 실시하였다.

시험물질은 멸균주사용수에 현탁하여 투여하였다. 약 8 주령의 수컷 ICR 마우스(군당 6 마리)에 음성(0), 시험물질 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량을 1 일 1 회 연속 2 일간 경구투여 하였다.

음성투여군을 음성대조군으로 하였으며, 양성대조군에는 70 mg/kg의 Cyclophosphamide·H₂O를 1 회 복강투여 하였다. 최종 투여로부터 약 24 시간 후에 모든 동물을 부검, 대퇴골에서 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였다.

소핵의 평가를 위하여 개체 당 2,000 개의 다염성적혈구를 계수하면서 이 중 소핵을 가진 다염성적혈구의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 없었다.

세포독성은 다염성적혈구/총적혈구 비율을 산출하여 평가하였다. 개체당 500 개의 총적혈구로부터 세포독성을 평가한 결과 이 비율은 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었다.

이상의 결과, RIS은 본 시험조건 하에서 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 대조물질

1) 시험물질 (Appendix 5)

명 칭: RIS
 코드번호: C-0690
 제조번호: RIS-04-11022
 입 수 일: 2011 년 03 월 09 일
 입 수 량: 5 kg /pack x 1 pack
 외 관: 암갈색의 분말
 함 량: 성적서 별첨
 유효일자: 2013 년 02 월 23 일
 보관조건: 냉장, 방습
 공 급 원: (주)에이지아이

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭: 멸균주사용수
 공 급 원: 대한약품공업주식회사
 제조번호: 12K1F21
 보관조건: 실온. 개봉 후 냉장(-1~10℃)
 선택이유: 시험물질이 잘 현탁되고 실험동물에 독성을 나타내지 않는 멸균주사용수를 부형제로 선택하였다.

3) 양성대조물질

다음과 같이 Cyclophosphamide·H₂O [CAS No. 6055-19-2, 약칭 CPA]를 사용하였다.

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
CPA	Sigma-Aldrich Co.	C0768	120M1253V	2011 년 01 월 25 일	-1~10℃

2. 투여시험물질 및 함량분석

1) 투여시험물질 조제

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 고용량군의 투여물질은 적량의 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁하여 최종 투여량에 맞게 조제하고, 중간 및 저용량군의 투여물질은 고용량군의 투여물질을 동일한 부형제로 희석하여 조제하였다.

2) 양성대조물질 조제

적량의 CPA를 투여 직전 멸균생리식염주사액에 용해하여 조제하였다.

3) 함량분석

조제물에 대한 함량분석은 실시하지 않았다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 마우스, Hsd:ICR(CD-1 [®])	
성별	수컷	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)	
선정사유	본 시험에 사용하는 마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 유전독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다. 또한 예비시험에서 성별에 따른 독성의 차이는 없는 것으로 판단되어 본시험에서는 수컷을 사용gkduT다.	
동물 수	입수시	36
	투여개시시	30
주령	입수시	7
	투여개시시	8
입수시 체중범위	30.87~33.14 g	
투여개시시 체중범위	33.64~36.95 g	
잔여동물의 처리	안락사 처리하였다.	

(2) 검역 및 순화

입수 후 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰다.

(3) 식별

동물은 피모색소표식법을 사용하여 식별하였다(순화기간: 미부표식법).

사육상자에는 색으로 구별하는 개체식별카드를 부착하고, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(4) 동물실험 윤리규정

(주)캠온 전임상연구센터의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 11-M045).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정

동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10~20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 유지되는 (주)캠온 전임상연구센터 제2동물사육구역 3 호실에서 사육하였다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기횟수 및 조도는 정기

적으로 측정하였다. 측정결과 실험기간 동안 동물실의 온도는 23.0-24.1 °C, 상대습도는 47.3-53.9 % 였고, 시험 결과에 영향을 줄만한 이상은 없었다.

(2) 사료, 물, 깔개 및 오염물질 검사

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Co. Ltd., USA)를 코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유섭취 시켰다. 사료의 '성분분석 성적서'를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 시켰다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

깔개는 나무깔개를 ㈜우정비에스씨(경기도 수원시 영통구 이의동 864-1 차세대융합기술연구원 B 동 3 층)로부터 공급받아 고압증기멸균 후 사용하였다. 깔개의 '오염물질 분석성적서'를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(3) 사육상자 및 사육밀도

폴리카보네이트 사육상자(W 170 x L 235 x H 125 mm)에서 검역 및 순화기간에는 5 마리 이하/사육상자 이하, 투여 및 관찰기간에는 3 마리/사육상자로 수용하였다.

(4) 사육관리

사육상자 및 깔개는 주 1 회, 물병은 주 2 회 이상 교환하였다.

(5) 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 다음 표와 같이 무작위 분배하였다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

1) 시험군 구성

시험군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)	투여일수	투여경로
G1	M	6	1-6	10	0	2	p.o.
G2	M	6	7-12	10	500	2	p.o.
G3	M	6	13-18	10	1,000	2	p.o.
G4	M	6	19-24	10	2,000	2	p.o.
G5	M	6	25-30	10 (mL/kg)	70 (mg/kg)	1	i.p.

G1: 음성대조군(멸균주사용수)

G2-G4: 시험물질 투여군

G5: 양성대조군(Cyclophosphamide·H₂O)

2) 투여량의 설정

투여량을 결정하기 위하여 동일종 동일주령의 동물을 사용하여 예비시험(11-MG-079P)을 실

시하였다. 예비시험에서 시험물질을 500, 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg/day의 용량으로 2 일간 투여하고, 투여일 포함 4 일간 관찰하였다. 그 결과 모든 동물에서 특별한 육안적 이상소견이 관찰되지 않았다.

이에 본시험에서는 2,000 mg/kg/day를 본시험의 고용량으로 설정하고, 공비를 2로 하여 위의 시험군 구성표와 같이 시험군을 구성하였다.

3) 투여[SOP-AT-001]

시험물질	
투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 약 24 시간 간격으로 2 일간, 16:00 이전에 투여하였다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 10 mL/kg/day 으로 산출하였다.
투여방법	경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여하였다.
양성대조물질	
투여경로 및 선택이유	일반적으로 채택되는 복강투여로 하였다.
투여횟수 및 기간	시험물질의 2 회차 투여일에 1 회 투여하였다. 16:00 이전에 투여하였다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 10 mL/kg 으로 산출하였다.
투여방법	시험물질은 70% 소독용 알코올을 이용하여 투여할 부위를 소독한 후 26G 주사침을 이용하여 복강에 투여하였다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상

다음 표와 같이 일반증상을 관찰하여 개체별로 기록하였다.

기간	증상관찰
순화기간	매일 1 회 증상 관찰
Day 1: 투여 1 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 2: 투여 2 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 3: 부검일	부검 전 1 회 증상관찰

2) 체중

모든 동물에 대하여 입수시, 군분리시, 투여 전, 투여일 및 부검일에 매일 측정하였다.

양성대조군 또한 시험물질 투여군과 동일하게 체중측정하였다.

3) 골수검체 제작

골수검체는 Schmid (1975)의 방법에 따라 다음과 같이 제작하였다. 검체 제작시기는 일반적으로 적용하는 기간인 최종 투여로부터 약 24 시간 후로 하였다.

(1) 각 마우스에 경추탈구를 실시하여 사망을 확인한 후 한 쪽 대퇴골을 적출해 23G 주사침을 사용, 2 mL의 Fetal Bovine Serum (Gibco)으로 골수를 씻어내려 현탁하였다.

- (2) 세포현탁액을 1,000 rpm으로 5 분간 원심분리하였다.
- (3) 상등액을 제거한 후 침전된 골수 세포를 slide glass에 도말하여 실온에서 충분히 건조한 후 메탄올에 5 분간 고정하였다. 검체는 각 동물당 2 매씩 제작하였다.
- (4) 고정과 건조가 끝난 검체는 다음 순서로 염색하였다.

May-Grunwald 염색액 원액	3 min.
May-Grunwald 염색액 1:1 희석액 (멸균주사용수)	2 min.
Giemsa 염색액 (5 % in PBS, pH 6.8)	10 min.

4) 소핵의 계수 및 결과의 표시

- (1) 각 동물당 염색상태가 양호한 1 매의 검체를 선정하여, 계수자가 내용을 알 수 없도록 미리 코드화 한 후 1,000 배의 배율로 소핵을 계수하였다.
- (2) 적혈구(RBC) 중 상대적으로 큰 크기에 청색으로 염색된 것을 다염성적혈구(PCE)로, 상대적으로 작고 분홍색으로 염색된 것을 정염성적혈구(NCE)로 계수하였다.
- (3) 동물당 2,000 개의 PCE를 계수하면서 그 중 소핵을 가진 PCE (MNPCE)의 수를 계수하였다. 계수시 세포 직경의 1/5-1/20 의 크기로 주변 유허세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형 내지 타원형 소체를 소핵으로 계수하였다.
- (4) 소핵 출현 빈도는 개체당 2,000 개의 PCE에서 관찰되는 MNPCE 수의 평균±표준편차로 나타내었다.
- (5) 소핵 유무에 상관없이 합계 500 개 이상의 적혈구(PCE+NCE)를 계수하여 PCE:RBC 비율을 산출해 세포독성의 지표로 하였다. 이 비율은 $PCE/(PCE+NCE)$ 로 산출하였다.

5) 타당성 기준

다음의 조건을 만족하였을 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정하였다.

- (1) 부검시 모든 군에서 5 마리 이상의 동물이 생존할 것.
- (2) 시험물질 투여군 및 양성대조군에서 PCE:RBC 평균값이 음성대조군의 20 % 이상일 것.
- (3) 2,000 개의 PCE 중 MNPCE의 빈도가 음성대조군은 평균 7.0 (0.35 %) 이하, 양성대조군은 평균 50 (2.5 %) 이상일 것.

6. 통계 분석 및 판정

1) 통계 분석 프로그램

시험 결과의 통계분석에는 SPSS (ver. 10.1K) 프로그램을 사용하였다.

2) 통계처리 및 판정

- (1) 다음의 방법으로 통계처리를 실시하고, $P < 0.05$ 인 경우에 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

시험자료	비교군	방법
소핵유발빈도	음성대조군-시험물질투여군	Kruskal-Wallis' H-test

	음성대조군-양성대조군	Mann-Whitney U-test
PCE:RBC	음성대조군-시험물질투여군	Kruskal-Wallis' H-test
	음성대조군-양성대조군	Mann-Whitney U-test
체중	음성대조군-시험물질투여군	ANOVA
	음성대조군-양성대조군	독립표본 T-검정

(2) 판정기준

투여군의 PCE:RBC 비율의 평균값이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소를 나타낼 때 세포독성이 있는 것으로 판단하였다.

시험물질 투여군에서 MNPCE의 빈도가 투여용량의 증가에 따라 증가하거나, 한 용량 이상에서 통계학적으로 유의한 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 그러나 통계학적인 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지는 않으며, 생물학적 연관성 또한 고려하였다.

결 과

소핵 유발빈도 및 세포독성(Table 1 and Appendix 1)

개체당 2,000 개의 PCE에서 관찰된 소핵을 가진 PCE (MNPCE) 빈도는 음성대조군 (0), 시험물질 500, 1,000, 2,000 mg/kg/day 투여군 순으로 평균 2.33, 2.33, 2.50, 2.83 이었다. 시험물질 투여군의 소핵 빈도에 대하여 음성대조군과의 차이를 조사한 결과, 모든 군에서 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다.

한편, 양성대조군에서는 소핵 빈도가 107.50으로, 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다($P < 0.01$).

세포독성의 지표인 PCE:RBC 값은 음성대조군 (0), 시험물질 500, 1,000, 2,000 mg/kg/day 투여군 순으로 평균 0.33, 0.32, 0.32, 0.32로, 시험물질 투여군에서는 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다.

양성대조군에서는 PCE:RBC 비율이 0.23 으로, 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났다($P < 0.01$).

체중(Table 2 and Appendix 2)

각 군간의 체중을 비교한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

일반증상(Table 3)

모든 동물에서 일반증상은 관찰되지 않았다.

고찰 및 결론

본 시험에 적용한 용량범위 내에서, 개체 당 2000 개의 PCE를 대상으로 소핵을 가진 PCE를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 없었으며, 양성판정 기준을 만족시키지 못하였다.

세포독성의 지표인 PCE:RBC 비율은 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 평균 0.32(음성대조군의 96 %) 이상이었고, 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

시험물질 투여로 인한 사망이나 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았고, 각 군간의 체중을 비교한 결과 모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다.

따라서 RIS은 본 시험조건 하에서 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Heddle, J.A., E. Stuart and M.F. Salamone (1984): The bone marrow micronucleus test, In: Handbook of mutagenicity test procedures, 2nd edition (edited by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel), Elsevier Science Publishers BV, pp. 441-457.
2. Schmid, W. (1975): The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31:9-15.

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by ChemOn Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

%	Percent
°	Degree
C	Celsius
L	Liter
mL	Milliliter
μL	Microliter
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Milligram
μg	Microgram
ng	Nanogram
m	Meter
cm	Centimeter
mm	Millimeter
μm	Micrometer
hr	Hour
min	Minute
sec	Second
rpm	Revolution per Minute
M	Male
F	Female
GLP	Good Laboratory Practice Regulation
ICH	International Conference on Harmonization
i.p.	intraperitoneal
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
KFDA	Korea Food and Drug Administration
MNPCE	Micronucleated PCE
NCE	Normochromatic erythrocyte
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
p.o.	Per Oral
PCE	Polychromatic erythrocyte
RBC	Red blood cell
QAU	Quality Assurance Unit
RH	Relative Humidity
SD	Standard Deviation
SOP	Standard Operating Procedures
SPF	Specific Pathogen Free
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

TABLES

Table 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – summary

Dose (mg/kg/day)	Animals per Dose	MNPCE/2,000 PCE (Mean±SD)	PCE:RBC Ratio	% Ratio
0	6	2.33 ± 1.37	0.33 ± 0.02	100
500	6	2.33 ± 1.03	0.32 ± 0.01	96
1,000	6	2.50 ± 1.87	0.32 ± 0.02	97
2,000	6	2.83 ± 1.17	0.32 ± 0.02	97
CPA 70 (mg/kg)	6	107.50 ± 26.08**	0.23 ± 0.02**	68

Test article: RIS

Vehicle: Sterilized distilled water

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Bone marrow smears were prepared about 24 hours after the final administration.

** Significantly different from the negative control group at $P < 0.01$.

Abbreviations

PCE: Polychromatic erythrocyte.

RBC: Red blood cells (polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte).

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte.

CPA: Cyclophosphamide·H₂O (positive control article).

Table 2. Body weights of mice – summary

Dose (mg/kg/day)	Animals per Dose	Body weights (g) at the time of		
		1 st Admin.	2 nd Admin.	Sacrifice
0	6	34.74 ± 0.86	35.31 ± 1.08	35.21 ± 1.12
500	6	34.87 ± 1.02	35.04 ± 1.35	35.35 ± 1.39
1,000	6	34.96 ± 1.09	35.48 ± 1.33	35.51 ± 1.49
2,000	6	34.70 ± 0.58	35.19 ± 1.36	35.17 ± 1.07
CPA 70 (mg/kg)	6	35.07 ± 0.74	35.44 ± 0.99	34.60 ± 0.98

Test article: RIS

Vehicle Sterilized distilled water

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Abbreviation

CPA: Cyclophosphamide·H₂O (positive control article).

Table 3. Observations of mice

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	1 st Admin.			2 nd Admin.			Before Sacrifice
		BD	IPD	1-hr PD	BD	IPD	1-hr PD	
0	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
500	7	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0
1,000	13	0	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0
2,000	19	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0
CPA 70 (mg/kg)	25	0	-	-	0	0	0	0
	26	0	-	-	0	0	0	0
	27	0	-	-	0	0	0	0
	28	0	-	-	0	0	0	0
	29	0	-	-	0	0	0	0
	30	0	-	-	0	0	0	0

Test article: RIS

Vehicle: Sterilized distilled water

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Mice were euthanized about 24 hours after the final administration.

-: Not done

Abbreviation

CPA: Cyclophosphamide-H₂O (positive control article).

BD: before dosing

IPD: Immediately post dosing last animal

PD: post dosing last animal

Observations

0=Normal

APPENDICES

Appendix 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – individual animal data

Dose (mg/kg/day)	Animal ID	MNPCEs/ 2,000 PCEs	Number of PCE / NCE	PCE:RBC Ratio
0	1	2	163 / 337	0.33
	2	1	171 / 329	0.34
	3	4	161 / 339	0.32
	4	2	180 / 320	0.36
	5	4	160 / 340	0.32
	6	1	155 / 345	0.31
500	7	2	155 / 345	0.31
	8	4	164 / 336	0.33
	9	1	156 / 344	0.31
	10	2	155 / 345	0.31
	11	3	154 / 346	0.31
	12	2	162 / 338	0.32
1,000	13	2	163 / 337	0.33
	14	1	153 / 347	0.31
	15	1	161 / 339	0.32
	16	3	170 / 330	0.34
	17	6	164 / 336	0.33
	18	2	146 / 354	0.29
2,000	19	4	155 / 345	0.31
	20	3	156 / 344	0.31
	21	1	159 / 341	0.32
	22	4	171 / 329	0.34
	23	3	165 / 335	0.33
	24	2	150 / 350	0.30
CPA 70 (mg/kg)	25	75	103 / 397	0.21
	26	104	114 / 386	0.23
	27	121	102 / 398	0.20
	28	124	113 / 387	0.23
	29	80	127 / 373	0.25
	30	141	118 / 382	0.24

Test article: RIS

Vehicle: Sterilized distilled water

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Bone marrow smears were prepared about 24 hours after the final administration.

Abbreviations

PCE: Polychromatic erythrocyte.

RBC: Red blood cells (polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte).

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte.

CPA: Cyclophosphamide·H₂O (positive control article).

Appendix 2. Body weights of mice – individual animal data

Dose (mg/kg/day)	Animal ID	1 st dosing (g)	2 nd dosing (g)	Sacrifice (g)
0	1	33.77	34.81	34.32
	2	34.31	35.28	34.99
	3	34.07	33.72	33.61
	4	34.93	35.01	35.63
	5	35.78	36.65	36.17
	6	35.77	36.41	36.52
500	7	33.64	33.52	34.37
	8	34.67	34.78	34.82
	9	34.26	34.77	35.61
	10	34.76	34.14	33.72
	11	35.28	35.58	35.93
	12	36.63	37.41	37.65
1,000	13	33.92	34.88	34.69
	14	34.46	34.33	34.18
	15	34.44	35.30	35.63
	16	34.58	34.56	34.88
	17	35.42	35.84	35.44
	18	36.95	37.95	39.22
2,000	19	33.97	34.62	34.69
	20	34.38	34.11	34.94
	21	34.96	35.30	35.30
	22	34.25	34.18	33.83
	23	35.29	37.77	37.08
	24	35.37	35.14	35.20
CPA 70 (mg/kg)	25	35.01	35.41	35.43
	26	34.24	35.29	33.74
	27	34.43	34.02	33.82
	28	34.87	35.15	33.71
	29	36.16	37.08	35.97
	30	35.70	35.69	34.93

Test article: RIS

Vehicle: Sterilized distilled water

Vehicle and Test article were intraperitoneal administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Mice were euthanized about 24 hours after the final administration.

Abbreviation

CPA: Cyclophosphamide·H₂O (positive control article).

Appendix 3. Historical control data

(May 2008 – May 2011, SPF male ICR Mice, 8 weeks old at administration)

All vehicle controls

	MNPCE/2,000 PCE	PCE/RBC
Minimum	0	0.31
Maximum	4	0.49
Mean	0.86	0.37
S.D.	0.97	0.04
No. of Values	209	

0.5 % Methylcellulose

	MNPCE/2,000 PCE	PCE/RBC
Minimum	0	0.31
Maximum	2	0.47
Mean	0.69	0.37
S.D.	0.71	0.03
No. of Values	29	

Positive controls (intraperitoneal administration)

	MNPCE/2,000 PCE	PCE/RBC
Minimum	41	0.19
Maximum	224	0.33
Mean	109.57	0.25
S.D.	33.09	0.02
No. of Values	208	

Positive control article: Cyclophosphamide·H₂O [CAS No. 6055-19-2]

Appendix 4. Protocol and amendment

10/00 2011 10:00 FAX

원000/000



시험계획서

RIS의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여
소핵시험

시험번호: 11-MG-080

승인:

이 우 주
이 우 주
시험책임자
㈜켄온 전임상연구센터

2011. 05. 06.
날 짜

김 갑 호
김 갑 호, M.S.
운영책임자
㈜켄온 전임상연구센터

2011. 05. 06
날 짜

박 상 재
박 상 재
의뢰책임자
㈜에이지아이

2011. 5. 10
날 짜

ORIGINAL

시 형 제 목	RIS의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험	
시 형 목 적	RIS의 생체내 영색체이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 ICR 마우스의 골수세포에서의 소핵 유발성을 지표로 하여 평가하기 위함이다.	
시 형 지 칭	의약품등의독성시험기준 (2009-116호, KFDA, 2009 년 08 월 24 일) OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG 474 (1997) 'Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test'	
시 형 의 회 자	㈜에이지아이 강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160 033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX)	
시 형 기 관	㈜켄온 전임상연구센터 경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826 경기도 수원시 영통구 이익동 864-1 경기바이오센터 내, 443-766 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)	
시 형 일 정	2011 년 05 월 11 일	동물입수(실험개시일)
	2011 년 05 월 18, 19 일	시험물질 투여
	2011 년 05 월 20 일	검체제작
	2011 년 06 월 10 일	판독완료 예정일(실험종료일)
	2011 년 06 월 27 일	최종보고서(안) 제출 예정일
주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	허 현 속
	통계분석:	이 민 행
	자료보관:	이 유 나

기록과 재료의 [SOP-AC-001~007]

보 관 시험계획서(수정 및 이탈기록), 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 시험종료 후 해당물질의 관리 당국에 의한 시험성적서의 신뢰성 평가가 가능한 기간 동안 보관하고, 자료보관실에 따로 규정이 없는 한 3 년간 (주)켄온 전임상연구센터의 자료보관실에 보관한다. 이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

G L P 대 응 비임상시험관리기준(제2009-183호, KFDA, 2009 년 12 월 22 일)

OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17 시험계획서의 수정 혹은 이탈은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다. (주)켄온 전임상연구센터의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 정검을 단독으로 행한다.

최 종 보 고 서 [SOP-TO-007]

최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성보증확인서, 목차, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.

1. 시험물질 및 대조물질**1) 시험물질[SOP-TA-001]**

명 칭: RIS
 코드번호: C-0690
 제조번호: RIS-04-11022
 입 수 일: 2011 년 03 월 09 일
 입 수 량: 5 kg /pack x 1 pack
 외 관: 암갈색의 분말
 함 량: Fustin과 Fisetin의 합 8.1 %
 유효일자: 2013 년 02 월 23 일
 보관조건: 냉장, 방습
 공 급 원: 쉐에이지아이

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭: 멸균주사용수
 제조번호: 최종보고서에 기재
 보관조건: 실온, 개봉 후 냉장(-1~10°C)
 제 조 사: 대한약품공업(주)
 선택이유: 시험물질이 잘 현탁되고 실험동물에 독성을 나타내지 않는 멸균주사용수를 부형제로 선택하였다.

3) 양성대조물질

(1) 다음과 같이 Cyclophosphamide·H₂O [CAS No. 6055-19-2, 약칭 CPA]를 사용한다.

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
CPA	Sigma-Aldrich Co.	C0768	079K1569	2010 년 11 월 19 일	-1~10°C

(2) 선택이유: OECD 가이드라인 TG 474에 제시된 것 중에서 선택하였다.

2. 조제시험물질 및 함량분석**1) 투여시험물질 조제 [SOP-TA-002]**

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용한다. 고용량군의 투여물질은 적량의 시험물질을 칭량한 후 부형제에 현탁하여 최종 투여량에 맞게 조제하고, 중간 및 저용량군의 투여물질은 고용량군의 투여물질을 동일한 부형제로 희석하여 조제한다.

2) 양성대조물질 조제

적량의 CPA를 투여 직전 멸균생리식염수에 용해하여 조제한다.

3) 함량분석

조제물에 대한 함량분석은 실시하지 않는다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보[SOP-AM-007/017/020]

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 마우스, Hsd:ICR(CD-1 [®])	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)	
선정사유	본 시험에 사용하는 마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 유전독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다. 또한 예비시험에서 성별에 따른 독성의 차이는 없는 것으로 판단되어 본 시험에서는 수컷을 사용한다.	
성별	수컷	
동물 수	입수시	36
	투여개시시	30
주령	입수시	7
	투여개시시	8
투여개시시 체중범위	평균체중(g)의 $\pm 20\%$ 이내	
잔여동물의 처리	㈜켄온의 SOP에 따른다.	

(2) 검역 및 순화[SOP-QT-001]

입수 후 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시킨다.

(3) 식별[SOP-AM-017/030/031]

동물은 피모색소표식법을 사용하여 식별한다(순화기간: 미부표식법).

사육상자에는 색으로 구별하는 개체식별카드를 부착하고, 사육상자대에는 고유번호를 부여한다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착한다.

(4) 동물실험 윤리규정[SOP-AM-008]

㈜켄온 전임상연구센터의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 11-M045).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정[SOP-FA-005]

동물은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 15\%$, 환기횟수 10~20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 유지되는 ㈜켄온 전임상연구센터 제2 동물사육구역 3 호실에서 사육한다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정한다.

(2) 사료, 물, 깔개 및 오염물질 검사[SOP-AM-014/015]

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유섭취 시킨다.

ChemOn Study No. 11-MG-080

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 시킨다.

깎개로는 나무깎개를 ㈜우정비에스씨(경기도 수원시 영통구 의의동 864-1 차세대융합기술연구원 B 동 3 층)로부터 공급받아 고압증기멸균 후 사용한다. 오염물질 검사는 ㈜켄온의 SOP에 따른다.

(3) 사육상자 및 사육밀도[SOP-AM-023]

폴리카보네이트 사육상자(W 170 x L 235 x H 125 mm)에서 검역 및 순화기간에는 5 마리 이하/사육상자 이하, 투여 및 관찰기간에는 3 마리/사육상자로 수용한다.

(4) 사육관리[SOP-AM-002]

사육상자 및 깎개는 주 1 회, 물병은 주 2 회 이상 교환한다.

(5) 군분리[SOP-AM-029]

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 순위화하고, 평균에 가까운 동물들을 선택하여, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 무작위 분배한다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

1) 시험군 구성

시험군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)	투여일수	투여경로
G1	M	6	1-6	10	0	2	p.o.
G2	M	6	7-12	10	500	2	p.o.
G3	M	6	13-18	10	1000	2	p.o.
G4	M	6	19-24	10	2000	2	p.o.
G5	M	6	25-30	10	70	1	i.p.

G1: 음성대조군(멸균주사용수)

G2-G4: 시험물질 투여군

G5: 양성대조군(Cyclophosphamide·H₂O)

2) 투여량의 설정

투여량을 결정하기 위하여 동일종 동일주령의 동물을 사용하여 예비시험(11-MG-079P)을 실시하였다. 예비시험에서 시험물질을 500, 1000, 2000 및 4000 mg/kg/day의 용량으로 2 일간 투여하고, 투여일 포함 4 일간 관찰하였다. 그 결과 모든 동물에서 특별한 육안적 이상소견이 관찰되지 않았다.

이에 2000 mg/kg/day를 본시험의 고용량으로 설정하고, 공비를 2로 하여 위의 시험군 구성표와 같이 시험군을 구성하였다.

3) 투여[SOP-AT-001]

시험물질	
투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용한다.

ChemOn Study No. 11-MG-080

투여횟수 및 기간	1 회/일, 약 24 시간 간격으로 2 일간, 16:00 이전에 투여한다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 산출한다.
투여방법	경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여한다.
양성대조물질	
투여경로 및 선택이유	일반적으로 채택되는 복강내 투여로 한다.
투여횟수 및 기간	시험물질의 2 회차 투여일에 1 회 투여한다. 16:00 이전에 투여한다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 산출한다.
투여방법	소독용 알코올을 이용하여 투여할 부위를 소독한 후 26 G 주사침을 이용하여 복강에 투여한다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상[SOP-AT-004]

다음 표와 같이 일반증상을 관찰하여 개체별로 기록한다. 계획부검 이전에 발견된 빈사동물 및 사망동물은 증상 및 외관 관찰 결과를 기록한 후 안락사 처리 또는 폐기한다. 이들 동물은 부검을 실시하지 않는다.

기간	증상관찰
순화기간	매일 1 회 증상 관찰
Day 1: 투여 1 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 2: 투여 2 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 3: 부검일	부검 전 1 회 증상관찰

2) 체중[SOP-AT-006]

모든 동물에 대하여 입수시, 군분리시, 투여 전, 투여일 및 부검일에 측정한다.

3) 골수검체 제작[SOP-MT-401]

골수검체는 Schmid (1975)의 방법에 따라 다음과 같이 제작한다. 검체 제작시기는 일반적으로 적용하는 기간인 최종 투여로부터 약 24 시간 후로 한다.

- (1) 각 마우스에 경추탈구를 실시하여 사망을 확인한 후 한 쪽 대퇴골을 적출해 23G 주사침을 사용, 2 mL의 Fetal Bovine Serum (Gibco)으로 골수를 씻어내려 현탁한다.
- (2) 세포현탁액을 1,000 rpm으로 5 분간 원심분리한다.
- (3) 상등액을 제거한 후 침전된 골수 세포를 slide glass에 도말하여 실온에서 충분히 건조한 후 메탄올에 5 분간 고정한다. 검체는 각 동물당 2 매씩 제작한다.
- (4) 고정과 건조가 끝난 검체는 다음 순서로 염색한다.

May-Grunwald 염색액 원액	3 min.
May-Grunwald 염색액 1:1 희석액 (멸균주사용수)	2 min.
Giemsa 염색액 (5 % in PBS, pH 6.8)	10 min.

4) 소핵의 계수 및 결과의 표시[SOP-MT-402]

- (1) 각 동물당 염색상태가 양호한 1 마의 검체를 선정하여, 계수자가 내용을 알 수 없도록 미리 코드화 한 후 1,000 배의 배율로 소핵을 계수한다.
- (2) 적혈구(RBC) 중 상대적으로 큰 크기에 청색으로 염색된 것을 다염성적혈구(PCE)로, 상대적으로 작고 분홍색으로 염색된 것을 정염성적혈구(NCE)로 계수한다.
- (3) 동물당 2000 개의 PCE를 계수하면서 그 중 소핵을 가진 PCE (MNPCE)의 수를 계수한다. 계수시 세포 직경의 1/5-1/20 의 크기로 주변 유핵세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형 내지 타원형 소체를 소핵으로 계수한다.
- (4) 소핵 출현 빈도는 개체당 2000 개의 PCE에서 관찰되는 MNPCE 수의 평균±표준편차로 나타낸다.
- (5) 소핵 유무에 상관없이 합계 500 개 이상의 적혈구(PCE+NCE)를 계수하여 PCE:RBC 비율을 산출해 세포독성의 지표로 한다. 이 비율은 $PCE/(PCE+NCE)$ 로 산출한다.

5) 타당성 기준

다음의 조건을 만족하였을 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정한다.

- (1) 부검시 모든 군에서 5 마리 이상의 동물이 생존할 것.
- (2) 시험물질 투여군 및 양성대조군에서 PCE:RBC 비율이 음성대조군의 20 % 이상일 것.
- (3) 2,000 개의 PCE 중 MNPCE의 빈도가 음성대조군은 평균 7.0 (0.35 %) 이하, 양성대조군은 평균 50 (2.5 %) 이상일 것.

6. 통계 분석 및 판정[SOP-CO-001]

1) 통계 분석 프로그램

시험 결과의 통계분석에는 SPSS (ver. 10.1K) 프로그램을 사용한다.

2) 통계처리 및 판정

- (1) 다음의 방법으로 통계처리를 실시하고, $P < 0.05$ 인 경우에 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정한다. 기타 통계학적 방법을 적용한 경우 그 내용을 최종보고서에 서술한다.

시험자료	비교군	방법
소핵유발빈도	음성대조군-시험물질투여군	Kruskal-Wallis' H-test
	음성대조군-양성대조군	Mann-Whitney U-test
PCE/(PCE+NCE)	음성대조군-시험물질투여군	ANOVA
	음성대조군-양성대조군	독립표본 T-검정
체중	음성대조군-시험물질투여군	ANOVA
	음성대조군-양성대조군	독립표본 T-검정

- (2) 판정기준

투여군의 PCE:RBC 비율의 평균값이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소를 나타낼 때 세포독성이 있는 것으로 판단한다.

시험물질 투여군에서 MNPCE의 빈도가 투여용량의 증가에 따라 증가하거나, 한 용량 이상에서 통계학적으로 유의한 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다. 그러나 통계학적인 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지는 않으며, 생물학적 연관성 또한 고려한다.

7. 참고문헌

1. Heddle, J.A., E. Stuart and M.F. Salamone (1984): The bone marrow micronucleus test, In: Handbook of mutagenicity test procedures, 2nd edition (edited by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel), Elsevier Science Publishers BV, pp. 441-457.
2. Schmid, W. (1975): The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31:9-15.

8. 약어일람

GLP	Good Laboratory Practice Regulation
KFDA	Korea Food and Drug Administration
MNPCE	Micronucleated PCE
NCE	Normochromatic erythrocyte
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PCE	Polychromatic erythrocyte
RBC	Red blood cell
QAU	Quality Assurance Unit
SOP	Standard Operating Procedures
SPF	Specific Pathogen Free
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

20/05 2011 10:10 FAX

001/002

Protocol Amendment Form
(시험계획서 수정 기록지)

Study Title: RIS의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

Study No.: 11-MG-080

Amendment No.: 1

Amendment to the Protocol:
(수정 내용)

1. 4 페이지 '1.1) 시험물질' 함량

수정 전	수정 후
함 량: Fustin과 Fisetin의 합 8.1 %	함 량: 성적서 불합

2. 4 페이지 '1.3) 양성대조물질' 로트번호 및 입수일

수정 전	수정 후
로트번호: 079K1569	로트번호: 120M1253V
입수일: 2010 년 11 월 19 일	입수일: 2011 년 01 월 25 일

Reason for the Amendment:
(수정 사유)

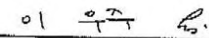
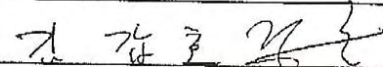
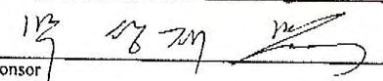
1. 의뢰자의 요청으로 수정함.
2. 실제시험에 사용할 양성대조물질의 입수일로 수정함.

Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

없음.



Approved by:

이 우진 
 Study Director
 김갑호 
 Management
 이영재 
 Authorized by Sponsor

2011. 05. 18
 Date
 2011. 05. 18
 Date
 2011. 5. 20
 Date

Chemon Inc.

TC-006-S03

ORIGINAL

Appendix 5. Certificate of analysis



생명공학을 선도하는 주식회사 에이지아이

Certificate of Analysis

Product Name: RIS	
Lot No. : RIS-01-11032S	Mfg Date : 2011년 12월 21일
Quantity : 50 ml	Exp Date : 2013년 12월 22일

Test Items	Specifications	Results
성상	갈색의 액상	갈색의 액상
성분	참꽃나무 추출물	참꽃나무 추출물
고형분 함량	50 mg/ml	50 mg/ml
고형분의 gallic acid 함량	> 1%	1.3 %
일반세균	무균	무균을 확인함.

* 분말상태의 시료를 캡은의 요청으로 D.W에 현탁 후 멸균하여 제공함.

Tested by K.H. Kim

최종보고서(안)

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단회 경구투여 독성시험

시험번호: 11-RA-072

시험의뢰기관: (주)에이지아이

(주)케온 전임상연구센터



Preclinical Research Center, Chemon Inc.
334, Jeil-Ri, Yangji-Myeon, Cheoin-Gu, Yongin-Si, Gyeonggi-Do,
449-826, Korea

진술서

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2009-183호, KFDA, 2009년 12월 22일), OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서의 일정과 (주)켄온 전임상연구센터의 SOP에 따라 수행되었고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험 수행에 있어 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

배진숙

시험책임자

주 소 : (주)켄온 전임상연구센터

경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826

연 락 처 : 031-329-9963 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E-mail : jsbae@chemon.co.kr

날 짜

김갑호, M.S.

운영책임자

(주)켄온 전임상연구센터

날 짜

신뢰성보증확인서

시험개요

시험제목	RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험		
시험목적	본 시험은 시험물질인 RIS를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.		
시험지침	의약품등의독성시험기준(제2009-116호, KFDA, 2009년 08월 24일)		
시험의뢰자	(주)에이지아이 강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160 033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX) 의뢰책임자: 박 상 재		
시험기관	(주)켄온 전임상연구센터 경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826 031-329-9900 (TEL), 031-329-9902 (FAX) 운영책임자: 김 갑 호		
시험일정	2011년 03월 25일:	시험계획서 승인(시험개시일)	
	2011년 03월 29일:	동물입수(실험개시일)	
	2011년 04월 05일:	시험물질 투여	
	2011년 04월 19일:	부검(실험종료일)	
	2011년 05월 02일:	최종보고서(안) 제출	
주요시험관계자	동물관리:	이 주 영	시험물질 조제/보관: 허 현 속
	부 검:	김 학 수	통계분석: 이 민 행
	자료보관:	이 유 나	보고서 작성: 차 승 범
기록과 재료의 보관	시험계획서, 시험계획서 수정기록지, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 해당물질의 관리당국에 의한 시험성적서의 신뢰성평가가 가능한 기간 동안 보관하고, 자료보관실에 따로 규정이 없는 한 시험종료 후 3년간 (주)켄온 전임상연구센터의 자료보관실에 보관한다. 이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.		

목 차

진 술 서	i
신뢰성보증확인서	ii
시험개요	iii
요 약	1
재료 및 방법	2
결 과	6
고찰 및 결론	7
TABLES	8
Table 1. Summary of mortalities	9
Table 2. Summary of clinical signs	10
Table 3. Summary of body weights	11
Table 4. Summary of necropsy findings	12
Appendix 1. Individual data	13
Appendix 1-1. Individual clinical signs	14
Appendix 1-2. Individual body weights	18
Appendix 1-3. Individual necropsy findings	20
Appendix 2. Protocol and amendment	22
Appendix 3. Certificate of analysis (test article)	31

요 약

본 시험은 RIS를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

RIS를 0 (부형제대조군), 2,000, 5,000 및 10,000 mg/kg으로 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 경구투여한 후 2 주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰결과, 유연 및 입주위오염이 10,000 mg/kg 투여군 수컷에서, 연변, 설사 또는 항문주위오염이 5,000 mg/kg 이상 투여군 암수에서 투여당일에 한하여 일시적으로 관찰되었다.
3. 시험물질 투여군의 체중변화는 부형제대조군과 유사하였다.
4. 부검소견 관찰결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 RIS를 2,000, 5,000 및 10,000 mg/kg으로 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 사망이 관찰되지 않았기에 본 시험조건 하에서 본 시험물질의 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose; ALD)은 암수 모두 10,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 부형제

1) 시험물질 (Appendix 3)

명 칭: RIS
코드번호: C-0690
로트번호: RIS-04-11022
입 수 일: 2011 년 03 월 09 일
입 수 량: 5 kg/pack × 1 pack
외 관: 암갈색의 분말
함 량: 시험성적서 별첨
유효일자: 2013 년 02 월 23 일
보관조건: 냉장, 방습
공 급 원: ㈜에이지아이

2) 부형제

명 칭: 0.5 % CMC-Na (Carboxymethyl cellulose sodium salt)
로트번호: CMC-Na; C0080JF, 멸균주사용수; A2J0F21
공 급 원: CMC-Na; 대정화금(주), 멸균주사용수; 대한약품공업(주)
보관조건: 조제 후 냉장
선택이유: 독성시험에서 시험물질의 현탁에 일반적으로 사용하는 부형제이고, 본 시험 조건에서 시험물질이 잘 현탁되어 선택하였다.

2. 투여시험물질 및 조제물의 함량 분석

1) 투여시험물질

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였으며, 투여직전에 조제하였다. 고용량군의 투여액은 시험물질을 정량 칭량한 후, 유발(motor)에 넣고, 부형제를 조금씩 넣어가면서 유평(pestle)으로 마쇄하여 조제하였다. 중간 및 저용량군의 투여액은 동일한 부형제를 단계 희석하여 조제하였다.

2) 조제물의 함량분석

실시하지 않았다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley [®] TMSD [®] ™		
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)		
선정사유	본 시험에 사용하는 랫드는 각종 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과와 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있다.		
성별	수컷	암컷	
동물 수	입수시	24	24
	투여개시시	20	20
주령	입수시	7	
	투여개시시	8	
체중범위	입수시	192.43-213.09 g	127.36-143.23 g
	투여개시시	216.45-231.99 g	140.23-150.59 g
잔여동물의 처리	연습동물로 사용하였다.		

(2) 검역 및 순화

동물은 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰고, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다. 동물 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 검토한 결과, 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

(3) 식별

동물은 순화기간, 투여 및 관찰기간 모두 유성 매직을 이용한 미부표식법을 사용하여 식별하였다. 사육상자에는 색으로 구별하는 개체식별카드를 부착하였고, 사육상자대는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(4) 동물실험 윤리규정

(주)캠온 전임상연구센터의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 11-R045).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정

동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8시 점등-오후 8시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 (주)캠온 전임상연구센터 제2동물사육구역 8호실에서 사육하였다. 온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하였고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였다. 실험기간 동안 동물실의 온도는 23.7 - 24.8 °C, 상대습도는 49.1-54.6 %였고, 시험 결과에 영향을 줄만한 이상은 없었다.

(2) 사료 및 물 오염물질 검사

사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET, 2918C, Harlan Laboratories., USA)를 코아텍으로부터 공급받아 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사료의 성분분석성적서를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 지하수를 자외선 살균기와 미세여과장치를 거친 후, 물병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

(3) 사육상자 및 사육밀도

동물은 스테인레스제 망 사육상자(W 215 x L 355 x H 200 mm)에서 검역 및 순화기간에는 5 마리 이하/사육상자로, 투여 및 관찰기간에는 3 마리 이하/사육상자로 사육하였다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

1) 시험군 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량(mL/kg)	투여량(mg/kg)
G1 ^{a)}	M / F	5 / 5	1-5 / 21-25	40	0
G2	M / F	5 / 5	6-10 / 26-30	40	2,000
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 31-35	40	5,000
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 36-40	40	10,000

a) 부형제대조군(0.5 % CMC-Na)

2) 투여량의 설정

본 시험물질을 800, 2,000 및 5,000 mg/kg 용량으로 SD 랫드 암수 각 1 마리에 단회 경구 투여한 후 7 일간 관찰한 예비시험 결과, 사망, 일반증상 및 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다. 상기 예비시험 결과와 본 시험물질이 건강기능식품인 점을 감안하여 본 시험에서는 10,000 mg/kg으로 고용량군으로 두고, 그 아래로 두 개군을 설정하였으며, 0.5 % CMC-Na만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 순위화하였고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 '시험군의 구성'표와 같이 무작위 분배하였다.

4) 투여

투여경로 및 선택이유	사람에 대한 임상예정경로인 경구투여를 선택하였다.
투여횟수 및 기간	2 회/일(투여액량의 1/2을 약 1 시간 간격으로 2 회 분할투여), 단회 투여하였으며, 10:00-11:17에 실시하였다.
투여액량 산출	투여당일에 측정된 체중을 기준으로 40 mL/kg으로 산출하였다.

투여방법	투여 전에 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 비운 후, 경구투여용 존대를 장착한 주사관을 위내에 직접 투여하였고, 투여 후 약 4 시간 후에 사료를 재공급하였다.
------	---

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상

모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상, 투여 후 14 일째까지 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 1 시간까지 지속적으로, 투여 후 6 시간까지 매 시간마다 관찰하였고, 투여일을 day 0으로 설정하였다.

2) 체중

투여 전(입수 및 군분리시), 투여일, 투여 후 1, 3, 7 및 14 일째의 체중을 측정하였다.

3) 부검

투여 후 14 일째에 생존동물을 CO₂를 이용하여 흡입마취시켜 개복한 후, 후대정맥과 복대동맥을 절단하여 방혈치사 시킨 다음, 체표 및 장기에 대한 육안적인 부검소견을 관찰하였다.

6. 통계 분석

체중 및 증체량은 평균과 표준편차를 산출하여 시험물질 투여군과 부형제대조군 간에 비교하였다. 통계방법은 Levene test로 등분산성을 검정한 후, One-way ANOVA test로 유의성을 확인하였다. 통계분석은 SPSS (ver. 10.1K)를 이용하였고, $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

사망동물 (Table 1; Appendix 1-1)

사망동물은 관찰되지 않았다.

일반증상 (Table 1; Appendix 1-1)

부형제대조군에서는 암수 모두에서 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

유연(salivation)이 10,000 mg/kg 투여군 수컷 전 레에서 투여 직후 관찰되었고, 입주위오염(staining around mouth)이 투여 후 1 시간째부터 4 시간째까지 관찰되었다.

설사(diarrhea) 및 항문주위오염(soiled perineal region)이 5,000 mg/kg 투여군 암수 각 3 레와 10,000 mg/kg 투여군 암수 전 레에서 투여당일에 한해 관찰되었다.

연변(soft stool)이 5,000 mg/kg 투여군 수컷 1 레와 암컷 2 레에서, 10,000 mg/kg 투여군 암컷 4 레에서 투여 후 2 시간 이내 동안 일시적으로 관찰되었다.

체중변화 (Table 3; Appendix 1-2)

시험물질 투여군 암수 모두 부형제대조군과 유사하게 관찰되었다.

부검소견 (Table 4; Appendix 1-3)

육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

고찰 및 결론

본 시험은 RIS를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.

10,000 mg/kg 투여군 수컷에서 관찰된 유연은 암컷에서는 관찰되지 않은 변화로 본 시험조건만으로 정확한 원인은 알 수 없었으나, 투여직후에만 일시적으로 관찰된 것으로 보아 투여된 시험물질의 양 또는 시험물질의 물리적인 성상에 의한 변화로 추정한다. 입주위오염은 유연으로 인한 변화로 판단한다.

5,000 mg/kg 이상 투여군 암수에서 관찰된 연변, 설사 또는 항문주위오염은 투여당일에만 일시적으로 관찰되었고, 체중변화 및 육안적 부검소견에서 이상이 관찰되지 않았기에 이는 공복에 과량으로 적용한 시험물질의 물리적인 자극에 의한 변화로 추정한다.

이상의 결과로 보아 RIS를 2,000, 5,000 및 10,000 mg/kg으로 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 사망이 관찰되지 않았기에 본 시험조건 하에서 본 시험물질의 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose; ALD)은 암수 모두 10,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

TABLES

Table 1. Summary of mortalities

STUDY: 11-RA-072		MORTALITIES										
GROUPS (mg/kg)	No. DEAD/ No. DOSED	DAYS AFTER DOSE										ALD ^{a)} Value
		0	1	2	3	4	5	6	7	8-14		
MALE												
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 10,000 mg/kg
G2 (2,000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G3 (5,000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G4 (10,000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
FEMALE												
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 10,000 mg/kg
G2 (2,000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G3 (5,000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G4 (10,000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

a) ALD: Approximate Lethal Dose.

Table 2. Summary of clinical signs

STUDY: 11-RA-072		CLINICAL SIGNS			
DAYS	SIGNS	GROUPS (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (2,000)	G3 (5,000)	G4 (10,000)
MALE					
0	Normal	5 / 5 ^{a)}	4 / 5	2 / 5	0 / 5
	Soft stool	0 / 5	1 / 5	1 / 5	0 / 5
	Diarrhea	0 / 5	0 / 5	3 / 5	5 / 5
	Soiled perineal region	0 / 5	0 / 5	3 / 5	5 / 5
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
	Staining around mouth	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
1-13	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE					
0	Normal	5 / 5 ^{a)}	5 / 5	2 / 5	0 / 5
	Soft stool	0 / 5	0 / 5	2 / 5	4 / 5
	Diarrhea	0 / 5	0 / 5	3 / 5	5 / 5
	Soiled perineal region	0 / 5	0 / 5	3 / 5	5 / 5
1-13	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

a) Number of animals observed/Number of animals examined.

Table 3. Summary of body weights

STUDY: 11-RA-072		BODY WEIGHTS (g)			
DAYS	GROUPS (mg/kg)				
	G1 (0)	G2 (2,000)	G3 (5,000)	G4 (10,000)	
MALE					
0	225.20±6.16	225.59±4.90	225.47±4.14	224.32±3.56	
1	248.53±5.86	250.66±7.09	248.91±4.96	249.18±5.58	
3	261.92±8.70	265.58±6.59	265.74±5.84	262.41±4.22	
7	282.28±19.58	287.50±6.84	282.64±16.36	281.57±9.24	
14	318.62±19.01	320.29±10.88	326.76±13.58	328.59±6.88	
GAINS ^{a)}	93.42±16.78	94.70±10.41	101.29±12.45	104.26±6.38	
N	5	5	5	5	
FEMALE					
0	145.94±3.83	146.79±2.20	146.22±2.61	146.24±2.93	
1	163.78±2.22	165.45±2.68	165.08±4.42	164.88±4.17	
3	175.12±4.81	175.55±4.30	174.19±5.63	175.62±5.45	
7	187.44±6.42	184.73±5.69	187.90±8.47	183.02±7.78	
14	205.29±6.24	200.24±8.59	207.78±13.03	206.03±12.77	
GAINS ^{a)}	59.35±4.39	53.45±9.23	61.56±11.56	59.79±12.11	
N	5	5	5	5	

a) Weight gains are body weight difference between day 14 and the day 0.

Table 4. Summary of necropsy findings

STUDY: 11-RA-072		NECROPSY FINDINGS	
GROUPS (mg/kg)	FINDINGS	FREQUENCY ^{a)}	
MALE			
G1 (0)	No gross findings	5 / 5	
G2 (2,000)	No gross findings	5 / 5	
G3 (5,000)	No gross findings	5 / 5	
G4 (10,000)	No gross findings	5 / 5	
FEMALE			
G1 (0)	No gross findings	5 / 5	
G2 (2,000)	No gross findings	5 / 5	
G3 (5,000)	No gross findings	5 / 5	
G4 (10,000)	No gross findings	5 / 5	

a) Number of animals observed/Number of animals examined.

Appendix 1. Individual data

Appendix 1-1. Individual clinical signs

STUDY: 11-RA-072		CLINICAL SIGNS	MALE
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
G1 (0)	1	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	2	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	3	Normal	DAY 0-14
Terminal sacrifice		DAY 14	
4	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
G2 (2,000)	6	Normal	DAY 0 (2-6 hrs), 1-14
		Soft stool	DAY 0 (0-1 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	7	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
8	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
9	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
10	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
G3 (5,000)	11	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	12	Normal	DAY 0 (0-1 hrs), 1-14
		Diarrhea	DAY 0 (2-3 hrs)
		Soiled perineal region	DAY 0 (2-6 hrs)
Terminal sacrifice		DAY 14	
13	Normal	DAY 0 (2-4 hrs), 1-14	
	Soft stool	DAY 0 (0-1 hrs)	
	Diarrhea	DAY 0 (5-6 hrs)	
	Soiled perineal region	DAY 0 (5-6 hrs)	
14	Normal	DAY 0 (0-1 hrs), 1-14	
	Diarrhea	DAY 0 (2-3, 5-6 hrs)	
	Soiled perineal region	DAY 0 (2-6 hrs)	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
15	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	

a) The day of administration was designated as day 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

STUDY: 11-RA-072		CLINICAL SIGNS	MALE
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
G4 (10,000)	16	Normal	DAY 1-14
		Salivation	DAY 0 (0 hr)
		Staining around mouth	DAY 0 (1-4 hrs)
		Soiled perineal region	DAY 0 (1-6 hrs)
		Diarrhea	DAY 0 (1-6 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	17	Normal	DAY 1-14
		Salivation	DAY 0 (0 hr)
		Staining around mouth	DAY 0 (1-4 hrs)
		Soiled perineal region	DAY 0 (1-6 hrs)
		Diarrhea	DAY 0 (1-6 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	18	Normal	DAY 1-14
		Salivation	DAY 0 (0 hr)
		Staining around mouth	DAY 0 (1-4 hrs)
		Soiled perineal region	DAY 0 (1-6 hrs)
		Diarrhea	DAY 0 (1-6 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	19	Normal	DAY 1-14
		Salivation	DAY 0 (0 hr)
Staining around mouth		DAY 0 (1-4 hrs)	
Soiled perineal region		DAY 0 (1-6 hrs)	
Diarrhea		DAY 0 (1-6 hrs)	
Terminal sacrifice		DAY 14	
20	Normal	DAY 1-14	
	Salivation	DAY 0 (0 hr)	
	Staining around mouth	DAY 0 (1-4 hrs)	
	Soiled perineal region	DAY 0 (0-6 hrs)	
	Diarrhea	DAY 0 (0-6 hrs)	
	Terminal sacrifice	DAY 14	

a) The day of administration was designated as day 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

STUDY: 11-RA-072		CLINICAL SIGNS	FEMALE
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
G1 (0)	21	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	22	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	23	Normal	DAY 0-14
Terminal sacrifice		DAY 14	
24	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
G2 (2,000)	25	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	26	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	27	Normal	DAY 0-14
Terminal sacrifice		DAY 14	
28	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
G3 (5,000)	29	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	30	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	31	Normal	DAY 0-14
Terminal sacrifice		DAY 14	
32	Normal	DAY 0 (0-4 hrs), 1-14	
	Diarrhea	DAY 0 (5-6 hrs)	
G3 (5,000)	33	Soiled perineal region	DAY 0 (5-6 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	34	Normal	DAY 0 (2-4 hrs), 1-14
		Soft stool	DAY 0 (0-1 hrs)
	35	Diarrhea	DAY 0 (5-6 hrs)
Soiled perineal region		DAY 0 (5-6 hrs)	
35	Terminal sacrifice	DAY 14	
	35	Normal	DAY 0 (0-1 hrs), 1-14
Soft stool		DAY 0 (2 hr)	
35	Diarrhea	DAY 0 (3-6 hrs)	
	Soiled perineal region	DAY 0 (3-6 hrs)	
35	Terminal sacrifice	DAY 14	

a) The day of administration was designated as day 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

STUDY: 11-RA-072		CLINICAL SIGNS	FEMALE
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
G4 (10,000)	36	Normal	DAY 1-14
		Soft stool	DAY 0 (0-1 hrs)
		Diarrhea	DAY 0 (2-6 hrs)
		Soiled perineal region	DAY 0 (2-6 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	37	Normal	DAY 0 (0-4 hrs), 1-14
		Diarrhea	DAY 0 (5-6 hrs)
		Soiled perineal region	DAY 0 (5-6 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	38	Normal	DAY 0 (0 hr), 1-14
		Soft stool	DAY 0 (1 hr)
		Diarrhea	DAY 0 (2-6 hrs)
		Soiled perineal region	DAY 0 (2-6 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	39	Normal	DAY 0 (0 hr), 1-14
		Soft stool	DAY 0 (1 hr)
		Diarrhea	DAY 0 (2-6 hrs)
		Soiled perineal region	DAY 0 (2-6 hrs)
		Terminal sacrifice	DAY 14
	40	Normal	DAY 0 (0 hr), 1-14
Soft stool		DAY 0 (1 hr)	
Diarrhea		DAY 0 (2-6 hrs)	
Soiled perineal region		DAY 0 (2-6 hrs)	
Terminal sacrifice		DAY 14	

a) The day of administration was designated as day 0.

<END>

Appendix 1-2. Individual body weights

STUDY: 11-RA-072		BODY WEIGHTS (g)					MALE
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	GAINS ^{a)}
G1 (0)	1	231.99	251.16	263.14	272.15	312.39	80.40
	2	216.45	238.57	248.33	254.55	289.05	72.60
	3	229.83	253.94	271.69	299.82	333.14	103.31
	4	222.42	249.60	266.21	301.03	336.15	113.73
	5	225.31	249.36	260.23	283.87	322.39	97.08
	MEAN	225.20	248.53	261.92	282.28	318.62	93.42
	S.D.	6.16	5.86	8.70	19.58	19.01	16.78
N	5	5	5	5	5	5	
G2 (2,000)	6	228.84	252.49	268.40	287.62	321.00	92.16
	7	222.76	251.61	266.16	296.72	335.70	112.94
	8	226.19	249.40	263.49	285.56	316.90	90.71
	9	231.25	259.76	273.87	289.74	322.36	91.11
	10	218.89	240.05	255.98	277.84	305.48	86.59
	MEAN	225.59	250.66	265.58	287.50	320.29	94.70
	S.D.	4.90	7.09	6.59	6.84	10.88	10.41
N	5	5	5	5	5	5	
G3 (5,000)	11	223.03	244.71	263.45	294.4	320.46	97.43
	12	227.21	249.79	267.62	304.80	345.87	118.66
	13	226.86	252.24	266.30	267.39	310.98	84.12
	14	230.49	254.76	273.63	277.50	334.55	104.06
	15	219.76	243.03	257.68	269.12	321.94	102.18
	MEAN	225.47	248.91	265.74	282.64	326.76	101.29
	S.D.	4.14	4.96	5.84	16.36	13.58	12.45
N	5	5	5	5	5	5	
G4 (10,000)	16	224.41	250.57	259.76	285.73	320.34	95.93
	17	229.45	257.66	269.31	295.85	336.48	107.03
	18	225.76	247.02	263.34	277.34	329.34	103.58
	19	221.33	242.48	258.77	275.27	322.99	101.66
	20	220.67	248.19	260.85	273.67	333.78	113.11
	MEAN	224.32	249.18	262.41	281.57	328.59	104.26
	S.D.	3.56	5.58	4.22	9.24	6.88	6.38
N	5	5	5	5	5	5	

a) Weight gains are body weight difference between day 14 and the day 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-2. Individual body weights

STUDY: 11-RA-072		BODY WEIGHTS (g)					FEMALE
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	GAINS ^{a)}
G1 (0)	21	145.24	164.84	172.95	182.14	206.14	60.90
	22	147.92	163.31	178.18	188.20	200.18	52.26
	23	140.23	160.14	167.84	180.33	198.97	58.74
	24	150.59	165.82	179.88	196.27	214.63	64.04
	25	145.72	164.80	176.77	190.25	206.55	60.83
	MEAN	145.94	163.78	175.12	187.44	205.29	59.35
	S.D.	3.83	2.22	4.81	6.42	6.24	4.39
	N	5	5	5	5	5	5
G2 (2,000)	26	146.04	170.11	181.84	193.81	207.99	61.95
	27	143.33	164.33	172.70	184.17	201.57	58.24
	28	147.79	165.12	172.00	179.66	185.94	38.15
	29	147.76	163.34	173.01	180.27	200.06	52.30
	30	149.01	164.37	178.22	185.72	205.63	56.62
	MEAN	146.79	165.45	175.55	184.73	200.24	53.45
	S.D.	2.20	2.68	4.30	5.69	8.59	9.23
	N	5	5	5	5	5	5
G3 (5,000)	31	143.62	160.05	165.82	175.32	188.29	44.67
	32	149.37	170.05	180.46	196.73	215.57	66.20
	33	145.87	166.80	175.20	194.05	222.31	76.44
	34	148.42	167.71	177.56	188.95	209.81	61.39
	35	143.84	160.81	171.90	184.47	202.92	59.08
	MEAN	146.22	165.08	174.19	187.90	207.78	61.56
	S.D.	2.61	4.42	5.63	8.47	13.03	11.56
	N	5	5	5	5	5	5
G4 (10,000)	36	145.72	166.80	174.55	184.33	205.79	60.07
	37	145.01	159.15	174.10	193.42	224.15	79.14
	38	142.53	161.94	168.20	171.87	188.48	45.95
	39	147.59	167.36	178.36	180.78	203.02	55.43
	40	150.35	169.14	182.88	184.70	208.73	58.38
	MEAN	146.24	164.88	175.62	183.02	206.03	59.79
	S.D.	2.93	4.17	5.45	7.78	12.77	12.11
	N	5	5	5	5	5	5

a) Weight gains are body weight difference between day 14 and the day 0.

<END>

Appendix 1-3. Individual necropsy findings

STUDY: 11-RA-072		NECROPSY FINDINGS		MALE
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
G1 (0)	1	Terminal sacrifice		No gross findings
	2	Terminal sacrifice		No gross findings
	3	Terminal sacrifice		No gross findings
	4	Terminal sacrifice		No gross findings
	5	Terminal sacrifice		No gross findings
G2 (2,000)	6	Terminal sacrifice		No gross findings
	7	Terminal sacrifice		No gross findings
	8	Terminal sacrifice		No gross findings
	9	Terminal sacrifice		No gross findings
	10	Terminal sacrifice		No gross findings
G3 (5,000)	11	Terminal sacrifice		No gross findings
	12	Terminal sacrifice		No gross findings
	13	Terminal sacrifice		No gross findings
	14	Terminal sacrifice		No gross findings
	15	Terminal sacrifice		No gross findings
G4 (10,000)	16	Terminal sacrifice		No gross findings
	17	Terminal sacrifice		No gross findings
	18	Terminal sacrifice		No gross findings
	19	Terminal sacrifice		No gross findings
	20	Terminal sacrifice		No gross findings

<CONTINUED>

Appendix 1-3. Individual necropsy findings

STUDY: 11-RA-072		NECROPSY FINDINGS		FEMALE
GROUPS (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
G1 (0)	21	Terminal sacrifice		No gross findings
	22	Terminal sacrifice		No gross findings
	23	Terminal sacrifice		No gross findings
	24	Terminal sacrifice		No gross findings
	25	Terminal sacrifice		No gross findings
G2 (2,000)	26	Terminal sacrifice		No gross findings
	27	Terminal sacrifice		No gross findings
	28	Terminal sacrifice		No gross findings
	29	Terminal sacrifice		No gross findings
	30	Terminal sacrifice		No gross findings
G3 (5,000)	31	Terminal sacrifice		No gross findings
	32	Terminal sacrifice		No gross findings
	33	Terminal sacrifice		No gross findings
	34	Terminal sacrifice		No gross findings
	35	Terminal sacrifice		No gross findings
G4 (10,000)	36	Terminal sacrifice		No gross findings
	37	Terminal sacrifice		No gross findings
	38	Terminal sacrifice		No gross findings
	39	Terminal sacrifice		No gross findings
	40	Terminal sacrifice		No gross findings

<END>

Appendix 2. Protocol and amendment

02/05 2011 16:08 FAX

001



시험계획서

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단회 경구투여 독성시험

시험번호: 11-RA-072



승인:

배진숙
배진숙
시험책임자
㈜헬온 전임상연구센터

2011. 03. 25
날짜

김갑훈
김갑훈, M.S.
준영책임자
㈜헬온 전임상연구센터

2011. 03. 28
날짜

박성재
의뢰책임자
㈜에이지아이

2011. 03. 28
날짜

ORIGINAL

시 험 제 목	RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험	
시 험 목 적	본 시험은 시험물질인 RIS를 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행한다.	
시 험 지 침	의약품등의독성시험기준 (2009-116호, KFDA)	
시 험 의뢰 자	주에이지아이 강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160 033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX)	
시 험 기 관	주렘온 전임상연구센터 경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)	
시 험 일 정	2011 년 03 월 29 일:	동물입수(실험개시일)
	2011 년 04 월 05 일:	시험물질 투여
	2011 년 04 월 19 일:	부검(실험종료일)
	2011 년 04 월 29 일:	최종보고서(안) 제출 예정

시 험 관 계 자	동물관리: 이 주 영 부 검: 김 학 수 자료보관: 이 유 나	시험물질 조제/보관: 허 현 숙 통계분석: 이 민 행
기록과 자료의 보 관	[SOP-AC-001~007] 본 시험의 시험계획서, 최종보고서, 시험기초자료 및 각종 증거자료는 해당물질의 관리당국에 의한 시험성적서의 신뢰성 평가가 가능한 기간 동안 보관하고, 자료보관실에 따로 규정이 없는 한 시험종료 후 3 년간 ㈜렘온 전임상연구센터에 보관한다. 그 이후의 보관에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.	
G L P 대 응	비임상시험관리기준(제2009-183호, KFDA) OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) 시험계획서의 수정 혹은 이합은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다. ㈜렘온 전임상연구센터의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 점검을 단독으로 행한다.	
최 종 보 고 서	[SOP-TO-007] 최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성보증확인서, 목차, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.	

1. 시험물질 및 부형제

1) 시험물질[SOP-TA-001]

명 칭: RIS
 코드번호: C-0690
 제조번호: RIS-04-110222
 외 관: 암갈색의 분말
 함 량: Fustin과 Fisetin의 합 8.1 %
 유효일자: 2013 년 02 월 23 일
 보관조건: 냉장, 방습
 공 급 원: (주)에이지아이

2) 부형제

명 칭: 0.5 % CMC-Na (Carboxymethyl cellulose)
 제조번호: 최종보고서에 기재
 공 급 원: 최종보고서에 기재
 보관조건: 조제 후 냉장
 선택이유: 독성시험에서 시험물질의 현탁에 일반적으로 사용하는 부형제이고, 본 시험 조건에서 시험물질이 잘 현탁되어 선택하였다.

2. 투여시험물질의 조제 [SOP-TA-002]

본 시험물질은 함량에 대한 보장 없이 중량 그대로를 조제에 사용하며, 투여직전에 조제한다. 고용량군의 투여액은 시험물질을 정량 칭량한 후, 유발(motor)에 넣고, 부형제를 조금씩 넣어 가면서 유평(pebble)으로 마쇄하여 조제한다. 중간 및 저용량군의 투여액은 동일한 부형제를 단계 희석하여 조제한다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보[SOP-AM-007/017/020]

Parameters		Male	Female
종 및 계통		특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley [®] TMSD [®] TM	
생산자 및 공급원		코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)	
선정사유		본 시험에 사용하는 랫드는 각종 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과와 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있다.	
동물 수	임수시	24	24
	투여개시시	20	20
주령	임수시	7	
	투여개시시	8	
투여개시시 체중범위		평균체중(g)의 ± 20 % 이내	
잔여동물의 처리		㈜켄온의 SOP에 따른다.	

(2) 검역 및 순화[SOP-QT-001]

임수 후 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시키고, 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰한다.

(3) 식별[SOP-AM-030/031]

동물은 순화기간, 투여 및 관찰기간 모두 유성 매직을 이용한 미부표식법을 사용하여 식별한다. 사육상자에는 색으로 구별하는 개체식별카드를 부착하고, 사육상자대는 고유번호를 부여한다. 사육실 입구에는 동물실 사용기폭지를 부착한다.

(4) 동물실험 윤리규정[SOP-AM-008]

㈜켄온 전임상연구센터의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 11-R045).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정[SOP-FA-005]

동물은 온도 23±3 °C, 상대습도 55±15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 정등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 (㈜켄온 전임상연구센터 제2동물사육구역 1 호실에서 사육한다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정한다.

(2) 사료, 물 [SOP-AM-014, SOP-AT-008/009]

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories, Inc., USA)를 코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유섭취 시킨다.

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 응수병에 넣고 자유섭취 시킨다. 물과 사료의 오염물질에 대한 검사는 ㈜샘온의 관련 SOP에 따라 실시한다.

(3) 사육상자 및 사육밀도[SOP-AM-023]

동물은 스테인레스제 망 사육상자(W 215 x L 355 x H 200 mm)에서 경역 및 순화기간에는 5 마리 이하/사육상자로, 투여 및 관찰기간에는 3 마리 이하/사육상자로 사육한다.

(4) 군분리[SOP-AM-029]

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 시험군의 구성과 같이 무작위 분배한다

4. 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

1) 시험군 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량(mL/kg)	투여량(mg/kg)
G1 ^{a)}	M / F	5 / 5	1-5 / 11-15	40	0
G2	M / F	5 / 5	6-10 / 16-20	40	2,000
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 21-25	40	5,000
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 26-30	40	10,000

a) 부형제대조군(0.5 % CMC-Na)

2) 투여량의 설정[SOP-GT-006]

본 시험물질을 800, 2,000 및 5,000 mg/kg 용량으로 SD 랫드 암수 각 1 마리에 단회 경구 투여한 후 7 일간 관찰한 예비시험 결과, 사망, 일반증상 및 체중변화의 이상은 관찰되지 않았다. 상기 예비시험 결과와 본 시험물질이 건강기능식품인 점을 감안하여 본 시험에서는 10,000 mg/kg으로 고용량군으로 두고, 그 아래로 두 개군을 설정하였으며, 0.5 % CMC-Na만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 투여[SOP-AT-001]

투여경로 및 선택이유	사람에 대한 임상예정경로인 경구투여를 선택하였다.
투여횟수 및 기간	2 회/일(투여액량의 1/2을 약 1 시간 간격으로 2 회 분할투여), 단회 투여하며, 오전중에 투여함을 원칙으로 한다.
투여액량 산출	투여당일에 측정된 체중을 기준으로 40 mL/kg으로 산출한다.
투여방법	투여 전에 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 비운 후, 경구투여용 존대를 장착한 주사관을 위내에 직접 투여한다. 투여 후 약 4 시간째에 사료를 재공급한다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상[SOP-AT-004]

모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시한다. 단, 투여 당일에는 투여 후 1 시간까지는 지속적으로, 이후 6 시간까지는 매시간마다 관찰한다. 일반증상관찰은 투여 후 14 일까지 실시한다. 일반증상이 악화된 개체는 동종섭식을 피하기 위하여 격리하며, 사망동물은 발견 즉시 해당 동물의 체중을 측정 후, 부검을 실시한다.

2) 체중[SOP-AT-006]

모든 동물에 대하여 투여 전 (입수 및 군분리시), 투여일, 투여 후 1, 3, 7 및 14 일에 측정한다.

3) 부검[SOP-PA-003]

투여 후 14 일째에 모든 생존동물을 CO₂를 이용하여 흡입 마취시킨 후 개복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사한다. 도중 사망동물에 대하여는 개복하여 육안적으로 모든 장기를 검사한다. 육안적 이상장기의 조직(사망한 동물은 투여 후 1 일째까지는 고정하지 않음)은 주검은 SOP에 따라 적합한 고정액에 고정하고, 필요한 경우에 조직병리학적 검사를 실시한다.

6. 통계 분석[SOP-CO-001]

체중변화는 일원배치 분산분석(One-way ANOVA test) 혹은 기타 방법으로 군간 비교하고, 사망이 관찰된 경우 반수치사량의 산출은 probit법에 따른다. 통계를 위한 전산프로그램으로는 SPSS 10.1K를 이용하고, 기타 통계방법을 사용할 경우 최종보고서에 기술한다.

Protocol Amendment Form
(시험계획서 수정 기록지)

Study Title: RIS의 Sprague-Dawley 랫드람 이용한 단위 경구투여 독성시험

Study No.: 11-RA-072

Amendment No.: 1

Amendment to the Protocol:
(수정 내용)

- Page 4. 1. 1) 항량: 'Fustin과 Fisetin의 합 8.1%'에서 '시험성적서 별첨'으로 수정한다.
- Page 6. 4. 1) 시험군의 구성; 암컷의 동물번호를 아래와 같이 수정한다.

군	성별	동물번호	
		수정 전	수정 후
G1*	M/F	1-5 / 11-15	1-5 / 21-25
G2	M/F	6-10 / 16-20	6-10 / 26-30
G3	M/F	11-15 / 21-25	11-15 / 31-35
G4	M/F	16-20 / 26-30	16-20 / 36-40

a) 무형제대조군(0.5% CMC-Na)

Reason for the Amendment:
(수정 사유)

- 의뢰자 요청에 따른 수정.
- 오기에 따른 수정

Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

1-2. 없음.

Approved by:

Study Director 김성민

Date 2011. 03. 20

Management 김정호

Date 2011. 03. 30

Authorized by Sponsor 김성민

Date 2011. 04. 03

Chemion Inc.

TC-006-S03

ORIGINAL

Appendix 3. Certificate of analysis (test article)




생명공학을 선도하는 주식회사 에이지아이

Certificate of Analysis

2011. 03. 07

Product Name: RIS	
Lot No. : RIS-04-11022	Mfg Date : 2011년 2월 24일
Quantity : 5 Kg	Exp Date : 2013년 2월 23일

Test Items	Specifications	Results
Appearance	암갈색의 분말	암갈색의 분말
Moisture (%)	<10 %	0.5 %
Gallic acid (%)	> 1 %	2.45 %
Salmonella	Negative	Negative
Coliform group	Negative	Negative

Tested by K.H. Kim 

최종보고서(안)

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
2 주간 반복 경구투여 DRF 독성시험

시험번호: 11-RR-073P

시험의뢰기관: (주)에이지아이

(주)케몬 전임상연구센터



Preclinical Research Center, Chemon Inc.
334, Jeil-Ri, Yangji-Myeon, Cheoin-Gu, Yongin-Si, Gyeonggi-Do,
449-826, Korea

시험개요

시 험 제 목	RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2 주간 반복 경구투여 DRF 독성시험	
시 험 목 적	본 시험은 시험물질 RIS를 Sprague-Dawley 랫드에 2 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 확인하여 추후 실시할 13 주간 반복 독성시험에서의 용량설정 근거로 활용하기 위하여 수행하였다.	
시 험 지 침	의약품등의독성시험기준(제2009-116호, KFDA, 2009 년 08 월 24 일)에 준함	
시 험 의뢰 자	(주)에이지아이 강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160 033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX) 의뢰책임자: 박 상 재	
시 험 기 관	(주)캠온 전임상연구센터 경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX) 운영책임자: 김 갑 호	
시 험 일 정	2011 년 05 월 11 일	시험계획서 승인(시험개시일)
	2011 년 05 월 12 일	동물입수(실험개시일)
	2011 년 05 월 19 일	시험물질 투여개시
	2011 년 06 월 01 일	시험물질 투여종료
	2011 년 06 월 02 일	부검
	2011 년 06 월 02 일	임상병리검사 완료(실험종료 예정일)
	2011 년 06 월 24 일	최종보고서(안) 제출

주요시험관계자	동물관리: 이 주 영	시험물질 조제/보관: 허 현 숙
	부 검: 김 학 수	임상병리: 김 학 수
	자료보관: 이 유 나	통계분석: 이 민 행

기록과 자료의 보 관 시험계획서, 시험계획서 수정기록지, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 실험종료 후 3 년간 (주)켄온 전임상연구센터의 자료보관실에 보관한다. 임상병리 검체는 측정 종료일로부터 1 년간 보관한다. 이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

승 인

배 진 숙

날 짜

시험책임자

주 소 : (주)켄온 전임상연구센터

경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826

연 락 처 : 031-329-9963 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E-mail : jsbae@chemon.co.kr

김 갑 호, M.S.

날 짜

운영책임자

(주)켄온 전임상연구센터

목 차

시험개요	i
승 인	ii
요 약	1
재료 및 방법	2
결 과	8
고찰 및 결론	10
참고문헌	12
약 어	13
TABLES	14
Table 1. Summary of clinical signs	15
Table 2. Summary of body weights	17
Table 3. Summary of food consumptions	18
Table 4. Summary of water consumptions	19
Table 5. Summary of ophthalmic findings	19
Table 6. Summary of urinalysis	20
Table 7. Summary of hematological values	22
Table 8. Summary of serum biochemical values	23
Table 9. Summary of absolute & relative organ weights	24
Table 10. Summary of necropsy findings	26
Appendix 1. Individual data	27
Appendix 1-1. Individual clinical signs	28
Appendix 1-2. Individual body weight changes	32
Appendix 1-3. Individual food consumptions	33
Appendix 1-4. Individual water consumptions	34
Appendix 1-5. Individual ophthalmic findings	35
Appendix 1-6. Individual urinalysis data	36
Appendix 1-7. Individual hematological values	38
Appendix 1-8. Individual serum biochemical values	40
Appendix 1-9. Individual absolute and relative organ weights	42
Appendix 1-10. Individual necropsy findings	50
Appendix 2. Certificate of analysis (test article)	52

요 약

본 시험은 시험물질 RIS를 Sprague-Dawley 랫드에 2 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 확인하여 추후 실시할 13 주간 반복 독성시험에서의 용량설정 근거로 활용하기 위하여 수행하였다.

RIS를 200, 1,000 및 5,000 mg/kg/day로 투여하는 시험물질 투여군과 0.5 % CMC-Na만을 투여하는 부형제대조군을 설정하여 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 2 주간 반복 경구투여하였다.

시험항목으로 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안과학적검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검소견을 관찰하였고, 시험물질 투여군의 결과를 부형제대조군과 비교하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰결과, 물질혼입변이 200 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서, 착색뇨가 1,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 투여개시 후 1 일째부터 투여종료 시까지 용량상관성 있게 관찰되었다. 유전이 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 투여개시 후 8 일째부터 투여종료 시까지 투여직후에만 일시적으로 관찰되었다.
3. 체중, 사료 및 물섭취량 측정결과, 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
4. 안과학적 검사 결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.
5. 요색조가 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 어두운 노란색으로 관찰되었다.
6. 혈액학적검사 결과, 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
7. 혈액생화학적검사 결과, 1,000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 Na^+ 및 Cl^- 이 용량상관성 있게 감소하였고, 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 IP가 감소하였다.
8. 장기중량 측정 결과, 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
9. 부검소견 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, RIS를 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 200, 1,000 및 5,000 mg/kg/day로 2 주간 반복 경구투여 하였을 때 암수에서 물질혼입변(200 mg/kg/day 이상 투여군) 또는 착색뇨(1,000 mg/kg/day 이상 투여군)가 관찰되었으나, 시험물질 또는 그 대사물이 변 또는 뇨로 배출되어 나타난 변화로 추정하고, 혈중에서 1,000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷의 Na^+ 및 Cl^- 와 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷의 IP가 감소하였으나, 정상범위 이내의 변화이었다.

상기 결과를 토대로 추후 실시할 13 주간 반복 경구투여 독성시험에서는 본 시험물질이 건강기능식품임을 감안하여 독성학적인 변화가 관찰될 것으로 예측되는 용량인 5,000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고, 그 아래로 공비 3으로 두 개군을 두는 것을 추천한다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 부형제

1) 시험물질

명 칭:	RIS
코드번호:	C-0690
로트번호:	RIS-04-11022
입 수 일:	2011 년 03 월 09 일
입 수 량:	5 kg/pack × 1 pack
외 관:	암갈색의 분말
함 량:	시험성적서 별첨
유효일자:	2013 년 02 월 23 일
보관조건:	냉장, 방습
공 급 원:	(주)에이지아이

2) 부형제

명 칭:	0.5 % CMC-Na (Sodium carboxymethyl cellulose)
제조번호:	CMC-Na: C0080JF, 멸균주사용수: 12K1F21
공 급 원:	CMC-Na: 대정화금(주), 멸균주사용수: 대한약품공업(주)
보관조건:	조제 후 냉장
선택이유:	독성시험에서 시험물질의 현탁에 일반적으로 사용하는 부형제이고, 본 시험 조건에서 시험물질이 잘 현탁되어 선택하였다.

2. 투여시험물질 및 함량분석

1) 투여시험물질 조제방법

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였으며, 투여직전에 조제하였다. 고용량군의 투여액은 시험물질을 정량 칭량한 후, 유발(motor)에 넣고, 부형제를 조금씩 넣어가면서 유봉(pestle)으로 마쇄하여 조제하였고 중간 및 저용량군의 투여액은 동일한 부형제를 단계 희석하여 조제하였다.

2) 함량분석

실시하지 않았다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley [®] TMSD [®] TM		
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)		
선정사유	본 시험에 사용하는 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.		
성별	수컷	암컷	
동물 수	입수시	24	24
	투여개시시	20	20
주령	입수시	5	
	투여개시시	6	
체중범위	입수시	135.31-116.63 g	106.02-119.53 g
체중범위	투여개시시	163.36-185.10 g	132.58-152.56 g
잔여동물의 처리	연습동물로 사용하였다.		

(2) 검역 및 순화

입수 후 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시키고, 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰한다.

(3) 식별

동물은 피모색소표식법을 사용하여 식별하였다(순화기간: 미부표식법).

사육상자에는 색으로 구별하는 개체식별카드를 부착하였고, 사육상자대는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(4) 동물실험 윤리규정

(주)캠온 전임상연구센터의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 11-R082).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정

동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 (주)캠온 전임상연구센터 제2동물사육구역 2 호실에서 사육하였다. 실험기간 동안 동물실의 온도는 22.8-23.8 °C, 상대습도는 50.8-60.0 %였고, 시험 결과에 영향을 줄만한 이상은 없었다.

(2) 사료 및 물 오염물질 검사

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)으로부터 공

급받아 급이기에 넣고 자유섭취 시켰다. 사료의 성분분석성적서를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 지하수를 자외선 살균기와 미세여과장치를 거친 후, 물병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

(3) 사육상자 및 사육밀도

동물은 스테인레스제 망 사육상자(W 215 x L 355 x H 200 mm)에서 검역 및 순화기간에는 5 마리 이하/사육상자, 투여 및 관찰기간 모두 3 마리 이하/사육상자로 사육하였다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

1) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1 ^{a)}	M / F	5 / 5	1-5 / 21-25	20	0
G2	M / F	5 / 5	6-10 / 26-30	20	200
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 31-35	20	1,000
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 36-40	20	5,000

a) 0.5 % CMC-Na (Sodium carboxymethyl cellulose)

2) 투여량의 설정

본 시험물질을 2,000, 5,000 및 10,000 mg/kg으로 SD 랫드에 단회 경구투여한 독성시험(시험번호: 11-RA-072) 결과, 사망이 관찰되지 않아 암수에서 개략의 치사량이 10,000 mg/kg을 상회하였다. 일반증상관찰결과, 10,000 mg/kg 투여군 수컷에서 유연 및 입주위오염이, 5,000 mg/kg 이상 투여군 암수에서 연변, 설사 또는 항문주위오염이 투여당일에 한하여 일시적으로 관찰되었고, 그 밖에 체중 및 부검소견에서 이상은 관찰되지 않았다.

상기 시험결과와 본 시험물질이 건강기능식품임을 감안하여 본 시험에서는 1 회 투여가능한 최대량인 5,000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고, 그 아래로 공비 5로 두 개군을 두었으며, 0.5 % CMC-Na만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 순위화하였고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 '시험군의 구성'표와 같이 무작위 분배하였다.

4) 투여

투여경로 및 선택이유	사람에 대한 임상예정경로인 경구투여를 선택하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 7 일/주, 2 주간 투여, 14:10 이전에 투여를 완료하였다.
투여액량 산출	최근에 측정된 체중을 기준으로 20 mL/kg/day으로 산출하였다.
투여방법	경배부 피부를 고정하였고, 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여하였다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상

투여 및 관찰기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 관찰하였고, 개체 별로 기록하였다. 투여개시일을 day 0으로 설정하였다.

2) 체중

입수일, 군분리일, 투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 및 부검일에 측정하였다. 부검일은 절식 시킨 체중을 측정하였다.

3) 사료 및 물 섭취량

사료 및 물 섭취량은 투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 측정하였다. 측정방법은 사료 및 물을 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하였고, 마리당 평균섭취량으로 산출하였다.

4) 안과학적 검사

관찰 최종주에 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 육안으로 관찰하였다.

6. 임상병리

1) 채뇨 및 채혈

(1) 채뇨

관찰 최종 주에 모든 동물에 대하여 스테인레스 망사육상자에 1 마리씩 수용하여 약 3-4 시간 동안 채뇨(약 0.3 mL)한 신선뇨를 이용하여 요검사를 실시하였다.

(2) 채혈

동물은 채혈 전에 하룻밤 동안 절식(물은 제공) 하였다.

부검일에 동물을 Isoflurane으로 흡입 마취한 후 후대정맥에서 주사기를 이용하여 채혈하였다.

검사항목	혈액량	튜브
혈액학적 검사	약 1 mL	EDTA-2K CBC bottle
혈액생화학적 검사	1 mL 이상	Clot activator vacutainer tube

2) 요검사 항목

당(GLU)	pH	빌리루빈(BIL)
요단백(PRO)	케톤체(KET)	유로빌리노겐(URO)
백혈구(WBC)	잠혈(OB)	아질산염(NIT)
요비중(SG)	요색조(urine color)	투명도(clarity)

3) 혈액학적 검사

부검시 채혈한 혈액 중 약 0.3 mL를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle

(Vacutainer 3 mL, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 이용하여 아래 항목을 검사하였다.

적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	림프구(LYM)
헤마토크리트치(HCT)	헤모글로빈분포폭(HDW)	단핵구(MONO)
혈색소량(HGB)	평균혈소판용적(MPV)	호산구(EOS)
평균적혈구용적(MCV)	혈소판수(PLT)	호염기구(BASO)
평균적혈구헤모글로빈량(MCH)	백혈구(WBC)	대형비염색성세포(LUC)
평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)	호중구(NEU)	

4) 혈액생화학적 검사

부검시 채혈한 혈액의 일부를 clot activator가 들어 있는 5 mL vacutainer tube (INSEPACK, SEKISUI, JAPAN)에 주입하고 15-20 분간 상온에 방치하여 응고시킨 후 10 분간 원심분리 (3,000 rpm, 1,630 RCF, MF300, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 아래 항목을 검사하였다.

㉑아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	㉒총콜레스테롤(TCHO)	㉓크레아티닌(CRE)
㉔알라닌 아미노기전이효소(ALT)	㉕중성지방(TG)	㉖무기인(IP)
㉗알칼라인 포스파타제(ALP)	㉘총단백(TP)	㉙칼슘(Ca ²⁺)
㉚크레아티닌산활성효소(CPK)	㉛알부민(ALB)	㉜칼륨(K ⁺)
㉝총빌리루빈(TBIL)	㉞알부민/글로불린 비(A/G)	㉟나트륨(Na ⁺)
㊱당(GLU)	㊲혈액요소질소(BUN)	㊳염소(Cl ⁻)

㉑-㉙: 혈액생화학분석기(AU400, Olympus, Japan)를 이용하여 측정.

㉜-㉟: 전해질분석기(RAPIDCHEM 744 Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정.

7. 조직병리

1) 부검

부검 전날 하룻밤 절식한 계획부검동물에 대하여 Isoflurane (Ifran liquid, Hana Pharm. Co., Ltd)으로 흡입마취하여, 마취가 확인되면 개복하여 후대정맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 그 후 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰하여 부검소견 기록지에 기록하고, 장기중량 측정 및 조직 고정을 실시하였다.

2) 장기중량 측정

모든 동물의 아래 장기에 대하여 전자저울(BP221S, Sartorius AG, Germany)로 중량을 측정 (양측성 장기는 각각 측정)하고, 각 장기에 대하여 부검시 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

뇌(brain)	비장(spleen)	고환(testes)
폐(lungs)	부신(adrenals)	부고환(epididymides)
심장(heart)	신장(kidneys)	전립샘(prostate gland)

가슴샘(thymus)

간장(liver)

난소(ovaries)

자궁(uterus)

3) 조직 및 장기의 보존

모든 동물의 장기중량을 측정한 장기 및 이상장기를 10 % 중성완충포르말린용액에 고정하되, 고환과 부고환은 Bouin's 용액에 고정하였다.

4) 조직병리학적 검사

고정된 장기에 대한 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

8. 통계 분석

모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였다.

모수적인 다중비교의 경우는 우선 일원배치분산분석(ANOVA)을 통하여 군간 유의성을 관찰하여 군간의 유의성이 인정되면 사후 검정을 실시하였다. 사후 검정방법은 Levene test에서 분산의 동질성이 인정되면 Duncan's multiple range test (또는 Scheffe)를 수행하였고, 분산의 동질성이 인정되지 않으면 Dunnett's T-test를 수행하였다.

비모수적인 다중비교는 순위화한 데이터를 이용한 Kruskal-Wallis' H-test를 실시하여, 군간 유의성이 인정되면 Mann-Whitney U-test를 통하여 부형제대조군과의 유의성을 검정하였다. 모든 통계학적인 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하였다.

결 과

일반증상 (Table 1; Appendix 1-1)

사망동물은 관찰되지 않았다.

갈색의 물질혼입변(compound colored-stool)이 200 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서, 황갈색의 착색뇨(chromaturia)가 1,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 투여개시 후 1 일째부터 관찰종료 시까지 관찰되었으며, 색깔이 용량상관성 있게 짙게 관찰되었다. 유연(salivation)이 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 투여개시 후 8 일째부터 투여종료 일까지 투여직후에만 일시적으로 관찰되었다.

체중 (Table 2; Appendix 1-2)

군간 통계학적으로 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

사료 섭취량 (Table 3; Appendix 1-3)

군간 통계학적으로 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

물 섭취량 (Table 4; Appendix 1-4)

군간 통계학적으로 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

안검사 (Table 5; Appendix 1-5)

이상소견은 관찰되지 않았다.

요검사 (Table 6; Appendix 1-6)

케톤체(KET)가 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서, 빌리루빈(BIL)이 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았다($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

요색조가 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 어두운 노란색(dark yellow)으로 관찰되었고, 노란색으로 관찰된 부형제대조군과 비교하여 통계학적인 유의성 있는 차이가 확인되었다($P < 0.01$).

혈액학적 검사 (Table 7; Appendix 1-7)

수컷에서, 적혈구(RBC) 수가 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮았다($P < 0.05$). 호산구(EOS) 백분비가 200 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았으나($P < 0.05$), 용량상관성 없는 변화이었다.

혈액생화학적 검사 (Table 8; Appendix 1-8)

총빌리루빈(TBIL)이 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았다($P < 0.05$). 수컷에서는 나트륨(Na^+) 및 염소(Cl^-)가 1,000 mg/kg/day 이상 투여군에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮았고($P < 0.05$, $P < 0.01$), 알칼라인 포스파

타제(ALP)가 5,000 mg/kg/day 투여군에서 유의성 있게 높았다($P<0.01$). 암컷에서는 IP가 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮았다($P<0.05$, $P<0.01$).

그 밖에 총콜레스테롤(TCHO)가 200 및 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았으나($P<0.05$, $P<0.01$), 용량상관성 없는 변화이었다.

장기중량 (Table 9; Appendix 1-9)

좌측 고환의 절대중량이 200 mg/kg/day 투여군 수컷에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮았으나($P<0.05$), 용량상관성 없는 변화이었다. 암컷에서는 군간 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

부검소견 (Table 10; Appendix 1-10)

가슴샘의 적색반점 산재(diffused red spots)가 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 2 레 관찰되었으나 우발적인 변화로 판단하고, 자궁내 맑은액체저류(retention of clear fluid)가 부형제대조군, 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 각 1, 1 및 2 레 관찰되었으나 동물의 정상적인 성주기에 따른 생리적인 변화로 판단한다.

고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 RIS를 Sprague-Dawley 랫드에 2 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 확인하여 추후 실시할 13 주간 반복 독성시험에서의 용량설정 근거로 활용하기 위하여 수행하였다.

실험결과, 사망은 관찰되지 않았고, 체중변화, 사료 및 물섭취량, 안과학적검사, 장기중량 및 육안적 부검소견에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

200 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 관찰된 물질혼입변, 1,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 관찰된 착색뇨 그리고 어두운 노란색조의 요는 용량상관성 있는 변화로 시험물질 투여에 의한 변화로 판단한다. 단, 관련항목에서 유의성 있는 변화가 동반 관찰되지 않은 것으로 보아 이는 시험물질 또는 그 대사물이 분변 또는 뇨로 배설되어 나타난 변화로 추정한다.

이와 관련하여 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷 또는 수컷에서 관찰된 요 중 KET 및 BIL의 증가 또한 관련 항목에서 유의한 변화를 동반 관찰되지 않은 것으로 보아 착색뇨의 색깔(황갈색)에 기인한 위양성 반응으로 판단한다¹⁾.

5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 관찰된 유연은 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하고, 투여직후에만 일시적으로 관찰된 것으로 보아 투여된 시험물질의 물리적인 성상 등에 기인한 변화로 추정한다.

혈액관련 검사결과, 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 관찰된 혈 중 RBC 수의 감소는 정상범위 이내의 변화로²⁾ 관련항목에서 유의한 변화를 동반하지 않았기에 시험물질 투여에 의한 변화로 보기 어려웠다.

1,000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 관찰된 혈중 Na^+ 및 Cl^- 의 감소는 용량상관성 있는 변화로 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하나, 모두 정상범위 이내의 변화이었다²⁾.

200 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 IP의 감소는 수컷에서도 용량상관성 있는 감소 경향을 보여 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하나, 정상범위 이내의 변화이었다²⁾.

5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 관찰된 TBIL의 증가는 관련항목에서의 뚜렷한 변화를 동반하지 않은 것으로 보아 혈청 중에 함유되어 있는 시험물질 혹은 그 대사물이 측정시약과 반응하여 나타난 간섭반응으로 추정하고³⁾, 추후 이에 대한 확인작업이 필요할 것으로 판단한다.

5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 관찰된 ALP의 증가는 성별 상관성 없는 변화로 시험물질 투여에 의한 변화로 보기 어려웠다.

이상의 결과로 보아, RIS를 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 200, 1,000 및 5,000 mg/kg/day로 2 주간 반복 경구투여 하였을 때 암수에서 물질혼입변(200 mg/kg/day 이상 투여군) 또는 착색뇨(1,000 mg/kg/day 이상 투여군)가 관찰되었으나, 시험물질 또는 그 대사물이 변

또는 뇨로 배출되어 나타난 변화로 추정하고, 혈중에서 1,000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷의 Na^+ 및 Cl^- 와 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷의 IP가 감소하였으나, 정상범위 이내의 변화 이었다.

상기 결과를 토대로 추후 실시할 13 주간 반복 경구투여 독성시험에서는 본 시험물질이 건강기능 식품임을 감안하여 독성학적인 변화가 관찰될 것으로 예측되는 용량인 5,000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고, 그 아래로 공비 3으로 두 개군을 두는 것을 추천한다.

참고문헌

- 1) Siemens Healthcare Diagnostics Reagent Strips for Urinalysis.
- 2) Han, Z.Z., Xu, H.D., Kim, K.H., Ahn, T.H., Bae, J.S., Lee, J.Y., Gil, K.H., Lee, J.Y., Woo, S.J., Yoo, H.J., Lee, H.K., Kim, K.H., Park, C.K., Zhang H.S., and Song S.W. (2010). Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague-Dawley Rats from Pre-clinical Toxicity Studies. *Korean J. of Lab. Anim. Sci.* 26 (2), 153-164.
- 3) 국립독성과학원(2008): 독성동태, 비임상시험 교육자료.

약어

Note: The following lists of codes, units and abbreviations are used by ChemOn Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

GLP	Good Laboratory Practice	MCHC	Mean Cell Hemoglobin Concentration
QAU	Quality Assurance Unit	MPV	Mean platelet volume
KFDA	Korea Food and Drug Administration	RET	Reticulocytes
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences	PLT	Platelet
ANOVA	Analysis of Variance	WBC	White Blood Cell
SOP	Standard Operating Procedure	NEU	Neutrophil
SPF	Specific Pathogen Free	LYM	Lymphocyte
N	Number of measurements in a group	MONO	Monocyte
NA	Not Applicable	EOS	Eosinophil
SD	Standard Deviation	BASO	Basophil
hr	Hour	LUC	Large Unstained Cells
min	Minute	APTT	Activated Partial thromboplastin Time
sec	Second	PT	Prothrombin Time
M	Male	AST	Aspartate Aminotransferase
F	Female	ALT	Alanine Aminotransferase
rpm	Revolution per Minute	ALP	Alkaline Phosphatase
RCF	Relative Centrifugal Force	CPK	Creatine Phosphokinase
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid	TBIL	Total Bilirubin
CBC	Complete Blood Count	TCHO	Total Cholesterol
GLU	Glucose	TG	Triglyceride
BIL	Bilirubin	TP	Total Protein
KET	Ketone body	ALB	Albumin
SG	Specific Gravity	A/G	Albumin/Globulin
PRO	Protein	BUN	Blood urea nitrogen
URO	Urobilinogen	CRE	Creatinine
NIT	Nitrite	IP	Inorganic Phosphorus
OB	Occult Blood	Ca ²⁺	Calcium
RBC	Red Blood Cell	Na ⁺	Sodium
HCT	Haematocrit	K ⁺	Potassium
HGB	Haemoglobin Concentration	Cl ⁻	Chloride
MCV	Mean Corpuscular Volume		
MCH	Mean Cell Hemoglobin		

TABLES

Table 1. Summary of clinical signs

STUDY: 11-RR-073P		CLINICAL SIGNS				MALE
DAYS ^{a)}	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)	
0	Normal	5 / 5 ^{b)}	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
1-7	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5	
8	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	2 / 5	
9-10	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	3 / 5	
11	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5	
12-13	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	2 / 5	
14	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5	
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	

a) The day of first treatment was designated day 0.

b) Number of animals observed/ Number of animals examined.

<CONTINUED>

Table 1. Summary of clinical signs

STUDY: 11-RR-073P		CLINICAL SIGNS			FEMALE
DAYS ^{a)}	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)
0	Normal	5 / 5 ^{b)}	5 / 5	5 / 5	5 / 5
1-7	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
8	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
9-10	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	0 / 5
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	5 / 5
11	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
12-13	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
	Salivation	0 / 5	0 / 5	0 / 5	3 / 5
14	Normal	5 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	Compound-colored stool	0 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Chromaturia	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

a) The day of first treatment was designated day 0.

b) Number of animals observed/ Number of animals examined.

<END>

Table 2. Summary of body weights

STUDY: 11-RR-073P		BODY WEIGHTS (g)			
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)	
MALE					
0	175.78±8.68 ^{b)}	174.62±7.31	175.32±7.46	174.42±6.24	
1	230.59±6.69	227.35±5.84	229.51±12.24	229.62±8.43	
2	272.09±6.41	268.25±6.53	267.70±15.77	273.33±12.41	
GAINS ^{a)}	96.32±7.98	93.63±5.44	92.38±10.47	98.91±6.54	
N	5	5	5	5	
FEMALE					
0	141.12±2.11	141.24±6.01	141.47±4.01	141.42±6.32	
1	173.22±11.28	169.37±9.64	168.82±7.64	166.32±7.05	
2	187.89±14.12	184.08±15.65	185.42±12.92	183.47±10.31	
GAINS	46.76±12.74	42.84±10.35	43.95±9.26	42.05±7.57	
N	5	5	5	5	

a) Weight gains are body weight difference between week 2 and week 0.

b) Data were expressed as Mean±S.D.

Table 3. Summary of food consumptions

STUDY: 11-RR-073P		FOOD CONSUMPTIONS (g/head/day)			
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)	
MALE					
0	21.14±0.18 ^{a)}	21.25±1.81	22.43±1.65	20.81±2.11	
1	24.42±0.10	24.16±1.02	23.04±0.31	22.41±1.86	
2	25.50±1.24	24.71±0.51	25.81±0.33	25.09±0.45	
N	5	5	5	5	
FEMALE					
0	14.63±0.24	18.95±7.71	15.37±0.14	15.58±0.93	
1	15.80±1.02	14.15±1.50	15.54±0.73	16.13±0.28	
2	15.60±0.74	14.60±2.61	15.78±2.95	16.44±0.27	
N	5	5	5	5	

a) Data were expressed as Mean±S.D.

Table 4. Summary of water consumptions

STUDY: 11-RR-073P		WATER CONSUMPTIONS (g/head/day)			
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)	
MALE					
0	23.25±2.81 ^{a)}	22.84±0.30	22.37±0.14	21.50±0.25	
1	26.48±1.40	24.47±0.78	22.93±3.01	24.61±4.16	
2	29.86±2.14	24.97±1.77	27.27±1.93	28.99±3.29	
N	5	5	5	5	
FEMALE					
0	16.67±1.06	15.90±0.43	17.06±0.39	16.94±0.19	
1	18.63±1.39	14.37±2.78	18.33±1.09	18.65±1.58	
2	19.56±0.78	16.60±5.77	18.85±2.66	19.11±0.53	
N	5	5	5	5	

a) Data were expressed as Mean±S.D.

Table 5. Summary of ophthalmic findings

STUDY: 11-RR-073P		OPHTHALMIC FINDINGS			
SITES	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)
MALE					
Left eye	Normal	5 / 5 ^{a)}	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE					
Left eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

a) Number of animals observed / Number of animals examined.

Table 6. Summary of urinalysis

STUDY: 11-RR-073P			URINALYSIS				MALE
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)				
			G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)	
GLU	-	0	5	5	5	5	
BIL	-	0	5	5	5	5	
KET	-	0	2	1	4	0	
	+/-	1	3	4	1	2	
	1+	2	0	0	0	2	
	2+	3	0	0	0	1*	
SG	1.015	2	0	0	2	0	
	1.020	3	4	1	1	1	
	1.025	4	1	1	1	3	
	≥1.030	5	0	3	1	1	
pH	7.5	0	0	0	0	1	
	8.0	1	5	4	5	3	
	8.5	2	0	1	0	1	
PRO	1+	2	1	1	1	0	
	2+	3	4	3	2	2	
	3+	4	0	1	2	3	
URO	0.1	0	5	5	5	3	
	1.0	1	0	0	0	2	
NIT	-	0	5	5	5	5	
OB	-	0	5	5	2	5	
WBC	+/-	1	2	1	0	0	
	1+	2	2	3	3	4	
	2+	3	1	1	2	1	
CLARITY-C			5	5	5	5	
COLOR-Y			5	5	5	0	
COLOR-DY			0	0	0	5**	
N			5	5	5	5	

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, Y: Yellow, DY: Dark yellow, C: Clear.

*/** Significant difference at $P < 0.05$ / $P < 0.01$ levels compared with the vehicle control.

RESULT	GLU (g/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	OB (EA/ μ L)
-	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
+/-	1	Not applicable	5	Trace	10
1+	2.5	Small	15	30	25
2+	5	Moderate	40	100	80
3+	10	Large	80	300	200

<CONTINUED>

Table 6. Summary of urinalysis

STUDY: 11-RR-073P			URINALYSIS				FEMALE
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)				
			G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)	
GLU	-	0	5	5	5	4	
	+/-	1	0	0	0	1	
BIL	-	0	5	5	5	1	
	+/-	1	0	0	0	0	
	1+	2	0	0	0	4*	
KET	-	0	5	5	3	0	
	+/-	1	0	0	2	2	
	1+	2	0	0	0	2	
	2+	3	0	0	0	1**	
SG	≤1.005	0	1	0	2	0	
	1.010	1	0	1	0	1	
	1.015	2	2	1	1	2	
	1.020	3	1	3	0	0	
	1.025	4	1	0	2	2	
pH	7.5	0	1	1	1	1	
	8.0	1	4	4	4	2	
	8.5	2	0	0	0	2	
PRO	-	0	1	2	1	0	
	+/-	1	1	1	1	1	
	1+	2	2	0	1	0	
	2+	3	1	2	2	1	
	3+	4	0	0	0	3	
URO	0.1	0	5	5	5	4	
	1.0	1	0	0	0	1	
NIT	-	0	5	5	5	5	
OB	-	0	5	4	5	5	
	+/-	1	0	0	0	0	
	1+	2	0	1	0	0	
	2+	3	0	0	0	0	
WBC	-	0	2	3	1	0	
	+/-	1	2	0	1	1	
	1+	2	0	1	3	2	
	2+	3	1	1	0	2	
CLARITY-C			5	5	5	5	
COLOR-Y			5	5	5	0	
COLOR-DY			0	0	0	5**	
N			5	5	5	5	

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, Y: Yellow, DY: Dark yellow, C: Clear.

*/** Significant difference at $P<0.05/P<0.01$ levels compared with the vehicle control.

RESULT	GLU (g/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	OB (EA/μL)
-	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
+/-	1	Not applicable	5	Trace	10
1+	2.5	Small	15	30	25
2+	5	Moderate	40	100	80
3+	10	Large	80	300	200

<END>

Table 7. Summary of hematological values

STUDY: 11-RR-073P		HEMATOLOGICAL VALUES			
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)
MALE					
RBC	10 ⁶ /μL	7.76±0.19 ^{a)}	7.31±0.32*	7.55±0.26	7.40±0.15*
HGB	g/dL	14.5±0.3	13.9±0.5	14.2±0.5	14.0±0.5
HCT	%	45.8±0.9	43.8±1.9	44.9±1.3	44.6±1.2
MCV	fL	59.0±1.6	59.9±0.4	59.4±1.3	60.2±0.8
MCH	pg	18.7±0.5	19.1±0.5	18.8±0.3	18.9±0.5
MCHC	g/dL	31.6±0.2	31.8±0.8	31.6±0.3	31.4±0.4
RDW	%	11.5±0.3	11.5±0.2	11.3±0.1	11.7±0.2
HDW	g/dL	2.18±0.07	2.19±0.08	2.13±0.07	2.14±0.05
PLT	10 ³ /μL	1182.6±115.1	1243.2±131.0	1279.4±122.6	1289.2±115.2
MPV	fL	6.86±0.36	6.72±0.31	6.72±0.47	7.16±0.34
WBC	10 ³ /μL	9.47±1.16	8.79±1.37	9.78±1.08	10.55±1.28
NEU	%	10.44±1.53	11.04±3.14	9.46±2.39	8.16±1.57
LYM	%	84.7±2.0	83.1±3.4	85.9±1.9	87.0±2.0
MONO	%	3.20±0.64	3.96±1.27	2.96±0.46	3.12±0.50
EOS	%	0.38±0.13	0.66±0.11*	0.46±0.22	0.36±0.11
BASO	%	0.20±0.07	0.16±0.09	0.26±0.05	0.24±0.09
LUC	%	1.04±0.61	1.04±0.15	0.94±0.21	1.14±0.15
FEMALE					
RBC	10 ⁶ /μL	7.32±0.16	7.41±0.31	7.15±0.12	7.19±0.15
HGB	g/dL	13.7±0.3	14.0±0.6	13.6±0.4	13.4±0.4
HCT	%	42.1±1.1	43.0±2.0	41.6±0.9	41.3±1.1
MCV	fL	57.4±0.9	58.0±1.4	58.2±1.0	57.4±1.4
MCH	pg	18.7±0.4	18.9±0.5	19.0±0.4	18.7±0.6
MCHC	g/dL	32.7±0.4	32.6±0.4	32.7±0.3	32.6±0.3
RDW	%	10.9±0.4	11.0±0.3	10.8±0.4	10.7±0.4
HDW	g/dL	2.24±0.18	2.23±0.13	2.12±0.06	2.09±0.14
PLT	10 ³ /μL	1217.0±77.7	1234.6±93.5	1220.8±104.4	1108.6±24.8
MPV	fL	6.30±0.22	6.24±0.34	6.50±0.60	6.82±0.67
WBC	10 ³ /μL	5.92±1.61	6.24±0.63	5.71±0.65	5.13±0.49
NEU	%	10.66±1.36	11.72±4.38	11.56±2.09	10.44±3.01
LYM	%	83.7±2.7	83.4±4.4	83.4±2.0	85.3±3.3
MONO	%	3.50±1.02	2.84±0.92	2.82±0.46	2.50±0.66
EOS	%	1.08±0.43	1.08±0.26	1.22±0.55	0.90±0.37
BASO	%	0.14±0.05	0.10±0.07	0.14±0.05	0.10±0.10
LUC	%	0.98±0.16	0.78±0.22	0.84±0.19	0.72±0.30
N		5	5	5	5

a) Data were expressed as Mean±S.D.

* Significant difference at $P<0.05$ levels compared with the vehicle control.

Table 8. Summary of serum biochemical values

STUDY: 11-RR-073P		SERUM BIOCHEMICAL VALUES			
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)
MALE					
AST	U/L	74.3±6.4 ^{a)}	86.8±14.0	75.0±11.2	86.6±13.2
ALT	U/L	36.2±3.5	41.2±5.4	38.3±4.2	42.1±7.4
ALP	U/L	151.2±15.2	172.9±23.7	162.4±10.4	206.5±16.5**
CPK	U/L	195.8±36.9	239.4±84.8	162.0±53.2	164.6±30.6
TBIL	mg/dL	0.15±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01	0.17±0.01*
GLU	mg/dL	134.9±13.9	134.2±19.5	142.5±26.7	111.5±14.9
TCHO	mg/dL	83.0±5.5	98.4±4.9**	92.6±6.3*	78.4±10.2
TG	mg/dL	47.8±17.9	56.4±5.9	54.8±8.7	55.6±20.9
TP	g/dL	5.76±0.08	5.72±0.20	5.72±0.13	5.60±0.17
ALB	g/dL	3.09±0.07	3.12±0.11	3.13±0.11	3.08±0.10
A/G	ratio	1.16±0.06	1.20±0.02	1.21±0.03	1.23±0.10
BUN	mg/dL	18.9±2.0	18.6±1.6	19.2±1.9	15.9±2.3
CRE	mg/dL	0.45±0.03	0.45±0.03	0.45±0.02	0.43±0.01
IP	mg/dL	8.40±0.31	8.26±0.46	8.13±0.50	7.69±0.45
Ca ²⁺	mg/dL	9.49±0.20	9.31±0.21	9.33±0.11	9.33±0.22
Na ⁺	mmol/L	140.0±0.3	139.8±1.0	139.2±0.3*	138.1±0.8*
K ⁺	mmol/L	4.91±0.19	4.76±0.30	4.90±0.28	5.08±0.20
Cl ⁻	mmol/L	104.7±0.8	103.9±0.9	103.5±0.6*	102.8±0.7**
FEMALE					
AST	U/L	92.1±13.3	97.9±15.0	96.6±15.0	91.9±21.5
ALT	U/L	34.4±4.1	35.5±8.7	32.5±2.2	33.6±7.1
ALP	U/L	116.8±24.7	120.6±14.2	123.2±25.3	116.5±29.6
CPK	U/L	152.2±27.8	178.4±46.7	165.8±57.5	166.0±36.1
TBIL	mg/dL	0.16±0.01	0.16±0.01	0.17±0.01	0.18±0.01*
GLU	mg/dL	106.7±6.7	104.4±4.1	99.4±6.7	109.2±8.8
TCHO	mg/dL	102.8±15.1	95.8±6.6	84.4±8.9	91.2±16.5
TG	mg/dL	44.0±10.3	41.0±11.9	43.0±13.5	44.6±15.1
TP	g/dL	5.66±0.10	5.81±0.17	5.75±0.21	5.70±0.20
ALB	g/dL	3.16±0.06	3.24±0.06	3.21±0.10	3.22±0.14
A/G	ratio	1.26±0.06	1.26±0.06	1.27±0.10	1.30±0.08
BUN	mg/dL	18.4±1.9	17.9±1.9	17.7±2.4	20.1±2.4
CRE	mg/dL	0.45±0.02	0.45±0.03	0.45±0.01	0.45±0.02
IP	mg/dL	7.98±0.38	7.47±0.37*	7.85±0.17	7.18±0.41**
Ca ²⁺	mg/dL	9.20±0.27	9.08±0.11	9.06±0.12	9.05±0.36
Na ⁺	mmol/L	139.9±1.3	139.0±1.2	139.3±0.8	138.7±1.7
K ⁺	mmol/L	4.58±0.16	4.50±0.09	4.28±0.21	4.43±0.22
Cl ⁻	mmol/L	105.4±1.6	105.2±0.7	104.8±0.3	104.5±0.8
N		5	5	5	5

a) Data were expressed as Mean±S.D.

*/** Significant difference at $P<0.05/P<0.01$ levels compared with the vehicle control.

Table 9. Summary of absolute & relative organ weights

STUDY: 11-RR-073P		ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS			
ORGANS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)	
MALE					
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	241.05±6.71 ^{b)}	242.48±7.19	239.56±13.17	247.63±10.17	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0253±0.0037	0.0234±0.0021	0.0240±0.0017	0.0219±0.0017	
% to BODY WEIGHT	0.0105±0.0014	0.0097±0.0010	0.0100±0.0005	0.0088±0.0008	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0259±0.0027	0.0235±0.0028	0.0223±0.0020	0.0226±0.0018	
% to BODY WEIGHT	0.0107±0.0010	0.0097±0.0014	0.0093±0.0006	0.0092±0.0010	
THYMUS	0.5308±0.0945	0.5213±0.0659	0.5146±0.0589	0.6154±0.1114	
% to BODY WEIGHT	0.2202±0.0380	0.2149±0.0248	0.2145±0.0183	0.2483±0.0430	
PROSTATE GLAND	0.2427±0.0367	0.2658±0.0777	0.2750±0.0349	0.2542±0.0446	
% to BODY WEIGHT	0.1009±0.0170	0.1092±0.0300	0.1148±0.0136	0.1022±0.0141	
TESTIS-LEFT	1.6302±0.0748	1.5091±0.0415*	1.6777±0.0778	1.5787±0.0541	
% to BODY WEIGHT	0.6768±0.0382	0.6224±0.0046	0.7010±0.0282	0.6382±0.0292	
TESTIS-RIGHT	1.6064±0.1109	1.5538±0.0535	1.6665±0.0567	1.5978±0.0642	
% to BODY WEIGHT	0.6672±0.0543	0.6411±0.0227	0.6963±0.0168	0.6460±0.0348	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.2962±0.0248	0.2915±0.0046	0.3119±0.0261	0.2885±0.0174	
% to BODY WEIGHT	0.1231±0.0122	0.1203±0.0030	0.1303±0.0103	0.1168±0.0111	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.2940±0.0380	0.3096±0.0312	0.2919±0.0209	0.2951±0.0283	
% to BODY WEIGHT	0.1220±0.0156	0.1276±0.0108	0.1220±0.0084	0.1192±0.0106	
SPLEEN	0.6984±0.1031	0.6167±0.0522	0.6421±0.1109	0.7167±0.0688	
% to BODY WEIGHT	0.2896±0.0398	0.2542±0.0181	0.2671±0.0358	0.2893±0.0237	
KIDNEY-LEFT	0.8951±0.0572	0.8675±0.0625	0.8963±0.0734	0.9622±0.0375	
% to BODY WEIGHT	0.3713±0.0197	0.3578±0.0237	0.3740±0.0185	0.3889±0.0169	
KIDNEY-RIGHT	0.8967±0.0763	0.9020±0.0522	1.0628±0.3571	0.9865±0.0250	
% to BODY WEIGHT	0.3717±0.0257	0.3720±0.0177	0.4470±0.1658	0.3987±0.0122	
HEART	0.9308±0.0715	0.8749±0.0463	0.9156±0.0593	0.9400±0.0729	
% to BODY WEIGHT	0.3858±0.0211	0.3610±0.0204	0.3826±0.0234	0.3802±0.0344	
LUNG	1.2134±0.1247	1.2676±0.0955	1.2354±0.1046	1.2967±0.0857	
% to BODY WEIGHT	0.5034±0.0501	0.5225±0.0316	0.5152±0.0228	0.5233±0.0183	
BRAIN	1.6995±0.0916	1.6950±0.0464	1.7194±0.1083	1.6920±0.1215	
% to BODY WEIGHT	0.7056±0.0447	0.6995±0.0257	0.7197±0.0631	0.6831±0.0355	
LIVER	7.5559±0.5203	7.5954±0.3166	7.8350±0.8497	7.6122±0.4712	
% to BODY WEIGHT	3.1339±0.1808	3.1319±0.0691	3.2640±0.1827	3.0724±0.0807	
N	5	5	5	5	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

b) Data were expressed as Mean±S.D.

* Significant difference at $P<0.05$ level compared with the vehicle control.

<CONTINUED>

Table 9. Summary of absolute & relative organ weights

STUDY: 11-RR-073P		ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS			
ORGANS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)	
	FEMALE				
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	173.50±13.76 ^{b)}	170.74±13.11	171.55±11.53	169.86±8.53	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0370±0.0099	0.0410±0.0079	0.0392±0.0039	0.0391±0.0045	
% to BODY WEIGHT	0.0212±0.0045	0.0242±0.0052	0.0229±0.0022	0.0230±0.0024	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0380±0.0076	0.0422±0.0041	0.0342±0.0049	0.0355±0.0047	
% to BODY WEIGHT	0.0219±0.0044	0.0247±0.0016	0.0201±0.0034	0.0209±0.0020	
OVARY-LEFT	0.0304±0.0057	0.0370±0.0192	0.0283±0.0033	0.0268±0.0014	
% to BODY WEIGHT	0.0176±0.0033	0.0216±0.0109	0.0166±0.0023	0.0158±0.0011	
OVARY-RIGHT	0.0307±0.0072	0.0270±0.0042	0.0276±0.0028	0.0270±0.0019	
% to BODY WEIGHT	0.0177±0.0039	0.0159±0.0025	0.0162±0.0021	0.0159±0.0015	
THYMUS	0.3894±0.0414	0.3650±0.0532	0.3572±0.0308	0.3667±0.0745	
% to BODY WEIGHT	0.2248±0.0214	0.2138±0.0262	0.2083±0.0130	0.2164±0.0463	
UTERUS	0.4405±0.2689	0.5985±0.3642	0.4243±0.1694	0.6510±0.2533	
% to BODY WEIGHT	0.2561±0.1569	0.3425±0.1823	0.2461±0.0921	0.3856±0.1570	
SPLEEN	0.4925±0.0597	0.5111±0.0702	0.5036±0.0462	0.4903±0.0358	
% to BODY WEIGHT	0.2838±0.0245	0.2986±0.0225	0.2933±0.0114	0.2888±0.0185	
KIDNEY-LEFT	0.6874±0.0859	0.6659±0.0563	0.6602±0.0490	0.6662±0.0435	
% to BODY WEIGHT	0.3951±0.0206	0.3902±0.0189	0.3850±0.0158	0.3922±0.0168	
KIDNEY-RIGHT	0.6880±0.0685	0.6953±0.0770	0.6671±0.0170	0.7048±0.0655	
% to BODY WEIGHT	0.3962±0.0134	0.4064±0.0157	0.3898±0.0182	0.4148±0.0312	
HEART	0.7364±0.1419	0.6896±0.0536	0.6933±0.0325	0.6704±0.0521	
% to BODY WEIGHT	0.4225±0.0534	0.4046±0.0267	0.4048±0.0166	0.3943±0.0145	
LUNG	1.0124±0.0504	1.0223±0.0710	1.0473±0.0505	1.0033±0.0502	
% to BODY WEIGHT	0.5848±0.0255	0.5997±0.0327	0.6115±0.0250	0.5908±0.0128	
BRAIN	1.6162±0.0827	1.6490±0.0663	1.5769±0.0521	1.6615±0.0571	
% to BODY WEIGHT	0.9361±0.0877	0.9693±0.0667	0.9228±0.0724	0.9795±0.0458	
LIVER	5.4763±0.7639	5.3209±0.7097	5.5452±0.6990	5.2638±0.2961	
% to BODY WEIGHT	3.1449±0.1918	3.1054±0.1805	3.2246±0.2340	3.0987±0.0731	
N	5	5	5	5	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

b) Data were expressed as Mean±S.D.

<END>

Table 10. Summary of necropsy findings

STUDY: 11-RR-073P		NECROPSY FINDINGS			
ORGANS	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (200)	G3 (1,000)	G4 (5,000)
MALE					
Thymus	Diffused red spots	0	0	0	2
	N	5	5	5	5
FEMALE					
Uterus	Retention of clear fluid	1	1	0	2
	N	5	5	5	5

Appendix 1. Individual data

Appendix 1-1. Individual clinical signs

STUDY: 11-RR-073P		CLINICAL SIGNS	MALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}	
G1 (0 mg/kg/day)			
1	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
2	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
3	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
4	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
5	Normal	DAY 0-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
G2 (200 mg/kg/day)			
6	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
7	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
8	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
9	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
10	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	

a) The day of first treatment was designated day 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

STUDY: 11-RR-073P		CLINICAL SIGNS	MALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}	
G3 (1,000 mg/kg/day)			
11	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
12	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
13	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
14	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
15	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
G4 (5,000 mg/kg/day)			
16	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Salivation	DAY 8-10, 12-13	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
17	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
18	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Salivation	DAY 8-10, 12-13	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
19	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Salivation	DAY 9-10	
	Terminal sacrifice	DAY 14	
20	Normal	DAY 0	
	Compound-colored stool	DAY 1-14	
	Chromaturia	DAY 1-14	
	Terminal sacrifice	DAY 14	

a) The day of first treatment was designated day 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

STUDY: 11-RR-073P		CLINICAL SIGNS	FEMALE
Animal ID	SIGNS		OBSERVED ON ^{a)}
G1 (0 mg/kg/day)			
21	Normal		DAY 0-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
22	Normal		DAY 0-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
23	Normal		DAY 0-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
24	Normal		DAY 0-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
25	Normal		DAY 0-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
G2 (200 mg/kg/day)			
26	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
27	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
28	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
29	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
30	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14

a) The day of first treatment was designated day 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

STUDY: 11-RR-073P		CLINICAL SIGNS	FEMALE
Animal ID	SIGNS		OBSERVED ON ^{a)}
G3 (1,000 mg/kg/day)			
31	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
32	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
33	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
34	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
35	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Terminal sacrifice		DAY 14
G4 (5,000 mg/kg/day)			
36	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Salivation		DAY 8-10
	Terminal sacrifice		DAY 14
37	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Salivation		DAY 9-10, 12-13
	Terminal sacrifice		DAY 14
38	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Salivation		DAY 9-10, 12-13
	Terminal sacrifice		DAY 14
39	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Salivation		DAY 9-10, 12-13
	Terminal sacrifice		DAY 14
40	Normal		DAY 0
	Compound-colored stool		DAY 1-14
	Chromaturia		DAY 1-14
	Salivation		DAY 9-10
	Terminal sacrifice		DAY 14

a) The day of first treatment was designated day 0.

<END>

Appendix 1-2. Individual body weight changes

STUDY: 11-RR-073P

BODY WEIGHTS (g)

MALE										
GROUP	G1 (0 mg/kg/day)					G2 (200 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
WEEK 0	173.76	163.36	184.33	183.84	173.59	165.32	180.87	171.40	183.14	172.39
WEEK 1	228.85	219.94	237.27	234.39	232.50	226.11	234.33	224.44	232.01	219.86
WEEK 2	274.04	262.10	272.46	271.98	279.88	265.60	275.43	268.15	273.19	258.89
GAINS ^{a)}	100.28	98.74	88.13	88.14	106.29	100.28	94.56	96.75	90.05	86.50
GROUP	G3 (1,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
WEEK 0	167.99	184.91	170.14	181.58	172.00	170.12	185.10	173.89	169.78	173.19
WEEK 1	227.88	249.64	219.38	230.49	220.16	222.95	243.37	230.10	222.55	229.12
WEEK 2	263.87	294.15	254.66	268.61	257.21	264.07	292.47	274.48	260.69	274.93
GAINS ^{a)}	95.88	109.24	84.52	87.03	85.21	93.95	107.37	100.59	90.91	101.74
FEMALE										
GROUP	G1 (0 mg/kg/day)					G2 (200 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
WEEK 0	140.67	140.23	144.71	140.85	139.15	144.12	132.58	146.08	146.03	137.41
WEEK 1	172.92	163.80	192.41	170.44	166.55	173.56	155.24	179.53	174.33	164.17
WEEK 2	197.06	167.53	204.43	187.59	182.82	191.62	158.64	199.97	188.32	181.86
GAINS ^{a)}	56.39	27.30	59.72	46.74	43.67	47.50	26.06	53.89	42.29	44.45
GROUP	G3 (1,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
WEEK 0	134.37	143.45	143.85	142.31	143.38	138.28	152.56	137.01	139.72	139.54
WEEK 1	155.64	174.25	173.86	170.94	169.42	156.52	175.73	167.54	168.40	163.42
WEEK 2	164.32	184.75	197.97	186.68	193.38	168.99	196.49	187.57	185.73	178.58
GAINS ^{a)}	29.95	41.30	54.12	44.37	50.00	30.71	43.93	50.56	46.01	39.04

a) Weight gains are body weight difference between week 2 and the week 0.

Appendix 1-3. Individual food consumptions

STUDY: 11-RR-073P

FOOD CONSUMPTIONS

MALE

GROUPS (mg/kg/day)		G1 (0)		G2 (200)		G3 (1,000)		G4 (5,000)	
WEEKS	N	2	3	2	3	2	3	2	3
0	Sum	42.03	63.82	45.05	59.91	47.20	63.79	44.60	57.96
	g / N	21.02	21.27	22.53	19.97	23.60	21.26	22.30	19.32
1	Sum	48.99	73.06	49.76	70.30	46.51	68.45	42.18	71.17
	g / N	24.50	24.35	24.88	23.43	23.26	22.82	21.09	23.72
2	Sum	52.74	73.86	50.15	73.05	52.08	76.73	50.82	74.30
	g / N	26.37	24.62	25.08	24.35	26.04	25.58	25.41	24.77

FEMALE

GROUPS (mg/kg/day)		G1 (0)		G2 (200)		G3 (1,000)		G4 (5,000)	
WEEKS	N	2	3	2	3	2	3	2	3
0	Sum	29.59	43.38	48.80	40.47	30.55	46.41	32.48	44.76
	g / N	14.80	14.46	24.40	13.49	15.28	15.47	16.24	14.92
1	Sum	30.16	49.56	26.17	45.64	30.05	48.18	32.67	47.80
	g / N	15.08	16.52	13.09	15.21	15.03	16.06	16.34	15.93
2	Sum	30.15	48.36	25.52	49.34	27.39	53.59	32.50	49.90
	g / N	15.08	16.12	12.76	16.45	13.70	17.86	16.25	16.63

Appendix 1-4. Individual water consumptions

STUDY: 11-RR-073P

WATER CONSUMPTIONS

MALE

GROUPS (mg/kg/day)		G1 (0)		G2 (200)		G3 (1,000)		G4 (5,000)	
WEEKS	N	2	3	2	3	2	3	2	3
0	Sum	42.53	75.71	46.10	67.86	44.55	67.41	42.65	65.05
	g / N	21.27	25.24	23.05	22.62	22.28	22.47	21.33	21.68
1	Sum	50.98	82.39	47.82	75.06	41.61	75.18	43.33	82.64
	g / N	25.49	27.46	23.91	25.02	20.81	25.06	21.67	27.55
2	Sum	56.70	94.12	47.44	78.66	51.81	85.90	53.32	93.95
	g / N	28.35	31.37	23.72	26.22	25.91	28.63	26.66	31.32

FEMALE

GROUPS (mg/kg/day)		G1 (0)		G2 (200)		G3 (1,000)		G4 (5,000)	
WEEKS	N	2	3	2	3	2	3	2	3
0	Sum	31.84	52.26	32.40	46.78	33.56	52.00	33.60	51.22
	g / N	15.92	17.42	16.20	15.59	16.78	17.33	16.80	17.07
1	Sum	35.29	58.85	24.80	49.00	35.13	57.31	39.53	52.59
	g / N	17.65	19.62	12.40	16.33	17.57	19.10	19.77	17.53
2	Sum	38.02	60.35	25.04	62.06	33.95	62.19	37.47	58.44
	g / N	19.01	20.12	12.52	20.69	16.98	20.73	18.74	19.48

Appendix 1–5. Individual ophthalmic findings

STUDY: 11-RR-073P			OPHTHALMIC FINDINGS			MALE
G1 (0 mg/kg/day)			G2 (200 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
1	Normal	Normal	6	Normal	Normal	
2	Normal	Normal	7	Normal	Normal	
3	Normal	Normal	8	Normal	Normal	
4	Normal	Normal	9	Normal	Normal	
5	Normal	Normal	10	Normal	Normal	
G3 (1,000 mg/kg/day)			G4 (5,000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
11	Normal	Normal	16	Normal	Normal	
12	Normal	Normal	17	Normal	Normal	
13	Normal	Normal	18	Normal	Normal	
14	Normal	Normal	19	Normal	Normal	
15	Normal	Normal	20	Normal	Normal	
FEMALE						
G1 (0 mg/kg/day)			G2 (200 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
21	Normal	Normal	26	Normal	Normal	
22	Normal	Normal	27	Normal	Normal	
23	Normal	Normal	28	Normal	Normal	
24	Normal	Normal	29	Normal	Normal	
25	Normal	Normal	30	Normal	Normal	
G3 (1,000 mg/kg/day)			G4 (5,000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
31	Normal	Normal	36	Normal	Normal	
32	Normal	Normal	37	Normal	Normal	
33	Normal	Normal	38	Normal	Normal	
34	Normal	Normal	39	Normal	Normal	
35	Normal	Normal	40	Normal	Normal	

Appendix 1-6. Individual urinalysis data

STUDY: 11-RR-073P		URINALYSIS										MALE
G1 (0 mg/kg/day)												
ANIMAL ID	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO ^{a)}	NIT	OB	WBC	CLARITY	COLOR
1	-	-	+/-	1.020	8.0	2+	0.1	-	-	2+	C	Y
2	-	-	-	1.020	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y
3	-	-	+/-	1.025	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y
4	-	-	+/-	1.020	8.0	2+	0.1	-	-	+/-	C	Y
5	-	-	-	1.020	8.0	1+	0.1	-	-	+/-	C	Y
G2 (200 mg/kg/day)												
ANIMAL ID	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO ^{a)}	NIT	OB	WBC	CLARITY	COLOR
6	-	-	+/-	≥1.030	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y
7	-	-	+/-	≥1.030	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y
8	-	-	+/-	1.025	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y
9	-	-	+/-	≥1.030	8.5	3+	0.1	-	-	2+	C	Y
10	-	-	-	1.020	8.0	1+	0.1	-	-	+/-	C	Y
G3 (1,000 mg/kg/day)												
ANIMAL ID	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO ^{a)}	NIT	OB	WBC	CLARITY	COLOR
11	-	-	-	1.015	8.0	1+	0.1	-	-	1+	C	Y
12	-	-	-	1.025	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y
13	-	-	+/-	≥1.030	8.0	3+	0.1	-	-	2+	C	Y
14	-	-	-	1.020	8.0	3+	0.1	-	-	2+	C	Y
15	-	-	-	1.015	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y
G4 (5,000 mg/kg/day)												
ANIMAL ID	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO ^{a)}	NIT	OB	WBC	CLARITY	COLOR
16	-	-	2+	1.025	7.5	3+	1.0	-	-	1+	C	DY
17	-	-	1+	1.020	8.0	3+	1.0	-	-	1+	C	DY
18	-	-	+/-	≥1.030	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	DY
19	-	-	1+	1.025	8.0	3+	0.1	-	-	2+	C	DY
20	-	-	+/-	1.025	8.5	2+	0.1	-	-	1+	C	DY

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, Y: Yellow, DY: Dark yellow, C: Clear.

a) The unit of Urobilinogen is Ehrlich unit /dL.

RESULT	GLU (g/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	OB (EA/μL)
-	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
+/-	1	Not applicable	5	Trace	10
1+	2.5	Small	15	30	25
2+	5	Moderate	40	100	80
3+	10	Large	80	300	200

<CONTINUED>

Appendix 1-6. Individual urinalysis data

STUDY: 11-RR-073P		URINALYSIS										FEMALE	
G1 (0 mg/kg/day)													
ANIMAL ID	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO ^{a)}	NIT	OB	WBC	CLARITY	COLOR	
21	-	-	-	1.025	8.0	1+	0.1	-	-	+/-	C	Y	
22	-	-	-	1.015	8.0	1+	0.1	-	-	-	C	Y	
23	-	-	-	1.020	8.0	2+	0.1	-	-	2+	C	Y	
24	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.1	-	-	-	C	Y	
25	-	-	-	1.015	7.5	+/-	0.1	-	-	+/-	C	Y	
G2 (200 mg/kg/day)													
ANIMAL ID	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO ^{a)}	NIT	OB	WBC	CLARITY	COLOR	
26	-	-	-	1.015	8.0	-	0.1	-	-	-	C	Y	
27	-	-	-	1.020	7.5	+/-	0.1	-	-	-	C	Y	
28	-	-	-	1.020	8.0	2+	0.1	-	1+	2+	C	Y	
29	-	-	-	1.020	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y	
30	-	-	-	1.010	8.0	-	0.1	-	-	-	C	Y	
G3 (1,000 mg/kg/day)													
ANIMAL ID	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO ^{a)}	NIT	OB	WBC	CLARITY	COLOR	
31	-	-	-	≤1.005	8.0	-	0.1	-	-	-	C	Y	
32	-	-	-	1.015	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y	
33	-	-	+/-	1.025	8.0	2+	0.1	-	-	1+	C	Y	
34	-	-	-	≤1.005	8.0	+/-	0.1	-	-	1+	C	Y	
35	-	-	+/-	1.025	7.5	1+	0.1	-	-	+/-	C	Y	
G4 (5,000 mg/kg/day)													
ANIMAL ID	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO ^{a)}	NIT	OB	WBC	CLARITY	COLOR	
36	-	1+	2+	1.025	7.5	3+	1.0	-	-	1+	C	DY	
37	-	1+	1+	1.025	8.0	3+	0.1	-	-	2+	C	DY	
38	-	-	+/-	1.015	8.5	2+	0.1	-	-	2+	C	DY	
39	+/-	1+	+/-	1.015	8.0	+/-	0.1	-	-	+/-	C	DY	
40	-	1+	1+	1.010	8.5	3+	0.1	-	-	1+	C	DY	

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, Y: Yellow, DY: Dark yellow, C: Clear.

a) The unit of Urobilinogen is Ehrlich unit /dL.

RESULT	GLU (g/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	OB (EA/μL)
-	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
+/-	1	Not applicable	5	Trace	10
1+	2.5	Small	15	30	25
2+	5	Moderate	40	100	80
3+	10	Large	80	300	200

<END>

Appendix 1-7. Individual hematological values

STUDY: 11-RR-073P		HEMATOLOGICAL VALUES										MALE
		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (200 mg/kg/day)					
TESTS	UNITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
RBC	10 ⁶ /μL	7.72	7.69	7.86	8.03	7.52	6.93	7.47	6.99	7.63	7.51	
HGB	g/dL	14.7	14.4	14.8	14.4	14.1	13.9	14.0	13.2	14.3	14.3	
HCT	%	46.6	45.5	46.8	45.1	44.9	41.8	45.2	41.7	45.4	44.8	
MCV	fL	60.3	59.2	59.6	56.2	59.8	60.3	60.5	59.7	59.5	59.7	
MCH	pg	19.1	18.7	18.8	17.9	18.8	20.0	18.7	18.9	18.8	19.0	
MCHC	g/dL	31.6	31.6	31.5	31.9	31.4	33.1	30.9	31.6	31.6	31.8	
RDW	%	11.8	11.7	11.2	11.3	11.3	11.3	11.3	11.7	11.6	11.8	
HDW	g/dL	2.28	2.22	2.18	2.11	2.13	2.16	2.08	2.17	2.29	2.25	
PLT	10 ³ /μL	1345	1150	1071	1093	1254	1163	1372	1392	1100	1189	
MPV	fL	7.1	7.2	6.7	6.3	7.0	6.5	7.0	7.0	6.8	6.3	
WBC	10 ³ /μL	11.13	9.39	9.32	9.62	7.87	8.01	10.26	10.15	7.13	8.39	
NEU	%	9.8	9.3	11.3	12.7	9.1	8.9	7.7	13.2	10.1	15.3	
LYM	%	85.0	86.0	82.0	83.5	87.1	86.7	84.8	82.2	84.1	77.8	
MONO	%	3.5	3.2	4.1	2.7	2.5	2.5	5.3	2.8	4.2	5.0	
EOS	%	0.5	0.5	0.4	0.3	0.2	0.7	0.6	0.8	0.5	0.7	
BASO	%	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	
LUC	%	1.0	0.7	2.1	0.6	0.8	1.0	1.3	0.9	1.0	1.0	
		G3 (1,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)					
TESTS	UNITS	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
RBC	10 ⁶ /μL	7.39	7.25	7.64	7.92	7.57	7.19	7.42	7.31	7.54	7.54	
HGB	g/dL	14.2	13.5	14.4	14.7	14.0	13.5	13.8	13.8	14.8	13.9	
HCT	%	45.3	42.9	45.8	46.1	44.2	43.0	44.3	44.3	46.3	44.9	
MCV	fL	61.3	59.2	60.0	58.1	58.5	59.8	59.7	60.5	61.4	59.5	
MCH	pg	19.2	18.7	18.8	18.6	18.5	18.8	18.6	18.9	19.6	18.4	
MCHC	g/dL	31.4	31.5	31.4	32.0	31.7	31.5	31.1	31.2	32.0	31.0	
RDW	%	11.4	11.3	11.4	11.1	11.3	11.5	11.8	12.0	11.5	11.7	
HDW	g/dL	2.14	2.02	2.10	2.16	2.21	2.10	2.19	2.18	2.08	2.13	
PLT	10 ³ /μL	1464	1219	1219	1156	1339	1403	1353	1209	1352	1129	
MPV	fL	7.4	6.9	6.7	6.2	6.4	7.5	7.3	7.1	6.6	7.3	
WBC	10 ³ /μL	11.50	8.92	9.51	10.08	8.87	11.49	11.81	11.08	9.04	9.31	
NEU	%	6.9	12.8	10.0	7.4	10.2	6.8	8.8	10.6	7.6	7.0	
LYM	%	87.0	83.1	85.5	88.2	85.6	88.9	85.2	84.6	87.8	88.5	
MONO	%	3.7	2.6	2.8	3.1	2.6	2.6	3.9	3.1	2.8	3.2	
EOS	%	0.8	0.5	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.3	0.5	0.2	
BASO	%	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	
LUC	%	1.3	0.8	0.9	0.8	0.9	1.2	1.3	1.2	1.1	0.9	

<CONTINUED>

Appendix 1-7. Individual hematological values

STUDY: 11-RR-073P		HEMATOLOGICAL VALUES										FEMALE
		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (200 mg/kg/day)					
TESTS	UNITS	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
RBC	10 ⁶ /μL	7.35	7.54	7.39	7.18	7.14	7.52	7.38	6.91	7.49	7.75	
HGB	g/dL	13.8	14.1	13.5	13.4	13.9	13.7	14.2	13.1	14.6	14.6	
HCT	%	42.5	43.7	41.4	41.1	41.6	41.9	42.8	40.4	44.4	45.5	
MCV	fL	57.8	57.9	56.0	57.3	58.2	55.7	58.0	58.5	59.2	58.7	
MCH	pg	18.8	18.7	18.2	18.6	19.4	18.2	19.3	19.0	19.4	18.8	
MCHC	g/dL	32.5	32.4	32.6	32.5	33.3	32.6	33.2	32.4	32.8	32.1	
RDW	%	11.2	10.4	10.5	11.0	11.2	10.7	11.0	11.0	11.6	10.9	
HDW	g/dL	2.27	2.29	2.05	2.10	2.50	2.07	2.38	2.24	2.32	2.14	
PLT	10 ³ /μL	1190	1094	1272	1284	1245	1235	1158	1391	1168	1221	
MPV	fL	6.2	6.4	6.3	6.0	6.6	6.1	6.2	5.9	6.8	6.2	
WBC	10 ³ /μL	6.43	7.84	5.74	3.40	6.21	6.98	5.27	6.38	6.13	6.45	
NEU	%	9.8	10.7	13.0	9.9	9.9	11.9	6.6	18.1	13.1	8.9	
LYM	%	85.7	83.6	79.2	84.4	85.7	82.9	89.3	78.2	80.7	86.1	
MONO	%	2.6	3.2	5.2	3.6	2.9	3.2	1.9	1.9	4.0	3.2	
EOS	%	0.9	1.3	1.4	1.4	0.4	1.0	1.5	1.0	1.1	0.8	
BASO	%	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	
LUC	%	1.0	1.1	1.1	0.7	1.0	0.9	0.6	0.5	1.0	0.9	
		G3 (1,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)					
TESTS	UNITS	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
RBC	10 ⁶ /μL	7.30	7.13	7.20	6.97	7.17	7.24	7.36	7.29	7.03	7.03	
HGB	g/dL	13.9	13.6	14.1	13.3	13.3	13.7	13.9	13.0	13.6	13.0	
HCT	%	41.9	41.3	43.1	40.8	41.0	42.0	42.4	40.6	41.7	39.8	
MCV	fL	57.4	58.0	59.8	58.5	57.2	58.0	57.5	55.7	59.4	56.6	
MCH	pg	19.0	19.0	19.6	19.0	18.5	18.9	18.8	17.9	19.4	18.5	
MCHC	g/dL	33.1	32.8	32.7	32.5	32.4	32.7	32.8	32.1	32.6	32.7	
RDW	%	10.3	10.9	11.5	10.8	10.7	10.6	11.1	11.1	10.3	10.6	
HDW	g/dL	2.02	2.19	2.13	2.12	2.14	2.19	2.15	1.87	2.22	2.04	
PLT	10 ³ /μL	1063	1336	1282	1184	1239	1076	1106	1135	1131	1095	
MPV	fL	6.4	5.9	6.9	7.3	6.0	6.0	6.3	7.6	7.3	6.9	
WBC	10 ³ /μL	5.24	6.13	6.26	6.11	4.80	4.56	5.59	5.63	5.19	4.70	
NEU	%	10.6	13.5	8.7	11.3	13.7	8.3	9.0	8.2	15.3	11.4	
LYM	%	84.4	82.3	86.5	82.1	81.8	86.3	86.5	88.2	79.7	85.9	
MONO	%	2.4	2.7	2.6	3.6	2.8	2.9	2.6	2.5	3.1	1.4	
EOS	%	1.8	0.6	1.0	1.8	0.9	1.2	1.2	0.5	1.1	0.5	
BASO	%	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0	0.2	0.1	0.2	
LUC	%	0.7	0.7	1.1	1.0	0.7	1.2	0.6	0.4	0.8	0.6	

<END>

Appendix 1–8. Individual serum biochemical values

STUDY: 11-RR-073P		SERUM BIOCHEMICAL VALUES										MALE
		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (200 mg/kg/day)					
TESTS	UNITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AST	U/L	73.3	74.3	82.3	76.9	64.8	72.4	89.0	108.0	75.9	88.6	
ALT	U/L	35.9	36.4	42.0	33.2	33.5	41.3	38.0	48.5	34.4	44.0	
ALP	U/L	146.2	163.4	170.8	139.5	136.2	193.6	166.7	198.7	164.9	140.6	
CPK	U/L	237	205	176	218	143	363	281	199	143	211	
BIL	mg/dL	0.15	0.15	0.16	0.14	0.16	0.16	0.14	0.15	0.17	0.14	
GLU	mg/dL	146.3	147.6	122.0	118.1	140.4	130.8	148.9	117.5	114.5	159.1	
CHO	mg/dL	89	83	84	85	74	101	96	92	105	98	
TG	mg/dL	37	78	50	39	35	60	59	59	46	58	
PRO	g/dL	5.70	5.80	5.85	5.65	5.78	5.74	5.51	5.75	6.02	5.58	
ALB	g/dL	3.04	3.17	3.15	3.09	2.99	3.16	2.97	3.15	3.25	3.06	
A/G	ratio	1.14	1.21	1.17	1.21	1.07	1.22	1.17	1.21	1.17	1.21	
BUN	mg/dL	19.3	21.8	16.4	17.7	19.1	19.7	20.5	17.4	16.5	18.9	
CRE	mg/dL	0.42	0.49	0.45	0.46	0.45	0.47	0.49	0.41	0.43	0.43	
IP	mg/dL	8.36	8.35	8.24	8.93	8.12	8.80	7.75	8.68	7.91	8.18	
Ca ²⁺	mg/dL	9.52	9.21	9.68	9.36	9.67	9.41	8.97	9.39	9.53	9.27	
Na ⁺	mmol/L	140.1	140.5	140.1	139.7	139.7	139.6	138.7	141.2	140.4	139.2	
K ⁺	mmol/L	4.64	4.93	4.83	5.05	5.11	4.52	5.26	4.76	4.69	4.57	
Cl ⁻	mmol/L	104.2	105.8	105.0	105.0	103.6	103.6	104.1	104.1	105.0	102.6	
		G3 (1,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)					
TESTS	UNITS	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
AST	U/L	66.4	91.0	66.8	82.7	68.2	72.8	102.6	77.3	82.1	98.4	
ALT	U/L	38.9	40.5	31.4	42.6	38.1	33.5	50.4	40.0	37.4	49.2	
ALP	U/L	162.3	162.4	145.5	171.6	170.2	186.0	222.0	203.7	196.3	224.3	
CPK	U/L	160	155	113	251	131	119	175	169	203	157	
BIL	mg/dL	0.15	0.16	0.15	0.16	0.14	0.16	0.17	0.17	0.18	0.16	
GLU	mg/dL	141.7	106.2	160.6	129.3	174.5	130.4	107.6	94.4	123.0	102.2	
CHO	mg/dL	89	87	99	100	88	78	83	71	93	67	
TG	mg/dL	56	64	61	51	42	54	91	53	41	39	
PRO	g/dL	5.60	5.68	5.61	5.83	5.88	5.35	5.75	5.50	5.75	5.65	
ALB	g/dL	3.04	3.10	3.04	3.20	3.28	2.97	2.98	3.11	3.13	3.21	
A/G	ratio	1.19	1.20	1.18	1.22	1.26	1.25	1.08	1.30	1.19	1.32	
BUN	mg/dL	19.6	16.0	19.1	21.0	20.3	14.5	13.4	15.2	17.4	19.2	
CRE	mg/dL	0.44	0.43	0.43	0.48	0.46	0.43	0.43	0.41	0.42	0.45	
IP	mg/dL	8.66	7.85	7.77	8.69	7.70	7.60	7.79	7.96	6.97	8.15	
Ca ²⁺	mg/dL	9.50	9.29	9.20	9.36	9.28	9.08	9.59	9.11	9.45	9.41	
Na ⁺	mmol/L	139.0	139.5	139.2	138.8	139.3	137.9	137.7	138.3	137.3	139.3	
K ⁺	mmol/L	5.29	4.91	4.74	5.01	4.54	4.88	4.92	5.08	5.36	5.18	
Cl ⁻	mmol/L	104.2	103.3	102.6	103.3	103.9	103.5	101.9	102.3	103.0	103.2	

<CONTINUED>

Appendix 1–8. Individual serum biochemical values

STUDY: 11-RR-073P		SERUM BIOCHEMICAL VALUES										FEMALE
TESTS	UNITS	G1 (0 mg/kg/day)					G2 (200 mg/kg/day)					
		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
AST	U/L	91.8	79.4	78.4	106.1	104.7	83.8	97.9	123.0	94.4	90.6	
ALT	U/L	30.3	34.4	30.7	39.9	36.8	29.4	31.3	50.7	31.7	34.4	
ALP	U/L	106.0	81.7	135.6	144.1	116.8	131.8	130.9	129.1	100.5	110.7	
CPK	U/L	152	136	120	159	194	248	171	121	192	160	
BIL	mg/dL	0.16	0.16	0.15	0.15	0.17	0.16	0.17	0.16	0.18	0.15	
GLU	mg/dL	117.6	107.7	105.3	102.5	100.5	107.3	105.7	107.5	104.1	97.5	
CHO	mg/dL	106	97	122	108	81	104	86	98	94	97	
TG	mg/dL	41	33	58	51	37	57	25	36	41	46	
PRO	g/dL	5.65	5.58	5.83	5.66	5.60	5.83	5.77	5.92	5.99	5.55	
ALB	g/dL	3.11	3.08	3.19	3.22	3.19	3.32	3.25	3.23	3.26	3.15	
A/G	ratio	1.22	1.23	1.21	1.32	1.32	1.32	1.29	1.20	1.19	1.31	
BUN	mg/dL	18.2	21.4	19.0	17.1	16.4	16.3	19.9	18.9	19.1	15.5	
CRE	mg/dL	0.43	0.45	0.47	0.47	0.43	0.45	0.48	0.47	0.45	0.41	
IP	mg/dL	8.23	8.39	7.90	7.41	7.95	7.56	8.02	7.48	7.28	7.02	
Ca ²⁺	mg/dL	9.45	9.29	9.41	9.06	8.79	9.02	9.05	9.27	9.04	9.03	
Na ⁺	mmol/L	141.2	139.4	139.0	141.4	138.6	137.4	140.7	139.6	138.8	138.6	
K ⁺	mmol/L	4.76	4.46	4.71	4.39	4.57	4.47	4.66	4.42	4.50	4.46	
Cl ⁻	mmol/L	106.1	104.9	103.3	107.7	105.1	105.2	106.2	104.8	104.4	105.2	
		G3 (1,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)					
TESTS	UNITS	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
AST	U/L	90.7	113.4	106.7	74.7	97.5	80.3	70.4	81.2	104.5	123.2	
ALT	U/L	31.0	32.4	35.6	30.0	33.4	35.0	25.4	34.4	29.2	44.1	
ALP	U/L	99.2	115.9	136.3	160.6	104.2	110.1	116.8	110.0	82.1	163.7	
CPK	U/L	150	177	250	90	162	131	130	182	215	172	
BIL	mg/dL	0.15	0.17	0.17	0.18	0.16	0.19	0.16	0.19	0.19	0.17	
GLU	mg/dL	100.3	94.2	92.9	109.8	99.8	100.6	123.5	103.7	110.1	107.9	
CHO	mg/dL	79	92	96	77	78	89	109	79	107	72	
TG	mg/dL	28	29	56	49	53	37	31	61	61	33	
PRO	g/dL	5.40	5.77	5.98	5.81	5.77	5.93	5.52	5.77	5.82	5.48	
ALB	g/dL	3.09	3.21	3.16	3.26	3.34	3.38	3.02	3.18	3.34	3.19	
A/G	ratio	1.34	1.25	1.12	1.28	1.37	1.33	1.21	1.23	1.35	1.39	
BUN	mg/dL	19.3	18.5	20.2	14.6	15.8	20.1	18.3	23.7	20.8	17.6	
CRE	mg/dL	0.45	0.43	0.45	0.45	0.45	0.47	0.42	0.47	0.45	0.43	
IP	mg/dL	7.93	7.96	8.02	7.61	7.75	6.64	7.22	7.61	7.52	6.91	
Ca ²⁺	mg/dL	8.91	9.15	9.12	9.17	8.96	8.88	9.38	9.38	9.09	8.53	
Na ⁺	mmol/L	138.7	139.8	140.4	139.2	138.3	141.4	138.5	136.8	137.7	139.0	
K ⁺	mmol/L	4.43	4.29	4.49	3.96	4.22	4.12	4.62	4.67	4.43	4.32	
Cl ⁻	mmol/L	104.7	104.4	105.1	105.1	104.6	105.3	105.2	103.5	103.9	104.8	

<END>

Appendix 1-9. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					
STUDY: 11-RR-073P	G1 (0 mg/kg/day)				MALE
ANIMAL ID	1	2	3	4	5
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	241.12	229.88	242.09	244.74	247.41
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0265	0.0210	0.0270	0.0221	0.0301
% to BODY WEIGHT	0.0110	0.0091	0.0112	0.0090	0.0122
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0269	0.0242	0.0271	0.0221	0.0290
% to BODY WEIGHT	0.0112	0.0105	0.0112	0.0090	0.0117
THYMUS	0.5725	0.5319	0.4324	0.4519	0.6653
% to BODY WEIGHT	0.2374	0.2314	0.1786	0.1846	0.2689
PROSTATE	0.1959	0.2804	0.2492	0.2733	0.2147
% to BODY WEIGHT	0.0812	0.1220	0.1029	0.1117	0.0868
TESTIS-LEFT	1.7148	1.6013	1.6994	1.5972	1.5381
% to BODY WEIGHT	0.7112	0.6966	0.7020	0.6526	0.6217
TESTIS-RIGHT	1.7181	1.6025	1.6806	1.6011	1.4299
% to BODY WEIGHT	0.7125	0.6971	0.6942	0.6542	0.5779
EPIDIDYMIS-LEFT	0.2936	0.3067	0.3187	0.3071	0.2547
% to BODY WEIGHT	0.1218	0.1334	0.1316	0.1255	0.1029
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.2957	0.2717	0.3359	0.3240	0.2429
% to BODY WEIGHT	0.1226	0.1182	0.1388	0.1324	0.0982
SPLEEN	0.7444	0.6613	0.6193	0.6103	0.8565
% to BODY WEIGHT	0.3087	0.2877	0.2558	0.2494	0.3462
KIDNEY-LEFT	0.9430	0.8390	0.8896	0.8406	0.9633
% to BODY WEIGHT	0.3911	0.3650	0.3675	0.3435	0.3894
KIDNEY-RIGHT	0.9461	0.7794	0.9663	0.8626	0.9293
% to BODY WEIGHT	0.3924	0.3390	0.3991	0.3525	0.3756
HEART	0.8904	0.8302	0.9532	1.0143	0.9660
% to BODY WEIGHT	0.3693	0.3611	0.3937	0.4144	0.3904
LUNG	1.2110	1.1155	1.4279	1.1518	1.1607
% to BODY WEIGHT	0.5022	0.4853	0.5898	0.4706	0.4691
BRAIN	1.6936	1.6963	1.8354	1.5768	1.6956
% to BODY WEIGHT	0.7024	0.7379	0.7581	0.6443	0.6853
LIVER	7.8674	7.1215	7.4487	7.0548	8.2869
% to BODY WEIGHT	3.2629	3.0979	3.0768	2.8826	3.3495

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					
STUDY: 11-RR-073P	G2 (200 mg/kg/day)				MALE
ANIMAL ID	6	7	8	9	10
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	235.26	249.02	248.51	245.35	234.26
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0216	0.0236	0.0218	0.0233	0.0269
% to BODY WEIGHT	0.0092	0.0095	0.0088	0.0095	0.0115
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0215	0.0230	0.0219	0.0225	0.0284
% to BODY WEIGHT	0.0091	0.0092	0.0088	0.0092	0.0121
THYMUS	0.4924	0.5081	0.6349	0.4641	0.5070
% to BODY WEIGHT	0.2093	0.2040	0.2555	0.1892	0.2164
PROSTATE	0.1987	0.3283	0.2255	0.3693	0.2072
% to BODY WEIGHT	0.0845	0.1318	0.0907	0.1505	0.0884
TESTIS-LEFT	1.4707	1.5532	1.5487	1.5072	1.4656
% to BODY WEIGHT	0.6251	0.6237	0.6232	0.6143	0.6256
TESTIS-RIGHT	1.5687	1.6406	1.5254	1.5278	1.5067
% to BODY WEIGHT	0.6668	0.6588	0.6138	0.6227	0.6432
EPIDIDYMIS-LEFT	0.2853	0.2970	0.2892	0.2945	0.2917
% to BODY WEIGHT	0.1213	0.1193	0.1164	0.1200	0.1245
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.2844	0.3510	0.3314	0.2775	0.3035
% to BODY WEIGHT	0.1209	0.1410	0.1334	0.1131	0.1296
SPLEEN	0.5875	0.5846	0.6574	0.6868	0.5673
% to BODY WEIGHT	0.2497	0.2348	0.2645	0.2799	0.2422
KIDNEY-LEFT	0.7895	0.8723	0.8437	0.9621	0.8701
% to BODY WEIGHT	0.3356	0.3503	0.3395	0.3921	0.3714
KIDNEY-RIGHT	0.8291	0.9691	0.8798	0.9255	0.9066
% to BODY WEIGHT	0.3524	0.3892	0.3540	0.3772	0.3870
HEART	0.8777	0.8496	0.8513	0.9542	0.8418
% to BODY WEIGHT	0.3731	0.3412	0.3426	0.3889	0.3593
LUNG	1.2557	1.2457	1.3353	1.3744	1.1267
% to BODY WEIGHT	0.5337	0.5002	0.5373	0.5602	0.4810
BRAIN	1.6559	1.6558	1.6951	1.7693	1.6990
% to BODY WEIGHT	0.7039	0.6649	0.6821	0.7211	0.7253
LIVER	7.2484	7.6915	7.7731	7.9763	7.2879
% to BODY WEIGHT	3.0810	3.0887	3.1279	3.2510	3.1110

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					
STUDY: 11-RR-073P	G3 (1,000 mg/kg/day)				MALE
ANIMAL ID	11	12	13	14	15
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	238.21	261.54	232.50	238.58	226.98
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0252	0.0264	0.0227	0.0223	0.0235
% to BODY WEIGHT	0.0106	0.0101	0.0098	0.0093	0.0104
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0239	0.0245	0.0195	0.0220	0.0218
% to BODY WEIGHT	0.0100	0.0094	0.0084	0.0092	0.0096
THYMUS	0.5604	0.5737	0.5230	0.4875	0.4282
% to BODY WEIGHT	0.2353	0.2194	0.2249	0.2043	0.1887
PROSTATE	0.2673	0.3152	0.2357	0.2498	0.3069
% to BODY WEIGHT	0.1122	0.1205	0.1014	0.1047	0.1352
TESTIS-LEFT	1.5853	1.7692	1.6740	1.7401	1.6197
% to BODY WEIGHT	0.6655	0.6765	0.7200	0.7294	0.7136
TESTIS-RIGHT	1.6509	1.7483	1.6375	1.6950	1.6010
% to BODY WEIGHT	0.6930	0.6685	0.7043	0.7105	0.7053
EPIDIDYMIS-LEFT	0.3460	0.3165	0.3086	0.3153	0.2729
% to BODY WEIGHT	0.1452	0.1210	0.1327	0.1322	0.1202
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.3247	0.2987	0.2756	0.2869	0.2738
% to BODY WEIGHT	0.1363	0.1142	0.1185	0.1203	0.1206
SPLEEN	0.7042	0.7761	0.6561	0.5878	0.4865
% to BODY WEIGHT	0.2956	0.2967	0.2822	0.2464	0.2143
KIDNEY-LEFT	0.8778	1.0162	0.9044	0.8217	0.8616
% to BODY WEIGHT	0.3685	0.3885	0.3890	0.3444	0.3796
KIDNEY-RIGHT	0.8729	1.0466	0.8455	0.8643	1.6849
% to BODY WEIGHT	0.3664	0.4002	0.3637	0.3623	0.7423
HEART	0.9955	0.9321	0.8713	0.9348	0.8445
% to BODY WEIGHT	0.4179	0.3564	0.3748	0.3918	0.3721
LUNG	1.3012	1.3661	1.1721	1.2378	1.0999
% to BODY WEIGHT	0.5462	0.5223	0.5041	0.5188	0.4846
BRAIN	1.7971	1.6684	1.5520	1.8022	1.7775
% to BODY WEIGHT	0.7544	0.6379	0.6675	0.7554	0.7831
LIVER	7.6457	9.2998	7.7081	7.3853	7.1361
% to BODY WEIGHT	3.2096	3.5558	3.3153	3.0955	3.1439

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					
STUDY: 11-RR-073P	G4 (5,000 mg/kg/day)				MALE
ANIMAL ID	16	17	18	19	20
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	240.70	263.18	250.60	236.95	246.70
ADRENAL GLAND–LEFT	0.0234	0.0222	0.0230	0.0217	0.0190
% to BODY WEIGHT	0.0097	0.0084	0.0092	0.0092	0.0077
ADRENAL GLAND–RIGHT	0.0245	0.0200	0.0235	0.0234	0.0218
% to BODY WEIGHT	0.0102	0.0076	0.0094	0.0099	0.0088
THYMUS	0.6671	0.6050	0.7386	0.4379	0.6285
% to BODY WEIGHT	0.2771	0.2299	0.2947	0.1848	0.2548
PROSTATE	0.2176	0.3127	0.2628	0.2025	0.2753
% to BODY WEIGHT	0.0904	0.1188	0.1049	0.0855	0.1116
TESTIS–LEFT	1.6170	1.5697	1.6483	1.5146	1.5437
% to BODY WEIGHT	0.6718	0.5964	0.6577	0.6392	0.6257
TESTIS–RIGHT	1.6319	1.5715	1.6936	1.5515	1.5403
% to BODY WEIGHT	0.6780	0.5971	0.6758	0.6548	0.6244
EPIDIDYMIS–LEFT	0.2952	0.2803	0.2704	0.3153	0.2812
% to BODY WEIGHT	0.1226	0.1065	0.1079	0.1331	0.1140
EPIDIDYMIS–RIGHT	0.2694	0.3270	0.2986	0.3172	0.2631
% to BODY WEIGHT	0.1119	0.1242	0.1192	0.1339	0.1066
SPLEEN	0.7098	0.7301	0.8212	0.6325	0.6899
% to BODY WEIGHT	0.2949	0.2774	0.3277	0.2669	0.2797
KIDNEY–LEFT	0.9150	0.9940	0.9331	0.9681	1.0008
% to BODY WEIGHT	0.3801	0.3777	0.3723	0.4086	0.4057
KIDNEY–RIGHT	0.9694	0.9962	1.0252	0.9630	0.9788
% to BODY WEIGHT	0.4027	0.3785	0.4091	0.4064	0.3968
HEART	0.8428	0.9169	0.9252	0.9766	1.0386
% to BODY WEIGHT	0.3501	0.3484	0.3692	0.4122	0.4210
LUNG	1.2963	1.4240	1.3245	1.2051	1.2334
% to BODY WEIGHT	0.5386	0.5411	0.5285	0.5086	0.5000
BRAIN	1.5948	1.8889	1.5881	1.6925	1.6958
% to BODY WEIGHT	0.6626	0.7177	0.6337	0.7143	0.6874
LIVER	7.2926	8.3543	7.8134	7.2885	7.3123
% to BODY WEIGHT	3.0297	3.1744	3.1179	3.0760	2.9640

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					
STUDY: 11-RR-073P	G1 (0 mg/kg/day)				FEMALE
ANIMAL ID	21	22	23	24	25
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	181.10	155.15	191.38	172.86	167.00
OVARY-LEFT	0.0301	0.0317	0.0539	0.0313	0.0381
% to BODY WEIGHT	0.0166	0.0204	0.0282	0.0181	0.0228
OVARY-RIGHT	0.0295	0.0419	0.0480	0.0388	0.0316
% to BODY WEIGHT	0.0163	0.0270	0.0251	0.0224	0.0189
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0401	0.0293	0.0248	0.0291	0.0288
% to BODY WEIGHT	0.0221	0.0189	0.0130	0.0168	0.0172
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0432	0.0276	0.0250	0.0302	0.0275
% to BODY WEIGHT	0.0239	0.0178	0.0131	0.0175	0.0165
THYMUS	0.4329	0.3261	0.3773	0.3930	0.4177
% to BODY WEIGHT	0.2390	0.2102	0.1971	0.2274	0.2501
UTERUS	0.2975	0.3110	0.2693	0.9116	0.4133
% to BODY WEIGHT	0.1643	0.2005	0.1407	0.5274	0.2475
SPLEEN	0.5742	0.4390	0.5261	0.4326	0.4904
% to BODY WEIGHT	0.3171	0.2830	0.2749	0.2503	0.2937
KIDNEY-LEFT	0.7674	0.5758	0.7800	0.6682	0.6456
% to BODY WEIGHT	0.4237	0.3711	0.4076	0.3866	0.3866
KIDNEY-RIGHT	0.7550	0.5951	0.7567	0.6662	0.6672
% to BODY WEIGHT	0.4169	0.3836	0.3954	0.3854	0.3995
HEART	0.7178	0.6541	0.9859	0.6706	0.6538
% to BODY WEIGHT	0.3964	0.4216	0.5152	0.3879	0.3915
LUNG	1.0597	0.9725	1.0745	0.9822	0.9729
% to BODY WEIGHT	0.5851	0.6268	0.5614	0.5682	0.5826
BRAIN	1.6725	1.6115	1.6230	1.4811	1.6928
% to BODY WEIGHT	0.9235	1.0387	0.8481	0.8568	1.0137
LIVER	5.7213	4.5695	6.6129	5.3929	5.0848
% to BODY WEIGHT	3.1592	2.9452	3.4554	3.1198	3.0448

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					
STUDY: 11-RR-073P	G2 (200 mg/kg/day)				FEMALE
ANIMAL ID	26	27	28	29	30
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	175.73	152.19	187.59	172.89	165.30
OVARY-LEFT	0.0510	0.0399	0.0315	0.0360	0.0466
% to BODY WEIGHT	0.0290	0.0262	0.0168	0.0208	0.0282
OVARY-RIGHT	0.0458	0.0353	0.0427	0.0444	0.0429
% to BODY WEIGHT	0.0261	0.0232	0.0228	0.0257	0.0260
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0242	0.0283	0.0355	0.0704	0.0265
% to BODY WEIGHT	0.0138	0.0186	0.0189	0.0407	0.0160
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0210	0.0280	0.0317	0.0298	0.0247
% to BODY WEIGHT	0.0120	0.0184	0.0169	0.0172	0.0149
THYMUS	0.4030	0.3632	0.4315	0.3225	0.3046
% to BODY WEIGHT	0.2293	0.2386	0.2300	0.1865	0.1843
UTERUS	0.4031	0.3343	1.2312	0.4520	0.5717
% to BODY WEIGHT	0.2294	0.2197	0.6563	0.2614	0.3459
SPLEEN	0.5202	0.4380	0.6229	0.4695	0.5050
% to BODY WEIGHT	0.2960	0.2878	0.3321	0.2716	0.3055
KIDNEY-LEFT	0.7356	0.6039	0.7023	0.6727	0.6149
% to BODY WEIGHT	0.4186	0.3968	0.3744	0.3891	0.3720
KIDNEY-RIGHT	0.7463	0.5900	0.7892	0.6903	0.6606
% to BODY WEIGHT	0.4247	0.3877	0.4207	0.3993	0.3996
HEART	0.7443	0.6397	0.6947	0.7391	0.6302
% to BODY WEIGHT	0.4235	0.4203	0.3703	0.4275	0.3812
LUNG	1.0134	0.9040	1.0535	1.0860	1.0546
% to BODY WEIGHT	0.5767	0.5940	0.5616	0.6281	0.6380
BRAIN	1.6039	1.5794	1.6599	1.7520	1.6497
% to BODY WEIGHT	0.9127	1.0378	0.8849	1.0134	0.9980
LIVER	5.5440	4.3229	6.2686	5.4013	5.0678
% to BODY WEIGHT	3.1548	2.8405	3.3416	3.1241	3.0658

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					
STUDY: 11-RR-073P	G3 (1,000 mg/kg/day)				FEMALE
ANIMAL ID	31	32	33	34	35
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	152.77	173.79	183.98	171.27	175.96
OVARY-LEFT	0.0350	0.0394	0.0380	0.0455	0.0382
% to BODY WEIGHT	0.0229	0.0227	0.0207	0.0266	0.0217
OVARY-RIGHT	0.0334	0.0354	0.0285	0.0417	0.0321
% to BODY WEIGHT	0.0219	0.0204	0.0155	0.0243	0.0182
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0290	0.0299	0.0263	0.0240	0.0324
% to BODY WEIGHT	0.0190	0.0172	0.0143	0.0140	0.0184
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0285	0.0287	0.0265	0.0235	0.0308
% to BODY WEIGHT	0.0187	0.0165	0.0144	0.0137	0.0175
THYMUS	0.3197	0.3963	0.3667	0.3327	0.3706
% to BODY WEIGHT	0.2093	0.2280	0.1993	0.1943	0.2106
UTERUS	0.3047	0.3352	0.3947	0.3657	0.7214
% to BODY WEIGHT	0.1995	0.1929	0.2145	0.2135	0.4100
SPLEEN	0.4466	0.5142	0.5722	0.4821	0.5027
% to BODY WEIGHT	0.2923	0.2959	0.3110	0.2815	0.2857
KIDNEY-LEFT	0.6097	0.6746	0.7372	0.6337	0.6458
% to BODY WEIGHT	0.3991	0.3882	0.4007	0.3700	0.3670
KIDNEY-RIGHT	0.6396	0.6624	0.6822	0.6762	0.6753
% to BODY WEIGHT	0.4187	0.3811	0.3708	0.3948	0.3838
HEART	0.6447	0.6928	0.7000	0.6930	0.7359
% to BODY WEIGHT	0.4220	0.3986	0.3805	0.4046	0.4182
LUNG	0.9712	1.0562	1.0890	1.0936	1.0266
% to BODY WEIGHT	0.6357	0.6077	0.5919	0.6385	0.5834
BRAIN	1.5706	1.5581	1.5280	1.5622	1.6656
% to BODY WEIGHT	1.0281	0.8965	0.8305	0.9121	0.9466
LIVER	4.6432	5.4391	6.5627	5.7573	5.3235
% to BODY WEIGHT	3.0393	3.1297	3.5671	3.3615	3.0254

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					
STUDY: 11-RR-073P	G4 (5,000 mg/kg/day)				FEMALE
ANIMAL ID	36	37	38	39	40
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	158.68	180.65	173.71	171.94	164.32
OVARY-LEFT	0.0349	0.0366	0.0435	0.0446	0.0361
% to BODY WEIGHT	0.0220	0.0203	0.0250	0.0259	0.0220
OVARY-RIGHT	0.0326	0.0410	0.0401	0.0337	0.0303
% to BODY WEIGHT	0.0205	0.0227	0.0231	0.0196	0.0184
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0282	0.0276	0.0268	0.0270	0.0246
% to BODY WEIGHT	0.0178	0.0153	0.0154	0.0157	0.0150
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0287	0.0289	0.0242	0.0262	0.0269
% to BODY WEIGHT	0.0181	0.0160	0.0139	0.0152	0.0164
THYMUS	0.2954	0.3266	0.4157	0.3233	0.4727
% to BODY WEIGHT	0.1862	0.1808	0.2393	0.1880	0.2877
UTERUS	0.6281	0.7166	0.5608	0.3266	1.0230
% to BODY WEIGHT	0.3958	0.3967	0.3228	0.1899	0.6226
SPLEEN	0.4587	0.5400	0.4737	0.4631	0.5158
% to BODY WEIGHT	0.2891	0.2989	0.2727	0.2693	0.3139
KIDNEY-LEFT	0.5975	0.6789	0.7177	0.6709	0.6660
% to BODY WEIGHT	0.3765	0.3758	0.4132	0.3902	0.4053
KIDNEY-RIGHT	0.6016	0.7179	0.7766	0.6914	0.7367
% to BODY WEIGHT	0.3791	0.3974	0.4471	0.4021	0.4483
HEART	0.6175	0.7267	0.6860	0.7081	0.6135
% to BODY WEIGHT	0.3891	0.4023	0.3949	0.4118	0.3734
LUNG	0.9611	1.0583	1.0460	1.0063	0.9448
% to BODY WEIGHT	0.6057	0.5858	0.6022	0.5853	0.5750
BRAIN	1.6375	1.6451	1.7066	1.7303	1.5879
% to BODY WEIGHT	1.0320	0.9107	0.9824	1.0063	0.9663
LIVER	4.9073	5.4713	5.4892	5.4773	4.9738
% to BODY WEIGHT	3.0926	3.0287	3.1600	3.1856	3.0269

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<END>

Appendix 1-10. Individual necropsy findings

STUDY: 11-RR-073P		NECROPSY FINDINGS		MALE
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS	
G1 (0 mg/kg/day)				
1	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
2	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
3	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
4	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
5	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
G2 (200 mg/kg/day)				
6	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
7	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
8	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
9	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
10	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
G3 (1,000 mg/kg/day)				
11	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
12	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
13	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
14	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
15	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
G4 (5,000 mg/kg/day)				
16	TERMINAL SACRIFICE	Thymus	Diffused red spots	
17	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
18	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
19	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
20	TERMINAL SACRIFICE	Thymus	Diffused red spots	

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual necropsy findings

STUDY: 11-RR-073P		NECROPSY FINDINGS		FEMALE
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS	
G1 (0 mg/kg/day)				
21	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
22	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
23	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
24	TERMINAL SACRIFICE	Uterus	Retention of clear fluid	
25	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
G2 (200 mg/kg/day)				
26	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
27	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
28	TERMINAL SACRIFICE	Uterus	Retention of clear fluid	
29	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
30	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
G3 (1,000 mg/kg/day)				
31	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
32	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
33	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
34	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
35	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
G4 (5,000 mg/kg/day)				
36	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
37	TERMINAL SACRIFICE	Uterus	Retention of clear fluid	
38	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
39	TERMINAL SACRIFICE		No gross findings	
40	TERMINAL SACRIFICE	Uterus	Retention of clear fluid	

<END>

Appendix 2. Certificate of analysis (test article)




생명공학을 선도하는 주식회사 에이지아이

Certificate of Analysis

2011. 03. 07

Product Name: RIS	
Lot No. : RIS-04-11022	Mfg Date : 2011년 2월 24일
Quantity : 5 Kg	Exp Date : 2013년 2월 23일

Test Items	Specifications	Results
Appearance	암갈색의 분말	암갈색의 분말
Moisture (%)	<10 %	0.5 %
Gallic acid (%)	> 1 %	2.45 %
Salmonella	Negative	Negative
Coliform group	Negative	Negative

Tested by K.H. Kim 

최종보고서(안)

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
13 주간 반복 경구투여 독성시험

시험번호: 11-RR-074

시험의뢰기관: (주)에이지아이

(주)캠온 전임상연구센터



Preclinical Research Center, Chemon Inc.
334, Jeil-Ri, Yangji-Myeon, Cheoin-Gu, Yongin-Si, Gyeonggi-Do,
449-826, Korea

진술서

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2009-183호, KFDA, 2009년 12월 22일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서의 일정과 ㈜켄온 전임상연구센터의 SOP에 따라 수행되었고, 시험 계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험 수행에 있어 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

배진숙

시험책임자

주 소 : ㈜켄온 전임상연구센터

경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826

연 락 처 : 031-329-9963 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E-mail : jsbae@chemon.co.kr

날 짜

김갑호, M.S.

운영책임자

㈜켄온 전임상연구센터

날 짜

신뢰성보증확인서

시험개요

시 형 제 목	RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험	
시 형 목 적	본 시험은 시험물질 RIS를 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하여 무독성량 및 표적장기를 알아보고자 수행하였다.	
시 형 지 칭	의약품등의독성시험기준 (2009-116호, KFDA, 2009 년 08 월 24 일)	
시 형 의뢰 자	(주)에이지아이 강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160 033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX) 의뢰책임자: 박 상 재	
시 형 기 관	(주)캠온 전임상연구센터 경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 FAX) 운영책임자: 김 갑 호	
시 형 일 정	2011 년 07 월 04 일	시험계획서 승인(시험개시일)
	2011 년 07 월 07 일	동물입수(실험개시일)
	2011 년 07 월 14 일	시험물질 투여개시
	2011 년 10 월 13 일	시험물질 투여종료
	2011 년 10 월 13 일	수컷 부검
	2011 년 10 월 14 일	암컷 부검
	2012 년 01 월 09 일	조직병리학적 검사 완료(실험종료일)
	2012 년 01 월 16 일	최종보고서(안) 제출
기록과 재료의 보 관	시험계획서, 시험계획서 수정기록지, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 해당물질의 관리 당국에 의한 시험성적서의 신뢰성 평가가 가능한 기간동안 보관하고, 자료보관실에 따로 규정이 없는 한 시험종료 후 3 년간 (주)캠온 전임상연구센터의 자료보관실에 보관한다. 임상 병리 검체(혈청)는 측정 종료일로부터 1 년간 보관한다. 이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.	

주요시험관계자

동물관리:	이 주 영, 실험동물기술원 (주캠온 전임상연구센터)
시험물질 조제/보관:	허 현 숙, B.S. (주캠온 전임상연구센터)
부 검:	김 학 수, M.S., 임상병리사 (주캠온 전임상연구센터)
임상병리:	김 학 수, M.S., 임상병리사 (주캠온 전임상연구센터)
조직병리:	강 민 수, D.V.M. (주캠온 전임상연구센터)
Peer review:	강 진 석, DVM, Ph.D., Toxicological pathologist 남서울대학교 임상병리학과 ¹⁾
통계분석:	이 민 행, M.S. (주캠온 전임상연구센터)
자료보관:	이 유 나 (주캠온 전임상연구센터)

1) 충남 천안시 성환읍 매주리 21 번지.

목 차

진 술 서	i
시험개요	iii
주요시험관계자	iv
요 약	1
재료 및 방법	2
결 과	10
고찰 및 결론	13
참고문헌	15
단위 및 약호	16
TABLES	18
Table 1. Summary of clinical signs	19
Table 2. Summary of body weight changes	20
Table 3. Summary of food consumptions	22
Table 4. Summary of water consumptions	24
Table 5. Summary of ophthalmological examination	26
Table 6. Summary of urinalysis	27
Table 7. Summary of urine sediments	29
Table 8. Summary of hematological test	30
Table 9. Summary of clinical biochemistry test	30
Table 10. Summary of absolute and relative organ weights	32
Table 11. Summary of necropsy findings	34
APPENDIX 1. INDIVIDUAL DATA	35
Appendix 1-1. Individual clinical signs	36
Appendix 1-2. Individual body weight changes	44
Appendix 1-3. Individual food consumptions	52
Appendix 1-4. Individual water consumptions	56
Appendix 1-5. Individual ophthalmological examination	60
Appendix 1-6. Individual urinalysis	61
Appendix 1-7. Individual urine sediments	63
Appendix 1-8. Individual hematological test	64
Appendix 1-9. Individual clinical biochemistry test	68
Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights	72
Appendix 1-11. Individual necropsy findings	88
APPENDIX 2. PATHOLOGY REPORT	92
APPENDIX 3. PROTOCOL AND AMENDMENT	157
APPENDIX 4. CERTIFICATE OF ANALYSIS	171

요 약

본 시험은 시험물질 RIS을 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하여 무독성량 및 표적장기를 알아보고자 수행하였다.

RIS을 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day로 투여하는 시험물질 투여군 및 0.5 % CMC-Na만을 투여하는 부형제대조군을 설정하여 군당 20 마리(암수 각 10 마리)에 13 주간 반복 경구투여하였다. 시험항목으로 일반증상관찰, 체중측정, 사료 및 물 섭취량 산출, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량측정, 육안적 부검소견관찰 및 조직병리학적 검사를 실시하였고, 시험물질 투여군의 결과를 부형제대조군과 비교하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상관찰 결과, 약물흔입변 및 착색뇨가 모든 시험물질 투여군 암수에서 관찰되었으나, 독성학적으로 의미 있는 변화가 아니었다.
3. 체중변화 관찰결과, 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 체중증가억제경향이 관찰되었으나, 통계학적으로 유의한 변화가 아니었다. 시험물질 투여군 암컷의 체중변화는 부형제대조군과 유사하였다.
4. 사료 섭취량 산출 결과, 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
5. 물 섭취량이 2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 증가 또는 증가경향을 보였으나, 독성학적으로 의미 있는 변화가 아니었다.
6. 안과학적 검사 결과, 이상증상은 관찰되지 않았다.
7. 요검사 결과, 모든 시험물질 투여군 암수에서 요색조의 변화가 어두운 노란색조, 호박색조, 주황색조로 용량상관성 있게 관찰되었으나, 독성학적으로 의미 있는 변화가 아니었다.
8. 혈액학적 검사 결과, 시험물질의 약리작용으로, 2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 EOS 백분비가 감소하였다.
9. 혈액생화학적 검사 결과, 2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 Na^+ 및 Cl^- 의 감소 또는 감소경향이 관찰되었으나, 독성학적으로 의미 있는 변화가 아니었다.
10. 장기중량측정 결과, 2,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 간장의 절대 및 상대중량이 증가였으나, 독성학적으로 의미 있는 변화가 아니었다.
11. 부검소견관찰 결과, 시험물질 투여에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.
12. 조직병리학적 검사 결과, 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, RIS을 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day로 13 주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질 투여에 의한 독성학적으로 의미 있는 변화가 관찰되지 않았다.

이에 본 시험조건에서 시험물질 RIS의 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 확인되지 않았다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 대조물질

1) 시험물질(Appendix 4)

명 칭:	RIS
코드번호:	C-0690
로트번호:	RIS-04-11022
입 수 일:	2011 년 03 월 09 일
입 수 량:	5 kg/pack × 1 pack
외 관:	암갈색의 분말
함 량:	시험성적서 별첨
유효일자:	2013 년 02 월 23 일
보관조건:	냉장, 방습
공 급 원:	(주)에이지아이

2) 부형제

명 칭:	0.5 % CMC-Na (Carboxymethyl cellulose sodium salt)	
로트번호:	CMC-Na: C0080KJ	멸균주사용수; N0K5F21, A2J0F21, 01K5F21
공 급 원:	CMC-Na: 대정화금(주)	멸균주사용수; 대한약품공업(주)
보관조건:	조제 후 냉장	
선택이유:	독성시험에서 시험물질의 현탁에 일반적으로 사용하는 부형제이고, 본 시험 조건에서 시험물질이 잘 현탁되어 선택하였다.	

2. 투여시험물질 및 함량분석

1) 투여시험물질

(1) 조제방법

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였으며, 투여직전에 조제하였다. 고용량군의 투여액은 시험물질을 정량 칭량한 후, 유발(motor)에 넣고, 부형제를 조금씩 넣어가면서 유봉(pestle)으로 마쇄하여 조제하였다. 중간 및 저용량군의 투여액은 동일한 부형제를 단계 희석하여 조제하였다.

2) 함량분석

투여시험물질의 함량분석은 실시하지 않았다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley [®] TMSD [®] TM	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)	
선정사유	본 시험에 사용하는 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수시	48
	투여개시시	40
주령	입수시	5
	투여개시시	6
입수시 체중범위	118.09-138.21 g	100.00-116.02 g
투여개시시 체중범위	173.86-204.26 g	131.68-147.84 g
잔여동물의 처리	수컷 4 마리는 다른 시험에 사용하였고, 나머지 동물은 CO ₂ gas로 안락사 시켰다.	

(2) 검역 및 순화

동물 공급처에서 제공한 '시험계의 병원체 검사 성적서'를 참고하여 검수검역을 실시하였고, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 동물은 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰다.

(3) 식별

동물은 순화기간에는 청색 유성매직을 이용한 미부표식법을 하였고, 투여 및 관찰기간에는 피모색소표식법 및 ear-punch법을 사용하여 식별하였다.

사육상자는 용량식별카드를 부착하고, 사육상자대는 고유번호를 부여하였다.

사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(4) 동물실험 윤리규정

(주)캠온 전임상연구센터의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 11-R111).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정

동물은 온도 온도 23±3 °C, 상대습도 55±15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 (주)캠온 전임상연구센터 제2동물사육구역 8 호실에서 사육하였다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하였고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였다.

실험기간 동안 동물실의 온도는 22.2-24.3 °C, 상대습도는 55.5-61.8 % 였고, 시험 결과에 영향을 줄만한 이상은 없었다.

(2) 사료, 물, 깔개 및 오염물질 검사

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 (주)나라바이오택(서울특별시 강남구 청담동 71-22)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유섭취 하도록 하였다. 사료의 '성분분석 성적서'를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 하도록 하였다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였다.

깔개는 나무깔개를 (주)우정BSC(경기도 수원시 영통구 의의동 864-1 차세대융합기술연구원 B 동 3 층)로부터 공급받아 고압증기멸균 후 사용하였다.

(3) 사육상자 및 사육밀도

동물은 적량의 깔개를 담은 폴리카보네이트 사육상자(W 235 x L 380 x H 175 mm)에서 검역 및 순화기간에는 3 마리 이하/사육상자, 투여 및 관찰기간에는 2 마리 이하/사육상자로 수용하였다.

(4) 사육관리

사육상자, 물병 및 깔개는 주 1 회 이상 교환하였고, 사육상자대는 매월 1 회 시계방향으로 순환배치 하였다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

1) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1 ^{a)}	M / F	10 / 10	1-10 / 41-50	20	0
G2	M / F	10 / 10	11-20 / 51-60	20	800
G3	M / F	10 / 10	21-30 / 61-70	20	2,000
G4	M / F	10 / 10	31-40 / 71-80	20	5,000

a) 부형제 대조군 (0.5 % CMC-Na)

2) 투여량의 설정

본 시험물질을 200, 1,000 및 5,000 mg/kg/day로 SD 랫드에 2 주간 반복 경구투여 한 DRF 독성시험(시험번호: 11-RR-073P) 결과, 암수에서 약물혼입변(2,000 mg/kg/day 이상 투여군)

또는 착색료(1,000 mg/kg/day 이상 투여군)가 관찰되었으나, 시험물질 또는 그 대사물이 변 또는 뇨로 배출되어 나타난 변화로 추정하였고, 1,000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 관찰된 혈중 Na^+ 및 Cl^- 의 감소와 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 IP의 감소가 관찰되었으나, 정상범위 이내의 변화이었다. 상기 결과와 본 시험물질이 건강기능식품임을 감안하여 사람에게 대한 임상예정용량(1.5 g/man \approx 25 mg/kg, 성인 평균체중 60 kg 기준)의 약 200 배에 해당하고, 투여 가능한 최대량인 5,000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고 그 아래로 공비 2.5로 두 개군을 두었으며 0.5 % CMC-Na만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 시험군 구성 표와 같이 무작위 분배하였다.

4) 투여

투여경로 및 선택이유	사람에 대한 임상예정경로인 경구투여를 선택하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 7 일/주, 13 주간, 14:40 이전에 투여를 종료하였다.
투여액량	계획된 일자에 측정된 체중을 기준으로 20 mL/kg/day로 산출하였다.
투여방법	경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여, 위 내에 직접 투여하였다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상

투여 및 관찰기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 관찰하고, 개체 별로 기록하였다. 투여개시일을 day 1로 설정하였다.

2) 체중

투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 및 부검일에 측정하였다. 부검일은 절식시킨 체중을 측정하였다.

3) 사료 및 물 섭취량

사료 및 물 섭취량은 투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 측정하였다. 측정방법은 사료 및 물을 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하고, 마리당 평균 섭취량으로 산출하였다.

4) 안과학적 검사

관찰 최종 주에 군당 암수 각 5 마리의 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후 양쪽 안구에 산동제(오큐호마핀, 삼일제약, Lot 022519)를 점적하여 동공확장을 유도한 다음, 안저 사진기(Genesis, Kowa Co. Ltd., Japan)로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰하였다.

관찰 결과, 이상 소견이 발견되지 않았기 때문에, 사진촬영은 실시하지 않았다.

6. 임상병리

1) 채뇨 및 채혈

(1) 채뇨

관찰 최종 주에 앞의 번호부터 군당 5 마리를 대사케이지에 수용하여 약 3 시간 동안 채뇨한 신선뇨(약 1 mL)를 이용하여 요검사를 실시하였고, 24 시간 동안 수집한 요로 요량을 측정하였다.

(2) 채혈

부검 전날 하룻밤(16-20 시간) 절식한 계획부검동물에 대하여 Isoflurane (Ifiran liquid Hana Pharm. Co., Ltd)으로 흡입마취하여, 마취가 확인되면 회복하여 후대정맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다.

검사항목	혈액량	튜브
혈액학적 검사	약 1 mL	EDTA-2K CBC bottle
혈액응고시간 검사	1.8 mL	0.2 mL 3.2 % sodium citrate tube
혈액생화학적 검사	2 mL 이상	Clot activator vacutainer tube

2) 요검사

(1) 요 일반검사

약 0.3 mL의 요를 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, USA)에 묻힌 후, 요자동분석기(CliniTek 100, SIEMENS, USA)를 이용하여 아래의 항목을 검사하였다. 단, 요색조는 동물실에서 관찰한 결과를 요자동분석기에 입력하였다.

요색조(urine color)	빌리루빈(BIL)	pH	아질산염(NIT)
투명도(clarity)	케톤체(KET)	요단백(PRO)	잠혈(OB)
당(GLU)	요비중(SG)	유로빌리노겐(URO)	

(2) 요침사 검사

요색조를 검사한 요를 5 분간 원심분리(Hanil MF300, 1,500 rpm, 425 g)한 후, 그 침전물을 SM법으로 염색한 후, 현미경으로 아래의 항목을 관찰하였다.

백혈구(WBC)	상피세포(epithelial cells)	적혈구(RBC)	원주(cast)
----------	------------------------	----------	----------

3) 혈액학적 검사

(1) 일반혈액검사

부검시 채혈한 혈액 중 약 1 mL를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle (Vacutainer 3 mL, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 이용하여 검사하였다.

적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	호중구(NEU)
헤마토크리트치(HCT)	헤모글로빈분포폭(HDW)	림프구(LYM)
혈색소량(HGB)	평균혈소판용적(MPV)	단핵구(MONO)
평균적혈구용적(MCV)	혈소판수(PLT)	호산구(EOS)
평균적혈구헤모글로빈량(MCH)	망상적혈구(RET)	호염기구(BASO)
평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)	백혈구(WBC)	대형비염색성세포(LUC)

(2) 혈액응고시간검사

채혈한 혈액 중 1.8 mL을 3.2 % sodium citrate 0.2 mL이 들어있는 microtube에 주입한 후 원심분리하여 얻은 혈장으로 혈액응고시간검사기(ACL 100, Instrumentation Laboratory, USA)를 이용하여 검사하였다.

부분활성트롬보플라스틴시간(APTT) 프로트롬빈시간(PT)

4) 혈액생화학적 검사

부검시 채혈한 혈액의 일부를 clot activator가 들어 있는 5 mL vacutainer tube (INSEPACK, SEKISUI, JAPAN)에 주입하고 15-20 분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 10 분간 원심분리 (3,000 rpm, 1,630 RCF, MF300, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 아래 항목을 검사하였다.

㉑아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	㉒총콜레스테롤(TCHO)	㉓크레아티닌(CRE)
㉔알라닌 아미노기전이효소(ALT)	㉕중성지방(TG)	㉖무기인(IP)
㉗알칼라인 포스파타제(ALP)	㉘총단백(TP)	㉙칼슘(Ca ²⁺)
㉚크레아티닌산활성효소(CPK)	㉛알부민(ALB)	㉜칼륨(K ⁺)
㉝총빌리루빈(TBIL)	㉞알부민/글로불린 비(A/G)	㉟나트륨(Na ⁺)
㊱당(GLU)	㊲혈액요소질소(BUN)	㊳염소(Cl ⁻)

㉑-㉙: 혈액생화학분석기(AU400, Olympus, Japan)를 이용하여 측정.

㉚-㉜: 전해질분석기(RAPIDCHEM 744 Na⁺/K⁺/Cl⁻ Analyzer, SIEMENS, USA)로 측정.

7. 조직병리

1) 부검

채혈을 완료한 동물에 대하여 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기에 대해 부검소견을 관찰하여 부검소견기록지에 기록하고, 장기중량 측정 및 조직 고정을 실시하였다.

2) 장기중량 측정

모든 동물의 아래 장기에 대하여 전자저울(BP221S, Sartorius AG, Germany)로 중량을 측정 (양측성 장기는 각각 측정)하고, 각 장기에 대하여 부검 시 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

난소(ovaries)	전립샘(prostate gland)	심장(heart)
자궁(uterus)	고환(testes)	폐(lungs)
부신(adrenals)	부고환(epididymides)	뇌(brain)
뇌하수체(pituitary gland)	비장(spleen)	간장(liver)
가슴샘(thymus)	신장(kidneys)	

3) 조직 및 장기의 보존

모든 동물의 아래 장기는 10 % 중성완충포름알데히드용액에 고정하였고, 안구는 Davidson's 용액에, 고환과 부고환은 Bouin's 액에 고정하였다.

뇌(brain)	십이지장(duodenum)	흉척수(thoracic spinal cord)
뇌하수체(pituitary gland)	공장(jejunum)	골격근(skeletal muscle)
폐(lungs)	회장(ileum)	말초신경(peripheral nerve)
심장(heart)	맹장(cecum)	대퇴경골관절(femorotibial joint)
가슴샘(thymus)	결장(colon)	방광(urinary bladder)
비장(spleen)	직장(rectum)	고환(testes)
부신(adrenals)	안구(eyes)	부고환(epididymides)
신장(kidneys)	하더샘(hardarian gland)	전립샘(prostate gland)
간장(liver)	갑상샘(thyroid gland)	정낭(seminal vesicles)
혀(tongue)	침샘(salivary gland)	난소(ovaries)
기관(trachea)	대동맥(aorta)	자궁(uterus)
식도(esophagus)	흉골(sternum)	질(vagina)
위(stomach)	턱밑림프절 (mandibular lymph node)	피부 및 젖샘(mammary glands with adjacent skin)
췌장(pancreas)	장간막림프절 (mesenteric lymph node)	육안적 병변 (gross lesions)

4) 조직병리학적 검사

부형제대조군 및 고용량군의 모든 동물의 고정장기, 부검 시 저용량 및 중간용량군에서 육안적 이상소견이 관찰된 고정장기에 대하여 조직슬라이드를 제작하여 조직병리학적 검사를 실시하였다. 이때, 조직병리 판독은 Pristima™ (Path/Tox system)¹⁾을 이용하여 실시하였다.

8. 통계 분석

체중, 사료 및 물 섭취량, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량에 대하여 One-way ANOVA test로 그 유의성을 평가하였다. 정규성을 가정하고, Levene test로 등분산성을 검정한 후 등분산인 경우에는 Duncan multiple range test를 사용하였고, 등분산이나 표본수(n수)가 다를 경우에는 Scheffe multiple range test를 사용하였으며, 등분산이 아닌 경우에는 Dunnett's T3-test를 사용하여 부형제대조군과의 유의성을 확인하였다. 요검사의 경우, 순위화한 데이터를 이용하여 척도변환을 한 후 *Kruskal-Wallis'H-test*를 실시하였으며, 군간 유의성이 인정되면 *Mann-Whitney U-test*를 통하여 부형제대조군과의 유의성을 확인하였다. 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

일반증상 (Table 1 또는 Appendix 1-1)

사망동물은 관찰되지 않았다.

800 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 약물혼입변(compound-colored stool) 및 착색뇨(chromaturia)가 각 투여 3 일째 및 투여 33 일째부터 관찰종료 시까지 지속적으로 관찰되었다. 약물혼입변은 800 mg/kg/day 투여군에서는 경도(slight)로, 2,000 mg/kg/day 이상 투여군에서는 중등도(moderate)로 관찰되었고, 착색뇨는 짙은 노란색 (dark yellow), 호박색(amber) 또는 주황색(orange)으로 용량상관성 있게 관찰되었다.

체중변화 (Table 2 또는 Appendix 1-2)

5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 투여 3 주째부터 투여 13 주째까지 부형제대조군에 비하여 평균 약 3 % 차이로 체중증가억제 경향을 보였으나, 통계학적으로 유의성 있는 차이는 아니었다. 시험물질 투여군 암컷의 체중변화는 부형제대조군과 유사하게 관찰되었다.

사료섭취량 (Table 3 또는 Appendix 1-3)

시험물질 투여군에서 부형제대조군과의 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

물섭취량 (Table 4 또는 Appendix 1-4)

2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 물섭취량의 증가경향이 관찰기간 전반에 걸쳐 관찰되었고, 부형제대조군에 비한 통계학적인 유의성은 투여 11 주째에 수컷의 평균 물 섭취량에서 확인되었다($P < 0.05$).

안과학적 검사 (Table 5 또는 Appendix 1-5)

이상소견은 관찰되지 않았다.

요검사 (Tables 6 and 7 또는 Appendices 1-6 and 1-7)

빌리루빈(BIL)이 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서, 케톤체(KET)가 800 mg/kg/day 이상 투여군 수컷 및 2,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서, 요단백(PRO)이 2,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서, 아질산염(NIT)가 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았고($P < 0.05$, $P < 0.01$), 용량상관성 있는 변화를 보였다.

요색조는 800 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 어두운 노란색조(dark yellow), 호박색조(amber) 및 주황색조(orange)로 용량상관성 있는 변화를 보였고, 이는 노란색조(yellow)로 관찰된 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 변화이었다($P < 0.01$).

5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 요침사 중 백혈구(WBC)가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로

로 유의성 있게 높았다($P < 0.05$).

그 밖에, 800 및 2,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 요비중(SG)이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았으나($P < 0.05$), 용량상관성 없는 변화이었다.

혈액학적 검사 (Table 8 또는 Appendix 1-8)

2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 호산구(EOS) 백분비가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 낮았고($P < 0.05$, $P < 0.01$), 용량상관성 있는 변화를 보였다. 800 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 헤모글로빈분포폭(HDW)이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮았다($P < 0.01$).

혈액생화학적 검사 (Table 9 또는 Appendix 1-9)

5,000 mg/kg/day 투여군 수컷 및 2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 나트륨(Na^+)이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮았다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

수컷에서는 2,000 mg/kg/day 이상 투여군에서 칼륨(K^+)의 증가, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 총콜레스테롤(TCHO) 및 총단백(TP)의 감소가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 관찰되었다($P < 0.05$, $P < 0.01$). 암컷에서는 2,000 mg/kg/day 이상 투여군에서 TP 및 알부민(ALB)의 증가와 염소(Cl^-)의 감소가, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 총빌리루빈(TBIL)의 증가가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 관찰되었다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

800 mg/kg/day 투여군 수컷에서 Na^+ 가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았으나($P < 0.05$), 용량상관성 없는 변화이었다.

장기중량 (Table 10 또는 Appendix 1-10)

2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 간장의 절대 및 상대중량이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았고($P < 0.05$, $P < 0.01$), 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 좌우측 고환의 상대중량이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았다($P < 0.01$).

부검소견 (Table 11 또는 Appendix 1-11)

800 mg/kg/day 투여군 수컷에서 좌측 고환이 없는 소견(absence)과 좌측 부고환의 왜소(small)가 1/10 레씩 관찰되었다. 암컷에서는 자궁내 맑은액체저류(retention of clear fluid)가 부형제대조군, 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군 순으로 각 2/10, 2/10, 1/10 및 1/10 레씩 관찰되었다.

조직병리학적 검사 (Appendix 2)

5,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제대조군과 비교하여 증가하거나 심화된 병변은 관찰되지 않았고, SD 랫드에서 자연발생적으로 관찰되는 병변들만이 관찰되었다. 그 중, 비교적 높은 빈도로 관찰된 병변은 신장의 만성진행성신증(nephropathy, chronic progressive)으로, 수컷에서는 부형제대

조군 및 5,000 mg/kg/day 투여군 모든 개체에서 관찰되었고, 암컷에서는 부형제대조군 및 5,000 mg/kg/day 투여군 순으로 각 5/10 례 및 7/10 례 관찰되었다.

부검 시, 없는 것으로 관찰되었던 좌측 고환과 왜소한 부고환은 조직병리학적 검사에서 위축 (atrophy)으로 확인되었고, 자궁내 맑은액체저류는 물자궁증(hydrometra)으로 확인되었다.

고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 RIS를 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하여 무독성량 및 표적장기를 알아보고자 수행하였다.

실험결과, 사망은 관찰되지 않았고, 사료섭취량 및 안과학적 검사에서 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

모든 시험물질 투여군에서 관찰된 약물혼입변 및 착색뇨는 그 정도가 용량상관성 있게 관찰되어 시험물질 투여에 의한 변화로 판단한다. 단, 위장관 또는 신장 등 관련 장기에서 유의한 변화가 동반 관찰되지 않았기에 이는 시험물질 또는 그 대사물이 변 또는 요로 배설되어 나타난 변화로 추정하고, 독성학적으로 의미 있는 변화가 아닌 것으로 판단한다.

5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 관찰된 체중증가억제경향은 투여 3 주째부터 지속적으로 관찰된 변화로 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하나, 부형제대조군과의 차이가 약 3 %로 통계학적으로 유의한 변화가 아니었기에 독성학적으로 의미 있는 변화가 아닌 것으로 판단한다.

2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 관찰된 물 섭취량의 증가 또는 증가경향은 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하고, 동일 용량군 암수에서 관찰된 Na^+ 또는 Cl^- 의 감소 또는 감소경향은 물 섭취량의 증가에 기인한 변화로 판단한다. 단, 모두 정상범위²⁾ 이내의 변화이었고, 신장에서 시험물질 투여에 의한 조직병리학적 이상이 동반 관찰되지 않았기에 독성학적으로 의미 있는 변화가 아닌 것으로 판단한다.

모든 용량의 시험물질 투여군 암수에서 관찰된 요 색조의 변화는 일반증상에서 관찰된 착색뇨에 상응하는 변화로 판단하고, 그 밖에 요 중 BIL, KET, PRO 또는 NIT의 변화는 요 색조 변화에 따른 위양성 반응³⁾으로 판단한다.

5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 요 중 WBC의 증가는 군간 용량상관성 있게 관찰되었으나, 신장 또는 비뇨생식기 계통에서 시험물질 투여에 의한 조직병리학적 이상이 동반 관찰되지 않았기에 독성학적으로 유해한 변화가 아닌 것으로 판단한다.

2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 관찰된 EOS 백분비의 감소는 용량상관성 있게 관찰되어 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하고, 이는 본 시험물질의 주성분인 갈릭산(gallic acid)의 항염증작용(anti-inflammatory effect)^{4),5)}에 의한 약리학적인 변화로 판단한다.

모든 시험물질 투여군 수컷에서 관찰된 HDW의 감소는 용량상관성 있는 변화로 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하나, 적혈구 지수 및 항수에서 유의한 변화가 동반 관찰되지 않았고, 정상범위¹⁾ 이내의 변화로 독성학적인 의미는 없는 변화로 판단한다.

2,000 또는 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 관찰된 TCHO, TP 또는 ALB의 변화는 암수 간 다른 양상의 변화를 보였고, 군간 용량상관성도 뚜렷이 관찰되지 않았기에 시험물질 투여에 의한 변

화로 보기 어려웠다.

그 밖에 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 TBIL의 증가는 정상범위 이내의 변화로²⁾ 알칼라인 포스파타제(ALP) 등 관련항목에서 유의한 변화를 동반하지 않았고, 간장에서 시험물질 투여에 의한 조직병리학적 이상이 관찰되지 않았기에 시험물질 투여에 의한 변화가 아닌 것으로 판단한다.

2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 관찰된 간장의 절대 및 상대중량 증가는 용량상관성 있게 관찰되어 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하나, 간장에서 시험물질 투여에 의한 조직병리학적 이상이 관찰되지 않은 것으로 보아 이는 외인성 물질에 대한 적응성 반응으로 추정하고⁶⁾, 독성학적으로 유해한 변화가 아닌 것으로 판단한다.

5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 관찰된 좌우측 고환의 상대중량 증가는 절대중량에서 유의한 변화가 동반 관찰되지 않았기에 이는 부형제대조군에 비하여 상대적으로 낮은 부검 시 체중 때문에 나타난 변화로 판단하고, 독성학적으로 유해한 변화가 아닌 것으로 판단한다.

부검 시 관찰된 육안적 이상장기 중 800 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 좌측 고환 및 부고환의 위축은 우측에서는 관찰되지 않았고, 용량상관성 없는 변화로 시험물질 투여에 의한 영향이 아닌 우발적인 변화로 판단한다. 암컷에서 관찰된 물자궁증은 부형제대조군을 포함한 모든 시험물질 투여군에서 2 레 이하의 빈도로 유사하게 관찰된 것으로 보아 성주기에 따른 정상적인 변화⁷⁾로 판단한다.

조직병리학적 검사에서 관찰된 신장의 만성진행성신증은 병변의 정도 및 빈도에서 부형제대조군과 차이를 보이지 않아 시험물질 투여에 의한 변화가 아닌 것으로 판단한다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, RIS을 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫드에 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day로 13 주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질 투여에 의한 독성학적으로 의미 있는 변화는 관찰되지 않았다.

이에 본 시험조건에서 시험물질 RIS의 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 확인되지 않았다.

참고문헌

1. Xybion (2010): Lexicon, Pristima™ (Path/Tox system), Version 6.3.0 Build 15. Xybion Medical Systems. USA.
2. Han ZZ, Xu HD, Kim KH, Ahn TH, Bae JS, Lee JY, Gil KH, Lee JY, Woo SJ, Yoo HJ, Lee HK, Kim KH, Park CK, Zhang HS and Song SW (2010): Reference data of the main physiological parameters in control Sprague–Dawley rats from pre–clinical toxicity studies, *Lab. Anim.*, 26(2): 153–164.
3. Siemens Healthcare Diagnostics Reagent Strips for Urinalysis.
4. Kim SH, Jun SD, Suk KH, Choi BJ, Lim HJ, Park SJ, Lee SH, Shin HY, Kim DK, Shin TY (2006): Gallic acid inhibits histamine release and pro–inflammatory cytokine production in mast cell, *Toxicological sciences*, 91(1): 123–131.
5. Kroes BH, van den Berg AJ, Quarles van Ufford HC, van Dijk H, Labadie RP (1992): Anti–inflammatory activity of gallic acid, *Planta Med.*, 58(6):499–504.
6. Williams GM and Iatropoulos MJ (2002): Alteration of liver cell function and proliferation: Differentiation between adaptation and toxicity, *Toxicologic Pathology*, 30(1):41–53.
7. Covance (2001). Covance Glossary, Version 5. Covance Inc.

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by ChemOn Inc.
 .Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

%	Percent	rpm	Revolution per Minute
L	Liter	RCF	Relative Centrifugal Force
dL	Deciliter	SD	Standard Deviation
mL	Milliliter	CV	Coefficient of Variation
μL	Microliter	RE	Relative Error
g	Gram	RH	Relative Humidity
kg	Kilogram	M	Male
mg	Milligram	F	Female
μg	Microgram	NA	Not Applicable
wk	Week	N	Number of measurements in a group
d	Day	SPF	Specific Pathogen Free
GLP	Good Laboratory Practice	SOP	Standard Operating Procedures
QAU	Quality Assurance Unit	KFDA	Korea Food and Drug Administration
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee		

<CONTINUED>

단위 및 약호

(임상병리 약호)

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by ChemOn Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

A/G	Albumin/Globulin ratio	MCH	Mean corpuscular hemoglobin
ALB	Albumin	MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
ALP	Alkaline phosphatase	MCV	Mean corpuscular volume
ALT	Alanine aminotransferase	MONO	Monocyte
APTT	Activated partial thromboplastin time	MPV	Mean platelet volume
AST	Aspartate aminotransferase	Na ⁺	Sodium
BASO	Basophil	NEU	Neutrophil
BIL	Bilirubin	NIT	Nitrite
BUN	Blood urea nitrogen	OB	Occult blood
Ca ²⁺	Calcium	pH	Potential of hydrogen
Cl ⁻	Chloride	PLT	platelet count
CPK	Creatine phosphokinase	PRO	Protein
CRE	Creatinine	PT	Prothrombin time
EOS	Eosinophil	RBC	Red blood cell
GLU	Glucose	RDW	Red cell distribution width
HCT	Hematocrit	RET	Reticulocytes
HDW	Hemoglobin distribution width	SG	Specific gravity
HGB	Hemoglobin	TBIL	Total bilirubin
IP	Inorganic phosphorus	TCHO	Total cholesterol
K ⁺	Potassium	TG	Triglyceride
KET	Ketone body	TP	Total protein
LUC	Large unstained cell	URO	Urobilinogen
LYM	Lymphocytes	WBC	White blood cell

<END>

TABLES

Table 1. Summary of clinical signs

CLINICAL SIGNS					
DAYS ^{a)}	SIGNS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
MALE					
1-2	Normal	10 / 10 ^{b)}	10 / 10	10 / 10	10 / 10
3-32	Normal	10 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
	Compound-colored stool	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
33-92	Normal	10 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
	Compound-colored stool	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Chromaturia	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
92	Normal	10 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
	Compound-colored stool	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Chromaturia	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Terminal sacrifice	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
FEMALE					
1-2	Normal	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
3-32	Normal	10 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
	Compound-colored stool	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
33-93	Normal	10 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
	Compound-colored stool	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Chromaturia	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
93	Normal	10 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
	Compound-colored stool	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Chromaturia	0 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
	Terminal sacrifice	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10

a) The day of first treatment was designated day 1.

b) Number of animals with the sign / Number of animals examined.

-: There was no animal after they had been sacrificed.

Table 2. Summary of body weight changes

BODY WEIGHTS (g)					MALE
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)	
0 ^{a)}	188.13±5.95 ^{c)}	186.71±6.62	189.44±8.13	187.77±6.12	
1	241.46±8.73	239.09±9.83	245.72±9.79	242.27±7.63	
2	284.72±12.00	286.65±10.12	294.71±17.46	285.16±11.16	
3	319.26±15.21	317.28±13.54	332.59±24.06	316.59±15.99	
4	348.65±18.65	343.52±15.35	361.69±31.32	340.87±18.05	
5	369.88±21.06	364.95±16.36	387.32±35.43	361.83±21.50	
6	387.18±23.19	382.54±16.26	408.15±41.48	377.26±21.20	
7	403.05±27.21	396.70±17.32	425.96±47.62	390.87±22.43	
8	411.14±27.02	406.36±19.11	433.99±51.14	397.34±21.25	
9	420.22±29.83	416.06±19.68	446.23±53.76	404.02±24.01	
10	431.10±31.37	427.47±20.81	458.27±56.97	410.00±19.09	
11	438.51±33.21	436.38±22.20	466.56±56.74	422.24±21.10	
12	443.35±34.41	440.26±20.04	475.70±58.32	427.84±21.13	
13	444.43±34.49	439.48±20.34	475.46±56.18	430.36±24.09	
GAINS ^{b)}	256.30±32.90	252.78±18.94	286.02±53.48	242.59±24.85	
N	10	10	10	10	

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains are body weight difference between week 13 and week 0

c) Data are expressed as Mean ± S.D.

<CONTINUED>

Table 2. Summary of body weight changes

WEEKS	BODY WEIGHTS (g)			
	FEMALE			
	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
0 ^{a)}	140.72±5.83 ^{c)}	140.76±3.39	140.54±4.85	139.69±4.43
1	159.50±5.87	161.74±7.79	159.91±6.99	159.21±9.55
2	173.07±9.87	178.20±9.30	175.23±10.78	175.31±8.40
3	185.87±10.64	192.18±10.64	188.44±11.27	187.25±8.95
4	197.28±13.33	206.69±10.15	200.85±13.43	200.03±9.50
5	207.55±14.01	218.80±10.35	210.26±13.46	209.69±10.44
6	215.20±12.99	223.59±10.23	218.30±13.55	216.96±11.10
7	221.21±14.54	227.58±11.08	225.26±14.70	225.04±10.41
8	224.25±15.74	231.29±10.84	227.23±13.89	228.67±9.88
9	227.64±15.30	234.52±11.56	233.63±15.57	232.57±11.24
10	230.78±16.01	241.16±12.85	236.62±16.54	236.97±10.03
11	234.40±14.37	244.51±11.91	240.94±17.22	239.62±10.22
12	236.27±16.25	247.16±13.68	247.52±17.99	244.44±9.35
13	237.52±16.19	248.04±13.26	245.32±16.21	244.53±10.69
GAINS ^{b)}	96.79±13.56	107.28±12.11	104.78±15.86	104.84±8.61
N	10	10	10	10

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains are body weight difference between week 13 and week 0

c) Data are expressed as Mean ± S.D.

<END>

Table 3. Summary of food consumptions

FOOD CONSUMPTIONS (g/rat/day)					MALE
WEEKS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)	
0 ^{a)}	19.93±1.31 ^{b)}	20.41±1.26	20.16±1.43	19.99±1.18	
1	21.18±0.53	21.22±1.87	22.14±3.53	22.32±1.51	
2	21.61±1.26	20.86±2.30	22.51±2.01	20.92±1.74	
3	21.11±1.59	20.86±2.19	21.57±1.61	21.67±2.07	
4	21.06±0.85	20.94±1.38	22.16±2.61	22.08±1.08	
5	19.78±2.12	18.08±0.78	21.24±1.62	19.28±1.61	
6	20.67±1.36	18.59±0.70	21.22±2.01	21.34±1.69	
7	18.91±1.75	18.55±1.11	21.71±1.90	19.88±1.18	
8	20.06±2.41	17.74±1.47	19.06±1.41	19.01±1.51	
9	18.70±2.09	18.22±0.75	20.37±3.95	18.97±1.46	
10	19.10±1.66	19.40±0.92	21.12±1.56	18.83±3.24	
11	19.30±1.29	17.89±1.42	19.27±1.00	18.86±2.72	
12	18.43±1.54	17.78±0.68	20.60±2.49	19.83±1.24	
13	16.89±1.84	16.10±1.18	15.18±4.66	17.82±1.39	
N	10	10	10	10	

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Data are expressed as Mean ± S.D.

<CONTINUED>

Table 3. Summary of food consumptions

WEEKS	FOOD CONSUMPTIONS (g/rat/day)				FEMALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)	
0 ^{a)}	12.10±0.76 ^{b)}	13.21±0.50	13.26±0.63	13.63±1.62	
1	11.84±0.86	12.19±0.49	12.31±1.38	12.41±1.42	
2	11.54±1.40	11.54±1.98	11.52±0.91	10.90±0.89	
3	12.14±1.57	13.11±1.77	12.15±1.40	11.92±0.45	
4	13.47±1.12	13.75±1.52	13.41±1.17	13.11±0.42	
5	11.74±0.61	12.01±1.41	10.84±0.97	11.50±1.39	
6	13.18±1.06	12.98±1.48	14.08±1.01	13.13±0.89	
7	11.84±0.98	12.22±0.75	11.56±1.18	11.73±1.04	
8	11.85±0.30	12.07±0.75	12.08±0.88	11.86±0.63	
9	11.01±0.75	12.16±1.33	11.11±1.19	11.94±0.42	
10	13.25±0.78	12.05±1.92	13.41±1.10	13.34±1.08	
11	11.33±1.62	11.57±1.09	10.31±2.36	11.04±1.58	
12	11.97±0.59	13.08±2.12	13.74±5.17	12.55±0.57	
13	10.68±0.85	11.09±1.05	10.24±1.52	11.53±0.87	
N	10	10	10	10	

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Data are expressed as Mean ± S.D.

<END>

Table 4. Summary of water consumptions

WEEKS	WATER CONSUMPTIONS (g/rat/day)				MALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)	
0 ^{a)}	24.10±3.76 ^{b)}	25.74±3.98	22.82±2.69	24.77±2.59	
1	27.29±3.68	30.17±3.14	28.39±0.51	32.05±3.92	
2	24.71±4.29	26.44±3.41	27.15±2.41	28.19±2.47	
3	25.02±2.24	25.02±3.50	27.17±3.40	28.76±2.47	
4	24.57±3.95	23.45±5.08	23.86±1.69	26.25±3.50	
5	23.09±3.12	22.06±2.06	24.58±3.40	24.03±2.62	
6	26.80±2.34	24.40±3.91	27.39±4.49	28.46±3.44	
7	24.88±5.23	26.06±3.65	27.29±2.88	27.67±3.09	
8	25.34±7.90	25.18±4.26	31.19±3.82	27.91±3.59	
9	21.62±3.64	23.10±4.63	24.90±4.73	27.78±3.17	
10	23.71±2.35	24.08±1.56	26.78±3.22	28.24±3.44	
11	21.00±4.37	19.61±2.31	26.31±2.19*	27.17±3.69*	
12	22.04±3.76	23.12±2.66	25.16±3.41	25.19±3.54	
13	20.17±3.49	20.16±1.54	22.41±4.19	25.10±3.38	
N	10	10	10	10	

* A significant difference at $P < 0.05$ level compared with the vehicle control.

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Data are expressed as Mean \pm S.D.

<CONTINUED>

Table 4. Summary of water consumptions

WEEKS	WATER CONSUMPTIONS (g/rat/day)				FEMALE
	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)	
0 ^{a)}	15.64±2.02 ^{b)}	16.98±1.32	18.16±2.67	19.91±5.48	
1	16.66±1.81	17.07±2.77	16.00±2.19	18.92±2.49	
2	14.53±1.53	17.41±4.65	17.97±3.77	17.58±2.93	
3	17.13±3.20	17.55±2.14	19.11±3.09	19.91±2.04	
4	17.38±2.68	17.81±2.38	19.35±1.86	19.44±3.58	
5	17.86±1.10	19.41±2.61	19.33±3.24	18.51±3.14	
6	21.10±3.40	21.26±4.99	23.12±5.70	24.37±4.60	
7	21.51±2.43	20.34±2.96	23.29±5.04	22.49±2.95	
8	19.99±2.16	22.37±3.61	26.00±7.33	24.63±1.88	
9	17.34±1.06	19.02±3.76	19.35±4.65	24.73±6.45	
10	21.52±2.49	21.62±1.93	23.69±6.21	25.59±3.00	
11	20.19±2.57	19.11±3.62	21.79±7.58	22.31±2.79	
12	22.50±2.96	22.61±3.49	24.15±6.56	24.22±2.50	
13	20.60±2.90	19.61±3.16	21.31±5.80	24.55±5.32	
N	10	10	10	10	

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Data are expressed as Mean ± S.D.

<END>

Table 5. Summary of ophthalmological examination

OPHTHALMOLOGICAL EXAMINATIONS					
SITES	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
MALE					
Left eye	Normal	5 / 5 ^{a)}	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE					
Left eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

a) Number of animals with the finding/Number of animals examined.

Table 6. Summary of urinalysis

URINALYSIS										
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)							
			MALE				FEMALE			
			G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
GLU	-	0	5	5	5	5	4	4	5	5
	+/-	1	0	0	0	0	1	1	0	0
BIL	-	0	5	5	5	0	0	0	0	1
	+/-	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1+	2	0	0	0	5**	0	0	0	4*
KET	-	0	5	0	1	0	5	3	0	0
	+/-	1	0	5**	3	0	0	2	4	0
	1+	2	0	0	1*	2	0	0	1**	2
	2+	3	0	0	0	2	0	0	0	3**
	3+	4	0	0	0	1**	0	0	0	0
SG	≤1.005	0	0	0	0	0	2	0	0	1
	1.010	1	2	0	0	1	1	2	0	1
	1.015	2	3	1	1	0	1	2	2	0
	1.020	3	0	4*	1	3	1	1	3	2
	1.025	4	0	0	3*	1	0	0	0	1
pH	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	5.5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.0	2	0	0	0	0	1	0	0	0
	6.5	3	0	0	0	0	0	0	1	0
	7.0	4	0	0	0	0	0	2	0	0
	7.5	5	1	0	2	0	2	0	0	0
	8.0	6	4	4	2	3	2	3	4	3
	8.5	7	0	1	1	2	0	0	0	1
PRO	-	0	0	0	0	0	5	5	3	2
	+/-	1	1	0	0	0	0	0	0	2
	1+	2	3	2	0	0	0	0	1	0
	2+	3	1	3	1	3	0	0	1	0
	3+	4	0	0	4**	2*	0	0	0	1
URO	0.1	0	5	5	5	3	5	5	5	5
	1.0	1	0	0	0	2	0	0	0	0
NIT	-	0	4	5	5	3	5	5	2	1
	+	1	1	0	0	2	0	0	3	4*
OB	-	0	3	5	3	3	4	5	5	3
	+/-	1	1	0	2	1	1	0	0	2
	1+	2	1	0	0	1	0	0	0	0
CLARITY	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5

*/** A significant difference at $P<0.05$ / $P<0.01$ levels compared with the vehicle control.

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood.

<CONTINUED>

Table 6. Summary of urinalysis

URINALYSIS										
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)							
			MALE				FEMALE			
			G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
VOLUME (mL)			23.0±2.0	23.2±1.9	29.4±9.6	23.4±5.0	25.2±3.6	28.0±5.1	23.8±6.9	25.2±5.4
COLOR	Yellow		5	0	0	0	5	0	0	0
	Dark Yellow		0	5*	3	0	0	5*	3	0
	Amber		0	0	2**	0	0	0	2	3
	Orange		0	0	0	5**	0	0	0**	2**
N			5	5	5	5	5	5	5	5

** A significant difference at $P < 0.01$ level compared with the vehicle control.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	OB (EA/μL)	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.1	Negative	Negative	Clear
+/-	1	Trace	Trace	Trace	Trace	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

NA: not applicable.

<END>

Table 7. Summary of urine sediments

URINE SEDIMENTS										
TESTS	RESULT	GRADE	GROUPS (mg/kg/day)							
			MALE				FEMALE			
			G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
			(0)	(800)	(2,000)	(5,000)	(0)	(800)	(2,000)	(5,000)
RBC	-	0	4	5	3	4	5	5	5	5
	+/-	1	1	0	2	1	0	0	0	0
WBC	-	0	0	0	0	0	5	4	2	1
	+/-	1	1	1	0	2	0	1	3	3
	1+	2	3	3	3	2	0	0	0	1*
	2+	3	1	1	2	1	0	0	0	0
EPITHELIAL CELL	-	0	4	3	2	5	5	3	4	4
	+/-	1	1	1	3	0	0	2	0	0
	1+	2	0	1	0	0	0	0	0	0
	2+	3	0	0	0	0	0	0	1	1
CASTS	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5
N			5	5	5	5	5	5	5	5

* A significant difference at $P < 0.05$ level compared with the vehicle control.

Result	Grade	RBC (mean/field)	WBC (mean/field)	Epithelial Cell	Casts (mean/field)
-	0	0	0	0 / 20 fields	0
+/-	1	≤4	≤5	Few / 20 fields	1
1+	2	5-8	6-20	Around 1 / few fields	2-5
2+	3	9-30	21-50	Few / field	6-10

Table 8. Summary of hematological test

HEMATOLOGICAL TEST					
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
MALE					
RBC	10 ⁶ /μL	9.14±0.28 ^{a)}	9.17±0.36	9.10±0.22	8.91±0.33
HGB	g/dL	15.6±0.3	15.5±0.6	15.7±0.4	15.5±0.5
HCT	%	47.7±1.0	47.9±2.4	48.0±1.4	47.5±1.7
MCV	fL	52.1±1.0	52.2±1.3	52.8±1.2	53.3±1.5
MCH	pg	17.1±0.3	17.0±0.5	17.3±0.4	17.3±0.5
MCHC	g/dL	32.7±0.5	32.5±0.6	32.7±0.4	32.5±0.4
RDW	%	12.2±0.3	12.1±0.3	12.2±0.4	12.0±0.5
HDW	g/dL	2.53±0.07	2.41±0.08 ^{**}	2.39±0.10 ^{**}	2.35±0.11 ^{**}
RET	%	2.30±0.23	2.11±0.25	2.38±0.24	2.39±0.46
PLT	10 ³ /μL	937.2±53.8	923.7±51.6	891.9±73.8	920.4±82.4
MPV	fL	6.0±0.4	6.5±1.0	6.0±0.3	6.3±0.2
WBC	10 ³ /μL	8.44±1.42	7.85±1.77	9.26±1.49	7.78±1.80
NEU	%	22.1±8.4	21.5±9.4	17.7±3.5	17.3±4.8
LYM	%	71.9±8.5	72.8±9.2	76.9±3.5	77.6±5.1
MONO	%	3.7±0.7	3.8±1.0	3.7±1.0	3.7±0.7
EOS	%	1.6±0.5	1.3±0.3	1.1±0.3 ^{**}	0.8±0.3 ^{**}
BASO	%	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.1
LUC	%	0.57±0.19	0.47±0.23	0.54±0.11	0.53±0.22
PT	Sec	8.99±0.41	9.20±0.41	9.00±0.29	9.24±0.40
APTT	Sec	18.0±0.6	18.0±0.5	17.8±0.7	17.8±0.6
N		10	10	10	10
FEMALE					
RBC	10 ⁶ /μL	7.81±0.26	7.72±0.15	7.75±0.30	7.70±0.25
HGB	g/dL	14.3±0.4	14.0±0.3	14.2±0.4	14.0±0.3
HCT	%	42.6±0.8	42.0±0.8	42.3±1.5	42.1±1.2
MCV	fL	54.6±1.1	54.4±1.3	54.7±0.7	54.7±2.1
MCH	pg	18.3±0.5	18.2±0.5	18.3±0.3	18.2±0.7
MCHC	g/dL	33.5±0.5	33.4±0.5	33.4±0.4	33.2±0.6
RDW	%	11.2±0.4	11.0±0.4	11.2±0.4	11.0±0.2
HDW	g/dL	2.43±0.15	2.30±0.18	2.41±0.15	2.31±0.13
RET	%	2.82±0.64	2.71±0.60	2.76±0.75	2.88±0.55
PLT	10 ³ /μL	979.7±81.4	956.5±107.5	990.0±87.9	999.9±87.0
MPV	fL	5.6±0.2	5.7±0.2	5.7±0.1	5.6±0.2
WBC	10 ³ /μL	4.23±1.32	4.09±1.12	5.00±1.73	5.02±0.73
NEU	%	13.9±3.7	13.4±3.1	13.9±6.6	10.6±3.8
LYM	%	79.3±3.4	81.1±3.1	80.8±6.8	84.1±4.0
MONO	%	4.1±1.4	3.1±0.6	3.3±0.7	3.3±0.9
EOS	%	1.9±0.5	1.7±0.6	1.5±0.3 [*]	1.2±0.4 ^{**}
BASO	%	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1
LUC	%	0.66±0.23	0.56±0.16	0.52±0.18	0.69±0.40
PT	Sec	8.68±0.29 (9) ^{b)}	8.96±0.29	8.85±0.20 (9) ^{b)}	8.82±0.36
APTT	Sec	17.1±1.7 (9)	17.2±0.9	17.8±1.2 (9)	17.7±1.4
N		10	10	10	10

*/** A significant difference at $P < 0.05$ / $P < 0.01$ levels compared with the vehicle control.

a) Data are expressed as Mean ± S.D.

b) Unreasonable data was excluded from this table (clotted specimen, animal no. 50, 64).

Table 9. Summary of clinical biochemistry test

CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST					
TESTS	UNITS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
MALE					
AST	U/L	98.3±19.5 ^{a)}	90.9±14.6	88.7±17.9	89.7±28.4
ALT	U/L	52.7±10.9	48.0±7.8	46.7±12.9	49.0±11.2
ALP	U/L	76.3±19.9	87.9±10.4	78.0±7.7	80.6±15.1
CPK	U/L	99.5±36.1	93.5±36.0	105.6±38.6	92.6±19.5
TBIL	mg/dL	0.19±0.03	0.18±0.01	0.18±0.01	0.19±0.02
GLU	mg/dL	135.0±16.3	126.8±6.4	136.5±18.3	127.8±8.8
TCHO	mg/dL	100.9±18.1	89.0±13.0	98.3±19.2	75.9±16.7**
TG	mg/dL	44.4±9.3	46.1±8.9	55.3±18.6	40.6±13.3
TP	g/dL	6.13±0.22	5.99±0.14	6.05±0.13	5.88±0.19**
ALB	g/dL	3.03±0.08	3.00±0.06	2.95±0.08	2.96±0.10
A/G	ratio	0.98±0.04	1.01±0.02	0.95±0.04	1.02±0.05
BUN	mg/dL	13.5±1.1	13.3±1.7	14.8±1.6	12.8±1.4
CRE	mg/dL	0.34±0.10	0.35±0.09	0.42±0.10	0.32±0.11
IP	mg/dL	5.70±0.24	5.75±0.19	5.92±0.24	6.20±0.52
Ca ²⁺	mg/dL	9.68±0.70	9.73±0.12	9.84±0.17	9.46±0.72
Na ⁺	mmol/L	141.3±0.8	142.2±0.8*	141.4±0.7	140.4±0.9*
K ⁺	mmol/L	4.47±0.25	4.48±0.20	4.71±0.24*	4.78±0.23**
Cl ⁻	mmol/L	102.5±1.2	102.3±0.4	101.7±1.0	101.6±1.1
N		10	10	10	10
FEMALE					
AST	U/L	84.1±9.2	83.4±12.2	80.4±19.4	77.5±14.2
ALT	U/L	37.5±6.4	33.3±3.9	34.6±5.4	34.7±6.2
ALP	U/L	56.9±11.6	50.6±9.9	50.1±13.2	47.4±9.3
CPK	U/L	93.6±42.1	114.7±32.6	107.3±53.5	81.3±33.5
TBIL	mg/dL	0.21±0.03	0.21±0.03	0.23±0.02	0.24±0.02*
GLU	mg/dL	110.0±10.9	106.3±7.3	112.3±12.0	101.3±10.2
TCHO	mg/dL	85.7±11.2	82.5±18.2	83.9±17.5	91.7±17.6
TG	mg/dL	27.6±3.2	31.5±6.6	26.4±5.6	33.3±12.0
TP	g/dL	5.68±0.20	5.78±0.24	5.96±0.28*	5.94±0.22*
ALB	g/dL	2.94±0.12	3.04±0.11	3.15±0.13**	3.08±0.12*
A/G	ratio	1.08±0.10	1.11±0.04	1.12±0.05	1.08±0.05
BUN	mg/dL	18.2±3.7	14.7±1.1	15.3±1.2	15.5±2.4
CRE	mg/dL	0.54±0.10	0.48±0.14	0.51±0.05	0.46±0.13
IP	mg/dL	5.17±0.42	5.10±0.57	5.45±0.61	5.69±0.43
Ca ²⁺	mg/dL	9.63±0.18	9.44±0.22	9.61±0.22	9.76±0.19
Na ⁺	mmol/L	140.9±0.8	140.9±0.7	139.8±0.9*	139.3±1.0**
K ⁺	mmol/L	4.09±0.11	4.12±0.17	4.15±0.21	4.27±0.31
Cl ⁻	mmol/L	105.3±0.8	104.5±1.0	103.8±1.1**	103.3±1.2**
N		10	10	10	10

*/** A significant difference at $P < 0.05$ / $P < 0.01$ levels compared with the vehicle control.

a) Data are expressed as Mean ± S.D.

Table 10. Summary of absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)				
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	424.79±34.78 ^{b)}	422.40±19.93	456.13±56.12	411.36±22.18	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0264±0.0057	0.0282±0.0028	0.0280±0.0032	0.0265±0.0041	
% to BODY WEIGHT	0.0062±0.0011	0.0067±0.0007	0.0062±0.0010	0.0065±0.0012	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0253±0.0050	0.0262±0.0015	0.0277±0.0023	0.0269±0.0029	
% to BODY WEIGHT	0.0059±0.0009	0.0062±0.0006	0.0061±0.0007	0.0065±0.0007	
PITUITARY GLAND	0.0126±0.0022	0.0129±0.0011	0.0136±0.0020	0.0127±0.0015	
% to BODY WEIGHT	0.0030±0.0005	0.0031±0.0003	0.0030±0.0003	0.0031±0.0003	
THYMUS	0.2975±0.0635	0.3013±0.0812	0.3279±0.0734	0.3119±0.0663	
% to BODY WEIGHT	0.0700±0.0135	0.0712±0.0181	0.0724±0.0165	0.0761±0.0171	
PROSTATE GLAND	0.5103±0.1921	0.6343±0.1903	0.6058±0.1471	0.5899±0.1276	
% to BODY WEIGHT	0.1204±0.0470	0.1509±0.0464	0.1348±0.0352	0.1437±0.0319	
TESTIS-LEFT	1.9939±0.1612	1.9774±0.0532	2.0964±0.1619	2.0978±0.1504	
% to BODY WEIGHT	0.4715±0.0482	0.4701±0.0222	0.4644±0.0547	0.5107±0.0377**	
TESTIS-RIGHT	1.9949±0.1423	2.0370±0.1406	2.0919±0.1767	2.0936±0.1768	
% to BODY WEIGHT	0.4725±0.0514	0.4830±0.0361	0.4627±0.0499	0.5094±0.0402**	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.6873±0.0518	0.6834±0.0978	0.7396±0.0471	0.7238±0.0547	
% to BODY WEIGHT	0.1624±0.0142	0.1622±0.0248	0.1639±0.0174	0.1760±0.0097	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.6995±0.0493	0.7333±0.0581	0.7519±0.0634	0.7280±0.0483	
% to BODY WEIGHT	0.1657±0.0179	0.1736±0.0111	0.1659±0.0131	0.1771±0.0107	
SPLEEN	0.7932±0.1271	0.7174±0.0943	0.8521±0.1157	0.8124±0.1586	
% to BODY WEIGHT	0.1867±0.0254	0.1695±0.0175	0.1876±0.0194	0.1967±0.0299	
KIDNEY-LEFT	1.3034±0.1317	1.2920±0.0862	1.3838±0.1105	1.4322±0.1718	
% to BODY WEIGHT	0.3073±0.0263	0.3060±0.0173	0.3053±0.0220	0.3474±0.0269	
KIDNEY-RIGHT	1.3611±0.1392	1.3178±0.0855	1.4194±0.1398	1.4486±0.1231	
% to BODY WEIGHT	0.3207±0.0248	0.3122±0.0190	0.3131±0.0280	0.3520±0.0193	
HEART	1.4437±0.1735	1.4101±0.1507	1.6102±0.2845	1.4341±0.1176	
% to BODY WEIGHT	0.3396±0.0243	0.3333±0.0263	0.3523±0.0372	0.3484±0.0163	
LUNG	1.7693±0.1137	1.7589±0.0966	1.8007±0.2125	1.7382±0.1133	
% to BODY WEIGHT	0.4173±0.0183	0.4167±0.0212	0.3961±0.0317	0.4229±0.0233	
BRAIN	1.9571±0.0896	1.9909±0.0606	1.9613±0.0707	1.9660±0.0458	
% to BODY WEIGHT	0.4625±0.0297	0.4721±0.0226	0.4348±0.0453	0.4789±0.0232	
LIVER	10.9815±1.2569	10.7894±0.7781	12.1487±1.9828	11.1225±1.5187	
% to BODY WEIGHT	2.5843±0.1759	2.5542±0.1347	2.6542±0.1557	2.6950±0.2325	
N	10	10 (9) ^{c)}	10	10	

** A significant difference at $P < 0.01$ level compared with the vehicle control.

a) The body weights were measured right before necropsy after approximately overnight fasting.

b) Data are expressed as Mean \pm S.D.

c) Absence of left testis (animal no. 11).

<CONTINUED>

Table 10. Summary of absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS				FEMALE
PARAMETERS	GROUPS (mg/kg/day)			
	G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	226.52±16.01 ^{b)}	235.68±11.92	233.12±15.84	231.87±10.16
OVARY-LEFT	0.0413±0.0069	0.0420±0.0068	0.0419±0.0085	0.0456±0.0086
% BODY WEIGHT	0.0183±0.0030	0.0179±0.0034	0.0179±0.0031	0.0196±0.0033
OVARY-RIGHT	0.0430±0.0067	0.0428±0.0089	0.0444±0.0080	0.0445±0.0088
% BODY WEIGHT	0.0191±0.0035	0.0182±0.0039	0.0190±0.0028	0.0192±0.0035
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0309±0.0057	0.0305±0.0033	0.0308±0.0032	0.0330±0.0037
% to BODY WEIGHT	0.0136±0.0021	0.0130±0.0016	0.0132±0.0016	0.0142±0.0013
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0292±0.0034	0.0314±0.0042	0.0304±0.0048	0.0315±0.0030
% to BODY WEIGHT	0.0129±0.0014	0.0134±0.0019	0.0131±0.0020	0.0136±0.0010
PITUITARY GLAND	0.0120±0.0015	0.0124±0.0011	0.0135±0.0016	0.0127±0.0021
% to BODY WEIGHT	0.0053±0.0005	0.0053±0.0004	0.0058±0.0005	0.0055±0.0007
THYMUS	0.2288±0.0298	0.2463±0.0317	0.2181±0.0274	0.2305±0.0288
% to BODY WEIGHT	0.1013±0.0137	0.1046±0.0129	0.0939±0.0131	0.0998±0.0150
UTERUS	0.8571±0.5891	0.7012±0.2042	0.7083±0.3928	0.6380±0.2911
% BODY WEIGHT	0.3823±0.2687	0.2973±0.0850	0.3087±0.1853	0.2754±0.1223
SPLEEN	0.5352±0.0843	0.5276±0.0567	0.5570±0.0671	0.5412±0.0440
% to BODY WEIGHT	0.2353±0.0243	0.2239±0.0221	0.2390±0.0248	0.2334±0.0155
KIDNEY-LEFT	0.6815±0.0585	0.6955±0.0623	0.7242±0.0573	0.7301±0.0425
% to BODY WEIGHT	0.3011±0.0219	0.2952±0.0238	0.3108±0.0167	0.3153±0.0217
KIDNEY-RIGHT	0.6935±0.0646	0.7117±0.0561	0.7288±0.0638	0.7287±0.0419
% to BODY WEIGHT	0.3061±0.0195	0.3022±0.0224	0.3126±0.0176	0.3146±0.0187
HEART	0.8689±0.0763	0.8666±0.0483	0.9212±0.0366	0.9096±0.0741
% to BODY WEIGHT	0.3835±0.0185	0.3682±0.0212	0.3968±0.0304	0.3923±0.0282
LUNG	1.2859±0.0618	1.2761±0.0589	1.3223±0.0852	1.3312±0.1089
% to BODY WEIGHT	0.5705±0.0522	0.5423±0.0286	0.5692±0.0469	0.5747±0.0479
BRAIN	1.7790±0.0583	1.7772±0.0437	1.7853±0.0592	1.7842±0.0547
% to BODY WEIGHT	0.7885±0.0538	0.7558±0.0413	0.7681±0.0417	0.7708±0.0407
LIVER	5.4694±0.4427	5.6150±0.3281	6.1009±0.7155*	6.4204±0.5395*
% to BODY WEIGHT	2.4158±0.1177	2.3866±0.1621	2.6122±0.1842**	2.7675±0.1765**
N	10	10	10	10

*/** A significant difference at $P<0.05/P<0.01$ levels compared with the vehicle control.

a) The body weights were measured right before necropsy after approximately overnight fasting.

b) Data are expressed as Mean ± S.D.

<END>

Table 11. Summary of necropsy findings

NECROPSY FINDINGS					
ORGANS	FINDINGS	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (800)	G3 (2,000)	G4 (5,000)
MALE					
ESTIS	Absence (left side)	0	1	0	0
EPIDIDYMIS	Small (left side)	0	1	0	0
	N	10	10	10	10
FEMALE					
UTERUS	Retention of clear fluid	2	2	1	1
	N	10	10	10	10

APPENDIX 1. INDIVIDUAL DATA

Appendix 1-1. Individual clinical signs

CLINICAL SIGNS		
G1 (0 mg/kg/day)		MALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
1	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
2	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
3	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
4	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
5	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
6	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
7	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
8	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
9	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92
10	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-92 DAY 92

a) The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

CLINICAL SIGNS		
G2 (800 mg/kg/day)		MALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
11	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
12	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
13	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
14	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
15	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
16	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
17	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
18	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
19	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
20	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92

a) The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

CLINICAL SIGNS		
G3 (2,000 mg/kg/day)		MALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
21	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
22	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
23	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
24	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
25	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
26	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
27	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
28	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
29	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
30	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92

a) The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

CLINICAL SIGNS		
G4 (5,000 mg/kg/day)		
MALE		
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
31	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
32	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
33	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
34	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
35	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
37	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
38	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
39	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92
40	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-92
	Chromaturia	DAY 33-92
	Terminal sacrifice	DAY 92

a) The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

CLINICAL SIGNS		
G1 (0 mg/kg/day)		FEMALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
41	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
42	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
43	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
44	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
45	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
46	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
47	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
48	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
49	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93
50	Normal Terminal sacrifice	DAY 1-93 DAY 93

a) The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

CLINICAL SIGNS		
G2 (800 mg/kg/day)		FEMALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
51	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
52	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
53	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
54	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
55	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
56	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
57	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
58	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
59	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
60	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93

a) The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

CLINICAL SIGNS		
G3 (2,000 mg/kg/day)		FEMALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
61	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
62	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
63	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
64	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
65	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
66	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
67	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
68	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
69	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
70	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93

a) The day of first treatment was designated day 1.

<CONTINUED>

Appendix 1-1. Individual clinical signs

CLINICAL SIGNS		
G4 (5,000 mg/kg/day)		FEMALE
Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON ^{a)}
71	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
72	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
73	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
74	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
75	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
76	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
77	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
78	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
79	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93
80	Normal	DAY 1-2
	Compound-colored stool	DAY 3-93
	Chromaturia	DAY 33-93
	Terminal sacrifice	DAY 93

a) The day of first treatment was designated day 1.

<END>

Appendix 1-2. Individual body weight changes

ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)									
	G1 (0 mg/kg/day)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
WEEK 0 ^{a)}	186.30	186.13	195.85	185.94	184.63	196.61	187.47	176.50	193.32	188.55
WEEK 1	237.30	234.12	257.78	244.78	236.05	247.93	237.96	228.87	250.88	238.92
WEEK 2	279.63	278.77	293.63	295.20	280.22	283.98	273.20	267.27	308.92	286.33
WEEK 3	312.96	304.48	322.31	335.62	319.79	316.33	312.87	301.37	353.13	313.70
WEEK 4	351.39	331.51	349.14	368.90	347.25	342.45	336.46	327.85	390.38	341.21
WEEK 5	377.60	349.94	365.14	394.99	367.22	360.76	356.49	348.30	415.65	362.74
WEEK 6	398.50	362.89	383.96	410.78	378.48	372.59	378.87	368.43	439.66	377.63
WEEK 7	413.40	378.08	393.96	430.61	391.78	387.82	394.88	382.31	466.95	390.72
WEEK 8	425.67	390.91	402.31	434.62	397.82	392.63	406.23	389.00	475.10	397.15
WEEK 9	431.18	399.86	407.20	440.31	406.42	395.81	419.27	396.13	494.12	411.85
WEEK 10	447.98	411.54	420.63	450.37	410.70	403.49	429.80	406.33	507.53	422.62
WEEK 11	458.12	416.14	424.86	455.65	422.13	413.30	437.76	406.05	519.49	431.61
WEEK 12	457.71	417.72	433.79	463.43	419.18	420.64	442.37	411.19	527.92	439.59
WEEK 13	456.54	416.39	441.19	451.68	417.10	422.27	445.65	420.28	533.12	440.07
GAINS ^{b)}	270.24	230.26	245.34	265.74	232.47	225.66	258.18	243.78	339.80	251.52

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains in the main groups are body weight difference between week 13 and the week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–2. Individual body weight changes

ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)									
	G2 (800 mg/kg/day)									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
WEEK 0 ^{a)}	186.34	184.15	192.11	198.52	173.86	187.26	183.37	181.89	189.71	189.84
WEEK 1	241.45	236.73	248.34	256.03	223.67	224.30	237.87	239.12	238.91	244.46
WEEK 2	284.75	286.35	299.08	301.81	265.02	282.15	289.45	289.89	286.66	281.35
WEEK 3	313.91	320.14	338.89	329.29	288.03	313.04	316.95	326.74	316.03	309.82
WEEK 4	343.14	348.03	368.69	356.07	311.03	333.92	344.97	353.28	339.34	336.76
WEEK 5	359.98	368.67	389.40	382.00	332.64	353.22	368.71	377.50	363.74	353.66
WEEK 6	380.75	390.56	403.78	399.01	354.52	366.63	385.58	396.04	384.85	363.68
WEEK 7	392.50	397.14	421.06	411.14	365.44	388.33	400.85	416.87	397.20	376.46
WEEK 8	410.55	411.04	442.45	403.62	374.46	396.79	413.72	422.93	403.88	384.17
WEEK 9	419.92	420.60	445.45	419.02	379.63	404.73	429.79	435.76	412.79	392.93
WEEK 10	435.48	425.63	457.59	433.56	390.27	414.39	442.02	447.42	427.77	400.61
WEEK 11	443.47	428.71	469.08	446.90	401.59	425.36	455.32	456.23	433.17	403.92
WEEK 12	452.28	428.85	468.63	449.02	407.75	434.15	456.19	456.36	438.18	411.17
WEEK 13	449.36	427.90	467.95	445.50	405.16	436.15	455.79	459.29	436.29	411.45
GAINS ^{b)}	263.02	243.75	275.84	246.98	231.30	248.89	272.42	277.40	246.58	221.61

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains in the main groups are body weight difference between week 13 and the week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–2. Individual body weight changes

ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)									
	G3 (2,000 mg/kg/day)									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
WEEK 0 ^{a)}	194.49	204.26	193.24	177.87	198.48	186.88	181.50	183.40	188.48	185.83
WEEK 1	252.89	258.33	255.93	229.87	255.23	237.66	237.60	238.97	249.15	241.53
WEEK 2	319.43	301.17	319.35	268.38	300.18	275.01	292.43	276.93	301.63	292.60
WEEK 3	367.06	325.92	372.12	300.05	335.52	303.60	331.04	313.11	343.65	333.78
WEEK 4	408.56	350.02	408.84	318.60	366.14	325.31	371.66	332.97	373.92	360.84
WEEK 5	446.10	379.66	432.21	335.51	391.35	345.14	398.72	355.56	399.33	389.57
WEEK 6	477.67	406.12	461.21	350.29	413.86	360.72	420.86	363.89	417.22	409.70
WEEK 7	504.58	421.39	490.38	364.62	429.10	366.24	445.53	378.48	434.87	424.37
WEEK 8	522.47	415.94	493.57	366.45	445.03	373.94	461.77	382.42	444.40	433.90
WEEK 9	537.16	434.88	513.53	381.43	455.12	376.00	475.44	391.47	450.62	446.62
WEEK 10	554.31	445.83	531.17	395.22	471.18	381.77	485.53	397.17	464.83	455.64
WEEK 11	561.91	460.24	535.22	397.53	472.19	388.52	497.62	409.84	473.92	468.60
WEEK 12	568.10	464.91	552.18	410.71	481.42	393.69	507.75	412.54	485.05	480.61
WEEK 13	566.18	464.43	539.74	405.22	480.31	395.13	508.37	419.69	490.60	484.91
GAINS ^{b)}	371.69	260.17	346.50	227.35	281.83	208.25	326.87	236.29	302.12	299.08

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains in the main groups are body weight difference between week 13 and the week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–2. Individual body weight changes

ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)									
	G4 (5,000 mg/kg/day)									
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
WEEK 0 ^{a)}	191.25	193.89	198.48	186.21	189.94	179.10	183.23	190.38	180.44	184.74
WEEK 1	249.81	247.89	249.47	240.82	242.96	239.02	248.17	244.82	226.58	233.14
WEEK 2	294.34	284.16	291.87	290.40	284.16	283.46	300.77	289.21	268.75	264.43
WEEK 3	327.54	314.87	323.71	321.52	302.37	319.19	347.23	318.43	301.17	289.88
WEEK 4	356.44	335.90	351.05	343.81	327.45	350.02	373.30	336.01	324.66	310.01
WEEK 5	377.77	357.20	374.41	369.69	352.94	374.16	396.84	352.21	343.37	319.69
WEEK 6	401.05	375.22	382.21	386.25	369.39	385.97	411.95	366.13	354.31	340.13
WEEK 7	412.29	389.83	397.61	403.30	381.89	396.85	429.69	377.45	368.36	351.40
WEEK 8	417.59	397.59	404.80	410.72	388.14	401.49	433.76	379.31	379.12	360.83
WEEK 9	431.20	401.24	414.43	415.73	393.98	419.40	438.87	382.20	377.27	365.92
WEEK 10	439.11	412.41	423.06	425.12	404.43	422.96	415.39	388.82	388.40	380.25
WEEK 11	449.21	429.05	434.65	434.38	411.82	436.19	441.98	393.66	398.51	392.92
WEEK 12	455.19	428.41	436.57	441.07	421.09	431.39	458.69	401.08	402.10	402.76
WEEK 13	456.31	426.39	440.50	436.77	417.32	443.65	472.85	398.62	406.04	405.10
GAINS ^{b)}	265.06	232.50	242.02	250.56	227.38	264.55	289.62	208.24	225.60	220.36

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains in the main groups are body weight difference between week 13 and the week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–2. Individual body weight changes

ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)									
	G1 (0 mg/kg/day)									
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
WEEK 0 ^{a)}	134.53	146.71	146.89	133.61	138.44	142.95	144.45	139.44	132.45	147.75
WEEK 1	153.25	159.13	170.10	155.95	163.85	160.05	166.02	157.04	150.69	158.89
WEEK 2	163.80	168.11	185.55	164.04	185.02	180.78	184.17	171.00	159.77	168.42
WEEK 3	175.18	181.97	196.67	175.31	192.89	198.96	201.06	183.94	172.79	179.90
WEEK 4	190.68	195.30	215.80	175.19	209.28	199.32	213.82	200.53	181.25	191.67
WEEK 5	194.53	205.83	229.54	189.47	216.99	213.61	224.95	209.45	189.87	201.29
WEEK 6	201.87	218.87	232.25	195.49	223.80	218.74	232.51	218.91	200.90	208.63
WEEK 7	210.67	222.93	239.55	201.14	232.53	221.46	240.44	229.89	201.32	212.17
WEEK 8	212.63	230.54	241.36	202.22	235.13	222.49	248.17	231.03	202.33	216.62
WEEK 9	217.67	227.07	243.85	209.04	242.61	225.74	248.20	239.72	205.61	216.90
WEEK 10	215.52	236.45	251.03	209.33	243.98	228.93	251.81	238.16	210.05	222.54
WEEK 11	222.92	236.60	251.32	214.14	249.10	234.01	252.03	240.95	213.71	229.22
WEEK 12	223.13	239.76	252.85	216.68	256.13	237.19	256.30	242.86	212.21	225.56
WEEK 13	221.92	239.55	253.42	212.25	255.21	236.84	257.82	248.33	219.45	230.37
GAINS ^{b)}	87.39	92.84	106.53	78.64	116.77	93.89	113.37	108.89	87.00	82.62

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains in the main groups are body weight difference between week 13 and the week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–2. Individual body weight changes

ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)									
	G2 (800 mg/kg/day)									
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
WEEK 0 ^{a)}	144.95	140.49	142.46	142.76	140.72	142.94	137.17	136.99	144.26	134.85
WEEK 1	162.43	164.90	164.93	171.53	145.99	163.47	154.45	159.57	172.07	158.08
WEEK 2	175.83	186.88	174.78	189.05	163.30	178.66	165.39	174.27	184.25	189.56
WEEK 3	190.06	196.65	186.33	202.32	181.47	193.28	173.88	186.46	207.91	203.42
WEEK 4	206.40	217.19	197.95	211.56	202.32	205.62	188.39	200.26	214.35	222.86
WEEK 5	228.90	224.60	220.08	218.43	220.58	215.74	195.81	210.04	220.71	233.14
WEEK 6	231.26	237.43	223.39	225.27	217.34	217.39	200.90	222.59	232.23	228.09
WEEK 7	232.72	241.08	225.34	236.26	225.51	228.63	199.62	228.36	232.56	225.68
WEEK 8	243.77	244.48	227.40	234.41	224.49	229.62	207.73	234.51	239.59	226.88
WEEK 9	244.63	251.18	227.42	235.37	235.02	238.25	208.63	234.05	241.86	228.81
WEEK 10	255.18	259.65	231.88	242.42	235.61	244.54	216.77	245.67	249.96	229.93
WEEK 11	256.29	261.03	236.59	245.94	243.15	241.77	220.13	246.63	256.33	237.25
WEEK 12	256.59	269.29	237.39	247.49	245.16	248.29	218.15	253.71	255.50	239.99
WEEK 13	256.69	261.05	236.73	243.71	244.86	254.49	219.96	254.15	265.19	243.53
GAINS ^{b)}	111.74	120.56	94.27	100.95	104.14	111.55	82.79	117.16	120.93	108.68

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains in the main groups are body weight difference between week 13 and the week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–2. Individual body weight changes

ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)									
	G3 (2,000 mg/kg/day)									
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
WEEK 0 ^{a)}	138.26	134.52	139.71	138.08	147.84	134.34	138.04	146.58	142.31	145.67
WEEK 1	163.02	158.72	155.56	165.87	169.61	145.77	162.40	165.96	158.08	154.09
WEEK 2	172.87	169.57	175.20	186.11	191.37	152.34	180.40	177.61	179.18	167.66
WEEK 3	185.63	184.32	192.09	205.10	202.85	165.73	189.24	186.05	193.49	179.89
WEEK 4	199.69	189.87	204.92	216.31	220.60	174.22	203.96	202.42	205.99	190.47
WEEK 5	215.01	194.52	219.11	224.55	223.33	185.21	215.11	214.67	215.30	195.75
WEEK 6	220.74	206.42	229.06	227.59	238.12	191.17	220.37	220.82	222.46	206.24
WEEK 7	229.13	205.91	234.61	239.53	243.10	199.04	228.62	226.63	233.86	212.13
WEEK 8	229.05	213.90	239.57	243.39	241.68	200.26	234.23	224.77	230.11	215.32
WEEK 9	239.86	217.34	246.01	250.02	252.44	206.05	243.35	223.22	235.86	222.10
WEEK 10	244.20	218.94	249.97	254.68	258.70	209.37	244.25	225.66	237.17	223.26
WEEK 11	253.21	222.48	253.41	254.62	260.21	209.91	245.56	232.13	252.95	224.88
WEEK 12	264.54	227.04	269.89	263.26	262.16	217.57	251.06	238.44	249.39	231.83
WEEK 13	259.91	230.42	254.58	268.20	262.40	217.68	249.39	237.04	240.84	232.73
GAINS ^{b)}	121.65	95.90	114.87	130.12	114.56	83.34	111.35	90.46	98.53	87.06

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains in the main groups are body weight difference between week 13 and the week 0.

<CONTINUED>

Appendix1-2. Individual body weight changes

ANIMAL ID	BODY WEIGHTS (g)									
	G4 (5,000 mg/kg/day)									
	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
WEEK 0 ^{a)}	133.84	138.65	142.84	139.42	146.02	131.68	144.41	141.47	138.35	140.18
WEEK 1	147.59	163.07	159.98	152.31	169.66	151.87	178.59	162.32	155.23	151.52
WEEK 2	165.38	181.91	177.90	167.77	189.72	167.94	178.84	183.97	173.03	166.68
WEEK 3	170.55	193.39	192.62	181.73	195.85	175.56	194.39	194.54	190.81	183.09
WEEK 4	186.54	211.89	203.45	189.93	209.54	191.89	204.85	210.16	201.54	190.53
WEEK 5	196.22	216.38	214.71	202.55	221.01	194.78	215.47	225.46	206.73	203.55
WEEK 6	198.52	221.65	220.64	214.07	225.43	200.86	224.89	234.57	216.51	212.48
WEEK 7	209.07	231.42	231.86	217.37	239.25	211.58	224.08	238.21	221.23	226.35
WEEK 8	210.90	233.36	232.89	224.50	236.62	213.21	235.35	241.22	230.04	228.64
WEEK 9	212.29	235.57	231.47	224.57	245.07	220.27	236.21	250.03	232.63	237.58
WEEK 10	223.18	240.55	238.42	227.58	247.67	222.20	240.28	253.28	238.22	238.32
WEEK 11	227.37	243.86	242.34	231.10	247.80	224.09	235.57	257.71	240.41	245.90
WEEK 12	237.09	242.40	245.55	230.95	257.66	235.89	240.13	259.36	243.52	251.84
WEEK 13	230.51	244.51	244.84	231.76	255.24	232.21	241.95	259.38	247.41	257.47
GAINS ^{b)}	96.67	105.86	102.00	92.34	109.22	100.53	97.54	117.91	109.06	117.29

a) The day of first treatment was designated week 0.

b) Weight gains in the main groups are body weight difference between week 13 and the week 0.

<END>

Appendix 1–3. Individual food consumptions

FOOD CONSUMPTIONS												MALE
GROUPS		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)					
WEEKS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
0 ^{a)}	Sum	38.07	43.23	37.15	38.87	41.95	42.69	41.04	36.62	42.92	40.84	
	g / N	19.04	21.62	18.58	19.44	20.98	21.35	20.52	18.31	21.46	20.42	
1	Sum	41.06	42.86	41.60	42.53	43.73	40.79	43.83	38.62	48.23	40.71	
	g / N	20.53	21.43	20.80	21.27	21.87	20.40	21.92	19.31	24.12	20.36	
2	Sum	41.27	44.33	46.85	40.54	43.10	40.77	46.96	36.23	45.90	38.77	
	g / N	20.64	22.17	23.43	20.27	21.55	20.39	23.48	18.12	22.95	19.39	
3	Sum	39.16	42.58	46.42	39.02	43.91	39.85	47.12	41.42	44.49	35.72	
	g / N	19.58	21.29	23.21	19.51	21.95	19.93	23.56	20.71	22.25	17.86	
4	Sum	44.48	40.55	43.04	42.01	40.52	40.98	40.85	40.28	46.79	40.46	
	g / N	22.24	20.28	21.52	21.01	20.26	20.49	20.43	20.14	23.40	20.23	
5	Sum	34.59	45.32	38.58	37.11	42.21	36.03	34.22	36.51	38.49	35.59	
	g / N	17.30	22.66	19.29	18.56	21.10	18.02	17.11	18.26	19.25	17.80	
6	Sum	37.76	43.06	39.14	42.78	43.97	36.75	38.04	35.00	38.63	37.48	
	g / N	18.88	21.53	19.57	21.39	21.99	18.38	19.02	17.50	19.32	18.74	
7	Sum	32.33	38.45	39.24	37.26	41.83	35.16	37.17	35.06	40.47	37.64	
	g / N	16.17	19.23	19.62	18.63	20.92	17.58	18.59	17.53	20.24	18.82	
8	Sum	36.00	42.25	36.61	38.21	47.55	32.71	38.27	32.00	36.53	37.89	
	g / N	18.00	21.13	18.31	19.11	23.78	16.36	19.14	16.00	18.27	18.95	
9	Sum	32.76	39.23	34.74	36.72	43.52	35.50	38.47	35.87	37.48	34.85	
	g / N	16.38	19.62	17.37	18.36	21.76	17.75	19.24	17.94	18.74	17.43	
10	Sum	34.30	39.41	35.34	39.66	42.33	36.12	39.68	39.62	40.81	37.81	
	g / N	17.15	19.71	17.67	19.83	21.17	18.06	19.84	19.81	20.41	18.91	
11	Sum	36.07	41.68	38.95	35.87	40.39	34.56	36.01	34.97	40.44	32.87	
	g / N	18.04	20.84	19.48	17.94	20.19	17.28	18.01	17.49	20.22	16.44	
12	Sum	32.76	41.00	36.26	35.77	38.47	34.35	35.90	34.83	37.77	34.93	
	g / N	16.38	20.50	18.13	17.89	19.24	17.18	17.95	17.42	18.89	17.47	
13	Sum	27.66	33.59	37.33	34.83	35.53	29.64	35.43	33.85	31.09	31.02	
	g / N	13.83	16.80	18.67	17.42	17.77	14.82	17.72	16.93	15.55	15.51	

a) The day of first treatment was designated week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–3. Individual food consumptions

GROUPS		FOOD CONSUMPTIONS										MALE
WEEKS	N	G3 (2,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)					
		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
0 ^{a)}	Sum	43.28	43.60	38.76	38.33	37.67	40.31	38.65	39.89	43.66	37.39	
	g / N	21.64	21.80	19.38	19.17	18.84	20.16	19.33	19.94	21.83	18.70	
1	Sum	51.72	34.22	42.92	42.20	50.37	46.56	44.70	46.37	46.13	39.41	
	g / N	25.86	17.11	21.46	21.10	25.19	23.28	22.35	23.19	23.07	19.71	
2	Sum	51.62	42.39	41.52	43.74	45.78	43.43	42.10	40.88	46.15	36.68	
	g / N	25.81	21.20	20.76	21.87	22.89	21.72	21.05	20.44	23.08	18.34	
3	Sum	44.87	39.45	40.38	47.27	43.72	39.58	46.33	44.18	48.05	38.58	
	g / N	22.44	19.73	20.19	23.64	21.86	19.79	23.17	22.09	24.03	19.29	
4	Sum	52.86	38.70	42.30	44.21	43.50	43.99	43.53	47.22	44.82	41.28	
	g / N	26.43	19.35	21.15	22.11	21.75	22.00	21.76	23.61	22.41	20.64	
5	Sum	47.65	39.34	40.35	41.97	43.08	37.95	37.81	38.75	43.61	34.69	
	g / N	23.83	19.67	20.18	20.99	21.54	18.98	18.91	19.38	21.80	17.35	
6	Sum	39.77	49.02	43.53	39.38	40.46	43.62	44.76	43.32	44.94	36.78	
	g / N	19.89	24.51	21.77	19.69	20.23	21.81	22.38	21.66	22.47	18.39	
7	Sum	47.61	47.50	40.36	40.35	41.27	42.25	38.89	40.35	41.13	36.15	
	g / N	23.81	23.75	20.18	20.18	20.64	21.13	19.44	20.18	20.56	18.07	
8	Sum	35.27	39.24	35.00	41.11	40.02	36.52	35.00	40.82	41.69	36.02	
	g / N	17.64	19.62	17.50	20.56	20.01	18.26	17.50	20.41	20.84	18.01	
9	Sum	37.98	54.72	38.15	37.47	35.37	36.09	39.09	39.77	40.95	33.81	
	g / N	18.99	27.36	19.08	18.74	17.69	18.05	19.55	19.89	20.48	16.91	
10	Sum	46.77	39.23	41.68	39.70	43.78	41.06	40.90	40.61	26.10	39.63	
	g / N	23.39	19.62	20.84	19.85	21.89	20.53	20.45	20.31	13.05	19.81	
11	Sum	41.28	39.14	35.92	38.88	37.50	36.95	35.59	35.71	47.14	33.22	
	g / N	20.64	19.57	17.96	19.44	18.75	18.48	17.80	17.85	23.57	16.61	
12	Sum	47.36	39.87	34.12	40.51	44.13	37.07	39.76	39.83	43.57	38.03	
	g / N	23.68	19.93	17.06	20.26	22.07	18.54	19.88	19.92	21.79	19.01	
13	Sum	25.18	17.70	30.35	38.75	39.82	38.14	38.58	34.99	31.79	34.69	
	g / N	12.59	8.85	15.18	19.38	19.91	19.07	19.29	17.50	15.90	17.35	

a) The day of first treatment was designated week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–3. Individual food consumptions

FOOD CONSUMPTIONS												FEMALE
GROUPS		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)					
WEEKS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
0 ^{a)}	Sum	23.83	23.75	26.56	24.45	22.38	27.21	25.89	26.37	27.56	25.06	
	g / N	11.92	11.88	13.28	12.23	11.19	13.60	12.95	13.19	13.78	12.53	
1	Sum	21.53	22.47	23.87	25.82	24.68	23.96	23.66	24.13	24.04	26.11	
	g / N	10.77	11.24	11.94	12.91	12.34	11.98	11.83	12.07	12.02	13.06	
2	Sum	20.31	27.53	23.81	22.34	21.40	18.24	26.48	24.12	19.61	26.91	
	g / N	10.16	13.77	11.91	11.17	10.70	9.12	13.24	12.06	9.81	13.46	
3	Sum	26.72	25.31	26.51	23.74	19.09	32.22	26.71	24.13	23.91	24.13	
	g / N	13.36	12.66	13.26	11.87	9.55	16.11	13.36	12.07	11.96	12.07	
4	Sum	25.87	29.54	27.16	23.76	28.33	27.37	27.50	32.41	24.24	25.97	
	g / N	12.94	14.77	13.58	11.88	14.17	13.69	13.75	16.21	12.12	12.99	
5	Sum	24.12	24.38	21.56	24.37	23.00	22.94	28.63	21.06	23.29	24.22	
	g / N	12.06	12.19	10.78	12.19	11.50	11.47	14.32	10.53	11.65	12.11	
6	Sum	27.61	25.06	23.25	27.68	28.16	29.34	27.00	27.69	22.33	23.41	
	g / N	13.80	12.53	11.63	13.84	14.08	14.67	13.50	13.85	11.17	11.71	
7	Sum	24.53	26.40	23.04	23.35	21.06	25.20	25.31	26.01	22.70	22.94	
	g / N	12.27	13.20	11.52	11.68	10.53	12.60	12.66	13.01	11.35	11.47	
8	Sum	23.48	23.24	23.22	24.67	23.84	24.92	24.74	24.58	21.48	25.00	
	g / N	11.74	11.62	11.61	12.33	11.92	12.46	12.37	12.29	10.74	12.50	
9	Sum	23.53	23.35	22.07	21.20	19.94	26.01	23.78	26.41	19.91	25.46	
	g / N	11.77	11.68	11.04	10.60	9.97	13.01	11.89	13.21	9.95	12.73	
10	Sum	28.41	27.01	24.24	27.06	25.80	24.75	30.23	20.90	23.69	20.88	
	g / N	14.21	13.51	12.12	13.53	12.90	12.38	15.12	10.45	11.85	10.44	
11	Sum	21.23	28.08	22.99	21.38	19.66	20.91	22.23	25.82	25.09	21.68	
	g / N	10.62	14.04	11.50	10.69	9.83	10.45	11.12	12.91	12.55	10.84	
12	Sum	23.69	22.64	24.07	25.84	23.45	28.08	27.83	30.90	24.00	19.98	
	g / N	11.85	11.32	12.04	12.92	11.73	14.04	13.92	15.45	12.00	9.99	
13	Sum	22.81	18.70	21.46	22.86	20.99	21.28	22.21	25.55	19.86	22.02	
	g / N	11.41	9.35	10.73	11.43	10.50	10.64	11.11	12.78	9.93	11.01	

a) The day of first treatment was designated week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1–3. Individual food consumptions

GROUPS		FOOD CONSUMPTIONS									
		G3 (2,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)				
WEEKS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
0 ^{a)}	Sum	26.09	28.08	27.22	24.70	26.50	25.07	24.34	26.16	32.37	28.35
	g / N	13.05	14.04	13.61	12.35	13.25	12.54	12.17	13.08	16.18	14.18
1	Sum	25.10	25.69	27.37	24.95	19.98	27.27	24.40	28.04	23.16	21.23
	g / N	12.55	12.85	13.69	12.48	9.99	13.64	12.20	14.02	11.58	10.62
2	Sum	20.73	23.46	21.62	24.83	24.60	22.57	18.93	21.71	23.77	21.97
	g / N	10.37	11.73	10.81	12.42	12.30	11.29	9.47	10.86	11.89	10.99
3	Sum	24.05	26.75	19.65	26.11	24.90	23.47	25.09	24.49	23.18	22.99
	g / N	12.03	13.38	9.82	13.06	12.45	11.74	12.55	12.25	11.59	11.50
4	Sum	27.85	28.23	28.48	22.82	26.72	26.27	25.16	27.48	26.23	25.98
	g / N	13.93	14.12	14.24	11.41	13.36	13.14	12.58	13.74	13.12	12.99
5	Sum	21.40	23.78	19.94	23.58	19.71	25.63	20.37	20.54	26.22	22.26
	g / N	10.70	11.89	9.97	11.79	9.86	12.81	10.19	10.27	13.11	11.13
6	Sum	25.54	27.33	28.51	31.11	28.26	25.17	24.40	25.58	28.76	27.41
	g / N	12.77	13.67	14.26	15.56	14.13	12.59	12.20	12.79	14.38	13.71
7	Sum	20.69	23.34	20.89	26.23	24.42	23.01	24.15	20.12	24.46	25.55
	g / N	10.35	11.67	10.45	13.12	12.21	11.51	12.07	10.06	12.23	12.78
8	Sum	25.11	26.34	23.09	21.79	24.49	22.49	23.57	25.41	22.59	24.58
	g / N	12.56	13.17	11.55	10.90	12.25	11.25	11.79	12.71	11.30	12.29
9	Sum	21.06	24.38	24.30	22.63	18.76	23.59	22.72	23.78	24.99	24.28
	g / N	10.53	12.19	12.15	11.32	9.38	11.80	11.36	11.89	12.50	12.14
10	Sum	28.50	25.52	24.94	29.83	25.31	24.53	27.78	26.74	29.67	24.71
	g / N	14.25	12.76	12.47	14.92	12.66	12.27	13.89	13.37	14.84	12.36
11	Sum	15.12	17.61	20.26	27.32	22.78	19.63	20.23	21.83	21.21	27.51
	g / N	7.56	8.80	10.13	13.66	11.39	9.81	10.12	10.92	10.61	13.76
12	Sum	45.92	22.29	21.79	23.42	23.96	25.88	26.01	23.78	23.91	25.93
	g / N	22.96	11.15	10.90	11.71	11.98	12.94	13.01	11.89	11.96	12.97
13	Sum	17.16	24.11	18.30	23.16	19.62	22.07	24.20	20.46	24.46	24.12
	g / N	8.58	12.05	9.15	11.58	9.81	11.04	12.10	10.23	12.23	12.06

a) The day of first treatment was designated week 0.

<END>

Appendix 1-4. Individual water consumptions

WATER CONSUMPTIONS												MALE
GROUPS		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)					
WEEKS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
0 ^{a)}	Sum	36.81	57.36	47.03	48.35	51.48	58.97	47.04	43.84	46.38	61.12	
	g / N	18.41	28.68	23.52	24.18	25.74	29.49	23.52	21.92	23.19	30.56	
1	Sum	42.14	59.55	53.89	57.28	60.03	62.94	66.17	49.74	60.24	62.57	
	g / N	21.07	29.78	26.95	28.64	30.02	31.47	33.09	24.87	30.12	31.29	
2	Sum	37.13	60.73	51.92	46.59	50.77	58.70	58.37	42.06	54.12	51.12	
	g / N	18.57	30.37	25.96	23.30	25.39	29.35	29.19	21.03	27.06	25.56	
3	Sum	42.91	51.54	53.05	48.66	54.03	57.50	54.37	40.94	52.85	44.52	
	g / N	21.46	25.77	26.53	24.33	27.02	28.75	27.19	20.47	26.43	22.26	
4	Sum	39.70	61.46	50.22	47.22	47.05	55.92	54.57	32.61	51.40	40.00	
	g / N	19.85	30.73	25.11	23.61	23.53	27.96	27.29	16.31	25.70	20.00	
5	Sum	37.04	51.71	51.65	43.05	47.43	50.54	43.91	39.74	41.45	44.91	
	g / N	18.52	25.86	25.83	21.53	23.72	25.27	21.96	19.87	20.73	22.46	
6	Sum	52.16	59.68	46.80	54.43	54.89	52.79	57.80	37.07	50.34	46.01	
	g / N	26.08	29.84	23.40	27.22	27.45	26.40	28.90	18.54	25.17	23.01	
7	Sum	34.27	63.56	50.21	52.12	48.62	52.53	60.92	40.62	52.55	54.01	
	g / N	17.14	31.78	25.11	26.06	24.31	26.27	30.46	20.31	26.28	27.01	
8	Sum	34.69	52.76	42.65	46.92	76.39	57.58	51.46	35.66	52.95	54.19	
	g / N	17.35	26.38	21.33	23.46	38.20	28.79	25.73	17.83	26.48	27.10	
9	Sum	31.19	49.95	42.97	44.33	47.80	60.41	39.27	37.47	44.09	49.76	
	g / N	15.60	24.98	21.49	22.17	23.90	30.21	19.64	18.74	22.05	24.88	
10	Sum	39.62	52.07	47.21	49.32	48.88	51.71	46.08	44.18	50.60	48.19	
	g / N	19.81	26.04	23.61	24.66	24.44	25.86	23.04	22.09	25.30	24.10	
11	Sum	28.58	50.57	38.23	46.83	45.79	40.96	36.89	35.87	46.58	35.82	
	g / N	14.29	25.29	19.12	23.42	22.90	20.48	18.45	17.94	23.29	17.91	
12	Sum	33.08	53.89	44.69	46.46	42.25	53.00	42.46	39.49	48.66	47.59	
	g / N	16.54	26.95	22.35	23.23	21.13	26.50	21.23	19.75	24.33	23.80	
13	Sum	28.80	43.57	47.40	41.69	40.28	42.52	38.41	36.24	40.55	43.87	
	g / N	14.40	21.79	23.70	20.85	20.14	21.26	19.21	18.12	20.28	21.94	

a) The day of first treatment was designated week 0.

-: There was no animal after they had been sacrificed.

<CONTINUED>

Appendix 1-4. Individual water consumptions

GROUPS		WATER CONSUMPTIONS										MALE
WEEKS	N	G3 (2,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)					
		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
0 ^{a)}	Sum	38.03	52.91	44.00	46.82	46.43	50.80	56.66	48.23	49.72	42.24	
	g / N	19.02	26.46	22.00	23.41	23.22	25.40	28.33	24.12	24.86	21.12	
1	Sum	57.54	57.24	56.96	57.14	54.98	66.25	76.43	61.85	60.18	55.81	
	g / N	28.77	28.62	28.48	28.57	27.49	33.13	38.22	30.93	30.09	27.91	
2	Sum	48.24	51.32	56.35	60.85	54.70	57.84	62.02	58.00	55.33	48.66	
	g / N	24.12	25.66	28.18	30.43	27.35	28.92	31.01	29.00	27.67	24.33	
3	Sum	45.25	58.82	55.84	61.99	49.76	56.81	64.41	60.17	51.76	54.45	
	g / N	22.63	29.41	27.92	31.00	24.88	28.41	32.21	30.09	25.88	27.23	
4	Sum	46.15	50.54	51.98	46.01	43.95	52.96	60.16	57.58	49.44	42.40	
	g / N	23.08	25.27	25.99	23.01	21.98	26.48	30.08	28.79	24.72	21.20	
5	Sum	45.39	57.73	52.72	49.92	39.99	48.12	54.34	52.11	42.75	42.98	
	g / N	22.70	28.87	26.36	24.96	20.00	24.06	27.17	26.06	21.38	21.49	
6	Sum	46.34	60.27	55.62	66.26	45.37	49.56	67.96	58.11	54.43	54.56	
	g / N	23.17	30.14	27.81	33.13	22.69	24.78	33.98	29.06	27.22	27.28	
7	Sum	51.84	57.98	54.27	61.93	46.87	55.43	60.03	51.13	47.54	62.56	
	g / N	25.92	28.99	27.14	30.97	23.44	27.72	30.02	25.57	23.77	31.28	
8	Sum	58.27	67.35	59.98	72.76	53.54	46.94	66.24	58.75	53.46	53.67	
	g / N	29.14	33.68	29.99	36.38	26.77	23.47	33.12	29.38	26.73	26.84	
9	Sum	41.06	52.79	56.55	59.94	38.65	50.28	59.53	54.66	49.10	64.20	
	g / N	20.53	26.40	28.28	29.97	19.33	25.14	29.77	27.33	24.55	32.10	
10	Sum	50.87	50.93	57.28	62.62	46.08	48.48	61.60	62.03	49.47	60.80	
	g / N	25.44	25.47	28.64	31.31	23.04	24.24	30.80	31.02	24.74	30.40	
11	Sum	45.80	54.87	55.18	56.49	50.76	49.13	67.12	51.22	54.06	50.21	
	g / N	22.90	27.44	27.59	28.25	25.38	24.57	33.56	25.61	27.03	25.11	
12	Sum	40.99	55.88	57.93	49.58	47.24	47.52	39.54	57.78	53.22	53.88	
	g / N	20.50	27.94	28.97	24.79	23.62	23.76	19.77	28.89	26.61	26.94	
13	Sum	32.10	41.32	50.52	53.16	46.95	44.95	60.95	52.11	48.51	44.44	
	g / N	16.05	20.66	25.26	26.58	23.48	22.48	30.48	26.06	24.26	22.22	

a) The day of first treatment was designated week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-4. Individual water consumptions

WATER CONSUMPTIONS												FEMALE
GROUPS		G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)					
WEEKS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
0 ^{a)}	Sum	30.27	37.49	32.85	27.71	28.06	35.46	36.39	30.65	31.59	35.73	
	g / N	15.14	18.75	16.43	13.86	14.03	17.73	18.20	15.33	15.80	17.87	
1	Sum	30.67	32.29	30.09	39.01	34.51	33.31	34.85	28.45	31.01	43.06	
	g / N	15.34	16.15	15.05	19.51	17.26	16.66	17.43	14.23	15.51	21.53	
2	Sum	24.17	29.45	29.31	29.75	32.66	30.77	42.06	29.29	24.95	47.04	
	g / N	12.09	14.73	14.66	14.88	16.33	15.39	21.03	14.65	12.48	23.52	
3	Sum	39.47	26.01	33.96	41.55	30.31	40.23	37.99	32.84	29.32	35.07	
	g / N	19.74	13.01	16.98	20.78	15.16	20.12	19.00	16.42	14.66	17.54	
4	Sum	39.94	36.10	26.80	32.19	38.81	35.81	42.66	36.84	32.81	29.99	
	g / N	19.97	18.05	13.40	16.10	19.41	17.91	21.33	18.42	16.41	15.00	
5	Sum	36.38	34.47	39.07	33.22	35.49	43.08	45.33	37.30	32.82	35.60	
	g / N	18.19	17.24	19.54	16.61	17.75	21.54	22.67	18.65	16.41	17.80	
6	Sum	44.45	31.13	43.65	42.09	49.64	36.25	48.12	57.48	36.48	34.30	
	g / N	22.23	15.57	21.83	21.05	24.82	18.13	24.06	28.74	18.24	17.15	
7	Sum	45.46	41.93	37.12	49.89	40.69	46.43	46.39	40.64	37.17	32.81	
	g / N	22.73	20.97	18.56	24.95	20.35	23.22	23.20	20.32	18.59	16.41	
8	Sum	44.74	37.46	33.95	42.85	40.85	43.89	49.38	53.91	35.22	41.27	
	g / N	22.37	18.73	16.98	21.43	20.43	21.95	24.69	26.96	17.61	20.64	
9	Sum	34.59	32.88	33.08	38.16	34.67	41.08	47.50	40.84	29.36	31.41	
	g / N	17.30	16.44	16.54	19.08	17.34	20.54	23.75	20.42	14.68	15.71	
10	Sum	42.07	39.99	37.35	50.09	45.71	43.73	48.45	42.24	37.71	44.02	
	g / N	21.04	20.00	18.68	25.05	22.86	21.87	24.23	21.12	18.86	22.01	
11	Sum	41.78	43.25	41.34	44.08	31.40	39.43	48.01	41.44	31.78	30.46	
	g / N	20.89	21.63	20.67	22.04	15.70	19.72	24.01	20.72	15.89	15.23	
12	Sum	43.66	35.78	46.01	51.56	47.98	44.09	56.80	44.77	42.37	38.07	
	g / N	21.83	17.89	23.01	25.78	23.99	22.05	28.40	22.39	21.19	19.04	
13	Sum	39.77	35.42	38.67	50.85	41.32	33.54	44.78	47.28	35.45	35.00	
	g / N	19.89	17.71	19.34	25.43	20.66	16.77	22.39	23.64	17.73	17.50	

a) The day of first treatment was designated week 0.

<CONTINUED>

Appendix 1-4. Individual water consumptions

WATER CONSUMPTIONS												FEMALE
GROUPS		G3 (2,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)					
WEEKS	N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
0 ^{a)}	Sum	32.10	33.10	32.11	41.80	42.51	33.21	57.65	33.66	43.13	31.48	
	g / N	16.05	16.55	16.06	20.90	21.26	16.61	28.83	16.83	21.57	15.74	
1	Sum	30.60	30.38	30.62	39.70	28.73	41.01	40.22	37.50	41.12	29.32	
	g / N	15.30	15.19	15.31	19.85	14.37	20.51	20.11	18.75	20.56	14.66	
2	Sum	26.42	34.54	31.91	45.34	41.45	38.16	31.27	32.82	43.94	29.63	
	g / N	13.21	17.27	15.96	22.67	20.73	19.08	15.64	16.41	21.97	14.82	
3	Sum	31.53	39.03	32.23	43.47	44.84	39.14	42.07	40.12	44.32	33.45	
	g / N	15.77	19.52	16.12	21.74	22.42	19.57	21.04	20.06	22.16	16.73	
4	Sum	35.45	41.86	34.03	42.05	40.09	35.39	39.10	42.33	48.29	29.27	
	g / N	17.73	20.93	17.02	21.03	20.05	17.70	19.55	21.17	24.15	14.64	
5	Sum	34.94	35.22	34.03	49.62	39.53	34.97	36.77	37.21	46.77	29.37	
	g / N	17.47	17.61	17.02	24.81	19.77	17.49	18.39	18.61	23.39	14.69	
6	Sum	33.28	43.12	42.50	64.28	48.01	48.47	56.26	45.71	58.10	35.11	
	g / N	16.64	21.56	21.25	32.14	24.01	24.24	28.13	22.86	29.05	17.56	
7	Sum	33.06	46.48	43.14	60.88	49.37	44.31	45.45	35.47	50.68	48.98	
	g / N	16.53	23.24	21.57	30.44	24.69	22.16	22.73	17.74	25.34	24.49	
8	Sum	42.07	46.75	39.15	75.36	56.64	47.26	55.68	49.53	46.63	47.22	
	g / N	21.04	23.38	19.58	37.68	28.32	23.63	27.84	24.77	23.32	23.61	
9	Sum	30.05	33.76	37.98	54.33	37.33	32.93	58.32	38.45	55.71	61.87	
	g / N	15.03	16.88	18.99	27.17	18.67	16.47	29.16	19.23	27.86	30.94	
10	Sum	41.10	38.43	38.34	67.27	51.77	46.89	57.63	52.30	55.76	43.30	
	g / N	20.55	19.22	19.17	33.64	25.89	23.45	28.82	26.15	27.88	21.65	
11	Sum	28.83	33.89	36.85	65.37	52.96	45.16	42.94	40.36	53.98	40.65	
	g / N	14.42	16.95	18.43	32.69	26.48	22.58	21.47	20.18	26.99	20.33	
12	Sum	38.93	42.04	48.47	70.91	41.14	46.45	55.64	44.81	51.48	43.78	
	g / N	19.47	21.02	24.24	35.46	20.57	23.23	27.82	22.41	25.74	21.89	
13	Sum	28.53	45.61	38.79	60.20	39.92	38.70	44.38	44.00	65.95	52.51	
	g / N	14.27	22.81	19.40	30.10	19.96	19.35	22.19	22.00	32.98	26.26	

a) The day of first treatment was designated week 0.

<END>

Appendix 1–5. Individual ophthalmological examination

OPHTHALMOLOGICAL EXAMINATION						MALE
G1 (0 mg/kg/day)			G2 (800 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
1	Normal	Normal	11	Normal	Normal	
2	Normal	Normal	12	Normal	Normal	
3	Normal	Normal	13	Normal	Normal	
4	Normal	Normal	14	Normal	Normal	
5	Normal	Normal	15	Normal	Normal	
G3 (2,000 mg/kg/day)			G4 (5,000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
21	Normal	Normal	31	Normal	Normal	
22	Normal	Normal	32	Normal	Normal	
23	Normal	Normal	33	Normal	Normal	
24	Normal	Normal	34	Normal	Normal	
25	Normal	Normal	35	Normal	Normal	
						FEMALE
G1 (0 mg/kg/day)			G2 (800 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
41	Normal	Normal	51	Normal	Normal	
42	Normal	Normal	52	Normal	Normal	
43	Normal	Normal	53	Normal	Normal	
44	Normal	Normal	54	Normal	Normal	
45	Normal	Normal	55	Normal	Normal	
G3 (2,000 mg/kg/day)			G4 (5,000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	ANIMAL ID	LEFT	RIGHT	
61	Normal	Normal	71	Normal	Normal	
62	Normal	Normal	72	Normal	Normal	
63	Normal	Normal	73	Normal	Normal	
64	Normal	Normal	74	Normal	Normal	
65	Normal	Normal	75	Normal	Normal	

Appendix 1–6. Individual urinalysis

ANIMAL ID	URINALYSIS											MALE
	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO	NIT	OB	CLARITY	COLOR	VOLUME (mL)
G1 (0 mg/kg/day)												
1	-	-	-	1.010	8.0	+/-	0.1	-	-	-	Y	21
2	-	-	-	1.015	8.0	1+	0.1	-	-	-	Y	22
3	-	-	-	1.015	8.0	1+	0.1	-	-	-	Y	24
4	-	-	-	1.010	8.0	1+	0.1	+	1+	-	Y	26
5	-	-	-	1.015	7.5	2+	0.1	-	+/-	-	Y	22
G2 (800 mg/kg/day)												
11	-	-	+/-	1.020	8.0	2+	0.1	-	-	-	DY	26
12	-	-	+/-	1.015	8.0	1+	0.1	-	-	-	DY	22
13	-	-	+/-	1.020	8.0	1+	0.1	-	-	-	DY	24
14	-	-	+/-	1.020	8.5	2+	0.1	-	-	-	DY	23
15	-	-	+/-	1.020	8.0	2+	0.1	-	-	-	DY	21
G3 (2,000 mg/kg/day)												
21	-	-	+/-	1.015	8.5	2+	0.1	-	-	-	A	24
22	-	-	+/-	1.025	8.0	3+	0.1	-	+/-	-	A	28
23	-	-	-	1.025	7.5	3+	0.1	-	+/-	-	DY	46
24	-	-	1+	1.025	8.0	3+	0.1	-	-	-	DY	22
25	-	-	+/-	1.020	7.5	3+	0.1	-	-	-	DY	27
G4 (5,000 mg/kg/day)												
31	-	1+	1+	1.020	8.0	2+	0.1	+	-	-	O	20
32	-	1+	2+	1.020	8.5	2+	1.0	-	+/-	-	O	20
33	-	1+	1+	1.025	8.0	3+	0.1	-	-	-	O	20
34	-	1+	2+	1.020	8.0	2+	0.1	-	-	-	O	31
35	-	1+	3+	1.010	8.5	3+	1.0	+	1+	-	O	26

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, Y: Yellow. DY: Dark Yellow, A: Amber, O: Orange.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	OB (EA/ μ L)	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.1	Negative	Negative	Clear
+/-	1	Trace	Trace	Trace	Trace	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	\geq 1,000	Large	\geq 80	\geq 300	\geq 8.0	NA	Large	Other

NA: not applicable.

<CONTINUED>

Appendix 1–6. Individual urinalysis

ANIMAL ID	URINALYSIS											FEMALE
	GLU	BIL	KET	SG	pH	PRO	URO	NIT	OB	CLARITY	COLOR	VOLUME (mL)
G1 (0 mg/kg/day)												
41	-	-	-	≤1.005	7.5	-	0.1	-	+/-	-	Y	20
42	-	-	-	≤1.005	7.5	-	0.1	-	-	-	Y	24
43	-	-	-	1.010	8.0	-	0.1	-	-	-	Y	26
44	+/-	-	-	1.015	6.0	-	0.1	-	-	-	Y	26
45	-	-	-	1.020	8.0	-	0.1	-	-	-	Y	30
G2 (800 mg/kg/day)												
51	-	-	+/-	1.020	7.0	-	0.1	-	-	-	DY	20
52	-	-	-	1.015	8.0	-	0.1	-	-	-	DY	28
53	-	-	-	1.010	8.0	-	0.1	-	-	-	DY	28
54	-	-	+/-	1.010	8.0	-	0.1	-	-	-	DY	34
55	+/-	-	-	1.015	7.0	-	0.1	-	-	-	DY	30
G3 (2,000 mg/kg/day)												
61	-	-	+/-	1.020	8.0	-	0.1	+	-	-	A	28
62	-	-	+/-	1.015	8.0	-	0.1	-	-	-	A	19
63	-	-	+/-	1.015	8.0	-	0.1	-	-	-	DY	34
64	-	-	1+	1.020	8.0	1+	0.1	+	-	-	DY	18
65	-	-	+/-	1.020	6.5	2+	0.1	+	-	-	DY	20
G4 (5,000 mg/kg/day)												
71	-	1+	2+	1.010	8.5	+/-	0.1	+	+/-	-	A	30
72	-	-	1+	1.020	8.0	-	0.1	+	-	-	O	28
73	-	1+	2+	≤1.005	5.0	+/-	0.1	+	-	-	A	29
74	-	1+	1+	1.020	8.0	-	0.1	-	-	-	O	18
75	-	1+	2+	1.025	8.0	3+	0.1	+	+/-	-	A	21

GLU: Glucose, BIL: Bilirubin, KET: Ketone body, SG: Specific gravity, PRO: Protein, URO: Urobilinogen, NIT: Nitrite, OB: Occult blood, Y: Yellow. DY: Dark Yellow, A: Amber, O: Orange.

RESULT	GRADE	GLU (mg/dL)	BIL	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	URO (EU/dL)	NIT	OB (EA/μL)	CLARITY
-	0	Negative	Negative	Negative	Negative	0.1	Negative	Negative	Clear
+/-	1	Trace	Trace	Trace	Trace	1.0	NA	Trace	Sl. Cloudy
+	1	NA	NA	NA	NA	NA	Positive	NA	NA
1+	2	250	Small	15	30	2.0	NA	Small	Cloudy
2+	3	500	Moderate	40	100	4.0	NA	Moderate	Turbid
3+	4	≥1,000	Large	≥80	≥300	≥8.0	NA	Large	Other

NA: not applicable.

<END>

Appendix 1-7. Individual urine sediments

URINE SEDIMENTS										
MALE										
GROUPS	G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	1	2	3	4	5	11	12	13	14	15
RBC	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
WBC	1+	1+	1+	+/-	2+	1+	+/-	1+	2+	1+
EPITHELIAL CELL	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	1+	-
CASTS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GROUPS	G3 (2,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	21	22	23	24	25	31	32	33	34	35
RBC	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-
WBC	2+	1+	1+	2+	1+	1+	+/-	+/-	2+	1+
EPITHELIAL CELL	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
CASTS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FEMALE										
GROUPS	G1 (0 mg/kg/day)					G2 (800 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	41	42	43	44	45	51	52	53	54	55
RBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
EPITHELIAL CELL	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
CASTS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GROUPS	G3 (2,000 mg/kg/day)					G4 (5,000 mg/kg/day)				
ANIMAL ID	61	62	63	64	65	71	72	73	74	75
RBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WBC	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	1+
EPITHELIAL CELL	-	2+	-	-	-	2+	-	-	-	-
CASTS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Result	Grade	RBC (mean/field)	WBC (mean/field)	Epithelial Cell	Casts (mean/field)
-	0	0	0	0 / 20 fields	0
+/-	1	≤4	≤5	Few / 20 fields	1
1+	2	5-8	6-20	Around 1 / few fields	2-5
2+	3	9-30	21-50	Few / field	6-10

Appendix 1–8. Individual hematological test

HEMATOLOGICAL TEST											MALE
G1 (0 mg/kg/day)											
TESTS	UNITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RBC	10 ⁶ /μL	9.37	8.80	9.20	9.43	9.24	9.11	9.34	9.35	9.01	8.57
HCT	%	15.9	15.4	15.6	15.7	15.9	15.7	15.8	15.9	15.0	15.2
HGB	g/dL	47.7	47.2	47.8	47.7	48.0	48.8	48.1	48.8	46.9	45.5
MCV	fL	50.9	53.6	51.9	50.6	51.9	53.6	51.5	52.2	52.1	53.1
MCH	pg	17.0	17.4	16.9	16.6	17.2	17.2	16.9	17.0	16.6	17.7
MCHC	g/dL	33.4	32.5	32.6	32.8	33.1	32.1	32.9	32.5	31.9	33.4
RDW	%	12.8	12.1	12.4	12.2	12.0	12.6	11.9	12.1	12.3	12.0
HDW	g/dL	2.50	2.57	2.53	2.52	2.60	2.59	2.36	2.45	2.56	2.57
RET	%	2.27	2.33	2.64	1.97	2.01	2.38	2.04	2.48	2.46	2.45
PLT	10 ³ /μL	927	998	925	954	922	1013	875	852	999	907
MPV	fL	5.3	6.6	6.3	6.4	6.1	6.4	5.9	6.0	5.7	5.6
WBC	10 ³ /μL	10.12	7.73	8.68	10.55	6.12	7.32	9.81	8.80	8.12	7.18
NEU	%	10.6	15.7	20.1	16.0	21.5	22.6	37.9	22.8	34.5	19.1
LYM	%	83.9	77.2	72.5	78.0	72.1	71.0	55.8	71.7	59.6	76.7
MONO	%	3.1	4.5	4.9	3.8	4.0	3.7	3.4	3.6	3.9	2.3
EOS	%	1.8	1.7	1.6	0.9	2.0	2.4	2.1	1.1	1.3	1.3
BASO	%	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.2
LUC	%	0.5	0.7	0.6	1.0	0.3	0.4	0.6	0.6	0.6	0.4
PT	sec	9.30	9.15	9.15	8.70	8.85	9.45	8.85	8.85	8.10	9.45
APTT	sec	18.6	18.8	18.3	18.3	17.7	17.3	17.9	17.7	16.7	18.3
G2 (800 mg/kg/day)											
TESTS	UNITS	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
RBC	10 ⁶ /μL	9.03	9.01	9.42	9.35	9.93	9.29	9.13	8.59	9.08	8.85
HCT	%	15.1	15.9	15.4	16.0	16.3	15.9	15.6	14.0	15.6	15.5
HGB	g/dL	45.7	48.3	48.9	48.7	52.2	49.2	47.6	42.8	47.9	47.7
MCV	fL	50.7	53.6	51.8	52.1	52.5	53.0	52.2	49.8	52.8	53.9
MCH	pg	16.7	17.7	16.4	17.1	16.4	17.2	17.1	16.3	17.2	17.5
MCHC	g/dL	33.0	33.0	31.6	32.8	31.2	32.4	32.7	32.8	32.5	32.5
RDW	%	12.0	12.0	11.8	12.4	12.6	11.9	12.1	11.8	12.2	11.8
HDW	g/dL	2.37	2.38	2.32	2.46	2.37	2.50	2.52	2.28	2.48	2.38
RET	%	2.16	1.83	1.69	2.13	2.29	2.32	2.39	1.94	2.41	1.97
PLT	10 ³ /μL	978	843	999	900	857	974	951	918	912	905
MPV	fL	6.3	6.4	8.2	6.2	8.3	5.9	5.7	6.1	6.5	5.6
WBC	10 ³ /μL	9.83	6.59	7.02	5.52	7.14	7.86	11.17	6.56	9.55	7.23
NEU	%	11.1	12.2	18.9	13.0	38.0	27.9	31.4	19.1	29.0	14.7
LYM	%	81.7	84.0	72.6	80.9	57.0	66.5	63.1	75.5	66.1	80.4
MONO	%	5.1	2.3	5.8	3.8	3.1	3.7	4.0	3.4	3.8	3.1
EOS	%	1.3	1.2	2.0	1.5	1.6	1.4	1.0	1.3	0.8	1.2
BASO	%	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.2	0.2	0.2	0.1
LUC	%	0.8	0.3	0.5	0.8	0.1	0.5	0.3	0.5	0.3	0.6
PT	sec	9.00	9.9	9.45	9.45	9.30	8.85	8.40	9.45	9.00	9.15
APTT	sec	18.3	18.5	18.5	18.2	18.3	17.7	17.4	18.3	17.0	17.6

<CONTINUED>

Appendix 1–8. Individual hematological test

HEMATOLOGICAL TEST												MALE
G3 (2,000 mg/kg/day)												
TESTS	UNITS	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
RBC	10 ⁶ /μL	9.13	9.04	9.37	9.09	9.17	8.59	9.06	9.28	8.96	9.33	
HCT	%	15.1	16.1	16.3	15.9	15.5	15.2	16.0	15.6	15.7	15.8	
HGB	g/dL	46.3	49.2	49.9	48.9	46.6	45.5	48.6	48.7	47.5	48.8	
MCV	fL	50.7	54.4	53.3	53.8	50.8	53.0	53.7	52.5	53.0	52.3	
MCH	pg	16.5	17.8	17.4	17.5	16.9	17.6	17.6	16.8	17.6	16.9	
MCHC	g/dL	32.5	32.7	32.6	32.6	33.3	33.3	32.8	32.0	33.1	32.3	
RDW	%	12.5	12.3	12.9	12.4	11.8	11.9	11.9	11.7	12.3	12.3	
HDW	g/dL	2.32	2.50	2.51	2.49	2.46	2.32	2.40	2.20	2.31	2.39	
RET	%	2.07	2.31	2.61	2.54	2.00	2.54	2.55	2.14	2.30	2.69	
PLT	10 ³ /μL	904	841	890	824	824	861	813	1024	985	953	
MPV	fL	6.4	6.0	6.1	6.2	5.8	6.0	5.8	6.2	5.9	5.4	
WBC	10 ³ /μL	10.42	8.88	8.16	8.58	7.07	7.53	9.29	11.70	10.57	10.42	
NEU	%	13.5	22.1	14.7	16.9	15.7	13.1	18.1	18.6	23.0	20.9	
LYM	%	81.3	72.4	77.3	78.3	78.2	82.2	76.2	77.2	71.2	74.8	
MONO	%	3.1	4.2	5.8	2.9	4.0	3.0	4.3	2.9	4.0	2.6	
EOS	%	1.4	0.6	1.5	1.3	1.5	1.1	0.9	0.6	1.2	0.8	
BASO	%	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	
LUC	%	0.7	0.5	0.5	0.4	0.5	0.6	0.4	0.6	0.5	0.7	
PT	sec	9.00	9.30	8.70	9.15	8.85	9.15	9.15	8.70	9.45	8.55	
APTT	sec	18.8	17.6	16.8	18.0	18.0	17.7	18.8	17.7	17.9	16.8	
G4 (5,000 mg/kg/day)												
TESTS	UNITS	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
RBC	10 ⁶ /μL	8.65	8.39	8.68	9.06	9.09	8.67	9.46	8.96	8.87	9.31	
HCT	%	15.5	14.8	15.6	15.9	15.7	15.3	15.8	14.6	15.3	16.3	
HGB	g/dL	45.9	45.7	48.4	48.8	48.0	47.0	48.8	45.1	47.2	50.5	
MCV	fL	53.0	54.5	55.7	53.8	52.8	54.2	51.6	50.3	53.3	54.2	
MCH	pg	17.9	17.6	17.9	17.5	17.2	17.6	16.7	16.3	17.2	17.5	
MCHC	g/dL	33.7	32.3	32.2	32.6	32.6	32.5	32.4	32.5	32.3	32.3	
RDW	%	12.2	11.8	12.0	11.6	12.1	11.8	13.4	11.6	11.8	11.9	
HDW	g/dL	2.50	2.39	2.46	2.21	2.47	2.29	2.42	2.24	2.33	2.23	
RET	%	2.05	2.36	2.84	1.93	2.53	2.55	3.38	1.94	2.15	2.16	
PLT	10 ³ /μL	1052	857	985	922	931	960	988	896	844	769	
MPV	fL	6.7	6.7	6.5	6.3	6.3	6.2	6.0	6.3	6.4	6.0	
WBC	10 ³ /μL	9.54	6.88	9.81	5.70	5.82	6.88	10.59	7.05	6.40	9.11	
NEU	%	14.4	14.3	11.6	15.4	13.0	15.2	23.1	25.6	18.4	22.2	
LYM	%	81.1	80.7	82.5	80.4	82.4	80.0	70.4	68.5	77.2	73.0	
MONO	%	3.2	3.8	4.5	3.1	3.5	3.2	5.0	4.3	2.8	3.3	
EOS	%	0.6	0.6	0.5	0.8	0.7	1.0	0.4	0.8	1.3	0.8	
BASO	%	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.0	0.2	
LUC	%	0.5	0.5	0.7	0.3	0.3	0.6	0.9	0.8	0.3	0.4	
PT	sec	9.15	9.60	9.30	9.60	9.75	8.85	8.55	9.60	9.15	8.85	
APTT	sec	17.7	18.2	17.7	17.6	18.5	18.0	17.0	16.5	18.2	18.2	

<CONTINUED>

Appendix 1–8. Individual hematological test

		HEMATOLOGICAL TEST										FEMALE
		G1 (0 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
RBC	10 ⁶ /μL	7.62	7.85	7.81	7.76	7.48	8.30	7.91	8.14	7.50	7.77	
HCT	%	14.2	14.3	14.0	14.0	14.4	14.5	14.8	15.0	13.6	13.9	
HGB	g/dL	42.1	42.5	42.1	42.1	42.3	43.4	43.7	43.9	41.3	42.9	
MCV	fL	55.3	54.2	53.8	54.2	56.5	52.3	55.2	53.9	55.1	55.2	
MCH	pg	18.7	18.2	17.9	18.1	19.2	17.4	18.7	18.4	18.1	17.9	
MCHC	g/dL	33.8	33.6	33.3	33.3	34.1	33.4	33.8	34.1	32.9	32.5	
RDW	%	11.4	11.6	11.0	11.3	11.2	10.7	11.0	10.6	11.7	11.0	
HDW	g/dL	2.42	2.56	2.46	2.54	2.57	2.16	2.45	2.31	2.60	2.21	
RET	%	2.58	3.21	2.18	2.49	3.89	1.89	2.54	2.62	3.70	3.09	
PLT	10 ³ /μL	1086	920	883	986	975	911	989	900	1016	1131	
MPV	fL	5.4	5.4	5.5	5.8	5.8	5.4	5.7	5.6	5.8	5.6	
WBC	10 ³ /μL	7.26	3.53	3.73	3.16	4.61	2.71	5.07	5.01	3.71	3.51	
NEU	%	10.1	10.3	9.2	13.5	13.2	15.8	17.8	17.2	11.7	19.9	
LYM	%	84.4	84.2	79.9	78.7	79.7	76.2	75.4	77.6	82.2	74.9	
MONO	%	3.3	2.8	7.7	4.5	4.6	4.1	4.3	3.0	3.7	3.1	
EOS	%	1.8	2.0	2.1	2.0	1.6	3.2	1.6	1.6	1.9	1.4	
BASO	%	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	
LUC	%	0.4	0.7	0.9	1.1	0.6	0.7	0.8	0.4	0.5	0.5	
PT	sec	8.55	9.00	8.40	9.15	8.55	8.85	8.25	8.85	8.55	– ^{a)}	
APTT	sec	20.7	17.9	16.2	17.7	15.3	17.6	15.0	16.7	17.0	–	
		G2 (800 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
RBC	10 ⁶ /μL	7.58	7.64	7.85	7.46	7.71	7.95	7.60	7.76	7.72	7.89	
HCT	%	14.2	14.4	13.6	13.8	14.2	13.8	13.9	14.3	14.0	14.2	
HGB	g/dL	41.4	42.5	40.9	40.9	42.0	41.7	41.9	43.2	41.8	43.3	
MCV	fL	54.6	55.7	52.0	54.9	54.4	52.4	55.1	55.7	54.1	54.9	
MCH	pg	18.7	18.9	17.3	18.6	18.4	17.3	18.2	18.4	18.1	18.0	
MCHC	g/dL	34.2	33.9	33.2	33.8	33.7	33.0	33.1	33.1	33.5	32.8	
RDW	%	11.0	11.2	10.3	10.6	11.0	10.5	11.5	11.3	11.4	11.0	
HDW	g/dL	2.39	2.45	1.98	2.27	2.20	2.13	2.56	2.46	2.39	2.18	
RET	%	2.59	2.97	2.02	2.48	2.62	1.97	3.40	3.77	3.12	2.14	
PLT	10 ³ /μL	940	884	912	998	893	867	988	998	862	1223	
MPV	fL	5.5	5.5	5.7	5.7	5.8	5.7	5.4	5.8	5.9	5.5	
WBC	10 ³ /μL	4.82	4.12	3.26	4.05	3.60	2.59	2.77	5.11	6.26	4.30	
NEU	%	7.6	12.6	11.0	11.9	14.5	12.0	18.0	15.8	14.2	16.8	
LYM	%	87.2	82.8	81.8	82.8	79.1	83.3	76.6	79.4	80.8	77.6	
MONO	%	2.7	2.8	4.3	3.3	3.0	2.1	3.6	3.1	2.9	2.7	
EOS	%	1.8	1.1	2.1	1.5	2.7	2.1	1.2	0.8	1.1	2.2	
BASO	%	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	
LUC	%	0.5	0.6	0.6	0.4	0.5	0.4	0.4	0.7	0.9	0.6	
PT	sec	9.45	9.00	8.70	9.15	9.30	9.00	8.70	8.70	9.00	8.55	
APTT	sec	17.3	17.1	17.6	14.9	17.1	16.8	17.4	18.0	17.7	18.2	

a) Unreasonable data (clotted specimen).

<CONTINUED>

Appendix 1–8. Individual hematological test

		HEMATOLOGICAL TEST										FEMALE
		G3 (2,000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	
RBC	10 ⁶ /μL	7.78	7.46	7.75	7.29	7.65	7.66	7.80	8.45	7.88	7.80	
HCT	%	14.2	14.1	14.2	13.5	14.1	13.9	14.3	15.2	13.9	14.1	
HGB	g/dL	41.9	41.3	42.3	40.6	42.4	41.8	42.5	46.3	42.1	42.2	
MCV	fL	53.9	55.4	54.6	55.7	55.5	54.6	54.5	54.9	53.5	54.1	
MCH	pg	18.3	18.9	18.3	18.5	18.4	18.2	18.3	18.0	17.6	18.0	
MCHC	g/dL	33.9	34.0	33.6	33.3	33.1	33.3	33.7	32.8	33.0	33.3	
RDW	%	10.6	11.6	11.0	11.5	11.4	11.7	11.2	11.0	10.4	11.5	
HDW	g/dL	2.20	2.39	2.49	2.43	2.48	2.57	2.24	2.52	2.17	2.56	
RET	%	2.04	3.73	2.06	3.64	3.47	2.40	3.18	2.41	1.63	3.06	
PLT	10 ³ /μL	1037	1031	944	942	1162	818	959	1022	995	990	
MPV	fL	5.5	5.6	5.5	5.6	5.9	5.8	5.7	5.8	5.6	5.7	
WBC	10 ³ /μL	6.62	8.57	5.44	3.37	4.31	2.54	4.47	6.04	4.33	4.35	
NEU	%	8.7	30.9	6.7	13.3	15.0	16.4	11.6	11.2	12.2	12.5	
LYM	%	85.6	62.8	88.3	81.4	80.2	79.4	82.9	82.3	83.0	82.5	
MONO	%	3.4	4.4	3.1	2.8	2.9	2.4	3.9	4.1	2.4	3.1	
EOS	%	1.6	1.1	1.1	1.8	1.7	1.3	1.2	1.6	1.7	1.4	
BASO	%	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
LUC	%	0.6	0.7	0.6	0.6	0.2	0.3	0.4	0.7	0.7	0.4	
PT	sec	8.70	8.85	8.70	– ^{a)}	8.70	9.00	9.30	8.70	8.85	8.85	
APTT	sec	20.4	17.4	17.7	–	17.7	16.5	17.1	18.5	18.3	16.2	
		G4 (5,000 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
RBC	10 ⁶ /μL	8.08	7.54	7.50	7.51	8.10	7.74	7.58	7.93	7.67	7.38	
HCT	%	13.2	14.1	13.8	14.1	14.4	13.7	14.0	14.3	13.9	14.0	
HGB	g/dL	39.9	41.3	41.4	42.1	44.6	42.4	42.0	42.9	41.9	42.4	
MCV	fL	49.3	54.7	55.2	56.0	55.1	54.7	55.4	54.1	54.7	57.5	
MCH	pg	16.4	18.7	18.4	18.8	17.8	17.7	18.5	18.1	18.2	19.0	
MCHC	g/dL	33.2	34.3	33.3	33.5	32.3	32.3	33.4	33.5	33.3	33.0	
RDW	%	11.5	10.9	11.1	11.1	10.7	10.7	11.1	10.8	11.0	11.0	
HDW	g/dL	2.05	2.29	2.46	2.32	2.19	2.19	2.42	2.42	2.37	2.34	
RET	%	2.36	3.88	2.89	3.05	2.50	2.28	3.02	2.47	2.64	3.68	
PLT	10 ³ /μL	1157	985	986	986	931	1106	1043	932	1015	858	
MPV	fL	5.7	5.6	5.7	5.5	5.9	5.9	5.5	5.4	5.4	5.6	
WBC	10 ³ /μL	6.07	5.08	5.43	4.25	4.44	4.52	4.14	5.35	6.18	4.70	
NEU	%	8.8	11.1	8.9	7.2	8.5	10.2	20.1	12.9	7.0	10.9	
LYM	%	86.9	83.6	86.7	88.1	86.0	84.8	74.9	79.6	85.7	84.3	
MONO	%	2.4	3.0	2.4	2.6	3.3	3.1	4.0	4.6	4.9	3.0	
EOS	%	1.0	1.7	1.2	1.1	1.8	1.3	0.7	1.7	0.8	1.1	
BASO	%	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	
LUC	%	0.8	0.4	0.7	0.8	0.3	0.5	0.3	1.0	1.6	0.5	
PT	sec	9.15	8.85	8.70	9.60	8.70	8.25	8.85	8.55	8.85	8.70	
APTT	sec	18.5	18.8	20.0	15.6	17.4	18.5	15.8	18.2	17.3	17.0	

a) Unreasonable data (clotted specimen).

<END>

Appendix 1–9. Individual clinical biochemistry test

CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST											MALE
G1 (0 mg/kg/day)											
TESTS	UNITS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AST	U/L	77.5	80.1	130.9	74.0	96.2	99.7	104.4	100.4	128.7	91.2
ALT	U/L	38.8	44.4	53.9	41.2	57.4	55.4	50.2	55.1	78.0	52.3
ALP	U/L	78.0	85.4	98.9	44.6	47.8	68.8	96.8	68.5	100.6	73.5
CPK	U/L	99	83	99	58	75	93	119	178	131	60
TBIL	mg/dL	0.20	0.16	0.22	0.18	0.17	0.16	0.17	0.16	0.26	0.17
GLU	mg/dL	136.6	148.4	139.6	157.2	144.4	126.8	141.3	105.4	139.9	110.3
TCHO	mg/dL	111	89	92	110	103	83	90	89	145	97
TG	mg/dL	53	50	63	40	44	45	38	31	45	35
TP	g/dL	6.46	6.07	6.26	6.11	5.89	6.06	6.19	5.79	6.46	5.99
ALB	g/dL	3.15	2.99	3.08	2.97	2.93	3.11	3.07	2.93	3.08	3.03
A/G	ratio	0.95	0.97	0.97	0.95	0.99	1.05	0.98	1.02	0.91	1.02
BUN	mg/dL	12.5	14.3	13.7	14.4	14.6	11.7	12.8	14.5	14.4	12.4
CRE	mg/dL	0.39	0.13	0.19	0.35	0.29	0.39	0.41	0.38	0.43	0.41
IP	mg/dL	5.87	6.01	5.90	5.41	5.51	5.41	5.49	5.73	6.01	5.67
Ca ²⁺	mg/dL	10.41	9.92	7.85	10.01	9.78	9.64	9.71	9.68	10.23	9.56
Na ⁺	mmol/L	140.1	140.3	141.4	140.8	141.4	142.6	142.2	141.3	141.2	141.7
K ⁺	mmol/L	4.43	4.75	4.30	4.07	4.29	4.38	4.34	4.78	4.87	4.46
Cl ⁻	mmol/L	102.1	102.6	101.9	100.6	102.1	104.2	101.5	102.9	102.4	104.8
G2 (800 mg/kg/day)											
TESTS	UNITS	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
AST	U/L	84.1	91.7	97.5	72.0	127.0	91.1	93.7	84.1	85.8	82.0
ALT	U/L	50.1	43.4	51.6	37.5	59.7	52.2	58.6	38.9	41.8	45.9
ALP	U/L	80.3	101.1	100.6	91.1	82.6	99.3	89.3	82.1	68.7	84.0
CPK	U/L	93	104	59	73	170	133	102	72	77	52
TBIL	mg/dL	0.18	0.18	0.16	0.17	0.18	0.18	0.19	0.18	0.17	0.18
GLU	mg/dL	130.0	119.0	138.1	135.7	121.9	128.7	124.7	126.6	121.3	121.9
TCHO	mg/dL	104	75	82	76	88	97	116	86	86	80
TG	mg/dL	46	37	63	36	39	46	49	51	56	38
TP	g/dL	5.93	6.04	5.84	6.02	6.29	6.05	5.94	5.81	6.03	5.91
ALB	g/dL	2.97	3.03	2.93	3.06	3.07	2.99	3.00	2.90	3.06	2.99
A/G	ratio	1.00	1.01	1.01	1.03	0.95	0.98	1.02	1.00	1.03	1.02
BUN	mg/dL	14.3	13.8	13.8	11.3	12.1	16.8	13.3	13.9	11.2	12.0
CRE	mg/dL	0.23	0.43	0.41	0.40	0.40	0.27	0.39	0.20	0.37	0.42
IP	mg/dL	5.85	5.86	5.73	6.10	5.40	5.58	5.61	5.71	5.81	5.81
Ca ²⁺	mg/dL	9.81	9.57	9.74	9.91	9.66	9.64	9.89	9.64	9.80	9.61
Na ⁺	mmol/L	141.6	143.9	142.0	141.8	142.7	142.6	141.6	141.4	141.7	142.2
K ⁺	mmol/L	4.27	4.50	4.50	4.47	4.68	4.65	4.77	4.36	4.50	4.12
Cl ⁻	mmol/L	101.7	102.2	101.9	102.1	102.6	102.0	102.6	102.8	101.8	102.9

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual clinical biochemistry test

CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST											MALE
G3 (2,000 mg/kg/day)											
TESTS	UNITS	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
AST	U/L	73.5	78.4	73.8	84.0	106.8	95.6	123.5	65.8	83.2	102.0
ALT	U/L	32.7	36.3	41.9	53.8	51.3	49.0	66.0	32.4	36.4	66.7
ALP	U/L	70.7	77.6	80.8	87.1	83.8	74.7	61.2	77.3	83.9	83.1
CPK	U/L	111	59	126	114	160	162	108	54	62	100
TBIL	mg/dL	0.17	0.19	0.18	0.17	0.16	0.19	0.19	0.17	0.18	0.18
GLU	mg/dL	177.5	138.4	141.9	131.7	124.5	108.8	148.2	123.9	140.5	129.9
TCHO	mg/dL	89	99	148	104	95	91	93	93	74	97
TG	mg/dL	96	53	75	35	52	44	49	38	65	46
TP	g/dL	6.04	6.14	6.09	6.04	5.83	5.95	6.27	5.92	6.08	6.16
ALB	g/dL	2.97	2.96	2.82	2.95	2.84	3.00	3.06	2.92	3.03	2.97
A/G	ratio	0.97	0.93	0.86	0.95	0.95	1.02	0.95	0.97	0.99	0.93
BUN	mg/dL	12.6	12.6	16.8	16.9	16.5	14.8	14.9	14.6	13.0	15.2
CRE	mg/dL	0.44	0.45	0.54	0.47	0.48	0.40	0.41	0.39	0.44	0.17
IP	mg/dL	5.60	5.71	6.30	5.63	6.05	5.84	6.15	5.89	6.16	5.86
Ca ²⁺	mg/dL	9.63	9.70	10.17	9.77	9.62	9.93	9.91	9.85	9.84	9.94
Na ⁺	mmol/L	141.6	140.2	141.1	141.1	141.4	141.8	142.2	142.1	141.9	140.5
K ⁺	mmol/L	4.68	4.59	5.33	4.54	4.59	4.44	4.66	4.65	4.77	4.81
Cl ⁻	mmol/L	101.4	100.9	100.5	101.0	102.3	102.7	101.9	103.9	101.1	100.9
G4 (5,000 mg/kg/day)											
TESTS	UNITS	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
AST	U/L	131.4	59.4	76.9	148.2	79.5	67.5	91.6	88.3	71.3	82.6
ALT	U/L	51.1	41.7	47.6	73.2	39.0	40.9	47.8	38.1	48.1	62.8
ALP	U/L	65.4	55.1	93.2	92.9	81.8	84.3	102.2	91.8	68.1	71.1
CPK	U/L	113	76	121	105	94	83	107	74	59	94
TBIL	mg/dL	0.22	0.18	0.19	0.21	0.19	0.18	0.16	0.19	0.19	0.17
GLU	mg/dL	134.6	137.2	116.7	123.1	125.3	142.4	127.6	117.9	133.6	119.6
TCHO	mg/dL	69	55	71	73	56	88	113	77	73	84
TG	mg/dL	40	33	42	33	29	44	75	35	31	44
TP	g/dL	5.86	5.54	5.92	5.76	6.13	6.08	5.96	6.06	5.64	5.82
ALB	g/dL	3.00	2.86	3.07	2.90	3.15	3.01	2.83	3.04	2.88	2.90
A/G	ratio	1.05	1.07	1.08	1.01	1.06	0.98	0.90	1.01	1.04	0.99
BUN	mg/dL	14.3	11.1	13.7	12.2	11.2	12.8	15.3	12.2	11.8	13.8
CRE	mg/dL	0.11	0.38	0.19	0.18	0.35	0.37	0.44	0.41	0.37	0.39
IP	mg/dL	6.83	6.04	6.21	5.79	6.19	5.86	6.76	5.39	7.02	5.91
Ca ²⁺	mg/dL	7.46	9.52	9.81	9.63	9.68	9.78	9.99	9.37	9.75	9.59
Na ⁺	mmol/L	138.7	139.7	140.3	141.2	141.0	141.0	139.5	141.3	140.9	140.5
K ⁺	mmol/L	4.76	4.59	4.71	4.82	5.04	4.98	5.20	4.50	4.59	4.59
Cl ⁻	mmol/L	99.6	102.6	101.1	101.6	102.5	102.6	99.8	102.1	102.5	101.6

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual clinical biochemistry test

		CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST										FEMALE
		G1 (0 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
AST	U/L	92.7	77.8	76.1	84.9	101.6	92.4	82.6	79.0	83.3	70.8	
ALT	U/L	37.9	37.3	34.2	31.2	50.4	39.3	45.6	29.6	34.2	34.9	
ALP	U/L	53.8	58.5	50.9	57.2	77.7	61.1	51.7	73.2	43.1	42.1	
CPK	U/L	142	82	71	66	70	53	57	180	128	87	
TBIL	mg/dL	0.26	0.22	0.22	0.19	0.21	0.19	0.16	0.20	0.23	0.21	
GLU	mg/dL	111.1	132.0	115.9	103.0	104.4	103.0	110.2	121.9	104.0	94.2	
TCHO	mg/dL	81	73	101	89	90	71	89	73	103	87	
TG	mg/dL	24	27	31	27	33	22	28	29	26	29	
TP	g/dL	5.97	5.36	5.46	5.55	5.77	5.80	5.71	5.88	5.83	5.51	
ALB	g/dL	2.83	2.89	2.86	3.04	2.78	3.01	2.96	3.07	3.14	2.80	
A/G	ratio	0.90	1.17	1.10	1.21	0.93	1.08	1.08	1.09	1.17	1.03	
BUN	mg/dL	26.4	17.5	19.0	21.9	15.7	14.8	19.9	16.3	16.1	14.5	
CRE	mg/dL	0.71	0.53	0.61	0.64	0.36	0.42	0.52	0.56	0.54	0.47	
IP	mg/dL	5.55	4.63	5.04	4.90	5.18	5.09	5.13	4.74	6.08	5.36	
Ca ²⁺	mg/dL	9.94	9.64	9.71	9.60	9.86	9.63	9.52	9.36	9.65	9.40	
Na ⁺	mmol/L	141.2	141.8	140.9	141.6	140.4	141.5	139.1	140.8	141.6	140.3	
K ⁺	mmol/L	4.12	4.17	4.15	4.03	3.87	3.99	4.06	4.11	4.20	4.21	
Cl ⁻	mmol/L	104.8	106.4	104.5	106.5	104.1	105.1	105.7	105.3	105.0	105.1	
		G2 (800 mg/kg/day)										
TESTS	UNITS	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
AST	U/L	72.1	72.9	80.7	109.1	70.1	79.0	98.0	81.1	86.2	85.2	
ALT	U/L	35.1	33.4	29.1	31.6	31.3	42.7	33.3	30.8	30.1	35.5	
ALP	U/L	47.2	56.1	43.9	62.2	65.3	59.1	45.6	36.1	52.1	38.7	
CPK	U/L	103	106	121	163	64	68	134	143	144	101	
TBIL	mg/dL	0.22	0.25	0.19	0.19	0.17	0.19	0.24	0.21	0.25	0.20	
GLU	mg/dL	111.8	116.4	112.7	108.2	112.2	103.7	97.4	101.5	105.0	93.6	
TCHO	mg/dL	64	96	85	58	58	83	98	111	77	95	
TG	mg/dL	31	43	39	25	26	29	30	33	22	37	
TP	g/dL	5.48	5.80	5.42	5.72	5.54	5.87	6.17	5.88	5.90	5.98	
ALB	g/dL	2.95	3.08	2.90	2.97	2.95	3.07	3.26	3.09	2.99	3.13	
A/G	ratio	1.17	1.13	1.15	1.08	1.14	1.10	1.12	1.11	1.03	1.10	
BUN	mg/dL	16.3	15.9	15.6	14.4	13.8	13.0	15.1	13.4	15.3	14.1	
CRE	mg/dL	0.54	0.12	0.40	0.57	0.53	0.49	0.57	0.51	0.55	0.48	
IP	mg/dL	4.89	5.24	4.68	5.35	4.58	4.11	5.22	5.11	6.14	5.65	
Ca ²⁺	mg/dL	9.39	9.69	9.38	9.19	9.46	9.09	9.60	9.35	9.80	9.48	
Na ⁺	mmol/L	140.6	141.3	140.4	140.5	141.8	140.3	141.9	139.6	141.4	140.7	
K ⁺	mmol/L	4.00	4.22	3.98	4.44	4.02	3.89	3.97	4.20	4.18	4.25	
Cl ⁻	mmol/L	103.7	103.6	104.1	104.6	105.9	105.8	105.3	103.5	103.5	105.3	

<CONTINUED>

Appendix 1–9. Individual clinical biochemistry test

CLINICAL BIOCHEMISTRY TEST											FEMALE
G3 (2,000 mg/kg/day)											
TESTS	UNITS	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
AST	U/L	61.3	80.4	62.6	62.9	82.8	76.5	89.0	126.8	90.0	71.9
ALT	U/L	28.7	34.2	37.3	27.8	40.0	29.1	37.1	43.9	37.2	30.6
ALP	U/L	49.1	61.2	35.6	46.4	38.4	81.7	41.7	51.6	49.6	45.3
CPK	U/L	83	72	65	121	76	76	188	203	139	50
TBIL	mg/dL	0.26	0.25	0.21	0.23	0.20	0.21	0.25	0.22	0.20	0.26
GLU	mg/dL	111.8	136.1	110.7	121.4	124.2	107.0	103.3	98.4	97.9	111.8
TCHO	mg/dL	105	93	86	88	83	67	69	110	52	86
TG	mg/dL	36	27	22	29	36	23	23	24	21	23
TP	g/dL	6.41	5.95	5.95	6.27	6.04	5.50	5.83	6.03	5.55	6.02
ALB	g/dL	3.41	3.15	3.14	3.29	3.21	3.00	3.01	3.09	3.03	3.13
A/G	ratio	1.14	1.13	1.12	1.10	1.13	1.20	1.07	1.05	1.20	1.08
BUN	mg/dL	15.7	17.3	14.1	16.0	16.8	14.1	14.7	16.1	14.8	13.8
CRE	mg/dL	0.42	0.55	0.55	0.56	0.53	0.49	0.45	0.53	0.49	0.54
IP	mg/dL	5.45	4.65	5.22	5.02	5.13	4.74	6.19	5.79	6.46	5.87
Ca ²⁺	mg/dL	10.08	9.68	9.76	9.54	9.50	9.24	9.51	9.68	9.45	9.65
Na ⁺	mmol/L	139.1	138.2	140.8	138.9	139.1	140.1	140.1	141.0	140.1	140.8
K ⁺	mmol/L	4.03	4.30	3.84	4.39	4.15	3.97	4.38	4.43	3.96	4.08
Cl ⁻	mmol/L	102.6	103.4	103.4	103.4	103.9	106.6	103.5	103.6	103.3	104.4
G4 (5,000 mg/kg/day)											
TESTS	UNITS	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
AST	U/L	70.4	71.7	63.6	69.4	85.7	77.4	112.4	71.6	85.1	67.9
ALT	U/L	37.2	29.4	27.7	37.1	33.8	40.9	35.8	30.9	46.9	27.7
ALP	U/L	47.6	44.2	34.6	57.6	57.8	49.0	56.3	35.0	54.4	37.0
CPK	U/L	78	108	56	64	45	57	161	88	85	71
TBIL	mg/dL	0.24	0.24	0.23	0.21	0.24	0.25	0.25	0.23	0.21	0.25
GLU	mg/dL	105.4	104.8	102.4	104.4	113.3	110.2	87.1	87.9	87.2	110.6
TCHO	mg/dL	93	89	96	51	83	95	88	118	109	95
TG	mg/dL	61	36	45	28	23	24	36	28	29	23
TP	g/dL	6.02	6.17	6.20	5.71	6.19	5.73	5.92	6.01	5.61	5.81
ALB	g/dL	3.05	3.14	3.27	3.04	3.25	2.97	3.04	3.02	2.89	3.08
A/G	ratio	1.03	1.04	1.12	1.14	1.11	1.08	1.06	1.01	1.06	1.13
BUN	mg/dL	19.6	14.9	12.3	14.5	15.8	13.2	17.4	13.6	18.5	15.4
CRE	mg/dL	0.16	0.32	0.53	0.57	0.55	0.47	0.51	0.50	0.53	0.47
IP	mg/dL	5.85	5.58	4.83	5.69	5.12	6.16	5.75	5.78	6.17	5.95
Ca ²⁺	mg/dL	9.99	10.01	9.71	9.48	10.04	9.71	9.62	9.77	9.58	9.69
Na ⁺	mmol/L	137.8	138.4	139.2	140.4	140.1	139.0	141.0	138.9	138.8	139.8
K ⁺	mmol/L	4.39	4.11	4.18	4.58	3.99	3.72	4.74	4.35	4.09	4.56
Cl ⁻	mmol/L	102.5	100.9	103.4	104.5	103.1	103.7	104.8	103.0	102.5	104.3

<END>

Appendix 1–10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
G1 (0 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	1	2	3	4	5	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	446.07	395.84	415.92	433.16	399.82	
ADRENAL GLAND–LEFT	0.0226	0.0215	0.0348	0.0215	0.0266	
% to BODY WEIGHT	0.0051	0.0054	0.0084	0.0050	0.0067	
ADRENAL GLAND–RIGHT	0.0206	0.0203	0.0298	0.0218	0.0250	
% to BODY WEIGHT	0.0046	0.0051	0.0072	0.0050	0.0063	
PITUITARY GLAND	0.0114	0.0112	0.0156	0.0093	0.0114	
% to BODY WEIGHT	0.0026	0.0028	0.0038	0.0021	0.0029	
THYMUS	0.4415	0.2519	0.2590	0.2861	0.2318	
% to BODY WEIGHT	0.0990	0.0636	0.0623	0.0660	0.0580	
PROSTATE GLAND	0.3391	0.0507	0.5168	0.7411	0.5228	
% to BODY WEIGHT	0.0760	0.0128	0.1243	0.1711	0.1308	
TESTIS–LEFT	1.7841	2.1556	2.0730	2.1920	1.8150	
% to BODY WEIGHT	0.4000	0.5446	0.4984	0.5060	0.4540	
TESTIS–RIGHT	1.8093	2.1607	2.0269	2.0861	1.7347	
% to BODY WEIGHT	0.4056	0.5459	0.4873	0.4816	0.4339	
EPIDIDYMIS–LEFT	0.5767	0.6824	0.6856	0.7136	0.6700	
% to BODY WEIGHT	0.1293	0.1724	0.1648	0.1647	0.1676	
EPIDIDYMIS–RIGHT	0.5736	0.7226	0.7418	0.7195	0.6780	
% to BODY WEIGHT	0.1286	0.1825	0.1784	0.1661	0.1696	
SPLEEN	0.6561	0.6506	0.9181	0.8890	0.6961	
% to BODY WEIGHT	0.1471	0.1644	0.2207	0.2052	0.1741	
KIDNEY–LEFT	1.1891	1.1781	1.3811	1.4008	1.2721	
% to BODY WEIGHT	0.2666	0.2976	0.3321	0.3234	0.3182	
KIDNEY–RIGHT	1.2485	1.2755	1.3931	1.4170	1.2938	
% to BODY WEIGHT	0.2799	0.3222	0.3349	0.3271	0.3236	
HEART	1.4915	1.3880	1.2979	1.4368	1.3115	
% to BODY WEIGHT	0.3344	0.3506	0.3121	0.3317	0.3280	
LUNG	1.7715	1.6322	1.8474	1.8411	1.6977	
% to BODY WEIGHT	0.3971	0.4123	0.4442	0.4250	0.4246	
BRAIN	1.8015	1.8771	1.9923	1.9679	1.8957	
% to BODY WEIGHT	0.4039	0.4742	0.4790	0.4543	0.4741	
LIVER	10.2324	10.1667	10.9291	10.9807	10.9777	
% to BODY WEIGHT	2.2939	2.5684	2.6277	2.5350	2.7457	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
G1 (0 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	6	7	8	9	10	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	400.78	423.02	399.16	511.87	422.26	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0201	0.0268	0.0258	0.0372	0.0273	
% to BODY WEIGHT	0.0050	0.0063	0.0065	0.0073	0.0065	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0204	0.0251	0.0278	0.0359	0.0263	
% to BODY WEIGHT	0.0051	0.0059	0.0070	0.0070	0.0062	
PITUITARY GLAND	0.0111	0.0129	0.0147	0.0159	0.0123	
% to BODY WEIGHT	0.0028	0.0030	0.0037	0.0031	0.0029	
THYMUS	0.3387	0.2501	0.2605	0.3132	0.3419	
% to BODY WEIGHT	0.0845	0.0591	0.0653	0.0612	0.0810	
PROSTATE GLAND	0.6020	0.5794	0.6332	0.5088	0.6092	
% to BODY WEIGHT	0.1502	0.1370	0.1586	0.0994	0.1443	
TESTIS-LEFT	2.0114	2.0935	1.7274	2.0477	2.0393	
% to BODY WEIGHT	0.5019	0.4949	0.4328	0.4000	0.4829	
TESTIS-RIGHT	1.9623	2.0941	1.9835	1.9294	2.1621	
% to BODY WEIGHT	0.4896	0.4950	0.4969	0.3769	0.5120	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.7184	0.6709	0.6540	0.7674	0.7335	
% to BODY WEIGHT	0.1793	0.1586	0.1638	0.1499	0.1737	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.7394	0.6878	0.7108	0.7295	0.6920	
% to BODY WEIGHT	0.1845	0.1626	0.1781	0.1425	0.1639	
SPLEEN	0.6477	0.7832	0.8942	0.9946	0.8020	
% to BODY WEIGHT	0.1616	0.1851	0.2240	0.1943	0.1899	
KIDNEY-LEFT	1.2140	1.2888	1.4082	1.5593	1.1420	
% to BODY WEIGHT	0.3029	0.3047	0.3528	0.3046	0.2704	
KIDNEY-RIGHT	1.2042	1.4487	1.4492	1.6559	1.2246	
% to BODY WEIGHT	0.3005	0.3425	0.3631	0.3235	0.2900	
HEART	1.3509	1.4043	1.5612	1.8764	1.3187	
% to BODY WEIGHT	0.3371	0.3320	0.3911	0.3666	0.3123	
LUNG	1.6521	1.6874	1.7803	2.0156	1.7675	
% to BODY WEIGHT	0.4122	0.3989	0.4460	0.3938	0.4186	
BRAIN	1.9805	1.9666	1.9328	2.1325	2.0239	
% to BODY WEIGHT	0.4942	0.4649	0.4842	0.4166	0.4793	
LIVER	10.1646	11.4005	11.0148	14.2297	9.7184	
% to BODY WEIGHT	2.5362	2.6950	2.7595	2.7799	2.3015	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						MALE
G2 (800 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	11	12	13	14	15	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	431.61	415.03	447.81	427.02	386.11	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0336	0.0276	0.0266	0.0251	0.0286	
% to BODY WEIGHT	0.0078	0.0067	0.0059	0.0059	0.0074	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0256	0.0261	0.0255	0.0249	0.0281	
% to BODY WEIGHT	0.0059	0.0063	0.0057	0.0058	0.0073	
PITUITARY GLAND	0.0139	0.0142	0.0115	0.0130	0.0140	
% to BODY WEIGHT	0.0032	0.0034	0.0026	0.0030	0.0036	
THYMUS	0.3151	0.2174	0.2677	0.2146	0.2174	
% to BODY WEIGHT	0.0730	0.0524	0.0598	0.0503	0.0563	
PROSTATE GLAND	0.5424	0.4701	0.3762	0.4734	0.6374	
% to BODY WEIGHT	0.1257	0.1133	0.0840	0.1109	0.1651	
TESTIS-LEFT	-	2.0006	1.9581	2.0831	1.9211	
% to BODY WEIGHT	-	0.4820	0.4373	0.4878	0.4976	
TESTIS-RIGHT	2.3439	1.9556	1.9085	2.1756	1.9750	
% to BODY WEIGHT	0.5431	0.4712	0.4262	0.5095	0.5115	
EPIDIDYMIS-LEFT	0.4658	0.6646	0.6511	0.7569	0.7751	
% to BODY WEIGHT	0.1079	0.1601	0.1454	0.1773	0.2007	
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.8284	0.7197	0.6880	0.7613	0.6645	
% to BODY WEIGHT	0.1919	0.1734	0.1536	0.1783	0.1721	
SPLEEN	0.7719	0.6718	0.7563	0.6236	0.5338	
% to BODY WEIGHT	0.1788	0.1619	0.1689	0.1460	0.1383	
KIDNEY-LEFT	1.2651	1.2871	1.2765	1.2833	1.2327	
% to BODY WEIGHT	0.2931	0.3101	0.2851	0.3005	0.3193	
KIDNEY-RIGHT	1.2951	1.2516	1.4136	1.3194	1.2831	
% to BODY WEIGHT	0.3001	0.3016	0.3157	0.3090	0.3323	
HEART	1.4238	1.4197	1.3833	1.5002	1.1532	
% to BODY WEIGHT	0.3299	0.3421	0.3089	0.3513	0.2987	
LUNG	1.8271	1.6988	1.7519	1.6776	1.6353	
% to BODY WEIGHT	0.4233	0.4093	0.3912	0.3929	0.4235	
BRAIN	2.0894	2.0242	1.9590	2.0157	1.9300	
% to BODY WEIGHT	0.4841	0.4877	0.4375	0.4720	0.4999	
LIVER	11.3321	9.8498	10.9816	10.2487	9.9312	
% to BODY WEIGHT	2.6255	2.3733	2.4523	2.4001	2.5721	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

-: Absence.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
G2 (800 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	16	17	18	19	20
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	415.24	437.99	446.48	418.00	398.74
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0244	0.0299	0.0283	0.0310	0.0265
% to BODY WEIGHT	0.0059	0.0068	0.0063	0.0074	0.0066
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0232	0.0268	0.0266	0.0269	0.0281
% to BODY WEIGHT	0.0056	0.0061	0.0060	0.0064	0.0070
PITUITARY GLAND	0.0114	0.0129	0.0134	0.0133	0.0115
% to BODY WEIGHT	0.0027	0.0029	0.0030	0.0032	0.0029
THYMUS	0.3123	0.2888	0.4555	0.4116	0.3130
% to BODY WEIGHT	0.0752	0.0659	0.1020	0.0985	0.0785
PROSTATE GLAND	0.6204	1.0021	0.6484	0.6964	0.8758
% to BODY WEIGHT	0.1494	0.2288	0.1452	0.1666	0.2196
TESTIS-LEFT	2.0267	1.9616	1.9861	1.9357	1.9235
% to BODY WEIGHT	0.4881	0.4479	0.4448	0.4631	0.4824
TESTIS-RIGHT	2.1352	1.9593	2.0507	1.9333	1.9329
% to BODY WEIGHT	0.5142	0.4473	0.4593	0.4625	0.4848
EPIDIDYMIS-LEFT	0.7252	0.7788	0.7577	0.6548	0.6043
% to BODY WEIGHT	0.1746	0.1778	0.1697	0.1567	0.1516
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.7773	0.7431	0.7963	0.7031	0.6517
% to BODY WEIGHT	0.1872	0.1697	0.1784	0.1682	0.1634
SPLEEN	0.7396	0.8762	0.7781	0.7391	0.6840
% to BODY WEIGHT	0.1781	0.2001	0.1743	0.1768	0.1715
KIDNEY-LEFT	1.4010	1.3362	1.4219	1.3020	1.1145
% to BODY WEIGHT	0.3374	0.3051	0.3185	0.3115	0.2795
KIDNEY-RIGHT	1.4096	1.4477	1.2417	1.3363	1.1798
% to BODY WEIGHT	0.3395	0.3305	0.2781	0.3197	0.2959
HEART	1.4354	1.5775	1.5520	1.5106	1.1449
% to BODY WEIGHT	0.3457	0.3602	0.3476	0.3614	0.2871
LUNG	1.6546	1.9152	1.7921	1.8903	1.7458
% to BODY WEIGHT	0.3985	0.4373	0.4014	0.4522	0.4378
BRAIN	2.0402	2.0506	1.9432	1.9085	1.9477
% to BODY WEIGHT	0.4913	0.4682	0.4352	0.4566	0.4885
LIVER	10.9596	12.4315	11.2601	10.5681	10.3317
% to BODY WEIGHT	2.6393	2.8383	2.5220	2.5283	2.5911

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
G3 (2,000 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	21	22	23	24	25
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	551.33	445.66	524.65	395.83	457.15
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0309	0.0317	0.0288	0.0325	0.0260
% to BODY WEIGHT	0.0056	0.0071	0.0055	0.0082	0.0057
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0280	0.0301	0.0308	0.0268	0.0262
% to BODY WEIGHT	0.0051	0.0068	0.0059	0.0068	0.0057
PITUITARY GLAND	0.0138	0.0140	0.0161	0.0120	0.0112
% to BODY WEIGHT	0.0025	0.0031	0.0031	0.0030	0.0024
THYMUS	0.4544	0.3108	0.2884	0.2396	0.2767
% to BODY WEIGHT	0.0824	0.0697	0.0550	0.0605	0.0605
PROSTATE GLAND	0.3767	0.5536	0.5578	0.6408	0.7907
% to BODY WEIGHT	0.0683	0.1242	0.1063	0.1619	0.1730
TESTIS-LEFT	2.0868	2.2483	2.2972	1.8128	1.8348
% to BODY WEIGHT	0.3785	0.5045	0.4379	0.4580	0.4014
TESTIS-RIGHT	2.1345	2.1853	2.3862	1.8187	1.8223
% to BODY WEIGHT	0.3872	0.4904	0.4548	0.4595	0.3986
EPIDIDYMIS-LEFT	0.6790	0.7726	0.7871	0.7071	0.7231
% to BODY WEIGHT	0.1232	0.1734	0.1500	0.1786	0.1582
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.7288	0.7503	0.8423	0.6710	0.7721
% to BODY WEIGHT	0.1322	0.1684	0.1605	0.1695	0.1689
SPLEEN	0.7774	0.9120	1.0869	0.7553	0.8063
% to BODY WEIGHT	0.1410	0.2046	0.2072	0.1908	0.1764
KIDNEY-LEFT	1.4480	1.4945	1.4575	1.2059	1.3928
% to BODY WEIGHT	0.2626	0.3353	0.2778	0.3047	0.3047
KIDNEY-RIGHT	1.4344	1.5508	1.4469	1.2300	1.4484
% to BODY WEIGHT	0.2602	0.3480	0.2758	0.3107	0.3168
HEART	2.1929	1.5886	1.9067	1.3445	1.3990
% to BODY WEIGHT	0.3977	0.3565	0.3634	0.3397	0.3060
LUNG	2.0061	1.9720	2.0816	1.4880	1.5888
% to BODY WEIGHT	0.3639	0.4425	0.3968	0.3759	0.3475
BRAIN	2.0064	1.9843	2.0398	1.9041	1.8711
% to BODY WEIGHT	0.3639	0.4452	0.3888	0.4810	0.4093
LIVER	14.8263	11.5040	15.7097	9.9731	11.4908
% to BODY WEIGHT	2.6892	2.5813	2.9943	2.5195	2.5136

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
G3 (2,000 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	26	27	28	29	30
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	376.28	482.89	396.72	470.34	460.44
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0245	0.0231	0.0266	0.0300	0.0262
% to BODY WEIGHT	0.0065	0.0048	0.0067	0.0064	0.0057
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0247	0.0263	0.0271	0.0315	0.0256
% to BODY WEIGHT	0.0066	0.0054	0.0068	0.0067	0.0056
PITUITARY GLAND	0.0104	0.0148	0.0123	0.0155	0.0159
% to BODY WEIGHT	0.0028	0.0031	0.0031	0.0033	0.0035
THYMUS	0.3551	0.3769	0.3827	0.3754	0.2192
% to BODY WEIGHT	0.0944	0.0781	0.0965	0.0798	0.0476
PROSTATE GLAND	0.4282	0.6414	0.5939	0.6063	0.8682
% to BODY WEIGHT	0.1138	0.1328	0.1497	0.1289	0.1886
TESTIS-LEFT	2.0725	2.1932	2.1229	2.0853	2.2098
% to BODY WEIGHT	0.5508	0.4542	0.5351	0.4434	0.4799
TESTIS-RIGHT	1.9960	2.1492	2.1338	2.0555	2.2370
% to BODY WEIGHT	0.5305	0.4451	0.5379	0.4370	0.4858
EPIDIDYMIS-LEFT	0.6974	0.8065	0.6818	0.7772	0.7637
% to BODY WEIGHT	0.1853	0.1670	0.1719	0.1652	0.1659
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.6383	0.8173	0.7269	0.8003	0.7717
% to BODY WEIGHT	0.1696	0.1693	0.1832	0.1702	0.1676
SPLEEN	0.7106	0.8666	0.7433	0.9217	0.9407
% to BODY WEIGHT	0.1888	0.1795	0.1874	0.1960	0.2043
KIDNEY-LEFT	1.2003	1.4754	1.2974	1.4029	1.4637
% to BODY WEIGHT	0.3190	0.3055	0.3270	0.2983	0.3179
KIDNEY-RIGHT	1.1769	1.6205	1.3327	1.4151	1.5382
% to BODY WEIGHT	0.3128	0.3356	0.3359	0.3009	0.3341
HEART	1.1949	1.6288	1.7057	1.5591	1.5822
% to BODY WEIGHT	0.3176	0.3373	0.4300	0.3315	0.3436
LUNG	1.6446	1.7958	1.5673	1.9176	1.9452
% to BODY WEIGHT	0.4371	0.3719	0.3951	0.4077	0.4225
BRAIN	1.9187	2.0425	1.9050	2.0515	1.8899
% to BODY WEIGHT	0.5099	0.4230	0.4802	0.4362	0.4105
LIVER	9.2850	12.7255	11.0504	12.3741	12.5482
% to BODY WEIGHT	2.4676	2.6353	2.7854	2.6309	2.7253

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
G4 (5,000 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	31	32	33	34	35
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	435.50	405.52	420.19	420.31	398.56
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0168	0.0277	0.0246	0.0293	0.0280
% to BODY WEIGHT	0.0039	0.0068	0.0059	0.0070	0.0070
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0233	0.0269	0.0225	0.0277	0.0254
% to BODY WEIGHT	0.0054	0.0066	0.0054	0.0066	0.0064
PITUITARY GLAND	0.0113	0.0130	0.0132	0.0158	0.0122
% to BODY WEIGHT	0.0026	0.0032	0.0031	0.0038	0.0031
THYMUS	0.3164	0.2864	0.4035	0.2009	0.3428
% to BODY WEIGHT	0.0727	0.0706	0.0960	0.0478	0.0860
PROSTATE GLAND	0.5050	0.4881	0.6614	0.7892	0.7398
% to BODY WEIGHT	0.1160	0.1204	0.1574	0.1878	0.1856
TESTIS-LEFT	2.0771	1.8469	2.1460	2.4305	2.1307
% to BODY WEIGHT	0.4769	0.4554	0.5107	0.5783	0.5346
TESTIS-RIGHT	2.1214	1.8982	2.2353	2.4741	2.1943
% to BODY WEIGHT	0.4871	0.4681	0.5320	0.5886	0.5506
EPIDIDYMIS-LEFT	0.6997	0.6632	0.7778	0.8130	0.6944
% to BODY WEIGHT	0.1607	0.1635	0.1851	0.1934	0.1742
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.7130	0.7473	0.7655	0.8124	0.7214
% to BODY WEIGHT	0.1637	0.1843	0.1822	0.1933	0.1810
SPLEEN	0.8286	0.8351	0.9062	0.7278	0.7821
% to BODY WEIGHT	0.1903	0.2059	0.2157	0.1732	0.1962
KIDNEY-LEFT	1.4834	1.3015	1.5786	1.3553	1.3174
% to BODY WEIGHT	0.3406	0.3209	0.3757	0.3225	0.3305
KIDNEY-RIGHT	1.4582	1.3340	1.5687	1.4250	1.3609
% to BODY WEIGHT	0.3348	0.3290	0.3733	0.3390	0.3415
HEART	1.4149	1.3768	1.5552	1.4985	1.4167
% to BODY WEIGHT	0.3249	0.3395	0.3701	0.3565	0.3555
LUNG	1.8230	1.5678	1.7668	1.9410	1.6993
% to BODY WEIGHT	0.4186	0.3866	0.4205	0.4618	0.4264
BRAIN	1.9977	1.9566	1.9885	2.0670	1.9072
% to BODY WEIGHT	0.4587	0.4825	0.4732	0.4918	0.4785
LIVER	11.6636	10.6545	11.5940	11.2039	10.0155
% to BODY WEIGHT	2.6782	2.6274	2.7592	2.6656	2.5129

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS					MALE
G4 (5,000 mg/kg/day)					
ANIMAL ID	36	37	38	39	40
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	425.49	448.76	383.08	390.31	385.89
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0295	0.0267	0.0297	0.0227	0.0298
% to BODY WEIGHT	0.0069	0.0059	0.0078	0.0058	0.0077
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0318	0.0312	0.0268	0.0269	0.0264
% to BODY WEIGHT	0.0075	0.0070	0.0070	0.0069	0.0068
PITUITARY GLAND	0.0130	0.0145	0.0115	0.0111	0.0115
% to BODY WEIGHT	0.0031	0.0032	0.0030	0.0028	0.0030
THYMUS	0.3670	0.2601	0.2512	0.2923	0.3984
% to BODY WEIGHT	0.0863	0.0580	0.0656	0.0749	0.1032
PROSTATE GLAND	0.6114	0.4888	0.4413	0.7072	0.4665
% to BODY WEIGHT	0.1437	0.1089	0.1152	0.1812	0.1209
TESTIS-LEFT	2.0503	2.1544	2.0355	2.1335	1.9729
% to BODY WEIGHT	0.4819	0.4801	0.5314	0.5466	0.5113
TESTIS-RIGHT	2.0587	2.0626	1.9459	2.0564	1.8887
% to BODY WEIGHT	0.4838	0.4596	0.5080	0.5269	0.4894
EPIDIDYMIS-LEFT	0.7564	0.7834	0.6565	0.7089	0.6847
% to BODY WEIGHT	0.1778	0.1746	0.1714	0.1816	0.1774
EPIDIDYMIS-RIGHT	0.7084	0.7529	0.6297	0.7354	0.6943
% to BODY WEIGHT	0.1665	0.1678	0.1644	0.1884	0.1799
SPLEEN	0.7269	1.2122	0.6970	0.7530	0.6549
% to BODY WEIGHT	0.1708	0.2701	0.1819	0.1929	0.1697
KIDNEY-LEFT	1.5036	1.8220	1.2522	1.3973	1.3110
% to BODY WEIGHT	0.3534	0.4060	0.3269	0.3580	0.3397
KIDNEY-RIGHT	1.4486	1.7308	1.3262	1.4607	1.3724
% to BODY WEIGHT	0.3405	0.3857	0.3462	0.3742	0.3556
HEART	1.4353	1.6739	1.2542	1.3677	1.3475
% to BODY WEIGHT	0.3373	0.3730	0.3274	0.3504	0.3492
LUNG	1.7570	1.7984	1.6648	1.7824	1.5817
% to BODY WEIGHT	0.4129	0.4007	0.4346	0.4567	0.4099
BRAIN	1.9658	1.9503	1.9605	1.9089	1.9575
% to BODY WEIGHT	0.4620	0.4346	0.5118	0.4891	0.5073
LIVER	11.5669	14.8139	9.4062	10.4213	9.8850
% to BODY WEIGHT	2.7185	3.3011	2.4554	2.6700	2.5616

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
G1 (0 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	41	42	43	44	45	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	212.62	230.11	242.77	201.89	243.67	
OVARY-LEFT	0.0430	0.0490	0.0300	0.0382	0.0492	
% to BODY WEIGHT	0.0202	0.0213	0.0124	0.0189	0.0202	
OVARY-RIGHT	0.0464	0.0532	0.0302	0.0418	0.0428	
% to BODY WEIGHT	0.0218	0.0231	0.0124	0.0207	0.0176	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0270	0.0330	0.0463	0.0290	0.0306	
% to BODY WEIGHT	0.0127	0.0143	0.0191	0.0144	0.0126	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0288	0.0304	0.0371	0.0267	0.0298	
% to BODY WEIGHT	0.0135	0.0132	0.0153	0.0132	0.0122	
PITUITARY GLAND	0.0117	0.0125	0.0127	0.0089	0.0141	
% to BODY WEIGHT	0.0055	0.0054	0.0052	0.0044	0.0058	
THYMUS	0.2032	0.1974	0.1931	0.2016	0.2581	
% to BODY WEIGHT	0.0956	0.0858	0.0795	0.0999	0.1059	
UTERUS	0.4843	2.1765	0.4635	0.4501	0.6395	
% to BODY WEIGHT	0.2278	0.9459	0.1909	0.2229	0.2624	
SPLEEN	0.5260	0.5145	0.6640	0.4458	0.6359	
% to BODY WEIGHT	0.2474	0.2236	0.2735	0.2208	0.2610	
KIDNEY-LEFT	0.6687	0.7122	0.7473	0.6744	0.6896	
% to BODY WEIGHT	0.3145	0.3095	0.3078	0.3340	0.2830	
KIDNEY-RIGHT	0.6602	0.7446	0.7115	0.6598	0.7873	
% to BODY WEIGHT	0.3105	0.3236	0.2931	0.3268	0.3231	
HEART	0.8867	0.8521	0.9398	0.7463	1.0012	
% to BODY WEIGHT	0.4170	0.3703	0.3871	0.3697	0.4109	
LUNG	1.3425	1.2725	1.2380	1.3049	1.2083	
% to BODY WEIGHT	0.6314	0.5530	0.5099	0.6463	0.4959	
BRAIN	1.7659	1.7291	1.7052	1.7449	1.7706	
% to BODY WEIGHT	0.8305	0.7514	0.7024	0.8643	0.7266	
LIVER	5.2613	5.5167	5.7070	5.1210	5.6806	
% to BODY WEIGHT	2.4745	2.3974	2.3508	2.5365	2.3313	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
G1 (0 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	46	47	48	49	50	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	229.37	244.39	236.41	205.32	218.69	
OVARY-LEFT	0.0447	0.0448	0.0326	0.0349	0.0462	
% to BODY WEIGHT	0.0195	0.0183	0.0138	0.0170	0.0211	
OVARY-RIGHT	0.0512	0.0398	0.0366	0.0437	0.0447	
% to BODY WEIGHT	0.0223	0.0163	0.0155	0.0213	0.0204	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0291	0.0289	0.0272	0.0280	0.0299	
% to BODY WEIGHT	0.0127	0.0118	0.0115	0.0136	0.0137	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0294	0.0249	0.0266	0.0270	0.0309	
% to BODY WEIGHT	0.0128	0.0102	0.0113	0.0132	0.0141	
PITUITARY GLAND	0.0126	0.0129	0.0115	0.0125	0.0102	
% to BODY WEIGHT	0.0055	0.0053	0.0049	0.0061	0.0047	
THYMUS	0.2182	0.2389	0.2767	0.2540	0.2464	
% to BODY WEIGHT	0.0951	0.0978	0.1170	0.1237	0.1127	
UTERUS	0.3976	0.6213	0.8762	1.6363	0.8255	
% to BODY WEIGHT	0.1733	0.2542	0.3706	0.7970	0.3775	
SPLEEN	0.4821	0.6444	0.5343	0.4608	0.4437	
% to BODY WEIGHT	0.2102	0.2637	0.2260	0.2244	0.2029	
KIDNEY-LEFT	0.7120	0.7239	0.6569	0.5341	0.6954	
% to BODY WEIGHT	0.3104	0.2962	0.2779	0.2601	0.3180	
KIDNEY-RIGHT	0.6696	0.7325	0.7063	0.5491	0.7141	
% to BODY WEIGHT	0.2919	0.2997	0.2988	0.2674	0.3265	
HEART	0.8230	0.9049	0.9174	0.7832	0.8348	
% to BODY WEIGHT	0.3588	0.3703	0.3881	0.3815	0.3817	
LUNG	1.4186	1.3092	1.2680	1.2252	1.2717	
% to BODY WEIGHT	0.6185	0.5357	0.5364	0.5967	0.5815	
BRAIN	1.8743	1.8312	1.8499	1.7169	1.8023	
% to BODY WEIGHT	0.8172	0.7493	0.7825	0.8362	0.8241	
LIVER	5.1305	6.4970	5.5643	4.9425	5.2730	
% to BODY WEIGHT	2.2368	2.6585	2.3537	2.4072	2.4112	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
G2 (800 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	51	52	53	54	55	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	242.57	249.72	226.44	228.25	233.70	
OVARY-LEFT	0.0468	0.0351	0.0454	0.0426	0.0504	
% to BODY WEIGHT	0.0193	0.0141	0.0200	0.0187	0.0216	
OVARY-RIGHT	0.0417	0.0411	0.0497	0.0525	0.0453	
% to BODY WEIGHT	0.0172	0.0165	0.0219	0.0230	0.0194	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0283	0.0308	0.0331	0.0359	0.0283	
% to BODY WEIGHT	0.0117	0.0123	0.0146	0.0157	0.0121	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0271	0.0360	0.0346	0.0340	0.0295	
% to BODY WEIGHT	0.0112	0.0144	0.0153	0.0149	0.0126	
PITUITARY GLAND	0.0116	0.0140	0.0116	0.0120	0.0133	
% to BODY WEIGHT	0.0048	0.0056	0.0051	0.0053	0.0057	
THYMUS	0.3117	0.2198	0.2116	0.2120	0.2499	
% to BODY WEIGHT	0.1285	0.0880	0.0934	0.0929	0.1069	
UTERUS	0.7171	0.8706	0.4579	0.6158	0.5243	
% to BODY WEIGHT	0.2956	0.3486	0.2022	0.2698	0.2243	
SPLEEN	0.5184	0.5162	0.4884	0.5815	0.5650	
% to BODY WEIGHT	0.2137	0.2067	0.2157	0.2548	0.2418	
KIDNEY-LEFT	0.6588	0.7159	0.7528	0.7442	0.7021	
% to BODY WEIGHT	0.2716	0.2867	0.3325	0.3260	0.3004	
KIDNEY-RIGHT	0.6990	0.6906	0.7901	0.7138	0.7460	
% to BODY WEIGHT	0.2882	0.2765	0.3489	0.3127	0.3192	
HEART	0.8459	0.8678	0.9311	0.8750	0.8622	
% to BODY WEIGHT	0.3487	0.3475	0.4112	0.3834	0.3689	
LUNG	1.2317	1.2786	1.2132	1.2310	1.3734	
% to BODY WEIGHT	0.5078	0.5120	0.5358	0.5393	0.5877	
BRAIN	1.7965	1.7300	1.7781	1.7384	1.8012	
% to BODY WEIGHT	0.7406	0.6928	0.7852	0.7616	0.7707	
LIVER	5.2993	5.3047	6.0264	5.5280	5.4336	
% to BODY WEIGHT	2.1846	2.1243	2.6614	2.4219	2.3250	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
G2 (800 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	56	57	58	59	60	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	240.68	210.86	240.15	250.71	233.74	
OVARY-LEFT	0.0363	0.0500	0.0357	0.0457	0.0315	
% to BODY WEIGHT	0.0151	0.0237	0.0149	0.0182	0.0135	
OVARY-RIGHT	0.0460	0.0397	0.0431	0.0490	0.0203	
% to BODY WEIGHT	0.0191	0.0188	0.0179	0.0195	0.0087	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0360	0.0278	0.0283	0.0290	0.0278	
% to BODY WEIGHT	0.0150	0.0132	0.0118	0.0116	0.0119	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0354	0.0275	0.0258	0.0280	0.0365	
% to BODY WEIGHT	0.0147	0.0130	0.0107	0.0112	0.0156	
PITUITARY GLAND	0.0131	0.0112	0.0140	0.0123	0.0113	
% to BODY WEIGHT	0.0054	0.0053	0.0058	0.0049	0.0048	
THYMUS	0.2223	0.2493	0.2600	0.2760	0.2499	
% to BODY WEIGHT	0.0924	0.1182	0.1083	0.1101	0.1069	
UTERUS	1.1163	0.8316	0.6617	0.7503	0.4662	
% to BODY WEIGHT	0.4638	0.3944	0.2755	0.2993	0.1995	
SPLEEN	0.5286	0.4723	0.5959	0.5892	0.4209	
% to BODY WEIGHT	0.2196	0.2240	0.2481	0.2350	0.1801	
KIDNEY-LEFT	0.7459	0.5505	0.6466	0.7338	0.7047	
% to BODY WEIGHT	0.3099	0.2611	0.2692	0.2927	0.3015	
KIDNEY-RIGHT	0.7522	0.5810	0.6883	0.7459	0.7105	
% to BODY WEIGHT	0.3125	0.2755	0.2866	0.2975	0.3040	
HEART	0.8832	0.7974	0.8179	0.9540	0.8314	
% to BODY WEIGHT	0.3670	0.3782	0.3406	0.3805	0.3557	
LUNG	1.2708	1.2437	1.3464	1.3478	1.2248	
% to BODY WEIGHT	0.5280	0.5898	0.5606	0.5376	0.5240	
BRAIN	1.8070	1.7549	1.7057	1.8168	1.8436	
% to BODY WEIGHT	0.7508	0.8323	0.7103	0.7247	0.7887	
LIVER	5.5434	5.1596	6.0369	5.9184	5.8993	
% to BODY WEIGHT	2.3032	2.4469	2.5138	2.3607	2.5239	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
G3 (2,000 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	61	62	63	64	65	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	246.14	219.48	243.22	251.30	254.71	
OVARY-LEFT	0.0443	0.0363	0.0458	0.0501	0.0380	
% to BODY WEIGHT	0.0180	0.0165	0.0188	0.0199	0.0149	
OVARY-RIGHT	0.0373	0.0396	0.0561	0.0462	0.0498	
% to BODY WEIGHT	0.0152	0.0180	0.0231	0.0184	0.0196	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0274	0.0322	0.0304	0.0305	0.0307	
% to BODY WEIGHT	0.0111	0.0147	0.0125	0.0121	0.0121	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0406	0.0291	0.0315	0.0272	0.0257	
% to BODY WEIGHT	0.0165	0.0133	0.0130	0.0108	0.0101	
PITUITARY GLAND	0.0127	0.0133	0.0136	0.0171	0.0146	
% to BODY WEIGHT	0.0052	0.0061	0.0056	0.0068	0.0057	
THYMUS	0.2690	0.2004	0.2330	0.1792	0.2320	
% to BODY WEIGHT	0.1093	0.0913	0.0958	0.0713	0.0911	
UTERUS	0.4745	0.7441	0.5113	0.7175	0.6655	
% to BODY WEIGHT	0.1928	0.3390	0.2102	0.2855	0.2613	
SPLEEN	0.5034	0.5656	0.5778	0.5940	0.6488	
% to BODY WEIGHT	0.2045	0.2577	0.2376	0.2364	0.2547	
KIDNEY-LEFT	0.7404	0.6557	0.7637	0.7885	0.7503	
% to BODY WEIGHT	0.3008	0.2988	0.3140	0.3138	0.2946	
KIDNEY-RIGHT	0.7302	0.6533	0.7605	0.8310	0.7926	
% to BODY WEIGHT	0.2967	0.2977	0.3127	0.3307	0.3112	
HEART	0.8380	0.9323	0.9375	0.9735	0.9404	
% to BODY WEIGHT	0.3405	0.4248	0.3855	0.3874	0.3692	
LUNG	1.4863	1.2560	1.2585	1.2045	1.3752	
% to BODY WEIGHT	0.6038	0.5723	0.5174	0.4793	0.5399	
BRAIN	1.7807	1.7745	1.8513	1.8447	1.8764	
% to BODY WEIGHT	0.7235	0.8085	0.7612	0.7341	0.7367	
LIVER	6.8859	5.4992	6.3978	7.2873	6.5735	
% to BODY WEIGHT	2.7976	2.5056	2.6305	2.8998	2.5808	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
G3 (2,000 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	66	67	68	69	70	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	206.82	234.03	223.08	233.78	218.64	
OVARY-LEFT	0.0312	0.0546	0.0331	0.0518	0.0337	
% to BODY WEIGHT	0.0151	0.0233	0.0148	0.0222	0.0154	
OVARY-RIGHT	0.0343	0.0488	0.0409	0.0555	0.0358	
% to BODY WEIGHT	0.0166	0.0209	0.0183	0.0237	0.0164	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0263	0.0310	0.0378	0.0326	0.0287	
% to BODY WEIGHT	0.0127	0.0132	0.0169	0.0139	0.0131	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0272	0.0306	0.0362	0.0305	0.0257	
% to BODY WEIGHT	0.0132	0.0131	0.0162	0.0130	0.0118	
PITUITARY GLAND	0.0110	0.0121	0.0133	0.0143	0.0133	
% to BODY WEIGHT	0.0053	0.0052	0.0060	0.0061	0.0061	
THYMUS	0.2409	0.2214	0.1922	0.1916	0.2217	
% to BODY WEIGHT	0.1165	0.0946	0.0862	0.0820	0.1014	
UTERUS	0.6551	0.6318	0.5167	0.3885	1.7780	
% to BODY WEIGHT	0.3167	0.2700	0.2316	0.1662	0.8132	
SPLEEN	0.4523	0.6113	0.6301	0.4929	0.4936	
% to BODY WEIGHT	0.2187	0.2612	0.2825	0.2108	0.2258	
KIDNEY-LEFT	0.6564	0.7968	0.7483	0.7032	0.6384	
% to BODY WEIGHT	0.3174	0.3405	0.3354	0.3008	0.2920	
KIDNEY-RIGHT	0.6826	0.7724	0.7455	0.6886	0.6314	
% to BODY WEIGHT	0.3300	0.3300	0.3342	0.2946	0.2888	
HEART	0.9080	0.8932	0.9467	0.9218	0.9208	
% to BODY WEIGHT	0.4390	0.3817	0.4244	0.3943	0.4211	
LUNG	1.2659	1.3087	1.4154	1.3505	1.3021	
% to BODY WEIGHT	0.6121	0.5592	0.6345	0.5777	0.5955	
BRAIN	1.7498	1.7484	1.8106	1.7125	1.7040	
% to BODY WEIGHT	0.8460	0.7471	0.8116	0.7325	0.7794	
LIVER	5.1612	6.0591	6.3361	5.4090	5.3995	
% to BODY WEIGHT	2.4955	2.5890	2.8403	2.3137	2.4696	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
G4 (5,000 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	71	72	73	74	75	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	219.19	232.93	230.74	216.39	239.68	
OVARY-LEFT	0.0409	0.0448	0.0450	0.0443	0.0448	
% to BODY WEIGHT	0.0187	0.0192	0.0195	0.0205	0.0187	
OVARY-RIGHT	0.0432	0.0336	0.0560	0.0361	0.0358	
% to BODY WEIGHT	0.0197	0.0144	0.0243	0.0167	0.0149	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0303	0.0329	0.0344	0.0268	0.0369	
% to BODY WEIGHT	0.0138	0.0141	0.0149	0.0124	0.0154	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0277	0.0297	0.0314	0.0263	0.0369	
% to BODY WEIGHT	0.0126	0.0128	0.0136	0.0122	0.0154	
PITUITARY GLAND	0.0109	0.0117	0.0104	0.0102	0.0143	
% to BODY WEIGHT	0.0050	0.0050	0.0045	0.0047	0.0060	
THYMUS	0.2219	0.2267	0.1988	0.2929	0.2533	
% to BODY WEIGHT	0.1012	0.0973	0.0862	0.1354	0.1057	
UTERUS	0.6370	0.5388	0.6468	0.6817	0.4916	
% to BODY WEIGHT	0.2906	0.2313	0.2803	0.3150	0.2051	
SPLEEN	0.4846	0.5735	0.5647	0.5011	0.5764	
% to BODY WEIGHT	0.2211	0.2462	0.2447	0.2316	0.2405	
KIDNEY-LEFT	0.7256	0.7166	0.6581	0.7318	0.7358	
% to BODY WEIGHT	0.3310	0.3076	0.2852	0.3382	0.3070	
KIDNEY-RIGHT	0.7120	0.7459	0.6890	0.7239	0.7126	
% to BODY WEIGHT	0.3248	0.3202	0.2986	0.3345	0.2973	
HEART	0.9052	1.0142	0.9965	0.8384	0.9626	
% to BODY WEIGHT	0.4130	0.4354	0.4319	0.3874	0.4016	
LUNG	1.2525	1.2718	1.3523	1.3329	1.3041	
% to BODY WEIGHT	0.5714	0.5460	0.5861	0.6160	0.5441	
BRAIN	1.8607	1.6980	1.8056	1.7875	1.8056	
% to BODY WEIGHT	0.8489	0.7290	0.7825	0.8261	0.7533	
LIVER	6.1573	6.7012	6.7659	5.4567	7.2931	
% to BODY WEIGHT	2.8091	2.8769	2.9323	2.5217	3.0428	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<CONTINUED>

Appendix 1-10. Individual absolute and relative organ weights

ABSOLUTE (g) & RELATIVE (%) ORGAN WEIGHTS						FEMALE
G4 (5,000 mg/kg/day)						
ANIMAL ID	76	77	78	79	80	
BODY WEIGHTS (g) ^{a)}	223.00	233.17	250.07	235.06	238.51	
OVARY-LEFT	0.0497	0.0417	0.0638	0.0300	0.0512	
% to BODY WEIGHT	0.0223	0.0179	0.0255	0.0128	0.0215	
OVARY-RIGHT	0.0450	0.0469	0.0571	0.0378	0.0535	
% to BODY WEIGHT	0.0202	0.0201	0.0228	0.0161	0.0224	
ADRENAL GLAND-LEFT	0.0372	0.0289	0.0377	0.0329	0.0319	
% to BODY WEIGHT	0.0167	0.0124	0.0151	0.0140	0.0134	
ADRENAL GLAND-RIGHT	0.0327	0.0322	0.0331	0.0323	0.0323	
% to BODY WEIGHT	0.0147	0.0138	0.0132	0.0137	0.0135	
PITUITARY GLAND	0.0137	0.0124	0.0171	0.0134	0.0133	
% to BODY WEIGHT	0.0061	0.0053	0.0068	0.0057	0.0056	
THYMUS	0.2156	0.2269	0.1960	0.2213	0.2518	
% to BODY WEIGHT	0.0967	0.0973	0.0784	0.0941	0.1056	
UTERUS	0.4389	0.5132	0.4454	0.5550	1.4320	
% to BODY WEIGHT	0.1968	0.2201	0.1781	0.2361	0.6004	
SPLEEN	0.4949	0.5821	0.5649	0.5864	0.4830	
% to BODY WEIGHT	0.2219	0.2496	0.2259	0.2495	0.2025	
KIDNEY-LEFT	0.7181	0.7352	0.7214	0.8330	0.7254	
% to BODY WEIGHT	0.3220	0.3153	0.2885	0.3544	0.3041	
KIDNEY-RIGHT	0.6736	0.7490	0.7481	0.8244	0.7085	
% to BODY WEIGHT	0.3021	0.3212	0.2992	0.3507	0.2971	
HEART	0.7969	0.8910	0.9700	0.8329	0.8878	
% to BODY WEIGHT	0.3574	0.3821	0.3879	0.3543	0.3722	
LUNG	1.2672	1.2943	1.3538	1.6224	1.2602	
% to BODY WEIGHT	0.5683	0.5551	0.5414	0.6902	0.5284	
BRAIN	1.7340	1.7896	1.8582	1.7871	1.7160	
% to BODY WEIGHT	0.7776	0.7675	0.7431	0.7603	0.7195	
LIVER	6.3492	5.8257	6.9292	6.4991	6.2262	
% to BODY WEIGHT	2.8472	2.4985	2.7709	2.7649	2.6105	

a) The body weights were measured right before necropsy after overnight fasting.

<END>

Appendix 1-11. Individual necropsy findings

NECROPSY FINDINGS			MALE
G1 (0 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
1	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
2	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
3	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
4	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
5	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
6	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
7	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
8	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
9	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
10	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
G2 (800 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
11	TERMINAL SACRIFICE	Left TESTIS	Absence
		Left EPIDIDYMIS	Small
12	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
13	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
14	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
15	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
16	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
17	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
18	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
19	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
20	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings

<CONTINUED>

Appendix 1-11. Individual necropsy findings

NECROPSY FINDINGS			MALE
G3 (2,000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
21	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
22	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
23	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
24	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
25	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
26	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
27	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
28	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
29	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
30	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
G4 (5,000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
31	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
32	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
33	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
34	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
35	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
36	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
37	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
38	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
39	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
40	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings

<CONTINUED>

Appendix 1-11. Individual necropsy findings

NECROPSY FINDINGS			FEMALE
G1 (0 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
41	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
42	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid
43	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
44	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
45	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
46	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
47	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
48	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
49	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid
50	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
G2 (800 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
51	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
52	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
53	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
54	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
55	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
56	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid
57	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid
58	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
59	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings
60	TERMINAL SACRIFICE	-	No gross findings

<CONTINUED>

Appendix 1-11. Individual necropsy findings

NECROPSY FINDINGS			FEMALE
G3 (2,000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
61	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
62	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
63	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
64	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
65	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
66	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
67	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
68	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
69	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
70	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid
G4 (5,000 mg/kg/day)			
ANIMAL ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
71	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
72	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
73	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
74	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
75	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
76	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
77	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
78	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
79	TERMINAL SACRIFICE	–	No gross findings
80	TERMINAL SACRIFICE	UTERUS	Retention of clear fluid

<END>

APPENDIX 2. PATHOLOGY REPORT

병리보고서

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
13 주간 반복 경구투여 독성시험

시험번호: 11-RR-074

시험의뢰기관: ㈜에이지아이

㈜켐온 전임상연구센터



Preclinical Research Center, Chemon Inc.
334, Jcil-Ri, Yangji-Myeon, Cheoin-Gu, Yongin-Si, Gyeonggi-Do,
449-826, Korea

서 명

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험
(병리 부문)

강민수 

강민수

병리책임자
DVM

쥬켄온 전임상연구센터

2012. 01.09

날 짜

시험개요

시 험 제 목 RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험

시 험 부 문 병리

시 험 일 정	2011 년 10 월 13 일	주요군 수컷 부검
	2011 년 10 월 14 일	주요군 암컷 부검
	2012 년 01 월 09 일	병리 보고서 제출

재료 및 방법

1. 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1 ^{a)}	M / F	10 / 10	1-10 / 41-50	20	0
G2	M / F	10 / 10	11-20 / 51-60	20	800
G3	M / F	10 / 10	21-30 / 61-70	20	2,000
G4	M / F	10 / 10	31-40 / 71-80	20	5,000

a) 부형제 대조군 (0.5 % CMC-Na)

2. 임상병리

1) 채뇨 및 채혈

(1) 채뇨

관찰 최종 주에 앞의 번호부터 군당 5 마리를 대사케이지에 수용하여 약 3 시간 동안 채뇨한 신선뇨(약 1 mL)를 이용하여 요검사를 실시하였고, 24 시간 동안 수집한 요로 요량을 측정하였다.

(2) 채혈

부검 전날 하룻밤(16-20 시간) 절식한 계획부검동물에 대하여 Isoflurane (Ifran liquid Hana Pharm. Co., Ltd)으로 흡입마취하여, 마취가 확인되면 회복하여 후대정맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다.

검사항목	혈액량	튜브
혈액학적 검사	약 1 mL	EDTA-2K CBC bottle
혈액응고시간 검사	1.8 mL	0.2 mL 3.2 % sodium citrate tube
혈액생화학적 검사	2 mL 이상	Clot activator vacutainer tube

2) 요검사

(1) 요 일반검사

약 0.3 mL의 요를 요검사용 시험지(Multistix 10SG, SIEMENS, USA)에 묻힌 후, 요자동분석기(CliniTek 100, SIEMENS, USA)를 이용하여 아래의 항목을 검사하였다. 단, 요색조는 동물실에서 관찰한 결과를 요자동분석기에 입력하였다.

요색조(urine color) 빌리루빈(BIL) pH 아질산염(NIT)

PATHOLOGY REPORT

ChemOn Study No. 11-RR-074

투명도(clarity)	케톤체(KET)	요단백(PRO)	잠혈(OB)
당(GLU)	요비중(SG)	유로빌리노겐(URO)	

(2) 요침사 검사

요색조를 검사한 요를 5 분간 원심분리(Hanil MF300, 1,500 rpm, 425 g)한 후, 그 침전물을 SM법으로 염색한 후, 현미경으로 아래의 항목을 관찰하였다.

백혈구(WBC)	상피세포(epithelial cells)	적혈구(RBC)	원주(cast)
----------	------------------------	----------	----------

3) 혈액학적 검사

(1) 일반혈액검사

부검시 채혈한 혈액 중 약 1 mL를 항응고제인 EDTA-2K가 들어있는 CBC bottle (Vacutainer 3 mL, BD, USA)에 주입한 후 자동혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS, USA)를 이용하여 검사하였다.

적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	호중구(NEU)
헤마토크리치(HCT)	헤모글로빈분포폭(HDW)	림프구(LYM)
혈색소량(HGB)	평균혈소판용적(MPV)	단핵구(MONO)
평균적혈구용적(MCV)	혈소판수(PLT)	호산구(EOS)
평균적혈구헤모글로빈량(MCH)	망상적혈구(RET)	호염기구(BASO)
평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)	백혈구(WBC)	대형비염색성세포(LUC)

(2) 혈액응고시간검사

채혈한 혈액 중 1.8 mL을 3.2 % sodium citrate 0.2 mL이 들어있는 microtube에 주입한 후 원심분리하여 얻은 혈장으로 혈액응고시간검사기(ACL 100, Instrumentation Laboratory, USA)를 이용하여 검사하였다.

부분활성트롬보플라스틴시간(APTT)	프로트롬빈시간(PT)
---------------------	-------------

4) 혈액생화학적 검사

부검시 채혈한 혈액의 일부를 clot activator가 들어 있는 5 mL vacutainer tube (INSEPACK, SEKISUI, JAPAN)에 주입하고 15-20 분간 실온에 방치하여 응고시킨 후 10 분간 원심분리 (3,000 rpm, 1,630 RCF, MF300, Hanil, Korea)하여 얻은 혈청으로 아래 항목을 검사하였다.

㉔아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	㉔총콜레스테롤(TCHO)	㉔크레아티닌(CRE)
㉔알라닌 아미노기전이효소(ALT)	㉔중성지방(TG)	㉔무기인(IP)
㉔알칼라인 포스파타제(ALP)	㉔총단백(TP)	㉔칼슘(Ca ²⁺)
㉔크레아티닌산화효소(CPK)	㉔알부민(ALB)	㉔칼륨(K ⁺)

PATHOLOGY REPORT

ChemOn Study No. 11-RR-074

식도(esophagus)	흉골(sternum)	질(vagina)
위(stomach)	턱밑림프절 (mandibular lymph node)	피부 및 젖샘(mammary glands with adjacent skin)
췌장(pancreas)	장간막림프절 (mesenteric lymph node)	육안적 병변 (gross lesions)

4) 조직병리학적 검사

부형제대조군 및 고용량군의 모든 동물의 고정장기, 부검 시 저용량 및 중간용량군에서 육안적 이상소견이 관찰된 고정장기에 대하여 조직슬라이드를 제작하여 조직병리학적 검사를 실시하였다. 단, 용어는 Pristima™의 Lexicon과 그 이외의 용어들은 Covance 회사에서 출판한 Covance Glossary와 미국독성병리학회에서 출판한 Standardized System for Nomenclature and Diagnostic Criteria-Guides for Toxicologic Pathology를 주로 참고하였고, 그 밖의 병리서적도 참고하여 선택하였다¹⁻⁸⁾.

4. 통계 분석

혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량에 대하여 One-way ANOVA test로 그 유의성을 평가하였다. 정규성을 가정하고, Levene test로 등분산성을 검정한 후 등분산인 경우에는 Duncan multiple range test를 사용하였고, 등분산이나 표본수(n수)가 다를 경우에는 Scheffe multiple range test를 사용하였으며, 등분산이 아닌 경우에는 Dunnett's T3-test를 사용하여 부형제대조군과의 유의성을 확인하였다. 요검사의 경우, 순위화한 데이터를 이용하여 척도변환을 한 후 *Kruskal-Wallis 'H-test*를 실시하였으며, 군간 유의성이 인정되면 *Mann-Whitney U-test*를 통하여 부형제대조군과의 유의성을 확인하였다. 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결과

요검사

빌리루빈(BIL)이 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서, 케톤체(KET)가 800 mg/kg/day 이상 투여군 수컷 및 2,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서, 요단백(PRO)이 2,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서, 아질산염(NIT)가 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았고($P < 0.05$, $P < 0.01$), 용량상관성 있는 변화를 보였다.

요색조는 800 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 어두운 노란색조(dark yellow), 호박색조(amber) 및 주황색조(orange)로 용량상관성 있는 변화를 보였고, 이는 노란색조(yellow)로 관찰된 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 변화이었다($P < 0.01$).

5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 요침사 중 백혈구(WBC)가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았다($P < 0.05$).

그 밖에, 800 및 2,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 요비중(SG)이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았으나($P < 0.05$), 용량상관성 없는 변화이었다.

혈액학적 검사

2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 호산구(EOS) 백분비가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 낮았고($P < 0.05$, $P < 0.01$), 용량상관성 있는 변화를 보였다. 800 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 헤모글로빈분포폭(HDW)이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮았다($P < 0.01$).

혈액생화학적 검사

5,000 mg/kg/day 투여군 수컷 및 2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 나트륨(Na^+)이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 낮았다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

수컷에서는 2,000 mg/kg/day 이상 투여군에서 칼륨(K^+)의 증가, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 총 콜레스테롤(TCHO) 및 총단백(TP)의 감소가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 관찰되었고($P < 0.05$, $P < 0.01$), 암컷에서는 2,000 mg/kg/day 이상 투여군에서 TP 및 알부민(ALB)의 증가와 나트륨(Cl^-)의 감소가, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 총빌리루빈(TBIL)의 증가가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 관찰되었다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

800 mg/kg/day 투여군 수컷에서 Na^+ 가 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았으나($P < 0.05$), 용량상관성 없는 변화이었다.

장기중량

2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 간장의 절대 및 상대중량이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았고($P < 0.05$, $P < 0.01$), 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 좌우측 고환의 상대중량이 부형제대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 높았다($P < 0.01$).

부검소견

800 mg/kg/day 투여군 수컷에서 좌측 고환이 없는 소견(absence)과 좌측 부고환의 왜소(small)가 1/10 레씩 관찰되었고, 암컷에서 자궁내 맑은액체저류(retention of clear fluid)가 부형제대조군, 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군 순으로 각 2/10, 2/10, 1/10 및 1/10 레씩 관찰되었다.

조직병리학적 검사

조직병리학적 결과를 바탕으로 볼 때 부형제대조군과 비교하여 증가한 병변은 관찰되지 않았다. SD 랫드의 암수동물에서 자연발생적으로 발생하는 변화들만 관찰되었다. 이 중 높은 빈도로 관찰된 병변은 만성진행성신증(nephropathy, chronic progressive)이었으며 수컷은 부형제대조군 및 5,000 mg/kg/day 투여군 모든 개체에서 관찰되었으며, 암컷 부형제대조군과 5,000 mg/kg/day 투여군에서 각 5/10 및 7/10 레 관찰되었다.

그리고 부검 시, 좌측 고환이 발견되지 않았고(absence), 좌측 부고환의 왜소(small)가 관찰되었던 개체의 부고환에서 직경 약 2 mm 정도로 심하게 위축(atrophy)된 고환이 관찰되었으며 부고환도 위축되어 관찰되었다. 그리고 맑은액체저류의 자궁에서는 몰자궁증(hydrometra)이 관찰되었다.

고찰 및 결론

조직병리학적 결과, 시험물질 투여와 관련된 병변은 관찰되지 않았다. 5,000 mg/kg/day 투여군의 신장에서 관찰된 만성진행성신증(chronic progressive nephropathy)은 부형제대조군과 비교하여 병변의 관찰 빈도가 유사하였고, 정도에서 차이를 보이지 않아 시험물질 투여에 의한 영향이 아닌 것으로 판단한다.

그리고 부검 시, 800 mg/kg/day 투여군 1 례에서 발견되었던 고환과 부고환의 위축은 동일 개체의 오른쪽이나 다른 개체들에는 이상이 관찰되지 않아, 시험물질의 영향은 아닌 우발적인 발생으로 판단한다. 그리고 자궁내 맑은액체저류에 의한 물자궁증은 성주기에 따라 발생하는 소견이며²⁾ 시험물질의 영향은 없는 것으로 판단한다.

그 외 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사에서 관찰된 변화는 모두 정상범위 이내의 변화로, 독성학적인 의미가 미약하다.

1,667 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 관찰된 간장의 절대 또는 상대중량의 증가는 정상범위 이내의 변화로, 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단한다.

그러므로 요검사, 장기중량 측정, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사 그리고, 조직 병리학적 결과를 바탕으로 볼 때, Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험에서 시험물질 RIS의 표적장기는 관찰되지 않았으며 무독성량(NOAEL)은 5,000 mg/kg/day 이었다.

참고문헌

1. Xybion (2010). Lexicon, Pristima™ (Path/Tox system), Version 6.3.0 Build 15. Xybion Medical Systems. USA.
2. Covance (2001). Covance Glossary, Version 5. Covance Inc.
3. International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice (INHAND) Guides (2009 and 2010), STP/RITA/ESTP/BSTP/JSTP.
4. Streett, C. Spencer et al (2003). Standardized System for Nomenclature and Diagnostic Criteria – Guides for Toxicologic Pathology. STP/ARP/AFIP, Washington, D.C.
5. Mohr U, ed (2001). International Classification of Rodent Tumours. The Mouse. STPs/ILSI.
6. Mohr U, ed (between 1992 and 1997). WHO International Classification of Rodent Tumors Part I-The Rat. IARC Scientific Publications (International Agency for Research on Cancer, Lyon, France).
7. Society of Toxicologic Pathologists (1990). Guides for Toxicologic Pathology: Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.
8. Travlos GS, Hard GC, Betz LJ, Kissling GE (2011). Chronic progressive nephropathy in male F344 rats in 90-day toxicity studies: its occurrence and association with renal tubule tumors in subsequent 2-year bioassays. Toxicol Pathol. 39(2):381-9.

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 1 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Skin	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Mammary gland	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Adrenal gland	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	8	0	0	10	10	0	0	10
Focus of cellular alteration		2	0	0	0	0	0	0	0
Pituitary gland	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	9	0	0	10	10	0	0	10
Cyst(s), pars distalis		1	0	0	0	0	0	0	0

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 2 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Testis	Number Examined:	10	1	0	10	0	0	0	0
	Number Unremarkable:	7	0	0	10	0	0	0	0
Atrophy		0	1	0	0	0	0	0	0
Atrophy, tubules		3	0	0	0	0	0	0	0
Epididymis	Number Examined:	10	1	0	10	0	0	0	0
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	0	0	0	0
Atrophy		0	1	0	0	0	0	0	0
Seminal vesicle	Number Examined:	10	0	0	10	0	0	0	0
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	0	0	0	0
Prostate gland	Number Examined:	10	0	0	10	0	0	0	0
	Number Unremarkable:	6	0	0	9	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell		4	0	0	1	0	0	0	0

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 3 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				Subchronic/13-week repeated oral dose			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Ovaries	Number Examined:	0	0	0	0	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	10	0	0	10
Uterus	Number Examined:	0	0	0	0	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	8	0	0	9
Hydrometra		0	0	0	0	2	2	1	1
Vagina	Number Examined:	0	0	0	0	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	10	0	0	10
Kidney	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	5	0	0	2
Dilation, tubules		2	0	0	0	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell, interstitial		0	0	0	0	0	0	0	1
Infiltration, mononuclear cell, pelvis		0	0	0	0	0	0	0	1

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 4 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Kidney	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	5	0	0	2
Mineralization		2	0	0	3	0	0	0	3
Nephropathy, chronic progressive		10	0	0	10	5	0	0	7
Pigmentation		0	0	0	0	0	0	0	1
Urinary bladder	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	9
Infiltration, mononuclear cell		0	0	0	0	0	0	0	1
Tongue	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Liver	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	2	0	0	6	8	0	0	8
Infiltration, mononuclear cell		8	0	0	4	2	0	0	2

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 5 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Spleen	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	8	0	0	5	9	0	0	9
Hematopoiesis		2	0	0	5	1	0	0	1
Pancreas	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	9	0	0	10
Atrophy, acinar cell		0	0	0	0	1	0	0	0
Lung	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	9	0	0	8	10	0	0	10
Aggregates, macrophages, foamy		1	0	0	1	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell		0	0	0	1	0	0	0	0
Heart	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 6 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Aorta	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Thymus	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	9	0	0	7	7	0	0	9
Cyst(s)		1	0	0	3	3	0	0	0
Hyperplasia, epithelial		0	0	0	0	0	0	0	1
Trachea	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Esophagus	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 7 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Thyroid gland	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	9
Cyst(s)		0	0	0	0	0	0	0	1
Parathyroid gland	Number Examined:	0	0	0	0	0	0	0	0
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivary gland, parotid	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	9	0	0	9	9	0	0	10
Infiltration, mononuclear cell		1	0	0	1	1	0	0	0
Salivary gland, mandibular	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 8 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Salivary gland, sublingual	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Lymph node, mandibular	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Lymph node, mesenteric	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Duodenum	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 9 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Jejunum	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Ileum	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Cecum	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Colon	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 10 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Rectum	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Spinal cord, thoracic	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Skeletal muscle	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Stomach	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 11 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Brain	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Eye	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Harderian gland	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	9	0	0	6	8	0	0	5
Infiltration, mononuclear cell		1	0	0	4	2	0	0	5
Sternum	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 12 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Nerve, peripheral	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Femorotibial joint	Number Examined:	10	0	0	10	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	10	0	0	10
Coagulating gland	Number Examined:	10	0	0	10	0	0	0	0
	Number Unremarkable:	10	0	0	10	0	0	0	0
Cervix	Number Examined:	0	0	0	0	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	10	2	1	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 13 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley	Dosage Group:	M				F			
		Control	2	3	4	Control	2	3	4
	Number of Animals:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Examined:	10	1	0	10	10	2	1	10
	Number Unremarkable:	0	0	0	0	2	0	0	0
Eye-Optic Nerve	Number Examined:	10	0	0	9	10	0	0	10
	Number Unremarkable:	10	0	0	9	10	0	0	10

Side by Side Summary Report of Histopathology

Page 14 of 14

Printed: 13 Jan 2012 07:00:03 PM +09:00
Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Subchronic/13-week repeated oral dose

Rat/Sprague-Dawley

Report Selections

Report generated by
Study Animal Number

baejinsook

001,002,003,004,005,006,007,008,009,010,011,031,032,033,034,035,036,037,038,039,040,041,042,043,044,045,046,047,048,049,050,056,057,070,071,072,073,074,075,076,077,078,079,080

Control group(s)

1

Comparison group(s)

2,3,4

Individual Data Listing of Histopathology

Page 1 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
001	M	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Adrenal gland (Required)		
Focus of cellular alteration - minimal		
Prostate gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - mild		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Spleen	Nerve, peripheral	Rectum
Cecum	Sternum	Coagulating gland
Eye	Harderian gland	Epididymis
Seminal vesicle	Thyroid gland	Testis
Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
Eye-Optic Nerve	Aorta	Brain
Colon	Duodenum	Esophagus
Femrotibial joint	Heart	Ileum
Jejunum	Liver	Lung
Mammary gland	Pancreas	Pituitary gland

Individual Data Listing of Histopathology

Page 2 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
002	M	1
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Dilation, tubules - minimal		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Thymus (Required)		
Cyst(s) - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Spleen	Nerve, peripheral	Rectum
Cecum	Sternum	Adrenal gland
Coagulating gland	Eye	Harderian gland
Epididymis	Seminal vesicle	Thyroid gland
Testis	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
Spinal cord, thoracic	Eye-Optic Nerve	Aorta
Brain	Colon	Duodenum
Esophagus	Femorotibial joint	Heart
Heum	Jejunum	Lung
Mammary gland	Pancreas	Pituitary gland
Prostate gland	Skeletal muscle	Skin
Stomach	Tongue	Trachea
Urinary bladder		
003	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 3 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
003	M	1
		Kidney (Required) Nephropathy, chronic progressive - mild
		Liver (Required) Infiltration, mononuclear cell - minimal
		Spleen (Required) Hematopoiesis - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Nerve, peripheral
		Sternum
		Eye
		Seminal vesicle
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Eye-Optic Nerve
		Colon
		Femorotibial joint
		Jejunum
		Pancreas
		Skeletal muscle
		Thymus
		Urinary bladder
		Rectum
		Adrenal gland
		Harderian gland
		Thyroid gland
		Salivary gland, parotid
		Lymph node, mesenteric
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Lung
		Pituitary gland
		Skin
		Tongue
		Cecum
		Coagulating gland
		Epididymis
		Testis
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Mammary gland
		Prostate gland
		Stomach
		Trachea
004	M	1
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92
		Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)
		Kidney (Required) Nephropathy, chronic progressive - mild

Individual Data Listing of Histopathology

Page 4 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
004	M	1
		Liver (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Spleen
		Cecum
		Coagulating gland
		Epididymis
		Testis
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Mammary gland
		Prostate gland
		Stomach
		Trachea
		Nerve, peripheral
		Sternum
		Eye
		Seminal vesicle
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Eye-Optic Nerve
		Colon
		Femorotibial joint
		Jejunum
		Pancreas
		Skeletal muscle
		Thymus
		Urinary bladder
		Rectum
		Adrenal gland
		Harderian gland
		Thyroid gland
		Salivary gland, parotid
		Lymph node, mesenteric
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Lung
		Pituitary gland
		Skin
		Tongue
005	M	1
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92
		Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)
		Pituitary gland (Required)
		Cyst(s), pars distalis - Present
		Testis (Required)
		Atrophy, tubules - minimal
		Prostate gland (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal

Individual Data Listing of Histopathology

Page 5 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal #	Sex	Group
005	M	1
Kidney (Required)		
Mineralization - minimal, cortex		
Nephropathy, chronic progressive - mild		
Harderian gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Spleen	Nerve, peripheral	Rectum
Cecum	Sternum	Adrenal gland
Coagulating gland	Eye	Epididymis
Seminal vesicle	Thyroid gland	Salivary gland, mandibular
Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic	Eye-Optic Nerve
Aorta	Brain	Colon
Duodenum	Esophagus	Femorotibial joint
Heart	Ileum	Jejunum
Liver	Lung	Mammary gland
Pancreas	Skeletal muscle	Skin
Stomach	Thymus	Tongue
Trachea	Urinary bladder	
006	M	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Mineralization - minimal, cortex		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Liver (Required)		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 6 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
006	M	I
		Liver (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal
		Spleen (Required)
		Hematopoiesis - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Nerve, peripheral
		Sternum
		Eye
		Seminal vesicle
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Eye-Optic Nerve
		Colon
		Femorotibial joint
		Jejunum
		Pancreas
		Skeletal muscle
		Thymus
		Urinary bladder
		Rectum
		Adrenal gland
		Harderian gland
		Thyroid gland
		Salivary gland, parotid
		Lymph node, mesenteric
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Lung
		Pituitary gland
		Skin
		Tongue
		Cecum
		Coagulating gland
		Epididymis
		Testis
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Mammary gland
		Prostate gland
		Stomach
		Trachea
007	M	I
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92
		Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)
		Kidney (Required)
		Nephropathy, chronic progressive - mild
		Liver (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal

Individual Data Listing of Histopathology

Page 7 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
007	M	I
Lung (Required)		
Aggregates, macrophages, foamy - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Spleen	Nerve, peripheral	Rectum
Cecum	Sternum	Adrenal gland
Coagulating gland	Eye	Harderian gland
Epididymis	Seminal vesicle	Thyroid gland
Testis	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
Spinal cord, thoracic	Eye-Optic Nerve	Aorta
Brain	Colon	Duodenum
Esophagus	Femorotibial joint	Heart
Ileum	Jejunum	Mammary gland
Pancreas	Pituitary gland	Prostate gland
Skeletal muscle	Skin	Stomach
Thymus	Tongue	Trachea
Urinary bladder		
008	M	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Adrenal gland (Required)		
Focus of cellular alteration - minimal		
Testis (Required)		
Atrophy, tubules - minimal		
Kidney (Required)		
Dilation, tubules - minimal		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 8 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
008	M	1
		Kidney (Required)
		Nephropathy, chronic progressive - low-moderate
		Liver (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal
		Salivary gland, parotid (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Spleen
		Cecum
		Eye
		Seminal vesicle
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Mammary gland
		Prostate gland
		Stomach
		Trachea
		Nerve, peripheral
		Sternum
		Harderian gland
		Thyroid gland
		Lymph node, mandibular
		Eye-Optic Nerve
		Colon
		Femorotibial joint
		Jejunum
		Pancreas
		Skeletal muscle
		Thymus
		Urinary bladder
		Rectum
		Coagulating gland
		Epididymis
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mesenteric
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Lung
		Pituitary gland
		Skin
		Tongue
009	M	1
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92
		Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)
		Testis (Required)
		Atrophy, tubules - minimal
		Prostate gland (Required)

Individual Data Listing of Histopathology

Page 10 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
010	M	I
		Kidney (Required)
		Nephropathy, chronic progressive - mild
		Liver (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Spleen
		Cecum
		Coagulating gland
		Epididymis
		Testis
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Mammary gland
		Skeletal muscle
		Thymus
		Urinary bladder
		Nerve, peripheral
		Sternum
		Eye
		Seminal vesicle
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Eye-Optic Nerve
		Colon
		Femorotibial joint
		Jejunum
		Pancreas
		Skin
		Tongue
		Rectum
		Adrenal gland
		Harderian gland
		Thyroid gland
		Salivary gland, parotid
		Lymph node, mesenteric
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Lung
		Pituitary gland
		Stomach
		Trachea
031	M	4
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92
		Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)
		Kidney (Required)
		Mineralization - minimal, cortex
		Nephropathy, chronic progressive - minimal
		Thymus (Required)

Individual Data Listing of Histopathology

Page 11 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
031	M	4
	Thymus (Required)	
	Cyst(s) - Present	
	Eye-Optic Nerve (Required)	Missing
	The following Tissues are No Abnormalities Detected:	
	Spleen	Nerve, peripheral
	Cecum	Sternum
	Coagulating gland	Eye
	Epididymis	Seminal vesicle
	Testis	Salivary gland, mandibular
	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
	Spinal cord, thoracic	Aorta
	Colon	Duodenum
	Femorotibial joint	Heart
	Jejunum	Liver
	Mammary gland	Pancreas
	Prostate gland	Skeletal muscle
	Stomach	Tongue
	Urinary bladder	
032	M	4
	Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice	
	Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92	
	Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)	
	Kidney (Required)	
	Nephropathy, chronic progressive - minimal	
	Spleen (Required)	
	Hematopoiesis - minimal	
	Thymus (Required)	

Individual Data Listing of Histopathology

Page 12 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
032	M	4
	Thymus (Required)	
	Cyst(s) - Present	
	The following Tissues are No Abnormalities Detected:	
	Nerve, peripheral	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Eye	Harderian gland
	Seminal vesicle	Thyroid gland
	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid
	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
	Eye-Optic Nerve	Aorta
	Colon	Duodenum
	Femorotibial joint	Heart
	Jejunum	Liver
	Mammary gland	Pancreas
	Prostate gland	Skeletal muscle
	Stomach	Tongue
	Urinary bladder	Cecum
		Coagulating gland
		Epididymis
		Testis
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Lung
		Pituitary gland
		Skin
		Trachea
033	M	4
	Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice	
	Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92	
	Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)	
	Prostate gland (Required)	
	Infiltration, mononuclear cell - minimal	
	Kidney (Required)	
	Nephropathy, chronic progressive - mild	
	Liver (Required)	
	Infiltration, mononuclear cell - minimal	

Individual Data Listing of Histopathology

Page 13 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
033	M	4
		Spleen (Required)
		Hematopoiesis - minimal
		Harderian gland (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Nerve, peripheral
		Sternum
		Eye
		Thyroid gland
		Salivary gland, parotid
		Lymph node, mesenteric
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Lung
		Pituitary gland
		Stomach
		Trachea
		Rectum
		Adrenal gland
		Epididymis
		Testis
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Mammary gland
		Skeletal muscle
		Thymus
		Urinary bladder
		Cecum
		Coagulating gland
		Seminal vesicle
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Eye-Optic Nerve
		Colon
		Femrotibial joint
		Jejunum
		Pancreas
		Skin
		Tongue
034	M	4
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92
		Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)
		Kidney (Required)
		Mineralization - minimal, cortex
		Nephropathy, chronic progressive - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Spleen
		Nerve, peripheral
		Rectum

Individual Data Listing of Histopathology

Page 14 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal																																									
#	Sex	Group																																							
034	M	4																																							
The following Tissues are No Abnormalities Detected:																																									
		<table border="0"> <tr> <td>Cecum</td> <td>Sternum</td> <td>Adrenal gland</td> </tr> <tr> <td>Coagulating gland</td> <td>Eye</td> <td>Harderian gland</td> </tr> <tr> <td>Epididymis</td> <td>Seminal vesicle</td> <td>Thyroid gland</td> </tr> <tr> <td>Testis</td> <td>Salivary gland, mandibular</td> <td>Salivary gland, parotid</td> </tr> <tr> <td>Salivary gland, sublingual</td> <td>Lymph node, mandibular</td> <td>Lymph node, mesenteric</td> </tr> <tr> <td>Spinal cord, thoracic</td> <td>Eye-Optic Nerve</td> <td>Aorta</td> </tr> <tr> <td>Brain</td> <td>Colon</td> <td>Duodenum</td> </tr> <tr> <td>Esophagus</td> <td>Femorotibial joint</td> <td>Heart</td> </tr> <tr> <td>Ileum</td> <td>Jejunum</td> <td>Liver</td> </tr> <tr> <td>Lung</td> <td>Mammary gland</td> <td>Pancreas</td> </tr> <tr> <td>Pituitary gland</td> <td>Prostate gland</td> <td>Skeletal muscle</td> </tr> <tr> <td>Skin</td> <td>Stomach</td> <td>Thymus</td> </tr> <tr> <td>Tongue</td> <td>Trachea</td> <td>Urinary bladder</td> </tr> </table>	Cecum	Sternum	Adrenal gland	Coagulating gland	Eye	Harderian gland	Epididymis	Seminal vesicle	Thyroid gland	Testis	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic	Eye-Optic Nerve	Aorta	Brain	Colon	Duodenum	Esophagus	Femorotibial joint	Heart	Ileum	Jejunum	Liver	Lung	Mammary gland	Pancreas	Pituitary gland	Prostate gland	Skeletal muscle	Skin	Stomach	Thymus	Tongue	Trachea	Urinary bladder
Cecum	Sternum	Adrenal gland																																							
Coagulating gland	Eye	Harderian gland																																							
Epididymis	Seminal vesicle	Thyroid gland																																							
Testis	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid																																							
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric																																							
Spinal cord, thoracic	Eye-Optic Nerve	Aorta																																							
Brain	Colon	Duodenum																																							
Esophagus	Femorotibial joint	Heart																																							
Ileum	Jejunum	Liver																																							
Lung	Mammary gland	Pancreas																																							
Pituitary gland	Prostate gland	Skeletal muscle																																							
Skin	Stomach	Thymus																																							
Tongue	Trachea	Urinary bladder																																							
035	M	4																																							
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice																																									
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92																																									
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)																																									
Kidney (Required)																																									
Nephropathy, chronic progressive - minimal																																									
The following Tissues are No Abnormalities Detected:																																									
		<table border="0"> <tr> <td>Spleen</td> <td>Nerve, peripheral</td> <td>Rectum</td> </tr> <tr> <td>Cecum</td> <td>Sternum</td> <td>Adrenal gland</td> </tr> <tr> <td>Coagulating gland</td> <td>Eye</td> <td>Harderian gland</td> </tr> <tr> <td>Epididymis</td> <td>Seminal vesicle</td> <td>Thyroid gland</td> </tr> <tr> <td>Testis</td> <td>Salivary gland, mandibular</td> <td>Salivary gland, parotid</td> </tr> <tr> <td>Salivary gland, sublingual</td> <td>Lymph node, mandibular</td> <td>Lymph node, mesenteric</td> </tr> </table>	Spleen	Nerve, peripheral	Rectum	Cecum	Sternum	Adrenal gland	Coagulating gland	Eye	Harderian gland	Epididymis	Seminal vesicle	Thyroid gland	Testis	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric																					
Spleen	Nerve, peripheral	Rectum																																							
Cecum	Sternum	Adrenal gland																																							
Coagulating gland	Eye	Harderian gland																																							
Epididymis	Seminal vesicle	Thyroid gland																																							
Testis	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid																																							
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric																																							

Individual Data Listing of Histopathology

Page 15 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
035	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Spinal cord, thoracic	Eye-Optic Nerve
	Brain	Colon
	Esophagus	Femorotibial joint
	Ileum	Jejunum
	Lung	Mammary gland
	Pituitary gland	Prostate gland
	Skin	Stomach
	Tongue	Trachea
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Liver
		Pancreas
		Skeletal muscle
		Thymus
		Urinary bladder
036	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
	Mineralization - minimal, cortex	
	Nephropathy, chronic progressive - mild	
Spleen (Required)		
	Hematopoiesis - mild	
Harderian gland (Required)		
	Infiltration, mononuclear cell - minimal	
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Nerve, peripheral	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Eye	Epididymis
	Thyroid gland	Testis
	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
		Cecum
		Coagulating gland
		Seminal vesicle
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Eye-Optic Nerve

Individual Data Listing of Histopathology

Page 16 of 39
 Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00
 Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemcon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
036	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Aorta	Brain
	Duodenum	Esophagus
	Heart	Ileum
	Liver	Lung
	Pancreas	Pituitary gland
	Skeletal muscle	Skin
	Thymus	Tongue
	Urinary bladder	
	Colon	
	Femorotibial joint	
	Jejunum	
	Mammary gland	
	Prostate gland	
	Stomach	
	Trachea	
037	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - low-moderate		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - mild		
Lung (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal, alveolus		
Thymus (Required)		
Cyst(s) - Present		
Harderian gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Nerve, peripheral	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Eye	Epididymis
	Cecum	
	Coagulating gland	
	Seminal vesicle	

Individual Data Listing of Histopathology

Page 17 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
037	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Thyroid gland	Testis	Salivary gland, mandibular
Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic	Eye-Optic Nerve
Aorta	Brain	Colon
Duodenum	Esophagus	Femorotibial joint
Heart	Ileum	Jejunum
Liver	Mammary gland	Pancreas
Pituitary gland	Prostate gland	Skeletal muscle
Skin	Stomach	Tongue
Trachea	Urinary bladder	
038	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - mild		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Lung (Required)		
Aggregates, macrophages, foamy - minimal		
Harderian gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Spleen	Nerve, peripheral	Rectum
Cecum	Sternum	Adrenal gland
Coagulating gland	Eye	Epididymis

Individual Data Listing of Histopathology

Page 18 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
038	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Seminal vesicle	Thyroid gland	Testis
Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
Eye-Optic Nerve	Aorta	Brain
Colon	Duodenum	Esophagus
Femorotibial joint	Heart	Ileum
Jejunum	Mammary gland	Pancreas
Pituitary gland	Prostate gland	Skeletal muscle
Skin	Stomach	Thymus
Tongue	Trachea	Urinary bladder
039	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Spleen	Nerve, peripheral	Rectum
Cecum	Sternum	Adrenal gland
Coagulating gland	Eye	Harderian gland
Epididymis	Seminal vesicle	Thyroid gland
Testis	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
Spinal cord, thoracic	Eye-Optic Nerve	Aorta

Individual Data Listing of Histopathology

Page 19 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
039	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Brain	Colon
	Esophagus	Femorotibial joint
	Ileum	Jejunum
	Mammary gland	Pancreas
	Prostate gland	Skeletal muscle
	Stomach	Thymus
	Trachea	Urinary bladder
		Duodenum
		Heart
		Lung
		Pituitary gland
		Skin
		Tongue
040	M	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 92		
Death Date and Time: 13 Oct 2011 09:22:45 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - mild		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Salivary gland, parotid (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Nerve, peripheral	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Eye	Harderian gland
	Seminal vesicle	Thyroid gland
	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, sublingual
	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
		Cecum
		Coagulating gland
		Epididymis
		Testis
		Lymph node, mandibular
		Eye-Optic Nerve

Individual Data Listing of Histopathology

Page 20 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
040	M	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Aorta	Brain	Colon
Duodenum	Esophagus	Femorotibial joint
Heart	Ileum	Jejunum
Lung	Mammary gland	Pancreas
Pituitary gland	Prostate gland	Skeletal muscle
Skin	Stomach	Thymus
Tongue	Trachea	Urinary bladder
041	F	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Thymus (Required)		
Cyst(s) - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum
Sternum	Adrenal gland	Eye
Harderian gland	Thyroid gland	Kidney
Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
Ovaries	Eye-Optic Nerve	Aorta
Brain	Colon	Duodenum
Esophagus	Femorotibial joint	Heart
Ileum	Jejunum	Liver
Lung	Mammary gland	Pancreas
Pituitary gland	Skeletal muscle	Skin

Individual Data Listing of Histopathology

Page 22 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
043	F	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum
Sternum	Adrenal gland	Eye
Harderian gland	Thyroid gland	Kidney
Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
Ovaries	Eye-Optic Nerve	Aorta
Brain	Colon	Duodenum
Esophagus	Femorotibial joint	Heart
Ileum	Jejunum	Liver
Lung	Mammary gland	Pancreas
Pituitary gland	Skeletal muscle	Skin
Stomach	Thymus	Tongue
Trachea	Urinary bladder	Uterus
044	F	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum

Individual Data Listing of Histopathology

Page 23 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
044	F	I
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Sternum	Adrenal gland
	Harderian gland	Thyroid gland
	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid
	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
	Ovaries	Eye-Optic Nerve
	Brain	Colon
	Esophagus	Femorotibial joint
	Heum	Jejunum
	Mammary gland	Pancreas
	Skeletal muscle	Skin
	Thymus	Tongue
	Urinary bladder	Uterus
045	F	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Harderian gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Vagina	Spleen
	Cervix	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Thyroid gland	Salivary gland, mandibular
	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
		Nerve, peripheral
		Cecum
		Eye
		Salivary gland, parotid
		Lymph node, mesenteric

Individual Data Listing of Histopathology

Page 24 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
045	F	I
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Spinal cord, thoracic	Ovaries
	Aorta	Brain
	Duodenum	Esophagus
	Heart	Ileum
	Liver	Lung
	Pancreas	Pituitary gland
	Skin	Stomach
	Tongue	Trachea
	Uterus	
046	F	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Thymus (Required)		
Cyst(s) - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Vagina	Spleen
	Cervix	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Harderian gland	Thyroid gland
	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
	Eye-Optic Nerve	Aorta
	Colon	Duodenum
		Eye-Optic Nerve
		Colon
		Femorotibial joint
		Jejunum
		Mammary gland
		Skeletal muscle
		Thymus
		Urinary bladder
		Nerve, peripheral
		Cecum
		Eye
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Ovaries
		Brain
		Esophagus

Individual Data Listing of Histopathology

Page 25 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
046	F	I
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Femorotibial joint	Heart	Ileum
Jejunum	Liver	Lung
Mammary gland	Pancreas	Pituitary gland
Skeletal muscle	Skin	Stomach
Tongue	Trachea	Urinary bladder
Uterus		
047	F	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - mild		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
Harderian gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Nerve, peripheral	Cervix
Rectum	Cecum	Sternum
Adrenal gland	Eye	Thyroid gland
Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
Ovaries	Eye-Optic Nerve	Aorta
Brain	Colon	Duodenum

Individual Data Listing of Histopathology

Page 26 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
047	F	1
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Esophagus	Femorotibial joint
	Ileum	Jejunum
	Mammary gland	Pancreas
	Skeletal muscle	Skin
	Thymus	Tongue
	Urinary bladder	Uterus
		Heart
		Lung
		Pituitary gland
		Stomach
		Trachea
048	F	1
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Vagina	Spleen
	Cervix	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Harderian gland	Thyroid gland
	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid
	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
	Ovaries	Eye-Optic Nerve
	Brain	Colon
	Esophagus	Femorotibial joint
	Ileum	Jejunum
	Lung	Mammary gland
	Pituitary gland	Skeletal muscle
	Stomach	Thymus
	Trachea	Urinary bladder
		Nerve, peripheral
		Cecum
		Eye
		Kidney
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Liver
		Pancreas
		Skin
		Tongue
		Uterus
049	F	1

Individual Data Listing of Histopathology

Page 27 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
049	F	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Uterus (Required)		
Hydrometra - Present		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Thymus (Required)		
Cyst(s) - Present		
Salivary gland, parotid (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum
Sternum	Adrenal gland	Eye
Harderian gland	Thyroid gland	Salivary gland, mandibular
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
Spinal cord, thoracic	Ovaries	Eye-Optic Nerve
Aorta	Brain	Colon
Duodenum	Esophagus	Femorotibial joint
Heart	Ileum	Jejunum
Liver	Lung	Mammary gland
Pancreas	Pituitary gland	Skeletal muscle
Skin	Stomach	Tongue
Trachea	Urinary bladder	
050	F	I
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 28 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
050	F	1
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Pancreas (Required)		
Atrophy, acinar cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum
Sternum	Adrenal gland	Eye
Harderian gland	Thyroid gland	Kidney
Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
Ovaries	Eye-Optic Nerve	Aorta
Brain	Colon	Duodenum
Esophagus	Femorotibial joint	Heart
Ileum	Jejunum	Liver
Lung	Mammary gland	Pituitary gland
Skeletal muscle	Skin	Stomach
Thymus	Tongue	Trachea
Urinary bladder	Uterus	
056	F	2
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Uterus (Non required)		
Hydrometra - Present		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Cervix		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 29 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
056	F	2
057	F	2
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93 Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate) Uterus (Non required) Hydrometra - Present The following Tissues are No Abnormalities Detected: Cervix		
070	F	3
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93 Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate) Uterus (Non required) Hydrometra - Present The following Tissues are No Abnormalities Detected: Cervix		
071	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93 Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate) Liver (Required) Infiltration, mononuclear cell - minimal Thymus (Required) Hyperplasia, epithelial - minimal Harderian gland (Required) Infiltration, mononuclear cell - minimal The following Tissues are No Abnormalities Detected:		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 30 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
071	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum
Sternum	Adrenal gland	Eye
Thyroid gland	Kidney	Salivary gland, mandibular
Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic	Ovaries
Eye-Optic Nerve	Aorta	Brain
Colon	Duodenum	Esophagus
Femorotibial joint	Heart	Ileum
Jejunum	Lung	Mammary gland
Pancreas	Pituitary gland	Skeletal muscle
Skin	Stomach	Tongue
Trachea	Urinary bladder	Uterus
072	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Spleen (Required)		
Hematopoiesis - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Nerve, peripheral	Cervix
Rectum	Cecum	Sternum
Adrenal gland	Eye	Harderian gland
Thyroid gland	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid

Individual Data Listing of Histopathology

Page 31 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
072	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
Spinal cord, thoracic	Ovaries	Eye-Optic Nerve
Aorta	Brain	Colon
Duodenum	Esophagus	Femrotibial joint
Heart	Ileum	Jejunum
Liver	Lung	Mammary gland
Pancreas	Pituitary gland	Skeletal muscle
Skin	Stomach	Thymus
Tongue	Trachea	Urinary bladder
Uterus		
073	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum
Sternum	Adrenal gland	Eye
Harderian gland	Thyroid gland	Salivary gland, mandibular
Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic	Ovaries
Eye-Optic Nerve	Aorta	Brain
Colon	Duodenum	Esophagus
Femrotibial joint	Heart	Ileum

Individual Data Listing of Histopathology

Page 32 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
073	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Jejunum	Liver
	Mammary gland	Pancreas
	Skeletal muscle	Skin
	Thymus	Tongue
	Urinary bladder	Uterus
		Lung
		Pituitary gland
		Stomach
		Trachea
074	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Harderian gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Vagina	Spleen
	Cervix	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Thyroid gland	Kidney
	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
	Eye-Optic Nerve	Aorta
	Colon	Duodenum
	Femorotibial joint	Heart
	Jejunum	Liver
	Mammary gland	Pancreas
	Skeletal muscle	Skin
	Thymus	Tongue
	Urinary bladder	Uterus
		Nerve, peripheral
		Cecum
		Eye
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Ovaries
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Lung
		Pituitary gland
		Stomach
		Trachea

Individual Data Listing of Histopathology

Page 33 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
074	F	4
075	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Mineralization - minimal, medulla		
Pigmentation - minimal		
Liver (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
Harderian gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum
Sternum	Adrenal gland	Eye
Thyroid gland	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
Spinal cord, thoracic	Ovaries	Eye-Optic Nerve
Aorta	Brain	Colon
Duodenum	Esophagus	Femorotibial joint
Heart	Ileum	Jejunum
Lung	Mammary gland	Pancreas
Pituitary gland	Skeletal muscle	Skin
Stomach	Thymus	Tongue
Trachea	Urinary bladder	Uterus
076	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 34 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
076	F	4
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
Harderian gland (Required)		
Infiltration, mononuclear cell - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Vagina	Spleen	Nerve, peripheral
Cervix	Rectum	Cecum
Sternum	Adrenal gland	Eye
Thyroid gland	Salivary gland, mandibular	Salivary gland, parotid
Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular	Lymph node, mesenteric
Spinal cord, thoracic	Ovaries	Eye-Optic Nerve
Aorta	Brain	Colon
Duodenum	Esophagus	Femorotibial joint
Heart	Ileum	Jejunum
Liver	Lung	Mammary gland
Pancreas	Pituitary gland	Skeletal muscle
Skin	Stomach	Thymus
Tongue	Trachea	Urinary bladder
Uterus		
077	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Kidney (Required)		
Infiltration, mononuclear cell, interstitial - mild		

Individual Data Listing of Histopathology

Page 35 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
077	F	4
		Kidney (Required)
		Infiltration, mononuclear cell, pelvis - moderate
		Mineralization - mild, medulla
		Nephropathy, chronic progressive - minimal
		Urinary bladder (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - mild
		Harderian gland (Required)
		Infiltration, mononuclear cell - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Vagina
		Cervix
		Sternum
		Thyroid gland
		Salivary gland, sublingual
		Spinal cord, thoracic
		Aorta
		Duodenum
		Heart
		Liver
		Pancreas
		Skin
		Tongue
		Spleen
		Rectum
		Adrenal gland
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Ovaries
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Lung
		Pituitary gland
		Stomach
		Trachea
		Nerve, peripheral
		Cecum
		Eye
		Salivary gland, parotid
		Lymph node, mesenteric
		Eye-Optic Nerve
		Colon
		Femrotibial joint
		Jejunum
		Mammary gland
		Skeletal muscle
		Thymus
		Uterus
078	F	4
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93
		Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)
		Kidney (Required)

Individual Data Listing of Histopathology

Page 36 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
078	F	4
		Kidney (Required)
		Nephropathy, chronic progressive - minimal
		Thyroid gland (Required) One of the pair is Missing
		Cyst(s) - Present
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Vagina Spleen Nerve, peripheral
		Cervix Rectum Cecum
		Sternum Adrenal gland Eye
		Harderian gland Salivary gland, mandibular Salivary gland, parotid
		Salivary gland, sublingual Lymph node, mandibular Lymph node, mesenteric
		Spinal cord, thoracic Ovaries Eye-Optic Nerve
		Aorta Brain Colon
		Duodenum Esophagus Femorotibial joint
		Heart Ileum Jejunum
		Liver Lung Mammary gland
		Pancreas Pituitary gland Skeletal muscle
		Skin Stomach Thymus
		Tongue Trachea Urinary bladder
		Uterus
079	F	4
		Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice
		Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93
		Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)
		Kidney (Required)
		Nephropathy, chronic progressive - minimal
		The following Tissues are No Abnormalities Detected:
		Vagina Spleen Nerve, peripheral

Individual Data Listing of Histopathology

Page 37 of 39
 Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00
 Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemcon Corp.

Study: 11-RR-074

Study Title: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
079	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Cervix	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
	Harderian gland	Thyroid gland
	Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual
	Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic
	Eye-Optic Nerve	Aorta
	Colon	Duodenum
	Femorotibial joint	Heart
	Jejunum	Liver
	Mammary gland	Pancreas
	Skeletal muscle	Skin
	Thymus	Tongue
	Urinary bladder	Uterus
		Cecum
		Eye
		Salivary gland, mandibular
		Lymph node, mandibular
		Ovaries
		Brain
		Esophagus
		Ileum
		Lung
		Pituitary gland
		Stomach
		Trachea
080	F	4
Death Status: Scheduled, Final phase sacrifice		
Phase/Death Day: Dosing Phase, Day 93		
Death Date and Time: 14 Oct 2011 09:22:09 AM +09:00(approximate)		
Uterus (Required)		
Hydrometra - Present		
Kidney (Required)		
Mineralization - minimal, medulla		
Nephropathy, chronic progressive - minimal		
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
	Vagina	Spleen
	Cervix	Rectum
	Sternum	Adrenal gland
		Nerve, peripheral
		Cecum
		Eye

Individual Data Listing of Histopathology

Page 38 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Animal		
#	Sex	Group
080	F	4
The following Tissues are No Abnormalities Detected:		
Harderian gland	Thyroid gland	Salivary gland, mandibular
Salivary gland, parotid	Salivary gland, sublingual	Lymph node, mandibular
Lymph node, mesenteric	Spinal cord, thoracic	Ovaries
Eye-Optic Nerve	Aorta	Brain
Colon	Duodenum	Esophagus
Femorotibial joint	Heart	Ileum
Jejunum	Liver	Lung
Mammary gland	Pancreas	Pituitary gland
Skeletal muscle	Skin	Stomach
Thymus	Tongue	Trachea
Urinary bladder		
-		

Phase/Death Day: , Day

Death Date and Time:

Individual Data Listing of Histopathology

Page 39 of 39

Printed: 13 Jan 2012 07:01:58 PM +09:00

Pristima® Version 6.3.0 Build 15

Chemon Corp.

Study: 11-RR-074

StudyTitle: A 13-Week repeated oral dose toxicity study of RIS in Sprague-Dawley rats

Test Article: RIS

Rat/Sprague-Dawley

Subchronic/13-week repeated oral dose

Report Selections

Report generated by
Study Animal Number

baejinsook

001,002,003,004,005,006,007,008,009,010,031,032,033,034,035,036,037,038,039,040,041,042,043,044,045,046,047,048,049,050,056,057,070,071,072,073,074,075,076,077,078,079,080

APPENDIX 3. PROTOCOL AND AMENDMENT

00/01 2011 14:58 FAX

001

ChemOn

시험계획서

RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
13 주간 반복 경구투여 독성시험

시험번호: 11-RR-074



승인:

배진숙
배진숙
시험책임자
㈜셀온 전임상연구소

2011.07.04
날짜

김갑호
김갑호, M.S.
운영책임자
㈜셀온 전임상연구소

2011.07.04
날짜

박상재
박상재
의뢰책임자
㈜에이지아이

2011.07.06
날짜

ORIGINAL

시 험 제 목	RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험	
시 험 목 적	본 시험은 시험물질 RIS를 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하여 무독성량 및 표적장기를 알아보고자 수행한다.	
시 험 지 칭	의약품등의독성시험기준 (2009-116호, KFDA, 2009 년 08 월 24 일)	
시 험 의뢰 자	㈜에이지아이 강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160 033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX)	
시 험 기 관	㈜켄온 전임상연구센터 경기도 용인시 처인구 양지면 제일리 334, 449-826 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)	
시 험 일 정	2011 년 07 월 07 일	동물입수(실험개시일)
	2011 년 07 월 14 일	시험물질 투여개시
	2011 년 10 월 13 일	시험물질 투여종료
	2011 년 10 월 13 일	주요군 수컷 부검
	2011 년 10 월 14 일	주요군 암컷 부검
	2011 년 12 월 09 일	조직병리검사 완료(실험종료 예정일)
	2012 년 01 월 13 일	최종보고서(안) 제출예정

주요시험관계자	동물관리:	이 주 영	시험물질 조제/보관:	허 현 숙
	부 검:	김 학 수	임상병리:	김 학 수
	조직병리:	강 부 현	통계분석:	이 민 행
	자료보관:	이 유 나		

기록과 재료의 보 관 [SOP-AC-001~007]
 시험계획서(수정 및 이탈기록), 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본, 검체 및 각종 증거자료는 해당물질의 관리 당국에 의한 시험성적서의 신뢰성 평가가 가능한 기간동안 보관하고, 자료보관실에 따로 규정이 없는 한 시험종료 후 3 년간 (㈜캠온 전임상연구센터의 자료보관실에 보관한다.
 임상병리 검체는 측정 종료일로부터 1 년간 보관한다.
 이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

G L P 대 응 비임상시험관리기준(제2009-183호, KFDA, 2009 년 12 월 22 일)
 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17
 시험계획서의 수정 혹은 이탈은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다.
 (㈜캠온 전임상연구센터의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 점검을 단독으로 행한다.

최 종 보 고 서 [SOP-TO-007]
 최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성보증확인서, 목차, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.

1. 시험물질 및 부형제

1) 시험물질[SOP-TA-001]

명 칭: RIS
 코드번호: C-0690
 로트번호: RIS-04-11022
 입 수 일: 2011 년 03 월 09 일
 입 수 량: 5 kg/pack × 1 pack
 외 관: 암갈색의 분말
 함 량: 시험성적서 별첨
 유효일자: 2013 년 02 월 23 일
 보관조건: 냉장, 방습
 공 급 원: ㈜에이지아이

2) 부형제

명 칭: 0.5 % CMC-Na (Carboxymethyl cellulose sodium salt)
 제조번호: 최종보고서에 기재
 공 급 원: 최종보고서에 기재
 보관조건: 조제 후 냉장
 선택이유: 독성시험에서 시험물질의 현탁에 일반적으로 사용하는 부형제이고, 본 시험 조건에서 시험물질이 잘 현탁되어 선택하였다.

2. 투여시험물질 및 함량분석

1) 투여시험물질[SOP-TA-002]

(1) 조제방법

본 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하며, 투여직전에 조제한다. 고용량군의 투여액은 시험물질을 정량 칭량한 후, 유발(motor)에 넣고, 부형제를 조금씩 넣어가면서 유봉(pestle)으로 마쇄하여 조제한다. 중간 및 저용량군의 투여액은 동일한 부형제를 단계 희석하여 조제한다.

2) 함량분석[SOP-AS-001/002]

투여시험물질의 함량분석은 실시하지 않는다.

3. 시험계 및 사육환경

1) 시험계

(1) 동물정보[SOP-AM-007/017/020]

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Hsd:Sprague Dawley [®] TMSD [®] TM	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리 406)	
선정사유	본 시험에 사용하는 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수시	48
	투여개시시	40
주령	입수시	5
	투여개시시	6
투여개시시 체중범위	평균체중(g)의 $\pm 20\%$ 이내	
잔여동물의 처리	㈜켄온의 SOP에 따른다.	

(2) 검역 및 순화[SOP-QT-001]

입수 후 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시키고, 매일 1 회 이상 일반증상을 관찰한다.

(3) 식별[SOP-AM-030/031]

동물은 피모색소표식법 및 ear-punch법을 사용하여 식별한다[순화기간: 미부표식법(청색)]. 사육상자에는 색으로 구별하는 개체식별카드를 부착하고, 사육상자대는 고유번호를 부여한다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착한다.

(4) 동물실험 윤리규정[SOP-AM-008]

㈜켄온 전임상연구센터의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다(일련번호: 11-R111).

2) 사육환경

(1) 환경조건 및 측정[SOP-FA-005]

동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10~20 회/hr, 조명시간 12 시간 (오전 8 시 정등-오후 8 시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 유지되는 ㈜켄온 전임상연구센터 제2동물사육구역 8 호실에서 사육한다.

온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정한다.

(2) 사료, 물, 깔개 및 오염물질 검사[SOP-AM-014/015]

사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET (2918C,

Harlan Laboratories Inc., USA)를 나라바이오택(서울특별시 강남구 청담동 71-22)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유섭취 시킨다.

물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣고 자유섭취 시킨다.

깔개는 나무깔개를 ㈜우정BSC (경기도 수원시 영통구 의의동 864-1 차세대융합기술연구원 B 동 3층)로부터 공급받아 고압증기멸균 후 사용한다.

오염물질 검사는 ㈜켄온의 SOP에 따른다.

(3) 사육상자 및 사육밀도[SOP-AM-023]

폴리카보네이트 사육상자(W 235 x L 380 x H 175 mm)에서 검역 및 순화기간에는 3 마리 이하/사육상자, 투여 및 관찰기간에는 2 마리 이하/사육상자로 수용한다.

(4) 사육관리[SOP-AM-002]

사육상자, 깔개 및 물병은 주 1 회 이상 교환하고, 사육상자대는 매월 1 회 시계방향으로 순환배치 한다.

(5) 군분리[SOP-AM-029]

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 시험군 구성표와 같이 무작위 분배한다.

4. 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

1) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1 ^{a)}	M / F	10 / 10	1-10 / 41-50	20	0
G2	M / F	10 / 10	11-20 / 51-60	20	800
G3	M / F	10 / 10	21-30 / 61-70	20	2,000
G4	M / F	10 / 10	31-40 / 71-80	20	5,000

a) 부형제대조군 (0.5 % CMC-Na)

2) 투여량의 설정[SOP-GT-006]

본 시험물질을 200, 1,000 및 5,000 mg/kg/day로 SD 랫드에 2 주간 반복 경구투여 한 DRF 독성시험(시험번호: 11-RR-073P) 결과, 암수에서 약물흔입변(2,000 mg/kg/day 이상 투여군) 또는 착색뇨(1,000 mg/kg/day 이상 투여군)가 관찰되었으나, 시험물질 또는 그 대사물이 변 또는 뇨로 배출되어 나타난 변화로 추정하였고, 1,000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 관찰된 혈중 Na⁺ 및 Cl⁻의 감소와 200 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 IP의 감소가 관찰되었으나, 정상범위 이내의 변화이었다. 상기 결과와 본 시험물질이 건강기능식품임을 감안하여 사람에게 대한 임상예정용량(1.5 g/man[≃]25 mg/kg, 성인 평균체중 60 kg 기준)의 약 200 배에 해당하는 5,000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고 그 아래로 공비 2.5로 두 개군을

두었으며 0.5 % CMC-Na만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.

3) 투여[SOP-AT-001]

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용한다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 7 일/주, 13 주간, 15:00 이전에 투여한다.
투여액량 산출	계획된 일자에 측정된 체중을 기준으로 20 mL/kg/day로 산출한다.
투여방법	경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여, 위 내에 직접 투여한다.

5. 관찰 및 검사

1) 일반증상[SOP-AT-004]

투여 및 관찰기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 관찰하고, 개체 별로 기록한다. 일반증상이 악화된 개체는 격리하고, 빈사동물 및 사망동물은 계획부검 동물에 준하여 처리한다. 투여개시일을 day 1으로 설정한다.

2) 체중[SOP-AT-006]

투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 및 부검일에 측정한다. 부검일은 절식시킨 체중을 측정한다.

3) 사료 및 물 섭취량[SOP-AT-008/009]

사료 및 물 섭취량은 투여개시일, 그 이후에는 주 1 회 측정한다. 측정방법은 사료 및 물을 정량급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하고, 마리당 평균섭취량으로 산출한다.

4) 안과학적 검사[SOP-AT-012]

관찰 최종 주에 주요군은 군당 암수 각 5 려의 동물에 대하여 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후 양쪽 안구에 산동제를 점적하여 동공확장을 유도한 다음, 안저사진기로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰한다. 특이증상이 발견되면 사진을 촬영하며, 시험책임자의 판단 하에 전체 동물에 대한 검사 확대 실시 및 사진촬영 여부를 결정한다.

6. 임상병리

1) 채뇨 및 채혈

(1) 채뇨[SOP-AT-010]

관찰 최종 주에 주요군은 앞의 번호부터 군당 5 마리의 동물을 대사 케이지에 수용한다. 3-4 시간 동안 수집한 신선뇨 중, 약 1 mL을 취하여 요검사를 실시하고, 24 시간 동안 수집한 요량을 측정한다.

(2) 채혈[SOP-AT-020, SOP-PA-001, SOP-BL-001]

동물은 채혈 전에 하룻밤 동안(16-24 시간) 절식(물은 제공)한다.

부검일에 동물을 Isoflurane으로 흡입마취하고, 후대정맥에서 주사기를 이용하여 채혈한다. 이때, 혈청 약 0.5 mL을 의뢰자에게 전달한다.

검사항목	혈액량	튜브
혈액학적 검사	약 1 mL	EDTA-2K CBC bottle
혈액응고시간 검사	1.8 mL	0.2 mL 3.2 % sodium citrate tube
혈액생화학적 검사	2 mL 이상	Clot activator vacutainer tube

상황에 따라, 혈액학적 검사 및 혈액응고시간 검사 시료는 분석 전까지 냉장보관하고, 혈액생화학적 검사 시료는 분석 전까지 냉동보관 한다.

2) 요검사 항목[SOP-BL-008/009]

(1) 요 일반검사 항목

요색조(urine color)	빌리루빈(BIL)	pH	아질산염(NIT)
투명도(clarity)	케톤체(KET)	요단백(PRO)	잠혈(OB)
당(GLU)	요비중(SG)	유로빌리노겐(URO)	

(2) 요침사 검사 항목

백혈구(WBC)	상피세포(epithelial cells)	적혈구(RBC)	원주(cast)
----------	------------------------	----------	----------

3) 혈액학적 검사 항목[SOP-BL-016]

백혈구(WBC)	평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)	림프구(LYM)
적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	단핵구(MONO)
혈색소량(HGB)	헤모글로빈분포폭(HDW)	호산구(EOS)
헤마토크리트치(HCT)	혈소판수(PLT)	호염기구(BASO)
평균적혈구용적(MCV)	평균혈소판용적(MPV)	대형비염색성세포(LUC)
평균적혈구헤모글로빈량(MCH)	호중구(NEU)	망상적혈구(RET)

4) 혈액응고시간 검사 항목[SOP-BL-006]

부분활성트롬보플라스틴시간(APTT) 프로트롬빈시간(PT)

5) 혈액생화학적 검사 항목[SOP-BL-002/017]

아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	총콜레스테롤(TCHO)	크레아티닌(CRE)
알라닌 아미노기전이효소(ALT)	중성지방(TG)	무기인(IP)
알칼라인 포스파타제(ALP)	총단백(TP)	칼슘(Ca ²⁺)
크레아티닌인산활성효소(CPK)	알부민(ALB)	나트륨(Na ⁺)
총빌리루빈(TBIL)	알부민/글로불린 비(A/G)	칼륨(K ⁺)
당(GLU)	혈액요소질소(BUN)	염소(Cl ⁻)

7. 조직병리

1) 부검[SOP-PA-001]

임상병리 검사를 위한 채혈 후, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사 시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기를 관찰하고, 부검소견을 기록한다.

2) 장기중량 측정[SOP-PA-001]

모든 동물의 아래 장기에 대한 중량을 측정(양측성 장기는 각각 측정)하고, 각 장기의 중량으로 체중에 대한 상대중량을 산출한다.

난소(ovaries)	전립샘(prostate gland)	심장(heart)
자궁(uterus)	고환(testes)	폐(lungs)
부신(adrenals)	부고환(epididymides)	뇌(brain)
뇌하수체(pituitary gland)	비장(spleen)	간장(liver)
가슴샘(thymus)	신장(kidneys)	

3) 조직 및 장기의 보존[SOP-PA-002]

모든 동물의 아래 장기를 적출하고, 안구(Davidson's 용액), 고환 및 부고환(Bouin's 용액)을 제외한 모든 장기를 10% 중성완충포름알린용액에 고정한다.

뇌(brain)	십이지장(duodenum)	흉척수(thoracic spinal cord)
뇌하수체(pituitary gland)	공장(jejunum)	대퇴근(femoral muscle)
폐(lungs)	회장(ileum)	좌골신경(sciatic nerve)
심장(heart)	맹장(cecum)	대퇴골(femur)
가슴샘(thymus)	결장(colon)	방광(urinary bladder)
비장(spleen)	직장(rectum)	고환(testes)

부신(adrenals)	안구(eyes)	부고환(epididymides)
신장(kidneys)	하더샘(hardierian gland)	전립샘(prostate gland)
간장(liver)	갑상샘(thyroid gland)	정낭(seminal vesicles)
혀(tongue)	침샘(salivary gland)	난소(ovaries)
기관(trachea)	대동맥(aorta)	자궁(uterus)
식도(esophagus)	위(stomach)	질(vagina)
췌장(pancreas)	흉골(sternum)	
장간막림프절 (mesenteric lymph node)	턱밑림프절 (submandibular lymph node)	피부 및 젖샘(mammary glands with adjacent skin)

4) 조직병리학적 검사[SOP-PA-006~013]

부형제대조근 및 고용량군의 모든 동물, 빈사 및 사망동물의 고정장기와 저용량 및 중간용량군에서 육안적 부검소견이 인정되는 장기에 대하여 조직슬라이드를 제작한다. 부형제대조근과 고용량군의 장기를 검사하여 시험물질에 의한 변화가 인정되는 장기는 모든 투여군의 해당 장기에 대하여 조직병리학적 검사를 실시한다.

8. 통계 분석[SOP-CO-001]

모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용한다.

모수적인 다중비교의 경우는 우선 일원배치분산분석(ANOVA)을 통하여 군간 유의성을 관찰하여 군간의 유의성이 인정되면 사후 검정을 실시한다. 사후 검정방법은 Levene test에서 분산의 동질성이 인정되면 Duncan's multiple range test (또는 Scheffe)를 수행하고, 분산의 동질성이 인정되지 않으면 Dunnett's T-test를 수행한다.

비모수적인 다중비교는 순위화한 데이터를 이용한 Kruskal-Wallis' H-test를 실시하여, 군간 유의성이 인정되면 Mann-Whitney U-test를 통하여 부형제대조근과의 유의성을 검정한다.

기타의 통계학적 방법을 사용한 경우에는 최종보고서에 상세히 기술하며, 모든 통계학적인 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용한다.

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by ChemOn Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

%	Percent	hr	Hour
°	Degree	min	Minute
C	Celsius	sec	Second
L	Liter	rpm	Revolution per Minute
dL	Deciliter	RCF	Relative Centrifugal Force
mL	Milliliter	SD	Standard Deviation
µL	Microliter	CV	Coefficient of Variation
g	Gram	RE	Relative Error
kg	Kilogram	RH	Relative Humidity
mg	Milligram	M	Male
µg	Microgram	F	Female
ng	Nanogram	NA	Not Applicable
m	Meter	N	Number
cm	Centimeter	SPF	Specific Pathogen Free
mm	Millimeter	TK	Toxicokinetic
µm	Micrometer	PK	Pharmacokinetic
ppm	Parts per million	AUC	Area Under the Curve
ppb	Parts per billion	C _{max}	Maximum Concentration
wk	Week	T _{max}	Time at Maximum Concentration
d	Day	t _{1/2}	Half-life
GLP	Good Laboratory Practice	SOP	Standard Operating Procedures
QAU	Quality Assurance Unit	ICH	International Conference on Harmonization
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	KFDA	Korea Food and Drug Administration
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

<CONTINUED>

단위 및 약호

(임상병리 약호)

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by ChemOn Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

A/G	Albumin/Globulin ratio	Li	Lithium
ALB	Albumin	LUC	Large unstained cell
ALP	Alkaline phosphatase	LYM	Lymphocytes
ALT	Alanine aminotransferase	MCH	Mean corpuscular hemoglobin
APTT	Activated partial thromboplastin time	MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
AST	Aspartate aminotransferase	MCV	Mean corpuscular volume
BASO	Basophils	MONO	Monocytes
BIL	Bilirubin	MPV	Mean platelet volume
BUN	Blood urea nitrogen	Na ⁺	Sodium
Ca ²⁺	Calcium	NEU	Neutrophils
Cl ⁻	Chloride	NIT	Nitrite
CPK	Creatine phosphokinase	OB	Occult blood
CRE	Creatinine	pH	Potential of hydrogen
EOS	Eosinophils	PLT	platelet count
Fe	Iron	PRO	Protein
GGT	Gamma glutamyl transpeptidase	PT	Prothrombin time
GLU	Glucose	RBC	Red blood cell
HCT	Hematocrit	RDW	Red cell distribution width
HDL	High density lipoprotein cholesterol	RET	Reticulocytes
HDW	Hemoglobin distribution width	SG	Specific gravity
HGB	Hemoglobin	TBIL	Total bilirubin
IP	Inorganic phosphorus	TCHO	Total cholesterol
K ⁺	Potassium	TG	Triglyceride
KET	Ketone body	TP	Total protein
LDL	Low density lipoprotein cholesterol	URO	Urobilinogen
LDH	Lactate dehydrogenase	WBC	White blood cell

<END>

Protocol Amendment Form
(시험계획서 수정 기록지)

Study Title: RIS의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험

Study No.: 11-RR-074 Amendment No.: 1

Amendment to the Protocol:
(수정 내용)

- Page 3. 주요시험관계자 중 조직병리책임자를 '강부현'에서 '강민수'로 변경한다.
- Page 10. 7.3) 조직 및 장기의 보존: 아래와 같이 수정한다.


수정 전	수정 후
턱밑림프절(submandibular lymph node)	턱밑림프절(mandibular lymph node)
좌골신경(sciatic nerve)	말초신경(peripheral nerve)
대퇴골(femur)	대퇴경골관절(femorotibial joint)
대퇴근(femoral muscle)	골격근(skeletal muscle)

Reason for the Amendment:
(수정 사유)



- 조직병리책임자의 업무과다로 인하여 변경한다.
- Pristima™ (Path/Tox system)의 Lexicon 용어에 준한 수정.

Impact on Study:
(시험에 미치는 영향)

- 없음.
- 단어의 의미는 동일 또는 유사하므로 시험에 미치는 영향은 없음.



Approved by:

	2011.12.05
Study Director	Date
	2011.12.08
Management	Date
Authorized by Sponsor	Date

APPENDIX 4. CERTIFICATE OF ANALYSIS



생명공학을 선도하는 주식회사 에이지아이

Certificate of Analysis

2011. 03. 07

Product Name: RIS	
Lot No. : RIS-04-11022	Mfg Date : 2011년 2월 24일
Quantity : 5 Kg	Exp Date : 2013년 2월 23일

Test Items	Specifications	Results
Appearance	암갈색의 분말	암갈색의 분말
Moisture (%)	<10 %	0.5 %
Gallic acid (%)	> 1 %	2.45 %
Salmonella	Negative	Negative
Coliform group	Negative	Negative

Tested by K.H. Kim 

최종보고서(안)

RIS의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호: 11-VG-694

시험의뢰기관: (주)에이지아이

(주)케온 전임상연구센터



Preclinical Research Center, Chemon Inc.
334, Jeil-Ri, Yangji-Myeon, Cheoin-Gu, Yongin-Si, Gyeonggi-Do,
449-826, Korea

진 술 서

RIS의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2009-183호, KFDA, 2009년 12월 22일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서의 일정과 (주)켄온 전임상연구센터의 SOP에 따라 수행되었고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험 수행에 있어 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

이 우 주, B.S.

날 짜

시험책임자

주 소 : (주)켄온 전임상연구센터

경기도 수원시 영통구 이의동 864-1 경기바이오센터 내, 443-766

연 락 처 : 031-888-6659 (TEL), 031-329-9901 (FAX)

E - m a i l : wjoo923@chemon.co.kr

김 갑 호, M.S.

날 짜

운영책임자

(주)켄온 전임상연구센터

신뢰성보증확인서

시험개요

- 시 형 제 목** RIS의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
- 시 형 목 적** 시험물질 RIS의 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium*의 4 개 TA 균주와 트립토판 요구성 균주 *E. coli* WP2 *uvrA*에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.
- 시 형 지 침** 의약품등의독성시험기준 (제2009-116호, KFDA, 2009 년 08 월 24 일)
OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG 471 (1997) ‘Bacterial Reverse Mutation Test’
- 시 형 의뢰자** (주)에이지아이
강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160
033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX)
의뢰책임자: 박 상 재
- 시 형 기 관** (주)켄온 전임상연구센터
경기도 수원시 영통구 이의동 864-1 경기바이오센터 내, 443-766
031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
운영책임자: 김 갑 호
- 시 형 일 정**
- | | |
|------------------|----------------|
| 2012 년 02 월 14 일 | 시험계획서승인(시험개시일) |
| 2012 년 02 월 21 일 | 균주접종(실험개시일) |
| 2012 년 02 월 22 일 | 시험물질 처리 |
| 2012 년 02 월 24 일 | 집락계수(실험종료일) |
| 2012 년 02 월 28 일 | 최종보고서(안) 제출 |
- 주요 시험 관계자** 시험물질 조제/보관: 허 현 속
자료보관: 이 유 나
- 기록과 자료의 보관** 시험계획서, 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 해당물질의 관리 당국에 의한 시험성적서의 신뢰성 평가가 가능한 기간동안 보관하고, 자료보관실에 따로 규정이 없는 한 시험종료 후 3 년간 (주)켄온 전임상연구센터의 자료보관실에 보관한다.
이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

목 차

진술서	i
신뢰성보증확인서.....	ii
시험개요.....	iii
요 약.....	1
재료 및 방법.....	2
결 과.....	9
고찰 및 결론.....	9
참고문헌.....	10
단위 및 약호.....	11
TABLE	
Table 1. Reverse mutagenicity assay results – summary	13
APPENDICES	
Appendix 1. Reverse mutagenicity assay results – individual plate counts	15
Appendix 2. Viable cell count of tester strains and results of sterility tests	16
Appendix 3. Historical control data	17
Appendix 4. Protocol	18
Appendix 5. Certificate of analysis	28

요 약

본 시험은 시험물질 RIS가 대사활성계 적용 및 비적용 하에 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 *uvrA*)에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보조소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였다. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다.

처리용 시험물질은 멸균주사용수로 조제하였다. 아래 표와 같이 설정한 농도군과 음성 및 양성대조군으로 시험균을 구성하였으며, 농도군당 3 개의 평판을 사용하였다.

균주명	대사활성계	농도($\mu\text{g}/\text{plate}$)				
		50	150	500	1,500	5,000
TA 균주	+/-	50	150	500	1,500	5,000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	50	150	500	1,500	5,000

시험결과, 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 집락 수의 증가는 관찰되지 않았으며 세포독성도 관찰되지 않았다.

한편 모든 양성대조군에서는 해당 음성대조군에 비해 집락수의 확실한 증가가 관찰되었다.

이상의 결과로, RIS은 본 시험조건 하에서 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 시험물질 및 대조물질

1) 시험물질(Appendix 5)

명 칭:	RIS
코드번호:	C-0690
제조번호:	RIS-01-11032S
입 수 일:	2011 년 12 월 28 일
입 수 량:	50 mg/mL, 50 mL/Bottle x 1 Bottle
외 관:	갈색의 액상
함 량:	의뢰자 미제공
유효일자:	2013 년 12 월 22 일
보관조건:	실온(11~30°C)
공 급 원:	㈜에이지아이

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭:	멸균주사용수(약칭 증류수)
제조번호:	P2KAF21
공 급 원:	대한약품공업㈜
보관조건:	실온. 개봉 후 냉장(-1~10°C)
선택이유:	의뢰자가 제공한 시험물질이 증류수로 조제한 것이므로 멸균주사용수를 부형제로 선택하였다.

3) 양성대조물질

다음과 같이 양성대조물질을 사용하였다. 이들 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 471에 제시된 것 중에서 선택하였다.

대사활성계	양성대조물질(약칭)	CAS No.	적용균주	농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
+	2-Aminoanthracene (2-AA)	613-13-8	TA100	1
			TA1535	2
			TA1537	1
			WP2 <i>uvrA</i>	6
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	50-32-8	TA98	1

-	Sodium azide (SA)	26628-22-8	TA100	0.5
			TA1535	0.5
	2-Nitrofluorene (2-NF)	607-57-8	TA98	2
	4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)	56-57-5	WP2 <i>uvrA</i>	0.5
	Acridine Mutagen ICR 191 (ICR-191)	17070-45-0	TA1537	0.5

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
2-AA	Sigma-Aldrich Co.	A38800	STBB1901	2010 년 07 월 16 일	11~30 °C
B[a]P	Sigma-Aldrich Co. (Supelco)	48564	LB81991V	2011 년 04 월 07 일	11~30 °C
SA	Sigma-Aldrich Co.	S8032	1453190	2010 년 07 월 16 일	11~30 °C
2-NF	Sigma-Aldrich Co.	N16754	S43858	2011 년 02 월 28 일	11~30 °C
4NQO	Sigma-Aldrich Co.	N8141	039K1332	2009 년 11 월 26 일	-15 °C 이하
ICR-191	Sigma-Aldrich Co.	I3636	088K1450	2009 년 11 월 26 일	-1~10 °C

2. 조제시험물질 및 함량분석

1) 시험물질 조제

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 최고농도군은 의뢰자가 제공한 액상의 시험물질(50 mg/mL)을 직접 처리하였다. 아래 농도군은 시험물질 원액을 부형제로 희석하여 조제하였다. 조제는 처리 직전에 실시하였다.

2) 양성대조물질 조제

SA는 멸균주사용수(대한약품공업㈜, 제조번호 A2K8F21)로 조제하여 냉동한 것을 해동하여 사용하였다. 2-AA, B[a]P, 2-NF, 4NQO 및 ICR-191은 DMSO (Sigma-Aldrich Co., # 154938-500ML, 제조번호 MKBF2985, 14196PMV, ≥99.9 %)로 조제하여 냉동 보관한 것을 해동하여 사용하였다.

3) 함량분석

조제물에 대한 함량분석은 실시하지 않았다.

3. 시험계

1) 시험계 및 선택 이유

히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 (Maron and Ames, 1983) 및 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (Green and Muriel, 1976) 를 사용하였다. 이 균주들은 전술한 KFDA 고시 및 OECD guideline에 복귀돌연변이 시험용 균주로 예시되어 있다. 이들 균주는 다양한 화학물질의 변이원성을 민감하게 검출할 수 있음이

입증되었으며, 각 균주의 유전적 특징과 검출 가능한 돌연변이 유형은 다음 표와 같다.

균주명	<i>his/trp</i> 돌연변이	부가적인 돌연변이	플라스미드	검출 돌연변이
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Base pair substitution
TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Base pair substitution
TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Frameshift
TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Frameshift
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trp</i>	<i>uvrA</i>	-	Base pair substitution

살모넬라 TA균주의 *rfa* 돌연변이는 세포벽의 lipopolysaccharide 장벽의 합성에 관련된 유전자에 일어난 돌연변이로써, 이 돌연변이로 인한 장벽의 손상은 일부 큰 분자량의 화학물질에 대한 세포벽의 투과성을 높여준다. DNA 손상의 절제회복에 관련된 유전자에 일어난 *uvrA* 혹은 *uvrB* 돌연변이는 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 현저히 높여준다. 플라스미드 pKM101은 이를 가진 균주에서 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 더욱 높여준다.

2) 균주 공급원 및 배지

균주 공급원

Molecular toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)에서 구입 후 (주)켄온 전임 상연구센터에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용하였다.

액체배지

복귀돌연변이 시험을 위한 균주의 전배양에는 2.5 % Oxoid Nutrient broth No. 2를 사용하였다.

최소배지(Minimal glucose agar plate)

1.5 % Bacto agar (Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2 % glucose를 함유한 것을 페트리디쉬(90 x 15 mm, 감마선 멸균)에 25 mL씩 분주한 것을 사용하였다. 대장균(*E. coli*)의 경우 위와 동일한 최소배지에 0.1 % tryptophan액을 0.25 mL/L로 첨가한 것을 사용하였다.

Top agar

Top agar는 0.6 % Bacto agar와 0.5 % NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 top agar에만 100 mL당 10 mL의 0.5 mM histidine-biotin 액을 첨가하였다.

3) 균주의 보존 및 형질확인

균주의 냉동보존

균주의 장기 보존을 위하여, 균배양액 1 mL 당 90 µL의 DMSO를 가하여 냉동 vial에 채워 -70°C 이하에서 냉동보관 하였다.

마스터 플레이트(Master plate)

마스터 플레이트는 냉동 균주를 해동하여 10 시간 배양한 균배양액을 적절한 최소배지에 도말하여 제작하고 냉장보관하였다. 균배양액의 일부는 형질확인에 사용하고, 각 균주의 형질확인

을 완료한 마스터 플레이트의 균주를 복귀돌연변이시험에 사용하였다.

형질확인

각 균주에 대하여 Maron and Ames (1983)의 방법에 준하여 다음 표와 같이 유전형질을 확인하였다.

형질	확인 대상 균주
histidine 요구성	살모넬라 TA 균주
<i>uvrB</i> mutation 유지	살모넬라 TA 균주
R-factor 유지	살모넬라 TA 균주
<i>rfa</i> 돌연변이의 유지	살모넬라 TA 균주
spontaneous revertant의 수	살모넬라 TA 균주 및 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
tryptophan 요구성	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
<i>uvrA</i> mutation 유지	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>

4. 대사활성계(S9 mix)

1) S9 및 Cofactor

S9

기원: Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간

공급원: Molecular Toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)

제품번호: 11-01L

로트번호: 2865

단백질 함량: 35.4 mg/mL

보관조건: 냉동보관(-15°C 이하)

Cofactor

명칭: Cofactor-I

공급원: Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)

제품번호: 309-50611

로트번호: 999102 / 999103

보관조건: 냉장보관(-1~10°C)

2) S9 mix 1 mL 중의 조성(5 % S9, v/v)

S9 mix는 S9과 보호소 용액으로 조제하였다. S9 mix의 조성은 8 μmol $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 33 μmol KCl, 5 μmol G-6-P, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 50 μL S9으로 하였으며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용하였다.

5. 시험 방법

1) 농도군 설정

본 시험의 처리 농도는 예비시험(시험번호 11-VG-693P)에서 본시험과 같은 방법으로 전술한 5 종의 균주에 대하여 농도군당 1 개의 플레이트(평판)를 사용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다.

예비시험에서는 1.5~5,000 µg/plate의 8 단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리시 top agar 와 혼합할 때 및 집락 계수시 플레이트에 침전 생성 여부를 관찰하였다. 그 결과 모든 농도군에서 처리시 침전은 관찰되지 않았으며, 최고농도군에서 현탁이 관찰되었다. 플레이트에서도 침전, 집락수의 증가 및 세포독성은 관찰되지 않았다.

따라서 본시험에서는 다음과 같이 시험군을 구성하고, 음성 및 양성대조군을 포함하며, 농도군당 3 개의 플레이트를 사용하여 시험하였다.

균주명	S9 mix	농도군(µg/plate)				
		50	150	500	1,500	5,000
TA strains	+/-	50	150	500	1,500	5,000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	50	150	500	1,500	5,000

2) 시험물질 처리 및 평판(plate) 제작

시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다.

시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체배지(2.5 % Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator (37±2°C, 200 rpm)에서 10 시간 전배양 하였으며, 전배양을 마친 균주는 파장 600 nm에서 흡광도 측정으로 생균수를 산출한 후 시험에 사용할 때까지 냉장 보관하였다.

온도 45±2°C를 유지하는 dry bath에 꽂은 멸균 tube (12 x 75 mm)에 고압증기멸균한 top agar 를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mix 0.5 mL (대사활성계 비적용시에는 S9 mix 대신 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer, pH 7.4), 균배양액 0.1 mL, 시험물질 용액 0.1 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 굳게 하였다.

음성대조군은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시하였다.

시험물질 및 S9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 평판을 제작하였다.

처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37±2°C에서 50±2 시간 배양한 후 복귀돌연변이집락(이하 집락)을 육안으로 계수하였다.

3) 평판의 구별

평판에 유성펜으로 시험번호, 균주명, 농도, S9 mix 처리여부 등의 내용을 구별할 수 있도록 기입하였다.

4) 관찰 항목

시험물질 처리시 시험물질액을 top agar에 혼합할 때 용해성을 관찰하였다. 육안으로 관찰하여 흐림현상 있을 때는 혼탁으로, 확인 가능한 입자가 관찰되면 침전으로 판단하였다.

집락은 육안으로 계수하였다. 집락 계수시 각 평판의 기본성장균층(background lawn)의 형성 여부를 음성대조군과 비교하여 검사하였으며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였다.

다음 중 최소 한 항목이 관찰되는 경우 해당 농도에서 세포독성이 있는 것으로 판단하였다.

(1) 기본성장균층이 얇어지거나 없어지면서 집락수의 감소가 나타날 때.

(2) 미세집락(microcolony)이 나타날 때.

집락수의 '감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 편의상 집락수가 음성대조군에서 나타난 집락수 평균치의 50 % 미만으로 감소한 경우 혹은 증가 경향이 역전되는 경우를 세포독성으로 판단하였다.

5) 결과의 표시

시험 결과는 각 농도군 당 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차 및 음성대조군에 대한 증가 배수로 나타내었으며, 집락 수의 실측치도 아울러 제시하였다.

6) 시험 타당성 기준

다음 기준을 모두 만족할 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정하였다.

(1) 플레이트 당 처리한 생균의 수가 0.5×10^8 CFU 이상일 것.

(2) 시험물질 처리군 중 세포독성을 나타내지 않는 농도가 최소한 3 단계 이상일 것.

(3) 음성대조군의 집락 수가 아래 범위일 것.

균주명	집락수
TA100	75-200
TA1535	3-37
TA98	15-60
TA1537	4-31
WP2 <i>uvrA</i>	5-40

(4) 모든 양성대조군의 평균 집락 수가 음성대조군의 2 배 이상일 것. 이 때 2-AA 및 B[a]P 처리군에서 나타난 집락수의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨.

(5) 시험물질과 S9 mix의 무균성 확인을 위한 플레이트에서 미생물 집락이 없을 것.

6. 통계학적 방법 및 결과의 평가

1) 통계학적 분석

통계분석은 실시하지 않았다.

2) 결과의 평가

대사활성계 적용 여부에 상관 없이 최소 1 개 균주에서 평균 집락 수가 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

양성판정 기준을 만족하지 못할 경우 음성으로 판정하며, 시험물질은 본 시험에 사용한 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단하였다. 생물학적 연관성 또한 판정에 참고하였다.

결 과

조제 시험물질

조제시험물질 1.5 mg/mL 액 이상의 농도에서 혼탁이 관찰되었다.

복귀돌연변이시험(Table 1, Appendix 1 and Appendix 2)

조제물을 top agar와 혼합할 때 최고 농도군에서만 혼탁이 관찰되었다. 집락계수시에는 모든 플레이트에서 침전이나 기타 이상은 관찰되지 않았다.

*Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537 의 4 개의 균주에서 대사활성계 적용 및 비적용시 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 세포독성 또한 나타나지 않았다.

E. coli WP2 *uvrA*에서도 대사활성계 적용 및 비적용시 모두 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 세포독성 또한 나타나지 않았다.

한편 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 집락수가 현저히 증가하였다.

시험물질 최고농도 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위한 플레이트에서 미생물 오염으로 인한 집락은 나타나지 않았다.

시험에 사용한 5 개 균주는 파장 600 nm에서의 흡광도 기준으로 생균수 측정 결과 $0.90-1.60 \times 10^9$ (TA균주) 및 3.36×10^9 (*E. coli*) CFU/mL 이었다.

고찰 및 결론

시험타당성 기준은 모두 만족하였다. 모든 시험균주에서 대사활성계 적용 여부에 상관 없이 시험물질 처리군의 평균 집락 수는 증가를 나타내지 않았으며, 이 결과는 양성판정 기준을 만족시키지 못하였다.

따라서 RIS는 본 시험조건 하에 사용한 시험 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Edited by David J. Kirkland, Cambridge University Press, 1990. ISBN 0-521-39347-7.
2. Green, MHL and Muriel, WJ (1976): Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli*., *Mutat. Res.*, 38:3-32.
3. GREEN, MHL (1984) Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli* in KILBEY, BJ, LEGATOR, M, NICHOLS, W and RAMEL, C (Eds.). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Second edition*, p.161-187. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
4. Maron, DM and Ames, BN (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113:173-215.
5. Vogel, HJ and Bonner, DM (1956): Acetylornithinase of *E. coli*: Partial purification and some properties, *J. Biol. Chem.*, 218:97-106 (1956).

단위 및 약호

Note: The following lists of codes, abbreviations and units are used by ChemOn Inc.
Some, but not necessarily all, of this information may be needed for this report.

%	Percent
°	Degree
C	Celsius
CFU	Colony Forming Unit
L	Liter
mL	Milliliter
μL	Microliter
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Milligram
μg	Microgram
ng	Nanogram
m	Meter
cm	Centimeter
mm	Millimeter
μm	Micrometer
hr	Hour
min	Minute
sec	Second
rpm	Revolution per Minute
G-6-P	Glucose-6-phosphate
KCl	Potassium chloride
MgCl₂	Magnesium chloride
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
GLP	Good Laboratory Practice Regulation
ICH	International Conference on Harmonization
KFDA	Korea Food and Drug Administration
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
QAU	Quality Assurance Unit
SD	Standard Deviation
SOP	Standard Operating Procedures
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

TABLE

Table 1. Reverse mutagenicity assay results – summary

Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate [factor] ^{a)}			
			With S9 mix		Without S9 mix	
TA100	Test article	0	164 \pm	6 [1.0]	160 \pm	7 [1.0]
		50	169 \pm	5 [1.0]	172 \pm	9 [1.1]
		150	166 \pm	11 [1.0]	156 \pm	9 [1.0]
		500	153 \pm	5 [0.9]	166 \pm	2 [1.0]
		1,500	161 \pm	9 [1.0]	165 \pm	9 [1.0]
		5,000 #	193 \pm	8 [1.2]	181 \pm	8 [1.1]
TA1535	Test article	0	16 \pm	1 [1.0]	18 \pm	2 [1.0]
		50	13 \pm	3 [0.8]	16 \pm	3 [0.9]
		150	14 \pm	3 [0.9]	15 \pm	3 [0.8]
		500	14 \pm	2 [0.9]	15 \pm	3 [0.9]
		1,500	13 \pm	1 [0.8]	16 \pm	3 [0.9]
		5,000 #	19 \pm	3 [1.2]	18 \pm	3 [1.0]
TA98	Test article	0	37 \pm	5 [1.0]	31 \pm	3 [1.0]
		50	36 \pm	2 [1.0]	36 \pm	1 [1.1]
		150	36 \pm	3 [1.0]	33 \pm	1 [1.0]
		500	35 \pm	2 [0.9]	33 \pm	4 [1.0]
		1,500	40 \pm	2 [1.1]	36 \pm	4 [1.1]
		5,000 #	42 \pm	4 [1.1]	32 \pm	2 [1.0]
TA1537	Test article	0	17 \pm	2 [1.0]	13 \pm	2 [1.0]
		50	18 \pm	1 [1.1]	14 \pm	3 [1.1]
		150	20 \pm	2 [1.2]	13 \pm	3 [1.1]
		500	17 \pm	2 [1.0]	11 \pm	2 [0.9]
		1,500	21 \pm	2 [1.2]	15 \pm	3 [1.2]
		5,000 #	21 \pm	2 [1.2]	14 \pm	2 [1.1]
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Test article	0	35 \pm	1 [1.0]	27 \pm	1 [1.0]
		50	29 \pm	1 [0.8]	26 \pm	3 [1.0]
		150	26 \pm	2 [0.7]	23 \pm	3 [0.9]
		500	28 \pm	2 [0.8]	21 \pm	3 [0.8]
		1,500	26 \pm	3 [0.8]	22 \pm	3 [0.8]
		5,000 #	26 \pm	4 [0.8]	26 \pm	4 [1.0]
Positive controls						
TA100	2-AA	1.0	730 \pm	23 [4.4]		
TA1535	2-AA	2.0	130 \pm	14 [8.0]		
TA98	B[a]P	1.0	239 \pm	20 [5.0]		
TA1537	2-AA	1.0	199 \pm	19 [11.5]		
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	6.0	126 \pm	4 [3.6]		
TA100	SA	0.5			508 \pm	36 [3.2]
TA1535	SA	0.5			433 \pm	36 [24.5]
TA98	2-NF	2.0			393 \pm	20 [12.6]
TA1537	ICR-191	0.5			199 \pm	23 [15.7]
WP2 <i>uvrA</i>	4NQO	0.5			144 \pm	11 [5.4]

Test article: RIS

a) Three plates/dose were used. No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

Turbid in the treatment mixture.

Abbreviations

2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; 2-NF, 2-Nitrofluorene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191; 4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide

APPENDICES

Appendix 1. Reverse mutagenicity assay results – individual plate counts

Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate (Status of background lawn) ^{a)}					
			With S9 mix			Without S9 mix		
TA100	Test article	0	157 (N)	169 (N)	167 (N)	164 (N)	152 (N)	164 (N)
		50	166 (N)	167 (N)	175 (N)	162 (N)	178 (N)	175 (N)
		150	177 (N)	155 (N)	166 (N)	164 (N)	147 (N)	158 (N)
		500	158 (N)	149 (N)	151 (N)	168 (N)	164 (N)	165 (N)
		1,500	153 (N)	160 (N)	171 (N)	155 (N)	168 (N)	171 (N)
		5,000 #	202 (N)	188 (N)	190 (N)	172 (N)	187 (N)	185 (N)
TA1535	Test article	0	16 (N)	16 (N)	17 (N)	18 (N)	19 (N)	16 (N)
		50	12 (N)	16 (N)	10 (N)	18 (N)	12 (N)	18 (N)
		150	17 (N)	12 (N)	14 (N)	17 (N)	15 (N)	12 (N)
		500	13 (N)	16 (N)	14 (N)	14 (N)	13 (N)	19 (N)
		1,500	12 (N)	12 (N)	14 (N)	12 (N)	18 (N)	18 (N)
		5,000 #	18 (N)	22 (N)	17 (N)	17 (N)	21 (N)	15 (N)
TA98	Test article	0	42 (N)	33 (N)	35 (N)	32 (N)	34 (N)	28 (N)
		50	34 (N)	37 (N)	38 (N)	36 (N)	37 (N)	35 (N)
		150	33 (N)	38 (N)	38 (N)	33 (N)	33 (N)	32 (N)
		500	35 (N)	33 (N)	36 (N)	34 (N)	36 (N)	28 (N)
		1,500	38 (N)	41 (N)	41 (N)	36 (N)	32 (N)	39 (N)
		5,000 #	38 (N)	42 (N)	45 (N)	30 (N)	34 (N)	31 (N)
TA1537	Test article	0	17 (N)	16 (N)	19 (N)	11 (N)	15 (N)	12 (N)
		50	19 (N)	17 (N)	19 (N)	18 (N)	13 (N)	12 (N)
		150	20 (N)	22 (N)	18 (N)	11 (N)	12 (N)	17 (N)
		500	19 (N)	17 (N)	16 (N)	9 (N)	13 (N)	12 (N)
		1,500	22 (N)	19 (N)	23 (N)	14 (N)	13 (N)	19 (N)
		5,000 #	23 (N)	20 (N)	21 (N)	16 (N)	13 (N)	14 (N)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Test article	0	35 (N)	36 (N)	34 (N)	27 (N)	26 (N)	27 (N)
		50	28 (N)	30 (N)	28 (N)	29 (N)	24 (N)	26 (N)
		150	24 (N)	28 (N)	25 (N)	21 (N)	22 (N)	26 (N)
		500	26 (N)	30 (N)	27 (N)	20 (N)	25 (N)	19 (N)
		1,500	29 (N)	24 (N)	26 (N)	24 (N)	18 (N)	23 (N)
		5,000 #	22 (N)	28 (N)	29 (N)	29 (N)	28 (N)	22 (N)
Positive controls								
TA100	2-AA	1.0	756 (N)	714 (N)	720 (N)			
TA1535	2-AA	2.0	114 (N)	137 (N)	140 (N)			
TA98	B[a]P	1.0	248 (N)	216 (N)	253 (N)			
TA1537	2-AA	1.0	194 (N)	184 (N)	220 (N)			
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	6.0	125 (N)	131 (N)	123 (N)			
TA100	SA	0.5				468 (N)	520 (N)	537 (N)
TA1535	SA	0.5				470 (N)	398 (N)	432 (N)
TA98	2-NF	2.0				412 (N)	373 (N)	395 (N)
TA1537	ICR-191	0.5				178 (N)	195 (N)	223 (N)
WP2 <i>uvrA</i>	4NQO	0.5				131 (N)	147 (N)	153 (N)

Test article: RIS

Turbid in the treatment mixture.

a) Status of background lawn (BL) and plate

N, normal BL; R, reduced BL; A, absent or almost absent BL; E, enhanced BL; O, obscured BL by precipitation;
P, precipitation of test article in plate; M, presence of microcolonies; C, contaminated plate.

Abbreviations

2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; 2-NF, 2-Nitrofluorene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191; 4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide

Appendix 2. Viable cell count of tester strains and results of sterility tests

Tester strain	Viable cell counts (10 ⁹ CFU/mL)	Sterility of test article Solution (highest dose)	Sterility of S9 mix
TA100	1.36		
TA1535	1.60		
TA98	0.90	No colony due to contamination	No colony due to contamination
TA1537	0.91		
WP2 <i>uvrA</i>	3.36		

Appendix 3. Historical control data

(January 2006 – Jan 2012, Reverse mutation assays in the histidine auxotroph strains of *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and a tryptophan auxotroph strain of *Escherichia coli* WP2 *uvrA*)

All solvent controls

Strain	TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2 <i>uvrA</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
S9 mix	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Min	98	86	7	7	15	13	4	4	13	10
Max	210	207	29	33	49	51	28	25	44	42
Mean	152	151	15	15	31	24	13	11	26	23
SD	25	22	5	4	6	6	4	4	6	6
No. of plates	273	273	264	264	267	270	273	270	273	270

Dimethylsulfoxide controls

Strain	TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2 <i>uvrA</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
S9 mix	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Min	116	108	8	8	15	13	4	4	14	10
Max	196	207	29	33	44	35	28	25	39	39
Mean	158	153	15	16	29	22	13	11	26	22
SD	22	19	5	4	5	5	4	4	6	6
No. of plates	99	99	96	96	99	99	99	99	102	99

Positive controls ^{a)}

Strain	TA100		TA1535		TA98		TA1537		WP2 <i>uvrA</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
S9 mix	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Min	443	180	53	62	109	218	72	104	69	68
Max	912	820	316	648	521	609	711	724	208	424
Mean	690	485	157	285	255	356	176	260	126	201
SD	118	100	67	95	105	76	84	122	37	72
No. of plates	72	273	264	264	117	270	273	171	69	270

a) See Table 1 for names of positive control articles and doses/plate

Appendix 4. Protocol



시험계획서

RIS의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호: 11-VG-694



승인:

이우주

2012. 02. 14

이우주, B.S.
시험책임자
㈜셀온 전임상연구센터

날짜

김갑호

2012. 02. 15

김갑호, M.S.
운영책임자
㈜셀온 전임상연구센터

날짜

박상재

2012. 02. 15

박상재
의뢰책임자
㈜에이지아이

날짜

ORIGINAL

시 험 제 목	RIS의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험		
시 험 목 적	시험물질 RIS이 히스티딘 요구성 <i>Salmonella typhimurium</i> 의 4 개 TA 균주와 트립토판 요구성 균주 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아 보기 위함이다.		
시 험 지 침	의약품등의독성시험기준 (2009-116호, KFDA, 2009 년 08 월 24 일) OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG 471 (1997) 'Bacterial Reverse Mutation Test'		
시 험 의뢰 자	㈜에이지아이 강원도 춘천시 후평동 198-53 320 호, 200-160 033-258-6366 (TEL), 033-258-6368 (FAX)		
시 험 기 관	㈜켄은 전임상연구센터 경기도 수원시 영통구 이의동 864-1 경기바이오센터 내, 443-766 031-329-9900 (TEL), 031-329-9901 (FAX)		
시 험 일 정	2012 년 02 월 21 일	균주접종(실험개시일)	
	2012 년 02 월 22 일	시험물질 처리	
	2012 년 02 월 24 일	집락계수(실험종료일)	
	2012 년 02 월 29 일	최종보고서(안)제출 예정	
주요시험관계자	시험물질 조제/보관:	허 현 속	
	자료보관:	이 유 나	

기록과 재료의 [SOP-AC-001~007]

보 관 시험계획서(수정 및 이탈기록), 최종보고서, 시험기초자료, 시험물질 표본 및 각종 증거자료는 해당물질의 관리 당국에 의한 시험성적서의 신뢰성 평가가 가능한 기간동안 보관하고, 자료보관실에 따로 규정이 없는 한 시험종료 후 3 년간 ㈜켐온 전임상연구센터의 자료보관실에 보관한다.
이후의 처리에 관하여는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

G L P 대 응 비임상시험관리기준(제2009-183호, KFDA, 2009 년 12 월 22 일)
OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17
시험계획서의 수정 혹은 이탈은 문서로 작성하고, 신뢰성보증부서(QAU)에서 검토 후 시험책임자, 운영책임자 및 시험의뢰자가 승인한다.
㈜켐온 전임상연구센터의 신뢰성보증부서는 시험과정 전반에 걸친 점검을 단독으로 행한다.

최 종 보 고 서 [SOP-TO-007]

최종보고서는 시험계획서의 내용을 반영하여 표지, 시험책임자진술서, 신뢰성 보증확인서, 목차, 요약, 재료 및 방법, 관찰 및 측정 결과, 고찰 및 결론, 참고문헌 등으로 구성하며, 필요에 따라 사진이나 표, 부표 및 첨부자료 등을 포함하여 작성한다.

1. 시험물질 및 대조물질

1) 시험물질 [SOP-TA-001]

명 칭:	RIS
코드번호:	C-0690
제조번호:	RIS-01-11032S
입 수 일:	2011 년 12 월 28 일
입 수 량:	50 mg/mL, 50 mL/Bottle x 1 Bottle
외 관:	갈색의 액상
항 량:	의뢰자 미제공
유효일자:	2013 년 12 월 22 일
보관조건:	실온(11~30°C)
공 급 원:	썬에이지아이

2) 부형제(음성대조물질)

명 칭:	멸균주사용수(약칭 증류수)
제조번호:	P2KAF21
공 급 원:	대한약품공업㈜
보관조건:	실온. 개봉 후 냉장(-1~10°C)
선택이유:	의뢰자가 제공한 시험물질이 증류수로 조제한 것이므로 멸균주사용수를 부형제로 선택하였다.

3) 양성대조물질

다음과 같이 양성대조물질을 사용한다. 이들 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 471에 제시된 것 중에서 선택하였다.

대사활성계	양성대조물질(약칭)	CAS No.	적용균주	농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
적용	2-Aminoanthracene (2-AA)	613-13-8	TA100	1
			TA1535	2
			TA1537	1
			WP2 <i>uvrA</i>	6
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	50-32-8	TA98	1	
비적용	Sodium azide (SA)	26628-22-8	TA100	0.5
			TA1535	0.5
	2-Nitrofluorene (2-NF)	607-57-8	TA98	2
	4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)	56-57-5	WP2 <i>uvrA</i>	0.5
	Acridine Mutagen ICR 191 (ICR-191)	17070-45-0	TA1537	0.5

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
2-AA	Sigma-Aldrich Co.	A38800	STBB1901	2010 년 07 월 16 일	11~30°C
B[a]P	Sigma-Aldrich Co. (Supelco)	48564	LB81991V	2011 년 04 월 07 일	11~30°C
SA	Sigma-Aldrich Co.	S8032	1453190	2010 년 07 월 16 일	11~30°C
2-NF	Sigma-Aldrich Co.	N16754	S43858	2011 년 02 월 28 일	11~30°C
4NQO	Sigma-Aldrich Co.	N8141	039K1332	2009 년 11 월 26 일	-15°C 이하
ICR-191	Sigma-Aldrich Co.	I3636	088K1450	2009 년 11 월 26 일	-1~10°C

2. 조제시험물질 및 함량분석

1) 시험물질 조제[SOP-TA-002]

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용한다. 최고농도군은 의뢰자가 제공한 액상의 시험물질(50 mg/mL)을 직접 처리한다. 아래 농도군은 시험물질 원액을 부형제로 희석하여 조제한다. 조제는 처리 직전에 실시한다.

2) 양성대조물질 조제

SA는 멸균주사용수(대한약품공업㈜, 제조번호 A2K8F21)로 조제하여 냉동한 것을 해동하여 사용한다. 2-AA, B[a]P, 2-NF, 4NQO 및 ICR-191은 DMSO (Sigma-Aldrich Co., # 154938-500ML, 제조번호 MKBF2985, 14196PMV, ≥99.9 %)로 조제하여 냉동 보관한 것을 해동하여 사용한다.

3) 함량분석

조제물에 대한 함량분석은 실시하지 않는다.

3. 시험계

1) 시험계 및 선택 이유

히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 (Maron and Ames, 1983) 및 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (Green and Muriel, 1976)를 사용한다. 이 균주들은 전술한 KFDA 고시 및 OECD guideline에 복귀돌연변이 시험용 균주로 제시되어 있다. 이들 균주는 다양한 화학물질의 변이원성을 민감하게 검출할 수 있음이 입증되었으며, 각 균주의 유전적 특징과 검출 가능한 돌연변이 유형은 다음 표와 같다.

균주명	<i>hisI trp</i> 돌연변이	부가적인 돌연변이	플라스미드	검출 돌연변이
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Base pair substitution
TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Base pair substitution
TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Frameshift
TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Frameshift
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trp</i>	<i>uvrA</i>	-	Base pair substitution

살모넬라 TA균주의 *rfa* 돌연변이는 세포벽의 lipopolysaccharide 장벽의 합성에 관련된 유전자에 일어난 돌연변이로써, 이 돌연변이로 인한 장벽의 손상은 일부 큰 분자량의 화학물질에 대한 세포벽의 투과성을 높여준다. DNA 손상의 절제회복에 관련된 유전자에 일어난 *uvrA* 혹은 *uvrB* 돌연변이는 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 현저히 높여준다. 플라스미드 pKM101은 이를 가진 균주에서 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 더욱 높여준다.

2) 균주 공급원 및 배지

균주 공급원

Molecular toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)에서 구입 후 ㈜케온 전임 상연구센터에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용한다.

액체배지 [SOP-MT-101]

복귀돌연변이 시험을 위한 균주의 전배양에는 2.5 % Oxoid Nutrient broth No. 2를 사용한다.

최소배지(Minimal glucose agar plate) [SOP-MT-101]

1.5 % Bacto agar (Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2 % glucose를 함유한 것을 페트리디쉬(90 x 15 mm, 감마선 멸균)에 25 mL씩 분주한 것을 사용한다. 대장균(*E. coli*)의 경우 위와 동일한 최소배지에 0.1 % tryptophan액을 0.25 mL/L로 첨가한 것을 사용한다.

Top agar [SOP-MT-101]

Top agar는 0.6 % Bacto agar와 0.5 % NaCl로 조제하며, 살모넬라 균주용 top agar에만 100 mL당 10 mL의 0.5 mM histidine-biotin 액을 첨가한다.

3) 균주의 보존 및 형질확인

균주의 냉동보존 [SOP-MT-107]

균주의 장기 보존을 위하여, 균배양액 1 mL 당 90 µL의 DMSO를 가하여 냉동 vial에 채워 -70°C 이하에서 냉동보관한다.

마스터 플레이트(Master plate) [SOP-MT-101/102]

마스터 플레이트는 냉동 균주를 해동하여 10 시간 배양한 균배양액을 적절한 최소배지에 도말하여 제작하고 냉장보관한다. 균배양액의 일부는 형질확인용에 사용하고, 각 균주의 형질확인을 완료한 마스터 플레이트의 균주를 복귀돌연변이시험에 사용한다.

형질확인 [SOP-MT-106]

각 균주에 대하여 Maron and Ames (1983)의 방법에 준하여 다음 표와 같이 유전형질을 확인한다.

형질	확인 대상 균주
histidine 요구성	살모넬라 TA 균주
<i>uvrB</i> mutation 유지	살모넬라 TA 균주
R-factor 유지	살모넬라 TA 균주
<i>rfa</i> 돌연변이의 유지	살모넬라 TA 균주
spontaneous revertant의 수	살모넬라 TA 균주 및 <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
tryptophan 요구성	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
<i>uvrA</i> mutation 유지	<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>

4. 대사활성계(S9 mix)**1) S9 및 Cofactor****S9**

기원: Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간

공급원: Molecular Toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)

제품번호: 11-01L

로트번호: 최종보고서에 기재

단백질 함량: 최종보고서에 기재

보관조건: 냉동보관(-15°C 이하)

Cofactor

명칭: Cofactor-I

공급원: Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)

제품번호: 309-50611

로트번호: 최종보고서에 기재

보관조건: 냉장보관(-1~10°C)

2) S9 mix 1 mL 중의 조성(5 % S9, v/v) [SOP-MT-108]

S9 mix는 S9과 보호소 용액으로 조제한다. S9 mix의 조성은 8 μmol MgCl₂ · 6H₂O, 33 μmol KCl, 5 μmol G-6-P, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 50 μL S9으로 하며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용한다.

5. 시험 방법

1) 농도군 설정

본 시험의 처리 농도는 예비시험(시험번호 11-VG-693P)에서 본시험과 같은 방법으로 전술한 5 종의 균주에 대하여 농도군당 1 개의 플레이트(평판)를 사용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다.

예비시험에서는 1.5~5,000 µg/plate의 8 단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리시 top agar 와 혼합할 때 및 집락 계수시 플레이트에 침전 생성 여부를 관찰하였다. 그 결과 모든 농도군 에서 처리시 침전은 관찰되지 않았으며, 플레이트에서도 침전, 집락수의 증가 및 세포독성은 관찰되지 않았다.

따라서 본시험에서는 다음과 같이 시험군을 구성하고, 음성 및 양성대조군을 포함하며, 농도군 당 3 개의 플레이트를 사용하여 시험한다.

균주명	S9 mix	농도군(µg/plate)				
TA strains	+/-	50	150	500	1,500	5,000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	50	150	500	1,500	5,000

2) 시험물질 처리 및 평판(plate) 제작[SOP-MT-102/103/104/105]

시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 실시한다.

시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체배지(2.5 % Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접중해 shaking incubator (37±2°C, 200 rpm)에서 10 시간 전배양 하며, 전배양을 마친 균주는 파장 600 nm에서 흡광도 측정으로 생균수를 산출한 후 시험에 사용할 때까지 냉장 보관한다.

온도 45±2°C를 유지하는 dry bath에 꽂은 멸균 tube (12 x 75 mm)에 고압증기멸균한 top agar 를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mix 0.5 mL (대사활성계 비적용시에는 S9 mix 대신 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer, pH 7.4), 균배양액 0.1 mL, 시험물질 용액 0.1 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 굳게 한다.

음성대조군은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시한다.

시험물질 및 S9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 평판을 제작한다.

처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37±2°C에서 50±2 시간 배양한 후 복귀돌 연변이집락(이하 집락)을 육안으로 계수한다.

3) 평판의 구별

평판에 유성펜으로 시험번호, 균주명, 농도, S9 mix 처리여부 등의 내용을 구별할 수 있도록 기

입한다.

4) 관찰 항목

시험물질 처리시 시험물질액을 top agar에 혼합할 때 침전 생성 여부를 관찰하였다. 육안으로 확인 가능한 입자가 관찰되면 침전으로 판단한다.

집락은 육안으로 계수한다. 집락 계수시 각 평판의 기본성장균층(background lawn)의 형성 여부를 음성대조군과 비교하여 검사하며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검한다.

다음 중 최소 한 항목이 관찰되는 경우 해당 농도에서 세포독성이 있는 것으로 판단한다.

- (1) 기본성장균층이 얇아지거나 없어지면서 집락수의 감소가 나타날 때.
- (2) 미세집락(microcolony)이 나타날 때.

집락수의 '감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 편의상 집락수가 음성대조군에서 나타난 집락수 평균치의 50 % 미만로 감소한 경우 혹은 증가 경향이 역전되는 경우를 세포독성으로 판단한다.

5) 결과의 표시

시험 결과는 각 농도군 당 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차 및 음성대조군에 대한 증가 배수로 나타내며, 집락 수의 실측치도 아울러 제시한다.

6) 시험 타당성 기준

다음 기준을 모두 만족할 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정한다.

- (1) 플레이트 당 처리한 생균의 수가 0.5×10^8 CFU 이상일 것.
- (2) 시험물질 처리군 중 세포독성을 나타내지 않는 농도가 최소한 3 단계 이상일 것.
- (3) 음성대조군의 집락 수가 아래 범위일 것.

균주명	집락수
TA100	75-200
TA1535	3-37
TA98	15-60
TA1537	4-31
WP2 <i>uvrA</i>	5-40

- (4) 모든 양성대조군의 평균 집락 수가 음성대조군의 2 배 이상일 것. 이 때 2-AA 및 B[a]P 처리군에서 나타난 집락수의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨.
- (5) 시험물질과 S9 mix의 무균성 확인을 위한 플레이트에서 미생물 집락이 없을 것.

6. 통계학적 방법 및 결과의 평가

1) 통계학적 분석

통계분석은 실시하지 않는다.

2) 결과의 평가

대사활성계 적용 여부에 상관 없이 최소 1 개 균주에서 평균 집락 수가 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다.

양성판정 기준을 만족하지 못할 경우 음성으로 판정하며, 시험물질은 본 시험에 사용한 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단한다. 생물학적 연관성 또한 판정에 참고한다.

7. 참고문헌

1. Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Edited by David J. Kirkland, Cambridge University Press, 1990. ISBN 0-521-39347-7.
2. Green, MHL and Muriel, WJ (1976): Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli*., Mutat. Res., 38:3-32.
3. GREEN, MHL (1984) Mutagen testing using *trp+* reversion in *Escherichia coli* in KILBEY, BJ, LEGATOR, M, NICHOLS, W and RAMEL, C (Eds.). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Second edition*, p.161-187. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
4. Maron, DM and Ames, BN (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutat. Res., 113:173-215.
5. Vogel, HJ and Bonner, DM (1956): Acetylornithinase of *E. coli*: Partial purification and some properties, J. Biol. Chem., 218:97-106 (1956).

Appendix 5. Certificate of analysis



생명공학을 선도하는 주식회사 에이지아이

Certificate of Analysis

Product Name: RIS	
Lot No. : RIS-01-11032S	Mfg Date : 2011년 12월 21일
Quantity : 50 ml	Exp Date : 2013년 12월 22일

Test Items	Specifications	Results
성상	갈색의 액상	갈색의 액상
성분	참꽃나무 추출물	참꽃나무 추출물
고형분 함량	50 mg/ml	50 mg/ml
고형분의 gallic acid 함량	> 1%	1.3 %
일반세균	무균	무균을 확인함.

* 분말상태의 시료를 캡온의 요청으로 D.W에 현탁 후 멸균하여 제공함.

Tested by K.H. Kim