J. Fd Hyg. Safety 11(4), 261 - 271(1996)

영지버섯으로부터 분리한 단백다당체, G009의 아급성독성시험

서경원† · 조일상* · 오미현 · 이경민 · 김효정
*식품의약품안전본부 독성부, *일양약품주식회사 중앙연구소*

Subacute Toxicity of G009, a Polysaccharide Isolated from *Ganoderma lucidum* IY009

Kyung Won Seo†, Il Sang Cho*, Mi Hyunge Oh, Kyung Min Lee and Hyo Jung Kim
Department of Toxicology, Korea Food and Drug Administration,
5 Nokbundong, Eunpyungku, Seoul 122-020
**Center Research Laboratory, Il Yang Pharmaceutical Compony, Ltd., Yong-In 449-900, Korea*

ABSTRACT — It has been reported that G009, polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* IY009 has various pharmacological effects, such as antiinflamatory, antiviral, anticarcinogenic and immunomodulation effects. The purpose of this study was to determine the subacute toxicity of orally administered G009 in Sprague-Dawley rats. Groups of 40 male and 40 female rats were gavaged with 0, 500, 1,000 or 2,000 mg/kg/day for 30 days. No drug-related deaths and clinical morbidities were resulted. There was no drug-related effect on the body weight gain, food consumption and water consumption. Statistically significant changes were observed in several hematological and biochemical parameters of G009-treated groups; however, most of these changes were within normal range and had no relationship to dosage. Urinalysis and bone marrow biopsy showed no remarkable changes in all treated groups. Gross necropsy and histopathology revealed no evidence of specific toxicity related to G009. Our data indicate that no-observed effect level of G009 is estimated to be above 2,000 mg/kg/day in rats.

Key word □ Subacute toxicity, G009, Rats

G009는 일양약품주식회사에서 개발한 영지(*Ganoderma. lucidum* IY009)의 배양액으로부터 분리된 단백다당체이다. *Ganoderma lucidum* IY009는 불로초속에 속하는 영지버섯으로서 전남 해남군 두륜산에서 자실체를 채집한 것이다. G009는 영지를 배양하여 얻은 균사를 알칼리 용액으로 추출하고 정제하여 건조시킨 물질로서, 1% 용액은 갈색을 띄고 약간 탁도를 나타낸다. 이 물질은 단백질 결합 다당체로서 당을 50~80% 함유하고 있으며, 분자량이 약 4KD~2000KD인 화합물로 구성되어 있다. 이 물질에 함유된 단당류는 포도당, 갈락토스, 만노스 등이고 구성 아미노산은 글라이신, 알라닌, 로이신 등이다. 이 균사체에서 얻은 다당류들이 면역조절작용,[1] 항염증,[2] 항암,[3-5] 항바이러스[6] 등의 효과를 나타낸다는 것이 보고된 바 있다. 또한 최근에는 간장보호 효과를 나타내어 간의 fibrosis등을 억제한다는 보고도 있다.[7]

†To whom correspondence should be addressed.

본 시험은 G009의 독성시험의 일환으로 랫드에서의 아급성 독성을 평가하기 위하여 실시하였다. 랫드에 30일 동안 G009를 경구로 투여한 후 사망율, 임상증상관찰, 체중측정, 사료 및 물 섭취량 측정, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사, 뇨검사, 골수검사, 안구검사 및 육안적 조직병리학적 검사 등을 실시하여 G009의 아급성독성을 평가하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육조건

실험동물은 식품의약품안전본부 독성연구소에서 생산된 SPF(특정 병원체 부재) Sprague- Dawley계 랫드를 1 주일간 순화시킨후 온도 23±1°C, 습도 55±5%, 배기 10-18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(280W × 400L × 1700H mm)에 3마

리씩 넣어 실험하였다. 시험기간동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121℃에서 15분간 멸균하고 물은 멸균수도물을 청결한 병에 넣어 실험동물에 자유로이 공급하였다.

시험물질의 조제 및 투여

시험물질인 G009는 담갈색내지 갈색의 가루로서 특이한 냄새가 있는 물질이며, (주)일양약품으로부터 수령하여 실험에 사용하였다. 시험물질의 조제는 G009의 일정량을 취하여 3차 증류수에 거품이 나지 않도록 조심스럽게 혼합하여 투여 당일에 하였다. 투여용량은 본원에서 실시한 급성독성시험성적을 참조하여, 랫드에 대한 최고 투여가능량인 2,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 1/2 등비로 1,000 mg/kg와 500 mg/kg을 설정하였다. 시험물질의 투여는 존데를 사용하여 경구투여하였으며, 투여량은 투여직전 체중에 따라 산출하였다. 투여는 일정한 시간에 주 7회, 30일간 하였으며 대조군에는 3차 증류수를 투여하였다.

사망률 및 일반증상의 관찰

모든 실험동물에 대하여 매일 1회 일정시간에 일반상태 변화, 중독증상발현 및 사망유무를 관찰하였다. 안구검사는 투여 4주째에 검안경을 이용하여 대조군과 최고용량군에서 각막, 홍채, 수정체 및 망막등을 검사하였다. 체중측정과 사료 및 물섭취량은 시험기간 중 주 2회 측정하였으며, 체중은 시험물질 투여전 및 부검전일에도 측정하였다.

혈액학적 및 혈액생화학적 검사

혈액학적 검사는 채취한 혈액을 EDTA로 항응고 처리하고 자동혈구계산기(H1 system, Technicon Co.)를 이용하여 실시하였으며, 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 적혈구용적(PCV), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 임파구(lymphocyte), 호중구(neutrophil), 단구(monocyte), 호산구(eosinophil), 호염기구(basophil) 등을 측정하였다.

혈액생화학적 검사는 혈액을 냉장고에 2시간 정도 방치한 후 원심분리하여 혈청을 분리하여 자동혈청생화학분석기(Technicon사의 RA-XT)를 이용하였으며, 혈청내 알부민(ALB), alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), alkaline phosphatase(ALP), cholesterol, triglyceride, glucose, creatinine, blood urea nitrogen(BUN), 총단백질량(T. Protein), sodium(Na), potassium(K), calcium(Ca), chloride(Cl) 등을 측정하였다. 또한 자동혈액응고검사기(COAGULYZER II, Lancer Co.)를 이용하여 3.8% sodium citrate로 항응고 처리하여 얻은 혈장의 prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT)을 측정하였다.

뇨분석 및 골수검사

뇨분석은 부검전일 채뇨하여 뇨스틱(Multistix, AMES)에 뇨를 침적시켜 뇨자동분석기(Clinitek10, AMES)를 이용하였으며, 비중, pH, protein, glucose, ketone체, bilirubin, 잠혈, nitrite 및 urobilinogen을 검사하였다. 골수검사를 위하여 부검시 대조군과 고용량군의 대퇴골에서 골수를 채취하여 도말표본을 제작한후 Wright 염색을 하였으며, 골수 세포의 형태를 관찰하고 myeloid : erythroid 비율(M/E)을 구하였다.

장기중량측정 및 조직병리검사

부검 전일 절식하고 모든 장기에 대하여 육안적 소견을 관찰하였으며, 뇌, 갑상선, 폐장, 심장, 간장, 신장, 비장, 부신, 정소(또는 난소)의 중량을 측정하였다. 대조군과 최고용량군의 동물에 대하여 뇌, 갑상선, 폐장, 심장, 간장, 신장, 비장, 부신, 정소(또는 난소) 등을 적출하여 조직을 2-3 mm 두께로 삭정하고, 10% 중성 완충 포르말린으로 고정하였다. 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매하였고, 박절된 조직은 hematoxylin & eosin 염색후 검경하였다.

통계학적 분석

결과에 대한 통계학적인 분석은 통계처리 프로그램인 SPSS를 이용하였다. Bartlett's test로 분산검정을 실시하여 등분산일 경우 one way analysis of variance(ANOVA) 검정, 부등분산일 경우 Kruskal-Wallis법으로 유의성 검정을 하였다. One way analysis of variance(ANOVA) 검정에서 유의한 경우에는 Scheffe법으로, Kruskal-Wallis법에서 유의성이 인정될 경우는 Distribution-free multiple comparision법에 의해 대조군과 각 투여군간에 다중비교를 실시하였다.

결과 및 고찰

사망률 및 일반증상

수컷 최고용량군(2,000 mg/kg/day)에서 투여 27일째 1례, 중용량군(1,000 mg/kg/day)에서 투여 7일, 15일, 27일째 각 1례, 저용량군(500 mg/kg/day)에서 투여 27일째 1례가 사망하였으며, 암컷 최고용량군(2,000 mg/kg/day)에서 투여 22, 24, 26일째 각 1례, 중용량군(1,000 mg/kg/day)에서 투여 27일째 1례, 저용량군(500 mg/kg/day)에서 투여 27일째 1례가 사망하였다. 사망동물을 부검한 결과 모두 폐장에 시험물

Table 1. Mortality of male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Sex	Dose (mg/kg)	0	1	2	···	7	···	15	···
		(Days)							
Male	0	0/12	0/12	0/12	···	0/12	···	0/12	···
	500	0/12	0/12	0/12	···	0/12	···	0/12	···
	1,000	0/12	0/12	0/12	···	1/12	···	1/11	···
	2,000	0/12	0/12	0/12	···	0/12	···	0/12	···
Female	0	0/12	0/12	0/12	···	0/12	···	0/12	···
	500	0/12	0/12	0/12	···	0/12	···	0/12	···
	1,000	0/12	0/12	0/12	···	0/12	···	0/12	···
	2,000	0/12	0/12	0/12	···	0/12	···	0/12	···

Sex	Dose (mg/kg)	22	24	26	27	···	30	end	mortality
		(Days)							
Male	0	0/12	0/12	0/12	0/12	···	0/12	TS[c]	0/12
	500	0/12	0/12	0/12	1/12	···	0/11	TS	1/12
	1,000	0/10	0/10	0/10	1/10	···	0/9	TS	3/12
	2,000	0/12	0/12	0/12	1/12	···	0/11	TS	1/12
Female	0	0/12	0/12	0/12	1/12	···	0/11	TS	1/12
	500	1/12	0/11	0/11	0/11	···	0/11	TS	1/12
	1,000	0/12	0/12	0/12	1/12	···	0/11	TS	1/12
	2,000	1/12	1/11	1/10	0/9	···	0/9	TS	3/12

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values are expressed as the numbers of dead animals/total numbers of animals.

[c] TS : terminal sacrifice

질이 팽만해 있었으므로, 사망의 원인은 시험물질에 의한것이 아닌 투여실수에 의한 것으로 판단되었다(Table 1). 모든 투여군에서 별다른 임상증상은 관찰되지 않았으며 대조군과 고용량군에 실시한 안검사에서도 이상소견은 관찰되지 않았다(Table 2). 체중측정, 사료 및 물섭취량 측정결과 암 · 수 모두에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 3, 4, 5). 이러한 결과로부터 G009 투여에 의해 특이적인 독성증상은 유발되지 않으며, 체중, 사료섭취량 및 물섭취량에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

혈액학적 및 혈액생화학적 검사

혈액학적 검사결과 수컷 투여군에서 백혈구수, 적혈구수, 혈색소량, 적혈구용적, 임파구 등에서 대조군과 비교하여 유의성이 있는 차이를 나타내는 군이 있었으며(Table 6), 혈액생화학적 검사에서도 투여군중 AST, cholesterol, triglyceride, albumine, 총단백질량, Ca, Na, Cl, 알부민, APTT 등의 측정항목에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 차이를 나타냈으나, 용량의존성이 없고 모두 생리적 정상범위를 벗어나지 않아 시험물질에 의한 특이한 변화로는 판단되지 않았다(Table 7).

Table 2. Clinical signs in male and female rats administered with G009 for 30 days[a]

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical signs	0	1	2	3	···	30
			(Days)					
Male	0	NAD[b]	-	-	-	-	···	-
	500	NAD	-	-	-	-	···	-
	1,000	NAD	-	-	-	-	···	-
	2,000	NAD	-	-	-	-	···	-
Female	0	NAD	-	-	-	-	···	-
	500	NAD	-	-	-	-	···	-
	1,000	NAD	-	-	-	-	···	-
	2,000	NAD	-	-	-	-	···	-

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] NAD, - : no abnormality detected

Table 3. Body weight change in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Sex	Dose (mg/kg)	0	3	7	10	14	17	21	24	29
		(Days)								
Male	0	194.4±9.7	219.3±12.7	254.9±16.0	277.9±16.0	306.6±16.1	329.9±19.3	357.8±20.7	365.7±22.3	388.0±23.1
	500	192.4±8.9	218.7± 9.0	252.3±10.2	276.2±12.4	306.1±14.3	328.4±14.4	351.2±18.0	361.8±19.9	384.6±21.5
	1,000	190.8±9.9	218.1±11.5	246.7±23.2	279.2±12.4	310.5±19.2	332.1±20.7	326.5±23.7	368.6±21.6	394.7±23.9
	2,000	190.8±9.0	217.5±12.3	251.5±13.2	276.8±13.3	308.5±15.5	331.6±18.0	353.9±22.0	368.0±23.0	390.5±26.1
Female	0	155.6±6.1	167.3±6.6	185.2±8.7	192.6± 9.2	202.8±10.2	211.9±11.2	224.3±11.6	225.8±12.6	236.5±12.3
	500	155.8±8.4	166.9±9.8	180.8±12.8	191.7±12.8	202.6±14.9	212.5±14.7	219.6±13.3	226.2±15.1	237.6±17.1
	1,000	157.5±6.7	171.1±7.1	185.6± 6.5	194.2± 8.4	207.0± 8.3	216.6± 8.9	228.7±10.4	234.1±12.1	247.7±12.1
	2,000	156.0±6.3	165.7±7.7	183.5± 9.2	193.3±10.0	208.8±15.1	219.1±14.9	225.7±15.2	228.9±15.3	242.9±18.8

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values(unit: g) are expressed as means ± S.D. for nine to twelve rats.

Table 4. Food consumption in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Sex	Dose (mg/kg)	3	7	10	14	17	21	24	28
		(Days)							
Male	0	20.2±1.2	22.5±1.2	23.9±0.8	22.4±1.4	25.6±2.9	24.2±0.6	24.9±1.7	24.2±1.5
	500	20.5±0.9	22.1±0.9	23.7±0.5	22.5±2.3	26.6±3.0	22.1±0.5	25.1±0.2	25.9±1.5
	1,000	18.8±1.6	21.2±1.8	23.8±1.2	24.2±1.0	26.3±1.6	24.9±1.9	25.2±1.0	26.9±2.5
	2,000	20.7±1.4	23.1±0.7	24.5±0.8	24.6±1.4	26.4±1.9	24.9±1.4	26.2±1.3	25.2±4.1
Female	0	14.4±0.9	15.4±0.8	15.1±0.6	16.1±0.2	16.5±0.6	16.2±1.0	16.4±1.1	16.5±0.8
	500	14.2±1.1	15.7±0.9	16.2±1.5	16.0±1.3	14.0±0.6	15.1±1.5	16.5±1.2	16.8±1.0
	1,000	14.2±0.8	13.2±6.1	18.7±5.7	15.9±1.9	17.5±1.2	17.4±0.9	17.1±1.3	19.2±1.5
	2,000	13.5±1.7	15.5±1.1	16.3±0.7	15.4±0.8	18.6±2.6	19.0±4.9	16.5±1.2	18.7±2.7

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values(unit: g) are expressed as means ± S.D. for nine to twelve rats.

Table 5. Water consumption in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Sex	Dose (mg/kg)	3	6	9	13	17	20	24	28
		(Days)							
Male	0	35.7±4.2	39.3±2.3	37.8±2.6	40.3±1.5	43.2±5.0	38.3±3.7	42.1±9.4	38.0±3.9
	500	34.9±5.9	38.4±5.5	38.7±6.5	43.6±8.7	47.5±8.2	43.3±7.1	48.4±6.8	47.7±8.2
	1,000	35.9±5.0	37.9±2.2	38.6±2.7	40.7±1.5	46.4±2.9	42.1±4.8	43.7±5.6	42.7±5.4
	2,000	35.8±1.8	38.4±1.9	38.7±0.9	41.8±5.1	41.5±2.1	42.0±5.0	42.7±4.7	39.0±3.4
Female	0	24.5±0.8	25.5±1.7	25.8±1.3	27.2±2.1	25.5±1.8	26.0±1.2	24.4±4.1	23.7±4.1
	500	27.1±4.9	27.3±4.5	28.2±4.0	26.4±3.0	28.9±6.7	28.5±6.2	28.6±3.7	25.4±3.8
	1,000	28.1±10.4	29.3±9.4	29.2±6.2	27.9±6.6	30.3±7.4	30.6±10.5	31.9±12.0	25.0±2.0
	2,000	23.4±2.1	26.6±1.8	26.2±1.5	28.5±3.0	29.8±3.2	25.3±2.6	26.7±2.7	27.7±1.6

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values(unit: g) are expressed as means ± S.D. for nine to twelve rats.

Table 6. Hematological indices in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Dose (mg/kg)	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
Sex	Male				Female			
WBC (103/μl)	10.57± 4.02	14.09± 4.44	17.04± 4.31*	13.91± 5.46	13.14± 5.00	13.26± 5.09	12.68± 2.81	12.42± 7.23
RBC (103/μl)	7.40± 0.42	7.85± 0.36*	7.96± 0.27*	7.64± 0.42	7.65± 0.32	7.58± 0.41	7.57± 0.23	7.56± 0.41
HGB (g/dl)	14.80± 0.66	15.50± 0.40*	15.70± 0.36*	15.00± 0.49	15.10± 0.70	15.00± 0.77	15.00± 0.46	15.00± 0.61
PCV (%)	42.10± 1.86	44.00± 0.85*	44.50± 1.65*	42.10± 1.84	41.90± 1.76	41.60± 2.44	41.60± 1.37	41.90± 1.82
MCV (fl)	57.07± 1.68	56.20± 2.04	55.90± 1.44	55.10± 1.29	54.80± 1.21	54.80± 0.78	54.90± 1.32	55.50± 1.12
MCH (pg)	20.10± 0.60	19.70± 0.67	19.70± 0.43	19.60± 0.74	19.70± 0.44	19.80± 0.25	19.80± 0.47	19.80± 0.38
MCHC (g/dl)	35.2 ± 0.34	35.1 ± 0.61	36.2 ± 0.61	35.5 ± 0.71	35.9 ± 0.38	36.1 ± 0.36	36.0 ± 0.23	35.70± 0.25
PLT (103/μl)	902.0 ±118.4	946.0 ±197.5	963.0 ±260.3	869.0 ±267.7	881.0 ±275.8	1034.0 ±159.2	967.0 ±194.8	952.0 ±252.4
Neutrophil (103/μl)	1.53± 0.95	1.88± 0.99	2.14± 1.03	1.83± 0.50	1.28± 0.53	1.53± 1.25	1.39± 0.58	1.30± 0.74
Lymphocyte (103/μl)	8.15± 3.47	11.32± 4.11	13.69± 3.66*	11.0± 4.97	10.91± 4.58	10.74± 4.14	10.32± 2.89	10.34± 6.22
Monocyte (103/μl)	0.23± 0.09	0.28± 0.12	0.36± 0.17	0.31± 0.15	0.35± 0.15	0.33± 0.18	0.27± 0.07	0.26± 0.15
Eosinophil (103/μl)	0.06± 0.05	0.07± 0.05	0.07± 0.03	0.06± 0.03	0.16± 0.23	0.10± 0.04	0.09± 0.06	0.07± 0.05
Basophil (103/μl)	0.12± 0.08	0.08± 0.04	0.11± 0.05	0.10± 0.05	0.07± 0.02	0.08± 0.03	0.09± 0.04	0.07± 0.07

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values are expressed as means ± S.D. for nine to twelve rats.

* Significantly different from the control at $p < 0.05$

Table 7. Serum biochemical indices in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Dose(mg/kg)	0	500	1000	2000
Sex		Male		
ALT (U/l)	44.0 ±11.5	40.0± 7.5	33.0± 5.6	39.0±15.0
AST (U/l)	119.0 ±24.6	117.0±17.1	119.0±38.0	121.0±55.7
ALP (U/l)	194.0 ±40.8	240.0±96.4	217.0±42.7	201.0±47.1
Cholesterol (mg/dl)	85.0 ± 9.5	96.0±13.1*	86.0±10.4	71.0± 8.4*
Triglyceride (mg/dl)	115.0 ±36.2	67.1±21.6*	68.0±13.6*	81.0±25.5*
Glucose (mg/dl)	128.0 ±18.7	122.0±14.5	134.0±25.7	125.0±27.5
Creatinine (mg/dl)	0.8 ± 0.07	0.8± 0.14	0.8± 0.12	0.8± 0.04
BUN (mg/dl)	16.0 ± 1.7	14.0± 1.9	15.0± 1.1	15.0± 2.8
Albumine (g/dl)	3.8 ± 0.22	4.0± 0.14*	3.9± 0.27	3.8± 0.14
T. Protein (g/dl)	6.9 ± 0.38	7.4± 0.52*	7.4± 0.35*	6.8± 0.33
Sodium (mmol/l)	163.5 ± 7.9	156.8± 7.0*	150.3± 4.4*	149.8± 3.8*
Potassium (mmol/l)	7.28± 0.8	6.9± 0.3	7.2± 0.8	7.4± 0.6
Calcium (mmol/l)	9.1 ± 0.7	10.9± 2.8*	11.6± 2.4*	9.6± 1.0
Chloride (mmol/l)	109.0 ± 2.1	110.0± 3.6	113.0± 1.6*	112.0± 2.4*
PT (sec)	14.3 ± 0.9	14.5± 0.3	14.5± 0.3	15.0± 0.9
APTT (sec)	23.5 ± 3.9	24.4± 1.5	21.9± 3.1	21.5± 4.3
Dose(mg/kg)	0	500	1000	2000
Sex		Female		
ALT (U/l)	34.0 ± 6.1	29.0± 4.3	29.0± 6.0	33.0± 5.9
AST (U/l)	125.0 ±40.3	107.0±16.1	96.0±12.8*	103.0±10.4
ALP (U/l)	130.0 ±43.6	129.0±29.2	139.0±49.4	126.0±23.7
Cholesterol (mg/dl)	100.0 ±15.0	92.0±21.0	88.0±15.5	92.0±18.9
Triglyceride (mg/dl)	59.0 ±14.1	59.0±20.2	60.0±20.5	68.0±18.6
Glucose (mg/dl)	109.0 ±10.0	118.0±22.8	124.0±36.8	113.0±25.5
Creatinine (mg/dl)	0.9 ± 0.08	0.9± 0.10	0.9± 0.08	0.8± 0.05
BUN (mg/dl)	16.0 ± 1.3	19.0± 2.9	17.0± 3.0	16.0± 3.5
Albumine (g/dl)	4.3 ± 0.34	4.2± 0.36	4.5± 0.25	4.4± 0.25
T. Protein (g/dl)	7.7 ± 0.43	7.2± 0.44*	7.4± 0.25	7.5± 0.38
Sodium (mmol/l)	147.1 ± 8.0	140.7± 4.6	143.9± 5.9	146.8± 5.6
Potassium (mmol/l)	7.12± 0.7	8.2± 1.5	7.5± 0.8	7.4± 0.8
Calcium (mmol/l)	9.3 ± 0.6	8.4± 0.7*	8.6± 0.5*	8.1± 0.4*
Chloride (mmol/l)	111.0 ± 1.9	111.0± 2.2	111.0± 3.2	111.0± 2.4
PT (sec)	15.4 ± 0.8	15.0± 0.5	14.3± 0.5*	14.6± 0.3*
APTT (sec)	19.7 ± 2.2	19.1±2.9	20.4± 2.1	21.0± 1.9

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values are expressed as means ± S.D. for nine to twelve rats.

* Significantly different from the control at $p < 0.05$

뇨분석 및 골수검사

뇨분석 결과에서는 대조군과 투여군 사이에 차이가 관찰되지 않았으며(Table 8), 골수검사에서는 대조군과 고용량군간에 적혈구 계통 전구세포나 백혈구 계통 전구세포의 형태학적 이상은 관찰되지 않았고, M/E비율도 0.81~0.89로 정상을 나타내었다.

육안소견 및 장기중량

Table 8. Urinalysis in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Sex		Male				Female			
Dose(mg/kg)		0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
No. of animals		12	9	9	11	9	9	11	8
Specific gravity	<1.005	0	0	0	0	0	1	0	0
	1.010	0	0	2	1	0	1	2	2
	1.015	1	0	0	2	1	2	0	0
	1.020	2	1	2	1	2	4	3	2
	1.025	4	4	4	2	3	1	6	4
	>1.030	5	4	1	5	3	0	0	0
pH	6.0~7.0	0	1	0	1	3	3	3	2
	~8.0	7	2	6	3	2	5	3	4
	~9.0	5	6	3	7	4	1	5	2
Protein	-	0	0	0	0	1	2	1	0
	+/1	0	1	0	0	0	2	3	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 mg/dl	0	0	2	3	4	1	4	4
	100 mg/dl	8	7	4	6	3	4	3	2
	>300 mg/dl	4	1	3	2	1	0	0	2
Glucose	-	12	9	8	11	9	9	11	8
	0.1 g/dl	0	0	1	0	0	0	0	0
	>0.25 g/dl	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	-	0	0	0	0	4	5	5	5
	+/-	5	5	3	5	5	4	6	3
	+	7	4	5	6	0	0	0	0
	++	0	0	1	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	3	5	3	6	6	6	7	4
	+	9	4	6	5	3	3	4	4
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	12	9	9	11	9	7	11	8
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	2	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrite	-	12	7	8	11	7	9	10	9
	+	0	2	1	0	2	0	1	0
Urobilinogen	0.1 EU/dl	12	3	3	3	1	6	4	6
	1.0 EU/dl	0	6	6	8	8	3	7	3
	>2.0 EU/dl	0	0	0	0	0	0	0	0

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values are expressed as the numbers of aninals under grade.

부검 결과 최고용량군에서 폐장의 첨엽과 횡격막엽에 대엽성 또는 아대엽성의 적갈색의 경화소가 암컷 1례에서 관찰되었고, 고환에서 양측성으로 위축된 소견이 1례에서 관찰되었다. 신장의 경우, 좌측신장의 할단면 소견에서 신우

Table 9. Gross findings in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Sex	Male				Female			
Dose(mg/kg) (No. animals)	0(12)	500(11)	1000(9)	2000(11)	0(11)	500(11)	1000(11)	2000(9)
Thyroid gland								
NGF[c]	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	11(100)	11(100)	11(100)	9(100)
Brain								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	11(100)	11(100)	11(100)	9(100)
Heart								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	11(100)	11(100)	11(100)	9(100)
Liver								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	11(100)	11(100)	11(100)	9(100)
Kidney								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	8(73)	11(100)	11(100)	9(100)
Hydronephrosis					2(18)	0	0	0
Dimpling of cortex					1(9)	0	0	0
Lung								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	11(100)	11(100)	11(100)	8(89)
Pneumonic consolidation					0		0	1(11)
Spleen								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	11(100)	11(100)	11(100)	9(100)
Adrenal gland								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	11(100)	11(100)	11(100)	9(100)
Testes (Ovary)								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	10(91)	11(100)	11(100)	11(100)	9(100)
Atrophy	0	0	0	1(9)				
Thymus								
NGF	12(100)	11(100)	9(100)	11(100)	11(100)	11(100)	11(100)	9(100)

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values are expressed as animal numbers (the percentage of animal numbers).

[c] NGF : no gross findings

의 확장소견이 대조군 암컷 2례에서 관찰되었고, 좌측 신장 표면의 함몰 소견이 대조군 암컷 1례에서 관찰되었다 (Table 9). 각 장기의 절대중량과 체중에 대한 상대중량 측정 결과, 대조군과 투여군간에 유의성있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 10).

조직병리검사

간장에 산발적인 염증세포 침윤 및 소육아종(microgranuloma)형성이 대조군 암컷 2례, 최고용량군 수컷 1례, 암컷 1례에서 관찰되었고, 국소적인 투명세포병변(clear cell foci)이 최고용량군 암컷 2례에서 관찰되었다. 신장에서는 중등도의 신우확장이 대조군 암컷 2례에서 관찰되었고, 국소적으로 간질에 염증세포침윤이 대조군 수컷 2례와 암컷 4례, 최고용량군 수컷 5례와 암컷 1례에서 관찰되었으며, 세뇨관의 무기질 침착으로 생각되어지는 소견이 최고용량군 수컷 6례에서 관찰되었다.

폐장에서는 간질성 폐렴이 대조군 수컷 2례와 암컷 4례, 최고용량군 암컷 4례에서 관찰되었으며, 심장에서는 국소적인 심장근의 염증세포 침윤이 대조군 수컷 1례와 암컷 1례에서 관찰되었고, 심장근 또는 혈관주위의 무기질 침착으로 생각되어지는 소견이 대조군 수컷 1례, 최고용량군 수컷 1례에서 관찰되었다. 최고용량군 수컷 1례의 고환에서 정세관의 위축이 양측성으로 관찰되었다(Table 11).

대조군과 고용량군의 소수례에서 나타나는 간장의 산발적인 염증세포 침윤 및 소육아종은 대조군과 투여군에서 동시에 관찰되는 점으로 보아, 시험물질에 의한 것이라기보다는 환경과 영양등의 요인에 의한 것으로 생각되었다. 최고용량군 암컷 2례에서 관찰되었던 투명세포 병변은 원

Table 10. Absolute and relative organ weights in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Dose(mg/kg)	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
Sex	Male				Female			
Adrenal(L)	0.031±0.007	0.030±0.006	0.034±0.007	0.034±0.00	0.037±0.009	0.041±0.008	0.035±0.006	0.039±0.010
Rel.wt[c]	0.008±0.002	0.008±0.002	0.009±0.002	0.009±0.00	0.035±0.008	0.017±0.004	0.014±0.003	0.016±0.004
Adrenal(R)	0.029±0.009	0.029±0.004	0.032±0.005	0.030±0.00	0.016±0.004	0.033±0.007	0.035±0.006	0.034±0.010
Rel.wt	0.007±0.002	0.008±0.001	0.008±0.001	0.008±0.00	0.015±0.004	0.014±0.003	0.014±0.003	0.014±0.004
Adrenal(T)	0.059±0.013	0.059±0.007	0.065±0.010	0.064±0.01	0.072±0.015	0.074±0.014	0.070±0.010	0.074±0.018
Rel.wt	0.015±0.003	0.015±0.002	0.017±0.002	0.017±0.00	0.031±0.007	0.031±0.006	0.028±0.005	0.030±0.006
Thyroid	0.036±0.017	0.028±0.012	0.032±0.008	0.034±0.02	0.026±0.009	0.021±0.007	0.024±0.007	0.025±0.009
Rel.wt	0.009±0.004	0.007±0.003	0.008±0.002	0.009±0.00	0.011±0.004	0.009±0.003	0.010±0.002	0.011±0.004
Brain	2.22±0.10	2.17±0.06	2.14±0.14	2.20±0.13	2.00±0.08	2.06±0.08	2.09±0.10	2.06±0.07
Rel.wt	0.57±0.04	0.57±0.03	0.54±0.03	0.57±0.04	0.85±0.05	0.87±0.05	0.85±0.05	0.8 5±0.07
Heart	1.39±0.16	1.40±0.20	1.38±0.19	1.38±0.16	1.01±0.34	0.84±0.07	0.88±0.07	0.93±0.13
Rel.wt	0.36±0.04	0.36±0.04	0.35±0.03	0.35±0.03	0.43±0.15	0.35±0.03	0.36±0.02	0.38±0.03
Liver	11.46±1.08	11.04±1.14	11.63±1.51	11.23±1.16	6.98±0.59	7.03±0.91	7.54±0.52	6.96±0.52
Rel.wt	2.95±0.17	2.87±0.20	2.94±0.27	2.87±0.20	2.95±0.21	2.95±0.22	3.05±0.20	2.87±0.16
Kidney(L)	1.59±0.22	1.54±0.15	1.58±0.17	1.59±0.20	0.89±0.08	0.95±0.10	0.98±0.11	0.96±0.09
Rel.wt	0.41±0.05	0.40±0.03	0.40±0.03	0.41±0.04	0.38±0.04	0.40±0.03	0.39±0.03	0.40±0.04
Kidney(R)	1.59±0.23	1.55±0.10	1.57±0.17	1.70±0.36	0.95±0.09	0.98±0.08	0.99±0.09	0.98±0.09
Rel.wt	0.41±0.05	0.40±0.02	0.40±0.03	0.44±0.10	0.40±0.04	0.41±0.03	0.40±0.03	0.40±0.03
Kidney(T)	3.18±0.45	3.08±0.25	3.15±0.33	3.29±0.47	1.84±0.16	1.93±0.17	1.96±0.20	1.93±0.18
Rel.wt	0.82±0.10	0.80±0.05	0.80±0.06	0.84±0.12	0.78±0.07	0.81±0.06	0.79±0.06	0.80±0.07
Lung	1.90±0.18	1.78±0.17	1.76±0.23	1.85±0.24	1.44±0.18	1.59±0.35	1.45±0.15	1.44±0.17
Rel.wt	0.49±0.05	0.46±0.04	0.45±0.05	0.47±0.05	0.61±0.06	0.67±0.16	0.58±0.06	0.60±0.07
Spleen	0.95±0.17	0.89±0.12	0.90±1.52	0.86±0.13	0.58±0.08	0.56±0.09	0.59±0.07	0.55±0.05
Rel.wt	0.24±0.04	0.23±0.03	0.23±0.03	0.22±0.04	0.25±0.03	0.24±0.03	0.24±0.02	0.23±0.02
Testis/Ov.(L)	1.68±0.13	1.62±0.10	1.65±0.11	1.55±0.33	0.06±0.012	0.053±0.012	0.062±0.015	0.055±0.007
Rel.wt	0.44±0.04	0.42±0.03	0.42±0.04	0.40±0.09	0.025±0.005	0.022±0.004	0.025±0.006	0.023±0.003
Testis/Ov.(R)	1.66±0.13	1.62±0.10	1.56±0.19	1.53±0.31	0.061±0.018	0.061±0.017	0.064±0.016	0.062±0.009
Rel.wt	0.43±0.04	0.42±0.03	0.40±0.05	0.40±0.09	0.026±0.007	0.026±0.007	0.026±0.006	0.026±0.004
Testis/Ov.(T)	3.34±0.25	3.23±0.20	3.22±0.25	3.07±0.64	0.12±0.03	0.11±0.03	0.13±0.03	0.12±0.01
Rel.wt	0.86±0.09	0.84±0.06	0.82±0.07	0.80±0.18	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
Thymus	0.73±0.12	0.72±0.11	0.79±0.17	0.63±0.15	0.58±0.12	0.58±0.13	0.52±0.09	0.50±0.09
Rel.wt	0.19±0.03	0.19±0.03	0.20±0.04	0.16±0.04	0.24±0.05	0.24±0.06	0.21±0.04	0.21±0.04

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values(unit: g) are expressed as means ± S.D. for nine to twelve rats.

[c]Rel. wt : Relative organ weights were expressed as the percentage of organ weights to body weights.

인은 뚜렷하지 않으나 6개월된 랫드의 34%에서 자연발생하였다는 보고[8]가 있어, 약물과 관련없이 발생할 수도 있으며 이에 대하여는 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 암수 다수례에서 관찰된 신장의 국소적인 간질의 염증세포 침윤과 폐장의 간질성 폐렴도 대조군과 투여군 모두에서 유사한 비율로 나타나는 것으로 보아, 시험물질에 의한 영향보다는 사육환경등에 의한 것으로 생각되었다. 최고용량군 수컷 6례에서 관찰된 세뇨관의 무기질 침착은 대조군과 고용량군 수컷 각 1례에서 관찰된 심장근 또는 혈관주위의 무기질 침착과 유사한 일련의 병변으로 그 원인은 알 수 없으나, 분명한 시험물질에 의한 독성소견으로는 생각되어지지 않았다.

Table 11. Incidence of histopathological findings in male and female rats administered with G009 for 30 days[a,b]

Sex	Male		Female	
Dose(mg/kg)	0	2,000	0	2,000
Number of animals	12	11	11	9
Thyroid gland				
Normal	12	11	11	9
Brain				
Normal	12	11	11	9
Heart				
Spontaneous myopathy	1(8)	0	1(9)	0
Mineralization	1(8)	1(9)	0	0
Liver				
Microgranuloma	0	1(9)	2(18)	1(11)
Clear cell foci	0	0	0	2(22)
Kidney				
Interstitial nephritis	2(17)	5(45)	4(36)	1(11)
Tubular mineralization	0	6(66)	0	0
Hydronephrosis	0	0	2(18)	0
Lung				
Interstitial pneumonia	2(17)	0	4(36)	4(44)
Thymus				
Normal	12	11	11	9
Spleen				
Normal	12	11	11	9
Adrenal gland				
Normal	12	11	11	9
Testis				
Bilatral atrophy	0	1(9)	0	9

[a] Rats were administered orally with G009 once a day for 30 days.

[b] Values are expressed as animal numbers (the percentage of animal numbers).

이상의 아급성독성시험 결과를 종합하여 보면, 본 시험에서 설정한 최고용량군인 2,000 mg/kg/day에서도 일반증상, 혈액학적 검사 및 조직병리검사 모두에서 시험물질과 관련된 유의성있는 변화가 관찰되지 않았으므로, G009의 랫드에 대한 1개월간 경구투여시 무영향량은 2,000 mg/kg/day 이상일 것으로 추정되었다.

국문 요약

영지버섯으로부터 분리한 단백다당체인 G009의 경구투여에 의한 아급성 독성을 평가하기 위하여 2,000, 1,000 및 500 mg/kg/day의 용량으로 Sprague-Dawley계 암 수 랫드에 한달간 주 7회 경구투여하였다. 모든 투여군에서 전 투여기간에 걸쳐 시험물질에 의한 사망동물은 없었으며, 임상증상관찰, 체중변화, 사료섭취량 및 물섭취량을 측정한 결과, 시험물질 투여군과 대조군간에 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다. 또한 혈액학적검사, 혈액생화학적검사, 뇨검사, 안구검사 및 골수검사에서도 일부 대조군과 유의성이 있는 차이를 보이는 항목이 있었으나 용량의존성이 없고 모두 정상범위를 벗어나지 않아 시험물질에 기인하는 이상소견으로는 판단되지 않

았다. 부검소견 및 병리조직학적 검사결과에서도 시험물질에 의한 특이적인 이상소견은 관찰되지 않았으며, 장기무게 측정결과에서도 대조군과 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 이상의 결과로 부터 G009의 1개월간 경구투여에 의한 무영향량은 시험물질에 의한 이상소견이 없는 것으로 판단되는 2,000 mg/kg/day 이상인 것으로 추정되었다.

참고문헌

1. Chung, H. T.: Effect of G009 (Extract of *Ganoderma lucidum* mycelium) on the nitric oxide from Macrophage-derived cell line(RAW 264.7). *Proc. Int. Sym. on Ganoderma lucidum.* June 17, 39-54, Seoul, Korea (1993).
2. Ukai, S., Kiho, T., Hara, C., Kuruma, I. and Tanaka, Y.: Polysaccharides in fungi(XIV), anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 983-990 (1983).
3. Miyazaki, T. and Nishijima, M.: Studies on fungal polysaccarides(XXVII), structral examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum. Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3611-3616 (1981).
4. Sone, Y., Okuda, R. Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A.: Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum. Aggri. Biol. Chem.*, **49**, 2641-2653 (1985).
5. Stavinoha, W. B., Hardman, W. E. and Cameron, I. L.: Short term dietary supplementation with *Ganoderma lucidum* slows development and growth of microadenomatous lesions in the colone of rats treated with the carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine. *Proc. Int. Sym. on Ganoderma lucidum.* June 17, 12-22, Seoul, Korea (1993).
6. Kim. B. K., Kim, H. W. and Choi, E. C.: Anti-HIV activities of *Ganoderma lucidum. Proc. Int. Sym. on Ganoderma lucidum.* June 17, 67-72, Seoul, Korea (1993).
7. Park, E. J., Kim, K. Y., Kim, S. W., Lee, S. Y. and Sohn, D. H.: The antifibrotic effects of polysaccharides extract from *Ganoderma lucidum* on the experimental hepatic cirrhosis. *Yakhak Hoeji*, **38**, 338-344 (1994).
8. Eustis, S. L., Boorman, G. A., Harada, T. and Popp, J. A.: Liver. *Pathololgy of the Fischer Rat.* 78 (1990).