

오키 아토(Okay Ato:Y.L.S-95 Compound)의 4주간 반복 경구투여가 자연적으로 유발된 NC/Nga 마우스의 아토피성 피부염에 미치는 기능성 검증

ChemOn

시험책임자 : 김 재 민

시험기관 : 주식회사 케온 전임상 연구센터

시험번호 : 03-ME-138N

시험시작일 : 2003. 06. 12

시험기간 : 2003. 06. 20 ~ 2003. 09. 20.

실험의뢰자 : 바이오 오키 (주)

의뢰책임자 : 권 진 수

시험기관주소 : 경기도 용인시 구성읍 중리 464-5

시험개요

시험제목 : 오키 아토(Okay Ato)의 4주간 반복 경구투여가 자연적으로 유발된 NC/Nga 마우스의 아토피성 피부염에 미치는 기능성효과 검증

시험번호 : 03-ME-138N

시험목적 : 오키 아토(Okay Ato)의 4주간 반복 경구투여에 의한 아토피성 피부염 기능성효과를 관찰하기 위하여 수행하였다.

시험방법 : 자연발생 아토피 피부염 모델 동물인 NC/Nga 마우스를 이용하여 4주간 반복 경구 투여하여 아토피성 피부염 지표 항목들을 측정하였다.

시험일정

- 1) 시험개시일 : 2003년 06 월 12 일
- 2) 동물 입수일 : 2003 년 06 월 20 일
- 3) 검역· 순화기간 : 2003 년 06 월 20 일 ~ 2003 년 08 월 31 일
- 4) 투여기간 : 2003 년 09 월 01 일 ~ 2003 년 09 월 28 일
- 5) 부검 및 조직 채취일 : 2003 년 09 월 29 일
- 6) 병리조직학적인 검사일: 2003 년 09 월 30 일 ~ 10 월 10 일
- 8) 최종보고서(안) 제출일 : 2003 년 10 월 31 일
- 9) 최종보고서 제출일 : 2003 년 12 월 12 일

시험의뢰자

명 칭 : 바이오 오키 (주)
소 재 지 : 서울시 마포구 도화동 541번지 일신빌딩 1501호
의뢰책임자 : 권 진 수
대표 이사 : 왕 성 호
연 락 처 : 02-717-2021, FAX : 02-717-2003

시험기관

명 칭 : (주) 케온 전임상연구센터
소 재 지 : 경기도 용인시 구성읍 중리 464-5
운영책임자 : 이 현 겔
대표 이사 : 권 오 령
연 락 처 : 031-288-6200, FAX : 031-288-6201

시험관계자

부 문	책임자	담당자
동물실험	길기현	이선경, 박재희
혈액 검사	김문순	김광호
시험물질 조제/보관	장경화	
조직병리	이재현	한명규, 양현주
자료보관	최윤영	최춘희

시험관계자 서명

시험물질 조제

장경화
장 경 화
시험물질조제보관책임자

2003.12.12
날짜

동물 시험

길기현
길 기 현, 실험동물기술사
동물실험책임자

2003.12.12
날짜

주 시험자

박재희
박 재 희, 실험동물기술사

2003.12.12
날짜

자료 보관

최윤영 Choi
최 윤 영, MS
자료보관책임자
연구기획 책임자

2003.12.12
날짜

보고서 검토

송시환
송 시 환 PhD, DVM

2003.12.12
날짜

시험책임자
보고서작성

김재민
김 재 민, 실험동물기술사

2003.12.12
날짜

운영책임자
승인

이현걸
이 현 걸 PhD, Toxicologist
운영책임자

2003.12.12
날짜

목 차

시험개요 -----	1
관계자 서명 -----	3
요약 -----	5
재료 및 방법 -----	6
결과 -----	10
고찰 및 결론 -----	12

Figures

Figure-1. Gross finding of male mice examined for 4week -----	14
Figure-2. Histopathological findings of male mice -----	15
Figure-3. Effect of test articles treatments in total IgE value -----	23

Tables

Table-1. Individual body weights of male mice -----	16
Table -2. Individual total IgE value of male mice -----	18
Table-3. Individual mortality and clinical signs of male mice -----	19
Table-4. Incidence of histopathological findings of male mice -----	22

1. 요약

(1) 일반증상 및 사망률

자연 발생적으로 유발된 피부의 소견을 제외하고, 시험물질 투여에 의한 이상 증상은 관찰되지 않았다.

(2) 체중 변화

체중의 변화에서는 시험물질 투여와 관련된 증감은 관찰되지 않았다.

(3) 혈액생화학적 검사

혈중 IgE의 양을 측정한 결과 시험물질 투여군과 양성대조군에서 매체 대조군과 비교해 통계학적으로 유의한 증가가 관찰 되었다

(4) 육안적인 부검소견

피부소견의 경우 육안적으로 등쪽의 아래 피부에 작은 반흔양의 상처가 있는 동물이 매체 대조군에서 7마리, 양성 대조군에서 4마리 시험물질 처리군에서 2마리가 관찰되었다.

(5) 병리조직학적인 검사

병리조직학적 검사에서 피부의 궤양, 염증, 상피세포의 비후, Scar조직의 발생빈도 및 병변의 정도에서 매체 대조군에 비해 시험물질 처리군에서 낮게 관찰되었다.

이상의 결과로부터, 육안소견 및 병리조직적인 검사에서 매체 및 양성대조군 (상품명:Protopic, 한국후지사과 약품)에 비해서 오키 아토 (Okay Ato)를 경구투여한 군에서 아토피피부염에 대한 개선이 확인되었다. 따라서, 바이오오키㈜의 오키 아토(Okay Ato)는 아토피 피부염에 대한 기능성이 있는 것으로 판단되었다.

2. 재료 및 방법

가. 시험물질 및 부형제 대조물질

(1) 시험물질

오키 아토(Okay Ato: Y.L.S-95 Compound)

(2) 양성대조물질

Tacrolimus(상품명:Protopic, 한국후지사와약품, Lot NO. 16161)연고제

(3) 매체대조물질

멸균 증류수(대한약품공업주식회사)

(4) 투여할 시험물질의 조제 방법

투여할 시험 물질은 의뢰자 측에서 제공된 시험물질을 원액 그대로 냉장 보관 하였다가 투여 전에 투여 될 양을 꺼내어 투여한 후 다시 냉장보관 하였다.

나. 시험계

(1) 종(계통) : 특정병원체부재(SPF) NC/Nga mouse

(2) 성별 및 입수시 주령 : 수컷 5 주령, 12.51 ~ 14.86 g

(3) 선택 이유 : 본 시험에 사용된 NC/Nga mouse는 아토피 피부염과 관련된 시험에 많이 사용되는 종으로 풍부한 기초 데이터를 가지고 있어 본 시험에 사용되었다.^(1, 2, 3)

(4) 공급원 : (주)바이오 제노믹스

(5) 입수일 : 2003 년 06 월 20 일

(6) 입수시 동물수 : 수컷 28 마리

(7) 검역 및 순화기간 : 입수 후 10주간의 순화기간 중 아토피를 유발할 목적으로 (주)캠온의 제3동물실에서 일반 환경에 노출 시켰다.^(1, 2, 3)

(8) 투여개시 시 주령 및 체중범위 : 수컷 15 주령, 18 g ~ 23 g

(9) 사용동물 수 : 수컷 24 마리

(10) 군분리법 : 무작위법에 의한 군분리

(11) 식별법 : Ear punch을 이용한 표식법과 사육상자별 개체 식별카드에 의한 식별법을 이용하였다.

다. 사육조건

- (1) 실 번 호 : 제3동물사육구역 (2003년06월20일~08월31일)
i.간이동물사육구역 (2003년08월31일~09월29일)
- (2) 온,습도 범위 : 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 15\%$
- (3) 환기횟수 : 10~20회/hr
- (4) 명암 cycle : 형광등조명 12 hr/day. (08:00 점등~20:00 소등)
- (5) 조 도 : 150~300 Lux
- (6) 사육상자의 종류(크기) : 순화, 검역 및 관찰기간 중 폴리카보네이트 사육상자(크기; 220 W × 360 L × 200 H mm)에 동물을 수용하여 사육하였다.
- (7) 사육상자 당 동물 수 : 순화, 검역기간, 투여기간 및 투여 후의 관찰기간 모두 5 마리 이하로 사육하였다.
- (8) 사 료
 - 가) 종 류 : 실험동물용 고형사료
 - 나) 공급원 : Harlan Co. Ltd.
 - 다) 급여법 : 방사선 멸균된 사료를 자유섭취 시켰다.
- (9) 물
물은 음용수로 적합한 지하수를 물병을 이용하여 급여 하였다.

라. 투여량, 투여방법

- (1) 투여방법
 - 가) 투여경로 : 경구
 - 나) 선택이유 : 본 시험물질의 사람에서의 적용 경로로써 경구투여를 선택하였다.
 - 다) 투여횟수 및 투여기간 : 4주간 반복 경구 투여, 1회/day
 - 라) 투여부위 및 투여법 : 존데를 이용하여 강제 경구 투여를 실시하였다.
 - 마) 투여액량 : 측정된 체중을 기준으로 10 ml/kg으로 투여 액량을 계산 하였다.
 - 바) 투여량 : 의뢰자의 요청에 따라 임상예정용량에 의거하여

1000 mg/kg에서 정하였다.

마. 시험군의 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
G1	male	8	1~8	10	0
G2*	male	8	9~16	*	*
G3	male	8	17~24	10	1000

*; G2군의 경우 경구 투여가 아닌 피부 도포로 60 mg을 도포하였다.

G1- 매체대조물질을 경구투여한 군

G2- 양성대조물질인 Tacrolimus(상품명:Protopic)을 피부에 직접 도포하는군

G3- 시험물질인 오키 아토(Okay Ato)를 경구투여한 군

바. 관찰 및 검사항목

- 1) 일반증상의 관찰: 매일 동물의 일반 증상을 관찰하고 기록하였다.
- 2) 체중측정: 투여 개시 시, 이후 주1회, 부검 시 체중을 측정하였다.
- 3) 혈액 생화학적검사(IgE): 혈청중의 IgE의 양 측정은 ELISA를 이용하여 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 우선 정제된 anti-mouse IgE capture mAb (BD Biosciences Cat. No. 553413, clone R35-72)를 2ug/ml 로 PBS 에 용해하여 well 당 100ul되게 enhanced protein-binding ELISA plate (e.g. BD Biosciences Nunc Immuno plate. Cat. No. 12-565-136)에 coating 하였다. 이를 서서히 흔들면서 for overnight at 4 °C로 하룻밤을 배양하였다. 이후에 PBS/Tween-20 (0.05%) 용액으로 3회 세척하고 well 당 200ul의 blocking buffer(1%BAS-PBS)를 이용하여 blocking 하였다.

실온에서 2시간 배양한 후에 세척액으로 다시 세척하고 IgE 표준품(BD Biosciences Cat. No. 557079, clone. C38-2)과 검체를 well에 분주하고 다시 4 °C로 하룻밤을 배양하였다. 수세 과정을 6회 반복한 후에 blocking buffer에 1 ug/ml의 농도로 들어 있는 biotinylated anti-mouse IgE(BD Biosciences Cat. No. 553419, clone R35-118)를 각각의 well에 100ul씩 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 다시 배양하고 6회의 세척과정을 거쳐 blocking agent에 녹아있는 발색제인 AV-HRP (BD Biosciences Cat. No. 554058, Avidin-Horseradish Peroxidase)를 첨가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 세척과정을 거치고 기질(ABTS : 3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid, Sigma Cat. No. A-1888)완충액으로 20분간 반응하고 11ul의 30% H₂O₂ (Sigma, Cat. No. H1009)와 11 ml의 Substrate buffer를 혼합하고 이를 100ul 씩 well 에 넣은 후에 20분간 반응시키고 405 nm에서 reading을 수행하였다.

- 4) 부검소견관찰: 육안적인 내부장기의 이상과, 피모를 제거 한 후 등쪽 피부의 상처를 관찰 하였다.
- 5) 병리조직학적인 검사: 등쪽의 피부를 적출하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 후 H&E 염색 슬라이드 표본을 만들어 광학현미경 하에서 검경 하였다. 검경 방법은 피부의 3Cm의 길이에서 피부궤양, 급만성 염증세포의 침윤, 피부상피 세포의 종충화적 비후 및 Scar의 잔존 등을 관찰 하였다.

사. 통계 처리

통계 처리는 SPSS 10.1 프로그램을 사용하여 One-way ANOVA를 이용하여 각 군간 유의성을 비교하였고 사후 검정으로 LSD test를 이용하였다. 유의성의 인정은 P<0.05로 하였다.

3. 결과

(1) 일반 증상(Table 3)

모든 시험군에서 일반 증상이 관찰 되지 않았으며, 순화가 끝난 뒤 제모를 하였을 때 모든 동물에서 염증이 관찰 되었다. 또한 시험 중 사망 동물은 시험물질 처리군의 19번 동물이 투여 실수로 인하여 사망 하였을 뿐, 그 외의 모든 동물에서는 사망 동물이 관찰 되지 않았다.

(2) 체중(Table 1)

특별한 체중의 감소나 증가는 관찰되지 않았다.

(3) 혈액 생화학적 검사(Table 2, Figure 3)

혈청중에 IgE의 함량을 ELISA Reader(Molecular Devices, CM-050-01)를 이용하여 측정 비교한 결과 양성대조군 및 시험물질 처리군이 매체 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 높은 결과를 보였다($P<0.05$).

(4) 육안적 부검소견(Figure 1)

내부장기의 소견으로는 별다른 이상이 관찰 되지는 않았지만, 피부의 외부소견에서 육안적으로 등쪽의 아래 피부에 작은 반흔양의 상처가 있는 동물이 매체 대조군에서는 7마리, 양성 대조군에서는 4마리 시험물질 처리군에서는 2마리가 관찰되어 유의한 차이가 있었다.

(5) 병리조직학적인 검사(Table 4, Figure 2)

매체 대조군, 양성 대조군 및 시험 물질 처리군의 피부를 현미경적으로 관찰한 결과 피부 병변은 피부궤양, 급만성 염증세포 침윤, 피부 상피세포의 중층화적 비후 및 scar 잔존 등으로 관찰 할 수 있었다. 각각의 소견은 다음의 표(Table-4)와 같다. 피부 3cm 길이에서 피부궤양은 매체 대조군에서 50%의 발생을 보인 반면 시험물질 처리군에서는 14.3%의 발생을 보였다. 염증은 피하조직 또는 궤양 주위에서 관찰되었으며 매체 대조군은 모두 급성 또는 만성염증세포 침윤이 관찰되었으나 시험물질 처리군은 57.1%에서만 염증소견을

보였다. 상피세포 비후는 매체 대조군에서 모두 부분적으로 비후가 관찰된 반면 시험물질 처리군은 57.1%가 정상으로 관찰되었다. Scar는 매체 대조군에서 8마리중 7마리가 관찰된(87.5%) 반면 시험물질 처리군에서는 7마리중 2마리에서만 관찰(28.6%)되었다.

4. 고찰 및 결론

오키 아토(Okay Ato)의 아토피 피부염에 대한 기능성을 알아보기 위하여 아토피 모델동물인 NC/Nga 마우스를 이용하여 시험을 수행하였다.

NC/Nga 마우스는 태어난 후 어렸을 때부터 일반사육환경(conventional system)에서 노출되어 자라게 되면 6~7주부터 사람에서의 아토피성 피부염과 유사한 병변이 발생하게 되고 16~18주령이 되면 피부건조증, 딱지가 앉은 상처 및 작은 결정의 병변이 관찰되는 동물로서 아토피 피부염 모델동물로 사용되고 있다.^(1,2,3,6)

본 시험에서 양성대조군으로는 아토피 피부염의 치료제로 사용하고 있는 Tacrolimus 연고를 사용하였는데 경구로 적용되는 아토피 치료제가 적합한 것이 없어서 가장 흔히 사용되는 Tacrolimus 연고를 사용하였다.

NC/Nga 마우스에서 Tacrolimus 연고를 사용하면 피부의 병변이 감소하고 IgE의 양이 줄어드는 것으로 나타났다.⁽⁶⁾ 본 시험에서는 양성대조군에서 IgE의 양이 부형제 투여 대조군에 비해 오히려 통계적으로 유의하게 증가 하였고 이러한 현상은 시험물질 투여군에서도 같은 양상으로 나타났다. 그러나 이러한 결과가 나온것에 대한 정확한 원인은 본 시험만으로는 알 수 없었다.

본 시험에서 피부의 육안적 소견과 조직 병리학적 소견으로 볼 때에 아토피성 병변의 발생 정도 및 심도에서 부형제를 투여한 대조군에 비해 양성대조군 및 시험물질 투여군에서 확실한 효과가 관찰 되었다. 특히 시험물질 투여군에서 양성대조물질을 처리한 군 보다도 병변의 발생율이 낮았고, 그 정도도 낮게 관찰 되어 시험물질의 투여에 의한 아토피 피부염이 감소된 것을 알 수 있다.

이상의 결과로부터, 육안소견 및 병리조직적인 검사에서 매체 및 양성대조군 (상품명:Protopic, 한국후지사와 약품)에 비해서 오키 아토(Okay Ato)를 경구투여한 군에서 아토피 피부염에 대한 개선이 확인되었다. 따라서, 바이오 오키㈜의 오키 아토(Okay Ato)는 아토피 피부염에 대한 기능성이 있는 것으로 판단되었다.

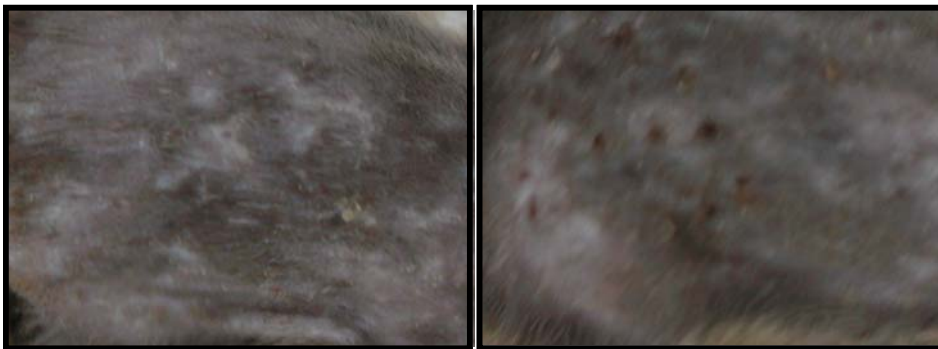
References

1. Katsuno M, Aihara M, Kojima M, Osuna H, Hosoi J, Nakamura M, Toyoda M, Matsuda H, Ikezawa Z. Neuropeptides concentrations in the skin of a murine (NC/Nga mice) model of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2003 Oct;33(1):55-65.
2. Hashimoto Y, Kaneda Y, Takahashi N, Akashi S, Arai I, Nakaike S. Clarithromycin inhibits the development of dermatitis in NC/Nga mice. *Chemotherapy*. 2003 Sep;49(5):222-8.
3. Higa S, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Hirano T, Suemura M, Kawase I, Tanaka T. Administration of anti-interleukin 18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga. *Br J Dermatol*. 2003 Jul;149(1):39-45.
4. Hashida R, Ogawa K, Miyagawa M, Sugita Y, Takahashi E, Nagasu T, Katsunuma T, Akasawa A, Tsujimoto G, Matsumoto K, Saito H. Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis by differential display. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Jun;131 Suppl 1:26-33.
5. Matsuoka H, Maki N, Yoshida S, Arai M, Wang J, Oikawa Y, Ikeda T, Hirota N, Nakagawa H, Ishii A. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy*. 2003 Feb;58(2):139-45.
6. Vogel W.H et al , Chapter P. Pharmacological model in dermatology in *Drug Discovery and Evaluation*. PP 1315-1316 2nd ed. Springer. Berlin

A)



B)



C)



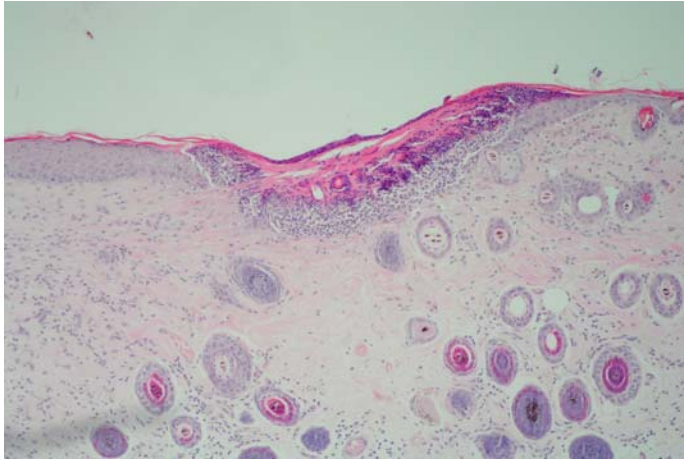
Figure 1. Gross finding of male mice examined 4week

(A) G1: Control

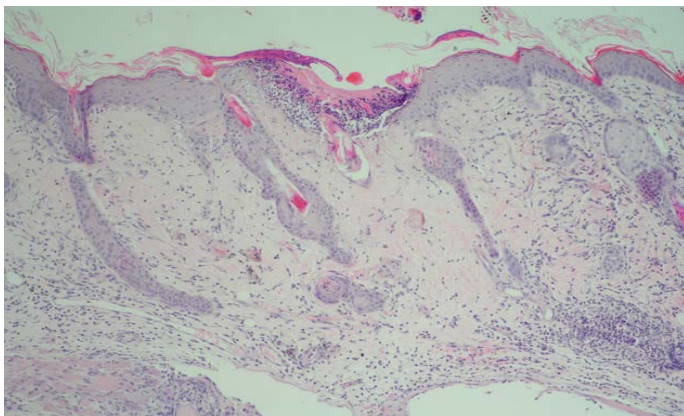
(B) G2: Positive control

(C) G3: Okay Ato(1000mg/kg)

(A)



(B)



(C)

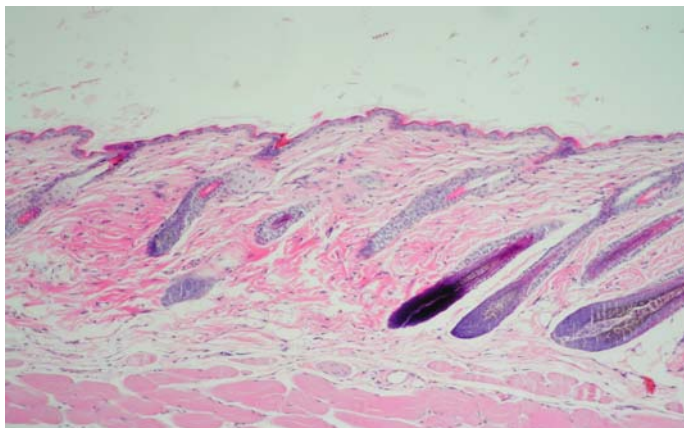


Figure 2. Incidence of histopathological findings of male mice
(A): Control, (B): Positive control, (C): Okay Ato (1000mg/kg)

Table 1-1. Individual body weights of male mice

INDIVIDUAL BODY WEIGHTS (Grams)				
STUDY : 03-ME-138N		GROUP : G1		SEX : MALE
ANIMAL NO	0 DAY	1Week	2Week	3Week
1	23.96	23.87	24.54	23.96
2	24.95	24.87	26.05	25.52
3	24.95	25.14	26.62	25.28
4	25.96	26.62	27.80	26.60
5	26.00	25.94	27.75	26.74
6	26.50	26.72	27.31	27.94
7	26.62	25.68	27.24	27.21
8	27.73	26.90	28.88	29.01
MEAN	25.83	25.72	27.02	26.53
S.D.	1.18	1.05	1.31	1.60
N	8	8	8	8

Table 1-2. Individual body weights of male mice

INDIVIDUAL BODY WEIGHTS (Grams)				
STUDY : 03-ME-138N		GROUP : G2		SEX : MALE
ANIMAL NO	0 DAY	1Week	2Week	3Week
9	24.38	23.29	28.58	23.45
10	24.77	26.78	27.27	27.61
11	25.13	25.42	26.04	26.23
12	25.82	26.27	27.91	27.76
13	26.05	24.55	25.94	25.89
14	26.33	25.22	26.23	26.22
15	26.68	26.20	27.16	25.81
16	27.15	28.62	22.19	29.56
MEAN	25.79	25.79	26.41	26.57
S.D.	0.96	1.59	1.94	1.79
N	8	8	8	8

Table 1-3. Individual body weights of male mice

INDIVIDUAL BODY WEIGHTS (Grams)				
STUDY : 03-ME-138N		GROUP : G3		SEX : MALE
ANIMAL NO	0 DAY	1Week	2Week	3Week
17	24.71	25.12	26.63	27.09
18	24.72	25.55	25.53	26.14
19	25.29	24.96	*	*
20	25.76	25.97	26.92	26.76
21	26.07	25.97	25.82	26.45
22	26.13	27.45	30.01	30.65
23	26.72	28.47	29.03	29.21
24	27.00	28.16	28.65	29.00
MEAN	25.80	26.46	27.51	27.90
S.D.	0.85	1.38	1.72	1.71
N	8	8	7	7

*Death

Table 2. Individual total IgE value of male mice

Total IgE value					
STUDY:03-ME-138N			SEX: MALE		
GROUP : G1		GROUP : G2		GROUP : G3	
DOSE : 0 (mg/kg)		DOSE : 6mg		DOSE : 1000 (mg/kg)	
Animal No.	IgE	Animal No.	IgE	Animal No.	IgE
1	0.124	9	0.272	17	0.217
2	0.092	10	0.197	18	0.216
3	0.181	11	0.199	19	*
4	0.182	12	0.188	20	0.200
5	0.234	13	0.174	21	0.220
6	0.177	14	0.240	22	0.202
7	0.168	15	0.217	23	0.198
8	0.207	16	0.237	24	0.222
MEAN	0.17	MEAN	0.22	MEAN	0.21
S.D.	0.045	S.D.	0.032	S.D.	0.010
N	8	N	8	N	7

* Death

Table 3-1. Individual mortality and clinical signs of male mice

CLINICAL SIGN INDIVIDUAL DATA		
03-ME-138N	GROUP:G1	SEX:MALE
ANIMAL No.	OBSERVATION	TIME OCCURED
1	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
2	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
3	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
4	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
5	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
6	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
7	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
8	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day

Table 3-2. Individual mortality and clinical signs of male mice

CLINICAL SIGN INDIVIDUAL DATA		
03-ME-138N	GROUP:G2	SEX:MALE
ANIMAL No.	OBSERVATION	TIME OCCURED
9	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
10	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
11	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
12	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
13	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
14	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
15	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
16	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day

Table 3-3. Individual mortality and clinical signs of male mice

CLINICAL SIGN INDIVIDUAL DATA		
03-ME-138N	GROUP:G3	SEX:MALE
ANIMAL No.	OBSERVATION	TIME OCCURED
17	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
18	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
19	Normal Death	0day-9day 10day
20	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
21	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
22	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
23	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day
24	Normal Terminal sacrifice	0day-28day 28day

Table 4. Incidence of histopathological findings of male mice

Ulcer						
Group	N	no lesion	mild	moderate	severe	marked
G1	8	4	1	3		
G2	8	4	4			
G3	7	6	1			

Inflammation						
Group	N	no lesion	minimal	mild	moderate	severe
G1	8	0	3	3	2	
G2	8	0	4	3	1	
G3	7	3	3	1		

Epithelial thickness						
Group	N	no lesion	minimal	mild	moderate	severe
G1	8	0	2	5	1	
G2	8	0	3	3	2	
G3	7	4	2	1		

Numbers of Scar							
Group	N	0	1	2	3	4	5
G1	8	1	2	1	2	1	1
G2	8	4	3	1			
G3	7	5	1	1			

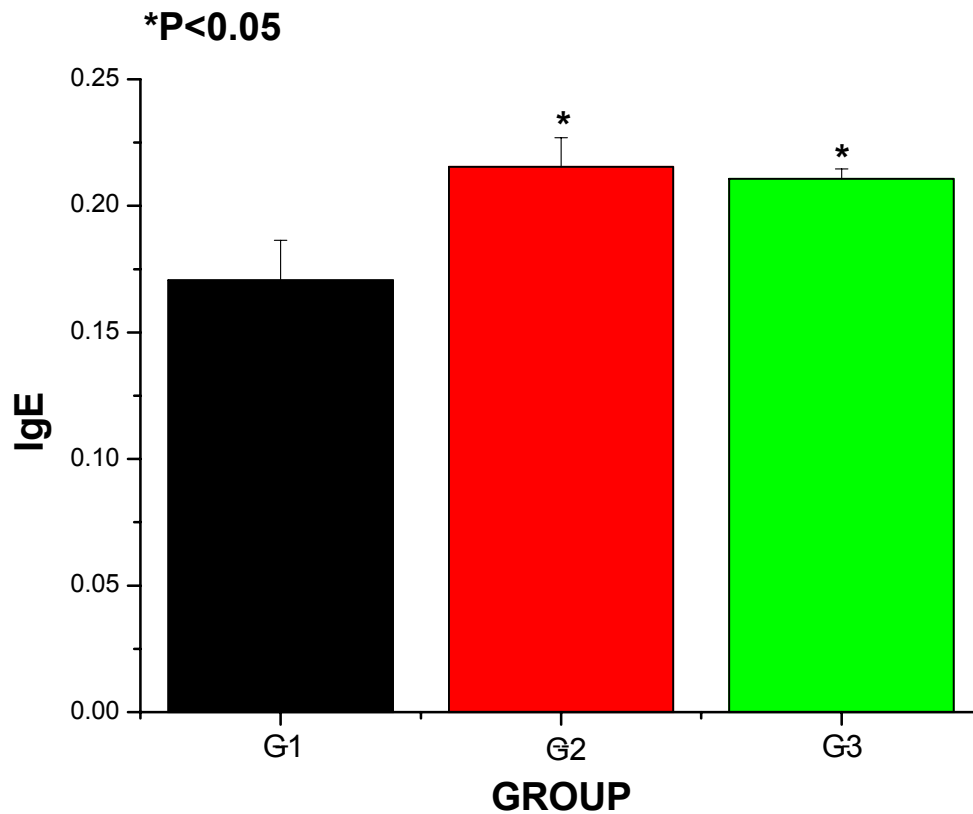


Fig-3. Effect of test articles treatments in total IgE value on the anti-inflammation test in NC/Nga mice. Data are expressed as mean ± S.D

G1:Vehicle control, G2:positive control, G3: Okay Ato (1000mg/kg)

The results were statistically analyzed by One-way ANOVA

***P<0.05 versus V.C value was taken as significant**