

Aloewhite의 안점막 및 피부에 대한 국소자극시험

김형식 · 광승준 · 김규봉 · 이승기 · 박현선 · 홍채영 · 안미영 · 조태형* · 오선택* · 박영인** · 이병무
성균관대학교 약학대학 독성학연구실, *남양알로에 중앙연구소, **고려대학교 식품공학과

Eye Irritation, Skin Irritation and Skin Sensitization Tests for Aloewhite in Animals

Hyung Sik Kim, Seung Jun Kwack, Kyu Bong Kim, Seung Ki Lee, Hyun Sun Park,
Che Young Hong, Mi Young Ahn, Tea Hyung Jo*, Sun Tack Oh*,
Young In Park** and Byung Mu Lee

Division of Toxicology, School of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University,
Kyunggi-Do, Suwon 440-746, Korea

*NamYang Aloe Co., Manny(B/D), 815-4, Yoksam-Dong, Kangnam-Ku, Seoul, Korea

**College of Natural Resources, Korea University, Seoul, Korea

(Received December 7, 1995)

(Accepted January 24, 1996)

ABSTRACT : Eye irritation, primary skin irritation and skin sensitization tests for Aloewhite were tested in New Zealand White rabbits and Hartley guinea pig. In primary skin irritation test of male New Zealand White rabbits, body weights were not significantly changed and Primary Irritation Index (PII) was 0.47, indicating Aloewhite as mildly irritating material. In ocular irritation test, any injury on iris, conjunctival membrane, and cornea in New Zealand White rabbits was not observed. No injuries of the ocular mucous membrane were also recorded. Skin sensitization was tested in guinea pig after intradermal and epicutaneous induction and graded I with zero % sensitization rate. These results indicate that Aloewhite was not considered to be irritant in test organs of animals.

Key Words : Aloewhite, Primary skin irritation, Eye irritation, Skin sensitization, Primary irritation index (PII)

I. 서 론

알로에는 백합과에 속하는 약용식물로서 다양한 약리활성 작용 때문에 오래전부터 민간에서 널리 이용되어 왔다. 고대로부터 알로에는 감염치료제 및 맛사지제로 사용하는 방법과 더불어 약제로서도 상처치유효과 및 케양과 편도선염을 완화시키는 효과가 있다고 보고된 바 있다(Fujita *et al.*, 1979; Winters *et al.*, 1981; Crewe, 1939). 그 중 피부의 보호 및 미백에 대한 효과에 대해서도 보고되어 있다(Yamamoto *et al.*, 1993). 최근 국민생활소득의 향상과 더불어 미에 대한 관심이 증가되면서 화장품을 비롯한 외용제의 수요가 증가되고 있는 추세이다. 화장품은 피부를 보호하고 아름다움을 유지시켜주기 위한 목적으로 널리 이용되고 있으므로 피부로부터의 흡수 및 국소자극에 의한 안전성시험은 매우 중요하다. 본 시험물질인 Aloewhite는 *Aloe*

*vera*의 잎으로부터 추출한 유효성분중 chromone유도체인 30% aloesin성분으로 멜라닌 색소의 생성과정에서 tyrosinase활성을 억제하여 피부의 색소침착을 방지함으로써 탁월한 미백효과를 나타낸다. 실제로 민간에서는 오래전부터 수종의 알로에(*Aloe aborescens* Mill., *Aloe ferox* M., *Aloe barbadensis* M.)를 쥬스, 화장품크림, 로션, 샴푸 등으로 다양하게 이용되었다. 알로에 추출물중 tyrosinase를 억제하는 물질이 함유되어 있다고 보고된바는 있으나 그 약효가 어떠한 성분으로부터 유래하는 것인지, 어떠한 작용기전에 의해서 나타나는 것인지에 대한 과학적인 연구는 비교적 최근에 와서야 이루어지고 있는 실정이다(Winters *et al.*, 1983; Yamamoto *et al.*, 1993). 그 결과 알로에의 유효성분중 하나인 aloesin과 그 유도체가 탁월한 tyrosinase 억제효과를 나타내며 미백제로서 유용함이 입증되어 본 제제를 화장품의 원료로서 사용하기 위해 남양알로에

(주)에서 개발한 물질이다. 지금까지 알로에는 일반적으로 *Aloe vera* 등과 같은 잎의 추출물로서 이들 성분 중에는 알로에의 모든 성분들이 그대로 함유되어 있기 때문에 목적하는 효과외에도 부작용을 야기시킬 수도 있었다. 본 실험에 사용된 제제는 알로에의 여러 성분 중 해당 유효성분인 aloesin만을 선택적으로 분리, 수득하여 그 효능을 확립시킨 물질이다.

따라서 본 연구에서는 Aloewhite의 안전성 시험의 일환으로 실험동물에 대한 피부자극, 안자극 및 피부 감수성시험을 시행하여 국소자극에 대한 안전성을 평가하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 시험물질

실험동물은 해은무역(주)으로부터 New Zealand White rabbits(2.2~2.4 kg) 및 Hartley계 guinea pig(300~350 g)을 분양받아 모든 동물에 대하여 snuffles와 ear mite의 감염, 피모의 이상유무 및 설사흔적 등을 조사한 후 건강한 동물만을 선별하여 시험에 사용하였다. 시험기간 동안 사료 및 물은 자유섭취 시켰다. 실험에 사용한 시험물질인 Aloewhite(aloesin 30%)는 남양알로에(주)에서 제공받았다.

2. 일차피부자극시험

본 시험에서는 8마리의 웅성 New Zealand White계 토끼를 선별하여 사용하였으며 시험물질 투여 약 24시간 전에 토끼 등의 중앙부위에 윤곽을 표시하였다. 그 후 동물용 전기 clipper로 그 부위를 제모하고, 피부에 손상이 가지않게 면도를 실시하여 처치구획과 대조구획으로 나누고, 각각을 비찰과피부와 찰과피부로 나누어 모두 4부분을 설정하였다. 찰과피부는 면도날을 이용하여 출혈하지 않는 범위내에서 표피만을 찰과하였다. 검체를 처치하기 위해 surgical tape인 Microfoam(제조회사 3 M)의 폭을 0.5 cm로 하여 2.5 cm×2.5 cm 크기의 지지체(mold)를 만들고 그중앙에 가아제(2.5 cm×2.5 cm, 3겹)를 고정시켰다. 시료의 조제는 Aloewhite 1.0 g을 생리식염수 1 ml에 용해하여 검체를 하였고 검체를 첩포용 밴드가아제에 0.5 ml를 취하여 토끼등 피부의 처치구획에 접촉하였다. 시험물질을 적용한 후 피부와 밀접해 있는 시험물질을 유지하고 증발을 막기 위해서 토끼의 투여부위는 가아제와 비자극성 테이프로 싸서 안전하게 하였다. 검체는 24시간

동안 1회 적용하였으며, 대조구획에는 시험물질을 가하지 않고 동시에 동일한 방법으로 실시하였다. 종료시 잔유물질은 생리식염수를 탈지면에 적시어 잘 닦아내었다. 시험물질 제거후 약 60분에 각 시험물질을 Draize기법에 따라 홍반과 부종의 정도를 기록하였다(Draize *et al.*, 1944; Marzulli and Maibach, 1975). 피부 반응의 평가는 국립보건안전연구원 고시 제 94-3호(1994. 4. 14) "의약품 등의 독성시험기준"에 준하여 평가하였으며, 이에 따라 시험물질 투여후 24시간 72시간 및 7일째의 평점을 산출하여, 그 결과에 대한 자극성의 판정은 일차자극지수에 기초하여 시험물질의 자극도를 구분하였다

3. 안점막자극시험

시험개시 24시간 전에 토끼의 양안을 검사하여 각막의 손상여부를 검사한 후 이상이 관찰되지 않은 9마리의 동물을 선별하여 시험에 사용하였다. 시험물질은 멸균처리한 saline에 용해하여 1 g/ml이 되도록 조제한 후 조제액을 여과(0.2 μ m, Acrocap, Gelman)하여 1.5 ml의 cryogenic vials에 충전하였다. 상기의 모든조작은 클린벤치내에서 조작하였다. 시험물질의 처치는 좌측 안구의 결막낭에 0.1 ml씩 점안한후 제 1군의 3 마리에 대해서는 점적후 약 30초 경과시 생리식염수로 1분간 세안하여 시험물질을 제거하였다. 우측안구는 비처치 대조로 하였다. 또 제 2군의 6 마리는 점적후 그대로 두고 세안을 실시하지 않았다. 시험물질 적용후 1, 24, 48, 72, 96시간 및 7일째에 안구검사용 손전등으로 투여군 및 대조군의 양안을 각각 검안하고, 육안적 각막 손상을 검안하며, 홍채의 충혈이나 빛에 대한 반응을 검사하였다. 또 안구결막, 안검결막 등의 혈관충혈을 관찰하여 발적여부, 결막의 부종 및 배출물의 유무를 관찰하고 안구병변은 국립보건안전연구원 예규 제 10호(1994. 4. 14) "의약품 등의 독성시험기준"에 준하여 평가하였으며 자극성의 판정은 국립보건안전연구원 "독성시험 표준작업지침서"(1993) 및 U.S. Federal Register, (1978)의 안점막자극표에 의해 구분하였다.

4. 피부감작성시험

피부감작성 시험은 maximization test법에 따라 실시하였다(Magnusson and Kligman, 1969; Kero and Hanuksela, 1980; OECD Guidelines, 1981). 피부감작성 시험에 적용하기 위한 피검물질 [① Freund's complete adjuvant: saline=1:1, ② Aloewhite(10% in saline), ③

Aloewhite(10%) in Freund's complete adjuvant에 유화]을 조제하여 제모한 동물의 경부배측피부(약 $2 \times 4 \text{ cm}^2$)에 피검물질 ①, ②, ③을 좌우 대칭으로 0.1 ml을 2회 피내주사하였다(1차감작). 1주일후 피내주사부위의 털을 제거하고 시험물질이 비자극성물질 이므로 sodium lauryl sulfate(바세린중 10%)을 도포하였다. 24시간후 피검물질(10% saline기제)을 여지($2 \times 4 \text{ cm}^2$)에 넓게 펴서 48시간 동안 폐색도포 하였다(2차감작). 2주일 관찰 후 측복부의 털을 제거하고 피검물질을 24시간 폐색도포 하였다(challenge). 비감작동물은 challenge만 같게 처리하여 판정하였으며, 양성대조군에는 0.1% 2,4-dinitrochlorobenzene(W/V, acetone)를 시험물질과 동일한 방법으로 조제하여 적용한후 평가하였다.

모든 시험동물에 대한 피부반응상태는 점포종료후 24, 48시간후의 피부반응(홍반 및 부종)에 따라 피부감작성을 평가하였다. 최종 평가는 피부의 발적 및 부종 정도에 의해 시험물질에 대한 피부감작이 양성반응으로 나타낸 동물의 수를 백분율로 환산하여 평가하고 Magnusson 등의 등급평가에 의하여 피부감작율을 산출하였다(Magnusson and Kligman, 1969).

III. 결과 및 고찰

1. 일차피부자극시험

시험물질 Aloewhite를 토끼 등피부에 적용할때 시험물질에 기인한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았으며

사망동물도 발견되지 않았다(Table 1, 2). 일차피부자극시험의 결과는 Table 3과 같다. 24시간째 찰과피부에서 8마리중 3마리가 미세한 홍반이 발생하였으며 그중 1마리에서는 가피형성이 관찰되었다. 또한 비찰과 피부에서도 2마리가 미세한 홍반이 나타났다. 무처치 피부에서는 비찰과 피부에서 3마리, 찰과 피부에서는

Table 1. Clinical signs and death rate in New Zealand White rabbits dressed dermally with Aloewhite

Sex	Dose ^a	Animal No.	General clinical signs	Death rate
Male	0.5 g	8	No Abnormalities Detected	0/8

^aAloewhite (0.5 g) was dissolved in 0.9% saline and applied to animals.

Table 2. Body weights in New Zealand White rabbits dressed dermally with Aloewhite (단위: kg)

Animals No.	Sex	Days after treatment				
		0	1	2	3	7
1	Male	2.22	2.24	2.28	2.34	2.36
2	Male	2.48	2.47	2.48	2.51	2.51
3	Male	2.35	2.30	2.31	2.35	2.38
4	Male	2.22	2.19	2.23	2.26	2.26
5	Male	2.38	2.38	2.41	2.40	2.42
6	Male	2.28	2.26	2.28	2.29	2.29
7	Male	2.15	2.15	2.16	2.16	2.17
8	Male	2.34	2.34	2.32	2.36	2.35
Mean \pm S.D.		2.30 \pm 0.11	2.29 \pm 0.10	2.30 \pm 0.09	2.33 \pm 0.10	2.34 \pm 0.10

Table 3. Result of primary skin irritation test (Draize's method) in New Zealand White rabbits dermally treated with Aloewhite

Change	Control site												Test site													
	Erythema & Eschar						Edema						Erythema & Eschar						Edema							
	Intact			Abraded			Intact			Abraded			Intact			Abraded			Intact			Abraded				
Phase	24	72	7	24	72	7	24	72	7	24	72	7	24	72	7	24	72	7	24	72	7	24	72	7		
Time (hr.) ^a																										
Animal No.																										
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
6	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total score	3	1	0	4	0	0	2	2	0	2	1	0	2	2	0	3	2	2	0	0	0	3	1	1	1	
Mean score	4			4			4			3			4			7			0			5				
P.I.I. ^b	15/32=0.47												16/32=0.59													

^aTime after topical application of Aloewhite (0.5 g).

^bP.I.I.: Primary Irritation Index= Σ Mean score/32.

Table 4. Ocular irritational reaction to Alowhite in New Zealand White rabbits

		Group		1 ^a				2 ^b				
Cornea	Opacity (A)	1 hr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		6 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Diffuse Areas (B)	1 hr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		6 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Iris (C)	1 hr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 days		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3 days		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4 days		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6 days		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Conjunctive	Redness (D)	1 hr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		6 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Edema (E)	1 hr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		6 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Secreta (F)	1 hr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1 day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		6 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Score ^c	1 hr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1 day	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6 days	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

^aAnimals treated with Aloewhite (100 mg) and not washed.

^bAnimals treated with Aloewhite (100 mg) and washed for 1 min.

^cScore: (A × B × 5) + (C × 5) + 2(D + E + F).

4마리가 가벼운 정도의 홍반이 발생하였다. 72시간째 관찰에서는 찰과피부에서 3마리중 1마리만 회복하는 경향을 나타내었으며 비찰과피부에서는 2마리가 약간의 홍반을 나타내었다. 무처치 피부에서는 비찰과 피부에서 24시간에 홍반이 관찰되었던 3마리중 2마리는 소실되었으며 찰과피부에서 홍반이 있었던 4마리는 모두 정상으로 회복되었다. 7일째 관찰시 투여군에서 찰

과피부의 홍반이 있었던 2마리는 일부 홍반이 남거나 회복되는 경향을 보였다. 무처치 피부에서는 모두 정상이었다.

검체를 적용한 후 부종을 관찰한 결과 24시간째 찰과피부 8마리중 3마리에서 가벼운 또는 보통의 부종이 관찰되었으며 비찰과 피부에서는 부종을 나타내지 않았다. 무처치 피부에서는 8마리중 2마리의 찰과 및 비

Table 5. Evaluation of skin sensitization in guinea pigs treated with Aloewhite

Groups	Aloewhite				2,4-dinitrochlorobenzene ^a			
	Sensitization		Nonsensitization		Sensitization		Nonsentization	
No. / Time	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Frequency of positive animals	0/20	0/20	0/20	0/20	17/20	16/20	3/20	0/20
Sensitization Score	0	0	0	0	85	80	15	0
Grade	I	I	I	I	V	V	II	I
Classification	weak	weak	weak	weak	extreme	extreme	mild	weak

^a2,4-dinitrochlorobenzene (0.1% in acetone) was used for positive control.

찰과피부에서 가벼운 부종이 관찰된 이외에는 정상이었다. 72시간에는 약물을 처리한 찰과피부에서 1마리가 가벼운 부종이 남아 있었고 무처리피부는 찰과피부에서 1마리가 비찰과피부는 2마리가 부종이 관찰되었다. 7일째 관찰시 약물을 처리한 찰과피부에서 1마리가 부종이 관찰되었을뿐 모두 정상이었다.

2. 안점막자극시험

Aloewhite(100 mg)의 New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극시험 결과 24시간후의 M.O.I.(평균안 자극지수)는 Table 4에 나타낸바와 같이 자극성은 인정되지 않았다. Aloewhite의 임상적 상용량(10%) 보다 고농도로 적용하였을때 본 시험기간중 모든 동물에서 결막, 홍채 및 각막의 손상은 전혀 인정되지 않았다. 따라서 Aloewhite의 안점막에 대한 자극성은 없는 것으로 사료된다.

3. 피부감작성시험

Aloewhite에 의한 감작동물 및 비감작동물의 첩포종료후 24, 48시간에 측정된 결과 Table 5에 나타낸 바와 같이 감작동물 및 비감작동물 모두에서 홍반 및 부종은 인정되지 않았다. 따라서 Aloewhite의 피부감작 정도는 grade I에 속하였고 피부감작은 매우 약하거나 일으키지 않는다고 사료된다. 양성대조물질인 0.1% 2,4-디나이트로클로로벤젠·아세톤용액(W/V)에 의한 감작동물 및 비감작동물의 첩포종료후 24, 48시간에 측정된 결과 감작동물에서는 24시간에 85%, 48시간에는 80%가 피부감작반응에 대하여 중정도의 홍반이 인정되었다. 비감작동물에 있어서는 단지 24시간에서 20마리중 3마리의 동물이 경미한 홍반을 나타내었으며 부종은 나타나지 않았다.

참고문헌

- Crewe, J.R. (1939): Aloes in the treatment of burns and scalds. *Minnesota Medicine* **22**, 538-539.
- Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. (1944): Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390.
- Fujita, K., Ito, S., Teradaira, R. and Beppu, H. (1979): Properties of a carboxypeptidase from aloe. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 1261-1261.
- Kero, M. and Hannuksela, M. (1980): Guinea pig maximization test, open epicutaneous test and chamber test in induction of delayed contact hypersensitivity. *Contact Dermatitis*, **6**, 341-344.
- Marzulli, F.N. and Maibach, H.I. (1975): The rabbit as a model for evaluating skin irritants; A comparison of results obtained on animals and man using repeated skin exposures, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **13**, 533-540.
- Magnusson, B. and Kligman, A.M. (1969): The identification of contact allergens by animals assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.*, **52**, 268-276.
- National Institute of Safety Research (1994): Toxicity test guideline for safety evaluation of drugs for human use, No. 94-3, Korea
- Organization for Economic Cooperation and Development (1981): *OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Section 4. Skin sensitization.* OECD, Paris, France.
- U.S. Federal Register, (1978): Primary eye irritation test, Environmental Protection Agency, Pesticide Programs, Proposed guidelines for Registering Pesticides in the U.S.
- Winters, W.D., Benavides, R. and Clouse, W.J. (1981): Effects of aloe extracts on human normal and tumor cells *in vitro*. *Economic Botany.*, **35**, 89-95.

Yamamoto, M., Sugiyama, K., Yokota, M., Maeda, Y. and Inaoka, Y. (1993): Study of possible pharmacological actions of aloe arborescens Miller on

mouse, hamster and human skin. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **35**, 409-414.