

햄스터에서 에이 마우스워시의 구강점막자극시험

강경선* · 제정환* · 김형섭* · 김경배* · 이지해* · 조성대* · 조종호*
김배환** · 이병렬** · 이영순*^{****}

*서울대학교 수의과대학 수의공중보건학교실, ** (주) 태평양기술연구원

The Effect of Repeated Application of A Mouthwash to the Mucosa of the Hamster Cheek Pouch

Kyung-Sun Kang*, Jeong-Hwan Che*, Hyung-Sub Kim*, Kyung-Bae Kim*,
Ji-Hae Lee*, Jong-Ho Cho*, Sung-Dae Cho*, Bae-Hwan Kim**,
Byung-Ryeul Lee** and Yong-Soon Lee*^{****}

*Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine and School of
Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seodun-Dong,
Kwonsun-Ku, Suwon 441-744, Korea

**Pacific Corporation/R&D Center, 314-1, Bora-ri, Kiheung-eup, Yongin 449-900, Korea

(Received February 1, 2001)

(Accepted April 4, 2001)

ABSTRACT : This study was carried out to evaluate the irritant potential of A mouthwash in hamster cheek pouch. The test substances were applied twice daily to right pouches of hamsters for 14 consecutive days. Animals were administered with A mouthwash, Listerine, saline and control solution, respectively. In order to evaluate the irritant potential in mucosa of hamster cheek pouch, we observed clinical signs, mortality, body weight changes and gross and histopathological findings for 14 days. In all groups, there were neither dead animals nor significant changes of body weights. In addition, there were no differences between saline and A mouthwash treated group in gross and histopathological findings. Therefore, these results suggest that there was no irritant potential of A mouthwash in hamster cheek pouch.

Key Words : Irritant potential, A mouthwash, Hamster cheek pouch

I. 서 론

최근 들어 입술과 피부, 점막에의 적용을 목적으로 여러 가지 생활용품이나 화장품 등이 등장하고 있다. 1960년대 부터 이러한 물질들의 독성과 유해성을 검증하기 위해서 햄스터 협낭을 이용한 구강점막자극시험이 효과적으로 이용되고 있다(Bourrinet *et al.*, 1995; Fancher *et al.*, 1968; Veys *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 1979). 또한, 햄스터 협낭은 chlorhexidine의 자극성 시험과(Lindhe *et al.*, 1970) 마우스워시를 반복 적용시켜 그 자극성을 평가하기 위해서도 이용되었는데(Cutright *et al.*, 1974; Bernstein *et al.*, 1979), chlorhexidine gluconate를 적용시킨 결과, 간과 신장에 축적되는 것이 관찰되었으며(Luostarinen *et al.*, 1977;

Harvey *et al.*, 1984), N-methyl-N-nitrosourea(NMU)를 적용시킨 결과 점막내의 악성변화가 여러 곳에서 관찰되었다(Chau *et al.*, 1984). 이러한 보고에서 햄스터 협낭의 상피세포를 통해서 물질이 흡수될 수 있으며 다른 장기로의 이동도 가능하다는 사실을 알 수 있었다(Utoguchi *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1980). 최근에는 햄스터 협낭의 생성 단계를 태아 단계에서부터 파라인 연속 절편을 통해서 조사하고 물질 투여 시의 변화를 평가하는 방법도 사용되고 있다(Hardy *et al.*, 1986; McMillan *et al.*, 1982).

따라서, 본 실험에서는 (주) 태평양기술연구원에서 개발 중인 에이 마우스워시, 에이 마우스워시 중 주요 성분을 첨가하지 않은 대조용액과 현재 시판되고 있는 Listerine을 가지고 Bourrinet *et al.*(1995)의 방법을 응용하여 햄스터 협낭에 14일간 1일 1분, 2회 적용 후 관찰되는 구강점막자극 유무를 비교 평가해 보고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed

Table 1. Test materials

성분	Control	A mouthwash
NaF	-	0.03%
CPC	-	0.05%
녹차추출액	-	0.04%
솔잎추출액	-	0.04%
증류수	적량	적량
향료	적량	적량
기타성분	적량	적량

II. 재료 및 방법

1. 시험 물질

본 실험에서 사용한 시험 물질은 주요성분인 NaF(0.03%), CPC(0.05%), 녹차추출액(0.04%) 및 솔잎추출액(0.04%)이 함유된 에이 마우스위시와 주요성분을 첨가하지 않은 대조 용액을 사용하였으며(Table 1), 비교 물질로는 (주)태평양 기술연구원에서 공급받은 Listerine과 음성대조군으로 saline(중외제약)을 사용하였다.

2. 시험 동물 및 사육조건

8~9주령된 90~110g의 수컷 햄스터(샘타코 BioKorea)를 동물실에서 1주일간 순화시켰고, 순화기간 중 일반 상태를 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 본 시험은 온도 22±3°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10~12회/hr, 조명시간 12시간 및 조도 150~200 Lux로 설정된 서울대학교 수의과대학 동물실험실(5호실)에서 실시하였으며 시험 기간 중에 햄스터는 polycarbonate cage(26×42×18 cm, 명진기계)에 cage당 5마리씩 사육하였다. 사료는 햄스터용 고형사료(퓨리나사료)를 섭취시켰으며, 투여 2시간 전에 급여를 중단하고 투여 2시간 후에 다시 자유 섭취시켰다. 음수는 투여 2시간 후에 상수도수를 자유 섭취시켰다.

3. 투여방법

Bourrinet *et al.*(1995)의 방법을 응용하였으며, 간략히 기술하면 Syrian golden hamster(수컷, 80~100 g)를 처치군(3개군)과 음성대조군 각각 10마리씩 4개군으로 나누고 우측 구강 협부에 있는 협낭을 핀셋으로 주의하여 끌어내고 생리식염수 10 ml로 3회 세정한 후 시료 0.5 ml을 협낭에 1분 동안 적용시킨 후, 생리식염수 2 ml로 세척, 협낭을 조심스럽게 원위치시켰다. 대조군의 햄스터도 같은 방법으로 처치하였다. 처치 기간은 혈관 분포가 현저한 협낭의 점막을 골라 일정 부위에 1일 1분, 2회(오전 10시, 오후 3시) 14일간 계속하였다.

4. 관찰 및 검사 항목

1) 임상 증상 관찰 및 체중, 사료 및 음수량 측정
순화 기간, 시험 물질 투여 전 및 최종 15일째 임상 증상의 변화 및 사망 여부를 관찰하였다. 체중 측정은 시험에 사용된 모든 햄스터에 대해 시험 물질 투여 전, 4일, 8일, 15일째(최종 처치 24시간 후)체중을 측정하였다. 사료 및 음수량도 체중 측정과 동일한 시기에 행하였다.

2) 투여부위 관찰

시험 물질 적용 전, 후 또는 최종 15일째 동물을 부검하기 전에 우측 구강 협부에 발생된 발적, 부종 등을 관찰하였으며, 전 동물의 구강협부의 협낭에 대해 광학 현미경상에서 조직병리소견을 검사하였다.

3) 조직병리검사

최종 15일째에 모든 시험군을 ether로 안락사시켜, 우측 구강 협부의 협낭을 절제하여 자극정도, 발적, 부종, 조직 손상 등을 관찰한 후 포르말린에 고정시킨 다음 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4 µm 절편을 잘라 Hematoxylin & Eosin으로 염색하여 관찰하였다.

4) 통계학적 방법

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 p<0.05로 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였고, 비모수인 경우는 분산에 대하여 Kruskal-Wallis nonparametric analysis 후 유의한 경우 Wilcoxon-Mann-Whitney rank-sum test, Nemenye-Kruskal-Wallis multiple comparisons를 실시했다. 또한, 병리조직학적으로 관찰된 병변의 발생빈도는 χ^2 (Chi-square) 검정을 하였다.

III. 결 과

1. 임상증상 관찰 및 사망 동물의 관찰(Table 2)

음성대조군을 포함한 모든 시험군에서 시험 기간동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 시험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

2. 체중 변화 관찰(Table 3)

투여전 각 동물은 99.68±9.97~101.64±8.78 g으로 고른 체중범위를 나타내었으며, 시험물질 투여기간중 및 부검시

Table 2. Clinical signs and death rate in cheek pouch of Syrian Golden hamsters treated with test materials.

Group	Sex	No. of animals	Clinical signs	Death rate (%) ^b
Saline	Male	10	NAD ^a	0
Control	Male	10	NAD	0
A mouthwash	Male	10	NAD	0
Listerine	Male	10	NAD	0

^aNo abnormalities detected; ^bNo. of dead/No. of treated animals.

Table 3. The mean body weight changes in cheek pouch of Syrian Golden hamsters treated with test materials (Unit : g).

Day after treatment	Group			
	Saline	Control	Listerine	A mouthwash
Day 0	101.31±8.66	99.68±9.97	101.64±8.78	100.12±9.67
Day 4	98.95±8.25	97.31±9.15	97.08±9.84	98.01±9.53
Day 8	102.76±7.65	98.46±8.63	99.78±10.38	96.06±8.98
Day 15	102.46±8.05	99.62±9.37	98.80±12.82	96.41±9.20

Each Value represents as mean±S.D.

Table 4. Gross pathological lesion on cheek pouch of Syrian Golden hamsters treated with test materials.

Parameter	Group			
	Saline	Control	Listerine	A mouthwash
Edema	0/10 ^a	0/10	0/10	0/10
Redness	0/10	0/10	0/10	0/10

^aNo. of abnormalities detected/No. of treated animals.

Table 5. Histopathological findings on cheek pouch of Syrian Golden hamsters treated with test materials.

Lesions	Group			
	Saline	Control	Listerine	A mouthwash
Epithelial lesion				
Degeneration	0/10 ^a	0/10	0/10	0/10
Necrosis	0/10	0/10	0/10	0/10
Ulceration	0/10	0/10	0/10	0/10
Erosion	0/10	0/10	0/10	0/10
Hyperplasia				
- hyperkeratosis	0/10	0/10	0/10	0/10
- acanthosis	0/10	0/10	0/10	0/10
Subepithelial lesion				
Muscular Deneration	0/10	0/10	0/10	0/10
Muscular atrophy	0/10	0/10	0/10	0/10
Inflammation	0/10	0/10	0/10	0/10
Fibrosis	0/10	0/10	0/10	0/10
Vascular disturbance				
Hyperemia	0/10	0/10	0/10	0/10
Congestion	0/10	0/10	0/10	0/10
Hemorrhage	0/10	0/10	0/10	0/10
Thrombosis	0/10	0/10	0/10	0/10
Embolism	0/10	0/10	0/10	0/10
Infarction	0/10	0/10	0/10	0/10
Edema	0/10	0/10	0/10	0/10

^aNo. of abnormalities detected/No. of treated animals.

까지 전 동물에서 시험물질 투여로 인한 체중변화는 관찰되지 않았다.

3. 육안적인 투여부위 관찰(Table 4)

시험 물질을 햄스터 구강협낭 점막에 투여한 후, 육안적

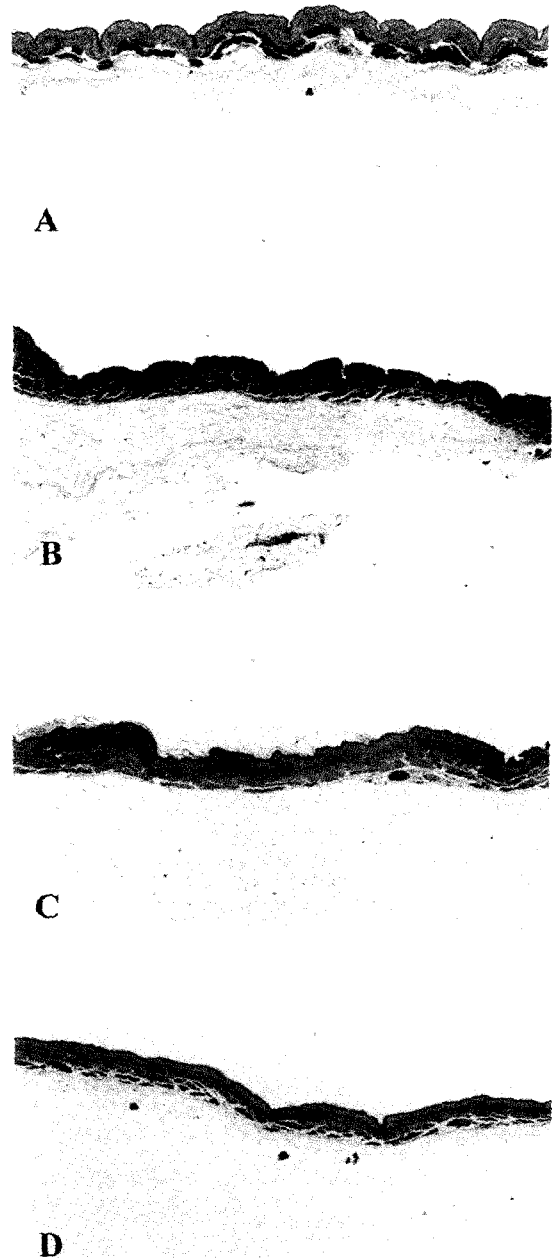


Fig. 1. Histopathological findings on cheek pouch of Syrian Golden hamsters treated with test materials (H/E, ×100). A, Saline; B, Control; C, Listerine; D, A mouthwash.

으로 발적 및 부종형성을 관찰한 결과, 시험 물질 투여전 및 최종부검일 15일째 모두 투여부위에서 발적 및 부종형성은 관찰되지 않았다.

4. 병리조직학적 검사(Table 5 and Fig. 1)

시험물질 투여군, 음성대조군 및 비교군 전 동물의 구강협낭 점막에서 상피세포의 변화, 근층의 변화, 혈관의 변화 등 시험물질에 의한 어떠한 병변도 관찰할 수 없었다.

IV. 결 론

본 실험에서는 (주)태평양기술연구원에서 개발 중인 에이 마우스워시, 에이 마우스워시 중 주요 성분을 첨가하지 않은 대조용액과 현재 시판되고 있는 Listerine을 이용하여 햄스터 협낭에 14일간 1일 1분, 2회 적용 후 관찰되는 구강점막자극 유무를 비교 평가해 보았다. 구강점막자극시험은 일반적으로 시험물질을 30분간 노출시키지만, 일반적으로 치약이나 마우스워시 제제들이 사람에게 접촉되는 시간은 1분 남짓에 불과하다. 따라서, 본 실험에서는 일상 생활에서 사용되는 조건에 가깝게 맞추었다는 데 그 의의가 있다고 하겠다.

실험 전 기간에 걸쳐 사망한 동물이나 특별한 임상증상은 나타나지 않았으며, 체중에서도 음성대조군에 비해 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다. 또한, 육안병변과 병리조직병변에서도 시험물질에 관련된 어떠한 증상도 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 시험물질인 에이 마우스워시는 Bourrinet *et al.*(1995)의 방법을 응용하여 1일 1분, 2회, 14일간 반복 처치한 결과, 햄스터의 구강협낭의 점막에 대하여 아무런 자극성을 나타내지 않는 물질로 사료된다. 하지만, Bernstein *et al.*(1979)에서 본 실험에 사용한 것과 동일한 시험물질인 Listerine 마우스워시로 41일 동안 매일 45분간 처치한 구강점막자극시험을 실시한 결과, 우리 실험진의 결과와는 다르게 hyperkeratotic white 병변이 관찰되었다. 이 실험결과로 볼 때, 비록 에이 마우스워시가 일상생활에서 사용되는 조건(1분)에서는 자극이 없다고 사료되지만, 그 이상의 시간을 적용할 경우에 생길 자극성에 대해 좀더 조사해 볼 필요가 있다.

감사의 글

본 논문은 2000년 서울대학교 수의과대학 수의과학연구소 연구비, Brain Korea 21 project에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bernstein, M.L. and Carlsh, R. (1979): The induction of hyperkeratotic white lesions in hamster cheek pouches with mouthwash. *Oral Surg.*, **48**, 517-522.
- Bourrinet, P., Conduzorgues, J.P., Dutertre, H., Macabies, J., Masson, P., Maurin, J. and Mercier, O. (1995): Interlaboratory study for the assessment of potential irritative properties of Hygiene products on the hamster cheek pouch. *Lab. Ani. Sci.*, **45**(1), 36-40.
- Chau, K.K. and Edwards, M.B. (1984): Topical carcinogenesis by N-methyl-N-nitrosourea in Syrian hamster cheek-pouch and oral mucosa. *Arch. Oral Biol.*, **29**(3), 185-190.
- Cutright, D.E., Perez, B., Larson, W.J., *et al.* (1974): the effects of repeated application of mouthwashes to the mucosa of the hamster cheek pouch. *J. Oral Med.*, **29**, 36-40.
- Fancher, D.E. and Calandra, J.C. (1968): Current status of FDA toxicity requirements. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **153**, 258-264.
- Ferguson, J.W. and Smillie, A.C. (1979): Vascularization of premalignant lesions in carcinogen-treated hamster cheek pouch. *J. Natl. Cancer.*, **63**(6), 1383-1392.
- Hardy, M.H., Vrablic, O.E., Covant, H.A. and Kandarkar, S.V. (1986): The development of the Syrian hamster cheek pouch. *Anat. Rec.*, **214**(3), 273-282.
- Harvey, B.V., Squier, C.A. and Hall, B.K. (1984): Effects of chlorhexidine on the structure and permeability of hamster cheek pouch mucosa. *J. Periodontol.*, **55**(10), 608-614.
- Lindhe, J., Heyden, G., Svanberg, G., *et al.* (1970): Effect of local applications of chlorhexidine on oral mucosa of the hamster. *J. Periodontal Res.*, **5**, 117-182.
- Luostarinen, V., Soderling, E., Knuuttila, M. and Paunio, K. (1977): Effect of chlorhexidine on the hamster cheek pouch. Microcirculation and penetration studies. *J. Periodontol.*, **48**, 421-424.
- McMillan, M.D., Smillie, A.C. and Gray, D.W. (1982): The surface structure of the epithelium of the hamster cheek pouch. *Arch. Oral Biol.*, **27**(8), 623-633.
- Tanaka, M., Yanagibashi, N., Fukuda, H. and Nagai, T. (1980): Absorption of salicylic acid through the oral mucous membrane of hamster cheek pouch. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**(4), 1056-1061.
- Utoguchi, N., Watanabe, Y., Takase, Y., Suzuki, T. and Matsumoto, M. (1999): Carrier-mediated absorption of salicylic acid from hamster cheek pouch mucosa. *J. Pharm. Sci.*, **88**(1), 142-146.
- Veys, R.J., Baert, J.H. and De boever, J.A. (1994): Histological changes in the hamster cheek pouch epithelium induced by topical application of sodium

lauryl sulphate. *Int. J. Exp. Pathol.*, **75**(3), 203-209.

Vogel, G.L., Mao, Y., Chow, L.C. and Proskin, H.M. (2000):
Fluoride in plaque fluid, plaque, and saliva measured

for 2 hours after a sodium fluoride monofluorophosphate rinse. *Caries Res.*, **34**(5), 404-411.