



비특이 면역증강제 BARODON®의 안점막 및 피부에 대한 국소자극시험

조은혜 · 조성대 · 안남식 · 정지원 · 양세란 · 박준석 · Nguyen Ba Tiep
박기수 · 홍인선 · 서민수 · 이영순 · 강경선
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Eye Irritation, Skin Irritation and Skin Sensitization Tests for Nonspecific Immunostimulator BARODON®

Eun-Hye Jo, Sung-Dae Cho, Nam-Shik Ahn, Ji-Won Jung, Se-Ran Yang, Joon-Suk Park,
Nguyen Ba Tiep, Ki-Su Park, In-Sun Hong, Min-Su Seo, Yong-Soon Lee
and Kyung-Sun Kang

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea

Received January 7, 2003; Accepted March 3, 2003

ABSTRACT. Two local irritation and skin sensitization studies of nonspecific immunostimulator, BARODON® were carried out with New Zealand White rabbits and Hartley guinea pigs. In skin irritation test of male New Zealand White rabbits, body weights were not significantly changed and there were no responses after treatment for 24 or 72 hours and the Primary irritation index (P.I.I.) was '0'. And, in the eye irritation test, there were chemosis in some of rabbits. One of 3 rabbits in washing group was detected chemosis after 24 and 72 h following treatment and 2 of 6 rabbits in non-washing group were detected chemosis after 24h and 7 days following treatment. Therefore, total score is '4' after 24 h and '2' after 72 h following treatment by conforming article "some blood vessel are clearly hyperemic". However evaluation value is non-irritant because M.O.I. (Mean ocular irritation index) score is below during the all experimental period and no significance through individuals and exposure time. In skin sensitization, the score of skin reaction was graded I with 0% sensitization rate. Taken together, these results indicate that BARODON® may be non-irritant material.

Keywords: BARODON®, Skin irritation, Eye irritation, Skin sensitization, Guinea pig, Rabbit.

서 론

BARODON®(바로돈 S.F(주), Korea)은 규소, 칼슘, 나트륨, 유기탄소 화합물 및 은 등을 혼합하여 액상 이온화시킨 물질로서 체내의 면역세포들 특히 T림파구들을 자극, 증가시켜 직접적인 세포성면역 증진에 작용하여 비특이적으로 돼지면역세포를 증강한다고 알려져 있다(Park *et al.*, 1998; Yoo *et al.*, 2002). BARODON®은 직접 사료

에 넣어 투여하거나 미강(米糠; 쌀겨) 등에 발효시켜 가축에게 급여함으로써 돼지유행성 설사에 매우 효과적인 예방효과를 확인한 바 있으며(농림부 연구보고서, 1999, unpublished data), 높은 폐사율로 인해 양계산업에 막대한 손실을 가져오는 가금티푸스에도 효과적으로 작용함이 확인되었다(수의과학연구소 시험결과보고서, 1996, unpublished data). 그리고 최근 BARODON®은 피부의 청결유지와 면역기능강화를 주기능으로 하는 피부 외용제로서의 제품이 출시된 바 있는데 원액 농도의 1000분의 1 (0.1%(v/v))에 해당하는 BARODON®이 함유되어 있다. 그 제품은 피부에 직접적으로 도포함으로써 피부로부터의 흡수 및 국소자극에 의한 안전성시험이 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 식품의약품안전청 고시(1999. 12.

Correspondence to: Kyung-Sun Kang, Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Shilim-9 dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
E-mail: kangpub@snu.ac.kr

12)의 의약품 등의 독성시험기준 제 1999-61호에 준하여 BARODON®의 New Zealand White Rabbit에 대한 피부자극시험, 안점막자극시험과 Hartley Guinea Pig에 대한 피부감작성시험을 실시하여 국소자극에 대한 안전성을 평가하였다.

재료 및 방법

시험 물질

본 실험에 사용된 시험물질은 바로돈 S.F(주)에서 공급한 음이온 알칼리 복합광물질 용액이다. 물질은 연한 갈색이며 사용기간 동안 실온에서 보관하였다.

시험동물 및 사육환경

실험동물은 피부자극과 안점막자극시험의 경우 New Zealand White Rabbit 3~4개월령, 피부감작성시험의 경우 Hartley Guinea Pig 7주령을 한림실험동물(주)에서 구입하여 1주간 순화시킨 후 시험에 사용하였다. 시험기간동안 온도 22±3°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10~12회/hr, 명암주기 12시간, 조도 150~200 lux로 유지하였으며 실험동물용 고품사료(푸리나(주))를 섭취시켰으며, 음수는 상수도를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

피부자극시험

투여량 설정: Rabbit의 피부에 도포할 용량은 BARODON®의 임상사용 예상용량인 BARODON® 원액 0.1%(v/v)으로 설정하였다. 그리고 도포액은 '의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청, 1999)에 따라 0.5 ml로 설정하였다. 음성대조군은 같은 부피의 용매(0.9% saline)를 사용하였다.

피부자극시험: 1주일의 순화기간이 지난 후 피부가 깨끗한 토끼 6마리를 사용하여 각 동물의 등부위에 약 2.5 × 2.5 cm² 정도의 크기로 좌우측 각각 비찰과피부 1개 부위와 찰과피부 1개 부위를 설정하였다. 찰과부위는 제모한 토끼의 등부위 좌우측 각각 1개소에 21G 주사기 바늘을 이용하여 같은 방향으로 각질층만 벗겨낸 손상피부를 동일하게 만들어 주었다. 좌측구획은 무처리 대조구획으로 하여 음성대조물질을, 우측에는 시험 물질을 도포하는 처치구획으로 하여 도포하였는데 토끼 1마리당 시험물질 0.5 ml씩 찰과 피부와 비찰과 피부 각기 2개소에 도포하였으며 음성대조물질 또한 동량을 시험하였다. 시험물질의 도포 후 물질의 증발을 막기 위하여 거즈로 덮고 반창고로 고정된 다음 알루미늄 호일을 다시 덮고 고정하여 빛으로부터 시험물질을 차단하였다(Kim *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 2002).

시험물질 도포 후 외관 및 사료와 음수 섭취상태 등에 대하여 매일 관찰하였고, 도포전 및 도포후 2, 3, 7일 째에 체중을 측정하여 시험 후 일반 임상증상을 관찰하였다. 시험물질 적용 후 24, 72시간 후에는 거즈, 반창고, 알루미늄 호일을 제거하고 도포부위를 0.9% saline 5 ml을 이용하여 세척한 후 홍반과 부종 등 약제에 의한 독성유무를 관찰하였다(Draize *et al.*, 1944; Marzulli and Maibach, 1975). 평가는 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호(1999. 12. 22) "의약품등의 독성시험기준"에 제시된 피부반응의 평가기준에 따라 실시하였다. 도포부위에 이상이 인정되는 경우에는 도포 후 7일째에 병변을 관찰하고 병변의 크기를 측정한 후, 전신 마취제를 이용하여 안락사시켜 병리부검을 실시하였다.

안점막자극시험

투여량 설정: Rabbit의 안점막에 도포할 용량은 BARODON®의 임상사용 예상용량인 BARODON® 원액 0.1%(v/v)으로 설정하였다. 그리고 점안액은 '의약품 등의 독성시험기준(식품의약품안전청, 1999)에 따라 0.1 ml로 설정하였다. 음성대조군은 같은 부피의 용매(0.9% saline)를 사용하였다.

안점막자극시험: 1주일의 시험동물 순화기간을 마친 후 시험물질 적용 24시간 전에 양쪽 안구를 검사하여 세척균 3마리와 비세척균 6마리, 총 9마리의 건강한 rabbit을 선별하여 시험물질을 토끼 한쪽(좌측) 눈에 점안하였고, 다른쪽(우측) 눈에는 음성대조물질을 점안하였다. 세척균은 시험물질 점안 20~30초 후 양쪽눈에 미온의 0.9% saline 20 ml로 1분간 세안하였고, 비세척균은 세안하지 않았다. 시험동물의 외관 및 사료와 음수 섭취 상태 등에 대하여 매일 관찰하고 시험물질 점안 후 2, 3, 7일째에 체중을 측정하여 일반 임상증상을 관찰하였다. 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호(1999. 12. 22) "의약품등의 독성시험기준"의 평가 기준에 따라 0.9% saline을 점안한 좌측눈을 대조로 하여, 시험물질 투여 1, 2, 3, 4, 7일 후 관찰을 실시하여 안구 병변의 등급표에 의해 평가하였고, 상해가 잔존하면 3일 간격으로, 투여 13일 이상 적용부위를 관찰한 후, 전신마취제를 이용하여 안락사시켜 병리부검을 실시하였다(U.S. Federal Register, 1978).

피부감작성시험

투여량 설정: Maximization test법에 따라 음성대조군은 시험물질을 희석하는데 사용하는 용매인 0.9% saline을, 양성대조군은 피부감작성 일반적으로 사용되는 Benzocaine(sigma EC No 202-303-5)를 사용하였고 BARODON® 투여군은 예비실험을 거쳐 1차감작성에는

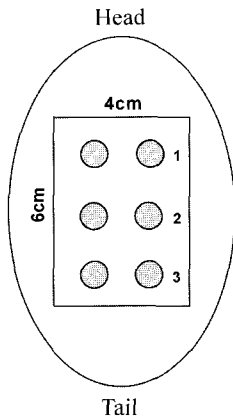


Fig. 1. 1차감작시 주사부위. 1) FCA, 2) BARODON®, 3) BARODON® + FCA.

피내투여 후, 피부괴사를 일으키지 않는 최고농도인 BARODON® 원액의 1.5%를 사용하였다. 2차감작시에는 폐쇄접포 후 홍반을 유발하는 최저농도인 15%, 그리고 야기시에는 홍반을 유발하지 않는 최고농도인 5%를 중간 용량으로 하여 공비로 고용량을 20%, 저용량은 1%로 사용하였다(Magnusson and Kilgman, 1969; Kero and Hannuksela, 1980; OECD Guidelines, 1981).

피부감작성시험: 시험물질의 감작투여를 위해 모든 시험물질은 투여시마다 사용직전에 제조하여 사용하였다. 1차감작 투여는 시험 0일째, 배측 부위에 4×6 cm²의 경계면을 만들어 6개의 주사부위(Fig. 1)를 만들어 maximization test법에 따라 시험물질과 대조군[1) FCA (Freund's complete adjuvant:saline = 1:1, 2) BARODON®, 3) FCA(Freund's complete adjuvant: BARODON® = 1:1)]을 피내로 감작투여하였는데, 시험 6일째 SLS(sodium lauryl sulfate)를 24시간 등에 발라주었다(Magnusson and Kilgman, 1969; Kero and Hannuksela, 1980; OECD Guidelines, 1981). 2차 감작투여는 시험 7일째 시험물질이 적셔진 2×4 cm² filter paper로 폐쇄접포하여 48시간 노출시킨 후, 시험 9일째 제거하였다(Hong *et al.*, 2000).

시험물질의 야기투여는 시험 21일째 양쪽 옆구리 부분에 5×5 cm²의 경계면을 만들어 제모한 후, 2×2 cm² filter paper를 이용하여 시험물질을 야기시켰다. 이때, 왼쪽 옆구리에는 야기농도의 시험물질을 오른쪽 옆구리에는 음성대조물질을 적용하였다(Stropp *et al.*, 1999; Prinsen *et al.*, 1997). 24시간 동안 야기를 시킨 후에 시험 22일째 첩포를 제거하고, 첩포 제거 21시간 후에 투여 부위를 제모한 후, 3시간 후인 시험 23일째 결과를 관찰하고, 시험 35일째 2차 야기를 시키고, 시험 36일째 첩포를 제거한 후, 첩포 제거 21시간 후에 투여부위를 제모한

Table 1. Skin Sensitization Index

※ Score of skin sensitization testing		
Score	Reaction	
0	no visible change	
1	slight or discrete erythema	
2	moderate and confluent erythema	
3	intense erythema and swelling.	
※ Grade of skin sensitization testing		
Sensitization (%)	Grade	Sensitization
0-8	I	Very weak
9-28	II	Weak
29-64	III	Moderate
65-80	IV	Strong
81-100	V	Very strong

후, 3시간 후인 시험 37일째 결과를 관찰하였다. 결과를 관찰시 피부반응상태에 따라 피부의 발적 및 부종정도에 의해 시험물질에 대한 피부감작이 양성반응으로 나타난 동물의 수를 백분율로 환산하여 평가하고 Magnusson 등의 등급평가에 의하여 피부감작을 산출하였다(Magnusson and Kligman, 1969)(Table 1).

결 과

피부자극시험

토끼의 피부에 3일 동안 임상예정용량인 BARODON® 원액 0.1%를 적용시킨 결과, 일반증상에서 시험물질에 의한 것으로 생각되는 특이병변은 관찰되지 않았고 체중의 증감 또한 전 시험기간 동안 유의성이 없었다(Tables 2 and 3). BARODON®을 토끼의 피부도포 후 24시간째 및 72시간째 관찰한 결과 찰과 비찰과 피부 모두 P.I.I. (primary irritation index)가 0으로서 어떠한 자극도 관찰되지 않았다(Table 4).

안점막자극시험

BARODON®의 New Zealand White계의 토끼에 대한

Table 2. Body weight changes of New Zealand white rabbits dressed dermally with BARODON®

Sex	Animal no.	hours after application		
		0 hr (g)	24 hr (g)	72 hr (g)
Male	D-1	2,500	2,600	2,600
	D-2	2,600	2,700	2,655
	D-3	2,500	2,500	2,550
	D-4	3,200	3,200	3,200
	D-5	2,950	2,900	2,950
	D-6	3,400	3,500	3,550
	Mean		2,858	2,900
S.D.		385.3	384.7	396.4

Table 3. Body weight changes of New Zealand white rabbits after ocular Irritation with BARODON®

Group	Animal no.	Day after application			
		0 days (g)	2 days (g)	3 days (g)	7 days (g)
Washed	O-1	3,000	3,000	3,000	3,000
	O-2	3,500	3,500	3,500	3,500
	O-3	2,600	2,700	2,800	2,900
	Mean	3,033	3,067	3,100	3,133
	S.D.	450.9	404.1	360.6	321.5
Not washed	O-4	3,500	3,600	3,600	3,500
	O-5	3,000	3,500	3,500	3,600
	O-6	3,000	3,000	3,250	3,200
	O-7	3,200	3,100	3,100	3,100
	O-8	2,600	2,600	2,600	2,400
	O-9	3,000	3,000	3,000	2,900
	Mean	3,050	3,133	3,175	3,117
	S.D.	295.0	367.0	363.0	435.5

Table 4. Results of primary skin irritation test (Draize's Method) in New Zealand white rabbits

Sites	Control site				Test site			
	Change	Erythema & eschar		Edema	Erythema & eschar		Edema	
Phase	Intact	Abraded		Intact	Abraded			
Time (hr) ^a	24	72	24	72	24	72	24	72
Anim. no.	Sex							
D-1	male	0	0	0	0	0	0	0
D-2	male	0	0	0	0	0	0	0
D-3	male	0	0	0	0	0	0	0
D-4	male	0	0	0	0	0	0	0
D-5	male	0	0	0	0	0	0	0
D-6	male	0	0	0	0	0	0	0
Total score	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean score	0		0		0		0	
P.I.I. ^b	0		0		0		0	

^aTime after topical application of BARODON®.^bP.I.I.; Primary Irritation Index.**Table 5.** Ocular irritation reaction in New Zealand white rabbits

Group	Animal no.	Tissue scores	days				
			1	2	3	4	7
Washed	O-1	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0
		Iris A × 5	0	0	0	0	0
		conjunctiva (A+B+C) × 2	2	0	2	0	0
	O-2	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0
		Iris A × 5	0	0	0	0	0
		conjunctiva (A+B+C) × 2	0	0	0	0	0
O-3	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0	
	Iris A × 5	0	0	0	0	0	
	conjunctiva (A+B+C) × 2	0	0	0	0	0	
O-4	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0	
	Iris A × 5	0	0	0	0	0	
	conjunctiva (A+B+C) × 2	2	0	0	0	0	
O-5	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0	
	Iris A × 5	0	0	0	0	0	
	conjunctiva (A+B+C) × 2	0	0	0	0	0	
O-6	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0	
	Iris A × 5	0	0	0	0	0	
	conjunctiva (A+B+C) × 2	0	0	0	0	0	
O-7	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0	
	Iris A × 5	0	0	0	0	0	
	conjunctiva (A+B+C) × 2	0	0	0	0	2	
O-8	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0	
	Iris A × 5	0	0	0	0	0	
	conjunctiva (A+B+C) × 2	0	0	0	0	0	
O-9	Cornea A × B × 5	0	0	0	0	0	
	Iris A × 5	0	0	0	0	0	
	conjunctiva (A+B+C) × 2	0	0	0	0	0	
Total score			4	0	2	0	2
M.O.I. ^a			0.44	0	0.22	0	0.22

A, Redness; B, Chemosis; C, Discharge.

^aM.O.I. (Mean ocular irritation index): total score/tested animal No. in each observation time.

Table 6. The calculated mean skin response (mean of scores for erythema and oedema combined) of animals showing skin reactions after each of the challenge treatments, and the incidence of positive test animals

Compound	Challenge no.			
	1		2	
	24 hr	% ^a	24 hr	%
0.9% Saline	0.0 ^b	0	0.0	0
20% BARODON®	0.2	20	0.1	10
5% BARODON®	0.0	0	0.0	0
1% BARODON®	0.0	0	0.0	0
20% Benzocaine	0.8	80	0.6	60

^aIncidence of positive animals.

^bMean score of skin reaction.

안점막자극시험 결과 일반임상증상 및 체중의 유의적 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 몇몇 개체에서 결막 충혈이 관찰되었는데 세안군에서 한 개체가 시험물질 노출 24, 72시간 후 결막충혈이 관찰되었고 세안을 하지 않은 군에서 다른 두 개체가 각각 24시간, 7일 후에 또한 결막 충혈이 관찰되었다(Table 5).

피부감작성시험

시험물질의 용매로 사용한 0.9% saline의 두 번의 야기시험 후 피부 감작성반응은 전 개체에서 관찰되지 않았다. 따라서 피부반응 평가기준의 무반응에 해당되고, 감작률이 0%이기 때문에 피부감작성 평가 기준의 I 등급, "매우 약함"에 해당된다. 양성대조군으로 사용한 Benzocaine은 첫 번째 야기시험 후 홍반과 부종을 수반하는 피부 감작

반응이 전 시험 개체 5마리 중 4마리의 기니픽(80%)에서 관찰되었고, 1주 뒤 두 번째 야기시험을 다시 실시 하였을 때는 3마리의 기니픽(60%)에서 피부 감작성반응이 관찰되었다. 피부반응 평가기준에 따라 점수화하고 시험동물 당 평균을 환산하였을 때, 첫 번째 야기시 0.8, 두 번째 야기시 0.6이었고 피부감작성 평가기준의 IV 등급인 "강함"에 해당된다. 그러나 시험물질인 BARODON®의 경우 고농도군에 해당되는 20% BARODON®을 감작·야기 하였을 때, 첫 번째 야기 후 홍반만 관찰할 수 있는 가벼운 피부 감작성반응이 전 개체 10마리 중 2마리의 기니픽 (20%)에서 발견되었다. 두 번째 야기에서는 1마리의 기니 픽에서(10%) 피부 감작성반응이 일어나 첫 번째 야기에 비하여 감작율이 감소하였다. 이 반응은 평균 피부반응 평가기준이 각각 0.2과 0.1이고, 피부 감작성 평가기준 의 "약함"에 대응된다. 중간농도, 저농도군의 5%, 1% BARODON®에서는 전 개체에서 어떠한 피부감작성반응도 찾아볼 수 없었고, 0.9% saline을 사용한 시험군과 비슷한 양상으로 감작성반응 발생율과 지속성이 없었다.

고 찰

본 연구에서는 바로돈 S.F(주)에서 개발된 BARODON® 피부외용제의 임상적용을 위한 비임상 안전성 평가의 일환으로 New Zealand White Rabbit을 사용하여 피부자 극성시험, 안점막자극성시험을 실시했고 Hartley Guinea Pig을 사용하여 피부감작성시험을 실시하였다.

피부자극성 시험의 경우 시험물질 BARODON®에 대한

Table 7. The skin response of male guinea pigs of each groups after challenges with BARODON®

Group	1		2		3		4		5	
1st sensitization	Saline		15%Benzocaine				1.5% BARODON®			
2nd sensitization	Saline		30%Benzocaine				15% BARODON®			
challenge	Saline		20%Benzocaine		20% BARODON® (H)		5% BARODON® (M)		1% BARODON® (L)	
No. of challenge	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
No. of Animal										
1	0 ^a	0	1	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
6	- ^b	-	-	-	1	0	0	0	0	0
7	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
10	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
Total score	0	0	4	3	2	1	0	0	0	0

^aThe score of skin reaction.

^bAnimals did not receive the challenge.

P.I.I. 가 0에 해당하여 일차 피부자극에 대한 반응이 없다고 생각되었다. 그리고 안점막 자극성시험의 경우 시험물질 점안 후 세안군에서 한 개체가 두 번, 세안하지 않은 군에서 두 개체가 각각 한번씩 결막 충혈이 관찰되었으나 그 정도가 미미하고 세안의 여부에 대한 반응과 시험 후 충혈이 관찰된 시간의 산발적이기 때문에 시험물질에 의한 것이라고 사료되지 않았다.

BARODON®의 Hartley Guinea Pig에 대한 피부감작성 시험에서는 두 번의 야기시험 후 시험물질의 용매로 사용된 0.9% saline은 감작용이 0%에 비하여 양성대조군인 Benzocaine은 감작용이 60~80%에 달함으로써 명료한 양성의 피부 감작반응을 나타내었다. 시험물질인 BARODON®의 경우, 고농도의 BARODON® 시험군은 1차야기시 20%, 2차야기시 10%의 감작용을 보여 양성의 감작결과를 나타내었지만, 피부반응의 지속성이 낮아 일과성 또는 미미한 감작반응으로 볼 수 있다. 그리고, 임상에서 적용될 BARODON® 제품의 경우 피부외용제로 사용되거나 사료에 첨가되어 사용될 경우 원액의 0.1%이고 미강에서 발효되어 가축에게 급여될 경우 원액의 3%로써 최고 임상예정용량은 3%이지만 시험경로가 다르기 때문에 이번 시험에서 적용시키지 않고 피부에 노출될 농도인 BARODON® 0.1%를 고려하였다. 따라서 고농도 20% BARODON®의 시험결과는 피부외용제로 사용될 임상예정용량의 200배이기 때문에 고려하지 않고 그 이하의 시험농도인 중간농도, 저농도에서만 피부반응도를 생각한다면 감작용이 0%이다. 또한, 피부감작성 시험의 전 단계 시험인 면역독성 시험에서 BARODON®은 anaphylaxis shock를 일으키지 않았으며, 조직 친화성 면역글로블린인 IgE를 생성하지 않는다고 결론지어졌기 때문에 임상예정용량에서 피부감작성이 없다고 사료된다(data not shown).

결론적으로 위에서 얻은 세 시험의 결과들을 종합하여 보면 인체에 피부외용제로 사용될 BARODON® 피부청결제는 임상예정용량에서 피부에 대한 자극 또는 감작성이 없다고 판단된다.

참고문헌

- 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.
- Hong, J.T., Kim, S.H., Park, K.S., Ryu, S.R., Kim, H.J., Kim, H.S., Lee, J.K., Nam, K.T., Jang, D.D., Lee, S.H., Kim, P.Y. and Cho, D.H. (2000): Skin irritation effect of glycolic acid and UVB in guinea pig, *J. Toxicol. Pub. Health*, **16**, 89-94.
- Kang, M.J., Kim, M.Y., Park, M.K., Kim, B.T., Ahn, K.K., Choi, Y.S., Moon, B.S. and Lee, J.W. (2002): Study on local irritation in rabbits and micronucleus test in mice with YHB216, *J. Toxicol. Pub. Health*, **18**, 79-85.
- 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.
- Kim, H.S., Kwack, S.J., Kim, K.B., Lee S.K., Park, H.S., Hong, C.Y., Ahn, M.Y., Jo, T.H., Oh, S.T., Park, Y.I. and Lee, B.M. (1996): Eye irritation, skin irritation and skin sensitization tests for aloewhite in animals, *J. Toxicol. Pub. Health*, **12**, 53-58.
- 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 manusing 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.
- Park, Y.H., Woo, H.J., Rhee, J.C., Han, J.H., Choi, S.I., Yoo, B.W. and Kim, K.Y. (1998): Enhancement of host immune responses by addition of nonspecific immunostimulator (BARODON®) in animal feed, *Seoul Univ. J. Vet.*, **23**(2).
- Prinsen, M.K., Romijn, T. and Snoeij, N.J. (1997): Skin sensitization testing: the relevance of rechallenge and pretreatment with sodium lauryl sulfate in the guinea pig maximization test. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 923-926.
- Stropp, G., Berthold, K., Bury, D., Heusener, A., Kuhlem, C. and Pittermann, W. (1999): The relevance of rechallenges and pretreatment with sodium lauryl sulfate (SLS) in the guinea pig maximization test (GPMT) was evaluated. *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 266-268.
- U.S. Federal Register. (1978): Primary eye irritation test, Environmental Protection Agency, Proposed guidelines for Registering Pesticides in the U.S.
- Yoo, B.W., Choi, S.I., Kim, S.H., Yang, S.J., Koo, H.C., Kwon, N.H., Seo, S.H., Park, B.K., Yoo, H.S. and Park, Y.H. (2002): Immunostimulatory effects of an anionic alkali mineral complex solution (BARODON®) on porcine lymphocytes, *J. Swine Health and Production*, **10**, 265-272.
- 식품의약품안전청 (1999): 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호.
- 식품의약품안전청 (2000): 비임상시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 2000-63호.