

토끼에서 oregano oil의 일차 피부 자극시험

신진영 · 신동호 · 김성호 · 배춘식 · 박승춘¹ · 김기현² · 배주현³ · 김종춘*

전남대학교 수의과대학

¹경북대학교 수의과대학

²(주)바이오미스트

³한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

(게재승인: 2005년 2월 24일)

Primary dermal irritation study of oregano oil in rabbits

Jin-Young Shin, Dong-Ho Shin, Sung-Ho Kim, Chun-Sik Bae, Seung-Chun Park¹,
Ki-Hyun Kim², Ju-Hyun Bae³, Jong-Choon Kim*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Biomist Co., Daejeon 305-764, Korea

³Korea Institute of Toxicology, KRICT, Daejeon 305-600, Korea

(Accepted: February 24, 2005)

Abstract : The present study was carried out to investigate the skin irritation potential of oregano oil in rabbits. A volume of 0.5 ml of test article was applied to intact and abraded skins, respectively, for 24 h in 6 healthy male New Zealand White rabbits. Parameters measured during 72 h observation period were mortality, clinical signs, body weight changes, and local irritation. Treatment-related toxic symptoms, as evidenced by anorexia and decreased locomotor activity, were observed in all rabbits tested. Two rabbits out of the 6 total died on day 2 after the application of test article due to treatment-related toxicity. The mean body weight of test animals decreased progressively during the 72 h observation period. All animals showed very slight edema at 24 h and then recovered at 72 h. These animals also showed very slight to severe erythema and/or slight eschar formation at both 24 h and 72 h. The eschar formation induced by oregano oil was not recovered at the end of additional 11-day recovery period. Based on these results, it was concluded that a single dermal application of the undiluted oregano oil caused an increased incidence of clinical signs and death and a decrease in the body weight and showed a primary irritation index score of 2.79 indicating moderate irritation.

Key words : oregano oil, dermal irritation study, primary irritation index, rabbits

서 론

최근 축산업의 집단지화 및 대규모화는 가축이 병원체에 노출될 가능성과 질병전파의 위험성을 증가시키고 있으며, 이로 인해 질병을 예방하고 치료하기 위한 항생제의 사용이 크게 증가하고 있다. 그러나 항생제의 사용

으로 다양한 부작용과 항생제 내성균의 출현, 축산물의 항생제 잔류 등 여러 가지 문제점을 유발하고 있는 것이 현실이다. 따라서 전 세계적으로 가축에서의 항생제 사용을 제한하는 움직임과 함께 항생제가 들어있지 않은 축산물에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있으며, 최근에는 항생제를 대체할 효소제나 미생물제, 유기산

본 연구는 2004년도 농림기술개발사업의 지원으로 수행되었음

*Corresponding author: Jong-Choon Kim

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

[Tel: +82-62-530-2827, Fax: +82-62-530-2809, E-mail: toxkim@chonnam.ac.kr]

제, 식물추출물, 식물정유(essential oil) 등에 대한 연구 개발이 크게 증가하고 있다 [5, 7].

식물정유는 여러 식물에서 얻어지는 천연항균물질로 고대로부터 다양한 용도로 사용되어 왔다 [5]. *Oregano oil*은 인도와 유럽 및 멕시코 등지에서 자생하는 개화기의 *Origanum vulgare* Linne로부터 추출한 휘발성의 황적색 오일로서 자극성 향기를 가지고 있다. 주성분은 carvacrol과 thymol이며, 그 외에 알콜과 에스테르, monoterpenes 및 sesquiterpenes를 함유하고 있는데, 이들은 항균작용과 항진균 및 항산화작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 [6, 12, 15]. *Oregano oil*의 항균작용은 세균의 세포벽에 작용하여 단백질을 변성 및 응고시키고, 세포질 막에도 작용하여 양이온의 막 투과성에 변화를 주어 나타나며, 항생제 내성균인 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)에 대해서도 우수한 항균활성을 나타낸다고 한다. 본 연구팀에서는 최근 항균 및 항진균 활성이 있는 정유조성물을 개발하였으며 [2, 3], 이를 이용하여 축산분야에서 사용 중인 화학합성 항균제를 대체할 수 있는 고효율의 천연소독제와 항균제 개발을 진행하고 있다. 그러나 이들 물질을 상품화하기 위해서는 신뢰성있는 독성 평가가 수행되어야 하나 *oregano oil*의 독성학적 특성에 대해서는 국내외적으로도 거의 보고된 바가 없어 안전성을 확보하기 위해서는 이에 대한 연구가 시급히 요구되고 있다. 정유를 함유하고 있는 허브식물의 사용은 자연 유래의 특성으로 인해 합성화학물질에 비해 비교적 안전한 것으로 인식되고 있지만 이들 역시 다양한 부작용을 유발한다는 것은 잘 알려져 있다 [9].

본 연구는 *oregano oil*에 대한 안전성 평가의 일환으로 피부노출에 의한 피부자극성 잠재력을 조사하기 위해 식품의약품안전청의 “의약품 등의 독성시험기준”에 준하여 일차피부자극시험을 수행하였다 [4].

재료 및 방법

시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 4개월령의 New Zealand White 계통의 토끼(수컷)를 확인실험동물센터(나주)로부터 구입하여 1주일간의 순화 및 검역을 거친 후 시험에 공시하였다. 본 계통의 토끼는 피부자극시험에 일반적으로 많이 사용되는 종으로서, 동일한 조건하에서 사람 피부보다 예민하게 반응하며 또한 비교적 풍부한 시험 기초자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택되었다. 입수 시 8마리(체중, 2,078~2,465 g)를 구입하여 피부에 이상이 없고 건강한 6마리(체중, 2,150~2,514 g)를 선발하여 시험에 이용하였다. 사육조건은 온도 22±3°C, 상대습도 50±20%, 환기횟수 12~15회/시간, 조명 150~300

Lux로 12시간(인공조명, 오전 8시~오후 8시)으로 하였으며, 순화, 검역 및 시험기간 동안 3년 4월의 사육상자에 배설된 스테인레스제 사육상자(420W×500L×300H mm)에 개체별로 수용하였다. 사육상자에는 시험번호와 동물번호를 기재한 개체식별카드를 부착하였다. 사료는 토끼용 고품사료(퓨리나 코리아, 펄택)를, 물은 상수도수를 자유섭취 시켰다.

시험물질

본 시험에 사용한 *oregano oil*은 (주)바이오미스트(대전)로부터 공급받아 사용하였으며, 공급된 원제를 사용하여 시험하였다.

시험군의 구성 및 시험물질의 적용

시험물질을 적용하기 위해 적용 전날에 동물의 배부(가로세로 약 15 cm 씩)를 동물용 전기제모기로 제모하였다. 동물의 척추를 중심으로 좌우 각각 2개소(각각 찰과 및 비찰과 부위, 2.5 cm×2.5 cm 크기)를 설정하여, 좌측구획은 무치치 대조구획으로, 우측구획은 시험물질을 적용하는 처치구획으로 정하여 시험하였다. 찰과는 주사침을 이용하여 표피만 손상되고 출혈이나 진피에 손상이 가지 않을 정도로 “#” 모양으로 실시하였다. 투여 당일 오전에 *oregano oil* 원제를 우측의 찰과부위 1개소와 비찰과부위 1개소에 각각 0.5 ml를 적용하였고, 대조구획에는 처치를 하지 않았다. 적용 후 처치구획 및 대조구획을 거즈로 덮은 후 비자극성 테이프를 잘 고정하여 24시간 동안 적용시켰다. 시험물질을 적용하고, 24시간 경과 후 잔류하는 시험물질을 제거하기 위해 미온수로 적용부위를 부드럽게 세정해 주었다.

일반증상 및 사망의 관찰

검역 및 순화기간에는 매일 1회씩 모든 동물에 대해 관찰하였고, 시험물질 적용기간에는 투여 전과 후에 1회씩 일반증상 및 사망의 유무에 관하여 관찰하였다. 단, 이상 증상이 발견되면 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개체별로 기록하였다.

체중측정

동물 입수 시와 시험물질 적용 전, 적용 후 1일 및 3일째에 개체별 체중을 측정하였다.

적용부위의 관찰 및 자극성의 평가

적용부위의 피부반응 평가는 식품의약품안전청의 “의약품등의 독성시험기준”에 표시된 피부반응의 평가기준에 따라 실시하였다 [4]. 24시간 동안 시험물질을 적용한 후 패취를 제거하여 24시간째(패취제거 직후) 및 72

시간째(폐취제거 후 48시간째)에 유발된 홍반(erythema)과 가피(eschar), 부종(edema) 등의 자극성 반응을 관찰하였다. 모세혈관의 울혈에 의한 피부 발적 등 여러 가지 원인으로 인하여 혈액에 의해 피부에 나타난 적색반응은 홍반으로 평가하였고, 부식작용 또는 괴저에 의하여 생긴 피부조직의 부육상태는 가피로 하였으며, 체액이 피하조직에 축적되어 부어오른 것은 부종으로 평가하였다. 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 일차피부자극지수(primary skin irritation index, PII)의 산출방법에 따랐다 [10, 14]. 본 시험에서는 시험물질 적용 후 72시간까지도 피부자극성이 인정되어 관찰기간을 적용 후 14일까지 연장하여 회복성 여부를 평가하였다.

결 과

일반증상 및 사망률

일반증상을 관찰한 결과(Table 1), 시험물질 적용 후 익일에 식욕부진(anorexia)이 모든 동물에서, 그리고 운동성감소(decreased locomotor activity)가 3례 인정되었으며, 적용 후 2일째에는 사망이 2례 관찰되었다. 반면, 적용 후 3일째부터는 시험물질의 투여에 기인된 일반증상과 사망은 인정되지 않았다.

Table 1. Mortality and clinical signs of rabbits treated with oregano oil

Summary of mortality and clinical sign	
No. of rabbits examined	6
Decreased locomotor activity (%)	3 (50)
Anorexia (%)	6 (100)
Found dead (%)	2 ^{a)} (33.3)

^{a)}Two rabbits were found dead on day 2 after the application of test chemical.

Table 2. Body weight changes of rabbits treated with oregano oil

Animal No.	Days after treatment		
	0	1	3
1	2352	2234	2109
2	2317	2125	2057
3	2150	1957	- ^{a)}
4	2514	2422	2344
5	2346	2197	2031
6	2408	2218	- ^{a)}
Mean±SD	2347.8±119.45	2192.2±151.71	2135.3±142.89

^{a)}Data unavailable due to death

Table 3. Results of skin reaction of rabbits treated with oregano oil

Sites	Control site								Test site							
	Erythema & Eschar				Edema				Erythema & Eschar				Edema			
Change	Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded	
Phases	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
Time (h)	24		72		24		72		24		72		24		72	
Animal No.																
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	0	1	0
3	0	- ^{a)}	0	-	0	-	0	-	1	-	4	-	1	-	1	-
4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	4	1	0	1	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	1	0	1	0
6	0	-	0	-	0	-	0	-	2	-	4	-	1	-	1	-
Mean score	0	0	0	0	0	0	0	0	1.67	2.00	2.50	3.00	1.00	0	1.00	0
Total score	0								11.17							
PII ^{b)}	0								2.79							

Erythema was scored as follows: no erythema = 0, very slight erythema (barely perceptible) = 1, well-defined erythema = 2, moderate to severe erythema = 3, and severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth) = 4. Edema formation was scored as follows: no edema = 0, very slight edema (barely perceptible) = 1, slight edema (edges of area well-defined by definite raising) = 2, moderate edema (raised approximately 1 mm) = 3, and severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure) = 4.

^{a)}Data unavailable due to death

^{b)}Primary irritation index = total score/4

체중변화

시험기간 중 수컷토끼의 체중변화는 Table 2에서 보는 바와 같이 시험물질 적용 후 1일째의 체중이 적용 전 체중에 비해 약 7% 감소하였고, 적용 후 3일째에는 적용 전 체중에 비해 약 9%의 체중감소가 나타났다.

피부자극성의 평가

시험물질 적용 후 24시간 및 72시간째에 적용부위의 자극성을 평가한 결과는 Table 3에 요약하였다. 모든 동물의 무처치 대조구획에서는 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았으나 시험물질 처치구획에서는 다양한 피부자극 반응이 관찰되었다. 시험물질의 적용에 의해 적용 후 24시간째에는 모든 동물의 찰과 및 비찰과 부위에서 경미한 부종이 인정되었으며, 적용 후 72시간째에는 회복되어 부종이 인정되지 않았다. 또한, 적용 후 24시간 및 72시간째에 모든 동물의 찰과 및 비찰과 부위에서 다양한 정도의 홍반과 경미한 가피형성이 인정되었다. 시험물질의 적용에 의해 유발된 피부자극성의 회복성 유무를 관찰하기 위해 적용 후 14일까지 관찰기간을 연장하여 피부반응을 관찰한 결과, 부종과 홍반은 회복성이 인정되었으나 가피형성은 시험물질 적용 후 14일까지도 완전히 회복되지 않았다. 상기 결과를 이용하여 Draize 법 [10]에 따라 일차피부자극성 정도를 평가한 결과, oregano oil의 일차피부자극지수는 2.79로써 중등도의 자극성 물질(moderate irritating agent)로 평가되었다.

고 찰

최근 식물정유의 다양한 효능이 새롭게 밝혀지면서 정유를 포함한 허브산업이 치료효능과 기능성을 증진시키는 대체의학의 한 축으로써 그 이용가치가 크게 증가하고 있다. 그러나 다양한 생리활성을 가진 식물정유를 산업화하기 위해서는 이들에 대한 생리활성성분의 검색 뿐만 아니라 신뢰성 있는 독성평가로 안전성을 확보하는 것이 필수적으로 요구된다. 본 시험에서는 식물정유 oregano oil의 일차피부자극성 잠재력을 평가하기 위해 New Zealand White계 토끼를 이용하여 시험한 결과, oregano oil의 피부적용은 일반증상과 체중감소 및 사망을 유발하고 적용부위에 중등도의 피부자극을 유발하는 것으로 나타났다.

일반증상 관찰 시 시험물질 적용 후 1일째에 관찰된 운동성감소와 식욕부진은 체중감소가 동반된 것으로 보아 시험물질의 적용에 의한 독성소견으로 사료된다. 상기 증상을 나타낸 개체 중 증상의 정도가 심했던 2례는 익일 사망하였으며, 이는 본 시험에 사용된 토끼의 평균 체중이 약 2.35 kg이고 찰과 및 비찰과부위에 0.5 ml 씩

을 적용한 점을 고려해 볼 때 oregano oil를 체중 kg당 약 0.425 ml의 용량으로 경피투여하면 약 3분의 1의 토끼가 사망한다는 것을 의미한다. 본 시험에서는 주요 실험장치에서 특이한 육안적 소견이 관찰되지 않아 명확한 사망원인은 알 수 없었다. 그러나 oregano oil은 랫드에서 다양한 일반증상과 체중감소 및 간독성 유발로 사망을 유발하고 [1], 다른 식물정유들도 간독성을 유발한다는 것 [13, 16]을 고려해 볼 때 본 시험에서 관찰된 토끼의 사망은 간독성이 주요 원인으로 추정된다. 한편, 본 연구실에서 랫드를 이용하여 oregano oil의 급성경구독성시험을 수행한 결과 [1], 경구 반수치사량은 약 5,000 mg/kg으로 산출되었으며, 경구투여 반수치사량이 5000 mg/kg 전후라는 것은 본 시험물질이 독성이 거의 없는 안전한 물질이라는 것을 나타낸다 [11, 17]. 그러나 랫드 시험의 결과와는 달리 토끼를 이용한 본 시험에서는 경피투여 반수치사량이 0.425 ml/kg을 조금 상회하는 것으로 나타났다. 이와 같이 치사량에 대한 두 시험간의 현격한 차이는 사용된 동물종의 차이와 투여경로의 차이가 주요 원인으로 사료되나, 추후 이에 대한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

시험물질 적용 후 모든 동물에서 공히 관찰된 체중의 감소는 일반증상 및 사망소견과 일치하는 것으로서 시험물질의 적용에 의한 독성소견으로 판단되며, 시험물질 적용 후 72시간까지 지속적인 감소를 나타내었다.

적용부위의 피부반응 관찰 시 시험물질 적용 후 24시간째에는 부종과 발적 및 가피형성이 모든 동물에서 인정되었다. 부종의 경우, 시험물질 적용 후 72시간째에는 회복성이 인정되었으나, 홍반을 제외한 가피형성은 적용 후 72시간째에도 관찰되었고, 시험물질 적용 후 14일까지도 완전히 회복되지 않았다. 본 시험물질의 일차피부자극지수는 2.79로 확인되었으며, 이는 oregano oil이 중등도의 피부자극성 물질이라는 것을 나타낸다. 식물정유 중 일부는 사람 및 동물에서 피부자극성과 피부감작성(dermal sensitization)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 최근 Craig 등 [8]의 연구에 의하면, 포트 오르포드 히말라야삼목 오일(Port-Orford-cedar oil)의 일차피부자극지수는 3.3이고 olive oil과 1:1로 희석 시 0.625로 감소하였다고 한다. 서양 노간주나무 오일(Western juniper oil)의 일차피부자극지수는 2.7이고, 5% 희석용액은 0.3, 그리고 0.5% 희석용액은 비자극성으로 확인되었다. 마우스를 이용한 local lymph node assay에서 50%의 서양 노간주나무 오일은 양성반응을 나타내었으나 5% 이하의 희석용액과 50% 이하의 포트 오르포드 히말라야 삼목 오일은 과민성반응을 나타내지 않았다고 한다. 본 시험에서 사용된 oregano oil 원제의 피부자극성은 상기 두 물질의 원제와 유사한 결과를 나타내었

나 일반독성에서 다소 차이가 인정되었다.

결론적으로 New Zealand White 토끼에 oregano oil을 적용한 결과, 일반증상과 체중감소 및 사망을 유발하고, 적용부위에 홍반과 가피 및 부종을 유발하였다. 본 시험조건 하에서 oregano oil의 일차피부자극지수는 2.79로써 중등도의 자극성물질로 평가되었으며, 피부손상은 적용 후 14일까지도 완전히 회복되지 않았다. 본 시험의 결과는 oregano oil을 피부에 원제로 노출하면, 일반독성과 피부자극성을 유발할 수 있으므로 사용 시 세심한 주의가 요구되며, 경피적용에 따른 무해용량을 산출하기 위해서는 추가연구가 필요하다는 것을 제시해 준다.

참고문헌

- 권태선, 신진영, 박승춘, 김기현, 신동호, 김종춘. 랫드에서 oregano oil의 급성독성 평가. 한국실험동물학회지 2004, **20**, 419-425.
- 김기현, 최영신. 유물 및 기록물의 소독을 위하여 허브 정유를 이용한 소독방법 및 소독장치(대한민국 특허 제 0330963호), 2002년 3월 20일.
- 김기현, 최영신. 향균 및 항진균작용이 있는 정유 조성물(대한민국 특허 제 0285781호), 2001년 1월 6일.
- 식품의약품안전청. 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시1999-61호, 식품의약품안전청, 서울, 1999.
- 정해근, 방진기, 성낙술, 김성민. 자원식물의 기능성 정유성분 이용고찰. 한작지 2003, **48**, 41-48.
- Arcila-Lozano CC, Loarca-Pina G, Lecona-Uribe S, Gonzalez de Mejia E. Oregano: properties, composition and biological activity. Arch Latinoam Nutr 2004, **54**, 100-111.
- Choi DW, Kim JH, Cho SY, Kim, DH, Chang SY. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. Toxicology 2002, **181-182**, 581-586.
- Craig AM, Karchesy JJ, Blythe LL, Gonzalez-Hernandez MDL, Swan LR. Toxicity studies on western juniper oil (*Juniperus occidentalis*) and Port-Orford-cedar oil (*Chamaecyparis lawsoniana*) extracts utilizing local lymph node and acute dermal irritation assays. Toxicol Lett 2005, **154**, 217-224.
- Deng JF. Clinical and laboratory investigations in herbal poisonings. Toxicology 2002, **181-182**, 571-576.
- Draize JH, Woodard G, Calvery H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther 1944, **82**, 377-390.
- Hodge HC, Sterner JH. Tabulation of toxicity classes. Am Ind Hyg Assoc Q 1949, **10**, 93.
- Johnson CB, Kazantzis A, Skoula M, Mitteregger U, Novak J. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. Phytochem Anal 2004, **15**, 286-292.
- Manabe A, Nakayama S, Sakamoto K. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. Jpn J Pharmacol 1987, **44**, 77-84.
- Patrick E, Maibach HI. Dermatotoxicology. In: Hayes AW(ed.), Principles and Methods of Toxicology, p. 383-406, 2nd ed. Raven Press, New York, 1989.
- Prudent D, Perineau F, Bessiere JM, Michel GM, Baccou JC. Analysis of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)-Evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. J Essent Oil Res 1995, **7**, 165-173.
- Sztajnkrzyer MD, Otten EJ, Bond GR, Lindsell CJ, Goetz RJ. Mitigation of pennyroyal oil hepatotoxicity in the mouse. Acad Emerg Med 2003, **10**, 1024-1028.
- US Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.100, Acute Toxicity Testing Background. US EPA, Washington, 1998.