

봉독의 피부자극시험 및 안점막자극시험

한상미* · 이광길 · 여주홍
농촌진흥청 국립농업과학원

Dermal and Ocular Irritation Studies of Honeybee (*Apis mellifera* L.) venom

SangMi Han*, KwangGil Lee and JooHong Yeo

National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-100, Korea

Abstract – The study of irritation and toxicity of honeybee(*Apis mellifera*. L) venom collected by a bee venom collector applied topically to the skin and mucous membrane were carried out to prove the safety of honeybee venom in clinical use. Animal for the research was the rabbit and the solution for the test was made from honeybee venom. Six animals were used for the skin test and nine animals were used for the eye mucous membrane test. In results, both tests proved that honeybee venom makes no irritable reaction on skin and eye mucous membrane of rabbit. We consider that this result is helpful for saying about the safety of honeybee venom in clinical use.

Key words – Honeybee venom, Skin irritaion, Eye irritaion, Rabbit

순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖는 봉독은 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 오래전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다.^{1,2)} 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(melittin)은 항염증^{3,4)}과 항균작용⁵⁾, 강력한 진통작용⁶⁾, 면역증강⁷⁾ 등의 역할을 한다. 봉독은 그람 음성 및 양성균에 대해 모두 항균작용을 보이거나, 특히 그람 양성균에서 더 강한 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 특히 봉독은 여드름 유발균인 *Propionibacterium acne*와 피부 상재균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* 및 *Streptococcus pyogenes*에 대한 강한 항균력을 갖고 있는 것으로 보고 되어있다.⁹⁾ 또한 봉독은 상처 및 자외선에 의해 손상된 피부의 재생을 촉진한다고 밝혀져 있다.¹⁰⁾ 이러한 약리효과를 갖는 봉독은 현재 화장품의 원료로 우리나라는 물론 유럽과 세계 화장품사전에 등재되어 있다.

곤충독과 특히 봉독에 관한 독성은 오래전부터 많은 연구가 이루어져 오고 있으며, 봉독은 한번 쏘였더라도 치사에 이를 수도 있지만 이는 ‘과민성’인 사람에게만 드물게 일어나는 현상으로, ‘정상인’의 경우는 단지 쏘인 자극과 부기 등만이 동반할 뿐 치명적인 결과를 초래하지는 않는 것으로 알려졌다.^{11,12)} 그러나 일반적으로 봉독은 과민 반응과 부

기 등으로 인해 쉽게 활용되지 못하는 단점이 있었다.

따라서, 본 연구에서는 국내에서 사육되는 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*. L)을 전기충격법을 사용하여 순수한 봉독만을 분리한 후, 화장품 또는 피부외용제의 원료로 사용하는데 있어 피부에 대한 안전성을 평가하고자 봉독의 피부자극시험과 안점막자극시험을 수행하였다.

재료 및 방법

봉독시료

본 연구소에서 사육중인 서양종꿀벌을 봉독채집장치((주) 청진바이오텍, 한국)를 이용하여 봉독을 분리하고 불순물을 제거한 후 순수한 봉독만을 실험에 사용하였다.¹³⁾

실험동물 및 사양관리 – 실험동물은 (주)오리엔트바이오로부터 2개월령의 수컷 토끼 (Yac:NZW(KBL))를 구입하였다. 입수일로부터 8일간 순화기간을 두어 건강한 동물만을 선발 한 후 경배부를 제모하여 피부에 이상이 없는 동물과 안검사를 실시하여 각막손상 등 안구의 손상이 없는 동물만을 실험에 이용하였다. 본 시험은 온도 20±3°C, 상대습도 45~65%, 조명시간 12시간 (08:00 점등~20:00 소등), 환기일수 10~20회/시간 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소의 안전성시험 연구실에서 실

*교신저자(E-mail): sangmih@korea.kr
(Tel): +82-31-290-8510

시되었다. 본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하여 실시하였으며(AAALAC International 인증 획득, 1998), 한국화학연구원 부설 안전성 평가연구소의 동물관리사용위원회(IACUC)에 의해 검토되었다.¹⁴⁾ 사료는 토끼용 고품사료(퓨리나코리아, 경기, 한국)를 자유 섭취시켰으며, 물은 상수도수를 미세여과기와 자외선 유수살균기로 소독시킨 후 자유 섭취시켰다.

피부자극시험 - 시험군은 6마리를 사용하였으며, 각 동물의 경배부에 약 2.5 × 2.5 cm 정도의 크기로 척추를 중심으로 좌우 각각 2개소를 설정하여, 좌측구획으로, 우측구획은 시험물질을 도포하는 처지구획으로 정하여 시험하였다. 봉독은 멸균증류수에 용해하여 조제하였으며, 찰과부위당 0.5 ml(10 mg / 100 ml w/v solution)를 경피투여하였다. 시험동물은 전일 제모를 실시한 후 처지구획 및 대조구획으로 구분하였다. 동물 1마리당 찰과부위 2개소와 비찰과 부위 2개소로 하여 우측의 찰과부위 1개소와 비찰과 부위 1개소에는 각각 0.5 ml씩을 도포한 거즈를 적용하였으며, 좌측의 대조구획에는 증류수를 적용하였다. 적용 후 처지구획 및 대조구획의 증발을 방지하기 위해 침투성 및 반응성이 없는 비닐로 덮은 후 비자극성 테이프로 잘 고정하여 24시간 동안 적용시켰다. 시험물질 적용 후 증류수를 이용해 적용부위를 부드럽게 세정해 주었다. 봉독 적용 후 72시간까지 매일 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무 등 일반증상을 관찰하였고, 시험물질 적용 전(투여시)과 적용 후 24시간 및 72시간째에 개체별 체중을 측정하였고, 적용부의 홍반과 가피형성 및 부종 등의 자극성 유무를 관찰하였다. 피부반응의 평가는 식품의약품안전청고시 '의약품등 독성시험기준'에 표시된 피부반응의 평가기준에 따라 실시하였다.¹⁵⁾ 또한 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 1차 자극지수(PII, primary irritation index)의 산출방법에 따랐다 (Table I).^{16,17)}

안점막자극시험 - 건강한 수컷 9마리를 이용하여 비세안군 6마리와 세안군 3마리로 구성하였다. 비세안군 및 세안군 동물에 대해서 우안은 시험물질을 적용하였고, 좌안은 대조로하여 부형제를 처지하였다. 점안은 토끼를 보정한 후 우안의 결막낭내에 시험물질을 마리당 0.1 ml씩 적용하였고 좌안은 대조측으로 하여 부형제 0.1 ml를 처지하였다. 점적 후 봉독의 누출을 방지하기 위해 약 1초간 양안검을 잡아 폐안시켰다. T2군의 3마리에 관해서는 30초 후에 20 ml

Table I. Evaluation of primary skin irritation in rabbits

Primary irritation index	Classification
0.0 ~ 0.5	Non-irritant
0.6 ~ 2.0	Weak irritant
2.1 ~ 5.0	Moderate irritant
5.1 ~ 8.0	Severe irritant

Table II. Scale for interpretation of ocular irritation evaluations

Index of acute ocular irritation	Classification
0 ~ 5	Non irritant
5 ~ 15	Mild irritant
15 ~ 30	Moderate irritant
30 ~ 60	Severe irritant
60 ~ 80	Extreme irritant
80 ~ 110	Maximal irritant

정도의 생리식염수로 1분 정도 세안하여 시험물질을 제거하였다. 이때 대조측도 동일한 요령으로 세안하였다. T1군의 6마리는 점적 후 그대로 두고 세안을 실시하지 않았다. 봉독은 0.1 ml/site(10 mg/100 ml, w/v solution)의 농도로 안점막에 처리하였으며, 전 시험기간동안 매일 일반증상의 변화, 중독 증상 및 사망동물의 유무, 체중을 측정하였다. 봉독 처리 후 1, 2, 3, 4, 및 7일째에 각막, 홍채 및 결막 등의 이상유무를 관찰하였다. 안자극의 평가는 식품의약품안전청고시 제2009-116호 "의약품등독성시험기준"에 표시된 안구병변의 등급 기준에 따라 실시하였다.¹⁵⁾ 결과에 대한 자극성의 정도판정은 안구병변의 등급에 따른 각 관찰시점의 개체별안자극지수(IOI, individual ocular irritation index)를 산출하였고, 이를 이용하여 각 기기별 평균안자극지수(MOI, mean ocular irritation index)를 산출하였으며, 평균안자극지수중 최고치를 급성안자극지수(AOI, acute ocular irritation index)로 하였다.^{16,18)} 이 결과에서 얻어진 급성안자극지수를 Table II에 따라 안점막자극정도로 구분하였다.

통계학적 방법 - 체중변화 수치는 mean 및 SD로 나타내었으며, 별도의 통계처리는 실시하지 않았다.

결 과

피부자극시험

일반증상 및 사망률 - 모든 동물에 있어서 봉독 적용에 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았으며, 사망동물도 발견되지 않았다(Table III).

체중변화 - 체중측정 결과 봉독 적용 후 24시간째의 평균 체중이 적용 전의 평균체중에 비해 다소 감소한 것으로 나

Table III. Mortality and clinical signs of individual rabbit after applying at skin with bee venom

No. of rabbits (sex: male)	Mortality	Clinical signs
6	0/6 ^{a)}	Normal

^{a)}No. of dead animals/No. of tested animals

Table IV. Body weight changes of individual rabbit after applying at skin with bee venom

Animal No.	Hours after treatment (g)		
	0	24	72
1	2,069	2,106	2,187
2	2,033	2,000	2,102
3	2,298	2,258	2,349
4	2,001	1,979	2,009
5	2,393	2,391	2,441
6	2,318	2,312	2,437
Mean	2,185±169.8	2,174±170.9	2,254±181.7

타났으나 72시간째에는 모두 정상적인 체중 증가가 관찰되었다(Table IV).

적용부의 관찰 - 봉독 적용 후 24시간 및 72시간째에 적용부의 자극성을 관찰한 결과, 봉독의 적용에 의한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 따라서 Draize의 산출방법에 따른 일차자극지수는 “0”으로 평가되었다(Table V).

안점막극시험

일반증상 및 사망률 - 모든 동물에 있어서 봉독 적용에 관련된 어떠한 이상 증상도 관찰되지 않았으며, 사망동물도 발견되지 않았다(Table VI).

체중변화 - 체중측정 결과 전 시험기간 동안 정상적인 체중의 증가가 인정되었다(Table VII).

적용부의 관찰 - 봉독 적용 후 1, 2, 3, 4, 및 7일째에 적용부위를 관찰한 결과 각막 홍채 및 결막에서 봉독 적용에

Table VI. Mortality and clinical signs of individual rabbit after applying at eye balls with bee venom

Group	No. of animals	Mortality	Clinical signs
T1 (No eye washing)	6	0/6 ^{a)}	Normal
T2 (Eye washing)	3	0/3	Noraml

^{a)}No. of dead animals/No. of tested animals

의한 어떠한 자극성도 인정되지 않았다. 따라서 봉독의 급성안자극지수는 “0” 평가되었다(Table VIII).

고 찰

봉독은 오래전부터 봉독이 갖고 있는 다양한 약리 성분으로 인해 식품, 의약품으로의 활용을 위해 많은 연구가 이루어져 왔으며, 민간과 한방에서 살아있는 벌을 이용하는 봉침요법(蜂針療法)으로 질병의 치료와 예방에 사용되어져 왔다. 그러나 인구 중 0.4~3.3%는 벌에 쏘였을 경우 과민반응(anaphylactic shock)을 갖고 있는 것으로 보고되어 있어 살아있는 벌을 이용하는 봉침요법에 대한 안전성에 논란이 되곤 하였다.^{9,19)} 최근, 세포재생 및 여드름 유발 병원균에 대한 억제 효과 등의 기능이 밝혀짐에 따라 봉독을 함유한 다양한 화장품 개발이 활발히 진행되고 있다.^{9,10)} 따라서 벌침이 아닌 봉독을 화장품이나 피부외용제로서 사용했을 경우 봉독이 피부의 안전성에 어떠한 영향을 주는가에 대한 연구가 필요하였다.

봉독에 대한 피부자극성을 조사하기 위하여 New Zealand

Table V. Results of skin reaction after applying with bee venom

Change Phases (hours) ^{a)}	Control site								Test site							
	Erythema & Eschar				Edema				Erythema & Eschar				Edema			
	Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded	
24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean Score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ΣMean Score	0				0				0				0			
Total	0								0							
PII ^{b)}	0								0							

^{a)}Time after topical application

^{b)}PII (primary irritation index) = total/4

Table VIII. Continued

Group		T1 (No eye washing)					T2 (Eye washing)			
	Animal No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IOI	Day 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Day 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Day 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Day 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Day 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOI	Day 1			0					0	
	Day 2									
	Day 3									
	Day 4									
	Day 7									

IOI (individual ocular irritation index) = (A × B × 5) + (C × 5) + (D + E + F) × 2

MOI (mean ocular irritation index) = \sum IOI/Number of animals

AOI (acute ocular irritation index) = the maximum value of MOI

white계 수컷 토끼를 사용하여 찰과 및 비찰과부위에 각각 24시간동안 적용하였고, 72시간까지의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 국소자극성을 평가하였다. 봉독 적용 후 24시간째에 관찰된 경미한 체중감소는 적용 후 72시간째에는 정상적인 체중증가를 나타내었고, 또한 특이적인 독성증상을 나타내지 않은 것으로 보아 시험물질의 적용에 의한 영향 이라기 보다는 적용시 보정을 위한 테이프 부착에 따른 스트레스등의 다른 요인에 의해 유발된 소견으로 판단되었다. 시험 기간 중 봉독의 적용에 따른 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다. 또한 봉독에 대한 안점막자극성을 조사하기 위하여 9마리의 New Zealand white계 수컷 토끼에 시험물질 0.1 ml을 처치한 후 7일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 국소자극성을 평가한 결과, 시험기간 중 봉독 적용에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았으며 체중 역시 정상적인 증가를 나타내었다. 또한 봉독 적용에 따른 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.

결 론

New Zealand white계 수컷 토끼에 있어서 봉독의 피부자극 및 안점막 적용은 어떠한 자극성도 유발하지 않는 것으로 나타났으며, 따라서 봉독은 피부자극독성과 안점막자극독성이 없는 무자극성인 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호 : PJ007178)에 의하여 수행되었으므로 감사를 드립니다.

인용문헌

1. 김민정, 박상동, 이아람, 김경호, 장준혁, 김갑성 (2002) 쥐의 Collagen 유발 관절염의 활액에서 단백분해효소의 활성 및 유리기 손상에 미치는 봉독약침의 억제효과. 대한침구학회지 **19**(5): 161-175.
2. Kim, H. W., Kwon, Y. B., Ham, T. W., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Lee, H. J., Han, H. J., Yang, I. S., Beitz, A. J. and Lee, J. H. (2003) Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J. Vet. Med. Sci.* **65**(3): 349-355.
3. Habermann, E. and Reiz, K. G. (1965) On the biochemistry of bee venom pep-tides, melittin and apamin. *Biochemistry.* **343**: 192-203.
4. James, A. V., Glenn, B. W. and Robert, B. B. (1975-1976) The effect of treatment with whole bee venom on cage activity and plasma cortisol levels in the arthritic dog. *Inflammation* **1**(2): 167-174.
5. Piek, T. (1986) Venoms of the Hymenoptera. Academic Press. London.
6. Curcio-Vonlanthen, V., Schneider, C. H., Frutig, K., Blaser, K. and Kalbacher, H. (1997) Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J. Pept. Sci.* **3**(4): 267-276.
7. Rudenko, S. V. and Nipot, E. E. (1996) Modulation of melittin-induced hemolysis of erythrocytes. *Biokhimiia.* **61**(12): 2116-2124.
8. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Kweon, H. Y., Woo, S. O., Baek, H. J. and Park, K. K. (2007) Inhibitory effect of bee venom against ultraviolet B induced MMP-1 and MMP-3 in human dermal fibroblasts. *J. Apic. Res.* **46**(2): 94-98.
9. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Baek, H. J. and Park, K. K. (2010) Antibacterial and anti-inflammatory effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom against acne-inducing bacteria.

- J. Med. Plant. Res.* **4**: 459-464.
10. Fennell, J. F., Shipman, W. H. and Cole, L. J. (1967) Antibacterial action of a bee venom fraction (melittin) against a penicillin-resistant staphylococcus and other microorganisms. *Res. Dev. Tech. Rep.* **5**: 1-13.
 11. Helbling, A., Hurni, T., Mueller, U. R. and Pitchler, W. J. (2004) Incidence of anaphylaxis with circulatory symptoms: a study over a 3-year period comprising 940,000 inhabitants of the Swiss Canton Bern. *Clin. Exp. Allergy.* **34**(2): 285-290.
 12. Golden, D. B., Marsh, D. G., Kagey-Sobotka, A., Freidhoff, L., Szkló, M., Valentine, M. D., and Lichtenstein, L. M. (1989) Epidemiology of insect venom sensitivity. *JAMA.* **262**(2): 240-244.
 13. 한상미, 이광길, 여주홍, 권해용, 이인경, 이명렬, 이만영, 백하주, 배기환 (2005) 전기충격법으로 채취한 국내산 봉독의 항균효과 (I). *한국양봉학회지* **20**(1): 53-58.
 14. OECD (1997) OECD Principles of Good Laboratory Practice.
 15. 식품의약품안전청 (2009) 식품의약품안전청고시 제 2009-116호(2009년 8월 24일) '의약품등독성시험기준'.
 16. Draize, J. H., Woodard, G. and Calverry, H. O. (1994) 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.
 17. Patrick, E. and Maibach, H. I. (1989) Dermatotoxicology. In Hayes AW, Editor. Principles and Methods of Toxicology (2nd edition), 383-406, Raven Press, New York.
 18. Ballantyne, B. (1993) Ophthalmic Toxicology in General & Applied Toxicology (Ballantyne B, ed). 567-593, Stockton Press, New York.
 19. Incorvaia, C., Pucci, S. and Pastorello, E. A. (1999) Clinical aspects of Hymenoptera venom allergy. *Allergy.* **58**: 50-52.
- (2011. 1. 27 접수; 2011. 3. 15 심사; 2011. 3. 15 게재확정)