

기니픽에서 정제봉독겔의 광독성 평가

한상미[#] · 홍인표 · 우순옥 · 김세건 · 장혜리 · 박관규*

국립농업과학원 농업생물부, *대구가톨릭대학교 의과대학

(Received December 14, 2015; Revised February 25, 2016; Accepted February 25, 2016)

Antigenicity of Purified Bee Venom Gel from Honeybee (*Apis mellifera* L.) in Guinea Pigs

Sang Mi Han[#], In Phyo Hong, Soon Ok Woo, Se Gun Kim, Hye Ri Jang and Kyun Kyu Park*

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

*Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 42472, Korea

Abstract — This study was performed to examine the skin phototoxicity of purified bee venom (*Apis mellifera* L.) collected using bee venom collector. To confirm whether the gel containing purified bee venom (BV gel) causes phototoxicity when used for the skin medicinal products, phototoxicity testing was conducted using guinea pig models. The BV gel (0.1 ml/site) was administered transdermally to guinea pigs. 8-MOP was used to introduce positive control response. After administration, the guinea pigs were irradiated with UVA (15 J/cm²) with doses based on standard phototoxicity study guidelines. In the weight measurement and clinical observation, BV gel groups didn't show any significant changes compared with control group. BV gel groups did not show any symptoms such as erythema and edema formation of skin. This study demonstrated that BV gel has promising potential external treatment for topical uses that do not induce significant levels of skin phototoxicity.

Keywords □ honeybee venom, phototoxicity, guinea pigs, erythema, edema

순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖는 봉독은 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 오래전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다.^{1,2)} 서양종꿀벌 (*Apis mellifera* L.) 일벌의 독인 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(melittin)은 항염증과,^{3,4)} 항균작용,⁵⁾ 강력한 진통작용,⁶⁾ 면역증강⁷⁾ 등의 역할을 한다고 알려져 있다. 본 연구팀에서는 2005년 봉독채집장치와 채집된 봉독으로부터 이물질 제거할 수 있는 봉독정제법을 개발하였다. 이로써 국내에서도 봉독 채집이 가능하게 되었으며, 화장품과 의약품의 원료로 순수 정제봉독이 상용화되었다. 정제봉독은 멜리틴 함량이 50~70% 범위로 꿀벌이 갖고 있는 순수 봉독으로 히스타민을 비롯하여 히알루니다아제, 포스포리파아제 등 꿀벌

의 봉독 성분을 온전히 갖고 있는 상태의 봉독이다.⁸⁾ 정제봉독은 피부주름 억제, 미백 등의 효과는 물론 피부자극 및 안점막 자극 시험에서 모두 무독성임이 입증됨에 따라 봉독화장품으로 개발, 판매되고 있다.⁹⁻¹²⁾ 최근 봉독이 여드름유발 원인균인 *Propionibacterium acnes*는 물론 피부상재균인 *Staphylococcus epidermidis* 등에 대한 항균효과 및 항염증효과가 구명되었으며,^{13,14)} 이를 유효성분으로 하는 여드름 치료제는 식품의약품안전처로부터 임상2상 시험을 허가 받은 상태이다. 그러나 한방에서는 봉독의 위험요소인 알러지 반응을 억제하기 위해 봉독의 주 항원으로 작용하는 포스포리파아제(phospholipase A2), 히알루니다아제(hyaluronidase)와 가려움이나 염증을 일으키는 히스타민(histamine) 등의 성분을 제거하고 순수한 멜리틴(melittin)만을 분리 정제하여 약침용 봉독으로 사용한다고 알려져 있다. 멜리틴만을 분리 정제한 봉독은 전신 과민반응이나 부종, 동통 그리고 중창과 같은 국소·즉시형 과민반응을 현저하게 감소시키나, Hartley계 기니픽을 이용한 능동성 아나필락시스 반응에서 항원성이 있는 것으로 보고되어 있다.¹⁵⁾ 그러나 본 연구진에서는 정제봉독의 능동성 아나필락시스반응에서 항원성이 없는 것으로

[#]Corresponding Author

Sang Mi Han

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Tel.: 063-238-2896 Fax.: 063-238-3832

E-mail: sangmih@korea.kr

Table I – Experimental design and treating groups for phototoxicity test of Guinea pigs for purified bee venom gel

Groups	Sex	Number of animal (Code No.)	Amounts (ml/site)	Dose (%)
G1 (Negative control)	Male	5 (1-5)	0.1	0
G2 (Purified bee venom gel)	Male	5 (6-10)	0.1	100
G3 (Positive control)	Male	5 (11-15)	0.1	1

확인하였을 뿐만 아니라, 펠리틴보다는 정제봉독을 사용했을 경우 세포독성에 대한 우려가 없을 뿐 더러, 다양한 약리효과를 보이는 것으로 확인할 수 있었다.¹⁶⁾

따라서 본 연구에서는 봉독을 의약품 외용제로 사용하기 위하여 필요한 안전성 확보를 위하여 광독성 시험을 수행하였다.

실험 방법

사료

본 실험에서 사용한 정제봉독겔(동성제약, 한국)은 국내산 꿀벌로부터 봉독채집장치를 이용하여 채집된 봉독을 봉독의 간이 정제방법⁸⁾으로 정제된 정제봉독(청진바이오텍, 한국)을 유효성분으로 하는 하는 여드름 치료제 임상시험용 제품을 사용하였다. 양성대조물질은 멸균 주사용수(대한약품공업(주), 한국)를 양성대조물질은 8-methoxypsoralen(8-MOP, Sigma-Aldrich, USA), 8-MOP의 부형제로는 아세톤(Sigma-Aldrich, USA)을 시험에 사용하였다.

시험 동물

시험동물인 특정병원체 부재 수컷 기니픽 Hartley 17두를 구입하여 사용하였다(샘타코 바이오코리아(주), 한국). 입수시 체중은 274.16~300.26 g이었으며 7일간의 순화 기간을 거쳐 체중 332.84~369.66 g인 15두의 기니픽을 시험에 사용하였다. 본 시험은 AAALAC(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) 인증을 득한 (주)캠온 실험동물운영위원회 승인을 득하였다(심의번호 14-G327).

사육환경

환경조건 – 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 (주)캠온 비임상연구소 제1동물사육구역 8호실에서 수행하였다. 시험기간 중 동물실의 온습도는 컴퓨터 시스템을 이용한 자동 온습도 측정기로 매시간 환기횟수 및 조도 등의 환경조건을 정기적으로 측정하였다. 환경 측정 결과, 실험기간 동안 온도는 21.3~22.0°C, 상대습도 53.6~66.2%이었으며, 온도, 습도, 환기횟수, 조도 등에서 설정 범위를 벗어나 시험의 결과에 나쁜 영향을 끼칠만한 이상은 관찰되지 않았다.

사료, 물 및 오염물질 검사 – 사료는 (주)카길에그리퓨리나(한국)에서 생산하는 기니픽용 고품사료를 구입하여 자유섭취하도록 하였다. 사료의 성분 분석 성적서를 검토한 결과 시험결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유 음수 하도록 하였다.

군 분리 – 순화기간 중 건강함 것으로 판정한 동물의 체중을 순위하였고, 각 군의 평균 체중이 균일하게 분포하도록 시험군 구성표과 같이 무작위 분배하였다.

시험군 구성 및 투여량 설정

시험군의 구성과 투여량 및 투여경로는 Table I과 같이 설정하였다. 투여량은 예비시험을 통해 시험물질의 조제 및 투여 가능한 농도는 100%로 확인되었으며, 이 농도에서도 감각이 관찰되지 않았다. 따라서 시험물질 100%를 감각 및 야기의 투여농도로 설정하였다.

투여경로

투여 전 기니픽의 등배부를 제모기와 면도기를 이용하여 전모하였다. 투여 전 전모부위를 좌우(1.5 cm×1.5 cm/site)로 나눈 후 부형제, 시험물질 및 양성대조물질을 1 site당 0.1 ml씩 도포한 후 30분간 방치하였다. 그 후 기니픽 고정틀에서 넣어서 기니픽 등배부 오른쪽 절반은 알루미늄 호일로 차단하여 UV가 닿지 않도록 하였고, 나머지 부분만 UV를 조사하였다(Fig. 1). 이때 UV 광량은

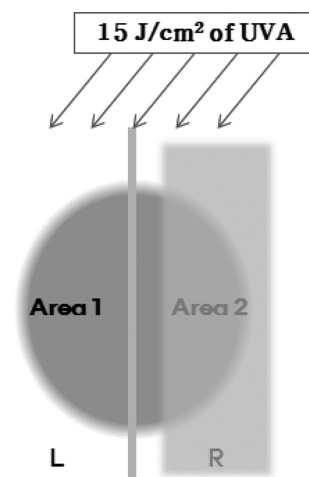
**Fig. 1** – Application pattern for phototoxicity test of Guinea pigs for purified bee venom gel.

Table II – Grading of skin reactions

Score	Erythema and eschar formation	Edema formation
0	No erythema	No oedema
1	Very slight erythema	Very slight oedema
2	Well defined erythema	Slight oedema (edges of area well defined raising)
3	Moderate to severe erythema	Moderate oedema (raised approximately 1 mm)
4	Severe erythema to eschar formation preventing grading of erythema	Severe oedema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)

Mean score=Sum of score for erythema and eschar formation and edema formation and edema/number of animals employed.

UVA(305~420 nm)에서 15 J/cm²가 될 때까지 조사하였다.^{17,18)}

관찰 및 검사

일반증상 – 실험기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 1일 1회 이상 관찰하여 개체 별로 기록하였다. 첫 투여일을 Day 1로 설정하였다.

체중 – 모든 동물에 대하여 입수시, 군 분리시 및 투여 전, 그리고 최종 평가일에 체중을 측정하였다.

적용부위의 관찰 – 조사종료 24, 48 및 72시간째 적용부위의 홍반과 가피 및 부종의 상태를 관찰하여 Table II의 Draize 평가기준에 따라 판정하였다.¹⁹⁾ 광독성 판정은 Table III의 기준에 따라 판정된 홍반과 가피항목 및 부종항목의 점수에 대해 평균값을 구하였다. 조사부위와 비조사부위의 평균값을 비교하여 조사부위가

0.6 이상 높은 경우를 광독성이 있다고 판정하였다(Table III).

실험 결과 및 고찰

일반증상 및 사망

시험 기간 중 사망동물이나 시험물질에 의한 일반증상은 관찰되지 않았다(Table IV). 따라서, 봉독을 함유한 정제봉독겔은 빛에 노출되어도 시험동물의 사망이나 이상반응을 일으키지 않는 것으로 확인되었다.

체중변화

시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 대조군과 비교하여 시험물질에서 체중변화는 전혀 관찰되지 않는 것으로 보아, 봉독으로 인한 사료 소모량의 감소, 음수량의 변화, 임상증상, 장기 무게의 변화, 혈액 및 혈청학적 변화 등이 없는 것으로 판단되었다.

피부반응 및 광독성의 평가

시투여부위 중 모든 UV 비조사부위에서는 아무런 피부반응이 관찰되지 않았다. UV 조사부위 중 시험물질 투여부위에서는 UV 조사 종료 24, 48, 72시간째 아무런 피부반응이 관찰되지 않아

Table III – Phototoxicity determined by mean score

Mean score	Evaluation
0.0~0.5	Non phototoxic
0.6~1.2	Minimally phototoxic
1.3~2.5	Severely phototoxic
2.6~5.0	Extremely phototoxic

Table IV – Individual clinical signs

Clinical signs			
Groups	Animal ID	Signs	Observed On
G1 (Negative control)	1	Normal	Day 1~4
	2	Normal	Day 1~4
	3	Normal	Day 1~4
	4	Normal	Day 1~4
	5	Normal	Day 1~4
G2 (Purified Bee Venom Gel)	6	Normal	Day 1~4
	7	Normal	Day 1~4
	8	Normal	Day 1~4
	9	Normal	Day 1~4
	10	Normal	Day 1~4
G3 (Positive control)	11	Normal	Day 1~4
	12	Normal	Day 1~4
	13	Normal	Day 1~4
	14	Normal	Day 1~4
	15	Normal	Day 1~4

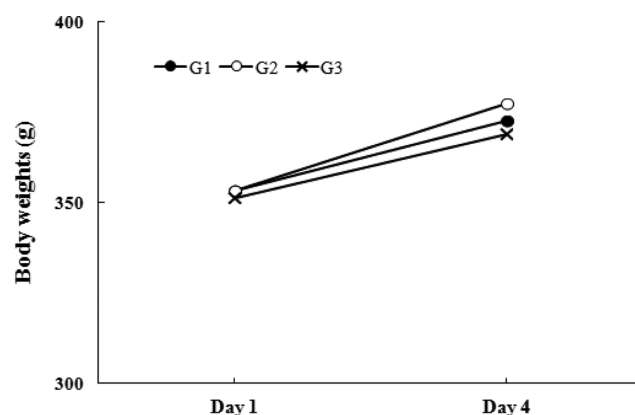


Fig. 2 – Changes of body weights for phototoxicity test of Guinea pigs for purified bee venom gel. ●; negative control (G1), ○; Purified bee venom gel (G2), ×; positive control (G3).

Table V – Evaluation of skin reaction

Groups	Animal ID	24 hours				48 hours				72 hours			
		UV(-)		UV(+)		UV(-)		UV(+)		UV(-)		UV(+)	
		Ery ^{a)}	Ede ^{b)}	Ery	Ede	Ery	Ede	Ery	Ede	Ery	Ede	Ery	Ede
G1 (Negative control)	1	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
	3	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
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ΣScore		0		0		0		0		0		0	
(ΣScore/N)		0		0		0		0		0		0	
(ΣScore/N) [UV(+)-UV(-)]≥0.6 ^{c)}		0 (Non-phototoxic)				0 (Non-phototoxic)				0 (Non-phototoxic)			
G2 (Purifide Bee Venom Gel)	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ΣScore		0		0		0		0		0		0	
(ΣScore/N)		0		0		0		0		0		0	
(ΣScore/N) [UV(+)-UV(-)]≥0.6 ^{c)}		0 (Non-phototoxic)				0 (Non-phototoxic)				0 (Non-phototoxic)			
G3 (Positive control)	11	0	0	2	2	0	0	2	1	0	0	2	1
	12	0	0	2	2	0	0	2	1	0	0	2	1
	13	0	0	3	2	0	0	3	2	0	0	2	2
	14	0	0	3	2	0	0	2	1	0	0	2	1
	15	0	0	2	1	0	0	2	1	0	0	1	0
ΣScore		0		21		0		17		0		14	
(ΣScore/N)		0		4.2		0		3.4		0		2.8	
(ΣScore/N) [UV(+)-UV(-)]≥0.6 ^{c)}		4.2 (Phototoxic)				3.4 (Phototoxic)				2.8 (Phototoxic)			

a) Erythema and eschar, b) Edema, c) Criterion of positive response in phototoxicity.

Phototoxicity positive response: (Average skin reaction observed in the UV-irradiated skin)-(Average skin reaction observed in the UV-non-irradiated skin)=0.6.

광독성 평가지수는 0이었다(Table V). 양성대조군의 모든 동물에서는 grade 2의 뚜렷한 홍반(pronounced erythema)과 grade 3의 중등도의 강한 홍반(strong erythema)이 관찰되었고, grade 1의 경도의 부종(mild erythema)과 grade 2인 뚜렷한 부종(pronounced erythema)이 관찰되었다. 광독성 평가지수는 각각 4.2, 3.4, 2.8이었다.

이상의 결과로 보아 꿀벌의 일벌독인 정제봉독을 함유한 정제봉독겔은 100%의 농도에서 광독성이 없는 것으로 판단되었다. 따라서 정제봉독은 전신투여를 통해 피부에 분포되거나 국소적용 되었을 때 광독성을 일으키지 않는 것으로 확인되었다.

결 론

본 연구는 Hartley계 기니픽을 이용하여 꿀벌 일벌독인 봉독을 유효성분으로 하는 정제봉독겔의 UV 조사에 의한 광독성을

조사하기 위하여 시험물질을 100% 농도로 정제봉독겔 투여군에 적용하여 부형제대조군 및 양성대조군과 비교하였다. 사용동물수는 군당 5마리로 하였고, 시험기간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 UV 조사 후 24, 48 및 72시간째 피부반응을 관찰하였다. 시험결과 사망동물, 일반증상 및 체중변화에서 이상변화는 관찰되지 않았다. 피부반응에 있어 정제봉독겔 투여군에서는 어떠한 피부변화도 관찰되지 않았다. 반면 양성대조군의 경우에는 뚜렷한 홍반과 중등도의 강한 홍반 및 경도 또는 뚜렷한 부종이 관찰되어 광독성이 있음을 확인하였다. 따라서 정제봉독을 유효성분으로 하는 정제봉독겔은 100%의 농도에서도 광독성이 없는 것으로 판단되어 이후 연고 등 외용제로 개발이 가능하게 되었다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호:

PJ01132503)에 의하여 수행되었으므로 감사를 드립니다.

References

- 1) 김민정, 박상동, 이어람, 김경호, 장준혁, 김갑성 : 쥐의 Collagen 유발 관절염의 활액에서 단백질분해효소의 활성 및 유리기 손상에 미치는 봉독약침의 억제효과. *대한침구학회지* **19**, 161 (2002).
- 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. J. : Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 349 (2003).
- 3) Piek, T. : Venoms of the Hymenoptera. London, Academic Press, p. 330 (1986).
- 4) Habermann, E. and Reiz, K. G. : On the biochemistry of bee venom pep-tides, melittin and apamin. *Biochemistry* **343**, 192 (1965).
- 5) Fennell, J. F., Shipman, W. H. and Cole, L. J. : Antibacterial action of a bee venom fraction (melittin) against a penicillin-resistant Staphylococcus and other microorganisms. *Res. Dev. Tech. Rep.* **5**, 1 (1967).
- 6) Curcio-Vonlanthen, V., Schneider, C. H., Frutig, K., Blaser, K. H. and Kalbacher, H. : Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J. Pept. Sci.* **3**, 267 (1997).
- 7) Rudenko, S. V. and Nipot, E. E. : Modulation of melittin-induced hemolysis of erythrocytes. *Biokhimiia.* **61**, 2116 (1996).
- 8) 한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권혜용 : 봉독의 간이 정제 방법, 대한민국특허 10-075881 (2007).
- 9) 한상미, 김정민, 이광길, 박관규, 장영채 : 정제봉독의 멜라닌 생성 억제 효과. *약학회지* **56**, 254 (2012).
- 10) Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H. and Pak, S. C. : Dermal and ocular irritation studies of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *Am. J. Chin. Med.* **40**, 759 (2012).
- 11) Han, S. M., Lee, K. G., Park, K. K. and Pak, S. C. : Skin sensitization study of bee venom (*Apis mellifera* L.) in guinea pigs and rats. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **32**, 27 (2013).
- 12) Han, S. M., Hong, I. P., Woo, S. O., Chun, S. N., Park, K. K., Nicholls, Y. M. and Pak, S. C. : The beneficial effects of honeybee-venom serum on facial wrinkles in humans. *Clin. Interv. Aging* **10**, 1587 (2015)
- 13) Han, S. M., Yeo, J. Y., Baek, H. J., Lin, S. M., Meyer, S. and Molan, P. : Postantibiotic effect of purified melittin from honeybee (*Apis mellifera*) venom against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **11**, 796 (2009)
- 14) Kim, J. Y., Lee, W. R., Kim, K. H., An, H. J., Chang, Y. C., Han, S. M., Park, Y. Y., Pak, S. C. and Park, K. K. : Effects of bee venom against *Propionibacterium acnes*-induced inflammation in human keratinocytes and monocytes. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 1651 (2015).
- 15) 조병균, 권기록 : 기니픽을 이용한 Sweet Bee Venom의 항원성 평가. *J. Pharmacopunct.* **14**, 23 (2011).
- 16) 한상미, 홍인표, 우순옥, 김세건, 장혜리, 박관규, 장영채 : 정제봉독의 아나필락시스 쇼크 반응 연구. *생약학회지* **46**, 203 (2015).
- 17) Lovell, W. W. and Sanders, D. J. : Phototoxicity testing in guinea pigs. *Fd. Chem. Toxic.* **30**, 155 (1992).
- 18) Okaumura, Y., Yamacuchi, H., Takyma, S., Kato, H. and Kokubu, M. : Phototoxicity study of a ketoprofen poultice in guinea pigs. *J. Toxicol. Sci.* **30**, 19 (2005).
- 19) Draize, J. H. : Dermal toxicity. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs, and cosmetics, The Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, Texas State Department of Health, p. 46 (1959).