

銀杏葉의 家兔 皮膚 接觸性炎症 誘發 毒成物質에 關한 研究

白秉杰 · 金秉洙 · 金善熙* · 安丙浚*

全北大學校 獸醫科大學 生體安全性研究所

忠南大學校 藥學大學*

(1991. 3. 21 접수)

Studies on toxic substances of *Gingko* leaves inducing contact dermatitis in rabbit

Byeong-kirl Baek · Byeong-su Kim · Sun-hee Kim* · Byung-zun Ahn*

Bio-safety Research Institute

College of Veterinary Medicine, Chunbuk National University

*College of Pharmacy, Chungnam National University**

(Received Mar 21, 1991)

Abstract: *Gingko biloba* is one of the oldest trees on earth. It can be traced 300 million years or more into past. In recent years, this tree has become increasingly popular because of its longevity. Amount of consumption of *Gingko* leaves in Korea is increased to produce drugs for blood circulating system's disorder.

The workers who work at the company of product drug with *Gingko* leaves complain pruritus at belt position of west, however toxic substance from extracts of *Gingko biloba* was carried out to determine what kind of the toxic substance from extract could induce a contact dermatitis by means of histopathological study.

Dried leaves of Korean *G. biloba* were exhaustively extracted with chloroform. The aqueous chloroform residue was extracted with hexane. After evaporation, the hexane extract was passed through a silica gel column chromatography, it was separated into 9 fractions by means of gradient solvent (benzene: acetone/ 98~93 : 2~7%). The 4th and 7th fraction were identified as bilibol and ginkgolic acid by silica gel thin layer chromatography and NMR spectrophotometer. The 4th and 7th fractions of Korean *Gingko* leaves have an irritant substances which can be induced ear swelling and increased thickness of stratum corneum of rabbit ear exposed with the fractions (3 time/3 day, 100 μ l of 50mg/ml ethyl alcohol). In the 4th fraction, the substance have induced the surface of ear to swell and mass of unknown cell like inflammatory cell were infiltrated within the stratum corneum, and the 7th fraction have the surface of ear to loss the hairs, and sebaceous gland and follicle of hair were infiltrated with inflammatory cells. and other fractions at all did not induced a certain contact dermatitis and also Deutschen drug of *Gingko* (named as Gerigeron) have induced the contact dermatitis such as dematitis of Korean *Gingko* extract.

Key words: *Gingko biloba*, contact dermatitis, chromatography, bilibol, ginkgolic acid.

結 論

은행나무는 이 地球의 여러 차례의 天地 개벽에도 불구하고 3억년을 살아온 끈질긴 生命力을 가진 樹種임에 틀림없다.¹ 이 같은 끈질긴 生命力을 갖게 된 데는 여러가지 理由가 있다. 즉 銀杏 나무는 昆蟲의 侵入을 막는 防蟲力을 갖고 있어 昆蟲에 의한 滅亡을 피할 수 있었고, 熱과 化學物質의 影響에 강한 저항력 그리고 高等動物에 의한 損傷을 막기 위하여 接觸性 皮膚炎을 誘發시키는 物質들을 함유하고 있기 때문이다.²⁻⁴

古代로부터 그의 열매는 飢식의 治療와 強壯劑로 사용되고 있으나⁵⁻⁸, 최근 銀杏葉을 蒐集 精選하고 粉碎하여 醫藥品 製造에 參與하는 사람들의 皮膚炎症과 두드러기 症狀이 허리띠 부위의 壓迫받는 부분, 손목 그리고 사타구니 등에서 敏感하게 일어나고 있다. 그러므로 이의 原因을 밝히는 것은 作業에 參與하는 사람들의 健康을 保護하여야 할 産業 保健學의 의미를 갖는 문제점으로 浮刻되고 있는 實情이다. 銀杏葉에 함유되어 있는 ginkgolic acid와 bilobol의 物質이 어떤 接觸性 皮膚炎症을 誘發시키는지에 대한 報告는 아직 接하지 못하고 있어 著者 등은 이들 物質을 우리나라 銀杏葉으로부터 分離하여 接觸性 皮膚炎症을 誘發시켜 組織學的으로 觀察하였기에 報告하는 바 이다.

사람에 있어서 銀杏葉의 毒性 物質이 接觸性 皮膚炎 誘發 原因이 밝혀져야 하는 또 다른 理由는 오늘 날 銀杏葉의 엑기스 製劑가 成人病 治療 目的으로 市販되고 있어 이들 物質의 毒性和 除去 方法에 대한 研究의

確立은 消費者 保護 및 醫藥品의 安全性 側面에서 매우 重要하기 때문이다.

材料 및 方法

試藥 및 機器: 實驗에 使用한 試藥 및 溶媒類는 國內외의 特級 또는 一級試藥을 使用하였으며, 作用物質의 分割을 위하여서는 silica gel 60 G(70~230 mesh), silica gel GF 254(TLC 用) 그리고 precoated silica gel GF 254 (Merk Co.)을 使用하였다. 銀杏葉으로부터 抽出한 物質의 構造 確認을 위해서는 NMR spectrophotometer (Bruker AC-80)과 UV/Vis spectrophotometer (Pye Unicomb PU 8800)을 使用하였다.

實驗 材料: 우리나라에서 蒐集한 銀杏葉을 東邦製藥에서 chloroform으로 抽出하여 生産된 濃縮 엑기스(以下 銀杏葉 抽出物質이라 稱함)과, 獨逸産 "Gerigeron"의 商品名을 가진 캡슐製品(以下 獨逸産 캡슐 抽出物이라 稱함)을 購入, 接觸性 皮膚炎 誘發 試驗을 위하여 使用 하였다.

接觸性 皮膚 炎症 誘發: 體重 1.5kg의 雄性 家兔의 耳 中央面에 皮膚 疾患이 없다고 認定되는 20 頭를 選定, 實驗室에 適應시킨 後 銀杏葉의 抽出 物質과 獨逸産 캡슐 製品으로부터 Fig 1의 抽出 方法에 의한 hexane層에 溶解된 抽出 物質을 ethyl alcohol로 50 mg/ml 되게 溶解하여 100 μ l을 家兔의 兩側耳 背面에 하루에 1회씩 3日間 塗布, 皮膚의 接觸性 炎症을 誘發시킨 後, 肉眼 그리고 病理 組織學的으로 變化된 所見을 觀察하였다.

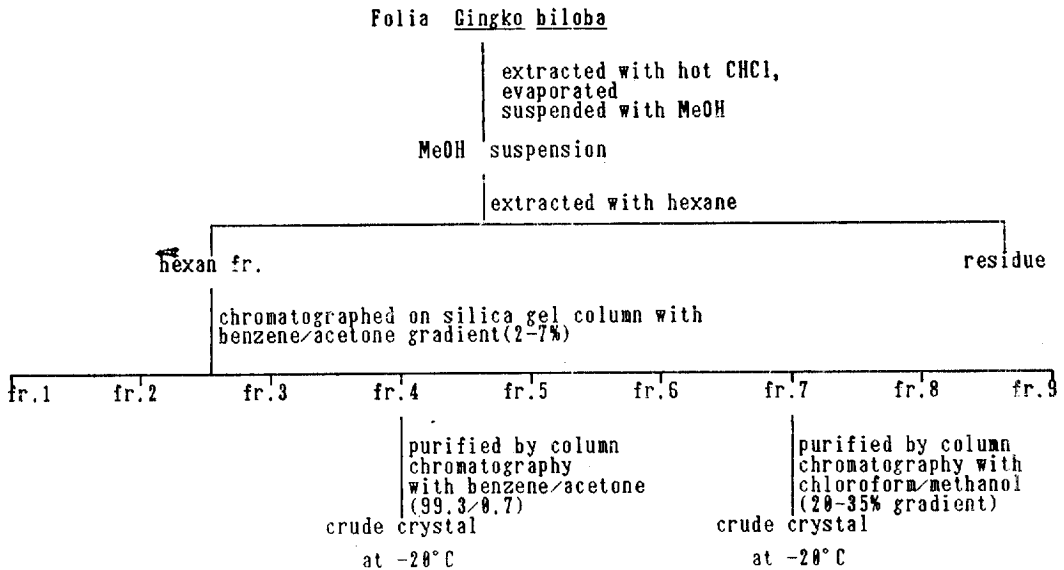


Fig 1. Extraction and isolation of the toxic substances from extract of *Ginkgo biloba* leaves

抽出物質의 塗布 部位는 家兔의 귀 尖端의 背面으로서 약 1.5cm² 程度의 面積위에 分割物質을 100μl씩 塗布한 後 溶媒를 揮發시켰으며, 對照 家兔에는 ethyl alcohol만을 上記와 같이 塗布시켰다.

皮膚毒性 物質의 準備 및 分割: 獨逸產 캡슐劑와 銀杏葉의 chloroform 抽出物質을 Fig 1에서 보는 마와 같이 methyl alcohol로 溶解시켜 얻은 抽出物質을 準備하여 다시 hexane으로 抽出하여 얻은 物質을 ethyl alcohol(50mg/ml)로 용해하여 皮膚에 接觸시켰던 마, 모두 炎症 所見이 觀察되었다. 毒性物質을 分割하고자 銀杏葉 chloroform 抽出 物質만을 hexane 溶解 物質을 benzene/acetone을 98~93/2~7%의 比率 溶媒로 column chromatography 하여 9個의 分割 物質을 얻었으며, 이를 다시 silica gel column chromatography하여 作用 物質을 silica gel thin layer chromatography (TLC라 稱함), NMR spectrophotometer UV/Visible spectrophotometer를 利用, 分析 化學의으로 그 物性を 確認하였다. 즉, 銀杏葉 粉末을 chloroform으로 抽出, 減壓濃縮한 엑기스 100g (東邦 製藥으로 부터 分讓받음)을 適當量의 methyl alcohol에 顯濁, 分割汝斗에 加한 다음 hexane으로 數回 抽出, hexane 抽出液을 한테 모아 減壓 濃縮하였으며, 이 중 12.4g을 silica gel (70~230 mesh) column chromatography (6.7cm × 26cm) benzene: acetone (gradient solvent system: 98~93 : 2~7%)을 溶媒로 column chromatography 하여 最終의으로 9個의 分割 物質을 얻었으며, 이를 TLC 하였던 마, 9個의 分割 物質이 자기 다른 Rf.를 나타내었으며 (Fig 2. 參照), 이들로부터 溶媒를 乾燥蒸發시킨 後에 抽出物을 50mg/ml ethyl alcohol이 되도록 稀釋, 冷藏庫에 保管 使用하였다. 이들 9個의 分割 物質을 皮膚 接觸 試驗 하였던 마, 毒性 作用을 나타내었던 第4와 7分割의 物性を 把握코자 다시 silica gel column chromatography하여 精製하였다. 즉 第4分割 物質을 純粹 分離하기 위해서는 benzene: acetone (99.3: 0.7%)을 使用하여 얻은 物質을 減壓 시켰던 마, -20°C에서 結晶을 얻었으며, 第7分割 物質을 다시 chloroform/methyl alcohol(80~65: 20~35% gradient system)로 分割하여 -20°C下에서 無色 結晶을 얻었다.

그리고 獨逸產 캡슐 80個의 粉末을 250ml 크기 三角 플라스크에 넣고 chloroform 100ml를 加한 後 magnetic stirrer를 使用하여 常溫에서 4時間 以上 抽出한 後, 減壓濃縮하였다. 이 엑기스를 methanol에 녹여 分割 汝斗에 加하고 hexane으로 다시 抽出하여 얻은 hexane 層을 減壓 濃縮하였던 마 94.62mg의 抽出 物質을 회

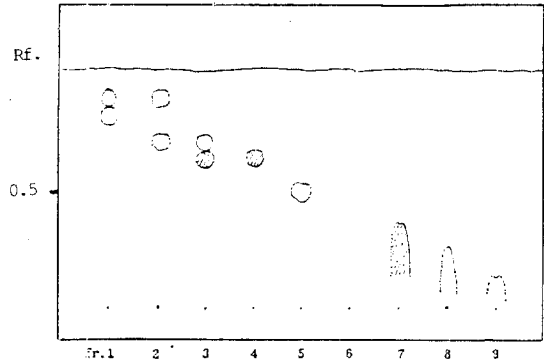


Fig 2. Thin layer chromatogram of the fractions obtained by column chromatography of extract of *Ginkgo biloba* leaves. Solvent (benzene: acetone/9 : 1)

收하였으며, 이를 ethyl alcohol에 50mg/ml되게 溶解하여 試料로 使用하였다.

毒性 作用 物質의 物性 分析: silica gel column chromatography하여 얻은 物質을 각각 實驗動物을 利用하여, 毒性作用을 나타내었던 第4分割을 TLC하여 potassium ferricyanide와 ferric chloride溶液(以下 發色製)을 噴霧하면 靑色 斑占이 나타났으며, 이를 多量 回收하고자 silica gel(70~230 mesh) 30g을 column에 넣고 benzene: acetone(99.3: 0.7%) 溶媒 system에서 4.13mg을 loading後 展開시켜 TLC 上的 제4分割 物質에 該當하는 部分의 試驗管內 物質을 모아 結晶化한 다음 分光 分析하였다.

그리고 第7分割 物質 역시 TLC판에 展開하여 發色製를 噴霧했을 때 褐色의 斑占이 나타났다. 이 物質 1.63g을 silica gel (70~230) 100g이 충전된 column에 넣어, chloroform: methyl alcohol (80~65: 20~35% gradient solvent system)으로 展開하여 該當 發色 分割을 얻어 溶媒를 除去한 後, -20°C의 溫度에서 petroleum ether로 再結晶하였으며 이를 -20°C acetone으로 세척한 다음 乾燥하여 分光 分析하였다.

肉眼 및 組織學的 觀察: 銀杏葉 抽出 物質의 各 分割物質과 獨逸產 캡슐 抽出 物質을 塗布한 後, 發赤程度와 耳의 두께를 微細 計測機(Mitutoyo, 日產, >0.01 mm)를 使用, 12時間마다 132 時間에 걸쳐서 測定하였으며 塗布 部位를 切斷, 10% formalin液에 固定하여 常法에 따라서 paraffin 包埋한 後, 6μm의 두께로 切片, hematoxylin-eosin 染色하여 病理組織學的인 所見을 觀察하였다.

結 果

獨逸產 캡슐劑 抽出物質의 皮膚 毒性: 캡슐劑로 부터의 chloroform 抽出物 94.62mg을 回收 50mg을 1ml의 ethyl alcohol에 溶解, 100 μ l를 1日 1回씩 3日間 塗布하였던 마, 塗布部位는 24時間제 부터 充血 및 腫脹되었는데 塗布 前에는 0.58mm이었는데 12時間後에는 0.74mm, 24時間 後에는 0.97mm로 測定되었으며, 96時間 以後에도 塗布 部位의 腫脹 所見이 肉眼的으로 觀察되었다.

國產 銀杏葉의 皮膚 接觸 毒性 物質 抽出: 國產 銀杏葉의 粉末을 chloroform으로 抽出하여 얻은 物質을 methyl alcohol에 녹이고, 다시 hexane으로 抽出한 hexane 溶液層과 殘留物質로 各各 區分하여 家兔의 귀에 塗布하였던 마, hexane 溶媒層의 物質이 腫脹과 脫毛 症狀를 가져왔으며, 殘留 物質에서도 微弱한 表皮 腫脹 所見이 있었지만, 作用 物質의 대부분은 hexane 層 內에서 觀察되었다.

hexane 溶解 物質 100gm을 모아 Fig 1. 과 같이 Column chromatography하였으며, 이를 TLC上的 斑占別로 9個로 分劃하였다. 즉, 第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 그리고 9分劃의 무게는 各各 125.4mg, 58.38mg, 72.18mg, 49.31mg, 23.46mg, 57.23mg, 189.33mg, 142mg 그리고 145.7mg이었으며, 이들 物質 中 50mg을 취하여 1ml ethyl alcohol에 各各 溶解, 毒性 試驗에 使用하였다.

肉眼的의 觀察 所見: 國產 銀杏葉 抽出 物質과 獨逸產 캡슐劑 抽出物을 皮膚에 接觸시켰던 마, 皮膚 接觸性 炎症이 肉眼的으로 觀察되었기에 國產 銀杏葉 物抽 物質에 대하여서만 毒作用 物質을 單獨 分離하고자, 9個의 分劃 物質을 各各 塗布하면서 귀의 두께를 12時間마다 測定하였던마, 第 2, 5, 6, 8 그리고 9分劃 物質에서는 거의 變化되지 않았지만, Fig 3에서 보는 마와 같이 第 1分劃에서는 塗布 前에 두께가 0.5mm 이었는데, 12, 24 時間 後에는 0.51mm, 0.68mm로 약간 두터워졌으며, 이 같은 變化는 그 以後에도 持續되었다. 第 3分劃에서는 塗布 前 0.57mm이었는데 12時間 後부터 두터워지기 始作하여 60時間 後에는 0.99mm의 두께가 測定되었는데 이는 132 時間까지 維持되었으며, 第 4分劃에서는 0.65mm이었는데 漸次的으로 두터워지면서 塗布部位에 연한 灰白色의 粘液性 物質이 24時間 以後에는 耳 表面에 參出되어 132 時間 後에는 1.40mm에 達하였으며, 이 粘液性 物質은 단단해지면서 두터운 假皮性 物質(Fig 5, 6, 7. 參照)의 狀態로 觀察되었다. 그리고 第 7分劃에서는 0.68mm이었던 귀의 두

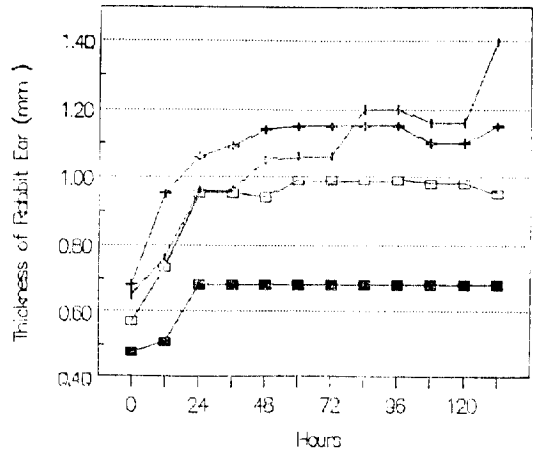


Fig 3. Measurement of the ear thickness of rabbit contacted with each fraction of extracts of *Ginkgo biloba* leaves.

The 1st fraction The 3rd fraction
The 4th fraction The 7th fraction

께가 12時間에 0.95mm로 두터워져 60時間 以後에 1.15mm로 測定되었으며, 96時間경에는 Fig 8에서 보는 마와 같이 塗布 部位에서 脫毛를 招來하였다.

組織學的의 觀察 所見: 銀杏葉의 hexane 抽出物質을 column chromatography하여 얻은 分劃物質 9個를 귀에 塗布한 132時間 後에 家兔를 各各 屠殺, 接觸 部位를 組織學的으로 觀察하였던 마 다음과 같은 성적을 얻었다. 즉, 肉眼的으로 毒作用이 없었던 第 2, 5, 6, 8 그리고 9分劃을 塗布한 귀 組織과 對照群의 所見은 Fig 4. 에서 보는 마와 같이 上皮細胞層 以下에는 結合 組織이 弛緩하게 잘 發達되어 있으며, 드물게 圓型의 細胞들이 觀察되고 있는 正常 組織 所見을 나타내었다. 그러나 第 4分劃 物質을 塗布한 例에서는 Fig 5. 에서 보는 마와 같이 上皮細胞層 最上部에 角質層이 形成되어 있으며, 이 두터운 角質層(Fig 6. 參照) 사이에는 口과구 크기의 炎症細胞樣 細胞塊가 hematoxylin에 濃染되어 있었으며 (Fig 7. 參照), 이 細胞들은 얇은 膜에 의하여 外部와 上皮세포층과 區分되었고 (Fig 6. 參照), 이 部位의 上皮細胞層內 細胞는 炎症性細胞의 浸潤 部位가 있으며, 角質層 아래의 stratum lucidum 層사이에는 毛脂腺에서 빠져나 온 組織 파편들이 觀察되었다(Fig 7. 參照). 第 7分劃 物質을 塗布한 部位는 Fig 8. 에서 보는 마와 같이 脫毛되었으며, 이 部位의 組織學的의 觀察 所見은 上皮細胞層과 眞皮層에 심한 炎症性 所見이 觀察(Fig 9. 參照)되었으리

表皮層에는 上皮細胞 주위에는 melanin 色素의 沈着과 더불어 모낭과 毛脂腺 주위에는 炎症性 細胞의 浸潤이 있었으며, 眞皮層은 심한 空泡變性의 所見이 觀察되었다. 그리고 上皮細胞層 基礎膜內의 形態는 圓型 또는 장타원형의 核을 갖는 인렬의 細胞層으로 形成되었으며 (Fig 10. 參照), stratum granulosum細胞 주위에는 melanin 色素顆粒物質이 觀察되었으며, 이 같은 色素顆粒物質은 表皮쪽으로 갈수록 濃染되었으며 (Fig 10. 參照) 모낭주위의 腺組織은 破壞되어 正常的인 腺細胞 所見을 觀察할 수 없는 염증 소견을 초래하였다 (Fig 11. 參照).

第4 그리고 7分割 物質의 化學的 動靜: Column chromatography 하여 얻은 제4分割 物質을 chloroform에 溶解시켜 分光分析을 實施한 바 다음과 같은 結果를 얻었다. 즉, UV $\lambda_{max}(\epsilon)$ (in $CHCl_3$): 271.4 nm, 277.7nm NMR δ ppm(in $CDCl_3$): tri 7.1, dd 6.65, m 5.35, s 2.95, m 2.0, bro 2.0, m 1.3, m 0.9로서 이같은 자료는 Tom et al(1988)²과 Takeshi(1987)⁷의 보고 내용과 일치되는 bilobol 物質이었다.

그리고 제7分割 物質을 再結晶하여 Chloroform에 溶解하여, 分光分析을 實施 하였던 바, UV $\lambda_{max}(\epsilon)$ (in $CHCl_3$): 246.2nm, 313.2nm, NMR δ ppm(in $CDCl_3$): tri 7.4, dd 6.8, tri 5.35, bro 2.95, bro 2.0, m 1.27, m 0.85로서 측정되었으며, 이는 Tom et al(1988)²과 Takeshi(1987)⁷가 보고한 ginkgolic acid의 분석 자료와 동일하였다.

以上的 結果를 미루워 보아 國產 銀杏葉으로 抽出한 bilobol과 ginkgolic acid는 皮膚에 각기 다른 毒작용을 나타내었다. 즉, 第4分割의 bilobol은 주로 allergy樣 作用을 誘發시킬 수 있는 物質을 含有하고 있었으며, 皮膚表面에 炎症 細胞와 같은 未知의 細胞塊를 가져오는 毒작용을 나타내었다. 그리고 ginkgolic acid는 毛脂腺, 모낭과 그 주위 組織에 炎症을 誘發시켜, 脫毛를 가져오는 炎症性 毒작용을 초래하였다.

考 察

銀杏나무는 地球上에서 가장 오래된 나무이고, 그 壽命은 千年 이상이 된다. 이는 都市의 스모그, 病害蟲에 대하여 가장 抵抗性이 높으며 休息 空間의 樹木이나 街路樹로서의 人氣가 높다. 空氣汚染에 抵抗力이 강하며, 他 種의 나무들이 被害를 입고 있는 地域에서도 잘 자라며 열매는 食用되어 왔다.^{4,5,8,9} 이와 같이 細菌, 곰팡이 또는 昆蟲 등과 같이 生物體에 毒性作用이 있기 때문에 生命을 오랫동안 維持할 수 있었다.¹⁰

우리나라에 分布되어 있는 銀杏나무는 Ginkgoaceae 科에 속하는 *Ginkgo biloba* L.로서 그 葉과 果實의 藥理作用은 利尿劑, 心臟 興奮劑, 抗結核劑, 慢性 肺氣管炎치료제, 血清 cholesterol值的 低下劑와 冠狀動脈 擴張劑, 狹心症의 緩和劑 등 광범위한 藥效를 갖고 있다.^{4,5,8,9} 또한 家兔의 腸管 마비, 子宮 收縮, 血壓 降下, 毛細血管 透過性 항진, histamine성 浮腫과 anaphylaxis, 浮腫, 그리고 接觸性 皮膚 毒性등이 毒작용으로 알려져 있다.^{2,3} 銀杏葉의 mouse에 對한 LD₅₀은 761mg/kg으로 有害하지 않지만 銀杏葉을 接觸 또는 果實을 먹으므로써 皮膚 炎症이나 allergy가 發生된 例를 想記하건데 接觸性 皮膚毒性에 對한 研究가 必要하다. 일찌기 Becker et al(1975)³는 銀杏 열매를 먹은 63세의 人에서 口盾炎, 口內炎, 그리고 항문 소양증 등의 allergy性 皮膚 炎症을 觀察, 이의 allergen으로서 役割을 報告한 바 있다.

銀杏 열매나 잎을 接觸 하거나 섭취 하므로써 일어나는 皮膚의 副作用은 주로 紅斑, 浮腫 그리고 水泡 形成과 더불어 강한 소양감이며, 이는 接觸 후 7日 내지 10日 이면 消失되지만 은행잎을 職業的으로 工場의 作業夫나, 이같은 allergy 誘發 物質을 除去하지 않고 의약품으로서 사용하고자하는 사람에게 危害를 가져올 수 있을 것이다.

은행잎을 職業的으로 취급하는 사람에게 발병하는 接觸性 職業病에 대한 관심은 他 農產物에 의한 직업 병에서의와 같이 우리나라에서는 큰 관심이 없었지만 미국 통계에 의하면¹¹ 1973~1984년에 있어서 職業性皮膚病의 發生은 農夫와 工場 作業者에서 주로 發生하며, 그 중에서도 農產物 즉 穀食 生産者가 가장 많고 林業, 가죽製品 取扱者 등의 順으로서 銀杏나무와 같은 林產物에 의한 皮膚病 發生 可能性이 높을 것으로 판단하건데, 植物性 醫藥品의 製造시에는 毒作用 物質에 對한 各별한 注意가 要求된다. 이 같은 皮膚病에 의한 損失은 주로 生産性 損失, 治療費, 月給의 減少 등인데 이는 약 數 10億 弗에 該當하는 것으로 報告되고 있다.¹¹

本 研究에서는 醫藥品의 製造 目的으로 銀杏葉을 職業的으로 取扱하는 人에서 皮膚에 接觸性 皮膚炎症勢(겨드랑이나 요대부에 가려움증 등)를 呼訴하고 있는 바, 國產 銀杏葉이 含有하고 있는 毒性物質에 대한 知識이 있어야 할 것으로 思料되어 實驗 動物을 이용한 毒性誘發 物質 糾明을 위한 實驗을 하였다. 즉 토끼의 皮膚에 抽出物質을 塗布한 바, 毒性에 의한 귀의 肉眼的 變化가 觀察되어, 이의 毒作用 物質을 化學的으로 糾明하고자 silica gel column chromatography하여 얻은 9個의 分割 物質을 3回 塗布한 後, 接觸 部位를

肉眼 및 病理組織學的으로 觀察하였던 바, 第4 및 7 分劃에서 各 各 다른 형태의 接觸性 皮膚 炎症 症勢를 觀察 하였다. 이들 두개의 分劃物質의 純粹精製 過程을 거쳐 얻은 分劃 4와 7 物質을 分光 分析 하였던 바 第4 分劃은 bilobol, 第7 分劃 物質은 ginkgolic acid 임이 確認 되었다. bilobol을 도포한 후 塗布 24時間 이후부터 表皮에 參出物이 형성되어 硝子樣 物質 變化는 時間이 經過 함에 따라서 堅固한 角質層을 形成하였을 뿐만아니라, 組織學的인 觀察所見(Fig 7 參照)에서 觀察되었던 바와 같이 表皮 上皮細胞層의 肥厚를 가져왔다. Ginkgolic acid를 1일 3회의 塗布에도 불구하고 달오와 같은 심한 皮膚 炎症所見을 招來하여(Fig 8. 參照) 上皮層과 眞皮層의 組織 所見(Fig 9, 11 參照)에서 보는 바와 같이 모낭선 주위 組織의 炎症所見과 더불어 眞皮層의 空泡 變性を 誘發시키고 있음과 모낭주위의 심한 炎症 細胞의 浸潤을 확인할 수 있었다.

國產 銀杏葉내의 接觸性 毒性 物質 含量은 銀杏葉 抽出物質 100gm에 第4 및 7분획에 該當되는 量만도 모두 238.64mg (0.23%)을 차지함을 고려하건데, 醫藥品으로서의 開發 研究에서의 이들 物質의 完全 除去는 絕對的으로 必要할 것이며, 더욱이 第4 分劃 物質의 塗布 部位에서 觀察되었던 未知의 炎症 細胞性 細胞塊는 아마 allergy에 의해서 형성된 것으로 추측되어 앞으로 이의 allergy 誘發에 대한 研究는 免疫 細胞學的으로 이루어져야 할 점이라 사료된다.

皮膚에 存在하는 上皮細胞, 肥滿細胞, keratinocyte, stratum granulosum, melanocyte, Langerhans cell 중에서¹², 肥滿細胞는 外部 接觸性 物質에 의한 防禦 기전의 一環으로 histamine 物質을 分泌하여 局所 部位의 腫脹을 誘發하고 있는 점과 銀杏葉 抽出 物質을 하루에 1회씩 3日間の 塗布만으로도 제 4와 7分劃 物質은 肉眼的으로 관찰할 수 있는 病變 所見을 가져왔었던 점을 감안하던 銀杏葉으로 부터 抽出한 物質은 대단히 강한 allergen인 것으로 思料되는 바이다.

第4 分劃을 塗布하였을 때 Fig 5, 6, 7에서 보는 바와 같이 두터운 角質層의 形成과 hematoxylin에 濃染되는 炎症 細胞 크기의 物質塊가 角質層 사이에 蓄積되었는데, 이들 細胞性 物質의 正體를 有感스럽게도 說明할 수 없었지만 이는 아마도 細胞의 代謝障礙에 의한 keratinocyte의 役割 異狀 또는 肥滿 細胞의 異狀 物質의 分泌 등의 起因 與否는 앞으로 더욱 研究되어야 할 것이다.

皮膚의 防禦免疫과 角質化 役割은 keratinocytes가 外部로부터 紫外線과 같은 刺戟을 받으면 그 數가 減

少되며 皮膚 發癌의 promoter로서 作用하며, 또한 melanin 生成에 있어 刺戟이 加해지면 이 또한 發癌性 光化合物質(carcinogenic photoproduct)이 形成되어 皮膚의 Langerhans cell의 消失과 直接關係가 있다는 免疫學的 研究主張이 있다.^{13, 14} Wilhelm et al (1990)¹⁵은 一般的으로 皮膚 毒性試驗에 使用되고 있는 sodium lauryl sulphate(SDS)을 皮膚角質層에 塗布 후, dansyl chloride fluorescene染色 方法으로¹⁶ 上皮細胞의 角質化에 達하는 時間을 측정하였던 바, 물을 마른 對照群은 19.3±0.8일, SDS를 塗布하면 10.9±0.6일로서 有意的(p<0.0001)으로 빠르게 毒작용이 나타난다고 하여 皮膚 표피 세포에 대한 외부 작용 物質에 대한 민감한 반응 시험 결과를 보고한 바 있다.

銀杏 果實로부터 接觸性 皮膚炎症 症狀을 Becker et al(1975)⁹는 3 例를 觀察 報告 하였다. 즉 첫번째 예는 陰莖 包皮가 腫脹된 男子 例와 25세의 女子(韓國에서 接觸性 皮膚 炎症의 前歴 있음.)로서 얼굴에 濕疹을 가져 왔지만, 그 女子는 *Rhus verniciifloa*에 接觸하여 심한 發赤을 일으킨 적이 있다고 하였다. 은행 열매를 볶아서 먹었더니, 팔에 작열감과 紅斑, 小水泡症, 2日後부터 皮膚炎症 狀態가 얼굴, 목, 허벅지 등에서 일어났으며, 4日 後에는 더욱 進行되어 소양성 수포가 發生, corticosteroid를 服用시켜 治療하였다.

2번째 예는 36세인 男子로서 陰莖 包皮의 심한 炎症을 呼訴하였는데, 이는 銀杏열매를 만진 바로 이튿날부터 發生, corticosteroid를 使用 治療하였다. 3번째 예는 33세의 婦人 例로서, 銀杏열매를 만지고 먹고 있었는데, 팔에 接觸性 皮膚炎의 誘發을 報告하고 있어 銀杏葉의 接觸性 皮膚 炎症에 대한 국내에서의 연구 필요성이 증대되고 있다.

오늘날 표피성 cytokine은 皮膚의 炎症과 免疫 反應에 있어서 重要的 役割을 하는 데 표피의 여러 細胞들은 cytokine을 分泌하는 能力이 있는데, keratinocytes, Langerhans cell, melacocytes 그리고 Merkle cell 등이 관련하고 있다. 이중 keratinocytes 細胞는 cytokine의 分泌에 있어서 가장 重要的 供給源이 되고 있다. 그런데 표피세포나 棘皮세포에서 분비되는 cytokine은 keratinocytes 特異 receptor가 있어 cytokine生産의 主要한 調整 役割을 하는데, 生體內에서의 cytokine의 生産 分비는 UV 照射¹⁷, 細菌性 enterotoxin, 醫藥品¹⁸ 또는 staphylococcus toxin 등은 棘皮구나 keratinocyte와 같은 비棘皮구성 細胞에 자극을 가하여, cytokine을 분비하도록 誘導하여 浸入한 微生物의 破壞를 위하여 炎症性細胞의 出現을 積極 誘導한다.^{18, 19}

銀杏 나무에 존재하는 物質은 다양하다. 즉 葉이나 果實에 含有되어 있는 物質을 보면, ginkgetin, quercetin, camphenol, sorhamnetin, kaempferol, sitotoxin, bilobol(C₂₁H₃₄O₂), ginkgolic acid(C₂₁H₃₂O₃), inketin(C₃₂H₂₂O₃), ginnol, D-sesamin(C₂₀H₁₈O₆), bilobanone(C₁₈H₂₀O₂), oxalic acid, malic acid, vanilic acid, phydroxybenzoic acid, 6-pentade ceryl salicylic acid, 6-heptaderenyl salicylic acid, anacardic acid, cardanols, 6-HKA 그리고 昆蟲의 成長을 抑制하는 2-hexenal이 報告되어 있다.^{5,6,8,11,21} 또한 곰팡이 (*Monilinia fructicala*)는 銀杏나무에 전혀 侵入하지 못하는데 이는 hydroxyl lactone 때문이며, 이는 乾燥 銀杏葉가루를 acetone과 ether로 抽出하여, chloroform으로 다시 抽出한 物質을 IR로 分析하였던 바, C₂₀H₂₄O₁₀와 C₂₁H₁₄O₁₀의 分子式을 갖고 있는 hydroxyl lactone이라고 하였다.¹ 이 밖에도 抗菌성과 抗곰팡이 作用이 있으며 이의 作用 物質로서 ginkgolic acid, hydrogingkolic acid, bilobol, ginnol, paragin, ginkgetin 그리고 tannic acid 등이 報告되었다.²⁰

本 研究에서 銀杏葉 抽出 物質로 부터 column chromatography하여 分割 方法으로 單離된 bilibol과 ginkgolic acid 物質을 接觸性 皮膚炎 誘發 試驗을 하였던 바, 생체내에서 각기 다른 毒性을 관찰하였으며, 이들 物質에 대한 角質化 作用과 未知의 細胞性 物質의 삼출 경위 그리고 모낭과 그 주위의 퇴행성 병변 등에 대한 보다 綿密한 細胞免疫學的 연구가 이루어져야 할 분야라고 사료되는 바이다.

끝으로 오는 날 銀杏葉으로부터 抽出한 物質이 血液 순환 改善劑, 皮膚 美容劑 등의 目的으로 널리 活用

되고 있음을 감안하면 국민 보건 향상의 측면에서 이들 毒作用 物質의 정체에 대한 正確한 把握과 이 毒性 物質은 화학적 지식을 근거로한 철저한 除去가 이루어져야 함을 본 실험 결과에 바탕을 두어 強調하고자 한다.

結 論

우리나라에서 銀杏葉이 醫藥品으로의 活用 必要가 증대되고 있으나, 이 銀杏葉이 含有하고 있는 毒性 物質에 대한 研究는 미흡하며, 銀杏葉을 取扱하고 있는 사람에서 皮膚 毒作用을 呼訴하고 있는 바, 銀杏葉 粉末을 chloroform으로 抽出 한 다음, 다시 benzene/acetone으로 column chromatography하여 9개의 分割 物質을 얻어 實驗의으로 家兎의 귀 皮膚에 接觸시켰던 바, 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

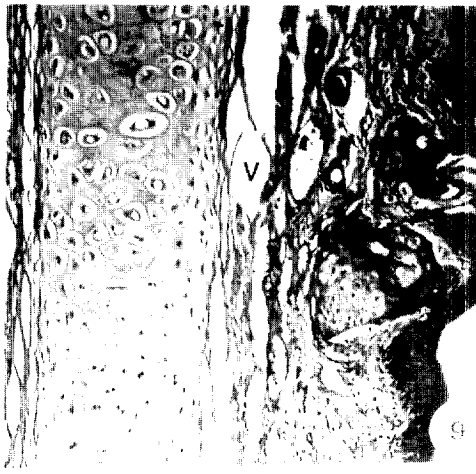
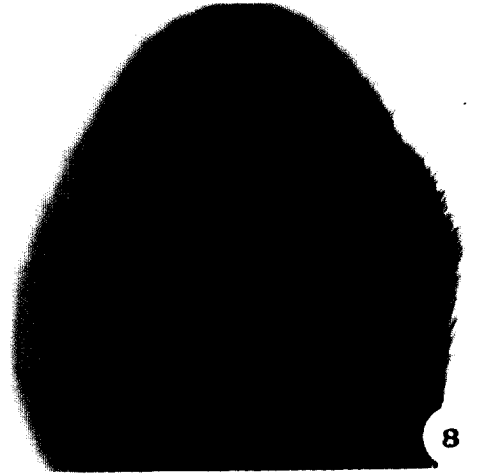
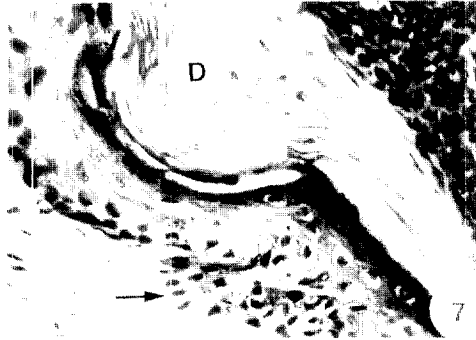
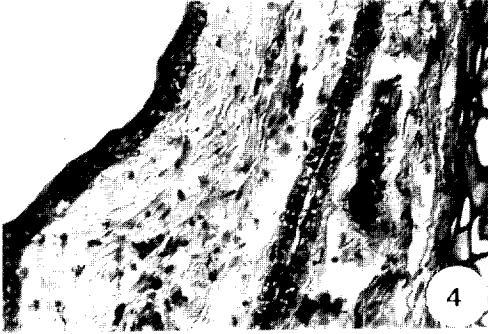
1. 國產 銀杏葉 粉末內的 hexane 溶媒 抽出 物質의 接觸部位에 發赤, 腫脹, 脫毛 등의 所見을 誘發시키는 物質을 分離할 수 있으며, benzene : acetone/98~93:2~7% 溶媒를 利用한 silica gel column chromatography에서 9개의 分割 物質을 얻었다.

2. 各 分割 物質 별로 皮膚에 接觸시켰던 바, 第1 分割의 塗布 初期에 약간의 발적과 동시에 腫脹이 觀察되었지만, 第3 分割 物質에서는 接觸 12 時間 後 부터 皮膚의 發赤과 동시에 腫脹이 132時間 이상 維持하였다. 第2,5,6,8 그리고 9 分割에서 發赤이나 腫脹 毒性作用을 觀察 할 수 없었다.

3. 9개의 分割 物質 중에서 第4 分割에서는 皮膚에 腫脹과 硝子樣 變性を 야기시키었는데 이는 bilibol이

Legend for figures

- Fig 4.** Light micrograph showing the normal epidermis of rabbit's ear skin. ×200.
- Fig 5.** The layer of the epidermis was shown very thick and an uncertain inflammatory cells(→) was accumulated within the stratum corneum in the 4th fraction from *Ginkgo* leaves. ×100.
- Fig 6.** A dark unknown cell like inflammatory cell (→) was stained with hematoxylin in the stratum corneum in the 4th fraction from *Ginkgo* leaves. ×200.
- Fig 7.** Round cells(→) are infiltrated adjacent stratum granulosum and observed the debris(D) of gland of rabbit's ear contacted with the 4th fraction from *Ginkgo* leaves extracts.
- Fig 8.** Loss of hair at surface of ear contacted with the 4th fraction of extracts from *Ginkgo* leaves.
- Fig 9.** Vacuolar(V) degeneration of the layer of dermis in rabbit's ear contacted with the 7th fraction from *Ginkgo* leaves extract. Destruction of sebaceous gland and follicle of hair were observed. ×100.
- Fig 10.** Melanin pigment around stratum granulosum of the stratum basal and the infiltration of round cells were observed. ×400.
- Fig 11.** The follicle of hair have degenerated with the contacts of the 7th fraction, and inflammatory cells were infiltrated around the root hair. ×400.



었으며, 第7分劃 物質에서는 모낭선과 주위 組織에 심한 炎症細胞의 浸潤과 모낭과 腺 주위 組織의 破壞에 의한 脫毛 現狀을 招來하였는데 이는 ginkgolic acid로서 규명되었다.

4. 獨逸産 蠟燭劑의 hexane 抽出물을 가토의 귀에 塗布한 마, 發赤, 腫脹 등의 소견이 觀察되었다.

參 考 文 獻

1. Major RT. The ginkgo, the most ancient living tree. *Science* 1967;157:1270~1273.
2. Tomb RR, Foussereal J and Sell Y. Mini-epidemic of contact dermatitis from ginkgo tree fruit(Ginkgo biloba L). *Contact Dermatitis* 1988; 19:281~283.
3. Becker MLE, Skipworth CGB. Ginkgo-tree dermatitis, stomatitis, and proctitis. *JAMA* 1975; 231(11):1162~1163.
4. 한태섭, Allergy를 誘發하는 生藥. 一銀杏을 中心으로—. 약학회지 1975;19:79-86.
5. 광천서점, 약용식물대사전 1963;30.
6. 육창수, 아카데미 출판사. 한국약품 식물 도감. 1989;31.
7. Takeshi M. Isolation of flavone glycosides from *Ginkgo biloba*. *Jpn Kokakkyo, Pat. No.* 87292794. 1987.
8. 소강신의학원편. 중약대사전. 상해 과학기술출판사 1977;684-685.
9. 육창수, 김성만, 정율모 등. 한약의 약리, 성분, 임상 응용. 계유문화사 1982;793-794.
10. Major RT, Marchini P, Boulton AJ. Observations on the production of α -Hexenal by leaves of certain plants. *J Biol Chem* 1963;238(5): 1813-1816.
11. Mathias CG, Morrison JH. Occupational skin diseases, Unites Statcs. Results from the Bureau of Labor Statistics Annual Survey of occupational injuries and illness, 1973 through 1984. *Arch Dermatol* 1988;124(10):1519-1524.
12. Ross MH, Reith EJ, Histology: Harper and Row. Lippincott. 1985;338-358.
13. Thiers BH, Maize JC, Spicer SS et al. The effect of aging and chronic sun exposure on human Langerhans cell populations. *J Invest Dermatol* 1984;82:223~226.
14. Gilchrest BA, Murphy GF, Soter NA. Effects of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cell in human skin. *J Invest Dermatol* 1982;79:85~88.
15. Wilhelm KP, Saunders JC, Maibach HI. Increased stratum corneum turnover induced by sub-clinical irritant dermatitis. *British Journal of Dermatology* 1990;122:793~798.
16. Takahashi M, Machida Y, Marks R. Measurement of turnover time in stratum corneum using dansyl chloride fluorocscenc. *J Soc Cos Chem* 1987;38:321~331.
17. Pham MA, Magdalou J, Siest G et al. Reconstituted epidermis: A novel model for the study of drug metabolism in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1990;94:749-752.
18. Kupper TS. Interleukin I and other human keratinocyte cytokine: Molecular and functional characterization. *Adv Dermatol* 1988;293~301.
19. Choi KL, Sauder DN. The role of Langerhans cells and keratinocytes in epidermal immunity. *J Leuk Biol* 1986;39:343~358.
20. Nasr C, Haag-Barrurier M, Lobstein A, et al. Kaempferol coumaroyl glucorhamnoside from *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry* 1986;25(3):770-771.