

藥鍼用 蜂毒液의 局所毒性試驗에 關한 研究

李宗錫*, 高炯均**, 金昌煥**

ABSTRACT

A Study on Local Irritation Test of Bee Venom for Herb-Acupuncture

Jong Seok Lee,* Hyung Kyun Koh,** Chang Hwan Kim,** O.M.D.,Ph.D.

Pursuant to the Medical Product Safety Administration Guidelines for safety assessment of Korean bee venom for herb-acupuncture, rabbits were used for skin, eye balls, subcutaneous and muscle irritation test.

The results were as follows;

1. The skin irritation test of bee venom for herb-acupuncture did not produce any irritation reactions, when the skin was covered with bee venom.
2. The eye irritation test produced moderate to severe stimulating reactions, once the eye mucous membrane was contacted with bee venom.
3. The subcutaneous and muscle irritation test of bee venom showed such local inflammatory reactions as death of cells, infiltration of inflamed cells, dropsical swelling, and congestion, once injected under the skin and in the muscle.

*:李宗錫 韓醫院

** : 慶熙大學校 韓醫科大學 鍼灸學教室

As the results of the study on bee venom for herb-acupuncture indicate that severe reactions in such tests as eye balls, subcutaneous and muscle irritation exist in the laboratory, more professional caution should be taken in clinical application of the therapy. In addition, further study on subacute, chronic toxicity and allergy reactions should be pursued.

KEY WORD: bee venom, skin irritation test, eye irritation test, subcutaneous and muscle irritation test

I. 緒論

蜂鍼療法는 經絡學說의 原理에 의하여 꿀벌의 毒囊에 들어있는 蜂毒을 抽出, 加工하거나 또는 蜂鍼을 직접 疾病과 有關한 穴位, 壓痛點 혹은 體表의 觸診으로 얻어진 陽性反應點에 注入하여 刺鍼效果 및 蜂毒의 生化學的 特異物質을 동시에 利用하여, 生體의 機能을 調整하고, 病理狀態를 改善시켜 疾病을 治療하고, 豫防하는 藥鍼療法^{3,6,21)}의 一種이다.

蜂毒은 그 性味²²⁾가 苦,辛,平하고, 主要作用은 强壯, 鎮靜, 平喘, 祛風濕, 鎮痛, 抗炎, 神經毒, 免疫, 抗癌, 아드레날린분비 촉진 및 임파세포와 적혈구의 再生과 增加作用^{1,22,24,26)} 등이 있으며, 適應症으로는 筋肉痛, 急·慢性關節炎, 神經痛, 痛風, 化膿性疾患, 高血壓, 류마티즘, 류마티스성 관절염, 皮膚病, 頭痛, 腰痛, 打撲傷^{1,20,22,23)} 등이 있다.

發表된 學界의 實驗 研究로는 抗炎¹⁶⁾, 鎮痛^{16,18)}, 解熱¹⁵⁾, 抗痙攣¹⁷⁾ 등이 報告되었으나, 蜂毒에 대한 過敏反應^{1,26,31,35,36,44,57,62)}으로 不安感, 두드러기, 가려움증, 嘔吐, 惡寒, 發熱, 痙攣, 泄瀉 등이 따를 수 있으며, 심한 心臟血管系 合併症 및 呼吸器障礙 등이 있을때에는 眩氣症, 低血壓, 失神, 呼吸困難, 氣道閉鎖 등의

부작용이 있으므로 臨床에 慎重을 기하여야 한다.

蜂毒에 대한 毒性^{27,30,35,49,54,55)}, 皮膚反應^{43,45,56,63)}, 角膜損傷^{46,61)}, 肝損傷⁵⁰⁾, Anaphylaxis^{31,36)}, Allergy^{30,42,44,57,59,62)}, 및 成分分析^{16,28,37,47,49,58)} 등의 報告가 있었으나, 韓國産 蜂毒液의 投與經路에 따른 安全性은 檢討는 急性毒性에 관한 報告¹⁶⁾ 뿐이었으므로, 이에 著者는 韓國産 蜂毒液을 "醫藥品등의 毒性試驗基準"^{6,8,10,12,14)}등에 따라 皮膚刺戟試驗, 眼粘膜刺戟試驗, 皮下 및 筋肉刺戟試驗을 實施한 結果 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 皮膚刺戟試驗

1) 材料 및 方法

(1) 試驗動物

삼육실험동물센터에서 분양받은 New Zealand White種 5-6 個月齡, 體重 2.0-2.5kg 의 수컷 토끼 8마리를 1週日間 實驗室 環境에 適應 시킨 후, 健康한 動物 6마리를 選定하여

使用하였다.

(2) 飼育環境

飼育 및 試驗期間동안 實驗室 環境은 溫度 $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, 相對溫度 $50\pm 10\%$, 換氣횟수 10-12회/hr., 螢光燈照明 12時間(07:00點燈, 19:00 消燈), 照度 150-200 Lux로 設定된 서울대학교 수의과대학 소동물 실험실에서 實施하였으며, 馴化 期間 및 試驗期間中에 토끼는 3단 飼育 箱子에 배열된 스테인레스 飼育箱子(420W×500D×310H mm, 명진기계.)에 個體別로 飼育하였고, 飼料은 토끼용 固形飼料(퓨리나 사료 Co.)와 飲水는 上水道水를 自由 攝取하였다.

(3) 投與量 및 試驗群의 構成

토끼는 모두 馴化期間중에 健康하다고 判定된 것을 選定하여 體重을 測定하였으며, 動物個體識別은 皮毛着色 마킹법과 tag표시법으로 하여 蜂毒液0.5ml를 塗布 하였다.

(4) 試驗方法

“醫藥品등의 毒性試驗基準”⁸⁾에 의하여 각 試驗動物의 頸背部에 약2.5×2.5cm 정도의 크기로 脊椎를 中心으로 左右 2區劃씩 設定하여 左側區劃은 無處置對照區劃으로 하고, 右側에는 試驗物質을 塗布하는 處置區劃으로 하여 擦過皮膚 2個所와 非擦過皮膚 2個所로 모두 4個所를 處置區劃 및 對照區劃으로 區分하였고, 試驗物質의 適用 24時間 前에 除毛를 실시하였다.(Fig.I)

投與方法은 皮膚擦過는 Hypodermic needle tip을 使用하였고, 試驗物質을動物 1마리當 臨床適用 濃度인 100:1로 稀釋하여 1ml(0.5ml/site)씩 投與部位에 1회 塗布하였으며, 無處置對照區劃에는 注射用 Saline液(중의

제약)을 塗布하였다. 塗布후 適用部位는 蒸發을 막기위해 가아제로 덮은 후 非刺戟性 테이프 로 잘 固定하여 24시간 適用시켰다. 適用期間 終了 後에는 注射用 Saline液을 利用하여 塗布部位를 가볍게 洗淨하여 주었다.

(5) 觀察 및 評價

① 一般症狀 및 斃死動物의 觀察

試驗物質 投與 後, 1週日間 매일 外觀, 飼料 및 飲水消費 狀態와 震顫, 痙攣, 流涎, 泄瀉, 昏睡狀態, 嗜眠, 瞳孔縮小 및 散瞳, 大便, 小便 등의 一般症狀과 斃死動物의 有無를 觀察하였다.

② 體重測定

모든 動物에 대하여 投與直前과 投與후, 剖檢日인 7일째(부검직전)에 體重計(Digital Computing Scale, HS-7000, Hana Co.)를 利用하여 測定하였다.

③ 剖檢 및 病理組織檢査

適用 後, 第7日째에 全身痲醉劑(thiopental sodium, 중의제약 Co.) 35mg/kg을 耳靜脈을 통해 注入하여 安樂死 시킨 後, 剖檢하여 肉眼의 으로 異常有無를 觀察하였다.

(6) 塗布部位의 皮膚反應 評價 및 刺戟性 判定

塗布部位의 皮膚反應의 評價는 “醫藥品등의 毒性試驗基準”⁸⁾을 利用하여 判定하였다. 또한, 皮膚에 대한 刺戟性的 程度判定은 一般的으로 많이 利用되는 Draize의 P.I.I.(Primary Irritation Index)의 算出方法^{2,33)}에 基準하였다. (Table I.)

2) 成績 및 結果

(1) 一般症狀 및 斃死率

試驗 全期間을 통하여 토끼에게 어떠한 臨床症狀의 變化 및 斃死動物도 觀察되지 않았

다.(Table II.& VI.)

(2) 體重變化

모든 토끼에서 適用 後 7일째의 體重은 塗布개시일의 體重과 比較하여 平均 약 67g의 體重增加를 보였는데, 이것은 일반적인 토끼의 體重增加이며, 試驗物質과 關聯하여 體重의 增加 또는 減少와 같은 變化는 認定되지 않았다.

(Table III.)

(3) 塗布部位의 觀察 및 刺戟率

塗布部位의 皮膚觀察은 全 動物에서 試驗物質 適用후, 1時間, 24時間, 48時間, 72時間 및 7일째에 각각 實施한 結果, 紅斑, 浮腫 및 痂皮形成은 전혀 觀察되지 아니하였고, 皮膚 1차 刺戟率(P.I.I.)을 算出한 結果 "0"이었으며, 또한 주사용Saline液을 投與한 無處置對照區劃에서의 皮膚反應의 結果도 全 動物에서 특이한 變化가 認定되지 않았다.(Table IV.)

(4) 病理組織 檢査 所見

本 試驗에서 使用된 全 動物을 試驗物質의 適用終了 後, 제 7일째에 剖檢한 結果, 試驗物質의 投與에 의한다고 생각되어지는 어떠한 病變도 觀察되지 않았다.(Table V.& VII.)

(피부반응의 판정)

- 홍반과 가피형성 등급
- 아주 가벼운 홍반 1
 - 분명한 홍반 2
 - 약간 심한 홍반 3
 - 심한 홍반과 가벼운 정도의 가피형성 4
 - 최고점 4

○ 부종 형성

- 부종이 전혀 없음 0
- 아주 가벼운 부종 1
- 가벼운 부종(변연부가 분명히 구분) 2
- 보통의 부종(약 1mm정도 부어올랐을 때) ... 3
- 심한 부종(1mm이상,노출주위 밖으로 확장) .. 4
- 최고점 4

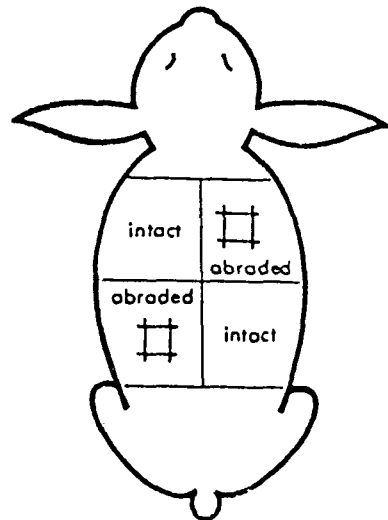


Fig. 1. Experimental region

Table I. Primary Irritation Index of Draize

P.I.I.*	Irritation
0.0 - 0.5	Non irritating
0.6 - 2.0	Mildly irritating
2.1 - 5.0	Moderately irritating
> 5.1	Severely irritating

*. P.I.I. : Primary Irritation Index

Table II. Mortality and Clinical Signs of Rabbits Treated with Bee Venom

Sex	No. of rabbits	Clinical signs	Mortality
Male	6	NAD*	0/6

* NAD : No abnormalities detected

Table III. Body Weight Changes of Rabbits Treated with Bee Venom. (unit: g)

Sex	No. of rabbits	Day of application		changes
		0 day	7 day	
Male	1	2,200	2,300	100
	2	2,150	2,250	100
	3	2,250	2,300	50
	4	2,150	2,250	100
	5	2,200	2,250	50
	6	2,150	2,200	50

Table IV. Results of Skin Reaction of Rabbits Treated with Bee Venom

Sites		Control site										Test site									
Change		Erythema, Eschar					Edema					Erythema, Eschar					Edema				
Phage(Time)		1	24	48	72	168	1	24	48	72	168	1	24	48	72	168	1	24	48	72	168
Ani. No	Sex																				
1	M.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	M.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3	M.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	M.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
5	M.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6	M.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Total Score		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Mean Score		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
P.I.I.*		○										○									

* P.I.I.: Primary Irritation Index, Sum of Mean Score/5

Table V. Autopsy Findings of Rabbits Treated with Bee Venom

Sex	No. of rabbits	Clinical signs
Male	6	NAD*

* NAD : No abnormalities detected.

Table VI. Mortality and Clinical Signs of Rabbits Treated with Bee Venom

Sex	No. of rabbits	Clinical sign							
		0	1	2	3	4	5	6	7 (day)
Male	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-

- : negative

Table VII. Autopsy Findings of Individual Rabbit Treated with Bee Venom

Sex	No. of rabbits	Findings
Male	1	NAD*
	2	NAD
	3	NAD
	4	NAD
	5	NAD
	6	NAD

* NAD : No abnormalities detected

2. 眼粘膜炎刺戟試驗

1) 材料 및 方法

(1) 試驗動物

삼육실험동물센터에서 分讓받은 3-4個月齡

의 New Zealand White種 수컷 토끼 12마리를 snuffle, ear mite, coccidium 感染與否, 皮毛異常有無 및 排便狀態 등을 調査하고, 動物檢疫과 實驗室 環境에 1週日間 適應시킨 후, 健康하고 異常없는 토끼 9마리(體重 2.0-3.0kg)를 選別하여 使用하였다.

(2) 飼育環境

馴化期間 및 試驗期間동안 實驗室環境은 溫度 20±3℃, 相對濕度 50±5%, 換氣회수 10-12回/hr., 螢光燈照明 12時間(07:00 點燈, 19:00 消燈), 照度 150-200Lux로 設定된 서울대학교 수의과대학 소동물실험실에서 實施되었으며, 馴化期間 및 試驗期間 중에 토끼는 3단 飼育箱子대에 배열된 스테인레스 飼育箱子(420W×500D×310H mm, 명진기계.)에 個體別로 3마리씩 수용하고, 토끼용 固形飼料(푸리나사료 Co.)와 上水道水를 自由 攝取시켰다. 飼育箱子에는 試驗番號, 動物番號등을 기입한 tag를 붙였다.

(3) 試驗群의 構成과 投與方法

“醫藥品 등의 毒性試驗基準”등^{2,8)}에 準하였고, 試驗物質 投與 24時間 前에 眼檢査를 實施하여 眼球損傷 및 角膜의 損傷有無를 確認하고 損傷이 없는 토끼 9마리를 選定하여, 試驗物質 100:1로 稀釋된 臨床適用 濃度 0.1ml를 모든 9마리의 토끼 오른쪽 눈의 下眼瞼을 眼球로부터 멀리 당기어 cup을 形成시킨 후, 眼粘膜炎에 點滴하여 1회 投與하고, 眼瞼을 1초동안 감기게 한 다음, 그 중 3마리는 20-30초 후에 微溫한 saline液으로 1분간 洗滌하여 주고, 나머지 6마리는 洗滌하여 주지 않았다. 檢體를 投與하지 않은 왼쪽 눈은 對照群으로 하

였다.

(4) 觀察 및 評價

試驗物質 投與 後, 1時間, 제 1,2,3,4 및 7日 에 洗滌群 및 非洗滌群 모두의 眼球를 檢査하고, 投與하지 않은 다른쪽 눈을 對照群으로 하

여, 角膜, 虹彩, 結膜에 대한 眼球病變의 評點을 국립안전연구원 예규에 나와 있는 “眼球病變의 等級表” 및 “眼粘膜 刺戟表”의 評價基準^{2,14)}에 따라 算出하였다.

(안구 병변의 등급표)

(1) 각막

- | | |
|--|----|
| (A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함) | 등급 |
| ○ 화농이나 혼탁이 없음 | 0 |
| ○ 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있음(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨 | 1 |
| ○ 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함 | 2 |
| ○ 진주색깔을 나타냄. 홍채의 말단이 관찰 안됨. 동공의 크기가 가까스로 관찰됨 | 3 |
| ○ 각막이 불투명(혼탁때문에 홍채가 관찰 안됨) | 4 |

(B) 혼탁된 각막의 범위

- | | |
|---------------------------|---|
| ○ 1/4이하(그러나 0은 아니다) | 0 |
| ○ 1/4이상 1/2미만 | 1 |
| ○ 1/2이상 3/4미만 | 2 |
| ○ 3/4이상 1까지 | 3 |

* $A \times B \times 5$ 최대치 = 80

(2) 홍채

(A) 반응치

- | | |
|---|---|
| ○ 정상 | 0 |
| ○ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막주위에 중등도의 충혈, 이상과 같은 단독 혹은 혼합. 홍채는 빛에 대해 반응함 (둔한 반응은 양성) | 1 |
| ○ 빛에 대해 반응 없음. 충혈. 대부분 파괴 (이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부) | 2 |

* $A \times 5$ 최대치 = 10

(3) 결막

(A) 발적(안검결막, 안구결막에 한함. 결막, 홍채 제외)

- 혈관은 정상 0
- 몇몇 혈관은 명확히 충혈 1
- 넓은 심홍색 색조, 각각의 혈관은 쉽게 관찰 안됨 2
- 얇은 선홍색 3

(B) 결막부종

- 부풀지 않음 0
- 정상보다 약간 종창(瞬膜 포함) 1
- 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창 2
- 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 종창 3
- 눈이 반 이상 잠길 정도의 종창 4

(C) 배출물

- 배출물 없음 0
- 약간의 배출물(정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은양 제외) 1
- ① 속눈섭과 눈꺼풀을 적시는 배출물 2
- 눈주위의 상당부위와 속눈섭과 눈꺼풀을 적시는 배출물 3

* 점수(A + B + C) × 2 최대치=20

(안점막 자극표)

평가구분	평 가 치		
	A.O.I.	M.O.I.	Day-7 I.O.I.
무자극물	0 - 5	0 (48시간후)	
경도자극물	5 - 15	≤5 (48시간후)	
자극물	15 - 30	≤5 (4일후)	
중등도자극물	30 - 60	≤20 (7일후)	≤30 (6마리토끼 전부) ≤10 (6마리중 4마리이상)
중강도자극물	60 - 80	≤40 (7일후)	≤60 (6마리토끼 전부) ≤30 (6마리중 4마리이상)
강도자극물	80 - 100		

M.O.I.(Mean Ocular Irritation Index) : (각 마리마다의 총계의 합)/(마리수)

A.O.I.(Acute Ocular Irritation Index) : 관찰기간중 M.O.I.의 최대치

Day-7 I.O.I.(Individual Ocular Irritation Index) : 7일째의 각 동물의 득점

2) 成績 및 結果

檢體投與 後 1時間 부터 심한 淚漏 및 眼 臉의 腫脹, 充血을 觀察할 수 있었으며, M.O.I. 는 36.3정도로 비교적 낮은 數値를 보이고 있으나, 1日 後 부터는 腫脹이나 淚漏는 減少 하였으나 심한 角膜의 混濁과 虹彩의 異常을 觀察할 수 있었고, M.O.I는 87.5로 이 試驗에서 가장 높은 數値를 보이고 있다. 이러한 症狀 은 投與 3日을 頂點으로 M.O.I는 87.5로 역시 같은 數値를 보였으나 그 이후는 점차 緩和되

어 7日째에 와서는 상당히 輕減되어 57.7로 타 나났다. 14日경에는 表로 提示하지는 않았지만 다소의 角膜混濁만이 觀察되어 상당히 自然治愈 되었음을 觀察할 수 있었다. 그 結果 眼粘膜에 대해서는 中強度 刺戟物 내지 強度 刺戟物로 判斷되고, 30초 後 洗眼한 경우도 中 等度 刺戟物로 判斷되었다. 따라서, 蜂毒은 眼 粘膜에 刺戟性이 매우 심한것으로 思慮된다.(Table I.- VI.)

Table I. Eye Irritation Test Treated with Bee Venom in Rabbits

Test Group				(After 1 Hour)
Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	5	10	20	35
2	10	10	20	40
3	5	10	20	35
4	10	5	20	35
5	10	10	18	38
6	5	10	20	35
M.O.I.				218/6=36.3

Control Group : Eyewashed with Saline Solution

Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	5	5	20	30
2	5	5	18	28
3	5	5	20	30
M.O.I.				88/3=29.3

Table II. Eye Irritation Test Treated with Bee Venom in Rabbits

Test Group				(After 1day)
Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	60	10	20	90
2	60	10	16	86
3	60	10	20	90
4	60	5	18	83
5	60	10	18	88
6	60	10	18	88
M.O.I.				525/6=87.5

Control Group : Eyewashed with Saline Solution

Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	45	5	16	66
2	45	5	14	64
3	40	5	18	63
M.O.I.				193/3=64.3

Table III. Eye Irritation Test Treated with Bee Venom in Rabbits

Test Group				(After 2days)
Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	60	10	20	90
2	60	10	18	88
3	60	10	20	90
4	60	5	18	83
5	60	10	16	86
6	60	10	18	88
M.O.I.				525/6=87.5

Control Group : Eyewashed with Saline Solution

Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	45	5	16	66
2	45	5	14	64
3	40	5	18	63
M.O.I.				193/3=64.3

Table IV. Eye Irritation Test Treated with Bee Venom in Rabbits

Test Group	(After 3days)			
Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	60	10	18	88
2	60	10	16	86
3	60	5	18	83
4	60	5	18	83
5	60	10	14	84
6	45	5	18	68
M.O.I.				492/6=82

Control Group : Eyewashed with Saline Solution

Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	45	5	16	66
2	40	5	14	59
3	30	5	18	53
M.O.I.				178/3=59.3

Table V. Eye Irritation Test Treated with Bee Venom in Rabbits

Test Group		(After 4days)		
Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	45	5	14	64
2	45	5	14	64
3	45	5	16	66
4	45	5	14	64
5	45	5	12	62
6	45	5	14	64
M.O.I.				384/6=64

Control Group : Eyewashed with Saline Solution

Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	40	5	12	57
2	30	5	12	47
3	30	5	14	49
M.O.I.				153/3=51

Table VI. Eye Irritation Test Treated with Bee Venom in Rabbits

Test Group		(After 7days)		
Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	45	5	10	60
2	40	5	12	57
3	45	5	10	60
4	35	5	12	52
5	40	5	10	55
6	45	5	12	62
M.O.I.				346/6=57.7

Control Group : Eyewashed with Saline Solution

Rabbit No.	Cornea sum (A×B×5)	Iris sum (A×5)	Conjunctiva sum (A+B+C)×2	Total(Max. 110)
1	30	5	10	45
2	20	5	8	33
3	10	5	10	25
M.O.I.	103/3=34.3			

3 皮下 및 筋肉刺戟試驗

1) 材料 및 方法

(1) 試驗動物

New Zealand White種 수컷 토끼 (5-6個月齡, 2.0-3.0kg) 15마리를 삼육실험동물 연구센터에서 供給받아 1週日間 試驗이 實施되는 實驗室에서 馴化시킨 다음, 馴化期間 중 一般狀態를 觀察하여 健康한 토끼 12마리를 試驗에 使用하였다. 群分離는 平均體重을 維持하기 위하여 無作爲法으로 하였으며, 個體識別은 皮毛着色 마킹법과 飼育箱子別 tag표시법을 利用하였다.

(2) 飼育環境

馴化期間 및 試驗期間동안 實驗室環境은 溫度 20±3℃, 相對濕度 50±5%, 換氣回數 10-12회/hr., 螢光燈照明 12時間(07:00 點燈, 19:00 消燈), 照度 150-200Lux로 設定된 서울대학교 수의과대학 소동물실험실에서 實施되었으며, 馴化期間 및 試驗期間 중에 토끼는 3단 飼育箱子대에 配列된 스테인레스 飼育箱子 (420W×500D×310H mm, 명진기계.)에 個體別로 3마리씩 收容하고, 토끼용 固形飼料(퓨리

나사료 Co.)와 上水道水를 自由 攝取시켰다. 飼育箱子에는 試驗番號, 動物番號등을 기입한 tag를 붙였다.

(3) 投與量 및 投與方法

試驗物質 適用 約 24時間前에 除毛를 實施한 後, 脊椎를 中心으로 2個所로 나누어 左側은 生理食鹽液을 皮下로 0.2ml를 注射하여 對照로 하고, 右側은 같은 部位에 蜂毒을 0.2ml를 注射한다. 또한, 筋肉刺戟은 左側다리의 臀部에 生理食鹽液을 0.2ml 注射하여 對照로 하고, 右側다리의 臀部에 蜂毒을 臨床濃度인 100:1로 稀釋하여 臨床投與量인 0.2ml씩 筋肉, 皮下 모두投與한다.

(4) 試驗群의 構成

수컷 6마리를 利用하여 2個群으로 나누고, 第 1群의 各 動物의 背部에 約 2.5×2.5cm程度의 크기로 脊椎를 中心으로 左右 2區劃씩 設定하여, 左側區劃은 對照區劃으로 하고, 右側區劃에는 試驗物質을 皮下 注射하는 處置區劃으로 한다. 第 2群은 左側臀部를 生理食鹽으로 處置를 한 對照로 하고, 右側臀部에 蜂毒을 筋肉注射한다.(Table I)

(5) 觀察 및 評價

① 臨床症狀

試驗物質 投與 後 1週日間 每日 外觀, 飼料 및 飲水消費狀態와 臨床症狀등에 대하여 觀察 하였다.

② 體重測定

投與時 및 適用 後, 第 2, 7日째(剖檢直前)에 各各 測定하였다.

③ 剖檢

適用 後, 第 2, 7日째에 全身麻酔劑 (thiopental sodium, 중외제약 Co.) 35mg/kg 을 耳靜脈을 통해 注入하여 安樂死를 시킨 後, 剖檢하여 肉眼的으로 異常有無를 觀察하였다.

④ 組織 病理學的 觀察

一般 組織病理學的인 方法에 의해 파라핀 포매를 거쳐 4um로 잘라 hematoxylin과 eosin 染色을 實施하여 光學顯微鏡下에서 觀察하였다.

2) 成績 및 結果

(1) 斃死率

試驗 全 期間동안 蜂毒을 皮下 및 筋肉에 投與한 토끼에서 斃死動物은 觀察되지 않았다.(Table II.)

(2) 臨床症狀

토끼가 蜂毒投與 初期에는 行動이 鈍化되었으며, 時間이 經過함에 따라 조금 銳敏해지는 樣相을 보였다.(Table II.)

(3) 體重變化

토끼가 蜂毒投與 適用 後 第 2, 7日째의 體重은 適用 開始日의 體重과 比較하여 약간의 體重增減을 보였으나 正常的인 範圍를 벗어나지는 않았다. (Table III.)

(4) 肉眼的 所見

本 試驗에서 使用된 全 動物을 試驗物質의 適用終了 後, 第 2, 7日째에 剖檢한 結果, 皮下投與의 경우 直徑 3cm정도 크기의 灰白色斑狀이 觀察되었고, 筋肉은 直徑 1-3cm 크기로 赤褐色으로 變色있음을 觀察하였다. 그러나, 溶媒對照部位에서는 어떠한 變化도 觀察할 수 없었다.(Table IV,V)

(5) 組織 病理學的 觀察

本 溶媒 投與部位에서는 어떠한 組織 病理學的 異常도 觀察할 수 없었으나, 蜂毒 投與部位는 심한 細胞의 壞死, 炎症細胞 浸潤, 浮腫, 充血등 局所的인 炎症反應이 觀察되었다. (Table IV,V) (Fig.2,3)

Table I. Composition of Groups and Schedule of Injection and Necropsy

Group	Substance	Site of injection	Route injection	Initial Day	Day of necropsy	No.of Animal
Group1	bee venom saline	right left	S.C	14/6	16/6, 21/6 *(3) (3)	6
Group2	bee venom saline	right left	I.M	14/6	16/6, 21/6 (3) (3)	6

* : Sacrifice No., S.C.:Subcutaneous, I.M.:Intramuscular
Clinical Dose : Bee Venom 100:1 dilution 0.2ml
Administration Dose : 0.2ml/rabbit

Table II. Mortality and Clinical Signs Treated with Bee Venom in Rats

Sex	Group	No. of animals examined	Clinical signs	Mortality
Male	1	6	5/6	0/6
	2	6	6/6	0/6

Table III. The Changes of Individual Body Weight Treated with Bee Venom in Rats

Group No.- Animal No.	B.W.(kg) on day of		
	injection	1st necropsy	2nd necropsy
1-A	2.60	2.60	2.80
1-B	3.00	3.10	3.40
1-C	2.80	3.10	3.20
1-D	2.40	2.50	-
1-E	2.30	2.50	-
1-F	2.80	3.00	-
2-A	2.70	2.80	3.00
2-B	2.90	3.00	3.20
2-C	2.70	2.70	2.90
2-D	2.90	3.00	-
2-E	2.50	2.60	-
2-F	2.80	3.00	-

Group 1 : S.C. Injection

Group 2 : I.M. Injection

Table IV. Individual Pathological Findings Treated with Bee Venom in S.C. in Rats

Necropsy day	16/6						21/6					
	Saline			Bee venom			Saline			Bee venom		
Specimen No.	1-D	1-E	1-F	1-D	1-E	1-F	1-A	1-B	1-C	1-A	1-B	1-C

Gross Findings												
hemorrhagic foci	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
necrotic foci	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Histological findings												
Focal necrosis	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Hyperemia	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Exudation	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Emigration of cell	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Suppuration	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++

- : Non Detectable
 + : Slight
 ++ : Mild
 +++ : Severe

Table V. Individual Pathological Findings Treated with Bee Venom in I.M.in Rats

Necropsy day	16/6						21/6					
	Saline			Bee venom			Saline			Bee venom		
Specimen No.	2-D	2-E	2-F	2-D	2-E	2-F	2-A	2-B	2-C	2-A	2-B	2-C
Gross Findings												
hemorrhagic foci	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
necrotic foci	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Histological findings												
Focal necrosis	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Hyperemia	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Exudation	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Emigration of cell	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
Suppuration	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++

- : Non Detectable
 + : Slight
 ++ : Mild
 +++ : Severe

III. 考 察

蜂鍼療法은 約 2,000年 前부터 民間療法^{1,39)}으로 使用되어 왔으며, 蜂鍼의 材料인 꿀벌로는 서양벌(*Apis mellifera*)중 일벌⁴⁾만이 使用되며, 벌의 針을 뽑아서 取穴하는 發針法이나 벌을 穴位에 놓아 刺針하는 直接法이 活用되고 있으나, 最近에는 電氣抽出法¹⁾이나 電子波 刺戟法¹⁹⁾으로 蜂毒을 抽出 加工하여 乾燥된 蜂毒을 注射用 Ampule, 연고 등으로 臨床 및 研究用으로 利用되고 있다.

蜂毒의 成分^{1,25,26,29,37)}은 Enzymes, Peptides, Non peptide components로 構成되어 있으며, 이 중 Enzymes의 主要成分으로는 Phospholipase A₂ 와 Hyaluronidase 등이 있고, Peptides는 乾燥 蜂毒量의 約 50%를 構成하고 있으며, Mellitin, Apamin, MCD peptide를 들 수 있는데, 그 중에서 가장 많이 分布하는 Mellitin(40-50%)은 크게 溶血作用과 酵素作用 및 抗炎作用을 한다. Apamin은 神經系에 作用하며 筋肉痙攣을 誘發하거나 過量을 注入하면 呼吸不全으로 死亡하게 된다. MCD peptide는 Mast cell의 溶解와 Histamine 擴散을 增加시켜 喘息, 發熱 등의 Allergy 誘發에 關與한다. Apamin과 MCD peptide는 免疫機能을 增加시키고 鎮痛, 消炎效果를 나타내며, 白血球의 食作用을 抑制하고, 血漿의 纖維化를 低下시키는 效能이 있다. Non peptide components는 Histamine, Dopamine, Noradrenaline등으로 構成되어 있는데, Histamine은 平滑筋과 氣管支 및 胃腸管을 收縮시키고, 毛細血管을 擴張시켜 血壓降下를 誘發한다. 또한 體内の Histamine

收容體와 結合하여 Allergy를 誘發한다고 믿어진다. 이러한, 成分들로 構成된 蜂毒은 오래 전부터 各種 疼痛 및 炎症性 疾患에 廣範圍하게 使用되어져 왔으며, 1910년 Terc P.가 “蜂針이 류마티즘 및 Gout에 미치는 效果”⁶⁰⁾를 報告하기 시작하면서, 그 이후로 各 成分들의 效能^{25,32,40,41)}, 作用^{26,27,30,34,38,52)}, 및 Allergy^{31,36,44,48,57,62)}에 대한 많은 論文이 發表되었다.

蜂毒의 性味²²⁾는 苦,辛,平하고 主要作用은 強壯, 鎮靜, 平喘, 祛風濕, 鎮痛, 抗炎, 神經毒, 免疫, 抗癌作用, 아드레날린분비 촉진 및 임파세포와 赤血球의 再生과 增加作用^{1,22,24,26)} 등이 있으며, 筋肉痛, 筋炎, 急·慢性關節炎, 神經痛, 痛風, 化膿性疾患, 高血壓, 류마티즘, 류마티스성 關節炎, 皮膚病, 腰痛, 打撲傷^{1,20,22,23)} 등에 利用되고 있으나, 한편 두드러기, 瘙癢症, 嘔吐, 惡寒, 痙攣, 泄瀉, 呼吸困難, 喘鳴, 眩氣症, 低血壓, 失神등의 蜂毒에 대한 過敏反應^{1,26,31,35,36,44,57,62)}으로 不安感이 있고, 심한 心臟血管系 合併症 및 呼吸器障礙 등이 있을 때 眩氣症, 低血壓, 失神, 呼吸困難등의 不作用이 있으므로 매우 慎重하게 臨床에 應用시켜야 하는 面도 있다.

이에 著者는 美國産, 中國産 및 韓國産 蜂毒液을 HPLC로 分析하여 比較하고, 韓國産 蜂毒液을 “醫藥品등의 毒性試驗基準”^{6,8,10,12,14)} 등에 따라 急性毒性試驗을 實施¹⁶⁾한 후 皮膚刺戟試驗, 眼粘膜刺戟試驗, 皮下 및 筋肉刺戟試驗을 施行하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

毒性試驗은 試驗物質의 安全性 評價를 위한 基礎資料이며, 우리나라의 毒性學 規定은

1988年 一般毒性試驗法 規定¹⁰⁾ 과 特殊毒性試驗法 規定¹¹⁾ 을 統合하여 “醫藥品등의 毒性試驗基準”⁸⁾ 을 保健社會部 산하 國立保健安全研究院 예규 제10호로 制定 公布하였다. 또한 新藥의 安全性에 대하여는 1990年 “醫藥品등의 製造業 및 製造品目 許可指針”¹³⁾ 이 규정 되었고, 複合劑의 製劑別 毒性試驗은 1990年 國立保健安全研究院 예규 제 23호 “醫藥品등의 安全性 有效性 檢討依賴書 審査에 관한 規定”⁹⁾ 에 包含되어 있다.

複合劑라 함은 有效成分 2가지 以上을 含有하는 醫藥品으로서, 蜂毒 또한 複合劑의 範疇에 속하는 것으로, 注射劑의 경우 急性毒性, 亞急性 및 慢性毒性試驗을 實施하도록 規定하고 있고, “複合劑의 有效成分 모두가 文獻등에 의한 LD₅₀值 등으로 보아 低毒性이라 判斷되는 경우와 複合劑의 急性毒性 試驗結果 및 藥理作用 등으로 보아 亞急性 毒性試驗이 필요없다고 判斷되는 것은 有效成分 및 複合劑의 亞急性毒性試驗을 省略할 수 있다.”⁹⁾ 고 規定하고 있다.

局所毒性試驗은 皮膚 또는 粘膜에 직접 適用되거나, 직접 適用하지 않더라도 接觸을 誘發하기 쉬운 醫藥品들의 皮膚 및 粘膜을 통한 毒性을 檢討하는 試驗으로, 皮膚刺戟試驗, 眼粘膜刺戟試驗 등이 있다.⁸⁾ 本 試驗에서는 皮膚刺戟試驗, 眼粘膜刺戟試驗, 皮下 및 筋肉刺戟試驗을 實施하였다.²⁾

皮膚는 表皮, 眞皮, 皮下組織으로 構成되어 있으며, 身體 전체를 덮어 外部로 부터의 化學物質, 기계적 損傷 및 熱에 대한 1차적 防禦組織으로 物質의 浸透 經路가 되어 皮膚 適用物質의 局所 效果 및 全身 毒性을 發生시킬 수

있다.^{2,7)} 皮膚刺戟이 觀察되는 共通의 症狀은 血管擴張과 發熱, 發赤, 疼痛, 浮腫 등이며 상처가 심하면, 세포 괴사를 초래하기도 하여 세포 재생이 불가능하게 되기도 하나 皮膚 刺戟 試驗時 發赤과 浮腫의 程度가 評價의 基準이 된다.^{2,8)} 또한, 觀察時日 및 間隔에 대하여 Draize test의 경우에는 24時間 間격으로 檢體露出 7日間 皮膚를 觀察하는 것³³⁾ 으로 되어 있으며, OECD는 1, 24, 48, 72時間의 間隔을⁵¹⁾, 국립보건안전연구원에서는 24, 72時間의 觀察時日 및 時間間隔을 規定⁸⁾ 하고 있으나, 檢體에 의하여 나타나는 皮膚反應의 變化程度와 接觸時間을 觀察하는 것이 重要하며, 여러가지 檢體의 다양한 性狀에 따라 皮膚變化의 始作이나 回復에 걸리는 時間이 달라지므로, 斷定的으로 쉽게 豫見하기는 어렵다.

本 試驗은 蜂毒液의 皮膚1차 刺戟試驗으로 6마리 수컷 토끼를 이용하여 국립보건안전연구원 예규 제10호(1988.10.29) “醫藥品 등의 毒性試驗基準”¹⁸⁾ 에 準하여 頸背部 두곳에 臨床適用濃度인 100:1로 稀釋하여 1ml/rabbit (0.5ml/site)로 經皮 適用하고, 觀察時間을 試驗物質 適用 後, 1時間, 24時間, 48時間, 72時間 및 7日째에 實施하여 本 結果, 一般症狀, 體重變化, 剖檢所見에서 蜂毒液에 의해 起因된 것으로 생각되는 特異病變은 觀察되지 않았으며, 紅斑 및 痂皮, 浮腫등의 皮膚刺戟反應도 나타나지 않았다. 또한, 以上과 같은 皮膚反應의 結果를 評價하기 위하여 皮膚 1次 刺戟率(P.I.I.)을 算出하여 本 結果, “0”으로 皮膚에 대한 刺戟이 전혀 없는 것으로 나타나, 蜂毒液에 起因되는 皮膚 1次 刺戟에 대한 安全性은 높은 것으로 思

慮되었다.

眼球的 損傷은 化學物質과의 직접적인 接觸으로 인한 局所的 形態 또는 藥品 및 食品汚染物質의 攝取 등으로 인한 全身的 形態의 일환으로 나타날 수 있으며, 많은 化學物質이 眼球 損傷을 일으킨다고 報告되고 있어서, 새로운 物質이 製造工程時의 作業者, 最終 消費者에 露出되기 前에 眼球損傷 可能性與否를 試驗하는것은 매우 重要的 일이다.^{2,7)}

眼球刺戟試驗은 “醫藥品 등의 毒性試驗基準”⁸⁾에 準하여 New Zealand White 種 Rabbit 9마리에 대하여 施行하였는데, 檢體를 臨床適用 濃度인 100:1로 稀釋하여 모든 토끼의 오른쪽 눈에 0.1ml를 點滴 投與한 後, 3마리의 토끼는 20-30초 후에 微溫 saline 液으로 1분간 부드럽게 洗滌해 주고, 나머지 6마리의 토끼는 그대로 두어, 檢體 投與 後 第 1時間, 第 1, 2, 3, 4 및 7日에 一般症狀의 變化와 洗滌群 및 非洗滌群 모두의 眼球를 投與하지 않은 다른쪽 눈을 對照群으로 하여 角膜, 虹彩 및 結膜에 대한 眼球 病變을 觀察한 結果, 檢體 投與 後 1時間 부터 심한 淚漏 및 眼瞼의 腫脹, 充血을 觀察할 수 있었으며, M.O.I.는 36.3정도로 비교적 낮은 數值를 보이고 있으나, 1日 後 부터는 腫脹이나 淚漏는 減少 하였으나 심한 角膜의 混濁과 虹彩의 異常을 觀察할 수 있었고, M.O.I.는 87.5로 이 試驗에서 가장 높은 數值를 보이고 있다. 이러한 症狀은 投與 後 3日을 頂点으로 M.O.I.는 87.5로 역시 같은 數值를 보였으나, 그 以後는 점차 緩和되어 7日째에 와서는 상당히 輕減되어 57.7로 타나났다. 14日頃에는 表로 提示하지는 않았지만 다소의 角膜 混濁

만이 觀察되어 상당히 自然治癒되었음을 觀察할 수 있었다. 그 結果 眼粘膜에 대해서는 中強度 刺戟物내지 強度刺戟物로 判斷되고, 30초 後 洗眼한 경우도 中等度 刺戟物로 判斷되었다. 따라서, 蜂毒液은 眼粘膜에 刺戟성이 매우 심한것으로 思慮된다.

蜂鍼의 人體에 대한 投與經路는 韓醫學의 으로는 經絡 路線上的 該當 經穴部位의 皮下組織 및 筋肉組織이라 하겠다. 藥鍼液 등 注射製劑의 投與經路로서 皮下 및 筋肉에 대한 刺戟反應을 檢討하는 것은 필수적이라 思慮되어 皮下 및 筋肉刺戟試驗을 實施하였다.^{3,5)}

따라서 “醫藥品 등의 毒性試驗基準”⁸⁾에 準하여 New Zealand White種 수컷 토끼 12마리를 利用하여 2個群으로 나누어 左右 區劃으로 試驗物質 投與群과 生理食鹽水 處置를 한 對照群을 1週日間 매일 觀察한 結果, 行動이 銳敏해지는 등의 臨床症狀이 觀察되었고, 剖檢所 見은 試驗物質의 皮下 投與部位에서는 對照 部位와는 달리 直徑 3-5cm의 灰白色 斑點이 觀察되었고, 筋肉 投與部位에서도 直徑 1-3cm의 赤色斑點이 나타났다. 組織學的 檢査結果도 對照 部位와 달리 심한 細胞의 壞死, 炎症細胞의 浸潤, 浮腫, 充血등 局所的인 炎症反應이 觀察되어, 蜂毒液은 토끼에서 皮下 및 筋肉投與時 매우 심한 局所 刺戟성이 있는 것으로 思慮된다.

以上에서 살펴 본 모든 試驗 成績으로 보아 本 試驗方法으로 實施한 경우, 藥鍼用 蜂毒液은 皮膚刺戟性試驗에서는 無害한 物質로 判斷되나, 急性毒性, 眼粘膜刺戟성과, 皮下 및 筋肉刺戟性試驗에서는 매우 강한 刺戟성이 있는

것으로 나타나 臨床에 適用할 때, 보다 전문적인 注意가 要求되며, 앞으로도 亞急性 과 慢性 毒性試驗 및 過敏反應 등 지속적인 研究가 필요하리라 思慮된다.

IV. 結 論

藥鍼用 蜂毒液의 安全性 評價를 위하여 韓國産 蜂毒液을 醫藥品安全性管理基準에 따라 토끼를 試驗動物로 하여 皮膚刺戟試驗, 眼粘膜刺戟試驗, 皮下 및 筋肉刺戟試驗을 實施한 結果, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 藥鍼用 蜂毒液은 皮膚塗布時, 皮膚刺戟症 狀을 나타내지 않았다.
2. 藥鍼用 蜂毒液은 眼粘膜 點滴時, 中強度 내지 強度刺戟物로 나타났다.
3. 藥鍼用 蜂毒液은 皮下 및 筋肉에 投與時, 細胞의 壞死, 炎症細胞의 浸潤, 浮腫, 充血 등 局所的인 炎症反應으로 심한 刺戟이 있었다.

以上の 結果로 보아 藥鍼用 蜂毒液은 眼粘膜과 皮下 및 筋肉刺戟試驗에서, 강한 刺戟성이 있는 것으로 나타나 臨床에 適用할 때, 보다 전문적인 注意가 要求되며, 앞으로도 亞急性, 慢性毒性 및 過敏反應등에 대한 지속적인 研究가 필요할 것으로 思慮된다.

參 考 文 獻

1. 金文昊 : 蜂毒療法과 蜂針療法, 서울, 한국교육기획, pp. 20-37, 41-42, 67-74, 104-112, 134-149, 171-176, 1992.
2. 金良恒 : 毒性學 原理와 試驗方法, 서울, 綠苑出版社, pp.15~18, 23~26, 209~210, 215~217, 549~564, 1986.
3. 金廷彦 : 奇蹟의 藥鍼療法 (1), 서울, 金剛出版社, p.25, pp.99~104, 1987.
4. 崔承允 : 新制養蜂學, 서울, 集賢社, pp.47-56, 328-330, 1987.
5. 崔容泰 外 : 鍼灸學, 서울, 集文堂, pp.1457~1458, 1991.
6. 한국약학대학협의회 약전분과회 : 대한약전 제5개정 1,2부해설, 서울, 문성사, pp.1211~1212, 1987.
7. 許仁會 外 10人 : 毒性學, 서울, 綠地社, pp.26~30, 101~102, 307~312, 353~354, 1983.
8. 국립보건안전연구원 : 醫藥品등의 毒性試驗 基準, 국립안전연구원예규 10호, 1988.
9. 국립보건안전연구원 : 醫藥品등의 安全性 有效性 檢討依賴書 審査에 관한 規定, 국립보건안전원 예규 제23호, 1990.
10. 국립보건원 : 一般毒性試驗에 관한 規定, 국립보건원예규 제222호, 1982.
11. 국립보건원 : 特殊毒性試驗에 관한 規定, 국립보건원예규 제267호, 1985.
12. 보건사회부 : 發熱性 物質 試驗法, 생물학적 제재기준 및 시험방법개정, pp.562~564, 1987.

13. 보건사회부 : 醫藥品등 製造業 및 제품목록 허가지침, 보건사회부고시 제90-70호, 1990.
14. 보건사회부 : 醫藥品安全性 試驗管理 基準 解說書, 대한보건공정서협회, PP.489-500, 1987.
15. 高炯均 : 蜂鍼毒 療법이 抗炎, 鎮痛 및 解熱에 미치는 效能에 關한 實驗의 研究, 대한한의학회지, 13(1):283~292, 1992.
16. 고희균 외: 약침용 봉독액의 급성독성에 관한 연구, 대한침구학회지, 11(1): 177-195, 1993.
17. 孔賢淑 : 蜂鍼毒 療법이 抗痙攣에 미치는 影響, 대한침구학회지,10(1):159~165,1993.
18. 李宗錫 : 中腕 및 足三里의 蜂毒療법이 鎮痛 效果에 미치는 影響, 경희한의대논문집, 15(1):483~495,1992.
19. 崔大鳳 : 養蜂 協會報, 韓國養蜂協會,서울,12월호, 1986.
20. 麻仲學 : 中國醫學療法大全, 山東, 山東科學技術出版社, pp.216~218. 1991.
21. 莊育民 : 中國鍼灸學 發展史, 臺北, 裕臺公司, pp.9~10, 1978.
22. 朱文鋒 : 實用 中醫辭典, 陝西, 陝西科學技術出版社, p.402, 1992.
23. 張震 : 雲南中醫雜誌, 上海, 雲南新華印刷社, 5:39~41, 1990.
24. 陳維辛 外 : 蜂毒, 蜂peptide 抗炎鎮痛,變凝原性 및 急性毒性的 比較, 한글판 中西醫結合雜誌 4:45~48, 1993..
25. Barbara & Rudolf : Chemistry and Pharmacology of Honey Bee Venom. Academic Press, London, pp.329-402, 1986.
26. Tom piek : Venom of the Hymenoptera. Academic Press, London, pp. 107-120, 1986.
27. Artemov, NM. : Comparative study of the toxic action of bee venom. Scientific reports of the State University in Gorki,14:177-204, 1949.
28. Blasik, M., Belliveau, J., Salem, S., Vivaris, J., O'Leary, G. : The rapid separation of bee venom components by high pressure liquid chromatography. NAAS Proceedings, 4:11-23, 1981.
29. Bousquet, J., Marty, JP., Clauses, C., Michael, FB. : Enzymes of bee venom, sac and whole body. Ann. Allergy, 43(2):110-114, 1979.
30. Bousquet, J., Huchard, G., Michel, FB. : Toxic reactions induced by hymenoptera venom. Ann. Allergy, 52(5):371-4, 1984.
31. Busse, WW. : Immunotherapy in bee sting anaphylaxis. JAMA 231(11):1154-6, 1975.
32. Doyle, L. : The therapeutic effectiveness of bee venom. NAAS Proceeding, 3:50-1, 1980.
33. Draize, J.H., Woodard, G. & Calvery, H.O. : Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. J. Pharmacol. Exp. Ther., 82:377-390, 1944.
34. Fennell, JF., Shipman, WH., Cole, LJ. : Antibacterial action of melittin, a

- polypeptide from bee venom. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127(3):707-10, 1968.
35. Ghosh, K., Singh, S., Pereira, B.J., Singhi, S.C. : Acute systemic toxic reactions caused by hornet stings. Indian Pediatr. 25(8):796-8, 1988.
50. Golub, JR., Kaplan, SR., Mascia, AV.: Stinging insect hypersensitivity, Safety and efficacy of venom immunotherapy. N.Y.State J. Med. 84(2):66-8, 1984.
36. Goodman, NW. : Anaphylaxis from bee stings. Lancet, Lond. p.24, 1932.
37. Haberman, E. : Biochemistry, pharmacology and toxicology of substances contained in Hymenoptera poisons, Ergebn. Physiol. 60:220-325, 1968.
38. Hanson, JM., Morley, J., Soria Herrera, C. : Anti-inflammatory property of 401(MCD-peptide) a peptide from the venom of bee. Br. J. Pharmacol. 50:383-92, 1972.
39. Jarvis D.C. : Folk Medicine. Frawcett crest & Ballantine Books, New York, p.101, 1982.
40. Kanno, I. : Radioprotection by bee venom. Nippon Acta Radiol. 29(12):14 94-500, 1970.
41. Kaplinsky, E. : Effects of bee venom on the electrocardiogram and blood pressure. Toxicon.15(3):251-6, 1977.
42. Kemeny, DM., Lessof, MH., Trull, AK. : IgE antibodies to bee venom as measured by a modification of the RAST method. Clin. Allergy 10(4):413-421, 1980.
43. Koller, DY., Pirkre, C., Jarisch, R., Gotz, M. : Influence of the histamine control on skin testing. Allergy 47(1):58-9, 1992.
44. Leaver, R., Weinberg, EG. : Bee venom allergy. S.Afr.Med.J. 66(8):294-296, 1984.
45. Lockey RF., Turkeltaub, PC., Olive, CA., Baird-Warren, IA., Olive, ES., Bukantz, SC. : The Hymenoptera venom study. II: Skin test results and safety of venom skin testing. J. Allergy Clin.Immunol. 84(6):967-74, 1989.
46. Mozherenkov,VP. : Injury of the cornea by bee sting. Vestn. Oftalmol.3 :83-4, 1975.
47. Mulfinger, LM. et al : A qualitative and quantitative analysis of proteins found in vespid venoms. J.Allergy Clin. Immunol. 77(5):681-6, 1986.
48. Muller U., Helbling A., Berchtold E. : Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safty, J. Allergy Clin.Immunol. 89(2):529-35, 1992.
49. Muller, U., Reisman, R., Elliott, W., Steger, R., Walsh, S., Wypych, J.,Arbesman, C. : Studies of chemically modified honeybee venom I. Bio chemical,toxicologic and immunologic characterization.Int. Arch.Allergy Appl.Immunol. 68(4):312-9, 1982.
50. Neuman, MG. et al : Hepatototoxicity of

- hornet's venom sac extract in isolated rat liver. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 56(2): 133-8, 1985.
51. Organization for Economic Cooperation and Development : OECD guidelines for testing of chemical, 1981.
52. Peitchev, P. : Action of the bee's poison on the central nervous system, *Folia Med.* 10(5):286-90, 1968.
53. Rader, K., Wildfeuer, A., Wintersberger, F., Bossinger, P. : Characterization of bee venom and its main components by high performance liquid chromatography. *J. of Chromatography*, 408:341-348, 1987.
54. Rosario, N.A. et al : Factors influencing the toxicity and antigenicity of detoxified *Apis mellifera* venom. *Rev. Bras. Biol.* 41(1):191-6, 1981.
55. Schmidt, J.O. et al : Comparative lethality of venoms from stinging hymenoptera. *Toxicon.* 18(4):469-74, 1980.
56. Schuller, D.Z. et al : Venom Skin Testing and alteration of RAST levels. *Ann. Allergy* 47(2):84-6, 1981.
57. Sobotka, A.K. : Diagnosis of insect hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 69(4): 213-4, 1977.
58. Strickle, P., Harman, A. : Separation of venom components by reverse phase high pressure liquid chromatography. *NAAS Proceeding* 4:5-10, 1981.
59. Tamir, R., Levy, I., Duer, S., Pick, A.I. : Immediate adverse reaction to immunotherapy in allergy. *allergy* 47(3):260-3, 1992.
60. Terc, P. : The action of the bee stings in rheumatism and Gout of the Joints, 1910
61. Tsvetkov, V.I. : Eyeball injury caused by bee sting. *Oftal. zh.* 20:389 -91, 1965.
62. Valentine, M.D., : Insect venom allergy: Diagnosis and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73:299-304, 1984.
63. Zelenick, L.D. ; Diagnosis of hymenoptera hypersensitive by skin testing with Hymenoptera venoms. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 59(13):2-9, 1977.

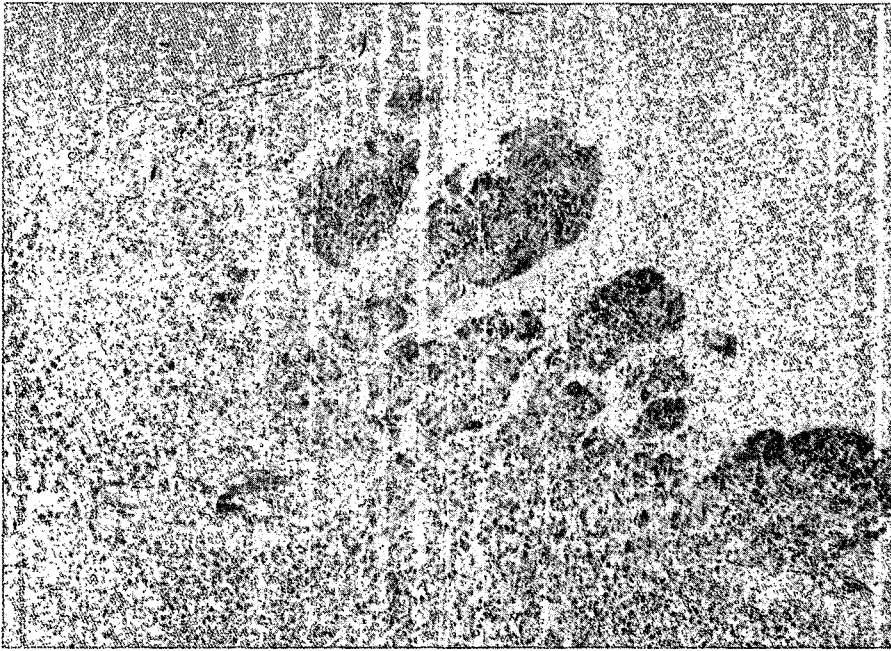


Fig. 2. Histopathological Findings on 2 day after Subcutaneous Injection with Bee Venom. H & E, x100.

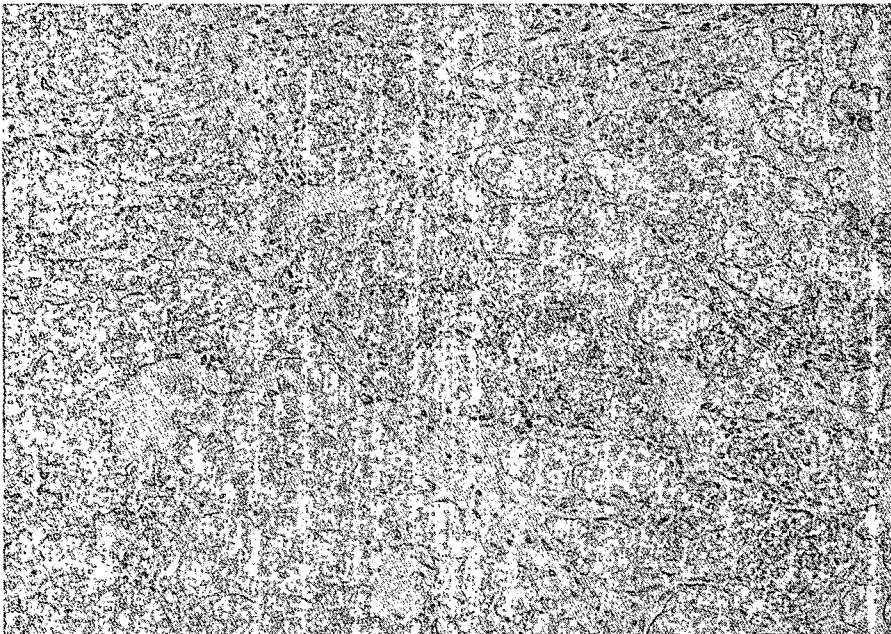


Fig. 3. Histopathological Findings on 2 day after Intramuscular Injection with Bee Venom. H & E, x100.