

봉독의 인체 피부자극성 평가

한은혜¹ · 임미경¹ · 이상호¹ · 박근태² · 박지은³ · 임영희^{3,4,5} · 심인숙^{4*}

¹고려온단 R&D부, ²(주)미래자원 ML 신소재 연구소,

³고려대학교 보건과학과(BK21 PLUS Program), ⁴고려대학교 의생명융합과학과

⁵고려대학교 구로병원, 진단검사의학과

Evaluation on Skin Irritation of Bee Venom in Human

Eun-Hye Han¹, Mi-Kyung Lim¹, Sang Ho Lee¹, Keun-Tae Park², Ji-eun Park³, Young-Hee Lim^{3,4,5}
and Insuk Sim^{4*}

¹Research and Development Center, Koreaeundan, Seongnam, Gyeonggi 13207, Republic of Korea

²Department of Research and Development Center, Milae Resources ML Co. Ltd, Seoul 138-050, Republic of Korea

³Department of Public Health Science (BK21 PLUS Program), Graduate School, Korea University,
Seoul 136-703, Republic of Korea

⁴Department of Integrated Biomedical and Life Sciences, College of Health Science, Korea University,
Seoul 136-703, Republic of Korea

⁵Department of Laboratory Medicine, Korea University Guro Hospital, Seoul 08308, Republic of Korea

Abstract – The purpose of this study was to investigate the skin irritation of bee venom (melittin) in human. Skin irritation test was performed at 0.05% bee venom by 48 h single patch test in 30 healthy volunteers with no skin disease and skin sensitization test was performed by local lymph node assay in animal. In single patch test, 28 human subjects showed no reaction and 2 subjects showed 1+ or 3+ grade skin reaction. In a skin sensitization test of bee venom conducted using mice, no erythema was observed on the dorsal side of mice up to 8 days after application of bee venom on the skin. The results of the average stimulation index by ATP values showed that there was no irritation to the mice skin at 0.005% and 0.01% of bee venom. Therefore, bee venom is not likely to induce a significant skin irritation under 0.05% concentration.

Keywords – Skin irritation, Skin sensitization, Bee venom, Melittin, Local lymph node assay

봉독은 천연물질이면서 강력한 항균작용,¹⁾ 항바이러스 작용,²⁾ 면역증강 효과를 갖는 물질³⁾로 잘 알려져 있으며, 전통적으로 다양한 질병의 치료제로 이용되고 있다. 최근에는 봉독의 신경보호작용 가능성이 인정받아 파킨슨병 치료물질로의 적용에 관한 연구와⁴⁾ 진통제 효과와 항염증성 작용에 기반하여 류마티스 관절염과 다발성 경화증의 치료에 관한 연구^{5,6)}가 이뤄지고 있다. 이러한 다양한 효과를 갖는 봉독은 포스포리파아제 A2(phospholipase A2)와 아파민(apamin), 멜리틴(melittin) 등 40여가지 단백질, 효소, 아민으로 구성⁵⁾되어 있으며, 그 중 멜리틴을 주성분으로 한다. 멜리틴은 선행 연구를 통하여 여러 종류의 세포에 작용하여 항산화, 항염증 효과를 가지며,⁷⁾ 여드름 균(*Propionibacterium acnes*)에

대한 항균 및 피부염증반응을 억제시킴으로써 피부질환의 치료 약제로 이용할 수 있음을 확인하였다.⁸⁾ 또한, 이를 유효성분으로 하는 정제봉독으로 피부주름 억제 및 미백효과를 측정하였고,⁹⁾ 동물실험을 통해 피부자극 및 안점막자극 시험에서 독성이 없음을 입증하여 화장품 원료로 쓰기에 적합하다고 인정받고 있다.¹⁰⁾ 이처럼 봉독은 약리적 효과가 크지만 적용에 있어 안전성에 대한 입증도 함께 필요한 실정이며, 다양한 방법으로 그에 대한 연구가 이뤄지고 있다.

본 연구에서는 봉독을 이용한 안전성 평가 방법 중 기존 연구와는 다른 대상과 항목을 적용하여 시험하였다. 정제봉독을 화장품 원료 또는 의약품 외용제로 이용하는데 있어 인체 피부에 대한 안전성을 평가하기 위해 마우스를 이용하여 피부 감각성 시험을 수행하고 이를 바탕으로 인체에 직접 적용하여 피부 자극성시험을 수행하였다.

*교신저자(E-mail): dlstnr@korea.ac.kr
(Tel): +82-2-940-2756

재료 및 방법

봉독시료 - 본 연구에 사용된 봉독은 정제봉독(청진바이오텍(주), 한국)을 사용하였고, 부형제로는 프로판디올((주)액티브온, 한국), 글리세린(IOI oleochemical, 말레이시아) 등을 사용하였고, 이들 성분을 적량 혼합하여 봉독 시료를 제조하여 사용하였다.

실험동물 - 실험동물은 8-12주령 CBA/J 암컷 마우스를 (주)코아텍(평택, 한국)에서 구입하여 1주일 이상 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육장의 실내 온도는 21~23°C, 상대습도는 50.0~60.0%, 조도는 200~300 Lux로 12시간 명암주기가 되도록 조절하였다. 동물실험은 고려대학교 동물윤리위원회의 승인(Approval No. KUIACUC-2015-281)을 얻어 수행하였다.

피부 감작성 시험: local lymph node assay (LLNA: DA) - 피부 감작성 시험은 국소림프절시험을 이용하여 수행하였다. 각 군마다 5마리씩을 사용하였으며, 식품의약품안전평가원 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인¹¹⁾에 따라 평가하였다. 1% 라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate) 용액을 붓을 이용하여 마우스 귀 배측에 도포 하고 1시간 후 시험물질(0.005, 0.01% 봉독), 용매, 양성대조물질(25% 헥실신나믹알데하이드, hexyl cinnamic aldehyde)을 25 µl씩 처치하였다. 시험 8일째 임상증상을 관찰하고 마우스의 이개림프절(auricular lymph node)을 적출하여 약하게 압력을 가해 으개서 단일 림프절 세포(lymph node cell)로 만들고, 각 동물마다 두 개의 시료를 준비하여 ATP의 양이 감소하지 않도록 30분 이내 ATP 양을 측정하였다. ATP 시험은 luminescence ATP detection assay system을 이용한 ATP-LITE™(Perkin Elmer™ Lifesciences, USA) kit를 사용하여 표준매뉴얼대로 측정하였다. 시험군의 결과는 평균 자극지수(mean SI)로 표현하였다. 자극지수는 시험군과 양성대조군의 평균 RLU(mean Relative Luminescence Units /mouse)를 용매대조군의 평균 RLU로 나눈 값으로 용매대조군의 평균 SI를 1로 정하고, SI≥1.8이면 양성으로 간주하였다.

시험 대상자 - 피부질환이 없는 건강한 18 - 60세의 남녀 30명(평균연령 41.83 ± 3.63세)을 대상으로 시험을 실시하였다. 각각의 지원자들은 시험에 앞서 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분히 설명을 듣고 자발적으로 서면 동의서에 서명을 하였으며, 숫자로 된 고유 번호를 부여하여 관리하였다.

인체 피부 자극시험(48 h single patch test) - 인체 피부 첩포시험은 헬싱키 선언에 근거한 윤리규정¹²⁾ 및 식품의약품안전처 인체적용시험가이드라인의 관련 규정¹³⁾에 따라 시행되었다. 첩포부위인 등을 70% 에탄올로 소독한 후 시험물질 16 µl가 적용된 8 mm 핀 챔버(Finn Chamber®: SmartPractice, Denmark)를 첩포하였다. 봉독의 제품화를 고려하고, 제품 내 봉독의 안정성 및 유효성을 감안하여 동물실험의 최고

Table I. Clinical standard photographs of visual assessment for human patch test

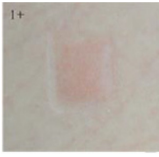
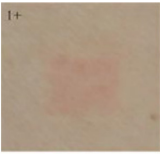
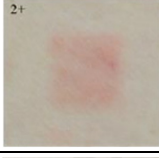
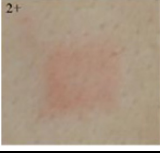




Description	After 30 min	After 24 h
Slight erythema, either spotty or diffuse		
Moderate uniform erythema		
Intense erythema with edema		
Intense erythema with edema & vesicle		

Table II. Human primary irritation index for cosmetic products

Range of Response	Criteria
0.00 ≤ R < 0.87	Slight
0.87 ≤ R < 2.42	Mild
2.42 ≤ R < 3.44	Moderate
3.44 ≤ R	Severe

농도인 0.01%보다 높은 0.05% 봉독함유 제품을 제조하여 인체적용 시험을 수행하기 전에 동일 농도로 인체 피부 자극 시험을 수행하였다. 48시간 후 첩포를 제거한 후에는 skin marker(Chemotechnique diagnostics AB, Sweden)로 시험 부위를 표시하고 30 분, 24 시간 후에 각 시험 부위를 관찰하였다. 피부 반응은 Frosch & Kligman 법¹⁴⁾을 반영한 기준에 따라 평가하였으며(Table I), 48시간 및 72시간의 평균 반응도는 다음의 식을 이용하여 계산하였고 CTFA 가이드라인(The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association, Safety testing guidelines)¹⁵⁾에 따라 평균반응도를 판정하였다(Table II).

$$\text{Response} = \frac{\sum(\text{Grade} \times \text{No. of Responders})}{4(\text{Maximum grade}) \times n(\text{Total Subjects})} \times 100 \times 1/2$$

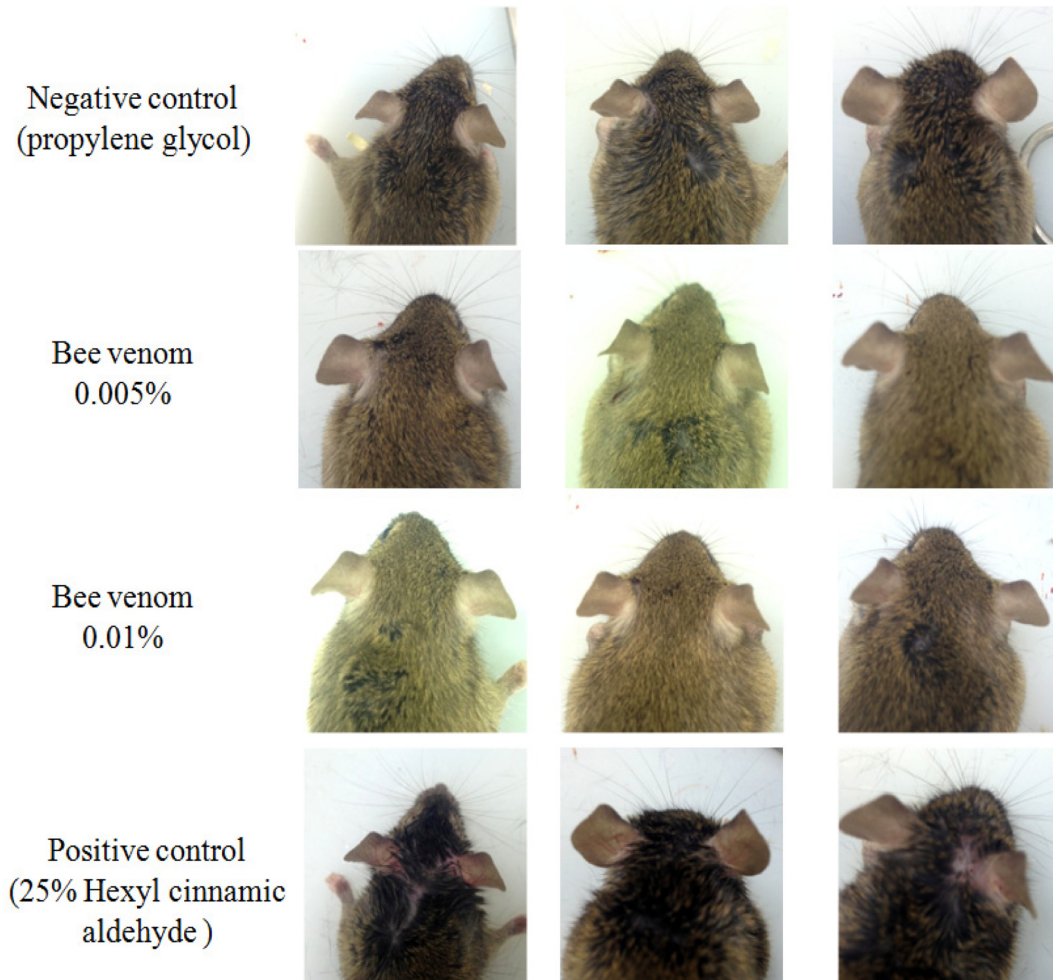
결 과

피부 감작성 시험 - 용매대조군의 평균 자극지수(mean SI) 값을 1로 산정한 후 비교한 결과, 봉독 0.005% (1.33±0.32), 0.01%(0.66±0.23) 두 농도에서 자극기준인 SI

Table III. Results of skin sensitization by LLNA:DA

Group	Negative control	Positive control	BV 0.005%	BV 0.01%
SI index	1 ± 0.12	2.21 ± 0.35	1.33 ± 0.32	0.66 ± 0.23

SI = test average/negative control average.

**Fig. 1.** Results of skin sensitization in mouse by bee venom.

값이 모두 1.8 이하였으므로 상기 농도에서는 피부에 자극이 없음을 알 수 있었다. 실험이 정상적으로 시행되었는지 확인하기 위한 양성대조군인 25% 헥실신나믹알데하이드를 처리했던 군(2.21±0.31)에서는 양성반응이 확인되었다(Table III). 실험 시작 후 8일째 되는 날, 마우스의 귀 배측을 관찰한 결과, 양성대조군에서 홍반이 관찰되었으나, 봉독을 바른 시험군에서는 홍반이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 홍반 관찰과 ATP 수치 확인을 통해 봉독은 상기 농도에서 피부에 자극을 주지 않은 것으로 확인되었다.

인체 피부 자극시험 - 본 시험의 전 과정에 참여한 피험자들의 피부특성은 설문에 의해 조사되었으며 그 결과는

Table IV와 같다. 건성피부 타입이 가장 많이 참여하였으며, 그 외는 건지성, 중성피부가 많았다. 화장품 부작용 경험, 아토피나 여드름같은 피부질환은 없었으며, 흡연자도 없었다. 알러지 유무의 경우 음식과 빛 알러지는 없었고, 금속 알러지가 있는 경우는 존재하였으나 시험결과에 영향을 미치지 않을 것으로 판단하였다.

피부자극 유무를 측정하기 위한 방법인 인체 피부 첩보 시험을 시행한 결과는 Table V에 나타났다. 본 시험제품에서 2명의 피험자가 1+ 또는 3+ grade의 피부반응을 보여 인체피부의 일차자극 측면에서 중자극 범주의 물질로 판단된다(Table V).

Table IV. Human skin characteristics of subjects (n=30)

Item	Classification	Frequency (n)	Percentage (%)
Skin Type	Dry skin	13	43.33
	Normal skin	7	23.33
	Oily skin	0	0.00
	Dry to oily skin	10	33.33
	Problem skin	0	0.00
Irritability	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Stinging	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Side effects by cosmetics	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Allergy	Food allergy	0	0.00
	Metal allergy	3	10.00
	Photoallergy	0	0.00
	Extra allergy	0	0.00
	No	27	90.00
Skin diseases	Acne	0	0.00
	Atopy	0	0.00
	Hair loss	0	0.00
	Extra skin diseases	0	0.00
	No	30	100.00
Tight feeling	Yes	0	0.00
	No	30	100.00
Taking supplements	Taking korean herbal medicines	0	0.00
	Taking nutrients	1	3.33
	Taking extra supplements	0	0.00
	No	29	96.67
Smoking	No	30	100.00
	Less than 10 pieces	0	0.00
	More than 10 pieces	0	0.00
Menstrual cycle	Within 1 week before menstruation	6	20.00
	During menstruation	8	26.67
	Within 1 week after menstruation	8	26.67
	The others	8	26.67

Table V. Results of human skin irritation test by single patch test (n=30)

Test material	No. of responder	48 h				72 h				Reaction Grade		
		1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	48 h	72 h	Mean
Bee Venom (melittin) 0.05%	2	1	-	-	-	-	-	2	-	0.8	5.0	2.9
Negative control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

고찰

봉독은 예전부터 다양한 약리성분으로 의약품처럼 이용되어 왔으며 지금도 다양한 질병의 치료제로 연구가 이뤄지고 있다. 하지만 봉독은 알러지를 일으킬 수 있는 물질(allergens)을 함유한 복합체로 과민반응(anaphylaxis)에 대한 염려로 광범위하게 사용할 수 없었으나, 현재는 알러지를 유발하는 물질을 규명하여 이를 제거하고 유효물질만 분리하여 사용하고 있다.⁵⁾ 약리적 효과가 크지만 안전성이 확보되지 않아 화장품이나 의약품으로의 적용이 어려웠던 봉독을 이용하기 위해서는 인체 피부 안전성에 대한 연구가 필요하다.

봉독을 이용한 피부자극 실험은 다양한 대상과 방법으로 이루어지고 있으며 그 중 동물 시험을 통한 피부 감작성 시험은 감작성 물질이 적용 부위 림프절 내 림프세포 증식을 유도한다는 것을 원리로 하며, 림프세포 증식은 물질의 농도와 감작용에 비례하여 나타난다.¹⁶⁾ 피부 감작성 시험인 국소림프절시험(local lymph node assay, LLNA:DA)은 ATP 정량을 통해 림프세포 증식을 측정하는 정량적 방법이다. 본 실험에서 동물을 이용하여 피부 감작성 시험을 시행한 결과 대조군의 평균 자극지수(mean SI) 값을 기준으로 봉독의 SI값이 모두 식약처가이드라인¹¹⁾ 이하였으며, 마우스의 귀 배측에서 흥반도 보이지 않아 봉독 0.005%, 0.01%에서는 동물피부에 자극이 없음을 보였다.

피부자극 유무를 관찰하는 방법인 인체 피부 첩보시험은 흥반, 부종, 수포 등을 유발하는 정도를 크게 4단계로 나누어 평가하는데 봉독 0.05%를 피부에 적용했을 때 30명 중 2명에게서 중자극을 일으키는 것으로 보였다. 최근 연구를 살펴보면 봉독의 피부자극성을 토끼를 이용하여 7일 반복 첩보 피부자극 시험으로 측정된 결과 흥반과 가피는 전혀 관찰되지 않아 피부자극지수 0으로 비자극성이라 하였고,¹⁷⁾ 안점막자극 시험을 한 결과에서도 각막이나 결막에 자극이 없었으며,¹⁰⁾ 봉독과 키토산을 넣은 필름의 첩보 피부자극 시험에서는 봉독이 들어있지 않은 대조군보다 자극지수가 낮게 나타나 상처소독에도 적합하다고 하였다.¹⁸⁾ 또한, 기니아 피그를 이용하여 봉독의 피부광독성과 민감성을 시험한 결과 흥반과 부종을 보이지 않아 독성이 없음을 확인하고, 의약품의 재료로 쓸 수 있다고 하였다.¹⁹⁾ 봉독을 인체 피부에 적용시킨 연구에서 봉독을 함유한 연고를 아토피 환자에 적용시켰을 때 안전하고 효과적이라고 평가하였다.²⁰⁾ 봉독의 피부자극 연구는 주로 동물을 대상으로 실험이 이뤄지고 있으며 본 연구의 봉독 농도보다 더 높은 농도에도 비자극성으로 보고되고 있으나 본 연구에서 인체를 대상으로 시험한 결과에서는 몇몇 자극을 확인하였다. 이는 향후 화장품 원료 또는 의약품 외용제로 이용하기 위해서는 더 많은 안전성 시험을 수행할 필요가 있다고 보여진다.

결론

본 연구는 식품의약품안전평가원 가이드라인에 따라 마우스를 이용하여 정제봉독의 피부감작성 시험을 조사하였다. 실험 시작 후 8일이 지나 관찰한 결과 마우스 배측에 흥반이 나타나지 않았고, ATP 수치에 의한 평균자극지수 결과에 의하면 자극기준 이하에 해당하여 봉독 0.005%, 0.01%에서는 피부에 자극이 없음을 확인하였다.

이를 바탕으로 건강한 피부를 가진 30명을 대상으로 봉독 0.05%의 용량을 인체에 적용하여 피부 첩보 시험을 시행한 결과 2명의 피험자가 1+ 또는 3+ grade의 피부반응을 보여 인체피부의 자극 측면에서 중자극 범주의 물질로 판단되었다.

사사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업(과제번호:114070-3)의 지원을 받아 연구되었으므로 감사를 드립니다.

인용문헌

- Han, S. M., Kim, J. M., Hong, I. P., Woo, S. O., Kim, S. G., Jang, H. R. and Pak, S. C. (2016) Antibacterial activity and antibiotic-enhancing effects of honeybee venom against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **21**: 79.
- Uddin, M., Lee, B. H., Nikapitiya, C., Kim, J. H., Kim, T. H., Lee, H. C., Kim, C., Lee, J. S. and Kim, C. J. (2016) Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. *J. Microbiol.* **54**: 853-866.
- Hossen, M. S., Shapla, U. M., Gan, S. H. and Khalil, M. I. (2017) Impact of bee venom enzymes on diseases and immune responses. *Molecules* **22**: 25.
- Hartmann, A., Müllner, J., Meier, N., Heseckamp, H., Van Meerbeeck, P., Habert, M.-O., Kas, A., Tanguy, M.-L., Mazmanian, M. and Oya, H. (2016) Bee venom for the treatment of Parkinson disease—a randomized controlled clinical trial. *PLoS one* **11**: e0158235.
- Komi, D. E. A., Shafaghat, F. and Zwiener, R. D. (2017) Immunology of bee venom. *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.* 1-11.
- Castro, H. J., Mendez-Inocencio, J. I., Omidvar, B., Omidvar, J., Santilli, J., Nielsen, H., Pavot, A. P., Richert, J. R. and Bellanti, J. A. (2005) A phase I study of the safety of honeybee venom extract as a possible treatment for patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Allergy Asthma Proc.* **26**: 470-476.
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcao, S., Queiroz, M., Calheta, R. C., Vilas-Boas, M. and Ferreira, I. (2016) Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic prop-

- erties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food Chem. Toxicol.* **94**: 172-177.
8. 이선재, 김경현, 이우람, 김정연, 안현진, 박관규 (2015) 여드름 균에 의한 염증성 동물모델에서 멜리틴에 의한 항균 및 염증 억제 효과. *한국양봉학회지* **30**: 95-101.
 9. Han, S. M., Hong, I. P., Woo, S. O., Chun, S. N., Park, K. K., Nicholls, Y. M. and Pak, S. C. (2015) The beneficial effects of honeybee-venom serum on facial wrinkles in humans. *Clin. Interv. Aging* **10**: 1587-1592.
 10. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H. and Pak, S. C. (2012) Dermal and ocular irritation studies of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *Am. J. Chin. Med.* **40**: 795-800.
 11. 식품의약품안전평가원 (2013) 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(IV) - Skin sensitization
 12. General assembly of the world medical association (2014) World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J. Am. Coll. Dent.* **81**: 14-18.
 13. Korea Food and Drug Administration (2015) Clinical test and in vitro test guideline for cosmetics.
 14. Frosch, P. J. and Kligman, A. M. (1979) The soap chamber test: a new method for assessing the irritancy of soaps. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1**: 35-41.
 15. Loretz, L. and Bailey, J. (2007) CTFA Safety Evaluation Guidelines. The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association.
 16. Zhang, H., Shi, Y., Wang, C., Zhao, K., Zhang, S., Wei, L., Dong, L., Gu, W., Xu, Y. and Ruan, H. (2017) An improvement of LLNA: DA to assess the skin sensitization potential of chemicals. *J. Toxicol. Sci.* **42**: 129-136.
 17. 한상미, 홍인표, 우순옥, 김세건, 장혜리, 박관규 (2017) 정제봉독의 반복 칩포 피부자극시험. *약학회지* **61**: 1-5.
 18. Amin, M. A., I. T. Abdel-Raheem, and H. R. Madkor (2008) Wound healing and anti-inflammatory activities of bee venom-chitosan blend films. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **18**: 424-430.
 19. Han, S. M., Hong, I. P., Woo, S. O., Kim, S. G., Jang, H. R., Park, K. K. (2017). Evaluation of the skin phototoxicity and photosensitivity of honeybee venom. *J. Cosmet. Dermatol.* DOI: 10.1111/jocd.12350.
 20. You, C. E., Moon, S. H., Lee, K. H., Kim, K. H., Park, C. W., Seo, S. J. and Cho, S. H. (2016) Effects of emollient containing bee venom on atopic dermatitis: A double-blinded, randomized, base-controlled, multicenter study of 136 patients. *Ann. Dermatol.* **28**: 593-599.
- (2017. 8. 25 접수; 2017. 9. 20 심사; 2017. 9. 22 게재확정)