

## 정제봉독의 아나필락시스 쇼크 반응 연구

한상미<sup>1\*</sup> · 홍인표<sup>1</sup> · 우순옥<sup>1</sup> · 김세건<sup>1</sup> · 장혜리<sup>1</sup> · 박관규<sup>2</sup> · 장영채<sup>2</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>2</sup>대구가톨릭대학교 의과대학

### Active Systemic Anaphylaxis Test of Purified Bee Venom (*Apis mellifera* L.)

Sang Mi Han<sup>1\*</sup>, In Phyo Hong<sup>1</sup>, Soon Ok Woo<sup>1</sup>, Se Gun Kim<sup>1</sup>, Hye Ri Jang<sup>1</sup>,  
Kyun Kyu Park<sup>2</sup> and Young Chae Chang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science,  
Rural Development Administration, Wanju 565-851, Korea

<sup>2</sup>School of Medicine Catholic University of Daegu, Daegu 702-701, Korea

**Abstract** – This study was performed to examine the antigenic potential of purified bee venom (*Apis mellifera* L., PBV) collected using bee venom collector. Antigenic potential of PBV was examined by active systemic anaphylaxis (ASA) in guinea pigs. PBV was subcutaneously administered at 0.025 and 0.05 mg/kg and also as a suspension with adjuvant (Freund's complete adjuvant, FCA). Ovalbumin (OVA) as a suspension with adjuvant was used to introduce positive control response. In the weight measurement and clinical observation, experimental groups didn't show any significant changes compared with control group. In the autopsy of body, the abnormalities of lung were detected only in the positive control. In the ASA test, experimental groups didn't show any symptoms of anaphylaxis like piloerection, hyperpnea and staggering gait. These results suggested that PBV didn't have antigenic potential in guinea pig.

**Key words** – *Apis mellifera*, Purified bee venom, Antigenicity, Active systemic anaphylaxis

순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 효과를 갖는 봉독은 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 오래전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다.<sup>1,2)</sup> 서양종꿀벌(*Apis mellifera* L.) 일벌의 독인 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있으며, 주 성분인 멜리틴(Melittin)은 항염증과<sup>3,4)</sup> 항균작용,<sup>5)</sup> 강력한 진통작용,<sup>6)</sup> 면역증강<sup>7)</sup> 등의 역할을 한다고 알려져 있다. 한방에서는 봉독의 위험요소인 알러지 반응을 억제하기 위해 봉독의 주 항원으로 작용하는 포스포리파아제(Phospholipase A<sub>2</sub>)와 히알루니다아제(Hyaluronidase)와 가려움이나 염증을 일으키는 히스타민(Histamin) 등의 성분을 제거하고 순수한 멜리틴(Melittin)만을 분리 정제하여 약침용 봉독으로 사용한다고 알려져 있다.<sup>8)</sup> 멜리틴만을 분리 정제한 봉독은 전신 과민반응이나 부종, 동통 그리고 종창과 같은 국소즉시형 과민반응을 현저하게 감소시키나, Hartley계 기니피그를 이용한 능

동성 아나필락시스 반응에서 항원성이 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>8)</sup>

본 연구팀에서는 2005년 봉독채집장치가 개발됨에 따라 국내에서도 봉독 채집이 가능하게 되었으며, 채집된 봉독으로부터 이물질을 제거한 순수 정제봉독이 시판 판매되고 있다. 정제봉독은 멜리틴 함량이 50~70% 범위로 꿀벌이 갖고 있는 순수 봉독으로 히스타민을 비롯하여 히알루니다아제, 포스포리파아제 등 꿀벌의 봉독 성분을 온전히 갖고 있는 상태의 봉독이다. 최근 봉독 함유 화장품이 개발, 판매됨에 따라 봉독을 화장품 또는 외용제로 사용하기 위한<sup>9-11)</sup> 피부 안전성 연구도 함께 진행되었으며, 그 결과 봉독에 대한 피부자극 및 안점막자극시험에서 모두 무독성임이 입증되었다.<sup>12,13)</sup>

따라서 본 연구에서는 멜리틴만을 분리 정제한 봉독이 아닌 꿀벌 독 성분을 모두 갖고 있는 정제봉독에 대한 능동성 아나필락시스 반응을 수행하여 항원성 유무를 판정하고자 하였다.

\*교신저자(E-mail): sangmih@korea.kr  
(Tel): +82-63-238-2896

## 재료 및 방법

### 공시 시료

시험물질인 정제봉독은 봉독채집장치를 사용하여 서양종 꿀벌로부터 채취한 봉독을 ‘봉독의 간이정제방법’<sup>14)</sup>으로 멜리틴 함량이 61%인 정제봉독을 구입하여 사용하였다(청진바이오테크(주), 한국). 부형제는 생리식염주사액(대한약품공업(주), 한국)을 사용하였으며, 양성대조물질로는 Ovalbumin(OVA, Albumin Chicken Egg, Sigma-Aldrich, 미국)을 사용하였다. 그 밖에 시약으로는 Freud's complete adjuvant(FCA, Sigma-Aldrich, 미국)를 시험에 사용하였다.

### 시험물질 조제

고용량군의 시험물질을 먼저 조제하고, 저용량군의 시험물질은 조제된 고용량군의 시험물질을 동일한 부형제로 희석하여 조제하였으며, OVA 또한 부형제를 이용하여 해당 용량으로 조제하였다. Adjuvant와 혼합하는 경우에는 시험물질 또는 OVA를 각각의 부형제를 이용하여 2배 용량으로 조제한 후 동일 용량의 adjuvant와 충분히 에멀전화 시켰으며 이를 감작 항원액으로 사용하였다. 야기 항원액의 조제는 고용량군의 시험물질을 먼저 조제하고, 저용량군의 시험물질은 조제된 고용량군의 시험물질을 동일한 부형제로 희석하여 조제하였으며, 이를 OVA 또한 부형제를 이용하여 해당용량으로 조제하였다.

### 시험 동물

시험동물인 특정병원체 부재 수컷 기니픽 32두를 구입하여 사용하였다(샘타코 바이오코리아(주), 한국). 입수시 체중은 278.50~314.21 g이었으며 7일간의 순화 기간을 거쳐 체중 319.14~378.14 g인 30두의 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-G269).

### 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 제 1동물사육구역 8호실에서 수행하였다. 시험기간 중 동물실의 온습도는 컴퓨터 시스템을 이용한 자동 온습도 측정기로 매시간 환기횟수 및 조도 등의 환경조건을 정기적으로 측정하였다. 환경측정 결과, 실험기간 동안 온도는 21.7~23.2°C, 상대습도 59.2~69.3%이었으며, 온도, 습도, 환기횟수, 조도 등에서 설정범위를 벗어나 시험의 결과에 나쁜 영향을 끼칠만한 이상은 관찰되지 않았다.

**사료, 물 및 오염물질 검사** - 사료는 (주)카길에그리프리나(한국)에서 생산하는 기니픽용 고품사료를 구입하여 자유 섭취하도록 하였다. 사료의 성분 분석 성적서를 검토한 결과 시험결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유 음수하도록 하였다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기, 한국)에서 수행하였고 먹는물 수질기준에 적합하였다.

**군 분리** - 순화기간 중 건강한 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. 감작 투여량으로 고용량군의 투여량은 0.05 mg/kg으로 설정하였고, 아래로 공비 2를 두어 저용량군을 설정하였으며, 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 설정하였다. G4는 고용량군의 용량을 adjuvant와 혼합 투여하며, G5는 양성 대조물질을 일반적으로 사용되는 2.5 mg/kg을 adjuvant와 혼합 투여하였다. 또한 G6는 시험물질 본연의 통증 유무를 구분하기 위한 것으로 아무것도 투여하지 않았다. 야기 투여량 설정은 일반적으로 아나필락시스 쇼크를 야기하는 항원량으로 감작시의 고용량을 사용하므로 본 시

**Table I.** Experimental design and treating groups for sensitization and active systemic anaphylaxis test of Guinea pigs

Groups	Sensitization test				Active systemic anaphylaxis test		
	Number of animal (Code No.)	Amounts (ml/kg)	Dose (mg/kg)	Pathway	Amounts (ml/kg)	Dose (mg/kg)	Pathway
G1 (Negative control group)	5 (1-5)	1	0	<i>iv</i>	1	0.05	<i>iv</i>
G2 (Low dose group)	5 (6-10)	1	0.025	<i>iv</i>	1	0.05	<i>iv</i>
G3 (High dose group)	5 (11-15)	1	0.05	<i>iv</i>	1	0.05	<i>iv</i>
G4 (High dose+adjuvant)	5 (16-20)	1	0.05	<i>iv</i>	1	0.05	<i>iv</i>
G5 (Positive control, OVA+adjuvant)	5 (21-25)	1	2.5	<i>iv</i>	1	2.0	<i>iv</i>
G6 (Normal group)	5 (26-30)	0	0	-	1	0.05	<i>iv</i>

험에서는 고용량군의 용량을 야기항원량으로 설정하였다. 양성대조물질은 일반적으로 사용되는 양인 2.0 mg/kg으로 하였다.

**투여경로**

**기니피크의 감각** - 기니피크의 경배부 피하에 투여하였고, FCA와 혼합하여 투여하는 군은 충분히 에멀전화 시킨 후에 투여하였다. 감각을 위한 최초 투여일을 Day 1로 설정하였다.

**감작기간** - G1, G2 및 G3군은 주 2회, 3주간, 총 6회 감작하였으며, G4와 G5군은 2주에 1회로 4주간 총 3회 감작하였다.

**아나필락시스 쇼크반응의 야기** - 최종감작 14일 후에 (G1~G3 : Day 33, G4~G5 : Day 43) 야기 항원액을 기니피크의 후지 정맥내에 투여하고 30분간 전신의 아나필락시스 쇼크 증상을 관찰하였다.

**관찰 및 검사**

**일반증상** - 모든 동물을 1일 1회 이상 관찰하여 결과를 개체별로 기록하였다. 1차 감작일을 Day 1로 설정하였다.

**체중** - 모든 동물에 대하여 첫 투여전, 시험기간 중 제 1회 및 야기일에 체중을 측정하였다.

**아나필락시스 쇼크반응의 판정** - Table II의 판정 기준에

**Table II.** Indication standard of shock for active systemic anaphylaxis test by Guinea pigs

Indication standard	
1 Restlessness	11 Dyspnea
2 Piloerection	12 Rhonchus
3 Tremor	13 Cyanosis
4 Rubbing or licking nose	14 Staggering gait
5 Sneezing	15 Jmping
6 Coughing	16 Gasping and writhing
7 Hyperpnea	17 Convulsion
8 Urination	18 Side position
9 Evacuation	19 Cheyne-Stokes respiration
10 Lacrimation	20 Death

**Table III.** Judgment of shock for active systemic anaphylaxis test by Guinea pigs

Judgment	
[-] Asymptomatic	Asymptomatic
[±] Mild	Symptom of 1~4 (Indictional standard)
[+] Moderate	Symptom of 1~10 (Indictional standard)
[++] Severe	Symptom of 1~19 (Indictional standard)
[+++] Death	Death

따라 Table III의 쇼크 반응을 판정하였다.

**부검상** - 야기 후 30분간 전신의 증상을 관찰한 후 모든 동물에 대하여 Ether 마취법으로 도살한 후 부검하여 기관점막, 폐, 심장, 흉강 및 횡격막 등에 대한 육안적 관찰을 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**일반증상 및 사망** - 투여부위 경결(induration)이 고용량군(G3)은 Day 8부터 Day 33까지, 고용량+adjuvant군(G4) 및 양성대조군(G5)의 모든 동물은 Day 3부터 Day 43까지 관찰되었다(Table IV). 투여부위 가피형성(crust formation)이 고용량+adjuvant군(G4) 및 양성대조군(G5)에서 Day 38부터 Day 43까지 각각 3례와 1례씩 관찰되었으며, 양성대조군(G5)의 1례는 Day 41부터 Day 43까지 관찰되었다(Table IV). 관찰기간 동안 모든 실험에서 사망 개체는 관찰되지 않았다(Table IV). 일반증상에서 관찰된 고용량군(G3), 고용량+adjuvant군(G4) 및 양성대조군(G5) 투여 부위의 경결과 고용량+adjuvant군(G4) 및 양성대조군(G5)에서 관찰된 투여 부위의 가피형성은 정제봉독 및 adjuvant 투여에 의한 것으로 판단하였다.

**체중변화** - 시험물질인 정제봉독에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 그러나 고용량군+고용량+adjuvant군(G4)의 1례와 양성대조군(G5)의 2례에서 Day 33에 일시적으로 관찰되었다. 하지만 Day 34 이후 회복성을 보였으며, 동일군의 다른 동물에서는 관찰되지 않아 개체차에 의해 나타난 우발적인 변화로 판단되었다.

**아나필락시스 쇼크반응의 판정** - 부형제대조군(G1), 저용량군(G2), 고용량군(G3), 고용량+adjuvant군(G4)에서는 아무런 이상이 관찰되지 않아 아나필락시스 쇼크반응의 판정결과 모두 무증상(asymptomatic)으로 판정하였다(Table V). 양성대조군(G5)에서는 코 문지르거나 핥음(rubbing or licking nose) 1례, 재채기(sneezing) 4례, 과호흡(hyperpnea) 3례, 배변(evacuation) 2례, 호흡곤란(dyspnea) 4례, 보행불안(staggering gait) 5례, 도약(jumping) 3례, 헐떡거리고 몸부림침(gasping and writhing) 5례, 횡와(side position) 5례, Cheyne-Stoke's 호흡(Cheyne-Stoke's respiration) 3례 등이 산발적으로 관찰되어 아나필락시스 쇼크반응의 판정결과 Severe(2+) 등급의 중등도 아나필락시스 쇼크반응이 나타나는 것으로 판정되었다. 아나필락시스 쇼크반응의 야기시 부형제 대조군, 저용량군, 고용량군, 고용량+adjuvant군에서는 모두 Asymptomatic(-) 등급이 관찰되었고, 코 문지르거나 핥음, 재채기, 과호흡, 배변, 호흡곤란, 보행불안, 도약, 헐떡거리고 몸부림침, 횡와, Cheyne-Stoke's 호흡 등이 산발적으로 관찰되어 아나필락시스 쇼크반응의 판정결과 Severe(2+) 등급의 중등도 아나필락시스 쇼크반응이 나타나



**Table VI.** Necropsy findings

Groups	N	Fate	Location	Findings
G1	5	Terminal sacrifice		No gross findings
G2	5	Terminal sacrifice		No gross findings
G3	5	Terminal sacrifice		No gross findings
G4	5	Terminal sacrifice		No gross findings
G5	5	Terminal sacrifice	Lung	Diffused red spot
G6	5	Terminal sacrifice		No gross findings

### 결 론

본 연구는 정제봉독의 항원성 시험의 하나로 Hartley계 수컷 기니픽을 이용하여 부형제대조군(G1), 저용량군(G2, 0.025 mg/kg), 고용량군(G3, 0.05 mg/kg), 고용량+adjuvant군(G4, 0.05 mg/kg) 및 양성대조군(G5, OVA+adjuvant)을 설정하여 부형제대조군 및 양성대조군과 정제봉독 투여군을 비교하였다. 모든 동물군에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반 증상 및 체중변화에서도 정제봉독 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 아나필락시스 쇼크반응의 판정 결과, 정제봉독 투여군에서는 쇼크반응이 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험 조건하에서 정제봉독의 0.025 및 0.05 mg/kg 용량에서 항원성이 나타나지 않는 것으로 사료된다.

### 사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ01132503)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**: 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.

- J. (2003) Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J. Vet. Med. Sci.* **65**: 349-355.
3. Piek, T. (1986) Venoms of the Hymenoptera. London, Academic Press.
4. Habermann, E. and Reiz, K. G. (1965) On the biochemistry of bee venom pep-tides, melittin and apamin. *Biochemistry* **343**: 192-203.
5. 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.
6. Curcio-Vonlanthen, V., Schneider, C. H., Frutig, K., Blaser, K. H. and Kalbacher, H. (1997) Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J. Pept. Sci.* **3**: 267-276.
7. Rudenko, S. V. and Nipot, E. E. (1996) Modulation of melittin-induced hemolysis of erythrocytes. *Biokhimiia* **61**: 2116-2124.
8. 조병균, 권기록 (2011) 기니픽을 이용한 Sweet Bee Venom의 항원성 평가. *J. Pharmacopunct.* **14**: 23-32.
9. 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**: 94-98.
10. Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Kim, W. T. and Park, K. K. (2011) Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **64**: e67-72.
11. Han, S. M., Park, K. K., Nicholls, Y. M., Macfarlane, N. and Duncan, G. (2013b). Effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom on keratinocyte. *Phcog. Mag.* **9**: 220-226.
12. 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**: 759-800.
13. Han, S. M., Lee, K. G., Park, K. K. and Pak, S. C. (2013) Skin sensitization study of bee venom (*Apis mellifera* L.) in guinea pigs and rats. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **32**: 27-30.
14. 한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권해용 (2007) 봉독의 간 이 정제 방법, 대한민국특허 10-075881.

(2015. 7. 21 접수; 2015. 9. 14 심사; 2015. 9. 15 게재확정)