J. Fd Hyg. Safety 20(1), 13–17 (2005)

Guinea Pig Maximization Test에 의한 옻나무 추출액(Rhus-II)의 접촉 알러지성 자극에 관한 연구

최창순 · 한동운*†

*오하이오 주립대학 수의과대학 병리학교실, *동물보호계열 천안연암대학**

The Observation of the Skin Contact Allergic Sensitization Test of Rhus-II with Guinea Pig Maximization Test

Changsun Choi and Dong Un Han*†

Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, Ohio State University

Department of Animal Care, Cheonan Yonam College

ABSTRACT – The purpose of the present study was to investigate differences in the sensitizing potential of *Rhus Veniciflua*(Rhus-II), when tested by the guinea pig maximization test(GPMT) and Freund's complete adjuvant test(FCAT) with an identical, intradermal induction concentration. A new grading classification of the sensitization potential is proposed. The GPMT was conducted according to OECD guideline #406, using a multiple-dose design and test results were analysed with logistic regression analysis. During the induction stage, we injected intradermally each three site 0.1ml(1mg/animal) test material, 0.1ml complete Freund's adjuvant and 0.1ml the test agent emulsified in the adjuvant. 7 days later, we induced weak sensitization with 10% sodium lauryl sulfate(SLS) and applide 1ml(10mg/animal) test agent topically on the same site and made a tight occlusion. 14 days later we challenged with 1ml(10mg/animal) of test material on the flank and observed ant 24 hours and 48 hours later. The results were also observed 0% at 24 hours challenge. The results observed 48 hours after challenge were the identical. These data indicated that, although Rhus-II is a no contact allergen. It was reported that the skin sensitization by Rhus-II was not detected the skin sensitization in the guinea pig maximization test (GPMT). Consequently, it was confirmed that Rhus-II had no contact allergic sensitization in guinea pig maximization test.

Key words: guinea pig maximization test, contact allergic sensitization, Rhus-II

오래전부터 옻나무(*Rhus Veniciflua*)는 생체에 다양한 기능성 효과를 지니고 있는 것으로 알려지고 있다.[1)] 사람의 위장에서 소화기능을 돕고 간에서는 어혈약으로 작용하여 염증회복에 도움을 주고 심장에서는 청혈제가 되어 혈액순환을 용이하게 하고 기생충의 제거제로도 사용되어 왔으며, 여성들이 통경약으로 널리 알려져 있다.[2-3)] 그러나 널리알려진 바와 같이 옻나무의 알러지 유발 특성으로 인하여 사람들이 옻나무를 가까이 하지 못하고 있다.[4)] 옻 추출물에 생약제를 첨가한 Rhus-II는 생 옻나무만을 추출한 물질과 비교해서 urushiol의 알러지 성분이 제거된 것으로 확인되었으며, 세포독성은 약해져 있었으며, 간암 유래세포인 HepG2 cell과 대장암 유래세포인 WiDr에서 암세포 성장 억제 효과를 갖는다고 보고하였다.[5-6)]

새로운 약제나 화장품 등의 다양한 종류의 화학물질은 동물의 접촉성 알러지 자극성이 있는지 여부를 검사하여 사람에서의 알러지 발현 유무를 간접적으로 확인하는 방법을 사용한다. 자극성 실험은 주로 약제로 사용될 후보 물질과 화장품 등을 대상으로 시행되는 피부 과민성 시험으로 초기에는 Draize 등이 고안한 기니픽을 이용한 Draize test가 가장 널리 이용되었다.[7)] 이 방법은 10일동안 격일로 피하주사한 다음 2주후에 피부내 주사로 피부 감작능을 시험하는 방법이었다. 이후 시험물질을 피부에 직접 국소도포하여 패쇄 첨부하는 방법과 패쇄하지 않고 국소도포하는 방법 등이 고안되어 시도되었다.[8-9)] Magnusson과 Kligman[10)]은 피부자극 유발을 촉진하기 위하여 complete Freund's adjuvant(CFA)를 사용하는 방법인 guinea pig maximization test(GPMT)를 도입하여 우수한 효과를 거두었다. 이러한 실험들이 시도된 후 위의 다양한 시험법들을 비교하기 위해 guinea pig에 적용한 결과 약한 접촉자극을 검출하는데는 CFA를 사용하는 방법이 부형제를 사용하지 않는 방법보다 좋은 결과를 얻을

†Author to whom correspondence should be addressed.

수 있었다고 보고되었다.[11] 또한, 기니픽을 이용한 실험방법들 중 GPMT가 접촉자극 알러지 유발 물질을 검출하는데 가장 좋은 검출율을 보였고 위양성이나 위음성이 발현할 확률도 가장 적은 것으로 나타났으며, 사람에서 modified Draize test를 이용한 검사결과와도 유사한 성적을 거두는 것으로 보고되었다.[12]

Buehler test는 감작 유발시의 투여를 전부 폐쇄도포에 의하여 행하는 피부감작성 시험으로 검출감도는 Maximization test 보다 약하고 Draize test 보다는 높게 나타난다.[13] 피부감작성 시험에 관하여, 시험지표로는 OECD(Organization of Economic Cooperation and Development)와 영국의 가이드라인이 있다.[14] 실험 수행자에 따라서 실시하는 방법이 약간씩 달라서 혼란을 초래할 수 있으나, 근래에 들어서는 Maximization test가 보편적인 자극성 실험으로 가장 널리 이용되고 있다. 영국의 가이드라인에 따르면 자극작용이 강하여 피내투여가 불가능한 경우에 대해서는 Buehler test를 Maximization test의 대용으로서 인정하고 있다. 본 실험에서는 실험물질인 Rhus-II가 동물의 피부에 감작성이 있는지를 알아보기 위하여 guinea pig maximization test를 실시하였다.

연구방법

시험동물 및 사육조건

Hartley계 기니픽 수컷을 사용하였으며, 입하시 200 g의 체중으로 1주간 순화시킨 후 체중이 280 g~320 g 사이의 개체를 사용하였으며 시험군은 시험물질 처치군(I), 시험물질의 부형제 처치군(II), 양성대조군(III) 및 양성물질의 부형제 처치군(IV)의 4군으로 설정하였다.

사육은 3~5단 사육상자대에 배분한 알루미늄 또는 스테인레스제 사육상자에 5마리씩 사육하고 온도 20~26°C, 습도 30~70%, 인공조명 12시간(오전8시~오후8시)으로 설정된 사육실에서 사육하였다. 시험계의 식별은 사육상자에 식별카드를 부착하였고 개체식별은 포화 피크린 산으로 식별하였다. 사료는 기니픽용 고형사료를 급여하였으며, 물은 자유 급여하였다.

투여용량의 설정

감작I(피내투여) – 동물의 건강을 해치지 않으며 국소의 괴사 또는 궤양을 일으키지 않는 농도로서 일반적으로 최대 5%정도로 시행하는데, 본 실험에서는 예비시험을 시행하여 이상이 없는 최대농도인 원액을 시험농도로 결정하였다.

감작II(국소적용) – 원액을 사용하였으며, 유발시에도 피부자극을 일으키지 않는 최대 농도인 원액을 그대로 사용하였다.

양성대조 – DNCB를 사용하여 감작에 있어서 국소적용 농도는 1.0%, 유발시 국소적용 농도는 0.1%로 적용하였다.

시험물질의 조제

피내투여 – 시험물질 단독투여에서는 시험물질 원액을 사용하였고 양성대조 물질인 DNCB (2,4,-dinitrochlorobenzene)의 경우는 40(v/v)% 에탄올 용액에 용해하여 사용하였다.

FCA와 등량 유제는 시험물질 원액을 동량의 FCA에 현탁하였고, 유화의 확인은 물을 넣은 비이커에 유화액을 1방울 떨어뜨려서 보면 혼합액이 수면에 확산되지 않고 떨어뜨렸을 때의 상태를 유지하면서 부유해 있으면서 유화가 형성된 것으로 확인하였다.

경피적용 – 시험물질은 원액을 그대로 적용하였고 DNCB 0.1%의 경우는 40(v/v)% 에탄올 용액에 용해하고 DNCB 1%(감작II)의 경우는 백색 바세린에 혼합하여 사용하였다.

시험물질 투여

시험은 감작I (피내투여), SLS(Sodium lauryl sulfate) 전처치, 감작II (국소적용) 그리고 유발의 4 단계로 나누어 실시하였다 (Table 1).

감작I(피내투여) – 기니픽의 상배부를 4x6cm의 크기로 제모하고 그림에 표시한 방법으로 1부위에 대해 0.1ml(0.05ml 좌우 2개소)씩 피내투여 하였다(Fig. 1-A).

SLS 전처치 – SLS 전처치는 그림 1의 (B)와같이 감작 I의 6일후 I군 및 II군의 동물을 대상으로 시험물질에 의한 감작을 증강하기 위해 동물의 상배부를 4x6cm의 크기로 제모하고 이 부위에 10%(w/v) SLS 함유 백색 바세린 0.5g을 도포한 다음 24시간 후 SLS를 씻어내고 감작 II를 실시하였다(FIg. 1-B).

감작II(국소적용) – 감작 I으로부터 7일 후 미리 전날에 4x6cm의 크기로 제모한 상배부에, I군에 있어서는 시험물질

Table 1. Test substance for treatment in guinea pig maximization test

Group	No. of animas	Induction		Challenge Topical
		Intradermal	Topical	
I	20<	FCA,Sample, Sample+FCA	SLD+Sample	Sample
II	10<	FCA,Saline, Saline+FCA	SLD+Saline	Sample
III	10<	FCA,DNCB, DNCB+FCA	SLD+DNCB	DNCB
IV	20<	FCA, 40%Ethanol, 40%Ethanol+FCA	SLD+40% Ethanol	DNCB

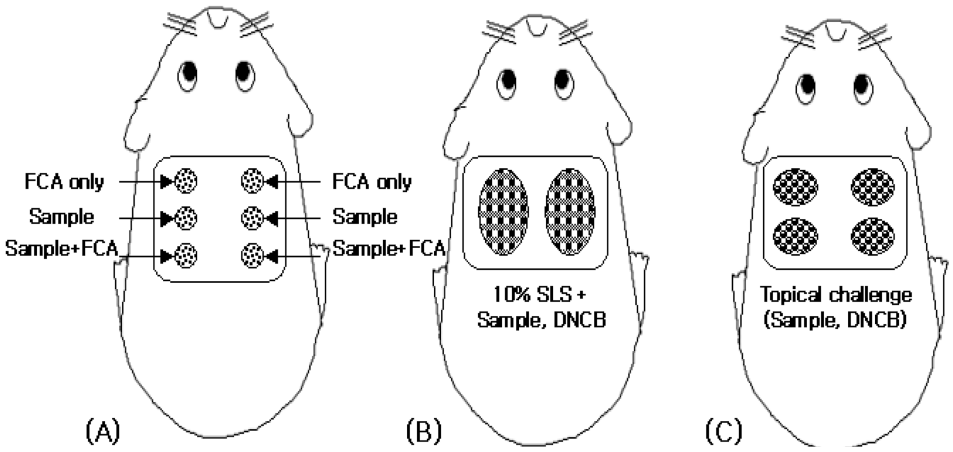

Fig. 1. A: Sensitization by intradermal injection Freund's complete adjuvant, sample solution (Rhus-II), sample solution + Freund's complete adjuvant. B: Topical sensitization using a filter-paper patch soaked in 10% sodium lauryl sulfate(SLS) and 24-hrs after the sample, DNCB. C: The topical challenge with the test sample was carrie out 14 days after the start of topical induction.

을, III군에 있어서는 양성 대조물질을, II군 및 IV군에 있어서는 각각의 부형제를 모두 0.5ml 또는 0.5g 흡착시킨 2x4cm의 여과지를 48시간 폐쇄 첨부하였다(Fig. 1-C).

유발 – 감작 II 실시후 2주 후 동물의 우측 복부를 5×5 cm의 크기로 제모하고 I군과 II군은 시험물질을 III군과 IV군은 양성대조물질인 DNCB를 각각 0.5 ml을 흡착시킨 2×2 cm의 린트포로 24시간 폐쇄 첨부하고, 좌복 측부에는 각각의 부형제 0.5ml을 동일한 방법으로 처치하였다.

일반 증상의 관찰 및 체중측정

감작기간 중 매일 오전 10시와 오후 5시 일반적인 상태를 관찰 기록 하였고, 매주 1회씩 체중을 측정하였다.

피부의 관찰 및 평가방법

유발을 위한 폐쇄첨부제거 24 및 48시간 후에 모든 동물에 관해서 피부 소견을 평가하였다(Table 2).

각 군에서 반응을 보이는 개체에 대한 양성반응의 비는 [양성동물수/전체동물수×100(%)]로 나타내었다.

I군 및 III군의 동물에 대해서는 반응이 나타난 동물에 대해서는 실험에 사용한 동물수에 대한 감작된 동물수의 감작율 [양성동물수/전체동물수×100(%)]을 구하고 피부 감작성의 정도를 평가하였다(Table 3).

Table 2. Evaluation of skin reaction for maximization scoring

Sansitization score	Erythema reaction state	Edema formation
0	No reaction	No edema
1	Scattered mild redness	Slight edema
2	Moderate and diffuse erythema	Moderate edema
3	Severe erythema with scar formation	Sever edema

Table 3. The maximization grade

Sansitization rate(%)	Sansitization score	Clasification
0 ~ 8	I	Weak
9~28	II	Mild
29~64	III	moderate
65~80	IV	Strong
81~100	V	Extreme

통계처리

측정한 체중에 관해서 대조군과의 사이에서 일원배치의 분산분석을 실시하였다. 차이가 있는 경우 t-test 검정에 따라 평균치의 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

본 실험에 사용된 Rhus-II의 기니픽에 대한 피부자극성을 확인하기 위하여 maximization test를 실시한 결과 다음과 같이 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

일반 중독 증상

시험물질을 처리한 두 그룹의 동물에서는 어떠한 증상도 관찰되지 않았으며, 치사한 동물도 발견되지 않았고 양성대조 물질을 투여한 그룹에서는 그룹 III에서 피부의 경도에서 중등도에 이르는 홍반과 부종이 관찰되었으나, 다른 임상 증상은 관찰되지 않았다.

피부반응의 평가

모든 동물의 처리 부위 관찰은 시험물질 처리 후 24, 48, 72시간째에 실시한 결과 Table 3에 나타난바와 같이 시험물질을 처리한 군에서는 발적, 홍반, 부종 등이 전혀 관찰되지 않았고 반응의 빈도도 0%로 나타나 grade I으로 판정되었다. 양성 대조군에서는 그룹 III에서 처리 후 24시간째부터 홍반과 부종 등의 증상이 관찰되었다(Table 4-5).

신약과 화장품 등의 화학물질과 기타 그 피부 자극에 대한 독성이 알려져 있지 않은 물질을 생산할 때는 접촉자극을 일으키는 알러지 유발가능성을 검토할 필요성이 있다. 접촉자극성을 검사하기 위한 실험에는 guinea pig이 주로 사용되고 있으며, Draiza method, LLNA, GPMT, Buehler method 등이 널리 알려져 있으나, Buehler method 는 특별한 경우에 사용되고 최근에 개정된 OECD guideline No. 406(1992)에 따른 GPMT가 널리 사용되고 있다. 또한 GPMT는 자극성이 약한 물질도 검출할 수 있어 다른 방법에 비해 선호되고 있다.[10-14]

GPMT의 결과는 양적 평가(quantitative assessment)와 질

Table 4. Erythema score in contact allergenicity test of Rhus-II with maximization test

Group	Induction	Challenge	No. of animals	Time[a]	Erythema score				FR[b]	MR[c]
					0	1	2	3		
I	Chonha moogeok	Chonha moogeok	20	24	10	0	0	0	0/20	0
				48	10	0	0	0	0/20	0
				72	10	0	0	0	0/20	0
II	Saline	Chonha moogeok	10	24	10	0	0	0	0/10	0
				48	10	0	0	0	0/10	0
				72	10	0	0	0	0/10	0
III	DNCB	DNCB	10	24	0	3	4	3	10/10	3.3
				48	0	1	5	4	10/10	3.9
				72	0	0	4	6	10/10	4.1
IV	40% Ethanol	DNCB	20	24	10	0	0	0	0/20	0
				48	10	0	0	0	0/20	0
				72	10	0	0	0	0/20	0

a: Reading time after the removal of closed patches.
b: Fraction response = Number of animals which showed a positive reactoin / Number of animals tested.
c: Mean response = Total number of erythema and edema scores / Number of animals tested.

Table 5. Edema score in contact allergenicity test of Rhus-II with maximization test

Group	Induction	Challenge	No. of animals	Time[a]	Erythema score				FR[b]	MR[c]
					0	1	2	3		
I	Chonha moogeok	Chonha moogeok	20	24	10	0	0	0	0/20	0
				48	10	0	0	0	0/20	0
				72	10	0	0	0	0/20	0
II	Saline	Chonha moogeok	10	24	10	0	0	0	0/10	0
				48	10	0	0	0	0/10	0
				72	10	0	0	0	0/10	0
III	DNCB	DNCB	10	24	2	3	5	0	10/10	3.3
				48	0	4	6	0	10/10	3.9
				72	0	5	5	0	10/10	4.1
IV	40% Ethanol	DNCB	20	24	10	0	0	0	0/20	0
				48	10	0	0	0	0/20	0
				72	10	0	0	0	0/20	0

a: Reading time after the removal of closed patches.
b: Fraction response = Number of animals which showed a positive reactoin / Number of animals tested.
c: Mean response = Total number of erythema and edema scores / Number of animals tested.

적 평가(qualitative assessment)로 나타낼 수 있다. 양적평가는 Draize에 의하여 작성된 기준에 따라 각 개체에서 나타나는 병변의 정도를 4단계로 나누어 분류하고 있다(Table 2).

이것은 guinea pig에서의 실험결과와 사람에서의 반응에 대한 근거를 제시해 줄 수 있다. 질적 평가는 시험동물에서 양성반응을 나타낸 개체수를 전체 대상 시험동물에 대한 백분율로 나타내는 방법으로 Draize가 제시한 기준에 따라 그 등급을 정하고 있다(Table 3).

질적 평가에 있어서는 실험동물 중 어느 한 개체에서라도 반응의 강도와 관계없이 양성반응이 나타나면 그 물질이 알러지 유발능을 가지고 있는 것으로 생각한다. 실험동물에서 시험물질에 의한 자극을 나타낸 개체수가 아무리 적더라도 대상물질이 생산된 후 사람에 노출되는 수는 막대하여 상당한 수의 사람들이 손상을 입을 수도 있기 때문에 GPMT에 있어서 양적평가보다는 질적 평가에 더 큰 비중을 두고 있다.

본 시험에 사용된 Rhus-II는 이러한 기준으로 해석해 볼 때 Grade I으로 접촉 자극 알러지를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

Rhus-II 원액에 대한 피부 감작성을 Hartley 계 기니픽 수컷을 사용하여 피부에 감작야기 후 24, 48시간과 72시간(패취제거후 0, 24, 48시간)째에 대한 피부반응 정도를 관찰하고 일반중독 증상을 관찰 조사한 결과 시험물질 0.1ml을 Hartley 계 수컷 기니픽의 피부에 처치한 결과 모든 처치 군에서 시험기간 중 치사한 동물이 관찰되지 않았고 일반적인 임상증상과 중독 증상은 관찰되지 않았으며, 시험물질에 의한 홍반과 부종 등이 유발되지 않았다. 또한 전 시험기간 동안 약제 투여에 따른 사료섭취량과 음수량에서 개체별로 약간의 차이를 보였지만 유의성이 없었고 각 그룹별로 체중에서도 유의할 만한 변화가 인정되지 않았다.

이상의 결과 본 시험물질에 대한 기니픽의 피부 감작율은 0%로 피부에 대한 피부 감작성이 없는 것으로 확인되었다.

참고문헌

1. Lee S.J. ToehaeBonchogangmok, Komoonsa, Seoul. pp.1139-1141 (1987).
2. 김태정. 한국의 자원식물. 294. 서울대학교 출판부. p. 194 (1996).
3. Kim I.H. Shinyak, Kwangjewon, Seoul. pp. 72-79 (1992).
4. Hong D.H. Han S.B., Lee C.W., Park S.H., Jeon Y.J., Kim M.J., Kwak S.S. and Kim H.M. Cytotoxicity of urushiols isolated from sap of Korean Lacpuertree. *Arch Pharm Res.* **22**:638-641 (1999).
5. 조영식, 정옥, 조정원, 이경애, 심정현, 김광수, 이홍수, 성기승, 윤도영. 오추 추출물의 세포독성 및 자궁경부암 바이러스 암 유발이자 E6 와 E7의 작용에 미치는 효과. 한국식품과학회지, **32**(6):1389-1395 (2000).
6. Seong K.S., Yoon S.S., KIm Y.J., Han C.K., Kim Y.B., Ha T.Y. and Jee J.R. A study on the development of fast foods on Rhus-Chicken and Rhus-Duck. *Ministry of Agriculture and Forestry,* 34-42 (1998).
7. Maurer T, Thomann P, Weirich EG, Hess R. The optimization test in the guinea-pig. A method for the predictive evaluation of the contact allergenicity of chemicals. *Agents Actions.* **5**(2):174-179 (1975).
8. Buchler E.V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arches. Derm.* **91**:171-177 (1965).
9. Buchler E.V. and Griffith J.F. Experimental skin sensitization in the guinea pig and man. "Animal models in dermatology" editied by Maibach H.I. Curchill-Livingstone New York. pp. 56. (1975).
10. Magnusson B. and Klingman A.M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Derm.* **52**(3):268-276 (1969).
11. Prince H.N. and Prince T.G. Comparative guinea pig assays for contact hypersensitivity. *Cosmet. Toiletries.* **92**:53 (1977).
12. Marzulli F. and Maguire H.C. Jr. Usefulness and limitation of various guinea pig test methods in detecting human skin sensitizer-valication of guinea pig tests for skin hypersensitivity. *Fd. Chem. Toxic.* **20**:67-74 (1982) .
13. Frankild S, Volund A, Wahlberg JE, Andersen KE. Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. *Acta. Derm. Venereol.* **80**(4):256-262 (2000).
14. Basketter DA, Selbie E, Scholes EW, Lees D, Kimber I, Botham PA. Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximization, Buehler and local lymph node assays. *Food Chem Toxicol* 1993 **31**(1):63-67 (1993).