

원 저

## Anti-BV의 봉약침 항체 효능에 관한 실험적 연구

권기록\* · 이광호\* · 박원필\*

\* 상지대학교 한의과대학 침구학교실

### Experimental Study on Anti-body effects of Anti-BV on the Bee Venom Herbal Acupuncture

Ki Rok Kwon\* · Kwang Ho Lee\* · Won Pil Park\*

\* Department of Acupuncture & Moxibution, College of Oriental Medicine, Sang-ji University

#### Abstract

**Objectives :** To observe physiological anti-body effects of anti-BV, acute toxic response, measurement of LD<sub>50</sub>, and the effects of anti-body were evaluated.

**Methods :** LD<sub>50</sub> of Anti-Bee Venom were measured, and to analyze acute toxic responses, weight, and the anti-body effects various concentrations of Anti-BV were diluted and the survival rate was measured. Cell blood count (CBC), liver, spleen, and kidney pathologies were observed from the histological aspects.

**Results :** Experiment was conducted to observe Anti-BV as the anti-body to the bee venom and the following results were obtained :

1. Anti-BV was injected intraperitoneally and no toxic responses were witnessed. All of the experiment subjects stayed alive during the experiment, making LD<sub>50</sub> analysis impossible.
2. Anti-BV was injected intraperitoneally in mice and no significant weight changes were measured between the control group and the experiment groups.
3. Measuring the concentration dependent survival rate, the highest survival rate was at the concentration of  $1.25 \times 10^2 \text{mg/kg}$  (1/2.000) for Anti-BV.
4. No particular results were shown in the CBC test.
5. Observation of changes in the organ tissues, Anti-BV was found to suppress blood stasis in the liver and inhibit necrosis of the cells.

**Conclusion :** Above results suggest that Anti-BV doesn't cause any toxic responses in the body and works as an anti-body to the bee venom. Further studies must be followed to secure the findings.

**Key words :** Bee Venom, Anti-Bee Venom, LD<sub>50</sub>, Acute toxicity, H-E stain, IgY

### 1. 서 론

봉약침요법이란 살아있는 꿀벌(Apis mellifera)의 독낭에 들어있는 독을 인위적으로 추출·가공하여 질병과 유관한 부위 및 경혈에 주입함으로써 자침의 효과와

벌의 독이 지니고 있는 생화학적 약리 작용을 질병의 치료에 이용하는 신침요법이다<sup>1)</sup>. 그동안의 많은 연구를 통하여 봉약침이 진통, 소염 효과가 뛰어날 뿐 아니라 면역계 등에 영향을 미쳐, 슬관절염이나 요추간판탈출증, 그리고 류마티스 관절염 등과 같은 질환에 우수한

효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>25)</sup>. 하지만 치료의 과정에서 발생하는 다양한 형태의 Allergy 반응은 시술자나 환자에게 있어서 부담으로 작용하며 특히 봉독에 대한 과민성을 지닌 경우에 발생하는 전신즉시형 반응인 anaphylactic shock은 봉약침 시술에서 가장 큰 장애가 되고 있다<sup>67)</sup>.

봉독에 대한 과민반응은 2-3명/10만 명 정도의 역학적 분포를 나타낸다. 벌에 처음 쏘였을 때나 봉약침 시술 시에 anaphylactic shock이 일어나면 혈압이 떨어지고 전신 무력감, 피부 발진, 두드러기, 안면 창백, 오심 구토, 복통, 빈맥, 오한 등이 나타날 수 있고 더 진행되면 빈호흡이나 실신, 사망에도 이를 수도 있다. 이러한 제1형 또는 전신즉시형 과민 반응은 동종양 세포항체(homocytotropic antibody)인 IgE에 의해 매개된다고 알려져 있다. 봉독의 Allergy반응에 가장 중요한 Allergen은 대표적인 효소인 Phospholipase A<sub>2</sub>(이하 PLA<sub>2</sub>)이다. PLA<sub>2</sub>는 효소성분의 대부분을 차지하는 물질로, 봉독에 민감한 사람들의 90% 정도에서 이에 대한 IgE 항체가 발견된다. 따라서 봉약침을 임상에서 사용하면서 발생할 수 있는 anaphylactic shock에 적극적으로 대처하기 위하여 개발된 것이 바로 Anti-BV(Bee Venom IgY 항체)이다. Anti-BV는 PLA<sub>2</sub>를 산란계에 주사하여 계란에서 생성된 IgY 특이 항체로, 봉약침의 중화항체로 사용되기에 적절한 항원-항체 역가를 나타내고 있음이 보고된 바 있다<sup>68)</sup>. 본 연구는 Anti-BV가 생체에 주입되었을 때 독성유무를 확인하고, 봉독의 항체로서 기능을 수행하는지를 확인하기 위해 항체효능을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 방 법

### 1. 동물 및 재료

#### 1) 동물

Anti-BV의 LD<sub>50</sub>, 그리고 급성독성실험과 항체효능을

관찰하기 위하여 체중 20±3g 내외의 ICR계 웅성 mouse를 실험에 사용하였다. 모든 동물은 중앙실험 동물센터에서 구입하여 2주 동안 고형사료와 물을 충분히 주며 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 정상군, 대조군, 농도별 실험군 모두 각 10마리씩으로 실험하였다.

### 2) 재료

#### ① 봉독의 조제

실험에 사용한 봉독은 전기자극용 봉독채취기(Bee Venom Collector -BVC)를 사용하여 채취한 것으로 정제 과정을 거친 후 동결건조하여 실험에 사용하였다. 동결건조된 분말봉독을 정량 조절하여 10mg/ml의 고농도로 희석한 후 pH 및 전해질 balance를 조절을 하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

#### ② Anti-BV의 조제

실험에 사용한 Anti-BV는 25주령된 Hy-Line Brown 산란계를 이용하여 PLA<sub>2</sub> 200µg을 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 녹인 후 complete Freund's adjuvant

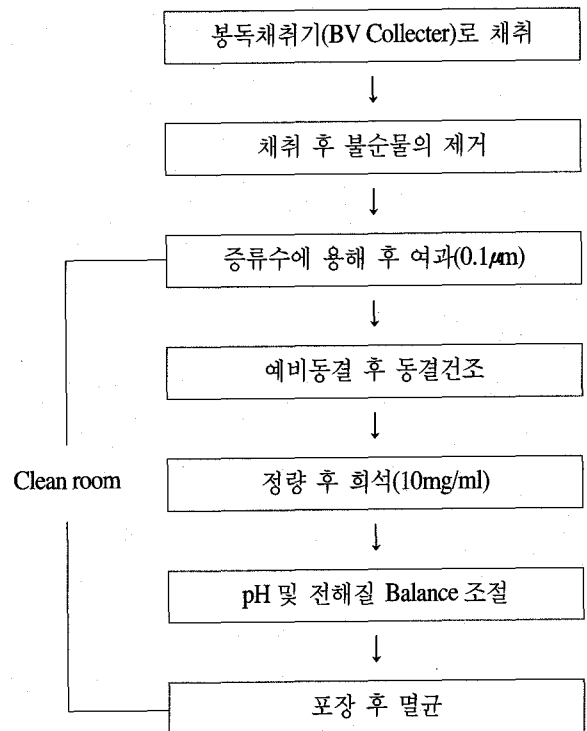


Fig. 1 Manufacturing process of Bee Venom Herbal Acupuncture

\* 본 연구에 도움을 주신 대한약침학회에 깊은 감사를 드립니다.

\* 교신저자 : 권기록, 상지대학교 한의과대학 침구학교실  
(Tel : 033-738-7503, E-mail : beevenom@paran.com)

와 섞어 닭의 가슴 근육에 1-2회/week 면역 주사하였다. 충분한 역가가 확보된 계란은 매일 수집하여 4°C에 보관하였고, 계란으로부터 anti-PLA<sub>2</sub> IgY는 Akita와 Nakai의 방법<sup>9)</sup>에 따라 lipoprotein을 침전시킨 후 수용성 분획으로부터 분리하였다.

분리된 Anti-BV는 동결건조하여 분말로 만든 후 정량 조절하여 10mg/ml의 고농도로 희석한 후 pH 및 전해질 balance를 조절을 하여 실험에 사용하였다(Fig. 2).

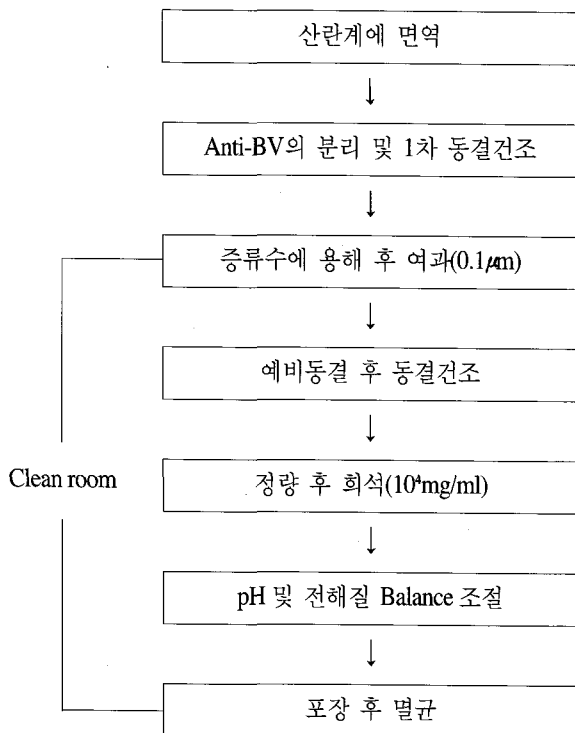


Fig. 2 Manufacturing process of Anti-Bee Venom(Anti-BV)

### ③ 주사기

30 gauge 1ml insulin syringe(Becton Dickinson, U.S.A.)를 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 실험군의 구성

Anti-BV의 LD<sub>50</sub> 측정 및 급성 독성 관찰은 예비실험으로 3마리를 한 군으로 하여 점차 용량을 증량하면서 동일한 방법으로 Anti-BV의 LD<sub>50</sub>을 찾아가 하였다. Anti-BV의 항체 효능에서는 10마리의 mouse를 한 군으

로 하여 정상군은 생리식염수를, 봉독군은 측정된 LD<sub>50</sub>량을, Anti-BV군은 봉독의 LD<sub>50</sub>량에 2×10<sup>3</sup>mg/ml, 10<sup>3</sup>mg/ml, 5×10<sup>2</sup>mg/ml, 2×10<sup>2</sup>mg/ml, 그리고 10<sup>2</sup>mg/ml의 Anti-BV를 희석하여 동량으로 사용하였다.

### 2) 봉독 및 Anti-BV의 시술

Injection Volume을 체중×18.75µl로 하여 정량으로 mouse의 복강 내에 주입하였다.

## 3. 측정 항목

### 1) Anti-BV의 LD<sub>50</sub> 및 급성 독성 관찰

Anti-BV의 독성을 관찰하기 위하여 다양한 용량으로 실험군을 구성하여 용량에 따른 독성을 실험적으로 규명하고자 식품의약품안전본부 고시(1998. 12. 3 제정)의 '의약품 독성시험기준' 제98-116호<sup>10)</sup>에 준하여 1회 주입한 후 1주일간 1일 1회 mouse의 호흡, 운동성, 경련, 반사, 안구증상, 심장혈관계 증상, 立毛, 통각, 근긴장 및 기타 독성반응 등의 상태를 관찰하였다. 체중은 실험 첫째 날과 7일째에 1회씩 저울을 이용하여 측정하였다. 사망유무와 독성반응을 생리식염수를 주입한 대조군과 비교하면서 관찰하였다.

### 2) Anti-BV의 항체 효능

#### ① Anti-BV의 농도에 따른 생존률 측정

10마리의 mouse를 한 군으로 정상군은 생리식염수를, 봉약침군은 예비실험에서 결정된 LD<sub>50</sub>량을, Anti-BV군은 봉약침의 LD<sub>50</sub>량에 1mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 5×10mg/kg, 10<sup>2</sup>mg/kg, 그리고 5×10<sup>2</sup>mg/kg의 Anti-BV를 희석하여 동량으로 사용하였고 48시간 생존율을 측정하였다.

#### ② 채혈

실험 종료일에 ether로 마취한 뒤, 복대정맥을 통하여 5cc의 혈액을 채취하였다. 채혈 직후 1cc는 EDTA bottle(녹십자의료공업, 한국)에 넣고, 나머지는 vacutainer tube(vacutainer, BECTON DICKINSON, U.S.A.)에 넣었고, tube에 넣은 혈액은 원심분리기를 이용하여 3000rpm으로 5분 원심한 뒤, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

③ Complete blood count 측정

EDTA bottle에 보존한 혈액을 이용하여 자동혈구계수기(sysmex kx-21, Japan)를 이용하여 WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, MCV, MCH, MCHC, Platelet를 측정하였다.

④ 조직검사

마취한 mouse에서 검사물을 채취하기 위하여 10×20×4mm의 크기로 간장, 비장, 그리고 신장을 Sampling하였다. 단백질 응고와 살균, 그리고 생체에 가깝게 세포구성성분 보호하기 위하여 10% Formalin(H-CHO)으로 조직을 Fixation한 후 formalin 색소와 고정액의 주성분 제거하기 위하여 흐르는 물에 12-24hr 동안 씻었다. 이후 70%부터 10% 간격으로 100%까지 1시간씩 Alcohol 농도를 증가시키면서 Dehydration시킨 후 Xylene과 Chloroform을 사용하여 Clearing 시켰다.

이후 Paraffin을 처리하여 embedding center의 warming chamber에서 60°C로 2hr 동안 방치하여 impregnation한 후 조직을 잘라 균등하게 냉각 후 냉동실에 보관하였다. 이를 4-5µm 두께로 자른 후, 박절된 조직을 붓으로 조심히 떼어내어 50% 알콜에 띄워 floating bath로 옮겨서 잘된 절편을 albumin이 얇게 발라진 slide위에 접착하여 labelling하였다. 완전히 물방울을 제거한 뒤 60도의 부란기에 2-3시간 방치하여 조직을 고착시켜 현미경으로 관찰하였다. 염색법은 mercuric oxide를 산화제로 사용하여 hematoxylin을 숙성시키는 Harris - Hematoxylin stain을 사용하였다.

4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 SPSS(Release 10.0.7)를 이용하였으며, student's T-test를 시행하여 각각의 경우 P-value가 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. Anti-BV의 LD<sub>50</sub> 및 급성독성반응 관찰

1) Anti-BV의 LD<sub>50</sub> 측정

Anti-BV의 LD<sub>50</sub>을 측정하기 위하여 다양한 농도를 mouse의 복강 내에 주입하였으나 실험군 모두에서 사망한 개체가 발생되지 않아 LD<sub>50</sub>은 산출할 수 없었다 (Table 1.).

Table 1. Mortality of mice treated with Anti-Bee Venom

Dose of Anti-Bee Venom(mg/kg)	Hours after treatment					Final Mortality	Survival Rate(%)
	24	48	72	120	168		
1.0(3)*	0	0	0	0	0	0/3	100
5.0(3)	0	0	0	0	0	0/3	100
10.0(3)	0	0	0	0	0	0/3	100
50.0(3)	0	0	0	0	0	0/3	100
10 <sup>2</sup> (10)	0	0	0	0	0	0/10	100
5×10 <sup>2</sup> (10)	0	0	0	0	0	0/10	100

\* : Number of Animal

2) 급성 독성반응 관찰

급성 독성실험에서 Anti-BV를 5×10<sup>2</sup>mg/kg mouse의 복강 내에 주입한 후, 7일간 임상관찰을 한 결과 주요 독성 증상들은 관찰되지 않았다(Table 2.).

Table 2. Clinical findings in mice treated with Anti-BeeVenom in acute toxicity test.

Clinical observation		Hours after treatment							
		1	12	24	48	72	96	120	168
Tachypnea	(10)*	0	0	0	0	0	0	0	0
Motor activities	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Opisthotonus	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflex	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Ocular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Cardiovascular signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerection	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Muscle tone	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Gastrointestinal signs	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
skin	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0
others	(10)	0	0	0	0	0	0	0	0

\* : Number of Animal

3) 체중측정

Anti-BV의 급성 독성실험에서 생리식염수를 주입한

정상군과 Anti-BV를  $10^2\text{mg/kg}$  주입한 군,  $5 \times 10^2\text{mg/kg}$  주입한 군의 체중 변화를 시험 시작 전과 일주일 후에 각각 비교하였다. 그 결과 실험군 모두 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 3.).

Table 3. Body weight of mice treated with Anti-Bee Venom in acute toxicity test.(unit : g)

Group	day1	day7
Normal	$25.59 \pm 1.55$	$28.49 \pm 2.52$
Anti-Bee Venom ( $10^2\text{mg/kg}$ )	$26.89 \pm 1.72$	$29.01 \pm 3.64$
Anti-Bee Venom ( $5 \times 10^2\text{mg/kg}$ )	$26.03 \pm 1.51$	$30.41 \pm 0.97$

## 2. Anti-BV의 항체 효능

### 1) Anti-BV의 농도에 따른 생존률

Anti-BV의 농도에 따른 생존율을 측정하기 위하여 예비실험에서  $LD_{50}$ 으로 추정되는 용량에서 상위용량인  $6.0\text{mg/kg}$ 에  $5 \times 10^2\text{mg/kg}(1/500)$ 부터  $2.5 \times 10\text{mg/kg}(1/10,000)$ 까지 다양한 농도의 Anti-BV를 정량으로 (Injection Volume=체중 $\times 18.75\mu\text{l}$ ) 조절하여 mouse의 복강 내에 주입한 후 48시간 동안 사망유무를 관찰하였다. 그 결과  $5 \times 10^2\text{mg/kg}(1/500)$ 에서는 3마리가 생존하여 생존율 30%를 나타내어 봉독 주입군과 차이를 나타내지 않았으나  $2.5 \times 10^2\text{mg/kg}(1/1,000)$ 에서는 4마리가 생존하여 생존율 40%를 나타내었고,  $1.25 \times 10^2\text{mg/kg}(1/2,000)$ 에서는 7마리가 생존하여 생존율 70%를 나타내었고,  $0.5 \times 10^2\text{mg/kg}(1/5,000)$ 에서는 6마리가 생존하여 생존율 60%를 나타내었으며,  $2.5 \times 10\text{mg/kg}(1/10,000)$ 에서는 6마리가 생존하여 생존율 60%를 나타내었다(Fig. 3).

### 2) Cell Blood Count(CBC)

Anti-BV의 농도에 따른 CBC의 변화를 측정한 결과 BV+Anti-BV(1/1,000)군에서 MCV가  $50.63 \pm 1.34$ 로 정상군에 비하여 유의하게 감소하였고, BV+Anti-BV(1/5,000)군에서는 Hemoglobin이  $14.00 \pm 0.14\text{g/dl}$ 를, Hematocrit이  $46.50 \pm 1.70\%$ 를 나타내어 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Table 4.).

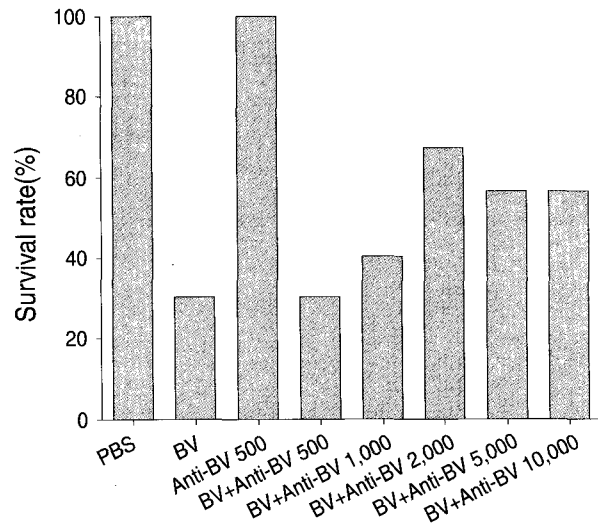


Fig. 3 Survival rate of Bee Venom and various concentration of Anti-Bee Venom in mice

Anti-BV 500 :  $5 \times 10^2\text{mg/kg}(1/500)$   
 Anti-BV 1,000 :  $2.5 \times 10^2\text{mg/kg}(1/1,000)$   
 Anti-BV 2,000 :  $1.25 \times 10^2\text{mg/kg}(1/2,000)$   
 Anti-BV 5,000 :  $5 \times 10^2\text{mg/kg}(1/5,000)$   
 Anti-BV 10,000 :  $2.5 \times 10^2\text{mg/kg}(1/10,000)$

### 3) 간장 조직에 미치는 영향

봉약침 및 Anti-BV 주입 후 나타나는 간장조직의 변화를 관찰하기 위하여 H-E stain으로 염색한 후 간장 조직의 병리소견을 살펴보았다. 그 결과 정상군의 간 조직은 정상이었으며, 봉약침을 주입한 군과 주입 후 항체를 주입한 군의 조직에서 모두 혈관에 혈액이 차 있는 소견이 관찰되었다. 특히 봉약침만 주입한 군에서의 congestion 소견이 뚜렷하였고, 전체적으로 염증반응은 보이지 않았다(Fig.4-6).

### 4) 비장 조직에 미치는 영향

봉약침 및 Anti-BV 주입 후 나타나는 비장조직의 변화를 관찰하기 위하여 H-E stain으로 염색한 후 비장 조직의 병리소견을  $\times 100$  배율로 살펴보았다. 그 결과 정상군의 비장 조직은 정상이었으며, 봉약침을 주입한 군과 봉약침 주입 후 항체를 주입한 군의 조직에서 모두 White pulp(Bcell, Tcell 집합체)에서 세포의 고사(apoptosis) 현상이 증가된 소견을 나타내어 대식세포에

Table 4. Complete blood count values in mice treated intraperitoneally with Bee Venom and Anti-Bee Venom in toxicity test.

Group CBC	Normal	Control BV (6.0mg/kg)	Anti-BV (5 × 10 <sup>2</sup> mg/kg)	BV+Anti-BV (1/500)	BV+Anti-BV (1/1,000)	BV+Anti-BV (1/2,000)	BV+Anti-BV (1/5,000)	BV+Anti-BV (1/10,000)
WBC(× 10 <sup>3</sup> /μl)	4.44 ± 1.84	3.69 ± 1.30	5.07 ± 1.48	3.78 ± 0.65	3.83 ± 1.22	3.47 ± 1.32	2.73 ± 0.45	2.83 ± 0.60
RBC(× 10 <sup>6</sup> /μl)	9.15 ± 0.37	9.98 ± 0.71	9.57 ± 0.54	8.40 ± 1.34	10.37 ± 0.18	10.10 ± 0.66	8.41 ± 0.88	9.19 ± 0.53
HGB(g/ dl)	14.80 ± 0.46	16.07 ± 0.68	15.50 ± 0.82	13.50 ± 2.00	16.60 ± 0.76	16.58 ± 1.00	14.00 ± 0.14 <sup>b)</sup>	15.06 ± 0.73
HCT(%)	49.03 ± 1.88	52.73 ± 2.35	50.91 ± 2.22	43.37 ± 6.92	52.67 ± 1.10	53.27 ± 3.55	46.50 ± 1.70 <sup>b)</sup>	49.88 ± 2.14
MCV(fL)	53.60 ± 0.92	52.90 ± 2.18	53.24 ± 0.98	51.67 ± 3.37	50.63 ± 1.34 <sup>a</sup>	53.78 ± 1.04	55.45 ± 3.75	54.32 ± 1.03
MCH(pg)	16.23 ± 0.29	16.17 ± 0.68	53.24 ± 0.98	16.07 ± 0.23	15.97 ± 0.55	16.42 ± 1.00	16.75 ± 1.63	16.40 ± 0.31
MCHC(g/dl)	30.27 ± 0.21	30.50 ± 0.10	30.52 ± 0.60	31.13 ± 1.67	31.43 ± 1.17	30.53 ± 0.85	30.15 ± 0.92	30.22 ± 0.40

a : Control and treat groups were compared with a normal group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

b : Treat groups were compared with a control group by students' two-tailed t test. (P<0.05)

RBC : Red blood cell

WBC : White blood cell

MCV : Mean corpuscular volume

MCH : Mean corpuscular hemoglobin

MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration

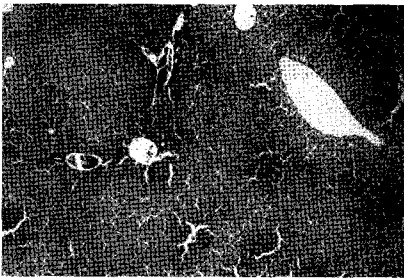


Fig. 4 The liver cells in mice treated with Normal Saline(× 100)



Fig. 5 The liver cells in mice treated with Bee Venom 6.0mg/kg(× 100)

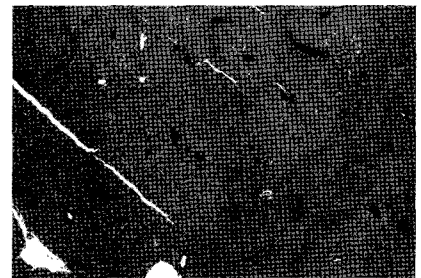


Fig. 6 The liver cells in mice treated with Bee Venom 6.0mg/kg and Anti-Bee Venom 1.25 × 10<sup>2</sup>mg/kg (× 100)

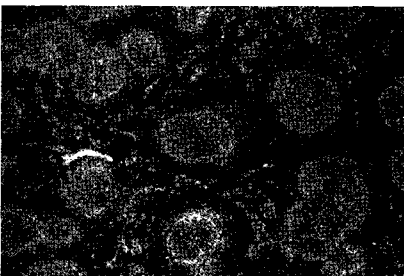


Fig. 7 The Spleen cells in mice treated with Normal Saline(× 100)



Fig. 8 The liver cells in mice treated with Bee Venom 6.0mg/kg(× 100)



Fig. 9 The Spleen cells in mice treated with Bee Venom 6.0mg/kg and Anti-Bee Venom 1.25 × 10<sup>2</sup>mg/kg (× 100)

서의 세포 분해물질이 증가한 소견이 관찰된다. 특히 봉약침만을 주입한 군에서 세포고사현상이 두드러진 것을 알 수 있었다(Fig. 7-9).

이를 보다 자세히 관찰(×400)한 결과 고사된 세포들을 처리하는 과정에서 발생한 비어 있는 흰 공간들이 관찰되며 이는 특히 봉약침 주입군에서 심하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 10-12).

### 5) 신장 조직에 미치는 영향

봉약침 및 Anti-BV 주입 후 나타나는 신장조직의 변화를 관찰하기 위하여 H-E stain으로 염색한 후 신장 조직의 병리소견을 살펴보았다. 그 결과 정상군, 봉약침을 주입한 군과 봉약침 주입 후 항체를 주입한 군의 조직에서 모두 정상적인 소견을 나타내어 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 13-15).

## N. 考 察

일반적으로 곤충독에 대한 과민성은 약 0.5-2.0% 정도에서 4-5% 정도에서 나타나며, 이러한 차이는 대상 집단이나 과민반응의 범위 등에서 기인한다. 의학적으로는 1-3% 정도로 생각되어지고 있다<sup>6)</sup>. 그러나 말벌과 꿀벌의 독성을 생각해 볼 때 꿀벌에 대한 과민반응은 훨씬 적을 것으로 판단된다. 곤충에 물린 후의 이상 반응 중에 꿀벌은 5% 미만이었다는 보고도 있다. 봉독에 대한 과민반응은 2-3명/10만 명 정도의 역학적 분포를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 벌에 쏘였을 때 과민반응의 양상은 혈압이 떨어지고 전신 무력감, 피부 발진, 안면 창백, 오심 구토, 복통, 빈맥, 오한 등이 나타날 수 있고 더 진행되면 호흡곤란이나 실신, 사망에도 이를 수도 있다. 이러한 경우는 산이나 들에서 가끔 벌집을 건드린 후 대량의 봉독에 노출되었을 때 흔히 발생한다. 봉

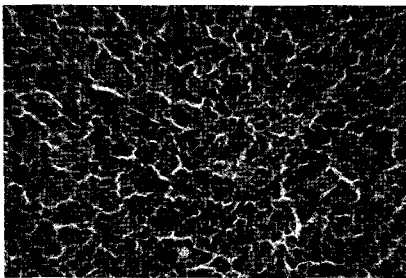


Fig. 10 The Spleen cells in mice treated with Normal Saline(× 400)

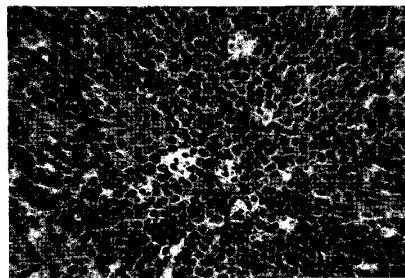


Fig. 11 The Spleen cells in mice treated with Bee Venom 6.0mg/kg and Anti-Bee Venom  $1.25 \times 10^2$ mg/kg(× 400)

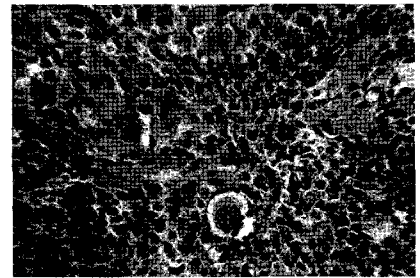


Fig. 12 The Spleen cells in mice treated with Bee Venom 6.0mg/kg and Anti-Bee Venom  $1.25 \times 10^2$ mg/kg(× 400)



Fig. 13 The Kidney cells in mice treated with Normal Saline(× 100)

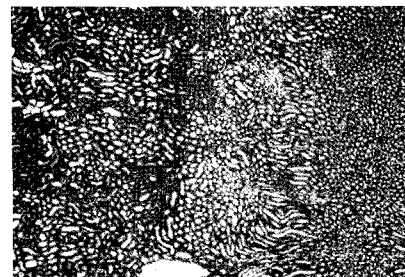


Fig. 14 The Kidney cells in mice treated with Bee Venom 6.0mg/kg(× 100)

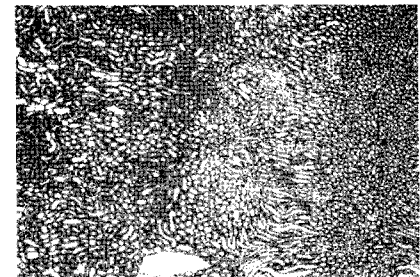


Fig. 15 The Kidney cells in mice treated with Bee Venom 6.0mg and Anti-Bee Venom  $1.25 \times 10^2$ mg/kg(× 100)

독의 과민반응은 노출된 용량과 환자의 체질에 따라 다양하게 나타날 수 있다. 과민반응은 크게 4가지, 국소·즉시형 반응, 국소·지연형 반응, 전신·즉시형 반응 그리고 전신·지연형 반응으로 나눌 수 있다.

국소반응은 그 크기에 관계없이 반응이 봉독이 주입된 곳을 포함한 국소에 나타나는 것을 말하는데, 기본적으로 별다른 처치가 필요 없다. 국소·즉시형 반응은 대개 시술 즉시 혹은 30분 이내에 나타난다. IgE와 비반세포 매개형이다. 피부에 발진, 발적, 종창, 온열감 등이 나타났다가 사라진다. 이것은 벌의 독에 포함되어 있는 약리 활성 성분에 대한 정상적 반응으로, 그 자체로는 무해하다. 하지만 곧 일어날 심각한 전신반응에 대한 전조로서 의미를 지니는 경우도 있다. 국소·지연형 반응은 주입 후 수 시간 내에 주입부에 부종, 발적, 소양감 등이 나타나는 것을 말하는데, 국소·즉시형 반응에 이어서 나타날 수도 있고, 국소·즉시형 반응 없이 나타나는 경우도 있다. 대개 1~2일 내에 약간 가려운 흔적만 남기고 사라진다. 간혹 길이 10~50cm의 큰 국소반응이 나타나는 경우도 있는데, 4~12시간 정도에 나타나기 시작해 3일 이상 지속되기도 한다. 하지만 대개 다음 시술에서는 내성이 생기고 IgG가 생기는 등 면역계에 변화가 와서 작은 국소반응 정도만을 나타내게 된다. 환자는 불편하게 느낄 수도 있겠지만 심각한 것은 아니며 큰 국소반응이 있었다고 해서 다음에 전신반응이 나타날 확률이 큰 것도 아니다. 다만 그 위치에 따라 주의할 필요가 있는데, 예를 들면 아주 드물게는 목이나 입술이 크게 부어 호흡장애가 나타날 수도 있다.

전신반응은 시술된 부위와 상관없이 전신에 반응이 나타나는 것을 말한다. 봉약침의 시술에서 가장 주의해야 할 반응이 바로 전신·즉시형 반응(아나필락시스 반응)이다. 이의 증상은 피부증상, 소화기증상, 호흡기증상, 순환기증상으로 나눌 수 있다. 피부 증상은 발진, 두드러기, 소양감, 혈관부종, 부종, 발적 등인데, 대개 얼굴, 목, 손에 나타난다. 가장 흔한 반응으로 처음에는 발제(머리카락이 있는 두피, 겨드랑이, 음부 등)에서 시작하여 점차 전신으로 확산되며 일반적으로 상열감이 동반된다. 보통 3-6시간가량 지속되며 특별한 처치가 없어도 해소되는 경우가 대부분이다. 항히스타민제의 복용이나 근육주사 등으로 쉽게 가라앉으며 이 후 피로감을 느껴 수면을 취하는 경우가 많다. 소화기 증상은 복통, 설사, 오심, 구토, 실금 등이다. 봉약침 시술 후 복부의 심한

통증을 호소하는데 아마도 일시적인 장의 마비와 대장의 수분 흡수대사에 장애를 유발하는 것으로 추정된다. 복통 뒤에 구토나 설사가 동반되며 이 후 편안해진다. 호흡기 증상은 호흡기계의 부종, 분비과다로 인한 호흡 곤란, 재채기, 목이나 가슴이 조이는 느낌, 거품 형태의 타액 등이 있다. 순환기 증상은 광범위한 혈관투과성 항진, 혈압강하로 인한 현훈, 졸도, 의식상실 등이 있다. 그 외 불안감, 죽을 것 같다는 느낌, 두통, 오한발열, 무기력감 등을 느끼기도 한다. 피부증상은 가장 흔하고 위험성이 적은 증상이지만 전신반응이 피부증상 후에 곧 호흡기계나 순환기계 증상으로 전개될 가능성이 있으므로 신속히 대처하고 주의할 필요가 한다. 하지만 예전에 전신성 피부반응을 보였다고 해서 다음에 호흡기계나 순환기계 증상을 나타낼 가능성이 다른 사람보다 높은 것은 아니며, 대부분은 다음 노출 시 증상이 훨씬 완화된다. 드물지만 호흡이나 혈액순환의 장애는 뇌의 산소공급차단 등 치명적인 결과를 초래할 수 있으므로 응급상황에 준하여 신속한 처치가 필요하다.

전신·지연형 반응은 면역반응으로 이런 몸살증상 뒤에는 병증이 완화되고 전신상태가 호전되는 경우가 종종 관찰되기 때문에 '병이 나으려고 몸살하는 것'이라고 불리기도 한다<sup>7)</sup>.

이러한 Allergy 반응은 봉약침을 임상에 사용하는데 시술자로 하여금 부담스러운 치료법이라고 인식하게 할 수 있으며, 특히 의료법상 항히스타민제나 steroid제 등을 사용할 수 없는 한의사들로서는 전신 즉시형 과민반응이 발생하였을 때의 신속한 대처방법은 절실하다고 할 수 있다. 일반적으로 봉약침이 퇴행성 관절염이나<sup>8)</sup> 요추간판탈출증<sup>9)</sup>과 같은 근·골격계 질환이나 류마티스 관절염과 같은 자가면역계 질환<sup>45)</sup> 그리고 많은 난치병<sup>11-12)</sup>에 치료효과가 우수한 것으로 보고되고 있으나 보다 적극적인 임상활용을 위해서는 Allergy 반응에 대한 효율적 대처가 필요하고 이를 위하여 개발된 것이 Anti-BV이다<sup>8)</sup>. Anti-BV는 봉독의 성분 중 가장 중요한 Allergen이 Phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)인 점에 착안하여 산란계에 PLA<sub>2</sub>를 과면역시킨 후 계란의 난황에서 항원의 특이 항체인 Immunoglobulin Y(IgY)를 얻은 것을 말한다.

일반적으로 생물학적 연구에서 사용하는 특이성 항체는 쥐, 염소, 토끼, 양, 말 등과 같은 포유동물에 과면역 시켜서 얻은 혈청에서 주로 분리하여 사용하지만 Anti-BV는 산란계를 이용하여 항체를 생산하였다. 이는



산란계의 경우 면역된 혈액으로부터 난황으로 많은 양의 항체가 활발히 이행되고<sup>13,14)</sup> 난황에 존재하는 항체는 매우 우수한 polyclonal 항체이며, 계란 1개에 들어 있는 IgY의 양도 약 90-100mg 정도로 여러 가지 장점이 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 봉독에 존재하는 Allergen인 PLA<sub>2</sub>를 25주령 된 Hy-Line Brown 산란계에 주사하여 Anti-PLA<sub>2</sub> IgY(Anti-BV)를 생산, 분리 및 정제한 후 항체의 기능을 생체에서 수행할 수 있는지를 알아보고자 시도되었다.

Anti-BV의 급성 독성 반응을 관찰하기 위하여 LD<sub>50</sub>을 측정한 결과 다양한 농도의 Anti-BV를 mouse의 복강 내에 주입하였으나 사망한 개체가 발생하지 않아 Anti-BV의 LD<sub>50</sub> 산출이 불가능하였다(Table 1.).

또한 Anti-BV를 5×10<sup>2</sup>mg/kg mouse의 복강 내에 주입한 후, 7일간 임상관찰을 한 결과 아무런 주요 독성 증상들이 관찰되지 않았다(Table 2.). Anti-BV의 급성 독성실험에서 생리식염수를 주입한 정상군과 Anti-BV를 10<sup>2</sup>mg/kg 주입한 군, 5×10<sup>2</sup>mg/kg 주입한 군의 체중 변화를 시험 시작 전과 일주일 후에 각각 비교하였다. 그 결과 실험군 모두 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 3.).

이상의 내용을 종합해보면 Anti-BV는 생체에서 특이한 독성반응을 일으키지 않음을 알 수 있었다.

Anti-BV의 농도에 따른 생존율을 측정하기 위하여 선형연구로 봉약침의 LD<sub>50</sub>을 측정하였고 그 결과 LD<sub>50</sub>은 4.5-6.0mg/kg임을 알 수 있었다. 봉약침의 LD<sub>50</sub>으로 추정되는 상위용량인 6.0mg/kg에 5×10<sup>2</sup>mg/kg(1/500)부터 2.5×10<sup>3</sup>mg/kg(1/10,000)까지 다양한 농도의 Anti-BV를 정량으로(Injection Volume=체중×18.75μl) 조절하여 mouse의 복강 내에 주입한 후 48시간 동안 사망유무를 관찰하였다. 그 결과 5×10<sup>2</sup>mg/kg(1/500)에서는 3마리가 생존하여 생존율 30%를 나타내어 봉약침 주입군과 차이를 나타내지 않았으나 2.5×10<sup>2</sup>mg/kg(1/1,000)에서는 4마리가 생존하였고, 1.25×10<sup>2</sup>mg/kg(1/2,000)에서는 7마리가, 0.5×10<sup>2</sup>mg/kg(1/5,000)과 2.5×10<sup>1</sup>mg/kg(1/10,000)에서는 각각 6마리가 생존하였다(Fig.3). 이러한 결과는 항원과 항체가 결합하여 면역침전물(immunoprecipitate)을 형성하기 위해서는 항원-항체의 농도비가 적절해야 하는데, 6.0mg/kg의 봉독과 1.25×10<sup>2</sup>mg/kg(1/2,000)의 Anti-BV가 적절히 반응하여 가장 높은 면역침전물을 형성한 것으로 추정되었다. 따라서 본 연구는 반수 치

사량을 중심으로 생존율을 관찰하여 비교하는데 그 목적이 있었으므로 항 후 보다 구체적인 연구가 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

Anti-BV의 농도에 따른 CBC의 변화를 측정한 결과 BV+Anti-BV(1/1,000)군에서 MCV가 50.63±1.34로 정상군에 비하여 유의하게 감소하였고, BV+Anti-BV(1/5,000)군에서는 Hemoglobin이 14.00±0.14g/dl를, Hematocrit이 46.50±1.70%를 나타내어 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 BV 및 Anti-BV 모두 CBC에 큰 영향은 주지 않음을 알 수 있었다(Table 4.).

봉약침 및 Anti-BV 주입 후 나타나는 장기조직의 변화를 관찰하기 위하여 H-E stain으로 간장과 비장, 그리고 신장을 염색한 후 조직학적 병리소견을 관찰하였다. 간장 조직의 병리소견을 살펴본 결과 정상군에 비하여 봉약침을 주입한 군과 봉약침 주입 후 항체를 주입한 군의 조직에서는 모두 혈관에 혈액이 차 있는 소견이 관찰되었다. 특히 봉약침만 주입한 군에서의 congestion 소견이 뚜렷하였고, 전체적으로 염증반응은 보이지 않았다(Fig. 4-6). 비장조직에서는 정상군에 비하여 봉독을 주입한 군과 봉독주입 후 항체를 주입한 군의 조직에서 모두 White pulp(Bcell, Tcell 집합체)에서 세포의 고사(apoptosis) 현상이 증가된 소견을 나타내 대식세포에서의 세포 분해물질이 증가한 소견이 관찰되었다. 특히 봉독만을 주입한 군에서 세포고사현상이 두드러진 것을 알 수 있었다(Fig.7-12).

봉약침 및 Anti-BV 주입 후 나타나는 신장조직의 변화를 관찰하기 위하여 H-E stain으로 염색한 후 신장 조직의 병리소견을 살펴보았다. 그 결과 정상군이나 봉약침 주입군, 그리고 봉약침 주입 후 항체를 주입한 군의 조직에서 모두 정상적인 소견을 나타내어 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 13-15).

이상의 내용을 종합하여 보면 봉독의 Allergy에 대처하기 위하여 개발된 IgY 항체인 Anti-BV는 생체에서 아무런 독성 반응을 일으키지 않았으며, 항체로서의 기능을 수행할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 항 후 Anti-BV에 대한 보다 심도 있는 연구를 바탕으로 임상에 기여할 수 있기를 기대한다.

## V. 結 論

Anti-Bv의 봉독항체로서의 작용과 독성을 관찰하기

위하여 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Anti-BV를 mouse의 복강 내에 주입하고 독성을 관찰한 결과 아무런 독성 반응이 나타나지 않았고, LD<sub>50</sub>도 사망한 개체가 발견되지 않아 측정할 수 없었다.
2. Anti-BV를 mouse의 복강 내에 주입하고 체중의 변화를 관찰한 결과 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다.
3. Anti-BV의 농도에 따른 생존율을 측정한 결과 1.25 × 10<sup>2</sup>mg/kg(1/2,000)에서 가장 높은 생존율을 나타내었다.
4. CBC 검사에서는 특이한 소견이 나타나지 않았다.
5. 장기조직의 변화 관찰에서 Anti-BV는 봉독으로 인한 간의 울혈이나 세포의 괴사를 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 Anti-BV는 생체에서 아무런 독성반응을 일으키지 않으면서 봉독항체의 효능을 수행하고 있음을 알 수 있었고 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 판단된다.

### 参考文献

1. 권기록 : 蜂針에 대한 考察, 대한 침구학회지, Vol 11, No1, 160, 1994
2. 이성노 외, 봉약침 치료의 퇴행성 슬관절염에 대한 임상적 고찰, 대한 침구학회지 20권 5호, 73-81, 2003.
3. 전형준 외, 봉약침으로 치료한 요추간판탈출증 환

- 자의 임상적 평가, 대한침구학회지 20권 5호, 63-72, 2003.
4. 권기록 : 봉독요법의 류마티스성 관절염 치료에 대한 임상적 연구, 전국한의학 학술대회지, 130-131, 1998.
5. 이상훈 외, 무작위 대조 이중맹검 시험을 통한 봉독약침의 류마티스 관절염 치료효과, 대한침구학회지 20권 6호, 80-87, 2003.
6. Schmidt J. O, Allergy to hymenoptera venoms: in Piek T. ed, Venoms of the hymenoptera, London, Academic press, 510, 1986.
7. 권기록, 봉독요법의 면역반응에 관한 임상적 연구, 대한 침구학회지, Vol 17, No.1, 169-174, 1999.
8. 황태준 외, 봉독의 항독소 생산을 위한 실험적 연구, 대한약침학회지 Vol. 4, No. 2, 5-16, 2001.
9. Akita, E. M. and Nakai, S., Immunoglobulin from egg yolk ; isolation and purification. J. Food Sci. 57, 629. 1992.
10. 식품의약품안전본부, '의약품 독성시험기준' 제98-116호.
11. 권기록, 한방치료를 통한 근위축성 측삭경화증의 임상적 연구, 대한침구학회지 20권 3호, 209-216, 2003.
12. 강계성 외, 다발성 경화증 환자 5례에 대한 임상 보고, 대한침구학회지 20권 1호, 209-217, 2003.
13. Matsuda, T., Kawauchi, M. and Nakamura, R. : Growth of ovarian follicle and yolk protein accumulation. japanese J. Dairy & Food Sci., 41(6), 223, 1992.
14. Gutierrez M. A., Miyazaki T., hatta, H. and Kim, M., Protective properties of egg yolk IgY containing anti-Edwardsiella tarda antibody against paracolo disease in the Japanese eel, Anguilla japonica Temminck & Schlegel. J. Fish Dis., 16, 113-122. 1993.