

발간등록번호

NIER-SP2014-225

11-1480523-002106-01

생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

2014년 12월



국립환경과학원

National Institute of Environmental Research

발간등록번호
11-1480523-002106-01

NIER-SP2014-225

생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

안전성평가연구소 전북흡입안전성연구본부¹⁾

안전성평가연구소 독성평가연구본부²⁾

영남대학교³⁾

이규홍¹⁾, 허용주¹⁾, 서균백¹⁾

유옥준²⁾, 김지영²⁾, 백승민²⁾, 이진수²⁾, 이설리²⁾

조경현³⁾

2014

국립환경과학원

제 출 문

국립환경과학원장 귀하

본 보고서를 “생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구”
연구용역과제의 최종보고서로 제출합니다.

2014. 12.

연구기관 : 한국화학연구원 부설
안전성평가연구소

요약문

1. 추진 배경 및 필요성

- 가습기 살균제 성분인 PHMG 및 PGH 등의 기존 유해성정보가 제한적이므로 사전 예방적 유해성 자료 필요
- PHMG 유독물 지정('12.9) 당시 확보된 독성정보는 90 일 흡입독성(저농도) 및 어류급성독성 등에 불과
- PGH는 유독물 지정('13.7)시에 급성독성, 유전독성 일부(Ames 시험자료) 및 흡입 독성(급성 및 90 일) 정도만 확보
- PHMG와 PGH 가습기성분에 대해서 아급성(4 주) 흡입독성, 급성경피독성, 생식독성 및 유전독성 자료 등의 추가확보 필요

2. 연구의 범위

- 가습기 살균제 성분인 PHMG 및 PGH 등의 기존 유해성정보가 제한적이므로 사전 예방적 유해성 자료 필요
- 생활화학제품 함유 유해화학물질의 유해성 정보를 추가 생산하여 위해성평가 근거자료로 활용
- PHMG 및 PGH 등 2 개 물질에 대한 8 개 항목 독성시험수행
- 국내외 독성연구 자료 조사 및 피부 in vitro 독성연구 수행

3. 주요 연구 결과

1. PGH에 대한 5 개 항목 독성시험

1) 아급성 흡입독성시험

- 가. Sprague-Dawley 랫드에 0, 0.10, 0.50 및 2.00 mg/m³의 용량으로 4 주간 반복 비부흡입노출을 실시하였으며, 추가적으로 회복군을 설정하여 노출 완료 후 14 일간 관찰하였음
- 나. 시험물질 노출 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 사료 섭취량을 관찰하고, 혈액/혈액 생화학검사, 부검 육안 소견, 장기무게측정, 조직병리검사 및 폐내세척액(BALF) 분석 및 폐 조직에서의 생화학분석을 실시하였음
- 다. PGH의 반복흡입노출로 인한 용량상관적인 특이적 일반증상은 노출 및 회복 기간 중 관찰되지 않았음. 한편 체중변화 및 사료섭취량 관찰 결과 노출 회복군의 수컷에서 노출 3 주 이후 유의성 있는 변화가 관찰되었음
- 라. 육안적 관찰 결과 고농도 노출군 암수컷의 폐에서 PGH의 반복흡입노출로 인한 변색, 병소 및 부패가 관찰되었으며, 노출 회복군에서도 동일하게 관찰되었음
- 마. 조직병리학적 검사 결과 고농도 노출군의 호흡기계통(폐, 비강, 기관 및 후두)에서 PGH의 반복흡입노출로 인한 독성학적 영향이 관찰되었음. 특히 폐의 경우 수컷은 중농도 군에서도 독성학적 영향이 관찰되었으며, 노출 회복군의 경우 노출군과 동일한 병변들이 관찰되었음
- 바. 폐내세척액(BALF) 분석 결과 고농도 노출군 및 노출 회복군에서 염증세포 증가가 관찰되었으며, 폐 손상 지표들의 변화들도 관찰되었음
- 사. PHMG Phosphate에 대한 4 주간 반복 흡입비부노출 결과 시험물질의 반복노출에 따른 다양한 독성학적 변화들이 관찰되었으며, 특히 폐에서 관찰된 독성학적 변화들은 모두 회복기간에 노출 회복군에서도 동일하고 지속적으로 관찰되었음. 이를 통하여 PGH의 반복 흡입 노출 시 하부 호흡기계통에 지속적으로 악영향을 끼칠 수 있음을 예측할 수 있는 결과로 판단됨. 또한 암컷 및 수컷의 빈도 및 변화 정도를 살펴볼 때 암컷에 비하여 수컷에서 상대적으로 높은 수준의 악영향이 관찰되었음
- 아. 본 시험에서 도출된 결과들을 종합적으로 해석해 볼 때, 본 시험 조건에서의 무악 영향관찰량(NOEL)은 수컷의 경우 0.10 mg/m³ 및 암컷의 경우 0.50 mg/m³로 판단됨

2) 생식능 및 차세대영향시험

- 가. 0, 30, 80 및 160 mg/kg 용량으로 수행된 PHMG에 대한 생식 및 발생독성스크리닝 시험 결과 고용량군인 160 mg/kg 투여군 암수동물에서 체중 감소, 수컷동물의

전립선, 흉선 및 폐의 절대중량, 암컷동물의 흉선의 절대중량 및 폐의 상대중량 증가가 관찰되었음

나. 160 mg/kg 투여군 암수동물 폐에 대한 조직병리학적 검사에서 이상소견이 관찰되었음

다. 모든 시험물질 투여군에서 생식 및 발생학적 지표에 대한 시험물질의 영향은 관찰되지 않았음

라. 본 시험조건에서의 무악영향관찰량(NOAEL)은 암수 각각 80 mg/kg/day로 판단됨

3) 염색체이상시험

가. Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 세포를 이용한 염색체이상시험에서는 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 CHL 세포에 유의적인 염색체 이상을 유발되었음

나. 부형제대조군의 경우에는 구조적 이상(겹 제외)을 가진 중기상의 수가 안전성평가 연구소의 historical control data 내에 들어왔고, 양성대조군의 경우에는 이상 중기상의 수가 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였음

4) 소핵시험

가. 500, 1000, 2000 mg/kg의 용량을 경구투여하여 수행된 골수세포 소핵시험에서는 수컷 마우스(ICR)의 골수에서 소핵을 가진 PCEs (MNPCes)의 빈도는 증가하지 않았음

나. 한편 부형제대조군의 경우 소핵의 빈도가 historical control data 내에 들어왔고, 양성대조군의 경우에는 소핵의 빈도가 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였음

5) 급성경피독성시험

가. 0, 100, 500, 2000 mg/kg 용량으로 수행된 급성경피독성시험에서는 수컷 2000 mg/kg에서 폐사와 암수 500 mg/kg 이상 투여군에서 시험물질에 의한 임상증상으로 피부 탈색, 피부의 변색, 가피 형성, 궤양, 활동성 저하, 반응 저하, 계속 들기, 강직성간대성경련 및 불규칙호흡이 관찰되었으며, 부검 소견으로 암컷 2000 mg/kg 투여군에서 가피 형성이 관찰되었음

나. 한편 본 연구 조건에서의 LD₅₀ 값은 2000 mg/kg 이상인 것으로 판단됨

2. PHMG에 대한 3개 항목 독성시험

1) 생식능 및 차세대영향시험

가. 0, 13, 40 및 120 mg/kg 용량으로 수행된 PGH에 대한 생식 및 발생독성스크리닝 시험 결과 시험물질 120 mg/kg 투여군 암수동물에서 천명, 자궁탈중 등의 일반증상과 체중 및 사료섭취량 감소, 흉선의 장기중량 감소, 비장 및 폐의 장기중량 증가 등이 관찰

나. 120 mg/kg 투여군의 암수 신생자의 체중 감소도 관찰

다. 생식 및 발생학적 영향평가를 위한, 모동물의 생식장기(고환 및 난소)에 대한 조직병리학적 검사, 수태능력 평가, 분만성적 및 신생자의 사망률 및 일반증상 등 생식 및 발생학적 영향평가 항목에서 시험물질에 의한 독성학적 영향은 관찰되지 않았음

라. 본 시험 조건에서의 무악영향관찰량(NOAEL)은 수컷은 13 mg/kg/day, 암컷 및 차세대 동물은 40 mg/kg/day로 판단됨

2) 염색체이상시험

가. Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 세포를 이용한 염색체이상시험에서는 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 CHL 세포에 유의적인 염색체 이상을 유발되었음

나. 부형제대조군의 경우에는 구조적 이상(꺾 제외)을 가진 중기상의 수가 안전성평가 연구소의 historical control data 내에 들어왔고, 양성대조군의 경우에는 이상 중기상의 수가 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였음

3) 소핵시험

가. 125, 250, 500 mg/kg의 용량을 경구투여하여 수행된 골수세포 소핵시험에서는 수컷 마우스(ICR)의 골수에서 소핵을 가진 PCEs (MNPCEs)의 빈도 증가가 관찰되지 않았음

나. 한편 부형제대조군의 경우 소핵의 빈도가 historical control data 내에 들어왔고, 양성대조군의 경우에는 소핵의 빈도가 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였음

3. PGH 및 PHMG에 대한 *in-vitro* 피부 독성 시험

가. PHMG와 PGH를 각각 사람 피부세포에 대한 독성을 조사한 결과, PHMG의 LD₅₀ 농도는 약 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm), PGH는 약 3.0×10^{-4} % (3 ppm)인 것으로 확인하였음

- 나. 계대 배양을 통한 장기적인 노출 독성을 확인해본 결과, 두 물질 모두 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm) 이하의 농도에서는 약 240 시간(10 일) 이상 노출되었을 때, 세포 사멸이 유발되는 등의 독성이 있다는 것을 확인하였음
- 다. 고농도에서 뿐만 아니라 저농도에서 지속적으로 노출될 시에 피부세포 생존율과 노화에 영향을 미칠 수 있다는 것을 확인하였음

목 차

I. 서론

- 가. 과업의 개요 1
- 나. 연구 배경, 목적 및 필요성 1

II. 연구 내용 및 방법

- 가. 과업의 범위 4
- 나. 주요 항목별 세부 내용 5

III. 연구결과 및 고찰

- 가. PGH에 대한 identification 분석 수행 6
- 나. PHMG 및 PGH 등 2 개 물질에 대한 8 개 항목 독성 시험 10
 - 1. PHMG 및 PGH에 대한 생식능 및 차세대 영향시험 10
 - 2. PGH에 대한 아급성 흡입독성시험 19
 - 3. PHMG 및 PGH에 대한 염색체이상시험 43
 - 4. PHMG 및 PGH에 대한 소핵시험 60
 - 5. PGH에 대한 급성경피시험 74
- 다. 피부 in vitro 독성연구 82

IV. 결론 97

V. 참고문헌 99

VI. Appendix 104

생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

I. 서론

가. 개요

과 제 명 : 생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

수행기관 : 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 흡입독성연구센터

과업기간 : 2014 년 05 월 08 일부터 12 월 10 일까지(계약일로부터 약 7 개월)

소요예산 : 239,090천원

나. 연구 배경, 목적 및 필요성

- 2011년 4월 산모를 중심으로 원인 불명의 폐질환 환자들이 갑자기 모여 들어 질병 관리본부에 보고되어 보건당국의 조사 결과 가습기 살균제에 의한 독성이 직접적인 사망원인인 것으로 드러남. 가습기 살균제로 인한 폐 손상 환자는 질병관리본부에 따르면 2001 년 이후 34 명, 그 중 사망자는 9 명에 이르는 것으로 밝혀짐
- 살균제의 주성분인 ‘폴리헥사메틸렌 구아니딘 포스페이트(PHMG phosphate)’, ‘올리고 에톡시에틸 구아니디움 클로라이드(PGH)’는 모두 살균 및 부패방지 효과가 뛰어난 구아니딘 계열의 화학물질이며, 곰팡이 제거제와 식기 세척제에 주로 들어가는 이 성분들이 호흡기를 통해 폐로 들어가 폐질환을 일으킬지는 예상 못함. 그러나 국민의 건강에 이상이 생기고 나서야 가습기 세정제 문제가 사회적 문제로 대두됨
- 한편 가습기 살균제는 의약품이나 의약외품으로 분류되지 않고 일반공산품으로 판매되어 업체가 지식경제부 산하 기술표준원에 등록만 하면 판매가 가능하여 성분에 대한 검증이 이루어지지 않았음. 이와 같이 별도의 안전성 검증이 진행되지 않고 일반 공산품으로 판매되는 문제를 지닌 생활용품은 가습기 살균제에만 국한되고 있지 않은 것으로 판단됨
- 하지만 생활용품에 사용되는 화학물질들에 대한 규제는 각 기관마다 제각각이고 관리 체계도 허술함. 우리나라에서 사용되는 화학물질은 모두 4만 3천여 종에 달함. 화학물질 그 자체는 환경부 소관이지만, 가전제품, 의약품처럼 가공되면 담당 부처가 바뀜. 같은 화학물질이라도 담당 부처가 다르고, 쓰이는 목적이 다르다보니 사용 범위와 기준도 제각각임. 환경부는 전체 화학물질의 15 %, 6천 6백여 종의 독성만 파악하고 있는 실정으로, 나머지 3만 6천여 종의 화학물질은 어떤 독성이 있는지, 어디에 얼마나 쓰이는지 파악이 안 됨
- 생활용품의 주성분들에 대한 독성 정보는 경구 및 피부 경로에 대해서는 기존에 많은 연구들을 통해 이미 다양한 안전성평가 자료가 확보되어 있으나, 흡입 노출에 의한 평가는 매우 미흡한 실정임

- 일반 생활용품을 포함한 제품 사용 과정에서의 유해물질 노출로 인한 피해가 국민 건강의 위해요소로 등장함에 따라 안전한 제품 사용에 대한 소비자들의 욕구가 증가하고 있음. 따라서 생활화학용품들의 노출경로와 제품의 안전성에 대한 구체적인 평가 자료가 요구됨
- 생활화학용품에 의한 인체독성피해 발생으로 관계부처 합동으로 생활화학용품의 안전관리를 강화. 가슴기 살균제처럼 일상생활에서 흡입을 통해 지속적으로 노출가능한 생활화학용품에 대한 소비자들의 불안감은 방향제 및 탈취제로 전이됨. 실제로 방향제 및 탈취제에 포함된 파라디클로로벤젠은 자주 노출될 경우 호흡기 질환에 걸릴 가능성이 매우 높아진다는 연구결과까지 존재. 이외에 프탈레이트, 포름알데히드 등의 유해물질이 들어있어 방향제의 지속 흡입에 의한 독성이 염려되는 상황임
- 방향제는 향기를 통해 흡입하는데, 이때 방향제제품의 향료보다 유해한 성분의 용매를 사용하여 문제가 됨. 「유해물질 함유 화학제품」 방향제 안전기준에는 현재 메탄올 및 포름알데히드만 규제하고 있음. 또한 방향제는 가슴기 살균제와 마찬가지로 공산품으로 분류돼 거의 대부분의 업체가 안전검사를 받지 않거나 표시하지 않고 있음. 현재 시판중인 방향제들의 흡입 독성에 대한 자료가 부족함
- 한편 선진국의 경우, 특히 EU의 경우 오래전부터 생활화학물질을 포함한 biocide를 특별 관리하기 위한 시스템 구축을 준비해왔으며, 곧 본격적으로 시행될 것으로 알려짐. EU의 biocide 법안을 시행하는 목적은 유럽시장에서 판매되는 biocide 제품의 안전성을 증대시키고 발암성 물질 등 매우 유해한 물질의 단계적 폐지와 기존 법령 하에서 다루어지지 않는 가구 및 섬유 제품에 사용되는 물질의 규제를 강화하고자 함에 있음. EU는 biocide 물질을 살균·소독제류, 방부제/보존제류, 해충방제류, 기타 biocide 물질 등 크게 4 개 그룹으로 나누고, 제품의 사용유형에 따라 다시 23 개 유형으로 세분화하고 있음. 표 1에서는 biocide 대상 제품들에 대한 주요 국가별 관리 현황을 제시하고 있음

표 1. 국가별 biocide 대상 제품의 관리 현황 요약

국가	대상 제품	법령
미국	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 농경지/농사장비, 식품취급/저장시설부지 및 장비 ▪ 거주지 및 공공장소, 병원부지 및 장비, 식수공급 시설 ▪ 물질방부제(산업공정 및 중간물질) ▪ 상업, 교육기관, 공장부지 및 장비, 수영장 ▪ 공장공정 및 용수 시스템 ▪ 부착방지제 ▪ 목재 방부제 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Federal Insecticide Fungicide and Rodenticide Act/Federal Food, Drug and Cosmetic Act ▪ FIFRA ▪ FIFRA/CWA ▪ FIFRA/QAPCA ▪ FIFRA/FFDCA
스위스	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 살균제 ▪ 부착방지제, 목재 방부제 ▪ 기타 살생물제 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ordinance on disinfection and pest control ▪ Federal law on trade in toxic substance ▪ Ordinance relating to environmentally hazardous substances ▪ Federal law on trade in toxic substances ▪ Federal law on trade in toxic substances
뉴질랜드	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 살균제/위생제, 방부제/살미생물 ▪ 부착방지제, 목재 방부제 ▪ 매립장 및 노천광산용 살미생물제 ▪ 식품목적 이외의 물 이용 ▪ 척추 및 무척추 유해동물 제어 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Toxic substances act ▪ Pesticide act ▪ Toxic ▪ Toxic substance act ▪ Pesticide act, medicine act, animal remeids act
캐나다	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 살균제/위생제 ▪ 먹는물 소독제 ▪ 방부제/살미생제, 부착방지제, 목재 방부제 및 구조물 처리제, 매립지 및 노천 광상 살 미생물제, 식품목적 이외의 물 이용, 척추 및 무척추 유해동물 제어 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Food & Drug act ▪ Drinking water materials safety act ▪ Pest control product act

- 다양한 화학물질은 대기를 통해 인체에 흡입되어 건강에 직간접적인 영향을 미치고 있음. 특히 우리나라의 환경특성상 춘기에 자주 발생하는 황사 등의 미세먼지는 각종 질환을 증가시킨다는 보고가 있고, 앞서 언급 하였듯이 가습기 살균제에 대한 biocide AI 등 실제 호흡에 의한 인체 내 독성영향을 파악하기 위한 흡입독성연구는 필수적임. 미국의 2002 년 통계에 의하면 호흡기계 질환(chronic lower respiratory diseases?)은 심장병, 암, 노혈관병(stroke)에 이어 4 번째로 높은 사망 요인임 (National Vital Statics Reports, 2004). 한국의 경우도 공기 중의 흡입을 통한 인체건강 위협을 유발할 수 있는 가능성이 많음을 감안하면, 하루빨리 생활화학용품에 대한 위해성 평가 및 관리 시스템의 도입 필요성이 매우 높다고 사료됨

생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

II. 연구 내용 및 방법

가. 과업의 범위

- 가습기 살균제 성분인 PHMG 및 PGH 등의 기존 유해성정보가 제한적이므로 사전 예방적 유해성 자료 필요
- 생활화학제품 함유 유해화학물질의 유해성 정보를 추가 생산하여 위해성평가 근거자료로 활용
- PHMG 및 PGH 등 2 개 물질에 대한 8 개 항목 독성시험수행
- 국내외 독성연구 자료 조사 및 피부 *in vitro* 독성연구 수행



그림 1. 본 연구를 통해 해결 및 도출하고자 하는 연구목적에 대한 모식도

나. 주요 항목별 세부 내용

1. PHMG 및 PGH 등 2 개 물질에 대한 8 개 항목 독성시험

- 주요 가습기 살균제 성분 중 PHMG 및 PGH에 대하여 OECD의 화학물질 시험지침(Test Guideline) 또는 국립환경과학원 “화학물질 유해성시험방법(고시 제 2013-2)”등을 기준으로 하여 표 2와 같이 총 8 개 항목에 대하여 독성시험 수행

표 2. 본 과업에서 수행된 PHMG 및 PGH에 대한 독성시험 항목 분류

시험항목(OECD TG)	시험물질	
	PGH	PHMG
생식능 및 차세대영향시험(TG421)	○	○
아급성(28 일)흡입독성(TG412)	○	
염색체이상시험(TG473), 고시 5-15	○	○
소핵시험(TG474), 고시 5-16	○	○
급성경피독성(TG402) 고시 5-4	○	

2. 국내외 독성연구 자료 조사 및 피부 in vitro 독성연구 수행

- 국내외 문헌조사를 통한 PHMG, PGH, PHMB, MIT 및 CMIT의 생체내/생체의 독성자료 수집 및 검토

※ 흡입 및 피부 in vitro 피부 독성 연구 등 5 가지 가습기 살균제 성분에 대한 국내외 peer review 자료 검토 및 자료집 도출

- 가습기 살균제 성분의 노화촉진 등 in vitro 피부독성 연구 수행

※ In vitro 피부 독성시험의 경우 반드시 비교(음성, 양성 대조) 물질을 포함시켜 수행

※ In vitro 피부 독성시험의 대상 시험물질은 국립환경과학원과 본 과업의 수행기관과의 협의를 통하여 추후 결정

생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

Ⅲ. 연구결과 및 고찰

가. PGH에 대한 identification 분석 수행

- 각 항목별 연구 수행에 앞서, 추가적으로 구입한 PGH (Lot No.: 201402-02-1500)에 대한 identification 분석을 수행하였음

1. 분석방법

- pH, 분자량분석(GPC), 고형분 함량(동결건조), 이온분석(IC), 기능기 고분자구조해석(NMR, IR)

2. 분석항목별 조건 및 결과

1) pH 분석

① 분석조건

측정기기	(1) 측정기기: pH meter (Lutron 사 YK-2005WA)
측정범위	0 ~ 14 pH
pH Calibration	pH 7, pH 10 (2 points calibration)

② 샘플의 pH는 8.7 로 분석되었음

2) 고형물 함량 분석 : 샘플 전처리 후 분석 수행

- 건조감량법에 의한 분석결과 고형분 함량은 17.16 %로 분석되었음 (1 회 측정 시 : 17.19 %, 2 회 측정 시 : 17.13 %)

3) 분자량 및 함량

① 시료처리

시료전처리	0.45 μ m Nylon 필터 사용
시료용해상태	완전용해
시료용액여과	바로 사용
안료/색상유무	해당사항 없음
나노입자 유무	해당사항 없음

② 분석조건

측정기기	Waters GPC
펌프	Waters 515 pump
검출기	Waters 410 RI
컬럼	TSKgel G5000PWXL-CP + G3000PWXL-CP (7.8 x 300 mm)
전개용매	MeOH : 0.1 M NaNO ₃ = 3 : 7

Injector, 검출온도	35 °C
유속	1 mL/min
주입양	100 µL, 3 mg/mL
표준 시료	PEG/PEO

③ 분자량 분석 결과

- 분자량 분석 결과 Mn = 2382, Mw = 6106로 분석되었음

Mn (수평균 분자량)	Mw (중량평균분자량)	Mp (최대피크에서의 분자량)	Mw/Mn
2382	6106	4580	2.56

4) 이온 분석

① 양이온 분석 조건

분석 기기	Ion chromatography
검출기	Conductivity detector
용매	1.7 mM HNO ₃ + 0.7 mM PDCA in DI water
컬럼	Metrohm, Metrosep C4 (100 x 4.0 mm)
온도	Room temperature
유속	0.9 mL/min
주입양	10 µL

② 양이온 분석 결과 : Na⁺ 이온 및 NH₄⁺ 이온이 검출되었음

③ 음이온 분석 조건

분석 기기	Ion chromatography
검출기	Conductivity detector
용매	1.8 mM Na ₂ CO ₃ + 1.7 mM NaHCO ₃ in DI water
컬럼	Metrohm, Metrosep A Supp 4 (250 x 4.0 mm)
온도	Room temperature
유속	1.0 mL/min
주입양	20 µL
분석 농도	참조시료 - 400 배 희석, 분석시료 - 10,000 배 희석

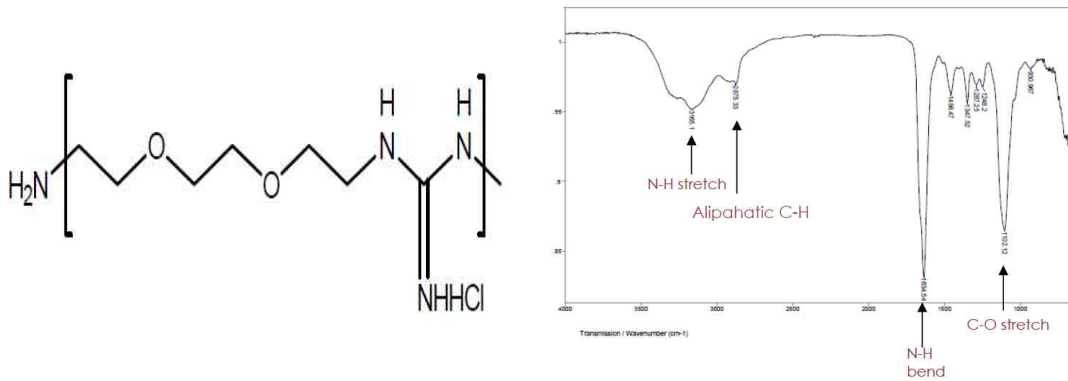
④ 음이온 분석 결과 : Cl⁻ 이온이 검출되었음

5) FT-IR 분석

① 분석 조건

측정 기기	JASCO FT-IR 4100
측정 모드	ATR mode
ATR 결정	Silicone
표준 물질	PE, PET
Resolution	4 cm ⁻¹
Scan 수	32
시료 전처리	참조시료-바로 측정, 분석시료-동결건조

② 분석 결과 : 샘플의 FT-IR 분석 결과, 아래와 같이 PGH의 특성피크가 확인되었음



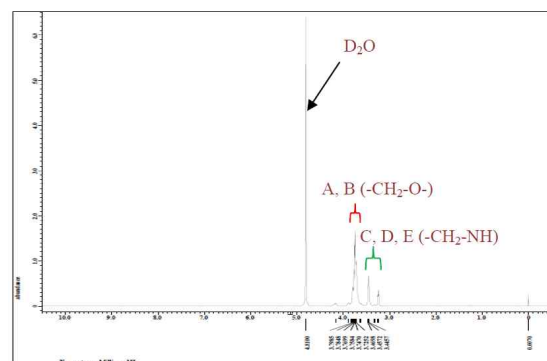
6) NMR 분석

① 분석조건

¹ H-NMR	JeolJNM-LA400 with LFG, 400 MHz, 용매 : D ₂ O
¹³ C-NMR	JeolJNM-LA400 with LFG, 400 MHz, 용매 : D ₂ O

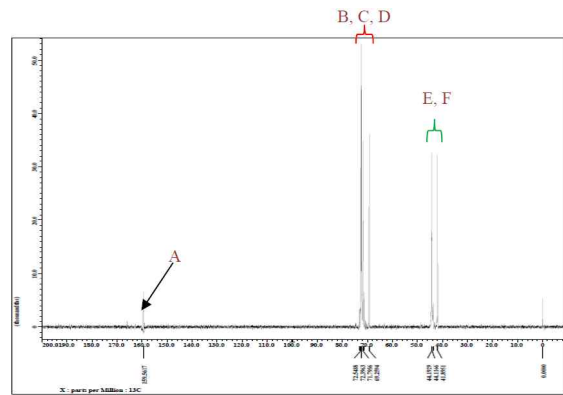
② ¹H-NMR 분석결과 : 샘플의 ¹H-NMR 분석결과, 아래와 같이 할당된 각 피크의 shift로부터 PGH임을 확인함

Assign.	Shift of sample (ppm)
A, B	3.67 ~ 3.71
C, D, E	3.39 ~ 3.46 3.08 ~ 3.11



③ ¹³C-NMR 분석결과 : 샘플의 ¹³C-NMR 분석결과, 아래와 같이 할당된 각 피크의 shift로부터 PGH임을 확인함

Assign.	Shift of sample (ppm)
A	159.58
B, C, D	72.42, 71.69, 70.78
E, F	44.22, 42.20



3. PGH에 대한 identification 분석 결론

- 이온분석과 기능기 고분자구조해석을 통하여 PGH인 것으로 확인되었으며, Mn 값 2382, Mw 값 6106, 함량은 약 17.16 %로 분석되었음

나. PHMG 및 PGH 등 2 개 물질에 대한 8 개 항목 독성시험

1. PHMG 및 PGH에 대한 생식능 및 차세대영향시험

1-1. PHMG

(1) 시험법 : OECD TG 421 및 국립환경과학원 고시 제 2014-1호

(2) 시험방법

시험물질 구성	1. 시험물질 : Polyhexamethyleneguanidine phosphate(PHMG) 2. 부형제 : Distilled water (DW)																																										
시험계의 구성	Sprague-Dawley/Crl:CD (SD) 랫드 약 7 주령 96 마리(암컷 48 마리, 수컷 48 마리)																																										
투여량	0, 13, 40 및 120 mg/kg																																										
시험군의 구성	<table border="1"> <thead> <tr> <th>군</th> <th>성별</th> <th>동물수 (마리)</th> <th>동물번호</th> <th>투여액량 (mL/kg)</th> <th>투여량 (mg/kg)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Vehicle control</td> <td>Male</td> <td>12</td> <td>1 ~ 12</td> <td rowspan="2">10</td> <td rowspan="2">0</td> </tr> <tr> <td>Female</td> <td>12</td> <td>49 ~ 60</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">T1</td> <td>Male</td> <td>12</td> <td>13 ~ 24</td> <td rowspan="2">10</td> <td rowspan="2">13</td> </tr> <tr> <td>Female</td> <td>12</td> <td>61 ~ 72</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">T2</td> <td>Male</td> <td>12</td> <td>25 ~ 36</td> <td rowspan="2">10</td> <td rowspan="2">40</td> </tr> <tr> <td>Female</td> <td>12</td> <td>73 ~ 84</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">T3</td> <td>Male</td> <td>12</td> <td>37 ~ 48</td> <td rowspan="2">10</td> <td rowspan="2">120</td> </tr> <tr> <td>Female</td> <td>12</td> <td>85 ~ 96</td> </tr> </tbody> </table>	군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/kg)	투여량 (mg/kg)	Vehicle control	Male	12	1 ~ 12	10	0	Female	12	49 ~ 60	T1	Male	12	13 ~ 24	10	13	Female	12	61 ~ 72	T2	Male	12	25 ~ 36	10	40	Female	12	73 ~ 84	T3	Male	12	37 ~ 48	10	120	Female	12	85 ~ 96
군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/kg)	투여량 (mg/kg)																																						
Vehicle control	Male	12	1 ~ 12	10	0																																						
	Female	12	49 ~ 60																																								
T1	Male	12	13 ~ 24	10	13																																						
	Female	12	61 ~ 72																																								
T2	Male	12	25 ~ 36	10	40																																						
	Female	12	73 ~ 84																																								
T3	Male	12	37 ~ 48	10	120																																						
	Female	12	85 ~ 96																																								
투여방법	<p>- 시험물질은 가장 최근에 측정된 체중에 따라 10 mL/kg로 투여용량을 계산하여 경구투여 함. 대조군의 부형제로는 멸균증류수를 이용하였으며, 투여되는 조제시험물질은 동물실에서 투여 전과 투여 중 magnetic stirrer를 이용하여 지속적으로 교반</p> <p>- 시험물질이 기도를 통해 호흡기계로 유입될 경우 심각한 독성이 유발되므로, 경구투여 시 주의하여 투여</p>																																										
투여 횟수 및 투여기간	대조물질과 조제시험물질은 하루에 한 번씩 대략 비슷한 시간대(08 : 30 ~ 13 : 00)에 교배 전 기간 시작일부터 암컷동물은 포육 4 일까지, 수컷동물은 부검 전날까지 31 일간 투여																																										
관찰 및 검사항목	사망률 및 일반증상, 체중, 사료섭취량, 교배성적, 부검소견, 장기중량, 병리조직학적 검사(교환, 부교환, 난소 및 폐), 임신기간, 분만성적, 신생자의 사망유무, 체중 및 외표검사 실시																																										

(3) 시험 결과

1) 사망률 : 암컷 120 mg/kg 투여군에서 포육 2 일째에 1 마리의 사망동물 관찰

2) 일반증상 :

- 수컷동물은 천명(noisy respiration)이 120 mg/kg 투여군에서 1 레, 유연(salivation)이 40 및 120 mg/kg 투여군에서 각각 3 및 9 레 관찰
- 암컷 120 mg/kg 투여군에서는 자궁탈증(prolapse of uterus), 천명(noisy respiration), 행동저하(subdued behavior), 쇠약(thin appearance) 및 창백(paleness)이 120 mg/kg 투여군에서 1 레씩 120 mg/kg 투여군에서 1 레, 유연(salivation)이 9 레 관찰
- 수컷 40 및 120 mg/kg 투여군과 암컷 120 mg/kg 투여군에서 관찰된 유연은 시험물질에 의한 자극에 반응으로 독성학적 의미는 없는 소견으로 판단
- 이외에 시험물질 투여군에서 관찰된 일반증상은 발생빈도가 낮아 우발적인 소견으로 판단

3) 체중측정

- 120 mg/kg 투여군에서 수컷동물은 교배전 기간 11 일부터 부검일까지, 암컷동물은 임신 7 일째부터 부검일까지 부형제 대조군과 비교할 때 유의성 있는 체중감소가 관찰

4) 사료섭취량 측정

- 120 mg/kg 투여군 수컷동물은 교배전 기간 4 일, 11 일 및 14 일째에 부형제 대조군과 비교하여 유의성 있는 감소가 관찰
- 120 mg/kg 투여군 암컷동물은 교배전 기간 4 일째 및 모든 임신기간에 부형제 대조군과 비교하여 유의성 있는 감소가 관찰
- 40 mg/kg 투여군 암컷동물은 임신 7 일째에 부형제대조군과 비교하여 유의성 있는 사료섭취량 감소를 나타내었으나 일시적인 소견으로서, 우발적인 결과인 것으로 판단

5) 교배성적 : 시험물질의 영향은 관찰되지 않았음

6) 부검 시 육안소견 : 수컷동물은 120 mg/kg 투여군에서 비장종대가 1 레, 전립선 및 정낭선의 위축이 1 레 관찰

7) 장기중량

- 흉선은 수컷 120 mg/kg 투여군에서 절대 장기중량이 유의성 있게 감소하였고 암컷 120 mg/kg 투여군에서는 절대 및 상대 장기중량이 유의성 있게 감소
- 비장은 수컷 40 및 120 mg/kg 투여군과 암컷 120 mg/kg 투여군에서 상대 장기중량이 유의성 있게 증가
- 폐는 수컷 40 및 120 mg/kg 투여군과 암컷 120 mg/kg 투여군에서 상대 장기중량이 유의성 있게 증가
- 뇌하수체는 수컷 40 및 120 mg/kg 투여군과 암컷 120 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 감소
- 고환, 부고환 및 자궁은 수컷 및 암컷 120 mg/kg 투여군에서 상대 장기중량이 유의성 있게 증가

8) 분만성적 : 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

9) 신생자에 대한 사망률 및 체중 관찰

- 120 mg/kg 투여군에서 수컷 및 암컷동물 모두 출생 0 일째와 4 일째에 체중의 부형제 대조군과 비교해 볼 때 유의성 있는 감소가 관찰

(4) 고찰 및 결론

- 시험물질 Polyhexamethyleneguanidine phosphate (PHMG)을 암수 랫드에 각 군당 0, 13, 40 및 120 mg/kg 용량으로 수컷동물은 31 일, 암컷동물은 교배 2 주전부터 임신 및 포육 4일까지 경구투여한 후 사망률 및 일반증상, 체중, 사료섭취량, 교배성적, 부검소견, 장기중량, 병리조직학적 검사(고환, 부고환, 난소 및 폐), 임신기간, 분만성적, 신생자의 사망유무, 체중 및 외표검사를 검사하였음
- 암수 120 mg/kg 투여군에서 관찰된 천명 등과 같은 일반증상은 빈도수는 낮게 관찰되었으나 증상의 정도가 일반적인 정상동물에서 관찰되지 않는 변화로 시험물질의 독성학적 변화로 판단되었으며, 암수 120 mg/kg 투여군에서 관찰된 체중 및 사료섭취량의 감소는 용량상관성이 있어 시험물질의 영향으로 판단됨
- 40 및 120 mg/kg 투여군에서 관찰된 Precoital time의 증가는 암수동물 동거 후 13일째에 각각 1 및 2 레 씩 교배성립이 관찰되었으며 이를 제외한 모든 동물에서 동거후 첫 번째 발정기에 교배가 성립된 것으로 미루어 볼 때 시험물질에 의한 독성학적인 변화로 단정할 수는 없음
- 부검 시 120 mg/kg 투여군에서 관찰된 비장종대, 전립선 및 정낭선의 위축은 발현 빈도가 낮아 시험물질의 영향이 아닌 것으로 판단됨
- 장기중량의 경우 뇌하수체는 수컷 40 및 120 mg/kg 투여군과 암컷 120 mg/kg 투여군에서 절대 장기중량이 감소하였으나 이는 상대 장기중량을 고려해 볼 때, 체중 감소에 의한 장기중량의 감소로 판단되어, 독성학적 영향이 아닌 것으로 판단되며, 고환, 부고환 및 자궁에서 관찰된 120 mg/kg 수컷 및 암컷 투여군의 상대 장기중량 증가는 체중감소에 의한 상대적인 장기중량의 증가로 판단되어, 시험물질의 영향이 아닌 것으로 판단됨
- 한편 흉선은 암수 120 mg/kg 투여군에서 절대 장기중량이 유의성 있게 감소하였으며, 암컷 120 mg/kg 투여군에서는 상대 장기중량도 유의성 있게 감소하였고, 수컷 120 mg/kg 투여군에서 상대 장기중량은 유의성을 보이지는 않았으나 감소하는 경향을 보였으며, 이는 시험물질에 의한 영향으로 판단됨
- 비장은 암수 120 mg/kg 투여군 및 수컷 40 mg/kg 투여군에서 상대 장기중량이 유

의성 있게 증가하였으며, 절대 장기중량은 비록 유의성을 보이지는 않았으나 증가하는 경향을 보이므로 이는 시험물질에 의한 영향으로 판단되었음

- 폐는 수컷 120 mg/kg 투여군에서 관찰된 상대 장기중량의 유의성 있는 증가가 절대 장기중량을 고려해 볼 때 시험물질에 의한 영향으로 판단되었음
- 120 mg/kg 투여군에서 관찰된 암수 신생자의 체중감소는 용량상관성이 있어 시험물질의 영향으로 판단되었음
- 본 시험조건에서 Polyhexamethyleneguanidine phosphate PHMG의 무악영향관찰량 (No Observed Adverse Effect Levels, NOAEL)는 수컷동물에 있어서 13 mg/kg/day, 암컷동물 및 차세대 동물에 있어서 40 mg/kg/day으로 판단되었음

1-2. PGH

(1) 시험법 : OECD TG 421 및 국립환경과학원 고시 제 2014-1호

(2) 시험방법

시험물질 구성	1. 시험물질 : Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride (PGH) 2. 부형제 : Distilled water (DW)																																										
시험계의 구성	Sprague-Dawley/Crl:CD (SD) 랫드 약 7 주령 96 마리(암컷 48 마리, 수컷 48 마리)																																										
투여량	0, 30, 80, 160 mg/kg																																										
시험군의 구성	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">군</th> <th style="width: 10%;">성별</th> <th style="width: 10%;">동물수 (마리)</th> <th style="width: 10%;">동물번호</th> <th style="width: 10%;">투여액량 (mL/kg)</th> <th style="width: 10%;">투여량 (mg/kg)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Vehicle control</td> <td>Male</td> <td>12</td> <td>1 ~ 12</td> <td rowspan="2">10</td> <td rowspan="2">0</td> </tr> <tr> <td>Female</td> <td>12</td> <td>49 ~ 60</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">T1</td> <td>Male</td> <td>12</td> <td>13 ~ 24</td> <td rowspan="2">10</td> <td rowspan="2">30</td> </tr> <tr> <td>Female</td> <td>12</td> <td>61 ~ 72</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">T2</td> <td>Male</td> <td>12</td> <td>25 ~ 36</td> <td rowspan="2">10</td> <td rowspan="2">80</td> </tr> <tr> <td>Female</td> <td>12</td> <td>73 ~ 84</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">T3</td> <td>Male</td> <td>12</td> <td>37 ~ 48</td> <td rowspan="2">10</td> <td rowspan="2">160</td> </tr> <tr> <td>Female</td> <td>12</td> <td>85 ~ 96</td> </tr> </tbody> </table>	군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/kg)	투여량 (mg/kg)	Vehicle control	Male	12	1 ~ 12	10	0	Female	12	49 ~ 60	T1	Male	12	13 ~ 24	10	30	Female	12	61 ~ 72	T2	Male	12	25 ~ 36	10	80	Female	12	73 ~ 84	T3	Male	12	37 ~ 48	10	160	Female	12	85 ~ 96
군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/kg)	투여량 (mg/kg)																																						
Vehicle control	Male	12	1 ~ 12	10	0																																						
	Female	12	49 ~ 60																																								
T1	Male	12	13 ~ 24	10	30																																						
	Female	12	61 ~ 72																																								
T2	Male	12	25 ~ 36	10	80																																						
	Female	12	73 ~ 84																																								
T3	Male	12	37 ~ 48	10	160																																						
	Female	12	85 ~ 96																																								
투여방법	<p>- 시험물질은 가장 최근에 측정된 체중에 따라 10 mL/kg로 계산하여 경구투여 실시함. 대조군의 부형제로는 멸균증류수를 이용하였으며, 투여되는 조제시험물질은 동물실에서 투여 전과 투여 중 magnetic stirrer를 이용하여 지속적으로 교반</p> <p>시험물질이 기도를 통해 호흡기계로 유입될 경우 심각한 독성이 유발되므로, 경구투여 시 주의하여 투여</p>																																										
투여 횟수 및 투여기간	대조물질과 조제시험물질은 하루에 한 번씩 대략 비슷한 시간대(08 : 30 ~ 13 : 00)에 교배 전 기간 시작일부터 암컷동물은 포육 4 일까지, 수컷동물은 부검 전날까지 30 일간 투여																																										
관찰 및 검사항목	사망률 및 일반증상, 체중, 사료섭취량, 교배성적, 부검소견, 장기중량, 병리조직학적 검사(교환, 부교환, 난소 및 폐), 임신기간, 분만성적, 신생자의 사망유무, 체중 및 외표검사 실시																																										

(3) 시험결과

1) 사망률

- 모든 시험물질 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았음

2) 일반증상

- 수컷동물은 유연(salivation)이 30, 80 및 160 mg/kg 투여군에서 각각 2, 8 및 12 레, 입모(piloerection)가 160 mg/kg 투여군에서 1 레, 행동저하(subdue behavior) 및 쇠약(thin appearance)가 80 mg/kg 투여군에서 1 레 관찰
- 암컷동물에서는 유연이 30, 80 및 160 mg/kg 투여군에서 각각 1, 10 및 12 레, 치아변색(discoloration of tooth)이 80 및 160 mg/kg 투여군에서 각각 1 레, 입모 및 행동저하가 160 mg/kg 투여군에서 1 레 관찰

3) 체중 변화

- 160 mg/kg 투여군 수컷동물은 투여 24 일째부터, 암컷동물은 임신 7 일째부터 통계학적으로 유의성 있는 체중 감소가 관찰

4) 사료섭취량 변화

- 60 mg/kg 투여군 암컷동물에서 시험물질 투여기간 동안 통계학적으로 유의성 있는 사료섭취량 감소가 관찰

5) 교배성적

- 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

6) 부검 시 육안 소견

- 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

7) 장기중량 측정

- 수컷동물 160 mg/kg 투여군에서 전립선, 흉선, 폐에서 통계학적으로 유의성 있는 절대 장기 중량의 감소가 관찰
- 암컷동물에서는 160 mg/kg 투여군 흉선에서 통계학적으로 유의성 있는 절대 장기 중량의 감소 및 80 및 160 mg/kg 투여군 폐에서 통계학적으로 유의성 있는 상대 장기 중량의 증가가 관찰

8) 병리조직학적 검사

- 160 mg/kg 투여군 암컷과 수컷동물 폐에서 이상소견이 관찰되었음

9) 분만성적

- 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

10) 신생자에 대한 사망률 및 체중 관찰 결과

- 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

(4) 고찰 및 결론

- 시험물질 Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride (PGH)을 암수 랫드에 각 군당 0, 30, 80 및 160 mg/kg 용량으로 수컷동물은 30 일, 암컷 동물은 교배 2 주전부터 포육 4 일까지 투여한 후, 시험물질에 의한 생신선 기능, 교미행동, 수태, 태자발생 및 분만 등 생식기능에 미치는 영향을 관찰하였음

- 일반증상에서 관찰된 유연증상은 용량상관성이 있고 발생빈도가 높아 시험물질에 의한 영향이지만, 유연과 관련된 다른 증상이 관찰되지 않아 독성학적 의미는 없는 것으로 판단되었음. 또한 80 및 160 mg/kg 투여군에서 관찰된 치아의 변색은 시험물질에 의한 영향이지만, 치아 변색이 관찰된 동물에서 특이적인 변화가 관찰되지 않아 독성학적 의미는 없는 것으로 판단됨. 그 외에 관찰된 일반증상은 용량상관성이 없거나 일시적으로 관찰되어 시험물질에 의한 독성학적 영향은 아닌 것으로 판단되었음

- 체중은 160 mg/kg 투여군 수컷동물에서는 투여 24 일째부터, 암컷 동물은 임신 7 일째부터 통계학적으로 유의성 있는 체중감소가 관찰되었으며, 암컷 동물의 경우 시험물질 투여 시작부터 사료섭취량 감소를 동반하였음

- 부검소견 관찰결과, 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았지만, 장기중량에서 160 mg/kg 투여군 수컷동물의 전립선, 흉선 및 폐의 절대 장기 중량감소, 암컷동물의 흉선 절대 장기 중량 감소가 관찰되었음. 또한 80 및 160 mg/kg 투여군 폐 상대 장기 중량의 증가가 관찰되었음

- 이와 관련하여 병리조직학적 관찰 결과, 고용량군 폐에서 이상소견이 관찰되었음

- 생식 및 발생학적 영향평가를 위한, 모동물의 생식장기(고환 및 난소)에 대한 조직 병리학적 검사, 수태능력 평가, 분만성적 및 신생자의 사망률, 일반증상 및 체중 관찰 등 모든 생식 및 발생학적 영향평가 항목에서 시험물질에 의한 독성학적 영향은 관찰되지 않았음
- 이러한 결과들을 종합적으로 해석해 볼 때, 본 시험 조건에서의 무악영향관찰량(NOAEL)은 암수 각각 80 mg/kg/day로 판단됨

2. PGH에 대한 아급성 흡입독성시험

2-1. 1 주 반복흡입노출 예비시험

(1) 시험법 : OECD TG 412

(2) 시험방법

시험종	Sprague-Dawley 랫드 (암수 각각 n = 10)
노출 경로	비부흡입노출
노출 시간	6 시간/1 회, 5 회/주(Total 5 회 노출)
흡입챔버 내 조건	산소농도는 19 % 이상, 온도는 22 ± 3 °C 및 상대습도는 30 % ~ 70 %로 유지. 단, 시험물질 발생의 특성상 상대습도를 포함하여 본 조건의 유지가 어려울 수 있음
발생 장치	시험물질 발생: Atomizer 타입의 Mist generator
노출 중 측정 항목	질량 농도 (mg/m ³ , 노출 시간 동안 각 노출군 각각 3 회) 입경 분포 (각 노출군당 1 회) 수농도 측정 (각 노출군당 1 회)
시험군	T1, T2
시험군별 노출 농도	T1 : 9 mg/m ³ T2 : 13 mg/m ³
관찰 및 측정항목	일반증상 사망률 체중 사료 섭취량 부검 시 장기 육안 소견

(3) 시험의 개요

- 1) PGH에 대한 4 주 반복흡입독성시험 수행의 용량 설정을 위하여 1 주간 반복흡입 독성 시험을 수행하였음
- 2) PGH를 포함한 가슴기 살균제 제품에 대하여 기 선행된 90 일 반복흡입독성 시험 수행의 용량 및 시험결과를 바탕으로 28 일 노출 시의 노출 용량을 예측한 다음, 이를 1 주간 반복 시 노출 용량으로 환산하여 노출을 진행하였음
- 3) 그림 2에서는 1 주 반복흡입독성시험의 발생 및 노출 모식도를 나타내고 있음. 노출 중 노출되는 PGH의 질량농도, 입경분포 및 수농도 측정을 수행하였음

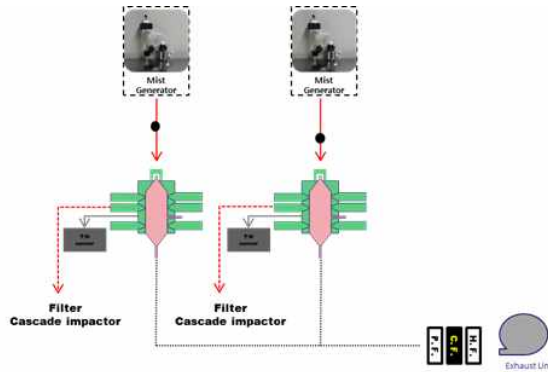


그림 2. PGH에 대한 1 주 반복흡입독성 시험의 발생 및 노출 모식도

- 4) 노출 기간 동안 사망률, 일반증상 관찰, 체중변화 및 사료섭취량을 측정 및 관찰하였으며, 부검 시 주요 장기, 특히 폐에 대한 육안적 소견을 관찰하였음

(4) 시험결과

1) 시험물질 노출

- 그림 3에서는 노출군별 평균 노출질량 농도를 제시하고 있음. 노출군 모두 목표농도의 $\pm 10\%$ 이내에서 정상적으로 노출이 진행되었음을 확인할 수 있음

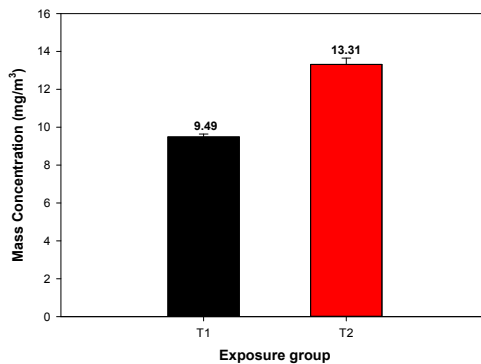


그림 3. 노출군별 평균 노출 질량 농도

- 그림 4에서는 입경별 질량 농도 분포 결과를 나타내고 있음. 노출군 모두 1 μm 이하 입경에서 대부분의 입자가 노출되었음을 확인할 수 있으며, T1 및 T2의 MMAD (Mass median aerodynamic diameter)의 경우 각각 0.33 및 0.13 μm 를 보였으며 GSD (Geometric standard deviation)의 경우 각각 2.80 및 3.53를 나타내었음

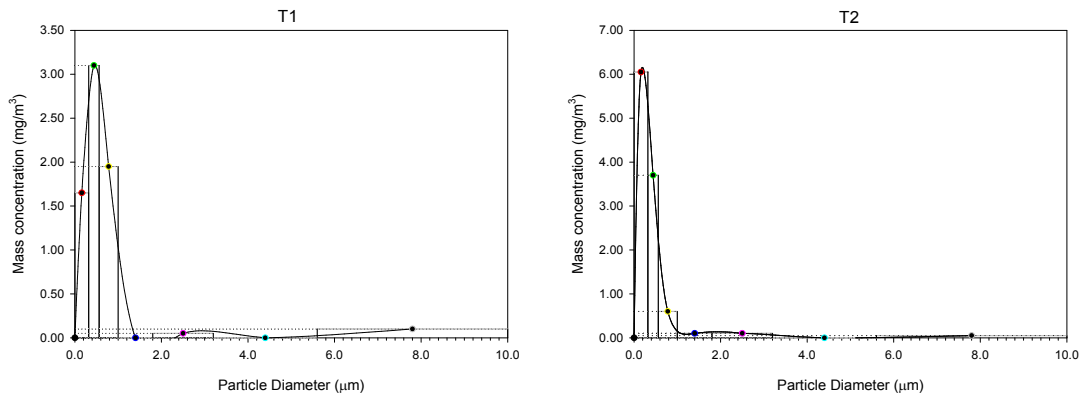


그림 4. 노출군의 입경별 질량 농도 분포 측정 결과

- 한편 그림 5에서는 실시간 입자 수농도 계측기를 이용한 입경(8 ~ 300 nm)별 수농도 분포 결과를 제시하고 있음. 노출군 모두 100 nm 이하에서 피크점이 확인되었음

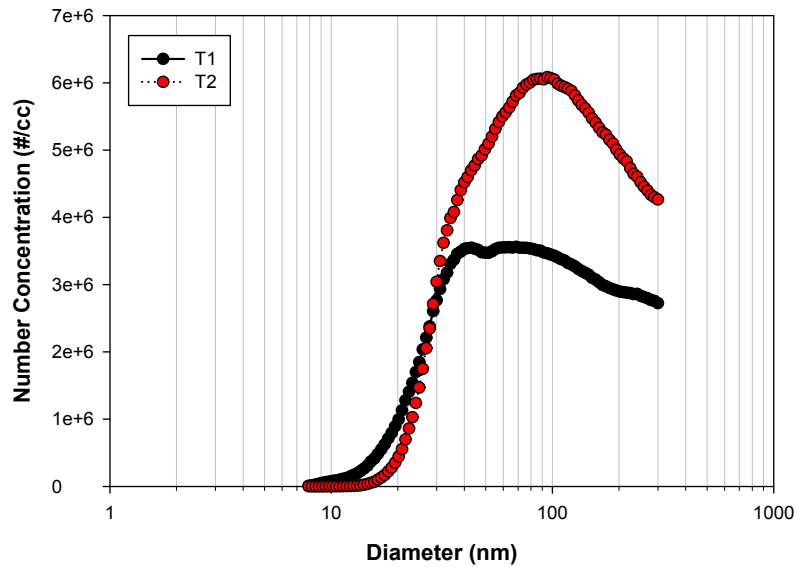


그림 5. 노출군별 수농도 (Number size distribution) 측정 결과

2) 사망률 및 일반증상 관찰

- 노출기간 중 사망동물 및 특이적 일반증상은 관찰되지 않았음

3) 체중변화 및 사료섭취량 변화

- 그림 6에서는 노출군별 노출기간 중 체중변화 측정 결과를 제시하고 있음. 암수 모두 T2군의 경우 노출 전 체중에 비하여 5 일 노출 후 체중이 현격하게 감소하였음을 알 수 있음

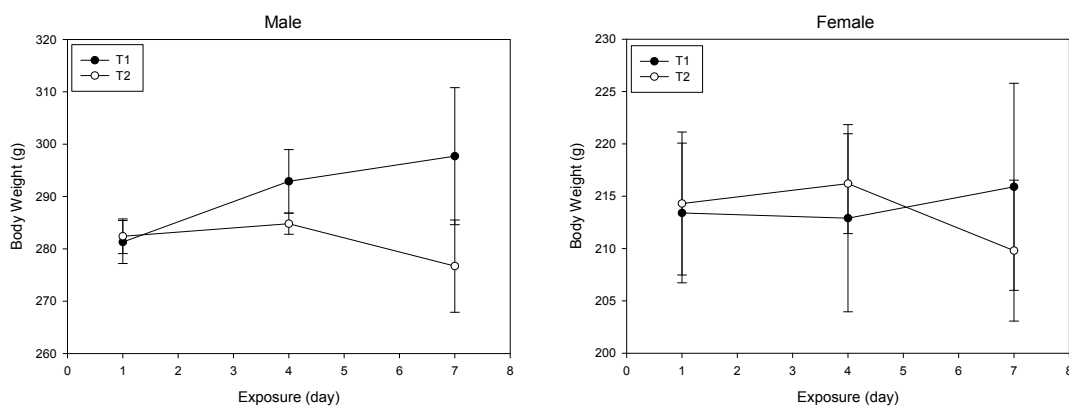


그림 6. 노출군별 체중변화 측정 결과

- 사료섭취량의 경우 T1 및 T2 노출군 모두 노출 초기에 비하여 사료섭취량이 감소하였음을 확인하였으며, T2 군의 경우 특히 현저하게 감소하였음(그림 7 참조)

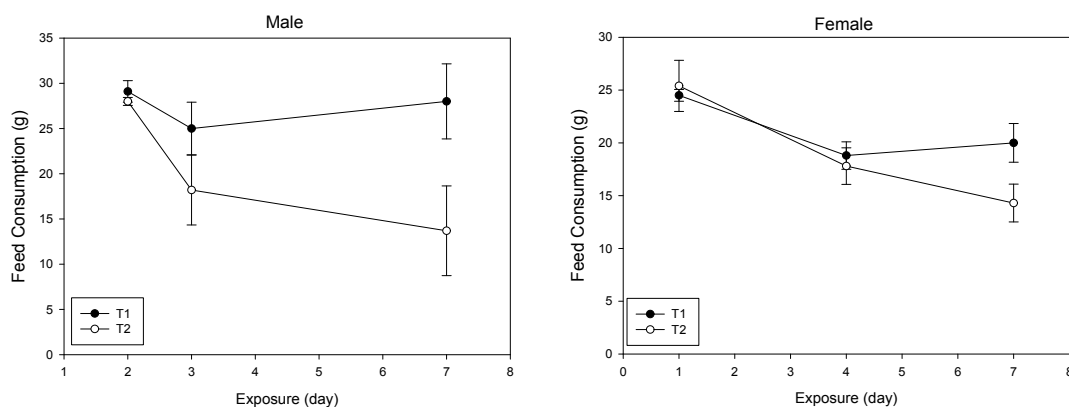


그림 7. 노출군별 사료섭취량 변화 측정 결과

4) 부검 시 육안 소견

- 부검 시 T1 및 T2 노출군 모두 폐에서 육안소견(변색, Discoloration)이 관찰되었음 (그림 8 참조)



그림 8. 부검 시 폐에 대한 육안적 소견 관찰 사진

(5) 고찰 및 결론

- 1주간 수행한 반복흡입독성시험 결과 T2 군의 경우 체중감소, 사료섭취량 감소 및 폐에서 육안적 소견이 관찰되었음. 또한 T1 군의 경우에도 완만한 체중증가 추세, 사료섭취량 감소 및 폐에서 육안적 소견도 추가로 관찰되었음
- 본 결과들을 바탕으로 PGH에 대한 4 주 반복흡입독성시험 수행을 위한 최고농도군의 용량을 설정하고, 최저농도군의 경우 기술적 발생 농도를 고려한 NOAEL 값이 도출될 수 있는 용량으로 설정 후 본 시험(4 주 반복흡입독성시험)을 수행하였음

2-1. 4 주 반복흡입독성시험

(1) 시험법 : OECD TG 412

(2) 시험방법

시험종	SD 랫드(암수 각 n = 54)
노출 경로	비부흡입노출
노출 시간	6 시간/1 회, 5 회/주, 4 주(총 20 회 노출) 노출 전 기간(Pretest) 기간 중 홀더트레이닝 3 회 실시
회복 기간	2 주
흡입챔버 내 조건	산소농도는 19 % 이상, 온도는 $22 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 및 상대습도는 30 ~ 70 %로 유지. 단, 시험물질 발생의 특성상 상대습도를 포함하여 본 조건의 유지가 어려울 수 있음
발생 장치	시험물질 발생: Atomizer 타입의 미스트 제너레이터
노출 중 측정 항목	질량 농도(mg/m^3 , 노출 시간 동안 각 노출군 별 각각 3회) 입경 분포(각 노출군 별 주 1 회) 수농도 측정(각 노출군 별 주 1 회)
시험군	대조군(회복군 포함), 저농도(T1), 중농도(T2) 고농도(T3) (회복군 포함)
시험군별 노출 농도	저농도(T1) : $0.10 \text{ mg}/\text{m}^3$ 중농도(T2) : $0.50 \text{ mg}/\text{m}^3$ 고농도(T3) : $2.00 \text{ mg}/\text{m}^3$
관찰항목	일반증상 사망률 체중 사료 섭취량 부검 육안소견 장기 무게 측정 조직병리 검사 임상병리 검사 폐내세척액(BALF) 분석

(3) 시험물질 발생, 노출법 및 챔버 내 질량농도 평가법

- 그림 9 는 4 주 반복흡입독성시험의 발생 및 노출 모식도를 나타내고 있음. 본 급성흡입 독성시험에서는 시험군별로 constant atomizer 타입의 미스트 제너레이터를 사용하여 희석 비율을 달리한 PGH 수용액으로부터 시험물질을 발생하였음. 시험군별 목적농도에 맞게 희석공기를 공급하여, 발생된 시험물질과 혼합시킨 후 비부노출챔버로 분배되는 시스템을 구성하였음
- 미스트 제너레이터로부터 발생되어 희석공기와 혼합된 후 목적농도에 맞게 챔버로 노출된 시험 물질에 대한 질량 농도 측정은 실제 실험동물인 랫드가 시험물질에 노출되는 동일한 공간, 즉 챔버 내 호흡 영역(breath zone)에서 노출되는 시험물질에 대한 질량 농도 측정이 수행되었음
- 시험물질의 노출농도는 노출 시간 동안 3 회 측정하여 노출된 시험물질의 질량농도를 평가하였음. 질량농도 평가를 위한 시험물질의 포집에는 fluorocarbon이 코팅된 25 mm micro glass fiber (Pallflex, Germany) 필터를 사용하였음
- 포집 전 · 후 필터의 무게를 칭량하여 질량농도를 계산하였음. 필터 무게 칭량은 1.0 µg 에서 5 g (Repeatability ≤ ± 1.0 µg)까지 칭량이 가능한 microbalance (ME5, Sartorius)를 이용하였음
- 시험물질의 질량농도는 다음의 수식으로부터 산출되었음

$$Mass\ concentration\ (mg/m^3) = \frac{Mass\ of\ Filter\ (mg)}{Flowrate\ (LM^{-1}) \times Sampling\ Time\ (Min)}$$

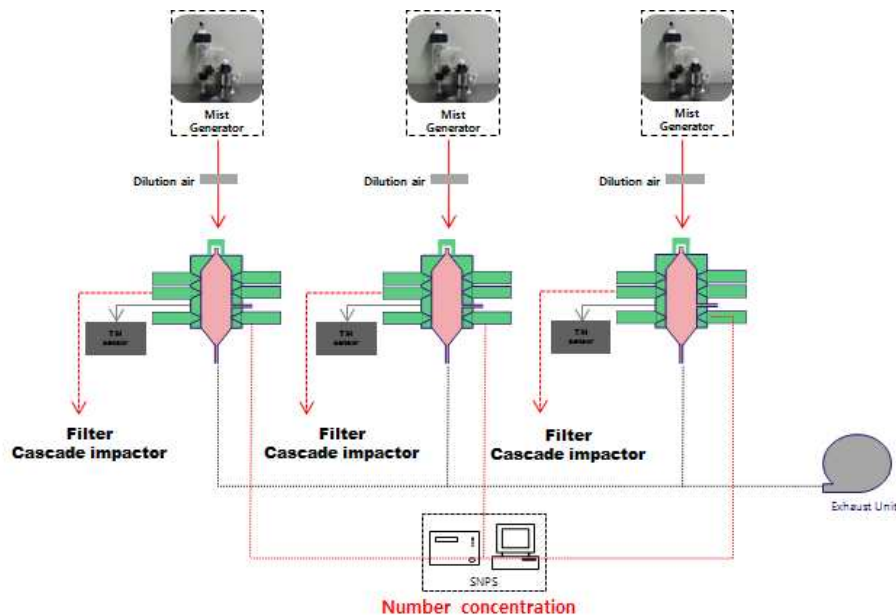


그림 9. 4 주 반복흡입독성 시험 발생 및 노출 모식도

(4) 시험 결과

1) 노출 질량농도

- 표 3 및 그림 10 는 노출군별 목표 농도 및 시험 기간 중 노출된 평균 질량 농도를 나타내고 있음. 각각의 목표 농도에 대해서 실제 평균 노출 농도는 ± 5.0 % 편차 내에 존재하고 있었음

표 3. 노출군별 목표 농도 및 실제 노출된 시험물질의 평균 질량 농도

노출군	목표 농도(mg/m ³)	실제 평균 노출 농도(mg/m ³)
저농도(T1)	0.10	0.10 ± 0.01
중농도(T2)	0.50	0.51 ± 0.04
고농도(T3)	2.00	1.98 ± 0.18

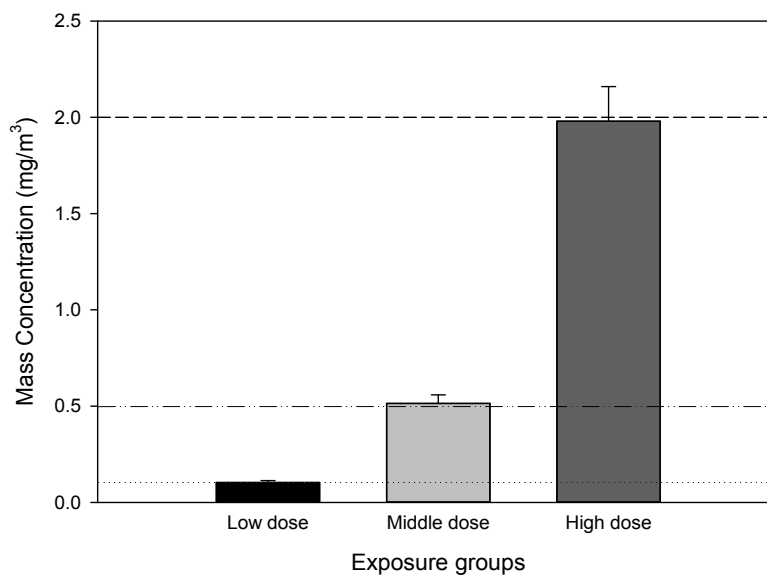


그림 10. 노출군별 노출기간 중 평균 노출질량농도

- 그림 11은 노출군별로 노출일별 측정된 질량농도의 일별 변동성을 나타내고 있음. 각 노출군에서 목표 농도 대비하여 일간 변동성은 20 % 이내로 유지되었음

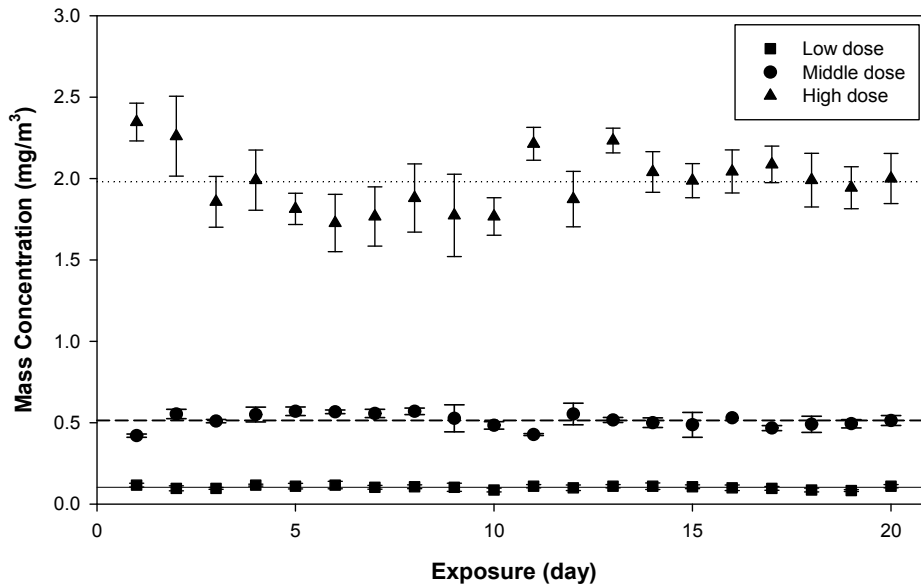


그림 11. 노출군별 질량농도의 일별 변동성 결과

2) 발생 입자의 MMAD (Mass median aerodynamic diameter) 측정

- 그림 12 은 전체 노출 기간 중 7 단 다단임팩터(Cascade impactor)을 이용하여 측정 및 분석한 각 노출군별 MMAD에 대한 평균값을 나타내고 있음. 모든 노출군에서 대부분 1 μm 이하 크기의 PGH 입자가 발생 및 노출되었음을 확인할 수 있음
- 특히 그림 13 를 살펴보면 각 입경별 질량농도 분포를 살펴볼 수 있는데, 각 노출군 모두 0.32 μm 이하 입경 범위에서 가장 우세한 질량농도 분포를 보였음. 이러한 경향성은 다음에서 제시되는 수농도 측정 결과에서도 확인할 수 있었음

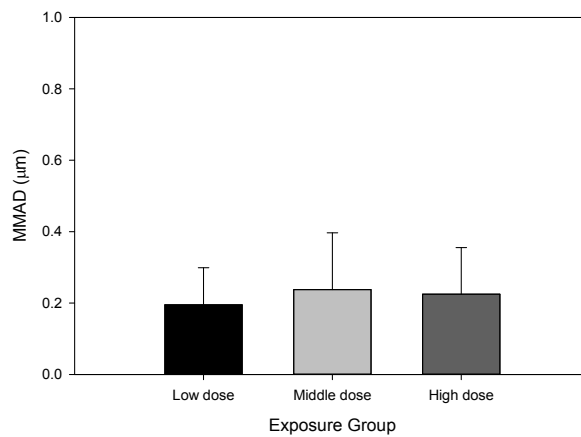


그림 12. 노출군별 평균 MMAD 측정 결과

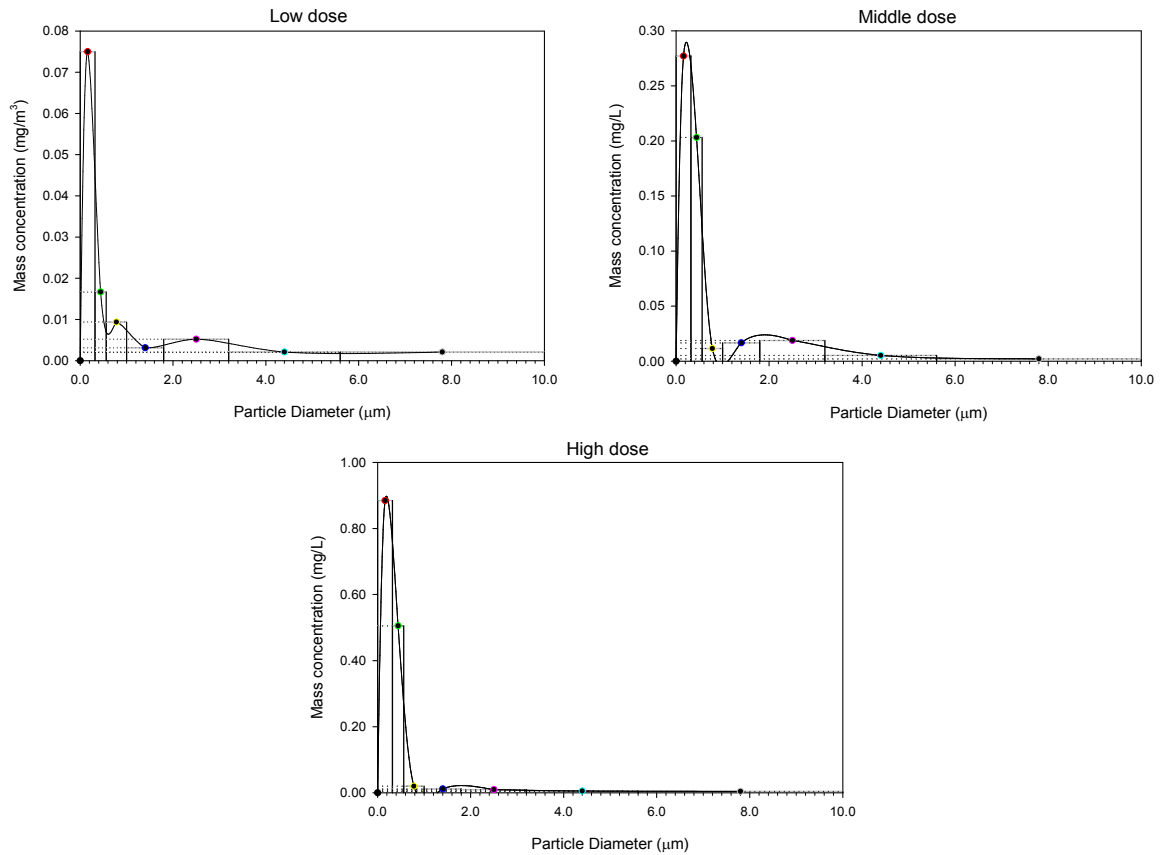


그림 13. 각 노출군 입경별 질량농도분포

3) 발생 입자 수농도 측정

- 본 시험에서는 발생 및 노출되는 PGH 입자의 수농도 및 입자 크기 분포를 분석하기 위하여 실시간 입자 계측기를 이용한 8 ~ 300 nm 범위의 입자에 대한 수농도 및 입경 분포를 측정하였음
- 그림 14은 각 노출군별 평균 입경 분포를 제시하고 있음. 입자의 피크점은 각 노출군 모두 100 nm 이하에 위치하고 있었으며, 노출군별로 발생하는 PGH 입자의 수농도 구배 또한 살펴볼 수 있었음. 이는 앞서 언급된 MMAD 측정결과와 유사성을 나타냄

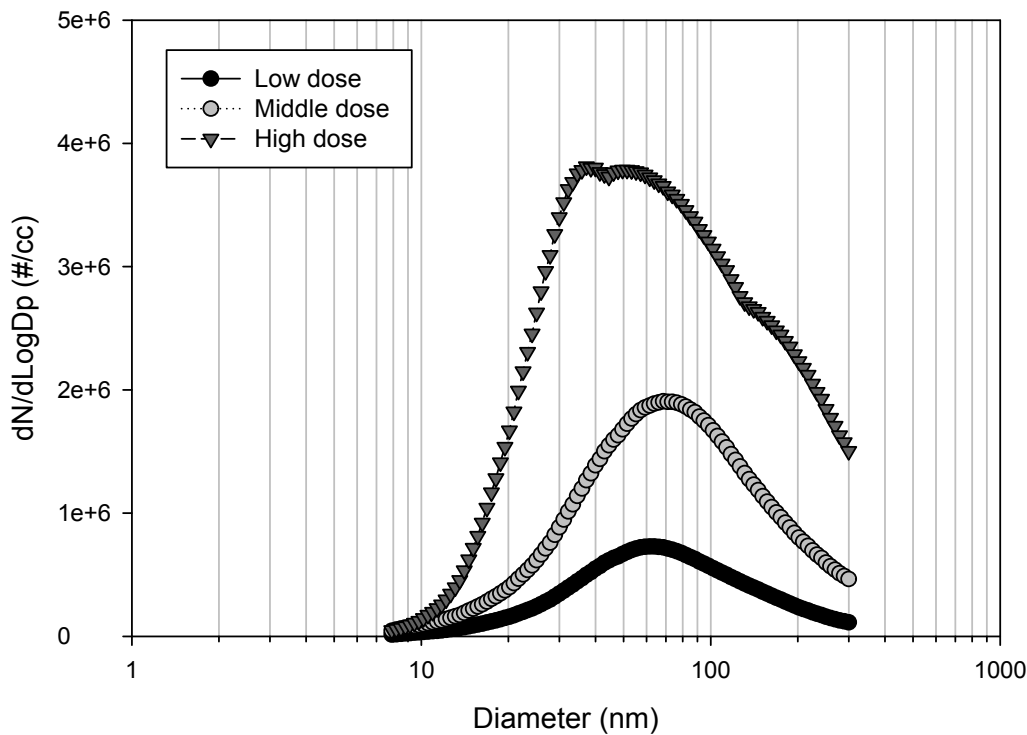


그림 14. 각 노출군별 수농도 분포 측정 경로가

4) 사망률 및 일반증상 관찰

- 노출 후 저농도 노출군 수컷 한 마리가 Day 2 에 사망하였으며, 회복기간 중 고농도 노출군 수컷 한 마리가 회복기간 7 일째 사망하였음. Day 2 에 사망한 저농도 노출군 수컷의 경우 시험물질의 영향보다는 개체 특이적인 원인에 의한 사망으로 판단되며, 회복기간 중 사망한 노출 회복군 수컷 한 마리의 경우 시험물질에 의한 영향으로 판단됨
- 한편 시험기간 중 시험물질에 의한 용량의존적인 일반증상은 관찰되지 않았으며, 고농도 노출군 수컷 1 마리에서 관찰된 야윰 및 탈모, 피부의 가피형성 등은 시험물질에 의한 영향이기 보다는 개체 특이적인 것으로 판단됨

5) 체중변화(그림 15 및 16)

- 노출 기간 중 암수컷 모두 대조군 대비하여 유의성 있는 체중변화가 관찰되지 않았음
- 한편 노출 회복군 수컷의 경우 노출 Day 22 일 이 후 대조군 대비하여 유의성 있는 체중 감소가 관찰되었음

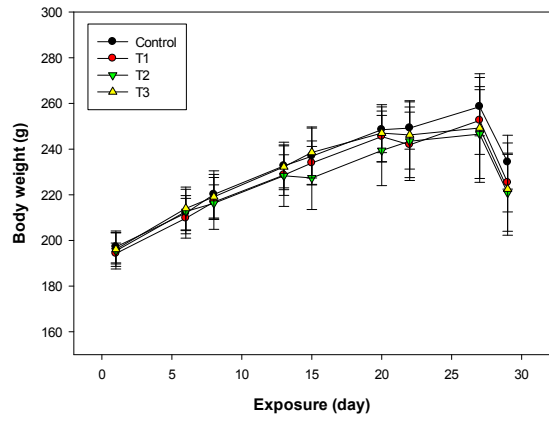
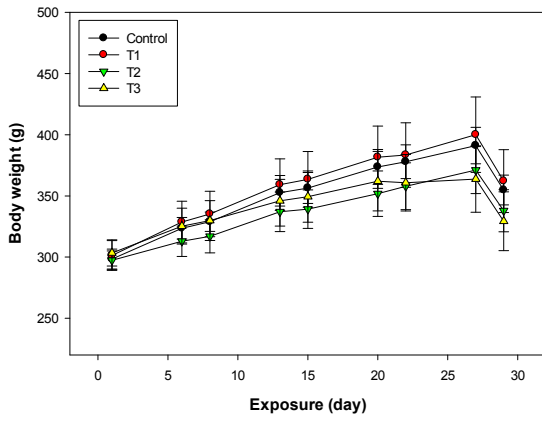


그림 15. 노출 기간 중 노출군별 체중 변화(좌 : 수컷 및 우 : 암컷)

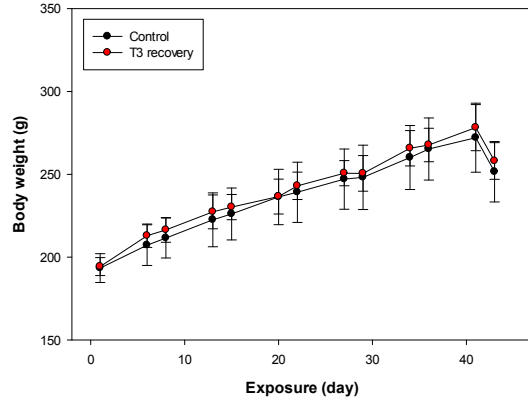
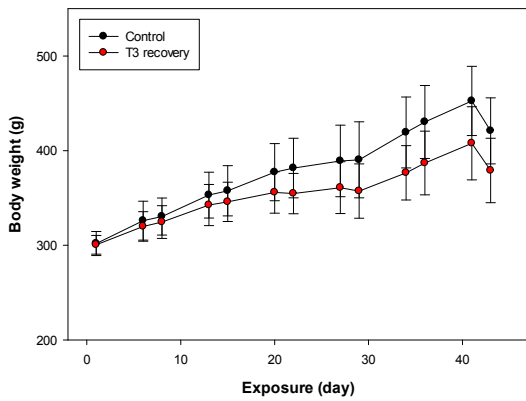


그림 16. 회복군의 체중 변화(좌 : 수컷 및 우 : 암컷)

6) 사료섭취량 변화(그림 17 및 18)

- 노출 기간 중 암수컷 모두 대조군 대비하여 유의성 있는 사료섭취량 변화가 관찰되지 않았음
- 한편 노출 회복군 수컷의 경우 노출 Day 21 일 이 후 대조군 대비하여 유의성 있는 사료섭취량 감소가 관찰되었음

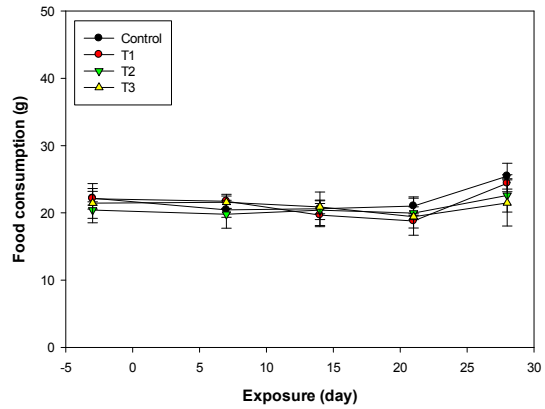
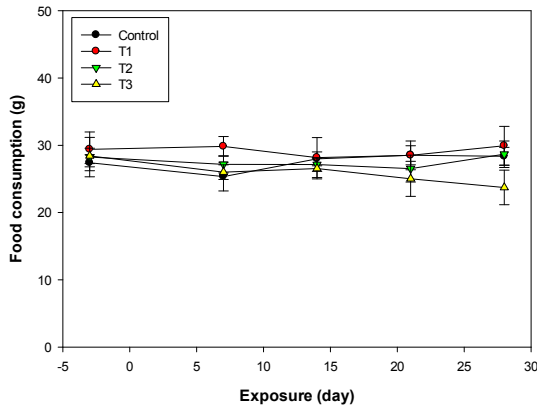


그림 17. 노출 기간 중 노출군별 사료섭취량 변화(좌 : 수컷 및 우 : 암컷)

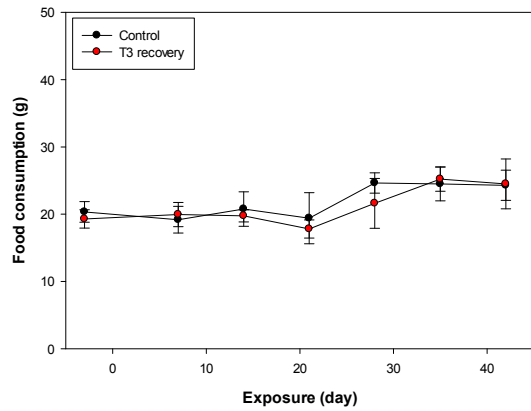
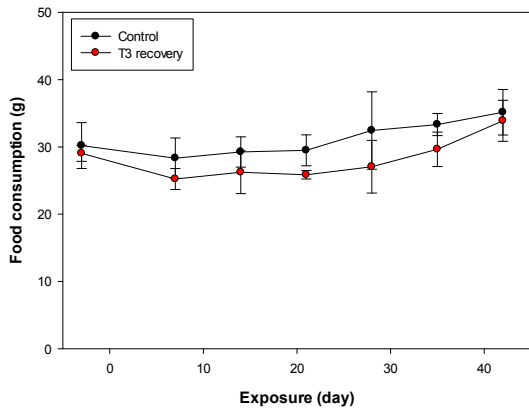


그림 18. 회복군의 사료섭취량 변화(좌 : 수컷 및 우 : 암컷)

7) 혈액학적 검사

- 혈액학적 검사 결과 노출 회복군 수컷의 프로트롬빈 시간의 유의적 연장을 제외하고는 노출군 및 노출 회복군 모두에서 통계적으로 유의한 증가 및 감소는 관찰되지 않았음

8) 혈액생화학적 검사

- 혈액 생화학적 검사 결과 노출군 및 노출 회복군 모두에서 통계적으로 유의한 증가 및 감소는 관찰되지 않았음

9) 부검 시 육안 소견

- 고농도 노출군 암컷 및 수컷의 대부분의 개체에서 폐에서 부풀음(Ballooning), 변색

(Discoloration) 및 병소(Focus/foci)가 관찰되었음

- 한편 고농도 노출군 암컷 한 마리의 흉선에서 변색(Discoloration) 및 병소(Focus/foci)가 관찰되었음
- 또한 고농도 노출군 수컷 두 마리의 기관지 림프선(Bronchial lymph node)의 확장(Enlarged)가 관찰되었음
- 이러한 소견들은 시험물질의 반복흡입노출에 의한 영향으로 판단됨

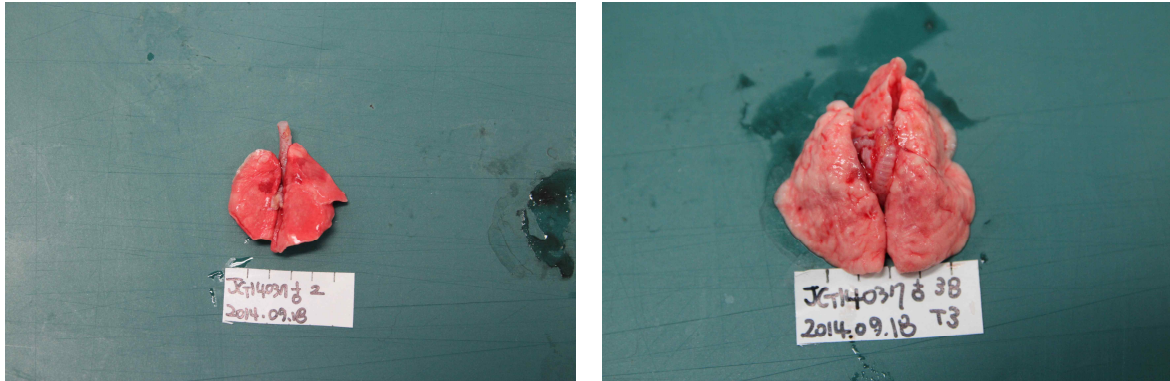


그림 19. 대조군 폐(좌) 및 육안적 소견(부품 및 변색)이 관찰된 고농도 노출군의 폐(우)

10) 장기중량 측정(그림 20 및 21)

- 고농도 노출군의 암컷 및 수컷에서 폐의 유의적인 증가가 관찰되었으며, 노출 회복군 수컷의 폐에서도 유의적인 증가가 관찰되었음. 노출 회복군 암컷의 경우 대조군 대비 폐의 중량 증가가 관찰되었지만 통계적인 유의성은 없었음
- 한편 고농도 노출군 암컷의 뇌에서 통계적으로 유의적인 증가가 관찰되었음. 수컷의 경우는 대조군 대비하여 증가하였지만 통계적인 유의성은 없었음
- 고농도 노출군 및 회복군에서 관찰된 폐의 유의적 중량 증가는 시험물질의 반복흡입노출에 의한 영향으로 판단됨

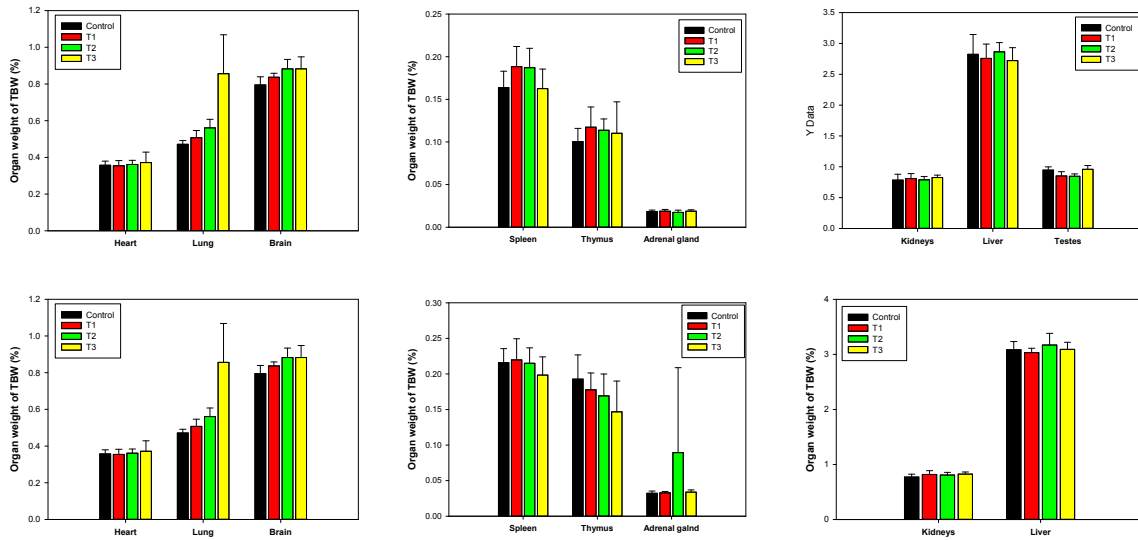


그림 20. 노출군 수컷 및 암컷의 상대장기중량 측정 결과(위 : 수컷, 아래 : 암컷)

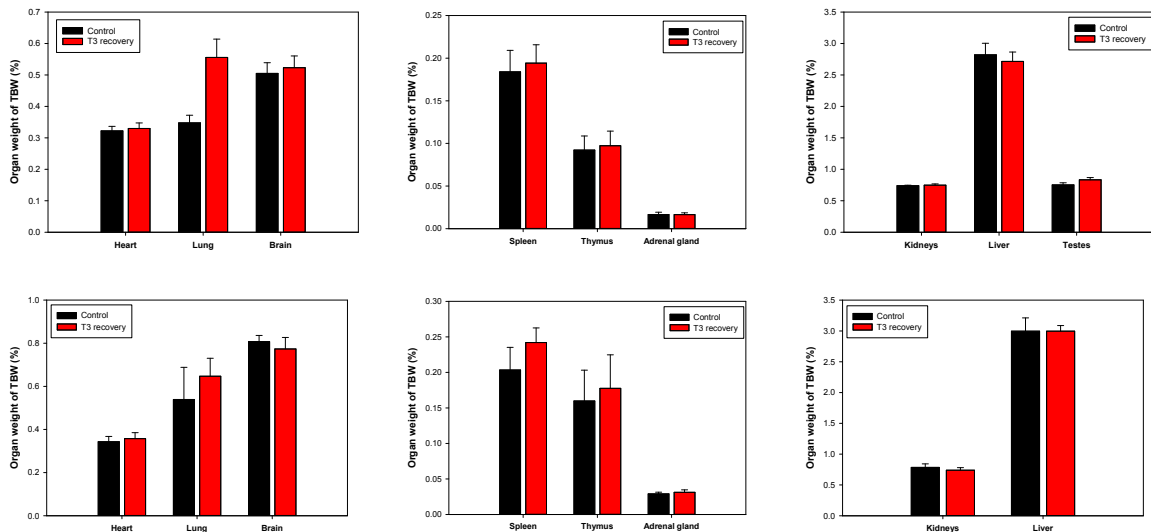


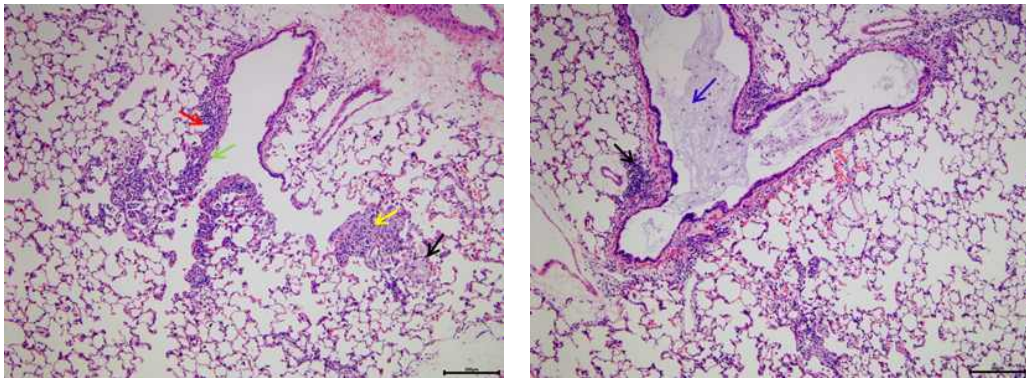
그림 21. 회복군 수컷 및 암컷의 상대장기중량 측정 결과(위 : 수컷, 아래 : 암컷)

11) 조직병리검사

- 폐, 비강, 기관 및 후두(호흡기 계통)에서 PGH의 4 주 반복흡입노출로 인한 독성학적 영향들이 관찰되었음. 특히 이러한 조직학적 변화들은 고농도 노출군 암컷 및 수컷에서 뚜렷하였음
- 암수 노출 회복군의 폐는 노출군과 동일한 병변들이 관찰되었으며, 증상의 정도로 보아서 2 주 후 회복되지 않은 것으로 판단됨

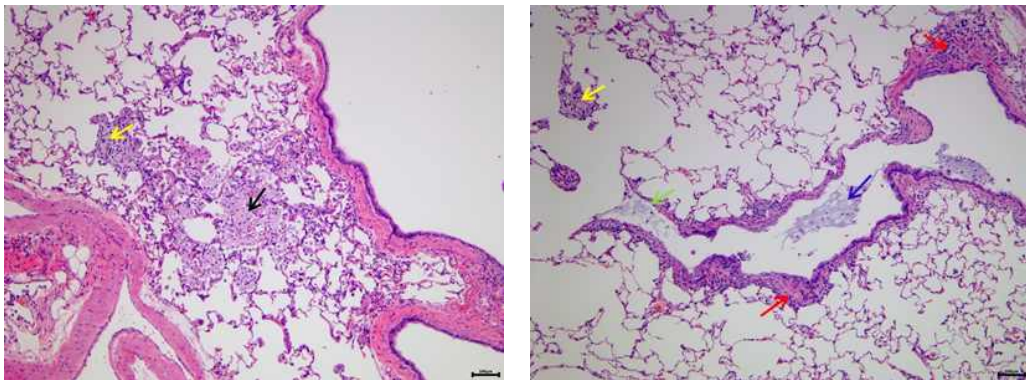
① 폐(그림 22, 23, 24 및 25)

- 암수 고농도 회복군의 폐에서 색소침착 대식세포 증가(Increased alveolar macrophages, pigmented), 염증세포 침윤(Inflammatory cell infiltration), 폐섬유증(Pulmonary fibrosis), 기관지 상피 변성/재생(Degeneration/regeneration, bronchiolar epithelium), 화농성 삼출물(Suppurative exudate)이 관찰되었으며, 노출 회복군의 암수컷에서도 동일하게 관찰되었음



색소침착 대식세포 증가(Black)
 염증세포침윤(Red)
 폐포 섬유화(Yellow)
 기관지상피 변성/재생(Green)
 화농성 삼출물(Blue)

그림 22. 고농도 노출군의 폐 조직병리검사 결과(H&E 염색)

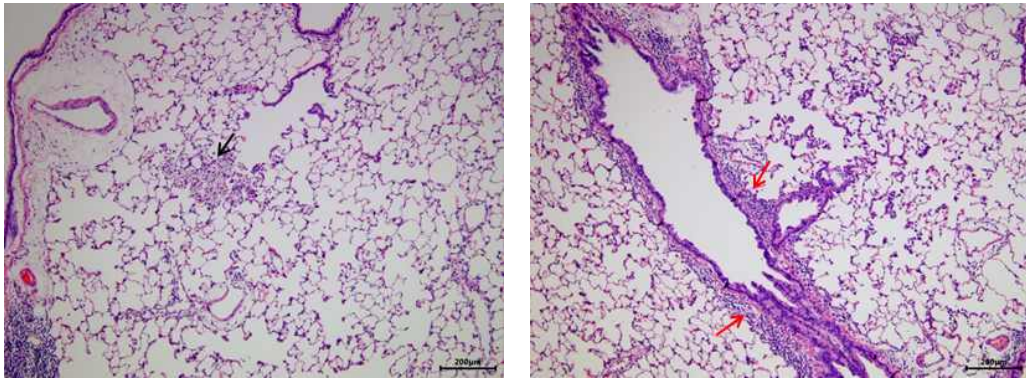


색소침착 대식세포 증가(Black)
 염증세포침윤(Red)
 폐포 섬유화(Yellow)
 기관지상피 변성/재생(Green)
 화농성 삼출물(Blue)

그림 23. 노출 회복군의 폐 조직병리검사 결과(H&E 염색)

- 한편 중농고 노출군에서는 염증세포 침윤(수컷) 및 색소침착 대식세포 증가(암컷 및 수컷)이 관찰되었으며, 수컷에서 관찰된 염증세포 침윤은 PGH의 반복흡입으로

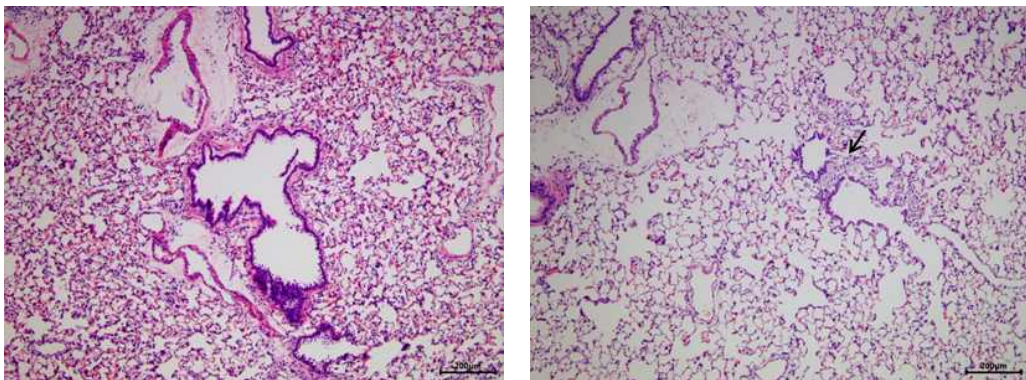
인한 독성학적 영향으로 판단되며, 색소침착 대식세포 증가의 경우 개체 빈도수가 낮으며 일반적으로 입자상 물질의 흡입 시 관찰되는 병변으로서 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단됨



색소침착 대식세포 증가(Black)
염증세포침윤(Red)

그림 24. 중농도 노출군의 폐 조직병리검사 결과(H&E 염색)

- 저농도 노출군의 경우도 색소침착 대식세포 증가가 관찰되었지만, PGH에 의한 영향은 아닌 것으로 판단됨

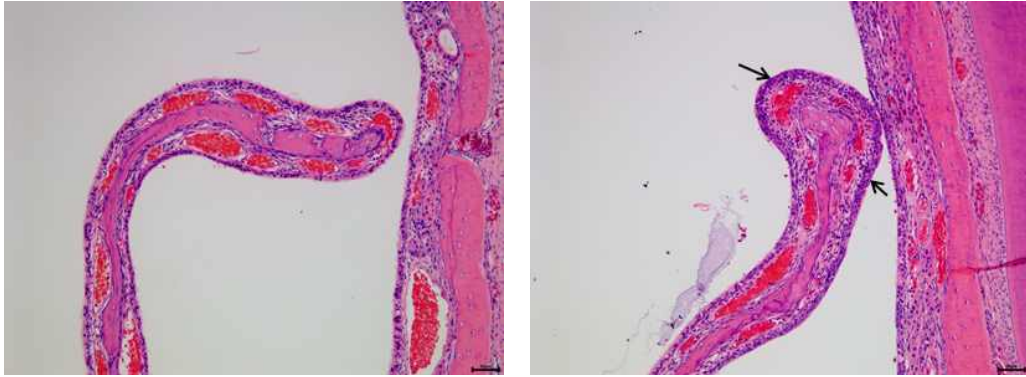


색소침착 대식세포 증가(Black)

그림 25. 대조군(좌) 및 저농도 노출군(우)의 폐 조직병리검사 결과(H&E 염색)

② 비강

- 고농도 노출군의 암컷 및 수컷에서 이행 상피의 변성 및 재생(Degeneration/regeneration, transitional epithelium)이 관찰되었음. 이러한 변화는 노출 회복군에서는 관찰되지 않았음

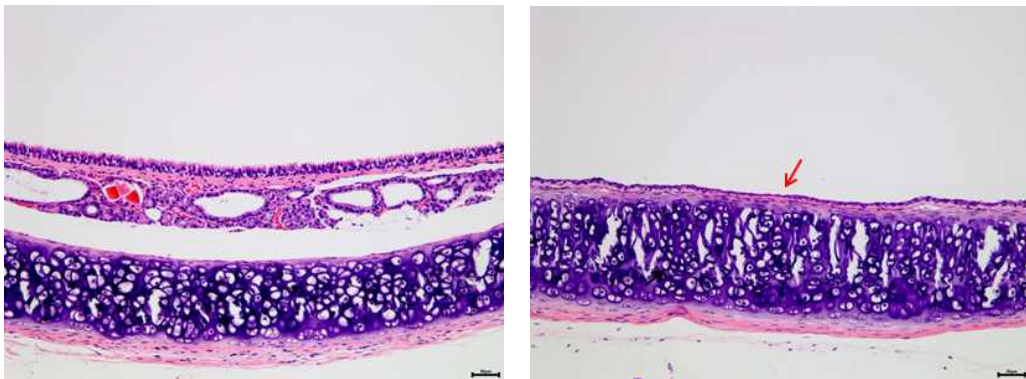


이행 상피의 변성 및 재생(Black)

그림 26. 대조군(좌) 및 고농도 노출군(우)의 비강 조직병리검사 결과(H&E 염색)

③ 기관

- 고농도 노출군의 암컷 및 수컷에서 상피 변성(Epithelial degeneration)이 관찰되었음. 이러한 변화는 노출 회복군에서는 관찰되지 않았음

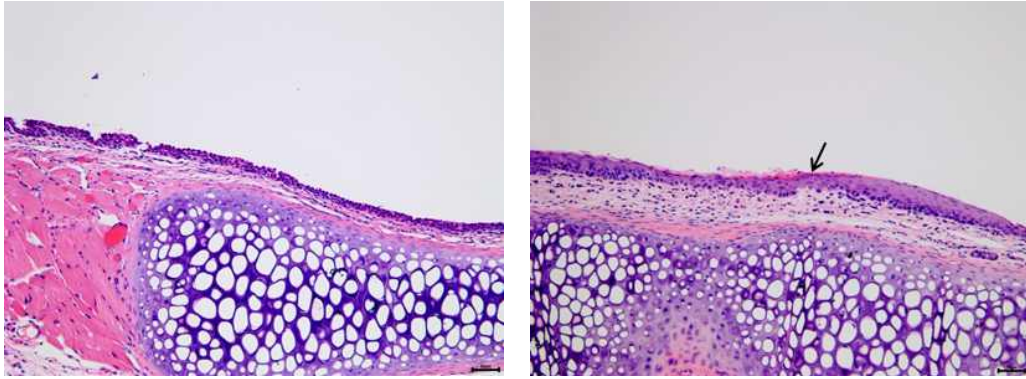


상피 변성(Red)

그림 27. 대조군(좌) 및 고농도 노출군(우)의 기관 조직병리검사 결과(H&E 염색)

④ 후두

- 고농도 노출군의 암컷 및 수컷에서 편평상피화생(Squamous metaplasia)이 관찰되었음. 이러한 변화는 노출 회복군에서는 거의 관찰되지 않았음



편평상피화생(Black)

그림 28. 대조군(좌) 및 고농도 노출군(우)의 후두 조직병리검사 결과(H&E 염색)

12) 폐내세척액(Bronchoalveolar Lavage Fluid, BALF) 검사

① 전균수측정(Total cell count)

- 전균수측정(Total cell count)은 폐내세척액(BALF) 채취 후 원심분리하여 획득한 펠릿(pellet)을 Vi cell analyzer를 이용하여 산정하였음. 분석 결과 노출군의 암컷 및 수컷에서 대조군 대비 유의적인 세포수 증가를 확인하였으며, 노출 회복군 암컷에서도 유의한 증가를 확인하였음. 한편 노출 회복군 수컷에서도 대조군 대비하여 세포수 증가가 관찰되었지만 통계적 유의성은 없었음

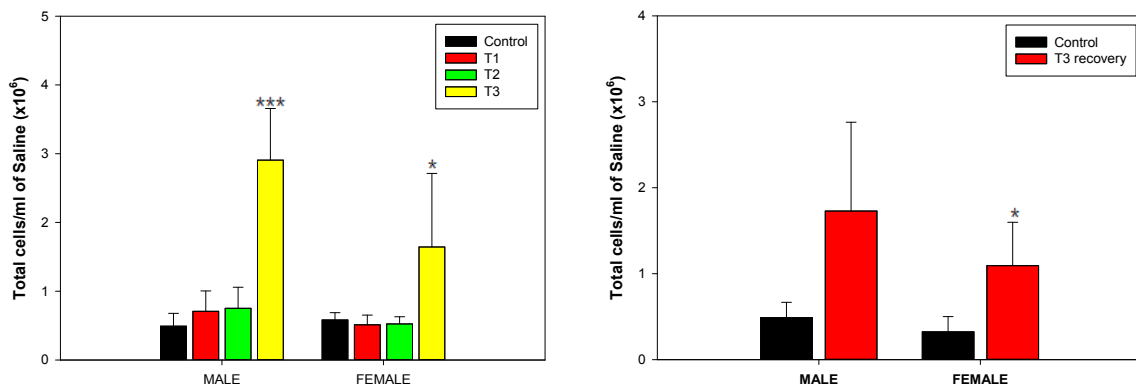


그림 29. 노출군(좌) 및 회복군(우)의 total cell count 산정 결과

② Differential cell count 측정

- Differential cell count 측정은 폐내세척액(BALF) 채취 후 원심분리 하여 획득한 펠릿(pellet)을 cyto-spin을 이용하여 슬라이드 글라스에 세포를 흡착시킨 후, 세포를 염색하여 대식세포(Macrophage), 호중구(Neutrophil) 및 림프구(Lymphocyte)

에 대하여 각각 산정하였음

- 그림 30은 노출군에 대한 노출군별 암수 각각의 측정 결과를 제시하고 있으며, 노출 농도가 증가함에 따라 용량 의존적으로 호중구(Neutrophil) 및 림프구(Lymphocyte) 비율이 증가함을 관찰하였음
- 그림 31은 노출 회복군에 대한 측정 결과를 제시하고 있으며, 대조군 대비하여 노출 회복군에서 호중구(Neutrophil) 및 림프구(Lymphocyte) 비율이 상대적으로 높음을 알 수 있었음

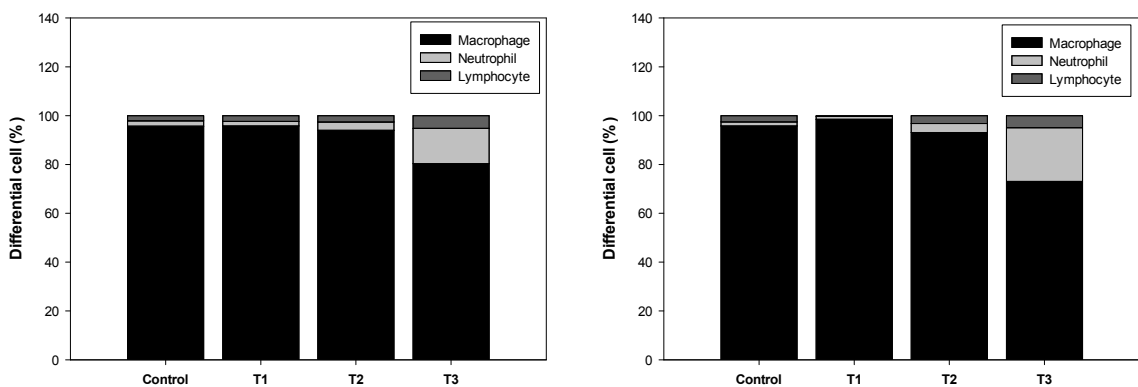


그림 30. 노출군의 differential cell count 산정 결과(좌 : 수컷, 우 : 암컷)

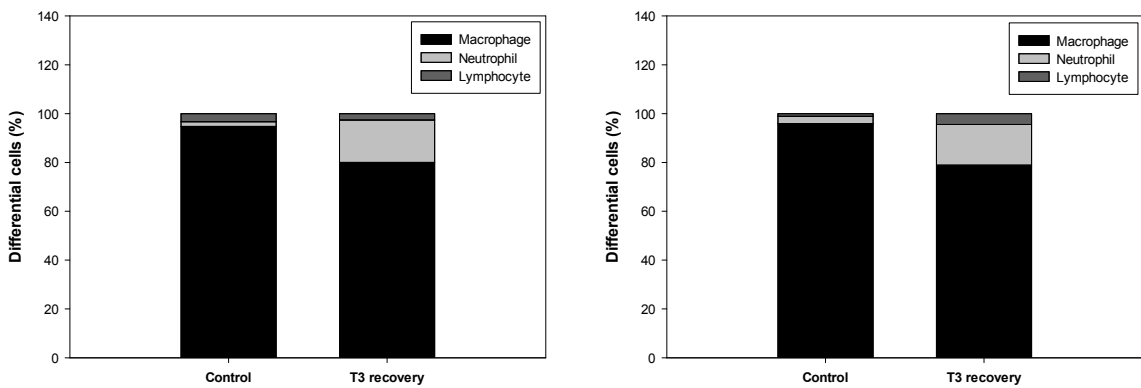


그림 31. 노출 회복군의 differential cell count 산정 결과(좌 : 수컷, 우 : 암컷)

③ 락트산탈수소효소(Lactate Dehydrogenase, LDH) 분석

- 락트산탈수소효소(LDH)의 경우 폐 내 손상 및 세포독성(Cytotoxicity)의 바이오마커로서, 1 차 폐내세척액에서 채취한 생리식염수(Saline)의 상층액을 LDH 슬라이드를 이용하여 측정하였으며, 고농도 노출군의 수컷에서 유의적 증가가 관찰되었고

노출 회복군의 암컷 및 수컷에서도 대조군 대비 증가가 관찰되었지만 통계적 유의성은 관찰되지 않았음

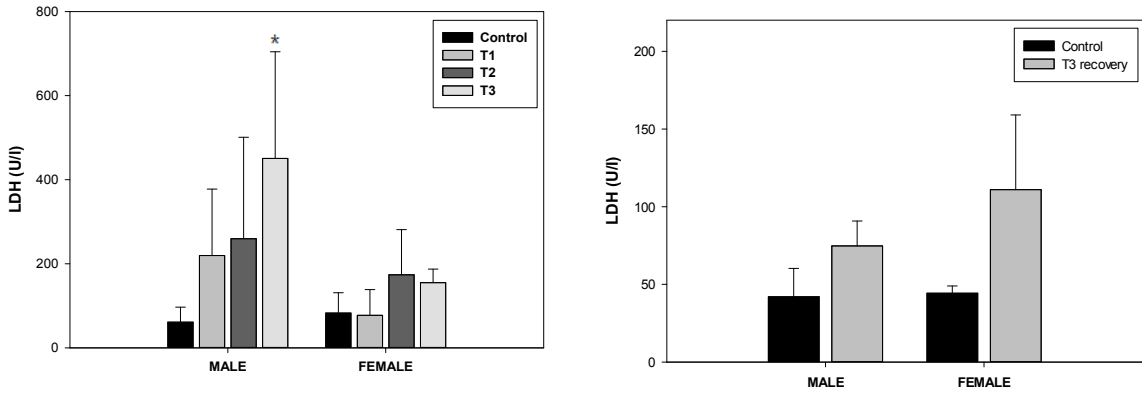


그림 32. 노출군(좌) 및 노출 회복군(우)의 LDH 분석 결과

④ 총 단백질(Total protein) 분석

- 총 단백질(Total protein)의 경우도 폐 내 손상 및 세포독성(cytotoxicity)의 바이오마커로서, 1 차 폐내세척액에서 채취한 생리식염수(Saline)을 원심분리시킨 상층액을 가지고, 표준물질(Standard)로 Bovine Serum Albumin (BSA)를 사용하여 Bichinchronic Acid (BCA)법을 이용하여 단백질(protein) 정량을 실시하였으며, 고농도 노출군 수컷에서 유의적 증가가 관찰되었고 고농도 노출군 암컷 및 노출 회복군에서도 대조군 대비 증가가 관찰되었지만 통계적 유의성은 관찰되지 않았음

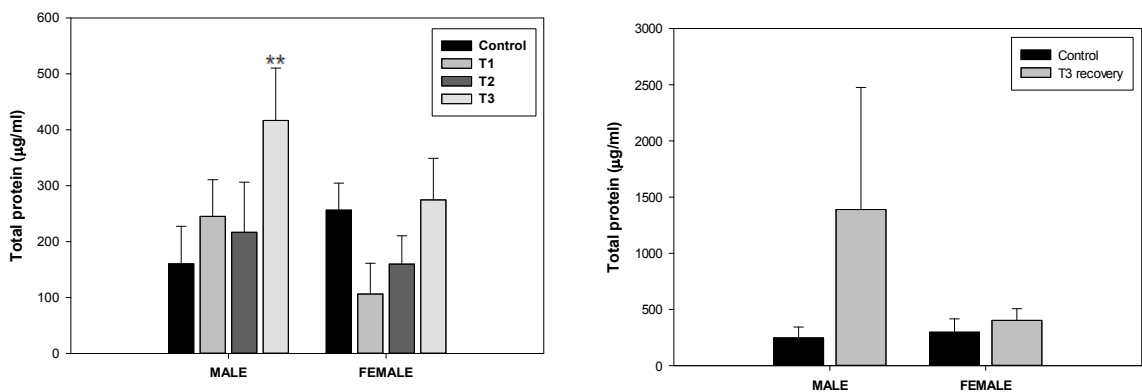


그림 33. 노출군(좌) 및 노출 회복군(우)의 total protein 분석 결과

⑤ 사이토카인(Cytokine) 분석(그림 34 및 35)

- 폐내 염증변화 및 독성학적 영향평가를 위하여 분리된 폐조직을 PBS에 처리 후 원

심분리 시킨 상층액을 분취하고, DuoSet ELISA kit를 이용하여 2가지 항목 사이토 카인(IL-1 β 및 IL-2)에 대하여 정량 분석하였음

- Interleukin-1 beta (IL-1 β)의 경우 대조군 대비하여 고농도 노출군에서 통계적으로 유의한 변화를 관찰하였으며, 노출 회복군의 경우 대조군 대비 증가를 관찰하였지만 통계적인 유의성은 관찰되지 않았음
- Interleukin-2 (IL-2)의 경우 고농도 노출군 암컷에서 유의적 증가가 관찰되었지만, 수컷 및 노출 회복군에서는 변화가 관찰되지 않았음

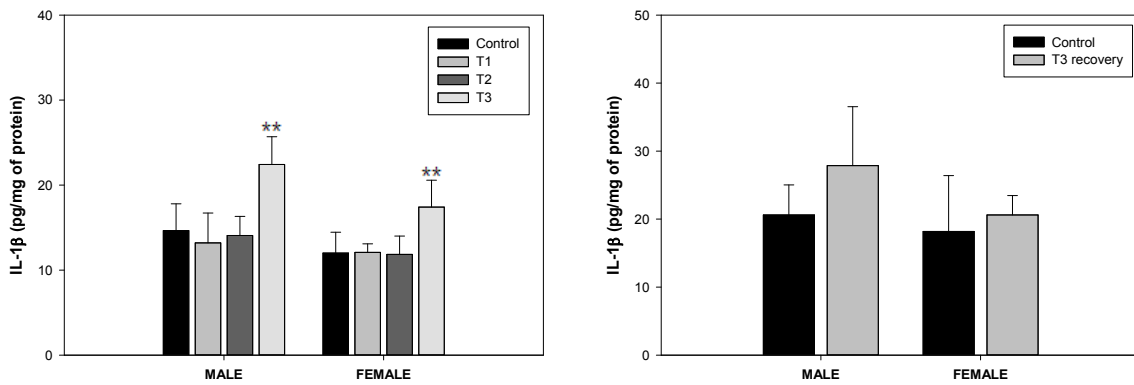


그림 34. 노출군(좌) 및 노출 회복군(우)의 IL-1 β 분석 결과

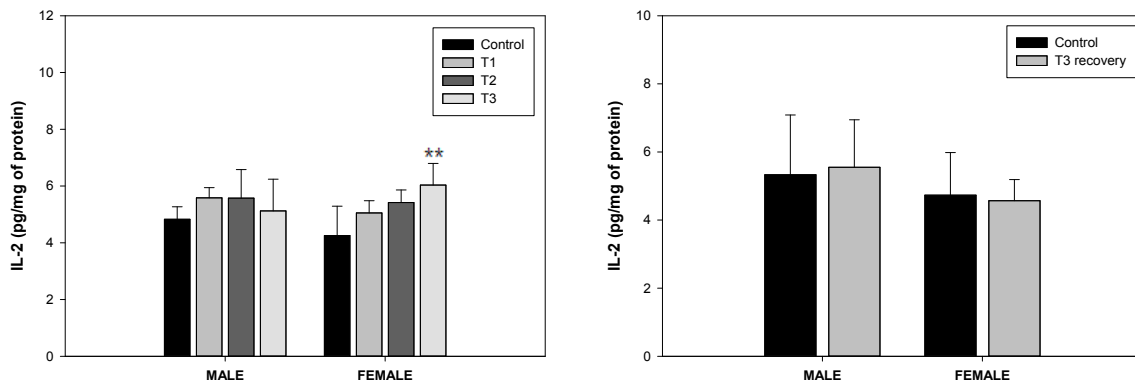


그림 35. 노출군(좌) 및 노출 회복군(우)의 IL-2 분석 결과

(5) 고찰 및 결론

- ① PGH에 대한 반복흡입독성을 조사하기 위하여 Sprague-dalwey 랫드에 0, 0.10, 0.50 및 2.00 mg/m³의 용량으로 4 주간 반복 비부흡입노출을 실시하였으며, 추가적으로 회복군을 설정하여 노출 완료 후 14 일간 관찰하였음. 시험물질 노출 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 사료 섭취량을 관찰하고, 혈액/혈액 생화학검사, 부검 육안 소견, 장기무게측정, 조직병리검사 및 폐내세척액(BALF) 분석 및 폐 조직에서의 생화학분석을 실시하였음
- ② 노출 기간 중 노출 회복군에서 사망한 수컷 한 마리가 사망하였는데, 이는 PGH의 반복흡입에 의한 영향으로 판단됨. 또한 PGH의 반복흡입노출로 인한 용량상관적인 특이적 일반증상은 노출 및 회복 기간 중 관찰되지 않았음. 한편 체중변화 및 사료 섭취량 관찰 결과 노출 회복군의 수컷에서 노출 3 주 이후 유의성 있는 변화가 관찰되었음
- ③ 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사 결과 유의적 변화는 모두 관찰되지 않았음
- ④ 부검 시 육안적 관찰 결과 고농도 노출군 암수컷의 폐에서 PGH의 반복흡입노출로 인한 변색, 병소 및 부패가 관찰되었으며, 노출 회복군에서도 동일하게 관찰되었음
- ⑤ 장기 무게 측정 결과 고농도 노출군 암수컷에서 유의적인 장기 무게 증가가 관찰되었으며, 노출 회복군에서의 수컷에서도 유의적 변화가 관찰되었음. 이러한 폐의 무게 증가는 PGH의 반복흡입노출에 의한 직접적인 영향으로 판단됨
- ⑥ 조직병리학적 검사 결과 고농도 노출군의 호흡기계통(폐, 비강, 기관 및 후두)에서 PGH의 반복흡입노출로 인한 독성학적 영향이 관찰되었음. 특히 폐의 경우 수컷은 중농도 군에서도 독성학적 영향이 관찰되었으며, 노출 회복군의 경우 노출군과 동일한 병변들이 관찰되었음
- ⑦ 폐내세척액(BALF) 분석 결과 고농도 노출군 및 노출 회복군에서 염증세포 증가가 관찰되었으며, 폐 손상 지표들의 변화들도 관찰되었음
- ⑧ PHMG Phosphate에 대한 4 주간 반복 흡입비부노출 결과 시험물질의 반복노출에 따른 다양한 독성학적 변화들이 관찰되었으며, 특히 폐에서 관찰된 독성학적 변화들은 모두

회복기간에 노출 회복군에서도 동일하고 지속적으로 관찰되었음. 이를 통하여 PGH의 반복흡입 노출 시 하부 호흡기계통에 지속적으로 악영향을 끼칠 수 있음을 예측할 수 있는 결과로 판단됨

⑨ 또한 암컷 및 수컷의 빈도 및 변화 정도를 살펴볼 때 암컷에 비하여 수컷에서 상대적으로 높은 수준의 악영향이 관찰되었음

⑨ 위와 같은 시험의 결과들을 종합적으로 해석해 볼 때 본 시험 조건에서의 무악영향관찰량(NOAEL)은 수컷의 경우 0.10 mg/m^3 및 암컷의 경우 0.50 mg/m^3 로 판단됨

3. PHMG 및 PGH에 대한 염색체이상시험

3-1. PHMG

(1) 시험법 : OECD TG 473 및 국립환경과학원 고시 제2014-1호, 화학물질유해성시험방법 제5장 건강영향 시험분야 15항 유전독성시험-포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험

(2) 시험방법

시험물질 구성	1. 시험물질 : Polyhexamethyleneguanidine phosphate(PHMG) 2. 부형제 : Distilled water (DW)
시험계의 구성	Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line
처리용량	<p>- 1 차 용량설정시험에서는 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$를 최고농도로 하고, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.3, 78.1, 39.1 및 19.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$의 농도군으로 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S) 6 시간 처리 및 대사활성계 미적용(-S) 22 시간 처리하에서 실시함. 시험물질 처리 후 상대세포증가수(RPD, Relative Population Doubling)를 산출하여 세포증식억제의 지표로 함. 1 차 용량설정시험 결과, 대사활성계 적용여부와 관계없이 50 % 이상의 세포증식억제가 관찰됨. 시험물질 처리 시 대사활성계 적용 여부와 관계없이 156.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도군에서 혼탁이 관찰되었으며, 시험물질 처리 종료 시 대사활성계 적용 6 시간 처리군에서는 39.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 78.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도군에서 혼탁이 관찰되었고, 156.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도군에서 침전이 관찰됨. 대사활성계 미적용 6 시간 처리군은 156.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도군에서 혼탁이 관찰되었고, 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도군에서 혼탁 및 침전이 관찰됨. 대사활성계 미적용 22 시간 처리군은 312.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도군에서 침전이 관찰됨. 한편, 시험물질의 처리시 및 처리 종료 시에 각 처리군의 최고농도군(5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 대하여 배양액의 pH 및 osmolality를 측정한 결과, 부형제대조군에 비해 각각 1 unit 및 50 mOsm/kg 이상의 변화는 관찰되지 않음</p> <p>- 따라서, 약 50 %의 세포증식억제가 나타나는 농도를 확인하기 위하여 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에 대하여 2차 용량설정시험을 실시함. 2 차 용량설정시험 결과, 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 약 50 %의 세포증식억제가 나타나는 농도를 각각 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$로 확인됨. 따라서, 본시험의 최고농도는 대사활성계 적용 6 시간 처리군은 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$로 설정하였고, 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군은 각각 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$로 설정함</p>

시험군의 구성	군	계열 I(6 + S)	계열 II(6 - S)	계열 III(22 - S)
	대사활성계	+	-	-
	부형제	0	0	0
	Polyhexamethyl eneguanidine phosphate (µg/mL)	10 30 80	2.5 5 13 15	2 4 8 10
	양성대조물질 (µg/mL)	CPA 6	EMS 800	EMS 600
	처리시간(hours)	6	6	22
	회복시간(hours)	18	18	2

처리방법	3 일간 배양한 세포의 각 계열에 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S) 6 시간, 대사활성계 미적용(-S) 22 시간 동안 부형제, polyhexamethyleneguanidine phosphate 또는 양성대조물질을 처리함. 처리를 위하여 각 플라스크의 기존 배양액을 제거하고, 신선한 배양액 4.0 mL (계열 I) 또는 4.5 mL (계열 II 및 III)을 분주하여 1시간 이상 경과한 후 각각의 플라스크에 아래의 표와 같이 부형제 또는 시험물질을 처리함. 양성대조군의 경우에는 지정된 각각의 플라스크에 신선한 배양액 4.5 mL (계열 I) 또는 5.0 mL (계열 II 및 III)을 분주하고 1 시간 이상 경과 후 0.05 mL를 처리함. 시험물질 및 대조물질의 처리 후, 계열 I에 대사활성계 0.5 mL를 각각의 플라스크에 분주함. 처리액의 조성은 다음과 같음			
	군	배양액	시험물질 또는 부형제	대사활성계
	계열 I(+S)	4.0 mL	0.5 mL	0.5 mL
	계열 II(-S)	4.5 mL	0.5 mL	-
계열 III(-S)	4.5 mL	0.5 mL	-	

관찰 및 검사항목	1. 세포증식억제는 상대세포증가수(Relative Population Doubling, RPD)로 산출함
	2. 염색체이상 계수 (본시험만) <ul style="list-style-type: none"> - 구조적 이상은 염색분체형 및 염색체형 갭(gap), 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 구별해 계수 - 수적 이상은 동원체 수에 따라 diploid (DP), polyploid (PP, ≥ 37 동원체) 및 핵내배화(ER, endoreduplication)로 분류해 계수

결과의 판정	<p>1. 시험의 적합성 판정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최소 3 농도군에서 염색체이상 계수. - 음성대조군의 구조적 이상(겍 제외)을 가진 중기상의 수가 historical control data 내에 있어야 함 - 양성대조군의 구조적 이상(겍 제외)을 가진 중기상의 수가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하여야 함 <p>2. 결과의 판정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험물질 처리군에 있어서 구조적 이상(겍 제외)을 가진 중기상의 빈도가 동시에 수행한 음성대조군에 비해 증가하지 않거나 각 농도군의 플라스크 모두에서 음성대조군에 대한 historical control data 범위 내에 있다면 음성으로 판정 - 시험물질 처리군에 있어서 염색체 이상을 가진 세포의 수(겍 제외)가 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정
---------------	---

(3) 시험결과

1) 용량설정시험의 세포증식억제 결과

- 1 차 용량설정시험 결과, 대사활성계 적용여부와 관계없이 50 % 이상의 세포증식억제가 관찰됨. 시험물질 처리 시 대사활성계 적용 여부와 관계없이 156.3 µg/mL 이상의 농도군에서 혼탁이 관찰되었으며, 시험물질 처리 종료시 대사활성계 적용 6 시간 처리군에서는 39.1 µg/mL 및 78.1 µg/mL 농도군에서 혼탁이 관찰되었고, 156.3 µg/mL 이상의 농도군에서 침전이 관찰됨. 대사활성계 미적용 6 시간 처리군은 156.3 µg/mL 이상의 농도군에서 혼탁이 관찰되었고, 625 µg/mL 이상의 농도군에서 혼탁 및 침전이 관찰됨. 대사활성계 미적용 22 시간 처리군은 312.5 µg/mL 이상의 농도군에서 침전이 관찰됨. 한편, 시험물질의 처리 시 및 처리 종료 시에 각 처리군의 최고농도군(5,000 µg/mL)에 대하여 배양액의 pH 및 osmolality를 측정 한 결과, 부형제대조군에 비해 각각 1 unit 및 50 mOsm/kg 이상의 변화는 관찰되지 않음. 따라서, 약 50 %의 세포증식억제가 나타나는 농도를 확인하기 위하여 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에 대하여 2 차 용량설정시험을 실시함

☒ 4. Relative Population Doubling of the First Dose Range–Finding Study

Nominal Conc. of Test Item (µg/mL)	Metabolic Activation System	Times ^{a)} (hours)	Cell Counts ^{b)}		Mean	RPD ^{c)} , %
			One Flask/Concentration			
6 – hour treatment (6 + S)						
0	+	6 – 18	6,107	6,207	6,157	100
19.5	+	6 – 18	5,882	5,865	5,874	93
39.1 \$	+	6 – 18	5,816	5,781	5,799	91
78.1 \$	+	6 – 18	4,527	4,689	4,608	58
156.3 #&	+	6 – 18	913	904	909	-181
312.5 #&	+	6 – 18	406	359	383	-307
625 #&	+	6 – 18	2,258	2,266	2,262	-47
1,250 #&	+	6 – 18	3,039	3,045	3,042	-3
2,500 #&	+	6 – 18	3,358	3,401	3,380	12
5,000 #&	+	6 – 18	3,157	3,030	3,094	-1
6 – hour treatment (6 – S)						
0	-	6 – 18	7,066	7,065	7,066	100
19.5	-	6 – 18	3,064	3,103	3,084	-1
39.1	-	6 – 18	368	321	345	-268
78.1	-	6 – 18	846	766	806	-165
156.3 # \$	-	6 – 18	592	608	600	-201
312.5 # \$	-	6 – 18	2,272	2,151	2,212	-42
625 # \$ &	-	6 – 18	2,606	2,694	2,650	-20
1,250 # \$ &	-	6 – 18	1,577	1,503	1,540	-86
2,500 # \$ &	-	6 – 18	13,653	13,050	13,352	178
5,000 # \$ &	-	6 – 18	12,789	12,408	12,599	171
22 – hour treatment (22 – S)						
0	-	22 – 2	8,634	8,635	8,635	100
19.5	-	22 – 2	2,268	2,200	2,234	-33
39.1	-	22 – 2	289	273	281	-236
78.1	-	22 – 2	447	421	434	-193
156.3 #	-	22 – 2	885	924	905	-121
312.5 # &	-	22 – 2	2,266	2,276	2,271	-31
625 # &	-	22 – 2	1,817	1,894	1,856	-51
1,250 # &	-	22 – 2	5,618	5,658	5,638	58
2,500 # &	-	22 – 2	9,304	9,271	9,288	107
5,000 # &	-	22 – 2	9,780	9,362	9,571	110
Cell Counts at Treatment			3,140	3,085	3,113	

Visible turbidity of test item was observed at the beginning of the treatment.

& Visible precipitation of test item were observed at the end of the treatment.

\$ Visible turbidity of test item was observed at the end of the treatment.

^{a)} Treatment time – recovery time

^{b)} Each culture was trypsinized and suspended with 1.0 mL of 0.05 % trypsin–EDTA and 9.0 mL of culture medium. The cell suspensions of 0.8 mL/culture were diluted 25 times with 19.2 mL of Isoton solution. The cells in 0.5 mL Isoton solution were counted twice/culture using Coulter Counter[®] model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

^{c)} Relative Population Doubling (RPD) = $\frac{\text{No. of Population doublings in treated flask}}{\text{No. of Population doublings in control flask}} \times 100$

Population Doubling = $[\log (\text{Post-treatment cell number} \div \text{Initial cell number})] \div \log 2$

표 5. Osmolality and pH Range of the First Dose Range-Finding Study

Nominal Conc. of Test Item (µg/mL)	Metabolic Activation System	Times ^{a)} (hours)	At the beginning of the treatment		At the end of the treatment	
			Osmolality ^{b)}	pH	Osmolality ^{b)}	pH
6 - hour treatment (6 + S)						
0	+	6 - 18	304	7.78	303	7.58
5,000 #&	+	6 - 18	314	7.79	317	7.59
6 - hour treatment (6 - S)						
0	-	6 - 18	291	7.93	289	7.71
5,000 #\$\$&	-	6 - 18	301	7.75	298	7.65
22 - hour treatment (22 - S)						
0	-	22 - 2	289	7.96	285	7.61
5,000 #&	-	22 - 2	300	7.78	298	7.62

Visible turbidity of test item was observed at the beginning of the treatment.

& Visible precipitation of test item were observed at the end of the treatment.

\$ Visible turbidity of test item was observed at the end of the treatment.

^{a)} Treatment time - recovery time

^{b)} mOsm/kg

- 2 차 용량설정시험 결과, 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 약 50 %의 세포증식억제가 나타나는 농도를 각각 15 µg/mL 및 10 µg/mL로 확인 함

표 6. Relative Population Doubling of the Second Dose Range-Finding Study

Nominal Conc. of Test Item (µg/mL)	Metabolic Activation System	Times ^{a)} (hours)	Cell Counts ^{b)}		Mean	RPD ^{c)} , %
			One Flask/Concentration			
6 - hour treatment (6 - S)						
0	-	6 - 18	11,083	10,916	11,000	100
1.0	-	6 - 18	10,657	10,484	10,571	97
2.5	-	6 - 18	9,929	9,965	9,947	92
5.0	-	6 - 18	7,836	7,805	7,821	74
7.5	-	6 - 18	6,790	6,813	6,802	63
10.0	-	6 - 18	6,612	6,403	6,508	60
12.5	-	6 - 18	5,629	5,716	5,673	50
15	-	6 - 18	5,440	5,542	5,491	47
17.5	-	6 - 18	4,907	4,839	4,873	38
20	-	6 - 18	3,979	3,904	3,942	22
22 - hour treatment (22 - S)						
0	-	22 - 2	10,386	10,389	10,388	100
1.0	-	22 - 2	9,409	9,253	9,331	91
2.5	-	22 - 2	8,350	8,520	8,435	83
5.0	-	22 - 2	6,310	6,318	6,314	60
7.5	-	22 - 2	5,566	5,589	5,578	50
10.0	-	22 - 2	5,150	5,212	5,181	45
12.5	-	22 - 2	4,610	4,666	4,638	36
15	-	22 - 2	4,068	4,107	4,088	26
17.5	-	22 - 2	3,387	3,285	3,336	10
20	-	22 - 2	2,441	2,292	2,367	-18
Cell Counts at Treatment			2,939	2,983	2,961	

a) Treatment time - recovery time

b) Each culture was trypsinized and suspended with 1.0 mL of 0.05 % trypsin-EDTA and 9.0 mL of culture medium. The cell suspensions of 0.8 mL/culture were diluted 25 times with 19.2 mL of Isoton solution. The cells in 0.5 mL Isoton solution were counted twice/culture using Coulter Counter® model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

c) Relative Population Doubling (RPD) = $\frac{\text{No. of Population doublings in treated flask}}{\text{No. of Population doublings in control flask}} \times 100$
 Population Doubling = $[\log (\text{Post-treatment cell number} \div \text{Initial cell number})] \div \log 2$

2) 본시험의 세포증식억제 결과

- 대사활성계 적용 6 시간 처리군에서는 처리 종료 시 30 µg/mL 이상의 농도에서 혼탁이 관찰됨
- 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 약 50 %의 세포증식억제가 관찰되는 농도가 각각 15 µg/mL 및 10 µg/mL에서 확인됨

표 7. Relative Population Doubling of the Definitive Study

Nominal Conc. of Test Item (µg/mL)	Metabolic Activation System	Time ^{a)} (hours)	Cell Counts ^{b)}				Mean	RPD ^{c)} , %
			Flask A		Flask B			
6 - hour treatment (6 + S)								
0	+	6 - 18	7,075	7,095	7,079	7,107	7,089	100
10	+	6 - 18	6,541	6,560	6,614	6,680	6,599	92
30 \$	+	6 - 18	5,937	6,022	6,230	6,119	6,077	84
80 \$	+	6 - 18	4,578	4,548	4,536	4,476	4,535	53
CPA 6	+	6 - 18	4,011	4,010	4,350	4,298	4,167	44
6 - hour treatment (6 - S)								
0	-	6 - 18	8,805	8,821	9,081	9,050	8,939	100
2.5	-	6 - 18	8,241	8,281	8,322	8,375	8,305	94
5	-	6 - 18	7,048	7,065	6,858	6,822	6,948	79
13	-	6 - 18	5,426	5,329	5,266	5,176	5,299	56
15	-	6 - 18	4,878	4,814	4,871	4,877	4,860	49
EMS 800	-	6 - 18	5,565	5,603	5,949	5,991	5,777	63
22 - hour treatment (22 - S)								
0	-	22 - 2	7,512	7,471	7,511	7,504	7,500	100
2	-	22 - 2	6,410	6,388	6,655	6,561	6,504	86
4	-	22 - 2	5,800	5,791	5,775	5,668	5,759	74
8	-	22 - 2	4,781	4,779	4,848	4,860	4,817	56
10	-	22 - 2	4,408	4,512	4,388	4,355	4,416	48
EMS 600	-	22 - 2	4,291	4,356	4,313	4,244	4,301	45
No. of Cell at Treatment			2,713	2,728	2,753	2,737	2,733	

\$ Visible turbidity of test item was observed at the end of the treatment.

a) Treatment time - recovery time

b) A and B indicate duplicate cultures. Each culture was trypsinized and suspended with 1.0 mL of 0.05 % trypsin-EDTA and 9.0 mL of culture medium. The cell suspensions of 0.8 mL/culture were diluted 25 times with 19.2 mL of Isoton solution. The cells in 0.5 mL Isoton solution were counted twice/culture using Coulter Counter® model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

$$\text{Relative Population Doubling (RPD)} = \frac{\text{No. of Population doublings in treated flask}}{\text{No. of Population doublings in control flask}} \times 100$$
$$\text{Population Doubling} = [\log (\text{Post-treatment cell number} \div \text{Initial cell number})] \div \log 2$$

3) 염색체이상 계수 결과

- 대사활성계 적용 처리군은 구조적 이상[꺾 포함/꺾 제외]을 가진 중기상의 빈도는 부형제대조군, 10, 30 및 80 µg/mL 농도군의 순으로 [0.0/0.0], [0.5/0.0], [1.0/1.0] 및 [0.0/0.0]으로 모든 시험물질 처리군에서 구조적 이상을 가진 중기상의 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰되지 않음. 부형제대조군의 [polyploid (PP, 배수체) + endoreduplication (ER, 핵내배화)]의 빈도는 [0.5 + 0.0]이었고, 모든 시험물질 처리군에서 수적 이상을 가진 중기상의 유의한 증가를 나타내지 않음
- 대사활성계 미적용 6 시간 처리군의 구조적 이상[꺾 포함/꺾 제외]을 가진 중기상의 빈도는 부형제대조군, 2.5, 5 및 15 µg/mL 농도군의 순으로 [1.0/0.5], [19.5/9.5], [42.5/28.5] 및 [60.5/40.5]로 모든 시험물질 처리군에서 구조적 이상을 가진 중기상의 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰됨(≥ 2.5 µg/mL, $P < 0.01$). 부형제대조군의 [PP + ER]의 빈도는 [1.0 + 0.0]이었고 모든 시험물질 처리군에서 수적 이상을 가진 중기상의 유의한 증가를 나타내지 않음
- 대사활성계 미적용 22 시간 처리군의 구조적 이상[꺾 포함/꺾 제외]을 가진 중기상의 빈도는 부형제대조군, 2, 4 및 10 µg/mL 농도군의 순으로 [0.5/0.5], [15.5/6.0], [23.5/8.5] 및 [28.0/9.5]로 모든 시험물질 처리군에서 구조적 이상을 가진 중기상의 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰됨(≥ 2 µg/mL, $P < 0.01$). 부형제대조군의 [PP + ER]의 빈도는 [0.5 + 0.0]이었고 모든 시험물질 처리군에서 수적 이상을 가진 중기상의 유의한 증가를 나타내지 않음

☒ 8. Results of Chromosome Aberration Assay and Relative Population Doubling

Nominal Conc. of Test Item ($\mu\text{g/mL}$)	Metabolic Activation System	Time ^{a)} (hours)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberrations	Mean of PP+ER	RPD, %
6 – hour treatment (6 + S)						
0	+	6 – 18	0.0 / 0.0 ^{b)}	0.0 / 0.0	0.5 + 0.0	100
10	+	6 – 18	0.5 / 0.0	0.5 / 0.0	0.0 + 0.0	92
30	\$ +	6 – 18	1.0 / 1.0	2.0 / 2.0	0.0 + 0.0	84
80	\$ +	6 – 18	0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.5 + 0.0	53
CPA 6	+	6 – 18	33.5 / 33.5 **	44.5 / 44.5	0.0 + 0.0	44
6 – hour treatment (6 – S)						
0	–	6 – 18	1.0 / 0.5	1.0 / 0.5	1.0 + 0.0	100
2.5	–	6 – 18	19.5 / 9.5 **	23.5 / 11.5	0.0 + 0.0	94
5	–	6 – 18	42.5 / 28.5 **	61.5 / 37.0	0.0 + 0.0	79
13	–	6 – 18	Not Counted			56
15	–	6 – 18	60.5 / 40.5 **	93.5 / 54.5	1.0 + 0.0	49
EMS 800	–	6 – 18	36.0 / 35.0 **	46.5 / 45.5	0.0 + 0.0	63
22 – hour treatment (22 – S)						
0	–	22 – 2	0.5 / 0.5	1.0 / 1.0	0.5 + 0.0	100
2	–	22 – 2	15.5 / 6.0 **	17.0 / 6.0	0.0 + 0.0	86
4	–	22 – 2	23.5 / 8.5 **	25.0 / 8.5	0.0 + 0.0	74
8	–	22 – 2	Not Counted			56
10	–	22 – 2	28.0 / 9.5 **	37.5 / 12.0	0.0 + 0.0	48
EMS 600	–	22 – 2	40.5 / 40.5 **	58.5 / 58.5	0.0 + 0.0	45

** Significantly different from the control at $P < 0.01$.

\$ Visible turbidity of test item was observed at the end of the treatment.

Vehicle versus test item-treated groups : After carrying out X^2 -test, performed Fisher's exact test, if $P < 0.05$.

Dose-response : Cochran-Armitage trend test will be used to determine the dose-response, if results of the statistical analyses above produce $P < 0.05$.

Vehicle versus positive control groups : Fisher's exact test.

a) Treatment time-recovery time

b) Gaps included/excluded, means of duplicate cultures; 100 metaphases were examined per culture.

Abbreviations :

PP; Polyploid, ER ; Endoreduplication, RPD ; Relative Population Doubling

CPA; Cyclophosphamide monohydrate, EMS ; Ethyl methanesulfonate

+ Presence of metabolic activation system

– Absence of metabolic activation system

(4) 고찰 및 결론

- ① Polyhexamethyleneguanidine phosphate의 체외 염색체이상시험 결과, 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 CHL 세포에 염색체 이상을 유발함
- ② 부형제대조군의 경우에는 구조적 이상(깎 제외)을 가진 중기상의 수가 안전성평가 연구소의 historical control data 내에 들어왔고, 양성대조군의 경우에는 이상 중기상의 수가 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가함. 이는 본 시험이 적합하게 수행되었다는 것을 나타내며, 결과의 정당성을 뒷받침함

3-2. PGH

(1) 시험법 : OECD TG 473 및 국립환경과학원 고시 제2014-1호, 화학물질유해성시험방법 제5장 건강영향 시험분야 15항 유전독성시험-포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험

(2) 시험방법

시험물질 구성	1. 시험물질 : Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride(PGH) 2. 부형제 : Distilled water (DW)
시험계의 구성	Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line
처리용량	<ul style="list-style-type: none"> - 1 차 용량설정시험에서는 5000 µg/mL를 최고농도로 하고, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.3, 78.1, 39.1 및 19.5 µg/mL의 농도군으로 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S) 6 시간 처리 및 대사활성계 미적용(-S) 22 시간 처리하에서 실시함 - 시험물질 처리 후 상대세포증가수(RPD, Relative Population Doubling)를 산출하여 세포증식억제의 지표로 함. 1 차 용량설정시험 결과, 대사활성계 적용여부와 관계없이 50 % 이상의 세포증식억제가 관찰됨 - 시험물질 처리 종료 시에 대사활성계 적용 6 시간 처리군에서 78.1 µg/mL 이상의 농도군에서 침전이 관찰되었고, 625 µg/mL 이상의 농도군에서 혼탁 및 침전이 관찰됨 - 한편, 시험물질의 처리 시 및 처리 종료 시에 각 처리군의 최고농도군(5000 µg/mL)에 대하여 배양액의 pH 및 osmolality를 측정 한 결과, 부형제대조군에 비해 각각 1 unit 및 50 mOsm/kg 이상의 변화는 관찰되지 않음 - 따라서, 약 50 %의 세포증식억제가 나타나는 농도를 확인하기 위하여 2 차 용량설정시험을 실시함. 2 차 용량설정시험 결과, 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 각각 30 µg/mL 및 26 µg/mL의 농도군에서 약 50 %의 세포증식억제가 나타나는 것을 확인됨 - 최종적으로, 본시험의 최고농도는 대사활성계 적용 6 시간 처리군은 80 µg/mL로 설정하였고, 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군은 각각 28 µg/mL 및 26 µg/mL로 설정함

시험군의 구성	군	계열 I(6 + S)	계열 II(6 - S)	계열 III(22 - S)												
	대사활성계	+	-	-												
	부형제	0	0	0												
	Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride (µg/mL)	20	10	10												
		40	20	20												
		80	26	24												
			28	26												
	양성대조물질 (µg/mL)	CPA 6	EMS 800	EMS 600												
처리시간(hours)	6	6	22													
회복시간(hours)	18	18	2													
처리방법	<p>- 3 일간 배양한 세포의 각 계열에 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S) 6 시간, 대사활성계 미적용(-S) 22 시간 동안 부형제, polyhexamethyleneguanidine phosphate 또는 양성대조물질을 처리함</p> <p>- 처리를 위하여 각 플라스크의 기존 배양액을 제거하고, 신선한 배양액 4.0 mL (계열 I) 또는 4.5 mL (계열 II 및 III)을 분주하여 1 시간이상 경과한 후 각각의 플라스크에 아래의 표와 같이 부형제 또는 시험물질을 처리함</p> <p>- 양성대조군의 경우에는 지정된 각각의 플라스크에 신선한 배양액 4.5 mL (계열 I) 또는 5.0 mL (계열 II 및 III)을 분주하고 1 시간이상 경과 후 0.05 mL를 처리함. 시험물질 및 대조물질의 처리 후, 계열 I에 대사활성계 0.5 mL를 각각의 플라스크에 분주함. 처리액의 조성은 다음과 같음</p>															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>군</th> <th>배양액</th> <th>시험물질 또는 부형제</th> <th>대사활성계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>계열 I(+S)</td> <td>4.0 mL</td> <td>0.5 mL</td> <td>0.5 mL</td> </tr> <tr> <td>계열 II(-S)</td> <td>4.5 mL</td> <td>0.5 mL</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>계열 III(-S)</td> <td>4.5 mL</td> <td>0.5 mL</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	군	배양액	시험물질 또는 부형제	대사활성계	계열 I(+S)	4.0 mL	0.5 mL	0.5 mL	계열 II(-S)	4.5 mL	0.5 mL	-	계열 III(-S)	4.5 mL	0.5 mL
군	배양액	시험물질 또는 부형제	대사활성계													
계열 I(+S)	4.0 mL	0.5 mL	0.5 mL													
계열 II(-S)	4.5 mL	0.5 mL	-													
계열 III(-S)	4.5 mL	0.5 mL	-													
관찰 및 검사항목	<p>1. 세포증식억제는 상대세포증가수(Relative Population Doubling, RPD)로 산출함</p> <p>2. 염색체이상 계수 (본시험만)</p> <p>- 구조적 이상은 염색분체형 및 염색체형 갭(gap), 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 구별해 계수</p> <p>- 수적 이상은 동원체 수에 따라 diploid (DP), polyploid (PP, ≥ 37 동원체) 및 핵내배화(ER, endoreduplication)로 분류해 계수</p>															

결과의 판정	<p>1. 시험의 적합성 판정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최소 3 농도군에서 염색체이상 계수. - 음성대조군의 구조적 이상(겹 제외)을 가진 중기상의 수가 historical control data 내에 있어야 함 - 양성대조군의 구조적 이상(겹 제외)을 가진 중기상의 수가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하여야 함 <p>2. 결과의 판정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험물질 처리군에 있어서 구조적 이상(겹 제외)을 가진 중기상의 빈도가 동시에 수행한 음성대조군에 비해 증가하지 않거나 각 농도군의 플라스크 모두에서 음성대조군에 대한 historical control data 범위 내에 있다면 음성으로 판정 - 시험물질 처리군에 있어서 염색체 이상을 가진 세포의 수(겹 제외)가 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정
---------------	---

(3) 시험결과

1) 용량설정시험의 세포증식억제 결과

- 1 차 용량설정시험 결과, 대사활성계 적용여부와 관계없이 50 % 이상의 세포증식억제가 관찰됨. 시험물질 처리종료 시에 대사활성계 적용 6 시간 처리군에서 78.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도군에서 침전이 관찰되었고, 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도군에서 혼탁 및 침전이 관찰됨. 한편, 시험물질의 처리 시 및 처리 종료 시에 각 처리군의 최고 농도군(5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 대하여 배양액의 pH 및 osmolality를 측정 한 결과, 부형제 대조군에 비해 각각 1 unit 및 50 mOsm/kg 이상의 변화는 관찰되지 않음. 따라서, 약 50 %의 세포증식억제가 나타나는 농도를 확인하기 위하여 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에 대하여 2 차 용량설정시험을 실시함

§ 9. Relative Population Doubling of the First Dose Range–Finding Study

Nominal Conc. of Test Item (µg/mL)	Metabolic Activation System	Times ^{a)} (hours)	Cell Counts ^{b)}		Mean	RPD ^{c)} , %
			One Flask/Concentration			
6 – hour treatment (6 + S)						
0	+	6 – 18	8,100	8,066	8,083	100
19.5	+	6 – 18	6,364	6,440	6,402	76
39.1	+	6 – 18	6,854	6,909	6,882	84
78.1 &	+	6 – 18	6,311	6,453	6,382	76
156.3 &	+	6 – 18	3,465	3,495	3,480	14
312.5 &	+	6 – 18	2,022	1,947	1,985	-44
625 \$&	+	6 – 18	3,044	2,969	3,007	-1
1,250 \$&	+	6 – 18	2,752	2,781	2,767	-10
2,500 \$&	+	6 – 18	2,463	2,274	2,369	-26
5,000 \$&	+	6 – 18	2,349	2,183	2,266	-30
6 – hour treatment (6 – S)						
0	-	6 – 18	10,645	10,510	10,578	100
19.5	-	6 – 18	7,909	8,019	7,964	77
39.1	-	6 – 18	2,904	2,961	2,933	-3
78.1	-	6 – 18	1,564	1,558	1,561	-54
156.3	-	6 – 18	2,270	2,192	2,231	-25
312.5	-	6 – 18	2,228	2,203	2,216	-25
625	-	6 – 18	1,401	1,376	1,389	-63
1,250	-	6 – 18	1,154	1,088	1,121	-80
2,500	-	6 – 18	1,000	979	990	-90
5,000	-	6 – 18	1,267	1,104	1,186	-76
22 – hour treatment (22 – S)						
0	-	22 – 2	10,698	10,597	10,648	100
19.5	-	22 – 2	6,528	6,631	6,580	62
39.1	-	22 – 2	2,018	1,944	1,981	-34
78.1	-	22 – 2	1,115	1,150	1,133	-79
156.3	-	22 – 2	2,500	2,529	2,515	-15
312.5	-	22 – 2	1,081	873	977	-91
625	-	22 – 2	913	783	848	-102
1,250 #&	-	22 – 2	733	699	716	-116
2,500 #&	-	22 – 2	721	705	713	-116
5,000 #&	-	22 – 2	973	964	969	-91
Cell Counts at Treatment			3,099	2,988	3,044	

\$ Visible turbidity of test item was observed at the end of the treatment.

& Visible precipitation of test item were observed at the end of the treatment.

^{a)} Treatment time – recovery time

^{b)} A and B indicate duplicate cultures. Each culture was trypsinized and suspended with 1.0 mL of 0.05% trypsin–EDTA and 9.0 mL of culture medium. The cell suspensions of 0.8 mL/culture were diluted 25 times with 19.2 mL of Isoton solution. The cells in 0.5 mL Isoton solution were counted twice/culture using Coulter Counter[®] model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

^{c)} Relative Population Doubling (RPD) = $\frac{\text{No. of Population doublings in treated flask}}{\text{No. of Population doublings in control flask}} \times 100$

Population Doubling = $[\log(\text{Post-treatment cell number} \div \text{Initial cell number})] \div \log 2$

표 10. Osmolality and pH Range of the First Dose Range-Finding Study

Nominal Conc. of Test Item (µg/mL)	Metabolic Activation System	Times ^{a)} (hours)	At the beginning of the treatment		At the end of the treatment	
			Osmolality ^{b)}	pH	Osmolality ^{b)}	pH
6 - hour treatment (6 + S)						
0	+	6 - 18	301	7.64	301	7.57
5000	\$&	6 - 18	326	7.68	327	7.66
6 - hour treatment (6 - S)						
0	-	6 - 18	285	7.90	287	7.75
5000	-	6 - 18	308	7.82	309	7.84
22 - hour treatment (22 - S)						
0	-	22 - 2	283	7.97	308	7.66
5000	-	22 - 2	307	7.82	284	7.60

\$ Visible turbidity of test item was observed at the end of the treatment.

& Visible precipitation of test item were observed at the end of the treatment.

^{a)} Treatment time - recovery time

^{b)} mOsm/kg

- 2 차 용량설정시험 결과, 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 각각 30 µg/mL 및 26 µg/mL의 농도군에서 약 50 %의 세포증식억제가 나타나는 것을 확인됨

표 11. Relative Population Doubling of the Second Dose Range-Finding Study

Nominal Conc. of Test Item (µg/mL)	Metabolic Activation System	Times ^{a)} (hours)	Cell Counts ^{b)}		Mean	RPD ^{c)} , %
			One Flask/Concentration			
6 - hour treatment (6 - S)						
0	-	6 - 18	10,269	10,274	10,272	100
5	-	6 - 18	10,272	10,337	10,305	100
10	-	6 - 18	9,988	9,876	9,932	97
14	-	6 - 18	9,395	9,384	9,390	93
18	-	6 - 18	8,987	9,105	9,046	90
22	-	6 - 18	7,752	7,690	7,721	77
26	-	6 - 18	6,239	6,232	6,236	60
30	-	6 - 18	4,849	4,845	4,847	40
34	-	6 - 18	3,927	3,902	3,915	22
38	-	6 - 18	3,123	2,982	3,053	2
22 - hour treatment (22 - S)						
0	-	22 - 2	8,406	8,451	8,429	100
5	-	22 - 2	8,204	8,469	8,337	99
10	-	22 - 2	7,914	7,745	7,830	93
14	-	22 - 2	7,805	7,717	7,761	92
18	-	22 - 2	6,971	7,034	7,003	82
22	-	22 - 2	5,762	5,776	5,769	64
26	-	22 - 2	4,671	4,556	4,614	42
30	-	22 - 2	3,625	3,641	3,633	20
34	-	22 - 2	2,757	2,755	2,756	-7
38	-	22 - 2	2,077	2,092	2,085	-34
Cell Counts at Treatment			2,939	2,983	2,961	

a) Treatment time – recovery time

b) A and B indicate duplicate cultures. Each culture was trypsinized and suspended with 1.0 mL of 0.05% trypsin-EDTA and 9.0 mL of culture medium. The cell suspensions of 0.8 mL/culture were diluted 25 times with 19.2 mL of Isoton solution. The cells in 0.5 mL Isoton solution were counted twice/culture using Coulter Counter® model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

c) Relative Population Doubling (RPD) = $\frac{\text{No. of Population doublings in treated flask}}{\text{No. of Population doublings in control flask}} \times 100$
 Population Doubling = $[\log (\text{Post-treatment cell number} \div \text{Initial cell number})] \div \log 2$

2) 분시험의 세포증식억제 결과

- 대사활성계 적용 6 시간 처리군에서는 처리 종료 시 80 µg/mL 농도에서 침전이 관찰됨
- 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 약 50 %의 세포증식억제가 관찰되는 농도가 각각 26 µg/mL 및 26 µg/mL에서 확인됨

표 12. Relative Population Doubling of the Definitive Study

Nominal Conc. of Test Item (µg/mL)	Metabolic Activation System	Time ^{a)} (hours)	Cell Counts ^{b)}				Mean	RPD ^{c)} , %
			Flask A		Flask B			
6 - hour treatment (6 + S)								
0	+	6 - 18	7,042	6,936	7,043	7,034	7,014	100
20	+	6 - 18	6,168	6,160	6,040	5,970	6,085	83
40	+	6 - 18	6,004	6,014	5,848	5,939	5,951	81
80 &	+	6 - 18	5,771	5,856	5,719	5,816	5,791	77
CPA 6	+	6 - 18	4,009	4,046	3,646	3,561	3,816	28
6 - hour treatment (6 - S)								
0	-	6 - 18	8,727	8,624	8,853	8,804	8,752	100
10	-	6 - 18	8,484	8,506	8,544	8,732	8,477	97
20	-	6 - 18	7,032	6,978	7,250	7,285	7,136	81
26	-	6 - 18	5,186	5,261	5,034	5,051	5,133	50
28	-	6 - 18	4,684	4,738	4,717	4,667	4,702	42
EMS 800	-	6 - 18	5,170	5,069	5,859	5,882	5,495	57
22 - hour treatment (22 - S)								
0	-	22 - 2	7,665	7,609	8,004	8,069	7,837	100
10	-	22 - 2	8,040	7,974	7,439	7,318	7,693	98
20	-	22 - 2	6,130	6,172	6,384	6,376	6,266	77
24	-	22 - 2	5,046	4,997	5,231	5,226	5,125	56
26	-	22 - 2	4,672	4,701	4,708	4,687	4,692	47
EMS 600	-	22 - 2	4,383	4,224	4,292	4,257	4,289	37
No. of Cell at Treatment			3,064	3,011	2,936	2,976	2,997	

& Visible precipitation of test item were observed at the end of the treatment.

a) Treatment time – recovery time

b) A and B indicate duplicate cultures. Each culture was trypsinized and suspended with 1.0 mL of 0.05% trypsin-EDTA and 9.0 mL of culture medium. The cell suspensions of 0.8 mL/culture were diluted 25 times with 19.2 mL of Isoton solution. The cells in 0.5 mL Isoton solution were counted twice/culture using Coulter Counter[®] model ZM. Actual number of cells per flask = Mean Count × 500.

c) Relative Population Doubling (RPD) = $\frac{\text{No. of Population doublings in treated flask}}{\text{No. of Population doublings in control flask}} \times 100$
 Population Doubling = $[\log(\text{Post-treatment cell number} \div \text{Initial cell number})] \div \log 2$

3) 염색체이상 계수 결과

- 대사활성계 적용군의 구조적 이상[꺾 포함/꺾 제외]을 가진 증기상의 빈도는 부형제 대조군, 20, 40 및 80 µg/mL 농도군의 순으로 [1.0/0.5], [0.5/0.5], [0.0/0.0] 및 [1.5/0.5]로 모든 시험물질 처리군에서 구조적 이상을 가진 증기상의 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰되지 않음. 부형제대조군의 [polyploid (PP, 배수체) + endoreduplication (ER, 핵내배화)]의 빈도는 [1.0 + 0.0]이었고, 모든 시험물질 처리군에서 수적 이상을 가진 증기상의 유의한 증가를 나타내지 않았음
- 대사활성계 미적용군 6 시간 처리군의 구조적 이상[꺾 포함/꺾 제외]을 가진 증기상의 빈도는 부형제대조군, 10, 20 및 26 µg/mL 농도군의 순으로 [0.0/0.0], [8.5/4.0], [29.0/16.5] 및 [35.5/22.5]로 모든 시험물질 처리군에서 구조적 이상을 가진 증기상의 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰됨($\geq 10 \mu\text{g/mL}$, $P < 0.01$). 부형제대조군의 [PP + ER]의 빈도는 [0.0 + 0.0]이었고 모든 시험물질 처리군에서 수적 이상을 가진 증기상의 유의한 증가를 나타내지 않았음
- 대사활성계 미적용 22시간 처리군의 구조적 이상[꺾 포함/꺾 제외]을 가진 증기상의 빈도는 부형제대조군, 10, 20 및 26 µg/mL 농도군의 순으로 [0.5/0.0], [6.0/2.5], [24.5/13.5] 및 [47.0/30.5]로 시험물질 처리군(20 및 26 µg/mL)에서 구조적 이상을 가진 증기상의 통계학적으로 유의성 있는 증가가 관찰됨($\geq 20 \mu\text{g/mL}$, $P < 0.01$). 부형제대조군의 [PP + ER]의 빈도는 [0.5 + 0.0]이었고 모든 시험물질 처리군에서 수적 이상을 가진 증기상의 유의한 증가를 나타내지 않았음

표 13. Results of Chromosome Aberration Assay and Relative Population Doubling

** Significantly different from the control at $P < 0.01$.

Nominal Conc. of Test Item ($\mu\text{g/mL}$)	Metabolic Activation System	Time ^{a)} (hours)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberrations	Mean of PP+ER	RPD, %
6 - hour treatment (6 + S)						
0	+	6 - 18	1.0 / 0.5 ^{b)}	2.0 / 1.5	1.0 + 0.0	100
20	+	6 - 18	0.5 / 0.5	0.5 / 0.5	1.0 + 0.0	83
40	+	6 - 18	0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.5 + 0.0	81
80	&	6 - 18	1.5 / 0.5	1.5 / 0.5	1.0 + 0.0	77
CPA 6	+	6 - 18	34.0 / 33.5 **	56.0 / 55.5	0.5 + 0.0	28
6 - hour treatment (6 - S)						
0	-	6 - 18	0.0 / 0.0	0.0 / 0.0	0.0 + 0.0	100
10	-	6 - 18	8.5 / 4.0 **	10.5 / 5.0	0.0 + 0.0	97
20	-	6 - 18	29.0 / 16.5 **	48.5 / 20.5	1.5 + 0.0	81
26	-	6 - 18	35.5 / 22.5 **	70.0 / 31.0	1.0 + 0.0	50
28	-	6 - 18	Not Counted			42
EMS 800	-	6 - 18	24.0 / 23.5 **	34.5 / 34.0	0.0 + 0.0	57
22 - hour treatment (22 - S)						
0	-	22 - 2	0.5 / 0.0	0.5 / 0.0	0.5 + 0.0	100
10	-	22 - 2	6.0 / 2.5	8.0 / 2.5	0.5 + 0.0	98
20	-	22 - 2	24.5 / 13.5 **	40.0 / 17.0	0.0 + 0.0	77
24	-	22 - 2	Not Counted			56
26	-	22 - 2	47.0 / 30.5 **	93.5 / 41.5	1.0 + 0.0	47
EMS 600	-	22 - 2	48.0 / 48.0 **	83.0 / 82.5	0.0 + 0.0	37

& Visible precipitation of test item was observed at the end of the treatment.

Vehicle versus test item-treated groups : After carrying out χ^2 -test, performed Fisher's exact test, if $P < 0.05$.

Dose-response : Cochran-Armitage trend test will be used to determine the dose-response, if results of the statistical analyses above produce $P < 0.05$.

Vehicle versus positive control groups : Fisher's exact test.

^{a)} Treatment time-recovery time

^{b)} Gaps included/excluded, means of duplicate cultures ; 100 metaphases were examined per culture.

Abbreviations :

PP ; Polyploid, ER ; Endoreduplication, RPD ; Relative Population Doubling

CPA ; Cyclophosphamide monohydrate, EMS ; Ethyl methanesulfonate

+ Presence of metabolic activation system

- Absence of metabolic activation system

(4) 고찰 및 결론

- ① Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride(PGH)의 체외 염색체 이상시험 결과, 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 CHL 세포에 염색체 이상을 유발함
- ② 부형제대조군의 경우에는 구조적 이상(겹 제외)을 가진 중기상의 수가 안전성평가 연구소의 historical control data 내에 들어왔고, 양성대조군의 경우에는 이상 중기상의 수가 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가함. 이는 본 시험이 적합하게 수행되었다는 것을 나타내며, 결과의 정당성을 뒷받침함

4. PHMG 및 PGH에 대한 소핵시험

4-1. PHMG

- (1) 시험법 : OECD TG 474 및 국립환경과학원 고시 제2014-1호, 화학물질유해성시험방법 제5장 건강영향 시험분야 16항 유전독성시험-골수세포 소핵시험
- (2) 시험방법

시험물질 구성	1. 시험물질 : Polyhexamethyleneguanidine phosphate(PHMG) 2. 부형제 : 멸균증류수 (DW)						
시험계의 구성	1. 종(계통/아계통) : 마우스(ICR/CrljOri:CD1), SPF 2. 투여 동물수 : 용량설정시험 - 7 주령, 암수 각 20 마리 본시험 - 7 주령, 수컷 25 마리						
투여량	<ul style="list-style-type: none"> - 용량설정시험에서는 2,000 mg/kg를 최고용량으로 하여 부형제대조군과 함께 4 단계 투여군(2,000, 1,000, 500, 250 mg/kg)에 1일 1 회 2 일간 경구투여 함. 투여 전날 path/tox system을 이용하여 각 군당 4 마리씩 군분리함 - 용량설정시험 결과, 암수 모두에서 체중변화는 관찰되지 않음 - 한편, 투여 첫날(DAY 1) 수컷의 2,000 mg/kg 투여군, 암컷의 1,000 mg/kg 및 2,000 mg/kg 투여군에서 각각 4 마리, 3 마리 및 4 마리에서 사망동물이 발견되었고, 투여 둘째날(DAY 2) 수컷의 1,000 mg/kg 투여군 및 암컷의 1,000 mg/kg 투여군에서 각각 3 마리 및 1 마리에서 사망동물이 발견됨 - 또한, 암수 모두 1,000 mg/kg 투여군에서 활동성저하(subdued behavior)가 관찰됨 - 따라서, 본시험은 암수 성별에 따른 차이가 관찰되지 않았으므로 125, 250, 500 mg/kg의 용량을 선택함 						
시험군의 구성	군	성별	동물수	동물번호	투여량 (mL/kg)	투여용량 (mg/kg)	투여경로
	부형제	수컷	5	1 ~ 5	10	0	경구
	T1	수컷	5	6 ~ 10	10	125	경구
	T2	수컷	5	11 ~ 15	10	250	경구
	T3	수컷	5	16 ~ 20	10	500	경구
	양성대조	수컷	5	21 ~ 25	10	70	복강
투여방법	강제 경구투여함						

	<ul style="list-style-type: none"> - 투여량은 가장 최근에 측정된 체중에 따라 10 mL/kg로 계산하며, 계획된 검체 제작일 전날까지 투여함 - 양성대조물질은 kg당 10 mL씩 70 mg/kg 용량으로 시험물질의 2 차 투여시에 복강내 투여함
투여 횟수 및 투여기간	1 일 1 회 2 일간
관찰 및 검사항목	<ol style="list-style-type: none"> 1. 일반증상 및 사망동물의 관찰 2. 체중측정 3. 소핵 계수 (본시험만)
결과의 판정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시험의 적합성 판정 <ul style="list-style-type: none"> - 모든 동물에 있어서 PCEs/(PCEs + NCEs) 비율이 0.1 이상 이어야 함 - 음성대조군에서 관찰되는 MNPCEs의 평균빈도가 0.5 % (5/1000 polychromatic erythrocytes)를 초과하지 않아야 함 - 음성대조군에서 관찰되는 MNPCEs의 빈도가 historical control data의 범위 내에 들어와야 함 - 양성대조군에서 관찰되는 MNPCEs의 빈도가 음성대조군에 비해 유의성 있게 증가하여야 함 2. 결과의 판정 <ul style="list-style-type: none"> - 시험물질 투여군에 있어서 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 음성대조군의 소핵을 가진 다염성적혈구의 수를 넘지 않거나 각 농도군의 시험동물 모두에서 음성대조군에 대한 historical control data 범위 내에 있다면 음성으로 판정 - 시험물질 투여군에 있어서 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량 단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우에 양성으로 판정

(3) 시험결과

1) 용량설정시험의 일반증상 결과

표 14. Clinical Signs of the Dose Range – Finding Study

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE					
Dosing					
SEX : MALE					
GROUP :	V.C	T1	T2	T3	T4
PERIOD DOSE : (mg/kg)	0	250	500	1,000	2,000
1 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/4	0/0
Subdued behavior	0/4	0/4	0/4	4/4	0/0
2 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/1	0/0
Subdued behavior	0/4	0/4	0/4	1/1	0/0
3 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/1	0/0
Subdued behavior	0/4	0/4	0/4	1/1	0/0
4 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	1/1	0/0
5 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	1/1	0/0
6 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	1/1	0/0
7 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	1/1	0/0

Number of Animals with Sign/Total Number of Animals Observed

SEX : FEMALE					
1 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/1	0/0
Subdued behavior	0/4	0/4	0/4	1/1	0/0
2 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/0	0/0
3 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/0	0/0
4 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/0	0/0
5 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/0	0/0
6 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/0	0/0
7 DAY					
No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	0/0	0/0

Number of Animals with Sign/Total Number of Animals Observed

2) 용량설정시험의 체중 결과

표 15. Body Weight of the Dose Range – Finding Study

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)						
Dosing						
SEX : MALE						
GROUP :		V.C	T1	T2	T3	T4
PERIOD DOSE : (mg/kg)		0	250	500	1000	2000
DAY 1 Dosing	MEAN	34.0	34.3	33.6	34.2	33.9
	S.D.	0.77	1.30	1.34	0.64	1.32
	N	4	4	4	4	4
DAY 2 Dosing	MEAN	34.0	33.6	33.2	34.5	—
	S.D.	0.98	1.64	1.73	—	—
	N	4	4	4	1	0
DAY 3 Dosing	MEAN	33.9	33.8	32.7	33.4	—
	S.D.	1.05	1.52	1.71	—	—
	N	4	4	4	1	0
DAY 5 Dosing	MEAN	34.5	33.8	31.8	34.9	—
	S.D.	1.21	1.54	2.32	—	—
	N	4	4	4	1	0
DAY 7 Dosing	MEAN	35.7	33.6	30.0	31.4	—
	S.D.	1.44	1.75	2.66	—	—
	N	4	4	4	1	0

Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

NP-KW;NSg-05/No unplanned test performed

SEX : FEMALE						
DAY 1 Dosing	MEAN	26.8	26.1	27.7	26.0	33.9
	S.D.	1.23	1.15	0.87	1.91	1.32
	N	4	4	4	4	4
DAY 2 Dosing	MEAN	26.8	25.0	27.5	—	—
	S.D.	1.47	2.07	0.85	—	—
	N	4	4	4	0	0
DAY 3 Dosing	MEAN	26.4	24.2	28.0	—	—
	S.D.	1.20	2.08	1.00	—	—
	N	4	4	4	0	0
DAY 5 Dosing	MEAN	26.7	24.6	27.0	—	—
	S.D.	1.30	2.49	1.50	—	—
	N	4	4	4	0	0
DAY 7 Dosing	MEAN	27.6	25.1	26.8	—	—
	S.D.	1.61	2.74	1.39	—	—
	N	4	4	4	0	0

Bart ; NSg-05/Anova ; NSg-05/No unplanned test performed

NP-KW ; NSg-05/No unplanned test performed

3) 본시험의 소핵 유발 빈도 및 세포독성

- 개체당 2,000 개의 PCEs에서 관찰된 소핵을 가진 PCEs (MNPCEs)의 빈도는 투여량을 기준으로 부형제대조군, 125, 250 및 500 mg/kg 투여군의 순으로 평균 1.20, 1.80, 2.60 및 2.60 으로 나타남. 시험물질 투여군의 소핵 빈도에 대하여 부형제대조군과의 차이를 조사한 결과 어느 투여군에서도 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않음. 세포독성의 지표인 PCEs/(PCEs + NCEs) 비율은 위와 같은 순서로 평균 0.49, 0.51, 0.54 및 0.52로 부형제대조군과 시험물질 투여군 사이에 통계학적으로 유의성 있는 차이는 나타나지 않음

표 16. Results of Micronucleus Assay

GROUP:	Vehicle	T1	T2	T3	Positive
DOSE: (mg/kg)	0	125	250	500	70
MNPCEs/2000 PCEs					
MEAN	1.20	1.80	2.60	2.60	78.60+
SD	0.84	1.48	1.52	1.14	14.36
PCEs/(PCEs+NCEs)					
MEAN	0.49	0.51	0.54	0.52	0.45
SD	0.06	0.03	0.08	0.07	0.01
N	5	5	5	5	5

+ Significantly different from the control at $P < 0.05$.

No. of MNPCEs between vehicle and treated group : Kruskal-Wallis H-test and Dunn's Rank Sum test

No. of MNPCEs between vehicle and positive control group : Mann-Whitney U-test

PCEs/(PCEs + NCEs) ratio between vehicle and treated group : ANOVA test and Dunnett's test

PCEs/(PCEs + NCEs) ratio between vehicle and positive control group : Student's t-test

Abbreviations

- MNPCEs : PCEs with one or more micronuclei
- PCEs : Polychromatic erythrocytes
- NCEs : Normochromatic erythrocytes

4) 본시험의 일반증상 결과

- 투여 둘째 날(DAY 2) 500 mg/kg 투여군의 4 마리에서 투여 후 3 시간에 활동성 저하(subdued behavior)가 관찰되었으나, 투여 후 5 시간째에 회복됨

표 17. Clinical Signs 관찰 결과 요약

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE Dosing					
SEX : MALE					
GROUP:	V.C	T1	T2	T3	Positive
PERIOD DOSE : (mg/kg)	0	125	250	500	70
1 DAY No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
2 DAY No Abnormalities Detected Subdued behavior	5/5 0/5	5/5 0/5	5/5 0/5	5/5 4/5	5/5 0/5
3 DAY No Abnormalities Detected	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Number of animals with sign/Total number of animals observed

5) 본시험의 체중결과

- 투여기간 체중을 비교한 결과, 시험물질을 투여한 모든 군 및 양성대조물질 투여군에서 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않음

표 18. Body Weight 측정 결과 요약

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g) Dosing						
SEX : MALE						
GROUP:		V.C	T1	T2	T3	T4
PERIOD DOSE : (mg/kg)		0	125	250	500	70
DAY 1 Dosing	MEAN	34.6	34.1	34.0	33.7	33.2
	S.D.	1.35	0.73	1.13	1.51	1.61
	N	5	5	5	5	5
DAY 2 Dosing	MEAN	34.5	33.8	33.0	32.6	33.6
	S.D.	1.02	0.81	1.08	1.59	1.25
	N	5	5	5	5	5
DAY 3 Dosing	MEAN	34.1	33.8	32.7	32.7	33.4
	S.D.	1.45	0.91	1.24	2.22	1.37
	N	5	5	5	5	5

Bart ; NSg-05/Anova ; NSg-05/No unplanned test performed

(4) 고찰 및 결론

- ① Polyhexamethyleneguanidine phosphate을 500 mg/kg까지 경구투여 한 경우, 수컷 마우스(ICR)의 골수에서 소핵을 가진 PCEs (MNPCEs)의 빈도는 증가하지 않았음

- ② 부형제대조군의 경우 소핵의 빈도가 historical control data 내에 들어왔고, 양성 대조군의 경우에는 소핵의 빈도가 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가함. 이는 본 시험이 적합하게 수행되었다는 것을 나타내며, 결과의 정당성을 뒷받침함

4-2. PGH

(1) 시험법 : OECD TG 474 및 국립환경과학원 고시 제2014-1호, 화학물질유해성시험방법 제5장 건강영향 시험분야 16항 유전독성시험-골수세포 소핵시험

(2) 시험방법

시험물질 구성	1. 시험물질: Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride 2. 부형제: 멸균증류수 (DW)																																																
시험계의 구성	1. 종(계통/아계통) : 마우스(ICR/CrIjOri : CD1), SPF 2. 투여 동물수 : 용량설정시험 - 7 주령, 암수 각 20 마리 본시험 - 7 주령, 수컷 29 마리																																																
투여량	<ul style="list-style-type: none"> - 용량설정시험에서는 2,000 mg/kg를 최고용량으로 하여 부형제대조군과 함께 4 단계 투여군(2,000, 1,000, 500, 250 mg/kg)에 1일 1 회 2 일간 경구투여 함. 투여 전날 path/tox system을 이용하여 각 군당 4 마리씩 군분리함 - 용량설정시험 결과, 암수 모두에서 체중변화는 관찰되지 않음 - 한편, 투여 둘째 날(DAY 2)와 셋째 날(DAY 3)에 수컷의 1,000 mg/kg 및 2,000 mg/kg 투여군에서 각각 1마리씩 사망동물이 발견되었으나, 일반증상은 관찰되지 않음. 또한, 암컷 2,000 mg/kg 투여군에서 DAY 3에 복부팽창(abdominal distention) 및 항문주위 오염(soiled perineal region)이 관찰됨 - 따라서, 본시험은 암수 성별에 따른 차이가 관찰되지 않았으므로 2,000, 1,000, 500 mg/kg의 용량을 선택함 																																																
시험군의 구성	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>군</th> <th>성별</th> <th>동물수</th> <th>동물번호</th> <th>투여량 (mL/kg)</th> <th>투여용량 (mg/kg)</th> <th>투여경로</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>부형제</td> <td>수컷</td> <td>5</td> <td>1 ~ 5</td> <td>10</td> <td>0</td> <td>경구</td> </tr> <tr> <td>T1</td> <td>수컷</td> <td>5</td> <td>6 ~ 10</td> <td>10</td> <td>500</td> <td>경구</td> </tr> <tr> <td>T2</td> <td>수컷</td> <td>7</td> <td>11 ~ 17</td> <td>10</td> <td>1,000</td> <td>경구</td> </tr> <tr> <td>T3</td> <td>수컷</td> <td>7</td> <td>18 ~ 24</td> <td>10</td> <td>2,000</td> <td>경구</td> </tr> <tr> <td>양성대조</td> <td>수컷</td> <td>5</td> <td>25 ~ 29</td> <td>10</td> <td>70</td> <td>복강</td> </tr> </tbody> </table>							군	성별	동물수	동물번호	투여량 (mL/kg)	투여용량 (mg/kg)	투여경로	부형제	수컷	5	1 ~ 5	10	0	경구	T1	수컷	5	6 ~ 10	10	500	경구	T2	수컷	7	11 ~ 17	10	1,000	경구	T3	수컷	7	18 ~ 24	10	2,000	경구	양성대조	수컷	5	25 ~ 29	10	70	복강
군	성별	동물수	동물번호	투여량 (mL/kg)	투여용량 (mg/kg)	투여경로																																											
부형제	수컷	5	1 ~ 5	10	0	경구																																											
T1	수컷	5	6 ~ 10	10	500	경구																																											
T2	수컷	7	11 ~ 17	10	1,000	경구																																											
T3	수컷	7	18 ~ 24	10	2,000	경구																																											
양성대조	수컷	5	25 ~ 29	10	70	복강																																											
투여방법	<p>강제 경구투여함</p> <ul style="list-style-type: none"> - 투여량은 가장 최근에 측정된 체중에 따라 10 mL/kg로 계산하며, 계획된 검체 제작일 전날까지 투여함. 양성대조물질은 kg 당 10 mL씩 70 mg/kg 용량으로 시험물질의 2 차 투여시에 복강내 투여함 																																																

투여 횟수 및 투여기간	1 일 1 회 2 일간
관찰 및 검사항목	<ol style="list-style-type: none"> 1. 일반증상 및 사망동물의 관찰 2. 체중측정 3. 소핵 계수 (본시험만)
결과의 판정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시험의 적합성 판정 <ul style="list-style-type: none"> - 모든 동물에 있어서 PCEs/(PCEs + NCEs) 비율이 0.1 이상 이여야 함 - 음성대조군에서 관찰되는 MNPCEs의 평균빈도가 0.5 % (5/1,000 polychromatic erythrocytes)를 초과하지 않아야 함 - 음성대조군에서 관찰되는 MNPCEs의 빈도가 historical control data의 범위 내에 들어와야 함 - 양성대조군에서 관찰되는 MNPCEs의 빈도가 음성대조군에 비해 유의성 있게 증가하여야 함 2. 결과의 판정 <ul style="list-style-type: none"> - 시험물질 투여군에 있어서 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 음성대조군의 소핵을 가진 다염성적혈구의 수를 넘지 않거나 각 농도군의 시험동물 모두에서 음성대조군에 대한 historical control data 범위 내에 있다면 음성으로 판정 - 시험물질 투여군에 있어서 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량 단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우에 양성으로 판정

(3) 시험결과

1) 용량설정시험의 일반증상 결과

표 19. Clinical Signs of the Dose Range-Finding Study

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE					
Dosing					
SEX : MALE					
GROUP :	V.C	T1	T2	T3	T4
PERIOD DOSE : (mg/kg)	0	250	500	1,000	2,000
1 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
2 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	3/3	4/4
3 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3
4 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3
5 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3
6 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3
7 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	3/3	3/3

Number of Animals with Sign/Total Number of Animals Observed

SEX : FEMALE					
1 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
2 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	3/3	4/4
3 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4
Abdominal distention, Slight	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
Soiled perineal region, Slight	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
4 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
5 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
6 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
7 DAY No Abnormalities Detected	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

Number of Animals with Sign/Total Number of Animals Observed

2) 용량설정시험의 체중 결과

표 20. Body Weight of the Dose Range-Finding Study

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g)						
Dosing						
SEX : MALE						
GROUP :		V.C	T1	T2	T3	T4
PERIOD DOSE : (mg/kg)		0	250	500	1,000	2,000
DAY 1 Dosing	MEAN	34.2	34.3	33.2	34.3	33.4
	S.D.	1.17	0.71	0.90	1.39	0.73
	N	4	4	4	4	4
DAY 2 Dosing	MEAN	34.2	34.0	33.2	32.5	33.2
	S.D.	0.95	0.95	1.28	2.98	1.02
	N	4	4	4	4	4
DAY 3 Dosing	MEAN	34.8	34.3	33.8	34.2	31.8
	S.D.	0.95	0.58	1.61	1.77	1.08
	N	4	4	4	3	3
DAY 5 Dosing	MEAN	35.3	34.9	33.7	35.4	33.1
	S.D.	1.02	1.00	1.28	1.62	1.59
	N	4	4	4	3	3
DAY 7 Dosing	MEAN	35.9	35.4	35.4	36.4	33.5
	S.D.	1.07	1.02	1.74	1.90	1.77
	N	4	4	4	3	3

Bart;NSg-05/Anova;NSg-05/No unplanned test performed

SEX : FEMALE						
GROUP :		V.C	T1	T2	T3	T4
PERIOD DOSE : (mg/kg)		0	250	500	1,000	2,000
DAY 1 Dosing	MEAN	28.0	27.6	28.3	27.8	28.5
	S.D.	0.88	0.76	1.93	0.54	0.64
	N	4	4	4	4	4
DAY 2 Dosing	MEAN	27.8	27.8	28.7	27.7	27.7
	S.D.	1.24	0.66	1.85	0.85	1.01
	N	4	4	4	4	4
DAY 3 Dosing	MEAN	27.4	27.4	28.3	27.2	27.2
	S.D.	0.59	0.66	1.60	0.73	2.18
	N	4	4	4	4	4
DAY 5 Dosing	MEAN	28.3	28.8	28.8	28.2	27.6
	S.D.	0.58	0.55	2.45	1.20	2.60
	N	4	4	4	4	3
DAY 7 Dosing	MEAN	28.8	29.5	29.2	27.5	27.5
	S.D.	1.29	0.37	2.02	1.00	1.70
	N	4	4	4	4	4

Bart ; NSg-05/Anova ; NSg-05/No unplanned test performed

Bart ; Sig-05/NP-KW ; NSg-05/No unplanned test performed

3) 본시험의 소핵유발 빈도 및 세포독성

- 개체당 2,000 개의 PCEs에서 관찰된 소핵을 가진 PCEs (MNPCEs)의 빈도는 투여량을 기준으로 부형제대조군, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg 투여군의 순으로 평균 1.40, 1.20, 1.00 및 1.60 으로 나타남. 시험물질 투여군의 소핵 빈도에 대하여 부형제대조군과의 차이를 조사한 결과 어느 투여군에서도 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았음. 세포독성의 지표인 PCEs/(PCEs + NCEs) 비율은 위와 같은 순서로 평균 0.55, 0.47, 0.57 및 0.60 으로 부형제대조군과 시험물질 투여군 사이에 통계학적으로 유의성 있는 차이는 없었음

표 21. Results of Micronucleus Assay

GROUP :	Vehicle	T1	T2	T3	Positive
DOSE : (mg/kg)	0	500	1,000	2,000	70
MNPCEs/2,000 PCEs					
MEAN	1.40	1.20	1.00	1.60	81.00+
SD	0.89	1.30	1.00	0.55	24.97
PCEs/(PCEs + NCEs)					
MEAN	0.55	0.47	0.57	0.60	0.47
SD	0.09	0.14	0.13	0.15	0.10
N	5	5	5	5	5

+ Significantly different from the control at $P < 0.05$.

No. of MNPCEs between vehicle and treated group: Kruskal-Wallis H-test and Dunn's Rank Sum test

No. of MNPCEs between vehicle and positive control group : Mann-Whitney U-test

PCEs/(PCEs + NCEs) ratio between vehicle and treated group : ANOVA test and Dunnett's test

PCEs/(PCEs + NCEs) ratio between vehicle and positive control group : Student's t-test

Abbreviations

- MNPCEs : PCEs with one or more micronuclei
- PCEs : Polychromatic erythrocytes
- NCEs : Normochromatic erythrocytes

4) 본시험의 일반 증상결과

- 투여 둘째 날(DAY 2) 2,000 mg/kg 투여군의 5 마리에서 투여 후 3 시간에 활동성저하(subdued behavior)가 관찰되었으나, 투여 후 5 시간째에 회복됨

표 22. Clinical Signs 관찰 결과 요약

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE Dosing					
SEX : MALE					
GROUP :	V.C	T1	T2	T3	Positive
PERIOD DOSE :(mg/kg)	0	500	1,000	2,000	70
1 DAY No Abnormalities Detected	5/5	5/5	7/7	7/7	5/5
2 DAY No Abnormalities Detected Subdued behavior	5/5 0/5	5/5 0/5	7/7 0/5	7/7 5/7	5/5 0/5
3 DAY No Abnormalities Detected	5/5	5/5	7/7	7/7	5/5

Number of animals with sign/Total number of animals observed

5) 본시험의 체중결과

- 투여기간 체중을 비교한 결과, 시험물질을 투여한 모든 군 및 양성대조물질 투여군에서 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않음

표 23. Body Weight 측정 결과 요약

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (g) Dosing						
SEX : MALE						
GROUP :		V.C	T1	T2	T3	T4
PERIOD DOSE :(mg/kg)		0	500	1,000	2,000	70
DAY 1 Dosing	MEAN	33.4	34.4	33.7	33.9	33.2
	S.D.	1.30	2.24	0.82	1.82	1.33
	N	5	5	7	7	5
DAY 2 Dosing	MEAN	33.4	33.9	33.6	33.3	33.3
	S.D.	1.62	2.55	1.17	1.70	0.87
	N	5	5	7	7	5
DAY 3 Dosing	MEAN	33.7	34.1	33.9	32.8	32.7
	S.D.	1.56	2.94	1.32	1.95	1.47
	N	5	5	7	7	5

Bart:NSg-05/Anova:NSg-05/No unplanned test performed

(4) 고찰 및 결론

- ① Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride(PGH)을 2,000 mg/kg까지 경구투여 한 경우, 수컷 마우스(ICR)의 골수에서 소핵을 가진 PCEs (MNPCEs)의 빈도는 증가하지 않았음

- ② 부형제대조군의 경우 소핵의 빈도가 historical control data 내에 들어왔고, 양성 대조군의 경우에는 소핵의 빈도가 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가함. 이는 본 시험이 적합하게 수행되었다는 것을 나타내며, 결과의 정당성을 뒷받침함

5. PGH에 대한 급성경피시험

(1) 시험법 : OECD TG 402법 및 국립환경과학원 고시 제 2013-2호

(2) 시험방법

시험물질 구성	1. 시험물질 : Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidium-chloride(PGH) 2. 부형제 : 멸균증류수																						
시험계의 구성	1. 시험종 : 랫드, Sprague-Dawley/Crl:CD(SD), SPF 2. 투여 동물수 : 약 8 ~ 9주령 암수 각각 5마리/군																						
투여량	Dose : 0, 100, 500, 2,000 mg/kg Volume : 12mL/kg - 투여량의 선정이유 : 본 시험 전 수행된 예비시험(KIT Study No. P14045)의 고용량군 (2,000 mg/kg)에서 시험물질 투여와 관련된 피부 관련 일반증상(피부 탈색 및 변색) 및 체중감소 이외에 사망동물이 관찰되지 않았으므로 2,000 mg/kg를 고용량으로 선정하였음. - 또한 예비시험에서 500 mg/kg에서 시험물질 투여와 관련된 피부관련 일반증상이 관찰되어 더 낮은 용량인 100 mg/kg를 저용량군으로 설정하였음																						
시험군의 구성	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">군</th> <th rowspan="2">투여용량 (mg/kg)</th> <th colspan="2">동물수 (개체번호)</th> </tr> <tr> <th>수컷</th> <th>암컷</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>V.C</td> <td>0</td> <td>5 (1 ~ 5)</td> <td>5 (21 ~ 25)</td> </tr> <tr> <td>T1</td> <td>100</td> <td>5 (6 ~ 10)</td> <td>5 (26 ~ 30)</td> </tr> <tr> <td>T2</td> <td>500</td> <td>5 (11 ~ 15)</td> <td>5 (31 ~ 35)</td> </tr> <tr> <td>T3</td> <td>2,000</td> <td>5 (16 ~ 20)</td> <td>5 (36 ~ 40)</td> </tr> </tbody> </table>	군	투여용량 (mg/kg)	동물수 (개체번호)		수컷	암컷	V.C	0	5 (1 ~ 5)	5 (21 ~ 25)	T1	100	5 (6 ~ 10)	5 (26 ~ 30)	T2	500	5 (11 ~ 15)	5 (31 ~ 35)	T3	2,000	5 (16 ~ 20)	5 (36 ~ 40)
군	투여용량 (mg/kg)			동물수 (개체번호)																			
		수컷	암컷																				
V.C	0	5 (1 ~ 5)	5 (21 ~ 25)																				
T1	100	5 (6 ~ 10)	5 (26 ~ 30)																				
T2	500	5 (11 ~ 15)	5 (31 ~ 35)																				
T3	2,000	5 (16 ~ 20)	5 (36 ~ 40)																				
투여방법	<p>① 투여 전일에 동물의 배부 부위의 피모를 약 10 × 10 cm²의 넓이로 제모</p> <p>② 투여일에 시험물질을 약 8 × 8 cm²의 넓이의 거즈에 도포한 후, 주사용수로 습윤 시켜 투여부위에 부착</p> <p>③ 이 후 수술용 테이프를 이용하여 거즈와 비닐 필름을 고정함</p> <p>④ 도포 24 시간 경과 후, 모든 처치물을 제거하고 피부에 남은 시험물질은 미온수를 이용하여 닦아 줌</p>																						
투여 횟수 및 투여기간	투여 당일에 하루 1 회(24 시간 적용) 투여																						
관찰 및 검사항목	1. 일반증상 및 사망동물의 관찰 2. 체중측정 3. 부검 소견																						

(3) 시험 결과

1) 사망률

- 수컷 2000 mg/kg 투여군 1 마리(동물번호 : 19)가 Day 2에 폐사하였음
- 폐사한 개체는 Day 2 에 피부 탈색(Depigmentation of skin, moderate to severe) 증상을 보이다가 투여기간 중 Day 2 에 폐사한 채로 발견되었으며, 부검 결과, 폐의 부풀어오름(Swelling)이 관찰되었음

2) 일반증상 관찰

- 암수 500 mg/kg 이상 투여군의 시험물질 투여 부위에서 피부 탈색(Depigmentation of skin, Day 2 ~ 5), 피부의 변색 (Skin coloration, Red, Day 2 ~ 11), 가피 형성(Scab, Day 3 ~ 15) 및 궤양(Ulceration, Day 7 ~ 14)이 용량 상관성을 보이며 관찰되었음
- 암컷 2000 mg/kg 투여군 3 마리(동물번호 36, 37, 40 번)에서 Day 2 에 반응 저하(Lack of response to stimuli), 강직성간대성경련(Tonic-clonic convulsion), 불규칙 호흡(Irregular respiration), 계속 돌기(Stereotypy-circling), 활동성저하(Subdued behavior)를 보였으나 Day 3 부터 회복되었음
- 암컷 대조군 1 마리(동물번호 25 번)에서 관찰된 피부의 변색의 경우, Day 4 부터 관찰되었으나 증상이 관찰된 부위가 시험물질 투여군과 상이하여 시험물질과 관련이 없는 것으로 판단되었음
- 그 외에 탈모(Loss of fur) 및 유루(Eye discharge)가 관찰되었으나, 용량 의존성이 없거나 일부 동물에서만 관찰되어 시험물질 투여와는 관련 없는 것으로 판단됨

표 24. Summary of clinical signs

군	G1	G2	G3	G4
Dose (mg/kg)	0	100	500	2000

Male

	5		5		5		5	
	#	%	#	%	#	%	#	%
No. of animal								
Depigmentation of skin	0	0	0	0	1	20	3	60
Skin coloration	0	0	1	20	2	40	3	60
Scab	0	0	0	0	2	40	3	60

Female

	5		5		5		5	
	#	%	#	%	#	%	#	%
No. of animal								
Depigmentation of skin	0	0	0	0	3	60	5	100
Skin coloration	1	20	2	40	5	100	5	100
Scab	0	0	1	20	3	60	5	100
Ulceration	0	0	0	0	0	0	1	20
Lack of response to stimuli	0	0	0	0	0	0	1	20
Tonic-clonic convulsion	0	0	0	0	0	0	2	40
Irregular respiration	0	0	0	0	0	0	1	20
Stereotypy -circling	0	0	0	0	0	0	1	20
Subdued behavior	0	0	0	0	0	0	1	20

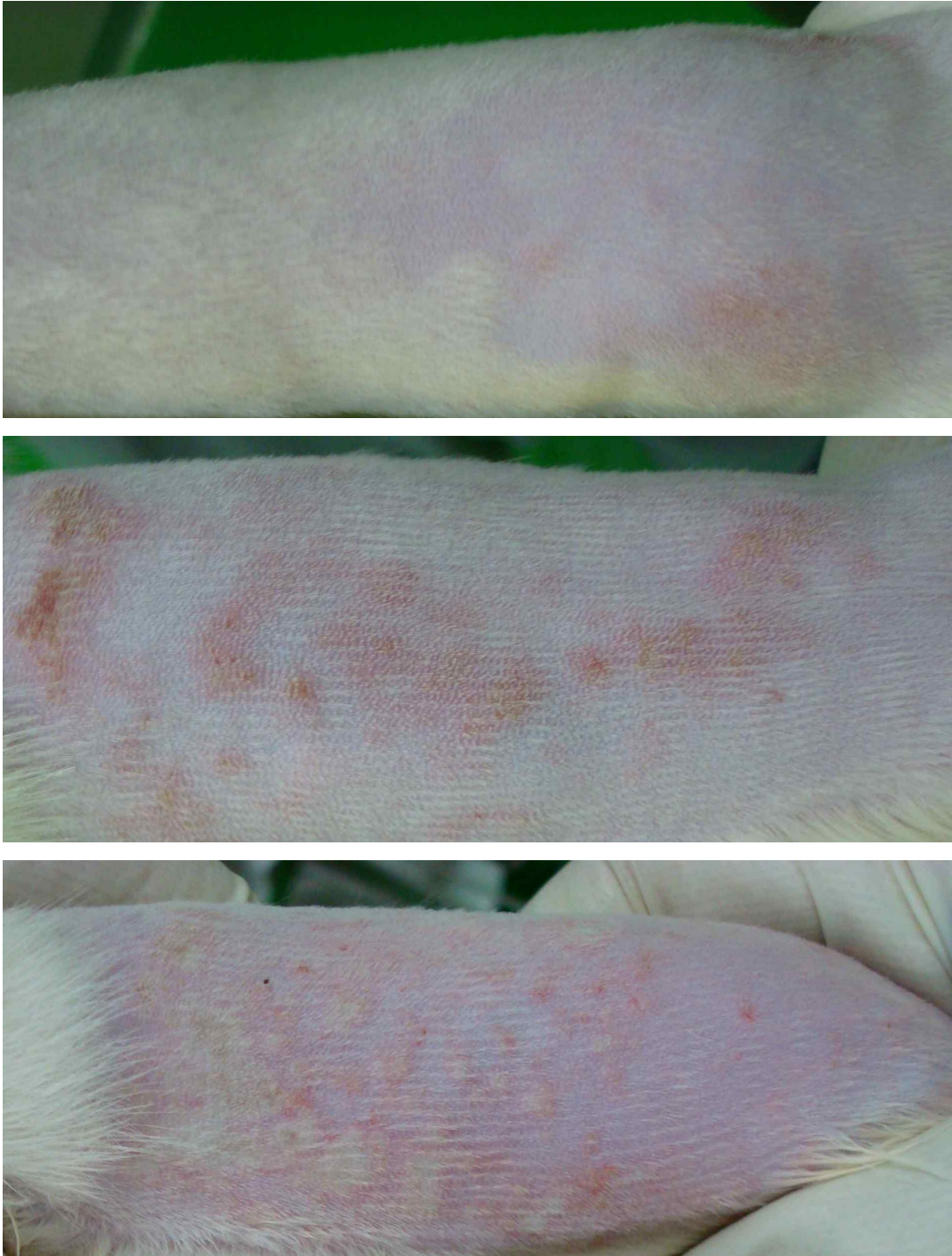


그림 36. 임상 증상 사진 (Day 2 에 관찰, 위부터 100(동물번호 : 26, skin coloration, slight), 500(동물번호 : 35, skin coloration, moderate 및 depigmentation of skin, slight), 2,000(동물번호 : 40, skin coloration, slight 및 depigmentation of skin, severe)mg/kg 투여군)

3) 체중 변화

- 암수 모든 투여군에서 Day 2 에 용량상관성을 보이는 일시적인 체중 감소가 관찰되었으며 이후 암컷 2,000 mg/kg 투여군을 제외한 나머지 투여군에서 회복되는 경향을 나타냄
- 암컷 2,000 mg/kg 투여군에서 Day 2에 일시적인 체중 감소 이 후, Day 8까지 체중이 서서히 회복되는 경향을 보이다 Day 15에 통계학적으로 유의성 있는 체중 감소를 나타냄

표 25. Summary of body weights

군		G1	G2	G3	G4
Dose (mg/kg)		0	100	500	2,000
Male					
Day 1	Mean	321.5	323.9	321.4	322.3
	S.D.	11.93	5.39	10.92	12.48
Day 2	Mean	309.7	314.6	304.3	297.2
	S.D.	14.04	9.54	13.58	19.36
Day 5	Mean	334.0	334.8	329.8	325.8
	S.D.	20.81	9.38	14.48	19.77
Day 8	Mean	350.0	352.5	349.2	341.9
	S.D.	22.64	10.15	20.88	24.45
Day 15	Mean	385.2	388.1	384.4	382.1
	S.D.	33.20	17.88	31.23	26.29
Female					
Day 1	Mean	246.3	242.2	236.4	245.0
	S.D.	13.24	8.44	13.80	10.98
Day 2	Mean	235.2	228.3	221.6	220.6
	S.D.	8.34	11.06	10.87	11.32
Day 5	Mean	250.1	241.5	238.8	238.0
	S.D.	11.52	12.81	17.58	16.20
Day 8	Mean	259.5	247.1	247.6	245.6
	S.D.	10.08	11.97	18.68	8.91
Day 15	Mean	271.5	260.5	262.0	225.2+
	S.D.	12.90	13.34	16.89	19.91

+ : significant differences from control group (p < 0.01)

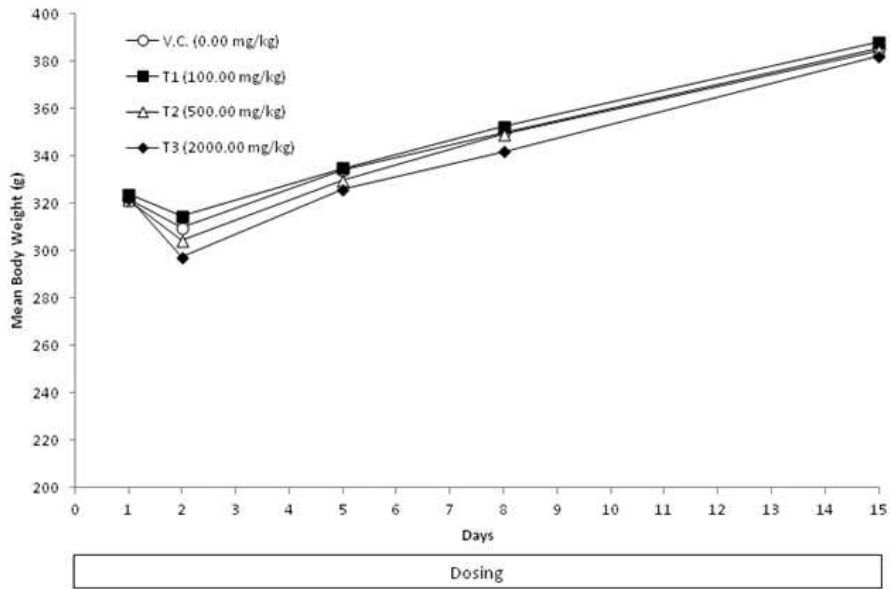


그림 37. Mean Body Weight of Male

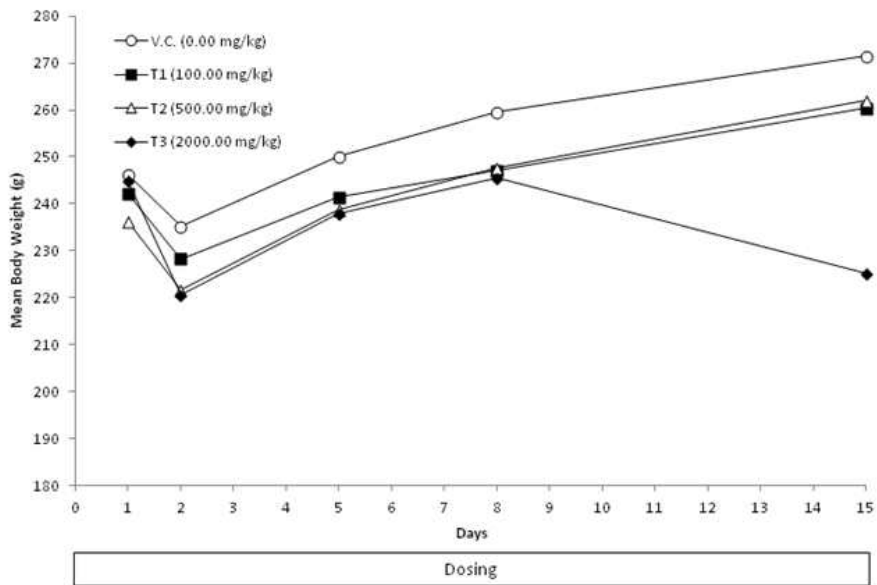


그림 38. Mean Body Weight of Female

4) 부검 소견(Gross findings)

- 부검 결과, 암컷 2,000mg/kg 투여군 3 마리(동물번호 37, 39, 40 번)에서 가피 형성(scab)이 관찰되었음

표 26. Macroscopic findings

군	G1		G2		G3		G4	
Dose (mg/kg)	0		100		500		2000	
Female								
No. of animal	5		5		5		5	
	#	%	#	%	#	%	#	%
Scab	0	0	0	0	0	0	3	60

(4) 고찰 및 결론

- ① 암수 500 mg/kg 이상 투여군에서 관찰된 피부 탈색, 피부의 변색, 가피 형성 및 궤양은 용량의존성이 나타나 시험물질 투여에 의한 소견으로 판단되며, 피부 탈색과 피부의 변색의 경우 Day 6 부터 서서히 회복되는 경향을 보임
- ② 암컷 2000 mg/kg 투여군에서 관찰된 활동성 저하, 반응 저하, 계속 돌기, 강직성 간대성경련 및 불규칙호흡은 일반적으로 관찰되는 소견이 아니며 고용량군에서만 관찰되었으므로, 시험물질 투여에 의한 소견으로 판단되며, Day 2 에 일시적으로 관찰된 이후 Day 3 부터 회복되는 경향을 보임
- ③ 암수 모든 투여군에서 Day 2 에 관찰된 체중감소는 임상증상과 함께 용량의존성을 보이며 관찰되었으므로 시험물질 투여에 의한 소견으로 판단되며, 이후 암컷 2000 mg/kg 투여군을 제외한 나머지 투여군에서 회복되는 경향을 보임
- ④ 암컷 2000 mg/kg 투여군에서 관찰된 체중 감소는 해당 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단된 가피 형성 및 궤양이 부검 전까지 지속적으로 관찰된 것으로 미루어 보아, 시험물질에 의한 이차적인 영향인 것으로 판단됨
- ⑤ 수컷 2,000 mg/kg 투여군 1 마리가 Day 2 에 폐사하였다. 해당 개체는 Day 2 에 피부 탈색 (Depigmentation of skin, moderate to severe)을 보였으며, 부검 시 폐의 부풀어오름(Swelling)이 관찰되었다. 2,000 mg/kg 투여군에서 Day 2 에 관찰된 체중 감소 및 임상 증상이 시험물질에 의한 영향으로 판단됨에 따라 해당 개체는 시험물질 투여에 의해 사망한 것으로 의심 되나, 사망의 명확한 원인은 알 수 없었음
- ⑥ 부검시 암컷 2,000 mg/kg 투여군에서 관찰된 가피 형성은 임상증상과 연속적으로 발견된 소견이므로 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단됨
- ⑦ 결론적으로, Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride (PGH)를 2,000 mg/kg 용량까지 Sprague-Dawley계통 랫드에게 단회 경피 투여한 결과, 수컷

2,000 mg/kg에서 폐사와 암수 500 mg/kg 이상 투여군에서 시험물질에 의한 임상증상으로 피부 탈색, 피부의 변색, 가피 형성, 궤양, 활동성 저하, 반응 저하, 계속 돌기, 강직성간대성경련 및 불규칙호흡이 관찰되었으며, 부검 소견으로 암컷 2,000 mg/kg 투여군에서 가피 형성이 관찰되었음. 따라서 Poly-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chloride (PGH)의 LD₅₀값은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단됨

다. 피부 in vitro 독성연구

1. 연구수행방법

(1) 사람피부세포의 배양 및 시료 처리

- 사람 피부 섬유세포(human dermal fibroblast, HDF)를 낮은 계대 배양수 (passage number)의 세포를 배양하였음
- HDF 는 100-mm 세포 배양용 접시 (Corning life science, Cat. no. 430167)에 1×10^5 개수의 세포를 DMEM 배지(Hyclone, Cat no. SH30243.01)에 넣어 37 °C, 5 % CO₂가 유지되는 세포 배양기(Thermo scientific, Water jacket CO2 incubator)에서 배양함
- 세포가 배양용 접시 면적의 80 % 정도로 자라면 trypsin을 처리하여 세포를 떼어낸 후 다음 계대 배양수로 넘기면서 24 well plate (Corning life science, Cat. no. 3524)에 1×10^4 으로 세포를 나눠서 배양하였음

(2) PGH, PHMG의 사람 피부세포 독성 평가

- 본 연구진은 환경과학원으로부터 PGH (17 %, 20 mL)와 PHMG (29 %, 20 mL)를 각각 제공받았음(그림 39)
- 각 물질을 독성을 평가하기 위해서 사람 피부세포에 가장 높은 농도로 처리할 수 있는 17 %부터 10 배씩 9 단계로 증류수를 이용하여 희석하여 처리할 시료를 확보하였으며(그림 40), 계대 배양수 7 인 사람 피부세포가 24 well plate에서 각 well에 100 %로 자랐을 때, 각 농도의 시료를 48 시간동안 처리하여 독성을 확인하였음
- 각 well의 최종 부피는 500 μ L이고, 최종 농도에서 10 배 높은 시료를 사용하여 최종 부피의 1/10의 부피(50 μ L)로 시료를 처리하였음
- 48 시간 처리 후에는 각 well을 4 % formaldehyde로 고정 시킨 후 PBS를 이용하여 washing 후 hematoxylin & eosin으로 염색하여 세포 사멸을 관찰하였음
- 염색한 세포는 현미경(Nikon Eclipse, TE2000 microscope)을 이용하여 100 배 배율로 촬영하여 관찰하였음



그림 39. 시료사진

PHMG	1.7 %	$1.7 \times 10^{-1} \%$	$1.7 \times 10^{-2} \%$	$1.7 \times 10^{-3} \%$	$1.7 \times 10^{-4} \%$	$1.7 \times 10^{-5} \%$	$1.7 \times 10^{-6} \%$	$1.7 \times 10^{-7} \%$	$1.7 \times 10^{-8} \%$	$1.7 \times 10^{-9} \%$
	ppm 17,000	1,700	170	17	1.7	0.17	0.017	0.0017	0.00017	0.000017
	ppb 17×10^6	17×10^5	17×10^4	17×10^3	17×10^2	170	17	1.7	0.17	0.017
PGH	1.7 %	$1.7 \times 10^{-1} \%$	$1.7 \times 10^{-2} \%$	$1.7 \times 10^{-3} \%$	$1.7 \times 10^{-4} \%$	$1.7 \times 10^{-5} \%$	$1.7 \times 10^{-6} \%$	$1.7 \times 10^{-7} \%$	$1.7 \times 10^{-8} \%$	$1.7 \times 10^{-9} \%$
	ppm 1,7000	1,700	170	17	1.7	0.17	0.017	0.0017	0.00017	0.000017
	ppb 17×10^6	17×10^5	1.7×10^4	17×10^3	17×10^2	170	17	1.7	0.17	0.017

그림 40. 독성 평가를 위한 PHMG, PGH 처리 계획

(3) PHMG, PGH LD₅₀ 농도 확인 및 장기적 노출에 대한 독성 평가

- 사람 피부세포를 계대 배양수 8 을 이용하여 24 well plate에 새로운 세포를 배양 하였음
- 같은 실험을 두개로 진행하면서 한 배양 접시는 계대 배양에 사용하고, 다른 한 배양 접시는 hematoxylin & eosin 염색 하였음
- 실험의 마지막 계대 배양수 12 에서는 hematoxylin & eosin 염색을 하고, 다른 한 배양 접시는 SA-β-gal & eosin staining을 통해서 노화가 일어난 정도를 확인하였음
- LD₅₀ 농도를 확인하기 위해 $1.7 \times 10^{-2} \%$ (170 ppm)부터 단계적으로 2 배씩 증류수로 희석하였으며, 동시에 낮은 농도에서의 장기간 노출에 대한 독성 평가를 진행하기 위해서 $1.7 \times 10^{-3} \%$ (17 ppm)부터 10 배씩 증류수로 단계적으로 희석하였음(그림 41)
- 장기간 노출에 대한 독성 평가 진행시에는 계대 배양을 할 때마다 세포수를 측정하였음
- 각 well의 최종 부피는 500 μL이고, 최종 농도에서 10 배 높은 시료를 사용하여 최종 부피의 1/10 의 부피 (50 μL)로 시료를 처리하였음

- 48 시간 처리 후에는 각 well을 4 % formaldehyde로 고정 시킨 후 PBS를 이용하여 washing 후 hematoxylin & eosin으로 염색하여 세포 사멸을 확인했으며, 염색한 세포는 100 배 배율로 촬영하여 관찰하였음



그림 41. LD₅₀ 농도 확인 및 장기적 노출에 대한 독성 평가 계획

(4) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

- PHMG 또는 PGH를 사람 피부세포에 처리하였을 때, 각 시료가 지질 산화물 (lipid peroxide) 생성에 영향을 주는지를 확인하기 위해서 실시하였으며, Malondialdehyde (MDA)을 이용하여 표준 그래프를 작성하였음
- 세포 배양액 200 μ L를 test tube에 넣고, 20 % trichloroacetic acid (in 0.05 N NaOH, TCA) 1 mL과 0.67 % Thiobarbituric acid (in 0.05 N NaOH, TBA) 1mL을 넣은 후 95 $^{\circ}$ C에서 20 분을 반응시킨 후, 반응이 끝난 시료를 e-tube로 옮겨 12,000 rpm에서 3 분 원심분리 시킨 후 상층액 200 μ L를 96 well plate에 넣고 540 nm에서 흡광도를 측정하였음

(5) Hematoxylin & eosin 염색법

- 0.7 % Hematoxylin (Sigma aldrich, Cat. no. HHS16)을 각 well에 300 μ L을 넣어 5 분동안 상온에서 염색시킨 후 PBS로 3 번 washing 한 후 0.1 % eosin (in ethanol)을 1 분동안 염색시킨 후 증류수로 washing하여 현미경으로 100 배 배율로 촬영하여 관찰하였음

(6) Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 염색법

- PHMG 또는 PGH를 피부세포에 처리한 후 노화가 진행되었는지를 확인하기 위해서 진행하였음

- 세포의 노화가 진행되면 SA- β -gal의 활성이 증가되어 세포질이 푸른색으로 염색 되는데, 그 정도를 비교하여 노화가 진행된 정도를 비교할 수 있음
- 48 시간의 시료 처리가 끝난 후 4 % formaldehyde로 고정시킨 후 SA- β -gal staining solution (40 mM citric acid/phosphate [pH 6.0], 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-X-galactosidase)을 16 시간동안 37 °C에서 염색시킨 후 PBS (pH 7.4)로 washing 후 eosin 염색을 실시하여 100 배 배율로 관찰하였음

2. 주요 연구 결과

(1) PHMG의 사람 피부세포 독성 평가

- PHMG 17 %로 희석한 시료 50 μ L를 세포배양액 450 μ L에 처리하여 최종 농도 1.7 %로 처리하였음
- 10 배씩 단계적으로 희석한 시료도 같은 방법을 이용하여 각 well에 처리한 후, 8 시간 뒤 hematoxylin & eosin으로 염색을 실시함(그림 42)
- 결과를 확인하였을 때, 1.7×10^{-3} % (17 ppm)과 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm) 사이에서 LD₅₀ 농도를 확인할 수 있을 것으로 예상됨

(2) PGH의 사람 피부세포 독성 평가

- PGH는 제공받은 시료 50 μ L를 세포배양액 450 μ L에 처리하여 최종 농도 1.7 %로 처리하였음
- 10 배씩 단계적으로 희석한 시료도 같은 방법을 이용하여 각 well에 처리하였으며, 처리 후 48 시간 뒤 hematoxylin & eosin으로 염색을 실시함(그림 43)
- 염색 사진에서 PHMG와 동일하게 1.7×10^{-3} % (17 ppm)과 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm) 사이에서 LD₅₀ 농도를 확인할 수 있을 것으로 예상되며, 또한 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm) 이하의 농도에서는 48 시간 동안에는 세포 사멸은 관찰되지 않았음
- 저농도에서 장기간 노출에서 세포 사멸이 일어나는지를 확인하기 위해 장기 노출 실험을 진행하였음

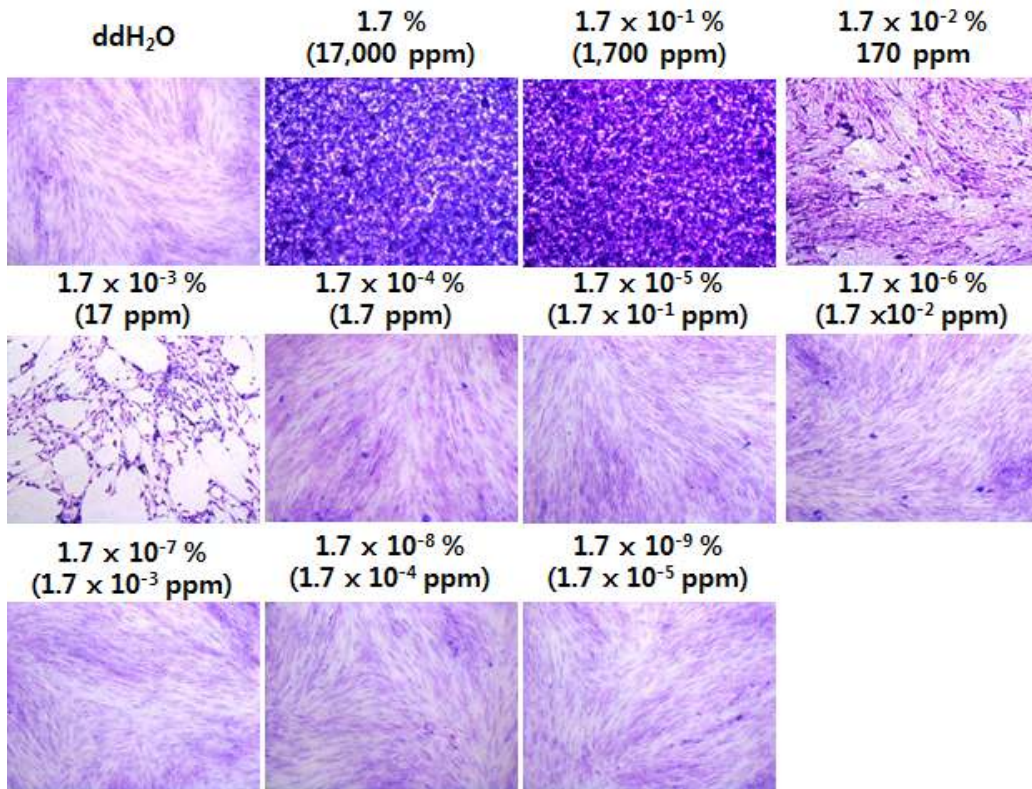


그림 42. PHMG 처리 후 H&E 염색한 사람 피부세포 (p = 7, × 100)

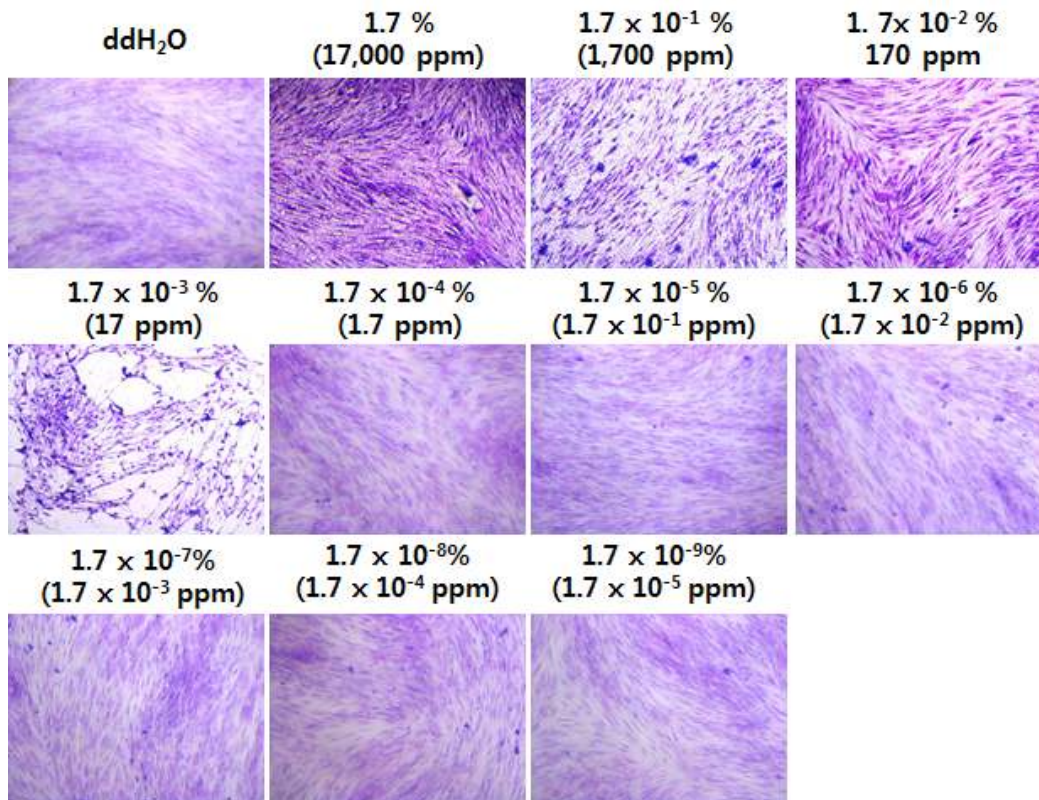


그림 43. PGH 처리 후 H&E 염색한 사람 피부세포 (p = 7, × 100)

(3) 세포 배양액에서의 리피드 산화물 측정

- PHMG 또는 PGH를 48 시간 동안 처리한 세포 배양액을 이용하여 리피드 산화물의 양을 측정하였으며, 리피드 산화물이 증가할수록 세포 독성이 강함을 의미함(그림 44)
- PHMG와 PGH 모두 $1.7 \times 10^{-9} \%$ (1.7×10^{-5} ppm)부터 $1.7 \times 10^{-2} \%$ (170 ppm)까지 처리한 세포 배양액에서는 증류수를 처리했을 때와 유사한 리피드 산화물이 측정되었음
- 하지만 $1.7 \times 10^{-1} \%$ (1,700 ppm)과 1.7% (17,000 ppm)에서는 유의성 있게 리피드 산화물이 증가했음을 확인할 수 있었음
- 또한 PHMG를 1.7% (17,000 ppm)로 처리하였을 때, 같은 농도의 PGH를 처리하였을 때보다 리피드 산화물 생성량이 많음을 확인하였으며, 이는 PHMG가 PGH보다 세포 독성이 더 클 수 있다는 것을 나타냄

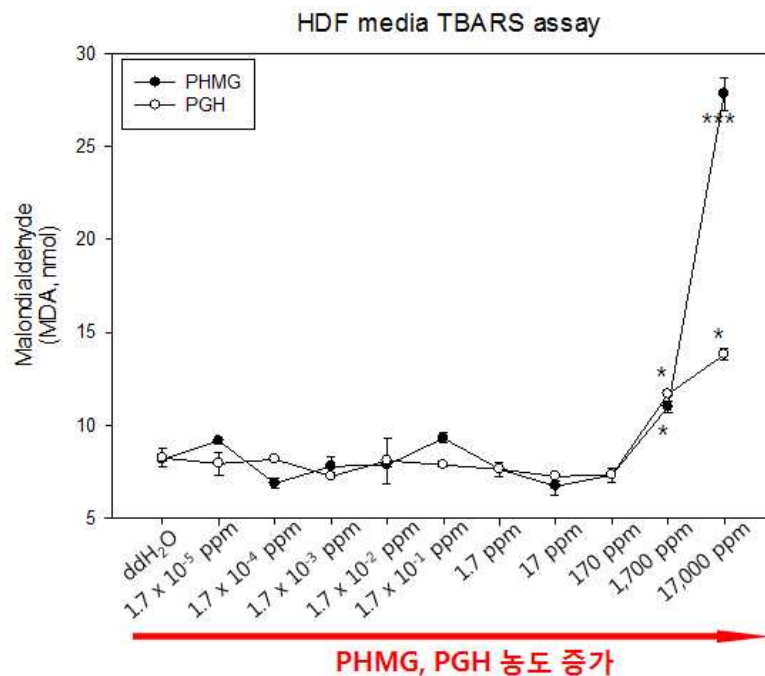


그림 44. 세포 배양액에서의 리피드 산화물 측정

(4) PHMG, PGH의 LD₅₀ 농도 도출

① PHMG

- PHMG를 $1.7 \times 10^{-4} \%$ (1.7 ppm)부터 $1.7 \times 10^{-3} \%$ (17 ppm)까지 2 배씩 단계

별 희석한 시료를 처리하여 LD₅₀ 농도를 확인하였음(그림 45)

- 계대 배양수 8에서 각 농도의 시료를 처리하였을 때 LD₅₀ 농도는 1.7 ppm으로 관찰되었음(17, 8.5, 4.3 ppm : 0 %, 2.1 ppm : 33 %, 1.7 ppm : 46 %)
- 한편 2.3 ppm과 1.7 ppm을 계대 배양하면서 세포수를 측정하였을 때, 계대 배양수 10에서 모든 농도에서 사멸함을 확인하였음
- 또한 계대 배양수 8의 세포에 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 하였을 때, 농도가 증가함에 따라 생존한 세포의 수의 차이가 사진에서도 관찰되었음(그림 46)

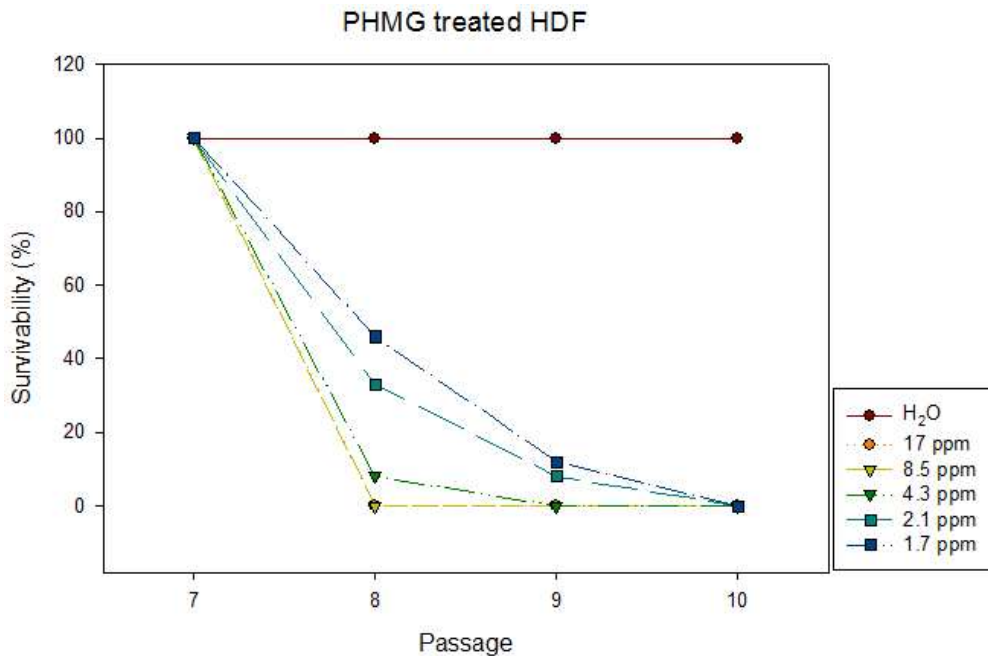


그림 45. PHMG 처리한 사람 피부세포 수 측정 (p = 7 ~ 10)

② PGH

- 사람 피부세포에 PGH를 PHMG와 동일한 방법으로 처리하여 LD₅₀ 농도를 확인하였음(그림 46)
- 계대 배양수 8에 각 농도의 시료를 처리하였을 때 17 ppm과 8.5 ppm에서는 모든 세포가 사멸한 반면, 4.3 ppm에서는 7 %, 2.1 ppm에서는 79 %, 1.7ppm에서는 96 %로 생존율이 관찰되었다. 이 결과로부터, PGH의 LD₅₀의 농도는 약 3 ppm으로 산출되었음
- 계대 배양수 8 에서 생존율이 측정된 3가지 농도 (4.3 ppm, 2.3 ppm, 1.7 ppm)를 계대 배양하면서 세포수를 측정하였을 때, 4.3 ppm은 계대 배양수 9에서, 2.3 ppm은 계대 배양수 10 에서 생존율이 0 %로 측정되었으며, 1.7 ppm은 실험이 진행된 계대 배양수 12까지 생존율이 20 %로 측정되었음

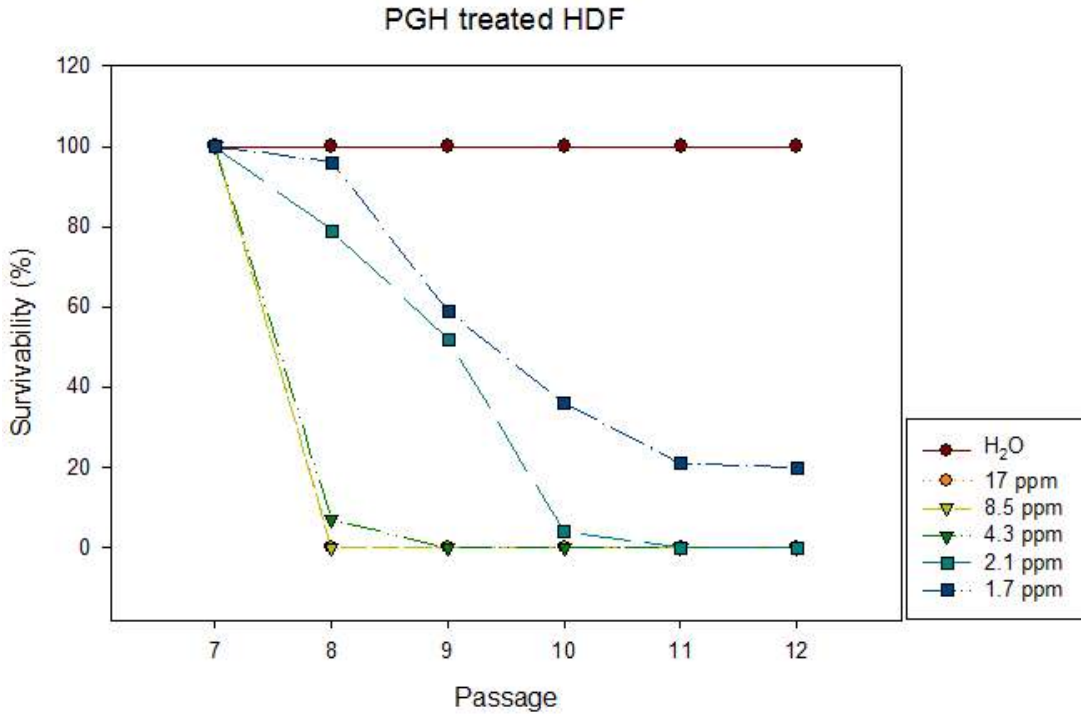


그림 46. PGH 처리한 사람 피부세포 수 측정 (p = 7 ~ 12)

- 또한 계대 배양수 8 의 세포에 hematoxylin & eosin 염색을 하였을 때, PHMG와 동일하게 농도가 증가함에 따라 생존한 세포의 수의 차이가 사진에서도 관찰되었음(그림 47)
- PHMG와 PGH가 각각 처리된 세포의 수와 염색된 세포를 비교하면 같은 농도를 처리하였을 때, PHMG가 PGH보다 사람 피부세포에서의 독성이 더 크다는 것을 확인할 수 있었음

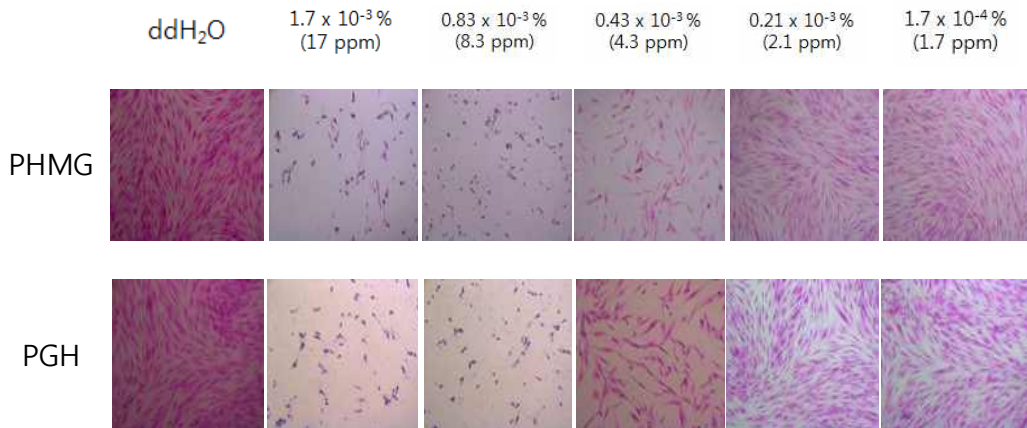


그림 47. PHMG와 PGH를 처리한 사람 피부세포 - H&E (Hematoxylin & eosin) 염색 (p = 8, × 100)

(5) PHMG, PGH의 장기적 노출에 대한 독성 평가

- 처음 계대 배양수 7에서 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm)부터는 세포 사멸이 관찰되지 않아 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm)에서부터 10 배씩 희석한 시료는 장기적 노출에 대한 독성이 있는지를 확인하고자 하였음

① PHMG

- PHMG를 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm)부터 1.7×10^{-9} % (1.7×10^{-5} ppm)까지를 계대 배양수 8부터 12까지 처리하면서 세포 수를 각 계대 배양 때마다 측정하였음 (그림 48)
- 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm)과 1.7×10^{-5} % (1.7×10^{-1} ppm)은 각각 계대 배양수 10과 11에서 세포가 모두 사멸하였으나, 나머지의 낮은 농도에서는 계대 배양수 12까지 다 죽는 농도는 관찰되지 않았음
- 계대 배양수 12에서 1.7×10^{-6} % (1.7×10^{-2} ppm)는 47 %, 1.7×10^{-7} % (1.7×10^{-3} ppm)는 72 %, 1.7×10^{-8} % (1.7×10^{-4} ppm)는 82 %, 1.7×10^{-9} % (1.7×10^{-5} ppm)는 94 %의 생존율을 보였음
- 마지막 계대 배양수 12에서는 H&E 염색과 SA- β -gal 염색을 각각 실시하였음(그림 49). Hematoxylin & eosin 염색에서는 PHMG의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 세포의 수가 줄어든다는 것을 확인할 수 있었음
- SA- β -gal 염색으로는 1.7×10^{-6} % (1.7×10^{-2} ppm)까지는 PHMG에 의해서 노화 정도가 증가한 것을 확인할 수 있지만, 그 이하의 농도에서는 증류수를 처리한 세포와 노화 정도에서 거의 차이를 보이지 않았음

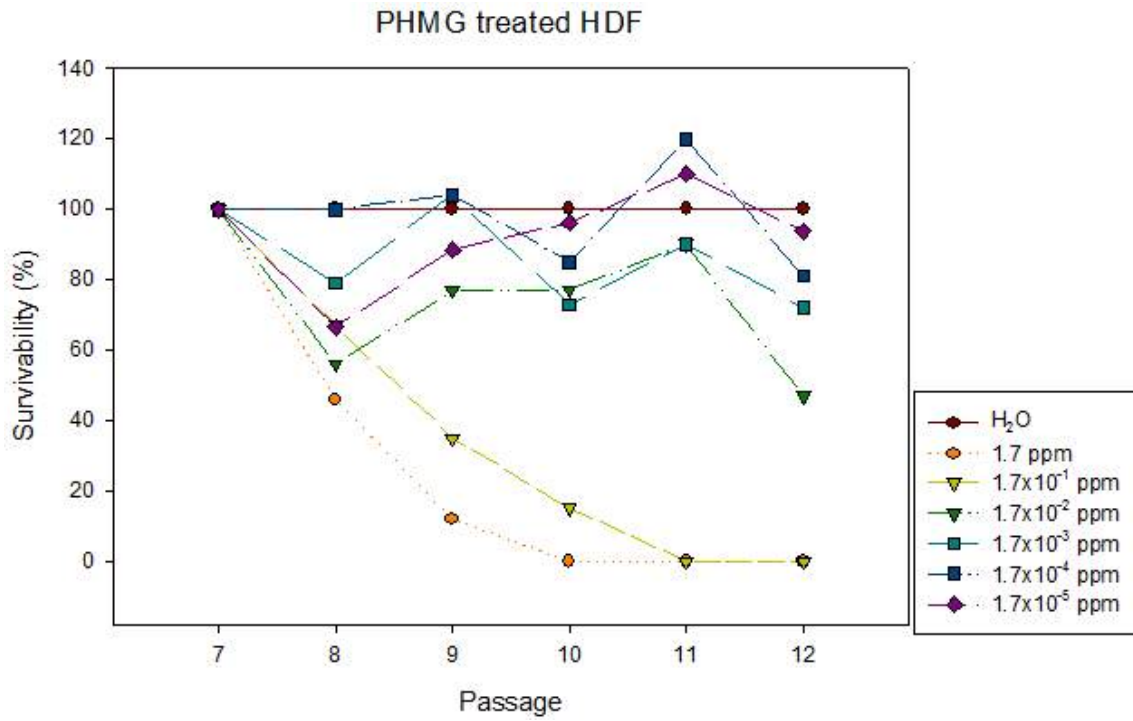


그림 48. PHMG를 처리한 세포의 수 측정

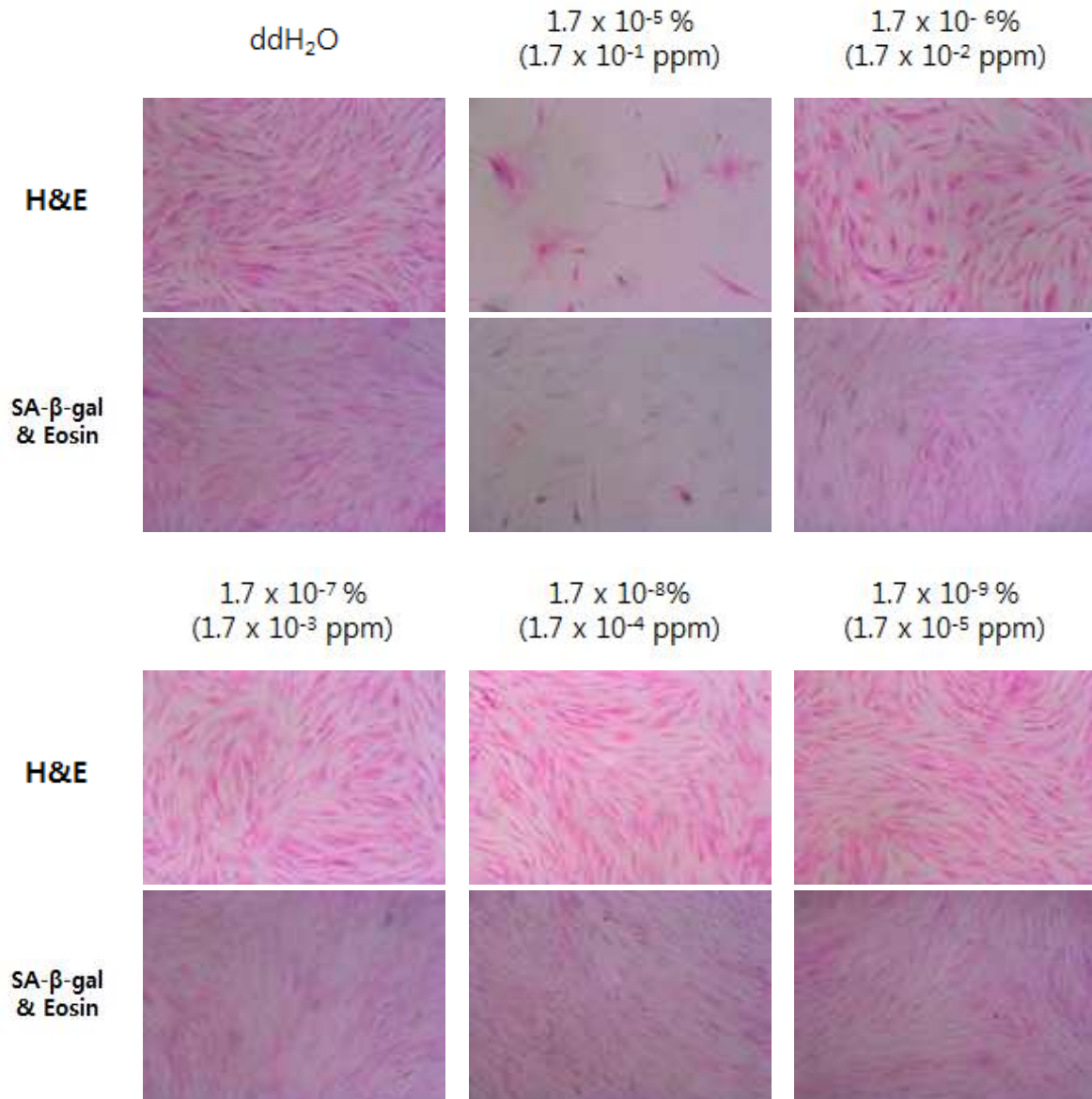


그림 49. PHMG를 처리한 사람 피부세포 (× 100)

② PGH

- PGH 또한 PHMG와 같은 방법으로 시료를 처리하면서 세포 수를 각 계대 배양 때마다 측정하였음(그림 50)
- PGH에서는 1.7 x 10⁻⁴ % (1.7 ppm) 농도 이하를 처리하였을 때, 계대 배양 후에도 모두 사멸하는 농도는 없었음
- 1.7 x 10⁻⁴ % (1.7 ppm)에서는 20 %, 1.7 x 10⁻⁵ % (1.7 x 10⁻¹ ppm)는 70 %, 1.7 x 10⁻⁶ % (1.7 x 10⁻² ppm)는 80 %, 1.7 x 10⁻⁷ % (1.7 x 10⁻³ ppm)는 112 %, 1.7 x 10⁻⁸ % (1.7 x 10⁻⁴ ppm)는 108 %, 1.7 x 10⁻⁹ % (1.7 x

10^{-5} ppm)는 112 %의 생존율을 보였음

- 같은 농도로 비교했을 때, PHMG가 PGH보다 세포 독성이 더 강함을 발견하였음
- 마지막 계대 배양수 12에서, Hematoxylin & eosin 염색에서는 PGH의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 세포의 수가 줄어든다는 것을 확인할 수 있었음. 하지만 1.7×10^{-7} (1.7×10^{-3} ppm) 이하의 농도에서는 증류수를 처리했을 때와 유사하게 관찰되었음
- SA- β -gal 염색을 통해 $1.7 \times 10^{-5}\%$ (1.7×10^{-1} ppm)까지는 PGH에 의해서 노화 정도가 증가한 것을 확인할 수 있었지만, 그 이하의 농도에서는 증류수를 처리한 세포와 노화 정도에서 거의 차이를 보이지 않았음(그림 51)

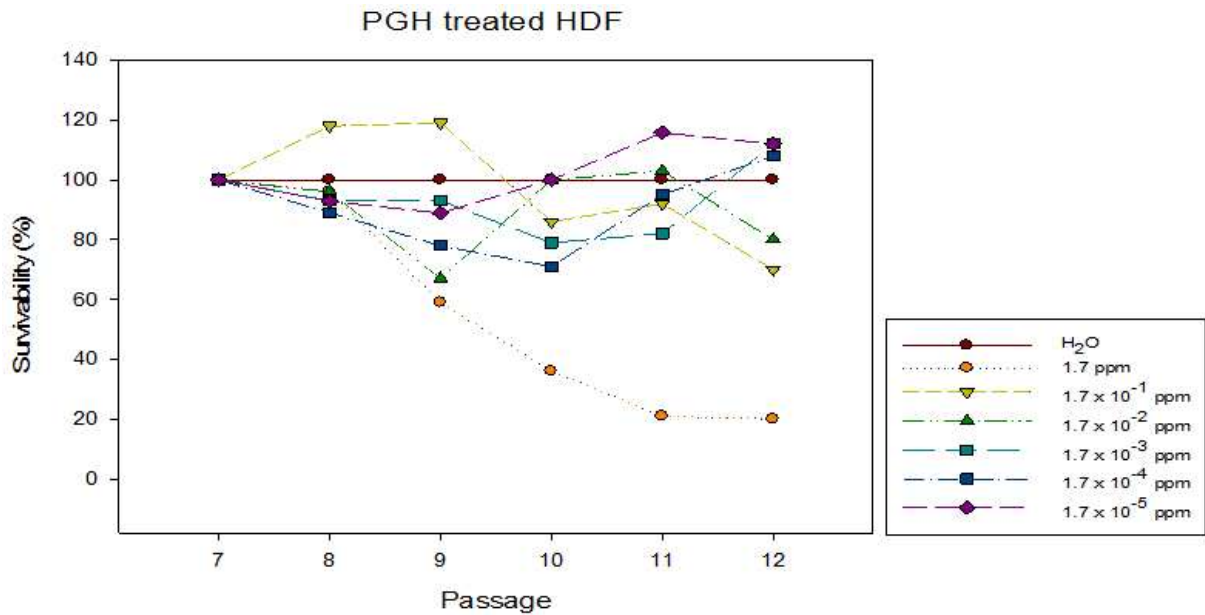


그림 50. PGH를 처리한 세포의 수 측정

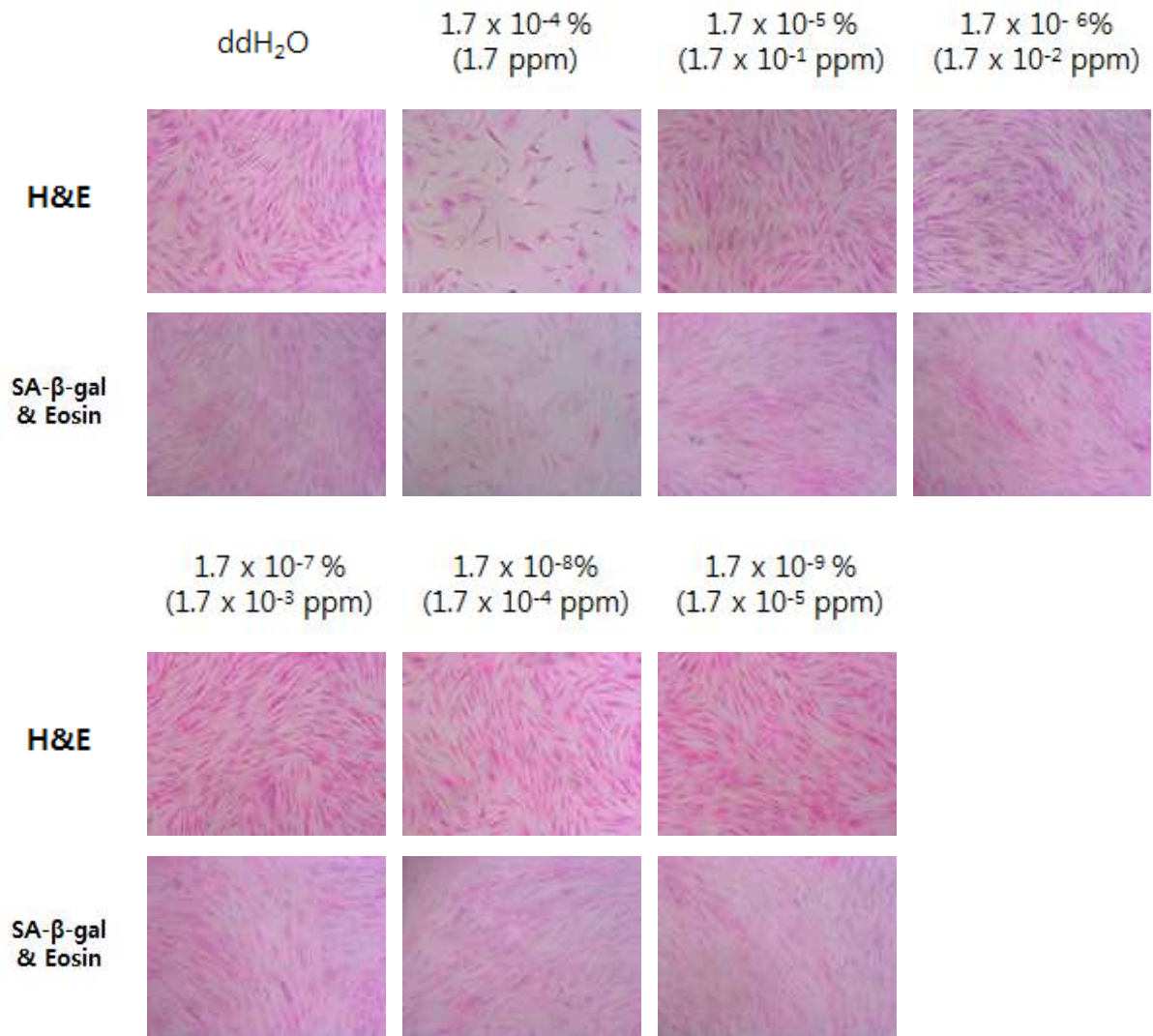


그림 51. PGH를 처리한 세포 염색

3. 결론

- 이번 연구에서 PHMG와 PGH를 각각 사람 피부세포에 대한 독성을 조사한 결과, PHMG의 LD₅₀ 농도는 약 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm), PGH는 약 3.0×10^{-4} % (3 ppm)인 것으로 확인하였음
- 계대 배양을 통한 장기적인 노출 독성을 확인해본 결과, 두 물질 모두 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm) 이하의 농도에서는 약 240 시간(10 일) 이상 노출되었을 때, 세포 사멸이 유발되는 등의 독성이 있다는 것을 확인하였음
- 본 연구진의 선행 연구에서 보고된 것과 같이 고농도(PHMG 0.03 %, 1 mM EDEA, 1 mM Gnd-HCl)에서 뿐만 아니라 저농도에서 지속적으로 노출될 시에 피부세포 생존율과 노화에 영향을 미칠 수 있다는 것을 확인하였음

생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

IV. 결론

본 과업에서는 생활화학용품에 함유된 유해물질 2 종(PHMG 및 PGH)에 대한 8 개 항목에 대하여 흡입독성시험을 포함한 8종의 시험을 수행하였다. 또한 In vitro 피부 독성에 대한 연구를 통해 피부 노화 촉진 등을 확인하였다.

PGH에 대하여 수행한 아급성 흡입독성시험은 Sprague-Dawley 랫드에 0, 0.10, 0.50 및 2.00 mg/m³의 용량으로 4 주간 반복 비부흡입노출을 실시하였으며, 추가적으로 회복군을 설정하여 노출 완료 후 14 일간 관찰하였다. 노출 종료 후 사망률, 일반증상, 체중 변화 및 사료 섭취량을 관찰하고, 혈액/혈액 생화학검사, 부검 육안 소견, 장기무게측정, 조직병리검사 및 폐내세척액(BALF) 분석 및 폐 조직에서의 생화학분석을 실시하여 독성학적 영향들을 관찰하였다. 특히 조직병리검사를 통하여 폐, 후두, 비강 및 기관에서 PGH의 반복흡입노출로 인한 호흡기계통에의 독성학적 영향을 관찰하였으며, 추가적으로 폐내세척액(BAL Fluid) 분석 및 폐내 독성학적 인자들에 대한 분석을 통해서 PGH의 폐 독성 평가도 완료하였다. 본 연구의 조건에서 시험물질인 PGH의 4 주반복흡입노출로 인한 표적 장기는 폐, 후두, 비강 및 기관으로 판단되며, 또한 무악영향관찰량(NOEL)은 수컷은 0.10 mg/m³ 및 암컷은 0.50 mg/m³으로 판단된다.

0, 13, 40 및 120 mg/kg 용량으로 수행된 PHMG에 대한 생식 및 발생독성스크리닝 시험 결과 120 mg/kg 투여군 암수동물에서 천명, 자궁탈증 등의 일반증상과 체중 및 사료섭취량 감소, 흉선의 장기중량 감소, 비장 및 폐의 장기중량 증가 등이 관찰되었다. 또한 120 mg/kg 투여군의 암수 신생자의 체중 감소도 관찰되었다. 한편 생식 및 발생학적 영향평가를 위한, 모동물의 생식장기(고환 및 난소)에 대한 조직병리학적 검사, 수태능력 평가, 분만성적 및 신생자의 사망률 및 일반증상관찰 등 생식 및 발생학적 영향평가 항목에서 시험물질에 의한 독성학적 영향은 관찰되지 않았다. 본 시험 조건에서의 무악영향관찰량(NOEL)은 수컷은 13 mg/kg/day, 암컷 및 차세대 동물은 40 mg/kg/day로 판단되었다.

0, 30, 80 및 160 mg/kg 용량으로 수행된 PGH에 대한 생식 및 발생독성스크리닝 시험 결과 고용량군인 160 mg/kg 투여군 암수동물에서 체중 감소, 수컷동물의 전립선, 흉선 및 폐의 절대중량, 암컷동물의 흉선의 절대중량 및 폐의 상대중량 증가가 관찰되었으며, 고용량군 160 mg/kg 투여군 암수동물 폐에 대한 조직병리학적 검사에서 이상소견이 관찰되었다. 한편 모든 시험물질 투여군에서 생식 및 발생학적 지표에 대한 시험물질의 영향은 관찰되지 않았다. 본 시험조건에서의 무악영향관찰량(NOEL)은 암수 각각 80 mg/kg/day로 판단되었다.

PHMG에 대한 대한 체외 염색체이상시험에서는 대사활성계 미적용 6 시간 및 22 시간 처리군에서 CHL 세포에 염색체 이상을 유발함을 관찰하였다. 또한 PGH에 대한 체외 염색체이상시험에서도 대사활성계 미적용 6시간 및 22 시간 처리군에서 CHL 세포에 염색

체 이상을 유발함을 관찰하였다. 한편 PHMG에 대한 소핵시험 결과 500 mg/kg까지 경구투여 한 경우, 수컷 마우스(ICR)의 골수에서 소핵을 가진 PCEs (MNPCEs)의 빈도는 증가하지 않았으며, PGH의 경우에는 2,000 mg/kg까지 경구투여 한 경우, 수컷 마우스(ICR)의 골수에서 소핵을 가진 PCEs (MNPCEs)의 빈도는 증가하지 않았다.

PGH에 대한 급성경피독성 시험의 경우 2,000 mg/kg 용량까지 Sprague-Dawley계통 랫드에게 단회 경피 투여한 결과, 수컷 2,000 mg/kg에서 폐사와 암수 500 mg/kg 이상 투여군에서 시험물질에 의한 임상증상으로 피부 탈색, 피부의 변색, 가피 형성, 궤양, 활동성 저하, 반응 저하, 계속 돌기, 강직성간대성경련 및 불규칙호흡이 관찰되었으며, 부검 소견으로 암컷 2,000 mg/kg 투여군에서 가피 형성이 관찰되었다. 한편 본 시험 조건에서의 LD₅₀ 값은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단된다.

또한 In vitro 피부독성 시험에서는 PHMG의 LD₅₀ 농도는 약 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm), PGH는 약 3.0×10^{-4} % (3 ppm)인 것으로 확인하였다. 그리고 계대 배양을 통하여 장기 노출 독성을 관찰한 결과 PHMG 및 PGH 모두 1.7×10^{-4} % (1.7 ppm) 이하의 농도에서는 약 240 시간(10 일) 이상 노출되었을 때, 세포 사멸이 유발되는 등의 독성이 있다는 것을 확인하였다. 이는 PHMG 및 PGH가 저농도에서 지속적으로 노출될 시에 피부세포 생존율과 노화에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

마지막으로 본 연구에서는 생활화학용품에 함유된 유해화학물질 5 종에 대한 생체외/생체내 및 in vitro 피부독성에 대한 독성자료를 수집·조사하였다. 본 연구를 통해서 향후 생활화학용품에 포함된 유해화학물질들의 안전성 관리 및 정책수립에 과학적인 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

V. 참고문헌

화학물질유해성시험방법, 제5장 건강영향 시험분야, 제22항 생식 및 발생독성 스크리닝 (국립환경과학원 고시 제 2014-1호)

Makoto Hayashi (1999) : 소핵시험, 실험법으로부터 데이터의 평가까지, 의약 안전성 연구회 모노그래피시리즈 No. 2.

화학물질유해성시험방법, 제5장 건강영향 시험분야, 제3항 급성경피독성시험 (국립환경과학원 고시 제 2013-2호)

화학물질유해성시험방법, 제5장 건강영향 시험분야, 제16항 유전독성시험(골수 세포 소핵시험) (국립환경과학원 고시 제 2014-1호)

OECD Guideline for Testing of Chemicals 421, Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test : Organisation for Economic Co-operation and Development, 1995

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG No. 412 : Subacute Inhalation Toxicity : 28-Day Study, OECD, 2009

OECD Guideline for Testing of Chemicals 402, Acute Dermal Toxicity : Organisation for Economic Co-operation and Development, 1987

OECD Guideline for Testing of Chemicals, 473, In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test : Organisation for Economic Co-operation and Development, 1997

OECD Guideline for Testing of Chemicals, 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test : Organisation for Economic Co-operation and Development, 1997

Greaves, P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies : Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, Third Edition, Elsevier, 2007

Frith C.H., Non-Proliferative Lesions of the Hematopoietic System in Rats, Guides for Toxicologic Pathology, 2000

Kulkarno et al. Aerosol Measurement : Principles, Techniques, and Applications, Wiley, 2010

Kastenbaum M.A. and Bowman K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutation Research, 1970; 9: 527-549

Maron, D. M. and Ames, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 1983; 113, 173-215

Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M. Mutagenicities of N-nitrosamines of Salmonella. Mutation Research, 1977; 48, 121-129

Claxton L.D., Allen J., Auletta A., Mortelmans K., Nestmann E. and Zeiger E. Guide for the Salmonella typhimurium/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. Mutation Research, 1987; 189(2):83-91

Park KH, Jang W, Kim KY, Kim JR, Cho KH., Fructated apolipoprotein A-I showed severe structural modification and loss of beneficial functions in lipid-free and lipid-bound state with acceleration of atherosclerosis and senescence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010; 392:295-300

Park KH, Shin DG, Cho KH. Dysfunctional lipoproteins from young smokers exacerbate cellular senescence and atherogenesis with smaller particle size and severe oxidation and glycation. Toxicol. Sci. 2014; 140:16-25

Kim JY, Kim HH, Cho KH. Acute cardiovascular toxicity of sterilizers, PHMG, and PGH : Severe inflammation in human cells and heart failure in

zebrafish. *Cardiovasc. Toxicol.* 2013; 13:148–160

Park KH, Kim JM, Cho KH. Elaidic acid (EA) generates dysfunctional high-density lipoproteins and consumption of EA exacerbates hyperlipidemia and fatty liver change in zebrafish. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2014; 58:1537–1545

Isaac Julius Asiedu–Gyekye et al. A Preliminary Safety Evaluation of Polyhexamethylene Guanidine Hydrochloride, *Int J Toxicol.* 2014 Oct 29

Ministry of health of russian federation, Report on research work “experimental estimation of maximal permitted concentration of polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) in aquatic environment”, 1993

Ha–Na Jung et al. Cytotoxicity and gene expression profiling of polyhexamethylene guanidine hydrochloride in human alveolar A549 cells, *Toxicol In Vitro.* 2014 Jun; 28(4):684–92

Jeong Ah Song et al. Polyhexamethyleneguanidine phosphate induces severe lung inflammation, fibrosis, and thymic atrophy, *Food Chem Toxicol.* 2014 Jul; 69:267–75

Sanghoon Park et al. Humidifier disinfectant–associated interstitial lung disease in an animal model induced by polyhexamethylene guanidine aerosol, *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Sep 15; 190(6):706–8

Jae–Yong Kim et al. Acute Cardiovascular Toxicity of Sterilizers, PHMG, and PGH : Severe Inflammation in Human Cells and Heart Failure in Zebrafish, *Cardiovasc Toxicol.* 2013 Jun; 13(2):148–60

Astrid Buxhaum et al. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid plus, *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jul; 58(1):193–7

Pelletier G et al. Effects of a 28-day oral exposure to a 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one biocide formulation in Sprague-Dawley rats, Drug Chem Toxicol. 2014 Apr; 37(2):149-55

Poon R et al. Effects of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and other candidate biodiesel biocides on rat alveolar macrophages and NR8383 cells, Arch Toxicol. 2011 Nov; 85(11):1419-27

Anna Ettore et al. Involvement of Oxidative Stress in Apoptosis Induced by a Mixture of Isothiazolinones in Normal Human Keratinocytes, J Invest Dermatol. 2003 Aug; 121(2):328-36

Christina L. Burnett et al. Final report of the safety assessment of methylisothiazolinone, Int J Toxicol. 2010 Jul; 29(4 Suppl):187S-213S

Opinion on the safety of poly(hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products, Scientific Committee on Consumer Safety, 2014

Committee for Risk Assessment RAC, ANNEX 1 - BACKGROUND DOCUMENT TO RAC OPINION ON - PHMB, ECHA, 2011

Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products, SCCS, 2014

Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one, SCCS, 2009

Christina L. Burnett et al. Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone, International Journal of Toxicology, 2010; 29(3) 1875 - 213S

생활화학용품 함유 유해화학물질 건강영향연구

VI. Appendix

PHMG, PGH, PHMB, CMIT 및 MIT에 대한 독성 자료

I. 서론

- 본 자료에서는 생활화학용품의 주 원료물질로 사용되는 5 종(PHMG, PGH, PHMB, CMIT 및 MIT)에 대한 독성자료를 조사하고 요약하였음

- 5 종의 물질에 대한 현재까지의 독성자료를 조사하기 위하여 본 연구진은 각각의 물질에 대하여 다음에 제시된 검색키워드를 사용하여 자료를 조사하였음

표 1. 독성자료 검색을 위한 물질별 검색 키워드

1. PHMG	<ul style="list-style-type: none"> ① 57028-96-3 ② Polyhexamethyleneguanidine hydrochloride ③ PHMG ④ PHMG chloride, PHMG hydrochloride ⑤ PHMG-phosphate ⑥ Fogucid
2. PGH	<ul style="list-style-type: none"> ① 374572-91-5 ② Oligo(2-(2-ethoxy)ethoxyethylguanidiumchloride) ③ PGH ④ Oligo(2-)ethoxy ethoxyethyl guanidine chloride ⑤ 2,2'-[1,2-Ethanediybis(oxy)]bisethanamine polymer with guanidine monohydrochloride ⑥ AKACID, AKACID PLUS
3. PHMB	<ul style="list-style-type: none"> ① 7083-27-8, 32289-58-0 ② Polyhexamethylene biguanide hydrochloride ③ PHMB ④ Poly(iminoimidocarbonyl), iminohexamethylene hydrochloride ⑤ N,N'''-1,6-Hexanediylbis(N'-cyanoguanidin
4. MIT	<ul style="list-style-type: none"> ① 2682-20-4 ② Methylisothiazolinone ③ MIT, MI ④ N-Methyl-3-oxodihydro isothiazole, 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one ⑤ N-METHYL-3-OXODIHYDRO ISOTHIAZOLE
5. CMIT	<ul style="list-style-type: none"> ① 26172-55-4 ② Methylchloroisothiazolinone ③ CMIT, MCI ④ 2-Methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-one ⑤ 2-methyl-3-isothiazolone ⑥ 2-methylisothiazol-3-one ⑦ 5-Chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone

- 표 1에서 제시된 물질별 검색 키워드에 대하여 다음의 검색 source를 활용하여 독성 자료 검색을 진행하였음

① Toxnet HSDB	② Echa
③ Google, Google Scholar	④ Science direct
⑤ Pubmed	⑥ FDA
⑦ EPA	

- 검색 방법은 물질의 cas number 로 HSDB 또는 Echa에서 독성자료 검색, 질명 또는 cas no 로 구글 및 논문 검색 웹에서 논문 검색 및 물질명 또는 cas number FDA 와 EPA에서 검색을 진행하였음

- 본 자료를 통하여 생활화학용품에 사용되고 있는 각 물질들에 대한 안전성 자료를 확보하고, 인체 유해성에 대한 예측 및 향후 생활화학용품 함유 물질들의 관리 및 규제 정책을 수립하는데 과학적인 기초자료로서 활용될 것으로 기대됨

II. 물질별 독성 자료

가. PHMG

Part 1. 경구 독성(Oral toxicity)

1. A Preliminary Safety Evaluation of Polyhexamethylene Guanidine Hydrochloride (2014)

1) 급성 및 아만성 경구독성 연구 수행(Non-GLP 시험)

2) 급성 경구독성

- ① 본 연구에서는 LD₅₀가 600 mg/kg로 도출되었음
- ② 신경독성의 증상들도 함께 관찰되었음

3) 아만성 경구독성

- ① 용량설정 : 0.006 mg/kg, 0.012 mg/kg 및 0.036 mg/kg
- ② 혈액학 및 생화학적 분석 인자들의 유의적 변화는 관찰되지 않았음
- ③ 0.006 mg/kg 및 0.036 0.006 mg/kg 용량군의 20 % 동물의 근위 세뇨관(Proximal tubule)의 변화가 관찰되었음
- ④ 모든 용량군의 10 % 동물에서 간세포 변성이 관찰되었음
- ⑤ 신장, 심장 및 신장에서 시험물질에 의한 독성학적 영향은 관찰되지 않았음

2. Report on research work “experimental estimation of maximal permitted concentration of polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) in aquatiq environment” (1993)

1) 급성 및 아급성 경구독성 연구(1993년)

- ① PHMG의 분자량(1,000 ~ 100,000)별로 급성 및 아급성 경구 독성 연구 수행

2) 급성 경구독성

- ① 랫드, 마우스 및 기니피그에 대해서 각각 연구 수행
- ② 탈염소 수돗물에 1 - 2 % 수용액 농도로 투여 실시
- ③ 투여 농도는 200에서 3,000 mg/kg 범위에서 실시
- ④ 랫드에 대한 ET₅₀ 값은 56 - 62 시간 범위에서 관찰되었음
- ⑤ 행동성 및 호흡기에서 특이적 육안소견 관찰됨
- ⑥ 표 3에서는 분자량별 급성 경구독성 시험에 대한 결과를 제시하고 있음. 이를 통해서

분자량의 차이에 따른 독성학적 영향과의 유의적 차이는 관찰되지 않았음

표 2. 급성경구독성 결과

Animal Specie	M. weight of PHMG, thousand units	LD ₅₀ , mg/kg	LD ₁₆ , mg/kg	LD ₈₄ , mg/kg	Method of calculation
White mice	1,0	450+/-53	335	598	Litchfield
	10,0	600+/-73	420	860	Litchfield
White rats	1,0	630+/-89	480	916	Litchfield
	10,0	830+/-153	460	1520	Litchfield
	100,0	760+/-130	370	1480	Litchfield
Guinea pigs	1,0	750			Deichman
	10,0	840			Deichman
	100,0	900			Deichman

3) 아급성 경구독성

① 동물종 : 수컷 랫드

② 투여 용량 :

- 저농도 : 5 ~ 25 mg/kg (분자량 : 1,000)

- 고농도 : 25 ~ 85 mg/kg (분자량 : 1,000 ~ 100,000)

③ 투여 횟수 : 1 회/1 일, 45 ~ 50일

④ 관찰 및 측정

- 체중변화

- 간, CNS 및 조혈시스템 기능 검사

- 생화학 및 혈액학적 검사

⑤ 결과 :

- 고농도군에서 체중변화, CNS 억제 및 SLI 증가가 관찰되었으며, 20에서 30일 사이에 혈액생화학적 인자들의 변화가 관찰됨

- PHMG의 반복투여는 간의 엔자임 활동성에 영향을 끼치며, 간독성 및 신경독성을 유발시킬 수 있을 것으로 예측함

Part 2. 흡입 독성(Inhalation toxicity)

1. Polyhexamethyleneguanidine phosphate induces severe lung inflammation, fibrosis, and thymic atrophy (2014)

- PHMG의 기도 내 점적 투여를 통해 폐 및 흉선에 대한 독성학적 영향 평가 수행

1) 방법 :

① 동물종 : C57BL/7 마우스

② 투여 용량 : 0.3 mg/kg, 0.9 mg/kg 및 1.5 mg/kg, 단회 투여

③ 관찰 및 측정

- 체중변화 및 일반증상 관찰

- 흉선, 비장 및 폐의 절대/상대 중량 측정

④ 검사 및 분석

- 조직병리학적 검사(폐, 흉선 및 비장)

- 싸이토카인 분석(폐내 염증 관련 인자)

- 생화학분석: 폐 섬유화 및 T cell 발현 관련 인자

2) 결과

① 폐내 독성학적 영향: 용량의존적인 폐내 염증 및 섬유화와 관련된 독성학적 영향 확인

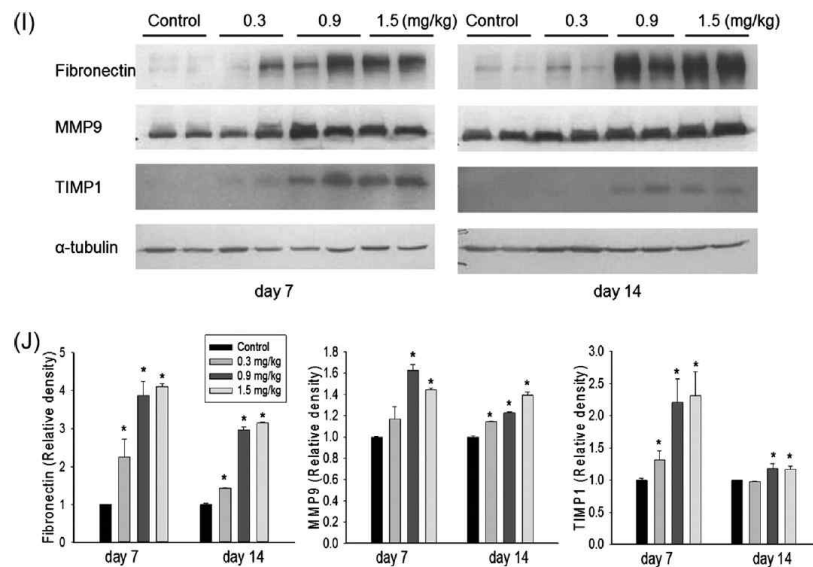


그림 1. 폐내 염증 및 섬유화 관련 바이오마커 분석 결과

② 흉선에 대한 영향 평가: PHMG로 인한 T cell의 발현 억제 등을 통하여 면역 메카커니즘에 영향을 미치고 이는 폐에서의 염증 악화 및 섬유화에도 연관성을 나타낼 수 있음을 확인

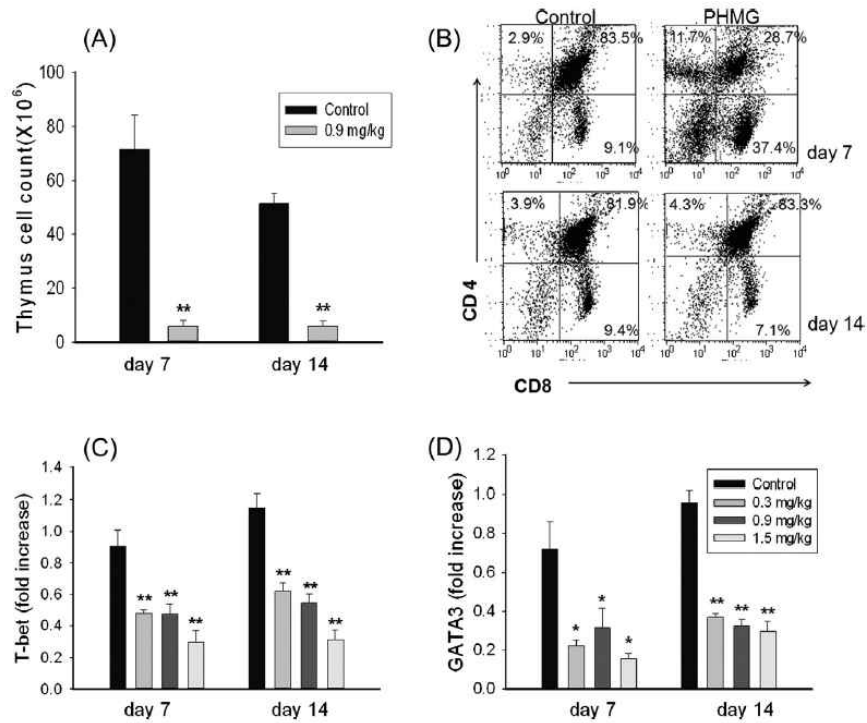


그림 2. T cell의 발현 관련 바이오마커 분석 결과

2. Humidifier disinfectant-associated interstitial lung disease in an animal model induced by polyhexamethylene guanidine aerosol (2014)

- 랫드 모델에서 PHMG의 흡입노출과 폐내 손상과의 연관성 연구 수행하여 임상에서의 환경성 폐 질환을 실험 동물 모델에서 동일하게 확인

1) 동물종 : Sprague-Dalwey 랫드

2) 노출 :

① 노출농도 : 1.6 mg/m³

② 노출기간 : 6 시간/1 회, 5 회/1 주, 4 주 반복

3) 평가 :

① CT 이미지 분석

② 조직병리학적 검사

4) 결과 :

① CT 이미지 분석 : 임상 환자와 유사한 폐 내 손상 확인

② 조직병리학적 검사 : 임상 환자와 동일하게 염증 악화 및 섬유증 등 증상 관찰

Part 3. 피부 자극성 및 부식성(Irritation & corrosivity)

1. Report on research work “experimental estimation of maximal permitted concentration of polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) in aquatic environment” (1993)

1) 피부 흡수성 및 자극성 연구(1993)

① 기니피그 및 토끼에 대한 피부 흡수 및 자극성 연구 수행

2) 피부 흡수성

① 기니피그의 피부(1.5 × 2 cm) 부위에 수행

② 투여 농도 범위 : 2.0 - 20.0 mg/ml

③ 결과 : 피부 흡수성은 관찰되지 않았음

3) 피부 자극성

① 토끼에 대하여 수행하였으며, 투여를 완료한 직후, 15 ~ 20분, 1 일, 3 일, 5 일 및 10 일 간격으로 증상을 관찰하였음

② 결과 : 피부 자극성은 관찰되지 않았음

Part 4. 세포독성(Cytotoxicity)

1. Acute Cardiovascular Toxicity of Sterilizers, PHMG, and PGH: Severe Inflammation in Human Cells and Heart Failure in Zebrafish (2012)

1) 목적 : Human cell에서 PHMG로 유발되는 세포독성 및 노화 확인

2) 방법 :

① 리포단백질 분석 : human LDL, HDL2 및 HDL3

- 처리농도 : 0.00003 ~ 0.3 %

② LDL 산화 분석 : 처리농도 0.3 %

③ Anti-atherosclerotic assay

- 세포주 : THP-1

④ 피부노화분석

- 세포주 : HDFs (Human dermal fibroblasts)

3) 결과 :

① apoA-I과의 연동을 통한 HDL의 전기이동성의 변화를 확인. 이를 통해서 PHMG의 정상 용량에서도 동맥경화의 가능성 확인

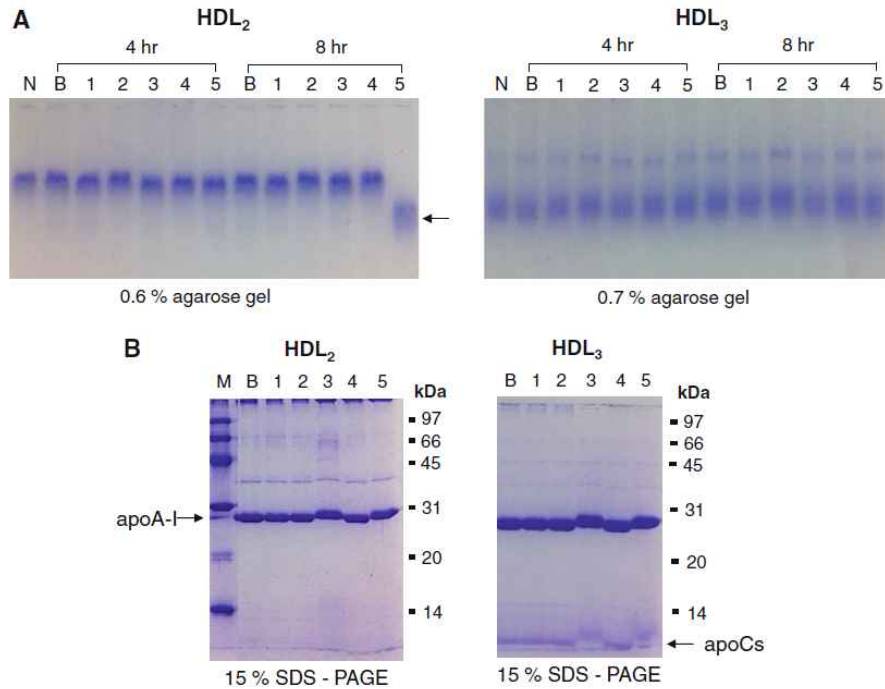


그림 3. PHMG 처리 후 human HDL의 전기영동 프로파일 비교

② LDL 산화분석 : PHMG 처리 시 대조군에 비하여 LDL의 산화도를 증가시켰음을 확인

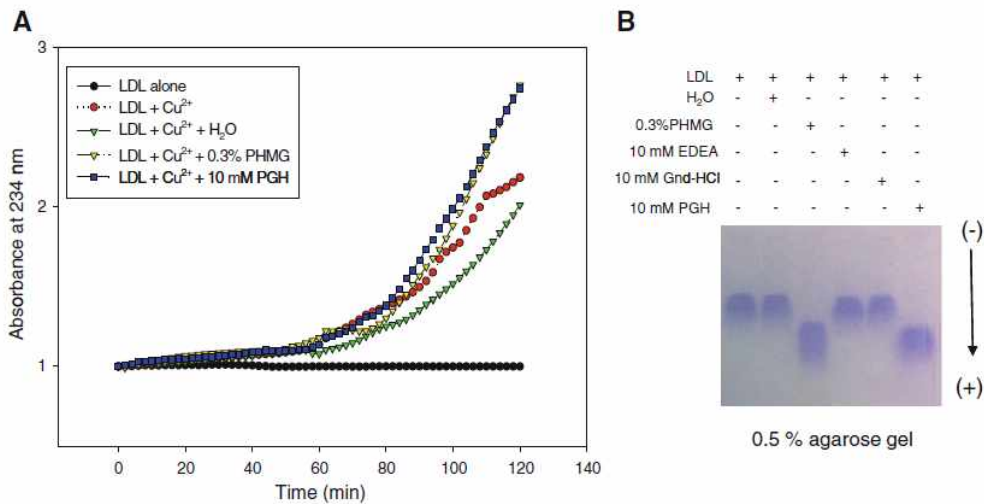


그림 4. PHMG 처리 후 human HDL의 전기영동 변동성

②피부 노화 : 0.03 %의 PHMG 처리군의 SA-β-gal-positive-cell의 가장 높은 계수 확인. 한편 정상세포의 경우 가장 낮은 계수 확인. 이를 통해 PHMG의 세포 노화 확인

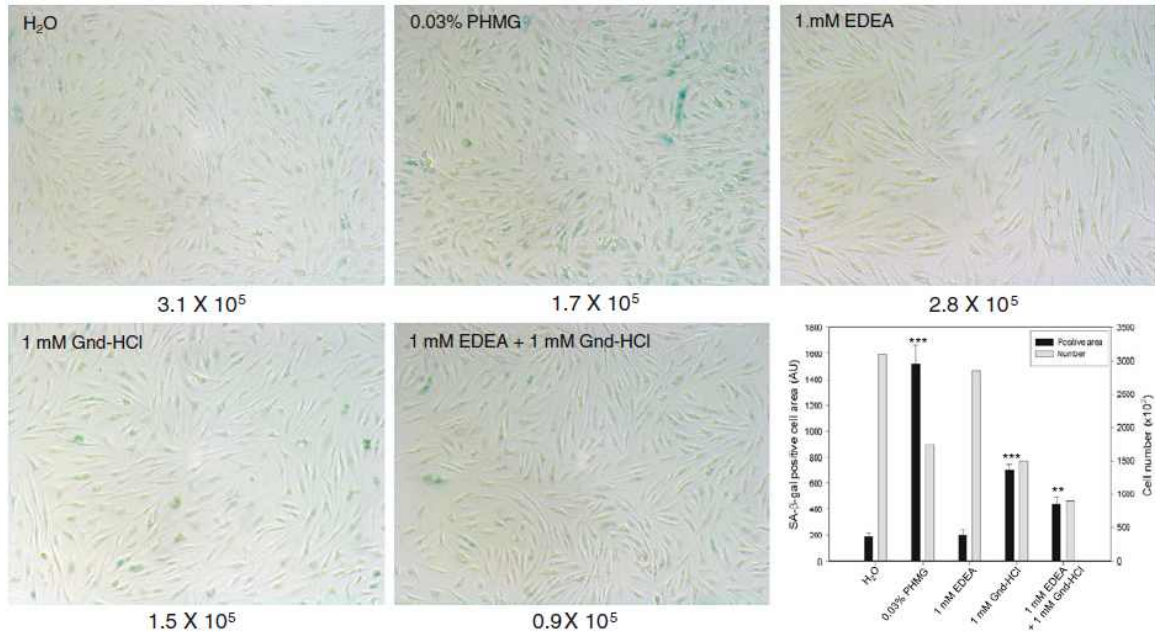


그림 5. HDF (Human dermal fibroblasts)에서의 세포 노화 확인

2. Cytotoxicity and gene expression profiling of polyhexamethylene guanidine hydrochloride in human alveolar A549 cells (2014)

1) 목적 : PHMG로 유발되는 세포에서의 독성학적 영향평가와 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행되었음

2) 방법 :

① 세포주 : A549 human alveolar 세포

② 분석 및 측정 :

- 세포생존도 : MTT assay

- ROS 분석 : 세포내 ROS 형성 분석

- Microarray : 유전자 발현 영향 평가(5 µg/mL 농도에서 진행)

- Western blot 및 apoptosis assay 수행

3) 결과 :

① 세포생존도 : 세포생존도 평가를 통하여 PHMG의 세포에 대한 독성학적 영향 확인

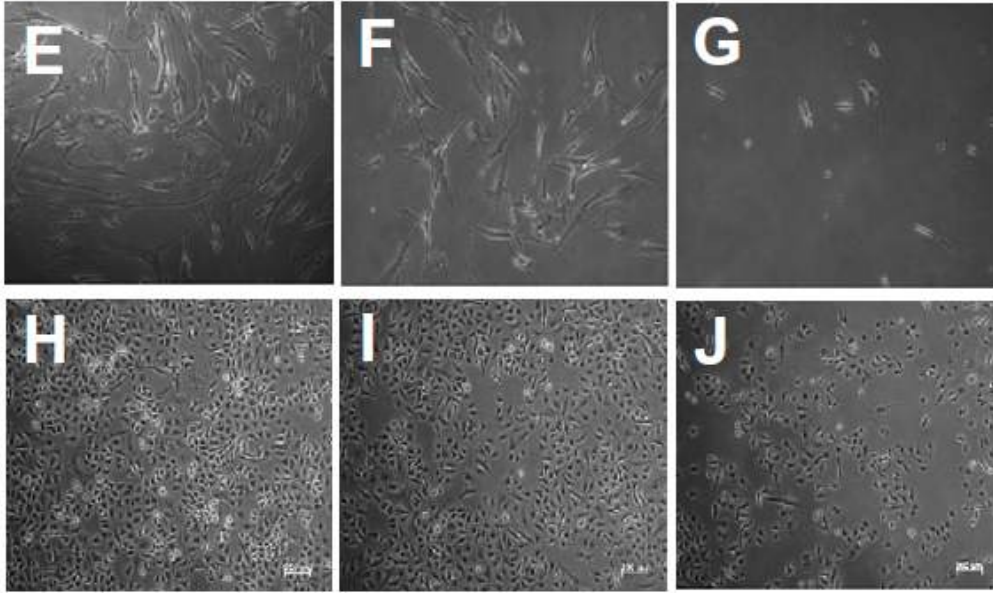


그림 6. 세포 생존도 평가 결과(E&H : 0 $\mu\text{g/mL}$, F&I : 2 $\mu\text{g/mL}$, G&J : 5 $\mu\text{g/mL}$)

② ROS 분석 : 대조군에 비해서 용량상관적인 ROS 증가 확인

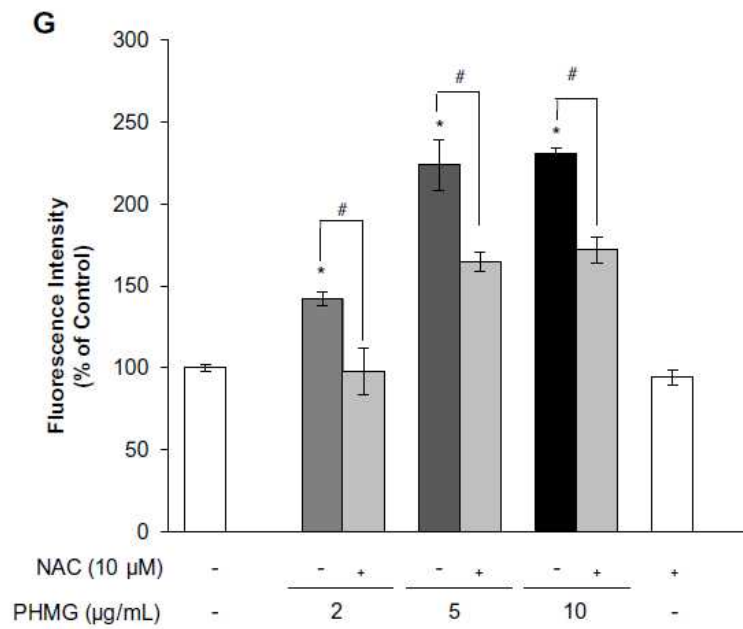


그림 7. 세포내 ROS 측정 결과

③ 유전자 발현 분석 : 세포자살(Apoptosis), 자가포식(Autophagy), 섬유화(Fibrosis) 및 cell cycle과 PHMG의 연관성 확인

나. PGH

- PGH의 경우 본 자료를 작성하기 위한 정보 수집과정에서 가장 낮은 정보수집 빈도를 나타내었음. 모든 키워드에서 PGH와 관련된 독성학적 정보는 거의 수집되지 않았음

Part 1. 경구 독성(Oral toxicity)

1. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid plus (2006)

- PGH와 PHMG가 1 : 3으로 혼합된 Akacid plus[®] 에 대한 급성경구독성 확인

1) 방법 :

① 동물종 : 랫드

② 투여 용량 :

- 예비시험 : 200 mg (as active ingredient)/kg

- 본 시험 : 2000 mg (as active ingredient)/kg 까지 증가

③ 부검 : 투여 14일 후 부검

2) 결과 :

① 암컷 및 수컷 각 1 마리씩 사망

② LC₅₀ : 2,000 mg/kg 이상으로 판단

Part 2. 경피 독성(Dermal toxicity)

1. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid plus (2006)

- PGH와 PHMG가 1:3으로 혼합된 Akacid plus[®] 에 대한 급성 경피 독성 확인

1) 방법 :

① 동물종 : Sprague-Dawley 랫드(암수 각 n = 5)

② 투여 용량 : 2,000 mg/kg

2) 결과 :

① 사망동물 없음

② 체중변화 : 관찰되지 않음

③ LC₅₀ : 2,000 mg/kg 이상으로 판단

Part 3. 피부 자극성 및 부식성(Irritation & corrosivity)

1. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid plus (2006)

- PGH와 PHMG가 1 : 3으로 혼합된 Akacid plus[®] 에 대한 피부 자극성/부식성 확인

1) 방법 :

- ① 동물종 : New Zealand white rabbit (암컷 n = 3)
- ② 투여 용량 : 1.5 g (20 % 수용액)
- ③ 관찰 : 패치 제거 후 1, 24, 47 및 72 시간 쯤 관찰

2) 결과 : 피부자극성 관찰되지 않음

Part 4. 세포독성(Cytotoxicity)

1. Acute Cardiovascular Toxicity of Sterilizers, PHMG, and PGH : Severe Inflammation in Human Cells and Heart Failure in Zebrafish (2012)

1) 목적 : Human cell에서 PGH로 유발되는 세포독성 및 노화 확인

2) 방법:

① 리포단백질 분석 : human LDL, HDL2 및 HDL3

– 처리농도: 0.001 ~ 10 mM

② LDL 산화 분석 : 처리농도 10 mM

③ Anti-atherosclerotic assay

– 세포주 : THP-1

④ 피부노화분석

– 세포주 : HDFs (Human dermal fibroblasts)

3) 결과 :

① apoA-I과의 연동을 통한 HDL의 전기이동성의 변화를 확인. 이를 통해서 PGH의 정상 용량에서도 동맥경화의 가능성 확인

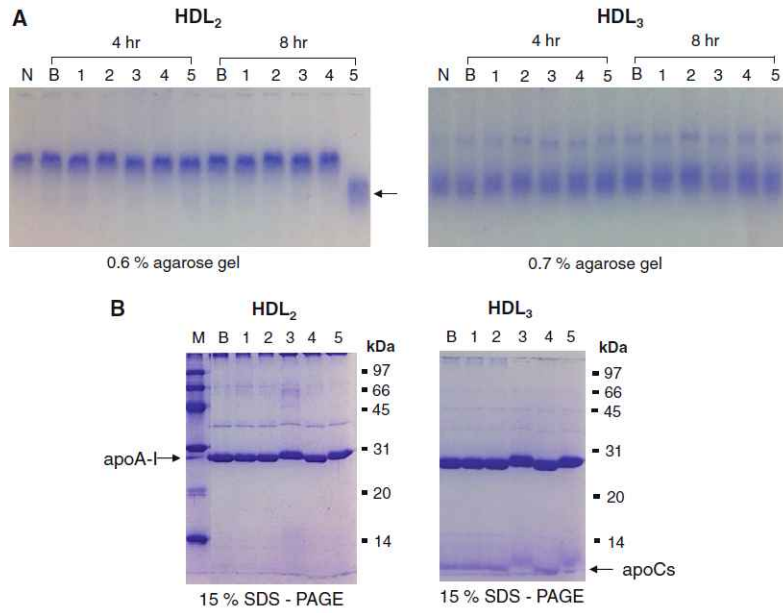


그림 8. PGH 처리 후 human HDL의 전기영동 프로파일 비교

② LDL 산화분석 : PGH 처리 시 대조군에 비하여 LDL의 산화도를 증가시킴을 확인

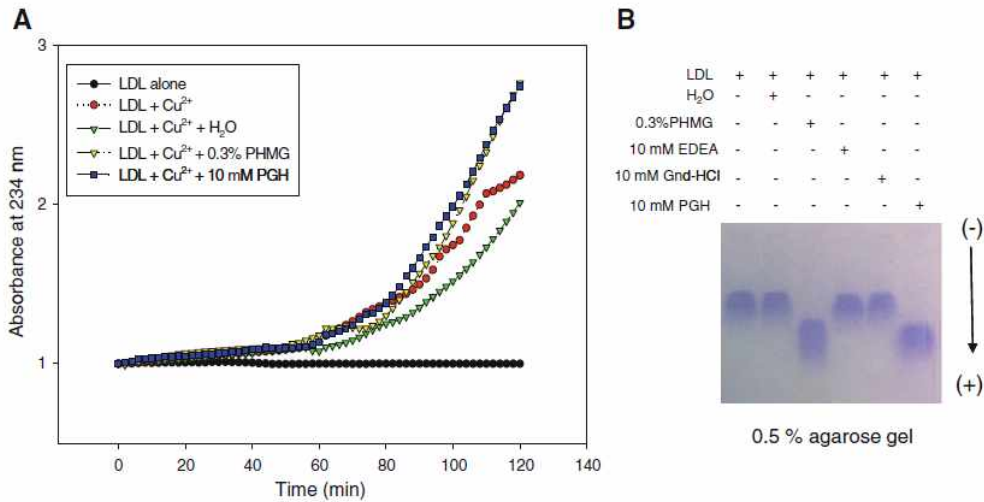


그림 9. PGH 처리 후 human HDL의 전기영동 변동성

② 피부 노화 : 10 mM의 PGH 처리군의 SA-β-gal-positive-cell의 계수가 EDEA에 비하여 3.6 배 높았음. 한편 정상세포의 경우 가장 낮은 계수 확인. 이를 통해 PHMG의 세포 노화 확인

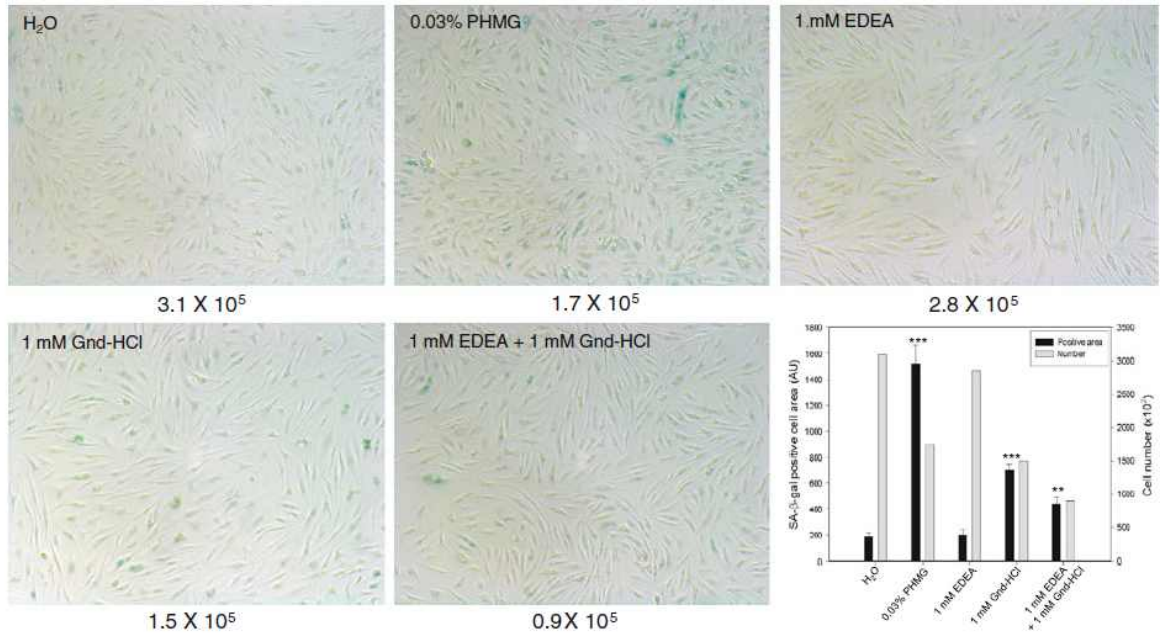


그림 10. HDF (Human dermal fibroblasts)에서의 세포 노화 확인

다. PHMB

Part 1. 경구 독성(Oral toxicity)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

1-1. 급성 경구 독성

1.

가이드라인	OECD TG 425
동물종	Sprague-Dawley 랫드 (암컷 n = 6)
투여 용량	550 및 2,000 mg/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 사망 : 2,000 mg/kg 투여군 모두 사망
- ② 일반증상: 2,000 mg/kg 투여군에서 신경독성의 징후 관찰
- ③ 부검 시 소견 : 폐, 간, 신장, 위에서 육안소견 관찰
- ④ LD₅₀ : 1,049 mg/kg

2.

가이드라인	OECD TG 401에 준하여 수행
동물종	Alderley Park 랫드 (군당 n=5)
투여 용량	700, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 5,000 mg/kg
투여	Stomach tube
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 일반증상 : 모든 투여군에서 관찰, 8일 이후 회복
- ② 사망 :
 - 수컷 : 2,000 mg/kg에서 1 마리, 2,500 mg/kg에서 2 마리, 3,000, 3,500, 5,000 mg/kg에서 각 4 마리
 - 암컷 : 2,000 mg/kg에서 1 마리, 2,500 mg/kg에서 2 마리, 3,000 mg/kg에서 5 마리, 3,500 mg/kg에서 4 마리, 5,000 mg/kg에서 5 마리
- ③ 수컷 LD₅₀ : 549 mg/kg

④ 암컷 LD₅₀ : 501 mg/kg

1-2. 반복 경구 독성(아급성)

1.

가이드라인	-
동물종	Alpl:ApfSD 랫드
투여 용량	0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml
군 구성	각 군당 암수 각 8 마리
시험 기간	28 일
투여 방법	Drinking water
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 사망률 : 고농도군의 암수 각 1 마리 사망
- ② 임상병리검사 : 고농도군에서 콜레스테롤 수치, ALP 및 AST 변화 관찰
- ③ 장기무게 : 신장에서 용량 상관적인 변화 관찰
- ④ NOAEL : 산출되지 않았음, LOAEL : 0.1 mg/ml

1-3. 반복 경구 독성(만성)

표 3. 만성 경구 독성 요약

No.	시험기간	시험군 구성	투여 용량	결과
1.	1 년	-Beagle dog - 군당 암수컷 n = 4	- 300, 1,500, 4,500 ppm (11주차에 3,000 ppm으로 조정)	- 4,500 PPM에서 다양한 독성학적 영향들이 관찰되어 3,000 ppm으로 조정 - 피부, 간, 신장 및 고환에서 조직 병리학적 병변이 관찰됨 - NOAEL : 54 mg/kg으로 판단
2.	2 년	- Alpk:APf 랫드 - 군당 암수컷 n = 63	- 0, 200, 600, 2,000 PPM	- 일반증상, 안검사, 혈액학적 검사 및 뇨검사에서 증상이 관찰되지 않았음 - NOEAL : 36 ~ 45 mg/kg으로 판단

Part 2. 경피 독성(Dermal toxicity)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

2-1. 급성 경피 독성

표 4. PHMB 급성 경피 독성 자료 요약

No.	가이드라인	동물종	투여 용량	LD50
1.	OECD 402	Sprague-Dawley 랫드	5,000 mg/kg	>5,000 mg/kg - 사망동물 및 일반증상 없음
2.	OECD 402	Sprague-Dawley 랫드	400 mg/kg	>400 mg/kg - 사망동물 및 일반증상 없음

2-2. 반복 경피 독성

가이드라인	OECD TG 410
동물종	Alpl:ApfSD 랫드
투여 용량	0, 20, 60, 200 mg/kg
군 구성	각 군당 암수 각 5 마리
시험 기간	30 일
투여 방법	Occlusive, 하루 6 시간
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 사망동물 : 관찰되지 않았음
- ② 체중변화, 사료섭취량, 장기무게, 임상병리 : 변화가 관찰되지 않았음
- ③ 60 및 200 mg/kg 투여군에서 용량 상관적인 피부 자극성 관찰
- ④ NOAEL : 20 mg/kg bw/day

Part 3. 흡입 독성(Inhalation toxicity)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

3-1. 급성 흡입 독성

가이드라인	OECD TG 403
동물종	Wistar 랫드 (군당 n=5)
투여 용량	0.1, 0.3 및 0.5 mg/L
노출 시간	4 시간
MMAD	1.49 ~ 2.20 μm
GSD	1.84 ~ 2.29

- 결과

① 사망률 :

- 0.3 mg/L 노출군 : 수컷 3 마리
- 0.5 mg/L 노출군 : 수컷 5 마리, 암컷 3 마리

② 체중변화 : 노출군별로 일시적인 체중변화를 보였으나, 회복되었음

③ 부검 시 소견: 0.3 및 0.5 mg/L 노출군 동물의 폐 및 기관에서 변색 관찰

④ LC₅₀ :

- 수컷 : 0.29 mg/L
- 암컷 : 0.48 mg/L

3-2. 반복 흡입 독성

가이드라인	OECD TG 412
동물종	Alpl:ApfSD 랫드
노출 용량	0, 0.025, 0.25, 2.5 mg/m ³
군 구성	각 군당 암수 각 5 마리
시험 기간	28 일 노출 및 13 주 회복기간
투여 방법	Nose-only, 6 시간/1 일, 5 일/1 주, 4 주 반복

- 결과

① 사망률 및 일반증상 : 관찰되지 않았음

- ② 체중변화 : 중농도 및 고농도군에서 약간의 체중 감소 관찰
- ③ 장기 중량 : 고농도 군에서 폐 및 흉선 무게 증가가 관찰
- ④ 조직병리검사 :
 - 중농도 및 고농도군의 후두에서 편평 상피 회생 관찰
 - 고농도군 폐에서 염증 관찰
 - 고농고군 기관에서 염증 관찰
- ⑤ NOAEL : 0.0239 mg/m³

Part 4. 피부 자극성 및 부식성(Irritation & corrosivity)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

4-1. 피부 자극성

- 피부 자극성의 경우 현재까지 3종의 시험이 진행된 것으로 조사되었음(표 5참조)

표 5. 피부 자극성 시험 요약

No.	동물종	시험법 및 농도	판정		결과
			홍진	부종	
1.	토끼	-NA -20 % 수용액	24 ~ 72간 사이 1.9	0.5 : Intact 0.8 : Abraded	- 홍진은 24 ~ 72 시간 사이에 관찰되었음 - 부종은 24 시간에 관찰되었으며 72에는 관찰되지 않았음
2.	토끼	- OECD 404 - 95% 고체	1.0	0.2	- 투여 후 1 시간에서 자극성 관찰되지 않았음 - 4 시간째 자극성 지수 : 1.0 - 홍진 : 패치 제거 후 4시간째 관찰 - 부종: 24 ~ 48 시간째 관찰 - 7 일째 피부자극 관찰되지않음
3.	토끼	- OECD 404 -20 % 수용액	2.0	0.0	- 모든 동물에서 24 시간 이후 홍진 관찰 - 부종 : 관찰되지 않음
4.	토끼	- OECD 404 -96 % 고체	0	0	- 홍진 및 부종 관찰되지 않음

4-2. 안자극성

가이드라인	OECD TG 405 (GLP Study 수행)
동물종	White New Zealand 토끼 (수컷 1마리)
투여 용량	0.1 ml (96 % PHMB)
투여법	점적투여

- 결과 : 투여 후 24 시간 쯤 부터 염증이 관찰되었으며, 21 일째 자극성이 관찰되었음

Part 5. 피부 민감성(Skin sensitisation)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

5-1. 동물시험

PHMB의 피부 민감성을 조사하기 위하여 6 개의 시험들이 기니피그에 대하여 수행되었음. 이러한 시험들을 종합해 볼 때 PHMB의 경우 동물에서 피부 민감성을 유발하는 것으로 판단됨

표 6. 피부 민감성 동물시험 요약

No.	가이드라인	Induction concentration	Challenge concentration	결과
1.	Maximisation test OECD 406	ID : 0.06 % Topical : 20 %	6 % PHMG : 15 % 20 % PHMB : 50 %	6 % : 민감성 없음 20 % : 강한 민감성 관찰
2.	Maximisation test	ID : 0.2 % Topical : 20 %	20 % PHMB : 62.5 %	강한 민감성 관찰
3.	Buehler test	Topical : 2%	2 % PHMB : 60 %	강한 민감성 관찰
4.	Buehler test	Topical : 0.3 ~ 5%	0.03 ~ 15 %	1.2 % 이상에서 중간에서 강한 민감성 관찰
5.	Maximisation test	ID : 0.25 % Topical : 20 %	2 % PHMG : 2.5 %	민감성 없음
6.	Maximisation test OECD 406	ID : 0.15 % Topical : 20 %	2 % PHMG : 1 % 10 % PHMB : 10 %	민감성 없음

5-2. 인체시험

PHMB는 오랜 기간 동안 수영장의 물 소독제로서 사용되어 왔으며, 현재까지 2 종의 RIPT 시험과 3 종의 패치 테스트가 수행된 것으로 조사되었음

표 7. 피부 민감성 인체시험 요약

No.	시험방법	민감도	결과
1.	RIPT	0/26	- 24 시간동안 1 % PHMB에 노출 후 3 ~ 4주에 걸쳐 9 ~ 12번 1 시간동안 햇빛에 노출시킴 - 6 주차에 1 % PHMB에 challenge시킴 - 민감도는 관찰되지 않았음
2.	RIPT	예비시험 : 8/49(16 %) 본 시험 : 18/115(16 %) 추가시험 : 1/28(3 %)	- 4 주 동안 10 차례 2 ~ 4%에 노출 - 6 주차에 0.05 ~ 2% PHMB에 challenge시킴 - 양성반응이 각각 원편과 같이 관찰되었음
3.	패치테스트	2.5 % PHMB : 6/1552 (0.4 %)	- 화장품과 의약품에 대하여 접촉성 피부염을 보유한 환자에 대하여 2.5 % PHMB에 노출시켰으며, 원편과 같은 비율로 양성반응이 관찰되었음
4.	패치테스트	2.5 % PHMB : 10/1975(0.5 %) 5 % PHMB : 16/1975(0.8 %)	- 2.5 % 및 5 %에 각각 10 명 및 16 명이 양성반응을 나타냄
5.	패치테스트	2.5 % PHMB : 2/347 (0.5 %)	- 2 명의 지원자가 양성반응을 나타냄

Part 6. 변이원성/유전 독성(Mutagenicity/Genotoxicity)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

6-1. In vitro 유전독성

No.	시험법	시험계	투여용량	결과	
				+ S9	- S9
1.	OECD 471	Salmonella typhimurium	+S9 : 0.063, 0.31, 1.57, 7.84, 39.2, or 98 µg/plate -S9 : 0.063, 0.31, 1.57, 7.84, 39.2, or 98 µg/plate	음성	음성
2.	OECD 473	Human lymphocytes	+S9 : Donor 1 : 4.9, 19.6, and 36.8 µg /ml ; Donor 2 : 4.9, 9.8, and 49 µg /ml -S9 : Donors 1 and 2 : 0.98, 4.9, and 9.8 µg /ml	음성	음성

6-2. In vivo 유전독성

No.	시험법	동물종	투여 용량	샘플링 시간	결과
1.	소핵시험 OECD 474	C57BL 마우스	250 및 400 mg/kg 암수 각 n=5	투여 후 24, 48 및 72 시 간	- 본 시험조건 하에서 염 색체 이상은 유발되지 않았음
2.	랫드 간을 이용한 DNA synthesis법	수컷 Alpk:A PrSD 랫드	147 및 294 mg/kg	투여 후 4 시 간 및 12 시 간	- 본 시험조건 하에서 랫 드 간에서의 DNA 손상 은 발현되지 않았음

Part 7. 발암성(Carcinogenicity)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

- 랫드에 대한 경구 발암성 시험에서는 혈관육종(haemangiosarcoma)이 2,000 ppm 투여군에서 증가함이 관찰되었음. 하지만 최근에 본 시험의 결과가 용량 상관적인 영향을 판단하는데 불충분하다고 보고되고 있음
- 마우스에 대한 경구 발암성 시험에서는 750 mg/kg 투여군에서 혈관육종(haemangiosarcoma) 유의적으로 증가함이 관찰되었음
- 마우스에 대한 경피 발암성 시험에서는 PHMG가 피부에 대한 발암을 유발하지 않는 것으로 예측되었지만, 750 mg/kg 투여군 암컷의 간에서는 혈관육종(haemangiosarcoma)의 유의적 증가가 관찰되었음

Part 8. 생식 독성(Reproductive toxicity)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

8-1. 차세대 독성(Reproductive toxicity)

No.	투여 경로	시험 법	시험종	투여용량	결과
1.	경구	2 세대 시험	랫드 (각 군당 암수 각 n = 26)	200, 600 및 2,000 ppm	<p>교배전 기간 동안 F0과 F1 동물에서 고농도 투여 시 체중감소</p> <p>생식지표 및 후세대 신체발달지표에는 어떠한 영향도 미치지 않음</p> <p>600과 2,000 ppm에서 F0 수컷의 부고환의 상대중량의 감소 (-4 %와 -8 %)</p> <p>200과 600 ppm에서 F2 수컷의 부고환의 절대중량의 감소 (-32 %와 -40 %)가 나타났으나 상대중량의 차이는 관찰되지 않음</p> <p>600 ppm에서 F1 수컷의 고환의 상대중량의 증가는 고농도는 2,000 ppm에서 이와 유사한 소견이 관찰되지 않았기 때문에 우발적인 소견으로 판단됨</p> <p>600 ppm에서 F2 수컷의 절대중량의 감소가 관찰되었으나 상대중량의 차이가 없고 고농도군에서 관찰되지 않았고 조직학적 소견이 동반되지 않았기 때문에 독성학적 중요성은 없는 것으로 판단됨</p> <p>PHMB 처치는 출생한 새끼 생존률에 어떠한 영향도 주지 않았지만 출생후 22 일까지 생존한 새끼의 산자수는 F1과 F2 세대에서 감소</p> <p>출생 후 1 ~ 5 일 사이에 출생 새끼의 사망자수가 출생후 5 ~ 22일 사이에 출생 새끼의 사망자수보다 높았으나 이것은 주변 환경에 의한 모체의 스트레스에 기인된 것으로 판단됨</p>
2.	경구	3 세대 시험	랫드 (각 군당 수컷 10 마리 및 암컷 20 마리)	0, 200, 650, 1,300 ppm	<p>20 % PHMB 투여는 친세대의 사료섭취량, 생존율, 임상증상, 수태율 및 생식성적에 어떠한 영향도 미치지 못했음. F3의 중간농도와 고농도군에서 약간의 체중 감소가 관찰되었고 이는 시험물질 투여에 기인된 것으로 판단됨</p> <p>생식성적과 성비, 태아중량, 이유 기간 동안 새끼 관찰항목에서 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음. 이유부검군의 동물에서는 시험물질과 관련된 육안적 소견은 관찰되지 않았고, 배태아 발생독성에서도 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음</p>

8-2. 발생 독성(Developmental toxicity)

No.	투여 경로	시험법	시험종	투여용량	결과
1.	경구	OECD 414	랫드 (암컷 20 ~ 22)	13, 54, 112 mg/kg	<p>모체 : 54와 112 mg/kg/day 투여된 모체에서 유의성 있는 체중감소와 사료섭취량의 감소가 관찰되었음</p> <p>태아 : 착상 전 소실과 착상 후 소실 및 태자중량에서는 어떠한 영향도 미치지 않았으나 112 mg/kg/day 농도에서 갈비뼈수과다가 유의성 있게 증가하였고 이것은 시험물질이 기형유발물질이 아닌 모독성에 의한 태아독성을 유발하는 것을 나타냄</p>
2.	경구	OECD 414	New Zealand 토끼 (암컷 20)	10, 20, 40 mg/kg	<p>모체 : 고농도군에서 모체사망률이 증가함. 고농도군에서 임신 8 ~ 14 일 사이에 사료섭취량이 감소하였고 체중감소가 나타남. 고농도군의 사망동물 부검시 약물의 접촉부위인 위와 맹장에서 육안적소견이 관찰됨. 고농도군에서 투여 후에는 사료섭취량이 증가하였고 마지막 체중은 대조군과 유사하게 나온 것으로 보아 투여 후에는 회복됨</p> <p>태아 : PHMB투여에 태아수, 성장, 및 태아사망률의 변화는 관찰되지 않았음. 40 mg/kg군에서 약간의 착상 전 소실이 관찰되었지만 이는 통계적인 차이가 인정되지 않았고 투여는 착상 후에 이루어졌기 때문에 시험물질 투여에 의한 것이 아닌 것으로 판단됨</p> <p>20 mg/kg에서는 착상 후 소실이 유의성 있게 증가하였으나 고농도에서 관찰되지 않았고 용량상관성이 인정되지 않기 때문에 투여에 의한 영향으로 판단되지 않음</p> <p>고농도군에서 복장뼈(흉골)분절의 골화부진 및 유착이 증가하였지만 이는 시험물질투여와 관련이 없는 것으로 사료됨</p> <p>PHMB는 기형유발 물질이 아닌 것으로 판단됨</p>

Part 9. 생태독성(Ecotoxicity)

참고문헌 : Opinion on the safety of poly (hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products

- 물고기, 무척추동물 및 조류에 대한 LC₅₀ 및 EC₅₀는 1 mg/L 이하로 관찰되었으며, 갑각류의 경우 물고기와 조류에 비해 덜 민감한 것으로 관찰되었음. 또한 PHMB의 경우 생물학적 분해도가 크지 않으며, 광화학적으로 안정하기는 하지만 PHMB의 물리화학적 특성에 기초해 볼 때 생물농축성을 크지 않을 것으로 알려짐

표 8. 다양한 수계 생물에 대한 생태독성 시험 요약

	종	시험조건	LC ₅₀ /EC ₅₀ (µg/L)	NOEC (µg/L)
물고기	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 시간 flowthrough	26	9.8
무척추 동물	<i>Daphnia magna</i>	48 시간, 정상상태	90	< 20
조류	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 시간, 정상상태	11.4	4.6
침전물 동물	<i>Chironomus riparius 2</i>	28 일		196

라. CMIT/MIT

Part 1. 경구 독성(Oral toxicity)

참고문헌 : Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

1-1. 급성 경구 독성

표 9. 급성 경구 독성 요약

No.	동물종	결과
1.	랫드	수컷 : LD ₅₀ > 5,000 mg/kg bw 암컷 : LD ₅₀ 3,310 mg/kg bw
2.	랫드	LC ₅₀ (Bliss' method) : 490 mg/kg bw LC ₅₀ (Litchfield & Wilcoxon's method) : 472 mg/kg bw
3.	랫드	수컷 LD ₅₀ : 465 mg/kg bw 암컷 LD ₅₀ : 393 mg/kg bw
4.	랫드	암컷 LD ₅₀ : 0.5 and 5.0 g/kg/bw

1-2. 반복 경구 독성

1. Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

가이드라인	OECD TG 409 (GLP Study 수행)
동물종	비글견(암수 각 n = 58)
시험물질	14 % CMIT/MIT (10.2% CMIT, 3.8% MIT)
투여 용량	0, 101, 363, 555 mg (a.i.)/kg
투여법	Diet
시험기간	90일

- 결과

- ① 사망동물 : 관찰되지 않음
- ② 체중변화 : 고농도군에서 체중 증가율 감소 관찰
- ③ 사료섭취량 : 중농도 및 고농도군에서 관찰
- ④ 임상병리검사, 안검사, 장기무게변화 : 유의성 없음

⑤ 부검 육안소견 및 조직병리검사 : 특이 사항 없음

⑥ NOAEL : 555 mg (a.i.)/kg

2. Effects of a 28-day oral exposure to a 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one biocide formulation in Sprague-Dawley rats (2014)

시험기간	28 일
투여법	Gavage
투여 용량	0, 0.26, 0.78, 2.33, 7.0 mg/kg

- 결과

- ① 고농도군의 수컷에서 혈청 중성 지방의 감소 관찰
- ② 고농도군의 암컷에서 간 대사 효소의 증가 관찰
- ③ 고농도군의 간에서 조직병리학적 병변 관찰

Part 2. 경피 독성(Dermal toxicity)

참고문헌 : Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

2-1. 급성 경피 독성

표 10. 급성 경피 독성 요약

No.	동물종	결과
1.	토끼	암컷 LD ₅₀ : >5000 mg/kg bw
2.	랫드	LD ₅₀ : 1008 mg/kg bw

2-2. 반복 경피 독성

1.

가이드라인	-
동물종	Sprague-Dawley 랫드(암수 각 n = 10)
시험물질	14 % CMIT/MIT (10.2 % CMIT, 3.8 % MIT)
투여 용량	0, 0.75, 3.75, 18.75 mg/kg
GLP	준하여 수행
시험기간	91 일

– 결과

- ① 사망동물 : 시험물질 투여와 관련된 사망동물 관찰되지 않았음
- ② 체중변화 및 사료섭취량 : 변화 없음
- ③ 증상 : 흥진 관찰
- ④ 임상병리, 안검사, 부검 육안 소견, 조직병리 : 특이사항 없음
- ⑤ 피부 반응성 : 중농도 및 고농도군에서 양성
- ⑥ 가피 형성 : 용량의존적으로 관찰됨
- ⑦ NOAEL : < 0.104 mg/kg

2.

가이드라인	–
동물종	New Zealand 토끼(암수 각 n = 6)
시험물질	14.6 % CMIT/MIT (12.1 % CMIT, 2.5 % MIT)
투여 용량	0, 100, 200, 400 ppm (유효성분)
GLP	준하여 수행
시험기간	90 일

– 결과

- ① 사망동물 : 12 마리 사망(고농도 : 4 마리, 중농도 : 5 마리, 저농도 : 3 마리)
- ② 체중변화 및 사료섭취량 : 변화 없음
- ③ 증상 : 사료섭취력 감소, 설사 관찰
- ④ 임상병리, 안검사, 부검 육안 소견, 조직병리 : 특이사항 없음
- ⑤ 흥진 : 용량 상관적인 발생 관찰
- ⑥ 임상병리 및 노분석 : 특이사항 관찰되지 않음

Part 3. 흡입 독성(Inhalation toxicity)

참고문헌 : Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

3-1. 급성 흡입 독성

표 11. 급성 흡입 독성 요약

동물종	결과
랫드	LD ₅₀ : 2.36 mg/L

3-2. 반복 흡입 독성

1.

가이드라인	OECD 412 (GLP Study 수행)
동물종	랫드, CRL : CD(SD)BR (암수 각 n = 16)
시험물질	14 % CMIT/MIT (10.2 % CMIT, 3.8 % MIT)
투여 용량	0, 0.34, 1.15, 2.64 mg/m ³
노출 및 시험기간	6 시간/1 일, 5 일/1 주, 13 주

- 결과

- ① 사망동물 : 시험물질 노출과 관련된 사망동물 관찰되지 않았음
- ② 체중변화 및 사료섭취량 : 고농도 군에서 체중 감소 관찰
- ③ 증상 : 호흡곤란 등 관찰
- ④ 혈액검사: 고농도군에서 protein 레벨 감소
- ⑤ 장기무게 : 고농도군 비장의 감소 관찰
- ⑥ 조직병리검사 : 비강 등 호흡기계통에서의 병변 관찰
- ⑦ NOEL : 0.34 mg/m³

Part 4. 피부 자극성 및 부식성(Irritation & corrosivity)

참고문헌 : Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

1975년부터 2002년 사이에 CMIT/MIT에 대한 피부자극성, 안점막 자극성 및 호흡기 자극성에 대한 독성 자료를 살펴보면 CMIT/MIT를 세정제로 사용 시의 조건하에서의 자극성은 없는 것으로 조사되었음

표 12. 자극성/부식성 독성 요약

피부 자극성			
No.	용량/농도	동물종	결과
1.	1.5 % (유효성분농도)	토끼	자극성 관찰
2.	14.2 % (유효성분농도)	토끼	자극성 관찰
안점막 자극성			
3.	100 PPM (0.01 % 유효성분 농도)	토끼	음성
호흡기 자극성			
4.	407 µg/L	랫드	RD ₅₀ : 69 µg/L

Part 5. 피부 민감성(Skin sensitisation)

참고문헌 : Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

다음의 시험 결과들을 근거로 CMIT/MIT는 동물에 대한 피부 민감성이 높은 것으로 보고되었음

표 13. 피부 민감성 요약

GMPT			
No.	용량/농도	동물종	결과
1.	1.5 % (유효성분농도)	기니피그	56 ppm에서 음성
2.	14.05 % (유효성분농도)	기니피그, 암컷	30 및 50 ppm에서 음성
3.	7.5, 4 %	기니피그, 암컷	민감성 양성
4.	14.2 %	기니피그	10, 7.5, 2.5 및 0.025 %에서 양성
LLNA			
5.	14.05 % (유효성분농도)	마우스, 수컷	EC ₃ : 30 ppm

Part 6. 변이원성/유전 독성(Mutagenicity/Genotoxicity)

참고문헌 : Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

6-1. In vitro 유전독성

- 박테리아에 대한 유전자 돌연변이 시험 결과 CMIT/MIT가 복귀돌연변이체 수를 증가시키는 것으로 확인되었음. 또한 포유류 세포에 대한 복귀돌연변이 시험 결과 마우스의 림프종 세포에서 돌연변이의 증가를 확인하였음

표 14. In vitro 유전 독성 요약

No.	시험법	결과
1.	복귀돌연변이 : Salmonella typhimurium 및 Saccharomyces cerevisiae	TA100 strain에서 양성
2.	복귀돌연변이 : Salmonella typhimurium	S9-mix 없이 TA100 strain에서 양성
3.	복귀돌연변이 : Salmonella typhimurium	TA100 strain에서 양성
4.	복귀돌연변이 : Salmonella typhimurium	TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537에서 양성
5.	MLA	양성
6.	MLA	양성
7.	UDS assay	음성
8.	염색체이상시험	음성

6-2. In vivo 유전독성

- 동물에 대한 소핵시험을 포함한 유전독성 결과 변이원성은 없는 것으로 관찰되었음

표 15. In-vivo 유전 독성 요약

No.	시험법	용량	결과
1.	염색체 이상시험(랫드)	단회 투여 및 5 일 반복(경구) 최대용량 : 28 gm/kg	음성
2.	염색체 이상 시험(마우스)	단회 투여 및 5 일 반복(경구) 최대용량 : 30 mg/kg	음성
3.	염색체 이상 시험(마우스)	단회 투여(경구) 최대용량 : 20 mg/kg	음성
4.	마우스 소핵 시험	단회 투여(경구) 최대용량 : 50 mg/kg	음성
5.	마우스 소핵 시험	2 회 반복(경구) 4.17 mg/kg	음성
6.	UDS assay	단회 투여(경구) 최대용량 : 500 mg/kg	음성
7.	UDS assay	단회 투여(경구) 최대용량 : 60 mg/kg	음성

Part 7. 발암성(Carcinogenicity)

참고문헌 : Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

7-1. 반복 경구

가이드라인	OECD 453
동물종	랫드, CRL : CD(SD)BR (수컷 n = 850, 암컷 n = 450)
시험물질	14.2 % CMIT/MIT
투여 용량	30, 100, 300 ppm (유효성분)
시험기간	2 년
GLP	준하여 수행

- 결과

- ① 사망동물 : 관찰되지 않음
- ② 체중변화 및 사료섭취량변화 : 중농도군까지는 관찰되지 않음, 고농도군에서는 체중 변화가 관찰되었음
- ③ 음수섭취량 : 모든 투여군에서 음수섭취량 감소 관찰(저농도: 0-22%, 중농도: 3 ~ 30 %, 고농도 : 15 ~ 40 %)

- 일별 음수 섭취량을 기준으로 고농도군이 MTD (Maximum tolerated dose)로 판단되었음

- ④ 임상병리, 안검사, 뇨검사 및 장기 무게 변화: 유의적 변화 관찰되지 않음
- ⑤ 조직병리검사 : 특이적 병변 관찰되지 않음
- ⑥ NOEL : 300 PPM, NOEL : 30 ppm

7-2. 반복 경피

가이드라인	-
동물종	CD-1 마우스 (수컷 n = 120)
시험물질	1.5 % CMIT/MIT
투여 용량	0, 400 ppm (유효성분)
시험기간	30 주

- 결과

- ① 사망동물 : 관찰되지 않음
- ② 증상 : 투여군에서 가피 형성 관찰
- ③ 피부에서의 조직병리검사 : 과형성, 염증, 병소 등 관찰
- ④ 그 외에 타 장기에서는 병변이 관찰되지 않음
- ⑤ 피부 발암성은 없는 것으로 판단

Part 8. 유전특성(Reproductive toxicity)

참고문헌 : Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one

8-1. 차세대 영향 시험

가이드라인	OECD 416
동물종	Cr1 : CD®BR 랫드 (암수컷 각 n = 26)
시험물질	14.76 % CMIT/MIT
투여 용량	0, 30, 100, 300 ppm (유효성분)
투여 경로	경구

- 결과

- ① 사망동물 및 사료섭취량 : 변화가 관찰되지 않았음
- ② 체중변화 : 체중증가의 감소가 P1에서 관찰

- ③ 조직병리검사 : P1 및 P1의 위에서 병변 관찰 (100 및 300 ppm)
- ④ NOAEL : 30 ppm (P1 : 2.8 ~ 4.4 mg/kg, P2 : 4.3 ~ 5.5 mg/kg)
- ⑤ NOEL : 300 ppm (P1 : 22.7 ~ 28.0 mg/kg, P2 : 35.7 ~ 39.1 mg/kg)

8-2. 최기성 시험

표 16. 최기성시험 요약

No.	동물종	투여경로	결과
1.	랫드	경구	NOEL : > 15 mg/kg
2.	랫드	경구	모계 NOAEL : ≤ 3.95 mg/kg 난독성 NOAEL : ≥ 19.6 mg/kg
3.	토끼	경구	NOAEL : > 5.49 mg/kg
4.	토끼	경구	모계 NOAEL: 2 mg/kg NOEL : 8 mg/kg

Part 9. 세포독성(Cytotoxicity)

1. Involvement of Oxidative Stress in Apoptosis Induced by a Mixture of Isothiazolinones in Normal Human Keratinocytes (2003)

1) 목적 : 사람의 keratinocyte에서 CMI/MI 혼합물의 세포독성기전 확인

2) 연구방법

① 시험물질 :

- CMI/MI 혼합물

② 세포주 : 사람의 keratinocyte

③ 측정 및 분석 :

- Cytotoxicity & cell viability

- Cellular DNA content

- Phosphatidylserine expression

- Transmembrane potential

- ROS production

- Caspase-3, -8, -9 activity

- Fas expression

3) 결과 :

① CMI/MI 혼합물은 사람의 keratinocyte의 cell viability를 농도 의존적으로 감소시킴

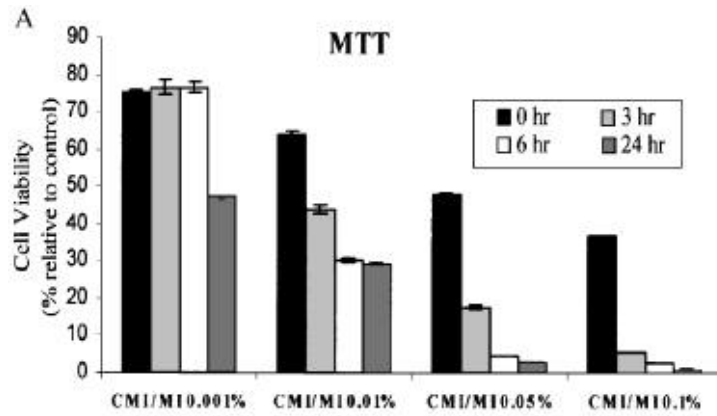


그림 11. CMI/MIT의 농도별 세포 생존율 측정 결과

- ② CMI/MIT 혼합물은 저농도에서 apoptosis를 유도하고, 고농도에서는 necrosis를 일으킴
- ③ CMI/MIT 혼합물에 의해 유도된 apoptosis와 necrosis의 주요기전은 ROS 발생과 관련됨

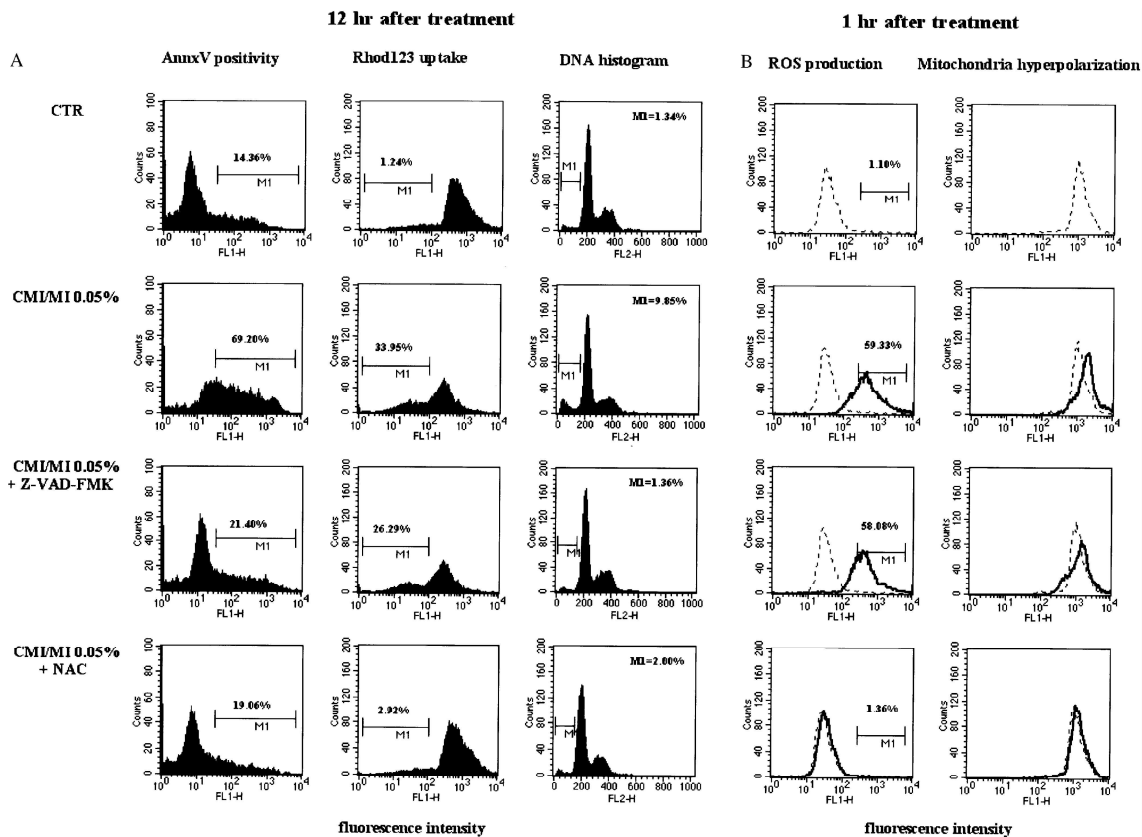


그림 12. CMI/MIT 처리군별 산화도 측정 결과

마. CMIT

Part 1. 세포독성(Cytotoxicity)

1. Effects of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and other candidate biodiesel biocides on rat alveolar macrophages and NR8383 cells (2011)

1) 목적 : CMIT의 폐 세포에서의 독성학적 영향을 평가하고 유사한 물질 간 독성학적 수준을 비교 및 분석

2) 연구방법

① 시험물질 :

- CMIT
- 1.2 % MIT
- MDC
- DAMD

② 세포주 : 마우스 폐 대식세포(Macrophage) 및 NR8383

③ 측정 및 분석 :

- LDH
- Chemiluminescence
- TNF- α

3) 결과

① Zymosan-induced Chemiluminescence 측정을 통한 식세포(Phagocyte) 산화물 배출의 현격한 증가 및 zymosan-induced TNF- α 측정을 통한 세포 사이토카인 배출을 확인하였음

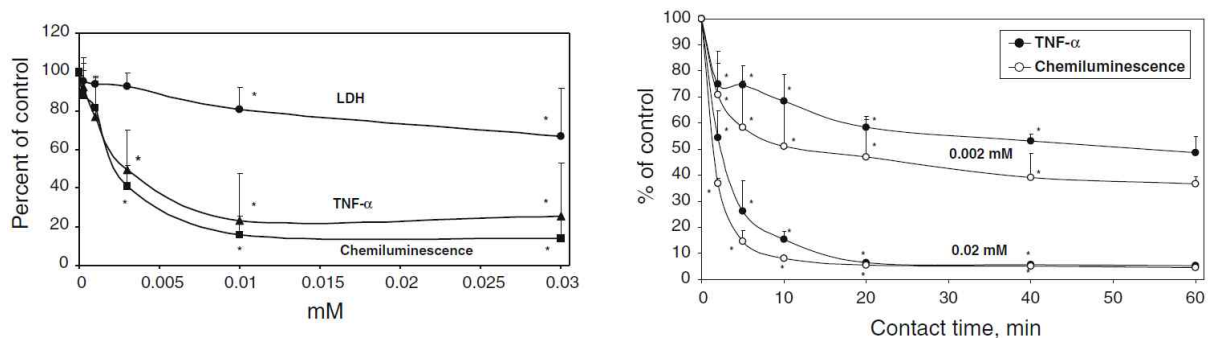


그림 13. CMIT의 농도 및 접촉 처리 시간에 따른 세포 독성 평가 인자들의 변화

② 마우스 폐 대식세포(Macrophage) 및 NR8383에서의 CMIT 처리에 따른 LC₅₀는 0.002 ~ 0.004 mM 범위에서 평가되었음

③ CMIT의 경우 타 물질에 대해서 가장 높은 독성을 나타냈으며, MDC, MIT, DMAD 순으로 독성이 감소함을 확인하였음

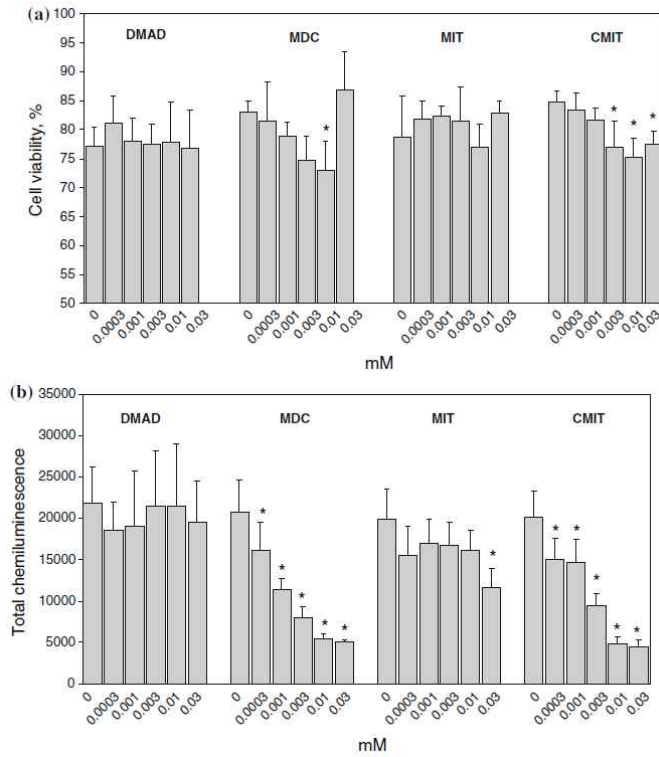


그림 14. 물질별 세포생존율 및 Chemiluminescence 측정 결과

마. MIT

Part 1. 경구 독성(Oral toxicity)

참고문헌 : Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone
(Christina L. Burnett et al., 2010)

1-1. 급성 경구 독성

1.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD BR 랫드 (36 male, 24 female)
투여물질(순도)	MIT(99.7 %)
투여 용량	수컷 : 75, 150, 180, 225 및 300 mg/kg 암컷 : 75, 150, 180 및 225 mg/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

① 사망 :

- 수컷 : 300 mg/kg에서 6 마리, 225 mg/kg에서 12 마리 중 4 마리
- 암컷 : 180 mg/kg에서 6 마리 중 4 마리, 225 mg/kg에서 6 마리 중 5 마리

② 일반증상 : 암컷 투여군 모두와 150 mg/kg 이상의 수컷 투여군에서 투여 1 시간
부 터 관찰됨

③ 부검 시 소견 : 위, 소장에서 육안소견 관찰

④ LD₅₀ : 수컷 235 mg/kg, 암컷 183 mg/kg

2.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD BR 랫드 (24 male, 18 female)
투여물질(순도)	Neolone(MIT 9.69 %)
투여 용량	수컷 : 2,000, 2,500, 3,000, 및 5,000 mg/kg 암컷 : 1,000, 1,500 및 2,000 mg/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 일반증상 : 모든 투여군에서 투여 1 시간 이후부터 4 일째 까지 나타남
- ② 사망:
 - 수컷 : 2,000 mg/kg에서 1 마리, 2,500 mg/kg에서 3 마리, 3,000 mg/kg에서 2 마리, 5,000 mg/kg에서 6 마리
 - 암컷 : 1,000 mg/kg에서 1 마리, 1500 mg/kg에서 6 마리, 2,000 mg/kg에서 5 마리
- ③ 부검 시 소견 : 위, 소장에서 육안소견 관찰
- ④ 수컷 LD₅₀ : 2,834 mg/kg
- ⑤ 암컷 LD₅₀ : 1,091 mg/kg

3.

가이드라인	-
동물종	Crj:CD(SD)IGS 랫드
투여물질(순도)	Anionic body lotion containing 100ppm MIT
투여 용량	물과 1 : 9로 희석하여 20 mL/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 일반증상: 없음
- ② LD₅₀: >2000mg/kg

4.

가이드라인	-
동물종	Crj:CD(SD)IGS 랫드
투여물질(순도)	Generic shampoo containing 100ppm MIT
투여 용량	물과 1 : 9로 희석하여 20 mL/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 일반증상 : 절반의 동물에서 투여 2시간 후에 나타남
- ② LD₅₀ : > 2000 mg/kg

5.

가이드라인	-
동물종	Crj:CD(SD)IGS 랫드
투여물질(순도)	High-SPF sunscreen containing 100ppm MIT
투여 용량	물과 1 : 9로 희석하여 20 mL/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 일반증상 : 없음
- ② LD₅₀ : > 2000 mg/kg

6.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD BR 랫드 (군당 n=6)
투여물질(순도)	MIT (51.4 %)
투여 용량	150, 180, 225 및 300 mg/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

- ① 사망 :
 - 수컷 : 180 mg/kg에서 4 마리, 225 mg/kg에서 1 마리, 300 mg/kg에서 6 마리
 - 암컷 : 150 mg/kg에서 4 마리, 180 mg/kg에서 5 마리, 225 mg/kg에서 5 마리
- ② 일반증상 : 투여 후 7 일째까지 일반증상이 관찰
- ③ 부검 시 소견 : 위에서 육안소견 관찰
- ④ 수컷 LD₅₀ : 232 ~ 249 mg/kg
- ⑤ 암컷 LD₅₀ : 120 mg/kg

7.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD-1(ICR)BR 마우스 (군당 n = 6)
투여물질(순도)	MIT (97.5 %)
투여 용량	150, 200 및 250 mg/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

① 사망 :

-수컷: 150 mg/kg에서 2 마리, 200 mg/kg에서 4 마리, 250 mg/kg에서 6 마리

-암컷: 150 mg/kg에서 2 마리, 200 mg/kg에서 5 마리, 250 mg/kg에서 6 마리

② 일반증상 : 모든 군에서 투여 1 시간 후부터 일반증상이 관찰

③ 부검 시 소견 : 위에서 육안소견 관찰

④ LD₅₀ : 167 mg/kg

8.

가이드라인	-
동물종	랫드 (군당 n = 6)
투여물질(순도)	MIT metabolite NMMA (100 %)
투여 용량	1000, 2,500 및 5,000 mg/kg
투여	Gavage
관찰기간	14 일

- 결과

① 사망 :

-수컷 : 2,500 mg/kg에서 1 마리, 5,000 mg/kg에서 5 마리

-암컷 : 2,500 mg/kg에서 1 마리, 5,000 mg/kg에서 4 마리

② 일반증상 : 5,000 mg/kg 투여군에서 일반증상이 관찰

③ 부검 시 소견 : 사망동물의 위에서 육안소견 관찰

④ 수컷 LD₅₀ : 3,550 mg/kg

⑤ 암컷 LD₅₀ : 4,100 mg/kg

1-2. 반복 경구 독성(아급성)

1.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD BR 랫드
투여물질(순도)	MIT (97.5 %)
투여 용량	0, 75, 250 및 1,000 ppm
군 구성	각 군당 암수 각 10 마리
시험 기간	90 일
투여 방법	Drinking water
관찰기간	-

- 결과

- ① 사망 : 사망동물 없음
- ② 임상증상 : 1,000ppm 투여군에서 체중증가율의 감소가 관찰되었고, 1,000ppm 투여군 수컷에서 사료섭취량 감소가 관찰되었으며 250, 1,000ppm 투여군 암컷과 수컷 전 투여군에서 음수량 감소가 관찰
- ③ 임상병리검사 : 변화 없음
- ④ 장기무게 : 변화 없음
- ⑤ NOAEL : 1,000ppm

2.

가이드라인	-
동물종	Beagle 도그
투여물질(순도)	MIT (51.4 %)
투여 용량	0, 100/130, 400 및 1,500ppm
군 구성	각 군당 암수 각 4 마리
시험 기간	90 일
투여 방법	Fed diet
관찰기간	-

- 결과

- ① 사망 : 사망동물 없음
- ② 임상증상 : 1,500ppm 투여군에서 투여 1 주차에 대조군과 비교하여 체중체중증가율의 감소가 관찰되었으나 3 주차(수컷), 4 주차에 대조군수준으로 회복

- ③ 임상병리검사 : 변화 없음
- ④ 장기무게: 변화 없음
- ⑤ NOEL : 400ppm
- ⑥ NOAEL : 1,500ppm

Part 2. 경피 독성(Dermal toxicity)

참고문헌 : Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone (Christina L. Burnett et al., 2010)

2-1. 급성 경피 독성

1.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD BR 랫드
투여물질(순도)	MIT (97.5 %)
투여 용량	100, 200, 300(수컷) 및 400 mg/kg
군 구성	각 군당 암수 각 6 마리
투여 방법	Occlusive, 하루 24 시간
관찰기간	14 일

- 결과

① 사망

- 수컷 : 300 mg/kg에서 5 마리, 400 mg/kg에서 5 마리
- 암컷 : 200 mg/kg에서 3 마리, 400 mg/kg에서 6 마리

② 임상증상 : 모든 투여군에서 투여 1 일째부터 관찰되었고, 200 mg/kg 이상의 투여군에서 체중증가율 감소가 관찰되었으며, 모든 투여군의 피부에서 창백, 부종, 가피, 탈수 등이 관찰됨

③ 부검 시 소견 : 위에서 육안소견 관찰

④ LD₅₀ : 242 mg/kg

2.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD BR 랫드
투여물질(순도)	Neolone (MIT 9.69 %)
투여 용량	193.8, 339.2, 484.5 mg/kg
군 구성	각 군당 암수 각 6 마리
투여 방법	Occlusive, 하루 24 시간
관찰기간	14 일

- 결과

① 임상증상 : 암컷 339.2 mg/kg과 484.5 mg/kg 투여군 2 일과 3 일에, 수컷 484.5 mg/kg 투여군 1 마리에서 배변량 감소가 관찰되었고, 피부에서 창백, 부종, 가피, 탈수 등이 관찰됨

② LD₅₀ : 484.5 mg/kg

Part 3. 흡입 독성(Inhalation toxicity)

참고문헌 : Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone (Christina L. Burnett et al., 2010)

3-1. 급성 흡입 독성

1.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD BR 랫드 (군당 n=6)
투여물질(순도)	MIT (97.8 %)
투여 용량	0.046, 0.012, 0.15, 1.07 및 2.09 mg/L
노출 시간	4 시간
노출 챔버	Nose-only

- 결과

① 사망

-수컷 : 1.07 과 2.09 mg/L에서 6 마리, 0.15 mg/L에서 3 마리

-암컷 : 1.07 과 2.09 mg/L에서 3 마리, 0.15 mg/L에서 5 마리

② 임상증상 : 관찰되었음

③ 부검 시 소견 : 폐의 모든 엽에서 약간의 발적이 관찰되었고, 산발적인 pinpoint foci와 가스로 팽창 되어있는 위가 관찰

④ LC₅₀ : 0.11 mg/L

2.

가이드라인	-
동물종	CrI:CD BR 랫드 (군당 n = 5)
투여물질(순도)	MIT (53.52 %)
투여 용량	0.15, 0.25, 0.47 및 0.68 mg/L
노출 시간	4 시간
노출 챔버	Nose-only

- 결과

① 사망

-수컷 : 0.25 mg/L에서 2 마리 0.47 mg/L에서 1마리, 0.68 mg/L에서 5마리

-암컷 : 0.25 mg/L에서 3 마리 0.47 mg/L에서 3마리, 0.68 mg/L에서 4마리

② 임상증상: 0.25 mg/L 암컷 노출군에서 체중증가율 감소가 관찰

③ 부검 시 소견: 사망동물에서 폐의 창백, 발적 및 장의 팽창이 관찰

④ LC₅₀ : 0.35 mg/L

Part 4. 피부 자극성 및 부식성(Irritation & corrosivity)

참고문헌 : Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone
(Christina L. Burnett et al., 2010)

4-1. 피부 자극성

표 18. 피부 자극성 시험 요약

No.	동물종	시험물질 및 농도	시험방법	결과
1.	New Zealand White rabbit (12 male)	MIT(97.8 %)	1, 3 시간 도포 (semi-occluded) 3 분 도포 (uncuffed)	- 1 시간 이상 도포에서 피부부식성 관찰
2.	New Zealand White rabbit (6 male)	Neolone950 (MIT 9.69 %) 100 ppm	4 시간 도포 (semi-occluded)	- 피부자극성 없음
3.	New Zealand White rabbit (6 male)	Neolone950 (MIT 10 %) 100, 300, 1,000 ppm	14 일 반복 도포 (nonoccluded)	- 피부자극성 없음
4.	4 Eiderm skin construct	MIT (1.7, 51.5 %)	3, 60 분 노출 후 MTT assay 로 측정	- 51.5 %의 농도로 60 분간 노출시킨 Epiderm skin에서 피부부식성 관찰

4-2. 안자극성(Ocular irritation)

1.

가이드라인	-
동물종	New Zealand White rabbit 수컷 6 마리
투여물질(순도)	Neolone 950 (MIT 9.69 %)
투여 방법	100 ppm으로 희석하여 24 시간 도포
관찰기간	투여 후 1, 24, 48, 72 시간에 관찰

- 결과 : 자극성이 관찰되지 않음

2.

가이드라인	-
동물종	Kbl:JW rabbit 수컷 6 마리
투여물질(순도)	Neolone 950 in shampoo 100 ppm (MIT 0.01 %)
투여 방법	점적투여
투여 용량	0.1 mL
관찰기간	투여 후 1, 24, 48, 72 시간 관찰 이후 21 일간 1 회/일 관찰

- 결과 : 자극성이 관찰되지 않음

3.

가이드라인	-
동물종	Kbl:JW rabbit 수컷 6 마리
투여물질(순도)	Neolone 950 in Body lotion 100 ppm (MIT 0.01 %)
투여 방법	점적투여
투여 용량	0.1 mL
관찰기간	투여 후 1, 24, 48, 72 시간 관찰 이후 21 일간 1 회/일 관찰

- 결과 : 자극성이 관찰되지 않음

4.

가이드라인	-
동물종	Kbl:JW rabbit 수컷 6마리
투여물질(순도)	Neolone 950 in high-SPF sunscreen 100ppm (MIT 0.01%)
투여 방법	점적투여
투여 용량	0.1mL
관찰기간	투여 후 1, 24, 48, 72 시간 관찰 이후 21일간 1회/일 관찰

- 결과 : 자극성이 관찰되지 않음

Part 5. 피부 민감성(Dermal sensitization)

참고문헌 : Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone (Christina L. Burnett et al., 2010)

표 19. 피부 민감성 동물시험 요약

No.	동물종	시험물질 및 농도	시험방법	결과
1.	Dunkin-Hartley guinea pig (24 female)	MIT(0.015 %)	Maximization test	- 민감성 없음
2.	Hartley guinea pig (25 male 25 female)	MIT(99.8 %) 1,000 ~ 3,0000 ppm (induction phase) 1,000 ~ 15,000 ppm (challenge phase)	Buehler method	- 1,000 ppm 이상에서 민감
3.	Hartley guinea pig (60 female)	MIT(99.7 %) 550 ppm (induction phase) 800, 1,000 ppm (challenge phase)	Maximization test	- 800 ppm 까지 민감하지 않음
4.	Hsd Poc: DH[SPF] guinea pig (64 female)	MIT(19.7 %) dose concentration = 0.15 % ~ 18 %	Open epicutaneous test	- 1.5 % 이상에서 민감

Part 6. Local lymph node assay

참고문헌 : Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone
(Christina L. Burnett et al., 2010)

표 20. Local lymph node assay 요약

No.	동물종	시험물질 및 농도	시험방법	결과
1.	CBA/J mice (n = 24)	MIT(99.8 %) dose concentration = 1,000 ~ 30,000 ppm	LLNA	- 10,000 ppm 이상에서 민감 - EC ₃ = 150 ppm
2.	CBA/J mice (40 Female)	Neolone950 (MIT 10.37 %) dose concentration = 0.15 ~ 1.80 %	LLNA	- 0.76 % 이상에서 민감 - EC ₃ = 0.86 %
3.	CBA/J mice (44 Female)	MIT(19.7%) dose concentration = 0.049 ~ 0.0985 % in acetone/olive oil, 0.99 ~ 9.85 % in propylene glycol	LLNA	- skin allergen with moderate strength - EC ₃ = 0.4 % (acetone, olive oil) - EC ₃ = 2.2 % (propylene glycol)

Part 7. 변이원성/유전 독성(Mutagenicity/Genotoxicity)

참고문헌 : Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone
(Christina L. Burnett et al., 2010)

7-1. Bacterial Assays

No.	시험법	시험물질	시험계	투여용량	결과
1.	Ames assay	MIT (99.9 %)	Salmonella typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100	-0.0001 ~ 0.25 µg/plate TA1535, TA1537 -0.0001 ~ 1 µg/plate TA98 -0.0001 ~ 100 µg/plate TA98	돌연변이를 유발하지 않음
2.	Ames assay	MIT (97.5 %)	Salmonella typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100, TA102	-5 ~ 1000 µg/plate	돌연변이를 유발하지 않음

7-2. Mammalian Cell Assays

No.	시험물질	시험계	투여용량	결과
1.	MIT (97.5 %)	Chinese hamster ovary (CHO) cell	-first definitive phase : 0.5, 1.0, 5.0, 15.0 및 25.0 µg/mL -second confirmatory phase : 5.0, 10.0, 15.0, 25.0 및 40.0 µg/mL	돌연변이를 유발하지 않음
2.	MIT (97.5 %)	Chinese hamster ovary (CHO) cell	-initial phase : 33.9 ~ 5000 µg/mL -definitive phase : 0.0785 ~ 40.0 µg/mL	

7-3. Animal Assay

No.	동물종	시험물질 및 농도	시험방법	결과
1.	Crl:CD(SD) IGS 랫드	MIT(51.1 %) 0, 100, 200 및 300 ppm	unscheduled DNA synthesis	- 돌연변이를 유발하지 않음
2.	CD-1 mice	MIT(97.5 %) 10, 50, 100 mg/kg	micronucleus test	- 돌연변이를 유발하지 않음

Part 8. 생식 발생 독성(Reproductive and Developmental toxicity)

참고문헌 : Final Report of the Safety Assessment of Methylisothiazolinone
(Christina L. Burnett et al., 2010)

No.	투여경로	시험법	시험종	투여용량	결과
1.	경구	최기형 성시험	CrI:CD(SD)I GS BR랫드 (n=100)	0, 5, 20, 60 mg/kg	- NOAEL(maternal toxicity) = 20 mg/kg/d - NOAEL(developmental toxicity) = 40 mg/kg/d
2.	경구	최기형 성시험	New Zealand White rabbit (n=100)	0, 3, 10, 30 mg/kg	- NOAEL(maternal toxicity) = 10 mg/kg/d - NOAEL(developmental toxicity) = 30 mg/kg/d
3.	경구 (음수)	2 세대 생식독 성시험	CrI:CD(SD)I GS BR랫드 (30 male, 30 female)	0, 50, 200, 1,000 ppm	- 본 시험의 농도에서는 생식독 성이 나타나지 않음