



Benzoyl Peroxide의 반복투여 독성과 생식 및 발생독성

송상환 · 김수현 · 배희경 · 김미경 · 구현주 · 박광식¹ · 이상균² · 박중훈² · 최은실² · 이문순
국립환경연구원 환경위해성연구부, ¹동덕여자대학교 약학대학, ²LG 생명과학기술연구원

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicities of Benzoyl Peroxide

Sanghwan Song, Su-Hyon Kim, Heekyung Bae, Mikyung Kim, Hyun Ju Koo, Kwangsik Park¹,
Sangkyun Lee², Joonghoon Park², Eun-Sil Choi² and Moon-Soon Lee

Environmental Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-170, Korea

¹College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-174, Korea

²Toxicology Center, LG Life Sciences, Ltd./R&D Park, Daejeon 305-380, Korea

Received April 22, 2003; Accepted May 28, 2003

ABSTRACT. This study was carried out to assess the combined repeated dose, reproduction and developmental toxicities of benzoyl peroxide for OECD SIDS (Screening Information Data Set) program. Male and female Sprague-Dawley rats were exposed to benzoyl peroxide at dose levels of 0, 250, 500 and 1,000 mg/kg/day for 29 days for males and for 41~51 days for females. No deaths were found in all animals including control group during exposure period. No hematological effects attributable to benzoyl peroxide were observed in all treated groups. Significant decrease in the weight of testes and epididymis were observed in males at 1,000 mg/kg/day. In females at 1,000 mg/kg/day, slight histopathological effects in uterus such as epithelial vacuolation or hyperplasia were observed. No treatment-related changes in pre-coital time and rate of copulation, fertility and gestation period were noted in all treated groups. There was no evidence of teratogenic effect of benzoyl peroxide, but body weight of pups at 1,000 mg/kg/day was significantly decreased. NOAEL for combined repeated dose and reproduction/developmental toxicity was 500 mg/kg/day.

Keywords: Benzoyl peroxide, Combined repeated dose, Reproduction and developmental toxicity, NOAEL, SIDS.

서 론

OECD SIDS(Screening Information of Data Set) 프로그램은 연간 1,000톤 이상 생산되는 대량생산화학물질(High Production Volume Chemicals, HPVCs)에 대해 물리화학적 성질, 환경 중 거동, 생태 및 인체 독성 등의 기존 자료를 바탕으로 동 물질의 환경 및 인체에 미치는 초기 위해성을 평가하는 사업으로서, 각 수행 회원국은 화학물질의 기초독성 자료와 대략의 노출자료 등 위해성

평가에 필요한 기초정보를 획득하여 생태 및 인체 위해성의 후속 평가 수행여부를 결정하는 프로그램이다. 우리나라 환경부에서는 1998년 유통량 조사기준으로 460여종의 화학물질을 HPVCs로 분류하고 있으며, 1996년 OECD 가입당시 조건부로 수락한 「기존화학물질 위해성 저감 및 체계적 조사를 위한 상호협력규정」[C(90)163]을 이행하기 위해 OECD와 협의하여 1999년부터 benzoyl peroxide 등 7종의 HPVCs에 대한 환경 및 인체 초기 위해성을 평가하기로 함으로써 본 프로그램에 적극적으로 참여하고 있다(환경부, 2000).

Benzoyl peroxide는 2001년도 조사한 결과에 의하면 우리나라에서 연간 약 1,357톤이상 생산되는 HPVCs 중 하나로 OECD SIDS 프로그램 대상 화학물질로 등재

Correspondence to: Moon-Soon Lee, Environmental Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research, Gyeongseo-dong, Seo-gu, Incheon 404-170, Korea
E-mail: mslee416@me.go.kr

되어 있는 물질이다. Benzoyl peroxide의 대부분은 ESP (expandable styrene polymer)나 기타 수지(resin) 제조 공정에서 중합반응 개시제로 이용되며 전체 생산량 중 0.1% 미만이 표백제 등으로서 밀가루 등의 식품 가공 공정에 사용되고있다. 또한 benzoyl peroxide는 22%, 75% 및 95% 등의 다양한 순도의 분말 형태로 유통되는데 직접적인 노출은 생산공정 혹은 중간체로 사용되는 화학산업에서의 작업자 노출 등이고, 일반 소비자 노출은 대부분 의약품(여드름 치료연고 등에 5~10% 함유)에 의한 피부노출이 대부분이다(국립환경연구원, 2001).

OECD SIDS 프로그램에서는 화학물질의 인체영향을 평가하기 위해서 필수적으로 급성독성, 반복투여 독성, *in vitro* 및 *in vivo* 유전독성 그리고 생식/발생 독성 등에 대한 신뢰성 있는 자료를 요구하고 있다(OECD, 2002). 그러나 benzoyl peroxide에 대한 기존의 독성자료를 검토한 결과 급성독성, 자극성, 과민성 및 피부 발암성 등에 대해서는 많은 연구가 수행되어 있으나, 무독성량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)의 결정에 필요한 반복투여독성, 생식독성 및 발생독성에 대한 연구자료가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 반복투여독성 및 생식/발생독성에 대한 신뢰성 있는 자료를 생산하고자 OECD에서 제안하고 있는 시험방법(OECD TG 422)에 따라 암수 랫트에 benzoyl peroxide를 28일 이상 반복 경구 투여하여 이에 따른 독성효과와 함께 생식·발생 독성영향을 평가하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질

Benzoyl peroxide($C_{14}H_{10}O_4$, CAS No. 94-36-0, Sigma, Lot No. 60K3400)을 71.8% 순도로 구입하여 corn oil (Sigma, Lot No. 89H0149)에 넣어 균질화 한 후 랫트 체중 1 kg 당 5 ml 수준으로 경구 투여하였다. 양성대조물질로는 cyclophosphamide(Sigma, Lot No. 108H0568)을 멸균 생리식염수에 녹여 사용하였다.

실험동물

실험동물로는 7주령의 Sprague-Dawley 계통의 암수 랫트를 (주)바이오제노믹스에서 제공받아 사용하였다. 10 일간의 검역 및 적응기간 동안 체중증가 및 일반증상에 이상이 없는 건강한 동물을 시험에 사용하였다. 실험개시 시의 체중범위는 수컷은 323.4~356.6 g, 암컷은 212.2~237.2 g이었다. 시험기간 동안 동물실의 환경은 온도 18.3~25.7°C, 습도 51.1~73.8% 및 12시간 자동조명으로 유지하였다. 시험기간 동안 방사선 멸균된 설치류 사료

(PicoLab[®] Rodent Diet 20, 미국)와 필터 후 자외선 소독한 상수도수를 자유 섭취시켰고 실험동물 수용에는 스테인레스 재질의 철망케이지 및 폴리카보네이트 케이지를 사용하였다.

투여량 설정 및 투여기간

투여량 설정을 위한 예비시험에서 benzoyl peroxide를 0, 250, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 시험군당 암수 각 3마리를 대상으로 10일간 경구 투여한 결과 임상증상, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 부검 소견에서 이상이 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서는 투여용량을 250, 500 및 1,000 mg/kg/day으로 하여 시험을 실시하였고, 투여군당 암수 각 10마리를 공여하였다. 이와 함께 후속관찰을 위해 음성대조군 및 benzoyl peroxide 1,000 mg/kg/day 투여군에 회복군을 암수 각 5마리씩 두었다. 투여방법은 1일 1회 경구 투여하였다. 수컷은 교미전 14일간, 교미기간 14일간을 포함하여 총 29일간 연속투여 후 부검하였다. 암컷은 교미전 14일간, 교미기간 14일간, 임신기간 21일간, 분만 후 3일간을 포함하여 총 41일에서 51일간 투여 후 부검하였다. 음성 및 1,000 mg/kg/day 회복군은 최초 부검 및 모체동물의 부검 후 14일간 회복기를 거친 후 부검하였다. 양성대조물질의 용량은 이상소견이 관찰되는 용량인 4.5 mg/kg/day 1개 투여군만을 두어 시험을 실시하였다. 음성대조군에는 corn oil만 투여하였고, 양성대조군에는 cyclophosphamide를 투여하였다.

관찰 및 검사항목

1일 1회 모든 동물에 대하여 사망여부를 관찰하였다. 관찰 시 피부와 털, 눈과 점막의 변화, 그 밖의 호흡기계, 순환기계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동성 및 행동패턴 등과 함께 경련, 유연, 설사, 졸림, 수면 및 혼수에 대해서도 관찰하였다.

암수의 체중은 부검 전까지 주 1회 측정하였고, 임신암컷의 경우 임신 0, 7, 14 및 20일에 측정하였다. 분만태자의 체중은 분만 1일째 및 분만 3일째 측정하였다. 투여 15일째 암수 각각 1마리씩 1:1로 동거 개시한 후 질정 검사를 통해 교미여부를 확인하였고, 교미가 확인된 날을 임신 0일째로 하였다.

혈액학적 검사는 암수 모두 최종투여 종료 후 다음날 처리군별로 5마리씩 선택하여 복대정맥으로부터 채혈하여 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 헤모글로빈농도(HGB), 적혈구용적(HCT), 혈소판(PLT) 등의 항목을 검사하였다. 혈액생화학적 검사항목으로는 혈당(GLU), 총콜레스테롤(TCHO), 요소(BUN), 크레아티닌(CRE), 총단백질(TP), 알부민(ALB),

알라닌·아미노트랜스퍼레이즈(ALT), 아스파테이트·아미노 트랜스퍼레이즈(AST) 등을 측정하였다.

시험동물의 부검은 최종투여가 종료한 다음날 실시하였다. 부검시 모든 동물에 대해 육안적 병리검사를 실시하였고, 임신동물의 경우 착상수 및 황체수를 파악하였다. 회복군의 경우 14일간의 회복기간 종료 후 부검하였다. 또한 모든 회복군의 육안적 병리검사를 실시하였다. 장기 중량은 처리군별로 암수 각 5마리씩 선택하여 간장, 신장, 부신, 흉선, 비장, 뇌, 심장 등의 중량을 측정하였고, 특히 수컷의 경우 고환 및 부고환의 무게를 측정하였다.

처리군별로 암수 각 5마리씩 선택하여 육안적 병변, 뇌(대뇌, 소뇌, 뇌교부위), 척수, 위, 공장 및 회장(Peyer's patch포함), 간장, 기관, 폐, 자궁, 방광, 신장, 부신, 비장, 심장, 흉선, 갑상선, 림프절, 말초신경, 골수 등의 장기에 대한 조직병리검사를 실시하였고 수컷의 고환, 부고환 및 부생식선과 암컷의 난소를 고정하여 조직병리검사를 하였다.

생식/발생 독성효과 측정을 위해 Table 1과 같은 지표를 사용하였다.

신생자는 분만 후 24시간 이내에 외표검사를 통한 이상 유무를 관찰하였고 분만 3일째까지 성장 및 발달여부를 관찰하였다

각 관찰항목과 시험동물 투여는 GLP(Good Laboratory Practice) 규정과 OECD TG 422에 의거 수행하였고 다만, 신경독성항목의 평가는 해당 GLP 시설의 미운영으로 임상증상의 관찰 및 신경조직의 조직병리검사로 대체하였다.

통계

측정결과 중 모수적 데이터는 One-way ANOVA를 실시하였고, 검정 결과 유의성이 인정되면 Dunnett's multiple comparison test를 실시하였다. 비모수적 데이터는 Kruskal-Wallis 검정을 실시한 후 유의성이 인정되면 Dunn's multiple comparison test를 실시하였다. 범주형 데이터는 자료의 정리로써 표현하거나 혹은 Two-sided Fisher's exact test를 실시하였다. 통계학적 유의성은 위

험을 5%에서 검사하였다.

결 과

모동물에 미치는 영향

사망률 및 임상증상: 시험기간 동안 음성 및 양성대조군을 포함한 모든 시험군에서 사망동물이 관찰되지 않았다. 수컷 500 mg/kg/day 투여군과 암컷 1,000 mg/kg/day 투여군에서 각 1례의 탈모 및 가피가 관찰되었고 암컷 500 mg/kg/day 투여군에서 2례의 탈모 및 가피가 관찰되었다. 수컷 500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여 후 토혈이 1례가 관찰되었으나 대조군과 비교하여 유의한 차이는 보이지 않았다. 한편, 암컷 1,000 mg/kg/day 회복군에서 설사 및 뇨에 의한 생식기의 오염이 2례 관찰되었다.

체중의 변화 및 사료섭취량: 암수 모두 시험기간 동안 전 투여군에서 정상적인 체중변화가 관찰되었다. 양성대조군의 경우 암컷에서 임신기간 중의 체중증가량이 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였고 1,000 mg/kg/day 암컷 회복군의 경우 투여 29일째부터 음성회복군에 비해 유의적인 체중의 증가가 관찰되었다(Figs. 1, 2와 3). 수컷 1,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 1주 및 4주째의 사료 섭취량이 음성대조군에 비하여 유의적으로 증가하였고, 이외의 투여군은 정상적인 사료섭취량을 나타내었다.

장기중량: 수컷의 장기중량을 측정한 결과 1,000 mg/kg/day 투여군의 좌측 고환의 절대중량 및 상대중량과 부고환의 상대중량은 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 기타 장기의 절대중량 및 상대중량에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다(Table 2).

암컷에서는 1,000 mg/kg/day 투여군의 좌·우측 신장의 절대중량 및 상대중량은 음성대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 다른 투여군에서 유의한 중량변화는 관찰되지 않았다(Table 3).

혈액학적 및 혈액생화학적 parameter: 암수 투여군에서 RBC, WBC, HGB 및 HCT 농도에서 시험물질에 의한

Table 1. Index of effects on reproduction

Index	Description
교미율(Copulation index)	(교미확인 동물수/동거시킨 동물수)×100
수태율(Fertility Index)	(임신확인 동물수/교미확인 동물수)×100
출산율(Gestation Index)	(분만동물수/임신확인 동물수)×100
배자소실율(%Pre-implantation loss)	(1 - (착상수/황체수))×100
태자소실율(%Post-implantation loss)	(1 - (출생수/착상수))×100
태자성비(Sex-ratio)	(수컷신생자수/총 신생자수)×100
분만1일째 생존신생자수	(분만1일째 생존신생자수/출생자수)×100
분만3일째 생존신생자수	(분만 3일째 생존신생자수/분만1일째 생존신생자수)×100

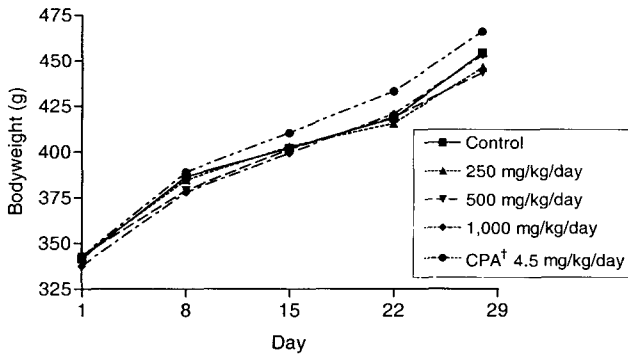


Fig. 1. Mean bodyweights of males. †CPA: Cyclophosphamide.

영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 1,000 mg/kg/day 수컷회복군의 RBC 및 WBC 농도는 음성대조군에 비하여 유의적으로 증가한 반면, 1,000 mg/kg/day 암컷회복군의 RBC 농도는 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였고 HCT 농도는 증가하였다. 수컷의 혈액생화학적 분석 결과, TP, ALB, ALT, CRE의 농도에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다. 암컷에서는 TP, ALB, ALT, BUN, CRE, TCHO,

GLU의 농도에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았으나 250 mg/kg/day 투여군의 ALT의 농도는 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다 (Table 4).

병리소견: 수컷동물의 조직에 대한 현미경 관찰 결과 1,000 mg/kg/day 투여군의 고환 및 부고환에서 퇴행성 병변이 6례 관찰되었는데 그 중 1례에서 심각한 퇴행성 병변이 관찰되었으며 나머지 소견의 경우 미약한 병변으로 관찰되었다. 고환의 퇴행성 병변은 주로 정자세포가 변형된 형태로 관찰이 되었고 세포사멸(apoptosis)에서 보이는 일반적 소견(핵농축, 핵분열 등)을 비롯하여 cellular swelling, multinucleated giant cell의 형성 등의 다양한 형태로 관찰되었다. 부고환의 경우, 정자의 수가 눈에 띄게 감소하였으며 변형 혹은 미성숙된 정자가 내강을 채우고 있었다. 폐에서 경미한 출혈(hemorrhage) 2례가 관찰되었다. 500 mg/kg/day 수컷 투여군의 신장에서 2례의 병변(basophilic tubules)이 관찰되었고, 250 mg/kg/day 수컷 투여군의 간에서 3례(mononuclear cell foci), 신장에서 2례(basophilic tubules, congestion)의 미약한 병변이 관찰되었다. 암컷의 생식기에 대하여, 1,000 mg/kg/day 투여군의 자궁에서 내강상피의 증생 혹은 vacuola-

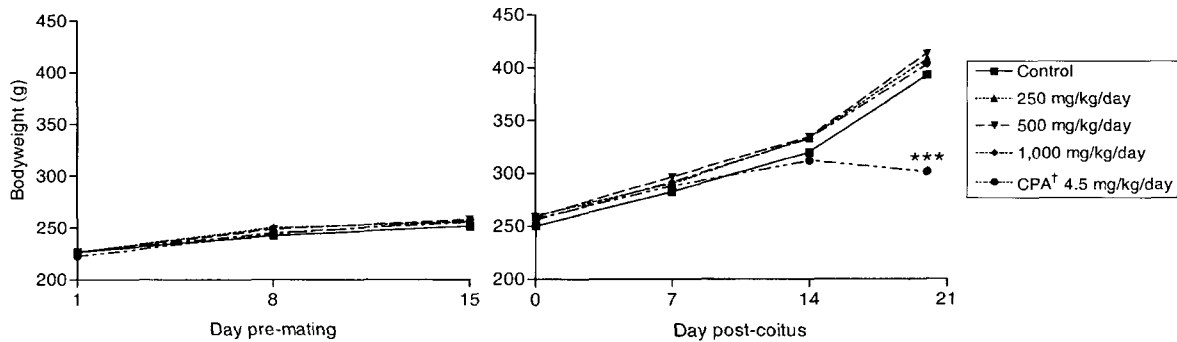


Fig. 2. Mean bodyweights of females. ***p<0.001, Dunnett's multiple comparison test. †CPA : Cyclophosphamide.

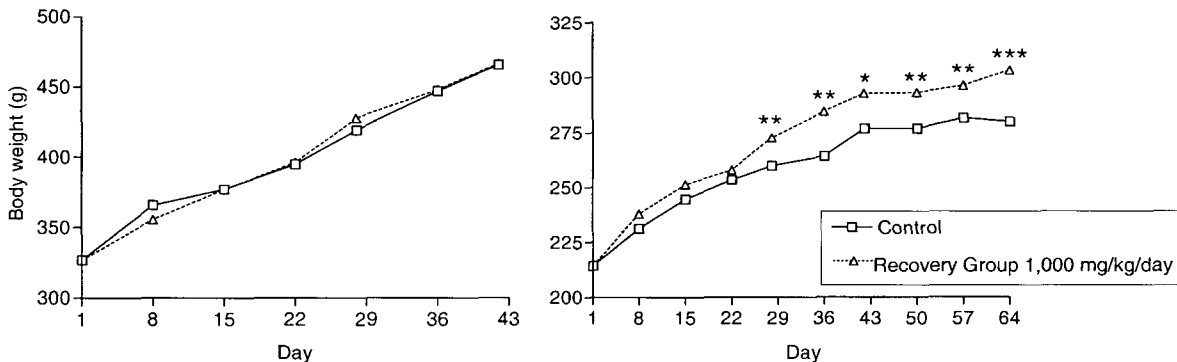


Fig. 3. Mean bodyweights of recoveries. (Left) male recoveries (Right) female recoveries. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, one-sided Student's t-test.

Table 2. Effect of benzoyl peroxide on absolute and relative organ weight of male rats

Dose (mg/kg)	Body wt (g)	LT Testes	RT Testes	LT Epididymis	RT Epididymis	Liver	Thymus	LT Kidney	RT Kidney	LT Adrenal	RT Adrenal	Spleen	Brain	Heart
0	weight (g)	1.714 ±0.134	1.734 ±0.15	0.633 ±0.067	0.648 ±0.077	11.396 ±1.234	0.441 ±0.13	1.451 ±0.113	1.476 ±0.114	0.035 ±0.005	0.032 ±0.003	0.765 ±0.095	2.09 ±0.129	1.419 ±0.114
	per B.W (%)	0.407 ±0.037	0.412 ±0.042	0.151 ±0.02	0.154 ±0.023	2.735 ±0.15	0.107 ±0.034	0.35 ±0.032	0.356 ±0.033	0.008 ±0.002	0.008 ±0.001	0.184 ±0.016	0.503 ±0.033	0.342 ±0.025
	weight (g)	1.645 ±0.098	1.638 ±0.092	0.609 ±0.06	0.611 ±0.056	11.887 ±2.262	0.437 ±0.146	1.419 ±0.183	1.448 ±0.16	0.032 ±0.005	0.032 ±0.007	0.742 ±0.098	2.058 ±0.033	1.352 ±0.22
250	per B.W (%)	0.398 ±0.046	0.396 ±0.042	0.147 ±0.019	0.148 ±0.017	2.799 ±0.295	0.102 ±0.026	0.336 ±0.031	0.343 ±0.019	0.008 ±0.001	0.008 ±0.002	0.176 ±0.019	0.491 ±0.041	0.321 ±0.046
	weight (g)	1.686 ±0.098	1.684 ±0.112	0.595 ±0.06	0.595 ±0.043	12.193 ±1.094	0.437 ±0.058	1.646 ±0.213	1.609 ±0.205	0.035 ±0.005	0.034 ±0.003	0.821 ±0.062	2.033 ±0.075	1.389 ±0.12
	per B.W (%)	0.4 ±0.027	0.399 ±0.03	0.141 ±0.016	0.141 ±0.016	2.816 ±0.165	0.102 ±0.018	0.379 ±0.026	0.371 ±0.027	0.008 ±0.001	0.008 ±0.001	0.191 ±0.022	0.472 ±0.042	0.321 ±0.025
1000	weight (g)	1.496 ±0.282*	1.589 ±0.117	0.553 ±0.071	0.576 ±0.055	11.985 ±1.031	0.453 ±0.019	1.482 ±0.114	1.521 ±0.077	0.038 ±0.006	0.038 ±0.007	0.77 ±0.103	2 ±0.037	1.295 ±0.084
	per B.W (%)	0.345 ±0.064*	0.367 ±0.028	0.128 ±0.016*	0.133 ±0.013	2.765 ±0.193	0.105 ±0.005	0.342 ±0.03	0.351 ±0.018	0.009 ±0.001	0.009 ±0.002	0.178 ±0.022	0.462 ±0.016	0.299 ±0.016
	weight (g)	1.592 ±0.092	1.582 ±0.111	0.65 ±0.093	0.66 ±0.061	12.112 ±0.98	0.437 ±0.114	1.5 ±0.122	1.47 ±0.087	0.036 ±0.006	0.033 ±0.008	0.78 ±0.144	1.917 ±0.116	1.327 ±0.048
1000 (recovery)	per B.W (%)	0.366 ±0.027	0.364 ±0.034	0.15 ±0.021	0.152 ±0.013	2.783 ±0.2	0.1 ±0.024	0.348 ±0.035	0.338 ±0.025	0.008 ±0.001	0.007 ±0.002	0.179 ±0.031	0.441 ±0.028	0.305 ±0.009

*Statistically significant difference from control group (p<0.05).

Table 3. Effect of benzoyl peroxide on absolute and relative organ weight of female rats

Dose (mg/kg)	Body wt (g)	Liver	LT kidney	RT kidney	LT adrenal	RT adrenal	Thymus	Brain	Spleen	Heart
0	weight (g)	9.088±1.413	0.878±0.061	0.913±0.088	0.039±0.005	0.034±0.002	0.244±0.107	1.882±0.015	0.579±0.133	1.029±0.137
	per B.W (%)	3.231±0.424	0.313±0.024	0.325±0.027	0.014±0.003	0.012±0.001	0.086±0.036	0.661±0.051	0.205±0.039	0.369±0.071
	weight (g)	10.124±0.76	0.997±0.036	0.989±0.03	0.04±0.002	0.039±0.006	0.345±0.113	1.96±0.14	0.659±0.076	0.965±0.033
250	per B.W (%)	3.219±0.132	0.319±0.032	0.316±0.033	0.013±0.002	0.012±0.002	0.11±0.038	0.628±0.084	0.209±0.012	0.308±0.026
	weight (g)	10.013±0.91	0.907±0.079	0.929±0.085	0.039±0.007	0.037±0.008	0.377±0.124	1.924±0.034	0.604±0.129	1.022±0.088
	per B.W (%)	3.278±0.151	0.297±0.02	0.304±0.011	0.013±0.002	0.012±0.002	0.121±0.031	0.633±0.052	0.197±0.036	0.334±0.004
1000	weight (g)	10.15±1.318	1.023±0.063*	1.059±0.099*	0.044±0.009	0.04±0.009	0.342±0.113	1.982±0.081	0.662±0.131	1.004±0.093
	per B.W (%)	2.958±1.113	0.351±0.023	0.363±0.036	0.015±0.003	0.014±0.003	0.117±0.038	0.681±0.053	0.226±0.037	0.344±0.018
	weight (g)	7.086±0.656	0.852±0.063	0.851±0.085	0.03±0.002	0.03±0.001	0.342±0.039	1.878±0.115	0.558±0.056	0.874±0.064
1000 (recovery)	per B.W (%)	2.336±0.198	0.275±0.026	0.281±0.032	0.01±0.001	0.01±0.0005	0.113±0.013	0.619±0.04	0.184±0.02	0.289±0.026

*Statistically significant difference from control group (p<0.05).

Table 4. Biochemical values in rats treated orally with benzoyl peroxide

Dose (mg/kg)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	BUN (mg/dl)	CREA (mg/dl)	TCHO (mg/dl)	GLU (mg/dl)
Male								
0	6.2±0.3	2.2±0.1	86±17.7	31.1±6.3	12.5±2.3	0.5±0.1	60.6±5.7	111.6±19.3
250	6.3±0.5	2.2±0.1	75.5±12.4	24.9±5.1	11±2	0.5±0	61.2±8.9	114±7.3
500	6.1±0.3	2.1±0.1	75.6±4.1	23.8±4.6	9.9±1.3	0.4±0	66.8±4.2	107.4±11
1000	6.2±0.3	2.3±0.1	99.4±5.3	31.1±5.9	10.2±0.5	0.5±0.1	67.6±8.8	106.6±15.9
recovery	6.6±0.4	2.3±0.1	105.2±13.9	32.3±5.5	17.2±1.5	0.5±0	53.6±7.4	112.4±7.2
Female								
0	6.9±0.2	2.5±0.2	145.5±33.7	51.1±8.7	18±1.5	0.6±0.1	90.8±9.9	87±17.1
250	6.7±0.3	2.5±0.1	88.2±32.9*	59.6±9.1	17±2.4	0.6±0.1	90.4±18.6	87.4±15.5
500	6.3±0.4*	2.3±0.2	122.6±16.8	56.9±10.3	18.9±3.7	0.6±0.1	101.4±12.4	82.8±16.9
1000	6.4±0.4	2.4±0.2	102.9±20.6	61.3±2.3	18.3±4.4	0.5±0.1	92.4±15.4	98.6±23.2
recovery	7.5±0.4	2.9±0.2	118.8±26	26.9±5.7	20.8±2.8	0.6±0	80.8±14.4	112.6±11.6

*Statistically significant difference from control group ($p < 0.05$).

Table 5. Short summary of Histopathological findings in rats treated orally with benzoyl peroxide

Dose (mg/kg)	0	250	500	1,000	Control (+)	1000 (recovery)
No. of animals	10	10	10	10	5	5
Male						
<u>Liver</u>						
Mononuclear cell foci						
Minimal	3	3	1	1		2
Bile duct hyperplasia						
Minimal	2					
Vacuolation						
Minimal	1					
<u>Kidney</u>						
Basophilic tubules						
Focal, minimal	1	1	2			1
Congestion						
Minimal		1			2	
Slight				1		
<u>Lung</u>						
Hemorrhage						
Focal, minimal				2	1	
<u>Testes</u>						
Degeneration						
Minimal				5*	2	1
Marked				1		
<u>Epididymidis</u>						
Degeneration						
Minimal				3	1	
Marked				1		
Decrease of spermatocyte				1		
Female						
<u>Liver</u>						
Mononuclear cell foci						
Minimal	2	1				3
<u>Spleen</u>						
Pigment						
Focal, minimal				2	2	3
<u>Kidney</u>						
Congestion						
Minimal	1	3			1	
Focal, minimal	1	2	2			2
Focal, slight				2		
<u>Uterus</u>						
Epithelial vacuolation						
Minimal				1		
Epithelial hyperplasia						
Minimal				1	1	
Inflammatory cell infiltration						
Focal, minimal				1	1	

*Statistically significant difference from control group ($p < 0.05$).

tion과 같은 미약한 증상 등이 1레씩 관찰되었다. 암컷의 신장에서는 1,000 및 500 mg/kg/day 투여군에서 2레, 250 mg/kg/day 투여군에서 5레, 음성대조군에서 2레의 경미한 병변(congestion)이 관찰되었다(Table 5).

교배, 임신 및 분만: 교미기간, 교미율, 수태율, 출산율, 출생률, 임신기간, 황체수, 착상수 및 착상전후 배·태자 소실율에 있어서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 1,000 mg/kg/day 투여군의 수태율이 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 시험계로 사용한 Sprague-Dawley 랫트의 일반적인 수태율인 88.6%를 상회하여 시험물질에 의한 영향으로 판단되지 않았다(Table 6).

신생자에 미치는 영향

출산수, 성비 및 생존율: 출산수, 성비, 분만 1일 및 3일째 생존율에 있어 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다(Table 6).

체중변화: 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 한배체 중의 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 분만 3일째 암수 신생자의 체중은 음성대조군에 비하여 용량의존적으로 감소하였고, 특히 1,000 mg/kg/day 투여군 암수 신생자의 체중은 유의적으로 감소하였다(Table 6).

외표검사: 신생자의 외표를 관찰한 결과, 250 mg/kg/day 투여군에서 주요 병변에 속하는 척수골폐쇄부전(Spina bifida)이 1레 발생하였으나 음성대조군과의 유의

Table 6. Reproductive and developmental findings in rats treated orally with benzoyl poroxide

Dose (mg/kg)	0	250	500	1000	Cyclophosphamide
No. of mated males	10	10	10	10	10
Copulation index (%)	100	100	100	100	100(5/5)
Fertility index (%)	100	100	100	90(9/10)	100(5/5)
No. of mated females	10	10	10	10	10
Copulation index (%)	100	100	100	100	100(5/5)
Fertility index (%)	100	100	100	90(9/10)	100(5/5)
Gestation index (%)	100	100	100	100	40(2/5)
Precoital time					
Mean±S.D (day)	2.2±1.2	3.2±1.3	2.4±1.2	2.3±1.2	5.3±5.3
No. of dams	10	10	10	9	2
No. of corpora lutea	169	182	171	157	90
Mean±S.D	16.9±4.1	18.2±2.3	17.1±1.9	17.4±2.5	18±1.9
No. of implantations	150	150	161	136	81
Mean±S.D	15.0±1.8	15.0±2.9	16.1±1.9	15.1±2.1	16.2±1.6
Mean % preimplantation loss	9	16.1	5.8	12.9	9.9
No. of embryo/fetal death	10/3	9/3	7/3	3/0	64/9
No. of live pups born					
Mean±S.D	13.7±2.7	13.8±2.5	15.1±2.1	14.8±2.2	1.6±2.3*
Mean pregnancy period (day)	20.4	20.8	20.6	20.8	22
Viability index on day 1 pp	97.5	98.1	100	100	53.3*
Viability index on day 3 pp	100	100	100	100	90*
Body weights of pups (g)					
Male 1 day	6.88±0.53	7.22±0.81*	6.91±0.64	6.72±0.79	4.59±0.77
3 day	8.93±0.91	9.10±1.03	8.69±0.79	8.12±1.01**	7.16±0.88
Female 1 day	6.51±0.53	6.93±0.76**	6.73±0.59	6.21±0.79	4.33±0.74
3 day	8.60±0.99	8.79±1.03	8.48±0.89	7.49±1.03**	5.48±0.89

*p<0.05, **p<0.01, Dunnett's test.

Table 7. Grossly visible abnormalities in rats treated orally with benzoyl peroxide

Dose (mg/kg/day)	0	250	500	1000	Cyclophosphamide
No. with major abnormalities	0	1	0	0	0
Mean % of pups examined	0	0.6	0	0	0
No. of females affected	0	1	0	0	0
No. with minor abnormalities	20	20	18	60	8
Mean % of pups examined	14.2	12.4	11.5	41.4**	100.0**
No. of females affected	6	4	5	6	2
No. with variants	0	0	0	0	0

**Statistically significant difference from control group (p<0.01).

성은 나타나지 않았다. 그리고 부가병변에 속하는 미숙아(Runt)는 음성대조군, 250, 500, 1,000 mg/kg/day 투여군 및 양성대조군에서 각각 20, 20, 18, 60 및 8례가 발생하였고, 1,000 mg/kg/day 투여군 및 양성대조군의 부가병변 발생율이 음성대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 이형병변(Variants)은 모든 시험군에서 발생하지 않았다(Table 7).

고찰 및 결론

일반적으로 benzoyl peroxide의 급성경구 및 흡입독성은 비교적 낮은 것으로 알려져 있으나(LD₅₀ > 5,000 mg/kg, LC_{0(4 hr)} = 24.3 mg/l) (Wazeter 등, 1973a, b) 장시간 노출시 피부 자극성 및 감작성을 나타내는 물질로 알려져 있다(NIOSH 1977; Haustein 등, 1985; Basketter 등, 1996; Kimber 등, 1998). Ames test와 기타 *in vitro* 및 *in vivo* 시험에서 유전독성은 없는 것으로 나타났다(石館 등, 1980; Fujita 등, 1987; Dillon 등, 1998; Zeiger 등, 1988). 한편 발암성에 대한 연구결과 initiator나 cocarcinogen은 아니지만 일부 *in vivo* 시험에서 피부의 종양촉진제(tumor promotor)로 작용하는 것으로 밝혀졌다(Sharratt 등, 1964; Slaga 등, 1981; Kurokawa 등, 1984; O'Connell 등, 1986; Gimenez-Conti 등, 1993). 밀가루에 함유된 benzoyl peroxide를 랫트와 마우스에 경구투여하여 만성독성을 조사한 결과를 보면(Sharratt 등, 1964), 280 ppm 이상 처리군에서 체중감소와 2,800 ppm, 28 ppm 및 2.8 ppm의 benzoyl peroxide를 섭취한 시험군에서 고환위축(testicular atrophy)이 나타났으나, 설정된 투여량은 통상의 인체 섭취량을 기준으로 산정하였고 구체적인 투여농도는 제시하지 않아 명확한 NOEL 및 최소독성량(Lowest Observed Adverse Effect Level, LOEL)을 산출할 수 없었다. 따라서 본 시험은 암수 랫트에 28일 이상 반복 경구투여 하여 반복 및 생식·발생독성을 알아보고 개략의 NOEL을 산정하였다.

시험과정의 신뢰성을 위해 양성대조물질인 cyclophosphamide 4.5 mg/kg/day를 암수에 반복 경구투여 한 결과, 수컷의 비장 무게와 백혈구의 수가 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였고 착상 후 태자소실율, 출생수 및 신생자의 체중이 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 이러한 소견은 기존의 연구결과와 유사하였으며 본 시험의 신뢰성을 뒷받침하여 준다(Tanaka 등, 1992).

Benzoyl peroxide를 수컷은, 교미전 14일간, 교미기간 14일을 포함하여 총 29일간 반복 경구투여 하고, 암컷은 교미전 14일간, 교미기간 14일간, 임신기간 21일간, 분만

후 3일간을 포함하여 총 41일에서 51일간 1일 1회 반복 경구투여 한 결과 1,000 mg/kg/day 투여군의 모동물 및 신생자로부터 독성효과가 관찰되었다.

수컷의 경우 고환 및 부고환의 무게가 유의적으로 감소하였고, 이는 투여물질에 의한 고환 및 부고환의 퇴행성 병변에 의하여 유발된 것으로 판단되었다. 암컷의 경우 경미한 생식기관 조직의 이상이 관찰되었다. 수컷의 생식기관에 대한 소견은 기존의 연구와도 일치하는데 Sharratt 등은 고환위축의 원인을 benzoyl peroxide가 사료의 비타민 E 함량을 감소시킴으로써 기인된다고 주장하였다. 그러나 그 연구에서 섭취한 사료의 분석이나 각 수컷 랫트의 고환위축 정도가 언급되어 있지 않아 원인에 대한 명확한 결론을 내리기는 어렵다. 시험동물 생식기관 외의 장기에 대한 소견은 background disease 혹은 종특이적 병변으로 판단되며 benzoyl peroxide에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다.

혈액-생화학적 분석 결과 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군에 비해 유의한 변화가 관찰되었지만 용량상관성이거나 관련장기에 대한 육안 및 조직병리와의 연관성이 없는 자연 발생적인 결과로 판단된다.

또한 교미기간, 교미율, 수태율, 출생률, 임신기간, 황체수, 착상수 및 착상전후 배·태자 소실율에 있어서 benzoyl peroxide에 의한 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다. 신생자의 경우 benzoyl peroxide에 의한 출산수, 성비, 생존율 및 한배체중의 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 부가병변에 속하는 미숙아(runt)의 출산율은 1,000 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 증가하였고, 분만 3일째 암수 신생자의 체중은 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 최고농도 투여군에서의 수태율이 음성대조군에 비하여 유의적으로 감소하였지만 시험계로 사용한 Sprague-Dawley 랫트의 일반적인 수태율인 88.6%를 상회하여 시험물질에 의한 영향으로 판단되지 않는다.

이와 같은 결과를 종합하면 benzoyl peroxide를 1,000 mg/kg/day 용량으로 반복 경구 투여한 결과 고환 및 부고환을 포함하는 수컷 랫트의 생식기관에 독성효과가 있는 것으로 판단되며, 미숙아의 출산율과 함께 신생자의 정상적인 발육을 저해하는 효과가 있는 것으로 판단되었다.

따라서 benzoyl peroxide의 반복투여에 따른 모동물의 NOEL과 생식독성에 대한 NOEL은 각각 500 mg/kg/day로 추정되고, LOEL은 1,000 mg/kg/day로 추정할 수 있었다. 또한 신생자 발생에 대한 NOEL 및 LOEL도 각각 500 mg/kg/day 및 1,000 mg/kg/day로 추정할 수 있었다.

참고문헌

- 국립환경연구원 (2001): 국내 화학물질 유통량 조사 현황.
- 石館基, 吉川邦衛, 祖父尼俊雄 (1980): 食品添加物の變異原性試驗成績, 變異原性と毒性, **3**, 82-90.
- 환경부 (2000): 유해화학물질관리기본계획, pp. 53-73.
- Basketter, D.A. and Gerberick, G.F. (1996): An interlaboratory evaluation of the buehler test for the identification and classification of skin sensitizers, *Contact Dermatitis*, **35**, 146-151.
- Dillon, D., Combes, R. and Zeiger, E. (1998): The effectiveness of *Salmonella* strains TA100, TA102 and TA104 for detecting mutagenicity of some aldehydes and peroxide, *Mutagenesis*, **13**, 19-29.
- Fujita, H. and Sasaki, M. (1987): Mutagenicity test of food additives with *Salmonella typhimurium* TA 97 and TA102 (II), *Annu. Rep. Tokyo Metro. Res. Lab. P.H.*, **38**, 423-430.
- Gimenez-Conti, I.B., Oubari, D. and Slaga, T.J. (1993): Dose-response of benzoyl peroxide hyperplastic, promoter and possible complete carcinogenic activities, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, **34**, 184.
- Haustein, U.-F., Tegetmeyer, L. and Ziegler, V. (1985): Allergic and irritant potential of benzoyl peroxide, *Contact Dermatitis*, **13**, 252-257.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladics, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998): Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay; an interlaboratory evaluation, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, **53**, 563-579.
- Kurokawa, Y., Takamura, N., Matsushima, Y., Imazawa, T. and Hayashi, Y. (1984): Studies on the promoting and complete carcinogenic activities of some oxidizing chemicals in skin carcinogenesis, *Cancer Letters*, **24**, 299-304.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH); Criteria for Recommended Standard, Occupational Exposure to Benzoyl Peroxide (1977).
- O'Connell, J.F., Klein-Szanto, A.J.P., DiGiovanni, D.M., Fries, J.W. and Slaga, T.J. (1986): Enhanced malignant progression of mouse skin tumours by the free-radical generator benzoyl peroxide, *Cancer Research*, **46**(6), 2863-2865.
- OECD Secretariat (2002): Manual for Investigation of HPV Chemicals.
- Sharratt, M., Frazer, A.C. and Forbes, O.C. (1964): Study of the biological effects of benzoyl peroxide, *Fd Cosmet. Toxicol.*, **2**, 527-538.
- Slaga, T.J., Klein-Szanto, A.J.P., Triplett, L.L.I., Yotti, L.P. and Trosko, J.E. (1981): Skin tumour-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound, *Science*, **213**, 1023-1025.
- Tanaka, S., Kawashima, K., Naito, K., Usami, M., Nakadate, M., Imaide, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Kurokawa, Y. and Tobe, M. (1992): Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test (OECD): familiarization using cyclophosphamide, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **18**, 89-95.
- Wazeter, F.X. and Goldenthal, E. (1973a): Acute oral toxicity test in male albino rats, international research and development corporation (IRDC) August 31.
- Wazeter, F.X. and Goldenthal, E. (1973b): Acute Inhalation to Rats, 328-005 International Research and Development Corporation (IRDC) August 31.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1988): *Salmonella* mutagenicity tests: IV. results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, **11/12**, 1-158.