

## 투명 양이온 계면활성제 ASCO EAQ80에 대한 급성 경구 독성시험 및 유전 독성시험에 관한 연구

김병조 · 김동현 · 이종기 · 분석식\*.<sup>†</sup>

에경정밀화학(주), \*공주대학교 화학과  
(2008년 11월 17일 접수, 2009년 3월 3일 채택)

### Acute Oral and Genetic Toxicity Study of ASCO EAQ80, a Novel Cationic Surfactant

Byeong-Jo Kim, Dong-Hyeon Kim, Jong-Ki Lee, and Surk-Sik Moon\*.<sup>†</sup>

Aekyung Specialty Chemicals Co., LTD., Daejeon 305-345, Korea

\*Department of Chemistry Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

(Received November 17, 2008; accepted March 3, 2009)

본 연구는 투명한 섬유유연제 제조용 양이온 계면활성제인 ASCO EAQ80의 개발 완료 후 이 제품의 안전성과 관련된 평가를 받기 위하여 실시되었다. 시험은 급성 경구투여 독성시험과 유전 독성시험으로 나뉘어 진행되었으며, 랫드를 이용한 경구 단회 투여 독성시험 결과, LD<sub>50</sub>는 5000 mg/kg를 초과하는 것으로 판단되었으며, Globally Harmonized Classification System의 기준에 의해 Category 5 또는 Unclassified로 분류되었다. 시험물질인 ASCO EAQ80의 복귀돌연변이 유발성에 대해서, 살모넬라균(TA98, TA100, TA1535, TA1537) 및 대장균(WP2uvrA (pKM101))을 이용하여 대사활성화 및 비대사활성화의 경우에서 변이원성 시험을 실시하였고, 그 결과는 모두 음성으로 판정되었다. 또한, 염색체이상 유발성 여부를 검색하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용하여 염색체이상시험을 수행하였으며, 시험물질인 ASCO EAQ80은 단시간처리법 및 연속처리법의 경우 대사활성계 적용여부에 관계없이 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포에 대해 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

The acute oral and genetic toxicity of ASCO EAQ80 was established in this study. ASCO EAQ80, a novel cationic surfactant produced by Aekyung Specialty Chemicals Co. LTD. is currently commercialized as a clear fabric softener. In acute oral toxicity study, the 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) of ASCO EAQ80 was determined to be higher than 5000 mg/kg and this product could be classified as Category 5 or Unclassified by Globally Harmonized Classification System. Also, to establish the genotoxicity of ASCO EAQ80, we performed bacterial reversion assay against *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA, and *in vitro* chromosomal aberration assay against Chinese hamster lung cells in the presence and absence of S-9 metabolic activation system. From these experiments, ASCO EAQ80 revealed nonmutagenic potential in *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, and *Escherichia coli* WP2uvrA both in the absence and presence of metabolic activation system. No clastogenicity of ASCO EAQ80 was observed in chromosomal aberration assay *in vitro*.

**Keywords:** ASCO EAQ80, cationic surfactant, clear fabric softener, acute oral toxicity, genetic toxicity

## 1. 서 론

투명 섬유유연제 제조용 양이온 계면활성제라 함은 기존 사용되는 대표적인 양이온 계면활성제인 DDAC (dialkyl dimethyl ammonium chloride), AAQ (amidoamine quat), EQ (ester quat), IMQ (imidazolium quat)보다 투명한 행광수 및 우수한 생분해도를 가짐으로써, 환경오염을 최소화 할 수 있고, 식물성 오일로부터 유도된 원료의 알킬기를 조절함으로써 유연성 및 흡수성을 변화 향상시킬 수 있으며, 한 분자 내에 4급화된 질소의 함유량을 늘림으로써 대전방지성을 향상시키고, 식물성 오일로부터 유도된 원료물질을 사용함으로써 생분해성이 우수하고 인체자극성이 낮으며, 분자 내에 친수기를 도입하여 용해성에

서 탁월한 성능을 가지는 차세대 양이온 계면활성제를 말한다. 투명 양이온 계면활성제의 용도는 공업용/가정용 섬유유연제, 헤어케어용, 화장품류, 살균제 및 살충제의 원료로 사용되며, 기존 양이온 계면활성제가 갖지 못한 투명성의 증가로 그 용도가 증가할 것으로 예상된다. 특히 현재 시판되는 가정용 섬유유연제의 경우는 양이온 계면활성제와 비이온 계면활성제의 단순 혼합형태로 제조되며, 계면활성제의 함량이 약 10% 이내이다.

이에 반해 투명용 양이온 계면활성제의 경우에는 용해성이 크기 때문에 고농축으로 제조할 수 있고, 비이온 계면활성제의 특성도 일부 지니고 있으므로, 비이온 계면활성제의 사용배제와 섬유유연제의 사용량 절감으로 인해 친환경 제품으로 각광받을 수 있다.

이와 같은 이유로 에경정밀화학(주)에서는 투명 섬유유연제 제조용

<sup>†</sup> 교신저자 (e-mail: ssmoon@kongju.ac.kr)



탁액의 흡광도를 UV spectrophotometer (측정파장 660 nm, V-550, Jasco, Japan)로 측정하여  $1 \times 10^9$  cells/mL 이상의 균수가 확인된 것을 시험에 사용하였다. Nutrient broth 액체배지는 Nutrient broth No. 2 (Oxoid, UK)를 2.5% 되게 3차 증류수에 용해한 후 고압증기멸균하여 사용하였다.

S9 mixture는 필요량을 사용시 조제하였다. 용량설정시험 결과, 사용한 모든 시험균주에서 생육저해가 관찰되었다. 시험물질에 의한 침전은 대사활성계 적용유무에 관계없이 사용한 모든 균주의 1250, 2500 및 5000 µg/plate 용량에서 관찰되었지만 콜로니 계수에는 영향이 없었다. 따라서 본시험의 용량은, 비대사활성화의 TA100 및 TA1535 균주는 312.5 µg/plate를 최고용량으로 설정하고, 그 이하는 공비 2로 최고용량을 포함한 6용량의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 실시하였다.

비대사활성화의 TA1537, 대사활성화의 TA100 및 대사활성계 적용유무에 관계없이 TA98 균주는 625 µg/plate를, 비대사활성화의 WP2uvrA (pKM101), 대사활성화의 TA1535 및 TA1537 균주의 경우에는 1250 µg/plate를, 대사활성화의 WP2uvrA (pKM101) 균주의 경우에는 2500 µg/plate를 최고용량으로 설정하고, 그 이하는 공비 2로 최고용량을 포함한 5용량의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 실시하였다.

Top agar가 고정된 후 페트리디쉬를 뒤집어서 37 °C 배양기에서 48 h 배양하였다. 배양 경과 후 복귀변이콜로니수를 콜로니카운터(ProtoCOL, SYMBIOSIS, UK)로 자동계측하였다. 또한, 자동계측을 실시한 페트리디쉬상에서 시험물질이 침전 혹은 생육저해작용 등에 의해 콜로니수의 자동계측이 정확하게 이루어지지 않았다고 판단한 경우에는 육안계측을 실시하여 복귀변이콜로니수를 보정하였다.

용량설정시험 및 본시험에서 얻어진 복귀변이콜로니수는 실측치로 기록하였다.

Background lawn은 육안으로 관찰하였다.

대사 활성계 존재 유무에 관계없이 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비하여 한 개 이상의 용량에서 명확히 증가하고, 2배 이상이면서, 용량 의존성을 가지며, 그 작용에 재현성이 인정될 경우 양성으로 판정하고, 그 외에는 음성으로 판정하였다.

생육저해의 판정기준은 시험물질군의 Background lawn이 음성대조군과 비교하여 확실히 조밀하거나 투명한 경우로 하였다.

## 2.3. 염색체 이상 시험

### 2.3.1. 포유동물 배양 세포주 및 배양

본 시험에서는 검출감도가 높은 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양 세포주를 사용하였다.

세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였고, 계대배양 후 각 로트별로 액체질소탱크(XC34/18, MVE, USA)에 냉동보존 하였다.

Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양 세포는 25개의 modal chromosome number를 가지고 있으며, 세포주기는 약 15~17 h이다. 세포는 EMEM을 사용하여 온도 37 °C, 습도 95%, CO<sub>2</sub> 농도가 5%로 설정된 CO<sub>2</sub> 인큐베이터(Mco-20AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포는 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 가하여 세포층 위에 잘 분산되게 한 다음 세포를 분리하고, 배지를 첨가하여 세포현탁액으로 만든 후, 원심분리하여 새로운 배지가 담긴 배양 플라스크에서 계대 배양하며, 주기적으로 mycoplasma의 오염이 있는지를 확인하였다.

Eagle's minimum essential medium (EMEM, Cambrex Bio Science Walker sville, Inc. USA)에 heat inactivation시킨 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, USA)을 10%가 되도록 첨가하고, Penicillin-streptomycin (Gibco, USA)을 100 : 1의 비율로 넣어 사용하였다.

### 2.3.2. 시험 방법[6-8]

시험물질의 용량을 설정하기 위해 0, 4.9, 9.8, 19.6, 39.1, 78.2, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 µg/mL의 12단계 용량으로 세포증식억제시험을 실시하였다. 세포증식억제시험(MTT assay)의 결과에 따라서, 세포독성지표인 50% 세포증식억제농도(Inhibition concentration 50%: IC<sub>50</sub>)를 구하여 IC<sub>50</sub>를 최고 용량으로 설정하고, 그 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 3단계 용량의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 구성하였다[6].

음성대조물질로는 주사용수가 사용되었고, 양성대조물질로는 MMC (Mitomycin C, Sigma, USA), B[a]P (Benzo[a]pyrene, Sigma, USA)가 사용되었다.

75 cm<sup>2</sup> 세포 배양용 플레이트(Nunc, USA)에 계대배양된 세포 부유액의 세포수를 혈구계수관을 이용하여 계수한 후  $5 \times 10^4$  cells/mL의 세포농도로 60 mm 세포배양용 페트리디쉬(Nunc, USA)에 5 mL씩 분주한 다음, 3계열(단시간처리법의 비대사활성화, 대사활성화 및 연속처리법)로 구분하고, 음성대조군, 시험물질군 및 양성대조군으로 나누어 라벨하였다. 각 시험군은 각각 2매의 페트리디쉬를 사용하였다.

단시간처리법은 각 페트리디쉬에 음성대조물질, 각 용량의 시험물질 조제액을 첨가하였다. 대사활성화계열에는 S9의 최종농도가 5%가 되도록 S9 mix를 첨가하였다. 비대사활성화계열에는 S9 mix와 동일한 양의 0.1 mol/L 인산완충액(pH 7.4)을 첨가하였다. 그리고, 양성대조물질로는 비대사활성화인 경우에 MMC를 0.05 µg/mL, 대사활성화 경우에는 B[a]P를 20 µg/mL 첨가하였다. 모든 계열을 6 h 배양한 후 신선한 배지로 교환하고 다시 18 h 더 배양하였다.

연속처리법은 각 페트리디쉬에 음성대조물질, 각 농도의 시험물질 조제액을 첨가하였다. 그리고, 양성대조물질 MMC를 0.05 µg/mL 첨가하여 24 h 배양하였다.

각 계열의 배양은 온도 37 °C, 습도 95%, 5% CO<sub>2</sub>로 설정된 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다.

배양종료 2 h 전에 Colcemid 용액(Gibco, USA)을 최종농도가 0.25 µg/mL되게 첨가하였다.

배양종료 후 37 °C로 가온한 0.25% Trypsin-EDTA로 처리하여 15 mL 원심분리관에 넣고 1000 rpm에서 5 min간 원심분리하여 세포를 모은 후 37 °C의 저장액(0.075 M KCl) 5 mL에 잘 현탁시킨 후, 37 °C에 30 min간 방치하고, 냉각 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)을 1 mL를 가하여 5 min간 원심분리하여 상층액을 버리고, 5 mL의 냉각 고정액으로 고정하고 원심분리(2000 rpm, 4 °C, 5 min)하였다. 이와같은 처리를 2회 반복하고, 얻은 세포현탁액을 잘 부유시켜 슬라이드글래스 2군데에 1~2방울씩 떨어뜨려 검체를 제작하였다. 하룻밤을 건조한 슬라이드글래스를 5% Giemsa (0.1 mol/L Sörensön 인산완충액, pH 6.8)로 30 min간 염색, 수세하여 건조해 망검법으로 검체에 번호를 매겼다.

### 2.3.3. 관찰

각 슬라이드 중에서 잘 흩어진 100개(1개 용량당 200개)의 분열중기상을 1000배의 현미경(BX51, OLYMPUS, Japan)에서 관찰하였다. 염색체이상의 분류는 수적 이상은 배수체(polyploidy; pol), 구조이상은 염색분체형 절단(chromatid break; ctb), 염색분체형 교환(chromatid exchange; cte), 염색체형 절단(chromosome break; csb), 염색체형 교환(dicentric, ring 등: chromosome exchange; cse) 및 기타(o)로 분류하였다.

염색분체형의 갭(chromatid gap; ctg) 또는, 염색체형의 갭(chromosome gap; csg)에 대해서는 별도로 기록하였다. gap(g)의 판단기준은 염색분체의 길이보다도 좁은 비염색성 부위의 것으로 하였다. 그 외 1개의 분열중

**Table 2. Clinical Signs of Rats in Acute Oral Toxicity Study**

Group/step/ dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Hour (Day0) after treatment				
			0.5	1	2	4	8
G1 Step1 300	1F01	Soft stool	-	-	-	+	-
		Mucous stool	-	-	-	+	+
	1F02	Mucous stool	-	-	-	+	+
		Mucous stool	-	-	-	-	+
G2 Step2 300	2F04	Mucous stool	-	-	-	+	+
	2F05	Mucous stool	-	-	-	+	+
	2F06	Mucous stool	-	-	-	-	+
G3 Step3 2000	3F07	Mucous stool	-	-	-	-	+
	3F08	Mucous stool	-	-	-	-	+
	3F09	Mucous stool	-	-	+	+	+
G4 Step4 2000	4F10	Mucous stool	-	-	+	+	-
	4F11	Mucous stool	-	-	+	+	-
		Soft stool	-	-	-	+	-
	4F12	Mucous stool	-	-	+	+	-
		Diarrhea	-	-	-	-	+

Group/step/ dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Day after treatment													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 Step1 300	1F01		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1F02		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1F03		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 Step2 300	2F04		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2F05		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2F06		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 Step3 2000	3F07		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3F08	Soft stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Soiled perineal region	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Dirty nose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3F09	Soiled perineal region	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G4 Step4 2000	4F10	Soiled perineal region	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4F11	Soiled perineal region	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4F12	Soiled perineal region	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : No abnormalities detected, + : abnormalities detected

기세포에 다수의 gap, 절단 등이 있는 경우는 단편화(frg)로 기록하였다. 이러한 이상을 1개라도 가지는 세포를 이상세포 1개로 기록하였다.

수적 이상은 배수성이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 그 종류를 각각 기록하였다.

2.3.4. 결과의 판정[9]

염색체 이상을 가진 분열중기상의 세포수의 출현율이 음성대조군에 비하여 확실히 증가하고 또, 용량 의존성이 인정되는 경우, 또한 한 개의 용량에서 확실히 증가되고 재현성이 인정되는 경우는 양성으로 판정하고 그 외는 음성으로 판정하였다. gap은 구조이상에 포함하지 않는 결과로 표기하고 종합판단에도 gap을 포함시키지 않고 결과를 평가하였다.

시험물질의 염색체이상유발성에 대한 최종판정은 Toshio Sofuni 등의 판정기준에 따라 염색체이상을 가지는 세포의 빈도가 5% 미만을 음성, 5% 이상 10% 미만을 의양성, 10% 이상을 양성으로 하였다[9].

3. 결과 및 고찰

3.1. 급성 경구투여 독성시험

ASCO EAQ80에 대한 급성 경구 투여시의 안전성을 평가하고자 암컷 랫드를 300 mg/kg (1단계 및 2단계)의 투여용량 및 2000 mg/kg (3단계 및 4단계)의 투여용량으로 각 2단계씩 투여하였고, 결과를 토대로 LD<sub>50</sub>치를 구하였다.

관찰기간 동안, 1단계에서 투여 당일 관찰 4 h째에 점액변 2례 및 연변 1례가 관찰되었고, 8 h째에 3례에서 점액변이 관찰되었다. 2단계에서는 투여당일 관찰 4 h째에 점액변 2례, 8 h째에 3례에서 점액변이 관찰되었다. 1단계 및 2단계 모든 개체에서 투여 후 1일 경과 후에는 특이한 증상이 관찰되지 않았다.

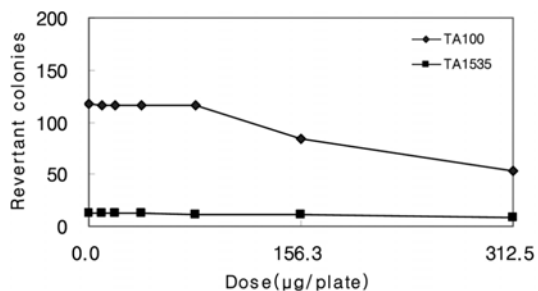
3단계에서는 투여 당일 관찰 2 h 및 4 h째에 점액변 각 1례가 관찰되었고, 8 h째에 3례에서 점액변이 관찰되었으며, 투여 후 1일째에는 코주위 오염 및 연변이 각 1례, 하복부 오염이 2례 관찰되었다. 투여 후 2일 경과 후에는 관찰되지 않았다.

4단계에서는 투여 당일 관찰 2 h째에 점액변 3례, 4 h째에 점액변

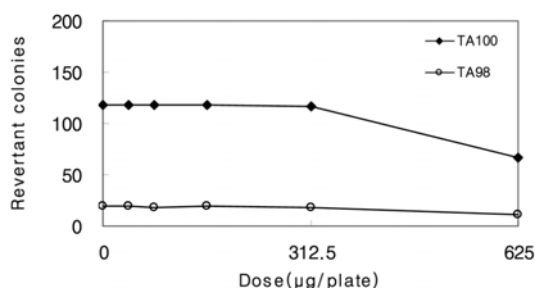
**Table 3. Summary Data of Preliminary Dose Range-Finding Test of ASCO EAQ80 [without and with S9 mix]**

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [N=2] (without S9 mix)				
	Base-pair substitution type			Frame-shift type	
	TA 100	TA 1535	WP2uvrA (pKM101)	TA98	TA1537
0	117, 118 [118 $\pm$ 1]	13, 10 [12 $\pm$ 2]	118, 119 [119 $\pm$ 1]	19, 20 [20 $\pm$ 1]	11, 9 [11 $\pm$ 1]
312.5	67, 51 [59 $\pm$ 11]*	8, 8 [8 $\pm$ 0]*	116, 115 [116 $\pm$ 1]	18, 17 [18 $\pm$ 1]	9, 10 [10 $\pm$ 1]
625	5, 5 [5 $\pm$ 0]*	5, 7 [6 $\pm$ 1]*	118, 117 [118 $\pm$ 1]	11, 11 [11 $\pm$ 0]*	4, 3 [4 $\pm$ 1]*
1250	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	4, 3 [4 $\pm$ 1]* <sup>†</sup>	81, 59 [70 $\pm$ 16]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>
2500	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	32, 30 [31 $\pm$ 1]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>
5000	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>
Positive control	427, 456 [442 $\pm$ 21]	325, 329 [327 $\pm$ 3]	648, 669 [659 $\pm$ 15]	480, 447 [464 $\pm$ 23]	583, 513 [548 $\pm$ 49]
	Number of revertant colonies per plate [N=2] (with S9 mix)				
0	119, 120 [120 $\pm$ 1]	15, 17 [16 $\pm$ 1]	114, 116 [115 $\pm$ 1]	20, 19 [20 $\pm$ 1]	7, 10 [9 $\pm$ 2]
312.5	120, 118 [119 $\pm$ 1]	17, 13 [15 $\pm$ 3]	114, 116 [115 $\pm$ 1]	19, 20 [20 $\pm$ 1]	10, 9 [10 $\pm$ 1]
625	79, 86 [83 $\pm$ 5] *	13, 12 [13 $\pm$ 1]	115, 119 [117 $\pm$ 3]	9, 11 [10 $\pm$ 1]*	9, 8 [9 $\pm$ 1]
1250	65, 52 [59 $\pm$ 9]* <sup>†</sup>	6, 6 [6 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	112, 113 [113 $\pm$ 1] <sup>†</sup>	3, 0 [2 $\pm$ 1]* <sup>†</sup>	3, 1 [2 $\pm$ 1]* <sup>†</sup>
2500	20, 21 [21 $\pm$ 1]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	32, 24 [28 $\pm$ 6]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>
5000	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>	0, 0 [0 $\pm$ 0]* <sup>†</sup>
Positive control	496, 465 [481 $\pm$ 22]	164, 121 [143 $\pm$ 30]	458, 450 [454 $\pm$ 6]	428, 488 [458 $\pm$ 42]	128, 147 [138 $\pm$ 13]
Strain (without S9)	Positive control	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Strain (without S9)	Positive control	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
TA100	: Sodium azide (SA)	1.5	TA100	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0
TA1535	: Sodium azide (SA)	1.5	TA1535	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0
WP2uvrA(pKM101)	: 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)	5.0	WP2uvrA (pKM101)	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0
TA98	: 2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	TA98	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0
TA1537	: 9-Aminoanthracene (9-AA)	80.0	TA1537	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0

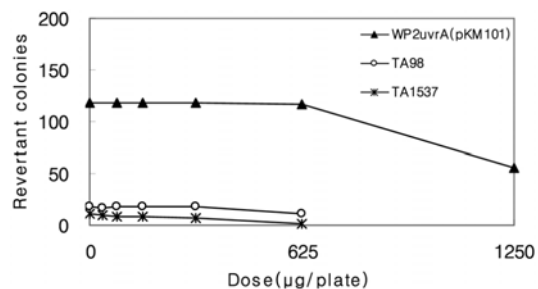
N : Number of bacterial reverse examined, [ ] : Mean  $\pm$  S.D., \* : Indicated growth inhibition, <sup>†</sup> : Precipitation



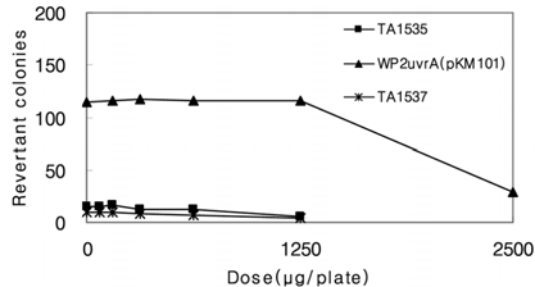
**Figure 2. Dose-response curve of revertant colonies by ASCO EAQ80 in differential bacterial strains [without S9 mix] (TA100, TA1535).**



**Figure 4. Dose-response curve of revertant colonies by ASCO EAQ80 in differential bacterial strains [with S9 mix] (TA98, TA100).**



**Figure 3. Dose-response curve of revertant colonies by ASCO EAQ80 in differential bacterial strains [without S9 mix] (TA98, TA1537, WP2uvrA (pKM101)).**



**Figure 5. Dose-response curve of revertant colonies by ASCO EAQ80 in differential bacterial strains [with S9 mix] (TA1535, TA1537, WP2uvrA (pKM101)).**

3일 및 연번 1레가 관찰되었고, 8 h째에는 설사 1레가 관찰되었으며, 투여 후 2일째까지 전 개체에서 하복부 오염이 관찰되었다. 투여 후

3일 경과 후에는 관찰되지 않았다(Table 2).

관찰기간 동안 1~4 단계 모두에서 사망례는 관찰되지 않았고, 전

**Table 4. Results of The Bacterial Reverse Mutation Test of ASCO EAQ80 [without S9 mix]**

Dose (µg/plate)	Number of revertant colonies per plate [N=2] (without S9 mix)				
	Base-pair substitution type			Frame-shift type	
	TA100	TA1535	WP2uvrA (pKM101)	TA98	TA1537
0	118, 118 [118 ± 0]	11, 14 [13 ± 2]	118, 118 [118 ± 0]	19, 18 [19 ± 1]	12, 11 [12 ± 1]
9.8	117, 116 [117 ± 1]	13, 12 [13 ± 1]	-	-	-
19.6	117, 115 [116 ± 1]	12, 14 [13 ± 1]	-	-	-
39.1	116, 116 [116 ± 0]	13, 13 [13 ± 0]	-	16, 18 [17 ± 1]	10, 9 [10 ± 1]
78.2	115, 117 [116 ± 1]	11, 12 [12 ± 1]	117, 119 [118 ± 1]	17, 18 [18 ± 1]	8, 10 [9 ± 1]
156.3	80, 87 [84 ± 5]*	11, 12 [12 ± 1]	118, 118 [118 ± 0]	17, 18 [18 ± 1]	9, 9 [9 ± 0]
312.5	49, 57 [53 ± 6]*	8, 9 [9 ± 1]*	117, 118 [118 ± 1]	17, 19 [18 ± 1]	7, 8 [8 ± 1]
625	-	-	118, 115 [117 ± 2]	13, 10 [12 ± 2]*	1, 3 [2 ± 1]*
1250	-	-	44, 68 [56 ± 17]*†	-	-
Positive control	413, 427 [420 ± 10]	321, 320 [321 ± 1]	490, 445 [468 ± 32]	435, 428 [432 ± 5]	540, 521 [531 ± 13]

Strain	Positive control	Dose (µg/plate)
TA100	: Sodium azide (SA)	1.5
TA1535	: Sodium azide (SA)	1.5
WP2uvrA(pKM101)	: 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)	5.0
TA98	: 2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0
TA1537	: 9-Aminoanthracene (9-AA)	80.0

N : Number of bacterial reverse examined, - : No data, [ ] : Mean ± S.D., \* : Indicated growth inhibition, † : Precipitation

**Table 5. Results of The Bacterial Reverse Mutation Test of ASCO EAQ80 [with S9 mix]**

Dose (µg/plate)	Number of revertant colonies per plate [N=2] (with S9 mix)				
	Base-pair substitution type			Frame-shift type	
	TA100	TA1535	WP2uvrA (pKM101)	TA98	TA1537
0	118, 119 [119 ± 1]	16, 15 [16 ± 1]	116, 114 [115 ± 1]	20, 19 [20 ± 1]	9, 10 [10 ± 1]
39.1	118, 119 [119 ± 1]	-	-	18, 20 [19 ± 1]	-
78.2	117, 119 [118 ± 1]	16, 14 [15 ± 1]	-	18, 19 [19 ± 1]	10, 10 [10 ± 0]
156.3	117, 118 [118 ± 1]	15, 17 [16 ± 1]	115, 116 [116 ± 1]	20, 20 [20 ± 0]	9, 9 [9 ± 0]
312.5	116, 118 [117 ± 1]	13, 13 [13 ± 0]	117, 117 [117 ± 0]	18, 17 [18 ± 1]	8, 8 [8 ± 0]
625	71, 63 [67 ± 6]*	12, 13 [13 ± 1]	115, 116 [116 ± 1]	9, 13 [11 ± 3]*	8, 7 [8 ± 1]
1250	-	6, 5 [6 ± 1]*†	115, 116 [116 ± 1]†	-	4, 3 [4 ± 1]*†
2500	-	-	29, 28 [29 ± 1]*†	-	-
Positive control	462, 442 [452 ± 14]	155, 145 [150 ± 7]	424, 468 [446 ± 31]	447, 492 [470 ± 32]	140, 122 [131 ± 13]

Strain	Positive control	Dose (µg/plate)	Strain	Positive control	Dose (µg/plate)
TA100	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	TA98	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0
TA1535	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	TA1537	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0
WP2uvrA (pKM101)	: 2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0			

N : Number of bacterial reverse examined, - : No data, [ ] : Mean ± S.D., \* : Indicated growth inhibition, † : Precipitation

단계의 모든 개체에서 순조로운 체증증가가 관찰되었으며, 계획 부검 결과, 특이한 소견은 발견되지 않았다.

이상의 결과로 볼 때, ASCO EAQ80의 랫드에 대한 급성 경구 투여시 Globally Harmonized Classification System은 Category 5 or Unclassified로 분류되며, LD<sub>50</sub>치는 5000 mg/kg b.w. 이상으로 판단된다.

**3.2. Salmonella typhimurium, Escherichia coli 균주를 이용한 복귀 돌연변이 시험**

시험물질인 ASCO EAQ80의 복귀돌연변이 유발성에 대해서, 살모넬라균(TA98, TA100, TA1535, TA1537) 및 대장균(WP2uvrA (pKM101))을 이용하여 대사활성화 및 비대사활성화의 경우에서 변이원성 시험을 실시하였다.

용량설정시험 결과, 사용한 모든 시험균주에서 생육저해가 관찰되

었다. 시험물질에 의한 침전은 대사활성계 적용유무에 관계없이 사용한 모든 균주의 1250, 2500 및 5000 µg/plate 용량에서 관찰되었지만 콜로니 계수에는 영향이 없었다(Table 3).

따라서 본 시험의 용량은, 비대사활성화의 TA100 및 TA1535 균주는 312.5 µg/plate를 최고용량으로 설정하고, 그 이하는 공비 2로 최고용량을 포함한 6용량의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 실시하였다. 비대사활성화의 TA1537, 대사활성화의 TA100 및 대사활성계 적용유무에 관계없이 TA98 균주는 625 µg/plate를, 비대사활성화의 WP2uvrA (pKM101), 대사활성화의 TA1535 및 TA1537 균주의 경우에는 1250 µg/plate를, 대사활성화의 WP2uvrA (pKM101) 균주의 경우에는 2500 µg/plate를 최고용량으로 설정하고, 그 이하는 공비 2로 최고용량을 포함한 5용량의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 실시하였다.

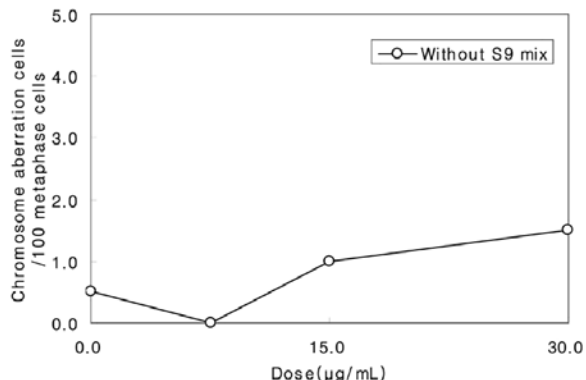
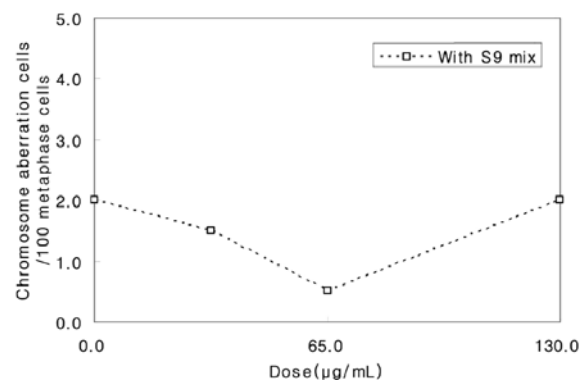
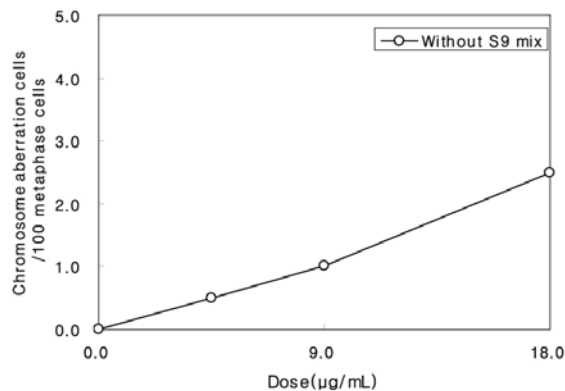
**Table 6. Results of Growth Inhibition Test in CHL/IU Cells Treated with ASCO EAQ80**

S9 mix/Time	Test substance	Dose (µg/mL)	Growth of CHL/IU cells (OD) (Mean ± S.D.)
S9 mix (-) /6+18 hrs	Water for injection	0	1.062 ± 0.005
		4.9	0.955 ± 0.031
		9.8	0.776 ± 0.016
		19.6	0.597 ± 0.030
		39.1	0.435 ± 0.016
	ASCO EAQ80	78.2	0.287 ± 0.005
		156.3	0.185 ± 0.002
		312.5	0.104 ± 0.002
		625	0.122 ± 0.007
		1250	0.150 ± 0.040
S9 mix (+) /6+18 hrs	Water for injection	0	1.045 ± 0.002
		4.9	0.953 ± 0.034
		9.8	0.802 ± 0.060
		19.6	0.722 ± 0.021
		39.1	0.645 ± 0.019
	ASCO EAQ80	78.2	0.661 ± 0.036
		156.3	0.495 ± 0.032
		312.5	0.168 ± 0.017
		625	0.110 ± 0.005
		1250	0.151 ± 0.004
S9 mix (-) /24+0 hrs	Water for injection	0	1.039 ± 0.007
		4.9	0.941 ± 0.009
		9.8	0.719 ± 0.053
		19.6	0.498 ± 0.047
		39.1	0.146 ± 0.028
	ASCO EAQ80	78.2	0.076 ± 0.001
		156.3	0.083 ± 0.002
		312.5	0.089 ± 0.005
		625	0.070 ± 0.007
		1250	0.046 ± 0.018
		2500	0.036 ± 0.003
		5000	0.019 ± 0.002

시험결과, 모든 시험군주에서 시험물질에 의한 복귀변이콜로니수는 대사활성계의 적용유무에 관계없이 용량 의존적으로 증가되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 2배 이상의 증가를 보이지 않았다. 또한 시험물질에 의한 생육저해는 대사활성계 적용유무에 관계없이 사용한 모든 시험군주에서 관찰되었다. 시험물질에 의한 침전은 비대사활성화의 WP2uvrA (pKM101) 및 대사활성화의 TA1535, TA1537 군주의 1250 µg/plate 용량에서, 대사활성화의 WP2uvrA (pKM101) 군주의 1250, 2500 µg/plate 용량에서 관찰되었지만 콜로니 계수에는 영향이 없었다(Figures 2, 3, 4 and 5, Tables 4 and 5).

음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균이 historical data의 범위에 속하였으며, 양성대조군은 각 군주의 특성을 확인할 수 있도록 해당농도에서 확실히 증가하였다.

또한, 본 시험에서 각 군주당 최소 4단계 이상의 농도단계에서 복귀

**Figure 6. Dose-response curve for the incidence of chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with ASCO EAQ80 [without S9 mix for 6 hrs].****Figure 7. Dose-response curve for the incidence of chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with ASCO EAQ80 [with S9 mix for 6 hrs].****Figure 8. Dose-response curve for the incidence of chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with ASCO EAQ80 [without S9 mix for 24 hrs].**

변이콜로니수를 확인할 수 있었으므로 시험이 적절하게 실시되었다고 판단하였으며, 용량설정시험 및 본 시험에서 실시된 무균시험에서 오염은 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 해당 시험조건에서 시험물질인 ASCO EAQ80의 복귀돌연변이 유발성은 음성으로 판정되었다.

**Table 7. Results of *in vitro* Chromosome Aberration Test in CHL/IU Cells Treated with ASCO EAQ80**

S9 mix/ Time	Test substance	Dose (µg/mL)	No. of cell scored	No. of aberration cell							Aberration cells (%)	Chromosome aberration cell/100 metaphase cells (%) (Mean ± S.D.)
				ctb	csb	cte	cse	frg	o	pol		
S9 mix (-) /6 + 18 hrs	Water for injection	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5 ± 0.7
			100	0	0	1	0	0	0	0	1	
	ASCO EAQ80	7.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0 ± 0.0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	
		15.0	100	1	0	0	1	0	0	0	2	1.0 ± 1.4
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	
	30.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5 ± 2.1	
		100	2	0	0	1	0	0	0	3		
	MMC	0.05	100	5	4	6	1	1	0	0	17	16.0 ± 1.4
			100	6	3	5	1	0	0	0	15	
S9 mix (+) /6 + 18 hrs	Water for injection	0	100	1	1	0	0	0	0	0	2	2.0 ± 0.0
			100	1	0	1	0	0	0	0	2	
	ASCO EAQ80	32.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5 ± 2.1
			100	2	0	0	1	0	0	0	3	
		65.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5 ± 0.7
			100	0	0	0	0	1	0	0	1	
	130.0	100	0	0	1	1	0	0	0	2	2.0 ± 0.0	
		100	2	0	0	0	0	0	0	2		
	B[a]P	20	100	6	4	5	2	0	0	0	17	16.0 ± 1.4
			100	4	2	7	1	1	0	0	15	
S9 mix (-) /24 + 0 hrs	Water for injection	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0 ± 0.0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	
	ASCO EAQ80	4.5	100	0	0	1	0	0	0	0	1	0.5 ± 0.7
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	
		9.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0 ± 1.4
			100	0	0	0	2	0	0	0	2	
	18.0	100	2	0	0	1	0	0	0	3	2.5 ± 0.7	
		100	1	0	1	0	0	0	0	2		
	MMC	0.05	100	4	3	6	2	0	0	0	15	15.5 ± 0.7
			100	5	2	7	2	0	0	0	16	

**3.3. 염색체이상 시험**

시험물질 ASCO EAQ80의 염색체이상 유발성 여부를 검색하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용하여 염색체이상시험을 수행하였다.

시험물질의 용량을 설정하기 위해 0, 4.9, 9.8, 19.6, 39.1, 78.2, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 µg/mL의 12단계 용량으로 세포증식억제시험을 실시하였고(Table 6), 그 결과에 따라서, 세포독성 지표인 IC<sub>50</sub>를 구한 결과, 단시간처리법의 비대사활성화의 경우에는 30.0 µg/mL, 단시간처리법의 대사활성화의 경우에는 130.0 µg/mL, 연속처리법의 경우에는 18.0 µg/mL이었다. 따라서, 본 시험은 단시간처리법 및 연속처리법의 경우 대사활성계 적용유무에 관계없이 IC<sub>50</sub>를 최고용량으로 설정하고, 그 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 3단계 용량의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 실시하였고, 그 결과, 단시간처리법 및 연속처리법의 경우 대사활성계 적용여부에 관계없이 구조이상 및 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 0.0 ~ 2.5%로 음성대조군과 비교하여 증가되지 않았다(Figures 6, 7, and 8, Table 7).

한편, 양성대조군에서 구조이상 및 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 단시간처리법의 비대사활성화 및 대사활성화의 경우는 각각 16.0, 16.0%이고 연속처리법의 경우는 15.5%로 관찰되어 음성대조군

에 비해 확실한 증가가 관찰되었다(Table 7).

음성대조군 및 양성대조군의 구조이상 및 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 historical data의 정상범위에 있었기 때문에 본시험은 적절한 조건하에서 실시되었음이 확인되었고, 이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질인 ASCO EAQ80은 단시간처리법 및 연속처리법의 경우 대사활성계 적용여부에 관계없이 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포에 대해 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

**4. 결 론**

애경정밀화학(주)에서 투명한 섬유유연제 제조용 양이온 계면활성제로 개발한 ASCO EAQ80에 대하여 랫드를 이용한 급성 경구투여 독성 시험을 실시하였고, 복귀돌연변이 유발성을 확인하기 위해 살모넬라균(TA98, TA100, TA1535, TA1537) 및 대장균(WP2uvrA (pKM101))을 이용하여 대사활성화 및 비대사활성화의 경우에서 변이원성 시험을 실시하였으며, 또한, 염색체이상 유발성 여부를 확인하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 수행하였다. 각각의 실험 결과는 앞서 밝힌 바와 같이, LD<sub>50</sub>는 5000 mg/kg 이상이고, Globally Harmonized Classification System의 기준에



의해 Category 5 또는 Unclassified로 분류될 수 있으며, 복귀돌연변이 유발성에 대해 음성으로 판정되었고, *in vitro* 에서의 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포에 대해 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 확인되었다. 본 연구가 랫드와 *in vitro* 상에서 진행되었으므로, 한계를 지니고 있어 실제 적용에 있어 확실하게 단언할 수는 없으나, 이상의 연구 결과를 종합해 봤을 때 ASCO EAQ80의 급성 경구투여 독성과 복귀돌연변이 유발성 및 염색체이상 유발성 등에 대해서는 비교적 안정성이 있을 것으로 예상된다.

## 참 고 문 헌

1. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 423, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (Adopted: 17<sup>th</sup> December 2001).
2. 국립환경연구원 고시 제1998-41호, 화학물질 유해성 시험 연구기관의 지정 등에 관한 규정의 별표 5 화학물질 유해성 시험방법 제 4장 10항 유전독성시험 (1998).
3. D. M. Maronand and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
4. T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, and M. Okada, *Mutat. Res.*, **48**, 121 (1977).
5. L. D. Claxton, J. Allen, A. Auletta, K. Mortelmans, E. Nestmann, and E. Zeiger, *Mutat. Res.*, **189**, 83 (1987).
6. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
7. M. Ishidate, Jr. and S. Odashima, *Mutat. Res.*, **48**, 337 (1977).
8. T. Sofuni, A. Matsuoka, M. Sawada, M. Ishidate, Jr., E. Zeiger, and M. D. Shelby, *Mutat. Res.*, **241**, 175 (1990).
9. T. Sofuni (Ed.), Data book of chromosomal aberration test *in vitro*, Revised edition (1998).