

화장품 중 1,2,4-트리하이드록시벤젠 위해평가

2020. 11.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

의료제품연구부 화장품연구과

화장품 중 1,2,4-트리하이드록시벤젠 위해평가

< 요약 >

- 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 국내 화장품에서 사용한다 물질로 관리하고 있지 않으며 유럽, 미국 및 일본에서도 사용한다 성분으로 지정되어 있지 않음
- 화장품 중 1,2,4-트리하이드록시벤젠 위해평가 결과
 - 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 심각한 피부감작성 물질로 분류되며, 유전 독성 가능성을 배제할 수 없음. 따라서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 산화성/영구적 염모제 성분으로 사용할 경우 안전성에 문제가 있을 가능성이 있음

〈목 차〉

1. 위해평가 배경 및 목적	4
2. 위해평가 방법	5
3. 위해평가 결과	6
3.1. 위험성 확인	6
3.2. 위험성 결정	31
3.3. 노출평가 및 위해도 결정	32
4. 결론	33
5. 외국의 평가사례	34
6. 제한점	35
7. 참고문헌	36

1. 위해평가 배경 및 목적

- 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 유럽에서 산화성/영구적 염모제로 사용하고 있음
- 국내에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 화장품 중 사용한도 원료로 관리하고 있지 않으며 유럽, 미국 및 일본에서도 사용한도 원료로 관리하고 있지 않음
- 국내 화장품 중 염모제 성분으로 1,2,4-트리하이드록시벤젠 사용 시 안전성을 확인하기 위하여 평가를 실시함

2. 위해평가 방법

2.1. 위험성 확인

- 물리·화학적 성질, 외국의 관리 현황, 노출경로, 독성학적 자료 등에 대한 문헌 조사를 통해 확인함

2.2. 위험성 결정

- ‘화장품 위해평가 가이드라인’의 위험성 결정 절차에 따라 평가함
- 동 가이드라인에 제시된 독성자료 수집원을 통해 독성자료 및 독성값 (무독성량, 최소유해용량 등)을 조사하였음
- ※ 무독성량 : NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)
- ※ 최소유해용량 : LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level)

2.3. 노출평가 및 위해도 결정

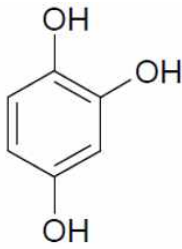
- 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 유전독성 우려로 따로 노출평가 및 위해도 결정은 하지 않음

3. 위해평가 결과

3.1. 위험성 확인

3.1.1. 물리·화학적 성질

표 1. 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 물리·화학적 성질

항 목	내 용
물질명(INCI)	1,2,4-트리하이드록시벤젠(1,2,4-Trihydroxybenzene)
IUPAC명	Benzene-1,2,4-triol
CAS No.	533-73-3
화학식	C ₆ H ₆ O ₃
분자량	126.11 g/mol
구조식	
물리적 성상	열은 베이지색 분말
용해도	486 g/L at 20°C
Log P _{ow}	0.2
동의어 (synonyms)	1,2,4-Benzenetriol 1,3,4-Trihydroxybenzene Hydroxyhydroquinone Hydroxyquinol

3.1.2. 사용현황

- 국내에서 화장품의 염모제 성분으로 허용되어 있지 않음
- 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 유럽에서 염모제 성분으로, 별도의 산화제 혼합 없이 최대 3% 농도로 사용됨(SCCS, 2019)
- 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 영구적 염모제에 최대 2.5%의 농도로 사용되는 자가 산화 염색제(auto-oxidative dye)임. 완제품은 공기에 노출되기 전까지 비활성화된 환경을 유지함(SCCS, 2019)
- 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 모발 염색 샴푸에 최대 0.7%의 농도로 사용되는 자가 산화 염색제임. 모발 염색샴푸는 모발 색 유지를 위해 일주일에 2 ~ 3회 사용됨(SCCS, 2019)
- 각국의 화장품 중 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 관리기준은 아래 표와 같음

표 2. 각국의 화장품 중 1,2,4-트리하이드록시벤젠 관리기준

국가	한국	유럽	미국	일본
기준	사용한도 원료로 관리하지 않음			

3.1.3. 노출경로

- 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 염모제로 주로 사용됨에 따라 피부노출이 주요한 노출경로임

3.1.4. 독성학적 자료

표 3. 독성학적 자료 확보 유무

일반독성		피부 자극성	면역 독성	신경 독성	생식·발생 독성	유전 독성	발암성	광독성
단회투여	반복투여							
✓	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-

(✓: 독성 자료 있음, -: 독성 자료 없음)

3.1.4.1. 동력학정보

3.1.4.1.1. 피부흡수율

- 1,2,4-트리하이드록시벤젠에 대한 피부흡수율을 사람 피부(3명의 여성)를 사용한 *in vitro* 시험법으로 측정하였음.

1,2,4-트리하이드록시벤젠이 2.78% 함유된 제형을 20 mg/cm²의 용량(556 µg/cm²에 상응)으로 30분 동안 적용함. 사용된 제형은 50%의 PEG-6과 대략 47%의 물을 함유함. 방사선 표지된 1,2,4-트리하이드록시-[U-¹⁴C]-벤젠을 사용하였으며 방사화학적 순도는 93.5%임. 피부는 실험실까지 약 1시간 이내에 운반되었으며 그동안 피부는 얼음에 보관하였음. 실험실에 도착한 후 피하 지방을 제거하고, 피부는 사용할 때까지 -18℃ 이하에서 알루미늄 호일로 보관함.

피부를 해동한 후 약 400 µm의 두께로 절단하여 직경 9 mm의 동적연속확산장치(flow-through automated diffusion cells)에 설치하였음. 수용액(receptor fluid, 0.01% 아지드화나트륨을 함유하는 인산완충식염수)을 대략 1.5 ml/h의 속도로 흘려주었으며 시험은 8개의 시료에 대해 실시함.

1,2,4-트리하이드록시벤젠 적용 30분 후 제거하기 위해 물로 피부를 10회 세정하고, 2% 도데실 황산나트륨 수용액과 물로 피부를 10회 세정함. 세정액은 방사능의 양을 측정하는 데 사용됨. 사후 노출 시간은 23.5시간이며 액체섬광계수법을 통해 검출함.

이 시험은 OECD 428 가이드라인 초안에 따라 진행되었으며, GLP를 준수하여 수행됨. 방사능의 회수율은 105%임. 물질 대부분이 30분의 노출 후 피부 세정을 통해 회수됨.

사실상 24시간 후 수용액(receptor fluid)으로 방사성물질의 통과는 일어나지 않았음(0.0019 µgeq/cm² 또는 적용된 용량의 0.0003%). 수용액(receptor fluid), 수용체 부분 세정(receptor compartment wash) 그리고 피부막(skin membrane)에 있는 화합물과 관련된 방사능의 합인 최대흡수율(피부 전달)은 적용된 용량의 $0.01 \pm 0.01\%$ 또는 $0.07 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 임.

SCCS는 평균 + 2×표준편차를 적용한 값인 0.03% 또는 0.17 µg/cm²을 피부흡수율로 제시함(Dr R.A.F de Ligt, 2004; SCCS 2012)

- 1,2,4-트리하이드록시벤젠에 대한 피부흡수율을 여성 피부를 이용한 *in vitro* 시험으로 측정하였음.

시험물질 1은 pH 7인 염모제에 1,2,4-트리하이드록시벤젠이 2.5%(w/w)로 함유되어 있으며 여성 6명(60 ~ 84세)의 복부, 등, 엉덩이 피부를 이용해 시험하였음.

시험물질 2는 2.25% 파라톨루엔디아민(PTD, *p*-Toluenediamine)을 포함하는 pH 7인 염모제에 1,2,4-트리하이드록시벤젠이 2.5%(w/w)로 함유되어 있으며 여성 4명(63 ~ 74세)의 복부와 등 피부를 이용해 시험하였음.

2.54 cm²의 유리로 된 정적확산장치(static glass diffusion cells)를 이용하여 각 시험 물질마다 12회씩 실험을 진행하였으며 피부의 온도는 32 ± 1°C임. 수용액(receptor fluid)은 인산완충생리식염수를 사용하였음. 방사선 표지된 [¹⁴C]-1,2,4-트리하이드록시벤젠과 표지 되지 않은 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 포함하여 [¹⁴C]-1,2,4-트리하이드록시벤젠을 총 2.5%(w/w) 포함하는 염모제를 제작함. 1 cm² 당 시험물질 20 mg(대략 1 cm²당 500 µg 1,2,4-트리하이드록시벤젠)을 30분간 피부 표면에 도포 후 순한 비누액으로 세정함. 세정 이후에, 셀을 수조에 다시 넣어 샘플링 기간 24시간 중 남은 시간을 보냄. 실험종료 시점에서 물질 균형을 맞추는 과정을 통해 [¹⁴C]-1,2,4-트리하이드록시벤젠의 분포와 24시간 동안의 투과 프로파일이 결정됨. 액체섬광계수법을 통해 방사능을 검출하여 분석함.

두 시험물질 모두에서 12개의 셀 중 하나가 24시간 시험 진행 과정 중 막이 손상되어 평균 ± 표준편차에 포함되지 않음. 이 시험은 OECD 428 가이드라인에 따라 진행되었으며, GLP를 준수하여 수행됨.

파라톨루엔디아민을 포함하지 않은 경우와 포함한 경우에 대하여 평균적인 회수율은 각각 101%와 99.2%임. [¹⁴C]-1,2,4-트리하이드록시벤젠만을 포함한 제형에서 총 전신 흡수량(표피, 진피, 수용액)은 1.13 ± 0.58

$\mu\text{geq}/\text{cm}^2$ 임. $[^{14}\text{C}]$ -1,2,4-트리하이드록시벤젠과 파라톨루엔디아민을 함유한 제형에서 총 전신 흡수량은 $1.94 \pm 1.76 \mu\text{geq}/\text{cm}^2$ 임. 안전역을 계산하기 위한 용도의 총 전신 흡수량은 생체외(*in vitro*) 피부흡수시험에서 '평균 + 1×표준편차'를 사용함.

따라서 $[^{14}\text{C}]$ -1,2,4-트리하이드록시벤젠만을 포함한 제형에서의 총 전신 흡수량은 $1.71 \mu\text{geq}/\text{cm}^2(0.342\%)$, $[^{14}\text{C}]$ -1,2,4-트리하이드록시벤젠과 파라톨루엔디아민을 함유한 제형에서의 총 전신 흡수량은 $3.70 \mu\text{geq}/\text{cm}^2(0.75\%)$ 임. 이 결과를 바탕으로 SCCS에서는 안전역을 계산하기 위한 피부흡수율을 총 전신 흡수량의 가장 높은 값인 $3.70 \mu\text{geq}/\text{cm}^2(0.75\%)$ 로 제시함(Dermal Technology Laboratories Ltd., 2015; SCCS, 2019)

표 4. 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 피부흡수량 자료 요약

시험방법	시험계	투여용량 (%)	피부흡수량 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	피부흡수율 (%)	참고문헌
<i>In vitro</i>	사람 피부	2.78	0.17	0.03	Dr R.A.F de Ligt (2004); SCCS (2012)
		2.5	1.71	0.342	Dermal Technology Laboratories Ltd. (2015); SCCS (2019)
		2.5 ¹⁾	3.70	0.75	

1) 2.25% 파라톨루엔디아민(PTD, *p*-Toluenediamine) 포함

3.1.4.2. 급성독성

3.1.4.2.1. 급성경구독성

- 그룹 당 암수 각 5마리의 Sprague-Dawley 랫드에 1% 1,2,4-트리하이드록시벤젠(1% in carboxymethylcellulose/water)을 100, 250, 350, 500, 1000 mg/kg의 용량으로 위관영양법으로 투여한 후 14일 동안 관찰하였음.

투여 후 14일 동안 폐사율을 관찰한 결과 LD₅₀은 350 ~ 500 mg/kg임 (Coquet and Guillot, 1977; SCCS, 2012)

3.1.4.2.2. 급성피부독성

- OECD 가이드라인 402에 따라 그룹 당 10마리(암수 각 5마리)의 Sprague-Dawley 랫드에 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 2000 mg/kg의 용량으로 피부에 적용 후 14일 동안 폐사율, 임상증상, 체중 증가를 관찰하여 급성피부독성을 평가하였음.

시험 중 폐사는 발생하지 않았음. 첩포 제거 후 2일째부터 8일째까지 모든 암컷 랫드에서 활동저하, 입모(piloerection), 호흡 곤란이 나타남. 암컷 1마리에서 떨림이 나타남. 9마리의 체중 증가는 대조군과 유사했으나, 암컷 1마리에서 2주째에 약간의 체중 감소가 나타남. 2일째부터 15일(시험 종료)까지 모든 랫드에서 피부에 검은 착색이 나타났음. 2일째에 수컷 2마리에서 홍반이 관찰되었으며, 그 중 한 마리는 3일째까지 지속됨. 2일째부터 5일째까지 수컷 2마리와 모든 암컷에서 부종이 관찰됨. 모든 랫드를 부검했을 때 특별한 이상은 발견되지 않음.

랫드에서 피부를 통한 최대 비치사용량(maximal non-lethal dose)은 2000 mg/kg임(Ollivier, 2004; SCCS, 2012)

3.1.4.3. 피부독성

3.1.4.3.1. 피부자극성

- OECD 가이드라인 404에 따라 뉴질랜드 흰색 수컷 토끼 3마리로 9일간 시험하였음. 3% 1,2,4-트리하이드록시벤젠 수용액 0.5 ml를 거즈에 적신 뒤 토끼의 옆구리에 도포함.

1,2,4-트리하이드록시벤젠에 3분 동안 노출할 때 매우 약한 홍반이 관찰됨. 1시간 동안 노출할 때 2마리의 토끼에서 홍반이 관찰됨. 4시간 동안 노출할 때 모든 토끼에서 피부에 갈색 착색이 나타나 홍반 발생

여부를 정확히 확인할 수 없었음. 시험기간 동안 다른 피부 반응은 기록되지 않았음. 1시간 동안의 노출 결과에 근거할 때 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 토끼 피부에 약한 자극성을 보임(Griffon, 2004a; SCCS, 2012)

3.1.4.3.2. 점막자극

- OECD 가이드라인 405에 따라 뉴질랜드 흰색 수컷 토끼 3마리에 3% 1,2,4-트리하이드록시벤젠 수용액을 0.1 ml의 용량으로 왼쪽 눈의 결막낭에 점적하여 3일 동안 안점막 자극성을 평가하였음.

오른쪽 눈을 대조군으로 설정하고 왼쪽 눈에 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 점적 후 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 씻어내지 않고 1, 24, 48, 72시간 후에 결과를 관찰하였음.

24시간 후 모든 토끼에서 매우 약한 결막부종과 발적이 나타났고 2마리에서는 증상이 72시간까지 지속되었음.

3% 1,2,4-트리하이드록시벤젠 수용액은 토끼 안점막에서 약한 자극성을 보임(Griffon, 2004b; SCCS, 2012)

3.1.4.3.3. 피부감작성

- OECD 가이드라인 429에 따라 CBA/J 마우스에 시험물질을 국소적으로 도포한 후 림프절의 세포증식을 측정하는 국소림프절시험(LLNA, local lymph node assay)를 6일간 수행하였음.

그룹 당 4마리의 마우스를 사용하였으며 귀에 25 µl의 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 3일간 도포한 후, 2일 후에 림프절 세포증식을 측정하였음.

첫 번째 실험에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 농도는 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5%로 처리하고 두 번째 실험에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 농도는 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5%로 처리하였음.

시험기간 동안 임상증상이나 폐사는 관찰되지 않음. 첫 번째 실험에서

1,2,4-트리하이드록시벤젠을 1, 2.5%로 처리한 마우스에서 피부건조가 관찰됨. 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 2.5, 5%로 처리한 마우스에서 중등도의 귀 두께 증가(45%)가 나타남. 두 번째 실험에서 눈에 띄는 피부 반응이나 귀 두께 증가는 관찰되지 않음. 첫 번째 실험에서 양성 림프 증식 반응이 모든 농도에서 관찰되었지만 용량-반응 관계의 명확한 증거는 없었음. 0.25, 0.5% 농도에서 관찰된 양성 반응은 지연성 접촉과민 반응으로 인한 것이었음. 첫 번째 실험에서 자극지수는 0.25 ~ 0.5%의 농도 범위에서 12.68 ~ 26.41로 나타남. 두 번째 실험에서 용량 증가에 따른 자극지수 증가(0.1% 투여군 제외)가 관찰됨.

두 번째 실험의 결과를 근거로 계산한 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 EC3 값은 0.08%임. 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 피부 감각 테스트에서 지연성 접촉 과민반응을 유발함. 이 실험 결과에 따라 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 심각한 감작성 물질로 분류됨(Griffon, 2004c; SCCS, 2012)

- OECD 가이드라인 442D에 따라 HaCaT 각질세포에서 ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험(luciferase test)을 6개월간 수행하였음. 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 농도는 0.977, 1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 μ M임.

시험결과를 아래 표5에 요약하였음. 시험결과에 따르면 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 잠재적 피부감작성 물질로 분류됨(Norman, 2016; SCCS, 2019)

표 5. HeCaT 각질세포 ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법 결과 요약

시험 물질	EC _{1.5} (μ M) ¹⁾	평균 IC ₅₀ (μ M) ²⁾	I _{max} ³⁾	CI _{max} ⁴⁾	Potential sensitiser
1,2,4-트리하이드록시벤젠	374.31	992.11	3.50	500.0	Yes
신나믹알데하이드 (양성 대조군)	10.37	>64	NA	NA	Yes

1) EC_{1.5}(Effective Concentration 1.5): 루시퍼라아제 활성이 용매대조군 대비 1.5배 초과하는 시험물질의 농도

2) IC₅₀(Half Maximal Inhibitory Concentration): 세포생존율을 50% 감소시키는 농도

3) I_{max}(Maximal Induction): 특정 농도에서 용매대조군(DMSO)과 비교하여 증가한 루시퍼라아제 활성 유도의 최대치

4) CI_{max}(Concentration For Maximal Gene Induction): 최대 활성 유도를 위한 농도

3.1.4.4. 반복투여독성

- 그룹 당 암수 각 15마리의 Han Wistar 랫드에 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 0, 50, 100, 200 mg/kg/day의 용량으로 위관영양법으로 90일간 투여하여 반복투여독성을 평가하였음. 대조군은 주사용 멸균수만 투여하였음.

시험기간 동안 폐사, 임상증상, 음수섭취량을 관찰하였음. 시험 마지막 단계에서 모든 랫드를 부검하여 육안 검사를 시행하였음

시험기간 동안 12마리의 랫드가 폐사함. 부검 결과 저용량 투여군 랫드의 폐사 원인은 잘못된 투여량 때문이었음. 고용량 투여군 9마리의 폐사 원인은 위궤양(stomach ulcerations)임.

100, 200 mg/kg/day 투여군에서 입모와 타액 분비가 관찰됨. 약 1개월 후부터 모든 시험군의 수컷에서 약간의 체중 감소가 관찰됨. 200 mg/kg/day 수컷 투여군에서 13주째에 사료섭취량이 14% 감소함. 암컷에서는 이러한 변화가 관찰되지 않음. 대조군과 비교하여 100, 200 mg/kg/day 투여군에서 평균 적혈구 용적, 평균 미립자 헤모글로빈, 혈소판의 통계적으로 유의한 증가와 적혈구용적률(haematocrit), 적혈구수, 헤모글로빈의 통계적으로 유의한 감소가 관찰됨. 고용량 투여군에서 암, 수 모두 빌리루빈 수치가 통계적으로 유의하게 증가함. 모든 수컷 투여군에서 비장의 무게 증가가 관찰됨. 100, 200 mg/kg/day 투여군에서 간, 신장의 무게 증가가 관찰됨. 200 mg/kg/day 투여군에서 고환과 심장의 무게 증가가 관찰됨. 암컷은 200 mg/kg/day 투여군에서 간, 비장, 신장의 무게 증가가 관찰됨. 고용량 투여군에서 위의 비선부위(non-glandular gastric region)에 궤양이 관찰됨. 신피질관의 세포 또는 내장에서 갈색 과립상의 색소 침착이 관찰됨.

연구 결과에서는 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 무독성량을 50 mg/kg/day로 판단하였으나 SCCS(2012)는 50 mg/kg/day 투여군에서 수컷 랫드 비장의 상대장기 무게 증가가 관찰되었기 때문에 무독성량을 50 mg/kg/day로 제시한 것에 이견을 제시함.

이러한 장기 무게 증가는 100, 200 mg/kg/day 투여군에서 농도 의존적으로 증가함. 50 mg/kg/day 투여군에서 수컷 랫드의 절대장기무게도 증가하나, 이 증가가 현저하게 관찰되지는 않음. 따라서 50 mg/kg/day를 최소유해용량으로 제시함(Hill, 2001; SCCS, 2012; SCCS, 2019)

3.1.4.5. 면역독성

- 자료 없음

3.1.4.6. 신경독성

- 자료 없음

3.1.4.7. 생식·발생독성

- 그룹 당 암컷 25마리의 Sprague-Dawley 랫드에 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 0, 30, 100, 300 mg/kg/day의 용량으로 위관영양법으로 임신 6일째부터 15일째까지 투여하여 생식·발생독성을 평가하였음.

임신 20일째에 랫드를 부검하고 태자는 채왕절개로 분리함. 황체의 양, 태자흡수(resorptions), 태자의 생존과 폐사, 착상 부위를 관찰하였음. 살아있는 태자는 무게를 측정하고 육안 검사를 하였음. 살아있는 태자 중 절반은 골격 검사를 하고 나머지 태자는 연조직 검사를 시행함.

0, 30, 100 mg/kg/day 투여한 암컷 쥐에서 어떠한 임상증상이나 사망도 관찰되지 않았음. 300 mg/kg/day 투여한 암컷 3마리는 거친 호흡의 임상증상을 보이며 폐사하였고 부검 결과 식도의 천공과 폐의 거품이 관찰되었음. 다른 암컷 1마리는 임상증상 없이 폐사하였고 부검 결과 가스로 인한 위와 장의 팽대와 울혈로 막힌 폐가 관찰되었음. 30,

100 mg/kg/day 투여군에서 체중 증가와 사료섭취량은 대조군과 유사하였음.

300 mg/kg/day 투여군에서 평균 체중은 대조군보다 약간 낮았고 사료 섭취량은 대조군에 비해 6.5% 감소함. 0, 30, 100 mg/kg/day 투여군에서 태자 기형은 관찰되지 않았음. 300 mg/kg/day 투여군에서 4마리의 태자는 열린 눈꺼풀과 연관된 바깥뇌증(exencephaly)이 나타남. 바깥뇌증은 비최기형성 물질을 투여한 산모로부터 출산된 태자에서 0.06% 확률로 발생하는데, 이번 시험에서 1.2%의 확률로 높게 나타났음. 하지만 바깥뇌증이 발생한 4마리의 태자가 모두 한 배에서 태어났고 다른 태자에서는 기형이 관찰되지 않은 것으로 보아, 이 실험에서의 바깥뇌증은 선천적 기형으로 간주함. 1,2,4-트리하이드록시벤젠 투여와 관련하여 어떠한 태자 골격 변이, 이형과 기형, 연조직 기형은 관찰되지 않음.

임신한 암컷 랫드에게 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 30, 100 mg/kg/day로 경구 투여했을 때, 모체독성, 태자독성, 최기형성은 없었음. 300 mg/kg/day로 경구 투여했을 때 모체독성은 있었으나 태자독성, 최기형성은 관찰되지 않음(Savary, 1991; SCCS, 2012)

3.1.4.8. 유전독성

- *Salmonella typhimurium*을 이용한 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 복귀돌연변이 시험을 수행하였음.

Aroclor 1254를 처리한 랫드의 간 S9 분획을 외인성 대사활성화 시스템으로 사용함. 시험 농도는 TA98, TA100, TA102 균주에 대한 예비 독성 시험 결과에 근거하여 농도를 설정함. 독성은 복귀 돌연변이 콜로니 수의 감소 및 콜로니 주변 환(bacterial background lawn)의 얇아짐으로 평가함. 음성, 양성 대조군은 OECD 가이드라인을 따름.

시험 결과 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 침전은 관찰되지 않았음. 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 S9을 처리하지 않은 조건에서 TA98, TA100 균주

의 복귀 돌연변이 수를 증가시켰음. S9을 처리한 조건에서 TA1537, TA98 균주의 복귀 돌연변이 수가 가끔 증가하였으나 이는 재현할 수 없었으며 생물학적 관련이 없는 것으로 간주됨. 결론적으로 시험조건 하에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 박테리아를 이용한 유전자 돌연변이 검사에서 유전독성을 나타냄(Haddouk, 2004; SCCS, 2012)

- *Salmonella typhimurium*을 이용한 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 복귀 돌연변이 시험을 수행하였음. TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102 균주를 사용하였으며 Aroclor 1254를 처리한 랫드의 간 S9 분획을 외인성 대사활성화 시스템으로 사용함. 예비 실험 결과를 바탕으로 최대 처리 농도를 5000 µg/plate로 설정함.

본 실험에서 S9을 처리한 조건과 처리하지 않은 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 0, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000 µg/plate 농도로 동일하게 처리하여 실험한 결과, S9을 처리하지 않은 조건의 TA1537 균주에서 복귀 돌연변이 수(revertant counts)의 증가가 관찰되었으나, 이는 개별 복귀 돌연변이 수(individual revertant counts)의 가변성(variability) 때문에 양성으로 간주하지 않음.

S9 처리 여부와 관계없이 모든 균주에서 돌연변이 유발 양성반응은 관찰되지 않았으나, 추가적으로 S9을 처리하지 않은 조건의 TA1537 균주의 돌연변이 유발 반응을 명확하게 판단하기 위하여 용량을 조정한 후 재시험을 실시함.

5.0, 15, 50, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1500 µg/plate 농도로 처리한 결과, 150 및 200 µg/plate 용량에서 돌연변이 양성반응이 관찰됨. SCCS에서는 1,2,4-트리하이드록시벤젠이 S9을 처리하지 않은 조건의 TA1537 균주에서 분명한 유전독성 유발 효과가 있다고 언급함(Wagner, 2015; SCCS, 2019)

- S9을 처리하지 않은 조건의 *Salmonella typhimurium* TA1537을 이용한 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 복귀 돌연변이 유발 반응에 대해 라디칼 제거제(radical scavengers), 카탈라아제(catalase)와 글루타티온(GSH,

L-glutathione)의 감소 영향을 평가하기 위한 시험을 수행함.

대사활성화 처리하지 않은 TA1537 균주에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 100, 150, 175, 200, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도로 처리함. 카탈라아제와 글루타티온은 각각 1000, 10000, 20000 IU 및 5, 10, 15 μM 농도로 처리함. 음성 및 양성 대조군이 허용기준을 충족하여 본 실험이 유효한 것을 입증함.

실험 결과, 대사활성화 처리하지 않은 TA1537 균주에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 돌연변이 유발효과가 이전 연구와 동일하게 재현되었음. 이 돌연변이 유발효과는 5, 10 μM 글루타티온과 1000, 10000, 20000 IU 카탈라아제를 처리했을 때에는 나타나지 않으며, 카탈라아제는 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 독성을 감소시켰음(Emily, 2019; SCCS, 2019)

- 마우스 림프종 세포를 이용하여 히포크산틴-구아닌 포스포리보실기 전이효소(*hprt*, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 위치(locus)에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 돌연변이 유발 가능성에 대한 실험을 수행하였음.

Aroclor 1254를 처리한 쥐의 간 S9 분획을 외인성 대사활성화 시스템으로 사용함. 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 농도는 세포독성 범위 측정 실험 결과에 근거하여 설정하였음. 첫 번째 실험에서 S9을 처리하지 않은 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 0.07813, 0.1563, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하고, S9을 처리한 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리함. 두 번째 실험에서 S9을 처리하지 않은 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하고, S9을 처리한 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리함. 세포에 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 3시간 동안 처리한 후 7일 동안 돌연변이 발현을 관찰함. 독성은 대조군 세포의 생존에 대한 상대 생존율로 측정함. 음성, 양성 대조군은 OECD 가이드라인을 따름.

실험 결과, S9 처리 여부와 관계없이 모든 농도에서 돌연변이 발생 빈도의 증가는 관찰되지 않음. 음성 대조군에서 돌연변이 발생 빈도는 정상 범위 내에서 감소하였고 양성 대조군에서는 명확히 증가함. 결론적으로 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 마우스 림프종 세포를 이용한 *hprt* locus 돌연변이 시험에서 유전독성이 없는 것으로 간주됨(Lloyd, 2004; SCCS, 2012)

- 배양된 인간 림프구를 이용하여 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 염색체 이상 유발 가능성에 대해 시험하였음.

Aroclor 1254를 처리한 쥐의 간 S9 분획을 외인성 대사활성화 시스템으로 사용함. 림프구 분리 후 48시간 동안 3.6% 피토헤마글루티닌(phytohaemagglutinin)을 처리하여 분열을 유도함. 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 농도는 예비 독성 시험결과에 근거하여 설정함. 첫 번째 실험에서 S9을 처리하지 않은 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 1.25, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간 동안 처리하고 24시간 후에 세포를 수확하였음. S9을 처리한 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 3.75, 7.5, 15 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 2시간 동안 처리하고 24시간 후에 세포를 수확하였음. 두 번째 실험에서 S9을 처리하지 않은 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 2.5, 5, 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간, 48시간 동안 처리하고 각각 24시간, 48시간 후에 세포를 수확하였음. S9을 처리한 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 2시간 동안 처리하고 24시간, 48시간 후에 세포를 수확하였음. 세포 수확 2시간 전에 세포 유사 분열의 중기를 차단하기 위해 콜세미드(colcemid) 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리함. 독성은 유사분열지수의 감소로 측정함. 음성, 양성 대조군은 OECD 가이드라인을 따름.

실험 결과, 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 S9 처리 여부와 관계없이 모든 농도에서 염색체 이상 발생 빈도의 증가는 관찰되지 않음. 결론적으로 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 인간 림프구를 이용한 염색체 이상 시험에서 유전독성이 없음.

그러나 SCCS는 1,2,4-트리하이드록시벤젠 처리 농도가 세포독성을 유발하는 농도보다 낮았고 세포의 수가 불충분하다고 평가되어 이 실험의 신뢰도는 제한적이라고 언급함(Molinier, 1994; SCCS, 2012)

- 배양된 인간 말초 혈액 림프구를 이용하여 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 자매염색분체교환(sister chromatid exchange) 유발 가능성에 대한 실험이 진행되었음.

건강한 1명의 남성으로부터 림프구 분리 후 24시간 동안 8 µg/ml의 콘카발린 A(concanavalin A)를 처리하여 분열을 유도함. 5 µM 5-브로모-2'-데옥시유리딘(5-bromo-2'-deoxyuridine)이 첨가된 인간 말초 혈액 림프구의 배양물에 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 5, 50, 70, 100, 300, 500 µM 농도로 48시간 동안 처리함. 배양 마지막 4시간 동안 1.35 µM 농도로 데메콜신(demecolcine)을 처리함.

실험결과 농도 의존적인 유사 분열 활성의 감소와 자매염색분체교환 발생 빈도의 증가가 관찰됨. 결론적으로 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 인간 말초혈액 림프구를 이용한 자매염색분체교환 유발 시험에서 유전독성이 있음.

그러나 SCCS에서 이 실험은 GLP와 OECD 가이드라인을 따르지 않았고 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 순도가 보고되어 있지 않기 때문에 신뢰도가 제한적이라고 언급함(Erexson et al., 1985; SCCS, 2012)

- 암컷 ICR 마우스 대퇴골의 배양된 골수 세포에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 DNA 사슬 절단 유발 가능성에 대한 실험을 수행하였음.

골수 세포에 1시간 동안 6, 12, 24 µM의 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 처리하였음. 알칼리성 DNA 용출법(pH > 9.5)을 사용하여 총 120분에 걸쳐 24분마다 DNA 분절을 수집하였음. 분리된 DNA는 마이크로 형광 분석법으로 측정하였음. 실험 결과, 골수 세포에서 농도 의존적으로 불안정한 DNA 단일 가닥 사슬 절단의 증가가 관찰됨. 결론적으로 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 마우스의 골수 세포를 이용한 DNA 사슬 절단

유발 시험에서 유전독성이 있음. 그러나 SCCS에서 이 실험은 GLP와 OECD 가이드라인을 따르지 않았고 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 순도가 보고되어 있지 않기 때문에 신뢰도가 제한적이라고 언급함(Lee and Garner, 1991; SCCS, 2012)

- 배양된 인간 말초혈액 림프구를 이용하여 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 소핵(micronuclei) 유발 가능성에 대한 실험을 수행하였음. 림프구 분리 후 24시간 동안 1% 피토헤마글루티닌을 처리하여 분열을 유도함. 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 농도는 10, 25, 50, 100 μM 로 48시간 동안 처리함. 배양 마지막 28시간 동안 6 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 시토크알라신 B(cytochalasin B)를 처리함.

림프구에서 농도 의존적이고 통계적으로 유의한 소핵의 증가와 염색체 7과 8의 이수성 유발이 관찰됨. 소핵에서 염색체 물질의 소실 후 염색체 7과 8의 비분리가 나타남. 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 인간 말초혈액 림프구를 이용한 실험에서 염색체의 구조적 이상과 수적 이상을 유발함. 그러나 SCCS에서 이 실험은 GLP와 OECD 가이드라인을 따르지 않았고 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 순도가 보고되지 않았다고 언급함 (Chung et al., 2002; SCCS, 2012)

- 한 명의 남성 지원자로부터 배양된 인간 말초혈액 림프구를 이용하여 1,2,4-트리하이드록시벤젠에 대한 생체외(*in vitro*) 소핵검사를 수행하였음. 예비 세포독성시험을 통해 적합한 분석 최대 농도를 결정하였음. 세포독성은 복제 지수(RI, replication index)의 감소로 평가함. 음성, 양성 대조군은 OECD 가이드라인을 따름. Aroclor 1254를 처리한 랫드의 간 S9 분획을 포유류 대사 활성화 시스템으로 사용함. S9을 처리한 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 12.5, 25, 50, 100, 125, 135, 150 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 4시간 동안 처리함. S9을 처리하지 않은 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 1.26, 3.15, 6.3, 12.5, 25, 50, 85, 100, 125, 135, 150 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 4시간 처리함. 추가적으로 S9을 처리하지 않은 조건에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 0.1, 0.25, 0.5, 1.26, 12.5, 30, 40, 50, 85, 100

$\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간 처리함. 모든 배양물은 처리 시작 24시간 후(배양 시작 72시간 후) 샘플링되었음. 각 배양물에서 총 1000개의 이핵 세포(농도당 2000개 세포)를 소핵에 대해 분석함.

시험결과, 어떤 용량군에서도 음성대조군에 비해 소핵세포의 비율은 유의하게 증가하지 않았음. 결론적으로 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 S9 활성화 여부와 관계없이 인간 말초혈액 림프구를 사용한 생체의 포유류 소핵시험에서 음성 반응을 보임(Roy, 2015; SCCS, 2019)

- 각질형성세포와 섬유아세포로 구성된 인간 피부 조직을 이용하여 3D 피부 코멧 분석법(skin comet assay)을 수행하였음.

코멧 분석에 적합한 용량 수준을 선택하기 위해 예비시험한 결과를 근거로 농도 범위를 결정함. 세포독성은 아데닐레이트키나제(AK, adenylate kinase) 및 젖산탈수소효소(LDH, lactate dehydrogenase)의 배양 배지로의 누출(leakage) 및 세포 내 아데노신 삼인산(ATP, adenosine triphosphate) 측정을 기반으로 결정함. 주요 시험에서의 유전독성 가능성은 코멧 분석 소프트웨어(Comet Assay IV software)와 형광 염료(SYBR gold)를 사용하여 표피세포와 진피세포 모두에 대해 피부막 당 코딩된 복제 코멧 분석 슬라이드(50 cells/slide)를 평가하여 결정함. 첫 번째 시험에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml(2, 4, 8, 16 $\mu\text{g/cm}^2$) 농도로 3, 24, 48시간 동안 처리하였음. 모든 농도에서 어떠한 세포독성도 관찰되지 않았음. 분석 감도를 높이기 위해 DNA 복구 억제제로 아피디콜린(aphidicolin)을 사용하여 두 번째 실험을 수행함. 두 번째 실험에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 0.25, 0.5, 1, 1.25 mg/ml(4, 8, 16, 20 $\mu\text{g/cm}^2$)로 3, 24, 48시간 동안 처리하고, 배양 마지막 4시간 동안 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 아피디콜린을 처리함.

세포독성과 관련하여 통계적으로 유의한 결과는 관찰되지 않음. 모든 농도에서 피부와 배지의 갈색 착색이 농도 의존적으로 관찰됨. 결론적으로 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 인간 피부 세포에서 DNA 손상을 유발하지 않음.

그러나 SCCS는 생체외 코멧 분석법(*the vitro comet assay*)이 현재 검증 중이며 아직 OECD 가이드라인이 없고, $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 농도에서 세포독성을 나타내지 않지만 모든 세포 독성 테스트에서 $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 데이터 분석값이 대조군에 비해 이미 상당히 증가했으므로, 이 농도와 더 높은 농도($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)를 적용하는 것은 정당화되지 않으며, 배지 및 피부 샘플의 명확한 용량 관련 갈색 염색이 관찰되어 (일부) 세포 생존력 측정을 방해할 수 있으므로 조정된 대조군을 고려할 것과 배지 및 조직 착색에 관여할 수 있는 간섭을 고려하여 간섭을 피하기 위한 접근 방식을 검증해야 한다고 하였음. 또한 이 연구에서 양성 대조군에 대한 세포독성 평가는 수행되지 않았음을 언급함(Reus, 2017; SCCS, 2019)

- 인공피부 MatTek EpiDerm™에 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 처리한 후 유전독성을 평가하는 3D 인간 재생 피부 소핵 유발 가능성에 대한 실험을 수행하였음.

첫 번째 실험에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 $0.09 \sim 12.50 \text{ mg/ml}$ ($1.5 \sim 200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 농도로 48시간 동안 처리하고 위상차현미경으로 변화를 관찰했음. 시험 결과, 12.5 mg/ml 농도에서 세포독성이 나타남. 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 처음 처리했을 때, $3.13 \sim 12.5 \text{ mg/ml}$ 농도 처리군에서 피부 조직의 색이 점진적으로 검게 변하고 배양액의 색은 분홍색으로 변함. 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 한 번 더 처리했을 때는 이러한 변화가 $1.56 \sim 12.5 \text{ mg/ml}$ 농도 처리군에서 나타났음.

두 번째 시험에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 $0.75 \sim 14 \text{ mg/ml}$ ($12 \sim 224 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 농도로 48시간 동안 처리하고 위상차현미경으로 변화를 관찰했음. 6.25 mg/ml 이상 농도에서 세포독성이 나타남. 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 처음 처리했을 때, $1.5 \sim 14 \text{ mg/ml}$ 농도 처리군에서 피부 조직의 색이 점진적으로 검게 변하고 배양액의 색은 분홍색으로 변함. 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 한 번 더 처리했을 때는 이러한 변화가 모든 농도 처리군에서 나타났음. $1.5, 3.125, 6.25 \text{ mg/ml}$ 농도 처리군을 대상으로 소핵유발 가능성에 대한 시험을 수행하였음. 소핵 유발

가능성의 농도 의존적이거나 유의한 증가는 관찰되지 않음.

세 번째 실험에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 0.1875 ~ 14 mg/ml(3 ~ 224 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 농도 범위로 72시간 동안 처리하고 0.75, 1.5, 4.5 mg/ml 농도 처리군을 대상으로 소핵유발 가능성에 대한 시험을 수행하였음. 소핵 유발 가능성의 농도 의존적이거나 유의한 증가는 관찰되지 않음.

결론적으로, 본 연구의 조건하에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 3D 인간 재생 피부 소핵유발 가능성에 대한 실험에서 음성이라고 결론지음(Roy, 2019; SCCS, 2019)

- 마우스의 골수 세포에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 소핵 유발 가능성에 대한 시험을 수행하였음.

예비시험에서 각 군당 2마리의 마우스에 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 500, 1000, 2000 mg/kg 농도로 복강 투여하였을 때 모든 마우스가 즉시 폐사하였음. 100 mg/kg을 주입하였을 때 2시간 후 입모와 운동 기능 저하가 나타났고 6시간 후 진정 효과가 나타남. 24시간 후 모든 마우스가 폐사하였음. 본 시험에서 50 mg/kg을 주입하였을 때 6시간 후 모든 마우스에서 입모와 운동 기능 저하가 나타났고 24, 48시간 후에도 입모가 나타남. 24, 48시간 후 정상 색소 적혈구에 대한 다염성 적혈구의 비율이 통계적으로 유의하게 감소함. 이는 골수 세포에 대한 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 독성을 나타냄. 24, 48시간 후 1,2,4-트리하이드록시벤젠에 노출된 마우스에서 소핵화된 다염성 적혈구의 수는 대조군과 차이를 보이지 않았음.

결론적으로 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 마우스의 골수 세포에서 유전독성이 없음. 그러나 SCCS에서 이 실험은 단일용량으로만 시행되었으므로 현행 OECD 가이드라인을 준수하지 않았다고 언급함(Molinier, 1993; SCCS, 2012)

- 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 유전독성시험에 대해 정리한 내용은 표 6과 같음

표 6. 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 유전독성시험 자료 요약

시험 방법	시험계	투여용량	결과	SCCS 의견	GLP	참고문헌
복귀 돌연 변이 시험	<i>S.typhimurium</i> TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537	<ul style="list-style-type: none"> - 시험 1 15.6 ~ 250 μg/plate (TA98, TA100, TA1535, TA1537, -S9) 78.13 ~ 2500 μg/plate (TA102, -S9) 78.13 ~ 2500 μg/plate (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102, +S9) - 시험 2 6.25 ~ 100 μg/plate (TA98, TA1537, -S9) 12.5 ~ 200 μg/plate (TA100, -S9) 25 ~ 400 μg/plate (TA1535, -S9) 100 ~ 2000 μg/plate (TA98, TA100, TA1535, TA1537, +S9) 100 ~ 4000 μg/plate (TA102, \pmS9) - 시험 3 1000 ~ 2000 μg/plate (TA98, TA1537, +S9) - 시험 4 1000 ~ 2000 μg/plate (TA98, TA1537, +S9) 	<p>양성</p> <ul style="list-style-type: none"> - S9을 처리한 조건에서 TA98, TA100 균주의 복귀 돌연변이 수 증가시킴 	-	준수	SCCS (2012); Haddouk (2004)

시험 방법	시험계	투여용량	결과	SCCS 의견	GLP	참고문헌
복귀 돌연 변이 시험	<i>S.typhimurium</i> TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537	<ul style="list-style-type: none"> - 시험 1: 6.7 ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102, $\pm\text{S9}$) - 시험 2-1: 15 ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102, $\pm\text{S9}$) - 시험 2-2: 5 ~ 1500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (TA1537, -S9) 	<p>양성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 150 및 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 용량에서 돌연변이 양성반응이 관찰됨 	<ul style="list-style-type: none"> - S9을 처리하지 않은 조건의 TA1537 균주에서 분명한 유전독성 유발 효과가 있다고 언급함 	준수	SCCS (2019); Wagner (2015)
복귀 돌연 변이 시험	<i>S.typhimurium</i> TA1537	100 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{plate}(-\text{S9})$	<p>양성¹⁾</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대사활성화 처리하지 않은 TA1537 균주에서 돌연변이 유발효과가 이전 연구와 동일하게 재현되었음 - 이 돌연변이 유발효과는 5, 10 μM 글루타타온과 1000, 10000, 20000 IU 카탈라아제를 처리했을 때에는 나타나지 않으며, - 카탈라아제는 1,2,4-트라이이드 록시벤젠의 독성을 감소시켰음 	-	준수	SCCS (2019); Emily (2019)
HRT 시험	마우스 림프종 세포	<ul style="list-style-type: none"> - 시험 1: 0.07813 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}(-\text{S9})$ 1.25 ~ 160 $\mu\text{g}/\text{ml}(+\text{S9})$ - 시험 2: 5 ~ 22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}(-\text{S9})$ 10 ~ 240 $\mu\text{g}/\text{ml}(+\text{S9})$ 	<p>음성</p> <ul style="list-style-type: none"> - S9 처리 여부와 관계없이 모든 농도에서 돌연변이 발생 빈도의 증가는 관찰되지 않음 - 음성 대조군에서 돌연변이 발생 빈도는 정상 범위 내에서 감소하였고 양성 대조군에서는 명확히 증가함 	-	준수	SCCS (2012); Lloyd (2004)

시험 방법	시험계	투여용량	결과	SCCS 의견	GLP	참고문헌
염색체 이상 시험	인간 림프구 세포	<ul style="list-style-type: none"> - 시험 1 1.25 ~ 5 $\mu\text{g/ml}$(-S9) 3.75 ~ 15 $\mu\text{g/ml}$(+S9) - 시험 2 2.5 ~ 7.5 $\mu\text{g/ml}$(-S9) 10 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$(+S9) 	<p>음성</p> <ul style="list-style-type: none"> - S9 처리 여부와 관계없이 모든 농도에서 염색체 이상 발생 빈도의 증가가 관찰되지 않음 	<ul style="list-style-type: none"> - 처리 농도가 세포 독성을 유발하는 농도보다 낮았고 세포의 수가 불충분하다고 평가되어 이 실험의 신뢰도는 제한적이라고 언급함 	준수	SCCS (2012); Molinier (1994)
자매 염색체 교환 시험	인간 말초 림프구 세포	5 ~ 500 μM	<p>양성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 농도 의존적인 유사 분열 활성의 감소와 자매염색체교환 발생 빈도의 증가가 관찰됨 	<ul style="list-style-type: none"> - GLP와 OECD 가이드 라인을 따르지 않았고 대상성분의 순도가 보고되어 있지 않기 때문에 신뢰도가 제한적이라고 언급함 	미준수	SCCS (2012); Erexson et al. (1985)
DNA 염색 분체 손상 시험	마우스 대퇴골 골수 세포	6 ~ 24 μM	<p>양성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 골수 세포에서 농도 의존적으로 불안정한 DNA 단일 가닥 사슬 절단의 증가가 관찰됨 	<ul style="list-style-type: none"> - GLP와 OECD 가이드 라인을 따르지 않았고 대상성분의 순도가 보고되어 있지 않기 때문에 신뢰도가 제한적이라고 언급함 	미준수	SCCS (2012); Lee and Garner (1991)
체외 소핵 시험	인간 말초 림프구 세포	10 ~ 100 μM	<p>양성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 림프구에서 농도 의존적이고 통계적으로 유의한 소핵의 증가와 염색체 7과 8의 이수성 유발이 관찰됨 - 소핵에서 염색체 물질의 소실 후 염색체 7과 8의 비분리가 나타남 	<ul style="list-style-type: none"> - GLP와 OECD 가이드 라인을 따르지 않았고 대상성분의 순도가 보고되지 않았다고 언급함 	미준수	SCCS (2012); Chung et al. (2002)

시험 방법	시험계	투여용량	결과	SCCS 의견	GLP	참고문헌
체외 소핵 시험	인간 말초 림프구 세포	1.26 ~ 150 $\mu\text{g/ml}$ (-S9, 4h) 0.1 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ (-S9, 24h) 12.5 ~ 150 $\mu\text{g/ml}$ (+S9, 4h)	음성 - 어떤 용량군에서도 음성대조군 에 비해 소핵세포의 비율은 유의하게 증가하지 않았음	-	준수	SCCS (2019); Roy (2015)
3D 피부 소핵 시험	Phenion® full thickness skin model	- 시험 1: 0.125 ~ 1 ng/ml (2 ~ 16 $\mu\text{g/cm}^2$) - 시험 2: 0.25 ~ 1.25 ng/ml (4 ~ 20 $\mu\text{g/cm}^2$)	음성 - 세포독성과 관련하여 통계적으로 유의한 결과는 관찰되지 않음 - 모든 농도에서 피부와 배지의 갈색 착색이 농도 의존적으로 관찰됨	- 생체외 코멧 분석법이 현재 검증 중이며 아 직 OECD 가이드라 인이 없고, - 16 $\mu\text{g/cm}^2$ 농도에서 세포독성을 나타내지 않지만 모든 세포 독 성 테스트에서 16 $\mu\text{g/cm}^2$ 의 데이터 분석 값이 대조군에 비해 이미 상당히 증가했 으므로, 이 농도와 더 높은 농도(20 $\mu\text{g/cm}^2$)를 적용하는 것은 정당화되지 않 으며, - 배지 및 피부 샘플의 명확한 용량 관련 갈 색 염색이 관찰되어 (일부) 세포 생존력 측정을 방해할 수 있 으므로 조정된 대조 군을 고려할 것과 배 지 및 조직 착색에	준수	SCCS (2019); Reus (2017)

시험 방법	시험계	투여용량	결과	SCCS 의견	GLP	참고문헌
				<p>관여할 수 있는 간섭을 고려하여 간섭을 피하기 위한 접근 방식을 검증해야 한다고 하였음</p> <p>- 또한 양성대조군에 대한 세포독성 평가가 수행되지 않았음을 언급함</p>		
3D 피부 소핵 시험	MatTek EpiDerm™	<p>- 시험 1: 0.09 ~ 12.5 mg/ml (1.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</p> <p>- 시험 2: 0.75 ~ 14 mg/ml (12 ~ 224 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</p> <p>- 시험 3: 0.1875 ~ 14 mg/ml (3 ~ 224 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</p>	<p>음성</p> <p>- 1.5, 3.125, 6.25 mg/ml 농도 처리군을 대상으로 소핵유발 가능성에 대한 시험을 수행하였을 때, 농도 의존적이거나 유의한 증가가 관찰되지 않음</p> <p>- 0.75, 1.5, 4.5 mg/ml 농도 처리군을 대상으로 소핵유발 가능성에 대한 시험을 수행하였을 때, 농도 의존적이거나 유의한 증가가 관찰되지 않음</p>	-	준수	SCCS (2019); Roy (2019)
체내 소핵 시험	마우스 골수세포	50 mg/kg	<p>음성</p> <p>- 24, 48시간 후 대상성분에 노출된 마우스에서 소핵화된 다염성 적혈구의 수는 대조군과 차이를 보이지 않았음</p>	- 이 시험은 단일용량으로만 시행되었으므로 현행 OECD 가이드라인을 준수하지 않았다고 언급함	준수	SCCS (2012); Molinier (1993)

1) 5, 10 μM 글루타티온 및 1000, 10000, 20000 IU 카탈라아제 처리 시, 음성

- SCCS(2019)에 따르면, 1,2,4-트리하이드록시벤젠이 GLP를 준수한 2번의 에임즈 시험(Ames test)에서 명확하게 양성이었음. 반면 GLP를 준수한 생체외 포유류 유전자 돌연변이 시험 및 소핵시험에서는 음성이었음. 3D 피부 코멧 분석(comet assay) 및 3D 피부 소핵 시험(micronucleus test)에서 음성으로 나타남. 그러나 또 다른 생체내 소핵 시험에서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 마우스에 노출시켰을 때, 소핵을 가진 적혈구가 증가하지 않았다는 점에 대해 지적하며 이 시험은 단일용량만을 시험했다는 점에 있어서 현재 OECD 가이드라인에 따라 수행되지 않아 그 결과가 제한적이라고 언급함.

SCCS는 1,2,4-트리하이드록시벤젠에 의한 H_2O_2 생성의 결과인 ROS가 DNA 손상 유발의 주요한 원인이라는 것에 동의함. 그러나 이를 뒷받침하기 위해서는 DNA 손상이 세포내에서 생성되는 ROS에 완전히 의존적이거나, 세미퀴논라디칼과 같은 다른 반응성 라디칼이 생성되지 않거나, 생성되는 경우에도 이에 의하여서는 돌연변이가 유도되지 않음을 보여줄 필요가 있다고 언급함.

많은 유전독성 시험의 양성 결과에 대한 것을 보면 최종 제품에 완전히 반응하지 않은 1,2,4-트리하이드록시벤젠이 존재한다고 가정했을 때, SCCS에서는 추가연구 없이도 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 유전독성에 대해 결론지을 수 있었음. 결론적으로 SCCS는 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 유전독성 가능성을 배제할 수 없다고 제시함(SCCS, 2019)

3.1.4.9. 발암성

- 국외 독성연구기관인 IARC 및 EPA의 발암물질 목록에는 현재 등재되어 있지 않음

3.1.4.10. 광독성

- 자료 없음

3.2. 위험성 결정

3.2.1. 최적의 최소유해용량 확인

- 1,2,4-트리하이드록시벤젠에 대한 최소유해용량은 랫드의 반복투여독성시험에서 수컷의 비장무게 증가를 근거로 설정된 50 mg/kg/day임을 확인하였음

표 7. 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 최소유해용량 자료 요약

시험방법	투여 경로	시험계	노출기간	투여용량 (mg/kg/day)	최소유해용량 (mg/kg/day)	참고문헌
반복투여 독성시험	경구	랫드	90일	50, 100, 200	50	SCCS (2019); SCCS (2012); Hill (2001)

3.3. 노출평가 및 위해도 결정

- 1,2,4-트리하이드록시벤젠의 유전독성 가능성을 배제할 수 없으므로 안전역을 산출하는 것은 의미가 없을 것으로 판단됨

4. 결 론

- 현재 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 국내 화장품에서 사용한다 물질로 관리하지 않으며 유럽, 미국 및 일본에서도 사용한다 성분으로 지정되어 있지 않음
- 1,2,4-트리하이드록시벤젠은 심각한 피부감작성 물질로 분류되며, 유전 독성 가능성을 배제할 수 없음.

따라서 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 산화성/영구적 염모제 성분으로 사용할 경우 안전성에 문제가 있을 가능성이 있음

5. 외국의 평가 사례

- SCCS는 1,2,4-트리하이드록시벤젠을 심각한 피부감작성 물질로 평가하였으며(2012),

SCCS는 유전독성 가능성을 배제할 수 없으므로, 1,2,4-트리하이드록시벤젠이 영구적/산화적 염모제로 사용될 경우 안전하지 않다고 결론지었음(2019)

6. 제한점

- 향후 새로운 독성값이 보고되는 등 최신의 자료가 추가될 경우 재평가할 수 있음
- 유전독성 가능성을 배제할 수 없어 정량적 위해평가는 실시하지 않았음

7. 참고문헌

- Chung H.W., Kang S.J. and Kim S.Y., A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol, *Mutation Research*, 516: 49 - 56 (26-4-2002). 2002.
- Coquet B. and Guillot J.P., DL50 par voie orale chez le rat. IFREB Study No. 706212, 1977.
- Dermal Technology Laboratories Ltd. In Vitro Penetration of [¹⁴C]-1,2,4-Trihydroxybenzene through Human Dermatomed Skin. Final Report, 2015.
- Dr R.A.F de Ligt. In vitro percutaneous absorption of [¹⁴C]-1,2,4-trihydroxybenzene through human skin membranes using flow-through diffusion cells. TNO Study No.5596, 2004.
- Emily Dakoulas. Bacterial Reverse Mutation Assay with Catalase and GSH. BioReliance Corporation, Study Number AE03R.502R.BTL., 13 February 2019.
- Erexson G.L., Wilmer J.L. and Kligerman A.D., Sister chromatid exchange induction in human-lymphocytes exposed to benzene and its metabolites in vitro, *Cancer Research*, 45: 2471 - 2477. 1985.
- Griffon B., Acute Dermal Irritation in Rabbits. Centre International de Toxicologie (CIT), Study No. 26917TAL, 2004a.
- Griffon B., Acute Eye Irritation in Rabbits. Centre International de Toxicologie (CIT), Study No. 26916TAL, 2004b.
- Griffon B., Evaluation of Skin Sensitization Potential in Mice Using the Local Lymph Node Assay (LLNA). Centre International de Toxicologie (CIT), Study No. 26918 TSS, 2004c.

- Hill M., 13 Week oral toxicity study in rats with toxicokinetics. RTC Research Toxicology Centre, Report N° 7698/T/303/2000, 2001.
- Haddouk H., Bacterial Reverse Mutation Test. Centre International de Toxicologie (CIT), Study No. 26919 MMO, 2004.
- IARC(International Agency for Research on cancer), Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1.123. 2019.
- Lee E.W. and Garner C.D., Effects of benzene on DNA strand breaks in vivo versus benzene metabolite-induced DNA strand breaks in vitro in mouse bone-marrow cells, Toxicology and Applied Pharmacology, 108: 497 - 508, 1991
- Lloyd M., 1,2,4-Trihydroxybenzene (A033): Mutation at the HPRT Locus of L5178Y Mouse Lymphoma Cells Using the MicrotitreR Fluctuation Technique. Covance Laboratories Ltd Study No.413/103, 2004.
- MFDS(The Ministry of Food and Drug Safety), 화장품 위해평가 가이드라인, 2017.
- Molinier B., Micronucleus Test by Intraperitoneal Route in Mice: Imexine OAM. Centre International de Toxicologie (CIT), Study N°9574MAS, 1993.
- Molinier B., In Vitro Mammalian Cytogenetic Test in Cultured Human Lymphocytes. Trihydroxybenzene. Centre International de Toxicologie (CIT), Study N° 10386 MLH, 1994.
- Norman K., Induction of Antioxidant-Response-Element Dependent Gene Activity and Cytotoxicity (using MTT) in the Kertinocyte ARE_Reporters Cell Line, KeratinoSens by 1,2,4-THB, Institute for In Vitro Sciences, Report issued June 8, 2016.
- Ollivier E., 1,2,4-Trihydroxybenzene (A033): Acute Dermal Toxicity in Rat.

- CIT Study No. 28834 TAR, 2004.
- OSU(The Ohio State University), OSU Office of Environmental Health and Safety. Chemical Hygiene Plan. Table 9 Carcinogens Table: OSHA, IARC, NTP, ACGIH Page 16. 2001.
- Reus A.A., 3D Skin comet assay with 1,2,4-Trihydroxybenzene, using Phenion® full thickness skin models. Triskelion, Report issued January 2017.
- Roy S., In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Assay in Human Peripheral Blood Lymphocytes (HPBL) of 1,2,4-Trihydroxybenzene, BioReliance Corporation, Report issued August 17, 2015.
- Roy S., In Vitro Micronucleus Test using Reconstructed skin Micronucleus (RSMN) assay in EpiDerm™, BioReliance Study Number AE03RS.358.BTL. 27 March 2019.
- Savary M.H., Assessment of possible embryotoxic or teratogenic effects by oral route in rats. Centre International de Toxicologie (CIT), Study N° 7200RSR, 1991.
- SCCS(Scientific Committee on Consumer Safety), EUROPEAN COMMISSION. OPINION ON 1,2,4-Trihydroxybenzene COLIPA n°A33, 2012.
- SCCS, EUROPEAN COMMISSION. OPINION ON hair dye 1,2,4-Trihydroxybenzene(1,2,4-THB) - A33 (CAS 533-73-3) Submission VI, 2019.
- Wagner V.O., Bacterial Reverse Mutation Assay of 1,2,4-Trihydroxybenzene, BioReliance Corporation, Report issued August 10, 2015.