

## E-screen assay 및 자궁비대반응시험 (Uterotrophic assay)을 이용한 di-(2-ethylhexyl) adipate의 에스트로겐성 작용에 관한 연구

한순영 · 김형식 · 한상국 · 이이다 · 양규환 · 박귀혜  
식품의약품안전청 국립독성연구소

### Study on the Estrogenic Activity of Di-(2-Ethylhexyl) Adipate in E-Screen Assay and Uterotrophic Assay

Soon Young Han, Hyung Sik Kim, Sang Kook Han,  
Rhee Da Lee, Kui Lea Park and Kyu Whan Yang  
National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration

#### Abstract

Di-(2-ethylhexyl) adipate(DEHA) has been used extensively as a plasticizer in the manufacture of plastic products such as PVC films. Though, phthalate esters plasticizers have been known to induce endocrine system-mediated responses, few studies have been conducted for the screening of estrogenic activity of DEHA, an adipate plasticizer. This study was initiated to evaluate the estrogenic activity of DEHA by *in vitro* E-screen assay and *in vivo* uterotrophic assay. MCF-7 human breast cancer cells were treated with DEHA ( $5 \times 10^{-9}$ ~ $5 \times 10^{-4}$  M), for 144 hr, and cell proliferation was determined by sulforhodamine B(SRB) assay. DEHA dissolved in corn oil was administered subcutaneously to ovariectomized(OVX) female Sprague-Dawley rats at dosage levels of 0, 2, 20 and 200 mg/kg/day for three consecutive days. Rats were sacrificed 24 hr after final treatment and vagina and uterus(wet and blotted) weights were obtained. E-screen assayed DEHA did not generate cell proliferation at treated concentrations( $5 \times 10^{-9}$ ~ $5 \times 10^{-4}$  M), whereas 17  $\beta$ -estradiol (E2), the positive control, induced cell proliferation at low concentrations( $5 \times 10^{-14}$ ~ $5 \times 10^{-9}$  M). In the uterotrophic assay, DEHA did not change vagina and uterus(wet and blotted) weights at dosage levels up to 200 mg/kg/day treatment. These results demonstrated that DEHA did not exhibit the estrogenic activity as determined by *in vitro* E-screen assay and *in vivo* uterotrophic assay.

Key words : Di-(2-ethylhexyl) adipate, DEHA, E-screen assay, uterotrophic assay, ovariectomized rats

#### 서 론

Di-(2-ethylhexyl) adipate(DEHA)는 bis-(2-ethylhexyl) adipate 또는 dioctyl adipate라고도 하며(Fig. 1), PVC 제품의 제조에 가소제로서 널리 사용되고 있고, di-(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)의 발암성 논란 이후 식품에 직접 접촉하는 랩 등의 제조에 많이 사용되고 있다<sup>(1)</sup>.

Petersen 등<sup>(2,3)</sup>에 의하여 PVC 필름으로부터 상당량의 DEHA가 용출되는 것이 보고된 바 있으며, 치즈

등 PVC 필름으로 포장된 식품에서도 DEHA가 검출되는 것으로 보고된 바 있다<sup>(4,5)</sup>. DEHP를 비롯한 di-n-butylphthalate(DBP), di-ethylphthalate(DEP), butyl benzyl phthalate(BBP), di-n-pentylphthalate(DPP), di-n-propylphthalate(DPrP), dicyclohexylphthalate(DCHP) 등 프탈레이트류 가소제의 내분비계 장애작용 논란이 지속되면서 adipate류 가소제인 DEHA에 대한 내분비계

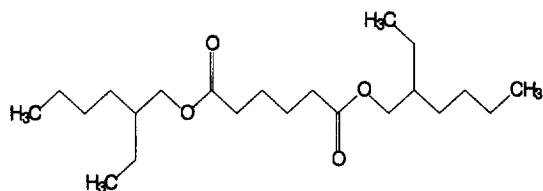


Fig. 1. Chemical structure of DEHA.

Corresponding author : Soon Young Han, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea  
Tel : 82-2-3801-789, 790  
Fax : 82-2-3801-791  
E-mail : soonyoung@kfda.go.kr

장애작용의 우려도 일부 제기되고 있다<sup>(6)</sup>.

현재까지 보고된 DEHA의 독성으로는 마우스를 이용한 우성치사시험에서의 양성반응과<sup>(7)</sup>, 설치류 간세포에서의 DNA 합성증가<sup>(8,9)</sup> 등 유전독성이 보고된 바 있다. 또한 마우스와 랫드에 고용량 투여시 간암을 발생시키며<sup>(10-13)</sup>, 랫드 및 마우스의 간장 중량과 peroxisome을 증가시키고<sup>(14,15)</sup>, 랫드의 혈청지질 감소<sup>(16)</sup>등을 일으키는 것이 보고된 바 있으나, 아직까지 DEHA에 의한 내분비계 장애작용 및 생식·발생독성 등에 대하여는 보고된 바가 없다.

한편 내분비계 장애작용 중 에스트로겐성 작용을 검색하는 방법으로서 사람의 유방암 세포주인 MCF-7 세포가 에스트로겐성 물질에 의하여 증식하는 성질을 이용한 검색법인 E-screen assay<sup>(17)</sup>가 *in vitro*에서는 널리 이용되고 있다. *In vivo*에서 에스트로겐성 작용을 검색하는 방법으로는 경제협력개발기구(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)<sup>(18)</sup> 및 미국 환경보호청 내분비계 장애물질 검색 및 시험자문위원회(US Environmental Protection Agency, Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)<sup>(19)</sup>에서 권고하고 있는 방법의 일종으로 난소를 절제하여 내인성 에스트로겐을 배제시킨 성숙한 동물 또는 미성숙 동물에 에스트로겐성 물질을 노출시킬 때 에스트로겐 수용체가 이에 반응하여 자궁 및 난소의 무게가 증가하는 것을 측정하는 방법인 자궁비대반응시험법(Uterotrophic assay)이 대표적이다.

따라서 본시험에서는 DEHA가 내분비계 장애작용 중 에스트로겐성 효과를 갖고 있는지의 여부를 E-screen assay 및 자궁비대반응시험법을 이용하여 검색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

시험물질인 di-(2-ethylhexyl) adipate(DEHA)는 Wako Chemical Industries(Japan)에서, corn oil, 17 $\beta$ -estradiol (E2), sodium bicarbonate, hydroxyapatite, Tris-HCl, DMSO 등은 Sigma Chemical Company(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### E-screen assay

**세포 및 배지** : MCF-7 세포(BUS cell)는 E-screen assay를 확립 개발한 Soto 연구실에서 직접 분양받아 5% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's

modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 배양하였다.

**시험방법** : 시험 하루 전 시험에 사용될 세포의 배지를 교환하고, 시험 당일 배지가 들어 있는 25 cm<sup>2</sup> 플라스크의 배지를 흡인 제거한 다음, PBS 완충액으로 1회 세정하였다. 0.25% 트립신 용액을 플라스크당 500  $\mu$ L 첨가하여 MCF-7 세포가 플라스크 바닥에서 분리되면(1-2분 정도) 배지 5 mL를 넣어서 피펫팅하였다. 배지를 15 mL 원심분리관(FALCON #352097)으로 옮겨 원심분리시켜(1000 rpm, 5분) 상정액을 흡인 제거한 다음, 세포가 남아 있는 원심분리관에 배지를 넣고 피펫팅하여 세포를 단일화시켜 세포수를 측정하였다. 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well로 96well 배양판(Falcon #353072, Non-pyrogenic)에 분주한 후(well당 배지량 100  $\mu$ L) 배양판을 천천히 흔들어 세포가 균일하게 분산되도록 하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C로 조절된 배양기에서 24시간 배양시킨 후, well에 들어 있는 배지를 흡인·제거하였다. Charcoal-dextran을 처리하여 혈청에 함유된 세포증식인자를 제거한 FBS(CDFBS) 5%를 함유한 DMEM 배지 90  $\mu$ L를 well에 넣고 시험 물질의 농도를 5 nM부터 최고 50  $\mu$ M까지 조제하여 각 농도별로 10  $\mu$ L씩 well에 가하였다. 이때, 용매로 사용한 DMSO의 최종 농도는 0.5%가 되도록 조절하였다. 시료가 첨가된 96 well plate를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C로 조절된 배양기에서 6일간(144시간) 배양한 후, sulforhodamine-B(SRB) assay로 세포 수를 측정하였다.

**Sulforhodamine-B (SRB) assay** : MCF-7 세포의 증식 정도를 측정하기 위하여 세포 단백질의 음이온과 SRB의 양이온이 결합하여 발색하는 원리를 이용한 SRB assay를 사용하였다<sup>(20)</sup>. 6일간 배양후 96well 배양판의 배지를 흡인·제거하고 4°C에 보관된 10% Trichloroacetic acid(TCA)를 well당 100  $\mu$ L씩 첨가하고 4°C에서 1시간 정치하여 세포를 고정하였다. 고정액을 제거하고 수세한 후 종이 타월로 물기를 완전히 흡수시켜 상온에서 건조시켰다. 건조된 배양판에 0.4% SRB (1% acetic acid에 용해)를 well당 50  $\mu$ L씩 가하여 상온에서 30분정도 염색한 후, 100  $\mu$ L의 1% acetic acid로 4회 세척하고 상온에서 건조시켜 10 mM Tris-buffer (pH 10.5)를 well당 100  $\mu$ L씩 분주한 다음 550 nM에서 흡광도를 측정하여 세포수를 측정하고 따로 세포 검량선을 작성하였다.

### 자궁비대반응시험

**실험동물** : 실험동물은 식품의약품안전청 국립독성연구소 barrier 시설 내에서 생산·사육된 4주령의 특정

병원체 부재(Specific Pathogen Free, SPF) Sprague-Dawley계 암컷 랫드를 2주간 순화시킨 후 사용하였다. 사육실은 온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 명암주기 12시간으로 유지하였고, 순화기간 및 실험기간동안 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 동물의 식별은 꼬리에 표시를 하여 구분하였다.

**난소 절제 수술 :** 체중이 180~200 g 정도인 6주령의 Sprague Dawley(SD)계 암컷 랫드를 diethylether로 마취시킨 다음, 면도기로 등부분의 털을 깎아내고 에탄올 솜으로 잘 닦은 후, dorso-abdominal wall을 미세가위로 직경 1 cm 정도 절개하였다. 지방으로 둘러싸인 난소 및 자궁을 핀셋으로 꺼내어 난소와 자궁의 경계를 봉합사로 잘 묶은 다음 난소를 완전히 잘라내고 봉합사로 내피를 봉합하고 autoclip으로 외피를 봉합한 다음 1주간 회복시킨 후 시험물질 투여하였다. 동물은 각 군당 6수씩을 사용하였다.

**시험물질 제조 및 투여 :** DEHA를 corn oil로 희석하여 0, 2, 20, 200 mg/kg/day의 용량으로 3일간 연속 피하주사하였다. 매일 체중을 측정하여 투여량을 산출하였으며 투약은 3일간 동일한 시간대에 시행하였다. 음성 대조군에는 corn oil을 투여하였고, 양성 대조군에는 E2를 corn oil에 녹여 투약직전에 조제하여 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 씩 피하로 투여하였다. 군당 동물수는 6수씩으로 하였다.

**자궁 및 질의 무게 측정 :** 마지막 시험 물질 투약 24시간 후인 4일째 되는 날 암컷 랫드를 경추 탈골시키고 체중을 측정한 후 자궁과 질을 적출하여 자궁을 둘러싸고 있는 지방을 제거하였다. 지방 제거시 자궁 상피를 건드려 자궁내의 분비액이 유실되지 않도록 조심하였고, 자궁과 질의 경계부분을 절단하여 각각의 무게를 측정하였다. 자궁은 다시 4등분 정도 절단하여 자궁 내 분비액을 여지(Whatman No. 3)로 blotting한 다음 순수 자궁만의 무게(blotted weight)를 측정한 후 필요시 조직관찰을 위하여 즉시 10% 중성 포르말린 용액으로 고정시켰다.

#### 통계처리

모든 실험결과는 MS-Excel(Ver. Office 97)을 이용하여 one way analysis of variance(ANOVA)검정을 실시하여 유의성이 인정된 경우, Dunnett's test를 이용하여 대조군과 각 투여군간에 다중비교를 실시하였다.  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

#### 결과 및 고찰

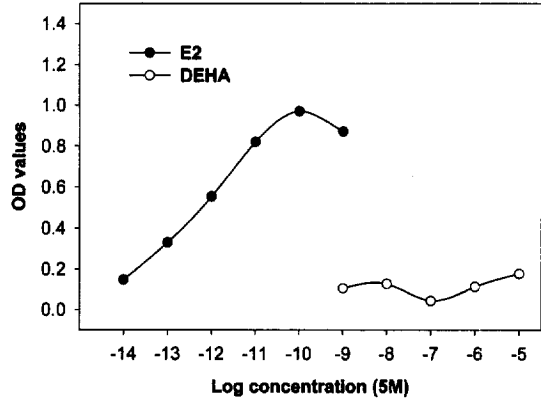


Fig. 2. Effects of DEHA on proliferation of MCF-7 human breast cancer cells.

Cells were exposed for 144 hrs to DEHA or E2 in DMEM medium supplemented with 5% charcoal dextran-treated FBS serum.

#### E-screen assay

DEHA에 대한 E-screen assay 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 내인성 여성 호르몬 물질로 잘 알려진 E2를 양성대조물질로 하여 에스트로겐 활성을 비교한 결과, DEHA는 시험농도( $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-5}$  M)에서 거의 에스트로겐 활성을 나타내지 않았으나, E2는  $5 \times 10^{-14} \sim 5 \times 10^{-9}$  M 농도에서 MCF-7 세포의 증식을 일으켰으며  $5 \times 10^{-10}$  M에서 가장 큰 활성을 나타내었다.

E-screen assay는 사람의 유방암 세포주인 MCF-7 세포가 에스트로겐성 물질과 에스트로겐 수용체(ER) 반응 등을 일으켜 증식하는 성질을 이용한 에스트로겐 고유활성 검색법으로서, 에스트로겐성 물질로 의심되는 여러 물질을 비교적 손쉽게 검색할 수 있는 장점이 있으므로 양성대조물질인 E2와 비교하여 시험물질의 에스트로겐 활성도[Relative Proliferative Effect (RPE), Relative Proliferative Potency(RPP)]를 측정하는데 적합한 시험법이다.

본 실험결과 adipate화합물인 DEHA는 에스트로겐성을 나타내지 않았으나, 본 연구실에서 실시한 E-screen assay 결과에서 7종의 프탈레이트류 화합물(DEHP, BBP, DBP, DPP, DPrP, DCHP 및 DEP) 중 BBP, DEHP, DBP 및 DEP가 5  $\mu\text{M}$ 에서 약한 에스트로겐 활성을 나타내었다<sup>(21)</sup>. 이중 BBP에 대한 결과는 Soto 등의 실험 결과<sup>(17)</sup>와 일치하였으며 DEHP는 Blom 등의 결과<sup>(22)</sup>와 유사하게 나타났다. 그리고 E-screen assay에서 DBP 및 DEP의 약한 에스트로겐 활성의 가능성을 본 연구실이 처음으로 보고하였다. 또한 이들 프탈레이트에 대하여

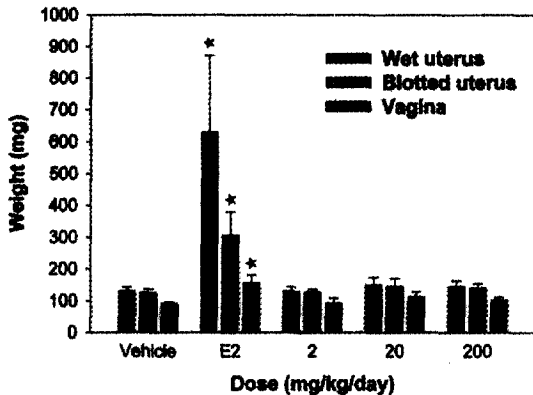


Fig. 3. Estrogenic effect of DEHA on ovariectomized Sprague-Dawley rats.

The test substances were administered by subcutaneous injection for three consecutive days. E2 was used as positive control and corn oil as negative control.

★ Significantly different from control,  $p < 0.05$ .

ER에 대한 E2와의 상경적 결합시험을 조사한 결과, BBP와 DEP는 E2보다  $10^4 \sim 10^6$ 배정도 높은 농도에서 에스트로겐 수용체에 대한 E2의 결합을 억제시켰지만 DEHP와 DBP는 ER과 거의 결합하지 않는 것을 알 수 있었다<sup>(21)</sup>.

#### 자궁비대반응시험

랫드의 자궁비대반응시험을 이용하여 *in vivo*에서 DEHA의 에스트로겐 활성을 검색한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. DEHA를 난소를 절제한 성숙 암컷에 0, 2, 20, 200 mg/kg/day의 용량으로 3일간 피하 투여할 때 자궁 및 질의 중량에 거의 영향을 미치지 못했는데, 반면 양성대조물질인 E2(1.0  $\mu\text{g/kg/day}$ ) 투여군에서는 대조군과 비교할 때 습자궁(wet uterus), blotted 자궁 및 질의 중량이 각각 대조군의 5.2배, 2.8배 및 1.8배씩 유의성있게 증가함을 볼 수 있었다.

본 시험 연구에 이용된 자궁비대반응시험법은 자궁의 무게 변화 및 질의 각화(cornification)로서 에스트로겐 활성을 평가하는 시험법으로서 OECD<sup>(18)</sup> 및 EDSTAC<sup>(19)</sup>에서 권고하고 있는 주요한 *in vivo* 내분비계 장애물질 검색법의 일종이다. 일반적으로 내인성 에스트로겐의 분비가 활발하지 않은 미성숙 랫드를 사용하거나 또는 성숙한 랫드의 난소를 절제하여 사용하는데, 이때에 외부에서 여성 호르몬 또는 여성 호르몬 유사물질이 유입되면 자궁내막이 증식하고 자궁내액이 증가하며 질이 각화되어 결과적으로 그 무게가 증가하게 된다.

본 시험에서 난소 절제 이전에 이미 분비된 내인성 에스트로겐의 작용을 배제하기 위하여 난소 절제 후 약 일주일의 회복기간을 두고 투약하였는데, Matsuzima 등<sup>(23)</sup>의 보고에 의하면 난소 절제 일주일 후의 자궁 무게는 난소 절제 전의 약 29%로, 4주 후에는 약 18%로 각각 감소한 바 있으며, OECD에서도 난소 절제 후 1주일의 회복기를 두도록 권장하고 있다<sup>(18)</sup>. 본 연구실에서도 OECD와 공동으로 난소를 절제한 성숙한 랫드와 미성숙 랫드에 17 $\alpha$ -ethinylestradiol 및 ZM189,154 등 에스트로겐 agonist 및 antagonist를 각각 피하 투여하여 본 시험법의 유용성을 입증하고 시험방법을 확립한 바 있다<sup>(24,25)</sup>. 본 연구실에서 7종의 프탈레이트 화합물(BBP, DEHP, DBP, DEP, DPP, DPrP 및 DCHP)에 대하여 자궁비대반응시험을 실시한 결과 각각 200 mg/kg/day까지 투여하여도 자궁무게 및 질의 무게에 거의 영향을 미치지 못함을 알 수 있었는데<sup>(26)</sup> 이는 시험에 사용된 프탈레이트류 화합물에 에스트로겐성 작용이 거의 없음을 시사하고 있으며, 이 결과는 Zacharewski 등<sup>(27)</sup>이 수행한 BBP, DBP, DEHP에 대한 결과와도 일치하였다.

서론에서도 언급하였듯이 국내·외적으로 DEHA의 생식·발생독성 및 내분비계 장애작용에 대한 보고가 거의 이루어지지 않은 실정으로, 앞으로 이 물질에 대한 생식·발생 및 내분비계에 대한 작용의 검색 및 시험이 *in vivo*와 *in vitro*에서 많이 이루어져야 할 것으로 생각된다. *In vitro*에 결여되어 있는 대사계가 *in vivo*에는 존재하므로 화학물질이 대사되면서 그 작용에 차이를 가져올 수도 있으며 시험방법마다 민감성의 차이도 있을 수 있다. 따라서 내분비계 장애작용의 검색을 위해서는 여러 종류의 *in vitro* 및 *in vivo* 시험계를 사용한 시험을 실시하여 그 결과를 종합적으로 분석함으로써 내분비계 장애작용 여부를 결론지어야 할 것으로 생각되나, 본 시험결과 DEHA는 *in vitro* E-screen assay 및 *in vivo* 자궁비대반응시험에서는 에스트로겐 활성이 없음을 확인할 수 있었다.

#### 요 약

랩 등 PVC 제품의 가소제인 DEHA의 에스트로겐 활성을 검색하기 위하여 내분비계 장애작용 중 에스트로겐성 작용을 검색하는 대표적인 방법인 *in vitro* E-screen assay와 OECD 및 미국 EPA EDSTAC에서 권고하고 있는 *in vivo* 난소절제 랫드를 이용한 자궁비대반응시험(uterotrophic assay)을 실시하였다. 시험결과 DEHA( $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-4}$  M)는 MCF-7세포의 증식을

유발하지 않았고 난소절제 랫드에 200 mg/kg/day 용량까지 투여하여도 자궁 및 질 무게에 영향을 미치지 않았다. 따라서 본 실험결과 DEHA는 E-screen assay 및 자궁비대반응시험에서 에스트로겐성 작용이 없는 것으로 확인되었으나, 이들 물질의 에스트로겐성에 대한 결론을 내리기 위해서는 여러 종류의 *in vitro* 시험 data 및 *in vivo* 시험 data가 더 보충되어야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 1999년도 식품의약품안전청 국립독성연구소 내분비계 장애물질 평가사업으로 이루어졌음.

## 문헌

- Lee, K.H., Kwon, K., Jeon, D.H., Jeong, D.Y., Choi, B.H., Lee, C.S., Kang, K.M., Kim, S.W. and Lee, C.W. The monitoring study on bisphenol A and phthalates in foodstuffs, food containers and packaging. *KFDA Report on Endocrine Disruptor Research 1*: 23-57 (1999)
- Petersen, J.H., Lillemark, L. and Lund, L. Migration from PVC cling films compared with their field of application. *Food Addit. Contam.* 14: 345-353 (1997)
- Petersen, J.H. and Breindahl, T. Specific migration of di-(2-ethylhexyl) adipate(DEHA) from plasticized PVC film: results from an enforcement campaign. *Food Addit. Contam.* 15: 600-608 (1998)
- Petersen, J.H., Naamansen, E.T. and Nielsen, P.A. PVC cling film in contact with cheese: health aspects related to global migration and specific migration of DEHA. *Food Addit. Contam.* 12: 245-253 (1995)
- Castle, L., Mercer, A.J., Startin, J.R. and Gilbert, J. Migration from plasticized films into foods. 2. Migration of di-(2-ethylhexyl) adipate from PVC films used for retail food packaging. *Food Addit. Contam.* 4: 399-406 (1987)
- Illinois EPA Endocrine Disruptors Strategy. Preliminary list of chemicals associated with endocrine system effects in animals and humans or *in vitro*. (1997)
- Singh, A.R., Lawrence, W.H. and Autian, J. Dominant lethal mutations and antifertility effects of di-2-ethylhexyl adipate and diethyl adipate in male mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32: 566-576 (1975)
- Miyagawa, M., Takasawa, H., Sugiyama, A., Inoue, Y., Murata, T., Uno, Y. and Yoshikawa, K. The *in vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test with hepatocytes prepared from male B6C3F1 mice as an early prediction assay for putative nongenotoxic (Ames-negative) mouse hepatocarcinogens. *Mutat. Res.* 343: 157-183 (1995)
- Busser, M.T. and Lutz, W.K. Stimulation of DNA synthesis in rat and mouse liver by various tumor promoters. *Carcinogenesis* 8: 1433-1437 (1987)
- NTP. Carcinogenesis bioassay of di-(2-ethylhexyl) adipate in F344 rats and B6C3F1 mice. *National Toxicology Program Technical Report Series No. 212* (1982)
- Kluwe, W.M., McConnell, E.E., Huff, J.E., Haseman, J.K., Douglas, J.F. and Hartwell, W.V. Carcinogenicity testing of phthalate esters and related compounds by the National Toxicology Program and the National Cancer Institute. *Environ Health Perspect* 45: 129-133 (1982)
- Kluwe, W.M., Huff, J.E., Matthews, H.B., Irwin, R. and Haseman, J. K. Comparative chronic toxicities and carcinogenic potentials of 2-ethylhexyl-containing compounds in rats and mice. *Carcinogenesis* 6: 1577-1583 (1985)
- Kluwe, W.M. Carcinogenic potential of phthalic acid esters and related compounds: structure-activity relationships. *Environ. Health Perspect* 65: 271-278 (1986)
- Keith, Y., Cornu, M.C., Canning, P.M., Foster, J., Lhuoguenot, J.C. and Elcombe, C.R. Peroxisome proliferation due to di-(2-ethylhexyl) adipate, 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanoic acid. *Arch. Toxicol.* 66: 321-326 (1992)
- Lake, B.G., Price, R.J., Cunninghame, M.E. and Walters, D.G. Comparison of the effects of di-(2-ethylhexyl) adipate on hepatic peroxisome proliferation and cell replication in the rat and mouse. *Toxicology* 123: 217-226 (1997)
- Moody, D.E. and Reddy, J.K. Serum triglyceride and cholesterol contents in male rats receiving diets containing plasticizers and analogues of the ester 2-ethylhexanol. *Toxicol. Lett.* 10: 379-383 (1982)
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. and Serrano, F.O. The E-Screen assay as a tool to identify estrogen, An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect* 103: 113-122 (1995)
- OECD. Validation Protocol for the Uterotrophic Assay. Task Force on Endocrine Disruptor Testing and Assessment. (1999)
- EPA EDSTAC. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Final Report. (1998)
- Villalobos, M., Olea, N., Brotans, J.A., Olea-Serrano, M.F., Ruiz de Almodovar, J.M. and Pedraza, V. The E-screen assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks. *Environ. Health Perspect* 103: 844-850 (1995)
- Han, S.Y., Han, S.K., Moon, H.J., Kim, H.S., Lee, D.H. Kim, S.H., Kim, T.S. and Park, K.L. Study on estrogenic activities of phthalate esters using E-screen assay and competitive binding assay. *J. Toxicol. Public Health* 16: 141-146 (2000)
- Blom, A., Ekman, E., Johannisson, A., Norrgren, L. and Pesonen, M. Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 306-310 (1998)
- Matsuzima, Y., Kanno, J., Miyashiro, E., Inoue, T. Uterotrophic reaction in relation to the length of ovariectomized period in rat. Abstract No. B46 presented

- at the 2nd meeting of Japan Society of Endocrine Disrupter Research, Kobe (1999)
24. Kim, H.S., Han, S.Y., Lee, R.D., Kil, K.S. and Park, K.L. Uterotrophic assay using ovariectomized female rats with sub-cutaneous administration. *J. Appl. Pharmacol.* 8: 78-83 (2000)
25. Han, S.Y., Kim, H.S., Lee, D.H., Oh, S.D., Kim, T.S. and Park, K.L. Dose-response characteristics of uterotrophic activity in immature female rats treated with estrogen agonist and antagonist. *Environ. Mutagens & Carcinogens* 20: 1-6 (2000)
26. Han, S.Y., Moon, H.J., Kim, H.S., Kim, C.K., Shin, J.H., Oh, S.D., Jang, S.J. and Park, K.L. No estrogenic activity of phthalate esters in ovariectomized rat uterotrophic assay. *J. Appl. Pharmacol.* 8: 147-152 (2000)
27. Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu, Z.F., Fielden, M.R. and Matthews, J.B. Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 46: 282-293 (1998)

---

(2000년 5월 2일 접수)