

사춘기 암컷 랫드에서 갑상선 시험에 의한 Methoxychlor의 에스트로젠 효과

정문구* · 김종춘 · 임광현
한국화학연구소 안전성연구센터 생식독성실

The Estrogenic Effects of Methoxychlor in Pubertal Female Rats: Establishment of Thyroid Assay for Endocrine Disruptors

Moon-Koo Chung*, Jong-Choon Kim and Kwang-Hyeon Lim

Reproductive Toxicology Division, Toxicology Research Center, Korea
Research Institute of Chemical Technology, Yousung, Daejeon 305-600, Korea
(Received December 1, 1999)
(Accepted February 24, 2000)

ABSTRACT : Recently, there is a worldwide concern that a great number of man-made chemicals have a hormone-like action both in humans and in animals. EPA and OECD are developing screening programs using validated test systems to determine whether certain substances may have an effect on humans. In the present study, the establishment of *in vivo* short-term test system for pubertal female assay with thyroid to detect endocrine disrupting chemicals was tried using a model substance, methoxychlor (MC), a chlorinated hydrocarbon insecticide. Forty female rats were assigned to four groups. MC was administered at dose levels of 0, 8, 40, and 200 mg/kg by gavage to female rats from day 21 post partum to the completion of vaginal opening. We evaluated body weight change, age at vaginal opening, onset of estrous cyclicity, age at first estrus, ovary weight, and serum concentrations of thyroxine and thyroid stimulating hormone in female rats. The age at vaginal opening of females receiving 40 and 200 mg/kg was significantly younger than controls. The onset of estrus cyclicity and age at first estrus of females receiving 200 mg/kg was also younger than controls. There was no effect of treatment on body weight, ovary weight, and hormone concentration. Based on these results, it can be concluded that application of MC at dose level of 40 mg/kg affects the vaginal opening and application of MC at dose level of 200 mg/kg accelerates the vaginal opening and the onset of estrus cyclicity.

Key Words : Endocrine disrupting chemicals, *In vivo* screening assay, Methoxychlor, Vaginal opening, Estrus cycle

I. 서 론

현대문명의 발달로 인하여 수많은 의약품, 농약, 화합물 등의 화학물질들이 개발되어 유용하게 사용되고 있다. 그러나 이들의 종류 및 사용량의 증가는 인체에 많은 부작용을 유발하게 되었고 따라서 이들에 대한 안전성평가와 사용에 관한 관련법규도 강화되고 있다. 최근 논란의 대상이 되고 있는 내분비계 장애물질(endocrine disrupting

chemicals)은 생체내 항상성 유지와 성장, 발육 및 생식기관의 발달 등을 조절하는 호르몬의 생성, 분비, 이동, 대사, 결합, 작용 또는 배설을 간섭하는 외인성물질로서(Kavlock 등, 1996) 생체내로 유입되면 마치 호르몬과 같이 작용한다고 하여 일명 환경호르몬이라 불리고 있다(Colborn 등, 1996). 이러한 물질들은 자연상태에서 잘 분해되지 않고 저농도로 장기간에 걸쳐서 생체에 노출됨으로서 생체의 내분비계를 교란시킨다고 한다. 내분비계 장애물질은 사람이나 야생동물에 있어서 요도하열(hypospadias), 잠복정소(cryptorchidism), 가성반음양(pseudohermaphroditism) 등의 생식기 발육이상과 정자수 감소 및 정자활력저하 등의 생식기능의 이상, 그리고 차세대의 발육이상 등의 생식독성학적 부작용을 초래하고 정소, 전립선

*To whom correspondence should be addressed
List of abbreviations. EDCs, endocrine disrupting chemicals; EDTA, Endocrine Disrupter Testing and Assessment. EDSTAC, Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee; MC, methoxychlor; T3, triiodothyronine; T4, thyroxine; TSH, thyroid stimulating hormone. TRH, thyrotrophin releasing hormone.

및 유방의 암발생을 증가시키는 중요한 원인이라고 알려지고 있다(Carlsen 등, 1992; Colborn 등, 1993; Ahlberg 등, 1995; Sharpe 등, 1995). 이에 따라 세계 각국의 정부는 그 대책수립에 나서 정부연구기관, 산업계, 학계, 소비자단체 및 환경보호단체들과 공동으로 해결책 마련에 부심하고 있다. 그러나 이러한 내분비계 장애물질을 검색하기에는 기존의 생식독성시험들은 많은 동물과 인력, 경비 및 시간이 소요되고 또한 민감성이 낮아서 내분비활성물질(hormonally active compounds)을 신속하고 정확하게 검색하기 위한 새로운 단검검색법의 개발 및 확립이 절실히 요구되고 있다. 그 중 국제기구인 경제협력개발기구(OECD)에서는 1998년 3월 환경호르몬 시험 및 평가 실무작업반(Endocrine Disrupter Testing and Assessment, EDTA)을 구성하여 독성기전연구, 실험동물모델개발, 생체 내에서 호르몬 생합성과 대사를 예견할 수 있는 *in vitro* 시험법 개발을 수행해 오고 있다. 미국 환경청(US EPA)에서는 1996년 5월 환경호르몬 검색 및 시험자문위원회(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)를 설치하였고 내분비계 장애물질로 의심되는 화학물질에 대한 검색 및 시험법에 대해서 연구를 하고 있다(EPA, 1997). 일본에서는 1996년 7월부터 후생성과 환경청을 중심으로 내분비계 장애물질에 대한 연구를 추진하고 있다. 그리고 우리나라에서는 1998년 5월부터 환경부와 식품의약품안전청을 중심으로 대책 및 연구협의회를 구성하여 이 문제를 다루기 시작하였다.

Methoxychlor(MC)는 염소를 함유한 탄화수소 살충제로서 DDT 대용농약으로 채소, 과일 등에 주로 사용되고 있다. MC는 활성화된 대사물질이 에스트로젠성을 나타낸다고 하며(Tullner, 1961; Bulger 등, 1978), 마우스와 랫드에서 자궁 상피세포의 비대증과 자궁중량의 증가 및 지속발정을 유발한다고 한다(Welch 등, 1969; Gray 등, 1989; Walters 등, 1993).

본 연구에서는 내분비계 장애물질의 검색 및 시험법 확립의 일환으로 EDSTAC에서 권고하는 설치류 사춘기 암컷 갑상선시험법을 확립하고자 모델물질인 MC를 이용하여 시험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 시험에는 Sigma사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입한 MC(Lot No. 87H1099)를 corn oil에 현탁하여 조제한 후 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100)에서 구입한 19일령의 SD 암컷 랫드를 SPF(specific pathogen free) 조건하에서 사육하였다. 시험기간 중 방사선 조사(2.0 Mrad)로 멸균한 실험동물용 고형사료 [제일사료(주)]와 자외선 유수살균기로 소독한 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 시험은 미국 실험동물관리 인증협회(American association for Accreditation of Laboratory Animal Care; AAALAC)가 인증한 시설에서 수행하였고, 모든 시험방법은 본 연구소의 동물관리사용위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)로부터 승인을 받았다.

3. 투여량의 설정과 시험군의 구성

본 시험의 용량설정을 위해 MC 1, 4, 16 및 64 mg/kg 용량으로 예비시험을 실시한 결과, 모든 투여용량에서 시험물질의 투여에 기인된 체중과 난소중량의 변화는 인정되지 않았으나 질개구와 첫 발정기는 64 mg/kg 투여군의 동물이 대조군에 비해 다소 빠른 결과를 나타내었다. 이 결과를 기초로 200 mg/kg을 고용량으로 정하고 공비 5로 증용량 및 저용량을 각각 40 및 8 mg/kg으로 설정하였으며 그 외에 매체대조군(corn oil)을 두었으며 군당 10마리씩의 암컷동물을 사용하였다.

4. 시험물질의 투여

시험물질을 생후 21일령의 암컷랫드에게 질개구가 완료될 때까지 1일 1회씩 경구로 반복투여하였다.

투여액은 주 2회 측정된 체중을 기초로 체중 kg당 10 ml로 산출하였다.

5. 관찰 및 검사항목

1일 1회씩 일반증상을 관찰하였고, 주 2회씩, 즉 1일(투여개시일)과 4, 7, 11, 14일 및 부검일(성주기 검사에서 첫 발정기가 관찰된 날)에 체중을 측정하였다. 투여일일부터 질개구를 관찰하였고, 질개구가 완료된 개체는 다음 날부터 질도말을 하여 첫 발정기와 성주기의 개시일령을 관찰하였다. 발정기와 성주기 개시일령의 관찰이 끝난 후 동물을 에테르로 마취시킨 후 부검하였다. 이 때 복대동맥에서 채혈한 후 혈청을 분리하여 thyroxine(T4)과 thyroid stimulating hormone(TSH) 함량을 RIA법(방사선면역측정법)으로 측정하였다. 또한 생식기관의 변화를 육안적으로 세밀

히 관찰한 다음 난소의 중량을 측정하였고, 갑상선 조직은 고정된 후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 병리조직학적인 변화를 관찰하였다.

6. 통계학적 분석

얻어진 모든 시험자료는 평균 ± 표준편차로 표기하였고, 통계분석은 SAS 프로그램(SAS Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다. 일원배치분산분석(one-way ANOVA)에서 유의성이 인정된 자료는 Dunnett 다중비교법을 이용하여 5% 수준에서 유의차 검정을 하였다.

III. 결 과

시험물질 MC를 투여하여 사춘기 암컷 갑상선 시험을 실시한 결과는 Table 1에 요약되어 있다. 시험물질의 투여에 기인된 체중의 변화는 인정되지 않았다. 질개구는 40 및 200 mg/kg 투여군의 동물에서 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 빨리 관찰되었고, 성주기 개시일령과 첫 발정기는 200 mg/kg 투여군의 동물에서 매체대조군에 비해 빨리 관찰되었다. 난소의 중량을 측정한 결과 200 mg/kg 투여군에서 좌측난소의 절대중량이 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였으나 상대중량에 있어서는 각 투여군과 매체대조군간에 유의성이 인정되지 않았다. 상기한 좌측난소의 절대중량감소는 상대장기중량이 대조군과 유의차가 없는 것으로 보아 체중감소에

기인한 소견으로 사료되며 시험물질의 영향으로는 인정되지 않았다. 혈청내의 T4와 TSH 함량에 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 유의차는 인정되지 않았다. 갑상선의 조직학적 검사시 모든 투여군에서 특이소견은 관찰되지 않았다.

IV. 고 찰

생식기관의 기능은 시상하부-뇌하수체-성선축(hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis)의 조절체계에 의하여 조절된다. 뇌하수체는 시상하부로부터 지령을 받아 여러 가지 호르몬을 분비하며 하위의 내분비 기관인 부신, 갑상선 및 부갑상선과 서로 협조하여 세포, 조직, 기관의 항상성 유지에 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 뇌하수체가 장해를 받으면 병변은 뇌하수체뿐만 아니라 그 분비호르몬의 표적기관이나 그 호르몬 분비를 조절하고 있는 기관에도 영향을 끼치게 된다. 시상하부 뉴런에서 분비된 갑상선 자극호르몬 유리호르몬(TRH; thyrotrophin releasing hormone)이 뇌하수체의 갑상선 자극호르몬 생산세포에 이르면 TSH가 유리되게 된다. TSH는 다시 혈류를 타고 갑상선으로 운반되어 여포세포(follicular cell)에서 T4와 T3(triiodothyronine)의 합성과 분비를 촉진시킨다. 따라서 갑상선호르몬의 생성과 분비는 뇌하수체에서 분비되는 TSH의 지배 아래서 조절되고 있고 갑상선 호르몬은 뇌하수체와 시상하부에 음성피드백(feedback mechanism)을 통하여 다시 갑상선 호르몬분비를 조절하므로 갑상선 호르몬이 높

Table 1. Findings of female rats treated with methoxychlor

| Parameters | Methoxychlor (mg/kg/day) | | | |
|--|--------------------------|--------------|---------------|---------------|
| | 0 | 8 | 40 | 200 |
| No of rats examined | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Body weights (g) Day 1 | 42.76± 5.43 | 43.15± 5.26 | 42.78± 5.60 | 41.37± 6.58 |
| Day 4 | 60.87± 5.01 | 61.58± 5.97 | 61.83± 6.72 | 59.10± 7.36 |
| Day 7 | 77.15± 5.42 | 78.88± 7.41 | 78.27± 7.95 | 74.98± 9.30 |
| Day 11 | 101.39± 7.48 | 101.64± 7.87 | 102.96± 9.65 | 96.14± 11.42 |
| Day 14 | 115.83± 12.44 | 119.58± 8.46 | 120.27± 9.83 | 113.07± 11.26 |
| Weight gain (Days 1-14) | 73.07± 8.02 | 76.43± 4.71 | 77.49± 5.59 | 71.70± 6.55 |
| Age at vaginal opening (day) | 30.50± 1.35 | 30.80± 1.69 | 28.50± 1.18** | 26.10± 0.32** |
| Age at onset of estrus cyclicity (day) | 33.50± 2.12 | 34.56± 1.86 | 31.30± 2.50 | 29.60± 2.99** |
| Age at first estrus (day) | 34.50± 2.12 | 35.50± 1.84 | 32.35± 2.45 | 30.65± 2.94** |
| Body weight at necropsy (g) | 130.65± 9.56 | 131.53± 8.30 | 132.66± 11.51 | 124.02± 13.68 |
| Left ovary weight (g) | 0.029± 0.008 | 0.025± 0.006 | 0.025± 0.003 | 0.021± 0.006* |
| per B.W (%) | 0.022± 0.007 | 0.019± 0.005 | 0.019± 0.002 | 0.017± 0.004 |
| Right ovary weight (g) | 0.025± 0.008 | 0.026± 0.006 | 0.025± 0.006 | 0.022± 0.003 |
| per B.W (%) | 0.019± 0.006 | 0.020± 0.004 | 0.019± 0.003 | 0.018± 0.002 |
| Serum thyroxine (µg/dl) | 2.597± 0.485 | 2.788± 0.466 | 2.990± 0.499 | 2.465± 0.549 |
| Serum TSH (µIU/ml) | 0.014± 0.010 | 0.018± 0.013 | 0.011± 0.003 | 0.015± 0.013 |

Values are means±S.D., * and ** indicate significant difference at p<0.05 and p<0.01 levels, respectively, when compared with the vehicle control group. TSH: thyroid stimulating hormone. B.W.=body weight IU=international unit.

으면 TSH가 낮아지고 갑상선 호르몬이 낮으면 TSH 분비가 증가하게 된다. 갑상선 기능저하에 따른 기능장애는 기초대사율의 저하로 나타난다. 생식독성학적 측면에서는 번식이상이 나타나며 수컷의 경우 성욕의 소실과 정자수의 감소가 나타나고 암컷에서는 수태율의 감소와 발정주기의 결여 또는 성주기의 이상이 생기게 된다. 갑상선의 기능을 검사하는 방법으로는 radioimmunoassay에 의한 혈중 T4 및 T3를 측정하고 TSH 함량을 측정하게 된다. 갑상선 조직의 중량과 여포상피세포의 형태학적 및 계측적 평가는 독성영향을 평가하는데 민감한 지표로 이용된다.

MC는 염소를 함유한 탄화수소계 살충제로서 현재 미국에서는 DDT 대용농약으로 채소, 과일 등에 사용되고 있다. 상기의 살충제는 proestrogen으로서 간장에서 O-demethylation에 의해 HPTE [2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1-trichloroethane]로 활성화되며 이렇게 활성화된 대사물질이 에스트로젠성을 나타낸다고 한다(Tullner, 1961; Bulger 등, 1978). 미성숙 마우스에 1 mg/kg의 농도로 MC를 투여할 경우 자궁에서 에스트로젠 수용체의 발현이 자극된다는 사실이 밝혀졌고(Eroschenko 등, 1996), 대사물질의 에스트로젠성 때문에 MC를 고용량으로 투여하면 자성생식기에 부작용을 초래하게 되는데 그 동안 이에 관한 일련의 연구결과가 발표된 바 있다. 예를 들면 마우스 신생자에 MC를 투여하면 지속발정 및 자궁중량의 증가가 유발되고(Walters 등, 1993), 성숙 마우스에 MC를 투여하면 자궁 상피세포의 비대증과 그에 따른 자궁중량의 증가가 야기된다고 한다(Welch 등, 1969; Schwartz 등, 1994).

본 연구에서는 에스트로젠성 물질로 알려진 MC를 미성숙 암컷 랫드에 투여한 결과, 40 mg/kg 용량에서는 매체대조군에 비해 질개구가 유의성있게 빨리 관찰되었으나 성주기의 개시일령과 난소 중량, 혈청중 TSH와 T4의 함량 및 갑상선조직의 병리조직학적 관찰에서는 대조군과 차이가 인정되지 않았다. 40 mg/kg의 투여는 성주기 및 갑상선에 영향을 주지 않은 것으로 미루어 볼 때 MC가 본 농도에서는 시상하부-뇌하수체 조절체계에는 영향을 끼치지 않고 질상피세포의 기능에 직접적으로 작용하여 에스트로젠 영향을 나타냄으로서 가성조숙(pseudoprecocity)을 유발했다는 것을 암시해 준다. 이러한 가성조숙은 다른 연구자들의 연구에서도 관찰되었는데, Gray 등(1989)에 의하면 MC 6 mg/kg 이상의 반복투여는 암컷동물의 가성조숙을 유발하여 질개구가 2 내지 7일 정도 빨리 나타난다고 한다. 이는 마우스를 이용한 연구에서도 확인되었는데, Walters 등(1993)은 마우스 신생자에 MC를 투여한 후 질개구가 빨리 나타남을 발견하였고, Eroschenko와 Cooke (1990)는 역시 마우스 신생자에 10일간 총 80~160 mg/kg을 투여한 후 질개구의 조숙과 지속발정을 관찰하였다고 한다. 본 시험의 200 mg/kg 투여군에서는 질개구일령 뿐

만 아니라 성주기의 개시일령과 첫 발정일령이 매체대조군에 비해 현저하게 빨리 나타났는데 본 투여군에서도 또한 혈중 TSH와 T4의 함량 및 갑상선조직의 병리조직학적 관찰에서는 어떠한 이상도 관찰되지 않았다.

결론적으로 미성숙 암컷 랫드에 MC를 반복투여하면 40 mg/kg 용량에서 질개구 일령이 앞당겨지고 200 mg/kg 용량에서 질개구와 성주기 개시 일령이 빨라진다는 것을 알 수 있었고, 본 시험을 통하여 설치류 사춘기 암컷 갑상선 시험이 에스트로젠성을 지닌 내분비계 장애물질의 검색에 유용한 시험법임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 환경부에서 주관하는 G7 과제의 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ahlborg, U.G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C.C., Hanberg, A., Baron, J., Tricopoulos, D. and Adami, O. (1995): Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometritis: an assessment of the biological and epidemiological evidence, *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**, 463-531.
- Bulger, W.H., Muccitelli, R.M. and Kupfer, D. (1978): Studies on the *in vivo* and *in vitro* estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic mono-oxygenase in methoxychlor activation, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2417-2423.
- Carlsen, E., Grwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *Br. Med. J.*, **305**, 609-613.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378-384.
- Colborn, T., Dumaoski, D. and Myers, J.P. (1996): Our Stolen Future. Are we threatening our fertility, intelligence and survival? A Scientific Detective Story, Dutton, USA.
- EPA. (1997): Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. Risk Assessment Forum. U.S. EPA, Washington, DC.
- Eroschenko, V.P. and Cooke, P.S. (1990): Morphological and biochemical alterations in reproductive tracts of neonatal female mice treated with the pesticide methoxychlor, *Biol. Reprod.*, **42**, 573-583.
- Eroschenko, V.P., Rourke, A.W. and Sims, W.F. (1996): Estradiol or methoxychlor stimulates estrogen recep-

- tor expression in uteri, *Reprod. Toxicol.*, **10**, 265-271.
- Gray, L.E., Ostby, J.S. and Ferrell, J.M. (1989): A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* **12**, 92-108.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, D., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G. and Luster, M. (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop, *Environ. Health Perspect.*, **104**[Suppl. 4], 715-740.
- SAS Institute Inc. (1990): SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schwartz, W.J., Wink, C.S. and Johnson, W.D. (1994): Response of adult murine uterine epithelium to 50% methoxychlor. *Reprod. Toxicol.*, **8**, 81-87.
- Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S. and Sumpter, J.P. (1995): Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production, *Environ. Health Perspect.*, **103**, 1136-1143.
- Tullner, W.W. (1961): Uterotrophic action of the insecticide methoxychlor, *Science*, **133**, 647-648.
- Walters, L.M., Rourke, A.W. and Eroschenko, V.P. (1993): Purified methoxychlor stimulates the reproductive tract in immature female mice, *Reprod. Toxicol.*, **7**, 599-606.
- Welch, R.M., Levin, W. and Conney, A.H. (1969): Estrogenic action of DDT and its analogs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **14**, 358-367.