

랫드 자궁비대반응시험(Uterotrophic assay)을 이용한 phthalate esters의 에스트로겐성 작용 연구

한순영* · 문현주 · 김형식 · 김철규 · 신재호 · 오세동 · 장성재 · 박귀례
식품의약품안전청 국립독성연구소

No Estrogenic Activity of Phthalate Esters in Ovariectomized Rat Uterotrophic Assay

Soon Young HAN*, Hyun Ju MOON, Hyung Sik KIM, Cheul Kue KIM, Jae Ho SHIN,
Se Dong OH, Seung Jae JANG and Kui Lea PARK

National Institute of Toxicological Research, Korea Food & Drug Administration,
5 Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea

(Received April 14, 2000; accepted May 10, 2000)

Abstract – The rodent uterotrophic assay is currently recommended as one of the primary *in vivo* assays for endocrine disrupting chemicals by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (US EPA EDSTAC). Generally, this assay relies on the rapid increase in uterus and vagina weights when exposed to estrogenic compounds. Phthalate esters have been used extensively as a plasticizer in the manufacture of plastic products such as PVC films and medical devices. Recently, phthalate esters have been shown to induce endocrine system mediated responses. However, a few studies have been conducted for the screening of their estrogenic activity. In this study the estrogenic activity of seven phthalate esters, butyl benzyl phthalate (BBP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-n-butylphthalate (DBP), diethylphthalate (DEP), di-n-pentylphtalate (DPP), di-n-propylphthalate (DPrP) and dicyclohexylphthalate (DCHP), was examined in uterotrophic assay. Phthalate esters dissolved in corn oil were administered to ovariectomized (OVX) female Sprague-Dawley rats by sub-cutaneous injection for three consecutive days. Rats were sacrificed 24h after final treatment, and then uterus and vagina weights were determined. All phthalate esters tested in this assay did not change the uterus and vagina weights at dosage levels up to 200 mg/kg/day treatment. These results demonstrated that phthalate esters did not exhibit estrogenic activity *in vivo* uterotrophic assay.

Keywords □ phthalate esters, uterotrophic assay, ovariectomized, estrogenic activity

프탈레이트류는 1930년대 이후 플라스틱 가소제로서 사용되어왔고, 총 생산량 중 25%를 DEHP가 차지하며 (Kirk-Othmer's Encyclopaedia) 플라스틱 제품이나 합판, 포장지에 사용되는 잉크의 재료나 첨가제로 사용된다 (MAFF, 1995). 1993년 "Total Diet Survey"에서 지방함유 식품에서의 프탈레이트량 조사 결과에 의하면, 성인의 경우 평균 0.8 mg/사람/일(0.013 mg/kg체중/일)내지 1.6 mg/사람/일(0.027 mg/kg체중/일)을 섭취한다고 보고된 바 있다 (MAFF, 1996).

프탈레이트류는 랫드(Ema 등, 1992, 1993, 1995; Field 등, 1989)와 마우스(Price 등, 1990)에서 배자 흡수, 두정

콜 및 흉골 이상과 구개열 등의 기형 및 발생 독성을 일으키는 것으로 보고되어 있으며, 주로 남성의 생식·발생에 미치는 영향에 대하여 많은 독성연구가 이루어져 왔다. DBP에 대하여 랫드의 다세대 독성시험을 실시한 결과, 요도하혈, 전립선 및 부고환 발육부전 등이 F0에서는 나타나지 않고 F1에서만 나타나는 것으로 보고되었다(Foster 등, 2000). Mylchreest 등 (1999)의 연구에서도 이러한 효과는 성분화 기간(임신 12~21일) 동안의 짧은 투여에 의해서 수컷 자손에 제한되어 나타났으며, 안드로겐 수용체를 매개하지 않고 항안드로겐성 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. DEHP는 미성숙 랫드에 2 g/kg/day 투여시 심각한 정소위축 및 아연 농도를 감소시켜 정소독성을 일으켰으며(Gray 등 1986; Oishi, 1986), 마우스에서도 생식독성이 관찰되었

*To whom correspondence should be addressed.

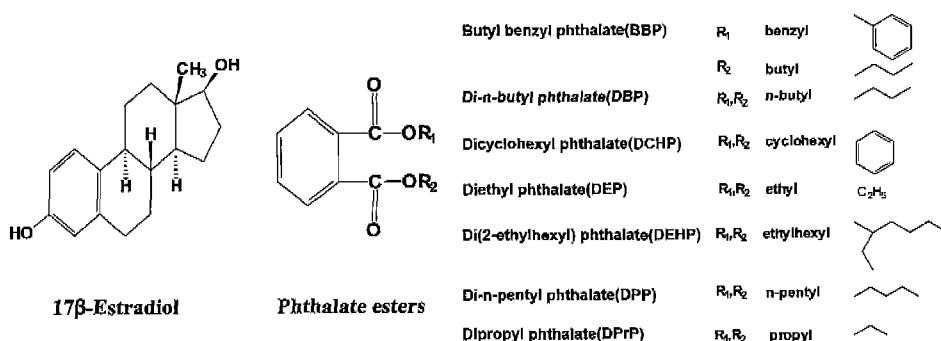


Fig. 1. Chemical structures of 17 β -estradiol and phthalate esters.

고, BBP가 항안드로겐성 작용을 나타낼 가능성은 사람의 안드로겐 수용체를 transfection시킨 yeast를 이용한 검색시험에서 dihydrotestosterone의 작용이 억제되었다는 사실에서도 이미 시사된 바 있다(Peters 등, 1997; Sohoni 등, 1988).

그러나 프탈레이트류 화합물의 에스트로겐 활성에 대하여는 *in vitro*에서의 연구는 어느 정도 보고되어 있지만 (Blom 등, 1998; Harris 등, 1997; Zacharewski 등, 1998), *in vivo*에서의 연구는 Zacharewski 등 (1998)이 실시한 BBP, DBP, DEHP, DHP(di-hexyl phthalate), Di7P(diisoheptyl phthalate), DiNP(diiso-nonyl phthalate), DnOP(di-*n*-octyl phthalate), DiDP(diiso-decyl phthalate) 등 총 8종에 대한 시험결과 에스트로겐성 작용이 없음이 보고된 이외에는 보고된 바가 없다.

한편 자궁비대반응시험(Uterotrophic assay)은 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 방법으로, OECD 및 EDSTAC에서 권고하고 있는 *in vivo* 내분비계 장애작용 검색법 중 하나이다 (OECD, 1999; EPA EDSTAC, 1998). 현재 OECD에서는 국제 공동연구를 통하여 이 시험법의 protocol을 확립하기 위한 pre-validation과정 중에 있다(OECD, 1999).

이상과 같이 프탈레이트류가 남성의 생식계 발달 및 기능에 미치는 영향에 대해서는 어느 정도 보고되어 있으나 에스트로겐성 영향에 대해서는 많이 보고되어 있지 않으므로, 현재 세계적으로 내분비계 장애작용에 대하여 논란이 되고 있는 프탈레이트류 화합물을 시험물질로 선정하여 OECD 및 EDSTAC에서 권고하고 있는 *in vivo* 자궁비대반응시험법을 이용하여 에스트로겐성 효과를 조사하고자 하였다.

실험방법

시험물질 및 시약

Phthalate류 화합물(Fig. 1)로서 di(2-ethylhexyl) phthalate

(DEHP), di-*n*-butylphthalate(DBP), di-*ethyl*phthalate(DEP)는 Junsei Chemical사(일본)에서, di-*n*-pentylphthalate(DPP), di-*n*-propylphthalate(DPrP)는 Kanto Chemical사(일본)에서, dicyclohexylphthalate(DCHP)는 Wako Chemical사에서 구입하였다. Butyl benzyl phthalate(BBP), corn oil, 17 β -estradiol(E2), sodium bicarbonate, hydroxyapatite, Tris-HCl, DMSO 등은 Sigma Chemical사 (MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험동물

실험동물은 식품의약품안전청 국립독성연구소 barrier 시설 내에서 생산·사육된 4주령의 특정 병원체 부재(SPF) Sprague-Dawley계 암컷 랙드를 2주간 순화시킨 후 사용하였다. 사육실은 온도 23±1°C, 습도 55±5%, 명암주기 12시간으로 유지하였고, 순화기간 및 실험기간동안 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 동물의 식별은 고리에 표시를 하여 구분하였다.

자궁비대반응시험

난소 절제 수술

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

시험물질 제조 및 투여

프탈레이트류 화합물을 corn oil로 희석하여 0, 2, 20, 200 mg/kg/day의 용량으로 3일간 연속 투여하였다. 매일 체중을 측정하여 투여량을 산출하였으며 투약은 3일간 동일한 시간대에 시행하였다. 음성 대조군에는 corn oil을

투여하였고, 양성 대조군에는 E2를 corn oil에 녹여 투여적 전 조제하여 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 씩 피하로 투여하였다.

자궁 및 질의 무게 측정

마지막 시험 물질 투약 24시간 후인 4일째 되는 날 암컷 랫드를 경주 텁풀시키고 체중을 측정한 후 자궁과 질을 적출하여 자궁을 둘러싸고 있는 지방을 제거하였다. 지방 제거시 자궁상피를 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 실험 결과는 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.

실험결과 및 고찰

랫드의 자궁비대반응시험을 이용하여 내분비계 장애물질로 추정되고 있는 프탈레이트류 가소제의 에스트로겐 활성을 검색하였다.

본 시험 연구에 이용된 자궁비대반응시험법은 자궁의 무게 변화 및 질의 각화(cornification)로서 에스트로겐 활성을 평가하는 시험법으로서 OECD 및 EDSTAC에서 권고하고 있는 주요한 *in vivo* 검색법의 일종이다. 일반적으로 내인성 에스트로겐의 분비가 활발하지 않은 미성숙 랫드를 사용하거나 또는 성숙한 랫드의 난소를 절제하여 사용한다. 이 경우 외부에서 여성 호르몬 또는 여성 호르몬 유사물질

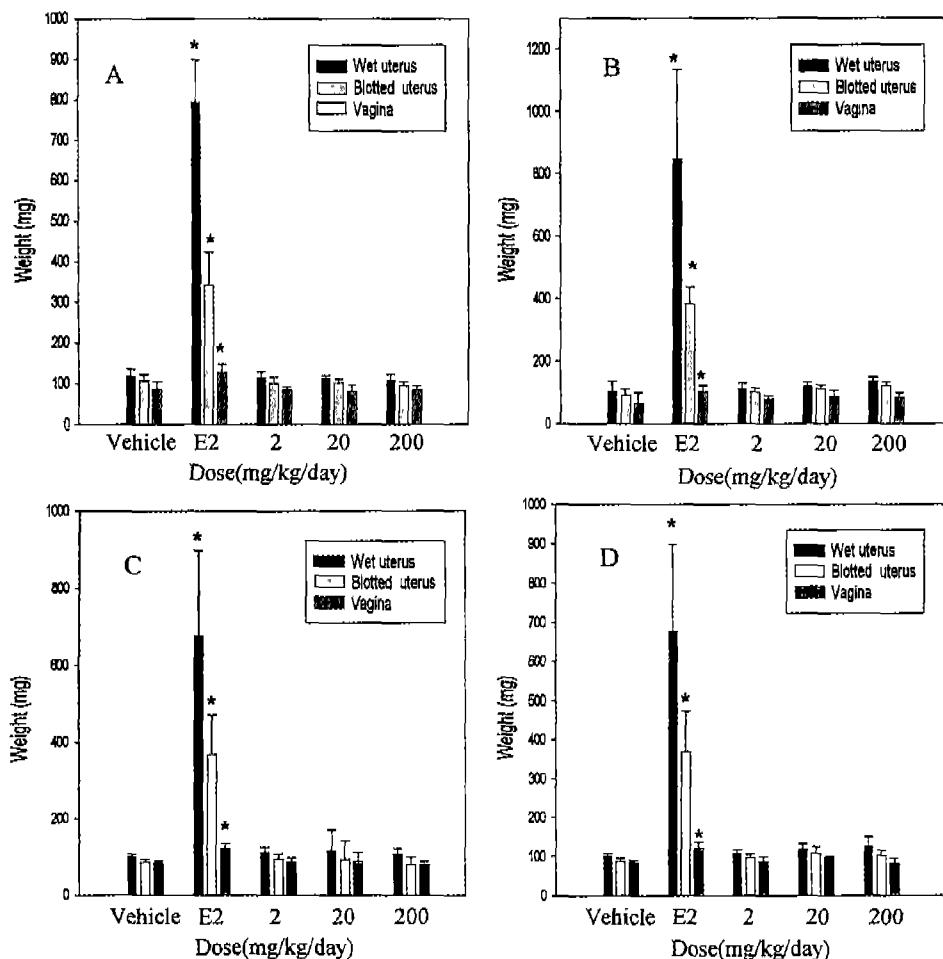


Fig. 2. Estrogenic effect of phthalates on ovariectomized Sprague-Dawley rats. The test substance was administered by sub-cutaneous injection for three consecutive days. A: BBP, B: DBP, C: DEHP, D: DEP. E2 (1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was used as positive control, and corn oil as negative control. *Significantly different from control, $p<0.05$.

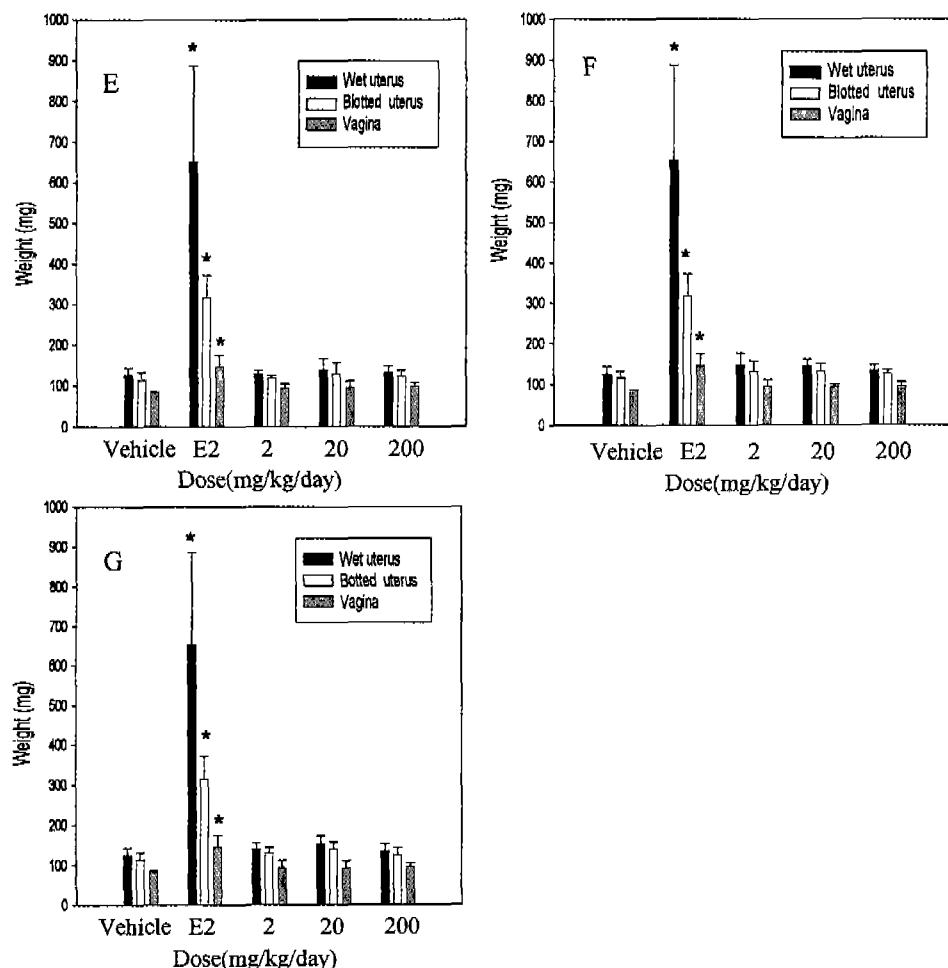


Fig. 3. Estrogenic effect of phthalates on ovariectomized Sprague Dawley rats. The test substance was administered by sub-cutaneous injection for three consecutive days. E: DPP, F: DPrP, G: DCHP. E2 (1.0 µg/kg/day) was used as positive control. *Significantly different from control, $p<0.05$.

이 유입되면 자궁내막이 증식하거나 질이 각화되어 결과적으로 그 무게가 증가하게 된다. 본 실험실에서도 OECD와 공동으로 미성숙 랙드와 난소를 절제한 성숙한 랙드에 17α -ethynodiol 및 ZM189,154 등 에스트로겐 agonist 및 antagonist를 각각 피하투여하여 본 시험법의 유용성을 입증하고 시험방법을 확립한 바 있다(Kim 등, 2000; Han 등, 2000a).

본 시험에서 난소 절제 이전에 이미 분비된 내인성 에스토겐의 작용을 배제하기 위하여 난소 절제 후 약 일주일의 회복기간을 두고 투약하였는데, Matsuzima 등 (1999)의 보고에 의하면 난소 절제 일주일 후의 자궁 무게는 난소 절제 전의 약 29%로, 4주 후에는 약 18%로 감소한 바 있으며, OECD에서도 난소 절제 후 1주일의 회복기를 두도록 권장하고 있다(OECD, 1999).

E2(1.0 µg/kg/day)를 양성대조물질로 사용하여 프탈레이트 화합물의 자궁비대반응시험 결과, 난소를 절제한 성숙

임컷에 7종의 프탈레이트 화합물(BBP, DEHP, DBP, DEP, DPP, DPrP 및 DCHP)을 각각 200 mg/kg/day까지 투여 하여도 자궁무게 및 질의 무게에 거의 영향을 미치지 못했다(Fig. 2 및 3). 반면 양성대조물질인 E2(1.0 µg/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. 따라서 본 시험에 사용된 프탈레이트류에는 에스트로겐성 작용이 거의 없음을 시사하고 있으며, 이 결과는 Zacharewski 등 (1998)이 수행한 BBP, DBP, DEHP에 대한 결과와도 일치 한다. Zacharewski 등 (1998)은 BBP, DBP, DEHP, DHP (di-hexyl phthalate), Di7P(diisoheptyl phthalate), DiNP (diiso-nonyl phthalate), DnOP(di-n-octyl phthalate), DiDP (diiso-decyl phthalate) 등 총 8종의 phthalate esters에 대해서 자궁비대반응시험을 수행한 바 있으나 모두 음성을 나타냈으며, BBP, DBP, DEHP에 대한 음성의 결과는 본

연구결과와 일치하고 있다.

프탈레이트류 화합물의 에스트로겐 활성에 대하여는 *in vitro*에서의 연구는 어느 정도 보고되어 있지만(Bлом 등, 1998; Harris 등, 1997; Zacharewski 등, 1998), *in vivo*에서의 연구는 많이 보고되어 있지 않다(Zacharewski 등, 1998). 에스트로겐 유사작용을 가지는 화합물에 대한 직업상의 노출과 유방암 발생과의 관계를 조사한 결과에서 BBP는 발암률을 증가시키지는 않았지만(Aschengrau 등, 1998), 효모 및 사람 유방암세포(MCF-7 cell)를 이용한 *in vitro* 시험에서 약한 에스트로겐 활성을 나타내었다(Catharine 등, 1997). DBP는 효모 및 MCF-7 세포를 이용한 *in vitro* 시험에서 약한 에스트로겐 활성을 나타내었고(Fishbein 등, 1992), *in vivo* 시험에서는 안드로겐 수용체와 결합하지 않으면서 항안드로겐성 효과를 나타내었다(Mylchreest 등, 1999).

이상의 보고와 같이 프탈레이트류에 대한 *in vivo*에서의 에스트로겐성 영향을 수행한 연구는 많이 보고되어 있지 않은 실정이므로 본 시험에서 uterotrophic assay를 이용하여 프탈레이트류의 에스트로겐 활성을 조사한 결과, 자궁에 대한 직접적인 에스트로겐 영향은 나타나지 않았다. 그러나 본 실험실에서 수행한 *in vitro* 시험 결과, 즉 MCF-7 세포의 종식을 이용한 E-Screen assay에서 일부 프탈레이트(BBP, DBP, DEHP 및 DEP)는 약한 에스트로겐 활성을 나타내었고 에스트로겐 수용체에 대한 상정적 결합시험에서도 BBP 및 DEP는 약한 수용체 결합정도를 나타내었으며(Han 등, 2000b), 다른 연구진에 의해서도 BBP 및 DBP의 MCF-7 세포에서의 약한 에스트로겐성이 보고된 바 있다(Catharine 등, 1997; Fishbein 등, 1992).

이러한 *in vivo*와 *in vitro*에서의 시험결과 차이는 *in vitro*에 결여되어 있는 대사계가 *in vivo*에는 존재하므로 프탈레이트가 대사되면서 그 작용에 차이를 가져올 수도 있을 것으로 생각될 수도 있고, 시험방법마다 민감성의 차이도 있을 것으로 생각된다.

본 시험에서는 다른 연구진에서 실시하지 않은 DEP, DPP, DPrP 및 DCHP에 대하여 *in vivo* 자궁비대반응시험을 실시하여 음성의 결과를 얻은 것에 의의가 있다고 할 수 있으며, 내분비계 장애작용의 검색을 위하여는 여러 종류의 *in vitro* 및 *in vivo* 시험계를 사용한 시험을 실시하여 그 결과를 종합적으로 분석함으로써 장애작용 여부를 결론지어야 할 것으로 생각된다.

결 론

OECD 및 미국 EPA EDSTAC에서 권고하고 있는 *in vivo* 내분비계 장애작용 검색법의 일종인 난소절제 랫드를 이용한 자궁비대반응시험법(uterotrophic assay)으로 BBP,

DEHP, DBP, DEP, DPP, DPrP 및 DCHP 등 프탈레이트 가소제 7종의 내분비계 장애작용을 검색한 결과, 프탈레이트류 화합물은 200 mg/kg/day 용량까지 투여하여도 자궁 및 질 무게에 영향을 미치지 않았다. 따라서 본 실험결과 프탈레이트류 가소제는 자궁비대반응시험법에서는 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 말씀

본 연구는 1999년도 식품의약품안전청 국립독성연구소 내분비계 장애물질 평가사업으로 이루어졌다.

참고문헌

- Aschengrau, A., Coogan, P. E., Quinn, M. and Cashins, L. J. (1998). Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer; an exploratory analysis. *Am. J. Ind. Med.* **34**(1), 6-14.
- Blom, A., Ekman, E., Johamisone, A., Norrgren, L. and Pesonen, M. (1998). Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7), *Arch. Environ. Contam. Toxicology* **34**, 306-310.
- Catharine, A. H., Pirkko, H., Malcolm, G. P. and John, P. S. (1997). The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ. Health Perspect.* **105**(8), 802-811.
- Ema, M., Itami T. and Kawasaki, H. (1992). Effect of period of exposure on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in rats. *J. Appl. Toxicol.* **12**, 57-61.
- Ema, M., Itami, T. and Kawasaki, H. (1993). Teratogenic phase specificity of butyl benzyl phthalate in rats. *Toxicology* **79**, 11-19.
- Ema, M., Kurosaka, R., Amano, H., and Ogawa, Y. (1995). Comparative developmental toxicity of n-butyl benzyl phthalate and di-n-butyl phthalate in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **28**, 223-228.
- EPA EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Final Report.
- Field, E. A., Sleet R. B., Price J., Mart, M. C., Myers, C. B., Morrissey, R. E. and Schwets, B. A. (1989). Developmental toxicity evaluation of butyl benzyl phthalate (CAS No. 85-68-7) administered in feed to CD-rats on gestation days 6-15. *Final Study Report NTP/NIEHS Contract No. N01-ES-95255*.
- Fishbein, L. (1992). Exposure from occupational versus other sources. *Scand J. Work Environ. Health* **18**, Suppl 1, 5-16.
- Foster, P. M., Cattley, R. C. and Mylchreest, E. (2000). Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment.

- Food Chem. Toxicol.*, **38**, Suppl. 1(2-3), S97-S99.
- Gray, T. J. B. and Gangoli, S. D. (1986). Aspect of testicular toxicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspective* **65**, 229-235.
- Han, S. Y., Kim, H. S., Lee, D. H., Oh, S. D., Kim, T. S. and Park, K. L. (2000a). Dose-response characteristics of uterotrophic activity in immature female rats treated with estrogen agonist and antagonist. *Environ. Mutagens & Carcinogens*, **20**(1), 1-6.
- 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. (2000b) Study on estrogenic activities of phthalate esters using E-screen assay and competitive binding assay. *J. Toxicol. & Public Health.*, **16**(2), in press
- Harris, C. A., Henttu P., Parker M. G., Sumpter J. P. (1997). The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ. Health Perspect.* **105**(8), 802-811.
- Kim, H. S., Han, S. Y., Lee, R. D., Kil, K. S. and Park, K. L. (2000). Uterotrophic assay using ovariectomized female rats with sub-cutaneous administration. *J. Appl. Pharmacol.*, **8**, 78-83.
- Kirk-Othmer's Encyclopaedia of Chemical Technology, 3rd. Vol. 18.
- MAFF (1995). Food surveillance information sheet number 60: Phthalates in paper and board packaging. UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- MAFF (1996). Food surveillance information sheet number 82: Phthalates in food, UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Matsuzima, Y., Kanno, J., Miyashiro, Inoue, T. (1999). Utero-trophic reaction in relation to the length of ovariectomized period in rat. *Proceedings of 2nd meeting of Japan Society of Endocrine Disrupter Research*, 88.
- Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R. C. and Foster, P. M. D. (1999). Disruption of androgen-related male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicology and Applied Pharmacology* **156**, 81-95.
- OECD (1999). Validation Protocol for the Uterotrophic Assay. Task Force on Endocrine Disruptor Testing and Assessment.
- Oishi, S. (1986). Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl) phthalate: changes in histology, cell-specific enzyme activities and zinc concentration. *Arch. Toxicol.* **59**, 290-295.
- Peters, J. M., Taubeneck, M. W., Keen, C. L. and Gonzalez, F. J. (1997). Di(2-ethylhexyl)phthalate induces a functional zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Teratology* **56**, 311-316.
- Price, C. J., Field, E. A., Marr, M. C., Myers, C. B. and Morrissey R. E. (1990). Final Report on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in CD-1-Swiss mice. NTP Report 90-114.
- Sohni P. and Sumpter, J. P. (1988). Several environmental estrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* **158**, 327-339.
- Zacharewski, T. R., Meek, M. D., Clemons, J. H., Wu Z, F., Fielden, M. R., Matthews, J. B. (1998). Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicological Sciences* **46**(2), 282-293.