

## 내분비계 장애물질의 개요와 검색법의 고찰

류재천\*

한국과학기술연구원 생체대사연구센터 독성연구실

**요약** : 내분비계 장애물질이 환경호르몬이란 용어로 우리들의 실생활에 사용되는 용기 등을 통해 여러 가지 영향을 미치고 있다. 수많은 화학물질들 중에서 환경호르몬은 어떠한 종류의 화학물질이며, 언제 알려지게 되었고, 어떻게 분류되었으며, 이러한 환경호르몬성을 갖는 물질들의 환경호르몬성은 어떠한 연구기법에 의해 검색되는지와 현재까지의 사용실태와 문제점 및 국내외 관련 동향 등을 고찰하여 보았다.(2002년 8월 29일 접수, 2002년 9월 30일 수리)

**Key Words** : endocrine disruptors, estrogenicity, receptor binding, E-screen, yeast two-hybrid.

### 1. 서론

화학물질들은 인간에게 편리함 등 많은 이로움을 주고 있는 것은 주지의 사실이나 최근에 사회적 문제가 되며 환경 외인성 에스트로젠(Environmental xenoestrogens), 식물성 에스트로젠(Phytoestrogens), 환경 에스트로젠(Environmental estrogens), 환경호르몬, 외인성 내분비 교란 화학물질, 내분비 교란 물질 등의 용어가 자주 사용되고 있는데, 모두 동일한 의미이며, 미국에서는 'Endocrine Disruptors', 일본에서는 '외인성 내분비 교란화학물질', 우리나라 환경부에서는 1998년 5월에 '내분비계 장애물질'로 공식 명칭으로 사용하고 있다. 그러나 생체내의 내분비계 기능을 변화시켜 정상적인 개체나 그 후손들의 건강 장애를 유발하기 때문에 공식명칭도, 과학적인 명칭도 아닌 "환경호르몬"이란 낯선 명칭으로, 언론을 비롯하여 우리생활 주변에서 자주 거론되고 있다.

1962년 Rachel Carson이 지은 「침묵의 봄(Silent Spring)」에서 농약과 여러 합성 화학물질 등이 생태계에 문제를 야기시켜 인류를 위협하게 될 것이라고 경고한 이후, 환경오염과 인간의 삶의 질(Quality of life) 문제는 우리의 일상생활 속의 문제로 자리 잡게 되었고, 최근에 들어서는, 1996년 Theo Colborn이 지

은 「도둑맞은 미래(Our Stolen Future)」에서 일부 농약과 합성화학물질이 생태계와 동물의 내분비계에 작용하여 우리 자신들은 물론 후손들의 운명에도 중대한 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 지적하여 사회적으로 문제화되면서 세계 각국이 이에 대한 대책 마련에 심혈을 기울이고 있다.

환경호르몬이란 용어에서도 유추할 수 있듯이 흔히 이야기되는 성 호르몬물질등과는 구조적으로 같지 않으면서도 생체 내에서 성호르몬과 같은 작용을 하고 있는 화학물질을 의미하며, 때로 인간의 의도와는 다르게 자연환경에 장기간 잔류되어 일부는 생태계 순환과정에서 생물체에 농축되어 인간과 인간의 삶을 공유하는 자연계의 모든 생물에 많은 해로움을 주고 있는 것도 사실이다. 이와 같은 내분비계 장애물질이 문제가 되는 이유로는 우리의 식탁에 오르는 식품생산에 널리 쓰이는 농약류처럼 내분비계 장애를 유발하는 화학물질들의 대부분이 우리의 생활을 윤택하게 하기 위하여 쓰이는 제품의 성분으로 우리들의 일상 생활과 떼어 수 없는 필연성을 갖고 있다는 사실 때문이며, 내분비계 장애물질로 야기될 독성을 이야기 할 경우에 또한 중요한 점은 극미량일지라도 장기간에 걸쳐 노출된다는 현실성의 문제이다. 즉 환경 분야 관련자 및 학자들에 의해 생태계의 야생동물에서 건강 장애를 발견하고 그 원인을 추적하여 본 결과, 합성 화학물질에 의해 자연환경이 오염되고 그에 따른 생체내의 내분비계에 이상이 있다는 사실이 알려지게

\*Corresponding author (Fax : +82-2-958-5070,  
E-mail : ryujc@kist.re.kr)

되었고, 공통적인 건강 장애로는 야생동물에서 비정상적인 생식 영향, 여성에서의 유방암 증가추세 및 남성에서의 정자 수 감소 등이 나타나며, 이러한 현상은 생체내의 내분비계(Endocrine system)를 교란시키는 화학물질에 기인된다고 추정하고 있다.

내분비계 호르몬 중에서 주요물질인 에스트로젠(estrogen)은 사람 혹은 다른 동물들의 난소와 정소에서 일차적으로 생성되는 스테로이드 호르몬(steroid hormone)으로서 성장, 발육, 행동 등에 영향을 주며 생식 주기를 조절하고 다른 신체 부위(뼈, 피부, 혈관, 뇌 등)에도 영향을 미치며, 에스트라디올(estradiol)이 가장 많이 존재하며 효과가 크고, 그 밖에 에스트론(estrone), 에스트리올(estriol) 등의 에스트로젠 유도체들이 있다. 1922 년의 Dictionary of Science and Technology에 의하면 에스트로젠은 일반적으로 "여성의 성적인 성장(sexual development)과 생식 기능을 조절, 유지시켜주는 일련의 스테로이드 호르몬"으로 정의하고 있다. 같은 맥락에서 Hertz 등의 현대 과학자들은 에스트로젠을 여성의 성 기관(유방, 자궁 등)에서 세포 증식 촉진(DNA 합성 및 세포분열), 사춘기에 여성의 유방이나 남성의 근육 등에서 일어나는 비대 촉진 혹은 세포의 크기 증가, 특수 단백질 합성 유도 등의 작용에 의해 조직의 성장을 자극하는 물질로 정의하고 있다.

실험실적인 시험에서 위와 같은 반응을 나타내는 모든 천연 스테로이드(natural steroids)와, 식물에서 기인하는 화합물 또는 합성 화학 물질들을 에스트로젠성(estrogenic) 이라고 말하며 이들로 인해 야기될 수 있는 생체에서의 여러 영향과 산업화에 따른 화학 물질들의 다량 사용으로 인해 자연 생태계 및 나아가 인류의 보건 등에 미치는 영향들을 논리적이고 합리적인 접근 방식에 따라 모든 방면의 전문가들이 힘을 합쳐 해결의 노력을 기울여야 되리라 사료된다.

## 2. 정 의

동물에 있어서 내분비계란 호르몬을 분비하여 몸의 기능을 조절하는 선(腺, Glands)으로 뇌하수체, 갑상선, 부갑상선, 흉선, 췌장, 부신, 난소와 고환 등이 있다. 이러한 내분비계에서 생산되는 화학적 신호인 호르몬은 구조상 단백질 호르몬(Protein Hormone)과 스테로이드 호르몬(Steroid Hormone)으로 구분되며, 단

백질 호르몬은 분자량이 크고 단백질로 구성되어 전하를 띠고 있어 세포막을 통과 할 수 없으므로 세포막에 있는 외부 수용체(receptor)와 작용하는 호르몬이고, 스테로이드 호르몬은 분자량이 적고 지방에 잘 녹는 성질이 있어 세포막을 통과 할 수 있으므로 외부 수용체가 필요 없이 직접 세포 내부수용체에 작용한다. 그중 성호르몬(Sex steroids)은 기능상 남성과 여성을 특징 짓는 성적 분화(Sexual differentiation)를 통제하며 또한 발생 초기 과정에서 성을 결정하는데 중요한 역할을 하고 있는 스테로이드 호르몬의 일종이다.

일부 내분비계 장애물질은 에스트로젠(Estrogens)이라고 불리는 여성 호르몬의 구조와 유사하여 작용 기전이, 여성 호르몬의 작용에 장애를 일으키기 때문에 환경성 에스트로젠(Environmental estrogens)이라고도 불리고 있고, 내분비계의 호르몬 그리고 세포 수용체의 전달 기관에 영향을 미칠 수 있는 합성 화학물질과 천연 식물성 화합물들이 포함된다. 대부분의 이러한 물질들은 야생 동물의 발육, 생식 및 그 밖의 건강 문제와 관련이 있다고 알려져 왔고 또한 관련 전문가들은 같은 방법으로 사람에게도 영향을 미칠 수 있음을 강조하고 있고, 에스트로젠과 유사한 행동을 하는 많은 합성 화학 물질들이 특수한 목적으로 상업적으로 생산되거나 부산물로서 생성되고 있으며, Phytoestrogen과 같이 에스트로젠 성 반응(estrogenic response)을 보이는 천연 화합물들도 여러 식물이나 곰팡이류(fungi)에서도 발견되고 있다. 인간은 일생을 통해 인간의 생존과 떨어져 생각할 수 없는 음식, 공기, 물, 토양 그리고 모유 등으로부터 이러한 물질들에 노출될 가능성이 매우 크며, 또한 어머니의 자궁 내에서 발육하는 동안에도 노출될 수 있다. 비록 그 농도는 적으나, 지속적으로 환경 에스트로젠에 노출됨으로써 야기될 수 있는 인간의 건강 위험도(human health risk)에 미치는 영향에 대해서는 아직 많은 부분이 알려지지 않아 아직도 많은 논란의 대상이 되고 있다. 내분비계 장애물질이란 용어에 대한 국제사회에서의 정의는 야생동물이나 인간의 내분비계 또는 호르몬 계의 정상적인 기능을 변화시키는 외인성 물질을 말하며 1997년 1월 미국 Washington D.C.에서 개최된 국제 내분비계 장애물질에 대한 Smithsonian workshop에서는 다음과 같이 정의하였다.

즉 "몸에서 항상성을 유지하고 생식이나 발생 과정

의 조절에 필수적인 내인성 호르몬의 생성, 방출, 이동, 대사, 결합, 작용 또는 배출을 방해하는 외인성 물질”(Exogenous agents that interfere with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body which are responsible for the maintenance or homeostasis, reproduction, development or behavior)이라고 하였고, 또한 1996년 12월 영국 Weybridge에서 열린 EU/WHO/OECD Workshop에서 채택한 정의는 "내분비계 장애물질은 내분비계 기능을 변화시켜 정상적인 개체나 그의 자손에게 건강 장애를 유발하는 외인성 물질"(An endocrine disrupting chemical (EDC) is an exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, consequent to changes in endocrine function) 이라고 하였으며, 미국 환경청의 자문위원회(EDSTAC)에서 1998년 6월 발표한 보고서 초안에서는 "과학적 원리, 자료, 유력한 증거, 예방 원리에 근거하여 - 개체나 그 후손, 개체의 집단 또는 아집단 수준에서 - 내분비계의 기능을 변화시키거나 건강 장애를 유발하는 외인성 화학물질 또는 혼합물"(An exogenous chemical substance or mixture that alters the function(s) of the endocrine system and causes adverse effects - at the level of the organism, its progeny, and populations or subpopulations of organism - based on scientific principles, data, weight - of - evidence, and precautionary principle)이라고 정의하고 있다.

### 3. 내분비계 장애물질 문제의 역사

내분비계 장애물질은 독성이 높거나 특별한 화학물질이라고 하기보다는 농약, 플라스틱, 세정제 등과 같이 우리 일상생활에서 흔히 접할 수 있는 생활용품에 들어 있는 합성 화학물질로써, 생물에 유해한 에스트로제닉(estrogenic) 효과를 나타낸다는 것은 표 1에서 보는 바와 같이 오래 전부터 문제가 되어 왔었다. 실제로 DDT, Methoxychlor와 Kepone (Chlordecone)과 같은 유기 염소계 농약은 내분비계를 혼란시키는 물질로 분류되고 있으며 특히, 살충제로 쓰였던 DDT는 과거 사람의 위생해충을 방제하기 위하여 직접 뿌리기도 하였으나 미국에서 1972년 농작물에 사용이 금지되었고 국내에서도 사용이 금지되어, 그 이후로 자연계에 잔류하는 DDT의 농도는 계속 감소되고 있지만, 아직도 자연계나 일부 농산물에서 검출되고 있어 생태계에 심각한 영향을 미치고 있다.

이렇듯, 내분비계 장애물질이 많은 관심의 초점이 되고 있는 이유는 세대를 이어서 사람에게 심각한 영향을 가져 올 위험이 높기 때문이다. 특히 환경 잔류성이 높은 유기염소화합물이 야생동물의 역학 조사에서 관련성이 높은 유해 물질로 예측되었다. 예로써 미국과 캐나다 국경 지역에 있는 오대호 연안이 DDT나 PCBs 같은 유기염소 화합물에 오염되어, 이 지역에 사는 물고기를 먹은 새들 중 출생 시 이상이나 비정상적인 성적 행동 및 새의 부리가 비뚤어져 태어난 경우도 보고되었다. 또한 1980년에 플로리다주의 아포카 호수(Lake Apopka)에 Dicofol이라는 살충제가 주성분인 Kelthane이라는 농약을 다량 버렸는데 이 호수의 악어에서 호르몬 농도가 변하고 변형된 생식기관의 발견 등이 보고되었고, 이외에도 Kepone

표 1. 내분비계 장애물질 관련 주요 일지

년 도	주 요 일 지
1923	생체추출물에서 에스트로젠 효과 확인
1950	DDT 의 에스트로젠 효과 발견
1962	Silent Spring 출판-농약과 합성화학물질에 의한 야생동물의 건강장애 논의 시작
1968	DDT의 포유동물과 조류에서의 에스트로젠 효과 발견
1971	Diethylstilbesterol (DES)를 임신시 복용하여 태어난 딸에서 질암 발생 보고
1972	DDT의 농업용 사용 금지
1976	DES가 인간의 생식장애와 연관됨을 보고
1977	PCBs의 제조 및 사용 금지
1977	도시소각로에서 Dioxin 생성 확인
1994	다이옥신의 발암성보다 생식발생 장애 유발 효과 관심
1996	Our Stolen Future 출판 - 내분비계 장애물질의 사람과 야생생물에 미치는 영향에 대한 가능성 지적

(chlordecone)에 오염된 바닷물에서 회수된 굴껍질의 이상이나, 도시 하수도 부근에 사는 수컷 물고기에서 암컷만이 생산하는 Vitellogenin이라는 단백질이 검출되고 있다.

또한 플라스틱의 예로서, 1970년대 후반 스탠포드 대학의 Feldman과 Krishnan은 효모균이 에스트로젠을 생성하는 것을 발견하고 이를 입증하려고 노력하였다. 왜냐하면 단세포 생물은 호르몬을 사용할 필요가 없기 때문이었다.

결국 십여년간의 연구결과 1990년에 이들이 얻은 결론은 효모균은 에스트로젠을 합성하지 않는다는 사실이었고 실험에서 발견된 에스트로제닉 효과가 있는 화학물은 효모균 배양시 사용한 플라스틱 용기에서 용출된 Bisphenol A라는 화학물질로써 플라스틱 용기의 재질인 Polycarbonate의 분해산물이었던 것이다.

이와 비슷한 예가 플라스틱을 유연하게 만들어 주는데 사용되는 물질인 Nonylphenol로써, 1992년 Tuft 대의 Soto와 Sonnenschein이 유방암 세포 배양 시 플라스틱 용기로부터 용출되는 Nonylphenol이 암세포 배양에 영향을 주는 것을 알았다.

내분비계 장애물질은 성질상 자연계에 존재하는 식물성 에스트로젠(Phytoestrogens)과 인공적으로 합성한 환경성 에스트로젠(Environmental estrogens)으로 구분되며, 이중 식물성 에스트로젠은 마늘, 밀, 당근, 사과나 커피 같은 음식에 존재하며 많이 섭취하면 생식기장해를 초래하지만, 이들은 체내에 잔류하지 않고 쉽게 배설되기 때문에 커다란 문제를 일으키지는 않는다고 보고되고 있다.

그러나 합성 환경성 에스트로젠은 생체 내에서 잘 대사 되지 않고, 자연 환경상태에서 분해되지 않고 오랫동안 잔류하며, 지방성이어서 체내에 축적되어 임신 시나 젖을 먹일 때 자손에게 이행되기도 하며, 먹이사슬에서 최상위치에 있는 사람에게는 생선이나, 우유, 달걀 등 음식물에 의한 축적이 문제가 된다.

이러한 내분비계 장애물질은 첫째, 호르몬이 수용체에 결합하는 것을 막거나, 방해하거나, 변화시키고, 둘째, 내인성 호르몬의 생성이나 분해를 변화시키며, 셋째, 필요한 수용체의 생성 또는 기능을 방해하고, 넷째, 새롭거나, 약한 또는 강한 호르몬 반응을 일으켜 부정확한 신호를 생체에 전달하는 등의 작용기전으로 장애를 일으킬 수 있다.

## 4. 국내현황

1998년 5월 29일 환경부 주도하에 '대책 협의회'와 그 산하에 '전문연구협의회'를 구성 운영하였으며, 용어는 "내분비계 장애물질"로 통일하기로 결정하고 WWF에서 제시한 67종을 추정물질로 선정하여 국내 사용 및 규제 실태를 조사하여, WWF에서 선정한 67종 중 16종은 국내에서 사용실적이 없는 물질이고, 국내에서 제조되거나 수입사례가 있는 물질이 51종이며, 이중 42종은 유해 화학물질 관리법, 농약 관리법, 산업안전 보건법에 의하여 규제하고 있는 물질이며 비스페놀A, 노닐페놀류, 및 플라스틱 관련 산업용 화학물질 9종은 규제되고 있지 않은 물질이었다. 이 9종의 물질 중 환경잔류성이 높고 유해성이 있다고 보고된 4종(펜타-노닐페놀류, 비스페놀 A, 디에틸헥실프탈레이트, 디부틸벤질프탈레이트)은 환경부에서 "관찰 물질"로 지정하여 제조, 수입 및 용도를 신고하도록 하여 관리하고 있다.

1999년 9월 22일부터는 유해 화학물질 관리법에 따라 유해 화학물질 대책위원회로 일원화되어 내분비계 장애물질은 물론 유해화학물질에 관해 협의하도록 하고 있으며, 현재는 내분비계 장애물질에 관한 10개년 중장기 연구사업 계획을 수립하여 전국적인 오염도 실태조사, 생태계 영향조사, 다이옥신조사연구사업 등을 진행하는 등 점진적인 해결접근을 시도하고 있으며, 1999년에는 국가차원에서 처음으로 전국적인 오염실태조사를 실시하여 발표하였고, 2000년도와 2001, 2002년도에 시료채취횟수, 항목 등을 변경하여 지속적으로 오염실태조사 및 생태계 영향조사사업을 수행하고 있다.

그 외, 농촌진흥청, 해양연구소, 식품의약품안전청 등에서도 각 부처에 맞는 우선순위를 가지고 내분비계 장애물질 평가사업을 수행하고 있다.

## 5. 국외현황

### 5-1. 미국

1995년 4월 미국 환경보호청(Environmental Protection Agency; EPA)은 내분비계 장애물질이 인간이나 생태계에 미치는 영향 및 위해성 평가를 위한 Workshop을 개최하여 연구의 필요성을 확인하였고, 미국 의회는 1996년 8월 Food Quality Protection Act와

Safety Drinking Water Act를 통과시키면서 EPA에 내분비계 장애물질의 스크리닝 방법과 테스트 방법을 1998년 8월까지 개발하여 보고하고, 개발된 방법에 따라 1999년 8월까지 실험을 실시하여, 2000년 8월까지 평가 결과를 보고하도록 조치하였고 연방정부 차원에서 과학계, 업계, 민간단체 등을 대표하는 39인의 내분비계 장애물질 검색 및 시험자문위원회(EDSTAC; Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee)를 1996년 10월 16일에 구성하여 운영하고 있으며, EDSTAC은 The Principles Work Group, the Priority Setting Work Group (PSWG), the Screening and Testing Work Group (STWG), the Communications and Outreach Work Group (COWG)의 4개의 실무팀으로 구성되어 있으며, 1998년 4월 작성한 EDSTAC의 보고서 초안에 Conceptual framework and principles, Priority setting, Screening and testing, Communications and outreach, Implementation 등의 결정사항 및 권고, 토의 사항이 포함되어 있다. 연구에 참여하는 정부기관으로는 EPA 외에 국가독성프로그램(NTP), 국립환경보건과학연구소(NIEHS), 질병연구소(CDC), 국립환경보건센터(NCEH) 등이 있으며 이들은 1996년부터 \$40 million에 달하는 연구비를 투자하여 환경 보호라는 차원에서 뿐 아니라 자연과의 조화로운 국민 보건복지 차원에서 매우 적극적인 해결책을 모색하고 있다고 할 수 있다.

### 5-2. 유럽

유럽 각국은 1995년부터 1996년에 내분비계 장애물질에 대한 보고서를 자체적으로 작성하였고, EC/WHO, Euro/OECD/EEA가 "The Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and wildlife"라는 합동Workshop을 1996년 12월 영국 Weybridge에서 개최하여, 이 물질들의 정의와 실험방법의 기본원칙 및 연구방향에 대해 토론하였다.

또한 OECD/SETAC이 "Endocrine Modulators and Wildlife Assessment and Testing" Workshop을 1997년 4월 네델란드 Veldhoven에서, 1997년 10월에는 SETAC-Europe open seminar를 벨기에 Brussels에서 열어 적극적인 해결책을 모색하고 있다.

### 5-3. 일본

일본은 Japan Chemical Industry Association과

Japan Chemical Industry Ecology and Information Center에 의해 연구가 진행되다가 1997년부터 정부가 주도하여 그해 3월 환경청에서 "외인성 내분비 교란 화학물질 문제에 대한 연구반"을 구성하고, 문헌 및 국내 모니터링 조사 결과를 기초로 하여 중점적으로 조사 및 연구하여야 할 사항을 검토하여 7월에 중간 보고서를 취합 공표하였다. 또한 후생성 산하 국립 의약품 식품 위생 연구소에서 "내분비계 장애물질의 건강에 미치는 영향에 대한 검토 회"를 만들고 1998년 3월 13일에 폴리카보네이트, 폴리스타이렌, 폴리염화비닐 등 식품포장 용기에서의 내분비계 장애물질의 안전성 등에 대한 회의를 개최하고 인체에 미치는 영향, 작용기전, 검색방법 및 평가 방법에 대한 검토를 하였다. 일본 정부는 "Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors '98/Japan Environment Agency (SPEED '98/JEA)" 라 하여, 총 20억 엔을 투자하여 "내분비 교란 작용물질의 인체 영향에 관한 조사 연구"에서 대상물질을 약 140여종으로 하고 그 중 인체노출 경로가 주로 식품인 경우의 약 80물질, 인체 노출 경로가 불분명한 약 60물질로 나누어 연구를 수행하고 있으며, 이를 기초로 국제적인 연대를 진행시키고 있다. 또한 "환경호르몬 긴급 전국 일제조사"에서 공공용수와 지하수와 같은 수질환경에서의 오염여부를 일본 전역의 130 지점에 걸쳐 조사하여 95%에 이르는 123지점에서 환경호르몬이 검출되었다는 충격적인 보고도 하여, 정부차원의 적극적인 투자 및 해결책을 모색하고 있으며, 1998년부터 매년, 2000년에는 12월 16~18일에 "International symposium on environmental endocrine disruptors 2000" ([www.env.go.jp/press](http://www.env.go.jp/press))을 정부와 학계가 개최하는 등, 많은 노력을 기울이고 있다.

### 5-4. 국제기구

1998년 3월 10일~11일 경제개발협력기구(OECD) 주관으로 22개국에서 총 46명의 각국대표 및 전문가가 모여 "제 1회 OECD 내분비계 장애물질 시험 및 위해성평가의 시험법 지침에 관한 각 국 조정관 회의 및 위해성 평가 고문단 합동회의"를 열어 시험법에 관한 합의 사항을 도출하였고, 계속해서 1998년 3월 16일~18일에는 국제화학물질안전계획(IPCS)과 OECD가 주최하고 국제연합미주보건기구(PAHO) 후원으로 'IPCS/OECD 내분비계 장애물질에 관한 합동회의'를

개최하여 내분비계 장애물질에 관한 실태와 연구상황을 토의하고 2년 내에 WHO 출판물을 간행하기로 하는 등 다각적으로 해결책 제시를 위한 접근방법을 모색하고 있다.

### 6. 내분비계 장애물질 목록

내분비계 장애물질의 분류는 국가와 기관에 따라 약간씩 차이가 난다. 우리나라 식품 의약품안전청 홈페이지([http://kfda.go.kr/webzine/endocrine/endocrine/endocrine\\_3.html](http://kfda.go.kr/webzine/endocrine/endocrine/endocrine_3.html))에 게시된 바에 의하면 세계야생 생물기금(WWF, 표 2)에서는 총 67여종(농약-44종, 산업용 화학물질-14종, 부산물 또는 대사산물-9종)을,

미국의 Illinois EPA(표 3)는 74여종을 더욱 세분하여 Known, Probable, Suspect Category로 나누어 1997년 6월에 DCBI NIHS에 보고하였는데, Known category(19종)는 동물과 일부 사람에서 내분비계 장애가 입증된 물질이고 Probable(29종)은 생물과 bio-assay에서 내분비계 장애 작용이 입증된 물질이고, Suspect(26종)는 생물에서는 증거가 부족하고 bio-assay에서만 입증된 물질이다. 일본 국립 의약품 식품위생연구소(표 4)에서는 총 140여종(가소제-9종, 플라스틱에 존재하는 물질-17여종, 산업장 및 환경오염물질-21종, 농약류-74종, 중금속-3종, 합성에스트로젠-8종, 식품 및 식품첨가물-3종, 식물에 존재하는 호르몬 유사물질-6종)을 목록에 포함시키고 있다.

Table 2. WWF List of Known & Suspected Hormone Disruptors

<b>Persistent Organohalogenes</b>		Dioxins/furans	Octachlorostyrene
		PCBs	Hexachlorobenzene
		PBBs	pentachlorophenol
<b>Pesticides</b>			
2,4,5-T	DBCP	h-epoxide	oxychlorthane
2,4-D	DDT	kelthane	permethrin
alachlor	DDT metabolites	kepone	synthetic pyrethroids
aldicarb	dicofol	malathion	toxaphene
amitrole	dieldrin	mancozeb	transnonachlor
atrazine	endosulfan	maneb	tributyltin oxide
benomyl	esfenvalerate	methomyl	trifluralin
beta-HCH	ethylparathion	methoxychlor	vinclozolin
carbaryl	fenvalerate	metribuzin	zineb
chlordane	lindane	mirex	ziram
cypermethrin	heptachlor	nitrofen	
<b>Penta-to Nonyl-Phenols</b>			
<b>Bisphenol A</b>			
<b>Phthalates</b>			
	Diethylhexyl phthalate (DEHP)	Di-hexyl phthalate (DHP)	
	butyl benzyl phthalate (BBP)	Di-propyl phthalate (DprP)	
	Di-n-butyl phthalate (DBP)	Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	
	Di-n-pentyl phthalate (DPP)	Diethyl phthalate (DEP)	
<b>Styrene dimers and trimers</b>		<b>Benzo(a)pyrene</b>	
Pollutants with Widespread Distribution Reported to Bind to Hormone Receptors and therefore Suspected to have Reproductive and Endocrine-disrupting Effects			
2,4-dichlorophenol		Diethylhexyl adipate	
Benzophenone		N-butyl benzene	

Pollutants with Widespread Distribution Reported to have Reprouctive and Endocrine- Disrupting Effects

Table 3. Illinois EPA endocrine disruptors strategy

Known	Probable	Suspect
Atrazine	Alachlor	Aldicarb
Chlordanes	Aldrin	Butyl Benzyl Phthalate
Chlordecone (Kepone) (*)	Amitrole (Aminotriazole)	tert-Butylhydroxyanisole (+)
DDD	Benomyl	p-sec-Butylphenol (+)
DDE	Bisphenol A(+)	p-tert-Butylphenol (+)
DDT	Cadmium (*)	Carbaryl
1,2-Dibromo-3	2,4-D	Cypermethrin
Chloropropane (*)	Di(2-Ethylhexyl)Phthalate	2,4-Dichloropheno (+)
Dicofol (Kelthane)	Endrin	Dicyclohexyl Phthalate
Dieldrin	Heptachlor	Di(2-Ethylhexyl)Adipate (+)
Diethylstilbestrol (DES)(*)	Hepatchlor Epoxide	Di-n-butyl Phthalate (+)
Dioxins (2,3,7,8-)	Hexachlorobenzene	Di-n-hexyl Phthalate
Endosulfans	p-Hexachlorocyclohexane	Di-n-pentyl Phthalate
Furans (2,3,7,8-)	Lead (*)	Di-n-propyl Phthalate
Lindane	Mancozeb	Esfenvalerate
Methoxychlor	Maneb	Fenvalerate
p-Nonylphenol	Mercury (*)	Malathion
PCBs	Methyl Parathion	Methomyl
Toxaphene	Metiram	Metribuzin
Tributyl Tin	Mirex	Nitrofen
	p-Octylphenol	Octachlorostyrene
	Parathion	PAHS
	Pentachloro phenol	p-iso-Pentylphenol (+)
	Polybrominated Biphenyls (PBBs)	p-tert-Pentylphenol (+)
	Styrene (*, +) Update	Permethrin
	2,4,5-T	Ziram
	Trifluralin	
	Vinclozolin	
	Zineb	

Preliminary List of Chemicals Associated with Endocrine System Effects in Animals and Humans (\*) or In Vitro (+)

이렇듯 환경호르몬으로 분류되었으나 주요 관점이 환경생태계나, 식품 등이냐의 관심도에 따라 주의물 기울이는 물질들이 조금씩은 다르고 또한 연구가 계속됨에 따라 분류되는 물질들이 추가되는 경향을 보이고 있으며, 우리나라에서는 1998년 이후 환경부를 중심으로 한 대책회의에서 우선은 그 당시 WWF에서 제시한 67여종(표 2)을 내분비계 장애 추정물질로 선정하여 주의 깊게 관찰하고 있다.

최근의 up-date된 인터넷상의 자료에 의하면, 세계 야생생물기금(WWF-International, www.wwf.org 또는 www.panda.org)에서는 환경호르몬 추정물질을 표 5에서와 같이 농약류, 중금속류, 유기염소계, 가소제와

계면활성제 등으로 분류를 하고 있으며, WWF-Canada (www.wwf.ca)에서는 표 6에서와 같이 제초제 약 29종, 진균제 약 15종, 살충제 약38종, 기타 살충제 4종 및 산업용화학물질과 오염원으로서 약 39여종 등 총 125여종을 분류하여 놓았다.

이와 같이 국가간 또는 기관의 특성상의 관심도에 따라 분류하는 물질이 조금씩은 다르지만, 계속 되는 연구결과로 인해 계속 추가되고 확대되는 경향과 어떤 한 물질을 특정지우기 보다는 그 물질의 대사산물이나, 분해산물, 이성질체 등도 포함시켜 넓은 범위로 분류하려는 경향이 보이기도 한다.

Table 4. 일본 국립 의약품 식품 위생연구소 분류 내분비계 장애 물질목록

Plasticizer	
butylbenzyl phthalate (BBP)	diethylhexyl adipate(DEHA)
di-nbutyl phthalate(DBP)	dihexyl phthalate (DHP)
dicyclohexyl phthalate (DCHP)	di-n-pentyl phthalate(DPP)
diethyl phthalate (DEP)	dipropyl phthalate(DprP)
di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)	
Pesticides	
alachlor (Lasso) (제초제)	hexaconazole (살균제)
aldicarb (살선충제)	beta-hexachlorocyclohexane (살균제)
aldrin (살충제, 살균제)	ioxynil (제초제)
amitrole (제초제)	iprodione (살균제)
atrazine, aminotriazol (제초제)	kepone, chlorodecon
azadirachtin (살충제)	lindane (살균제)
benomyl (살균제)	linuron (제초제)
carbendazim (살균제)	malathion (살충제, 살균제)
cabaryl (살균제, 살충제)	methomyl (살충제)
chlorodanes (살균제)	methoxychlor (살충제, 살균제)
chlodecon (살충제)	methyl parathion (살충제)
chlorpropham (제초제)	metribuzin (제초제)
clofentezine (제초제)	mirex (살충제, 살균제)
cyanazine (제초제)	molinate (제초제)
cypermethrin (제초제)	nitrofen (제초제)
2,4-D (제초제)	oryzalin (제초제)
DDE (살충제)	oxychlorthane (살충제, 살균제)
DDD (살충제)	oxydemeton-methyl (살충제)
DDT (살충제)	parathion(ethyl phrathion) (살충제)
1,2-dibromo-3-chloropropane (살선충제)	pendimethalin (제초제)
dichlorovos (살충제, 살균제)	pentachloronitrobenzene(PCNB) (살균제)
dicofol(kelthane) (살충제, 살균제)	pentachlorophenol (살균제)
dieldrin (살충제, 살균제)	permethrin (살충제)
diflubenzuron (살충제)	phenylphenol (살균제)
endosulfan (살충제)	procymidone (살균제)
endrin (살충제)	pronamide (제초제)
esfenvalerate (살충제)	pyrimidine carbionol family (살충제)
ethylene dibromide (살균제)	simazine (제초제)
ethylenebisdithiocarbamate (살균제)	toxaphene, camphechlor (살균제)
(mancozeb, maneb, metiram, zineb)	hexachlorobenzene (살균제)
ethylene thiourea(ETU) (살균제)	trans-nonachlor (살충제)
fenoxycarb (살충제)	tributyltin compound (살균제)
fenvalerate (살충제)	trfluralin (제초제)
fluazifop-butyl (제초제)	vinclozoline(dicarboximides) (살균제)
heptachlor (살충제)	ziram (살균제)
heptachlor epoxide (살충제)	

## 7. 환경호르몬 검색법

### 7-1. E-screen assay

#### 1) 개론

환경에 존재하는 environmental chemical들이 생체 내의 내분비계에 작용하여 생물체에게 breast cancer,



Table 4. (Continued)

Chemical Substances in Plastics	
alkylphenol ethoxylates	4-propylphenol
nonylphenol ethoxylates	4-sec-butylphenol
octylphenol ethoxylates	4-n-butylphenol
bisphenol A	2-t-butylphenol
alkylphenol	3-t-butylphenol
2-octylphenol	4-t-pentylphenol
4-nonylphenol	4-t-octylphenol
4-octylphenol	styrene dimers and trimers
p-octylphenol, octylphenol	
Chemical Substances in Industry and Environmental Pollutnas	
alkyphenol ethoxylates	para-nitrotoluene
PCBs/aloclor	nonylphenol
benzophenone	octachlorstyrene
benzo(a)pyrene	tributyltin compound
6-bromonaphthol-2	para-nitrotoluene
chlorobenzenes	nonylphenol
chlorphenate	octachlorostyrene
dibromoacetic acid	PBB
2,4-dichloropehnol	pentachlorophenol
4,4'-dihydroxybiphenyl	TCDF, PCDF, furan
4-dodecylphenol	TCDD, PCDD, dioxin
hexadhlorobenzene	tributyltin oxide
tributyltin compound	
Heavy Metals	
cadmium	mercury
lead	
Synthetic Estrogen	
centchroman	hexestrol
estradiol	2-hydroxyestradiol
ethynylestradiol	tamoxifen
DES(diethylstylbestrol)	raloxifene
Foodstuff and Food Additives	
BHA (butylated hydroxyanisole)	enterolactone
equol	
Hormone-mimicking Substances Naturally Present in Platns	
Phytoestrogens	daidzein
coumestrol	biocheanin A
formonoetin	genistein

testicular cancer 및 reproductive system에 문제를 일으켜 차세대의 생태계까지 심각한 문제를 야기 시키고 있다. 이와 같은 environmental chemical을 빠르고 간편하게 screening 하여 물질의 estrogenicity를 밝히고자 하는 노력이 계속되고 있다. Estrogen은

adult female의 genital track, mammary gland와 같은 생식기관 발달에 관여하여 menstrual cycle, pregnancy, lactation과 같은 생식기능에 중요한 생리 작용을 나타낸다. 세포수준에서는 cell proliferation과 female secondary sex organ의 hypertrophy를 촉진시

**Table 5. ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS (EDCs) : Chemicals Considered to Have Reproductive and Endocrine Disruptor Effects**

- Pesticides (commercial and/or domestic) : 2,4,5-T, 2,4-D, alachlor, aldicarb, amitrole, atrazine, benomyl, lindane, carbaryl, chlordane, cypermethrin, DBCP, DDT, dicofol, dieldrin, endosulfan, esfenvalerate, ethyl parathion, fenvalerate, heptachlor, hexachlorobenzene, malathion, mancozeb, maneb, methomyl, methoxychlor, metiram, metribuzin, mirex, nitrofen, oxychlordane, permethrin and other synthetic pyrethroids, toxaphene, transnonachlor, tributyltin oxide, trifluralin, vinclozolin, zineb, ziram
- Heavy Metals : Cadmium (used in nickel/cadmium batteries, coatings, pigments, stabilizers in plastics and synthetic products and alloys, fossil fuels) Lead (used in lead batteries, paints, pipes, leaded gasoline) Mercury (used in nickel-cadmium batteries, fluorescent lighting ballasts, seed dressings, chlorine production, dental amalgams, fossil fuels)
- Organochlorines : Dioxin ((2,3,7,8-TCDD) a by-product of other organochlorine production, use & disposal (not intentionally produced). Examples include incinerator emissions, metal smelting, PVC (vinyl) plastic production, chlorine-bleached pulping PBBs & PCBs (Production now banned but PCBs still used in electrical transformers. PCBs still reside in landfills, toxic waste dumps and sediments) Pentachlorophenol (wood preservative, used in textile industry)
- Plasticizers & Surfactants : Phthalates, Polycarbonates, Styrenes (used to make plastics soft) Alkyl & Nonyl Phenol Ethoxylates (used in detergents, pulp & paper and textile industry, some plastic products, paints, pesticides)

Source : WWF Canada Eagle's Eye, Special Issue on Toxics that Tamper with Hormones, Summer 1995, and Wingspread I Statement, recorded in Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection, eds. T. Colborn and C. Clement, Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ, 1992

키며 cell type-specific protein의 합성과 분비를 유도 시킨다고 보고 되었다. 이러한 estrogenic effect는 estrogen receptor와의 반응을 통해서 일어나며 estrogen receptor는 기존에 알려진 고전적인 receptor인 estrogen receptor alpha(ER $\alpha$ ) 이외에 1996년 estrogen receptor beta (ER $\beta$ )도 발견되었다. E-screen assay는 environmental chemical의 estrogenicity를 in vitro 방법으로 평가하는 방법으로서 Soto등이 개발하였으며 chemical이 MCF-7 Bus cell에 미치는 cell proliferative effect를 parameter로 하여 chemical의 estrogenicity를 평가하는 방법으로서 estrogen - induced gene expression에 기초한 assay 방법이며 cloned MCF-7 Bus cell을 사용하여 실험한다. 여성 유방암유래 MCF-7 cell은 estrogen receptor를 가지고 있으며 estrogen-like chemical 첨가에 의해 세포증식이 촉진된다는 사실이 알려져 있으며 Pedraza의 보고에 의하면 여러 MCF-7 세포 중 가장 민감성을 보인 세포는 Soto 등이 cloning한 MCF-7 Bus cells 이었다. E-screen assay에 의해서 alkylphenol류, antioxidants,

polychlorinated biphenyl, pesticides, bisphenol-A, plasticizer등이 MCF-7 cell proliferation을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. *In vitro* assay 방법은 생체 내에서 chemical의 metabolism, plasma-protein binding, pharmacokinetics에 의한 효과는 입증 할 수 없으며 cell proliferation effect가 모두 estrogenicity에 의한 것인지에 대한 mechanism 여부는 직접적으로 알 수 는 없지만 이는 estrogen receptor binding assay나 다른 transcriptional assay를 통해서 밝혀질 수 있다. E-screen assay는 수많은 chemical의 estrogenicity를 저렴하고 민감하게 간편하고 신속히 screening 할 수 있는 방법이며 agonist와 antagonist를 구분할 수 있다는 장점도 갖고 있다.

## 2) 실험재료 및 방법

### (1) 세포 및 세포 배양액

세포주는 estrogen-sensitive human breast cancer cell line으로 Soto 등에 의해 clone된 MCF-7 Bus cells을 분양 받아 사용하였고, 사용한 배지는 5%

FBS Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)로 을 함유하는 phenol red free-DMEM 배지이다. 서, 5% charcoal dextran treated fetal bovine serum

**Table 6. EDC List : Chemicals in the environment reported to have reproductive and endocrine disrupting effects**

<b>Herbicides</b>				
- 2,4-D	- bromacil	- ioxynil	- oxyacetamide (FOE 5043)	- pronamide
- 2,4,5-T	- bromoxynil	- linuron	- paraquat	- simazine
- acetochlor	- cyanazine	- metribuzin	- picloram	- terbutryn
- alachlor	- DCPA	- molinate	- pendimethalin	- thiazopyr
- amitrole	- ethiozin	- nitrofen	- prodiamine	-trichlorobenzene
- atrazi	- glufosinate-ammonium	- oryzalin		- trifluralin
<b>Fungicides</b>				
- benomyl	- fenbuconazole	- maneb	- pentachloro-nitrobenzene	- vinclozolin
- etridiazole	- hexachloro-benzene	- metiram	- triadimefon	- zineb
- fenarimol	- mancozeb	- nabam	- tributyltin	- ziram
<b>Insecticides</b>				
- aldrin	- DDT&metabolites (DDE, DDD)	- ethofenprox	- malathion	- synthetic-pyrethroids
- bifenthrin	- deltamethrin	- fenitrothion	- methomyl	- ronnel (fenchlorfos)
- carbaryl	- dicofol	- fenvalerate	- methoxychlor	- toxaphene
- carbofuran	- dieldrin	- fipronil	- mirex	- transnonachlor
- chlordane	- dimethoate	- ?HCH	- oxychlordane	- aldicarb
- chlordecone	- dinitrophenol	- heptachlor&H-epoxide	- parathion (methylparathion)	- DBCP
- chlorfentezine	- endosulfan(a & ?	- endrin	- photomirex	- n-2-fluorenyl-acetamide
- l-cyhalothrin		- lindane(g-HCH)	- pyrethrins	
<b>Other Types of Pesticides</b>				
- ethylenethiourea (ETU)	-pentachlorobenzene	- pentachlorophenol (PCP)	- piperonyl-butoxide	
<b>Industrial Chemicals &amp; Contaminants</b>				
- 4-OH-alkyl-phenol	- furans	- 2,3,4 trichlorobiphenyl	- penta-tononylphenols	-diOHbenzoic-acids (DHBA)
- aluminum*	- hydroxy (hydro)-quinones	- 4-OH trichlorobiphenyls (2,2',5,2',4',6')	- phthalates	- phenol
- benzopyrene	- lead*	- 3-OH2',3',4',5'tet rachlorobiphenyl	- benzylbutyl-phthalate	-polychlorinated diphenyl ether
- bisphenol-A	- mercury*	- 4-OH2',3',4',5'tet rachlorobiphenyl	- diethylhexyl-phthalate(DEHP)	- radioactive iodine
-4-OH-biphenyl	- methylcolanthrene (MCA)	- 2,2',3,3',6,6'hexa chlorobiphenyl	- diisobutyl-phthalate	- resorcinol
- t-butylhydroxyanisole(BHA)	- polybrominated-biphenyls (PBBs)	- pentabromo-diphenyl ether	- dinhexylphthalate (DnHP)	- styrenes
- cadmium*	- polychlorinated-biphenyls (PCBs)		- di-n-octyl-phthalate(DnOP)	- tetrachloro-benzyltoluenes
- carbon-disulfide	- 2to4-OH 2',5' dichlorobiphenyl			- thiocyanate
- dioxin (2,3,7,8-TCDD)				- vinyl acetate
				*metals

## (2) 실험방법

실험방법은 Soto 등에 의해 소개된 방법을 약간 수정하여, 6-7일간 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에서 배양한 MCF-7 세포를 12 well plate에  $3 \times 10^4$  cells/well이 되도록 seeding 하였다. 24 시간 후 배지를 제거하고 시험물질을 포함한 5% charcoal dextran으로 처리된 FBS를 함유하는 phenol red free-DMEM 배지(CD-DMEM)로 교환하였다. 시험물질을 포함한 CD-DMEM medium은 ethanol에 녹인 chemical stock solution을 사용하기 바로 직전에 CD-DMEM medium으로 희석하여 사용하였다. Control은 CD-DMEM만을 사용하고 positive control은  $10^{-10}$  M  $17\beta$ -estradiol를 처리하였으며 용매의 최종농도는 0.5% 이하로 하였다.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 late exponential phase에 도달하는 144 시간에 MTT assay를 시행하였다. 즉 MTT[2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma]를 0.1 mg/well이 되도록 처리하고 4 시간 더 배양한 후 배지를 버리고 DMSO를 넣어 생성된 결정을 녹인 다음 ELISA Plate Reader (UVmax, U.S.A)로 540nm에서 흡광도를 측정한다.

## 7-2. Estrogen receptor binding assay

### 1) 개론

Estrogen receptor binding assay는 미국 EPA의 EDSTAC이 Tier 1 Screening in vitro method에서 권장하는 방법으로서 estrogenic effects의 molecular mechanism을 밝히고 간편하며 빠르게 screening 할 수 있는 장점을 가지고 있다. Endocrine disrupting chemicals(EDCs)는 estrogen receptor(ER) nuclear protein에 specific하게 결합하여 natural estrogens의 활성을 증가시키거나 차단 할 수 있다. ER는 tissue growth와 differentiation에 관련된 gene expression을 조절하는 66 kDa의 transcription factor이며 reproductive, skeletal, cardiovascular 그리고 mammary tumor를 포함한 다양한 target tissue에서 작용한다. ER과 다른 steroid hormone-receptor들은 receptor의 carboxy-terminal hormone binding domain에 high affinity를 나타내며 하나 또는 그 이상의 endogenous ligands에 의해 활성화된다. Ligand binding은 receptor의 conformation의 변화나 dimerization 그리고 다른 protein과의 interaction의 변화

등을 포함하는 많은 receptor의 변화를 가져올 수 있다. Hormone-receptor complex는 다른 transcriptional accessory protein과 함께 또는 단독으로 receptor의 DNA binding domain을 통해 DNA response elements에 결합하여 target gene의 transcription을 유도 또는 억제시킨다. ER의 competitive inhibitor(antiestrogen; e.g., tamoxifen)는 target tissue의 ER 작용을 block 함으로써 유방암 치료제로 개발되기도 하였다.

최근에는 ER이 cloning 되었으며 이는 ER과는 다른 estrogen에 대한 affinity를 가지며 ligand binding 방식도 다른 것으로 밝혀지고 있다. Hormone, DNA 그리고 ER 상호작용의 복잡성이 밝혀지고 있으며 조직에 따라 estrogen에 대해 다양하게 반응한다는 것을 알 수 있게 되었다.

따라서 EDCs가 ER에 결합하거나 ER-mediated gene regulation events에 영향을 주는 지를 구별해 낼 수 있는 in vitro screening 방법이 필요하다. 따라서 test compound가 radioactive  $17\beta$ -estradiol를 치환하는 원리를 이용한 competitive estrogen receptor binding assay로서, cell이나 tissue로 부터 crude receptor를 만드는 대신 ER의 cDNA를 PCR-amplification하여 얻어진 recombinant human ER를 이용하여 간편하고 신속하게 실험이 가능하도록 만들어졌다.

### 2) 실험재료 및 방법

#### (1) 실험재료

Recombinant human ER는 PanVera에서 입수하여 사용하였으며 실험 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. Radioactive  $17\beta$ -estradiol( $2,4,6,7\text{-}^3\text{H}$  estradiol, 88.0 Ci/mmol)을 Amersham(Buckinghamshire, England)에서 구입하였으며 이외에 charcoal, dithiothreitol, bovine serum albumin은 Sigma로부터 구입하여 사용하였다. Ultima Gold scintillation cocktail은 Packard BioScience Company에서 구입하여 사용하였다.

#### (2) 기기

Table top centrifuge (GR - 6R, Beckman, USA)와 liquid scintillation counter (2000CA, Packard Instrumental International Switzerland)를 사용하였다.

### (3) 실험방법

Estrogen receptor(ER)은 cDNA를 PCR-amplification 하여 얻어진 recombinant human ER를 PanVera에서 구입하여 사용하였으며 Binding buffer의 조성은 10 mM Tris (pH 7.5), 10% glycerol, 1 mM DTT 그리고 1 mg/ml BSA이다. Estrogen receptor, (2,4,6,7-<sup>3</sup>H) estradiol(10 nM), 농도별 test compound를 microcentrifuge tube에 넣고 최종 반응용량이 200  $\mu$ l가 되도록 하였다. 25°C에서 3시간 동안 incubation시킨 후, GF/B glass filter로 filtration하여 free (2,4,6,7-<sup>3</sup>H) estradiol은 제거하고 filter paper를 scintillation vial에 옮긴 후 Ultima Gold scintillation cocktail 4 ml을 가하고 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정한다. Nonspecific binding을 위해서는 10<sup>-5</sup>M 17 $\beta$ -estradiol을 사용하며, Competitive receptor binding assay를 위한 양성 대조약물로는 17 $\beta$ -estradiol과 diethylstilbestrol(DES)를 사용한다.

## 7-3. Rodent 3-day Uterotrophic assay

### 1) 개론

Uterotrophic assay는 오랜 기간 널리 사용되어온 방법으로서, 미국 EPA의 EDSTAC에서 Tier 1 Screening *in vivo* method으로 권장하는 종종 "gold standard" 방법이라 불리며 estrogen에 의해 유발된 uterus tissue mass 증가를 측정함으로써 estrogenicity를 간접적으로 평가하는 방법이다. 그러나 투여경로나 세부적인 실험방법이 표준화되어 있지 않아 실험 group 간의 차이도 있어 국제적으로 실험방법을 표준화하려는 노력이 진행되고 있다. Hertz등은 uterotrophic assay가 chemical이 estrogen으로 작용하는지 아닌지를 평가하는 방법으로서 반드시 채택되어야 한다고 주장하였다. 한편 estrogenic chemical이 조직에 따라서 다른 반응성을 가질수 있다. 좋은 예로서 breast tissue에 antiestrogen으로 작용하는 tamoxifen은 uterine tissue에 대해서는 uterotrophic estrogenic agonist로서 작용한다. 따라서 uterus 이외의 다른 tissue의 proliferative effect를 측정한다면 좀더 sensitive 하고 informative 한 방법이 될 것이다. Rodent uterotrophic assay의 장점은 다른 *in vivo* assay처럼 chemical의 plasma-protein binding 그리고 pharmacokinetics의 효과에 의해 estrogenicity를 측정할 수 있다는 점이며 metabolism에 의해 변화된

estrogen의 estrogenic response를 평가할 수 있고, 낮은 농도의 estrogen-like chemical도 *in vivo* system에서 검출해낼 수 있는 민감한 방법이다.

## 2) 실험재료 및 방법

### (1) 실험동물 및 사육조건

Female Sprague-Dawley rat를 구매하여 3일간 실험실에 적응 시킨 후 생후 22일째 체중 차이가 약 10 g 범위 내에 속하는 동물을 선택하여 사용하였다. 온도 24 $\pm$ 1°C, 상대습도 55 $\pm$ 5%, 명암교대시간 12시간, 조도 300-400 Lux의 사육환경을 유지하였다. 사료 (삼양사, Seoul)를 자유롭게 섭취할 수 있게 하였으며 음수는 상수를 충분히 공급하였다.

### (2) 실험방법

#### 가) 군분리 및 용량설정

순화 기간 중 평균 체중에 가까운 개체로 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하여 한 군 당 5 마리로 하였다. 동물의 개체식별은 tail marking과 사육 상자별 tag 표시법을 사용하였다.

#### 나) 시험물질의 조제 및 투여

양성 대조군은 17 $\beta$ -estradiol을 30  $\mu$ g/3 ml가 되도록 corn oil에 균질하게 현탁 시킨 후 corn oil로 이를 단계적으로 희석하여 사용하였다. 17 $\beta$ -estradiol을 0.3, 3, 및 30  $\mu$ g/kg의 용량으로 3일간 매일 복강주사하였다. 투여용량은 미성숙 rat 체중 10 g 당 0.03 ml로 하였으며, 제조는 투여 당일 실시하였다.

#### 다) 검사항목

##### A. 체중

모든 동물에 대해 투여 직전과 부검직전에 체중을 측정한다.

##### B. 자궁무게

마지막 투여 후 약 24시간이 지난 생후 25일째 경추 탈구하여 희생 시킨 후 자궁을 조심스럽게 적출하여 지방 및 섬유조직을 제거하고 여지 위에서 물기를 완전히 건조시킨 후 Mettler microbalance를 사용하여 각 rat에서 얻어진 자궁무게를 정확히 측정한다. 실제로 양성대조물질인 17 $\beta$ -estradiol(0.3, 3, 30  $\mu$ g/kg)을 생후 21 일째인 암컷 SD계 rats에 3일간 복강 투여 시, 미성숙 난소에 미치는 영향을 조사한 결과, 17 $\beta$ -estradiol 투여 군은 corn oil만을 투여한 control 군에 비해 2.5-3배의 유의성 있는 자궁무게의 변화, 즉 estrogenic effect를 보고 하고 있다.

#### 7-4. Yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay

##### 1) 개론

스테로이드의 생화학적 활성은 스테로이드 수용체로 알려진 특정 세포 내 단백질에 대한 결합에 의해 매개된다. 세포 내에서 스테로이드가 그 수용체에 결합하는 것은 스테로이드-스테로이드 수용체 복합체가 DNA의 특정한 부위에 결합하도록 하여 수용체에서 구조적인 변화를 야기 시키게 된다. 스테로이드-스테로이드 수용체의 복합체가 DNA에 결합한 후에, 이것들은 스테로이드 반응유전자들의 발현을 변형시키면서 원래 스테로이드가 작용하여 나타내는 유전자 발현에 변형을 일으킨다. 화학물질들이 수용체 매개과정을 변형시키는 메커니즘은 많이 알려져 있다. 화학물질은 내인성 스테로이드의 합성, 대사, 분배, 및 분해를 변형시킴으로써 특별한 유전자의 위치에서 그것들의 작용단계를 변형시킬 수 있다. 이와는 다르게, 화학물질은 아마도 수용체 단계들을 변형시키거나 수용체의 기능에 영향을 주는 2차적인 경로를 통한 활동에 의해 조직의 반응들을 변형시킬 수 있다. 마지막으로, 화학물질은 스테로이드의 활동과 비슷한 유사활동과 스테로이드 활동을 방해하면서 직접적으로 상호작용을 할 것이다. 이와 같이 스테로이드 수용체에 직접적으로 작용하는 화학물질들은 매우 낮은 농도에서 효과를 나타내는 잠재성을 가지므로, 화학물질들의 내분비 장애 효과를 평가할 때는 수용체가 매개되어지는 과정 또는 상호경로를 통해서 나타나는지를 측정하는 것이 필수적이다.

포유류의 스테로이드 수용체는 효모종의 하나인 *Saccharomyces cerevisiae*가 스테로이드에 의존하는 transcriptional activator로써 기능을 나타낼 수 있다고 알려져 있다. Estrogen, androgen, progesterone 수용체 유전자를 가지는 plasmid가 들어 있는 recombinant yeast strain에 화학물질을 처리한 후 yeast의  $\beta$ -galactosidase를 측정하여 화학물질과 에스트로젠, 안드로젠, 프로게스테론 수용체와의 상호작용을 나타낼 수 있는 기법이다. 이 기법은 phytoestrogens이나 pharmaceuticals등과 같은 많은 수의 천연적, 합성적 스테로이드와 스테로이드 수용체들과의 상호작용을 통해 내분비 조절 활성에 원인이 되는 화학물질과 스테로이드 수용체간의 상호작용을 민감하고, 특이적으로 분석 할 수 있다.

##### 2) 실험방법

###### (1) Yeast-based estrogen receptor assay

가) Human estrogen receptor gene이 들어 있는 yeast stock 125  $\mu$ l를 growth medium 50 ml에 접종한 후 28°C shaking incubator에서 24시간 동안 배양을 한다.

나) 양성 대조물질로서 17 $\beta$ -estradiol을 사용하고, 이는 실험하고자 하는 chemical과 함께 각각 ethanol로 1/2 농도로 희석하여 각각 농도별로 96-well optically flat bottom microtitre plate에 10  $\mu$ l씩 넣은 후 건조시킨다.

Assay medium 조성	
Growth medium	50 ml
24hr incubated yeast medium	0.5~2 ml
Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG)	0.5 ml

다) Assay medium을 다음의 조성에 따라 제조한 후 200  $\mu$ l씩 각 well에 넣고 2분간 shaking한다.

라) Low temperature incubator(32°C)에서 24시간 동안 배양한다.

마) 배양 중인 plate를 꺼내어 shaking함으로써 자라고 있는 yeast를 잘 섞어준 후 incubator에 넣고 다시 24시간 동안 배양한다.

바) 3일간 배양한 후에 microplate reader를 이용하여 540 nm와 620 nm에서 흡광도를 측정한다.

사) 각 파장에서의 흡광도 측정 결과를 다음 식에 따라 correct value를 계산한다.

$$\text{Corrected value} = \text{chem. abs. (540 nm)} - [\text{chem. abs. (620 nm)} - \text{blank abs. (620 nm)}]$$

###### (2) Yeast-Based androgen receptor assay

가) Androgen receptor gene이 들어 있는 yeast stock 1 ml을 selective medium 50 ml에 접종 후 30°C shaking incubator(300 rpm)에서, 배양한다.

나) Yeast medium의 OD<sub>600</sub> 값이 1~2 될 때까지 배양한다.

다) OD<sub>600</sub>이 0.03이 되도록 yeast medium을 selective medium으로 희석하고 CuSO<sub>4</sub> 50  $\mu$ M이 되도록 한다.

라) Chemical은 tube에서 10배씩 희석하여 최종농도를 yeast medium의 1/1000이 되도록 한 후 30°C

shaking incubator에서 overnight 배양을 한다.

마) 배양 후 OD<sub>600</sub>이 0.25가 되도록 하고 10배로 희석하여 각 well에 100 μl씩 넣는다.

바) Microplate reader로 590 nm에서 흡광도를 측정한다.

Assay Buffer (11ml)	
o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)	2 mg/ml
SDS	0.1 %
β-mercaptoethanol	50 mM
Oxalyticase	200 U/ml
z- buffer	10.9 ml

사) Assay medium을 아래와 같은 조성으로 제조하여 각 well에 100 μl씩 담는다. (단, Assay medium은 제조 후 1시간 내에 사용한다.)

아) 420 nm에서 20분 동안 매분마다 흡광도를 측정하여 V<sub>max</sub> 값을 얻는다.

자) 다음 식에 따라 β-galactosidase activity를 계산한다.

$$\beta\text{-Galactosidase Activity} = V_{\max}/OD_{590}$$

**(3) Yeast-Based progesterone receptor assay**

가) Progesterone receptor gene이 들어 있는 yeast stock 1 ml을 selective medium 50 ml에 접종한 후 30°C, shaking incubator(300 rpm)에서 24시간 동안 배양한다.

나) Yeast medium의 OD<sub>600</sub>이 0.8~1.0 될 때까지 배양 한 후 배양한 yeast medium에 2배의 100 μM이 되도록 CuSO<sub>4</sub>를 넣는다.

다) 처리 농도의 2배의 Chemical을 위의 배지로 10 배씩 희석한 후 96 well plate 각 well에 50 μl씩 담는다.

라) 2)에서 준비한 yeast medium을 50 μl씩 각각의 well에 넣고 잘 혼합한다.

마) Chemical을 처리한 plate는 30°C에서 4시간 동안 배양한다.

바) 배양 후 microplate reader로 500 nm에서 흡광도를 측정한다.

사) Assay medium을 제조하여 각 well에 100 μl씩 넣는다. (단, Assay medium은 제조 후 1시간 내에 사용한다.)

아) 420 nm에서 20분 동안 흡광도를 측정하여 V<sub>max</sub> 값을 결정한다.

자) 다음 식에 따라 β-galactosidase activity를 계산한다.

$$\beta\text{-Galactosidase Activity} = V_{\max}/OD_{590}$$

**7-5. Yeast Two-Hybrid System**

**1) 개론**

효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 본래 steroid hormone receptor(SHR)을 가지고 있지 않지만 포유류의 SHR을 도입함으로써, 이들은 steroid 의존하에 전사 활성인자로써 기능을 하고 있다. 따라서, 효모는 포유류세포에 존재하는 다른 여러 인자의 영향을 받지 않는 상태에서 SHR와 화학물질의 상호작용, 그리고 이것에 의한 target유전자의 전사활성화만을 관찰할 수 있는 특징을 가지고 있다.

효모를 이용한 내분비계장애물질의 검출system의 하나인 yeast two- hybrid system은 최근 분자생물학의 분야에서 폭넓게 이용되고 있는 방법이다. 이 방법은 효모의 전사조절인자인 GAL4유전자를 이용하고 있다. GAL4유전자에 code된 GAL4단백질은, DNA결합영역(DNA binding domain, GAL4 DBD)과 전사활성화영역(transcriptional activation domain, GAL4 TAD)의 2개로 분리할 수가 있다. 여기에서 각각의 domain 하류에 단백질을 code하는 유전자, 즉 인간 유래의 estrogen receptor(hERα, β)의 ligand binding domain (LBD)을 GAL4 DBD에 연결시켜 구축한 융합단백질, 그리고 GAL4 TAD에 co-activators(SRC-1, TIF-2)을 각각 연결시켜 구축한 융합단백질을 염색체 상에 reporter 유전자(UAS<sub>GAL4</sub>-TATA-lacZ)을 integration 시킨 효모에서 발현시킴으로써 EDs 검출계인 two-hybrid system을 구축했으며, 각종 화학물질의 estro-genic activity의 측정과 그 평가를 실시할 수 있었다. Two-hybrid system에서 hER은 ligand와 결합해서 구조변화가 일어나고 전사를 활성화시키는 인자 co-activator와 상호작용해서 그 signal이 기본 전사장치에 전달되고 reporter유전자 lacZ가 발현하여 효소 β-galactosidase을 생산한다. 이때, β-galactosidase의 활성을 측정함으로써 hER와 EDs와의 결합특이성에 의해 EDs를 간접적으로 검출 할 수 있는 측정 원리이다.

## 2) 실험방법 - Growth of Yeast and $\beta$ -Galactosidase Assay

(1) 효모 형질전환체는 SD선택배지 2 ml에서 30 °C, 24 h 전 배양 한다.

(2) 이 전배양액을 9.7 ml의 SD배지에 2 % 식균한다. 이것에 estrogenic activity을 측정하고 싶은 화합물의 용액을 100  $\mu$ l 첨가한다. 이 때, positive control로써는 17 $\beta$ -estradiol(E<sub>2</sub>), negative control로써는 DMSO를 첨가한 것도 동시에 배양했다. 30 °C에서 11 h 진동배양(300 rpm)한다.

(3) 집균 후 균체를 냉각수에 세정하고, 1 ml의 Z-buffer(60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 35 mM  $\beta$ -mercaptoethanol)에 현탁하고, glass beads를 첨가한다.

(4) 1 min동안 vortex한 후, 1 min 이상 냉각시킨다. 이 cycle을 3회 이상 실시하여 균체를 파괴시킨다.

(5) 원심분리로부터 glass beads와 비파괴 균체를 분리하고 그 상정액을 효소액으로 사용하였다. 효소액 농도의 정량에는 Bio-Rad Protein Assay 시약을 사용하여 595 nm의 흡광도 값을 측정하며, BSA(Bovine Serum Albumin)를 standard(Z-buffer에 의해 0.2~0.9 mg/ml가 되도록 용해)로 해서 만든 검량선으로부터 정량했다. Report gene인 lacZ유전자가 발현하여 효소  $\beta$ -galactosidase를 생성한다. 이때  $\beta$ -galactosidase는 기질인 ONPG(o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside dissolved in Z-buffer)를 분해해서 황색의 ONP(o-nitrophenol)를 생성한다. 이 ONP를 정량함으로써  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정하는 원리이다.

(6) 효소액 200  $\mu$ l을 Z-buffer로 희석하여 500  $\mu$ l로 만들고 Z-buffer에 4 mg/ml의 농도인 ONPG용액을 100  $\mu$ l 가하고 30 °C에서 보온한다.

(7) 적당한 시간(반응액이 옅은 노란색으로 변하는 시점)에서 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 250  $\mu$ l 첨가하여 반응을 멈추고 반응시간(min)을 기록한다.

420 nm의 흡광도 값을 측정한다. 흡광도 측정조건에 의한 ONP의 mol 흡광계수를 21300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 하고 1 unit을 1 min 동안 1 $\times$ 10<sup>-3</sup> mmol ONP을 생산하는 효소 량이라고 정의하고 모든 실험은 최저 3회 이상 반복 실험하고 측정치로부터 표준편차를 구하며 재현성을 확인한다.

단백질 1 mg에 해당하는 unit수를 아래의 식을 이용하여 계산한다.

$$\beta\text{-galactosidase activity (unit/mg protein)} = \frac{A420 \times 10^6 \times \text{반응액량 (0.85 ml)}}{21300 \times \text{반응시간(min)} \times \text{사용효소량 (0.2 ml)} \times \text{단백질농도(mg/ml)}}$$

## 8. 사용실태와 문제점

### 8-1. 사용용도와 규제

내분비계장애물질로 알려진 물질들은 산업계 또는 실생활에서 매우 다양한 형태로 쓰여 지고 있으며, 또한 사용량도 물질의 용도에 따라 다양하게 나타나고 있다.

표 7은 환경부에서 내분비계장애물질로 추정되는 물질들에 관해 용도와 규제내용을 정리한 것으로서 주요 환경호르몬으로 널리 알려진 다이옥신 등은 소각시설 등에서의 부산물로서 “비 의도적 생성물”로 환경생태계에 영향을 미치며, Polychlorinated biphenyl류 등은 변압기의 절연유로 사용되어 왔으나 독성 등으로 금지되었고, 기타 살균, 살충, 제초제 등의 농약류, 플라스틱 가소제 등 다양한 용도로 생활 속에서 널리 쓰이고 있는 물질들도 많이 있어 더욱더 세심한 주의가 필요하다고 할 수 있다. 특히 아직 어떠한 법적인 규제나 관심의 대상이 되고 있지 않은 화학물질들 중에는 bisphenol A나 몇몇 프탈레이트 같이 환경부에서 “관찰 물질”로 지정하여 주도면밀하게 물질들의 제조, 수입 등 사용에 관해 주시를 하고 있기도 하다.

### 8-2. 피급효과

내분비계 장애물질의 대부분이 화학물질인 관계로 이들을 취급 또는 생산, 소비하는 산업계에 미치는 영향은 내분비계 장애물질의 안전성이 아직 완전하게 확립되지 못한 현실 하에서 곧바로 경제적 파급효과로 나타날 수 있다.

컵 라면 문제에서도 알 수 있듯이 스티로폴을 생산하는 산업체는 막대한 타격을 입고 그 대책에 부심하고 있는 실정이며 styrene dimer, trimer의 환경호르몬성 유발효과에 대해서는 아직도 많은 논쟁이 있는 것도 사실이다.

그러나 내분비계 장애물질로 현재 알려진 물질들 이외에도 많은 수의 화학물질들이 내분비계 장애를 유발할 수 있는 가능성이 항상 내재되어 있으므로 이와 같은 경제적 파급효과 및 국민적 불안감등을 고려



표 7-1. 우리나라의 내분비계장애 추정물질 목록 및 사용실태 - 1

※ 농약 (41종), 산업용화학물질 (17종), 부생성물 또는 대사물 (9종)

	물 질	용 도	규 제 내 용
1	다이옥신	비의도적 생성물	대기(특정)
2	퓨란		
3	폴리염화비페닐류(PCBs)	변압기 절연유	유해(금지 '96), 폐기물, 수질(특정)
4	폴리브롬화비페닐류(PBBs)	방염제	유해(금지)
5	tributyltin oxide	방오제	유해(제한)
6	펜타클로로페놀(PCP)	방부제, 제초제, 살균제	유해(금지 '91), 농약(금지 '87)
7	2,4,5-디클로르페녹시초산(2,4,5-T)	제초제	유해(유독물), 농약(금지)
8	2,4-디클로르페녹시초산(2,4-D)	제초제	유해(유독물), 농약(등록)
9	알라클로르(Alachlor)	제초제	농약(등록)
10	알디카프(Aldicarb)	살(선)충제	유해(금지'91), 농약(금지)
11	베노밀(Benomyl)	살균제	농약(등록)
12	( beta-HCH )	살충제	유해(금지 '91), 농약(금지 '79)
13	carbaryl	살충제	유해(유독물), 농약(등록)
14	클로르단(Chlordane)	살충제	유해(금지), 농약(금지 '69)
15	cypermethrin	살충제	유해(유독물), 농약(등록)
16	DBCP	살(선)충제	유해(금지 '91), 농약(금지)
17	DDT	살충제	유해(금지 '91), 농약(금지 '71)
19	디엘드린(Dieldrin)	살충제	유해(금지), 농약(금지'70)
20	엔도술판(Endosulfan)	살충제	유해(금지), 농약(등록)
21	esfenvalerate	살충제	농약(등록)
22	ethlyparathion	살충제	유해(금지), 농약(등록)
23	fenvalerate	살충제	유해(유독물), 농약(등록)
24	lindane	살충제	유해(금지 '91), 농약(금지 '79)
25	heptachlor	살충제	유해(금지), 농약(금지 '79)
26	kelthane (2,2-디코폴)	살충제	유해(유독물), 농약(등록)
27	malathion	살충제	유해(유독물), 농약(등록)
28	mancozeb	살균제	농약(등록)
29	maneb	살균제	농약(금지 '89)
30	methomyl	살충제	유해(유독물), 농약(등록)
31	metribuzin	제초제	농약(등록)

하여 앞으로 화학물질의 취급, 생산 등 모든 면에서 주의 깊은 관찰과 내분비계 장애물질에 관한 많은 연구가 이루어져야 하리라 사료된다.

특히 앞으로는 국가간 수출입에 관련된 제품들 속에서의 내분비계 장애물질들의 존재여부가 하나의 또 다른 무역장벽으로 대두될 가능성도 배제 할 수 없는 상황이므로, 많은 다국적 기업 등에서는 수면 하에서

이들을 대체할 물질들의 제조 등에 많은 연구를 기울이고 있는 것으로 알려지고 있으므로, 우리나라에서도 내분비계 장애물질의 사용을 최대한 줄이려는 노력과 병행하여, 이들의 대체물질 개발, 대체공정, 저감기술 등의 연구에도 산업계와의 연계 차원에서 시급한 연구가 병행되어야 하리라 사료된다.

표 7-2. 우리나라의 내분비계장애 추정물질 목록 및 사용실태 - II			
※ 농약 (44종), 산업용화학물질 (14종), 부생성물 또는 대사물 (9종)			
	물 질	용 도	규 제 내 용
32	nitrofen	제초제	유해(금지), 농약(금지 '81)
33	toxaphene	살충제	유해(금지 '91), 농약(금지 '82)
34	trifluralin	제초제	유해(금지), 농약(등록)
35	vinclozolin	살균제	농약(등록)
36	zineb	살균제	농약(금지 '90)
37	ziram	살균제	유해(유독물), 농약(금지)
38	Octachlorostyrene	유기염소계화합물의 부생성물	
39	DDT metabolites	DDT의 대사물	
40	heptachlor epoxide	heptachlor의 대사물	
41	oxychlordane	클로르단의 대사물	
42	헥사클로르벤젠 (HCB)	살균제, 비의도적 생성물	제조.수입사례 없는 물질
43	아미트롤	제초제, 분산염료, 수지경화제	유해(유독물), 농약(금지)
44	아트라진	제초제	제조.수입사례 없는 물질
45	kepone	살충제	제조.수입사례 없는 물질
46	synthetic pyrethroids	살충제	제조.수입사례 없는 물질
47	methoxychlor	살충제	제조.수입사례 없는 물질
48	mirex	살충제	제조.수입사례 없는 물질
49	permethrin	살충제	유해(유독물)
50	trans-nonachlor	살충제	제조.수입사례 없는 물질
51	Pentyl~Nonyl phenols	계면활성제원료	유해(유독물)
			nonyl-
			tert-octyl-
			유해(관찰) 유해(유독물) 제외 물질
52	Bisphenol A	가소제, 합성수지원료	유해(관찰)
53	di-ethylhexylphthalate (DEHP)	가소제	유해(관찰)
54	di-hexylphthalate (DHP)	플라스틱가소제	-
55	butylbenzylphthalate (BBP)	플라스틱가소제	유해(관찰)
56	di-propylphthalate (DprP)	플라스틱가소제	-
57	di-n-butylphthalate (DBP)	플라스틱가소제	-
58	dicyclohexylphthalate (DCHP)	가소제	-
59	di-n-pentylphthalate (DPP)	플라스틱가소제	-
60	di-ethylphthalate (DEP)	플라스틱가소제	-
61	styrene dimers	스티렌수지의 미반응물	대기 (오염물질:스티렌단량체)
62	styrene trimers		
63	Benzo(a)pyrene	비의도적생성물	Polystyrene
64	2,4-dichlorophenol	원료중간체	
65	Diethylhexyladipate	가소제	
66	Benzophenone	의약품합성원료, 보착제	
67	N-butylbenzene	합성중간체, 액정제조용	

## 9. 참고문헌

- A Study on Hormone-like (Hormone-mimic) Effects of Exogenous substances. (1997) Japan Chemical Industry Association and Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology and Information Center.
- Andersen H.R., Andersson A.M., Arnold S.F., Autrup H., Barfoed M., Beresford N.A., Bjerregaard P., Christiansen L.B., Gissel B., Hummel R., Jorgensen E.B., Korsgaard B., Le Guevel R., Leffers H., McLachlan J., Moller A., Nielsen J.B., Olea N., Oles-Karasko A., Pakdel F., Pedersen K.L., Perez P., Skakkeboek N.E., Sonnenschein C., Soto Ana M., Sumpter J.P., Thorpe S.M., Grandjean P. (1999) Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. *Environ. Health Persp.* 107(Suppl 1):89~108
- Appraisal of Test Methods for Sex-Hormone disrupting Chemicals capable of affecting the reproductive process; prepared by the MRC. Institute for Environmental and Health for the UK Department of Environment, Transport and Regions, (1998)
- Arcaro K.F., Yang Y., Vakharia D.D., Gierthy J.F. (2000) Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. *Toxicology & Environ. Health Part A.* 59(3):197~210.
- Arcaro K.F., Yang Y., Vakharia D.D., Gierthy J.F. (2000) Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. *Journal of Toxicology & Environ. Health Part A.* 59(3):197~210.
- Arcaro K.F., Yang Y., Vakharia D.D., Gierthy J.F. (2000) Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. *Journal of Toxicology & Environ. Health Part A.* 59(3):197~210.
- Ashby J., Lefevre P.A., Odum J., Tinwell H., Kennedy S.J., Beresford N.A., Sumpter J.P., (1997) Failure to confirm estrogenic activity for benzoic acid and clofibrate: implications for lists of endocrine-disrupting agents. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26(1 Pt 1):96~101.
- Barnes S. Kim H. Darley-Usmar V. Patel R. Xu J. Boersma B. Luo M. (2000) Beyond ER alpha and ER beta: Estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *Journal of Nutrition.* 130(3):656S~657S.
- Beekman J.M., Allan G.F., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1993) Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol. Endocrinol.* 7:1266~1274.
- Carlos Sonnenschein and Ana M. Soto (1998) An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 65(1):143~150.
- Co-ordination of Endocrine Disrupters Assessment Activities, <http://www.oecd.org/ehs/endocrin.htm>
- Colorn, T. (1995) Environmental estrogens; Health implications for Humans and wildlife, *Environ. Health Persp.*,103(Suppl 7):135~136.
- Davis, D.L. and Bradlow, H.L. (1995) Can Environmental Estrogens Cause Breast Cancer, *Sci. Amer.* pp.166~172.
- Endocrine disruptors listed from our stolen future and other references, <http://www.nihs.gov/hse/environ/sdsubs/substancesnew.html>
- Endocrine disruptors research Initiative, <http://www.epa.gov/endocrine>
- Environmental Estrogens & other hormones, <http://www.tmc.tulane.edu/ecme/eehome/>
- Environmental Health Information Service, <http://ehis.niehs.nih.gov/>
- Environmental Oestrogens: Consequences for human health and wildlife. Assessment A1. MRC Institute for Environment and Health, University of Leicester (1995).
- EPA : EDSTAC (1998) Draft report, June 12,
- European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife. Report of Proceedings. December 2~4, (1996) Weybridge, UK,P128.
- Fox, G.A., Gilman, A.P., Peakall, D.B., Anderka,

- F.W. (1978) Behavioural Abnormalities on Nesting Lake Ontario Gulls. *J. Wildl. Manage.* 43(3):477~483.
- Fry, D.M. (1995) Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals, *Environ. Health Persp.* 103(Suppl. 7):165~171.
- Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., and McDonnell, D. P. (1997) Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a Yeast-Based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143:205~212.
- Garrett S.D., Lee H.A., Morgan M.R.A. (1999) A nonisotopic estrogen receptor based assay to detect estrogenic compounds. *Nature. Biotechnology* (12):1219~1222.
- Gilbertson, M., *et al.*, (1991) Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *J. Toxicol. Environ. Health* 33:455~520.
- Grainger D.J., Metcalfe J.C. (1996) Tamoxifen : teaching an old drug new tricks. *Nat. Med.* 2:381~385.
- Green S, Chambon P. (1991) The estrogen receptor: from perception to mechanism. *In* : Nuclear hormone receptors : molecular mechanisms, cellular functions, clinical abnormalities(Parker MG, ed). London: Academic Press. pp.15~38.
- Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., and Woodward, A.R. (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida, *Environ. Health Persp.* 102:680~688.
- Harris, C. A., Henttu, P., Parker, M. G., and Sumpter, J. P. (1997) The estrogenic activity of phthalate esters *In vitro*, *Environ. Health Perspect.* 105(8):802~811.
- Hertz, R. (1985) The estrogen problem: retrospect and prospect. *In* Estrogens in the Environment. II. Influences on Development, ed. J.A. Mclachlan. Elsevier Science B.V., Amsterdam. pp.1~11.
- Hutz R.J. Wimpee BAB. Dasmahapatra A. Weber DN. Heimler I. Chaffin CL. (1999) Differential modulation by aromatic hydrocarbon receptor agonist of circulating estradiol-17 beta and estrogen-receptor DNA-binding capability in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Zoological Science.* 16(1):161~166.
- Introduction to hormone disrupting chemicals, <http://website.lineone.net/~mwarhurst/>
- Jordan V.C. (1994) Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 31:41~52.
- Kartin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S., McGuire, W.L. (1978) Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 103:1860~1867.
- Kelley S.T., Thackray V.G. (1999) Phylogenetic analyses reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms. *J. Mol. Evolution* 49(5):609~614.
- Korach K.S. and Mclachlan J.A. (1995) Techniques for detection of estrogenicity. *Environ. Health Persp.* 103(Suppl 7):5~8.
- Krishnan, A., *et al.* (1991) Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during auto claving., *Endocrinology.* 132(8):2279~2286.
- Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 138(3):863~870.
- Kuiper G.G., Enmark E., Pelto-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 93(12):5925~5930.
- Landel C.C., Kushner P.J., Greene G. (1995) Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ Health Persp.* 103(Suppl 7):23~28.

- Lee, H-S., *et al.*, (2002) Empolyment of the human estrogen receptor  $\beta$ ligand-binding domain and co-activator SRC1 nuclear receptor-binding domain for the contruction of a yeast two-hybrid detection system for endocrine disrupters. *J. Biochem.* 131:399~405.
- Long X.H., Steinmetz R., Ben-Jonathan N. Caperell-Grant A. Young P.C.M., Nephew K.P., Bigsby R.M. (2000) Strain differences in vaginal responses to the xenoestrogen bisphenol A. *Environ. Health Persp.* 108(3):243~247.
- McDonnell, D.P., *et al.* (1991) High level expression of biologically active estrogen receptor in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39:291~297.
- Metzger, D., *et al.* (1988) The human oestrogen receptor function in yeast. *Nature* 334:31~36.
- NIEHS/NTP Research and Interagency Activities on Endocrine Disrupting Chemicals, NIH, USA.
- Odum J., Lefevra P.A., Tittensor S., Paton D., Routledge E.J., Beresford N.A., Sumpter J.P., Ashby J., The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* (1997) 25(2):176~88.
- Paech K., Webb P., Kuiper G.G., Nilsson S., Gustafsson J., Kushner P.J., Scanlan T.S. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta at AP 1 sites. *Science* 277:1508~10.
- Palmer, B.D. and Palmer, S.K. (1995) Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and african clawed frog, *Environ. Health Persp.* 103(Suppl 4):19~25.
- Parker M.G., Arbuckle N., Dauvois, Danielian P., White R. (1993) Structure and funtion of the estrogen receptor. *Ann NY Acad Sci* 684:119~126.
- Pedraza V. *et al.* (1991) The E-screen assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks, *Environ. Health Persp.* p.103, pp.844~850.
- Perez P., Pulgar R., Olea-Serrano F., Villalobos M., Rivas A., Metzler M., Pedraza V. and Olea N. (1998) The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health Persp.* 106(3):167~74.
- Reel J.R., Lamb I.V.C., Neal B.H. (1996) Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl Toxicol.* 34(2):288~305.
- Rehmann K. Schramm K.W. Kettrup A. Chemosphere (1999) Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. 38(14): 3303~3312.
- Routledge, E. J. and J.P. Sumpter (1997) Structural feature of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.* 272:3280~3288.
- Routledge, E. J., and J.P. Sumpter (1996) Estrogenic activity of surfactant and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.* 15(3):241~248.
- Schultz, T. W., Seward, J. R., and Sinks G. D. (2000) Estrogenicity of benzophenes evaluated with a recombinant yeast assay: comparison of experimental and rules-based predicted activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(2):301~304.
- Smith D.F., Toft D.O. (1993) Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol* 7:4~11.
- Smithsonian Institution (1997) International Workshop on endocrine disruptors, Workshop report, Washington D.C. pp.23~24, USA.
- Soto Ana M. and Sonnenschein C. (1984) Mechanism of estrogen action on cellular proliferation: evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* 16;122(3):1097~1103.
- Soto Ana M. and Sonnenschein C. (1985) The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J Steroid Biochem.*23(1):87~94.
- Soto Ana M., Fernandez M.F., Luizzi M.F., Oles

- Karasko A.S. and Sonnenschein C. (1997) Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ. Health Persp.* 105(Suppl 3):647~654.
- Soto, Ana M., Justica, H., Wray, J. and Sonnenschein, C. (1991) *p*-Nonylphenol : A estrogenic xenobiotic released from 'Modified' polystyrene, *Environ. Health Persp.* 92:167~173.
- Soto, Ana. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., and Serrano, F. O. (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogen: An update on estrogenic environmental pollutants, *Environ. Health. Persp.* pp.103~122.
- Stancel G.M., Boettger-Tong H.L., Chiappetta C, Hyder S.M., Kirkland J.L., Murthy L., Loose-Mitchell D.S. (1995) Toxicity of endogenous and environmental estrogens: what is the role of elemental interactions. *Environ. Health Persp.* 10(Suppl 7):29~33.
- Thomas J.A. and H.D. Colby (1997) *Endocrine Toxicology*, Ed:2nd Ed., Taylor & Francis.
- Tsai M.J. and O'Malley B.W. (1994) Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 63:451~486.
- U.S. EPA. (1997) Special report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Office of Research and Development, EPA/630/R-96/012, Washington D.C.
- Vinggaard A.M., Breinholt V. and Larsen J.C. (1999) Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation in vitro. *Food Additives & Contaminants* 16(12):533~542,
- Welcome to EPA's Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Home, <http://www.epa.gov/opptintr/opptendo>
- Workshop on the Status of Regulatory and Research Activities on Endocrine Disrupting Chemicals, July 12, Holiday Inn Seoul, Korea, (1999)
- Wright, A. P. H., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J. A. (1990) Ligand-specific transactivation of gene expression by a derivative of the human glucocorticoid receptor expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 265:14763~14769.
- Yadatie F. Arukwe A. Goksoyr A. Male R. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. *Science of the Total Environment.* 233(1~3):201~210, 1999.
- Zava, D. T., and McGurie, W. L. (1978) Androgen activation through estrogen receptor in a human breast cancer cell line. *Endocrinology* 103:624~631.
- 내분비계장애물질 중장기 연구사업계획 (38000-67610-57-9961) 환경부, (1999)

---

#### Overall Review on endocrine disruptors

Jae-Chun Ryu\* (*Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea*)

---

\*Corresponding author (Tel : +82-2-958-5070, E-mail : ryujc@kist.re.kr)