

## E-screen assay법을 이용한 농약화학물질의 에스트로겐 활성 연구

한 상 국

목포해양대학교 해양시스템공학부 해양환경공학전공  
(2004년 2월 13일 접수; 2004년 5월 14일 채택)

### Study on Estrogenic Activities of Pesticide Chemicals using E-screen Assay

Sang-Kuk Han

Department of Marine Environmental Engineering, Faculty of Ocean System Engineering,  
Mokpo National Maritime University, Mokpo 530-729, Korea  
(Manuscript received 13 February, 2004; accepted 14 May, 2004)

In this study, sixty chemicals including 47 pesticides were screened for estrogenic activity using E-screen assay. MCF-7 cell, used in E-screen assay, is known to be proliferated by addition of estrogenic chemicals. Eight of the measured pesticides showed estrogenic activity at the concentration range of 100-10,000nM. Their relative proliferative effect (RPE) and the relative proliferative potency (RPP) were 20-65% and 0.01-1.0%, respectively, when compared with 1.0nM of  $\beta$ -Estradiol-17-acetate( $E_2$ ). DDVP and diazinone showed most strong estrogenic potency(RPP; 1.0%) and effect(RPE; 65%) of the eight pesticides. These results are in agreement with estrogenic activity of bisphenol A is known as a positive endocrine disrupter. Also, in this study, paraquat, DDVP, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4,6-trichlorophenol and diazinon of the measured pesticides are estimated to estrogenic chemical.

Key Words : MCF-7, E-screen assay, Pesticides, Relative proliferative effect(RPE), Relative proliferative potency (RPP), Estrogenic

#### 1. 서 론

환경 중에는 다이옥신, PCB등과 같이 건강장애를 일으키는 화학물질들은 심각한 사회문제가 되고 있다. 이런 잔류성이 높고 독성이 강한 화학물질 외에, 지금까지 안전하다고 생각되어온 농약, 계면활성제, 플라스틱 원료 등의 화학물질 중에 생체호르몬 수용체, 특히 여성호르몬 수용체에 결합하여 호르몬 feedback에 영향을 주어 내분비계 교란작용을 일으키게 하는 화학물질들이 알려지고 있다<sup>1)</sup>. 그 중에서도 DDT 등의 농약에 의한 내분비계 교란작용은 1950년대부터 생태역학조사 및 동물실험 등으로부

터 증명되어져 왔다<sup>2)</sup>. 그러나 이러한 연구결과는 일부 농약류에만 한정되어 환경중 농약류의 안정성을 확보하기 위해서는 더 많은 연구자료가 필요하다.

한편, 내분비계 교란물질 검색법은 배양세포를 이용한 *in vitro*법과 어류, 양서류 등의 생물개체를 이용한 *in vivo*법으로 구분할 수 있다. 다종다수의 화학물질이 존재하는 환경을 대상으로 내분비계 교란작용을 분석 검토하기 위해선 정성적으로 신속하게 분석할 수 있는 방법이 우선되기 때문에 EPA의 EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee)에서는 배양세포를 이용한 *in vitro*법을 우선단계 평가법으로 권장하고 있다<sup>3)</sup>. 이중, 여성유방암유래 MCF-7세포는 에스트로겐 수용체를 가지고 있으며 다른 여성유방암 유래세포(ZR-75-1, T-47-D) 보다 에스트로겐 유사작용성 물질의 첨가에 의해 세포증식이 더욱 촉진되

Corresponding Author : Sang-Kuk Han, Department of Marine Environmental Engineering, Faculty of Ocean System Engineering, Mokpo National Maritime University, Mokpo 530-729, Korea  
Phone : +82-61-240-7236  
E-mail : skhan@mmu.ac.kr

어 그 감도의 우수성이 입증되었다<sup>4)</sup>. 또한, Villalobos<sup>5)</sup> 등의 보고에 의하면, MCF-7의 stock세포 중에서도 에스트로겐 유사작용성 물질에 가장 민감한 반응을 보인 것은 Soto 등이 가지고 있는 MCF-7 (Bus cell)세포였으며, 이들은 MCF-7 세포를 이용하여 에스트로겐 활성을 검증하기 위해 세포증식실험법(E-screen assay)<sup>4)</sup>을 개발하였다. 또한, 한상국 등<sup>6)</sup>은 2000년도에 식품의약품안전청에서 연구비를 지원 받아 MCF-7(Bus cell)세포를 이용한 Soto 등의 E-screen assay법을 확립하였고 프탈레이트 물질 8종류의 에스트로겐 유사작용성에 대한 결과를 발표하였다.

따라서, 본 연구는 확립된 E-screen assay를 이용해서 수환경의 내분비계 교란작용을 검증하기 위한 일차적인 방안으로 각종 분석방법에 의하여 하천이나 호소 등 수환경에 존재한다고 여겨지는 농약화학물질 약 80여종<sup>7)</sup> 중 발암성 및 유전독성물질을 포함한 유해 농약화학물질 47종과 내분비계 교란물질로 판정된 물질 3종, 그리고 기타물질 10종을 포함한 60종을 선택하여 이들의 에스트로겐 활성에 미치는 영향을 규명함에 그 목적을 두었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

MCF-7 세포(BUS cell)는 E-screen assay를 수립 개발한 Soto 연구실에서 직접 분주 받아 5% Fetal Bovine Serum(FBS)가 함유된 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium(DMEM)배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다.

DMEM배지와 phenol red free DMEM배지, 그리고 FBS는 Gibco BRL사에서 구입하였다. β-Estr-

adiol-17-acetate(E<sub>2</sub>)와 농약화학물질을 포함한 60종의 실험대상 화학물질, dimethylsulfoxide (DMSO), 그리고 일반적으로 실험에 쓰여진 화학물질들은 Sigma사(미국)와 Aldrich사(미국)에서 구입하여 실험에 이용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 표준용액조제

Table 1에 실험대상 화학물질을 종류별로 분류하였다. 내분비계교란 표준물질은 E<sub>2</sub>를 포함한 3종을 선택하였고 농약류로서 Insecticide(살충제) 20종, Herbicide(제초제) 16종, Fungicide(살균제) 11종, 그리고 기타 화학물질 10종을 포함하여 총 60종의 화학물질을 실험대상 물질로 선택하였다. 모든 화학물질은 초순수 또는 DMSO용액에 녹여 0.2μm membrane filter로 멸균하여 차광멸균바이알에 보관하였다. 이들 화학물질의 농도는 표준분석법에 의하여 결정하였다. 농도가 결정된 표준용액은 표식을 하여 실험에 이용될 때까지 -20°C이하에서 냉동 보관하였다.

2.2.2. MCF-7세포 배양

2.2.2.1. 배지 및 트립신 제조

세포배양 배지는 1L양의 DMEM(Gibco)용액에 최종농도가 1mM되도록 sodium pyruvate와 7.5% NaHCO<sub>3</sub>(pH조절)를 첨가한 후, 0.2μm filter로서 멸균한다. 여기에 불활화(56°C, 30분)된 FBS 50ml를 첨가하여서, 5% FBS DMEM배지를 만들어 실험에 이용하였다. 제조된 배지의 오염확인 37°C 배양기에서 48시간 정치 후 부유물로 확인한다. 계대배양을 위한 0.25% 트립신용액은 2.5% 트립신, 0.2% EDTA를 제조한 후 PBS:0.2% EDTA:2.5% trypsin

Table 1. 60 Chemicals examined by the E-screen assay in this study

Chemicals	
Endocrine disrupter(ED) standard chemicals(3)	bisphenol A, diethylstilbestrol(DES), β-estradiol-17-acetate(E <sub>2</sub> )
Pesticides	Insecticides(16) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, pentachlorophenol, thiobencarb, 2,4,5-trichlorophenol, paraquat, alachlor, simazine, simetryne, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, trifluralin, molinate, glyphosate, NIP, DCPA, bifenox, diquatdibromide monohydrate
	Herbicides(20) 1,2-dibromo-3-chloropropane, 1,2-dichlorobenzen, 1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane, malathion, methomyl, NAC, MEP, 1,2,3-trichlorobenzene, 2-dichlorobenzene, kelthane, permethorin, EPN, ethylcarbomate, tetrachloroethylene, 1,3-dichloropropene, dimethoate, BPMC, PAP, IBP, DDVP
	Fungicides(11) thiuram, maneb, manzeb, ziram, captans, TPN, vinclozoline, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4,6-trichlorophenol, thiophanat methyl, PCNB
Others(10)	formaldehyde, isophorone, 2-phenylene diamine, hexachlorophene, quinoline, fthalide, acephate, diazinone, EDDP, 2,4,6-trimethylphenol

를 8:1:1로 혼합하여 0.2 $\mu$ m filter로서 멸균한 뒤 실험에 사용하였다.

### 2.2.2.2. 계대배양조작

세포가 들어 있는 25cm<sup>2</sup> 플라스크(Corning)의 배지를 흡인·제거한 후, 바닥표면에 남아있는 잔여물을 제거하기 위하여 PBS완충액 5~6ml로 세정한다. 0.25% 트립신 용액을 플라스크 당 500 $\mu$ l를 첨가하고 MCF-7 세포가 플라스크 바닥에서 떨어져 나오면(1~2분 정도) 배지 5ml를 넣어 피펫팅한 후, 15ml 원심튜브(Falcon)에 분주하여 원심분리(1000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5분)한다. 상층액을 aspirator로 흡인제거하고 새 배지를 넣고 피펫팅하여 세포를 단일화한 후 세포수를 계측한다. 새로운 25cm<sup>2</sup> flask에 5% FBS DMEM 배지를 5ml 넣고, 4~5  $\times$  10<sup>4</sup> cells/25cm<sup>2</sup> flask가 되도록 세포를 분주한다. 플라스크를 천천히 흔들어서 세포가 균일하게 분산되도록 하여 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양한다. 3~4일에 한번 aspirator로 배지를 흡인·제거하고 새로운 배지로 교환해 준다. 6~7일 간격으로 계대배양을 한다.

### 2.2.3. Charcoal-Dextran처리

혈청 중에 함유된 세포증식인자를 제거하기 위하여 다음과 같은 처리를 하였다.

뚜껑이 있는 유리원심튜브에 (혈청량 $\times$ 1.1)ml의 증류수를 넣고, 수면의 위치에 정확히 표시를 해둔 후, 증류수를 버린다. 표시지점 용량에 대한 5% 활성탄(Sigma, USA)을 첨가하여 표시된 지점까지 증류수를 넣고 상하로 뒤집으면서 잘 흔들어서 활성탄을 분산시킨 후, 원심 분리한다(250rpm, 2분). 이를 3회 이상 반복하여 활성탄 부유입자를 제거한다. 표시지점 용량에 대한 0.5% Dextran를 넣고 표시지점까지 증류수를 넣은 후 위아래로 뒤집어 활성탄을 분산시켜 원심 분리한다(600rpm, 5분). 상층액을 흡인·제거한 후, 혈청을 넣고 기포발생이 안되도록 서서히 교반해서 활성탄을 분산시킨다. 이를 Shaking water bath에서 37 $^{\circ}$ C, 60분간 배양한 후, 원심 분리한다(3000rpm, 20분). 상층액을 스포이드로 흡인·제거하여 다른 유리원심튜브에 분주한 후, 또다시 원심 분리한다(3000rpm, 20분). 이 과정을 2회 반복하여 얻어진 상층액을 0.45 $\mu$ m filter로 여과한다. 그리고, 0.2 $\mu$ m filter로 여과 멸균한다. 10ml용 유리원심튜브에 4~5ml정도 분주한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하고 실험시 상온에서 해동한 후, phenol red free배지에 Charcoal-Dextran처리혈청을 5% 첨가하여 E-screen assay에 이용한다.

### 2.2.4. E-screen assay

96well plate(Falcon, Non-pyrogenic)에 세포를 분

주하기 전일에 시험에 사용될 세포의 배지(5% Charcoal-Dextran처리 혈청배지 : CDFBS)를 교환해준다. 그리고, 실험 당일에 세포가 들어 있는 25cm<sup>2</sup> 플라스크내 배지를 흡인제거하고 PBS완충액으로 1회 세정한 후, 0.25%트립신 용액을 플라스크당 500 $\mu$ l를 첨가하여 MCF-7세포가 플라스크 바닥에서 떨어져 나오면(1~2분 정도), 동일 플라스크에 배지 5ml를 넣어서 피펫팅한다. 배지를 15ml 원심튜브(Falcon)에 이동시켜서 원심(1000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5분)하여 상층액을 aspirator로 흡인·제거한다. 세포가 남아 있는 원심튜브에 배지를 넣고 피펫팅하여 세포를 단일화한 후, 세포수를 계측한다. 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well로 96well plate(Falcon, Non-pyrogenic)에 세포를 분주(well당 배지량은 100 $\mu$ l)한다. 96well plate를 천천히 흔들어서 세포를 균일하게 분산시키고 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 배양한 후, well에 들어 있는 배지를 흡인·제거한다. CDFBS 90 $\mu$ l를 well에 넣고 시험물질의 농도를 조절하여 각 농도별로 10 $\mu$ l씩 well에 첨가한다. 이때, 음성대조물질인 DMSO의 최종농도가 0.5%가 되도록 한다. 시료가 첨가된 96well plate를 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 6일간(144시간) 배양하고 6일 후, Sulforhodamine-B(SRB) assay로 세포계측을 한다. SRB assay는 한상국등<sup>4)</sup>에 의해 제시된 실험방법을 이용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

3.1. 내분비계교란 표준물질의 에스트로젠 활성도  
본 연구에서 활성탄 처리한 혈청을 이용하여 내분비계교란 표준물질인 E<sub>2</sub>, DES, 그리고 bisphenol A에 대한 E-screen assay를 실시한 결과 용량 의존적으로 MCF-7 세포의 증식을 촉진시키는 경향을 나타내었다(Fig. 1). E<sub>2</sub>, DES 모두 100pM에서 세포

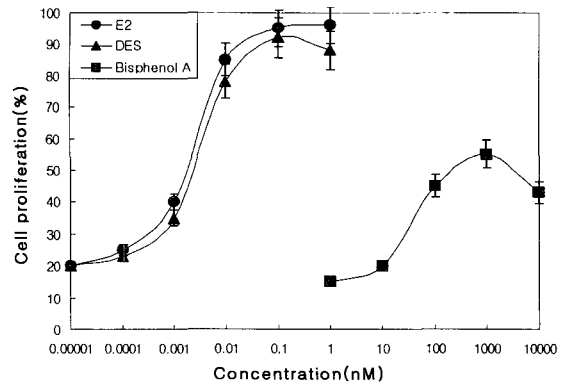


Fig. 1. Dose response curves of E<sub>2</sub>, DES, and bisphenol A on MCF-7 cells in culture. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells at least three times.

증식율이 최대치를 보였으며 bisphenol A는 1 $\mu$ M에서 세포증식율이 최대치를 보였으나 E<sub>2</sub>, DES에 비해 최대 60% 정도의 증식활성을 나타내었다. 이러한 E<sub>2</sub>와 DES의 세포증식 활성에 대한 결과들은 Steinmetz 등<sup>8)</sup>의 결과들과 일치하였다. 이러한 결과로부터 화학물질중 대표적인 내분비계 교란물질로 추정되는 bisphenol A의 에스트로겐 활성도를 분석한 결과 내인성 여성호르몬 물질(E<sub>2</sub>)과 합성호르몬 물질(DES)에 비해 감도가 10<sup>4</sup>배 낮으며 작용력 또한 1/2정도에 해당되었고 이런 결과는 Olea 등<sup>9)</sup>의 발표와 일치하였다. 한편, bisphenol A의 고농도(1 $\mu$ M이상)에서 세포밀도가 감소하고 있는 것은 세포독성이 발현되고 있기 때문으로 사료된다. 일반적으로 Soto 등<sup>10)</sup>이 확립한 MCF-7세포주는 배양조건, 계대배양 횟수 및 보관조건 등에 따라 세포증식을 및 생존율에 차이를 나타낸다고 보고된 바 있다. 그러나, 본 연구 결과는 Soto<sup>4)</sup> 및 Steinmetz 등<sup>8)</sup>의 결과와 유사하여 Soto 등이 제안한 E-screen assay 시험법이 확립되어 미지물질의 에스트로겐 활성 검색에 이용될 수 있으리라 사료되지만 시험물질이 에스트로겐 수용체에 직접 작용하는 지에 대한 정보를 알 수 없다는 단점이 있기 때문에 차기 연구에서는 이런 단점을 보충할 수 있는 MVLN 시험법 같은 방법들이 요구되어진다.

3.2. 농약화학물질에 대한 에스트로겐성 모니터링

본 연구에서는 E-screen assay를 이용하여 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)를 포함한 제초제 16종, 1,2-dibromo-3-chloropropane를 포함한 살충제 20종, thiuram의 10종의 살균제, 그리고 방부제를 비롯한 기타 물질 10종 등 총 57종 농약화학물질들의 에스트로겐성을 모니터링하기 위해 4번의 반복 실험을 통한 결과를 Table 2에 나타내었다. 실험결과에서 2번 이상 에스트로겐성을 나타낸 농약화학물질은, paraquat, alachlor, trifluralin의 제초제 3종, kelthane, DDVP의 살충제 2종, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4,6-trichlorophenol의 살균제 2종, 그리고 기타물질 중 diazinon을 포함하여 총 8종의 농약화학물질만이 에스트로겐성 물질로 분류되었다. 나머지 49종의 농약화학물질은 에스트로겐성에 음성반응 결과를 나타내어 에스트로겐 활성에 의한 내분비계 교란작용 가능성이 미약하리라 사료된다. 본 실험에서 에스트로겐 활성에 영향을 보인 8종의 농약물질 중 alachlor, trifluralin, kelthane 등은 한국환경부, 일본후생성, 그리고 세계야생동물보호기금(WWF)에서 내분비계 교란물질로 추정하고 있는 물질이며 이외 paraquat, DDVP, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4,6-trichlorophenol, diazinon 등 5종은 본 연구에

서 처음으로 에스트로겐성 물질로 인지되었다. 본 연구에서 49종의 음성반응 에스트로겐성 물질로 검증된 것 중 각국에서 내분비계 교란물질로 추정하고 있는 물질들도 포함되어 있지만 실험방법 등에 의한 내분비계 교란작용의 발현 차이에 의해 본 실험과 상이한 결과가 도출되었다고 판단된다.

3.3. 8종 농약화학물질의 에스트로겐 고유활성도

양성적 에스트로겐 활성을 나타낸 8종 농약화학물질에 대한 용량-작용곡선을 작성하여 Fig. 2에 나타내었다. 대부분의 농약화학물질 중에서 내인성 여성 호르몬 물질로 잘 알려진 E<sub>2</sub>와 동일하게 용량의존적으로 세포증식이 나타났고 10nM 이상에서 MCF-7세포의 증식을 촉진시키는 경향을 보였다. 그러나, DDVP 및 Kelthane등의 살충제는 100nM, 1000nM 이상의 농도에서 오히려 세포독성을 유발하는 경향을 보였다. Fig. 2에 나타난 농약화학물질의 용량-작용곡선 결과는 세포증식 활성에 미치는 영향이 저농도보다 고농도에서 농약화학물질에 따라 상이하하다는 사실을 시사하고 있다. 본 연구 결과는 Soto 등<sup>9)</sup>의 toxaphene을 포함한 여러 농약화학물질에 대한 E-screen assay결과와 일치하였다. 또한, 이들 8종의 농약화학물질을 양성대조물질인 E<sub>2</sub>(1.0nM)로 하여 에스트로겐 활성도[relative proliferative effect (RPE)와 relative proliferative potency(RPP)]를 비교한 결과, DDVP(RPP=1.0%, RPE=40%)가 가장 높은 활성을 나타내었으며, 다음은 2,4,6-trichlorophenol (RPP=0.1%, RPE=55%)과 kelthane(RPP=0.1%, RPE=38%)이었고 diazinon(RPP=0.01%, RPE=65%), 4-

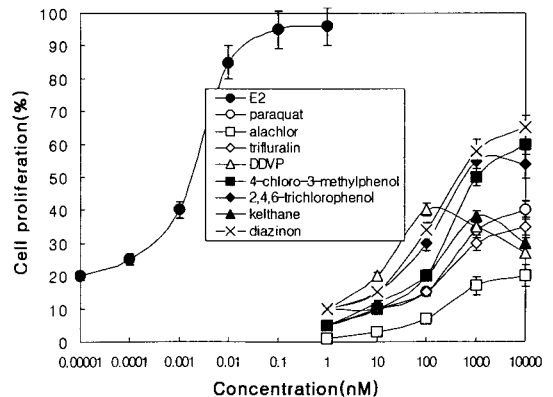


Fig. 2. Effects of pesticide chemicals on proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. Cells were exposed for 144hrs to pesticides or E<sub>2</sub> in DMEM medium supplemented with 5% charcoal dextran-treated FBS serum. Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells to four times. Cell proliferation was determined by SRB assay.

Table 2. Estrogenic monitoring on pesticide chemicals by the E-screen assay

Herbicides	Estrogenic	Insecticides	Estrogenic
2,4-dichlorophenoxyacetic acid	----	1,2-dibromo-3-chloropropane	----
pentachlorophenol	----	1,4-dichlorobenzen	----
thiobencarb	----+	1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane	----
2,4,5-trichlorophenol	----	malathion	---+
paraquat	+++	methomyl	----
alachlor	++++	NAC	----
simazine	----+	MEP	----
simetryne	----	1,2,3-trichlorobenzene	----
2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid	----	2-dichlorobenzene	----+
trifluralin	++++	kelthane	---+
molinate	----	permethorin	----
glyphosate	----	EPN	----
NIP	----	ethyl carbamate	----
DCPA	----	tetrachloroethylene	----
bifenox	----	1,3-dichloropropene	----
diquat dibromide monohydrate	----	dimethoate	----
		BPMP	----
		PAP	----
		IBP	----
		DDVP	++++

Fungicides	Estrogenic	Others	Estrogenic
thiuram	----	formaldehyde	----
maneb	---+	isophorone	----
manzeb	----	2-phenylene diamine	----
ziram	----	hexachlorophene	----
captans	----	quinoline	----
TPN	----	ftalide	----+
vinclozoline	-+-	acephate	----
4-chloro-3-methylphenol	+++	diazinon	+++
2,4,6-trichlorophenol	+++	EDDP	----
thiophanat-methyl	----	2,4,6-trimethylphenol	----
PCNB	----		

+ )Positive chemicals on estrogenic activity, - )Negative chemicals on estrogenic activity

Proliferation experiments conducted in quadruplicate wells to four times

chloro-3-methylphenol(RPP=0.01%, RPE=60%), paraquat(RPP=0.01%, RPE=40%), trifluralin(RPP=0.01%, RPE=35%),alachlor(RPP=0.01%, RPE=20%)의 순으로 나타났다(Table 3). DDVP, 2,4,6-trichlorophenol, kelthane은 다른 농약화학물질과 비교하여

상대적으로 RPP가 높았으나 RPE는 낮은 결과를 나타내어 에스트로겐 활성효능은 뛰어나나 활성효과는 낮은 물질로 판단된다. 반면, diazinone과 4-chloro-3-methylphenol은 RPP가 낮고 RPE는 높은 결과를 나타내어 에스트로겐 활성효능은 미비하지만 활성효

Table 3. Estrogenic activity of pesticide chemicals measured by the E-screen assay

Compound	Concentration <sup>a</sup>	RPE (%) <sup>b</sup>	RPP (%) <sup>c</sup>
E <sub>2</sub>	1nM	100	100
Paraquat	10000nM	40	0.01
Alachlor	10000nM	20	0.01
Trifluralin	10000nM	35	0.01
4-chloro-3-methylphenol	10000nM	60	0.01
2,4,6-trichlorophenol	1000nM	55	0.1
DDVP	100nM	40	1.0
Kelthane	1000nM	38	0.1
Diazinone	10000nM	65	0.01

<sup>a</sup>Indicates the lowest concentration required for maximal cell yield

<sup>b</sup>Relative proliferative effect (RPE); 100× the ratio between the highest cell yield obtained with the chemical and with E<sub>2</sub>

<sup>c</sup>Relative proliferative potency (RPP); 100× the ratio between the minimal concentration of E<sub>2</sub> required for maximal cell yield at day 6 and the minimal dose of the test compound required to achieve a similar effect

과는 높은 물질로 판단된다. 나머지 paraquat를 포함한 3종은 RPP, RPE 모두 낮은 결과를 나타내어 약한 에스트로젠 활성도를 갖는 물질로서 판단된다. 2,4,6-Trichlorophenol 및 paraquat의 결과는 에스트로젠성 검증을 위한 실험방법은 차이가 있지만 Petit등<sup>11)</sup>의 결과와 일치하였다.

본 연구결과 일부 농약류가 E-screen assay에서 에스트로젠성을 나타내기는 하나 양성대조물질로 사용한 여성 호르몬 물질인 E<sub>2</sub>와 비교할 때 그 작용 농도가 매우 높으며 반면 그 작용력은 미약하므로 일상생활로부터의 노출에 의한 에스트로젠성 작용의 가능성은 미비할 것으로 추정된다. 그러나, 자연 환경에서는 먹이사슬에 의한 생농축 현상이 진행되기 때문에 이러한 물질들이 극미량으로 존재하더라도 내분비계 교란에 미칠 위험성은 항상 존재하리라 판단된다. 따라서, 본 연구에서 에스트로젠 양성 반응을 보인 물질에 대한 관리규제가 요망된다.

본 연구결과 에스트로젠 표준물질 및 일부 농약 화학물질에 대한 *in vitro* 시험결과는 다른 논문의 연구결과와 크게 상이하지 않으면서 paraquat, DDVP, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4,6-trichlorophenol, diazinon 등 5종의 농약화학물질에 대한 에스트로젠 활성 가능성을 새롭게 제시하고 있다. 그러나, 이들 물질의 에스트로젠성에 대한 결론을 내리기 위해서는 보다 충분한 여러 종류의 *in vitro* 시험

결과가 더 보충되어야 할 것으로 사료된다.

#### 4. 결 론

- 1) 57종의 농약화학물질을 대상으로 에스트로젠성을 모니터링한 결과, paraquat, alachlor, trifluralin, kelthane, DDVP, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4,6-trichlorophenol, diazinon 등 총 8종에서 에스트로젠 활성을 보였다.
- 2) 측정된 농약화학물질 중 paraquat, DDVP, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4,6-trichlorophenol, diazinon 등 5종은 에스트로젠성 물질로 추정되었다.
- 3) 에스트로젠성 양성반응 농약화학물질 8종을 내인성 에스트로젠 물질인 E<sub>2</sub>와 비교할 때 그 작용 농도가 매우 높으며 반면 그 작용력은 미약하지만, 이들에 대한 관리대책이 요망된다.

#### 감사의 글

본 논문은 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업 (과제번호:2003-07002-0002-1)과 과학재단 독성평가 기술사업(과제번호: M10312000013-03B4000-00411)의 지원을 받아 연구되었습니다. 이에 대하여 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Soto, A. M., C. Sonnenschein and T. Colborn, 1996, Special issue : Endocrine disruption and reproductive effects in wildlife and humans, Comments Toxicol., 5, 315-506.
- 2) Robert, J. K., P. D. George, D. Chris, F. C. Penny, K. Steve, L. George, L. Michael, J. M. Michael, M. Carol, M. Ron, M. Jack, R. Rosalind, S. Geoffrey, M. S. Daniel, S. Thomas and A. T. Hugh, 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, 715-741.
- 3) EDSTAC(EPA), 1998, Final draft report, U.S. EPA, 17-18.
- 4) Soto, A. M., C. Sonnenschein, K. L. Chung, M. F. Fernandez, N. Olea and F. O. Serrano, 1995, The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, Environ Health Perspect, 103, 113-122.
- 5) Villalobos, M., N. Olea, J. A. Brotons, M. F. Olea-Serrano, J. M. Ruiz de Almodovar and

- V. Pedraza, 1995, The E-screen assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks, *Environ Health Perspect*, 103, 844-850.
- 6) Han, S. K., S. Y. Han, H. J. Moon, H. S. Kim, D. H. Lee, S. H. Kim, T. S. Kim and K. L. Park, 2000, Study on estrogenic activities of phthalate esters using E-screen assay and competitive binding assay, *J. Toxicol. Pub. Health*, 16(2), 141-146.
- 7) 内海秀雄, 1998, 環境廳未來環境添創造型基礎研究「化學物質による生物・環境負荷の總閥評價手法の開発」, 環境廳, 平成9年度報告書.
- 8) Steinmetz, R., N. G. Brown, D. L. Allen, R. M. Gigsby and N. Ben-Jonathan, 1997, The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo, *Endocrinology*, 138, 1780-1786.
- 9) Olea, N., R. Pulgar, P. Perez, F. Olea-Serrano, A. Rivas, A. Novillo-Fertrell, V. Pedraza and A. M. Soto, 1996, Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, *Environ Health Perspect*, 104, 298-305.
- 10) Soto, A. M., K. L. Chung and C. Sonnenschein, 1994, The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells, *Environ Health Perspect*, 102, 380-383.
- 11) Petit, F., P. L. Goff, J. P. Cravedi, Y. Valotaire and F. Pakdel, 1997, Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures, *J. Molecular Endocrinology*, 19, 321-335.