

자궁비대시험 연구에서 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸 파라벤의 내분비독성

조은혜¹ · 정지윤³ · 박철범² · 박선희² · 심용희² · 강대혁² · 이성호² ·

유종훈² · 김선중¹ · 이성훈¹ · 박정란¹ · 이영순¹ · 강경선^{1,†}

¹서울대학교 수의과대학 공중보건학교실, ²(주)바이오톡스텍

³공주대학교 산업과학대학 특수동물학과

Oestrogenic Activity of Parabens in Uterotrophic Assay

Eun-Hye Jo¹, Ji-Youn Jung³, Cheol-Beom Park², Sun-Hee Park², Yhong-Hee Shim²,
Dae-Hyuck Kang², Sung-Ho Lee², Jong-Hoon Yu², Sun-Jung Kim¹, Sung-Hoon Lee¹,
Jung-Ran Park¹, Yong-Soon Lee¹, and Kyung-Sun Kang^{1,†}

¹Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

²Biotoxtech Co.Ltd, Chung-buk, Korea

³Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Chung-nam, Korea

(Received June 3, 2006/Accepted June 25, 2006)

ABSTRACT – This study was conducted to determination of the endocrine distruptor function of 'Parabens' by dosing ethyl paraben, propyl paraben, isopropyl paraben, butyl paraben and isobutyl paraben to the immature SD rats. 18 groups were given vehicle control group, negative control group (Dibutyl phthalate), positive control group (17- α Ethynylestrdiol) and each paraben groups involved 3 dose level. Rats were injected with 62.5, 250 and 1,000mg/kg from postnatal day 19 till 21 once a day in subcutaneous and a total 3 times. There was no treatment related death. but, subcutaneous nodule, edema, alopecia and scrub formation on injection site was observed. These signs was become worse in high dose level. these signs was cause from physical stimulation by test substance which parabens were mix with corn oil as vehicle. In the analysis of organ weights, absolute and relative weights of brain, spleen, liver, thymus, heart, kidneys, adrenals, ovaries and vagina were no difference with control group. but, wet and blotted weight of uterus was increased in every high dose parabens treat group. Especially, all dose level of isobutyl paraben was showed increment of uterus weight. uterus dilatation of parabens treated group was observed in gross anatomic pathology and these result was agree with wet and blotted weight of uterus. In the result of this study, estrogenic effect as endocrine distruptor was observed in ethyl paraben, propyl paraben, isopropyl paraben, butyl paraben and isobutyl paraben. and it was considered isobutyl paraben has highest estrogenic effect under the condition of this study.

Key words: Parabens, Estrogenic effect, Uterotrophic assay, Endocrine disrupter

파라벤은 파라옥시안식향산 에스텔이라고도 불리며, 종류로는 에틸 파라벤, 이소프로필 파라벤, 부틸 파라벤, 이소부틸 파라벤 등이 있고, 겨드랑이에 뿌리는 디오드런트, 발한 억제제, 냄새제거용 방향제, 스킨크림 등 수많은 화장품에 방부제로 첨가되고 있는 화학물질이며 여성 호르몬의 일종인 에스트로겐과 유사한 작용을 수행할 수 있음이 입증되어 파라벤이 내분비계를 교란하는 내분비 장애물질로 작용할 수 있는 것을 시사한다. 본 연구는 파라벤류 물질의 내분비 장

애물질로서 인체에 미칠 수 있는 영향을 평가하기 위하여 파라벤류 (에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸)를 생후 19일령부터 21일령까지 3일간 투여하여 일반증상, 체중 및 사료섭취량을 관찰하였고, 부검하여 간 및 생식기관의 중량 특히, 자궁의 습증량에 대하여 조사하였다. 또한 자궁에 대하여 영상분석 및 조직병리학적 검사를 실시하여 자궁 경관의 변화를 관찰하였다. 본 연구의 과정은 'The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *in vivo* Estrogenic Responses : Phase

[†]Author to whom correspondence should be addressed.

1 (August 2001)', 'The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay. Phase 2 : Coded Single - Dose Studies (September 2003)' 및 'OECD test strategies and methods for endocrine disruptors (June 2004)' 등의 문헌을 참조하여 실시하였으며, 각 연구의 과정에 대하여 GLP 규정을 준수하여 실시하였다.

재료 및 방법

시험 물질

시험물질은 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 이소프로필 파라벤, 부틸 파라벤 및 이소부틸 파라벤으로서 에틸파라벤 및 프로필 파라벤은 SIGMA-ALDRICH사에서 생산된 제품을 사용하였고, 부틸파라벤은 WAKO사, 이소부틸 파라벤 및 이소프로필 파라벤은 동경화학주식회사에서 생산된 제품을 사용하였다. 음성대조물질인 Dibutyl phthalate, 양성대조물질인 17 α -Ethinylestradiol은 SIGMA-ALDRICH사의 제품을 사용하였다. 부형제는 Corn oil(FLUKA사)을 사용하였으며, 시험물질, 음성대조물질 및 양성대조물질은 투여직전에 부형제에 현탁하여 조제하였다.

시험동물

시험에 사용한 랫드는 18일령의 암컷 SpragueDawley(SD, Sam:TacN(SD), (주)샘타코 바이오 코리아, 경기도 오산시 서랑동 77-1)를 입수하였다. SD 랫드는 각종 독성평가시험에 가장 널리 사용되고 있으며, 비교할 생리, 해부 및 독성학적인 기초 자료가 많이 축적되어 있으며 자궁비대반응에 추천되어 선택하였다.¹⁾ 또한, 성숙한 난소절제동물보다 미성숙한 암컷이 자궁비대에 대하여 민감한 반응을 보이는 것으로 보고되어 생후 19일령의 암컷을 사용하였다.²⁾ 시험기간 중 사육실 환경조건은 온도 19~25°C, 상대습도 30~70%, 환기횟수 10~15 회/hr, 조명주기 12 hr, 점등 / 12 hr 소등, 조도 150~300 Lux로 하였다. 사육상자는 스테인레스 철망사육상자(260W×350L×210H (mm), 대중기기상사)에 10 마리 (검역 및 순화기간) / 3 마리(관찰기간)씩 수용하였다. 사료는 자궁비대에 영향이 없어 알려진 SAM #31 쥐사료 (로트번호: 040702, 신촌사료 주식회사)를 자유섭취시켰으며, 필터와 유수살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수를 자유섭취시켰다. 24시간 동안 순화를 실시한 후 체중을 기초로 하여 군분리하였으며, 군분리시 균평균체중 및 균표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다. 개체식별은 사육상자에 시험번호, 군/투여용량, 개체번호, 성별, 투여경로, 투여기간 및 부검일을 기재한 개체식별카드를 부착하였다. 개체식별은 유성매직을 이용하여 개체식별법에 따라 꼬리에 표시하였다.

시험군의 구성, 투여농도 및 용량

시험군의 구성은 18개의 군으로 대조군, 음성대조군, 양성대조군을 두고 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 이소프로필 파라벤, 부틸 파라벤 및 이소부틸 파라벤에 대하여 각각 62.5, 250, 1,000 mg/kg으로 용량단계를 구성하고 각 군당 암컷을 6 마리씩 배정하여 생후 19일부터 21일까지 3일간 1일 1회 피하투여하였다. 대조군은 0 mg/kg으로 부형제인 Corn oil을 투여하였고, 음성대조군은 Dibutyl phthalate를 100 mg/kg으로, 양성대조군은 17 α -Ethinylestradiol을 1 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 투여액량은 2 mL/kg body wt.로 하였으며, 개체별 투여액량은 투여 직전의 체중을 기준으로 산출하였다.

관찰 및 검사항목

1) 일반증상

투여기간동안 1일 1회 모든 시험동물에 대하여 실시하였으며, 일반상태의 변화, 운동성, 외관, 자율신경 등의 일반증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

2) 체중 측정

투여기간 및 부검당일에 측정(랫드용 저울, BP3100S, Sartorius, Germany)하였다.

3) 사료 및 음수 섭취량 측정

투여 1, 2 및 3일에 사료 및 음수 공급량을 측정하고 그 익일에 잔량을 측정하여 산출하였다.

4) 질개구 검사

질개구의 유무를 투여개시일부터 부검일까지 관찰하였다.

5) 호르몬 검사

본 시험의 모든 동물에 대해 투여종료 후 배대동맥(abdominal aorta)으로부터 혈액을 5 mL 가량 채혈하여 의료법인 삼광의료재단(서울특별시 서초구 양재동 9-60번지)에 의뢰하여 혈중 FSH, LH 및 Estrogen의 농도를 측정하였다.

6) 부검

생존동물은 관찰기간 종료 시 ether 로 마취시켜 외관검사를 실시한 후, 배대동맥으로부터 방혈 및 치사시켜 체내 외장기조직을 육안적으로 검사하였다.

7) 장기중량측정

본 시험의 모든 동물은 개체별로 간, 비장, 심장, 뇌 (Brain), 신장, 흉선, 부신 (좌/우), 난소 (좌/우), 자궁, 질을 적출하여

중량을 측정하였다.

특히, 자궁의 경우에는 자궁경부부터 난관의 시작부위까지를 포함하며 다음의 방법으로 중량을 측정하였다.

- Wet weight (관강내 액체존재 습중량) : 자궁을 적출한지 3분 내에 측정하였다.

- Blotted weight (관강내 액체제거 습중량) : Wet weight을 측정된 자궁을 여과지위에 놓고 약 1분 경과 후 중량을 측정하였다

질은 개구부부터 자궁경부까지를 포함하여 중량을 측정하였다.

난소는 난관팽대부 및 난소 주변의 지방을 제거하고 중량을 측정하였다.

7) 조직병리학적검사

모든 동물에 대하여 자궁을 적출하여 10 % 중성포르말린 용액(neutral formalin)에 고정하고 일정한 두께 (3 mm)로 삭정한 다음 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4 μ m의 조직절편을 제작하였다. 이후 일반적인 염색방법인 Hematoxylin & Eosin 염색 (H&E stain)을 하여 광학현미경 (Olympus BX50, Olympus Optical Co., Japan)으로 관찰하였다.

8) 자궁의 영상분석

모든 동물의 자궁은 조직절편을 제작한 후 광학현미경하에서 조직을 사진촬영 한 후 Image analyzer (Image - Pro plus, Media Cybernetics. Inc., USA)를 이용하여 자궁 경관의 변화에 대하여 관찰하였다.

자료의 통계처리

체중, 호르몬 검사 결과, 장기중량 측정 및 자궁의 영상분석 결과에서 얻어진 모든 자료들에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시하였고, 분산이 동질하면 one way ANOVA test를 실시하여 유의성이 관찰되면 Dunnett's *t*-test를 실시하였다. Levene's test 결과 분산이 이질적인 경우에는 rank-transformed data를 실시하였고, transformed data에 대한 Levene's test를 재실시하여 분산이 동질하면 one way ANOVA test를 실시하여 유의성이 관찰되면 Dunnett's *t*-test를 실시하였으며, 분산이 이질적이면 non-parametric ANOVA test를 실시하였고 그에 합당한 *t*-test 방법을 선정하여 통계학적 해석을 실시하였다.

결과 및 고찰

일반증상 및 사망률

대조군, 음성대조군 및 양성대조군에서는 관찰기간 동안 특이한 일반증상은 관찰되지 않았으나, 모든 파라벤 투여군에서 투여부위의 피하결절이나 부종을 나타냈고, 투여가 진행됨에 따라 용량이 높을수록 투여부위의 가피형성이나 탈모 등을 증상으로 발전하는 경향을 보였다 (Table 1). 관찰기간 동안 모든 시험 군에서 사망례는 발생하지 않았고 체중 및 사료와 음수 섭취량에 대하여 대조군 및 시험물질투여군간의 차이는 관찰되지 않았다 (data not shown).

질 개구 검사

질개구 검사를 실시하였으나, 모든 개체에서 질개구는 나타나지 않았다.

호르몬 측정

혈중 에트로젠 농도에서 대조군에 비해 음성대조군, 양성대조군, 에틸파라벤 62.5, 1000 mg/kg 투여군이 감소하였으며, 혈중 난포자극호르몬(FSH)농도와 혈중 황체형성호르몬(LH) 농도에서 대조군 및 시험물질투여군 간의 차이는 관찰되지 않았다 (Table 2).

장기중량 측정

생식기계를 제외한 절대장기중량에서 대조군 및 시험물질투여군 간의 차이는 관찰되지 않았으나, 생식기계의 절대장기중량에서는, 에틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군의 오른쪽 난소가 대조군에 비해 유의성있게 감소하였고, 자궁의 wet weight에서 양성대조군, 에틸파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 프로필 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 이소프로필 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 부틸 파라벤 250 mg/kg 투여군, 부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 62.5 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 250 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군에서 유의적으로 증가하였다.

또한 자궁의 blotted weight에서는 양성대조군, 에틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 프로필 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 이소프로필 파라벤 62.5 mg/kg 투여군, 이소프로필 파라벤 250 mg/kg 투여군, 이소프로필 파라벤 투여군 1,000 mg/kg 투여군, 부틸 파라벤 투여 250 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 62.5 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 250 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군과 부틸파라벤 250 mg/kg 투여군에서 각각 대조군에 비해 유의성있게 감소하였으며 흉선이 이소프로필 1,000 mg/kg 투여군이 대조군에 비해 유의성있게 감소하였

생식기계를 제외한 상대장기중량에서 간이 부틸파라벤 62.5 mg/kg 투여군과 부틸파라벤 250 mg/kg 투여군에서 각각 대조군에 비해 유의성있게 감소하였으며 흉선이 이소프로필 1,000 mg/kg 투여군이 대조군에 비해 유의성있게 감소하였

Table 1. Clinical signs

Test item	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Signs	Day after treatment			
				0	1	2	3
Vehicle	G1 0	6	No abnormalities detected	6	6	6	6
Dibutyl phthalate	G2 100	6	No abnormalities detected	6	6	6	6
17 α -Ethinylestradiol	G3 1	6	No abnormalities detected	6	6	6	6
Ethyl paraben	G4 62.5	6	No abnormalities detected	6	6	6	5
			Subcutaneous nodule in injection site	0	0	0	1
	G5 250	6	No abnormalities detected	6	5	0	0
			Subcutaneous nodule in injection site	0	1	5	6
			Edema on the injection site	0	0	2	0
	G6 1,000	6	No abnormalities detected	6	5	0	0
Subcutaneous nodule in injection site			0	0	6	6	
Edema on the injection site			0	2	5	0	
Scrub formation on the injection site			0	1	1	1	
Propyl paraben	G7 62.5	6	No abnormalities detected	6	5	6	6
			Subcutaneous nodule in injection site	0	1	0	0
	G8 250	6	No abnormalities detected	6	6	0	0
			Edema on the injection site	0	0	6	6
	G9 1,000	6	No abnormalities detected	6	6	0	0
			Subcutaneous nodule in injection site	0	0	6	6
Edema on the injection site			0	0	2	0	
Isopropyl paraben	G10 62.5	6	No abnormalities detected	6	6	6	6
			Subcutaneous nodule in injection site	0	0	0	0
	G11 250	6	No abnormalities detected	6	5	4	6
			Subcutaneous nodule in injection site	0	1	2	0
	G12 1,000	6	No abnormalities detected	6	0	0	0
			Subcutaneous nodule in injection site	0	6	6	6
Edema on the injection site			0	1	5	0	
Scrub formation on the injection site			0	0	0	2	
Aopecia on the injection site	0	0	1	1			
Butyl paraben	G13 62.5	6	No abnormalities detected	6	6	6	6
	G14 250	6	No abnormalities detected	6	6	3	2
			Subcutaneous nodule in injection site	0	0	3	4
			Scrub formation on the injection site	0	0	0	1
	G15 1,000	6	No abnormalities detected	6	0	0	0
Subcutaneous nodule in injection site			0	6	6	6	
Edema on the injection site			0	6	6	0	
Scrub formation on the injection site			0	0	1	1	
Aopecia on the injection site	0	2	2	4			
Isobutyl paraben	G16 62.5	6	No abnormalities detected	6	6	5	5
			Subcutaneous nodule in injection site	0	0	1	0
			Scrub formation on the injection site	0	0	0	1
	G17 250	6	No abnormalities detected	6	6	1	0
			Subcutaneous nodule in injection site	0	0	5	5
			Scrub formation on the injection site	0	0	0	1
			Aopecia on the injection site	0	0	0	1
			Soiled perineal region	0	0	1	1
	G18 1,000	6	No abnormalities detected	6	0	0	0
			Subcutaneous nodule in injection site	0	5	6	6
			Edema on the injection site	0	6	6	0
			Scrub formation on the injection site	0	1	3	3
Aopecia on the injection site	0	3	4	4			

Table 2. Serum hormone concentration

Test item	Group /Dose (mg/kg)		Hormone concentration		
			Estrogen (pg/mL)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)
Vehicle	G1	Mean	451.25	20.71	0.26
	0	S.D.	199.6	10.3	0.2
Dibutyl phthalate	G2	Mean	130.75**	14.83	0.19
	1	S.D.	50.8	7.3	0.0
17 α -Ethinylestradiol	G3	Mean	201.83*	5.51	0.00
	100	S.D.	77.2	0.0	0.0
Ethyl paraben	G4	Mean	155.40**	17.54	0.26
	62.5	S.D.	80.7	0.0	0.0
	G5	Mean	213.67	15.51	0.30
	250	S.D.	69.9	1.3	0.1
	G6	Mean	143.60***	5.29	0.10
	1,000	S.D.	77.1	2.3	0.0
Propyl paraben	G7	Mean	470.00	10.11	0.38
	62.5	S.D.	372.0	0.4	0.0
	G8	Mean	343.40	13.53	0.34
	250	S.D.	345.0	1.4	0.0
	G9	Mean	143.60	5.29	0.10
	1,000	S.D.	77.1	2.3	0.0
Isopropyl paraben	G10	Mean	181.33	0.00	0.00
	62.5	S.D.	116.0	0.0	0.0
	G11	Mean	453.40	13.80	0.65
	250	S.D.	312.6	0.0	0.0
	G12	Mean	195.00	7.82	0.16
	1,000	S.D.	0.0	1.4	0.1
Butyl paraben	G13	Mean	314.67	12.29	0.28
	62.5	S.D.	126.1	1.6	0.2
	G14	Mean	302.75	9.96	0.46
	250	S.D.	284.0	0.0	0.2
	G15	Mean	213.20	10.61	0.00
	1,000	S.D.	97.0	0.0	0.0
Isobutyl paraben	G16	Mean	239.17	0.00	0.00
	62.5	S.D.	119.1	0.0	0.0
	G17	Mean	164.50	8.43	0.18
	250	S.D.	67.2	2.4	0.1
	G18	Mean	154.50	12.00	0.31
	1,000	S.D.	133.6	11.0	0.2

Significant differences as compared with control(G1) : * p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

다. 또한 좌측 신장의 상대장기중량에서 부틸 파라벤 62.5 mg/kg 투여군이 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다. 생식기계의 상대장기중량에서 좌측 난소가 에틸파라벤

1,000 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성있게 증가하였고, 자궁의 wet weight에서 양성대조군, 에틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 프로필 파라벤 1,000 mg/kg 투여군,

Table 3-1. Absolute organ weights

Test item	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Spleen (g)	Liver (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Kidneys		Adrenals		
									Lt. (g)	Rt. (g)	Lt. (mg)	Rt. (mg)	
Vehicle	G1 0	6	Mean	46.98	1.41	0.29	2.28	0.17	0.28	0.34	0.33	6.30	6.85
			S.D.	7.3	0.1	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	0.1	3.2	3.1
Dibutylphthalate	G2 1	6	Mean	48.12	1.37	0.30	2.36	0.20	0.29	0.35	0.35	5.47	5.28
			S.D.	7.7	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.1	0.1	1.4	1.0
17 α -Ethinyles triadial	G3 100	6	Mean	46.91	1.44	0.27	2.20	0.15	0.28	0.32	0.33	5.95	5.42
			S.D.	5.0	0.1	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	1.3
Ethylparaben	G4 62.5	6	Mean	47.59	1.45	0.33	2.28	0.18	0.27	0.33	0.31	5.75	5.33
			S.D.	4.6	0.1	0.1	0.4	0.1	0.0	0.0	0.0	1.5	1.0
			Mean	48.29	1.37	0.31	2.32	0.17	0.29	0.32	0.33	5.25	4.52
Propylparaben	G7 62.5	6	Mean	48.13	1.45	0.29	2.03	0.17	0.28	0.33	0.33	7.73	7.28
			S.D.	3.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	1.4
			Mean	43.41	1.41	0.31	1.88	0.17	0.27	0.33	0.36	7.02	6.22
Isopropylparaben	G10 62.5	6	Mean	49.91	1.40	0.32	2.25	0.19	0.28	0.34	0.36	7.62	7.65
			S.D.	5.7	0.1	0.1	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	1.1	1.2
			Mean	48.09	1.45	0.30	2.15	0.18	0.28	0.32	0.34	7.25	7.25
Butylparaben	G13 62.5	6	Mean	47.88	1.45	0.32	2.03	0.17	0.28	0.31	0.32	6.15	7.57
			S.D.	5.7	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	1.7
			Mean	48.01	1.46	0.33	2.06	0.20	0.29	0.33	0.33	7.45	6.75
Isobutylparaben	G16 62.5	6	Mean	48.13	1.45	0.29	2.03	0.17	0.28	0.33	0.33	7.73	7.28
			S.D.	3.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	1.4
			Mean	43.41	1.41	0.31	1.88	0.17	0.27	0.33	0.36	7.02	6.22
Ethylparaben	G5 250	6	Mean	48.28	1.39	0.37	2.30	0.15	0.27	0.33	0.34	5.53	5.08
			S.D.	6.3	0.1	0.1	0.4	0.1	0.0	0.0	0.0	3.2	3.4
			Mean	46.30	1.43	0.34	2.02	0.15	0.28	0.32	0.33	6.92	7.05
Isobutylparaben	G17 250	6	Mean	43.41	1.41	0.31	1.88	0.17	0.27	0.33	0.36	7.02	6.22
			S.D.	6.9	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	1.6	1.6
			Mean	46.98	1.44	0.35	2.09	0.14	0.27	0.31	0.31	6.65	6.80
Isobutylparaben	G18 1,000	6	Mean	46.98	1.44	0.35	2.09	0.14	0.27	0.31	0.31	6.65	6.80
			S.D.	4.1	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.1

이소프로필 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 부틸 파라벤 250 mg/kg 투여군, 부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 62.5 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 250 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성있는 증가를 보였다. 자궁의 blotted weight에서는 양성대조군, 에틸파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 프로필 파라벤 투여군, 이소프로필 파라벤 250 mg/kg 투여군, 이소프로필 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 부틸파라벤 투여군 250 mg/kg 투여군, 부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 62.5 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 250 mg/kg 투여군 및 이소부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다 (Table 3-1, 3-2 and 4).

부검소견

양성대조군, 에틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 프로필 파라벤 1,000 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 62.5 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 250 mg/kg 투여군, 이소부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군에서만 자궁각의 확장소견(dilatation of uterus horn)이 관찰되었으며, 그 외 다른 시험물질 투여군의 경우 육안적으로 대조군과의 차이가 관찰되지 않았다 (Table 5).

조직병리학적 검사

양성대조군의 경우, 자궁 내막이 현저히 비후 되어 있고, 상피는 큰 원주상피(very large tall columnar epithelial cell)로 구성되어 있었으며, 세포질과 핵의 비율은 2이상(\geq

Table 3-2. Absolute organ weights

Test item	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Ovaries		Uterus		Vagina (mg)	
				Lt. (mg)	Rt. (mg)	Wet (mg)	Blotted (mg)		
Vehicle	G1	6	Mean	46.98	12.48	11.92	33.52	23.20	61.67
			S.D.	7.3	3.3	1.1	7.6	6.7	15.6
Dibutyl phthalate	G2	6	Mean	48.12	14.17	12.97	32.60	26.55	57.78
			S.D.	7.7	4.7	1.8	13.4	8.5	16.6
17 α -Ethinylestradiol	G3	6	Mean	46.91	12.62	12.52	152.35 ^{***}	100.40 ^{***}	76.48
			S.D.	5.0	3.7	2.6	37.9	6.9	35.3
Ethylparaben	G4	6	Mean	47.59	10.08	9.82	37.15	30.63	32.15
			S.D.	4.6	1.5	1.9	14.0	10.9	15.1
	G5	6	Mean	48.29	10.70	9.83	42.67	31.53	52.58
			S.D.	5.4	2.1	1.6	18.8	15.0	24.7
	G6	6	Mean	48.28	9.13	8.93 [*]	70.93 ^{**}	59.83 ^{***}	58.00
			S.D.	6.3	2.2	1.9	17.7	17.8	20.1
Propylparaben	G7	6	Mean	46.09	8.47	9.37	37.43	30.42	44.22
			S.D.	10.3	2.1	4.3	6.2	6.3	25.6
	G8	6	Mean	48.82	11.73	12.12	38.10	27.68	40.23
			S.D.	6.2	6.3	4.4	14.4	10.6	14.7
	G9	6	Mean	45.61	8.62	8.95	62.92 ^{***}	55.32 ^{***}	84.85
			S.D.	3.3	3.4	1.9	12.1	9.7	35.6
Isopropylparaben	G10	6	Mean	49.91	12.65	14.18	42.70	33.07 [*]	70.48
			S.D.	5.7	4.8	3.0	7.6	5.0	39.7
	G11	6	Mean	48.09	12.48	15.17	45.40	37.85 ^{**}	56.97
			S.D.	6.0	1.9	6.4	6.9	7.6	16.6
	G12	6	Mean	45.33	13.87	14.53	74.22 ^{***}	64.83 ^{***}	64.65
			S.D.	4.3	2.2	3.8	22.1	17.9	45.5
Butylparaben	G13	6	Mean	47.88	14.85	16.55	31.18	24.97	40.12
			S.D.	5.7	4.6	5.7	4.9	4.6	12.4
	G14	6	Mean	48.01	13.93	16.52	45.05 ^{**}	35.40 [*]	61.62
			S.D.	5.4	2.8	4.1	7.1	5.7	18.4
	G15	6	Mean	46.30	11.22	13.30	60.37 ^{***}	49.40 ^{**}	66.38
			S.D.	4.6	1.9	2.0	9.7	10.9	31.5
Isobutylparaben	G16	6	Mean	48.13	14.18	14.40	140.50 ^{***}	93.23 ^{***}	114.53
			S.D.	3.2	2.3	3.6	37.9	16.1	36.0
	G17	6	Mean	43.41	13.92	13.95	85.10 ^{**}	68.78 ^{***}	86.82
			S.D.	6.9	2.5	3.8	23.9	17.9	42.3
	G18	6	Mean	46.98	13.08	16.08	131.43 ^{***}	101.85 ^{***}	94.68
			S.D.	4.1	3.3	3.0	27.6	9.1	34.7

Significant differences as compared with control (G1) : * p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

2)이었다.

이소프로필 파라벤 및 부틸 파라벤의 경우 용량은 모두 1,000 mg/kg 용량에서만 중간크기의 높은 원주상피(medium high columnar)로 구성되어 있었고, 세포질과 핵의 비율은 1.5 정도로 양성대조군 보다는 다소 작게 관찰되었다. 그러나 이소부틸 파라벤 투여군의 경우 용량의존성은 관찰되지 않았으나, 6.25, 250 및 1,000 mg/kg의 모든 용량에서 큰 원주상피(very large tall columnar epithelial cell)로 구성되어 있었으며, 세포질과 핵의 비율은 2이상(≥ 2)이었다. 그 외, 음성대조군을 포함한 다른 시험물질 투여군의 자궁내막은 모두 작고 낮은 원주상피로서 대부분 세포질과 핵의 비율이 1 미만(< 1)이었다 (Table 6).

자궁의 영상분석

자궁의 영상분석에서 자궁직경(uterine diameter)에서 장축(major)은 대조군에 대해 유의성있는 증가, 에틸 파라벤 250 mg/kg 투여군이 유의성 있는 감소, 이소프로필 파라벤 62.5 mg/kg 투여군이 유의성 있는 감소 및 이소부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군이 유의성 있는 증가를 보였다.

자궁직경의 단축(minor axis)은 대조군에 대해 에틸파라벤 250 mg/kg 투여군이 유의성있는 감소, 이소프로필 파라벤 1,000 mg/kg 투여군이 유의성있는 증가, 이소부틸 파라벤 250 및 1,000 mg/kg 투여군이 유의성있는 증가를 보였다.

자궁벽두께(Uterine wall thickness)의 최대치(Maximum)에서 대조군에 대해 양성대조군이 유의성 있는 증가, 에틸 파라벤 250 mg/kg 투여군이 유의성 있는 감소를 보였다.

Table 4. Relative organ weights

Test item	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (%)	Spleen (%)	Liver (%)	Thymus (%)	Heart (%)	Kidneys		Adrenals			
									Lt. (%)	Rt. (%)	Lt. (%×1.000)	Rt. (%)		
Vehicle	G1	6	Mean	46.98	3.04	0.62	4.81	0.35	0.60	0.72	0.70	13.16	14.12	
			S.D.	7.3	0.3	0.1	0.4	0.1	0.0	0.0	0.1	5.1	4.1	
Di butyl phthalate	G2	6	Mean	48.12	2.90	0.63	4.86	0.42	0.60	0.72	0.73	11.36	11.09	
			S.D.	7.7	0.4	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	2.0	2.0	
17 α -Ethinylestradiol	G3	6	Mean	46.91	3.09	0.57	4.67	0.32	0.60	0.69	0.71	12.56	11.48	
			S.D.	5.0	0.2	0.0	0.4	0.1	0.0	0.1	0.0	2.4	2.0	
Ethyl paraben	G4	6	Mean	47.59	3.06	0.68	4.78	0.38	0.56	0.69	0.65	12.11	11.28	
			S.D.	62.5	4.6	0.3	0.1	0.5	0.1	0.0	0.1	0.0	2.8	2.2
	G5	6	Mean	48.29	2.86	0.65	4.79	0.34	0.60	0.67	0.67	10.91	9.43	
			S.D.	250	5.4	0.3	0.1	0.3	0.1	0.0	0.0	2.0	1.4	
Propyl paraben	G6	6	Mean	48.28	2.92	0.77	4.75	0.31	0.55	0.67	0.71	11.32	10.39	
			S.D.	1,000	6.3	0.4	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	6.3	6.7
	G7	6	Mean	46.09	3.25	0.70	5.14	0.40	0.65	0.72	0.72	10.54	10.30	
			S.D.	62.5	10.3	0.8	0.1	0.7	0.1	0.1	0.1	5.4	3.9	
Iso propyl paraben	G8	6	Mean	48.82	2.92	0.62	4.85	0.32	0.58	0.70	0.65	11.91	10.74	
			S.D.	250	6.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	1.1	2.8
	G9	6	Mean	45.61	3.08	0.68	4.50	0.44	0.57	0.70	0.71	11.68	10.80	
			S.D.	1,000	3.3	0.3	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	1.7	1.4	
Iso propyl paraben	G10	6	Mean	49.91	2.83	0.64	4.50	0.37	0.56	0.68	0.72	15.34	15.37	
			S.D.	62.5	5.7	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	2.1	1.9
	G11	6	Mean	48.09	3.04	0.62	4.44	0.37	0.58	0.67	0.71	15.19	15.13	
			S.D.	250	6.0	0.3	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	2.6	0.8	
Butyl paraben	G12	6	Mean	45.33	3.10	0.79	4.46	0.24**	0.62	0.71	0.72	17.22	16.27	
			S.D.	1,000	4.3	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	2.2
	G13	6	Mean	47.88	3.05	0.66	4.24**	0.36	0.57	0.65*	0.68	12.91	15.83	
			S.D.	62.5	5.7	0.3	0.1	0.3	0.0	0.0	0.1	3.6	3.1	
Butyl paraben	G14	6	Mean	48.01	3.06	0.68	4.27*	0.41	0.60	0.70	0.69	15.51	14.05	
			S.D.	250	5.4	0.3	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	2.0
	G15	6	Mean	46.30	3.13	0.73	4.37	0.32	0.61	0.69	0.71	14.94	15.24	
			S.D.	1,000	4.6	0.4	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	1.7	2.0	
Iso butyl paraben	G16	6	Mean	48.13	3.03	0.60	4.21	0.35	0.58	0.68	0.69	16.12	15.18	
			S.D.	62.5	3.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	2.2	3.1
	G17	6	Mean	43.41	3.31	0.72	4.41	0.41	0.61	0.79	0.86	16.79	14.17	
			S.D.	250	6.9	0.5	0.1	0.7	0.1	0.0	0.2	0.3	6.2	2.8
Iso butyl paraben	G18	6	Mean	46.98	3.07	0.75	4.44	0.30	0.58	0.66	0.66	14.17	14.48	
			S.D.	1,000	4.1	0.3	0.1	0.3	0.0	0.1	0.1	0.1	2.0	2.0

Significant differences as compared with control(G1) : * p<0.05 ** p<0.01

Table 5. Necropsy findings

Organ	Group	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
	Dose (mg/kg)	0	100	1	62.5	250	1,000	62.5	250	1,000
	Number of examined animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Uterus	No. of examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Not Remarkable	6	6	0	6	6	4	6	6	5
	Remarkable	0	0	6	0	0	2	0	0	1
	- Dilatation									
	minimal	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	mild	-	-	-	-	-	2	-	-	-
	moderate	-	-	6	-	-	-	-	-	-
Organ	Group	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18
	Dose (mg/kg)	62.5	250	1,000	62.5	250	1,000	62.5	250	1,000
	Number of examined animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Uterus	No. of examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Not Remarkable	6	6	6	6	6	6	0	3	0
	Remarkable	0	0	0	0	0	0	6	3	6
	- Dilatation									
	minimal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mild	-	-	-	-	-	-	-	3	-

Table 6. Histopathological findings

Group		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Tissues	Dose (mg/1mL/kg)	0	100	1	62.5	250	1,000
	Number of examined animals	6	6	6	6	6	6
Uterus	Epithelial cells, small, low columnar (≤ 1)	6	6	0	6	6	6
	Epithelial cells, medium, high columnar (> 1)	0	0	0	0	0	0
	Epithelial cells, medium, high columnar (≈ 1.5)	0	0	0	0	0	0
	Epithelial cells, very large, tall columnar (≥ 2)	0	0	6	0	0	0
Group		G7	G8	G9	G10	G11	G12
Tissues	Dose (mg/1mL/kg)	62.5	250	1,000	62.5	250	1,000
	Number of examined animals	6	6	6	6	6	6
Uterus	Epithelial cells, small, low columnar (≤ 1)	6	6	6	6	6	1
	Epithelial cells, medium, high columnar (> 1)	0	0	0	0	0	1
	Epithelial cells, medium, high columnar (≈ 1.5)	0	0	0	0	0	4
	Epithelial cells, very large, tall columnar (≥ 2)	0	0	0	0	0	0
Group		G13	G14	G15	G16	G17	G18
Tissues	Dose (mg/1mL/kg)	62.5	250	1,000	62.5	250	1,000
	Number of examined animals	6	6	6	6	6	6
Uterus	Epithelial cells, small, low columnar (≤ 1)	6	6	3	0	6	0
	Epithelial cells, medium, high columnar (> 1)	0	0	1	0	0	0
	Epithelial cells, medium, high columnar (≈ 1.5)	0	0	2	0	0	0
	Epithelial cells, very large, tall columnar (≥ 2)	0	0	0	6	0	6

Table 7. Image analysis of uterus

Test item	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Uterine diameter				Uterine wall thickness	
			Major axis		Minor axis		Maximum	Minimum
			Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Vehicle	G1 0	6	Mean	1,159.27	770.02	424.60	251.94	
			S.D.	174.70	124.77	93.35	173.88	
Dibutyl phthalate	G2 100	6	Mean	1,030.75	658.63	415.21	191.82*	
			S.D.	334.90	302.59	172.89	61.53	
17 α -Ethinylestradiol	G3 1	6	Mean	1,817.42***	1,110.76	568.21*	287.86***	
			S.D.	297.19	198.95	65.93	36.69	
Ethyl paraben	G4 62.5	6	Mean	1,105.97	743.72**	520.90	203.45	
			S.D.	471.49	356.66	259.83	88.47	
	250	6	Mean	820.02***	544.62	306.33**	142.11	
			S.D.	116.59	128.40	60.27	52.04	
	1,000	6	Mean	1,056.98	729.93	482.47	175.11	
			S.D.	134.29	126.53	193.55	49.75	
Propyl paraben	G4 62.5	6	Mean	1,038.95	638.78	392.89	160.89	
			S.D.	286.04	289.15	175.32	46.34	
	250	6	Mean	942.40	635.28	372.53	223.63	
			S.D.	140.18	156.29	75.88	195.53	
	1,000	6	Mean	1,109.45	1,397.67	508.64	202.40	
			S.D.	237.25	2,160.91	77.48	42.41	
Isopropyl paraben	G4 62.5	6	Mean	948.85**	723.66	414.33	221.00	
			S.D.	173.97	94.31	132.00	108.03	
	250	6	Mean	1,103.22	826.01	450.23	250.48	
			S.D.	140.25	114.94	105.07	62.58	
	1,000	6	Mean	1,208.98	962.04**	464.10	240.82	
			S.D.	132.45	157.90	91.19	47.93	
Butyl paraben	G4 62.5	6	Mean	1,068.30	655.42	367.58	190.86	
			S.D.	258.32	120.18	124.52	30.92	
	250	6	Mean	1,021.69	786.98	417.57	196.52	
			S.D.	165.63	156.03	53.63	71.74	
	1,000	6	Mean	1,170.45	840.50	415.53	228.51	
			S.D.	272.52	190.25	108.95	65.24	
Isobutyl paraben	G4 62.5	6	Mean	1,409.26	953.82	490.56	214.49	
			S.D.	362.16	191.61	93.30	48.61	
	250	6	Mean	1,416.83	1,116.52***	546.73	256.36	
			S.D.	369.30	233.70	150.32	94.73	
	1,000	6	Mean	1,629.74***	1,108.94***	528.23	231.95	
			S.D.	164.03	191.94	99.91	71.03	

Uterine diameter and uterine wall thickness was measured about uterine horn of left and right
 Significant differences as compared with control(G1) : * p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

자궁벽두께의 최소치(Minimum)에서는 대조군에 대해 음성 대조군 및 양성대조군이 유의성있는 증가를 보였으며, 대조군 및 시험물질 투여군간의 차이는 관찰되지 않았다 (Table 7).

분비계장애물질 평가사업 연구비에 의해 수행되었습니다 (KFDA-04132-EDS-311). 아울러, 2006년도 한국학술진흥재단의 지원에 의한 결과이며 이에 감사드립니다(KRF-005-E00076).

감사의 글

이 연구는 국립독성연구원/식품의약품안전청 2004년도 내

국문요약

본 시험은 암컷 랫드에 파라벤류(에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸)를 생후 19일령부터 21일령까지 3일간 투여하여 자궁비대반응을 관찰하고, 이를 토대로 시험물질의 내분비계 장애작용을 검색하고자 실시하였다. 본 시험의 투여기간 동안 사망은 발생하지 않았으나, 용량결정시험에서 관찰된 것과 같이 투여부위의 피하결절 및 부종의 증상이 관찰되었으며, 이러한 증상들은 용량의존적으로 증가되는 경향을 나타내었고, 점차 투여부위의 탈모 및 가피 형성 등의 과정을 거치면 발전되었다. 이러한 증상은 투여용량이 다소 낮은 음성대조군 및 양성대조군에서 발생하지 않아, 분말상태의 시험물질이 고용량으로 현탁되어 투여되며 생긴 물리적인 영향에 의한 것으로 사료되었으며, 시험물질의 에스트로겐성의 영향과는 무관한 것으로 사료되었다. 체중, 사료 및 음수섭취량에서 대조군과 시험물질간의 영향은 없는 것으로 판단되었다. 혈중 호르몬 농도에서 혈중 에스트로겐의 농도는 음성대조군, 양성대조군 및 에틸 파라벤 투여군에서 대조군에 비해 유의성있는 감소를 보였고, 이외의 시험물질에서 차이는 관찰되지 않았다. 또한, 혈중 난포자극 호르몬 및 혈중 황체형성 호르몬의 변화도 관찰되지 않아 파라벤류에 의한 혈중 에스트로겐, 난포자극 호르몬 및 황체형성 호르몬의 변화는 없는 것으로 사료되었다. 장기중량에서 생식기계를 제외한 장기에서 시험물질에 의한 영향은 없는 것으로 사료되었으며, 또한 난소 및 질의 중량에서 시험물질과 연관된 변화는 없는 것으로 판단되었다. 그러나 자궁의 wet weight 및 blotted weight에서는 각 시험물질군에서 대조군에 대해 증가가 관찰되었다. 이소부틸 파라벤 투여군은 모든 용량군이 자궁중량에서 유의성있는 증가를 보여 가장 에스트로겐성 영향이 큰 것으로 사료되었고, 250 및 1,000 mg/kg 투여군에서 유의성있는 증가를 보인 이소프로필 투여군이 그 다음으로 에스트로겐 영향이 큰 것으로 판단되었다. 부검결과, 자궁의 확장정도는 자궁의 중량에서 관찰된 바와 대부분 일치하였으며, 조직병리학적 검사를 통해 자궁상피세포를 관찰한 결과, 이소부틸 파라벤 투여군이 가장 높은 세포질과 핵의 비율을 나타내었으며, 이소프로필 파라벤 및 부틸 파라벤 1,000 mg/kg 투여군에서는 다소 작게 관찰되었다. 자궁의 영상분석결과, 대부분의 시험물질투여군에서 자궁직경의 장축 및 단축, 자궁벽의 최소 및 최대치에서 대조군에 대해 유의성있는 변화가 없거나 감소하는 경향을 나타냈으나, 이소부틸 파라벤 투여군의 경우에는 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과를 토대로, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 이소프로필 파라벤, 부틸 파라벤, 이소부틸 파라벤에서 자궁비대 반응이 관찰되어 파라벤류의 물질은 내분비 장애물질로서 검토되어야 할 것으로 사료되며, 이소부틸 파라벤이 가장 높은 에스트로겐성 영향을 주는 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Christian M.S., Hoberman A.M., Bachmann S. and Hellwig J. : Variability in the uterotrophic response assay (an *in vivo* estrogenic response assay) in untreated control and positive control (DES-DP, 2.5 microG, bid) wistar and Sprague Dawely rats. Drug chem. Toxicol. 1, 51-100 (1998)
2. Kang K.S., Kim H.S., Ryu D.Y., Che J.H. and Lee Y.S. : Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized
3. Yamasaki K., Sawaki M., Noda S. and Takatuki M. : Effect of Olive, Corn, Sesame or Peanut Oil in the Body Weights and Reproductive Organ Weights of Immature Male and Female Rats. Exp. Anim. 50(2), 173-177 (2001)
4. Koda T., Umezu T., Kamata R., Morohoshi K., Ohta T. and Morita M. : Uterotrophic effects of benzophenone derivatives and a *p*-hydroxybenzoate used in ultraviolet screens. Environ. uteritrophoc assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprague -Dawely rats. Toxicology Letters 118, 109-115 (2002)

- Res. 98(1), 40-45 (2005)
5. Seidlova-Wuttke D., Jarry H. and Wuttke W. : Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology* 205(1-2), 103-112 (2004)
 6. Gelbke H.P., Kayser M. and Poole A. : OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 205(1-2), 17-25 (2004)
 7. Yamasaki K., Noda S., Imatanaka N. and Yakabe Y. : Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicology Letters* 146, 111-120 (2004)
 8. Kim H.S., Shin J.H., Moon H.J., Kang I.H., Kim T.S., Kim I.Y., Seok J.H., Pyo M.Y. and Han S.Y. : Comparative estrogenic effects of *p*-nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. *Reproductive Toxicology* 16, 259-268 (2002)
 9. Oshi. S. : Effect of propyl paraben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1807-1813 (2002)
 10. Thigpen J.E., Haseman J.K., Saunders H., Locklear J., Caviness G, Grant M. and Forsythe D. : Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detection and Prevention* 26, 381-393 (2002)