

진보된 유해성 평가 기법과 내분비계 장애물질
(환경호르몬, Endocrine Disruptors)

한국 과학 기술 연구원

독성 연구실

류 재 천

Tel. : 02-958-5070

Fax. : 02-958-5059

E-mail : ryujc@kist.re.kr

A. 진보된 유해성 평가 기법

20세기에 들어 과학기술 및 산업의 눈부신 발달로, 인류는 경제 성장에 따른 전례 없는 풍요로움과 안락함, 편리함 등 많은 혜택을 누리오고 있다. 이러한 풍요로움과 안락함, 편리함을 위한 수단으로서 많은 화학물질들이 사용되게 되었고 필요에 따라 새로이 만들어지기도 하였다. 그러나 때로 인간이 인간을 위해 만들어낸 어떤 물질들이 예기치 못하게 인간의 생활 및 건강을 위협하기도 한다. 즉 화학물질에 의한 생활환경의 오염과 의약품, 농약 등에 의한 예기치 못한 건강 피해도 날로 심각하게 증가하고 있는 실정이다. 따라서 이와 같은 화학물질들의 독성을 평가하여, 우리 인간 및 인간이 살고 있는 생활 환경에서 화학물질의 안전성을 확보하는 것은 환경보존 뿐 아니라 인간 생존 차원 이상의 중요성을 갖는 문제라 하지 않을 수 없다.

우리는 금세기에 들어와 화학물질로 인해 인간에게 피해를 준 커다란 사건들을 잊을 수 없을 것이다. 예를 들어 1980년대 미국의 Dow Chemical사의 폐기물 매립에 의한 Love Channel사건, 인도에서 미국 Union Carbide사의 유독가스 누출에 의한 사건, 또 사용 후 한참 후에야 알려진 고엽제 즉 Agent orange의 피해사건들이 그 대표적인 예라 할 수 있다.

이와 같은 인간이 인간을 위해 창조해 낸 화학물질들이 인간을 때로 위협하고 환경을 오염시키는 문제점을 야기하자, 이에 불안을 느낀 우리 인류는 마침내 브라질의 리우 데자네이로에서 개최된 「환경과 개발에 관한 회의」에서 21세기 지구환경보존을 위한 환경과 개발에 관한 리우선언 (Adoption of Agreements on Environment and Development - The Rio Declaration on Environment and Development)을 채택하여 공표하기에 이르렀다.

이러한 리우선언을 통하여 보면 앞으로의 환경유해물질의 제조, 판매, 사용 등은 선진국, 개발도상국 및 후진국에 예외 없이 인류 공동체 의식으로서, 보다 철저한 감시 및 규제가 가해지리라 예상된다. 또한, 세계 각국 등은 자국 내에서 생산 유통되는 화학물질 등의 관리 감독을 보다 강화하여 개발과 보전의 비중을 똑같이 두어 쾌적한 환경의 조성 및 유지에 힘쓰고자 할 것이다.

이러한 세계적인 흐름 속에서 우리 나라의 경우를 살펴보면 60년, 70년대의 경제 성장 위주의 정책으로 눈부신 경제 성장을 이룩한 반면, 반대 급부적으로 극심한 환경오염이라는 것을 남겨놓게 되었다. 그러나 선진 외국은, 미국의 경우 EPA 등을 통해 자국 내에서 생산, 유통되는 화학물질들을 엄격하게 관리 감독하고 있으며, 유럽에서는 유럽공동체간의 관리규정을 제정 시행하고 있다. 또한 가까운 일본의 경우는 「화학물질의 심사 및 제조 등의 규제에 관한 법률」에 의해 신규 화학물질의 제조 수입에 대해서 사전

에 엄격한 조사를 통하여 안전성 평가를 하고 있다.

이와 같은 각국의 상황을 통하여 보며 유해화학물질의 안전성 평가는, 우리 주변 생활 환경의 보전뿐만 아니라 수출·입과도 관련이 있어 경제적인 측면에도 영향을 주며, 결국 이러한 규제 법률의 미비는 자국내의 공해 산업유치 및 유해화학물질의 범람이라는 엄청난 국민적인 피해를 감수해야하는 경우가 발생할 여지가 있다고 할 수 있다.

이에 우리 나라도 "유해 화학물질 관리법" 등 관련 법규를 제정하여 시행하고 있어 국민 복지 차원에서 쾌락한 복지 국가를 위한 걸음마를 차분히 시행하고 있으며 화학물질들의 안전성을 여러 측면에서 면밀하게 검토할 수 있는 제도적인 장치를 완비하여 국민 보건 향상을 "삶의 질" 차원에서 강력히 추진하고 있어 앞으로 크게 기대가 되고 있다.

화학물질 사용은 인류의 번영에 필연적이라 할 수 있다. 문제는 어떻게 안전성을 확보하여, 어떻게 인류에게 노출을 최소화하고 유해성을 경감시켜 국민의 건강을 지키고 보건을 향상시킬 수 있는가가 문제일 것이다. 자연에서 유래한 물질이건, 또는 인간이 인간의 필요성에 의해 만들어낸 화학물질이건 궁극적으로 이들의 섭취로 인해 야기될 수 있는 독성을 인간의 입장에서 주의 깊게 살피려는 일환으로 독성학이 태동되었고, 현재는 인간 뿐 아니라 자연환경에 미치는 독성까지를 커버하는 커다란 연구 영역으로 자리매김하고 있다.

이러한 화학물질들은 **인간에게 많은 이로움**을 주고 있는 것은 주지의 사실이나 최근에 사회적 문제가 되고 있는 환경호르몬 (Endocrine Disruptors)에서도 알 수 있듯이, 때로 인간의 의도와는 다르게 자연환경 오염 등을 통해 일부는 생태계 순환과정에서 장기간 잔류되거나 생물체에 농축되어 **인간과 인간의 삶을 공유하는 자연계**의 모든 생물에 많은 **해로움**을 주고 있는 것도 사실이다. 더욱이 국내 화학물질의 유통량과 종류는 경제 규모의 증가 및 소비수준의 상승 추세를 감안할 때 지속적으로 증가하게 될 것으로 전망되므로 생산, 유통, 사용 및 폐기 전과정에서 화학물질에 **노출될 위험성**은 날로 **증가**할 것이다. 이와 같은 위험성을 극복하기 위하여 여러 위해성 평가기술이 개발되어 OECD guideline for the testing of chemicals 등에 등재되어 과학 선진국들을 중심으로 사용되어 왔다. 또한 화학물질의 국가 간 이동이 빈번해지고 있어, 이들 화학물질의 독성 data가 국가간 상호 관심사로 부각되고 있고 무역 기술 장벽으로까지 대두되고 있어, 신속한 국가간의 화학물질 독성 data 구축을 위한 준비가 진행되고 있다. 이에 따라 **신속**하고 인체 영향에 대한 **정확**한 판단을 내릴 수 있는 **위해성 평가** 방법의 개발은 매우 절실하여, 최근에는 **분자생물학**의 발달에 힘입어 과학 선진국들을 중심으로 한 지금까지의 고전적인 위해성 평가 방법에서 벗어나 **세포와 유전자**를 활용한 **신속**하고 **정확**한 위해성 평가 기법의 새로운 paradigm이 활발히 **International harmonization** 되고 있다. 이러한

움직임은 최근에 표면화되어, 과학선진국들을 중심으로 1999년 3월 24-26일, 미국 Washington DC에서 OECD와 ICH guideline의 International Harmonization을 위한 IWGTP International workshop에서, 진보된 위해성 평가기법들, 예를 들면, Transgenic system, thymidine kinase forward gene mutation, single cell gel electrophoresis, DNA binding/adduct assay 등을 주제로 한 회의가 개최된 바 있고, 필자도 전문가로 초청되어 참가한 바 있다. 더불어 OECD guideline for the testing of chemicals의 변천과 ICH 과정을 고려하고, 특히 현재의 OECD의 Expert Committee에서 논의되고 있고, 과학 선진국들을 중심으로 활발히 International harmonization 되고 있는 여러 세포와 유전자 level의 진보된 위해성 평가 방법과 더 나아가 DNA microarray 기술을 이용한 첨단기법인 Toxicogenomics 연구 등, 최근의 국제적인 움직임에 부응하여 환경유해물질, 신농약, 의약 후보 물질은 물론 모든 화학물질의 안전성 확보를 위한 국가적인 차원의 첨단 전략기술로써 하루빨리 국내에 정립·보급하여야 한다.

우리가 흔히 독성평가의 OECD guideline으로 부르는 OECD guidelines for the testing of chemicals는 선진국들의 독성평가 방법의 체계화 및 객관화를 시켜주는 중요 guideline으로서 의약품, 화학물질들의 독성평가에 주요 지침서가 되고 있다. 이와 같은 OECD guideline의 변천 흐름과 개정을 위해 Expert Committee에서 논의되고 있는 Draft document를 중심으로 빠르게 변화되는 독성평가 방법의 흐름을 파악해 보고자 한다. OECD guideline의 경우 특히 분자생물학의 발전에 힘입은 분자독성학의 발전에 따라 급속한 변화를 볼 수 있다.

현재 새로운 독성평가 방법으로 눈부신 발전을 거듭해오는 주요 topic으로서는 cell level에서의 DNA strand breakage를 탐지할 수 있는 Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE assay) 일명 Comet Assay 또 ICH에서 현재의 고전적인 *in vitro* 염색체이상시험을 대체할 목적으로 Harmonization을 하고 있는 Mouse Lymphoma thymidine kinase gene Assay 등이 있다. ICH는 미국, EU, 일본이 삼국 (tripartite) 체제로 하여 각국의 정부와 그 나라 제약회사의 연합체인 제약협회가 중심이 되어 사람에게 사용하는 의약품 개발을 위한 여러 안전성 시험법들에 관한 통일된 guideline을 만들어 신약개발 기간, 비용 등을 절감하고자 하는 의도로 시작되었다. 제 1회 ICH 회의는 1991년 11월 벨지움의 브뤼셀에서 약 1200명이 참가하고 EC위원회 부위원장, 일본, 미국의 EC대사 등이 참석한 국제회의로 시작하였다. 그 이후로 제2회 ICH는 1993년 10월 미국 Florida에서 미국의 FDA장관 등이 출석하고 약 1600여명의 관계자들이 참석하여 회의를 가지며 국제적인 Harmonization을 하여왔다. 이와 같은 ICH에 관한 긍정적인 면도 있으나, 몇 가지 간과해서는 안되는 면들 또한 깊이 생각해야 할 것이다. ICH는 미국, EU, 일본의 삼국 (tripartite)을 주축으로 각 나라에서의 정부와 각국의 제약협회 즉 EU에서는 ①

European Commission-European Union (EU), ② European Federation of Pharmaceutical Industries Associations (EFPIA)가 참여하고, 일본에서는 ① Ministry of Health and Welfare, Japan (MHW), ② Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) 그리고 미국에서는 ① US Food and Drug Administration (FDA), ②Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA)가 중심이 되고 있고 observer로서는 WHO, EFTA (European Free Trade Area), Canada로 구성되어 있다. 그리고 ICH의 기획 입안, 의사 결정에 관한 협의체로 운영위원회를 두어 각 주최자로부터 2명의 위원을 두고 원칙적으로 6개월에 1회씩 열도록 되어 있으며, 나아가 실무적인 Harmonization을 위해 전문가위원회 (Expert Working Group)를 약 25분과로 나누어 각 시험에 관한 guideline을 작성하고 있고 이것도 원칙적으로 6개월에 1회씩 개최하는 것으로 되어 있다. 이 Expert Working Group의 전문가들은 거의 모든 실험법 작성에 깊이 관여하고 있고 그 전문가들은 적어도 그 분야에만 수십 년씩 종사해온 국제적으로도 알아주는 진정한 그 분야의 전문가들이 주축을 이루고 있다. 1995년 Yokohama에서 열린 ICH3의 Safety Symposium에서 주로 발표된 것을 살펴보면 최근의 분자생물학 (Molecular Biology)의 눈부신 진보를 고려하여, 그 결과로서 많은 Biotech 의약품들의 출현을 눈앞에 두고 있는 실정을 감안해서 Safety Studies for Biotechnological Products에 관한 Harmonization 결과가 발표되었고, 생식독성에 관한 Male Fertility Studies in Reproductive Toxicology, 그리고 많은 관심이 쏠린 발암성시험 (Carcinogenicity Study)에 관한 Harmonization, 특히 Use of Two Rodent Species 즉, 두 종의 시험 동물 사용에 관한 보고가 있었다. 발암성시험과 관련하여 빼놓을 수 없는 연구과제가 Genetic Toxicity에 관한 연구방법이라 하겠다. ICH3에서는 일본이 주축이 되어 Genetic Toxicity에 관한 Standard Battery Test를 구축하고 기존의 고전적인 연구방법에서 탈피하여 Molecular Biology 연구기법을 가미한 연구방법의 일환으로 Mouse Lymphoma Thymidine Kinase (TK) Gene Assay에 대한 Harmonization 연구결과를 Dr. Sofuni가 발표하기도 하였다. 나아가 발암성과 관련된 연구방법으로 Transgenic Animal의 사용도 많이 권장되고 있음을 알 수 있었다. 본인이 여러 번 기회 있을 때마다 언급하여 왔듯이 OECD를 비롯한 여러 독성 guideline에서 고전적인 독성평가기법들은 아주 빠르게, 많은 변화가 있으리라 믿고 있다. 특히 우리나라의 OECD 가입에 따라 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals도 현재 최신 정보에 의하면 많은 변화가 각 실험법에 대해, 분자독성학의 진보에 따라, 보완 또는 추가되고 있다는 점이다. 최근에는 분자생물학적 기법이 접목된 새로운 독성시험법이 개발되고 이들에 대하여 표준화 작업들이 ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Resistration of Pharmaceuticals for Human Use)와 OECD 등을 중심으로 이루어지고 있

다. 현재는 고전적인 안전성 평가 기법에 대하여 International Harmonization이 이루어지고 있으나, ICH 발족 후, 진보된 시험법으로 대체할 준비를 여러 첨단 과학기술기법을 적용하여 준비하고 있음이 분명하다. 이에 따라 본 연구팀에서는 국내의 counterpart로서 학문적인, 기술적인 접근을 하여 진보된 위해성 평가기법을 확립하여 국내에 전수 보급 시키고자 노력하여 여러 대학 및 연구기관에 기술을 전수 보급하여왔다. 특히 최근의 분자생물학의 발달로 분자독성학(Molecular Toxicology)의 연구기법이 활성화되면서 DNA 자체를 추출하지 않고도 DNA damage를 cell level에서 손쉽게 정량적으로 계산이 가능한 single cell gel electrophoresis, 또한 유전자를 활용하여 DNA 손상여부를 포유동물 세포나 포유동물 자체에서 측정할 수 있는 thymidine kinase gene forward mutation assay나 *lac I* gene을 target으로 개발된 Stratagene의 Big Blue와 *lac Z* gene을 target으로 개발된 Hazelton의 MutaMouse 와 같이 *lac I* 나 *lac Z* 유전자를 target gene으로 개발된 Transgenic mutagenesis system 등의 활용은 앞으로 화학물질의 발암성 예측 및 유전적인 손상여부를 아주 용이하게 검출해 낼 수 있는 매우 진보된 연구기법으로 과학 선진국을 중심으로 International Harmonization되고 있어 가까운 장래에 guideline에 등재될 가능성이 매우 큰 연구 기법이라 하겠다. 나아가 혈액 한 방울로, 동물을 죽이지 않고 측정할 수 있는 supravital *in vivo* micronucleus assay법, 더 나아가 *in vitro* cytokinesis blocking micronucleus assay가 개발되어 International Harmonization 되고 있다. 장기적으로 극미량 노출에 대한 유전적 손상 연구로서 지금 과학선진국에서는 Transgenic fish도 미국 NIEHS의 Dr. Burkhardt를 중심으로 개발 정립되고 있고, 그리고 염색체이상시험과 병행이 가능한 FISH (fluorescence *in situ* hybridization), PCR을 이용한 PRINS (primed *in situ* hybridization) 등과, microarray 기술을 이용한 DNA chip 나아가 Protein chip 등의 toxicogenomics, pharmacogenomics 연구 등 우리 나라도 고전적인 연구기법에서 하루 빨리 탈피하여 진보된 위해성 평가 기술의 확립 및 보급에 주력해야 하리라 사료된다.

여기서는, 본 연구실에서 수행하고 있는 진보된 유해성 평가 방법들과 재료를 소개하고, 본 연구실에서 수행한 연구 결과를 중심으로 소개하고자 하며, 실제 화학물질들의 안전성 확보를 위한 국제적인 시험 guideline과 화학물질의 유익성과 유해성 또 최근에 문제가 되고 있는 환경호르몬, 나아가 Human Genome Project 완성 후에 전개될 microarray 기술을 이용한 functional Genomics의 DNA chip, Protein chip 등에 대한 소개를 중심으로 고전적인 연구기법에서 벗어나 진보된 유해성 평가 기법의 확산을 통하여 화학물질 사용에 따른 안전성 확보 나아가 국민과 국가 차원의 보전에 이바지 하고자 한다.

I . Mouse Lymphoma L5178Y $tk^{+/-}$ (thymidine kinase) Gene forward mutation Assay (MOLY)

I -1. 서론

Mouse lymphoma *tk* gene assay (MOLY)는 mouse lymphoma 세포주를 이용한 *in vitro* mutagenicity를 연구하는 시험법으로써 그 유용성이 Clive등에 의해 1972년 처음으로 소개되었고, 그후 세포주의 개발과 시험법의 보완 등을 거쳐 민감도가 뛰어난 유전독성시험법으로 대두되고 있고, 현재 ICH를 중심으로 *in vitro* 염색체이상시험을 대체할 강력한 tool로서 international Harmonization 되고 있는 연구방법이다 (Clive *et al.*, 1987).

I -2. MOLY의 기본원리

이 MOLY의 기본적인 원리는 mouse lymphoma L5178Y $tk^{+/-}$ -3.7.2C cell line을 이용하며, 11번 염색체 내에 heterozygote로 존재하는 thymidine kinase gene($tk^{+/-}$)의 tk^{-} homozygote로의 mutation을 인식할 수 있는 시험체계를 지닌다.

MOLY법의 원리는 thymidine kinase의 역할에 있다. thymidine kinase는 DNA의 생합성시 전구체로 필요한 thymidine monophosphate(TMP)를 만들기위한 thymidine의 인산화에 관여하는 효소로서 세포 내에서 TMP를 합성하는 과정은 Fig. 1에서 보여지는 바와 같이 *de novo* synthesis와 salvage pathways에 의한 두 가지 경로에 의해 합성될 수 있다.

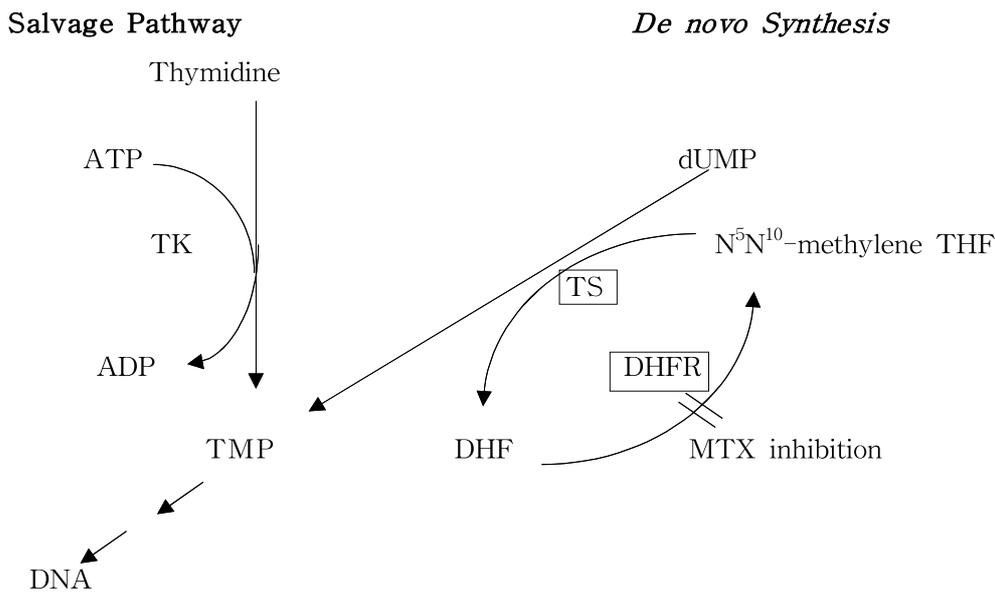


Fig. 1. Biosynthetic pathway of thymidine monophosphate

TK : thymidine kinase, TMP : thymidine monophosphate, DHFR : dihydrofolate reductase,
TS : thymidylate synthase, dUMP : deoxyuridine monophosphate, DHF : dihydrofolate,
N⁵, N¹⁰-methylene THF : N⁵, N¹⁰-methylenetetrahydrofolate, MTX : methotrexate

MOLY는 *de novo* synthesis에 의해서만 TMP를 합성하여 생존할 수 있는 *tk*⁻ mutant 세포를 정상 두 pathway를 통하여 TMP를 합성할 수 있는 *tk*^{+/+} 세포로부터 detection 하는 시험체계를 지닌다. 따라서 어떤 시험물질의 mutagenicity를 평가하기 위한 본실험을 시작하기 전에 L5178Y cell에 *de novo* synthesis를 저해하도록 methotrexate (MTX)를 처리해줌으로써 자연돌연변이에 의해 형성될 수 있는 *tk*⁻의 homozygotes는 생존할 수 없도록 하여 *tk*^{+/+}의 heterozygote만을 선택한 후 본실험을 실시한다. L5178Y *tk*^{+/+} 세포주에 시험물질을 처리함으로써 *tk*⁻ homozygotes로 돌연변이가 유도된 세포는 trifluorothymidine (TFT)를 배양액에 처리함으로써 선택되어진다. 세포내에서 TFT는 *tk*에 대한 기질로 사용되어 인산화되어 TFT-monophosphate (TFTMP)를 생성하게되고 이 산물은 세포의 생존을 방해하여 치사하도록 유도한다(Fig. 2). 따라서 돌연변이가 유도되지 않은 *tk*^{+/+} heterozygotes들은 생존하지 못하고, thymidine kinase를 합성할 수 없는 *tk*⁻ homozygotes는 *de novo* synthesis에 의해 TMP를 합성하며 생존하게된다.

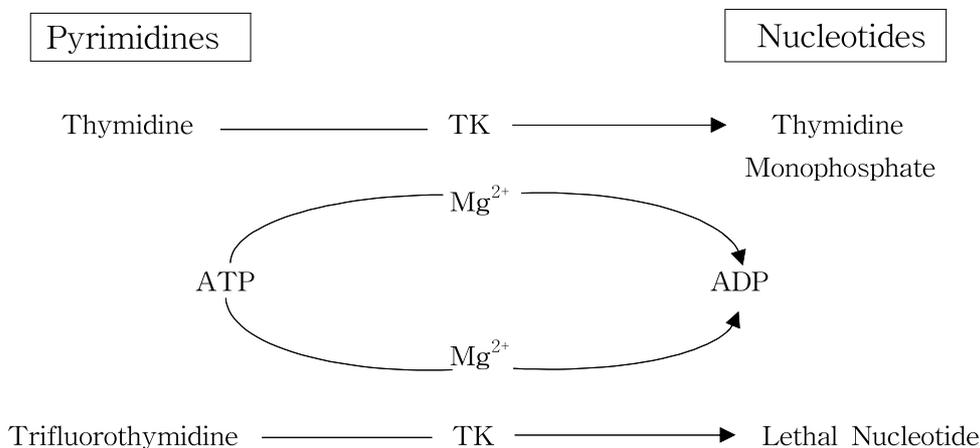


Fig. 2. The enzymatic role of thymidine kinase.

I -3. MOLY의 장점

MOLY는 *tk* gene내의 또는 *tk* gene을 포함하는 11번 chromosome내에서 발생하는 넓은 범위의 유전적 변화를 인식할 수 있다는 장점을 지닌다. 즉, 기존의 변이원성시험으로 널리 이용되어오고있는 박테리아 복귀돌연변이 시험법인 Ames test가 point mutation, frameshift mutation 등의 하나 또는 수개의 base 정도의 작은 유전적변이만을 인식할 수 있고, 포유동물세포를 이용한 염색체 이상시험이 염색체 수준에서의 large scale의 구조적, 수적 이상만을 인식할 수 있다는 데 반해, MOLY는 두 가지 모두를 인식할 수 있으므로 인해 두 시험법을 동시에 보완할 수 있다는 것이다 (Gorelick, 1995; Toyokuni et.al., 1995). 즉, MOLY는 *tk* gene내부의 point mutation, *tk* gene 전체의 deletion, 11번

염색체 전체의 deletion, 또한 *tk* gene을 포함하는 유전자 재조합 등에 의해서 유도된 *tk*^{-/-} cells을 인식할 수 있는 훌륭한 실험방법으로 대두되고 있다.

I-4. MOLY의 활용가능성

MOLY는 유전적변이의 양상에 따라 L5178Y *tk*^{+/-} 세포의 성장에 있어서 두 가지 형태의 mutant type을 볼 수 있다. 즉, *tk* gene 내부의 small scale의 변화에 대해서는 정상적인 성장을 보이는 large colony mutants를 형성하게 되고, *tk* gene과 함께 염색체 11번 내의 large scale의 손상의 경우에는 성장에도 영향을 미치게되어 slow growth로 인한 small colony mutants를 형성하게 된다 (Applegate *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1985). 따라서 환경유해물질에 대한 MOLY의 수행결과에 대한 mutant type을 분석함에 따라 환경유해물질이 유도하는 mutation의 특성을 예측할 수 있다 (Fig. 3).

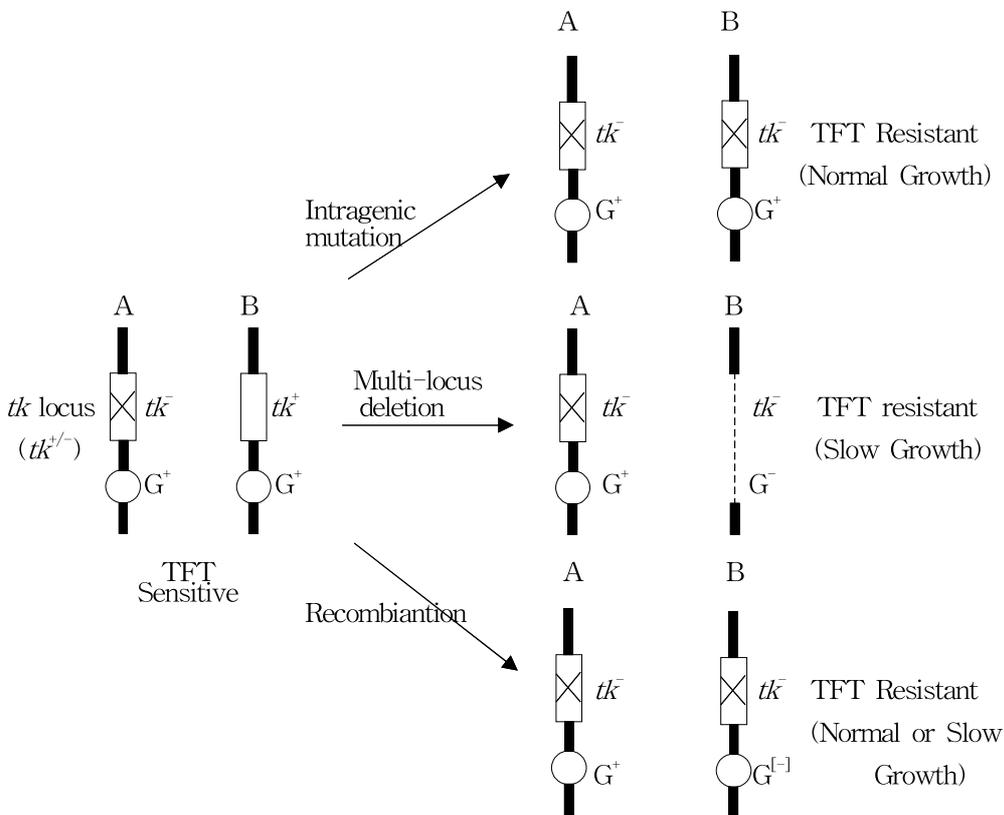


Fig. 3. Genetic mutations in thymidine kinase gene and 11 chromosome, and growth patterns of L5178Y *tk*^{+/-} cells.

MOLY는 과거에 soft agar 배지상에서 mutant cell이 clone되는 방법(agar assay)이 이용되어왔으나, Cole(1986) 등에 의해 96-microwell을 이용한 cloning 법(microtiter assay)이 개발되어 (Clements, 1990) 최근에는 microtiter assay 법에 따라 수행하고 있다.

MOLY의 결과처리는 UKEMS (United Kingdom Environmental Mutagen Society)에서 Guideline (Robinson *et al.*, 1990)을 제시하고 있는데, microtiter assay에 있어서 UKEMS Guideline을 바탕으로 한 통계처리 software package가 영국의 Hazleton사에서 개발된 Mutant V2.34으로 제공되어 유용하게 이용되고 있어 앞으로 환경유해물질의 검색 및 통계처리에 유용하게 제공될수 있으리라 사료된다.

II. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay)

II-1. 서론

인류에 있어 어떤 화학물질에의 폭로를 신속, 정확하게 감지하고 정량화 하는 것은 외부물질에 대한 인간의 생물학적 반응과 화학물질의 특성을 이해하는데 중요한 일이라 할 수 있다. 특히 대부분의 암 유발 원이나 독성물질들은 특정기관에 작용하기 때문에 각각의 세포수준에서 DNA 손상을 감지 할 수 있는 기술을 개발하는 것은 중요한 과제이었고 지금까지 여러 원인에 의해 유발되는 DNA 손상들을 탐지해내기 위한 노력으로써 많은 연구 방법들이 개발되어 왔다.

SCGE(single cell gel electrophoresis) assay, 일명 comet assay는 처음 Ostling and Johanson(1984)에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA손상을 직접확인 하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis방법으로 N.P. Singh(1988)에 의해 보다 민감하게 damage를 감지 해낼 수 있는 방법으로 발전되었다. 이와 같이 세포 level에서의 DNA damage를 측정 할 수 있는 single cell gel electrophoresis(Singh, N.P., 1988)는 방법적인 면에 있어서 간단히 눈으로 그 손상정도를 쉽게 볼 수 있어 세포질 유전에 관한 assay중 각각의 세포수준으로 결과를 얻을 수 있는 고유한 방법으로 최근 몇 년 사이에 과학선진국에서는 널리 쓰이고 있으며 최근에는 OECD guideline으로 도입하기 위한 International workshop 개최는 물론 전문가들이 구체적인 Harmonization을 진행 중에 있다.

II-2. SCGE assay 의 원리

세포 핵 안에 존재하는 DNA는 supercoiled되어 tight하게 모여있다. 여기에 high salt로 lysis 과정을 거치면 핵단백질이 빠져나가게 되어 핵 모양을 지니면서 내부에 DNA를 포함하는 nucleoid가 된다. 이때 핵은 supercoiled가 완화된 open loop 구조들이 일련의 higher order 구조들 이루고 있게 된다. 이때 nucleoid 내에 strand breakage가 있는 경우 alkali상태에서 DNA 염기쌍이 분리되면서 DNA 가닥이 서로 분리되어 molecule의 양쪽 끝이 서로 풀리게 되면서 구조가 변형되어 supercoiling 상태가 완화되면서 결과적

으로 DNA의 구조가 relax되고 음극이 외부로 노출되어 전기영동시 양극 쪽으로 이동되어 원래구조로부터 확정된 tail의 형태를 보임으로써 gel electrophoresis에 의해 쉽게 감지될 수 있다(Mckelvey-Martin V.J. et al., 1993). 상해를 입은 세포는 밝은 형광을 나타내는 head 부분과 tail로써 나타나게 되고 손상을 받지 않은 세포는 완전한 형태로 head만을 보이게 된다. 처리물질에 의한 손상정도는 tail의 형광 강도 즉 DNA양과 관련이 있으며 특정 처리 물질과 세포의 종류에 따라 실험시 tail의 길이가 처리 물질의 농도가 증가함에 따라 증가되는 것이 아니고 일정길이까지 진행되면 더 이상 진행되지 않기 때문에 tail에 존재하는 DNA 양을 측정하는 것이 오히려 손상을 측정하는 데는 보다 정확한 방법이라고 할 수 있겠다. 이에 따라 대부분 실험실에서는 data 분석 시 computer software에서 image를 분석하여 비교 가능한 data로서 tail 내의 DNA content를 포함하는 parameter로 tail moment를 주로 사용하고 있으며 tail length와 병기하고 있다.

II-3. SCGE assay의 장점

SCGE는 Nucleoid sedimentation(Cook, P.R. and I. A. Brazell, 1976)과 halo assay (Rotti J. L. and W. D. wright, 1987) 같은 다른 방법들을 적용하여 alkaline상태를 만들어 줌으로써 단일 가닥 DNA손상을 보다 명확하게 만들어 주었고 실제로 nucleoid sedimentation 이나 alkaline elution만큼 민감한 방법으로 소수의 strand breakage를 나타내 줄 수 있는 것으로 평가되고 있다. 이제까지 연구된 바로는 pH가 중성인 경우는 double strand breakage를, alkali인 경우는 single strand breakage 의 형성을 감지 할 수 있는데 많은 물질들이 5-2000배정도 double strand breakage보다는 single strand breakage를 유발하기 때문에 DNA손상을 감지하는데 alkali 의 경우가 더욱 민감한 방법이라는 보고가 있으나(Singh, N.P. et al.,1988) 실험 목적에 따라 적절한 방법을 선택하여야 한다. 실험과정은 data 분석까지 하루에 끝낼 수 있어 간단하며, 손상을 단일세포수준에서 정량이 가능하므로 적은 sample의 양으로도 실험이 가능하며 형광염색에 의해 눈으로 직접 확인 할 수 있다는 여러 장점이 있다.

II-4. SCGE의 이용과 활용가능성

Comet assay는 빠른 시간 내에 간편하게 세포수준에서 data를 얻을 수 있어 DNA손상을 유발할 수 있는 물질에 대해 subpopulation에서 저항성이나 민감도를 측정해 볼 수 있고, 적은 수의 세포에서 실험가능하고 DNA손상을 감지하는데 민감하여 10^9 dalton 당 0.1 DNA breakage를 감지 할 수 있는 매우 유용한 장점을 가지고 있다. Cell cycle position에 영향을 받지 않는 것으로 보고되어 asynchronous로 배양된 세포에 적용가능

하고 세포주기 stage가 동일할 필요가 없는 primary 세포에서도 적용가능하며 장비면에서도 다른 short term test에 요구되는 것보다 훨씬 적다는 장점을 지녀 최근 몇 년간 comet assay를 통해 DNA상해를 본 논문들이 과학 선진국을 중심으로 급격하게 증가되고 있다(Fairbairn D. W. et al., 1995).

이와 같이 본 SCGE assay는 간편하고 신속하게 다양한 재료들을 가지고 곧바로 DNA 손상 여부를 cell level에서 감지 할 수 있어 매우 유용한 연구 방법으로 자리 매김을 할 것이고 현재 *in vivo* comet assay가 널리 시도되어 발표되고 있어, *in vivo* DNA damage 측정에도 널리 사용될 것으로 시도된다.

III. *in vivo* Acridine Orange Supravital Staining Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Reticulocytes

III-1. 서 론

포유동물인 mouse를 이용한 설치류의 골수내 다염성적혈구(polychromatic erythrocytes, PCE)를 이용한 소핵시험(micronucleus assay)이 1975년 Schmid에 의해 개발되어 소개된 이후, 화학물질등의 변이원성을 평가하는 *in vivo* 시험법으로 전세계적으로 활용되어 오고 있다.

III-2. 소핵시험법의 발달

소핵시험은 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체성분인 소핵(micronuclei)의 유도를 지표로하는 cytogenetic 시험법으로서 소핵(micronuclei)은, Fig. 4에서 볼 수 있듯이 유핵의 적혈구 모세포로부터 무염성적혈구를 target으로 하여 소핵을 함유한 다염성 적혈구의 출현빈도로서 변이원성을 판정하였다. 그러나 실제 광학 현미경 하에서의 Giemsa 염색에 의한 소핵의 구별, 골수세포 사용할 때의 번거로움, 또 골수 채취를 위해 실험동물의 도살, 숙련된 관찰을 위한 장기간의 훈련등 많은 단점을 내포하고 있는 것이 현실이다.

이와 같이 골수세포를 이용한 Giemsa 염색에 의한 소핵시험법의 단점을 보완하고자, 최근 소핵시험에 있어서 골수세포 대신 말초혈액을 이용한 시험법이 1980년 MacGregor 등에 의해 소개되었으나, 미성숙적혈구의 수가 적은 것과 기존의 Giemsa 염색법으로는 미성숙적혈구와 성숙적혈구의 구분이 쉽지 않은 이유로 널리 사용되지 못하였다. 그러나 최근 Hayashi등(1990)에 의해 말초혈액 내의 망상적혈구(reticulocyte)를 target으로 하여 acridine orange로 형광염색하는 초생체염색법(Supravital Staining Method)이 소개되고,

이 시험법의 개발은 기존의 골수내 다염성적혈구의 Giemsa 염색을 통한 소핵시험이 지니고 있는 여러 가지 문제점을 보완해 주며, 골수세포 대신 말초 혈액세포의 대치 유용성이 실험적 검증을 통하여 입증되었다.

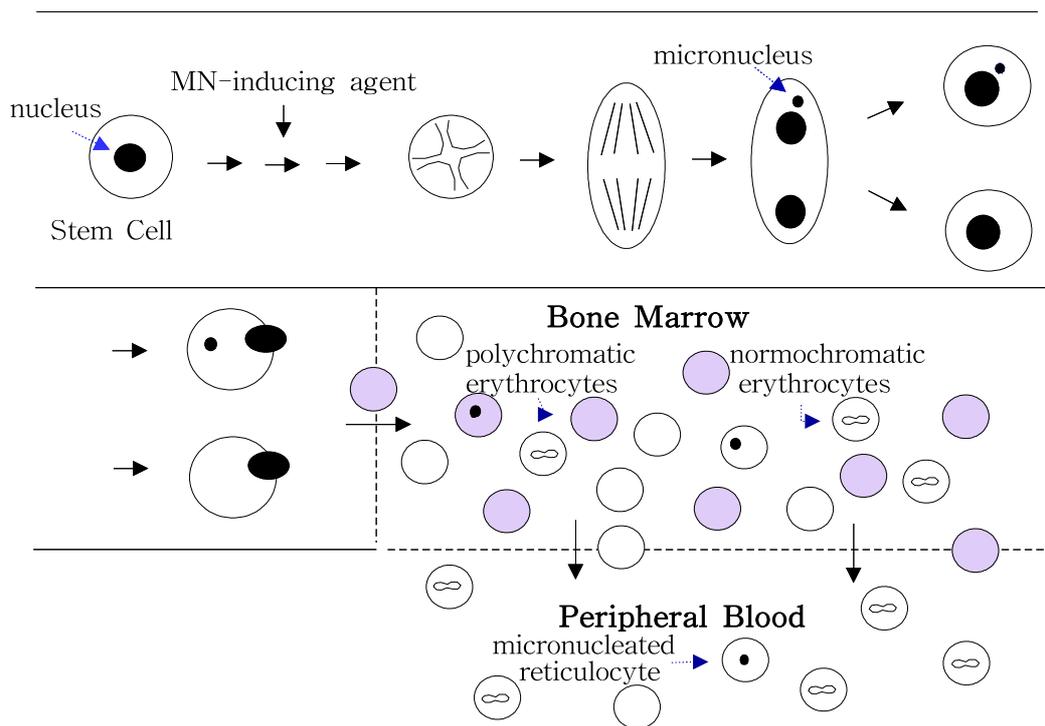


Fig. 4. Micronucleus formation in erythropoiesis

III-3. 소핵시험법의 기본원리

말초혈액내의 망상적혈구는 무핵의 미성숙 적혈구로서 성숙단계에 따라 세포내 RNA 함량에 의해 Fig. 5에서와 같이 acridine orange 형광 염색시 Type I, II, III, IV의 4가지 형태로 구분될 수 있다. 이들은 분화과정에서 핵이 소실되었기 때문에 정상적인 핵은 지니지 않으며, 그러나 분화과정 중 변이원성 물질과 같은 소핵유도물질에 의해 형성된 소핵은 핵소멸시에도 제거되지 않고 적혈구 형성과정에 그대로 존재하게 되어 망상적혈구 내에 연녹색으로 관찰되어진다.

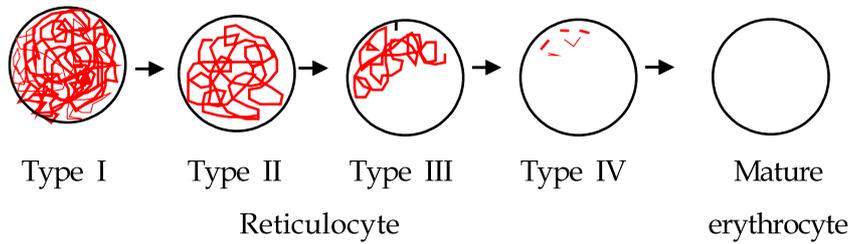


Fig. 5. The types of reticulocyte in erythropoiesis

말초혈액을 이용한 supravital staining에 의한 소핵시험은 Type I, II, III의 망상적혈구를 계수하며, 이들 중 소핵을 함유하는 망상적혈구(micronucleated reticulocyte)의 빈도를 계수하여 Cochran Armitage법에 의한 통계처리로 유의성을 평가한다.

III-4. 소핵시험법의 장점

기존의 골수내 다염성적혈구를 통한 Giemsa 염색법의 문제점들은 지방과립, RNA 과립, 비만세포의 파괴로 형성된 과립 등이 소핵과 유사하게 염색이 되어 구분이 어렵다는 것과 관찰자마다 주관적인 차이가 있다는 것이다. 또한 실험동물의 대퇴골로부터 골수를 채취하기 위해 동물을 도살해야만 한다는 것, 또 이로 인해 동일한 개체 내에서의 시간에 따른 적정 소핵 유도시간의 결정이 불가능하다는 것이다.

그러나, 말초혈액내의 망상적혈구의 acridine orange 형광염색 시에는, 소핵과 artifacts의 구별이 분명하다는 큰 장점을 지닌다. DNA 성분인 소핵은 acridine orange와 결합하며 520nm 파장의 황록색의 형광을 발하고, RNA와 결합하게 되면 590nm의 적색형광을 발하게 된다. 또한 Giemsa 염색시 소핵과 유사하게 염색이 되는 지방과립이나 mucopolysaccharides 성분은 적색의 형광을 발하게 됨으로써 소핵과의 식별이 본 방법에서는 분명하다는 장점이 있다.

말초혈액을 이용한 초생체 염색법의 또 다른 장점으로서 cell population이 일정하고 규칙적이어서 관찰이 쉽고 빠르며, 또한 실험동물을 도살하지 않고 혈액을 반복적으로 채혈할 수 있기 때문에, 예비실험을 별도로 하지 않고도 동일 개체 내에서 최적 소핵유도 시간을 결정할 수 있다는 것이다.

III-5. 소핵시험법의 활용가능성

초생체 염색법은 실험동물을 죽이지 않고 소량의 혈액만을 필요로 하기 때문에 다른 독성학이나 약리대사 등의 실험과 병행하여 할 수 있다는 장점을 지닌다. 즉 앞서 언급

한 transgenic mouse를 이용한 독성 발현기전 연구와 본 소핵시험의 병행이 가능하다는 것이다. 이처럼 기존의 골수내 다염성적혈구의 Giemsa 염색에 의한 소핵시험의 단점들을 말초혈을 이용한 supravital staining법으로 극복할 수 있을 뿐아니라 여러 가지 장점들을 지니므로, 이 시험법에 대해 *in vivo* 실험법으로써 뿐 아니라, 국제적으로도 International Harmonization이 이루어지고 있다.

IV. Cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei

1. 서론

In vitro mutagen/carcinogen-screening 실험방법은 잘 확립되어 있어 일반적으로 신속한 결과를 얻을 수 있다.

동물을 사용한 안전성과 비교하여 보다 짧은 기간이 소요되는 이런 시험법들은 비교적 신속한 결과를 제공하며 경제적으로 저렴하다고 할 수 있다. 짧은 기간이 소요되는 *in vitro* mammalian cytogenetic assay들 가운데, 염색체이상 시험법이 널리 이용되어지고 있다(Preston et al., 1981; Thompson, 1986; Ishidate et al., 1988). 최근 몇 년간, 염색체 이상을 탐지하는 포유동물 세포 배양에서 새로운 시험 기법을 확립하고 발전시키기 위한 노력을 기울여 왔다. 이들 중 Mutagens와 carcinogens에 의해 야기되어지는 염색체 이상을 탐지하기 위한 *in vitro* 소핵 시험법은 이런 과정 중의 하나이다. 소핵 시험법은 환경물질에 의해 야기되는 염색체 절단 및 spindle dysfunction의 평가를 위한 신속하고, 저렴하며 노동집약적 실험법이라고 할 수 있다.

2. 연구배경

Mutagenic carcinogens에 의한 염색체 이상을 측정하기 위한 소핵의 유도는 *in vivo* bone marrow assay에서 광범위하게 발전되고 연구되어져 왔다 (Heddle et al., 1983; Ashby, 1986). *In vivo* bone marrow micronucleus assay의 단점은 실험에 사용되는 agent 또는 대사산물이 항상 bone marrow에 도달하는 것은 아닐 수 있다 (Heddle et al., 1983). 배양된 세포를 사용하는 실험은 세포가 시험물질에 직접적으로 더 고르게 노출되기 때문에 이러한 문제들을 피할 수 있다. 그러나 분열 중간기에 있는 세포 (interphase cell)에서는 *in vitro* mammalian micronucleus assay를 이용하는 연구는 지금까지는 별로 없었다 (Heddle et al., 1983; Lasne et al., 1984; Dunn et al., 1987). Fenech and Morley (1985)는 *in vitro* 소핵 시험법으로써 human lymphocyte에서 cytokinesis-block 방법을 확립하였다.

3. 원리

이 방법은 actin의 polymerization에서 작용하는 cytochalasin B (CYB)를 이용하여 cytokinesis를 block 함으로서 나누어진 핵의 분화를 식별하는데 기초를 두고 있다. Cytochalasin B는 그 자체가 염색체 이상을 유발하지 않으며, 이 약물을 이용한 소핵의 분석은 1차 분열 진행이 멈추어 있는 binucleated cell들로부터 확인할 수 있다(Wakata and Sasaki, 1987). 현재까지 V79 Chinese hamster lung cell line을 이용한 시험법이 발전되어 왔다. 이 cell line을 배양함으로써 특별한 locus mutation, sister-chromatid exchange 그리고 chromosomal aberration의 분석에까지 널리 사용되어지고 있다 (Bradley et al., 1981; Hsie and Schenley, 1983; Kaina, 1985; Lake et al., 1982; Latt et al., 1981; Lasne et al., 1984; Nishi et al., 1984). V79 Chinese hamster cell line에서 in vitro 소핵 시험법에 대한 cytokinesis-block method의 확립은 동일한 cell line에서 분석되어지는 다양한 유전적 최종산물 (genetic endpoint)들을 비교하는 데에 도움을 줄 것이며, 염색체 이상과 spindle dysfunction을 야기하는 물질을 신속히 탐지하는 일반적인 선별법과 염색체이상에 대한 메카니즘을 연구하는데 이용되어질 것이다.

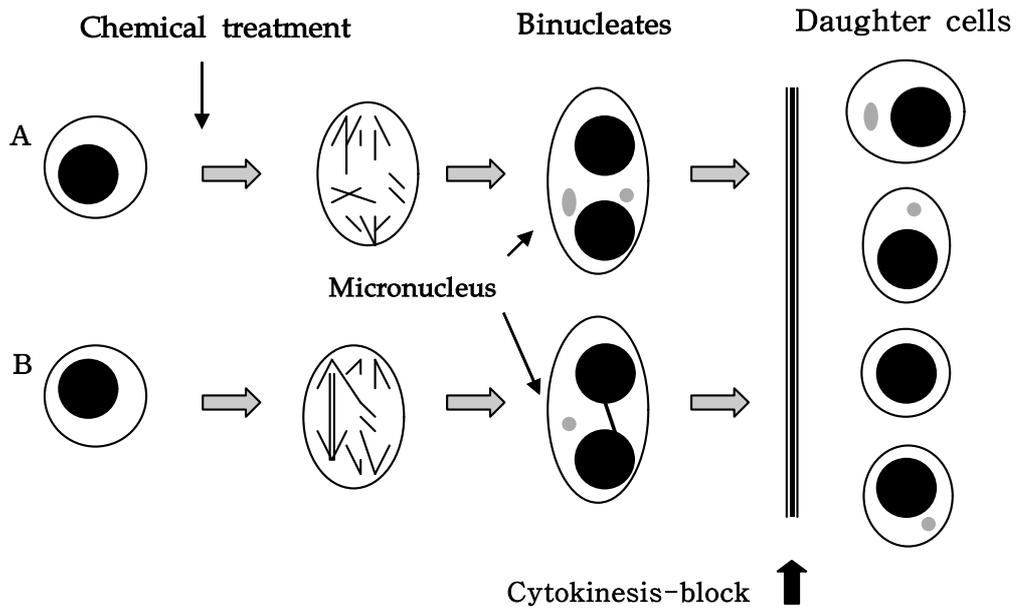


Fig 1. Schematic diagram illustrating the origin of micronuclei from acentric fragment and lagging whole chromosome in a dividing cell (A) and the origin of nucleoplasmic bridges from dicentric bridges in a binucleated cell (B).

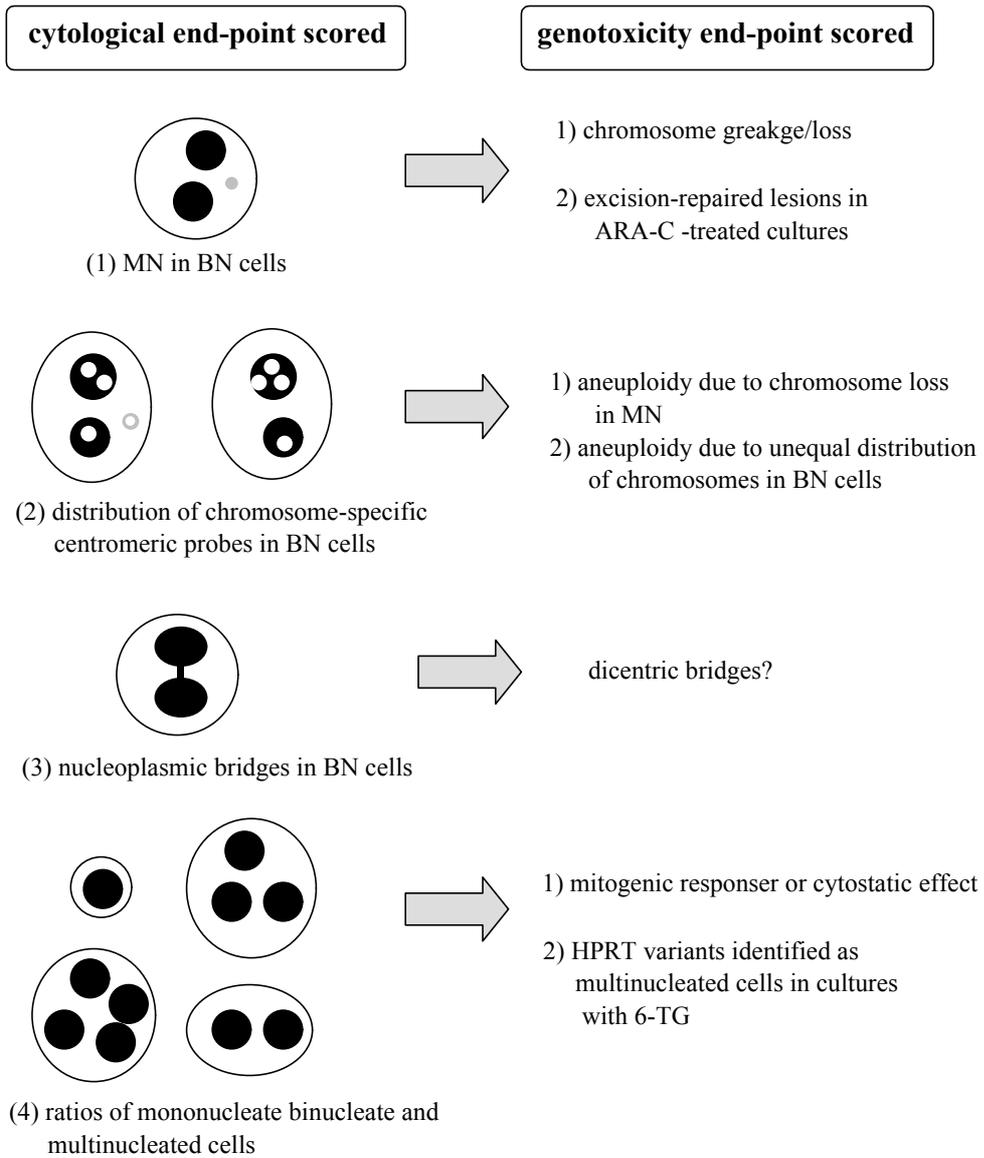
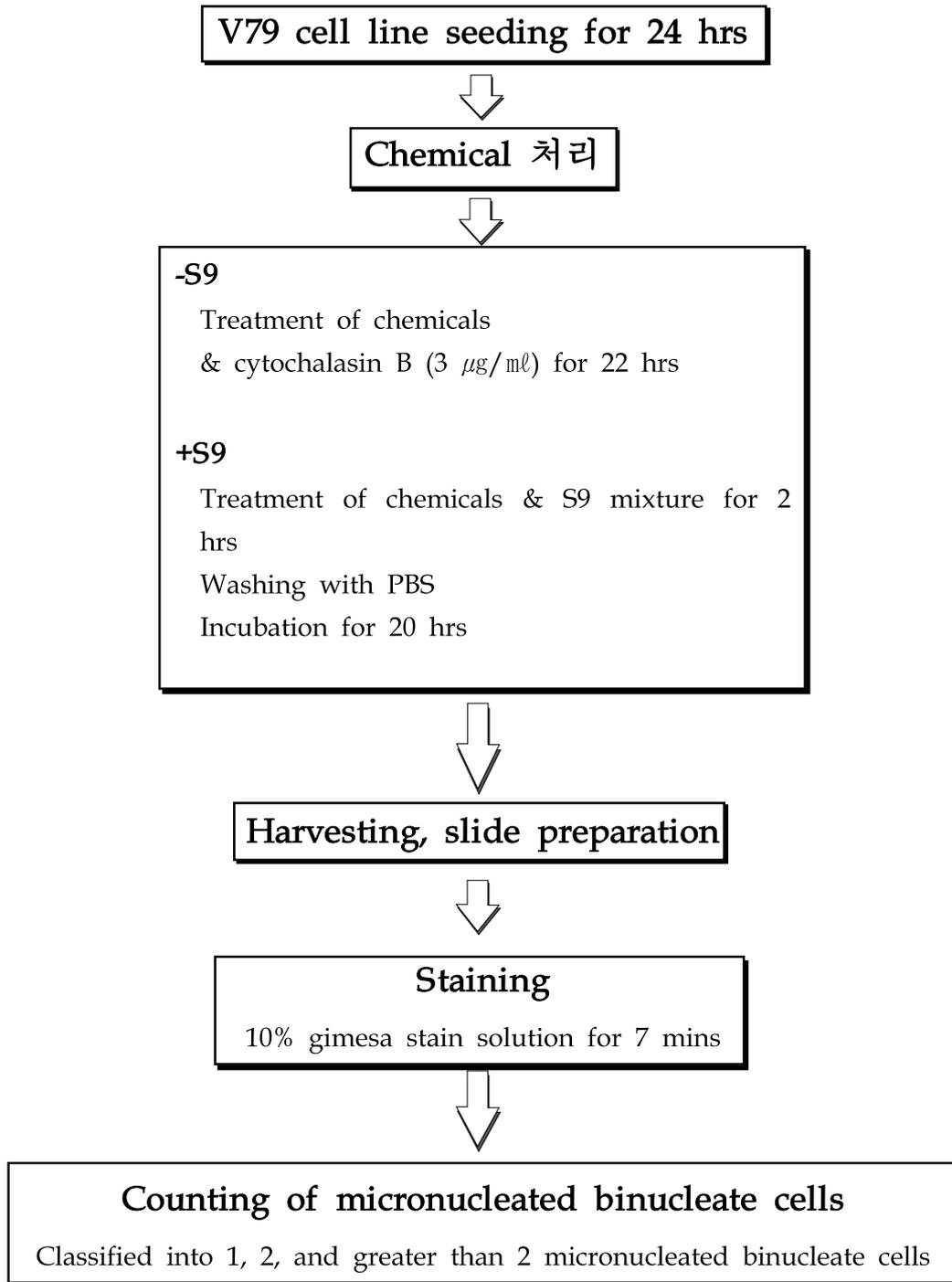


Fig 2. A schematic diagram illustrating the various end-points that can be scored using the cytokinesis-block technique.

4. 실험 방법



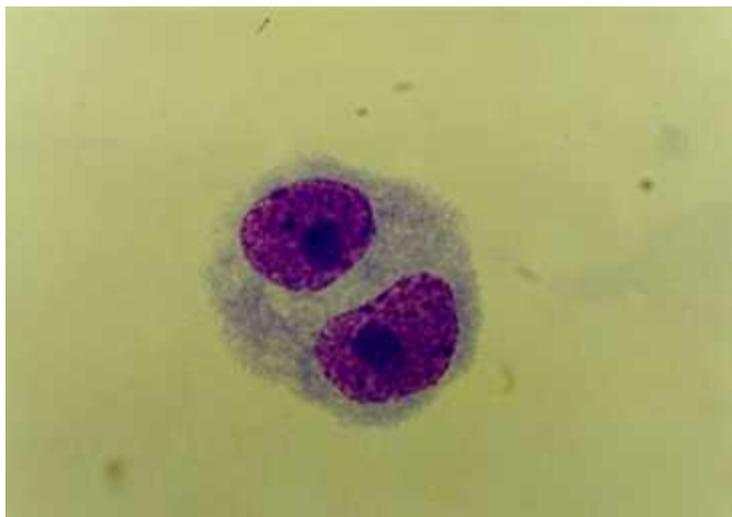


Fig. 3. Normal binucleate cells

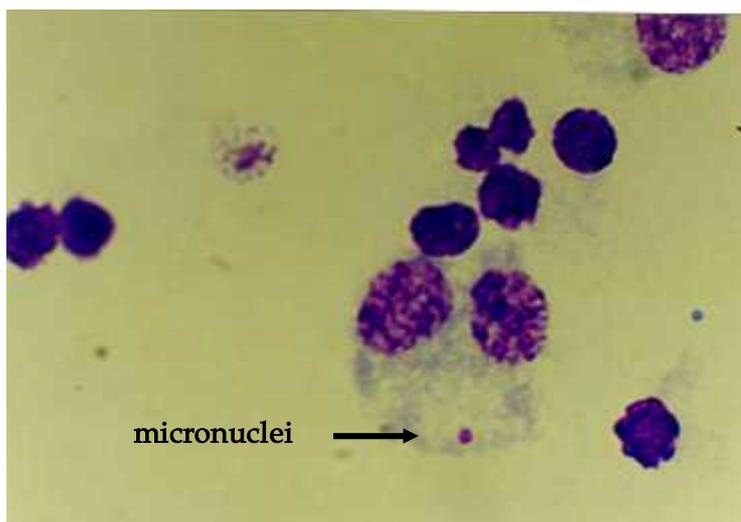


Fig. 4. Micronucleated binucleate cells

V. Transgenic Mutagenesis Assay

IV-1. 서론

Transgenic animal model은 자신의 genome내에 외부 유전자를 유입시켜 생체 내에서의 돌연변이를 감지할 수 있도록 제작되었으며 현재 mutation assay system으로 가장 많이 이용되고 있는 것은 Big Blue™ mouse (Stratagene) 와 Mutamouse (Hazleton) 이다. 이들 mouse model은 감지하기 편리하고 분석하기 용이한 *lac I* gene과 *lac Z* gene을 target으로 하는 lambda shuttle vector를 가지고 있어서 생체 내 여러 조직에서의 *in vivo* mutation측정을 가능하게 해주며 각 compound의 target gene에서의 mutational spectrum을 밝혀주는데 큰 역할을 하고 있다. 이처럼 target gene에서의 mutation에 따른 reporter gene발현과 sequence analysis를 가능하게 해주는 transgenic mutagenesis assay는 질병에 관여하는 것으로 여겨지는 특정 gene의 변화와 *in vivo*에서의 효과는 물론 mutation, cancer발생 mechanism을 이해할 수 있도록 하는 가장 진보된 독성평가 기법중의 하나라 할 수 있다.

IV-2. 원리

a. Transgenic animal & cell line의 제작

Transgenic animal은 자신의 genome에 외부 DNA fragment(transgenic vector)를 갖고 있다. Big Blue mouse는 lambda/*lacI* shuttle vector를 microinjection으로 integration시키는 기술에 의해 Stratagene사에서 개발되었다. Cell line의 경우도 크게 다르지 않다. 현재 개발된 transgenic cell line으로는 Big Blue cell line(Stratagene)이 있으며 이 cell line에는 Big Blue mouse에 삽입된 것과 동일한 vector가 포함되어 있다. 또한 pSV2Neo plasmid를 lambda shuttle vector와 함께 calcium phosphate cotransfection방법으로 cotransfect시켜 제작되었으므로 세포 배양 시 항생제 G418(geneticin)을 이용하여 select할수 있다.

b. lambda shuttle vector & *lac I* gene

lambda / *lacI* shuttle vector(λ LIZ)는 size가 약 45.5kb이며 cos site가 있는 일종의 cosmid이다. 각 shuttle vector는 mutagenesis의 target으로 작용하는 *lacI* gene을 가지고 있다. *lacI* gene(약 1080bp)은 Lac repressor protein을 coding하는 gene으로서, β -galactosidase을 coding하는 *lac Z* gene의 transcription을 억제하는 역할을 한다. 따라서 *lacI* gene에 mutation이 일어나면, β -galactosidase가 발현되어 X-gal 존재 시 blue dye를 형성하게 된다. transgenic Big Blue mutation assays는 이러한 *lac I* gene과 *lac Z* gene의 특성에 원리를 두고 있다.

c. Assay & Detection system

시험물질을 여러 경로를 통해서 mouse에 투여하고 연구대상 조직으로부터 DNA를

분리한다. Cell line의 경우는 compound처리 후 cell을 harvest하여 DNA를 분리한다. 분리한 genomic DNA에 shuttle vector에 있는 cos site를 인지하여 이 부위를 절단하고 packaging시키는 transpack extract를 첨가하면 infectious phage particle이 형성된다.

lambda head로 package된 phage는 α -complementation되는 host *E. coli*에 infection시키고 X-gal이 포함된 indicator agar배지에 plating하면 일정시간 배양 후 mutant를 detect할 수 있게 된다.

Mutant frequency는 mutant인 blue plaque와 nonmutant인 colorless plaque의 총수와 blue plaque 수의 비율로 나타낸다.

IV-3. 방 법

a. Test compound처리

Animal

Test compound의 적절한 처리경로, 횟수, 투여량을 결정하고 다른 방법으로 연구되어 있는 조직, 노출경로에 근거하여 target tissue를 선택하고, 원하는 조직세포의 proliferation rate와 compound의 cytotoxicity를 고려하여 expression time을 결정한다.

Big Blue rat cell line

10% fetal calf serum과 200 μ g/ml geneticin, 50units/ml penicillin, 50ug/ml streptomycin이 첨가된 DMEM배지를 사용하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건하의 incubator에서 매 3-4일마다 계대배양한다. 예비실험을 거쳐 test compound의 농도를 결정한 후 cell이 30-40% confluency를 나타냈을 때 처리한다. 처리가 후 PBS로 washing하고 cell이 confluent하게 자랄 때까지 culture한다.

b. Genomic DNA isolation

Animal의 경우 test compound의 처리 후 DNA replication이 일어날 수 있는 충분한 시간을 둔 후 원하는 조직을 분리하여 DNA를 분리하고 cell line의 경우는 cell을 scraping하여 harvest 한 후 DNA isolation을 수행한다. (-70 $^{\circ}$ C에서 일정기간 보관 가능하다)

Genomic DNA isolation은 proteinase K digestion, phenol/chloroform extraction, ethanol precipitation을 차례로 진행하여 수행한다. 기존에 알려져 있는 여러 가지 방법이나 kit사용을 통해 분리할 수 있다.

c. *in vitro* packaging & plating

분리한 DNA를 정량한 후 적정농도의 DNA를 transpack packaging extract(Stratagene)와 함께 incubation(30 $^{\circ}$ C)하여 shuttle vector를 recovery한다. Packaging으로 인해 형성된 infectious phage stock을 SCS-8 *E. coli* host cell에

infection시키고 chromogenic substrate X-gal이 포함된 top agar를 cell-phage와 혼합하여 bottom agar(25x25 cm² assay tray) plate에 붓는다.

Top agar가 굳어지면 plate를 뒤집어 37°C incubator에서 incubation시킨다.

약 8시간이 지나면 plaque가 나타나기 시작하며, 16~24h 내에 plaque수를 세어 mutant frequency를 결정한다.

d. Lambda plaque의 분리

Plate에서 blue plaque를 picking한 후 plaque의 순수단독분리를 위해 replating을 실시한다.

Picking한 plaque를 SM buffer(chloroform포함)로 현탁시킨 후 희석하여 host cell에 infection시키고 plating한다. 한 plate에 적정 수의 plaque가 생성되도록 하고 인접부위에 다른 plaque들이 없는 잘 분리된 mutant plaque의 top agar부분만을 분리해낸다. TE buffer에 분리한 plaque를 첨가하고 boiling하여 phage DNA가 용출되도록 한다.

e. Mutant plaque의 DNA sequence analysis

분석하려는 *lac I* gene에 대한 primer와 잘 분리한 phage DNA를 template로 하여 PCR(polymerase chain reaction)를 실시한다. PCR수행 후 product일부를 전기영동하여 반응이 제대로 되었는지 확인한 후 DNA를 purify하거나, phage로부터 직접 *lac I* gene을 excision, 분리하여 sequencing한다. 준비한 DNA를 sequence analysis한다. 최근에는 automated fluorescent DNA sequencer를 보편적으로 이용한다.

IV-4. Transgenic mutagenesis assay system의 장점과 응용

Transgenic animal은 transgene의 존재가 생물학적으로 크게 영향을 주지 않으므로 nontransgenic mouse와 거의 동일한 반응을 나타낸다. 따라서 어떤 compound가 유도하는 target gene의 mutation연구를 통해 endogenous gene에서의 현상을 알 수 있다. Chemical의 조직특이성을 알아낼 수 있으며 다른 여러 가지 endpoint와 더불어 평가할 수 있다(다른 *in vivo* 실험과 병행이 가능). 또한 germ cell을 사용할 경우 heritable effect를 예측할 수 있고, safety testing에 필요한 동물의 수를 줄이는 효과가 되므로 비용절감에도 기여한다. *lac I* gene을 target으로 한 경우 detection이 더욱 쉽고(background white중에서 blue를 detect) 다른 target gene에 비하여 크기가 작으므로 분석이 용이한 장점이 있다. 또한 direct acting mutagen의 경우는 animal을 이용하지 않더라도 transgenic cell line을 사용하여 mutational spectrum을 규명하는 것이 가능하다. 이 system은 chemical의 effect를 mutational spectrum으로 밝힐 수 있으므로 chemical carcinogenesis에 관여하는 특정 gene의 역할의 이해를 가능하게 해준다.

무엇보다도 양적인 평가(MF)와 질적인 평가(mutational spectrum)가 동시에 빠르게 이루어질 수 있다는 점에서 높게 평가되는 이 방법은 mutagenesis연구 뿐 아니라 DNA

repair, *in vivo* carcinogenicity 연구 등 다양한 독성학적 연구에 응용될 수 있고, 몇몇 유전독성연구방법과 이 Transgenic system을 병용한 Battery test를 과학선진국에서 구상하고 있어, 실제 *in vivo* 발암성 시험시의 비용, 기간 등을 극복할 수 있는 유용한 tool로서 빠른시간내에 대체 발암성 시험법의 일환으로 자리매김하리라 믿는다.

VI. REFERENCES

1. Anderson D., Yu T.-W., Phillips B.J. and Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay, *Mutat. Res.*, 1994, 307, 261-271
2. Applegate M. L., Moore M. M., Broder C. B., Burrell A., Juhn G., Kasweck K. L., Lin P. F., Wadhams A., and Hozier J. C., (1990) Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 51-55.
3. Betti C., Tania D., Liliana G., Nicola L. and Roberto B. Comparative studies by comet assay and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects, *Mutat. Res.* 1995, 343, 201-207
4. Betti C., Tania D., Liliana G., Nicola L. and Roberto B. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.* 1994, 307 323-333
5. Carr G. J. and Gorelick N. J. (1996) Mutational spectrum in transgenic animal research: Data analysis and study design based upon the mutant or mutation frequency, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28, 405-413.
6. Clements J., (1990) Gene mutation assays in mammalian cells, In S. O'Hare and C. K. Atterwill (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol.43: *in vitro* Toxicity Testing Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ., pp. 277-286.
7. Clive D., Caspary W., Kirkby P. E., Krehl R., Moore M., Mayo J., and Oberly T. J. (1987) Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity, *Mutat. Res.*, 189, 145-156.
8. Collins A. R., Ma A.-G., Susan J. D., The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cell. *Mutat. Res.*, 1995. 336, 69-77
9. Cook P. R. , and Brazell I.A. , Conformational constraints in nuclear DNA, *J. Cell. Sci*, 1976, 22, 287-302

10. De Meo M., Laget M., Castegnaro M. and Dumenil G., Genotoxicity activity of potassium permanganate in acidic solutions *Mutat. Res.*, 1991, 260, 295-306
11. Dyaico M. J., Provost G. S., Kretz P. L., Ransom S. L., Moors J. C. and Short J. M. (1994) The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats, *Mutation Res.*, 307, 461-478.
12. Exerson G. L., Bryant M. F., Kwanyuen P. and Kigerman A. D. (1995), Bleomycin sulfate-induced micronuclei in Human, rat and mouse peripheral blood lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.*, 25, 31-36
13. Fairbairn D. W., Olive P. L., Kim L. O'neill., The comet assay : a comprehensive review, *Mutat. Res.*, 1995, 339, 37-59
14. Gedik C. M., Ewen S.W.B. and Collins A. R., Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and it's repair in human cells, *Int J. Radiat.*, 1992, 62, 313-320
15. Gorelick N. J. (1995) Overview of mutation assay in transgenic mice for routine testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 25, 218-230
16. Gorelick N. J., (1995) Genotoxicity of trans-anethole *in vitro*, *Mutation Res.*, 326:199-209
17. Green M. H. L. , Lowe J. E., Harcourt S. A., Akinluyi P., Rowe T., Cole J., Austey A. V. and Arlett C. F., UV-C sensitivity of unstimulated and human lymphocytes from normal and xerodermal pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique. *Mutat. Res.*, 1992, 272, 137-144
18. Hartmann A., Herkommer K., Michael G. and Gunter S., DNA-damaging effect of Cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studies with the single cell gel test (comet assay) *Environ. Mol. Mutage.*, 1995, 25, 180-187
19. Hayashi M., Hashimoto S., Sakamoto Y., Hamada C., Sofuni T., and Yoshimura I. (1994) Statistical analysis of data in mutagenicity assays : rodent micronucleus assay, *Environ. Health perspect.* (102) supp. 1 , 49-52
20. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., and Ishidate M. Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.*, 245, 245-249.
21. Hayashi M., Sofuni T. (1994), The micronucleus assay wirth rodent peripheral blood and acridine orange supravital staining. In *Chromosomal alterations* (edited by G. Obe and A.T. Natarajan), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 203-213

22. Hayashi M., Tice R. R., MacGregor J. T., Anderson D., Blakey D. H., Kirsh-Volders M., Oleson F. B. Jr, Pacchierotti F., Romagna F., Shimada H., Sutou S., and Vannier B. (1994) *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.*, 312, 293-304.
23. Hellman B., Vaghef H., Bostrom B., The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay, *Mutat. Res.*, 1995, 336, 123-131
24. Heo M. Y. and Ryu J. C. (1996), The micronucleus formation in peripheral blood of mitomycin C-treated mice using supravital staining with acridine orange, *Environ. Mutagens & Carcinogens* ,16, 24-29
25. Iwakura K., Tamura H., Matsumoto A., Ajimi S., Ogura A., Kakimoto K., Matsumoto T. and Hayashi M. (1992), The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes by acridine orange supravital staining with 1- β -D-arabinofuranosylcytosine, *Mutat. Res.*, 278, 131-137
26. Kleimen N. J. and Abraham S., DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract. *Current Eye Res.*, 1993, 12(5), 423-431
27. Lotti M. (1995) Mechanism fo toxicity and risk assessment, Transgenic models for detection of mutation in tumors and normal tissues of rodents, *Toxicology letters* 82/83, 131-134.
28. Lundberg K. S., Kretz P. L., Provost G. S. and Short J. M. (1993) The use of selection in recovery of transgenic targets for mutation analysis, *Mutation Res.*, 301, 99-105.
29. MacGregor J. T., Wehr C. M., and Gould D. H. (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environ Mutagen*, 2, 509 - 514.
30. Mavournin K. H., Blakey D. H., Cimino M. C., Salamone M. F., and Heddle J. A. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report the U.S. environmental protection agency gene-Tox program, *Mutat Res*, 239, 29-80
31. Mckelvey-Martin V. J., Green M. H. L., Schemezzer P., Pool-Zobel B. L., De Meo M. P. and Collins A., The single gel electrophoresis assay (Comet assay): A european review. *Mutat. Res.*, 1993, 288, 47-63
32. Moore M. M., Clive D., Hozier J. C., Howard B. E., Batson A. G., Turner N. T., and Sawyer J. (1985) Analysis of TFTr mutants of L5178Y/TK^{+/-} mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.* 151, 161-174.

33. Muller W. U. , Bauch T., Streffer C., Niedereichholz F. and Bocker W., Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Radiat. Res.* 1994, 65 (3), 315-319
34. Olive P. L., Banath J. P. and Fjell C. D., DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline comet assay, *Cytometry*, 1994, 16, 305-312
35. Olive P. L., Garnet F. and Judit P.B., Radiation-induced apoptosis measured in Tk6 Human B lymphocytes cells using the comet assay, *Radiat. Res.* 1993. 136, 130-136
36. Pandrang R., Peters M., Ralph S. and Vrzoc M., Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and carp, *Environ. & mol. Mutagen.*, 1995, 26, 345-356
37. Piegorsch W. P., Margolin B. H. et al (1995) Study design and sample sizes for a *lac I* transgenic mouse mutation assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 25, 231-245.
38. Provost G. S., Krez P. L., Hammer R. T., Matthews C. D., Rogers B. J., Lundberg K. S., Dycaico M. J. and Short J. M. (1993) Transgenic systems for *in vivo* mutation analysis. *Mutation Res.*, 288, 133-149
39. Ralph S., Peters M., Pandrang R., and Vrzoc M., Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles, *Environ. & mol. Mutagen.*, 1996, 28, 112-120
40. Robinson W. D., Green M. H. L., Cole J., Garner R. C., Healy M. J., and Gatehouse D. (1990) Statistical evaluation of bacterial/mammalian fluctuation tests, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data* (Kirkland, D. J., ed.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 102-140.
41. Ryu J. C., Kim K. R., Kim H. J., Ryu E. K., Lee S. Y., Jung S. O., Youn J. Y., Kim M. H. and Kwon O. S. (1996) Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (II), a pyrethroid insecticide, fenpropathrin, *Arch. Pharm. Res.*, 19(4), 251-257.
42. Schmid W. (1975) The micronucleus test, *Mutat. Res.*, 31, 9-15.
43. Singh N. P., Danner D. B., Raymond R. T., Brant L. and Schneider E. L., DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes, 1990, 237, 123-130
44. Singh N. P., McCoy T. Michael, Raymond R. T. and Schneider E. L., A simple

- technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 1988, 175, 184-191
45. Singh. N. P., Stephens R. E. and Schneider E. L., Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1994, 66(1), 23-28
 46. Sisk S. C., Pluta L. J., Bond J. A., and Reico L. R. (1994) Molecular analysis of *lac I* mutant from bone marrow of B6C3F1 transgenic mice following inhalation exposure to 1,3-butadiene, *Carcinogenesis* 15, 471-477.
 47. Sofuni T., Suzuki T., Hayashi M. (1996) Initial consideration for use of transgenic mutation in a regulatory submission, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28, 443-446.
 48. Suzuki T., Hayashi M., Hakura A., Asita A. O., Kodama Y., Honma M. and Sofuni T. (1995), Combination effects of clastogens in the mouse peripheral blood micronucleus assay, *Mutagenesis* (10) 1, 31-36
 49. Suzuki T., Hayashi M., Sofuni T., and Myhr B. C. (1993) The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C *in vivo* using *lac Z* transgenic mice, *Mutat. Res.*, 285, 219-224.
 50. Tao K. S., Urlando C. and Heddle J. A. (1993) Comparison of somatic mutation in a transgenic versus host locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10681-10685.
 51. Testoni M. I., Nestor O. B. and Martha S. B., The kinetics of chromosome and DNA damage by streptonigrin in CHO cells. *Mutat. Res.*, 1995, 334, 23-31
 52. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, *Mutat. Res.*, 278, 83-98.
 53. Toyokuni S., Sagripanti J. L., Hitchins V. M. (1995) Cytotoxic and mutagenic effects of ferric nitrilotriacetate on L5178Y mouse lymphoma cells, *Cancer Lett* 88(2):157-162
 54. Wyborski D. L., Malkhosyan S., Moores J., Perucho M. and Short J. M. (1995) Development of a rat cell line containing stably integrated copies of a lambda/ *lac I* shuttle vector, *Mutation Res*, 334, 161-165.
 55. Antoccia, A., Tanzarella, C., Modesti, D., and Degrassi, F. Cytokinesis-block micronucleus assay with kinetochore detection in colchicine-treated human

- fibroblasts. *Mutat. Res.* 287(1), 93-99. 1993
56. Benning, V., Depasse, F., Melcion, C., and Cordier, A. Detection of micronuclei after exposure to mitomycin C, cyclophosphamide and diethylnitrosamine by the in vivo micronucleus test in mouse splenocytes. *Mutat. Res.* 280(2), 137-142. 1992
 57. Ellard, S. and Parry, J. M. A comparative study of the use of primary Chinese hamster liver cultures and genetically engineered immortal V79 Chinese hamster cell lines expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. *Toxicology* 82(1-3), 131-149. 1993
 58. Jamali, M. and Trott, K. R. Increased micronucleus frequency in the progeny of irradiated Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 69(3), 301-307. 1996
 59. Jeremic, B., Sibamoto, J., and Abe, M. Significance of formation of micronuclei in SCC VII murine cells treated with various chemotherapeutic agents. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 124(7-8), 169-174. 1996
 60. Jeremic, B., Shibamoto, Y., and Abe, M. Assessment of micronucleus induction in murine SCCVII cells treated with various anticancer agents. *Chemotherapy* 42(4), 266-272. 1996
 61. Kalweit, S., Utesch, D., von der Hude W., and Madle, S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutat. Res.* 439(2), 183-190. 1999
 62. Kalweit, S., Utesch, D., von der Hude W., and Madle, S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutat. Res.* 439(2), 183-190. 1999
 63. Krishna, G., Kropko, M. L., and Theiss, J. C. Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 Chinese hamster lung cells: results with mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 222(1), 63-69. 1989
 64. Nesti, C., Trippi, F., Scarpato, R., Migliore, L., and Turchi, G. Cytokinesis-block micronucleus assay in primary human liver fibroblasts exposed to griseofulvin and mitomycin C. *Mutagenesis* 15(2), 143-147. 2000
 65. Ren, L., Yang, J. P., and Zhang, H. X. Use of the cytokinesis-block micronucleus method in mouse splenocytes. *Mutat. Res.* 262(2), 119-124. 1991
 66. Surralles, J., Antoccia, A., Creus, A., Degrassi, F., Peris, F., Tanzarella, C., Xamena, N., and Marcos, R. The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two

- laboratories. *Mutagenesis* 9(4), 347-353. 1994
67. Wakata, A. and Sasaki, M. S. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat. Res.* 190(1), 51-57. 1987
68. Whong, W. Z., Stewart, J. D., and Ong, T. Use of rat primary lung cells for studying genotoxicity with the sister- chromatid exchange and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 241(1), 7-13. 1990

B. 내분비계 장애물질 (환경호르몬, Endocrine Disruptors)

1962년 Rachel Carson이 지은 「침묵의 봄 (Silent Spring)」에서 농약과 여러 합성 화학물질 등이 생태계에 문제를 야기시켜 인류를 위협하게 될 것이라고 경고한 이후, 환경 오염과 인간의 삶의 질 (Quality of life) 문제는 우리의 일상 생활 속의 문제로 자리 잡게 되었고, 최근에 들어서는, 1996년 Theo Colborn이 지은 「도둑맞은 미래 (Our Stolen Future)」에서 일부 농약과 합성화학물질이 생태계와 인간의 내분비계에 작용하여 우리 자신들은 물론 후손들의 운명에도 중대한 영향을 미칠수 있다는 가능성을 지적하여 사회적으로 문제화되면서 세계 각국이 이에 대한 대책 마련에 심혈을 기울이고 있다.

최근에 자주 사용되는 단어로써 환경 외인성 에스트로젠 (Environmental xenoestrogens), 식물성 에스트로젠 (Phytoestrogens), 환경 에스트로젠 (Environmental estrogens), 환경호르몬, 외인성 내분비 교란 화학물질, 내분비 교란 물질 등이 있는데, 이들은 상황에 따라 달리 불리어지고 있으나 동일한 의미를 가지며 미국에서는 'Endocrine Disruptors', 일본에서는 '외인성내분비 교란화학물질', 그리고 우리 나라 환경부에서는 1998년 5월에 '내분비계 장애물질'이라고 명명하였고, 살아 있는 생체내의 내분비계 기능을 변화시켜 정상적인 개체나 그 후손들의 건강 장애를 유발하기 때문에 최근에는 일명, 환경호르몬 이라고도 부르고 있다.

즉 환경 보호 단체 등의 여러 분야 관련자 및 학자들에 의해 생태계의 야생동물에서 건강 장애를 발견하고 그 원인을 추적하여 본 결과, 합성 화학물질에 의해 자연환경이 오염되고 그에 따른 공통된 건강 장애로서 생체내의 내분비계에 이상이 있다는 사실이 알려지게 된 것이다. 내분비계 장애물질의 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 수많은 농약류나 합성화학물질에 기인된다고 추정하고 있다. 현재 내분비계 장애물질로는 세계 야생생물 보호기금 (WWF)에서 약 67여종, 미국 Illinois 환경 보호청 (Environmental Protection

Agency, EPA)에서 73여종, 일본에서 약 142여종으로 분류하고 있으나 각 대상물질들의 이성체, 대사물질 등도 수없이 존재하므로 숫자에는 큰 의미를 부여하지 않아도 되리라 본다. 왜냐하면 이들 외에도 내분비계 장애를 일으킬 수 있는 화학물질은 수없이 많기 때문에 미국 환경 보호청 (Environmental Protection Agency, EPA)에서 구성한 EDSTAC (the Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee)은 87,000 종의 화학물질을 검색한 후, 내분비계 장애를 일으키는 물질에 대한 검색 결과를 2000년 8월에 미국 의회에 보고할 예정이어서, 내분비계 장애물질은 앞으로도 계속 밝혀질 것이고 그 종류는, 현재 세계야생생물보호기금에서 발표한 약 67여종은 고사하고, 더욱 더 늘어갈 것이고, 그 종류의 다양성에서도 미국 Illinois EPA에서 내분비계 장애를 일으킨다고 확신하여 "알려진 (known)"으로 구분된 물질만해도 19 종으로 그 종류는 농약에서 중금속까지 다양하다는 것이다.

내분비계 호르몬 중에서 환경호르몬 작용의 주요물질인 에스트로젠 (estrogen)이란, 사람 혹은 그 밖의 다른 동물들의 난소와 정소에서 일차적으로 생성되는 스테로이드 호르몬 (steroid hormone)이다. 이들은 성장, 발육, 행동 등에 영향을 주며 생식 주기를 조절하고 다른 신체 부위 (뼈, 피부, 혈관, 뇌 등)에도 영향을 미친다. 에스트로젠 호르몬 중에서 에스트라디올 (estradiol)은 가장 다량으로 존재하며 효과가 크고, 그 밖에 에스트론 (estrone), 에스트리올 (estriol) 의 세 가지 주요 에스트로젠과 그의 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 영향들에 관하여, 산업화에 따른 화학물질들의 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. 정의

동물에 있어서 내분비계 (Endocrine system)란 호르몬을 분비하여 몸의 기능을 조절

하는 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 구분할 수 있으며, 단백질 호르몬은 분자량이 크고 단백질로 구성되어 있으며 전하를 띄고 있어서 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 작용하는 호르몬이다. 그중 일부 스테로이드 호르몬을 성호르몬 (Sex steroids)이라고도 불리는데 이는 기능상 남성과 여성을 특정 짓는 성적 분화 (Sexual differentiation)를 통제하며 또한 발생 초기 과정에서 성을 결정하는데 중요한 역할을 하고 있기 때문이다.

일부 내분비계 장애물질은 구조상 스테로이드 호르몬 중 에스트로젠 (Estrogens)이라고 불리는 여성 호르몬의 구조와 유사하여 작용 기전 등에서 이들 여성 호르몬의 작용에 장애를 일으키기 때문에 환경성 에스트로젠 (Environmental estrogens) 이라고도 불리고 있고, 내분비계 장애물질, 즉 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 있다.

내분비계 장애물질들은 다음과 같은 몇 가지 방법에 의해 생체내에서 호르몬의 기능을 변화시키는 것으로 알려져 있다 :

- 호르몬 수용체와 결합하거나 세포의 신호 전달 과정에 영향을 미치므로써 성 스테로이드 호르몬인 에스트로젠 혹은 남성 성 호르몬인 안드로젠 (androgen)과 유사하거나 부분적으로 유사한 작용을 한다.
- 호르몬 수용체에 대한 결합이나 세포 신호 전달 과정을 막거나, 방해하거나 또는 변경시키며, 이러한 작용을 하는 화학 물질들을 다른 말로는 anti-estrogen 혹은 anti-androgen 이라 한다.
- 천연 호르몬의 생성 및 분해과정을 변경시킨다.
- 호르몬 수용체의 생성 및 기능을 모식화한다.

이러한 환경 호르몬으로서 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 화합물들이, 많은 종류의 식물과 곰팡이류 (fungi)에도 존재하고 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. 그러나 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 과정의 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 하였다.

또한 1996년 12월 영국 Weybridge에 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 하였다.

미국 환경청의 자문위원회 (EDSTAC)에서 1998년 6월 발표한 보고서 초안에서 정의한 내분비계 장애물질은 "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 약사

내분비계 장애물질은 독성이 높거나 특별한 화학 물질이라기 보다는 농약, 플라스틱, 세정제 등과 같이 우리 일상 생활에서 흔히 접할 수 있는 생활용품에 들어 있는 합성 화학물질로써, 이러한 합성 화학물질이 생물에 유해한 에스트로제닉 (estrogenic) 효과를 나타낸다는 것은 표 1에서 알 수 있듯이 오래 전부터 문제가 되었기 때문에 예상되어 왔다고 할 수 있다. 실제로 DDT, Methoxychlor와 Kepone (Chlordecone)과 같은 유기 염소

계 농약은 내분비계를 혼란시키는 물질로 분류되고 있으며 특히, 살충제로 쓰였던 DDT는 과거 인체에 직접 뿌리기도 하였으나 미국에서 1972년에 농작물에 사용 금지가 되었고 국내에서도 사용이 금지되어, 그 이후로 자연계에 잔류하는 DDT의 농도는 계속 감소되고 있지만, 아직도 자연계나 일부 농산물에서 검출되고 있어 생태계에 심각한 영향을 미치고 있다.

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

이렇듯, 내분비계 장애물질이 많은 관심의 초점이 되고 있는 이유는 세대를 이어서 사람에게 심각한 영향을 가져 올 위험이 높기 때문이다. 특히 환경 잔류성이 높은 유기염소화합물이 정밀 조사 대상이 되고 있는데, 이는 야생동물의 역학 조사에서 관련성이 높은 유해 물질로 예측되었기 때문이다. 예로써 미국과 캐나다 국경 지역에 있는 오대호 연안은 DDT나 PCBs 같은 유기염소 화합물에 오염되어 있는 지역인데, 이 지역에 사는 물고기를 먹은 새들 중 출생 시 이상이나 비정상적인 성적 행동을 보여주는 경우가 있으며 또한 새의 부리가 비뚤어져 태어난 경우도 보고되었다. 또한 1980년에 플로리다 주의 아포카 호수 (Lake Apopka)에 Dicofol이라는 살충제가 주성분인 농약인 Kelthane이라는 살충제를 다량 버렸는데 이 호수에 사는 악어에서 호르몬 농도가 변하고 변형된 생식기관이 발견되었다고 보고되고 있다. 이외에도 Kepone (chlordecone)에 오염된 바닷

물에서 회수된 굴껍질에 이상이 발견되었고, 도시 하수도 부근에 사는 숯컷 물고기에서 암컷만이 생산하는 Vitellogenin이라는 단백질이 생산됨이 보고되고 있다.

이러한 자연계의 야생동물로부터 오는 내분비계 장애물질의 경고를 심각하게 생각하는 이유는 이러한 증후가 여성에서의 유방암은 물론 남성에서의 내분비계 장애를 초래하고 동물에서의 비정상적인 발생 등과 서로 연관되어 있다고 생각되기 때문이다.

최근 들어 플라스틱들도 에스트로제닉 효과가 있는 내분비계 장애물질로 분류되고 있는데, 이는 1970년대 후반 스탠포드대학의 연구실에서 우연히 밝혀진 사실로써, Feldman과 Krishnan은 효모균이 에스트로젠을 생성하는 것을 발견하고 이를 입증하려고 노력하였다. 왜냐하면 단세포 생물은 호르몬을 사용할 필요가 없기 때문이다. 그러나 십여년간의 연구결과 1990년에 이들이 얻은 결론은 효모균은 에스트로젠을 합성하지 않는다는 사실이었고 실험에서 발견된 에스트로제닉 효과가 있는 화합물은 효모균 배양시 사용한 플라스틱 용기에서 용출된 것임을 알게 되었다. 그 화합물은 Bisphenol A라는 물질로써 플라스틱 용기의 재질인 Polycarbonate의 분해산물이었던 것이다. Bisphenol A의 인체에 대한 에스트로제닉 효과는 플라스틱 공장에 근무하는 남성 근로자들에서 가슴이 커지는 것으로 입증되어 내분비계에 영향을 주는 것은 확실하나 좀 더 연구하여야 할 대상 중 하나이다.

이와 비슷한 예가 Nonylphenol로써 플라스틱을 유연하게 만들어 주는데 사용되는 물질이다. 이는 1992년 Tuft대의 Soto와 Sonnenschein이 유방암 세포 배양 시 플라스틱 용기로부터 용출되는 Nonylphenol이 암세포 배양에 영향을 주는 것을 알았다. 이와 관련된 내분비계 장애 물질들은 폴리스타이렌 포장기, 튜브, 일부 세척제나 가정용품에서 발견되고 있으나, 인체에 대한 영향은 계속 연구중이다.

내분비계 장애물질은 성질상 자연계에 존재하면서 에스트로제닉 효과가 있는 식물성 에스트로젠 (Phytoestrogens)과 합성 환경성 에스트로젠 (Environmental estrogens)으로 구분할 수 있다. 이 중 식물성 에스트로젠은 마늘, 밀, 당근, 사과나 커피 같은 음식에 존재하며 많이 섭취하면 생식기장애를 초래하지만, 이들은 체내에 잔류하지 않고 쉽게 배설되기 때문에 커다란 문제를 일으키지는 않는다고 보고되고 있다. 그러나 합성 환경성 에스트로젠은 인위적인 에스트로젠 성질을 갖고 있는 화합물로써 생체에 치명적인 역할을 할 수 있다. 그 이유로서

첫째, 생체 내에서 잘 대사되지 않고, 둘째, 자연 환경상태에서 분해되지 않고 오랫동안 잔류하며, 셋째, 이들은 지방성이어서 체내에 축적되며 임신이나 젖을 먹일 때 자손에게 다시 이행되기도 하며, 넷째, 합성 환경성 에스트로젠의 축적은 먹이 사슬과 관련되어 있어, 먹이사슬에서 최상위치에 있는 사람에게서는 생선이나, 우유, 달걀 등 음식물에 의한 섭취가 문제가 된다.

이러한 성질을 갖고 있는 내분비계 장애물질은 Estrogens나 Androgens를 흉내내거나 해당 수용체의 결합을 방해하여 내분비계에 영향을 주어 장애를 일으키며 가능한 작용기전은 아래와 같이 4가지로 구분 지을 수 있다.

첫째, 호르몬이 수용체에 결합하는 것을 막거나, 방해하거나, 변화시킨다.

둘째, 내인성 호르몬의 생성이나 분해를 변화시킨다.

셋째, 필요한 수용체의 생성 또는 기능을 방해한다.

넷째, 새롭거나, 약한 또는 강한 호르몬 반응을 일으켜 부정확한 신호를 생체에 전달하는 등의 작용기전에 따라 장애를 일으킬 수 있다.

이러한 내분비계 장애물질의 작용기전에 따라 발생하는 여러 가지 영향 중 큰 문제가 되는 것은 발생기 과정에서 성 결정에 영향을 주고, 앞에서 예를 든바와 같이 야생동물에 여러 가지 문제를 야기할 뿐만 아니라 인간에게도 커다란 영향을 주리라 예상되고 있기 때문이다. 그래서 세계 야생생물기금 (World Wildlife Fund : WWF)과 세계 각국이 이에 대한 대책을 강구하기 위하여 많은 노력을 기울이고 있다.

4. 국내 현황

국내에서는 1998년 5월 29일 환경부 주도하에 내분비계 장애물질 대책회의를 개최하여 '대책 협의회'와 그 산하에 '전문연구협의회'를 구성 운영하고 있으며, Endocrine disruptor에 대한 용어를 "내분비계 장애물질"로 통일하기로 결정하고 내분비계 장애물질은 세계 야생생물기금 (WWF)에서 선정한 67여종을 추정물질로 선정하여 국내 사용 및 규제 실태를 조사하기로 하였다.

조사결과 세계야생생물 기금 (WWF)에서 선정한 67종 중 16종은 국내에서 사용실적이 없는 물질이고, 국내에서 제조되거나 수입사례가 있는 물질이 51종이고 이중 42종은 유해 화학물질 관리법, 농약 관리법, 산업안전 보건법에 의하여 규제하고 있는 물질이며 비스페놀A, 노닐페놀류, 및 플라스틱 관련 산업용 화학물질 9종은 현재 규제되고 있지 않은 물질이다. 규제되고 있지 않은 9종의 물질 중 환경잔류성이 높고 유해성이 있다고 보고된 4종 (펜타-노닐페놀류, 비스페놀 A, 디에틸헥실프탈레이트, 디부틸벤질프탈레이트)은 환경부에서 관찰 물질로 지정하여 제조, 수입 및 용도를 신고하도록 하여 관리하고 있다. 현재는 내분비계 장애물질에 관한 중장기 연구사업 계획을 수립하여 전국적인 오염도 실태조사연구사업 등을 진행하는 등 점진적인 해결접근을 시도하고있으며, 1999년 9월 22일부터는 유해 화학물질 관리법에 따라 유해 화학물질 대책위원회로 일원화되어 내분비계 장애물질은 물론 여러 유해화학물질에 관한 사항을 협의하도록 하고 있다.

5. 국외현황

가) 미국

1995년 4월 미국 환경보호청(Environmental Protection Agency; EPA)은 내분비계 장애물질이 인간이나 생태계에 미치는 영향 및 위해성 평가를 위한 Workshop을 개최하고 이에 대한 연구의 필요성을 확인하였다. 이에 따라 미국의회는 1996년 8월 식품품질보호법 (Food Quality Protection Act)과 음용수 안전법 (Safety Drinking Water Act)을 통과시키면서 환경청에 내분비계 장애물질의 스크리닝 방법과 테스트 방법을 1998년 8월까지 개발하여 보고하고, 개발된 방법에 따라 1999년 8월까지 실제 실험을 실시하여, 2000년 8월까지 평가 결과를 보고하도록 조치하였다. 이에 따라 연방정부 차원에서 과학계, 정치계, 기업계, 민간단체 등을 대표하는 39인의 내분비계 장애물질 검색 및 시험자문 위원회 (EDSTAC; Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee)를 1996년 10월 16일에 구성하여 운영하고 있으며, EDSTAC는 4개의 실무팀으로 나누어 작업하고 있다. 즉 4개의 실무팀은 The Principles Work Group, the Priority Setting Work Group (PSWG), the Screening and Testing Work Group (STWG), the Communications and Outreach Work Group (COWG)으로 구성되어 자문하고 있으며, 1998년 4월 작성한 자문위원회 (EDSTAC)의 보고서 초안에 자문위원회의 결정사항 및 권고사항을 주 내용으로 기록하고 있고, 기본개념 및 이론 (Conceptual framework and principles), 우선 순위결정 (Priority setting), 검색 및 시험 (Screening and testing), 정보제공 및 홍보 (Communications and outreach), 이행 (Implementation) 등의 토의 사항이 포함되어 있다. 연구에 참여하는 정부기관으로는 환경보호청 (EPA)외에 국가독성프로그램 (NTP), 국립환경보건 과학연구소 (NIEHS), 질병연구소 (CDC), 국립환경보건센터 (NCEH)등이 있으며 이들은 1996년부터 \$40 million에 달하는 연구비를 투자하여 연구하고 있어 환경 보호라는 차원에서 뿐 아니라 자연과의 조화로운 국민 보건복지 차원에서도 매우 적극적인 해결책을 모색하고 있다고 할 수 있다.

나) 유럽

유럽 각국은 1995년부터 1996년 사이에 내분비계 장애물질에 대한 보고서를 자체적으로 작성하였고, 전 유럽 프로그램으로 EC/WHO, Euro/OECD/EEA 합동 Workshop을 1996년 12월 영국 Weybridge에서 “The Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and wildlife”라는 주제로 개최하여, 내분비계 장애물질과 추정 내분비계 장애물질의 정의와 실험방법에 대한 기본원칙 및 연구방향에 대하여 토론하였

다. 계속해서 이와 관련된 회의로써 OECD/SETAC 합동 Workshop이 1997년 4월 네델란드 Veldhoven에서 “Endocrine Modulators and Wildlife Assessment and Testing”이라는 주제로 열렸고, 1997년 10월에는 SETAC-Europe open seminar가 벨기에 Brussels에서 열렸다. 그리고 1998년 3월 OECD 주최로 22개국에서 46명의 전문가들이 모여 OECD 내분비계 장애물질의 시험 및 위해성 평가를 위한 시험법 지침에 관한 각국 조정관 회의 및 위해성 평가 자문단 회의를 개최하여 서로간 정보 교환과 시험 지침법에 대한 사항을 논의하여 적극적으로 해결책 모색을 강구하고 있다.

다) 일 본

일본은 기업 연합체인 Japan Chemical Industry Association과 Japan Chemical Industry Ecology and Information Center에 의해서 내분비계 장애물질에 대한 연구가 진행되다가 1997년부터 정부에서 주도하고 있다. 1997년 3월 환경청에서 “외인성 내분비 교란 화학물질 문제에 대한 연구반”을 구성하고, 지금까지의 문헌 및 국내 모니터링 조사 결과를 기초로 하여 내분비계 장애물질에 대한 과학적 지견을 정리하고 중점적으로 조사 및 연구하여야 할 사항을 검토하여 7월에 중간보고서를 취합 공표하였다. 또한 후생성 산하 국립 의약품 식품 위생 연구소에서도 “내분비계 장애물질의 건강에 미치는 영향에 대한 검토회”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 총 20억엔을 투자하여 “내분비 교란 작용물질의 인체 영향에 관한 조사 연구”를 실시예정이며 대상물질을 약 140여종으로 하고 그 중 인체노출 경로가 주로 식품인 경우; 약 80물질, 인체 노출 경로가 불분명한 약 60물질로 나누어 연구를 수행하고 있으며, 외국 및 관련 국제기관에 대해서는 본 방침을 “Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors '98/Japan Environment Agency (SPEED '98/JEA)” 라는 명칭으로 표시하고 이를 기초로 국제적인 연대를 진행시키고 있다. 또한 얼마 전엔, “환경호르몬 긴급 전국 일제조사”의 일환으로서 공공용수와 지하수와 같은 수질환경에서의 환경호르몬 오염여부를 일본 전역의 130 지점에 걸쳐 조사하여 95%에 이르는 123지점에서 환경호르몬의 일부 물질들이 검출되었다는 충격적인 보고도 한 바 있어 정부차원에서 적극적인 투자 및 해결책 모색을 실시하고 있다.

라) 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 각국 조정관 회의 및 위해성평가 고문단 합동회의”를 열어 시험법에 관한 합의 사항을 도출하였고, 계속해서 1998년 3월 16일 - 18일에는 국제연합 빌딩에서 국제화학물질안전계획 (IPCS)과 경제개발협력기구 (OECD)가 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

1996년 12월 영국 Weybridge에서 개최한 EU/WHO/OECD Workshop에서 내분비계 장애물질 대상은 “생체에서 내분비계 장애를 유도하리라고 예상되는 성질을 갖고 있는 물질”이라고 정의하였다. 일반적으로 내분비계 장애 물질의 물리 화학적 특성은 내인성 호르몬과 달리 쉽게 분해되지 않고 안정하여 환경이나 생체내에서 지속적으로 수년간씩 잔류하며, 인체 등 생물체의 지방 및 조직에 농축되는 성질이 있는 것으로 알려져 있다.

구체적인 분류를 보면 세계야생 생물기금 (WWF)에서는 총 67여종 (농약-41종, 산업용 화학물질 - 17종, 부산물 또는 대사산물 - 9종)을, 미국 EPA는 69여종을 등재하였고, 미국 Illinois EPA에서는 총 73여종 (알려진 물질 19종, 가능성 있는 물질 - 28종, 의심되는 물질 26종)이고, OECD는 27개 부류를 그리고 일본 환경청은 WWF와 동일한 67여종을 등재하였으며, 일본 국립 의약품 식품위생연구소에서는 총 142여종 (가소제-9종, 플라스틱에 존재하는 물질-17종, 산업장 및 환경오염물질-21종, 농약류-75종, 중금속-3종, 합성 에스트로젠-8종, 식품 및 식품첨가물-3종, 식물성 에스트로젠-6종)으로 분류하고 있고, 우리나라에서는 WWF의 67종을 내분비계 장애 추정물질로 선정하여 주의깊게 관찰하고 있다. 미국 Illinois EPA 목록은 분류를 좀 더 자세히 세분하여 Known, Probable, Suspect Category로 나누어 1997년 6월에 DCBI NIHS에 보고하였는데, Known category는 동물과 일부 사람에서 내분비계 장애가 입증된 물질이고 Probable category는 생물과 bio-assay에서 내분비계 장애 작용이 우세하다고 입증된 물질이고, Suspect category는 생물에서는 증거가 부족하고 bio-assay에서만 입증된 물질을 분류하였다. 대표적인 WWF 67종, Illinois EPA 73종, 일본 국립의약품식품위생연구소의 142종의 내분비계 장애물질 목록을 첨부하였다.

【WWF List of Known & Suspected Hormone Disruptors】

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

Persistent Organohalogenes		Dioxins/furans	Octachlorostyrene
		PCBs	Hexachlorobenzene
		PBBs	pentachlorophenol
Pesticides			
2,4,5-T	DBCP	h-epoxide	oxychlorane
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	

Penta-to Nonyl-Phenols

Bisphenol A

Phthalates

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)

Styrene dimers and trimers

Benzo(a)pyrene

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

【ILLINOIS EPA ENDOCRINE DISRUPTORS STRATEGY】

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

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 Pthalate (+)
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)	sp-tert-Pentylphenol (+) Permethrin
	Styrene (*, +) Update	Ziram
	2,4,5-T	
	Trifluralin	
	Vinclozolin	
	Zineb	

【일본 국립 의약품 식품 위생연구소 분류 내분비계장애 물질목록 - I】

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)	oxychlorane (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)	

【일본 국립 의약품 식품 위생연구소 분류 내분비계장애 물질목록 - II】

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)prylene	tributyltin compound
6-bromonaphtol-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	
Hormon-mimicking Substances Naturally Present in Platns	
Phytoestrogens	daidzein
coumestrol	biocheanin A
formonoetin	genistein

7. 산업관련 내분비계 장애물질과 파급효과

가) 용도와 사용량

내분비계장애물질로 알려진 물질들의 산업계 또는 실생활에서의 용도는 매우 다양한 형태로 쓰여지고 있다. 또한 사용량도 물질의 용도에 따라 다양하게 나타나고 있다. 주요 내분비계장애물질들의 산업계에서의 용도와 규제내용 및 사용량을 도표화하여 다음과 같이 정리하였다.

우리나라의 내분비계장애 추정물질 목록 및 사용실태 - 1						
※ 농약 (41종), 산업용화학물질 (17종), 부생성물 또는 대사물 (9종)						
	물 질	용 도	규 제 내 용	제 조 (톤)	수 입 (톤)	사 용 (톤)
1	다이옥신	소각시설 부산물	폐기물			
2	퓨란					
3	폴리염화비페닐류(PCBs)	변압기 절연류	유해(금지 '96), 폐기물, 수질, 산안(특정)			
4	폴리브롬화비페닐류(PBBs)	방염제	hexa-, octa-; 신규, deca-; 기존			
5	tybutyltin oxide	선저도료	유해 (제한)	232	7	239
6	펜타클로로페놀(PCP)	방부제, 제초제, 살균제	유해(금지 '91), 산업(특정), 농약(금지)			
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)		3	3
9	알라클로르	제초제	농약(등록)	392		392
10	알디캅	살충제	유해(금지'91), 농약(금지)			
11	베노밀	살충제	농약(등록)	37	138	175
12	(bata-HCH)	살충제	유해(금지 '91)			
13	carbaryl	살충제	유해(유독물), 농약(등록)		39	39
14	클로르단	살충제	유해(제한), 농약(금지 '69)			
15	cypermethrin	살충제	유해(유독물), 농약(등록)	304		304
16	DBCP	살충제	유해(금지 '91)			
17	DDT	살충제	유해(금지 '91), 농약(금지 '71)			
19	디엘드린	살충제	유해(제한), 농약(금지'70)	593		
20	엔도수판	살충제	유해(제한), 농약(등재)			593
21	esfenvalerate	살충제	농약(등재)			
22	ethlyparathion	살충제	유해(제한), 농약(등재)	135		135
23	fenvalerate	살충제	유해(유독물), 농약(등재)		23	23
24	lindane	살충제	유해(금지 '91), 농약(금지 '79)			23
25	heptachlor	살충제	유해(제한), 농약(금지 '79)			
26	kelthane (22.디코폴)	살충제	유해(유독물), 농약(등재)		15	15
27	malathion	살충제	유해(유독물), 농약(등재)		2	2
28	mancozeb	살균제	농약(등재)		1,946	1,946
29	maneb	살균제	농약(금지 '89)			
30	methomyl	제초제	유해(유독물), 농약(등재)	56	144	200
31	metribuzin	제초제	농약(등재)			

우리나라의 내분비계장애 추정물질 목록 및 사용실태 - II

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

	물 질	용 도	규 제 내 용	제 조 (톤)	수 입 (톤)	사 용 (톤)
32	nitrofen	제초제	유해(유독물), 농약(금지 '81)			
33	toxaphene	살충제	유해(금지 '91), 농약(금지 '82)			
34	trifluralin	제초제	유해(제한), 농약(등재)			
35	vinclozolin	살균제	농약(등재)		2	2
36	zineb	살균제	농약(금지 '90)			
37	ziram	살균제	유해(유독물)			
38	Octachlorostyrene	유기염소계화합물의 부생성물				
39	DDT metabolites	DDT의 대사물				
40	heptachlor epoxide	heptachlor의 대사물				
41	oxychlorane	클로르단의 대사물				
42	헥사클로르벤젠 (HCB)	살균제, 유기합성원료	제조.수입사례 없는 물질			
43	아미트롤	제초제, 분산염료, 수지경화제	농약(제조.수입사례 없는 물질)			
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	농약(제조.수입사례 없는 물질)			
50	trans-nonachlor	살충제	제조.수입사례 없는 물질			
51	Penta-to-Nonyl-Phenols	계면활성제 원료	nonyl-		5,728	4,972
			octyl-			35
			tert-octyl			6
52	Bisphenol A	합성수지원료		28,885	33,479	61287
53	di-ethylhexylphthalate (DEHP)	플라스틱가소제		171617		92986
54	di-hexylphthalate (DHP)	플라스틱가소제				
55	butylbenzylphthalate (BBP)	플라스틱가소제			1,749	1,832
56	di-propylphthalate (DprP)	플라스틱가소제				
57	di-n-butylphthalate (DBP)	플라스틱가소제		2,300	91	4,495
58	dicyclohexylphthalate (DCHP)	플라스틱가소제			1	1
59	di-n-pentylphthalate (DPP)	플라스틱가소제				
60	di-ethylphthalate (DEP)	플라스틱가소제				
61	styrene dimers	스티렌수지의 미반응물	Polystyene	2,941	490	18879
62	styrene trimers					
63	benzo(a)pyrene	비의도적생성물				
64	2,4-dichlorophenol	원료중간체				
65	Diethylhexyladipate	플라스틱가소제		3,724		1,372
66	Venxophenone	의약품합성원료, 보착제				
67	N-butylbenzene	합성중간체, 액정제조용				

나) 경제적 파급효과

내분비계 장애물질의 대부분이 화학물질인 관계로 이들을 취급 또는 생산, 소비하는 산업계에 미치는 영향은 곧바로 경제적 파급효과로 나타날 수 있다. 컵라면 문제에서도 알 수 있듯이 스티로폴을 생산하는 산업체는 막대한 타격을 입고 그 대책에 부심하고 있는 실정이다. 내분비계 장애물질로 현재 알려진 물질들 이외에도 많은 수의 화학물질들이 내분비계 장애를 유발할 수 있는 가능성이 내재되어 있으므로 이와같은 경제적 파급효과를 고려하여 앞으로 화학물질의 취급, 생산 등 모든 면에서 주의 깊은 관찰과 많은 연구가 이루어져야 하리라 사료된다.

특히 국가간 수출입에 관련된 제품들 속에서의 내분비계 장애물질들의 존재여부가 하나의 또 다른 무역장벽으로 대두될 가능성도 배제 할 수 없는 상황이므로, 내분비계 장애물질을 최대한 줄이려는 노력과 병행하여, 이들의 대체물질 개발, 대체공정, 저감기술 등에도 산업계와의 연계 차원에서 시급한 연구가 병행되어야 하리라 본다. 무슨 일이 일어난 후 그것을 인지하면 늦을 수밖에 없듯이, 합리적이고 논리적인 해결의 접근방법으로 “내분비계 물질이 들어있다”는 단순한 “있다” “없다”의 차원에서 한 차원 성숙한 접근 방법으로서 첨단과학기술력을 이용하여 산업계 및 경제적 파급효과를 최소화하는 슬기로운과 무엇보다도 중요한 국민들의 불안감해소와 국민복지차원의 자연과의 조화로운 삶에 모든 역량의 집중이 필요하리라 사료된다.

E-screen assay

1. 서론

환경에 존재하는 environmental chemical들이 생체내의 내분비계에 작용하여 생물체에게 breast cancer, 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 촉진시키며 cell type-specific protein의 합성과 분비를 유도시킨다고 보고되었다 (1). 이러한 estrogenic effect는 estrogen receptor와의 반응을 통해서 일어나며 estrogen receptor는 기존에 알려지고 전적인 receptor인 estrogen receptor alpha (ER α) 이외에 1996년 estrogen receptor beta (ER β)도 발견되었다 (2-3). E-screen assay는 environmental chemical

의 estrogenicity를 in vitro 방법으로 평가하는 방법으로서 Soto등이 개발하였으며 chemical이 MCF-7 cell (Bus cell)에 미치는 cell proliferative effect를 parameter로 하여 chemical의 estrogenicity를 평가하는 방법으로서 estrogen-induced gene expression에 기초한 assay 방법이며 cloned MCF-7 Bus cell을 사용하여 실험한다 (4-7). 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 Soto등이 cloning한 MCF-7 Bus cells 이었다 (8). E-screen assay에 의해서 alkylphenol류, antioxidants, polychlorinated biphenyl, pesticides, bisphenol-A, plasticizer등이 MCF-cell proliferation을 증가시키는 것으로 밝혀졌다 (4). In vitro assay가 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 수는 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 있어 실험법의 정립을 통해 널리 활용되리라 기대된다.

2. 실험재료 및 방법

(1) 세포 및 세포 배양액

본 연구에 사용되는 세포주는 estrogen-sensitive human breast cancer cell line으로 Soto 등에 의해 cloned된 MCF-7 Bus cells을 분양 받아 사용하였다. 배양을 위해 사용한 배지는 5% FBS Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)이며 시험 시에는 5% charcoal dextran treated fetal bovine serum을 포함한 phenol red free-DMEM 배지를 사용하였다.

(2) 실험방법

실험방법은 Soto 등에 의해 소개된 방법 (4-7)을 수정하여 본 연구실에 맞게 정립하였다. 6-7일간 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지로 배양한 MCF-7 세포를 12 well plate에 3×10^4 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 포

함한 CD-DMEM medium은 ethanol에 녹인 chemical stock solution을 사용하기 바로 직전에 CD-DMEM medium으로 희석하여 만들어 사용하였다. Control은 CD-DMEM만을 가하고 positive control은 10^{-10} M 17β -estradiol를 처리하였으며 실험 계에서의 용매의 최종농도는 0.5% 이하로 하였다. 37°C , 5% CO_2 incubator에서 late exponential phase에 도달하는 144 시간에 MTT assay를 시행하였다 (9). 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 측정하였다.

Estrogen receptor binding assay

1.서론

Estrogen receptor binding assay는 미국 EPA의 EDSTAC의 Tier 1 Screening in vitro method에서 권장하는 방법으로서 estrogenic effects의 molecular mechanism을 밝히는데 필요한 방법이며 간편하고 빠르게 screening 할 수 있는 장점을 가지고 있다. Endocrine disrupting chemicals (EDCs)는 estrogen receptor (ER) nuclear protein에 specific하게 결합하여 natural estrogens의 활성을 증가시키거나 차단할 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 (1-2). 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 (4-6). ER의 competitive inhibitor (antiestrogen; e.g., tamoxifen)은 target tissue의 ER 작용을 block 함으로써 유방암 치료제로 개발되기도 하였다 (7-8). 최근에는 ER이 cloning 되었으며 이는 ER와는 다른 estrogen에 대한 affinity를 가지며 ligand binding 방식도 다른 것으로 밝혀지고 있다 (9). Hormone, DNA 그리고 ER 상호작용의 복잡성이 밝혀지고 있으며 조직에 따라 estrogen에 대해 다양하게 반응한다는 것을 알 수 있게 되었다 (10). 따라서 EDCs가 ER에 결합하거나 ER-mediated

gene regulation events에 영향을 주는 지를 구별해낼 수 있는 in vitro screening 방법이 필요하다. 따라서 test compound가 radioactive 17β -estradiol을 치환하는 원리를 이용한 competitive estrogen receptor binding assay를 정립하였으며, cell이나 tissue로부터 crude receptor preparation을 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 실험전까지 -70°C 에서 보관하였다. Radioactive 17β -estradiol을 $[2,4,6,7-^3\text{H}]$ 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)과 liquid scintillation counter (2000CA, Packard Instrumental International Switzerland)를 사용하였다.

(3) 실험방법

Estrogen receptor (ER)은 ER의 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, $[2,4,6,7-^3\text{H}]$ estradiol (10 nM), 농도별 test compound를 microcentrifuge tube에 넣고 최종 반응용량이 200 μl 가 되도록 하였다. 25°C 에서 3 시간 동안 incubation시킨 후, GF/B glass filter로 filtration하여 free $[2,4,6,7-^3\text{H}]$ estradiol은 제거하고 filter paper를 scintillation vial에 옮긴 후 Ultima Gold scintillation cocktail 4 ml을 가하고 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다. Nonspecific binding을 위해서는 10^{-5}M 17β -estradiol을 사용하였다. Competitive receptor binding assay를 위한 양성 대조약물로는 17β -estradiol 과 diethylstilbestrol (DES) 를 사용하였다.

Rodent 3-day Uterotrophic assay

1. 서론

Uterotrophic assay는 estrogen에 의해 유발된 uterus tissue mass 증가를 측정함으로써 estrogenicity를 간접적으로 평가하는 방법이다 (1). Uterotrophic assay는 미국 EPA의 EDSTAC에서 Tier 1 Screening in vivo method으로 권장하는 방법이며 종종 "gold standard" 방법이라 하기도 한다. Uterotrophic assay는 estrogenicity를 평가하는데 있어 오랜 기간 동안 널리 사용되어온 방법이다. 그러나 투여경로나 세부적인 실험방법이 표준화되어 있지 않아 실험 group 간의 차이도 있어 국제적으로 실험방법을 표준화하려는 노력이 진행되고 있다 (2-4). Hertz등은 uterotrophic assay가 chemical이 estrogen으로 작용하는지 아닌지를 평가 하는 방법으로서 이 방법이 반드시 채택되어야 한다고 주장하였다 (5). 한편 estrogenic chemical 이 조직에 따라서 다른 반응성을 갖을수 있다. 좋은 예로서 breast tissue에 antiestrogen인 tamoxifen은 uterine tissue에 대해서는 uterotrophic estrogenic agonist로서 작용한다. 따라서 uterus 이외의 다른 tissue의 proliferative effect를 측정한다면 좀더 sensitive 하고 informative 한 방법이 될 것이다 (6). Rodent uterotrophic assay 의 장점은 다른 in vivo assay처럼 chemical의 plasma-protein binding 그리고 pharmacokinetics의 효과 하에서 estrogenicity를 측정 할 수 있다는 점이며 metabolism에 의해 변화된 estrogen의 estrogenic response를 평가할 수 있으며 낮은 농도의 estrogen-like chemical도 in vivo system에서 검출해낼 수 있는 민감한 방법이다. .

2. 실험재료 및 방법

(1) 실험동물

대한 실험동물센터를 통해 female Sprague-Dawley rat를 구매하여 3일간 실험실에 적응 시킨후 생후 22일째 체중 차이가 약 10g 범위내에 속하는 동물을 선택하여 사용하였다. 온도 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, 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

1) 군분리 및 용량설정

순화 기간 중 평균 체중에 가까운 개체로 선택하여 무 작위법을 이용하여 군 분리를 실시하여 한 군 당 5 마리로 하였다, 동물의 개체식별은 tail marking 과 사육 상자별 tag 표시법을 사용하였다.

2) 시험물질의 조제 및 투여

양성 대조군 (positive control group)은 17 β -estradiol을 30 μ g/3 ml가 되도록 corn oil에 균질하게 현탁 시킨 후 corn oil로 이를 단계적으로 희석하여 사용하였다. 17 β -estradiol을 0.3, 3, 및 30 μ g/kg의 3 가지 용량으로 3일간 매일 복강주사 (i.p.) 하였다. 투여용량은 미성숙 rat 체중 10 g 당 0.03 ml로 하였으며 물질의 용액제조는 투여 당일 실시하였다.

3) 검사항목

A. 체중

모든 동물에 대해 투여 직전과 부검직전에 체중을 측정한다.

B. 자궁무게

마지막 투여 후 약 24 시간이 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.

Yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay

1. 서론

환경 중에 존재하고 있는 많은 화학물질들은 정상적인 내분비 기능을 저해하여 인간의 건강에 영향을 미치고 있음이 알려져 있다. 스테로이드와 유사한 활성을 지닌 화학물질에 대한 노출에 따라 생식능력의 변형, 불임증, 자궁내막 증 유방암, 및 전립선암 등이 유발되는지의 여부가 관심을 끌고 있다. 스테로이드와 유사한 활성을 갖는 화학물질들에는 coumestrol, genistein 등의 천연물, DDT, methoxychlor, vinclozolin과 같은 살충제와 살진균제 그리고 bisphenol A와 p-nonylphenol 등이 있다. 화학물질들은 주변에 널리 분포되어있기 때문에, 어느 정도의 노출은 피할 수 없는 현실이다. 그러므로, 환경 중에서 이런 화학물질들이 어느 정도 농도의 노출로 인간의 건강을 위협하는지를 결정하는 것이

필요하다.

2. 내분비 기능 저해

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 반응 유전자들의 발현을 변형시키면서 원래 스테로이드가 작용하여 나타내는 유전자 발현에 변형을 일으킨다. 화학물질들이 수용체 매개 과정을 변형시키는 메커니즘은 많이 알려져 있다. 화학물질은 내인성 스테로이드의 합성, 대사, 분배, 및 분해를 변형시킴으로써 특별한 유전자의 위치에서 그것들의 작용 단계를 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 유사 활동과 스테로이드 활동을 방해하면서 직접적으로 상호작용을 할 것이다. 이와 같이 스테로이드 수용체에 직접적으로 작용하는 화학물질들은 매우 낮은 농도에서 효과를 나타내는 잠재성을 갖는다. 그러므로, 내분비 장애 효과에 관해서 화학물질들을 평가할 때는 그 효과가 수용체 매개되어지는 과정 또는 상호경로를 통해서 나타나는지를 결정하는 것이 필수적이다.

3. 원리

포유류의 스테로이드 수용체는 효모 종의 하나인 *Saccharomyces cerevisiae*가 스테로이드에 의존하는 transcriptional activator로써 기능을 나타낼 수 있다고 알려져 있다.

Estrogen, androgen, progesterone 수용체 유전자가 들어 있는 plasmid가 들어 recombinant yeast strain에 화학물질을 처리한 후 yeast가 나타나는 β -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 것으로 여겨져 온 상품화된 화학물질들을 평가함으로써 화학물질과 스테로이드 수용체간의 상호작용을 민감하고, 특이적인, 분석을 수행 할 수 있다.

4. 실험방법

(1) Yeast-based estrogen receptor assay

- 1) Human estrogen receptor gene이 들어 있는 yeast stock 125 μ l를 growth medium 50 ml에 접종한 후 28°C shaking incubator에서 24 시간 동안 배양을 한다.
- 2) 양성 대조물질로서 17 β -estradiol을 사용하고, 이는 실험하고자 하는 chemical과 함께 각각 ethanol로 2배 농도로 희석하여 각각 농도별로 96-well optically flat bottom microtitre plate에 10 μ l씩 넣은 후 건조시킨다.
- 3) Assay medium을 다음의 구성에 따라 제조한 후 200 μ l씩 각 well에 넣고 2분간 shaking한다.

Assay medium 구성	
Growth medium	50 ml
24hr incubated yeast medium	0.5~2 ml
Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside(CPRG)	0.5 ml

- 4) Low temperature incubator (32°C)에서 24시간 동안 배양한다.
- 5) 배양 중인 plate를 꺼내어 shaking함으로써 자라고 있는 yeast를 잘 섞어준 후 incubator에 넣고 다시 24시간 동안 배양한다.
- 6) 3일간 배양한 후에 microplate reader를 이용하여 540 nm와 620 nm에서 흡광도를 측정한다.
- 7) 각 파장에서의 흡광도 측정 결과에 의하여 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

- 1) Androgen receptor gene이 들어 있는 yeast stock 1 ml을 selective medium 50 ml에 접종 후 30°C shaking incubator (300 rpm)에서, 배양한다.
- 2) Yeast medium의 OD₆₀₀ 값이 1~2 될 때까지 배양한다.
- 3) OD₆₀₀이 0.03이 되도록 yeast medium을 selective medium으로 희석하고 CuSO₄ 50 μ M이 되도록 한다.
- 4) Chemical은 최종농도를 yeast medium의 1/1000이 되도록 tube에서 10배씩 희석하여 한 후 30°C shaking incubator에서 overnight 배양을 한다.
- 5) 배양 후 OD₆₀₀이 0.25가 되도록 희석한 후 10배로 희석하여 각 well에 100 μ l씩

넣는다.

6) Microplate reader로 590 nm에서 흡광도를 측정한다.

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

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

8) 420 nm에서 20분 동안 매분마다 흡광도를 측정하여 V_{max} 값을 얻는다.

9) 다음 식에 따라 β -galactosidase activity를 계산한다.

(3) Yeast-Based progesterone receptor assay

1) 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.

2) Yeast medium의 OD₆₀₀이 0.8~1.0 될 때까지 배양 한 후 배양한 yeast medium에 2배의 100 μ M이 되도록 CuSO₄를 넣는다.

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

4) 2)에서 준비한 yeast medium을 50 μ l씩 각각의 well에 넣고 잘 혼합한다.

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

6) 배양 후 microplate reader로 500 nm에서 흡광도를 측정한다.

8) Assay medium을 제조하여 각 well에 100 μ l씩 넣는다. (단, Assay medium은 제조 후 1시간 내에 사용한다.)

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

- 8) 420 mm에서 20분 동안 흡광도를 측정하여 V_{max} 값을 결정한다.
- 9) 다음 식에 따라 β -galactosidase activity를 계산한다.

8. 참고문헌

1. International Workshop on endocrine disruptors, Workshop report, Smithsonian Institution, Washington D.C. Jan. 23-24, USA, 1997.
2. Endocrine Toxicology, Ed; J.A. Thomas and H.D. Colby, 2nd Ed., Taylor & Francis, 1997
3. A Study on Hormone-like (Hormone-mimic) Effects of Exogenous substances, June 1997, Japan Chemical Industry Association and Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology and Information Center
4. 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
5. 내분비계장애물질 중장기 연구사업계획 (38000-67610-57-9961) 환경부, 1999
6. NIEHS/NTP Research and Interagency Activities on Endocrine Disrupting Chemicals, NIH, USA
7. Workshop on the Status of Regulatory and Research Activities on Endocrine Disrupting Chemicals, July 12, Holiday Inn Seoul, Korea, 1999
8. Welcome to EPA's Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Home, <http://www.epa.gov/opptintr/opptendo>
9. Endocrine disruptors listed from our stolen future and other references, <http://www.nihs.go.jp/hse/environ/sdsubs/substancesnew.html>

10. Co-ordination of Endocrine Disrupters Assessment Activities, <http://www.oecd.org/ehs/endocrin.htm>
11. Introduction to hormone disrupting chemicals, <http://website.lineone.net/~mwarhurst/>
12. Environmental Health Information Service, <http://ehis.niehs.nih.gov/>
13. Environmental Estrogens & other hormones, <http://www.tmc.tulane.edu/ecme/eehome/>
14. Endocrine disruptors research Initiative, <http://www.epa.gov/endocrine>
15. 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.
16. European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife. Report of Proceedings. December 2-4, 1996, Weybridge, UK,P128.
17. EPA : EDSTAC, Draft report, June 12, 1998.
18. Davis, D.L. and Bradlow, H.L., Can Environmental Estrogens Cause Breast Cancer?, *Sci. Amer.*, (1995) October, 166-172.
19. Fry, D.M., Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals, *Environ. Health Persp.*, (1995) 103 (Suppl. 7), 165-171.
20. Gilbertson, M., et al., Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease, *J. Toxicol. Environ. Health*, (1991) 33, 455-520.
21. Fox, G.A., Gilman, A.P., Peakall, D.B., Anderka, F.W., Behavioural

- Abnormalities on Nesting Lake Ontario Gulls, J. Wilc. Manage. (1978) 43(3), 477-483.
22. Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., and Woodward, A.R., Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida, Environ. Health Persp., (1994) 102, 680-688.
 23. Environmental Oestrogens: Consequences for human health and wildlife. Assessment A1. MRC Institute for Environment and Health, University of Leicester (1995).
 24. Palmer, B.D. and Palmer, S.K., Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and african clawed frog, Environ. Health Persp., (1995) 103 (Suppl 4), 19-25.
 25. Colorn,, T., Environmental estrogens; Health implications for Humans and wildlife, Environ. Health Persp., (1995) 103 (Suppl 7) 135-136.
 26. Krishnan, A., et al., Bisphenol-A : An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during auto claving., Endocrinology, (1991) 132 (8), 2279-2286.
 27. Soto, A.M., Justica, H., Wray, J. and Sonnenschein, C., *p*-Nonylphenol: A estrogenic xenobiotic released from 'Modified' polystyrene, Environ. Health Persp., (1991) 92, 167-173.
 28. Kartin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S., McGuire, W.L., Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. Endocrinology, (1978) 103, 1860-1867.
 29. Green S, Chambon P. The estrogen receptor: from perception to mechanism. In: Nuclear hormone receptors: molecular mechanisms, cellular functions,

- clinical abnormalities (Parker MG, ed). London:Academic Press, 1991; 15-38.
30. Parker MG, Arbuckle N, Dauvois, Danielian P, White R, Structure and function of the estrogen receptor. *Ann NY Acad Sci* 684:119-126 (1993).
 31. Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11 (1993).
 32. Landel CC, Kushner PJ, Greene G. Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ Health Perspect*;103 Suppl 7:23-8 (1995).
 33. Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol* 7:1266-74 (1993).
 34. Jordan VC. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 31:41-52 (1994).
 35. Grainger DJ, Metcalfe JC. Tamoxifen: teaching an old drug new tricks? *Nat Med* 2:381-5 (1996).
 36. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277:1508-10 (1997).
 37. Stancel GM, Boettger-Tong HL, Chiappetta C, Hyder SM, Kirkland JL, Murthy L, Loose-Mitchell DS. Toxicity of endogenous and environmental estrogens: what is the role of elemental interactions? *Environ Health Perspect* 10 Suppl 7:29-33 (1995).
 38. Hertz, R., The estrogen problem: retrospect and prospect. In *Estrogens in the Environment. II. Influences on Development*, ed. J.A. McLachlan. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1985, pp. 1-11.

39. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5925-30.
40. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA., Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997 Mar;138(3):863-70.
41. Carlos Sonnenschein and Ana M. Soto., An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 65(1) 143-150. 1998.
42. Soto AM, Sonnenschein C., The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J Steroid Biochem*. 1985 Jul;23(1):87-94.
43. Soto AM, Sonnenschein C., Mechanism of estrogen action on cellular proliferation: evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984, 16;122(3):1097-1103.
44. Soto AM, Fernandez MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C., Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect*. 1997 Apr;105 Suppl 3:647-54.
45. Pedraza V et al., The E-screen assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks, *Environ Health Perspect*, 1991, 103, 844-850.
46. Reel JR, Lamb IVC, Neal BH. Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam Appl Toxicol*. 1996 Dec;34(2):288-305
47. Ashby J, Lefevre PA, Odum J, Tinwell H, Kennedy SJ, Beresford NA, Sumpter

- JP., Failure to confirm estrogenic activity for benzoic acid and clofibrate: implications for lists of endocrine-disrupting agents. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1997 Aug;26(1 Pt 1):96-101.
48. Odum J, Lefevra PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J., The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1997 Apr;25(2):176-88.
49. Andersen HR, Andersson AM, Arnold SF, Autrup H, Barfoed M, Beresford NA, Bjerregaard P, Christiansen LB, Gissel B, Hummel R, Jorgensen EB, Korsgaard B, Le Guevel R, Leffers H, McLachlan J, Moller A, Nielsen JB, Olea N, Oles-Karasko A, Pakdel F, Pedersen KL, Perez P, Skakkeboek NE, Sonnenschein C, Soto AM, Sumpter JP, Thorpe SM, Grandjean P., Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. *Environ Health Perspect.* 1999 Feb;107 Suppl 1:89-108
50. Hertz, R., The estrogen problem; retrospect and prospect. In *Estrogens in the Environment. II. Influences on Development*, J.A. Mclachlan. ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1985, pp. 1-11.
51. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA, Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, 93 (12): 5925-30.
52. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA., Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology.* 1997, 138(3): 863-70.
53. Sonnenschein C and Soto AM, An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1998, 65(1): 143-150.

54. Soto AM, Sonnenschein C, The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1985, 23(1): 87-94.
55. Soto AM, Sonnenschein C, Mechanism of estrogen action on cellular proliferation: evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 122(3): 1097-1103.
56. Soto AM, Fernandez MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C, Developing a marker of exposure to xenostrogen mixture in human serum. *Environ. Health. Perspect.* 1997, 105 (suppl 3): 647-54.
57. Pedraza V et al., The E-screen assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks. *Environ. Health. Perspect.* 1991, 103: 844-850.
58. Perez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, Pedraza V, Olea N, The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health. Perspect.* 1998, 106(3): 167-74.
59. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. Yadetie F. Arukwe A. Goksoyr A. Male R. *Science of the Total Environment.* 233(1-3):201-210, 1999.
60. Strain differences in vaginal responses to the xenoestrogen bisphenol A. Long XH. Steinmetz R. Ben-Jonathan N. Caperell-Grant A. Young PCM. Nephew KP. Bigsby RM. *Environmental Health Perspectives.* 108(3):243-247, 2000
61. Arcaro KF. Yang Y. Vakharia DD. Gierthy JF. Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. [Article] *Journal of Toxicology & Environmental Health. Part A.* 2000,2 ,59(3):197-210,

62. Garrett SD. Lee HA. Morgan MRA. A nonisotopic estrogen receptor-based assay to detect estrogenic compounds. [Article] *Nature Biotechnology*. 1999 11. 17(12):1219-1222,
63. Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation in vitro. Vinggaard AM. Breinholt V. Larsen JC. *Food Additives & Contaminants*. 16(12):533-542, 1999.
64. Phylogenetic analyses reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms. Kelley ST. Thackray VG. *Journal of Molecular Evolution*. 49(5):609-614, 1999.
65. Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. Arcaro KF. Yang Y. Vakharia DD. Gierthy JF. *Journal of Toxicology & Environmental Health. Part A*. 59(3):197-210, 2000.
66. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. Rehmann K. Schramm KW. Kettrup AA. *Chemosphere*. 38(14):3303-3312, 1999.
67. Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. Arcaro KF. Yang Y. Vakharia DD. Gierthy JF. *Journal of Toxicology & Environmental Health. Part A*. 59(3):197-210, 2000.
68. Green S, Chambon P. The estrogen receptor: from perception to mechanism. In: *Nuclear hormone receptors: molecular mechanisms, cellular functions, clinical abnormalities* (Parker MG, ed). London: Academic Press, 1991; pp 15-38.
69. Parker MG, Arbuckle N, Dauvois S, Danielian P, White R, Structure and function fo the estrogen receptor. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1993 684:119-126.
70. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 1994, 63: 451-486.

71. Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* 1993, 7: 4-11.
72. Landel CC, Kushner PJ, Greene G. Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ. Health. Perspect.* 1995; 103 (Suppl 7): 23-8.
73. Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol. Endocrinol.* 1993, 7:1266-74.
74. Jordan VC. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994, 31:41-52.
75. Grainger DJ, Metcalfe JC. Tamoxifen: teaching an old drug new tricks? *Nat. Med.* 1996, 2: 381-5.
76. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*, 1997, 277: 1508-10.
77. Stancel GM, Boettger-Tong HL, Chiappetta C, Hyder SM, Kirkland JL, Murthy L, Loose-Mitchell DS. Toxicity of endogenous and environmental estrogens: what is the role of elemental interactions? *Environ. Health. Perspect.* 1995, 103 (Suppl 7): 29-33.
78. Barnes S. Kim H. Darley-Usmar V. Patel R. Xu J. Boersma B. Luo M. Beyond ER alpha and ER beta: Estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *Journal of Nutrition.* 130(3):656S-657S, 2000
79. Hutz RJ. Wimpee BAB. Dasmahapatra A. Weber DN. Heimler I. Chaffin CL. Differential modulation by aromatic hydrocarbon receptor agonist of circulating estradiol-17 beta and estrogen-receptor DNA-binding capability in

female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). [Article] *Zoological Science*. 16(1):161-166, 1999

80. Korach KS, Mclachlan JA, Techniques for detection of estrogenicity. *Environ Health Perspect*. 1995, 103 (Suppl 7): 5-8.
81. Reel JR, Lamb IVC, Neal BH. Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol*. 1996, 34(2): 288-305.
82. Ashby J, Lefevre PA, Odum J, Tinwell H, Kennedy SJ, Beresford NA, Sumpter JP., Failure to confirm estrogenic activity for benzoic acid and clofibrate: implications for lists of endocrine-disrupting agents. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 1997, 26 (1 Pt 1): 96-101.
83. Odum J, Lefevra PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, 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.
84. Hertz, R., The estrogen problem: retrospect and prospect. In *Estrogens in the Environment. II. Influences on Development*, ed. J.A. Mclachlan. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1985, pp. 1-11.
85. Andersen HR, Andersson AM, Arnold SF, Autrup H, Barfoed M, Beresford NA, Bjerregaard P, Christiansen LB, Gissel B, Hummel R, Jorgensen EB, Korsgaard B, Le Guevel R, Leffers H, McLachlan J, Moller A, Nielsen JB, Olea N, Oles-Karasko A, Pakdel F, Pedersen KL, Perez P, Skakkeboek NE, Sonnenschein C, Soto AM, Sumpter JP, Thorpe SM, Grandjean P., Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of

- hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health. Perspect.* 1999, 107 (Suppl 1): 89-108.
86. Beresford, N., Routledge, E. J., Harris, C. A., and Sumpter, J. P., Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity, 162, 22-33 2000.
87. Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., and McDonnell, D. P., Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a Yeast-Based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, 205-212, 1997.
88. Harris, C. A., Henttu, P., Parker, M. G., and Sumpter, J. P., The estrogenic activity of phthalate esters *In vitro*, *Environ. Health. Perspect.*, 105(8), 802-811, 1997.
89. Routledge, E. J., and Sumpter, J. P. Structural feature of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 3280-3288, 1997.
90. Routledge, E. J., and Sumpter, J. P., Estrogenic activity of surfactant and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(3), 241-248, 1996.
91. Schultz, T. W., Seward, J. R., and Sinks G. D., Estrogenicity of benzophenones evaluated with a recombinant yeast assay: comparison of experimental and rules-based predicted activity, *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(2), 301-304, 2000.
92. Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., and Serrano, F. O., The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogen: An update on estrogenic environmental pollutants, *Environ. Health. Perspect.*, 103-122, 1995.

93. Wright, A. P. H., Carlstedt-Duke, J., and Gustafsson, J. A., Ligand-specific transactivation of gene expression by a derivative of the human glucocorticoid receptor expressed in yeast. *J. Biol. Chem.*, 265, 14763-14769, 1990.
94. Zava, D. T., and McGurie, W. L. Androgen activation through estrogen receptor in a human breast cancer cell line, *Endocrinology*, 103, 624-631, 1978.