

미성숙 수컷 랫드에서 Hershberger 시험에 의한 Di(n-butyl) Phthalate의 항안드로젠 효과

정문구* · 김종춘 · 서정은
한국화학연구소 안전성연구센터 생식독성실

The Antiandrogenic Effects of Di(n-butyl) Phthalate in Immature Male Rats: Establishment of Hershberger Assay for Endocrine Disruptors

Moon-Koo Chung*, Jong-Choon Kim and Jeong-Eun Suh

Reproductive Toxicology Division, Toxicology Research Center, Korea
Research Institute of Chemical Technology, Yousung, Daejeon 305-600, Korea
(Received December 1, 1999)
(Accepted February 24, 2000)

ABSTRACT : Hershberger assay is known as one of the *in vivo* short-term screening assays for endocrine disrupting chemicals (EDCs), but this method is not a validated test system. In the present study, the establishment of Hershberger assay to detect EDCs was tried using a model substance, di(n-butyl) phthalate (DBP), a plasticizer for plastics. Thirty-six immature male rats were randomly assigned to six groups: DBP 0, 40, 200, and 1000 mg/kg, a positive control (flutamide 20 mg/kg), and a combination group (DBP 1000 mg/kg and testosterone 50 µg/kg). DBP and flutamide were administered by gavage to male rats from day 21 to 40 post partum. Testosterone was subcutaneously injected during the same period. We evaluated body weight gain, weights of ventral prostate, seminal vesicle, and levator ani and bulbocavernosus muscle, and serum concentrations of testosterone and luteinizing hormone in male rats. The weights of seminal vesicle and levator ani and bulbocavernosus muscle of males receiving 1000 mg/kg of DBP were significantly lower than controls. There was no effect of DBP-treatment on body weight gain, prostate weight, and hormone concentrations. In the positive control group, the weights of seminal vesicle and levator ani and bulbocavernosus muscle of males receiving 20 mg/kg of flutamide were significantly lower than controls. In the combination group, there was no effect of co-treatment of DBP and testosterone on all parameters observed. The results suggest that DBP has an antiandrogenic effect and testosterone has an antagonistic effect against DBP. This method was found to be a useful short-term screening assay system for EDCs.

Key Words : Endocrine disrupting chemicals, *In vivo* screening assay, Di(n-butyl) phthalate, Ventral prostate, Seminal vesicle, Levator ani and bulbocavernosus muscle

I. 서 론

최근에는 생체내에서 호르몬의 생성, 분비, 이동, 대사 및 수용체와의 결합 등을 교란시키는 유해화학물질인 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemicals)에 대한 문제가 세계적인 관심의 초점이 되고 있다(Colborn 등,

1996). 이들은 생체내에서 마치 호르몬과 같이 작용한다고 하여 일명 환경호르몬이라 불리고 있으며, 일상생활에서 접하는 거의 모든 화학제품에 포함되어 있다는 데에 그 심각성이 있다. 이러한 물질들은 자연상태에서 잘 분해되지 않고 저농도로 장기간에 걸쳐서 생체에 노출됨으로서 생체의 내분비계를 교란시킨다고 한다. 내분비계장애물질은 사람이나 야생동물에 있어서 요도하열(hypospadias), 잠복정소(cryptorchidism), 가성반음양(pseudohermaphroditism) 등의 생식기 발육이상과 정자수 감소 및 정자활력저하 등의 생식기능의 이상, 그리고 차세대의 발육이상 등의 생

*To whom correspondence should be addressed

List of abbreviations: EDCs, endocrine disrupting chemicals, EDTA, Endocrine Disrupter Testing and Assessment, EDSTAC, Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee; DBP, di(n-butyl) phthalate.

식독성학적 부작용을 초래하고 정소, 전립선 및 유방의 암 발생을 증가시키는 중요한 원인이라고 알려지고 있다 (Colborn 등, 1993; Ahlborg 등, 1995). 이에 따라 세계 각국의 정부는 그 대책수립에 나서 정부연구기관, 산업계, 학계, 소비자단체 및 환경보호단체들과 공동으로 해결책 마련에 부심하고 있다. 그러나 이러한 내분비계 장애물질을 검색하기에는 기존의 생식독성시험들은 많은 동물과 인력, 경비 및 시간이 소요되고 또한 민감성이 낮아서 내분비활성물질(hormonally active compounds)을 신속하고 정확하게 검색하기 위한 새로운 단기검색법의 개발 및 확립이 절실히 요구되고 있다. 그 중 국제기구인 경제협력개발기구(OECD)에서는 1998년 3월 환경호르몬 시험 및 평가 실무작업반(Endocrine Disrupter Testing and Assessment, EDTA)을 구성하여 독성기전연구, 실험동물모델개발, 생체내에서 호르몬 생합성과 대사를 예견할 수 있는 *in vitro* 시험법 개발을 수행해 오고 있다. 미국 환경청(US EPA)에서는 1996년 5월 환경호르몬 검색 및 시험자문위원회(Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)를 설치하였고 내분비계 장애물질로 의심되는 화학물질에 대한 검색 및 시험법에 대해서 연구를 하고 있다(EPA, 1997). 일본에서는 1996년 7월부터 후생성과 환경청을 중심으로 내분비계 장애물질에 대한 연구를 추진하고 있다. 그리고 우리나라에서는 1998년 5월부터 환경부와 식품의약품안전청을 중심으로 대책 및 연구협의회를 구성하여 이 문제를 다루기 시작하였다.

Di(*n*-butyl) phthalate(DBP)는 가소제로 주로 사용되며 접착제, 플라스틱 코팅제 및 화장품 등의 많은 소비제품들이 DBP를 함유하고 있다. DBP는 항안드로젠성 물질로서 랫드에서 수컷 생식기의 발달 및 기능의 이상을 유발하고 (Dostal 등, 1988; Mylchreest 등, 1999), 임신암컷에서는 모독성과 최기형성을 나타낸다고 한다(Ema 등, 1993).

본 연구에서는 내분비계 장애물질을 단기간에 검색할 수 있는 *in vivo* 시험법을 확립하고자 모델물질인 DBP를 이용하여 Hershberger 시험(1953)을 수행하였다. Hershberger 시험에서 수컷동물의 정소적출여부와 투여기간 등의 세부적인 시험방법은 여러 가지가 제안되고 있지만 본 시험에서는 정소에서 호르몬 영향이 크지 않은 미성숙 수컷동물을 사용하여 정소적출을 하지 않고 20일간 투여하는 방법으로 시험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질은 Sigma사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입한 di(*n*-butyl) phthalate(DBP, Lot

No. 67H0327), flutamide(Lot No. 87H1511) 및 testosterone (Lot No. 71620)을 사용하였다. DBP와 testosterone은 corn oil에 현탁하여 조제하였고, flutamide는 0.5% CMC (carboxy methyl cellulose) 용액에 현탁하여 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100)에서 구입한 19일령의 미성숙 SD 수컷 랫드를 인공조명하의 SPF(specific pathogen free) 조건하에서 사육하였다. 시험기간 중 방사선 조사(2.0 Mrad)로 멸균한 실험동물용 고형사료 [제일사료(주)]와 자외선 유수살균기로 소독한 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 시험은 미국 실험동물관리 인증협회(American association for Accreditation of Laboratory Animal Care: AAALAC)가 인증한 시설에서 수행하였고, 모든 시험방법은 본 연구소의 동물관리사용위원회(Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)로부터 승인을 받았다.

3. 투여량의 설정과 시험군의 구성

용량설정을 위해 DBP 15, 60, 240 및 960 mg/kg 용량으로 예비시험을 실시한 결과, 모든 투여 용량에서 시험물질의 투여에 기인된 체중과 복측전립선(ventral prostate) 중량의 변화는 인정되지 않았으나 정소(testis)는 960 mg/kg 투여군의 동물에서 심한 위축을 나타냈고 정낭선(seminal vesicle)의 중량은 960 mg/kg 투여군에서 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 이를 기초로 1000 mg/kg 을 고용량으로 정하고 공비 5로 중용량 및 저용량을 각각 200 및 40 mg/kg으로 설정하였으며 그 외에 매체대조군(corn oil)을 두었다. 본 시험의 양성대조군으로서는 flutamide 20 mg/kg 투여군을 설정하였고, antagonistic effects를 조사하기 위해 testosterone(50 µg/kg/day, s.c.) 병용투여군을 두었다. 각 군당 6마리씩의 수컷동물을 사용하였다.

4. 시험물질의 투여

정소를 적출하지 않은 21일령의 수컷에게 DBP와 flutamide는 20일간 1일 1회씩 경구적으로 반복투여하였고 testosterone은 동일기간에 피하로 반복투여하였다. 투여액은 주 2회 측정된 체중을 기초로 DBP와 flutamide는 체중 kg당 10 ml로, testosterone은 kg당 4 ml로 산출하였다.

5. 관찰 및 검사항목

1일 1회씩 일반증상을 관찰하였고 주 2회씩 체중을 측

정하였다. 20일간의 반복투여가 끝난 익일에 동물을 에테르로 마취시킨 후 부검하였다. 이 때 복대동맥에서 채혈한 후 혈청을 분리하여 testosterone과 luteinizing hormone 함량을 측정하였다. 또한 생식기관의 변화를 육안적으로 세밀히 관찰한 다음 복측전립선과 정낭선의 중량을 측정하였고, 항문거근과 구해면체근(levator ani and bulbocavernosus muscle)을 함께 적출하여 중량을 측정하였다.

6. 통계학적 분석

얻어진 모든 시험자료는 평균±표준편차로 표기하였고, 통계분석은 SAS 프로그램(SAS Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다. 일원배치분산분석(one-way ANOVA)에서 유의성이 인정된 자료는 Dunnett 다중비교법을 이용하여 5% 수준에서 유의차 검정을 하였다.

III. 결 과

DBP와 flutamide는 경구로 그리고 testosterone은 피하로 반복투여하여 얻어진 결과는 Table 1과 같다. 본 시험에서 시험물질 DBP의 투여에 기인한 체중의 변화는 인정되지 않았으며, 복측전립선 중량에서도 통계학적 유의성은 관찰되지 않았다. 반면 정낭선과 항문거근 및 구해면체근의 중량은 1000 mg/kg 투여군에서 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하여, DBP 1000 mg/kg의 반

복투여가 미성숙 랫드의 정낭선과 항문거근 및 구해면체근에 현저한 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다. 그런데 본 시험의 양성대조군인 flutamide 20 mg/kg 투여군에서는 역시 정낭선과 항문거근 및 구해면체근의 중량감소가 발견되었으나, DBP(1000 mg/kg/day)와 testosterone (50 µg/kg/day, s.c.) 병용투여군에서는 상기의 항쪽에 있어서 어떠한 변화도 관찰되지 않아 testosterone이 DBP에 대하여 길항작용을 나타냄을 알 수 있었다. 그리고 testosterone과 luteinizing hormone 함량이 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 유의차는 인정되지 않았다.

IV. 고 찰

DBP는 여러종류의 세포를 기초로 한 분석에서 약한 에스트로젠 수용체 작용물질로 판명된 이래(Jobling 등, 1995; Harris 등, 1997), 환경호르몬으로서 주목을 끌어들였다. DBP는 많은 소비제품들에 포함되어 있고 구강섭취가 인체노출의 주요 경로로 알려져 있으며 경구섭취 후 주로 mono(*n*-butyl) phthalate의 형태로 위장관을 통해 신속히 흡수된다고 한다. 최근 연구보고에 의하면 DBP는 에스트로젠성이라기 보다 항안드로젠성 물질이라고 하며, 암컷에서 성주기 이상, 자궁중량 증가, 수태율 감소 등은 유발하지 않고 발생중인 수컷에서 안드로젠 의존적 변화를 야기하는 것으로 보고되었다(Meek 등, 1997; Gray 등, 1998; Mylchreest 등, 1998; Wu 등, 1998). 임신중인 랫드

Table 1. Findings of male rats treated with di(*n*-butyl) phthalate

Parameters	Di(<i>n</i> -butyl) phthalate (mg/kg/day)				Flutamide	Di(<i>n</i> -butyl) phthalate and Testosterone
	0	40	200	1000		
No. of male rats examined	6	6	6	6	6	6
Body weight (g) Day 1	44.53±5.69	42.48±4.20	43.27±4.05	42.05±3.21	43.63±2.94	41.22±2.63
Day 4	66.57±6.48	65.25±5.82	65.98±5.80	63.03±3.56	66.08±4.21	62.70±2.52
Day 7	83.92±7.10	85.55±5.50	85.10±6.18	81.82±3.25	83.25±3.20	79.73±4.69
Day 11	110.47±8.86	115.33±8.31	115.87±8.19	110.20±3.01	110.77±3.74	110.05±5.71
Day 14	136.07±12.67	141.83±9.45	141.18±10.39	135.65±2.95	134.97±4.04	135.15±6.66
Day 18	169.25±16.38	176.22±11.52	176.27±11.94	168.00±5.97	163.42±3.04	167.47±6.93
Day 21	185.55±18.37	193.72±11.30	192.55±12.97	183.50±5.35	178.88±3.12	182.13±7.49
Weight gain (Days 1-21)	141.02±12.92	151.23±7.78	149.28±9.48	141.45±7.63	135.25±2.26	140.92±5.66
Ventral prostate weight (g)	0.092±0.015	0.121±0.022*	0.143±0.021**	0.083±0.017	0.071±0.020	0.099±0.020
per B.W. (%)	0.049±0.005	0.063±0.011	0.074±0.012**	0.045±0.009	0.040±0.011	0.054±0.011
Seminal vesicle weight (g)	0.126±0.026	0.143±0.034	0.124±0.035	0.083±0.016*	0.053±0.019**	0.099±0.018
per B.W. (%)	0.068±0.011	0.074±0.016	0.064±0.016	0.045±0.008	0.030±0.011**	0.054±0.010
Levator ani & bulbocavernosus muscle weight (g)	0.256±0.032	0.273±0.080	0.290±0.040	0.189±0.008	0.148±0.020**	0.227±0.022
per B.W. (%)	0.137±0.012	0.140±0.035	0.150±0.012	0.103±0.006*	0.083±0.011**	0.125±0.016
Serum testosterone concentration (ng/ml)	0.72±0.55	0.53±0.42	0.40±0.42	0.50±0.45	0.68±0.72	1.02±0.73
Serum LH concentration (IU/l)	1.47±0.05	1.42±0.11	1.42±0.09	1.50±0.05	1.51±0.07	1.52±0.04

Values are means±S.D., * and ** indicate significant difference at p<0.05 and p<0.01 levels, respectively, when compared with the vehicle control group. B.W.=body weight

에 DBP를 투여하면 항안드로젠성 물질인 flutamide와 유사한 기형을 유발하며(Imperato-McGinley 등, 1992; van der Schoot, 1992; Ema 등, 1993; Kassim 등, 1997), 차세대 동물에게는 음성 생식기의 발달 및 기능에 장애를 나타낸다고 한다(Mylchreest 등, 1999). 또한 랫드의 정소에서는 세르톨리세포에 독성을 나타내고(Foster 등, 1982; Gray와 Beaman, 1984), 1일 1g/kg 이상의 단회 또는 반복투여는 곡세정관 상피세포의 탈락을 유도함으로써 정자형성을 저해하는데(Cater 등, 1977), 이러한 정소독성은 신생아 또는 사춘기의 랫드가 성숙한 랫드보다 더 민감하다고 한다(Foster 등, 1980; Dostal 등, 1988).

본 Hershberger 시험에서는 항안드로젠성 물질인 DBP가 1000 mg/kg의 용량에서 미성숙 수컷 랫드의 정낭선과 항문거근 및 구해면체근의 중량감소를 유발한다는 것이 증명되었다. 또한 flutamide 20 mg/kg을 투여한 양성대조군에서도 정낭선과 항문거근 및 구해면체근의 중량이 감소하여 두 물질간의 항안드로젠성에 대한 유사성과 수컷 랫드에 대한 agonistic effects를 확인할 수 있었다. 정낭선의 발육과 분화는 안드로젠 의존적이기 때문에 본 시험에서 관찰된 정낭선의 중량감소는 DBP와 flutamide의 항안드로젠성 효과에 기인된 것으로 인정된다. Hershberger 시험에서 또 다른 검사항목중의 하나인 전립선중량은 DBP 투여군과 양성대조군에서 공히 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 혈청내 testosterone 및 leutenizing hormone 함량이 있어서도 양성대조군을 포함한 모든 시험군에서 유의성있는 변화가 인정되지 않았는데, 이는 전립선중량과 호르몬 함량은 정낭선이나 항문거근 및 구해면체근의 중량에 비해 DBP의 항안드로젠성에 덜 민감하게 반응한다는 것을 나타낸다. 체중의 변화에 있어서도 모든 시험군에서의 결과가 매체대조군과 유사하게 나타났으며 이 소견 또한 DBP나 flutamide와 같은 항안드로젠성 물질에 대해서 체중은 거의 영향을 받지 않는다는 것을 암시해 준다. 한편 항안드로젠성 물질인 DBP에 대한 testosterone의 antagonistic effects를 확인하기 위해 DBP와 testosterone을 병용투여한 결과, DBP 단독투여군에서 관찰되었던 정낭선과 항문거근 및 구해면체근의 중량감소는 관찰되지 않았으며 다른 검사항목에서도 매체대조군과 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 소견은 testosterone의 antagonistic effects에 의한 결과로서 testosterone이 DBP와 같은 항안드로젠성 물질의 작용을 억제한다는 것을 나타낸다.

이상의 결과로부터 미성숙 수컷 랫드에 DBP를 1000 mg/kg의 용량으로 반복투여하면 정낭선과 항문거근 및 구해면체근의 중량 감소를 유발한다는 것을 알 수 있었고, 또한 정소를 적출하지 않은 미성숙 수컷랫드를 이용한 본 Hershberger assay법이 안드로젠성 및 항안드로젠성 내분

비계 장애물질의 검색에 유용한 시험법임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 환경부에서 주관하는 G7 과제의 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ahlborg, U.G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C.C., Hanberg, A., Baron, J., Tricopoulos, D. and Adami, O. (1995): Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometritis; an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**, 463-531.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378-384.
- Colborn, T., Dumaoski, D. and Myers, J.P. (1996): Our Stolen Future. Are we threatening our fertility, intelligence and survival? A Scientific Detective Story, Dutton, USA.
- Cater, B.R., Cook, M.W., Gangolli, S.D. and Grasso, P. (1977): Studies on dibutyl phthalate-induced testicular atrophy in the rat: effect on zinc metabolism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**, 609-618.
- Dostal, L.A., Chapin, R.E., Stefanski, S.A., Harris, M.W. and Schwetz, B.A. (1988): Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **95**, 104-121.
- Ema, M., Amano, H., Itami, T. and Kawasaki, H. (1993): Teratogenic evaluation of di-n-butyl phthalate in rats, *Toxicol. Lett.*, **69**, 197-203.
- EPA. (1997): Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. Risk Assessment Forum. U.S. EPA, Washington, DC.
- Foster, P.M.D., Thomas, L.V., Cook, M.W. and Gangolli, S.D. (1980): Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 392-398.
- Foster, P.M.D., Foster, J.R., Cook, M.W., Thomas, L.V. and Gangolli, S.D. (1982): Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 120-132.
- Gray, T.J.B. and Beaman, J.A. (1984). Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells, *Fd. Chem. Toxicol.*, **22**,

- 123-131.
- Gray, L.E., Ostby, J.S., Mylchreest, E., Foster, P.M.D. and Kelce, W.R. (1998): Dibutyl phthalate (DBP) induces antiandrogenic but not estrogenic *in vivo* effects in LE hooded rats, *Toxicol. Sci.*, **42**, 176-180.
- Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1997): The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*, *Environ. Health Perspect.*, **105**, 802-811.
- Hershberger, L., Shipley, E. and Meyer, R. (1953): Mytrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 175-180.
- Imperato-McGinley, J., Sanchez, R.S., Spencer, J.R., Yee, B. and Vaughan, E.D. (1992): Comparison of the effects of the 5 α -reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: Dose-response studies, *Endocrinol.*, **131**, 1149-1156.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1995): A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic, *Environ. Health Perspect.*, **103**, 582-587.
- Kassim, N.M., McDonald, S.W., Reid, O., Bennet, N.k., Gilmore, D.P. and Payne, A.P. (1997): The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat, *J. Anat.*, **190**, 577-588.
- Meek, M.D., Clemons, J., Wu, Z.F., Fielden, M.R. and Zacharewski, T. (1997): *In vitro* and *in vivo* assessments of the alleged estrogen receptor-mediated activities of phthalate esters, *Fund. Appl. Toxicol.*, **36**, 295-299.
- Mylchreest, E., Cattley, R.C. and Foster, P.M.D. (1998): Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: An antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.*, **43**, 47-60.
- Mylchreest, E., Sar, M., Cattley R.C. and Foster, P.M.D. (1999): Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(*n*-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 81-95.
- SAS Institute Inc. (1990): SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- van der Schoot, P. (1992): Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide, *J. Reprod. Fertil.*, **96**, 483-496.
- Wu, Z.F., Hodgert, J.H., Hammond, G. and Zacharewski, T. (1998): Phthalate monoesters: Interactions with human sex hormone binding globulin and human estrogen receptors. *Toxicol. Sci.*, **42**, 176-180.