

수유기에 투여된 Butyl Benzyl Phthalate가 랫드 차산자에 미치는 영향

김판기[†] · 양윤희*

용인대학교 환경생명학부, *숙명여자대학교 생명과학과

Effects of Butyl Benzyl Phthalate on Dams and F1 during Lactation Period of Rats

Pan Gyi Kim[†] · Yool Hee Yang*

Division of Environmental and Biological Sciences, Yongin University, Yongin 449-714, Korea

*Department of Life Science, Sookmyong Women's University, Seoul 140-742, Korea

(Received March 8, 2003; Accepted April 23, 2003)

ABSTRACT

BBP (Butyl benzyl phthalate), a widely used plasticizer, can enter the food and environment as consequence of its manufacture, use, and disposal. BBP was found to be developmental and teratogenic or endocrine disrupting chemical in rats. The effects of BBP were investigated in female rats (P) and second generation (F1) via lactations. Sprague-Dawley were given BBP by oral administration at 0, 5, 10, 100, 1000 mg/kg on day 0 to 21 of lactation period. The results were as follows ; At maternal findings, there were some significant changes ($p < 0.05$) in relative organ weight, especially liver and uterus weight by BBP administration. In estrous cycle, high treated group was inclined to be proestrus or estrus compared to control group. BBP induces estrous cycle earlier than the control group. At fetal findings, there were some significant changes in relative liver and spleen weight, especially 100, 1000 mg/kg administered groups. The relative weight of ventral prostate was decreased, so it was represent to dose-response tendency. Parent rats (P) were detected monobenzyl phthalate (MBEP) 3.21~5.81 $\mu\text{g/ml}$ in 100, 1000 mg/kg dose groups. MBEP of male and female fetuses (F1) were detected at the level of 1.21~2.63 $\mu\text{g/ml}$ of serum. Male serum concentration of MBEP was higher than the females'. Estrogen receptor α expression by BBP and bisphenol A in uterus and testis of F1 were studied. The ER α expression were increased in F1 male testis and female uterus. F1 male showed distinct ER α expression, especially in the combined exposure. Synergistic ER α expression was found by combined treatment group of BBP and bisphenol A. From the above results, it could be concluded that the effects of dams and F1 by BBP administration during lactation period were estrogenic, and BBP can transfer to F1 via lactation, and make estrogenic at F1 reproductive organs.

Keywords: Butyl benzyl phthalate (BBP), ER α , Food safety, Estrus

I. 서 론

Butyl benzyl phthalate(BBP)는 마루타일, 접착제, 합성피혁과 헤어스프레이, PVC의 가소제로 널리 사용되고 있으며, 보통 Santicizer 160이라는 상품명으로 더 잘 알려져 있다.¹⁾ 또한, 식품용기 및 포장재를 만드는 가소제로 폭넓게 사용되고 있어 환경에 널리 분포하

며, 식품원료로의 이행이 용이하여 여러 단계의 경로를 통하여 사람에게 섭취될 수 있다.²⁾ 캐나다에서 버터와 마아가린의 BBP 조사결과 알루미늄 호일 포장된 제품에서 47.8 mg/kg의 BBP가 검출되기도 하였다.³⁾ 이는 60 kg 체중의 여성이 하루 50 g의 버터를 섭취하였을 때, 하루평균 40 $\mu\text{g/kg}$ 의 BBP를 섭취하게 되는 양이다.

BBP는 랫드를 이용한 최기형시험에서 태자흡수가 고용량에서 관찰되었으나, 기형발생은 없었다고 보고하였다.⁴⁾ Jobling 등은 DBP(di-n-butyl phthalate)와 BBP가 잠재적으로 estrogenic 하다고 보고 하였으며, 유방암세포를 이용한 in vitro 실험에서 세포증식과 estrogen 수

[†]Corresponding author : Division of Environmental and Biological Sciences, Yongin University
Tel: 82-31-330-2752, Fax: 82-31-330-2886
E-mail : pgkim@yongin.ac.kr

용체의 상호활성화에 관한 영향을 평가하였다.⁵⁾ 한편, BBP를 랫드 임신기간 동안에 (임신 7~9일) 경구 투여하여 임신말기에 검사한 결과 골격기형(경추융합, 흉추이상)이 0.75 g/kg의 용량에서 증가하였고, 태자 기형발생이 다발하는 시기는 임신 13~15일이라는 보고도 있었다.⁶⁾ BBP에 관한 연구는 최기형성과 발달독성 평가에 치중되고 있으나, 수유기 영향에 의한 평가는 없는 실정이다. 랫드에서 BBP나 dibutyl phthalate를 경구 혹은 정맥내 투여 후 급속하게 흡수되어, monobenzyl phthalate(MBeP)와 mono butyl phthalate(MBuP)로 대사물이 생성되는데, 이 두 대사물질은 유독한 성질을 보이며 최종 대사체인 phthalic acid(PA)는 거의 독성이 없는 물질로 확인되었다.⁷⁾

BBP는 플라스틱 가소제 등으로 사용됨으로써 환경에 널리 분포하면서 식품오염이 우려되는 물질의 하나일 뿐만 아니라, 적절한 정도의 규제가 시행되고 있지 않은 물질로서 이에 대한 위해성을 평가할 필요가 있다고 하겠다. 본 실험은 Sprague-Dawley의 수유기 동안 BBP를 모체에 경구투여하고 수유기간 중 모체의 유즙을 통하여 다음세대에 미치는 영향을 평가하고자 수행하였다.

II. 연구방법

1. 실험재료

시험물질 butyl benzyl phthalate(CAS No. 85-68-7, 순도 98%)는 Sigma사로부터 상업적으로 구입하여 사용하였다. 용매는 corn oil을 사용하였고 0, 5, 10, 100, 1000 mg/kg의 용량으로 구분하였다. 실험동물은 삼육실험동물센터로부터 9주령의 Sprague-Dawley 랫드를 구입하여 온도 23±2°C, 상대습도 55±7% 환경조건에서 명암주기 12시간의 환경에서 사육하였다.

암컷을 수컷과 교배시켜 질전이 형성되었거나 질내 정자가 확인된 것을 임신 0일로 하였으며, 임신 21~23일 사이에 분만한 날을 수유 0일로 정하였다.

2. 실험방법

분만일부터 이유까지(생후 21일) 5, 10, 100, 1000 mg/kg의 BBP를 매일 경구투여하였다. 체중측정은 모체가 출산후 3일 간격으로 (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 부검일)하였고, 차산자는 분만 1, 4, 7, 14, 21, 부검당일에 하였다. 출산 후 21일에 모든 실험동물을 경추탈골하여 신속하게 체혈하고, 혈액은 원심분리(1500 rpm, 10~15분)하여 혈청을 분리한 후 측정일까지 냉동보관하였다. 간장, 신장, 비장, 자궁, 난소, 고환, 부고환, 정낭, 전립선의 장기중량은 절대와 상대장기중량(장기무

게/체중×1000)을 계산하였다. 모체의 수유기동안 발정주기 순환여부를 확인하기 위하여 부검전 5일간 질도 발표본을 작성하고 현미경으로 관찰하였다.

표준용액으로 98% MBeP(TCI co.) 20 mg을 ethanol(HPLC grade) 200 μl에 용해하였다. 표준곡선은 0, 1, 2, 5 mg/4ml의 농도로하여 혈청을 가한 시료를 제조하여 분석에 사용하였다. 분석은 HPLC(Young-lin Instrument Co.) C₁₈ μ-bondapak column과 UV detector(λ = 254.2 nm)를 사용하였고, 이동상으로 acetonitrile/ater(35:65)에 1% acetic acid를 사용하였으며, 분석중 유속은 1.0 ml/min이었다. 혈청에 ethanol(HPLC grade)을 첨가하고 methylene chloride(HPLC grade)를 혼합하고 실온에 방치한 후 유기용매 층을 분리하여 rotary vacuum evaporator 농축하였다. 농축된 분말을 acetonitrile로 희석하여 분석에 사용하였다. 부검시 채취한 F1의 자궁과 고환조직은 냉장상태에서 균질화하고 16,000 g로 30분간 원심분리하였다. 상층액(cytosol 분획)을 취하여 냉동(-70°C) 보관하였으며, 냉동보관된 시료를 얼음안에서 완전 해동하여 분석에 사용하였다. 시료내 단백질 함량분석은 Bradford 분석법을 사용하였다. 동량의 단백질을 전기영동(polyacrylamidegel electrophoresis)하였으며, 니트로셀룰로즈막에 전이하여 이 막을 estrogen receptor 항체(αER anti-mouse, Santa Cruz, CA, USA)와 반응시켰다. 여기에 2차항체(alkaline phosphatase labelled anti-mouse, Santa Cruz)를 반응시키고, 형광발광제(ECL+ reagent, Amersham, USA)를 첨가하여 X-선 필름(Hyperfilm, Amersham)에 감광시켜 estrogen receptor 발현정도를 분석하였다. 통계처리는 대조군과 각 투여군간의 차이를 분산분석으로 비교하였으며, 유의수준은 α=0.05로 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 모체의 영향

수유기동안에 경구투여된 BBP 1000 mg/kg 투여군의 모체체중이 증가되는 결과를 가져왔으나, 용량의존적인 결과는 아니었다. 투여 21일에 10, 100 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 체중증가(p<0.05)를 보였다(Table 1). 수유기간의 체중증가는 차산자의 마릿수, 영양상태 및 건강상태에 따라 달라지며, 비유량이 임신 18일 전후하여 감소⁸⁾하므로, 이를 전후한 시기에 체중변화를 예상할 수 있다. Ema는 BBP 2.0%을 임신기간에 투여한 결과 임신랫드의 체중이 감소하였다고 보고하였고, DBP 0, 0.5, 0.63, 0.75, 1.0 g/kg을 임신

Table 1. Body weight change of dams treated with BBP during lactation period

Group(mg/kg)	(mean(g) ± SD)				
	Control	5	10	100	1000
0 day	306 ± 17.0	313 ± 20.1	316 ± 36.6	309 ± 15.5	296 ± 17.2
3 day	308 ± 16.4	317 ± 15.1	304 ± 34.5	313 ± 12.8	304 ± 22.3
6 day	309 ± 18.3	308 ± 19.1	294 ± 36.7	305 ± 15.2	306 ± 21.3
9 day	310 ± 13.9	302 ± 10.4	297 ± 40.7	310 ± 18.6	311 ± 18.3
12 day	315 ± 11.3	307 ± 7.9	312 ± 32.2	319 ± 14.8	315 ± 17.1
15 day	311 ± 19.7	311 ± 11.2	307 ± 23.4	311 ± 11.4	318 ± 14.2
18 day	309 ± 9.1	308 ± 12.8	303 ± 27.8	299 ± 14.8	313 ± 25.8
21 day	263 ± 13.4	255 ± 13.0	289 ± 23.6*	287 ± 12.9*	260 ± 31.6

*: Statistically different from control group (p<0.05).

7~15일에 경구투여한 결과 모체 체중감소가 0.63 g/kg 군에서 가장 현저하였다고 보고하였다.^{6,9)} 본 실험에서 유의한 변화가 인정되지는 않았지만, 1000 mg/kg 투여군에서 증체량의 변화가 있는 것으로 판단된다. BBP는 대사체가 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 2.0% 식이를 하루평균 974 mg/kg, 약 1000 mg/kg으로 볼 때, 체중에 영향을 미치는 최소 수준의 BBP는 약 1000 mg/kg, DBP 630 mg/kg, MBuP 500 mg/kg, MBeP 313 mg/kg이라고 한다.⁷⁾

상대장기중량에서 간장, 비장, 자궁(100 mg/kg 제외)은 BBP 투여에 의하여 증가하였으나, 신장, 난소는 감소하는 경향을 보였다. 간장 상대장기중량은 10, 100, 1000 mg/kg 투여군에서 유의하게 높았으나 (p<0.05), 좌측신장, 좌우측난소는 100 mg/kg 투여군에서 유의하게 낮은 (p<0.05) 결과를 보였다(Table 2). 다른 연구자의 보고에서는 모체측 영향으로 체중의 감소와 사료 섭취량의 감소를 보고하고 있다.

수유기간에 투여된 BBP에 의한 발정주기의 발현을 관찰한 결과, 5 mg/kg 투여군에서 발정전기를 보인 모

체가 2마리, 10 mg/kg 투여군에서 3마리, 100 mg/kg 투여군에서 3마리, 1000 mg/kg 투여군에서 2마리였다. 발정기를 보인 모체는 1000 mg/kg 투여군에서 2마리였다. 대조군은 모두 발정휴지기를 보였다. BBP는 미약하지만, 투여군 모두에서 발정주기를 촉진하는 결과를 보였다(Table 3). 랫드의 발정주기는 발정전기, 발정기, 발정후기, 발정휴지기의 4단계로 구분하며, 질내 상피세포 관찰에 의하여 발정전기는 유헥상피세포(epithelial cell)이 현저하며, 발정기에는 각화상피세포(cornified epithelial cell)가 현저하고, 발정후기는 소수

Table 3. Estrous cycle of dams treated with BBP during lactation period (unit : number of rats)

Group (mg/kg)	Control	5	10	100	1000
Proestrus	0	2	3	3	2
Estrus	0	0	0	0	2
Diestrus	10	7	8	6	6
Total	10	9	11	9	10

Table 2. Relative organ weight of dams treated with BBP during lactation period

Group(mg/kg)	(mean(%) ± SD)				
	Control	5	10	100	1000
Liver	36.3 ± 4.11	38.3 ± 6.06	43.4 ± 7.91*	49.6 ± 4.28*	42.6 ± 2.51*
Kidney(Rt)	4.0 ± 0.31	4.18 ± 0.34	3.5 ± 0.88	3.8 ± 0.41	4.2 ± 0.38
Kidney(Lt)	4.0 ± 0.25	4.0 ± 0.46	3.7 ± 0.68	3.7 ± 0.17*	4.1 ± 0.45
Spleen	1.9 ± 0.40	2.2 ± 0.33	2.2 ± 0.75	2.2 ± 0.29	2.1 ± 0.41
Uterus	0.99 ± 0.128	1.45 ± 0.842	1.29 ± 0.625	1.21 ± 0.196	1.35 ± 0.252
Ovary(Rt)	0.12 ± 0.028	0.10 ± 0.007	0.11 ± 0.027	0.09 ± 0.020*	0.12 ± 0.025
Ovary(Lt)	0.12 ± 0.028	0.10 ± 0.007	0.11 ± 0.027	0.09 ± 0.020*	0.12 ± 0.025

*: Statistically different from control group (p<0.05).

Rt: right ± Lt : left.

Table 4. Reproductive finding of females treated with BBP to dams during lactation period

(unit : number of rats)

Group(mg/kg)	Control	5	10	100	1000
No. Dams	10	9	11	9	10
No. implants	13.5 ± 3.15	13.2 ± 4.24	13.9 ± 2.59	13.0 ± 1.58	12.2 ± 3.82
No. live neonates	13.2 ± 3.14	13.0 ± 4.24	13.6 ± 2.58	12.6 ± 1.60	11.7 ± 3.87
Sex ratio	0.91	0.98	0.95	1.02	1.12

Table 5. Body weight change of male offsprings treated with BBP to the dams during lactation period

(mean(g) ± SD)

Group(mg/kg)	Control	5	10	100	1000
1 day	6.4 ± 1.04	6.7 ± 0.46	6.9 ± 0.89	7.0 ± 0.54	6.9 ± 0.69
4 day	9.4 ± 1.44	9.9 ± 0.60	9.7 ± 1.56	9.9 ± 0.97	9.0 ± 1.13
7 day	14.2 ± 2.20	14.3 ± 1.67	15.4 ± 4.78	14.0 ± 2.16	11.9 ± 2.50*
14 day	26.0 ± 5.26	26.2 ± 3.13	25.4 ± 6.364	24.1 ± 4.04	20.8 ± 5.18*
21 day	37.3 ± 6.47	37.9 ± 5.34	34.9 ± 7.68	33.9 ± 7.03	32.4 ± 9.37
at sacrifice	36.4 ± 7.18	36.8 ± 5.09	34.7 ± 6.95	38.8 ± 7.26	31.9 ± 10.76

*: Statistically different from control group (p<0.05).

Table 6. Body weight change of female offsprings treated with BBP to the dams during lactation period

(mean(g) ± SD)

Group(mg/kg)	Control	5	10	100	1000
1 day	6.5 ± 0.52	6.4 ± 0.67	6.5 ± 0.86	6.6 ± 0.90	6.5 ± 0.76
4 day	9.3 ± 0.81	9.4 ± 1.26	9.1 ± 1.60	9.2 ± 1.28	8.6 ± 1.16
7 day	13.6 ± 1.68	13.9 ± 1.83	13.6 ± 3.70	14.0 ± 2.49	11.6 ± 1.80*
14 day	25.3 ± 3.40	25.2 ± 4.00	24.0 ± 5.91	25.3 ± 4.77	20.6 ± 4.95*
21 day	35.3 ± 6.20	36.7 ± 5.29	34.1 ± 8.62	35.1 ± 7.83	33.6 ± 7.4
at sacrifice	34.2 ± 6.28	37.2 ± 5.56	33.8 ± 8.14	34.8 ± 8.09	32.0 ± 8.64

*: Statistically different from control group (p<0.05).

의 유핵상피세포, 각화상피세포와 백혈구가 관찰되며, 발정휴지기는 백혈구와 무정형의 점액질이 현저하게 출현한다.¹⁰⁾ 랫드 발정주기는 분만후발정이 있을 후 포유에 의해 주기가 소실되어, 이유 후에 정상으로 회복되므로,¹⁰⁾ 포유중 발정주기의 회복은 BBP 투여에 의한 영향으로 판단된다. 모체와 생존태자에 관한 생식특성을 Table 4에 표시하였다. 모체당 산자수는 11.7~13.6마리의 분포를 보였으며, 이는 Sprague-Dawley의 생식특성과 일치하는 결과이며, 성비 0.91~1.12를 보여 역시 같은 종의 성비 0.85~1.25의 범위내에 속하는 결과이다.¹⁰⁾

2. 차산자의 영향

숫컷 차산자의 체중변화를 Table 5에 나타내었다. 숫컷 차산자의 체중은 투여군 간의 약간의 차이가 나타났지만, 용량의존적인 변화는 나타나지 않았다. 생후 7

일과 14일에 1000 mg/kg에서 유의하게 낮았으며 (p<0.05), 생후 21에도 낮은 결과를 보였으나 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 암컷 차산자의 체중변화를 Table 6에 나타내었다. 생후 7일, 14일에 1000 mg/kg 투여군에서 유의하게 낮은 (p<0.05) 결과를 보였다. 이러한 체중의 변화는 투여군에서 대조군에 비하여 증가의 경향을 보인 석 등²⁾의 결과와 다르나, 석 등²⁾의 실험에서는 임신기간에 투여한 실험으로서 본 실험의 투여시기와 차이가 있었다. Wine 등¹¹⁾은 플라스틱 가소제로 사용되는 DBP를 0.1, 0.5, 1.0%로 식이섭취시킨 결과, 모든 투여군의 생존태자수가 8~17% 감소하였고, 0.5, 1.0% 투여군에서는 생존태자 무게가 약 13% 이하로 감소하였으며, 체중변화는 숫컷보다는 암컷에서 유의하게 감소하였다고 보고하였다. 수유기 BBP 고용량(1000 mg/kg) 투여에 의하여 생후 7일, 14일에 암수차산자의 체중증가가 억제되었다.

Table 7. Relative organ weight of F1 males treated with BBP to the dams during lactation period

Group(mg/kg)	(mean(%) ± SD)				
	Control	5	10	100	1000
Liver	32.1 ± 2.27	31.7 ± 3.03	32.9 ± 2.38	40.9 ± 1.88*	37.1 ± 3.74*
Kidney(Rt)	6.2 ± 0.36	6.2 ± 0.45	5.8 ± 0.47	6.1 ± 0.38	6.6 ± 0.80
Kidney(Lt)	6.1 ± 0.39	5.9 ± 0.34	5.9 ± 0.34	5.9 ± 0.34	6.4 ± 0.45
Spleen	4.3 ± 0.77	4.4 ± 0.41	4.7 ± 1.40	4.8 ± 0.87	5.8 ± 1.83*
Testis(Rt)	2.66 ± 0.237	2.98 ± 0.340*	2.85 ± 0.440	2.58 ± 0.266	2.80 ± 0.236
Testis(Lt)	2.74 ± 0.286	2.99 ± 0.334	2.79 ± 0.447	2.53 ± 0.272*	2.79 ± 0.230
Epididymis(Rt)	0.44 ± 0.125	0.42 ± 0.067	0.43 ± 0.073	0.35 ± 0.065*	0.48 ± 0.126
Epididymis(Lt)	0.41 ± 0.115	0.40 ± 0.058	0.42 ± 0.061	0.40 ± 0.072	0.47 ± 0.094
Seminal vesicle (Rt)	0.15 ± 0.033	0.15 ± 0.020	0.15 ± 0.044	0.16 ± 0.053	0.13 ± 0.022*
Seminal vesicle (Lt)	0.12 ± 0.036	0.14 ± 0.027	0.15 ± 0.038	0.17 ± 0.048*	0.15 ± 0.028*
Ventral prostate gland	0.51 ± 0.076	0.55 ± 0.089	0.50 ± 0.109	0.43 ± 0.071*	0.47 ± 0.072*

*: Statistically different from control group (p<0.05).

Table 8. Relative organ weight of female offsprings treated with BBP to dams during lactation period

Group(mg/kg)	(mean(%) ± SD)				
	Control	5	10	100	1000
Liver	32.8 ± 1.78	32.8 ± 2.74	32.5 ± 1.77	41.0 ± 2.09*	36.4 ± 3.82*
Kidney(Rt)	6.0 ± 1.60	6.5 ± 0.34	5.6 ± 0.72	5.3 ± 0.63	5.2 ± 0.51
Kidney(Lt)	6.5 ± 0.25	4.0 ± 0.46*	3.7 ± 0.68*	3.7 ± 0.17*	4.1 ± 0.45*
Spleen	4.3 ± 0.74	5.2 ± 0.71*	5.2 ± 1.11*	5.6 ± 1.42*	5.3 ± 1.17*
Uterus	0.77 ± 0.127	0.73 ± 0.096	0.74 ± 0.098	0.69 ± 0.116*	0.77 ± 0.099
Ovary(Rt)	0.16 ± 0.043	0.15 ± 0.027	0.18 ± 0.046	0.13 ± 0.044	0.16 ± 0.045
Ovary(Lt)	0.16 ± 0.038	0.15 ± 0.028	0.19 ± 0.064*	0.14 ± 0.044	0.15 ± 0.037

*: Statistically different from control group (p<0.05).

BBP를 수유기에 투여한 모체의 수컷 차산자의 상대 장기중량 변화를 Table 7에 표시하였다. 간장은 100, 1000 mg/kg에서 유의한 증가(p<0.05)를, 비장은 1000 mg/kg 투여군에서 유의한 증가(p<0.05)를, 우측고환 5 mg/kg, 좌측고환 100 mg/kg 투여군에서 유의한 증가(p<0.05)를, 좌측정낭 100, 1000 mg/kg 투여군에서 유의한 증가(p<0.05)를 보였다. 반면에 전립선 100, 1000 mg/kg 투여군에서 유의한 감소(p<0.05)를 우측 정낭 1000 mg/kg에서 유의한 감소(p<0.05)를 보였다.

BBP를 수유기에 모체에 투여한 암컷 차산자의 상대 장기중량을 Table 8에 나타내었다. 간장중량은 100, 1000 mg/kg 투여군에서 유의하게 증가(p<0.05)하였으며, 비장 5, 10, 100, 1000 mg/kg 투여군에서 유의한 증가(p<0.05)를, 좌측난소 10 mg/kg 투여군에서 유의하게 증가(p<0.05)하였다. 반면에 좌측신장은 모든 투여군에서 유의한 감소(p<0.05)를 나타내었으며, 역시 100 mg/kg 투여군의 자궁도 유의한 감소(p<0.05)를 나

타내었다.

Wine 등¹¹⁾은 1.0% 투여의 결과에서 수컷의 간장중량이 유의한 증가를 보였고, 암컷에서 간장과 신장은 유의한 변화가 없었다고 보고하였다. 수컷 차산자의 전립선, 정낭과 우측고환의 중량이 0.1% 용량에서 감소하였다고 보고하였다. 또한 CD-1 마우스를 2.5% DEP 투여함으로써 F1의 체중감소는 물론이고 장기무게 변화가 초래되었다고 보고하였다.¹²⁾ Agarwal¹³⁾의 연구에서 BBP 고환독성의 NOEL 수준은 랫드에서 125~150 mg/kg으로 보고하였고, Sharpe 등¹⁴⁾은 이 NOEL 수준의 약 300배 정도 낮은 농도에서 고환무게가 약 10% 감소하였다고 보고하였다. 특히 BBP 1 mg/l 투여하여 고환크기가 5~13% 감소하고 정자수의 감소가 10~21% 나타났다고 보고하였다.

3. BBP의 유증이행

BBP 투여한 모체혈청에서는 100 mg/kg 투여군에서

Table 9. Concentration of MBeP in dam and F1 rats serum sample sacrificed at post parturition 21 days (unit : $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Group ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Control	5	10	100	1000
Dam	ND	ND	ND	3.21 ± 0.425	5.81 ± 0.574
Male	ND	ND	ND	1.35 ± 0.128	2.63 ± 0.183
Female	ND	ND	ND	ND	1.21 ± 0.078

*: Statistically different from control group ($p < 0.05$).

$3.21 \mu\text{g}/\text{ml}$, $1000 \text{ mg}/\text{kg}$ 투여군에서 $5.81 \mu\text{g}/\text{ml}$ 가 검출되었고, 숫컷 차산자에서 역시 $100, 1000 \text{ mg}/\text{kg}$ 투여군에서 각각 $1.35, 2.63 \mu\text{g}/\text{ml}$ 가 검출되었으며, 암컷 차산자의 혈청에서는 $1000 \text{ mg}/\text{kg}$ 투여군에서 $1.21 \mu\text{g}/\text{ml}$ 검출되었다. BBP는 경구 혹은 정맥투여되면 흡수되어 3시간 후에 완전대사되고, 중간대사물 중 MBeP (monobenzyl phthalate)로 약 16%, MBuP(monobutyl phthalate)로 44%가 전환되는 특성¹⁵⁾을 감안하여 대사된 일부만이 검출된 것으로 판단된다. BBP의 독성보다는 대사체인 MBeP, MBuP가 독성이 있는 것으로 알려지고 있다.⁷⁾ 직접 경구투여된 모체에서의 검출량 ($3.21\sim 5.81 \mu\text{g}/\text{ml}$)에 비하여 암컷차산자($1.21 \mu\text{g}/\text{ml}$) 보다는 숫컷차산자($1.35\sim 2.63 \mu\text{g}/\text{ml}$)에서 모체 혈액간류량의 절반가량인 많은 양이 검출되었다. 차산자 혈청중에서 MBeP가 검출되어, 수유로 인하여 모체유즙을 통해 대사체의 일부가 전달된 것을 확인하였다. MBeP와 MBuP는 다시 phthalic acid로 변환⁷⁾하므로, BBP의 유즙이행을 정확하게 파악하기 위하여 MBuP와 phthalic acid를 정량하는 것이 필요하리라 판단된다.

4. BBP의 ER α 영향

BBP와 bisphenol A를 단독 혹은 혼합투여한 모체가 수유한 차산자의 자궁과 고환에서 ER α 를 검출한 결과는 Fig. 1, 2에 표시하였다. 자궁의 ER α 발현은 BBP 100, 1000 mg/kg 투여군에서 증가하였으며, bisphenol



Fig. 1. Representative immunoblots analysis of ER induction in second generation's uterus treated with BPA and BBP to the dams on post-parturition.

Lane 1. control 2. BPA 20 μg 3. BPA 200 μg
 4. BBP 100 mg 5. BBP 1000 mg
 6. BPA 20 μg + BBP 100 mg
 7. BPA 200 μg + BBP 1000 mg

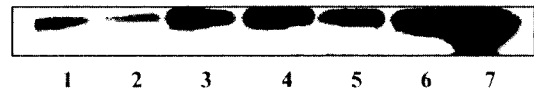


Fig. 2. Representative immunoblots analysis of ER induction in second generation's testis treated with BPA and BBP to the dams on post-parturition.

Lane 1. control 2. BPA 20 μg 3. BPA 200 μg
 4. BBP 100 mg 5. BBP 1000 mg
 6. BPA 20 μg + BBP 100 mg
 7. BPA 200 μg + BBP 1000 mg

A 혼합투여에 의하여도 발현이 증가하였다(Fig. 1). 고환의 ER α 발현역시 BBP 100, 1000 mg/kg 투여군에서 증가하였으며, bisphenol A 혼합투여에 의하여 발현이 상승되는 결과를 보였다(Fig. 2). Estrogen receptor는 체내 estrogen이나 외부의 estrogen 유사물질이 세포내로 유입되었을 때 결합하여 호르몬 효과가 발현되도록 하는 단백질로서, ER α 는 인간의 유방암세포주인 MCF-7 세포에서 많이 발견되고, 최근 발견된 ER β 는 ER α 의 isoform으로서 신경계, 심혈관계, 면역계, 소화기계, 신장, 폐장 등 다양한 조직에 분포하는 반면 자궁에는 ER α 가 ER β 보다 훨씬 많이 존재하고 있는 것으로 알려지고 있다. Bisphenol A도 ER α 에 의해 estrogenicity를 나타내는 것으로 확인¹⁶⁾되어, 이 물질과 유사한 발현양상을 보이는 BBP도 생체내에서 ER α 에 의한 작용으로 estrogenicity를 나타낼 수 있다고 판단된다.

IV. 결 론

플라스틱 가소제로 식품용기 등으로 사용되어 환경에 널리분포하는 butyl benzyl phthalate(BBP)가 모체에 폭포되었을 때 수유중인 차산자에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 실험한 결과는 다음과 같다. BBP 투여에 의하여 모체의 간장과 자궁의 상대중량이 유의하게 증가($p < 0.05$)하였다. 수유중 모체의 발정주기가 BBP 투여에 의하여 조기회복되는 결과를 보였다. 차산자 암컷과 숫컷의 체중은 투여 7일, 14일에 $1000 \text{ mg}/\text{kg}$ 투여군에서 유의하게 감소하였다. 암컷, 숫컷 차산자의 간장, 비장의 상대중량이 모체 BBP 투여에 의하여 유의하게 증가($p < 0.05$)하였으며, 전립선 상대중량이 유의하게 감소($p < 0.05$)되었다. 모체혈액중에 BBP의 대사체인(methyl benzyl phthalate) MBeP가 $100, 1000 \text{ mg}/\text{kg}$ 투여군에서 각각 $3.21, 5.81 \mu\text{g}/\text{ml}$ 검출되었으며, 이 검출량의 절반에 가

까운 MB테가 슛컷 차산자에서 1.35, 2.63 µg/ml 검출되었고, 암컷 차산자에서는 이보다 적은 1.21 µg/ml 만 이 검출되었다. BBP에 폭로된 모체로부터 수유시킨 차 산자의 자궁과 고환에서 ER α 발현이 확인되었다. 이상 의 결과로부터 BBP는 모체의 유즙을 통하여 전달되어 차산자에 검출되는 것을 확인하였고, ER α 발현을 확인 한 결과 bisphenol A와 유사한 기전으로 estrogenicity 를 나타내는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. CIRC (Cosmetic Ingredient Review Committee) : Final report the safety assessment of butyl benzyl phthalate. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **11**, 1-23, 1992.
2. 석지현, 황성희, 권은아, 김대용, 김판기 : 임신랫드에 투여한 butyl benzyl phthalate가 차산자에 미치는 영향. *한국환경위생학회지*, **26**(1), 85-94, 2000.
3. Page, B. D. and Lacroix, G. M. : Studies into the transfer and migration of phthalate esters from aluminium foil paper laminates to butter and margarine. *Food Additive Contam.*, **9**, 197-212, 1992.
4. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. : Reproductive effect of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, **12**(4), 127-132, 1998.
5. Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G. and Sumpter, J. P. : A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 582-587, 1995.
6. Ema, M. : Teratogenic phase specificity of butyl benzyl phthalate in rats. *Toxicology* **79**, 11-19, 1993.
7. Ema, M., Harazono, A. and Miyawaki, E. : Developmental toxicity evaluation of phthalic acid, one of the metabolites of phthalic acid esters in rats. *Toxicol. Letter*, **93**, 109-115, 1997.
8. Ema, M. : Effects of period of exposure on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in rats. *J. App. Toxicol.*, **12**(1), 57-61, 1992.
9. Ema, M. and Amano, H. : Teratogenic evaluation of di-n-butyl phthalate in rats. *Toxicol. Letter*, **69**, 197-203, 1993.
10. Baker, H. J., Lindsey, J. R. and Weisbroth, S. H. : The laboratory rat. pp.88-93. Academic Press, New York. 1984.
11. Wine, R. N., Li, L. H., Barnes, L. H., Gulati, D. K. and Chapin, R. E. : Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.*, **45**, 103-109, 1997.
12. Price, C. J., Field, E. A. and Marr, M. C. : Final report on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in CD-1-Swiss Mice. NTP Report. 90-114, 1990.
13. Agarwal, D. K. : Adverse effects of butyl benzyl phthalate on the reproductive and hematopoietic systems of male rats. *Toxicology* **35**(3), 189-206, 1985.
14. Sharp, R. M., Fisher, J. S., Miller, M. M., Jobling, S. and Sumpter, J. P. : Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 1136-1143, 1995.
15. Eigenberg, D. A., Bozigian, H. P., Carter, D. E. and Sipes, I. G. : Distribution excretion, and metabolism of butyl benzyl phthalate in the rat. *J. Toxicol. Environ. Health* **17**, 445-456, 1986.
16. Gould, J. C., Leonard, L. S., Maness, S. C., Wagner, B. L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D. P. and Gaido, K. W. : Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **142**, 203-214, 1998.