

미성숙 랫드 자궁비대반응시험을 이용한 DEHA의 내분비계 장애작용 평가

박기대 · 한범석 · 정자영 · 오재호 · 조완섭 · 조민정 · 최미나 · 김성준 · 김승희[†]

식품의약품안전청, 국립독성과학원
(2007. 10. 8. 접수/2007. 10. 20. 채택)

Immatured Type Uterotrophic Assay for Estrogenicity Evaluation of DEHA

Ki Dae Park · Beom-Seok Han · Jayoung Jeong · Jae Ho Oh · Wan Seob Cho ·

Min Jeong Cho · Mina Choi · Sung Joon Kim · Seung Hee Kim[†]

Korea Food and Drug Administration, National Institute of Toxicological Research

(Received October 8, 2007/Accepted October 20, 2007)

ABSTRACT

This study was aimed to investigate the estrogenic activity of Di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) using immatured type uterotrophic assay. SD rats were treated with DEHA (40, 200, 1000 mg/kg/day), estradiol-3-benzoate (EB) (1 µg/kg/day) as positive control on the assay. In immatured-type uterotrophic assay, relative organ weights of kidney and reproductive organs such as ovary at high-dose group were significantly increased compared to those of vehicle control group. DEHA did not influence the levels of serum FSH and LH, and uterine morphological changes such as luminal epithelial height, myometrial thickness and numbers of uterine gland, and BrdU indices. In these results, there was no significant variation by DEHA treatment, suggesting that DEHA appears not to be an endocrine disrupter with estrogenic activity.

Keywords: DEHA, immatured type uterotrophic assay, estrogenic activity

I. 서 론

Di-(2-ethylhexyl) adipate(DEHA)는 무색 액체의 물리적 성상을 가지고 있으며 필름, PVC 제품 및 식품포장용기 등의 제조 시에 제품의 유동성과 신장성을 높이기 위한 플라스틱가소제로써 널리 사용되고 있다.¹⁾ 플라스틱가소제로 많이 사용되던 DEHP의 간독성²⁾ 및 내분비장애작용³⁾이 밝혀진 후 DINP 등의 대체물질이 추천되었으나, 프탈레이트계 물질들의 독성^{4,5)}이 속속 알려지고 있는 가운데 DINP도 peroxisome proliferation 작용에 의해 간암발생이 관찰되는⁶⁾ 등 대체가소제로 추천된 물질에서도 위해성이 밝혀지고 있어, 현재 사용중인 대체 플라스틱가소제의 안전성 문제

가 제기되고 있다. DEHA는 식품포장용 랩 제품의 총 중량 중 20-40%를 차지하고 있으며, 특히 업소용 식품포장용 랩에서 상당량의 유출이 보고되고 있다. 특히 PVC, 필름 등에서 상당량이 유출되고 있으며, 국내에서 제조된 랩에서 포장된 음식물로의 DEHA 유출이 보고되고 있다. 특히 고온의 지질용매에 의해 랩에서 음식물로의 DEHA 용출량은 확연히 증가⁷⁾했을 뿐만 아니라 냉장상태인 5°C에서 2시간동안 저장했을 경우에도 DEHA의 음식물로의 유출이 보고되었다.⁸⁾ DEHA의 안전성에 대한 국내외적 관심이 증가함에 따라 식약청은 국내 식품포장용 랩 생산업체들과 의견 수렴을 거쳐 2005년도부터 DEHA에 대한 랩 제품생산 및 DEHA 함유 식품포장용 랩의 수입을 금지하고, 대체가소제를 사용하는 내용의 '기구 및 용기포장 기준·규격' 개정안을 마련하였고, "EEC Scientific Committee for Food"는 체중 1kg당 일일 섭취량을 0.3 mg으로 설정하였다.⁹⁾ 플라스틱가소제로 사용되던

[†]Corresponding author : Korea Food and Drug Administration, National Institute of Toxicological Research
Tel: 82-2-380-1822~3, Fax: 82-2-388-6451
E-mail : biokim@kfda.go.kr

여러 프탈레이트류 가소제의 내분비계 장애작용에 대한 논란이 지속되면서 대체플라스틱가소제로 이용되고 있는 adipate류 가소제인 DEHA에 대한 안전성이 의심되고 있으며, 특히 내분비장애작용의 유무가 확실치 않거나 밝혀지지 않은 현 시점에서 최근 랩 등의 식품포장제에 대해 내분비장애 추정물질인 DEHA 사용을 금지하는 등 국내에서 이 물질의 독성에 대한 관심이 증가하고 있다. 현재까지 보고된 DEHA의 독성은 마우스를 이용한 우성치사시험에서의 양성반응¹⁰⁾과 설치류 간세포에서의 DNA 합성증가¹¹⁾ 등 유전독성이 보고된 바 있으며, 마우스 및 랫드에서 간장의 무게와 peroxisome 증가¹²⁾ 및 랫드의 혈청지질 감소¹³⁾ 등이 보고되어 있다. 또한 미국 NTP에서는 DEHA의 2년 발암성시험 결과, 마우스의 암컷과 수컷에서 간암을 유발하는 것으로 보고되어 있다.^{14,15)} 그러나 아직까지 DEHA의 내분비계장애물질 분류는 아직 명확하지 않아 국가마다, 기관마다 조금씩 다르게 설정되어 있다.¹⁶⁾ WWF에서는 내분비계장애물질로 의심되는 물질로 분류하고 있으며, 일본 의약품식품위생연구소에서는 내분비계장애물질 가소제 중의 하나로 정하고 있다. 또한 미국의 환경보호청 (Environmental Protection Agent; EPA)은 내분비계장애물질이 아닌 것으로 분류하고 있다. 현재 국내에서는 환경부의 내분비계 장애물질 목록 중 산업용 화학물질로 DEHA를 분류하고 있으며, 2006년부터 DEHA의 독성에 따라 랩 등의 식품포장제 사용에 이 물질의 사용을 금지시킬 예정이다. 이렇듯 DEHA의 내분비계 장애물질 포함 여부는 국가마다, 기관에 따라 많은 차이가 발생하고 있으며, 그로인한 산업계와 소비자의 혼란이 가중되고 있다. 따라서 DEHA에 대한 내분비장애작용 유무의 확인이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

내분비계장애물질을 확인하는 방법은 현재까지 여러 많은 기술들이 소개되고 있으며 그 중 에스트로겐 작용 평가에 대하여 OECD¹⁷⁾와 EPA¹⁸⁾는 자궁비대반응 시험을 효과적인 내분비장애물질 검색법으로 제시하고 있다. 더욱 민감한 자궁비대반응시험법을 찾기 위해 난소절제된 성숙랫드가 아닌 미성숙 랫드를 이용한 방법이 Jordan 등¹⁹⁾에 의해 소개된 이후, raloxifene,²⁰⁾ nonylphenol²¹⁾ 등 다양한 물질에 대한 내분비장애효과가 보고되고 있으며 이 검색법이 성숙 랫드를 이용하는 것보다 더 민감하다고 알려져 있다.²²⁾ 본 실험에서는 미성숙 랫드를 이용한 자궁비대반응시험을 이용하여 DEHA의 내분비계장애물질로서의 작용유무 확인을 통해 DEHA의 안전성을 평가하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 시험물질

DEHA(bis(2-ethylhexyl) adipate, Cas No. 103-23-1, purity 99%)는 Aldrich(Cat No. 525197)사에서 구매하여 사용하였다. DEHA는 corn oil(Sigma, USA)에 용해한 후 40, 200, 1000 mg/kg/day의 농도로 투여하였으며, 양성대조군은 estradiol-3-benzoate(EB, Sigma, USA)를 1 µg/kg/day 농도로 corn oil에 용해한 후 투여하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

본 실험의 동물실험은 국립독성과학원, 실험동물운영 위원회의 검토 및 승인(승인번호 : NITR-05-12)을 받고 진행되었다. 생후 18일령의 SD 암컷 랫드를 식품의약품안전청 국립독성과학원 실험동물자원실로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, 각 실험동물은 정확한 체중을 측정하여 체중차가 5g 내외의 동물을 1차 선별한 후 2일 후 체중 재측정을 통해 체중차 5g 내외의 동물을 2차로 선별하여 최종 30마리를 실험에 사용하였다. 실험동물은 임의로 각 6마리씩 5군으로 나누어 사육하였고 실험기간동안 사육환경은 23±2°C, 상대습도 55±10%를 유지하였다. 인공조명(12시간 점등, 12시간 소등) 하에서 사육하였으며, 사료는 soy-bean oil을 함유하지 않은 AIN-76A (Dyets, USA)사료를 펠릿 형태로 제작하여 자유급이 하였고, 정제수를 자유 급수시켰다.

3. 자궁비대반응시험(Uterotrophic assay)

DEHA의 에스트로겐 효과를 관찰하기 위하여 민감도가 비교적 높은 것으로 알려진 immature type의 자궁비대반응시험²²⁾을 수행하였다(Fig. 1). 생후 17일령의 암컷 SD 랫드를 체중의 편차를 가능한 줄이기 위해 2차 선별하여 각 6마리씩 5군으로 임의로 설정하였으며, 군 분리 후 시험물질을 피하로 투여하였다. 음성대조군과

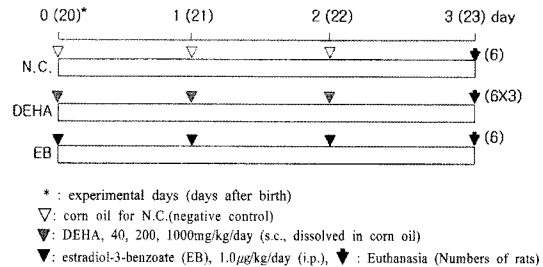


Fig. 1. Experimental design of immature type uterotrophic assay.

양성대조군을 설정하고 양성대조군은 EB를 1 µg/kg/day 농도로 투여하였으며, 시험물질 투여군은 DEHA를 40, 200, 1000 mg/kg/day 농도로 투여하였다. 투약기간은 생후 20, 21, 22일령간 3일 동안 동일시간 대에 하루 한번 투여하였다. 최종 투여 24시간 후 체중측정 후 투여 순서대로 안락사 시켰으며, 자궁, 질, 난소 등의 장기를 적출하고, 지방을 제거한 뒤 정확한 무게를 측정하였다. 그 외 간장, 갑상샘, 뇌하수체, 부신 등의 내분비계 관련장기를 적출하여 병리학적 평가를 위하여 10% 중성포르말린에 고정하였다.

4. 호르몬 농도분석

DEHA의 체내잔류정도를 평가를 위하여 혈중 hormone level을 측정하였다. 실험동물의 follicle stimulating hormone(FSH)와 luteinizing hormone(LH) level을 RAT FSH ELISA kit(BioCode, USA)를 이용하여 측정·분석하였다.

5. 조직병리학적 연구

부검시 절취한 장기를 10% 중성포르말린에 고정시킨 후 ethyl alcohol에 단계적으로 탈수 및 투명화 처리를 거쳐 파라핀에 포매한 뒤 3~4 µm의 연속 절편을 제작하였다. DEHA의 각 농도별 장기의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 전체 군에 대해 일반조직학적 방법으로 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 병리조직학적으로 진단하였으며, 각 군의 병변 발생률을 분석·비교하였다.

6. 면역조직화학적 연구

DEHA가 세포증식에 미치는 영향을 파악하기 위하여 BrdU(5-bromodeoxyuridine)에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 실험동물의 자궁 및 간장에서의 BrdU 양성세포의 수를 영상분석장치를 통해 측정하였다. BrdU 표지세포 수는 1000개의 정상세포 당 면역양성세포의 개수를 대비하여 계산하였다.

7. 통계처리

시험기간 중 측정된 체중변화, 주요장기 무게, 호르몬 농도분석 결과 및 면역조직학적 결과는 SAS JMP 통계프로그램을 이용한 Dunnet's t-test를 실시하였으며, 조직학적 병변에 대한 결과는 동 프로그램의 Chi-Square test를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 체중 및 상대장기무게

자궁비대반응시험에서 DEHA 투여에 의한 투여군의 부검 시 체중에서는 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다. DEHA의 투여농도에 따른 간장 상대장기무게 변화는 관찰되지 않았으나 DEHA 고농도투여군에서 신장 상대장기무게의 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 암컷생식기 장기인 난소, 질, 자궁의 무게를 측정된 결과 양성대조군의 자궁 상대장기무게가 증가하였으며, 특히 DEHA 고농도군인 1000 mg/kg 투여군에서 난소무게의 유의성 있는 증가가 관찰되었으나, 그 외 다른 생식기 계통의 상대장기무게의 변화가 관찰되지 않았다(Table 1). 생식기계통 중 난소만의 무게변화를 바탕으로 에스트로겐 작용 여부를 평가하기는 어려울 것으로 판단되며, 이전의 DEHA에 대한 랫드 발암성시험과, 암컷 성체를 이용한 자궁비대반응시험에서는 생식기 계통에서의 무게변화가 나타나지 않은 것으로 보고되어 있어²³⁾ DEHA 투여에 따른 생식기계통 장기무게의 변화로 인하여 내분비계통 장기에 독성을 나타냈다고 보기 어렵다.

2. 호르몬 농도측정

자궁비대반응시험에서 암컷 랫드 혈청을 분리하여 혈액 내 존재하는 호르몬 발현을 ELISA로 측정된 결과, 혈청 내 LH 수치는 DEHA 40 mg 투여군에서 다소 증가하는 경향은 관찰되었으나 대조군에 비하여 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 또한 혈청내

Table 1. Body weights and relative organ weights of female rats treated with DEHA or EB

Groups	No. of rats	Body weight	Relative organ weight				
			Liver	Kidney	Ovary	Vagina	Uterus
Control	6	55.12 ± 2.61	4.238 ± 0.419	1.335 ± 0.155	0.050 ± 0.010	0.078 ± 0.026	0.096 ± 0.012
DEHA 40 mg	6	52.83 ± 3.05	3.906 ± 0.316	1.167 ± 0.070	0.047 ± 0.017	0.076 ± 0.031	0.092 ± 0.022
DEHA 200 mg	6	52.63 ± 4.01	4.323 ± 0.708	1.325 ± 0.165	0.053 ± 0.012	0.063 ± 0.032	0.100 ± 0.020
DEHA 1000 mg	6	52.55 ± 2.79	4.360 ± 0.432	1.352 ± 0.072*	0.052 ± 0.007*	0.079 ± 0.029	0.089 ± 0.015
EB 1 µg	6	54.50 ± 4.58	4.167 ± 0.353	1.292 ± 0.112	0.047 ± 0.006	0.092 ± 0.044	0.114 ± 0.013*

*Significantly different from control value at p<0.05.

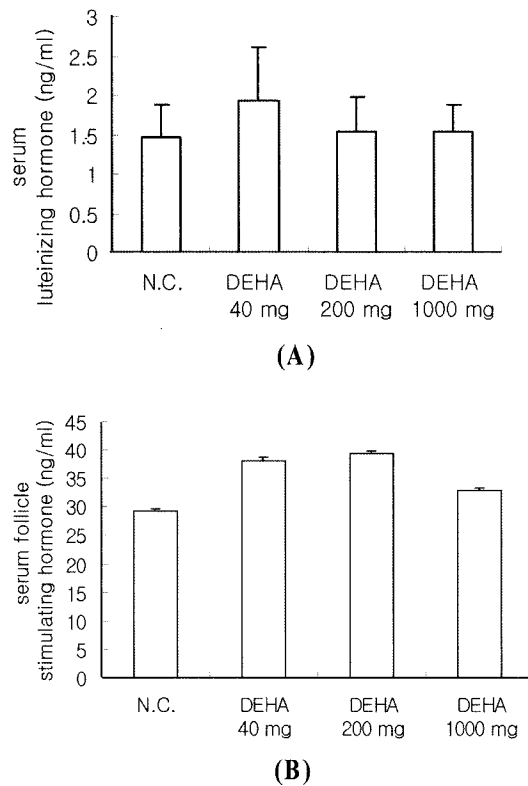


Fig. 2. Expression of hormone levels in female rats administrated with DEHA. Hormone levels were measured by ELISA and statistic method was assessed by Dunnett's t-test. (A) serum LH levels, (B) serum FSH levels.

FSH 수치 역시 DEHA 40 mg 및 200 mg 투여군에서 다소 증가하는 경향은 나타내었으나 DEHA 투여농도에 따른 유의성 있는 변화는 관찰되지 않아 DEHA 투여에 의한 암컷 미성숙 랫드 자궁비대반응시험 실시에서 혈중 호르몬의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이는 이전 성숙 암컷 랫드에 대해 수행된 자궁비대반응시험의 내분비계 장애물질 검색시험법 결과와, 분만 전후 DEHA 노출이 암수 신생랫드의 혈청내 FSH 및 LH에 영향을 미치지 않았다²⁴⁾는 보고와 일치하였다.

3. 조직병리학적 변화

DEHA 투여에 따른 독성평가 및 내분비관련 장기의 변화를 판단하기 위하여 조직병리학적 평가를 실시한 결과, DEHA 투여농도가 높아질수록 간장의 염증소견이 증가하는 경향을 보였으나, 간장을 포함하는 모든 장기에서 통계학적 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다. 특히 음성 및 양성대조군을 포함하는 모든 군의 간

Table 2. Histopathological findings of the female rats treated with DEHA or EB

Histologic findings	N.C.*	DEHA			EB†
		40 mg	200 mg	1000 mg	
Numbers of examined rats	6	6	6	6	6
Vagina					
inflammation	0	0	1	0	0
Liver					
fatty changes	5	6	5	6	5
inflammation	1	1	2	3	0
Kidney					
fibrosis	1	0	1	0	0
cystic dilatation	1	0	0	0	0

*: negative control, †: estradiol-3-benzoate

장에서 fatty change가 관찰되었는데 이는 corn oil을 용매로 사용했기 때문으로 생각된다. 또한 신장에서는 fibrosis와 cystic dilatation이 관찰되었으나 이 같은 변화는 무처치군에서도 역시 관찰되었으며, 투여 여부에 따른 병리학적 소견의 유의성 있는 차이는 발견되지 않았다. 또한 질에서는 DEHA 200 mg/kg 투여군에서 focal inflammation이 1건 관찰되었으나, 통계적 유의성은 없었다. 이상의 결과로 볼 때 DEHA의 미성숙 랫드에서의 자궁비대반응시험 수행결과, 시험물질에 의한 조직병리학적 변화는 관찰되지 않았다(Table 2).

4. 자궁의 형태학적 변화

DEHA 투여에 따른 자궁내막 및 자궁근육의 증식을 측정하고자 H-E 염색을 실시한 자궁조직에서 자궁내막 높이와 자궁근육두께 및 자궁샘 개수를 영상분석장치를 이용하여 측정하였다. 자궁비대반응시험을 시험한 암컷 랫드의 자궁에서 자궁내막의 높이는 양성대조군에서 음성대조군 및 시험물질 투여군에 대하여 유의성 있는 증가를 관찰하였으나 DEHA를 투여한 각 군에서 농도에 따른 군간의 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 또한 자궁근육의 두께와 자궁점막 내의 샘 개수에 대한 분석결과, 역시 물질투여에 따른 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3, 4).

5. 면역조직화학적 검사

DEHA의 투여에 따른 세포증식능을 판단하기 위하여, 부검 1시간 전 BrdU를 100 mg/kg 용량으로 복강에 투여하였으며, 면역조직화학적 검사를 실시한 결과는 Table 3과 Fig. 5, 6에 제시하였다. BrdU는 구조적으로 티민과 비슷하여 새로 합성되는 DNA에 삽입될

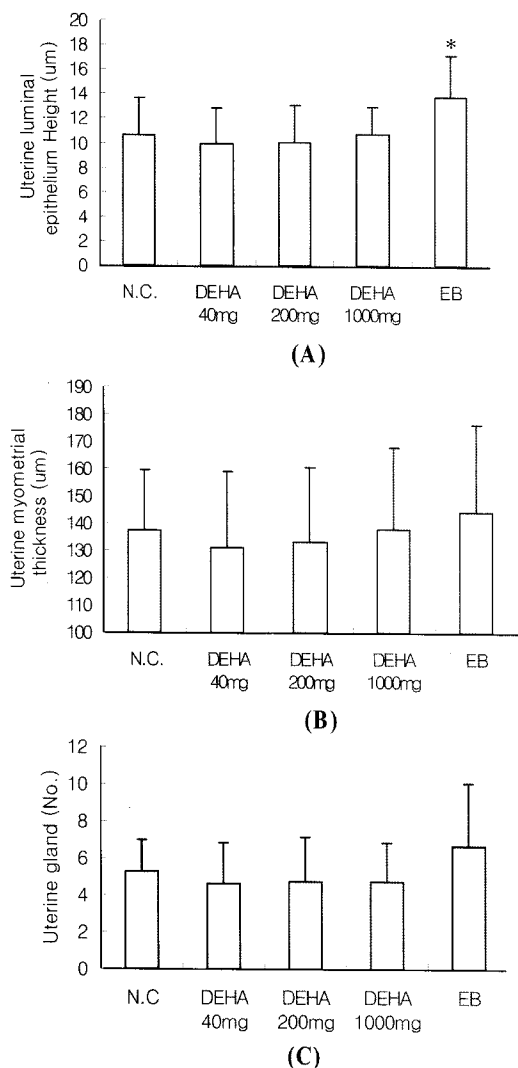


Fig. 3. Effect of DEHA on uterine growth parameters. Uterine luminal epithelium height(A), myometrial thickness (B) and Numbers of uterine gland (C) were measured in H&E stained uterine sections using image analyzing system with IMTechnology. Endometrial gland numbers (C) were counted in randomly chosen visual fields (X100 magnification). Epithelial heights of EB were increased significantly (*; $p < 0.05$) but no other differences were observed in these parameters among groups.

수 있다. 따라서 포유류 세포생물학에서 배양된 세포에서 세포주기 parameter를 정의하고, DNA 수리기작을 연구하며, 조직절편에서 암적인 병소를 동정하는데 면역세포화학적으로 BrdU 함유 DNA를 검출하는 방법이 사용되어 왔다. 특히 분열하는 세포의 DNA 구조에

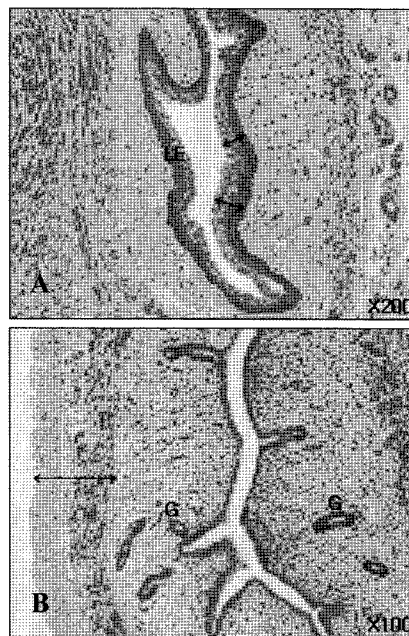


Fig. 4. Histologic figures on effect of uterine growth by DEHA. (A) Uterine luminal epithelium height (LE) and myometrial thickness were measured in H&E stained uterine sections using image analyzing system with IMTechnology. Epithelial height and myometrial thickness of uterus were calculated by image analyzer (X200 magnification). (B) Numbers of endometrial gland (G) also were counted in visual fields (X100 magnification).

Table 3. BrdU labeling indices in uterus and liver of female rats treated with DEHA

Organ	N.C.	DEHA		
		40 mg	200 mg	1000 mg
Uterus	1.35 ± 0.54 ^a	1.29 ± 0.99	1.44 ± 0.41	1.24 ± 0.59
Liver	0.85 ± 0.79	0.96 ± 0.31	1.65 ± 0.93	1.84 ± 1.20

^aindices of BrdU labeling cells/1,000 tissue cells.

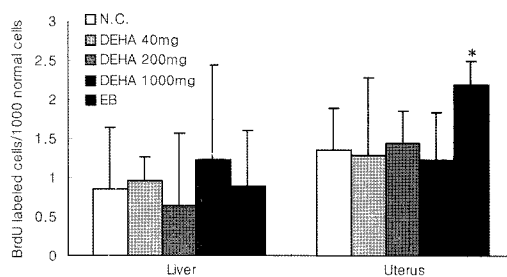


Fig. 5. BrdU labeling indices of female rats treated with DEHA. *, Significantly different from the value of control group at $p < 0.05$.

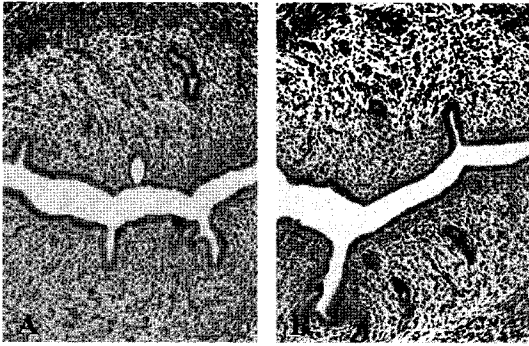


Fig. 6. Immunohistochemical study of rats treated with DEHA on uterotrophic assay. BrdU labeling cells were detected in uterus. (A) uterus treated with EB (X100 magnification), (B) uterus treated with DEHA 1000 mg/kg, (X100 magnification).

삽입되므로 세포증식능의 표지인자로 널리 알려져 있다.^{25,26)} DEHA에 대한 자궁비대반응시험 수행에서 간장과 자궁에 대하여 BrdU labeling indices를 측정할 결과, DEHA 1000 mg/kg 투여군에서 대조군에 대하여 다소 증가한 경향이 관찰되었으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 자궁에서는 자궁내막상피세포와 자궁샘 근처 등에서 하나 또는 두세 개의 표지세포가 흩어져 관찰되었으며, DEHA를 투여한 각 군에서는 차이가 발견되지 않았다. 이상에서 자궁비대반응시험 결과, 간과 자궁을 비롯한 주요 생식기 장기에서 시험물질 투여에 따른 BrdU 양성세포 수의 유의적 변화가 관찰되지 않아, DEHA 투여로 인한 실험동물의 생식세포 및 간장에서의 세포증식능에 대한 영향은 없는 것으로 평가된다.

IV. 결 론

식품포장용 램의 주성분으로 사용되었던 DEHA의 내분비장애작용을 평가하고자, 통상 사용되는 난소적출성체를 이용하는 자궁비대반응시험보다 더 민감도가 높은 것으로 보고되어진 미성숙 암컷 랫드를 이용한 자궁비대반응시험을 실시하였다. Estrogen 성 작용을 평가하기 위한 본 실험에서 생식기계의 무게증가나 조직병리학적 평가 및 자궁내막 및 자궁근육의 두께, 자궁샘의 수에서도 특이적인 변화는 관찰되지 않았다. 세포증식능을 평가하기 위한 BrdU 양성반응세포 수도 큰 변화가 관찰되지 않아, DEHA는 미성숙 암컷 랫드에 대하여 내분비장애작용을 가지지 않는 것으로 생각된다. 그러나, 최근 OECD에서는 내분비장애물질을 평가하기 위한 좀더 강화된 가이드라인들을 제시하고 있으

며, 기존의 3~10일간의 시험물질투여기간을 28일로 늘려 시험물질의 노출시간 연장 및 자궁비대반응시험의 짧은 시험기간에 따른 생식주기 측정의 어려움 등의 단점을 보완하고 있으므로,^{27,28)} 향후 DEHA를 포함한 이들 물질에 대한 내분비장애작용을 정확히 평가하기 위해서는 *in vivo* 및 *in vitro* 시험 등의 추가 시험이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 식품의약품안전청 국립독성과학원의 “내분비계장애물질 평가사업”의 지원(05141내분비501)을 받아 수행된 연구입니다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청 : 내분비계 장애(추정)물질 독성자료집. 141, 1999.
2. Melnick, R. L., Morrissey, R. E. and Tomaszewski, K. E. : Studies by the National Toxicology Program on di(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology and Industrial Health*, 3(2), 99-118, 1987.
3. Kim, E. J. : Study on Anti-estrogenic Activity of DEHP as an Endocrine Disruption Chemical. *Korean Journal of Environmental Health*, 29(2), 7-15, 2003.
4. Kim, P. G. and Yang, Y. H. : Effects of Butyl Benzyl Phthalate on Dams and F1 during Lactation Period of Rats. *Korean Journal of Environmental Health*, 29(2), 16-22, 2003.
5. Choi, K., Hwang, S. D., Kwon, E. and Kim, P. G. : The Reproductive Toxicity by Combined Treatment of Bisphenol A and Butyl Benzyl Phthalate During Gestation, Lactation Period in Rats. *Korean Journal of Environmental Health*, 30(2), 71-78, 2004.
6. Kaufmann, W., Deckardt, K., McKee, R. H., Butala, J. H. and Bahnmann, R. : Tumor induction in mouse liver: di-isononyl phthalate acts via peroxysome proliferation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 175-183, 2002.
7. Laurence, C., Angela, J. M. and John, G. : Migration from plasticized films into foods. 4. Use of polymeric plasticizers and lower levels of di-(2-ethylhexyl) adipate plasticizers in PVC films to reduce migration into food. *Food Additives Contaminants*, 15(3), 277-282, 1988.
8. Peterson, J. H. and Breindahl, T. : Specific migration of di-(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) from plasticized PVC film: results from an enforcement campaign. *Food Additives Contaminants*, 15(5), 600-608, 1998.
9. Petersen, J. H., Naamansen, E. T. and Nielsen, P. A. : PVC cling film in contact with cheese: health aspects related to global migration and specific migration of DEHA. *Food Additives Contaminants*, 12(2), 245-

- 253, 1995.
10. Singh, A. R., Lawrence, W. H. and Autian, J. : Dominant lethal mutations and antifertility effects of di-2-ethylhexyl adipate and diethyl adipate in male mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **32**(2), 566-576, 1975.
 11. Miyagawa, M., Takasawa, H., Sugiyama, A., Inoue, Y., Murata, T., Uno, Y. and Yohikawa, K. : The *in vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test with hepatocytes prepared from male B6C3F1 mice as an early prediction assay for putative nongenotoxic (Ames-negative) mouse hepatocarcinogens. *Mutation Research*, **343**, 157-183, 1995.
 12. Lake, B. G., Price, R. J., Cumminghame, M. E. and Walters D. G. : Comparison of the effects of di-(2-ethylhexyl) adipate on hepatic peroxisome proliferation and cell replication in the rat and mouse. *Toxicology*, **123**(3), 217-226, 1997.
 13. Moody, D. E. and Reddy, J. K. : Serum triglyceride and cholesterol contents in male rats receiving diets containing plasticizers and analogues of the ester 2-ethylhexanol. *Toxicology Letters*, **10**(4), 379-383, 1982.
 14. NTP : Carcinogenesis bioassay of di-2-ethylhexyl) adipate in F344 rats and B6C3F1 mice. *National Toxicology Program Technical Report*, Series No. 212, 1982.
 15. Kluwe, W. M., McConnell, E. E., Huff, J. E., Hase-man, J. K., Douglas, J. F. and Hartwell, W. V. : Carcinogenicity testing of phthalate esters and related compounds by the National Toxicology Program and the National Cancer Institute. *Environmental Health Perspectives*, **45**, 129-133, 1982.
 16. 환경부 : 유해화학물질관리기본계획(2001~2005). 236, 2000.
 17. OECD : Validation Protocol for the Uterotrophic Assay. Task Force on Endocrine Disruptor Testing and Assessment. 1999.
 18. EPA EDSTAC : Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Final Report, 1998.
 19. Jordan, V. C. and Gosden, B. : Differential antiestrogen action in the immature rat uterus: a comparison of hydroxylated antiestrogens with high affinity for the estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry*, **19**(3), 1249-1258, 1983.
 20. Ashby, J., Odum, J. and Foster, J. R. : Activity of raloxifene in immature and ovariectomized rat uterotrophic assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **25**(3), 226-231, 1997.
 21. Odum, J., Lefevre, P. A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E. J., Beresford, N. A., Sumpter, J. P. and Ashby, J. : The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **25**(2), 176-188, 1997.
 22. Kang, K. S., Kim, H. S., Ryu, D. Y., Che, J. H. and Lee, Y. S. : Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprague-Dawley rats. *Toxicology Letters*, **20**, 118(1-2), 109-115, 2000.
 23. Han, S. Y., Kim, H. S., Han, S. K., Rhee, Y., Yang, K. H. and Park, K. R. : Study on the estrogenic activity of di-(2-ethylhexyl) adipate in E-screen assay and uterotrophic assay. *Korean Journal of Food Science Technology*, **32**(4), 964-969, 2000.
 24. Lee, H. C., Yamanouchi, K. and Nishihara, M. : Effects of Perinatal Exposure to Phthalate/adipate esters on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats. *The Journal of Reproduction and Development*, **52**(3), 343-52, 2006.
 25. Birner, P., Ritz, M., Musahl, C., Knippers, R., Gerdes, J., Voigtlander, T., Budka, H. and Hainfellner, J. A. : Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. *The American Journal of Pathology*, **158**(6), 1991-1996, 2001.
 26. Bosq, J. and Bourhis, J. : Bromodeoxyuridine (BrdU). Analysis of cellular proliferation. *Annals of Pathology*, **17**(3), 171-178, 1997.
 27. Shin, J. H., Moon, H. J., Kim, T. S., Kang, I. H., Ki, H. Y., Choi, K. S. and Han, S. Y. : Repeated 28-day oral toxicity study of vinclozolin in rats based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline No. 407" to detect endocrine effects. *Archives of Toxicology*, **80**(9), 547-554, 2006.
 28. Cho, S. D., Kim, J. H., Kim, D. Y., Lee, Y. S. and Kang, K. S. : Pre-validation study for OECD enhanced test guideline 407 protocol by gavage for 4 weeks using propylthiouracil and tamoxifen. *Toxicology Letters*, **144**(2), 195-204, 2003.