

## 랫드에서 비스페놀 A의 발생독성에 대한 고려홍삼 물추출물의 효과

김종춘<sup>1\*</sup> · 임광현<sup>1</sup> · 서정은<sup>1</sup> · 위재준<sup>2</sup> · 남기열<sup>2</sup> · 정문구<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 안전성연구센터 생식독성실, <sup>2</sup>한국인삼연초연구원 인삼효능연구부

## Effects of Korean Red Ginseng Water Extract on Bisphenol A-induced Developmental Toxicity in Rats

Jong-Choon Kim<sup>1\*</sup>, Kwang-Hyun Lim<sup>1</sup>, Jeong-Eun Suh<sup>1</sup>, Jae-Joon Wee<sup>2</sup>,  
Ki-Yeul Nam<sup>2</sup> and Moon-Koo Chung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Reproductive Toxicology Division, Toxicology Research Center,  
Korea Research Institute of Chemical Technology,

<sup>2</sup>Ginseng Pharmacology Division, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

(Received July 26, 2001)

(Accepted August 22, 2001)

**ABSTRACT:** The present study was conducted to investigate the effects of Korean red ginseng water extract (KRGWE) on developmental toxicity caused by the environmental estrogen bisphenol A (BPA) in Sprague-Dawley rats. Fifty females successfully mated were randomly assigned to five experimental groups, i.e., group I (vehicle control), group II (BPA 1000 mg/kg), group III (KRGWE 400 mg/kg), group IV (BPA 1000 mg/kg & KRGWE 200 mg/kg), and group V (BPA 1000 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg). The test articles were administered by gavage to mated females from gestational days (GD) 1 through 20 (sperm vaginal lavage = day 0). All females were subjected to caesarean section on GD 21 and their fetuses were examined for external, visceral, and skeletal abnormalities. In the group II, significant maternal toxic effects including suppressed body weight, decreased body weight gain during pregnancy, and reduced food consumption were observed in pregnant rats. The minimal developmental toxicity including fetal ossification delay was also found in fetuses. In addition, a tendency for increased pregnancy failure, increased pre- and postimplantation loss, and decreased fetal body weight was observed. However, no fetal morphological abnormalities were seen in surviving fetuses at a dose level of 1000 mg BPA/kg. On the other hand, the maternal toxicity and developmental toxicity found in the groups IV and V were comparable to those of the group II. There were no adverse signs of either maternal toxicity or developmental toxicity in the group III. These results showed that administration of BPA at a dose level of 1000 mg/kg to pregnant rats resulted in significant maternal toxicity and minimal developmental toxicity, and that no protective effects on BPA-induced maternal toxicity and developmental toxicity were found by concomitant gavage dosing of KRGWE.

**Key Words:** Environmental disrupting chemical, Bisphenol A, Developmental toxicity, Korean red ginseng, Pregnancy, Rats

### I. 서 론

최근 사람과 야생동물에서 내분비계와 관련된 질환의 발생빈도가 증가하는 것이 호르몬 작용을 흉내내거나 조절하는 능력을 가진 환경오염물질의 노출과 밀접하게 관련이 있다는 가설이 세계적인 관심의 초점이 되고 있다

(Colborn 등, 1993; Daston 등, 1997; Sonnenschein 등, 1998). 최근의 많은 연구보고에 의하면 유방, 전립선 및 고환의 암발생, 정자의 질적 저하, 비뇨생식기의 선천성 기형 등과 같은 호르몬 의존적인 질환들이 점차 증가하는 것으로 나타났다(Carlsen 등, 1992; Ahlborg 등, 1995; Bergstrom 등, 1996). 이러한 내분비계와 관련된 질환들의 발병율이 증가하는 것에는 에스트로젠성 활성을 가진 환경 화학물질이 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다

\*To whom correspondence should be addressed

(Jones와 Hajek, 1995). 실제로, 많은 수의 환경화학물질들이 실험동물에서 에스트로젠성 활성을 가지고 있음이 증명되었고, 특히 디에틸stil베스트롤(diethylstilbestrol, DES)과 다이옥신(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD)은 여러 가지의 내분비 의존성 부작용을 유발하는 것으로 밝혀졌다(Newbold 등, 1990; Theobald 등, 1997). 이러한 환경호르몬들이 유발하는 부작용에는 발육중인 새끼가 성숙한 개체보다 더욱 감수성이 높은 것으로 보고되어 있다(Bern, 1992). 성숙동물에서의 환경호르몬의 부작용은 전형적으로 일시적인 양상을 보이지만 세포가 분화하는 발생기간중에 유전인자의 작용을 변형시키는 환경호르몬들은 세포(cell)나 기관(organ) 및 기관계(organ system)의 기능을 영구적으로 파괴하게 된다(vom Saal 등, 1998).

Bisphenol A(BPA)는 합성수지와 폴리카보네이트 프라스틱의 원료로 널리 사용되고 있으며, 치과치료제로서도 사용되고 있다(Olea 등, 1996; Staples 등, 1998). BPA를 함유하는 폴리카보네이트와 합성수지 등은 식품용기나 치과치료재 등으로 생활용품에 폭 넓게 사용되고 있기 때문에 생태계내로 혼입되는 양은 점차 증가하고 있으며, 따라서 이들에 의한 생식 및 발생독성에 대해서 많은 관심이 집중되고 있다. BPA에 대한 독성연구는 지난 수십년간 광범위하게 수행되었으며, 그 결과 이 물질은 여러 시험계에서 에스트로젠성을 가지고 있음이 밝혀졌다(Krishnan 등, 1993; Colerange와 Roy, 1997). 특히, BPA는 암컷동물에서 자궁증식성을 나타내고(Ashby와 Tinwell, 1998; Steinmetz 등, 1998; Papaconstantinou 등, 2000), 임신동물에서는 모독성(maternal toxicity)과 발생독성(developmental toxicity)을 유발하는 것이 확인된 바 있다(Hardin 등, 1981; Reel 등, 1985; Morrissey 등, 1987). 최근 본 연구실에서는 BPA가 임신랫드에서 모독성과 임신장애 및 초기배아의 사망을 유발한다는 것을 증명한 바 있다(Kim 등, 2001b).

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 다양한 약리효과를 가지고 있어서 동양의학에서 오래전부터 여러 질환의 예방과 치료 또는 보약재로서 널리 사용되어 온 전통적인 생약이다. 문헌들에 의하면 인삼과 그 성분들은 면역증진과 항암, 기억력 및 학습능력의 향상, 방사선과 바이러스, 온도, 스트레스 및 물리적 운동에 대한 저항력을 증가시킨다고 한다(Yun, 1996; Attele 등, 1999; Vogler 등, 1999). 최근 연구보고에 따르면 기니픽에서 고려홍삼 물추출물(Korean red ginseng water extract, 이하 홍삼추출물)이 TCDD의 고환독성을 감소시킨다는 사실이 확인된 바 있다(Kim 등, 1999). 환경오염물질의 위해성이 심각한 사회문제로 대두되고 있는 현실을 감안할 때 다양한 약리작용을 나타내는 홍삼추출물이 BPA가 유발하는 발생독성을 억제 또는 감소시키는지를 밝히는 것은 매우 중요한 연구

과제라고 생각된다.

본 연구는 환경에스트로젠인 BPA가 임신랫드에서 유발하는 모독성 및 발생독성을 홍삼추출물이 방어 또는 억제시켜 주는지를 구명하기 위하여 식품의약품안전청의 비임상시험관리기준(KGLP, 2000) 및 OECD의 Good Laboratory Practice(GLP, 1997)에 준하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

한국화학연구원 안전성연구센터의 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100번지)에서 입수한 특정병원체부재 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 9주령의 암수동물을 입수한 후 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 암수동물을 2:1로 교배시켰다. 익일 질도말에서 정자가 확인된 동물을 교미동물로 판정하였고, 이 날을 임신 0일로 산정하였다.

### 2. 사육환경

본 시험은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 교배기간중에는 스테인레스계 방사육상자(210 W×350 L×180 H mm)에 암수 2:1로 수용하였고, 교미가 확인된 동물은 폴리카보네이트 사육상자(260 W×420 L×180 H mm)에 개체별로 수용하였다. 시험기간 중 사료는 방사선 조사(25 kGy)로 멸균한 실험동물용 고형사료[제일사료(주), 대전광역시 대덕구 대화동 40-36]를, 그리고 물은 자외선 유수살균기로 소독한 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 시험은 미국 실험동물관리인증협회(American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)로부터 인증된 시설에서 수행되었고, 모든 시험방법은 기관내 동물관리사용위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에 의해 검토되었다.

### 3. 시험물질

Bisphenol A(CAS No. 80-05-7)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, corn oil(Sigma Chemical Co.)에 현탁조제하여 투여하였다. 고려홍삼 물추출물은 한국인삼연초연구원(대전광역시 유성구 신성동 302번지)으로부터 입수하여 멸균증류수에 용해하여 사용하였다. 각 시험물질은 매일 투여하기 직전에 조제하였다.

#### 4. 시험군의 구성

50마리의 교미확인동물을 I군(부형제대조군), II군(BPA 1000 mg/kg & 홍삼추출물 0 mg/kg), III군(BPA 0 mg/kg & 홍삼추출물 400 mg/kg), IV군(BPA 1000 mg/kg & 홍삼추출물 200 mg/kg) 및 V군(BPA 1000 mg/kg & 홍삼추출물 400 mg/kg)으로 구성된 5개군에 군당 10마리씩 체중범위에 따라 무작위로 배정하였다.

#### 5. 투여량의 설정

용량설정을 위해 100, 200, 400, 800 및 1200 mg/kg 용량으로 예비시험을 실시한 결과 200 mg/kg 이하의 용량에서는 어떠한 독성소견도 인정되지 않았고, 400과 800 mg/kg 용량에서는 모동물의 체중감소경향과 착상후 배자손실이 증가하였다. 1200 mg/kg 용량에서는 6마리중 3마리가 심한 독성으로 인하여 투여기간중에 사망하였고, 1마리는 심한 모독성과 배자의 완전흡수를 나타냈으며, 나머지 2마리는 동복자수의 감소와 태자체중의 감소를 나타내었다. 이 결과를 기초로 하여 1000 mg/kg을 BPA의 발생독성용량으로 설정하였다. 홍삼추출물은 약리작용을 나타내는 것으로 알려져 있는 200 mg/kg과 용량반응성을 보기 위해 400 mg/kg을 사용하였다.

#### 6. 투여방법 및 투여기간

교미확인된 암컷동물에게 임신 1일째부터 20일째까지 BPA 및 홍삼추출물을 각각 경구로 1일 1회씩 20일간 반복투여 하였다. BPA 및 홍삼추출물은 모두 오전중에 투여하였으며, BPA를 투여하기 30분 전에 홍삼추출물을 투여하였다. 각 시험물질의 투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 하여 kg당 10 ml로 산출하였다.

#### 7. 일반증상관찰

시험기간 중 1일 1회씩 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 관해서 관찰하였고 투여기간 중에는 투여전후로 1일 2회씩 관찰하였다.

#### 8. 체중측정

각 어미동물에 대하여 임신 0, 3, 7, 10, 14, 17 및 21일째에 체중을 측정하였다. 또한, 임신 21일째의 모동물 체중에서 부검시 측정된 임신자궁의 중량을 감하여 모동물의 실질적인 중량인 보정중량(corrected body weight)을 산출하였다.

#### 9. 사료섭취량 측정

각 어미동물에 대하여 체중측정일에 사료를 급여한 후 익일 잔량을 측정하였다. 단, 임신 21일째에는 제왕절개로 인하여 임신 20일째에 사료급여 후 익일 잔량을 측정하였다.

#### 10. 부검 및 제왕절개

각 임신동물들을 임신 21일째에 CO<sub>2</sub> 마취하에 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 임신자궁은 난소와 분리하여 적출한 다음 중량을 측정하였고, 임신황태수, 착상수, 생존태자수, 흡수배자수, 사망태자수 등을 조사하였다. 암수 생존태자의 항문-성기간 길이(anogenital distance)는 caliper를 이용하여 항문과 생식유두간의 거리를 측정하였다. 태자의 항문-성기간 길이는 본 연구실에서 발생독성시험시 통상적으로 측정하는 검사항목은 아니지만(Kim 등, 2000a), 시험물질이 내분비계와 관련되는 경우 측정항목에 추가하고 있다(Kim 등 2001b). 흡수배자의 경우 태반조직만 보일 경우 초기흡수로 하였고, 태반 및 태자의 근조직이 관찰될 경우에는 후기흡수로 분류하였다. 배자가 착상초기에 흡수 또는 사망하여 착상부위를 관찰하기 어려운 경우에는 착상부위를 명확히 구분하기 위해 2% sodium hydroxide 용액에서 1시간 동안 침적한 다음 황색 또는 황갈색의 착상흔을 계수하였다(Yamada 등, 1988). 생존태자와 태반은 개체별로 중량을 측정하였고, 태자의 성별을 확인하였다.

#### 11. 태자의 형태학적 검사

생존태자를 자궁에서 적출한 후 구개열(cleft palate)을 포함한 외표이상의 유무에 대하여 관찰하였고 왼쪽 자궁각의 난소측에서 번호를 매겨 흡수번호는 골격검사에 그리고 짝수번호는 내장검사에 제공하였다. 골격검사는 각 배당 생존태자를 5% 중성원충포르말린액에 고정한 다음 변형된 Dawson법(Dawson, 1926)에 따라 골격표본을 제작하여 실시하였다. 내부장기검사는 각 배당 생존태자를 Bouin액에 고정한 다음 두부 및 복부는 Wilson법(Wilson, 1965), 흉부는 Nishimura법(Nishimura, 1974)에 따라 수행하였다. 태자의 외표과 내부장기 및 골격검사시 형태학적이상은 기형(malformation), 변이(variation) 또는 발육지연(retardation)으로 분류하였으며, 이상소견에 대한 용어는 Wise 등(1997)의 용어통일안을 기준으로 하여 표기하였다.

#### 12. 통계학적 분석

시험결과는 가능한한 평균값과 표준편차로 표기하였다.

**Table 1.** Effects on body weights of pregnant rats treated with bisphenol A (BPA) and Korean red ginseng water extract (KRGWE) during gestational days (GD) 1 through 20

| Parameter                          | Group      |             |            |              |                 |
|------------------------------------|------------|-------------|------------|--------------|-----------------|
|                                    | I          | II          | III        | IV           | V               |
| No. of pregnant rats               | 10         | 7           | 10         | 7            | 10 <sup>a</sup> |
| GD 0                               | 234.6±13.6 | 239.5±17.1  | 238.6±14.5 | 242.0±19.1   | 239.0±17.6      |
| GD 3                               | 250.9±16.3 | 241.4±23.2  | 251.9±11.5 | 249.7±25.5   | 244.6±13.5      |
| GD 7                               | 263.8±16.0 | 241.9±21.1  | 263.1±12.0 | 242.8±28.3   | 238.6±11.0      |
| GD 10                              | 276.1±15.7 | 253.2±26.8  | 288.2±29.2 | 252.3±26.3   | 250.2±11.9      |
| GD 14                              | 296.9±17.4 | 268.4±29.9  | 298.7±14.7 | 270.4±29.8   | 266.3±13.2      |
| GD 17                              | 327.0±18.5 | 288.0±23.8  | 330.3±17.9 | 290.6±25.9   | 280.7±17.1*     |
| GD 21                              | 387.1±28.5 | 315.6±44.2* | 389.9±40.8 | 311.4±28.5** | 312.6±34.3*     |
| Body weight gain <sup>b</sup>      | 152.5±23.0 | 76.0±30.2** | 151.4±36.0 | 69.5±27.1**  | 76.4±43.4**     |
| Corrected body weight <sup>c</sup> | 293.5±19.4 | 249.3±35.6* | 292.1±20.7 | 276.1±25.5   | 264.8±16.1      |

Group I, vehicle control; group II, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 0 mg/kg; group III, BPA 0 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg; group IV, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 200 mg/kg; group V, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg.  
Values are means±S.D. (g).

<sup>a</sup>One female in the group died on GD 7 due to the severe toxicity.

<sup>b</sup>Body weight gain = body weight on GD 21 - body weight on GD 0.

<sup>c</sup>Corrected body weight = body weight on GD 21 - gravid uterine weight.

\* and \*\* indicate significant difference at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  levels, respectively, when compared with the group I.

통계학적 분석은 SAS 프로그램을 이용하여 분석하였고, 비교단위는 모동물 또는 동복자(litter)로 하였다. 모동물의 체중과 사료섭취량, 태자체중 등의 모수적인 자료는 일원 배치분산분석(one-way ANOVA)을 한 다음 유의성이 인정된 항목에 대해서는 Duncan's multiple comparison test로 각 시험군간의 유의차를 조사하였다. 황체수와 착상수, 생존 및 사망태자수, 착상전 및 착상후 배자손실율 등의 비모수적 자료는 Kruskal-Wallis ANOVA를 한 다음 유의성이 인정된 항목에 대해서는 Mann-Whitney U test로 각 군간의 유의차를 분석하였다. 기형을 가진 태자와 기형태자를 가진 동복자 등의 빈도수를 나타내는 자료는 chi-square test를 하였고, 필요시 Fisher's exact probability test로 각 시험군간의 유의차를 조사하였다. 각 항목의 통계학적 유의수준은 5% 및 1%에서 검정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 모동물에 대한 영향

사망동물의 경우 BPA 1000 mg/kg과 홍삼추출물 400 mg/kg을 병용투여한 V군에서 임신 7일째에 1마리가 사망하였으며, 그 외의 시험군에서는 전 시험기간 동안 사망동물이 관찰되지 않았다. 일반증상을 관찰한 결과, 부형제대조군인 I군 및 홍삼추출물 단독투여군인 III군에서는 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았으나 BPA를 단독 또는 홍삼추출물과 병용투여한 II군, IV군 및 V군에서는 거의 모든 동물이 투여개시 후 3일째부터 부검시까지 허약(weakness), 자발운동 저하(decreased locomotor activity), 연변(soft

stool), 설사(diarrhea), 하복부 오염(perineal soiling) 등의 독성소견을 나타내었다.

임신기간 중 모동물의 체중변화는 Table 1과 같다. I군과 III군의 모동물들은 정상적인 체중증가를 나타내었다. 반면, BPA를 단독 또는 홍삼추출물과 병용투여한 II군, IV군 및 V군에서는 임신 17일 또는 21일째의 체중이 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 임신 전 기간동안의 증체량도 부형제대조군인 I군에 비해 유의성있게 감소하였다. 부검시 모동물의 체중에서 임신자궁의 중량을 뺀 보정중량은 II군에서의 결과가 I군의 결과에 비해 유의성있게 낮았다. 반면, 홍삼추출물을 병용투여한 IV군과 V군에서의 보정중량은 I군의 결과에 비해 다소 감소하였으나 BPA 단독투여군인 II군에 비해서는 다소 증가한 것으로 나타났으며, 각 시험군간의 통계학적 유의성은 인정되지 않았다.

임신기간 중 사료섭취량을 측정한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 II군, IV군 및 V군에서 임신 4일째의 섭취량이 I군의 섭취량에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 그 외의 기간중에는 각 시험군간에 유의성있는 섭취량의 차이는 인정되지 않았다.

#### 2. 태자에 대한 영향

임신 21일째에 모동물을 제왕절개하여 얻은 생식소견은 Table 3에 요약하였다. 각 시험군의 임신율은 I군, II군, III군, IV군 및 V군의 순으로 100%, 70%, 100%, 70% 및 100%로 나타났으며, 임신장애(pregnancy failure)는 II군 및 IV군에서 각각 30%로 다소 높은 수치를 나타냈으나

**Table 2.** Effects on food consumption of pregnant rats treated with bisphenol A (BPA) and Korean red ginseng water extract (KRGWE) during gestational days (GD) 1 through 20

| Parameter            | Group      |            |           |            |                 |
|----------------------|------------|------------|-----------|------------|-----------------|
|                      | I          | II         | III       | IV         | V               |
| No. of pregnant rats | 10         | 7          | 10        | 7          | 10 <sup>a</sup> |
| GD 1                 | 19.4±2.21  | 18.7±2.12  | 22.0±6.50 | 18.3±3.04  | 20.0±2.76       |
| GD 4                 | 16.0±2.20  | 6.4±1.91** | 16.4±2.94 | 7.5±2.35** | 7.0±4.03**      |
| GD 8                 | 15.6±2.23  | 15.5±9.51  | 18.1±3.14 | 10.4±4.16  | 14.1±6.88       |
| GD 11                | 22.5±10.47 | 13.7±7.14  | 16.8±4.37 | 18.3±6.75  | 19.4±6.89       |
| GD 15                | 18.6±4.07  | 19.2±9.02  | 19.2±4.64 | 20.3±8.42  | 19.7±9.55       |
| GD 18                | 21.7±3.15  | 17.9±4.48  | 22.2±3.10 | 17.6±2.35  | 18.2±3.79       |
| GD 21                | 19.1±4.71  | 16.5±7.49  | 18.2±5.20 | 16.5±5.66  | 14.1±4.60       |

Group I, vehicle control; group II, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 0 mg/kg; group III, BPA 0 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg; group IV, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 200 mg/kg; group V, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg.

Values are means±S.D. (g).

<sup>a</sup>One female in the group died on GD 7.

\*\* indicates significant difference at  $p < 0.01$  level when compared with the group I.

**Table 3.** Effects on reproductive parameters of pregnant rats treated with bisphenol A (BPA) and Korean red ginseng water extract (KRGWE) during gestational days 1 through 20

| Parameter                              | Group                 |              |             |             |             |
|--|-----------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|  | I                     | II           | III         | IV          | V           |
| No. of mated females                   | 10                    | 10           | 10          | 10          | 10          |
| No. of pregnant females                | 10                    | 7            | 10          | 7           | 10          |
| No. of dead females                    | 0                     | 0            | 0           | 0           | 1           |
| No. of litters examined                | 10                    | 7            | 10          | 7           | 9           |
| No. of corpora lutea                   | 16.9±2.8 <sup>a</sup> | 16.4±1.8     | 17.2±2.7    | 15.0±3.9    | 14.0±3.2    |
| No. of implantations                   | 14.2±3.4              | 14.6±3.8     | 15.1±3.9    | 8.90±3.2*   | 9.70±5.5    |
| Preimplantation loss (%) <sup>b</sup>  | 15.8±17.6             | 12.3±17.3    | 12.8±17.5   | 37.4±26.3   | 33.4±28.9   |
| No. of fetal deaths                    | 4                     | 16           | 10          | 23          | 18          |
| Resorptions: Early                     | 4                     | 15           | 10          | 19          | 16          |
| Late                                   | 0                     | 0            | 0           | 3           | 2           |
| Dead fetuses                           | 0                     | 1            | 0           | 1           | 0           |
| Postimplantation loss (%) <sup>c</sup> | 2.8±6.1               | 19.6±24.0    | 7.3±10.0    | 34.6±33.0** | 12.2±11.6   |
| No. of litters totally resorbed        | 0                     | 0            | 0           | 1           | 1           |
| No. of litters with live fetuses       | 10                    | 7            | 10          | 6           | 8           |
| Litter size                            | 13.8±3.5              | 12.3±4.6     | 14.1±4.1    | 5.6±4.6**   | 7.7±5.8     |
| Sex ratio (♂ / ♀)                      | 1.12(73/65)           | 0.59(33/53)* | 1.47(84/57) | 0.95(19/20) | 0.92(33/36) |
| Fetal body weight (g)                  |                       |              |             |             |             |
| Male                                   | 4.9±0.3               | 3.4±1.8**    | 5.1±0.3     | 4.7±0.7     | 4.3±0.6     |
| Female                                 | 4.7±0.2               | 3.2±1.7**    | 4.8±0.4     | 4.4±0.8     | 4.0±0.6     |
| Placental weight (g)                   | 0.6±0.1               | 0.5±0.1      | 0.6±0.1     | 0.7±0.1     | 0.6±0.2     |
| Anogenital distance (mm)               |                       |              |             |             |             |
| Male                                   | 3.2±0.2               | 2.7±0.4**    | 3.1±0.2     | 3.0±0.3     | 2.8±0.2     |
| Female                                 | 1.7±0.2               | 1.5±0.2      | 1.7±0.1     | 1.7±0.2     | 1.7±0.5     |

Group I, vehicle control; group II, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 0 mg/kg; group III, BPA 0 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg; group IV, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 200 mg/kg; group V, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg.

<sup>a</sup>Values are means±SD.

<sup>b</sup>Preimplantation loss (%) = [(no. of corpora lutea - no. of implantation sites)/no. of corpora lutea]×100.

<sup>c</sup>Postimplantation loss (%) = [(no. of implantation sites - no. of live fetuses)/no. of implantation sites]×100.

\* and \*\* indicate significant difference at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  levels, respectively, when compared with the group I.

각 시험군간에 통계학적 유의차는 인정되지 않았다. 임신 황체수에 있어서는 모든 시험군에서 유사한 결과를 보여 주었다. 반면, IV군의 착상수는 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, V군의 착상수는 통계학적 차이는 인정되지 않았지만 부형제대조군에 비해 다소

감소한 것으로 나타났으며, 이로 인하여 착상전 손실율 (preimplantation loss rate)이 다소 증가한 것으로 나타났다. 태자사망수의 경우 BPA를 단독 또는 병용투여한 II군, IV군 및 V군의 결과가 I군에 비해 다소 증가하였으며, 특히 IV군에서는 이로 인하여 착상후 손실율(postimplantation

loss rate)이 I군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 증가하였고 동복자수도 유의성있게 감소하였다. IV군과 V군의 경우 착상된 모든 배자가 사망한 동복자는 각각 1례 관찰되었다. 생존태자의 성비(수컷태자/암컷태자)는 II군의 결과가 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였으나, 그 외의 시험군에서는 부형제대조군과 유의성있는 차이가 인정되지 않았다. 생존태자의 체중을 측정된 결과 II군에서의 암수태자 체중이 부형제대조군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 그 외

의 시험에서는 유의성있는 차이가 인정되지 않았다. 태반 중량의 경우 모든 시험군에서 유사한 결과를 관찰할 수 있었으며, 태자의 항문-성기간 길이는 II군의 수컷태자의 결과가 I군의 결과에 비해 유의성있게 짧은 것으로 나타났다.

생존태자의 외표검사 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 척추전만증(lordosis), 구형두부(domed head), 안구돌출(exophthalmos), 무하악증(agnathia), 만곡족(club foot), 흔적미(thread-like tail) 항문폐쇄(anal atresia), 왜소태자(small fetus) 등의 기형소견이 각 시험군에 산발적으로 관

**Table 4.** External alterations in fetuses from pregnant rats treated with bisphenol A (BPA) and Korean red ginseng water extract (KRGWE) during gestational days 1 through 20

| Parameter                                   | Group    |          |          |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|
|   | I        | II       | III      | IV       | V        |
| Fetuses examined                            | 138      | 86       | 141      | 39       | 69       |
| Litters examined                            | 10       | 7        | 10       | 6        | 8        |
| Fetuses with malformations (%) <sup>a</sup> | 1 (0.7)  | 2 (2.3)  | 1 (0.7)  | 1 (2.2)  | 2 (2.9)  |
| Litters affected (%) <sup>b</sup>           | 1 (10.0) | 1 (14.3) | 1 (10.0) | 1 (16.7) | 2 (25.0) |
| Lordosis                                    | 0        | 0        | 0        | 1        | 1        |
| Domed head                                  | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        |
| Exophthalmos                                | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        |
| Agnathia                                    | 0        | 0        | 1        | 0        | 0        |
| Club foot                                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        |
| Thread-like tail                            | 1        | 0        | 0        | 0        | 1        |
| Anal atresia                                | 0        | 0        | 0        | 0        | 1        |
| Small fetuses <sup>c</sup>                  | 0        | 2        | 0        | 0        | 0        |

Group I, vehicle control; group II, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 0 mg/kg; group III, BPA 0 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg; group IV, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 200 mg/kg; group V, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg.

<sup>a</sup>A single fetus may be represented more than once in listing individual defects.

<sup>b</sup>Includes litters with one or more affected fetuses.

<sup>c</sup>Less than 20% of the control fetal body weight.

**Table 5.** Visceral alterations in fetuses from pregnant rats treated with bisphenol A (BPA) and Korean red ginseng water extract (KRGWE) during gestational days 1 through 20

| Parameter                                   | Group     |                |           |                |                |
|---|-----------|----------------|-----------|----------------|----------------|
|   | I         | II             | III       | IV             | V              |
| Fetuses examined                            | 66        | 41             | 67        | 18             | 32             |
| Litters examined                            | 10        | 6 <sup>a</sup> | 10        | 5 <sup>b</sup> | 7 <sup>b</sup> |
| Fetuses with malformations (%) <sup>c</sup> | 1 (1.5)   | 0              | 0         | 0              | 1 (3.1)        |
| Litters affected (%) <sup>d</sup>           | 1 (10.0)  | 0              | 0         | 0              | 1 (14.3)       |
| Dilated cerebral ventricle                  | 1         | 0              | 0         | 0              | 0              |
| Small lung                                  | 0         | 0              | 0         | 0              | 1              |
| Diaphragmatic hernia                        | 0         | 0              | 0         | 0              | 1              |
| Malpositioned kidney                        | 0         | 0              | 0         | 0              | 1              |
| Absent kidney                               | 0         | 0              | 0         | 0              | 1              |
| Fetuses with variations (%) <sup>c</sup>    | 18 (27.3) | 6 (14.6)       | 20 (29.9) | 6 (33.3)       | 4 (12.5)       |
| Litters affected (%) <sup>d</sup>           | 9 (90.0)  | 3 (50.0)       | 7 (70.0)  | 4 (80.0)       | 3 (42.9)       |
| Dilated renal pelvis                        | 8         | 0              | 7         | 3              | 0              |
| Dilated ureter                              | 13        | 1              | 14        | 4              | 3              |
| Misshapen thymus                            | 2         | 5              | 6         | 0              | 1              |

Group I, vehicle control; group II, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 0 mg/kg; group III, BPA 0 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg; group IV, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 200 mg/kg; group V, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg.

<sup>a</sup>One litter with a single fetus was excluded because of the severe growth retardation.

<sup>b</sup>One litter with a single fetus was excluded because of the skeletal examination.

<sup>c</sup>A single fetus may be represented more than once in listing individual defects.

<sup>d</sup>Includes litters with one or more affected fetuses.

**Table 6.** Skeletal alterations in fetuses from pregnant rats treated with bisphenol A (BPA) and Korean red ginseng water extract (KRGWE) during gestational days 1 through 20

| Parameter                                   | Group     |                |           |          |           |
|---|-----------|----------------|-----------|----------|-----------|
|   | I         | II             | III       | IV       | V         |
| Fetuses examined                            | 72        | 43             | 74        | 21       | 37        |
| Litters examined                            | 10        | 6 <sup>a</sup> | 10        | 6        | 8         |
| Fetuses with malformations (%) <sup>b</sup> | 1 (1.4)   | 0              | 0         | 0        | 1 (2.7)   |
| Litters affected (%) <sup>c</sup>           | 1 (10.0)  | 0              | 0         | 0        | 1 (12.5)  |
| Absent rib                                  | 1         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Absent thoracic centrum                     | 1         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Absent supraoccipital                       | 0         | 0              | 0         | 0        | 1         |
| Discontinuous rib                           | 0         | 0              | 0         | 0        | 1         |
| Fused rib                                   | 1         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Fused sternebra                             | 1         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Fetuses with variations (%) <sup>b</sup>    | 10 (13.9) | 6 (13.6)       | 21 (28.4) | 5 (23.8) | 12 (32.4) |
| Litters affected (%) <sup>c</sup>           | 7 (70.0)  | 5 (83.3)       | 7 (70.0)  | 4 (66.7) | 7 (87.5)  |
| Bipartite ossification of sternebra         | 1         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Bipartite ossification of thoracic centrum  | 1         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Cervical rib                                | 1         | 1              | 0         | 0        | 1         |
| Dumbbell ossification of thoracic centrum   | 9         | 1              | 21        | 4        | 6         |
| Enlarged fontanel                           | 0         | 0              | 0         | 0        | 1         |
| Hemicentric thoracic centrum                | 1         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Incomplete ossification of interparietal    | 0         | 0              | 0         | 0        | 1         |
| Incomplete ossification of parietal         | 0         | 0              | 0         | 0        | 1         |
| Incomplete ossification of pubis            | 0         | 3              | 0         | 0        | 0         |
| Incomplete ossification of supraoccipital   | 0         | 0              | 0         | 0        | 1         |
| Misshapen sternebra                         | 1         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Short 13th rib                              | 2         | 0              | 0         | 0        | 0         |
| Full supernumerary rib                      | 0         | 1              | 0         | 0        | 0         |
| Short supernumerary rib                     | 0         | 0              | 1         | 2        | 3         |
| Wavy rib                                    | 1         | 0              | 0         | 0        | 1         |
| No. of ossification centers (mean±SD)       |           |                |           |          |           |
| Cervical vertebra                           | 2.5±1.61  | 1.8±2.14       | 1.7±0.76  | 1.9±1.39 | 0.6±0.81  |
| Sternebra                                   | 6.0±0.09  | 4.7±1.74*      | 6.0±0.00  | 5.7±0.82 | 5.9±0.19  |
| Metacarpals in both forelimbs               | 8.0±0.09  | 7.0±1.23       | 8.0±0.00  | 7.7±0.82 | 7.8±0.30  |
| Metatarsals in both hindlimbs               | 8.8±0.40  | 7.9±1.28       | 8.6±0.58  | 8.4±0.43 | 8.1±0.27  |
| Sacral and caudal vertebra                  | 9.8±0.81  | 7.6±2.50       | 10.1±0.79 | 8.9±1.62 | 8.4±0.84  |

Group I, vehicle control; group II, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 0 mg/kg; group III, BPA 0 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg; group IV, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 200 mg/kg; group V, BPA 1000 mg/kg & KRGWE 400 mg/kg.

<sup>a</sup>One litter with a single fetus was excluded because of the severe growth retardation.

<sup>b</sup>A single fetus may be represented more than once in listing individual defects.

<sup>c</sup>Includes litters with one or more affected fetuses.

\* indicates significant difference at  $p < 0.05$  level when compared with the group I.

찰되었으나 시험군간에 유의성있는 차이는 관찰되지 않았으며, BPA의 투여에 기인된 외표이상은 인정되지 않았다.

태자의 내부장기 기형 및 변이의 발현빈도 및 형태는 Table 5에 나타내었다. 내부장기기형으로는 부형제대조군의 1레에서 측뇌실확장(dilated cerebral ventricle)이 관찰되었고, V군의 1레에서 폐의 형성부전(small lung)과 횡격막 탈장(diaphragmatic hernia), 신장의 위치이상(malpositioned kidney) 및 신장결손(absent kidney)이 관찰되었으나 각 시험군간의 발생빈도는 유의차가 인정되지 않았다. 내부장기변이로서는 신우확장(dilated renal pelvis), 요관확장(dilated ureter) 및 흉선형태이상(misshapen thymus)이 각 시험군에서 유사한 빈도로 관찰되었다.

생존태자의 골격표본을 관찰한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다. 골격기형으로는 부형제대조군의 1레에서 늑골결손(absent rib), 흉추추체결손(absent thoracic centrum), 늑골유착(fused rib) 및 흉골분절유착(fused sternebra)이 관찰되었고, V군의 1레에서 늑골불연속(discontinuous rib) 및 늑골유착이 관찰되었지만 각 시험군간에 통계학적 차이는 인정되지 않았다. 골격변이를 관찰한 결과, 이분흉골분절(bipartite ossification of sternebra), 이분 흉추추체(bipartite ossification of thoracic centrum), 경늑(cervical rib), 아령형 흉추추체(dumbbell ossification of thoracic centrum), 천문확장(enlarged fontanel), 편측성 흉추추체(hemicentric thoracic centrum), 두정간골의 불완전골화

(incomplete ossification of interparietal), 두정골(parietal)의 불완전골화, 치골(pubis)의 불완전골화, 상후두골(supraoccipital)의 불완전골화, 흉골분절의 형태이상(misshapen sternebra), 말늑골단소(short 13th rib), 장요늑(full supernumerary rib), 단요늑(short supernumerary rib) 및 파상늑(wavy rib)이 각 시험군에서 유사한 빈도로 관찰되었으며, BPA의 투여에 의한 특징적인 이상소견은 인정되지 않았다. 골화정도를 평가하기 위해 주요 골격부위의 골화점수를 계수한 결과 II군에서 흉골분절수가 I군의 결과에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였으며, 그 외의 골화점수에 있어서는 각 시험군간에 유의성있는 차이는 인정되지 않았다.

#### IV. 고 찰

본 시험은 환경에스트로젠성 물질인 BPA를 랫드에 임신 전 기간동안 반복투여하여 임신의 개시와 유지 및 배태자 발생에 미치는 영향을 평가하였고, 이에 대한 홍삼추출물의 방어 또는 억제효과를 구명해 보고자 하였다. 결과에 대한 해석은 통계학적 유의성의 검정, 용량반응상관성의 존재유무, 모독성의 증가유무, 최종 기형발생율의 증가유무, 발생학적 변이율의 증가유무에 따라 평가하였다.

시험결과 임신랫드에 BPA 1000 mg/kg의 반복투여는 체중증가의 억제, 임신기간중 증체량의 감소, 사료섭취량의 감소, 태자의 발육지연을 유발하였으며, 홍삼추출물의 병용투여는 BPA의 상기한 모독성 및 발생독성을 억제 또는 방어해주는 못한다는 것을 보여 주었다. 본 시험결과에서 중요한 소견중의 하나는 랫드에서 임신 전 기간동안 홍삼추출물의 반복투여는 어떠한 모독성 및 발생독성도 유발하지 않는다는 것이다.

BPA를 단독 또는 홍삼추출물과 병용투여한 시험군의 모동물에서 관찰된 허약, 자발운동 저하, 연변, 설사, 하복부 오염 등의 독성소견들은 BPA를 투여하지 않은 시험군에서는 관찰되지 않은 것으로 보아 BPA의 투여에 의해 나타난 것으로 인정된다. 상기한 독성소견중 연변과 설사는 BPA의 투여로 인해 야기된 위장관독성의 한 지표로 판단되며, 이로 인하여 자발운동저하 및 허약이 동반된 것으로 사료된다. BPA와 홍삼추출물 400 mg/kg을 병용투여한 V군에서 임신 7일째에 관찰된 사망 1례는 상기한 독성증상으로 인하여 나타났으며, 본 시험의 용량설정시험시 BPA 1200 mg/kg 용량에서 6례중 3례가 사망했던 것으로 미루어 보아 BPA의 투여가 직접적인 사인으로 판단된다. 모동물의 체중증가억제와 임신기간중 증체량의 감소 및 사료섭취량의 감소로 나타난 현저한 모독성 소견들은 BPA를 단독 또는 홍삼추출물과 병용투여한 모든 시험군에서 관찰되었고, 또한 발현빈도 및 소견의 정도도 유사하여 홍삼

추출물의 병용투여에 의한 독성의 억제 또는 감소는 인정되지 않았다. BPA를 단독투여한 II군에서 관찰된 모동물의 실질체중인 보정중량의 감소는 BPA의 투여에 의해 유발된 것으로 판단된다. 한편, 홍삼추출물을 BPA와 병용투여한 IV군과 V군에서의 보정중량은 II군의 결과에 비해 다소 높은 경향이 인정되었으나, 이는 홍삼추출물의 투여용량과는 비의존적으로 나타났기 때문에 홍삼추출물의 병용투여에 의한 결과는 아닌 것으로 판단되며, Table 3에서 보는 바와 같이 동복자수의 감소로 인해 모체체중의 감소가 억제된 것으로 사료된다. 임신동물의 경우 모체의 생리적 변화로 인하여 혈액 및 혈액생화학치에 많은 변동이 유발되고(Kim 등, 2000b), 또한 이들 수치들은 독성반응에 매우 민감하게 반응하기 때문에 모독성의 평가에 유용하게 이용될 수 있다. 그러나 본 시험에서는 아쉽게도 이들 임상병리학적 수치의 변화는 측정하지 못하였다.

모동물의 제왕절개시 II군 및 IV군에서 다소 높은 빈도(각각 30%)로 관찰된 임신장애는 부형제대조근 및 홍삼단독투여군에서는 모든 동물이 임신한 것으로 보아 BPA의 투여에 기인된 것으로 판단된다. 반면, 홍삼추출물 400 mg/kg을 병용투여한 V군에서는 전 동물이 임신한 것으로 나타나 BPA 단독투여군에 비해 임신율이 다소 높게 나타났다. 홍삼추출물 200 mg/kg을 병용투여한 VI군에서의 착상수는 유의성있게 감소한 것으로 나타났다. 상기 소견들은 홍삼추출물의 병용투여에 의한 용량상관성이 인정되지 않았고, 착상전과 착상후의 배자사망률 등의 관련항목의 결과도 홍삼추출물의 투여용량에 비의존적으로 나타나 홍삼추출물의 병용투여에 의해 나타난 소견은 아닌 것으로 판단된다. 따라서, BPA를 단독 또는 홍삼추출물과 병용투여한 시험군에서 나타난 임신장애율 및 착상수의 차이는 본 시험에서 사용한 BPA의 투여용량이 임신장애를 유발하는 역치(threshold level)에 근접했기 때문에 유발된 것으로 추정된다. 착상전 및 착상후 배자사망률은 II군, IV군 및 V군에서 산발적으로 증가 또는 증가경향을 나타냈고, 이로 인하여 IV군 및 V군의 동복자수가 감소 또는 감소경향을 보였는데, 이들 소견 또한 BPA의 투여에 의한 것으로 판단되지만 홍삼추출물의 병용투여에 기인된 변화는 아닌 것으로 판단된다. BPA를 단독으로 투여한 II군에서는 수컷태자수의 감소로 인하여 성비의 유의성있는 감소가 관찰되었으나 본 시험조건에서는 우발적인 소견인지 아니면 BPA의 투여에 기인된 소견인지 명확히 구분할 수는 없었다. 홍삼추출물을 병용투여한 IV군 및 V군에서의 태자체중은 BPA 단독투여군의 태자체중보다 다소 높은 경향을 나타냈는데, 이 결과는 홍삼추출물의 병용투여에 의해 증가된 것이 아니라 동복자수의 감소에 의해 모동물의 영양공급이 보다 원활한 것에 기인된 것으로 판단된다. 태자체중의 경우 동복자수에 매우 의존적으로 차이가 있



다는 것은 본 연구실의 기초자료에서도 잘 나타나 있다 (Kim 등, 2001a). II군에서 관찰된 수컷태자의 항문-성기 간 길이의 감소는 BPA의 에스트로젠 작용으로 생식기 발육이 지연되어 나타난 것이 아니라 태자의 체중이 감소한 것으로 미루어 볼 때 태자발육이 지연됨으로서 이에 동반되어 나타난 것이었으며 태자전체길이에 대한 항문-성기 간의 상대길이는 감소하지 않은 것으로 판단된다.

태자의 외표, 내부장기 및 골격검사결과 몇몇 기형과 변이소견들이 모든 시험군에서 낮은 빈도로 관찰되었는데, 이들은 Sprague-Dawley 랫드에서 흔히 관찰되는 자연 발생적인 소견으로서 (Morita 등, 1987; MARTA, 1997; Nakasuka 등, 1997), 본 연구실의 기초자료의 정상범위내에 포함되는 변화였다 (Kim 등, 2001a). 따라서, BPA는 심각한 모독성을 나타내는 1000 mg/kg 용량에서도 태자의 형태학적 이상을 유발하지 않았으며, 홍삼추출물의 병용투여에 의한 변화도 인정되지 않았다. 골격검사시 II군에서 관찰된 흉골분절수의 통계학적 유의한 감소는 BPA의 투여에 의한 태자의 발육지연에 기인된 것으로서 태자체중의 감소경향과도 잘 일치한다. IV군 및 V군에서의 흉골분절과 완전골, 부전골 및 천·미추의 골화점수는 II군의 결과에 비해 통계학적 유의성은 없었지만 다소 증가한 경향을 나타냈다. 그러나, 이 소견은 동일군의 태자체중의 증가 경향과 마찬가지로 홍삼추출물의 병용투여에 의해 증가된 것이 아니라 동복자수의 감소에 의해 태자발육이 촉진된 것이 주요 원인으로 판단된다.

결론적으로 랫드에 환경에스트로젠인 BPA를 1000 mg/kg으로 임신 전 기간동안 반복투여하면 체중증가의 억제, 임신기간중 증체량의 감소, 사료섭취량의 감소 및 태자의 발육지연이 유발되고, 홍삼추출물 200 또는 400 mg/kg을 BPA 1000 mg/kg 용량과 병용투여하면 BPA의 모독성 및 발생독성을 억제 또는 방어해주지는 못하는 것으로 나타났다. 한편, 랫드에 홍삼추출물 400 mg/kg을 임신 전 기간 동안 반복투여하여도 모체 및 태자에 어떠한 부작용도 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

## 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.
- Ashby, J. and Tinwell, H. (1998): Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat, *Environ. Health Perspect.*, **106**, 719-720.
- Attele, A.S., Wu, J.A. and Yuan, C.S. (1999): Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions, *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 1685-1693.
- Bergstrom, R., Adami, H.O., Mohner, M., Zatonski, W., Storm, H., Ekblom, A., Tretli, S., Teppo, L., Akre, O. and Hakulinen, T. (1996): "Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon", *J. Nat. Cancer Inst.*, **88**, 727-733.
- Bern, H.A. (1992): "The fragile fetus." in *Chemically-induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection* (Colborn, T. and Clement, C. eds.). Princeton Scientific Publishing Co, Princeton, pp. 9-15.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *Brit. Med. J.*, **305**, 609-613.
- 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.
- Colerange, J.B. and Roy, D. (1997): Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **60**, 153-160.
- Daston, G.P., Gooch, J.W., Breslin, W.J., Shuey, D.L., Nikiforov, A.I., Fico, T.A. and Gorsuch, J.W. (1997): Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data, *Reprod. Toxicol.*, **11**, 465-481.
- Dawson, A.B. (1926): A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S, *Stain Technol.*, **1**, 123-124.
- Hardin, B.D., Bond, G.P., Sikov, M.R., Andrew, F.D., Beliles, R.P. and Niemeier, R.W. (1981): Testing of selected workplace chemicals for teratogenic potential, *Scand. J. Work Environ. Health*, **7**, 66-75.
- Jones, L.A. and Hajek, R.A. (1995): Effects of estrogenic chemicals on development, *Environ. Health Perspect.*, **103**(Suppl. 7), 63-67.
- Kim, J.C., Lee, S.J., Bae, J.S., Park, J.I., Kim, Y.B. and Chung, M.K. (2001a): Historical control data for developmental toxicity study in Sprague-Dawley rats, *J. Toxicol. Pub. Health*, **17**, 83-90.
- Kim, J.C., Shin, H.C., Cha, S.W., Koh, W.S., Chung, M.K. and Han, S.S. (2001b): Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy, *Life Sci.*, **69**, in press.
- Kim, J.C., Shin, H.C., Yun, H.I., Han, S.S. and Chung, M.K. (2000a): Embryo lethality and teratogenicity of a new fluoroquinolone antibacterial DW-116 in rats, *Arch. Toxicol.*, **74**, 120-124.
- Kim, J.C., Yun, H.I., Lim, K.H., Suh, J.E. and Chung, M.K.

- (2000b): Haematological values during normal pregnancy in Sprague-Dawley rats, *Comp. Haematol. Int.*, **10**, 74-79.
- Kim, W., Hwang, S., Lee, H., Song, H. and Kim, S. (1999): Panax ginseng protects the testis against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced testicular damage in guinea pigs, *Brit. J. Urol. Int.*, **83**, 842-849.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L. and Feldman, D. (1993): Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrinology*, **132**, 2279-2286.
- MARTA (Middle Atlantic Reproduction Teratology Association) (1997): Appendix B: Historical Control Data in *Handbook of Developmental Toxicology* (Hood, R.D. ed.), CRC Press, New York, pp. 716-724.
- Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., Nishimura, K., Kasegawa, Y., Miyamoto, M. and Watanabe, T. (1987): Spontaneous malformations in laboratory animals: frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, **27**, 147-206.
- Morrissey, R.E., George, J.D., Price, C.J., Tyl, R.W., Marr, M.C. and Kimmel, C.A. (1987): The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **8**, 571-582.
- Nakasuka, T., Horimoto, M., Ito, M., Matsubara, Y., Akaike, M. and Ariyuki, F. (1997): Japan pharmaceutical manufactures association (JPMA) survey on background control data of developmental and reproductive toxicity studies in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, **37**, 47-138.
- Newbold, R.R., Bullock, B.C. and McLaclan, J.A. (1990): Uterine adenocarcinoma in mice following developmental treatment with estrogens: a model for hormonal carcinogenesis, *Cancer Res.*, **50**, 7677-7681.
- Nishimura, K.A. (1974): Microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses, *Cong. Anom.*, **14**, 23-40.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (1996): Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, *Environ. Health Perspect.*, **104**, 298-305.
- Papaconstantinou, A.D., Umbreit, T.H., Fisher, B.R., Goering, P.L., Lappas, N.T. and Brown, K.M. (2000): Bisphenol A-induced increase in uterine weight and alteration in uterine morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of the estrogen receptor, *Toxicol. Sci.*, **56**, 332-339.
- Reel, J.R., George, J.D., Lawton, A.D., Myers, C.B. and Lamb, J.C. (1985): Unpublished report entitled "Bisphenol A: Reproduction and Fertility Assessment in CD-1 Mice When Administered in the Feed." dated May 31, 1985, for the National Toxicology Program from Research Triangle Institute, Research Triangle Park, NC, USA. [NTIS PB86-103207].
- Sonnenschein, C. and Soto, A.M. (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **65**, 143-150.
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Kelcka, G.M., O'Block, S.T. and Harris, L.R. (1998): A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A, *Chemosphere*, **36**, 2149-2173.
- Steinmetz, R., Mitchner, N.A., Grant, A., Allen, D.L., Bigsby, R.M. and Benjonathan, N. (1998): The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract, *Endocrinology*, **139**, 2741-2747.
- Theobald, H.M. and Peterson, R.E. (1997): In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: effects on development of the male and female reproductive system of the mouse, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **145**, 124-135.
- Vogler, B.K., Pittler, M.A. and Ernst, E. (1999): The efficacy of ginseng. A systematic review of randomised clinical trials, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **55**, 567-575.
- vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S. and Welshons, W.V. (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior, *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 239-260.
- Wilson, J.G. (1965): Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals in *Teratology. Principles and Techniques* (Wilson, J.G. and Warkany, J. eds.). University of Chicago Press, Chicago and London, pp. 262-277.
- Wise, L.D., Beck, S.L., Beltrame, D., Beyer, B.K. and Chahoud, I., *et al.* (1997): Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1), *Teratology*, **55**, 249-292.
- Yamada, T., Ohsawa, K. and Ohno, H. (1988): The usefulness of alkaline solutions for clearing the uterus and staining implantation sites in rats, *Exp. Ani.*, **37**, 325-331.
- Yun, T.K. (1996): Experimental and epidemiological evidence of the cancer-preventive effects of *Panax ginseng* C.A. Mayer, *Nutr. Rev.*, **54**, S71-S81.