



ORIGINAL ARTICLES

## 신규 접근법(NAMs)을 활용한 농약의 내분비계 활성 예측: ToxCast/Tox21 데이터 및 QSAR 모델 기반 분석

제갈현<sup>1</sup> · 도예진<sup>1,2</sup> · 신현길<sup>1</sup> · 정순탁<sup>1</sup> · 함온주<sup>1</sup> · 유욱준<sup>1</sup> · 박수진<sup>3</sup> · 조유미<sup>3</sup> · 윤석주<sup>1,2\*</sup> · 오정화<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>국가독성과학연구소, 첨단예측연구본부 & 차세대비임상연구본부

<sup>2</sup>과학기술연합대학원, 국가독성과학연구소 스쿨, 인체 및 환경 독성학

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과

### Application of New Approach Methodologies (NAMs) for *In silico* and *In vitro* Evaluation of Estrogenic and Androgenic Potential of Pesticides

Hyun Jegal<sup>1</sup>, Yejin Do<sup>1,2</sup>, Hyunkil Shin<sup>1</sup>, Soontag Jung<sup>1</sup>, Onju Ham<sup>1</sup>, Wookjon Yoo<sup>1</sup>,  
Soo-Jin Park<sup>3</sup>, Yumi Jo<sup>3</sup>, Seokjoo Yoon<sup>1,2\*</sup>, and Jung-Hwa Oh<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Advanced Predictive Research, Division of Next Generation Non-Clinical Research,  
Korea Institute of Toxicology (KIT)

<sup>2</sup>Department of Human and Environmental Toxicology, University of Science & Technology (UST)

<sup>3</sup>Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences,  
Rural Development Administration

(Received on August 27, 2025. Revised on September 12, 2025. Accepted on September 13, 2025)

**Abstract** Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) are chemical substances that disrupt the human hormone system and extensively damage reproductive, developmental, neurological, and immune functions. There is a growing need to develop new technology-based prediction systems that overcome the limitations of existing tests to effectively regulate the management of EDCs. Our study aimed to predict the potential androgenic and estrogenic activities of 510 domestic pesticides using New Approach Methodologies (NAMs) derived from the U.S. EPA's ToxCast/Tox21 database. We collected and analyzed *in vitro* data related to the estrogen receptor (ER) and the androgen receptor (AR). We also applied EPA's ToxCast pathway models for ER and AR to assess the agonistic or antagonistic activities of pesticides. Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) prediction values were comprehensively analyzed to identify potential estrogenic- and androgenic-active substances. The NAM approach may be effectively utilized to prioritize high-risk EDCs associated with exposure levels of pesticides in humans and to determine the requirement of additional animal testing. This suggests the potential of NAM as a useful tool for risk management of pesticides.

**Key words:** Androgen receptor, Endocrine disrupting chemicals (EDCs), Estrogen receptor, New Approach Methodologies (NAMs), Pesticides

## 서 론

내분비계장애물질(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)은

생체 내 호르몬 시스템을 교란하여 생식 건강, 신경 발달, 대사 균형 등 다양한 생리적 과정에 중대한 영향을 미칠 수 있는 화학물질로 정의된다(Diamanti-Kandarakis et al., 2009). 특히 에스트로겐 수용체(Estrogen Receptor, ER)와 안드로젠 수용체(Androgen Receptor, AR) 등 주요 호르몬 수용체의 기능을 방해함으로써, 인간과 생태계 건강에 심각한 위

\*Corresponding author

E-mail: jhoh@kitox.re.kr, sjyoon@kitox.re.kr

협을 초래하는 것으로 알려져 있다(Jobling and Tyler, 2006; Zoeller et al., 2012). 농약은 현대 농업 생산성 향상에 필수적이지만, 일부 농약 성분이 내분비계에 잠재적 영향을 미칠 수 있다는 우려가 지속적으로 제기되어, EDCs로 작용할 수 있는 농약의 체계적 선별 및 평가가 중요한 과제로 대두되고 있다(Stoker and Kavlock, 2010; Mnif et al., 2011; Kjeldsen et al., 2013).

기존의 독성 평가는 주로 동물실험에 의존해 왔지만, 높은 비용, 긴 소요 시간, 그리고 윤리적 문제로 인해 신속하고 효율적인 대체 방법 개발의 필요성이 꾸준히 제기되고 있다(EPA, 2024a). 이러한 한계를 극복하기 위해 경제협력개발기구(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD), 미국 환경보호국(United States Environmental Protection Agency, EPA), 유럽 화학물질청(European Chemicals Agency, ECHA) 등 주요 국제 규제기관은 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP) 모델과 신규 접근법(New Approach Methodologies, NAMs)을 활용한 EDCs 평가 체계를 도입하고 있다(OECD, 2018; EPA, 2020a; ECHA, 2021). NAMs는 고속 스크리닝 시험법(high-throughput assays), *in silico* 모델, 정량적 구조-활성 관계(Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) 분석 등 첨단 기술을 포괄하며, 대규모 화학물질의 독성정보를 신속하고 신뢰성 있게 평가할 수 있는 대안으로 주목받고 있다(Harrill et al., 2024; Holmer et al., 2025).

미국 EPA는 내분비계장애물질 선별 프로그램(Endocrine Disruptor Screening Program, EDSP)을 통해 1단계(ER, AR, 갑상선 수용체 경로의 생물학적 활성 평가)와 2단계(용량-반응 관계 및 유해 영향 확인)로 구성된 평가체계를 운영 중이다(EPA, 2022). 특히 EDSP 1단계에서는 기존 동물실험 기반 시험법을 대체하기 위해 고속 스크리닝 시험법과 *in silico* 모델의 도입을 적극적으로 추진하고 있다. ToxCast Pathway 모델은 Tox21/ToxCast 프로그램에서 수행된 ER 및 AR 신호전달 경로의 주요 생물학적 단계를 포괄하는 다양한 *in vitro* 시험 데이터를 통합하여, 화학물질의 내분비계 활성 가능성을 예측하는 수학적 모델이다(Judson et al., 2015; Kleinstreuer et al., 2017). 이 모델은 수용체 결합, 이합체화, 공동인자 발현, DNA 결합, 전사, 번역, 세포 증식 등 다양한 생물학적 단계를 반영하며, 약 1,800개의 화학물질에 대한 스크리닝이 수행되었다. 2020년 미국 EPA는 ToxCast Pathway 모델이 EDSP 1단계의 ER 결합, ER 전사활성, AR 결합, AR 전사활성 등 4개 핵심 시험법을 대체할 수 있음을 공식 승인하였다(EPA, 2022). 단, 용해도가 낮거나 휘발성이 높은 일부 농약의 경우 NAMs 적용에 한계가 있음을 인지하고, EPA는 각 화학물질의 물리화학적 특성과 NAMs의 장단점을 종합적으로 평가하여 적합성을 판단하고 있다(Sewell et al., 2024).

QSAR 모델은 화학물질의 분자 구조 정보를 기반으로 생

물학적 활성 또는 독성 등 다양한 생체 반응을 예측하는 컴퓨터 기반 모델이다. 이 모델은 ToxCast Pathway 모델과 달리, 화학물질의 독성 평가를 위해 수행되는 *in vitro* 및 *in vivo* 등 다양한 시험 데이터가 충분하지 않은 경우에도, 분자 구조만으로 신속하게 독성 예측과 우선순위 선정을 가능하게 한다(Cherkasov et al., 2014). 최근 미국 EPA가 주도한 CERAPP (Collaborative Estrogen Receptor Activity Prediction Project) 및 CoMPARA (Collaborative Modeling Project for Androgen Receptor Activity) 등 국제 협력 프로젝트를 통해, 여러 개별 QSAR 모델의 예측값을 통합한 합의(*consensus*) QSAR 모델이 ER 및 AR 활성 예측을 위해 개발되었다(Mansouri et al., 2016; Mansouri et al., 2020). 이들 프로젝트에는 미국과 유럽 등 전 세계 여러 연구팀이 참여하였으며, ToxCast/Tox21 *in vitro* 시험 데이터를 기반으로 ER 및 AR 활성 예측을 위한 수십 개의 QSAR 예측모델을 개발하였다. 개발된 각 모델의 예측값을 합의 방식으로 통합함으로써, 화학물질의 구조만으로 ER 및 AR 결합, 작용제, 길항제 활성 등 내분비계 활성 가능성을 예측할 수 있다. 이러한 합의 QSAR 모델 예측값은 내분비계장애 평가와 규제기관의 우선순위 선정에 활용되고 있다(EPA, 2024b).

미국 EPA의 ToxCast 데이터베이스는 ER 및 AR 활성에 대한 ToxCast Pathway 모델의 약 1,800개 화학물질 예측값과, CERAPP 및 CoMPARA에서 개발된 합의 QSAR 모델의 약 6만 개 화학물질 예측값 등 대규모 독성정보를 제공하여 내분비계장애 물질 선별에 유용하게 활용되고 있다. 그러나 국내의 농약 원제에 대한 NAMs 기반 내분비계 영향 평가 및 통합 분석 연구는 아직 부족하며, 특히 농약 분야에서의 체계적 적용 사례는 제한적이다. 이에 본 연구에서는 국내에서 사용되는 510개 농약 원제를 대상으로, EPA에서 제공하는 ToxCast Pathway 모델 예측값과 CERAPP/CoMPARA 합의 QSAR 모델 예측값을 활용하여 ER 및 AR 활성 가능성을 분석하였다. 또한, ER 및 AR 활성에 대해 ToxCast Pathway 모델과 합의 QSAR 모델의 예측값을 비교함으로써, 합의 QSAR 모델의 신뢰성과 한계를 평가하였다. 본 연구는 NAMs 기반 독성정보 통합 분석을 통해 EDCs 평가에서 NAMs의 적용 가능성과 한계를 분석하여, 위해성 평가 분야에서 NAMs 활용을 위한 과학적 근거를 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 농약 및 화학물질 정보

국내에서 관리하고 있는 농약 원제 목록을 대상으로 분석하였다(농약관리법 고시에 따른 농약 원제 목록 참고, 농촌진흥청고시 제 2025-16호). 농약 원제의 화학물질명을 EPA의 DTXSID (DSSTox Substance Identifier) 식별자 코드로 전환한 후 매칭된 ID를 기준으로 데이터를 추출하여 분석하였다.

**Table 1.** Assay information related ER-or AR-activity in Tox21 database

Assay name	Description	Organism	Tissue	Cell line	Assay format
<i>ER-related assay</i>					
tox21-er-bla-agonist-p2	ER-BLA agonist	Human	Kidney	HEK293	receptor
tox21-er-bla-antagonist-p1	ER-BLA antagonist	Human	Kidney	HEK293	receptor
tox21-er-luc-bg1-4e2-agonist-p2	ER-BG1 agonist	Human	Ovarian	BG1	receptor
tox21-er-luc-bg1-4e2-agonist-p4	ER-BG1 agonist (with antagonist)	Human	Ovarian	BG1	receptor
tox21-er-luc-bg1-4e2-antagonist-p1	ER-BG1 antagonist	Human	Ovarian	BG1	receptor
tox21-er-luc-bg1-4e2-antagonist-p2	ER-BG1 antagonist (lower agonist)	Human	Ovarian	BG1	receptor
tox21-erb-bla-antagonist-p1	ER-beta antagonist	Human	Kidney	HEK293	receptor
tox21-erb-bla-p1	ER-beta agonist	Human	Kidney	HEK293	receptor
<i>AR-related assay</i>					
tox21-ar-bla-agonist-p1	AR-BLA agonist	Human	Kidney	HEK293	receptor
tox21-ar-bla-antagonist-p1	AR-BLA antagonist	Human	Kidney	HEK293	receptor
tox21-ar-mda-kb2-luc-agonist-p1	AR-MDA agonist	Human	Breast Cancer	MDA-MB-453	receptor
tox21-ar-mda-kb2-luc-agonist-p3	AR-MDA agonist (with antagonist)	Human	Breast Cancer	MDA-MB-453	receptor
tox21-ar-mda-kb2-luc-antagonist-p1	AR-MDA antagonist	Human	Breast Cancer	MDA-MB-453	receptor
tox21-ar-mda-kb2-luc-antagonist-p2	AR-MDA antagonist (lower agonist)	Human	Breast Cancer	MDA-MB-453	receptor

### Tox21/ToxCast *in vitro* 데이터 분석

EPA Tox21/ToxCast 데이터베이스의 *in vitro* 데이터를 활용하였다(<https://tripod.nih.gov/pubdata/>). 농약 원제의 화학물질명을 DTXSID 식별자 코드로 전환하여 매칭된 ID를 기준으로 데이터를 추출하였다. 데이터베이스에서 제공하고 있는 데이터 중에서 AR 및 ER과 관련된 각 6개, 8개의 분석법으로부터 *in vitro* 데이터를 수집하였다(Table 1). 결과값은 데이터베이스가 제공하고 있는 활성/비활성 판정(active/inactive call) 기준에 따라서, 각 농약 원제 물질에 대해서 분석법별로 활성이 나타난 결과값을 계수하였다.

### ToxCast Pathway 모델 데이터 분석

EPA Tox21/ToxCast 데이터베이스에서 2020년 9월 공개한 데이터베이스(InVitroDB) 3.3 버전에서 제공하는 모델 결과값을 활용하였다. EPA 화학물질의 경우, ER 및 AR pathway 모델의 결과값을 가지고 있는 1,790개에 대하여 분석하였고, 국내 농약원제의 경우, 결과값을 가지고 있는 ER 208개, AR 210개 물질에 대해 분석하였다. ER과 AR의 작용제 및 길항제 활성 정도는 AUC(Area Under the Curve) 값에 따라 EPA에서 권고하는 기준으로 아래와 같이 분류하였다:  $\geq 0.1$  = 활성(active);  $0.01 - 0.1$  = 판정 불가(inconclusive);  $< 0.01$  = 비활성(inactive)

### CERAPP 및 CoMPARA QSAR 모델 데이터 분석

EPA Tox21/ToxCast 데이터베이스에서 2020년 9월 공개한 InVitroDB 3.3 버전에서 제공하는 합의 QSAR 모델 결과값을 활용하였다. CERAPP 및 CoMPARA 모델을 활용하여, ER 및 AR에 대한 작용제, 길항제, 결합 예측값을 활용하였다

(EPA, 2020b). 화학물질 중 중복된 DTXSID 식별자를 가진 것은 제거하고 결과값을 가지고 있는 전체 물질을 대상으로 분석하였다.

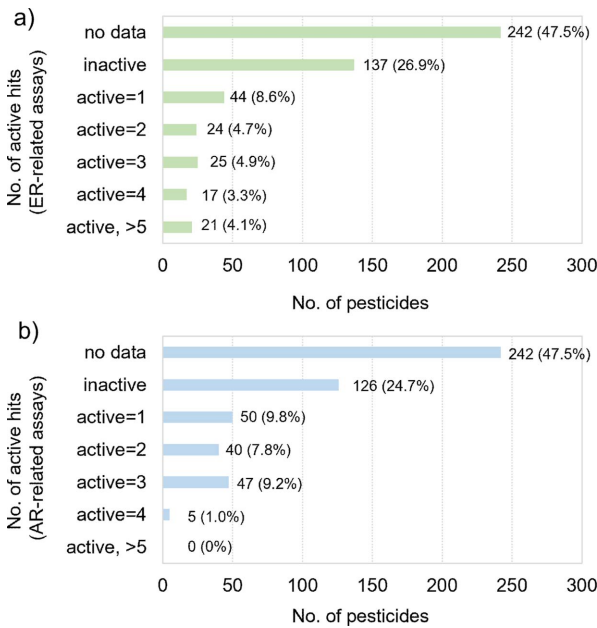
## 결과 및 고찰

### 농약 원제에 대한 Tox21/ToxCast *in vitro* 독성데이터 분석

농약 원제에 대한 ER 및 AR 관련 내분비계 활성 가능성을 평가하기 위해, 미국 EPA의 Tox21/ToxCast 데이터베이스에 수록된 *in vitro* 시험법 결과(ER 관련 8종, AR 관련 6종)를 수집하여 분석하였다(Table 1). 각 시험은 작용제(agonist)와 길항제(antagonist) 활성을 다양한 세포모델(HEK293, BG1, MDA-MB-453 등)에서 평가한 결과로 구성되며, 이를 바탕으로 농약 원제의 *in vitro* 내분비계 활성 가능성을 체계적으로 분석하였다(Fig. 1).

510개 농약 원제 중 ER 또는 AR 시험 데이터가 확보된 원제는 각각 268개(52.5%)였다. 반면, ER 및 AR 시험 데이터가 모두 없는 원제는 242개(47.5%)로, 전체의 약 50%는 Tox21/ToxCast 프로젝트에서 시험이 수행되지 않았음을 알 수 있다. ER 및 AR 시험 중 1개 이상에서 활성(active call) 판정을 받은 농약 원제는 각각 131개(25.7%), 142개(27.8%)로 확인되었고, 비활성(inactive call)으로 분류된 원제는 각각 137개(26.9%), 126개(24.7%)였다. 또한, ER 및 AR 시험 모두에서 1개 이상 활성을 보인 농약 원제는 131개로, 상당수 농약 원제가 복수 호르몬 수용체에 대해 교차 활성을 나타낼 가능성이 있음을 시사한다.

Tox21/ToxCast 프로그램에서 수행된 ER 및 AR 관련 다양한 *in vitro* 시험은 농약 원제의 내분비계 활성 평가를 위

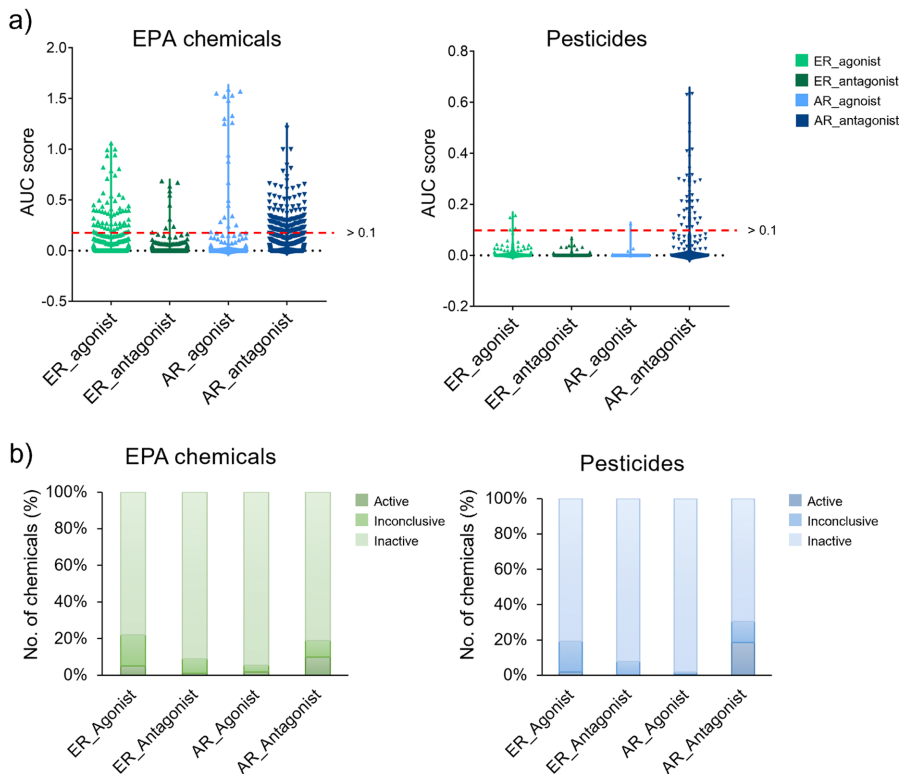


**Fig. 1.** Data distribution of domestic pesticides with *in vitro* ER and AR Assay results from Tox21/ToxCast Database. Distribution of pesticides with available data from a) 8 ER and b) 6 AR *in vitro* assays. Out of a total of 510 pesticides, 268 and 247 had active or inactive values from at least one assay for ER and AR, respectively. For each ER and AR assay, the number of pesticides with active ER or AR calls was counted.

한 초기 스크리닝 자료로 활용될 수 있다. 그러나 시험법 별 결과값에 차이가 많아, 단일 시험법 결과만으로 내분비계 활성을 명확히 판단하기에는 한계가 있었다. 따라서 ER 및 AR 활성을 보다 신뢰성 있게 평가하기 위해서는 여러 *in vitro* 시험법 결과를 통합적으로 분석할 수 있는 모델의 적용이 필요함을 확인하였다.

**ToxCast Pathway 모델을 활용한 ER 및 AR 활성 평가**

본 연구에서는 단일 *in vitro* 시험법 결과에서 발생할 수 있는 불일치성을 보완하고, ER 및 AR 활성을 보다 종합적으로 평가하기 위해 미국 EPA의 ToxCast Pathway 모델을 활용하였다. ToxCast Pathway 모델은 실제로 수행된 다양한 *in vitro* 시험법 결과를 수학적으로 통합하여, 화학물질의 수용체 활성 가능성을 정량적으로 평가하는 모델이다. ER Pathway 모델은 18개, AR Pathway 모델은 11개의 시험법을 기반으로 개발되었으며, 두 모델 모두 참조물질(reference chemicals)을 이용한 검증을 통해 0.95 이상의 높은 균형 정확도(balanced accuracy, BA)를 보여 신뢰성이 입증되었다. ToxCast Pathway 모델은 미국 EPA가 보유한 1,790개의 화학물질 각각에 대해 여러 *in vitro* 시험법에서 얻어진 데이터를 통합 알고리즘으로 분석하여, ER 및 AR의 작용제와 길항제 활성 가능성을



**Fig. 2.** Analysis of ToxCast Pathway model results for EPA chemicals and domestic pesticides. a) Distribution of AUC scores; b) Proportion of chemicals by activity classification. Model outputs from the EPA Tox21/ToxCast InVitroDB v3.3 were analyzed. a) Violin plots depict the distribution of AUC scores for 1,790 EPA chemicals, focusing on pathway models for ER agonists/antagonists and AR agonists/antagonists. b) Based on ToxCast pathway model classification criteria, chemicals were categorized as active (AUC ≥ 1), inactive (AUC < 0.01), or inconclusive (0.01 ≤ AUC < 0.1). The number of chemicals in each category was quantified.

AUC(Area Under the Curve) 점수로 정량화하였다. AUC 점수는 값이 높을수록 해당 수용체에 대한 활성 가능성이 높음을 의미한다.

EPA의 1,790개 화학물질 중 농약 원제에 해당하는 물질의 AUC 점수를 조사하여, 전체 EPA 화학물질 그룹과 농약 원제 그룹 간의 내분비계 활성 분포를 비교 분석하였다(Fig. 2). AUC 점수 분포를 분석한 결과, EPA 전체 화학물질에서는 AR 길항제, ER 작용제, AR 작용제, ER 길항제 순으로 AUC 점수 0.1 이상을 보이는 물질이 많았다. 특히 AR 작용제 활성에서 AUC 1.0을 초과하는 매우 높은 활성을 보이는 물질이 다수 관찰되었으며, ER 길항제 활성 물질은 상대적으로 적게 분포하고 있었다. ToxCast Pathway 모델 결과값을 가지고 있는 농약 원제의 AUC 분포를 분석한 결과, AR 길항제, ER 작용제, AR 작용제 순으로 AUC 0.1 이상을 보이는 물질이 분포하고 있었다(Fig. 2a). ToxCast Pathway 모델의 활성 판정 기준에 따라, AUC 점수가 '0.1 이상(AUC  $\geq$  0.1)인 경우를 활성(active)'으로, '0.01 이상 0.1 미만(0.01  $\leq$  AUC < 0.1)'은 판정 불가(inconclusive)로, 그리고 '0.01 미만(AUC < 0.01)은 비활성(inactive)'으로 분류하였다(Fig. 2b). 그 결과, 1,790개의 EPA 화학물질 중 321개가 활성으로 분류되었고, 세부적으로는 ER 작용제 91개(5%), ER 길항제 18개(1%), AR 작용제 33개(2%), AR 길항제 179개(10%)가 활성으로 확인되었다. 농약 원제의 경우, 총 44개가 활성으로 분류되었으며, 이 중 ER pathway 모델에서는 ER 작용제는 4개(1.9%), ER 길항제는 활성으로 확인된 물질이 없었다. AR Pathway 모델에서는 AR 작용제가 1개(0.5%), AR 길항제가 39개(18.6%)로 활성 물질로 분류되었다(Fig. 2b). 이와 같이, ToxCast Pathway 모델을 활용하여 농약 원제 중에 AR 길항제 활성 가능성이 있는 물질을 스크리닝할 수 있었다.

### 합의 QSAR 모델을 활용한 ER 및 AR 활성 예측

ToxCast Pathway 모델은 참조물질을 활용한 검증을 통해 높은 균형 정확도를 보였으나, 신규 화학물질에 대한 ER 및 AR 활성 예측을 위해서는 *in vitro* 시험법 데이터가 반드시 필요하다. 이러한 한계를 보완하기 위해, CERAPP 및 CoMPARA

프로젝트를 통해 화학물질의 분자 구조만으로 활성을 예측하는 합의 QSAR 모델이 도입되었으며, 선행연구에서 0.74~0.91 수준의 예측 정확도가 보고된 바 있다(EPA, 2022). 따라서, 합의 QSAR 모델의 활용성을 검증하고자 ToxCast Pathway 모델의 결과와 비교 분석을 실시하였다.

ER 활성을 예측한 합의 QSAR 모델 (CERAPP) 결과는 데이터베이스에서 강함(strong), 보통(moderate), 약함(weak), 매우 약함(very weak), 비활성(inactive) 등으로 등급별로 정리되어 제공된다. 본 연구는 35,737개 화학물질에 대한 ER 작용제, 길항제, 결합 활성 예측 결과를 각 등급별로 분석하여 화학물질 수를 파악하였다(Table 2). AR 활성을 예측한 합의 QSAR 모델(CoMPARA) 결과는 데이터베이스에서 활성과 비활성으로 구분되어 제공된다. 본 연구에서는 63,848개 화학물질에 대해 AR 결합, 작용제, 길항제 활성 예측 결과의

**Table 2.** Data distribution of *consensus* QSAR model for ER and AR activity among EPA chemicals

No. of Chemicals	<i>consensus</i> QSAR model		
	Agonist	Antagonist	Binding
<i>ER consensus</i> QSAR model			
Active			
Strong	25	354	35
Moderate	116	439	190
Weak	812	748	1,156
Very weak	1,628	1,694	2,836
Inactive	33,156	32,502	31,520
Total	35,737	35,737	35,737
<i>AR consensus</i> QSAR model			
Active	2,837	12,930	11,544
Inactive	61,011	50,918	52,304
Total	63,848	63,848	63,848

Distribution of chemical counts across ER and AR activity classifications for three mode-of-action categories: agonist, antagonist, and binding. The CERAPP model classifies ER activity into five potency levels: strong, moderate, weak, very weak, and inactive. The CoMPARA model categorizes AR activity into two classes: active and inactive.

**Table 3.** Confusion matrices comparing *consensus* QSAR model predictions with ToxCast Pathway model

ToxCast model	<i>consensus</i> QSAR model							
	ER agonist		ER binding for agonist		ER antagonist		ER binding for antagonist	
ER Pathway	Active	Inactive	Active	Inactive	Active	Inactive	Active	Inactive
Active	72	18	113	8	8	4	8	4
Inactive	30	1,435	63	1,402	186	1,430	206	1,410
AR Pathway	AR agonist		AR binding for agonist		AR antagonist		AR binding for antagonist	
	Active	Inactive	Active	Inactive	Active	Inactive	Active	Inactive
Active	27	3	27	3	153	12	151	14
Inactive	22	1,583	210	1,395	63	1,302	52	1,365

각 분류별(활성/비활성) 화학물질 수를 분석하였다(Table 2). 또한, ER 합의를 QSAR 모델에서는 등급 중 매우 약함 이상을 활성으로 간주하여 ToxCast Pathway 모델과 결과값을 비교하였다(Table 3). ToxCast Pathway 모델은 작용제와 길항제에 대한 예측값을 제공하며, 합의 QSAR 모델은 작용제, 길항제, 결합 등 세 가지 예측값을 제공한다. 이에 따라 본 연구에서는 QSAR 모델의 작용제 및 길항제 예측값뿐만 아니라 결합 예측값과의 상관관계도 함께 비교하였다.

혼동 행렬(confusion matrix) 결과를 바탕으로, QSAR 모델의 예측 정확도를 민감도(sensitivity, true positive rate), 특이도(specificity, true negative rate), 그리고 BA로 평가하였다. 분석 결과, ER 합의 QSAR 모델에서 작용제 예측의 BA는 0.89, 길항제 예측의 BA는 0.78로 나타나 길항제 예측의 BA가 상대적으로 낮았다. ER 결합 예측값을 기준으로 한 작용제 및 길항제 예측의 BA는 각각 0.95, 0.77로, 결합 예측에서 특히 높은 BA를 보였다. AR 합의 QSAR 모델에서는 작용제와 길항제 모두에서 예측의 BA가 0.94로 매우 높았으며, AR 결합 예측값을 기준으로 한 작용제 및 길항제 예측의 BA 역시 각각 0.88, 0.94로 높은 BA를 보였다.

종합적으로, 농약 원제에 대한 ER 및 AR 활성 예측에 합의 QSAR 모델 예측값을 활용할 경우, ER 길항제 예측값은 정확도가 다소 낮은 점을 감안해야 하며 ER 결합 예측값을 함께 고려하는 것이 바람직하다. 한편, AR 활성에 대한 QSAR 예측값은 ToxCast Pathway 모델 결과와 높은 일치성을 보이는 것으로 확인되었다.

**ToxCast Pathway 및 합의 QSAR 모델을 이용한 농약 원제 분석**

ToxCast Pathway 모델의 예측값이 제공되는 농약 원제는 약 200개로 제한적이므로, 510개 농약 원제를 대상으로 합의 QSAR 모델의 예측값을 추가로 분석하였다(Table 5). ER 활성을 예측하는 ER 합의 QSAR 모델의 예측값을 보유한 농약 원제는 425개, AR 활성을 예측하는 AR 합의 QSAR 모델의 예측값을 보유한 농약 원제는 453개로 확인되었다.

**Table 5.** Data distribution of *consensus* QSAR model for ER and AR activity among domestic pesticides

No. of Chemicals	<i>consensus</i> QSAR model for domestic pesticides		
	Agonist	Antagonist	Binding
<b>ER <i>consensus</i> QSAR model</b>			
Active			
Strong			
Moderate			
Weak	1	3	2
Very weak	3	11	15
Inactive	421	411	408
Total	425	425	425
<b>AR <i>consensus</i> QSAR model</b>			
Active	7	139	112
Inactive	446	314	341
Total	453	453	453

ER 활성 예측 결과, 각각 4개, 14개, 17개의 농약 원제가 작용제, 길항제, 결합 활성으로 분류되었으며, 대부분의 농약 원제는 비활성으로 분류되었다. AR 활성 예측에서는 7개, 139개, 112개의 농약 원제가 각각 작용제, 길항제, 결합 활성으로 분류되었다. 이러한 분포는 ToxCast Pathway 모델의 ER 및 AR 활성 예측 결과와 유사한 경향을 보였다. 이상의 결과를 바탕으로, ToxCast Pathway 모델과 합의 QSAR 모델의 예측값을 통합 분석하여 잠재적 ER 및 AR 활성 물질을 스크리닝하였다. 이들 중 각 예측 모델에서 활성 가능성을 나타낸 15개 농약 원제를 Table 6에 제시하였다. ER 및 AR 활성 가능성을 보이는 물질로는 리누론(linuron), 빈클로졸린(vinclozolin) 및 페나리몰(fenarimol) 등이 확인되었으며, 이들은 기존 연구에서 내분비계 교란물질로 의심되는 물질들로서 본 연구의 QSAR 예측모델에서도 활성 가능성이 예측되었다.

ToxCast Pathway 및 합의 QSAR 모델과 같은 NAMs 기

**Table 4.** Performance metrics for *consensus* QSAR prediction model on ToxCast pathway model

Performance	ER agonist	ER binding for agonist	ER antagonist	ER binding for antagonist
Sensitivity	0.80	0.93	0.67	0.67
Specificity	0.98	0.96	0.88	0.87
Balanced Accuracy	0.89	0.95	0.78	0.77
Performance	AR agonist	AR binding for agonist	AR antagonist	AR binding for antagonist
Sensitivity	0.90	0.90	0.93	0.92
Specificity	0.99	0.87	0.95	0.96
Balanced Accuracy	0.94	0.88	0.94	0.94

Sensitivity (i.e., the fraction of correctly predicted actives among all actives), specificity (i.e., the fraction of correctly predicted inactives among all inactives), and balanced accuracy (BA; the average of sensitivity and specificity) were calculated for each model.

**Table 6.** Domestic pesticide list showing potential ER or AR activity using ToxCast pathway and *consensus* QSAR model

Chemical Name	ToxCast_ER		ToxCast_AR		<i>consensus</i> ER (CERAPP)			<i>consensus</i> AR (CoMPARA)		
	Agonist	Antagonist	Agonist	Antagonist	Agonist	Antagonist	Binding	Agonist	Antagonist	Binding
Fenhexamid	A	I	Inc	A	VW	W	W	I	A	A
Fenarimol	A	I	I	I	I	VW	VW	I	A	A
Pyridaben	A	I	I	I	I	I	I	I	A	A
Phoxim	A	I	I	I	I	VW	VW	I	I	NA
Folpet	I	I	I	A	I	I	I	A	A	NA
Acibenzolar-S-methyl	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A
Linuron	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A
Triflumizole	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A
Azinphos-methyl	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A
Flusilazole	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A
Captafol	NA	NA	I	A	I	I	I	I	A	A
Vinclozolin	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A
Fenitrothion	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A
Parathion	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A
Fenthion	I	I	I	A	I	I	I	I	A	A

A = Active; I = Inactive; Inc = Inconclusive; W = Weak; VW = Very Weak; NA = Not Assigned. Compounds classified as or having activity levels of or higher were each assigned a score of 1. Total scores were calculated by summing the results from both the ToxCast and *consensus* QSAR models. classifications were excluded from the total score calculation.

술은 잠재적인 내분비계장애물질의 신속한 스크리닝 및 우선순위 결정에 유용한 도구로 활용될 수 있다. 이에 따라 미국 EPA 등 주요 국제 규제기관에서는 NAMs 기술의 신뢰성과 적용 가능성을 확보하기 위해 양성대조물질을 활용한 검증 연구를 지속적으로 수행하고 있다. 그러나 이러한 예측기술의 신뢰성 및 적용 범위에 대해서는 여전히 추가적인 검증과 연구가 필요한 상황이다(EPA, 2022). 본 연구에서는 국내 농약 원제를 대상으로 ToxCast Pathway 모델과 합의 QSAR 모델의 예측 결과를 비교 분석하였다. 분석 결과 ER 및 AR 활성 가능성이 있는 농약 원제를 효과적으로 스크리닝할 수 있었으며, 향후 기존의 동물실험 결과와 비교 검증을 통해 QSAR 예측모델의 활용 가능성을 추가로 검토할 필요가 있다. 또한, 농약 원제에 대한 ER 및 AR 활성 예측에서 EPA 합의 QSAR 모델을 활용한 결과, AR 활성 예측값은 ToxCast Pathway 모델과 높은 일치성을 보였으나, ER 길항제 예측값의 정확도가 상대적으로 낮아 ER 결합 예측값에 대해서는 추가적인 검증 및 보완이 필요할 것으로 생각된다. 본 연구는 NAMs 기반 ER 및 AR 활성 예측모델의 활용 가능성을 제시함으로써 기존 시험법의 한계를 보완할 수 있는 새로운 내분비계 장애물질 평가 체계의 가능성을 제시하고 있다. 향후 NAMs 기술의 검증과 표준화가 이루어지면 기존 평가 모델을 보완하거나 대체하여 독성 예측 정확도 향상과 동물 실험 필요성 감소에 기여하고, 나아가 규제 과학 발전에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 수출전략형 신작물보호제 기반 기술 개발 연구사업 “작물보호제 독성 예측 평가 기술 연구(과제 번호: RS-2024-00400007)”의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

## Author Information and Contribution

Hyun Jegal, Division of Advanced Predictive Research, Korea Institute of Toxicology (KIT), Postdoctoral researcher, <https://orcid.org/0009-0006-5362-8856>, Writing-original draft preparation and data analysis.

Yejin Do, Department of Human and Environmental Toxicology, University of Science Technology (UST), Master-Ph.D. Student, <https://orcid.org/0009-0007-3007-267X>, Data collection and curation.

Hyun Kil Shin, Division of Advanced Predictive Research, Korea Institute of Toxicology (KIT), Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-3665-0841>, Review of QSAR data.

Soontag Jung, Korea Institute of Toxicology (KIT), Postdoctoral researcher, <https://orcid.org/0000-0001-7049-5510>, *in vitro* data collection and analysis.

Onju Ham, Division of Next Generation Non-Clinical Research, Korea Institute of Toxicology (KIT), Senior Researcher, <https://orcid.org/0009-0001-7754-7923>, *in vitro* data collection and analysis.

Wookjon Yoo, Division of Next Generation Non-Clinical Research, Korea Institute of Toxicology (KIT), Principal Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-3844-0274>, Data review of endocrine disruptors.

Soo-Jin Park, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-2522-3185>, Data analysis and Review.

Yumi Jo, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0008-6733-7181>, Data analysis and Review.

Seokjoo Yoon, Division of Advanced Predictive Research, Korea Institute of Toxicology (KIT), Principal Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-1884-2591>, Conceptualization.

Jung-Hwa Oh, Division of Advanced Predictive Research, Korea Institute of Toxicology (KIT), Principal Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-3348-3120>, Writing-original draft preparation and Review.

## 이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

## Literature Cited

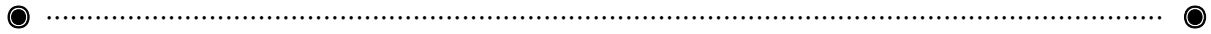
- Cherkasov A, Muratov EN, Fourches D, Varnek A, Baskin II, et al., 2014. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? *J. Med. Chem.* 57(12):4977-5010.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, et al., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30(4): 293-342.
- ECHA, 2021. ECHA's integrated regulatory strategy – Towards the safe and sustainable use of chemicals. [https://echa.europa.eu/documents/10162/5641810/irs\\_annual\\_report\\_2021\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/5641810/irs_annual_report_2021_en.pdf) (Accessed July 11, 2025).
- EPA, 2020a. EPA new approach methods work plan: Reducing use of vertebrate animals in chemical testing. <https://www.epa.gov/chemical-research/epa-new-approach-methods-work-plan-reducing-use-vertebrate-animals-chemical> (Accessed July 11, 2025).
- EPA, 2020b. ToxCast/Tox21 InVitroDB v3.3. <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical-lists?filtered=&search=invitrodb> (Accessed July 11, 2025).
- EPA, 2022. Availability of new approach methodologies (NAMs) in the Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). <https://www.epa.gov/chemical-research/availability-new-approach-methodologies-nams-endocrine-disruptor-screening-program> (Accessed July 11, 2025).
- EPA, 2024a. EPA new approach methods work plan: Reducing use of vertebrate animals in chemical testing. <https://www.epa.gov/chemical-research/epa-new-approach-methods-work-plan-reducing-use-vertebrate-animals-chemical> (Accessed July 11, 2025).
- EPA, 2024b. Exploring ToxCast data. <https://www.epa.gov/comptox-tools/exploring-toxcast-data> (Accessed July 11, 2025).
- Harrill A, Carstens K, Sipes N, Noyes P, Lowit A, et al., 2024. US Environmental Protection Agency Center for Computational Toxicology and Exposure's reports. In: (Eds.). Validation, Qualification, and Regulatory Acceptance of New Approach Methodologies. U.S. Environmental Protection Agency, City, Country.
- Holmer ML, Holmberg RD, Despicht C, Bouftas N, Axelstad M, et al., 2025. Assessment of endocrine disruptors in the European Union: Current regulatory framework, use of new approach methodologies (NAMs) and recommendations for improvements. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 162:105883.
- Jobling S & Tyler CR, 2006. Introduction: The ecological relevance of chemically induced endocrine disruption in wildlife. *Environ. Health Perspect.* 114(Suppl 1):7-8.
- Judson RS, Magpantay FM, Chickarmane V, Haskell C, Tania N, et al., 2015. Integrated model of chemical perturbations of a biological pathway using 18 *in vitro* high-throughput screening assays for the estrogen receptor. *Toxicol. Sci.* 148(1):137-154.
- Kjeldsen LS, Ghisari M & Bonefeld-Jørgensen EC, 2013. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272(2):453-464.
- Kleinstreuer NC, Ceger P, Watt ED, Martin M, Houck K, et al., 2017. Development and validation of a computational model for androgen receptor activity. *Chem. Res. Toxicol.* 30(4):946-964.
- Mansouri K, Abdelaziz A, Rybacka A, Roncaglioni A, Tropsha A, et al., 2016. CERAPP: Collaborative estrogen receptor activity prediction project. *Environ Health Perspect.* 124(7): 1023-1033.
- Mansouri K, Kleinstreuer N, Abdelaziz AM, Alberga D, Alves VM, et al., 2020. CoMPARA: Collaborative modeling project for androgen receptor activity. *Environ Health Perspect.* 128(2):27002.
- Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, et al., 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8(6):2265-2303.
- OECD, 2018. Detailed review paper on the state of the science

on novel in vitro and in silico methods for the identification of endocrine disrupting chemicals and potential applicability for regulatory use. <https://www.epa.gov/chemical-research/epa-new-approach-methods-work-plan-reducing-use-vertebrate-animals-chemical> (Accessed July 11, 2025).

Sewell F, Alexander-White C, Brescia S, Currie RA, Roberts R, et al., 2024. New approach methodologies (NAMs): Identifying and overcoming hurdles to accelerated adoption. *Toxicol. Res.* 13(2).

Stoker TE & Kavlock RJ, 2010. Chapter 18 - Pesticides as endocrine-disrupting chemicals. In: KRIEGER, R. (Eds.). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*. Academic Press, City, Country. pp. 551-569.

Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, et al., 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology.* 153(9):4097-4110.



## 신규 접근법(NAMs)을 활용한 농약의 내분비계 활성 예측: ToxCast/Tox21 데이터 및 QSAR 모델 기반 분석

제갈현<sup>1</sup> · 도예진<sup>1,2</sup> · 신현길<sup>1</sup> · 정순탁<sup>1</sup> · 함은주<sup>1</sup> · 유욱준<sup>1</sup> · 박수진<sup>3</sup> · 조유미<sup>3</sup> · 윤석주<sup>1,2\*</sup> · 오정화<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>국가독성과학연구소, 첨단예측연구본부 & 차세대비임상연구본부

<sup>2</sup>과학기술연합대학원, 국가독성과학연구소 스쿨, 인체 및 환경 독성학

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과

**요약** 내분비계장애물질(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)은 인체의 호르몬 시스템을 교란하여 생식, 발달, 신경계, 면역기능에 심각한 영향을 미치는 화학물질이다. 내분비계 교란물질을 효과적으로 규제 및 관리하기 위해서는 기존 시험법의 한계를 보완할 새로운 기술 기반 예측 시스템 개발이 필요하다. 본 연구는 미국 EPA의 ToxCast/Tox21 데이터베이스에서 얻은 신규 접근법(New Approach Methodologies, NAMs)을 활용하여 510개 농약 원제에 대한 에스트로겐 및 안드로겐 활성 가능성을 예측하고자 하였다. 우선, 에스트로겐 수용체(Estrogen Receptor, ER) 및 안드로겐 수용체(Androgen Receptor, AR) 관련 *in vitro* 데이터를 수집하여 분석하였다. 또한, EPA가 제공하는 ER 및 AR에 대한 ToxCast pathway 모델을 적용하여 농약 원제의 작용제(agonist) 또는 길항제(antagonist) 활성을 예측하였으며, 정량적 구조-활성 관계(Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) 예측값을 종합 분석하여 잠재적인 에스트로겐 및 안드로겐 활성 물질을 선별하였다. 이러한 접근법은 인체 노출량을 고려한 고위험 물질의 우선순위 결정과 추가 동물시험 필요성 판단에 도움을 줄 수 있다. 따라서 농약 원제의 위해성 관리를 위한 유용한 도구로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

**색인어:** 내분비계장애물질, 농약, 신규 접근법(NAMs), 안드로겐 수용체, 에스트로겐 수용체

