



ORIGINAL ARTICLES

## 첨단독성시험(New Approach Methodologies, NAMs) 결과를 활용한 농약의 갑상선 영향 연구

조유미<sup>1,†</sup> · 이하은<sup>2,†</sup> · 김남석<sup>1</sup> · 신지영<sup>1</sup> · 홍소혜<sup>1</sup> · 양시영<sup>1</sup> · 임영주<sup>1</sup> · 박수진<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과,

<sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 식물병방제과

## Evaluation of Thyroid Effects of Pesticides Using New Approach Methodologies (NAMs)

Youmi Jo<sup>1,†</sup>, HaEun Lee<sup>2,†</sup>, Namseok Kim<sup>1</sup>, Ji-Young Shin<sup>1</sup>, So-Hye Hong<sup>1</sup>, Si Young Yang<sup>1</sup>, Young-Joo Lim<sup>1</sup>, and Soo-Jin Park<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Toxicity and Risk Assessment Division, Department of Agro-Food Safety & Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, Republic of Korea

<sup>2</sup>Plant Disease Control Division, Department of Agro-Food Safety & Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, Republic of Korea

(Received on October 27, 2025. Revised on November 12, 2025. Accepted on November 13, 2025)

**Abstract** Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis by endocrine-active substances can have significant effects on development and metabolism. By integrating cell-based thyroid hormone receptor (TR $\alpha$ / $\beta$ ) reporter assays, EPA ToxCast/Tox21 high-throughput screening (HTS) data, and *in silico* QSAR predictions, this study assessed three pesticides (Folpet, Bromoxynil, Fenoxycarb) of concern for potential thyroid effects. TR $\alpha$ / $\beta$  agonist activity was minimal (approximately 0.1%) for all three pesticides. As TR reporter assays represent only a subset of thyroid-related mechanisms, complementary analyses using HTS and QSAR data were conducted to identify other potential molecular initiating events (MIEs). In the HTS dataset, the three pesticides were identified as active in certain assays. However, with the exception of Bromoxynil, most responses occurred at near cytotoxic concentrations, suggesting non-specific rather than thyroid-specific activity. QSAR modeling predicted negative outcomes for all three pesticides. A comparison with published *in vivo* studies indicated that the observed effects were more consistent with secondary consequences of high-dose exposure or other toxicity rather than direct thyroid-mediated mechanisms. These findings were consistent with the *in vitro* and *in silico* results. Overall, this study demonstrates that integrating *in vitro* and *in silico* data provides a comprehensive approach to evaluate thyroid-related endocrine activity and can serve as a screening framework for mode-of-action-based assessment.

**Key words:** Endocrine disruptor, Pesticide, Thyroid

### 서론

내분비계 교란물질(Endocrine Disruptors, EDs)은 사람과 환경에 영향을 미칠 수 있는 화학물질로 내분비계의 정상

기능을 방해하여 부정적 영향을 초래하는 외인성 물질 또는 혼합물로 정의된다(WHO/IPCS, 2002). 1990년대 화학물질이 사람과 야생동물의 생식 및 발달에 손상을 일으킬 수 있다는 사례들이 발표되면서 내분비계 교란물질은 국제 당국의 주요 관심사가 되었으며(Crisp et al., 1998; Marty et al., 2010) 이에 따라 다양한 시험법과 과학적 접근법이 개발되어 왔다. 경제협력개발기구(OECD)는 내분비계 교란물질을 확인·평가 하기 위해 EATS(Estrogen, Androgen, Thyroid, Steroidogenesis)

<sup>†</sup>The authors contributed equally to this work

\*Corresponding author

E-mail: jiny0451@korea.kr

**Table 1.** Pesticides tested in this study

Pesticide (CAS no)	SMILES <sup>a)</sup>	Adverse effects (Study) <sup>b)</sup>
Folpet (133-07-3)	<chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C2=O)SC(Cl)(Cl)Cl</chem>	Follicular cell hyperplasia (2-year rat)
Bromoxynil (1689-84-5)	<chem>C1=C(C=C(C(=C1Br)O)Br)C#N</chem>	Follicular cell hyperplasia (90-day rat)
Fenoxycarb (72490-01-8)	<chem>CCOC(=O)NCCOC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2</chem>	Follicular cell hyperplasia (90-day rat)

<sup>a)</sup>SMILES(Simplified Molecular Input Line Entry System) strings were retrieved from PubChem (accessed October 2025)

<sup>b)</sup>EFSA 2019; EFSA 2024

모달리티와 관련된 시험지침(Test Guidelines, TGs) 및 평가 체계를 종합적으로 정리한 지침서를 발간하였다(OECD, 2018d). 또한 유럽연합(EU)은 내분비계 교란물질에 대한 과학적 기준을 도입하고, 이를 확인하기 위한 지침을 발간하여 농약 유효성분의 승인·갱신 과정에서 내분비계 교란 여부를 평가하고 있다(ECHA and EFSA, 2018; European Union, 2009; Liszewska et al., 2024). 미국 환경보호청(EPA)은 내분비계 교란물질 선별프로그램(Endocrine Disruptor Screening Program, EDSP)을 운영하며, 농약 유효성분을 우선적으로 포함시켜 2단계 접근법(Tiered approach)을 적용하여 내분비계 교란 가능성을 평가하고 있다(EPA, 2009; EPA, 2025). 또한 EDSP 단기 이행전략을 발표함에 따라 신규 농약에 대해서도 내분비계 영향을 평가하도록 하고 있다(EPA, 2023).

내분비계 중 갑상선은 대사, 신경 발달, 항상성 등 다양한 생리 과정을 조절하는 필수적인 내분비 체계로, 교란 시 뇌 발달 지연, 대사 이상, 생식 장애 등 심각한 건강 영향을 초래할 수 있어 중요한 평가 영역으로 강조되고 있다(Jugan et al., 2010; OECD, 2006). 그럼에도 불구하고 기존 내분비계 독성 시험법 및 평가법은 주로 에스트로겐과 안드로젠 영향에 집중되어 있다(Egalini et al., 2022; Zgheib et al., 2021). 갑상선에 대한 영향을 평가하기 위해서는 90일 반복경구투여독성시험, 기형독성시험, 번식독성시험, 확장 1세대 번식독성시험에서 갑상선 호르몬 측정이나 양서류 변태 시험을 통한 시상하부-뇌하수체-갑상선축(Hypothalamic-Pituitary-Thyroid axis, HPT축)의 기능을 평가하는 방법으로 제한된다(OECD 2013; OECD 2016a; OECD 2016b; OECD 2018a; OECD 2018b; OECD 2018c). 즉 갑상선 영향을 보기 위한 검증된 시험법은 대부분 척추동물 시험에 한정되어 있어, 동물복지 측면에서 윤리적 문제가 제기된다.

본 연구에서는 세포기반의 갑상선 호르몬 수용체 알파(Thyroid hormone Receptor  $\alpha$ , TR $\alpha$ ) 및 베타(Thyroid hormone Receptor  $\beta$ , TR $\beta$ ) 리포터 반응 시험을 활용하여 갑상선 영향 의심 농약 3종에 대해 평가하였다. 또한 이를 *in silico* QSAR 모델과 국외 *in vitro* 및 *in vivo* 시험결과를 비교·분석함으로써, 갑상선에 대한 영향 및 작용기전을 종합적으로 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험물질

본 연구에서는 갑상선 영향을 평가하고자 동물시험에서 갑상선 영향이 있는 것으로 분류된 농약 3종(Table 1)을 선정하여 실험을 수행하였다(EFSA, 2019; EFSA, 2024). 사용된 농약은 Folpet(Hankook samgong Co. Ltd., Seoul, South Korea), Bromoxynil(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Fenoxycarb(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 있으며 Dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 녹여 시험 당일에 사용하였다.

### 세포주 배양

본 연구에서는 갑상선 세포독성 평가를 위해 인체 갑상선 여포 상피세포주 Nthy-ori 3-1(#90011609, Merck, Rahway, NJ, USA)를 사용하였다. RPMI 1640(Gibco, Thermofisher-Scientific, Waltham, MA, USA) 배지에 2 mM Glutamine와 10% FBS(Gibco, Thermofisher-Scientific, Waltham, MA, USA)를 혼합한 배지를 사용하였다. Nthy-ori 3-1 세포는 T75 플라스크에  $3 \times 10^3$ /well/100  $\mu$ L/96 well plate로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 배양하였다. 모든 세포주는 계대수(Passage number) 10 이내로 제한하여 실험을 수행하였다.

갑상선 호르몬 수용체 리포터 분석을 위해 Human TR $\alpha$ /TR $\beta$  Reporter assay kit(Indigo biosciences, Stage college, PA, USA)에 포함된 인체 유래 갑상선 리포터(Reporter) 세포주를 사용하였다. 동결된 세포는 Kit 내 동봉된 Cell Recovery Medium과 혼합하여 37°C 항온수조에서 10분간 해동 및 안정화시킨 후 사용하였다.

### 세포 생존률 분석

실험농약 원액(stock solution)은 DMSO에 용해하여 1 M 농도로 제조하였으며, 사용 직전에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. Folpet은 실험에 필요한 최고농도를 1250  $\mu$ M, Bromoxynil 및 Fenoxycarb는 10000  $\mu$ M로 하였다. 실험농약은 4반복 처리하였으며, 물질처리를 위해 96-well plate의 12열에 최고농도의 실험농약이 포함된 배지를 분주하였다. 이후 11열부터 2배 단계희석(Serial dilution) 방식으로 처리

하였고, 1열은 배지대조군으로 설정하였다. 실험물질 처리 후 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 배양하였다.

세포 생존률은 WST-1 assay(#5015944001, Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다. 실험농약 노출 종료 2시간 전에 각 well에 WST-1 시약을 10 µL씩 처리한 후, 37°C 배양기에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 마이크로플레이트 리더(Microplate reader)(Thermofisher-Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 420~480 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험 결과는 배지대조군과 양성대조군(Full kill well, DMSO 50~100%)을 기준으로 정규화하여 분석하였다. 세포 생존률 데이터를 기반으로 GraphPad Software(San Diego, CA, USA)을 사용하여 IC<sub>50</sub>를 산출하였다.

**갑상선 호르몬 수용체(TRα, TRβ) 활성화(Agonist) 반응 분석**

세포 현탁액을 96-well plate에 well당 200 µL씩 분주하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건의 배양기에서 4-6시간 동안 전배양한 후, 시험농약을 처리하였다. 실험농약(Bromoxynil, 100 µM; Fenoxycarb, 900 µM; Folpet, 30 µM)은 각 최고 농도를 기준으로 DMSO를 사용하여 3배 희석(Serial dilution)하여 처리하였다.

갑상선 호르몬 수용체 활성화 반응 분석실험에서 희석배지는 Human TRα/TRβ Reporter assay kit에 동봉된 Compound Screening Medium(CSM)을 사용하였다. 음성 대조군으로는 희석배지인 CSM을 사용하였고, 양성대조군은 150 nM T3(3,3',5-Triiodo-L-thyronine)를 사용하였다. 처리 후 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건의 배양기에서 24시간 배양하였다.

실험농약 처리 후 각 well에 제조사에서 제공하는 Luciferase

Detection Reagent 100 µL를 첨가하고, 실온에서 5분간 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더기(Thermofisher-Scientific, Waltham, MA, USA)의 luminescence 기능을 사용하여 발광값(Relative Light Units, RLU)을 측정하였다.

실험농약의 갑상선 수용체 활성화 반응은 참조 양성대조물인 T3에 대한 상대활성(Percent Relative Activity, %RA)으로 산출하였다. 실험농약의 상대활성 값이 10% 이상이면 활성있음(Active)로 판정하였다(Caviola E and Sherf B, 2023).

$$\%RA = \frac{(RLU_{sample} - RLU_{blank})}{(RLU_{T3,max} - RLU_{blank})} \times 100$$

**고속대량시험(High-Throughput Screening, HTS) 데이터 비교·분석**

미국 EPA ToxCast/Tox21 프로그램에서 제공하는 갑상선 관련 HTS 자료를 수집·검토하였다. ToxCast에서 갑상선 교란과 관련된 시험법은 크게 수용체 반응(Thyroid hormone Receptor, TR; Thyroid-Stimulating Hormone Receptor, TSHR 등), 호르몬 합성(Thyroid peroxidase, TPO; Iodothyronine deiodinases, DIO; iodotyrosine deiodinase, IYD 등), 요오드 흡수·수송(Sodium-iodide symporter, NIS) 범주로 구분되며, 관련된 HTS 결과는 Hit call, Scaled\_top, Emax, Cutoff, AC<sub>50</sub>, Cytotox burst(세포독성 급증농도) 수치 이용하여 분석하였다(Tables 2, 3). Scaled\_top은 최대반응영향(Emax)을 Cutoff로 정규화한 값이며, 이 값이 1 이상일 경우 Hit call에서 활성(Active)으로 판정하였다. AC<sub>50</sub>은 최대반응의 50%를 보이는 농도이며, Cytotox burst는 세포독성과 관련된 활성

**Table 2.** ToxCast/Tox21 high-throughput screening (HTS) Assays

MIE <sup>a)</sup>	Assay name	Organism	Cell type	Target	Endpoint
Receptor Activity	TOX21_TSHR_HTRF_Agonist_ratio	Human	HEK293T	Thyroid stimulating hormone receptor	Activity % (signal gain)
	TOX21_TR_LUC_GH3_Antagonist	Rat	GH3	Thyroid hormone receptor (TRα, TRβ)	Activity % (signal loss)
Hormone synthesis	CCTE_Simmons_AUR_TPO	Rat	Cell-free; thyroid gland tissue-based	Thyroid peroxidase (TPO)	Activity % (signal loss)
Iodine uptake and transport	CPHEA_Stoker_NIS_Inhibition_RAIU	Human	HEK293T	Sodium/iodine symporter (NIS)	Activity %
Thyroid hormone responsive gene expression	LTEA_HepaRG_THRSP	Human	HepaRG	mRNA	mRNA expression (fold change)
Cytotoxicity (control)	TOX21_TR_LUC_GH3_Antagonist viability	Rat	GH3	Cytotoxicity	Viability%
	CCTE_Simmons_CellTiterGLO_HEK293T	Human	HEK293T	Cytotoxicity	Activity % (signal loss)
	CPHEA_Stoker_NIS_Cytotoxicity	Human	HEK293T	Cytotoxicity	Activity %

<sup>a)</sup>MIE: Molecular Initiating Event; initial key event in thyroid-related pathways as identified in ToxCast/Tox21 assays.

**Table 3.** Summary of ToxCast/Tox21 high-throughput screening (HTS) results for pesticides

Pesticides	MIE	Assay name	Hit call	SCALED _TOP <sup>a)</sup>	Emax (%) <sup>b)</sup>	Cutoff (%)	AC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>c)</sup>	Cyto- tox Burst ( $\mu$ M) <sup>d)</sup>
Folpet	Receptor Activity	TOX21_TSHR_HTRF_Agonist_ratio	Active	2.97	82.72	27.85	12.68	14.08
		TOX21_TR_LUC_GH3_Antagonist	Active	5.54	124.34	22.44	1.88	14.08
	Horomne synthesis	CCTE_Simmons_AUR_TPO	Active	2.13	42.70	20	25.65	14.08
	Iodine uptake and transport	CPHEA_Stoker_NIS_Inhibition_RAIU	Active	1.77	98.35	55.54	11.62	14.08
	Cytotoxicity (control assays)	TOX21_TR_LUC_GH3_Antagonist viablility	Active	2.49	99.95	40.08	2.3	14.08
		CCTE_Simmons_CellTiterGLO_HEK293T	Active	4.90	98.06	20	9.76	14.08
Bromoxynil	Receptor Activity	TOX21_TR_LUC_GH3_Antagonist	Active	2.68	60.14	22.44	51.61	55.77
	Thyroid hormone responsive gene expression	LTEA_HepaRG_THRSP	Active	7.61	7.40	0.97	26.48	55.77
	Cytotoxicity (control assays)	TOX21_TR_LUC_GH3_Antagonist viablility	Active	2.49	99.95	40.08	2.3	14.08
Fenoxycarb	Iodine uptake and transport	CPHEA_Stoker_NIS_Inhibition_RAIU	Active	1.61	89.18	55.54	40.21	40
	Cytotoxicity (control assays)	CPHEA_Stoker_NIS_Cytotoxicity	Active	1.29	63.21	48.91	34.0	40

<sup>a)</sup>Scaled\_TOP is the model-derived maximum response (Emax) normalized to the assay-specific activity threshold (Cutoff).

A Scaled\_TOP value  $\geq 1.0$  indicates that the modeled maximum response meets or exceeds the predefined cutoff and is therefore considered an active(hit) response in the assay.

<sup>b)</sup>Emax, Maximum effect, maximal response, maximal activity

<sup>c)</sup>AC<sub>50</sub>, Half-maximal activation concentration

<sup>d)</sup>Cytotox\_Burst refers to a nonspecific cellular response in which multiple cellular pathways are simultaneously activated as cells become damaged and lose homeostatic control and it can produce false positive signals. AC<sub>50</sub> < Cytotox\_Burst, indicating that the observed activity occurred below the concentration associated with general cytotoxicity; therefore, the response is considered specific and unlikely to reflect a cytotoxicity-related false positive.

폭증 농도로 데이터 해석에 활용하였다(Judson Richard et al., 2016; Natalia Ryan, 2017).

### QSAR 모델을 이용한 예측

갑상선 호르몬 수용체 작용 이외에 교란을 유발하는 다른 기작을 예측하기 위해 공개 QSAR 플랫폼인 VEGA(Mario Negri Institute, Milan, Italy)와 Danish QSAR(National Food Institute and Technical University of Denmark)를 활용하였다.

VEGA 플랫폼에서는 Thyroid receptor  $\alpha$  effect(NRMEA v1.0.1), Thyroid receptor  $\beta$  effect(NRMEA v1.0.1), Thyroperoxidase(TPO) inhibitory activity(OBERON v1.0.1) 모델을 대상으로 각 농약의 활성(Active/Inactive)을 예측하였다. 이때 적용범위(Applicability Domain, AD) 및 신뢰도(Reliability)를 고려하였으며, 적용범위 지수(Applicability Domain Index, ADI)가 0.85 이상인 경우 신뢰 가능한 예측 결과로 판단하여 활용하였다(VEGA HUB).

Danish (Q)SAR database에서는 Iodothyronine deiodinase (DIO1, DIO2, DIO3) 억제, Thyroperoxidase(TPO) 억제, Thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) 억제, sodium/iodide symporter(NIS)와 관련된 모델을 활용하였다. Danish (Q)SAR Database에서는 QMRF(QSAR Model Reporting Format) 문서(DTU Food, 2018)에 따라 모델의 적용범위(AD)를 구조적 유사도(Structural domain)와 예측확률(Predicted Value)을 기준으로 정의하였다. 구조적 적용범위는 예측

농약과 학습세트 간의 Tanimoto 유사도를 이용하여 평가하였으며, 예측확률이 0.7 이상인 경우 활성(Positive), 0.3 이하인 경우 비활성(Negative)으로 분류하였다. 0.3~0.7 구간의 농약은 경계값(out of AD)으로 간주하여 예측의 신뢰도를 평가하였다.

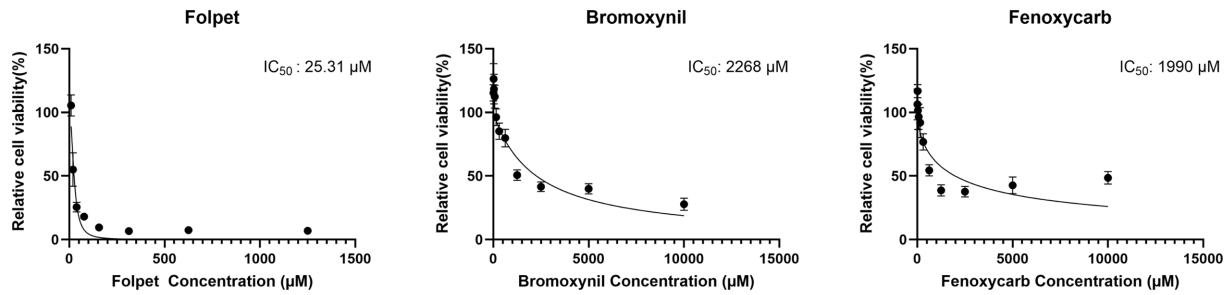
두 가지 QSAR 플랫폼에서의 예측 결과는 본 연구에서 수행한 세포 기반 갑상선 수용체 리포터 시험 결과와 국외 *in vitro* 및 *in vivo* 시험 결과와 비교 분석에 활용하였다.

## 결과 및 고찰

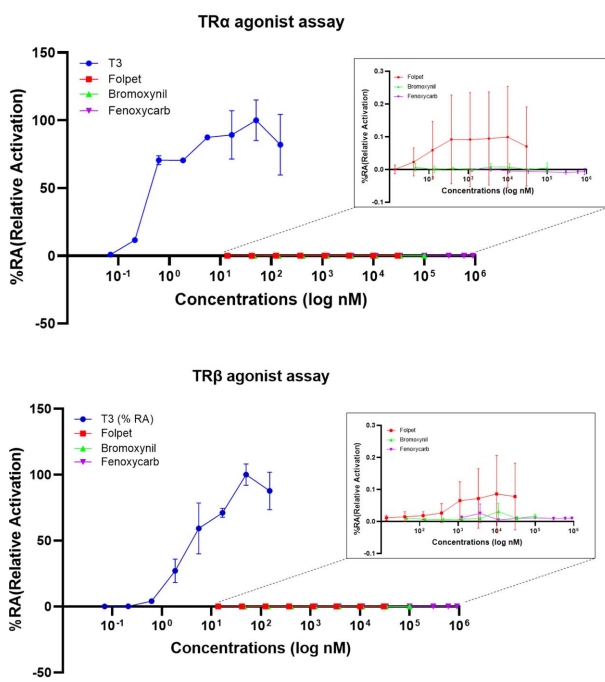
### 갑상선 세포독성 및 갑상선 호르몬 수용체(TR) 활성화(Agonist) 반응 분석

EFSA에서 갑상선에 영향이 있을 것으로 우려하는 농약 3종(EFSA, 2019; EFSA, 2024)을 선정하고 갑상선 세포독성 실험을 수행하였다. 실험결과 Folpet의 반최대억제농도(IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration)는 25.31  $\mu$ M, Bromoxynil은 2268  $\mu$ M, Fenoxycarb는 1990  $\mu$ M이었다.

갑상선 영향 작용 기작 중 갑상선 호르몬 수용체(TR) 활성화 반응에 대한 영향을 *in vitro* luciferase 시험을 통해 평가하고자 하였다. TR $\alpha$  및 TR $\beta$  대한 활성화 시험을 수행하였으며, 양성대조군으로는 T3를 사용하였다. 실험 농도는 갑상선 세포독성 평가의 결과(Fig. 1)에 따라 세포독성이 없는 농도에서 수행하였다. 시험 결과, 양성대조군에서의 갑상선



**Fig. 1.** Cell viability of human thyroid cells after 24-h exposure to test pesticide. Data represent mean ± SD (n = 4). IC<sub>50</sub> value, defined as the concentration of a test substance that reduces cell viability by 50%, was calculated using nonlinear regression (normalize response curve fitting) in GraphPad Prism 10.



**Fig. 2.** Agonist activity of test pesticides in TR $\alpha$  and TR $\beta$  reporter gene assays. Relative activation (%RA) was calculated based on the response induced by positive control, T3. Data represent mean ± SD (n = 3)

수용체 활성화(relative activation, %) 반응은 확인된 반면, 실험농약은 0.1% 내외의 활성을 보여 모두 갑상선 호르몬 수용체에 유의한 활성화 영향은 없는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

### 고속대량시험(HTS) 데이터 분석

*In vitro* 갑상선 호르몬 수용체 시험은 현재 활성화(agonist) 시험 결과의 활용에만 권고하고 있기 때문에 길항(antagonist) 영향 평가에 제약이 있다(OECD, 2024). 또한 갑상선 영향은 단일 경로가 아닌 여러 분자개시사건(Molecular Initiating Event, MIE)과 하위 생물학적 단계의 상호작용에 의해 나타나므로(EFSA, 2019) 다중 기전을 검토하기 위해 미국 EPA의 CompTox Chemical Dashboard(v2.6.0)에 수록된 ToxCast/

Tox21 *in vitro* HTS 데이터를 수집·분석하였다(Table 2).

Folpet은 갑상선과 관련된 여러 어세이(TSHR, TR, TPO, NIS)에서 최대반응영향(Emax)을 Cutoff로 정규화한 Scaled\_top값이 1 이상이므로 Hit call에서 활성(Active)으로 수집되었다(Table 3). 그러나 각 실험 별 AC<sub>50</sub>와 세포독성(cytotoxic burst 또는 viability assay 결과)을 비교한 결과, 세포독성에 의한 비특이적인 반응 가능성이 높은 것으로 판단되었다. CCTE\_Simmons\_AUR\_TPO 실험의 경우, AC<sub>50</sub>(25.65 µM)가 세포독성 급증농도(Cytotox Burst, 14.08 µM)보다 높은 농도에서 관찰되어 세포독성에 의해 유도된 반응일 가능성이 높았다. TOX21\_TR\_LUC\_GH3\_Antagonist 실험의 경우, AC<sub>50</sub>(1.88 µM)가 세포독성 급증농도(14.08 µM)보다 낮았으나, 동일 세포주를 이용한 세포생존율 실험(TOX21\_TR\_LUC\_GH3\_Antagonist viability)의 AC<sub>50</sub>(2.3 µM)와 유사하였다. 즉 세포독성(viability) AC<sub>50</sub>/Antagonist AC<sub>50</sub>의 비율(1.22)이 5를 초과하지 않아 세포독성에 의한 영향을 배제하기 어렵다고 판단하였다(Debabrata Mahapatra et al., 2018). TOX21\_TSHR\_HTRF\_Agonist\_ratio 실험 및 CPHEA\_Stoker\_NIS\_Inhibition\_RAUI 실험은 대조군 세포생존율 실험(CCTE\_Simmons\_CellTiterGLO\_HEK293T)과 비교 시, 세포독성이 나타난 농도(AC<sub>50</sub> 9.76 µM)보다 높은 농도에서 활성이 관찰되어, 세포독성에 의한 비특이적인 반응으로 간주되었다.

Bromoxynil은 갑상선 관련 두 개의 어세이에서 모두 활성(Active)으로 수집되었다(Table 3). 갑상선 호르몬 수용체 길항 반응 시험(TOX21\_TR\_LUC\_GH3\_Antagonist)에서의 AC<sub>50</sub>(51.61 µM)은 세포독성 급증농도(55.77 µM)와 유사하였고, 같은 세포계를 이용한 세포생존율 실험에서는 2.3 µM 농도에서 독성이 관찰되었다. 따라서 51.61 µM에서의 길항 활성은 비특이적 세포 독성 영향에 의한 것으로 판단하였다. 한편 갑상선호르몬 반응성 유전자(THRSP) 발현 어세이(LTEA\_HepaRG\_THRSP)에서는 AC<sub>50</sub> 26.5 µM로 세포독성 급증 농도(55.77 µM) 이하에서 활성이 나타났다. 그러나 THRSP 유전자는 간세포의 지질·대사 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있으므로(Yao et al., 2016) 갑상선호르몬계 반응으로 판단하기 위해서는 추가적인 자료 분석이 필요하

다고 사료되었다.

Fenoxycarb는 요오드 흡수-수송 경로에 대한 어세이 결과를 확인할 수 있었다. NIS 억제 어세이(CPHEA\_Stoker\_NIS\_Inhibition\_RAIU)는 활성으로 분류되었으나( $AC_{50}$ : 40.21  $\mu$ M), 세포독성 급증농도(40  $\mu$ M)와 유사하였다. 또한 세포독성 대조 어세이(CPHEA\_Stoker\_NIS\_Cytotoxicity)에서 세포독성이 더 낮은 농도( $AC_{50}$ : 34  $\mu$ M)에서 관찰되어 비특이적 세포독성에 기인했을 가능성이 높다고 판단하였다.

### QSAR 모델을 이용한 갑상선 영향 평가

국외 고속대량시험(HTS) 데이터에서도 분자개시사건에 대한 자료 공백이 확인되었기 때문에 이를 보완하고자 *in silico* QSAR 모델을 적용하여 잠재적 갑상선 영향을 추가로 확인하고자 하였다.

Folpet, Bromoxynil, Fenoxycarb 모두 VEGA 플랫폼의 갑상선 관련 3가지 모델에서 일관되게 비활성(negative)으로 예측되었다(Table 4). Thyroid receptor  $\alpha$  및  $\beta$  effect (NRMEA v1.0.1), Thyroperoxidase (TPO) inhibitory activity (OBERON v1.0.1) 모델에서 세 농약의 적용범위(Applicability Domain, AD) 지수는 0.92~1.0으로 평가되어 모두 적용범위 내(in AD)에 포함되었다. 또한 일부 모델에서는 실험값이 함께 포함되어 예측의 신뢰도가 높은 것으로 평가되었다. 이를 종합할 때, 세 가지 실험농약은 갑상선 호르몬 수용체( $TR\alpha$ ,  $TR\beta$ ) 및 TPO 억제 활성 기작을 통해 갑상선 기능에 영향을 미칠 가능성이 낮을 것으로 판단하였다.

Danish (Q)SAR에서는 Folpet의 경우, 8개의 모델에서 모두 비활성(negative)으로 예측되었다(Table 5). Thyroid peroxidase (TPO) inhibition QSAR1 모델과 Thyroid-stimulating hormone

**Table 4.** Vega QSAR model predictions for thyroid hormone system-related endpoints

Models	Folpet				Bromoxynil				Fenoxycarb			
	Experimental	Prediction	AD status (index value)	Reliability	Experimental	Prediction	AD status (index value)	Reliability	Experimental	Prediction	AD status (index value)	Reliability
Thyroid receptor Alpha effect(NRMEA)-v.1.0.1	NEG	NEG	IN (1.0)	Good	N/A	NEG	IN (0.92)	Good	NEG	NEG	IN (1.0)	Good
Thyroid receptor Beta effect(NRMEA)-v.1.0.1	NEG	NEG	IN (1.0)	Good	N/A	NEG	IN (0.92)	Good	NEG	NEG	IN (1.0)	Good
Thyroperoxidase inhibitory activity (OBERON)-v.1.0.1	NEG	NEG	IN (1.0)	Good	NEG	NEG	IN (1.0)	Good	NEG	NEG	IN (1.0)	Good

In the VEGA QSAR platform, the AD index (index value) represents the degree of reliability of a prediction, ranging from 0 (low reliability, outside the applicability domain) to 1 (high reliability, inside the domain).  
NEG: Negative; POS: Positive; INC: Inconclusive; N/A: Not Applicable

**Table 5.** Danish QSAR model predictions for thyroid hormone system-related endpoints

Models	Folpet				Bromoxynil				Fenoxycarb			
	Experimental	Probability <sup>a)</sup>	Prediction	AD status	Experimental	Probability	Prediction	AD status	Experimental	Probability	Prediction	AD status
Thyroperoxidase (TPO) inhibition QSAR1 (in vitro)	N/A	0.33	NEG	OUT	NEG	0.53	INC	OUT	NEG	0.53	INC	OUT
Thyroperoxidase (TPO) inhibition QSAR2 (in vitro)	N/A	0.19	NEG	IN	NEG	0.49	INC	OUT	NEG	0.44	INC	OUT
Sodium/iodide symporter (NIS), higher sensitivity	N/A	0.11	NEG	IN	N/A	0.53	INC	OUT	N/A	0.52	INC	OUT
Sodium/iodide symporter (NIS), higher specificity	N/A	0.10	NEG	IN	N/A	0.45	INC	OUT	N/A	0.43	INC	OUT
Iodothyronine deiodinase type 1 (DIO1) inhibition (in vitro)	N/A	0.09	NEG	IN	N/A	0.52	INC	OUT	NEG	0.04	NEG	IN
Iodothyronine deiodinase type 2 (DIO2) inhibition (in vitro)	N/A	0.09	NEG	IN	N/A	0.62	POS	OUT	N/A	0.14	NEG	IN
Iodothyronine deiodinase type 3 (DIO3) inhibition (in vitro)	N/A	0.10	NEG	IN	N/A	0.46	INC	OUT	N/A	0.27	NEG	IN
Thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) inhibition (in vitro)	NEG	0.34	NEG	OUT	N/A	0.19	NEG	IN	NEG	0.21	NEG	IN

<sup>a)</sup>Probability, the model-estimated probability. According to the Danish QSAR Group criteria, positive predictions with probability  $\geq 0.7$  and negative predictions with probability  $\leq 0.3$  are considered within the applicability domain (AD). Predictions with probabilities between 0.5–0.7(positive) or 0.3–0.5(negative) are defined as out of the applicability domain.  
NEG: Negative; POS: Positive; INC: Inconclusive; N/A: Not Applicable

receptor(TSHR) inhibition에서는 예측확률이 각각 0.326 및 0.338로 나타나 경계값(0.3~0.7 범위)에 해당되어, 적용범위 밖(out of AD)으로 판정되었다. 다만 TSHR inhibition 모델에서는 비활성의 실험값이 존재하여 최종 비활성으로 판단하였다. 나머지 6개의 모델(TPO inhibition, NIS sensitivity, NIS specificity, DIO1 inhibition, DIO2 inhibition, DIO3 inhibition)은 적용 범위 내에서 비활성으로 예측되어 이와 관련된 기작으로 갑상선 기능에 영향을 미칠 가능성은 낮은 것으로 판단하였다.

Bromoxynil의 경우, Danish (Q)SAR Database의 8개 갑상선 관련 모델 중 6개 모델에서 예측확률이 0.3~0.7 범위에 해당하여 불확정(inconclusive)으로 판정되었으며, 동시에 모델의 적용범위 밖(out of AD)으로 분류되었다. 그러나 이중 TPO inhibition 2개의 모델에서 비활성의 실험값이 존재하여 최종 비활성인 것으로 판단하였다. DIO2 inhibition 모델에서는 활성(positive)으로 예측되었으나, 결과가 적용범위 밖(out of AD)으로 분류되어, 해당 예측의 신뢰도는 제한적인 것으로 사료되었다. TSHR inhibition 모델에서는 비활성(negative, in AD)으로 예측되어, Bromoxynil은 TSHR inhibition, TPO inhibition 기작을 통해 갑상선 기능에 영향을 미칠 가능성은 낮은 것으로 판단되었다.

Fenoxycarb의 경우, Danish (Q)SAR Database의 8개 갑상선 관련 모델 중 TPO inhibition QSAR1 및 QSAR2, NIS (higher sensitivity/specificity) 모델에서 예측확률이 각각 0.43~0.53 범위로 나타나 불확정(inconclusive)으로 판정되었으며, 동시에 적용범위 밖(out of AD)으로 분류되었다. 다만, TPO inhibition 모델 2가지의 경우, 비활성의 실험값이 존재하여 비활성으로 판단하였고 NIS 모델 2가지만 예측 신뢰도가 제한적인 것으로 판단하였다. 반면 DIO1, DIO2, DIO3, TSHR inhibition 모델에서는 적용범위 내(in AD)에서 비활성(negative)으로 예측되었으며, 특히 DIO1 inhibition 모델 및 TSHR inhibition 모델은 실험값이 비활성으로 확인되었다. 이를 바탕으로 Fenoxycarb는 TPO, DIO, TSHR 등 갑상선 관련 주요 기작을 통해 갑상선 기능에 영향을 미칠 가능성이 낮은 것으로 사료되었다.

**In vivo, in vitro, in silico 갑상선 영향 결과 비교**

농약에 의한 갑상선 교란은 시상하부-뇌하수체-갑상선축(HTP axis)의 조절 경로를 방해함으로써 갑상선 호르몬의 합성, 대사, 운반, 수용체 결합 등 여러 단계에서 일어날 수 있다고 알려져 있다(Antonio et al., 2020; Leemans et al., 2019; EFSA 2024). 대표적으로 일부 농약은 시상하부나 뇌하수체 수준에서 TRH(Thyrotropin-releasing hormone) 또는 TSH(Thyroid-stimulating hormone) 분비를 변화시켜 갑상선 자극 신호에 영향을 유발할 수 있다. 또한 갑상선호르몬(T3, T4)은 NIS(Sodium/iodide symporter)를 통한 요오드 흡수,

TPO(Thyropoxidase)에 의한 산화, Tg(Thyroglobulin)에 결합 등 복잡한 생합성 과정을 거치는데, 이러한 단계에 작용하여 갑상선호르몬 합성 또는 분비에 영향을 유발할 수 있다. 이외에도 혈중 운반단백질(Transthyretin, TTR; Thyroxin-binding globulin, TBG; 알부민)과 결합 방해, 세포막 수송체(Monocarboxylate Transporter 8, MCT8) 및 핵 내 갑상선 호르몬 수용체(TR $\alpha$ , TR $\beta$ ) 교란 등이 갑상선 기능 이상을 초래할 수 있다고 보고되어 있다.

본 연구에서는 국외에서 갑상선 영향 우려가 제기된 농약 3종을 대상으로 *in vitro* 및 *in silico* 실험을 통해 잠재적 갑상선 영향 기전을 예측하고, 그 결과를 *in vivo* 독성시험 결과와 비교하고자 하였다.

Folpet의 경우, 2년 랫드 발암성시험에서 갑상선여포세포 과형성이 관찰되어 갑상선 영향 가능 물질로 분류되었다(EFSA 2019; EFSA 2024). 그러나 다른 문헌에서는 T4 호르몬의 감소가 최대내약용량(Maximally Tolerated Dose, MTD)을 초과하고 전신독성이 나타나는 용량에서만 보고되었다(EFSA, 2023; EPA, 2015). 본 연구의 *in vitro* 및 *in silico* 분석 결과에서도 Folpet은 TPO, TR, NIS 등 주요 갑상선 영향 경로에서 비활성으로 예측되어 *in vivo*에서 관찰된 T4 저하, 갑상선여포세포 과형성은 갑상선의 직접적 영향보다는 고용량 노출에 따른 2차적인 효과로 해석하는 것이 타당하다고 사료되었다.

Bromoxynil의 경우, 90일 랫드 반복투여경구독성시험에서 갑상선여포세포 과형성이 관찰되어 갑상선 영향 가능 물질로 분류되었다(EFSA 2019; EFSA 2024). 또한 설치류 및 비설치류 반복투여독성시험에서 갑상선비대 및 소포세포 비대/증식이 보고되었으며, 일부시험에서 T4의 농도 감소가 나타났다(EFSA, 2017). 그러나간에서의 microsome 효소 유도가 확인되어 bromoxynil의 갑상선 영향은 간 대사 효소에 의한 2차적 영향으로 보고하였다(EFSA, 2017). 본 연구의 *in vitro* 분석의 갑상선호르몬 반응성 유전자(THRSP) 발현 어세이(LTEA\_HepaRG\_THRSP)에서 활성이 관찰되었다. 다만 THRSP 유전자는 간세포의 지질-대사 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있으므로(Yao et al., 2016), 해당 활성은 갑상선 호르몬계에 특이적인 반응이라기보다는 간 대사 등에 따른 2차적 변화일 가능성을 배제하기 어려웠다. 따라서, 갑상선 관련 활성의 생물학적 의미를 명확히 하기 위해 추가 기전 검증이 필요하다고 사료되었다.

Fenoxycarb는 90일 랫드 반복투여경구독성시험에서 갑상선여포세포 과형성이 관찰되어 갑상선 영향 가능 물질로 분류되었다(EFSA 2019; EFSA 2024). 그러나 다른 연구에서 갑상선과 관련된 호르몬의 변화, 조직병리학적 변화, 장기무게 변화가 보고되지 않았으며, 대신 간 대사 효소 유도, 간무게 증가 등이 관찰되어 갑상선 영향의 직접적인 기전과 연계성이 낮은 것으로 해당 연구에서는 평가되었다(EFSA, 2010). 본

연구에서는 HTS 어세이 중 NIS inhibition 어세이의 고농도에서만 활성이 관찰되었으나 이는 세포독성에 의한 것으로 판단하였고 *in silico* 모두 비활성으로 예측되어 갑상선 영향 가능성은 낮은 것으로 판단하였다.

농약은 병해충·잡초로부터 작물을 보호하고 농산물의 생산성과 품질향상에 기여해 왔다. 그러나 일부 농약 성분은 내분비계(endocrine system)에 영향을 줄 수 있다는 가능성이 보고되고 있다(Mnif et al., 2011). 내분비계 영향 물질로 평가할 시에는 단순한 표면적인 관찰보다는 기전에 기반한 시험방법을 적용하여 내분비계 영향 가능성이 있는 물질과 2차적인 영향에 의한 물질인지 구분할 필요가 있다. 이러한 측면에서 *in vitro* 및 *in silico* 기반의 시험법은 동물시험의 대체뿐 아니라 내분비계 영향 가능성을 조기에 탐지할 수 있는 과학적 스크리닝 도구로서 유용하다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (과제번호: RS-2024-00400007)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## Author Information and Contributions

Youmi Jo, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0009-0008-6733-7181>, Writing-original draft preparation, Data analysis and Conducted the experiments.

HaEun Lee, Plant Disease Control Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-9840-7164>, Conducted the experiments and Drafting the introduction part.

Namseok Kim, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-4046-1744>, Data analysis and Review.

Ji-Young Shin, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-3177-161X>, Data Visualization and editing

So-Hye Hong, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-9958-5552>, Data analysis and proofreading.

Si Young Yang, Toxicity and Risk Assessment Division,

National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0009-0000-7308-969X>, Data analysis and Review.

Young-Joo Lim, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Deputy Director, <https://orcid.org/0009-0005-5942-702X>, Review and proofreading.

Soo-Jin Park, Plant Disease Control Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-2522-3185>, Project administration and review.

## 이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

## Literature Cited

- Antonio F. Hernández, Susanne H. Bennekou, Andy Hart, Luc Mohimont, Gerrit Wolterink, 2020. Mechanisms underlying disruptive effects of pesticides on the thyroid function, *Current Opinion in Toxicology*, 19:34-41, doi.org/10.1016/j.cotox.2019.10.003
- Caviola E, Sherf B, 2025. Standard Operation Procedure for the human thyroid hormone receptor alpha(TR $\alpha$ ) and beta(TR $\beta$ ) reporter genes transaction assay measuring agonist activity-version 2. EURL ECVAM. Available online: [https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/ThyroidMethods/6a/Method6a\\_SOP\\_Part2\\_PubsubJRC132776.pdf](https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/ThyroidMethods/6a/Method6a_SOP_Part2_PubsubJRC132776.pdf) (Accessed Nov. 12, 2025)
- Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, et al., 1998. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environ. Health Perspect.* 106(Suppl.1): 11-56. DOI 10.1289/ehp.98106s111
- Debabrata Mahapatra, Jill A. Franzosa, Kyle Roell, Melaine Agnes Kuenemann, Keith A. Houck, et al., 2018. Confirmation of high-throughput screening data and novel mechanistic insights into VDR-xenobiotic interactions by orthogonal assays. *Scientific Reports*, 8, Article number 8883. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27055-3>
- DTU Food. QMRF Documentation, 2018. Available online: <https://qsarmodels.food.dtu.dk/download/QMRF/QMRF.html> (Accessed Oct. 22, 2025)
- EFSA, 2010. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fenoxycarb. *EFSA Journal* 2010;8(12):1779. doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1779
- EFSA, 2017. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bromoxynil (variant evaluated bromoxynil octanoate). *EFSA J.* doi: 10.2903/j.efsa.2017.4790
- ECHA and EFSA, 2018. Guidance for the identification of

- endocrine disruptors in the context of Regulation (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. *EFSA Journal* 2018; 16(6):5311. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5311
- EFSA, 2019. Establishment of cumulative assessment groups of pesticides for their effects on the thyroid. *EFSA J.* 17(9): 5800. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5800.
- EFSA, 2023. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance folpet. *EFSA J.* doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8139
- EFSA, 2024. Specific effects on the thyroid relevant for performing a dietary cumulative risk assessment of pesticide residues: 2024 update. *EFSA J.* 22(3):e8672. DOI: 10.2903/j.efsa.2024.8672
- EPA, 2009. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP); Policies and Procedures for Initial Screening. *Federal Register* 74(71):17560-17579.
- EPA, 2015. EDSP weight of evidence conclusion on the tier 1 screening assays for the list 1 chemicals, Available online: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2012-0859-0024> (Accessed Oct. 22, 2025).
- EPA, 2023. Endocrine Disruptor Screening Program: Near-Term Strategies for Implementation. EPA. Available online: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2023-0474-0005> (Accessed Nov. 11, 2025).
- EPA, 2025. Endocrine Disruptor Screening Program Tier 1 Screening Determinations and Associated Data Evaluation Records. EPA. Available online: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-tier-1-screening-determinations-and> (Accessed Aug. 22, 2025).
- European Union, 2009. Regulation (EU) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC.
- Egalini F, Marinelli L, Rossi M, Motta G, Prencipe N, et al., 2022. Endocrine disrupting chemicals: effects on pituitary, thyroid and adrenal glands. *Endocrine* 78(3):395-405.
- Jugan ML, Levi Y, Blondeau JP, 2010. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. *Biochem. Pharmacol.* 79(7): 939-947.
- Judson R, Houck K, Martin M, Richard AM, Knudsen TB, et al., 2016. Analysis of the effects of cell stress and cytotoxicity on in vitro assay activity across a diverse chemical and assay space. *Toxicological Sciences*, 153(2), 409. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw148>
- Leemans M, Couderq S, Demeneix B, Fini JB, 2019. Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Dec 9;10:743. doi: 10.3389/fendo.2019.00743. PMID: 31920955; PMCID: PMC6915086.
- Liszewska M, Czaja K, Korcz W, Lewinski R, Strucinski P, 2024. Endocrine-disrupting chemicals - pesticide regulatory issues from the EU perspective. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 154:105735. DOI: 10.1016/j.yrtph.2024.105735
- Marty MS, Carney EW, Rowlands JC, 2010. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol. Sci.* 120(Suppl.1):S93-S108. DOI: 10.1093/toxsci/kfq329
- Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, et al. 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Jun;8(6):2265-303. doi: 10.3390/ijerph8062265. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21776230; PMCID: PMC3138025.
- Natalia Ryan, 2017. A User's Guide for Accessing and Interpreting ToxCast Data Available online: <https://www.americanchemistry.com/content/download/6800/file/A-Users-Guide-for-Accessing-and-Interpreting-ToxCast-Data.pdf> (Accessed Nov.11.2025).
- OECD, 2006. Detailed review paper on thyroid hormone disruption assays. OECD Publishing, Paris, France. Available online: [https://www.oecd.org/en/publications/detailed-review-paper-on-thyroid-hormone-disruption-assays\\_a17a1437-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/detailed-review-paper-on-thyroid-hormone-disruption-assays_a17a1437-en.html) (Accessed Nov.11.2025).
- OECD, 2013. OECD TG 231 Amphibian metamorphosis assay. OECD Publishing, Paris, France. Available online: [https://www.oecd.org/en/publications/test-no-231-amphibian-metamorphosis-assay\\_9789264076242-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/test-no-231-amphibian-metamorphosis-assay_9789264076242-en.html) (Accessed Feb.17.2025).
- OECD, 2016a. OECD TG 421 Reproduction/developmental toxicity screening test. OECD Publishing, Paris, France. Available online: [http://oecd.org/en/publications/test-no-421-reproduction-developmental-toxicity-screening-test\\_9789264264380-en.html](http://oecd.org/en/publications/test-no-421-reproduction-developmental-toxicity-screening-test_9789264264380-en.html) (Accessed Feb.17.2025).
- OECD, 2016b. OECD TG 422 Combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test. OECD Publishing, Paris, France. Available online: [http://oecd.org/en/publications/test-no-422-combined-repeated-dose-toxicity-study-with-the-reproduction-developmental-toxicity-screening-st\\_9789264264403-en.html](http://oecd.org/en/publications/test-no-422-combined-repeated-dose-toxicity-study-with-the-reproduction-developmental-toxicity-screening-st_9789264264403-en.html) (Accessed Feb.17.2025).
- OECD, 2018a. OECD TG 408 Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. OECD Publishing, Paris, France. Available online: [http://oecd.org/en/publications/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents\\_9789264070707-en.html](http://oecd.org/en/publications/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en.html) (Accessed Feb.17.2025).
- OECD, 2018b. OECD TG 414 Prenatal developmental toxicity study. OECD Publishing, Paris, France. Available online: [https://www.oecd.org/en/publications/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study\\_9789264070820-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study_9789264070820-en.html) (Accessed Feb.17.2025).
- OECD, 2018c. OECD TG 443 Extended one-generation reproductive toxicity study. OECD Publishing, Paris, France. Available online: [http://oecd.org/en/publications/test-no-443-extended-one-generation-reproductive-toxicity-study\\_9789264185371-en.html](http://oecd.org/en/publications/test-no-443-extended-one-generation-reproductive-toxicity-study_9789264185371-en.html) (Accessed Feb.17.2025).
- OECD, 2018d. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption.

- OECD Series on Testing and Assessment No. 150. OECD Publishing, Paris, France. Available online: [https://www.oecd.org/en/publications/guidance-document-on-standardised-test-guidelines-for-evaluating-chemicals-for-endocrine-disruption-2nd-edition\\_9789264304741-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/guidance-document-on-standardised-test-guidelines-for-evaluating-chemicals-for-endocrine-disruption-2nd-edition_9789264304741-en.html) (Accessed Nov.11.2025).
- OECD, 2024. Thyroid in vitro methods: assessment reports by the thyroid disruption methods expert group. Reports assessing the validation status of assays from the EU-NETVAL activities. Available online: [http://oecd.org/en/publications/thyroid-in-vitro-methods-assessment-reports-by-the-thyroid-disruption-methods-expert-group\\_3786c75f-en.html](http://oecd.org/en/publications/thyroid-in-vitro-methods-assessment-reports-by-the-thyroid-disruption-methods-expert-group_3786c75f-en.html) (Accessed Oct.22. 2025).
- VEGA Hub. A Tutorial for an Adequate Interpretation. Available at: <https://www.vegahub.eu/download/vega-interpretation/> (Accessed Nov.11.2025).
- World Health Organization/International Programme on Chemical Safety (WHO/IPCS), 2002. Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors. WHO, Geneva, Switzerland. WHO/PCS/EDC/02.2.
- Yao DW, Luo J, He QY, Wu M, Shi HB, et al., 2016. Hyroid hormone responsive (THRSP) promotes the synthesis of medium-chain fatty acids in goat mammary epithelial cells, *Journal of Dairy Science*, 99(4):3124-3133, doi.org/10.3168/jds.2015-1063
- Zgheib E, Kim MJ, Jornod F, Bernal K, Tomkiewicz C, et al., 2021. Identification of non-validated endocrine disrupting chemical characterization methods by screening of the literature using artificial intelligence and by database exploration. *Environ. Int.* 154:106574.

## 첨단독성시험(New Approach Methodologies, NAMs) 결과를 활용한 농약의 갑상선 영향 연구

조유미<sup>1,†</sup> · 이하은<sup>2,†</sup> · 김남석<sup>1</sup> · 신지영<sup>1</sup> · 홍소혜<sup>1</sup> · 양시영<sup>1</sup> · 임영주<sup>1</sup> · 박수진<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과,

<sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 식물병방제과

**요약** 내분비계 영향 물질이 유발하는 갑상선 축(HPT) 교란은 발달·대사에 중대한 영향을 미친다. 본 연구에서는 국외에서 갑상선 영향 우려가 제기된 농약 3종인 Folpet, Bromoxynil, Fenoxycarb을 대상으로 세포기반 갑상선 호르몬 수용체(TR $\alpha$ / $\beta$ ) 리포터 시험, EPA ToxCast/Tox21 HTS 데이터 해석, *in silico* QSAR 예측을 통합하여 갑상선 영향 가능성을 평가하였다. 세 농약에 대해서 TR $\alpha$ / $\beta$  agonist 활성화는 0.1% 내외로 유의성이 확인되지 않았다. 갑상선 호르몬 수용체 활성화 실험은 갑상선 영향 작용 기전 중 일부만 반영하므로 보완적으로 HTS 데이터 및 QSAR 결과를 활용하여 다른 기전 영향을 확인하였다. HTS에서는 세 농약이 각 해당하는 기전에서 활성(active)으로 확인되었으나 추가 검증이 필요한 Bromoxynil을 제외하면 대부분 세포독성 발생 농도에서의 비특이적 활성으로 판단되었다. QSAR 모델에서는 세 농약 모두 비활성(negative)으로 예측되었다. 또한 문헌 기반의 동물시험 결과와 비교한 바, 관찰된 결과는 직접적인 갑상선 영향보다는 고농도 시험농약 노출 또는 다른 독성에 따른 2차적인 영향으로 판단되었으며 이는 *in vitro*와 *in silico* 결과와 일관된 경향을 보였다. 본 연구에서는 *in vitro* 및 *in silico* 시험 결과를 통합적으로 활용함으로써 갑상선 영향 가능성을 다각적으로 평가하였으며 향후 다양한 농약에 대하여 내분비계 교란 물질의 영향과 작용기전을 스크리닝 할 수 있는 데 활용할 수 있다고 판단되었다.

**색인어:** 내분비계교란물질, 농약, 갑상선