

한국산 어류에서 내분비계장애물질 위해성 평가에 대한 연구

계 명 찬

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

1. 서 론

환경오염물질의 일종인 내분비계장애물질(endocrine disrupter, EDC)은 지구온난화, 오존층의 파괴와 함께 인류의 미래를 위협하는 3대 위협의 하나이다. 일명 환경호르몬에 의한 생식기능을 중심으로 한 내분비계 교란현상이 전세계적으로 확인되고 대중들에게 알려지자 엄청난 충격을 불러일으켰다. EDC에 관한 연구는 환경 내 EDC의 오염실태를 파악하고 그 위해성을 인간의 보건과 생태학적 견지에서 추적 규명하기 위해 활발히 진행되어 왔다. 이러한 연구는 이들 EDC에 의한 생체의 반응을 정량적으로 규명하여 궁극적으로 적절한 관리를 위한 안전관리 기준을 설정하는데 있다. 이를 위해 기본적으로는 독성학적 접근을 통해 잠재적 위험을 내포하는 물질을 찾고 그 인체에서 위험의 강도를 규명하고 생산 및 사용의 허용기준을 마련하고자 하였다. 많은 연구가 다양한 실험 포유류를 대상으로 유전, 생식, 면역, 신경, 발생 및 기형, 암독성 평가부분에 집중되어 왔다. 한편 생태계에 존재하는 동물들을 대상으로 생식, 내분비기능의 교란을 규명하기 위한 연구가 진행되었다. 지난 십 수 년간 EDCs 가운데 PAH, dioxin, PCB, TBT, 및 nonylphenol, octylphenol 등의 polyphenol류의 오염정도가 환경매체 및 생체 조직에서 모니터링 되었다. 한국은 빠른 속도로 공업화가 진행되는 과정에서 국토가 광범위하게 EDC를 포함한 공해물질로 오염되었다. 현재도 플라스틱 제조과정, 쓰레기소각장, 하수종말처리장 등에서 bisphenol A, dioxin, octylphenol 및 nonylphenol 등 내분비계장애물질이 다량으로 방출되고 있으며 한국의 수서생태계를 구성하는 내륙의 강과 호수, 강하구, 연안 지역에서 도시화에 따른 활동인구 및 산업활동의 증가로 다양한 무기, 유기물에 의한 오염이 가속화 되고 있다 (Shim *et al.* 1998; Kang *et al.* 1999; Kaminuma *et al.* 2000; Choi *et al.* 2001; Jeong *et al.* 2001; Khim *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001; Hong *et al.* 2002; Im *et al.* 2002; Martin *et al.* 2003; Monirith *et al.* 2003). 따라서 이에 따른 생태계 특히 수서생태계의 변화는 필연적 현상이다. 이미 많은 종류의 야생 척추동물들이 서식지의 감소와 오염으로 인해 그 수가 줄어들었으며 멸종위기에 처한 동물들도 많으며 EDC는 이러한 현상의 보이지 않는 원인으로 추측된다.

2. EDC 위해성 평가

1) EDC와 어류

어류는 생태계 먹이사슬에서 중상위 단계의 소비자이며 난, 치자어, 성어 단계에서 인간을 비롯한 보다 상위의 포식자들에게 중요한 먹이자원이다. 따라서 어류의 다양성 및 군집구조 및 크기는 수생 생태계의 안정성에 중요한 인자이다. 많은 종류의 EDC가 다양한 어류에서 생식을 위협할 수 있는 것으로 보고 되었으며 특히 수환경에서 EDC의 오염을 측정할 수 있는 biomarker로서의 효용성으로 인해 어류는 내분비계장애물질에 의한 생태 위해성 평가연구의 주요 소재로 다뤄져 왔다. 그러나 어류의 생물학적 특징상 각 EDC 물질별로 개체의 종, 성별, 발생시기에 따라 EDC에 의한 생체위해성의 정도가 다르게 나타날 뿐 아니라 어류의 지리적 분포 특성상 다양한 지역에서 다양한 어류를 대상으로 EDC에 대한 노출 여부 및 생체위해성을 평가하는 것이 중요한 문제로 대두되었다.

현재까지 어류에서의 내분비계 장애물질 연구는 주로 송어, 잉어, 제브라피시, 송사리, 넙치, 틸라피아 등의 실험 또는 양식어종을 대상으로 미국과 유럽, 일본 등에서 많이 연구되어져 왔으나 담수와 해수에 서식하는 야생어류에 대한 연구는 상대적으로 미진한 편이었다. EDC의 오염 문제가 일부 G7국가에 국한된 문제가 아닐 뿐 아니라 중국과 한국 등 환경관리가 구조적으로 취약한 후발개도국에서 중요한 환경이슈로 대두되었고 따라서 다양한 연구 노력이 경주되고 있다. 그러나 잉어, 붕어, 누치, 풀망둑, 버들치, 넙치 등 여전히 극히 제한된 야생 어종에서 EDC의 위해성을 평가하려는 시도가 있을 뿐이다(계, 2003; 심 & 계, 2003).

2) Biomarker를 이용한 어류 EDC 위해성 평가 연구

최근 분자생물학적 연구기법의 발달로 어류의 생식내분비 기능과 관련된 표현형에 영향을 미칠 수 있는 미량 EDC의 영향을 유전자발현 수준에서 평가하는 것이 가능해졌다. 그 대상 유전자로는 난황전구단백질인 vitellogenin과 요막단백질인 choriogenin 등이 대표적이다. 이들 단백질을 암호화하고 있는 유전자는 estrogen에 의해 전사가 조절된다. 따라서 xenoestrogen에 수컷이 노출될 경우 이 유전자들의 발현이 유도된다. 이들 유전자의 발현 정도를 수컷 또는 유어의 간조직 또는 간세포 배양체에서 확인함으로써 EDC가운데 xenoestrogen으로 추정되는 물질의 규명과 그 위해성의 정도를 정량적으로 평가할 수 있다. 또한 특정 수컷에서 채집한 어류에서 이들 유전자의 발현을 조사함으로써 이들이 서식하는 수환경 내 EDC의 오염여부를 판독할 수 있게 되었다. 한편 dioxin같은 organochlorine compounds 및 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) 계열의 독성물질은 arylhydrocarbon receptor를 경유하며 하위 신호전달과정에서 hepatic cytochrome P450 (CYP1A) 유전자를 활성화시킨다. 이들 유전자들은 상기 물질에 처리되었을 때 발현량이 크게 증가하므로 따라서 어류에서 이들 유전자의 발현을 추적함으로써 PAH 등의 독성물질에 의한 어류의 노출을 모니터링 할 수 있게 되었다. 이외에도 최근 널리 이용되기 시작한 DNA chip 또는 protein chip을 이용한 유전자발현의 대용량 검색(high throughput

screening)법을 이용하여 EDC를 비롯한 특정 환경오염물질에 대한 노출 여부를 유전자 수준에서 대량으로 검색하려는 유전독성학적연구(toxicogenomics)가 시도되고 있다.

3) 어류의 xenoestrogen 노출과 biomarker

EDC 가운데 에스트로젠과 유사한 효과를 보이는 물질들이 있다. 식물성의 phytoestrogen은 주로 음식을 통해 섭취되며 에스트로젠의 효과를 나타내며 합성물로 주로 환경 오염물질에서 기원된 것을 환경에스트로젠(xenoestrogen)으로 정의된다. 환경에스트로젠들은 다양한 척추동물에서 여성호르몬과 유사한 효과를 나타낸다(Anderson *et al.* 1999; Gronen *et al.* 1999; Ratnasabapathy *et al.* 1997; Hess *et al.* 1997). Xenoestrogen으로 구분되는 EDC물질에 의한 어류의 생식교란 현상을 검색하려는 연구가 매우 활발하였다(계와한 2000). 지금까지 제브라피쉬, 무지개송어, 송사리(Japanese medaka, Gronen *et al.* 1999), 잉어(common carp, Harushisa *et al.* 2003), 미꾸라지, 넙치, 틸라피아, 해그피쉬, 스위드피쉬 등 몇몇 양식 또는 실험어종에서 estrogen에 의해 발현이 유도되는 난황전구단백질(vitellogenin, Vg), 요막단백질(choriogenin) 등 몇몇 생물학적표시유전자(biomarker gene)들이 동정되었으며, 개체수준(liver tissue) 또는 조직배양(liver cell culture) 수준에서 이들 biomarker 유전자의 발현을 RNA 및 단백질 수준에서 검출함으로써 새로운 xenoestrogen의 검색 수단을 개발하기 위한 연구 및 내분비계 장애효과를 유발하는 최소한의 농도 등 적절한 안전기준을 제시하려는 연구들이 진행되었다(Heppell *et al.* 1995; Hennies *et al.* 2003; Rotchell & Ostrander 2003). 한편 최근에는 담수 및 해양 환경 내에 서식하는 야생 어류를 대상으로 지역적 특성에 따른 수환경 내의 내분비계 장애물질 오염을 추적하려는 연구가 활발하여 현지 채집된 어류 또는 현장의 물 또는 침전물을 처리한 송어, 잉어, 넙치, 모래망둑, 뱀장어 등에서 RT-PCR 혹은 ELISA법 등으로 Vg의 발현을 분석하여 이들의 서식 환경에서 xenoestrogen의 오염 여부를 확인하고자하는 연구가 활발하다. 반면 한국 담수 및 해수에 서식하는 야생 어류를 대상으로 xenoestrogen 오염추적을 위한 biomarker는 누치, 풀망둑, 버들치, 송사리 등 일부 제한된 어류에서 시도되고 있으나 대부분은 항체에 의한 것이며 유전자 염기서열에 기초한 분자생물학적 biomarker의 개발은 취약한 편이다.

어류의 경우 환경에스트로젠의 여성호르몬 유사효과 발현에서 종특이성은 없는 것으로 보고되었다(Sumpter and Jobling 1995). 일부 EDC가 어류의 수컷에서 Vg 형성을 유발하는 것이 확인되면서(Sumpter 1995; Wahli *et al.* 1998; Gronen *et al.* 1999) Vg 형성은 수환경내에 에스트로젠 유사효과를 갖는 물질의 오염을 나타내는 생물학적지표로 이용되고 있다(Sumpter and Jobling 1995). 이때 수컷의 간 또는 간세포의 일차배양계, 혈액, 또는 생식소에서 일어나는 Vg의 발현을 RNA 및 단백질 수준에서 확인하기 위해 역전사중합반응(RT-PCR) 또는 정제된 Vg 항원으로부터 제조된 항체를 이용하여 Vg 단백질의 존재를 확인함으로써 여성호르몬과 유사한 EDC의 환경내 오염을 추적하는 도구로 활용되고 있다(Heppell *et al.* 1995).

3. 어류 Biomarker 개발 전략

1) 어류에서 EDCs 위해성 추적 연구를 위한 모델

국내의 수서생태계에서 환경호르몬의 위해성 평가를 위해서는 궁극적으로는 전체 어류에 대한 평가가 필요하겠으나 엄청난 연구 투자를 필요로 할 것이므로 분류군 별로 대표성이 있는 모델어종을 선발하여 다양한 환경호르몬에 대한 영향을 검출할 수 있는 평가법을 표준화하고 이에 근거하여 감수성, 야외에서 채집한 개체의 오염여부를 판정할 수 있을 것이다. 모델 어류는 국내 분포의 광범위성, 야외채집의 용이성, 실험실 사육의 용이성에 관련된 생태학적 특성과 생식내분비학적 특징에 대한 기초생물학적 연구정보가 축적되어 있는 종들이 적합할 것이다. 현재까지 진행해온 결과에 의하면 이들 대부분의 야생 어류들이 계절적으로 번식하기 때문에 이들을 대상으로 환경호르몬의 위해성 평가를 위한 생물학적 지표로서 수컷에서 Vg 생성 여부를 조사할 경우 조사시기 및 위도에 따라 동일한 종에서도 biomarker 발현의 정도가 달리 검출된다는 것이다. 따라서 이러한 특성에 대한 고려가 중요하다.

2) 실험법 선택

① 단백질항원의 검출

ELISA법: 대상어의 vitellogenin 등에 대한 항체를 이용하여 항원-항체 반응을 이용하여 특정 biomarker 유전자의 발현을 단백질 수준에서 추적 정량평가 할 수 있는 방법이다. 그러나 근본적으로 항체를 필요로 하고 항원에 대한 항체의 높은 특이성을 요구한다. Biomarker 단백질의 발현과 체내 동태를 고려할 때 과거 xenoestrogen에 노출된 경험이 있는 어류의 수컷에서 간, 간세포, 혈액, 생식소를 대상으로 사용 가능한 방법이다. 현재 다양한 어류에서 vitellogeni 등을 검색할 수 있는 ELISA kit가 상용화 되어 있으나 아직 검증되지 않은 특정 야생어류에 적용하는데 난점이 있다.

조직화학적 검색법: 간, 간세포, 생식소 조직 절편을 이용하여 Biomaerker 단백질의 발현을 검색하고자할 때 사용 가능한 방법이다. 정량적 분석이 불가능한 단점을 갖는다. 특이항체를 필요로 하며 아직 검증되지 않은 특정 야생어류에 적용하는데 난점이 있다.

② Biomarker gene mRNA 검출

Nothern Blot: 가장 확실한 biomarker 유전자 발현의 추적법이다. 그러나 다량의 시료를 분석하거나 실험자간에 동일한 조건을 구사하는데 난점이 있어 필드에 적용하기는 어렵다. Biomaerker 유전자의 mRNA의 발현과 세포 내 동태를 고려할 때 단백질보다 신속하게 유도되지만 빨리 소멸되므로 xenoestrogen에 대한 급성 및 아급성 노출 후의 반응을 추적할 때 이용되며 어류의 수컷의 간에서 사용이 가능하다.

PCR법: RT-PCR법을 이용하여 estrogenic 화합물에 의해 수컷에서 미량으로 발현되는 biomarker 유전자의 발현을 추적할 수 있다. 특정 화합물의 투여 후 간조직을 절취하여 RNA를 추출한 후 역전사반응을 통해 cDNA를 합성하고 그 종특이적 biomarker gene의

cDNA 염기서열에 근거한 primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하는 RT-PCR 방법이다. 그러나 여전히 정량적 평가를 위해서는 정교한 PCR법의 확립이 필요하며 반드시 house keeping gene을 이용하여 상대적인 발현량을 normalize한 후 이용하여야만 정량적 평가가 가능하다.

3) Biomarker를 이용한 xenoestrogen의 노출 평가의 유의점

① 계절적 적응

다양한 경골어류에서 에스트로젠 처리에 따른 Vg 발현의 유도는 어종에 따라 수온과 번식계절의 영향을 받는 것으로 알려졌다(Atlantic salmon, Korsgaard *et al.* 1986; carp, Hernandez *et al.* 1992; trout, Mackay and Lazier 1993). Vg 발현을 위해서는 간조직에서 estrogen 수용체의 발현이 선행되어야 하며 비번식기 어류에서 간조직내의 estrogen 수용체의 발현이 매우 낮아 estrogen 처리 시에도 Vg는 유도되지 않는다. 뱀장어의 간세포 일차배양체에서는 growth hormone과 prolactin이 estrogen에 의한 Vg 유도에 필요한 것으로 보고되었다(Kwon and Mugiya 1994). 따라서 계절적으로 변동하는 뇌-생식소 축 상에 작용하는 내분비호르몬 변동이 난황형성기에 estrogen의 감수성을 담보하는 것으로 사료된다. 실제로 한국산 풀망둑의 경우 암컷의 생식소지수(gonadosomatic index)는 11월부터 서서히 증가하여 3월 말에 최고에 달한다(계 2002). 따라서 난황형성기로 estrogen에 대한 감수성 즉, estrogen 수용체의 발현이 일어나는 시기인 동계에 수컷을 사용하여야 Vg biomarker 발현을 확인할 수 있을 것이다. 수컷의 번식주기가 암컷과 동기화되었다는 것을 전제로 할 때 수컷에서 에스트로젠 또는 xenoestrogen에 의해 Vg mRNA 유도를 확인하고자 할 때는 암컷의 난황형성기로 수컷에서도 estrogen 감수성이 유지되는 동계에 채집한 개체를 이용하여 Vg 발현을 검사하는 것이 타당할 것이다.

② 암수간의 차이

Estrogen을 처리하지 않은 수컷에서 확인되는 Vg의 발현량은 결코 무시할 수 있는 정도가 아니다. 이처럼 수컷에서 Vg가 발현되는 이유는 수컷 체내에 존재하는 estrogen 때문으로 추정된다. 비록 수컷이라도 혈중에는 미량의 estrogen이 존재하며 이들은 spermatogonial stem cell의 증식을 촉진하는 등의 정상적인 정자형성에 중요한 역할이 있다(Hess *et al.* 1997; Miura *et al.* 1999). 또한 척추동물 수컷의 정소 뿐 아니라 뇌조직에도 testosterone을 estrogen으로 전환하는 aromatase의 발현이 확인된다(Schlinger *et al.* 1992; Nitta *et al.* 1993). 따라서 간 조직에서 estrogen 수용체를 발현할 경우 미량의 estrogen에 의해 Vg 전사가 가능하며 RT-PCR과 같이 민감한 검출방법을 사용하게 되면 미량의 Vg mRNA의 존재를 확인할 수 있을 것이다. 따라서 미량의 Vg mRNA가 발현되었다고 해서 사용된 수컷 개체가 xenoestrogen에 의해 오염되었다고 단정하기는 어렵다. 외부로부터 estrogen 또는 xenoestrogen을 투여한 경우 Vg 전사체는 단백질로 전환될 뿐 아니라 정소 조직에 축적된다(Folmar *et al.* 2001). 그러나 estrogen을 투여하지 않은 간조직의 경우에도 Vg mRNA의 발현이 미량 검출되므로 xenoestrogen에 의한 오염에 대한 명확한 결론은

수컷 체내에 존재하는 생리적 농도의 estrogen에 의한 Vg mRNA의 발현정도 및 생성된 Vg 단백질의 반감기 등 체내 동태에 대한 정보에 기초하여야 할 것이다. RT-PCR 등을 이용한 간조직에서의 Vg mRNA의 검출은 ELISA법을 이용한 혈중 Vg 단백질의 검출보다 예민하다. 그러나 Vg mRNA는 estrogen에 대해 노출된 후 단기간에만 검출되는 반면 단백질은 이 보다 더 오랜 기간동안 검출된다(Hemmer *et al.* 2002). 따라서 대상 어류의 서식활동범위 및 전체 서식지에서의 오염도의 지역적 편차 등이 Vg mRNA 발현에 기초한 xenoestrogen 오염여부에 대한 해석에 고려되어야 할 것이다.

③ In vitro 검사법의 제한사항

Biomarker mRNA의 RT-PCR 검출법은 liver cell primary culture 등에 적용하여 잠재적인 estrogen 활성을 갖는 물질의 검색에 이용될 수 있다. 어류의 Vg 발현을 이용한 estrogen활성의 검출은 in vivo 및 in vitro 법이 개발되어 이용되고 있지만 대사경로를 통해 활성화된 후 estrogenic 활성을 보이는 물질의 검색에는 적합하지 않으며, proestrogen은 검출하지 못하며, antiestrogen의 검출 감도는 미약하다. 또한 전신적으로 나타날 수 있는 생리적 변화에 대한 정보는 제한된다. 또한 in vitro assay는 in vivo에서 관찰되는 신호의 증폭이 원활하지 않으므로 estrogen 활성의 검출에 둔감한 특징을 갖는다(Folmar *et al.* 2002). 따라서 in vitro VTG 발현에 기초한 특정 물질의 estrogen 활성화에 대한 시험법은 과소평가될 위험이 있으므로 in vivo에서의 결과와 반드시 함께 비교되어야 할 것이다.

4. 전 망

1) 연구개발 전망

수환경에서 내분비계 장애물질에 대한 위해성 평가의 중요성이 날로 증대되고 있다. 세계 각국에서는 자국의 수환경에 서식하는 어종에 대한 내분비계 장애물질 위해성을 평가하기 위한 biomarker 활용연구가 강화되고 있다. 향후 bisphenol, nonylphenol 등 이미 다양한 어류에서 Vg 발현을 유도하는 것으로 알려진 다양한 외인성 estrogen에 의한 영향을 확인하기 위해서는 물질 별로 투여 농도-발현량 관계에 근거한 구체적인 기준의 설정에 관한 연구와 함께 다양한 어류들을 대상으로 다양한 biomarker gene의 발굴과 xenoestrogen을 포함한 내분비계 장애물질 검색을 위한 표준화 연구가 진행될 전망이다.

2) 학문적 발전전망

EDC 위해성 평가 모델어류 및 biomarker 유전자 등의 발굴을 통해 한국의 수서 환경내 EDC 오염 모니터링 기술이 확보될 전망이다. 이 기술이 확보된다면 수서 환경오염의 분자생물학적 수준에서의 조기 경보체제를 확립할 수 있을 것이다. 독성효과의 대용량 검색에 요구되는 on chip analysis 기술의 접목을 통해 EDC 등 환경오염물질에 의한 생태독성 평가 biomarker 유전자은행의 설립이 예상된다. 특정어류에서 확인된 정보는 compara-

tive toxicogenomics로 확립될 것이다. 궁극적으로 축적된 연구정보는 systems biology 접근을 통해 독성 메커니즘의 cascade를 규명을 통해 방호수단의 개발로 이어질 것이다.

3) 관련기술의 상업성

EDEC 위해성을 평가하기 위한 biomarker 관련 연구개발 상품은 실험동물 개발 및 단백질 측정키트, biomarker 유전체확보 및 이용기술 등을 포함한다. R&D 투자는 아직까지는 주로 정부주도로 이뤄지고 있으나 향후 민간에서의 개발이 가속화되고 있으며 확대될 전망이다. 이 기술과 관련된 상품만으로 국한시킨 관련 시장의 세계적인 교역규모는 EU, 미국, 일본등에서 이미 연간 수백만 달러에 이르는 것으로 추산된다. 따라서 기초과학연구 분야이면서도 연구결과의 실용성 측면에서 충분한 상업적 부가가치가 예상되는 분야이다. 환경오염물질의 위해성의 평가 기술은 아직 구미 선진국에서도 시작하고 있는 기술로써 환경기술 경쟁력 차원에서 한국에 적합한 고부가가치 연구분야로 생각된다.

사 사

본 연구는 학술진흥재단 중점연구소 프로그램(KRF-2002-005-C00022)의 지원에 의해 수행되었음.

인용문헌

- 계명찬. 2002. 폴망둑(*Synechogobius hastus*)의 난황형성과 난황전구 단백질. 한국육수학회 춘계학술대회 초록집 P. xx.
- 계명찬, 한명수, 2000. 척추동물의 난황형성과 환경에스트로젠. 한국환경생물학회지 18: 291-298.
- 심대용, 계명찬, 2003. 폴망둑(*Synechogobius hastus*) 난황전구단백질의 RT-PCR 검출법. 환경생물학회 춘계학술대회 초록집 P. 26.
- Andersson PL, Blom A, Johannisson A, Pesonen M, Tysklind M, Berg AH, Olsson P, Norrgren L, 1999. Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: in vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37: 145-150.
- Choi JW, Matsuda M, Kawano M, Min BY, Wakimoto T. 2001. Accumulation profiles of persistent organochlorines in waterbirds from an estuary in Korea. Arch Environ Contam Toxicol. 41: 353-363.
- Folmar LC, Gardner GR, Schreiber MP, Magliulo-Cepriano L, Mills LJ, Zaroogian G, Gutjahr-Gobell R, Haebler R, Horowitz DB, Denslow ND. 2001. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). Aquat Toxicol. 51: 431-441.
- Folmar LC, Hemmer MJ, Denslow ND, Kroll K, Chen J, Cheek A, Richman H, Meredith H, Grau EG. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol,

- nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat Toxicol.* 60: 101–110.
- Gronen S, Denslow ND, Manning S, Barnes S, Barnes D, Brouwer M. 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health Perspect.* 107: 385–390.
- Haruhisa F, Yumi F, Takayuki T, Naoshi H, Craig VS, Akihiko H, 2003. Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 134: 615–23.
- Hemmer MJ, Bowman CJ, Hemmer BL, Friedman SD, Marcovich D, Kroll KJ, Denslow ND. 2002. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 beta-estradiol and p-nonylphenol. *Aquat Toxicol.* 58: 99–112.
- Hennies M, Wiesmann M, Allner B, Sauerwein H, 2003. Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. *The Science of the Total Environment* 309: 93–103.
- Hernandez I, Poblete A, Amthauer R, Pessot R, Krauskopf M (1992) Effect of seasonal acclimatization on estrogen-induced vitellogenesis and on the hepatic estrogen receptors in the male carp. *Biochem Int* 28: 559–567.
- Heppell SA, Denslow ND, Folmar LC, Sullivan CV, 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect. Suppl* 7: 9–15.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB, 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390: 509–512.
- Hong HK, Takahashi S, Min BY, Tanabe S. 2002. Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. *Environ Pollut.* 117: 475–486.
- Im SH, Kannan K, Matsuda M, Giesy JP, Wakimoto T. 2002. Sources and distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in sediments from Masan Bay, Korea. *Environ Toxicol Chem.* 21: 245–252.
- Jeong GH, Kim HJ, Joo YJ, Kim YB, So HY. 2001. Distribution characteristics of PCBs in the sediments of the lower Nakdong River, Korea. *Chemosphere.* 44: 1403–1411.
- Kaminuma T, Ohtake C, Kabuyama N. 2000. Distribution and origin of plastic resin pellets as environmental pollutants at the East China Sea area. *Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* 118: 90–99.
- Kang SG, Choi MS, Oh IS, Wright DA, Koh CH. 1999. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. *Sci Total Environ.* 234: 127–137.
- Khim JS, Lee KT, Kannan K, Villeneuve DL, Giesy JP, Koh CH. 2001. Trace organic contaminants in sediment and water from Ulsan Bay and its vicinity, Korea. *Arch Environ Contam Toxicol.* 40: 141–150.
- Korsgaard B, Mommsen TP, Saunders RL (1986) The effect of temperature on the vitellogenic response in Atlantic salmon post-smolts (*Salmo salar*). *Gen Comp Endocrinol* 62: 193–201
- Kwon HC, Mugiya Y, 1994. Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93: 51–60.
- Lee KT, Tanabe S, Koh CH. 2001. Contamination of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments

- from Kyeonggi Bay and nearby areas, Korea. *Mar Pollut Bull.* 42: 273–279.
- Mackay ME, Lazier CB. 1993. Estrogen responsiveness of vitellogenin gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kept at different temperatures. *Gen Comp Endocrinol.* 89: 255–266.
- Martin M, Richardson BJ, Lam PK. 2003. Harmonisation of polychlorinated biphenyl (PCB) analyses for ecotoxicological interpretations of southeast Asian environmental media: what's the problem? *Mar Pollut Bull.* 46: 159–170.
- Miura T, Miura C, Ohta T, Nader MR, Todo T, Yamauchi K. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 230–234.
- Monirith I, Ueno D, Takahashi S, Nakata H, Sudaryanto A, Subramanian A, Karuppiyah S, Ismail A, Mughtar M, Zheng J, Richardson BJ, Prudente M, Hue ND, Tana TS, Tkalin AV, Tanabe S. 2003. Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Mar Pollut Bull.* 46: 281–300.
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM. 1993. Germ cells of the mouse testis express p450 aromatase. *Endocrinology* 132: 1396–1401
- Ratnasabapathy R, Tom M, Post C. 1997. Modulation of the hepatic expression of the estrogen-regulated mRNA stabilizing factor by estrogenic and antiestrogenic nonsteroidal xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* 53: 1425–1434.
- Rotchell JM, Ostrander GK. 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 6: 453–96.
- Schlinger BA, Arnold AP. 1992. Circulating estrogen in a male songbird originate in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7650–7653.
- Shim WJ, Oh JR, Kahng SH, Shim JH, Lee SH. 1998. Accumulation of tributyl- and triphenyltin compounds in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, from the Chinhae Bay System, Korea. *Arch Environ Contam Toxicol.* 35: 41–47.
- Sumpter JP, 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol. Lett.* 82–83: 737–742.
- Sumpter JP, Jobling S, 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health. Perspect.* 103 Suppl 7: 173–178.