

송사리의 Partial life-cycle (PLC) test를 이용한 내분비계 장애물질 검색 및 시험법 확립

Establishment of Screening and Testing Methods on Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) with Partial life-cycle (PLC) test of Japanese medaka

서진원

한국수자원공사 수자원연구원 호소환경연구소

연구배경

최근 몇 년간 세계적 관심은 수중생태계에서 생체 내 스테로이드 호르몬과 호르몬적인 영향을 야기하는 다른 화학물질들의 잠재적인 영향에 초점을 맞추어왔다 (Seki et al. 2003). 특히 이러한 영향 중 야생동물에 있어 성적 발달과 생식에 대한 영향이 많은 관심을 일으켰지만 현존하는 *in vivo* 시험법 중 어느 것도 이러한 내분비계 장애물질에 대한 검색법 및 시험법이 충분치 않았다. 이와 같은 이유로 내분비계 장애물질 시험에 대한 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, Paris, France) 위원회에서 3단계 (three-tiered) 시험계획안을 동의하고 각각의 단계에 대한 *in vivo* 검색법 및 시험법 시리즈를 제안하였다. 그 중 partial life-cycle (PLC) test는 어류의 수정란 (embryo) 단계부터 성체가 되는 단계 때까지 시험물질에 노출시켜 야기될 수 있는 영향을 여러 가지 Endpoints를 가지고 비교분석하는 방법이다.

일본산 송사리 (Japanese medaka, *Oryzias latipes*)는 부화 후 6~8주내에 생식이 가능한 성체가 되는 짧은 성숙기간 때문에 생활사 독성을 평가하기 위한 아주 좋은 공시생물임에 틀림없다. 특히 이 송사리는 최적의 조건에서 매일 산란할 수 있기 때문에 시험생물 확보에 큰 어려움이 없어 많은 독성연구에 사용되어 왔다. 현재 OECD 시험법 중 어류에 관한 독성시험에 중요한 공시생물중 하나로 자리매김 함으로서 기본 생활사 및 습성, 먹이 등 많이 알려져 있고, 시험법 210과 212에서 최상의 시험조건 및 기본생존율, 부화율에 대해서도 언급되고 있다 (Yokota 2000; Kang et al 2002).

최근 내분비계 장애물질에 대한 연구가 활발히 진행되면서 많은 시험물질들이 연구되고 있으며 환경 중에 노출되어 있는 농도와 관련하여 실험실에서 시험어종을 이용하여 농도별 영향을 살펴보고 있다. 많은 화학물질들 중 가장 많은 연구가 되고 있는 물질은 비스페놀 A (Bisphenol A, BPA) 와 노닐페놀 (Nonylphenol, NP) 이다. 비스페놀 A (2,2-bis[4-hydroxyphenyl]propane)는 폴리카보네이트 (Polycarbonates)와 에폭시 레진 (Epoxy resins) 등의 생산에 있어 중간산물로서, 일본에서만 1990년 후반 매년 200,000톤 이상 생산되며 환경으로 방출되는 주된 공급처는 비스페놀 A를 생산하거나 위에서 언급한 최종산물을 생산하는 공장으로부터 나오는 배출수이다 (Yokota 2000). 이렇게 방출된 비스페놀 A는 수용성이

높아 물에 녹거나 일부 토양에 흡착된다. 노닐페놀은 알킬페놀 (Alkylphenol)의 일종으로 많은 isomer를 가지고 있다. 계면 활성제나 합성세제의 원료로 많이 쓰이는 노닐페놀은 일본 두개의 공장에서 1990년 후반 매년 15,000톤 이상씩 생산되고 있다. 따라서 이 두 물질이 수중생태계로 끊임없이 배출되고 있는 실정에서 어류에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구는 일본을 비롯한 유럽, 미국에서 많이 진행되고 있다.

이 연구의 목적은 환경 중 검출되는 비스페놀 A와 노닐페놀이 송사리에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 수정란 단계부터 부화 후 60일 성 성숙이 될 때까지 어류 초기단계 노출시험을 실행함으로써 확인할 수 있는 여러 가지 Endpoints를 측정하고 이를 통해 어류 초기단계 시험을 통한 내분비계 장애물질 검색·시험법을 확립하는데 있다. 이는 내분비계 장애물질연구의 세계적 흐름을 이해하고 국제적으로 진행되고 있는 최근시험법 변화에 맞추어 나아가고자 하는 것이다.

연구내용

본 연구에서는 EDCs로서 언급되면서 최근 국제적으로 많은 연구가 되고 있는 시험 물질들을 가지고 실험실에서 수정란부터 부화 후 60일간 총 70여일에 걸쳐 노출 시험으로서 나타날 수 있는 여러 가지 Endpoints를 통하여 어류 초기단계에 미치는 영향을 살펴보기로 하였다.

재료 및 방법

1. 시험방법 및 기간 : *In Vivo* Fish Early Life-Stage Testing, 부화 후 60일
2. 시험어종: Japanese medaka (*Oryzias latipes*)
Fertilized eggs, 노출농도별 69개씩 3반복에 균등분배
3. 시험물질: Bisphenol A (BPA), Nonylphenol (NP), 17 β -estradiol (E₂)
4. 시험농도: Control, Positive control(E₂ 0.5 μ g/L)
A 농도 - 1.2 BPA μ g/L + 1.0 NP μ g/L
B 농도 - 80 BPA μ g/L + 6.0 NP μ g/L
C 농도 - 400 BPA μ g/L + 12 NP μ g/L
D 농도 - 2.0 BPA mg/L + 24 NP μ g/L
5. 시험용액 온도: 24 \pm 1 $^{\circ}$ C
6. 광주기: 16:8 hr light/dark
7. 노출방법: Continuous flow-through
계산된 시험용액 농도에 맞게 조제된 20 Liter의 용액이 원형수조에 담겨져 있고 펌프를 사용하여 분당 약 8 ml씩 3반복의 맨 처음 수조로 투입되고 overflow되면서 두 번째, 세 번째 수조로 흐르게 된 후 최종적으로 배출된다.
8. 먹이공급: 부화 직후 Rotifer, 일주일 후 Artemia (24시간 미만) 1일 1회 급여함
9. 표본채집: 부화 후 60일간 노출시킨 후 최종일에 송사리를 채집하여 각각의 농도별, 반복수별로 전장 및 체중을 측정
농도별 생존 마리수의 절반은 ELISA 시험을 위해 Whole-body Homogenization을 하고 나머지 절반은 추후 성비 확인 및 생식소 조직 관찰을 위해 Formalin에 고정
10. Endpoints: 수정란 시기 - 치사율, 부화율, 부화시간
치어 및 성체 시기 - 성장률 (전장, 체중), VTG 농도

수정란은 2003년 2월에 부화되어 5개월 이상 성장한 성체들로부터 수집하여 pooling한 후 23개씩 나누고 무작위로 선택되어 농도별 수조에 공급되었다.

결과 및 고찰

1) 수정란 (Embryo) ~ 부화자어 (Yolk-sac fry) 단계

노출이 개시된 시점에서 부화때까지 관찰한 결과 세가지 측면에서 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

Table 1. 시험물질 농도에 따른 치사율, 부화율, 부화시간의 영향

Treatment (ppb)	Mortality (%)	Hatching rate (%)	Time to hatch (day)
Control	11.6 ± 1.4	84.1 ± 3.8	8.7 ± 0.2
BPA (1.2) + NP (1)	11.6 ± 2.9	87.0 ± 2.5	8.2 ± 0.2
BPA (80) + NP (6)	13.0 ± 5.0	82.6 ± 6.7	8.0 ± 0.1
BPA (400) + NP (12)	13.0 ± 5.0	87.0 ± 5.0	8.3 ± 0.1
BPA (2000) + NP (24)	5.9 ± 1.4	92.6 ± 2.8	8.5 ± 0.3
E ₂ (0.5)	10.4 ± 5.6	88.4 ± 5.2	8.9 ± 0.2
P value	0.813	0.710	0.083

위에서와 같이 크게 세가지로 치사율 (Mortality rate)과 부화율 (Hatching rate), 부화시간 (Time to hatch)을 살펴본 결과 약간의 차이는 있었으나 농도별 영향과 관련된 차이는 보이지 않았다 ($P > 0.05$). 특히 이 수치는 OECD Test Guideline 210과 212에서 제시한 값인 생존율 80%와 송사리의 일반적 부화시간 8 ~ 11일에 모두 부합되는 값으로서 적합성 유무에 문제가 없는 것으로 사료되었다. 비록 대조군의 수치가 일부 농도의 수치보다 다소 떨어지는 면은 있으나 통계적으로 차이를 보이지 않았다.

또한 이시기에 관찰된 기형유무 및 비정상 발달단계 유무를 살펴보면 농도와는 상관없이 이루어졌으며 이는 다른 문헌에서도 제시한 자연상태에서의 발생이라고 볼 수 있었다.

2) 부화자어 ~ 성체

수정란으로부터 약 10일 후 또는 최대 17일이 지난 후 부화가 되기 시작한 시점부터 약 두달간 지속적인 시험물질 노출결과 개체수준에서의 영향과 생화학적 수준에서의 영향을 살펴보면 다음과 같다.

Table 2. 시험물질에 따른 개체수준의 영향

Treatment (ppb)	Total Length (mm)	Total weight (mg)
Control	21.0 ± 0.5	87.8 ± 6.2
BPA (1.2) + NP (1)	20.7 ± 0.4	80.8 ± 4.5
BPA (80) + NP (6)	21.0 ± 0.4	82.3 ± 4.7
BPA (400) + NP (12)	21.1 ± 0.3	80.2 ± 3.6
BPA (2000) + NP (24)	20.1 ± 0.3	69.4 ± 2.7
E ₂ (0.5)	15.9 ± 0.5*	42.3 ± 4.0*
P value	≤ 0.001	≤ 0.001

먼저 개체수준에서의 영향을 살펴보면 각각의 농도별 또는 반복수별로 다양한 변이를 보였으나 전체적인 양상을 살펴볼때 E₂ 처리군에서 상당히 낮은 성장률 (전장 및 체중)을 보였으며, 이는 통계적인 수준에서도 영향차이를 나타내었다. 대조군에

비해 길이면에서는 25%, 체중면에서는 약 50%정도가 성장에 저해를 받았다. 반면 각 시험물질별 최대농도 혼합액에선 대조군이나 다른 농도 처리군보다 성장이 저해됨을 볼 수 있었지만 통계적 유의수준에서는 차이가 나타나지 않았다.

둘째로 생화학적 수준에서의 영향을 살펴보기 위해 1차년도에서 시도되었던 vitellogenin 정량화 분석을 시도하였다. 이 때 사용된 것은 일본 Enbiatec에서 개발된 송사리 vitellogenin kit로서 이미 국제적으로 인증된 상품을 사용하였다. 이에 대한 결과를 살펴보면 다음과 같다.

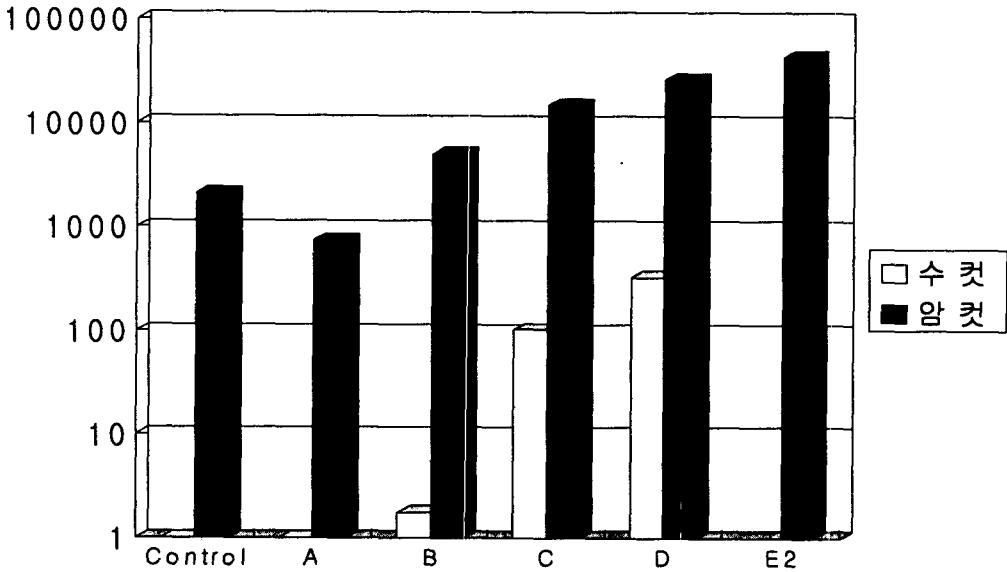


Figure 9. 시험물질에 따른 vitellogenin의 분석

먼저 대조군과 A 농도 수컷의 송사리로부터는 전혀 vitellogenin이 검출되지 않았으며 농도가 높아질수록 수컷에서도 시험물질에 노출된 농도와 비례하여 (Dose-response) vitellogenin이 검출되었다. 또한 E₂ 농도에서는 수컷이라고 생각되는 표본이 없는 점으로 미루어보아 전 개체가 발생초기에 암컷으로 전환되었음을 예측할 수 있었다. 반면에 암컷의 경우 대조군이 A 농도보다 일부 높게 검출되었지만 이는 개체간 차이에 의해 나타났을 뿐 통계적으로 큰 차이를 보이지 않았으며 농도가 높아질수록 비례하여 검출된 vitellogenin도 높았다. 하지만 이 결과는 일부 표본을 가지고 나타낸 것으로서 앞으로 다수의 표본을 확인해 볼 필요가 있다고 사료되었다.

참고문헌

Kang, I. J., H. Yokota, Y. Oshima, Y. Tsuruda, T. Oe, N. Imada, H. Tadokoro, and T. Honjo. Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2394-2400.

Seki M., H. Yokota, H. Matsubara, M. Maeda, H. Tadokoro, and K. Kobayashi. 2003. Fish full life-cycle testing for the weak estrogen 4-tert-pentylphenol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.

Yokota, H. Y. Tsuruda, M. Maeda, Y. Oshima, H. Tadokoro, A. Nakazono, T. Honjo, and K. Kobayashi. 2000. Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.