

## 넙치 *Paralichthys olivaceus* 초대 배양 간세포의 Vitellogenin 합성에 미치는 Bisphenol A의 영향

여 인 규 · 최 미 경\*

제주대학교 해양생산과학부, \*국립수산진흥원

### Effects of Bisphenol A on Vitellogenin Synthesis in the Hepatocyte Primary Culture in the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

In-Kyu Yeo and Mi-Kyung Choe\*

Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

\*National Fisheries Research and Development Institute, Pusan 619-900, Korea

The effects of bisphenol-A (BPA), a monomer of plastics used in many consumer products, on vitellogenin (VTG) synthesis were examined in primary hepatocyte culture of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The hepatocytes were precultured for 2 days, and then estradiol-17 $\beta$  ( $10^{-6}$  M) and BPA were simultaneously added to the incubation medium. The hepatocytes were cultured for 6 more days and then spent medium was analyzed by SDS-PAGE. BPA increased the rate of VTG to total protein concentrations in a concentration-dependent way, and a significant difference was obtained at concentrations of  $10^{-6}$  M and  $10^{-5}$  M ( $P < 0.05$ ). In particular, the rate of VTG to total protein concentrations was 26.36% at  $10^{-5}$  M of BPA, and its level did not differ from the control level with  $E_2$  alone.  $E_2$  and/or BPA-primed VTG synthesis was markedly inhibited to about 80% of the control (with  $E_2$ ) by the addition of tamoxifen ( $10^{-6}$  M) to the incubation medium. Furthermore, *In vivo*  $E_2$ -primed VTG synthesis was significantly inhibited by *in vitro*  $E_2$ -free incubation of hepatocyte to about 22% of the control (with  $E_2$ ) on Day 6. The effect of reducing was delayed in a BPA concentration-dependent way. These results suggest that BPA induce VTG synthesis by estrogenic activity through estrogen receptor mediated response and prolong VTG synthesis on vitellogenesis in olive flounder.

**Key words** : Bisphenol-A, vitellogenin synthesis, tamoxifen, hepatocyte culture, *Paralichthys olivaceus*

#### 서 론

환경호르몬은 주로 에스트로겐의 수용체와 결합하여 에스트로겐과는 유사 작용을 하는 화학물질로서, 인간의 건강은 물론 생태계에 큰 해를 끼치는 것으로 알려져

있다(Korach, 1993; Stone, 1994). 현재까지 알려진 대부분의 환경호르몬은 불포화 벤젠고리를 가지며 분자 크기는 매우 작아 분자량 300 Da 정도로, estradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ )를 비롯한 성호르몬과 유사한 점이 많다(筏, 1998). 환경호르몬으로 분류되어 지고 있는 물질에는 농약, 살충제 및 산업용 화학물질들 뿐만 아니라, 콩류 및 클로

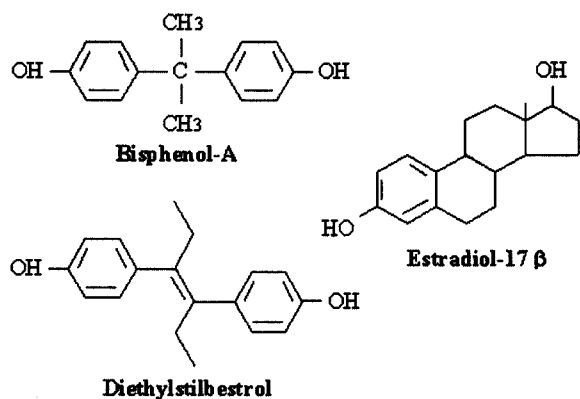


Fig. 1. Chemical structure of BPA, DES and E<sub>2</sub>.

버 등의 식물에 포함되어 있는 식물에스트로젠이나 의 약품으로 사용되고 있는 합성 에스트로젠인 diethylstilbestrol (DES) 등도 포함되어 있다.

Bisphenol A (BPA)는 일상 생활에서 음식용기나 병원 및 실험실용 플라스틱용기로 널리 사용되고 있는 플라스틱인 polycarbonate와 에폭시 수지의 합성원료로서, 축산 동물의 유산방지 및 성장촉진으로 이용되고 있는 DES와 그 분자구조가 매우 흡사한 물질이다 (Fig. 1). BPA의 E<sub>2</sub> 유사작용의 발견은 Krishnan *et al.* (1993)에 의해서 알려지기 시작하였다. 그들은 polycarbonate 용기로 멸균한 물을 사용하여 MCF-7 세포를 배양한 결과, progesterone 수용체가 출현하였으며 그 원인 물질이 BPA이라고 보고하였다. 이외에도 BPA는 E<sub>2</sub>와 동일하게 뇌하수체로부터 E<sub>2</sub> receptor (ER)를 경유하여 prolactin의 분비를 촉진시킨다고 보고되는 (Steinmetz *et al.*, 1997; Chun and Gorski, 2000) 등 많은 연구들이 진행되고 있다.

BPA는 ER을 경유한 E<sub>2</sub> 유사작용을 하는 것으로 알려진 반면, 생체내에서는 E<sub>2</sub>와 다소 다른 특성을 가지고 있다. 포유류인 경우, 태반을 통하여 태아로의 E<sub>2</sub>의 축적 현상은 나타나지 않지만, BPA는 모체의 축적보다도 태아에서의 축적농도가 높아지는 것으로 보고되고 있다 (Miyakoda *et al.*, 1999). 또한, E<sub>2</sub>의 경우에는 ER의 종류인 ERα 및 ERβ에 균등한 비율로 결합하는 반면 (Ikeuchi *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1999), BPA는 ERβ와는 E<sub>2</sub>와 동일한 작용을 가지지만, ERα에 대해서는 E<sub>2</sub> 작용의 agonist와 antagonist의 성질을 모두 가지는 것으로 보고되고 있다 (Hiroi *et al.*, 1999). 그리고, Long *et al.* (2000)의 보고에 의하면, BPA의 E<sub>2</sub> 유사작용은 배양된 세포주에 따라서도 그 작용반응의 정도에 큰 차이를 갖는다. 이처럼, BPA는 ER과 관련되어 내분비 작용을 교란하는 것으로는 여겨지고 있으나, 아직 해양생물에 어

떠한 영향을 미치는 지에 대해서는 거의 연구가 이루어지지 않았다.

어류에 있어서 BPA는 환경수의 약 1/100 정도가 단기간 내에 간세포에 축적되는 것으로 보고되어 있다 (Lindholm *et al.*, 2000). 그리고, BPA의 번식에 대한 영향은 송사리 *Oryzias latipes*에 있어서 *in vivo*에서의 노출에 따른 산란개체 부화율의 저하 및 누시개송어 *Oncorhynchus mykiss*에서의 난황 전구물질인 vitellogenin (VTG)의 합성유도 등이 보고되고 있다 (Lindholm *et al.*, 2000; Shioda and Wakabayashi, 2000). 그러나, 어류에 있어서의 성 성숙시기의 *in vitro*에서 BPA가 어떠한 작용을 유발하는 지에 대해서는 정확히 알려져 있지 않다. 따라서 이 연구에서는 양식어류인 넙치 *Paralichthys olivaceus*의 배양 간세포를 이용하여, 해양생물에 있어서의 BPA의 내분비 교란 작용을 파악하기 위해 환경호르몬의 biomarker로 사용되어지고 있는 VTG의 합성 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 간세포의 배양

넙치 *Paralichthys olivaceus*는 제주대학교 해양연구소에서 사육한 체중 640±24g인 것을 사용하였다. 넙치를 0.01% 2-phenoxyethanol로 마취를 시킨 후, 담낭과 같이 간장을 분리하였다. 간문맥에 Ca<sup>2+</sup>이 포함되지 않은 관류용 buffer (120 mM NaCl, 1.22 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4.7 mM KCl, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 23 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4)를 약 10분간 관류하였다 (5~8 ml/min.). 그 후 Collagenase (0.3 mg/ml; Sigma) 및 소혈청 알부민 (0.98 mg/ml; Sigma)을 포함한 관류용 buffer에 약 20분간 (5~8 ml/min.), 2 mM EDTA를 첨가하여 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>을 제거한 관류용 buffer에 약 10분간 각각 관류하였다. 관류 후 간장은 100 ml 비이커에 넣어 Ca<sup>2+</sup>-free 관류용 buffer로 3회 세척한 후, 50 ml의 관류용 buffer 내에서 해부가 위로 잘게 분산시켰다. 분산된 간세포는 pipet으로 더욱 분리 여과시킨 후에 원심분리 (700 rpm, 2분)를 3회 반복하여 간실질세포 이외의 성분 (비실질세포, 파열 세포, 세포의 파편 및 적혈구 등)을 제거하였다.

간세포는 양전하를 처리한 250 ml T/C 플라스크 (Falcon)에 2×10<sup>6</sup>개를 넣어 배양하였다. 배양에는 0.2 μM bovine insulin (Sigma), streptomycin (100 μg/ml), penicillin (70 μg/ml) 및 NaHCO<sub>3</sub> (23 mM)을 첨가한 William's medium (Life Technol. Inc.)을 이용하였다. 간세포는 배양액 20 ml를 첨가하여 배양하였다. 사전 배양은 3

일간 행하고, 배양액은 3일 간격으로 교환하였다.

## 2. BPA 농도 변화에 따른 VTG 합성

$E_2$  (Sigma) 및 BPA (Aldrich Chem. Com. Inc.)는 95% 에탄올로 용해한 후, 3일간의 사전 배양 후에  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  M의 농도를 첨가하여 실험을 행하였다. 그리고, tamoxifen  $10^{-6}$  M을 첨가하여 BPA와  $E_2$ 의 작용기전에 대하여 조사하였다. 배양액은 실험개시 후 3일 간격으로 회수하여 원심분리(3,000 rpm, 20 min.)를 행하였다. 회수한 배양액은 trichloacetic acid (TCA) 10%로 단백질을 침전시킨 후 5% TCA로 3회 세척하였다. 침전시킨 단백질은 sample buffer (0.175 m Tris-HCl, 8 M urea, 1% SDS, 0.5% mercaptoethanol, pH 7.4)로 용해시켰다. 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE로 분리하여, coomassie brilliant blue R-250으로 40분간 염색하였다. 넓치 VTG의 판별은 SDS-PAGE 후 성 성숙기에 나타나는 암컷 혈청 특이 단백질인 분자량 175 kDa의 결과에 따라다. VTG 밴드(175 kDa)는 densitometer (Bio-Rad Lab.; Model GS-710)를 이용하여 총 단백질에 대한 VTG의 optical density 수치를 퍼센트로 나타내었다.

## 3. VTG 합성 유도 후의 BPA 첨가에 따른 간세포에서의 VTG 합성 변화

VTG의 합성 유도는 넓치의 복강내에  $E_2$  1 mg을 어체 중 100 g 당 0.5 ml의 propylene glycol에 용해하여 주사로 행하였다. 주사 후 5일째의 넓치로부터 간세포를 분리하여 배양을 하였다. 2일간 사전배양을 한 후,  $E_2$  및 BPA를 첨가하여 3일 간격으로 배양액을 회수하여 VTG 합성의 변화를 조사하였다. BPA의 농도는  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  M로 첨가하였다. VTG의 합성변화는 사전배양후 회수한 배양액에서의 VTG 양을 100으로 하여 3일 및 6일에 각 실험구에서 합성된 VTG의 양을 퍼센트로 환산하여 나타내었다.

## 4. 통계분석

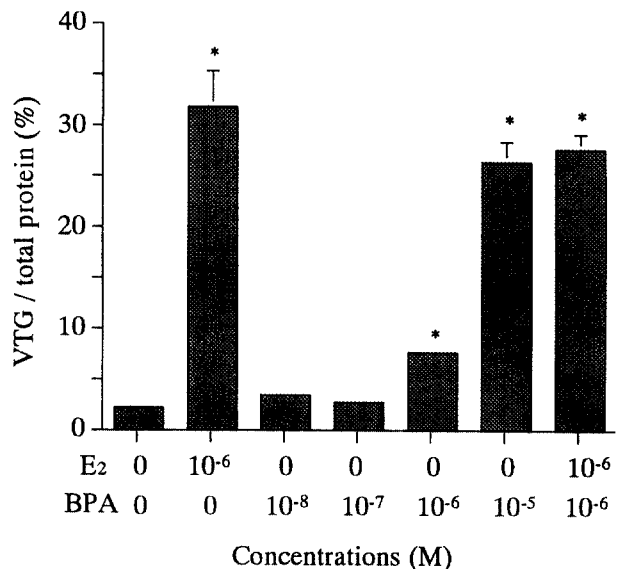
실험 결과는 One-way ANOVA-test를 실시하여 Fisher's PLSD-test를 행하였다. 통계적 유의성은  $P < 0.05$ 로 판단하였다. 그리고 퍼센트 결과는 Arcsine의 수치로 전환 후 통계 분석을 하였다.

## 결 과

### 1. BPA의 농도변화에 따른 VTG 합성

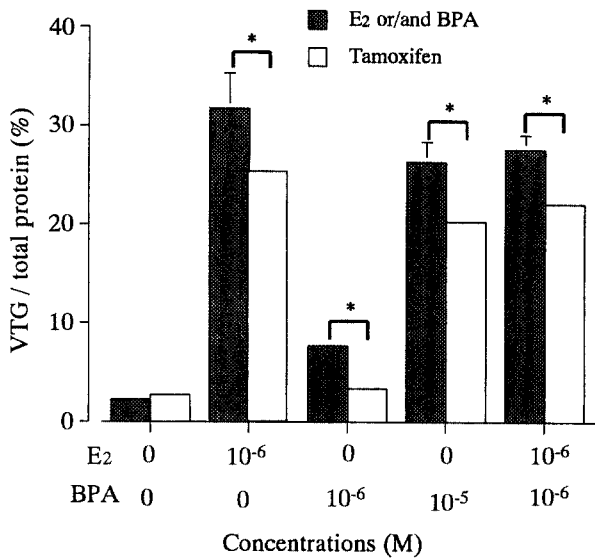
넓치 간세포의 배양에 있어서  $E_2$  및 BPA의 첨가에

**Fig. 2.** SDS-PAGE showing the effects of BPA on the induction VTG (arrow) in hepatocyte cultures of olive flounder. Spent media were analyzed on day 6 after BPA addition. M: molecular weigh (MW) marker. CBB stain.



**Fig. 3.** Effects of BPA on VTG synthesis in hepatocyte cultures of olive flounder. The activity of VTG synthesis was estimated for the relative optical density of VTG to total protein after SDS-PAGE on day 6 after BPA and/or  $E_2$  addition. Vertical bars represent the SE of mean for three experiments. \* $P < 0.05$  for control (without  $E_2$  and BPA).

다른 생존율 및 세포의 성장 등의 차이는 관찰되지 않았다. 7.5% SDS-PAGE의 결과,  $E_2$   $10^{-6}$  M의 첨가에 의

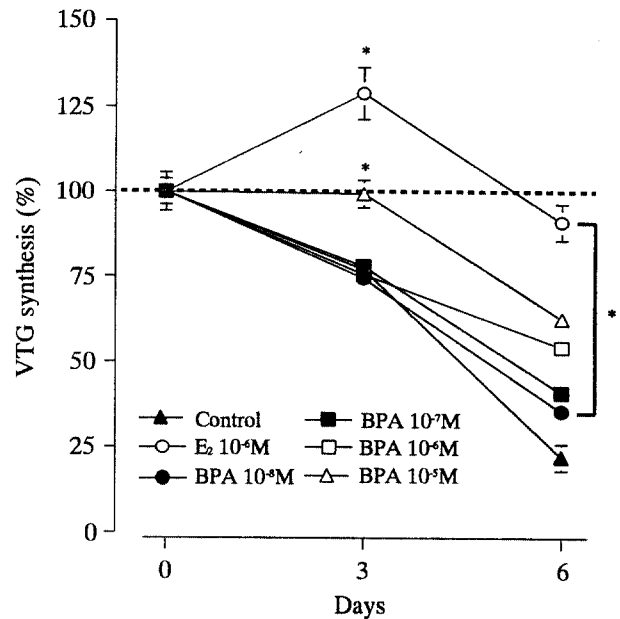


**Fig. 4.** Effects of tamoxifen (10<sup>-6</sup> M) on the synthesis of VTG by cultures hepatocytes stimulated by E<sub>2</sub> and BPA for 6 days. Hepatocytes were primed for VTG production by incubating with E<sub>2</sub> or/and BPA for 6 days and then tamoxifen was added. The activity of VTG synthesis was estimated for the relative optical density of VTG to total proteins after SDS-PAGE. Vertical bars represent the SE mean for three experiments. \*P < 0.05.

해서 175 kDa에 강한 염색성을 가진 VTG의 밴드가 나타났다(Fig. 2). BPA의 첨가에 있어서는 10<sup>-8</sup> M 및 10<sup>-7</sup> M의 농도에서 VTG의 밴드가 나타나지 않았으나, 10<sup>-6</sup> M에서 약하게 VTG의 밴드가 출현하였으며 10<sup>-5</sup> M에서는 강한 염색성을 띤 VTG밴드가 나타났다(Fig. 2). 이때의 optical density를 비교하여 총 단백질에 대한 VTG의 비율은 Fig. 3에 나타내었다. 10<sup>-8</sup> M과 10<sup>-7</sup> M의 BPA 첨가군 및 E<sub>2</sub>와 BPA를 첨가하지 않은 대조군에서는 VTG의 합성이 이루어지지 않아 총 단백질에 대한 비율은 2~3% 정도를 나타내었다. 그러나, BPA 10<sup>-6</sup> M의 첨가군에서는 7.65%로 대조군에 비해 유의하게 증가하여, BPA 10<sup>-5</sup> M에서는 26.36%로 E<sub>2</sub> 첨가군의 31.74%와 유사한 수치를 나타내었다(P < 0.05). E<sub>2</sub>와 BPA 10<sup>-6</sup> M을 동시에 첨가한 경우에는 VTG 합성의 상승 및 억제작용을 나타내지 않고 E<sub>2</sub> 첨가군과 동일한 수치를 나타내었다(P < 0.05). VTG의 합성이 나타난 모든 구간에서 tamoxifen 10<sup>-6</sup> M의 첨가로 약 20%의 감소를 나타내었다(Fig. 4).

2. VTG합성 유도 후의 BPA 첨가에 따른 간세포에서의 VTG합성 변화

*In vivo*에서 E<sub>2</sub>의 복강내 주사로 VTG합성을 유도한



**Fig. 5.** Effects of BPA *in vivo* E<sub>2</sub>-primed VTG synthesis. Oliver flounder was intraperitoneally injected with 1 mg E<sub>2</sub> dissolved in propylene glycol per 100 g body weight. After single injection of E<sub>2</sub>, hepatocytes were isolated 5 days after injection. Hepatocytes were cultured in the medium containing E<sub>2</sub> and BPA for 6 days. Vertical bars represent the SE of mean for three experiments. \*P < 0.05 for control (without E<sub>2</sub> and BPA).

개체로부터 간세포를 분리하여 BPA의 난황형성기에 있어서의 영향에 대하여 조사한 결과, VTG의 합성은 E<sub>2</sub>를 첨가하지 않은 대조군에서는 6일간 배양을 함에 따라 약 78%가 감소되었다(Fig. 5). 이러한 감소는 BPA를 첨가함에 따라 늦어지는 경향을 나타내었다. Fig. 3에서와 같이, 단독 첨가로 VTG의 합성이 이루어지지 않은 BPA 10<sup>-8</sup> M과 10<sup>-7</sup> M의 첨가군에서도 VTG합성의 감소경향은 대조군에 비해 유의하게 늦어지는 경향을 나타내었다(P < 0.05). 그리고, 다량의 VTG합성을 유도한 BPA 10<sup>-5</sup> M에서는 배양 6일에 36%의 감소만이 나타났다. E<sub>2</sub>의 지속적인 첨가는 배양 3일에는 약 23%의 증가를 나타내었고, 배양 6일에는 12%의 감소를 나타내었다. 이러한 E<sub>2</sub>의 첨가에 따른 변화는 *in vivo*와 *in vitro*의 VTG 합성능력 차이에 의해 나타나는 것으로 여겨진다.

고 찰

VTG는 최근에 생물의 내분비계를 교란하여 종의 번식에 악영향을 미치는 것으로, 환경호르몬 연구에 있어서 biomarker로서 널리 사용되고 있다(Sumpster and

Jobling, 1995; Hashimoto *et al.*, 2000). 또한 간세포배양을 이용한 *in vitro*의 실험은 독성시험 또는 호르몬 작용 연구에 널리 사용되고 있어(Kawahara *et al.*, 1987; Guyomard *et al.*, 1990; Liang and Jost, 1991), 내분비적 작용기전을 밝혀내는데 적합한 실험방법이라고 할 수 있다.

환경호르몬 물질들 중에 일부 화학물질들은 E<sub>2</sub> 유사작용과 동시에 세포의 증식 등에도 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, Beresford *et al.*(2000)은 효모 세포에 있어서 BPA 및 4-nonylphenol의 첨가에서는 E<sub>2</sub> 첨가와 동일하게 세포의 변화 등의 차이는 없는 것으로 보고하고 있다. 이 연구의 결과에서도 BPA는 간세포의 생존 및 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Steinmetz *et al.*(1997)은 BPA가 나타내는 E<sub>2</sub> 유사작용은 대부분 E<sub>2</sub> 보다 1,000배 이상의 농도에서 작용을 가지는 것으로 보고하고 있다. 그러나, Sheeler *et al.*(2000)은 E<sub>2</sub>의 100배의 농도에서 유전자 변형 효모법을 이용한 ER element의 E<sub>2</sub> 반응이 나타나는 것으로 보고하고 있다. 그리고, Long *et al.*(2000)은 쥐의 세포주에 따라 BPA의 민감성이 서로 다르게 나타나는 것으로 보고하고 있다. 이처럼 BPA의 E<sub>2</sub> 유사작용은 세포의 차이에 따라서도 그 정도가 달라지는 것으로 여겨진다. 본 연구의 결과에서는 BPA 10<sup>-6</sup>M의 농도에서 VTG의 합성이 나타나 10<sup>-5</sup>M에서는 E<sub>2</sub> 10<sup>-6</sup>M의 첨가군과 거의 유사한 수치를 나타내어, BPA의 농도 의존적으로 VTG 합성이 증가되는 것으로 나타났다. 또한 VTG 합성이 유도된 모든 구간에 tamoxifen 10<sup>-6</sup>M을 첨가하여 3일간 배양한 결과, VTG 합성은 동일하게 약 20% 전후의 억제 효과를 나타내었다. Tamoxifen은 E<sub>2</sub>의 ER과의 결합을 경쟁적으로 억제하며(Jobling and Sumpter, 1993), BPA의 ER 경유를 통한 초기 배발생에 미치는 영향을 억제한다(Takai *et al.*, 2000). 따라서, BPA에 의해 합성된 VTG는 ER을 경유한 E<sub>2</sub> 유사작용에 의한 결과라고 추정된다.

한편, 어류에 있어서 성 성숙시기에 BPA에 노출되었을 경우에는 부화율의 감소가 나타나는 것으로 보고되고 있다(Shioda and Wakabayashi, 2000). 이러한 부화율의 감소는 성 성숙시기의 성호르몬의 불균형에 의해서도 유도되는 것으로 여겨지고 있다. BPA와 같은 화학물질은 생물체의 내재적인 성호르몬과는 달리 체내에서의 feedback작용으로 조절이 이루어지지 않으므로 E<sub>2</sub> 유사작용을 장기간으로 지속시킬 우려가 있는 것으로 여겨진다. 본 연구에서 BPA에 의해서 VTG의 합성이 유도되지 않은 10<sup>-8</sup>~10<sup>-7</sup>M 농도에서도 E<sub>2</sub>에 의해 VTG의 합성이 유도되어 있는 간세포에서는 VTG합성의 감

소경향은 있었으나, E<sub>2</sub>가 첨가되지 않은 구간에 비교하면 지속적인 VTG합성의 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 내분비작용의 교란에 의한 비정상적인 알의 생산에 따른 부화율의 감소를 초래할 가능성이 있는 것으로 여겨진다. 따라서 앞으로는 환경호르몬의 E<sub>2</sub> 유사작용 뿐만 아니라, 차세대에 미치는 정확한 영향을 파악하는 연구 또한 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

## 적 요

플라스틱의 원재료로 이용되는 bisphenol-A(BPA)가 vitellogenin(VTG)의 합성에 미치는 영향을 넘치의 간세포를 초대 배양하여 조사하였다. 간세포는 2일간 사전 배양을 하였으며, estradiol-17β(E<sub>2</sub>) 및 BPA를 배양액에 동시에 첨가하였다. 간세포는 6일간 배양한 후 배양액을 회수하여 SDS-PAGE로 분석하였다. BPA는 농도 의존적으로 총 단백질에 대한 VTG 비율은 증가하였으며, 10<sup>-6</sup>M과 10<sup>-5</sup>M의 농도에서 유의한 차이를 나타내었다(P<0.05). 특히, BPA 10<sup>-6</sup>M의 농도에서의 총 단백질에 대한 VTG 비율은 26.36%로 E<sub>2</sub>만을 첨가한 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. E<sub>2</sub>와 BPA를 단독 또는 동시에 첨가하여 유도된 VTG합성은 배양액에 tamoxifen(10<sup>-6</sup>M)을 첨가함으로써 E<sub>2</sub>를 첨가한 대조군의 약 80%로 유의하게 억제되었다. 그리고, *in vivo*에서 E<sub>2</sub>에 의해 유도된 VTG합성은 *in vitro*에서 간세포를 6일간 배양함에 따라 E<sub>2</sub>를 첨가한 대조군의 약 22%까지 억제되었다. 이러한 감소효과는 BPA의 농도 의존적으로 지연되는 결과를 나타내었다. 따라서 넘치에서의 BPA는 E<sub>2</sub> receptor와의 반응을 통한 에스트로젠 작용에 의해 VTG합성을 유도하고, 난황형성기에서의 VTG 합성을 장시간 지속시킬 가능성이 있는 것으로 추측된다.

## 사 사

이 논문은 2000년도 제주대학교 두뇌한국21 사업에 의하여 지원되었음.

## 인 용 문 헌

- Beresford, N., E.J. Poutledge, C.A. Harris and J.P. Sumpter. 2000. Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 162 : 22~33.
- Chun, T.Y. and J. Gorski. 2000. High concentrations of bisphenol A induce cell growth and prolactin secretion in

- an estrogen-responsive pituitary tumor cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 162 : 161~165.
- Guyomard, C., C. Chesne, B. Meunier, A. Fautrel, C. Clerc, F. Morel, M. Rissel, J.P. Campoin and A. Guillouzo. 1990. Primary culture of adult rat hepatocytes after 48-hour preservation of the liver with cold UW solution. *Hepatology*, 12 : 1329~1336.
- Hashimoto, S., H. Bessho, A. Hara, M. Nakamura, T. Iguchi and K. Fujita. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo bay, Japan. *Mar. Environ. Res.*, 49 : 37~53.
- Hiroi, H., O. Tsutsumi, M. Momoeda, Y. Tatai, Y. Osuga and Y. Taketani. 1999. Differential interactions of bisphenol A and 17 beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ER alpha) and ER beta. *Endocrine J.*, 46 : 773~778.
- Ikeuchi, T., T. Todo, T. Kobayashi and Y. Nagahama. 1999. cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. *J. Biol. Chem.*, 274 : 25205~25209.
- Jobling, S. and J. Sumpter. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an *in vitro* study rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, 27 : 361~372.
- Kawahara, A., S. Kohara, Y. Sugimoto and M. Amano. 1987. A change of the hepatocyte population is responsible for the progressive increase of vitellogenin synthetic capacity at and after metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 122 : 139~145.
- Korach, K.S. 1993. Editorial: Surprising places of estrogenic activity. *Endocrinology*, 132 : 2277~2278.
- Krishnan, A.V., P. Stathis, S.F. Permth, L. Tokes and D. Feldman. 1993. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132 : 2279~2286.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227 : 680~685.
- Liang, H. and J.P. Jost. 1991. An estrogen-dependent polysomal protein binds to the 5' untranslated region of the chicken vitellogenin mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 19 : 2289~2294.
- Lindholst, C., K.L. Pedersen and S.N. Pedersen. 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 48 : 87~94.
- Long, X.H., R. Steinmetz, N. Ben-Jonathan, A. Caprell-Grant, P.C.M. Young, K.P. Nephew and R.M. Bigsby. 2000. Strain differences in vaginal responses to the xenoestrogen bisphenol A. *Environ. Health Perspect.*, 108 : 243~247.
- Miyakoda, A., M. Tabata, S. Onodera and K. Takeda. 1999. Passage of bisphenol A into the fetus of the pregnant rat. *J. Health Sci.*, 45 : 318~323.
- Sheeler, C.Q., M.W. Dudley and S.A. Khan. 2000. Environmental estrogens induce transcriptionally active estrogen receptor dimers in yeast: Activity potentiated by the coactivator RIP140. *Environ. Health Perspect.*, 108 : 97~103.
- Shioda, T. and M. Wakabayashi. 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 40 : 239~243.
- Steinmetz, R., N.G. Brown, D.L. Allen, R.M. Bigsby and N. Ben-Jonathan. 1997. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, 138 : 1780~1786.
- Stone, R. 1994. Environmental estrogens stir debate. *Science*, 265 : 308~310.
- Sumpter, J.P. and S. Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, 103 : 173~178.
- Takai Y., O. tsutsumi, Y. Ikezuki, H. Hiroi, Y. Osuga, M. Momoeda, T. Yano and Y. Taketani. 2000. Estrogen receptor-mediated effects of a xenoestrogen, bisphenol A, on preimplantation mouse embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270 : 918~921.
- Xia, Z., R. Patino, W.L. Gale, A.G. Maule and L.D. Densmore. 1999. Cloning, *in vitro* expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113 : 360~368.
- 筏 義人. 1998. 環境ホルモン. 講談社, 東京, pp. 221.