

Microarray를 이용한 Octachlorostyrene-노출 송사리 (*Oryzias latipes*)에서의 분자생물학적 지표연구

유대은, 강미선, 박은정, 김일천¹, 이재성², 박광식*

동덕여자대학교 약학대학, ¹한국해양연구원 극지연구소,
²한양대학교 대학원 생물학과

Molecular Biomarkers of Octachlorostyrene Exposure in Medaka, *Oryzias latipes*, using Microarray Technique

Dae-Eun You, Misun Kang, Eun-Jung Park, IL-Chan Kim¹,
Jae-Seong Lee² and Kwangsik Park*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, #23-1 Wolgok-dong,
Seongbuk-gu, Seoul 136-714, Korea

¹Korea Polar Research Institute, #1270 Sa-2-dong, Sanglok-gu, Ansan 426-744, Korea

²Department of Environmental Science, Hanyang University, #17 Haengdang-dong,
Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT

Octachlorostyrene (OCS) is a primarily concerning chemical in many countries because of its persistent and bioaccumulative properties in the environment. OCS is not commercially manufactured or used but it may be produced during incineration or chemical synthetic processes involving chlorinated compounds. There are several reports that OCS was found in the waters, sediments, fish, mussels, and also in human tissues. However, systematic studies on the OCS toxicities are scarce in literature. In this study, we tried to get the gene expression data using medaka DNA chip to identify biomarkers of OCS exposure. Medaka (*Oryzias latipes*) was exposed to OCS 1 ppm for 2 days and 10 days, respectively. Total RNA was extracted and purified by guanidine thiocyanate method and the Cy3- and Cy5-labelled cDNAs produced by reverse transcription of the RNA were hybridized to medaka microarray. As results, eighty five genes were found to be down- or up-regulated by OCS. Some of the genes were listed and confirmed by real-time PCR.

Key words : octachlorostyrene, biomarker, medaka (*Oryzias latipes*), microarray

서 론

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-02-940-4522, E-mail: kspark@dongduk.ac.kr

Octachlorostyrene (OCS)은 styrene에 염소가 8개
부가된 화합물로서 상업적으로 유통되거나 생산되

는 화학물질은 아니다 (Fig. 1). OCS는 dioxin처럼 소각과정에서 탄소화합물과 염소의 열반응에 의해 생성되는 것으로 추정되고 있으며 또한 마그네슘 생산과정, 유기염소계 용매의 합성과정, 반도체 산업의 알루미늄제련 (판금) 과정, 금속합금공정의 hexachloroethane에 의한 aluminum degassing, titanium의 chlorination, chlor-alkali 생산 공정 등이 OCS가 생성되는 유력한 배출원일 것으로 추정되고 있다. (Chu *et al.*, 2003) OCS는 화학구조상 hexachlorobenzene (HCB)와 유사하여 그 독성 또한 HCB와 유사할 것으로 추정되고 있다. 특히, 물에 대한 용해성이 매우 낮아 물속에 잔류하는 것보다는 저질 (sediment)이나 부유물질 (water suspended particles)에 부착되는 경향이 있으며 따라서 수계 생물중 저질에 서식하는 생물 종에 대한 유해 작용이 강하게 나타날 것으로 추정하고 있다 (Bjerk *et al.*, 1980; Vogelgesang *et al.*, 1986; Luckas, 1987).

미국에서는 나이아가라 강, 텍사스해안 및 오대호에 서식하는 어패류에서 OCS가 검출되었다는 보고가 있으며 그 외 유럽 여러 나라의 호수, 강, 물고기 등에서 검출된 결과들이 보고 되고 있다 (Kuehl *et al.*, 1976; Ofstad *et al.*, 1978; Kuehl *et al.*, 1981; Solbakken *et al.*, 1986; Muncaster *et al.*, 1990; Metcalfe *et al.*, 1990) OCS의 환경잔류실태 조사결과를 살펴 보면 캐나다 온타리오주의 사르니아 지역에서는 산업단지로부터 배출된 것으로 추정되는 OCS가 인근지역의 저질에 침적된 후 어류에 농축된 것으로 조사된 보고가 있다 (Carey *et al.*, 1986). 미국의 조사결과에서는 채집어류에서의 검출 평균농도는 1.7 ng/g 수준이라고 보고된 바 있으며 지역에 따라 이보다 훨씬 고농도 (49.6~138 ng/g)로 검출된 지역도 알려졌다 (Li *et al.*, 2003).

인체에 대한 검출사례로는 HCB를 사용하는 알루미늄 공장의 근로자 혈액에서 OCS 검출사례가 보고 되었고, 직업과는 무관한 산모의 모유에서 검출된 사례도 보고 되었다 (Mes *et al.*, 1986; Selden *et al.*, 1997). 독일의 조사에 의하면 Schleswig-Holstein 거주지역 주민중 135인의 혈액으로부터 검출되었는데 이는 평균수준 1.4 ng/L 농도로 오염된 강물에서 서식하는 물고기를 섭취한 결과인 것으로 판명되었다 (Lommel *et al.*, 1992). 캐나다에서 조사된 바에 의하면 사람의 지방조직에서 검출된 사례는 전체 조사 인구의 8% 정도에 달하였는데 사

람의 지방조직에는 평균 1 ng/g 수준으로 검출되었다고 한다. 우유나 우유지방에서 검출된 사례도 다수 보고 되었는데 조사사례의 7% 정도가 오염된 것으로 보고 되었다 (Mes *et al.*, 1993). OCS의 인체에 대한 영향은 PBT의 일반적인 독성과 유사할 것으로 추정되나 구체적인 자료는 거의 없는 실정이다. 다이옥신, PCB, HCB와 마찬가지로 돌연변이 원성을 갖거나 발암을 촉진하는 promoter로서 작용하는 것이 밝혀졌으며 최근에는 내분비계에 미치는 작용에 대한 영향도 활발히 연구되고 있다. 캐나다 보건부는 식품으로부터의 OCS에 대한 MRI (Minimum Risk Intake)를 0.31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 설정하고 있다. OCS가 인체에 검출된 것은 비직업적 노출의 경우 주로 식품섭취에 의한 것인데 이는 OCS의 생물농축성이 매우 높아 먹이연쇄에 의한 어류에서의 농축효과 때문인 것으로 판단되고 있다. 이외에도 인체영향과 관련하여서는 미성숙 흰쥐에서의 자궁증식에 관한 실험을 수행한 결과 양성반응을 보였으나 bisphenol A, nonylphenol, genistein, zeralenone 등에 비해서는 상대적으로 미약한 것으로 나타났으며 (Yamasaki K *et al.*, 2002) OCS에 노출된 알루미늄 주물공장 노동자의 혈액에서 OCS가 검출되었는데 이때 뇨중 porphyrin 배설량이 증가하는 것이 밝혀졌다 (Selden *et al.*, 1997).

본 연구에서는 OCS의 환경위해성평가 연구의 일환으로서 OCS에 노출된 송사리의 유전자 변화를 측정함으로써 OCS가 어류에 미치는 생태독성을 평가하고 치사량이하의 수준에서 나타날 수 있는 생리학적인 변화를 파악하고, 아울러 OCS의 저농도 노출을 평가할 수 있는 바이오마커를 발굴하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 어류 및 시험물질

시험에 사용한 송사리 (*Oryzias latipes*)는 한국화학시험연구원 (경기도 김포시)으로부터 분양받아 본 연구실에서 사육하였으며 먹이로는 아미노산, 비타민, 미네랄 등이 풍부히 함유된 시판용 물고기 고형사료를 제공하였으며 생물 사료로서는 동결장구벌레 유충을 매일 각 1회씩 공급하였다. 송사리는 부화 후 6개월 이상 성장한 건강한 수컷만을

시험에 사용하였다(Lee *et al.*, 2002). 시험물질로 사용한 Octachlorostyrene (Wako chemical, Japan)은 DMSO에 녹인 stock solution (40 mg/mL)을 적당량 시험수에 투입하여 최종 시험농도를 1 ppm으로 조정하였다. 이때 DMSO의 최종농도는 0.0025%를 초과하지 않도록 하였다. 시험물질 노출기간동안 공기투입 (aeration)은 실시하지 않았으며 먹이는 소량씩 공급하고 먹고 남은 경우 즉시 제거하였다. 시험물질 노출기간동안 송사리는 외관상 특별한 변화를 보이지 않았으며 유영상의 특이한 행동변화는 나타나지 않았고 사망개체도 없었다.

2. RNA정제 및 microarray hybridization과 판독

OCS를 처리 후 각 2일 후 및 10일 후에 송사리 대조군 및 처리군을 해부하여 간을 적출하고 guanidine thiocyanate 용액을 처리하여 간 조직을 완전히 용해 시켰다. 용해시킨 액에 sodium acetate를 넣고 phenol:chloroform:isoamylalcohol 혼합액을 넣어 잘 섞은 후 원심분리한 상등액에 대해 isopropanol 침전으로 total RNA를 분리하였다(Ryu *et al.*, 2004). 분리한 RNA의 A260/A280은 1.7 이상이였다.

Microarray analysis는 medaka cDNA library로부터 PCR 증폭시켜 얻은 산물을 MicroSpotting solution plus (TeleChem, USA)에 녹인 후 Micro Grid II TAS Microarrayer (Biorobotics, USA), SMP3 pin (TeleChem, USA)으로 SperAldehyde slide (TeleChem, USA)에 spotting 하여 완성시킨 3K medaka chip (한양대학교 환경과학과 제작)을 사용하여 실시하였다. Fluorescence-labeled (Cy5, Cy3) cDNA probe는 송사리 대조군 및 처리군으로부터 얻은 total RNA에 oligo dT primer 사용하여 amino-allyl cDNA 합성 kit로 합성하였다. 각각의 Cy3- 및 Cy5-labelled cDNA는 하나의 튜브에 합쳐 speed-vac에 건조시킨 후 핵산분해효소가 존재하지 않는 정제된 물로 녹이고 95°C에서 2분간 가온하고 열음에 식힌 후 hybridization buffer에 녹여 3,000개의 송사리 유전자가 printing된 medaka DNA chip에 loading 하여 hybridization 시켰다. Hybridization은 GeneTAG automatic hybridizer (Genomic solution)로 52°C에서 8시간동안 시행하였다. 이후 0.2% SDS 함유 SSC 용액으로 세척하고 테시케이터에서 30분간 방치하였다. Fluorescence image는 GMS418

array scanner (Affimetrix)로 scan하였다. Image 분석의 raw data는 ImaGene 4.2 (Biodiscovery)로 얻었다. 발현된 유전자들을 Gene Ontology 분류기준에 따라 분류하였다(Park, 2004).

3. Microarray analysis로 확인된 유전자의 증폭

microarray analysis로부터 OCS에 의해 그 발현이 조절되는 것으로 확인된 몇 종의 유전자에 대해서는 PCR 및 real time PCR을 사용하여 확인하였다. 역전사반응(reverse transcription)은 RNA 주형 1 µg에 oligo dT primer, reverse transcriptase 및 각 nucleotide가 함유된 반응액 20 µL에 대해 42°C로 60분간 실시한 후 94°C에서 5분간 가열함으로써 반응을 종료하였다. Microarray analysis 결과 OCS에 의해 유전자 발현이 증가 또는 감소되는 것으로 확인된 유전자에 대한 PCR 증폭을 위해서는 각각의 선별된 유전자 프라이머쌍을 합성한 후 이들 프라이머쌍과 RT-PCR에서 얻은 반응생성물 2 µL, Taq polymerase 및 각 nucleotide가 함유된 Bioneer™ Kit를 사용하여 총 20 µL의 반응액을 만든 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 간씩 조절되도록 하여 25회 반응시켰다. 마지막 25회 반응이후에는 최종적으로 72°C에서 15분간 더 증폭시켰다. 각각의 primer 쌍을 이용하여 증폭된 생성물에 대해서는 1.5% agarose gel 상에서 TAE 완충용액을 사용하여 전기 영동하였다(Lee *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2004).

4. Real time PCR

OCS처리군과 대조군으로부터 total RNA를 분리하고 total RNA 1 µg을 RT-Kit (Pharmacogenechips, Korea)를 사용하여 42°C에서 1시간동안 반응시킨 후 증류수를 가하여 100 µL로 한 후 template로 사용하였다. 2 µL의 template에 Cybergreen Mix (Pharmacogenechips, Korea)를 가한 후, primer의 조건에 따라 ABI Prism 7000 (Applied Biosystems)으로 분석하였다.

결과 및 고찰

PBTs (Persistent, Bioaccumulative and Toxic Substances)는 환경에서의 잔류성 (Persistent)이 높아

쉽게 분해되지 않으며 먹이연쇄상의 생물상에 고 농도로 축적될 뿐만 아니라 (Bioaccumulative) 환경 및 인간에 대한 독성 (Toxic)이 매우 높은 물질 군을 일컫는 말로서 기존의 POPs (Persistent Organic Pollutants) 개념을 보다 확장한 것으로 이해할 수 있다. 이들 물질은 각종 암을 비롯하여 생식기능장애, 신경계장애, 성장 및 발육부진 등 인체건강에 장애를 초래할 뿐만 아니라 환경 중에서의 생태독성 (만성 및 발생독성)이 특히 강하여 성체뿐만 아니라 그 자손에까지 악영향을 나타냄으로써 현존

하는 생물계의 다양성을 위협하고 있다. PBTs는 대기, 수질, 토양으로 쉽게 이동하며 장거리 이동의 특성 때문에 현재 선진국을 비롯하여 OECD, UNEP 등 주요 국제기구는 이들 PBTs를 가장 중요한 환경현안의 하나로 인정하고 이에 대한 국제적인 관리시스템 구축을 위해 노력중이다. PBT Chemicals 그룹에 속하는 화학물질은 UNEP에서 지정한 12개 POPs 물질 외에 alkyl lead, mercury, perfluorooctane sulfonate, OCS (Fig. 1) 등 보다 다양한 형태의 잔류성/생물농축성/독성 화학물질을 포함하고 있으며 현재 미국 EPA는 생물농축성, 독성, 환경배출량 등을 고려하여 priority level을 분류하고 우선 level 1에 속하는 16종의 PBT 물질군의 목록을 제시하였는데 OCS도 이중의 한 물질이다 (Council of Great lakes Industries, 1999; EPA, 2000; NICNAS, 2002). 그러나 OCS에 대한 독성은 다른 PBTs 물질과는 달리 독성연구가 거의 이루어져 있지 않았으며 생태독성자료로서 조류, 물벼룩, 어류 등에 대한 급성독성 데이터 세트도 마련되어 있지 않는 실정이다. 이에 본 연구에서는 OCS에 대한

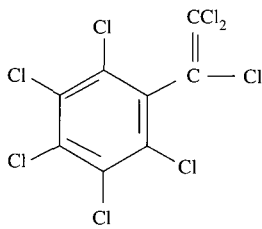


Fig. 1. Chemical Structure of Octachlorostyrene.

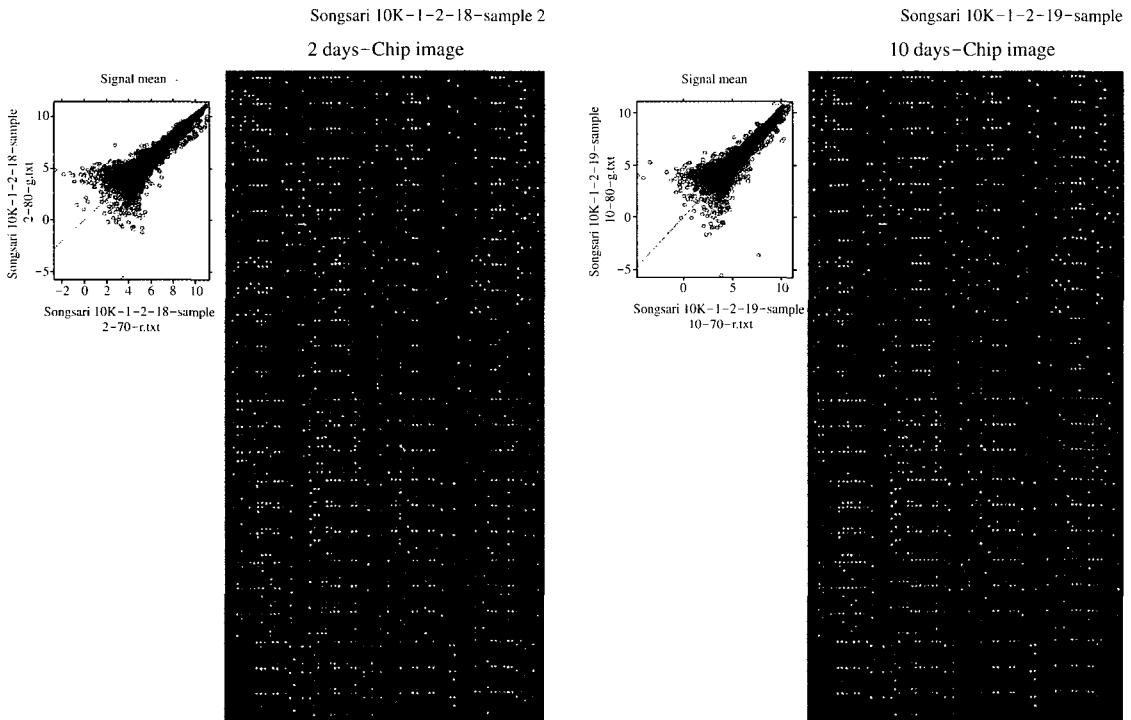


Fig. 2. A scanned microarray image contains 2,941 medaka genes. Among the genes, 1,351 medaka genes are unknown.

Table 1. Gene numbers of induction or repression by OCS exposure

	2 day exposure	10 day exposure
Induction	58 genes	58 genes
Repression	25 genes	27 genes

어류독성을 연구하고자 하며 우선 치사량이하의 수준에서 나타나는 생리학적 변화에 대한 지견을 얻고자 OCS를 1 ppm 이하의 수준에서 노출시킨 후 나타나는 유전자 발현변화를 연구하였다.

그 결과 OCS는 송사리의 다양한 유전자의 발현

Table 2. Partial list of up- or down-regulated genes by 2-day exposure of OCS to medaka, *oryzias latipes*

Up-regulation		Down-regulation	
Genes	Fold	Genes name	Fold
Tripartite motif protein 16	7.0	Similar to hypothetical protein	0.2
Lactoylglutathione lyase (Methylglyoxalase)	6.2	Beta tubulin	0.3
C1q-like adipose specific protein	5.2	10 kDa heat shock protein mitochondrial (Hsp10)	0.4
TBT-binding protein	5.1	Squalene epoxidase	0.4
Similar to heat shock protein, 74 kDa, A	5.0	Vitellogenin 1	0.4
Putative senescence-associated protein	5.0	Proteasome endopeptidase complex	0.5
Complement component C7	3.8	Annexin max3	0.5
ZPC domain containing protein 5	3.2	Selenoprotein M	0.5
Pellino 2	3.2	Choriogenin H	0.5
Apolipoprotein B	3.1	Metallothionein (MT)	0.5
Orla C3-1	2.8	Reverse transcriptase-like protein	0.5
15 kDa selenoprotein	2.8	Choriogenin L	0.5
NADH dehydrogenase subunit 5	2.8	Similar to profilin 2	0.5
Tropomyosin 1-1	2.6	Family-2 cystatin	0.7
Orla C3-2	2.5	Hepcidin precursor	0.7

* unknown gene are not listed.

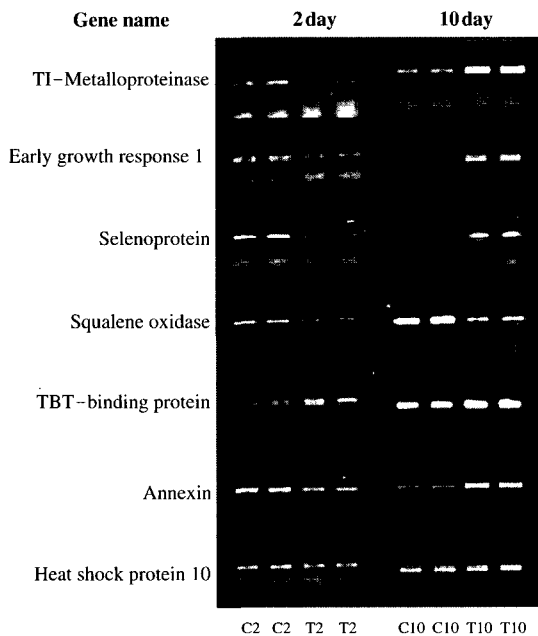
Table 3. Partial list of up- or down-regulated genes by 10-day exposure of OCS to medaka, *oryzias latipes*

Up-regulation		Down-regulation	
Genes	Fold	Genes Name	Fold
TBT-binding protein	18.5	Trypsinogen 2 precursor	0.2
Tissue inhibitor of metalloproteinase-2	17.4	Similar to hypothetical protein	0.2
C1q-like adipose specific protein	5.2	Choriogenin H	0.2
Complement component C7	4.3	Metallothionein (MT)	0.3
Early growth response 1	4.1	Trypsin III precursor	0.3
Apolipoprotein A-IV	3.9	Alpha amylase	0.3
Ependymin	3.6	Elastase 1 precursor	0.30
Similar to chromosome 20 open reading frame 149	3.6	Alpha-amylase	0.3
TARS protein	3.4	Exosomal core protein CSL4	0.4
Stearoyl-CoA desaturase	3.0	Cytidine deaminase	0.4
Ependymin	2.9	Family-2 cystatin	0.40
Warm-temperature-acclimation-related -65 kDa-protein-like-protein	2.9	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	0.4
Orla C3-1	2.9	Putative nuclear movement protein	0.5
Orla C3-2	2.8	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.5
Selenoprotein M	2.2	Type I keratin S8	0.6

* unknown gene are not listed.

Table 4. Primer sequences of medaka gene for PCR

Gene name	Primer sequence
Stearyl CoA desaturase	F: 5'-AGACGTGTTTGATAACGCTT-3' R: 5'-GAAGCCTTGTAGGTTCTGTG-3'
Tissue inhibitor of Metalloproteinase-2	F: 5'-AGATGAGCTGGATGAATAACA-3' R: 5'-GTCCTACCAATTTTGCTCTG-3'
Early growth response 1	F: 5'-GTTGCTACCACATACCCTTC-3' R: 5'-GTGAGCTGTAGATGGTGGAT-3'
TBT-binding protein	F: 5'-CATTAGCTACCTGCCATACC-3' R: 5'-CTTCGAGGGAGATGTT-GTAG-3'
C1q-like adipose specific protein	F: 5'-GAGTAAAGCACCAACCAGAG-3' R: 5'-CGTAAATTCCCACAATGAAT-3'
Lactoylglutathione lyase	F: 5'-GGTCAGAAAATGAAGAGCAG-3' R: 5'-TCACAAATGTGACTCCTTGA-3'
Estrogen response B-box	F: 5'-CAATAACCAGGAAAAGATGC-3' R: 5'-TGTTTGAGATGCTGTGAAAG-3'
Squalene oxidase	F: 5'-CACCTGATTTACTGAGGAGC-3' R: 5'-GGTCCACTTTAAAACACCAA-3'
Annexin	F: 5'-TCTGAAGCCTCTTGACTGAT-3' R: 5'-ATTTGCTGTCTCTGTTTCGTT-3'
Selenoprotein M	F: 5'-GGTCAAAGCTTTTGTGACTC-3' R: 5'-CATAATAGTGGCTGAGGAGG-3'
Heat shock protein 10	F: 5'-GGAAGTTCCTCCCTCTGTT-3' R: 5'-CACCTTCCCCTGAGACTT-3'

**Fig. 3.** Expression of genes identified to be up- or down-regulated by OCS in medaka by RT-PCR. Control; lane 1 and 2, Treated; lane 3 and 4 in each 2 day- or 4 day-exposure column. C2: 2 day control, T2: 2 day treat, C10: 10 day control, T10: 10 day treat.

을 조절하는 것으로 밝혀졌는데 송사리 DNA chip에 printing된 약 3,000개의 유전자 중 대조군에 비해 2배 이상의 변화가 나타나는 것은 약 80여개로 나타났다(Fig. 2, Table 1). 노출기간에 따라 변화된 유전자는 서로 같지 않았으나 변화를 보인 유전자의 수에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며 2일 노출과 10일 노출의 경우 유전자 발현이 증가되는 것은 각각 58종, 유전자 발현이 감소되는 것은 각각 25종과 27종이었다. 2일 노출에 의해 발현이 변화되는 경우의 일부 유전자 목록을 Table 2에 제시하였으며 10일 노출에 의해 그 발현이 변화되는 경우의 일부 유전자 목록을 Table 3에 각각 나타내었다. OCS 2일 노출에 의해 변화된 유전자중 그 발현이 증가된 유전자는 Tripartite motif protein 16을 비롯하여 lactoylglutathione lyase, C1q-like adipose specific protein 및 TBT-binding protein 등이 포함되어 있었다. 그 발현이 감소된 유전자는 squalene oxidase, vitellogenin, annexin 등으로서 콜레스테롤 대사관련, 난황단백질 합성관련, 배의 발달과 관련된 기능을 가진 것들이다. OCS 10일 노출에 의해 그 발현이 증가된 유전자는 tissue inhibitor of metalloproteinase-2 등을 비롯하여 early growth response 1, apolipoprotein A-IV 등이었으며 감소된

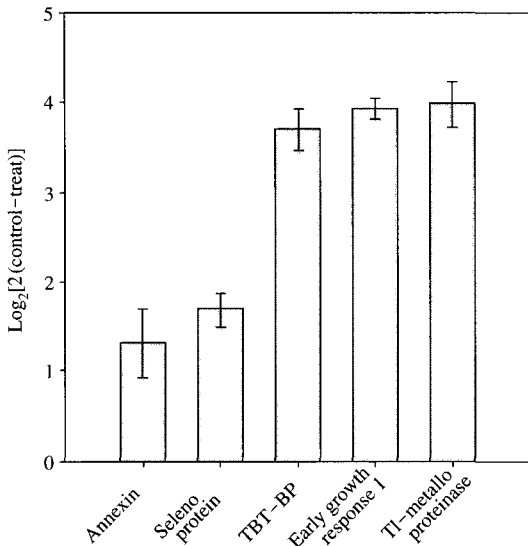


Fig. 4. Quantitative analysis of gene expression by real-time PCR.

유전자는 trypsinogen 2 precursor를 비롯하여 choriogenin H, metallothionein 등이 감소되는 것으로 나타났다.

OCS에 의해 그 발현이 변화된 유전자 중 본 연구에서는 Stearyl CoA desaturase, squalene oxidase 등 Cholesterol 합성과 관련된 유전자를 포함하여 11개의 유전자에 대한 보다 상세한 발현변화를 연구할 목적으로 이들 유전자 정보를 확인하고 프라이머를 합성하였다. 각각의 프라이머 염기서열은 Table 4에 나타나 있다. 각각의 프라이머를 이용하여 역전사후 증폭시킨 결과는 Fig. 3에 나타나 있는데 micararray 결과와 잘 일치하는 것을 알 수 있었으며 real time PCR로 정량적인 분석을 실시한 결과 Tissue inhibitor of metalloproteinase, early growth response 1, TBT-binding protein 등은 대조군에 비해 약 16배 정도로 그 발현이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

본 연구에서 사용한 송사리 DNA chip은 약 3,000의 유전자 정보를 동시에 파악할 수 있는 매우 효율적인 수단이다. 그러나 아직 송사리 유전자에 대한 염기서열정보가 전 세계적으로 충분히 밝혀져 있지 않아 유전자의 발현변화가 나타난다 할지라도 그 유전자가 어떤 유전자인지 그 기능은 무엇인지 충분히 알아 낼 수 있는 방법은 없다. 더

구나 각각의 유전자 발현이 송사리의 생리활성에 어떤 변화를 초래하는지를 알 수 없는 상태이다. 그럼에도 불구하고 본 연구결과 이제까지 알 수 없었던 OCS의 생태영향에 대한 많은 정보를 얻을 수 있었으며 향후에는 이러한 알 수 없는 유전자에 대한 정보를 규명하고 이들 변화가 각각 어떠한 연계성을 갖고 있는지 등 보다 구체적인 연구를 추진할 계획이다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 차세대핵심환경기술개발사업으로 지원받은 과제입니다.

참고 문헌

Bjerk JE and Brevik EM. Organochlorine compounds in aquatic environments. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1980; 9: 743-750.

Carey JH and Hart JH. Gas chromatographic/mass spectrometric identification of the major components of non aqueous material from the St. Clair River. Water POLL. RES. J. 1986; 21: 309-322.

Chu S, Covaci A, Voorspoels S and Schepens P. The distribution of octachlorostyrene (OCS) in environmental samples from Europe. Journal of Environ. Monit. 2003; 5: 619-625.

Council of Great Lakes Industries, Octachlorostyrene and suggested industrial sources, in "A report to the Great Lakes Binational Toxics Strategy OCS Workgroup", 1999.

EPA (USEPA OCS Work Group), Octachlorostyrene. in "Draft PBT National Action Plan for Octachlorostyrene", 1999.

Kuehl DW, Kopperman HL, Veith GD and Glass GE. Isolation and identification of poly chlorinated styrene in Great Lakes fish. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology 1976; 16: 127-132.

Kuehl DW, Johnson KL, Butterworth BC, Leonard EN and Veith GD. Quantification of octachlorostyrene and related compounds in Great Lakes fish by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Great Lakes Res. 1981; 7: 330-335.

Lee CW, Jeon SH, Na JG and Park K. Sequence analysis of choriogenin H gene of medaka (*Oryzias latipes*) and

- mRNA expression, *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002; 21(8): 1709–1714.
- Li H, Drouillard KG, Bennett E, Haffner GD and Letcher RJ. Plasma-associated halogenated phenolic contaminants in benthic and pelagic fish species from the Detroit River. *Environ. Sci. Technol.* 2003; 37: 832–839.
- Lommel A, Kruse H, Muller E and Wassermann O. Organochlorine pesticides, octachlorostyrene and mercury in the blood of Elb River residents, Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1992; 22: 14–20.
- Luckas B. Characteristic levels of chlorinated hydrocarbons and trace metals in fish from coastal waters of North and Baltic Sea. *J. Environ. Anal. Chem.* 1987; 29: 215–225.
- Mes J, Davies DJ, Doucet J, Weber D and McMullen E. Levels of chlorinated hydrocarbon residues in Canadian human breast milk and their relationship to some characteristics of the donors. *Food Additives and Contaminants* 1993; 4: 429–441.
- Mes J, Davies DJ, Turton D and Sun WF. Levels and trends of chlorinated hydrocarbon contaminants in the breast milk of Canadian woman. *Food Additives and Contaminants* 1986; 3: 313–322.
- Metcalf JL and Charlton MN. Freshwater mussels as biomonitors for organic industrial contaminants and pesticides in the St. Lawrence River. *The Science of the Total Environment* 1990; 97/98: 595–615.
- NICNAS, in *Polychlorinated Styrenes (Australia)*, 2002; 1–16.
- Muncaster BW, Hebert PDN and Lazar R. Biological and physical factors affecting the body burden of organic contaminants in freshwater mussels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1990; 19: 25–34.
- Ofstad EB, Lunde G and Martinsen K. Chlorinated aromatic hydrocarbon in fish from an area polluted by industrial effluents. *The Science of the Total Environment* 1978; 10: 219–230.
- Park K. Expression of Metallothionein mRNA in cadmium treated leydig cells. *Kor. J. Env. Toxicol.* 2004; 19(3): 261–269.
- Ryu J., Lee MS, Na JG, Chung K, Song BJ and Park K. Molecular cloning of CYP1A cDNA of medaka (*Oryzias latipes*) and regulation by environmental pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 2004; 23(4): 1004–1011.
- Selden AI, Nygren Y, Westberg HB and Boldin LS. Hexachlorobenzene and octachlorostyrene in plasma of aluminium foundry workers using hexachloroethane for degassing. *Occupational and Environmental Medicine* 1997; 54: 613–618.
- Solbakken JE and Kanp AH. Disposition of phenanthrene and octachlorostyrene in spiny lobsters, *Panulirus argus*, After intragastric administration. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 1986; 37: 747–751.
- Vogelgesang J, Kypke-Hutter K, Malisch R, Binnemann P and Dietz W. The origin of a contamination of fish from the river Neckar with hexachlorobenzene, octachlorostyrene and pentachlorobenzene: formation in an industrial process. *Z Lebensm Unters Forsch* 1986; 182: 471–474.
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Imatanaka, N and Takatsuki Mineo. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicol.* 2002; 170: 21–30.