

내분비계장애물질의 생태독성평가를 위한 표준시험법 비교연구 A Comparative Study of Standard Methods for Assessing Ecotoxicity of Endocrine Disrupting Chemicals

곽진일 · 최영설 · 문종민 · 김도경 · 안윤주[†]

Jin Il Kwak · Rongxue Cui · Jongmin Moon · Dokyung Kim · Youn-Joo An[†]

건국대학교 환경보건과학과

Department of Environmental Health Science, Konkuk University

(Received January 11, 2017; Revised February 14, 2017; Accepted March 3, 2017)

Abstract : Endocrine disrupting chemicals (EDCs) interfere with endocrine system in organisms, and have different mode of actions compared to conventional chemicals. Therefore, EDCs specific ecotoxicity tests and assessments have been globally developed by some organizations such as OECD, ASTM, and USEPA. In Korea, researches on EDCs and monitoring of EDCs in domestic environments were also continued. However, Korean ecotoxicity test guidelines for EDCs are not suggested till date. The purpose of this study is to review and analyze international ecotoxicity test guidelines for EDCs and the compare ecotoxicity methods and toxicity endpoints among standard test guidelines. We found that there are very limited EDCs specific soil ecotoxicity test guidelines (only in ASTM) compared to aquatic ecotoxicity test guidelines. Currently, fish, amphibian, waterflea, copepoda, earthworm, white worm, springtail, nematode, mite, and midge are suggested as standard ecotoxicity test species for EDCs. Reproduction, hormones, growth, vitellogenin, sex ratio and development were proposed as endpoints for EDCs ecotoxicity. This study provided the comparison of EDCs specific ecotoxicity methods and endpoints between standard test guidelines, and suggested the further research to develop the method for assessing ecotoxicity of EDCs.

Key Words : Endocrine Disrupting Chemicals, Ecotoxicity, Toxicity Endpoints

요약 : 내분비계 장애물질 (EDCs)은 생물체내에 유입되면 내분비계의 정상적 기능을 방해하는 특징이 있으며, 일반화학물질과는 다른 독성기전을 보이기 때문에 기존의 생태독성시험법과 달리 EDCs만의 독성을 평가하기 위한 생태독성시험법 및 독성종말점의 개발을 위한 연구가 필요하다. OECD, ASTM 및 USEPA와 같은 신뢰성 있는 국제기관에서는 EDCs의 생태독성시험법을 제안하고 있는 상황이다. EDCs가 유해성이 알려진 만큼 국내에서도 EDCs관련 정부지원 사업이 일부 EDCs에 대해 사업장내의 배출량, 환경매체에서 검출농도를 지속적으로 모니터링하고 있으며, EDCs관련 연구들이 보고되고 있다. 그러나 국내에는 EDCs를 대상으로 하는 생태독성시험법이 부재한 상황이다. 본 연구에서는 국외 EDCs의 생태독성시험법을 조사 및 분석하여 제안된 생물종과 독성종말점의 종류 및 시험조건 파악하고자 하였다. 그 결과, ISO에서는 아직 EDCs 생태독성시험법을 따로 제안하고 있지 않은 상태이며, OECD, ASTM, USEPA에서만 수생생물종인 어류 양서류, 물벼룩 및 요각류, 토양생물종인 지렁이, 애지렁이, 톡토기, 진드기, 토양선충, 그리고 퇴적물서식종인 지렁이와 깔따구에 대한 EDCs 평가시험법이 제시되어 있고, 생식, 호르몬, 성장, 비탈로제닌, 성비 및 발달 등과 관련된 독성종말점으로 제안되어 있었다. 결론적으로 EDCs 대상의 생태독성 평가방법은 매우 제한적이며, 생태독성 시험법 개발 및 독성종말점을 개발하기 위한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

주제어 : 내분비계장애물질, 생태독성, 독성종말점

1. 서론

내분비계 장애물질(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)이란 “내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 물질로 환경으로 배출된 물질이 체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용한다고 하여 환경호르몬으로 불리기도 하는 물질”¹⁾이다. EDCs에 노출될 경우 인간뿐만 아니라 생태계 모든 생물종에 위협할 수 있기 때문에,^{1,2)} 국제적으로 EDCs에 대한 문제인식을 하고 관련 연구 및 규제가 이뤄지고 있다.

우리나라의 경우 환경부에서 관련 연구로서 “내분비계장애물질 조사·연구사업(VI)”³⁾, “물환경종합평가방법 개발 조사연구(III)”⁴⁾ 등을 수행한 바 있으며, “수계 유출가능성이 있는 유해화학물질 분류화”²⁾에서는 수계유출 가능성별 우선순위

물질 목록 도출시 세계야생보호기금과 환경부의 환경자료집¹⁾에 근거하여 유해성을 파악한바 있다. 최근에는 2015년도의 “EDCs 통합적 위해평가 및 수용체 중심의 통합적 위해관리 방안 구축”, 2016년의 “EDCs 통합위해관리를 위한 한국형 환경 및 생태 유해성 평가 기술 개발”과 같이 환경호르몬으로부터 인체 및 생태 보호를 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

국내환경을 보호하기 위한 매체별(수질, 토양) 기준의 경우 EDCs 특성이 있는 일부 물질들이 기준들에 포함되어 있는 상황이다. 다만, 각 법에서 EDCs로 특정하지 않고, 다른 물질들과 동일한 잣대로 관리하고 있다. 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률에 근거하여 특정수질유해물질로 EDCs 특성이 있는 것으로 알려진 물질인 polychlorinated biphenyl, di(2-ethylhexyl) phthalate, lead, mercury, cadmium가 지정되

[†] Corresponding author E-mail: anyjoo@konkuk.ac.kr Tel: 02-2049-6090 Fax: 02-2201-3211

어 있고, 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙의 수질오염물질 목록에도 polychlorinated biphenyl, di(2-ethylhexyl) phthalate, lead, mercury, cadmium이 포함되어 있다. 환경정책기본법에서는 사람의 건강보호를 위한 수질 기준에 근거하여 polychlorinated biphenyl, di(2-ethylhexyl) phthalate, hexachlorobenzene, lead, mercury, cadmium을 관리하고 있으며, 토양오염우려기준에서는 polychlorinated biphenyl, lead, mercury, cadmium을 관리하고 있다.

또한 국내에서는 11종의 내분비계 장애추정물질(4,4'-Bisphenol A, 4-tert-octylphenol, branched 4-nonylphenol, nonylphenol, di(2-ethylhexyl) adipate, di(2-ethylhexyl) phthalate, mancozeb, benomyl, amitrole, carbaryl, permethrin)에 대해 사업장에서 환경매체로의 연간 배출량, 자가매립량, 및 위탁처리량에 대한 정보를 주기적으로 보고하도록 하고 있다.⁵⁾ 국내 수계 모니터링의 경우 환경부 수질측정망을 통해 EDCs 특성이 있는 것으로 알려진 물질인 polychlorinated biphenyl, di(2-ethylhexyl) phthalate, hexachlorobenzene, cadmium, lead, mercury을 대상으로 연 1회-12회 모니터링 하고 있다.^{6,7)} 또한 퇴적물 측정망을 통해 하천의 퇴적물에서 EDCs 특성이 있는 것으로 알려진 cadmium, lead, mercury이 포함되어 연 1회 모니터링하고 있으며, 호소 퇴적물에서 polychlorinated biphenyls 10동족체(Chlorobiphenyl, Dichlorobiphenyl, Trichlorobiphenyl, Tetrachlorobiphenyl, Pentachlorobiphenyl, Hexachlorobiphenyl, Heptachlorobiphenyl, Octachlorobiphenyl, Nonachlorobiphenyl, Decachlorobiphenyl)와 DDTs 6종(o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT)을 연 1회 모니터링하고 있다.^{6,7)} 위와 같이 국내에서는 EDCs를 대상으로 정부지원 관련연구 수행 및 환경매체에서의 모니터링이 지속되고 있고, 제한적이긴 하나 환경매체별 기준이 마련되어 있다. 그러나 아직 국내에서 EDCs의 생태독성기법과 관련된 연구가 수행된바 없고, 기법이 구축되지 않은 상황이므로, 본 연구에서는 국외 EDCs관련 생태독성기법을 조사하여 시험조건 및 독성종말점을 비교하고자 국내 적용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 연구방법

EDCs의 생태독성기법 문헌 수집을 위해 국제기관에서 제시하는 검증된 시험법으로 범위를 설정하였다. 조사기관은 Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), American Society for Testing and Materials (ASTM), U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) 및 International Organization for Standardization (ISO)을 대상으로 하였으며, 일반물질이 아닌 EDCs에 특화된 생태독성기법 존재여부 확인 및 독성종말점 분석을 수행하였다.

3. 연구결과

3.1. OECD

OECD⁸⁾에서는 시험지침 프로그램(OECD Test Guidelines Programme)을 위한 시험지침 작업반(working group of national coordinators of the test guidelines programme, WNT)을 운영하여 EDCs 시험평가 작업을 진행하고 있다. EDCs 시험평가 작업은 내분비계장애물질 시험 및 평가 감독그룹, 생태독성시험 개발그룹, 비동물시험 개발그룹, 포유동물 시험 개발그룹 4개의 주요 그룹으로 나뉘어 관리되고 있으며 EDCs 시험평가를 위하여 1996년부터 OECD 시험지침 프로그램 중 절반에 달하는 시험지침(test guideline, TG)과 기타 툴(tool)을 개발하였다. 또한 2002년에 EDCs Conceptual Framework (CF)를 제시하였으며 2012년에 업데이트를 하였다. CF⁹⁾에서는 시험레벨을 5개 레벨로 나누어 제시하고 있는데, 레벨 1에서는 기존 데이터 및 비시험정보 관련 내용을 포함하고 있으며 레벨 2-5에서는 내분비 메커니즘, 경로, 내분비 관련 부정적인 영향 관련 독성종말점 산출에 적용 가능한 독성시험을 포유류와 비포유류로 나누어 제시하고 있다. 생태독성평가를 위한 독성시험은 비포유류를 이용한 독성기법에 포함되었으며 총 24종의 생태독성시험을 권장하고 있다. 제시된 생태독성시험 중 현재 사용 가능한 TG는 기존에 존재하는 일반물질에 대한 TG, EDCs 평가를 위하여 업데이트한 TG 및 EDCs 평가만을 위해 개발된 TG를 포함하여 15건이 있으며, 그 외 9건의 독성시험에 관하여 시험기법이 계속하여 개발 중인 것으로 확인되었고 관련 내용은 보고서 또는 GD로 제시되어 있다. 개발 중인 시험기법으로는 물벼룩을 이용한 다세대 평가,⁹⁾ 양서류의 수정란을 이용한 갑상선 신호 방법,^{9,10)} 연체동물을 이용한 부분 및 전반 생활사 평가,^{9,10)} 어류 생활사 독성평가,^{9,11)} 암컷 큰가시고기를 이용한 안드로제닉 스크리닝 평가,^{9,12-14)} 보리새우 생활사 독성평가,^{9,10)} 어류 부분 생활사에서의 생식을 평가,^{9,15)} 요각류를 이용한 생식 및 발달평가^{9,16,17)}가 있다. 또한 OECD는 계속하여 EDCs에 관하여 연구를 진행하여 문서를 제시하고 있으며 현재 EDCs 시험 및 평가에 관하여 59건의 리포트가 제시가 되어 있다.¹⁸⁾ 한편, OECD는 기존에 존재하는 일반물질에 대한 TG 중 EDCs 생태독성평가에 적용 가능한지를 검토하여 기존의 15건의 TG 중 일부 어류, 양서류, 갈따구, 지렁이, 물벼룩, 톡토기, 애지렁이, 진드기 대상의 TG를 EDCs 평가에 활용 가능한 것으로 보고하였다.⁹⁾

따라서 OECD에서 검증한 EDCs 생태독성평가 관련 TG 중 생물종으로는 어류가 4건으로 가장 많았으며 시험매체는 수서 7건, 토양 4건, 퇴적물 4건으로 수생태 독성기법이 가장 많은 것으로 분석되었다. 독성종말점은 모든 시험지침에서 생존율과 생식율을 기반으로 하고 있으며 어류와 양서류를 이용한 TG에서만 EDCs 관련 특정 독성종말점을 제시하고 있다(Table 1). 수서매체에서의 독성기법은 어류, 양서류, 물벼룩을 이용한 7건의 시험기법으로 어류 4건, 양서류 2건, 물벼룩 1건이 있다. 어류 관련 TG는 TG 229,¹⁹⁾ TG 230,²⁰⁾ TG 234,²¹⁾ TG 240²²⁾에 제시되어 있다.

TG 229¹⁹⁾는 EDCs 평가 관련 리포트인 No. 109를 기반으로 한 어류 급성 생식율 평가 시험법으로 *Pimephales promelas*;

Table 1. EDCs specific ecotoxicity test guidelines and test conditions in OECD

Species	Test duration	Media	Temperature	Light	Endpoint	Note	Ref.
<i>Pimephalespromelas</i> ; <i>Oryziaslatipes</i> ; <i>Daniorerio</i>	21 d	water	25/26±2 °C	12/16 h light, 540-1000 lux	survival, behaviour, fecundity, 2y sex characteristics, VTG, gnadal histopathology	Developed	19)
<i>Pimephalespromelas</i> ; <i>Oryziaslatipes</i> ; <i>Daniorerio</i>	21 d	water	25/26±2 °C	12/16 h light, 540-1000 lux	survival, behaviour, fecundity, 2y sex characteristics, VTG, oestrogenic, aromatase inhibition, androgenic activity	Developed	20)
<i>Oryziaslatipes</i> ; <i>Daniorerio</i> ; <i>Gasterostreusaculeatus</i>	60 dph	water	20/25/27±2 °C	12-16 h light, 540-1080 lux	hatching success, survival gross-morphology, VTG gonadal histology, sex retio	Developed	21)
<i>Oryzias latipes</i>	19 w	water	24-26 °C	16 h light, ~150 lux	fecundity, fertility, hatching, growth, survival, VTG, secondary sex characteristics, external sex ratio, time of 1st spawn, hisropathology (gonad, liver, kidney)	Developed	22)
<i>Xenopus laevis</i>	21 d	water	22±1 °C	12 h light, 600-2000 lux	mortality, development stage, hind limb length, SVL, wet body weight, thyroid gland histology	Developed	23)
<i>Xenopus laevis</i>	~17 w	water	21±1 °C	12 h light, 600-2000 lux	mortality, time of NF stage 62, thyroid histology assessment, growth, liver-somatic index, genetic/phenotypic sex ratios, histopathology for gonads, reproduction ducts, kidney and liver and plasma VTG	Developed	24)
<i>Daphnia magna</i>	21 d	water	18-22 °C	16hlight, <15-20 µEm- 2S-1	offspring, mortality, growth, first brood, broods size, aborted broods, male neonates, ephippia, intrinsic rate	Updated	29)
<i>Enchytraeus albidus</i>	42 d	soil	20±2 °C	16 h light, 400-800 lux	fecundity, mortality, behavioural change	Existed	31)
<i>Eiseniafetida</i> ; <i>Eiseniaandrei</i>	56 d	soil	20±2 °C	16 h light, 400-800 lux	mortality, weight, reproduction, behavioural change	Existed	32)
<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>	14 d	soil	20±2 °C	16 h light, 400-800 lux	reproduction, mortality, behavioural change	Existed	33)
<i>Folsomiaacandida</i> ; <i>Folsomiafimetaria</i>	21/28 d	soil	20±1 °C	12 h light, 400-800 lux	reproduction, mortality, behavioural change	Existed	34)
<i>Chironomus sp.</i>	20-65 d	sediment	20/23-25 °C	16 h light, 500-1000 lux	emergence, growth, survival	Existed	35)
<i>Chironomus sp.</i>	20-65 d	sediment	20/23-25 °C	16 h light, 500-1000 lux	emergence, growth, survival	Existed	36)
<i>Chironomus sp.</i>	44/100 d	sediment	20/23/25±2 °C	16 h light, 500-1000 lux	reproduction, development rate, sex retio, mortality, behavioural change, No. of egg ropes, fertility of egg ropes	Developed	37)
<i>Lumbriculus variegatus</i>	28 d	sediment	20±2 °C	16 h light, 100-500 lux	mortality, biomass, reproduction, behavioural change	Existed	38)

Oryzias latipes; *Danio rerio* 3가지 시험종을 이용하여 어류 생식율에 대하여 시험법으로 암수컷 성체를 21일간 유수식으로 노출시켜 생존, 거동, 생식, 2차 성징 특성, 비텔로제닌 (vitellogenin, VTG), 생식선 조직병리를 독성종말점으로 사용하였다. TG 230²⁰⁾은 리포트 No 76, 77, 91, 92 등의 EDCs 평가 관련 리포트가 제시되어 있으며 어류 단시간 노출을 통하여 에스트로제닉, 안드로제닉 활성과 아로마타제 저해를 평가하는 스크리닝 시험법이다. 이때 시험종은 *Pimephales promelas*; *Oryzias latipes*; *Danio rerio* 성체를 제안하였으며 유수식 환경에서 21일간 노출하여 생존, 거동, 2차 성징, VTG를 독성종말점으로 제시하였다. TG 234²¹⁾는 어류 성적 발달에 관한 시험법으로 *Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Gasterostreus*

*aculeatus*의 수정란을 사용하여 유수식 혹은 반지수식에서 60 dph (days post-hatch)간 진행하였으며 독성종말점은 부화율, 형태변화, VTG, 성비(sex ratio)를 측정하였다. TG 240²²⁾은 *Oryzias latipes*를 이용한 한세대 이상 생식율 평가 시험법으로 유수식에서 한쌍의 12 wpf (weeks post fertilization) 암수컷을 노출하였으며 태어난 수정란 (F1)을 재노출하여 F2가 부화할 때까지 진행하였다. 시험기간은 19주이며 독성종말점은 F0의 생식율; F1의 부화율, 생존 (0-4 wpf, 4-9 wpf, 9-15 wpf), 성장, 2차 성징 특성, VTG, 생식선 발달, 생식, 산란까지의 기간, 조직병리학; F2의 부화율을 측정하였다. 양서류를 이용한 독성기법은 TG 231,²³⁾ TG 241²⁴⁾로 시험은 수서환경에서 진행되었다.

TG 231²³⁾은 EDCs 관련 리포트 No 76,²⁵⁾ 77,²⁶⁾ 91,²⁷⁾ 92²⁸⁾ 등이 있으며 *Xenopus laevis*를 이용한 변태(metaorphosis) 평가 시험기법으로 유충(larvae)을 이용하여 우수식 또는 반지수식에서 총 21일간 진행되었으며 생존, 발달단계, 뒷다리 길이, 콧구멍 길이, 무게, 감성선 조직학을 독성종말점으로 사용하였다. TG 241²⁴⁾는 *Xenopus laevis*를 이용한 성장 및 발달단계 평가 독성기법으로 우수식에서 최대 14주간 진행하여 개체의 생존, 생식, NF 62단계에 도달하는 시간, 갑상선 조직병리, 성장, 간 수치, 유전적/표현형 성비, 생식선 조직병리, 신장과 간 및 플라스마 VTG를 독성종말점으로 제시하고 있다.

물벼룩 독성기법은 TG 211²⁹⁾로 EDCs 평가에 적용하기 위하여 EDCs 관련 리포트 No 93³⁰⁾을 기반으로 2012년에 업데이트를 하였으며⁸⁾ *Daphnia magna*를 이용한 생식율 평가 시험법으로 21일간 태어난 지 24 h 미만 어린 개체를 노출하여 우수식 또는 반지수식으로 진행되며 독성종말점은 생존, 성장, 생식, 첫배 생산시간, 배반복, 낙태된 배수, 수컷 개체 생성을 제시하고 있다.

토양에서는 애지렁이, 지렁이, 진드기, 톡토기를 이용한 총 4건의 시험기법으로 각각 TG 220,³¹⁾ TG 222,³²⁾ TG 226³³⁾ 및 TG 232³⁴⁾에 제시되어 있다. TG 220³¹⁾은 *Enchytraeus albidus* 성체를 이용한 생식율 평가 독성기법으로 시험기간은 총 42일로 성체 제거 전 후로 각각 21일간 노출하여 성체의 생존, 생식, 거동을 독성종말점으로 제시하였다. TG 222³²⁾는 *Eisenia fetida*와 *Eisenia andrei* 성체를 시험중으로 사용하여 지렁이 생식율 평가 시험법이며 시험기간은 총 56일로 성체 제거 전 후 각각 28일간 노출하여 성체의 생존, 생식, 거동을 독성종말점으로 사용하고 있다. TG 226³³⁾은 육식성 진드기인 *Hypoaspis (Geolaelapa) aculeifer*의 암컷 성체를 이용하여 생식독성을 평가한 시험법으로 시험기간은 14일로 독성종말점은 생존, 생식을 측정하였다. TG 232³⁴⁾는 *Folsomia candida*와 *Folsomia fimetaria*를 이용하여 생식율 평가를 위한 시험기법이다. *Folsomia candida*는 9-12일 개체를 사용하여 28일간 노출하고 *Folsomia fimetaria*는 23-26일 개체를 사용하여 21일간 노출하며 독성종말점은 모두 생존과 생식을 제시하였다.

퇴적물에서는 총 4건의 시험기법으로 깔따구 3건과 지렁이 1건으로 각각 TG 218,³⁵⁾ TG 219,³⁶⁾ TG 233³⁷⁾ 및 TG 225³⁸⁾에 제시되었다. TG 218-219^{35,36)}는 *Chironomus riparius*, *Chironomus tentans*, *Chironomus yoshimatu* 1령기 유생을 이용한 독성시험기법으로 노출기간은 *C. riparius*와 *C. yoshimatu*는 28일, *C. tentans*는 65일이며 우수식 또는 반지수식에서 시험을 진행하며 독성종말점은 생존, 개체출현율(emergence), 개체출현까지의 시간, 알 무게를 사용하였다. TG 233³⁷⁾은 *Chironomus riparius*, *Chironomus dilutus*, *Chironomus yoshimatu* 1령기 유생을 이용한 생활사 독성평가 시험기법으로 시험기간은 F1세대까지 진행되어 F0 및 F1 노출기간이 *C. riparius*와 *C. yoshimatu*는 최대 28일이며 *C. dilutus*는 최대 65일이다. 독성종말점은 F0 및 F1 세대의 암수컷 개체출현, 성비,

생존율, 거동, 생식율을 평가하였다. TG 225³⁸⁾는 *Lumbriculus variegatus* 성체를 이용한 독성평가 시험기법으로 28일간 노출 후 생존, 무게, 생식, 거동을 독성종말점으로 사용하였다.

3.2. ASTM

ASTM은 1999년에 “Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment”³⁹⁾를 출판하며 EDCs 생태독성평가 관련 문서를 제시하였다. 본 문서에는 무척추동물과 척추동물을 이용한 EDCs 스크리닝 평가 방법, 체외에서의 내분비 시험방법, 산업적 관점에서의 내분비 스크리닝 방법에 관한 29건의 문서가 포함되어 있으며, 독성 및 위해성평가를 위한 생물지표 종말점을 중점으로 제시하였다. 여기에는 생화학적, 발달단계별, 거동 및 내분비 지표가 포함되어 있다. 그 중 EDCs에 대한 생태독성기법 관련 문서는 총 19건(어류 7건, 무척추동물 1건, 패류 1건, 원생동물 1건, 해양갑각류 2건, 토양선충 1건)이었으며, 그 외에 EDCs 독성평가를 위한 갑상선 기능 평가, 에스트로겐 활성 평가, 뇌-뇌하수체-고환에서의 생식율 평가, EROD 효소활성 평가, 유세포분석기(flow cytometry)를 이용한 세포분석, 현장샘플을 이용한 독성평가 등의 기법을 제시하였다. 생태독성과 관련하여 어류 관련 시험기법이 가장 많았으며, 퇴적물에서는 조개를 이용한 생존율 평가가 포함되어 있고, 토양매체에서는 토양선충을 이용한 생식율 평가만이 있는 것으로 확인되었다(Table 2).

어류를 이용한 독성평가는 다양한 종을 이용하여 유전자분석부터 개체독성평가를 진행하였다. *Cyprinodon variegatus*를 이용한 독성기법은 시험물질을 주입하고 4일 후 추가주입 후 VTG mRNA, 에스트로겐 리셉터 mRNA 평가하였다. *Oryzias latipes*를 이용한 독성기법에서는 in vitro는 3시간 노출, in vivo는 10일간 노출 후 뇌의 아로마타제 활성(aromatase activity)을 평가하였다. *Oreochromis mossambicus*를 이용한 독성기법은 시험물질에 28일 노출 후 성비, 무게, 간 무게, 고화 무게, 뇌하수체 무게 등을 독성종말점으로 제시하였다. *Orconectes rusticus*를 이용한 독성기법은 7d 노출 후 생존율과 거동을 평가하였으며 *Oncorhynchus mykiss*를 이용한 독성기법은 96 h 노출 후 거동, 단백질함량 및 폴린에스테라제 활성을 평가하였다. *Lepomis macrochirus*를 이용한 독성기법은 실험실에서 30일 노출 후 생존, 성장, 유명상태, 개체간 충돌횟수, 먹이효율, 공격성 등을 독성종말점으로 제시하였고 메조코즘(mesocosm) 환경에서는 56일 노출 후 생존, 성장, 무게, 생식율을 평가하였다. *Oreochromis niloticus*를 이용한 독성기법은 각각 4개월, 7개월, 치사 전까지 노출하여 생존 및 시험물질의 축적을 평가하였다.

무척추동물을 이용한 독성기법으로는 ASTM E1193-87⁴⁰⁾을 기반으로 한 물벼룩 독성평가 및 ASTM E1191-90⁴¹⁾을 기반으로 한 새우류 독성평가를 제시하고 있는데 물벼룩은 21일, 새우류는 28일 만성노출 후 성장, 탈피, 발달, VTG,

Table 2. EDCs specific ecotoxicity test guidelines and test conditions in ASTM³⁹⁾

Species	Test duration	Media	Endpoint
<i>Daphnia shrimp</i>	21 d	water	growth, molting, parthenogenetic development, VTG, lipid analyses, steroid hormone metabolism, reproductive maturation
	28 d		
<i>sheepshead minnow</i>	5 d	-	VTG mRNA, estrogen receptor mRNA (RNA from liver)
<i>Palaemonetes pugio</i>	until maturation	water	survival, morting, development stage
<i>Rhithropanopeus harrisi</i>	until maturation	water	survival, morting, development stage
<i>Oryzias latipes</i>	3 h (<i>in vitro</i>)	water	brain aromatase activity
	10 d (<i>in vivo</i>)		
<i>Oreochromis mossambicus</i>	28 d	water	sex ratio, body weight, liver weight, gonad weight, pituitary weight
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	8 h	water	growth
<i>Callinectes sapidus embryo</i>	2-6 d	water	hatching
	24 h	water	DNA damage
<i>Orconectes rusticus</i>	7 d	water	survival, swimming behaviour
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 h	water	swimming behaviour, protein content, cholinesterase activity
<i>Lepomis macrochirus</i>	30 d	water	survival, growth, swimming capacity, strike frequency, feeding efficiency, aggression
	56 d		survival, growth, biomass, reproduction
<i>Oreochromis niloticus</i>	until dead	water	survival, uptake
	4 months		
	7 months		
<i>Lampsilis straminea claibomensis</i>	9 d	sediment	survival
<i>Caenorhabditis elegans</i>	24 h	soil	survival, recovery

지질, 스테로이드 호르몬, 성숙 등을 독성종말점으로 제시하였다. 원생동물인 *Tetrahymena pyriformis*를 이용한 독성 평가는 8시간 노출 후 성장을 평가하였다.

해양동물을 이용한 독성기법은 2건으로 새우류 *Palaemonetes pugio*와 게류 *Rhithropanopeus harrisi*를 이용한 만성독성 기법으로 개체 성숙까지 노출하였으며 독성종말점은 생존, 탈피, 발달단계를 평가하였다. 다른 한 건은 게의 수정란을 이용한 독성평가로 embryo를 2-6일 노출 후 부화율을 평가하였고 24 h 노출 후 DNA 손상을 평가하였다.

또한 퇴적물 독성평가는 패류인 *Lampsilis straminea claibomensis*를 이용하여 9일 노출 후 개체의 생존을 평가하였고, 토양매체에서의 독성평가는 토양선충 *Caenorhabditis elegans*를 이용하여 24시간 노출하였으며 생존을 독성종말점으로 사용하였다.

3.3. USEPA

미국 환경보호국(USEPA)에서는 EDCs 독성평가를 위한 실험법을 제공하고 있으며, 이는 유해물질규제법(toxic substances control act, TSCA), 살충·살균·살서제법(insecticide, fungicide, and rodenticide act, FIFRA), 및 연방식품의약품화장품법(federal food, drug, and cosmetic act, FFDC)에 따른 데이터를 제공하기 위해 USEPA 소속의 예방농약유독물질실 (office of prevention, pesticides and toxic substances, OPPTS)과 화학물질안전/오염방지실(office of chemical safety and pollution prevention, OCSPP) 에서 만들어졌다.⁴²⁾

USEPA에서 시행하고 있는 내분비계장애물질 스크리닝 프

로그렘(endocrine disrupter screening program, EDSP)에서는 FFDC section 408 (21 U.S.C. 346a)에 명시된 바에 따라 실험 가이드라인을 Tier 1과 Tier 2로 나누어 제시하고 있다.⁴³⁾ Tier 1 스크리닝은 OPPTS 890 Series의 가이드라인을 통해 full-screening battery를 진행하고, 대상물질이 에스트로겐, 안드로겐, 및 갑상선 호르몬에 영향을 줄 수 있는 가능성을 확인한다. 그러나 대상물질이 호르몬 시스템에 영향을 미치는지 까지만 확인 할 수 있으며, 인간이나 환경에 내분비계 장애물질로써 작용하는지는 확인할 수 없다. Tier 1 스크리닝의 결과는 추가적인 과학적 정보와 함께 비교하고, 이를 토대로 Tier 2 시험의 진행여부를 결정하게 된다. Tier 2 시험은 OCSPP 890 Series에서 총 3건의 가이드라인을 제시하고 있으며, 이를 통해 대상 물질이 내분비계 장애물질로 악영향에 관여되는지 판단 할 수 있다. 또한, 대상물질로 발생한 악영향과 대상물질의 농도간의 용량-반응 관계를 알아 낼 수 있다.

Tier 1 스크리닝은 총 11건의 가이드라인이 존재하며, 대상 시험종으로 양서류, 어류, 인간 세포주 렛트 그리고 렛트에서 추출한 효소를 이용한 실험법을 제시하고 있다.⁴³⁾ 이 중 양서류 변태과정과 어류 생식능 평가를 이용한 단 2건만이 생태독성평가 실험법에 해당한다(Table 3). OPPTS 890.1100 (USEPA, 2009a)에서는 양서류인 *Xenopus laevis*의 올챙이를 이용하여 변태 간에 발생할 수 있는 형태학적 이상을 스크리닝 할 수 있는 방법을 제시하였다. 20마리의 올챙이를 1일간 유수식(25 ml/분)으로 노출하였으며, 노출 조건은 22 °C, 12 h light: 12 h dark (600-2000 lux)이었다. 내분비계 장

Table 3. EDCs specific ecotoxicity test guidelines and test conditions in USEPA

Tier	Species	Test duration	Media	Temperature	Light	Endpoint	Ref.
Tier 1	<i>Xenopus laevis</i>	21 d	any water that is locally available	22±1 °C	12 h light: 12 h dark (600 to 2000 lux)	limb length, snout to vent length, developmental stage, wet weight, thyroid histology	42
	<i>Pimephales promela</i>	21 d	clean, surface, well, or reconstituted water	25±1 °C	16 h light: 8 h dark (540 to 1080 lux)	survival, reproductive behavior, secondary sex, fecundity, fertility	44
Tier 2	<i>Oryzias latipes</i>	19 w	any water that is suitable long-term survival and growth	25±1 °C	16 h light: 8 h dark (100 to 150 lux)	survial, growth, vitellogenin, secondary sex, histopathology, fecundity, fertility	45
	<i>Xenopus laevis</i>	10 w	any water that is locally available	21±1 °C	12 h light: 12 h dark (600 to 2000 lux)	survial, abnormal behavior, abnormal morphology, length, weight	46

애물질로 인하여 영향이 발생하는 생존률, 성장단계, 뒷다리 길이, 몸통길이, 생체량, 갑상선 조직학적 이상으로 총 6가지의 종말점을 제시하고 있으며 생존률은 매일, 형태학적 종말점(길이, 무게)은 7일과 12일, 및 갑상선 조직학적 이상은 21일에 한 번씩 측정하도록 하였다. OPPTS 890.1350⁴⁴⁾에서는 어류인 *Pimephales promelas*를 이용하여 발생하는 생존률, 생식률 및 다양한 생식기관의 이상을 관찰 할 수 있는 방법을 제시하였다. 4-6달 된 4마리의 암컷, 2마리의 수컷 *P. promelas*를 유수식(2.7 L/시간)으로 노출하며, 노출 조건은 25°C, 16 h light: 8 h dark (540-1080 lux)으로 하였다. 생존률, 생식률, 이상 거동, 및 알 생산(Fecundity)은 매일 측정하였으며, 수정률, 성체의 형태학적 이상, 성체의 무게 및 길이는 노출이 종료된 시점에 측정하였다. 노출 종료 후 노출 개체를 회수 하여 vitellogenin의 농도, 성 호르몬농도, 2차 성징 및 생식샘 이상을 측정하도록 하였다. 특히 생식샘 이상의 경우 현미경 관찰에서 확인 할 수 있는 이상 현상을 정상개체, 수컷, 암컷, 및 기타 이상 징후로 나누어 현미경 관찰사진으로 제시하였다.

Tier 2 시험법은 총 3건의 가이드라인이 존재하며, 대상 시험종으로 메추라기, 어류, 양서류를 이용한 시험법을 제시하고 있다. Tier 1 스크리닝에서 보다 오랜 기간 동안 노출 후 독성을 평가 한다.

OCSPP 890.2200⁴⁵⁾에서는 어류인 *Oryzias latipes*를 이용하여 어미세대에서 후세대까지 수정, 부화, 치어, 성체, 및 생식에 이르는 종말점을 모두 평가할 수 있는 실험법을 제시하였다. 반복별 1 쌍의 교배 쌍(F0)을 유수식으로 노출하였고, 반복 당 20개의 수정란(F1) 14주간 노출시켰다. 노출 조건은 25°C, 16 h light: 8 h dark (100-150 lux)으로 하였다. 어미세대(F0)에 노출 후 첫 3주동안 F0의 알 생산량과 수정률을 평가하였으며, 4주차에는 F0의 성장률을 평가하였다. 5주차(수정 후 2주차)에는 F1의 부화율과 6주차에는 치어(F1)의 생존률을 평가하였다. 12주차에 F1의 생존률, 성장률, vitellogenin 및 2차 성징을 평가하였고, 15-17주차에는 F1의 알 생산량 및 수정률을 평가하였으며, 18주차(수정 후 14주)에 F1의 생존률, 성장률, 2차 성징 및 생식소 및 장기의 조직 병리학적 이상을 현미경으로 관찰하였다. 마지막

으로 19주차에 F2의 부화율을 측정하도록 하여 한 생식주기 동안 발생하는 이상현상을 관찰 할 수 있도록 하였다. OCSPP 890.2300⁴⁶⁾에서는 양서류인 *Xenopus laevis*를 이용하여 올챙이에서 성체까지 다양한 종말점을 평가할 수 있는 실험법을 제시하였다. 반복별 Nieuwkoop and Faber (NF) stage 8-10의 *X. laevis*를 20개체 씩 노출하여 매일 생존율 및 병리학적 이상을 확인하였다. NF stage 62 (노출 후 약 41일 후) 갑상선의 조직병리학적 이상, 길이 및 무게를 측정하였다. NF stage 66(노출 후 약 70일 후)에 도달한 개체를 임의로 10개체를 선발 한 뒤 16 주 까지 노출하였다. 노출 종료 후 길이, 무게, liver-somatic 지수, 유전학적 성비, 생식기관 및 내장 기관의 조직병리학적 이상을 측정하도록 하여 OCSPP 890.2200 (USEPA, 2015a)에서와 마찬가지로 대상 생물종의 한 생식주기 동안 발생하는 이상 현상을 관찰 할 수 있도록 하였으며, Tier 1 스크리닝 수준에서 보다 충분한 실험 결과를 바탕으로 내분비계장애물질이 개체에 어떠한 악영향을 미치는지 예측 할 수 있도록 하였다. 현재 USEPA에서 제공하는 EDCs를 위한 생태독성시험법은 Tier 1에서 2건, Tier 2에서 2건이며 모두 수서 생태종을 이용한 시험법이다. 현재까지는 토양생태 시험종에 대한 시험법은 제시되고 있지 않고 있다.

3.4. ISO

현재까지 국제표준화기구(ISO)에서는 기존의 생태독성시험법, 독성종말점 이외에 EDCs에 대한 생태독성시험법과 독성종말점을 제안하고 있지 않는 것으로 확인되었다.

4. 결론

국의 EDCs관련 생태독성시험법을 조사한 결과, 수서생물종은 어류 양서류, 물벼룩 및 요각류, 토양생물종은 애지렁이, 지렁이, 토티기 및 토양선충, 그리고 퇴적물서식 생물종은 깔따구와 지렁이에 대해 기법이 개발되거나 기존 일반물질에 대한 기법을 그대로 적용 가능한 것으로 확인한 문서들이 보고되었다. 어류의 경우 androgen, estrogen, thyroid hor-

mone, diagnosis, sexual development, diagnosis of gonads, reproduction에 대한 종말점을, 양서류의 경우 metamorphosis, histology, growth, development에 대한 종말점을, 요각류의 경우 development 및 생식에 대한 종말점을, 물벼룩의 경우 생식에 대한 종말점을, 지렁이 종의 경우 생존, 성장 및 생식에 대한 종말점을, 갈따구의 경우 암수컷 개체출현, 성비, 생존율, 거동, 생식에 대한 종말점을, 진드기와 톡토기의 경우 생존율 및 생식에 대한 종말점, 그리고 토양선충의 경우 생식에 대한 종말점을 평가하고 있었다. EDCs에 의한 생태독성을 평가할 수 있는 종말점으로서 수서, 토양, 퇴적물 생물종에서 공통적으로 생식이 제안되어 있었으며, 어류와 양서류는 호르몬과 관련된 종말점들을 평가할 수 있는 기법이 마련되어 있는 상태이다. 한편 수서생태독성기법과 달리 EDCs에 대한 토양생태독성기법은 현재까지 몇가지 TG에 대해 기존의 TG를 그대로 적용 가능함을 확인한 것으로서 EDCs 특이적인 TG로 개발된 것은 없었다. 따라서 향후 국내뿐만 아니라 국외에서도 EDCs에 대한 토양생태독성기법은 다양한 생물종에 대해 개발이 되어야 할 필요성이 있는 것으로 분석되었다.

Acknowledgement

이 연구는 환경부 “생활공감 환경보건기술개발사업(EDCs 통합위해관리를 위한 한국형 환경 및 생태유해성 평가 기술 개발)” 및 한국연구재단(NRF-2016R1A2B3010445) 지원을 받아 수행되었음.

KSEE

Reference

1. Ministry of Environment, Handbook of Environmental Science (II)(1999).
2. An, Y.-J., Nam, S.-H. and Lee, J.-K., “Categorization of hazard chemicals potentially discharged into water system,” *J. Korean Soc. Water Environ.*, **24**, 247-259(2008).
3. Ministry of Environment, Study on endocrine disruptors (VI) (2005).
4. Ministry of Environment and National Institute of Environmental Research, Development of integrated methodology for evaluation of water environment (III)(2006).
5. Ministry of Environment, 2014 Pollutant Release and Transfer data, <http://ncis.nier.go.kr/tri/>(2017).
6. Ministry of Environment, Water information system, <http://water.nier.go.kr/main/mainContent.do>(2017).
7. Ministry of Environment, Action plan for water monitoring. (2016).
8. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), OECD work related to endocrine disrupters, <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>(2016).
9. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Series on testing and assessment No. 150 Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption,” (2012).
10. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Work plan for the test guidelines programme (TGP),” (2016).
11. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Series on testing and assessment No. 95 Detailed review paper on fish life-cycle tests,” (2008).
12. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Series on testing and assessment No. 127 Peer review report of the validation of the 21-day androgenised female stickleback screening assay,” (2011).
13. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Series on testing and assessment No. 128 Validation report on the 21-day androgenised female stickleback screening assay,” (2010).
14. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Series on testing and assessment No. 148 Guidance document on the androgenised female stickleback screen,” (2011).
15. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Work plan for the test guidelines programme (TGP),” (2015).
16. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Series on testing and assessment No. 158 Report of progress on the interlaboratory validation of the OECD harpacticoid copepod development and reproduction test,” (2011).
17. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Series on testing and assessment No. 201 New guidance document on harpacticoid copepod development and reproduction test with amphiascus,” (2011).
18. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Series on testing and assessment: Testing for endocrine disrupters, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmenttestingforendocrinedisrupters.htm> (2016).
19. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Guideline for testing of chemicals 229 Fish short term reproduction assay,” (2012).
20. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Guideline for testing of chemicals 230 21-day fish assay: A short-term screening for oestrogenic and androgenic activity, and aromatase inhibition,” (2009).
21. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Guideline for testing of chemicals 234 Fish sexual development test,” (2011).
22. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Guideline for testing of chemicals 240 Medaka extended one generation reproduction test (MEOGRT),” (2015).
23. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “Guideline for testing of chemicals 231 The amphibian metamorphosis assay,” (2009).
24. Organization for Economic Cooperation and Development

- (OECD), "Guideline for testing of chemicals 241 The larval amphibian growth and development assay (LAGDA)," (2015).
25. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Series on testing and assessment No. 76 Final report of the validation of the amphibian metamorphosis assay for the detection of thyroid Active substances - Phase 1: Optimisation of the test protocol," (2007).
 26. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Series on testing and assessment No. 77 Final report of the validation of the amphibian metamorphosis assay - Phase 2: Multi-chemical interlaboratory study," (2007).
 27. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Series on testing and assessment No. 91 Report of the validation of the amphibian metamorphosis assay (phase 3)," (2008).
 28. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Series on testing and assessment No. 92 Report of the validation peer review for the amphibian metamorphosis assay and agreement of the working group of the national coordinators of the test guidelines programme on the follow-up of this report," (2008).
 29. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 211 Daphnia magna reproduction test," (2012).
 30. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Series on testing and assessment No. 93 Report of the validation of an enhancement of OECD TG 211: Daphnia magna reproduction test," (2008).
 31. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 220 Enchytraeid reproduction test," (2004).
 32. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 222 Earthworm reproduction test (Eisenia fetida / Eisenia andrei)," (2004).
 33. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 226 Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil," (2008).
 34. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 232 Collembolan reproduction test in soil," (2009).
 35. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 218 Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment," (2004).
 36. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 219 Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water," (2004).
 37. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 233 Sediment-water chironomid life-cycle toxicity test using spiked water or spiked sediment," (2010).
 38. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), "Guideline for testing of chemicals 225 Sediment-water Lumbriculus toxicity test using spiked sediment," (2007).
 39. American Society for Testing and Materials (ASTM), "STP 1364 Environmental toxicology and risk assessment: Standardization of biomarkers for endocrine disruption and environmental assessment: 8th volume," (1999).
 40. American Society for Testing and Materials (ASTM), "ASTM Standard E-1193-87: Standard practice for conducting renewal life-cycle toxicity tests with Daphnia magna," (1987).
 41. American Society for Testing and Materials (ASTM), ASTM Standard E-1191-90: Standard guide for conducting life-cycle toxicity test with saltwater mysids, (1990).
 42. United States Environmental Protection Agency (USEPA), "Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OPPTS 890.1100: Amphibian Metamorphosis (Frog)," (2009a).
 43. United States Environmental Protection Agency (USEPA), "Series 890 - Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines," <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-890-endocrine-disruptor-screening-program>, (2016.08).
 44. United States Environmental Protection Agency (USEPA), "Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OPPTS 890.1350: Fish Short-Term Reproduction Assay," (2009b).
 45. United States Environmental Protection Agency (USEPA), "Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OCSPP 890.2200: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)," (2015a).
 46. United States Environmental Protection Agency (USEPA), "Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OCSPP 890.2300: Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)," (2015b).