Korean J. Limnol. 36 (2) : 97~107 (2003)

REVIEW

# 어류를 이용한 내분비계 장애물질 검출 및 Biomarker로서 Vitellogenin의 이용

윤석주 · 김일찬[1] · 윤용달[2] · 이재성[3,*]

(한양대학교 자연과학연구소, [1]한양대학교 의과대학 생화학교실,
[2]한양대학교 자연과학대학 생명과학과, [3]한양대학교 대학원 환경과학과)

**Detection of Endocrine-Disrupting Chemicals in Fish and the Use of Fish Vitellogenin as a Biomarker.** ***Yoon, Seokjoo, Il-Chan Kim[1], Yong-Dal Yoon[2] and Jae-Seong Lee[3,*] (The Research Institute for Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea; [1]Department of Biochemistry, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea; [2]Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea; [3]Department of Environmental Science, Graduate School, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)***

**Fish vitellogenin produces in female liver during oogenesis through estradiol cycle, and produces even in male liver by endocrine-disrupting chemicals (EDCs) such as alkylphenols. The resulting effects of EDCs lead to the low fecundity of female and the feminization (eg. shrinkage of testis) in male. Especially, the production of vitellogenin in male indicates the environmental contamination of EDCs, resulting in the modulation of gene expression profiles and the monitoring of environmental contamination at specific area. In this paper, we suggest that fish vitellogenin is useful for biomonitoring for environmental contamination and would be substantially useful as a biomarker for a detection of EDCs in aquatic environment.**

**Key words : Endocrine disruptor, EDC, Fish, Vitellogenin, Biomarker**

## 서 론

자연환경 속으로 방출되는 화학물질 중 생물체의 내분비계에 영향을 미치는 물질에 대해 국내외적으로 많은 연구자들에 의해 연구가 수행되어 왔고 그 유해성에 대해 논의가 있어 왔다(McLachlan, 1985; Colborn *et al*., 1993; Stone, 1994; Sumpter, 1995; Arukwe and Goksoyr, 1998; Bjerregaard *et al*., 1998; Jobling *et al*., 1998; Andersen *et al*., 1999; Heemken *et al*., 2001; Ackermann *et al*., 2002; Hutchinson and Pickford, 2002). 이러한 연구들은 과학적인 관심의 대상 뿐만 아니라 자연환경의 파괴 및 인류의 생존에 직결되는 만큼 많은 관심과 연구가 요구된다.

내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemicals, EDC)은 인위적으로 만들어지는 것 뿐만 아니라, 자연계에 존재하고 있는 천연물질이나 합성된 화학물질 중에도 상당수 포함되어 있는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 물질들은 인간과 야생동물에서 내분비계의 교란을 통해 개체수 감소 및 생식에 문제를 유발하는 것으로 알려지고 있으며, 이러한 효과는 호르몬의 생합성, 수송과 대사 과정을 포함하여 조절단계의 여러 수준에서 나타난다. Xenobiotic chemical들은 세포내의 nuclear hormone receptor와의 결합에서 촉매제 또는 억제제가 될 수 있

* Corresponding author: Tel: 02) 2290-0769, Fax: 02) 2294-6270, E-mail: jslee2@hanyang.ac.kr

어 결과적으로 유전자의 발현에 영향을 준다(Gray *et al*., 1997).

내분비계 장애물질은 1980년대 후반 영국 각지에서 암수 구별이 어려운 어류의 대량 발견을 통해 널리 알려졌고, 이러한 현상의 원인 물질이 합성세제, 유화제등의 성분인 비이온성 계면활성제의 분해물, 즉 알킬페놀이라는 사실이 밝혀지게 되었다(Sumpter and Jobling, 1995). 알킬페놀은 수컷의 정소발달을 방해할 뿐 아니라 암컷의 간에서만 합성되는 난황단백질 전구물질(vitellogenin)을 수컷에서도 생성되게 촉진한다는 사실이 알려졌다. 이처럼 내분비장애물질들은 특히 어류에 있어서 estrogen receptor를 포함하여 endogenous steroid receptor들에 대한 ligand로 작용함으로 정상적인 내분비 기능을 차단하여 수컷 생식능의 변화 및 수컷의 암컷화 등을 초래하는 것으로 나타난다.

Estrogen receptor와 결합하는 이러한 물질들은 여러 가지 효과를 나타내는데 그 중 하나가 vitellogenin 같은 estrogen response gene을 활성화시키는 것이다(Dolphin *et al*., 1971; Denslow *et al*., 1999; Bowman *et al*., 2000). 또한, 전통적인 화학물질분석에 의한 환경오염 정도의 측정한계를 극복하기 위해 환경오염을 모니터링 하기 위한 다양한 biomarker(생체지표)의 개발이 시도되었다(Heppel *et al*., 1995; Palmer and Palmer, 1995; Sumpter and Jobling, 1995; Hansen *et al*., 1998; Nilsen *et al*., 1998; 구 등, 2001; 황 등, 2001; 황 등, 2002; Easom and O'Halloran, 2002). 그 환경오염을 일으키는 화학물질 중에 steroid 계통의 hormone(특히 estrogen) mimic 작용을 하는 물질에 대한 관심과 연구가 지속적으로 이루어져왔고(Colborn *et al*., 1993; Stone 1994; Arukwe *et al*., 1998), 이들 biomarker와 특히, 어류를 이용한 biomarker의 개발은 수용성 독성화학물질들의 위해성을 평가하기 위한 생물 모니터링 기법으로서 이용되고 있다(Harries *et al*., 1996; Harries *et al*., 1997; Nilsen *et al*., 1998; Livingstone *et al*., 2000; Canapa *et al*., 2002; Kashiwada *et al*., 2002; Taioli and Bonassi, 2002).

본 논문에서는 어류의 vitellogenin을 이용한 연구사례를 살펴보고 biomarker로서의 활용방안을 제시해보고자 한다.

## 내분비계 장애물질의 용어 정의

내분기계 장애물질이란 용어가 정의되고 사용되게 된 것은 최근의 일이다. 하지만 지금까지 의학적, 생물학적, 독성학적으로 설명이 곤란한 현상들이 인체나 야생동물에서 발견되어 왔는데 이러한 현상 중에는 내분비계장애물질에 의한 것이 다수 포함되어 있었음을 추측할 수 있다. 예를 들어 1930년대 초에 생산된 합성 estrogen 계통의 물질중의 하나인 diethyl stilbesterol(DES)는 1940～1960년에 걸쳐 유산 방지용 의약품으로 사용되었으나 유산방지 효과가 거의 없으며 태어난 2세에서 유아기에 성기기형 및 질암을 야기시키는 것으로 밝혀졌다(Albin *et al*., 1976; Magnan *et al*., 1979; Ford *et al*., 1983; Barter *et al*., 1986). 또한 세계각지에서 야생동물의 생식행동과 생식기의 이상이 보고 되었고 이러한 현상이 DDT를 시작으로 각종 유기염소계 화합물에 의한 환경오염에 의한 것으로 추정하고 있다. 1991년에 미국의 Soto 등(1991)의 보고에 의하면 유방암 세포증식 실험 중 estrogen을 투여하지 않은 실험군에서도 이상증식이 발견되었는데 그 원인이 미약한 estrogen 작용을 하는 nonylphenol이 실험기구로부터 녹아 나온 것임이 밝혀졌다.

내분비계장애물질을 어떻게 정의하느냐는 그 작용 기작이 확실히 밝혀져 있지 않기 때문에 아직 해결해야 할 문제로 남아있다. 단지, 미국 환경보호청(EPA)의 정의에 따르면 "내분비계장애물질은 체내의 항상성 유지, 생식, 발생, 성장 그리고 행동을 지배하는 자연 호르몬의 생성, 분비, 결합, 운송, 작용 또는 소멸의 과정에 개입하는 외인성 물질"이라고 하였고(Special report in environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis [Reported for the risk assessment forum U.S. environmental protection agency, Washington, D.C.], February 1997), 유럽에서는 내분비계장애물질이란 "정상의 동물(사람을 포함)에서 건강에 악영향을 일으키거나 결과적으로 내분비기능을 변화시키는 외인성 물질"이라고 정의하였다(European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife, report of proceedings 2～4 December 1996). 일본의 경우 환경성이 발표한 환경호르몬전략계획인 SPEED 98(Strategic Program on Environmental Endocrine Disrupters 1998)에 의하면 "동물의 생체 내에 어떤 화학물질이 들어왔을 경우 원래의 그 생체 내에서 작용하고 있는 정상적인 호르몬작용에 영향을 주는 외인성물질"이라고 정의하고 있다. 이러한 정의들은 유사하면서도 정의하는 범주가 조금씩 다르다. 1999년 7월 미국의 National Research Council(NRC)은 내분비시스템은 여러 작용 기작에 의해 조절되기 때문에 내분비교란물질이란 용어를 사용하지 않고 hormonally active agents

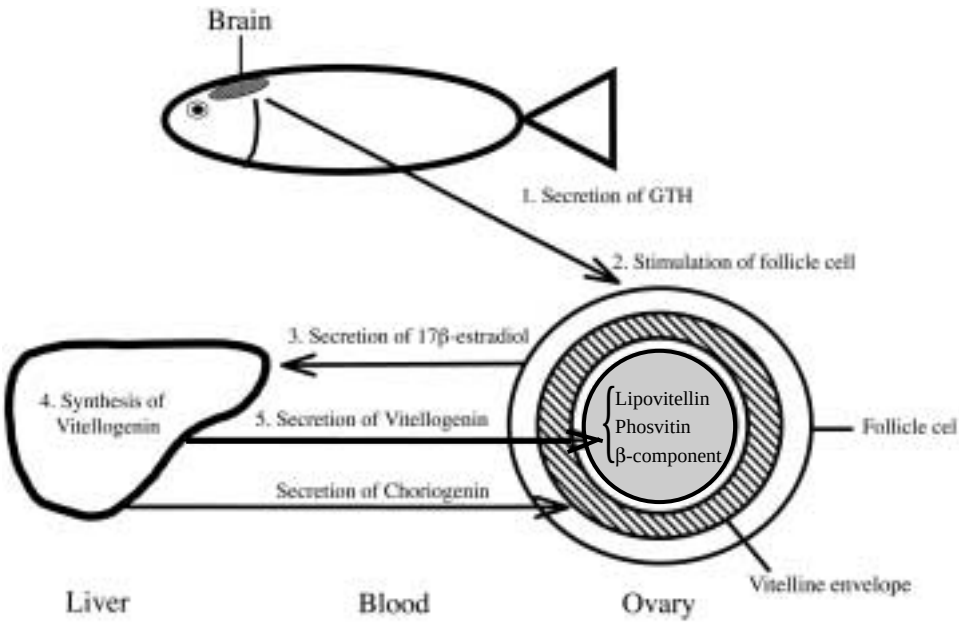


**Fig. 1.** Schematic representation of 17-β estradiol stimulated vitellogenesis and choriogenesis in fish. Abbreviations: GTH, Gonadotropin hormone. Courtesy of Prof. Akihiko Hara (Faculty of Fishery, Hokkaido Univ., Japan).

(HAA)라는 새로운 용어를 사용하기로 했다. 우리나라의 경우는 식품의약안전청에서 "내분비계장애물질"이라는 용어로 통일하여 사용하고 있다.

## Vitellogenin의 합성 및 조절

Vitellogenin은 난생동물의 난황전구체로 난형성과정 동안에 estradiol cycle에 의하여 정상적으로 암컷의 간에서 생산되며(Hinton and Lauren, 1990), 수컷의 간에서도 vitellogenin의 유전자는 존재하지만 silent gene 형태로 존재한다(Denslow *et al*., 1999). 이러한 유전자들이 estrogen이나 estrogen 유사물질에 한번 노출되면 자극을 받아 vitellogenin이 합성된다. 합성 후 혈액을 통해 순환되게 되는데 수컷의 경우는 신장에서 제거될 때 까지 머물러 있고 암컷의 경우는 수용체에 의해 조절되는 내부세포 분할에 의해 발생중인 난세포로 들어가 난황단백질로 축적된다(Fig. 1) (Lane *et al*., 1983; Mommsen and Walsh, 1988; Stifani *et al*., 1990; Tyler *et al*., 1991; Hyllner *et al*., 1994; Schneider, 1996).

Vitellogenin은 난황 형성기의 암컷의 혈중에 특이적으로 출현하기 때문에 암수 구별이나 난황 형성기 및 성성숙에 관련된 지표단백질로서 분자량이 약 300~600 kDa의 큰 단백질로 혈청내의 phospholipoglycoprotein으로 구성되어 있으며 난생척추동물의 난황단백질의 주요 전구물질로 작용한다(Merry *et al*., 1973; Wallace and Selman, 1985). 모든 난생동물에서 간은 vitellogenin 합성 조절에 있어 중요한 역할을 담당하고 vitellogenin의 합성은 estrogen에 의존한다(Lethimonier *et al*., 2000). Estrogen은 표적세포의 수용체에 결합하고 이 estrogen receptor complex은 DNA의 전사조절부위에 결합한다(Wetekam *et al*., 1975). 전형적으로 estrogen response element (ERE)는 두 개의 반복된 hexanucleotide를 포함하는데 여기에 homodimer로 결합하여 최종적으로 vitellogenin의 발현을 증가시키게 된다(Fig. 2) (Martinez *et al*., 1987).

어류는 estrogen에 의해 유도되는 vitellogenin 합성에 민감하게 반응하여 estrogen과 estrogen mimic 또는 이 물질들을 억제하는 화학물질을 탐지하는데 이용되어 왔다(Anderson *et al*., 1996). 그러나 어류의 vitellogenin 합성은 estrogen agonist 혹은 antagonist 뿐만 아니라 vitellogenin 단백질 합성에 관련된 다양한 단계에서 작용할 수 있는 화학물질에 의해서도 영향을 받을 수 있다. 이와 같이 estrogen은 vitellogenin 합성의 시작과 유지에 작용하는 핵심 호르몬이다(Gillesby and Zacharewski, 1998).

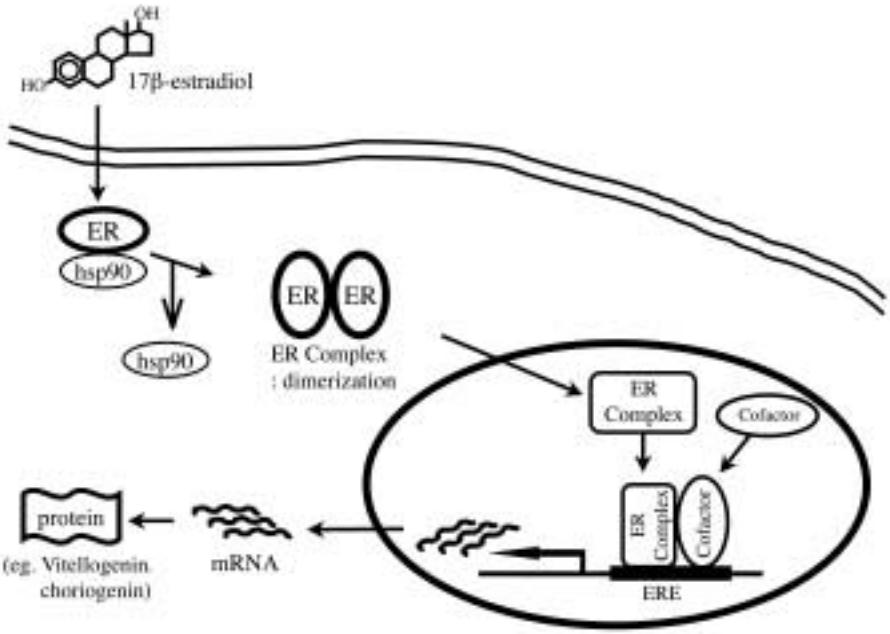


**Fig. 2.** Schematic representation of transcriptional regulation of proteins induced by estrogen. Abbreviations: ER, estrogen receptor; hsp90, heat shock protein 90; ERE, estrogen response element (See Flouriot *et al*., 1995).

## Estrogen mimic 화학물질

내분비계장애물질 가운데는 estrogen receptor의 agonist 또는 antagonist의 기능을 가진 것들이 존재하는데 그 중에서 estrogen과 유사한 작용을 하는 화학물질(estrogen mimic chemical)들이 다수 알려져 있다. 이러한 작용을 하는 인공 화학물질로는 플라스틱의 중합체나 계면활성제로 사용되는 nonylphenol, 에폭시 수지나 폴리카보네이트 수지의 원료로 사용되는 bisphenol A, 염화비닐 가소제로 사용되는 phthalates, 유기염소화합물인 DDT나 PCB 등이 거론되고 있다(McLachlan, 1985; Wester and Canton, 1986; Jobling and Sumpter, 1993; Krishnan *et al*., 1993; Pelissero *et al*., 1993; Palmer and Palmer, 1995; Donohoe and Curtis, 1996; Gillesby and Zacharewski, 1998). 이러한 물질들은 생체내에서 estrogen receptor와 결합하여 마치 endogenous estrogen처럼 작용하는 것으로 생각된다. Estrogen 작용 화학물질에 의한 피해는 1996년 미국에서 출판된 "Our stolen future (국역판: 도둑맞은 미래, 사이언스 북스)"에 잘 묘사되고 있으며(Colborn *et al*., 1996), 이 책에서는 세계각지의 과학자들의 연구결과를 정리하여 자연계가 암컷화 되어 가고 있다고 보고하고 있다. "이러한 상태가 지속되면 지구상의 유성생식을 하는 동물들은 멸종하게 되고 이러한 자연계의 암컷화는 환경 중에 존재하는 화학물질이 그 원인이다." 라는 내용의 골자를 세상에 알렸다.

위에서 언급한 것 같이 estrogen 작용물질은 생체내의 내분비 균형을 붕괴시킬 뿐만 아니라 그 부작용으로 수컷에서는 발현되지 않는 유전자가 비정상적으로 유도되는 현상이 관찰되었다. 본 논문에서 다루고 있는 vitellogenin과 관련되는 nonylphenol이 내분비계장애물질로 주목을 받게 된 것은 아래에 소개될 사건이 발단이 되었다. 영국의 남쪽지방의 하천에서 양성을 가진 어류들이 발견되었다. 원인을 알아내기 위해 Sumpter and Jobling (1995)은 강의 하류에서 채집한 무지개송어의 vitellogenin의 농도와 nonylphenol의 농도를 측정하였다. 이 결과를 통해 어류의 양성화를 일으킨 주된 원인은 당시 옷감공장에서 양모제품을 세탁하는 과정에서 세제로 사용된 alkylphenol류, 특히 nonylphenol에 의한 것임을 알게 되었다.

## Vitellogenin과 어류 생태계

생태학적인 관점에서 어류의 vitellogenin은 단순히 환경오염의 biomarker로 활용하는 것 보다 환경오염시 암컷 어류의 생식능의 변화와 수컷의 암컷화 등 수서생

태계파괴에 직접적인 영향을 주어 수서생태계내 어류 건강성 연구에 핵심 쟁점이 되었다.

서론에서도 밝힌 바와 같이 실험실 연구를 통해 물고기에 알킬페놀을 처리했을 때 수컷의 정소발달이 방해받는다는 사실이 알려지게 되었으며 원래 암컷의 간에서만 만들어지는 vitellogenin이 수컷에서도 발현되는 것이 확인되었다(Sumpter, 1995; Todorov *et al*., 2002). 아울러, sheepshead minnow 수컷 물고기는 vitellogenin을 높은 농도로 생성하기도 하고, 심지어 어떤 수컷에서는 정소에서 난자의 전구세포를 생산하기도 하였다(Hemmer *et al*., 2001, 2002; Vethaak *et al*., 2002). 이러한 연구는 소위 내분비계장애물질이 생태계에 미치는 영향이 자명하다.

실제 수서생태에서의 인위적 가두리망에 송어를 넣고 실험한 결과에 따르면, 영국에서 수십여종의 공장폐수가 배출되는 지점에 수주간 노출된 수컷의 혈액에서 정상 수컷보다 수만배 이상의 vitellogenin이 검출되었다(Purdom *et al*., 1994; Harries *et al*., 1997). 최근 Jobling 등(2002a, b)은 roach류의 어류를 이용한 연구에서 내분비계장애물질에 의해 번식률이 현저하게 줄어든 것과 함께 생식기성숙에 이상이 생긴 결과를 보고 하였다. 일본에서도 도쿄만에서 채집한 수컷 넙치에서 혈청내의 vitellogenin이 증가된 것이 보고되었다(Hashimoto *et al*., 2000).

이러한 내분비계장애물질은 저농도에서도 estrogen 호르몬과 유사하게 작용하여 그 생물의 내분비계에 영향을 줄 수 있다. 내분비계가 교란되어 수컷 정소의 축소 및 암컷의 난자생성과정이 비정상적으로 바뀌게 될 경우에 야생 어류의 번식에 심각한 영향이 예상된다. 이러한 번식장애는 해당 어종에서 그 문제가 끝나는 것이 아니라 먹이사슬 관계로 이어져 상급 포식자 및 그 하부의 피식자 개체군에도 영향을 미치게 된다. 궁극적으로 내분비계장애물질에 의한 개체수의 불균형은 포식관계에 있는 종에게도 영향을 미쳐 전체적인 생태계에 직·간접적인 영향을 끼치게 된다.

## Nonylphenol이 어류에 미치는 영향

Alkylphenol에는 nonylphenol 이외에 octylphenol, butylphenol 그리고 dodecylphenol 등의 3 가지가 산업적으로 많이 이용되고 생산이 되며 alkylphenol은 주로 alkylphenol epoxylates의 원료나 비이온성 계면활성제의 원료로 이용된다. 아울러, 계면활성제의 경우는 nonylphenol이 대부분을 차지하고 있다. Nonylphenol에 의한 내분비장애에 관한 보고에 의하면 주로 세제의 성분으로 되어있는 nonylphenol이 estrogen 작용물질로 작용하고 있다(Soto *et al*., 1991; Jobling and Sumpter, 1993; White *et al*., 1994; Jobling *et al*., 1996; Lech *et al*., 1996; Foran *et al*., 2000; Kinnberg *et al*., 2000; Schwaiger *et al*., 2002).

일본 국립환경연구원의 2001년 nonylphenol의 어류에 내분비계장애 효과에 관한 시험보고서가 발간된 이래 nonylphenol에 의한 어류에서의 estrogen 작용 효과에 관한 많은 논문이 있다. 예를들면, *in vitro* 실험에서 White 등(1994)에 의해 무지개송어의 초대배양 간세포를 이용한 nonylphenol 처리 실험에서 $10^{-6}$ M 이상의 농도에서 vitellogenin 발현이 관찰되었고, Milligan 등(1998)에 의하면 무지개송어의 혈장에서 sex steroid (17β-estradiol)와 수용체 단백질사이의 부착 및 탈착에 대한 nonylphenol의 영향농도는 $10^{-6}$에서 $3\times10^{-3}$ M이었다. 이 농도는 17β-estradiol에 비해 1/10,000 혹은 그 이하의 농도에서 estrogen 작용을 나타낼 수 있음을 보여준다. 한편, Fluoriot 등(1995)은 수컷 무지개송어의 초대배양 간세포에 $10^{-7}$ M 농도의 nonylphenol을 24시간 처리했을 때 vitellogenin mRNA와 estrogen receptor의 mRNA의 발현을 보고하였다. 이 결과로 nonylphenol이 17β-estradiol에 비해 1/5000에서 1/500 정도의 낮은 농도에서 작용을 한다는 것을 알 수 있다. 끝으로, Jobling과 Sumpter(1993)는 수컷 무지개송어의 초대배양 간세포에 1, 10, 50, 100 μM 농도의 nonylphenol을 2일 또는 4일간 처리하였을 때 vitellogenin이 10 μM 또는 그 이상의 농도로 세포배양액에서 검출되었다. 즉, nonylphenol이 17β-estradiol에 비해 1/111,000 정도 낮은 농도에서 estrogen과 같은 양상의 작용을 하였다.

한편, nonylphenol의 영향을 *in vivo* system에서 본 몇몇 결과를 보면, Miles-Richardson 등(1999)이 nonylphenol을 암수 fathead minnows에 0.05, 0.16, 0.4, 1.6 그리고 3.4 μg의 농도로 42일간 처리하였을 때 1.6 μg 이상의 농도를 처리한 수컷의 정소 조직이 비정상적으로 변화된 것이 보고 되었고, Ren 등(1996)이 어린 무지개송어에 10, 20, 50, 100, 150 μg의 nonylphenol을 72시간 처리하였을 때 10 μg 이상의 농도 처리군의 무지개송어의 간에서 vitellogenin mRNA가 발현되었다. 또, Jobling 등(1996)이 수컷의 무지개송어에 nonylphenol 0.24, 1.06, 1.85, 5.02, 20.3, 54.3 μg/L를 3주간 처리하였을 때 20.3 μg/L 이상의 농도군의 혈장에서 vitellogenin이 유도되었고, Korsgaard and Pedersen (1998)이 nonylphenol 10,

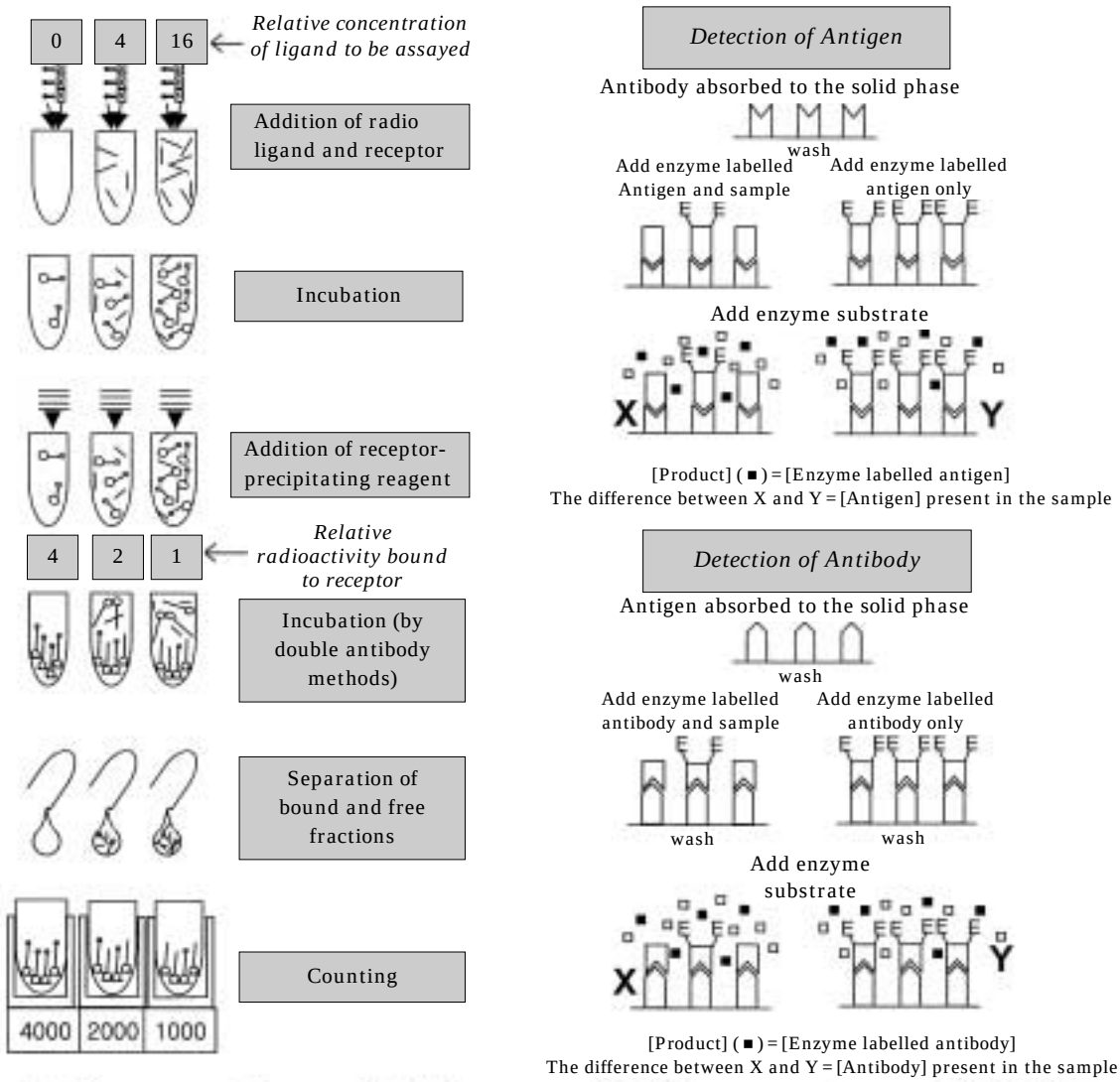


**Fig. 3.** Schematic flowcharts of radioimmunoassay (RIA) and enzyme linked imuno-sorbent assay (ELISA) for fish vitellogenin detection. Abbreviation, E, enzyme (See Tyler and Sumpter, 1990; Korsgaard and Pedersen, 1998).

50, 100, 250, 500, 1000 μg/L를 등가시치(zoarcidae)에 3주간 처리했을 때 100 μg/L 이상 농도 처리군의 혈장에서 vitellogenin의 농도가 증가하였다. 즉, nonylphenol은 어류에서 dose-response의 양상으로 vitellogenin의 합성을 유도하였다. 이는 어류가 nonylphenol같은 내분비계 장애물질이 어류에 미치는 영향을 효과적으로 조사할 수 있는 실험동물임을 제시해준다.

## 어류 vitellogenin과 측정방법

경제협력개발기구(OECD)에서는 어류 vitellogenin을 환경 모니터링에 유용하게 쓰일 수 있도록 제도적인 장치를 마련하고 있으며, 시험법에 사용할 어류로 medaka (*Oryzias latipes*), fathead minnow, zebrafish 등을 이용하는 방향으로 검토하고 있다. 따라서, 우리나라에서는 국내의 생태적 특성에 맞는 어류를 선정하여 환경오염 모니터링용 어류로 개발할 필요가 있다. 어류를 이용한 estrogen 스크리닝 시험법 중 가장 보편적인 방법은 vitellogenin 유전자 또는 단백질의 유도를 이용하는 것이고, 수컷에서 vitellogenin의 발현의 dose-response를 중요한 지표로 삼고 있다(Sumpter and Jobling, 1995; Ryu, 1999).

어류에서의 vitellogenin 합성의 측정방법은 크게 *in vivo*와 *in vitro*로 나뉠 수 있는데, 먼저 *in vivo* 방법을 살펴보면, radioimmunoassay (RIA) 및 enzyme linked immuno-sorbant assay (ELISA)로 크게 분류할 수 있다. RIA는 Tyler and Sumpter (1990)에 의해 개발되었고 어류를 이용한 실험시 우선 17β-estradiol을 복강내 주사하여 대상어류의 혈액을 채취하고 gonadosomatic index를 성성숙 단계별로 계산하여 분석에 보조 자료로 사용한다. Purdom 등(1994)은 무지개송어를 cage에 넣어 하수구에서 사육한 뒤에 혈액샘플로부터 혈장을 분리하여 vitellogenin의 농도를 RIA를 이용하여 측정하였다(Fig. 3A). 한편, Pelissero 등(1991)은 철갑상어(Siberian sturgeon)에 식물성 estrogen (formononetin, daidzein, equol, biochanin A, genistein 또는 coumestrol)을 복강내 투여한 후, 17β-estradiol을 처리한 실험에서 토끼에서 생산된 철갑상어 특이적 면역혈청을 사용하여 혈장 vitellogenin의 ELISA 분석에 사용하였다(Fig. 3B).

*In vitro* 방법은 Pesissero 등(1993)이 *in vivo*에서 일어나는 화학물질의 이차 대사 변환과정을 *in vivo*와 같이 일차세포배양을 이용한 방법으로 얻어낼 수 있고, 이를 무지개송어를 이용한 1차 간세포 배양법을 제시하였다. 그러나, *in vitro*시스템에서는 *in vivo*시스템에서 관찰할 수 있는 대사과정들이 원천적으로 배제되어 있는 단점이 있다.

## 대안 biomarker 및 개발 전망

어류에서 외인성 물질에 의한 생식계통의 장애에 관한 문제를 포괄적으로 해결하기 위해 실험실에서의 연구 뿐만 아니라 집단수준에서의 영향을 보기 위해 필드 관찰과 관찰결과를 실험실내에서 재현하는 연구가 필요하다. 현재까지 vitellogenin을 포함하여 여러 biomarker로 zona radiata protein, aromatase, choriogenin 등이 개발되었다(Arukwe *et al*., 1999; Kloasy *et al*., 1999; Oppen-Berntsen *et al*., 1999; Celius *et al*., 2000; Schultz *et al*., 2000; Lee *et al*., 2002). 이들 biomarker간에는 내분비계장애물질에 대한 감수성과 발현 패턴에 차이가 있다. 이상적인 biomarker의 조건은 신속하고 신뢰할 수 있는 정보를 얻을 수 있으며 비용이 적게 드는 것과 종(種), 동종이형(同種異形), 생활사(生活史) 사이의 차이를 극복할 수 있는 것과 만성적 혹은 일과성 노출에 대한 반응여부, 장기적인 관찰 및 다음 세대에서도 검출 가능여부를 들 수 있다. 그러나 현실적으로 이와 같은 조건을 전부 만족 시킬 수 있는 biomarker는 없다. 그러나, 현재 개발된 biomarker 각각의 특성을 잘 이해하고 목적에 따라 복수의 biomarker를 이용하여 환경오염 모니터링을 하는 방법도 생각할 수 있다. 현재는 혈청내의 vitellogenin을 ELISA나 RIA 방법으로 측정 또는 유전자 발현 변화의 수준을 reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 측정하고 있으며, 실제로 일본의 한 회사에서 송사리 혈액을 이용한 vitellogenin 발현을 즉시 알 수 있는 ELISA kit가 개발, 상품화 되었다. 고가인 것이 단점이지만 수컷의 혈액에서 1 μg/ml의 감도로 vitellogenin을 정성적으로 검출할 수 있다.

현재에 개발되어 있는 제반기술외에 real-time biosensor 기술을 적용하여 필드 현장에 이를 설치하여 환경오염을 실시간으로 모니터링하는 방법의 개발이 필요하다.

## 적 요

어류 vitellogenin은 난황전구체로 난형성과정동안에 estradiol의 체내 순환에 의해 암컷의 간에서 생산되며 alkylphenol류와 같은 비이온성 계면활성제 등의 내분비계 장애물질에 의해 수컷에서도 생산된다. 물 환경의 주요 생물종인 어류는 내분비계장애물질에 의해 암컷에서는 번식률 저하와 함께 수컷에서는 정소의 축소 및 이에 따른 암컷화가 관찰된다. 특히 수컷에서 내분비계 장애물질에 의해 유도된 vitellogenin의 생성을 이용하여 환경오염에 의해 유도된 생물체의 유전자 발현 변화 뿐만 아니라 이를 토대로 특정지역의 환경오염을 모니터링할 수 있다. 본 논문에서는 어류의 vitellogenin를 이용하여 수환경의 내분비계장애물질의 검출과 환경오염 모니터링을 위한 biomarker로서의 유용성을 검토하였다.

## 사 사

본 연구자들은 논문심사시 세세한 조언을 해주신 심사자들께 깊은 사의를 표합니다. 본 연구는 2002년도 한국학술진흥재단 중점연구소 지원 프로그램(KRF-2002-005-C00019)에 의해 수행되었습니다.

## 인 용 문 헌

구자민, 류지성, 정규혁, 이철우, 박응로, 박광식. 2001. 어류생

체지표를 이용한 내분비계장애 연구, 한국환경독성학회지 **16**: 197–204.

황운기, 강주찬. 2002. 외인성 estrogen에 노출된 조피볼락, *Sebastes schlegeli* 치어의 혈장 VTG과 GPT의 변화, 한국환경독성학회지 **17**: 239–243.

황인영, 박정규, 이은경. 2001. 17β–estradiol 처리에 따른 해산 어류의 vitellogenin 생성, 한국환경독성학회지 **16**: 21–28.

Ackermann, G.E., J. Schwaiger, R.D. Negele and K. Fent. 2002. Effects of long term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol*. **60**: 203–221.

Ablin, R.J., G.R. Bruns, P.D. Guinan, H. Al sheik and I.M. Bush. 1976. Hormonal therapy and alteration of lymphocyte proliferation. *J. Lab. Clin. Med*. **87**: 227–231.

Andersen, H.R., A.M. Andersen, S.F. Arnold, H. Autrup, M. Barfoed, N.A. Beresford, P. Bjerregaard, L.B. Christiansen, B. Gissel, R. Hummel, E.B. Jorgensen, B. Korsgaard, R. Le Guevel, H. Leffers, J. McLachlan, A. Moller, J.B. Nielsen, N. Olea, A. Oles–Karasko, F. Pakdel, K.L. Pedersen, P. Perez, N.E. Skakkeboek, C. Sonnenschein and A.M. Soto. 1999. Comparison of short–term estrogenicity tests for identification of hormone–disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect*. **107**(suppl. 1): 89–108.

Anderson, M.J., H. Olsen, F. Matsumura and D.E. Hinton. 1996. *In vivo* modulation of 17β–estradiol–induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by β–naphthoflavone. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **137**: 210–218.

Arukwe, A. and A. Goksoyr. 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia* **83**: 225–241.

Arukwe, A., F.R. Knudsen and A. Goksoyr. 1999. Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect*. **105**: 418–422.

Barter, J.F., J.M. Austin and H.M. Shingleton. 1986. Endometrial adenocarcinoma after *in utero* diethylstilbesterol exposure. *Obstet. Gynecol*. **67**(suppl): 84S–85S.

Bjerregaard, P., B. Korsgaard, L.B. Christiansen, K.L. Pedersen, L.J. Christensen, S.N. Pedersen and P. Horn. 1998. Monitoring and risk assessment for endocrine disruptors in the aquatic environment: a biomarker approach. *Arch. Toxicol*. **20**: 97–107.

Bowman, C.J., K.J. Kroll, M.J. Hemmer, L.C. Folmar and N.D. Denslow. 2000. Estrogen–induced vitellogenin mRNA and protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Gen. Comp. Endocrinol*. **120**: 300–313.

Canapa, A., M. Barucca, A. Celeste, E. Olmo and F. Regoli. 2002. Preliminary investigations on vitellogenin mRNA induction in some bioindicator Mediterranean fish species. *Mar. Environ. Res*. **54**: 673–677.

Celius, T., J.B. Matthews, J.P. Giesy and T.R. Zacharewski. 2000. Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using realtime PCR after *in vivo* treatment with estradiol–17β or α–zearalenol. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. **75**: 109–119.

Colborn, T., F.S. vom Saal and A.M. Soto. 1993. Developmental effects of endocrine–disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect*. **101**: 378–384.

Colborn, T., D. Dumanoski and J.P. Myers. 1996. Our stolen future, Dutton, New York.

Denslow, N.D., C.C. Marjorie, K.J. Kroll and L. Green. 1999. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* **8**: 385–398.

Dolphin, P.J., A.Q. Ansari, C.B. Lazier, K.A. Munday and M. Akhtar. 1971. Studies on the induction and biosynthesis of vitellogenin, an oestrogen–induced glycolipophospho protein. *Biochem. J*. **124**: 751–758.

Donohoe, R.M. and L.R. Curtis. 1996. Estrogenic activity of chlordecone, *o, p′*–DDT and *o, p′*–DDE in juvenile rainbow trout: induction of vitellogenesis and interaction with hepatic estrogen binding sites. *Aquat. Toxicol*. **36**: 31–52.

Easom C. and K. O'Halloran. 2002. Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology* **181–182**: 517–521.

Flouriot, G., F. Pakdel, B. Ducouret and Y. Valotaire. 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J. Mol. Endocrinol*. **15**: 143–151.

Foran, C.M., E.R. Bennett and W.H. Benson. 2000. Exposure to environmentally relevant concentrations of different nonylphenol formulations in Japanese medaka. *Mar. Environ. Res*. **50**: 135–139.

Ford, C.D., G.H. Johnson and W.G. Smith. 1983 Natural killer cells in *in utero* ethylstilbesterol–exposed patients. *Gynecol. Oncol*. **16**: 400–404.

Gray, L.E. Jr.,W.R. Kelce, T. Wiese, R. Tyl, K. Gaido, J. Cook, G. Klinefelter, D. Desaulniers, E. Wilson, T. Zacharewski, C. Waller, P. Foster, J. Laskey, J. Reel, J. Giesy, S. Laws, J. McLachlan, W. Breslin, R. Cooper, R. Di Giulio, R. Johnson, R. Purdy, E. Mihaich, S. Safe and T. Colborn. 1997. Endocrine screening methods

workshop report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reprod. Toxicol.* **11**: 719–750.

Gillesby, B.E. and T.R. Zacharewski. 1998. Estrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 3–14.

Hansen, P.D., H. DIzer, B. Hock, A. Marx, J. Sherry, M. McMaster and C. Blaise. 1998. Vitellogenin–a biomarker for endocrine disruptors. *Trend. Anal. Chem.* **17**: 448–451.

Harries, J.E., D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, E.J. Routledge, R. Rycroft, J.P. Sumpter and T. Taylor. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 1993–2002.

Harries, J.E., D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, J.P. Sumpter, T. Tylor and N. Zaman. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 534–542.

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.

Heemken, O.P., H. Reincke, B. Stachel and N. Theobald. 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North sea. *Chemosphere* **45**: 245–259.

Hemmer M.J., B.L. Hemmer, C.J. Bowman, K.J. Kroll, L.C. Folmar, D. Marcovich, M.D. Hoglund and N.D. Denslow. 2001. Effects of *p*–nonylphenol, methoxychlor, and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 336–343.

Hemmer M.J., C.J. Bowman, B.L. Hemmer, S.D. Friedman, D. Marcovich, K.J. Kroll and N.D. Denslow. 2002. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*), after cessation of exposure to 17β–estradiol and *p*–nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* **58**: 99–112.

Heppel, S.A., N.D. Denslow, L.C. Folmar and C.V. Sullivan. 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogen. *Environ. Health Perspect.* **103** (suppl. 7): 9–15.

Hinton, D.E. and D.J. Lauren. 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *Am. Fish. Soc. Symp.* **8**: 51–66.

Hutchinson, T.H. and D.B. Pickford. 2002. Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology* **181–182**: 383–387.

Hyllner, S.J., C. Silversand and C. Haux. 1994. The formation of vitelline envelope precedes the active uptake of vitellogenin during oocyte development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev.* **39**: 166–175.

Jobling, S. and J.P. Sumpter. 1993. Detergent components in sewage effluents are weakly oestogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* **27**: 361–372.

Jobling, S., J.A. Sheahan, P. Osborne, P. Matthiessen and J.P. Sumpter. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 194–202.

Jobling, S., M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty and J.P. Sumpter. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 2498–2506.

Jobling S., N. Beresford, M. Nolan, T. Rodgers–Gray, G.C. Brighty, J.P. Sumpter and C.R. Tyler. 2002a. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol. Reprod.* **66**: 272–281.

Jobling S, S. Coey, J.G. Whitmore, D.E. Kime, K.J. Van Look, B.G. McAllister, N. Beresford, A.C. Henshaw, G. Brighty, C.R. Tyler and J.P. Sumpter. 2002b. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biol. Reprod.* **67**: 515–524.

Kashiwada, S., H. Ishikawa, N. Miyamoto, Y. Ohnishi and Y. Magara. 2002. Fish test for endocrine–disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Res.* **36**: 2161–2166.

Kinnberg, K., B. Korsgaard, P. Bjerregaard and A. Jespersen. 2000. Effects of nonylphenol and 17β–estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculates. J. Exp. Biol.* **203**: 171–181.

Kloasy, W., L. Ilka and E. Ralf. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disrupters: II. estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Total Environ.* **225**: 59–68.

Korsgaard, B. and K.L. Pedersen. 1998. Vitellogenin in *Zoarces viviparus*: purification, quantification by ELISA and induction by estradiol–17 and 4–nonylphenol. *Comp. Biochem. Physiol.* **120C**: 159–166.

Krishnan, A.V., P. Stathis, S.F. Permuth, L.Tokes and D. Feldman. 1993. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving.

*Endocrinology* **132**: 2279–2286.

Lane, C.D., J. Champion, A. Colman, T.C. James and S.W. Applebaum. 1983. The fate of *Xenopus* and locust vitellogenins made in *Xenopus* oocytes. an export–import processing model. *Eur. J. Biochem.* **130**: 529–535.

Lech, J.J., S.K. Lewis and L. Ren. 1996. *In vivo* estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. *Fund. Appl. Toxicol.* **30**: 229–232.

Lee, C., J.G. Na, P.C. Lee and K. Park. 2002. Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption. *Aquat. Toxicol.* **61**: 233–241.

Lethimonier, C., G. Flouriot, Y. Valotaire, O. Kah and B. Ducouret. 2000. Transcriptional interference between glucocorticoid receptor and estradiol receptor mediates the inhibitory effect of cortisol on fish vitellogenesis. *Biol. Reprod.* **62**: 1763–1771.

Livingstone, D.R., C.L. Mitchelmore, L.D. Peters, S.C. O' Hara, J.P. Shaw, B.S. Chesman, A. Doyotte, J. McEvoy, D. Ronisz, D.G. Larsson and L. Forlin. 2000. Development of hepatic CYP1A and blood vitellogenin in eel (*Anguilla anguilla*) for use as biomarkers in the Thames Estuary, UK. *Mar. Environ. Res.* **50**: 367–371.

Mangan, C.E., R.L. Guintoli, T.V. Sedlacek, T. Rocereto, E. Rubin, M. Burtnett and J.J. Mikuta. 1979. Six years' experience with screening of a diethylstilbesterol–exposed population. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **15**: 860–865.

Martinez, E., F. Givel and W. Wahli. 1987. The estrogen–responsive element as an inducible enhancer: DNA sequence requirements and conversion to a glucocorticoid–responsive element. *EMBO J.* **6**: 3719–3727.

McLachlan, J.A. 1985. Estrogens in the environment II. p.435. *In*: Influences in development (J.A. McLachlan, ed.). Elsevier Science, New York.

Merry, A.H., P.J. Dolphin, K.A. Munday and M. Akhtar. 1973. Studies on the assembly and secretion of a multicomponent protein. The biosynthesis of vitellogenin, an oestrogen–induced glycolipophosphoprotein. *Biochem. J.* **132**: 459–463.

Miles–Richardson, S.R., S.L. Pierens, K.M. Nichola, V.J. Kramer, E.M. Snyder, S.A. Snyder, J.A. Render, S.D. Fitzgerald and J.P. Giesy. 1999. Effects of waterborn exposure to 4–nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Res.* **80**: S122–S137.

Milligan, S.R., O. Khan and M. Nash. 1998. Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat α–fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Onchorhyncus mykiss*) plasma. *Gen. Comp. Endocrinol.* **112**: 89–95.

Mommsen, T.P. and P.J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. p.347–406. *In*: Fish physiology. Vol. XIA (Hoar, W.S. and D.J. Randall, eds). Academic Press, New York.

Nilsen, B.M., K. Berg, A. Arukwe and A. Goksoyr. 1998. Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* **46**: 153–157.

Oppen–Berntsen, D.O., A. Arukwe, F. Yadetie, J.B. Lorens and R. Male. 1999. Salmon eggshell protein expression: a marker for environmental estrogens. *Mar. Biotechnol.* **1**: 252–260.

Organization for Economic Cooperation and Development. 1997. Draft detailed review paper: appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals. Paris, France.

Palmer, B.D. and S.K. Palmer. 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red–eared turtle and African clawed frog. *Environ. Health Perspect.* **103** (suppl. 4): 19–25.

Pelissero, C., B. Bennetau, P. Babin, F. Le Menn and J. Dunogues. 1991. The oestrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **38**: 293–299.

Pelissero, C., G. Flouriot, J.L. Foucher, B. Bennetau, J. Dunogues, F.L. Gac and J.P. Sumpter. 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **44**: 263–272.

Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler and J.P. Sumpter. 1994. Oestrogenic effects of effluents from sewage–treatment works. *Chem. Ecol.* **8**: 275–285.

Ren, L., S.K. Lewis and J.J. Lech. 1996. Effects of estrogen and nonylphenol on the posttranscriptional regulation of vitellogenin gene expression. *Chem.–Biol. Interact.* **100**: 67–76.

Report on the test results of endocrine disrupting effects of nonylphenol on fish. Environmental Health Department, Ministry of the Environment, Government of Japan, August 2001.

Ryu, B.H. 1999. Vitellogenin as a biomarker of endocrine disruptor in the aquatic environment. *J. Food Hyg. Safety* **14**: 408–414.

Schneider, W.J. 1996. Vitellogenin receptors: oocyte–specific members of the low–density–lipoprotein receptor

supergene family. *Int. Rev. Cytol.* **166**: 103–137.

Schultz, I.R., G. Orner, J.L. Merdink and A. Skillman. 2000. 17–α–ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* **50**: 363–373.

Schwaiger, J., U. Mallow, H. Ferling, S. Knoerr, T. Braunbeck, W. Kalbfus and R.D. Negele. 2002. How estrogenic is nonylphenol? a transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquat. Toxicol.* **59**: 177–189.

Soto, A.M., H. Justicia, J.W. Wray and C. Sonnenschein. 1991. *p*–Nonyl–phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* **92**: 167–173.

Stifani, S., F. Le Menn, J.N. Rodriguez and W.J. Schneider. 1990. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim. Biophys. Acta* **1045**: 271–279.

Stone, R. 1994. Environmental estrogens stir debate. *Science* **265**: 308–310.

Sumpter, J.P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol. Lett.* **82/83**: 737–742.

Sumpter, J.P. and S. Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contaminants of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* **103**(suppl. 7): 173–178.

Taioli, E. and S. Bonassi. 2002. Methodological issues in pooled analysis of biomarker studies. *Mutat. Res.* **512**: 85–92.

Todorov J.R., A.A. Elskus, D. Schlenk, P.L. Ferguson, B.J. Brownawell and A.E. McElroy. 2002. Estrogenic responses of larval sunshine bass (*Morone saxatilis* × *M. Chrysops*) exposed to New York City sewage effluent. *Mar. Environ. Res.* **54**: 691–695.

Tyler C.R. and J.P. Sumpter. 1990. The development of a radioimmunoassay for carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.* **8**: 129–140.

Tyler, C.R., D.E. Sumpter, H. Kawauchi and P. Swanson. 1991. Involvement of gonadotropins in the uptake of vitellogenin into vitellogenetic oocytes of the rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**: 224–233.

Vethaak A.D., J. Lahr, R.V. Kuiper, G.C. Grinwis, T.R. Rankouhi, J.P. Giesy and A. Gerritsen. 2002. Estrogenic effects in fish in the Netherlands: some preliminary results. *Toxicology* **27**: 147–150.

Wallace, R.A. and K. Selman. 1985. Major protein changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus* oocytes. *Dev. Biol.* **110**: 492–498.

Wester, P.W. and J.H. Canton. 1986. Histopathological study of *Oryzias latipes* (Medaka) after long term–hexachlorocyclohexane exposure. *Aquat. Toxicol.* **9**: 21–45.

Wetekam, W., K.P. Mullinix, R.G. Deeley, H.M. Kronenberg, J.D. Eldridge, M. Meyers and R.F. Goldberger. 1975. Effect of estrogen on gene expression: purification of vitellogenin messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3364–3368.

White, R., S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter and M.G. Parker. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* **36**: 175–182.

(Received 10 Apr. 2003, Manuscript accepted 30 May 2003)