碩 士 學 位 論 文

내분비장애물질 (EDCs), Bisphenol A가 송사리, *Oryzias latipes*의 성분화와 번식력에 미치는 영향

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟 州 大 學 校 大 學 院
水 産 生 物 學 科

羅 午 洙

1999年 12月

Effects of Sex Differentiation, Fertility and Reproductive Output in Songsari, *Oryzias latipes* Exposed to Bisphenol A (EDCs)

Oh-Soo Na

(Supervised by Professor Young-Don Lee)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12.

내분비장애물질 (EDCs), Bisphenol A가 송사리, *Oryzias latipes*의 성분화와 번식력에 미치는 영향

指導敎授 李 榮 敦

羅 午 洙

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1999年 12月

羅午洙의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 최 광 식 ㊞

委 員 여 인 규 ㊞

委 員 이 영 돈 ㊞

濟州大學校 大學院

1999年 12月

목 차

Abstract 1

Ⅰ. 서론 3

Ⅱ. 재료 및 방법 5

Ⅲ. 결과 9

1. 수정란의 발생 9
2. 성분화와 생식세포 형성 9
   1) 성분화와 생식세포 형성 9
   2) 성비 17
   3) 간세포의 활성 17
3. 어미의 번식력 22

Ⅳ. 고찰 26

Ⅴ. 요약 29

Ⅵ. 참고문헌 31

감사의 글 35

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Abstract

This study was conducted to investigate effects of bisphenol A (BPA), known as one of the endocrine disrupting chemicals, on the early development of fertilized eggs, sex differentiation, gonadal development of fry and fertility of adult fish of "Songsari", *Oryzias ratipes*.

Fertilized eggs of Songsari hatched at 9 to 12 days after fertilization in the control Ⅰ, Ⅱ while the eggs treated with BPA 50 and 100 ㎍/ℓ hatched 26 to 27 and 26 to 35 days after fertilization. The eggs treated with BPA 200 ㎍/ℓ even failed to hatch. Hatching rate was 86.8 and 84.3% in the controls while the rate was 23.3 and 22.2% in the BPA 50, 100 ㎍/ℓ treatment group, respectively. Chromatin-nucleolus and peri-nucleolus oocytes were observed in the ovaries of 70 days old Songsari in the controls. Yolk vesicles and yolk glouble oocytes were observed in the ovaries of the BPA 50 and 100 ㎍/ℓ treatment groups. Mature oocytes were observed in the BPA 200 ㎍/ℓ treatment group. In contrast, testis had a high proportion of spermatids in the controls in comparison with treatment groups. BPA induced a premature ovary of the female Songsari while inhibited spermatogenesis of the male Songsari. Sex ratio of Songsari was 1:1 in the controls while the ratio of the BPA 50 and 100 ㎍/ℓ treatment groups were 2:1 which means that female were more than male. The ratio of BPA 200 ㎍/ℓ treatment group was 1:1 that was not different in the controls($P > 0.05$). Liver tissue of 70 days old Songsari treated with BPA was observed higher volume of hepatocyte and hepatocellular vacuolation and fat accumulation in comparison with controls($P < 0.05$). The liver tissue

제주대학교 중앙도서관

showed eosinophilic, PAS-positive reaction in the treatment groups. Adult Songsari(total length 2.9±0.25 cm, total weight 0.3±0.07 g) produced 52.5, 47.0 and 48.0 eggs for 3 weeks in the control Ⅰ, Ⅱ, and BPA 50 ㎍/g BW/day treatment group, respectively while the less amount of 21.5 and 18.5 eggs were produced in the BPA 100, 200 ㎍/g BW/day treatment group. Abnormal rate of eggs was 11.8 and 16.2% in the control Ⅰ, Ⅱ while the rate of eggs treated with BPA 50, 100 and 200 ㎍/g BW/day were 38.8, 46.8 and 74.1%, respectively which means that the higher concentration of BPA increased the number of abnormal eggs. Hatching rate of fertilized eggs was more than 78.0% in the controls while the rate was less than 50.0% in the treatment groups.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 서 론

수서생태계는 산업화가 만들어 낸 유기화합물의 유입으로 심하게 오염되고 있으며, 이들 화합물은 생물학적, 화학적 분해가 느리고 친유성을 띄기 때문에 수서생물의 체내에 축적된다(Colborn *et al.*, 1993; Von Westernhagen *et al.*, 1981, 1987).

최근, 스테로이드 호르몬과 유사한 기능을 하는 유기화합물질들의 존재가 밝혀지고 있고, 이러한 물질을 내분비장애물질(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)이라 명명하고 있다(Kavlock *et al.*, 1996). 내분비장애물질이 어류의 성분화와 번식에 미치는 영향에 관한 연구에는 β-hexachlorocyclohexane, p-nonylphenol 처리에 의한 송사리, *O. latipes*의 testis-ova 유도(Wester and Canton, 1986; Michelle *et al.*, 1997), 4-tert-pentylphenol 처리에 의한 수컷 잉어, *Cyprinus carpio*의 자성화 유도(Gimeno *et al.*, 1996), estrogenic alkylphenol성 화학물질에 침적된 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*에 있어 정소 성장 억제(Jobling *et al.*, 1996), nonylphenol을 처리한 등가시치과 어류 eelpout, *Zoarces viviparus*에 있어 vitellogenin 합성 유도와 정소 구조에 미치는 영향(Christiansen *et al.*, 1998) 등이 있다.

내분비장애물질인 BPA는 폴리카보네이트 플라스틱과 에폭시수지의 원료로 세계적으로 널리 사용되고 있다. 폴리카보네이트 플라스틱은 음식용기와 음료 포장재료로 널리 사용되고 있으며, 또한 에폭시수지는 캔 용기, 병 뚜껑 그리고 물 공급용 파이프 등에 금속을 코팅하는 물질이며(Brotons *et al.*, 1995), 치과 재료에도 포함되어 있고 플라스크를 멸균할 때 용출되는 것으로 보고되고 있다(Olea *et al.*, 1996; Krishnan *et al.*, 1993). 그리고 BPA가 생물에 미치는 영향에 관한 연구는 마우스의 생식소발달(Waechter *et al.*, 1998; Dimond *et al.*, 1998)과 무흉선 마우스의 estrogenicity(Kang *et al*, 1998)에 관한 연구가 있을 뿐, 어류의 번식에 대한 BPA의 영향을

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

보고한 논문은 찾아보기 힘들다.

이 연구는 BPA에 송사리, *O. latipes*의 수정란과 자어를 침적처리 하였을 때 수정란의 부화능력, 자어의 성분화, 생식세포 형성 및 간세포 활성에 미치는 영향, 그리고 송사리 어미에 BPA를 경구투여 하였을 때 알의 생산력과 수정란의 부화능력에 미치는 영향을 번식생물학적 측면에서 탐색하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅱ. 재료 및 방법

실험어류

이 연구에 이용된 송사리는 1999년 5월 19일과 7월 20일 전라남도 광양시 광양읍 서천과 동천으로 유입되는 농로와 하천 개울가에서 채집하였다. 채집된 송사리의 평균 전장은 2.58±0.64 ㎝, 평균 체중은 0.21±0.13 g 이었다. 채집된 송사리는 제주대학교 해양연구소로 옮긴 후 지하수를 이용하여 유수식으로 사육하면서 40 ℓ 유리수조에 적응시켰다. 산란기에는 수정란의 부착을 위해 사육수조에 수초를 함께 넣어 주었다.

실험 약품

BPA는 흰색 결정이고, 녹는점이 150~155 ℃, 끓는점이 220 ℃, 밀도가 1.95로 자극성 및 과민성 물질이며, 생식독성 및 기형 유발가능성 물질이다. 이 실험에서는 aceton 10 ㎖에 BPA (Aldrich chemical company, Inc., USA) 1 g을 녹인 stock solution을 제조하여 BPA-50, 100 및 200 ㎍/ℓ의 농도로 수정란과 부화자어에 침적 처리하였고, BPA-50, 100 및 200 ㎍/g BW/day의 농도로 어미에 경구투여 하였다.

수정란 침적처리

수정란의 부화율과 부화시간에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 송사리 어미 사육수조의 수초에 부착한 알 중에서 2~4 세포기의 발생단계의 것을 수거하여 500 ㎖ 비이커에 실험구별로 45~55 개씩 수용하였다. BPA 처리구는 50, 100 및 200 ㎍/ℓ 농도가 되도록 각 실험구에 BPA를 첨가하였으며, 대조구는 사육수만을 공급한 실험구(대조구 Ⅰ)와 BPA의 용매인 aceton을 단독으로 처리한 실험구(대조구 Ⅱ)를 두었다. 사육수는 24시간마다 전량 환수하였으며, 증발에 따른 농도 변화를 막기 위해 덮개를 씌웠다. 수온은 25±0.5℃, 광주기는 L:D=16:8을 유지하였으며, 실험은 2회 반복 수

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

행하였다.

부화자어 침적처리

실험어는 부화자어의 성분화와 생식세포 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 자연 산란된 수정란을 수거하여 10 ℓ 유리수조에서 부화시켜 이용하였다. 갓 부화한 송사리 자어를 1 ℓ 유리수조에 40개체씩 수용하였다. BPA 처리구는 50, 100 및 200 ㎍/ℓ 농도가 되도록 각 실험구에 BPA를 첨가하였으며, 대조구는 사육수만을 공급한 실험구(대조구 Ⅰ)와 BPA의 용매인 aceton을 단독으로 처리한 실험구(대조구 Ⅱ)를 두었다. 사육수는 Michelle 등(1997)의 방법에 따라 72시간마다 전량 환수시킨 후 각 실험구의 BPA 농도를 유지하였으며, 증발을 막기 위해 덮개를 씌우고, 산소공급을 위하여 aeration을 시켰다(Fig. 1). 실험기간동안 수온은 26±0.5℃, 광주기는 L:D=16:8을 유지하였다. 먹이는 시판되는 초기미립자사료(이화유지공업주식회사)를 수시로 공급하였으며, 실험은 2회 반복 수행하였다.

실험어는 부화후 10, 20, 30 및 70일째에 채집하여 투영기(Mitutoyo, PJ 3000)와 전자저울(Sartorius, BP 3100S)을 이용하여 각각 0.1 mm, 0.01 g까지 전장과 체중을 측정한 후, 조직학적 관찰을 위해 Bouin's solution에 어체 전체를 고정하였다. 고정된 시료는 자동조직 파라핀 유도기(Richertjung, Histokinett 2000)를 이용하여 파라핀 유도과정을 거쳐 5 ㎛로 절편을 만든 후 탈파라핀을 유도하여 Hansen's Haematoxyline과 0.5 % Eosin에 비교 염색하였으며, 간조직의 변화를 관찰하기 위해 PAS (periodic acid-schiff) 반응을 시켰다. 염색한 시료는 생물현미경(Carl Zeiss, HBO 50)을 이용하여 검경하였다. 생식소 절편 내에 발달단계는 CCTV system (Sony, KX 14cp1)으로 조직상을 모니터에 띄워 각각의 세포들이 분포하는 범위를 조사하여 관찰하였다.

어미의 경구투여

각 실험구별로 평균전장 2.9±0.25 cm, 평균체중 0.3±0.07 g의 송사리 어미를 1 ℓ 비이커에 20마리씩 수용하였다. BPA 처리구는 각 실험구별로

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

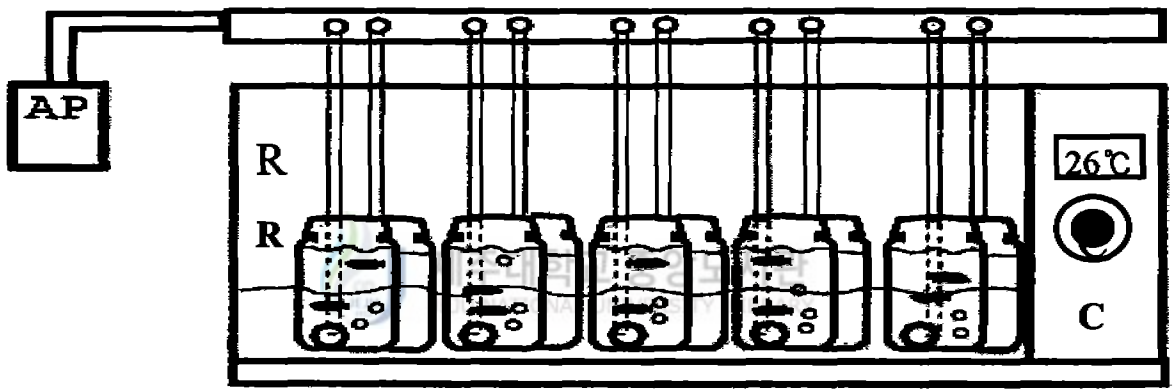


Fig. 1. Schematic diagram of rearing system.
AP: air pump, R: rearing tank, C : control box

50, 100 및 200 ㎍/g BW/day 농도로 시판중인 초기사료(農産工業株式會社, 日本)에 흡착시킨 후 3주 동안 경구투여 하였다. 대조구는 사료만을 투여한 실험구(대조구 Ⅰ)와 BPA의 용매인 aceton을 단독으로 처리한 실험구(대조구 Ⅱ)를 두었다. 사육수는 3일에 한번 전량 환수하였으며, 수정란의 부착을 위하여 수초를 넣어주었다. 실험기간동안 수온은 25±0.5℃, 광주기는 L:D=16:8을 유지하였다.

수정란은 수초에서 수거하여 계수한 후 500 ㎖ 비이커에 수용하여 부화를 유도하였으며 백탁된 알과 찌그러진 알은 비정상적인 알로 간주하여 제거하였다. 부화율은 [부화개체수/(생산된 알의 수-비정상적인 알의 수)×100] 식으로 계산하였다.

통계분석

실험결과의 성비는 χ^2-test를 실시하였고, 간세포의 크기는 nested analysis of variance (ANOVA)를 실시한 후 Statistical Analysis (SAS Institute North Caroline, USA)를 이용하여 Tukey's multiple range test로 평균간의 유의성을 검정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅲ. 결 과

1. 수정란의 발생

송사리 수정란의 부화시간과 부화율은 Fig. 2와 같다. 부화 개시는 대조구에서 수정 후 9일째에 시작되었으나, BPA 처리구에서 수정 후 26일에 시작되어 대조구보다 부화속도가 약 3배정도 늦었다. 그리고, 부화가 종결되는 시점은 대조구에서 수정 후 12일에 부화가 완료되었지만, BPA 50, 100 ㎍/ℓ 처리구에서 수정 후 27일과 35일에 부화가 완료되었다. BPA 200 ㎍/ℓ 처리구의 수정란은 부화되지 않았다.

부화율은 대조구 Ⅰ, Ⅱ가 각각 89.8±1.14, 84.3±4.54%로 높았으나, BPA 50, 100 ㎍/ℓ 처리구의 부화율은 각각 23.3±7.86, 22.2%로 대조구에 비해 상대적으로 낮았다(Fig. 2).

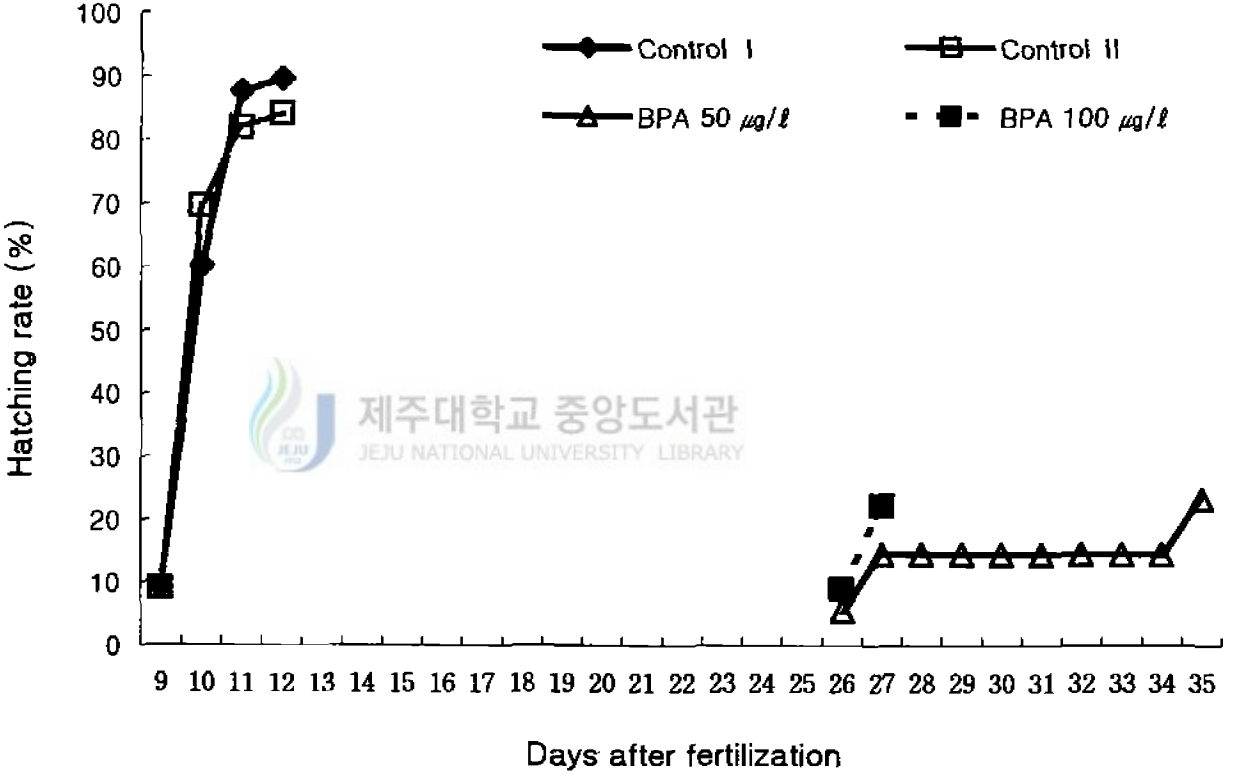
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 성분화와 생식세포 형성

1) 성분화와 생식세포 형성

부화직후 송사리의 암컷 생식소는 중신관과 소화관 사이의 생식상피를 따라 원시생식소(primitive gonad)를 형성하고 8 ㎛의 내외의 생식원세포(gonia cell)들이 분포하고 있으며, 후복막 쪽으로 신장되었다(Fig. 3-A, B).

부화 후 20일째 송사리의 난소는 난경 25 ㎛의 내외의 주변인기 난모세포들이 생식소 내에 존재하고, 정소는 등쪽 체강에 길게 신장된 생식상피를 따라 생식원세포들이 분열증식 하였다(Fig. 3-C, D).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 2. Hatching rate of the fertilized eggs in Songsari, *O. latipes* treated with BPA.

부화 후 30일째 난소는 수적으로 증가한 주변인기 난모세포들을 가지고 있으며, 정소는 소엽 내에 정원세포와 정모세포 단계까지 발달하였다(Fig. 3-E, F). 부화 후 30일째까지 BPA 처리한 후 송사리의 성분화과정을 조직학적으로 검경한 결과 대조구와 모든 처리구간의 차이는 없었다.

그러나, 부화 후 70일째 생식소를 조직학적으로 검경한 결과 난소 내 난 발달단계는 Fig. 4와 같다. 대조구에서 암컷의 난소 내에는 염색인기 난모세포와 주변인기 난모세포들만 관찰되었고, 그 비율이 각각 13.1±2.05, 86.9±2.05%를 차지한 반면, BPA 50 ㎍/ℓ 처리구에서 난 발달과정은 염색인기 및 주변인기 난모세포가 각각 8.3±0.29, 88.4±2.95%이었고, 난황포기 난모세포가 3.2±2.60%를 차지하였다(Fig. 5-A, B). BPA 100 ㎍/ℓ 처리구의 난소는 염색인기, 주변인기 난모세포의 비율이 각각 4.3±0.04, 89.6±2.80%이었고, 난황포기 및 난황구기 난모세포의 비율이 각각 3.9±1.21, 2.2±1.56%를 차지했다(Fig 5-C). 또한 BPA 200 ㎍/ℓ 처리구의 난소 내 난 발달과정이 더욱 발달하여 염색인기, 주변인기 난모세포가 각각 3.9±0.19, 80.1±1.48%를 차지하고 있고, 난황포기, 난황구기 및 완숙 난모세포가 각각 8.4±3.08, 5.5±2.50 및 2.1±1.93%를 보이고 있어 처리농도가 높을수록 난소의 발달이 빨랐다(Fig. 5-D).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

한편, 정소 내 정자형성단계별 점유율은 Fig. 6과 같다. 대조구에서 정소 내 정원세포, 정모세포 및 정세포의 비율이 각각 67.9±8.12, 4.0±0.35 및 22.7±2.40%를 차지하였다(Fig. 7-A). BPA 처리구의 정소 내 정원세포, 정모세포 및 정세포의 비율은 BPA 50 ㎍/ℓ 처리구에서 각각 78.8±10.06, 1.9±0.60 및 16.7±8.94%이었으며, BPA 100 ㎍/ℓ 처리구에서 각각 86.3±10.68, 3.7±0.53 및 6.0±1.16%, 그리고 BPA 200 ㎍/ℓ 처리구에서 각각 99.3±0.90, 0.1±0.05 및 0.5±0.01%를 차지하였다. BPA 200 ㎍/ℓ 처리구에서 정원세포가 가장 높은 비율을 보였고, 대조구에서 정세포가 가장 높은 비율을 보여 정소는 난소와는 반대로 처리구보다는 대조구에서 정자형성과정의 발달이 빨랐다(Fig. 7-B, C, D).

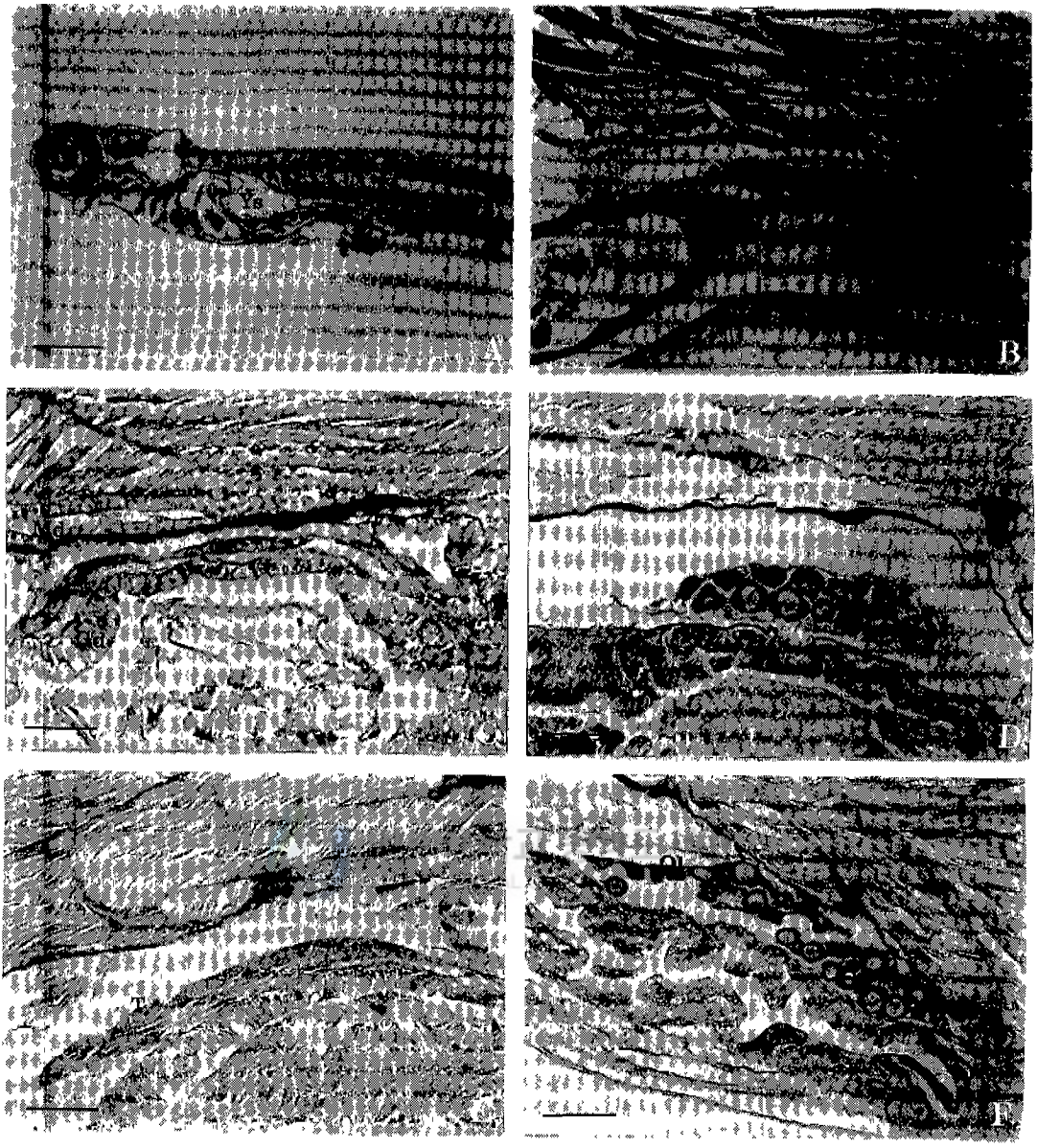
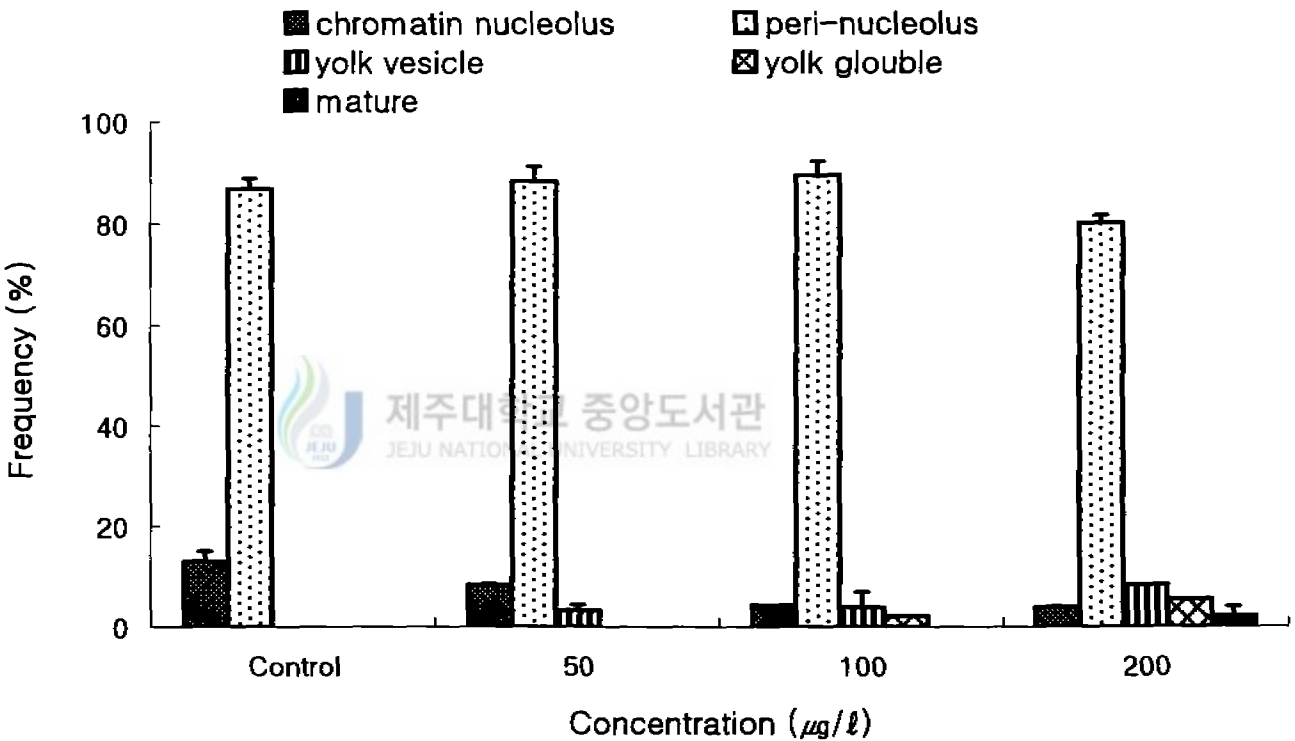
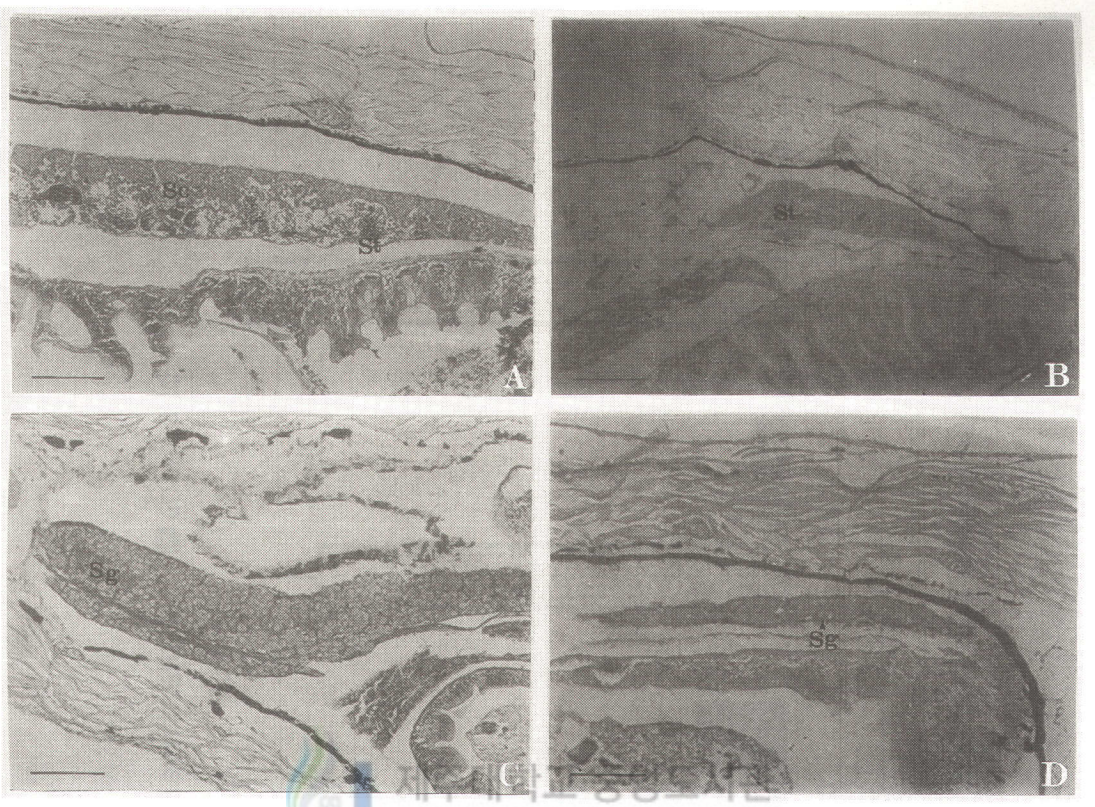


Fig. 3. Photomicrographs of sex differentiation in Songsari, *O. latipes* treated with BPA. (A) newly hatched fry. Scale bar=100㎛. (B) primitive gonad of newly hatched fry. Scale bar=25 ㎛. (C) sagittal section of genital ridge of the 20 days after hatching. Scale bar=25 ㎛. (D) sagittal section of ovary of the 20 days after hatching. Scale bar=50 ㎛. (E) testicular tissue of the 30 days after hathing. Scale bar=50 ㎛. (F) ovarian tissue of the 30 days after hatching. Scale bar=50 ㎛. Md: mesonephric duct, Gc: germ cell, Gd: gut duct, N: notochord, Oc: oocyte, Ol: ovarian lamella, Pg: primitive gonad, T: testis, Ys: yolk sac.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

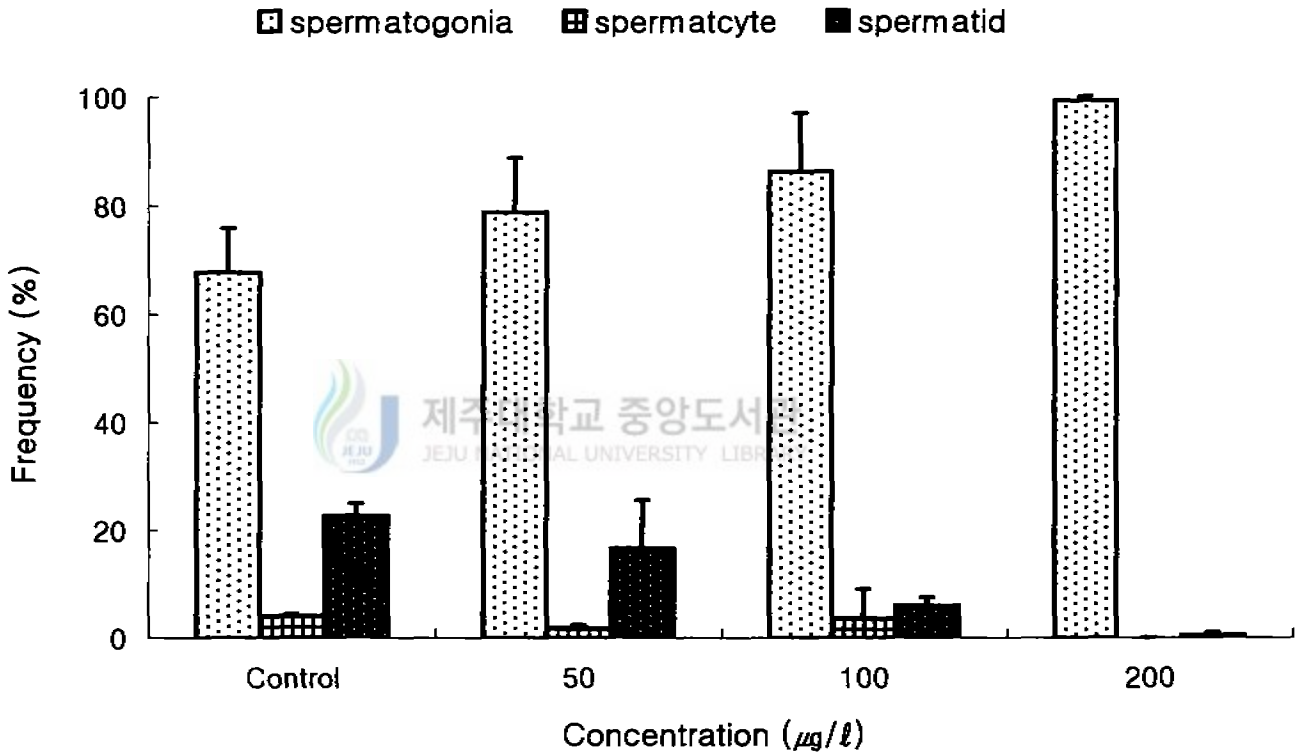
Fig. 4. Frequency of developmental stage of ovary in 70 days old Songsari, *O. latipes* treated with BPA.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig 5. Phtomicrographs of ovary 70 days old Songsari, *O. latipes*.

(A) control group. (B) BPA 50 ㎍/ℓ treatment group. (C) BPA 100 ㎍/ℓ treatment group. (D) BPA 200 ㎍/ℓ treatment group. Pn: peri-necleolous oocyte, Yv: yolk vesicle oocyte, Yg: yolk glouble oocyte, M: mature oocyte. Scale bar=100 ㎛.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 6. Frequency of developmental stage of testis in 70 days old Songsari, *O. latipes treated with* BPA

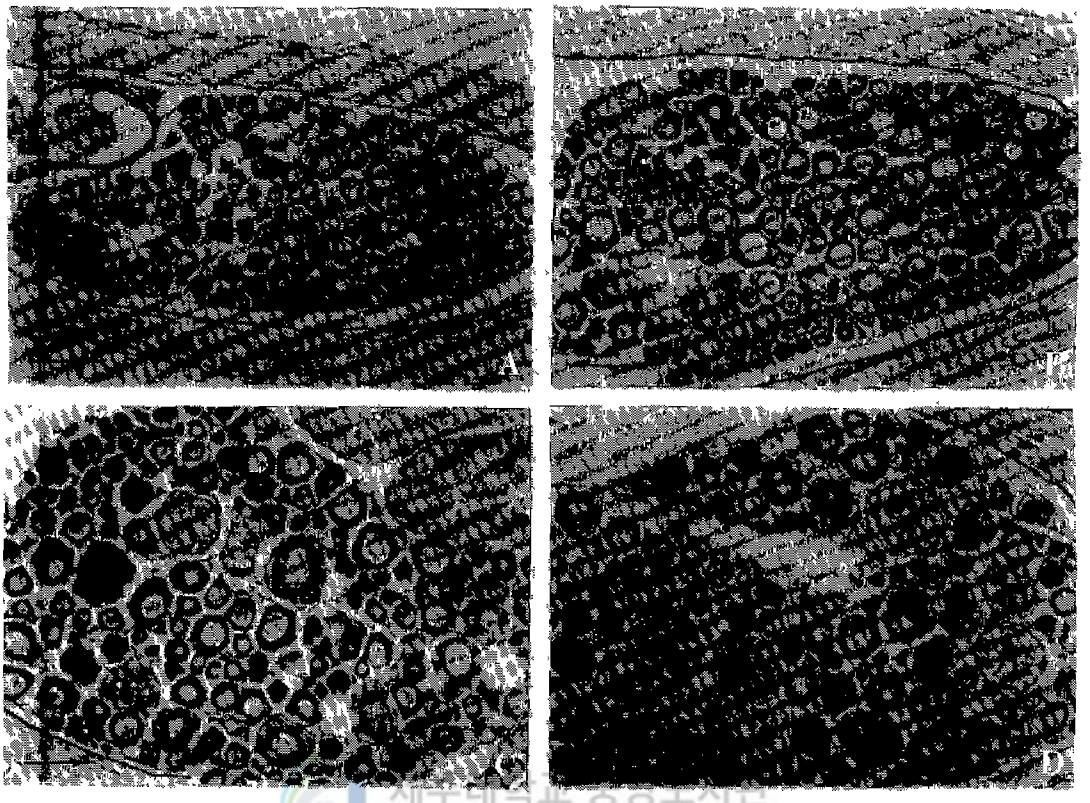


Fig. 7. Phtomicrographs of testis 70 days old Songsari, *O. latipes*.
(A) control group. (B) BPA 50 ㎍/ℓ treatment group. (C) BPA 100 ㎍/ℓ treatment group. (D) BPA 200 ㎍/ℓ treatment group Sg: spermatogonia, Sc: spermatocyte, St. spermatid. Scale bar=100 ㎛.

2) 성비

부화 후 70일된 송사리의 성비는 대조구에서 암컷 16마리, 수컷 12마리로 암:수 비율이 1:1인데 비하여, BPA 50, 100 ㎍/ℓ 처리구에서 암컷이 각각 30마리, 20마리, 수컷이 각각 17마리, 15 마리로 암:수 비율이 2:1이었다. BPA 200 ㎍/ℓ 처리구의 성비는 암컷이 21마리, 수컷이 20마리로 암:수 비율이 1:1이었다 (P> 0.05, Table 1).

3) 간세포 활성

부화 후 70일된 송사리의 간세포 크기는 Fig. 8과 같다. 암컷의 간세포 크기는 대조구에서 8.3±0.68 ㎛이었고, BPA 50, 100 및 200 ㎍/ℓ 처리구에서 각각 12.9±1.16, 15.6±1.33 및 14.7±1.11 ㎛로 대조구에 비해 처리구가 컸다(P <0.05). 수컷의 간세포 크기는 BPA 50, 100 및 200 ㎍/ℓ 처리구에서 각각 11.2±1.29, 12.1±1.14 및 10.5±0.6 ㎛로 암컷의 대조구에 비해 컸다(P <0.05).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

PAS 염색을 하였을 때, 대조구 암컷의 간조직 보다 BPA 처리구 암컷의 간조직이 강한 양성반응을 보였고, BPA 처리구 수컷에서도 암컷의 간조직과 비슷한 양상을 보였다. 그리고 대조구 암·수의 간조직은 대부분 간 세포질에 지방축적에 따른 공포들이 없었으나, BPA 처리구 암·수의 간조직은 간 세포질에 지방축적으로 공포들이 분포하였다(Fig. 9, 10).

3. 어미의 번식력

송사리 어미에서 생산된 알의 수를 조사한 결과는 Fig. 11과 같다. 대조구 Ⅰ, Ⅱ 및 BPA 50 ㎍/g BW/day 처리구의 송사리 어미는 각각 52.5±33.23, 47.0±16.97 및 48.0±12.73개의 알을 생산하였고, BPA 100, 200 ㎍/g

BW/day 처리구의 어미는 각각 21.5±0.71, 18.5±7.78개의 알을 생산해 상대적으로 낮은 산란량을 보였다. 생산된 알 중에서 비정상적인 알의 비율은 대조구 Ⅰ, Ⅱ에서 각각 11.8±1.99, 16.2±1.34%이었고, BPA 50, 100 및 200 ㎍/g BW/day 처리구에서 각각 38.8±17.65, 46.8±14.69 및 74.1±6.87%의 값을 보여 처리 농도가 높을수록 비정상적인 알이 많았다.(Fig. 12).

어미에서 생산된 수정란을 부화시킨 결과 부화율은 Fig. 13과 같다. 대조구 Ⅰ, Ⅱ의 부화율은 각각 78.7±8.41, 78.9±4.34%인 반면, BPA 50, 100 및 200 ㎍/g BW/day 처리구의 부화율은 각각 47.7±30.22, 45.2±16.84 및 47.2±3.96%로 대조구보다 상대적으로 낮았다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 1. Numbers and ratios of female and male songsari in the different groups at 70 days after hatching

Experimental group	No. females	No. males	Sex ratio (F : M)
Control I	16	12	1 : 1
Control II	24	26	1 : 1
Bisphenol A 50 ㎍/ℓ	30	17	2 : 1
Bisphenol A 100 ㎍/ℓ	24	15	2 : 1
Bisphenol A 200 ㎍/ℓ	21	20	1 : 1

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

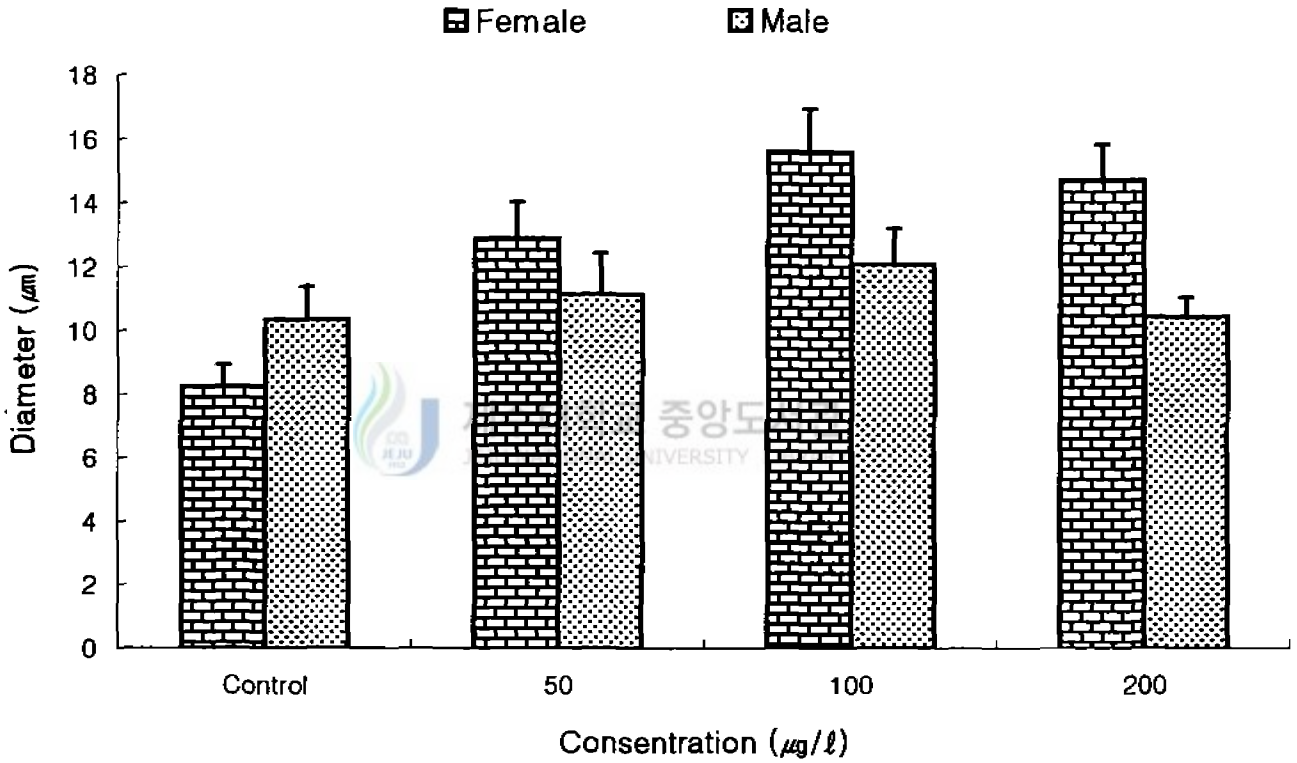


Fig. 8. Diameter of hephtic cell in Songsari, *O. latipes* treated with BPA.

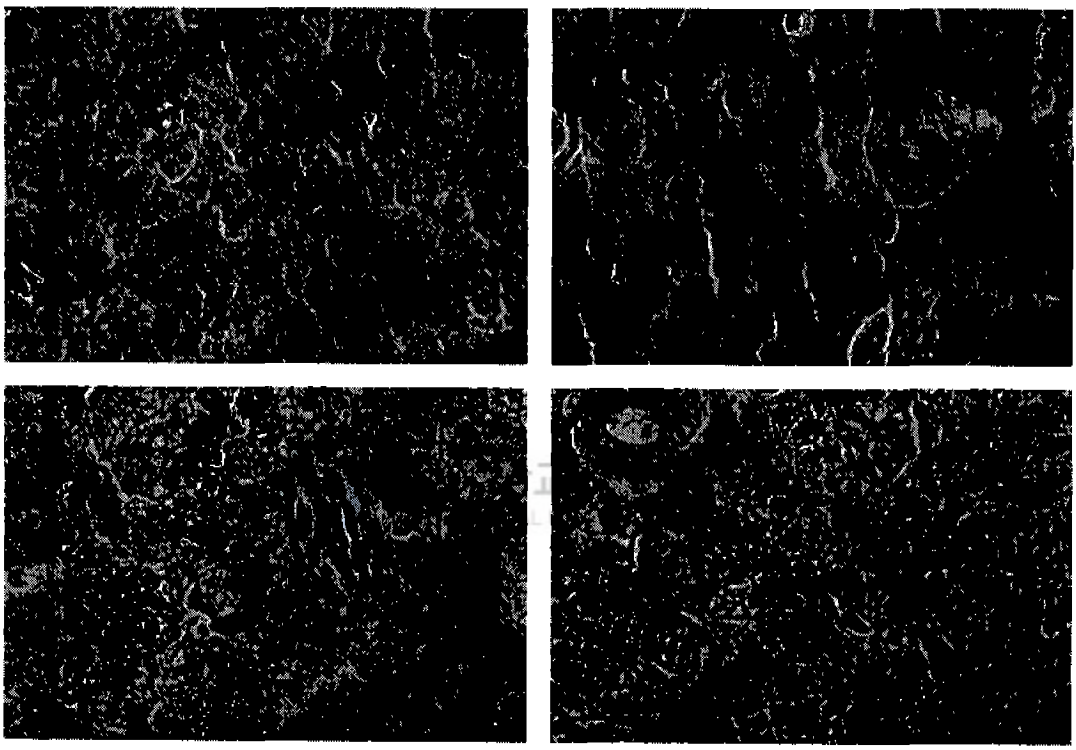


Fig. 9. Photomicrographs of liver tissue of HE stain in 70 days old Songsari, *O. latipes*.

(A) control group of female. (B) control group of male. (C) BPA treatment group of female (D) BPA treatment group of male. Scale bar=25 ㎛.

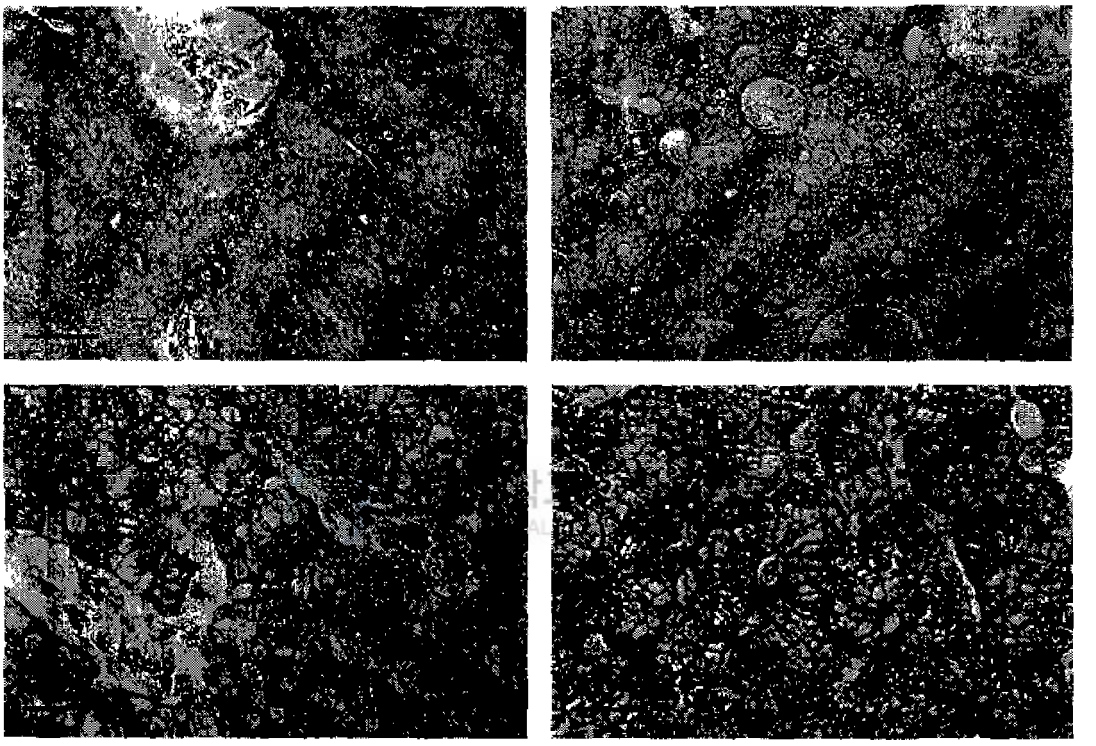


Fig. 10. Photomicrographs of liver tissue of PAS stain in 70 days old Songsari, *O. latipes*.

(A) control group of female. (B) control group of male. (C) BPA treatment group of female. (D) BPA treatment group of male. Scale bar=25 ㎛.

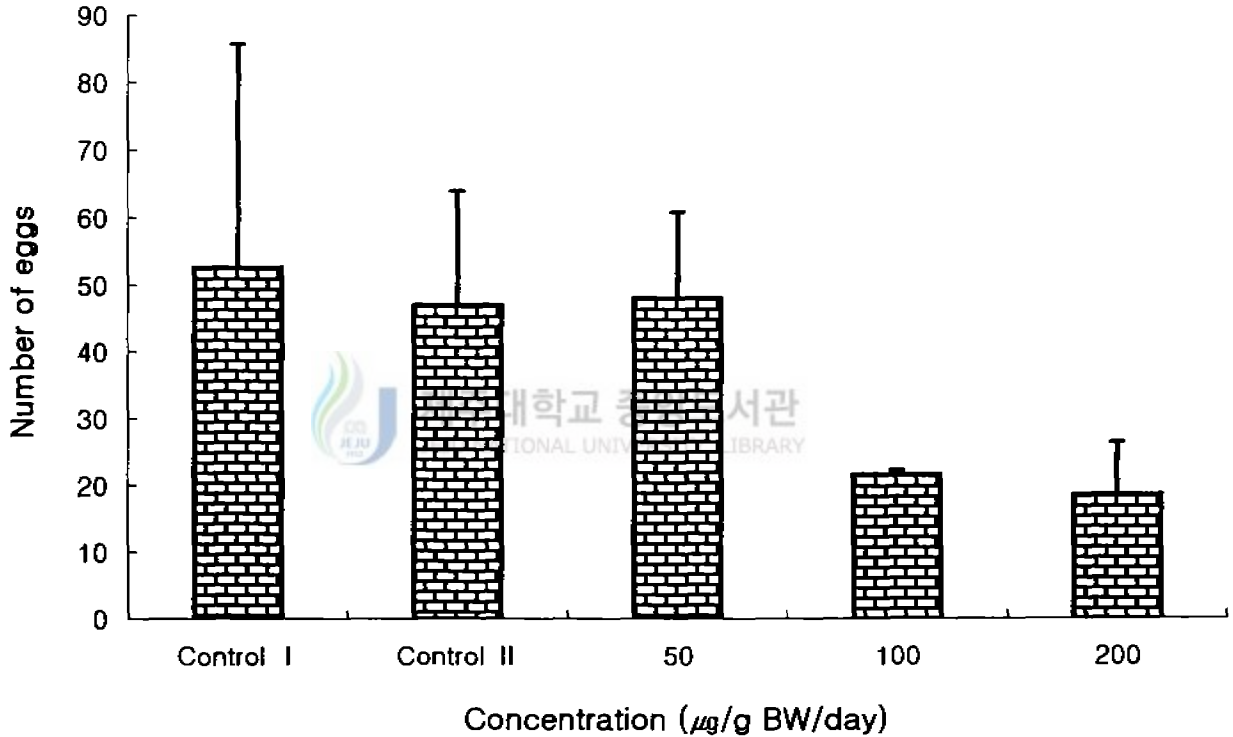
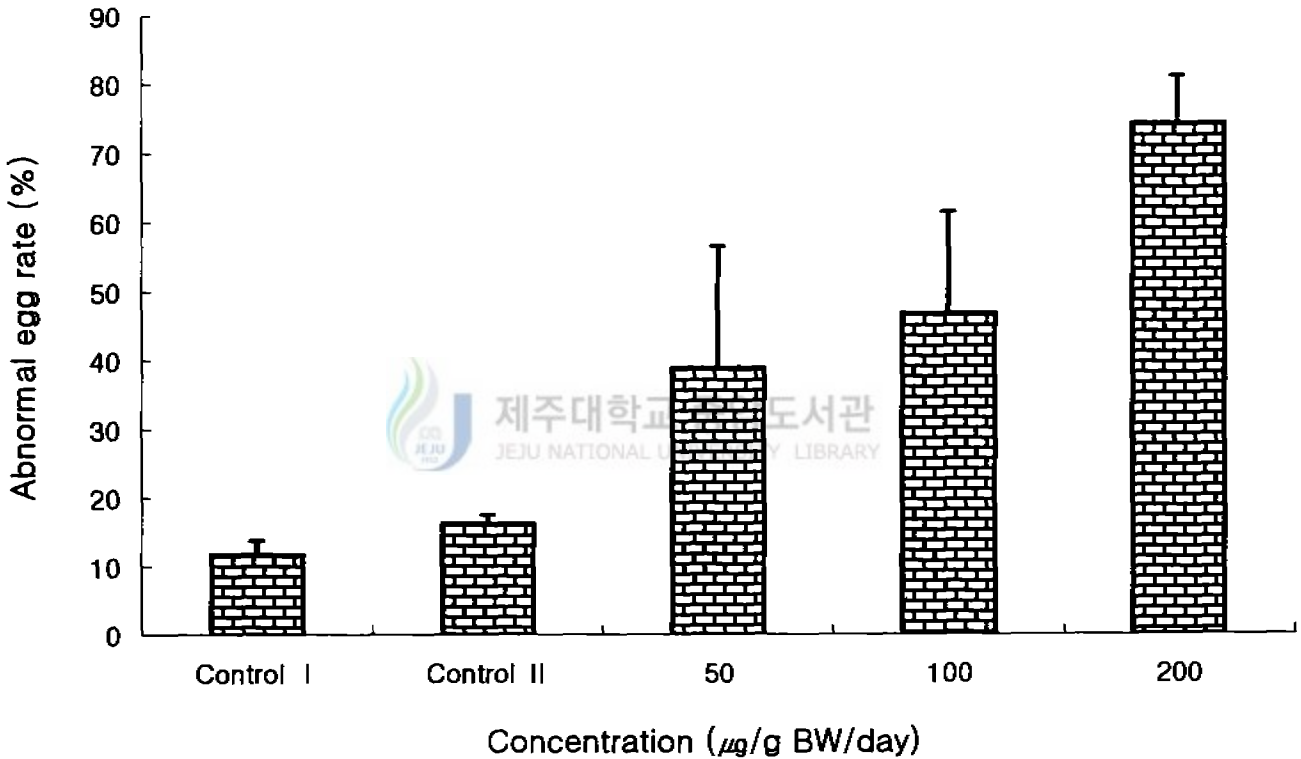


Fig. 11. Number of eggs spawned in adult Songsari, *O. latipes* treated with BPA.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 12. Number of abnormal eggs spawned in adult Songsari, *O. latipes treated with* BPA.

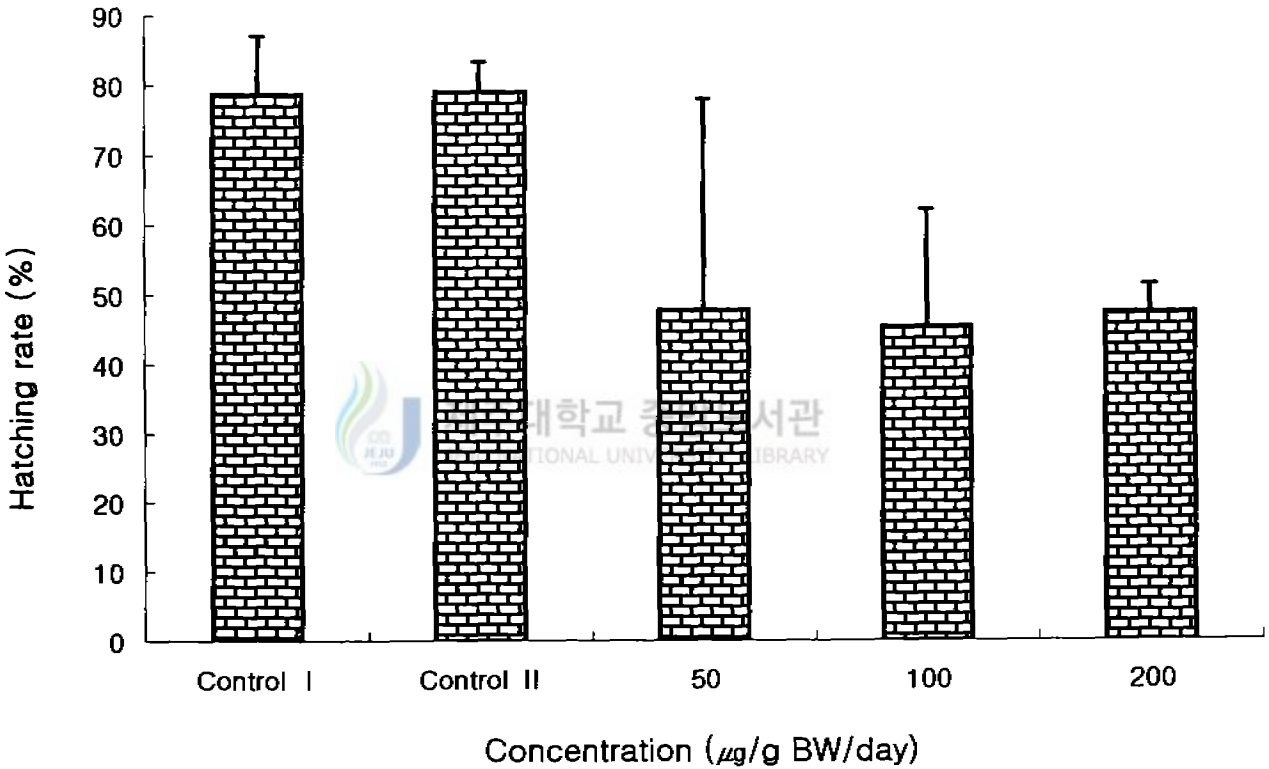


Fig. 13. Hatching rate of fertilized eggs spawned in adult Songsari, *O. latipes* treated with BPA.

Ⅳ. 고 찰

BPA가 송사리 *O. latipes* 수정란의 초기발생과 자어의 성분화와 생식세포형성 및 간세포 활성 그리고 어미의 번식력에 미치는 영향을 조사하는데 목적이 있다.

어류에 있어 유기화합물은 생식소와 생식세포의 직접적인 상호작용에 의한 성분화(Armstrong, 1986) 또는 수정의 방해(Spies *et al.*, 1988), 부화율(Von Westernhagen *et al.*, 1981; Hose *et al.*, 1982), 부화자어의 생존율(Von Westernhagen *et al.*, 1987)를 감소시킬 수 있다. 이 연구에서 송사리의 수정란은 대조구 Ⅰ, Ⅱ에서 수정 후 9일째에 부화를 시작하여 12일째에 완료되었지만, BPA 50, 100 ㎍/ℓ 처리구의 수정란은 26일째에 부화가 시작되어 각각 27일째, 35일째 완료되었다. 그리고 BPA 200 ㎍/ℓ 처리구는 부화하지 않았다. 부화율은 대조구 Ⅰ(89.8%), Ⅱ(84.3%)는 높았지만, BPA 50 (23.2%), 100 (22.2%) ㎍/ℓ 처리구는 상대적으로 낮았다. 이처럼 BPA는 송사리 수정란의 부화에 소요되는 시간을 3배 이상 지연시키고 부화율 또한 현저히 감소시켰다.

송사리 어미는 대조구 Ⅰ, Ⅱ 및 BPA 50 ㎍/g BW/day 처리구에서 각각 52.5, 47.0 및 48.0개의 알을 생산하였고, BPA 100, 200 ㎍/g BW/day 처리구의 어미는 각각 21.5, 18.5개의 알을 생산해 상대적으로 낮은 산란량을 보였다. 생산된 알 중에서 비정상적인 알의 비율은 대조구 Ⅰ, Ⅱ에서 각각 11.8, 16.2%이었고, BPA 50, 100 및 200 ㎍/g BW/day 처리구에서 각각 38.8, 46.8 및 74.1 %의 값을 보여 처리 농도가 높을수록 비정상적인 알이 많았다. 그리고 정상적으로 수정된 알의 부화율은 대조구에서 78.0% 이상이었으나, 처리구에서 50.0% 이하로 BPA가 송사리 어미의 비정상적인 성숙을 유도하여 번식에 장애를 주는 것으로 추정된다. 알인 상태에서 오염물질에 노출된 결과와 어미로부터 생산된 알이 노출된 결과는 많은 점에서 유사하지만, 수정란에 더 강한 독성을 보이는 것은 오

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

염물질이 어미로부터 축적되는 시간보다는 알에 침투하는 시간이 더 짧기 때문인 것으로 생각된다.

송사리, *O. latipes*는 부화 후 13일 경에 수컷 생식소의 분화가 이루어지는 반면에, 암컷 생식소는 부화하기 직전에 분화하기 시작하는 분화형 자웅이체이다(Yamamoto, 1969; Tuzuki *et al*, 1966). Wester and Cantǫn(1986)은 β-hexachlorocyclohexane에 송사리, *O. latipes* 알을 수정에서부터 3개월간 노출시켜 수컷에서 testis-ova 형성을 관찰했고, *p*-nonylphenol에 3개월간 0.05, 0.1 ㎎/ℓ 농도로 노출시켜 수컷 testis-ova 비율이 각각 50%와 86%를 보였지만, 0.01 ㎎/ℓ농도에서는 영향이 없었다 (Gray and Metcalfe, 1997). 또한 대조구(33%)와 비교하여 0.1 ㎎/ℓ 처리구(67%)에서 암컷의 수가 증가하였다. 이 연구에서 BPA가 송사리 자어의 성분화 시기에 미치는 영향을 조직학적으로 검경한 바에 의하면 부화 후 70일째 BPA에 침적 처리된 송사리 자어에서 testis-ova를 가진 개체나, 성전환 개체는 관찰할 수 없었다. 그러나 부화 후 70일된 송사리의 난소 내에 발달단계별 난모세포의 비율은 대조구에서 염색인기 난모세포와 주변인기 난모세포만이 분포하지만, 높은 농도의 BPA 처리구로 갈수록 더욱 발달하여 난황포기, 난황구기 및 완숙기 난모세포의 비율이 증가하였다. Waxman(1988)은 오염물질에 노출된 어류의 난소가 PAHs (Polycychlic Aromatic Hydrocarbons)와 PCB (Polychlorinated Biphenyls)와 같은 유기오염물질이 간에서 cytochromes P-450의 활성을 방해하여 17β-oestradiol의 이화작용을 감소시키거나 아니면 17β-oestradiol의 수치를 증가시켜 스테로이드 합성과정의 변화로 조기 성숙을 야기한다고 보고하고 있다. 반대로, 정소 내에 정원세포, 정모세포 및 정세포의 분포를 조사한 결과 대조구에서 정세포와 정모세포의 비율이 높게 나타나는 반면에, BPA 처리구에서 정원세포의 비율이 높게 나타났다. 이런 결과에서 BPA는 송사리 암컷의 조기성숙을 유도하지만, 수컷의 정자형성과정을 저해하는 것으로 생각된다.

부화 후 70일된 송사리의 성비는 대조구에서 암컷 16마리, 수컷 12마리로 암:수 비율이 1:1인데 비하여, BPA 50, 100 ㎍/ℓ 처리구의 성비는 암컷이 각각 30마리, 20마리, 수컷이 각각 17마리, 15 마리로 암:수 비율이 2:1

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

로 암컷의 비율이 높았다. BPA 200 $\mu g/\ell$ 처리구의 성비는 암컷 21마리, 수컷 20마리로 암:수 비율이 1:1이었다. 적은 양의 estrogen이 정상적인 암컷의 발달에는 필수적인 것처럼 보이는 반면, 많은 양은 웅성화를 초래한다고 보고된 바 있으나(Hines, 1992), 과잉의 estrogenic hormome이 어류의 생식소발달에 미치는 정확한 hormone 기작에 관해서는 앞으로 심도 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

Wester and canton(1986)은 β-hexachlorocyclohexane에 장기간 처리한 송사리 간의 전자현미경적 관찰에서 지방과 글리코겐의 축적을 보고하였다. 이 실험에서 부화 후 70일된 송사리의 간조직을 광학현미경에서 관찰한 결과 대조구에 비해 처리구에서 간세포 크기가 증가하였고, 지방축적으로 공포들이 분포하였다. 이러한 간세포의 비대는 BPA의 영향으로 인한 글리코겐의 축적으로 생각된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

V. 요 약

내분비장애물질로 알려진 bisphenol A (BPA)가 송사리, *O. latipes* 수정란의 초기발생과 자어의 성분화와 생식소 발달 그리고 어미의 번식력에 미치는 영향을 조사하였다.

송사리 수정란은 대조구 Ⅰ, Ⅱ에서 9~12일째 부화되었으나, BPA 50과 100 ㎍/ℓ 처리구의 수정란은 각각 26~27일째 그리고 26~35일째 부화되었다. 그러나 BPA 200 ㎍/ℓ 처리구의 수정란은 부화되지 않았다. 부화율은 대조구 Ⅰ과 Ⅱ에서 89.8%와 84.3%이었고, BPA 50, 100 ㎍/ℓ 처리구의 부화율은 각각 23.3, 22.2%이었다.

부화 후 70일된 송사리 난소는 대조구에서 염색인기 난모세포와 주변인기 난모세포만 관찰되었다. 부화직후 자어에서부터 70일 동안 BPA를 침적 처리한 송사리 난소는 BPA 50, 100 ㎍/ℓ 처리구에서 난황포기, 난황구기 난모세포가 관찰되었고, 200 ㎍/ℓ 처리구에서 완숙한 난모세포가 관찰되었다. 반면에, 정소는 대조구에 비해 처리구에서 정세포의 비율이 낮았다. BPA는 암컷의 조기성숙을 유도하였지만, 수컷의 정자형성과정 발달을 저해하였다.

송사리의 성비는 대조구에서 1:1이었으나, BPA 50, 100 ㎍/ℓ 처리구의 성비는 2:1로 암컷이 많았다. BPA 200 ㎍/ℓ 처리구의 성비는 1:1로 대조구와 차이가 없었다($P < 0.05$).

부화 후 70일 동안 BPA에 침적 처리된 송사리의 간조직은 대조구에 비해 처리구에서 간세포의 크기가 증가하였고($P > 0.05$), 지방의 축적과 공포화 현상이 관찰되었다. 그리고 처리구의 간조직은 PAS에 강한 양성반응을 보였다.

송사리 어미(전장 2.9±0.25 cm, 체중 0.3±0.07 g)는 3주 동안 대조구 Ⅰ, Ⅱ와 BPA 50 ㎍/g BW/day 처리구에서 각각 52.5, 47.0 및 48.0개의 알을 생산하였으나, BPA 100, 200 ㎍/g BW/day 처리구에서 상대적으로

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

적은 21.5, 18.5개의 알을 생산했다. 생산된 알 중에서 비정상적인 알의 비율은 대조구 Ⅰ, Ⅱ에서 11.8, 16.2% 이었고, BPA 50, 100 및 200 ㎍/g BW/day 처리구에서 각각 38.8, 46.8 및 74.1%의 값을 보여 처리 농도가 높을수록 비정상적인 알이 많았다. 그리고 정상적으로 수정된 알의 부화율은 대조구에서 78.0% 이상이었으나, 처리구에서 50.0% 이하로 대조구에 비해 상대적으로 낮았다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅵ. 참 고 문 헌

Armstrong, D. T. 1986. Environmental stress and ovarian function. Biology of Reproduction, 3 : 29-39.

Brotons, J. A., M. F. Olea-Serrano, M. Villalobos, V. Pedraza and N. Olea. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food can. Environ. Health Perspect, 103 : 608-612.

Christiansen, T., B., Korsgaaard and A. Jespersen. 1998. Induction of Vitellogenin Synthesis by Nonylphenol and 17β-Estradiol and Effect on the Testicular Structure in the Eelpout *Zoarces viviparus*. Marine Environmental Research, 46(1-5) : 141-144.

Colborn, T., F. S. Vom Saal and A. M. Soto. 1993. Development effect of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health perspect, 101 : 378-384.

Diomond, S. S., J. M. Waechter Jr., W. J. Breslin, J. H. Butala, S. Z. Cagen, F. W. Jekat, R. L. Joiner, R. N. Shiotsuka and G. E. Veenstra. 1998. Evaluation of reproductive organ development in the male offspring of female wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. Unpublished study of the Society of the Plastics Industry Inc.

Gray, M. A. and C. D. Metcalfe. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka(*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. Environ. Toxicol. Chem., 16 : 1082-1086.

Hines, M. 1992. Surrounded by estrogens considerations for neurobehavioral development in human beings. Chemically induced alterations in sexual and functional development,

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Princeton Scientific Publishing, 261-281 pp.

Hose, J. E., J. B. Hannah, D. Dijulio, M. L. Landolt, B. S. Miller, W. T. Iwaoka and S. P. Felton. 1982. Effects of benzopyrene on early development of flatfish. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 11 : 167-171.

Jobling, S., D. Sheathan, J. A. 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.

Kang, K. S., Y. S. Lee and K. S Shin. 1998. Estrogenicty of Genistein and bisphenol A. Kor. Soc. of Food Hygiene and Safety, 13(2) : 106-111.

Kavlock, R. J., G. P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L. E. Gray, S. Kaatari, G. Lucier, L. Luster, M. J. Mac, C. Macza, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D. M. Sheehan, T. Sinks and H. A. Tilson. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disrupters: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environ. Health. Persp., 104(4) : 715-740.

Krishnan, A. V., P. Stathis, S. F. Permuth and L. Tokes. 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinol., 132 : 2279-2286.

Olea, N., R. Pulgar, P. Perez, F. Olea-Serrano, A. Rivas, A. Novillo-Fertrell, V. Pedraza, A. M. Soto and C. Sonnenschein. 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. Environ. Health Perspect., 104 : 298-305.

Spies, R. B., D. W. Rice and J. Felton. 1988. Effects of organic contaminants on reproduction of the starry flounder,

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Platichthys stellatus, in San Francisco Bay. Ⅱ. Reproductive success of fish captured in San Francisco Bay and spawned in the laboratory. Marine Biology, 98 : 191-200.

Tuzuki, E., N. Egami and Y. Hyodo. 1966. Multiplication and sex differentiation of germ cells during development in the medaka, *Oryzias latipes*. Japanese Journal of Ichthyology, 13(4/6) : 176-182.

Gimeno, S., A. Gerristen, T. Bowmer and H. Komen. 1996. Feminization of male carp, *Cyprinus carpio*. Nature, 384(21) : 221-222.

Von Westernhagen, H., V. Dethlefsen, P. Cameron and D. Janssen. 1987. Chlorinated hydrocarbon residues in gonads of marine fish and effects on reproduction. Sarsia, 72 : 419-422.

Von Westernhagen, H., H. Rosenthal, V. Dethlefsen, W. Ernst, U. L. Harms and P. D. Hansen. 1981. Bioaccumulating substances and reproductive success in Baltic flounder *Platichthys flesus*. Aquatic Toxicology, 1 : 85-89.

Waechter, Jr. J. M., S. S. Dimond, W. J. Breslin, S. Z. Cagen, F. W. Jekat, R. L. Joiner, R. N. Shiotsuka, G. E. Veenstra. 1998. Evaluation of reproductive organ development in CF-1 mice after prenatal exposure to bisphenol A. Unpublished study of the Society of the Plastics Industry Inc.

Waxman, D. J. 1988. Interactions of hepatic cytochromes P-450 with steroid hormones. Regioselectivity and stereospecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P-450 enzyme expression. Biochemical Pharmacology, 37 : 71-84.

Wester, P. W. and J. H. Canton. 1986. Histopathological study of *Oryzias latipes*(medaka) after long-term β-hexachlorochclohexane exposure. Aquatic Toxicol., 9 : 21-45.

Yamamoto, T. 1969. Sex differentiation. In : W. S. Hoar and D. J.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Randall(eds.). Fish Physiology, 3. Academic Press, New York 117- 175 pp.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 항상 부족한 저를 언제나 따뜻한 격려와 사랑으로 이끌어 주신 이영돈 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 부족한 논문을 정성껏 다듬어 주신 최광식 교수님과 여인규 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 올립니다.

많은 관심과 자상한 충고를 아끼지 않으셨던 이정재 교수님, 정상철 교수님, 이기완 교수님, 노 섬 교수님, 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님 그리고 강원도립대학 김형배 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

실험과 자료정리를 위해 많은 시간을 동고동락하였던 발생학 실험실의 성립, 영보, 성보, 봉원, 치훈, 순주, 숙자, 정권, 호진, 진완, 창범, 한준, 범호, 성민, 종표형, 봉래형에게 고마움을 전하며, 멀리 이국땅에서 항상 격려를 아끼지 않았던 병호형, 봉수, 용주에게도 고마움을 전합니다. 아울러 늘 옆에서 많은 조언을 해준 변수철 선배님을 비롯한 대학원 선후배님들께 감사를 드립니다.

조카 상일이의 오랜 투병생활 속에서도 뒷바라지에 정성을 다하신 형님 내외분과 늘 성원을 아끼지 않았던 누님가족들 그리고 작은아버지 내외분께 고마움을 전합니다. 끝으로 늘 친아들처럼 보살펴 주신 장인어른과 장모님께 감사를 드리며, 어려운 여건 속에서도 말없이 내조해 준 사랑하는 아내와 3개월 후면 태어나게 될 2세에게 이 논문을 바칩니다.

이 연구는 제주대학교 해양연구소의 시설과 기자재를 이용하여 수행하였고, 연구수행에 큰 도움을 주신 해양연구소 직원 여러분들께 진심으로 사의를 표합니다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY