

# 한국산 양서류에서 Biomarker를 이용한 에스트로젠성 내분비계장애물질 위해성 평가

계명찬

(한양대학교 자연과학대학 생명과학과)

## 1. 서론

환경오염물질의 일종인 내분비계장애물질 (endocrine disrupter, EDC)은 지구온난화, 오존층의 파괴와 함께 인류의 미래를 위협하는 3대 위협 요인의 하나이다. 따라서 환경 내 EDC의 오염실태를 파악하고 그 위해성을 인간의 보건과 생태적 견지에서 추적 규명하기 위한 연구가 활발한데, 많은 연구가 다양한 실험 포유류를 대상으로 유전, 생식, 면역, 신경, 발생 및 기형, 암독성 평가부분에 집중된 반면 야생환경에 서식하는 동물들을 대상으로 생식, 내분비기능의 교란을 규명하기 위한 연구는 미진한 편이다. 한국은 빠른 속도로 산업화가 진행되는 과정에서 국토가 광범위하게 EDC를 포함한 공해물질로 오염되었다. 현재도 플라스틱 제조과정, 쓰레기소각장, 하수종말처리장 등에서 bisphenol A, dioxin, octylphenol 및 nonylphenol 등 내분비계장애물질이 다량으로 방출되고 있으며 한국의 수서생태계를 구성하는 내륙의 강과 호수, 강하구, 연안 지역에서 도시화에 따른 활동인구 및 산업활동의 증가로 다양한 무기, 유기물에 의한 오염이 가속화 되고 있다 (Shim et al., 1998; Kang et al., 1999; Kaminuma et al., 2000; Jeong et al., 2001; Khim et al., 2001; Lee et al., 2001; Hong et al., 2002; Im et al., 2002; Martin et al., 2003; Monirith et al., 2003). 이미 많은 종류의 수생 척추동물들이 서식지의 감소와 오염으로 인해 그 수가 줄어들었거나 멸종위기에 처한상태이다. EDC는 이러한 현상의 보이지 않는 원인으로 추측된다 (Blaustein and Wake 1995; Carey and Bryant 1995; Houlihan *et al.* 2000). 따라서 EDC에 의한 생체반응을 정량적으로 규명하여 이들 물질의 생산과 배출등에 관한 적절한 환경관리 기준의 설정이 중요하다.

## 2. 양서류 EDC 위해성 평가

### 1) EDC와 양서류

최근 전세계적으로 양서류의 감소 추세가 확연하다. 양서류는 생태계 먹이사슬에서 중상위 단계의 소비자이며 파충류, 조류, 포유류 등 상위 단계의 포식자들에게 중요한 먹이자원이다. 특히 난, 유생 시기를 수중에서 진행하며, 성체가 된 후에도 수변의 육상 환경에 서식한다. 따라서 양서류의 다양성 및 군집구조 및 크기는 수서 생태계의 안정성에 중요한 인자이다. 많은 종류의 EDC가 다양한 양서류에서 생식을 위협할 수 있는 것으로 보고되었다. 특히 유생시기의 양서류는 다양한 독성 환경오염물질에 의한 발생학적 기형 표현의 효용성으로 인해 독성학 연구의 주요 소재로 다뤄져 왔다 (Plotner and Gunther 1987; Boyer and Grue 1995; Lahr 1997; Loeffler *et al.* 2001; Bogi *et al.* 2003). 현재까지 양서류에서의 환경독성 연구는 주로 아프리카물두꺼비, 옴개구리, 표범개구리 등의 실험실 종을 대상으로 많이 연구되어져 왔으나 한국 내 양서류에 대한 연구는 상대적으로 미진하며 특히 다양한 내분비계장애물질에 의한 양서류에서 위해성 평가는 무당개구리 적절히 이뤄지지 않고 있다.

### 2) Biomarker를 이용한 양서류 EDC 위해성 평가 연구

분자생물학적 연구기법의 발달로 양서류의 생식내분비 기능에 영향을 미칠 수 있는 미량 EDC의 영향을 기능 유전체학적 측면에서 평가하는 것이 가능해졌다. 그 대상 유전자로는 난황전구단백질인 vitellogenin (VTG)이 대표적이다. VTG는 간에서 생성되는데 이를 암호화하고 있는 유전자는 estrogen에 의해 전사가 조절된다. 또한 estrogen은 수컷에서도 VTG 발현을 유도한다. 따라서 수컷의 간조직 또는 간세포 배양체에서 VTG 유전자의 발현 정도를 확인함으로써 EDC 가운데 xenoestrogen으로 추정되는 물질의 규명과 그 위해성의 정도를 정량적으로 평가할 수 있다. 또한 특정 지역에서 채집된 개체에서 이들 유전자의 발현을 조사함으로써 이들이 서식하는 환경 내 xenoestrogen성 EDC의 오염여부를 판독할 수 있게 되었다. 한편 dioxin 같은 organochlorine compounds 및 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) 계열의 독성물질은 arylhydrocarbon receptor를 경유하며 하위 신호전달과정에서 hepatic cytochrome P450 (CYP1A) 유전자를 활성화시킨다. 이들 유전자들은 상기 물질에 처리되었을 때 발현량이 크게 증가하므로 이들 유전자의 발현을 추적함으로써 PAH 등 독성물질에 의한 양서류 노출을 모니터링 할 수 있다. 이외에도 최근 널리 이용되기 시작한 DNA chip 또는 protein chip을 이용한 유전자발현의 대용량 검색 (high throughput screening)법을 이용하여 EDC를 비롯한 특정 환경오염물질에 대한 노출 여부를 유전자 수준에서 대량으로 검색하려는 유전독성학연구 (toxicogenomics)가 시도되고 있으나 전체 유전자에 대한 생물정보학적 자료의 수집이 선행되어야만 한다.

### 3) 양서류의 xenoestrogen 노출과 biomarker

EDC 가운데 에스트로젠과 유사한 효과를 보이는 물질들이 있다. 식물성의 phytoestrogen은 주로 음식을 통해 섭취되며 에스트로젠 효과를 나타낸다. 합성물로 주로 에스트로젠의 효과를 발휘하는 환경에스트로젠 (xenoestrogen)들은 다양한 척추동물에서 여성호르몬과 유사한 효과를 나타낸다 (Anderson *et al.*, 1999; Gronen *et al.*, 1999; Ratnasabapathy *et al.*, 1997; Hess *et al.*, 1997). 최근에는 담수 및 해양 환경 내에 서식하는 야생 어류를 대상으로 내분비계 장애물질 오염을 추적 연구가 활발한데 현지 채집된 어류 또는 현장의 물 또는 침전물을 처리한 송어, 잉어, 넙치, 모래망둑, 뱀장어 등에서 VTG의 발현을 분석하여 이들의 서식 환경에서 xenoestrogen의 오염 여부를 확인하고 있다. 반면 한국산 양서류에서는 외래종인 황소개구리를 모델로 VTG 단백질에 대한 항체를 이용하여 xenoestrogen 오염과 위해성 여부를 추적하고 있을 뿐 이외의 토종 양서류 및 이들의 biomarker 유전자 정보에 기초한 분자생물학적 biomarker의 개발은 미진한 편이다. 최근 한국산 무당개구리(*Bombina orientalis*)를 모델로 VTG 유전자를 동정하고 이에 근거하여 xenoestrogen에 의한 양서류 위해성 평가방법이 개발되었다 (계 등, 2004). 그러나 이들과 서식지 분포 특성이 다른 참개구리, 산개구리 등 더 다양한 양서류를 대상으로 연구방법의 개발이 요구된다.

### 3. 양서류 EDCs 위해성 추적 Biomarker 개발 전략

#### 1) 연구모델 선발

궁극적으로는 전체 양서류에 대한 평가가 필요하지만 분류군 별로 대표성이 있는 모델종을 선발하여 다양한 환경호르몬에 대한 영향을 검출할 수 있는 평가법을 표준화하고 이에 근거하여 현지 채집 개체의 오염여부를 판정할 수 있을 것이다. 모델 종 선발을 위한 기준은 국내 분포의 광범위성, 야외채집의 용이성, 실험실 사육의 용이성에 관련된 생태학적 특성과 생식내분비학적 특징 등 기초생물학적 연구 정보가 축적되어 있는 종들이 적합할 것이다. 그러나 아직까지 위의 기준을 충족할 수 있는 국내 양서류 실험모델은 없다.

#### 2) 실험법 선택

① 단백질항원의 검출: 대상종의 vitellogenin에 대한 항체를 이용하여 항원-항체 반응을 이용하여 특정 biomarker 유전자의 발현을 단백질 수준에서 추적 정량평가 할 수 있는 방법이다. 그러나 항원에 대한 항체의 높은 특이성을 갖는 항체를 필요로 한다. Biomarker 단백질의 발현과 체내 동태를 고려할 때 과거 xenoestrogen에 노출된 경험이 있는 개체에서 간, 간세포, 혈액, 생식소를 대상으로 사용이 가능한 방법이다. 현재 몇몇 양서류에서 vitellogenin을 검출할 수 있는 ELISA kit가 상용화 되어 있으나 아직 검증되지 않은 특정 야생종에 적용하는데 난점이 있다. 또한 간,

간세포, 생식소 조직 절편에서 항체를 이용하여 발현 정도를 분석할 수 있으나 정량적 분석에는 한계가 있다.

② Biomarker gene mRNA 검출: Biomarker 유전자의 mRNA의 발현과 세포 내 동태를 고려할 때 단백질 보다 신속하게 유도되지만 빨리 소멸되므로 xenoestrogen에 대한 급성 및 아급성 노출 후의 반응의 추적에 유리하다. Northern blot등을 이용하여 biomarker 유전자 발현의 추적이 가능하지만 다량의 시료를 분석하거나 실험자간에 동일한 조건을 구사하는데 난점이 있어 필드에 적용하기는 어렵다. 따라서 이러한 목적으로는 정량적 RT-PCR법을 구사하게 되는데 house keeping gene을 이용하여 Biomarker 유전자의 상대적 발현량을 normalize한 정량적을 시행한다. 특히 최근 개발된 Realtime RT-PCR과 같은 매우 정교한 분석법을 이용하여 estrogen성 화합물에 의해 수컷의 간조직 또는 간세포 배양체 등 미량의 조직으로도 biomarker 유전자의 발현을 추적할 수 있다. 이를 위해서는 biomarker 유전자 염기서열 정보의 확보가 선행되어야 하며 유전자별로 최적화된 PCR법의 확립이 요구된다.

### 3) Biomarker를 이용한 xenoestrogen의 노출 평가의 유의점

① 계절적 적응: 어류에서와 마찬가지로 양서류 간에서 에스트로젠에 의한 VTG 발현의 유도는 계절적인 영향 하에 있다 (Gobbetti et al., 1985; ). *Rana esculenta* 혈중 prolactin 수준은 계절적으로 변동 양상을 보일 뿐 아니라 간세포 배양체에서 VTG의 유도는 pituitary homogenate 또는 prolactin에 의해 직접 유도될 수 있는데 prolactin 주사에 따른 VTG 유도는 동계에 더 높다 (Carnevali & Mosconi, 1992; Carnevali et al., 1993). E2에 의한 VTG 발현을 위해서는 간조직에서 estrogen 수용체의 발현이 선행되어야 하는데 비번식기 간조직의 estrogen 수용체의 발현이 매우 낮아 estrogen 처리 시에도 VTG가 쉽게 유도되지 않는다. 따라서 계절적으로 변동하는 뇌-생식소 축 상에 작용하는 내분비호르몬 변동이 난황형성기에 estrogen의 감수성을 담보한다. 수컷의 번식주기가 암컷과 동기화되었다는 것을 전제로 할 때 수컷에서 xenoestrogen에 의해 VTG mRNA 유도를 확인하고자 할 때는 암컷의 난황형성기로 수컷에서도 estrogen 감수성이 유지되는 시기에 채집한 개체를 대상으로 하여야 할 것이다.

② 발현량 분석을 통한 위해성 기준 설정: Estrogen을 처리하지 않은 수컷에서도 미량의 VTG 발현이 확인된다. 이처럼 수컷에서 Vg가 발현되는 이유는 수컷 체내에 존재하는 estrogen 때문으로 추정된다. 암컷 개구리의 간, 부신, 정소, 뇌 조직 등에서 aromatase의 활성이 검출되며 간에서 발현되는 aromatase는 testosterone (T)에 의해 유도된다. 따라서 혈중 T는 estrogen으로 전환되어 VTG 발현을 유도할 수 있다. 수컷에서도 이와 동일하게 T가 estrogen으로 전환될 수 있는지의 여부는 확인되지 않았으나 aromatase는 수컷의 간에서도 발현되므로 수컷 체내의 estrogen 수준에 영향을 미칠 수 있다 (Di Fiore et al., 1998). 특히 이들은 spermatogonial stem cell의 증식을 촉진하는 등의 정상적인 정자형성에 중요한 역

할이 있다 (Hess et al., 1997; Miura et al., 1999; Schlinger et al., 1992; Nitta et al., 1993). 따라서 수컷의 간 조직에서 미량의 Vg mRNA가 발현되었다고 해서 이들이 xenoestrogen에 의해 오염되었다고 단정하는 것은 곤란하며 xenoestrogen에 의한 오염에 대한 명확한 결론은 수컷 체내에 존재하는 생리적 농도의 estrogen에 의한 Vg mRNA의 발현정도 및 생성된 Vg 단백질의 반감기 등 체내 동태에 대한 정보에 기초하여야 할 것이다. RT-PCR 등을 이용한 간조직에서의 Vg mRNA의 검출은 ELISA법을 이용한 혈중 Vg 단백질의 검출보다 예민하다. 그러나 Vg mRNA는 estrogen에 대해 노출된 후 단기간에만 검출되는 반면 단백질은 이 보다 더 오랜 기간동안 검출된다 (Hemmer et al., 2002). 따라서 대상 양서류의 서식활동 범위 및 전체 서식지에서의 오염도의 지역적 편차 등이 Vg mRNA 발현에 기초한 xenoestrogen 오염여부에 대한 해석에 고려되어야 할 것이다.

③ In vitro 검사법의 제한사항: Biomarker mRNA의 RT-PCR 검출법은 liver cell primary culture 등에 적용하여 잠재적인 estrogen 활성을 갖는 물질의 검색에 이용될 수 있다. 어류의 경우 in vitro 시험법이 개발되어 이용되고 있지만 대사경로를 통해 활성화된 후 estrogenic 활성을 보이는 물질의 검색에는 적합하지 않으며, progestrogene의 효과는 검출하지 못하며, antiestrogen의 검출 감도는 미약하고 전신적으로 나타날 수 있는 생리적 변화에 따른 내분비계교란효과에 대한 정보는 제한된다. 또한 in vitro assay는 in vivo에서 관찰되는 신호의 증폭이 원활하지 않으므로 estrogen 활성의 검출에 둔감한 특징을 갖는다 (Folmar et al., 2002). 따라서 in vitro VTG 발현에 기초한 특정 물질의 estrogen 활성화에 대한 시험법은 과소평가될 위험이 있으므로 in vivo에서의 결과와 반드시 함께 비교되어야 할 것이다.

#### 4. 전망

수환경에서 내분비계 장애물질에 대한 위해성 평가의 중요성이 날로 증대되고 있다. 세계 각국에서는 자국의 자연환경에 서식하는 생물 종에 대한 내분비계 장애물질의 위해성을 평가하기 위해 biomarker를 활용한 연구가 강화되고 있다. 한국의 경우 야생 척추동물에서 EDC 위해성을 평가하기 위한 모델 종 및 biomarker 유전자를 발굴하기 위한 연구 노력이 필요하다. 이를 통해 한국의 수환경 내 EDC 오염 모니터링 기술이 확보될 것이며 분자생물학적 수준에서의 수서 환경오염의 조기 경보체제를 확립할 수 있을 것이다. 한편 독성효과의 대용량 검색을 위해서는 생태독성평가 biomarker 유전자은행의 설립이 필요하며 on chip analysis 기술의 접목을 통해 내분비계장애물질 뿐 아니라 다양한 독성물질의 검색이 가능해질 전망이다. 궁극적으로 축적된 연구정보는 systems biology 접근을 통해 독성 메커니즘의 규명과 방호수단의 개발로 이어질 것이다.

향후 bisphenol, nonylphenol 등 이미 다양한 난생 척추동물에서 VTG 발현을 유도하는 것으로 알려진 다양한 외인성 estrogen에 의한 영향을 확인하기 위해서는 물질 별로 투여 농도-발현량 관계에 근거한 구체적인 기준의 설정에 관한 연구와

함께 다양한 종들을 대상으로 다양한 biomarker gene의 발굴과 xenoestrogen을 포함한 내분비계 장애물질 검색을 위한 표준화 연구가 진행될 전망이다.

## 사사

본 연구는 학술진흥재단 중점연구소 프로그램 (KRF-2002-005-C00022)의 지원에 의해 수행되었음.

## 인용문헌

- 계명관, 이명식, 정경아, 안혜선 2004. 무당개구리 비텔로제닌 유전자발현의 RT-PCR 검출법.  
한국환경생물학회지 22: 329-335.
- Andersson PL, Blom A, Johannisson A, Pesonen M, Tysklind M, Berg AH, Olsson P, Norrgren L, 1999. Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: in vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37:145-150.
- Blaustein AR and DB Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. Sci. Am. 272:52-57.
- Bogi C, J Schwaiger, H Ferling, U Mallow, C Steineck, F Sinowatz, W Kalbfus, RD Negele, I Lutz and W Kloas. 2003. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. Environ. Res. 93:195-201.
- Boyer R and CE Grue. 1995. The need for water quality criteria for frogs. Environ. Health Perspect. 103:352-357.
- Carey C and CJ Bryant. 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. Environ. Health Perspect. 103 Suppl. 4:13-17.
- Carnevali O, Mosconi G. 1992. In vitro induction of vitellogenin synthesis in *Rana esculenta*: role of the pituitary. Gen Comp Endocrinol. 86:352-8.
- Choi JW, Matsuda M, Kawano M, Min BY, Wakimoto T. 2001. Accumulation profiles of persistent organochlorines in waterbirds from an estuary in Korea. Arch Environ Contam Toxicol. 41:353-363.
- Carnevali O, Mosconi G, Yamamoto K, Kobayashi T, Kikuyama S, Polzonetti-Magni AM. 1993. In-vitro effects of mammalian and amphibian prolactins on hepatic vitellogenin synthesis in *Rana esculenta*. J Endocrinol. 137:383-9.

- Di Fiore MM, Assisi L, Botte V. 1998. Aromatase and testosterone receptor in the liver of the female green frog, *Rana esculenta*. *Life Sci.* 62:1949-58.
- Folmar LC, Hemmer MJ, Denslow ND, Kroll K, Chen J, Cheek A, Richman H, Meredith H, Grau EG. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat Toxicol.* 60:101-110.
- Gobbetti A, Polzonetti-Magni A, Zerani M, Carnevali O, Botte V. 1985. Vitellogenin hormonal control in the green frog, *Rana esculenta*. Interplay between estradiol and pituitary hormones. *Comp Biochem Physiol A.* 82:855-8.
- Gronen S, Denslow ND, Manning S, Barnes S, Barnes D, Brouwer M. 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health Perspect.* 107:385-390.
- Hemmer MJ, Bowman CJ, Hemmer BL, Friedman SD, Marcovich D, Kroll KJ, Denslow ND. 2002. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 beta-estradiol and p-nonylphenol. *Aquat Toxicol.* 58:99-112.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB, 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390:509-512.
- Hong HK, Takahashi S, Min BY, Tanabe S. 2002. Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. *Environ Pollut.* 117:475-486.
- Houlahan JE, CS Findlay, BR Schmidt, AH Meyer and SL Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404:752-755.
- Im SH, Kannan K, Matsuda M, Giesy JP, Wakimoto T. 2002. Sources and distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in sediments from Masan Bay, Korea. *Environ Toxicol Chem.* 21:245-252.
- Jeong GH, Kim HJ, Joo YJ, Kim YB, So HY. 2001. Distribution characteristics of PCBs in the sediments of the lower Nakdong River, Korea. *Chemosphere.* 44:1403-1411.
- Kaminuma T, Ohtake C, Kabuyama N. 2000. Distribution and origin of plastic resin pellets as environmental pollutants at the East China Sea area. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* 118:90-99.
- Kang SG, Choi MS, Oh IS, Wright DA, Koh CH. 1999. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. *Sci Total Environ.* 234:127-137.

- Khim JS, Lee KT, Kannan K, Villeneuve DL, Giesy JP, Koh CH. 2001. Trace organic contaminants in sediment and water from Ulsan Bay and its vicinity, Korea. *Arch Environ Contam Toxicol.* 40:141-150.
- Lahr J. 1997. Ecotoxicology of organisms adapted to life in temporary freshwater ponds in arid and semi-arid regions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32:50-57.
- Lee KT, Tanabe S, Koh CH. 2001. Contamination of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from Kyeonggi Bay and nearby areas, Korea. *Mar Pollut Bull.* 42:273-279.
- Loeffler IK, DL Stocum, JF Fallon and CU Meteyer. 2001 Leaping lopsided: a review of the current hypotheses regarding etiologies of limb malformations in frogs. *Anat. Rec.* 265:228-245.
- Martin M, Richardson BJ, Lam PK. 2003. Harmonisation of polychlorinated biphenyl (PCB) analyses for ecotoxicological interpretations of southeast Asian environmental media: what's the problem? *Mar Pollut Bull.* 46:159-170.
- Miura T, Miura C, Ohta T, Nader MR, Todo T, Yamauchi K. 1999. Estradiol-17 $\beta$  stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 264:230-234.
- Monirith I, Ueno D, Takahashi S, Nakata H, Sudaryanto A, Subramanian A, Karupiah S, Ismail A, Muchtar M, Zheng J, Richardson BJ, Prudente M, Hue ND, Tana TS, Tkalin AV, Tanabe S. 2003. Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Mar Pollut Bull.* 46:281-300.
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM. 1993. Germ cells of the mouse testis express p450 aromatase. *Endocrinology* 132:1396-1401
- Plotner J and R Gunther. 1987. Toxicity of an anionic detergent to the spawn and larvae of anurans (Amphibia). *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 72:759-771.
- Ratnasabapathy R, Tom M, Post C, 1997. Modulation of the hepatic expression of the estrogen-regulated mRNA stabilizing factor by estrogenic and antiestrogenic nonsteroidal xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* 53:1425-1434.
- Schlinger BA, Arnold AP. 1992. Circulating estrogen in a male songbird originate in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7650-7653.
- Shim WJ, Oh JR, Kahng SH, Shim JH, Lee SH. 1998. Accumulation of tributyl- and triphenyltin compounds in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, from the Chinhae Bay System, Korea. *Arch Environ Contam Toxicol.* 35:41-47.