

## 2-Bromopropane에 의해 유발된 Sprague-Dawley 랫트의 고환위축의 병리조직학적 관찰 및 Flow Cytometry를 이용한 검사

손화영 · 강부현 · 조성환\* · 차신우 · 노정구  
한국화학연구소, 스크리닝-안전성연구센터, \*충남대학교

### Histopathological Observation and Flow Cytometry Analysis of Testicular Atrophy Induced by 2-Bromopropane on the Sprague-Dawley Rat

Hwa-Young Son, Boo-Hyon Kang, Sung-Whan Cho\*, Sin-Woo Cha and Jung-Koo Rho  
Screening & Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,  
P.O. Box 107, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea  
\*College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea  
(Received February 23, 1998)  
(Accepted March 26, 1998)

**ABSTRACT :** This study was carried out to evaluate the testicular toxicity of 2-bromopropane (2-BP), which recently caused occupational intoxication on the reproductive and hematopoietic system in Koreans, using light microscopy, immunohistochemistry and flow cytometry. 10 weeks old male Sprague-Dawley (SD) rats were treated with 0.5 g/kg/day of 2-BP orally for 8 consecutive weeks. The testes of the rats were vascularly perfused with Karnovsky's solution or immersed in Bouin's solution, embedded in plastic and evaluated with light microscopy. And relative proportions of haploid, diploid, and tetraploid states of DNA ploidy in the testicular cell suspensions of the SD rats were examined by flow cytometry. 2-BP induced severe testicular atrophy, depletion and degeneration of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids and mild hyperplasia of Leydig cells without significant morphological changes. The Leydig cell hyperplasia was confirmed by immunohistochemistry using proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The immunopositive cells against PCNA were observed in the nuclei of some interstitial cells. Relative proportions of haploid states of DNA ploidy decreased in the atrophic testicular cell suspensions comparing with those of the control. In conclusion, 2-BP induced testicular atrophy with Leydig cell hyperplasia as examined by histopathology, immunohistochemistry and DNA flow cytometry.

**Key Words :** 2-Bromopropane, Rat, Testis, Flow cytometry, PCNA, Histopathology

### I. 서 론

최근 50여년간 사람의 정자수는 급격히 감소하였다는 보고가 많이 있어 사람에서 독성물질에 의한 생식기의 이상에 대해 최근 많은 관심이 모아지고 있다. Carlsen 등(1992)은 영국에서 1938년부터 1991년 까지 53년 동안 61건의 논문에서 불임사실이 없는 성인 14,947명에 대해 조사한 결과 정자수가 50%가량 감소하였으며, 이에 반해 고환의 중량, 잠복고환, 요도하열 등은 증가하였다고 하였다. Auger 등(1995)은 20년간

프랑스 빠리 정자은행에 기증된 정자를 조사한 결과 정자의 수는 해마다 2.1%, 정자의 운동성은 0.6%씩 감소하였으며, 비정상 정자의 수는 해마다 0.5% 증가한다고 하였다. 이러한 원인에 대해 Sharp(1995)는 environmental estrogen의 영향을 보고한 바 있으며, 이 외에도 의약품, 식품첨가물, 산업화학물질, 유기용매, 농약화학물질 등 여러 가지 요인이 보고되고 있다 (Creasy, 1997).

할로젠화합물들은 축매, 유기용매, 탈지화합물, 농약 등으로 많이 사용되고 있으며, 이들 물질은 변이원성, 발암성이 있고 신장, 고환, 간장에 급성독성을 야기하는 것으로 알려져 있다(Kluwe, 1981; Heindel 등, 1989,

\*To whom correspondence should be addressed

Lag 등, 1991). 이들 물질은 할로겐 치환기의 수, 위치 및 형태 등이 독성 유발에 가장 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 세계의 halogen을 가지고 두 개 이상의 bromine을 가진 경우 독성이 강하게 나타난다 (Lag 등, 1991). 이들 화합물 중 대표적인 것은 1955년부터 생산되어 토양살충제로 널리 사용된 1,2-di-bromo-3-chloropropane(DBCP)으로서 신장과 고환에 대한 독성이 오래 전부터 보고되었으며(Torkelson 1961), 최근 까지 많이 연구되고 있다(Kluwe 1981; Heindel 등, 1989; Kaplanski 등, 1991; Sod-Moriah 등, 1989).

2-bromopropane(isopropyl bromide, 이하 2-BP)은 브롬이 프로판의 두 번째 탄소에 결합한 형태( $\text{CH}_3\text{CHBrCH}_3$ )로서 분자량은 122.99이며, 비점은  $59.35(60\sim 61)^\circ\text{C}$ , 어는점은  $-89^\circ\text{C}$ 이며 휘발성이 강한 물질로서 독성학적 성질은 아직 명확하게 알려져 있지 않다(Buckingham과 Macdonald, 1996). 2-BP는 1995년 국내의 한 전자 부품공장에서 집단 중독사고를 일으켰던 물질로서 인체의 생식기와 조혈계에 심각한 장애를 유발하는 것으로 나타났다(Kim 등, 1996). 최근의 연구에서 2-BP는 *Salmonella typhimurium* TA 100을 이용한 복귀돌연변이 시험에서 염기쌍 치환형의 돌연변이를 유발하였으며, Chinese hamster lung cells을 이용한 염색체이상시험과 소핵시험에서는 음성의 결과를 보였다(Maeng 등, 1997). 한편, 2-BP의 SD 랫트를 이용한 28일 복강내 반복투여시험(Ichihara 등, 1997)과 Wistar 랫트를 이용한 흡입독성시험(Yu 등, 1997)결과 고환과 조혈기에 독성이 있다고 하였고, 암컷 SD 랫트를 이용한 14일 복강내 반복투여 시험에서는 용량과 상관성 있게 발정 주기가 지연되었다고 하였다(Lim 등, 1997). 이 이외에 2-BP의 독성에 대한 자료는 복강투여에 의한 반수치사량( $\text{LD}_{50}$ ), 흡입에 의한 반수치사농도( $\text{LC}_{50}$ ) 등이 알려져 있을 뿐 아직 미비한 실정이다(Sweet, 1995; Kim 등, 1996). 따라서 본 연구에서는 2-BP에 의해 유발된 고환의 위축을 병리조직학적으로 관찰하여 그 특성을 알아보고 또한 flow cytometry를 이용하여 DNA ploidy를 검사하여 병리조직학적 소견과의 연관성 및 이의 활용성을 검사하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

한국화학연구소 스크리닝-안전성연구센터 실험동물실의 차폐시설에서 생산된 SPF SD 랫트 수컷을 4~5주령에 입수하여 준차폐시설에서 5주간의 순화기간

을 거친 후 시험에 사용하였다.

### 2. 사육환경, 사료 및 음수

공시동물은 철망사육상자( $410\text{ mm} \times 220\text{ mm} \times 200\text{ mm}$ )에 2~3마리씩 배치하여 온도는  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도는  $55 \pm 5\%$ , 환기회수는 시간당 13~18회, 조도는 150~300 Lux에서 12시간 조명하는 조건에서 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(제일사료주식회사)를 자유섭취하게 하였으며, 음수는 수도물을 자유섭취하게 하였다.

### 3. 시험물질 및 투여방법

2-bromopropane[isopropyl bromide, ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>CHBr; Aldrich Chemical Co., USA]은 휘발성이 강한 무색투명한 액체로서 순도 99% 이상의 것을 corn oil(Sigma Chemical Co., USA)과 혼합하여 경구투여용 존데(sonde)를 사용하여 500 mg/10 ml/kg의 용량으로 일주일에 6회, 8주간 경구투여 하였다. 대조군은 용매인 옥수수기름을 10 ml/kg으로 강제경구투여하였다. 주 1회 측정된 체중을 기초로 하여 투여량을 산정하였으며, 매일 아침 조제하여 투여하였다.

### 4. 병리학적 검사

#### 1) 광학현미경적 관찰

시험에 사용된 랫트는 부검하여 고환 및 부고환을 Bouin-용액에 침지고정한 후 일반적인 파라핀 포매하거나 hydroxyethyl methacrylate(HEMA) 포매를 위해 10% 중성완충포르말린용액 또는 Karnovsky용액(Karnovsky, 1965)으로 관류고정하였다. 관류고정은 랫트를 에테르로 전신 마취시킨 다음, 흉강을 열고 관류용 cannula를 좌심실에 삽입한 후 이 관을 통하여 먼저 0.85% 생리 식염수를 주입하여 혈관내 혈액을 관류수세하였으며, 이어서 고정액으로 관류하였다. 고정된 고환은 두께가 1 mm를 넘지 않도록 삭정하여 6.8% sucrose가 함유된 PBS(pH 7.4)로  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 수세하였다. 100% acetone으로  $4^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 탈수하였으며, 처음에는 용액이 맑아질 때까지 계속 교환하였다. HEMA(Jung HistoResin™ Plus, Jung, Heidelberg, Germany)를 사용하여 포매한 후 조직을 1~1.5  $\mu\text{m}$ 로 박절하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 2시간 가량 건조하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 염색시 0.01% trypsin이 포함된  $\text{CaCl}_2$ (pH 7.8)용액으로  $37^\circ\text{C}$ 에서 5분 동안 처리한 후

H-E phloxine(Marlene과 Castro, 1985), PAS-hematoxylin염색 등을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 2) 면역조직화학적 관찰

파라핀 포매한 조직은 5  $\mu\text{m}$ 의 두께로 박절하여 면역조직화학적 관찰에 이용하였다. Slide는 Henderson 등(1989)의 방법에 따라 aminoalkylsilane(Sigma Chemical Co., USA)을 사용하여 조직의 탈락을 방지하였다. 항체는 PCNA(BioGenex, San Ramon, CA, USA)에 대한 단클론항체를 이용하였으며, abidin-biotin system(ABC Vectastain Elite kit, Vector Laboratorie, Burlingame, CA, USA)을 이용하여 반응시킨후 DAB kit(Vector Laboratorie, Burlingame, CA, USA)로 발색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 5. Flow cytometry검사

Flow cytometry 검사를 위하여 Hirsch 등(1993)의 방법에 따라 고정된 조직을 일정한 크기로 세절한 다음 유리슬라이드 위에서 으깨어 세포를 분리시켜 citrate buffer에 넣어 부유한 다음 4°C에 보관하였다. 고환세포부유액은 Coulter<sup>®</sup> Z1(Coulter Electronics Limited, Luton, Beds, England)를 이용하여 세포수를 측정 후  $2 \times 10^7$ 세포/ml의 농도가 되도록 조정하였다. 부유액은 바로 0.5% trypsin이 함유된 spermine-tetrahydrochloride buffer로 실온에서 10분간 처리하였다. Trypsin의 작용을 중지시키고 double-stranded ribonucleic acid를 제거하기 위하여 trypsin inhibitor와 ribonuclease A(12 mg/ml)를 10분간 처리하였다. Propidium iodide(50 mg/ml)와 spermine-tetrahydrochloride buffer를 가하여 10분간 암실에서 염색하였다. 분석은 FACSsort(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)을 이용하여 시료 중 핵 10,000개에 대하여 haploid(n), diploid(2n), tetraploid(4n)의 비율을 측정하였으며, 결과는 그래프로 나타내었다.

## III. 결 과

### 1) 육안적 관찰

고환은 육안적으로 정상 크기의 1/3수준으로 위축되었으며, 고환내에는 약간 투명한 수양성의 물질이 들어있는 것처럼 관찰되었다. 피막은 주글주글하고 매우 유약하여 쉽게 함몰되었으며, 탄력이 소실되어 있었다.

### 2) 광학현미경적 관찰

H-E 또는 PAS 염색하여 관찰한 결과 정세관 상피세포는 거의 대부분 소실되어 일부를 제외하고 stage를 구분할 수는 없었다. 정자와 장자세포는 거의 대부분의 정세관에서 소실되었으며, 정세관에서는 정조세포와 정모세포만이 관찰되고 소수의 정자세포가 관찰되었다. 그러나 남아있는 정세포들도 일부 변성소견을 보였으며, 정세관 내강에서는 탈락된 정세포들이 다수 관찰되었다. 일부 정세관에서는 Sertoli세포만 관찰할 수 있었는데, Sertoli 세포는 기저막으로부터 떨어져 정세관 내강에 위치하고 있었으며, 형태는 매우 불규칙하였다. 고환의 간질에서는 호산성의 단백질양 물질이 균질하게 분포하고 있었으며, Leydig 세포의 증식이 관찰되었다(Fig. 1, 2). Leydig 세포의 세포질은 호산성으로 진하게 염색되었으며, 핵은 호염기성으로 진하게 염색되었으나 세포의 형태는 정상세포와 유사하게 나타났다. 부고환에서는 oligospermia가 심하게 나타났으며, 탈락된 정세포들이 많이 관찰되었다(Fig. 3).

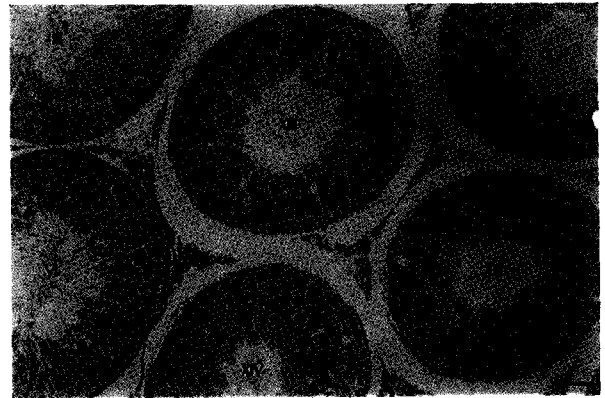


Fig. 1. Normal seminiferous tubules in various stages. H-E stain. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

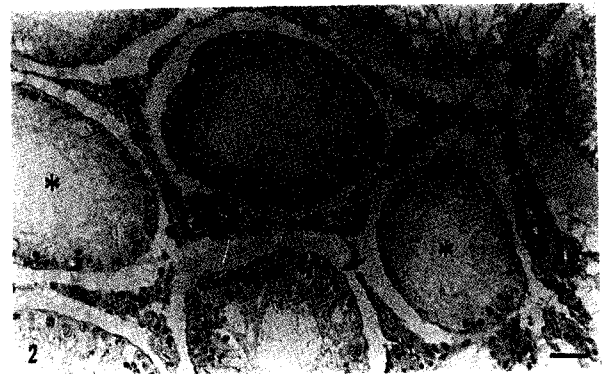


Fig. 2. Seminiferous tubules showing depletion (\*) and degeneration of germ cells (arrow) and hyperplasia of Leydig cells in the interstitium. 8 weeks after, 0.5 g/kg/day treatment of 2-bromopropane orally for 8 consecutive weeks. H-E stain. Bar=20  $\mu\text{m}$ .



Fig. 3. Epididymis showing oligospermia and exfoliated germ cells (arrow) in lumen. 8 weeks after, 0.5 g/kg/day treatment of 2-bromopropane orally for 8 consecutive weeks. H-E stain. Bar=20 μm.

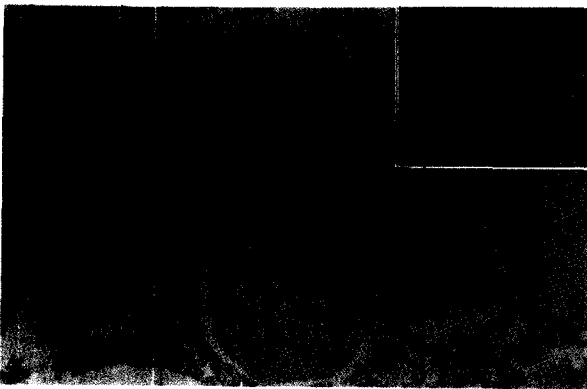


Fig. 4. Some Leydig cells showing PCNA Ab positive reaction (arrows). 8 weeks after, 0.5 g/kg/day treatment of 2-bromopropane orally for 8 consecutive weeks. Immunohistochemical stain using PCNA Ab., inset; high magnification of rectangle, Bar=20 μm.

면역조직화학적 관찰에서 정세관내에서는 PCNA 항체에 양성반응을 보인 세포가 일부 정세관에서만 소수 관찰되었다. 간질에서는 양성반응을 보인 세포의 수가 대조군에서 관찰되지 않았으나 투여군에서는 자주 관찰되었는데 이런 세포는 핵이 난원형으로 Leydig세포와 유사하였으며, 때로 두 개가 인접하여 나타나기도 하였다(Fig. 4).

3) Flow cytometry 검사

Flow cytometry를 이용하여 정세포의 DNA ploidy를 검사한 결과 대조군에서는 haploid 세포가 56.29±3.06%, diploid 세포가 27.36±1.73%, tetraploid 세포가 8.97±1.48%의 비율로 관찰되었다. 8주 투여군에서는 haploid 세포가 39.81±1.65%, diploid 세포가 35.49±0.83%, tetraploid 세포가 13.44±1.12%의 비율로 관찰되어 haploid세포의 수가 현저히 감소하였다(Fig. 5).

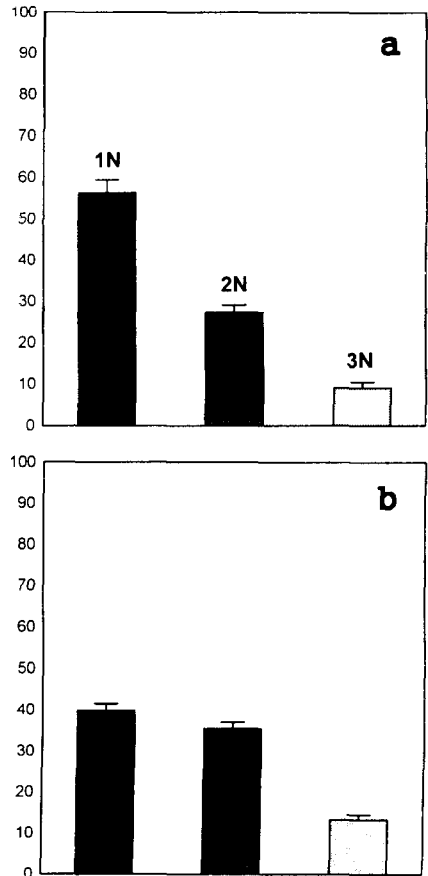


Fig. 5. Relative proportions of cells with haploid, diploid and tetraploid states of DNA ploidy in the testicular cell suspensions of the Sprague-Dawley rats treated with 500 mg/kg/day of 2-bromopropane orally for 8 weeks. a. control b. 8 weeks after the completion of administration, showing proportions of decreased haploid cells.

IV. 고 찰

포유류에서 정세포의 변성은 정자발생 과정중에 정상적으로도 발생하며(Lee 등, 1993), 환경적 요인, 즉, 열, 방사선, 허혈, 세포독성물질에 노출되었을 경우 발생한다(Allan 등, 1987). 인간은 많은 작업환경 물질에 노출되고 있으며, 이 중 생식기능에 장애를 일으키는 것은 세포독성 물질(ethylene dibromide, carbaryl, chlordecon), glycoethers(페인트, 아교, 잉크, 부동액 등에 포함), 유기용매(styrene, chloroprene), 중금속, 고온, 전자기장(300 kHz-300 mHz) 등 여러 가지가 있다(Bond, 1993).

2-BP는 1995년 8월 경상남도 양산 소재의 한 전자부품 공장에서 집단 중독사고를 일으켰던 물질로서 전자제품 제조 및 조립공정시 사용하는 침지액인 솔벤트-5200의 주성분인 유기용제이다. 솔벤트-5200은 1994년 2월 Freon이 환경규제물질로 공표된 후 그 대체물질로

국내 산업체에서 수입하여 사용하고 있는 물질이다. 이 공장 근로자에 대한 역학조사결과 남자근로자 8명 중 5명에서 생식기능저하, 1명에서 골수기능과 생식기능저하가 모두 관찰되었으며, 여자근로자에서는 총 25명 중 11명에서 생식기능저하, 6명에서 골수기능과 생식기능저하가 관찰되어 인체의 생식기와 조혈계에 심각한 장애를 유발하는 것으로 나타났다(Kim 등, 1996). 2-BP의 독성에 관하여 포유류에서 복강투여에 의한 LD<sub>50</sub>이 4839 mg/kg, LC<sub>50</sub>이 36 gm/m<sup>3</sup>로 알려져 있으며(Sweet, 1995), 또한 마우스에서 LC<sub>50</sub>이 31,171 ppm(Kim 등, 1996)으로 밝혀져 있다. 또한 *Salmonella typhimurium* TA 100에서 염기쌍치환형의 돌연변이를 유발하였으며, chinese hamster lung cells을 이용한 염색체 이상시험과 소핵시험에서는 이상이 없다고 하였다(Maeng과 Yu 1997). 한편 2-BP의 SD 랫트를 이용한 28일 복강내 반복투여시험(Ichihara 등, 1997)과 Wistar 랫트를 이용한 흡입독성시험(Yu 등, 1997) 결과 2-BP의 표적장기가 정소이며 조혈기관에 영향이 있음이 보고되었다. 2-BP의 SD 암컷 랫트를 이용한 14일 복강내 반복투여 시험에서는 용량과 상관성있게 발정주기가 지연되었다고 하였다(Lim 등, 1997). 본 시험에서도 고환의 심한 위축이 관찰되어 다른 연구자들의 결과와 유사한 고환의 독성을 확인할 수 있었다.

고환에서 Leydig세포의 변화는 호르몬 이상 또는 독성물질의 자극 등에 의해 가능하다. Leydig세포의 변화에 관해 Johnson 등(1992)이 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)에 의해 spermatogenesis에는 큰 변화 없이 Leydig 세포의 수가 용량상관성 있게 감소하였음을 보고한 바 있다. 반면 고환의 위축이 있는 경우 Leydig 세포의 증식이 관찰되는 경우가 많으며, 여러 연구자들이 이를 관찰하여 보고한 바 있다(Nelson, 1938; Naka 등, 1991). Mitsumori 등(1994)은 nitrobenzene에 의한 간질의 증식을 관찰하였으며, Lui와 Wysocki(1987)는 DBCP투여에 의해 정세관 상피세포의 위축과 더불어 간질의 증식이 나타난다고 하였다. Jonsz와 Pomeranz(1984), Kerr 등(1979), Sod-Moriah 등(1989)도 같은 결과를 보고한 바 있다. 반면 Leone 등(1988)은 10 mg/kg을 2주간 피하투여한 경우와 단회 투여한 경우에서 Leydig세포의 큰 변화를 관찰하지 못하였다고 하여 차이를 보였다. Mendis-Handagama(1992)는 17 $\beta$  estradiol을 16주간 투여한 후 Leydig세포의 변화를 여러 관찰방법에 따라 비교하여 그 차이를 보고하여 관찰방법에 따라 차이가 있음을 보고한 바 있다. 이는 고환의 위축에 따라서 간질이 상대적으로 수축되어 수가 증가한 것처럼 보일 수도 있는 변화로

서 시험물질에 의한 영향이 아닐 수도 있으나 이에 관련된 연구는 많지 않다. 그러나 본 연구에서는 2-BP에 의해 Leydig세포의 형태학적 변화는 관찰되지 않았으나 수적 증가가 관찰되어 고환의 위축에 따른 상대적인 간질의 변화는 아니었다고 생각된다. 또한 PCNA 양성반응세포의 수적증가가 관찰되어 Leydig세포의 증가를 간접적으로 증명할 수 있었다. Naka 등(1991)은 ethanedimethanesulfonate(EDS)에 의한 Leydig세포의 변화를 BrdU를 이용하여 관찰하여 본 연구 결과와 유사한 결과를 보고한 바 있다. 이들 Leydig세포는 정세포의 분화와 성장에 매우 중요하기 때문에 정세포가 현저히 감소한 경우 이들 세포가 증식되어 정세포의 분열을 자극하는 것으로 사료된다. 이는 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있으며(Naka 등 1991), 본 연구에서도 같은 결과를 얻었다.

Flow cytometry(FCM)에 의한 정세포의 검사법은 환경적 또는 직업적으로 독성물질에 노출되었거나 치료시에 의약품에 의해 유발된 고환의 독성변화를 신속하고, 민감하게 검사하는데 이용될 수 있다(Spano와 Evenson, 1993). FCM을 이용한 고환 이상의 검사는 여러연구자들에 의해 사람(Hittmair 등, 1992; Hirsch 등, 1993; Spano와 Evenson, 1993; Hartmann과 Hettewer, 1983)과 동물(Evenson 등, 1986; Toppari 등, 1986; Crotty 등, 1995; Scoog 등, 1991)에서 많이 이루어 졌다. 고환의 정세포는 성숙단계에 따라 DNA함량이 달라지기 때문에 정세포관상피세포의 연구에 FCM은 매우 유용하다. FCM를 이용하여 정세포의 배수체 상태를 히스토그램으로 나타낼 경우 대개 3개의 주요 peak로 나타난다. 즉, haploid, diploid, tetraploid로 나뉘며, haploid는 elongate spermatid, round spermatid 및 정자로 구성되어 있다. Diploid는 정조세포(G1 phase), 세사전기 정모세포, 이차정모세포 및 Sertoli 세포, Leydig세포, 결합조직 세포등으로 구성되어 있으며, tetraploid는 정조세포(G2 phase), 세사기, 세사전기의 일차정모세포로 구성되어 있다. S-phase의 세포들은 diploid와 tetraploid사이의 peak에 나타난다(Spano와 Evenson, 1993; Hittmair 등, 1992). 따라서 독성물질 또는 다른 원인에 의해 정세관의 이상이 야기된 경우 DNA ploidy의 구성에 이상이 나타나기 때문에 FCM을 이용하여 화학물질이 spermatogenesis에 미치는 영향을 쉽게 검사할 수 있으며, 또한 시간의 경과에 따른 변화를 측정함으로써 표적세포를 추적할 수 있다(Crotty 등, 1995; Scoog 등 1991; Evenson 등 1986). 본 시험에서도 정세포의 DNA ploidy 구성 비율이 정상과 비교해 볼 때 haploid세포가 감소하여 정자세포 및 정자의 현

저한 감소를 알 수 있었으며, 이는 병리조직학적 소견과 어느정도 일치하는 결과였다. 따라서 FCM에 의한 고환의 DNA ploidy검사는 병리조직학적 검사를 뒷받침해 주거나 또는 병리조직학적 검사전에 독성을 신속하게 알아볼 수 있는 방법으로서 많은 도움을 준다고 사료된다.

결론적으로 2-BP는 고환에 독성을 나타내어 정세포의 변성, 괴사 및 소실에 따른 정세포의 위축을 유발하였다. 이러한 변화는 flow cytometry를 이용하여 양적 변화로 확인할 수 있었으며, 또한 간질에서 Leydig세포의 증식을 PCNA 항체를 이용한 면역조직화학적 염색으로 확인할 수 있었다.

### 참고문헌

- Allan, D.J., Hormon, B.V., and Kerr, J.F.R. (1987): Cell death in spermatogenesis. In: *Perspectives on Mammalian Cell Death*. Potten C.S., Ed., pp. 229-257, Oxford Univ. Press, New York.
- Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., and Jouannet, P.V. (1995): Decline in semen quality among fertile men in paris during the past 20 years, *N. Eng J. Med.*, **332**, 326-328.
- Bond, J.P. (1993): Occupational medical research of medical reproductive capacity, *Ugeskr. Laeger.*, **155**(14), 1029-1037.
- Buckingham, J., and Macdonald, F. ed., (1996): Dictionary of organic compounds. 6th ed., Chapman and Hall., Cambridge, University Press, pp. 1098-1099.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., and Skakkebaek, N.E. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *Br. Med. J.*, **305**, 609-613.
- Creasy, D.M. (1997): Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: The appropriate use of spermatogenic staging, *Toxicol. Pathol.*, **25**, 119-131.
- Crotty, K.L., May, R., Kilvicki, A., Kumar, D., and Neal, Jr. D.E. (1995): The effect of antimicrobial therapy on testicular aspirate flow cytometry, *J. Urol.*, **153**, 835-838.
- Evenson, D.P., Bear, R.K., Jost, L.K., and Gesch, R.W. (1986): Toxicity of thiotepa on mouse spermatogenesis as determined by dual-parameter flow cytometry, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **82**, 151-163.
- Hartmann, W., Hettewer, H. (1983): The flow cytometry for diagnosis of male fertility, *Acta. Histochem.*, **73**(2), 243-249.
- Heindel, J.J., Berkowitz, A.S., Kyle, G., Luthra, R., and Bruckner, J.V. (1989): Assessment in rats of the gonadotoxic and hepatorenal toxic potential of dibromochloropropane (DBCP) in drinking water, *Fundamental and Appl. Toxicol.*, **13**, 804-815.
- Henderson, C. (1989): Aminoalcylosilane: An inexpensive, simple preparation for slide adhesion, *J. Histochem.*, **12**(2), 123-124.
- Hirsch, I.H., McCue, P., Kulp-Hugues, D., Sedor, J., and Flanigan, M. (1993): Validation of flow cytometry analysis in the objective assessment of spermatogenesis: comparison to the quantitative testicular biopsy, *J. Urol.*, **150**, 342-346.
- Hittmair, A., Rogatsch, H., Dffner, F., Feichtinger, H., Ofner, D., Mikuz, G. (1992): Deoxyribonucleic acid flow cytometry and semiquantitative histology of spermatogenesis: a comparative study, *Fertil. Steril.*, **58**(5), 1040-1045.
- Ichihara, G., Asaeda, N., Kumazawa, T., Tagawa, Y., Kamijima, M., Yu, X., Kondo, H., Nakajima, T., Kitoh, J., Yu, I.J., Moon, Y.H., Hisanaga, N., and Takeuchi, Y. (1997): Reproductive and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane, SOT Annual Meeting, p357, No. 1815.
- Johnson, L., Dickerson, R., Safe, S.H., Nyberg, C.L., Lewis, R.P., Welsh, T.H. Jr. (1992): Reduced Leydig cell volume and function in adult rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin without a significant effect on spermatogenesis, *Toxicology*, **76**(2), 103-118.
- Jonsz, G.F., and Pomerantz, D.K. (1984): Fetal irradiation increases androgen production by dispersed Leydig cells of the rat, *J. Androl.*, **5**, 344-350.
- Kaplanski, J., Shemi, D., Waksman, J., Potashnik, G., Sod-Moriah, U.A. (1991): The effect of 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP) on general toxicity and gonadotoxicity in rats, *Andrologia*, **23**(5), 363-366.
- Karnovsky, M.J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **27**, 137.
- Kerr, J.B., Rich, K.A., and DeKretser, D.M. (1979): Alterations of the five structure and androgen secretion of the interstitial cells in the experimentally cyptorchid rat testis, *Biol. Reprod.*, **20**, 409-422.
- Kim, H.Y., Chung, Y.H., Yi, K.H., Kim, J.G., Yu, I.J. (1996): LC<sub>50</sub> of 2-bromopropane. *Ind. Health.*, **34**(4), 403-407.
- Kim, Y., Jung, K., Hwang, T., Jung, G., Kim, H., Park, J., Kim, J., Park, J., Park, D., Park, S., Choi, K., Moon, Y. (1996): Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic work-

- ers exposed to solvents containing 2-bromopropane, *Scand. J. Work Environ. Health*, **22**(5), 387-391.
- Kluwe, W.M. (1981): Acute Toxicity of 1,2-Dibromo-3-chloropropane in the F344 male Rat. I. Dose-response relationships and differences in routes of exposure, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 71-83.
- Lag, M., S derlund, E.J., Omichincki, J.G., Brunborg, G., Holme, J.A., Dahl, J.E., Nelson, S.D., and Dybing, E. (1991): Effect of bromine and chlorine positioning in the induction of renal and testicular toxicity by halogenated propanes, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 528-534.
- Lee, K.P., Frame, S.R., Sykes, G.P., Valentine, R. (1993): Testicular degeneration and spermatid retention in young rats, *Toxicol. Pathol.*, **21**(3), 292-302.
- Leone, M., Costa, M., Capitanio, G.L., Palmero, S., Prati, M., and Leone, M.M. (1988): Dibromochloropropane(DBCP) effects on the reproductive function of the adult male rat, *Acta Europaea Fertilitatis*, **19**(2), 99-103.
- Lim, C.H., Maeng, S.H., Lee, J.Y., Chung, Y.H., Park, J.H., Kim, H.Y., Moon, Y.H., and Yu, I.J. (1997): Effect of 2-bromopropane(2-BP) on female reproductive function in Sprague-Dawley Rats. SOT Annual Meeting, p357, No. 1816.
- Lui, E.M.K., and Wysocki, G.P. (1987): Reproductive tract defects induced in adult male rats by post-natal 1,2-dibromo-3-chloropropane exposure, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **90**, 299-314.
- Maeng, S.H., and Yu, I.J. (1997): Mutagenicity of 2-bromopropane, *Ind. Health.*, **35**(1), 87-95.
- Marlene, D. and Castro, B.A. (1985): A hematoxylin-Eosin Phloxine stain for tissues embedded in Glycol Methacrylate, *J. Histotech.*, **8**(1), 23-24.
- Mendis-Handagama, S.M.L.C. (1992): Estimation error of Leydig cell numbers in atrophied rat testes due to the assumption of spherical nuclei, *J. Microscopy*, **168**(1), 25-32.
- Mitsumori, K., Kodama, Y., Uchida, O., Takada, K., Saito, M., Naito, K., Tanaka, S., Kurokawa, Y., Usami, M., Kawashima, K., Yasuhara, K., Toyoda, K., Onodera, H., Furukawa, F., Takahashi, M., and Hayashi, Y. (1994): Conformation study, using nitrobenzene, of the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity protocol proposed by the organization for economic cooperation and development(OECD), *J. Toxicol. Sci.*, **19**, 141-149.
- Naka, Y., Inui, T., Okada, H., Izumo, Y., Shoji, T., Okuda, M., Watanabe, A., and Mori, S. (1991): Rapid recovery of Leydig cell population in rat cryptorchid testes after ethanedimethanesulfonate injury: Immunohistochemical studies, *Acta Histochem. Cytochem.*, **24**(2), 257-265.
- Nelson, A.A. (1938): Giant interstitial cells and extraparenchymal interstitial cells in the human testis, *Am. J. Pathol.*, **14**, 831-841.
- Scoog, S.J., Evans, C.P., Hayward, I.J., Griffin, J.L., and Hitchcock, C.L. (1991): Flow cytometry of fine needle aspirations of the Sprague-Dawley rat testis: Defining normal maturation and the effects of multiple biopsies. *J. Urol.*, **146**, 620-623.
- Sharpe, R.M. (1995): Declining sperm counts in men- Is there an endocrine cause? *J. Endocrinol.*, **136**, 357-360.
- Sod-Moriah, U.A., Shemi, D., Potashnik, G., and Kaplanski, J. (1989): Age-dependent differences in the effects of 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP) on fertility, sperm count, testicular histology and hormonal profile in rats, *Andrologia*, **22**, 455-462.
- Spano, M., Evenson, D.P. (1993): Flow cytometric analysis for reproductive biology, *Biol. Cell*, **78**(1-2), 53-62.
- Sweet, D.V. ed. (1995): Registry of Toxic Effects of Chemical Substances(RTECS), TX4111000, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Government Printing Office., Washiton DC., USA.
- Toppari, J., Mali, P., and Eerola, E. (1986): Rat spermatogenesis *in vitro* traced by quantitative flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, **34**(8), 1029-1035.
- Torkelson, T.R., Sadek, S.E., Rowe, V.K., Kodama, J. K., Anderson, H.H., Loquvam, G.S., and Hine, C. H. (1961): Toxicological investigations of 1,2-dibromo-3-chloropropane, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **3**, 545-559.
- Yu, I.J., Chung, Y.H., Lim, C.H., Maeng, S.H., Lee, J. Y., Kim, H.Y., Lee, S.J., Kim, C.H., Kim, T.G., Lim, C.H., Park, J.S., and Moon, Y.H. (1997): Reproductive toxicity of 2-bromopropane. SOT Annual Meeting, p358, 1817.