

랫드에서 고환독성의 검색을 위한 정량적 평가법의 확립: 2-bromopropane의 예

차신우¹ · 배주현¹ · 손우찬² · 신진영 · 신동호 · 김성호 · 박승춘³ · 김종춘*

전남대학교 수의과대학, ¹한국화학연구원 부설 안전성평가연구소, ²Huntingdon Life Sciences, Woolley Road, Alconbury, Huntingdon, PE284HS, UK, ³경북대학교 수의과대학

Received March 2, 2005 / Accepted May 16, 2005

Establishment of Quantitative Evaluation Method for Screening Testicular Toxicity in Rats: 2-Bromopropane as an Example. Shin-Woo Cha¹, Joo-Hyun Bae¹, Woo-Chan Son², Jin-Young Shin, Dong-Ho Shin, Sung-Ho Kim, Seung-Chun Park³ and Jong-Choon Kim*. *College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, ¹Korea Institute of Toxicology, KRICT, Daejeon 305-600, Korea, ²Huntingdon Life Sciences, Woolley Road, Alconbury, Huntingdon, PE284HS, UK, Gwangju 500-757, Korea, ³College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea* – The aims of the study were to establish a short-term screening test for detecting testicular toxicity of chemicals in rats and to determine whether a 2-week administration period is sufficient to detect testicular toxicity of 2-bromopropane (2-BP) as an example. Male Sprague-Dawley rats were subcutaneously administered with 1000 mg/kg/day of 2-BP or its vehicle for 2 weeks. Ten male rats each were sacrificed on days 3, 7 and 14 after the initiation of treatment. Parameters of testicular toxicity included genital organ weights, testicular sperm head counts, epididymal sperm counts, motility and morphology, and qualitative and quantitative histopathologic examinations. The early histopathological changes observed on day 3 of treatment included degeneration of spermatogonia and spermatocytes, multinuclear giant cells, mature spermatid retention, vacuolization of Sertoli cells, and decreased number of spermatogonia in stages II and V. On day 7 of treatment, atrophy of seminiferous tubules, exfoliation of germ cells, degeneration of spermatogonia and spermatocytes, multinuclear giant cells, mature spermatid retention, vacuolization of Sertoli cells, decreased number of spermatogonia in stages II and V, and decreased number of spermatocytes in stages VII and XII. On day 14 after treatment, a significant decrease in the weights of testes and seminal vesicles was found. Atrophy of seminiferous tubules, exfoliation of germ cells, degeneration of spermatogonia and spermatocytes, mature spermatid retention, vacuolization of Sertoli cells, decreased number of spermatogonia in stages II and V, and decreased number of spermatocytes in all spermatogenic stages were also observed. In addition, a slight non-significant decrease in testicular sperm head counts, daily sperm production rate and epididymal sperm counts was found. The results showed that 2 weeks of treatment is sufficient to detect the adverse effects of 2-BP on male reproductive organs. It is considered that the short-term testicular toxicity study established in this study can be a useful tool for screening the testicular toxic potential of new drug candidates in rats.

Key words – Male reproductive toxicity, short-term administration, screening test, rats

생명과학(Bio)산업은 21세기 산업성장을 주도할 차세대 성장동력산업으로 각광을 받고 있으며, 특히 생명의약품은 의학발전, 기술혁신, 공공의료 등 사회적 가치도 중요한 비중을 차지하고 있어서 세계 각국은 국가경쟁력 강화차원에서 지원을 더욱 강화하고 있다. 신약개발은 신물질 창출과 효능 검색, 전임상시험(preclinical trials) 및 임상시험의 과정을 거치게 되며, 오랜 개발기간과 막대한 경비가 소요되는 자본 및 기술 집약적인 산업이다. 전임상시험, 즉 화학물질의 독성 평가는 신물질 개발에 있어서 매우 중요한 과정이다. 국내의 경우, 많은 신약 후보물질들이 독성평가기술의 미비로 독성 평가가 지연되거나 선진국의 독성시험기관에 의뢰되고 있어

국산신약의 개발에 큰 걸림돌이 되고 있다. 독성평가의 지연에 기인된 신약개발의 병목현상을 해소하기 위해서는 개발 초기 단계에 독성을 스크리닝할 수 있는 단기검색시험법의 개발 및 확립이 시급히 요구된다.

생식독성시험에 있어서 고환독성을 포함한 수태능력과 초기배아의 발생영향을 평가하는 수태능 및 초기배 발생시험(fertility and early embryonic development study)은 개체 수준에서 독성을 직접 확인할 수 있는 좋은 방법이지만 많은 동물과 인력, 경비 및 시간이 소요되는 단점이 있다 [5,17,28]. 랫드 수태능 및 초기배 발생시험에서는 일반적으로 수컷 랫드에 시험물질을 교배 전 9주간 반복투여 하도록 규정하고 있으나 ICH 가이드라인에서는 반복투여시험에서 고환독성이 인정되지 않을 경우 시험기간을 단축하기 위해 교배 전 4주간의 반복투여를 추천하고 있다[9]. 최근 고환독

***Corresponding author**

Tel : +82-62-530-2827, Fax : +82-62-530-2809
E-mail : toxkim@chonnam.ac.kr

성을 검색하기 위한 시험기간에 대해서 유럽연합과 미국에서는 최소 2주간이 필요한 것으로 의견이 일치되고 있다[20]. 일본에서는 설치류에서 2주간의 반복투여가 고환독성을 검색하기에는 무리가 있다는 판단 하에 다양한 고환독성물질을 대상으로 하여 2주간의 반복투여 후 생식기관의 장기증량과 고환의 정자생성주기법을 이용하여 조직학적 변화를 평가한 결과, 2주간의 투여도 4주간의 투여와 큰 차이 없이 고환독성의 검색이 가능하다는 결론을 내렸다[20,25]. 단기간의 반복투여로 유발되는 고환의 미세한 독성학적 변화를 검출해내기 위해서는 고환조직에서 정자발생단계를 구분하여 각 발생단계별 정자발생세포의 변화를 관찰하는 기술이 필요하다. 또한 화학물질에 의한 정자의 경미한 질적 및 양적 변화를 검색하기 위해서는 객관성 있는 평가방법과 신뢰성 있는 시험조건의 확립이 반드시 요구된다[21]. 국내의 경우, 주로 랫드를 이용하여 고환독성을 평가하고 있으나 실험실마다 시험방법 및 평가기준에 많은 차이가 있어서 정상수치에도 많은 차이가 있으며, 이로 인해 시험결과의 신뢰성도 크게 미흡한 실정이다. 따라서 국내 GLP 시험기관에서도 보다 진보된 단기 고환독성 평가기술과 신뢰성 있는 정자독성평가 기술의 개발 및 확립이 절실히 요구되고 있다.

본 연구는 화학물질의 고환독성 잠재력을 단기간에 검색할 수 있는 단기 고환독성검색법을 확립하기 위해 수행하였다. 또한, 랫드에서 2주간의 반복투여기간으로 고환독성을 충분히 검색할 수 있는지를 확인하기 위해 수행하였다. 표준물질로는 고환독성물질로 알려져 있는 환경오염물질 2-bromopropane (2-BP)을 사용하였다[2,10,16].

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경

실험동물은 화인실험동물연구센터(전남 나주)로부터 12주령의 특정병원체무배제(specific-pathogen free) Sprague-Dawley 랫드를 구입하였고, 1주일간의 순화 및 검역 후 건강한 동물만을 선발하여 시험에 사용하였다. 실험동물은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 인공조명 12시간(08:00~20:00)으로 유지된 실험실에 사육하였으며, 스테인레스제 망사육상자(220 W×410 L×200 H mm)에 순화기간 및 검역기간 중에는 사육상자당 3마리 이하로, 투여기간 중에는 2마리 이하로 사육하였다. 사료(삼양사료, 원주)와 물(상수도수)은 자유 섭취시켰다.

시험물질 및 부형제(vehicle) 대조물질

시험물질 2-bromopropane (2-BP)은 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 화학적 순도는 99% 이상이었으며, 부형제인 옥수수기름(Sigma Chemical Co., MO, USA)에 용해하여 사용하였다. 시험물질은 매일 조제하여 사용하였으며, 부형제대조군은 옥수수기

름만을 사용하였다.

투여기간 및 투여방법

수컷 랫드에게 1일 1회씩 14일간 반복투여 하였고, 투여액량은 가장 최근에 측정된 체중을 기준으로 하여 kg당 3 ml로 하였다. 본 시험의 투여경로는 피하로 설정하였다. 사람에 있어서 본 시험물질의 주요 노출 경로는 흡입 또는 피부이지만 흡입노출이나 피부적용은 많은 기술적 어려움이 있다. 따라서 본 시험에서는 흡수경로가 경피와 매우 유사하면서도 경피나 흡입경로에 비해 보다 많은 양의 시험물질을 개체마다 일정하게 투여할 수 있는 피하를 투여경로로 선택하였다.

시험군의 구성 및 투여용량의 설정

투여용량을 결정하기 위해 1000, 2000 및 3000 용량으로 각 군당 3마리씩 5일간 반복투여한 결과, 3000 mg/kg 용량에서는 3마리 중 2마리가 사망하였고, 2000 mg/kg 용량에서는 운동성감소와 허약, 적색유투 등의 전신적 독성증상이 관찰되었다. 반면, 1000 mg/kg 용량에서는 운동성감소와 식욕부진 등의 미약한 독성증상만 인정되었다. 2-BP의 4주간 반복경구투여시험에서도 1000 mg/kg 용량은 고환독성용량으로 확인되었다[11]. 따라서 본 시험에서는 2주간의 반복피하투여에 의해 사망이 초래되지 않으면서도 고환독성이 나타날 것으로 예상되는 1000 mg/kg 용량을 투여용량으로 선택하였다.

부검 및 장기증량측정

투여개시 후 3, 7 및 14일째에 각각 10마리의 투여군 동물을 부검하였고, 대조군 동물은 투여개시 후 14일째에 부검하였다. 에테르 마취 하에 부검한 다음 방혈치사 시켰으며, 주요 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 14일째에 부검한 대조군 및 투여군 동물에 대해서는 고환과 부고환, 전립샘 및 정낭샘의 습중량을 측정하였고, 부검 시 체중에 대한 상대장기증량(organ-to-body weight ratio, %)을 계산하였다. 우측고환은 중량 측정 후 조직검사를 위해 Bouin 용액에 고정하였다.

조직병리학적 검사

고정이 완료된 우측고환은 파라핀 포매, 박절한 다음 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 하였고, 통상적인 조직관찰방법을 적용하여 광학현미경으로 검정하였다[11,12]. 고환조직의 변화를 정량적으로 관찰하기 위해서 각각의 곡세정관을 정자발생세포(spermatogenic cells)의 특징에 따라 14단계(stages I~XIV)로 분류하였으며[19], 본 시험에서는 정자발생 단계 중 II, V, VII 및 XII를 나타내는 곡세정관을 각 개체당 2개씩 선별하여 세정관내의 발생단계별 생식세포수를 계

수하였다. 고환독성평가 시 정자생성주기법의 사용은 독성 기전과 정자형성에 관한 세부적인 정보를 이해하는 데에 유용한 것으로 알려져 있다[4,6,15,24].

고환의 정자두부수 검사

투여개시 후 14일째에 부검하여 적출한 좌측고환의 중량을 측정하고, 백막을 제거한 다음 12 ml의 증류수가 들어있는 튜브에 넣었다. 균질기를 이용하여 3분간 충분히 균질화한 후, 이 균질액을 초음파기를 이용하여 4~7°C에서 3분간 초음파 처리하였다. 균질액 한 방울을 취하여 혈구계산판(hemocytometer, Germany)에 고르게 퍼지도록 주입하고, 충분히 안정이 되도록 5분 이상 방치한 후에 광학현미경을 이용하여 200배율로 관찰하여 고환당 총 정자두부수를 계산하였다.

일일 정자생성률 측정

일일 정자생성률은 고환에서 관찰된 정자두부수 즉, 균질화 및 초음파 과정에서 깨어지지 않고 계수된 step 17~19의 정자세포수를 이용하여 산출하였다. 랫드에서 이 단계의 정자세포 발생에는 약 6.3일이 소요되기 때문에 고환 정자두부수에 6.3을 나누어서 고환당 일일정자생성률을 계산하였다 [3,18,26].

부고환의 정자수 검사

좌측부고환 미부의 중량을 측정한 다음 10 ml의 생리식염수가 들어있는 용기에서 세절하고 균질기를 이용하여 충분히 균질화한 후, 정자두부수와 같은 방법으로 혈구계산판에서 정자수를 계수하였다.

정자운동성 검사

정자운동성을 관찰하기 위한 정자배양액은 5 mg/ml의 bovine serum albumin이 들어있고 pH 7.2로 조정된 Hank's balanced salt solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하였다. 1회용 주사기를 이용하여 정관 내에 있는 정자를 수세하여 배양액에 넣고, 37°C의 배양기에서 5분간 배양하였다. 이 정자배양액을 37°C로 유지된 홈이 파진 슬라이드 글라스에 놓고 커버글라스를 덮어서 현미경의 향온판(microwarm plate)에 놓은 다음 200배율로 검정하였으며, 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 운동성의 유무를 관찰하였다.

정자형태검사

정관에서 얻은 정자배양액 1방울을 슬라이드 글라스상에 1% eosin Y와 2:1로 잘 혼합한 다음 커버글라스를 덮어서 염색표본을 만든 후, 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 형태학적 이상 유무를 관찰하였다.

자료의 통계처리

시험물질 투여군과 대조군과의 차이를 비교하기 위하여 SAS program (Statistical Analysis System Institute Inc., Version 6.12, NC, USA)을 이용하여 통계학적 분석을 실시하였다. 시험결과는 가능한 한 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 대조군과 투여군간의 통계학적 분석은 Student t-test로 수행하였다. 통계학적 유의수준은 5% 및 1%에서 검정하였다.

결 과

부검소견

투여개시 후 3일, 7일 및 14일째에 부검을 실시하여 주요 장기에 대해서 육안적인 소견을 관찰한 결과, 대조군에서는 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았으나 시험물질 투여군에서는 경미한 고환위축이 2례 관찰되었다(자료 미제시).

장기중량

투여개시 후 14일째에 부검한 대조군 및 투여군 동물의 주요 생식장기에 대해서 절대 및 상대 장기중량을 측정한 결과 (Table 1), 투여군의 좌측 고환과 정낭샘의 절대중량이 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 시험물질 투여군에서 측정된 부고환과 전립샘의 절대중량 역시 대조군에 비해 다소 감소하였으나 대조군과 비교할 때 통계학적 차이는 인정되지 않았다. 한편, 주요 생식장기의 상대중량은 투여군과 대조군간에 통계학적 유의차가 인정되지 않았다.

Table 1. Reproductive organ weights of male rats treated with 2-bromopropane for 2 weeks

Parameters	2-Bromopropane (mg/kg/day)	
	0	1,000
No. of rats examined	10	10
Initial body weight	399.9±32.75	397.1±20.23
Terminal body weight	419.4±29.31	391.9±17.24**
Testis: left (g)	1.77±0.119	1.61±0.064**
per body weight (%)	0.42±0.027	0.41±0.024
Testis: right (g)	1.77±0.158	1.63±0.069**
per body weight (%)	0.42±0.032	0.42±0.018
Epididymis: left (g)	0.66±0.074	0.63±0.054
per body weight (%)	0.16±0.026	0.16±0.010
Epididymis: right (g)	0.68±0.067	0.62±0.064
per body weight (%)	0.16±0.024	0.16±0.013
Prostates (g)	0.73±0.126	0.62±0.150
per body weight (%)	0.17±0.024	0.16±0.037
Seminal vesicles (g)	1.30±0.120	1.13±0.122**
per body weight (%)	0.31±0.036	0.29±0.034

Values are expressed as mean±SD.

**Indicates significant difference at p<0.01 level when compared with the control group.

조직병리소견

투여개시 후 3일, 7일 및 14일째에 부검한 동물의 고환조직변화를 정성적 및 정량적으로 관찰한 결과는 Table 2 및 Table 3에 요약하였다. 시험물질 투여개시 후 3일째에는 정조세포(spermatogonia)의 변성(degeneration, Fig. 1B and Fig.

2B)이 8례, 정조세포 수의 감소(Fig. 1B and Fig. 2B)가 전례, 정모세포(spermatocyte)의 변성(Fig. 3B and Fig. 4B)이 전례, 다핵거대세포(multinuclear giant cell)가 1례, 성숙정자저류(mature spermatid retention)가 6례, 지지세포(Sertoli cell)의 공포화(vacuolization)가 8례 관찰되었다. 정량적 평가결과,

Table 2. The incidence and severity of histopathological lesions in testes of male rats treated with 2-bromopropane for 2 weeks

Parameters Grades:	Control				Days after treatment (1000 mg/kg/day)											
					Day 3				Day 7				Day 14			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Testis																
Atrophy of seminiferous tubules	10 ^a	0	0	0	10	0	0	0	9	1	0	0	6	2	2	0
Exfoliation of spermatogenic cells	10	0	0	0	10	0	0	0	6	2	2	0	6	3	1	0
Degeneration of spermatogonia	10	0	0	0	2	5	3	0	0	4	5	1	7	3	0	0
Decrease of spermatogonia	10	0	0	0	0	4	6	0	0	0	10	0	0	10	0	0
Degeneration of spermatocytes	10	0	0	0	0	7	3	0	0	3	5	2	4	5	1	0
Decrease of spermatocytes	10	0	0	0	10	0	0	0	0	7	3	0	0	0	4	6
Multinuclear giant cells	10	0	0	0	9	1	0	0	5	2	2	1	10	0	0	0
Mature spermatid retention	10	0	0	0	4	6	0	0	2	3	5	0	1	2	7	0
Vacuolation of Sertoli cells	10	0	0	0	2	6	2	0	1	8	1	0	2	6	2	0

Grades are as follows: 0, normal; 1, slight; 2, moderate; and 3, severe change.

^a No. of animals with the sign

Table 3. The number of spermatogenic cells in seminiferous tubules of male rats treated with 2-bromopropane for 2 weeks

Parameters	Control	Days after treatment (1000 mg/kg/day)					
		Day 3		Day 7		Day 14	
Stage II	Spermatogonia	20.2±3.61	4.0±3.65**	1.9±1.60**	2.3±3.22**		
	Pachytene spermatocytes	49.4±10.33	52.9±7.38	40.7±9.88	5.3±7.47**		
	Round spermatids	158.3±18.48	147.4±28.17	129.2±35.04	148.8±16.09		
	Elongated spermatids	153.5±27.75	153.9±22.48	138.1±28.28	148.6±39.73		
	Sertoli cells	18.8±4.29	17.4±4.16	16.1±4.15	15.9±2.02		
Stage V	Spermatogonia	37.4±4.93	3.9±3.89**	2.1±2.13**	2.0±3.62**		
	Pachytene spermatocytes	52.5±7.70	50.1±9.19	45.3±14.93	34.0±16.30		
	Round spermatids	153.6±9.49	146.4±26.89	138.2±36.88	150.6±23.39		
	Elongated spermatids	167.3±12.75	148.7±32.07	152.5±33.48	150.5±29.04		
	Sertoli cells	17.5±3.92	15.7±1.89	15.4±3.03	14.9±2.42		
Stage VII	Spermatogonia	2.3±0.67	2.1±0.69	1.8±0.63	1.9±0.74		
	Preleptotene spermatocytes	38.8±4.18	34.3±10.37	3.0±2.05**	4.2±5.65**		
	Pachytene spermatocytes	56.4±8.82	53.9±6.12	50.7±12.26	48.0±9.83		
	Round spermatids	151.6±15.87	145.4±19.10	157.1±30.50	136.1±31.61		
	Elongated spermatids	157.0±19.84	153.0±32.86	146.8±25.26	138.0±25.72		
Sertoli cells	17.8±2.90	15.9±5.55	14.9±3.07	14.6±3.27			
Stage XII	Spermatogonia	3.6±1.35	2.0±1.15	2.8±2.15	1.5±1.51		
	Zygotene spermatocytes	46.9±5.34	43.4±2.51	20.6±25.07**	2.4±5.23**		
	Pachytene spermatocytes	61.8±5.37	63.6±5.80	64.8±13.13	60.9±19.16		
	Elongated spermatids	168.7±27.37	154.4±15.99	153.1±41.31	143.0±27.83		
	Sertoli cells	19.7±3.56	19.6±3.87	16.5±2.22	17.1±3.38		

Values are expressed as mean±SD.

* Indicates significant difference at P<0.05 level when compared with the control group.

** Indicates significant difference at P<.0.01 level when compared with the control group.

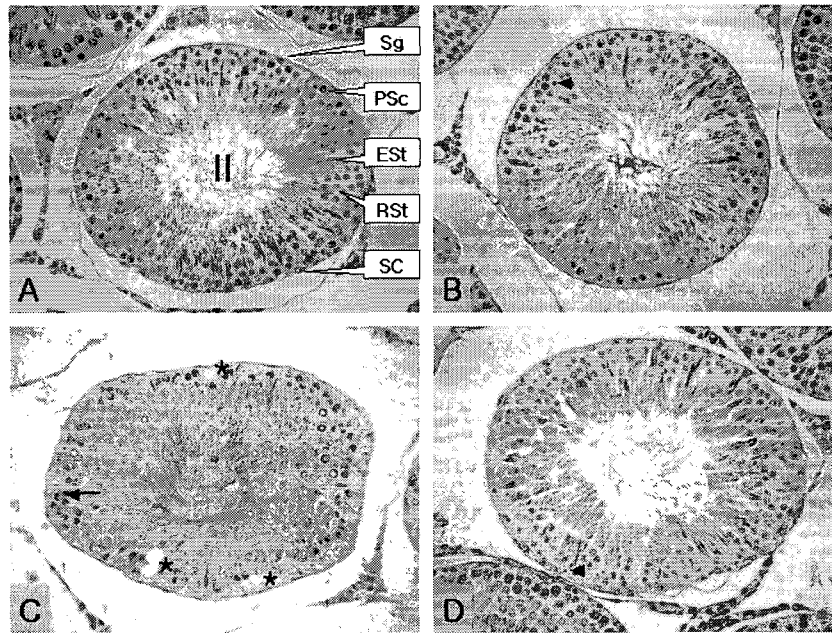


Fig. 1. Representative photographs of stage II seminiferous tubules. (A) a control rat, showing normal appearance. (B) a 2-bromopropane treated rat on day 3 of treatment, showing degenerating spermatogonia (arrow) and decreased spermatogonia. (C) a 2-bromopropane treated rat on day 7 of treatment, degenerating pachytene spermatogonia (arrow), decreased spermatogonia and vacuolization of Sertoli cells (*). (D) a 2-bromopropane treated rat on day 14 of treatment, showing degenerating spermatogonia (arrow head) and decreased spermatogonia and pachytene spermatocyte. Sg, spermatogonia; PSc, pachytene spermatocyte; RSt, round spermatid; Est, elongated spermatid; SC, Sertoli cell. Hematoxylin & Eosin stain, $\times 400$.

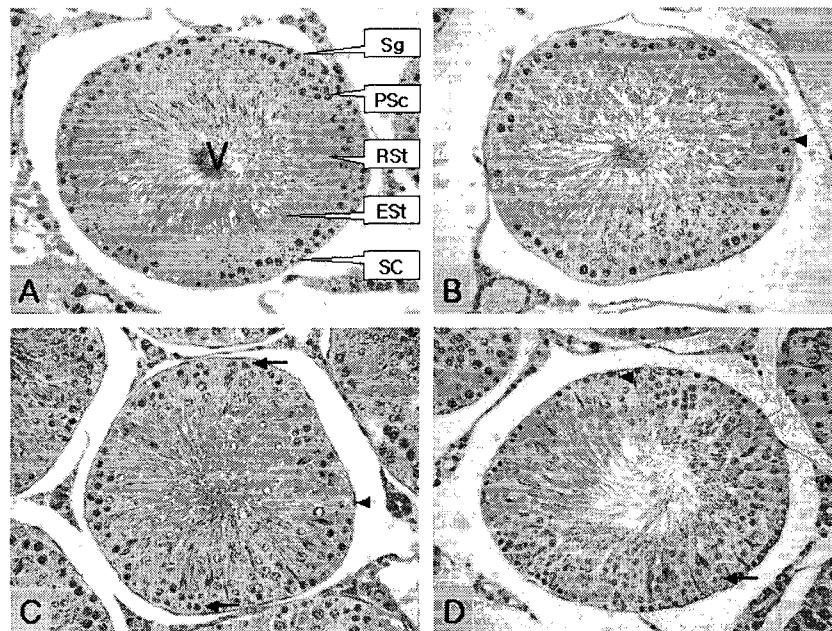


Fig. 2. Representative photographs of stage V seminiferous tubules. (A) a control rat, showing normal appearance. (B) a 2-bromopropane treated rat on day 3 of treatment, showing degenerating spermatogonia (arrow head) and decreased spermatogonia. (C) a 2-bromopropane treated rat on day 7 of treatment, showing decreased spermatogonia and pachytene spermatocyte, degenerating pachytene spermatocyte (arrow) and spermatogonia (arrow head). (D) a 2-bromopropane treated rat on day 14 of treatment, showing decreased spermatogonia and pachytene spermatocyte, degenerating pachytene spermatocyte (arrow) and spermatogonia (arrow head). Sg, spermatogonia; PSc, pachytene spermatocyte; RSt, round spermatid; EST, elongated spermatid; SC, Sertoli cell. Hematoxylin & Eosin stain, $\times 400$.

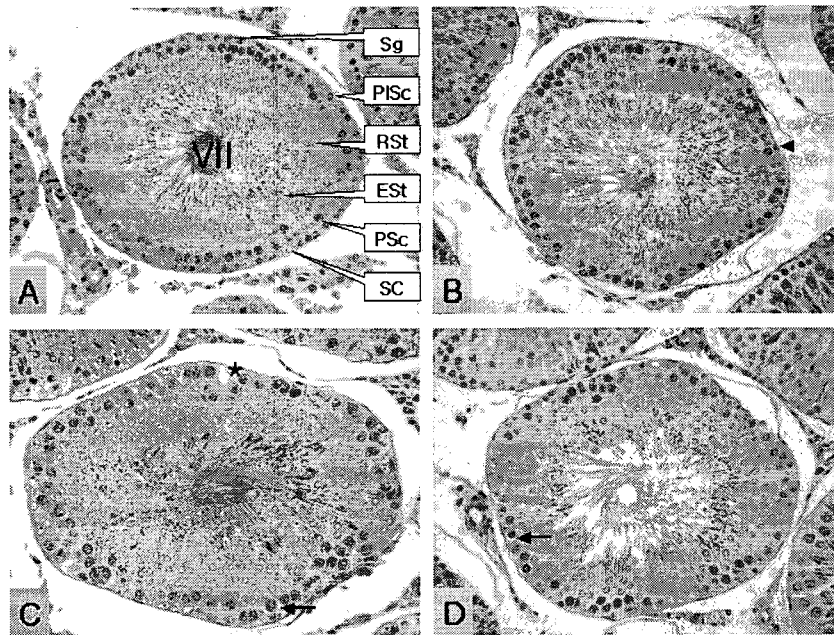


Fig. 3. Representative photographs of stage VII seminiferous tubules. (A) a control rat, showing normal appearance. (B) a 2-bromopropane treated rat on day 3 of treatment, showing degenerating spermatogonia (arrow head). (C) a 2-bromopropane treated rat on day 7 of treatment, showing degenerating pachytene spermatocyte (arrow), vacuolization of Sertoli cell (*), exfoliation of pachytene spermatocyte and decreased preleptotene spermatocyte. (D) a 2-bromopropane treated rat on day 14 of treatment, showing degenerating pachytene spermatocyte (arrow) and decreased preleptotene spermatocyte. Sg, spermatogonia; PISc, preleptotene spermatocyte; PSc, pachytene spermatocyte; RSt, round spermatid; Est, elongated spermatid; SC, Sertoli cell. Hematoxylin & Eosin stain, $\times 400$.

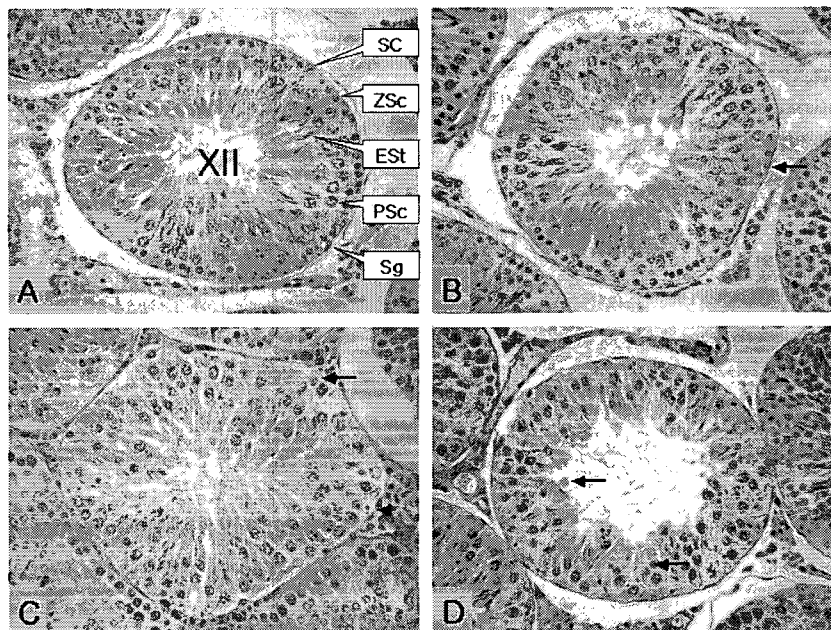


Fig. 4. Representative photographs of stage XII seminiferous tubules. (A) a control rat, showing normal appearance. (B) a 2-bromopropane treated rat on day 3 of treatment, showing degenerating zygotene spermatocyte (arrow). (C) a 2-bromopropane treated rat on day 7 of treatment, showing degenerating pachytene spermatocyte (arrow) and zygotene spermatocyte (arrow head) and decreased zygotene spermatocyte. (D) a 2-bromopropane treated rat on day 14 of treatment, showing degenerating pachytene spermatocyte (arrow) and decreased zygotene spermatocyte. Sg, spermatogonia; ZSc, zygotene spermatocyte; PSc, pachytene spermatocyte; Est, elongated spermatid; SC, Sertoli cell. Hematoxylin & Eosin stain, $\times 400$.

정자발생단계 II와 V에서 정조세포 수가 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였으며, 그 외의 정자발생세포 수는 대조군과 통계학적 차이가 인정되지 않았다. 투여개시 후 7일째에는 곡세정관의 위축(atrophy)이 1례, 정자발생세포의 탈락(exfoliation)이 4례, 정조세포의 변성(Fig. 2C)과 정조세포 수의 감소(Fig. 1C and Fig. 2C), 정모세포의 변성(Fig. 1~4C) 및 정모세포 수의 감소(Fig. 3C and Fig. 4C)가 각각 전례, 다핵거대세포가 5례, 성숙정자저류가 8례, 지지세포의 공포화(Fig. 1C and 3C)가 9례에서 관찰되었다. 정량적 분석결과, 정자발생단계 II와 V에서 정조세포수가 대조군에 비해 통계학적으로 유의성 있게 감소하였고, 정자발생단계 VII에서 세사전기 정모세포(preleptotene spermatocyte)와 XII에서 접합기 정모세포(zygotene spermatocyte)의 수가 대조군에 비해 각각 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다. 투여개시 후 14일째에는 곡세정관의 위축이 4례, 정자발생세포의 탈락이 4례, 정조세포의 변성(Fig. 1D and Fig. 2D)이 3례, 정조세포 수의 감소(Fig. 1D and Fig. 2D)가 전례, 정모세포의 변성(Fig. 2~4D)이 6례, 정모세포 수의 감소(Fig. 1~4D)가 전례, 성숙정자저류가 9례, 지지세포의 공포화가 8례에서 관찰되었다. 정량적 분석결과, 7일째에 관찰된 소견과 유사하게 정조세포와 세사전기 및 접합기 정모세포의 수가 유의성 있게 감소하였고, 추가로 정자발생단계 II 및 V에서 태사기 정모세포(pachytene spermatocyte) 수의 감소가 인정되었다.

정자검사소견

투여개시 후 14일째에 부검하여 정자검사를 실시한 결과 (Table 4), 시험물질 투여군에서 고환의 정자두부수와 일일정자생성률이 대조군에 비해 각각 통계학적 유의성은 인정되지 않았으나 다소 감소(약 6.2%)한 것으로 나타났다. 시험물

질 투여군에서 부고환의 정자 수 역시 대조군에 비해 통계학적 차이는 인정되지 않았으나 다소 감소(약 10.7%)한 것으로 나타났다. 부고환 정자의 형태학적 이상유무를 관찰한 결과, 시험물질 투여군에서는 비정형두부(amorphous head)와 소두부(small head), 이중두부/미부(double heads/tails), 두부각도과다(excessive hook), 두부각도과소(blunt hook), 미부접합(folded tail), 미부짧음(short tail) 및 미부탈락(detached tail)을 포함하는 이상정자가 8.4%의 비율로 관찰되었으나 대조군(정자기형률, 7.3%)과 차이는 인정되지 않았다.

고찰

본 연구는 화학물질의 고환독성을 단기간에 검색할 수 있는 단기 고환독성검색법을 확립하고, 랫드에서 2주간의 반복 투여기간으로 고환독성을 충분히 검색할 수 있는지를 확인하기 위해 수행하였다. 시험물질로는 고환독성물질로 알려져 있는 2-BP를 사용하여 성숙이 완료된 수컷 랫드에게 14일간 반복 피하투여 하였고, 생식장기의 증량과 고환의 조직학적 검사 및 정자검사를 실시하였다.

투여군 동물에서 관찰된 좌측 고환과 정낭샘의 절대증량 감소는 2-BP의 투여에 의한 생식장기의 손상을 나타내며, 부고환과 전립샘의 절대증량 역시 통계학적 차이는 인정되지 않았지만 다소 감소하여 주요 생식장기가 2-BP의 투여에 의해 손상되었음을 암시해 준다. 장기증량은 독성평가 시험에서 이용되는 중요한 검사항목으로서 체중변화에 기인된 상대적 영향을 배제하기 위해 절대증량보다는 체중이나 뇌증량에 대한 상대증량이 많이 이용되고 있다[1]. 본 시험의 경우, 생식장기의 절대증량은 2-BP의 투여에 의해 유의성 있는 감소가 인정되었으나 체중대비 상대증량은 대조군과 투여군

Table 4. Findings of sperm examination of male rats treated with 2-bromopropane for 2 weeks

Parameters	2-Bromopropane (mg/kg/day)	
	0	1,000
No. of rats examined	10	10
Sperm head count ($\times 10^6$ /testis)	254.3 \pm 23.28	238.6 \pm 28.54
Daily sperm production ($\times 10^6$ /testis)	40.4 \pm 3.69	37.9 \pm 4.54
Sperm count ($\times 10^6$ /cauda epididymis)	218.4 \pm 31.13	196.1 \pm 37.86
Sperm motility (%)	77.9 \pm 7.55	80.0 \pm 9.70
Sperm abnormality (%)	7.3 \pm 2.49	8.4 \pm 2.39
Amorphous head	0.5 \pm 0.53	0.6 \pm 0.74
Small head	0.4 \pm 0.52	0.3 \pm 0.46
Two heads/tails	0.1 \pm 0.35	0.3 \pm 0.71
Excessive hook	0.9 \pm 0.83	0.4 \pm 0.52
Blunt hook	1.6 \pm 0.92	2.9 \pm 2.23
Folded tail	2.4 \pm 1.41	2.0 \pm 1.31
Short tail	0.3 \pm 0.46	0.4 \pm 0.74
Detached tail	1.1 \pm 1.13	1.5 \pm 1.41

Values are expressed as mean \pm SD (g).

간에 차이가 인정되지 않았다. 이는 본 시험에서 사용한 동물이 성 성숙이 완료된 13주령의 동물을 사용하였고, 또한 시험기간이 상대적으로 단기간이어서 초래된 결과로 판단된다. 이러한 결과는 성장기 랫드를 이용하는 중·장기시험과는 달리 성숙랫드를 이용한 단기 고환독성시험에서는 절대장기증량이 상대장기증량보다 더 민감한 평가항목임을 암시해 준다. 최근의 연구보고[27]에 의하면, 2-BP는 배양된 고환 간질세포의 DNA를 손상시키고, 세포 항산화 방어체계의 손상과 지질과산화를 증가시킨다고 한다. Zhao 등[29]은 2-BP이 2'-deoxyguanosin에 작용하여 DNA 부가체로서 N⁷-isopropyl guanine을 형성하는 것을 증명한 바 있다. 상기 연구결과들은 2-BP에 의한 DNA의 손상이 2-BP 노출에 의해 야기된 여러 형태의 독성에 밀접하게 관계된다는 것을 암시해 주고 있다. 2-BP를 포함하여 DNA에 손상을 유발하는 물질들이 다양한 생식발생독성을 유발한다는 것은 잘 알려져 있다[13,14].

조직병리학적 관찰 시, 투여개시 후 3일째에는 정조세포의 변성과 정조세포 수의 감소, 정모세포의 변성과 다핵거대세포, 성숙정자저류 및 지지세포의 공포화가 다수 관찰되었다. 상기 소견 중에서 정조세포의 변성과 감소는 경도에서 중등도로 거의 모든 투여동물에서 관찰되었다. 고환조직의 정량적평가결과, 정자발생단계 II 및 V에서 정조세포수가 유의성 있게 감소한 것으로 확인되었다. 이 결과는 랫드의 정자발생단계별 생식세포를 고려해볼 때[19,22], 2-BP의 투여로 중간형(type intermediate)과 B형(type B)의 정조세포가 1차적으로 손상되며, A형(type A)의 정조세포는 영향을 받지 않는다는 것을 의미한다. 정모세포의 변성 또한 경도에서 중등도로 모든 투여동물에서 주로 정자발생 단계 VII~X의 기저부에서 관찰되었으며, 정모세포 유래의 다핵거대세포도 관찰되었다. 본 소견은 2-BP의 투여가 초기 정모세포, 즉 세사전기와 세사기 정모세포에도 영향을 끼친다는 것을 암시해 준다. 지지세포의 공포화는 거의 모든 정자발생 단계에서, 그리고 성숙정자의 저류는 정자발생단계 IX~XI에서 각각 경도로 관찰되었는데, 이들 소견은 2-BP의 투여가 지지세포의 기능이상(dysfunction)을 유발했음을 암시해 준다. 곡세정관상피에서 공포형성과 생식세포의 탈락 및 성숙정자의 저류는 지지세포의 기능 이상을 나타내는 지표로 잘 알려져 있다[7, 19]. 이전 연구결과[23]에 따르면, 2-BP를 3500 mg/kg 용량으로 3일간 반복경구투여하고 3일 후에 부검한 결과, 정자발생단계 I~IV에서 정조세포의 변성이 관찰된다고 하였으며, 본 시험에서도 일치하는 결과를 얻었다. 특히, 본 시험에서는 세포분열이 활발한 중간형과 B형의 정조세포가 1차적으로 손상되며, A형의 정조세포는 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 또한 투여개시 후 3일째에는 정조세포의 손상뿐만 아니라 정모세포의 손상과 지지세포의 기능이상도 유발한다는 것을 확인하였다. 두 시험간의 이러한 차이는 투여경로나 투여용량, 부검시기 등의 차이가 주요 원인으로 사료된다.

투여개시 후 7일째에는 3일째에 관찰된 소견들이 더 심한 정도로 관찰되었고, 추가로 곡세정관의 위축과 정자발생세포의 탈락, 정모세포의 감소 및 다핵거대세포의 증가가 관찰되었다. 이러한 소견들은 2-BP의 투여로 인한 고환독성이 투여개시 후 3일째에 비해 7일째에 더 심하게 진행된다는 것을 나타낸다. 7일째에 관찰된 고환독성소견들은 시험물질 투여개시 후 3일째에 관찰되었던 정조세포와 정모세포의 변성 및 정조세포의 감소가 지속되었고, 또한 이로 인해 이들의 딸세포(daughter cells)의 감소가 초래되어 나타난 것으로 판단된다. 특히, 정자발생단계 VII과 XII에서 정모세포수의 유의성 있는 감소가 관찰되어 세사전기와 세사기 및 접합기의 정모세포까지 영향을 받은 것으로 나타났다.

투여개시 후 14일째에는 7일째의 소견과 비교할 때, 정자발생세포의 탈락과 성숙정자의 저류 및 지지세포의 공포화는 유사한 정도로 관찰되었으나 정조세포와 정모세포의 변성은 현저히 감소하였으며, 다핵거대세포는 관찰되지 않았다. 반면, 곡세정관의 위축과 정모세포의 감소는 이전에 비해 증가하였다. 정조세포와 정모세포의 변성이 감소한 것은 2-BP의 투여개시 후 14일째에는 정자발생세포들의 추가적 손상이 거의 발생하지 않는다는 것을 의미하며, 이는 다핵거대세포가 더 이상 관찰되지 않은 것에도 일치하는 결과이다. 곡세정관의 위축은 정자발생세포의 감소에 기인된 2차적인 결과로서 부검 시 관찰된 고환의 위축과 일치하는 소견이다. 정모세포는 특정 정자발생단계가 아닌 모든 정자발생단계에서 유의성 있는 감소가 인정되어 태사기(pachytene) 정모세포까지 영향을 받은 것으로 나타났다.

정자검사 시, 시험물질 투여군에서 관찰된 정자두부수와 일일정자생성률의 감소(약 6.2%)는 비록 통계학적 유의성은 인정되지 않았지만 시험물질의 투여에 기인된 소견으로 판단된다. 이 결과는 고환조직에서 관찰된 정자발생세포의 탈락과 관계되는 소견으로서 지지세포의 기능이상으로 성숙정자를 포함한 정자발생세포가 탈락함으로써 초래된 것으로 판단된다. 투여군 동물의 부고환에서 관찰된 정자 수의 감소(약 10.2%)는 대조군과 비교하여 통계학적 차이는 인정되지 않았지만 고환의 일일정자생성률 감소와 일치하는 소견으로써 시험물질의 투여에 기인된 소견으로 판단된다. 본 시험에서는 투여개시 후 14일째에 정자검사를 하였기 때문에 정자두부수 및 정자수의 감소가 다소 경미하였으나, 랫드의 정자발생주기를 고려해 볼 때 투여개시 후 4~6주 후에는 고환의 정자두부수와 부고환의 정자수가 현저하게 감소할 것으로 판단된다. 한편, 본 시험조건 하에서 2-BP는 정자운동성과 정자형태에는 어떠한 이상도 초래하지 않는 것으로 나타났다. 정자검사의 경우, 각 실험실의 분석조건과 측정자의 판정기준에 다소의 차이가 있기 때문에 신뢰성 있는 평가방법과 객관성 있는 평가기준의 확립이 매우 중요하다. 특히, 정자운동성은 정자의 채취부위나 실험조건에 따라 많은 차이가 있

으며, 일반적으로 정상동물에서 약 70% 이상의 운동성이 관찰되어야 실험조건이 적절하다고 평가한다[7]. 본 시험에서 얻어진 대조군의 정자운동성은 약 80%로 나타났고, 다른 연구자들[8]의 정상치와도 유사하여 본 시험의 정자분석조건이 적절함을 확인하였다.

이전 연구에 따르면, Ichihara 등[10]은 2-BP를 300 ppm 이상의 농도로 9주간 반복 흡입노출하여 수컷 생식장기의 증량과 정자수 및 정자운동성의 감소, 정자기형률의 증가 및 정자발생세포의 감소를 관찰하였다. Son 등[23]은 2-BP를 3500 mg/kg 용량으로 랫드에게 3일간 반복경구투여한 후 경시적으로 관찰한 결과, 먼저 정조세포의 손상이 관찰되고, 이어서 정모세포와 정자세포의 소실, 그리고 고환위축이 초래되는 것을 확인하였다. Kim 등[10]은 랫드에게 1000 mg/kg 용량으로 4주간 반복경구투여하고 고환조직의 경시적 변화를 관찰한 결과, Son 등[23]의 연구결과와 일치하는 결과를 얻었으며, 투여종료 후 8주째에는 현저한 고환위축과 정자발생장애를 관찰하였다. Omura 등[16]은 랫드에게 2-BP를 1355 mg/kg 용량으로 1일 1회씩 투여한 결과, 1회 투여 후에는 정자발생단계 I에서 정조세포와 태사기 정모세포가 감소하였고, 2회 투여 후에는 정자발생단계 I~III에서 정조세포가 감소하였으며, 5회 투여 후에는 정자발생단계 VII를 제외한 모든 단계에서 정조세포가 감소하였다고 한다. 본 시험에서는 14일간의 단기간 투여와 생식장기의 증량측정, 고환조직의 정성적 및 정량적 평가, 그리고 정자검사를 통하여 2-BP의 고환 및 정자독성 잠재력을 명백히 규명할 수 있었다. 고환독성을 평가하는 방법에는 1) 고환독성의 정도(mild, moderate, severe)에 따라 분류하는 방법, 2) 손상된 곡세정관의 빈도를 측정하는 방법, 3) 전체 곡세정관 중에서 마지막 단계의 정자발생단계에 있는 곡세정관의 수를 측정하는 방법, 4) 정자발생세포 수와 지지세포 수의 비율을 이용하는 방법 등이 알려져 있다[24]. 그러나 이들 방법들은 현저한 고환손상을 평가하는 데에는 유리하나 미약한 조직학적 변화를 세부적으로 평가하거나 손상정도를 객관적으로 평가하기에는 많은 단점이 있다. 최근 Chung 등[4]은 지지세포 지수를 이용한 2-BP의 고환독성 평가결과를 보고한 바 있으나 이 방법은 고환조직의 미세한 정성적 변화는 규명할 수가 없으며, 정자발생세포 수의 감소가 2-BP에 의한 직접적 손상인지 아니면 지지세포의 기능이상에 의한 2차적 영향인지 구분하기는 어렵다. 본 시험에서는 고환조직의 변화를 정성적으로 평가하였고, 정자발생단계별 생식세포의 변화를 정량적으로 평가함으로써 조직변화의 정도를 객관화 시킬 수 있었다. 또한, 정자분석을 통하여 고환의 정자두부수와 부고환의 정자수 감소를 확인할 수 있었다. 즉, 상기 연구자들이 단기 및 장기시험을 통하여 규명한 2-BP의 고환독성을 2주간의 시험기간으로도 확인할 수 있었으며, 이는 본 시험법이 화학물질의 고환독성 잠재력을 단기에 검색하는데 유용하게 활용될 수 있음을 보여

준다.

종합하여 볼 때, 랫드에서 2-BP 1000 mg/kg의 14일간 반복피하투여는 고환중량의 감소와 정자발생세포의 변성, 감소 및 탈락, 지지세포의 기능이상, 곡세정관의 위축, 그리고 일일정자생성률 및 정자수의 감소를 초래하였다. 고환조직의 정량적 분석은 2-BP의 투여에 의해 초래된 특정 정자발생세포의 수적 감소를 정량화할 수 있었으며, 표적생식세포는 중간형 및 B형 정조세포인 것으로 확인되었다. 결론적으로 본 연구에서 확립된 고환독성평가법은 14일간의 단기간 투여에 의해 나타난 고환독성을 효율적으로 검색할 수 있었으며, 신약 후보물질의 고환독성잠재력을 단기간에 효율적으로 평가할 수 있는 검색법으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 국책연구개발사업(M1-0312-00-005)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Bailey, S. A., R. H. Zidell and R. W. Perry. 2004. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicol. Pathol.* **32**, 448-466.
- Boekelheide, K., S. P. Darney, G. P. Daston, R. M. David, U. Luderer, A. F. Olshan, W. T. Sanderson, C. C. Willhite and S. Woskie. 2004. NTP-CERHR Expert Panel Report on the reproductive and developmental toxicity of 2-bromopropane. *Reprod. Toxicol.* **18**, 189-217.
- Chung, M. K., S. J. Lee, Y. B. Kim, S. C. Park, D. H. Shin, S. H. Kim and J. C. Kim. 2005. Evaluation of spermatogenesis and fertility in F1 male rats after in utero and neonatal exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Asian J. Androl.* **7**, 189-194.
- Chung, Y. H., J. H. Han and I. J. Yu. 2001. Reproductive toxicity assessment on 2-bromopropane using spermatogenesis stage classification and Sertoli cell indices. *J. Toxicol. Pub. Health.* **17**, 267-272.
- Chung, M. K. and J. C. Kim. 2000. Principles and methods for the reproductive-toxicological evaluation of new drug candidates. *J. Toxicol. Pub. Health* **16**, 229-238.
- Creasy, D. M. 1997. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol. Pathol.* **25**, 119-131.
- Creasy, D. M. 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol. Pathol.* **29**, 64-76.
- Dostal, L. A., C. K. Faber and J. Zandee. 1996. Sperm motion parameters in vas deferens and cauda epididymal rat sperm. *Reprod. Toxicol.* **10**, 231-235.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. 1993. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products.
- Ichihara, G., N. Asaeda, T. Kumazawa, T. Tagawa, M.

- Kamijima, X. Yu, H. Kondo, T. Nakajima, J. Kitoh, I. J. Yu, Y. H. Moon, N. Hisanaga and Y. Takeuchi. 1997. Testicular and haematopoietic toxicity of 2-bromopropane, a substitute for ozone layer-depleting chlorofluorocarbons. *J. Occup. Health* **39**, 57-63.
11. Kim, J. C., H. S. Lee, H. I. Yun and M. K. Chung. 2000. Evaluation of the testicular toxicity caused by 2-bromopropane in rats. *Korean J. Vet. Res.* **40**, 361-371.
 12. Kim, J. C., K. H. Lim and M. K. Chung. 1999. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod. Toxicol.* **13**, 391-397.
 13. Kim, J. C., S. H. Kim, D. H. Shin, T. H. Ahn, H. C. Kim, Y. B. Kim, C. Z. Jiang, J. Han and M. K. Chung. 2004a. Effects of prenatal exposure to the environmental pollutant 2-bromopropane on embryo-fetal development in rats. *Toxicology* **196**, 77-86.
 14. Kim, J. C., D. H. Shin, S. H. Kim, J. K. Kim, S. C. Park, W. C. Son, H. S. Lee, J. E. Suh, C. Y. Kim, C. S. Ha and M. K. Chung. 2004b. Subacute toxicity study of a new camptothecin anticancer agent CKD-602 administered by intravenous injection to rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **40**, 356-369.
 15. Matsui, H. and M. Takahashi. 1999. A novel quantitative morphometry of germ cells for the histopathological evaluation of rat testicular toxicity. *J. Toxicol. Sci.* **24**, 17-25.
 16. Omura, M., Y. Romero, M. Zhao and N. Inoue. 1999. Histopathological evidence that spermatogonia are the target cells of 2-bromopropane. *Toxicol. Lett.* **104**, 19-26.
 17. Riecke, K. and R. Stahlmann. 2000. Test systems to identify reproductive toxicants. *Andrologia* **32**, 209-218.
 18. Robb, G. W., R. P. Amann and G. J. Killian. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* **54**, 103-107.
 19. Russel, L. D., R. A. Ettlin, A. P. Sinha Hikim and E. D. Clegg. 1990. *Histological and Histopathological Evaluation of The Testis*. pp. 1-286, Cache River Press, Clearwater, Florida.
 20. Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno. 2000. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats: overview of the studies. *J. Toxicol. Sci.* **25 (Suppl. 1)**, 1-21.
 21. Seed, J., R. E. Chapin, E. D. Clegg, L. A. Dostal, R. H. Foote, et al. 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod. Toxicol.* **10**, 237-244.
 22. Sharpe, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: *The Physiology of Reproduction*. Second Edition. Knobil E and Neil JD (eds), pp. 1363-1434, Raven Press, New York.
 23. Son, H. Y., Y. B. Kim, B. H. Kang, S. W. Cho, C. S. Ha and J. K. Roh. 1999. Effects of 2-bromopropane on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat. *Reprod. Toxicol.* **13**, 179-187.
 24. Son, W. C., J. C. Kim and I. J. Yu. 2003. The recommended approaches for the evaluation of testicular toxicity with awareness of the spermatogenic cycle and quantitative testicular toxicity evaluation methods. *J. Toxicol. Pub. Health* **19**, 83-90.
 25. Takayama, S., M. Akaike, K. Kawashima, M. Takahashi and Y. Kurokawa. 1995. A collaborative study in Japan on optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorders induced by drugs in rats. *J. Am. Coll. Toxicol.* **14**, 266-292.
 26. Takahashi, O. and S. Oishi. 2003. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1035-1044.
 27. Wu, X., A. S. Faqi, J. Yang, B. P. Pang, X. Ding, X. Jiang and I. Chahoud. 2002. 2-Bromopropane induces DNA damage, impairs functional antioxidant cellular defenses, and enhances the lipid peroxidation process in primary cultures of rat Leydig cells. *Reprod. Toxicol.* **16**, 379-384.
 28. Zenick, H. and E. Clegg. 1989. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes AW, ed), Second Edition, pp. 275-309, Raven Press, New York.
 29. Zhao, L. X., E. K. Kim, H. T. Lim, Y. S. Moon, N. H. Kim, T. H. Kim, H. Choi, W. Chae, T. C. Jeong and E. S. Lee. 2002. Synthesis, characterization and in vitro identification of N⁷-guanine adduct of 2-bromopropane. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 39-44.