

화학물질의 폭로에 따른 건강장해의 분자생물학적 평가 연구

- 2 - Bromopropane의 폭로가 Rat의 Spermatogenesis와
Germ Cell Cycle에 미치는 영향 -

1997



한국산업안전공단
산업보건연구원

제출문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 연구결과를 1997년도 산업보건연구원의 연구사업중 “화학물질의 폭로에 따른 건강장해의 분자생물학적 평가 연구”에 대한 최종결과보고서로 제출합니다.

1997년 12월 31일

제출자 : 산업보건연구원장 문 영한

연구책임자 : 기술직 4급 정용현

공동연구자 : 책임연구원 유일재

기술직 4급 이준연

선임연구원 임철홍

선임연구원 맹승희

책임연구원 김현영

수석연구원 이용묵

목 차

ABSTRACT	i
I. 서 론	1
1. 연구배경	1
2. 연구방향 및 목적	3
II. 재료 및 방법	4
1) 시험물질	4
2) 실험동물	4
3) 관찰 및 검사항목	5
(1) 해부 및 병리조직표본제작	5
(2) 병리조직학적 검사	5
(3) 면역조직화학적 검사	5
4) 통계처리	6

Ⅲ. 결 과	7
1. 세르토리 세포지수	7
2. 투여농도별 배세포수의 변화	9
3. 스테이지별 배세포수의 변화	11
3. 조직병리.....	19
4. 면역조직화학적 검사	20
Ⅳ. 고 찰	32
Ⅴ. 결 론	36
참 고 문 헌	39

Effect of 2-Bromopropane on the Spermatogenesis and Germ Cell Cycle in Sprague-Dawley Male Rats.

Yong Hyun Chung, Il Je Yu, Hyeon Yong Kim, Seung Hee Maeng, Cheol hong Lim, Jun Yeon Lee, Jeong Hee Han, Kwang Jin Kim, Jae Hwang Jeong, Yong Mook Lee, Young Hahn Moon.

Industrial Chemicals Research Center, Industrial Health Research Institute, Korea Industrial Safety Corporation
104-8 Moonji-Dong, Yusung-Ku, Taejon 305-380, Korea

ABSTRACT

To clarify the effect of spermatogenesis and germ cell cycle of rat 2-bromopropane (2-BP) has been investigated. 2-BP was tested through 28 days of repeated dose experiments in male Sprague-Dawley rats. Ten rats were allocated to each treatment group. Vehicle control olive oil, 125 mg, 250 mg, and 500 mg/kg body weight of 2-BP were injected into intraperitoneum daily for 28 days. Sertoli cells indices (SCI) per tubule of rats had a tendency to decrease depending on the dose of 2-BP, showing 30.4 for the control group, and 12.2 for the 500 mg/kg group. Testes treated with 125 mg/kg of 2-BP showed some decreases of cellular associations in seminiferous epithelium at all stages of spermatogenesis. Testes treated with 250 mg/kg of 2-BP showed a tubular degeneration with depletion of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids. Vacuoles were present in the germinal epithelium. The testes of treated with 2-BP 500 mg/kg showed a significant decrease of seminiferous tubules size and an apparent increase in interstitial Leydig cells. Multinucleated giant cells derived from spermatids were observed in the seminiferous tubules. Even if

2-BP administration was stopped and the rat were allowed to recover from the testicular toxicity, the high dose treated rats did not show any significant recovery after 62 days. Rats treated with 250 mg/kg and 500 mg/kg of 2-BP resulted in the cellular damages characterized by a decreased number of spermatogonia, spermatocytes and spermatids at all stages. No immunopositive staining of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and cyclin D3 was observed in rats seminiferous tubules treated with 500 mg/kg of 2-BP. In conclusion, 2-BP affected the spermatogenesis and germ cell cycle of male Sprague-Dawley rats.

I. 서 론

1. 연구배경

최근 사회적으로 문제가 되었던 전자부품회사의 조립공정에서 사용된 2-bromopropane (2-BP)에 대한 그 동안의 연구결과에 의하면 2-BP가 여성근로자에서 악성빈혈을 동반한 무월경증, 남성근로자에서 정자감소증, 무정자증 등 생식독성의 원인물질임이 밝혀졌으나 (Kim *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1997; Maeng *et al.*, 1997; Ichihara *et al.*, 1997; Kamijima *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1997), 정소독성에 관한 연구자료 (Yu *et al.*, 1997, Ichihara *et al.*, 1997)는 매우 한정적이었으며, 특히 정소독성을 평가하는데 가장 중요한 요소 중에 하나인 정소의 정세포 생성과정과 생식세포 cycle에 미치는 영향에 관한 연구는 밝혀져 있지 않았다.

사람의 정소에 생식독성을 일으키는 화학물질에는 클로로에틸렌 (chloroethylene)과 같이 유전자에 영향을 미치는 물질과 내분비조절 메카니즘에 작용하여 정자생산을 감소시키는 레셀핀(reserpine), 디아제팜(diazepam) 등이 있으며, 정자생산을 항진시키는 성선분비자극제 등이 있다 (Drife, 1987). 직접 정자의 발생에 작용하는 물질로서 혈액정소간문에 장애를 일으키는 물질은 카드뮴과 납 등이 있고, 정상피에 영향을 주는 물질로는 DBCP가 있다 (Drife, 1987). 정자의 성숙에 장애를 주는 물질은 항안드로겐이 있으며, 정자의 운동에 장애를 주는 물질은 니코틴 (nicotine), 카페인 (caffeine) 등이 있고 (Drife, 1987), 조혈기능장애와 생식기능장애를 동시에 일으키는 것으로 알려진 물질은 납, 포름알데하이드 (formaldehyde), 벤젠, 디브로모클로로프로페인 (Dibromochloropropane, DBCP) 등이 있다 (Amdur *et al.*, 1991).

영양불량이나 비타민 A나 E의 결핍에 의해서도 정소는 영향을 받을 수 있다 (Manson and Mauer, 1975). 에스트로겐 (Estrogen)이나 황체형성호르몬 (luteinizing hormone)을 투여한 랫트에서 정소의 위축성변화를 볼 수

있고, 코발트를 투여한 랫트에서는 세르토리세포 (Sertoli cell)의 괴사가 나타난다 (Corrier *et al.*, 1985). 리히디히세포 (Leydig cell)의 증생은 에스트로겐을 투여한 랫트에서 볼 수 있다 (Rich *et al.*, 1979).

2. 연구방향 및 목적

정소는 호르몬을 생산하고, 호르몬의 표적 장기로서 왕성한 세포분열과 정자형성주기, 정소혈액간문 등의 특징이 있고 웅성생식기 가운데 가장 독성변화가 생기기 쉬운 장기이나, 정소를 구성하는 세포가 다양하며, 호르몬의 지배에 따른 변화를 파악하기 어렵고, 독성의 작용기전이 달라도 변화의 최종상이 유사하고, 조직변화보다 생식능력이 중요시되기 때문에 정소 독성에 관한 관심이 낮았다 (前川昭彦 과 林裕造, 1991).

본 연구에서는 수컷 랫트에 28일간 2-BP를 투여한 후 정소의 정자세포 내의 골지체로부터 만들어지는 acrosome이 파스-헤마톡시린 (PAS-Hematoxylin) 염색에 양성반응으로 보이고 정자형성단계 (spermatogenesis)별로 핵을 싸고 있는 각도가 다르게 나타나는 것을 활용하여 (高橋道人, 1994) 2-BP 노출량에 따라 정소의 정상피에서 14가지 스테이지 (stage)별로 구성되어 있는 정세포의 형성단계에 미치는 영향을 파악하여 정소의 변성정도를 평가하였다. 랫트에서는 1주기가 14 스테이지로 구분되며, 1주기에 12일이 소요되고 약 4주기만에 정자가 완성되어 정자의 형성과정에 소요되는 기간은 48일 정도이다. 그러나 이 때까지의 정자는 운동성이 없는 상태로서 정소상체에서 운동능을 갖게 되기까지에는 14일이 소요되어 완전한 정자로서의 기능을 갖기에는 62일 정도가 소요된다고 한다 (Jones *et al.*, 1987). 이러한 정소형성기간을 고려하여 정소의 회복능을 관찰하기 위하여 2-BP 투여를 중지한 후 62일이 경과한 다음에 정소에 대한 조직병리학적인 검사를 하였으며, 2-BP가 정소의 정세관 세포들의 세포분열주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포의 분열주기에 관계하는 단백질인 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)와 cyclin D3의 특이항체인 Anti-PCNA, Anti-cyclin D3를 이용하여 면역조직화화학적 염색을 하여 세포분열주기에 미치는 영향을 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

2-bromopropane는 일본의 Tokyo Chemical Industry에서 구입하였다 (Lot. FGA01). 2-BP의 순도는 GC-mass (Shimadzu, model GCMS-QP5000)를 이용하여 확인하였는데 순도가 99% 였으며, 저장보관에 의한 분해물은 발견되지 않았다. 그리고 2-BP는 올리브 기름 (Lot. 25613, Yakuri Pure Chemical Co., LTD, Osaka, Japan)에 섞어 랫트에 복강으로 주사하였다.

2. 실험동물

10주령의 특이병원균 (SPF; specific pathogen free)이 없는 환경에서 사육된 Sprague-Dawley(SD) 수컷 랫트를 대한실험동물센타에서 구입하였다. 실험동물은 실험 전에 2주간의 순화기간을 거쳐 사육환경에 적응하도록 하였다. 동물사육실의 온도는 20-26°C 정도였고, 상대습도는 40-60% 였다. 동물은 퓨리나 설치류 사료를 구입하여 정제수와 같이 부족함이 없이 공급하였다. 동물사육은 폴리카보네이트로 만들어진 케이지 당 3-4 마리씩 분리 사육하였다. 실험 개시 1주일 전에 체중을 측정하여 대조군 10마리, 저농도군 (125 mg/kg/day) 10마리, 중농도군 (250 mg/kg/day) 10마리, 고농도군 (500 mg/kg/day) 10마리 등으로 나누었다. 2-BP는 올리브기름 (olive oil)에 섞어 총 부피가 kg 당 1 ml 수준으로 하여 1일 1회 복강투여로 1주일에 6회, 4주 동안 투여하였다.

3. 관찰 및 검사항목

1) 부검 및 병리조직표본제작

동물의 복대동맥을 통하여 혈액을 채취한 후, 외관 및 내부 장기 이상유무를 상세히 관찰하였고, 정소를 10% 중성 포르마린용액에 고정한 후 파라핀 (paraffin)에 포매하고 헤마톡시린과 에오신 (Hematoxylin and eosin) 및 파스-헤마톡시린 (PAS-hematoxyline) 염색을 하였다.

2) 병리조직학적 검사

정소의 변성정도를 관찰하기 위하여 대조군, 125 mg/kg 투여군, 250 mg/kg 투여군, 500 mg/kg 투여군등 투여농도별로 각각 6 마리를 임의로 선정하여 정소 및 정소상체를 관찰하였으며, 1개의 정소당 스테이지 종류별로 1개씩 13개의 정세관을 임의로 선정하여 검사하였다. 검사방법은 대조군 및 2-BP 투여농도군 별로 6개의 정소를 임의로 선택하고 1개의 정소당 스테이지 종류별로 13개의 정세관(14 스테이지 중 2-3 스테이지는 같은 스테이지로 분류함)을 임의적으로 선정하고 한 개의 정세관 (seminiferous tubule)내의 전체 세르토리 세포수와 전체 배세포수와의 비율을 400배율의 광학현미경으로 관찰하여 1개의 정세관내의 세르토리 세포와 배세포의 평균을 구하고, 배세포의 수를 세르토리 세포의 수로 나누어 세르토리세포지수 (Sertoli cell indices, SCI)를 산출하고, 정세관내의 세포변화를 투여농도와 스테이지별로 312개 정세관 (24개 정소)의 변성정도를 비교하여 정조세포, 정모세포, 정자세포 등의 배세포의 변성정도를 평가하였다.

3) 면역조직학적 검사

2-BP가 정소의 정세관 세포들의 세포분열주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포의 분열주기에 관계하는 단백질인 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)와 cyclin D3의 특이항체인 Anti-PCNA, Anti-cyclin D3를 이용하여 면역조직화화학적 염색을 하여 관찰하였다.

4. 통계처리

세르토리세포지수 (Sertoli cell indices, SCI)의 통계처리는 Student ' s t-test로 분석하였다.

III. 결 과

1. Sertoli cell indices

대조군 및 2-BP 투여농도별로 6개의 정소를 임의로 선택하고 1개의 정소당 스테이지 종류별로 13개의 정세관을 임의적으로 선정하고 한 개의 정세관(seminiferous tubule)내의 전체 Sertoli cells수 와 전체 germ cells 수와의 비율을 400배율의 광학현미경으로 비교하여 SCI를 산출하여 312개 정세관 (24개 정소)의 변성정도를 비교 평가하여 본 결과는 Table 1와 같이 2-BP의 투여농도가 높을수록 유의성 있게 낮아졌다.

Table 1. Average numbers of Sertoli cells and germinal cells, and Sertoli cells indices (SCI) per tubule of rats treated with 2-bromopropane for 28 days.

	Sertoli cells	Germinal cells	S C I
No. of tubules	78	78	78
Control	17.6 ± 4.1	515.0 ± 117.4	30.4 ± 9.3
125 mg/kg	16.8 ± 3.5	418.9 ± 93.0	25.4 ± 5.4**
250 mg/kg	13.6 ± 2.7	281.2 ± 82.3	21.1 ± 6.0**
500 mg/kg	16.1 ± 2.7	189.0 ± 45.2	12.2 ± 4.3**

Values are mean ± SD. ** indicates $p < 0.01$ versus control.

SCI = The total number of the germinal cells / total number of Sertoli cells.

Total numbers of testes counted in each concentration = 6

Number of tubules in each testis = 13

대조군과 투여군의 정세관을 배세포의 구성이 같은 스테이지별로 분류하여 SCI를 산출한 결과는 Table 2에서와 같이 투여용량 의존적으로 SCI가 낮아졌으며, 500 mg/kg 투여군과 250 mg/kg 투여군에서는 전 스테이지에서 SCI 유의성이 나타나 스테이지 특이성을 찾을 수 없었으나, 125 mg/kg 투여군에서는 스테이지 VII-VIII에서만 SCI 유의성을 나타내어 스테이지 특이성을 보였다.

Table 2. Sertoli Cell Indices at different stages of seminiferous tubules.

	Control	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
No. of tubules	78	78	78	78
I-VI	30.8 ± 6.7	27.0 ± 5.3	22.3 ± 6.0**	10.1 ± 2.2**
VII-VIII	43.1 ± 13.5	28.5 ± 6.1**	27.8 ± 5.1**	15.9 ± 6.9**
IX-XI	25.8 ± 4.2	22.8 ± 4.8	18.1 ± 3.4**	12.8 ± 4.4**
XII-XIV	25.8 ± 4.3	23.2 ± 4.0	18.1 ± 4.6**	12.7 ± 2.4**

Values are mean ± SD.

** indicates $p < 0.01$ versus control.

$$\text{Sertoli Cell Index} = \frac{\text{number of germ cells}}{\text{number of sertoli cells}}$$

2. 투여농도별 배세포수의 변화

투여농도별 배세포수의 변화는 Table 3과 같이 2-BP의 투여농도가 높을수록 대조군에 대한 생존율이 낮아졌으나 elongate spermatids는 거의 변화가 없었다.

정세관내의 정조세포 (spermatogonia)는 125 mg/kg 투여군에서는 평균 75.3%, 250 mg/kg 투여군에서는 평균 34.0%, 500 mg/kg 투여군에서는 평균 21.2%로 대조군에 비하여 감소하였다.

정세관내의 정모세포 (spermatocyte) 중 pachytene은 대조군에 대하여 125 mg/kg 투여군에서는 평균 76.3%, 250 mg/kg 투여군에서는 평균 32.0%로 감소하였으며, 500 mg/kg 투여군에서는 평균 0.3%로 현저한 감소를 보였으며, 500 mg/kg 투여군의 leptotene spermatocyte (L)는 평균 6.0%, diplotene spermatocyte (D)는 평균 0.5%로 현저히 감소하였으며, preleptotene spermatocyte (PL)와 zygotene spermatocyte (Z)는 500 mg/kg 투여군의 거의 모든 정세관에서 찾아볼 수가 없었다.

정세관내의 round spermatids는 대조군에 대하여 125 mg/kg 투여군에서는 평균 79.4%, 250 mg/kg 투여군에서는 평균 52.9%, 500 mg/kg 투여군에서는 평균 10.6%로 감소하였다 (Table 3).

Table 3. Percentages of germ cells in the seminiferous tubules.

	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg
No. of tubules	78	78	78
	%	%	%
G	75.3 $\pm$ 19.1	34.0 $\pm$ 16.2	21.2 $\pm$ 10.8
P	76.3 $\pm$ 9.5	32.0 $\pm$ 7.2	0.3 $\pm$ 0.5
PL	66.5 $\pm$ 12.0	20.5 $\pm$ 7.8	0
L	73.7 $\pm$ 6.0	30.7 $\pm$ 5.0	6.0 $\pm$ 4.4
Z	80.5 $\pm$ 19.1	25.0 $\pm$ 1.4	0
D	97.0 $\pm$ 21.2	34.5 $\pm$ 17.7	0.5 $\pm$ 0.7
R	79.4 $\pm$ 3.2	52.9 $\pm$ 18.0	10.6 $\pm$ 18.1
E	85.8 $\pm$ 13.4	79.9 $\pm$ 18.2	83.2 $\pm$ 23.9

Values are mean $\pm$ SD.

Data are expressed as % of mean control value.

spermatogonia (G), pachytene spermatocyte (P), preleptotene spermatocyte (PL), leptotene spermatocyte (L), zygotene spermatocyte (Z), diplotene spermatocyte (D), round spermatid (R), elongate spermatid (E).

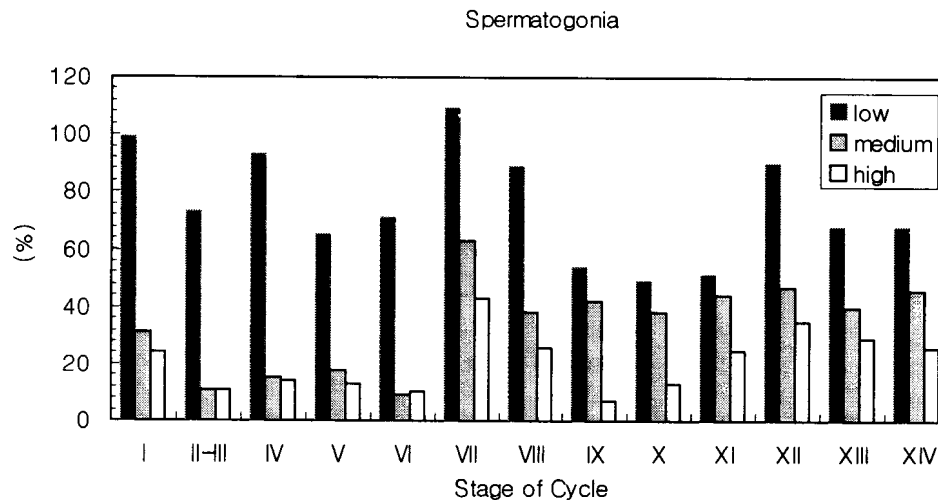
3. 스테이지별 배세포수의 변화

Figure 1에서 보는바와 같이 125 mg/kg 투여군의 정조세포 (spermatogonia)의 대조군에 대한 생존율은 IX, X, XI 스테이지에서는 60% 이하로 떨어졌으나 다른 스테이지에서는 60% 이상이었다.

250 mg/kg 투여군의 정조세포 (spermatogonia)의 대조군에 대한 생존율은 I-VI 스테이지에서는 40% 이하로 떨어졌으나 다른 스테이지에서는 40% 이상이었다.

500 mg/kg 투여군의 정조세포 (spermatogonia)의 대조군에 대한 생존율은 모든 스테이지에서 50% 이하로 떨어졌다.

Figure 1. Percentages of spermatogonia in I-XIV stages of seminiferous tubles.



Data are expressed as % of mean control value.

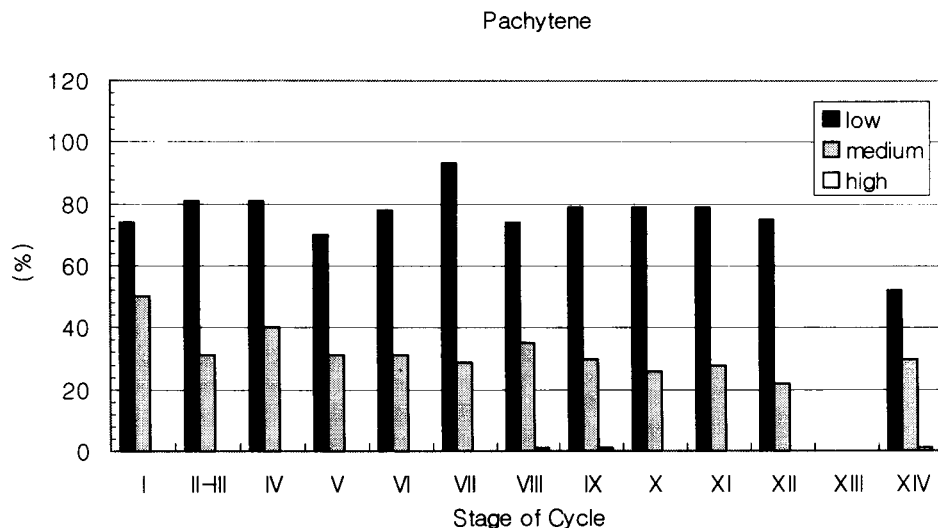
Low=125 mg/kg, Medium=250 mg/kg, High=500 mg/kg

Figure 2에서 보는바와 같이 125 mg/kg 투여군의 pachytene spermatocytes는 대조군에 대한 생존율이 XIV 스테이지에서는 60% 이하로 떨어졌으나 다른 스테이지에서는 70% 이상이었다.

250 mg/kg 투여군의 pachytene spermatocytes는 대조군에 대한 생존율이 스테이지 I 은 40% 이상이였으나 다른 모든 스테이지에서는 40% 이하였다.

500 mg/kg 투여군의 pachytene spermatocytes는 전 스테이지에서 찾아보기 어려웠다.

Figure 2. Percentages of pachytene spermatocytes in I-XIV stages of seminiferous tubles.



Data are expressed as % of mean control value.

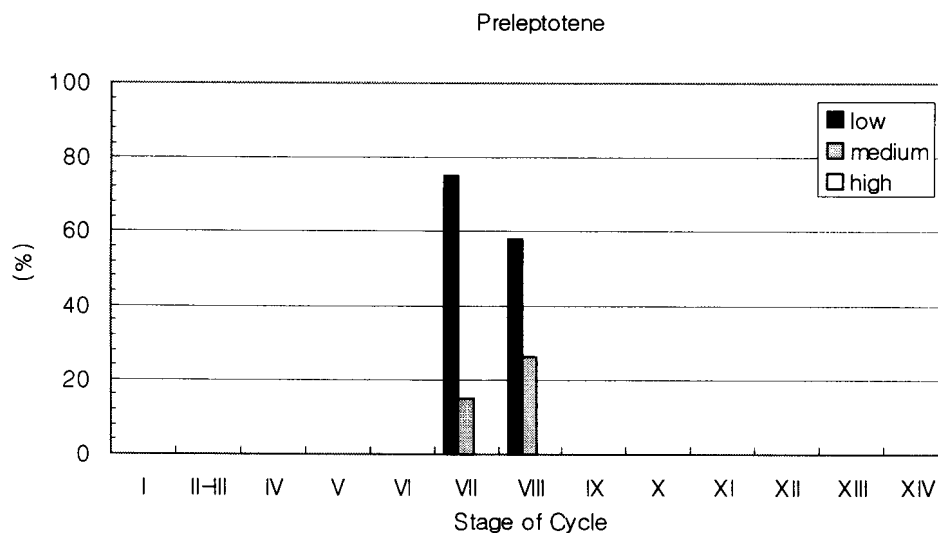
Low=125 mg/kg, Medium=250 mg/kg, High=500 mg/kg

Figure 3에서 보는바와 같이 125 mg/kg 투여군의 preleptotene spermatocytes는 대조군에 대한 생존율이 VII 스테이지에서는 60% 이상이었으며 VIII 스테이지에서는 60% 이하였다.

250 mg/kg 투여군의 preleptotene spermatocytes는 대조군에 대한 생존율이 모든 스테이지에서 40% 이하였다.

500 mg/kg 투여군의 preleptotene spermatocytes는 전 스테이지에서 찾아보기 어려웠다.

Figure 3. Percentages of preleptotene spermatocytes in I-XIV stages of seminiferous tubles.



Data are expressed as % of mean control value.

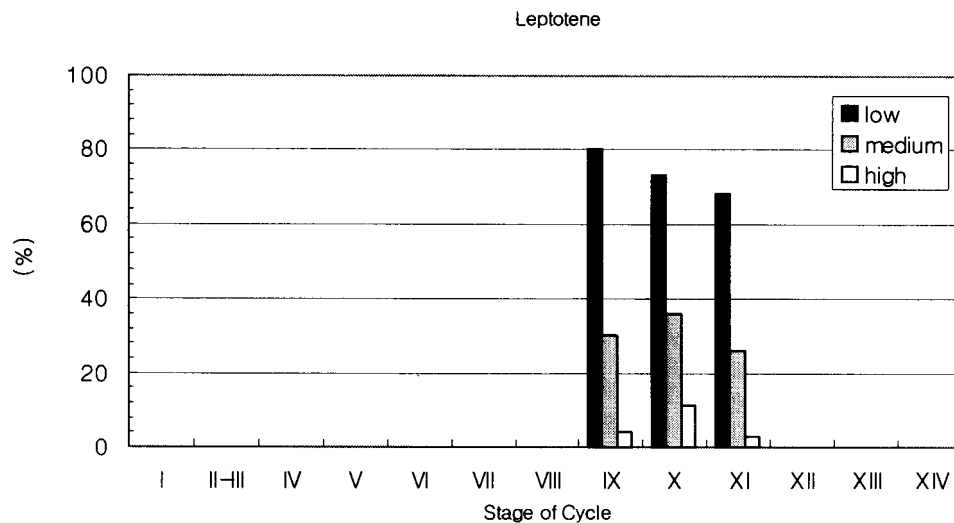
Low=125 mg/kg, Medium=250 mg/kg, High=500 mg/kg

Figure 4에서 보는바와 같이 125 mg/kg 투여군의 leptotene spermatocytes는 대조군에 대한 생존율은 IX, X, XI 스테이지에서 모두 60% 이상이었다.

250 mg/kg 투여군의 leptotene spermatocytes는 대조군에 대한 생존율이 모든 스테이지에서 40% 이하였다.

500 mg/kg 투여군의 leptotene spermatocytes는 모든 스테이지에서 20% 이하의 생존율을 보였다.

Figure 4. Percentages of leptotene spermatocytes in I-XIV stages of seminiferous tubles.



Data are expressed as % of mean control value.

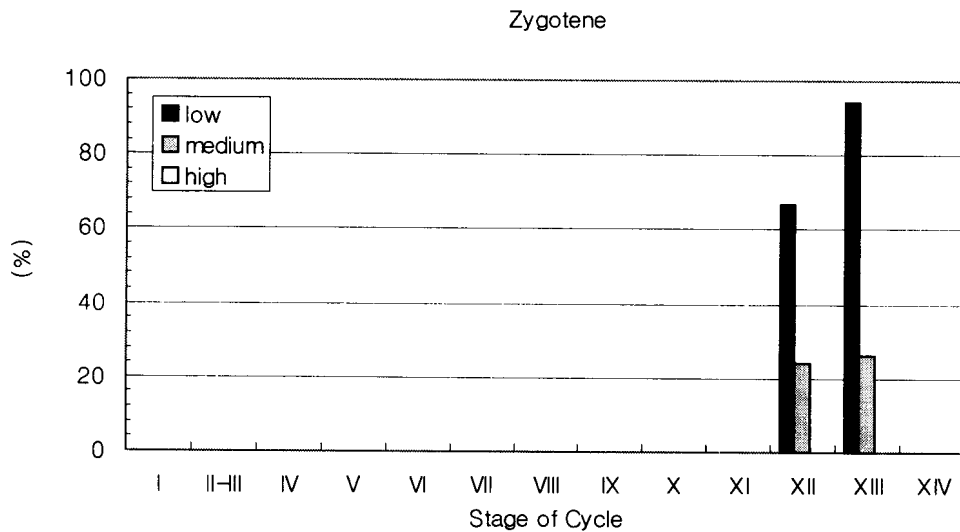
Low=125 mg/kg, Medium=250 mg/kg, High=500 mg/kg

Figure 5에서 보는바와 같이 125 mg/kg 투여군의 zygotene spermatocytes의 대조군에 대한 생존율은 XIII 스테이지에서 80% 이상이었으나 XII 스테이지에서는 70% 이하였다.

250 mg/kg 투여군의 zygotene spermatocytes의 대조군에 대한 생존율은 모든 스테이지에서 40% 이하였다.

500 mg/kg 투여군의 zygotene spermatocytes는 모든 스테이지에서 거의 찾을 수가 없었다.

Figure 5. Percentages of zygotene spermatocytes in I-XIV stages of seminiferous tubles.



Data are expressed as % of mean control value.

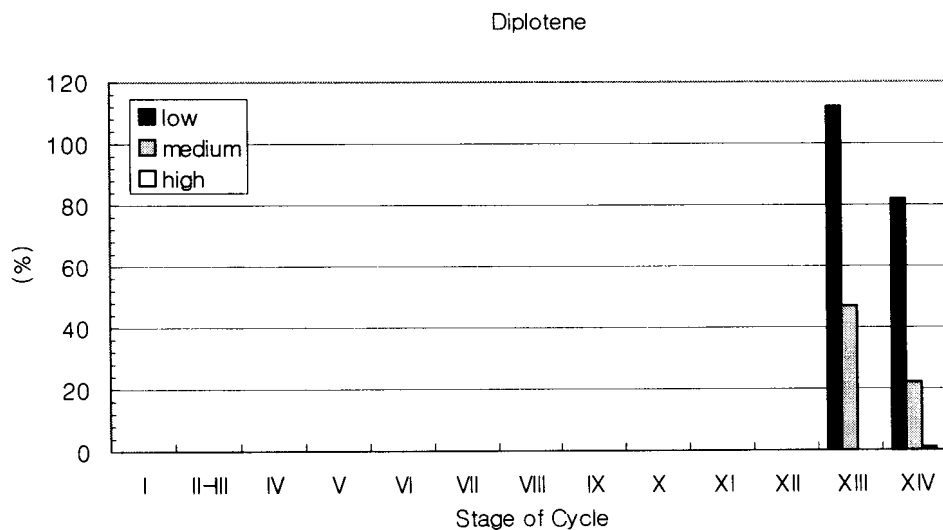
Low=125 mg/kg, Medium=250 mg/kg, High=500 mg/kg

Figure 6에서 보는바와 같이 125 mg/kg 투여군의 diplotene spermatocytes의 대조군에 대한 생존율은 XIII, XIV 스테이지에서 80% 이상이었다.

250 mg/kg 투여군의 diplotene spermatocytes의 대조군에 대한 생존율은 모든 스테이지에서 60% 이하였다.

500 mg/kg 투여군의 diplotene spermatocytes는 모든 스테이지에서 거의 찾을 수가 없었다.

Figure 6. Percentages of diplotene spermatocytes in I-XIV stages of seminiferous tubles.



Data are expressed as % of mean control value.

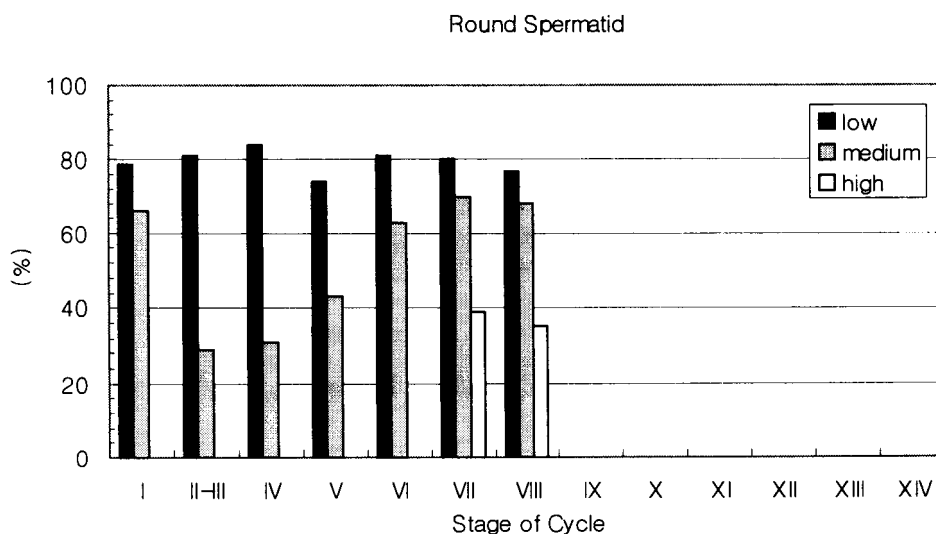
Low=125 mg/kg, Medium=250 mg/kg, High=500 mg/kg

Figure 7에서 보는바와 같이 125 mg/kg 투여군의 round spermatids의 대조군에 대한 생존율은 I-VII 스테이지에서 모두 70% 이상이였다.

250 mg/kg 투여군의 round spermatids의 대조군에 대한 생존율은 I, VI, VII, VIII 스테이지에서는 60% 이상이였으나 II-V 스테이지에서는 50% 이하의 생존율을 보였다.

500 mg/kg 투여군의 round spermatids는 VII, VIII 스테이지에서는 30% 이상의 생존율을 보였으나 I-V 스테이지에서는 거의 찾을 수가 없었다.

Figure 7. Percentages of round spermatids in I-XIV stages of seminiferous tubes.



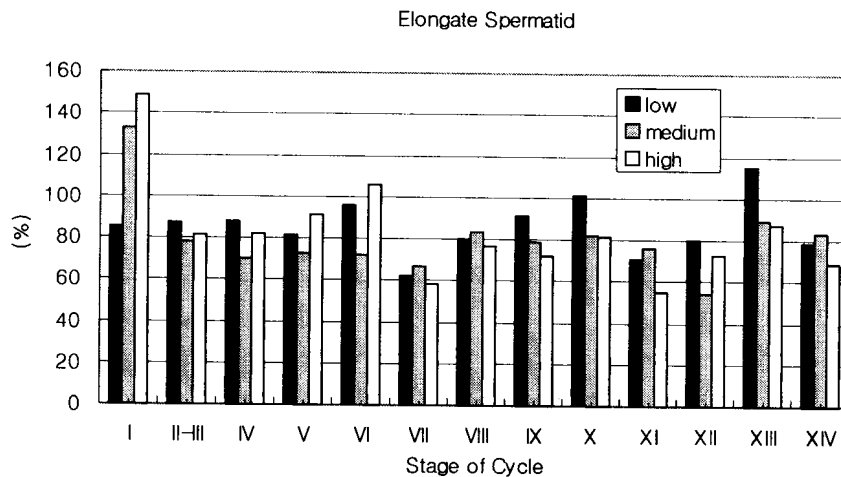
Data are expressed as % of mean control value.

Low=125 mg/kg, Medium=250 mg/kg, High=500 mg/kg

Figure 8에서 보는바와 같이 125 mg/kg 투여군의 elongate spermatids의 대조군에 대한 생존율은 전 스테이지에서 60% 이상이었다.

250 mg/kg 투여군과 500 mg/kg 투여군의 elongate spermatids는 전 스테이지에서 50% 이상을 나타내었다.

Figure 8. Percentages of elongate spermatids in I-XIV stages of seminiferous tubles.



Data are expressed as % of mean control value.

Low=125mg/kg, Medium=250mg/kg, High=500mg/kg

3. 조직병리

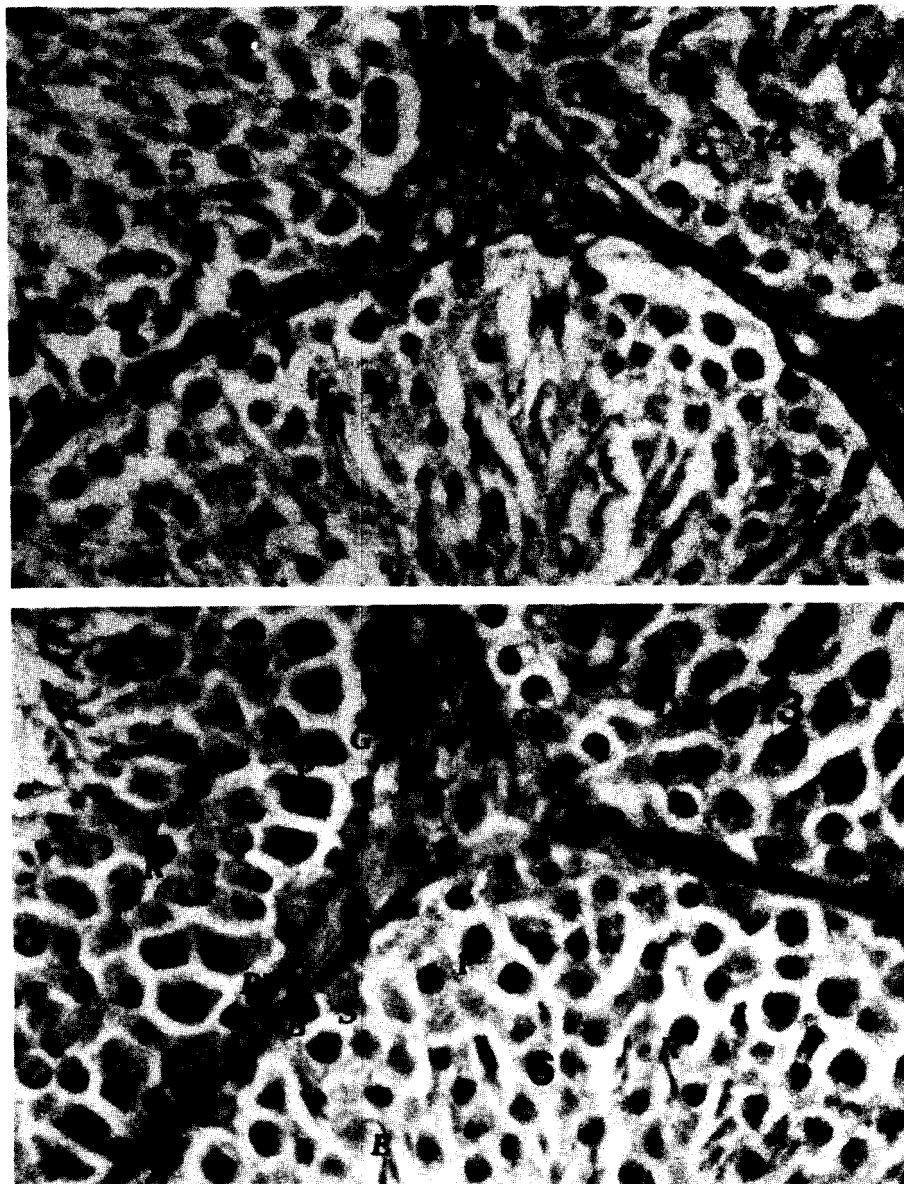
대조군 (Figures 9)에 비하여 125mg/kg 투여군에서는 배세포의 변성 (degeneration)과 소실 (disappearance)이 일어나기 시작하였다 (Figure 10). 250 mg/kg 투여군의 정소에서는 뚜렷한 정세관 (seminiferous tubule)의 변성과 비틀린 기저막이 나타나기 시작하였고, 배상피내에서는 세르토리 세포의 변성을 볼 수 있었으며, 배세포의 변성과 소실이 뚜렷히 나타났다 (Figures 11, 12, 13). 500 mg/kg 투여군의 정소에서는 뚜렷한 정세관의 변성과 비틀린 기저막이 심하게 나타났으며, 배상피내에서는 세르토리 세포의 변성을 볼 수 있었으며, 배세포의 변성과 소실이 뚜렷히 나타났으며, 공포 (vacuoles)와 다핵거대세포 (multinucleated giant cell)가 나타났다. 간질조직 (interstitial tissue)에서는 리이디히 세포 (Leydig cell)의 증생 (hyperplasia)이 관찰되었다 (Figures 14, 15, 16).

2-BP 투여를 중지하고 62일 후 고농도군의 정소에 대한 조직병리학적인 검사를 하였으나, 정소의 정세관은 전혀 회복되지 않고 직경이 현저히 줄었으며, 정세관내에는 독성에 강한 세르토리 세포 만 남아있고, 정조세포 (spermatogonia), 정모세포 (spermatocytes), 정자세포 (spermatids) 등 배세포는 완전히 소실되었다. 간질조직에서는 리이디히 세포의 증생을 볼 수 있었다 (Figure 17).

4. 면역조직화학적 검사

28일 동안 2-BP를 500 mg/kg 투여한 군의 정소에 Cyclin D3와 PCNA의 특이항체를 이용하여 면역조직화화학적 염색을 하여 관찰한 결과, Anti-PCNA를 이용한 대조군의 정소의 정세관에서는 spermatogonia와 초기 spermatocyte에 주로 염색되었으나, 2-BP를 500 mg/kg 으로 처리한 랫트의 정소의 정세관에서는 대부분의 spermatogonia가 괴사되어 염색되는 세포가 현저히 감소하였으며 (Figure 18), Anti-cyclin D3를 이용한 대조군의 정소의 정세관에서는 spermatocyte와 round spermatid에 주로 염색이 되었고, 2-BP를 500 mg/kg 으로 처리한 랫트의 정소의 정세관에서는 대부분의 spermatocyte와 round spermatid가 괴사하여 염색되는 세포가 현저히 감소하였다 (Figure 19).

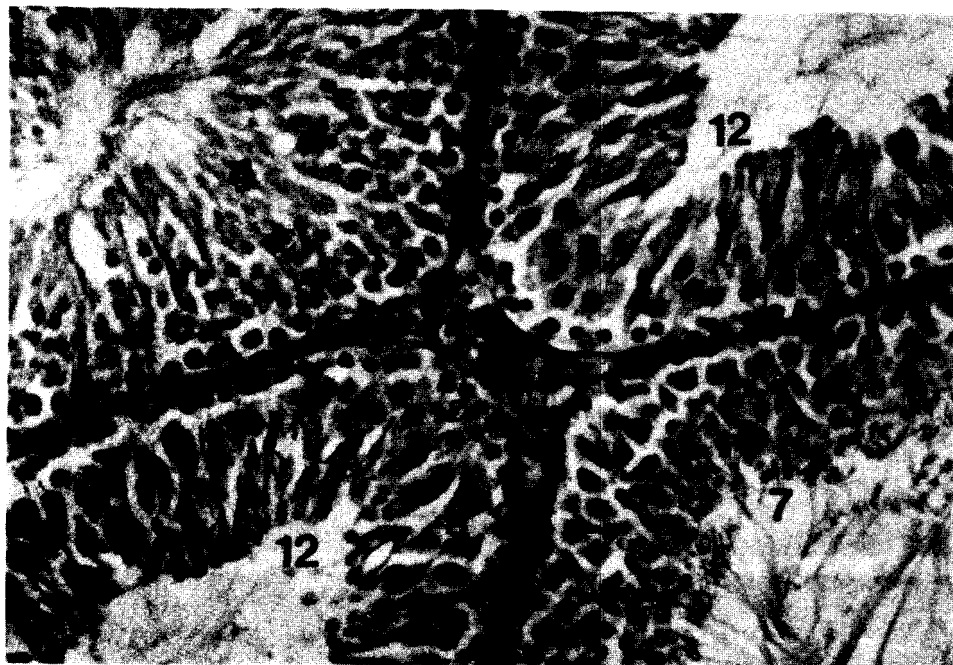
Figure 9. (C) Normal cellular associations of seminiferous epithelium at stage 1, 5, 6, 8, 13, 14 of spermatogenesis.



spermatogonia (G,A,B), preleptotene (PL), leptotene (L), zygotene (Z) pachytene (P), diplotene (DI) round spermatid (R), elongate spermatid (E).

x 400. PAS & Hematoxylin.

Figure 10. (L) Histopathology of Testes treated with 125 mg/kg of 2-bromopropane for 28 days.



Cellular associations of seminiferous epithelium at 4, 7, 12 stage of spermatogenesis.

Testes treated with 125 mg/kg of 2-BP showed some decreased cellular associations of seminiferous epithelium at all stage of spermatogenesis.

spermatogonia (G,A,B), preleptotene (PL), leptotene (L), zygotene (Z) pachytene (P), diplotene (DI) round spermatid (R), elongate spermatid (E).

x 100. PAS & Hematoxylin.

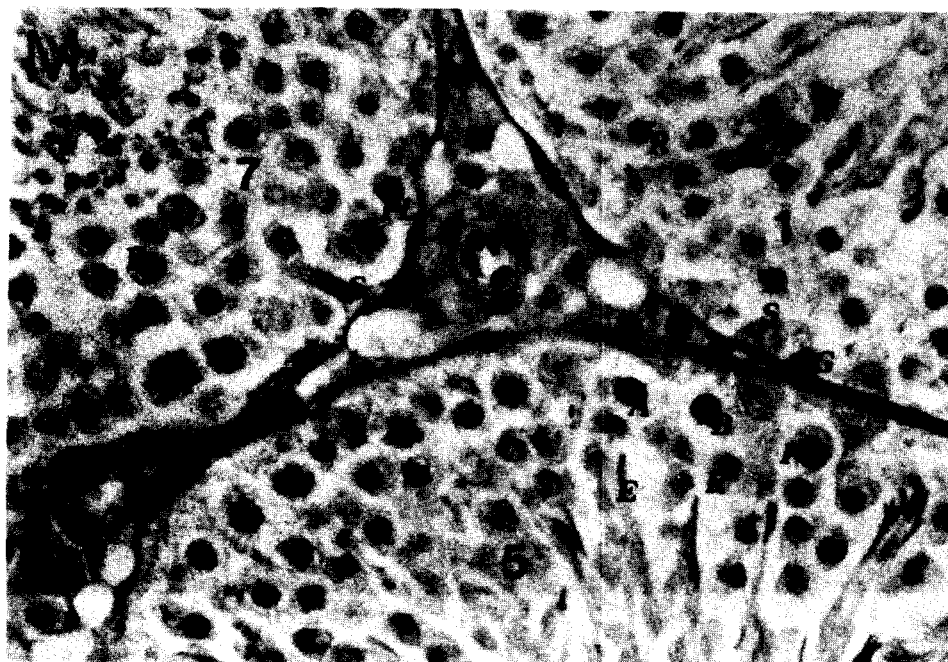
Figure 11. (M) Histopathology of Testes treated with 250 mg/kg of 2-bromopropane for 28 days.



Stage 5 seminiferous tubule showed cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia (G), pachytene spermatocytes (P), and round spermatids (R). Vacuoles (V) are present in germinal epithelium.

x 200. PAS & Hematoxylin.

Figure 12. (M) Abnormal cellular associations of seminiferous epithelium at stage 1, 5, 7 treated with 2-bromopropane 250 mg/kg for 28 days.



Stage 1, 5 seminiferous tubules with cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia (A,B), pachytene spermatocyte (P), step 5 round spermatid (R), and step 17 elongate spermatid (E).

Stage 7 seminiferous tubule with cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia (G), preleptotene (PL), pachytene (P) spermatocytes, step 7 round spermatids (R), and step 19 elongate spermatids (E).
x 400. PAS & Hematoxylin.

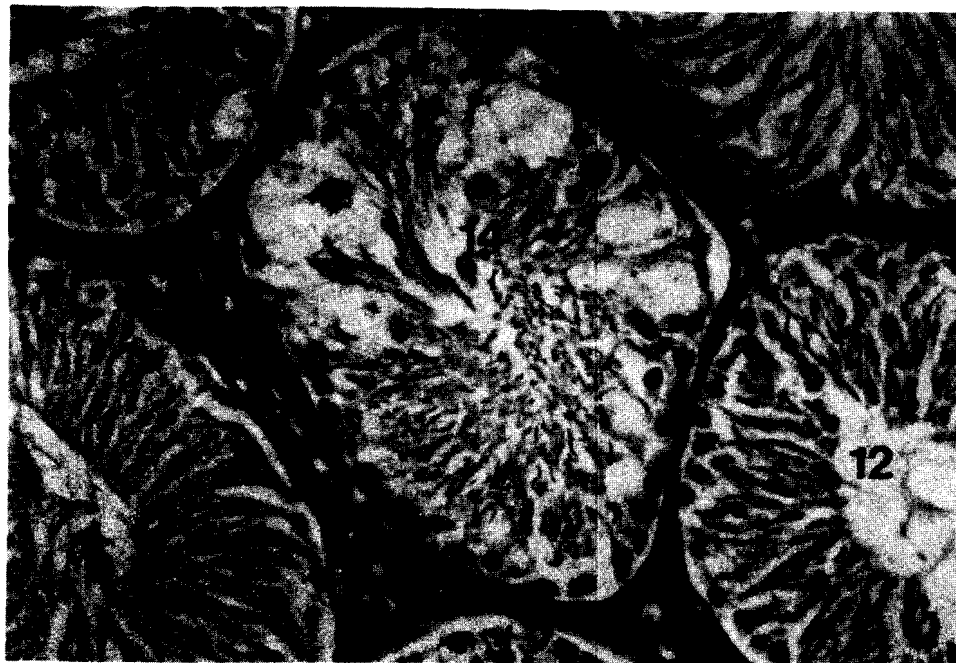
Figure 13. (M) Abnormal cellular associations of seminiferous epithelium at stage 10, 12 treated with 2-bromopropane 250 mg/kg for 28 days.



Stage 10 seminiferous tubule with cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia (G), leptotene (PL), pachytene (P) spermatocytes, and step 10 elongate spermatid (E).

Stage 12 seminiferous tubule showed cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia (G), zygotene (Z), pachytene (P) spermatocytes, and step 12 elongate spermatid (E). x 400. PAS & Hematoxylin.

Figure 14. (H) Histopathology of Testes treated with 500 mg/kg of 2-bromopropane for 28 days.



Typical patch appearance of severely depleted atrophic tubules. Apparent increases in interstitial Leydig cells can be seen. Multinucleated giant cells (arrow) derived from spermatids are present.

Stage 14 seminiferous tubule with disappearance of spermatogonia (G), zygotene spermatocyte (Z), pachytene spermatocyte (P), and diplotene spermatocyte (DI) were observed. x 100. PAS & Hematoxylin.

Figure 15. (H) Abnormal cellular associations of seminiferous epithelium at stage 1, 8 treated with 2-bromopropane 500 mg/kg for 28 days.



Stage 1 seminiferous tubule with cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia(A, B), step 1 round spermatids (R), and step 15 elongate spermatids (E).

Pachytene spermatocytes (P) and step 1 round spermatids (R) were disappeared.

Stage 8 seminiferous tubule with cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia (G), step 8 round spermatids (R), and step 19 elongate spermatids (E). Preleptotene (PL) and pachytene (P) spermatocytes were disappeared. Stage 8 seminiferous tubule with a tortuous basement membrane (arrow) and vacuoles (V) were present in germinal epithelium. x 400. PAS & Hematoxylin.

Figure 16. (H) Abnormal cellular associations of seminiferous epithelium at stage 10, 12 treated with 2-bromopropane 500 mg/kg for 28 days.



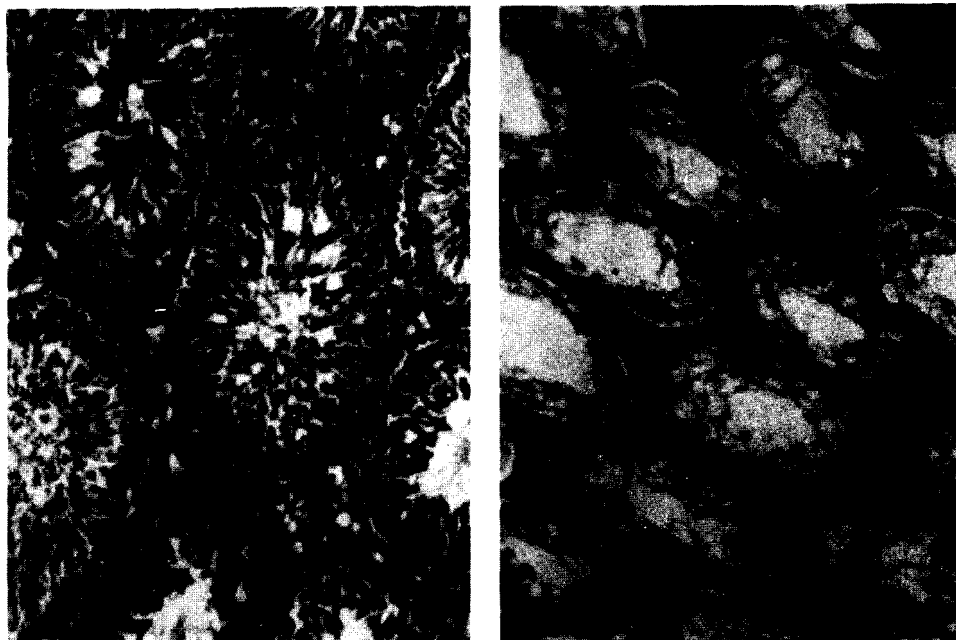
Stage 10 seminiferous tubules with cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia (G), leptotene (PL), pachytene (P) spermatocytes, and step 10 elongate spermatid (E).

Leptotene (PL), pachytene (P) spermatocytes disappeared.

Stage 12 seminiferous tubules with cytoplasmic rarefaction of the Sertoli cells and tubular degeneration with depletion of spermatogonia (G), and step 12 elongate spermatid (E). Zygotene (Z), pachytene (P) spermatocytes were disappeared.

x 400. PAS & Hematoxylin.

Figure 17. The testes of rats initially treated with 2-BP 500 mg/kg for 28 days and allowed to recover for 2 months.



C. Control. x 100. H&E.

H. Rats treated with 500 mg/kg/day for 28 days showed testes cellular shrinkage. Even if stopping of 2-bromopropane administration for 2 months, spermatogenesis of testis was not recovered.

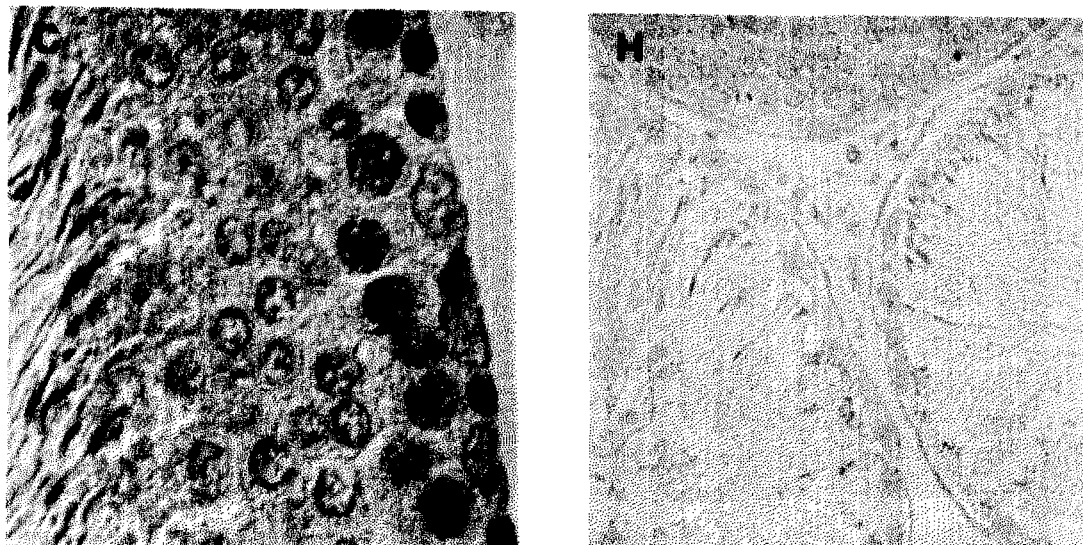
Atrophy, the most severe form of seminiferous tubular degeneration, refers to total absence of germinal epithelium and irreversible.

Only Sertoli cells were present within these tubules.

The diameter of involved tubules was markedly decreased.

Interstitial tissue was usually increased. Leydig cell hyperplasia was present.
x 100. H&E.

Figure 18. Seminiferous tubules immunostained with PCNA (proliferating cell nuclear antigen) antibody.



PCNA appeared as intense reddish-brown punctated stains.

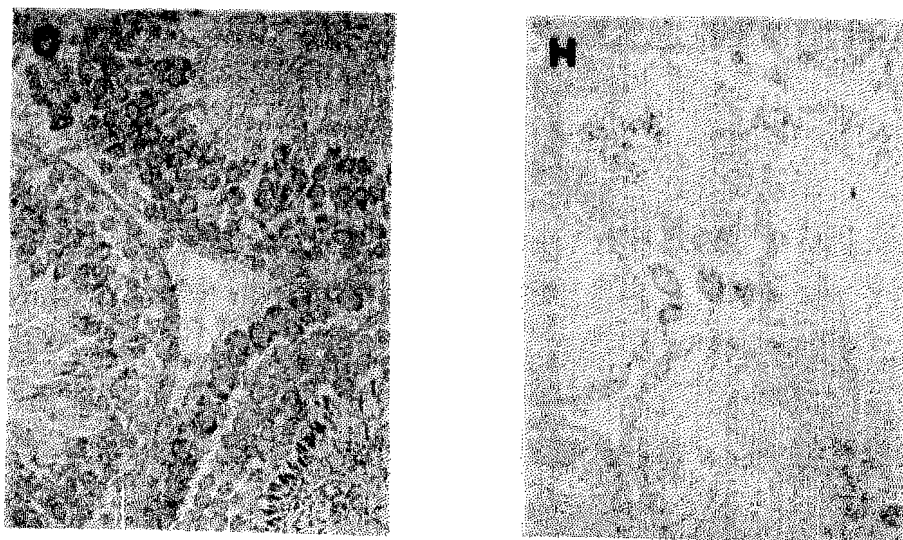
C = control. x 1,000.

PCNA was abundant only in the nuclei of spermatogonia and early stage primary spermatocytes regardless of seminiferous tubule stage.

H = Male rat seminiferous tubules treated with 500mg/kg of 2-bromopropane for 28 days. x 200.

No immunopositive staining of PCNA was observed in seminiferous tubules.

Figure 19. Immunolocation of cyclin D3 within the male rat seminiferous tubules.



Cyclin D3 appeared as intense reddish-brown punctated stains.

C = control. x 200.

Strong cyclin D3 immunopositive staining was located mainly in the cytoplasm of luminal spermatocytes but undetected in spermatogonis cells and Sertoli cells.

H = Male rat seminiferous tubules treated with 500mg/kg of 2-bromopropane for 28 days. x 200.

There was no immunopositive cyclin D3 in seminiferous tubules.

IV. 고 찰

정소에 변성을 이끄는 요인은 온도, 빛, 호르몬, 영양요소, 각종 유해물질 등 여러 가지가 있으며 (Irby *et al.*, 1984; Enomoto & Akazaki, 1987; Jones *et al.*, 1987; Behne *et al.*, 1983, 1996), 웅성의 생식기 변성은 가령과 종 그리고 계통의 차이에 따라 다를 수 있고 (Gary *et al.*, 1990), 정소가 선천적으로 병소를 나타내는 경우는 매우 드물다 (Boorman *et al.*, 1990). 본 연구에서도 대조군의 정소에서 특별한 증상을 관찰할 수는 없었다.

체중의 변화에 따른 정소독성의 해석 방법은 前川昭彦과 林裕造 (1991)에 의하면 체중억제가 심한 경우에는 부생식기도 위축성 변화가 일어날 수 있고, 영양장애와 그에 따른 대사장애를 생각할 수 있다고 하였으며 이러한 경우 직접적인 정소독성이 나타날 수 있지만, 체중억제의 결과로 2차적으로 발현한 것과 구별할 필요가 있다고 하였으며, 아연이나 비타민 결핍이 일어난 실험동물에서 볼 수 있는 바와 같이 정소의 위축 (Mason, 1975)은 정소의 크기가 육안적으로 거의 50% 정도로 줄어들고 간질조직이 증가되는데 (Jones *et al.*, 1987), 본 연구에서도 500 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 정소의 크기가 절반정도로 줄었으며 뚜렷한 정소의 위축이 관찰되었다.

랫트의 정소에서 가장 많이 볼 수 있는 병변은 정세관내의 배세포의 소실과 변성이며 (Aulikki, 1975; Wright *et al.*, 1982; Chapin *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 1987), 정소의 변성은 변성 정도에 따라서 8단계로 나누어 볼 수 있는데, 1-4단계는 대부분의 정상피 (germinal epithelium)와 지지세포 (Sertoli cell)가 살아 있어서 회복이 가능한 일시적인 변성이고, 5-8단계는 대부분의 배세포 (germinal element)가 사라져서 회복이 불가능한 단계이다 (Jones *et al.*, 1987).

2-BP를 125 mg/kg 투여한 군에서는 배세포의 변성과 소실이 일어나기 시작하였다. 250 mg/kg 투여군의 정소에서는 뚜렷한 정세관의 변성과 비

틀린 기저막이 나타나기 시작하였으며, 배상피내에서는 세르토리 세포의 변성과 배세포의 변성이 뚜렷히 나타났으며, 정자의 울체를 볼 수 있었다. 500 mg/kg 투여군의 정소에서는 뚜렷한 정세관의 변성과 비틀린 기저막이 나타났으며, 배상피내에서는 세르토리 세포의 변성을 볼 수 있었고, 공포와 다핵거대세포가 나타나고 대부분의 배세포가 사라져서 회복이 불가능한 상태를 보여주고 있었다.

정세관의 정상피에 있는 배세포, 세르토리 세포와 간질의 리이디히 세포는 테스토스테론 (testosterone), FSH, LH, 등의 호르몬의 영향으로 정세관 경과 정상피세포수의 감소와 위축이 발현될 수 있으며, 화학물질의 직접적인 작용에 의해서도 정상피가 위축될 수 있는데 (Wand and Colin, 1991; Nagano *et al.*, 1984; Foster *et al.*, 1983; Rich *et al.*, 1979) 호르몬의 불균형에 의한 리이디히 세포의 증생은 정세관 사이의 응집 (collections)이 특징적이며, 공포 (vacuolated cytoplasm)나 호산성 과립 (eosinophilic cytoplasm)이 나타날 수 있다 (Kirkman 1972, 1982; Ito *et al.*, 1972; Jones *et al.*, 1987; Gary *et al.*, 1990). 본 연구에서도 2-BP 투여군은 농도의존적으로 배세포가 줄었으며 (Table 3), 2-BP를 500 mg/kg 투여한 랫트에서는 리이디히 세포의 증생을 관찰할 수 있었다 (Figure 17). 이러한 결과로 미루어 2-BP는 황체형성호르몬 (luteinizing hormone)에 의하여 자극되는 간질세포 (Bloom and Fawcett, 1986)와 배세포에 전반적으로 영향을 미침을 알 수 있다. 코발트를 투여한 랫트에서 세르토리 세포의 장애로 생기는 정세포의 위축이 보이지만 (Corrier *et al.*, 1985), 본 연구에서는 세르토리 세포의 변성은 나타났으나 2-BP 투여농도에 비례하여 영향을 받지 않았다 (Table 1).

2-BP투여군에서 발견되는 정세관의 세포찌꺼기 (debris)와 다핵거대세포는 변성 초기에 볼 수 있으며 (Morton *et al.*, 1986 a,b; Jones *et al.*, 1987), 다핵거대세포는 인접한 세포의 세포질결합에 의하여 생기며, 유사분열 (mitotic activity)은 보이지 않는다 (Cohen *et al.*, 1969).

정자형성이 중지될 때는 세포의 분열이 저하되어 성숙세포는 찾아볼 수 없고 미성숙한 형태의 세포만 볼 수 있게 되는데 이런 현상은 초기 아

연 결핍이나 그리고 영양실조 등에서 찾아 볼 수 있지만 (Manson *et al.*, 1982), 2-BP를 투여한 군에서 이러한 증례는 보이지 않았다.

정소경색 (testicular infarction)에 의한 만성적인 정소변성은 정소위축의 마지막 단계와 유사한 형태를 보여주는데, 이러한 유형은 정소 모세혈관의 상피세포에 손상을 입히는 카드뮴 독성에 의한 정소에서 관찰되지만 자연적으로 발생하는 경우는 거의 없다 (Jones *et al.*, 1987). 2-BP를 투여한 군에서도 이러한 예는 보이지 않았다.

정소의 변성을 평가하는 방법으로는 비정상적인 정세관의 수를 측정하는 법, 세르토리 세포와 배세포의 비율을 비교하는 법 등 여러가지 평가방법이 있으며 (Kumi-Diaka and Dennis, 1978; Carroll and Ball 1970), 일반적으로 정소의 정상피는 정자세포, 정모세포, 정조세포 그리고 세르토리 세포 순서로 변성이 일어나지만, 화학물질에 따라서는 배세포 (germinal element)의 세포특이성이나 스테이지 특이성이 있는 경우도 있다 (Teresa *et al.*, 1992; Federica *et al.*, 1989; Mebus *et al.*, 1989; Foster *et al.*, 1983).

정상적인 랫트의 경우에는 XIV, XIII, I, XII 스테이지 등에서 배세포의 변성이 많이 일어나고 II-VI 스테이지에서는 변성이 거의 일어나지 않는다고 하였는데 (Kerr, 1992) 본 연구에서는 대조군과 투여군의 정세관 312개를 투여농도와 생식세포의 구성이 같은 스테이지별로 분류하여 SCI를 산출한 결과는 투여용량 의존적으로 SCI가 낮아졌고 (Table 1), 125mg/kg 투여군의 스테이지 VII-VIII에서는 다른 스테이지에 비하여 SCI가 유의한 변화를 나타냈다.

2-BP 투여군에 대하여 투여농도와 스테이지별로 배세포의 수를 살펴보면 2-BP투여농도 의존적으로 대조군에 대한 배세포의 생존율이 낮아졌으나, 전 투여군에서 elongate spermatids는 변화율이 가장 적었다. 500 mg/kg을 투여한 군에서는 I-VI 스테이지의 round spermatids가 대부분 소실되었으나, VII-VIII 스테이지에서는 round spermatids가 많이 남아 있었고 (Figure 7), pachytene, preleptotene, leptotene, zygotene, diplotene 등의 spermatocytes는 전 스테이지에서 거의 관찰할 수 없었으나 (Figures

2, 3, 4, 5, 6), spermatogonia는 II-VI 스테이지와 IX-X 스테이지에서 대조군의 20% 이하로 줄었다 (Figure 1). Elongate spermatids는 전 스테이지에서 비슷한 분포를 보였다 (Figure 8). 2-BP를 125 mg/kg 투여한 군과 250 mg/kg 투여한 군은 투여농도 의존적으로 배세포의 감소 비율이 대조군과 비슷한 양상을 보였다 (Figures 1-8).

2-BP 투여를 중지하고 2개월 후 정소 회복 가능성을 판단하기 위하여 위성군으로 남겨 두었던 500 mg/kg 투여군의 정소에 대한 조직병리화학적 검사를 하였으나, 정소의 정세관은 전혀 회복되지 않고 정세관의 직경이 현저히 줄었으며, 정세관내에는 독성에 강한 세르토리 세포만 남아있고, 배세포는 완전히 소실되었으며, 간질조직에서는 리디히 세포의 증생을 볼 수 있었다 (Figure 17). 정소는 비타민 E 결핍의 경우에서 처럼 충분한 양의 비타민 E를 재공급하여도 정소가 회복되지 않는 경우도 있지만, 비타민 A 결핍이나 망간 결핍에서 볼 수 있는 것처럼 정소의 크기가 50% 정도 줄어든 경우에도 충분한 양을 재공급하면 정소는 정상적으로 회복하는 경우도 있다 (Manson and Mauer, 1975).

세포의 분열주기에 관계하는 단백질인 Cyclin D3는 감수분열(meiosis)이 일어나는 spermatocyte와 round spermatid에 영향을 미치고, PCNA는 유사분열(mitosis)이 일어나는 spermatogonia와 초기 spermatocyte에 영향을 미치지만 (Kang *et al.*, 1997), 28일 동안 2-BP를 500 mg/kg 투여한 군의 정소에 Cyclin D3와 PCNA의 특이항체를 이용하여 면역조직화화학적 염색을 하여 관찰한 결과, Anti-PCNA를 이용한 대조군의 정소의 정세관에서는 spermatogonia와 초기 spermatocyte에 주로 염색되었으나, 2-BP를 500 mg/kg 으로 처리한 랫트의 정소의 정세관에서는 대부분의 spermatogonia가 괴사되어 염색되는 세포가 현저히 감소하였으며, Anti-cyclin D3를 이용한 대조군의 정소의 정세관에서는 spermatocyte와 round spermatid에 주로 염색이 되었고, 2-BP를 500 mg/kg 으로 처리한 랫트의 정소의 정세관에서는 대부분의 spermatocyte와 round spermatid가 괴사하여 염색되는 세포가 현저히 감소하였다.

V. 결 론

2-BP는 투여농도 의존적으로 정소세포, 정모세포, 정자세포 등 정자형성 단계의 배세포에 전반적으로 영향을 미쳤으며, 세르토리 세포에도 유의한 영향을 주었으며, 125mg/kg 투여군에서는 VII-VIII 스테이지에서 유의한 SCI 감소를 보였다. 위성군으로 남겨두었던 500 mg/kg 투여군을 62일 후 관찰하였지만 정자형성능의 회복은 이루어지지 않았으며, 2-BP를 500 mg/kg 투여한 군의 정소에 Cyclin D3와 PCNA의 특이항체를 이용하여 면역조직화화학적 염색을 하여 관찰한 결과, 대부분의 생식세포가 괴사되어 염색되는 세포수가 현저히 감소하였다.

1) 대조군과 투여군의 정세관을 배세포(germ cell)의 구성이 같은 스테이지별로 분류하여 SCI를 산출한 결과, 투여용량 의존적으로 SCI가 낮아졌으며, 125 mg/kg 투여군의 스테이지 VII-VIII에서는 유의한 SCI 감소가 나타났다.

2) 스테이지 단계별로 배세포수의 변화를 살펴보면 정세관내의 정소세포는 대조군에 대하여 125 mg/kg 투여군에서는 평균 75.3%, 250 mg/kg 투여군에서는 평균 34.0%, 500 mg/kg 투여군에서는 평균 21.2%로 감소하였다.

3) 정세관내의 정모세포중 pachytene spermatocytes은 대조군에 대하여 125 mg/kg 투여군에서는 평균 76.3%, 250 mg/kg 투여군에서는 평균 32.0%로 감소하였으며, 500 mg/kg 투여군에서는 평균 0.3%로 현저한 감소를 보였으며, pachytene spermatocytes을 스테이지별로 살펴보면 전 스테이지에서 농도 의존적으로 감소하였다. 500 mg/kg 투여군의 정모세포중 leptotene spermatocytes는 6.0%, diplotene spermatocytes는 0.5%로 현저히 감소하였으며, preleptotene spermatocytes와 zygotene spermatocytes는

500 mg/kg 투여군의 거의 모든 정세관에서 찾아볼 수가 없었다

4) 정세관내의 round spermatids는 대조군에 대하여 125 mg/kg 투여군에서는 평균 79.4%, 250 mg/kg 투여군에서는 평균 52.9%, 500 mg/kg 투여군에서는 평균 10.6%로 감소하였으며, round spermatids를 스테이지별로 살펴보면 전 스테이지에서 농도 의존적으로 감소하였으나, 250 mg/kg 투여군과 500 mg/kg 투여군의 7-8 스테이지에서는 감소율이 낮았으며, 500 mg/kg 투여군의 1-6 스테이지에서는 round spermatids를 찾아보기 어려웠다.

5) 정세관내의 elongate spermatids는 대조군에 대하여 125 mg/kg 투여군에서는 평균 85.8%, 250 mg/kg 투여군에서는 평균 79.9%, 500 mg/kg 투여군에서는 평균 83.2%로 변화가 거의 없었고, elongate spermatids를 스테이지별로 살펴보아도 전 스테이지에서 변화가 거의 없었다.

6) 2-BP 투여농도별로 정소를 살펴보면, 125 mg/kg 투여군에서는 배세포의 변성과 소실이 일어나기 시작하였다.

7) 250 mg/kg 투여군의 정소에서는 뚜렷한 정세관의 변성과 비틀린 기저막이 나타나기 시작하였으며, 배상피내에서는 세르토리 세포의 변성을 볼 수 있었으며, 배세포의 변성과 소실이 뚜렷히 나타났다.

8) 500 mg/kg 투여군의 정소 (testes)에서는 뚜렷한 정세관의 변성과 비틀린 기저막이 나타났으며, 배상피내에서는 세르토리 세포의 변성을 볼 수 있었고, 배세포의 변성과 소실이 뚜렷히 나타났으며 공포와 다핵거대세포가 나타났다. 간질조직에서는 라이디히 세포의 증생이 관찰되었다.

9) 2-BP 투여를 중지하고 62일 후 고농도군의 정소에 대한 조직병리학적 인 검사를 하였으나, 정소의 정세관은 전혀 회복되지 않고 정세관의 직경

이 현저히 줄었으며, 정세관내에는 독성에 강한 세르토리 세포만 남아 있고, 정조세포, 정모세포, 정자세포 등 배세포는 완전히 소실되었다. 간질조직에서는 라이디히 세포의 증생을 볼 수 있었다.

10) Cyclin D3와 PCNA의 특이항체를 이용하여 면역조직화화학적 염색을 하여 관찰한 결과, Anti-PCNA를 이용한 대조군의 정소의 정세관에서는 spermatogonia와 초기 spermatocyte에 주로 염색되었으나, 2-BP를 500 mg/kg 으로 처리한 랫트의 정소의 정세관에서는 대부분의 spermatogonia가 괴사되어 염색되는 세포가 현저히 감소하였다.

11) Anti-cyclin D3를 이용한 면역조직화화학적 염색을 하여 관찰한 결과 대조군의 정소의 정세관에서는 spermatocyte와 round spermatid에 주로 염색이 되었고, 2-BP를 500 mg/kg 으로 처리한 랫트의 정소의 정세관에서는 대부분의 spermatocyte와 round spermatid가 괴사하여 염색되는 세포가 현저히 감소하였다.

참고문헌

Amdur M. O., Doull J., Klaassen C. D. (1991) : Toxicology. Pergamon press , New york, 484-520.

Amann R. (1981) : A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristic. J. Andro., 2, 37-58.

Aulikki O. (1975) : Testicular lesions of streptozotocin diabetic rats. Hormone Res., 6, 138-144.

Behne D., Weiler H. and Kyriakopoulos A. (1996) : Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. J. Reprod. Fertil., 106, 291-297.

Behne D., and Wolters W. (1983) : Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. J. Nutr., 113, 456-461.

Bergmann M., and Dierichs R. (1983) : Postnatal formation of blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. Anat. Embryol., 168, 269-275.

Bloom W., and Fawcett D.W. (1986) : A textbook of histology. W. B. Saunders Company, 796-848.

Brinkworth M. H., Weinbauer G. F., Schlatt S., and Nieschlag E., (1995) : Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. J. Reprod. Fertil., 105, 25-33.

Brown D. G., and Burk R. F. (1973) : Selenium retention tissue and sperm of rats fed a torula yeast diet. J. Nutr., 103, 102-108.

Carroll E. J., and Ball L. (1970) : Testicular changes as affected by mating systems in beef cattle. Am. J. Vet. Res., 31, 241-254.

Chapin R. E., Morgan K. T., and Bus J. S. (1983) : The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5-hexanedione. Exp. Mol. Pathol., 38, 149-169.

Cohen B. J., de Vries M. J. (1969) : Giant cells in the rat testes after accidental and experimental thermal injury. Pathol. Eur., 4, 336-344.

Corrier D. E., Mollenhauer H. H., Clark D. E., and Hare M. H. (1985) : Testicular degeneration and necrosis induced by dietary cobalt. Vet. Pathol., 22, 610-616.

Drife J. O. (1987) : The effects of drugs on sperm. Drugs, 33, 610-622.

Enomoto M., and Akazaki K. (1987) : Color atlas of toxicological pathology. soft science publications, 189-193.

Fawcett D. W., Leak C. V., and Heiger P. M. (1970) : Electron microscopic observation on the structural components of the blood-testis barrier. J. Reprod. Fertil., 10, 105-122.

Federica M. F. D., Arijan J. G., Frank H. J., and Dirk G. R. (1989) : Inhibin reduces spermatogonial numbers in testes of adult mice and chinese hamsters. Endocrinology, 125, 1899-1903.

Foster P. M. D., Creasy D. M., Foster J. R., Thomas L. V., Cook M. W., and Gangolli S. D. (1983) : Testicular toxicity of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 69, 385-399.

Gary A. B., Scot L. E., Michael R. E., Charles A. M. Jr., and Willam F. M. (1990) : Pathology of the fisher rat. Academic press, New York, 405-418.

Heindel J. J., Chapin R. E. (1993) : Female reproductive toxicology. Academic press, New York, 45-55.

Ichihara G., Asada N., Kumazawa T. *et al.*, (1997) : Testicular and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane, a substitute for ozone layer-depleting chlorofluorocarbons. *J. Occup. Health.*, 39, 57-63.

Ito A., Moy P., Kaunitz H., Kortwright K., Clarke S., Furth J., Meites J. (1972) : Incidence and charater of the spontaneous pituitary tumors in strain CR and W/Fu male rats. *JNCI*, 49, 701-711.

Irby D. C., Kerr J. B., Risbridger G. P., and de Krester D. M. (1984) : Seasonally and experimentally induced changes in testicular function of the Australian bush rat (*rattus fuscipes*). *J. Reprod. Fertil.*, 70, 657-666.

Jones T. C., Mohr U., Hunt R.D. (1987) : Genital system. pringer-Verlag, 179-225.

Kamijima M., Ichihara G., Kitoh J. *et al.* (1997) : Ovarian toxicity of 2-bromopropane in the non-pregnant female rat. J. Occup Health., 39, 144-149.

Kerr J.B. (1992) : Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis : assesment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. J. Repro. Fertil., 95, 825-830.

Kim H.Y., Chung Y.H., Yi K.H., Kim J.G., and Yu I.J. (1996) : LC50 of 2-Bromopropane. Ind. Health, 403-407.

Kim Y., Jung K., Hwang T., Jung G., Kim H., Park J. (1996): Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromoproane. Scand. J. Work Environ Health, 22, 394-398.

Kirkman H. (1972) : Hormone-related tumors in Syrian hamsters Prog. Exp. Tumor Res, 16, 201-240.

Kirkman H., and Kempson R.L. (1982) : Tumours of the testis and accessory male sex glands. IARC Sci. Publ., 34, 175-198.

Kluwe W.M. (1981) : Acute toxicity of 1,2-dibromo-3-chloropropane in the F344 male rat. Dose response relationships and differences in routes or exposure. Toxicol. Appl. Parmacol., 59, 71-83.

Kluwe W.M. (1981) : Development and repair of the renaepididymal, testicular and hepatic lesions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 59, 84.

Kumi-Diaka J., and Dennis S.M. (1978) : The Sertoli cell index as a measure of testicular degeneration in the bull. Vet. Rec., 103, 112-114.

Lim C. H., Maeng S. H., Lee J. Y., Chung Y.H., Kim T.G., Park J. H., Moon Y. H., and Yu I. J. (1997) : Effects of 2-bromopropane on the female reproductive function in Sprague-Dawley rats. Ind. Health, 35, 278-284.

Maeng S. H., and Yu I. J. (1997) : Mutagenicity of 2-bromopropane. Ind. Health, 35, 87-95.

Mason K.E., Burns W.A., and Smith J.C.Jr. (1982) : Testicular damage associated with zinc deficiency in pre-and postpubertal rats : response to zinc repletion. J. Nutr., 112, 1019-1028.

Mason K.E., and Mauer S.I. (1975) : Reversible testis injury in the vitamin E-deficient hamster. J. Nutr., 105, 484-490.

Mebus C. A., Welsch F., and Working P. K. (1989) : Attenuation of 2-methoxyethanol-induced testicular toxicity in the rat by simple physiological compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol., 99, 110-121.

Meistrich M. (1982) : Quantitative correlation between testicular stem cell survival, sperm production and fertility in the mouse after treatment with different cytotoxic agents. J. Androl., 3, 58-68.

Meistrich M. (1989) : Evaluation of reproductive toxicity by testicular sperm head count. J. Amer. Coll. Toxicol., 8, 551-567.

Kang M. J., Kim M. K. *et al.*, (1997) : Cytoplasmic localization of cyclin D3 in seminiferous tubules during testicular development. *experimental cell research*, 234, in press.

Morton D., Weisbrode S.E., Wyder W.E., Maurer J.K., and Capen C. C. (1986a) : Spermatid giant cells, tubular hypospermatogenesis, spermatogonial swelling, cytoplasmic vacuoles, and tubular dilatation in the testes of normal rabbits. *Vet. Pathol.*, 23, 176-183.

Morton D., Weisbrode S.E., Wyder W.E., Maurer J.K., and Capen C.C. (1986b) : Histologic alterations in the testes of laboratory rabbits used as controls in percutaneous toxicity studies. *Vet. Pathol.*, 23, 214-217.

Nagano K., Nakayama E., Oobayashi H., Nishizawa T., Okuda H., and Yamazaki K. (1984) : Experimental studies on toxicity of ethylene glycol alkyl ethers in Japan. *Environmental Health Perspectives*, 57, 75-84.

Nakajima T., Shimodaira S., Ichihara G. *et al.* (1997) : 2-bromopropane-induced hypoplasia of bone marrow in male rats. *J. Occup Health*, 39, 228-233.

Park J.S., Kim Y., Park D.W., Choi K.S., Park S.H., Moon Y.H. (1997) : An outbreak of hematopoietic and reproductive disorders due to solvents containing 2-bromopropane in an electronic factory, South Korea : Epidemiological survey. *J. Occup. Health*, 39, 138-143.

Potashnik G., and Porath A. (1995) : Dibromochloropropane (DBCP) A 17 year reassessment of testicular function and reproductive performance. J. Occup. Environ Med., 37(11), 1287-1292.

Rich K. A., Kerr J. B., and de Krester D. M. (1979) : Evidence of Leydig cell disfunction in rats with seminiferous tubule damage. Mol. Cell Endocrinol, 13, 123-135.

Sharpe R.M., Millar M., and Mckinnell C. (1993) : Relative roles of testosterone and the germ cell compliment in determining stage - dependent change in protein secretion by isolated rat seminiferous tubules. International Journal of Andrology, 16, 71-81.

Takahashi M. and Matsui H. (1993) : Mechanism of testicular toxicity. J. Toxicol. Pathol., 6, 161-174.

Takayama S., Akaike m., Kawashima K., Takahashi M., and Kurokawa Y. (1995) : Studies on the optimal treatment period and parameters for the detection of male fertility disorder in rats. J. Toxicol. Scien., 20, 173-182.

Teresa K. W., James B., Kenneth M. A., Edward T. C., Glenn C. R., and Jennie P, M. (1992) : Stage-specific binding of inhibin and activin to subpopulations of rat germ cells. Endocrinology, 130, 871-881.

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., Moon Y. H. (1997) : Reproductive toxicity of 2-bromopropane in Sprague Dawley rats. Scand. J. Work Environ. Health., 23, 281-8

Wanda M. H., and Colin G. R. (1991) : Toxicologic Pathology. Academic press, 829-889.

Wright J. R., Yates A. J., Sharma H. M., Shim C., Tigner R. L. (1982) : Testicular atrophy in the spontaneously diabetic BB Wister rat. Am J Pathol., 108, 72-79.

高橋道人 (1994) : 精細管 Atlas. soft science publications, 1-36.

前川昭彦, 林裕造 (1991) : 毒性病理學. 地人書館, 387-434.