

放射線이 생쥐生殖細胞에 미치는 影響에 關한 研究

韓國에너지研究所

鄭圭會 · 千基貞 · 鄭海元 · 柳炳善 · 李鉦浩

緒 論

放射線이 生體에 미치는 影響을 두가지로 大別하면 非確率의 影響(non-stochastic effect)과 放射線量에 따라 線量-反應關係(dose-response)를 나타내는 確率의 影響(stochastic effect)으로 區分할 수 있다¹⁾.

放射線에 依한 身體的 影響은 前者에 屬하고 遺傳的 影響은 後者에 屬한다. 放射線에 依한 傷害정도를 보기 위해서는 骨髓細胞를 對象으로 染色體의 異常頻度나 小核細胞의 出現頻度を 觀察하는 方法이 一般化되어 있으며 生殖細胞를 對象으로 直接的인 傷害정도를 評價하는 研究도 많이 수행되어 오고 있다.

生殖細胞는 여러 發生段階의 細胞들이 모여있는 異質的인 細胞로서 이루어진 集團이기 때문에 各 發生段階 細胞別로 放射線에 對한 感受성이 다르다고 報告되어 있다²⁾.

本 研究에서는 생쥐의 精子形成過程을 考慮하여 放射線이 生殖細胞에 미치는 影響을 몇가지 方法을 利用하여 觀察하였으며 이들 方法들이 放射線에 依한 傷害程度를 評價하는 方法으로서의 實用性與否를 比較研究하였다.

첫째, 原細胞가 精子를 生成하는 能力을 보기 위해 精子數를 測定하고, 이들 精子의 異常形態 出現頻度を 直接 觀察하였으며,

둘째, 精子形成 過程中 生殖細胞에 特異적으로 나타나는 同位酵素인 LDH-X의 活性정도를 測定하여 原細胞가 精母細胞와 精細胞를 生成하는 能力을 觀察하였으며,

셋째, 精母細胞와 精細胞에서의 非週期性 DNA 合成 정도를 測定하여 放射線이 生殖細胞에 미치는 傷害정도를 間接적으로 觀察하였다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

가. 實驗動物 : 生後 8~10週된 ICR系 생쥐를 使用하였으며 常溫으로 維持된 飼育室에서 飼育하면서 實驗하였다.

나. 放射線 照射 : 韓國에너지 研究所에 所在한 10 kCi Co-60 照射 施設을 利用하여 1.5×10^3 rad/hr.의 線量率로 50 rad, 100 rad, 200 rad 및 600 rad를 생쥐에 全身 照射하였다.

2. 實驗 方法

가. 精子數 測定

辜丸內 原細胞가 精子까지 分化하는 精子 發生 過程을 考慮하여 생쥐에 放射線을 照射한 後 2週, 4週, 6週 및 8週 後에 Searle and Beechy³⁾의 方法에 따라 생쥐의 副辜丸으로부터 精子를 收去하여 測定하였다. 卽 副辜丸 양쪽을 摘出하여 2ml의 1% sodium citrate 溶液에 담근 後 가위로 잘게 잘라 30分間 放置한 다음 血球計數器로 測定하였다.

나. 精子의 異常形態 出現頻度 測定

上記 2-가에서 얻어진 試料를 利用하여 Wyrobek and Bruce (1975)⁴⁾의 方法에 準하여 染色後 精子의 異常形態의 頻度を 測定하였다.

卽, 試料에 1%의 Eosin Y를 10:1로 稀釋한 溶液

을 3~5 방울을 떨어뜨려 30분이 經過한後 slide에 塗抹하여 室溫에서 乾燥시켜 顯微鏡으로 觀察하였다. 約 2,000마리의 精子를 觀察하여 Fig. 1에서와 같은 四種類의 異常形態를 確認하였다.

다. 受精 能力 測定

線量別로 放射線을 照射받은 생쥐의 受精能力을 보기 위해 放射線 照射後 8週가 經過된 컷컷 생쥐를 正常인 암컷이 2~3마리씩 들어있는 飼育函에 한마리씩 넣고 交配시킨 後 妊娠與否를 確認하고 分娩되는 새끼의 個體數를 測定하였다. 새끼를 出産한 날로 부터 妊娠期間 20日을 考慮하여 빼어주면 放射線을 照射한 後의 不妊期間을 알 수 있으며 이는 間接的으로 各 發生段階別 細胞들의 放射線에 依한 傷害如否를 判斷할 수 있는 方法이 된다.

라. LDH-X의 活性度 測定

各 線量 別로 생쥐에 放射線을 照射한 後 2週, 4週, 6週 그리고 8週가 經過時 辜丸을 빼어낸 後 이를 冷凍 保存(-20°C)하면서 試料로 使用하였다. 酵素 活性度 測定은 Meistrich 等(1977)⁶⁾의 方法에 準하였다.

冷凍된 試料에 0.05M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 2ml를 넣고 glass/teflon homogenizer로 均質化시켰다. 均質화된 試料를 55°C에서 3分間熱處理하여 LDH-X 活性에 影響을 주지 않으면서 다른 酵素들을 不活性化 시켰다. 그후 10,000×g에서 15分間 遠心分離하여 上澄液을 酵素活性 測定에 使用하였다.

LDH-X의 酵素 活性는 α-ketoisovalerate를 基質로 使用하여 NADH의 酸化를 340 nm에서 吸光分析機로 測定하였다. 分析溶液은 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 7.4) 2.7 ml에 0.9mM α-ketoisovalerate 100 μl와 4.5 mM NADH 100 μl를 加하고 分析 試料 100 μl를 添加한 後 常溫에서 1分間 變化하는 O.D.값을 測定하였다.

酵素的 活性度(units/ml)는 다음과 같은 式에 依하여 求하였다.

Units/ml = ΔA340 nm per minute per milliliter × 4.82.

마. 非週期性 DNA 합성(Unscheduled DNA syn-

thesis) 정도 測定

Sega 等(1976)⁶⁾의 方法에 따라 생쥐에 線量別로 放射線을 照射後 1時間 以內에 [Methyl-³H] thymidine (specific activity 51Ci/mmol Amersham international Pic社 製品) 36μCi씩을 양쪽 辜丸에 Hamilton syringe를 使用하여 注射하였다.

이 생쥐들을 飼育하면서 放射線 照射後 10日, 16日, 21日, 28日 그리고 34日後에 죽인 後 副辜丸을 摘出하여 비이커에 넣고 가위로 잘게 절단한 다음 4ml의 生理食鹽水를 加하고 強하게 흔든후 5分間 放置하였다. 上澄液에서 精子數를 測定하고 이중 3ml를 取해 遠心分離하여 3回 洗滌하였으며 1ml의 生理食鹽水를 加하여 흔들어서 均質化시켰다.

이중 200 μl를 取해 미리 protosol(NEF 935 New England Nuclear) 1 ml가 들어있는 scintillation vial에 조심스럽게 넣고 50°C로 加熱하여 完全히 溶解한 後 scintillation cocktail (4g PPO+0.1g POPOP/1,000 ml toluene) 10ml씩을 넣고 liquid scintillation counter (Loonan Associates Inc. Type 43-AAE)로 서 放射能을 20分間씩 測定하였다.

各 試料當 精子數(100萬)에 따른 計測值를 換算하여 表示하였다.

結 果

1. 精子數 測定

線量別로 放射線을 照射한 後 經過 時間에 따른 精子數 및 辜丸 무게의 變化는 Table 1과 같다. 放射線 照射後 2週日 後에는 辜丸의 무게가 照射線量이 增加함에 따라 점차 減少되어 600 rad에서는 對照群에 비해 60%로 減少되었으며 精子의 數도 600 rad 照射에서는 현저히 減少되어 對照群의 45%로 減少되었다. 放射線 照射後 4週日 後에도 放射線 線量의 增加에 따라 辜丸의 무게가 減少하는 傾向을 보여주고 있는 것을 알 수 있으며 精子數도 放射線 線量의 增加에 따라 減少하는 것을 알 수 있으나 100 rad와 200 rad의 사이에는 辜丸의 무게나 精子의 數나 큰 差異를 發見할 수 없었다.

Table 1. Testis weight and sperm head in mouse after irradiation.

Radiation Dose(rad)	Time after irradiation							
	2 weeks		4 weeks		6 weeks		8 weeks	
	Testis wt. % of control	Sperm count % of control	Testis wt. % of control	Sperm count % of control	Testis wt. % of control	Sperm count % of control	Testis wt. % of control	Sperm count % of control
0	100	100	100	100	100	100	100	100
50	93	85	93	65	104	76	122	103
100	77	55	60	58	81	43	105	86
200	73	54	61	57	82	13	80	48
600	60	45	—	—	61	7	60	14

Table 2. The percentage of sperm with abnormal shape in mouse after irradiation.

Dose (rad)	Time after irradiation	Sperm shape abnormality(%)				
		2 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks	10 weeks
50		3.9	6.05	7.0	6.93	3.9
100		4.1	10.1	10.6	8.71	4.5
200		4.6	11.1	11.96	10.7	3.7
600		6.1	15.0	30.0	22.09	8.7

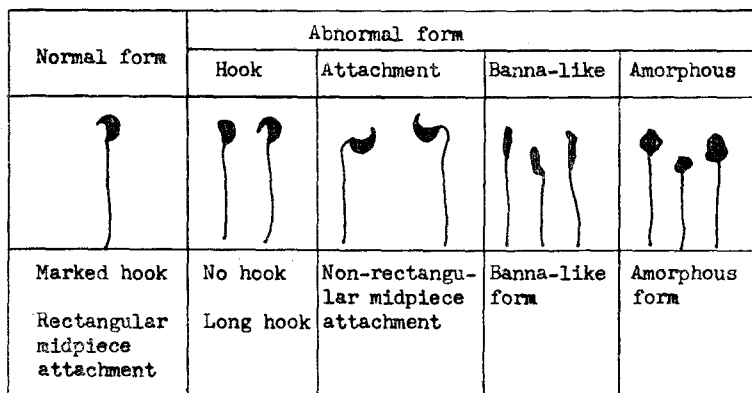


Fig. 1. Abnormal head shapes of epididymal sperm in mouse.

放射線 照射 6週後에도 放射線 線量에 따라 辜丸의 무게나 精子의 數가 減少하는 것을 알 수 있었으며 特히 精子數의 경우는 급격한 減少를 보임을 알 수 있었다. 卽, 精子數가 50 rad의 경우 對照群에 비해 76%, 100rad 43%, 200rad 13% 그리고 600 rad의 경우 7%로 나타났으며 特히 100 rad와 200 rad의 경우 辜丸의 무게는 비슷하나 精子數의 경우 큰 差異가 나타남을 알 수 있었다. 放射線 照射 8週後에는 線量의 增加에 따

라 減少하는 傾向을 볼 수 있으나 放射線 照射後 6週 째의 結果와 比較해 보면 辜丸의 무게나 精子數가 점차 正常水準으로 回復되어감을 알 수 있었다.

以上的 結果를 綜合해 보면 어느 경우나 放射線 線 量에 따라 辜丸의 무게와 精子數가 減少하나 放射線 照射 2週와 4週째에서는 100rad와 200 rad의 경우 差 異가 明確하지 않으며 6週째에는 完全한 差異가 있는 데 이는 精子 形成 過程에서 各 發生段階의 生殖細胞

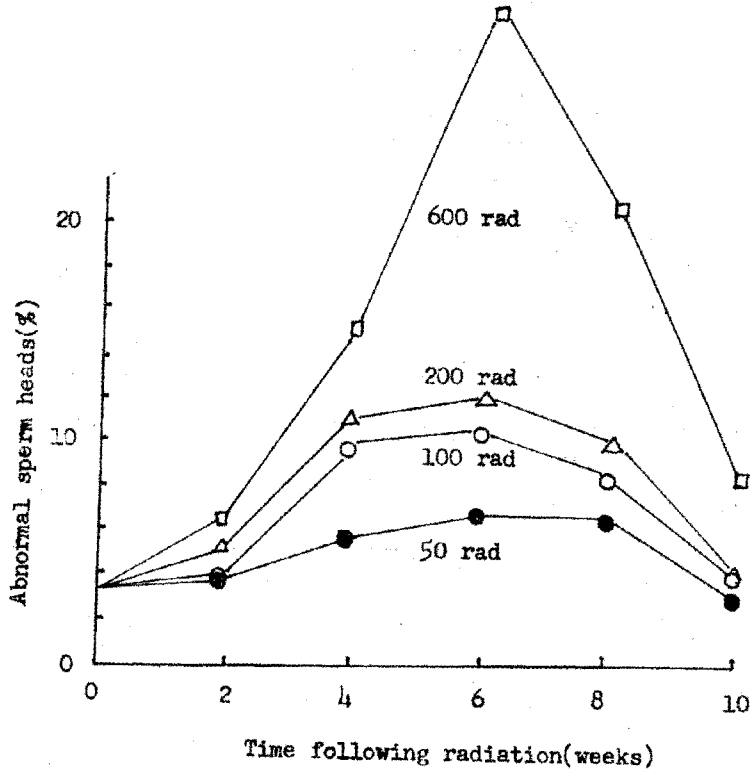


Fig. 2. The percentage of sperm with abnormal shape in irradiated mouse observed at weekly intervals.

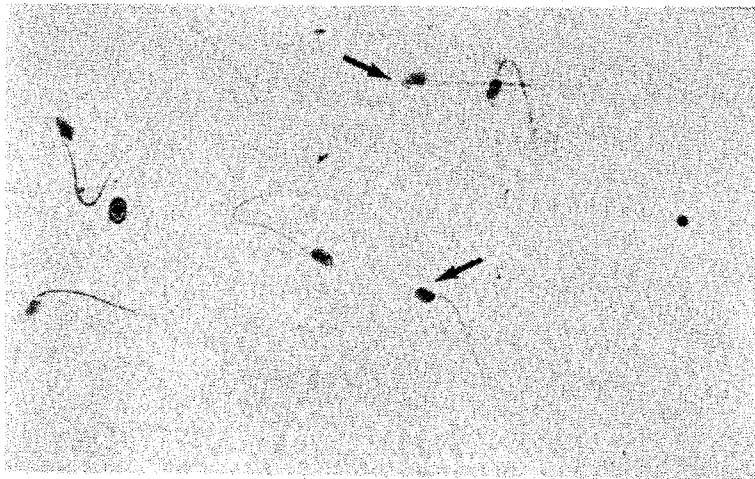


Fig. 3. Abnormal head shapes of epididymal sperm in mouse after irradiation (arrows).

의 放射線 感受性を 反映한다고 볼 수 있다.

2. 精子의 異常形態 出現頻度 測定

各 線量別로 放射線을 照射後 時間經過에 따라 精子의 異常形態出現頻度を 調査한 結果는 Table 2, Fig.

2와 같다.

Fig. 1 및 3에서와 같이 4-

거나 없는것 (long hor-

部分에 붙는 什

rectan-

Table 3. Fertility of male mouse following irradiation.

Dose (rad)	Day of return to fertility	Mean*	Litter size	Mean*
50	56, 56, 57, 68, 78, 81, (st)	65	15, 12, 14, 9, 10, 11, 9, (st)	11.4
100	56, 57, 62, 67, 89, (st), (st), (st), (st), (st)	66	9, 9, 8, 12, 15, (st), (st), (st), (st), (st)	10.6
200	57, 58, 60, 60, 61, 64, 65, 70, 71, 80, 91, (st)	67	10, 8, 7, 5, 5, 8, 3, 17, 9, 3, 8, (st)	7.5
600	66, 68, 83, 96, 111, (st), (st), (st), (st)	85	8, 7, 8, 6, 7, (st), (st), (st), (st)	7.2

Remarks: (st); permanently sterilized

*; Means are obtained without counting permanent sterile case.

Table 4. Activity of LDH-X per testis in mouse after irradiation.

Dose (rad)	Time after irradiation	LDH-X activity (percent of control)			
		2 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks
Control		100	100	100	100
50		105.3	98.1	90.6	107.4
100		72.6	73.1	76.2	84.8
200		68.7	49.9	50.7	53.3
600		53.3	25.0	28.0	27.5

한 것 (banana-like). 그리고 머리모양이 無定型인 것 (amorphous) 등으로 區分하여 測定하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 放射線량이 增加할수록 異常形態의 出現頻도가 增加하는 것을 알 수 있으며 특히 放射線照射後 經過時間에 따라 그 頻도가 增加하여 200 rad 照射群의 경우 放射線照射 2週째에 4.6%, 4週째 11.1% 이던 것이 6週째에 11.96%로 가장 높은 頻도를 나타내다가 8週째에 10.7%로 減少되어 10週째에는 3.7%로 서서히 回復되는 樣相을 보여주고 있다. 모든 線量에서 時間經過에 따라 비슷하게 增加되는 傾向을 나타내며 放射線照射後 6週째에 異常頻도가 最大值가 됨을 알 수 있으며 특히 600 rad의 경우에는 30%의 異常頻도를 나타내고 있다.

3. 受精 能力 測定

숫컷 생쥐에 線量別로 放射線을 照射後 8週後에 正常인 암컷 생쥐에 交配시켜 受精能力을 調査한 結果는 Table 3과 같다. Table에는 암컷 생쥐가 맨처음 交配된 날(이는 생쥐의 不妊期間이 된다)을 表示하였고 出産한 새끼수도 나타내었다. Table 3에서 보는 바와 같

이 50 rad, 100 rad, 200 rad 그리고 600 rad 照射의 경우 모두 不妊期間이 飼育函과 個體間에 큰 差異가 나타남을 알 수 있다. 出産새끼수는 50 rad 照射群의 경우 9~15마리(平均 11.4), 100 rad 8~15(平均 10.6), 200 rad 3~19마리(平均 7.5) 그리고 600 rad 照射群은 6~8마리(平均 7.2)로, 線量에 따라 漸次 減少되는 傾向을 알 수 있었다. 모든 線量에서 永久不妊(200日以上 交配안된 것)된 경우가 있었으며 특히 100 rad 照射群에서는 10個의 飼育函中 5個가 모두 不妊으로 나타나 說明하기가 곤란하지만 交配가 이루어진 飼育函中에서 맨 처음 交配가 된 경우만을 뽑아서 不妊期間을 平均해 綜合해 본 結果, 50 rad 照射群의 경우 65日, 100 rad 66日, 200 rad 67日로서 線量間의 差異를 볼 수 없었으나 600 rad 照射群의 경우는 85日로 20日정도가 더 延長된 것을 알 수 있었다.

4. LDH-X의 活性度

放射線 線量別로 放射線을 照射한 後 經過時間別로 LDH-X의 活性度を 測定한 結果는 Table 4와 같다. 50 rad를 照射한 경우에는 照射後 2週, 4週 및 8週의

Table 5. Unscheduled DNA synthesis in meiotic and postmeiotic germ cell stages in caudal epididymis of mouse.

Time after irradiation (days)	No. of sperm in million					cpm per million sperm				
	Con.	50 rad	100 rad	200 rad	600 rad	Con.	50 rad	100 rad	200 rad	600 rad
10	32.9	—	1.0	14.4	—	6.8	—	—	2.0	—
14	31.1	—	—	15.2	—	8.4	—	—	5.7	—
16	21.5	24.3	12.0	14.9	8.1	6.0	4.0	15.0	14.4	5.8
21	18.7	19.4	7.5	2.4	8.75	14.6	22.2	46.5	51.7	2.9
28	14.1	—	—	7.0	—	45.6	—	—	162.2	—
34	9.0	—	—	5.3	—	831.0	—	—	349.9	—

경우 對照群과 거의 差異가 없으나 6週째에는 90.6%로 活性度가 약간 떨어지는 것을 알 수 있었으며 100 rad 以上の 放射線 線量에서는 모든時期에서 對照群에 비해 活性度가 많이 減少하는 것을 알 수 있었다. 卽 200 rad의 放射線 線量에서는 큰 폭으로 減少되는 것을 알 수 있었으며 특히 600 rad를 照射한 경우 放射線 照射 2週後에는 53.3%로 거의 半減되었으며 6週後에는 最大로 減少하여 28.0%로 나타나고 있었다. 卽 放射線 照射 6週後에는 活性度가 最大로 減少되는 것을 알 수 있었으며 8週後에는 活性度가 다시 回復되는 傾向을 보여 주었다.

5. 非週期性 DNA 合成 (Unscheduled DNA synthesis)

本 實驗에서는 精子形成 過程에서의 各段階別 生殖細胞의 放射線에 依한 損傷정도를 보기 위해 放射線照射後 經過時間別로 精子를 收集하였고 非週期性 DNA 損傷정도가 放射線에 依한 傷害정도를 얼마나 잘 反映하는가를 보기 위해 非週期性 DNA 合成이 나타나리라고 豫測되는 時期인 放射線 照射後 16~24日까지에 線量別로 測定하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 放射線을 照射한 後 10日째에는 放射線을 받지않은 對照群에서 6.8 cpm, 200 rad 照射群에서는 2 cpm으로 나타났으며 14日째에는 對照群 8.4 cpm, 200 rad 照射群은 5.7 cpm으로 나타나 14日째까지 經過時間 別로 差異가 없었다. 放射線 照射後 16日째에는 對照群 6 cpm, 50 rad 4 cpm, 100 rad 15 cpm, 200 rad 14.4

cpm 그리고 600 rad 5.8 cpm으로 나타나 100 rad와 200 rad의 경우만 對照群에 비해 약간 增加했을 뿐 50 rad와 600 rad의 경우 對照群과 별 差異가 없어서 經過時間 別에 따른 放射線 線量別로도 큰 差異가 없는 것을 알 수 있었다. 그러나 放射線 照射 20日째에는 對照群이나 放射線 照射群이나 모두 放射能이 增加되는 것을 알 수 있는데 對照群 14.6 cpm, 50 rad 22.2 cpm, 100 rad 46.5 cpm 그리고 200 rad 51.7 cpm으로 放射線 線量別로 比例의으로 非週期性 DNA 合成이 나타나는 것을 알 수 있었으나 600 rad의 경우는 2.9 cpm으로 가장 낮은 値를 나타내었다. 週期性 DNA 合成이 始作된다고 推測되는 28日째에는 45.6 cpm, 200 rad 照射群은 162.2 cpm으로 두 경우 모두 放射能이 增加하였으며 34日째에는 對照群 831 cpm, 照射群 350 cpm으로 本 實驗結果로는 最大 値를 나타내었다. 副辜丸內에 들어있는 精子의 數는 放射線을 照射받은 群이 放射線 照射後 經過時間에 關係없이 적게 나타났으며 時間이 經過함에 따라 對照群이나 放射線 照射群 모두 減少하는 것을 알 수 있었다.

考 察

1. 精子數 測定

放射線 照射에 依해 精子數 및 辜丸의 크기가 減少된다는 事實은 널리 報告^{3,7,8)}되어 있다. 本 實驗에서는 생쥐를 50 rad, 100 rad, 200 rad 그리고 600 rad 放射線 線量別로 全身 照射後 時間 經過에 따라 辜丸의

무게와 精子數를 測定하였다. 대체로 어느 時期에서 測定한 結果도 放射線 線量에 따라 精子數가 比例적으로 減少하는 것을 알 수 있었으며 減少되는 정도는 放射線 照射後 經過時間에 따라 差異가 나는데 200 rad의 放射線을 照射한 경우 2週와 4週째에는 對照群에 비해 各各 54%, 57%로 나타났으며 放射線 照射後 6週째에는 13%로 最大로 減少하였다가 8週째에는 48%로 回復되는 樣相을 보여 주었다. 이러한 結果는 精子形成 過程에서 各段階別 生殖細胞의 放射線에 對한 感受性を 反映해 준다고 볼 수 있는데 이는 Meistrich等(1978)²²의 精子形成 過程을 說明해 주는 model中 Oakberg model¹⁹에 따른 原細胞로 부터 精子까지의 發生 段階別로 放射線 感受性を 整理한 結果로서 알 수 있다. 卽 原細胞로 부터 Aal精原細胞가 되고 이들은 7.4日間 A₁-A₂-A₃-A₄-ln-B의 단계를 거쳐 精母細胞가 되는데 13.7日間の 精母細胞의 發生단계를 지나 14.1日間の 精細胞가 된다. 各 단계별로 放射線 感受性を LD₅₀로 比較해보면 原細胞는 200~300 rad, Aal은 100 rad以下, A₁에서 B까지의 精原細胞는 25rad, 그리고 精母細胞는 各 分裂段階別로 感受성이 달라서 前細胞系는 200 rad, 合系期는 520 rad, 太系期는 480 rad 그리고 複系期까지는 560 rad이며 以後의 精細胞는 1,500 rad以上, 마지막의 精子는 60,000 rad以上이라고 報告하고 있다. 本 實驗에서는 精子가 睪丸을 떠난後 2~3日後에 到達하는 副睪丸로부터 精子를 收集하였기 때문에, 放射線 照射後 2週에서 4週의 結果는 放射線 抵抗성이 매우 큰 精細胞와 精母細胞의 特性을 反映하였다고 볼 수 있으며 6週後의 結果는 放射線 抵抗성이 낮은 精原細胞 그리고 8週後는 原細胞의 結果를 反映한다고 볼 수 있다. 이러한 觀點에서 볼때 本 實驗의 結果는 위의 model을 比較의 잘 反映해 준다고 볼 수 있다. Harrison等(1984)²⁷의 實驗結果를 보아도 X-ray 照射後 4週後에 60 rad에서 精子數가 對照群에 비해 84%로 200 rad에서 45%로 減少한다고 보여 주고 있어서 放射線 線量에 따른 減少 傾向을 나타낸다고 報告하고 있다. 以上の 結果를 綜合해 볼때 發生 段階별로 자기 다른 段階에 있는 生殖細胞들은 자기 다른 放

射線 感受性を 나타내 주기 때문에 放射線에 對한 傷害를 研究할 때에는 一定 時期의 세포를 取해 比較하여야 한다는 것을 알 수 있다.

2. 精子의 異常形態 出現頻度 測定

精子의 形態의 異常頻度を 測定함으로써 化學物質이나 放射線等 環境 汚染物質에 의한 損傷정도를 把握하고자 하려는 試圖는 많이 報告^{4,10~12})되고 있다. 精子의 異常頻度を 測定하는 것은 빠르고 簡單히 이루어질 수 있기 때문에 이 方法은 生體內의 生殖細胞에 미치는 環境物質의 影響을 反映해 주는 좋은 尺度가 되고 있다¹³.

本 實驗의 경우 放射線 線量에 따라 精子의 異常頻도가 增加되고 있으며, 이러한 傾向은 放射線 照射後 時間經過에 따라 漸次 增加하여 6週째에 最大로 나타났다가 8週째부터 서서히 減少되고 있다. 이와같은 結果는 前述한 생쥐의 精子形成 過程의 各 段階別 生殖細胞의 放射線 感受성과 精子形成 過程의 經過 時期別 生殖細胞의 特性을 잘 反映하여 준다고 할 수 있다. Bruce等(1974)¹⁴은 C₅₇BL/6와 B₆C₃F₁等 두 strain의 생쥐에 放射線을 照射하여 精子의 異常形態를 調査하였는데 線量 增加에 따라 異常頻도가 增加하며 放射線 照射後 5~6週後에 最大로 增加되다가 그後 서서히 減少된다고 報告하고 있다. 卽 以上の 結果로 볼때 精母細胞와 늦은 時期의 精原細胞가 放射線에 가장 敏感하여 異常形態의 精子를 生成한다고 볼 수 있다. 本 實驗에서 觀察된 精子의 異常形態는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 全部가 머리 部分에 나타나는 것으로서 고리모양과 머리모양의 非正常的인 形態이다. 正常的인 精子의 모양도 種間 그리고 같은 種內의 자기 다른 strain에 따라서도 差異가 난다고 알려져 있으나 나타나는 異常形態는 거의 비슷한 樣相을 보여주고 있다고 報告¹²)되어 있다. 種間 그리고 strain間에 서로 다른 精子의 形態를 나타내는 데는 遺傳的인 要因이 作用한다고 알려져 있다¹⁵. Bruce等(1973)¹⁶은 생쥐에서의 精母細胞의 分化 過程을 支配하는 遺傳的 要素가 常染色體에 있는 어떤 要因에도 起因한다고 報告하고 있으며,

또한 精子內의 異常形態의 出現頻度도 遺傳子型에 依해 支配된다는 報告가 있는데 Krzanowska(1976)¹⁷⁾는 여러가지 異常形態는 遺傳子型의 特性을 反映하며 특히 Y 染色體가 異常形態 出現에 影響을 끼친다고 報告하고 있다. 以外에도 Hugenholtz and Bruce(1973)¹⁸⁾는 X 染色體도 생쥐의 精子의 形態를 나타내는데 關係가 있다고 報告하고 있으며 Wyrobek 等(1976)¹⁹⁾은 여러개의 常染色體上의 몇가지 要因도 精子의 異常形態의 出現에 關係가 있음을 報告하고 있다. 卽 精子의 形態를 發現하는데 關係되는 遺傳的인 X,Y 要因은 染色體와 常染色體上에 分布한다는 것을 알 수 있으며, 이들 遺傳的 要因은 각기 다른 放射線感受性을 나타낸다고 報告하고 있기 때문에 放射線 照射에 依해 나타나는 異常形態의 頻도는 이들 遺傳因子들의 放射線感受性도 部分的으로 關여한다고 볼 수 있다.

3. 受精 能力 測定

放射線 照射後에 나타나는 不妊期間은 放射線 照射에도 살아남은 原細胞들이 다시 受精能力을 回復하는 期間으로 볼 수 있다. 不妊의 原因으로는 放射線 照射에 의해 原細胞로부터 生成되는 精子數가 減少되어 受精이 일어나지 않거나²⁰⁾ 또는 精子에 完全한 優性致死 突然變異가 나타나지 않기 때문이라고 說明될 수 있다.²⁰⁾ 卽 이 不妊期間은 原細胞로부터 受精을 可能케 하는 最少限의 精子數를 生成할 때까지 回復되는 期間이라고 말할 수 있으며²¹⁾ 이는 原細胞의 生存을 直接的으로 反映해 주는 것으로 말할 수 있다. Reid 等(1981)²²⁾은 200 rad 照射時에는 精子數가 正常群의 10%까지만 回復되어도 受精이 可能하나 600~900 rad 照射時에는 15%까지 回復되어야만 受精이 可能하다고 報告하고 있다. 卽 本 實驗에서 600 rad 照射群에서 不妊期間이 85日, 그 以下 線量에서 65日로 나타난 것은 受精에 必要한 精子數를 生成할 수 있는 期間이 線량이 增加함에 따라 더 延長된다는 것을 잘 나타내어 주고 있다. 이와같은 結果는 Meistrich(1978)²³⁾의 實驗에서도 볼 수 있는데 C₃Hf/BU 생쥐에 600 rad, 900 rad 그리고 1,200 rad 의 放射線을 照射하고 59日後에

交配시킨 結果 600 rad 는 85日, 900 rad 는 195日 그리고 1,200 rad 는 400日 以上の 不妊期間을 나타낸 것으로 잘 알 수 있다.

4. LDH-X의 活性度

LDH-X는 lactate dehydrogenase의 X-isozyme으로 精子形成 過程中 太系期의 中期로부터 精細胞 그리고 精虫에 特異적으로 存在하는 酵素^{4,23)}이며 睪丸內의 LDH-X의 水準을 測定하게 되면 原細胞가 精母細胞, 精細胞 그리고 精虫을 生成하는 能力을 測定할 수 있기 때문에 放射線에 依한 原細胞의 損傷如否를 定量的으로 判斷할 수 있다. 本 實驗의 경우 放射線 照射後 2週부터 8週까지 經過時間 別로 酵素의 活性度를 測定하였는데 어떤 時期에서나 放射線線量에 따라 活性도가 減少하는 것을 알 수 있으나 그 程度는 差異가 남을 알 수 있다. 放射線 照射後 2週後에는 LDH-X가 存在하는 細胞中 放射線을 照射받은 精細胞는 排出되었지만 精母細胞는 存在하며 이들은 原細胞나 精原細胞 보다 훨씬 放射線 抵抗力이 커서 LD₅₀가 500 rad 정도²⁴⁾가 되기 때문에 原細胞로부터 새로운 精母細胞가 많이 生成되지 않더라도 그 後의 時期보다 LDH-X의 活性도가 높게 나타난 것으로 測定되었으며 實際로 600 rad 照射群에서 53.3%의 酵素 活性度를 나타내어 주고 있다. 放射線 照射後에는 4週後에는 2週後보다 조금씩 낮은 酵素의 活性度를 나타내고 있는데 이는 처음에 存在하던 LDH-X를 가지고 있는 細胞들도 모두 排出되어 버리기 때문에 이때부터는 原細胞로부터 새로 生成된 細胞이거나 精原細胞로 存在하던 細胞들로부터 生成된 精母細胞나 精細胞에서의 酵素의 量을 反映한다고 할 수 있기 때문이라고 말할 수 있다. 위와같은 解析을 考慮할 때 放射線 照射 6週後에는 睪丸內에 存在하는 거의 모든 細胞가 放射線에 依해 損傷을 받은 原細胞로부터 生成된 것이므로 LDH-X의 活性도가 낮을 것으로 쉽게 豫測할 수 있다. 放射線 照射後 8週後의 경우는 6週後 보다 酵素의 活性도가 높아 50 rad와 100 rad 照射의 경우는 거의 對照群과 비슷하게 나타났다. 이는 睪丸內에는 放射線에 依해

損傷을 받은 세포와 전혀 放射線을 照射받지 않은 세포들로부터 生成된 生殖細胞가 存在할 것이므로 특히 低線量인 100 rad 以下の 경우는 거의 원상으로 回復되고 그 以上の 放射線 線量에서는 原細胞가 損傷을 받아서 나타나는 結果라고 解析된다.

5. 非週期性 DNA 合成 정도 測定

動物細胞에 放射線을 照射하거나 化學物質을 處理하면 DNA 傷害를 誘發시키며 이 損傷된 DNA 절제 回復過程을 나타낸다. 動物細胞에 있어 DNA 회복 복제가 나타난다는 事實은 放射線을 照射받은 HeLa 細胞를 對象으로 한 實驗에서 細胞週期中 DNA 合成 時期가 아닌 時期에서 合成이 이루어진다는 事實로서 처음으로 알려졌다²⁴⁾.

體細胞 以外에 生殖細胞에서도 非週期性 DNA 合成을 誘發시킨다는 事實을 ethyl methane sulfonate (EMS), methyl methane sulfonate(MMS) propyl methane sulfonate(PMS), isopropyl methane sulfonate(IMS), ethylene imine(EI), methyl nitrosourea (MNU), cyclophosphamide(CP) 그리고 hycanthone methane sulfonate 등에서 非週期性 DNA 合成 (Unscheduled DNA synthesis)이 나타났다는 事實이 報告되어 있으며, 體外培養中인 흰쥐의 精子細胞에 紫外線이나 X線을 照射하면 非週期性 DNA 合成이 誘發된다는 事實이 報告²⁵⁾되어 있다. 生殖細胞는 體細胞와 달리 원래의 原細胞로부터 精子까지의 分化過程이 複雜한데, 생쥐의 경우 精子形成 過程에서 마지막 DNA 合成은 前細糸期 精母細胞의 14時間 동안 일어난다고 알려져 있고²⁶⁾, DNA 合成이 끝나고, 이 精母細胞들은 28~30日 동안의 發生段階를 거쳐 精細胞가 되어 形成된 精細胞들은 睪丸을 떠나 그 다음의 生殖管을 통해 排出되게 된다. 即 睪丸을 떠난 精細胞는 副睪丸의 上部로 들어가 2~3日後에 그다음 生殖管인 副睪丸의 下部로 가고 그後 2~3日後에 精管에 이르게 되므로 精子를 收集하는 位置나 時期에 따라 精子形成 過程의 測定時期에 있는 細胞들의 放射線 傷害 정도를 各各 測定할 수 있게 된다. 그러므로 감수분열

이나 감수분열 다음時期에 있는 生殖細胞들의 DNA 가 放射線에 依해 損傷을 받게 되면 非週期性 DNA 合成이 일어나게 되고 이 損傷정도는 [H^3]-thymidine이 吸着되는 정도로서 測定될 수 있다. 이러한 觀點에서 볼때 감수분열이나 감수분열 다음 時期에 있는 生殖細胞, 即 마지막 週期性 DNA 合成이 일어나는 前細糸期의 精母細胞以後에 나타나는 DNA 合成은 非週期性인 DNA 合成이라고 말할 수 있으며 이들 細胞들은 精子로서의 發生過程에서 放射線 照射後 32日이 經過한 後에 週期性인 DNA 合成을 거친 細胞들이 副睪丸에서 나타난다는 點을 考慮할 때 放射線 照射後 16日~24日 째에 나타나게 된다고 말할 수 있다. 원래 非週期性 DNA 合成은 autoradiograph를 使用해 損傷받은 生殖細胞의 發生段階에서 直接的으로 測定할 수 있으며, 間接적으로는 이 損傷받은 細胞들이 精子로 成熟되어 生殖管으로 들어갈 때까지 기다렸다가 液體 閃光 計數器(Liquid scintillation counter)로 測定할 수 있다. 液體 閃光 計數器로 하는 方法은 autoradiograph에서 처럼 grain을 計數하는 번거로움이 없이 쉽게 測定되는 長點이 있는 반면에 生殖管에는 언제나 여러 發生段階의 生殖細胞가 存在할 可能性이 있다는 短點이 있다. 또한 放射線이나 藥品 處理에 對해 精子形成 過程이 遲延되는 可能性이 있어서 對照群과 같이 比較되지 못할 可能性이 存在한다²⁷⁾. Autoradiograph로서는 生殖細胞를 오랜 時間 露出시켜야 하고 또한 線量-反應 曲線을 爲한 grain의 測定도 液體 閃光 計數器보다 훨씬 힘들고 努力이 많이 들게 되므로 Segal等(1979)²⁷⁾ 여러 研究者들에 依해 液體 閃光 計數器로서 實驗을 하고 있는 實情이다. 本 實驗의 경우도 液體 閃光 計數器로 放射能을 測定하였으며 放射線을 處理하지 않은 對照群에서 同位元素를 注射한 後 34日後에 放射能 831 cpm으로 最大로 되며 이는 前細糸期 週期性 DNA 合成을 間接적으로 나타낸다고 말할 수 있다. 200 rad의 放射線을 照射받은 경우에는 34日後에 350 cpm으로 最大로 나타나나 이값이 과연 最大值를 反映하는 것인지 前後의 實驗結果가 없기 때문에 確實치는 않다. 實際로 생쥐에 藥品이나 放射線等을 處理하면 精子形

成 過程이 遲延될 수도 있기 때문에 各 照射線量 別로 어느 時期에 週期性 DNA 合成이 일어나는 가를 確因해야만 한다. 그러나 Lu等(1980)²⁸⁾은 600 rad까지의 範圍에서는 原細胞의 分化過程을 遲延시키지 않는다고 報告하였다. 本 實驗에서는 放射線 照射後 28日後에서 對照群이나 200 rad 照射群에서 放射能이 낮게 測定되어 이 後의 어느 時期부터 週期性 DNA 合成이 일어난다고 말할 수 있으므로 放射線 線量에 따른 精子形成過程의 遲延은 200 rad 以下의 線量에서는 나타나지 않는다고 看做할 수 있다. Sega(1974)²⁹⁾은 (C_3H_6 -103) F₁mice에 Ethyl methane sulfonate를 處理하여 나타나는 非週期性 DNA 合成을 測定하였는데 處理後 14일부터 24일까지 對照群과 比較해 현저한 非週期性 DNA 合成의 差異를 보아 精子形成 段階를 감수분열 前期의 初中期 精母細胞로부터 初中期 精細胞時期에서 非週期性 DNA 合成이 일어남을 報告하였으며 對照群과 處理群 모두 處理後 30일부터 週期性 DNA 合成이 始作되어 39일까지 續繼되며 對照群의 경우 33日째, 實驗群의 경우 36日째 最大値를 나타냈다고 報告하고 있다. 本 實驗에서는 放射線 照射後 21日째에 對照群과 比較하여 높은 非週期性 DNA 合成을 볼 수 있었으며 放射線 線量에 따른 非週期性 DNA 合成의 誘發은 200 rad까지 觀察할 수 있었으나 600 rad 線量은 照射群에서는 對照群보다도 오히려 낮은 非週期性 DNA 合成値를 나타내고 있다. 이러한 結果는 非週期性 DNA 合成이 일어나는 時期가 Sega(1974)²⁹⁾의 경우와 비슷하다는 것을 알 수 있으며 比較的 低線量인 50 rad에서 200 rad까지는 線量 反應을 나타내나 600 rad에서는 전혀 낮은 反應을 나타낸다는 事實은 明確히 說明은 할 수 없지만 高線量을 照射한 경우 損傷받은 細胞는 回復복제되지 않고 除去되며 損傷받지 않은 細胞만이 生存하여 낮은 非週期性 DNA 合成値를 나타낼 수 있다고 推定을 해 볼 수 있다. Choi等(1981)³⁰⁾은 DNA에 주는 傷害效果가 감마線과 비슷하다고 보는 MMS(methyl methanesulfonate)를 생쥐의 發生中인 初期 胚芽細胞에 處理한 結果 0.1 mM에서부터 DNA 回復 合成이 觀察되며 濃도가 增加함에 따라 線量-反應을 보이

다가 3~5 mM 以上에서는 오히려 減少하는 傾向을 보여 준다고 報告하는 것으로 間接적으로 設明될 수 있으나 좀 더 定量的인 分析을 통해서만이 確實하게 말할 수 있다고 생각된다. 收集된 精子의 數도 線量 別로는 有意한 差異를 볼 수 없었으나 對照群에 比較하여 200 rad의 경우를 比較하면 모든 경우에 減少하였다. 50 rad 照射의 경우 放射線 照射 16日, 21日後에도 差異가 나타나지 않았다. 또한 同位元素 注入後 時間 經過에 따라 모든 경우에서 精子數가 減少되는데 對照群의 경우 注射後 10日째에 32.9×10^6 이던 것이 34日째에는 9.0×10^6 으로 減少되었는데 이는 Sega(1974)²⁹⁾의 實驗에서 注入後 9日째에 29.4×10^6 에서 時間經過에 따라 精子數가 減少하다가 39日째에는 16.4×10^6 으로 減少하는 경우보다도 더 큰폭으로 減少하였다. Sega의 경우는 27日 前까지의 實驗을 爲해서는 $110 \mu\text{Ci}$ 를 注射하였고 27일부터 39日까지의 實驗을 爲해서는 $55 \mu\text{Ci}$ 를 注射하였는데 반해 本 實驗에서는 全 實驗 過程에서 $36 \mu\text{Ci}$ 를 注射하여 오히려 Sega의 경우 보다는 精子數가 減少하는 폭이 相對적으로 적어야 함에도 減少폭이 높게 나타나는 것은 藥品 處理보다 放射線이 精子形成 過程에 더 큰 障害를 招來함을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) International commission on radiation protection, Recommendations of the international commission on radiological protection, ICRP Publication 26, Annals of the ICRP 1, 3(1977).
- 2) M.L. Meistrich, N.R. Hunter, N. Suzuki, P.K. Trostle, and H.R. Withers, "Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation", Radiat. Res., 74, 349~362(1978).
- 3) A.G. Searle and C.V. Beechey, "Sperm count, egg-fertilization and dominant lethality after X-irradiation of mice", Mut. Res., 22, 63~72 (1974).
- 4) A.J. Wyrobek, and W.R. Bruce, "Chemical induction of sperm abnormalities in mice",

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 72, 4425~4429 (1975).
- 5) M.L. Meistrich, P.K. Trostle, M. Frapart and R.P. Erickson, "Biosynthesis and localization of Lactate Dehydrogenase X in Pachytene Spermatocytes and Spermatids of mouse testes", *Developmental Biology*, 60, 428~441 (1977).
 - 6) G.A. Sega, J.G. Owens and R.B. Cuming, "Studies on DNA repair in early spermatid stages of male mice after *in vivo* treatment with methyl-, ethyl-, and isopropyl methanesulfonate", *Mut. Res.*, 36, 193~212(1976).
 - 7) A. Harrison and L. Royle, "Determination of absorbed dose to blood, kidneys, testes and thyroid in mice injected with ^{211}At and comparison of testes mass and sperm number in X-irradiated and ^{211}At treated mice", *Health Physics*, 46(2), 377~384(1984).
 - 8) A. Harrison and P.C. Moore, "Reduction in sperm count and increase in abnormal sperm in the mouse following X-irradiation injection of ^{22}Na ", *Health Physics*, 39, 219~224(1980).
 - 9) E.F. Oakberg, "Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse", *Ana. Rec.*, 169, 515~532 (1971).
 - 10) E.F. Oakberg and R.L. DiMinno, "X-ray sensitivity of primary spermatocyte of the mouse", *Intern. J. Radiat. Biol.* 2, 196~209 (1960).
 - 11) E.L. Gillette, "Morphology of bovine epididymal spermatozoa after X irradiation of testes", *Diss. Abstr.*, 26, 5512(1966).
 - 12) W.M. Generoso, W.L. Russel, S.W. Huff, S. K. Stout and D.G. Gosslee, "Effects of dose on the induction of dominant-lethal mutations and heritable translocation with ethyl methanesulfonate in male mice", *Genetics*, 77, 741~752(1974).
 - 13) A.J. Wyrobek, "Changes in mammalian sperm morphology after X-ray and chemical exposures", *Genetics*, 92, 5105~5119(1979).
 - 14) W.R. Bruce, R. Furrer and A.J. Wyrobek, "Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular X-irradiation", *Mut. Res.*, 23, 381~386(1974).
 - 15) R.A. Beatty, "The genetics of the mammalian gamete", *Biol. Rev.*, 45, 73~119(1970).
 - 16) W.R. Bruce, R. Furrer, R.B. Goldberg, M.L. Meistrich and B. Mintz, "Genetic control of the kinetics of mouse spermatogenesis", *Genet. Res.*, 22, 155~167(1973).
 - 17) H. Krzanowska, "Inheritance of sperm head abnormality type in mice—the role of the Y chromosome", *Genet. Res.*, 28, 189~198(1976).
 - 18) A.P. Hugenholtz and W.R. Bruce, "Transmission of radiation-induced elevations of abnormally shaped murine sperm", In *Pro. 8th. Ann. Meet. Environ., Mutagen Soc. Denver, Colorado*, 75(1977).
 - 19) A.J. Wyrobek, G. Watchmaker and B.L. Gledhill, "Comparison of 24 murine genotype for abnormalities in the shape of sperm after acute testicular X-irradiation", *Proc. 9th. Meet. Soc. Study Reprod.*, p 73 (1976).
 - 20) W. Sheridan, "The effects of the time interval in fractionated X-ray treatment of mouse spermatogonia", *Mut. Res.*, 13, 163~169(1971).
 - 21) B.M. Cottanach, "Spermatogonial stem cell killing in the mouse following single and fractionated X-ray doses as assessed by length of sterile period", *Mut. Res.*, 25, 53~62(1974).
 - 22) B. O. Reid, K. A. Mason, H. R. Withers, and J. West., "Effects of hyperthermia and radiation on mouse testis stem cells", *Cancer Res.*, 41, 4453~4457(1981).
 - 23) E. Goldberg, "Lactate dehydrogenase in spermatozoa: subunit interactions *in vitro*", *Arch. Biochem. Biophys.*, 109, 134~141(1965).
 - 24) R.E. Rasmussen, and R.B. Painter, "Evidence for repair of ultraviolet damaged deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells", *Nature*, 203, 1360~1362(1964).
 - 25) S. Kofman-Alfaro, and A.G. Chandley, "Radiation-initiated DNA synthesis in spermatogenic cells of the mouse", *Exp. Cell Res.*, 69, 33-44 (1971).
 - 26) V. Monesi, "Autoradiographic study of DNA

- synthesis and cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine”, *J. Cell Biol.*, **14**, 1-18 (1962).
- 27) G.A. Sega, “Unscheduled DNA synthesis(DNA repair) in the germ cells of male mice-its role in the study of mammalian mutagenesis”, *Genetics*, **92**, 549-558 (1979).
- 28) C.C. Lu, M.L. Meistrich and H.D. Thames, Jr., “Survival of mouse testicular stem cells after gamma or neutron irradiation”. *Rad. Res.*, **81**, 402-415 (1980).
- 29) G.A. Sega, “Unscheduled DNA synthesis in the germ cells of male mice exposed in vivo to the chemical mutagen ethyl methanesulfonate”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **71**, 4955-4959(1974).
- 30) K.H. Choi, M.G. Kim, S.D. Park and W.K. Cho, “Effects of MMS and Captan on DNA synthesis and repair synthesis in developing mouse embryo cells”, *Korean J. Genetic*, **2**, 78-89 (1981).

Studies of the Radiation Effects on Mouse Germ Cell

Kyu-Hoi Chung, Ki-Jung Chun, Hai-Won Chung,
Byung-Sun Yoo, Jeong-Ho Lee

Korea Advanced Energy Research Institute

= Abstract =

The objectives of present study is to investigate genetic damage of radiation in mammalian male germ cell and to establish available screening method for determining genetic hazard by radiation. Several methods were employed to measure the genetic damage of radiation as follows:

Sperm head counts, frequency occurrence of sperm with abnormal head shape, fertility, activity of LDH-X, and the induction of unscheduled DNA synthesis (U.D.S.) in male mouse were performed with the passing of time after irradiation by making use of the sequence of event that occurs during spermatogenesis.

Sperm head counts and activity of LDH-X in testes were gradually reduced by increased radiation dose and with the passing of the time after irradiation. Frequency occurrence of sperm with abnormal head shape, sterile period, and the induction of unscheduled DNA synthesis were increased by increased radiation dose. It is suggested that since germ cell is a direct reflection of genetic complement, the use of male germ cell is rapid and convenient method for measuring genetic damage by radiation.