

랫트를 이용한 정자독성평가 연구

정문구 · 김종춘

한국화학연구소 안전성연구부

A Study on the Spermatotoxicity Evaluation in Rats

Moon Koo Chung and Jong Choon Kim

KRICT, Toxicology Research Center, Daejeon, 305-606, Korea

(Received January 4, 1995)

(Accepted January 27, 1995)

ABSTRACT : The present study was carried out to establish several spermatotoxicity test methods. For this purpose we investigated following parameters in the fertility study of DA-125, a new anticancer agent, in rats: testicular spermatid counts, epididymal sperm counts, daily sperm production rate, sperm morphology, and serum testosterone concentration. Motility and velocity of sperms were also measured using non-treated rats.

At 0.3 mg DA-125/kg, spermatids per 1 g testis and daily sperm production rate per 1 g testis were significantly decreased, when compared with those of control group. Several types of abnormal sperms, such as no head, pin head, double head, hook at wrong angle, no tail, and small sperm, were found in both treated and control groups at a low frequency. Serum testosterone concentration at 0.3 mg DA-125/kg was close to the control value. Sperm motility and velocity measured with non-treated rats were in a good agreement with the results of other investigators.

In our study established spermatotoxicity test methods can be used as a tool not only for the close examination of the cause of drug- or chemical-induced infertility, but also for the effective evaluation of reproductive toxicity.

Key Words : Spermatotoxicity, Rats.

I. 서 론

인간과 동물에 있어서 생식능력의 형성과정은 매우 복잡하다. 중추신경계, 시상하부 및 생식기관간의 신경적 교류는 정상적인 생식기능을 위한 전제조건이 된다. 수컷 동물의 경우 신경화학적 신호는 시상하부, 뇌하수체전엽, 라이디히세포(Leydig's cells), 세르톨리세포(Sertoli's cell) 및 생식세포간에 정보를 전달한다. 수정이 성립되기 위해서는 상기한 조직 또는 세포와 정소상체 및 부생식기관의 상호작용이 연속적으로 조율되어 이루어져야만 한다.

의약품이나 환경오염물질 등의 화학물질은 인간과 동물의 웅성 생식기관에 작용하여 수태능력 장애를 야기시킬 수 있는데, 상기한 생식능력 형성과정의 복잡성 때문에 수태능력의 평가를 위해서는 다양한 검사절차가 필요하다.

수태율의 저하는 수컷동물의 경우 정자형성장애, 정소중량의 감소, 호르몬의 분비이상, 성행동의 변화 등에 의해 야기될 수 있는데, 의약후보물질의 생식독성 평가시

주로 랫트를 이용하여 실시하는 수태능력시험의 경우 국내에서는 수태율(fertility index), 장기중량, 정소의 병리조직 등만을 조사하고 있는 실정이다. 그런데 질전 또는 정자의 확인을 통해서 수태율을 조사할 경우에는 수태율의 저하가 생식기관의 기능장애(예: 정자형성부전)에 기인한 것인지 또는 CNS 손상(예: 성행동의 변화)에 의해 나타난 것인지를 구분할 수가 없다(Zenick 등, 1984).

본 연구는 의약품등의 화학물질에 의해 야기될 수 있는 수태능력장애의 원인규명과 그에 따른 효율적인 생식독성평가를 위하여 랫트를 이용한 정자독성시험법을 확립하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 시험에는 동아제약에서 합성한 DA-125(Lot No.

DA-125-026)가 사용되었다. DA-125의 구조식은 7-0-(2, 6-dideoxy-2-fluore- α -talopyranosyl)-adriamycinone-14- β -alaniolate HCl이고 분자량은 670이며 적색분말로서 순도는 95%이상이었다. 주사시 DA-125는 1 mM lactic acid (in saline, pH 4.0)용액에 용해시켜 사용하였다.

2. 실험동물 및 환경조건

실험동물은 한국화학연구소 안전성연구부 실험동물 육종실(대전광역시 유성구 장동 100)로 부터 입수한 Sprague-Dawley 랫트(SPF)를 사용하였다. 5주령의 암수 각각 116마리를 입수한 후 수컷은 약 1주일간 그리고 암컷은 약 1개월간 검역과 순화사육을 거친 뒤 외견상 건강한 암수 각각 96마리를 선별해 시험에 사용하였다. 그리고 정자의 운동성 및 속도측정 시험에는 추가로 각각 10마리씩의 무처치동물(13주령)을 사용하였다.

본 시험은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 환기횟수 13-18/hr., 조명시간 12시간(오전9시-오후9시) 및 조도 200-300 Lux로 설정된 동물실에서 실시되었다.

시험기간중 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료(주))를 방사선(2.0 Mrad) 멸균하여, 그리고 물은 상수도수를 자외선살균기로 소독시킨 후 자유섭취시켰다.

3. 투여량의 설정과 시험군의 구성

0, 0.012, 0.06 및 0.3 mg/kg의 4개 용량으로 DA-125의 90일 랫트 아급성시험을 실시한 바, 0.3 mg/kg군에서 경미한 체중증가억제가 나타났으나 그 밖의 군에서는 어떠한 독성증상도 관찰되지 않았다. 이를 기초로 본 시험에서는 0.3 mg/kg을 고용량으로 정하고 공비 3으로 중용량 및 저용량을 0.1 및 0.03 mg/kg으로 설정하고 그 외에 매체대조군을 두었다. 시험군의 구성은 Table 1과 같다.

4. 투여방법 및 투여기간

동물의 미정맥내로 수컷은 교배 60일전부터 교배성립 시까지, 암컷은 교배 14일전부터 임신 7일까지 1일 1회 오전중에 연속투여하였다. 투여액량은 암수 모두 주 1회 측정된 체중을 기초로 산출하였다.

5. 관찰 및 검사항목

일반증상관찰: 시험기간중 1일 1회 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 관해서 관찰하였다.

체중측정: 수컷동물의 체중은 교배전에 주 1회 간격으

Table 1. Experimental design for fertility study of DA-125 in rats.

Group	Dose (mg/kg)	Volume (ml/kg)	No. of animals	
			Male	Female
Control	0	1	24	24
T1	0.03	1	24	24
T2	0.1	1	24	24
T3	0.3	1	24	24

로 측정하였다.

교배의 판정: 질전 또는 질도말시 정자를 확인한 날을 임신 0일로 정하였으며, 임신유무의 최종판정은 제왕절개시 자궁의 착상흔적 유무에 따랐다.

부검: 시험에 사용된 모든 동물들은 부검하여 체표, 체강, 흉강 및 복강의 전 장기에 대하여 육안적 검사를 실시하였다. 해부시기는 수컷은 교배종료후에 실시하였다. 부검시 간장, 신장, 비장, 심장, 뇌, 부신, 정소, 정소상체, 전립선 및 정낭선의 중량을 측정하였다.

정소의 병리조직학적 검사: 최고용량군과 대조군 동물 각각 10마리씩의 좌측 정소를 10% 포르말린액에 고정된 후 파라핀 포매, 박절한 뒤 hematoxylin-eosin염색을 실시하여 검경하였다.

정자검사: 각 군당 수컷 10마리씩에 대하여 우측의 정소와 정소상체 미부를 10 ml의 생리식염수가 들어있는 용기에 넣은 후 ultraturax균질기(7000 rpm, 2분)로써 균질화한 뒤 혈구계산판(hemocytometer; Neubauer, Germany)을 이용하여 정자세포 및 정자의 수를 계수하였다. 그리고 정소 1 g내의 정자세포수를 6.1일로 나눔으로써 1 g 정소당의 1일 정자생산율을 산출하였다(Amann 등, 1976; Robb 등, 1978). 또한 정관내의 정자를 채취하여 1 ml의 생리식염수로 희석한 정자 현탁액을 염색액(2% 에오신과 3% 구연산염의 혼합액)과 1:1로 혼합하여 도말표본을 만들고 최고용량군과 대조군 각각 10마리에 대하여 표본당 100마리의 정자를 200배의 배율로 현미경 하에서 관찰함으로써 정자의 형태학적 이상유무를 조사하였다.

호르몬 측정: 각 군당 수컷 10마리씩 후대정맥에서 혈액을 채취한 후 원심분리(3000 rpm, 10분)시켜 얻은 혈청을 -80°C 에 보관하였다. 저장된 혈청을 갖고 Serono SR Analyzer(Serono Diagnostic S.A)를 이용하여 효소면역분석법(enzyme immunoassay)에 따라서 테스토스테론의 함량을 측정하였다.

정자의 운동성 검사: 무처치동물 10마리에 대하여 우측정소상체 미부를 37°C 의 Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS; GIBCO)10 ml에 bovine serum albumin(BSA; Fraction V, Sigma Chemical Co.) 100 mg이 들어 있는 샐레에 넣고서 안과용 가위로 잘게 세절한 다음

37°C배양기에서 배양하였다. 이 정자배양액을 5분간 배양하여 BSA가 함유된 PBS로 10배 희석한 다음 혈구계산판에서 100배의 배율로 검경하면서 비디오테이프 (Video camera recorder)에 녹화하였다.

녹화된 테이프에서 각 개체당 200개의 정자에 대해서 운동성을 관찰하였으며, 조금이라도 움직이는 정자는 운동성 정자로 판정하였다(Working 등, 1987; 谷村, 1992).

정자의 속도검사: 상기 정자배양액을 15분간 배양하여 BSA가 함유된 PBS로 10배 희석한 다음 혈구계산판에서 100배의 배율로 검경하면서 비디오테이프에 녹화하였다. 녹화된 테이프에서 각 개체당 20개의 정자에 대해서 운동 속도를 측정하였으며, 3초 동안 움직인 직선거리를 측정하여 초당 속도로 환산하였다(Working 등, 1987).

6. 통계학적 분석

얻어진 시험자료에 대한 통계분석은 SAS 프로그램 (SAS Institute Inc., Ver. 6.04)을 이용하였으며 일원배치 분산분석(ANOVA)을 실시하여 P<0.05일 경우에는 다중 비교검정법인 Dunnett's test를 실시하였다. 통계학적인 유의성은 1% 혹은 5%에서 검사하였다.

III. 결 과

1. 수컷동물의 일반증상

전 시험기간동안 수컷동물에 대하여 일반증상 관찰을

실시한 결과, 대조군에서는 탈모(hair loss)가 2례 그리고 후지마비(paralysis of hindlimb), 비루(nasal discharge) 및 눈주위 암적색 분비물(dark material around eye)이 각각 1례씩 관찰되었다. 0.03 mg/kg군에서는 탈모 2례와 후지마비 1례가 나타났고, 0.1 mg/kg군에서는 탈모 및 눈주위 암적색 분비물이 각각 1례씩 발견되었다. 상기 소견들 중에서 0.03 mg/kg군에서 1례 나타난 후지마비는 대조군에서도 1례 관찰되었는데 투여보정시 동물의 격한 운동으로 야기되었고, 0.03 mg/kg군과 0.1 mg/kg군에서 소수에

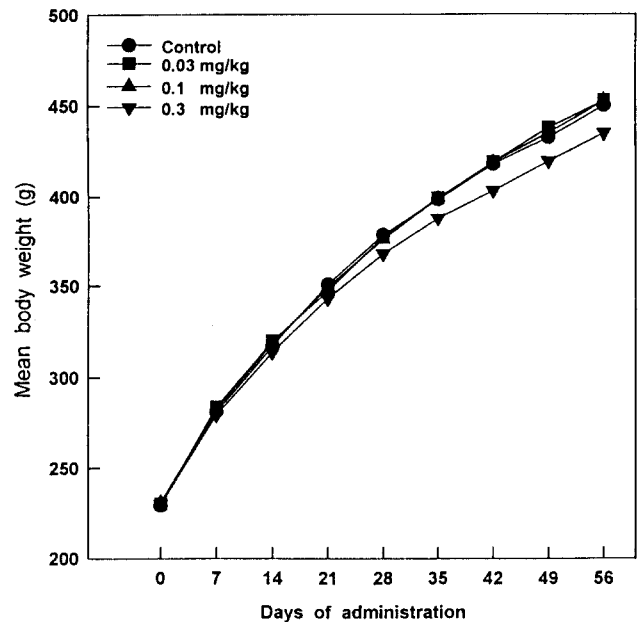


Fig. 1. changes in body weights of male rats before mating.

Table 2. Relative organ weights of male rats treated with DA-125 during the pre-mating period.

Group : Dose : (mg/kg)	Control 0	T1 0.03	T2 0.1	T3 0.3
No. of animals	24	24	24	24
Body weight (g)	456.2±31.2	452.3±46.0	456.5±40.8	439.4±34.6
% Body weight				
Brain	0.480±0.055	0.476±0.054	0.472±0.048	0.505±0.038
Adrenal gland-left	0.006±0.001	0.006±0.002	0.006±0.001	0.007±0.002
Adrenal gland-right	0.005±0.001	0.006±0.001	0.006±0.003	0.006±0.001
Liver	3.199±0.451	3.628±0.364**	3.300±0.283	3.231±0.303
Spleen	0.145±0.018	0.146±0.015	0.140±0.014	0.133±0.015*
Kidney-left	0.340±0.039	0.363±0.052	0.347±0.048	0.371±0.048
Kidney-right	0.341±0.033	0.368±0.043	0.355±0.044	0.370±0.048
Heart	0.286±0.024	0.286±0.025	0.281±0.025	0.298±0.024
Testis-left	0.361±0.055	0.373±0.049	0.369±0.047	0.386±0.047
Testis-right	0.364±0.059	0.364±0.034	0.373±0.047	0.386±0.042
Seminal vesicle	0.266±0.063	0.254±0.076	0.285±0.099	0.277±0.069
Prostate gland	0.143±0.043	0.149±0.045	0.156±0.050	0.160±0.042
Epididymis-left	0.120±0.019	0.128±0.050	0.123±0.019	0.127±0.176
Epididymis-right	0.123±0.020	0.122±0.015	0.125±0.018	0.129±0.012

Values are Mean ± S.D.

* and ** indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels when compared with the control group.

로써 관찰된 탈모와 눈주위 암적색 분비물은 대조군에서도 발견되었는데 투여보정에 의한 물리적 자극에 기인한 소견으로서 시험물질에 의한 변화는 아니었다.

2. 수컷동물의 체중

수컷동물의 교배전 기간의 체중에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다(Fig. 1).

3. 수컷동물의 부검소견

수컷동물의 교배종료후 부검시 대조군에서는 정소위축(atrophy)이 1례 나타났고, 0.03 mg/kg군에서는 정소상체의 황색결절(nodule)이 1례 관찰되었다. 그리고 0.1 mg/kg군에서는 좌측신장의 낭종(cyst) 및 좌측 정낭선 위축

이 각각 1례씩 관찰되었고, 0.3 mg/kg 군에서는 횡격막 탈장(diaphragmatic hernia)이 1례 발견되었다.

상기 소견들은 SD랫트에 있어서 자연발생적으로 나타나는 소견들로서 시험물질의 영향은 아니었다.

4. 수컷동물의 절대 및 상대장기중량

수컷동물의 절대 및 상대장기중량에 있어서 0.03 mg/kg군의 간장은 대조군에 비해 통계학적으로 유의성있는 증가를 나타냈고, 0.3 mg/kg군의 비장은 유의성있는 감소를 보였다(Table 2). 이 중 0.03 mg/kg군의 간장중량 증가는 용량상관성이 없어서 시험물질에 의한 변화는 아니었고, 0.3 mg/kg군의 비장중량 감소는 시험물질의 투여에 기인한 독성증상으로 인정되었다.



Fig. 2. A cross-section of a rat testis in the control group. H & E, x 200

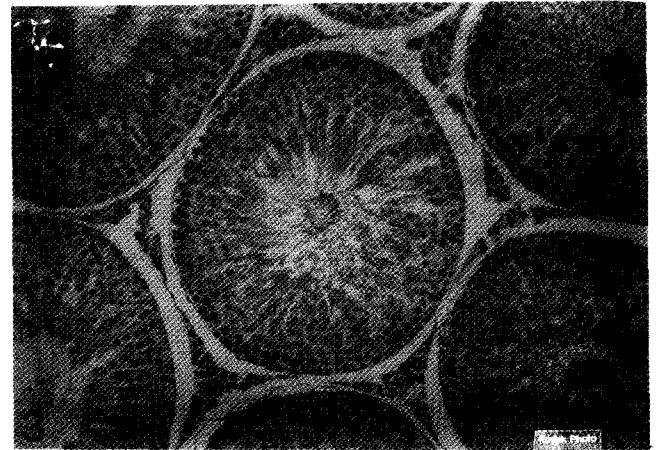


Fig. 3. A cross-section of a rat testis in the 0.3 mg DA-125/kg group. H & E. x200

Table 3. Testicular spermatid reserves, epididymal sperm reserves and daily sperm production of male rats treated with DA-125 during the pre-mating period.

Group :	Control	T1	T2	T3
Dose : (mg/kg)	0	0.03	0.1	0.3
No. of animals	9	10	10	10
Body weight (g)	445.1 ± 25.7	447.6 ± 47.9	449.5 ± 36.9	415.2 ± 29.8
Testis (g)	1.63 ± 0.10	1.63 ± 0.08	1.66 ± 0.23	1.69 ± 0.08
Cauda epididymidis (g)	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.27 ± 0.03
No. (million) of :	268.0 ± 35.8	253.1 ± 35.6	239.3 ± 71.8	218.9 ± 25.5
Spermatids/testis	164.4 ± 18.5	155.3 ± 21.2	141.8 ± 35.4	129.5 ± 11.9**
Spermatids/g testis	134.0 ± 38.0	107.4 ± 29.7	100.1 ± 36.9	94.7 ± 27.0
Sperms/epididymis				
Sperms/0.1 g Epididymis	46.5 ± 10.9	39.4 ± 8.2	39.2 ± 14.0	34.9 ± 7.9
Daily sperm production rate/g testis	27.0 ± 3.0	25.5 ± 3.5	23.2 ± 5.8	21.2 ± 2.0**

Values are Mean ± S.D.

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

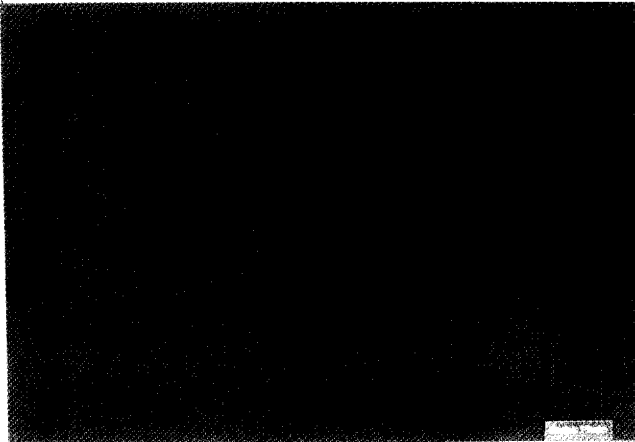


Fig. 4. No tail in a sperm of the control group. Eosin Y. x400

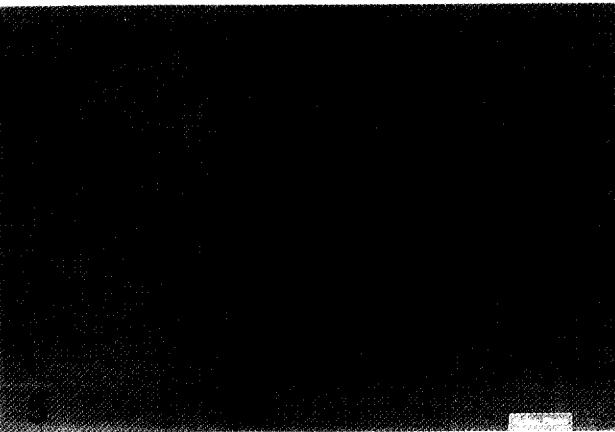


Fig. 5. No head in a sperm of the control group. Eosin Y. x400.

5. 정소의 병리조직학적 검사

정소, 특히 곡정세관(tubuli seminiferi contorti)의 조직 검사시 고용량군에서 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다(Fig. 2~3).

6. 정자검사

정자검사에 있어서 0.3 mg/kg군의 1g 정소당 정자세포수와 1일 정자생산율이 대조군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었는데 이는 시험물질의 영향으로 사료되었다. 상기 소견을 제외하고는 정소내의 정자세포수, 정소상체내의 정자수와 1일 정자생산율에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다(Table 3). 정관내 정자의 형태학적 검사시 고용량군에서는 무미부(no tail, Fig. 4), 무두부(no head, Fig. 5), 송곳형 두부(pin head, Fig. 6), 두부갈고리의 각도이상(hook at wrong angle) 및 이중두부(double head, Fig. 7)가 각각 6.1, 3.2, 0.2,

Table 4. Serum testosterone concentration of male rats treated with DA-125 during the pre-mating period.

Group :	Control	T1	T2	T3
Dose : (mg/kg)	0	0.03	0.1	0.3
No. of animals	10	9	9	10
Hormone conc. (n mol/L)	7.1±2.6	7.1±2.5	7.5±5.4	7.7±4.6

Values are Mean ± S.D.

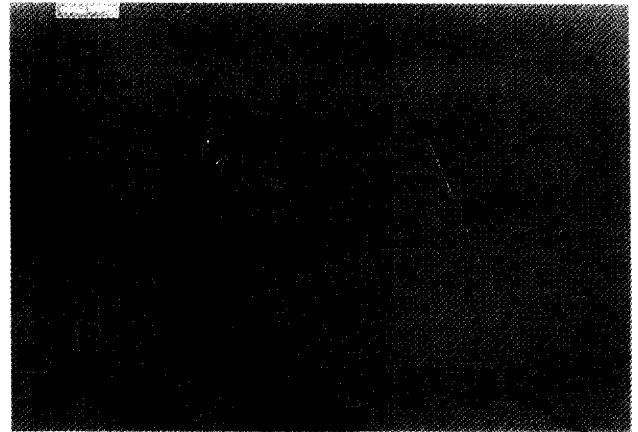


Fig. 6. Pin head in a sperm of the 0.3 mg DA-125/kg group. Eosin Y. x400

0.1 및 0.1%씩 비율로 관찰되어 총 9.7%의 정자기형 발현율을 나타냈다. 그런데 대조군에서도 무두부, 무미부, 송곳형 두부, 두부갈고리의 각도이상 및 소정자(small sperm)가 각각 3.2, 1.8, 0.5, 0.1 및 0.1%씩 총 5.7%의 기형정자가 발견되어 시험물질의 영향은 인정되지 않았다.

7. 호르몬 측정

수컷동물의 혈청내 융성호르몬 테스토스테론 함량에 있어서 각 투여군과 대조군간의 유의차는 인정되지 않았다(Table 4).

8. 교배성적

교미율과 수태율은 모든 투여군에서 대조군에 대하여 유의성을 나타내지 않았다(Table 5).

9. 정자의 운동성 및 속도

무처치동물을 이용하여 정자의 운동성과 속도를 조사한 바, 그 결과는 Table 6과 같다.

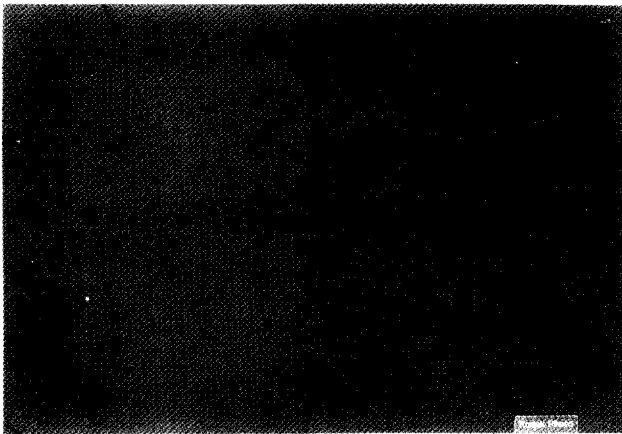
IV. 고 찰

Table 5. fertility data of parent animals treated with DA-125 during the pre-mating period.

Group : Dose : (mg/kg)	Control 0	T1 0.03	T2 0.1	T3 0.3
Male				
No. of mated animals	24	24	24	24
No. of copulated animals	23	24	24	24
% to no. of mated animals	95.8	100.0	100.0	100.0
No. of fertilized animals	19	20	20	22
% to no. of copulated animals	82.6	83.3	83.3	91.7
Female				
No. of mated animals	24	24	24	24
No. of copulated animals	23	24	24	24
% to no. of mated animals	95.8	100.0	100.0	100.0
No. of fertilized animals	19	20	20	22
% to no. of copulated animals	82.6	83.3	83.3	91.7

Table 6. Cauda epididymal sperm motility in SD rats.

Indicator	No. of animals	Range	Mean \pm S.D.	CV(%)
Motile cells (%)	10	55.0~68.0	61.3 \pm 4.3	7.0
Straight-line velocity (μ m/sec)	10	47.0~70.0	59.2 \pm 9.6	16.2

**Fig. 7.** Double head in a sperm of the 0.3 mg DA-125/kg group. Eosin Y. x400

금세기초 작업장에서의 납에 대한 노출이 남성의 수태 능력장애를 유발할 수 있다는 사실이 보고된 바 있지만 (Reid, 1911), 납성에 기인한 생식기능 저하에 관한 연구는 오랜 세월동안 관심의 대상이 되지 않았다.

1961년에 Torkelson 등은 1, 2-dibromo-3-chloropropane(DBCP)에 노출된 랫트에 있어서 정자형성이 감소함을 발견하였는데, 이 소견은 1970년대 중반에 DBCP에 노출된 작업자들에게서 역학조사를 통해 증명되었다(Whorton 등, 1977; Biava 등, 1978; Potashnik 등, 1978). 이를 계기로 남성생식기관이 화학물질에 대해 민감하게 반응할 수 있다는 사실이 알려졌고, 작업장에서의

안전에 관한 의식이 높아졌으며 남성 생식능력의 부정적 영향에 관한 관심과 주의력이 상승하게 되었다(Amann, 1982; Schrader 등, 1988).

산업사회의 발달과 더불어 오늘날 인류는 수많은 화학 물질의 홍수속에 살고 있다. 작업장에서의 화학물질에 대한 노출가능성은 과거보다 더욱 높아졌으며 의약품의 남용 또한 큰 사회적 문제로 등장하였다.

생체이물(xenobiotics)에 의한 남성수정능력의 감소는 피해자들에게 있어선 치명적인 일이 아닐 수 없다. 이 때문에 외부물질에 의한 남성생식능력의 영향을 검색할 수 있는 민감한 동물모델과 평가모델을 개발, 확립하는 일은 매우 중요하다고 판단된다.

본 연구에서는 생식독성시험에서 흔히 쓰이는 동물종인 랫트를 이용하여 정자독성 시험법을 개발, 확립하였다. 신약후보물질인 DA-125는 항암제로서 세포 증식율이 높은 생식세포에 작용하여 수태율의 감소를 야기할 수 있는 잠재력을 지니고 있지만 수컷동물에게 경미한 일반독성이 유발된 본 시험조건하에서는 1g 정소당 정자세포수와 1일 정자생산율만이 감소했을뿐 수태율은 정상치를 나타냈다. 본 연구를 통해 얻은 정상동물의 기초 데이터, 즉, 정자의 운동성, 정자의 속도, 혈청중의 호르몬함량 등은 타 연구자들의 보고와 매우 근접하게 나타났다(Working 등, 1987; Zenick 등, 1989).

상기 시험법의 확립으로 의약후보물질의 수태능력시험에서 수태율의 저하가 관찰될 경우 그 원인의 규명은 물론 환경오염물질에 대한 효율적인 생식독성평가에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 그런데 사출액당의 정자수는 인간의 경우 수정능력을 보장하는 기준치의 약 2배에 달하는 반면에(Smith, 1978; David 등, 1979; MacLeod 등, 1979; Amann, 1987) 실험동물에 있어서는 수정에 필요한 수보다 약 10~1000배나 된다고 한다(Afjes 등, 1980). 이러한 이유때문에 랫트에 있어서는 정자수가

90%이상 감소할 때에서야 수태장애를 유발한다고 한다 (Meistrich, 1982; Robaire 등, 1984; Amann, 1986). 동물 실험 결과를 기초로 인간에 대한 위험성을 평가할 때에는 상기한 동물과 인간간의 생물학적 차이를 반드시 고려해야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Afjes, J.H., Vels, J.M. and Schenck, E. (1980): Fertility of rats with artificial oligozoospermia. *J. Reprod. Fertil.*, **58**, 345-351.
- Amann, R.P. *et al.* (1976): Daily spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biol. Reprod.*, **15**, 586-592.
- Amann, R.P. (1982): Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fund. Appl. Toxicol.*, **2**, 13-26.
- Amann, R.P. (1986): Detection of alternations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ. Health. Perspect.*, **70**, 149-158.
- Amann, R.P. (1987): A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.*, **2**, 37-58.
- Biava, C.G., Smuckler, E.A. and Whorton, D. (1978): The testicular morphology of individuals exposed to dibromochloropropane. *Exp. Molec. Pathol.*, **29**, 448-458.
- David, G.P. *et al.* (1979): Sperm counts in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.*, **13**, 453-455.
- MacLeod, J. and Wang, Y. (1979): Male fertility potential in terms of semen quality : A review of the past, a study of the present. *Fertil. Steril.*, **31**, 103-116.
- Meistrich, M.L. (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.
- Potashnik, G. *et al.* (1978): Suppressive effect of 1, 2-dibromo-3-chloropropane on human spermatogenesis. *Fertil. Steril.*, **30**, 444-447.
- Reid, G. (1911): Report of the departmental commission on the dangers attendant on the use of lead. Quoted by T. Oliver: Lecture on lead poisoning and the race. *Br. Med. J.*, **1**, 1096-1098.
- Robaire, B., Smith, S. and Hales, B.F. (1984): Suppression of spermatogenesis by testosterone in adult male rats: Effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol. Reprod.*, **31**, 221-230.
- Robb, G.W., Amann, R.P. and Killian, G.J. (1978): Daily sperm reproduction and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.*, **54**, 103-107.
- Schrader, S., Turner, T. and Ratcliffe, J. (1988): The effects of ethylene dibromide on semen quality: A comparison of short-term and chronic exposure. *Reprod. Toxicol.*, **2**, 191-198.
- Smith, K.D. (1978): Evaluation of sperm counts in 2543 men requesting vasectomy. *Andrologia*, **10**, 362-368.
- Torkelson, T.R., Sadek S.E., and Rowe, V.K. (1961): Toxicologic investigations of 1,2-di-bromo-3-chloropropane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **3**, 545-549.
- Whorton, D. *et al.* (1977): Infertility in male pesticide workers. *The Lancet*, **2**, 1259-1261.
- Working, P.K. and Hurtt, M.E. (1987): Computerized videomicrographic analysis of rat sperm motility. *J. Androl.*, **8**, 330-337.
- Zenick, H. and Clegg, E.D. (1989): Assessment of male reproductive toxicity: A risk assessment approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*. W. Hayes *et al.*, eds, Raven Press, New York, p. 275-309.
- Zenick, H. *et al.* (1984): Evaluating male reproductive toxicity in rodents: A new animal model. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen*, **4**, 109-128.
- 谷村 孝 (1992): 毒性試験講座 Vol. **11**, 發生毒性, 地人書館, p. 299-315.