

## 내분비계 장애물질 검색법의 확립을 위한 항안드로젠성 물질 flutamide의 랫드 28일 반복투여 독성시험

정문구\* · 김종춘 · 임광현 · 하창수  
한국화학연구소 안전성연구센터 생식독성실

### 28-day Repeated-dose Toxicity Study of Flutamide, an Anti-androgenic Agent, in Rats: Establishment of Screening Methods for Endocrine Disruptors

Moon-Koo Chung\*, Jong-Choon Kim, Kwang-Hyeon Lim and Chang-Su Ha

Reproductive Toxicology Division, Toxicology Research Center, Korea Research  
Institute of Chemical Technology, Yousung, Daejeon 305-600, Korea

(Received March 15, 2000)

(Accepted April 25, 2000)

**ABSTRACT** : Recently, there is a worldwide concern that a great number of man-made chemicals have a hormone-like action both in humans and in animals. OECD is developing screening programs using validated test systems to determine whether certain substances may have an effect in humans. In the present study, the establishment of repeated-dose toxicity test method was tried. Flutamide, an anti-androgenic agent, was administered by gavage to Sprague-Dawley rats for 28 days at dose levels of 0, 0.5, 3 and 18 mg/kg body weight (10-15 rats/sex/group) to examine the effects on general findings, especially reproductive and endocrine parameters. Clinical signs, body weights, food consumption, and sexual cycle were checked and measured. For the gross and microscopic examinations, 10 rats/sex/group were sacrificed at the end of dosing period and the remaining animals of control and high dose groups (5 each) were sacrificed after 14 days recovery. Examinations for hematology and clinical chemistry were carried out at necropsy. There were no treatment-related changes in clinical signs, body weights, food consumption, gross necropsy, hematology and clinical chemistry at all doses of both sexes. The period and regularity of sexual cycle were not adversely affected at all doses by the test agent. At 18 mg/kg, both decreased weights of prostate, seminal vesicle and epididymis in males and increased weights of spleen and thymus in females were observed. In addition, decreased number of spermatids and sperms, increased serum testosterone concentration and increased incidence (100%) of interstitial cell hyperplasia were seen in males. At 18 mg/kg of the recovery group, decreased prostate weight, reduced sperm count and increased incidence (20%) of interstitial cell hyperplasia in males and increased thymus weight in females were observed. At 3 mg/kg, reduced sperm count was found. There were no adverse effects on parameters examined at 0.5 mg/kg of both sexes. The results suggested that the potential target organs of flutamide may be accessory sexual glands including testes for males and spleen and thymus for females. Taken together, this test method was found to be a useful screening test system for endocrine disrupting chemicals.

**Key Words** : Endocrine disrupting chemicals, In vivo screening test, Repeated-dose toxicity study, Flutamide, Atrophy of male sexual organs, Leydig cell hyperplasia.

#### I. 서 론

환경 화학물질에 대한 노출이 내분비계 장애를 유발시

킴으로서 인간의 번식과 발달에 중대한 위협을 야기시킬 수 있다는 우려가 크게 증대되고 있다(Colborn 등, 1993; Sharpe와 Skakkebaek, 1993; Toppari 등, 1996). 논란의 대상이 되고 있는 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemicals, EDCs)은 생체내 항상성(homeostasis) 유지와

\*To whom correspondence should be addressed

성장, 발육 및 생식기관의 발달 등을 조절하는 천연호르몬의 생성, 분비, 이동, 대사, 결합, 작용 또는 배설을 간섭하는 외인성 물질로서(Kavlock 등, 1996), 생체내로 유입되면 마치 호르몬과 같이 작용한다고 하여 일명 “환경호르몬”이라 불리고 있다. 조직의 분화를 조절하는데 있어서 호르몬의 역할은 매우 중대하기 때문에 발달중의 개체는 호르몬 또는 항호르몬 작용을 지닌 화학물질의 노출의 시점 및 강도에 특히 영향을 받기가 쉽다. 내분비계 장애물질은 자연상태에서 잘 분해되지 않고 저농도로 장기간에 걸쳐서 생체에 노출됨으로서 내분비계를 교란시킨다고 한다. 이러한 물질들은 사람이나 야생동물에 있어서 요도하열(hypospadias), 정류고환(cryptorchidism), 가상반음양(pseudohermaphroditism) 등의 생식기 발육이상과 정자수 감소 및 정자활력 저하 등의 생식기능이상을 초래하고, 또한 내분비계 장애물질중 일부는 생식기계 및 내분비계 영향을 받는 고환, 전립선 및 유방의 암발생 증가의 중요한 원인일 것이라고 추정되고 있다(Carlsen 등, 1992; Ahlberg 등, 1995; Sharpe 등, 1995; Colborn 등, 1996). 이에 따라 세계 각국의 정부는 그 대책수립에 나서 정부연구기관, 산업계, 학계, 소비자단체 및 환경보호단체들과 공동으로 해결책을 마련해야 한다고 생각하고 있다. 미국 환경청(US EPA)에서는 1996년 5월 내분비계 장애물질 검색 및 시험자문위원회(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)를 설치하였고, 내분비계 장애물질로 의심되는 화학물질에 대한 검색 및 시험법을 실시할 예정이다. 일본에서는 1996년 7월부터 후생성과 환경청을 중심으로 내분비계 장애물질에 대한 연구를 추진하고 있고, 우리 나라에서도 1998년 5월부터 환경부와 식품의약품안전청을 중심으로 가칭 “내분비계 장애물질 연구협의회”를 구성하여 이 문제를 다루기 시작하였다.

국제기구인 OECD는 1998년 3월 환경호르몬 시험 및 평가 실무작업반(Endocrine Disruptor Testing and Assessment, EDTA)을 구성하여 독성기전연구, 실험동물모델개발, 생체내에서 호르몬 생합성과 대사를 예견할 수 있는 *in vitro* 시험법 개발을 수행해 오고 있다. 최근에는 내분비계 장애물질 검색법의 확립의 일환으로 반복투여 독성 시험법(OECD, 1993)에 대한 검증작업(validation work)을 수행하고 있으며, 우리나라를 포함한 여러 나라의 독성시험기관에서 이러한 검증시험사업에 참여하고 있다. OECD에서는 반복투여 독성시험법의 검증작업을 위해 항안드로젠성 물질로 알려져 있는 flutamide를 시험물질(reference compound)로 선정하였다. Flutamide는 toluidine 유도체로서 안드로젠에 의해 야기된 질병의 치료에 사용되고 있는데, 전립선 종양의 치료를 위한 임상용량은 경구복용시 100~300 mg/day, 즉 체중 kg당 1.7~5 mg 정도이다.

본 연구실에서는 국제공동연구의 일환으로 랫드를 이용

하여 flutamide의 28일간 반복 경구투여 독성시험을 수행하였다. 본 시험에서는 flutamide가 랫드의 생식 및 내분비 기관에 미치는 영향을 평가하는데에 초점을 두었으며, 일반독성 시험과는 다소 차이가 있는 본 시험에서의 검사 항목이 내분비계 장애물질의 검색에 적합한지를 평가해보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질

본 시험에는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입한 미황색 분말형태의 Flutamide(Lot No. 87H1511)를 0.5% Carboxymethyl cellulose 용액(CMC, Lot No. 07326-3)에 현탁시켜 사용하였다.

### 2. 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구부 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100)에서 구입한 4주령의 Sprague-Dawley 랫드를 3주일간 검역과 순화사육을 거쳐 외견상 건강한 암수 각각 50마리를 선별해 시험에 사용하였다. 본 시험은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/hr., 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 시험기간중 방사선조사(25 kGy)로 멸균한 실험동물용 고형사료[제일사료(주), 대전광역시 대덕구 대화동]와 자외선 유수살균기로 소독한 상수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 3. 투여량의 설정과 시험군의 구성

용량설정을 위한 랫드 14일 반복투여 독성시험에서 flutamide를 0, 0.08, 0.4, 2.0 및 10.0 mg/kg의 용량으로 경구투여한 결과 2 mg/kg 투여군에서는 전립선의 중량이, 그리고 10 mg/kg 투여군에서는 전립선 및 정낭선의 중량이 매체대조군에 비해 현저하게 감소하였다(미발표 자료). 이를 기초로 18 mg/kg을 고용량으로 정하였고 공비 6으로 중용량 및 저용량을 각각 3 및 0.5 mg/kg으로 설정하였으며, 그 외에 매체대조군(0.5% CMC)을 두었다. 28일간 반복투여후 부검한 주요군은 각 군당 암수 10마리씩으로 구성하였고, 회복군은 매체대조군과 고용량군에 암수 5마리씩으로 구성하였다.

### 4. 투여방법 및 투여기간

경구투여용 존데(sonde)가 장착된 주사기를 이용하여 1

일 1회씩 28일간 반복하여 위내로 직접 주입하였다. 회복군에 대해서는 28일간 반복투여 후 휴약기간 14일을 추가로 두었다. 투여액은 주 2회씩 측정된 체중에서 가장 최근의 체중을 기준으로 하여 kg당 10 ml로 산출하였다.

**5. 관찰 및 검사항목**

**일반증상 관찰:** 투여 전기간에 걸쳐 1일 2회씩 일반증상 및 사망의 유무에 관하여 관찰하였고, 증상의 종류와 정도를 Labcat system(Innovative Programming Associates Inc., New Jersey, USA)을 이용하여 기록하였다.

**체중 측정:** 투여개시후 1주일에 2회의 빈도로 체중을 측정하였다.

**사료섭취량 측정:** 체중측정일에 사료를 급여하고 익일 잔량을 측정하여 일일 섭취량을 계산하였다.

**성주기검사:** 암컷동물에 대하여 부검 개시전 8일간 질도말 검사를 실시하여 성주기의 규칙성과 기간을 조사하였다.

**혈액학적 검사:** 모든 동물에 대하여 에테르로 마취하여 개복 후 복대동맥에서 채혈한 혈액으로 아래의 항목을 측정하였다. 응고방지제로서 혈액응고 검사에는 3.2% sodium citrate를 이용하였으며 그 외의 측정항목에는 EDTA-2K를 사용하였다.

①~⑨의 각 항목은 혈구자동계측장치 T-540 Coulter

항목	단위	방법
① WBC (White blood cell count)	$\times 10^3/\text{mm}^3$	전자저항법
② RBC (Red blood cell count)	$\times 10^6/\text{mm}^3$	전자저항법
③ HGB (Hemoglobin concentration)	g/dl	시안메트헤모글로빈변법
④ HCT (Hematocrit)	%	②, ③ 항목으로 산출
⑤ MCV (Mean corpuscular volume)	fl	전자저항법
⑥ MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	②, ③ 항목으로 산출
⑦ MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration)	g/dl	③, ④ 항목으로 산출
⑧ Platelet	$\times 10^3/\text{mm}^3$	전자저항법
⑨ Differential leucocyte count	$\times 10^3/\text{mm}^3$	도말표본, Wright 염색법
⑩ Prothrombin time	second	응고시간 계산법

Counter(Coulter Counter Electronics)에 의하여 측정하였다. ①의 항목에 관해서는 혈액도말 표본을 검경하여 검사하였다. ⑩ 항목에 관하여는 혈액응고시간 측정장치(COBAS FIBRO; F. Hoffmann & La Roche Co.)를 이용하여 측정하였다.

**혈청생화학적 검사:** 투여종료 익일에 복대동맥으로부터 채혈한 혈액을 10~15분간 상온에 방치하였다가 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하여 아래와 같은 항목을 측정하였다.

항목	단위	방법
① AST (Aspartate aminotransferase)	IU/l	UV-Rate법
② ALT (Alanine aminotransferase)	IU/l	UV-Rate법
③ ALP (Alkaline phosphatase)	IU/l	P-NPP법
④ BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dl	Urease-UV법
⑤ CREA (Creatinine)	mg/dl	Jaffe법
⑥ GLU (Glucose)	mg/dl	Enzyme법
⑦ T-CHO (Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme법
⑧ TP (Total protein)	g/dl	Biuret법
⑨ ALB (Albumin)	g/dl	Biuret법
⑩ TG (Triglyceride)	mg/dl	Enzyme법
⑪ CA (Calcium)	mg/dl	OCPC법
⑫ IP (Inorganic phosphorus)	mg/dl	Enzyme법
⑬ A/G (Albumin/globulin ratio)	-	①, ⑨ 항목으로 산출
⑭ Na (Sodium)	mmol/l	전극법
⑮ K (Potassium)	mmol/l	전극법
⑯ Cl (Chloride)	mmol/l	전극법

①~⑭의 항목에 대해서는 자동분석장치(Shimadzu-CL-7200, Shimadzu Co.)를 이용하여 측정하였다. ⑮~⑯의 항목에 대해서는 전해질자동분석장치(644 Na, K, Cl Analyzer, Ciba-Corning)를 이용하여 측정하였다.

**부검:** 28일간 반복투여가 끝난 주요군의 동물들을 투여종료 익일에 부검하였으며, 암컷동물에 대해서는 투여종료 익일부터 질도말을 하여 성주기가 휴지기를 나타내는 동물만을 부검하였다. 암컷의 경우 부검전 질도말에서 지속적인 발정을 나타내는 동물들은 29일째(수컷 부검일)에 부검하였고, 부검일은 최고 5일까지 연장하였다. 회복군의 동물들은 14일간의 휴약후에 주요군과 동일한 방법으로 부검을 실시하였다.

**장기중량 측정:** 주요군 및 회복군의 동물들을 에테르로 마취하여 방혈치사시킨 후 부검하여 간장, 신장, 부신, 고환, 부고환, 흉선, 비장, 뇌, 심장, 난소, 자궁, 갑상선, 정낭선 및 전립선의 중량을 측정하였다.

**정자 검사:** 주요군과 회복군의 모든 수컷동물에 대하여 고환의 정자두부수와 부고환의 정자수, 정자운동성 및 정자기형률을 조사하였다. 정자검사법은 실험실마다 사용하는 방법이 많은 차이가 있고 측정치에도 다소의 변이가 있는 것으로 알려져 있는데(Seed 등, 1996), 본 시험에서는 Kim 등(1999)이 사용한 측정법에 따라 정자의 질적 및 양적 검사항목들을 조사하였다. 정자두부수를 측정하기 위해 중량을 측정된 좌측고환의 백막을 제거하고 12 ml의 증류수가 들어있는 튜브에 넣은 다음 균질기(homogenizer)로 충분히 균질화한 후, 이 균질액을 초음파기(ultrasonicator)를 이용하여 4~7°C에서 3분간 초음파 처리하였다. 이 균질액을 혈구계산판(hemocytometer; Neubauer, Germany)에 고루게 퍼지도록 주입하고 충분히 안정이 되도록 5분 이상 방치한 후에 광학현미경을 이용하여 200배율로 관찰

하여 고환당 총 정자두부수를 계산하였다. 정자수를 측정하기 위해 좌측부고환 미부의 중량을 측정한 다음 10 ml의 생리식염수가 들어있는 용기에서 잘게 세절하고 균질기를 이용하여 충분히 균질화한 후, 정자두부수와 같은 방법으로 혈구계산판에서 정자수를 계수하였다. 정자의 운동성은 우측부고환 미부를 5 mg/ml의 Bovine serum albumin이 들어있고 pH 7.2로 조정된 Hanks' balanced salt solution(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 10 ml이 들어있는 1회용 배양접시에 넣고 세절한 다음 37°C의 배양기에서 5분간 배양하였다. 이 정자배양액을 37°C로 유지된 홈이 파진 슬라이드 글라스에 넣고 커버글라스를 덮어서 현미경의 향온판(microwarm plate, Japan)에 놓은 다음 200배율로 검경하였으며, 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 운동성의 유무를 관찰하였다. 정자의 형태학적 검사를 위해 좌측고환 미부에서 얻은 정자배양액을 슬라이드 글라스에서 1% eosin Y와 2:1로 잘 혼합한 다음 커버글라스를 덮어서 염색표본을 만든 후, 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 형태학적 이상유무를 관찰하였다.

**호르몬 측정:** 모든 수컷동물에 대하여 혈청중 테스토스테론(testosterone) 및 황체형성호르몬(luteinizing hormone; LH)의 함량을 방사선 면역측정법(radioimmunoassay)으로 측정하였다.

**병리조직학적검사:** 모든 동물에 대해서 뇌, 척수, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 간장, 신장, 부신, 비장, 심장, 흉선, 갑상선, 기관, 폐, 뇌하수체, 난소, 자궁, 질, 부고환, 정낭선, 전립선, 유선, 방광, 장간막립프절, 악하림프절, 좌골신경 및 골수를 적출하여 10% 중성 포르말린액에 고정하였고, 고환은 Bouin's 액에 고정하였다. 매체대조군과 고용량군의 모든 고정장기를 파라핀 포매, 박절하여 Hematoxylin & eosin(H&E) 염색표본을 만든 다음 병리조직학적 이상유무를 조사하였고, 중간용량군과 저용량군에서는 투여와 관련된 변화가 관찰된 장기에 대하여 염색표본을 만들어 검경하였다.

## 6. 통계학적 분석

얻어진 자료중 체중, 사료섭취량, 혈액학치, 혈청생화학치, 장기중량, 성주기검사치, 정자두부수, 정자수 및 호르몬함량에 대하여는 일원배치분산분석을 한 다음 유의한 결과가 나타난 항목에 대해서 Dunnett's test나 Student t-test를 실시하였다. 일반증상, 부검소견, 정자운동성, 정자기형률 및 병리조직학적 소견은 백분율로 표시하였다. 이러한 분석은 당 연구소에서 사용하고 있는 아급성독성시험용 Labcat module 또는 SAS 프로그램을 이용하여 실시하였고, 검정의 위험률은 5% 및 1%로 정하였다.

## III. 결 과

### 1. 일반증상

전 시험기간동안 수컷동물에 대하여 일반증상관찰을 실시한 결과, 매체대조군에서는 연변(soft stool)이 1례 관찰되었고, 0.5 및 3 mg/kg 투여군에서는 이상증상이 나타나지 않았다. 18 mg/kg 투여군에서는 탈모가 2례 그리고 두부에 부종이 1례 발견되었다. 상기의 소견들 중에서 18 mg/kg 투여군에서 2례 관찰된 탈모는 동일사육상자내의 다른 동물과의 서열경쟁이나 투여시 보정에 의한 스트레스 등에 의해 유발된 소견으로 사료되며 시험물질에 의한 변화는 아니라고 판단되었다. 18 mg/kg 투여군에서 1례 관찰된 부종은 명확한 원인은 알 수 없으나 발생빈도로 보아 시험물질의 영향은 아니라고 사료되었다. 암컷동물의 경우 매체대조군에서 탈모가 2례 관찰되었고 3 mg/kg 투여군에서는 탈모, 절상(incised wound) 및 창백(paleness)이 각각 1례 발견되었는데, 상기 소견 또한 서열경쟁에 의한 상처나 스트레스 등에 기인한 소견으로서 시험물질의 영향은 아니라고 판단되었다.

### 2. 체중변화

시험기간동안의 암·수동물의 체중에 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 통계학적 유의성은 인정되지 않았다.

### 3. 사료섭취량

수컷동물의 사료섭취량에 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 암컷동물의 경우 사료섭취량은 18 mg/kg 투여군에서 투여 5일 및 22일째에 매체대조군과 비교할 때에 통계학적으로 유의성있는 감소를 나타냈는데, 체중이 대조군과 차이가 없는 것으로 보아 독성학적으로 의미있는 변화는 아니라고 판단되었다.

### 4. 성주기 소견

주요군의 경우 성주기의 기간에 있어서 각 투여군과 매체대조군간의 통계학적 유의차는 인정되지 않았다. 또한 매체대조군, 0.5, 3 및 18 mg/kg 투여군의 순으로 1, 0, 0 및 1례씩 성주기의 불규칙성이 관찰되어 시험물질의 영향은 인정되지 않았다. 회복군에서도 성주기의 기간과 규칙성에 있어서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

## 5. 혈액학적 소견

주요군의 암수 모든 투여군에서 시험물질의 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다. 회복군에서는 수컷 18 mg/kg 투여군에서 MCH 및 MCHC가 통계학적으로 유의성있게 증가하였고 암컷 18 mg/kg 투여군에서 RBC 및 HCT가 통계학적으로 유의성있게 감소하였다. 백혈구감별에 있어서는 주요군의 경우 수컷 18 mg/kg 투여군에서 호중구수의 통계학적 유의한 감소가 그리고 암컷 18 mg/kg 투여군에서 림프구수의 통계학적 유의한 증가가 관찰되었고, 회복군에서는 암컷 18 mg/kg 투여군에서 호산구수의 통계학적 유의한 증가가 발견되었다. 상기의 소견들은 통계학적 유의성을 나타내긴 했지만 정상수치 범위(Wolford 등, 1986; 송 등, 1990)내에 있는 것으로 보아 시험물질에 기인한 독성학적 영향으로는 판단되지 않았다.

## 6. 혈청생화학적 소견

주요군의 암컷 3 및 18 mg/kg 투여군에서는 GLU의 통계학적 유의한 감소가 관찰되었고, 암컷 0.5, 3 및 18 mg/

kg 투여군에서는 K의 통계학적 유의한 감소가 발견되었다. 회복군의 경우 수컷 18 mg/kg 투여군에서 BUN과 TG의 통계학적 유의한 감소가 관찰되었고, 암컷 18 mg/kg 투여군에서 ALP의 통계학적 유의한 증가가 발견되었다. 주요군과 회복군에서 나타난 상기의 소견들은 통계학적 유의성을 나타내긴 했지만 정상수치 범위(Wolford 등, 1986; 송 등, 1990) 내에 들어있는 변화로서 독성학적으로 의미 있는 변화는 아니라고 판단되었다.

## 7. 부검 소견

주요군에 속한 수컷동물의 부검시 매체대조군에서는 신우확장(pelvis dilatation)이 1례 관찰되었고 그 밖의 투여군에서는 특이소견이 발견되지 않았다. 암컷동물의 경우 3 mg/kg 투여군에서 신우확장이 1례 관찰되었고 18 mg/kg 투여군에서 좌측자궁의 무형성증(aplasia)이 1례 나타났다. 상기의 소견들 중에서 암컷 3 mg/kg 투여군에서 1례 관찰된 신우확장은 SD 랫드에서 흔히 관찰되는 자연발생적 소견으로서 시험물질에 의한 변화는 아니라고 판단되었고, 18 mg/kg 투여군에서 1례 발견된 자궁의 무형성증은 자연

**Table 1.** Organ weights of male rats treated with flutamide

Dose (mg/kg/day)	Administration 4 weeks				Recovery 2 weeks	
	0	0.5	3.0	18.0	0	18.0
No. of animals	10	10	10	10	5	5
Body weight (g)	424.6±28.68	407.9±34.66	401.1±17.59	392.8±15.85	448.6±38.45	431.7±39.60
Brain (g)	2.019±0.078	1.992±0.080	1.974±0.069	1.959±0.079	2.018±0.085	2.017±0.068
per B.W. (%)	0.477±0.022	0.491±0.043	0.493±0.031	0.500±0.033	0.451±0.026	0.471±0.050
Adrenals (g)	0.063±0.015	0.056±0.008	0.062±0.008	0.066±0.013	0.051±0.006	0.067±0.004**
per B.W. (%)	0.015±0.003	0.013±0.002	0.015±0.002	0.017±0.003	0.011±0.002	0.015±0.001**
Liver (g)	15.435±1.136	14.354±1.917	13.935±1.377	14.530±0.960	14.430±1.399	13.386±1.971
per B.W. (%)	3.636±0.118	3.510±0.235	3.468±0.219	3.698±0.159	3.218±0.170	3.089±0.180
Spleen (g)	0.715±0.067	0.714±0.096	0.737±0.077	0.697±0.061	0.737±0.104	0.710±0.133
per B.W. (%)	0.169±0.013	0.175±0.016	0.183±0.016	0.178±0.016	0.164±0.014	0.164±0.021
Kidneys (g)	2.898±0.240	2.672±0.271	2.668±0.229	2.549±0.201**	2.731±0.189	2.885±0.285
per B.W. (%)	0.684±0.051	0.656±0.050	0.666±0.056	0.649±0.047	0.611±0.042	0.673±0.096
Heart (g)	1.293±0.118	1.279±0.118	1.267±0.091	1.260±0.135	1.223±0.072	1.257±0.087
per B.W. (%)	0.305±0.029	0.314±0.026	0.316±0.016	0.320±0.028	0.273±0.014	0.292±0.025
Thymus (g)	0.600±0.098	0.557±0.092	0.606±0.083	0.548±0.073	0.412±0.039	0.389±0.071
per B.W. (%)	0.141±0.018	0.137±0.022	0.151±0.022	0.140±0.023	0.092±0.012	0.091±0.020
Thyroids (g)	0.018±0.004	0.018±0.004	0.022±0.007	0.020±0.005	0.020±0.004	0.022±0.004
per B.W. (%)	0.004±0.001	0.005±0.001	0.006±0.002	0.005±0.002	0.004±0.000	0.005±0.001
Testes (g)	3.225±0.250	3.199±0.372	3.228±0.294	3.418±0.296	3.192±0.102	3.360±0.269
per B.W. (%)	0.753±0.069	0.787±0.094	0.805±0.067	0.871±0.072**	0.715±0.057	0.780±0.050
Prostate (g)	0.598±0.111	0.609±0.068	0.552±0.135	0.387±0.054**	0.620±0.064	0.492±0.089*
per B.W. (%)	0.141±0.024	0.150±0.015	0.137±0.033	0.099±0.013**	0.138±0.010	0.114±0.021*
Seminal vesicles (g)	1.396±0.251	1.457±0.106	1.353±0.208	0.991±0.278**	1.395±0.394	1.479±0.176
per B.W. (%)	0.328±0.050	0.358±0.024	0.337±0.050	0.253±0.074**	0.308±0.076	0.344±0.038
Epididymides (g)	0.999±0.102	1.019±0.110	0.936±0.100	0.828±0.094**	1.115±0.059	1.016±0.097
per B.W. (%)	0.237±0.032	0.250±0.028	0.234±0.025	0.210±0.019	0.250±0.021	0.236±0.015

Values are means±S.D., B.W.: Body weight, \* and \*\* indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels, respectively, when compared with the control group.

발생적인 선천성 결손으로 판단되었다. 회복군의 암·수 모든 동물에서도 시험물질의 투여와 관련된 특이소견은 인정되지 않았다.

## 8. 장기중량

주요군 수컷동물의 장기에 있어서 절대중량은 18 mg/kg 투여군에서 신장, 전립선, 정낭선 및 부고환이 매체대조군과 비교할 때 통계학적 유의한 감소를 나타내었고, 상대중량은 18 mg/kg 투여군에서 고환 중량의 증가와 전립선 및 정낭선 중량의 감소가 관찰되었다. 암컷동물에서는 18 mg/kg 투여군에서 비장 및 흉선의 절대중량과 비장의 상대중량이 매체대조군과 비교할 때 통계학적 유의한 증가를 나타냈다(Table 1). 회복군의 경우 수컷동물에 있어서는 18 mg/kg 투여군에서 부신의 절대 및 상대중량이 매

체대조군과 비교할 때에 통계학적 유의한 증가를 나타내었고, 전립선의 절대 및 상대중량은 유의성있는 감소를 나타냈다. 암컷동물은 18 mg/kg 투여군에서 신장 및 흉선의 절대중량과 흉선의 상대중량이 통계학적 유의한 증가를 나타냈다(Table 2).

## 9. 정자 소견

주요군의 동물중 각 군당 수컷 10마리씩에 대하여 정자 검사를 실시한 결과, 고환내의 정자두부수는 18 mg/kg 투여군에서 그리고 부고환내의 정자수는 3 및 18 mg/kg 투여군에서 매체대조군과 비교할 때에 통계학적 유의한 감소를 나타냈다. 회복군에서는 18 mg/kg 투여군에서 부고환내의 정자수가 매체대조군에 비해 유의성있게 감소하였다. 정자의 운동성과 기형발현률에 있어서는 주요군과 회

**Table 2.** Organ weights of female rats treated with flutamide

Dose (mg/kg/day)	Administration 4 weeks				Recovery 2 weeks	
	0	0.5	3.0	18.0	0	18.0
No. of animals	10	10	10	10	5	5
Body weight (g)	243.0± 15.99	247.4± 9.40	246.3± 22.08	242.9± 19.02	249.3± 14.70	261.4± 6.77
Brain (g)	1.843±0.0561	1.852±0.0559	1.838±0.0961	1.814±0.0820	1.850±0.0397	1.921±0.0666
per B.W. (%)	0.761±0.0458	0.749±0.0327	0.751±0.0699	0.750±0.0512	0.744±0.0315	0.735±0.0347
Adrenals (g)	0.075±0.0129	0.076±0.0108	0.080±0.0162	0.070±0.0133	0.067±0.0108	0.076±0.0091
per B.W. (%)	0.031±0.0048	0.031±0.0046	0.032±0.0053	0.030±0.0061	0.027±0.0039	0.030±0.0038
Liver (g)	8.848±0.6659	9.197±0.5974	9.018±0.9900	8.376±0.9264	8.382±1.1966	9.368±0.8283
per B.W. (%)	3.642±0.1630	3.717±0.1901	3.662±0.2310	3.448±0.2734	3.353±0.3521	3.588±0.3549
Spleen (g)	0.449±0.0278	0.448±0.0467	0.457±0.0535	0.506±0.0408*	0.420±0.0820	0.438±0.0373
per B.W. (%)	0.186±0.0147	0.182±0.0240	0.186±0.0168	0.209±0.0182*	0.168±0.0287	0.168±0.0177
Kidneys (g)	1.743±0.1859	1.714±0.1203	1.712±0.1415	1.666±0.1697	1.669±0.0781	1.865±0.1409*
per B.W. (%)	0.717±0.0574	0.693±0.0545	0.695±0.0263	0.686±0.0491	0.671±0.0392	0.715±0.0661
Heart (g)	0.830±0.0638	0.870±0.0704	0.834±0.0781	0.807±0.0609	0.826±0.0702	0.798±0.0589
per B.W. (%)	0.342±0.0201	0.352±0.0264	0.339±0.0188	0.333±0.0247	0.331±0.0253	0.305±0.0192
Thymus (g)	0.387±0.0798	0.419±0.0466	0.433±0.0891	0.482±0.0713*	0.288±0.0430	0.381±0.0558*
per B.W. (%)	0.160±0.0356	0.170±0.0191	0.177±0.0401	0.200±0.0338	0.116±0.0177	0.146±0.0229*
Thyroids (g)	0.016±0.0054	0.018±0.0054	0.014±0.0045	0.017±0.0031	0.014±0.0047	0.014±0.0034
per B.W. (%)	0.007±0.0022	0.007±0.0025	0.006±0.0016	0.008±0.0015	0.006±0.0018	0.006±0.0015
Ovaries (g)	0.095±0.0217	0.108±0.0171	0.101±0.0216	0.097±0.0207	0.086±0.0130	0.099±0.0196
per B.W. (%)	0.039±0.0082	0.044±0.0071	0.041±0.0075	0.040±0.0093	0.035±0.0061	0.038±0.0087
Uterus (g)	0.412±0.0706	0.434±0.0926	0.421±0.0475	0.415±0.1117	0.400±0.0695	0.394±0.0819
per B.W. (%)	0.171±0.0366	0.176±0.0384	0.172±0.0217	0.170±0.0371	0.161±0.0316	0.151±0.0335

Values are means±S.D., B.W.: Body weight, \* indicates significant difference at P<0.05 level, when compared with the control group.

**Table 3.** Sperm examination results of rats treated with flutamide

Dose (mg/kg/day)	Administration 4 weeks				Recovery 2 weeks	
	0	0.5	3.0	18.0	0	18.0
No. of animals	10	10	10	10	5	5
Sperm head count (×10 <sup>6</sup> /testis)	231.54±17.93	228.31±26.80	212.86±20.63	201.91±23.93*	205.16±10.36	188.01±28.93
Sperm count (×10 <sup>6</sup> /epididymis)	153.31±26.13	150.61±24.83	115.79±24.65**	111.26±23.48**	199.85±22.36	151.59±14.63**
Sperm motility (%)	72.5±9.1	75.0±7.8	71.5±12.7	70.1±7.6	84.0±7.0	87.8±5.0
Sperm abnormality (%)	7.2±3.6	5.4±2.1	8.4±3.7	5.9±2.5	4.9±3.1	3.7±2.6

Values are means±S.D., \* and \*\* indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels, respectively, when compared with the control group.

**Table 4.** Hormone concentration of male rats treated with flutamide

Dose (mg/kg/day)	Administration 4 weeks				Recovery 2 weeks	
	0	0.5	3.0	18.0	0	18.0
No. of animals	10	10	10	10	5	5
Serum testosterone (ng/ml)	2.25±1.97	1.20±0.54	3.29±1.63	6.86±2.16**	4.79±2.16	3.81±3.08
Serum LH (IU/ml)	1.55±0.79	1.20±0.43	1.23±0.44	1.44±0.47	0.90±0.08	0.78±0.08

Values are means±S.D., LH: Lutenizing hormone, IU : International unit, \*\* indicates significant difference at P<0.01 level, when compared with the control group.

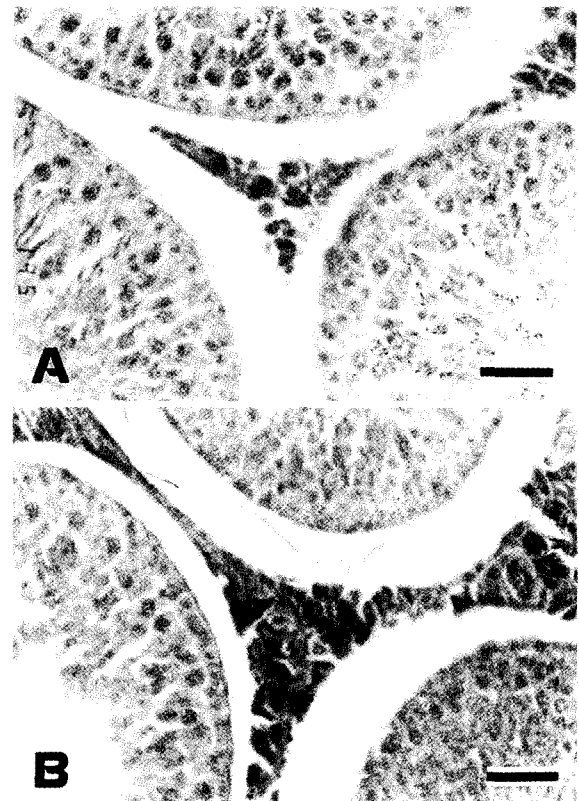
복군 모두 각 투여군과 매체대조군간의 통계학적 유의성은 인정되지 않았다(Table 3).

### 10. 호르몬 분석성적

수컷동물의 혈청내 테스토스테론 함량은 주요군 18 mg/kg 용량에서 매체대조군과 비교할 때에 통계학적 유의한 증가를 나타내었으나, 회복군의 경우 모든 투여군에서 시험물질의 영향은 인정되지 않았다(Table 4).

### 11. 병리조직학적 소견

매체대조군과 18 mg/kg 투여군에 속한 수컷동물에 대해 병리조직학적 검사를 실시한 결과, 매체대조군에서 신장의 신증(nephropathy)과 수신증(hydronephrosis)이 각각 1례, 신장의 무기질침착(mineralization)과 갑상선의 말단아가미낭(ultimobranchial cyst)이 각각 2례, 간장의 만성염증이 4례, 그리고 전립선의 만성염증이 5례 관찰되었다. 18 mg/kg 투여군에서는 신장의 무기질 침착, 방광의 호산성 내용물(eosinophilic material)과 간장의 육아종(granulation)이 각각 1례, 신장의 신증과 수신증 그리고 갑상선의 말단아가미낭이 각각 2례, 간장의 만성염증이 3례, 전립선의 만성염증이 5례, 그리고 고환의 간질세포 과형성[interstitial cell(Leydig cell) hyperplasia]이 10례 발견되었다(Fig. 1). 암컷동물의 경우 매체대조군에서 신장의 무기질 침착이 1례, 간장의 만성염증이 2례, 갑상선의 말단아가미낭이 3례 관찰되었고, 18 mg/kg 투여군에서 간장의 육아종과 갑상선의 말단아가미낭이 각각 1례 그리고 간장의 만성염증이 2례 나타났다. 회복군에서는 수컷의 매체대조군에서 신장의 무기질 침착과 신증, 간장의 육아종 및 뇌하수체의 낭포가 각각 1례, 갑상선의 말단아가미낭이 2례, 그리고 전립선의 만성염증이 3례 관찰되었고, 18 mg/kg 투여군에서는 신장의 무기질 침착과 신증, 고환의 정세관 위축 (atrophy of seminiferous tubule)과 간질세포 과형성 그리고 부고환의 정자감소증(oligozoospermia)이 각각 1례, 그리고 간장의 육아종과 전립선의 만성염증이 각각 2례 관찰되었다. 암컷의 매체대조군에서는 간장의 만성염증, 갑상선의 말단아가



**Fig. 1.** Representative photographs of testis cross section. (A) a control rat, showing normal appearance. (B) a flutamide-treated rat, showing interstitial cell hyperplasia. H&E stain, Bar = 40  $\mu$ m.

미낭과 뇌하수체의 낭포가 각각 1례, 그리고 신장의 수신증이 3례 관찰되었고, 18 mg/kg 투여군에서는 신장의 무기질 침착, 신증과 수신증, 흉선의 충혈(congestion) 및 간장의 만성염증이 각각 1례 발견되었다.

## IV. 고 찰

Flutamide는 강력한 안드로젠 수용체 길항물질로서 안드로젠 수용체와의 결합에 안드로젠과 경쟁하고 안드로젠 의존적 유전자의 안드로젠 수용체 DNA 결합과 전사를 방해한다. 그 결과 테스토스테론에 의해 중재되는 볼프관의 부고환, 정관 및 정낭선으로의 분화와 다이하이드로테스테

스트론에 의해 중재되는 전립선 및 외부생식기의 분화가 억제되며, 테스토스테론 의존적인 고환하강은 억제되어 정류고환(cryptorchidism)이 발생한다고 한다. Flutamide와 같은 항안드로젠은 안드로젠의 생산, 수송, 수용체 결합, 배설 등의 여러 수준에서 안드로젠 신호체계를 간섭함으로써 응성의 성분화를 교란시킬 수 있다. Vinclozolin과 p,p'-DDE와 같은 환경성 항안드로젠은 안드로젠 수용체 길항제이고 발생중인 동물에 있어서 flutamide와 유사한 효과를 나타낸다고 한다(Kelce 등, 1998). 배자발생에 대한 안드로젠 억제에 관한 연구로서 Imperto-McGinley 등(1992)의 보고에 의하면 임신 랫드에 flutamide를 임신 12~21일까지 18~300 mg/kg의 용량으로 반복투여한 후 태어난 수컷동물의 경우 18 mg/kg 투여군에서는 정낭선 및 전립선의 중량감소가, 24 mg/kg 투여군에서는 외부생식기의 자성화(feminization), 전립선 결손 및 유두 잔유(retention)가, 그리고 100 mg/kg 투여군에서는 볼프관 분화 영향, 즉 정관결손 및 부고환 흔적이 관찰되었다고 한다. Kassim 등(1997)은 임신 랫드에 flutamide를 임신 10일부터 출생일까지 10 mg/day의 용량으로 반복투여한 후 태어난 수컷동물에서 외부생식기의 자성화와 정류고환 및 정세관 손상을 관찰하였다고 한다.

본 시험에서는 flutamide를 0, 0.5, 3 및 18 mg/kg의 용량으로 7주령의 SD 암수 랫드에 28일간 반복 경구투여하여 아급성독성을 평가하였고, 특히 생식기 및 내분비 계통에 미치는 영향을 면밀히 조사하였다.

암수동물의 일반증상, 체중, 사료섭취량, 성주기검사, 혈액 및 혈청생화학적 검사 및 부검소견에 있어서는 시험물질의 투여에 기인한 것으로 사료되는 변화는 인정되지 않았다.

장기중량 측정시 18 mg/kg 투여군의 수컷 주요군에서 관찰된 신장의 절대중량 감소는 통계학적 유의성은 인정되지 않았지만 체중이 다소 감소함으로 인하여 나타난 것으로 판단되었으며, 동일 용량군의 수컷 회복군에서 나타난 부신의 절대 및 상대중량 증가는 주요군에서 관찰되지 않았고, 또한 병리조직학적 변화도 나타나지 않은 것으로 미루어 보아 우발적인 소견으로 판단되었다. 18 mg/kg 투여군의 암컷 회복군에서 인정된 신장의 절대중량 증가도 역시 우발적인 소견으로서 시험물질에 의한 변화는 아니라고 사료되었다. 반면 수컷 18 mg/kg 투여군에서 관찰된 고환의 상대중량 증가는 시험물질의 투여에 의해 유발된 것으로 판단되며, 병리조직학적 검사에서 나타난 간질세포의 과형성에 기인된 것으로 사료되었다. Dhar와 Setty(1976)의 연구보고에 따르면 flutamide 25 mg/kg의 30일간 반복투여는 고환중량의 증가를 초래하지만 간질세포의 형태학적 이상은 유발하지 않는다고 하였는데, 이 결과는 간질세포의 과형성이 관찰된 본 시험의 결과와 다소 차이가

인정되었다. 수컷 18 mg/kg 투여군에서 관찰된 전립선, 정낭선 및 부고환 중량의 감소는 Ladics 등(1998)의 랫드 15일 반복복강투여 독성시험에서 관찰된 소견과 일치한다. 이는 flutamide와 주 대사산물인 hydroxyflutamide가 안드로젠 수용체와 결합함으로써 경쟁적 길항작용을 나타내어 안드로젠의 인식을 효과적으로 억제하고 그 결과 세포내 안드로젠성 자극이 감소되어 궁극적으로는 안드로젠 의존적 장기의 정상적인 성장과 기능을 억제함으로써 중량 감소가 초래된다고 한다(Cook 등, 1993). 특히 전립선은 회복군에서도 중량감소를 보여 시험물질 투여 중단후에도 회복이 이루어지지 않음을 알 수 있었다. 암컷 18 mg/kg 투여군에서 발견된 비장과 흉선중량의 증가는 시험물질이 면역장기인 비장과 흉선에 독성학적 영향을 나타냄을 시사해 주고 있다.

정자검사시 3 mg/kg 투여군에서 관찰된 부고환의 정자수 감소와 18 mg/kg 투여군에서 발견된 고환의 정자두부수 및 부고환의 정자수 감소는 모두 시험물질의 영향으로 판단되었다. 상기 소견 중 18 mg/kg 투여군에서의 정자두부수 감소는 flutamide의 반복투여가 랫드의 정자발생(spermatogenesis)에 영향을 끼쳐서 성숙된 정자세포(spermatid)의 수가 감소하였다는 것을 의미하며, 3 및 18 mg/kg 투여군에서 관찰된 부고환의 정자수 감소는 시험물질의 항안드로젠 효과에 의하여 부고환이 위축되어 나타난 결과로 사료되었다. 그러나 항안드로젠 물질인 flutamide의 반복투여는 정자의 운동성과 형태에는 어떠한 영향도 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

혈청중 호르몬 분석시 18 mg/kg 투여군의 수컷 주요군에서 관찰된 테스토스테론 함량의 증가는 시험물질에 기인한 변화로 인정되었으며, 이는 다른 연구자들의 보고와 일치한다(Sardanons 등, 1989; Ladics 등, 1998). 혈청중 테스토스테론 함량 증가의 원인을 살펴보면 세포내 안드로젠 자극 감소의 결과로 간질세포로부터 테스토스테론 생산을 자극하기 위하여 뇌하수체 전엽으로부터의 생식선 자극호르몬 방출이 증가되고 생식선자극호르몬 증가에 대한 반응과 간질세포의 안드로젠 수용체의 억제반응으로 혈청중 테스토스테론 함량은 증가한다고 한다(Simard 등, 1986; Cook 등, 1993).

병리조직학적 검사시 대조군과 18 mg/kg 투여군의 암수 동물에서 소수례씩 관찰된 신장의 신증과 수신증 및 무기질 침착, 뇌하수체의 낭포, 갑상선의 말단아가미낭, 흉선의 충혈, 간장의 만성염증과 육아종, 전립선의 만성염증 및 방광의 호산성 내용물 등의 소견은 시험물질의 투여와 관련성이 인정되지 않았고, 또한 발현률이 낮아서 자연발생적인 소견들로 판단되었다(Coleman 등, 1977). 반면 고환의 정세관 위축과 부고환의 정자감소증은 정자분석시 관찰된 고환의 정자두부수와 부고환의 정자수의 감소와



상관된 소견으로서 시험물질의 투여에 기인된 것으로 추정되었다. Creasy와 Foster(1991)에 따르면 간질조직의 증가는 세정관 손상에 따른 일반적 속발증의 하나로서 간질세포의 비대(hypertrophy), 과형성(hyperplasia) 또는 곡세정관의 위축에 따르는 상대적 증가 등으로 나타난다고 하며, 그 원인에 대해서는 명확하게 밝혀진 바가 없다고 한다. 본 시험의 18 mg/kg 투여군에서 관찰된 간질세포의 과형성은 세정관의 위축을 동반하지 않은 간질세포의 절대적 증가에 기인된 것으로서, 이는 혈청중 테스토스테론 함량의 증가와 상관된 소견으로 판단되었다. 상기한 소견은 Ladics 등(1998)의 보고와 일치하는 결과로서 회복군에서는 발생빈도수가 현저하게 감소한 것으로 보아 일정한 회복기를 두면 쉽게 회복되는 가역적 변화임을 시사하고 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 랫드에 있어서 flutamide 3~18 mg/kg의 4주간 반복투여는 수컷에서 정자발생의 억제, 부생식기관의 발육억제, 혈청중 테스토스테론 함량의 증가 및 고환의 간질세포 과형성을 유발하고, 암컷에서 비장과 흉선의 중량을 증가시키는 것으로 나타났으며, 또한 본 랫드 28일간 반복 경구투여시험은 내분비계 장애물질의 검색에 유용한 시험법임을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 환경부에서 주관하는 G7과제의 연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ahlborg, U.G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C.C., Hanberg, A., Baron, J., Tricopoulos, D. and Adami, O. (1995): Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometritis; an assessment of the biological and epidemiological evidence, *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**, 463-531.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *Br. Med. J.*, **305**, 609-613.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378-384.
- Colborn, T., Dumaoski, D. and Myers, J.P. (1996): Our stolen future. Are we threatening our fertility, intelligence and survival? A scientific detective story, Dutton, USA.
- Coleman, G.L., Barthold, S., Osbaldiston, G., Foster, S. and Jonas, A.M. (1977): Pathological changes during aging in barrier reared Fischer 344 male rats, *J. Gerontol.*, **32**, 258-278.
- Cook, J.C., Mullin, L.S., Frame, S.R. and Biegel, L.B. (1993): Investigation of a mechanism for Leydig cell tumorigenesis by linuron in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **119**, 195-204.
- Creasy, D.M. and Foster, P.D.M. (1991): Male reproductive system *In Handbook of Toxicologic Pathology* (Haschek, W.M. and Rousseaux, C.G. eds), Academic press, San Diego, pp. 829-889.
- Dhar, J.D. and Setty, B.S. (1976): Studies on the physiology and biochemistry of mammalian epididymis: effect of flutamide, a nonsteroidal antiandrogen, on the epididymis of the rat, *Fertil. Steril.*, **27**, 566-576.
- Imperto-McGinley, J., Sanchez, R., Spencer, J.R., Yee, B. and Vaughan, E.D. (1992): Comparison of the effects of the 5  $\alpha$ -reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies, *Endocrinol.*, **131**, 1149-1156.
- Kassim, N.M., McDonald, S.W., Reid, O., Bennett, N.K., Gilmore, D.P. and Payne, A.P. (1997): The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the albino Swiss rat, *J. Anat.*, **190**, 577-588.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, D., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G. and Luster, M. (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop, *Environ. Health Perspect.*, **104**[Suppl 4], 715-740.
- Kelce, W.R., Gray, L.E. and Wilson, E.M. (1998): Antiandrogens as environmental endocrine disruptors, *Reprod. Fertil. Dev.*, **10**, 105-111.
- Kim, J.C., Lim, K.H. and Chung, M.K. (1999): Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats, *Reprod. Toxicol.*, **13**, 391-397.
- Ladics, G.S., Smith, C., Nicastro, S.C., Loveless, S.E., Cook, J.C. and O'Connor, J.C. (1998): Evaluation of the primary humoral immune response following exposure of male rats to 17 $\beta$ -estradiol or flutamide for 15 days, *Toxicol. Sci.*, **46**, 75-82.
- OECD (1993): Guidelines for the testing of chemicals. No. 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Sardanons, M.L., de las Heras, M.A., Calandra, R.S., Solano, A.R. and Podesta, E.J. (1989): Effect of the antiandrogen flutamide on pituitary LH content and release, *Neuroendocrinol.*, **50**, 211-216.
- Seed, J., Chapin, R.E., Clegg, E.D., Dostal L.A., Foote, R.H., 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.

- Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N.E. (1993): Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?, *Lancet*, **341**, 1392-1395.
- Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S. and Sumpster, J.P. (1995): Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production, *Environ. Health Perspect.*, **103**, 1136-1143.
- Simard, J., Luthy, I., Guay, J., Belanger, A. and Labrie, F. (1986): Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **44**, 261-270.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jegou, B. and Jensen, T.K. (1996): Male reproductive health and environmental xenoestrogens, *Environ. Health Perspect.*, **104** [Suppl 4], 741-776.
- Wolford, S.T., Schroer, R.A., Gohs, F.X., Gallo, P.P., Brodeck, M., Falk, H.B. and Ruhren, F.R. (1986): Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals, *J. Toxicol. Environ. Health*, **18**, 161-188.
- 송창우, 황화선, 한상섭 (1990): Ktc: SD 랫트의 주령에 따른 기초연구: 체중변화, 혈액·혈액생화학적 변화 및 뇨분석, *한국실험동물학회지*, **6**, 33-43.