



정자생성 주기법을 이용한 고환독성 평가 필요성과 정량적인 고환독성 평가방법에 대한 고찰

손우찬¹ · 김종춘² · 유일재

¹Huntingdon Life Sciences, Woolley Road, Alconbury, Huntingdon, UK

²전남대학교 수의과대학 약리독성학교실

산업안전공단 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터

The Recommended Approaches for the Evaluation of Testicular Toxicity with Awareness of the Spermatogenic Cycle and Quantitative Testicular Toxicity Evaluation Methods

Woo-Chan Son¹, Jong-Choon Kim² and Il Je Yu

¹Huntingdon Life Sciences, Huntingdon, Woolley Road, Alconbury, Huntingdon, UK

²Department of Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Center for Occupational Toxicology, Occupational Safety and Health Research Institute,
Daejeon 305-380, Korea

Received April 21, 2003; Accepted June 11, 2003

ABSTRACT. Since histopathological examination was known to be the most sensitive evaluation for testicular toxicity, regulatory authorities have been published the guidelines on practical testicular assay approach. Those guidelines specified details of evaluation including fixation, embedding, staining, histological examination and also seminiferous tubular staging methods. However, there have been confusing understanding among toxicologists and even pathologists on staging theory and its application on industrial testicular toxicity. Guidelines did not intend to conduct quantitative assay with staging but recommended the use of knowledge of staging. To count each tubular stage with statistical analysis is known to be time consuming and labor burdening work but the significance of toxicity has little value. It also has been pointed out that the application of staging theory for longer-term toxicity considered to be lacking of rationale. It could be recommended that qualitative assay with awareness of germ cell loss is more efficient method rather than quantitative counting of each tubular stage. Therefore it would be required that comprehensive understanding of testicular toxicity evaluation and the use of testicular staging method.

Keywords: Testicular toxicity evaluation, Seminiferous tubular staging, Guidelines.

서 론

수컷의 생식기능은 여러 가지의 약물이나 환경화학물질에 의해 영향을 받기 쉬우며, 특히 고환은 화학물질의 독

성영향에 가장 민감하게 반응하는 장기 중의 하나이다 (Overstreet, 1984; Overstreet *et al.*, 1988). 최근 들어 합성화학물질의 증가에 따라 화학물질의 고환독성 평가에 대한 요구는 날로 증가하고 있다. 많은 역학적 조사에 의하면 사람의 정자생산 능력과 생식능력은 명백한 감소 추세에 있는 것으로 확인되고 있으며, 주요 원인으로서의 약품, 농약, 화학물질, 환경오염물질 등에 지속적인 노출이 지적되고 있다 (Carlsen *et al.*, 1992, Auger *et al.*, 1995; Becker and Berhane, 1997). 실험동물을 이용한

Correspondence to: Il Je Yu, Center for Occupational Toxicology, Occupational Safety and Health Research Institute, Korea Occupational Safety and Health Agency, 104-8 Munjodong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380, Korea
E-mail: u1670916@chollian.net

독성시험에서 고환의 독성을 검색하는 방법으로 다양한 모델이 제시되고 있다. 그러나 실험동물을 이용한 독성시험에서 여러 형태의 생식독성이 나타나더라도 실제로 사람에게 외삽 시 불임이나 유산 등의 기능적 이상을 나타내지 않는 경우가 많으며, 생식독성의 복잡성 때문에 독성결과에는 불확실성이 많이 존재한다. 이런 이유에서 가장 신뢰성있고 합리적인 검색방법의 개발이 요구되고 있다. 그 중 조직병리학적 검색법이 고환독성의 초기단계에서도 독성물질을 검색할 수 있는 방법이며 또한 민감한 생식독성 검출방법임이 인식되었고 이에 따라 규제기관들도 고환독성의 조직병리학적 검색법에 대한 자세한 지침을 발표하였다(OPPTS (870.3800), 1998; ICH Guidelines (S5A), 1996, 2000; OECD guidelines (416, 421, 422), 1995, 1996). 이 가이드라인들은 고환독성을 민감하게 평가하기 위해서는 고환의 고정에서부터, 포매, 그리고 염색 방법들부터 일반적인 조직방법과 다르게 준비해야 할 필요성을 강조하였고 정자의 생성주기에 대한 소개도 간략하게 하였다. 그런데 이 가이드라인을 해석하는 과정에서 큰 혼선이 있었다. 고환독성 평가 시 정자생성 주기를 세분화해서 분류하여야 하고, 이의 개념에 의해서 고환의 독성을 평가를 해야만 하며, 또한 이 방법을 모든 물질에 대해서 일률적으로 적용하여야 한다고 생각하는 독성관련 종사자, 혹은 병리학자들이 있었다. 또는 이런 방법을 실제 평가에 반듯이 적용하여야만 고환독성을 민감하게 평가할 수 있다고 판단하기도 하였고, 심지어는 정자생성 주기별로 곡세정관의 수를 세어서 보고하는 등의 과학적 오류를 범하기도 하였다(Lanning *et al.*, 2002). 정자생성 주기를 구분하는 것은 병리학자에게는 시간의 소모가 많은 번거로운 작업이며 동시에 많은 비용이 드는 검색 방법이다. 그러므로 정자생성 주기법을 효율적으로 적용하여 명확한 독성평가를 위해서는 규제기관을 포함한 독성평가기관 관련자들의 고환독성 평가방법에 대한 상세하고 정확한 이해, 그리고 명확한 입장이 요구되고 있다(Creasy, 1997). 본 총설에서는 정자생성 주기법에 대한 이해와 정량적 고환독성 평가방법에 대한 고찰을 하려고 한다.

정자생성 주기법에 대한 논쟁

규제기관의 가이드라인을 그냥 정해진 지침으로 해석하지 말고 과학적 근거에 의해서 좀더 유연성 있는 시험을 시행하라고 가이드라인에서 명백히 밝히고 있음에도 불구하고 실무에서 독성시험을 수행하는 독성시험 수행자의 입장, 그리고 또한 규제기관의 입장에서 시험결과를 심사하는 입장에서 조차 유연성 있는 이해보다는 가이드라인에 명시된 문구에 너무 의존하여 해석하는 경향이 있다. 고환 독성의 평가 시 정자생성단계 주기법을 잘못 적용하

는 빈번한 오류는 대표적인 예가 될 것이다. 조직병리학적 검색방법에 의한 고환독성 평가에 관련된 중요성이 강조되면서 규제기관의 가이드라인에서 고환의 고정, 염색에 관한 규정뿐만 아니라 검경 시 구체적으로 어떻게 관찰, 평가를 하여야 하는지에 대하여 기술하였다(Lanning *et al.*, 2002). 가이드라인의 초안 작성과정에서 정자생성 주기법에 대한 언급 여부에 대한 많은 논란이 있었지만 최종 가이드 라인에 구체적으로 삽입되지 않고 발행되었다(Lanning *et al.*, 2002; OPPTS (870.3800), 1998; ICH Guidelines (S5A), 1996, 2000; OECD guidelines, (416, 421, 422), 1995, 1996).

생식독성 가이드라인 중 고환의 독성병리평가의 중요성의 일환으로 고환의 적출, 고정, 염색 및 평가에 대한 권고가 1995년과 1996년에 발간된 OECD 421 및 422 가이드라인(OECD guidelines (416, 421, 422), 1995, 1996) 등에 발표되었다. 그 중 다음과 같은 문구가 있었다.

"Full histopathology should be carried out on the preserved organs and tissues of Control/HDL (with special emphasis on stages of spermatogenesis in the male gonads and histopathology of interstitial testicular cell structure)"

가이드라인의 위와 같은 구절을 근거로 일부 독성학자들이 정자생성주기에 대해 잘못 해석하는 오류를 종종 범하였다. 즉 일부 병리학자나 독성학자들은 초기단계의 독성 평가 시 가장 빈번히 행해지는 일반독성시험, 즉 28일 반복투여시험 등에서 시험물질의 특성에 관련 없이 정자생성 단계법을 적용해야 한다는 주장을 하였다. 가이드라인 중 충분한 병리조직학적 평가(full histopathology) 라는 표현을 고환의 조직검경 시 곡세정관에서 정자형성단계의 주기를 파악하여야 한다는 의미로 해석하고서는 독성병리 보고서에 "세정관의 평가를 정자생성주기상의 각 정자형성 단계를 구분하고 각 정자형성단계를 구분한 세정관의 여러 가지 다양한 세포의 형태의 존재여부까지 평가하였다. 어떤 이상병변도 발견되지 않았다.

Seminiferous tubules were evaluated with respect to their stage in the spermatogenic cycle and the integrity of the various cell types present within the different stages. No abnormalities were noted"

라고 기술하려면 일반적인 검경방법으로 관찰하는 것으로 충분하지 않으며 정자생성주기별로 곡세정관을 정량적으로 관찰하는 것이 필요하다고 이해하였다. 그래서 대부분의 통상적인 시험계획서에 정자생성주기법을 적용한다는 것을 명시하고 이에 따라 병리학자가 일일이 곡세정관의 주기를 판별하고 이에 따른 비용증가분을 시험비용에 추가해야 한다는 주장을 하였다.

그러나 이에 대한 반론을 펴는 사람들은, 즉 일반적인 독성시험 즉 고환이 표적장기로 밝혀지기 전에 고환주기를 구분하는 검색방법을 적용하는 데에 무리가 있다고 주장하며 생식독성 2세대 시험에 관한 가이드라인, 즉 OECD 416과 EPA의 OPPTS 870.3800, 그리고 1996년과 2000년에 발행된 ICH 가이드라인에서 더 상세히 기술한 다음의 문구를 제시한다(OECD guidelines (416), 1996; OPPTS (870.3800), 1998; ICH Guidelines (S5A) 1996, 2000).

"Detailed testicular histopathological examination (e.g. using Bouin's fixative, paraffin embedding and transverse sections of 4~5 μ m thickness) should be conducted in order to identify treatment-related effects such as retained spermatids, missing germ cell layers or types, multinucleated giant cells or sloughing of spermatogenic cells into the lumen ..."

또한 비록 표적장기가 고환으로 예상되어 정자생성주기 단계법을 적용하더라도 엄격한 주기판별과 이의 정량화를 모든 시험에 적용하는 것은 효율이 떨어지는 방법이라고 지적하였다. 특수하게 제작한 검경 표본으로 검사한 결과가 통상적인 PAS나 H & E 염색법에 파라핀 포매를 한 표본을 가지고 일반적인 병리변화 형태를 관찰한 결과와 크게 다르지 않다고 주장하였다. 그 이유로 첫째는, 플라 스틱 포매 등을 한 후 정자생성주기 단계를 구분한 평가법이 실제로 적용하는 데에는 일부의 조직절편에 한정되기 때문에 검사할 수 있는 표본의 수가 적을 수 밖에 없고, 둘째, 반복투여 독성시험에서는 포괄적인 병변이 관찰되기 때문에 특정 포인트에서의 변화를 관찰하는 단계평가 방법의 효용성이 감소하며, 셋째, 곡세정관을 검경할 때 정성적인 방법으로도 특정주기의 특정 생식세포의 소실을 파악 할 수 있기 때문에 일반독성 시험에서 적용하기 보다는 이미 초기단계 혹은 예비시험에서 고환독성 형태의 특별한 탐색이 요구될 경우에만 고려하는 것이 균형(balance)을 가진 판단일 것이라고 주장하였다.

이러한 논란과정에서 일부 병리학자, 독성학자들은 고환의 조직단면에 보이는 곡세정관에 대해서 각 정자형성 주기를 모두 파악하고 그 숫자를 세어서 대조군과 투여군 사이에 각 정자생성주기를 나타내는 곡세정관의 숫자가 통계적 유의한 차이가 나타나는가를 보는 방법으로 고환 독성을 파악하려고도 하였다. 그러나 이 평가 방법은 정자생성주기의 동태(dynamics)에 대한 정보를 줄 수는 있어도 포괄적인 고환의 독성의 정도를 파악하려는 규제 독성시험의 목적에는 적당하지 않은 방법이다(Lanning, 2002).

그렇다면 어떤 경우에 어느 방법을 적용하는 것이 효율

적이고 합리적인가에 대하여 살펴보기로 하자. 우선 정자형성 주기에 대해서 이해할 필요가 있다.

정자생성 주기

정자는 정자생성주기라고 불리는 일정한 과정을 거쳐서 생성된다. 즉 배수체 줄기세포인 정원세포에서 고도로 분화된 세포인 반수체 정자로 변화하는 일련의 과정을 말한다. 감수분열은 DNA의 복제를 시작으로 해서, 염색체의 응축, 그리고 감수분열을 거쳐서 반수체 정자세포로 변한다. 정자세포는 처음엔 단순히 보이는 둥근 형태로 시작하지만 상당히 복잡한 형태학적인 변화를 거친다. 핵의 DNA는 고농도로 응축되어서 머리부위로 이동하고 머리는 아크로솜이라는 당단백으로 둘러싸여지고 세포질은 채찍처럼 길게 늘어진 채로 많은 양의 미토콘드리아를 함유하게 된다. 세포가 각 단계별로 분화가 되어 가면서 형태학적인 변화를 거치는 것을 관찰하여 보면 정자생성주기를 쉽게 이해할 수 있다(高橋, 1994). 실제로 고환을 병리조직 표본으로 만들어서 관찰하게 되면 곡세정관에 여러 가지 단계의 세포가 가지런히 자리를 잡고있는 것을 볼 수 있다. 네 단계의 세포가 각기 일정한 특징을 가지고 분포하고 있어서 시간의 진행에 따라서 일정하게 분화의 단계를 거치게 된다. 일제히 상피에서 성숙과정을 거쳐서 곡세정관 내강으로 성숙된 정자세포가 배출되게 된다. 이러한 주기는 생식세포의 분화단계에 따라 랫드는 14단계, 마우스는 12단계, 그리고 개는 8단계로 구분한다(高橋, 1994). 각 단계별로 특징적인 정자생성 주기를 관찰할 수 있으며, 랫드의 경우 한 주기는 12.9일이 소요되고, 줄기세포에서 완전한 성숙정자로 되기까지는 4~5주기(약 56

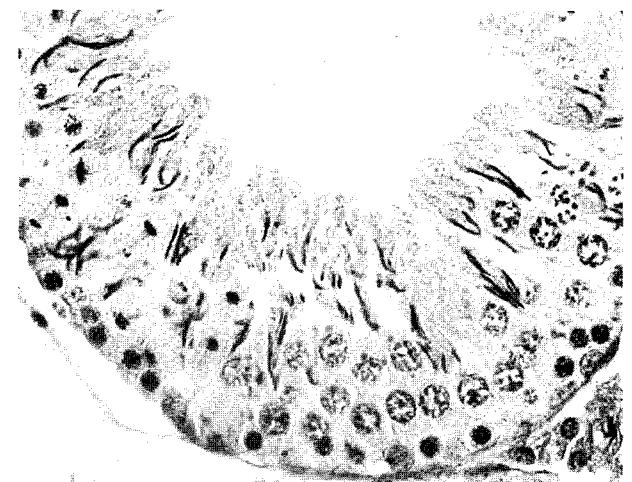


Fig. 1. Stage XIV seminiferous tubule from the normal rat. Meiotic spermatocytes along with the secondary spermatocytes from the first division are shown.

일)가 필요하다(Leblond와 Clermont, 1952). Fig. 1은 정상적인 랫드 곡세정관의 XIV 번째 단계인데 각 생식세포 간의 조합이 다른 단계의 곡세정관과는 다르게 XIV 단계의 곡세정관에서만 특이하게 배열됨을 알 수 있다. 또한 정모세포가 감수분열을 하는 것이 특징적으로 관찰되는 것을 볼 수 있다.

어떤 경우에 적용하는가?

통상적인 독성시험에서는 확실증독량을 투여하여 독성 반응을 평가하기 때문에 나타나는 독성이 명확하게 관찰이 되는 경우가 대부분이다. 그렇지만 때로는 독성물질이 고환에 영향을 주는 물질인지 혹은 고환 독성 중 어느 세포, 어느 부위에 독성을 일으키는지를 규명할 필요가 있을 때가 있다. 과연 많은 시간과 노력이 투입되어야 하는 정자생성 주기법은 어떤 경우에 효율적으로 이용되어야 하는지에 대하여 명확히 이해할 필요가 있다. 고환의 독성 여부를 검색하는 방법의 일환으로 정자생성 주기법을 이용한다면 곡세정관에 있는 생식세포의 소실이 명확히 파악된다. 일반적 병리관찰에서 생식세포 소실이 관찰되면 사실 더 이상의 상세한 관찰이 필요하지 않은 경우가 대부분이다. 이 경우에 정자생성 주기법을 적용하면 어떤 특정 주기에 어떤 종류의 세포가 소실되었는지를 알 수 있을 것이다. 라이디히(Leydig) 세포나 세르톨리(Sertoli) 세포 등도 화학물질에 예민하게 반응하지만 주로 생화학적인 반응으로 기능적 이상을 나타내며 생식세포에 비해서는 독성물질에 저항성을 나타내기 때문에 세포의 사멸을 가져오는 경우는 드물다(Yu *et al.*, 1997, 1999). 생식세포는 호르몬이나 영양 및 기타 주변환경의 변화에 대해서 변성 등의 반응을 보이는 극도로 예민한 세포들이다. 만일 구체적으로 어떤 세포가 영향을 받았는지를 밝혀내려고 한다면 정자생성 주기법이 유용할 것이다. 그러나 일반적으로 아주 조기에 검경을 하지 않으면 사멸된 세포가 탐식세포에 의해서 처리되거나 혹은 탈락되어서 관강내로 배출되어 증거를 잃어버리기 쉽다. 빠르게는 몇 시간 정도의 이른 시기에서부터 시간차를 두고서 경시적으로 검색하여야 한다. 또한 일반 독성시험에서처럼 많은 양의 시험물질을 투여하면 표적세포의 영향이 곧 다른 세포의 변성으로 이어지기 때문에 표적세포의 검색이 어려운 경우가 있으므로 적은 양을 투여하는 것도 중요한 요소이다. 고환의 독성평가 시 특히 정자생성주기법의 적용 시에는 조직제작에 특별한 기법이 도입되어야 한다. 고정 시 관류 고정법의 사용, 포매시 플라스틱 포매법, 그리고 해상도가 좋은 고배율의 현미경, 때로는 전자현미경으로 세포 소기관을 관찰하여야 할 경우도 있다(Hess and Moore, 1993). 조직병리 이외에도 호르몬 함량의 측정이

필요할 경우도 있는데 호르몬은 일반적으로 고환 등의 호르몬 의존성 기관의 손상으로 이차적인 반응을 보이기 때문에 보통은 독성반응의 초기에 호르몬의 함량을 측정하는 것이 필요하다(Chapin and Heindel, 1993). 정자생성 주기법은 특정세포에 특이적으로 나타나는 독성, 그리고 특정 정자생성 단계에 특이적으로 나타나는 독성 등의 규명에 유용하게 이용될 수 있다.

정자생성 주기법의 실제적 접근방법

일단 정자생성 주기법의 타당성이 인정되고 정량적인 측정이 요구된다면 합리적인 표본적 검사가 필요하다. 세포의 소실을 검색하려는 목적으로는 효율적인 파라미터의 선택이 필요하다. Foote 등(1986)은 곡세정관의 지름을 측정, 고환 표본당 일정수의 곡세정관의 선택 등을 제시하였으며, 무영향용량(no-observed-effect level)의 산정에 합리적이었다고 보고하였다. 곡세정관의 숫자는 임의적으로 정하는데 일반적으로 10마리의 랫드에서 각각 15개의 정관을 선택한다(Berndtson *et al.*, 1989). 정자세포를 세는 데에도 세르톨리 세포당 정자세포의 갯수, 특정한 단계를 임의로 정하여 세는데 즉 주기 IX-X에서 렘토텐 정모세포의 수, 그리고 주기 VII에서 파키텐 정모세포의 수 등을 세는 방식으로 임의적 파라미터를 표준화하여 평가하는 것이 합리적이다. 곡세정관에는 각기 다른 주기단계가 주기의 경과시간에 비례하여 나타난다. 즉 주기의 경과시간이 긴 단계일수록 고환조직 단면에 주기가 많은 빈도로 나타난다. 짧은 단계는 약 2.5%만 나타나며, 그 어떤 주기도 전혀 관찰되지 않는 경우는 없다. 단, 동물 개체의 차이를 극복하고 통계학적으로 의미 있는 결과를 얻으려면 12마리 이상의 동물에서 개체당 200개의 세정관의 검사가 필요하다(Hess *et al.*, 1990).

일반적인 규제독성 시험에서 고환독성 평가의 실제적 접근방법

일반규제독성 시험에서는 정성적으로 각 주기별로 소실된 생식세포 여부를 파악하는것이 합리적인 방법이다. 그렇다면 구체적으로 어떤 방법으로 정성적 평가를 해야 하는지에 대하여 알아보자.

장기 반복투여 독성시험(90일 반복투여 독성시험 등): 첫째, 고환의 중량감소는 고환독성 평가시 특별한 의미를 준다. 뇌-혈관 장벽과 마찬가지로 고환을 보호하기 위한 고환-혈관 장벽이 있어서 고환은 비교적 안전한 영역에 보호되는데 독성에 노출 시 고환중량감소가 척도로 이용될 정도로 예민하게 감지가 된다. 중량감소가 나타나면 보통 생식세포의 상실을 동반한다. 만일 고환의 무게가 감소되면 어느 특정세포만 소실이 되었는지 혹은 모든 세

포에 영향이 있었는지를 관찰한다. 예를 들어서 세정관내 세서 정원세포와 파키텐 정모세포만 관찰되었다면 독성효과가 파키텐 정모세포에 있었다는 의미가 된다. 또한 신장된 정자세포가 소실되었다면 전립선과 정낭의 무게와 조직병리학적 변화에서 위축이 있었는지를 평가해야 한다. 두번째, 부고환과 고환의 무게변화가 없었다면 고환의 현저한 조직변화가 없을 가능성이 크며 이런 경우에는 아주 경미한 변화가 관찰될 수 있다. 정자생성주기 IX와 X를 찾아내어서 정자생산이 지연되었거나 방해를 받았는지의 여부를 판단해 보아야 하는데 이런 경우에는 신장된 정자세포만 있는지를 살펴보아야 한다. 어떤 경우에는 IX단계와 X단계의 기저 세포질에서 정자세포가 정체되어있는 것이 관찰되며, 이와 같은 성숙정자세포의 방출지연은 세르톨리 세포의 기능적이상으로부터 초래된다. 세번째, 모든 단계의 세정관에 대하여 특정 생식세포의 부분적 소실 혹은 정상피가 정상의 배열에서 흐트러져 있는지를 관찰해 본다. 이 경우에도 정자생산 주기별로 세정관이 어느 주기에 있는지를 정확하게 이해를 할 수 있어야만 평가가 가능하다. 일반적으로 I-VII주기까지는 정원세포, 조기 파키텐 정모세포, 원형 정자세포 그리고 성숙 신장된 정자세포가 관찰되며, IX-XIV 사이에는 정원세포, 프레 파키텐 정모세포, 후기 정모세포 그리고, 신장된 정자세포가 보인다. 네번째, 변성 혹은 괴사된 생식 세포가 증가되어 있는지를 살펴본다. 이럴 경우 흔히 세포질의 호산성이 증가되며 핵이 변화되어 있거나 다핵 거대세포가 관찰된다. 간질세포를 관찰하여 위축, 과형성 또는 비대가 있는지를 관찰한다. 다섯번째, 부고환의 관강내에 에 탈락된 생식세포나 세포 변성부산물 존재 또는 정자함량이 감소되었는지를 살펴본다. 만일 정자세포가 관강내에 보인다면 정자도 감소되어 있는데 보통 간과되기 쉽다. 고환의 세정관에서 원형 혹은 신장된 정자세포가 경미하게 감소되었다면 보통 현미경적 관찰에서 구분하기 힘들다. 그렇지만 부고환에서 관찰되는 탈락된 세포는 고환의 생식세포가 탈락된 분명한 증거로서 확실한 증거를 관찰한 결과가 된다.

단기시험(14~28일 시험): 단기시험에서 고환독성을 파악하는데 병리학자에 대한 의존도는 매우 높으며 중요하다. 첫번째, 역시 정성적인 관찰을 하게 되는데, 세정관의 공포변화, 생식세포의 변성, 괴사 또는 정자세포의 정체 등을 관찰하고, 위축, 과형성 혹은 비대를 관찰한다 (Fukuda *et al.*, 2000; Ozawa *et al.*, 2000; Tsuchiya *et al.*, 2000). 두번째, 각기 다른 종류의 생식세포의 증감을 관찰한다. 특히 IX-XIV에서 관찰되는 초기 정모세포 즉 프레 파키텐/렙토텐을 상세히 살펴본다. 만일 이 세포의 감소변화가 관찰되면 보통 정원세포가 약 6~8주 이내에

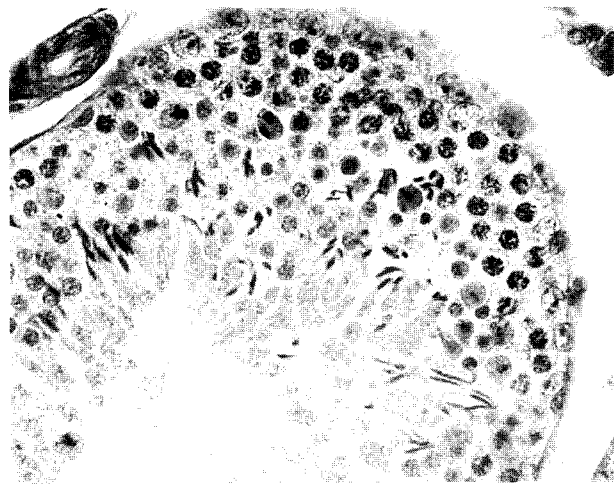


Fig. 2. Stage XIV seminiferous tubule from the rat treated with single dose glycol ether at the dose of 250 mg/kg. At the time point of 24 hours, many necrotic spermatocytes are evident especially in dividing spermatocytes.

화학물질에 의해 변화를 받은 것이며 정자의 감소와 수정능력의 감소로 연결되는 경우가 있을 수 있다. 세번째, 부고환 관강 내에 탈락된 고환의 생식세포, 정자감소 등 어떤 변화가 관찰되면 즉시 고환을 다시 상세히 관찰하여야 한다. 특정 생식세포가 영향을 받은 대표적인 예로서 glycol ether를 250 mg/kg의 용량으로 단회 경구 투여시에 나타난 변화를 들 수 있다. Fig. 2에는 랫드의 곡세정관의 정자형성 XIV 단계에서 분열중인 정모세포에서만 괴사가 나타나는 것을 볼 수 있다(Figs. 1, 2). 네번째, 부고환 관강내에 탈락된 고환의 생식세포, 정자감소 등 어떤 변화가 관찰되면 즉시 고환을 다시 상세히 관찰하여야 한다.

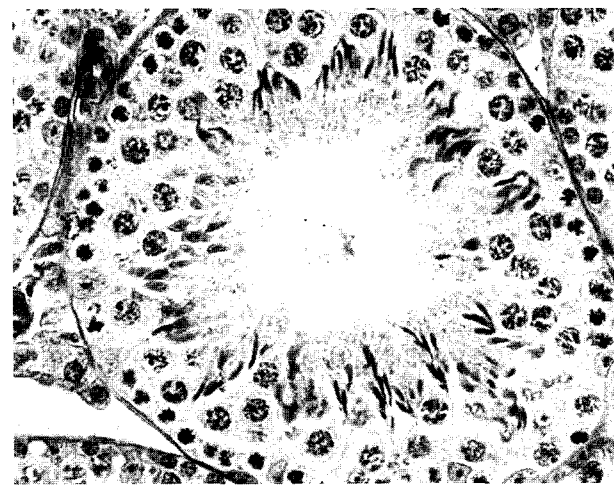


Fig. 3. Stage XII seminiferous tubule from the control mouse. Note the step 12 elongating spermatid heads showing a sickle shape and characteristic features of zygotene spermatocytes.

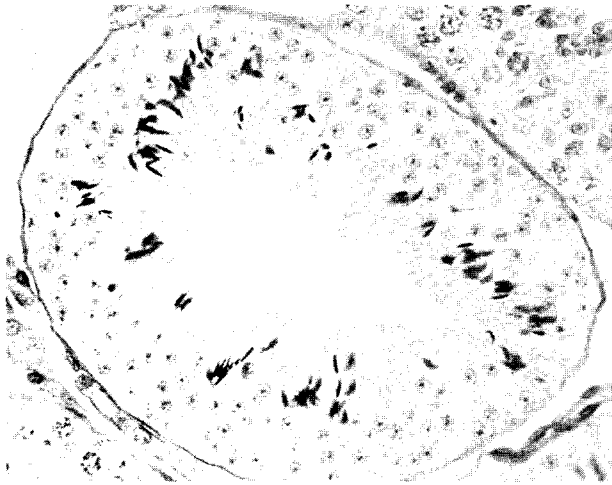


Fig. 4. Stage XII seminiferous tubule from the mouse treated with novel anti-cancer drug. There are no spermatozoa and no zygote spermatocytes.

고환의 독성변화를 평가하기 위한 추가시험: 일반적인 광학현미경관찰에서 고환이나 부고환 등에 고환독성의 증거가 발견되면 일차적인 독성변화의 위치 혹은 구체적인 주기단계의 파악 등이 필요하게 되고 이를 위해서는 추가 시험이 필요하다. 이 경우에 구체적인 정자형성 주기법을 정량적으로 적용하면 유용하다. 이럴 경우 낮은 용량에서도 독성변화가 같이 일어났는지를 살펴보아서 가장 독성

Table 1. Gradings of testicular degeneration in rat

Grade	Appearance
I	정상적인 다세포층의 정상피
II	세정관에 1개 또는 다수의 공포를 가지고 있으나 정상피의 두께에 변화가 없는 것
III	정상피의 두께에 감소가 있으나, Sertoli 세포와 정조세포로 구성되어 있으며 정자세포와 정모세포에 유래된 다핵의 거대세포가 나타나기 시작
IV	정상피의 정원세포와 Sertoli세포로 정열된 세정관
V	정상피가 Sertoli 세포로 정열된 세정관
VI	세정관이 기저막으로만 정열된 것
VII	세정관의 내강에 정자가 범주어져 광물질화되고 세정관 주위의 육아종의 형성
VIII	세정관의 섬유화

변화가 경미한 용량을 선택해서 경시별로 고환의 변화를 관찰해야 한다. 예비시험으로 1, 3, 7, 14, 28일 등의 시간차별로 3~4마리의 규모로 시험을 하여 어느 시간대에서 가장 변화가 민감한지를 살펴보아야 한다. Glycol methacrylate 등의 포매 매체를 사용하고 관류고정을 하면 관찰이 좀더 용이해진다. 변화의 모습이 이미 밝혀진 생리적 특성을 가진 특정 화학물질의 전형적인 효과(class effects) 인지를 파악해 보려고 노력해야 한다. 이미 밝혀진 메커니즘 중 어떤 기전에 의해서 변화가 나타났는지를 이미 밝혀진 기전과 비교하면 비슷한 모습을 가려내기가 용이하다. 예비시험에서 얻은 결과를 모두 모아서 본시험을 실시하는데 이때 정자생성주기 단계법을 적절히 적용

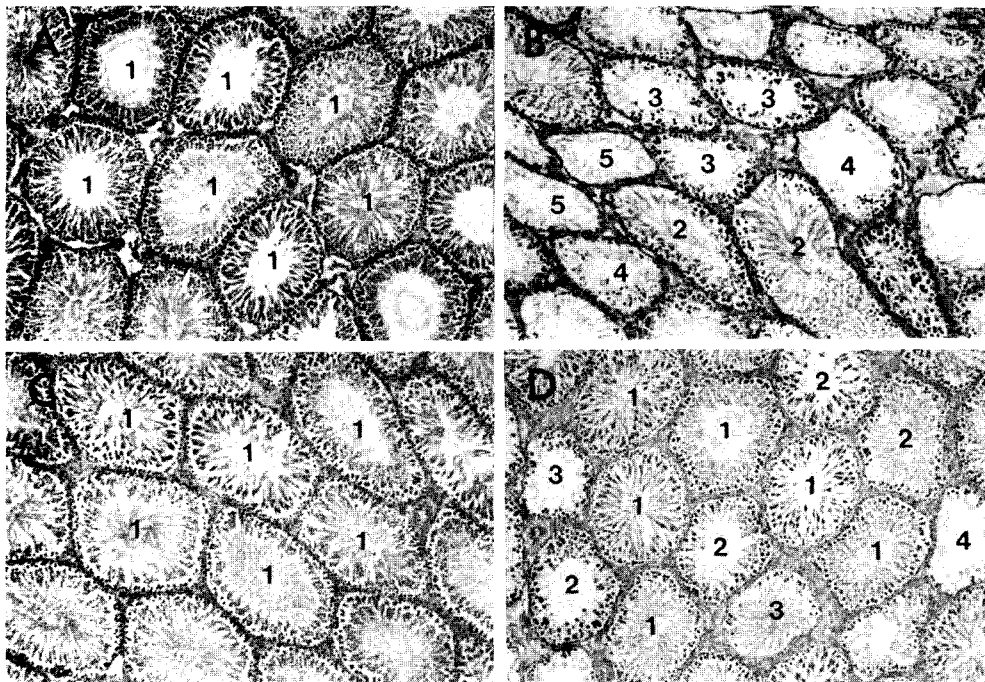


Fig. 5. Histopathology of rat testes treated with ethylene glycol monoethyl ether. Gradings of testicular degeneration were marked with numbers (Yu *et al.*, 1999).

하면 어느 세포가 어느 주기에서 민감하게 먼저 독성변화를 일으켰는지, 이차적인 변화를 받은 특정세포는 어떠한 것인지, 또한 정자의 성숙에 어떻게 영향을 미쳤는지에 대한 보다 상세한 독성정보를 얻을 수 있다. 특정 생식세포가 영향을 받은 예로 마우스에 항암제를 투여한 시험에서 나타난 결과를 보면 정원세포와 자이고텐 정모세포가 없어지는 것을 볼 수 있다(Figs. 3, 4).

정량적인 고환독성의 평가방법

일반적으로 사용되는 고환독성의 정량적인 평가방법으로는 1) 고환독성의 정도에 따른 분류 즉, mild, moderate, severe 등으로 나누는 방법, 2) 비정상적인 세정관의 빈도를 측정하는 방법(Carrol and Ball, 1970), 3) 전체 세정관과 마지막 정자생성주기에 있는 세정관의 비율 측정(Cupps and Laben, 1960), 4) 세르톨리 세포지수, SCI(Sertoli cell index, 생식세포와 Sertoli 세포의 비율)를 측정하는 방법 등이 소개되었다(Kumi-Diaka and Dennis, 1978). 이중 곡세정관의 변성정도를 정량적으로 보는 하나의 방법으로 "세정관 이상 정도의 선택적평가 방법 (Selected degrees of tubular abnormality)" 을 예로 들 수 있다(Yuan, 1979; Yuan and McEntee, 1987). 이 방법은 무작위로 선정된 세정관에서 세정관의 독성영향 정도를 8단계로 구분하고(Table 1) 이 단계에 속하는 세정관 수를 곱하여 합산하여 평가하는 방법이다. 즉 grade II의 세정관 5개와 grade 4의 세정관 2개가 관찰되었다면 $(2 \times 5) + (4 \times 2) = 18$ 로 평가할 수 있다. Fig. 5에서 보이는 바와 같이 ethylene glycol monoethyl ether에 의한 곡세정관 독성의 grading으로 분류하여 평가하는 방법이다. 그러나 이 방법이 정량적인 방법의 잇점이 있는 반면에 규제 독성시험에서 다른 장기와 함께 평가를 할 때 고환만을 정량적으로 하는 번거로움이 있다.

일반적으로 병변을 기술할 때 상황에 따라서 사용하는 용어가 다르고 적용해야 할 정량적 방법도 달라져야 할 것이다. 즉 위축(atrophy) 이라는 용어로 포괄적인 변성 변화를 나타내야 할 때도 있고, 어떤 경우에는 "19번째 정자세포의 소실(loss of 19 spermatids)" 등으로 상세한 기술이 필요할 경우가 생기기 때문이다. 그러므로 이 두 가지 종류의 병변을 모두 다 포용하는 이상적인 정량적 모델은 실제적으로 가능하지 않을 것이다.

고 찰

고환의 조직병리학적 검색 시 정자생성주기 단계법의 중요성과 유용성에 대하여 널리 인식이 되어있지만 이 지식을 어떻게 활용해야 하는지에 대해서는 혼동이 있었다.

혼동의 핵심은 첫째, 병리학자들의 주기를 이용한 평가법에 대한 무시이다. 통상적인 광학현미경 검경에서 발견되는 고환의 독성현상 이외에 그렇게 시간과 비용이 드는 검색법의 필요성을 잘 이해하지 못하는 경우이다 복잡한 방법으로 알아낸 아주 미세한 고환의 조직학적 변화가 안전성 평가의 차원에서 왜 중요한지를 이해하지 못하였기 때문이다. 두번째는, 병리학자가 아니거나 혹은 고환독성 병리에 대한 이해가 부족한 사람들이 맹신적으로 계량적인 장점만 생각하고 적용하는 경우이다. 정자생성단계 주기법을 일반 규제독성 시험에 적용할 때 과학적이며 또한 논리적으로 타당성 있는 방법은, 병리학자가 일반적인 조직관찰에서와 같이 고환조직을 관찰하면서 동시에 각 정자생성주기에 염두에 두어 관찰하여, 특정 주기의 특정 세포가 소실 등의 다양한 독성 변화가 나타나는지를 동시에 관찰하는 것이다. 즉 정성적인 관찰방법으로 각 주기별로 각 세포의 조합이 제대로 되어있는지의 여부를 동시에 보는 것이다(Lanning, 2002). 단지 유념해야 될 사항은 주기법은 특정 세포의 소실을 보는 보조적인 방법이며 단기 시험의 미약한 독성을 평가하는 유용한 방법이지만 결코 그 자체로서 고환독성을 모두 평가하는 방법이 아니라는 점을 명심해야 할 것이다. 독성 메커니즘과 정자의 형성단계에 대한 정보 즉 특정주기의 특정세포에 대한 정보를 상세히 알려면 정자형성 주기법을 정량적으로 적용하는 것이 합리적인데, 이때에는 저용량을 투여하고 시간차를 둔 시험을 실시해야 하고, 조직학적 평가 시 정자생성주기에 대한 충분한 지식이 요구된다. 고환독성을 평가할 때 정성적 혹은 정량적으로 평가하는 몇 가지 방법을 제시하였는데 독성의 특성에 따라 다양하게 적용이 가능할 것이다.

참고문헌

- Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F. and Jouannet, P. (1995): Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 281-285.
- Becker, S. and Berhane, K. (1997): A meta-analysis of 61 sperm count studies revisited. *Fertil Steril.*, **67**, 1103-1108.
- Berndtson, W.E., Neefus, C., Foote, R.H. and Amann, R.P. (1989): Optimal replication for histometric analysis of testicular function in rats and rabbits. *Fund. Appl. Toxicol.*, **12**, 291-301.
- Blazac, W.F., Ernst, T.L. and Stewart, B.E. (1985): Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time and motility in F344 rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, **5**, 1097-1103.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N.E. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* **305**, 609-613.

- Carroll, E.J. and Ball, L. (1970): Testicular changes as affected by mating systems in beef cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **31**, 241-254.
- Chapi, R.E., Sloane, R.A. and Hasemanm, J.K. (1998): Reproductive endpoints in general toxicity studies: are they predictive. *Reprod. Toxicol.*, **12**, 489-494.
- Chapin, R.E. and William, J. (1989): Mechanistic approaches in the study of testicular toxicity: Toxicants that affects the endocrine regulation on the testis. *Toxicol. Pathol.*, **17**, 446-451.
- Chapin, R.E. and Hendel, J.J. (1993). Male reproductive toxicology, Academic Press, 1993.
- Creasy, D.M. (1997): Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol. Pathol.*, **25**, 119-131.
- Cupps, P.T. and Laben, R.C. (1960): Spermatogenesis in relation to spermatozoa concentration in bovine semen. *J. Dairy Sci.*, **43**, 782-786.
- Foote, R.H., Berndtson, W.E. and Rounsaville, T.R. (1986): Use of quantitative testicular histopathology to assess the effects of DBCP on reproduction in rabbits. *Fund. Appl. Toxicol.*, **6**, 638-647.
- Fukuda, R., Hirode, M., Mori, I., Chatani, F., Morishima, H. and Mayahara, H. (2000): Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 24). Testicular toxicity of boric acid after 2- and 4-week administration periods. *J. Toxicol. Sci.*, Spec No:233-9.
- Hess, R.A. (1990): Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: Light microscopic observation of perfusion-fixed and plastic embedded testis. *Biol. Reprod.*, **43**, 525-542.
- Hess, R.A., Schaeffer, D.J., Eroschenko, V.P. and Keen, J.E. (1990): Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol. Reprod.*, **43**, 517-524.
- Hess, R.A. and Moore, B.J. (1993): Histological methods for evaluation of the testis, Male Reproductive Toxicology, Chapin R.E. and Heindel J.J. editors, Academic Press, California.
- Kumi-Diaka, J. and Dennis, S.M. (1978): The Sertoli cell index as a measure of testicular degeneration b zinc. *Am. J. Pathol.*, **42**, 685-702.
- Lanning, L.L., Creasy, D.M., Chapin, RE., Mann, P.C., Barlow, N.J., Regan, K.S. and Goodman, D.G. (2002): Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 507-520.
- Linder, R.E., Starder, L.F., Slott, V.L. and Suarez, J.D. (1992): Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to 14 reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.*, **6**, 491-505.
- Leblond, C.P. and Clermont, Y. (1952): Spermiogenesis of rat, mouse, hamster, and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.*, **90**, 167-215.
- OPPTS (Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances) (EPA) 870.3800. Reproduction and Fertility Effects (issued August 1998).
- Overstreet, J.W. (1984): Reproductive risk assessment. *Teratogenesis Carcinogen. Mutagen*, **4**, 67-75.
- Overstreet, J.W., Samules, S.J. and Day, P., (1988): Early indicators of male reproductive toxicity. *Risk Analysis*, **8**, 21-26.
- The ICH Guidelines for Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A) Including Addendum S5B and S5M(M): Toxicity on Male Fertility (issued October 1996 and November 2000, respectively).
- The OECD 416 Two-generation Reproduction Toxicity Study (issued January 2001).
- The OECD 421 and 422, The Repro/Developmental Toxicity Screening Test, and the Combined Repeated Dose Toxicity Study With Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (issued July 1995/March 1996).
- Ozawa, S., Yokoi, R., Kitamura, T., Kuriyama, K., Kobayashi, K. and Shibata, N. (2000): Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 15). Two-week and 4-week administration study of methyl methanesulfonate (MMS). *J. Toxicol. Sci.*, Spec No:155-62.
- Tsuchiya, T., Ooyama, N., Murakami, T., Sano, F., Sugimoto, J. and Mutai, M. (2000). Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 25). Effects of 2- and 4- week repeated-dosing of dibromoacetic acid. *J. Toxicol. Sci.*, Spec No:241-9.
- 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. and Moon, Y.H. (1997): Reproductive toxicity of 2-bromopropane, *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, **23**, 281-288.
- Yu, I.J., Lee, H.Y., Chung, Y.H., Kim, K.J., Han, J.H., Cha, G.Y., Chung, W.G., Chan, Y.N., Park, J.D., Lee, Y.M. and Moon, Y.H. (1999): Co-administration of toluene and xylene antagonized the testicular toxicity but not the hematopoietic toxicity caused by ethylene glycol monoethyl ether in Sprague-Dawley rats. *Tox. Letters*, **109**, 11-20.
- Yuan, Y.D. (1979): Correlation of testicular pathology and reproductive performance in bulls used for artificial insemination. PhD thesis, Cornell University.
- Yuan, Y.D. and McEntee, K. (1987): Testicular degeneration, rat. Monographs on pathology of laboratory animals sponsored by the ILSI, Genital system, Jones TC, Mohr U and Hunt RD, editors, Springer-Verlag, Heidelberg.
- 高橋道人 (1994). 精細管, Atlas, Soft Science Publication, Tokyo.