



3-MCPD의 생식 · 발생독성에 관한 연구

곽승준 · 김순선 · 최요우 · 이규식 · 손경희 · 이이다 · 채수영 · 정용현¹ · 유일재¹ · 박귀례
국립독성연구원, ¹산업안전보건연구원

Study on the Reproductive and Developmental Toxicity of 3-MCPD

Seung Jun Kwack, Soon Sun Kim, Yo Woo Choi, Gyu Seek Rhee, Kyung Hee Sohn,
Rhee Da Lee, Soo Young Chae, Yong-Hyun Chung¹, Il Je Yu¹ and Kui Lea Park

National Institute of Toxicological Research, Seoul 122-704

¹Occupational Safety and Health Research Institute, Daejeon 305-380, Korea

Received February 11, 2004; Accepted May 6, 2004

ABSTRACT. 3-Monochloro-1,2-propanediol(3-MCPD) is a toxic compound, often present in different foods containing acid hydrolyzed(AH) protein, like seasonings and savory food products. The purpose of the present study was to investigate the effects of 3-MCPD on male fertility, sperm and testosterone secretion. *In vivo* male fertility test was performed for observing the adverse effects of 3-MCPD on the function of male reproductive system and pregnancy outcome. 0.01, 0.05, 0.25, 1 and 5 mg/kg b.w. of 3-MCPD was given daily by gavage to groups of 15 adult male SD rats for 4 weeks. At the end of pre-treatment period, males were mated overnight with normal females. Following morning, males demonstrating successful induction of pregnancy were sacrificed on that day to assess sperm parameters and histopathology of reproductive organs. The resulting pregnant females were sacrificed on day 20 of gestation to evaluate pregnancy outcome. As a result, four-week paternal administration with 3-MCPD resulted in adverse effects on male fertility and pregnancy outcome without remarkable histopathological changes in testes and epididymides; sperm motility, copulation index and fertility index were markedly decreased in the treated group and numbers of live fetuses showed steep dose-response curves. Also, spermatogenesis was investigated in this experiment. However, no effect was observed on production of sperm in testes treated with 3-MCPD for 4 weeks. Hormone assay was performed for observing the effects of 3-MCPD on testosterone and luteinizing hormone (LH) in blood and testes of male SD rats and cultured primary Leydig cell. In result, significant changes of related hormones did not observed by treatment of 3-MCPD. These results indicated that paternal treatment with 3-MCPD induced spermatotoxic effect, which caused an antifertility on male.

Keywords: 3-MCPD, Reproductive and developmental toxicity, Sperm, Leydig cell, Spermatogenesis.

서 론

3-MCPD(또는 α -chlorohydrin)는 chloropropanol류의 화합물로서 식품오염물질의 하나로 알려져 있다(Velisek *et al.*, 1978). 3-MCPD는 산분해 단백질을 이용한 양념 및 구운 빵 등에 많이 존재하며 국내에서도 산분해 간장에서 검출되어 문제가 야기된 독성물질이다(Lee, 2002;

Song and Lee, 2002). 3-MCPD의 독성영향 중 발암성에 대해서는 논란이 있으나, 신장독성 및 생식독성에 대해서는 다양한 연구결과가 존재한다. 기존의 연구결과에 따르면, 랫드에 1 mg/kg/day 용량으로 반복 투여했을 때, 정자의 성숙도가 감소되었으며, 2.5~90 mg/kg/day 이상의 용량에서는 정자의 운동성 상실, 수정능력 저하, 황체퇴화, 고환 및 부고환의 기능이상 등이 보고되었다(Coppola, 1969; Erickson and Bennett, 1971; Crabo *et al.*, 1979; Lohika and Arya, 1979; Heral, 1982; Paz *et al.*, 1985; Sood and Majid, 1987; Woods and Garside, 1996). 3-MCPD에 의한 수컷의 생식능력 감소는 랫드뿐

Correspondence to: Kui-Lea Park, National Institute of Toxicological Research, #5, Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea
E-mail: parkkl@kfda.go.kr

만 아니라 다른 종류의 실험동물에서도 관찰되었다(Jones, 1983). 이와 같이 기존의 연구에서 3-MCPD의 생식독성에 대한 많은 연구결과가 있으나, 3-MCPD에 노출된 수컷의 생식능력 감소와 정자 또는 호르몬 분비와의 상관성은 명확하게 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 SD계 수컷 랫드와 primary culture한 Leydig 세포를 이용하여 3-MCPD가 수컷의 생식능력, 정자형성, 정자의 운동성 및 생식호르몬에 미치는 영향을 실험하였다.

실험재료 및 방법

시험재료

3-MCPD, percoll solution, collagenase, bovine serum albumin(BSA) 및 일반적으로 실험에 사용된 화학물질들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 세포 및 조직배양에는 culture flask와 well culture plate(Corning Co., U.S.A.)를 구입하여 사용하였다. Testosterone 및 LH 측정 kit은 IBL GmbH(Hamburg, Germany)사에서 구입하였다.

실험동물 및 사육조건

특정병원체 부재(SPF) SD계 7주령의 랫드를 Bio Genomics(Seoul, Korea)사로부터 구입하여 1 주일간 순화시킨 후 사용하였다. 나무갈집을 사용한 polycarbonate 사육상자에 cage당 3마리씩 수용하였으며, 사료 및 수돗물을 자유롭게 섭취시켰다. 사육온도는 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $55 \pm 5\%$ 인 상태로 유지시켰으며, 명암은 1일 12시간(오전 6시~오후 6시)씩 교대하였다. 암컷 흰쥐를 수컷과 2:1로 교배시켜 다음날 아침 질전이 확인되거나 질도발법에 의해 정자가 발견된 암컷을 임신 0일로 산정하였다.

수컷 랫드를 이용한 생식·발생독성 영향 평가시험

8주령 수컷 SD계 랫드를 각각 15마리씩 용매대조군, 3-MCPD 투여군으로 분리하였다. 3-MCPD를 멸균 생리식염수에 용해한 후 4주 동안 경구투여 하였다. 투여량은 기존의 연구에서 생식독성이 보고된 용량을 근거로 하여 0.01, 0.05, 0.25, 1, 5 mg/kg으로 설정하였고, 투여액량은 5 ml/kg로 조정하였다(Helal, 1982; Paz and Homonnai, 1982; Ban *et al.*, 1999). 투여액량은 이틀마다 체중을 측정하여 체중에 따라 산출하였으며 시료는 투여직전에 조제하였다. 투여는 매일 동일한 시간에 실시하였다. 마지막 투여 후 약물을 투여하지 않은 암컷 랫드를 수컷과 1:1로 교배시켜 다음날 아침 임신이 확인된 암컷을 임신 0일로 산정하였다. 교배가 확인된 수컷은 에테르로 마취시킨 후, 혈액을 채취하고 주요장기와 생식장기(간, 신장,

비장, 고환, 부고환, 전립선, 정낭)를 적출하고 각 장기의 무게를 측정하였다. 정자수 및 정자운동성을 관찰하기 위하여 부고환에서 정자를 취하여 M199 배지(pH 7.4, 0.5% BSA, 37°C)에서 5분간 CO_2 배양기에서 배양한 후, Sperm analyzer(TOX IVOS, Hamilton Thorne Research, USA)를 사용하여 검사하였다. 고환과 부고환에서의 정자형성과정을 관찰하기 위하여 무게를 측정된 후 10% 중성 포르말린 용액에 고정하였다. 고정된 각 조직들은 일상적인 알코올탈수 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매시킨 후, 절편을 제작하여 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드에 붙여 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 임신된 암컷은 임신지수를 측정하기 위하여 임신 20일째 제왕절개하여 황체수, 착상수, 흡수태자수, 생존태자수, 사망태자수, 생존태자의 성별, 체중 및 태반 무게 등을 측정하였다. 흡수태자의 경우 태반조직만 보일 경우 초기흡수로 하였고, 태반 및 태자의 근조직이 관찰될 경우에는 후기흡수로 분류하였다. 또한 교배된 암·수컷과 임신 확인된 암·수컷간의 비율을 통하여 임신율 및 수정율을 측정하였다. 시험물질에 의한 호르몬 변화를 관찰하기 위하여 부검 시 채취한 혈청과 고환조직의 균질액에서 testosterone과 LH를 측정하였다. 구입한 IBL ELISA kit를 사용하여 지시대로 조작한 후 ELISA reader에서 testosterone과 LH를 흡광도 450 nm에서 측정하여 정량하였다(Cochran *et al.*, 1981; Plassmann and Urwyler, 2001).

Leydig 세포 배양시험

Leydig 세포를 분리 배양하기 위하여 9주령의 SD계 랫드의 고환을 적출하였다. 적출된 고환의 동맥을 collagenase가 함유된 M199 배지(0.1% BSA, 25 ml/l soybean trypsin inhibitor and 1 mg/ml collagenase)로 관류시켜 혈액을 제거하였다. 각각의 고환의 피막을 제거한 후, M199 배지가 들어있는 50 ml 튜브로 옮기고 34°C 에서 15분간 배양하였다. 배양이 끝난 고환을 5 ml의 collagenase M199 배지(0.1% BSA, 25 mg/l soybean trypsin inhibitor and 0.5 mg/ml collagenase)로 옮기고, 90 cycle/min의 속도로 진탕하며 15분간 34°C 에서 배양하고 배양액을 100 mesh Nitex filter로 여과하였다. 여과액에 3배량의 M199 배지를 가하고 4°C 에서 $250 \times \text{g}$ 로 10분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 M199 배지에 현탁시키고 5, 30, 58, 70% Percoll solution(in HBSS)에 가하여 4°C 에서 $800 \times \text{g}$ 로 30분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후 밀도에 따라 분리된 세포 구획 중 4번째 불투명층에서 Leydig 세포를 수거하였다. 분리된 Leydig 세포는 DMEM/F12 배지에서 배양하였다. 분리 배양된 Leydig 세포의 존재를 확인하기 위하여 3β -hydroxy-

steroid hydrogenase(β -HSD) 활성을 이용한 세포 염색 방법을 사용하였다. 소량의 세포현탁액을 슬라이드 위에 떨어뜨려 건조시킨 후, nitroblue tetrazolium(NBT) solution과 β -NAD solution을 처리하고 1시간 동안 반응시킨 다음, 10% 포르말린 용액으로 고정시켰다. 고정된 세포들은 현미경 하에서 관찰하여 blue-purple로 염색된 Leydig 세포의 존재를 확인하였다. 8시간 동안 배양된 Leydig 세포의 배양액을 교환해주고 12 시간 후에 3-MCPD를 배지에 섞어 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mmol/l의 농도로 처리하였다. 동시에 1 U의 hCG를 가한 후, 6, 12, 18, 24 시간 뒤에 배지를 취하여 배지 내 testosterone의 함량을 구입한 IBL ELISA kit로 정량하였다(Risbridger and Kretser, 1986; Klinefelter *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1999).

자료의 통계학적 해석

자료 분석을 위해 SigmaStat 통계프로그램을 사용하였으며, 모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. One-way ANOVA를 이용하여 통계학적 유의성을 검사하였고, Dunnett's test로 유의수준 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 에서 대조군과 시험물질 투여군간의 통계학적 유의성을 검증하였다.

결 과

3-MCPD를 수컷 SD계 랫드에 4주 동안 최고 5 mg/kg

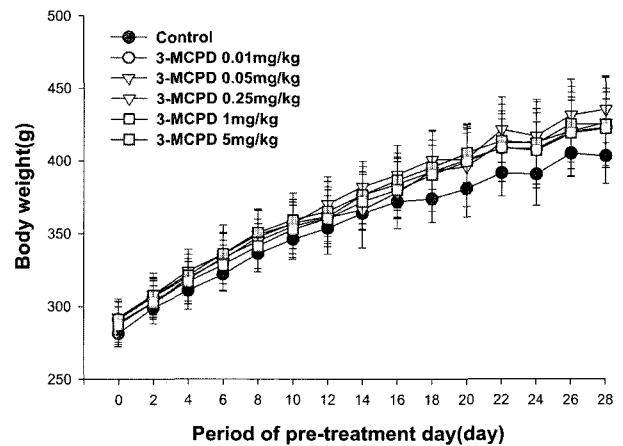


Fig. 1. Body weight changes of male during pretreatment period. Body weight was assessed every two days to determine the effect of the treatment on the general health of the males.

의 농도로 경구 투여한 결과 시험물질에 의한 것으로 판단되는 임상증상은 관찰되지 않았으며 대조군과 투여군간의 체중변화에 있어서도 통계적 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 부검 시 측정된 간, 신장 등의 주요장기와 고환, 부고환 등의 생식장기의 절대 및 상대중량에서도 시험물질에 기인한 것으로 보이는 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(Table 1). 정자분석기를 이용한 정자수 및 운동성 측정시험에서는 0.25 mg/kg/day 이상 투여군에서부터 용량의존적인 감소가 관찰되었으며, 전체 정자 중 운동성

Table 1. Effects of 3-MCPD treatment on body and organ weight

| | Control | 3-MCPD (mg/kg/day) | | | | |
|--------------------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | | 0.01 | 0.05 | 0.25 | 1 | 5 |
| Body weight (g): | | | | | | |
| Day 0 | 281.4 \pm 8.9 | 291.2 \pm 12.4 | 292.4 \pm 12.7 | 288.8 \pm 14.8 | 291.9 \pm 12.0 | 287.7 \pm 12.2 |
| Day 28 | 403.1 \pm 18.8 | 422.5 \pm 19.7 | 435.1 \pm 2.31* | 426.0 \pm 31.1* | 424.9 \pm 24.8 | 421.8 \pm 25.3 |
| Organ weight | | | | | | |
| Absolute(g) | | | | | | |
| Kidney | 1.35 \pm 0.12 | 1.43 \pm 0.13 | 1.38 \pm 0.18 | 1.38 \pm 0.12 | 1.31 \pm 0.12 | 1.39 \pm 0.13 |
| Liver | 13.88 \pm 1.28 | 15.21 \pm 1.50 | 15.43 \pm 1.62 | 14.54 \pm 1.87 | 14.23 \pm 1.52 | 14.86 \pm 1.66 |
| Spleen | 0.80 \pm 0.26 | 0.72 \pm 0.07 | 0.76 \pm 0.08 | 0.79 \pm 0.15 | 0.78 \pm 0.12 | 0.82 \pm 0.27 |
| Testis | 1.60 \pm 0.10 | 1.63 \pm 0.17 | 1.63 \pm 0.13 | 1.64 \pm 0.15 | 1.55 \pm 0.14 | 1.63 \pm 0.11 |
| Epididymides | 0.46 \pm 0.03 | 0.45 \pm 0.07 | 0.44 \pm 0.05 | 0.46 \pm 0.05 | 0.46 \pm 0.05 | 0.46 \pm 0.03 |
| Prostate | 0.51 \pm 0.12 | 0.50 \pm 0.17 | 0.40 \pm 0.18 | 0.51 \pm 0.13 | 0.45 \pm 0.12 | 0.55 \pm 0.39 |
| Seminal Vesicle | 0.80 \pm 0.19 | 0.83 \pm 0.34 | 0.82 \pm 0.19 | 0.78 \pm 0.16 | 0.75 \pm 0.12 | 0.77 \pm 0.18 |
| Relative (% b.w.) | | | | | | |
| Kidney | 0.33 \pm 0.03 | 0.33 \pm 0.03 | 0.32 \pm 0.04 | 0.32 \pm 0.03 | 0.31 \pm 0.02 | 0.33 \pm 0.03 |
| Liver | 3.42 \pm 0.26 | 3.50 \pm 0.26 | 3.37 \pm 0.79 | 3.15 \pm 0.77 | 3.31 \pm 0.21 | 3.47 \pm 0.33 |
| Spleen | 0.20 \pm 0.06 | 0.17 \pm 0.01 | 0.18 \pm 0.01 | 0.18 \pm 0.03 | 0.18 \pm 0.02 | 0.19 \pm 0.06 |
| Testis | 0.40 \pm 0.03 | 0.38 \pm 0.04 | 0.37 \pm 0.03** | 0.38 \pm 0.04 | 0.36 \pm 0.04** | 0.38 \pm 0.04 |
| Epididymides | 0.11 \pm 0.01 | 0.10 \pm 0.01** | 0.10 \pm 0.01** | 0.11 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.01 |
| Prostate | 0.13 \pm 0.03 | 0.11 \pm 0.03 | 0.09 \pm 0.04 | 0.12 \pm 0.03 | 0.11 \pm 0.03 | 0.13 \pm 0.08 |
| Seminal Vesicle | 0.20 \pm 0.04 | 0.19 \pm 0.07 | 0.19 \pm 0.04 | 0.18 \pm 0.03 | 0.18 \pm 0.03 | 0.18 \pm 0.05 |

The results are given as mean \pm SD data (n=15). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ are compared with control group.

Table 2. Effects of 3-MCPD treatment on sperm counts and motility

| | Control | 3-MCPD (mg/kg/day) | | | | |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0.01 | 0.05 | 0.25 | 1 | 5 |
| Sperm counts ($\times 10^6$) | 1016 \pm 399 | 1003 \pm 222 | 672 \pm 68 | 474 \pm 168* | 417 \pm 121** | 455 \pm 258* |
| Sperm motility | | | | | | |
| Total | 847 \pm 413 (81) | 803 \pm 197 (80) | 571 \pm 90 (85) | 345 \pm 148* (71) | 304 \pm 118* (71) | 328 \pm 222* (68) |
| Rapid (%) | 768 \pm 363 (74) | 741 \pm 188 (74) | 520 \pm 62 (77) | 323 \pm 136* (66) | 274 \pm 112* (64) | 290 \pm 214* (58) |
| Medium (%) | 26 \pm 19 (2) | 21 \pm 2 (2) | 29 \pm 27 (4) | 5 \pm 6 (1) | 8 \pm 3 (2) | 12 \pm 9 (3) |
| Slow (%) | 53 \pm 34 (5) | 42 \pm 9 (4) | 23 \pm 8 (3) | 9 \pm 4 (2) | 23 \pm 5 (6) | 25 \pm 5 (7) |
| Static (%) | 170 \pm 49 (19) | 199 \pm 39 (20) | 102 \pm 39 (15) | 137 \pm 42 (30) | 113 \pm 19 (28) | 127 \pm 62 (32) |

The results are given as mean \pm SD data (n=15). * p <0.05, ** p <0.01 are compared with control group.

Table 3. Effects of 3-MCPD treatment on reproductive performance of males

| | Control | 3-MCPD (mg/kg/day) | | | | |
|-----------------------------------|---------|--------------------|------|------|-----|------|
| | | 0.01 | 0.05 | 0.25 | 1 | 5 |
| No. of pairs | 15 | 14 | 15 | 15 | 13 | 15 |
| No. of copulated pairs | 15 | 13 | 15 | 14 | 13 | 14 |
| Copulation index (%) ^a | 100 | 92.9 | 100 | 93.3 | 100 | 93.3 |
| No. of fertile pairs | 15 | 12 | 12 | 14 | 13 | 2 |
| Fertility index (%) ^b | 100 | 90 | 80 | 100 | 100 | 14.3 |

^aCopulation index (%)=(No. of copulated pairs/No. of pairs) \times 100.

^bFertility index (%)=(No. of fertile pairs/No. of copulated pairs) \times 100.

을 나타내는 정자는 대조군이 81%인 반면, 최고농도군인 5 mg/kg/day 투여군은 68%였다. 특히 운동성을 갖는 정자 중 활발한 움직임을 나타내는 정자의 비율이 대조군은 74%인데 비하여 5 mg/kg/day 투여군은 58%까지 감소하는 경향을 나타내었다(Table 2). 정상적인 암컷과의 교배를 통하여 수컷의 생식능력을 검사한 결과, 교배율에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 수정율은 최고농도군이 대조군에 비해 급격히 감소하는 양상을 나타내었

으며 수치상 14.3%의 수정율만을 나타내었다(Table 3). 임신모체를 제왕절개하여 태자의 상태를 관찰한 결과에서는 최고농도인 5 mg/kg/day 투여군에서 황체수, 착상수, 생존태자수 등이 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으나, 시험물질에 의한 외표, 내장 및 골격기형 등은 관찰되지 않았다(Table 4). 시험물질이 투여된 수컷 랫드의 혈액 및 고환에서 호르몬의 함량을 측정된 결과, 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 고환 및 부고환 조직 절편

Table 4. Effects of 4-weeks paternal 3-MCPD treatment on caesarean sectional findings of dams

| | Control | 3-MCPD (mg/kg/day) | | | | |
|--|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | | 0.01 | 0.05 | 0.25 | 1 | 5 |
| No. of examined females* | 15 | 12 | 12 | 14 | 13 | 2 |
| Corpora lutea | 19.8 \pm 2.9 | 20.0 \pm 2.5 | 21.8 \pm 7.6 | 19.9 \pm 3.2 | 21.0 \pm 4.5 | 10.5 \pm 2.1 |
| Total implants | 15.9 \pm 1.9 | 16.9 \pm 1.7 | 17.0 \pm 1.8 | 16.3 \pm 1.1 | 21.0 \pm 4.5* | 10.5 \pm 2.1* |
| Resorption | | | | | | |
| Early | 0.9 \pm 1.3 | 0.4 \pm 0.7 | 0.3 \pm 0.5 | 0.4 \pm 0.5 | 0.7 \pm 0.6 | 0 |
| Late | 0.53 \pm 0.7 | 0.42 \pm 0.9 | 0.75 \pm 1.6 | 0.36 \pm 0.8 | 0 | 0 |
| Live fetuses | | | | | | |
| Total | 14.5 \pm 2.3 | 16.1 \pm 2.1 | 16.0 \pm 2.6 | 15.6 \pm 1.8 | 15.3 \pm 2.3 | 1.0 \pm 0** |
| Male | 7.3 \pm 2.0 | 7.6 \pm 2.2 | 7.3 \pm 3.2 | 8.8 \pm 2.0 | 7.3 \pm 2.8 | 1.0 \pm 0** |
| Female | 7.2 \pm 1.8 | 8.2 \pm 2.3 | 8.7 \pm 3.4 | 6.8 \pm 2.2 | 8.0 \pm 3.0 | 0** |
| Dead fetuses | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fetus weight(g) | | | | | | |
| Male | 3.69 \pm 0.28 | 3.66 \pm 0.25 | 3.68 \pm 0.32 | 3.85 \pm 0.28 | 3.77 \pm 0.31 | 4.40 \pm 0.30* |
| Female | 3.51 \pm 0.25 | 3.44 \pm 0.24 | 3.50 \pm 0.34 | 3.68 \pm 0.31 | 3.60 \pm 0.21 | 0 |
| No. of pups with external malformation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Placental weight(g) | 0.56 \pm 0.07 | 0.48 \pm 0.03 | 0.53 \pm 0.07 | 0.53 \pm 0.04 | 0.55 \pm 0.15 | 0.80 \pm 0.10** |

The results are given as mean \pm SD data (n=15). * p <0.05, ** p <0.01 are compared with control group.

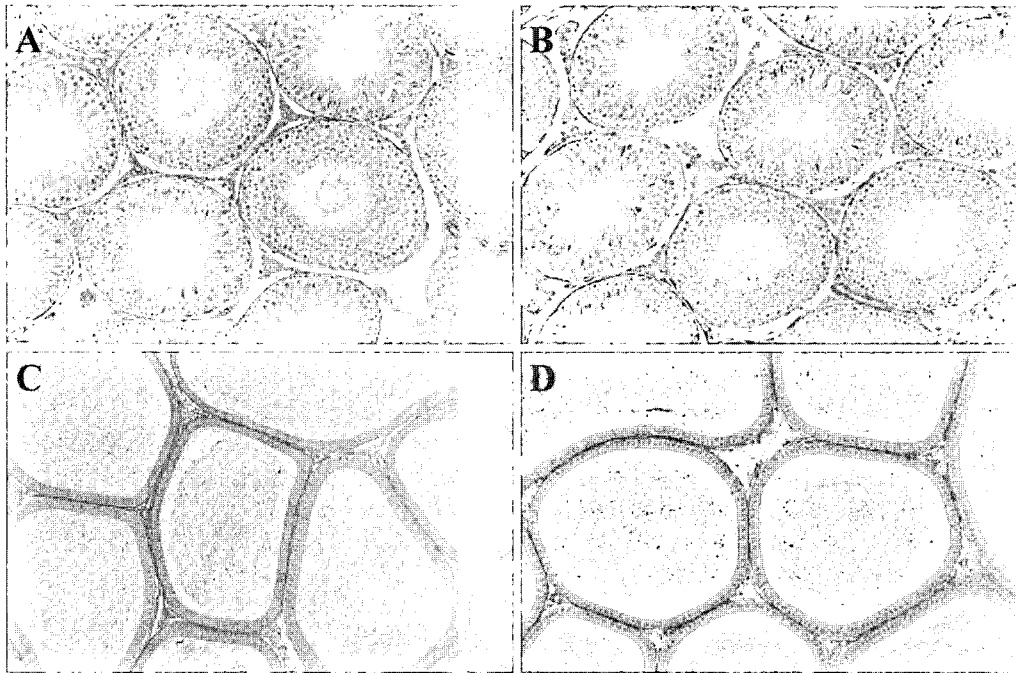


Fig. 2. Light micrographs of paraffin embedded section from testicular tubules (A and B) and epididymides (C and D) for spermatogenesis. A and C : control, B and D : 3-MCPD; 5 mg/kg/day. In testicular tubules, significant effects of administration with 3-MCPD were not observed. But, in epididymides, sperm of epididymis of male treated with 3-MCPD were slightly congealed. Magnification 100×.

에서 정자형성을 관찰한 실험에서는 대조군에 비해 비정상적인 양상이 관찰되지 않았다. 고환 내 tubule의 수나 형태 등에도 이상이 없었으며, 정자의 형성 단계에서도 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 부고환 조직에서는 최고농도군에서 정자의 응결된 상태가 관찰되기도 하였으나, 대조군과 비교하여 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다(Fig.

2). 수컷 랫드의 고환에서 Leydig 세포를 분리 배양하였을 때, percoll solution에 의한 원심분리 방법은 Leydig 세포의 순도를 높일 수 있는 방법으로 본 실험에서도 순도가 높은 Leydig 세포를 얻을 수 있었다. 분리된 Leydig 세포를 β -HSD 염색하여 관찰한 결과, 대부분의 세포들이 blue-purple로 염색되어 실험에 사용한 세포들이 Leydig 세포임을 확인할 수 있었다. 배양된 Leydig 세포에 3-MCPD를 처리하고 일정시간 뒤에 배지를 취하여 배지 내 testosterone의 함량을 측정된 결과, 24시간 후 최고농도 처리군인 10 mmol/ml에서만 유의적인 testosterone의 감소가 나타났으나 시험물질에 의한 영향이라기보다는 세포의 손상에 의한 감소로 판단되었다(Fig. 3).

고찰

본 연구결과에서 수컷의 경우 3-MCPD에 의한 고환 및 부고환에서의 조직병리학적 소견은 발견되지 않았으나, 정자의 운동성 감소 등 3-MCPD가 정자에 독성영향을 나타내는 것으로 관찰되었고, 암컷의 임신결과에서는 투여군에서 착상률, 생존태자수 등의 임신지수가 감소되고 수컷의 생식능력 감소가 관찰되었다. 고환조직에서의 정자형성 과정을 관찰한 결과에서는 3-MCPD에 의한 유의적인 영향은 나타나지 않았다. 또한, 3-MCPD에 의한 testosterone

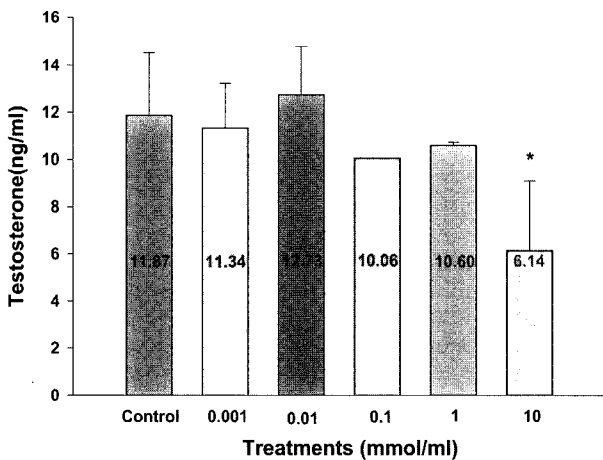


Fig. 3. Measurement of testosterone secretion in isolated Leydig cells. Effects of 3-MCPD on testosterone secretion by Leydig cells incubated in the presence of hCG for 24 h. Significantly different from control group (* $p < 0.05$).

및 LH 등 생식호르몬의 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 본 실험에서 확인된 3-MCPD에 의한 수컷 랫드의 생식능력 감소는 3-MCPD가 반응성이 강한 알킬화유도체로서 수정을 억제한다는 보고와 일치하며(Gunn *et al.*, 1969; Ericsson and Youngdale, 1970), 독성영향이 나타나는 주요 표적은 정자세포인 것으로 관찰되었다. 이와 관련하여 3-MCPD에 의해 생식장기의 혈관이 손상됨으로써 부고환 내 산소결핍으로 인해 정자의 운동성 상실이 나타났다는 연구결과가 있으며(Brown-Woodman *et al.*, 1979), 최근의 연구에서는 3-MCPD에 의한 정자의 운동성 감소를 정자가 움직이는데 필요한 ATP 생성의 억제에서 유발되었다는 보고도 있다(Jelks *et al.*, 2001). 본 연구에서 3-MCPD 투여에 의한 정자형성 이상 및 생식호르몬의 변화 등은 관찰되지 않았으나 정자수 및 운동성에 유의적인 변화가 나타났으므로 이러한 결과들은 3-MCPD에 노출될 경우 정자에 독성영향을 야기할 수 있으며, 이는 남성 불임의 원인이 될 수 있다고 판단된다. 식품의 안전성에 대한 사회적 요구가 높아지고 있는 만큼 3-MCPD의 독성기전에 대한 명확한 규명과 *in vitro* 및 *in vivo* 독성에 대한 점진적인 연구가 요구된다.

참고문헌

- Ban, Y., Asanabe, U., Inagaki, S., Sasaki, M., Nakatsuka, T. and Matsumoto, H. (1999): Effect of alpha-chlorohydrin on rat sperm motions in relation to male reproductive functions. *J. Toxicol. Sci.*, **24**, 407-413.
- Brown-Woodman, P.D., White, I.G. and Ridley, D.D. (1979): The antifertility and toxicity of alpha-chlorohydrin derivatives in male rats. *Contraception*, **19**, 517-525.
- Cochran, R.C., Ewing, L.L. and Niswender, G.D. (1981): Serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, testosterone, 5 alpha-dihydrotestosterone, 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol, 5 alpha-androstane-3 beta, 17 beta-diol, and 17 beta-estradiol from male beagles with spontaneous or induced benign prostatic hyperplasia. *Invest. Urol.*, **19**, 142-147.
- Coppola, J.A. (1969): An extragonadal male antifertility agent. *Life Sciences*, **8**, 43-48.
- Crabo, B.G., Zimmerman, K.J., Hunter, A.G., Graham, E.F. and Moore, R. (1979): Effects of α -Chlorohydrin on epididymal sperm and epididymal plasma in swine. *Arch. Andrology*, **3**, 79-87.
- Erickson, G.I. and Bennett, J.P. (1971): Mechanism of antifertility activity of minimal dose level of alpha-chlorohydrin in the male rat. *Biol. Reprod.*, **5**, 98.
- Ericsson, R.J. and Youngdale, G.A. (1970): Male antifertility compounds: structure and activity relationships of U-5897, U-15, 646 and related substances. *J. Reprod. Fert.*, **21**, 263-266.
- Gunn, S.A., Gould, T.C. and Anderson, W.A. (1969): Possible mechanism of posttesticular antifertility action of 3-chloro-1,2-propanediol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 656-659.
- Helal, T.Y. (1982): Chemosterilant and rodenticidal effects of 3-chloro-1, 2-propanediol (Epibloc) against the albino laboratory rat and the Nile field rat. *Int. Pest Control.*, **24**, 20-23.
- Jelks, K., Berger, T., Horner, C. and Miller, M.G. (2001): Alpha-chlorohydrin induced changes in sperm fertilizing ability in the rat: association with diminished sperm ATP levels and motility. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 11-20.
- Jones, A.R. (1983): Antifertility actions of α -chlorohydrin in the male. *Aust. J. Biol. Sci.*, **36**, 333-350.
- Klinefelter, G.R., Kelce, W.R. and Hardy, M.P. (1993): Isolation and culture of Leydig cells from adult rats. *Methods In Toxicol.*, **3A**, 167-181.
- Lee, B.M. (2002): Safety and risk assessment of 3-monochloro -1,2-propanediol (3-MCPD). *J. Toxicol. Pub. Health*, **18**, 1-11.
- Lohika, N.K. and Arya, M. (1979): Antifertility activity of alpha-chlorohydrin (3-chloro-1,2-propanediol, U-5897) on the female rats. *Acta Eur. Fert.*, **10**, 23-27.
- Paz, G.F. and Homonnai, Z.T. (1982): A direct effect of α -chlorohydrin on rat epididymal spermatozoa. *Int. J. Androl.*, **5**, 308-316.
- Paz, G.F., Carmon, A. and Homonnai, Z.T. (1985): Effect of alpha-chlorohydrin on metabolism and testosterone secretion by rat testicular interstitial cells. *Int. J. Androl.*, **8**, 139-146.
- Plassmann, S. and Urwyler, H. (2001): Improved risk assessment by screening sperm parameters. *Toxicol. Lett.*, **119**, 157-171.
- Risbridger, G.P. and Kretser, D.M. (1986): Percoll-gradient separation of Leydig cells from postnatal rat testes. *J. Reprod. Fert.*, **76**, 331-338.
- Song, H.S. and Lee, B.M. (2002): Analysis of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in soy sauce products in Korea. *J. Toxicol. Pub. Health*, **18**, 191-194.
- Sood, P.P. and Majid, M.A. (1987): Qualitative and quantitative changes of acid and alkaline phosphatases in the testis and epididymis of mice in relation to single high dose of α -chlorohydrin. *Acta Europaea Fertilitas*, **18**, 33-38.
- Velisek, J., Davidek, J., Hajslova, J., Kubelka, V., Janicek, G. and Mankova, B.Z. (1978): Chlorohydrins in protein hydrolysates, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **167**, 241-244.
- Woods, J. and Garside, D.A. (1996): An *in vivo* and *in vitro* investigation into the effects of α -chlorohydrin on sperm motility and correlation with fertility in the Han Wistar rat. *Reprod. Toxicol.*, **10**, 199-207.
- Wu, X.D., Yang, J.M., Wu, X.Y., Ding, X.C., Pang, B., Jiang, X.Z., Ji, Z.S. and Shin, K. (1999): The effects of 2-bromopropane on viability and testosterone production ability of rat Leydig cells in primary culture. *Biomed. Environ. Sci.*, **12**, 43-49.