

고용량의 2-Bromopropane 투여가 Sprague-Dawley 랫트의 고환에 미치는 영향

손화영¹, 조성환², 김용범¹, 하창수¹, 강부현¹

¹한국화학연구소 스크리닝-안전성연구센터 ²충남대학교*

Testicular Lesion in the Sprague-Dawley Rats Treated with High Dose of 2-Bromopropane

Hwa-Young Son¹, Sung-Wan Cho², Yong-Bum Kim¹, Chang-Su Ha¹,
Boo-Hyon Kang¹

¹Korea Research Institute of Chemical Technology, Screening & Toxicology Research Center
²Chungnam National University

Abstract. This study was carried out to investigate the testicular toxicity of environmental toxicant, 2-bromopropane(2-BP), recently caused occupational intoxication in Korea, by light microscopy and electron microscopy. To evaluate the effect on spermatogenesis and find target germ cell, 10 weeks old male Sprague-Dawley rats were treated with 5g/10ml/kg/day of 2-bromopropane for 3 consecutive days orally and observed on day 1 or day 7 after treatment. 2-BP induced depletion of spermatogonia and early spermatocytes on stages I~IX or extensive degeneration of germ cells on the other stages on day 1. But extensive degeneration of germ cells without stage specificity was observed and round spermatid formed multinucleated giant cells in the lumen of seminiferous tubules on day 7. Electron microscopically, Sertoli cells showed irregular shape of nucleus and cytoplasmic vacuolation. And spermatocyte showed a extensive heterochromatin and cytoplasmic vacuolation. But there was no histopathological changes in the interstitial cells. On the base of the results, the target germ cell was spermatogonia in the early of the study but Srtoli cells also effected by high-dosed 2-BP in the late of the study.

Key words : 2-bromopropane, rat, testis, histopathology, electron microscopy

서론

사람의 생식기 독성을 검사하기 위해서 실험동물을 이용하는데 사람과 같은 생식기의 특성을 가진 실험동물이 없기 때문에 독성을 검사할 때에는 사람과 유사한 동물을 실험동물로 선택하는 것이 바람직하다⁴⁶. 영장류가 사람과 유사한 실험동물이나 구하기가 용이하지 않으며, 비용이 많이 드는 단점이 있다. Baboon(*Papio anubis*)도 고환의 구조가 사람과 유사한 동물로 알려져 있으나 사람에서는 정

세포의 구성이 매우 불규칙하기 때문에 랫트에서와 같이 정세관 내에서의 정세포성숙단계(stage)가 쉽게 구별되지 않는다²⁰. 따라서 랫트와 같이 정세포의 구성이 단순한 동물이 실험동물로서 더욱 적합하다⁴. 랫트는 약리학적, 내분비학적 연구가 가장 많이 이루어진 동물로서 정상적인 생식기의 구조, 생리 및 생화학에 대한 자료가 풍부하기 때문에 일반적인 독성시험뿐만아니라 생식독성 시험에도 많이 사용되고 있다⁴. 또한 사람에서 생식기능의 이상을 유발한 약물은 모두 랫트에서도 이상을 유발한다고 하였고⁹, Clegg⁴는 사람과 랫트의 생식기계통을 비교

하였으며, 또한 잘 알려진 고환독성물질인 chlorodecone (Keppone)과 1,2-di-bromo-3-chloropropane (DBCP)에 대해 사람과 랫트에서의 독성을 비교하여 유사한 결과를 보고하였다.

화학물질들이 고환에 독성을 야기하는 방법은 각각 다르며, 또한 특정 정세포에 친화성을 나타낸다^{4,29}. Cadmium과 zinc는 다른 정세포에 비해 성숙단계 후기의 정자세포에 특히 친화성을 가지며²¹, ethanedimethanesulfonate(EDS)는 Leydig 세포에 친화성을 가진다²⁸. 또한 많은 alkylsulfonates는 쉽게 정세포에 도달하며, stage 특이성이 있는 변성을 일으킨다¹³. 즉, 고환의 spermatogenesis에서 여러단계의 세포들은 독성물질에 대한 감수성이 매우 다르다. 따라서 spermatogenesis에 기초한 병리조직학적 검사를 통해 환경유해물질의 고환에 대한 독성 유발 양상을 구명할 수 있으며, 정자형성에 미치는 영향을 구명함으로써 고환독성의 상세한 평가를 할 수 있다. 또한 독성물질에 대해 감수성있는 세포는 시험물질 투여 후 이차적인 변화가 나타나기 전에 가장 빠른 시간내에 검사하여야 찾을 수 있다³⁰.

2-bromopropane(2-BP)은 1995년 한 전자부품공장에서 집단 중독사고를 일으켰던 물질로서 인체의 생식기와 조혈계에 심각한 장해를 유발하는 것으로 나타났다¹⁷. 최근의 연구에서 2-BP는 SD 랫트를 이용한 28일 복강내 반복투여시험¹²과 Wistar 랫트를 이용한 흡입독성시험⁴⁵의 결과 고환과 조혈기에 영향이 있다고 하였고, 암컷 SD 랫트를 이용한 14일 복강내 반복투여 시험에서는 용량과 상관성있게 발정주기가 지연되었다고 하였다²³. 이 이외에 2-BP의 독성에 대한 자료는 복강투여에 의한 반수치사량(LD₅₀)³⁷, 흡입에 의한 반수치사농도(LC₅₀)¹⁶이 알려져 있을 뿐 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 고환에 대한 독성이 어느정도 알려진 2-BP를 고용량으로 단기간 투여한 후 정자형성단계에 미치는 영향 및 표적정세포의 형태학적 변화 등에 대한 정확한 평가를 하고자 광학현미경적 관찰 및 전자현미경적 관찰을 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물

한국화학연구소, 스크리닝-안전성연구센터, 실험동물실의 차폐시설에서 생산된 Sprague-Dawley 랫트 수컷을 4-5주령에 입수하여 준차폐시설에서 5주

간의 순화기간을 거친 후 시험에 사용하였다.

사육환경, 사료 및 음수

공시동물의 사육환경은 철망사육상자(410mm×220mm×200mm)에 2-3마리씩 배치하여 온도; 23±1°C, 상대습도; 55±5%, 환기회수; 시간당 13-18회, 조도; 150~300Lux에서 12시간 조명하는 조건을 유지하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료주식회사)를 자유섭취하게 하였으며, 음수는 수도물을 자유섭취하게 하였다.

시험물질 및 투여방법

2-bromopropane[isopropyl bromide, (CH₃)₂CHBr; Aldrich Chemical Co., USA]을 corn oil(Sigma Chemical Co., USA)과 혼합하여 인체 노출경로 중 하나인 경구로 경구투여용 존데(sonde)를 사용하여 5g/10ml/kg/day로 3일간 강제투여하였으며, 대조군은 용매인 옥수수기름을 10ml/kg/day로 강제경구투여하였다. 주 1회 측정된 체중을 기초로 하여 투여량을 산정하였으며, 매일 아침 조제하여 투여하였다. 투여 후 1, 7일에 각각 5마리씩 부검하였으며 각 부검일에 3마리를 대조군으로 두어 같이 부검하였다.

고환의 고정 및 병리조직학적 검사

랫트는 에테르로 전신 마취시킨 다음, 흉강을 열고 관류용 cannula를 좌심실에 삽입한 후 이 관을 통하여 먼저 0.85% 생리 식염수를 주입하여 혈관내 혈액을 관류 수세하였으며, 이어서 Karnovsky¹⁵(4% paraformaldehyde & 5% glutaraldehyde) 또는 10% 중성완충포르말린용액으로 45분간 관류고정하였다. 이렇게 고정된 한 쪽 고환 및 부고환을 채취하여 세절한 다음 동일한 고정액에 추가로 수 시간 침지 고정하였으며, 일부 고환은 Bouin용액에 고정하였다.

광학현미경적 관찰을 위해 고정된 고환은 일반적 인 파라핀 포매하거나 hydroxyethyl methacrylate(HEMA) 포매를 위해 두께가 1mm를 넘지 않도록 삭정하여 6.8% sucrose가 함유된 PBS(pH 7.4)로 4°C에서 하룻밤 동안 수세하였다. 100% acetone으로 4°C에서 1시간 동안 탈수하였으며, 처음에는 용액이 맑아질 때까지 계속 교환하였다. HEMA(Jung HistoResinTM Plus, Jung, Heidelberg, Germany)를 사용하여 포매한 후 조직을 1-1.5μm로 박절하고 37°C에서 2시간

가량 건조하여 4°C에서 보관하였다. 염색시 0.01% tripsin이 포함된 CaCl₂(pH 7.8)용액으로 37°C에서 5분 동안 처리한 후 H-E phloxine²⁵, PAS-hematoxylin, Toluidine Blue염색 등을 실시하였다.

전자현미경적 관찰을 위해 고정된 고환은 1mm³ 크기로 세절한 다음 PBS 또는 0.1M Cacodylate buffer로 수세한 후 1% OsO₄(0.1M Cacodylate buffer, pH 7.4)로 1시간 후고정 하였다. Alcohol과 propylene oxide로 탈수하고 Epon으로 포매하여 준초박절편을 제작하고 toluidine blue로 가온염색하여 관찰부위를 정한 다음 초박절편하여 0.5% uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 전자현미경(Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

결 과

육안적 및 광학현미경적 관찰

체중 kg당 5g을 1일에 1회, 3일간 투여한 후 1일째, 7일째에 부검하여 관찰한 결과 육안적으로 고환에서 특별한 소견은 관찰되지 않았다. 투여 후 1일째 고환의 광학현미경적 관찰에서는 일부 정상적인 정세포의 구성을 가진 정세관과 심한 정세포의 변성을 보인 정세관이 함께 관찰되었다. 성숙단계의 구분이 가능한 정세관중에 I~IX기의 정세관에서는 정모세포와 정자세포가 정상적인 구조를 보였으나 정조세포와 초기 정모세포는 소실되어 관찰되지 않았다. 심한 정세포의 변성을 보인 정세관에서는 정자세포가 모두 변성되거나 탈락되어 성숙단계를 구분할 수 없었으며, Sertoli세포의 공포화와 정조세포, 정모세포 및 정자세포의 변성이 모두 관찰되었다. 변성된 정모세포는 핵이 짙은 염색성을 나타내거나 세포질에 공포를 내포하고 있었다. 정자세포의 핵내에는 원형으로 밝게 염색되는 부분이 관찰되었으며, 세포질은 호산성으로 짙게 염색되었다(Fig. 1,2). 투여 7일 후에는 정세포는 모두 탈락되어 공포가 다수 형성되어 있었고 기저막에 Sertoli세포만 관찰되었다. 또한 정세관의 내강에는 변성된 정자세포들이 모여 형성된 다핵거대세포들이 다수 관찰되었다(Fig. 3). Sertoli세포의 세포질에서는 커다란 공포가 다수 관찰되었다. 간질에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

전자현미경적 관찰

정세관의 기저막은 매우 불규칙한 형태를 보였으며, Sertoli 세포, 정조세포, 정모세포와 정자세포 모

두에서 변성이 관찰되었다. Sertoli 세포는 핵의 변연부가 함몰되어 모양이 매우 불규칙한 형태를 보였으며, 세포질에는 많은 공포가 나타났다. 변성된 정조세포와 정모세포의 핵은 염색질이 여러조각으로 분리되어 매우 불규칙한 형태로 나타났으며, 세포질은 다수의 공포가 형성되어 있었다(Fig. 4). 정자세포의 핵에서는 핵의 중앙부분이 투명하거나 핵주위에 투명대가 관찰되었다(Fig. 5). 간질에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

고 찰

사람이나 실험동물에서 고환의 독성을 검사하는 방법은 고환, 부고환, 부속생식선의 형태적, 기능적, 병리조직학적 검사 및 정액, 호르몬치, 수태능력의 검사등 여러 가지가 있다^{38,41,46}. 이전의 독성시험지침서에서는 수컷의 생식기능을 검사하는 방법중 수태능력을 가장 중요하게 간주하였으나 일부 연구에서 수태능력시험이 생식기능의 이상을 검사하는데 상대적으로 정확한 검사법이 아니라고 하였다³⁴. 또한 일본의 연구자들이 잘 알려진 14개의 고환독성물질에 대해 연구하였는데 수태능력의 검사보다 병리조직학적 검사가 더 민감하고 신뢰할 만한 결과를 준다고 하였다⁴⁰. Linder등²⁴과 Ulbrich등⁴³도 유사한 결과를 보고하였다. 따라서 최근의 생식독성에 관한 지침서에는 생식의 이상을 초기에 민감하게 알아낼 수 있는 방법으로 병리조직학적 검사의 중요성을 강조하고 있다⁵. 고환의 병리조직학적 검사에 의한 독성평가는 질적인 평가(qualitative evaluation)^{27,11,22,27}와 양적인 평가(quantitative evaluation)^{6,26,44}로 분류할 수 있다. 질적인 평가는 간질의 검사(Leydig세포의 형태, 크기의 이상, 혈관의 이상, 간질액의 증감, 정세관내로 간질세포의 침윤), 정세관 기저막의 이상(함몰이나 위축), 변성된 정세관의 검사, 다핵핵 거대세포의 존재, Sertoli세포의 이상, 정자방출의 지연, 특정 정세포의 소실, 정세포에 의한 이상 또는 정세포 발달의 이상, 정세관 내강의 소실, Sertoli세포내의 지방함량 증가³³, Sertoli 세포에 의한 barrier이상 등을 관찰함으로써 고환의 독성을 평가하는 것이다. 양적인 평가는 고환의 무게, 수태능력의 검사⁴⁶, 정세관 직경 측정, 정자생산량 측정, 정세관 구성세포의 비율검사³¹, 형태학적인 방법으로 세포수 측정⁸, 변성된 정세관의 비율측정 등에 의한 방법으로 고환의 독성을 평가하는 것이다³². Takahashi등³⁹은 고

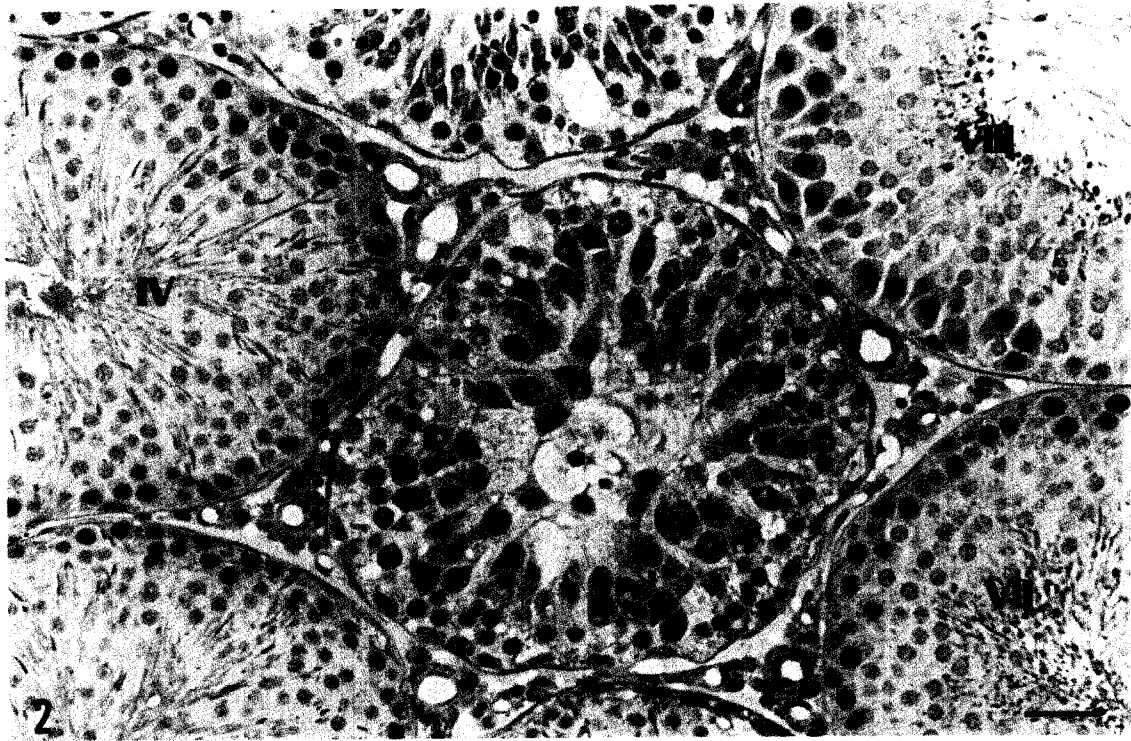
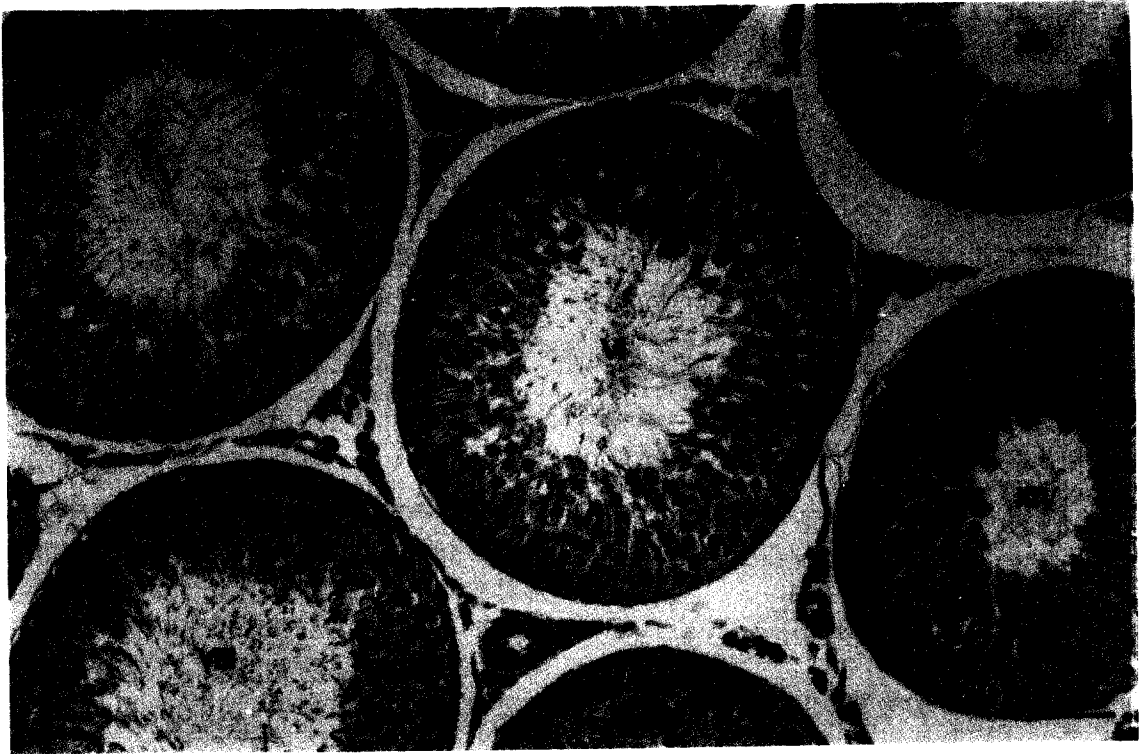


Fig. 1. Normal seminiferous tubules in various stages. H-E stain. Bar= $20\mu\text{m}$

Fig. 2. Seminiferous tubules in various stages showing depletion of spermatogonia and early spermatocytes or severe exfoliation and degeneration of germ cells, and cytoplasmic vacuolation of Sertoli cells. 1 day after treatment of 5g/kg of 2-bromopropane for 3 consecutive days orally. H-E. Bar= $20\mu\text{m}$.

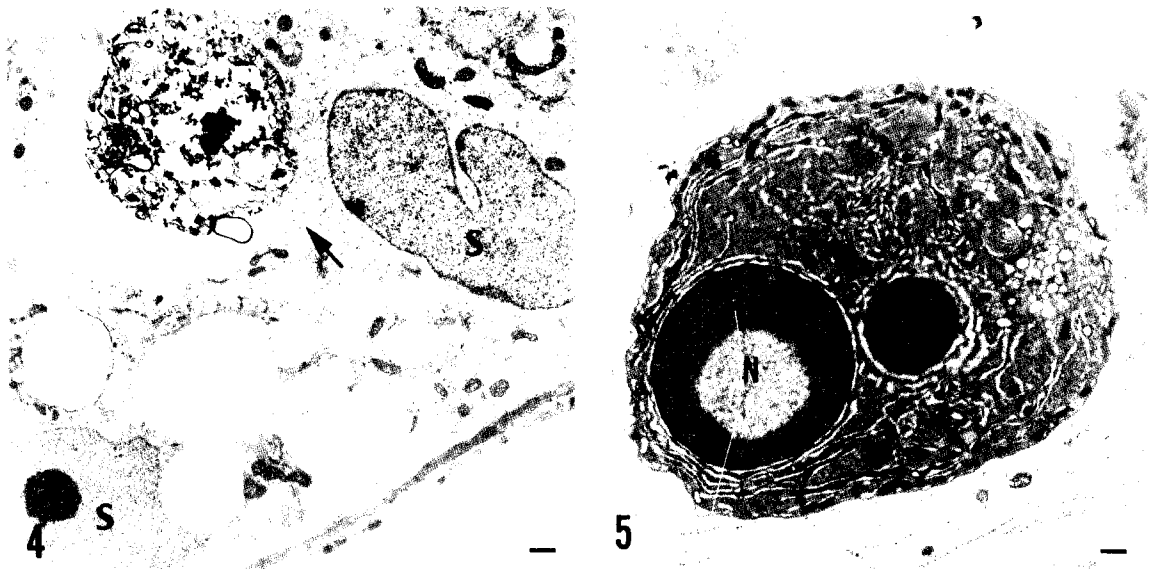
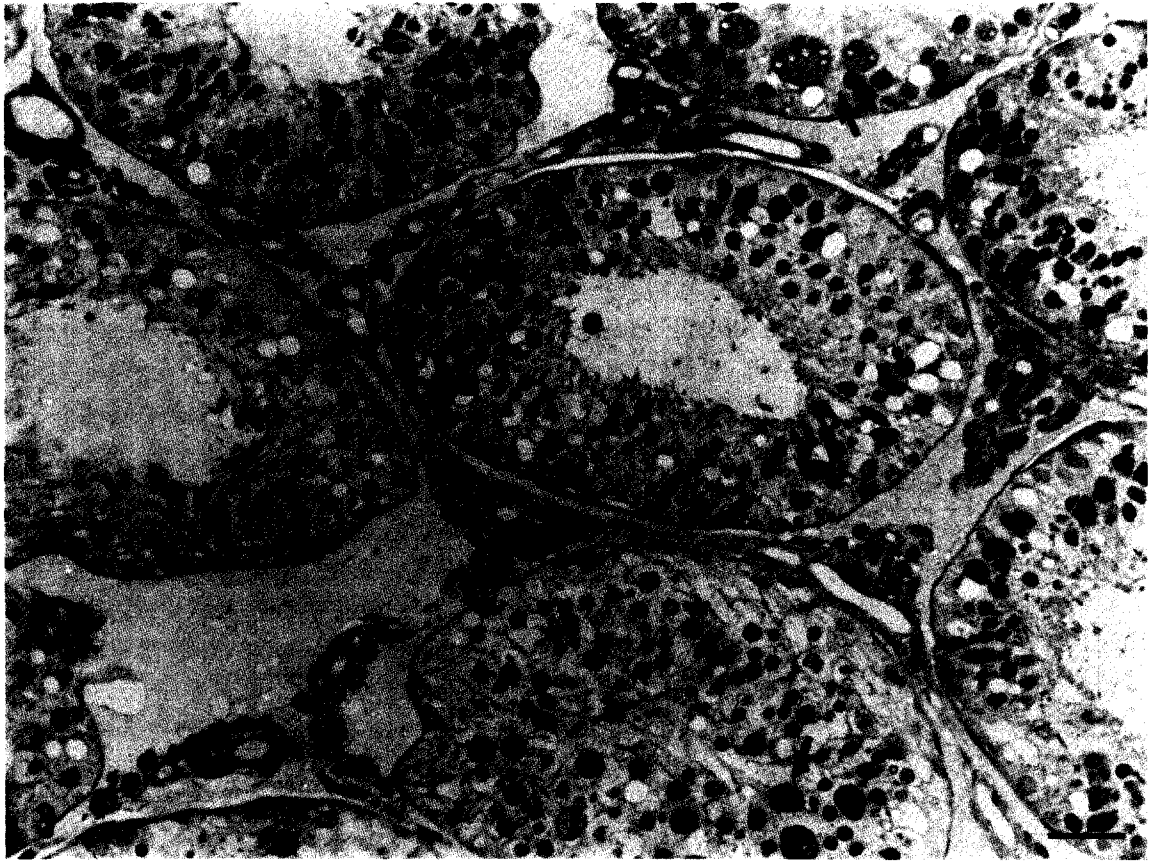
환의 일반적인 독성평가에서 spermatogenic stage를 크게 stage I~VI, VII~VIII, IX~XI, XII~XIV 네 가지로 분류하여 사용할 것을 제안하였다. 이 방법은 H-E염색에서도 stage의 개략적인 구분이 가능한 장점이 있다. 그러나 Matsui등²⁶은 고환독성의 평가 시험에서 일반적인 독성을 평가하는 데는 매우 유용한 방법이나 cyclophosphamide를 이용한 독성 시험에서 이 방법을 이용하여 정확한 표적세포를 찾기가 어렵다고 하였다. 따라서 고환의 독성을 정확하게 평가하기 위해서는 질적인 평가와 양적인 평가를 종합적으로 실시한 관찰이 필요하다.

고환의 정세관 상피세포에 장애를 일으키는 물질은 이들 물질이 야기하는 형태학적 변화에 따라 대략 다섯가지의 기전으로 그 독성을 나타낸다. 첫째, 정세관상피세포에 직접 영향을 미치는 물질로 정조세포에서의 단백질합성을 억제하거나 Sertoli세포에 장애를 유발하여 독성을 야기한다. Cyclophosphamide, procarbazine, adriamycin등과 같은 alkylating agent는 핵산의 합성을 억제함으로써 유사분열을 방해하여 정조세포나 정자세포의 괴사를 야기하며, nitrobenzene, 1,3-dinitrobenzene, phthalate esters, 2,5-hexanedione등은 Sertoli세포에 영향을 주어 정세관상피세포의 장애를 초래한다. 둘째, 호르몬에 이상을 야기하여 간접적으로 spermatogenesis에 영향을 야기하는 것으로 4가지 기전에 의해 작용한다. (1) 표적세포에서 androgen의 생산과는 상관없이 그 작용을 억제하는 antiandrogen으로서 작용하는 cyproterone acetate가 해당한다. (2) Leydig세포에서 steroid합성이나 대사작용에 이상을 야기하여 testosterone의 합성을 억제하는 물질로서 ethane -1,2-dimethanesulfonate, spiroolactone, aminoglutethimid 등이 속한다. (3) gonadotropin의 분비를 억제함으로써 작용하는 물질로 시상하부나, 뇌하수체로부터 호르몬의 방출을 억제하며, estrogen, androgen, progestogen과 같은 물질이 이에 해당한다. (4) prolactin의 생성을 자극하는 물질로서 reserpine, haloperidol, sulpyrife등이 이에 속한다. 이들은 dopamine의 작용을 차단하여 hyperprolactinemia를 일으켜 혈중 testosterone치를 감소시키며, 고환의 위축을 야기한다. 셋째, 직접 또는 간접적으로 정자에 영향을 주는 물질로 정자의 수정능력 소실이나 사멸을 일으킨다. Chlorhydrin은 수출관내에서 정자의 ATP치를 감소시킴으로서 수정을 하지 못하게 하며, methyl chloride는 부고환 상피세포에 급성염

증을 야기하여 정자의 이상을 야기한다. 넷째, 순환 장애를 일으켜 고환의 독성을 야기하는 것으로 고환실질의 광범위한 괴사를 일으킨다. 다섯째, 기타 비타민 A 또는 아연결핍과 같은 영양부족에 의해서도 고환의 장애가 일어난다^{39,47}.

본 시험에서는 Sertoli 세포, Leydig 세포, 정세포의 미세구조변화를 관찰한 결과, Sertoli세포에서는 핵의 모양이 매우 불규칙하게 나타났으며, 세포질내에서 공포가 다수 관찰되었다. 또한 정모세포의 변성 및 정자세포에서는 핵의 중앙부가 투명하게 관찰되었고 multinucleated giant cell도 나타났다. Sertoli세포가 표적세포인 경우에 Sertoli 세포의 변화는 세포질의 공포화, 핵의 공포화로 나타나고, 결국 불특정한 정세포가 변성되는 다른 연구결과와 일치하였다⁷. 또한, 정조세포, 정모세포, 정자세포들이 변성되어 정세관내로 박리되고, 정자세포들이 모여 multinucleated giant cell을 형성하게 되며, 부고환에서도 이들 세포를 관찰할 수 있었다. 이러한 소견들은 고용량의 2-BP는 1차적으로 Sertoli세포의 변성에 의한 2차적인 정세포의 변성괴사가 수반된 것을 강력하게 시사해주고 있다. 또한 시험의 초기에 stage I~IX의 정세관에서는 정세포의 부분적인 소실만 관찰되었으며, 반면 stage X~XIV의 정세관에서 광범위한 정세포의 탈락이 관찰되었다. 이는 Allard등¹이 colchicine을 투여에 의한 Sertoli세포의 구조에 관한 연구에서 stage IX~XIV의 Sertoli세포가 가장 민감하여 정세포의 소실이 현저하게 일어났다고 한 결과와 상응하는 결과였다. Allard 등에 의하면 이는 vimentin filament의 손상때문이라고 하였으나 본 시험에는 이에 대한 연구가 수행되지는 않았으나 같은 원인에 의한 결과로 사료되며, 이에 대한 추후 연구가 필요하다고 사료된다.

할로젠화합물들은 촉매, 유기용매, 탈지화합물, 농약등으로 많이 사용되고 있으며, 이들 물질은 변이원성과 발암성이 있고 신장, 고환 및 간장에 급성 독성을 야기하는 것으로 알려져 있다^{10,18,19}. 이들 물질은 할로젠 치환기의 수, 위치 및 형태등이 독성 유발에 가장 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 세개의 할로젠을 가지고 두 개 이상의 브롬을 가진 경우 독성이 강하게 나타낸다¹⁹. 할로젠화합물 중 가장 많이 사용되고 또한 독성이 문제가 되었던 것은 1955년부터 생산되어 토양살충제로 널리 사용된 DBCP인데 이것은 간장, 신장, 조혈계, 정소, 난소에 독성을 나타낸다고 오래 전부터 보고되었으



- Fig. 3.** Seminiferous tubules showing severe degeneration and exfoliation of germ cells, and cytoplasmic vacuolation of Sertoli cells. Arrows; exfoliated multinucleated giant cells. 7 days after treatment of 5g/kg of 2-bromopropane for 3 consecutive days orally. H-E. Bar=20 μ m.
- Fig. 4.** Electron micrograph of degenerating spermatocytes(\uparrow) and Sertoli cell(S). spermatocyte showing extensive heterochromatin and Sertoli cells showing irregular shape of nucleus and cytoplasmic vacuolation. 1 day after treatment of 5g/kg of 2-bromopropane for 3 consecutive days orally. Bar=2 μ m.
- Fig. 5.** Electron micrograph showing a multinucleated giant cell formed by degenerating spermatid. 7 day after treatment of 5g/kg of 2-bromopropane for 3 consecutive days orally. Bar=2 μ m.

며, 최근 까지 많이 연구되고 있다^{10,14,19,36,42}.

2-BP는 브롬이 프로판의 두 번째 탄소에 결합한 형태(CH₃CHBrCH₃)의 휘발성이 강한 물질로서³ 인체의 생식기와 조혈계에 심각한 장애를 유발하는 것으로 알려져 있으며¹⁷, 최근의 연구에서 2-BP는 SD 랫트를 이용한 28일 복강내 반복투여시험¹²과 Wistar 랫트를 이용한 흡입독성시험⁴⁵에서 고환과 조혈기에 영향이 있다고 한 바 있다. 본 시험에서도 고용량을 단기간 투여하여 고환에 독성이 유발되어 2-BP가 용량, 투여기간, 투여방법 등에 다소 차이가 있으나 모두 고환에 독성을 야기함을 확인하였다.

Shemi 등³⁵은 SD 랫트에서 DBCP를 50mg/kg의 용량으로 피하투여하여 6일 후 고환의 병변을 관찰하였다. 광학현미경적으로 정세포들이 정세관 내강으로 탈락되었고 정자세포가 가장 영향을 많이 받았고 Sertoli세포에는 변화가 없었다고 하여 본 시험 결과와 차이를 보였으나 간질세포에는 거의 영향이 없었다고 하여 본 시험 결과와 부분적으로나마 일치 보여 2-BP가 간질세포에는 영향이 없음을 뒷받침해 주고 있다. DBCP와 2-BP의 Sertoli세포와 정세포에 대한 독성발현양상의 차이는 구조가 유사한 시험물질이라도 투여용량이나 시험기간, 투여경로 등의 요인에 의해 나타날 수 있다고 사료된다. 2-BP의 용량에 따른 독성발현양상의 차이에 대해서는 약물의 대사나 호르몬, 전신적인 이상에 의한 이차적인 변화 등을 고려한 연구가 더 필요하다.

결론적으로 조직병리학적 결과를 바탕으로하여 2-BP의 고용량 투여는 일차적으로 Sertoli세포의 변성을 유발하고 2차적으로 정세포에 변성을 광범위하게 일으켜 고환의 생식기능에 장애를 가져온다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Allard EK, Johnson KJ, et al. Colchicine disrupts the cytoskeleton of rat testis seminiferous epithelium in a stage-dependent manner. *Biol Reprod* **48**(1):143-153, 1993.
- Blackburn DM, Gray AJ, et al. A comparison of the effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testis in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **92**:54-64, 1988.
- Buckingham J, and Macdonald F ed., *Dictionary of organic compounds*. 6th ed., Chapman and Hall, University Press, Cambridge, pp. 1098-1099, 1996.
- Clegg JA. Male reproductive toxicity testing. *Adverse Drug React Toxicol Rev* **13**(4):235-47, 1994.
- Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: The appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol* **25**:119-131, 1997.
- Creasy DM, Flynn JC, et al. A quantitative study of stage-specific spermatocyte damage following administration of ethylene glycol monomethyl ether in the rat. *Exp Mol Pathol* **43**:321-336, 1985.
- Creasy DM, Foster JR, et al. The morphological development of Di-phenyl phthalate induced testicular atrophy in the rat. *J Pathol* **139**:309-321, 1983.
- Elias H, and Hyde DM. An elementary introduction to stereology(quantitative microscopy). *Am J Anat* **159**:412-446, 1980.
- Foster PMD. Testicular organization and biochemical function. In: *Physiology and Toxicology of Male Reproduction*, ed. Lamb JC IV, and Foster PMD, Academic Press, London. pp. 7-34, 1988.
- Heindel JJ, Berkowitz AS, et al. Assessment in rats of the gonadotoxic and hepatorenal toxic potential of dibromochloropropane(DBCP) in drinking water. *Fundamental and Appl Toxicol* **13**:804-815, 1989.
- Hew KW, Ericson WA, et al. A single low cadmium dose cause failure of spermiation in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **121**:15-21, 1993.
- Ichihara G, Asaeda N, et al. Reproductive and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane. *SOT Annual Meeting*, p357, 1815, 1997.
- Jackson H, Fox B.W, et al. Antifertility substances and their assessment in the male rodent. *J Reprod Fert* **2**:447-465, 1961.
- Kaplanski J, Shemi D, et al. The effect of 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP) on general toxicity and gonadotoxicity in rats.

- Andrologia 23(5):363-366, 1991.
- 15 Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137, 1965.
 - 16 Kim HY, Chung HY, et al. LC₅₀ of 2-bromopropane. *Ind Health* 34:403-407, 1996.
 - 17 Kim Y, Jung K, et al. Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane. *Scand J Work Environ Health* 22(5):387-391, 1996.
 - 18 Kluwe WM. Acute Toxicity of 1,2 - Dibromo-3-chloropropane in the F344 male Rat. I. Dose-response relationships and differences in routes of exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 59:71-83, 1981.
 - 19 Lag M, Söderlund EJ, et al. Effect of bromine and chlorine poisoning in the induction of renal and testicular toxicity by halogenated propanes. *Chem Res Toxicol* 4:528-534, 1991.
 - 20 Leblond CP, and Clermont Y. Spermatogenesis of rat, mouse, hamster, and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulphurous acid' technique. *Am J Anat* 90:167-206, 1952.
 - 21 Lee IP and Dixon RL. Effects of cadmium on spermatogenesis is studied by velocity sedimentation cell separation and serial mating. *J Pharmacol Exp Ther* 187:641-652, 1973.
 - 22 Lee KP, Frame SR, et al. Testicular degeneration and spermatid retention in young rats. *Toxicol Pathol* 21(3):292-302, 1993.
 - 23 Lim CH, Maeng SH, et al. Effect of 2-bromopropane(2-BP) on female reproductive function in Sprague-Dawley rats. SOT Annual Meeting, p357, 1816, 1997.
 - 24 Linder RE, Strader LF, et al. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to 14 reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 6:491-505, 1992.
 - 25 Marlene D, and Castro BA. A hematoxylin-eosin phloxine stain for tissues embedded in glycol methacrylate. *J Histotech* 8(1):23-24, 1985.
 - 26 Matsui H, Mitsumori K, et al. Morphological evaluation of cyclophosphamide testicular toxicity in rats using quantitative morphometry of spermatogenic cycle stages. *J Toxcol Sci* 20:407-414, 1995.
 - 27 Mebus CA, Welsch F, et al. Attenuation of 2-methoxyethanol-induced testicular toxicity in the rat by simple physiological compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 99:110-121, 1989.
 - 28 Naka Y, Inui T, et al. Rapid recovery of Leydig cell population in rat cryptorchid testes after ethanedimethanesulfonate injury: Immunohistochemical studies. *Acta Histochem Cytochem* 24(2):257-265, 1991.
 - 29 Okumura K, Lee IP, et al. Permeability of selected drugs and chemicals across the blood-testis barrier of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 194:89-95, 1975.
 - 30 Parvinen LM, Lähdetie J, et al. Disease, metabolism, and reproduction in the toxic response to drugs and other chemicals. *Ach Toxicol(suppl.)* 7:128-139, 1987.
 - 31 Russell LD, and Clermont Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone-treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 187:347-366, 1977.
 - 32 Russell LD, Etllin RA, et al. Eds. Histological and histopathological evaluation of the testis. pp. 210-264. Cache River Press. Florida, 1990.
 - 33 Russell LD, and Russell JA. Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Am J Anat* 192:142-168, 1991.
 - 34 Schwetz BA, Rao KS, et al. Insensitivity of tests for reproductive problems. *J Environ Pathol Toxicol* 3:81-98, 1980.
 - 35 Shemi D, Waksman J, et al. Ultrastructure of testicular cells in rats treated with dibromochloropropane(DBCP). *Andrologia* 21(3):229-236, 1989.
 - 36 Sod-Moriah UA, Shemi D, et al. Age-dependent differences in the effects of 1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP) on

- fertility, sperm count, testicular histology and hormonal profile in rats. *Andrologia* 22:455-462, 1989.
- 37 Sweet DV ed. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances(RTECS), TX4111000, National Institute for Occupational Safety and Health(NIOSH), Government Printing Office, Washiton DC, USA, 1995.
- 38 Szczech GM, and Russell LD. Commentary on application of refined morphologic evaluation of the testis to the practice of toxicologic pathology. *Toxicol Pathol* 25(2):230-237, 1997.
- 39 Takahashi M, and Matsui H. Mechanisms of testicular toxicity. *J Toxicol Pathol* 6:161-174, 1993.
- 40 Takayama S, Akaike M, et al. A collaborative study in japan on optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorders induced by drugs in rats. *J Am Coll Toxicol* 14:266-292, 1995.
- 41 Thomas JA. Toxic responses of the reproductive system. In: Casarrett and Doull's Toxicology, ed. Amdur MO, Doull J, and Klaasen CD, 4th ed. pp. 484-520, Pergamon Press, New York, 1991.
- 42 Torkelson TR, Sadek SE, et al. Toxicological investigations of 1,2-dibromo-3-chloropropane. *Toxicol Appl Pharmacol* 3:545-559, 1961.
- 43 Ulbrich B, and Palmer AK. Detection of effects on male reproduction-A literature survey. *J Am Coll Toxicol* 14:2293-3327, 1995.
- 44 Wing TY, and Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 165:13-25, 1982.
- 45 Yu IJ, Chung YH, et al. Reproductive toxicity of 2-bromopropane. SOT Annual Meeting, pp. 358, No.1817, 1997.
- 46 Zeinick H, and Clegg ED. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: Principles and Methods of Toxicology. ed. Hayes AW, 2nd ed., pp. 275-309, Raven Press, New York, 1989.
- 47 Zschauer A, and Hodel C. Drug-induced histological changes in rat seminiferous tubular epithelium. *Ach Toxicol Pathol(suppl)* 4:466-470, 1980.