

Sprague-Dawley 랫트에 자연발생한 고환위축의 병리조직학적 관찰

손화영, 김용범, 하창수, 강부현
한국화학연구소, 스크리닝-안전성연구센터

Histopathological observation of spontaneous testicular atrophy in Sprague-Dawley rat

Hwa-Young Son, Yong-Bum Kim, Chang-Su Ha, Boo-Hyon Kang

Screening & Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology

Abstract. The incidence of spontaneous testicular atrophy and its morphological changes during stage-specific spermatogenesis were investigated in male Sprague-Dawley rats at 10, 19, and 32 weeks of age. The incidence of testicular atrophy was 0.2%(2/90), 7.9%(9/114), and 10%(4/40) in 4, 13 and 26 weeks respectively. The epididymis with testicular atrophy had low sperm density. In the minimally affected testes, scattered tubules showed complete depletion of germ cells without stage specificity. Testes with moderate to severe testicular atrophy showed seminiferous tubules lined with dense Sertoli cell population. While Leydig cells in the interstitium appeared hypertrophy, they were immunohistochemically negative for proliferating cell nuclear antigen, a marker of cell proliferation.

Key words: spermatogenesis, spontaneous, Sprague-Dawley rats, testicular atrophy

서 론

생식기에 대한 독성을 검사하기 위해서는 실험동물을 이용하는데 그중 랫트는 약리학적, 내분비학적 연구가 가장 많이 이루어진 동물로서 정상적인 생식기의 구조, 생리 및 생화학에 대한 자료가 풍부하기 때문에 일반적인 독성시험 뿐만 아니라 생식독성 시험에도 많이 사용되고 있다.¹ 고환의 위축은 노령의 랫트에서 가장 흔히 나타나는 비종양성 질환이다.²⁻⁵ 랫트의 정세관 상피는 정조세포, 정모세포, 정자세포로 구성되어 있으며, 일련의 생화학 및 형태학적 변화과정을 거쳐 정조세포로부터 정자를 형성한다. 이와 같은 정자형성단계는 정세관을 종축으로 잘랐을 때 정세관을 구성하는 정세포의 종류에 따라 여러단계로 구분하는데 랫트에서

는 14단계로 구분하여 로마자로 I-XIV까지 표기한다.⁶ 이러한 정자형성 단계에 기초한 병리조직학적 검사를 통해 환경유해물질의 고환에 대한 독성을 정확하게 평가할 수 있다.⁷ 정자형성에 기초한 고환위축의 독성평가에 관한 보고가 여러 연구자들에 의해 이루어 졌다.⁸⁻¹⁰ 그러나 많은 독성시험에서의 이용에도 불구하고 랫트에서 자연발생적인 고환위축에 대한 보고는 많지 않다.⁴

따라서 본 연구의 목적은 국내에서 독성시험에 가장 많이 사용되는 SD랫트에 자연발생한 고환위축을 spermatogenesis에 기초하여 관찰함으로써 시험물질에 의한 표적세포 및 정자형성단계에 미치는 영향 등과 비교할 수 있는 기초자료로서 고환의 독성평가에 도움이 되게 하고자 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물

한국화학연구소 스크리닝-안전성연구센터 실험동물실의 차폐시설에서 생산되어 독성시험에 이용된 Sprague-Dawley 랫트 수컷 중 시험물질을 처치하지 않은 동물에서 고환의 위축을 나타낸 동물의 고환을 시험에 사용하였다. 공시동물은 철망사육상자(410mm×220mm×200mm)에 2-3마리씩 배치하여 온도는 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $55\pm 5\%$, 환기회수는 시간당 13-18회, 조도는 150~300Lux에서 12시간 조명하는 조건에서 사육되었다. 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료주식회사)를 방사선 멸균(2.0M rad)하여 자유섭취하게 하였으며, 음수는 수도물을 cartridge wind-filter(호원상사)로 여과한 후 자외선유수멸균기(Dynamics, M600, USA)를 통하여 멸균하여 자유섭취하게 하였다.

조직처리

랫트를 에테르로 전신 마취시켜 방혈한 후 고환과 부고환을 채취하여 Bouin용액에 침지고정하였다. 고정된 고환은 파라핀 포매한 후 H-E 또는 PAS염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 면역조직화학적 관찰로서 PCNA(BioGenex, USA)에 대한 단클론 항체를 이용하여 avidin-biotin system(ABC Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 염색과정은 xylene으로 탈파라핀한 조직을 0.3% hydrogen peroxide로 30분간 처리하여 내인성 peroxidase의 활성을 제거하였다. 정상면양혈청으로 20분간 처리하여 비특이 반응을 제거한 후 PCNA(마우스 IgG_{2a}) 항체로 60분간 처리하였다. Biotinylated anti-mouse IgG를 60분 처리한 후 avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex로 60분 처리하였다. 발색은 DAB kit(Vector Co.)로 10분간 실시하였다. 각각의 염색과정 중 수세는 0.05M tris buffered saline(pH 7.4)으로 실시하였다.

환 위축의 발생율은 1개월 독성시험군에서 90마리 중 2마리(0.2%), 13개월 독성시험군에서 114마리 중 9마리(3%), 26개월 독성시험군에서 40마리 중 4마리(4.0%)로 각각 다르게 나타났다.

Table 1. Incidence of testicular degeneration in control rats used in subacute toxicity studies.

Age	Number of rats	Testicular atrophy(%)
4weeks	90	2 (0.2)
13weeks	114	9 (7.9)
26weeks	40	4 (10)

고환은 육안적으로 심한 경우에는 정상 크기의 1/2-1/3 수준으로 작아져 있었으며, 고환내에는 약간 투명한 수양성의 물질이 들어있는 것처럼 관찰되거나 정상과 유사한 경도, 색깔을 가지고 있는 경우도 있었다. 피막은 쭈글쭈글하고 매우 유약하여 쉽게 함몰되었으며, 탄력이 소실되어 있었다.

광학현미경적 관찰에서 미약한 고환의 위축이 관찰된 경우에는 단면당 3-4개의 정세관에서 정세포가 관찰되지 않았으며, 정세포의 소실로 stage는 구분할 수 없었고 기저막에서 Sertoli 세포만 관찰되었다. 그러나 그 이외의 대부분의 정세관은 정상적인 소견을 보였다(Fig. 1). 중등도의 위축을 보인 고환의 경우에는 정세포가 없는 정세관의 수가 증가하여 단면당 5-20개 정도로 많이 나타났으며, 부고환에서는 변성된 정세포들이 드물게 관찰되었다. 심한 위축을 보인 고환에서는 거의 모든 정세관이 Sertoli세포 1~5층으로만 구성되어 있었으며, 정세포들이 거의 대부분 소실되어 관찰되지 않아 stage를 구분할 수는 없었다. Sertoli세포는 핵이 형태는 매우 불규칙하고, 기저막으로부터 떨어져 정세관 내강에 위치하고 있었다. 간질에서는 Leydig 세포수의 증가가 인정되었으나 간질세포의 형태학적 변화는 인정되지 않았으며(Fig. 2), PCNA를 이용한 면역조직화학적 염색에서도 양성반응세포가 관찰되지 않았다. 또한 부고환에서는 현저한 정자 감소 또는 정자의 완전한 소실이 인정되었다.

결 과

고 찰

고환위축의 발생율은 Table 1에 나타내었다. 고

포유류에서 정세포의 변성은 정자발생과정 중에

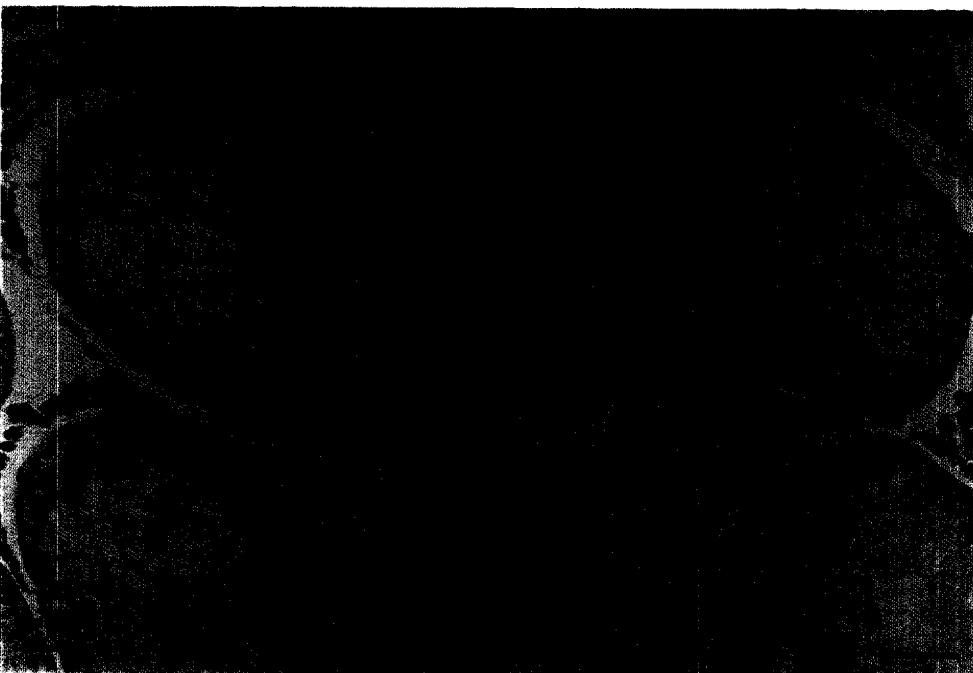
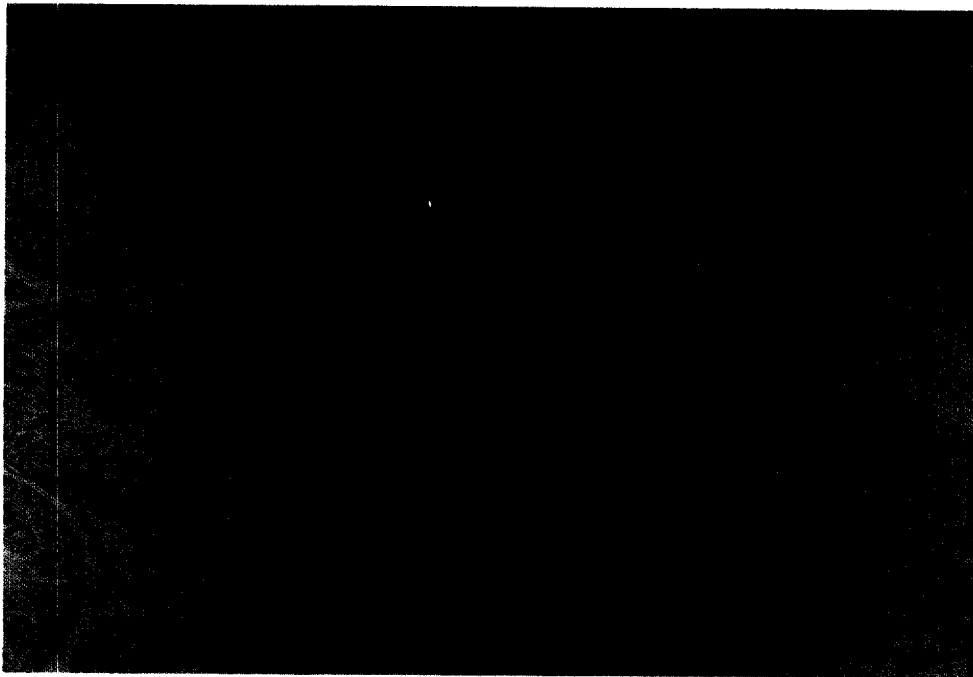


Fig. 1. Some seminiferous tubules show complete depletion of germ cells(*).
H-E. Bar=10 μ m.

Fig. 2. Seminiferous tubules show severe depletion of germ cells. Arrow;
Sertoli cells. H-E. Bar=20 μ m.

정상적으로도 발생하며,⁴ 환경적 요인, 즉, 열, 방사선, 허혈, 세포독성물질에 노출되었을 경우 발생한다.¹¹ 최근 들어 내분비교란물질(endocrine disruptors, xenoestrogen, or endocrine disrupting chemicals)에 의한 사람, 물고기 및 야생동물의 영향에 관한 관심이 고조되고 있다.¹² 이러한 물질 중에는 자연적으로 존재하는 스테로이드 호르몬(phyto-, myco-estrogens) 뿐만 아니라 합성물질(synthetic hormone, organotins, organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, dioxins, phenolic compounds, and phthalate esters) 등이 포함되어 있다.^{13,14} 이러한 물질들은 환경에 널리 퍼져 있으므로 인간은 이들 물질에 쉽게 노출되어 생리적으로 많은 악영향을 받고 있다.

화학물질의 독성은 특정 정세포뿐만 아니라 spermatogenesis에 기초한 stage에 따라 다르게 나타난다. 즉, 카드뮴은 stage VII의 정세관에 작용하여 독성을 일으키며,¹⁵ dichloroacetic acid는 stage IX에 작용하여 정자의 방출지연을 야기한다.¹⁶ Ethylene glycol monomethyl ether는 stage V, XI and XII의 정세관에서 정모세포의 변성을 야기하며,¹⁷ 고용량의 2-bromopropane은 stage IX-XIV의 정세관에서 정세포의 광범위한 변성을 유발하며, stage I-VIII에서는 정조 및 정모세포의 소실을 야기한다.¹⁰ 반면, ethanedimethanesulfonate(EDS)는 Leydig 세포에 작용하여 고환에 독성을 야기하며,¹⁸ di-(2-ethylhexyl) phthalate는 Sertoli 세포에 작용하여 독성을 일으킨다.¹⁹ 따라서 stage에 따른 정세관의 형태학적 변화를 관찰하는 것은 독성을 평가하는 데 매우 중요하다. 본 연구에서는 정세관의 위축이 stage 특이성을 보이지 않았다. 따라서 이러한 점이 약물에 의한 독성과 자연발생적인 고환의 위축과 감별할 수 있는 점이라고 사료된다.

Lee등⁴은 CrI:CD¹⁶ BR 랫트의 고환을 관찰한 결과 경구독성시험에 이용된 대조군의 랫트에서 2.5%(5/197), 흡입독성에 이용된 랫트에서 9.4%(31/327)의 정세포 변성을 보고한 바 있다. 이들은 정세포의 소실 이외에 정세포의 변성 및 탈락을 관찰하였으며, stage VII-VIII의 정자 방출지연등 다양한 소견을 관찰하였다. 또한 부고환에서도 탈락된 정세포들이 관찰되어 본 연구의 결과와 다소 차이를 보였다. 이러한 차이는 관찰한 동물수와 동물종, 환경에 따른 차이로 사료된다.

간질의 증식은 독성물질이 고환의 위축을 야기한 경우에 자주 관찰된 소견으로서 여러 연구자들에게 의해 보고된 바 있다.²⁰⁻²³ 손등²⁴은 2-bromopropane을 투여한 랫트에서 간질의 증식을 PCNA Ab를 이용한 면역조직화학 염색으로 확인하여 보고한 바 있다. 본 연구에서 간질세포의 증식소견이 심한 고환위축을 보인 동물에서 관찰되었는데 이는 정세관의 위축에 따라 상대적으로 간질세포들이 모여 수적으로 증가한 것처럼 보인 것으로 사료된다. 이를 면역조직화학적 염색법을 이용하여 검사한 결과 간질에서 음성반응을 보여 이를 확인할 수 있었다.

결론적으로 독성시험에 이용된 랫트에 자연발생한 고환의 발생율을 조사한 결과 4주 독성시험군 90마리중 2마리(0.2%), 13주 독성시험군 114마리중 9마리(3%), 26주 독성시험군에서 40마리중 4마리(4.0%)로 나타나 연령이 증가함에 따라 증가하는 추세를 나타내었으며, 이들 위축을 보인 고환의 주요한 병리조직학적 소견은 정세관에서 정세포의 소실과 부고환의 oligospermia 또는 aspermia였다.

참고 문헌

- 1 Clegg JA. Male reproductive toxicity testing. *Adverse. Drug React Toxicol Rev.* 13(4): 235-247. 1994.
- 2 Goodman DG, Ward JMI, et al. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 48:237-248. 1979.
- 3 Goodman DG, Ward JMI, et al. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging Osborne--Mendel rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 55:433-447. 1980.
- 4 Lee KP, Frame SRI, et al. Testicular degeneration and spermatid retention in young rats. *Toxicol Pathol.* 21(3):292-302. 1993.
- 5 Ward JM, Hamlin MH III, et al. Age-related neoplastic and degenerative lesions in aging male virgin and ex-breeder ACI/segHapBR rats. *J Gerontol* 38:538-548. 1983.
- 6 Clermont Y, Leblond CP. Renewal of spermatogonia in the rat. *Am J Ana.* 93:475-

502. 1953.
- 7 Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: The appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol.* **25**:119-131. 1997.
 - 8 Lee KP, Kennedy GL Jr. Testicular toxicity of rats exposed to hexafluoroacetone(HFA) for 90 days. *Toxicology.* **67**:249-265. 1991.
 - 9 Lee KP, Kennedy LA. The ultrastructure and reversibility of testicular atrophy by ethylene glycol monoethyl ether(EGME) in the rat. *Toxicol Pharmacol* **17**:759-773. 1989.
 - 10 Son HY, Cho SW, et al. Testicular lesion in the Sprague-Dawley rats treated with high dose of 2-bromopropane. *Kor J Vet Pathol* **1**(2):97-105. 1997.
 - 11 Allan DJ, Hormon BVI, et al. Cell death in spermatogenesis. In: *Perspectives on Mammalian Cell Death*. Potten CS, ed. New York, Oxford Univ. Press, pp. 229-257. 1987.
 - 12 Reiter LW, DeRosa CI, et al. The U.S. federal framework for research on endocrine disruptors and an analysis of research programs supported during fiscal year 1996. *Environ Health Perspect.* **106**(3):105-113. 1998.
 - 13 Harrison PT, Holmes PI, et al. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *Sci Total Environ.* **205**(2-3): 97-106. 1997.
 - 14 Turner KJ, and Sharpe RM. Environmental oestrogens--present understanding. *Rev Reprod.* **2**(2):69-73. 1997.
 - 15 Hew KW, Ericson WAI, et al. A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* **121**:15-21. 1993.
 - 16 Linder RE, Klinefelter GRI, et al. Spermatoxicity of dichloroacetic acid. *Reprod Toxicol.* **11**(5):681-688. 1997.
 - 17 Creasy DM, Flynn JCI, 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.
 - 18 Naka Y, Inui TI, 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.
 - 19 Dorstal LA, Chapin REI, et al. Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol Appl Pharmacol* **95**:104-121. 1988.
 - 20 Kerr JB, Rich KAI, et al. Alterations of the fine structure and androgen secretion of the interstitial cells in the experimentally cryptorchid rat testis. *Biol Reprod.* **20**:409-422. 1979.
 - 21 Lui EMK, Wysocki GP. Reproductive tract defects induced in adult male rats by postnatal 1,2-dibromo-3-chloropropane exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* **90**:299-314. 1987.
 - 22 Mendis-Handagama SMLC. Estimation error of Leydig cell numbers in atrophied rat testes due to the assumption of spherical nuclei. *J Microscopy.* **168**(1):25-32. 1992.
 - 23 Mitsumori K, Kodama YI, et al. Conformation study, using nitrobenzene, of the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity test protocol proposed by the organization for economic cooperation and development(OECD). *J Toxicol Sci.* **19**: 141-149. 1994.
 - 24 Son HY, Cho SW, et al. Testicular atrophy induced by 2-bromopropane in the Sprague-Dawley Rats. *Kor J Toxicol*, 1998.