

수컷랫드에 있어서 새로운 안트라사이클린계 항암제 DA-125의 생식독성 연구

김종춘 · 김갑호 · 신호철 · 정문구*
한국화학연구소 안전성연구센터

Male Reproductive Toxicity of DA-125, a New Anthracycline Anticancer Agent, in Rats

Jong-Choon Kim, Kap-Ho Kim, Ho-Chul Shin and Moon-Koo Chung*
Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P.O. Box 107, Yu-Sung, Daejeon 305-600, Korea
(Received March 2, 1998)
(Accepted May 26, 1998)

ABSTRACT : The toxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, on the male reproductive system was studied in Sprague-Dawley rats. Forty male rats were randomly assigned to four groups with ten rats in each group and given single intravenous doses of DA-125 at dose levels of 0, 12.5, 25, and 50 mg/kg body weight. On day 56 after treatment the animals were allowed to mate, and their male reproductive functions and organs were examined in detail. Copulated females were sacrificed on day 20 of gestation for examination of embryo-fetal development. One out of ten rats in the 50 mg/kg group died on day 12 after treatment. Clinical signs such as emaciation, sedation, anorexia, swelling, dark material around eye, alopecia, and diarrhea were observed in the 25 and/or 50 mg/kg groups. Reduction in the body weight gain, decrease in the absolute weights of testes, epididymis and seminal vesicles, and/or decrease in the number of testicular sperm heads were also found. Although histopathological changes such as atrophy of seminiferous tubules, loss or decrease of spermatogenic cells, exfoliation of spermatogenic cells, vacuolization of Sertoli cells, decrease of sperm, and/or increase of necrotic spermatogenic cells in epididymal ducts were observed, no adverse effects on the motility and morphology of epididymal sperm, copulation index, fertility index, and embryo-fetal development were detected in the 25 and 50 mg/kg groups. There were no evidences of male reproductive toxicity in the 12.5 mg/kg group. These results show that single intravenous doses of DA-125 produce significant dose-related testicular atrophy, histopathological changes, and oligozoospermia in rats and LD₁₀ for DA-125 appears to be 50 mg/kg body weight.

Key Word : DA-125, Anticancer agent, Male reproductive toxicity, Rats

I. 서 론

안트라사이클린계 항암제인 doxorubicin은 고형종양 및 혈액종양에 대해 우수한 항암효과를 나타내기 때문에 가장 널리 사용되고 있는 암화학요법제 중의 하나이며 상품명인 adriamycin으로 잘 알려져 있다(Blum과 Carter, 1974). Adriamycin은 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*로부터 추출된 것으로서(Di Marco 등, 1969), DNA에 결합하거나 주형(template)기능을 방해함으로써 항암력인 세포치사활성(cytocidal activity)을

나타내게 된다(Schmid와 Zbinden, 1979). 반면 이러한 특징적인 작용기전으로 인하여 변이원성(Benetic 등, 1977)과 발암성 및 최기형성(Thomson 등, 1978)을 나타내며, 생식세포에서는 염색체이상(chromosome aberration)을 유발한다고 한다(William과 Hsu, 1980). 또한 대부분의 안트라사이클린계 항암제와 마찬가지로 반복 투여시 약제내성과 심근증(cardiomyopathy) 유발 등의 축적성 심장독성 때문에 사용량이 제한되어 장기간 투여가 불가능하다(Lefark 등, 1973; Myers 등, 1977).

약제내성과 만성 심장독성을 개선하고 항암효과를 향상시키기 위해 epirubicin, esorubicin 및 idarubicin 등

*To whom correspondence should be addressed

의 새로운 안트라사이클린계 유도체들이 많이 개발되었으나 아직도 만족할 만한 수준에는 이르지 못하고 있는 실정이다(Calabresi와 Chabner, 1991).

DA-125는 현재 동아제약(주) 연구소에서 개발중에 있는 불소를 함유한 새로운 adriamycin 유도체로서 M1의 C14 위치에 β -alanine이 결합된 수용성 전구물질(prodrug)인데 기존의 adriamycin에 비하여 항암효과가 뛰어나고 수용성 및 안정성이 우수하며 만성 심장독성과 조혈기 독성 및 국소자극성 등의 부작용을 개선한 새로운 안트라사이클린계 항암제이다(김 등, 1993; 백 등, 1993; 안 등, 1993).

악성종양의 치료에 효과가 뛰어난 많은 암 화학요법제들은 투약시 강한 세포독성으로 인하여 세포분열이 왕성하게 일어나는 골수(bone marrow), 위장관(gastro-intestinal tract), 모낭(hair follicles) 및 점막(mucous membrane) 등의 여러 조직에 심각한 부작용을 초래하기도 한다. 생식기관의 손상 또한 흔히 관찰되는 것으로서 일시적 또는 영구적인 무정자증(azoospermia)을 유발하기도 하는데(Wyrobek 등, 1983), 이는 생명에 직결되는 절박한 문제가 아니어서 항암제가 유발하는 다른 부작용들에 비해 상대적으로 덜 중요시되어 온 것이 사실이다. 그러나 어떠한 물질도 생식기관을 표적으로 하는 물질 만큼 중의 번식에 영향을 미치는 것은 없으며, 특히 생식연령에 해당되는 사람들에서의 생식선과 그 기능의 손상은 매우 심각한 문제임에 틀림없다.

남성 생식기에 독성을 나타내는 항암제로서는 actinomycin D, adriamycin, bleomycin, daunomycin, mitomycin C 등이 있다. 그 중 안트라사이클린계 항암제인 adriamycin은 DNA 작용물질(DNA-intercalating agent)로서 여러 종의 실험동물에서 정소독성에 관한 연구결과가 보고되어 있는데, 마우스에서는 정조세포(spermatogonia)에 세포독성을 나타내고 줄기세포(stem cell)를 사멸시키며(Lu와 Meistrich, 1979), 또한 곡세정관의 위축(tubular atrophy)과 체세포(somatic cell) 및 생식세포(germinal cell)에 유전독성을 일으키고(Au와 Hsu, 1980; Hacker-Klom 등, 1986), 우성치사 돌연변이(dominant lethal mutation)를 야기한다고 한다(Meistrich 등, 1985). 랫드에서는 정소와 정낭선의 중량 감소와 정조세포의 소실에 따른 정자발생 상피세포(germinal epithelium)의 소실을 유발하며(Ward 등, 1988; Matsui 등, 1993), 정소내에 투여할 경우 세포분열 중기(metaphase) I과 II에서 1차 및 2차 정모세포(spermatocyte)들이 급속히 사멸한다고 한다(Parvinen과 Parvinen, 1978). 토끼에서는 정모세포에서 비주기

성 DNA합성(unscheduled DNA synthesis)을 야기하고 정조세포의 DNA합성을 억제하여 정자수의 감소를 유발하며(Schmid와 Zbinden, 1979), 비글견에서도 곡세정관의 변성과 전립선의 위축을 일으킨다고 한다(Gralla 등, 1979).

안트라사이클린계 유도체인 DA-125도 adriamycin과 마찬가지로 DNA에 작용하여 세포독성을 나타내기 때문에 독성학적인 면에서 유사한 발현양식을 나타내는데, 생식독성학적 측면에서도 랫드와 토끼에서 최기형성이 보고되었으며(Chung 등, 1995; 정 등, 1995), 랫드와 비글견에서는 정소독성을 유발하는 것이 확인된 바 있다(이 등, 1993; 정 등, 1994; 김 등, 1997).

본 연구에서는 새로운 안트라사이클린계 항암제인 DA-125를 수컷 랫드의 미정맥내로 1회 투여한 후 56일째에 무처치 암컷과 교배시켜 수태능력을 확인하고 병리조직학적 검사와 정자분석을 실시하여 수컷의 생식기관에 미치는 영향을 세부적으로 조사해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 시험에는 동아제약에서 합성한 DA-125(Lot No. DA-125-039, 순도 961 μ g/mg)를 사용하였다. DA-125의 구조식은 7-O-(2,6-dideoxy-2-fluoro- α -talopyranosyl)-adriamycinone-14- β -alaninate HCl이고, 분자량은 670이며 적색분말로서 주사시 1 mM lactic acid(in saline, pH 4.0)용액에 용해시켜 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

실험동물은 한국화학연구소 안전성연구부 실험동물 육종실(대전광역시 유성구 장동 100)로 부터 입수한 Sprague-Dawley 계통의 랫드(SPF)를 사용하였다. 5주령의 동물을 암수 각각 50마리씩 입수한 후 약 1주일간 순화사육을 실시하여 건강하다고 판단된 동물 40마리씩을 선발하여 사용하였다.

본 시험은 철망사육상자에 개체별로 수용하였으며 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간(오전 8시 ~ 오후 8시) 및 조도 200~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 시험기간중 사료는 실험동물용 고품사료[제일사료(주)]를 방사선조사(2.0 Mrad) 멸균하여, 그리고 물은 상수도수를 자외선 유수살균기로 소독시킨 후 자유섭취시켰다.

3. 투여용량의 설정과 시험군의 구성

DA-125의 랫드 급성독성시험(Ahn 등, 1993)에서 수컷동물의 반수치사량(LD₅₀)은 체중 kg당 61 mg 이라고 보고된 바 있는데, 이를 기초로 하여 투여 동물중 반수 이상이 생존하면서 생식기관에 독성을 나타낼 것으로 예상되는 50 mg/kg을 최고용량으로 하여 공비 2로서 25 및 12.5 mg/kg의 중용량 및 저용량군을 두었으며 그 외에 매체대조군을 두어 4개의 시험군으로 구성하였다. 투여일에 측정된 체중을 근거로 각 군당 10마리씩 체중이 고르게 분포되도록 난수표를 이용하여 무작위로 군분리를 하였다.

4. 시험물질의 조제 및 투여

시험물질은 각각의 용량으로 pH 4.0의 1 mM lactic acid 용액에 용해시켜서 사용하였다. 약물의 투여는 26 게이지의 주사기를 이용하여 체중 kg당 1 ml의 액량으로 미정맥에 주사하였으며, 대조군에는 용매를 같은 방법으로 투여하였다.

5. 일반증상관찰

시험기간중 매일 동물의 일반증상, 중독증상 및 사망유무에 대하여 관찰하였다.

6. 체중측정

각 군의 전 동물에 대하여 투여일에서 투여후 8주째 까지 주 1회씩 체중을 측정하였다.

7. 교배

투여후 56일째까지 생존한 각 군의 수컷동물에 대해 동일한 주령의 무처치 암컷동물과 1:1로 2주간 동거 교배시켰다. 교미유무는 익일 오전에 질전(vaginal plug)이나 질도말시 정자의 확인으로 판정하였고 그 날을 임신 0일로 산정하였으며, 임신유무의 최종판정은 제왕절개시 난소의 임신황체와 자궁의 착상흔에 따랐다. 이 결과를 근거로 교미율과 수태율을 산출하였다.

8. 제왕절개

교배가 성립된 각 군의 암컷동물을 임신 20일째에 제왕절개하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수

또는 사망태자(배자)수, 생존태자의 체중 및 외표이상 유무에 대해서 관찰하였다.

9. 부검

교미가 성립된 각 군의 수컷동물에 대하여 체중을 측정후 부검하여 정소, 정소상체, 정낭선, 전립선 등의 생식기관에 대하여 육안적인 관찰과 함께 장기중량을 측정하였으며, 부검시의 체중을 이용하여 상대장기 중량을 계산하였다.

10. 정자분석

정소의 정자두부수계산은 Meistrich(1989)의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 중량측정이 끝난 좌측정소의 백막을 제거하고 12 ml의 증류수가 들어있는 튜브에 넣은 다음 균질기(homogenizer)를 이용하여 1분 이상 충분히 균질화하였다. 이 균질액을 초음파기(ultrasonicator)를 이용하여 4~7°C에서 3분간 처리한 다음 한 방울을 취하여 혈구계산판(hemocytometer; Neubauer, Germany)에 고루게 퍼지도록 주입하였다. 정자가 계산판내에서 충분히 안정이 되도록 5분 이상 방치한 후에 광학현미경을 이용하여 200~400배율로 관찰하여 정소당 총 정자두부수를 계산하였다. 정자의 운동성을 측정하기 위해 좌측 정소상체 미부의 끝을 외과용 칼로 절개한 후 눌러서 흘러 나오는 유출액을 50mg의 bovine serum albumin(Fraction V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)이 함유된 5 ml의 Dulbecco's phosphate buffered saline(Gibco Lab. Co., Grand Island, NY, USA)에 넣은 다음 37°C 배양기에서 15분간 배양하였다. 이 정자배양액 한방울을 37°C로 유지된 슬라이드 글라스에 놓고 커버 글라스를 덮어서 현미경의 항온판(microwarm plate; MDF-10, Japan)에 놓은 다음 정자배양액이 안정되면 200~400배율로 검경하였다. 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 운동성의 유무를 관찰하였는데, 0.5초 동안에 조금이라도 움직이면 운동성 정자로 판정하였으며 운동성 지수는 운동성이 있는 정자수를 관찰된 총 정자수에 대한 백분율로 표시하였다. 정자의 형태학적 검사를 위해 좌측 정소상체 미부에서 얻은 정자배양액을 슬라이드 글라스 상에서 1% eosin Y와 2:1로 잘 혼합한 다음 커버 글라스를 덮어서 염색표본을 만들었다. 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 형태학적 이상유무를 관찰하였으며, 판정기준은 Wyrobek과 Bruce(1975) 그리고 Fukazawa와 Kotosai(1987)의 방법에 따랐다.

11. 병리조직학적 검사

Bouin's 용액에서 1일 동안 고정한 후 70% 알코올에 침적해 두었던 우측정소와 정소상체를 paraffin 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin 염색을 한 후 광학현미경으로 검정하였다.

12. 통계학적 분석

얻어진 시험자료에 대한 통계분석은 SAS 프로그램 (SAS institute Inc., Version 6.04, Cary, NC, USA)을 이용하였으며, 전체적으로 검정수준은 1% 혹은 5%에서 검사하였다. 체중, 장기중량, 정자수 등은 일원배치분산분석(ANOVA)과 Dunnett 다중비교검정을, 빈도수를 나타내는 황체수, 착상수, 사망태자(배자)수, 생존태자수, 생존태자의 외포이상 등은 Kruskal-Wallis(H) 검정과 Dunnett 다중비교검정을, 그리고 교미율과 수태율 등은 chi-square 검정법으로 각각 대조군과 유의차 검정을 실시하였다.

III. 결 과

1. 일반증상

투여후 56일 동안 일반증상을 관찰한 결과 50 mg/kg 투여군에서는 전 동물에서 쇠약(emaciation), 진정(sedation), 눈 주위 암적색 분비물, 식욕부진(anorexia), 흉배부의 광범위한 종창(swelling), 전신성의 탈모(alopecia) 및 암적색의 점액성 설사 등의 독성 증상이 나타났다. 특히 투여후 12일째에 폐사한 동물은 극도의 쇠약과 함께 호흡곤란 소견을 나타내었으며, 그 외의 동물들은 시간의 경과에 따라 점차 독성

증상이 감소하였다. 25 mg/kg 투여군의 동물들은 눈 주위 암적색 분비물과 탈모 등의 소견들이 관찰되었으나 그 정도가 다소 경미하였으며, 12.5 mg/kg 투여군 및 대조군에서는 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

2. 체중

Table 1에 나타낸 바와 같이 12.5 mg/kg 투여군의 동물들은 투여후 1주째부터 4주째까지의 체중이 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성(P<0.01 or P<0.05)있게 감소하였으나 그 이후에는 정상적인 체중변화를 나타내었으며 시험물질 투여일에서 부검시까지의 체중 증가량도 대조군과 유의차가 인정되지 않았다. 25 및 50 mg/kg 투여군에서는 투여후 1주째부터 부검시까지의 체중과 체중 증가량이 대조군에 비하여 각각 통계학적으로 유의성(P<0.01)있게 감소하였다.

3. 교배성적

투여후 56일째에 각 군의 수컷동물을 무처치 암컷동물과 2주간 동거교배시킨 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 각 투여군에서 나타난 교미율 및 수태율은 대조군과 유사하게 나타났다.

4. 제왕절개성적

암컷동물을 임신 20일째에 제왕절개하여 얻은 결과는 Table 2와 같다. 각 투여군에서 나타난 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수 또는 사망태자(배자)수, 생존태자의 체중 및 외포 소견 등의 모든 결과가 대조군과 통계학적 유의성이 인정되지 않았다.

Table 1. Changes in body weights of male rats treated with DA-125

Period	Treatment (mg/kg)			
	0	12.5	25	50
No. of animals	10	10	10	10
Week 0 (g)	222.2±13.5	222.7±12.2	222.3±10.9	222.3± 9.7
Week 1 (g)	274.9±14.5	243.2±12.4**	225.2± 9.9**	158.1± 5.6**
Week 2 (g)	319.9±15.9	293.9±17.9**	271.0±11.9**	203.6±11.1**
Week 3 (g)	355.1±21.5	332.2±21.9*	308.7±13.9**	249.6±21.5**
Week 4 (g)	385.6±27.1	357.7±23.9*	330.5±17.5**	279.3±22.2**
Week 5 (g)	410.0±31.8	383.1±27.8	348.1±22.0**	293.2±20.8**
Week 6 (g)	429.9±33.3	399.4±30.5	354.8±22.4**	301.5±22.9**
Week 7 (g)	443.4±38.0	412.6±30.0	332.8±37.0**	306.5±21.6**
Week 8 (g)	462.4±38.8	426.5±33.4	340.0±36.1**	317.5±24.4**
Weight gain (g)	240.2±38.7	203.8±27.9	117.7±30.4**	95.2±25.6**

Values are mean±S.D.

*and ** indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels when compared with the control group.

Table 2. Mating performance and cesarean section data when treated males were mated untreated females

Parameter	Treatment (mg/kg)			
	0	12.5	25	50
No. of treated males	10	10	10	9
No. of untreated females	10	10	10	9
Copulation index ^{a)} (%)	100	100	100	100
Fertility index ^{b)} (%)	90	90	90	88.9
No. of corpora lutea: mean±S.D.	16.3±1.2	18.4±2.3	17.0±1.0	13.8±5.5
No. of implantations: mean±S.D.	13.7±3.7	14.3±3.7	14.4±2.7	10.3±6.6
No. of dead or resorbed fetuses	14	26	10	17
No. of live fetuses: mean±S.D.	12.2±3.9	11.1±4.6	13.3±2.1	8.1±5.8
Fetal body weights: mean±S.D. (g)	3.2±0.3	3.3±0.2	3.2±0.2	3.4±0.2
No. of fetuses with external anomalies	0	2 ^{c)}	1 ^{d)}	0

^{a)}: (No. of males with successful copulation/No. of males examined)×100

^{b)}: (No. of impregnating males/No. of males with successful copulation)×100

^{c)}: thread-like tail, ^{d)}: umbilical hernia.

5. 부검소견

교배가 끝난 수컷동물을 부검한 결과 25 및 50 mg/kg 투여군의 동물들은 정소와 정소상체 및 정낭선의 위축이 관찰되었으며, 반면에 전립선에서는 어떠한 이상소견도 나타나지 않았다. 12.5 mg/kg 투여군에서는 대조군과 유사하게 정상적인 소견을 나타내었다.

6. 절대 및 상대 장기중량

수컷동물의 부검시 측정된 생식기관의 장기중량 결과는 Table 3과 같다. 절대장기중량에 있어서는 25 및 50 mg/kg 투여군의 정소와 정소상체 및 정낭선이 대조군에 비하여 유의성(P<0.01)있게 감소하였으며 전립선은 대조군의 결과와 유사하게 나타났다. 12.5 mg/kg 투여군의 각 장기는 대조군과 어떠한 유의차도 없었다. 각 장기의 상대중량에 있어서는 전 투여군의 결과가 대조군과 통계학적 유의성이 인정되지 않았다.

7. 정자분석성적

교미가 완료된 수컷동물을 부검하여 정자를 분석한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 50 mg/kg 투여군에서 정소당 정자두부수가 대조군에 비해 통계학적으로 유의성(P<0.01)있게 감소하였으며 그 외의 투여군에서는 유의한 차이가 없었다. 정소상체 미부에서 채취한 정자의 운동성은 전 투여군의 결과가 대조군과 유사한 결과를 나타냈으며 정자의 형태학적 관찰에서도 각 투여군에서 두부의 단소, 두부의 비정형, 두부 갈고리의 각도이상, 미부의 접힘 등의 이상소견이 4~6% 범위로 관찰되었으나 대조군과 유사한 결과로서 차이가 인정되지 않았다.

8. 병리조직학적 소견

정소 및 정소상체의 병리조직학적 검사 결과는 Table 5에 요약되어 있다. 대조군과 12.5 mg/kg 투여군에서는 상기한 장기들에서 어떠한 병리조직학적 이상

Table 3. Reproductive organ weights of male rats treated with DA-125

Parameter	Treatment (mg/kg)			
	0	12.5	25	50
No. of males examined	10	10	10	9
Body weights (g) at sacrifice	471.1±40.7	436.3±33.7	359.1±28.6**	316.3±22.6**
Testis-left (g)	1.6±0.10	1.5±0.11	1.3±0.17**	1.1±0.17**
Testis-left (g%)	0.3±0.04	0.4±0.02	0.4±0.05	0.4±0.04
Testis-right (g)	1.6±0.10	1.5±0.15	1.3±0.16**	1.1±0.16**
Testis-right (g%)	0.3±0.04	0.4±0.02	0.4±0.05	0.3±0.04
Epididymis-left (g)	0.6±0.08	0.5±0.05	0.4±0.07**	0.4±0.03**
Epididymis-left (g%)	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
Epididymis-right (g)	0.6±0.07	0.5±0.07	0.4±0.07**	0.4±0.08**
Epididymis-right (g%)	0.1±0.01	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.02
Seminal vesicle (g)	1.1±0.23	1.1±0.26	0.9±0.20*	0.8±0.16**
Seminal vesicle (g%)	0.2±0.04	0.3±0.06	0.2±0.06	0.2±0.05
Prostate gland (g)	0.6±0.17	0.6±0.19	0.6±0.23	0.5±0.22
Prostate gland (g%)	0.1±0.03	0.1±0.04	0.2±0.06	0.2±0.07

Values are mean±S.D.

*and ** indicate significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels when compared with the control group.

Table 4. Findings of sperm examination of male rats treated with DA-125

Parameter	Treatment (mg/kg)			
	0	12.5	25	50
No. of males examined	10	10	10	9
Sperm head count ($\times 10^6$ /testis)	249.3 \pm 29.3	246.8 \pm 36.0	227.6 \pm 13.8	119.0 \pm 28.1**
Sperm motility (%)	72.6 \pm 8.9	70.3 \pm 8.5	74.3 \pm 6.8	71.8 \pm 11.1
Sperm abnormality (%)	3.1 \pm 1.7	4.3 \pm 2.8	5.5 \pm 2.3	4.0 \pm 1.1

Values are mean \pm S.D.

** indicates significant difference at $P < 0.01$ level when compared with the control group.

Table 5. Histopathological findings in male rats treated with DA-125

Parameter	Treatment (mg/kg)															
	0				12.5				25				50			
	Grade*				Grade*				Grade*				Grade*			
No. of animals examined	10				10				10				9			
Testes																
Atrophy of seminiferous tubules	10	0	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	0	7	2	0
Decreased number of spermatogonia	10	0	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	0	7	2	0
Decreased number of spermatocyte	10	0	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	0	7	2	0
Decreased number of spermatid	10	0	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	0	7	2	0
Exfoliation of spermatogenic cells	10	0	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	0	9	0	0
Degeneration of spermatogenic cells	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	3	6	0	0
Formation of giant cells	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	5	4	0	0
Vacuolization of Sertoli cells	10	0	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	0	6	3	0
Hyperplasia of Leydig cells	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	7	2	0	0
Epididymides																
Decrease of sperm in ducts	10	0	0	0	10	0	0	0	8	2	0	0	0	6	3	0
Exfoliated spermatogenic cells in ducts	10	0	0	0	10	0	0	0	5	5	0	0	0	7	2	0

*: Grades are as follows: -, no change; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

도 발견되지 않았다(Fig. 1, 2). 25 mg/kg 투여군에서는 대부분의 동물들이 정상적인 조직소견을 나타냈으나 정소에서는 2례에서 이상소견이 관찰되었는데, 이들 조직에서는 대부분의 곡세정관(seminiferous tubules)에서 활발한 정자발생이 이루어지고 있었으나 국소적으로 가벼운 정도의 곡세정관 위축과 정조세포, 정모세포 및 정자세포(spermatid) 수의 감소, 정자발생세포의

탈락 및 지지세포(Sertoli cell)의 공포형성(vacuolization) 등이 관찰되었다(Fig. 3). 또한 정소상체 미부에서도 정도의 정자수 감소가 2례 그리고 변성된 정자발생세포의 혼재소견이 5례 관찰되었다(Fig. 4). 50 mg/kg 투여군에서는 전 동물의 정소에서 정자발생상피세포의 탈락으로 인해 지지세포만이 잔존(Sertoli cell only syndrome)하는 위축된 곡세정관이 전체 곡세정관의 약

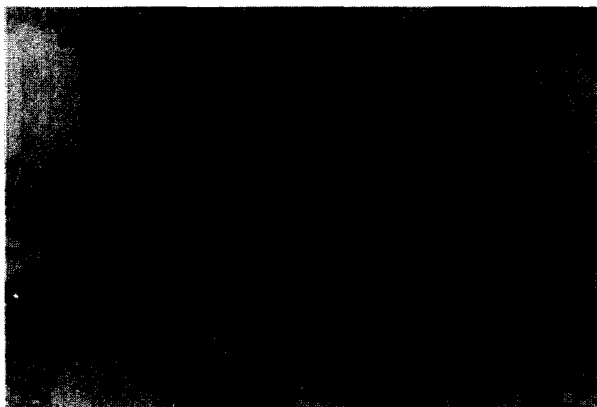


Fig. 1. Testis from a control rat, showing the normal appearance. H-E stain, $\times 200$.

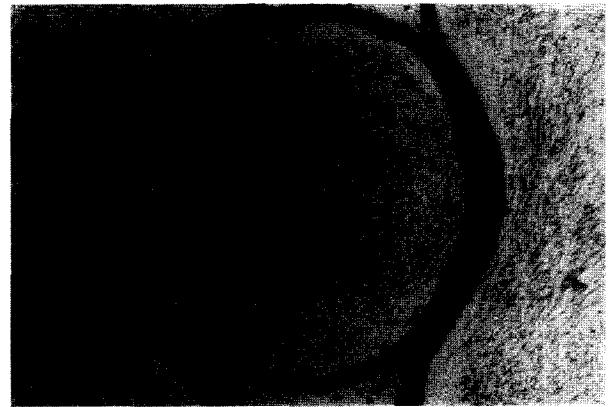


Fig. 2. Epididymis from a control rat, showing no abnormalities. H-E stain, $\times 200$.



Fig. 3. Testis from a rat treated with 25 mg/kg of DA-125, showing slight atrophy of tubules, decrease of spermatogenic cells, exfoliation of round spermatid, and vacuolization of Sertoli cells in occasional tubules. H-E stain, $\times 200$.



Fig. 4. Epididymis from a rat treated with 25 mg/kg of DA-125, showing slight decrease of sperm and increase of necrotic spermatogenic cells in epididymal ducts. H-E stain, $\times 200$.



Fig. 5. Testis from a rat treated with 50 mg/kg of DA-125, showing moderate atrophy of tubules, decrease of spermatogenic cells, exfoliation of spermatid and spermatocyte, vacuolization of Sertoli cells, and hyperplasia of Leydig cells. H-E stain, $\times 200$.

20~30% 정도로 광범위하게 나타났으며 그 외의 곡세정관에서는 대부분 활발한 정자발생이 이루어 지고 있

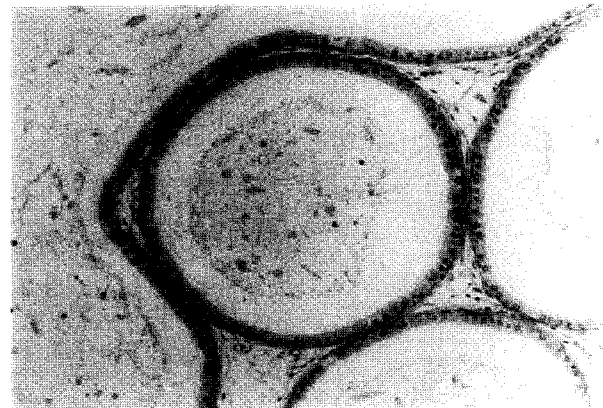


Fig. 6. Epididymis from a rat treated with 50 mg/kg of DA-125, showing moderate decrease of sperm and increase of necrotic spermatogenic cells in epididymal ducts. H-E stain, $\times 200$.

었으나 일부의 곡세정관에서는 정조세포, 정모세포 및 정자세포 수의 감소, 정자발생세포의 탈락과 지지세포의 공포형성도 관찰되었다(Fig. 5). 그 밖에 정자발생세포의 변성(degeneration)이 6례, 다핵거대세포(multinuclear giant cell)의 출현이 4례, 그리고 간질세포(Leydig cell)의 과형성(hyperplasia)이 2례 관찰되었다. 정소상체에서는 전 동물에서 관강내에 중등도의 정자수 감소와 함께 변성된 정자발생세포들이 다소 관찰되었다(Fig. 6).

IV. 고 찰

안트라사이클린계 항암제의 항암력의 기본이 되는 세포독성은 DNA에 intercalation되어 나타나는 활성으로 핵산합성억제, DNA 절단, 그리고 DNA polymerase와 RNA polymerase 및 topoisomerase II 등의 DNA 관련효소들의 억제 등을 들 수 있으며 최근에는 topoisomerase II의 매개에 의한 DNA 절단이 주된 작용기전으로 보고되고 있다(Carprinco 등, 1990, Kumimoto 등, 1990). 약제내성과 만성 심장독성을 개선하고 항암효과를 향상시키기 위해 현재 동아제약(주) 연구소에서 개발중에 있는 DA-125는 adriamycin과 유사한 생화학적 활성을 가지고 있기 때문에 두 물질의 세포독성효과는 유사한 생화학적 기전을 가지고 있을 것으로 예상된다.

Ahn 등(1993)이 실시한 DA-125의 랫드 급성독성시험에서 수컷동물의 반수치사량은 체중 kg당 61 mg 이라고 보고된 바 있는데, 본 시험에서는 이를 기초로 하여 투여동물중 반수이상인 생존하여 생식기관에 독성을 나타낼 것으로 예상되는 50 mg/kg을 최고용량으로 정하였으며, 시험물질을 투여한 후 56일째에 무처리

암컷동물과 교배를 시켜 수태능력을 확인하였고, 교배가 확인된 날에 부검하여 생식기관에 미치는 영향을 평가하였다.

일반증상 관찰시 25 mg/kg 투여군에서 나타난 눈 주위 암적색 분비물과 탈모, 그리고 50 mg/kg 투여군에서 관찰된 쇠약, 진정, 식욕부진, 눈 주위 암적색 분비물, 종창, 탈모 및 설사 등의 소견들은 시험물질의 투여에 기인된 독성증상으로 인정되며, 투여량의 증가에 따라 독성증상의 발생예와 정도가 용량의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 본 시험의 최고용량인 50 mg/kg 투여군에서는 10마리의 동물중 1마리가 극도의 쇠약과 함께 호흡곤란을 나타내다가 투여후 12일째에 폐사하였으며, 이 용량은 본 시험조건에 의한 10% 치사량(LD₁₀)으로 나타났다.

체중 측정시 12.5 mg/kg 투여군의 동물에서 투여후 1주째부터 4주째까지 나타난 체중증가의 억제는 시험물질의 투여에 기인된 소견으로 판단되지만 그 이후에는 대조군과 유사한 체중변화를 나타냄으로서 중요한 변화는 아닌 것으로 생각된다. 반면 25 및 50 mg/kg 투여군의 동물에서 투여후부터 부검시까지 관찰된 체중증가의 억제는 시험물질에 의해 유발된 불가역적(irreversible)인 변화라고 생각된다.

대부분의 암화학요법제들은 투약시 강한 세포독성으로 인하여 세포분열이 왕성하게 일어나는 모낭, 위장관 및 골수 등의 여러 조직에 심각한 부작용을 초래하게 되는데, 본 시험의 25 및 50 mg/kg 투여군에서도 DA-125의 투여에 의해 전신성의 탈모가 관찰되었으며, 또한 위장관 계통의 세포가 상해를 입어 식욕부진과 혈변 등이 나타났으며 이로 인하여 체중증가의 억제가 동반된 것으로 생각된다. 25 및 50 mg/kg 투여군에서 관찰된 정소, 정소상체 및 정낭선의 위축과 절대중량의 감소는 시험물질의 투여에 기인된 소견으로서 이들 생식기관이 DA-125의 주요한 표적장기인 것으로 판단된다. 한편 이들 장기의 상대중량은 대조군과 유사한 결과를 나타냈는데 이는 과도한 체중증가 억제에 따른 상대적인 결과로 사료된다.

수컷의 수태능력은 줄기세포의 연속적인 자가재생과 그 세포로부터 분화하는 정자발생세포들의 형성정도에 달려 있다. 세포독성물질의 노출에 따른 불임성(sterility)은 치사손상으로부터 분화된 정모세포까지 빠르게 진행된다. 그 후 수태능력의 복원은 적당한 줄기세포의 생존과 재생 그리고 수정에 필요한 충분한 수의 정자를 생성할 수 있는 정자발생세포들의 유무에 좌우된다. 줄기세포의 직접적인 형태학적 동정은 그 수가 매우 적고 다양한 형태를 나타내기 때문에 매우

어렵고 힘들다. 줄기세포의 생존을 측정하기 위한 대체 방법으로는 세포독성물질을 투여하고 일정기간이 지난 후에 곡세정관에서 정자발생세포들의 재생(regeneration)과 비재생(non-regeneration)을 관찰하는 것이 있다. 비재생 곡세정관은 줄기세포의 결손에 기인된 것이며 반대로 재생된 곡세정관은 인접지역에 적어도 하나 이상의 생존하는 줄기세포가 있다는 것을 나타낸다. 정소당 정자두부수와 정소상체 관강내의 정자수측정은 줄기세포 생존의 정도를 측정하는 직접적인 기능적 검사방법이다. 랫드의 정자발생(spermatogenesis)은 계통에 따라서 48~53일이 소요된다고 하는데(Creasy와 Foster, 1991), 56일은 줄기세포가 분화과정을 통하여 새로운 정자를 생성하는데 충분한 시간이며, 또한 생존한 줄기세포가 최소한의 재생에 필요한 충분히 짧은 시간이다. DA-125를 투여한 시점에 이미 분화된 정자발생세포들은 56일 이내에 정소를 떠나게 되므로 투여후 56일에 측정된 정소의 정자두부수는 DA-125 독성으로부터 줄기세포생존의 믿을 수 있는 지표이다.

Adriamycin은 랫드에서 정소와 정낭선의 중량 감소와 정조세포의 소실에 따른 정자발생상피세포의 소실을 유발하며(Ward 등, 1988; Matsui 등, 1993), 정소내에 투여할 경우 세포분열 중기 I과 II에서 1차 및 2차 정모세포들이 급속히 사멸한다고 한다(Parvinen과 Parvinen, 1978). 마우스에서는 정조세포에 세포독성을 나타내고 줄기세포를 사멸시키며(Lu와 Meistrich, 1979) 곡세정관을 위축시킨다고 한다(Au와 Hsu, 1980; Hacker-Klom 등, 1986). 상기한 바와 같이 adriamycin은 정소에 직접적으로 작용하여 정조세포에 일차적으로 손상을 입히기 때문에 세정관에 있는 모든 발생단계의 정자발생세포들이 손상을 입게 되며 정자수의 감소로 인하여 일시적 또는 영구적인 불임증을 유발한다고 한다.

Adriamycin과 동일계 유도체인 DA-125를 투여한 본 시험에서는 25 및 50 mg/kg 투여군의 정소에서 곡세정관 위축과 정조세포, 정모세포 및 정자세포 수의 감소, 정자발생세포들의 탈락 및 지지세포의 공포형성, 그리고 정소상체 관강내의 정자수 감소와 변성된 정자발생세포의 혼재 등의 소견이 나타났으며 또한 50 mg/kg 군에서는 상기 소견 외에도 정자발생세포들의 변성, 다핵거대세포의 출현 및 간질세포의 과형성 등의 이상 소견이 관찰되었는데, 이들은 시험물질의 투여에 기인된 것으로 판단된다.

25 및 50 mg/kg 투여군의 정소에서 관찰된 위축된 곡세정관중 일부 곡세정관들은 재생이 이루어지고 있었으나 정조세포, 정모세포 및 정자세포가 소수씩 관

찰되어 정자발생세포들의 감소가 인정되었으며 심하게 위축된 곡세정관에서는 모든 정자발생세포들이 소실되어 지지세포만이 관찰되었는데, 이 소견은 DA-125의 투여에 의해 줄기세포나 정조세포가 손상되었음을 나타내는 것으로서 심하게 위축된 비재생 곡세정관들에는 모든 줄기세포가 사멸된 것으로 판단된다.

곡세정관에서 정자발생세포들의 소실은 곡세정관의 직경과 정소의 크기 및 중량의 감소원인이 되는데, 본 시험에서도 25 mg/kg 투여군과 50 mg/kg 투여군에서 시험물질의 투여에 의해 정자발생세포들의 감소 및 소실이 나타났으며 이로 인하여 곡세정관의 위축과 함께 정소의 중량이 감소한 것으로 인정된다.

정소의 변성시 정조세포와 정모세포의 괴사는 매우 빨리 진행되기 때문에 변성초기의 세포들은 매우 관찰하기가 어렵고 또한 괴사된 세포들도 빠른 속도로 지지세포에 탐식되거나 관강내로 탈락하게 되지만 정자세포의 손상은 잘 관찰되는 소견으로서 변성된 정자세포는 핵의 염색질 변연화(chromatin margination)를 나타내거나 세포간교(cytoplasmic bridge)로 연결된 합포체(syncytial group)들의 융합으로 다핵거대세포를 형성한다고 한다(Creasy와 Foster, 1991). 본 시험의 25 및 50 mg/kg 투여군에서도 변성된 정조세포와 정모세포는 거의 관찰되지 않았으나 정자세포는 변성이나 탈락 소견을 나타내었으며 50 mg/kg 투여군에서는 다핵거대세포도 다소 관찰되었다. 지지세포에서는 이러한 변성 또는 괴사된 정세포들을 탐식하여 발생한 것으로 추정되는 세포질의 확장이 공포형성으로 나타났고 일부 탈락된 정자발생세포들은 정소상체의 관강내에서 관찰되었다.

Creasy와 Foster(1991)에 따르면 간질조직의 증가는 곡세정관 손상에 따른 일반적 속발증의 하나로서 간질조직의 비대(hypertrophy), 과형성(hyperplasia) 또는 곡세정관의 위축에 따르는 상대적 증가 등으로 나타난다고 하며, 그 원인에 대해서는 확실히 밝혀진 바가 없다고 한다. 본 시험의 50 mg/kg 투여군에서는 곡세정관이 위축된 부분에서 간질세포의 과형성과 곡세정관의 위축에 의한 상대적 증가가 인정되었다.

정자분석시 50 mg/kg 투여군에서 관찰된 정소의 정자두부수 감소는 DA-125의 세포독성으로 인하여 정자발생세포들이 변성, 괴사, 탈락함으로써 유발된 것으로 이로 인하여 정소상체 관강내의 정자수가 감소하였는데 그러나 수컷동물의 교미율과 수태율에는 영향을 끼치지 않았다. 이는 정 등(1994)이 보고한 DA-125의 랫드 수태능력시험 결과와 일치하는 것으로서 랫드의 생식능력에는 영향을 끼치지 않지만 정자발생에는 장애

를 일으키는 것이 확인되었다.

동물의 수컷들은 정상적인 수태와 새끼수를 보장하는 정자수의 10배에서 1000배 정도를 1회에 사정하며(Amann, 1986), 랫드의 경우 정상정자수의 90% 감소에 의해서도 수태율이 저하되지 않는다고 한다(Aafjes 등, 1980). 반면 사람의 경우에는 사출액당 정자수가 정상적인 수정에 필요한 정자수의 2배 이내로서 상당히 적고 또한 전진운동성을 나타내면서 형태학적으로도 정상적인 정자의 비율이 동물들에 비해 낮기 때문에 약 60%의 정자수 감소로도 수태장애가 유발된다고 한다(Smith, 1978; David 등, 1979).

대표적인 안트라사이클린계 항암제인 adriamycin은 심장독성 등의 부작용으로 인해 사용이 제한되는 용량을 남성에게 투약하면 무정자증이나 정자감소증을 유발하지는 않으나 정자무력증(asthenospermia)과 수태율 감소의 원인이 된다고 하며(Kreuser 등, 1986), 다른 세포독성물질과 혼용시에는 정세포손상이나 불임 등의 정소독성이 상승작용(synergism)을 나타낸다고 하는데(Da Cunha 등, 1983; Bajpai와 Anderson, 1985), DA-125도 본 시험에서 관찰된 생식기관의 중량감소와 정자발생 장애, 그리고 정자수 감소 등의 소견으로 미루어 보아 사람에게 투약할 경우 adriamycin과 유사한 정소독성을 나타낼 것으로 사료된다.

참고문헌

- 김원배, 박정배, 안병옥, 류병권, 양중익, 박재갑, 홍원선, 김선진, 임종식. (1993): 새로운 Anthracycline계 항암제 DA-125의 *in vitro* 세포독성 및 마우스 백혈병에 대한 항종양 효과. 대한암학회 초록집, **19**, 47.
- 김종춘, 차신우, 송시환, 정문구. (1997): 비글견에 있어서 새로운 안트라사이클린계 항암제 DA-125의 정소독성연구. 대한수의학회지, **37**, 425-438.
- 백남기, 안병옥, 이순복, 김원배, 양중익, Watanabe, T. (1993): 새로운 항암성 항생물질 DA-125의 심장독성에 대한 평가. 응용약물학회지, **1**, 9-19.
- 안병옥, 백남기, 이순복, 김원배, 양중익, 김부영, 김대병, 이종권. (1993): DA-125의 국소자극성. 응용약물학회지, **1**, 20-25.
- 이순복, 백남기, 안병옥, 김옥진, 강경구, 이철용, 김원배, 양중익. (1993): 새로운 Anthracycline 항암제 DA-125의 랫드에 있어서의 아급성독성연구. 응용약물학회지, **2**, 226-235.
- 정문구, 김종춘, 김원배, 노정구. (1994): 새로운 안트라사이클린계 항암제 DA-125의 생식독성연구:(II) 랫드 수태능력시험. 응용약물학회지, **2**, 94-102.
- 정문구, 김종춘, 한상섭, 노정구. (1995): 새로운 안트라사이클린계 항암제 DA-125의 생식독성연구: 토끼 최기형시

- 험. 응용약물학회지, **3**, 47-53.
- Aafjes, J.H., Vels, J.M. and Schenck, E. (1980): Fertility of rats with artificial oligozoospermia. *J. Reprod. Fertil.*, **58**, 345-351.
- Ahn, B.O., Baik, N.G., Lee, S.B., Kim, W.B., Yang, J., Kim, J.Y., Park, J.S., Shin, C.C. and Roh, J.K. (1993): Acute and subacute toxicity study of DA-125, a new anthracycline anticancer agent. *Korean Cancer Assoc.*, **19**, 23.
- Amann, R.P. (1986): Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ. Health Perspect.*, **70**, 149-158.
- Au, W.W. and Hsu, T.C. (1980): The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutat. Res.*, **79**, 351-361.
- Bajpai, P.K. and Anderson, K.J. (1985): Chemotherapeutic agents and male reproduction in *Male fertility and its regulation* (Lobl, T.J. and Hafez, E. S.E. eds, MTP Press, Lancaster), p. 13-24.
- Benict, W.F., Baker, M.S., Haroun, L., Choi, E. and Ames, B.N. (1977): Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in Salmonella/microsome test. *Cancer Res.*, **37**, 2209-2213.
- Blum, R.H. and Carter, S.K. (1974): Adriamycin - a new anticancer drug with clinical activity. *Am. Intern. Med.*, **80**, 249-259.
- Calabresi, P. and Chabner, B.A. (1991): Antineoplastic agents In *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics(8th ed)*, (Per-gamon press, New York), p. 1209-1263.
- Carprinco, G., Zunino, F., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (1990): Sequence-selective Topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV 40 DNA: Relationship with DNA binding and cytotoxicity. *Biochemistry*, **29**, 562.
- Chung, M.K., Kim, J.C. and Roh, J.K. (1995): Teratogenic effects of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod. Toxicol.*, **9**, 159-164.
- 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), p. 829-889.
- Da Cunha, M.F., Meistrich, M.L., Reid, H.L., Gordon, L.A., Watchmaker, G. and Wyrobek, A.J. (1983): Active sperm production after cancer therapy with doxorubicin (Adriamycin). *J. Urol.*, **130**, 927-930.
- David, G.P., Jouannet, P., Martin-Boyee, A., et al. (1979): Sperm counts in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.*, **31**, 453-455.
- Di Marco, A., Gaetani, M. and Scarpinato, B. (1969): Adriamycin (NSC-123127), a new antibiotic with anti-tumor activity. *Cancer Chemother. Rep.*, **53**, 33-37.
- Fukazawa, H. and Kotosai, K. (1987): Investigation of the sperm examination method and the properties of sperm in rats. *J. Tokyo Vet. Anim. Sci.*, **35**, 1-6.
- Gralla, E.J., Fleischmann, R.W., Luthra, Y.K. and Stadnicki, S.W. (1979): The dosing schedule dependent toxicities of adriamycin in beagle dogs and rhesus monkeys. *Toxicology*, **13**, 263-273.
- Hacker-Klom, U.B., Meistrich, M.L. and Gohde, W. (1986): Effect of doxorubicin and 4'-epi-doxorubicin on mouse spermatogenesis. *Mutat. Res.*, **160**, 39-46.
- Kreuser, E.D., Harsch, U., Hetzel, W.D. and Schreml, W. (1986): Chronic gonadal toxicity in patients with testicular cancer after chemotherapy. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **22**, 289-294.
- Kumimoto, S., Komuno, K., Nosoka, C., Tsuchiya, T., Fukatsu, S. and Tacheuchi, T. (1990): Biological activity of new anthracyclines containing fluorine, FAD104 and its metabolites. *J. Antibiotics*, **43**, 556.
- Lu, C.C. and Meistrich, M.L. (1979): Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res.*, **39**, 3575-3582.
- Lefark, A.E., Pttha, J., Rosenheim, S. and Gottlieb, J. (1973): A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, **32**, 302-314.
- Matsui, H., Toyoda, K., Shinoda, K., Okamiya, H., Furukawa, F., Kawanishi, T. and Takahashi, M. (1993): Quantitative histopathological study on the adriamycin testicular toxicity in rats. *Bulletin of the National Institute of Health Sciences (Japan)*, **111**, 39-46.
- Meistrich, M.L., Goldstein, L.S. and Wyrobek, A.J. (1985): Long-term infertility and dominant lethal mutations in male mice treated with adriamycin. *Mutat. Res.*, **152**, 543-565.
- Meistrich, M.L. (1989): Evaluation of reproductive toxicity by testicular sperm head counts. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, **8**, 551-567.
- Myers, C.E., McGuire, W.P., Liss, R.H., Ifrim, I., Grotzinger, K. and Young, R.C. (1977): Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, **197**, 165-167.
- Parvinen, L.M. and Parvinen, M. (1978): Biochemical studies of the rat seminiferous epithelial wave: DNA and RNA synthesis and effects of adriamycin. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, **18**, 585-594.
- Schmid, B. and Zbinden, G. (1979): Unscheduled

- DNA synthesis in male rabbit germ cells induced by methylmethane sulfonate, cyclophosphamide and adriamycin. *Arch. Toxicol.*, **2**, 503-507.
- Smith, K.D. (1978): Evaluation of sperm counts in 2543 men requesting vasectomy. *Andrologia*, **10**, 362-368.
- Thomson, D.J., Molello, J.A., Strebing, R.T. and Dyke, I.L. (1978): Teratogenicity of adriamycin and daunomycin in the rat and rabbit. *Teratology*, **17**, 151-158.
- Ward, J.A., Bardin, C.W., Knight, M., Robinson, J., Gunsalus, G. and Morris, I.D. (1988): Delayed effects of doxorubicin on spermatogenesis and endocrine function in rats. *Reprod. Toxicol.*, **2**, 117-126.
- William, W.A. and Hsu, T.C. (1980): The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutat. Res.*, **79**, 351-361.
- Wyrobek, A.J. and Bruce, W.R. (1975): Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 4425-4429.
- Wyrobek, A.J., Gordon, L.A., Burkhart, J.G., Francis, M.W., Kapp Jr., R.W., Letz, G., Malling, H.V., Yopham, J.C. and Whorton, M.D. (1983): An evaluation of human sperm as indicators of chemically induced alterations of spermatogenic function: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutat. Res.*, **115**, 73-148.