

Propylthiouracil을 이용한 OECD enhanced TG407의 내분비계 장애 물질 검색을 위한 유효화 실험

강경선 · 김대용¹ · 제정환 · 김태원 · 김형섭 · 박지은 · 윤준원 · 김경배 · 이지해
조성대 · 조종호 · 최재훈¹ · 이종근¹ · 이영순*
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실, ¹수의병리학교실, 농생명공학부

Pre-validation of the OECD Enhanced Test Guideline 407 Protocol on Screening and Testing for Endocrine Disrupters using Propylthiouracil

Kyung-Sun Kang, Dae-Yong Kim¹, Jeong-Hwan Che, Tae-Won Kim, Hyung-Sub Kim,
Ji-Eun Park, Jun-Won Yun, Kyung-Bae Kim, Ji-Hae Lee, Sung-Dae Cho,
Jong-Ho Cho, Jae-Hoon Choi¹, Gung-Keun Lee¹ and Yong-Soon Lee*

Department of Veterinary Public Health and ¹Department of Veterinary Pathology,
College of Veterinary Medicine, School of Agricultural Biotechnology,
Seoul National University, Seodun-Dong, Kwonsun-Ku, Suwon 441-744, Korea
(Received July 3, 2001)
(Accepted July 20, 2001)

ABSTRACT : We investigated the toxic effects of propylthiouracil (PTU) in Sprague-Dawley (SD) rats to develop and validate an enhanced protocol for Test Guideline 407 as OECD project. Twenty male and female SD rats, 7 weeks old, were treated with PTU in corn oil at levels of 0, 0.1, 1 and 10 mg/kg/day for 4 weeks orally. Clinical observation, body weight changes, food uptake, water consumption, urinalysis, estrus cycle and sperm analysis, serum chemistry, autopsy findings and histopathological findings were evaluated in this study. No clinical signs and mortality were observed in the study. The body weights and food uptakes in the group treated with 10 mg/kg/day were reduced from 3 weeks after the initiation of the treatment. The levels of 3,5,3'-triodothyronine (T3) and thyroxine (T4, 3,5,3',5'-tetraiodothyrosine) were also significantly decreased in the group treated with 10 mg/kg/day. Also, the relative and absolute organ weights of thymuses were decreased. Thyroid glands of rats in the group treated with PTU 10 mg/kg/day were bigger than those of rats in the control group. In the histopathological examination, diffuse hyperplasia and hypertrophy of thyroid follicular cells were observed in all treatment groups, leading to the reduction of lumen size and papillary enfolding of lining epithelium. The degree of lesion was increased in a dose-dependent manner. The results suggested that PTU would cause toxicity in thyroid gland and decrease the levels of T3 and T4 in SD rats. However, there were no effects on the other organs including testis and uterus especially in spermatogenesis and estrus cycle. On the basis of the results, enhanced protocol for Test Guideline (TG) 407 may be sensitive and reliable to detect endocrine-active substances like PTU.

Key Words : Propylthiouracil, Test GuideLine 407, Thyroid Hormone, T3, T4, Thyroid Gland, Thyroid Follicular Cell, Spermatogenesis, Estrus Cycle

I. 서 론

OECD project는 내분비계에 작용하는 물질들을 검색하기 위한 기존의 Test Guideline(TG) 407 protocol에 내분

비계와 관련된 새로운 parameter의 민감도 평가를 추가하여 TG 407 protocol을 강화하는 것이다. 이에 따라 tamoxifen, genistein, nonylphenol, propylthiouracil(PTU) 등을 포함한 10개의 물질을 물질당 각각 2개의 실험실에서 평가하였다. 임상증상, 체중변화, 사료·음수 섭취량, 뇨검사, 발정주기, 정자검사, 혈청검사, 부검 및 조직학적 검사 등

*To whom correspondence should be addressed

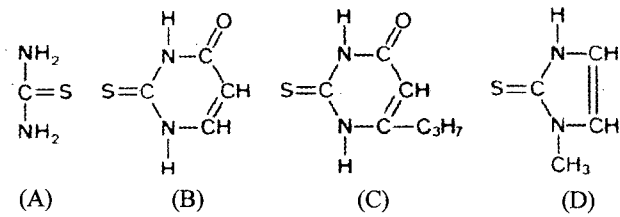


Fig. 1. Structures of thiouracil class. (A) Thiourea, (B) Thiouracil, (C) Propylthiouracil and (D) Methimazole.

을 포함한 기존의 TG 407 protocol에 민감도와 신뢰성을 높이기 위해서 갑상선 호르몬(thyroid hormone, TH) 수치를 측정하고, 정자의 수와 형태를 관찰하였으며 암컷은 diestrus 시기에 부검하는 등의 실험을 추가하였다.

PTU는 thiourea, thiouracil, 그리고 methimazole 등 항갑상선 약제로 알려진 thiourea class의 하나로 특히 Graves' disease 등과 같은 갑상선 기능 항진증 또는 갑상선 중독 증의 치료물질로 알려져 있다(Fig. 1). 이 물질로 암컷 랫드에 pubertal assay를 실시할 경우 증체율 감소, 질개구 시기 지연, 갑상선 중량증가 및 조직학적 변화, 호르몬 수치 변화, 난소중량 감소 등이 보고되었으며(Marty 등, 1999), rats에 90일간 125 ppm의 PTU를 경구 투여하면 3,5,3'-triiodothyronine(T3) 및 thyroxine(T4, 3,5,3',5'-tetraiodothyrosine)치의 감소, TSH치의 증가, 갑상선 기능 및 형태 변화 등이 나타났다(Freudenthal 등, 1978). 또한, PTU를 0.5~1.5 mmol/kg로 복강 투여한 경우에서도 용량 의존적 체중감소, 간장중량 증가 및 비장중량 감소, 백혈구 감소, 간의 공포형성 및 비장의 red pulp congestion 등이 나타나고(Kariya 등, 1983), 이유 직후의 Wistar rat에 0.05% 음수로 6주 투여할 경우 T3 및 T4치의 감소가 보고되었다(Yoshida 등, 1995).

T3 및 T4 같은 갑상선 호르몬은 모든 세포에 중요한 작용을 하며 일반적인 대사, 발달 및 조직의 분화 등에 작용한다. TH치의 저하는 임상적으로 갑상선 부전증(hypothyroidism)을 유발하는데, 이는 순환장애, 정신장애 및 행동장애 등을 특징으로 한다. 특히, 자궁 내에서 또는 신생아에서의 갑상선 부전증은 여러 가지 선천적 장애와 뇌의 복합적인 구조적, 생화학적 이상을 가져오며 결과적으로 심각하고 비가역적인 지능발달 장애를 유발한다고 한다(Vassart 등, 1995). 설치류에서 행해진 연구 결과에 의하면 선천적인 갑상선 부전증은 뇌의 수초 형성 감소, 신경계 성장 저하 및 수상 수지상 분기(dendritic arborization) 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(Elder 등, 2000). 또한, 갑상선의 비정상적 상태는 내장기능의 변화와도 관련된다. 예를 들어, 갑상선 부전증은 서맥을 유발하고 위산분비와 궤양형성을 증가시키는 반면, 갑상선 항진증(hyperthyroidism)은 심계 항진을 유발하고 위산분비를 저하시킨다

고 보고되었다(Seely 등, 1990).

따라서 이번 실험은 PTU를 SD 랫드에 4주간 반복 경구 투여하여 PTU의 노출에 의해 야기되는 변화와 갑상선 호르몬 수치의 변화 및 고환의 정자 형성 과정 및 발정 주기에 나타나는 변화 그리고 장기의 이상 등을 규명함으로써 기존의 TG 407 실험법 및 추가된 실험항목의 신뢰성과 민감도를 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질로 사용된 6-n-propyl-2-thiouracil(PTU, SIGMA, MO, St. Louis)를 corn oil에 현탁하여 조제하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

Sprague Dawley(SD) 계통의 SPF(specific pathogen free) 랫드 암·수 각각 6주령 25마리를 (주)샘타코 바이오에서 입수하여 1주일간 순화시키고, 각 군당 건강한 동물 암·수 각각 20마리를 실험에 사용하였다. 실험은 온도 22±3°C, 상대습도 55±10%, 환기회수 10~12회/시간, 조명시간 12시간(07:00 점등 - 19:00 소등), 조도 150~220 lux의 사육환경에서 실시하였으며, polycarbonate cage(26 W×42 L×18 H cm, 명진기계제작)에 사육 상자당 순화, 검역 기간에는 5마리씩, 투여 기간에는 1마리씩 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료((주) 신촌 사료)를 자유 섭취시켰으며, 물은 상수도 물을 자유 섭취시켰다.

3. 투여농도 설정 및 시험군의 구성

이 실험에서, 고용량은 동물에서의 endocrine-related effects를 유도하기 위하여, 기존자료(Freudenthal 등, 1978; Kariya 등, 1983; Marty 등, 1999; Yoshida 등, 1995) 및 예비시험을 근거로 고용량을 PTU 10 mg/kg(사망 및 심한 고통을 동반하지 않으며 최소한의 독성 증상이 발현되는 용량)으로 선정하였으며, 10배 공비로 중간 용량과 저용량을 두었다. 저용량의 경우는 no-observed-adverse effects level(NOAEL) 용량을 선정하였다. 또한, 대조군은 매체 물질인 corn oil을 같은 양으로 투여하였다. 투여 전 체중 대비 무작위 군 분리를 하였고, 경구로 주 7회, 1일 1회, 28일간 투여하였다.

4. 관찰 및 검사항목

1) 임상증상 및 감각신경 관찰

1일 2회씩 일반증상을 관찰하였고, 적어도 1주일에 1회는 상세히 임상 증상을 기록하였다. 투여 후 넷째 주 초기에는 청각, 시각, 주광성 등의 자극 및 grip strength, motor activity에 대한 변화를 기록하였다.

2) 체중 및 사료·음수 섭취량 측정

모든 동물에 대하여 투여 개시 전, 투여 개시 후, 시험 종료 시까지 매주 1회 이상 측정하였다.

3) 뇨검사 및 안검사

모든 동물에 대하여 투여 4째주에 측정하였다. 안검사는 육안 검사에서 이상이 있을 경우 검안경을 이용하여 안과학적 검사를 실시하였다.

4) 부검

28일간 반복투여가 끝난 뒤 수컷동물들을 투여 종료 일일에 부검하였으며, 암컷동물의 경우 투여 4주째 말기부터 적어도 5일간 estrus cycle을 측정하여 기록하였으며, diestrus를 나타내는 동물만을 29일째(수컷부검일)에 부검하였고, 부검일은 투여 후 28~32일까지 연장하였다.

5) 육안소견 및 장기중량 측정

시험 종료 후 방혈 치사시켜 내부장기의 육안적 이상유무를 상세히 관찰하였다. 필요한 장기의 중량을 측정하고 체중에 대한 상대중량을 산출하였으며, 병리조직검사를 위해 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

6) 혈액학적 및 혈액생화학적 검사

복대동맥에서 채혈한 혈액의 일부는 항응고제가 포함된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 검사를 실시하였고 나머지 혈액은 4°C 냉장 보관한 후 원심분리(3000 rpm, 10 min)하여 자동생화학검사기를 이용하여 혈액생화학적 검사를 실시하였다.

7) 병리조직학적 검사

고환, 부고환은 bouin's solution에 24시간 고정 후 70% ethanol 용액으로 교환하여 포매하였고, 다른 장기는 10% 중성 포르말린 액에 2주 이상 고정시킨 후 파라핀 포매기(SAKURA, Tissue-Tek VIP, vacuum infiltration Processor)에 포매하여 Microtome(HM340E)으로 5 μm 절편을 만든 뒤 Hematoxylin & Eosin 염색을 하여 관찰하였다.

8) 정자의 형태학적 이상, 활성, 수 측정

수컷 동물의 고환의 정자 두부수와 부고환의 정자수, 정자 운동성 및 형태학적 이상 유무를 관찰하였다(Nishikawa, 1972; Yamada 등, 1995). 중량을 측정한 좌측고환

의 피막을 제거하여 고환실질조직의 중량을 측정한 후 50 ml의 SMT 용액이 들어있는 튜브에 넣은 다음 균질기(autohomogenizer, Janke & Kunkel, IKA-Laborotechnik)로 충분히 균질화한 후, 혈구계산판(hemocytometer, Neubauer, Germany)에 고루 퍼지도록 주입하고 광학현미경을 이용하여 200배율로 관찰하여 고환당 총 정자 두부수를 계산하였다. 좌측부고환 미부의 중량을 측정한 다음 bovine serum albumin(BSA)이 들어있는 Hank's balanced salt solution(Gibco, pH 7.2) 5 ml가 들어있는 60 mm dish에서 안과용 가위로 세절하고 그 중 10 μ는 10배 희석하여 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 운동성의 유무를 관찰하였다. 나머지 정자 샘플은 5분간 37°C에서 incubation 시킨 후, 혈구계산판에서 정자수를 계수하였다. 정자의 형태학적 검사를 위해 좌측고환 미부에서 얻은 정자배양액을 1% eosin Y, 10% formaline과 100:1:1로 잘 혼합한 다음 커버글라스를 덮어서 염색표본을 만든 후, 각 개체당 200마리의 정자에 대해서 형태학적 이상유무를 관찰하였다.

$$\text{sperm head count} = [(\text{mean sperm head count}) \times (\text{squares factor}) \times (\text{hemocytometer factor}) \times (\text{dilution factor})] \div (\text{tissue weight, in grams})$$

sperm motility scoring;

4 : sperm 수가 많고 rapid, linear progressive linear movement

3 : sperm 수가 많고 rapid 또는 linear progressive linear movement

2 : slow, sluggish linear movement 또는 non-linear movement

1 : non-progressive motility

sperm motility counting; 정자 200개당 움직이는 정자수의 %

$$\text{Daily sperm production; sperm head count} \div \text{time divisors of rats}(6.10)$$

9) 통계처리

본 실험에서 얻은 측정치의 통계분석은 SAS program(SAS institute Inc., Version 8.01, Cary, NC, USA)을 이용하여 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 로 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였다. 또한, 병리조직학적으로 관찰된 병변의 발생 빈도는 χ^2 (Chi-square) 검정법으로 각각 대조군과 유의차 검정을 실시하였다.

III. 결 과

1. 임상증상 및 감각신경 관찰

암·수 전 투여 용량군과 대조군에서 투여기간 중 사망한 동물은 없었으며 임상 증상이나 감각 신경의 이상은 관찰되지 않았다(data not shown).

2. 체중 및 사료·음수 섭취량 측정

체중은 수컷과 암컷 모두 고용량군 투여 3주 이후에는 대조군에 비해 유의적으로 감소했다(Fig. 2). 사료 섭취량은 수컷 고용량군에서 1주 이후 대조군에 비해 유의적인 감소가 나타났다. 암컷 저용량군은 1, 2주째에 대조군에

비해 유의적으로 증가했으나, 고용량군은 투여 1주 이후 대조군에 비해 유의적인 감소가 나타났다(Fig. 3). 음수 섭취량은 수컷 중간용량군과 고용량군에서 1주째에 대조군에 비해 유의적인 일시적 증가가 있었으나, 이후 고용량군 3주째는 대조군에 비해 유의적으로 감소했다. 암컷 고용량군은 1, 2주째에 대조군에 비해 유의적인 감소가 나타났다(Fig. 4).

3. 뇨검사 및 안검사

암·수 모두 투여용량군과 대조군에서 이상을 나타내지 않았다(Table 1).

4. 혈액학적 및 혈액생화학적 검사

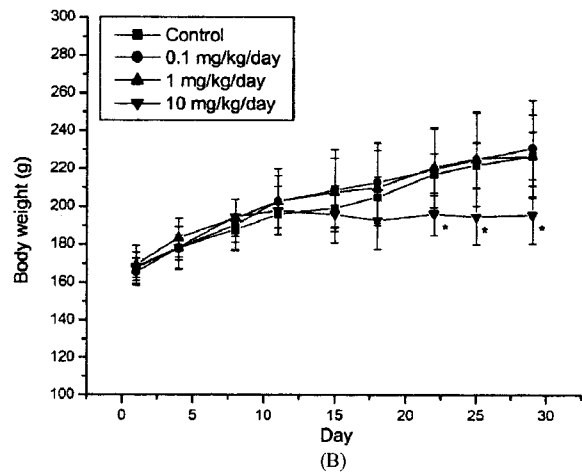
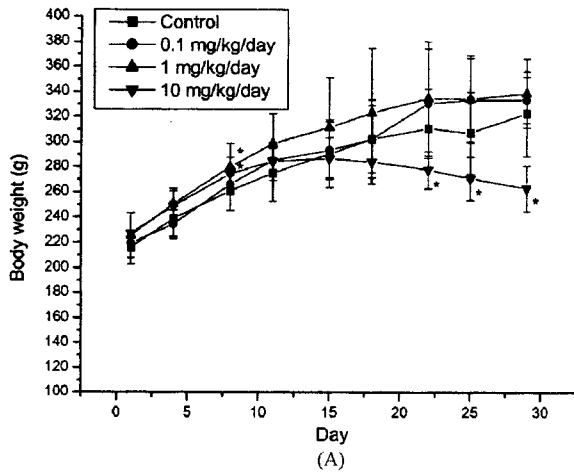


Fig. 2. Body weights in male (A) and female (B) rats orally treated with test materials. Each point represents the mean±S.D. ■ : Control [n = 5]; ● : 0.1 mg/kg/day [n = 5]; ▲ : 1 mg/kg/day [n = 5]; ▼ : 10 mg/kg/day [n = 5]; * : Significantly different from control at p < 0.05.

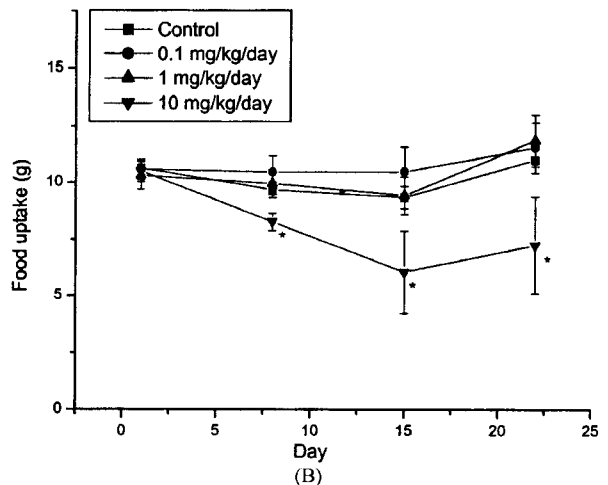
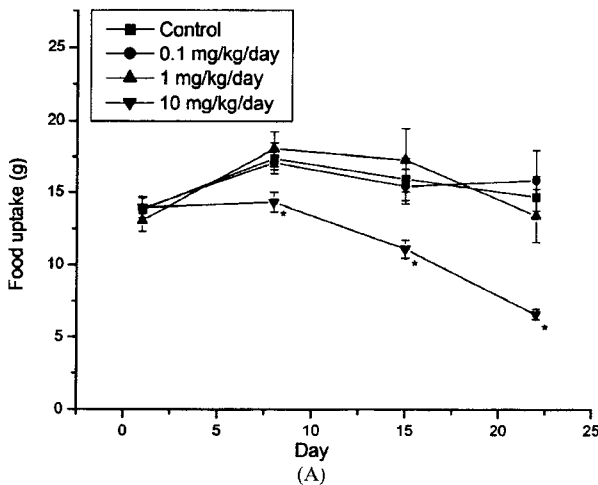


Fig. 3. Daily mean food uptake in male (A) and female (B) rats orally treated with test materials. Each point represents the mean±S.D. ■ : Control [n = 5]; ● : 0.1 mg/kg/day [n = 5]; ▲ : 1 mg/kg/day [n = 5]; ▼ : 10 mg/kg/day [n = 5]; * : Significantly different from control at p < 0.05.

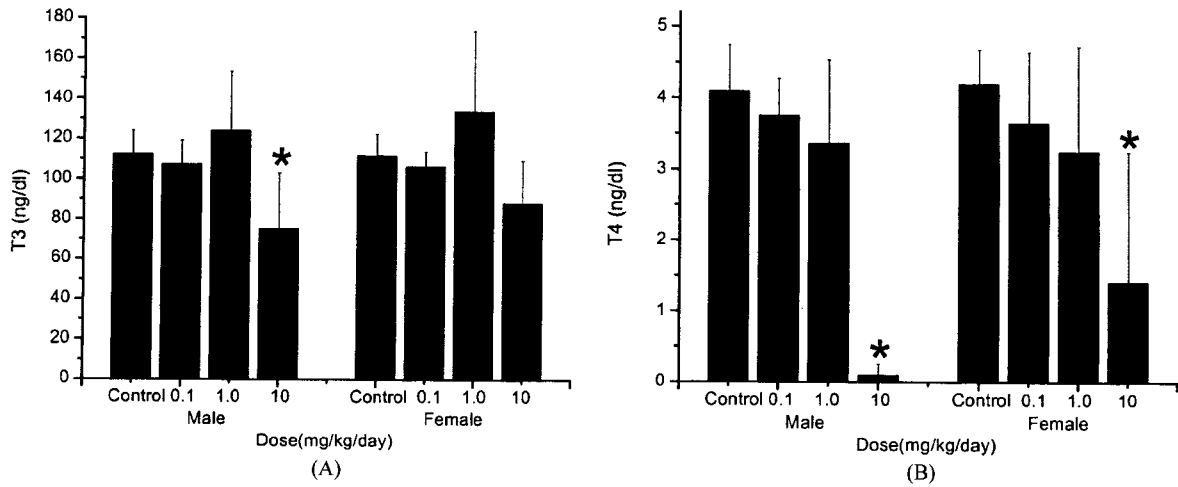


Fig. 5. Hormonal analyses of T3 (A) and T4 (B) orally treated with test materials. Each point represents the mean±S.D.; * : Significantly different from control at p < 0.05.

부검시의 혈액학적 검사소견으로는 암컷 고용량군에서 platelet치가 대조군에 비해 유의적으로 감소했으나, neutrophil치는 대조군에 비해 유의적으로 증가했다. 부검시의 혈액생화학적 검사소견으로는 수컷 고용량군에서 T3치와 T4치가 대조군에 비해 유의성있게 감소했고(Fig. 5), total protein치와 total cholesterol치는 대조군에 비해 증가했다. 또한 수컷 저용량군의 K치는 대조군에 비해 감소했다. 암컷 고용량군은 TSH치, albumin치, BUN치 및 Cl치가 대조군에 비해 증가했다. PT치는 대조군 및 투여군 모두에서 유

의적인 이상을 나타내지 않았으나, APTT치는 수컷 고용량군이 대조군에 비해 유의적으로 증가했다(Tables 2 and 3).

5. 장기의 절대중량 및 상대중량비

절대장기중량의 경우 수컷 저용량군에서 thymus와 lung이 대조군에 비해 유의적으로 감소했으며, 수컷 고용량군은 thymus, lung, heart, liver, spleen, left kidney 및 right kidney가 대조군에 비해 유의적으로 감소했다. 암컷 고용

Table 2. Hematological values of SD rats orally treated with test materials

Parameter	Male				Female			
	Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
	\Dose (mg/kg/day)	0	0.1	1	10	0	0.1	1
\No. of rat	5	5	5	5	5	5	5	5
WBC (10 ³ /μl)	6.85±1.84 ^{a)}	6.98±1.52	6.64±0.50	6.36±1.29	5.17±1.77	5.03±1.01	4.12±1.27	5.56±2.33
RBC (10 ⁶ /μl)	7.38±0.32	7.50±0.63	7.66±0.22	7.92±0.29	7.05±0.31	6.76±0.68	6.81±0.28	6.95±0.52
Hemoglobin (g/dl)	14.83±0.41	15.24±0.86	15.24±0.50	15.88±0.69	14.25±0.59	13.80±1.31	13.87±0.57	13.58±0.94
Hematocrit (%)	47.17±2.04	48.20±3.19	48.20±1.64	49.80±2.28	43.17±2.32	42.00±4.38	41.33±1.86	41.40±3.65
Platelet (10 ³ /μl)	724.00±162.60	800.20±138.93	887.00±116.42	764.00±72.87	812.17±60.90	788.17±83.74	782.33±76.69	671.40±98.46*
MCV (fl)	63.67±2.94	64.60±2.61	63.00±2.55	63.00±2.35	61.67±2.94	62.33±1.86	60.83±3.37	59.80±2.39
MCH (pg)	19.67±0.52	20.00±0.71	19.40±0.89	19.60±0.89	19.67±0.82	19.83±0.75	20.00±0.89	19.20±0.45
MCHC (g/dl)	31.00±0.89	31.00±0.71	30.80±1.10	31.20±0.45	32.17±2.23	32.17±1.33	32.83±1.33	32.00±1.41
Neutrophil (%)	18.33±9.09	15.60±12.01	16.20±5.07	16.40±8.79	16.67±7.28	12.33±4.63	14.00±4.82	27.00±11.40*
Lymphocyte (%)	80.67±9.07	84.00±11.81	82.80±4.66	82.60±8.88	81.83±7.55	86.67±4.13	85.17±5.12	72.00±11.68
Monocyte (%)	0.33±0.82	0.20±0.45	0.00±0.00	0.40±0.50	0.33±0.52	0.17±0.41	0.17±0.41	0.60±0.89
Eosinophil (%)	0.67±0.53	0.20±0.45	1.00±1.00	0.60±0.89	1.17±2.04	0.83±0.98	0.67±1.21	0.40±0.55
Basophil (%)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
APTT (sec)	22.50±11.98	21.00±5.61	16.80±12.52	31.40±3.97*	22.33±3.88	31.25±16.84	28.20±14.18	31.75±7.85
PT (sec)	13.12±0.34	13.46±1.45	14.26±0.74	16.40±3.64	13.47±0.56	14.03±1.02	16.88±7.91	14.48±1.13

^{a)}Values were expressed as mean±S.D.

*Significantly different from control at p < 0.05.

WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; APTT, activated partial thromboplastin time; PT, prothrombin time.

Table 3. Serum biochemical values of SD rats orally treated with test materials

Parameter	Male				Female				
	\Group	Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
	\Dose (mg/kg/day)	0	0.1	1	10	0	0.1	1	10
\No. of rat	5	5	5	5	5	5	5	5	
T3(RIA) (ng/dl)	112.213±11.576 ^{a)}	107.345±11.754	123.847±29.668	75.156±28.063*	111.704±10.644	106.283±7.215	133.678±40.356	87.939±21.472	
T4(RIA) (µg/dl)	4.093±0.649	3.752±0.517	3.364±1.168	0.093±0.166*	4.190±0.483	3.647±0.994	3.244±1.480	1.411±1.836*	
TSH(RIA) (uIU/ml)	0.018±0.019	0.029±0.024	0.057±0.078	0.027±0.025	0.020±0.017	0.011±0.003	0.010±0.000	0.038±0.014*	
Total protein (g/dl)	6.61±0.33	6.69±0.21	6.94±0.25	7.31±0.26*	6.56±0.16	6.99±0.44	6.68±0.35	7.02±0.40	
Albumin (g/dl)	4.13±0.94	4.12±0.07	4.25±0.08	4.30±0.21	4.24±0.12	4.30±0.30	4.25±0.17	4.68±0.17*	
Glucose (mg/dl)	116.17±15.11	137.40±7.73	127.33±13.81	129.00±12.08	126.50±26.99	120.67±17.35	145.75±33.08	117.40±22.92	
GOT (IU/l)	154.00±15.19	168.40±25.89	156.00±53.50	118.60±7.77	150.50±35.53	197.50±87.18	137.75±29.25	185.00±19.66	
GPT (IU/l)	43.67±5.32	40.20±8.87	41.83±8.13	49.00±11.51	28.50±4.14	39.83±12.21	33.00±9.49	42.60±13.13	
ALP (IU/l)	462.67±92.94	407.20±86.33	429.33±110.95	386.60±62.98	449.50±177.54	437.33±90.35	324.25±119.99	491.60±124.43	
T. Chol (mg/dl)	82.50±8.46	81.80±6.34	82.67±5.24	103.20±14.27*	62.67±14.33	65.67±17.15	60.00±12.78	68.00±13.06	
BUN (mg/dl)	16.89±2.74	14.90±3.12	13.97±2.20	19.62±1.78	16.65±3.58	16.67±2.65	20.48±1.31	25.10±5.42*	
Creatinine (mg/dl)	0.55±0.05	0.50±0.12	0.48±0.08	0.56±0.09	0.52±0.04	0.52±0.12	0.58±0.05	0.50±0.07	
Na (mEq/l)	139.50±1.38	139.00±0.71	138.50±0.55	140.60±1.34	137.17±1.83	137.33±1.86	135.75±0.50	138.20±3.11	
K (mEq/l)	4.87±0.48	4.36±0.29*	4.80±0.38	5.32±0.28	5.77±1.41	6.10±2.11	5.38±0.51	5.60±1.61	
Cl (mEq/l)	100.50±1.05	100.40±0.89	100.33±0.52	101.60±1.95	100.50±1.05	101.33±1.21	99.25±0.96	102.80±2.28*	
Ca (mg/dl)	10.40±0.32	10.38±0.50	10.17±0.38	10.44±0.40	9.97±0.15	9.42±1.29	9.65±0.31	10.34±0.65	

^{a)}Values were expressed as mean±S.D.

*Significantly different from control at $p < 0.05$.

T3, 3,5,3'-triiodothyronine; T4, thyroxine; TSH, thyroid stimulating hormone; GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase; ALP, alkaline phosphatase; T. chol, total cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; Ca, calcium.

Table 4. Absolute organ weights in SD rats orally treated with test materials

Parameter	Male				Female				
	\Group	Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
	\Dose (mg/kg/day)	0	0.1	1	10	0	0.1	1	10
\No. of rat	5	5	5	5	5	5	5	5	
Body Weight	336.90±17.23 ^{a)}	333.72±18.46	339.05±27.38	280.37±87.61*	221.03±9.84	223.32±31.94	222.67±22.03	201.68±26.47	
Brain	1.91±0.09	2.02±0.10	2.07±0.10	1.76±0.60	1.88±0.07	1.87±0.17	1.87±0.06	1.75±0.10	
Hypophysis	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	
Thymus	0.82±0.24	0.46±0.13*	0.74±0.09	0.49±0.26*	0.41±0.08	0.46±0.14	0.37±0.08	0.27±0.10*	
Lung	2.09±0.16	1.76±0.13*	2.25±0.28	1.80±0.64*	1.57±0.25	1.41±0.11	1.42±0.18	1.44±0.14	
Heart	1.13±0.07	1.11±0.09	1.13±0.17	0.90±0.32*	0.83±0.06	0.78±0.10	0.75±0.10	0.62±0.10*	
Liver	11.34±1.26	10.72±2.00	11.59±1.01	8.90±3.38*	7.71±0.89	7.33±1.16	6.96±0.67	6.39±0.95	
Spleen	0.83±0.05	0.76±0.13	0.79±0.10	0.59±0.24*	0.60±0.07	0.68±0.19	0.55±0.11	0.49±0.11	
Kidney left	1.20±0.14	1.15±0.20	1.22±0.07	0.92±0.35*	0.74±0.04	0.67±0.09	0.72±0.09	0.60±0.13	
Kidney right	1.16±0.07	1.13±0.20	1.21±0.08	0.92±0.35*	0.70±0.07	0.64±0.11	0.73±0.08	0.61±0.10	
Adrenal gland left	0.02±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01	0.04±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01	
Adrenal gland right	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01	0.04±0.02	0.04±0.01	0.03±0.01	
Testis (ovary) left	1.60±0.09	1.65±0.20	1.70±0.12	1.49±0.43	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.02	0.06±0.01	
Testis (ovary) right	1.68±0.24	1.66±0.20	1.71±0.16	1.52±0.43	0.06±0.02	0.07±0.02	0.07±0.03	0.06±0.02	
Epididymis left	0.48±0.04	0.44±0.06	0.45±0.03	0.41±0.12					
Epididymis right	0.48±0.04	0.45±0.06	0.45±0.03	0.41±0.12					
Prostate (Uterus)	1.73±0.01	1.32±0.01	1.64±0.01	1.55±0.01	0.41±0.07	0.36±0.05	0.41±0.07	0.45±0.09	

^{a)}Values were expressed as mean±S.D.

*Significantly different from control at $p < 0.05$.

량은 thymus와 heart가 대조군에 비해 유의적으로 감소했다(Table 4). 상대장기중량의 경우 수컷 저용량군에서 thymus와 lung이 대조군에 비해 유의적으로 감소했으나 이는 시험물질과는 무관한 우발적 소견으로 판단된다. 수

컷 고용량군은 thymus, liver, spleen, left kidney 및 right kidney가 대조군에 비해 유의적으로 감소했으며, hypophysis, left testis 및 right epididymis는 대조군에 비해 유의적으로 증가했다. 암컷 고용량군의 thymus는 대조군에

Table 5. Relative organ weights in SD rats orally treated with test materials

Parameter	Male				Female				
	Group	Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
	Dose (mg/kg/day)	0	0.1	1	10	0	0.1	1	10
	No. of rat	5	5	5	5	5	5	5	5
Brain		0.57±0.03 ^{a)}	0.61±0.03	0.61±0.04	0.59±0.19	0.85±0.05	0.85±0.07	0.85±0.06	0.87±0.07
Hypophysis		0.30±0.01	0.30±0.02	0.30±0.03	0.38±0.04*	0.60±0.36	0.54±0.26	0.45±0.05	0.61±0.26
Thymus		0.24±0.08	0.14±0.04*	0.22±0.02	0.16±0.07*	0.18±0.04	0.21±0.05	0.17±0.03	0.13±0.03*
Lung		0.62±0.04	0.53±0.04*	0.66±0.06	0.59±0.18	0.71±0.13	0.64±0.09	0.64±0.12	0.72±0.11
Heart		0.34±0.02	0.33±0.02	0.33±0.03	0.29±0.09	0.38±0.04	0.35±0.04	0.34±0.03	0.31±0.04
Liver		3.36±0.24	3.23±0.66	3.43±0.33	2.91±0.89*	3.49±0.38	3.28±0.12	3.14±0.23	3.17±0.23
Spleen		0.25±0.01	0.23±0.04	0.23±0.04	0.19±0.06*	0.27±0.03	0.30±0.06	0.25±0.06	0.25±0.05
Kidney left		0.36±0.03	0.35±0.07	0.36±0.03	0.30±0.09*	0.34±0.02	0.31±0.05	0.32±0.04	0.30±0.06
Kidney right		0.34±0.01	0.34±0.07	0.36±0.03	0.30±0.09*	0.32±0.03	0.29±0.06	0.33±0.04	0.31±0.05
Adrenal gland left		0.69±0.23	0.78±0.36	0.69±0.34	0.50±0.18	1.44±0.47	1.67±0.97	1.19±0.31	1.78±0.58
Adrenal gland right		0.64±0.35	0.72±0.27	0.69±0.30	0.62±0.26	1.58±0.25	1.63±1.20	1.12±0.22	1.71±0.52
Testis (ovary) left		0.47±0.02	0.50±0.08	0.50±0.02	0.50±0.16*	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00
Testis (ovary) right		0.50±0.08	0.50±0.08	0.50±0.03	0.51±0.16	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
Epididymis left		0.14±0.01	0.13±0.02	0.13±0.01	0.14±0.04				
Epididymis right		0.14±0.02	0.13±0.02	0.13±0.01	0.14±0.04*				
Prostate (Uterus)		0.52±0.13	0.40±0.15	0.49±0.07	0.53±0.19	21.65±4.12	19.45±3.52	21.76±4.02	26.02±6.18

^{a)}Values were expressed as mean±S.D.

*Significantly different from control at p < 0.05.

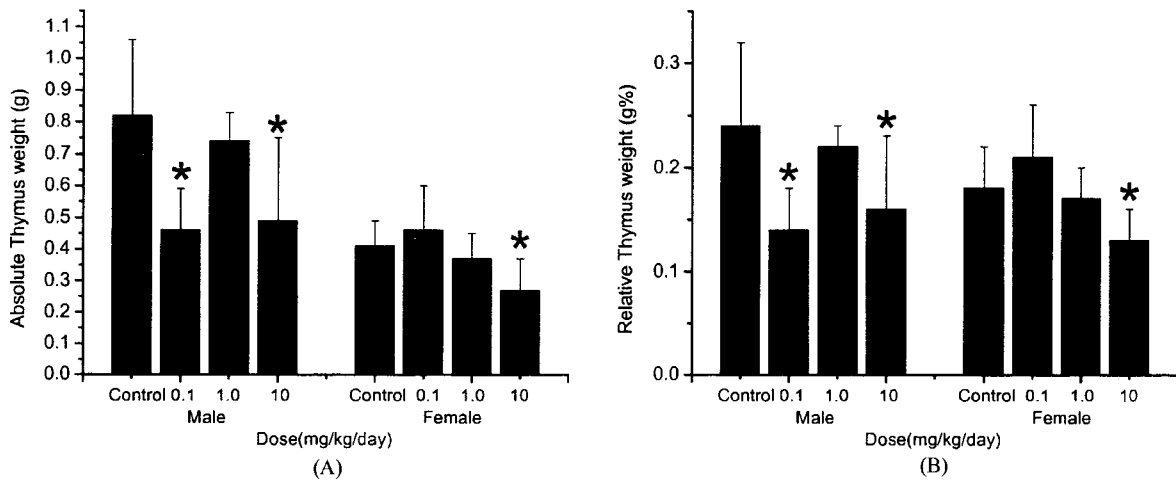


Fig. 6. (A) Absolute organ weights of Thymus and (B) relative organ weights of Thymus orally treated with test materials. Each point represents the mean±S.D.; * : Significantly different from control at p < 0.05.

비해 유의적으로 감소했다(Table 5 and Fig. 6).

6. 병리조직학적 검사

병리조직학적 검사 결과 PTU 투여군에서 용량 의존적으로 thyroid follicular cell의 hypertrophy와 hyperplasia가 관찰되었다(Fig. 7). 고용량의 경우 follicle들이 내강내로 함입되어 papillary와 lumen size가 감소되었다. 그리고 basophilic 또는 colloid lack이 약간 관찰되었다(Fig. 8).

Parafollicular cells의 경우 어떤 조직학적 변화도 보이지 않았다. Follicular cell의 변화에는 성별 차이가 없었으며 thyroid gland를 제외한 다른 장기에서는 특이할만한 조직학적 변화가 없었다.

7. 정자의 형태학적 이상, 활성, 수 측정

대조군 및 투여군 모두에서 유의할 만한 이상이 발견되지 않았다(Table 6).

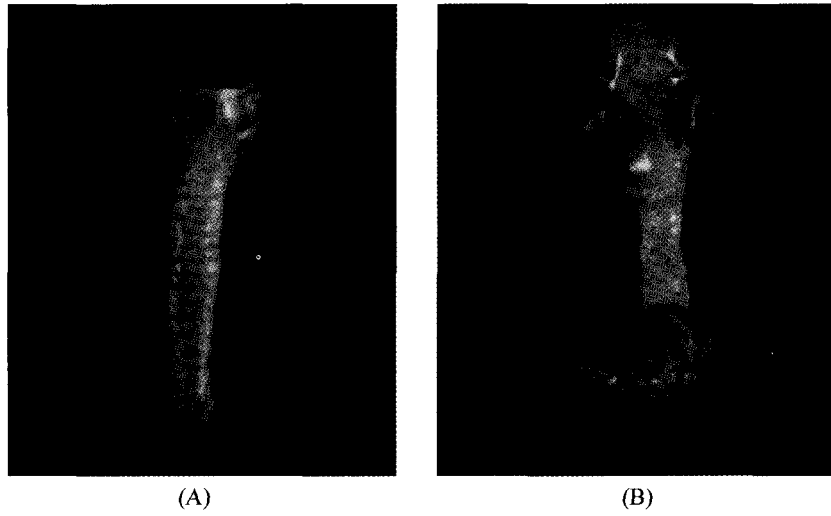


Fig. 7. Thyroid glands of female control group (A) and female PTU 10 mg/kg/day-treated group (B).

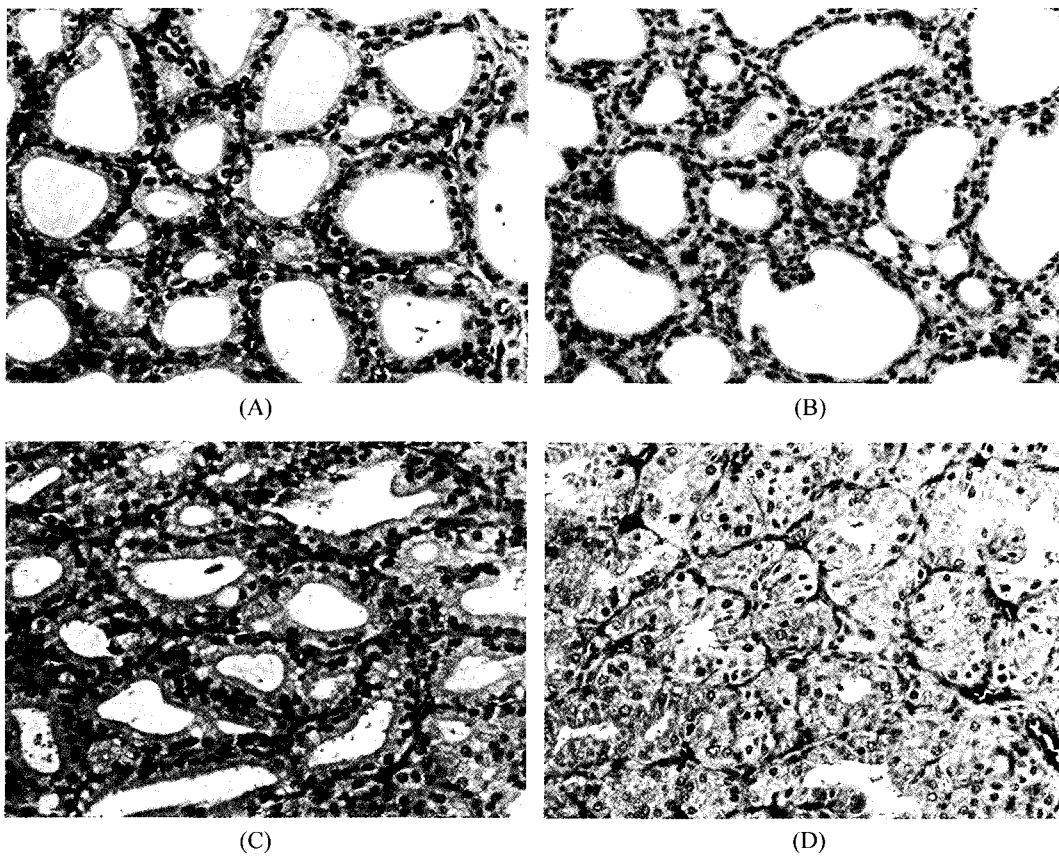


Fig. 8. Thyroid glands of female control group (A), female PTU 0.1 mg/kg/day-treated group (B), female PTU 1 mg/kg/day-treated group (C) and female PTU 10 mg/kg/day-treated group (D); * : Significantly different from control at $p < 0.05$.

IV. 고 찰

기존의 Test GuideLine 407에 갑상선 호르몬수치 정량과 정자의 수와 형태, 발정 휴지기 암컷 부검 등의 실험

방법을 첨가하여 TG 407의 민감도와 신뢰성을 강화하기 위한 OECD project에 따라, propylthiouracil의 투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 암·수 SD rats에 저용량(0.1 mg/kg/day), 중간용량(1 mg/kg/day), 고용량(10 mg/kg/day)

Table 6. Individual sperm examinations of Male rats orally treated with test materials

Variable	\Group	Control	Middle	Low	High
	\Dose (mg/kg/day)	0	0.1	1	10
	\No of rat	5	5	5	5
Weight	Testis	1.55±0.23 ^{a)}	1.54±0.18	1.55±0.14	1.42±0.11
	Caudal Epididymidis	0.19±0.03	0.16±0.03	0.16±0.02	0.18±0.02
No. of sperms (×10 ⁶)	Testis	229.32±39.52	231.24±30.84	233.58±17.48	269.92±47.96
	Epididymis	18007±4207	19313±840	17670±2153	19912±2977
No. of mobile sperms (/100)		47.25±14.96	46.80±5.39	42.25±4.59	46.33±4.67
Motility score		2.92±0.38	2.50±0.50	2.33±0.41	2.50±0.32
No. of teratosperms (/100)		3.25±0.94	3.20±0.76	4.00±1.26	3.83±1.33
Daily sperm production (×10 ⁶)		37.58±6.48	37.92±5.09	38.28±2.88	44.25±7.86

^{a)}Values were expressed as mean±S.D.

을 1일 1회, 주 7회, 28일간 경구 반복 투여하고 다음의 결과를 얻었다. 시험 기간 중 사망한 동물이나 임상 증상의 이상을 보이는 동물은 없었지만, 체중 변화, 사료 및 음수 섭취량에서 용량 의존적인 변화를 관찰할 수 있었다. 혈액, 혈청생화학적 검사에서도 여러 가지 유의적 변화가 나타났으며 특히 고용량군에서 T3, T4치가 대조군에 비해 유의적으로 낮게 관찰되었다. 고용량의 경우 흉선과 신장의 장기 중량은 수컷과 암컷 모두에서 유의적인 감소가 나타났다. 그리고 투여군에서 갑상선의 크기 증가가 관찰되었다. 병리조직학적 검사에서는 모든 처치군에서 thyroid

follicular cell의 증식과 비대가 용량 의존적으로 관찰되었다. 또한, follicle들이 내강내로 함입하여 papillary 형성과 내강의 크기 감소되었다. 그러나, parafollicular cell 등의 다른 장기에서는 어떤 조직학적 변화도 보이지 않았다. 정자의 수와 형태 그리고 발정 주기 관찰에서는 투여군과 대조군 사이에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

시상하부에서 TRF(thyrotropin-releasing factor)이 분비되면 뇌하수체에서 TSH 또는 thyrotropin이 방출되고 이는 갑상선에 있는 follicular cell을 자극하여 순환 혈액 중의 iodine을 trapping하게 한다. Trapping된 iodine이 과산

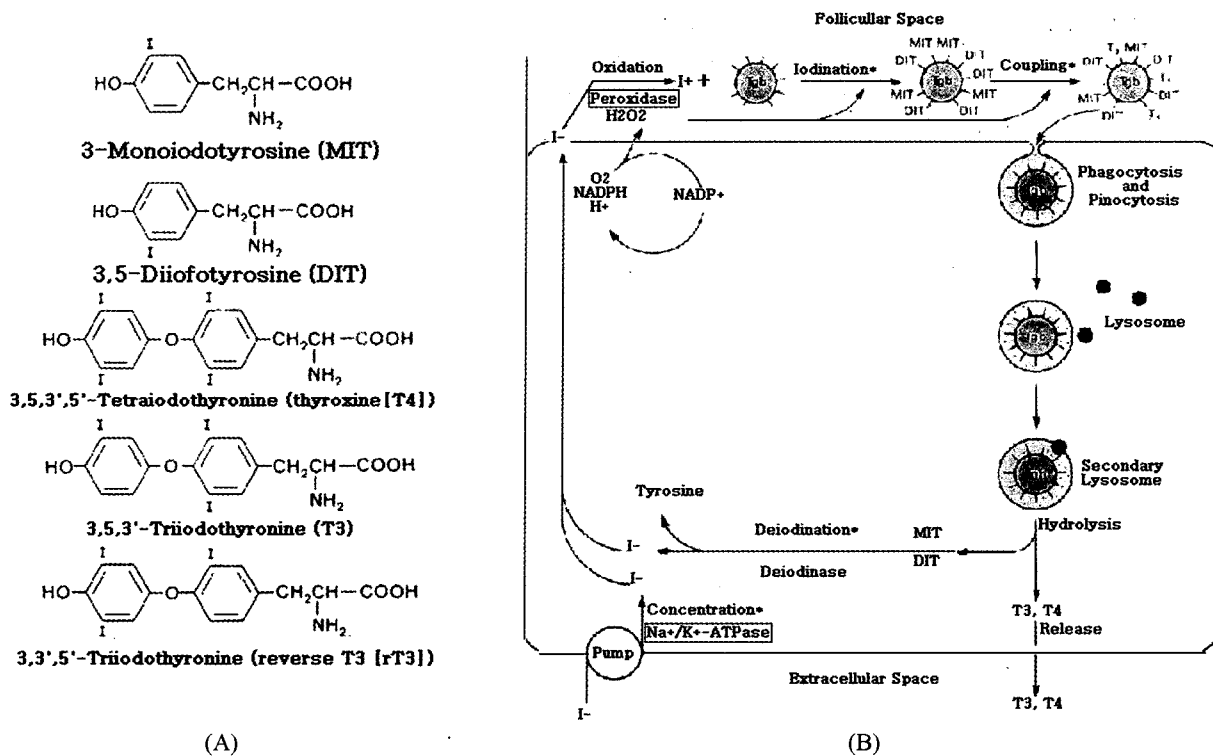


Fig. 9. Thyroid Hormones. (A) structure of thyroid hormones and related compounds, (B) Model of iodide metabolism in the thyroid follicle. Tgb, thyroglobulin; MIT, monoiodotyrosine; DIT, diiodotyrosine; T3, triiodothyronine; T4, tetraiodotyrosine.

화효소에 의해 산화되면 active free iodine radical이 되고 이것이 thyglobulin과 결합하여 MIT(monoiodotyrosine) 또는 DIT(diiodotyrosine)를 형성한다. DIT 두 개가 결합하면 비활성형 또는 수송형인 T4가 되고, MIT와 DIT가 결합하면 활성형인 T3이 된다. 이 특징적인 갑상선 호르몬들은 여러 가지 세포 반응에 작용한다. 실제 분비되는 호르몬의 90%는 비활성형인 T4이고 10%는 활성형인 T3이다. T4는 표적 세포에 도달한 후 탈이온화되어 비활성형인 rT3(reverse T3)와 활성형인 T3로 변하여 표적 장기에 작용한다(Murray 등, 1996). 이 때, PTU는 말초 조직에서 thyroid iodine의 산화와 organification을 억제하고, T4가 T3으로 전환하지 못하게 한다(Fig. 9). 본 실험에서도 T3과 T4치의 감소가 나타났으며 이는 Freudenthal 등(1978)의 PTU 경구 투여 실험과 같은 결과였다. 갑상선의 크기가 증가한 것은 T3과 T4 등의 TH치의 감소가 일어나자 보상성으로 TSH치가 증가됨에 따라 생긴 변화라고 생각된다. 그러나, 본 실험에서는 Marty 등(1999)의 결과와 다르게 PTU가 정자 형성 과정이나 발정 주기 등에는 아무 영향을 끼치지 않는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 실험 용량의 차이 또는 투여 방법의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

OECD TG 407 protocol의 강화를 위해 PTU를 랫드에 4주간 경구 투여하여 아급성 독성 시험을 한 결과, T3과 T4 등 갑상선 호르몬수치의 감소와 보상성 갑상선 크기 증가가 특징적으로 나타났으나, 생식 계통과 기타 장기 등에는 별다른 영향을 끼치지 않은 것으로 밝혀졌다. 이번 실험에서는 기존의 TG 407에 추가적으로 실시한 갑상선 호르몬수치 측정에서 유의할만한 결과가 나왔으며, 이는 OECD의 강화된 TG 407이 PTU와 같은 내분비계 장애 물질들을 검색하는데 좀 더 민감하고 신뢰도 높은 방법으로 사용될 수 있는 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 환경부에서 주관하는 OECD TG407 과제의 연구비와 Brain Korea 21 사업지원에 의해 진행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

정문구, 김종춘, 임광현, 하창수 (2000): 내분비계 장애물질 검색법의 확립을 위한 항안드로젠성 물질 flutamide의 랫드 28일 반복투여 독성시험, *J. Toxicol. Pub. Health*, **16**(2), 163-172.

- Duarte, C.G., Santos, G.L., Calerio, A.E., Azzolini, E. and Assis Pandochi, A.I. (2000): The effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the alternative pathway of complement in rats, *Int. J. of Immunopharmacol.*, **22**, 25-33.
- Elder, D.A., Karayal, A.F., D'Ercole, A.F. and Calikoglu, A.S. (2000): Effects of hypothyroidism on insulin-like growth factor-1 expression during brain development in mice, *Neurosci. Lett.*, **293**, 99-102.
- Freudenthal, R.I., Kerchner, G., Persing, R. and Baron, R.L. (1978): Dietary subacute toxicity of ethylene thiourea in the laboratory rat, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, Sep.-Oct., **1**(1), 147-161.
- Kariya K., Dawson, E. and Neal, R.A. (1983): Toxic effects of propylthiouracil in the rat, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, May, **40**(2), 333-336.
- Marty, M.S., Crissman, J.W. and Carney, E.W. (1999): Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 β -estradiol, steroid biosynthesis inhibitors and a thyroid inhibitor, *Toxicol. Sci.*, Dec., **52**(2), 269-277.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.W. (1996): Thyroid hormone. In: Harper's Biochemistry, edited by Appleton & Lange, Connecticut, 533-538.
- Nishikawa, Y. (1972): Microscopic observation of sperm; in mammalian sperm, Iida, I. et al., eds., Gakusosya, Tokyo, 203-208.
- Seely, E.W. and Williams, G.H. (1990): Gastrointestinal manifestations of endocrine disease. In: Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism, edited by K. L. Becker. Philadelphia, PA: Lippincott, 1503-1506.
- Seely, E.W. and Williams G.H. (1990): The cardiovascular system and endocrine disease. In: Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism, edited by K. L. Becker. Philadelphia, PA: JB Lippincott, 1496-1501.
- Vassart, G., Dumont, J.E. and Refetoff, S. (1995): Thyroid disorders, in: C.R. Scriver, A.R. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle (Eds.), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, McGraw-Hill, New York, 2883-2928.
- Yamada, T., Inoue, T., Sato, A., Yamagishi, K. and Sato, M. (1995): Effects of short-term administration of alpha-chlorohydrin on reproductive toxicity parameters in male Sprague-Dawley rats, *J. Toxicol. Sci.*, Aug, **20**(3), 195-205.
- Yoshida, M. and Nakazono, N. (1995): Effect of ingestion of 6-propyl-2-thiouracil on biochemical indices of selenium status in rats, *J. Toxicol. Sci.*, Feb, **20**(1), 23-28.