

# Chick Embryo를 이용한 식품첨가물의 기형독성시험

이 영 순

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

## Teratogenicity Test of Food Additives Using Chick Embryo

Yong-Soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University,

Suwon 170, Korea

독성시험법은 산업의 발달과 농업의 과학화에 따르는 환경오염이 심각해짐에 따라 더욱 더 주목을 끌면서 개발되어 왔다. 특히, 실험동물의 태자에 영향을 주어 기형을 유발시킬 수 있는 물질에 대한 screening test의 필요성은 thalidomide에 의한 신생아의 기형발생사건 이후 고조되었다 하겠다.

이러한 일련의 기형시험의 방법은 태자의 기관형성기에 투여하는 형태를 취하게 되는데, 계태아를 이용한 기형시험법은 적어도 다음과 같은 이유로 해서 최근 널리 소개, 이용되고 있다<sup>1)</sup>: ① 이용이 편리하다; ② 적은 비용으로 많은 수의 공시동물을 이용할 수 있다; ③ 광범위한 화학적, 물리적 요인에 감수성이 높다; ④ 형태학적 발육이 포유동물의 경우와 유사하다.

그러나 계태아를 이용한 시험결과와는 다른 실험동물에서보다 다소 차가 있을 수 있다는 단점이 있다. 투여시간과 경로, 발육의 정도, 실험자의 기술, 관찰·분석의 방법등에 따라 차를 보일 수 있으며, 또 계란의 영양상태, 시험물질의 특성과 형태·분포와 대사특성 등에 의한 다소의 차이가 발생할 수 있으므로 이러한 사항들을 고려하여 알맞은 실험방법을 선택해야 할 것이며 그에 따르는 충분한 기술의 습득이 요망된다.

이러한 이유로 인하여 아직 적당한 protocol이 마련되어 있지 못한 실정이다.

### 1. 시설과 기구

1) 부란기: 온도, 상대습도, 공기순환 등을 조절할 수 있는 것으로 난좌를 회전시키는 교반기가 설치되어 있어야 한다.

2) 검란장소와 기구: 적당한 환기가 가능한 암실이 필수적이다. 적당한 높이의 벤치(1.2m 정도)와 난좌에 구멍을 낼 수 있는 펀치나 드릴(hand-held dental drill 등은 매우 좋음), 전원과 검란 등(candling lamp)이 필요하다.

3) 집종장소와 기구: 실험대와 기구차를 둘 수 있는 공간을 가진 작은 방이면 족하다. Reflectors가 달린 UV-light는 방의 대기를 정화하는데 좋다.

### 2. 계란의 선택

1) 구입: SPF egg를 사용하는 것이 좋다. SPF가 아니더라도 수정율과 부화율이 90% 이상으로 일정한 중계장에서 구입해도 큰 문제는 없다. 이 경우에는 잠복해 있는 독성을 일으킬 수 있는 요인들(virus, 환경요인 등)을 알아두어야 하는데, 독성의 종류와 발생빈도가 극히 낮은 곳이어야 한다. 일반적으로 관리가 철저한 중계장의 경우 검란시 폐기율은 10% 이하이다. 현재 우리나라에서는 수년전부터 SPF egg가 생산되고 있으므로 그것을 사용하면 문제는 없을 것이라고 생각된다(천호 SPF 가금농장).

품종은 White Leghorn이나 Rhode Island가 많이 이용되고 있는데, 구입시 대형란, 소형란, 기형란은 대충 골라낸다. 평균무게 50~65g(52~63g) 정도의 것을 실험에 사용하도록 한다. 실험실로 운반할 때의 온도는 15°C 정도가 좋다.

Received for publication 4 March; 1987  
Reprint requests; Dr. Y.S. Lee at the above address

일반적으로 유의성을 인정하기 위해서는 군당 100 개 정도의 수정란이 필요하다.

**2)검란 :** 부란전에 검란하여 금이 간 것, 석회 침착이 불완전한 난각을 가진 것, 기실이 움직이는 것, 기실의 위치가 전이된 것, 혈괴가 있는 것, 무정란, 사란 등을 골라낸다. 부란중에도 매일 검란하여 부정란, 사란, 죽어가는 란을 골라내야 하는데 건강한 계태아는 혈관내 혈류로 인해 orange-yellow 색을 띤다. 반면, 죽어가는 란 또는 사란은 혈관분포가 줄어들어 선명하지 못하거나 완전히 사라진 경우도 많다. 초기 사망 태아는 전체적으로 선명한 황색을 띠며, 불분명한 난황의 한계(24~48시간), 흑색반(태아, 8~32시간)이나 선명한 반(양막낭, 32~60시간)의 결여 등을 볼 수 있다. 충분히 자란 경우에 사망하면 운동성이 결여되므로 쉽게 구별된다. 또한 virus 등의 오염으로 사망한 경우는 녹변 또는 흑변을 볼 수 있다.

**3)발육계란의 해부학적 구조 :** Fig.1은 입란전의 정상적인 계란의 해부학적 구조이며, Fig.2는 발육란의 해부학적 구조이다. 태아가 안에 자라고

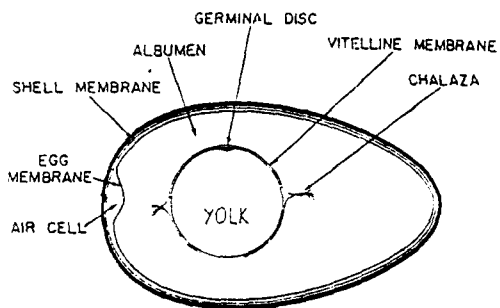


Fig.1. Diagram of normal egg.

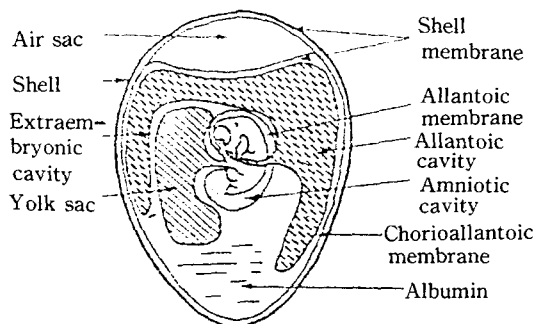


Fig.2. Diagram of embryonating egg.

있는 란을 발육란이라 한다. 이들은 3 일령 수정란, 5 일령 수정란 등으로 불리는데, 성계가 알을 낳았을 때부터 말하는 것이 아니라 부란기에 넣은 후의 날짜를 말한다. 즉, 부란기에 넣기 전에는 어미체내에서의 발육이 계속되지 않고 정지되어 있는 상태인 것이다.

① 난각 및 난각막(shell and shell membrane) —난각을 forceps 등으로 깨어 부드럽게 들어내면 난각에 아주 밀착되어 있는 막을 발견하게 되는데, 이것이 난각막이다. 이것은 자세히 관찰하지 않으면 보기 힘든데, forceps 등으로 난각의 내면을 긁어 보면 확실히 알 수 있다.

난각은 교환시스템으로서의 기능을 하는 몇가지 기구중의 하나이다. 난각을 통하여 가스나 액체분자들이 출입한다. 이것이 바로 부란시 적당한 환기와 습도가 필요한 이유이다. 만일 너무 낮은 습도에서 부란된다면 수분을 잃어 내용물이 탈수되어 죽게 될 것이며, 너무 높은 습도에서는 계태아가 요구수에 익사하게 될 것이다. 환기에 대해서도 마찬가지이다. 만일 부란기내 너무 밀집배열한 다거나, 구멍이 없는 난좌를 사용한다면 환기부족으로 높은 계태아 사망의 원인이 될 것이다.

② 기실(air cell)—정상적으로 형성된 계란은 둥근 선단(rounded end)과 뾰족한 선단(pointed end)을 갖는다. 둥근쪽의 난각막 아래 빈 공간이 기실이다. 계란의 내용물은 여러 층의 강한 막에 의해 기실로부터 분리되어 있다. 이 기실은 호흡과 압력조절의 기능을 한다.

③ 요맥락막(chorioallantoic membrane, CAM) 및 요맥락막낭(CAS)—발육태아의 후장 유래의 낭상구조로 용성, 불용성 가스 배설물을 제거하는 기능을 한다. 태아가 발육함에 따라 이 낭역시 커지면서 이중막의 우산형태로 배아를 둘러싼다. 이 낭내의 액체를 요맥락막수(CAF)라 하며, 간단히 AIF 라고도 부른다. 접촉시 CAS 접촉은 CAF로 들어가게 하는 방법이나 CAM 접촉은 CAS 밖의 막에 도달하게 하는 방법이다.

④ 난황 및 난황낭(yolk sac)—난황낭은 난황 내용물을 완전히 둘러싼다. 태아가 성장함에 따라 난황 내용물은 점차 감소하여 부화전 3 일에는 직경 1cm 정도에 이른다. 이 단계에서 태아는 복부의 일부만을 남기고 난의 대부분을 채우게 된다.

부란전 1 일에 태아의 복부가 닫히면서 남아 있던 난황은 소화관내로 흡수되어 버린다.

⑤ 양막낭(AMS)—매우 얇은 막구조로 4~9일령 태아에서 가장 관찰이 용이하다. 이것은 투명하고 맑으며, 액체로 가득찬 dome 형으로 발육태아위로 뻗쳐있다. 실제로 CAS와 yolk sac 이 부착된 부위를 제외하고는 태아 전체를 둘러싸고 있다. 이 막과 내용물(양수)은 태아를 물리적 충격으로부터 보호하며 물질교환의 영역으로서의 기능을 한다.

태아가 발육함에 따라 이 막은 그 크기를 수용하기에 위해 늘어나며 물리적 운동에 대한 완충기로서의 역할은 점차 줄어들게 된다. 태아가 성숙함에 따라 얇게 늘어나며 완전히 발육한 태아를 싸고 있을 때는 간신히 보이는 정도이다.

### 3. 부란조건과 영향인자

부란좌에 둥근 선단이 위로 향하도록 입란한다.

정상적인 부란조건하에서도 전 발육기간을 통하여 어느 정도의 태아사망이 있게 마련인데, 발육 3~4일째(1st critical period)와 19~20일째(last critical period)에 집중되어 발생한다<sup>2,3)</sup>. 이 시기에서의 사망율은 각각 3~4%, 4~15% 정도이다<sup>3,4)</sup>. 또, 여러가지 복합적인 요인들보다도 특히 O<sub>2</sub>와 CO<sub>2</sub>의 농도이상, 영양결핍 등에 기인하는 middle(3rd.) critical period 가 발육 13~14일쯤에 나타난다. 이러한 peaks는 다른 조류에서도 닭과 비교되는 같은 시기에 비슷하게 나타난다고 한다<sup>5)</sup>. 따라서 각 조류에서 비슷한 요인들이 작용할 것으로 믿어진다. 위의 critical periods 이외의 나머지 기간에서의 사망율은 일평균 1% 이하이다.

1) 온도 : 가장 치명적인 영향을 미치는 요인이다.

배엽 발육이 정지되는 생리학적 정지온도(physiological zero)는 약 27°C이며<sup>6)</sup> 상한선은 약 41°C이다. 이 상한선을 초과하는 경우에는 세포가 사망한다.

계란이 부화할 수 있는 범위는 60%의 상대습도가 유지되는 경우 35.5~39.5°C이다<sup>7)</sup>. 그러나 태아 발육의 최적온도는 37.8°C(100°F, 상대습도

61%)이며, 이 점에서 멀어질수록 사망율과 기형 발생율이 증가하게 된다<sup>8,9)</sup>. 태아자체의 온도조절 기구가 6~12일경 발달하기 시작하기 때문에 그 이후의 고온은 매우 위험하다. 고온에서의 기형발생은 잘 알려져 있는데, 39.4°C 이상에서 90% 이상의 중추신경이상 발현에<sup>10)</sup>와 40°C 이상에서 심맥관계이상의 발현에<sup>9)</sup>를 들 수 있다. 이러한 기형의 발생은 난황 소화지연, 난백의 불완전 흡수, 요막수의 감소등에 기인한다고 한다<sup>8,11)</sup>. 온도에 따른 사망율을 보면 36.5°C에서 33.9%, 37.5°C에서 31.7%, 38.5°C에서 72.7%, 그리고 40.5°C 이상과 35.5°C 이하에서 100%를 나타내며 고온에서 더 민감하다는 보고가 있다<sup>7)</sup>.

2) 습도 : 발육한계내에서 습도와 온도 사이에는 역관계가 있다. 최적 상대습도는 37.8°C가 유지되는 경우 61% 정도(38°C에서 60%)이다. 습도가 너무 낮은 경우 수분의 상실로 난각으로부터의 칼슘 섭취가 줄어들며 성장지연을 보이고, 부화시 난각을 깨고 나오지 못한다. 또 습도가 너무 높을 경우 난황이 수양성으로 태아의 운동에 의해 쉽게 파열되며, 요막락막이 덜 건조하여 태아가 익사하게 된다<sup>12)</sup>.

3) 비중 : 비중 때문에 계란이 놓여진 방향에 따라 태아의 위치가 달라진다. 매일 4~5회 계란을 돌려줌으로써 태아와 난각의 유착을 막고 공기와의 접촉을 좋게 하여 부화율을 높일 수 있다.

만일 빠른 선단이 위로 향하도록 입란한다면 태아의 머리가 위로 오게 되어 부화시 부리가 기실로 들어가지 못하므로 산소부족으로 질식사하게 된다<sup>13)</sup>. 또 입란전이나 초기의 오랜 진동이나 충격은 이상이나 사망을 유발할 수 있다.

4) 환기 : 부란기내 fan을 가동하여 공기를 순환시켜 준다. 또, 공간이 많으면 계란을 간격을 두고 배치하여 공기와의 접촉을 좋게 하고 밑에 구멍이 나 있는 난좌를 사용하도록 한다. 구멍이 없는 난좌는 아랫부분의 호흡장애로 높은 사망율의 원인이 된다<sup>14)</sup>. 따라서 이 경우에는 두 시간마다 계란을 돌려주어야 하는 불편이 있다.

5) 공기의 조성 : 엄밀하게는 고려되고 있지 않으나 CO<sub>2</sub>의 농도에 대해서는 고려할 필요가 있다. 산소와 이산화탄소를 기준으로 할 때 21%의 O<sub>2</sub>와 0.5% 이하의 CO<sub>2</sub>농도가 적당하다<sup>8)</sup>. 입란

초기 산소과다는 1st critical period에서 높은 사망율의 원인이 되며<sup>15)</sup>, 전 기간에 있어 어느 시기의 이산화탄소과다(1.0% 이상)는 last critical period에서의 높은 사망율의 원인이 된다.

6) 영양결핍: 계란 자체내의 riboflavin, protein 등의 결핍은 기형과 사망의 원인이 된다. Riboflavin 결핍시는 일반적으로 맥관계, 골격계의 이상을 동반하는 왜소한 태아를 관찰할 수 있으며, 3 critical periods에서의 사망율이 높다<sup>16)</sup>. Protein 결핍의 경우는 middle critical period에서 높은 사망율을 보이며, micromelia, chondrodystrophy 등의 골격이상이가 높게 발생한다<sup>17)</sup>.

계란자체의 영양결핍은 성계로부터 이어받은 것으로 실험조건에 의해 보충될 수 없는 성질의 것이므로 계란 구입시 주의해야 한다.

7) 기타: 방사선, 입란시간<sup>18,19)</sup>, 성계의 연령<sup>20)</sup>, 계절<sup>21)</sup> 등에 의한 영향도 고려해야 한다.

#### 4. 용 매

용액상의 물질은 그대로 주입할 수도 있으나 보통은 D.W, propylene glycol, corn oil, ethanol, ethylene glycol 등으로 희석하여 사용하게 되는데, 이들 용매자체에 의한 이상 발생은 yolk sac 과 air cell 투여에서 무치치군의 <1.0%에 비해 <2.0% 정도라 한다<sup>22)</sup>. 한편 McLaughlin<sup>23)</sup>은 yolk sac 투여에서 D.W, propylene glycol, corn oil, peanut oil, isotonic saline, isotonic glucose solution 등은 자체독성이 거의 없다고 하였다. 단, 식품첨가물등 상품으로 사용되는 물질은 formula대로 주사용액을 만드는 쪽을 택한다.

시험물질의 성상에 따라 용매의 선택에 신중을 기해야 한다. 여기에는 비중, 용해도, 응고효과, pH, 그리고 이온농도 등이 있다. 용해도는 매우 중요한 요인으로 계태아가 대상물질을 이용하는데는 부분적으로 용해도에 의존하기 때문이다. 불용성의 화학물질은 부유물 입자의 크기도 고려해야 한다. 이러한 물질은 유화상태의 난황내 주입경로가 권장된다. 독작용을 보이기 위해서는 화학물질이 직접 또는 간접적으로 혈류를 통해 태아와 접촉하여야 한다. Lower aliphatic alcohols와 같은 물질은 단백질응고 효과가 있어 난황영양소나 화학

물질의 이용도가 감소된다. 화학물질의 비중이 높은 경우에는 계란의 하부로 가라앉아 저독성을 보일 수가 있다. 강산이나 강알칼리물질은 태아의 산-염기 평형을 방해한다. 유사한 이유로 이온농도도 중요시된다. 결과적으로 난황 등에 들어간 화학물질은 그 자체가 비타민이나 미네랄 등을 파괴, 변형시키거나, 그들과 결합함으로써 특이한 형태의 독성을 일으키게 된다.

#### 5. 투여농도 및 용량

통상사용 농도와 TD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>를 고려하여 투여농도를 결정한다<sup>24,25,26,27)</sup>. 투여량은 각 경로에 따라 다소 차이가 있겠으나 일반적으로 50  $\mu$ l~100  $\mu$ l 정도라면 적당하다. Air cell이나 yolk sac 경로는 100  $\mu$ l 까지도 무난하겠으나 공간이 작은 양막낭, 요맥락막경로는 그 양을 최소로 할 필요가 있는데, 이는 주사액의 양에 의한 물리적 영향이 우려되기 때문이다.

#### 6. 투여시기

계태아는 입란개시부터 기관형성과 발육을 계속한다. 각 기관의 형성시기는 각기 다르기 때문에 시험물질에 의해 기대되는 독성의 성격과 표적기관, 그리고 투여경로에 따라서 투여시기가 결정되어야 할 것이다.

Yolk sac 경로를 예로 들면, 계태아의 기관형성이 가장 활발한 입란 4일 전후에 투여되는 경우가 많으나, 처음 72시간 동안의 계태아 발생이 계속적인 발생의 성공에 기초가 된다는 점과, 투여된 물질이 태아에 도달하여 최대 영향을 줄 수 있는 시간의 차가 있다는 점에서 가능하면 초기투여가 권장된다<sup>14)</sup>. 그러나 이러한 초기투여에는 어려움이 있고 혈관의 미발달로 시험물질이 태아에 도달하기까지의 시간이 더 길다.

심장의 형태발생은 입란 2~8일 사이에 이루어지며 8일 이후에는 비가역적이기 때문에 심장기형 유발물질은 8일 이전에 투여되어야 할 것이다<sup>28)</sup>.

유기인제 등 신경계에 영향을 주는 물질들은 입란 9일 이후 투여에서는 기형발생이나 신경계효

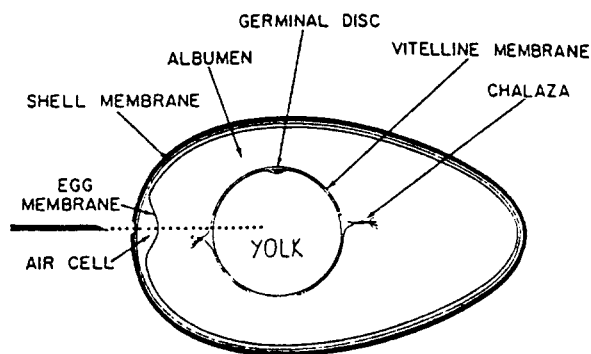


Fig.3. Diagram of egg and position for injection.

소의 활성저하에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 알려져 있다<sup>27,29,30,31</sup>).

### 7. 투여경로

오염을 막기 위해 투여는 무균상자내에서 하는 것이 바람직하다. Formaldehyde 증기(potassium permanganate 2g+37% formalin 50 ml)를 사용하여 혼증하며, 계란을 formalin에 30분간 노출시킨 후 투여한다. 이 formaldehyde 증기는 계란에 독성이 없으므로 안전하다<sup>23</sup>.

난각 소독에는 70% 알콜을 사용하며 난각에 구멍을 낸 후 미세입자를 제거할 목적으로 흡입기(aspirator)가 필요하다. 또, 주사후 scotch tape, paraffin, 또는 Elmer's glue 등으로 구멍을 막아 주는데 이때 많은 면적을 덮지 않도록 해야 한다.

투여전 검란하여 계태아의 위치를 확인하고 계란을 누운 상태로 그 장축에 따라 회전시켜 태아가 기실쪽에 가서 붙지 않도록 하면서 원하는 위치에 오도록 하고, 주사하고자 하는 부위의 난각에 연필로 표시를 한다. 검란후 5분 이내에 주사하도록 한다<sup>14</sup>.

투여경로는 매우 다양하다. 계란 전체를 용액내 담그는 방법<sup>32</sup>; 기실의 바로 아래 난각에 국소도 포하는 방법<sup>33,34</sup> 난각에 구멍을 내고 태아위의 배외막에 피펫 등으로 떨어뜨린단기<sup>35,36</sup>, 배외강내 주사한다든가<sup>37,38</sup>, 또는 태아아래 직접 주사하는 방법<sup>39,40</sup>; 그리고 난황내 주사하는 방법<sup>41,42,43</sup> 등이 많이 사용되어 왔다.

이들 각각의 방법에 대하여 구체적으로 설명해 두기로 한다<sup>44</sup>.

#### 1) 요막강(요맥락막낭)경로

① 계란을 검란하면서 태아와 양막강에서 먼쪽에 기실의 기저부 3mm 아래 큰 혈관이 없는 부위를 선택하여 집중하고자 하는 점에 연필로 표시를 해둔다.

② 기실위의 중앙에도 같은 표시를 하고 알콜 등으로 소독한다.

③ 두 점에 난각막을 다치지 않도록 구멍을 낸다.

④ 25 gauge, 7/8 inch 바늘을 사용하여 45° 로 약 1/8 inch 깊이로 요막강내로 삽입하여 주입한다.

⑤ Scotch tape, paraffin, Elmer's glue 등으로 구멍을 막는다.

⑥ 입란 9~11일령의 투여에 적당하다.

#### 2) 난황낭경로

① 혈관들이 기실 주변부에 보이도록 회전시킨다. 이혈관들은 희미한 선의 배열로 보일 뿐이며 오렌지색을 띠는데, 선명한 구(halo)로부터 뻗어

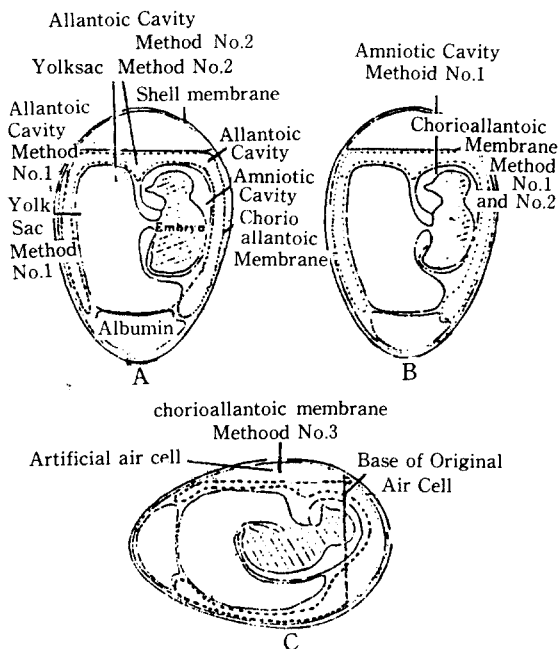


Fig.4. Routes of inoculation of chicken embryos.

있다. 이 구내에 태아가 존재한다.

② Punch 로 난각의 정상(등근쪽 선단)에 구멍을 낸다.

③ 22~27 gauge, 1~1.5 inch hypodermic needle 을 사용하는데, 계란을 세워서 투여하는 경우에는 바늘을 수직으로 계란 길이의 1/3~1/2 깊이로 삽입한다. 계란을 수평으로 눕워서 투여하는 경우에는 구가 위쪽에 오도록 유도(orientation)한 후 바늘을 수평으로 삽입, 투여한다.

④ 주사바늘을 빼낼 때 난황막(vitelline membrane)을 다치지 않게 주의해야 하는데, 이때 잘못하면 난황이 난백내로 터져나오게 된다.

⑤ 이 경로는 5~6일령 이전에 많이 이용된다.

### 3) CAM 정상경로(top route)

① 검란하여 생존을 확인한 후 소독한다.

② 기실의 정상에 구멍을 낸다.

③ 26~28 gauge, 1/2 inch 바늘을 사용하여 직하방으로 바늘의 전 길이를 삽입한 후 다시 1/4 inch 를 후퇴시켜 주입한다.

④ 9~11일령 태아에 사용된다.

### 4) CAM 인공기실경로(artificial air cell route)

① 검란하여 생존을 확인하고 태아의 반대측 혈관분포가 적은 부위를 선택한다.

② 기실의 기저로부터 1/4 inch 아래에 포시를 하고 소독한다.

③ 이 점에 난각막을 찢지 않도록 주의하여 난각에 구멍을 낸다. 기실의 중앙 정상에도 같은 구멍을 낸다.

④ 난좌에 난의 측면 구멍이 위에 오도록 수평으로 놓는다.

⑤ 기실위의 구멍에 rubber bulb 를 대고 공기를 빨아낸다. 음압에 의해 CAM 이 내려가면서 기실이 이동하게 된다.

⑥ 25~27 gauge 바늘을 사용하여 인공기실내로 1/8 inch 깊이로 삽입하여 주입한다. 24시간 동안 태아가 수평으로 누워 있도록 둔 다음 세운다.

⑦ 9~11일령 태아에 접종한다.

### 5) 기실경로

① 검란하여 생존을 확인한 후 소독한다.

② 기실의 상단에 구멍을 내고 바늘을 기실의 주변부까지 비스듬히 삽입하여 주입한다. 이때 바늘

이 CAM 쪽으로 뚫고 들어가지 않게 주의한다.

③ 접종방법이 쉽고 언제나 이용 가능하나, 어린 일령의 태아에 많이 사용된다.

### 6) 양막강경로

① 계란을 검란하여 태아측에, 기실의 기저에서 1cm 쯤 아래에 구(halo)를 확인한 후 포시를 하고 소독한다.

② 기실의 정상과 표시한 부위에 구멍을 낸 후 계란을 세워 구멍이 태아의 목부위에 와 있는지 확인한다.

③ 27~28 gauge, 7/8 inch 바늘을 사용하여 45°C 방향으로 1/4 inch 깊이로 삽입하여 설명한 구내로 들어가게 한다.

④ 7~11일령 태아에서 접종 가능하다.

⑤ 바늘이 태아에 물리적 영향을 줄 수 있어 주의해야 하며, 주사액량도 줄여주어야 한다.

## 8. 관찰방법

1) 수정율 및 부화율 : 수정율과 부화율에 영향을 줄 수 있는 생태학적 요인들로는 유전적 기반과 성계의 나이, 영양상태와 계군의 관리, 계절적인 차이 등을 들 수 있다.

관리가 잘된 계군의 경우 검란에 의한 폐기율은 10% 이하(약 5%)이며, 검란으로 선별한 후 부화율은 95% 정도이다<sup>23)</sup>.

실험대상물질의 독성은 주로 무처치군에 대해 용량변화에 따른 부화율로 평가된다.

2) 혈액채취<sup>31,45)</sup> : 혈액학적, 혈액화학적 검사를 위한 혈액의 채취는 부화가 가까운 경우에는 decapitation 으로 용이하나, 충분히 자라지 않은 태아의 경우에는 어려움이 없지 않다.

계란의 등근쪽에서 난각에 창을 내고 CAM 에 노출된 chorioallantoic artery 를 절개하여 heparin 처리된 모세관내로 들어오게 한다.

3) 체중 및 체장측정 : 다음의 항목을 대조군과 동일한 조건하에 측정한다. Body weight, sex ratio, beak length, body length(tip of the spine ~top of the skull), leg length(femoral-tibial joint~tip of the claw), claw length(longest claw of the right hind limb), fore limb length(humeroulnar joint~tip of the wing)등.

4) 기형발생지수 : 일반적으로 독성이 약한 물질에서와 높은 독성과 기형을 유발시키는 물질에서의 기형의 형태는 다소 차이가 있다.

Moscioni 등<sup>46)</sup>은 유기인제에 의한 계태아 기형을 제 1형증상과 제 2형증상으로 구분하였다. 즉, 소지증(micromelia), 피모발생 이상(abnormal feathering), 부리이상(abnormal beak) 등의 기형은 제 1형에 속하는 것으로 독성이 다소 약한 물질이나 저농도에서 흔히 보인다. 반면, 사경(wry neck), 단경(short neck), 관절만곡(arthrogryposis), 후지근의 형성부전(muscular hypoplasia of the legs) 등은 제 2형에 속하는데, 높은 기형발생 물질의 고농도 투여에서 볼 수 있다.

이러한 육안적 관찰 이외에 장기와 골격의 이상 유무를 관찰해야 하는데, 장기검사는 Bouin 액이나 10% 중성 formalin 등에 1주일 이상 고정하여 조대절편<sup>47)</sup>하여 입체현미경하에서 행하며, 골격검사는 alizarin red S 나 alcian blue 등으로 염색하여 관찰한다.<sup>48,49,50,51)</sup>

심장의 기형은 심장의 형태발생 종료기인 입란 8 일 이전의 투여에 의해 유발되는데, Cheung 등<sup>28)</sup>은 TCDD(2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)에 의한 심장기형의 형태를 다음의 4가지로 분류하고 있다. (1) ventricular septal defect; (2) aortic arch anomaly; (3) (1)+(2); (4) conotruncal malformation.

위에 열거한 기형의 형태에 더하여 흔히 나타나거나 관찰 가능한 항목들을 열거해 보기로 하겠다: celosomia, coloboma, exencephaly, microphthalmia, bupthymia, ablepharia, agnathia, dysgnathia, brachygnathia, phocomelia, ectromelia, syndactyly, cleft palate, cataract, torticollis, skeletal anomalies, aortic stenosis, atrial septal defect, thin ventricular walls, valvular malformations, gastroschisis, stunting, everted viscera, ataxia, hypopigmentation of the down, 등.

5) 광학 및 전자현미경관찰 : 필요한 장기조직을 적출하여 중성 formalin 에 고정한 후 Harris' hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학현미경관찰을 한다<sup>31)</sup>. 태아가 어린 경우에는 태아전체를 연속 횡단 또는 연속 시상절단(6~8  $\mu$ m)하여 관찰

하도록 한다<sup>52)</sup>.

또 glutaraldehyde 와 osmium tetroxide 등에 고정한 후 uranyl acetate 와 lead citrate 로 이중염색하여 투과전자현미경 관찰을 하거나, formalin 등으로 고정한 태어나 그 장기를 carbon coating 하여 주사전자현미경 관찰을 하기도 한다<sup>53)</sup>.

6) 태아 발육정지시기 계산 : 실험도중 사망하거나 실험계획상 태아를 꺼내는 경우 발육정지시기와 단계를 Hamburger-Hamilton<sup>54)</sup>, Sissman<sup>55)</sup> 등의 방법을 기준으로 하여 결정하고, 사망태아의 경우에도 전 항목에 걸쳐 기형유무를 관찰한다.

## 참고문헌

1. Wilson, J.G., Survey of in vitro systems: Their potential use in teratogenicity screening. In Handbook of Teratology(J.G. Wilson and F.C. Fraser, eds.), Vol.4, pp.135-153, Plenum, New York, London, (1978).
2. Payne, L.F., Distribution of mortality during the period of incubation, *J. Amer. Assn. Instruct. and Invest. in Poultry Husb.*, **6**, 9(1919).
3. Byerly, T.C., Titus, H.W., and Ellis, N.R., Effect of on egg composition. 2. Mortality of embryos in eggs from hens on diets containing protein supplements of different origin, *J. Nutrition*, **6**, 225, (1933).
4. Romanoff, A.L., Why some eggs do not hatch, *Cornell Ext. Bull.*, **205**, 1(1931).
5. Needham, J., Biochemistry and morphogenesis, Cambridge Univ. Press, London. (1942).
6. Funk, E.M., and Bieller, H.V., The minimum temperature for embryonic development in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), *Poultry Sci.* **23**, 538(1944).
7. Romanoff, A.L., Smith, L.L., and Sullivan, R. A., Biochemistry and biophysics of the developing hen's egg. 3. Influence of temp., *Cornell Univ. Agric. Exp. Sta., Memoir*, **216**, 1(1938).
8. Barott, H.G., Effect of temp., humidity, and other factors on hatch of hen's eggs and on

- energy metabolism of ch. embryos, *U.S. Dept. Agric. Tech. Bull.*, **553**, 1(1937).
9. Nilson, N., Vascular abnormalities due to Hyperthermia in ch. emb., *Teratology*, **30**, 237(1984).
  10. Alsop, F.M., The effect of abnormal temperatures upon the developing nervous system in the ch. emb., *Anat. Rec.*, **15**, 307(1919).
  11. Romanoff, A.L., Assimilation of avian yolk and albumen under normal and extreme incubating temp., *Anat. Rec.*, **86**, 143(1943).
  12. Romanoff, A.L., Biochemistry and Biophysics of the developing hen's egg. I. Influence of humidity, *Cornell Univ. Agric. Exp. Sta., Memoir*, **132**, 1(1930).
  13. Byerly, T.C., and Olsen, M.W., The influence of gravity and air-hunger on hatchability, *Poultry Science*, **10**, 281(1931).
  14. Wytttenbach, C.R., *et al.*, Precision delivery of small Vol. of liquids to very young avian emb., I. Locating and positioning the emb. in ovo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 40(1981).
  15. Riddle, O., On the cause of twinning and abnormal development in birds. *Amer. J. Anat.*, **32**, 19(1923).
  16. Romanoff, A.L., and Bauernfeind, J.C., Influence of riboflavin-def. in eggs on embryonic development (*Gallus domesticus*), *Anat. Res.*, **82**, 11(1942).
  17. Byerly, T.C., Titus, H.W., and Landauer, W., A new nutritional disease of the ch. emb., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **32**, 1542 (1935).
  18. Hutt, F.B., and Pilkey, A.M., Studies in embryonic mortality in the fowl. 4. Comparative mortality rates in eggs laid at different periods of the day and their bearing on theories of the origin of monsters, *Poultry Sci.*, **9**, 194(1930).
  19. McNally, E.H., and Byerly, T.C., Variation in the development of embryos of hen's egg, *Poultry Sci.*, **15**, 280(1936).
  20. Landauer, W., The hatchability of ch. eggs as influenced by environmental and heredity, *Storrs Agric. Exp. Sta. Bull.*, **216**, 1(1937).
  21. Landauer, W., Sex and season in relation to malformations of ch. embryos, *Anat. Rec.*, **86**, 365(1943).
  22. Verrett, M.J., Scott, W.F., *et al.*, Toxicity and Teratogenicity of food additive chemicals in the developing ch. emb., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 265(1980).
  23. McLaughlin, J. Jr., Marliac, J.P., *et al.*, The injection of chemicals into the yolk sac of fertile eggs prior to incubation as a toxicity test, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **5**, 760(1963).
  24. Litchfield, J.T. Jr., and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect exp., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99(1949).
  25. Buck, W.B., *et al.*, Clinical and Diagnostic Vet. Toxicology, 2nd. ed., pp.17-24, (1976).
  26. Jusko, W.J., Pharmacodynamic principles in chemical teratology: dose-effect relationships, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **183**, 469(1972).
  27. Msawa, M., Doull, *et al.*, Teratogenic effects of cholinergic insecticides in ch. emb., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 20(1981).
  28. Cheung, M.O., Gilbert, E.F., *et al.*, Cardiovascular teratogenicity of 2, 3, 7, 8-tetrachloro-diben-zo-p-dioxin in the ch. emb., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **61**, 197(1981).
  29. 조준형, Teratogenic effects of diazinon and carbacol in ch. emb., 서울대 수의대논문집 (1984).
  30. Walker, N.E., The effect of malathion and malaoxon on esterases and gross development of the chick embryos, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **19**, 590(1971).
  31. Hoffman, D.J., and Sileo, L., Neurotoxic and teratogenic effects of an organophosphorus insecticide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 284(1984).
  32. Mieniel, R., Action protectrice de la prali doxime vis-a'-vis des effets teratogenes du parathion sur le squelette axial de l'embryon de caille, *C.R. Acad. Sci. Sec. D.*, **279**, 603(1974).
  33. Hoffman, D.J., Embryotoxic effects of crude oil in mallard ducks and chicks, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 183(1978).
  34. Hoffman, D.J., Eastin, W.C. Jr., *et al.*, Embryotoxic and Biochemical effects of waste crankcase oil on brid's eggs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 230(1982).
  35. Hall, B.K., Thallium-induced achondroplasia in chick embryos and the concept of critical periods during development, *Teratology*, **151**, 1(1977).
  36. Hodach, R.J., Gilbert, E.F., and Fallon, J.F.,



- Aortic arch anomalies associated with the administration of epinephrine in chick embryos, *Teratology*, **9**, 203(1974).
37. A., Ascorbate inhibition of 6-aminonicotinamide teratogenesis in chicken embryos, *Teratology*, **13**, 85(1976).
  38. Overman, D.O., Graham, M.N., and Roy, W. A., Ascorbate inhibition of 6-aminonicotinamide teratogenesis in chicken embryos, *Teratology*, **13**, 85(1976).
  39. Gebhardt, D.O.E., The teratogenic action of propylene glycol(propanediol-1, 2) and propanediol-1, 3 in the chick embryo, *Teratology*, **1**, 153(1968).
  40. Van Steenis, G., and Logten, M.J., Neurotoxic effect of the dithiocarbamate tecoram on the chick embryo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **19**, 675(1971).
  41. Landauer, W., Cholinomimetic teratogens: studies with chicken embryos, *Teratology*, **12**, 125(1975).
  42. Roger, J.C., Upshall, D.G., and Casida, J.E., Structure activity and metabolism studies on organophosphate teratogens and their alleviating agents in developing hen eggs with special emphasis on Bidrin, *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 373(1969).
  43. Schom, C.B., and Abbott, U.K., Temporal, morphological, and genetic responses of avian embryos to Azodrin, an organophosphate insecticide, *Teratology*, **15**, 81(1977).
  44. Villegas, P., Avian diseases, College of Vet. Med., Univ. of Georgia, Athens. (1986).
  45. Hoffman, D.J., and Ramm, G.M., Physiological effects of trypan blue on ch. emb., *J. Exp. Zool.*, **182**, 227(1972).
  46. Moscioni, A.D., et al., Kynurenine formamidase inhibition as a possible mechanism for certain teratogenic effects of organophosphorus and methyl-carbamate insecticides in ch. emb., *Biochem. Pharm.*, **26**, 2251(1976).
  47. Wilson, J.G., 1, Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals, 2, Embryonal considerations in teratology. In *Teratology-Principles and Techniques*(J.G. Wilson and J. Wakany, eds.), pp. 262-277, Univ. of Chicago Press, Chicago. (1981).
  48. Karnofsky, D.A., The ch. emb. in drug screening. In *Teratology-principles and techniques* (J.G. Wilson and J. Warkany, eds.), Univ. of Chicago Press, Chicago. (1965).
  49. Kimmel, C.A., and Trammell, C., A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals, *Stain Technol.*, **56**, 271(1965).
  50. Simons, E.V., and Vanhorn, J.R., A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilagenous skeleton of ch. emb., Adapted to the clearing procedure in pot. hydroxide, *Acta. Morphl. Neerl.-Scand.*, **8**, 281(1971).
  51. Dingerkus, G., and Uhler, L.D., Enz. Clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage, *Stain Tech.*, **52**, 229(1977).
  52. Gilani, S.H., et al., Teratogenicity of ochratoxin A in ch. emb., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **46**, 543(1978).
  53. Yander, G., and Searls, R.L., A screening electron microscopic study of the development of the shoulder, visceral arches, and the region ventral to the cervical somites of the ch. emb., *Amer. J. Anat.*, **157**, 27(1980).
  54. Hamburger, V., and Hamilton, H.L., A series of normal stages in the development of the ch. emb., *Teratology*, **88**, 49(1951).
  55. Sissman, N.J. Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: *Comparative chronology*, **25**, 141(1970).