

## TERATOGENICITY STUDY OF FOOD ADDITIVES CHEMICALS IN THE DEVELOPING CHICK EMBRYO

Yong-Soon Lee and Jae-Jun Choi\*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 440-744, Korea  
and Eli Lilly Asia Inc. Korea Branch\*

(Received May 14, 1989)

(Revision Received May 25, 1989)

(Accepted June 15, 1989)

**ABSTRACT:** To evaluate possible teratogenicity of food additives such as sodium propionate and monosodium glutamate, 300 hatching eggs were subjected to potential mutagenicity assay by administration of low and high doses of the materials via yolk and air sac.

The results are summarized as follows:

1. Mortality rate of chick embryo was increased significantly by dosage related in the group of sodium propionate and monosodium glutamate when compared to placebo and non-treated group
2. Frequency of embryo with malformation in treated group was not increased significantly when compared to placebo and non-treated group.
3. The hatched chicks treated by 5.0 mg and 10.0 mg of monosodium glutamate showed shortened body length significantly when compared to non-treated group.

### 서 론

국민 생활수준의 향상에 따라 식생활은 다양해지고 있으며 특히 가공식품에 대한 수요는 크게 증가되어 각종 새로운 가공식품이 대량으로 생산공급되고 있다. 또한 식품공업이 발달됨에 따라 가공식품에는 식품의 영양적 가치향상, 보존, 영양강화, 식욕증진 등 여러가지 목적에 의해 다양한 식품첨가물이 사용되고 있다. 따라서 국민 개개인이 하루에 섭취하는 식품첨가물의 양은 증가추세에 있다. 그러나 대부분의 식품첨가물은 다소의 독성을 지니고 있고 또한 빈번한 사용에 의한 체내의 누적으로 만성중독을 유발할 가능성이 있어 그에 대한 안전성을 확보할 필요가 있다. 아울러 기형아의 출생율이 증가일로에 있는 경향이어서 식품 및 의약품의 복용 또는 섭취에 의한 기형 유발 가능성에 대하여도 많은 연구가 진행 중에 있다(Verrett 등, 1980). 이에 따라 현재까지 안전하다고 생각되어 사용되어온 많은 식품첨가물에 대해 기형 유발 가능성을 재평가하여 이에 대한 안전성을 확보하여 소비자들로 하여금 식품에 대한 신뢰감을 높일 필요가 있다.

기형독성을 검색하기 위한 실험모델로 계태아는 이용하기 쉽고, 또한 취급이 간편한 이유로 약리학적, 독성학적 연구에 널리 쓰이며, 시험대상 물질에 대한 계태아의 반응의 대부분은 다른 실험동물을 이용한 독성평가 시험에 전초적인 여러 자료를 제공하기 때문에 많이 사용되고 있다. 계태아를 이용한 독성시험의 잇점은 (1) 이용 및 조작이 간편하다 (2) 적은 비용으로 많은 수의 공시동물을 이용할 수 있다. (3) 광범위한 화학적, 물리적 요인에 감수성이 높다. (4) 형태학적 발육이 포유동물의 경우와 유사하다. 이러한 이유로 해서 계태아는 특히 기형독성시험에 널리 이용되는데, 기형 유발 가능성이 큰 물질이나 그의 길항제를 같이 계태아 발달과정 중의 특정시기에 투여하여 형태학적, 생리학적, 생화학적 반응을 지속적으로 관찰하게 된다(Goel, 1976 ; Greenberg, 1970 ; Hoffman, 1982 ; Maclaulhin, 1963 ; Verrett, 1964). 계태아를 이용한 기형독성시험의 대상물질에는 농약, 의약품, 화장품, 식품첨가물 등 많은 화학물질들이 포함될 수 있는데(Gebhardt 1968, Marliac 등 1965, Walker 1971). 특히 식품첨가물의 기형 유발 가능성을 평가하는데 유용한 까닭에 FDA에서는 10여년 전부터 GRAS(Generally Recognized As Safe)의 첨가물들을 대상으로 광범위한 기형독성시험 프로그램을 설정하여 실시하고 있다(Verrett 등, 1980).

본 연구의 목적은 계태아를 이용하여 현재 국내에서 식품첨가물로 그 사용이 허가되고 있으며 또한 많이 사용되고 있는 식품첨가물 중에서 다른 나라의 연구발표에 의해 기형 유발 가능성을 지녔다고 평가되고 있는 식품첨가물을 대상으로 기형독성 유무를 시험하여 국내에서 사용되는 식품첨가물의 기형독성 유발능의 정도를 파악하여 국민보건 향상에 이바지하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험용 수정란

국내의 SPF 계란 생산장인 천호 SPF 계란농장으로부터 모든 수정란을 구입하였다. 수정율과 부화율이 90% 이상으로서 품종은 White Leghorn이며 대형란과 소형란을 골라낸 52~63g의 것을 사용하였다(Marliac 등, 1965).

### 2. 시험물질

보존제로서 sodium propionate(순도 99%)와 조미료로서 Monosodium glutamate(MSG, 순도 99%)의 2가지를 사용하였다.

### 3. 시험군설정 및 투여실험

설계와 각군의 처치내용 및 수정란의 수는 Table 1 과 같다. 무처치 대조군을 제외한 모든 투여군은 각각 2개의 소군으로 나누어 부란 0시간과 96시간에 용매와 시험물질을 투여하였다. 투여 경로는 각 시험물질마다 독성발현에 대한 감수성이 높은 경로를 선택하였던 바 sodium propionate는 난황내로 투여하였으며 MSG는 기실내로 투여하였다. Sodium propionate의 투여용량은 저용량(0.2mg/egg), 중간용량(1.0mg/egg), 고용량(5.0mg/egg)으로 각각 나누었으며, MSG의 투여량은 저용량(2.5mg/egg), 중간용량(5.0mg/egg), 고용량(10.0mg/egg)으로 각각 나누어 용매인 증류수(D.W.)에 용해시켜 총용량 0.1ml를 각각 투여하였다. 용매대조군은

**Table 1.** Experimental groups and each treatment

| Test material            | Sodium Propionate |                 |           |             |           | Monosodium glutamate |                 |           |             |            |
|--------------------------|-------------------|-----------------|-----------|-------------|-----------|----------------------|-----------------|-----------|-------------|------------|
|                          | untreated control | vehicle control | low dose  | middle dose | high dose | untreated control    | vehicle control | low dose  | middle dose | high dose  |
| Group                    |                   |                 |           |             |           |                      |                 |           |             |            |
| Administration time (hr) |                   | 0               | 96        | 0           | 96        | 0                    | 96              | 0         | 96          | 0          |
| Number of eggs           | 30                | 15              | 15        | 15          | 15        | 30                   | 15              | 15        | 15          | 15         |
| Treatment                |                   | D.W.            | 0.2mg/egg | 1.0mg/egg   | 5.0mg/egg |                      | D.W.            | 2.5mg/egg | 5.0mg/egg   | 10.0mg/egg |
| Administration route     |                   |                 | via yolk  |             |           |                      |                 | air sac   |             |            |

**Table 2.** Effects of sodium propionate and monosodium glutamate on the body weight and body length of hatchlings

| Test material         | Sodium propionate |                 |              |              |              | Monosodium glutamate |                 |              |              |              |
|-----------------------|-------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
|                       | untreated control | vehicle control | low dose     | middle dose  | high dose    | untreated control    | vehicle control | low dose     | middle dose  | high dose    |
| Group                 |                   |                 |              |              |              |                      |                 |              |              |              |
| Index(units)          |                   |                 |              |              |              |                      |                 |              |              |              |
| Body weight (g)       | 36.25 ± 1.17      | 37.30 ± 2.01    | 35.57 ± 2.60 | 36.30 ± 0.57 | 35.70 ± 2.25 | 35.40 ± 2.01         | 36.60 ± 2.22    | 36.30 ± 1.90 | 36.46 ± 1.30 | 35.50 ± 0.84 |
| Body length (cm)      | 9.15 ± 0.36       | 9.16 ± 0.37     | 9.09 ± 0.46  | 9.38 ± 0.38  | 9.24 ± 0.47  | 9.62 ± 0.23          | 9.46 ± 0.25     | 9.52 ± 0.28  | 9.26 ± 0.23  | 9.28 ± 0.08  |
| Hind limb length (Cm) | 7.12 ± 0.25       | 7.04 ± 0.20     | 7.04 ± 0.40  | 7.58 ± 0.45  | 6.98 ± 0.47  | 7.38 ± 0.33          | 7.18 ± 0.26     | 7.32 ± 0.16  | 7.30 ± 0.16  | 7.32 ± 0.21  |
| Claw length (mm)      | 3.30 ± 0.30       | 3.40 ± 0.29     | 3.64 ± 0.39  | 3.64 ± 0.17  | 3.48 ± 0.26  | 3.50 ± 0.28          | 3.48 ± 0.08     | 3.52 ± 0.13  | 3.56 ± 0.23  | 3.62 ± 0.20  |
| Fore limb length (Cm) | 4.32 ± 0.31       | 4.44 ± 0.26     | 4.41 ± 0.20  | 4.46 ± 0.37  | 4.26 ± 0.23  | 4.32 ± 0.36          | 4.20 ± 0.26     | 4.06 ± 0.23  | 4.38 ± 0.23  | 4.38 ± 0.17  |
| Beak length (Cm)      | 1.10 ± 0.06       | 1.16 ± 0.06     | 1.16 ± 0.08  | 1.16 ± 0.06  | 1.10 ± 0.07  | 1.12 ± 0.08          | 1.14 ± 0.06     | 1.06 ± 0.06  | 1.12 ± 0.84  | 1.15 ± 0.06  |

a : Significantly different from the untreated control group ( $p < 0.05$ ).b : Significantly different from the untreated control group ( $p < 0.01$ ).c : Significantly different from the vehicle control group ( $p < 0.05$ ).

(Mean ± S.D.)

**Table 3.** Experimental data demonstrating mortality rates and frequencies of embryos with malformations following treatment of sodium propionate and monosodium glutamate (%)\*

| Test material                            | Sodium propionate |                 |          |             |           | Monosodium glutamate |                 |          |             |           |
|--|-------------------|-----------------|----------|-------------|-----------|----------------------|-----------------|----------|-------------|-----------|
|  | untreated control | vehicle control | low dose | middle dose | high dose | untreated control    | vehicle control | low dose | middle dose | high dose |
| Total No. embryos                        | 30                | 30              | 30       | 30          | 30        | 30                   | 30              | 30       | 30          | 30        |
| No. dead embryos                         | 6(20.0)           | 7(23.3)         | 11(36.7) | 18(60.0)    | 24(80.0)  | 7(23.3)              | 10(33.3)        | 19(63.3) | 23(76.7)    | 27(90.0)  |
| No. embryos with hind limb malformations | 0                 | 0               | 0        | 0           | 0         | 0                    | 0               | 0        | 0           | 0         |
| No. embryos with fore limb malformations | 0                 | 0               | 0        | 0           | 0         | 0                    | 0               | 0        | 0           | 0         |
| No. embryos with beak malformations      | 0                 | 2 (6.7)         | 1 (3.3)  | 0           | 1 (3.3)   | 1 (3.3)              | 0               | 0        | 0           | 1 (3.3)   |
| No. embryos with brain malformations     | 0                 | 1 (3.3)         | 1 (3.3)  | 0           | 1 (3.3)   | 1 (3.3)              | 1 (3.3)         | 0        | 1 (3.3)     | 1 (3.3)   |
| No. embryos with eye defect              | 0                 | 1 (3.3)         | 2 (6.7)  | 0           | 0         | 2 (6.7)              | 2 (6.7)         | 0        | 1 (3.3)     | 3(10.0)   |
| No. embryos with cephalothoracopagus     | 0                 | 0               | 0        | 1 (3.3)     | 0         | 0                    | 0               | 0        | 0           | 0         |
| No. embryos with generalized edema       | 2 (6.7)           | 0               | 0        | 0           | 1 (3.3)   | 0                    | 0               | 0        | 1 (3.3)     | 0         |
| No. embryos with hematoma                | 0                 | 1 (3.3)         | 1 (3.3)  | 0           | 0         | 0                    | 0               | 0        | 0           | 0         |
| No. embryos affected                     | 2 (6.7)           | 3(10.0)         | 3(10.0)  | 1 (3.3)     | 2 (6.7)   | 2 (6.7)              | 2 (6.7)         | 0        | 2 (6.7)     | 3(10.0)   |
| No. embryos affected including death     | 6(20.0)           | 8(26.7)         | 11(36.7) | 18(60.0)    | 24(80.0)  | 7(23.3)              | 10(33.3)        | 19(63.3) | 24(80.0)    | 28(93.3)  |

\* ; % of total numbers of embryos

동량의 D.W.를 투여하였다. 투여는 무균상자 내에서 실시하였다.

#### 4. 부란기의 조건

상대습도, 온도, 공기순환 등을 조절할 수 있는 것으로 난자를 회전시키는 교반시설이 갖추어진 부란기로써, 발육조건은 37.8°C의 온도와 상대습도를 61%로 유지하도록 하였다.

#### 5. 검 란

검란은 매일 같은 시각에 행하였으며, 검란시 발육정지란 및 사란을 수거하여 태아의 발육 정도를 검사하였고, 실체현미경으로 기형발생을 검색하였다(Hamburger와 Hamilton 등, 1951). 발육이 계속된 태아는 부란 22일까지 자연 부화시켰으며 부화하지 않은 태아는 폐사된 것으로 간주하여 난각을 제거시킨 후 외형검사와 골격검사를 실시하였다.

#### 6. 검사와 통계학적 처리

부화된 병아리는 육안적으로 외형검사를 한 후 ether로 마취시켜 체중, 체장, 전지와 후지의 길이, 부리의 길이 등을 측정하고 부검을 하여 장기검사를 하였으며(Faherty와 Jacson 등, 1972) 각 군마다 5마리씩을 Alizarin red S와 Alcian blue로 이중염색하여 실체현미경으로 골격검사를 하였다(Simons와 Vanhorn 등, 1971). 대조군과 실험군, 그리고 각 실험군간의 유의성 검정은 Students *t*-test로 하였다.

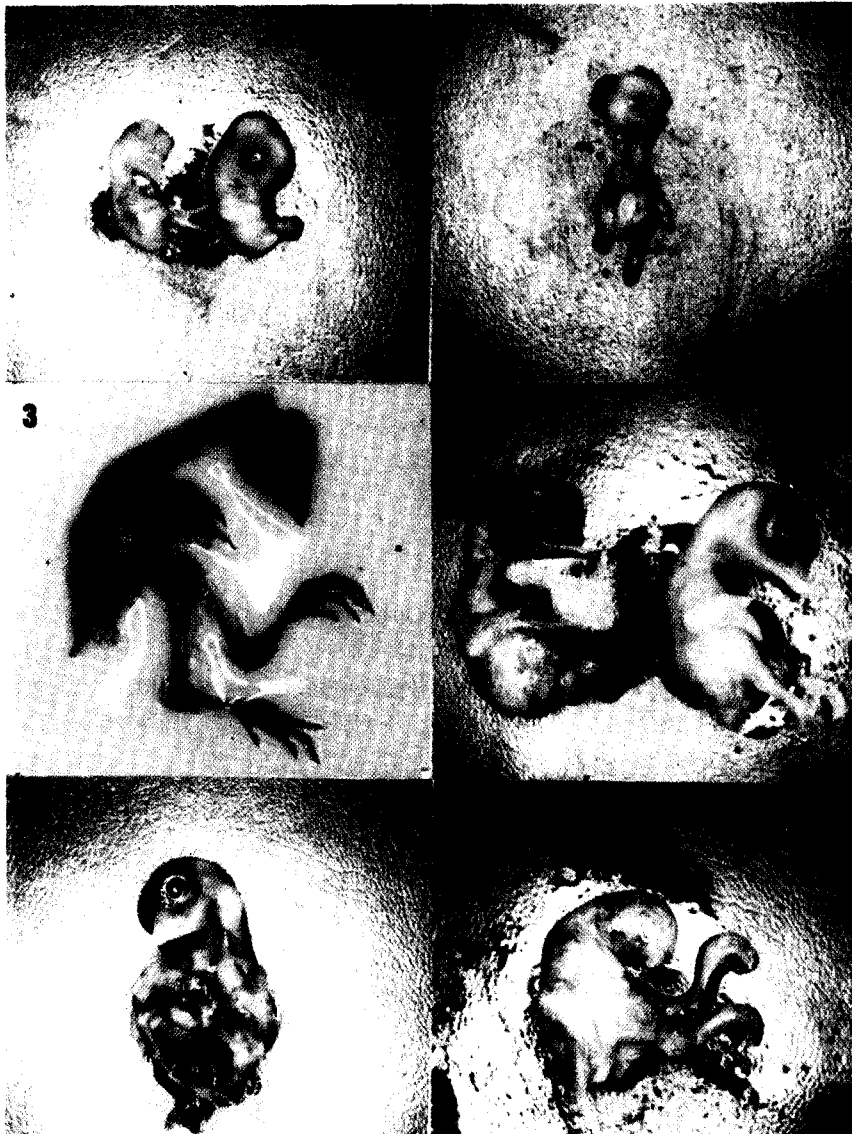
## 결 과

### 1. 외형검사

Sodium propionate와 MSG 투여가 부화한 병아리의 체중, 체장, 전·후지의 길이, 발톱길이 및 부리길이에 미치는 영향은 Table 2와 같다. MSG를 5.0 mg/egg, 10.0 mg/egg의 용량으로 기실내 투여한 군에서는 병아리(hatchling)의 체장이 무처리 대조군에 비해 각각 유의성 있는 감소를 보였다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ).

### 2. 폐사율과 기형발생율의 변화

각 군의 폐사율과 기형발생수 및 종류는 Table 3과 같다. Sodium propionate와 MSG를 투여한 계태아의 폐사율은 용량의존성으로 증가되었으나 기형발생율은 무처리대조군과 용매대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보이지 않았다. 기형발생 양상은 sodium propionate와 MSG에서 서로 비슷한 경향을 보였는데, 주로 관찰되는 기형은 안구기형, 두개기형, 부리기형 등이 있다. 안구기형은 양측성 또는 편측성의 무안구증(anophthalmia)과 소안구증(micropthalmia)이며, (Fig.1 및 2)무안구증을 나타내는 계태아는 안검은 존재하나 안구가 결손되어 있었다. 안구기형을 보인 총 11마리의 계태아 중 82%인 9마리는 부란 15일 이전에 폐사하였으며 나머지 두 마리는 부란 19일까지 발육을 계속하였으나 부화하지 못하고 폐사하였다. 두개 및 대뇌결손을 나타낸 계태아는 대뇌발육이 이루어지지 않거나 두개밖으로 뇌의 일부가 탈출된 뇌노출기형



**Fig. 1.** Right lateral view of 8-day malformed (left) and normal chick embryos. Malformed embryo following administration of 5.0 mg sodium propionate on day 0 of incubation, showing cerebral dysplasia and anophthalmia.

**Fig. 2.** A 9-day chick embryo following treatment of 10.0 mg monosodium glutamate on day 0 of incubation showing left microphthalmia. Note the small left eyeball compared with the right one.

**Fig. 3.** A 20-day chick embryo following treatment of 0.1 ml D.W. on day 0 of incubation. The embryo shows right anophthalmia. Note the skull that has leaned toward right and shortened upper beak. Alizarin red S and alcian blue stain.

**Fig. 4.** A 11-day chick embryos following treatment of 0.1 ml D.W. on day 0 of incubation. Note the absence of upper beak of the left.

**Fig. 5.** A 12-day chick embryo following treatment of 1.0mg sodium propionate on day 0 of incubation. The embryo has one head and two bodies (cephalothoracopagus).

**Fig. 6.** A 12-day chick embryo following treatment of 0.2 mg sodium propionate on day 0 of incubation. Note the absence of eyes and malformed beak.

**Table 4.** Effects of administration time on the occurrence of malformations

| Test material | Group | Sodium propionate |                 |          |             | Monosodium glutamate |                   |                 |          |             |           |
|---------------|-------|-------------------|-----------------|----------|-------------|----------------------|-------------------|-----------------|----------|-------------|-----------|
|               |       | untreated control | vehicle control | low dose | middle dose | high dose            | untreated control | vehicle control | low dose | middle dose | high dose |
| Incubation    | 0 hr  | 2                 | 2               | 3        | 1           | 1                    | 2                 | 2               | 0        | 2           | 1         |
|               | 96 hr |                   | 1               | 0        | 0           | 1                    |                   | 0               | 0        | 0           | 2         |

(exencephaly)을 보였다. 대조군과 실험군을 포함하여 부리기형을 보인 모든 계태아는 안구기형을 같이 나타내었다(Fig.3, 4 및 6). 한편 1.0 mg/egg 용량의 sodium propionate를 부란 전에 난황내로 투여한 한 개체에서 두흉 접합기형(cephalo-thoracopagus)이 발생되었는데 이 개체의 두부는 하나로 외견상 정상이었으나 경부에서부터 두 개체로 나누어져 전지와 후지가 각각 2쌍이었으며, 내부장기는 서로 연결되어 있으나 항문은 2개였다(Fig.5).

### 3. 투여시기에 따른 기형발생의 변화

Sodium propionate와 MSG의 투여시기에 따른 기형발생 수는 Table 4와 같다.

용매대조군을 포함하여 sodium propionate와 MSG를 부란 0시간과 96시간에 투여했을 경우 기형발생비율은 sodium propionate와 MSG에서 각각 7:2와 5:2였다. 기관형성이 활발한 부란 96시간에 투여하는 경우보다 부란 전에 투여하는 것이 기형을 잘 유발시키는 이러한 경향은 sodium propionate와 MSG에 모두 공통되는 현상이며 sodium propionate 투여시 더욱 잘 나타났다.

## 고 찰

기형발생의 유무를 검색하는 데에는 여러가지 방법들이 사용되고 있으나, 많은 양의 물질을 단시간내에 검색하는 방법 중의 하나로 SPF 계란을 이용하는 계태아법이 고안되어 사용하게 되었다.

이 계태아법은 한꺼번에 대량의 계란으로 많은 시험을 할 수 있는 잇점이 있다. 그러나 계태아를 이용한 시험결과는 다른 동물에서보다 다소 차이가 있을 수 있다는 단점이 있다. 투여시간과 경로, 발육의 정도, 실험자의 기술, 관찰, 분석의 방법에 따라 차이를 나타낼 수 있으며, 또 계란의 영양상태, 시험물질의 특성과 형태, 분포와 대사특성에 의한 다소의 차이가 발생할 수 있으므로 이러한 사항들을 고려하여 알맞는 실험방법을 선택해야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서는 우리나라에서 유일하게 SP 계란을 생산하는 천호농장으로부터 종란을 구입하였는데, 이곳은 수정율과 부화율이 90% 이상이 되었으며, 이밖에도 transvarian transmission할 수 있는 바이러스나 기타 세균들도 없는 상태이기 때문에 실험에 영향을 주는 요인은 비교적 없다고 보아야 하겠다. 이밖에도 온도, 습도, 조건 등 실험에 직접적인 영향을 미치는 인자들도 배제하여 실험에 큰 영향을 미치지 않도록 하였다.

이와 같은 상태에서 MSG를 5.0 mg, 10.0 mg씩을 기실 내에 투여한 군의 병아리에서 체장이 각각 유의성( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )이 있는 감소를 보였다. 계란당 전체적인 투여 용량이 일정했기 때문에 물리적인 장애가 아니라고 볼 수 있으며, 계태아의 발생에 영향을 주는 것으로 사료된다. 이것은 sodium propionate와 MSG 모두가 용량 의존성으로 계태아의 폐사율이 증가된 것만 보아도 알 수 있다.

기형발생 양상은 sodium propionate 와 MSG 모두에서 서로 비슷한 발생양상을 보였는데, 관찰되는 기형은 주로 안구기형, 두개기형, 부리기형 등이 있다. 그러나 이러한 발생 정도는 용매 대조군에 비하여, sodium propionate 나 MSG 투여그룹 모두가 유의성 있게 증가된 것은 아니었다.

이러한 결과는 sodium propionate 에 대해서만은 Verrett 등(1980)이 시험한 성적과 상치되는 결과로써, 그들은 최고용량 10 mg/egg 투여의 결과는 그들의 결과와 마찬가지로 아무런 기형 발생에 영향을 미친 것이 아니었는데, 그들의 연구에서는 난황내 투여였으며, 본 실험은 기실내 투여였다. 따라서 MSG 는 기실내나 난황내 투여 어느 것에서나 기형을 발생시키지 않았다.

### 참고문헌

- Abbott, U.K., and Craig, R.M. (1963): The laboratory preparation of normal avian embryos, *Poultry Sci.*, **42**, 429-437.
- Dunachie, J.F., and Fletcher, W.W. (1966): Effects of some insecticides on the hatching rate of hen's eggs, **212**, 1062-1063.
- Eto, M., Seifert, J., Engel, J.L. and Casida, J.E. (1980): Organophosphorus and methylcarbamate teratogens: Structural requirements for inducing embryonic abnormalities in chicken and kynurine formamidase inhibition on mouse liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 20-25.
- Faherty, J.F., Jackson, B.A. and Greene, M.F. (1972): Surface staining of 1 mm(Wilson) slices of fetuses for internal visceral examination, *Stain Technol.*, **47**, 53-58.
- Flockhart, I.R., and Cacida, J.E. (1972): Relationship of the acylation of membrane esterases and proteins to the teratogenic action of organophosphorous insecticides and eserine in developing hen eggs, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2591-2603.
- Gebhardt, D.O.E. (1968): The teratogenic action of propylene glycol (propanediol-1,2) and propanediol-1,3 in the chick embryo, *Teratol.*, **1**, 153-161.
- Goel, S.C., and Jurand, A. (1976): Effects of hydrocortison acetate on the development of chicken embryos, *Teratol.*, **13**, 139-149.
- Greenberg, J. and LaHam, O.N. (1970): Reversal of malathion-induced teratisms and its biochemical implications on the developing chick, *Canad. J. Zool.*, **48**, 1047-1053.
- Grubb, R.B. and Monjtiegel, E.C. (1975): The teratogenic effects of 6-mercaptopyruvate on chick embryos in ovo, *Teratol.*, **11**, 179-185.
- Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951): A series of normal stages on the development of the chick embryos, *J. Morphol.*, **88**, 49-92.
- Hoffman, D.J. and Eastin, W.C.Jr. (1982): Embryotoxic and biochemical effects of waste crankcase oil on bird's eggs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 230-241.
- Marliac, J.P., Verrett, M.J., McLaughlin, J. and Fitzhugh, O.G. (1965): A comparison of toxicity data obtained for twenty-one pesticides by the chicken embryo technique with acute oral LD<sub>50</sub> in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **7**, 490-496.
- McLaughlin, J. and Marliac, J.P. (1963): The injection of chemicals into yolk sac of fertile eggs prior to incubation as a toxicity test, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, 230-241.



- Simons, E.B. and VanHorn, J.R. (1971): A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure on potassium hydroxide, *Acta Morphol. Neerl.-Scand.*, **8**, 281-292.
- Verrett, M.J., Marliac, J.P. and McLaughlin, J. (1964): Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **47**, 1003-1006.
- Verrett, M.J., William, F.S., Reynaldo, E.F., Alterman, E.K. and Thomas, C.A. (1980): Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **58**, 265-273.
- Walker, N.E. (1971): The effect of malathion and malaoxon on esterases and gross development of the chick embryo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **19**, 590-601.
- Wilson, J.G. (1978): Survey of *in vitro* systems; Their potential use in teratogenicity screening. In *Handbook of Teratology* (J.G. Wilson and F.C. Fraser, Eds), (Plenum, New York), Vol. 4, p. 135-153.