

## 재조합 인간상피세포 성장인자(rhEGF, DWP401)의 배·태자발달 독성 연구

박귀례<sup>#</sup> · 한순영 · 신재호 · 이유미\* · 박희정 · 장성재  
식품의약품안전청 국립독성연구소, \*부산대학교  
(Received July 6, 1998)

### Embryo and Fetal Developmental Toxicity Study on Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rhEGF) in Rats

Kui Le Park<sup>#</sup>, Soon-Young Han, Jae-Ho Shin, Yoo Mie Lee\*,  
Hee Jung Park and Seung Jae Jang

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research,  
KFDA, Seoul, 122-704, Korea,

\*Pusan National University, Pusan 449-714

**Abstract**—Effect of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF, DWP401) on fetal external, visceral and skeletal malformation during organogenesis was examined. Pregnant Sprague-Dawley rats were administered with 0.2, 1 and 5 mg/kg/day subcutaneously on gestation day 6 through 16. Dams were sacrificed at 20th day of gestation. Maternal body weight, food consumption and clinical observation were not changed. Significant dose-dependent increase of relative and absolute liver weight were observed in the treatment group, whereas other organ weights were not changed. Placental weight of 1 and 5 mg/kg/day group and number of resorption in 5 mg/kg/day treatment group were significantly increased. External and visceral malformation of fetuses were not observed with treatment. However, skeletal variations (increase of asymmetry sternbrae, decrease of dumb-bell and asymmetry sternbrae at 5 mg/kg/day, and fused sternbrae at 5 mg/kg/day) were observed. These results showed that rhEGF (DWP401) may not have embryo and/or fetal developmental toxicity effect in rats.

**Keywords** □ rhEGF (DWP401), embryo and fetal developmental toxicity, rats.

Epidermal growth factor(EGF)의 존재는 1960년 Stanley Cohen이 nerve growth factor에 대한 연구 중 마우스의 submaxillary gland 추출물의 한분획이 신경성장 촉진인자와는 다른 활성이 있다는 것을 확인하였다. 이를 신생자에게 투여했을 때, 개안(eye opening) 및 치아맹출(teeth eruption)이 조기에 일어남을 보고한 바 있다.<sup>1)</sup> 그후 Cohen<sup>2)</sup>은 눈꺼풀과 앞니의 발달을 촉진하는 효과는 조직학적으로 상피세포의 증식을 의미하며, 이에 수반하여 각질화 현상이 전반적으로

증가하기 때문이며, 이 내피성장과 케라틴화를 촉진하는 성분을 분리하여 EGF라 명명하였다.

EGF는 53개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 약 6,200 dalton, single polypeptide으로서 당쇄수식이 없으며 6개의 cysteine residue는 각기 3개의 intramolecular disulfide bond를 형성하여 compact한 구조를 가지고 있었다고 보고하였다.<sup>3,4)</sup>

인체내에도 역시 EGF가 존재하는데, hEGF의 체내 합성부위는 분명하게 밝혀져 있지 않으나 주로 Brunner's gland와 submaxillary gland일 것으로 추정되고 있으며, 사람의 체액 중에 널리 분포되어 있는데 특히 침, 젖샘, 전립선액과 정액, 뇨, 눈물, 혈소판등에 존재하

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-380-1789 (팩스) 02-380-1788

며 혈액에는 상대적으로 낮은 농도로 뇨에는 상대적으로 높은 농도로 존재하고, 가장 고농도로 존재하는 곳은 산모의 초유이다.<sup>5)</sup>

현재까지 발표된 EGF의 다양한 생리작용을 나타내는 기전의 전과정은 명백히 밝혀지지 않았으나, 세포표면에 존재하는 EGF receptor를 통하여 신호전달되는 것은 이미 밝혀졌다.<sup>6)</sup> 이렇게 전달된 신호는 세포 내부의 단백질을 활성화시켜 대사 및 생리변화를 일으켜 세포의 성장 및 증식을 유발하는 것으로 알려졌다.<sup>7)</sup>

보고에 의하면 안과영역에서는 각막절제, 각막이식, 백내장수술 후 각막세포 촉진효과가 인정되어 왔고,<sup>8)</sup> 외상과 감염에 의해 일어나는 각막손상, 각막궤양에서도 상처부위의 신속한 정상화 효과도 인정되었다. 또한 난치성 피부궤양(당뇨병성궤양, 정맥류성궤양, 욕창등) 등의 치료에 효과가 있으며 조직의 복구와 유지등 분열유발물질임이 밝혀졌다.<sup>9)</sup> 위장관에 대해서는 위산의 분비를 억제하고 위궤양 유발물질에 의한 조직손상에 대해 위 십이지장 점막을 보호하는 작용을 하며 위장관 세포의 증식을 촉진하여 위장관 궤양을 치료하는 작용이 있다.<sup>10)</sup> 따라서 EGF는 상처조직의 치유를 목적으로 하는 국소적용제나 위산분비억제를 목적으로 하는 제제 개발될 가능성도 있다.

EGF는 생체내에 미량 존재하므로 1983년 이후 hEGF를 미생물에서 발현시켜 왔다. 또한 천연 hEGF와 유전자재조합기법으로 합성된 EGF가 물리화학적·생물학적으로 동등함이 증명되었다.<sup>11)</sup> 본 실험에 사용된 DWP401은 유전자재조합기술을 이용하여 벡터(pTE105)로 *E. Coli*에 클로닝시킴으로서 DWP401(rhEGF)를 대량 생산하였으며 DWP401은 사람의 EGF와 아미노산 서열이 완전히 동일한 구조를 가지고 있다. 본 실험에서는 신약개발을 목적으로 유전자재조합기술로 개발된 DWP401이 랫드의 배·태자 발달에 대하여 어떤 독성이 나타나는지를 연구하였다.

**실험방법**

**시험물질 및 실험동물** - 시험물질인 DWP 401은 대용계약에서 제공받아 -70°C 냉동고에 보관하였다가 사용시 생리식염주사액으로 희석하여 사용하였다. 대조군은 생리식염주사액을 투여하였다.

실험에 사용한 동물은 식품의약품안전청 실험동물자원실에서 번식사육한 10주이상 된 SPF SD랫드를 사

용하였다. 암수동물(2:1)을 사육상자에 넣어 암컷에서 질전(corpulatory plug)이 확인되거나 질내에 정자가 확인된 날을 임신 0일로 하였다. 임신 0일의 체중을 측정하고 난수표법으로 구분리하였으며 각군은 22~26마리를 사용하였다.

사육실은 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%, 환기회수 15회/hr, 조명은 07:00~19:00로 유지하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(신촌사료)를, 물은 수도물을 자유롭게 섭취토록 하였다.

**투여용량** - 본 실험의 투여용량을 결정하기 위하여 아급성독성시험 결과와 수태능 및 일반생식독성시험 결과를 참조하여 예비실험용량으로 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/kg 7개 용량군으로 나누어 1일 1회 피하투여하였다. 예비실험결과 5 mg/kg투여군에서 태자의 흡수율이 약간 증가하는 경향이 나타났다. 따라서 본실험에서는 각군 동물수는 22~26마리로 하고 투여용량을 0, 0.2, 1, 5 mg/kg으로 하였다.

투여는 26G주사기를 이용하여 1일 1회 경배부에 피하주사하였다. 투약은 식품의약품안전본부 고시 제96-8호(의약품등의 독성시험법기준: 96. 4. 16)의 생식독성시험기준<sup>12)</sup>에 따라 기관형성기인 임신 6일부터 16일까지 매일 투여하였으며, 임신 20일에 제왕절개하여 각 시험 항목별로 관찰하였다.

**F. 암컷에 대한 영향** - 투여기간 중에는 투여 전후 1일 2회, 그 이외의 시험기간 중에는 1일 1회, 실험동물의 일반상태, 중독증상 및 사망여부등에 관하여 관찰하였다. 각 군의 모든 임신 암컷 동물에 대하여 임신 0, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20일에 체중을 측정하였다. 체중측정일에 일정량의 사료를 급여하고 다음 체중 측정일에 사료잔량을 측정하였다. 사료섭취량은 전회의 사료급여량에서 잔량을 빼어 산출하였다. 임신 20일째 각 군의 임신 동물을 모두 부검하여 황체수, 착상수, 흡수태자수, 생존태자수, 사망태자수, 성별, 생존태자의 개체별 체중, 임신자궁의 무게 및 태반무게등을 측정하였다. 착상율 및 성비를 구하였고, 모체 내부장기의 육안적 병리검사를 시행하고 간장, 신장, 폐장, 비장, 흉선, 좌·우 신장, 좌·우 부신, 좌·우 난소 및 심장을 적출하여 생리식염수로 세척하여 혈액을 제거하고, 여과지로 물기를 제거한 다음 무게를 측정하였다.

- 착상율(%) = (착상수/임신향체수) × 100
- 성비 = 수컷 생존태자수/암컷 생존태자수

**태자의 형태학적 검사**

**외형검사** - 생존태자를 자궁에서 적출한 후 외형의 이상 유·무를 관찰하였다. 오른쪽 자궁각의 난소축에서 부터 일련번호를 매겨 태자의  $\frac{1}{2}$ 은 내부장기 검사 후 머리는 Bouin액에 고정하였고, 나머지  $\frac{1}{2}$ 은 탈피하여 골격검사에 이용하였다.

**골격검사** - 모체당  $\frac{1}{2}$ 의 생존태자를 95% ETOH에 고정한 다음 Alizarin red S와 Alcian blue 로 이중 염색한 후 Inouye법<sup>13)</sup>에 따라 골격이상 및 골화정도에 대하여 검사를 실시하였다.

**내장검사** - 자궁에서 적출한 생존태자를 입체현미경 하에서 내장을 관찰하고, Bouin용액에 고정시킨 머리 부분은 Wilson방법<sup>14)</sup>에 따라 검사하였다.

**통계학적 분석** - 각 시험자료의 특성에 따라 일원배치분산분석 및 Duncan 또는 Scheffe test, Kruskal-Wallis 및 Mann-Whitney U test, 또는 chi-square test 를 실시하였다. 모든 통계처리는 5%의 통계학적 유의수준에서 검정하였으며 통계 프로그램으로는 SPSS for windows(Release 6.0, 1993) 또는 PHA-

RM/PCS(Version 4, 1986)을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**F<sub>0</sub> 입컷에 대한 영향** - 대조군을 포함한 전투여군에서 투여약물과 관련된 것으로 판단되는 임상증상은 발견되

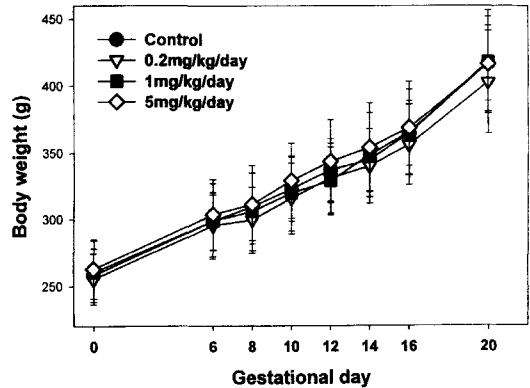


Fig. 1—Body weight changes of dams treated with DWP401 during gestational period.

**Table I**—Food consumption of dams treated with DWP401 during organogenesis period (Unit : gram)

Dose (mg/kg/day)	Gestational day						
	0~6	6~8	8~10	10~12	12~14	14~16	16~20
0	138.58±11.15	47.80±5.38	50.84±6.92	54.18±4.38	50.74±5.60	51.83±7.77	96.94±17.96
0.2	132.02±11.77	44.77±2.94	49.67±4.99	53.47±3.47	48.70±5.33	50.83±5.20	98.37±15.78
1	126.25±20.90	45.21±7.27	49.38±5.63	52.81±4.54	53.61±4.43	50.59±5.44	95.80±24.54
5	137.57±11.84	46.20±4.32	50.57±3.88	52.95±4.26	52.18±4.68	53.82±7.43	104.22±13.07

**Table II**—Effect of DWP401 on caesarean sectional findings of dams treated with DWP401 during organogenesis period

Dose (mg/kg/day)	0	0.2	1	5
No. of pregnant dams	22	23	26	24
Corpus lutea	19.4±3.08	18.2±3.64	17.8±3.99	18.1±4.11
Implantations	14.6±2.99	14.4±2.93	14.0±3.66	14.0±3.04
Resorptions	16	17	21	41
Early	14	14	19	21
Late	2	3	2	20*
Live fetuses	13.8±2.99	13.7±3.10	13.2±3.69	12.2±3.05
Male	7.4±2.32	7.3±2.43	6.2±2.52	6.1±2.56
Female	6.4±2.04	6.4±2.55	7.1±2.80	6.1±1.91
M/F ratio	163/141 (1.16)	167/147 (1.14)	162/184 (0.88)	147/146 (1.01)
Dead fetuses	0	0	0	2
Implantation (%)	75.35	78.76	82.02	77.42
Gravid uterus (g)	3.77±0.200	80.5±17.90	79.2±19.59	73.77±19.36
Fetus weight (g)				
Male	80.0±17.60	3.87±0.256	3.80±0.272	3.70±0.326
Female	3.65±0.180	3.75±0.326	3.63±0.356	3.47±0.322
Placental weight (g)	0.59±0.079	0.60±0.066	0.64±0.060*	0.70±0.114*

\*: Statistically different from control group (p<0.05)

지 않았다. 임신암컷의 체중을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 약물투여에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

각군의 평균 사료섭취량의 변화는 Table I과 같다. 약물투여에 의한 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

임신 20일에 제왕절개한 결과는 Table II와 같다. 모든 임신동물에서 생존태자가 관찰되었으며 각 모체의 황체수 및 착상수는 대조군과 비교할 때 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 총 자궁의 무게가 감소하는 경향이었는데 이는 생존태자수의 감소경향에 기인하는 것으로 생각된다. 투여용량이 증가함에 따라 생존태자수의 감소 경향은 흡수태자수 특히 후기 흡수태자수의 통계적으로 유의성있는 증가와 관련이 있는 것으로 생각된다. 태반의 무게는 대조군에 비해 유의성있게 증가하였으며 태자 체중, 암수의 성비는 영향은 없었다.

임신모체의 제왕절개 부검시 모체의 흉강, 복강내 장기의 육안적이상을 검사한 결과, 대조군과 투여군 모두에서 특이한 소견이 관찰되지 않았다.

또한 투여약물이 모체의 장기에 미치는 영향을 파악하기 위하여 간장, 신장, 폐장, 비장, 흉선, 좌·우 신장,

좌·우 부신, 좌·우 난소 및 심장의 절대 및 상대무게를 측정된 결과는 Table III, Table IV와 같다. 간장의 절대무게는 최고용량인 5 mg/kg투여군에서 대조군에 비해 유의성있게 증가하였으며, 상대무게는 1 mg/kg 및 5 mg/kg투여군에서 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다. 그외의 장기무게는 투여약물과 관련하여 유의성은 없었다.

태자의 형태학적 검사

**외형검사** - 외형이상관찰에서 대조군의 한모체의 태자 2마리는 왜소태자(dwarf)였으며 그 중 1마리는 왜소태반(small placenta)을 수반하였다. 다른 모체의 태자 1마리도 왜소태자였으며, 또 다른모체의 태자 1마리에서는 무미(acauda)가 관찰되었다. 0.2 mg/kg투여군의 모체에서 왜소태자 1마리가 관찰되었고, 1 mg/kg투여군의 4마리 모체에서도 각 1마리씩 왜소태자가 관찰되었으며, 그 중 한마리는 왜소태반까지 관찰되었다. 5mg/kg투여군의 3마리 모체에서 태자 각 1마리가 왜소태자였으며, 다른 한 모체에서는 태자의 태반융합(fused placenta)이 관찰되었다.

**Table III**— Absolute organ weight of dams treated with DWP401 during organogenesis period (Unit : gram)

Dose (mg/kg/day)	0	0.2	1	5	
Heart	1.082±0.120	1.043±0.102	1.072±0.259	1.124±0.113	
Liver	15.876±1.121	15.990±1.596	16.861±1.851	17.358±1.434*	
Spleen	0.928±0.282	0.993±0.148	1.030±0.273	1.051±0.197	
Lung	1.726±0.458	1.671±0.472	1.920±0.508	1.923±0.440	
Thymus	0.408±0.102	0.422±0.122	0.428±0.107	0.454±0.140	
Kidney	Right	1.065±0.088	1.053±0.105	1.057±0.110	1.071±0.128
	Left	1.046±0.072	1.041±0.096	1.047±0.118	1.073±0.139
Ovary	Right	0.072±0.019	0.071±0.025	0.071±0.018	0.076±0.023
	Left	0.075±0.018	0.064±0.017	0.059±0.019	0.078±0.029
Adrenal gland	Right	0.030±0.012	0.036±0.011	0.037±0.013	0.035±0.013
	Left	0.035±0.013	0.038±0.009	0.035±0.013	0.040±0.013

\* Statistically different from control group (p<0.05).

**Table IV**— Relative organ weight of dams treated with DWP401 during organogenesis period (Unit : %)

Dose (mg/kg/day)	0	0.2	1	5	
Heart	0.260±0.025	0.260±0.030	0.259±0.066	0.270±0.028	
Liver	3.818±0.289	3.984±0.361	4.046±0.230*	4.162±0.224*	
Spleen	0.222±0.062	0.249±0.044	0.247±0.052	0.252±0.042	
Lung	0.415±0.108	0.419±0.136	0.466±0.144	0.461±0.099	
Thymus	0.089±0.037	0.105±0.027	0.104±0.028	0.109±0.034	
Kidney	Right	0.256±0.018	0.263±0.031	0.254±0.022	0.257±0.024
	Left	0.251±0.017	0.260±0.029	0.252±0.022	0.257±0.026
Ovary	Right	0.017±0.004	0.018±0.006	0.017±0.004	0.018±0.006
	Left	0.018±0.004	0.015±0.005	0.014±0.004	0.019±0.008
Adrenal gland	Right	0.007±0.003	0.009±0.003	0.009±0.003	0.008±0.003
	Left	0.008±0.003	0.009±0.002	0.008±0.003	0.009±0.004

\* Statistically different from control group (p<0.05)

**Table V**— Skeletal alterations of F1 rats obtained from dams treated with DWP401 during organogenesis period

Dose (mg/kg/day)	0	0.2	1	5
No. of dams examined	22	23	25	23
No. of fetuses examined	156	154	168	143
No. of fetuses with anomaly/variation	135	123	164	113
Thoracic vertebrae				
dumb-bell	180	164	237	172
butter fly	20	18	29	13
bipartite	66	61	91	55
asymmetry	1	12*	9*	9*
dumb-bell/asymmetry	9	15	17	1*
Sternebrae				
ossification retardation	15	14	5*	8
fused	7	6	2*	1*
bipartite	0	0	1	0
dumb-bell	5	4	5	3
hemisternebrae	7	8	0*	4
asymmetry	30	34	56	28
Ribs				
rudimentary	1	0	0	1
wavy ribs	3	0	2	0

\* Statistically different from control group ( $p < 0.05$ )

**골격검사** - 관찰결과 흉추와 흉골에서 여러 변이 (dumb-bell, butter fly, bipartite, asymmetry, scrambled 등)와 골화지연 (retardation of ossification) 이 관찰되었는데, 흉추의 변이중 asymmetry가 모든 투약군에서 유의성있게 증가하였고 5 mg/kg투약군에서 흉추의 dumb-bell/asymmetry와 1 mg/kg, 5 mg/kg 투약군에서 fused sternebrae가 유의성있게 감소되었으며 그외에는 대조군과 유사하였다. 혼적능골(rudimentary rib)과 파상능골(wavy rib)도 관찰되었으나 이는 자연발생적 빈도 수준 정도였다(Table V).

**내장검사** - 내장기형관찰시 0.2 mg/kg투약군의 모체의 태자 1마리에서 요관확장(dilatation of ureter)이, 다른 모체의 태자 1마리에서 심장의 위치역전(cardiac malposition)과 내장(동맥혈관, 폐, 비장, 신장, 위 등)의 역위(total translocation of viscera) 및 요관확장이 관찰되었다. 1 mg/kg투약군의 모체 5마리의 각 태자 1마리에서 요관확장이 일어나 통계적 유의성이 있었고, 다른 모체 2마리의 각 태자 1마리에서 심장혈관이상(cardio-vascular malposition)이, 또 다른 모체의 태자 1마리에서 좌측하지혈종(hematoma of hindlimb)이 관찰되었다. 5 mg/kg투약군의 한 모체의 경우 검사 태자 8마리 모두 요관확장이, 다른 모체

2마리의 각 태자 1마리에서도 요관확장이 관찰되었다. 또 다른 모체 2마리의 각 태자 1마리에서 심장혈관이상이 관찰되었으며, 모체 태자 1마리의 좌측자궁내에 혈액성내용물이 관찰되었으며 사망태자 부검결과 심장비대(heart enlargement)와 간괴사(liver necrosis)가 관찰되었다. 두부의 기형검사 결과 5 mg/kg투약군의 태자 1마리에서 구개열(cleft palate)이 관찰되었다.

이상의 실험결과를 요약하면 DWP401은 태자독성의 증가로 태자흡수수 증가 및 흉추의 일부 골격변이는 증가 혹은 감소하였으나 기형유발물질은 아닌것으로 판단된다.

## 결 론

DWP401을 SD 임신 랫드에 0, 0.2, 1, 5 mg/kg 용량으로 임신 6~16일동안 매일 피하주사하여 최기형성 시험을 실시하여 얻은 결과는 다음과 같다.

약물투여에 의한 것으로 생각되는 임신모체의 일반증상, 체중 및 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다. 임신모체의 부검결과 간장의 절대 및 상대무게는 투여용량이 증가할수록 유의적으로 증가하였고, 그외의 장기무게도 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 1 mg/kg 및 5 mg/kg투약군에서 태반무게가, 5 mg/kg 투약군에서 태자흡수수가 유의성있게 증가되었다. 태자의 외표이상, 내장이상 및 골격기형검사를 실시한 결과 약물투여에 의한 것으로 판단되는 뚜렷한 기형은 관찰되지 않았으나, 일부 골격변이가 유의성있게 증가 또는 감소하였다(모든 투약군에서 흉추 asymmetry의 증가와, 5 mg/kg투약군에서 흉추의 dumb-bell/asymmetry 및 1 mg/kg, 5 mg/kg투약군에서 fused sternebrae의 감소).

## 문 헌

- 1) Cohen, S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 302 (1960).
- 2) Cohen, S. and Elliot, G. J. : *Invest. Dermatol.* **40**, 1 (1963).
- 3) Gregory, H. and Preston, B. M. : The primary structure of human urogastrin. *Peptide Proteins Res.* **9**, 107 (1977).
- 4) Makino, K., Morimoto M., Nishi M., Sakamoto S., Tamura A., Inooka H., Akasaka K. : protein nu-

- clar magnetic resonance study on the solution conformation of human epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8741 (1987).
- 5) Uchihashi M. Hirata Y. Fujita T. Matsukura S : Age-relate decrease of urinary excretion of human epidermal growth factor (HEGF). *Irataet al life science*. **31**, 679 (1982).
  - 6) Carpenter. G. and Cohen. S. : Epidermal growth factor. *J. biol. Chem.* **265**, 7709 (1990).
  - 7) Carpenter. G. and Wahl. M. I. : in peptide growth factors and their receptors. Sporn, M. and Roberts. A. B. eds. *Springer-Verlag, Berlin*, 69 (1990).
  - 8) Reim, M. Busse S, Leber M, Schulz C : Effect of epidermal growth factor in severe experimental alkli burns, *Ophthalmic Res.* **20**, 327 (1988).
  - 9) Franklin, T. J. Gregory H, Morris W. P : Acceleration of wound healing by recombinant human urogestrone(epidermal growth factor): *J. Lab. Clin. Med.* **108**, 103 (1986).
  - 10) Konturek, S. J. Dembinski, A. Warzecha, Z. Brzozowski, T. Gregory, H : Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats. *Gastroenterology* **94**, 1300 (1988).
  - 11) Read, L. C. Summer, L. Gale, S. M. George-Nascimento, C. Ballard, F. J. Wallace, J. C : Properties of synthetic-gene recombinant human epidermal growth factor: comparison with the natural growth factor from human urine and milk. *J. endocrinology* **109**, 245 (1986).
  - 12) 식품의약품안전본부 고시 제96-8호(의약품등의 독성 시험법기준 : 96. 4. 16).
  - 13) Inouye, M. : Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S. *Cong. Anom.*, **16**, 171 (1976).
  - 14) Wilson, J. G. and Warkany, J. : Teratology, Principles and techniques. The university of Chicago press. 1 (1972).
  - 15) Nishimura, K. : A microdissection method for detecting thoracic visceral malformation in mouse and rat fetuses. *Cong. Anom.*, **14**, 23 (1974).