

의약후보물질의 생식독성평가 원칙 및 방법

정문구* · 김종춘

한국화학연구소 안전성연구센터 생식독성실

Principles and Methods for the Reproductive-toxicological Evaluation of New Drug Candidates

Moon-Koo Chung* and Jong-Choon Kim

Reproductive Toxicology Division, Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, P. O. Box 107, Yousong, Daejeon 305-606, Korea

(Received June 21, 2000)

(Accepted August 31, 2000)

ABSTRACT : The purpose of reproductive toxicity studies is to evaluate all effects resulting from paternal or maternal exposure that interfere with conception, development, birth, and maturation of offspring. In 1966, the US Food and Drug Administration (US FDA) published guidelines for a three-segment study for drug testing to examine adverse effects on fertility and pregnancy. Three segments were proposed: Segment I, Study of Fertility and General Reproductive Performance, to provide information on breeding, fertility, nidation, parturition, neonatal effects and lactation; Segment II, Teratological Study, to provide information on embryotoxicity and teratogenicity; and Segment III, Perinatal and Postnatal Study, to provide information on late fetal development, labour and delivery, neonatal viability, and growth and lactation. The classic guideline is still used to this day with only minor modification throughout the world. In the present review, the principles and methods of reproductive toxicity studies are discussed with special attention given to scientific issues.

Key Words : Reproductive toxicity, Three-segment studies, Guidelines, Toxicological evaluation

I. 서 론

인간과 동물에 있어서 생식능력의 형성과정은 매우 복잡하다. 질병, 물리적 작용(방사선 등) 및 화학물질(의약품, 환경화학물질, 식품 등)은 생식기관에 작용하여 형태적 혹은 기능적 변화를 야기시킬 수 있다. 의약품인 탈리도마이드(thalidomide) 복용에 따른 신생아 기형발생사건 등 각종 화학물질이 그 유용성과 함께 유해한 영향을 나타냄에 따라 각국에서는 화학물질, 특히 신규 의약품이 인간의 생식능력에 미치는 부작용을 동물실험을 통해 조사하도록 규정하고 있다. 생식독성시험은 실험동물의 생식전반, 즉 생식세포의 발생으로부터 출생후 성장까지의 시험을 총망라하고 있다. 이러한 생식독성의 시험과 평가는 작용기전 및 병인론의 규명면에서 본질적으로 타 독성분야와 동일하다(Manson과 Kang, 1989; Ratcliffe 등, 1993; Tyl,

1993; Hood, 1997). 본 논문에서는 생식·발생독성시험법의 발달과정과 일반적 원칙을 소개하고 3종류의 표준시험 방법을 서술한 후 각 시험별로 생식·발생독성 평가시 고려해야 할 점들을 종합, 검토하고자 하였다.

II. 역사적 고찰

이미 19세기에 사람들은 인간과 동물에 있어서의 수태능력의 문제와 더불어 기형발현에 관심을 기울이기 시작했다. 발생학자 및 병리학자들은 닭의 배자(embryo)를 이용하여 기형유발성(teratogenicity)을 실험적으로 시도하였고, 인간의 기형형태를 정확하게 서술하기 시작하였다. 선천성 기형에 대한 학문적 접근은 Wolf(1939)와 Gregg(1942)가 토크소플라스마증(toxoplasmosis)과 풍진(rubella)이 임신 중 태아에 기형을 유발할 수 있다는 사실을 인식함으로써 처음으로 시작되었다(Warkany, 1977). 이와 거의 동일한 시기에 외부물질(xenobiotics)이 여러 종의 척추

*To whom correspondence should be addressed

동물에서 기형을 유발시킬 수 있다는 사실이 발견되었다 (Wilson, 1979). 1949년 미국에서는 화학물질이 수태능력에 미치는 영향 여부 등을 조사하기 위해서 생식독성 검사시 암수 동물에 3세대 동안 사료를 통해 시험물질을 공급하도록 규정하였다. 이 규정은 1959년에 차세대 동물의 번식능력 관찰로 확대되었고, 이로써 전반적 생식발달기간 동안의 생식독성 영향검사가 실시되었다. 그러나 이 시험들은 시험물질의 초기형성 발현능력과 배자(태자) 독성을 파악하는 데에는 적합하지 못했다(Wilson, 1979). 1961년의 탈리도마이드 사태(Speirs, 1962) 후에 생식독성검사를 위한 표준화된 동물실험 모델을 개발하기 위해 학자들이 모였고 이에 따라 일련의 심포지움 및 위원회 보고서가 발표되었다. 탈리도마이드의 기형생성여부를 여러 동물종에서 입증하기 시작하였고, 이와 동시에 표준화된 실험모델 개발을 위한 국제적인 노력이 시도되었다. 1961년에 시작된 생식독성 시험법의 개발은 1966년 1월 미국 식품의약품안전청(U.S. FDA)에 의해 발표된 시험기준으로 종결지어졌다(Goldenthal, 1966). 'FDA 생식독성 시험기준'은 수태능 및 일반생식독성시험(fertility and general reproductive study, Segment I), 초기형성시험(teratogenicity study, Segment II) 그리고 주산·수유기시험(peri- and postnatal study, Segment III)의 3가지 표준시험방법을 서술하고 있다. 아직도 통용되는 이 시험법은 다른 나라에서도 받아들이거나 약간 변형된 방법으로 적용되어 왔고, 최근에는 ICH(International Conference on Harmonization)의 생식독성시험기준으로 변천되게 되었다(ICH, 1994; OECD, 1995; U.S. EPA, 1996; KFDA, 1998; Collins 등, 1999, Fig. 1).

III. 생식독성학의 일반원칙

1. 모동물 및 태자의 약력학과 대사

화학물질의 흡수, 분포, 대사 및 배설은 임신동물의 경우 더욱 복잡하다. 임신동물의 생리적 변화는 화학물질의 약력학(pharmacokinetics)에 영향을 줄 수 있으며(O'Flaherty, 1997), 종(species)에 따라 다른 태자 대사계통의 발생은 물론 '모동물 태자구획'(dam-fetus compartment)을 고려해야 한다(Neubert 등, 1987; Tyl, 1993). 어떤 물질에 대한 종간의 용량상관성의 비교는 약력학의 차이 때문에 약력학과 대사에 관한 비교자료가 있을 때에만 신빙성이 있다. 물론 약력학 검사결과가 종 혹은 장기에 따라 상이하게 나타나는 반응을 항상 설명할 수는 없기 때문에 어떤 물질의 배자(태자) 내에서의 작용기전의 차이가 결정적인 역할을 한다(Wilson 등, 1979).

2. 태반의 형태 및 기능

'모동물 태자구획' 사이에는 태반이 위치하고 있는데 태반은 제한적 장벽으로서 외부물질을 여러 가지 기작[수동적 분산, 세포흡수 작용(pinocytosis), 조직간 통과, 능동수송계]에 의해 모체로부터 태아로 상호 통과할 수 있다(Kaufmann과 Burton, 1994; Morriss 등, 1994). 수동적 분산이 가장 중요한 기작으로 간주되며 흡수가 가능한 물질의 양중에서 태반을 통과하는 양은 여러 가지 인자에 의해서 영향을 받는다(Morriss 등, 1994). 태반의 외부형태는 동물종에 따라 상이하며(Kaufmann과 Burton, 1994) 태반구

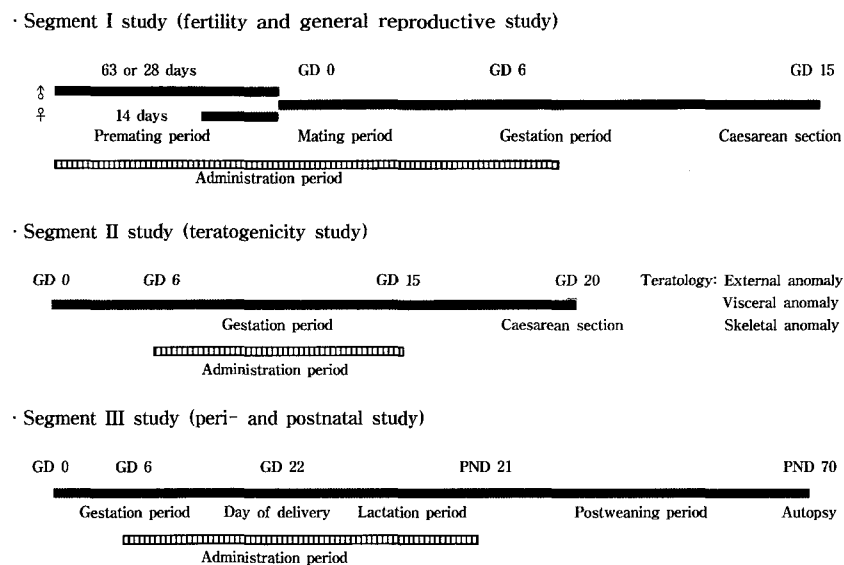


Fig. 1. Typical experimental methods to evaluate reproductive-toxicological risks. GD : gestational day, PND : postnatal day.

조의 결정적인 차이는 모동물과 배아의 혈액 사이에 놓인 조직층의 수가 상이함에 기인된 것이다. 시험물질의 기형 유발의 중요한 시기인 임신초기의 경우 종에 따라 다른 조직영양(histotroph)의 기간 및 배아의 발생상태 등에 기인하여 종간에 현저한 차이가 있다(Beck, 1976). 기능적 측면을 살펴보면, 태반은 물질을 분해할 수 있고 내분비 조절 및 임신유지에 관여하고 있으며 종간에 현저한 차이가 있다(Norman, 1997).

3. 배자(태자) 발생의 민감기

배자(태자) 발생의 가장 큰 특성은 극도로 높은 세포 증식율과 수많은 세포, 조직 및 기관의 분화과정이다(Neubert 등, 1980). 유전적으로 결정된 이러한 모든 발생과정들은 각 단계마다 시간적 연속과 여러 과정들의 구조적, 기능적 의존성에 있어서 복잡한 규율을 따르고 있다. 배자(태자) 독성물질의 작용은 종에 따라 특이한 작용시점에 달려있다. 각 조직 및 기관들이 형성되는 시기로 기형유발물질에 대해 특히 민감하게 반응하는 시기는 흔히 기관형성기(organogenesis)라고 불리며, 종에 따라 다른 이 발생기간의 길이는 배자(태자) 독성, 특히 기형유발성을 조사할 때 투여기간의 선택에 기초가 된다(Neubert 등, 1987; Manson과 Kang, 1989). 특정한 기형이 출생이전 어느 시점에서 유도되었는지를 증명하기 위해서는 해당 기관들의 발생과정에 대한 상세한 정보가 필요하다.

4. 배자(태자) 독성작용의 원인, 기작 및 특성

유전인자의 손상이나 염색체 이상을 비롯하여 여러 가지 외부인자들이 배자(태자) 독성의 원인으로 간주되고 있다. 방사선, 화학물질(의약품 포함), 병원체감염, 산소부족 및 과다, 고온 또는 저온, 모동물인자[영양, 대사 및 내분비장애, 양막 삭(amnion string)에 의한 기계적 손상, 과도 의 자궁압력, 경색, 화학적 병독(noxa), 해부학적 기형의 결과로 나타나는 태반의 기능장애] 등이 기형유발 등의 배자(태자) 독성을 일으킬 수 있다(Neubert 등, 1980; Tyl, 1993). 배자(태자) 독성의 실제적인 발현은 단일 혹은 복합 인자들이 임계세포수의 비가역적인 손상을 유발할 수 있는 능력을 지니고 있느냐에 달려있다(Wilson, 1977). 세포 내 및 세포간의 1차적 손상기작으로는 돌연변이, 염색체 이상, DNA 복제 및 단백질합성 장애와 이에 따른 필수적인 화학적 기질의 결핍, 효소억제, 삼투압의 변화, 세포분열장애, 세포막의 구조 및 기능변화, 세포의 성분의 형성장애 등을 들 수 있다(Wilson, 1977; Wilson과 Fraser, 1977; Neubert 등, 1980; Tyl, 1993). 배자(태자) 독성의 병인을 살펴보면 일련의 형태적 및 기능적 장애는 한가지 혹

Table 1. Toxic effects manifested in the reproductive toxicology

· Sterility (masculine/feminine)
· Embryo/fetotoxicity (structural, functional, and biochemical deviation)
· Teratogenicity (lasting structural abnormality)
· Growth retardation (prenatal dystrophia or hypoplasia)
· Embryo- or fetolethality (mortality)
· Transplacental carcinogenesis
· Prenatal induced functional abnormality

은 여러 가지 1차 손상의 결과로서 생겨난다고 사료되고 있다. 예를 들면 증식장애(세포의 사멸, 과다증식, 생리적 세포사멸의 지연), 세포분화장애, 세포의 상호작용 및 세포이동 장애, 대사장애 등을 들 수 있다. 어떤 물질의 배자(태자) 독성은 1차 및 후속손상의 결과로 인한 배자(태자) 치사(embryoletality), 기형유발(teratogenicity), 발육지연(growth retardation), 기능장애(functional anomaly) 등으로 표현되며(Table 1), 배자(태자) 치사효과와 기형유발 효과는 서로 다른 기작에 의해서 유발될 수 있기 때문에 따로 분리해서 평가해야 한다(Wilson, 1977; Neubert 등, 1980; Neubert 등, 1987).

5. 배자(태자) 독성효과의 용량상관성

배자(태자) 독성물질의 투여 후에 나타나는 독성발현에 있어서는 용량상관성(dose-response)의 원칙이 통용된다(Kavlock 등, 1995). 즉 기형유발 등의 생식·발생독성은 용량에 따라서 증가하며, 배자(태자) 독성이 나타나는 용량범위는 역치(threshold)로 구분된다(Wilson, 1977; Neubert 등, 1980; Chung 등, 1998; Kim 등, 2000). 최소 유효용량으로부터 나타나기 시작하는 배자(태자) 독성작용은 대조군의 결과와 비교할 때에 식별이 가능하다. 배자(태자) 독성용량의 상한선은 모독성을 나타내는 용량의 하한선으로 간주된다. 왜냐하면 임신한 모동물에 현저한 독성을 나타내는 용량의 투여시 나타나는 배자(태자) 독성은 제한적 의미를 부여하기 때문이다(Neubert 등, 1980). 어떤 물질은 배자(태자) 독성용량 범위의 한계 내에서 배자(태자) 독성효과에 대해서 충분히 미세한 용량간격으로 용량상관 관계를 직선으로 나타낼 수 있다. 여러 가지 형태의 독성에 관한 용량상관 직선들은 일반적으로 상이한 경사를 나타낸다(Neubert 등, 1980). 또한 시험물질과 동물종에 따라 다른 배자(태자) 독성효과는 상이한 임계용량으로부터 나타날 수 있다(Wilson, 1977). 높은 농도에서 50% 이상의 배자(태자)가 사망하거나 흡수되면 다른 종류의 배자(태자) 독성의 평가는 현저히 제한된다(Neubert 등, 1980). 이처럼 높은 배자(태자) 치사용량 범위내에서는 다른 형태의 배자(태자) 독성의 평가는 검사가 가능한 생존 배자(태자) 수의 감소로 현저히 제한을 받는다. 그 밖에 배자(태자) 치사작

용이 나타나지 않거나 단지 소수로 나타나는 농도에서 관찰되는 발육지연 또는 기형유발효과는 용량을 높일 때에 배자(태자)에 심한 기능장애를 일으켜서 임신중에 사망함으로써 배자(태자) 치사효과로 전이할 수 있기 때문이다.

IV. 생식독성시험

1. 수태능 및 초기배 발생시험(Study of fertility and early embryonic development to implantation)

1) 목적과 원칙

주로 랫드를 이용해 실시하는 수태능 및 초기배 발생시험의 일차적인 목적은 어떤 물질이 암수 동물의 생식능력에 미치는 영향을 조사하는데 있다. 이에 따라 수컷은 9주 또는 4주 동안, 암컷은 3-4회의 성주기 동안 교배전에 투여하고 암컷동물은 임신 6일까지 투여를 계속하도록 규정하고 있다 (ICH, 1994). 수태능력 시험의 계획시에 주의해야 할 관점들은 원칙적으로 다른 생식독성시험의 경우와 동일하다. 물론 투여용량은 배·태자발생시험의 경우보다 낮을 수 있다. 왜냐하면 투여기간이 길어서 최고용량을 잘못 선택할 경우 명백한 독성학적 작용 또는 과다 약리작용에 의한 결과의 변조가 나타나게 되는데 가급적 이를 피해야 한다.

2) 시험방법

수컷 랫드에 시험물질을 교배전 63일 또는 28일과 교배기간 동안 반복투여하고 군당 같은 수의 암컷을 교배전 14일간, 교배기간 및 초기배 발생기간동안 투여한다. 수컷 랫드의 경우 아급성 독성시험시 정소에서 이상소견이 나타나면 교배전 63일간을 투여하고, 이상소견이 나타나지 않으면 28일간을 투여하게 된다. 수컷에서 투여기간 63일은 생식세포인 정조세포가 정자세포로 성숙하는데에 소요되는 필요충분한 시간으로서 정자독성평가가 많이 이용되고 있는 시험기간이다(Russell 등, 1990; Creasy, 1997). 모든 암컷동물들은 임신 15일째에 제왕절개하여 임신황체수, 착상수, 생존태자수, 흡수태자수 등을 조사한다. 친세대 암수 동물은 매일 일반증상을 관찰하고 주 2회씩 체중측정을 실시한다. 친세대동물의 수태능력을 평가하기 위해 성주기, 황체수, 교배동물수 및 임신동물수, 교배성립일수 (precoital time), 착상전 배자사망수(preimplantation loss), 생존자의 수 및 크기 등을 조사한다. 또한 수컷동물은 교배종료후 부검시 정자검사 및 호르몬측정을 실시하고 암수 생식장기에 대하여 병리조직학적 검사를 실시한다. 정자검사의 경우 실험실마다 측정방법과 측정결과에 많은 차이가 있으므로 실험실 여건에 따라 적절한 측정방법의 선택과 객관적인 평가가 매우 중요하다(Seed 등, 1996; Kim 등, 1999).

3) 결과의 평가

비교적 단순한 수태능력 검사항목의 조사를 통해서 큰 어려움 없이 랫드에 있어서 수태능력 장애를 인식할 수 있다. 이상소견의 해석은 흔히 병리조직학적인 검사결과(특히 생식기관)와의 연계하에서만 가능하다. 그 외에 특정한 수태능력 장애를 해석하기 위해서는 흔히 시험물질의 독특한 약리학적(특히 내분비학적) 성질에 대한 지식이 필수적이다. 예를 들면, 고용량의 진정제, 스테로이드 혹은 비스테로이드 항안드로젠 또는 프로스타글란딘 합성억제제는 수컷동물의 생식불능을 유발할 수 있다. 암컷동물에 있어서는 제스타젠(LaPolt 등, 1998), 항제스타젠 작용물질(Kendle 등, 1978) 또는 LH-RH 유사체(Banik와 Givner, 1976)가 성주기 또는 배란에 영향을 줄 수 있고 에스트로젠(Oettel 등, 1980)은 교미 후 난자의 난관통과의 시간적 경과를 변화시킬 수 있으며, 에스트로젠 길항물질(Menegola 등, 1998)도 수정란의 착상을 방해하여 수태능력의 저하를 가져올 수 있다. 독성학적인 관점에서 설치류를 이용한 수태능 및 초기배 발생시험의 신뢰성에 대한 평가는 아직 폭넓게 실시되지 않았다. 반면에 여성과 남성의 피임을 위한 여러 가지 약물의 사용 가능성 문제를 다루고 있는 개요들이 있다(Rosenberg 등, 1995). 설치류에서 얻어진 번식성적을 인간에게 적용하기란 매우 어려운 것으로 간주되지만, 문헌에 나타난 바로는 논란이 되는 다수의 물질에 있어서 적어도 수태능력 억제작용과 작용기작에 대한 최초의 지식은 설치류, 특히 랫드에서 발견되었다. 이것은 랫드를 이용한 수태능 및 초기배 발생시험의 충분한 적합성을 말해준다.

2. 배·태자발생시험(Study for effects on embryofetal development)

1) 목적 및 원칙

배·태자발생시험의 목적은 시험물질을 아독성 용량(subtoxic dose)으로 동물에 처치한 후 한가지 혹은 여러 가지 종류의 배자(태자) 독성작용을 유발할 수 있는지를 조사하는데 있다. 실험동물을 이용하여 얻은 결과는 임신부에 있어서의 배자(태자) 독성의 위험을 평가하기 위해 사용된다. 이러한 시험목적에 부합되도록 배·태자발생시험에서는 실험동물의 임신중 배자(태자)가 외부물질에 가장 민감한 시기(기관형성기)에 투여된다. 시험물질의 배자(태자) 독성작용은 임신동물과 태자의 여러 가지 검사에 의해 평가된다.

2) 시험계획

어떤 물질의 배·태자발생시험을 위한 종의 선택은 실제적인 관점(예: 육종, 관리 및 취급비용), 축적된 경험의

정도 그리고 생리적, 발생학적 및 약력학적 측면에서의 인간과의 근접도에 달려있다(Neubert 등, 1987; Tyl, 1993). 마지막으로 언급된 기준은 실험동물의 종에 관계없이 다만 제한적으로 충족되어 배·태자발생시험을 위해서는 약물대사 양식이 사람과 유사한 여러 동물종을 사용함으로써만 인체상황에 근접한 결과를 얻을 수 있다. 현재 여러 종의 실험동물들이 배·태자발생시험을 위해 사용되고 있는데 모든 동물종들이 상기한 기준들에 있어서 장단점을 나타낸다. 일반적으로 랫드와 토끼가 실험동물로 많이 사용되고 있으며 다른 종에 비해서 경험이 많이 축적되어 있고 실제적인 장점 이외에 이미 알려진 기형유발 물질에 대해 충분한 민감성을 나타내기 때문이다. 마우스도 역시 기형유발물질에 대해 민감하게 반응하지만 계통간의 차이와 비특정 요소에 대한 민감성 때문에 결과해석의 제한성이 있다. 어떤 약제를 임신부의 치료를 위해 사용하고자 할 때에는 원숭이(예: callithrix, paviane 등)를 실험동물로 사용할 수 있다. 왜냐하면 원숭이는 적어도 번식생리, 태반형성 및 발생에 있어서 인간과 가장 유사하기 때문이다(Wilson, 1978a). 그러나 매우 값이 비싼 원숭이를 이용한 배·태자발생시험은 시험물질의 흡수율, 약력학검사 항목의 비교 데이터를 확보한 후에 실시해야 한다. 임신중의 투여개시 및 기간은 동물종에 따라 다른 기관형성에 따라 선택된다. 보통 3개 용량군을 두며 최저농도군은 대략 임상예정농도 범위에 근접하고 최고농도군은 경미한 모독성(예: 10%의 체중증가 억제)을 나타내야 한다. 최고농도의 선택은 동일한 종을 사용한 일반독성시험의 성적을 고려하여 명백한 독성과 과다 약리작용을 피해야 한다(Chernoff 등, 1989). 임신동물을 이용한 농도결정 예비시험(range finding study)은 낮은 배자(태자) 치사농도의 선택을 위한 정보를 얻을 수 있는 장점이 있다. 통계처리 기준에 따라서 군당 사용동물수가 정해지는데, 의미있고 실제적인 범위내에서 동물이 사용되어야 한다(예: 랫드 16, 토끼 12, 원숭이 10마리 임신동물/군). 다산동물을 이용한 생식독성시험은 통계처리의 측면에서 특수한 문제를 지니고 있다. 왜냐하면 동복자들의 시험정적이 얻어지기 때문이다. 이와 같은 자료를 놓고 볼 때 일반적으로 동복자(litter), 즉 한 모동물의 태자 또는 출산자들이 다른 모동물의 태자 또는 출산자들 보다 유사하게 반응하는 경향을 보인다. 해당 검사항목(예: 태자체중, 태자치사, 기형발현 등)의 통계처리를 위해서는 태자가 아니라 동복자를 비의존적 통계단위로 사용할 것이 추천되고 있다(Staples와 Haseman, 1974). 물론 두가지 절치는 장단점이 있기 때문에 시험자료는 두가지 방법에 따라서 처리하는 것이 좋다(Neubert 등, 1980). 모든 변수(variable)에 대한 통계처리 절차 및 방법은 통계단위의 선택과 정상 혹은 비정상 분포 여부에 따라서 결정된다.

3) 시험방법

군분리 후에 임신동물들은 종에 따라 서로 다른 기관형성기 동안 처치된다. ICH 독성시험 기준(ICH, 1994)에 따르면 투여기간은 랫드의 경우 임신 6~15일, 토끼는 임신 6~18일 그리고 원숭이는 임신 20~50일이다. 임신기간중 매일 모동물의 일반증상을 관찰하고 일정한 간격으로 체중을 측정한다. 분만 1~2일 전에 동물을 도살한 후 자궁과 난소를 적출한다. 원숭이에 있어서는 임신 100일째에 제왕절개에 의해 태자를 적출한다. 황체수(랫드, 토끼) 이외에 착상수 및 위치, 생존 및 사망태자수, 초기 및 후기 흡수태자수를 조사한다. 생존태자의 체중측정 및 성별확인 후 외표기형 검사를 실시한다. 태자의 골격검사는 2가지 방법이 있는데, 윈트겐 검사와 연조직을 KOH로 처리한 후 골화된 골격부위를 alizarin red S로 염색하는 방법이다(Kawamura 등, 1990). 이를 약간 변형한 이중염색법들이 활용되고 있으며(Inouye, 1976; Web과 Byrd, 1994; Young 등, 2000), 윈트겐 방법은 다만 큰 태자에만 성공적으로 이용될 수 있다. 원숭이 태자의 내부장기 검사를 위해서는 병리에서 사용되는 부검법이 이용된다. 작은 태자(마우스, 랫드 등)에 있어서는 소위 Wilson의 절단법(Wilson, 1965)이 정평이 있다. 이 방법의 경우 Bouin 용액에 고정된 태자를 약 1~2 mm 두께의 횡단면으로 자르고 실체현미경으로 내부장기의 이상을 조사한다. 이 때 모든 태자의 골격염색이 불가능하므로 충분히 큰 태자수를 조사하기 위해서는 군당 산자수가 많은 동물종을 선택해야 한다. 또한 소형태자에 맞게 개발된 방법으로서 시간이 많이 소요되는 미세절단법은 랫드(Nishimura, 1974) 및 토끼태자(Stuckhardt와 Poppe, 1984)에 사용될 수 있으며 이중 토끼태자는 검사후에 골격염색이 가능하다.

4) 결과의 평가

출생전 투여에 의해 유도될 수 있는 배자(태자) 독성효과 중 발육지연 및 치사는 형태학적 기형과 구분된다. 발육지연은 태자체중 감소와 골화지연으로 표현되고, 형태학적 기형의 평가는 동물의 계통(strain)에 특이하게 자연발생적으로 정상범위내에서 규칙적으로 나타나는 경미한 구조적 변화로부터 매우 드물게 나타나는 중기형(major anomaly)에 이르기까지 종류가 다양하므로 복잡성을 나타낸다. 따라서 형태학적 이상을 의미도에 따라서 구분하는 것이 유리하다. 이 때 정상적인 구조와 다른 상이도의 기준은 예측되는 생리적 기능장애와 변화의 가역성(reversibility)이 기초가 된다. 각 범주별로 분리해서 평가를 실시함으로써 중기형의 발현율을 흔히 나타나는 다수의 변이(variation)와 경기형(minor anomaly)으로 부터 구분할 수 있으며(Kimmel과 Wilson, 1973; Chahoud 등, 1999a), 최근에는 형태학적 이상에 대한 용어통일안이 발표된 바 있다(Wise

등, 1997; Horimoto 등, 1998). 일반적으로 명백히 구분할 수 있는 변이와 기형 이외에 경미한 변이들(예: 랫드와 토끼의 요늑, 랫드의 파상형 늑골, 신우확장)이 나타나는데 이들의 병리학적인 의미는 다소 의문스럽다(Khera, 1981; Chernoff 등, 1991). 이와 같이 자연발생적으로 나타나는 기형의 높은 발현율은 최기형성효과가 아니라 발육지연 또는 비특정작용(unspecific effect)의 표시이다(Khera, 1981). 배자(태자) 독성평가에 있어서 모독성과의 상관성은 매우 중요하게 고려되어야 하는데, 이는 배자 및 태자에 나타나는 독성영향이 약물에 의해 직접적으로 나타나기도 하지만 모동물의 독성영향에 의해 간접적으로 나타날 수도 있기 때문이다(Khera, 1985; Chernoff 등, 1989; Daston, 1994; Chahoud 등, 1999b). 배자(태자)독성과 모독성과의 상관성은 각각의 무해용량을 이용한 발생학적 위험지수(developmental hazard index)로 평가하기도 한다(Johnson 등, 1987). 배자(태자) 독성 작용물질을 규명하는 데에는 동물실험 이외에 인간의 역학조사(epidemiological study)가 큰 도움이 된다. 역학조사는 인과관계의 규명측면에서 본질적으로 제한성이 있다. 따라서 인간에게 있어서 배자(태자) 독성작용을 유발할 가능성이 있는 다수의 약물들이 문헌에 열거되어 지는 것이 이해가 된다. 인체에 확실히 기형을 유발하는 것으로 간주되는 소수의 물질들(예: thalidomide, aminopterin, methotrexate, alcohol, phenytoin)에 반해서 실험동물에 있어서는 기형을 유발하는 이천이상의 화학물질들이 있다(Shepard, 1989). 이러한 차이는 한편으로는 실험동물과 인간과의 종의 차이로 설명되며 다른 한편으로는 동물실험에서 최기형성을 나타낸 많은 물질들이 사람의 임신기간 동안 실험동물의 경우와 동일하게 높은 용량으로 장기간동안 투여되지 않았기 때문이다.

5) *In vitro* 배·태자독성시험

이십여년 전부터 화학물질의 기형유발 잠재력(teratogenic potential)을 조사하기 위한 일련의 *in vitro* 시험법들이 도입되고 있는데(Wilson, 1978b; Neubert, 1982), 그중 몇가지 *in vitro* 시험법들[닭의 배자(태자), 착상후의 랫드태자 등]은 척추동물을 이용한 *in vivo* 결과와 높은 상관성을 나타낸다. 생식독성학의 범위내에서 *in vitro* 시험법의 사용 가능성을 평가할 때에는 우선 이러한 시험법들이 번식에 미치는 부작용의 평가를 위해 중요한 검사들[예: 수태능력 검사항목과 복잡한 출생시(후) 발달]을 파악할 수 없다는 것을 고려해야 한다. 그 밖에 적어도 출생전 발달의 후기에 가능한 치사 및 발육지연 작용은 *in vitro* 시험법으로는 식별할 수가 없어서 *in vitro* 시험법은 다만 최기형성 및 세포독성효과의 검사를 위해서 사용할 수 있다(Neubert, 1982; Spielmann과 Vogel, 1989). 이와 같이 어떤 물질의

최기형성 잠재력의 평가를 위한 이용성의 관점에서 볼 때 *in vitro* 시험법은 본질적으로 제한성이 있다. 특정(기형유발성) 및 비특정변화의 구분의 난해성 등의 방법적인 문제 이외에도 *in vitro* 시험법들은 복잡한 출생전 발달과정중에서 제한된 시점만을 파악할 수 있다(Webster 등, 1997). 그 밖에 어떤 시험물질의 기형유발 대사물질의 식별은 처치동물의 혈청이 사용되지 않았을 때에는 신중하게 선택된 대사활성계의 사용을 전제로 한다(Kitchin 등, 1981). 결론적으로 말해서 지금까지 사용되고 있는 *in vitro* 시험법들은 단시간에 적은 경비로 최기형성을 평가할 수 있는 장점은 있지만 생식기능의 복잡성으로 인하여 어느 것도 *in vivo* 시험계의 대치로 혹은 인체 최기형성의 위험평가를 위한 충분하고 신뢰할 만한 시험으로 간주될 수는 없다(Wilson, 1978b; Daston, 1996; Spielmann, 1998).

3. 출생전·후 발생 및 모체기능시험(Study for effects on pre- and postnatal development, including maternal function)

1) 목적 및 원칙

본 시험의 목적은 어떤 물질이 착상 후의 배자(태자)발달, 분만, 수유, 차세대 동물의 성장 및 성숙성에 미치는 영향을 조사하는데 있다. 이에 따라 모동물들에게 착상 후 임신기간동안과 수유기간 동안 시험물질이 투여된다. 용량설정과 통계학적 처리는 배·태자발생시험의 경우와 동일한 기준으로 실시한다. 최고용량의 선택은 수태능 및 초기배 발생시험의 경우와 마찬가지로 매우 신중하게 이루어져야 한다. 왜냐하면 배·태자발생시험의 경우 보다 높은 과다 약리 또는 독성작용은 처치된 모동물의 생리적 기능과 간섭해서 생식관련 검사항목에 영향을 주기 때문이다.

2) 시험방법

교배성립된 암컷 랫드를 임신 6일부터 이유기까지 투여한다. 매일의 일반증상 관찰과 체중측정 이외에 모동물의 임신기간, 분만상태 등을 조사한다. 포육기간의 차세대 생존율을 구하기 위해 일정간격으로 생존 및 사망지수를 기록하고 생존동물의 성별확인 및 체중을 측정한다. 또한 매일같이 가능한한 형태학적 기형 유무를 조사하고 생존동물의 일반행동 및 신체발달을 조사한다. 이유후 모동물의 부검 및 착상수의 확인은 출생지수와 더불어 출산전후 배자(태자) 사망의 계산을 가능하게 한다. 모동물당 산자의 일부는 성숙기까지 사육을 하고 F1 세대의 수태 및 번식능력을 조사하기 위해서 동일군 내에서 교배를 시킨다.

3) 결과의 평가

랫드에 있어서 출생전후의 발달은 비교적 민감한 시험

계로 간주될 수 있다. 왜냐하면 환경인자들[예: 모동물의 깔개(Norris와 Adams, 1976), 산자수(Agnish와 Keller, 1997), 스트레스(Vogel, 1993)]가 출생후 발달항목에 있어서 성육시 사망율의 증가에 이르기까지 현저한 변이를 유발할 수 있기 때문이다. 어떤 물질의 독성학적 농도는 물론 약리학적으로 유효한 농도도 모동물의 생리적인 과정에 영향을 주어 출산 또는 차세대동물의 성장에 장애를 유도할 수 있다(예: 비스테로이드계 소염제, 제스타젠, 진정제, 프로락틴 억제제). 출생전·후 발생 및 모체기능시험의 결과를 평가할 때에는 일반적으로 어떤 물질이 직접 태자 또는 출생자에 미치는 작용과 모동물의 약리, 독성학적인 효과에 의해 유도된 간접적인 부작용을 구분하도록 해야 한다. 의문시에는 출생자를 무처리 유모로 육성함으로써 이 문제를 규명할 수 있다(McClain과 Hoar, 1980). 직접적인 태자독성학적 영향과 출생전후 독성학적 작용은 인간 및 동물에 잘 알려져 있으며, 안드로젠(androgen)에 의한 남성화 현상, 알코올 태아장애(alcohol embryopathy), 디에틸stil베스트롤(diethylstilbestrol)의 경태반성 발암 작용 등이 이에 속한다(Allbeck과 Olsen, 1998; Kitamura 등, 1999). 그와 반면에 임상적인 경험을 근거로 볼 때 출생전 임신기간동안에 노출된 후 출생후에 나타나는 부작용과 출생후 수유기에 모유를 통해 노출될 때 나타나는 부작용을 시사하는 일련의 물질들이 있다(Faqi 등, 1998; Friedmann 등, 1999). 상응하는 동물실험 결과에 관한 논문발표의 수가 명백하게 낮은 것은 한편으로는 배·태자 발생효과가 학문적 관심의 초점이 되었고 다른 한편으로는 인간에게서 출생후 관찰된 몇가지 부작용(예: 억제증후군)은 현재 사용되는 실험방법으로는 쉽게 파악할 수 없다는 사실로서 설명이 된다.

4) 행동시험

출생으로부터 성장기까지의 난해한 행동발달은 복잡한 출생후 발달과정의 중요한 부분에 속하는데 행동이란 폭 넓은 범주의 기능적 능력으로 비교적 단순한 신체발달 과정으로부터 신경근육 조정능력을 거쳐 복잡한 학습 및 기억력을 포괄한다(Alder와 Zbinden, 1977; Butcher 등, 1980; Zbinden, 1981; Williams, 1995; Henck 등, 1996; Clausing 등, 2000). 어떤 물질(예: 수은염, 알코올)이 출생전 노출후에 인간의 행동장애를 일으킬 수 있다는 역학조사에서 인식된 위험 때문에(Zbinden, 1981), 출생전에 유도된 행동장애를 인식하기 위한 실험방법의 개발이 중요한 비중을 차지하게 되었는데 실험동물로서는 주로 랫드가 이용된다. 특정검사의 높은 기술적, 시간적 비용 이외에도 랫드의 짧은 출생후 발달시간의 관점에서 볼 때 어떤 한 실험의 모든 동물에 대해 모든 항목의 검사를 실시하기는 불가능하다. 실험결과는 다수의 환경인자와 실험조

건에 달려있으므로 시험의 실시는 본질적으로 제한을 받게된다(Zbinden, 1981; Claudio 등, 2000). 보통 랫드에 있어서의 출생후 행동변화는 모독성, 배자(태자)독성 또는 출생시(후) 독성을 나타내는 용량보다 명백하게 낮은 용량에서는 관찰되지 않는다(Butcher 등, 1980; Zbinden, 1981; Vorhees 등, 1982). 랫드를 이용한 행동시험의 민감성에 대한 의심은 어떤 신경독성 물질이 중추신경계 기형유발 농도를 투여한 후에도 출생초기에 생존동물에 있어서 어떠한 중대한 행동 및 기능장애를 유발하지 않았던 실험결과를 통해서도 증명된다(Brunner 등, 1978). 전체적으로 볼 때 랫드의 출생후기 행동변화 검사를 위한 적절한 시험법을 선택, 추천하는 것은 용이하지 않으며 현재의 학문 수준으로 볼 때 청각, 시각, 자발운동성, 학습능력 등의 검사를 위한 testing battery approach의 이용이 가장 적합하다(Zbinden, 1981; Williams, 1995; Claudio 등, 2000).

V. 결 론

그간 과학기술의 발전과 함께 우리 나라에서도 자체적으로 의약품 등의 신물질 개발이 성공적으로 추진되고 있다. 물질특허제도에 효율적으로 대처하기 위하여 1980년대부터 화학물질의 안전성평가가 체계를 구축하기 시작하였고 정부에서는 독성시험자료의 신뢰성을 확보하기 위하여 의약품 안전성시험관리기준(Good Laboratory Practice, GLP)을 제정, 운영하고 있다. 새로운 의약품의 개발시 반드시 수행되어야 하는 전임상시험(pre-clinical test)의 일종인 생식독성시험은 인간에 있어서 의약품이 생식세포의 발달로부터 출생 후 성장에 이르기까지 미치는 유해한 영향을 평가하는 분야로서 수태능 및 초기배 발생시험, 배·태자 발생시험과 출생전·후 발생 및 모체기능시험으로 구분되는데, 신규 의약품에 대한 효율적인 생식독성 평가를 위해서는 각 시험별로 기술한 결과의 해석방법들을 고려해야 한다. 동물실험을 통해 얻은 생식독성시험의 결과를 인체에 실제로 적용하기 위해서는 양적위험평가(quantitative risk assessment)가 요구되는데, 올바른 양적평가는 종의 특이성(species-specificity)을 고려한 실험동물의 선택과 무해용량(No Observed Adverse Effect Level)의 확립, 약력학적 데이터(pharmacokinetic data)의 고려 및 안전계수(safety factor, 약 10~30)의 사용으로 가능해진다.

참고문헌

- Agnish, N.D. and Keller, K.A. (1997): The rationale for culling of rodent litters, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **38**, 2-6.
- Alder, S. and Zbinden, G. (1977): Methods for the Eval-

- uation of Physical, Neuromuscular and Behavioral Development of Rats in Early Postnatal life in *Methods in Prenatal Toxicology* (Neubert, D. et al. eds.), George Thieme Publishers, Stuttgart, pp. 175-185.
- Allebeck, P. and Olsen, J. (1998): Alcohol and fetal damage, *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, **22**, 329S-332S.
- Banik, U.K. and Givner, M.L. (1976): Effects of a luteinizing hormone-releasing hormone analog on mating and fertility in rats, *Fertil. Steril.*, **27**, 1078-1084.
- Beck, F. (1976): Comparative placental morphology and function, *Environ. Health Perspect.*, **18**, 5-12.
- Brunner, R.L., Mc Lean, M., Vorhees, C.V. and Butcher, R.E. (1978): A comparison of behavioral and anatomical measures of hydroxyurea-induced abnormalities, *Teratology*, **18**, 379-384.
- Butcher, R.E., Wootten, V. and Vorhees, C.V. (1980): Standards in behavioral teratology testing: Test variability and sensitivity, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **1**, 49-61.
- Chahoud, I., Buschmann, J., Clark, R., Druga, A., Flake, H., et al. (1999a): Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation, *Reprod. Toxicol.*, **13**, 77-82.
- Chahoud, I., Ligensa, A., Dietzel, L. and Faqi, A.S. (1999b): Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects, *Reprod. Toxicol.*, **13**, 375-381.
- Chernoff, N., Rogers, J.M. and Kavlock, R.J. (1989): An overview of maternal toxicity and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments, *Toxicology*, **59**, 111-125.
- Chernoff, N., Rogers, J.M., Turner, C.I. and Francis, B.M. (1991): Significance of supernumerary ribs in rodent developmental toxicity studies: Postnatal persistence in rats and mice, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **17**, 448-453.
- Chung, M.K., Kim, J.C. and Roh, J.K. (1998): Embryotoxic effects of SKI 2053R, a new potential anticancer agent, in rats, *Reprod. Toxicol.*, **12**, 375-381.
- Claudio, L., Kwa, W.C., Russel, A.L. and Wallinga, D. (2000): Contemporary issues in toxicology: Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **164**, 1-14.
- Clausing, P., Mothers, H.K. and Opitz, B. (2000): Prewaning experience as a modifier of prenatal drug effects in rats and mice- a review, *Neurotoxicol. Teratol.*, **22**, 113-123.
- Collins, T.F.X., Sprando, R.L., Shackelford, M.E., Hansen, D.K. and Welsh, J.J. (1999): Food and drug administration proposed testing guidelines for developmental toxicity studies, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 39-44.
- Creasy, D.M. (1997): Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: The appropriate use of spermatogenic staging, *Toxicol. Pathol.*, **25**, 119-131.
- Daston, G.P. (1994): Relationship between Maternal and Developmental Toxicity in *Developmental Toxicity* (Kimmel, C. and Buelke-Sam, J. eds.), Raven Press, New York, pp. 189-212.
- Daston, G.P. (1996): The theoretical and empirical case for in vitro developmental toxicity screens, and potential applications, *Teratology*, **53**, 339-344.
- Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Merker, H.J. and Chahoud, I. (1998): Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of TCDD in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **150**, 383-392.
- Friedman, M.A., Tyl, R.W., Marr M.C., Myers, C.B., Gerling, F.S. and Ross, W.P. (1999): Effects of lactational administration of acrylamide on rat dams and offspring, *Reprod. Toxicol.*, **13**, 511-520.
- Goldenthal, E.I. (1966): *Guidelines for Reproduction Studies for Safety Evaluation of Drugs for Human Use*. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.
- Henck, J.W., Frahm D.T. and Anderson, J.A. (1996): Validation of automated behavioral test systems, *Neurotoxicol. Teratol.*, **18**, 189-197.
- Hood, R.D. (1997): *Handbook of developmental toxicology*. CRC Press, Boca Raton.
- Horimoto, M., Ariyuki, F., Daidohji, S., Fujii, T., Fukunishi, K. and Hanada, S. (1998): Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals, *Cong. Anom.*, **38**, 153-227.
- ICH (International Conference on Harmonization) (1994): Guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products, Fed. Regist. 59(183), 48746-48752, SEP 22, 1994.
- Inouye, M. (1976): Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S, *Cong. Anom.*, **16**, 171-173.
- Johnson, E.M., Christian, M.S., Dansky, L. and Gabel, B.E.G. (1987): Use of the developmental relationship in prescreening for developmental hazards, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **7**, 273-285.
- Kaufmann, P. and Burton, G. (1994): Anatomy and Genesis of the Placenta in *The physiology of Reproduction* (vol I), Second edition, (Knobil, E. and Neill, J.D. eds.), Raven Press, New York, pp. 441-484.
- Kavlock, R.J., Allen, B.C., Faustman, E.M. and Kimmel, C.A. (1995): Dose-response assessments for developmental toxicity: IV. Benchmark doses for fetal weight changes, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **26**, 211-222.
- Kawamura, S., Hirohashi, A., Kato, T. and Yasuda, M. (1990): Bone-staining technique for fetal rat specimens without skinning and removing adipose tissue, *Cong. Anom.*, **30**, 93-95.

- Kendle, K.E., Paterson, J.R. and Wilson, C.A. (1978): Effects of RMI 12, 936, a synthetic antiprogestational steroid, on the oestrus cycle and ovulation in the rat, *J. Reprod. Fert.*, **53**, 363-368.
- KFDA (1998): Guidelines for Toxicity Studies of Drugs, Notification No. 1998-116, Seoul, Korea Food and Drug Administration.
- Khera, K.S. (1981): Common fetal aberrations and their teratologic significance: A review, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1**, 13-18.
- Khera, K.S. (1985): Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species, *Teratology*, **31**, 129-153.
- Kim, J.C., Lim, K.H. and Chung, M.K. (1999): Testicular cytotoxicity of DA -125, a new anthracycline anticancer agent, in rats, *Reprod. Toxicol.*, **13**, 391-397.
- Kim, J.C., Shin, H.C., Yun, H.I., Han, S.S. and Chung, M.K. (2000): Embryo lethality and teratogenicity of a new fluoroquinolone antibacterial DW-116 in rats, *Arch. Toxicol.*, **74**, 120-124.
- Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973): Skeletal deviation in rats; malformations or variations?, *Teratology*, **8**, 309-316.
- Kitamura, T., Nishimura, S., Sasahara, K., Yoshida, M., Ando, J., Takahashi, M., Shirai, T. and Maekawa, A. (1999): Transplacental administration of diethylstilbestrol (DES) causes lesions in female reproductive organs of Donryu rats, including endometrial neoplasia, *Cancer letters*, **141**, 219-228.
- Kitchin, K.T., Sanyal, M.K. and Schmid, B.P. (1981): A coupled microsomal activating embryo culture system : Toxicity of reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 985-992.
- LaPol, R.S., Matt, D.W. and Lu, J.K.H. (1998): Progesterone implants delay age-related declines in regular estrous cyclicity and the ovarian follicular reserve in long-evans rats, *Biol. Reprod.*, **59**, 197-201.
- Manson, J.M. and Kang, Y.J. (1989): Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology in *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, W. ed), Raven Press, New York, pp. 311-359.
- McClain, R.M. and Hoar, R.M. (1980): The effect of flunitrazepam on reproduction in the rat. The use of cross-fostering in the evaluation of postnatal parameters in rat reproduction studies, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 92-100.
- Menegola, E., Broccia, M.L., Prati, M. and Giavini, E. (1998): Postcoital antifertility activity of aminoalcohols, *Reprod. Toxicol.*, **12**, 371-374.
- Morriss, F.H., Boyd, R.D.H. and Mahendran, D. (1994): Placental Transport in *The Physiology of Reproduction* (vol II), Second edition, (Knobil, E. and Neill, J.D. eds.), Raven Press, New York, pp. 813-861.
- Neubert, D. (1982): The use of culture techniques in studies on prenatal toxicity, *Pharmac. Ther.*, **18**, 397-434.
- Neubert, D., Barrach, H.J. and Merker, H.J. (1980): Drug Induced Damage to the Embryo or Fetus in *Drug Induced Pathology. Current Topics in Pathology* (vol. 69) (Grundmann, E. eds.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 241-331.
- Neubert, D., Chahoud, I., Platzet, T. and Meister, R. (1987): Principles and problems in assessing prenatal toxicity, *Arch. Toxicol.*, **60**, 238-245.
- Nishimura, K. (1974): A microdissection method for detecting thoracic visceral malformations in mouse and rat fetuses, *Cong. Anom.*, **14**, 23-40.
- Norman, A.W. (1997): Hormones of Pregnancy and Lactation in *Hormones* (2nd edition), Academic Press, San Diego, pp. 387-411.
- Norris, M.L. and Adams, C.E. (1976): Incidence of pup mortality in the rat with particular reference to nesting material, maternal age and parity, *Lab. Anim.*, **10**, 165-169.
- OECD (1995): OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Guideline 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Oettel, M., Kurischko, A., Strecke, J. and Koch, M. (1980): Embryotoxic effects of post coital fertility inhibiting steroids, *Arch. Toxicol.*, **4**(Suppl.), 248-251.
- O'Flaherty, E.J. (1997): Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and prediction of developmental abnormalities, *Reprod. Toxicol.*, **11**, 413-416
- Ratcliffe, J.M., McElhatton, P.R. and Sullivan, F.M. (1993). Reproductive Toxicity in *General and Applied Toxicology* (vol II), (Ballantyne, B., et al. eds.), Stockton Press, New York, pp. 989-1020.
- Rosenberg, M.J., Burnhill, M.S., Waugh, M.S., Grimes, D.A., Paula J.A. Hillard, P.J.A. (1995): Compliance and oral contraceptives: a review, *Contraception*, **52**, 137-141.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinhaikim, A.P., et al. (1990): The Classification and Timing of Spermatogenesis in *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Florida, pp. 41-58.
- Seed, J., Chapin, R.E., Clegg, E.D., Dostal L.A., Foote, R.H., et al. (1996): Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report, *Reprod. Toxicol.*, **10**, 237-244.
- Shepard, T.H. (1989): Catalog of Teratogenic Agents. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Speirs, A.L. (1962): Thalidomide and congenital abnormal-

- alities, *Lancet*, **1**, 303-305.
- Spielmann, H. and Vogel, R. (1989): Unique role of studies on preimplantation embryos to understand mechanisms of embryotoxicity in early pregnancy, *Crit. Rev. Toxicol.*, **20**, 51-64.
- Spielmann, H. (1998): Reproduction and development, *Environ. Health Perspect.*, **106**(Suppl 2), 571-576.
- Staples, R.E. and Haseman, J.K. (1974): Selection of appropriate experimental units in teratology, *Teratology*, **9**, 259-260.
- Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984): Fresh visceral examination of rat and rabbit fetuses used in teratogenicity testing, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **4**, 181-188.
- Tyl, R.W. (1993): Developmental Toxicology in *General and Applied Toxicology* (vol II), (Ballantyne, B. et al. eds), Stockton Press, New York, pp. 1021-1046.
- U.S. EPA (Environmental Protection Agency). (1996): Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.3700, Prenatal developmental toxicity study, Public Draft, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Vogel, W.H. (1993): The effect of stress on toxicological investigations, *Hum. Exp. Toxicol.*, **12**, 265-271.
- Vorhees, C.V., Klein, K.L., and Scott, W.J. (1982): Aspirin-induced psychoteratogenesis in rats as a function of embryonic age, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **2**, 77-84.
- Warkany, J. (1977): History of Teratology in *Handbook of Teratology* (vol. 1), (Wilson, J.G. and Fraser, F.C. eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 3-45.
- Web, G.N. and Byrd, R.A. (1994): Simultaneous differential staining of cartilage and bone in rodent fetuses: an Alcian Blue and Alizarin Red S procedure without glacial acetic acid, *Biotechnol. Histochem.*, **69**, 181-185.
- Webster, W.S., Brown-Woodman, P.D.C. and Ritchie, H.E. (1997): A review of the contribution of whole embryo culture to the determination of hazard and risk in teratogenicity testing, *Int. J. Develop. Biol.*, **41**, 329-335.
- Williams, A.M. (1995): Neurobehavioral test batteries: current status, critical evaluation and new directions, *Toxicol. Lett.*, **82/83**, 203-209.
- Wilson, J.G. (1965): Methods of Examining Rat Fetuses for Malformations in *Teratology. Principles and Techniques* (Wilson, J.G. and Warkany, J. eds.), University of Chicago Press, Chicago and London, pp. 263-277.
- Wilson, J.G. (1977): Current Status of Teratology-General Principles and Mechanisms Derived from Animal Studies in *Handbook of Teratology* (vol. 1), (Wilson, J.G. and Fraser, F.C. eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 47-74.
- Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (1977): Mechanisms and Pathogenesis in *Handbook of Teratology* (vol. 2), (Wilson, J.G. and Fraser, F.C. eds.), Plenum Press, New York and London.
- Wilson, J.G. (1978a): Feasibility and Design of Subhuman Primate Studies in *Handbook of Teratology* (vol. 4), (Wilson, J.G. and Fraser, F.C. eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 255-273.
- Wilson, J.G. (1978b): Review of in vitro systems with potential for use in teratogenicity screening, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **2**, 149-167.
- Wilson, J.G. (1979): The evolution of teratological testing, *Teratology*, **20**, 205-212.
- Wilson, J.G., Scott, W.J., Ritter, E.J. and Fradkin, R. (1979): Comparative distribution and embryotoxicity of methotrexate in pregnant rats and rhesus monkeys, *Teratology*, **19**, 71-80.
- Wise, L.D., Beck, S.L., Beltrame, D., Beyer, B.K. and Chahoud, I., et al. (1997): Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1), *Teratology*, **55**, 249-292.
- Young, A.D., Phipps, D.E. and Astroff, A.B. (2000): Large-scale double-staining of rat fetal skeletons using alizarin red S and alcian blue, *Teratology*, **61**, 273-276.
- Zbinden, G. (1981): Experimental methods in behavioral teratology, *Arch. Toxicol.*, **48**, 69-88.