

生殖・発生毒性試験の代替法（現状と近未来）

秋田 正治

Current Status and Future Progress of Reproductive/Developmental Toxicity Test

Masaharu AKITA

Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Family and Consumer Sciences,
Kamakura Women's University, 6-1-3 Ofuna, Kamakura City 247-8512, Japan

(Received January 11, 2008)

Currently, the European Centre for the Validation of Alternative Methods in the EU appears to be at the forefront of the development of alternative methods for developmental toxicity test (reproductive/developmental toxicity test). Why is it difficult to develop alternative methods for developmental toxicity test in comparison with other toxicity tests? In developmental toxicity test, chemical substances first enter the bloodstream and then reach the placenta *via* metabolism in the liver and other organs. After further metabolism in the placenta, chemical substances finally reach the fetus, where they affect fetal development. The difference in the *in vivo* route of chemical substances is an important reason for the difficulty in the establishment of new methods for developmental toxicologic test in comparison with general toxicity tests. According to the EU, the use of “*in silico*” techniques for developmental toxicity test may be difficult, and I agree with this. The *in silico* technique is basically a method for prediction of toxicologic effects from existing data, and cannot predict new effects, because data obtained by developmental toxicologic test are too complex. Three techniques are now being examined to overcome the difficulty in changing the method of developmental toxicologic test: the technique utilizing embryonic stem cells; micromass culture technique; and the whole embryonic culture technique. In this symposium, the current status of developmental toxicity tests and the three techniques being examined in the EU are introduced, and opinions on future progress are presented.

Key words—whole embryonic culture; developmental toxicological test; alternative Method

1. はじめに

動物実験代替法が世界的に重要視されていることは周知の通りであり、各領域でその検討が進められている。

動物実験代替法の研究が必要とされる理由は、動物福祉や愛護の立場から、動物を殺すような行為は廃止すべきとの観点によるところが強い。確かに、現在までに行われてきた動物実験はすべて有益かつ極めて意義が高く、不必要な実験は1つとしてないと言及できるかは疑問である。研究者は、この点について生物を扱う立場として慎重な対応が必要であろう。しかし、動物実験代替法は、この意味からのみ必要とされているものではない。現実を考えた場

合、世の中で使用されている化学物質は2-3万種類以上あるとされ、しかもそのほとんどの物質の詳細な安全性は確認されていない状況にある。これを既存の手法に従い安全性を評価した場合、時間と試験費が膨大にかかるため、ハイスループット化すること、さらには大幅なコストダウンが現実的に必要とされている。この理由も動物実験代替法が、必要とされている大きな理由の1つである。これらすべての理由により、現在の動物実験代替法はRussellとBurchが提唱した「3つのR」、すなわち削減 (Reduction)、純化 (Refinement)、及び置き換え (Replacement) という考えを基本的概念^{1,2)}として、様々な検討が行われている。

2. 国内外の動向

日本における代替法開発研究は日本動物実験代替法学会やJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) などが中心となって進められ、さらに平成18年度から5ヵ年計画で

鎌倉女子大学家政学部管理栄養学科 (〒247-8512 鎌倉市大船 6-1-3)

e-mail: kwu-kiri@kamakura-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS40で発表したものを中心に記述したものである。

NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization)においても代替法開発のプロジェクトが開始されている。世界的に最も研究が進んでいるのはEUであり、EUにおいては2003年3月11日に公布されたEU化粧品指令第7次改正で、多くの試験に対する動物実験廃止の達成期限を2009年3月11日としたが、薬物動態試験、発生毒性試験、反復投与試験に限り、その達成期限を10年後の2013年3月11日までとし、その後の延長もあり得るとしている。これは、これら3つの手法が他の試験法と比較して代替化が非常に困難であることを示している。

さらにECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)においても、EUの代替法研究の中心を担い、発生毒性試験法の代替化に積極的に乗り出している。

また、REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals)においては、現状のまま安全性試験を行うと動物実験が膨大となるので、代替法の導入を加速することで乗り切ろうと考えて、平成17年より急性毒性・発生毒性・感作性の3つのプロジェクトが5年計画でスタートしている。

このようなEUなどの取り組みからも分かるように、発生毒性試験に関する代替法開発は極めて困難と位置づけられている。

3. 発生・毒性試験としての代替法の課題

Figure 1のように、一般毒性試験の場合、投与された化学物質は動物体内に吸収され、肝等で代謝さ

れながら動物に影響を及ぼす。発生毒性試験の場合、化学物質は、はじめに母獣に投与されると母獣の肝において代謝されながら母獣の体内を循環するところまでは一般毒性と同様である。しかし、それ以降、その未変化体や代謝産物が胎盤に到達し、胎盤機能の影響を受け、そして胎盤を通過した物質は、そこで初めて胎児に到達し影響を及ぼす。当然ながら、胎児自身や胎児を取り巻く組織(卵黄嚢等)によっても物質は変化する可能性がある。さらに、投与された薬物により母獣に変化が生じ、2次的に胎児の発育に影響を与えることも考えられる。

このように、発生毒性試験は、胎児に化学物質が到達するまでに母獣と胎盤を通過するため、何重もの影響を受ける可能性があり、これが一般毒性試験と大きく異なる点である。発生毒性試験の代替法を考える場合は、これらのことをすべて考慮した試験系でなければ *in vivo* と同じ結果を導くことは不可能である。発生毒性試験の代替法は、今までいくつかの試験法が考案されている。哺乳動物を使用する方法³⁻¹²⁾や、非哺乳動物¹³⁻²⁷⁾から非脊椎動物まで実に様々な生物を使用した手法があるが、どの手法も前述のように母獣や胎盤機能を考慮した試験系ではなく、現在の哺乳動物を用いた *in vivo* 試験データと完全に一致するものは皆無であり、今後もそれを期待することは限りなく不可能に近いと考えられる。これが、発生毒性試験の代替化が困難を極めている要因である。

当然ながら、*in silico* による手法も発生毒性試験

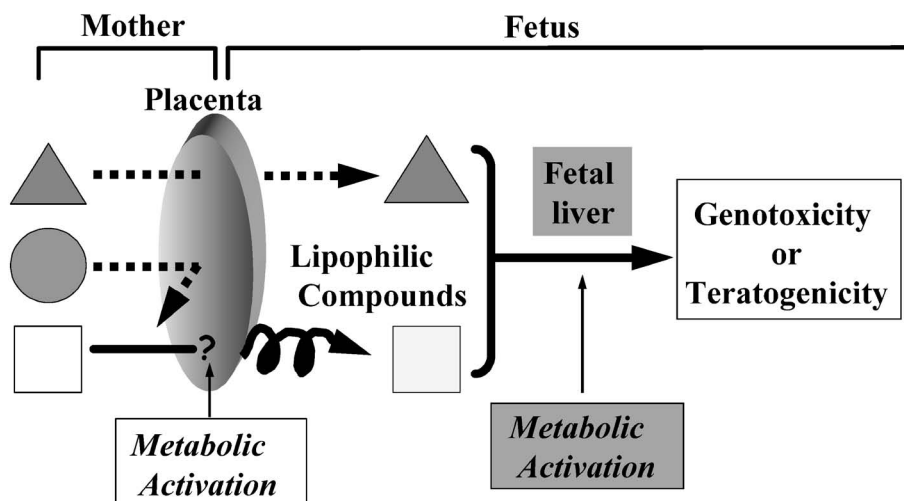


Fig. 1. Toxicity of Xenobiotic Substances in Fetus: Focus on the Metabolic Activation Process in the Fetal Liver or in the Fetus as a Whole

法への適用は無理であろうというのが、EUの見解である。In silico はあくまで既存の蓄積されたデータから影響を予測する手法で、新たな影響を予測することはできない。また、発生毒性試験の結果は、パターン化できるほど単純なものではなく、in silico により予測することは不可能であろう。

ECVAM は、この困難といわれる発生毒性試験代替化の取り組みとして、ES 細胞を用いる方法 (EST)、マイクロマスカルチャー法 (MM)、胎児培養法 (WEC) の 3 種類の手法を組み合わせ、総合的に判断する方向で検討が進められている。

4. 3 手法の比較

EST, MM 及び WEC の 3 つの手法について比較をした (Table 1)。動物の使用の有無を比較すると、EST は最初の段階で動物から ES 細胞を採取するが、その後は全く動物を使用することがない。それと比較して、MM は胎児から肢芽 (Limb Bud) などの未分化細胞を取り出し、この細胞の増殖能を確

認する手法であり、WEC は母体から胎児を取り出して胎盤が付いている状態の Whole body を培養装置に入れて胎児が発育する過程を確認する手法であるため、MM 及び WEC の両試験法とも試験毎に動物を使用することになる。すなわち、EST は Replacement になるが、MM と WEC は Reduction と考えなければならない。一方、評価については、EST と MM はともに細胞の増殖率等の判定のため分化能しか評価できない。これに対し、WEC は、胎盤を付けた状態で胎児をそのまま培養するため Fig. 2 に示したように、尾の異常や浮腫、血腫等、さらに口唇裂などの奇形を予測できるような形態異常も確認することが可能である。さらに経時的に観察が可能であるため生理機能などを測定することができる。このように WEC は分化能のみならず、形態形成の異常を実際に確認することや生理機能解析が可能となることが、EST や MM とは大きく異なるといえる。

Table 1. Comparison of EST, MM and WEC

Test	Animal	Evaluation	Difficulty of technique	Evaluation period	Cost
EST	No use	Differentiation	+	5-14 days	No difference
MM	Use	Differentiation	+	5-7 days	
WEC	Use	Differentiation Morphogenesis Physiogenesis	≡	2-3 days	

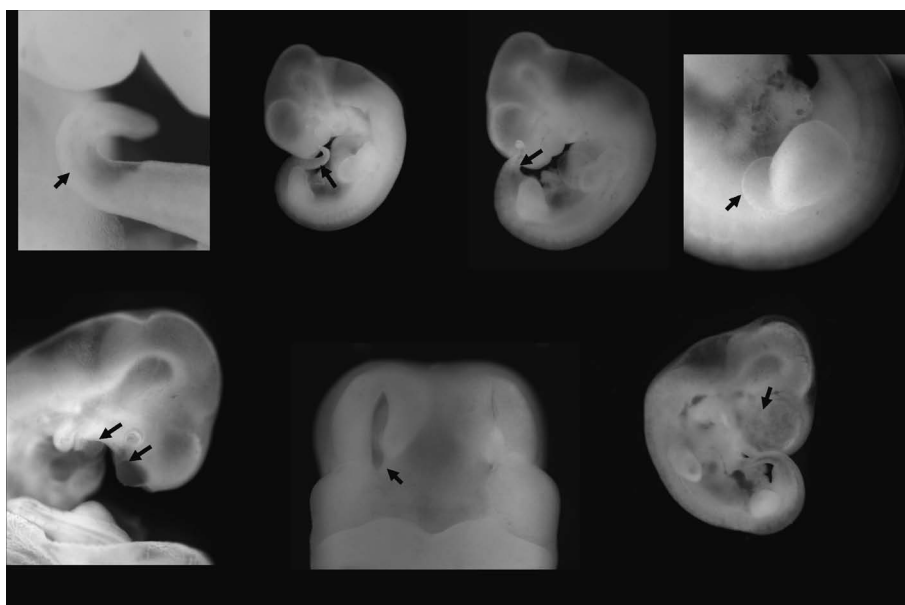


Fig. 2. Photos Indicated Embryos Presenting Abnormalities

また、操作方法については、全く手法が異なるため技術的な問題であり正確に比較することはできず、また3手法とも自動化できるような簡単な手法ではない。しかし、あえて比較するならば、EST並びにMMは、細胞を扱うことができれば比較的容易に操作することが可能だが、一般にWECは他の手法に比べ難しいとされている。それは、WECはそのすべての過程を人間の手により処理していくことになるため、人為的な影響が非常に強く現れることが大きな原因と考えられる。

評価時間においては、*in vivo* 試験と比較すると、3手法とも著しく短期間で判定が可能であり、どれもハイスループットな試験法と考えられる。3手法間で比較すると、MMとESTは1-2週間ほど判定に時間を必要とするが、WECは3日以内で判定が可能となり、WECが他の試験法と比較するとやや優れていることになる。しかし、前述したようにWECは操作性においての難しさや、1人当たりの処理能力を考慮して総合判定に要する日数は、むしろ他の手法よりも評価時間が長くなる可能性が考えられるため、評価時間の優劣をつけるのは難しい。さらに経費については、それぞれの試験法を確立しないと比較はできないが、動物費や様々なキット費用を鑑みても現時点では同じ程度と判断する。

これらのことを総合的に判断して、発生毒性試験の代替法として最も中心的存在を担うのは、動物を使用しないESTであることは間違いないであろう。しかしESTのみで発生毒性試験の代替法を確立することは前述したように分化能のみからの判定となるため不安が残る。

ISO/TC194/WG6の専門部会が2007年2月にベルリンにおいて開催され、ECVAMでバリデーションを行った3手法(EST, MM, WEC)を作業分科会(Annex)とすることが提案された。すなわち、現在の発生毒性試験の方向性は、この3種を試験法として確立し、これらの試験データを総合的に判断することとされている。

このような方向性にWECが組み込まれることとなった最大の理由は、発生毒性試験は、あくまで胎児がどのような奇形を有するかが最も重要だからであり、この点において発生毒性試験の代替法におけるWECの果たす役割は、非常に大きいと思われる。

5. 胎児培養法 (WEC)

5-1. 歴史及び手技

発生学を研究するためには、体外でその過程が容易に観察できることが必要であり、そのため両生類などを用いた研究が進められてきた。

哺乳動物の胎児を母体から取り出してそのまま培養させる手法は、20世紀はじめに原始的なものが開発され、1930年代に現在の手法の原点ともいえる技術開発が進められた。²⁸⁻³⁰⁾そして1960年代にWatch-Glass culture法などが確立し、³¹⁾哺乳動物における器官形成期の胎児が培養できる手法の基礎は、1978年にD. A. T. Newによって開発された。³²⁻³⁴⁾一方、Hsuにより、マウス胚盤胞から初期体節数まで発生させることに成功したとの報告もあるが、³⁵⁻³⁷⁾成功率が低く操作性が煩雑なため、それ以降使用された報告は見当たらない。現在はラット、マウスの胎児の培養が主流であるが、その他にもウサギやオポッサムなどの胎児も培養が可能であり、基本的には哺乳動物ならば培養ができるとされている。

ラットは、器官形成期初期の胎齢9.5日目(plug day=0)から、マウスは8.5日目から培養が可能である。神経管閉鎖前の時期から四肢の指放線が認められる時期までが培養の限界であるが、この器官形成期の胎児をWhole Bodyで培養できる系は本手法しか存在しない。培養期間が限られるため、どの時期の胎児の発生過程を用いるかにより培養開始胎児を選択する必要がある。

現在、筆者が代替法として検討しているステージは、ラット胎齢11.5日目から48時間である(Fig. 3)。Figure 4の通り培養開始時の胎齢11.5日目の胎児は、平均値として頂殿長3.8 mm、総タンパク質量300 µg/embryo、総体節数34であり、この胎児を48時間培養すると頂殿長7.8 mm、総タンパク質量4000 µg/embryo、総体節数48にまで成長・発育する。このステージは、培養開始から24時間後に、卵黄嚢に切開を加えて胎児を卵黄嚢内から開放する操作が必要となる。この時期は、顔面形態形成、肢芽や心などの臓器の発達も顕著であり、形態形成異常も起こり易い時期である。培養液は100%ラット血清を用い、本研究室では、Fig. 5のような自動送気型の培養装置を使用している。その他に、ローラーボトルを利用する場合もあるが、詳細な異

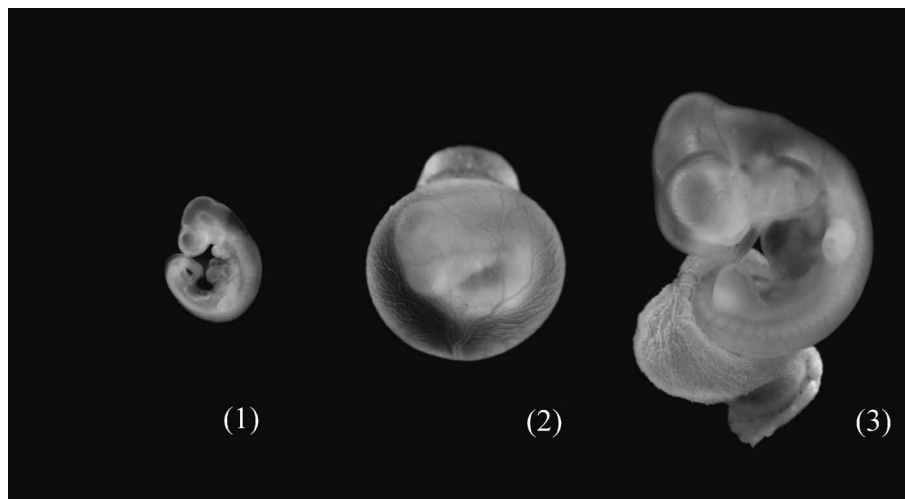


Fig. 3. Time-course of Morphological Change of the Cultured Rat Embryo in the Medium

(1): the embryo isolated from immediately the uterus (incubation time=0), (2): the embryo 24 h after incubation in the medium, (3): the embryo 48 h after incubation in the medium.

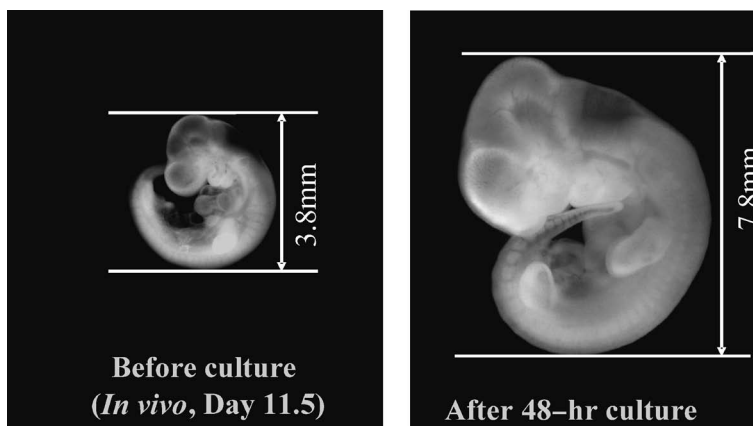


Fig. 4. Growth and Differentiation of Cultured Rat Embryo

Growth Marker	Crown-rump length	3.8 mm	→	7.8 mm
		Total Protein		
Differentiation marker	Total number of somites	34 → 46		

常の確認やメカニズム解析などには、この装置は不適と考える。

5-2. 利点と欠点 WECは、前述の通り器官形成時期の胎児を、そのままの状態では培養するもので、成長・発育の過程を肉眼で確認できる唯一の手法である。発生毒性試験の代替法としてES細胞を使用する意義は絶大であり、ES細胞の遺伝子発現等の異常を確認することにより多くの催奇形性を予測することが可能と判断する。しかし発生毒性試験においては、1962年まで使用されたサリドマイドの事例からの教訓により、実際の形態形成はどのようになるのかを確認しない限りは、不安因子を取り

除くことができない。現在の *in vivo* 試験は、これらのことを可及的に解決する手段として確立されている。その *in vivo* 試験の代替法を考える場合、当然のごとく形態形成を肉眼で確認することが望まれるのでWECは現在の手法の中で、最良とされている。³⁸⁻⁴⁹⁾

一方、WECを動物実験代替法として考えた場合の最大の欠点は、生体を使用することである。胎児培養を利用する限り、ReplacementにはならずReductionの方向で手法の開発を検討することになる。使用動物数は、現時点においても *in vivo* 試験と比較すれば、圧倒的にWECの方が少ないと言え

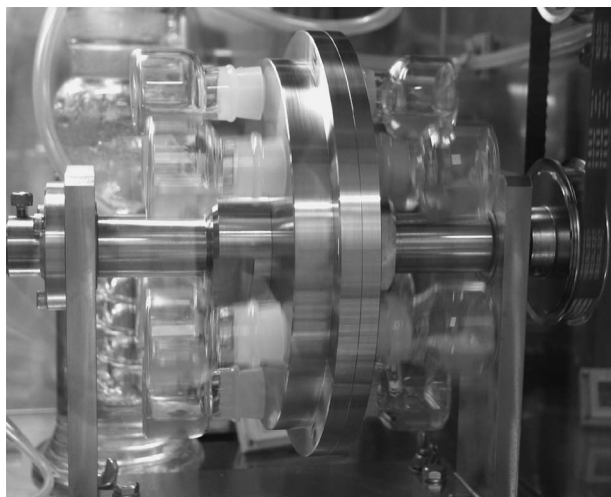


Fig. 5. This is a Rotor for Culturing the Embryo

るが、他の *in vitro* 試験法と比べた場合、WEC は確実に多くの動物を使用することになる。特に培養液として 100% のラット血清を非動化^{50,51)}して使用するため、血清採取用に大量の動物を使用することが大きな課題となる。筆者らはラット血清を使用せず培養を行うため、大型家畜動物（牛、豚）、ヒト、⁵²⁻⁵⁶⁾ウサギ等の血清の使用を試みたがラット血清以上の培養成績は得られなかった。マウス血清の使用は可能であるが、採取量が極めて少ないため現実的な解決策ではない。さらに人工培養液の検討も試みたが、一部の培養ステージにおける短期間の培養は可能であるが、すべての培養ステージで使用できる人工培養液の開発は不可能であった。これらのことから、現時点において WEC を行う場合は、100% ラット血清を培養液とする以外に方法はなく、この培養液の少量化が、WEC を発生毒性試験の代替法として検討する場合の大きな課題となる。

Figure 3 のような自動送気型培養装置を用いる場合は、1 匹の胎児を培養するために約 4-5 ml の培養液を必要とするため、現在、NEDO のプロジェクトにおいて、新しい培養装置の開発を進めている。これが完成することにより、わずか 1-1.5 ml の培養液で 1 匹の胎児が培養できることになり、培養液使用量は現在の約 1/3 に少量化できる計算となり、当然使用動物数も 1/3 に減少できる。この開発が進めば、WEC も Reduction の観点から、発生毒性試験の代替法として、今以上に有効な手法になるものと考えられる。

次に、WEC を動物実験代替法として考える場

合、その操作性と評価が課題となる。本手法には、自動化できる部分は 1 つもなく、すべての操作を人間が行うことになる。それゆえ、技術者の能力により、実験結果に大きなバラツキが生じる。ごく普通に胎児を成長させるだけならば、培養成績に差があまり認められない場合でも、化学物質を投与すると、大きな差が現れることが頻繁にある。またラット胎齢 11.5 日目以降の培養を行う場合、かならず卵黄嚢を開放させることが必要となり、この技術が特に難しいとされる。培養技術の習得には、かなりの時間と労力が必要となるため、なんらかの対策を講じる必要がある。評価法においては、Brown⁵⁷⁾ が培養終了後の胎児を評価するスコア法を考案しているが、評価できるステージが限られており、また、詳細な安全性評価に使用できるかについても疑問が残る。しかし、これについては *in vivo* 試験の評価同様、一定の基準を設け対応することは可能と考える。またコンピューター技術を用いることにより、ある程度の評価法に関する自動化もできると思われる。

5-3. その他の課題 大きな課題は前項で述べた通りだが、その他細かな点を上げれば、化学物質の処理方法や培養開始時の発生ステージの統一などの課題もある。一般的な処理方法は、培養液中に化学物質を投与し、培養期間中その化学物質に暴露し続けるものであるが、その他にも、短時間の暴露処理法、卵黄嚢内投与法さらに胎盤投与等もある。また発生ステージを統一するための手法もいくつかある。さらには化学物質を処理する際に使用する溶媒も検討する必要がある。⁵⁸⁾ これらの課題は、今後の対応を期待したい。

5-4. 新たなる試み 現在、NEDO のプロジェクトとして、WEC データを *in vivo* データにより近付けるために、培養液にラット肝代謝酵素 S-9mix を添加して母獣の代謝機能を組み込む手法を検討している。以前にも WEC にラット S-9mix を処理する方法の実例はあるが、S-9mix 自体に毒性がありその安全領域の設定は検討されたことはない。そこで、筆者は WEC に対する S-9mix 濃度設定を行い、さらに S-9mix を添加することにより培養液中で化学物質が代謝される可能性、そしてその速度などのデータを取り、発生毒性試験の代替法として WEC を確立することを進めている。

また培養に使用する胎児の検討も必要である。現時点で使用している胎児は、一般に販売されている Wistar 系や SD などである。当然ラットとヒトとはその代謝機能や存在する薬物代謝酵素が異なるため、化学物質に対する反応も変わってくる。サリドマイドではラットにおける催奇形性が認められなかったが、その原因の1つとして、代謝機能の差異が上げられている。

遺伝子操作などを用いて、ヒト肝に存在する CYP をマウス肝の CYP と入れ替えた動物が現在作成され始めている。この動物が使用できるようになれば、ヒトに対する影響を確認する精度が飛躍的に向上することは確実である。このようにヒトと同じ薬物代謝能力を有しているマウス胎児を WEC に用いることは発生毒性試験の代替法開発として、とても意義の高いことである。このようなヒト型の薬物代謝機能を持った動物が1日でも早く確立されることを切望する。

6. まとめと今後の展望

1954年に開始された動物福祉のための大学連合 (University Federation of Animal Welfare: UFAW) が源となり、W.M.S. Russell と R. L. Burch の「3つのR」が提唱され、動物実験代替法開発は現在に至っている。残念なことに、このUFAWが開催されてから1980年代まで実験動物使用数は増加の一途を辿ってきた。この増加をきっかけに、1991年にはヨーロッパでECVAMが、さらに1994年にアメリカでICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) が設立された。日本においては、ECVAM設立前の1989年に日本動物実験代替法学会が、そして2005年にJaCVAMがそれぞれ設立された。また1993年には1st World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciencesが開催された。UFAWの開催からおおよそ30年後、ようやく世界的に動物実験代替法が本格的に検討され始め、20年あまりが経過しようとしている。代替法がほぼ確立できた分野もあるが、発生毒性試験のように、まだ出口が明確でないものも多いのが現状である。個人的な見解としては、EU化粧品指令第7次改正で提示された2013年3月11日の期日までには、発生毒性試験の代替法開発は、おおよその方向性が示されるのが限界であり、期間延長が余儀なくされると思われる。

しかし、極めて余裕がないことは事実であり、これから10年後には明確な指針が示されなければならない。発生毒性試験の代替化は、慎重かつ急速な対応が望まれている。日本は、これから世界に向けて動物実験代替法の提案を積極的に発信していくことが必要であり、日本の今後の活動に期待したい。

謝辞 本内容の一部は、NEDOからの委託研究「高機能簡易型有害性評価手法の開発／培養細胞を用いた有害性評価手法の開発 (P06040)」による成果である。また Fig. 1 は、北海道大学名誉教授 鎌滝哲也先生から借用させて頂いた。

REFERENCES

- 1) Russell, W. M. S., Burch R. L., "The Principles of Humane Experimental Technique," London, 1959, p.238.
- 2) Smyth D., "Alternatives to Animal Experiments," London, 1978, p.218.
- 3) Flint O. P., Orton T. C., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **76**, 383 (1984).
- 4) Flint O. P., Orton T. C., Ferguson R. A., *J. Appl. Toxicol.*, **4**, 109 (1984).
- 5) Shoji R., Suzuki K., Lee I. P., *Teratog. Carcinog Mutagen.*, **1**, 333 (1980).
- 6) Guntakata M., Mathews E. J., Rundell J. O., *Teratog. Carcinog Mutagen.*, **4**, 349 (1984).
- 7) Braun A. G., Nicholson B. B., Horowicz P. B., *Teratog. Carcinog Mutagen.*, **2**, 343 (1982).
- 8) Pratt R. M., Willis W. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 5791 (1985).
- 9) Mumery C. I., Van Den Brink C. E., Van den Saag P. T., De Loat S. W., *Teratology*, **29**, 271 (1984).
- 10) Keller S. J., Smith M. K., *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **2**, 361 (1982).
- 11) Friendman L., *Environ. Health Perspect.*, **72**, 211 (1987).
- 12) Razan K. T., Woollam D. H. M., Moris G. M., "Experimental and Teratology," London 1974, pp. 66-89.
- 13) Jelinek R., Peterka M., Rychter Z., *J. Exp. Biol.*, **23**, 588 (1985).
- 14) Lueke N. P., *Food Chem. Toxicol.*, **23**, 287 (1985).
- 15) Lansdown A. B. G., Crees S. J., Wilder R. G., *J. Inst. Anim. Tech.*, **21**, 71 (1970).

- 16) Khera K. S., Lyon D. A., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **13**, 1 (1968).
- 17) Dumont J. N., Schultz, T. W., Newman, S. M., *Teratology*, **25**, 37A (1982).
- 18) Dawson D. A., McCormic C. A., Bantle, J. A., *J. Appl. Toxicol.*, **5**, 234 (1985).
- 19) Llewellyn G. C., Stephenson G. A., Hofman J. W., *Toxicon*, **15**, 582 (1977).
- 20) Birge W. J., Black J. A. A., "EPA-560/5-77-002," Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1977, p.59.
- 21) Landner L., Neilson A. H., Sorensen L., Tarnholm A., Viktor A., *Exotoxicol. Environ. Saf.*, **9**, 282 (1985).
- 22) Schuler R. L., Hardin B. D., Niemein, W., *Teraog. Carcinog. Mutagen.*, **2**, 293 (1982).
- 23) Walton B. T., *Fundam. Appl. Toxicol.*, **3**, 233 (1983).
- 24) Itow T., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 237 (1980).
- 25) Johnson E. M., German R. M., Gabel B. E. G., George M. E., *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **2**, 263 (1982).
- 26) Best J. B., Morita M., *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **2**, 277 (1982).
- 27) Pagano G., Esposito A., Giordano V. E., Quinto I., Bronzetti G., Bauer C.Corsi C., Nieri R., Ciajolo A., *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **3**, 377 (1983).
- 28) Nicholas J. S., Rudnick D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **20**, 656 (1934).
- 29) Nicholas J. S., Rudnick D., *J. Exp. Zool.*, **78**, 205 (1938).
- 30) Jolly J., Lieure C., *Arch. Anta. Microscop.*, **38**, 307 (1938).
- 31) New D. A. T., Stein K. F., *Nature*, **199**, 297 (1963).
- 32) New D. A. T., Wilson J. G., Fraser F. C., "Handbook of Teratology, 4," New York 1978, p.95.
- 33) New D. A. T., *Biological Rev*, **53**(1), 81-122 (1978).
- 34) New D. A. T., Cockroft D.L., *Experientia*, **35**, 138-140 (1978).
- 35) Hsu Y. C., Baskar J., Stevens L. C., Rash J., *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **31**, 235-245 (1974).
- 36) Hsu Y. C., *Dev. Biol.*, **68**, 453 (1979).
- 37) Chen L. T., Hsu Y. C., *Science*, **218**, 66 (1982).
- 38) Flynn T. J., *Environ. Health Perspect.*, **72**, 203 (1987).
- 39) Fantel A. G., *Teratog. Carcinog. Matagen.*, **2**, 231 (1982).
- 40) Sadler T. W., Kalter H., *Issues Rev. Teratol.*, **3**, 273 (1985).
- 41) Brown N. A., "in Postimplantation Mammalian Embryos. A practical Approach." eds. by Copp A. J., Cockroft D. L., IRL Press, Oxford, 1990, pp. 93-108.
- 42) Schmid B. P., Homburager F., Goldberg A. M., *Concepts Toxicol.*, **3**, 46 (1985).
- 43) Brown N. A., *Arch. Toxcol., Suppl.* **11**, 105 (1987).
- 44) Phillip E. M., Greenaway J. C., Shepard T. H., *Teratology*, **28**, 249-256 (1983).
- 45) Fantel A. G., Greenaway J. C., Shepard T. H., *Teratology*, 223-231 (1981).
- 46) Greenaway J. C., Fantel A. G., Juchau M. R., Selleck S. B., *Teratology*, 36A-37A (1981).
- 47) Mirkes P. E., Greenaway, J. C., *Teratology*, 37A (1981).
- 48) Greenaway J. C., Shepard T. H., Fantel A. G., Juchau M. R., *Teratology*, **26**, 167-171 (1982).
- 49) Schmid B. P., Goulding E., Kitchin K., Sanyal M. K., *Teratology*, **22**, 235-243 (1982).
- 50) Steele C. E., *Nature New Biol.*, **237**, 150 (1972).
- 51) Steele C. E., New D. A. T., *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **31**, 707 (1974).
- 52) Chatot C. L., Klein N. W., Riatek J., Pierro L. J., *Science*, **207**, 1471 (1980).
- 53) Chatot C. L., Klein N. W., *Teratology*, **23**, 30A (1981).
- 54) Klein N. W., Pierro L. J., Johnson E. M., Kochhar D. M., *Teratog. Reprod. Toxicol.*, **35** (1983).
- 55) Chatot C. L., Klein N. W., Clapper M. L., Resor S. R., Singer W. D., Russman B. S., Holmer G. L., Marrson R. H., Cramer J. A., *Epilepsia*, **25**, 205 (1984).
- 56) Beck F., Huxham I. M., Gulamhusein A. P., *Ciba Found. Symp.*, 105, 218 (1983).
- 57) Brown N. A., Fabro S., *Teratology*, **24**, 65 (1981).
- 58) Shoji R., Kimura R., Matsui F., Oohara A., *Teratology*, **42**, 23A (1990).