

돌연변이 물질이 출생전후의 마우스에 미치는 영향에 관한 세포유전학적 연구

〈지도 鄭仁熙 · 申泰善 교수〉

전주 예수병원 정형외과

孫 聖 根

연세대학교 의과대학 병리학교실

韓 思 淑

= Abstract =

The Cytogenetic Effects of Mutagens on Mouse Offspring

Sung Keun Sohn, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Presbyterian Medical Center, Jeonju, Korea

Sah Sook Hahn, Ph.D.

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

(Directed by Prof. In Hee Chung, M.D. and Tai Sun Shin, M.D.)

When chemical agents penetrate the placenta, it is potentially hazardous to the embryo because the embryonic stage is known to be extremely sensitive to various toxic agents. It has been reported that exposure to some chemical agents during pregnancy resulted in the induction of malformation or cancer in the offspring of experimental animals (Larsen, 1947; Klein, 1952; DiPaolo, 1964; Druckrey et al, 1966; Mohr et al, 1966; DiPaolo and Elis, 1967; Spatz and Laqueus, 1967; Alexandrov, 1968; Fujii and Nishimura, 1969; Rice, 1969; Bulay and Wattenberg, 1970; Currie, 1970; Vesselinovitch et al, 1971; Swenberg et al, 1972; Nomura et al, 1973). Fraser and Fainstat (1954) and Kalter (1954) found that administration of cortisone to pregnant female mice induced the appearance of cleft palates in the offspring. The frequency with which this deformity appears was observed to depend on: 1) the genotype of the treated animal (strain differences), 2) the dose of the chemical administered, 3) the time during the gestation period when the animal was treated. A single intraperitoneal injection of 5-fluorouracil at 10, 11, 12 or 13 days after copulation in mice also produced abnormalities to the feet, cleft palate and deformities of the tail in a large proportion of fetuses (Dagg, 1960). Urethan has been considered to be a highly teratogenic and carcinogenic agent in experimental animals (Nishimura and Kuginuki, 1958; Nomura and Okamoto, 1972). However, they stated that accurate timing of urethan toxicity and accurate calculation of urethan dosage actually reaching the embryo make it possible to analyze the sensitivity of the developing mouse embryo to mortality, growth inhibition, malformation and neoplasm. Nomura and Okamoto (1972) reported that when pregnant mice were exposed to urethan on various days of gestation (day 5 to 19) by a single injection malformations and neoplasms were induced in their offspring.

It is frequently implied that an abnormal phenotype is due to the aberration in the genotype, but it is not possible to prove the specific causal relation. Though, the frequent association between a variety of chromosomal abnormalities solves the problem of how the genotypic and phenotypic are interrelated (Schultz, 1965). 5-bromodeoxyuridine (BUdR) and dimethyl-

nitrosamine (DMN) induce chromosome aberrations in Chinese hamster cells cultured human lymphocytes and mouse cells in vivo (Somers and Hus, 1962; Kato, 1968; Matsuoka et al, 1979; Hahn and Kim, 1979). BUdR is a thymidine analog incorporated into only the DNA of proliferating cells and its mutagenic action is well understood (Freese, 1963). DMN is a potent carcinogen which induces tumors of the liver, lung, and kidney in rats (Magee and Barnes, 1959). This agent has no teratogenic effect in rats when given in doses of different concentrations for different periods of time and by several routes of administration during all stages of embryogeny (Alexandrov, 1967).

The experiments reported in this study were undertaken to investigate the possibility that treatment of ICR inbred pregnant mice with BUdR and DMN might show deformities or abnormalities in their offspring and also to determine whether chemical exposure during fetus will effect at 32 weeks after birth with second exposure to DMN by cytogenetical means. In this study, estrus ICR females were mated and 32 mice which had been diagnosed as pregnant were used. BUdR at the rate of 70, 100 and 150mg/kg of body weight was injected intraperitoneally at 6, 7, 8 days and 9, 11, 13 days of gestation, and DMN at the rate of 10, 20 and 30 mg/kg of body weight was injected at 8, 10, 12 days and 14, 15, 16 days of gestation. The offspring were examined macroscopically at time of birth for malformations. All animals were killed at 32 weeks of age and examined for liver abnormalities. The liver were cultured and treated with 1, 5 and 10 ug/ml of DMN for 18 hours. The frequencies of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges (SCE) were analyzed.

The results are summarized as follows:

1. The litter size was reduced on treated animals.
2. Among the 279 progeny from 36 BUdR treated mothers, malformations were seen in a total of 10 progeny and the group treated at the 9 to 13 gestation days stage had the most.
3. Of the 155 progeny from 24 mothers injected with DMN, none had any visible deformity. However, 37.5% of the group were found to have liver nodules after 32 weeks treated at the 8 to 12 gestation day stage.
4. Repetitive treatment with DMN of the liver culture of the previously BUdR and DMN treated progeny, showed increased chromosome aberrations and SCE frequencies.

In conclusion since the exposure of the mother of BUdR and DMN during pregnancy leads to increased chromosomal abnormalities of the cultured liver cells of progeny when treated with DMN a second time, it is necessary to keep in mind that genetic damage may be occur to the progeny by exposing the mother during pregnancy.

Key words: Chromosomal, Cytogenic, Abnormality mutagen, BUdR, DMN, SCE, Mouse.

I. 서 론

자연적으로 일어나는 유전적 이상이나 방사선 혹은 약물등이 태자(embryo)에 미쳐서 일어나는 기형현상이 자연유산, 사산 혹은 신생아 사망으로 소멸되는 동시에 기형아로 남는 것도 상당수에 이른다. 태자는 여러 종류의 화학물질이나 독성 물질에 대하여 대단히 예민하므로 태반을 통하여 태자에 미치는 영향도 상당한 위험이 될 수 있다. 발기형 물질(teratogen)의 작용은 대단히 특수한 과정으로 미량으로도 기형을 유발할 수 있다. 또한 임신에서 흔히 투여되는 cortison을 A종 임신 마우스에 투여함으로써 차대에서 cleft palate를 유발시켰으며²²⁾ Dagb는 5-fluorouracil을 129/Rr과 BALB/CRr 잡종 임신 마우스에 복강 주사함으로써 태자에서 발과 꼬리의 이상 및 cleft palate를 발견하였다. 이러한 여러형의 기형발생과 빈도는 실험동물의 계간차이(strain difference)와 투입한 화학물질의 농도, 그리고 약물투입 시기

등으로 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 많은 발암물질로도 세포가 사망되거나 이상이 유발되며 태자 시기에는 기형발생의 빈도보다 발암작용에 더 예민하고 발기형 물질이나 발암물질은 모두 태자에 영향을 미치는 것은 사실이다.

실험동물에서 화학물질이 태반을 통하여 태자에게 발암되는 것은 일찌기 Larson과 Sinclair^{37, 69)}에 의해서 보고된 후 여러종의 돌연변이 물질, 발암물질 혹은 홀몬등을 임신중 동물이 투여하는 태자나 신생동물에서 종양이 유발되는 연구가 활발하게 진행되었고^{1, 4, 7, 48, 56, 69, 65, 73, 78, 79, 81)} 또한 종양과 함께 기형유발도 관찰되었다^{8, 11, 12, 13, 21, 24, 28, 39, 50, 53, 71)}. Urethan은 실험동물에서 기형발생과 발암작용이 있는 물질로서^{52, 56, 60, 62)} urethan이 태자에 미치는 정확한 시간과 농도를 계산하여 태자의 사망율, 발육부진, 기형 혹은 암 발생등을 일으킬 수 있는 예민도를 분석하여야 한다고 강조하였다. Nomura와 Okamoto⁶⁰⁾는 임신 5일에서 19일까지 urethan을 단일 주사하여 기형과 암발생율을 분석하였다.

태자는 여러종의 화학물질의 유해작용에 대해서 대단히 예민하다. Dimethylnitrosamine(DMN)은 강한 발암물질로서 여러 실험동물에서 강력한 발암 작용이 있어 쥐에서 간, 폐 혹은 신장등에 암을 유발하며 기관 특이적일 뿐 아니라 단일 혹은 짧은 처리 시간으로도 암을 유발하는 것이 밝혀졌다^{40, 41, 44, 77)}. DMN은 공업용매 또는 선충제, 방부제 등으로 사용되어 왔으며 1963년 Druckrey 등이¹⁵⁾ secondary aliphatic amine이 체내에서 sodium nitrite와 반응하여 nitrosamine을 생성한다고 주장한 후 실제로 amine들이나 sodium nitrite가 각종 식품에 함유되어 있는 것이 밝혀짐으로서 인간이 이 화학물질에 노출되는 기회가 많다는 것이 알려졌다. 아질산염으로 방부처리된 청어, 밀가루, 치즈, 가염건어물뿐 아니라 불고기, 생선에서도 DMN이 검출되었으며^{17, 18, 19, 20, 42, 43)} Lijinsky 등은 생체내에서 섭취된 nitrosating agent인 아질산염과 amine에 의하여 nitrosamine이 생성되는 것을 보고하였으며 Asahina 등은³⁾ 실제로 다량의 질산염과 dimethylamine을 마우스에 동시 투여하여 급성 간손상이 유발되는 것을 관찰하였다.

돌연변이물질(mutagen)인 5-bromodeoxyuridine(BUDr)은 thymidine의 analog로서 포유동물의 DNA에 들어가 변이를 일으키는 것이 알려졌다²³⁾ A/C3H-MF 잡종 임신 마우스에 투여하여 생생 마우스에서 후측에서만 기형이 유발된 것이 DiPaolo 에¹²⁾ 의해서 보고되었으나 예비실험에 머물고 있는 상태이고 구체적인 기전에 관해서 규명하기 위한 연구가 아직 진행되지 못하고 있다.

표현형 이상(phenotypical anomaly)은 인자형(genotype)의 이상으로 인하여 일어나는 것으로 알고 있으나 그 두 사이를 증명하는 방법중 염색체이상 검사가 있다. BUDr과 DMN이 동물과 사람의 염색체에 이상을 일으키는 것은 보고된 바 있다^{26, 27, 32, 46)}.

본 연구에서는 비발암물질로써 mutagen인 BUDr과 발암물질인 DMN을 ICR 순종 임신 마우스에 복강 투여하여 새끼들의 각종 형태학적 및 세포유전학적 변화를 관찰 분석하고 약물의 영향을 미리 in vivo에서 받은 새끼의 간을 배양하여 in vitro에서 다시 약물처리 함으로써 유도되는 염색체 이상을 관찰하여 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1) 근교계 마우스 사육(inbred)과 임신유발

비 근교계(noninbred) 마우스를 본 실험실 내에서 7대 근교(brother-sister bred)하였다. Estrus에 있는 암 마우스를 수 마우스와 같은 사육장에 6시간(9am-3pm) 넣어 vaginal plug 발견시를 임신 0일로 정하였다.

2) 약물투여

BUDr(Sigma 회사)은 25mg/ml로 Hanks 용액에 희석하고 실험동물을 6군으로 나누어 70, 100, 150mg/Kg를 임신 6일, 7일, 8일과 9일, 11일, 13일에 복강주사 하였다. DMN(Esatman Organic Chemical)은 10, 20, 30mg/Kg를 임신 8일, 10일, 12일과 14일, 15일, 16일에 복강주사 하였다.

3) 육안적 검사

태자 출산후 수를 세고 이상 발생을 관찰한 다음 매일 검사하고 4주 후에는 어미로부터 이유하여 따로 사육장에 넣고 32주간 관찰하였으며 2주마다 동물을 도살하여 각 동물의 내장의 육안적 병변을 관찰하였다.

4) 세포배양과 DMN 투여

정상마우스의 간과 in vivo에서 BUDr과 DMN을 받은 새끼의 간의 정상부위를 취하여 세포배양을 MEM(minimal essential medium)에 10% fetal calf serum을 가한 배지로 배양한 후 계대배양(subculture)하여 48시간 후에 1, 5, 10ug/ml의 DMN으로 18시간 처리하였다. 대조군은 약물처리를 받지 않은 정상 새끼의 간세포를 배양한 것과 약물처리 받은 새끼의 간세포를 사용하였다.

2) 염색체 이상조사

염색체 표본제작은 Moorhead 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포수확 5시간 전에 colcemid(Ciba)를 최종농도 0.5ug/ml를 가하고 세포를 가하고 후 0.075 M KCl 용액으로 10분간 처리하고 Carnoy 용액으로 고정시킨 후 slide에 세포를 떨어뜨려 공기건조 시켰다. 24시간 후 slide를 Giemsa(Harleco)용액에서 20분간 염색시켰다. 각 실험군에서 50개의 중기상을 관찰하고 현미경 사진기로 촬영하였다.

6) 자매 염색분체 교환 조사

자매 염색분체 교환(sister chromatid exchange; 이하 SCE) 표본제작은 세포 수확하기 48시간 전에 BUDr을 50uM로 투여하고 30시간 후에 DMN 처리한후 13시간후에 colcemid를 최종농도 0.5ug/ml로 처리하고 5시간후에 세포를 수확한 후 air dry 방법으로 slide를 제작하였다. 24시간에서 48시간 후에 표본을 Hoechst 33258 10⁻⁴M 용액으로 염색하고 0.16M sodium phosphate-0.04M sodium citrate (pH 7.0)로 덮은후 200W 수은 등과 35W 자외선등 아래서 3시간 노출시킨 후 5% Giemsa 용액에서 15분간 염색하였다^{25, 83)}.

각 실험군에서 50개의 세포를 관찰하여 SCE의 빈도

를 측정하고 사진촬영 하였다.

III. 실험결과

1) 태자의 사망율과 이상율

(A) BUDR 투여군 : 임신중 BUDR 처리된 마우스를 출산시 검사한 결과 새끼의 평균수는 각 실험군에서 8.3 내지 6.7이었고 대조군의 평균 새끼수는 8.3 이었으며 BUDR의 양이 증가함에 따라 새끼의 수는 점차 감소하는 경향을 보였다. 대조군과 70mg/Kg의 BUDR 처리군에서는 외관상의 이상이 발견되지 않았으나 100mg/Kg 이상의 약물 처리군에서는 눈의 이상이 2예, 발에 이상이 6 예, 꼬리의 이상이 2 예이었으며 발은 비후 또는 족지 형성 부전등의 기형이었고 꼬리는 꼬여있는 모양이었다 (Fig. 1). 약물 투여 시기와 기형발생의 빈도는 임신 9-11-13일에 BUDR 100mg/Kg 및 200mg/Kg 투여군에서 각각 8.9%와 12.5%로 6-7-3일에 투여한 경우보다 증가하였다 (Table 1).

2) DMN 처치군 : 임신중 DMN 처리된 마우스의 새끼

에서는 외관상의 이상은 없었고 평균 새끼 수는 각 실험군에서 7.5내지 5.0이었고 대조군에서는 8.0이었으며, 역시 약물의 투여량이 증가함에 따라 새끼의 수는 감소하였으며 BUDR 처리군에서 보다 더욱 현저하였다. 4 주 후 이유시까지의 사망율은 대조군에서는 없었으나 실험군에서는 1 마리 부터 4 마리 까지로 3.57-20%에 달하였다.

20mg/Kg 이상의 DMN을 처치한 군에서 생후 20주 부터 32주 사이에 간에서 소결절(nodule)이 발견되었으며 발생율은 전체 새끼 마우스의 5.0-37.5%였고, 임신 8-10-12일에 투여한 군에서보다 더 많은 발생빈도를 보였다 (Table 2).

2) 염색체 이상율

임신중 150mg/Kg의 BUDR과 30mg/Kg의 DMN으로 처리된 각각의 마우스 새끼와 대조군의 새끼를 생후 32주에 도살하여 간의 정상부위를 세포 배양하여 염색체 이상빈도를 관찰한 결과 대조군 (Fig. 2)에 비하여 실험군에서 염색체 절단이나 염색체 교환등의 염색체 이상

Table 1. Gross malformations in offspring of pregnant mice treated with BUDR

| Daily dose (mg/kg) | Treatment gestation (day) | Total pregnant | Live birth | | No. with malformation | | | Total malformation | |
|--------------------|---------------------------|----------------|------------|------------|-----------------------|------|------|--------------------|------|
| | | | No. | Av./litter | eye | foot | tail | No. | % |
| Control | 6-7-8 | 6 | 50 | 8.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (Hanks') | 9-11-13 | 6 | 49 | 8.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 70 | 6-7-8 | 6 | 50 | 8.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 70 | 9-11-13 | 6 | 47 | 7.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 6-7-8 | 6 | 49 | 8.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 9-11-13 | 6 | 45 | 7.5 | 1 | 1 | 1 | 4 | 8.9 |
| 150 | 6-7-8 | 6 | 48 | 8.0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2.1 |
| 150 | 9-11-13 | 6 | 40 | 6.7 | 1 | 3 | 1 | 5 | 12.5 |

Table 2. Liver nodules from offspring of pregnant mice treated with DWN for 32 weeks

| Daily dose (mg/kg) | Treatment gestation (day) | Total Pregnant mice | Live birth | | No. of mice at weaning | Liver nodules | | | Other tumors |
|--------------------|---------------------------|---------------------|------------|------------|------------------------|---------------|------|--------------------------|--------------|
| | | | No. | Av./litter | | No. of mice | % | Av. latent period (wks.) | |
| Control | 8-10-12 | 4 | 32 | 8.0 | 32 | 0 | 0 | 32 | — |
| (Hanks') | 14-15-16 | 4 | 31 | 7.8 | 31 | 0 | 0 | 32 | — |
| 10 | 8-10-12 | 4 | 28 | 7.0 | 27 | 0 | 0 | 32 | — |
| 10 | 14-15-16 | 4 | 30 | 7.5 | 28 | 0 | 0 | 32 | — |
| 20 | 8-10-12 | 4 | 25 | 6.3 | 22 | 2 | 9.1 | 28 | — |
| 20 | 14-15-16 | 4 | 28 | 7.0 | 27 | 0 | 0 | 32 | — |
| 30 | 8-10-12 | 4 | 20 | 5.0 | 16 | 6 | 37.5 | 20 | — |
| 30 | 14-15-16 | 4 | 24 | 6.0 | 22 | 1 | 5.0 | 32 | — |

Table 3. Frequencies of chromosome aberrations in different concentrations of DMN treated on cultured mouse liver cells of offspring treated with BUDR and DMN during pregnancy

| Cells preconditioned | DMN conc. (ug/ml) | Scored cells | Total No. of aberration | Aber/cell (\pm S.E.) |
|-----------------------------------|-------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| Control | — | 50 | 5 | 0.10 ± 0.05 |
| | 1 | 50 | 37 | 0.74 ± 0.13 |
| | 5 | 50 | 51 | 1.02 ± 0.34 |
| | 10 | 50 | 72 | 1.44 ± 0.38 |
| BUDR (150 mg/kg) during pregnancy | — | 50 | 7 | 0.14 ± 0.66 |
| | 1 | 50 | 38 | 0.76 ± 0.21 |
| | 5 | 50 | 46 | 0.92 ± 0.20 |
| | 10 | 50 | 74 | 1.48 ± 0.46 |
| DMN (30 mg/kg) during pregnancy | 1 | 50 | 16 | 0.32 ± 0.26 |
| | 1 | 50 | 47 | 0.94 ± 0.19 |
| | 5 | 50 | 56 | 1.12 ± 0.19 |
| | 10 | 50 | 83 | 1.66 ± 0.24 |

* Mouse was sacrificed at 32 weeks of age

이 유발되었다. 임신때 약물처리를 하지 않은 동물에서 출생한 새끼의 간 세포에서는 세포당 염색체 이상이 0.1 ± 0.05 이었으며, 1, 5, 10ug/ml의 DMN으로 *in vitro*에서 처리한 염색체 이상은 세포당 1.44 ± 0.38 까지 농도에 따라 증가되었다. 임신때 BUDR로 처리된 새끼의 간세포에서는 염색체 이상이 0.14 ± 0.66 이었으며 *in vitro*에서 DMN으로 다시 처리한 결과(BUDR+DMN) 염색체 이상은 0.76 ± 0.21 에서 1.48 ± 0.46 까지 농도에 따라 더욱 증가되었으며(Fig. 3), DMN처리군 역시 염색체 이상이, DMN으로 처리되지 않은 실험군에서는 세포당 0.32 ± 0.26 에서 1ug/ml까지의 DMN으로 (DMN+DMN) 처리후 0.94 ± 0.19 에서 1.66 ± 0.24 로 각각 현저히 증가하는 것이 관찰어(Fig. 4), BUDR+DMN처리군 보다 높은 빈도 와 보였다(Table 3).

3) 자매 염색분체 교환(SCE) 빈도

염색체 이상만으로는 염색분체(chromatid) 내에서 일어나는 약물의 작용과 효과를 자세히 관찰할 수 없어서 검사를 한 결과(Fig. 5). 임신때 약물처리를 하지 않은 동물에서 출생한 새끼의 간세포에서는 SCE의 수가 세포당 4.68 ± 0.34 이었고 여기에 1, 5, 10ug/ml의 DMN으로 *in vitro*에서 다시 처리한 결과 10.56 ± 0.25 에서 13.04 ± 0.26 까지 농도에 따라 점차 증가하였으며 BUDR을 임신때만 받은 실험군에서는 7.06 ± 0.34 이었고 *in vitro*로 DMN는 다시 처리한 군에서는 10.78 ± 0.40 에서 12.86 ± 0.38 까지로 증가하였다(Fig. 6). DMN을 임신때만 받은 실험군에서는 7.66 ± 0.36 이었고 *in vitro*로 DMN을 한번 더 처리한 군에서는 12.42 ± 0.35 에서 15.08 ± 0.46

까지 농도에 따라 현저한 증가를 보여서(Fig. 7). BUDR +DMN군보다 높은 증가율을 보였다(Table 4). SCE 빈도는 염색체 이상빈도보다 약 10배 예민하게 나타났다.

IV. 총괄 및 고안

사람에 있어서 일어나는 기형(maltormation)의 5%는 유전인자의 돌연변이에 의한 것이고, 10%는 염색체 이상에서 그리고 5%는 찾아낼 수 없는 환경물질의 영향에서 일어난다고 한다.

기형 유발물(teratogen)로는 thalidomide를 위시하여 virus, 홀몬, urethan, 수종의 alkylating agents, 돌연변이 물질등이 있고 riboflavin 결핍증, 산소결핍, x-ray등이 있다^{9, 10, 22, 37, 50, 55, 56, 59, 61, 67, 68, 69, 75, 80, 81} 실험동물도 guinea pig, 쥐, 닭, 마우스 등으로 여러 계통이 있고 마우스 중에서도 종(strain)이 다르거나, 순종, 비순종, hybrid종에서 각각 다른 종류의 기형이 발생하는데도 알려져 있다^{1, 47, 48, 50, 58, 82}.

BUDR은 돌연변이 유발물질로 deoxynucleotide triphosphate로 쉽게 변하며 uracil이나 cytosine형성이나 방해가 적고 thymidine의 analog로서 BUDR로 변이된 DNA를 가진 태자 세포가 정상 발달을 할 수 있는지를 조사하는 것도 본 실험의 목적의 하나이다.

DMN은 dialkylnitrosamine으로서 핵산이나 단백질을 alkylate하는데 공여함으로서 염색체 이상을 초래하여 태자의 기관형성(organogenesis)이 일어나는 임신 초기에 기본적인 신진대사에 방해를 주므로써 여러종의 이상을 유발할 수 있는 물질이다. 태반장벽(placental barrier)을 통

Table 4. Frequencies of SCE in different concentrations of DMN treated on cultured mouse liver cells of offspring treated with BUdR and DMN during pregnancy

| Cells preconditioned | DMN conc. (ug/ml) | Scored cells | Total No. of SCE | SCE/cell (\pm S.E.) |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------|---------------------|------------------------|
| Control | 1 | 50 | 234 | 4.68 \pm 0.34 |
| | 1 | 50 | 528 | 10.56 \pm 0.25 |
| | 5 | 50 | 593 | 11.86 \pm 0.40 |
| | 10 | 50 | 652 | 13.04 \pm 0.26 |
| BUdR (150 mg/kg during pregnancy) | 1 | 50 | 353 | 7.06 \pm 0.34 |
| | 1 | 50 | 539 | 10.78 \pm 0.40 |
| | 5 | 50 | 600 | 12.00 \pm 0.56 |
| | 10 | 50 | 643 | 12.86 \pm 0.38 |
| DMN (30 mg/kg during pregnancy) | 1 | 50 | 383 | 7.66 \pm 0.36 |
| | 1 | 50 | 621 | 12.42 \pm 0.35 |
| | 5 | 50 | 727 | 14.54 \pm 0.66 |
| | 10 | 50 | 754 | 15.08 \pm 0.46 |

* Mouse was sacrificed at 32 weeks of age

하여 약물이 태자에 미치는 양은 소량이지만⁵⁶ 태자는 약물의 독성에 예민하므로 그에 대한 작용이 현저한 것은 Tomatis, Goodal⁷⁶⁾과 Alexandrov, Shendrikova²⁾에 의해서 보고되었다. 3-methylcholanthrene이나 7,12-dimethylbenz-(a)anthracene은 임신 아무 시기에도 태반을 통과하지 않는데 비해^{2,67,78)} Urethan은 임신중 어느 시기에도 자유롭게 통과하는 것이 Nomura 등에⁶²⁾ 의하여 증명된 것처럼 약물이 태반을 통하는 정도가 다르므로 본 실험에서도 약물 투여 시기를 달리하였으며 또한 약물에 따라 특정 장기에 미치는 양과 작용이 다르므로 간의 종양 발생의 예민도와 유발시기를 비교하였다.

Agent의 작용이 선택적이거나, 임신 시기를 다르게 처리하거나 또한 처리방법에 따라서 기형 발생율이나 기형의 종류에 차이가 나는 것도 밝혀졌다^{11,57,60,68)} 즉, 모체에 풍진(rubella)감염이 임신 첫 4주 안에 있었을 경우 출생아가 기형을 가질 위험도는 47%에 반하여 임신 5-8주인 경우에는 22%, 임신 9-12주 경우에는 7% 그리고 임신 13-16주인 경우에는 6% 이하로 줄어든다고 한다. 이러한 현상은 소위 기형 형성에 있어서의 "critical period"가 있으며 실험적으로 기형물 연구에 중요한 역할을 한다고 본다^{10,38)}. Time-specificity는 agent-specificity와 함께 대단히 중요하며 또한 투여량에 따라서 특이성에 차이가 있는 것도 고려되어야 하겠다.

화학물질의 영향으로 태자에 기형은 유발되지 않더라도 과식(hyperplasia)이 유발될 수도 있는데, 사람에게 있어서 임신 첫 3주까지, 동물(rodent)에 있어서는 임신 첫 6일까지 화학물질을 받았을 때 과식이나 태아 사망이

일어난다. 기관발생 과정(organogenesis)은 사람에게 있어서는 약 3-8주, 동물에 있어서는 7-16일 간에서 일어난다⁶³⁾, 그리고 이 기간에 분자구조 단계에서 기관에 이상을 주어 외적기형도 유발되는 것이다. Hydroxyurea 혹은 cyclophosphamide 같은 DNA-damaging mutagenic teratogen은 대단히 작용이 강하여 상당한 수의 태자 세포를 죽게 하므로 이러한 작용으로 기형이 태어나게 하려면 선택적으로 어느 특정한 시기에 투여되어야 한다⁴⁵⁾.

외형의 기형은 urethan의 경우 임신중 태아의 기관(organ)의 분화(differentiation)가 일어날 때 투여하였을 때만 유발되었고⁶⁶⁾ x-ray나 다른 화학물질에서도 같은 결과를 보여주었다^{14,51,66)} 그러나 신체 내부의 조직에서 이상 유발이란 종양 유발로서 기형 유발과 구별되며 어떠한 화학물질로서 기형과 발암이 같은 동물에서 동시에 유발되려면 다량을 임신중 계속해서 투여하여야 되므로 치사량에 쉽게 도달하여 사망을 초래하게 된다. 그러나 다량의 방사선이나 임신중의 어느 한정된 시기에 여러종의 화학물질 투여로서 유발되는 기형 이외에도 일반적으로 임신 중기나 후기에는 안전하다고 인정된 어떤 화학물질이라도 차대에서 암을 발생할 수 있으므로 적은 양이라도 각별한 주의가 필요하다고 생각된다.

종식이 빠른 세포에서 종양에 대한 예민도가 높은 것은 발암 현상내에서 손상이 된 DNA가 수복 착오(mis-repair) 같은 현상이 복사중 혹은 복사 전후에 일어나는 것으로 추측이 되었으며³⁵⁾ 임신 초기에서 빨리 분열되는 간세포는 임신 후기에서 분열이 늦은 세포 보폭 예민도가 높고 재생(regeneration)되는 간에서 종양 유발이 더

높은 것이 Chernozemski와 Warwick, Lane 등에 의해서 보고 되었는데 본 실험에서도 임신 8-12일에 DMN 투여군에서 14-16일 투여군 보다 간에 소결절이 많이 발생한 것으로 일치된 결과를 보였다.

Hsu와 Somers는 BUdR이 염색체 이상을 유발한다는 사실을 발견하였는데 그들은 BUdR이 세포내 DNA로 합성되어 짐으로서 DNA의 분자적인 불안정이 유발되고 결국에는 염색체 결실로서 표현된다고 제의하였다. 이 돌연변이 유발원의 제암효과는 염색체내 결실을 일으키는 특성에 기인된다. 염색체내 결실이 생기면 여러가지 현상이 수반되어지고 그 결과로 세포분열시 혹은 몇번의 세포분열을 계속하다가 세포는 죽게되고 따라서 악성종양에 대한 제암효과에 대한 기본을 이루게 된다. 그들은 염색체 결실이 일정한 위치에 있다는 증거를 통해서 화학물의 독특한 효과가 그 부위의 핵산염(nucleotide)의 배열순서에 관계있을 것이라고 시사하였다. 염색체 연구에 있어서 염색체의 분자적인 구조에 관한 문제에 대해서 그렇게 많이 다루고 있지는 않지만 염색체가 형태적인 면에서나 기능적인 면에서 동질적인 구조가 아니라는 것은 알려진 사실이다³⁴⁾. 본 연구에서 태자때 일단 약물의 영향을 받은 간세포에서 다시 DMN처리를 받음으로서 염색체 이상이 증가된 것은 처음 염색체에 결실이 생겨 세포분열시에 세포가 죽게 되어 주위에 있는 다른 세포에 어떠한 영향을 주므로서 후에 DMN처리시 염색체 이상을 촉진시키는 것이 아닌가 추정할 수 있다. 또한 Perry와 Evan⁶⁴⁾의 보고와 같이 자매 염색분체 교환빈도 분석결과 더 예민하게 염색체 이상을 측정할 수 있었다. 자매 염색분체 교환은 subtoxic한 양의 발암물질로도 유발되며 유전인자의 손실을 빠르고 예민하게 양적으로 분석할 수 있어서^{5, 30, 31, 70, 72)} 본 실험에서도 자매 염색분체 교환은 염색체 이상보다 약 10배 더 많이 관찰되었다.

V. 결 론

돌연변이 물질중 비발암물질인 5-bromodeoxyuridine (BUdR)과 발암물질인 dimethylnitrosamine(DMN)을 순종 임신 마우스(ICR)에 투여후 미치는 영향을 형태학적 및 세포유전학적 방법으로 관찰하기 위하여 비근교제(non-inbred) 마우스를 본 실험실내에서 7대 근교하여 여러 농도의 BUdR과 DMN을 임신 시기를 다르게 복강주사 하였다. 새끼 출산후 이상 발생을 관찰하고 32주일 후에 도살하여 간을 절취 배양하고 다시 여러 농도의 DMN으로 처리하여 염색체 이상과 SCE 빈도를 관찰 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 약물처리군에서 태자의 평균수(litter size)는 현저히 감소되었다.

2. BUdR로 처리된 36마리의 어미에서 출산된 279마리 새끼 중 10마리에서 이상이 발견되었으며 임신 9일에서 13일 사이에 처리된 실험군에서 더 많이 유발되었다.

3. DMN으로 처리된 24마리 어미에게서 출산된 155마리 새끼중에서는 외관상 이상이 32주 후에도 발견되지 않았으나 임신 8일에서 12일에 처리된 실험군에서는 간의 이상이 37.5%가 유발되었다.

4. BUdR처리 간세포와 DMN처리 간세포에 DMN을 *in vitro*로 다시 처리한 결과 염색체 이상과 자매 염색분체 교환이 현저하게 증가되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 비발암 물질이며 돌연변이 물질인 BUdR이나 발암물질인 DMN을 임신 마우스에 투여하면 태자의 유전인자에 어떠한 변화를 잠정적으로 주어서 출생후에 다시 발암물질에 노출 될 때 염색체의 이상 발생을 촉진시키는 것이 아닌가 사려된다.

REFERENCES

- 1) Alexandrov, V.A. : *Blastomogenic effect of dimethylnitrosamine on pregnant rats and their off spring. Nature* 218:280, 1968.
- 2) Alexandrov, V.A., Shendrikova, I.A. : *Penetration of 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene transplacentally and dynamic of its accumulation in the rat embryo, Vop. Onkol.* 18:59, 1972.
- 3) Asahina, S., Friedman, M.A., Arnold, E., Miller, G.N., Miskin, M., Bishop Y., Epstein S.S. : *Acute synergistic toxicity and hepatic necrosis following oral administration of sodium nitrite and secondary amines to mice. Cancer Res* 31:1201, 1971.
- 4) Bulay, O.M., Wattenberg, L.W. : *Carcinogenic effects of subcutaneous administration of benzo (a) pyrene during pregnancy on the progeny. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 135:84, 1970.
- 5) Carrano, A.V., Thompson, I.H., Lindl, P.A., Mindler, J.L. : *Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. Nature (London)* 271:551, 1978.
- 6) Chernozemski, I.N., Warwick, G.P. : *Liver regeneration and induction of hepatomas in B6A F mice by urethan. Cancer Res.* 30:2985, 1970.
- 7) Currie, A.R., Bird, C.C., Crawford, A.M., Sims, P. : *Embryopathic effects of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene and its hydroxymethyl derivatives in the Sprague-Dawley rat. Nature* 229:911, 1970.
- 8) Dagg, C.P. : *Sensitive stages for the production of*

- development abnormalities in mice with 5-fluorouracil. *Am. J. Anat.* 106:89, 1960.
- 9) Danforth, C.H., Center, E. : Nitrogen mustard as a teratogenic agent in the mouse. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 86:705, 1954.
 - 10) De Lahunt, C.S., Lassen, L.J. : Thalidomide syndrome in monkeys. *Science* 146:1300, 1964.
 - 11) DiPaolo, J.A. : Congenital malformation in strain A mice. *J. Am. Med. Assoc.* 183:139, 1963.
 - 12) DiPaolo, J.A. : Polydactylism in the offspring of mice injected with 5-Bromodeoxyuridine. *Science* 145:501, 1964.
 - 13) DiPaolo, J.A., Elis, J. : The comparison of teratogenic and carcinogenic effects of some carbamate compounds. *Cancer Res.* 27:1696, 1967.
 - 14) DiPaolo, J.A., Kotin, P. : Teratogenesis-oncogenesis: A study of possible relationships. *Arch. Pathol.* 81:3, 1966.
 - 15) Druckrey, H., Ivankovic, S., Preussmann, R. : Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. *Nature* 210:1378, 1966.
 - 16) Druckrey, H., Steinhoff, D., Beuthner, H., Schneider, H., Klärner, P. : Prüfung von nitrit auf chronische toxische wirkung an ratten. *Arzneimittel-Forsch.* 13:320, 1963.
 - 17) Eisenbrand, G., Marquardt, P. : Über die problematik des vorkommens von N-Nitrosoverbindungen in der Nahrung. *Med. u. Ernähr* 10:73, 1969.
 - 18) Ender, F., Havre, G., Helgebostad, A., Koppang, N., Madsen, R., Ceh, L. : Isolation and identification of a "hepatotoxic factor" in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften* 51:637, 1964.
 - 19) Fang, Y.Y., Walsh, E.O.F. : Carcinogenic nitrosamines in cantonese salt-dried fish. *Lancet* 2:1032, 1971.
 - 20) Fazio, T., Damico, J.N., Howard, J.W., White, R.H., Watts, J.O. : Gas chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of N-nitrosodimethylamine in smoke-processed marine fish. *J. Agric. Food Chem.* 19:250, 1971.
 - 21) Fraser, F.C. : Relation of animal studies to the problem in man. In: *Handbook of teratology*. Vol 1 ed. J.C. Wilson & F.C. Fraser, pp. 80-87, 1977, Plenum Press, New York.
 - 22) Fraser, F.C., Fainstat, T.D. : Production of congenital defects in the offspring of pregnant mice treated with cortisone. *Pediatrics* 8:527, 1951.
 - 23) Freese, E. : *Molecular genetics* (Academic Press, New York 1963) pt 1 pp.207-269, 1963.
 - 24) Fujii, T., Nishimura, H. : Teratogenic actions of some methylated xanthines in mice. *Okajima Folia Anat Japon* 46:167, 1969.
 - 25) Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H., Sugiyama, T. : Simple differential Giemsa staining of sister chromatid after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma* 53:223, 1975.
 - 26) Hahn, S., Kim, D.S. : The production of micronuclei from chromosome aberrations by chemical carcinogens in mouse. *Yonsei Med. J.* 29:105, 1979.
 - 27) Hsu, T.C., Somers, C.E. : Effect of 5-Bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:396, 1961.
 - 28) Ingalls, T.H., Curley, E.J., Prindle, R.A. : Experimental production of congenital anomalies. *New England J. Med.* 247:758, 1952.
 - 29) Kalter, H. : The inheritance of susceptibility to the teratogenic action of cortisone in mice. *Genetics* 39:185, 1954.
 - 30) Kato, H. : Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labelling method. *Int. Rev. Cytol.* 49:55, 1977.
 - 31) Kato, H., Shimada, H. : Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C: A new method of detecting DNA damage at chromosomal level. *Mut. Res.* 28:459, 1975.
 - 32) Kato, R. : Chromosome breakage induced by a carcinogenic hydrocarbon in Chinese hamster cells and human leukocytes in vitro. *Hereditas* 59:120, 1968.
 - 33) Klein, M. : The transplacental effect of urethan on lung tumorigenesis in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 12:1003, 1952.
 - 34) Koback, M.M., Saksela, E., Ellman, W.J. : The effect of 5-bromodeoxyuridine on human chromosomes. *Exp. Cell Res.* 34:182, 1964.
 - 35) Kondo, S. : DNA repair and evolutionary considerations. In: *Advances in Biophysics*. Ed. M. Kotani Tokyo: Univ. Tokyo Press, 1975.
 - 36) Lane, M., Liebelt, A., Calvert, J., Liebelt, R.A. : Effect of partial hepatectomy on tumor incidence in BALE/C mice treated with urethan. *Cancer Res.* 30:1812, 1970.
 - 37) Larsen, C.D. : Pulmonary-tumor induction by transplacental exposure to urethan. *J. Natl. Cancer Inst.*

- 8:63, 1947.
- 38) Lenz, W. : *Malformations caused by drugs in pregnancy.* *Am. J. Dis. Child* 112:99, 1966.
 - 39) Leonard, A., Lauwerys, R.R. : *Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of Arsenic.* *Mut. Res.* 75:1, 1979.
 - 40) LePage, R.N., Christie, G.S. : *Induction of liver tumors in the guinea pig by feeding dimethylnitrosamine.* *Pathology* 1:49, 1969a.
 - 41) LePage, R.N., Christie, G.S. : *Induction of liver tumors in the rabbit by feeding dimethylnitrosamine.* *Brit. J. Cancer* 23:125, 1969b.
 - 42) Lijinsky, W., Conrad, E., Van de Bogart, R. : *Carcinogenic nitrosamine formed by drug/nitrite interactions.* *Nature* 239:165, 1972.
 - 43) Lijinsky, W., Epstein, S.S. : *Nitrosamines as environmental carcinogens.* *Nature* 225:21, 1970.
 - 44) Magee, P.N., Barnes, J.M. : *The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine.* *Brit. J. Cancer* 10:114, 1956.
 - 45) Manson, J.M. : *Developmental toxicity of alkylating agents.* In: *Biochemical mechanisms of teratogenesis.* ed. MR Juchau 1980.
 - 46) Matsuoka, A., Hayashi, M., Ishidate, M. Jr. : *Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro.* *Mut Res* 66:277, 1979.
 - 47) Miller, R.W. : *Transplacental chemical carcinogenesis in man.* *J. Natl. Cancer Inst.* 47:1169, 1971.
 - 48) Mohr, U., Althoff, J., Authaler, A. : *Diaplacental effect of the carcinogen dimethylnitrosamine in the Golden hamster.* *Cancer Res.* 26:2349, 1966.
 - 49) Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Batipps, D.M., Hungerford, D.A. : *Chromosome preparation of leukocyte cultured from human peripheral blood.* *Exp. Cell Res.* 20:613, 1960.
 - 50) Murphy, M.L. : *A comparison of the teratogenic effects of five polyfunctional alkylating agents on the rat fetus.* *Pediatrics* 23:231, 1959.
 - 51) Napalkov, N.P., Alexandrov, V.A. : *On the effects of blastomogenic substances on the organism during embryogenesis.* *Z Krebsforsch* 71:32, 1968.
 - 52) Nishimure, H., Kuginuki, M. : *Congenital malformations induced by ethylurethan in mouse embryos.* *Okajima Folia Anat Japan* 31:1, 1958.
 - 53) Nishimure, H., Nakai, K. : *Developmental anomalies in offspring of pregnant mice treated with nicotine.* *Science* 127:877, 1958.
 - 54) Nishimure, H., Takagaki, S. : *Congenital malformation in mice induced by nitrogen mustard.* *Acta Scholae Med. Univ. Kioto* 36:20, 1959.
 - 55) Nomura, T. : *Carcinogenesis by urethan via mother's milk and its enhancement of transplacental carcinogenesis in mice.* *Cancer Res.* 33:1677, 1973.
 - 56) Nomura, T. : *An analysis on the changing urethan response of the developing mouse embryo in neoplasm.* *Cancer Res.* 34:2217, 1974.
 - 57) Nomura, T. : *Carcinogenicity of the food additive furylfuramide in foetal and young mice.* *Nature* 258:610, 1975.
 - 58) Nomura, T. : *Comparison of tumour susceptibility among various organs of foetal, young, and adult ICR/JCI mice.* *Brit. J. Cancer* 33:521, 1976.
 - 59) Nomura, T., Kanzaki, T. : *Induction of urogenital anomalies and some tumors in the progeny of mice receiving diethylstilbestrol during pregnancy.* *Cancer Res.* 37:1099, 1977.
 - 60) Nomura, T., Okamoto, E. : *Transplacental carcinogenesis by urethan in mice: Teratogenesis and carcinogenesis in relation to organogenesis.* *Gann.* 63:731, 1972.
 - 61) Nomura, T., Okamoto, E., Manabe, H. : *Ovarian teratoma found in an offspring of mother (ICR-JCI mice) treated with urethan.* *Med. J. Osaka Univ.* 23:121, 1972.
 - 62) Nomura, T., Takabe, H., Okamoto, E. : *Long retention of urethan transferred into newborn mice transplacentally, as a possible cause of high carcinogenesis.* *Gann.* 64:29, 1973.
 - 63) Otis, E.M., Brent, R. : *Equivalent ages in mouse and human embryos.* *Anat. Rec.* 120:33, 1954.
 - 64) Perry, P., Evans, H.J. : *Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchanges.* *Nature* 258:121, 1975.
 - 65) Rice, J.M. : *Transplacental carcinogenesis in mice by 1-ethyl-1-nitrosourea.* *Ann NY Acad Sci.* 163:813, 1969.
 - 66) Russell, L.B., Russell, W.L. : *An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo.* *J. Cellular Comp. Physiol.* 43:103, (Suppl 1) 1954.
 - 67) Shendrikova, I.A., Ivanov-Golitsyn, M.N., Anisimov, Va, Likhachev, A.T. : *Dyanmice of the transplacental penetration of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene in*

- mice. *Vop. Onkol.* 19:75, 1973.
- 68) Siegel, M., Grunberg, M. : *Fetal death, malformation and prematurity after maternal rubella: results of prospective study, 1949-1958.* *New York Engl. J. Med.* 262:389, 1960.
 - 69) Sinclair, J.G.A. : *Specific transplacental effect of urethan in mice.* *Texas Rept. Biol. Med.* 8:623, 1950.
 - 70) Solomon, E., Bobrow, M. : *Sister chromatid exchanges: A sensitive assay of agents damaging human chromosomes.* *Mut. Res.* 30:273, 1975.
 - 71) Spatz, M., Laqueus, L. : *Transplacental induction of tumors in Sprague Dawley rats with crude cycad material.* *J. Natl. Cancer Inst.* 38:233, 1977.
 - 72) Stetka, D.G., Wolff, S. : *Sister chromatid exchanges as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. in vitro test for compounds requiring metabolic activation.* *Mut. Res.* 41:343, 1976.
 - 73) Swenberg, J.A., Koestner, A., Wechsler, W., Delinger, R.H. : *Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats.* *Cancer Res.* 32:2656, 1972.
 - 74) Takayama, S., Dota, K. : *Malignant tumors induced in mice feed with N-nitrosodimethylamine.* *Gann.* 54:465, 1963.
 - 75) Tanaka T. : *Transplacental induction of tumors and malformations in rats treated with some chemical carcinogens.* *International agency for research on cancer scientific Publication, WHO* 4:100, 1973.
 - 76) Tomatis, L., Goodal, C.M. : *The occurrence of tumors in F1, F2, F3 descendants of pregnant mice injected with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene.* *Inter. J. Cancer* 4:219, 1969.
 - 77) Tomatis, L., Magee, P.N., Shubik, P. : *Induction of liver tumors in Syrian hamster by feeding dimethylnitrosamine.* *J. Natl. Cancer Inst.* 33:341, 1964.
 - 78) Tomatis, L., Turusov, V., Guibbert, D., Duperray, B., Malaveille, C., Pacheco, H. : *Transplacental carcinogenic effects of 3-methylcholanthrene in mice and its quantitation in fetal tissues.* *J. Natl. Cancer Inst.* 47:645, 1971.
 - 79) Topping, D.C., Griesemer, R.A., Nettesheim, P. : *Development and fate of focal epithelial lesions in tracheal mucosa following exposure to 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene.* *Cancer Res* 39:4829, 1979.
 - 80) Vesselinovitch, S.D., Mihaiovich, N., Pietra, G. : *The prenatal exposure of mice to urethan and consequent development of tumors in various tissue.* *Cancer Res.* 27:2333, 1967.
 - 81) Vesselinovitch, S.D., Mihailovich, N., Rao KVN, Itze L. : *Perinatal carcinogenesis of urethan.* *Cancer Res* 31:2143, 1971.
 - 82) Wilson, J.G. : *Current status of teratology-general principles and mechanisms derived from animal studies. In: Handbook of teratology. Vol. 1, ed Wilson, J.G., Fraser, F.C. pp.47-74, 1977, Plenum Press, New York.*
 - 83) Wolff, S., Perry, P. : *Differential Giemsa staining of sister chromatid and the study of sister chromatid exchanges without autoradiograph.* *Chromosoma* 48:341, 1974.

Explanation of Figures

Fig. 1. The malformations of the fetus which born from BUdR treated mouse.

Fig. 2. Normal chromosome of the cultured mouse liver cells (control group).

Fig. 4. Chromosomal abnormality of the progeny from DMN treated mother followed by re-exposure of 10 ug/ml of DMN at 32 weeks (DMN + DMN).

Fig. 3. Chromosomal abnormality of the progeny from BUdR treated mother followed by re-exposure of 10 ug/ml of DMN at 32 weeks (BUdR + DMN).

Fig. 5. The normal SCE of the cultured mouse liver cells.

Explanation of Figures

Fig. 6. SCE of the progeny from BUdR treated mother followed by reexposure of 10 ug/ml of DMN at 32 weeks (BUdR + DMN).

Fig. 7. SCE of the progeny from DMN treated mother followed by reexposure of 10 ug/ml of DMN at 32 weeks (DMN + DMN).