

Ethylenethiourea의 임신 랫트에 있어서 기관형성기 투여시험

2. 수 미로 시험과 양수내의 α -fetoprotein, 요소 및 유리지방산 함량에 미치는 영향

김 성 훈* · 허 린 수
경북대학교 수의과대학 · 한국화학연구소*
(1991. 5. 6 접수)

Administration of ethylenethiourea during organogenesis periods in pregnant rats

2. Effects on water filled multiple T-maze test and α -fetoprotein, urea and free fatty acid concentrations in amniotic fluids

Sung-hoon Kim*, Rhin-soo Huh

*Department of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
Korea Research Institute of Chemical Technology**

(Received May 6, 1991)

Abstract: This study was carried out to investigate the alpha-fetoprotein, urea and free fatty acid in amniotic fluids and water filled multiple T-maze test of fetuses affected by Ethylenethiourea. The S.P.F. Sprague-Dawley female rats(10 weeks) were used in this study and these animals were divided into four groups; control group I (10mg/kg/day), group II (30mg/kg/day), group III (50mg/kg/day).

The results obtained were summarized as follows;

1. In the water filled multiple T-maze test of F1 male rats, The time and errors from start point to goal point of 30mg/kg group are significantly($p < 0.001$) increased from control group in 3rd day of test. In F1 female rats of 2nd day and 3rd day of water filled multiple T-maze test, The time and some errors in 30mg/kg group are significantly ($p < 0.05$) increased from control group.
2. Alpha-fetoprotein values of all treated groups(10mg/kg, 30mg/kg and 50mg/kg) were significantly($p < 0.001$) decreased from control values in the amniotic fluids.
3. Urea values of amniotic fluids in 50mg/kg group are significantly increased from control group.
4. Free fatty acid values of amniotic fluids in 50mg/kg group are significantly increased from control group.

Key words: Ethylenethiourea, amniotic fluid, α -fetoprotein, urea, free fatty acid.

서 론

농작물과 장식용 식물에 살균제로써 널리 사용되는 ethylenethiourea(2-Imidazolidinethione, ETU)는 발암유발효과¹⁻⁴ 및 돌연변이 유발효과⁵⁻⁹가 있으며 임신 동물에 투여될 경우 기형유발효과가 있다고 보고되고 있다.^{2,10-16}

α -fetoprotein은 기형의 태아를 가진 모체내의 혈청에서 증가하는 물질로 알려져 있으며 인간의 임상에서 태아의 무뇌증 또는 신경관기형의 검사에서 모체의 혈청이나 양수내의 α -fetoprotein의 증가를 확인함으로써 기형진단에 도움을 줄수 있다고 보고하고 있다.¹⁷⁻²⁴

또한 선천적 신장증(congenital nephrosis)⁷, 염색체미립(chromosomal aberrations)²⁵, 복벽결손(abdominal wall defect)²⁶, 태아심통(fetal distress) 혹은 사망^{27,28}, 식도폐쇄증(esophageal atresia)²⁹ 등의 기형유발시에도 모체의 혈청 및 양수내 α -fetoprotein이 증가한다고 보고하고 있다.

김과 허의 보고³⁰에서는 ethylenethiourea를 임신랫트에 투여하여 골격 및 내부장기의 기형이 유발될 경우에는 양수내 단백질의 함량 및 단백질을 구성하고 있는 아미노산의 함량이 감소된다고 하였다.

본 연구에서는 분만된 태자의 행동학습 시험을 수행하기 위하여 water filled multiple T-maze 시험을 실시하였다. 또한 단백질과 아미노산은 대사되어 암모니아를 거쳐 요소를 형성하므로 양수내의 요소농도의 변화를 관찰하고 몇몇 아미노산의 이화작용에 의하여 생성되는 유리지방산 함량 변화를 관찰함으로써 아미노산 함량변화의 원인을 규명함과 동시에 α -fetoprotein의 함량변화를 관찰하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 일본(Clea Co.)에서 SPF랫트(sprague-Dawley)를 수입하여 한국화학연구소 SPF 사육실에서 생산한 F2로써 9주령인 것을 1주일간 clean room에서 순화하였다. 사육실의 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 이었으며 습도는 $50\pm 5\%$ 이었다. 1일 조명시간은 오전 8시부터 오후 8시까지 12시간이었으며 인공조명을 사용하였다.

사료(제일사료, 조단백질 22.5% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 7.0% 이하, 조회분 10.0% 이하, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상)는 물과 함께 무제한 급여하였다.

실험계획 및 수행 : 임신이 확인된 암컷 랫트를 군당 25마리씩으로 하여 5마리씩 5반복으로 완전 임의배치

법에 따라 4개 군으로 나누어 ETU의 용량이 0(대조군), 10(I군), 30(II군) 및 50mg/kg/day(III군)가 되도록 조제된 약제를 임신 7일에서부터 임신 17일까지 기관형성기간 동안 매일 오전중에 경구용 zonde를 통해 위내에 직접 투여를 실시하였다.

임신 21일째, α -fetoprotein, 요소 및 유리지방산 등을 검사하기 위하여 각 군 21마리는 가벼운 ether 마취 후 자궁적출수술에 의해 양수를 채취하였다. 채취된 양수에 대해서 α -fetoprotein의 함량은 Bogart 등의 방법³¹에 따라 Dynatech제품 Enzyme Linked Immunosorbent assay(ELISA)를 사용하였으며 요소 함량은 UN-V(극동, 주) 요소결소 측정 KIT를 이용하였고 유리지방산 함량은 김 등³²의 방법에 따라 실시하였다.

각군 4마리는 자연 분만시켜 8주령이 된 태자를 Hasegawa 등³³의 방법에 따라 Water filled multiple T-maze 시험을 시행하였다.

통계학적 분석 : 모든 결과는 student t-검정을 실시하였다.

결 과

수 미로 시험 : 행동학습의 이상유무를 관찰하기 위하여 각군 모체 4마리씩, ETU를 임신 7일에서 임신 17일까지 투여한 후 자연분만된 태자를 모든 군에서 암수 각각 12마리씩 임의선별하여 8주령까지 성숙시킨 후 수 미로 시험을 수행하였으나 III군에서는 자연 분만된 태자의 두부에 수막류가 관찰되었으며 어미랫트는 두부의 돌출부위를 훑으면서 두정부위에 구멍이 생겨 모든 태자가 사망함으로써 본 실험을 할 수 없었다.

표 1에서 보는 바와 같이 수컷랫트에서 적선수로의 목표점까지 도달시간을 보면 대조군에서 1회 시행시에는 10.52초 였으나, I군에서 16.75초로써 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었으며 II군에서는 25.89초($p < 0.01$)로써 목표점까지 도달시간이 더 오래 걸렸다. 그러나 2회 시행과 3회 시행에서는 투여군에서 모두 대조군에 비하여 도달시간이 길어졌으나 5% 수준에서 유의성은 인정되지 않았다.

T-미로에서의 목표점까지 도달시간은 1일째와 2일째에서는 유의성이 나타나지 않았으나 3일째에서는 II군에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있게 증가하였다. 또한 selecting error, backing error 및 zone error에서도 II군에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$) 있게 증가하였다. 암컷랫트에서는 표 2에서 보는 바와 같이 적선수로에서는 1회 시행시 I군에서만

Table 1. Time score and errors in the water filled multiple T-maze test (F1 male rat)

		Control	10mg/kg	30mg/kg
Straight channel ^(a)	1	10.52	16.75*	25.89**
	2	5.69	8.57	9.11
	3	5.79	5.99	5.96
day 1	SE	3.06	2.97	3.88
	BE	1.19	1.50	1.85
	ZE	3.53	2.89	3.30
	time ^(a)	60.63	68.09	76.74
day 2	SE	1.97	2.22	3.00*
	BE	1.25	1.39	2.12
	ZE	1.11	1.31	2.30*
	time ^(a)	52.43	54.08	67.43
day 3	SE	1.25	1.61	3.24***
	BE	0.58	0.92	2.67***
	ZE	0.31	0.78*	2.82***
	time ^(a)	31.02	41.21	70.52***

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$.
 ** : Significantly different from control value at $p < 0.01$.
 *** : Significantly different from control value at $p < 0.001$.
^(a) : Seconds.
 SE : Selecting error.
 BE : Backing error.
 ZE : Zone error.

유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었을뿐 그 외에는 5% 수준에서 유의성이 인정되지 않았다. 그러나 T-미로 시험에서는 2일째 및 3일째에 II군에서만 유의성($p < 0.05$)이 인정되었다.

양수내의 α -fetoprotein 함량 : 양수의 α -fetoprotein 함량은 표 3에서 보는 바와 같다. 대조군의 평균 함량은 $5.17 \pm 0.30 \text{ ng/ml}$ 이었으며 I군에서는 $1.73 \pm 1.34 \text{ ng/ml}$, II군에서는 $0.39 \pm 0.63 \text{ ng/ml}$ 및 III군에서는 $0.11 \pm 0.24 \text{ ng/ml}$ 로써 대조군에 비하여 모든 투여군에서는 유의성($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다.

양수내의 요소함량 : 양수내의 요소 함량을 측정한 결과 표 4에서 보는 바와 같이 대조군의 $54.11 \pm 5.46 \text{ mg/dl}$ 에 비하여 I군 및 II군에서는 각각 $55.43 \pm 2.60 \text{ mg/dl}$ 및 $58.36 \pm 2.45 \text{ mg/dl}$ 로써 5% 수준에서 유의성이 인정되지 않았으며 III군에서는 $60.80 \pm 3.93 \text{ mg/dl}$ 로써 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다.

양수내의 유리지방산 함량 : 양수내의 유리지방산 함

Table 2. Time score and errors in the water filled multiple T- maze test (F1 female rat)

		Control	10mg/kg	30mg/kg
Straight channel ^(a)	1	10.58	17.00*	19.19
	2	7.58	6.70	7.47
	3	5.21	5.90	7.35
day 1	SE	2.72	3.17	3.03
	BE	1.03	1.19	1.64
	ZE	2.53	2.50	3.47
	time ^(a)	55.39	59.39	74.25
day 2	SE	1.92	2.53	3.19**
	BE	0.86	1.78	2.14*
	ZE	1.00	1.53	2.25*
	time ^(a)	44.67	53.77	61.24
day 3	SE	2.19	2.25	3.08
	BE	1.47	1.25	3.03*
	ZE	0.97	0.50	2.97**
	time ^(a)	48.69	49.07	73.89*

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$.
 ** : Significantly different from control value at $p < 0.01$.
^(a) : Seconds.
 SE : Selecting error.
 BE : Backing error.
 ZE : Zone error.

Table 3. Alpha-fetoprotein levels in amniotic fluid of dams were treated with ethylene-thiourea(ng/ml)

	Control	10mg/kg	30mg/kg	50mg/kg
1.	5.52	1.13	0.00	0.00
2.	6.10	0.68	0.00	0.00
3.	5.52	2.95	0.00	0.23
4.	5.52	3.85	0.00	0.68
5.	5.52	0.87	1.45	0.00
6.	6.10	0.87	0.87	0.00
7.	—	—	—	0.00
8.	—	—	—	0.00
M \pm SD	5.17 ± 0.30	1.73 ± 1.34 ***	0.39 ± 0.63 ***	0.11 ± 0.24 ***

*** : Significantly different from control value at $p < 0.001$.

량을 측정한 결과는 표 5에서 보는 바와 같다. 대조군의 $1.46 \pm 0.26 \text{ mg/dl}$ 에 비하여 I군 및 II군에서

Table 4. Urea values in amniotic fluids of dams were treated with ethylenethiourea(mg/dl)

	Control	10mg/kg	30mg/kg	50mg/kg
1.	44.49	54.31	60.88	62.27
2.	55.66	55.36	61.59	61.00
3.	58.44	56.15	57.05	61.59
4.	59.15	51.27	54.37	54.25
5.	49.71	54.02	59.15	66.81
6.	52.86	59.17	58.10	57.74
7.	58.44	57.76	57.39	61.93
M±SD	54.11 ±5.46	55.43 ±2.60	58.36 ±2.45	60.80 ±3.93*

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$.

Table 5. Free fatty acid levels in amniotic fluids of dams were treated with ethylene-thiourea(mg/dl)

	Control	10mg/kg	30mg/kg	50mg/kg
1.	1.28	1.34	1.34	1.54
2.	2.01	1.40	1.52	2.38
3.	1.36	1.30	1.33	1.78
4.	1.54	1.95	1.27	1.67
5.	1.26	1.40	1.94	2.03
6.	1.32	1.60	1.67	1.89
7.	1.42	1.24	1.22	1.58
M±SD	1.46 ±0.26	1.46 ±0.24	1.47 ±0.26	1.84 ±0.29*

* : Significantly different from control value at $p < 0.05$.

는 각각 1.46 ± 0.24 mg/dl 및 1.47 ± 0.26 mg/dl로써 5% 수준에서 유의성이 인정되지 않았으나 III군에서는 1.84 ± 0.29 mg/dl로써 유의성 ($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다.

고 찰

본 연구에서는 기형유발물질로 알려진 ETU를 투여하여 수뇌류의 기형이 유발되었을때 학습지능에 영향을 미칠 것으로 사료되어 수 미로 시험을 수행하였다. 또한 무뇌증 또는 신경관 기형의 기형을 가진 모체의 혈청내에 α -fetoprotein 함량이 증가한다고 하였다.¹⁷⁻²⁴ 무뇌증 및 신경관 기형은 모두 신경계에 기형이 발생

된 것으로서 ETU에 의한 수뇌류 역시 신경계에 기형이 발생된 것이므로 같은 계통의 기형이 생긴 것으로 볼때 ETU 투여에 의한 α -fetoprotein함량 역시 변화가 있을 것으로 추측하여 ELISA를 이용한 정량분석을 수행하였다.

자연 분만된 태자를 8주령까지 성숙시킨 후 수 미로 시험을 수행한 결과 목표점까지의 도달시간 및 selecting error, backing error, zone error 등에서 유의성 있는 증가 현상을 나타낸 것은 ETU에 의해 제 3뇌실 영역에 기형을 포함한 중추신경계에 발달부진이 유발됨으로써 학습지능의 감소 및 운동 감각 등의 감소가 나타난 것으로 생각된다.

α -fetoprotein은 인간의 임상에서 태아의 무뇌증 또는 신경관 기형의 검사에서 모체의 혈청이나 양수내의 α -fetoprotein의 증가를 확인함으로써 기형진단에 도움을 줄 수 있다고 보고하고 있다.^{17-19, 21-24}

Bogart 등³¹의 보고에 의하면 ELISA를 이용하여 인간의 양수를 임신기간별로 α -fetoprotein을 측정된 결과 15주에서는 $6.64 \mu\text{g/ml}$ 의 함량을 나타내다가 임신이 진행됨에 따라 점차 감소하여 20주에서는 $3.17 \mu\text{g/ml}$ 의 함량을 나타내었으며 무뇌증과 신경관기형의 태아를 가진 모체의 양수는 α -fetoprotein이 증가한다고 보고하였다. 또한 Laitinen 등²⁰의 보고에서는 수두증(hydrocephalus)의 기형을 가진 1개의 표본에서 양수의 α -fetoprotein함량이 기타 기형을 가진 양수에서보다 낮았으나 대조군보다는 다소 높은 함량을 보였다고 하였다.

본 연구에서의 양수내 α -fetoprotein 함량은 대조군에 비하여 투여군에서 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타낸 것은 무뇌증 및 신경관 기형 등의 기형에서와는 달리 ETU에 의한 수뇌류의 기형에서는 α -fetoprotein이 증가하지 않는 것으로 볼 때 양수의 α -fetoprotein 정량에 의한 수뇌류 기형의 진단을 불가능하다고 판단된다.

김과 허의 보고³⁰에 의한 두개골의 골화 지연현상을 뒷받침하는 사실로써 표 5에서 보는 바와 같이 유리지방산의 증가를 들 수 있다. 이들 아미노산의 대사는 acetyl-CoA를 거쳐 lipogenesis에 의하여 지방산합성이 이루어지기 때문이다. 또한 본 연구에서 거의 모든 아미노산이 감소가 나타난 사실은 대조군에 비하여 실험군에서 탈아미노 반응의 결과로 생성된 암모니아가 이산화탄소와 결합하여 요소로 합성되므로 증가된 요소 생성이 아미노산 감소를 의미한다. 또한 양수내의 유리지방산 함량이 대조군에 비하여 투여군에서 증가를 나타낸 것은 많은 수의 아미노산이 이화작용에서

acetyl-CoA로 전환이 되며 이 acetyl-CoA는 lipogenesis 작용을 받아 유리지방산을 형성하게 되므로³⁴ 유리지방산 함량이 대조군에 비하여 Ⅲ군에서 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타낸 것으로 사료된다.

이상의 사실을 종합적으로 고찰해 볼 때 투여된 ETU가 DNA에 영향을 주어 손상된 DNA가 단백질 합성 기통에 관여하여 단백질이 감소 한다고 말할 수는 없다. 그 사실로서는 요소 증가 및 유리지방산 증가를 들 수 있다. 유리아미노산이 증가 또는 유리지방산 요소함량이 증가한 사실은 아미노산의 이화작용이 증가한 것을 뜻한다.

고로 ETU는 단백질 합성에 관여하는 DNA에 영향을 주는 것이 아니라 아미노산의 이화작용과 단백질 합성에 관여하는 효소계에 영향을 미치는 것으로 추측된다.

요 약

본 연구는 ethylenethiourea의 투여에 따른 태자의 행동학습능력 및 α -fetoprotein, 요소 및 유리지방산 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10주령의 S.P.F Sprague-Dawley계 랫트를 이용하여 대조군, I군(10 mg/kg/day), II군(30mg/kg/day) 및 III군(50mg/kg/day)으로 나누어 각군 모두 임신 7일에서부터 임신 17일까지 11일간 투여하여 임신 21일째 각군 21마리씩 자궁적출수술시에 채집된 양수에 대해서는 α -fetoprotein, 요소, 유리지방산 함량을 측정하였으며 또한 임의로 선별된 각군 4마리의 어미랫트는 자연분만을 시켜 행동 학습의 정도를 조사하기 위하여 수 미로 시험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 자연분만된 태자를 8주령까지 성숙시킨 후 수 미로 시험을 수행한 결과 출발점에서 목표점까지의 수영 시간 및 여러가지 error가 3일째 수행의 II군 수컷태자와 암컷태자에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001$ 및 $p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다.

2. 양수내의 α -fetoprotein 함량은 대조군에 비하여 I군, II군 및 III군에서 모두 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다.

3. 양수내의 요소 함량은 대조군에 비하여 III군에서 모두 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었다.

4. 양수내의 유리지방산 함량은 대조군에 비하여 III군에서 모두 유의성($p < 0.05$)는 증가를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Graham, SL and Hansen, WH: 1972, Effects of short-term administration of ethylenethiourea

upon thyroid function of the rat *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 7:19~25.

2. Lu, MH and Staples, RE: 1978, Teratogenicity of ethylenethiourea and thyroid function in the rat. *Teratology.* 17:171~178.
3. Philippe, Q, Christine, DB and Maurice, H: 1985, The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutation Research*, 147(3): 79~95.
4. Ulland, BM, Weisburger, JH, Weisburger, EK, Rice, JM and Cypher, R: 1972, Thyroid cancer in rats from ethylenethiourea intake. *J Natl Cancer Inst* 49:583~584.
5. Kristien, M, Steve, H, Timothy, L, William, S, Beth, T and Errol, Z: 1986, Salmonella mutagenicity test: II. Results from the testing of the 270 chemicals. *Environ Mutagen.* 8:1~119.
6. Seiler, JP: 1974, Ethylenethiourea(ETU), a carcinogenic and mutagenic metabolite of ethylene bis-dithiocarbamate. *Mutation Res*, 26:189~191.
7. Shirasu, Y, Moriya M, Kato, K, Lienard, F, Tezuka, H, Teramoto, S and Koda, T: 1977, Mutagenicity screening on pesticides and modification products: a basis of carcinogenicity evaluation. Cold spring Harbor Conferences on Cell proliferation. 4:267~285.
8. Szegedi, M.: 1983, Compartive mutagenic investigation of the decomposition products of alkylene bis (dithiocaramate) fungicides and Neviram 80 W.P. Nehezvegyip. *Kut. Intex. Kozl.* 14:37~51.
9. Teramoto, S, Moriya, M, Kato, K, Tezuka, H, Nakamura, S, Shingu, A and Shirasu, Y: 1977, Mutagenicity testing on ethylenethiourea. *Mutation Res*, 56:121~129.
10. Daston, GP, Ebron, MT, Carver, B and Stefanadis, JG: 1987, In Vitro teratogenicity of ethylenethiourea in the rat. *Teratology*, 35: 239~245.
11. Khara, KS: 1973, Ethylenethiourea teratogenicity study in rats and rabbits. *Teratology*, 7:243~252.

12. Ruddick, JA and Khera, KS: 1975, Pattern of anomalies following single oral doses of ethylenethiourea to pregnant rats. *Teratology*, 12:277~282.
13. Ruddick, JA, Newsome, WH and Nash, L: 1976, Correlation of teratogenicity and molecular structure Ethylenethiourea and related compounds. *Teratology*, 13:263~266.
14. Teramoto, S, Harada, T, and Kaneda, M: 1978, Effects of ethylenethiourea upon developing brain and limb buds in the rat. *Cong Anom*, 18:241~249.
15. Teramoto, S, Saito, R and Shirasu, Y: 1980, Teratogenic effects of combined administration of ethylenethiourea and nitrite in mice. *Teratology*, 21:71~78.
16. Teramoto, S, Shingu, A, Kaneda, M and Saito, R: 1978, Teratogenicity studies with Ethylenethiourea in Rats Mice and hamsters. *Cong Anom* 18:1~17.
17. Allan, LD, Ferguson-Smith, MA, Donald, I et al.: 1973, Amniotic fluid alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of spina bifida. *Lancet* ii: 522.
18. Brock, DJH and Sutcliffe, RG: 1972, Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* ii:197.
19. Crandall, BF and Matsumoto, M: 1984, Routine amniotic fluid α -fetoprotein measurement in 34,000 pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 149: 744~747.
20. Laitinen, R, Jalanko, H, Kolho, KL, Koskull, H and Vuori, E: 1985, Zinc and α -fetoprotein in amniotic fluid from early pregnancies with fetal malformations. *Am J Obstet Gynecol* 152: 561~565.
21. Lorber, J, Stewart, CR, Ward, AM: 1973, Alpha-fetoprotein in antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* ii:1187.
22. Milunsky, A. and Alpert, E: 1974, The value of alpha-fetoprotein in the prenatal diagnosis of neural tube defects. *J Pediator* 84:889.
23. Milunsky, A, Alpert, E and Charles, D: 1974, Amniotic fluid alpha-fetoprotein in anencephaly *Obstet Gynecol*, 43:592.
24. Milunsky, A, Alpert, E, Neff, RK et al.: 1980, Prenatal diagnosis of neural tube defect IV. Maternal serum serum alpha-fetoprotein screening. *Obstet Gynecol*, 55:60.
25. Toftager-Larsen, K, Benzie, RJ, Doran, TA et al.: 1983, alpha-fetoprotein and ultrasound scanning in the prenatal diagnosis of Turner's syndrome. *Prenatal Diagn* 3:35~
26. King, CR and Prescott, GH: 1978, Amniotic fluid alpha-fetoprotein elevation with fetal omphalocele and a possible mechanism for its occurrence *Am J Obstet Gynecol* 130:279.
27. Seppala, M and Ruoslahti, E: 1973, Alpha-fetoprotein in maternal serum: A new marker for detection of fetal distress and interuterine death *Am J Obstet Gynecol* 115:48.
28. Weiss, RR, Marci, JN, Robins, J et al: 1976, Maternal serum and amniotic fluid alpha-fetoprotein as a marker for acute fetal distress in midtrimester abortion model. *Obstet Gynecol* 48:718~
29. Seppala, M, Laes, E and Harvo-Nopenen, M: 1974, Elevated amniotic alpha-fetoprotein in congenital oesophageal atresia *J Obstet Gynecol Br Commonw* 81:827.
30. 김성훈, 허린수: 1991, Ethylenethiourea의 임신 랫트에 있어서 기관형성기 투여 시험, 1. 기형발생과 양수내의 아미노산 및 단백질함양에 미치는 영향, 대한수의학회지,
31. Bogart, MH, Winkelbauer, D and Jones, DW: 1985, Evaluation of amniotic fluid α -fetoprotein using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay *Obstet Gynecol*, 66(3):341~345.
32. 김성훈, 박광균, 모기철, 허린수: 1983, 원청내 유리지방산의 미세정량법, 대한수의학회지, 91(1): 54~61.
33. Hasegawa, N, Shimamura, K, Suzuki, K and Imamichi, T: 1987, The development of water maze-learning ability in rats: (2) Effect of pretraining with the water filled straight channel. *Exp Anim*, 36(2):163~168.
34. Murray, RK, Granner, DK, Mayes, PA and Rodwell, VW: *Harper's Biochemistry*, 21st Ed. Appleton and Lange. (1988)pp.253~317,