



Thimerosal의 발생독성에 관한 연구

곽승준 · 이규식 · 김순선 · 손경희 · 김소희 · 채수영 · 최요우 · 원용혁 · 박귀례

국립독성연구원 특수독성부

Study on the Developmental Toxicity of Thimerosal

Seung Jun Kwack, Gyu Seek Rhee, Soon Sun Kim, Kyung Hee Sohn, So Hee Kim,
Soo Young Chae, Yo Woo Choi, Yong Hyuck Won and Kui Lea Park

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

Received September 17, 2003; Accepted October 27, 2003

ABSTRACT. The purpose of our study was to evaluate the toxicity of the thimerosal in embryos and neonates. Thimerosal (also known as mercuriothiolate) is a mercury-containing compound used in trace amounts to prevent bacteria and other organisms from contaminating vaccines, especially in opened multi-dose vials. The toxicity of mercury is well known and those most at risk occurs in unborn babies and newborn babies. Test methods included *in vitro* whole embryo culture (WEC) system and *in vivo* test of neonatal toxicity in Wistar rats. Ethylmercury and methylmercury were used as positive controls for the evaluating of toxic effects of mercury. In WEC assay, treated concentrations of thimerosal, ethylmercury and methylmercury were up to 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. All compounds didn't show any morphological abnormalities, but showed retardation of growth and development in dose dependent manner ($>0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$). These data indicated that thimerosal showed developmental toxicity *in vitro*. *In vivo* neonatal toxicity, Wistar rats were administered subcutaneously with thimerosal, ethylmercury, or methylmercury (5, 25, 50, 250, and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) during from postnatal day (PND) 4 to 25. Significant effects of these compounds on relative organ weights and organ morphology were not observed in this experiment. However, accumulation of mercury was detected in the kidney and testis when treated with thimerosal, ethylmercury, or methylmercury. These results suggest that thimerosal may be a harmful compound to embryo and neonate, but used concentration of thimerosal in these experiments is much higher than that of clinical application. Further investigation is needed on the safety of vaccine components, i.e. a thimerosal using *in vitro* and *in vivo* tests in the future.

Keywords: Thimerosal, Vaccine, Mercury, Whole embryo culture, Neonatal toxicity.

서 론

Thimerosal (or mercuriothiolate)은 유기수은을 함유하는 화합물로서 박테리아나 병원성 미생물로부터 백신의 오염을 방지하는 목적으로 사용되는 살균제이며 여러 종류의 백신제제, 특히 opened multi-dose 백신 종류에 많이 쓰이고 있다(Elferink, 1999). 사람은 출생 직후부터

18세 정도까지 백신제제를 투여받고 있으며, 특히 생후 14주까지의 영·유아는 thimerosal이 함유된 백신주사를 통해 최대 187 μg 의 수은에 노출될 수 있고 이러한 용량은 WHO 등에서 설정한 안전범위(34~159 μg)를 상회하는 수준이다. Thimerosal은 70여년 동안 백신의 살균제로 사용되어 왔으나, 그 위해성에 대한 명확한 자료는 없으며, WHO 등에서는 유효한 대체물질이 있을 경우 백신 내 thimerosal의 사용금지를 권하고 있는 실정이다. 다수의 국가에서는 제조업자에게 백신 중 thimerosal 사용을 억제토록 권장하고 있으나, 단순히 thimerosal 사용을 중단할 경우 백신 수급에 차질을 초래함으로써 더욱 큰 위

Correspondence to: Seung Jun Kwack, Department of Specialized Toxicology, National Institute of Toxicological Research, #5, Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea
E-mail: sjkwack@kfda.go.kr

해를 가져올 수도 있다. 백신 내 thimerosal 사용의 가장 큰 문제는 유기수은을 함유하고 있다는 것이다. 수은의 독성은 1950년대에 methylmercury 중독에 의한 뇌의 조직병변이 보고되었으며(Hunter and Russel, 1954), 수은에 오염된 생선의 섭취로 인한 중독현상이 보고된 일본 미나마타현 사건과 이라크에서 무분별한 수은제제 농약 사용으로 400여명의 사망을 불러온 사건은 수은에 의한 대표적인 피해사례이다. 수은 중독 시 가장 심각하게 영향을 받는 생체기관은 신경계 및 비뇨 생식기계로 알려져 있으며 특히, 대뇌, 소뇌 및 신장에서 병변이 많이 관찰된다(Kumar *et al.*, 1985; Cho *et al.*, 1997). 생화학적 연구에서도 수은은 sulfhydryl enzyme의 활성을 감소시키고 단백질의 합성을 저해하며(Yoshino *et al.*, 1966), microtubule의 integrity에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Abe *et al.*, 1975; Miura *et al.*, 1984; Vogel *et al.*, 1985). 백신에 함유되어 있는 thimerosal은 비록 매우 적은 양이나, 수은이 임신 중 태어나 신생아의 발달에 영향을 미치는 만큼 그 위해성의 평가는 반드시 필요하다(Bierman-van Eendenburg *et al.*, 1981; Davidson *et al.*, 1998; Grandjean *et al.*, 1999; Stajich *et al.*, 2000; Steuerwald *et al.*, 2000). 본 연구에서는 전배자 배양 실험법을 통하여 thimerosal 및 양성 대조물질인 ethylmercury, methylmercury의 배자독성을 검색하고, 랫드 신생자에 대한 투여를 통하여 신생자에서의 직접적인 노출에 대한 영향을 평가하고자 하였다. 또한, 각 장기에 대한 수은의 침착 정도를 확인하기 위하여 조직절편에서 autometallography(AMG) 염색을 통한 수은 검출을 실시하였다. 이 같은 연구결과는 thimerosal에 대한 노출이 어떠한 발생독성을 나타내는지 밝혀내고, 더 나아가 측정 가능한 biomarker를 탐색하는데 유용할 것으로 사료된다.

실험재료 및 방법

시험재료

Glutaraldehyde, absolute ethanol, thimerosal, Tyrode's salt, Poly-Prep™ slides 및 일반적으로 실험에 쓰여진 화학물질들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. Ethylmercury chloride 및 methylmercury chloride는 WAKO Chemical Co.(Osaka, Japan)에서 구입하였으며, xylene은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였고 Permout solution은 Fisher Chemical Co.(New Jersey, U.S.A.)에서 구입하였다.

실험동물 및 사육조건

국립독성연구원 실험동물자원실에서 사육된 특정병원체

부재(SPF) Wistar(W/S)계 9주령 랫드를 공급받아 사용하였다. 나무깎집을 사용한 polycarbonate 사육상자에 cage 당 3마리씩 수용하였으며, 고품사료(신촌사료) 및 수도물을 자유롭게 섭취시켰다. 사육온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $55 \pm 5\%$ 인 상태로 유지시켰으며, 명암은 1일 12시간(오전 6시~오후 6시)씩 교대하였다. 암컷 랫드를 수컷과 2:1로 교배시켜 다음날 아침 질전이 확인되거나 질도말법으로 정자가 발견된 암컷을 임신 0일로 산정하였다.

랫드 전배자배양(WEC system)을 이용한 독성영향 평가

임신 9.5일령의 Wistar계 랫드를 오후 1시부터 2시 사이에 경추탈구 후 자궁을 적출하여 멸균된 Tyrode's solution(pH 7.2)이 담긴 petri dish에서 자궁체로부터 수태산물을 제거하고 배자가 들어있는 탈락막(decidua)을 노출시켰다. 입체현미경하에서 탈락막을 제거하여 배자를 분리하고, Reichert's membrane을 조심스럽게 제거하여 적출된 배자들을 3 ml의 배양용 배지가 담겨있는 배양병에 3개체씩 넣었다. Thimerosal, ethylmercury chloride 및 methylmercury chloride를 DMSO에 녹여 최종농도가 각각 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하고, 음성대조군은 DMSO(0.5%)를 처리하여, 전배자 배양기(Ikemoto Co., Japan)에서 48시간 동안 배양하였다. 배양용 배지는 Wistar계 랫드의 IC (immediately centrifuged) 혈청을 사용하였고, 배양기내 온도는 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로, 회전속도는 1분당 25회전으로 유지시켰다. 가스는 혼합 제조된 가스[(주)동아사]를 습윤하게 한 후, 150 ml/min의 속도로 22 μm 의 filter에 통과시켜 멸균 공급했다. 가스 교환은 처음 17시간은 5% O_2 , 5% CO_2 , 90% N_2 의 조성으로 그 후에는 20% O_2 , 5% CO_2 , 75% N_2 의 조성으로 7시간 동안 공급하였으며 이후 24시간 동안은 40% O_2 , 5% CO_2 , 55% N_2 의 조성으로 공급하였다. 배자의 관찰은 배양 48시간 후 모든 배자의 난황막혈액순환을 관찰하였으며, yolk sac diameter, crown rump length, head length, 체질수 등을 측정하였다. 각 배자의 성장 및 분화상태를 평가하기 위해 G. Van Maele-Fabry 등의 배자독성 평가방법(embryo scoring system)에 따라 점수화하여 성장 및 분화를 평가하였다(Maele-Fabry *et al.*, 1990).

랫드 신생자를 이용한 독성영향 평가

임신한 랫드 모체로부터 자연분만시킨 차산자(분만일을 생후 0일로 산정하였음)를 생후 1일에 암수 각 6마리씩 용매대조군, thimerosal 투여군, ethylmercury 투여군, methylmercury 투여군으로 분리하였다. 생후 4일부터 thimerosal, ethylmercury, methylmercury를 멸균 생리

식염수에 용해한 후 생후 25일까지 피하투여 하였다. 투여량은 예비실험을 통하여 시험물질마다 5, 25, 50, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로 하였고, 투여액량은 10 ml/kg로 조정하였다. 투여액량은 매일 체중을 측정하여 체중에 따라 산출하였으며 시료는 투여직전에 조제하였다. 투여는 매일 동일한 시간에 실시하였다. 마지막 투여 후 24시간에 각 군당 암수 3마리씩을 투약 순서대로 마취시킨 후, 3% glutaraldehyde 용액을 간문맥으로 관류시켜 사멸한 다음 뇌, 간, 신장, 비장 및 생식장기(고환, 부고환, 자궁 및 난소)를 적출하여 지방을 제거하고 육안으로 이상을 관찰한 다음 상대중량을 측정하였다. 무게를 측정된 조직은 3% glutaraldehyde 용액에 고정하여 조직학적 관찰 및 조직내 수은검출을 위한 autometallography에 사용하였다. 실험하고 남아있는 각 군의 암수 3마리씩은 생후 45일까지 회복기를 가진 후 같은 방법으로 사멸하여 장기를 적출하여 처리하고, 각 조직은 고정하였다. 고정된 각 조직들은 일상적인 알코올탈수 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매시킨 후, 4 μm 로 절편을 제작하여 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드에 붙여 수은검출을 위한 autometallography 방법을 실시하였다. 각 조직 절편이 부착된 슬라이드를 100% xylene 및 여러 농도의 ethanol(100~30%)을 사용하여 파라핀 제거 및 수화과정을 거치고 증류수로 세척한 후, 26°C의 developing solution(protective colloid (50% natural gum arabic resin) 60%, citrate buffer 10%, reducing agent 15%, silver ion supply 15%, v/v)에서 2시간 동안 차광상태에서 발색시켰다. 발색이 끝난 다음 증류수로 수세 후, 5% sodium thiosulfate에서 12분간 반응시키고 증류수로 수세하였다. 0.5% toluidine blue 용액에서 20초간 염색한 후 증류수로 수세하고, 여러 농도의 ethanol(50~100%) 및 100% xylene을 이용하여 세척 및 탈수과정을 거친 다음 permount solution을 이용하여 고정하였다(Danschler, 1984, 1991; Cho *et al.*, 1997; Stoltenberg and Danschler, 2000).

자료의 통계학적 해석

시험결과는 대조군과 비교해서 분석하였다. SigmaStat 프로그램을 사용하여 ANOVA(one way analysis of variance)/Dunnet's test를 실시하여 통계처리 하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

Thimerosal이 전배자의 발달에 미치는 영향

임신 9.5일 랫드에서 분리한 배자에 thimerosal, ethylmercury chloride 및 methylmercury chloride를 DMSO

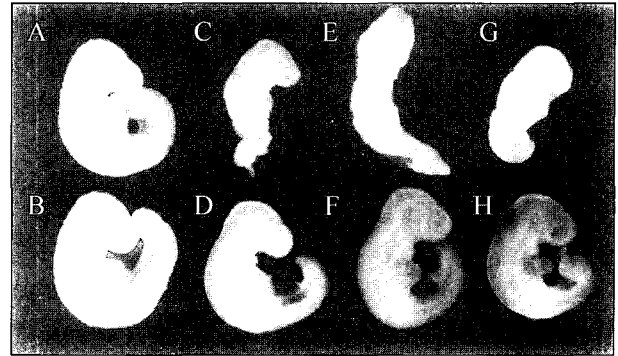


Fig. 1. Morphological appearance of day 9.5 rat embryos cultured for 48 hr with thimerosal, ethylmercury, or methylmercury. A: Non-treated control embryo, B: Vehicle control (DMSO), C: Embryo treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ methylmercury, D: Embryo treated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ methylmercury, E: Embryo treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethylmercury, F: Embryo treated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethylmercury, G: Embryo treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ thimerosal, H: Embryo treated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ thimerosal. Magnification 10x.

에 녹여 최종농도가 각각 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하고 IC 혈청에서 48 시간 배양 후 G.Van Maele-Fabry의 방법으로 배자의 기형도와 형태학적인 변화를 평가하였다. Thimerosal, ethylmercury 및 methylmercury는 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 배자의 성장을 유의적으로 저해하였으며, 특히 thimerosal은 yolk sac diameter, allantois, crown-rump length 및 flexion, ethylmercury는 yolk sac diameter, allantois, crown-rump length, flexion, caudal neural tube, hind brain 및 mid brain, methylmercury는 yolk sac diameter, flexion 등을 농도의존적으로 유의하게 배자의 성장을 저해하였다(Fig. 1). 시험물질을 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 처리하였을 때는 ethylmercury에서는 배자의 치사작용이 관찰되었고, thimerosal 및 methylmercury에서도 배자의 성장저해가 심각하여 scoring이 불가능하였다(Tables 1, 2 & 3).

Thimerosal이 신생자에 미치는 영향

랫드 신생자에 생후 4일부터 25일까지 thimerosal, ethylmercury chloride, methylmercury chloride를 평균 생리식염수에 녹여 5, 25, 50, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로 투여 전 측정된 체중에 따라 피하투여하고, 마지막 투여 후 24시간 및 생후 6주까지 회복기를 둔 다음에 각각 사멸하여 뇌, 간, 신장, 비장 및 생식장기(고환, 부고환, 자궁 및 난소)를 적출하여 지방을 제거하고 육안으로 이상을 관찰한 다음 중량을 측정하였다. 암수 전군에서 투여물질에 의한 것으로 판단되는 임상증상은 발견되지 않

Table 1. Effects of thimerosal on growth and development of day 9.5rat embryos exposed *in vitro*

Parameters	Control	Thimerosal ($\mu\text{g/ml}$)			
		0.1	0.25	0.5	1
Yolk sac diameter (mm)	3.70 \pm 0.20	3.30 \pm 0.14*	3.08 \pm 0.09*	2.90 \pm 0.10*	3.83 \pm 0.21*
Yolk sac circulatory system	4.50 \pm 0.00	4.37 \pm 0.25	4.12 \pm 0.25*	4.00 \pm 0.00*	4.50 \pm 0.00
Allantois	2.80 \pm 0.25	2.50 \pm 0.00	2.25 \pm 0.28*	2.16 \pm 0.28*	2.33 \pm 0.28*
Head length (mm)	1.66 \pm 0.11	1.45 \pm 0.09	1.42 \pm 0.21	1.13 \pm 0.15*	1.66 \pm 0.06
Crown-rump length (mm)	3.09 \pm 0.17	2.50 \pm 0.08*	2.37 \pm 0.12*	2.33 \pm 0.28*	2.33 \pm 0.29*
Flexion	4.80 \pm 0.25	4.37 \pm 0.25	4.12 \pm 0.25*	4.16 \pm 0.28*	4.00 \pm 0.50*
Caudal neural tube	4.80 \pm 0.25	4.50 \pm 0.00	4.25 \pm 0.29	4.16 \pm 0.28	4.50 \pm 0.00
Hind brain	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.16 \pm 0.28	4.16 \pm 0.28
Mid brain	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.16 \pm 0.28	4.16 \pm 0.28
Fore brain	4.95 \pm 0.15	5.00 \pm 0.00	4.88 \pm 0.28	4.66 \pm 0.28	4.33 \pm 0.28
Somites	4.60 \pm 0.51	4.25 \pm 0.05	4.25 \pm 0.50	4.00 \pm 0.00	4.00 \pm 0.00
TOTAL SCORE	35.5 \pm 0.95	34.00 \pm 0.71	32.88 \pm 1.49	31.00 \pm 1.80*	32.00 \pm 1.50*

Each value represents mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control group ($p<0.05$).

Table 2. Effects of ethylmercury on growth and development of day 9.5rat embryos exposed *in vitro*

Parameters	Control	Ethylmercury ($\mu\text{g/ml}$)			
		0.1	0.25	0.5	1
Yolk sac diameter (mm)	3.70 \pm 0.20	3.63 \pm 0.15	3.57 \pm 0.21*	3.03 \pm 0.25*	3.26 \pm 0.06*
Yolk sac circulatory system	4.50 \pm 0.00	4.67 \pm 0.29	4.67 \pm 0.58	4.33 \pm 0.28	4.00 \pm 0.00
Allantois	2.80 \pm 0.25	2.67 \pm 0.29	2.50 \pm 0.00	2.16 \pm 0.28*	2.00 \pm 0.00*
Head length (mm)	1.66 \pm 0.11	1.57 \pm 0.15	1.43 \pm 0.12	1.20 \pm 0.27*	1.36 \pm 0.06
Crown-rump length (mm)	3.09 \pm 0.17	3.07 \pm 0.06	2.68 \pm 0.06	2.30 \pm 0.36*	2.63 \pm 0.06*
Flexion	4.80 \pm 0.25	4.50 \pm 0.00	4.17 \pm 0.58	3.50 \pm 0.86*	3.00 \pm 0.00*
Caudal neural tube	4.80 \pm 0.25	4.50 \pm 0.00	4.33 \pm 0.29*	4.16 \pm 0.28*	4.50 \pm 0.00
Hind brain	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.16 \pm 0.28*	4.00 \pm 0.00*
Mid brain	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.16 \pm 0.28*	4.00 \pm 0.00*
Fore brain	4.95 \pm 0.15	5.00 \pm 0.00	5.00 \pm 0.00	4.33 \pm 0.57	4.50 \pm 0.00
Somites	4.60 \pm 0.51	5.00 \pm 0.00	5.00 \pm 0.00	4.33 \pm 0.57	4.00 \pm 0.00
TOTAL SCORE	35.5 \pm 0.95	35.33 \pm 0.58	34.67 \pm 1.44	31.17 \pm 2.89*	30.00 \pm 0.00*

Each value represents mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control group ($p<0.05$).

Table 3. Effects of methylmercury on growth and development of day 9.5rat embryos exposed *in vitro*

Parameters	Control	Methylmercury ($\mu\text{g/ml}$)			
		0.1	0.25	0.5	1
Yolk sac diameter (mm)	3.70 \pm 0.20	3.30 \pm 0.27	3.26 \pm 0.21	3.40 \pm 0.17	2.83 \pm 0.21*
Yolk sac circulatory system	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.33 \pm 0.28	4.00 \pm 0.00*
Allantois	2.80 \pm 0.25	2.50 \pm 0.00	2.50 \pm 0.00	2.50 \pm 0.00	2.17 \pm 0.29*
Head length (mm)	1.66 \pm 0.11	1.57 \pm 0.15	1.40 \pm 0.17	1.43 \pm 0.06	1.27 \pm 0.15
Crown-rump length (mm)	3.09 \pm 0.17	2.77 \pm 0.12	2.80 \pm 0.27	2.87 \pm 0.06	2.37 \pm 0.35*
Flexion	4.80 \pm 0.25	4.16 \pm 0.28*	4.00 \pm 0.00*	4.00 \pm 0.00*	3.50 \pm 0.50*
Caudal neural tube	4.80 \pm 0.25	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	3.83 \pm 0.57*
Hind brain	4.50 \pm 0.00	4.33 \pm 0.28	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.00 \pm 0.00*
Mid brain	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	4.00 \pm 0.00*
Fore brain	4.95 \pm 0.15	4.83 \pm 0.28	5.00 \pm 0.00	5.00 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00*
Somites	4.60 \pm 0.51	4.66 \pm 0.57	4.66 \pm 0.58	4.00 \pm 0.00	4.00 \pm 0.00
TOTAL SCORE	35.5 \pm 0.95	34.00 \pm 1.32	34.17 \pm 0.58	33.33 \pm 0.29*	30.00 \pm 0.87*

Each value represents mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control group ($p<0.05$).

Table 4. Relative organ weight of male rats (PND 25) administered subcutaneously with thimerosal, ethylmercury, or methylmercury during from PND 4 to PND 25

Control	Brain	Spleen	Liver	Kidney (R)	Kidney (L)	Epididymis (R)	Epididymis (L)	Testis (R)	Testis (L)
	1.92±0.09*	0.53±0.09	5.55±0.05	0.50±0.05	0.48±0.01	0.04±0.00	0.04±0.00	0.30±0.02	0.32±0.01
Thimerosal (µg/kg)	5	2.02±0.12	0.52±0.13	5.82±0.72	0.49±0.07	0.52±0.06	0.04±0.01	0.04±0.00	0.31±0.04
	25	2.04±0.16	0.46±0.04	5.39±0.76	0.58±0.04	0.52±0.04	0.04±0.00	0.03±0.00	0.31±0.02
	50	1.95±0.24	0.59±0.08	5.74±0.86	0.55±0.06	0.54±0.02	0.04±0.00	0.04±0.00	0.32±0.02
	250	2.30±0.31	0.58±0.08	5.13±0.41	0.55±0.05	0.50±0.02	0.04±0.00	0.04±0.00	0.31±0.01
	500	1.92±0.09	0.53±0.09	5.55±0.05	0.59±0.05	0.50±0.02	0.03±0.01	0.03±0.00	0.29±0.01
Ethylmercury (µg/kg)	5	2.12±0.08	0.61±0.04	4.87±0.78	0.56±0.04	0.53±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.33±0.01
	25	2.11±0.23	0.57±0.09	5.29±0.48	0.55±0.03	0.40±0.31	0.04±0.01	0.04±0.00	0.33±0.01
	50	1.89±0.05	0.48±0.02	5.68±0.66	0.51±0.03	0.52±0.01	0.04±0.00	0.04±0.01	0.33±0.01
	250	2.09±0.18	0.55±0.06	5.08±0.22	0.51±0.03	0.58±0.03	0.04±0.00	0.04±0.00	0.31±0.02
	500	2.01±0.14	0.45±0.06	4.95±0.54	0.55±0.03	0.52±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.30±0.02
Methylmercury (µg/kg)	5	1.92±0.13	0.58±0.07	5.01±0.09	0.56±0.08	0.55±0.04	0.04±0.00	0.04±0.00	0.30±0.01
	25	2.04±0.16	0.48±0.06	4.70±0.54	0.54±0.03	0.52±0.04	0.03±0.00	0.03±0.00	0.32±0.02
	50	2.07±0.09	0.64±0.12	5.53±0.70	0.47±0.03	0.53±0.04	0.03±0.00	0.04±0.00	0.33±0.06
	250	1.94±0.09	0.43±0.03	4.41±0.15	0.52±0.04	0.51±0.01	0.04±0.00	0.04±0.00	0.32±0.01
	500	1.93±0.02	0.53±0.10	5.04±0.67	0.48±0.04	0.50±0.05	0.04±0.00	0.04±0.00	0.32±0.02

*Mean±SD (% body weight).

Table 5. Relative organ weight of female rats (PND 25) administered subcutaneously with thimerosal, ethylmercury, or methylmercury during from PND 4 to PND 25

Control	Brain	Spleen	Liver	Kidney (R)	Kidney (L)	Uterus	Ovary (R)	Ovary (L)
	2.18±0.14*	0.52±0.01	4.83±0.15	0.52±0.01	0.50±0.01	0.06±0.01	0.01±0.01	0.01±0.001
Thimerosal (µg/kg)	5	2.01±0.15	0.55±0.13	5.90±0.69	0.50±0.02	0.51±0.06	0.04±0.04	0.02±0.00
	25	1.99±0.13	0.47±0.07	5.88±0.24	0.53±0.05	0.56±0.07	0.08±0.01	0.02±0.00
	50	2.04±0.11	0.48±0.10	4.99±0.74	0.53±0.01	0.55±0.02	0.07±0.01	0.01±0.00
	250	2.26±0.30	0.55±0.11	4.96±0.37	0.54±0.05	0.59±0.08	0.06±0.02	0.02±0.00
	500	2.02±0.11	0.61±0.05	5.67±0.29	0.54±0.10	0.58±0.07	0.07±0.00	0.01±0.00
Ethylmercury (µg/kg)	5	2.16±0.12	0.47±0.08	4.34±0.56	0.52±0.02	0.54±0.03	0.10±0.02	0.02±0.00
	25	2.29±0.34	0.71±0.23	6.02±0.35	0.52±0.01	0.56±0.05	0.06±0.01	0.02±0.00
	50	2.03±0.10	0.48±0.01	6.12±0.55	0.57±0.09	0.63±0.05	0.06±0.01	0.02±0.00
	250	2.09±0.21	0.48±0.04	6.23±0.39	0.58±0.04	0.55±0.03	0.08±0.02	0.02±0.00
	500	2.01±0.14	0.47±0.05	4.88±0.29	0.58±0.08	0.66±0.04	0.08±0.01	0.01±0.00
Methylmercury (µg/kg)	5	2.05±0.08	0.54±0.13	5.07±0.61	0.51±0.03	0.51±0.04	0.07±0.01	0.02±0.00
	25	2.03±0.16	0.46±0.04	5.59±2.02	0.54±0.03	0.51±0.06	0.08±0.01	0.02±0.00
	50	2.25±0.15	0.55±0.04	4.72±0.59	0.51±0.04	0.50±0.05	0.08±0.02	0.02±0.00
	250	1.92±0.11	0.46±0.03	4.63±0.32	0.51±0.04	0.52±0.02	0.06±0.01	0.02±0.00
	500	1.98±0.16	0.42±0.03	4.96±0.65	0.56±0.07	0.52±0.04	0.05±0.00	0.02±0.00

*Mean±SD (% body weight).

았다. 생후 4일부터 25일까지의 투여기간 중의 체중증가는 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 투여 종료 후, 생후 45일까지의 회복기간 중에도 대조군과 비교하여 유의적인 체중변화는 나타나지 않았다. 투여물질이 장기에 미치는 영향을 조사한 결과 외형적인 이상은 나타나지 않았으며, 각 장기의 무게를 체중과 비교하여 상대증량을 산출한 결과에서도 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 발견되지 않았다(Tables 4, 5, 6 & 7).

Thimerosal이 신생자의 장기에 미치는 영향

Thimerosal, ethylmercury 및 methylmercury가 각 장기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시험물질을 각각 5, 25, 50, 250, 500 µg/kg씩 투여한 rat의 장기를 auto-metallography 방법을 사용하여 수은이 미치는 영향을 관찰하였다. 관찰장기는 뇌, 간, 신장, 비장 및 생식장기(수컷의 경우는 고환 및 부고환, 암컷의 경우는 자궁 및 난소)를 대상으로 하여 4~5 µm로 절편하여 슬라이드에 고정하고 염색 처리한 후, 현미경으로 관찰하였다. Thi-

Table 6. Relative organ weight of male rats (PND 45) administered subcutaneously with thimerosal, ethylmercury, or methylmercury during from PND 4 to PND 25

Control		Brain	Spleen	Liver	Kidney (R)	Kidney (L)	Epididymis (R)	Epididymis (L)	Testis (R)	Testis (L)
		0.76±0.00*	0.63±0.08	5.86±0.51	0.42±0.03	0.40±0.02	0.05±0.01	0.05±0.01	0.44±0.01	0.44±0.01
Thimerosal (µg/kg)	5	0.79±0.04	0.45±0.08	5.73±0.37	0.44±0.02	0.43±0.02	0.05±0.01	0.05±0.01	0.49±0.02	0.49±0.03
	25	0.81±0.04	0.37±0.00	6.22±0.23	0.46±0.04	0.47±0.08	0.05±0.01	0.05±0.01	0.44±0.04	0.44±0.04
	50	0.75±0.03	0.51±0.05	6.59±0.70	0.44±0.07	0.46±0.10	0.06±0.00	0.06±0.01	0.44±0.03	0.44±0.02
	250	0.81±0.04	0.57±0.10	5.95±0.39	0.46±0.04	0.46±0.01	0.05±0.01	0.05±0.00	0.47±0.03	0.47±0.02
	500	0.76±0.00	0.48±0.10	5.25±0.57	0.47±0.04	0.45±0.04	0.05±0.01	0.05±0.01	0.41±0.00	0.41±0.02
Ethylmercury (µg/kg)	5	0.80±0.03	0.51±0.04	5.50±0.23	0.43±0.02	0.44±0.04	0.05±0.01	0.05±0.01	0.49±0.04	0.50±0.04
	25	0.80±0.02	0.45±0.10	5.78±0.76	0.41±0.02	0.43±0.05	0.05±0.00	0.05±0.00	0.48±0.01	0.48±0.03
	50	0.76±0.04	0.42±0.05	5.83±0.21	0.47±0.02	0.47±0.02	0.05±0.00	0.05±0.01	0.43±0.02	0.43±0.02
	250	0.81±0.02	0.54±0.02	5.72±0.47	0.45±0.05	0.48±0.05	0.05±0.01	0.06±0.01	0.45±0.00	0.47±0.02
	500	0.74±0.04	0.40±0.06	5.43±0.47	0.44±0.04	0.43±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00	0.45±0.02	0.45±0.02
Methylmercury (µg/kg)	5	0.77±0.04	0.56±0.08	5.88±0.30	0.47±0.04	0.45±0.03	0.05±0.00	0.05±0.00	0.45±0.01	0.46±0.01
	25	0.80±0.01	0.39±0.02	5.99±0.40	0.44±0.02	0.42±0.02	0.06±0.02	0.05±0.00	0.45±0.02	0.46±0.02
	50	0.80±0.01	0.60±0.03	5.16±0.87	0.44±0.06	0.46±0.04	0.05±0.00	0.05±0.00	0.46±0.04	0.45±0.05
	250	0.75±0.04	0.48±0.06	5.50±0.39	0.42±0.01	0.42±0.01	0.05±0.00	0.06±0.00	0.47±0.02	0.46±0.02
	500	0.80±0.02	0.45±0.04	5.67±0.34	0.46±0.06	0.44±0.05	0.06±0.01	0.06±0.01	0.48±0.04	0.48±0.03

*Mean±SD (% body weight).

Table 7. Relative organ weight of female rats (PND 45) administered subcutaneously with thimerosal, ethylmercury, or methylmercury during from PND 4 to PND 25

Control		Brain	Spleen	Liver	Kidney (R)	Kidney (L)	Uterus	Ovary (R)	Ovary (L)
		0.98±0.01*	0.53±0.07	4.63±0.16	0.44±0.04	0.45±0.03	0.19±0.12	0.02±0.00	0.02±0.01
Thimerosal (µg/kg)	5	0.99±0.02	0.45±0.12	6.08±0.32	0.37±0.14	0.44±0.03	0.19±0.11	0.02±0.00	0.02±0.00
	25	0.99±0.02	0.35±0.04	6.18±0.72	0.48±0.06	0.47±0.03	0.24±0.08	0.02±0.00	0.02±0.00
	50	0.91±0.02	0.41±0.07	5.70±0.33	0.44±0.02	0.45±0.02	0.14±0.05	0.02±0.01	0.02±0.00
	250	1.01±0.04	0.47±0.08	5.89±0.35	0.46±0.03	0.43±0.02	0.19±0.06	0.02±0.00	0.02±0.00
	500	0.93±0.03	0.44±0.05	5.99±0.46	0.49±0.06	0.46±0.01	0.19±0.11	0.02±0.00	0.02±0.00
Ethylmercury (µg/kg)	5	0.98±0.05	0.43±0.04	5.74±0.15	0.51±0.02	0.44±0.06	0.15±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
	25	0.95±0.04	0.46±0.11	6.14±0.37	0.48±0.05	0.49±0.01	0.13±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00
	50	0.88±0.04	0.48±0.06	5.42±0.25	0.43±0.04	0.41±0.02	0.13±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00
	250	0.97±0.01	0.40±0.02	6.91±0.70	0.47±0.02	0.52±0.01	0.21±0.10	0.02±0.00	0.02±0.01
	500	0.96±0.02	0.37±0.03	5.74±0.50	0.49±0.02	0.49±0.01	0.14±0.05	0.02±0.00	0.02±0.00
Methylmercury (µg/kg)	5	0.95±0.02	0.40±0.10	5.76±0.24	0.49±0.02	0.46±0.05	0.24±0.07	0.02±0.00	0.02±0.00
	25	0.95±0.02	0.45±0.15	5.10±0.16	0.39±0.02	0.41±0.04	0.20±0.11	0.02±0.00	0.02±0.00
	50	1.00±0.06	0.54±0.06	6.16±0.65	0.50±0.07	0.50±0.04	0.15±0.04	0.02±0.00	0.02±0.00
	250	0.92±0.03	0.43±0.04	5.96±1.09	0.48±0.06	0.46±0.01	0.26±0.16	0.02±0.00	0.02±0.00
	500	0.96±0.02	0.40±0.11	5.82±0.30	0.50±0.06	0.50±0.09	0.14±0.02	0.02±0.01	0.02±0.00

*Mean±SD (% body weight).

merosal, ethylmercury 및 methylmercury를 투여한 결과, 모든 용량에서 뇌, 간, 비장, 부고환, 자궁 및 난소에서 수은 축적이 나타나지 않았다. 신장에서는 생후 25일에 부검하였을 때 암수 모두에서 thimerosal과 ethylmercury가 50 µg/kg 이상에서, methylmercury는 250 µg/kg 이상에서 수은의 축적이 나타났으며, 이 현상은 생후 45일에 부검하였을 때도 계속 관찰이 되었다. 생후 25일에는 신장의 피질(cortex)과 근위 세뇨관(proximal tubule)에서 수은의 축적이 많이 관찰되었고 생후 45일에

는 신장의 수질(medulla)과 원위 세뇨관(distal tubule)으로도 축적이 확산된 것이 관찰되었다(Fig. 2). 고환에서는 생후 25일에 부검하였을 때 thimerosal과 ethylmercury가 50 µg/kg 이상에서, methylmercury는 250 µg/kg 이상에서 미량의 수은 축적이 나타났으나, 생후 45일에서는 수은의 축적이 나타나지 않았다. 고환에서의 수은 축적은 Leydig cell에서 나타났으며 seminiferous tubule 내에서는 관찰되지 않았다. 시험물질을 고농도로 처리했을 때, 대조군과 비교하여 tubular atrophy 등의 형태학적 손상

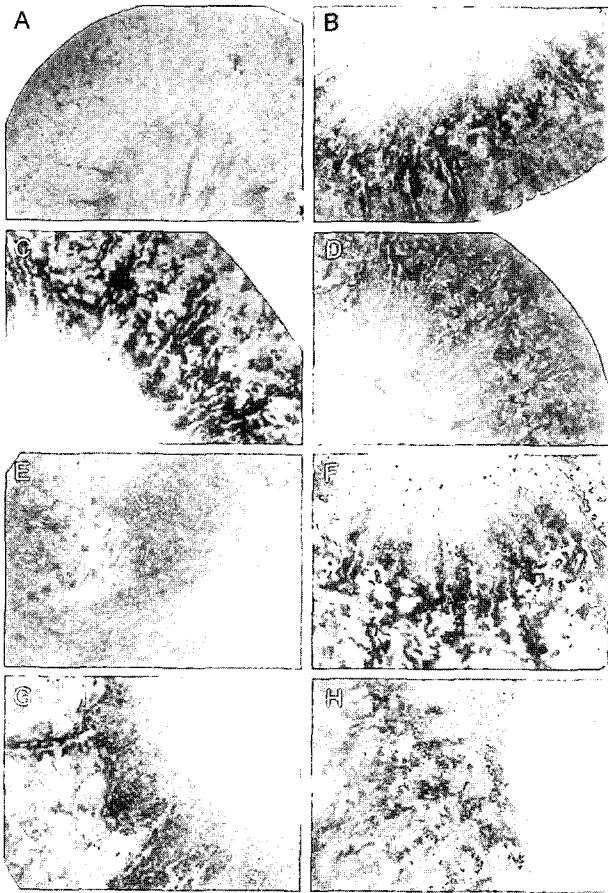


Fig. 2. Light micrographs of 4 µm paraffin-embedded section from kidney of male W/S rat. AMG developed for 120 min and counterstained with 0.5% toluidine blue. Mercury deposits, which appear as dark black (A~D: PND 25, E~H: PND 45, A, E: vehicle control, B, F: thimerosal 500 µg/kg, C, G: ethylmercury 500 µg/kg, D, H: methylmercury 500 µg/kg). Magnification 50x.

도 일부 관찰되었다.

고 찰

Thimerosal은 수은을 함유하는 물질로서 백신제제의 세균 오염방지를 위한 살균보존제로 널리 사용된다. Thimerosal은 화합물의 구조에서 ethylmercury를 포함하고 있으며, 생체내에서 분리되어 수은의 영향을 나타낸다. 백신에 함유되어 있는 thimerosal의 양은 비록 매우 적지만, 태어나 신생아에 대한 수은의 독성이 큰 만큼, 생체내에서의 독성영향은 평가되어야 한다. 본 실험에서는 thimerosal의 배자 및 신생아에 대한 독성을 평가하기 위하여 *in vitro* 및 *in vivo* 방법을 사용하였다. *In vitro* 단기 발생독성시험법 중 설치류의 배자 또는 배자의 기관이나 세포를 배양하여 화학물질의 독성을 평가하는 방법에

는 착상전 배자배양법, 전배자 배양법, 중뇌세포 배양법, 지아세포 배양법 및 지아기관 배양법 등이 단기 검색법으로 많이 사용되고 있다(Faustman, 1988). 이 중 전배자 배양법은 New(1978)에 의해 개발된 방법으로 포유동물에서 착상후 배자를 분리하고 배양하여 화학물질이 배자의 발달상태에 미치는 영향을 평가하는 방법이다. 임신 9.5일의 랫드 배자를 48시간 동안 *in vitro* 배양하면 배자의 발달상태 및 각 기관의 발육상태가 *in vivo*와 거의 유사하게 나타나므로 기관형성기에 성장상태를 나타내는 여러 endpoint를 가지고 화학물질이 배자의 성장 및 발달에 어떠한 영향을 주는지 평가할 수 있으며, *in vivo*와 비교하여 배자의 흡수나 회복으로 인한 영향을 배제할 수 있고, 시험물질의 정확한 양을 시간에 따라 배자에 직접 노출시킬 수 있는 장점이 있다. 이 방법은 1980년대 초기에 주로 화학물질에 의한 배자독성의 기전 연구에 이용되었다(Sadler, 1980; Kitchin *et al.*, 1981). 전배자 배양결과, thimerosal, ethylmercury 및 methylmercury 모두 0.5 µg/ml 이상에서 배자의 성장을 유의적으로 저해하였으나, 기형과 관련한 증상은 나타나지 않았다. 평가 항목 중 yolk sac diameter 및 flexion의 score는 전 물질에서 유의적으로 감소하였고, 그 외 thimerosal은 allantois 및 crown-rump length, ethylmercury는 allantois, crown-rump length, caudal neural tube, hind brain 및 mid brain의 score를 농도의존적으로 감소시켰다. 각 시험물질 중 ethylmercury는 thimerosal 및 methylmercury에 비교하여 상대적으로 배자독성이 높게 나타났다.

랫드 신생아에 대한 독성영향을 평가하기 위해 생후 4일부터 25일까지 연속적으로 피하주사하고 투약 종료 시와 생후 45일까지 회복기를 둔 후 부검 조사하였다. 투여량은 예비실험 결과 최대투여량을 일반 임상 독성증상이 나타나지 않는 500 µg/kg로 설정하였다. 실험결과, 암수 전 군에서 투여물질에 의한 것으로 판단되는 임상증상, 체중변화 및 장기의 상대중량 변화는 관찰되지 않았다. 기존의 실험에서는 랫드에 유기수은제를 10 mg/kg 농도로 1주일간 투여할 때 체중감소, 다리골절 및 다리꼬임 등의 증상이 관찰되었다는 보고가 있으며, 같은 실험결과가 예비실험을 통하여 확인되었다(Kinoshita *et al.*, 1999). Thimerosal, ethylmercury 및 methylmercury가 각 장기에 미치는 영향을 관찰하고자 autometallography(AMG) 염색법을 이용한 수은 검출 실험을 실시하였다. 이 방법은 Liesegang에 의해 조직관찰에 도입되어 Denmark의 Gorm Danscher에 의해 발전된 것으로, 수은과 같은 중금속의 small cluster가 AMG silver amplification을 촉진시키는 원리를 이용한 것이다(Liesegang, 1911; Liesegang and Rieder, 1921). 이 방법은 금, 은, 수은 및 비스무스/

셀레나이드 등 중금속의 조직내 검출에 유용하게 사용되고 있다(Roberts, 1935; Zeiger, 1938; Yimm, 1962; Ross *et al.*, 1996). 본 실험에서는 조직 슬라이드를 AMG 염색한 후, 0.2% toluidine blue로 counter 염색하여 관찰하였다. 수은의 축적은 검은색으로 나타나며 정상적인 조직은 파란색을 나타낸다. 실험결과, 신장에서는 생후 25일에 부검하였을 때 암수 모두에서 thimerosal과 ethylmercury가 50 µg/kg 이상에서, methylmercury는 250 µg/kg 이상에서 수은의 축적이 나타났으며, 이 현상은 생후 45일에 부검하였을 때도 계속 관찰이 되었다. 고환에서는 생후 25일에 부검하였을 때 thimerosal과 ethylmercury는 50 µg/kg 이상, methylmercury는 250 µg/kg 이상 처리군에서 수은의 축적이 나타났으나, 생후 45일에서는 수은의 축적이 나타나지 않았다. 또한 시험물질을 고농도로 처리했을 때는 대조군과 비교하여 tubular atrophy 등의 형태학적 손상도 일부 관찰되었으며, 이 결과는 기존의 연구결과와도 일치하였다(Orisakwe *et al.*, 2001). 수은의 축적은 ethylmercury, thimerosal, methylmercury 순서로 나타났다. 조직내 수은의 축적은 동물의 성에 따라 조직친화성이 다르며 특히 뇌 및 신장에 많이 축적되는 것으로 알려져 있으나(Pamphlett *et al.*, 1997), 본 실험 결과에서는 암수의 신장과 수컷의 고환에서만 관찰되었다. 신장에서의 수은 축적은 회복기 동안에도 감소되지 않으므로 수은에 의해 가장 크게 영향받을 수 있는 장기로 판단된다. 이상의 결과에서 thimerosal은 랫드의 배자 및 신생자에서 독성을 나타낼 수 있는 것으로 관찰되었으나, 실험에 사용된 투여량이 사람에서의 노출량에 비해 매우 많기 때문에 사람에서 같은 영향을 나타낸다고 볼 수는 없다. 또한, 사람에서의 노출량을 본 실험에 적용할 때는 실험결과에서 무해용량 수준이므로 백신에서의 thimerosal은 안전하다고 판단할 수도 있다. 하지만 백신의 안전성에 대한 사회적 요구가 높아지고 있는 만큼 thimerosal을 포함한 백신 내 첨가물에 대해 뇌 발달, 면역계 및 행동발달과의 상관성 등 *in vitro* 및 *in vivo* 독성에 대한 점진적인 연구가 요구된다.

참고문헌

- Abe, T., Haga, T. and Kurokawa, M. (1975): Blockage of axoplasmic transport and depolymerisation of reassembled microtubules by methylmercury. *Brain Res.*, **86**, 504-508.
- Bierman-van Eendenburg, M.E., Jurgens-van der Zee, A.D., Olinga, A.A., Huisjes, H.H. and Touwen, B.C. (1981): Predictive value of neonatal neurological examination: a follow-up study at 18 months. *Dev. Med. Child. Neurol.*, **23**, 296-305.
- Cho, H.W., Kim, M.H., Hwang, K.Y. and Yee, S.T. (1997): Detection of mercury in kidney, liver, spleen and cerebellum of the mouse by autometallography. *Korean J. Toxicol.*, **13**, 401-408.
- Danschler, G. (1984): Autometallography: A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochem.*, **81**, 331-335.
- Danschler, G. (1991): Application of autometallography to heavy metal toxicology. *Pharmacol. Toxicol.*, **68**, 414-423.
- Davidson, P.W., Myers, G.J., Cox, C., Axtell, C., Shamlaye, C., Sloane-Reeves, J., Cernichiari, E., Needham, L., Choi, A., Wang, Y., Berlin, M. and Clarkson, T.W. (1998): Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *JAMA*, **280**, 701-707.
- Elferink, J.G. (1999): Thimerosal: A versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *General Pharmacol.*, **33**, 1-6.
- Faustman, E.M. (1988): Short-term tests for teratogens. *Mutation Res.*, **205**, 355-384.
- Grandjean, P., Budtz-Jorgensen, E., White, R.F., Jorgensen, P.J., Weihe, P., Debes, F. and Keiding, N. (1999): Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 years. *Am. J. Epidemiol.*, **150**, 301-305.
- Hunter, D. and Russel, D.S. (1954): Focal cerebral and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **17**, 235-241.
- Kinoshita, Y., Ohnishi, A., Kohshi, K. and Yokota, A. (1999): Apparent diffusion coefficient on rat brain and nerves intoxicated with methylmercury. *Environm. Res.*, **80**, 348-354.
- Kitchin, K.T., Schmid, B.P. and Sanyal, M.K. (1981): Teratogenicity of cyclophosphamide in a coupled microsomal activating/embryo culture system. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 59-64.
- Liesegang, R.E. (1911): Die kolloidchemie der histologischen silberfärbungen. In kolloidchemische beihfte (Erganzungshefte zur kolloid-zeitschrift) Ostwald W, ed., Dresden-Leipzig: Verlag von Theodor Steinkopff, 1-44.
- Liesegang, R.E. and Rieder, W. (1921): Versuche mit einer "Keimmethode" zum nachweis von silber in gewebsschnitten. *Z. Wiss. Mikrosk.*, **38**, 334-338.
- Maele-Fabry, G.V., Delhaise, F. and Picard, J.J. (1990): Morphogenesis and quantification of the development of postimplantation mouse embryos. *Toxicol. In vitro*, **4**, 149-156.
- Miura, K., Inokawa, M. and Imura, N. (1984): Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma cells and *in vitro* tubulin polymerization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 218-231.
- New, D.A. (1978): Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **53**, 81-122.
- Orisakwe, O.E., Afonne, O.J., Nwobodo, E., Asomugha, L. and Dioka, C.E. (2001): Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *Eur. J. Obstet.*

- Gynecol. Reprod. Biol.*, **95**, 92-96.
- Pamphlett, R., Ewan, K.B., McQuilty, R. and Waley, P. (1997): Gender differences in the uptake of inorganic mercury by motor neurons. *Neurotoxicol. Teratol.*, **19**, 287-293.
- Roberts, W.J. (1935): A new procedure for detection of gold in animal tissue. *Proc. R. Acad.*, **38**, 540-544.
- Ross, J.F., Switzer, R.C., Poston, M.R. and Lawhorn, G.T. (1996): Distribution of bismuth in the brain after intraperitoneal dosing of bismuth subnitrate in mice; implications for routes of entry of xenobiotic metals into the brain. *Brain Res.*, **725**, 137-154.
- Sadler, T.W. (1980): Effects of maternal diabetes on early embryogenesis: II. Hyperglycemia-induced exencephaly. *Teratology*, **21**, 349-356.
- Stajich, G.V., Lopez, G.P., Harry, S.W. and Sexson, W.R. (2000): Iatrogenic exposure to mercury after hepatitis B vaccination in preterm infants. *J. Pediatr.*, **136**, 679-681.
- Steuerwald, U., Weihe, P., Jorgensen, P.J., Bjerve, K., Brock, J., Heinzow, B., Budtz-Jorgensen, E. and Grandjean, P. (2000): Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurologic function. *J. Pediatr.*, **136**, 599-605.
- Stoltenberg, M. and Danscher, G. (2000): Histochemical differentiation of autometallographically traceable metals (Au, Ag, Hg, Bi, Zn): Protocols for chemical removal of separate autometallographic metal clusters in Epon sections. *Histochemical J.*, **32**, 645-652.
- Vogel, D.G., Margolis, R.L. and Mottet, N.K. (1985): The effects of methylmercury binding to microtubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 473-486.
- Yimm, F. (1962): Histochemische lokalisation und nachweis der schwermwtalle. *Acta Histochem. (suppl.)*, **3**, 142-158.
- Yoshino, Y., Mozai, T. and Nakao, K. (1966): Biochemical changes in the brain in rats poisoned with an alkylmercury compound, with special reference to the inhibition of protein synthesis in brain cortex slices. *J. Neurochem.*, **13**, 1223-1230.
- Zeiger, K. (1938): Physikochemische grundlagen der histologischen methodik. *Wiss. Forschungsber*, **48**, 55-105.