

산개구리 배아를 활용한 화학물질의 기형성 평가에 관한 연구¹

고 선 근²

A Study on the Evaluation of Teratogenicity of Chemical by Korean Brown Frog Embryo, *Rana dybowskii*¹

Sun-Kun Ko²

요 약

최근 화학물질 및 환경오염물질의 독성 시험법으로 Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*(FETAX) 방법이 독성평가에 활용되어지고 있다. 본 연구에서는 FETAX 방법에 따라 한국산 개구리 중 산개구리(*Rana dybowskii*)의 배아를 이용하여 NiCl₂, Carbofuran, Diazinon의 기형성을 조사하였으며 치사율과 기형률은 probit 분석법으로 조사하였다. NiCl₂, Carbofuran, Diazinon에 따른 teratogenic concentration(EC₅₀)은 0.4, 1.6, 1.9mg/l 을 각각 나타내었으며 embryoethal concentrations(LC₅₀)은 17.5, 41.5, 20.2mg/l 을 나타내었다. Teratogenic indices (TI=LC₅₀/EC₅₀)는 NiCl₂의 경우 43.8, Carbofuran의 경우 26.0, Diazinon의 경우 10.6을 나타내었다. NiCl₂, Carbofuran, Diazinon는 산개구리 배아에 대해 강력한 기형성을 나타내었으며 이들의 농도에 의존하여 수포형성, 꼬리, 척추기형 등이 증가하였다. 이상의 결과들로 보아 NiCl₂, Carbofuran, Diazinon 모두 낮은 농도에서 배아의 발생을 억제하여 산개구리 배아의 기형성 시험방법은 화학물질 및 환경오염물질의 독성검정에 요긴하게 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

주요어 : NiCl₂, Carbofuran, Diazinon

ABSTRACT

The Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*(FETAX) protocol was recently adopted as a valuable tool for evaluating chemical toxicity and the effect of environmental contaminants in frogs. In this study, the teratogenicity of NiCl₂, Carbofuran, Diazinon were determined in the Korean frog, *Rana dybowskii* using the FETAX protocol. The mortality rate and the percentage of malformed larvae were investigated by probit analysis. The teratogenic concentrations(EC₅₀) of NiCl₂, Carbofuran and Diazinon were 0.4 and 1.6 and 1.9mg/l . The embryoethal concentrations(LC₅₀) of NiCl₂, Carbofuran and Diazinon were 17.5 and 41.5 and 20.2mg/l . The teratogenic indices (TI=LC₅₀/EC₅₀) were 43.8 for NiCl₂, 26.0 for Carbofuran and 10.6 for Diazinon. NiCl₂, Carbofuran and Diazinon were shown to be potent teratogens for *Rana dybowskii* embryo, caus-

1 접수 6월 25일 Received on Jun. 25, 2004

2 호남대학교 생명과학과 Dept. of Biological Science, Honam Univ., Gwsngui (506-714), Korea(sunkun@honam.ac.kr)

ing concentration related increase of edema, tail and abdomen. The study results reveal that NiCl_2 , Carbofuran and Diazinon suppress the development of embryos at relatively low concentrations. Therefore, the *Rana dybowskii* embryo teratogenesis assay system was proven to be a useful tool to evaluate the toxicity of environmental pollutants.

KEY WORDS : NiCl_2 , CARBOFURAN, DIAZINON

서론

최근 화학물질의 종류와 사용량이 급증하여 화학물질들에 의한 환경오염이 심화되어가고 있다. 이러한 화학물질에 대한 독성평가와 환경오염물질의 독성 및 기형유발에 대한 연구는 개구리의 배아를 활용하는 Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus(FETAX) 방법이 널리 사용되고 있으며(Fort *et al.*, 1988; Bantle *et al.*, 1990; Presutti *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1996) 이러한 FETAX 방법에 따라 다른 여러 나라에서 그 나라에 서식 중인 개구리들의 배아를 활용하려는 연구가 진행되고 있다(Gutleb *et al.*, 1999; Mann and Bidwell, 2000). 그러나 우리나라에서는 아직 국내에서 서식 중인 개구리의 배아를 활용하여 화학물질 및 환경오염물질의 독성을 평가할 수 있는 연구는 거의 진행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 한국산 개구리 중정자형성주기 등의 번식기와 번식기의 난자내 호르몬 변화 양상 및 난자의 성숙현상 등이 알려져 있는 산개구리(*Rana dybowskii*)(Ahn *et al.*, 1993; Ko *et al.*, 1997; Ko and Lee, 1997; Ko *et al.*, 1998) 배아의 정상발생과정을 조사하여 FETAX 방법에 따라 이들 배아를 배양하면서 중금속 및 농약을 처리하여 LC_{50} , EC_{50} 및 Teratogenic Index(TI)를 구하고 기형양상 등을 조사하여 화학물질 및 환경오염물질의 효과를 평가할 수 있는 기법으로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

산개구리(*Rana dybowskii*)는 광주 전남 일대에서 동면 직후인 11월 중순에 암컷(약 30g 이상)과 수컷(약 20g 이상)의 성체를 채집하여 암컷과 수컷을 각각 분리하고 약 5°C가 유지된 냉장실에 가 동면을 유도하면서 필요에 따라 실험에 사용하였다.

2. 배양액 제조

Amphibian Ringer 용액(AR; 6.6g NaCl/l , 0.15g KCl/l , 0.15g CaCl_2/l , 0.2g NaHCO_3/l , 0.05g Streptomycin/ l , 0.03g Penicillin/ l)을 제조하여 pH 7.4로 맞추어 사용하였다.

3. 호르몬 및 시약

암컷의 배란을 유도하기 위한 뇌하수체 추출물은 수컷의 뇌하수체 2개와 암컷의 뇌하수체 2개를 1ml의 AR에 넣어 homogenizer로 균질화시킨 후 사용하였다(Johnson and Volpe, 1973). NiCl_2 은 1000ppm Stock solution(Aldrich Chem.)을 희석하여 사용하였으며 Carbofuran(Sigma Chem.)과 Diazinon(농업과학기술원)은 DMSO에 녹여 Stock solution으로 제조한 후 이를 AR용액으로 희석하여 사용하였다.

4. 배란유도 및 인공수정

뇌하수체 추출물을 암컷에 주사하여 24시간 후에 배란을 유도하였으며 수컷의 정자현탁액은 정소를 터트려 정자들을 배양액 내로 방출시킨 후 정자들의 운동성을 확인한(약 70% 정도) 다음 정자 현탁액을 배란된 난자에 뿌려 수정을 유도하였다.

5. 수정란 채취 및 배양

수정을 유도한 후 3시간 이내에 2세포의 배아들이 출현하기 시작하면(Johnson and Volpe, 1973; Mathews, 1986) 2세포의 배아들 중 세포질들이 균일한 할구들을 가진 배아들을 선택하여 포셋으로 젤리층을 제거하고 포배기 및 낭배기까지 배양하여 실험에 사용하였다.

6. 정상발생과정 조사

유리 배양접시에 배양액을 10ml씩 넣고 25개의 배아를 24시간마다 새로운 배양액으로 교환하면서 배양하여 2세포기에서 올챙이의 꼬리지느러미 순환시기까지 진행되는 정상발생과정과 각 발생단계에 소요되

는 시간을 조사하였다.

7. 시험물질 처리

시험물질이 포함되지 않는 대조군과 시험물질이 농도별로 포함된 실험군으로 나누어 24시간 마다 새로운 용액으로 교환하면서 96시간 배양하였으며 시험물질의 농도 구간은 5개 이상으로 정하여 실시하였고 모든 농도구간에 대해 각기 다른 개체에서 채취한 배아들을 사용하여 3회 이상 반복 실험하였다.

8. 결과처리 및 분석

각 농도별로 사망률을 조사하고 96시간 후 3% Formalin에 고정하였다. 이들 고정된 개체들을 대상으로 기형 개체수 및 양상을 조사하고 그 결과들을 %로 환산하여 Probit analysis Program으로 분석하여 LC_{50} , EC_{50} 을 구하였으며 아울러 Rayburn 등(1990)의 방법에 따라 LC_{50} 값을 EC_{50} 값으로 나누어 Teratogenic Index(TI)를 구하여 TI 값이 1.5 이상이 되면 유해성이 있는 물질로 판정하였다. 기형의 종류는 정상발생 올챙이를 기준으로 올챙이 꼬리가 파상을 나타내는 양상, 꼬리가 휘어지는 양상 등을 관찰하여 꼬리기형으로 판정하였고 복부의 돌출현상 등을 관찰하여 복부기형으로 판정하였다. 또한 몸 전체에 형성된 수포(물집)의 형성을 관찰하여 수포형성기형(Edema)으로 판정하였다.

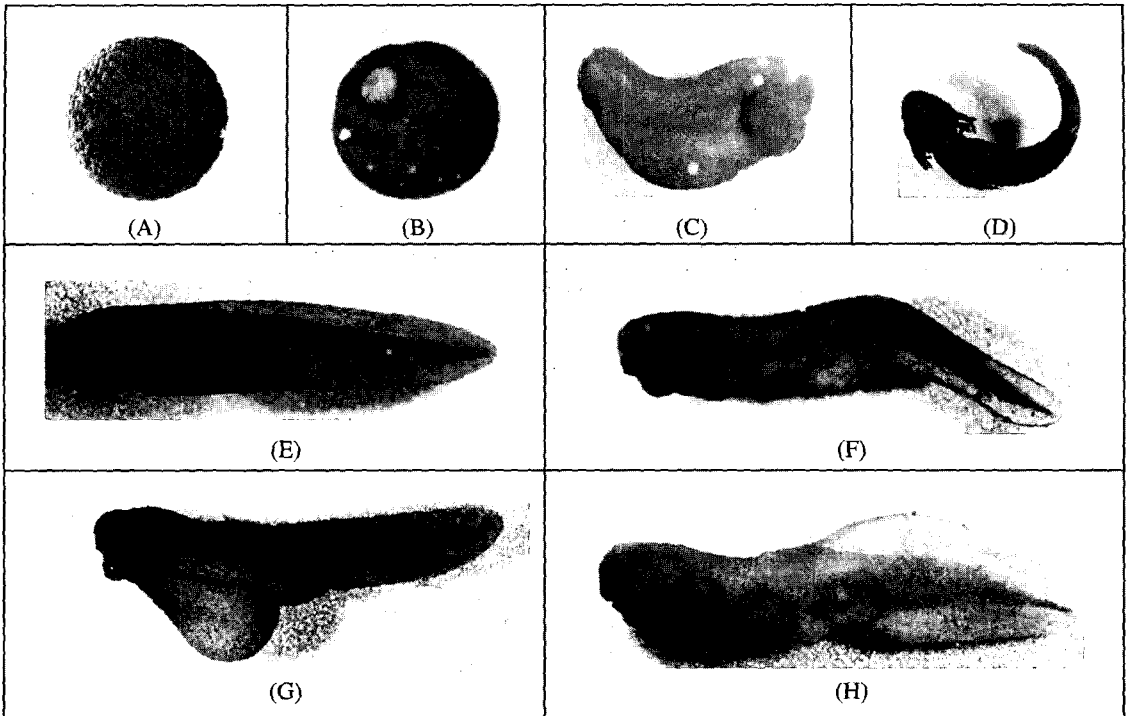
결 과

산개구리 발생과정: 산개구리의 발생과정을 조사하기 위해 인공수정을 유도하여 발생과정을 조사하였다(Figure 1, A-E). 포배기의 배아는 수정 후 대략 24시간 이내에 출현하였으며 그 직경은 2.1~2.3mm 정도였다. 이들 배아는 초기 낭배기부터 점차적으로 커가기 시작하여 낭배기(gastrulation)에는 대략 2.3~2.5mm 정도를 나타냈다. 이후 신경관, 신경습, 신경구 등을 형성하는 기관형성(organogenesis) 단계에서는 그 크기가 증가되어 약 2.6~2.8mm 정도였으며 수정이후 신경관이 완성되는 시기까지는 대략 72시간 정도를 필요로 했다. 올챙이의 기본형태를 갖추어 나타나기 시작한 꼬리 눈 형성시기에서부터는 배아의 크기가 급격하게 증가하여 그 전장이 5.1~6.5mm 정도를 나타냈다. 현미경 시야에서 올챙이의 운동성을 관찰해 볼 수 있는 근육반응 시기에는 배아의 전장이 5.5~7.5mm 정도였으며 수정 후 대략 94시간 정도에서 나타나기 시작하였

다. 또한, 올챙이의 걸아가미가 나타난 시기에서는 그 전장이 대략 6.0~8.5mm 정도였으며 118시간 정도가 소요되었다. 올챙이가 헤엄치며 이동하는 시기인 꼬리지느러미 순환기에는 그 전장이 8.5~9.5mm 정도로 자랐으며 이때까지 필요한 시간은 대략 130시간 정도였다.

$NiCl_2$ 의 영향: $NiCl_2$ 의 영향을 알아보기 위해 산개구리의 초기 낭배 배아들을 $NiCl_2$ 이 첨가되지 않는 대조군과 $NiCl_2$ 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 100.0(mg/l)를 각각 처리하여 96시간 배양 후 배아들에게 나타난 치사율, 기형률, 기형의 종류 등을 조사하였다. 0.1(mg/l)에서부터 죽는 배아들이 나타나기 시작하였으며 5, 10, 20(mg/l)으로 농도가 높아지면서 비율도 증가하였다. 기형은 0.05(mg/l)에서부터 나타나기 시작하였으며 기형률도 5, 10, 20(mg/l)으로 농도가 높아지면서 그 비율이 증가하였다(Figure 2). 산개구리의 배아에 대한 $NiCl_2$ 의 LC_{50} 은 17.5를 나타내었고 EC_{50} 은 0.4를 나타내었으며 TI는 43.8을 나타내었다(Table 1). $NiCl_2$ 의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 수포형성, 꼬리기형, 복부기형 등을 나타내었으며 꼬리기형(Figure 1, F)의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다. 이들의 비율을 농도별로 살펴보면 LC_{50} 을 나타내는 농도보다 낮은 5(mg/l)과 LC_{50} 을 나타내는 비슷한 농도인 10(mg/l)에서는 수포를 형성하는 기형과 꼬리기형의 비율이 높았으며 20(mg/l)으로 농도가 높아지는 경우에는 복부기형의 비율이 5, 10(mg/l)의 농도에서 보다 높은 비율로 나타났다.

Carbofuran의 영향: Carbofuran의 영향을 알아보기 위해 산개구리의 초기낭배 배아들을 Carbofuran이 첨가되지 않는 대조군과 Carbofuran 0.01, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 50.0, 60.0, 100.0(mg/l)을 각각 처리하여 96시간 배양 후 배아들에게 나타난 치사율, 기형률, 기형의 종류 등을 조사하였다. 1.0(mg/l)에서부터 죽는 배아들이 7%의 비율로 나타나기 시작하였으며 5, 10, 50(mg/l)으로 농도가 높아지면서 이들의 비율도 증가하였다(Figure 3). 기형은 0.01(mg/l)에서부터 5%의 배아들에서 나타나기 시작하였으며 기형률도 5, 10, 20(mg/l)으로 농도가 높아지면서 비율이 증가하였다. 산개구리의 배아에 대한 Carbofuran의 LC_{50} 은 41.5를 나타내었고 EC_{50} 은 1.6를 나타내었으며 TI는 26.0를 나타내었다(Table 1). Carbofuran의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 대개가 꼬리기형, 복부기형 등을 나타내었으며 복부기형(Figure 1, G)의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다. 이들의 비율을 농도별로 살펴보면 LC_{50} 을 나타내는 농도보다 낮은 5(mg/l)의 농도에서는 꼬리기형과 복부기형의 비율이 거의



- (A) *Rana dybowskii* embryo of mid-blastulla stage approximately 21 hours after fertilization.
 (B) *Rana dybowskii* embryo of late-gastrula stage approximately 42 hours after fertilization.
 (C) *Rana dybowskii* embryo of tail bud stage approximately 86 hours after fertilization.
 (D) *Rana dybowskii* embryo of gill circulation stage approximately 118 hours after fertilization.
 (E) *Rana dybowskii* embryo of tail fin circulation stage approximately 130 hours after fertilization.
 (F) *Rana dybowskii* embryo after 96 hours exposure to 10.0mg/l NiCl_2 displaying flexure of the tail.
 (G) *Rana dybowskii* embryo after 96 hours exposure to 10.0mg/l Carbofuran displaying abdominal abnormality.
 (H) *Rana dybowskii* embryo after 96 hours exposure to 10.0mg/l Diazinon displaying severe Edema.

Figure 1. Various stage embryo of development(A-E) and morphology of *Rana dybowskii* exposure to NiCl_2 (F), Carbofuran(G), Diazinon(H)

비슷하게 나타났으나 10(mg/l) 농도와 LC_{50} 을 나타내는 근처의 농도인 50(mg/l)으로 농도가 높아지면서 꼬리기형의 비율보다 복부기형의 비율이 높게 나타났으며 수포형성의 기형은 그 비율이 매우 낮게 나타났다.

Diazinon의 영향: Diazinon의 효과를 알아보기 위해 산개구리의 초기낭배 배아들을 Diazinon이 첨가되지 않는 대조군과 Diazinon 0.01, 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 50.0, 60.0(mg/l)을 각각 처리하여 96시간 배양 후 배아들에게 나타난 치사율, 기형률, 기형의 종류 등을 조사하였다. 0.1(mg/l)에서부터 죽는 배아들이 6%의 비율로 나타나기 시작하였으며 5, 10, 50(mg/l)으로 농도가 높아지면서 비율도 증가하였다. 기형은

0.01(mg/l)에서부터 7%의 배아들에서 나타나기 시작하였으며 기형률도 5, 10, 50(mg/l)으로 농도가 높아지면서 비율이 증가하였다(Figure 4). 산개구리의 배아에 대한 Diazinon의 LC_{50} 은 20.2를 나타내었고 EC_{50} 은 1.9를 나타내었으며 TI는 10.6을 나타내었다(Table 1). Diazinon의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 수포형성기형, 꼬리기형, 복부기형 등을 나타내었으며 수포형성 기형(Figure 1, H)의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다. 이들의 비율을 농도별로 살펴보면 LC_{50} 을 나타내는 농도보다 낮은 5(mg/l)의 농도에서는 수포형성기형 비율이 매우 높게 나타났으나 10(mg/l) 농도에서는 수포형성기형, 꼬리기형, 복부기형의 비율

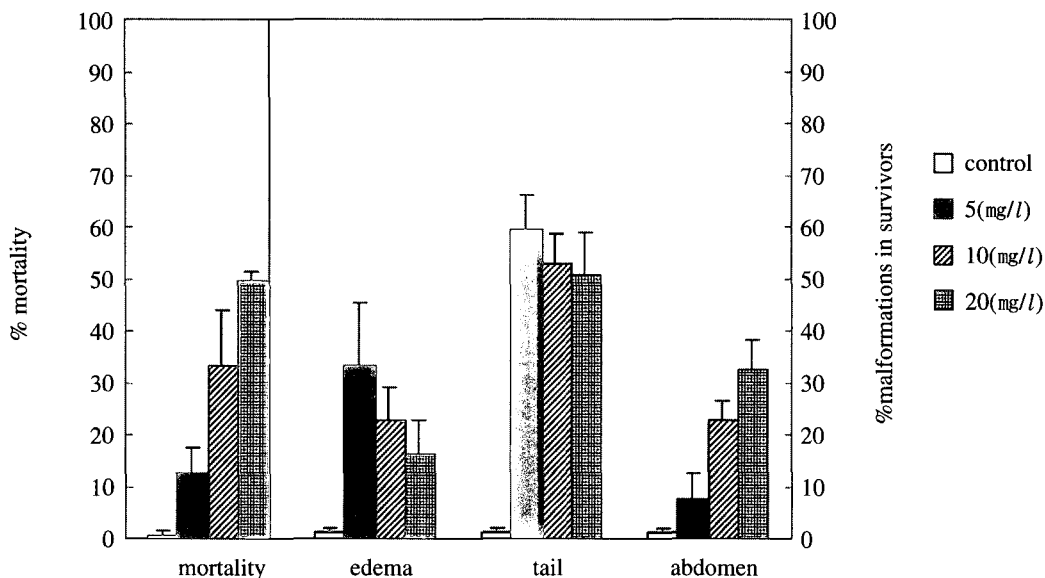


Figure 2. Mortality and percentage of malformation in survivors of *Rana dybowskii* embryo after 96 hours exposure to NiCl₂

이 거의 비슷하게 나타났다. 그러나 LC₅₀을 나타내는 농도보다 높은 농도인 50(mg/l)으로 농도가 높아지면 서 수포형성기형이나 꼬리기형의 비율보다 복부기형의 비율이 높게 나타났다.

고찰

본 실험의 결과로부터 산개구리의 뇌하수체 주입에 의한 배란 유도과 인공수정에 의한 배아의 채취법을

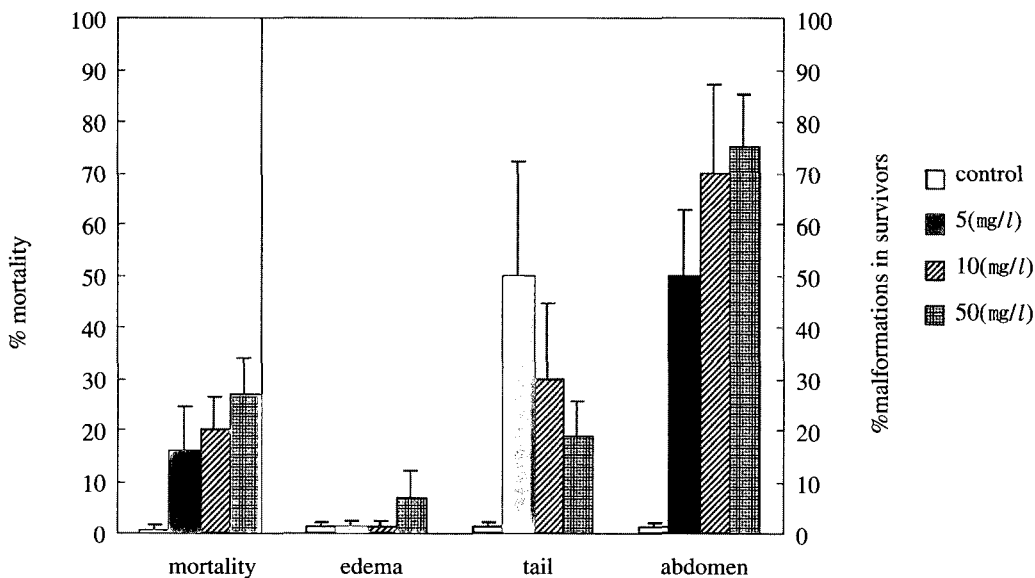


Figure 3. Mortality and percentage of malformation in survivors of *Rana dybowskii* embryo after 96 hours exposure to Carbofuran

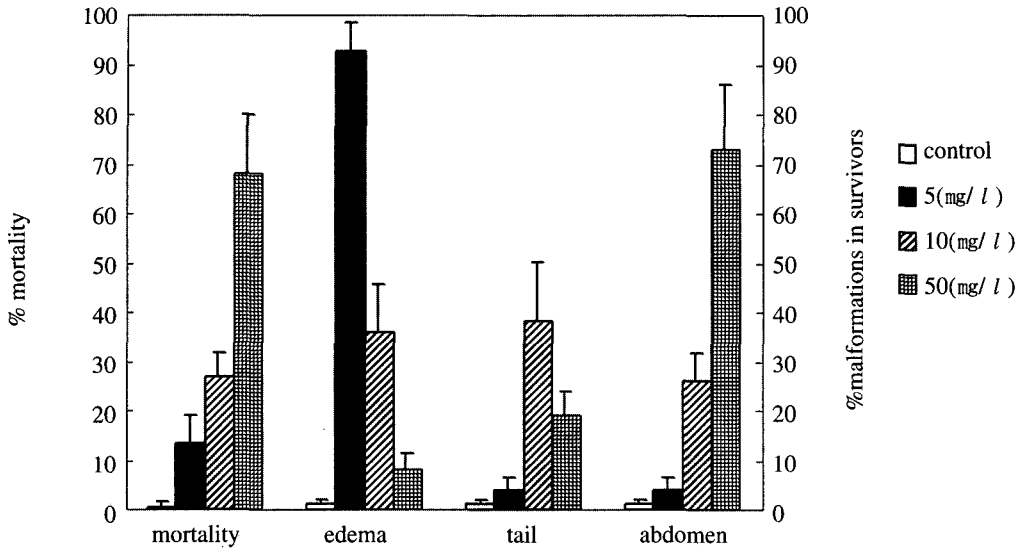


Figure 4. Mortality and percentage of malformation in survivors of *Rana dybowskii* embryo after 96 hours exposure to Diazinon

확립할 수 있었고 배아의 배양을 통하여 발생과정을 확인할 수 있었다(Figure 4). 산개구리 발생의 전반적인 과정은 *Xenopus laevis*(Deuchar, 1972)와 거의 유사한 경향을 나타내었다.

NiCl₂의 시험을 통하여 0.1(mg/l)에서부터 죽는 배아들이 나타나며 0.05(mg/l)에서부터는 일부의 배아들에서 기형 배아들이 출현하여 LC₅₀은 17.5를 나타내었고 EC₅₀은 0.4를 나타내었으며 TI는 43.8를 나타내었다. 또한 Carbofuran의 경우 1.0(mg/l)에서부터 죽는 배아들이 나타나며 기형은 0.01(mg/l)에서부터 나타나기 시작하여 LC₅₀은 41.5를 나타내었고 EC₅₀은 1.6를 나타내었으며 TI는 26.0를 나타내었다. 한편 Diazinon은 0.1(mg/l)에서 죽는 배아들이 나타나며 기형은 0.01(mg/l)에서 나타나기 시작하여 LC₅₀은 20.2를 나타내었고 EC₅₀은 1.9를 나타내었으며 TI는 10.6을 나타내어 본 시험에 사용했던 시험물질 모두가 산

개구리 배아의 발생과정에 민감하게 반응하여 배아들을 치사시키거나(Figure 2, 3, 4) 낮은 농도에서도 발생을 저해하여 기형을 유발시킨다는 사실을 알 수 있었다(Figure 1). 이러한 산개구리의 배아는 발생과정에서 화학물질에 노출되어지면 매우 민감하게 반응한다는 사실을 알았으며 짧은 시간의 배양을 통하여 이들의 독성효과를 판정할 수 있는 좋은 재료가 된다는 사실을 알았다. 이러한 사실들로 보아 본 시험에 사용했던 시험물질들은 모두가 산개구리의 발생에 심각한 영향을 미칠 수 있는 강력한 최기형성 물질임을 확인할 수 있었다(Table 1). 또한 본 시험을 통하여 나타난 기형양상들은 *Xenopus laevis*에서 흔히 나타나는 양상(Bantle et al., 1991)과 거의 일치하였으나 산개구리 올챙이의 복부는 투명한 *Xenopus laevis*의 올챙이와는 달리 색소들이 존재하여 복강내부의 기형양상은 관찰할 수 없었다.

Table 1. LC₅₀, EC₅₀(malformation) and TI of *Rana dybowskii* embryos exposed to heavy metal and pesticides

	Exposure time(hr)	LC ₅₀ (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l)	TI (LC ₅₀ /EC ₅₀)
Heavy Metal				
NiCl ₂	96	17.5	0.4	43.8
Pesticides				
Carbofuran	96	41.5	1.6	26.0
Diazinon	96	20.2	1.9	10.6

개구리의 배아는 포유동물에 비해 배아의 채취가 용이하고 다량으로 얻을 수 있고 배양이 비교적 간편한 장점이 있으며, 수계생태계와 육상생태계를 연결하는 생태적 특성을 고려하여 최근에 각 나라에 서식하고 있는 개구리들의 발생계를 활용하여 화학물질 및 환경오염물질들의 독성과 작용기작을 파악하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다(Gutleb *et al.*, 1999; Mann and Bidwell, 2000). 본 실험의 결과들로 보아 한국산개구리 중 산개구리의 발생계는 화학물질 및 환경오염물질들의 독성 등을 파악하는 데 좋은 모델로 사용되어 질 수 있으나 계절적 번식을 하는 산개구리의 번식주기를 고려한다면 번식이 가능한 시기에만 활용할 수 있는 단점이 존재한다. 그러나 이러한 문제는 서로 번식주기가 다른 참개구리(*Rana nigromaculata*), 움개구리(*Rana rugosa*), 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 등의 번식주기를 조사하여 활용한다면 한국산개구리 배아의 발생계는 화학물질 및 환경오염물질의 독성검정에 요긴하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

인 용 문 헌

- Ahn, R.S., S.K. Ko, D.G. Bai, Y.D. Yoon and H.B. Kwon (1993) Steroidogenesis shift by cultured ovarian follicles of *Rana dybowskii* at breeding season. *J. Exp. Zool* 267: 275-282.
- Bantle, J.A., J.N. Dumont, R.A. Finch and G. Linder (1991) Atlas of Abnormalities: a Guide the Performance of FETAX. Oklahoma State Publications Department.
- Bantle, J.A., D.J. Fort, J.R. Rayburn, D.J. Deyoung and S.J. Bush(1990) Further validation of FETAX: evaluation of the developmental toxicity of five known mammalian teratogens and non-teratogens. *Drug. Chem. Toxicol* 13: 267-282.
- Deucher, E.M.(1972) "Xenopus laevis and Developmental Biology" *Biological Reviews*, 47, pp. 37-112.
- Fort, D.J., D.A. Dawson and J.A. Bantle(1988) Development of ametabolic activation system for the frog embryo teratogenesis assay Xenopus (FETAX). *Teratog. Carcinog. Mutagen* 8: 251-264.
- Gutleb, A.C., J. Appelman, M.C. Bronkhorst, J.H.J. Van den Berg, A. Spenkelink, A. Brouwer, A.J. Murk(1999). Delayed effects of pre-and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species(*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 8: 1-14.
- Johnson, R.E. and E.P. Volpe(1973) Patterns and Experiments in developmental biology. In: Observation and experiments on the living frog embryo. W.M. C. Brown Co, 7-9, pp. 215-227.
- Ko, S.K. and D.P. Lee(1997) Effect of heavy metal ions on the Oocyte maturation of frog, *Rana dybowskii* *in vitro*. *Kor. J. Env. Eco* 11(3): 310-315.
- Ko, S.K., H.M. Kang, W.B. Im and H.B. Kwon(1998) Testicular cycles in three species of korean frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa*, *Rana dybowskii*. *Gen. and Comp. Endocrinol*, 111, pp. 347-358.
- Ko, S.K., H.M. Kan, J.W. Kim and H.B. Kwon(1997) Testicular cycles in the korean frogs: Annual spermatogenic patterns, seasonal changes in the steroidogenic competence, and responsiveness to gonadotropins *in vitro*. *Korean J Biol Sc*: 99-105.
- Mann Reinier, M., R. Bidwell Joseph(2000) Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. *Aquatic Toxicology* 51: 19-29.
- Mathew, W.W.(1986) Atlas of descriptive embryology. Forth Ed. pp. 54. Macmillan Pub. Co. New York.
- Morgan, M.K., P.R. Scheuerman, C.S. Bishop, R.A. Pyles(1996) Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX. *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 151-168.
- Presutti, C., C. Vismara, M. Camatini, G. Bernardini(1994) Ecotoxicological Effects of a Nonionic Detergent(Triton DF-16) Assayed by ModFETAX 53: 405-411.
- Rayburn, J.R., D.J. Fort, R. McNew and J.A. Bantle. (1990) Synergism and antagonism induced by three carrier solvents with retinoic acid and 6-aminonicotinamide using FETAX. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 46: 625-632.