

培養細胞を用いた化学物質の毒性評価— 2

—数種類の魚類培養細胞に対する金属類の毒性
及び毒性に及ぼす曝露温度の影響—

森 真朗 若林 明子

要 旨

現在、世界中で10万種類を越える化学物質が商品化されている。それらの一部は水環境中にも流出し、水生生物に潜在的な脅威を及ぼしている。膨大な数にのぼる化学物質の水生生物に対する毒性を評価するためには、簡便、迅速、安価かつ再現性の高い評価方法を開発する必要がある。

魚類培養細胞は、化学物質の毒性スクリーニングに、魚類バイオアッセイの代わりとして利用しうる可能性がある。本研究では、ブラウンプルヘッド由来線維芽性細胞のBB細胞、マスノスケ由来上皮性細胞のCHSE-214細胞、コイ由来上皮性細胞のEPC細胞、ファットヘッドミノール由来上皮性細胞のFHM細胞、ニジマス由来線維芽性細胞のRTG-2細胞を4種類の金属類(カドミウム、亜鉛、銅、ニッケル)に曝露した。細胞に対する毒性は、ニュートラルレッド取り込み阻害によって評価した。また、化学物質の毒性に及ぼす曝露温度の影響を評価するため、CHSE-214細胞とFHM細胞の増殖適温域をニュートラルレッドを用いた吸光度法により調べた。さらに、10、15、20、25、30℃の温度でCHSE-214細胞をカドミウムに曝露した。

4種類の金属類の細胞毒性度は、5種類の細胞いずれに対しても同じ順番で、カドミウム>亜鉛>銅>ニッケルであった。CHSE-214細胞の増殖適温は20-25℃、FHM細胞の増殖適温は30℃以上であった。このように、魚類培養細胞の増殖適温は細胞の由来する魚類の生息水温を反映していた。10、15、20、25、30℃で曝露したCHSE-214細胞に対するカドミウムのNR₅₀値は、それぞれ、0.08、0.07、0.05、0.03、0.01mMであった。曝露温度が高いほどカドミウムに対する魚類培養細胞の感受性が高まるということは、生体を用いて行われた多くの研究結果と一致するものであった。

キーワード：魚類、培養細胞、細胞毒性、ニュートラルレッド、金属、温度

Cells in Culture for the Evaluation of the Toxicity of Chemicals— 2 —Cytotoxicity of Metals toward Cultured Fish Cells and Effect of Exposure Temperature on Cytotoxicity—

Masaaki Mori and Meiko Wakabayashi

Summary

An estimated chemicals of over 100,000 are already in commerce in the world. Some of those chemicals enter into aquatic environments and pose a potential threat to the aquatic biota. For the assessment of the toxicity of those vast numbers of chemicals to the aquatic biota, simple, rapid, reproducible

and inexpensive assays have to be developed.

Cultured fish cells are of potential use in the screening of toxicity of chemicals instead of fish bioassays. In this study, BB cells, a fibroblast-like cell line derived from brown bullhead, CHSE-214 cells, an epithelial cell line derived from chinook salmon, EPC cells, an epithelial cell line derived from carp, FHM cells, an epithelial cell line derived from fathead minnow and RTG-2 cells, a fibroblast-like cell line derived from rainbow trout were exposed to four metals (cadmium, zinc, copper, nickel). Cytotoxicity was assessed by the neutral red uptake inhibition test. In addition, to evaluate influence of exposure temperature on the toxicity of chemicals, optimum growth temperature for CHSE-214 and FHM cell lines was measured by the absorbance method using neutral red, and CHSE-214 cells exposed to cadmium at 10, 15, 20, 25, 30 °C.

The rank order of cytotoxicity of four metals toward five cell lines was the same in the order of cadmium > zinc > copper > nickel. Optimum growth temperatures ranged from 20 to 25°C for CHSE-214 cells and more than 30°C for FHM cells. These optimum growth temperature for fish cell lines reflected the surrounding water temperature for the fish from which the cell line was derived. For the CHSE-214 cells exposed to cadmium at 10, 15, 20, 25, 30°C, the NR_{50} (midpoint toxicity in the NR assay) was 0.08, 0.07, 0.05, 0.03, 0.01mM, respectively. The greater sensitivity of cultured fish cells to cadmium at the higher temperature of exposure was consistent with that obtained in the *in vivo* study.

Keywords: fish, cell culture, cytotoxicity, Neutral Red, metal, temperature

1 はじめに

魚類培養細胞を用いた、魚類急性毒性試験に代わる化学物質の *in vitro* 毒性試験は、Rachlin and Perlmutter¹⁾によりファットヘッドミノール由来FHM細胞を用いて初めて実施されて以来、現在に至るまで、ヨーロッパ、アメリカ、日本で研究が行われてきている。しかし、これまでに、*in vitro* 毒性試験に用いられた魚類培養細胞の種類数は、現時点までに樹立されている魚類培養細胞の種類数34科74魚種から159株²⁾という数字に比べればほんの僅かにすぎない。また、化学物質に対する魚類培養細胞間の感受性の比較を行った研究も、Babich等³⁾、Segner and Lenz⁴⁾、Segner等⁵⁾などがあるだけで、非常に少ない。

実際の水域では、水質汚濁化学物質の魚類に対する曝露は低水温から高水温まで、広い温度範囲で起こっている。水質汚濁化学物質の魚類に対する毒性は、曝露温度により変化することが知られており、魚類急性毒性試験の代替法としての *in vitro* 毒性試験においても、温度影響は当然考慮されなければならない。魚類培養細胞は、哺乳類培養細胞と異なり、増殖可能温度域が広い⁶⁾。したがって、*in vitro* 毒性試験における温度影響を調べるのに非常に適した細胞系と考えられる。しかし、魚類培

養細胞を用いて水質汚濁化学物質の毒性に及ぼす温度影響を調べた例はこれまでほとんどない。

著者らは、前報⁷⁾において、冷水性魚類のマスノスケ由来CHSE-214細胞に対するカドミウム及び銅の毒性を、エンドポイントとしてニュートラルレッド法を用いて検討し、魚類培養細胞を用いた *in vitro* 毒性試験の有用性について考察した。

本研究では、第一に数種類の異なる魚種由来の魚類培養細胞に対する金属類の毒性を調べ、培養細胞間でこれらの金属類に対する感受性に違いがあるかどうか検討した。第二に魚類培養細胞の増殖適温域をマイクロプレート及びニュートラルレッド色素を用いた吸光度法で求める簡便な方法について検討した。第三に魚類培養細胞を用いてカドミウムの毒性に及ぼす曝露温度の影響を調べ、温度影響の研究に対する魚類培養細胞の有用性について考察した。

2 方法

(1) 数種類の魚類培養細胞に対する金属類の毒性

ア 魚類培養細胞

以下の5種類の魚類培養細胞を供試した。

BB細胞：ブラウンプルヘッド (*Ictalurus nebulosus*)

から樹立された線維芽性の株化細胞。

CHSE-214細胞：マスノスケ(*Oncorhynchus tshawytscha*)から樹立された上皮性の株化細胞。

EPC細胞：コイ(*Cyprinus carpio*)の上皮腫瘍組織から樹立された株化細胞。

FHM細胞：ファットヘッドミノー(*Pimephales promela*)から樹立された上皮性の株化細胞。

RTG-2細胞：ニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)から樹立された線維芽性の株化細胞。

これらの細胞のうち、前報⁷⁾に記載しなかったEPC細胞の形態を写真1に示した。

これらの供試細胞は、牛胎児血清(GIBCO BRL)を10%加えたイーグルMEM培地(日水製薬)(以下、MEM-10と言う。)を用いて、20℃、閉鎖系で維持した。

細胞継代は、0.1%トリプシン(GIBCO BRL)、0.02%EDTA(同仁化学)を含むPBS[-](日水製薬)(以下、細胞分散剤と言う。)を用いて、常法で行った。

イ 供試金属類

カドミウム($\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$)、亜鉛($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、銅($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、ニッケル(NiCl_2) (いずれも和光純薬)を用いた。

ウ ニュートラルレッド法による毒性評価

(ア) 試薬

a MEM(-) 牛胎児血清を含まないイーグルMEM培地。

b MEM-5 牛胎児血清を5%加えたイーグルMEM培地。

c ニュートラルレッド(NR)溶液 ニュートラルレッド(和光純薬)をMEM-5で希釈し140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液を作製する。マグネチックスターラーで充分攪拌したのち、1夜20℃に静置する。翌日、2,500rpmで10分間遠沈し、上清を0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過して用いる。

d 細胞固定液 1% CaCl_2 を含む1%ホルマリン液。

e NR抽出液 1%酢酸を含む50%エタノール液。

(イ) 操作手順

a 96穴マイクロプレートへの細胞の播種 培養フラスコ(IWAKI)を用い、20℃、閉鎖系で培養し、コンフルエントの状態に達する直前の供試細胞を細胞分散剤で

処理し、MEM-10で所定の細胞数の細胞浮遊液を調製した。96穴マイクロプレート(FALCON)の各ウェルに細胞浮遊液の100 μl ずつを植え込み、プレートシーラー(三光純薬)でプレート上部をきつくシーリングし、20℃で24時間培養した。各ウェル当たりの播種細胞数は、BB細胞、CHSE-214細胞、EPC細胞、FHM細胞では3~5 $\times 10^4$ 個/ウェル、RTG-2細胞では2 $\times 10^4$ 個/ウェルとした。

b 検体作製 供試金属類を超純水で溶解し、MEM(-)で所定濃度に希釈したのち、0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過滅菌した。

c 検体処理 細胞が植え込まれたプレートの培養液を捨て、各濃度段階の検体溶液を100 μl ずつ各ウェルに加え、シーリングし、さらに20℃で24時間培養した。測定に用いるウェルは96ウェルのうち外周のウェル列を除く60ウェルとし、原則として1濃度段階につき5ウェルを用いた。

d ニュートラルレッド処理と吸光度の測定 各ウェル内の検体溶液を捨て、NR溶液を100 μl ずつ、MEM-5のみを加えた5つのブランクウェル以外のすべてのウェルに加え、20℃で3時間、生細胞にニュートラルレッド色素を取り込ませた。その後、プレート上のNR溶液を捨て、すべてのウェルに固定液を200 μl に加え、1分間、固定した。固定液を捨て、すべてのウェルに色素抽出液を100 μl に加え、シーリングし、室温で20分間、生細胞に取り込まれたニュートラルレッド色素を抽出した。その後、マイクロプレートミキサーで約1分間ミキシングし、マイクロプレートリーダー(MPR-A4 iII、東ソ-)を用いて540 nmの波長で各ウェルの吸光度を測定した。

e 測定結果の処理 各金属類の細胞毒性度は、処理濃度・細胞生存率関係図を基に、未処理群における色素の取り込み量に対する処理群における色素の取り込み量の比が50%になる金属類の濃度(NR₅₀値)で示した。

(2) 吸光度法による魚類培養細胞の増殖適温域の検討

ア 供試細胞

冷水性魚類由来のCHSE-214細胞と温水性魚類由来のFHM細胞を用いた。

イ 培養液

MEM-10を用いた。

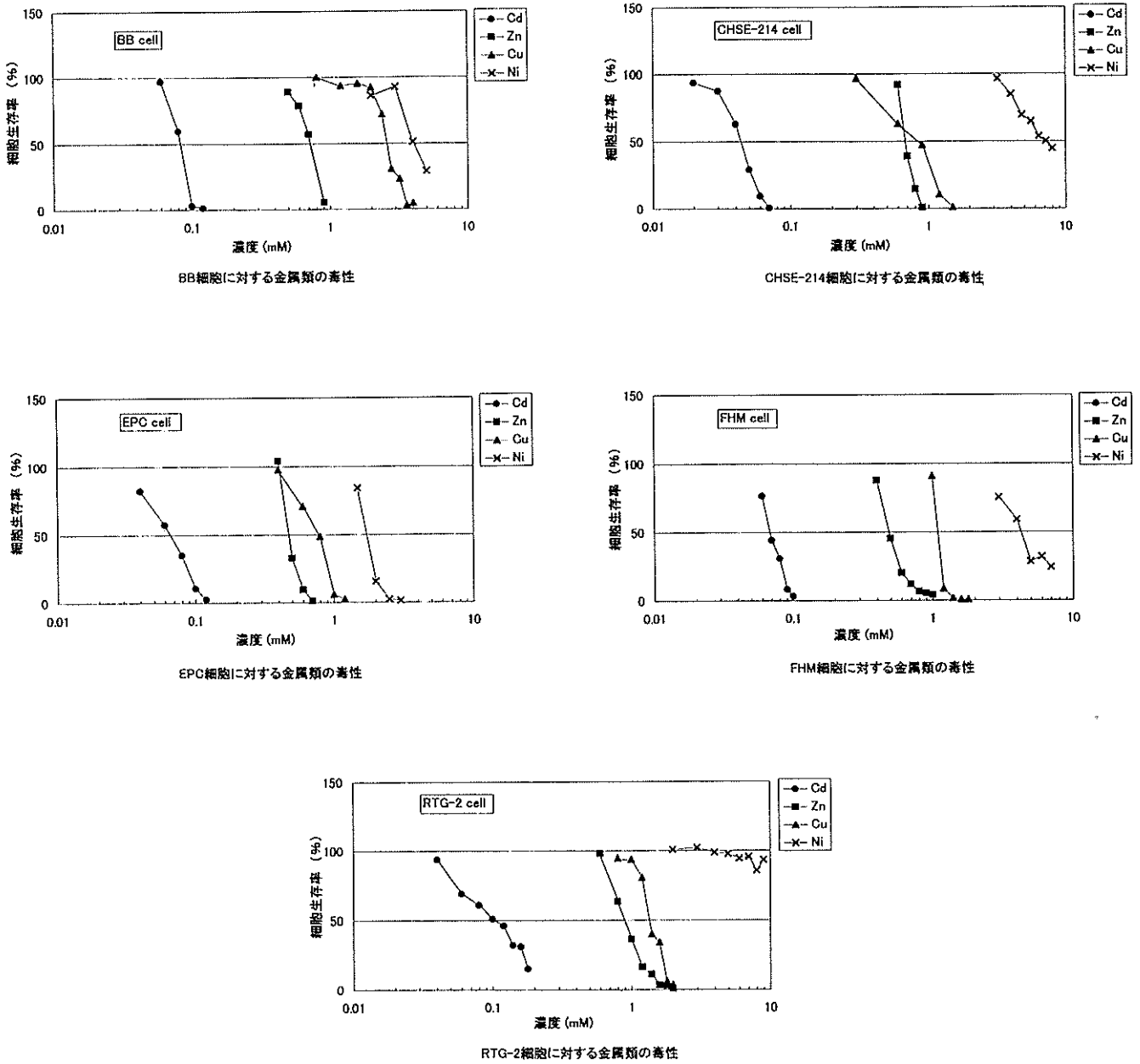
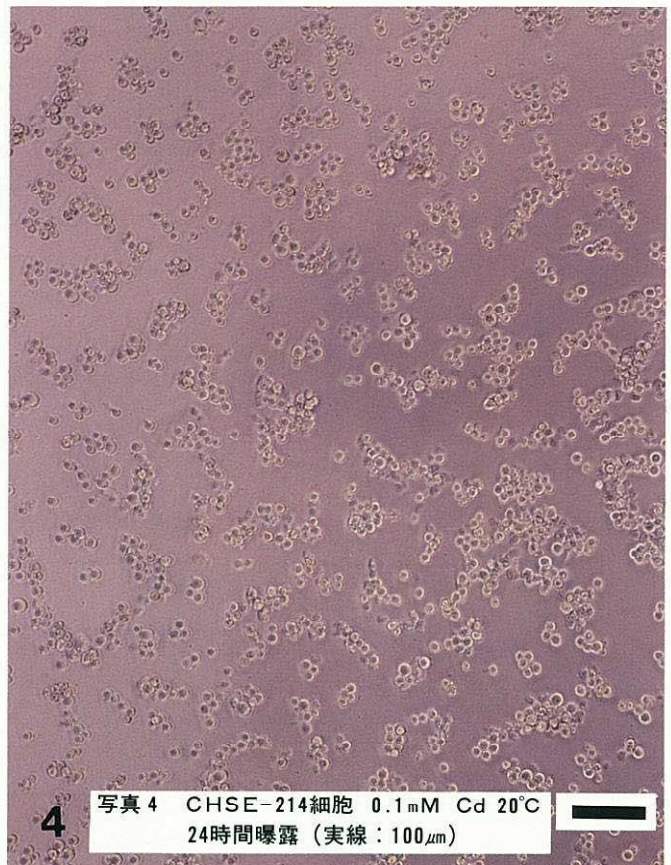
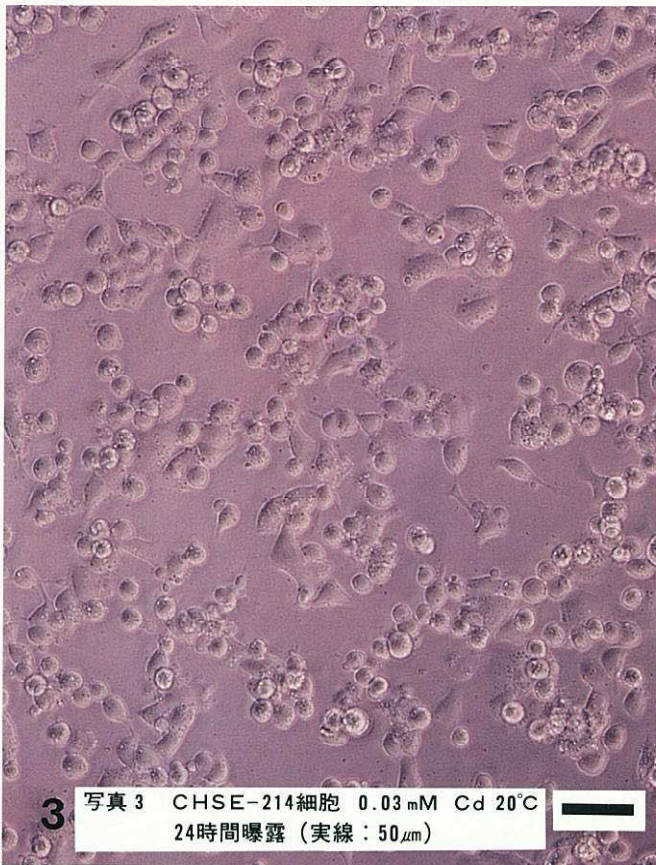
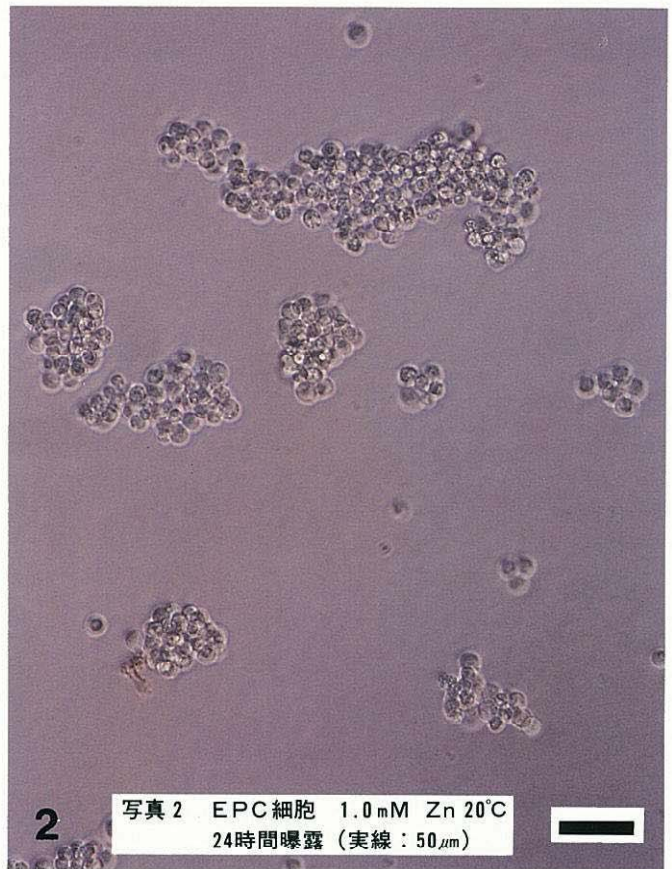
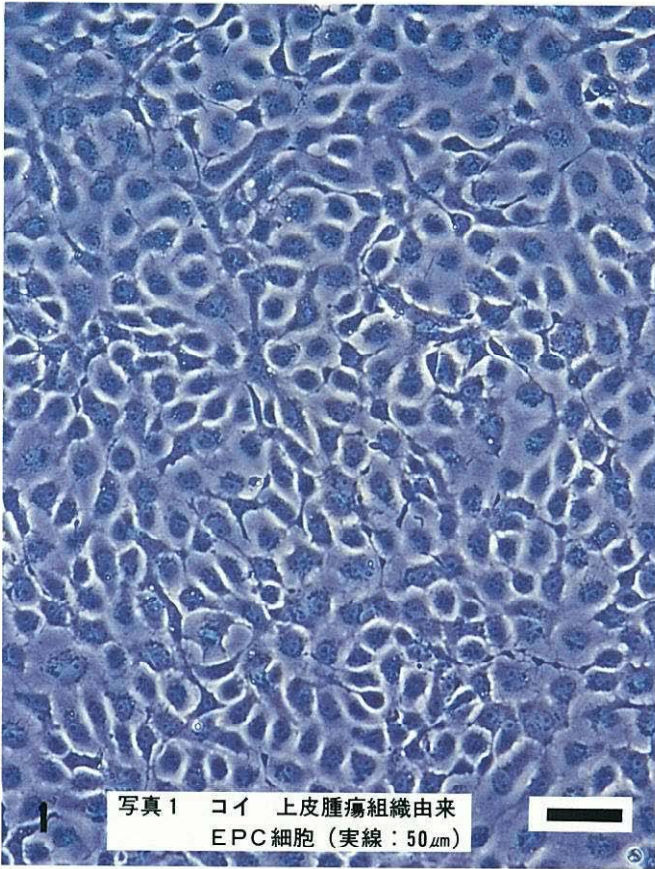


図1 数種類の魚類培養細胞に対する金属類の毒性

表1 数種類の魚類培養細胞に対する金属類の毒性

細胞名	由来魚種	金属類			
		Cd	Zn	Cu	Ni
BB	ブラウンブルヘッド	0.08	0.74	2.5	4
CHSE-214	マスノスケ	0.04	0.65	0.8	7.2
EPC	コイ	0.06	0.47	0.78	1.7
FHM	ファットヘッドミノー	0.06	0.48	1	4.2
RTG-2	ニジマス	0.1	0.89	1.3	> 10

(NR50 ; mM)



ウ 試験

20℃で培養した元培養の細胞を、細胞分散剤及び培養液で常法にしたがって分散し、 1×10^4 細胞を含む100 μ ℓの細胞浮遊液を96穴マイクロプレートの各ウェルに播種した。マイクロプレートはプレートシーラーでシーリングした。温度勾配恒温器で10、15、20、25、30℃の温度区を設定し、各温度区に細胞を播種したマイクロプレートを1枚ずつ静置した。各温度で96時間、細胞培養後、(1)と同様の方法でニュートラルレッド色素を生細胞に取り込ませ、固定、抽出後、吸光度を測定した。

(3) CHSE-214細胞に対するカドミウムの毒性に及ぼす曝露温度の影響

ア 供試細胞

CHSE-214細胞を用いた。

イ 供試金属

カドミウム($\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$)を用いた。

ウ 培養液

MEM-10を用いた。

エ 試験

20℃で培養した元培養のCHSE-214細胞を常法にし

たがって分散し、 3×10^4 細胞を含む100 μ ℓの細胞浮遊液を96穴マイクロプレートの各ウェルに播種した。20℃で24時間培養後、各ウェルの培養液を捨て、超純水で溶解しMEM(-)で所定濃度に階段希釈したカドミウム溶液を100 μ ℓずつ各ウェルに加えた。細胞の播種、カドミウム溶液への置換は室温で行った。温度勾配恒温器を用いて、10、15、20、25、30℃の温度区を設定し、所定の濃度のカドミウム溶液に置換したマイクロプレートを各温度区に1枚ずつ静置した。各温度で24時間、細胞をカドミウムに曝露したのち、カドミウム溶液を捨て、ニュートラルレッド法で色素を生細胞に取り込ませ、固定、抽出後、吸光度を測定し、各温度区におけるNR₅₀値を算出した。

3 結果及び考察

(1) 数種類の魚類培養細胞に対する金属類の毒性

1.0mMの亜鉛に20℃で24時間曝露したEPC細胞の倒立顕微鏡位相差観察像を写真2に、0.03mM及び0.1mMのカドミウムに20℃で24時間曝露したCHSE-214細胞の観察像を写真3及び写真4に示した。いずれも、細胞の球形化、培養器底からの剥離が認められる。このような細胞形態の変化は各細胞種に共通で、曝露濃度に比例して著しくなり、高濃度曝露ではすべての細胞が球形化し、培養器底から剥離脱落してしまった。

BB細胞、CHSE-214細胞、EPC細胞、FHM細胞、RTG-2細胞に対するカドミウム、亜鉛、銅、ニッケルの毒性影響を処理濃度・細胞生存率関係図として一括して図1に示した。また、それぞれのNR₅₀値を一括して表1に示した。

本研究で用いた5種類の魚類培養細胞に対する4種類の金属類の毒性影響は、NR₅₀値で見ると、いずれの細胞に対してもカドミウム> 亜鉛> 銅> ニッケルの順であった。

Babich等³⁾は、BF-2細胞(ブルーギルサンフィッシュ由来)及びRTG-2細胞に対するカドミウム($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)、亜鉛(ZnCl_2)、銅(CuCl_2)、ニッケル($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)の影響をニュートラルレッド法のNR₅₀をエンドポイントとして、26℃、24時間曝露の条件で検討し、どちらの細胞に対しても、毒性影響はカドミウム> 亜鉛> 銅> ニッケルの順であったと報告している。また、George⁸⁾が、TF細胞(ヒラメ由来)

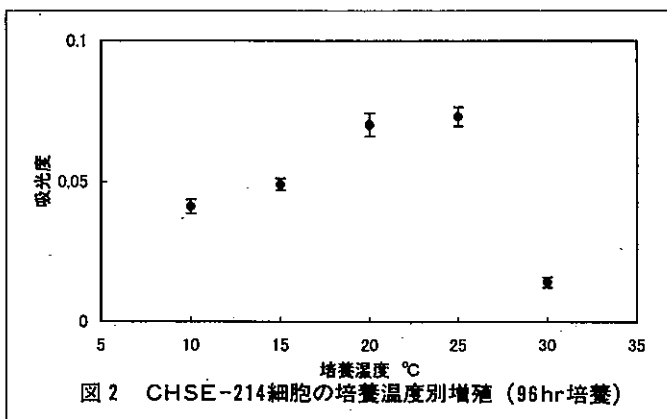


図2 CHSE-214細胞の培養温度別増殖 (96hr培養)

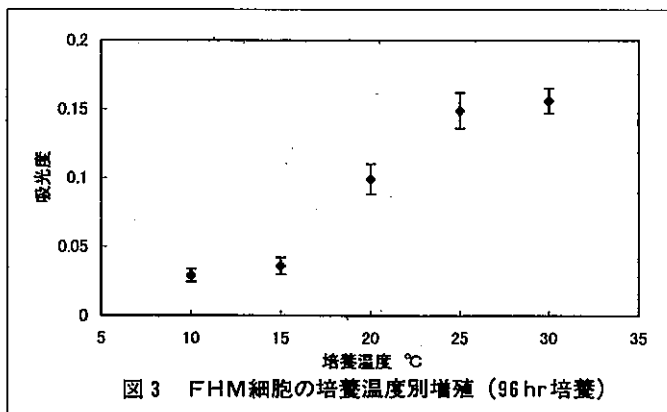


図3 FHM細胞の培養温度別増殖 (96hr培養)

及びBF-2細胞を用いて、Segner等⁹⁾が、R1細胞(ニジマス由来)を用いて検討した結果でも、毒性影響はカドミウム> 亜鉛> 銅> ニッケルの順であった。

このように、曝露温度、曝露時間、供試細胞(BB細胞、CHSE-214細胞、EPC細胞、FHM細胞、RTG-2細胞、BF-2細胞、TF細胞、R1細胞)は異なるが、カドミウム、亜鉛、銅、ニッケルの魚類培養細胞に対する毒性影響はカドミウム> 亜鉛> 銅> ニッケルの順で同じであった。ここでは金属類の毒性影響だけを見たが、Segner and Lenz⁴⁾は種々の有害化学物質の魚類培養細胞に対する影響をR1細胞を用いて検討し、同時に既報のBF-2細胞、FHM細胞、GFS細胞に対する毒性データと比較し、これら4種類の細胞に対する有害化学物質の毒性傾向は同じであることを明らかにしている。

本研究においては、5種類の魚類培養細胞(BB細胞、CHSE-214細胞、EPC細胞、FHM細胞、RTG-2細胞)をin vitro毒性試験に供試したが、これらのうち、BB細胞及びEPC細胞はこうした試験に初めて用いられたものである。また、5種類の魚類培養細胞を同時に化学物質のin vitro毒性試験に供試し、感受性等を比較検討した研究はこれまでにない。

現在までに、in vitro毒性試験に用いられた魚類培養細胞は、ファットヘッドミノール由来FHM細胞¹⁾、ニジマス由来RTG-2細胞⁹⁾、ブルーギルサンフィッシュ由来BF-2細胞⁹⁾、スチールヘッドトラウト由来STE細胞⁹⁾、キンギョ由来CAR細胞¹⁰⁾、キンギョ由来ABIII細胞¹¹⁾、ニジマス由来R1細胞¹²⁾、キンギョ由来GFS細胞¹³⁾、マスノスケ由来CHSE-214細胞¹⁴⁾等にすぎず、その種類数はこれまでに樹立された魚類培養細胞の種類数34科74魚種から159株²⁾という数字に比べればほんの僅かである。159株の培養細胞のなかには、ある種の化学物質に対しては感受性が非常に高いという細胞もあるかもしれない。こうした点については、さらに多くの種類の魚類培養細胞を用いたin vitro毒性試験を実施していく必要がある。

(2) 吸光度法による魚類培養細胞の増殖適温域の検討

CHSE-214細胞及びFHM細胞を10~30℃の各温度区で96時間培養し、ニュートラルレッド法で吸光度を測定した結果を図2及び図3に示した。ニュートラルレッド法は、生体染色色素ニュートラルレッドが生細胞に取り

込まれ、リソゾームに蓄積されるという原理を利用したもので、最終的なニュートラルレッド抽出量(波長540nmにおける吸光度)と生細胞数の間には高い相関関係がある¹⁵⁾。細胞播種後、10~30℃の各温度で96時間培養後のニュートラルレッドの取り込み量は、CHSE-214細胞では20及び25℃区で高く、FHM細胞では25及び30℃区で高かった。CHSE-214細胞の30℃区、FHM細胞の10及び15℃区では、ニュートラルレッドの取り込み量は非常に低かった。

Fernandez等¹⁶⁾は、淡水魚類から樹立した7種類の培養細胞の増殖適温域をクリスタルバイオレット染色による吸光度法で検討し、魚類培養細胞の増殖適温域は、細胞の由来する魚類の自然環境における生息適温を反映していることを明らかにしている。本研究においても、CHSE-214細胞の増殖適温域は20~25℃、FHM細胞の増殖適温域は30℃以上であると考えられ、培養細胞の増殖適温域は由来魚種の生息適温をある程度反映していると考えられた。

(3) CHSE-214細胞に対するカドミウムの毒性に及ぼす曝露温度の影響

CHSE-214細胞に対するカドミウムの曝露温度別の毒性を処理濃度・細胞生存率関係図として図4に示した。

CHSE-214細胞の増殖適温域は20~25℃であることが分かったが、NR₅₀値は曝露温度が高いほど小さくなる傾向が認められた。

同様の傾向は、Babich and Borenfreund¹⁷⁾が、BF-2細胞及びFHM細胞に対する有機金属Diethyltin dichlorideと殺虫剤4,4'-DDTの毒性を26℃及び34℃の曝露温度で比較した研究においても認められている。

水生生物の毒性試験において、水温は重要な環境要因である。しかし、水生生物を用い、温度条件を変えて毒性試験を実施することは施設的にも経費的にも多大の困難を伴う。本研究及びBabich and Borenfreund¹⁷⁾の研究結果から、in vitro毒性試験でも曝露温度の上昇に伴い化学物質の毒性が強まるという傾向が認められた。したがって、魚類培養細胞を用いたin vitro毒性試験は水質汚濁物質の毒性に及ぼす温度影響の研究に有用な試験方法の一つと考えられる。

細胞レベルにおいて、曝露温度上昇に伴うカドミウムの毒性影響増強は、細胞膜の膜透過性の亢進ということ

で説明できるものかもしれない。培養可能温度域の広い魚類培養細胞は、そうした細胞レベルの研究においても、好適な研究材料と考えられる。

培養細胞を用いたin vitro毒性試験は、実際に起こりうる曝露温度条件で実施するのがベターである。東京都内河川の水温の年平均値の範囲は平成7年度で11.5~19.2℃である(水質常時測定データ年平均値・経年変化表)。一般に哺乳類由来細胞は37℃付近で種々の試験が行われる。曝露温度が上昇すると毒性が強まるカドミウムの例のように、温度条件を考えた場合は、哺乳類由来細胞よりも、低温で試験可能な魚類培養細胞がin vitro毒性試験に適していると思われる。なかでも、東京の河川水を想定した場合は、多くが20℃またはそれ以下に培養適温域を有する冷水性魚類由来細胞が供試細胞として適していると考えられる。

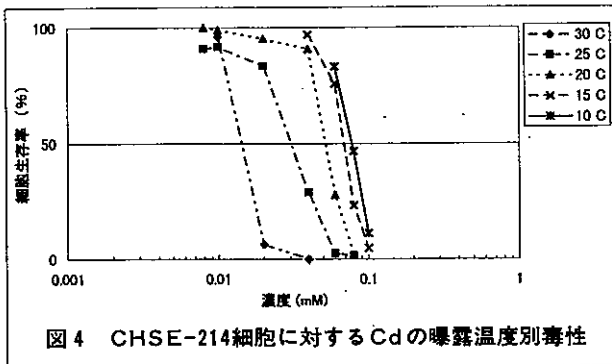


図4 CHSE-214細胞に対するCdの曝露温度別毒性

4 おわりに

本研究では、一部の金属類の毒性影響を対象にしたが、水質汚濁化学物質は金属類以外にも多種多様に存在する。今後は、金属類以外の化学物質についても同様のin vitro毒性試験を実施し、in vivo試験の結果と比較検討し、相関関係を明らかにすることにより、魚類培養細胞を用いたin vitro毒性試験方法を魚類急性毒性試験の代替試験方法として確立していく必要がある。

謝辞

本研究に用いたBB、CHSE-214、EPC、FHM、RTG-2細胞は、東京水産大学 福田穎穂教授のご好意により分与賜ったものである。記して深謝の意を表す。

引用文献

- 1) Rachlin J.W. and A. Perlmutter: Fish cells in culture for study of aquatic toxicants, *Water Research*, 2, p.409-414(1968).
- 2) Fryer J.L. and C.N. Lannan: Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes, *Journal of Tissue Culture Methods*, 16, p.87-94(1994).
- 3) Babich H., et al.: In vitro cytotoxicity testing of aquatic pollutants (cadmium, copper, zinc, nickel) using established fish cell lines, *Ecotoxicol. and Environ. Safe.*, 11, p.91-99(1986).
- 4) Segner H. and D. Lenz: Cytotoxicity assays with the rainbow trout R₁ cell line, *Toxic. in Vitro*, 7(4), p.537-540(1993).
- 5) Segner H., et al.: Cytotoxicity of metals toward rainbow trout R1 cell line, *Environ. Toxic. Water Quality*, 9, p.273-279(1994).
- 6) 齊藤穂高, 茂岡忠義: 魚類細胞による化学物質の魚毒性予測手法について, 第1回エコトキシコロジー研究会、バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集、B-10(1995).
- 7) 森 真朗, 若林明子: 培養細胞を用いた化学物質の毒性評価-1 カドミウム及び銅のマスノスケ由来CHSE-214細胞に対する毒性, 東京都環境科学研究所年報 1996、p.72-79(1996).
- 8) George S.G.: In vitro toxicology of aquatic pollutants: use of cultured fish cells, *Toxicology of aquatic pollution.*, Edited by Taylor E.W. (1996).
- 9) Kokan R.M., et al.: In vitro toxicity of eight mutagens/carcinogens for three fish cell lines, *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 23, p.269-274 (1979).
- 10) Shea T.B. and E.S. Berry: Uptake and toxicity of toxaphene to cell cultures derived from goldfish (*Carassius auratus*), *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29, p.68-75(1982).
- 11) Shea T.B. and E.S. Berry: Toxicity and intracellular localization of carbaryl and 1-naph-

- thol in cell cultures derived from goldfish, *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **30**, p.99-104(1983).
- 12) Hadler M. and W.Ahne: Evaluation of waste water toxicity with three cytotoxicity tests, *Z Wasser-Abwasser-Forsch.*, **23**, p.233-236(1990).
- 13) Saito H., *et al.*: In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF - Scale(GFS) cells, *Chemosphere*, **23**(4), p.525-537(1991).
- 14) Castano A., *et al.*: Acute toxicity of selected metals and phenols on RTG -2 and CHSE -214 fish cell lines, *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **55**, p.222-229(1995).
- 15) Borenfreund E. and J.A.Puerner: Toxicity determined in vitro by morphological alternations and neutral red absorption, *Toxicology Letters*, **24**, p.119-124(1985).
- 16) Fernandez R.D., *et al.*: Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish, *Journal of Aquatic Animal Health*, **5**, p.137-147(1993).
- 17) Babich H. and E.Borenfreund: Fathead minnow FHM cells for use in in vitro cytotoxicity assays of aquatic pollutants, *Ecotoxicol. and Safe.*, **14**, p.78-87(1987).