

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 배양 간세포에서 Vitellogenin 합성에 미치는 Cu 및 Zn의 억제효과

呂寅圭 · 棚橋亞紀子* · 麥谷泰雄*

부경대학교 양식학과, *북해도대학 증식학과

Inhibitory Effects of Cu and Zn on Vitellogenin Production in Hepatocytes Culture of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

In-Kyu Yeo, Akiko Tanahashi* and Yasuo Mugiya*

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Lab. of Comparative Physiology, Hokkaido University, 3-1-1 Minato, Hakodate 041-8611, Japan

Effects of Cu and Zn on estradiol-17 β -induced vitellogenin (VTG) production were electrophoretically examined in hepatocyte cultures of rainbow trout. Hepatocytes were precultured for 2 days and then Cu (10^{-5} ~ 10^{-4} M) and Zn (10^{-5} ~ 10^{-3} M) were added to the incubation medium with estradiol-17 β (2×10^{-6} M). The hepatocytes were cultured for 5 more days. The relative VTG production rate was expressed as the percentage of VTG to total proteins including the VTG. The addition of Cu and Zn to the incubation medium had no appreciable toxin effect on the viability of hepatocytes in the culture. However, Cu markedly reduced VTG production at any concentration used. Zn also specifically reduced VTG production by hepatocytes in a concentration dependent way and there was a significant reduction at Zn concentrations of 10^{-3} M. The reduction recovered by removing Zn from the media, but Cu did not. Additionally, enriched Ca concentrations (1.8 to 2.5 or 5.0 mM) in the incubation medium had no protective effect on the reduction of VTG production by Cu 10^{-4} M. These results suggest that the production of VTG is more susceptible to Cu and Zn than are other hepatocyte-derived proteins.

Key words : Vitellogenin, Cu, Zn, Hepatocyte culture, Rainbow trout

서 론

최근, 산업발달에 따른 산성비가 세계적인 규모로 문제시되고 있다. 이 문제는 산림자원에만 영향을 미치는 것이 아니라, 하천, 호수 등의 수생생물에 있어서도 심각한 문제로 대두되고 있다. 비의 산성도가 강해져 호수의 pH가 5정도로 저하되면, 플랑크톤 등 미소생물의 사망률이 높아짐에 따라 어류 등 수생생물의 생리에도 큰 영향을

미치게 된다. Lee and Gerking (1980)은 담수성의 desert pupfish (*Cyprinodon n. nevadensis*)를 pH7~5의 산성 환경수에서 사육하면 대조군 (pH8.3)에 비해 난황발달의 억제가 유발된다고 보고하였다.

또한, 산성비는 육상의 Cu 및 Zn 등의 금속이온을 가용화하여 수중의 유해 금속이온 농도를 상승시킴으로서 유해작용을 유발시킨다. Hickie et al. (1993)은, 산성비의 피해를 받고 있는, 캐나다

남부의 온타리오호와 같은 수질환경을 인위적으로 만들어, 무지개송어 치어사육 실험을 하였다. 그 결과, 수중의 Cu 및 Zn이 무지개송어 치어에 있어 치명적인 독성을 가진다고 보고하였다.

Cu 및 Zn이 어류의 생리에 미치는 영향은 pH의 저하로 인해 그 독성효과가 더욱 커지는 것으로 보고되고 있다 (Hutchinson and Sprague, 1989). Cu 및 Zn은 생체내에 흡수되어 혈장 중의 알부민 또는 아미노산과 결합하여 그 대부분이 간장으로 운반된다 (遠山, 1994; 小山, 1994). 그러므로, 산성수 중에서는 Cu 및 Zn이 생체내, 특히 간장의 생리기구에 영향을 미칠 가능성이 클 것으로 여겨진다. 어류의 간장은 성 성숙기에 난황 전구체인 Vitellogenin (VTG)을 합성시키는 중요한 역할을 하는 기관으로 알려져 있으므로 (Hara et al., 1993; Kwon et al., 1993), 어류 생식 활동에 장애를 유발하는 것으로 알려진 금속이온과의 관련성을 밝히는 것은 수산학에 있어서 중요한 과제라고 여겨진다.

또한, 최근, Mugiya and Tanahashi (1998)는 무지개송어의 간세포배양에 의한 VTG 합성시, 유해 금속이온 중의 하나로 알려진 Al이 농도의존적으로 VTG 합성을 억제시킨다고 보고하였다. 그러나, 현재까지 Al 이외의 금속이온이 VTG 합성에 미치는 영향에 대한 직접적인 보고는 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는, 무지개송어의 배양 간세포를 이용하여, 유해 금속이온인 Cu 및 Zn이 VTG 합성에 미치는 영향에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)는 북해도 대학 수산학부내 옥외 사육수조에서 사육한, 체중 150~250 g인 것을 사용하였다. 무지개송어는 실험 3일전에 먹이 급여를 중지하여 간장을 휴식시킨 후 사용하였다.

1. 간세포의 분리 및 배양

간세포는 Kwon et al. (1993)에 의해 수정된

Hayashi and Ooshiro (1986)의 방법에 따라 분리하였다. 간세포는 Collagenase (0.5 mg/ml; Wako Pure Chemicals) 및 소 혈청 알부민 (0.98mg/ml; Sigma)을 포함한 관류용 buffer에 의해 분리시켰다.

분리된 간세포는 positive-charge (Falcon)를 행한 플라스틱 배양접시에 3×10^6 개를 넣어 배양하였다. 배양에는 0.2 μ M Bovine insulin (Sigma), Streptomycin (100 μ g/ml), Penicillin (70 μ g/ml) 및 NaHCO₃ (23 mM)을 첨가한 William's medium (Ca 1.8 mM; Life Technol. Inc.)을 이용하였다. 간세포 배양은 배양액 3 ml를 첨가하여 15°C, 5% CO₂ 조건하에서 행하였다. 사전 배양은 2일간 행하였고, 배양액은 매일 교환하였다.

2. 배양세포의 생존율 배양

세포는 2일간 사전 배양을 행한 후, E₂ 및 금속이온 (Cu 및 Zn)을 동시에 첨가하여 5일간 배양한 후, 0.03% EDTA를 포함한 인산 Buffer (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.09 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄)를 첨가하여 진동시켜 배양접시로부터 분리시켰다. 핵 염색은 0.05% Crystal violet가 포함된 0.1 M Citric acid로 2시간동안 행하였으며, 핵의 수는 Thomas 혈구 계산판을 이용하여 계수하였다. 배양세포의 생존율은 E₂ 및 금속이온을 첨가한 후 5일째에 조사하여, 대조군 (E₂첨가군)의 생존 세포 수에 대한 퍼센트로 나타내었다.

3. 호르몬 및 금속이온의 첨가

간세포는 2일간 사전 배양을 한 후, 95% 에탄올로 용해한 Estradiol-17 β (E₂, 2×10^{-6} M; Sigma), Cu (CuSO₄; Wako Pure Chemicals) 및 Zn (ZnSO₄·7H₂O; Wako Pure Chemicals)을 첨가하여 실험을 행하였다. Cu는 10^{-5} M~ 10^{-4} M의 농도를, Zn은 10^{-5} M~ 10^{-3} M의 농도를 각각 이용하였다. VTG 합성에 미치는 Cu 및 Zn의 영향은 2일간의 사전 배양 후, E₂와

동시에 Cu 또는 Zn을 첨가하여 5일째 배양액의 총 단백질에 대한 VTG의 비율을 산출하여 조사하였다. 첨가한 용매의 양은 배양액 3 ml 당 0.3 µl가 되도록 조절하였다.

그리고, Cu 및 Zn의 VTG 합성에 미치는 효과를 보다 상세히 조사하기 위하여, Cu 및 Zn을 첨가한 후 다시 제거함에 따른 VTG 합성의 변화에 대해서도 실험하였다. 먼저, 2일간의 사전 배양 후, E₂ 와 Cu (10⁻⁵ M~10⁻⁴ M) 또는 Zn (10⁻³ M)을 첨가하여 4일간 배양을 행하였다. 그 후, Cu 및 Zn을 제거한 후, 6일간 배양을 계속 하여, 총 단백질에 대한 VTG의 비율을 조사하였다.

또한, 일반적으로, 어류에 미치는 Cu의 독성작용은 Ca이 완화시키는 것으로 알려져 있기 때문에 (Sayer et al., 1989), 본 연구에서는 VTG 합성에 미치는 Cu의 효과에 대한 Ca의 영향에 대해서도 실험을 행하였다. 2일간의 사전배양 후 E₂, Cu (10⁻⁴M) 및 Ca (1.8 mM, 2.5 mM 및 5.0 mM)을 첨가하여 5일째 배양액의 총 단백질에 대한 VTG의 비율을 산출하여, Ca의 영향에 대하여 조사하였다.

4. SDS-PAGE 및 VTG 합성량의 분석

분리 배양된 간세포의 배양액을 회수하여 원심 분리 (3000 rpm, 20 min.)를 행한 후, 10%의 Trichloacetic acid에 의해 단백질을 침전시켜 Sample buffer (0.175 M Tris-HCl, 8 M urea, 1% SDS, 0.5% Mercaptoethanol, pH 7.4)로 용해시켰다. 단백질은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE로 분리하여, Coomassie brilliant blue R-250으로 30분간 염색하였다. VTG의 판별은 Kwon et al. (1993)에 의해 분리된 무지개송어 VTG (분자량 175kDa)의 결과를 따랐다.

VTG의 밴드 (175kDa)는 Bio Image (Millipore)를 이용하여 총 단백질에 대한 VTG의 Integrated optical density (IOD)치를 퍼센트로 나타내었다.

5. 통계분석

실험결과를 One-way ANOVA-test를 실시하여 Fisher's PLSD-test를 행하였다. 통계적 유의성은 P<0.05로 판단하였다.

결 과

1. 배양 간세포의 생존율에 미치는 금속이온의 영향

Cu 및 Zn의 첨가 후 5일째의 배양 간세포 생존율을 Table 1에 나타내었다. Cu를 첨가한 경우, 배양 간세포의 생존율은 E₂첨가군의 92.3~95.4%를 나타내었다. Zn의 첨가로도 그 생존율은 86~134%로 일정한 수치는 아니었으나, 유의한 차이는 없었다. 이러한 결과로, 본 연구에 사용한 Cu 및 Zn의 모든 농도는 배양 간세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

Table 1. Effects of Cu or Zn on the survival rate of hepatocytes on Day 5 after metal addition in cultures with E₂(2×10⁻⁶ M)

Cu concentration(M)	Survival rete(%)*
0	100±5.7
10 ⁻⁵	93.2±5.1
5×10 ⁻⁵	95.4±4.3
10 ⁻⁴	92.3±4.1
Zn concentration(M)	Survival rete(%)*
0	100±5.7
10 ⁻⁵	94.2±6.4
5×10 ⁻⁵	111.1±9.3
10 ⁻⁴	86.9±6.1
10 ⁻³	134.4±8.0

*Percentage of the number of living cells on Day 5 after metal addition to the numble of living cells on Day 5 after E₂ only addition.

2. VTG 합성에 미치는 금속이온의 영향

E₂첨가에 의한 총 단백질에 대한 VTG 합성률은 6.2%로 나타났으며, Fig. 1은 E₂ 첨가군에 대한 각 농도의 Cu 및 Zn 첨가군의 VTG 합성률 퍼센트로 나타내었다. Cu 10⁻⁴ M의 첨가시에는 E₂ 첨가군의 약 55%로, 5×10⁻⁵ M의 첨가 시

에는 56%로 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다 ($P < 0.05$). 특히, $\text{Cu } 10^{-5} \text{ M}$ 의 첨가 시에서는 약 68%로 가장 큰 감소율을 보였다 ($P < 0.01$). 이러한 결과로, Cu 는 간세포에서 합성되는 단백질 중에서 VTG 합성을 특이적으로 억제하는 것으로 판단된다. Zn 의 첨가에 있어서는, 10^{-5} M 에서 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 까지의 저농도에 있어서는 E_2 첨가군과 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 10^{-4} M 의 첨가로 약 19%의 감소를 나타내었다. 그리고, $\text{Zn } 10^{-3} \text{ M}$ 의 농도에서는 약 54%의 유의한 감소율을 나타내어($P < 0.05$), VTG 합성은 Zn 의 농도의 존적으로 감소하는 경향을 보였다.

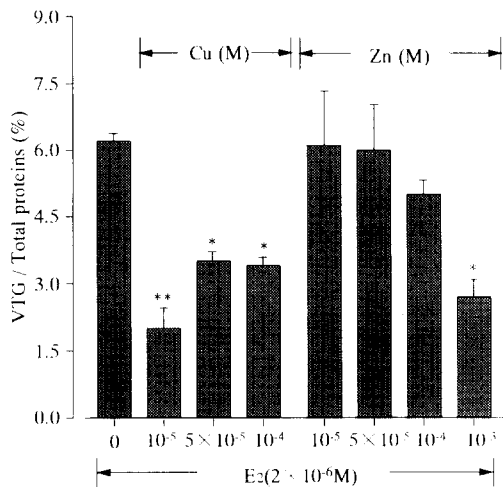


Fig. 1. Effects of Cu or Zn on VTG production in hepatocyte cultures with E_2 ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) in rainbow trout. The activity of VTG production was estimated for the relative optical density of VTG to total proteins after SDS-PAGE on day 5 after metal addition. Vertical bars represent the average (mean \pm SE) percentage of four experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ for control (E_2 only).

3. 금속이온 제거에 따른 VTG 합성억제의 회복

본 연구에서는, Cu ($10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ M}$) 및 Zn (10^{-3} M)의 첨가에 있어서 VTG 합성의 억제 효과를 확인 할 수 있었다. 이에 따라, 이러한 억제 효과를 나타내는 금속이온의 제거에 따라 VTG

합성이 회복되는지의 여부를 조사하였다.

실험에는 E_2 및 억제 효과를 나타낸 각 농도의 금속이온을 첨가하여 4일간 배양한 후, 금속이온만을 제거하여 6일간 배양한 후의 배양액내 총 단백질에 대한 VTG의 비율을 산출하여 VTG의 회복정도를 조사하였다.

먼저, Cu ($10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ M}$)의 제거에 따른 VTG 합성 회복정도를 Fig. 2에 나타내었다. 4일간의 E_2 첨가시, 총 단백질에 대한 VTG의 비율은 약 6%를 나타내었고, 그 비율은 6일 후까지 지속되었다. E_2 와 Cu 동시 첨가시의 VTG 비율은 E_2 첨가군의 약 50%의 수치를 나타내어, 유의하게 억제되었다. 이러한 억제효과는 Cu 의 첨가를 중지하여, E_2 만을 계속 6일간 첨가하여도, VTG 비율의 증가는 나타나지 않았다.

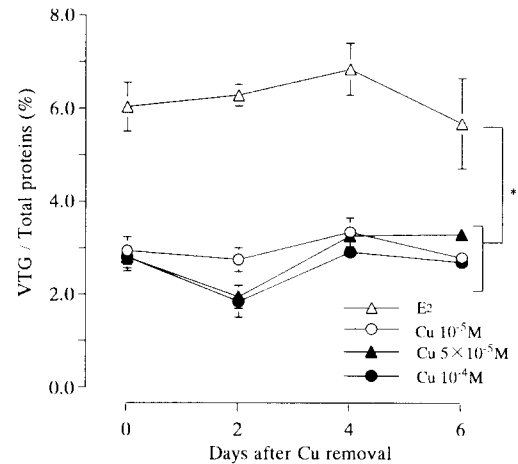


Fig. 2. Effects of Cu removal on VTG production by Cu -primed hepatocytes in cultures with E_2 in rainbow trout. Hepatocytes were cultured with E_2 ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) and Cu for 4 days and then Cu only was removed. Vertical bars represent the average (mean \pm SE) percentage of five experiments. * $P < 0.01$ for respective controls.

이에 반해, Zn (10^{-3} M)의 제거에 있어서는 VTG 합성은 회복되는 경향을 나타내었다 (Fig. 3). E_2 와 Zn 의 동시 첨가로, VTG 비율은 E_2

첨가군의 약 20%의 수치였으나, Zn 첨가 증지로 급격히 증가하여 4일 후에는 E₂만의 첨가군과 거의 같은 수치를 나타내었다. 이러한 결과로, Zn에 의해 억제된 VTG 합성은 Zn을 제거함에 따라 급격히 증가하여 회복되는 것을 알 수 있었다.

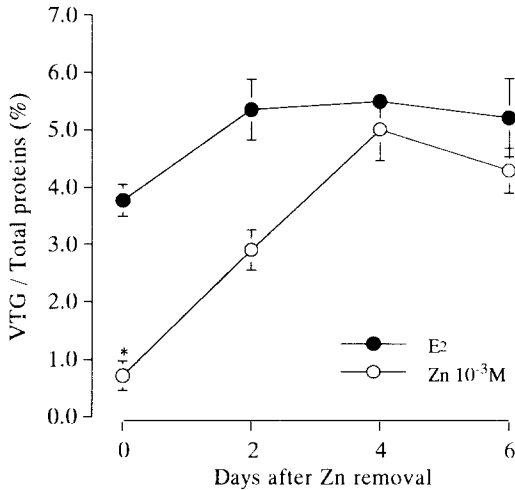


Fig. 3. Effects of Zn removal on VTG production by Zn-primed hepatocytes in cultures with E₂ in rainbow trout. Hepatocytes were cultured with E₂ (2 × 10⁻⁶ M) and Zn for 4 days and then Cu only was removed. Vertical bars represent the average (mean ± SE) percentage of four experiments. *P < 0.05 for control.

4. Cu (10⁻⁴ M)의 VTG 합성억제에 미치는 Ca의 영향

일반적으로 환경수 중의 Ca은 산성비에 의해 증가하는 Cu의 독성을 완화하는 것으로 알려져 있으므로, 본 연구에서는, 금속이온의 제거에도 VTG 합성의 회복을 보이지 않은 Cu의 효과를 보다 자세히 조사하기 위하여 Ca에 의한 독성 완화 실험을 행하였다.

총 단백질에 대한 VTG의 합성 비율은 Ca 1.8 mM의 배양액에 E₂를 첨가한 후, 5일째에 6.2% 이었으나, E₂와 함께 Cu 10⁻⁴ M을 첨가함에 따라 E₂ 첨가군의 약 37%로 현저한 억제효과를 나타

내었다 (Fig. 4). 여기에 Ca을 첨가하여 배양액의 Ca농도를 2.0 및 5.0 mM로 높인 결과에 있어서도, 그 억제효과는 변화를 보이지 않았다 (Fig. 4). 이러한 결과로 보아, *in vitro*에서는 Cu의 독성억제효과에 Ca이 아무런 역할을 미치지 않는 것으로 판단된다.

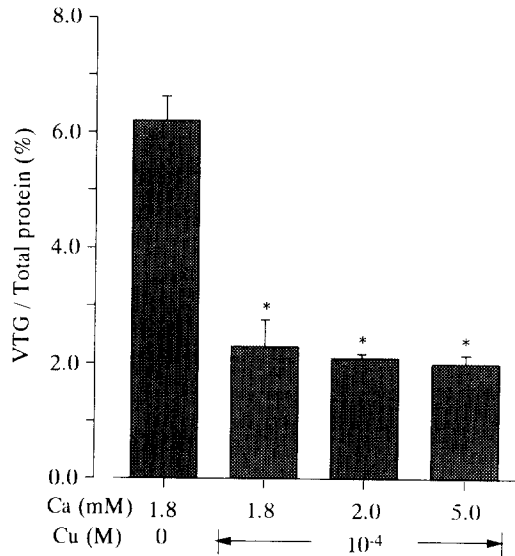


Fig. 4. Effects of enriched Ca concentrations in the incubation media on the Cu-induced inhibition of VTG production in hepatocyte cultures with E₂ (2 × 10⁻⁶ M) in rainbow trout. The relative optical density of VTG to total proteins was determined after SDS-PAGE on day 5 in incubation. Vertical bars represent the average (mean ± SE) percentage of four experiments. *P < 0.01 for control (Ca, 1.8 mM; Cu, 0 mM).

고 찰

최근, 산업의 발달에 의해 발생하는 산성비는 육상의 유해 금속원소를 가용화시켜 하천이나 호수로 유입시킨다. Hickie et al. (1993)은, 무지개송어의 치어에 있어 수중의 Cu 및 Zn이 치명적인 타격을 가하는 것으로 보고하고 있다. 더욱이, 이러한 환경에서 서식하는 어류에서는 알 수의

감소, 난황 형성의 억제 또는 부화율 저하 등, 생식활동의 장애현상이 일어나는 것으로 알려져 있다 (Runn et al., 1977; Lee and Gerking, 1980).

Hutchinson and Sprague (1989)는 American flagfish를 이용하여, 낮은 pH 환경수에서는 Cu 및 Zn의 독성이 급격히 증가한다는 것을 밝혔다. Cu 및 Zn은 생체내에 흡수된 후, 그 대부분이 간장에 축적 된다 (遠山, 1994; 小山, 1994). 최근, 유해 금속원소 중의 하나인 Al이 무지개송어의 VTG 합성을 억제하는 것이 보고되어졌다 (Mugiya and Tanahashi, 1998). 이러한 결과로 보아, 간세포에서의 VTG 합성은 환경수 중의 유해 금속원소에 의해 그 합성이 억제되는 등의 악영향을 받을 가능성이 크다고 할 수 있다.

본 연구에서는, 배양액 중의 Cu 및 Zn에 의한 세포 생존율은 변화를 나타내지 않았으나, VTG 합성은 이용한 Cu의 모든 농도에서, Zn에서는 농도 의존적으로 억제되어 고농도의 10^{-4} M에서, 유의하게 억제되는 효과를 나타내었다. 이러한 결과로 보아, VTG 합성은 Cu 및 Zn에 의해 억제되는 것으로 판단된다. 그렇지만, 그 억제 효과의 정도에는 차이가 있으며, Cu가 Zn보다 강한 억제효과를 가지는 것으로 여겨진다.

일반적으로, 환경수 중의 Ca은 산성비에 의해 증가하는 유해 금속물질의 작용을 완화시키는 것으로 알려져 있다. Sayer et al. (1989)은 brown trout의 치어 사육에 있어서, Cu (80 nM)에 따른 사망률은 Ca농도의 증가로 감소되었다고 보고하였다. 그러나, 본 연구에서는, Cu에 의한 VTG 합성억제는 고농도 Ca의 첨가로도 회복되지 않았다. Wicklund-Glynn et al. (1992)은, 금속이온의 독성은 아가미의 형태적, 생리적 저해를 가져오며, Ca은 이러한 독성을 억제시킨다고 보고하였다. 이상의 결과를 종합해 보면, *in vitro*에서는 Ca이 Cu의 독성을 직접적으로 완화시키지 않는다는 것을 알 수 있으며, *in vivo*에서의 독성 완화효과는 아가미의 활성을 거친 이차적인 생리활성에 의한 것이라고 추정된다.

한편, Zn의 첨가에 따른 VTG 합성의 억제효과는 배양액에서 Zn을 제거함으로써 회복되는 경향을 보였으나, Cu의 경우에는 회복되지 않았다. 이것은 Cu와 Zn이 VTG의 합성과정에서 미치는 작용간의 차이에 의한 것으로 추정된다. Sargripanti et al. (1991)은, 인간의 DNA에는 적어도 2종류의 Cu 결합부위가 존재하며, Cu의 농도가 일정량 이상 증가하면 DNA를 파괴시킨다고 보고하였다. 그리고, 저 농도의 Cu에 있어서는, RNA polymerase 및 ribonuclease를 저해하여 RNA의 합성을 억제시켰으며, 이러한 작용은 불가역적이었다고 보고되어져 있다 (Agarwal et al., 1989). 따라서, Cu는 VTG 합성 단계 중에서 DNA 및 VTG mRNA의 합성을 억제할 가능성이 큰 것으로 추정된다. 이에 반해, Zn의 억제효과는 Zn의 제거에 따라 없어지는 가역적인 반응을 가지는 것으로 보아, VTG 합성의 초기단계인 E_2 와 E_2 -수용체간의 결합 등에 관여하여 VTG 합성을 억제하는 것으로 추정된다. 그러나, Cu 및 Zn의 작용 기작에 대해서는 아직 불분명하므로, 각 원소에 의한 VTG mRNA의 변화와 같은 보다 세부적인 항목의 연구가 필요한 것으로 여겨진다.

이상에서와 같이, 무지개송어의 배양 간세포에 있어서의 VTG 합성은 Cu 및 Zn에 의해 특이적으로 억제된다는 것이 밝혀졌다. 그리고, 두 금속원소는 VTG 합성 억제에 있어서 서로 다른 작용 양식을 가지는 것으로 추정된다.

요 약

Estradiol- 17β (E_2)에 의한 Vitellogenin (VTG) 합성에 미치는 Cu 및 Zn의 영향을 무지개송어의 배양 간세포를 이용하여 조사하였다. 간세포는 2일간 배양 한 후, E_2 (2×10^{-6} M)와 동시에 Cu ($10^{-5} \sim 10^{-4}$ M) 또는 Zn ($10^{-5} \sim 10^{-3}$ M)을 배양액에 첨가하여 5일간 배양하였다. VTG 합성률은 총 단백질에 대한 VTG의 비율로 나타내었다. Cu 및 Zn의 첨가는 배양 간세포의

생존율에는 영향을 미치지 않았다. 그러나, Cu의 첨가에는 사용된 모든 농도에서, Zn의 첨가에는 농도 의존적으로 감소하여 10^{-3} M에서 유의하게 감소하였다. 이러한 감소는, Zn의 제거시에는 회복되었으나, Cu에서는 회복되지 않았다. 그리고, Cu 10^{-4} M의 첨가 시에 Ca (1.8 mM) 농도를 2.5 및 5.0 mM로 증가시켜도 Cu의 작용을 저해하지 못하였다. 이러한 결과로 보아, Cu 및 Zn은 간세포에서 합성되는 다른 단백질 보다 VTG 합성에 더 깊이 관여하는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- Agarwal, K., A. Sharma and G. Talukder, 1989. Effects of copper on mammalian cell components. *Chem. Biol. Interact.*, 69 : 1-16.
- Hara, A., C. V. Sullivan and W. W. Dickhoff, 1993. Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.*, 10 : 245-256.
- Hayashi, S., M. Q. Tang, T. Hirakawa and S. Yamada, 1993. Effects of fish concentration of ammonia on cultures hepatocytes of eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 105C : 17-23
- Hickie, B. E., N. J. Hutchinson, D. E. Dixon and P. V. Hodson, 1993. Toxicity of trace metal mixtures to alevin rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in soft, acid water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50 : 1348-1355.
- Hutchinson, N. J. and J. B. Sprague, 1989. Lethality of trace metal mixtures to american flagfish in neutralized acid water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18 : 249-254.
- Kwon, H. C., S. Hayashi and Y. Mugiya, 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 β in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B : 381-396.
- Leammli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227 : 680-685
- Lee, R. M. and S. D. Gerking, 1980. Survival and reproductive performance of the desert pupfish, *Cyprinodon n. Nevadensis* (Eigenmann and Eigenmann), in acid water. *J. Fish. Biol.*, 17 : 507-515.
- Mugiya, Y. and A. Thanahashi, 1998. Inhibitory effects of Aluminium on vitellogenin induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 109 : 37-43.
- Runn, P., N. Johansson and G. Milbrink, 1977. Some effects of low pH on the hatchability of eggs of Perch, *Perca fluviatilis* L. *Zoon*, 5 : 115-125.
- Sagripani, J. L., P. L. Goering and A. Lammanna, 1991. Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 110 : 477-485.
- Sayer, M. D. J., J. P. Reader and R. Morris, 1989. The effect of calcium concentration on the toxicity of copper, lead and zinc to yolk-sac fry of brown trout, *Salmo trutta* L., in soft, acid water. *J. Fish Biol.*, 35 : 323-332.
- Wicklund-Glynn, A., L. Norrgren and O. Malmberg, 1992. The influence of calcium and humic substances on aluminium accumulation and toxicity in the minnow, *Phoxinus phoxinus*, at low pH. *Com. Biochem. Physiol.*, C102 : 427-432.
- 小山 洋, 1994. Zn 亞鉛. "Toxicology Today" (佐藤 洋 編), 金芳堂, 193-202.
- 遠山 千春·本間 志乃, 1994. Cu. 銅. "Toxicology Today" (佐藤 洋 編), 金芳堂, 63-70.