

## Effect of Cadmium on C<sub>6</sub> Glioma Cells in Culture

Young-Woo Son and Kang-Chang Lee<sup>†</sup>

Sanbon Medical Center, Wonkwang University, Gyeonggi-do, Gunpo 435-040, Korea

It is demonstrated that cadmium has cytotoxic effect on glial cells, oxygen radicals are involved in cadmium-induced cytotoxicity. However, the toxic mechanism of cadmium is left unknown so far. The purpose of this study was to examine the cytotoxicity of CdCl<sub>2</sub> on C<sub>6</sub> glioma cells. The cytotoxicity was measured by cell viability via XTT assay in C<sub>6</sub> glioma cells. Colorimetric assay such as XTT assay is regarded as a very sensitive screening method for the determination of the cell viability on a lots of chemicals. In this study, CdCl<sub>2</sub> decreased cell viability according to the dose- and time dependent manners after C<sub>6</sub> glioma cells were treated with various concentrations of CdCl<sub>2</sub> for 48 hours. IC<sub>90</sub> and IC<sub>50</sub> values for XTT assay was determined at 5 μM and 55 μM of CdCl<sub>2</sub>, respectively. These results suggest that CdCl<sub>2</sub> has highly cytotoxic effect on C<sub>6</sub> glioma cells by the decrease of cell viability.

**Key Words:** Glial cells, Cadmium, Cytotoxicity

### 서 론

납을 비롯한 수은 및 카드뮴과 중금속류는 독성이 매우 강하기 때문에 피부접촉이나 호흡기를 통해 인체에 노출되면 각종 부작용과 심각한 후유증을 유발하게 된다 (Ganther, 1980; Coogan et al., 1992). 최근에는 각종 산업장에서 배출되는 흙이나 미세먼지 또는 공장폐수 및 차량의 배기가스 등에서 배출되는 각종 중금속입자들은 대기나 수질을 오염시키는 물론 나아가서 호흡기계나 또는 먹이사슬을 통해 인체에 노출됨으로서 직접적으로 국민의 보건건강에 매우 위협적으로 작용하고 있다 (Peterson et al., 1981; Park et al., 1996). 특히, 카드뮴은 자연 상태에서 광택이 있는 청백색의 금속으로 물에는 잘 녹지 않으나 산성용액에서는 빨리 용해되는 특성을 가지고 있다 (Chowdhury and Louria, 1976; Storeng and Jonsen, 1980). 카드뮴은 내식성이 다른 금속류에 비하여 뛰어나기 때문에 다양한 산업분야의 공정과정에 널리 사용되고 있다 (Nordberg, 1972). 예를 들면 축전지의 전극생산을 위한 공정을 비롯하여 형광등 제조, 보석연마, 자동차 및 항공기 산업 등에 널리 사용될 뿐만 아니라 (Layton et al., 1979), 더욱이 농작물의 수확을 방해하는 벌레나 잡초를 제거하는 살충제나 제조제의 원료로도 사용되어 진다 (Storeng and Jonsen, 1980; Chung et al., 1993).

\*논문 접수: 2006년 8월 11일

수정재접수: 2006년 8월 28일

<sup>†</sup>교신저자: 이강창, (우) 435-040 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대학교 의과대학 산본병원 마취통증의학과  
Tel: 031-390-2367, e-mail: kcl207@wonkwang.ac.kr

카드뮴의 중독은 공정과정에서 나오는 흙이나 카드뮴의 입자를 포함하고 있는 화학물질이 피부접촉이나 호흡기 또는 소화기를 통하여 인체에 노출됨으로서 카드뮴중독에 이완되어 진다 (Greener and Kochen, 1983; Coogan et al., 1992). 일반적으로 카드뮴의 중독을 이타이-이타이 (itai-itai)병이라 하는데 이러한 병변의 유발은 인체에 폭로된 카드뮴을 인체에서 미처 처리하지 못하여 발생하는 현상의 하나이다 (Layton et al., 1979; Bianchi et al., 1980). 즉, 카드뮴이 일단 체내에 유입되면 이의 자극으로 즉시 간에서 metallothionein이라는 해독물질이 만들어 진 후 인체에 들어온 카드뮴과 결합함으로써 인체 밖으로 카드뮴을 배출하게 된다 (Chowdhury and Louria, 1976; Norseth, 1981). 그러나 인체에서 합성된 metallothionein양은 소량으로 대개의 경우 노출된 카드뮴이 양적으로 더 많기 때문에 카드뮴중독에 노출되는 경우가 빈번하다 (Gilani and Marano, 1979; Chung et al., 1993).

카드뮴에 의해 중독된 경우 급성 시에는 구토와 급성위장염이 일어나며 그 밖에도 근육통이나 복통 및 간이나 신장장애를 초래한다고 알려져 있다 (Nordberg, 1972). 따라서 국내외 많은 학자들은 카드뮴과 같은 중금속에 대한 독성기전을 밝히기 위하여 동물을 대상으로 많은 연구를 진행하고 있다 (Gale, 1978; Levis and Majone, 1979; Storeng and Jonsen, 1980). 특히, 카드뮴은 다른 중금속과 달리 공기 중에서 가열되면 황갈색의 산화카드뮴이 생성하는데 이같이 생성된 흙은 호흡기를 통하여 쉽게 폐로 들어오게 되어 중독증을 유발하는 요인으로 되고 있다 (Chowdhury and Louria, 1976). 카드뮴의 중독으로 인하여 나타나는 현상으로는 신장장애를 비롯하여 신장의 신세뇨관의 재흡수의 억제, 폐간질세포의 파괴에 의

한 폐기종의 유발과 같은 증상을 초래한다 (Kasuya, 1975; Layton et al., 1979). 특히, 카드뮴은 칼슘대사에 영향을 주어 그 결과 골연화증 및 골다공증을 일으키기도 한다 (Nordberg, 1972; Mattson et al., 1993). 최근 카드뮴을 비롯한 구리나 수은 등과 같은 중금속류는 이들이 붕괴시 메틸라디칼이나 산소라디칼을 발생한다고 한다 (Ferm and Hanlon, 1974; Hayase et al., 1989; Coogan et al., 1992). 특히, 산소라디칼은 세포내 항산화계를 공격하여 catalase를 비롯한 glutathione peroxidase 및 superoxide dismutase (SOD)와 같은 항산화효소의 활성을 저해하여 그 결과 산화적 손상에 의한 세포고사를 초래하기도 한다 (Przyklenk and Kloner, 1986; Rosen et al., 1993; Decker, 1995). 또한 산소라디칼은 세포막의 지질에 작용하여 지질과산화반응 (lipidperoxidation)의 사슬을 촉진시켜 세포막의 손상을 초래하기도 한다 (Saunders et al., 1987). 더욱이 산소라디칼은 세포막에 위치하고 있는 칼슘통로의 수용체인 N-methyl-D aspartate (NMDA) 수용체를 과 자극함으로써 세포내 칼슘유입을 촉진시킨다고 한다 (Pellegrini-Giampietro, 1990).

따라서 최근 많은 선진국의 학자들은 카드뮴과 같은 중금속의 독성을 산화적 손상 측면에서 규명하려는 연구를 시도하고 있다 (Ganther, 1980; Park et al., 1996). 근래에 세포배양 기술이 발달되면서 신경세포를 비롯한 각종 세포의 배양이 가능하게 되면서 배양세포를 재료로 독성실험이 많이 행해지고 있다 (Bianchi et al., 1980). 특히, 세포배양에 있어서 신경세포는 다른 세포들과는 달리 배양이 어렵고 여러 화학물질이나 독성물질에 매우 민감하기 때문에 배양이 어렵다 (Michikawa et al., 1994). 그러나 각종 화학약제나 독성물질의 독성효과를 정량적으로 검정하는데 매우 적합한 재료로 선택되고 있으며 동시에 약제의 독성이나 효능을 단시간 내에 정확히 검색하는데 널리 이용되고 있다. 본 연구는 카드뮴의 신경독성에 대한 기전을 규명하기 위하여 C<sub>6</sub> glioma세포를 일정시간 동안 배양한 후 카드뮴의 독성효과를 colorimetric assay에 의하여 정량적으로 분석 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 약제 제조

본 실험에 사용한 CdCl<sub>2</sub> (Sigma Co.)는 각각 1 M, 100 mM, 10 mM, 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 2. 세포배양

배양중 신경세포의 분리는 효소해리술에 의하여 행하였다.

C<sub>6</sub> glioma세포는 혈구계산기를 이용하여 배양액에 1×10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 96-well에 넣어 분주하였다. 분주가 완료된 세포는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, CdCl<sub>2</sub>가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 실험군과 비교 조사하였다.

### 3. 카드뮴의 처리

CdCl<sub>2</sub>가 배양 C<sub>6</sub> glioma세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5 μM에서 50 μM 까지의 농도로 CdCl<sub>2</sub>가 각각 포함된 배양액에서 C<sub>6</sub> glioma세포를 48시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 조사하였다.

### 4. 세포생존을 조사

배양 C<sub>6</sub> glioma세포에 여러 농도의 CdCl<sub>2</sub>를 처리한 후 CdCl<sub>2</sub>가 신경세포에 미치는 독성효과를 Mosmann (1983)의 XTT 분석법에 의하여 조사하였다.

### 5. 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 P값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

## 결 과

### 1. CdCl<sub>2</sub>의 세포생존을 정량

#### 1) 농도에 따른 세포생존을

C<sub>6</sub> glioma세포에 CdCl<sub>2</sub>가 10~50 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 CdCl<sub>2</sub>의 독성효과를 XTT 분석법에 의하여 조사하였다. 결과 10 μM CdCl<sub>2</sub>의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군인 100% (8.19±0.51) 비하여 89.9% (7.36±0.43)로 나타났으며 30 μM의 처리에서는 54.8% (4.49±0.27)로 나타났다. 또한 50 μM CdCl<sub>2</sub>의 처리에서는 세포의 생존율이 40.2% (3.69±0.38)로 나타나 30 μM과 50 μM 농도의 처리에서는 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (P<0.05) (Table 1).

#### 2) 시간에 따른 세포생존을

CdCl<sub>2</sub>가 30 μM의 농도로 포함된 배양액에서 C<sub>6</sub> glioma 세포를 24~72시간 동안 배양한 후 CdCl<sub>2</sub>의 독성효과를 XTT 분석법에 의하여 조사한 결과 24시간 CdCl<sub>2</sub>의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군인 100% (8.29±0.52)에 비하여 53.9% (4.47±0.31)로 나타났으며 48시간의 처리에서는 49.6% (4.11±0.24)로 나타났다. 또한 72시간 동안의 CdCl<sub>2</sub>의 처리에서는 세포의 생존율이 46.8% (3.88±0.43)로 나타나 24~72시간 동안 처리에서 모두 대조군에 비하여 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈다 (P<0.05). 또한, 48시간 CdCl<sub>2</sub>의 처리에서

**Table 1.** The cell viability of cadmium (CdCl<sub>2</sub>) on C<sub>6</sub> glioma cells in concentration by XTT assay

Concentration of CdCl <sub>2</sub> (μM)	Group	
	Mean ± SE	(% of control)
Control	8.19±0.51	100
10	7.36±0.43	89.9
30	4.49±0.27	54.8*
50	3.69±0.38	40.2*

C<sub>6</sub> glioma cells were incubated with or without 10~50 μM CdCl<sub>2</sub> for 48 hours. The value represent the mean ± SE for triplicate experiments. \*P<0.05 (Student's t-test)

**Table 2.** The cell viability of hexavalent chromium (CdCl<sub>2</sub>) on C<sub>6</sub> glioma cells in incubation time by XTT assay

Incubation time of CdCl <sub>2</sub> (hour)	Group	
	Mean ± SE	(% of control)
Control	8.29±0.52	100
24	4.47±0.31	53.9*
48	4.11±0.24	49.6*
72	3.88±0.43	46.8*

C<sub>6</sub> glioma cells were incubated with or without 30 μM CdCl<sub>2</sub> for 24~72 hours. The value represent the mean ± SE for triplicate experiments. \*P<0.05 (Student's t-test)

XTT<sub>50</sub> 값을 나타냈다 (Table 2).

3) XTT IC<sub>90</sub>과 IC<sub>50</sub>

XTT IC<sub>90</sub>과 IC<sub>50</sub>을 측정하기 위하여 C<sub>6</sub> glioma세포에 CdCl<sub>2</sub>가 10~50 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 다음 XTT 흡광도를 측정하였다 그 결과 CdCl<sub>2</sub>의 IC<sub>90</sub>과 XTT<sub>50</sub>은 각각 10 μM과 30 μM에서 나타났다 (Table 3).

## 고 찰

카드뮴은 환경오염원인 동시에 발암성 물질로 잘 알려져 있다 (Layton et al., 1979). 특히, 카드뮴과 같은 맹독성의 중금속류는 일단 체내에 축적이 되면 빠르게 배설되지 않기 때문에 생체에 지속적으로 축적이 이루어지며 그 결과 만성 또는 급성의 카드뮴중독을 일으킨다 (Chowdhury and Louria, 1976). 카드뮴의 중독은 다른 질환보다 통증이 매우 심하기 때문에 이타이-이타이 (itai-itai)병으로도 잘 알려져 있다 (Storeng and Jonsen, 1980). 특히, 카드뮴은 주로 호흡기계를 통하여 인체에 흡수되기 때문에 카드뮴을 재료로 하는 공정 과정에 관여하고 있는 근로자들에게서 빈번히 급성폐렴이나 폐기종과 같은 호흡계질환 등과 같은 직업병이 초래되고 있다 (Nordberg and Kjellstrom, 1981).

생쥐를 대상으로 한 카드뮴의 독성실험에 있어서 임신 쥐

**Table 3.** The values of IC<sub>90</sub> and IC<sub>50</sub> of cadmium (CdCl<sub>2</sub>) on C<sub>6</sub> glioma cells by XTT assay

Cell line	XTT assay	
	IC <sub>90</sub>	IC <sub>50</sub>
C <sub>6</sub>	10 μM	30 μM

C<sub>6</sub> glioma cells were incubated with 10~50 μM CdCl<sub>2</sub>, respectively. The values were determined by XTT assay in C<sub>6</sub> glioma cells

에 카드뮴을 노출시킨 결과 사지와 안면부에 기형을 유발한다고 알려져 있다 (Layton et al., 1979), 그밖에 카드뮴의 폭로는 신장이나 심혈관계 및 골격계 등 다양한 장기에도 기능부전을 유발한다고 보고된 바 있다 (Friberg and Kjellstrom 1981). 그러나 카드뮴의 독성이 기형과 여러 부작용을 유발한다는 것 외에도 발암성 물질이라는 것만이 밝혀져 있으며 이에 대한 기전규명은 자세히 정립되어 있지 않은 실정이다 (Coogan et al., 1992; Chung et al., 1993). 더욱이 카드뮴이 신경계에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡할 뿐만 아니라 배양 신경세포를 재료로 한 연구는 많이 되어 있지 않다 (Friberg and Kjellstrom, 1981; Michikawa et al., 1994). 따라서 본 연구에서는 카드뮴의 신경독성효과를 조사하기 위하여 C<sub>6</sub> glioma 세포를 일정시간 동안 배양한 후 10~50 μM CdCl<sub>2</sub>가 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 처리한 결과 CdCl<sub>2</sub>는 신경세포에 처리 농도에 비례하여 세포생존율을 감소시켰으며 특히 30 μM과 50 μM에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다 (P<0.05). 또한 30 μM CdCl<sub>2</sub>의 처리에서 XTT<sub>50</sub> 값이 나타났다.

본 실험 결과는 CdCl<sub>2</sub>가 배양 C<sub>6</sub> glioma세포에 독성효과를 가지고 있음을 말해주고 있으며 (Storeng and Jonsen, 1980), 타 연구에서 Chung 등 (1993)이 생쥐의 신경세포에 CdCl<sub>2</sub>를 처리한 결과 세포독성을 나타냈다는 연구 결과와 일치하였다. 카드뮴의 독성은 세포내 DNA나 RNA와 같은 핵산형성의 저해나 또는 세포내 단백질합성계의 손상을 통하여 나타난다고 보고된 바 있다 (Chowdhury and Louria, 1976).

따라서 본 실험의 결과는 카드뮴이 세포내 핵산물질의 합성 저해나 또는 조면소포체나 리보솜과 같은 단백질합성연관 효소활성을 억제하여 그 결과 세포의 단백질합성이 저해됨으로서 세포생존율을 감소시켰을 가능성을 배제할 수는 없다 (Coogan et al., 1992). 한편, XTT assay는 주로 세포내 사립체와 밀접한 관련이 있을 뿐 만 아니라 세포생존율을 측정하는 민감한 분석방법의 하나로 간주되고 있다 (Mosmann 1983). 따라서 Borenfreund와 Puerner (1984)는 XTT assay를 비롯한 MTT assay의 중간독성값 (midcytotoxicity value, MCV)을 측정하여 독성물질의 독성 정도를 판정하였다. 즉, MCV의 수치가 100 μM 이하이면 고독성 (highly toxic)으로 판정하였으며 또한 MCV가 100 μM 이상에서 1,000 μM 이하인

경우 중간독성 (midtoxic)으로, 1,000  $\mu\text{M}$  이상에서 2,000  $\mu\text{M}$  이하인 경우는 저독성 (lowly toxic)으로, 2,000  $\mu\text{M}$  이상이면 무독성 (non-toxic)으로 판정하였다. 따라서 본 실험에서 나타난  $\text{CdCl}_2$ 의 영향은 XTT assay에서 나타난 것처럼 XTT assay가 세포내 사립체의 효소활성과 연관이 깊은 것을 고려하면 아마도 카드뮴의 독성이 사립체와 같은 세포소기관의 효소활성을 억제한 결과일 가능성이 클 것으로 생각되며 Borenfreund와 Puerner의 판정에 의하여  $\text{CdCl}_2$ 는  $\text{C}_6$  glioma 세포에 고독성 나타냈다. 그러나 이에 대한 자세한 기전규명을 위해서는  $\text{CdCl}_2$ 의 독성이 단백질합성에 관여하고 있는 효소의 활성에 미치는 영향을 비롯하여 DNA의 합성 및 세포내 protein kinase C와 같은 신호전달체계와 같은 측면에서 더욱 많은 분석이 필요할 것으로 생각한다.

#### 감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

### REFERENCES

- Bianchi V, Toso RD, Debetto P, Levis AG, Luciani S, Majone F, Tamino G. Mechanism of chromium toxicity in mammalian cell cultures. *Toxicology* 1980. 219-224.
- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth*. 1984. 9: 7-9.
- Chowdhury P, Louria DB. Influence of cadmium and trace metals on human  $\alpha$ -antitrypsin: An in vitro study. *Science* 1976. 191: 480-487.
- Chung YT, Park ST, Choi MK, Kim JJ, Woo WH, Han DS, Choi BK, So JT. A study on the cytotoxicity of cadmium in vitro. *Korea J Toxicol*. 1993. 9: 45-60.
- Coogan TP, Bare RM, Waalkes MP. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992. 113: 227-233.
- Decker EA. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutr Rev*. 1995. 53: 49-58.
- Fern VH, Hanlon DP. Toxicity of copper salts in hamster embryonic development. *Biol Reprod*. 1974. 11: 97-101.
- Friberg L, Kjellstrom T. Cadmium (Bronner F, Coburn JW eds.) In "Disorders of Mineral Metabolism". New York Academic Press Inc. 1981. pp. 318.
- Gale TF. Embryonic effects of chromium trioxide in hamster. *Environ Res*. 1978. 16: 101-106.
- Ganther HE. Interaction of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci*. 1980. 355: 212-225.
- Gilani SH, Marano M. Chromium poisoning and chick embryogenesis. *Environ Res*. 1979. 19: 427-432.
- Greener Y, Kochen JA. Methylmercuric toxicity in the chick embryo. *Teratology* 1983. 28: 23-28.
- Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H. Scavenger of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem*. 1989. 53: 3383-3389.
- Kasuya M. The effect of vitamin E on the toxicity of alkyl mercurials on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1975. 32: 374-354.
- Levis AG, Majone F. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble chromium compound on mammalian cell cultures. *Br J Cancer*. 1979. 40: 523-528.
- Leyton WM Jr, Layton MW. Cadmium induced limb defects in mice: Strain associated differences in sensitivity. *Teratology* 1979. 19: 229-237.
- Mattson MP, Zhang Y, Bose S. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury but not ATP depletion in hippocampal neurons. *Exp Neurol*. 1993. 121: 1-13.
- Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res*. 1994. 37: 62-70.
- Momann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1984. 65: 55-63.
- Nordberg GF. Cadmium metabolism and toxicity. *Environ Physiol Biochem*. 1972. 2: 7-12.
- Norseth T. The carcinogenicity of chromium. *Environ Health Perspect*. 1981. 40: 121-125.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology* 1996. 17: 37-46.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morrioni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci*. 1990. 10: 1035-1041.
- Peterson A, Lewne M, Walum E. Acute toxicity of organic solvents, heavy metals, and DDT tested in cultures of mouse neuroblastoma cells. *Toxicol Lett*. 1981. 9: 101-108.
- Przyklenk K, Kloner RA. Superoxide dimutase plus catalase

- improve contractile function in the canine model of stunned myocardium. *Cir Res.* 1986. 58: 149-157.
- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krrizus A, et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated wigh familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature (London)* 1993. 362: 59-62.
- Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Harrocks LA, Anderson DK. Effects of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem.* 1987. 49: 24-31.
- Storeng R, Jonsen J. Effect of nickel chloride and cadmium acetate on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *Toxicology* 1980. 17: 183-188.
-