

化学物質の安全性評価における*in vivo*遺伝毒性
—特にげっ歯類を用いる小核試験の基礎研究並びにその行政面への応用—

林 真*, 本間 正充
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

Evaluation of *in vivo* genotoxicity of chemicals
—The development and application of rodent micronucleus assay—

Makoto Hayashi* and Masamitsu Honma
Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences

Abstract

Genotoxicity tests play an important role for the safety evaluation of chemicals. It is well known that there are *in vitro* and *in vivo* assay systems for evaluation of chemical genotoxicity on different endpoints. Bacterial gene mutation test and chromosomal aberrations test using mammalian cultured cells are representative examples. It is apparent that there are limitations of *in vitro* assay systems for chemical safety evaluation and risk assessment for human health and *in vivo* assay systems are becoming more important in the view point of weight of evidence. There are several *in vivo* assay systems have been developed and used for different endpoints. Among these, the rodent micronucleus test using hematopoietic cells has been most widely and frequently used to detect induction of chromosomal aberration. It is evident that there are chemicals that gave positive result in the *in vitro* chromosome aberration test but negative in the rodent micronucleus test. In such case, as a rule, the *in vivo* negativity is dominant to *in vitro* positivity.

It is important and necessary to reduce animals without any loss of accuracy. In the micronucleus test, the development of the method using peripheral blood instead of bone marrow cells succeeded to reduce total number of animals for chromosomal aberration evaluation *in vivo*. Tiny amount of blood sampling can be done without killing animals, which is one of the most important advantages of the method, also permits to combine other assays for different endpoints that require different optimal sampling times. Based on this development, *in vivo* multiple endpoint assay system will be realized and lead more reduction of animals for evaluation of chemical genotoxicity. In this manuscript, We describe the history of development and applications of the peripheral blood micronucleus assay.

Keywords: Genotoxicity assay; Rodent micronucleus assay; Peripheral blood; Acridine orange supravital staining

1. 緒言

化学物質の安全性を評価する上で、変異原性は重要な位置を占める。また、がん原性は安全性を考える上でもっとも大きな関心事のひとつであり、実験動物を用いて、その生涯にわたって処理し、多大な経費と労力を用いての試験が現在も行われている。このがん原性を短時間で予測する手法として細菌を用いる復帰突然変異試験をはじめとする多くの変異原性試験が考案されてきた。当初はがん原性の予測のためにこれらの試験結果が用い

られたが、現在ではがん原性のメカニズムの解明のための方法として重要視されている。すなわち、がん原性のメカニズムとして変異原性の関与が認められたときには閾値が存在しない、との考えが厳然としており、今なおこの考えを基に化学物質の評価がなされる。これまでは、細菌を用いる復帰突然変異試験の結果のみで遺伝毒性メカニズムが考えられてきたが、発がんの標的部位において遺伝毒性が認められるか否かは重要で、この場合、*in vivo*試験がその役割を果たす。

遺伝毒性試験は、その指標と試験に用いる材料で分類される。遺伝毒性の主な指標は遺伝子突然変異と染色体異常である。また、材料面からは大別して*in vitro*系と*in vivo*系がある。本稿では、染色体異常誘発性を指標とした動物個体を用いる*in vivo*試験である小核試験を中心に議論を進める。げっ歯類を用いる小核試験は遺伝毒性試

*To whom corresponding should be addressed:
Makoto Hayashi;1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan
Tel: +81-33700-9872
Fax: +81-33700-2348
E-mail: hayashi@nihs.go.jp

験の標準的なバッテリーを構成する一員であり、変異遺伝部ではこの研究分野で世界をリードし、試験方法の開発、並びに結果の評価、解釈に関する研究を行ってきた。主な成果としては、小核の生成機構に関して検討し、骨髄細胞で見られる切断型と交換型の染色体構造異常の小核形成への寄与率を明らかにしたこと (Hayashi et al., 1984)、標本の染色手法の開発を行い、アクリジンオレンジ蛍光染色法 (AO法) を導入して観察精度の向上を図ったこと (Hayashi et al., 1983)、さらに、このAO法を超生体染色法を小核試験に適用し、正確で、パフォーマンスの高い手法の確立に成功した (Hayashi et al., 1990) こと、などが挙げられる。AO法は、現在OECD等のガイドラインにおいても推奨されている (OECD, 1997)。試験結果に影響及ぼす可能性のある要因 (性差、系統差、投与回数、投与経路等) の解明についても、日本環境変異原学会・MMS研究会 (分科会) を中心として多くの共同研究を組織し、その研究成果はICHやOECDのガイドライン策定に大きな影響を与えた (CSGMT 1986; 1988; 1990; 1995; Hayashi et al. 1989)。また、最近では、新しい手法のバリデーションに関する共同研究も行なっている (CSGMT 1992; Morita et al., 1997; Wakata et al., 1998; Hamada et al., 2001)。通常試験に用いられる造血組織以外での染色体異常誘発性評価 (Ohyama et al., 2002; Nishikawa et al., 2001; 2002; Suzuki et al., 2004)、観察の自動化 (Asano et al., 1998; Dertinger et al., 2005)、結果の評価・解釈 (Hauschke et al., 1997; Adler, et al., 1998; Hayashi et al., 1985; 1989; 1994; Kirkland et al., 2000, 2003; Müller et al., 2003) についても当部が果たした役割は大きい。

2. 小核試験とは

化学物質の遺伝毒性を評価する試験法は試験の指標と用いる実験生物に基づき、Table 1のように分類できる。国内外の多くの試験ガイドラインでは、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験またはマウスリンフォーマTK試験 (MLA)、およびげっ歯類を用いる小核試験 (以下小核試験) が標準的な試験バッテリーを構成している。小核試験は染色体異常誘発性を指標とし、動物個体を用いる *in vivo* 試験系として最も汎用されている代表的な試験系である (Hayashi et al., 1994, 2000; Heddle et al., 1991)。汎用されている理由としては、染色体異常誘発性を検出する *in vivo* 試験系としては感度が高く、パフォーマンスの高い試験系であることが考えられる。

Table 1. 代表的な遺伝毒性試験

	DNA 損傷性	遺伝子突然変異	染色体異常
<i>In vitro</i>	付加体形成試験 コメット試験	Ames 試験 MLA	培養細胞を用いる分裂中期像解析 培養細胞を用いる小核試験
<i>In vivo</i>	DNA 付加体形成試験 コメット試験	トランスジェニック動物を用いる試験	骨髄/末梢血を用いる小核試験 骨髄を用いる分裂中期像解析

MLA: mouse lymphoma assay using L5178Y cells

げっ歯類の骨髄における小核生成機構を Fig. 1 に示す。赤血球の生成過程において、最終の細胞分裂時に染色体異常が誘発されると、その一部が小核を形成し、脱核の過程で細胞質内に取り残され、本来無核の赤血球中に小核が出現する。小核形成の効率は、染色体異常の型により異なり、単純な切断ではそれらの約 90 % が小核を形成するが、交換型の異常はその約 35 % 程度しか小核を形成しないものもある (Hayashi et al., 1984)。脱核後間もない幼若な赤血球を顕微鏡下に観察し、小核を有する幼若赤血球の出現頻度から、最終細胞分裂時における染色体異常誘発性を推定する。これまでは、骨髄中の幼若赤血球である多染性赤血球を観察対照としてきたが、現在では末梢血も観察対象細胞として用いられている。小核試験全般に関しては成書 (林, 1990) を参照されたい。

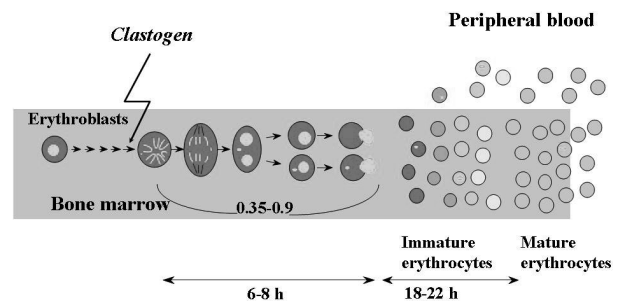


Fig.1 赤血球分化過程での小核の発生

3. 末梢血を用いる小核試験

Fig. 1 に示したように、幼若な赤血球は骨髄中にしばらくとどまるとともに、確率的に血流に出て行く。末梢血を用いる小核試験に関しては、MacGregorら (1980) によって紹介され、その後も彼らのグループによって数多くの報告がなされている。しかし、末梢血を用いることによる多くの利点が強調されたが、あまり普及しなかった。末梢血を用いる小核試験は、被験物質を長期間投与し、成熟した赤血球を観察して化学物質の慢性的影響を評価しようとするものと、末梢血中の幼若赤血球を観察し、骨髄中の多染性赤血球を用いる小核試験と同等

の結果を得ようとするものに大別できる。

一般の変異原性試験は、短期試験法とも呼ばれるように、化学物質の急性効果を評価するための手法である。しかし、ヒトが変異原に暴露されるのは低濃度で長期間のことが多く、遺伝子の突然変異や染色体異常の誘発についても、化学物質の慢性的な影響を評価できる系が必要となる。骨髄中の幼若な赤血球を観察対象とする通常の小核試験が、化学物質の急性効果を評価するものであるのに対し、末梢の成熟赤血球を観察する方法は、慢性的な影響を評価できる試験系として期待できる。

ヒトやラットでは、末梢血中に出た小核を持つ赤血球は異常赤血球として脾臓で効率よくトラップされ壊されてしまうが、幸いなことにマウスではこの機能が不完全であるため、小核を有する赤血球も壊されることなく、正常な赤血球と同様の寿命(約30日)を全うする。従って、少なくとも赤血球の寿命の期間中小核を有する赤血球を蓄積することができ、被験物質の長期間投与の影響を評価できる。さらに、末梢血は非常に均質な細胞集団であり、観察の機械化に最も適した材料である。末梢血を用いる小核試験と、観察の機械化が結びついてこの分野での大きな進歩となることが期待される (Hayashi et al., 1992a,b; Asano et al., 1998; Dertinger et al., 2005)。

末梢血中の幼若赤血球である網赤血球を観察して、骨髄中の幼若赤血球を観察するのと同等の結果を得ることが出来れば、動物をそのつど殺さなくとも経時的に標本作製することが可能となり、標本時期決定のための予備試験も必要なくなり、動物愛護の観点からも推奨される手法と考えられる。少なくともマウスについては、一般の単回投与試験の動物より採血することにより、実験動物を共有することが可能である。

3. 1 標本作製および観察方法

アクリジン・オレンジ (AO) は未固定の細胞にも取り込まれ、核酸と結合して蛍光を発する色素である。2重鎖のDNAには塩基対間に入り込み、530nmにピークを持つ黄緑色の蛍光を発し、単鎖のRNAとも結合し、590nmにピークを持つ赤色の蛍光を発する。この性質を利用し、一定量のAOをあらかじめスライドガラスに塗布しておき、そこへ微量の末梢血をのせ、カバーガラスで覆うと、AOが血清中に溶け出し、それが細胞中に取り込まれ、自動的に蛍光染色が施される(超生体染色)。手法の詳細については文献 (Hayashi et al., 1990; 林 1991; CSGMT, 1995) を参照されたい。このように作製された標本の観察は、波長490nm付近の励起光、観察用フィルタとして515-530nm以上の波長の光を透過するものを備えた蛍光顕微鏡で行う。赤血球の細胞質中の赤色蛍光を発している網状構造が大きいほど幼若なもの

と考えることができる。黄緑色の小核を有する網赤血球 (MNRET) の出現頻度は、骨髄中の小核を持つ多染色赤血球 (MNPCE) と同様、少なくとも2000個の網赤血球を観察して求める。

3. 2 実験動物の削減

末梢血を用いる小核試験を行うことにより、骨髄を用いるこれまでに行われてきた標準的な方法と比較して、どれくらい実験動物の削減につながるかについて考えてみる。現行のガイドラインでは、1群5匹の動物を用い、陰性、陽性対照群と3用量群で試験を行うことが求められている。単回投与の場合は、2回の標本作製が必要とされており、骨髄を用いる方法では、その都度動物を安楽死させる必要があるため、陽性対照群は1回の標本作製と考えても合計で45匹の動物が必要となる。ただし、複数回の投与の場合には、1回の標本作製で良いとされているので、その場合は25匹となる。一方、末梢血小核試験では2回の標本作製を行うとしても、同一の動物を用いることが出来るので、投与回数にかかわらず25匹で試験が完結する。しかも、陰性対照は投与直前の末梢血のデータで代表することが可能なため、陰性対照群を別個にもうける必要がなくなる。従って20匹の動物で良いことになる。また、最近小核試験における陽性対照群をその都度設ける必要はないとの議論が国際的になされており、ICHのメンテナンスでもそのような提案がなされる予定である。もしそれが認められるなら、15匹の動物で試験が完結することとなり、骨髄の45匹と比較すると1/3の動物で試験が可能になり、大きな動物資源の節約、動物愛護につながる。

4. バリデーション

行政的な安全性の評価に新しい試験手法を用いる場合には、その試験法の信憑性に関する十分な保証が必要である。末梢血を用いる小核試験法に関しても、安全性評価の一手法として用いるには、その性質を十分理解する必要があり、多くの確認試験を行うことになる。日本環境変異原学会MMS研究会でこの方法のバリデーション共同研究が企画され、実施された。44機関が参加し (Table 2)、原則として1つの化学物質が2機関で比較検討された。また、評価に用いるモデル化学物質は、小核の誘発が知られており、かつ、その作用機構が異なるものを選択した (Table 3)。実際の共同研究を始める前に、技術移転のための講習会を開催し、試験方法の伝授を行った。結果は、ほとんどの参加者にとって初めての手法であるにもかかわらず、ばらつきの少ないデータが得られた。化学物質の投与直前に採血した対照データのまとめをFig. 2に示す。ヒストグラムが実際の観察値

であり、丸印が平均値を実測値にあわせた2項分布から予測された値を示している。このように実測値と理論値が一致していることは、偶然のばらつき以外にデータのふれをもたらす要因が少なかったことを意味する。すなわち、経験のない者が本試験を行っても、十分満足のいく結果を得ることが可能であることを示している。モデル化学物質に関しては、ほとんどのものが陽性結果を示し、さらに、単回の腹腔内投与48時間後にMNRET出現頻度が最大になることを示した。骨髄細胞を用いて小核の出現を観察するときには、化学物質によって経時的な変化が異なることが知られているが、末梢血の場合には48時間後に観察すればほとんどの化学物質の染色体異常誘発性を検出することが可能であることが報告されている(CSGMT, 1992)。

Table 2. バリデーション共同研究参加者リスト

1. Biological Research Center for the Protection of Environment
2. Biomedical Laboratories, Inc.
3. Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides
4. Central Institute for Experimental Animals
5. Chemicals Inspection & Testing Institute
6. Daicel Chemical Industries
7. Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.
8. Food and Drug Safety Center
9. Fuji Photo Film Co., Ltd.
10. Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.
11. Green Cross Co., Ltd.
12. Health Sciences Research Institute
13. Institute of Environmental Toxicology
14. Itoham Central Research Institute
15. Japan Tobacco, Inc.
16. Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.
17. Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories
18. Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.
19. Kumiai Chemical Industry Co., Ltd.
20. National Institute of Hygienic Sciences
21. Nihon Bioresearch Center, Inc.
22. Nihon Noyaku, Co., Ltd.
23. Nippon Glaxo, Ltd.
24. Nippon Shinyaku Co., Ltd.
25. Nitto Denko Corporation
26. Ono Pharmaceutical Co., Ltd.
27. Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.
28. Pfizer Pharmaceutical, Inc.
29. Sandoz Pharma Ltd.
30. Sankyo Co., Ltd.
31. Shionogi & Co., Ltd.
32. Shiseido Toxicological Analytical Research Center
33. Sumitomo Chemical Co., Ltd.
34. Suntory Co., Ltd.
35. Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.
36. Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.
37. Takeda Chemical Industries, Ltd.
38. Tanabe Seiyaku Co., Ltd.
39. Teijin Ltd.
40. Toyama Institute of Health
41. Toyobo Co., Ltd.
42. University of Shizuoka
43. Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.
44. Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.

Table 3. 共同研究に用いたモデル化学物質

Chemicals Tested

Alkylating agents

Cyclophosphamide monohydrate
 Dimethylnitrosamine
 Ethyl methanesulfonate
 N-Ethyl-N-nitrosourea
 Methyl methanesulfonate
 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 Triethylenemelamine

Base analogues and related chemical

1-β-D-arabinofuranosylcytosine
 5-Fluorouracil
 6-Mercaptopurine
 Methotrexate

Aromatic amines

2-Acetylaminofluorene
 Phenacetin

Polycyclic aromatic hydrocarbons

Benzo[*a*]pyrene
 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene

Crosslinking agent

Mitomycin C

Inorganic chemicals

Potassium bromate
 Potassium chromate (VI)

Spindle poisons

Colchicine
 Vincristine sulfate

Miscellaneous chemicals

Benzene
 Procarbazine hydrochloride
 Urethane

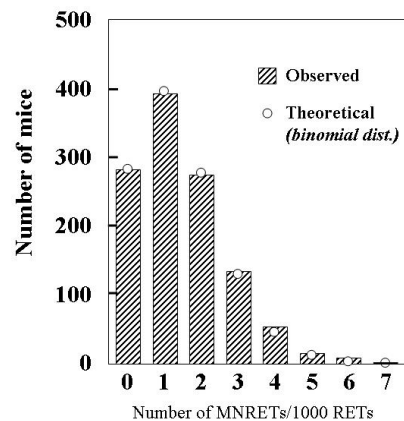


Fig.2 共同研究における陰性対照マウスでの小核の出現分布

5. 末梢血小核試験の特徴と展望

末梢血を用いる小核試験の特徴はいろいろ考えられるが、実験動物を殺すことなく微量の採血により染色体異常誘発性を評価できることが最も重要な点であると考えられる。これは、動物愛護の観点からもすぐれた特徴であるが、それ以上に化学物質の経時的な変化を同一動物からとることが可能となり、メカニズムの解析にも大きな意味を持つ。

本法の特徴をよく示す一例として、マウスの各系統で、自然小核出現頻度が加齢に伴って変化するか否かを毎月同一個体から採血して評価する研究がMMS研究会の共同研究として行われた (Sato et al., 1995) 系統により多少差はあるが1年以上にわたりほとんど変化のないことが判明した (Fig. 3)。従って、試験の材料とするときに動物の週齢に対しては頑健な手法であり、その他の要件により週齢を選ぶことが可能である。

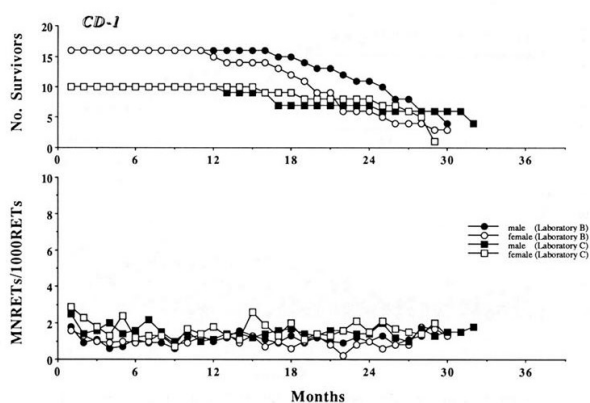


Fig.3 CD-1マウスでの自然発生小核に対する加齢の影響

各種試験法はそれぞれに最適な標本作製時期があり、同一個体から各種のデータをとることに無理があったが、微量の採血のみであれば他の指標に大きな影響を与えることは少ないので、他の試験と組みあわせることが可能になった。現在トランスジェニックマウスを用いる *in vivo* の遺伝子突然変異を検出する系が、安全性評価に用いられるようになってきている。その系と末梢血を用いる小核試験を組み合わせると、突然変異と染色体異常を同時に *in vivo* で調べることができ、この分野に大きな展開をもたらすことが期待できる (Hayashi et al., 1994c; Kohara et al., 2002a, b; Suzuki et al., 1993, 1994, 1995)。

網赤血球を用いる方法は、脾臓で小核赤血球が破壊されない点を考えてマウスを対象とすることに問題は無い。しかし、小核試験の結果を総合的に評価するには、一般毒性のデータや薬物動態学的なデータが重要であ

り、これらのデータはラットを用いたものの方が圧倒的に多い。そこで、ラットを用いる小核試験が重要な役割を果たすことになるが、ラットでは脾臓で小核赤血球は破壊されてしまうので、末梢血を観察対象とするのは困難であると考えられている。しかし、MNRETが末梢血流に出てから破壊されるまでにごく幼若な網赤血球を観察対象とすることにより、小核観察が可能であることがMMS研究会での大規模なバリデーション研究により証明され、ラットもマウス同様試験動物として用いることが可能であることが判明した (Wakata et al., 1998)。さらに、末梢血小核試験を一般の毒性試験に組み込むことが可能か否かを調べるための共同研究がMMS研究会で行われた (Hamada et al., 2001)。その結果、紡錘体形成阻害剤での反応が明確でなかったが、その他のモデル化学物質では小核の誘発性が確認され、一般毒性試験に組み込むことが期待できる結果となった。現在ICHにおいて、遺伝毒性の見直しが行われている (S2(R1))。ここでは、動物愛護に関する3Rの概念に基づき、一般毒性試験に組み込みが可能な場合には、実験動物の共用を認める方向性が打ち出されている。

6. 骨髄以外の組織を用いる小核試験

緒言にも記載したように、化学物質の安全性評価を評価するに当たり、遺伝毒性に関する評価の重要性が増している。すなわち、対象とする化学物質にがん原性が認められ、かつ遺伝毒性がそのメカニズムであることが判明した場合、閾値がない重要な毒性と見なされ、一日摂取許容量が設定されない。これまでは細菌を用いる復帰突然変異試験の結果のみで、このような決定がなされていたが、最近では発がんの標的臓器において遺伝毒性が認められるか否かが重要視されるようになってきた。DNA損傷性に関しては単細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ) により、発がんの標的組織において評価が可能であり、遺伝子突然変異に関してはトランスジェニック動物を用いることで、各組織での評価が可能である。ただし、遺伝毒性の主要標的の一つである染色体異常誘発性を、造血組織以外で評価できる優れた試験系がなかった。しかし、現在では小核試験を多臓器に対して行うことが可能になってきた。2005年に開催された「遺伝毒性試験に関する国際シンポジウム」において、それらの試験が評価され、多臓器で染色体異常誘発性を評価する手法として認められるようになった。本稿末に、多臓器小核試験の概略を紹介し、前記論文に収載されている (Appendices)。

6. 1 肝臓を用いる小核試験

肝臓は体内に取り込まれた化学物質の代謝を司る主要臓器であり、がん原性を始め、多くの毒性の標的となる。肝細胞を標的とした小核試験の歴史は古いが (Tates and den Engelse 1989)、近年幼若なラットを用いる手法が共同研究により評価された。小核の生成には細胞分裂が必須であり、肝細胞のように分裂頻度が低い臓器においては、部分肝切除や肝毒性物質を事前投与して肝細胞の分裂を促す必要があった。しかし、生後4週程度の幼若なラットにおいては肝細胞の増殖が進行していると共に、薬物代謝能を有することも判明しているため、小核試験の標的組織として受け入れ可能である。

6. 2 大腸を用いる小核試験

大腸も比較的発がんの標的となりやすい臓器であり、腸上皮の基底部では細胞分裂が盛んであり、小核誘発性を評価することが可能である。

6. 3 皮膚を用いる小核試験

皮膚は体表を覆う大きな組織であり、常に様々な化学物質に暴露されている。また、発がんの標的ともなる組織で、特に光により活性化される化学物質の評価には重要な組織である。

6. 4 生殖細胞を用いる小核試験

生殖細胞は発がんの標的組織としての重要性は不明であるが、遺伝毒性をがん原性の予測のみならず、次世代への影響を評価する試験法と位置づけた場合にはもっとも主要な臓器である。これまで多くの化学物質について試験されてきたが、その評価の戦略が固まっているとは言いがたく、今後更に重みを増した評価・解釈は必要であると考えられる。

7. 行政への対応と今後の課題

小核試験は生体内における遺伝毒性の発現を見る手法としてもっとも汎用されている試験法であり、医薬品を始め、化粧品および部外品、食品添加物等食品関連物質、農薬、工業化学物質等の安全性を評価する上で重要な役割を果たしてきた。特に生体内でのDNA損傷性や、遺伝子突然変異誘発性を評価する試験系が十分バリデートされていなかった時代には、ほぼ唯一の試験系として用いられてきたが、今後はそれぞれの指標について適切な試験法が選択される必要があるものと考えられる。

小核試験はその表現系の単純さ、特に末梢血を用いた場合には観察対象細胞の均一性もあり、機械的な測定法の適用が進められてきた。画像解析手法を用いた手法と、フローサイトメトリーを適用した手法がある。現在は後

者が主流を占め、幼若赤血球を識別する免疫学的手法の導入以降、かなり普及してきた。この手法は、遺伝毒性試験に関する国際シンポジウムでも取り上げられ、行政への申請資料として受け入れ可能であるとの合意が得られた。また、これを受けて、ICHにおいてもフローサイトメトリーによる評価が認められる方向にある。ここでの懸念事項は、フローサイトメトリーを用いた場合には、観察細胞数を増やすことが容易であり、細胞を解析の単位とした場合には統計学的な検出力が高まることである (Torous et al., 2006)。これは化学物質の小核誘発性能を感度よく検出することを意味するので、歓迎することであると考えられる。しかし、微妙な小核誘発性を検出することの意義について考える必要があり、言い古された表現ではあるが、「統計学的有意性と生物学的有意性」について改めて考える必要が出てきた。ただし、統計解析の単位を細胞ではなく動物個体とすることで、個体間の差が明確になり、全体としての検出力はそれほど高まらないことが判明した (Asano et al., 2006)。

遺伝毒性全般の問題としては、評価と解釈に関する戦略の問題がある。これまでは遺伝毒性あり、なし、と定性的に評価してきたが、今後は暴露の評価も加味し、最終的にヒトのリスクとして考える必要がある。Sofuniらは、代表的な変異原についても、暴露証明はあるが突先変異が誘発されない濃度領域のあることを証明している (Sofuni et al., 2000)。暴露量、DNA修復機能等も十分考慮した評価を心がける必要がある。これは、ヒトの化学物質に対する暴露形態でもある、複合暴露を考える上でも重要事項である。今後は、EUのREACHに代表される動物愛護の観点も取り込んだ戦略が必要であり、ICH S2の改訂、OECDにおける毒性試験法ガイドライン等を注目する必要がある。

参 考 文 献

- Adler, I.-D., J. Bootman, J. Favor, G. Hook, G. Schriever-Schwemmer, G. Welzl, E. Whorton, I. Yoshimura and M. Hayashi (1998) Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis, *Mutat. Res.*, 417, 19-30.
- Asano, N., Y. Katsuma, H. Tamura, N. Higashikuni and M. Hayashi (1998) An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells, *Mutat. Res.*, 404, 149-154.
- Asano, N., Torous, DK., Tometsko, CR., Dertinger, SD., Morita, T., Hayashi, M. (2006) Practical threshold for micronucleated reticulocyte induction observed

- for low doses of mitomycin C, Ara-C and colchicine. *Mutagenesis*, 21, 15-20.
- CSGMT (1986) Sex difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 172, 151-163.
- CSGMT (1988) Strain difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 204, 307-316.
- CSGMT (1990) Single versus multiple dosing in the micronucleus test: the summary of the fourth collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS, *Mutat. Res.*, 234, 205-222.
- CSGMT (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS, *Mutat. Res.*, 278, 83-98.
- CSGMT (1995a) Individual data in the Results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/JEMS·MMS, *MMS Communications*, 3, 117-131
- CSGMT (1995b) Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, 153-159.
- Dertinger SD, Bishop ME, McNamee JP, Hayashi M, Suzuki T, Asano N, Nakajima M, Saito J, Moore M, Torous DK, Macgregor JT. (2006) Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicol Sci.*, 94, 83-91.
- Hamada, S., S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya, S. Ozawa, K. Kondo, M. Nakajima, H. Shimada, K. Osawa, Y. Kondo, N. Asano, S. Sato, H. Tamura, N. Yajima, R. Marshall, C. Moore, D.H. Blakey, L.M. Schechtman, J.L. Weaver, D.K. Torous, R. Proudlock, S. Ito, C. Namiki, and M. Hayashi (2001) Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day-treatment protocol: Summary of the 13th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS, *Environ. Mol. Mutagen.*, 37, 93-110.
- Hauschke, D., M. Hayashi, K.K. Lin, D.P. Lovell, W.D. Robinson, I. Yoshimura (1997) Recommendations for biostatistics of mutagenicity studies, *Drug. Inf. Jour.*, 31, 323-326.
- 林 (1991) 小核試験,サイエンティスト社
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, 120, 241-247.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1984) Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, *Mutat. Res.*, 127, 129-137.
- Hayashi, M., M. Yamazaki, Y. Kikuchi and M. Ishidate, Jr. (1985) Use of historical control data for assessing micronucleus test data (in Japanese), *Toxicol. Forum*, 8, 48-57.
- Hayashi, M., I. Yoshimura, T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1989a) A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 347-356.
- Hayashi, M., S. Sutou, H. Shimada, S. Sato, Y. F. Sasaki and A. Wakata (1989b) Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test: The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, *Mutat. Res.*, 223, 329-344.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T and Ishidate, M. Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides, *Mutat. Res.*, 245, 245-249.
- Hayashi, M., Norppa, H., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1992a) Flow cytometric micronucleus test with mouse peripheral erythrocytes, *Mutagenesis*, 7, 257-264.
- Hayashi, M., Norppa, H., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1992b) Mouse bone marrow micronucleus test using flow cytometry, *Mutagenesis*, 7, 251-256.
- Hayashi, M., T. Suzuki and T. Sofuni (1994a) The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction, *Environ. Mut. Res. Commun.*, 16, 67-77.
- Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Kirsh-Volders, M, Oleson, F.B., Pachierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994b) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.*, 312, 293-304.
- Hayashi, M., Hashimoto, S., Sakamoto, Y., Hamada, C., Sofuni, T. and Yoshimura, I. (1994c) Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environ. Health Perspect.*, 102 suppl. 1, 49-52.
- Hayashi, M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, I-D. Adler, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo and S. Sutou (2000) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 234-252.
- Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F.,

- Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, Ph. and MacGregor, J. T. (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, Present, and Future, *Env. Mol. Mutagen.*, 18, 277-291.
- Kirkland, D.J., M. Hayashi, J.T. MacGregor, L. Müller, L. Schechtman and T. Sofuni (2000) Summary of major conclusions from the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 162-166.
- Kirkland, D.J., M. Hayashi, J.T. MacGregor, L. Müller, L.M. Schechtman, and T. Sofuni (2003) Summary of major conclusions—the 3rd International Workshop on Genotoxicity Testing—, *Mutat. Res.*, 540, 123-125.
- Kohara, A., T. Suzuki, M. Honma, T. Ohwada, and M. Hayashi (2002a) Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaTMMouse), *Mutat. Res.*, 515, 63-72.
- Kohara, A., T. Suzuki, M. Honma, T. Oomori, T. Ohwada, and M. Hayashi (2002b) Dinitropyrenes induce gene mutations in multiple organs of the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaTMMouse), *Mutat. Res.*, 515, 73-83.
- MacGregor, J.T., C.M. Wehr and D.H. Could (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test, *Environ. Mutagen.*, 2, 509-514.
- Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y.F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A, and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS, *Mutat. Res.*, 389, 3-122.
- Müller, L., D. Blakey, K.L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. MacGregor, J.M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka, D. Tweats, and H. Yamasaki (2003) Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat. Res.*, 540, 177-181.
- Nishikawa, T., M. Haresaku, A. Fukushima, T. Nakamura, K. Adachi, M. Masuda and M. Hayashi (2001) Further evaluation of an in vivo micronucleus test on rat and mouse skin: results with five skin carcinogens, *Mutat. Res.*, 513, 93-102.
- Nishikawa, T., M. Haresaku, A. Fukushima, T. Nakamura, K. Adachi, M. Masuda, and M. Hayashi (2002) Further evaluation of an in vivo micronucleus test on rat and mouse skin: results with five skin carcinogens, *Mutat. Res.*, 513, 93-102.
- OECD. 1997. Guideline for the testing of chemicals. mammalian erythrocyte micronucleus test. Guideline 474, July, 1997.
- Ohyama, W., M. Gonda, H. Miyajima, K. Kondo, T. Noguchi, J. Yoshida, S. Hatkeyama, E. Watabe, Y. Ueno, M. Hayashi, and T. Tokumitsu (2002) Collaborative validation study of the in vivo micronucleus test using mouse colonic epithelial cells, *Mutat. Res.*, 518, 39-45.
- Sato, S., M. Taketomi, M. Nakajima, M. Kitazawa, H. Shimada, S. Ito, M. Igarashi, N. Higashikuni, S. Sutou, Y.F. Sasaki, M. Hayashi, T. Sofuni, T. Higashiguchi, S. Nito, Y. Kondo, S. Honda, M. Hayashi, Y. Shinagawa, E. Nakajima, Y. Oka, K. Shimoi, Y. Hokabe, A. Morita, N. Kinase, M. Takeuchi, H. Hirono, E. Yamamura and K. Tamai (1995) Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains: the results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/MMS, *Mutat. Res.*, 338, 51-57.
- Sofuni T, Hayashi M, Nohmi T, Matsuoka A, Yamada M, Kamata E. (2000) Semi-quantitative evaluation of genotoxic activity of chemical substances and evidence for a biological threshold of genotoxic activity. *Mutat Res.*, 464, 97-104.
- Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T. and Brian C. Myhr (1993) The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C in vivo using lacZ transgenic mice, *Mutat. Res.*, 285, 219-224.
- Suzuki, T., Hayashi, M. and T. Sofuni (1994) Initial experiences and future directions for transgenic mouse mutation assays, *Mutat. Res.*, 307, 489-494.
- Suzuki, T., M. Hayashi, B. Myhr and T. Sofuni (1995) Diethylnitrosamine is mutagenic in liver but not in bone marrow of lacZ transgenic mice (MutaTMMouse), *MMS Commun.*, 3, 33-39.
- Suzuki, H., T. Shirotori, and M. Hayashi (2004) A liver micronucleus assay using; young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation, *Cytogenet. Genome. Res.*, 104, 299-303.
- Tates AD., den Engelse L. (1989) The role of short-lived lesions in the induction of micronuclei in rat liver

by ethylnitrosourea and methyl methanesulphonate: the importance of experimental design. *Mutat Res.*, 210, 271-279.

Torous D, Asano N, Tometsko C, Sugunan S, Dertinger S, Morita T, Hayashi M. (2006) Performance of flow cytometric analysis for the micronucleus assay--a reconstruction model using serial dilutions of malaria-infected cells with normal mouse peripheral blood. *Mutagenesis*, 21, 11-3.

Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo and M. Hayashi (1998) Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: The summary of the 9th collaborative study by CSGMT/MMS•JEMS, *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 84-100.

Appendix 1

Tables of micronuclei assay results using liver, colon, and skin

[Specific tissue/organ] Chemical	MN in erythrocyte		MN in the specific tissue/organ	
	Result	Reference	Result	Reference
[Liver]				
2-Acetylaminofluorene	+	[1]	+/-	[2]; [3]; [4]; [5]
4-Acetylaminofluorene	-	[6]	-	[3]
Acrylamide	I	[7]	+	[8]
4-Aminobiphenyl	+	[7]	+	[9]
Amsacrine (<i>m</i> -AMSA)	+	[2]	+	[2]
<i>o</i> -Anthranilic acid	-	[6]	-	[5]
L-Ascorbic acid	-	[10]	-	[5]
Auramine O	-	[7]	+	[8]
Benzene	+	[1]	-	[2]; [11]
ϵ -Caprolactam	-	[10]	-	[5]
Carbon tetrachloride	-	[7]	-	[11]
Clofibrate			+	[8]
4-Chloro- <i>o</i> -phenylenediamine (CPDA)	+	[12]	-	[13]
Cyclophosphamide	+	[1]	+/-	[2]; [4]; [5]
2,4-Diaminotoluene	I	[7]	+	[5]
Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)	-	[7]	-	[13]
Diethylnitrosamine	-	[7]	+	[14]; [15]; [9]; [2]; [4]; [16]
<i>p</i> -Dimethylamino-azobenzene (DAB)	-	[7]	+	[13]
4-Dimethylamino-3'-methylazobenzene	-	[2]	+	[2]
6-Dimethylaminophenylazobenzothiazole	-		+	[3]
7,12-Dimethylbenz[<i>a</i>]anthracene	+	[1]	-	[4]
Dimethylnitrosamine	+	[1]	+	[13]; [14]; [15]; [9]; [8]; [3]
	-/+	[17]; [18]		
1,1-Dimethylhydrazine	+	[7]	+	[9]; [5]
1,2-Dimethylhydrazine	+	[7]	+	[3]
2,4-Dinitrotoluene	-	[19]	+	[5]
1,4-Dioxane	I/-	[7]; [20]	+	[20]
Ethylmethanesulfonate	+	[1]	-	[21]
Ethylnitrosourea	+	[1]	+	[15]; [2]
5-Fluorouracil	+	[1]	+	[2]
Kojic acid	+	[13]	-	[13]
D-Mannitol	-	[10]	-	[5]
Methoxychlor	-	[5]	-	[5]
4,4'-Methylenedianiline (MDA)	-	[13]	-	[13]
Methylmethanesulfonate	+	[1]	-	[13]; [15]
Mitomycin C	+	[1]	+	[2]; [4]; [5]
2-Nitrofluorene	-	[4]	+	[4]
<i>N</i> -Nitrosomorpholine	+	[7]	+	[22]

Phenazopyridine hydrochloride	+	[7]	+	[5]
Potassium chromate (IV) (K ₂ CrO ₄)	+	[1]	+	[2]
β-Propiolactone	-	[7]	+	[9]
4-N-Pyrrolidinylazobenzene			-	[3]
Quinoline	I	[13]	+	[13]
Selenious acid (H ₂ SeO ₃)	+	[2]	+	[2]
Styrene oxide	-	[7]	+	[8]
<i>o</i> -Toluidine	+	[13]	-	[13]
[Colon epithelium]				
Carbendazim	+	[23]; [24]; [25]	+	[26]
	-	[26]		
Colchicine	+	[1]; [26]; [27]; [28]; [29]; [30]	+	[26]
Cyclophosphamide	+	[1]; [28]; [31]; [32]	+	[32]
1,2-Dimethylhydrazine	+	[7]	+	[34]; [26]; [32]; [35]; [36]; [33]
	-	[26]; [31]; [32]; [33]		
Griseofulvin	-	[7]; [26]	+	[26]
Methylnitrosourea	+	[7]	+	[34]
Mitomycin C	+	[1]; [28];	+	[34]
Tubulazole	+	[26]; [28]; [30]	+	[26]
[Skin]				
Acetone	-	[37]	-*	[38]; [39]
			-	[40]
2-acetylaminofluorene (2-AAF)	+	[41]	+	[42]
Anthracene			-	[43]
Benz[<i>a</i>]anthracene	I	[7]	+	[43]
Benzene (BEN)	+	[1]	-	[42]
Benzo[<i>a</i>]pyrene	+	[1]	+	[44]; [38]; [43]; [45]
Benzo[<i>e</i>]pyrene			-	[43]
Catechol	+	[46]	-	[42]
Chrysene			+	[38]
			-	[43]
Clinafloxacin(CLFX) + UVA			+	(oral) [47]
Colchicine (COL)	+	[1]	+	[42]
Cyclophosphamide	+	[1]	-	[42]
			+	[48]
Dibenz[<i>a,c</i>]anthracene			+	[43]
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	+	[7]	+	[43]
Dichlorvos	-	[7]	+	[49]
Diethylstilbesterol (DES)	-	[1]	-	[42]
15,16-Dihydrocyclopenta[<i>a</i>]- phenanthrene-17-one			-	[45]
15,16-Dihydro-11-methylcyclo- penta[<i>a</i>]phenanthrene-17-one			+	[45]
7,12-Dimethylbenz[<i>a</i>]anthracene	+	[1]	+	[38]; [39]; [50]
			+	[44]; [43];
1,2-Dimethyl Hydrazine dihydro- chloride	+	[7]	+	[42]
17-β-Estradiol	-	[7]	-	[42]

2-Ethyl-1,3-hexanediol			-	[48]
<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine(ENNG)	+	[51]	+	[44]; [48]
5-Fluorouracil (5-FU)	+	[1]	+	[42]
Hydrazine HCl (HDZ)	+	[7]	-	[42]
Hydroquinone	+	[46]	-	[42]
<i>o</i> -Hydroxybiphenyl			-	[42]
Levofloxacin(LVFX) + UVA			-(oral)	[47]
Lomefloxacin(LFLX) + UVA			+(oral)	[47]
6-Mercaptopurine	+	[1]	+	[42]
3-Methylcholanthrene			+	[43]
Methyl methanesulfonate	+	[1]	+*	[39]
			+	[40]; [42]
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (MNNG)	+	[1]	+	[44]
Mitomycin C	+	[1]	+	[40]; [48]
Nickel chloride (NiCl ₂)	-	[7]	I	[42]
<i>p</i> -Nitrophenol			-	[48]
4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO)	+	[52]	+	[44]
<i>N</i> -Nitrosodiethylamine (DEN)	-	[7]	-	[42]
	+(Liver)	[16]		
Pyrene			-	[38]; [43]
TPA			-	[39]
TPA+mezerin			+	[53]
Trichloroethylene			-	[48]
Triethylenemelamine	+	[1]	+	[54]
Urethane	+	[1]	+	[38]
Vinblastine	+	[55]	+	[42]; [48]

Abbreviations:

TPA; Phorbol-12-myristate-13-acetate

+: positive, -: negative, I: inconclusive (i.e., there were contradictory results from different laboratories).

*: in vivo/in vitro method

Appendix 2

Tables of micronuclei assay results on spermatids

Compound	Method ^a	Species tested ^b	No. of doses	No. of animals	No. of SPD/ animal	Stages tested	Results	Ref.						
Acrylamide	S	M	3	4-5	1000-2000	diakinesis-MI/MII diff.SPG-preleptotene	- +	[56]						
Acrylamide	D	R	3	5	2000	diplotene diakinesis late pachytene preleptotene	- - +	[57]						
Acrylamide	S	R	3	5	1000	Diakinesis diplotene diff.SPG/preleptotene	- - +	[58]						
Butadiene	S	M	3	5	2000	late meiotic prophase diff. SPG/prelept./ early prophase	- +	[59]						
Butadiene	S	M	3	3-5	1000	late meiotic prophase prelept./ early prophase diff. SPG/preleptotene	- - +	[60]						
Butadiene diolepoxide	D	R	2	4-5	2000	diplotene diakinesis late pachytene preleptotene	+ + +	[61]						
Carbendazim	D	Rat	3	6	1500	Stage I	+	[62]						
						Stage V	+							
						Stage VII	-							
Chloral hydrate	S	M	3	5	1000	diakinesis-MI leptotene-zygotene preleptotene stem cell SPG	- - + +	[63]						
						S	M		1	2-3	2000	Pachytene-diakinesis	-	[64]
												Preleptoten	-	
Stem cell SPG	+													
1,2,3,4- diepoxybutane	S	M	2	5	2000	diakinesis/ meiotic divisions diff. SPG/preleptotene	+ +	[65]						
1,2,3,4- diepoxybutane	S	M	2	4-5	1000	Diakinesis diplotene zygotene diff. SPG-preleptotene	- + - -	[60]						
1,2,3,4- diepoxybutane	D	R	2	4-5	2000	diplotene diakinesis late pachytene preleptotene stem cell SPG	+ - + +	[61]						
1,2,3,4- diepoxybutane	S	R	4	4-5	1000	Diakinesis diplotene zygotene diff.SPG-preleptotene	- + + +	[60]						
3,4- epoxybutene	S	M	3	5	2000	diakinesis/MI/MII diff. SPG/preleptotene	- +	[65]						
3,4- epoxybutene	S	M	2	5	1000	Diakinesis diplotene diff. SPG-preleptotene	- - +	[60]						

3,4-epoxybutene	D	R	5	4-5	2000	diplotene diakinesis late pachytene preleptotene stem cell SPG	+ + + -	[61]
3,4-epoxybutene	S	R	2	4-5	1000	Diakinesis diplotene diff. SPG-preleptotene	+ + +	[60]
Etoposide	D	R	2	2-5	1000	diplotene diakinesis late pachytene preleptotene	+ + +	[57]
	D	M	1	3	1000	Diplo-tene-diakinesis	+	[66]
Merbarone	D	M	2	3	1000	Diplo-tene-diakinesis (CREST)	+	[66]
						Prometaphase-MI	-	
						Prometaphase-MII	-	
Potassium bromate	S	Mouse	3	10	2000	Spermatogonial stem cells – spermatogonia/ spermatocytes	-	[67]
Trichloroethylene	S	M	3	6	1000	preleptotene-early pachytene	+	[63]
Trophosphamide	S	M	2	4-5	1000	diakinesis/MI/MII diff.SP-G-preleptotene	- +	[68]
Trophosphamide	D	R	2	5	2000	diplo.diak. late pachytene preleptotene	+ + +	[69]
Merbarone	D	Mouse	2	3	1000	Diplo-tene-diakinesis	+	[66] ^c
						Prometaphase-MI	-	
						Prometaphase-MII	-	
VP-16	D	Mouse	1	3	1000	Diplo-tene-diakinesis	+	[66] ^c
Carbendazim	D	Rat	3	6	1500	Stage I	+	[62] ^c
						Stage V	+	
						Stage VII	-	
Potassium bromate	S	Mouse	3	10	2000	Spermatogonial stem cells – spermatogonia/spermatocytes	-	[67] ^d
Chloral hydrate	S	Mouse	1	2-3	2000	Pachytene-diakinesis	-	[70] ^e
						Preleptoten	-	
						Stem cell SPG	+	

a: S: suspension method, D: dissection method

b: M: mouse, R: rat

c: CREST staining

d: In drinking water for 8 weeks, anti-kinetochore FISH

e: CREST and FISH

References for Appendices

- [1] CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMSMMS, *Mutat. Res.* 278 (1992) 83-98.
- [2] M. Igarashi, H. Shimada, An improved method for the mouse liver micronucleus test, *Mutat. Res.* 391 (1997) 49-55.
- [3] I. Braithwaite, J. Ashby, A non-invasive micronucleus assay in the rat liver, *Mutat. Res.* 203 (1988) 23-32.
- [4] J.W. Parton, M.L. Garriott, An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using four-week-old rats treated with known clastogens *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (1997) 379-385.
- [5] T. Shirotori, M. Miyagawa, Early detection of liver carcinogens by hepatocytes micronucleus test with juvenile/young rats, Proceeding of the 26th JEMS Annual Meeting, Hatano (1997) p. 83, Abstract.
- [6] A.F. McFee, P.P. Jauhar, K.W. Lowe, J.T. MacGregor, C.M. Wehr, Assay of three carcinogen/non-carcinogen chemical pairs for *in vivo* induction of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 14 (1989) 207-220.
- [7] T. Morita, N. Asano, T. Awogi, Y. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni, M. Hayashi, Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens. Groups 1, 2A and 2B. The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMSMMS, *Mutat. Res.* 389 (1997) 3-122 [Erratum: *Mutat. Res.* 391 (1997) 259-267].
- [8] CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test), Usefulness of mouse liver micronucleus assay, Proceeding of the 25th JEMS Annual Meeting, Tokyo (1996) p.103, Abstract.
- [9] I. Cllet, E. Fournier, C. Melcion, A. Cordier, *In vivo* micronucleus test using mouse hepatocytes, *Mutat. Res.* 216 (1989) 321-326.
- [10] M.D. Shelby, G.L. Erexson, G.L. Hook, R.R. Tice, Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: Results with 49 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.* 21 (1993) 160-179.
- [11] T. Shirotori, M. Miyagawa, Induction of tissue specific micronucleated hepatocytes by liver carcinogens which are positive in *in vitro* chromosomal aberration test, Proceeding of the 27th JEMS Annual Meeting, Osaka (1998) p. 80, Abstract.
- [12] A. Wakata, Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo, M. Hayashi, Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS•MMS, *Environ. Mol. Mutagen.* 32 (1998) 84-100.
- [13] H. Suzuki, N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka, M. Hayashi, Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSMGT)/ Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Mutat. Res.* 583 (2005) 133-145.
- [14] A.D. Tates, I. Neuteboom, M. Hofker, L. den Engelse, A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*, *Mutat. Res.* 74 (1980) 1-20.
- [15] A.D. Tates, I. Neuteboom, A.H. Rotteveel, N. de Vogel, G.J. Menkveld, L. den Engelse, Persistence of preclastogenic damage in hepatocytes of rats exposed to ethylnitrosourea, diethylnitrosamine, dimethylnitrosamine and methyl methanesulphonate. Correlation with DNA O-alkylation, *Carcinogenesis* 7 (1986) 1053-1058.
- [16] H. Suzuki, T. Shirotori, M. Hayashi, A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation, *Cytogenet. Genome Res.* 104 (2004) 299-303.
- [17] T. Suzuki, T. Itoh, M. Hayashi, Y. Nishikawa, F. Furukawa, M. Takahashi, T. Sofuni, Organ variation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue mice, *Environ. Mol. Mutagen.* 28 (1996) 348-353.
- [18] D. Janssen, C. Ramel, Factors affecting the induction of micronuclei at low doses of X-rays, MMS and dimethylnitrosamine in mouse erythroblasts, *Mutat. Res.* 58 (1978) 51-65.
- [19] J. Ashby, B. Burlinson, P.A. Lefevre, J. Topham, Non-genotoxicity of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) to the mouse bone marrow and the rat liver: implications for its carcinogenicity, *Arch. Toxicol.* 58 (1985) 14-19.
- [20] T. Morita, M. Hayashi, 1,4-Dioxane is not mutagenic in five *in vitro* assays and mouse peripheral blood micronucleus assay, but is in mouse liver micronucleus assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 32 (1998) 269-280.
- [21] A.D. Tates, I. Neuteboom, N. de Vogel, L. den Engelse, The induction of chromosomal damage in

- rat hepatocytes and lymphocytes, I. Time-dependent changes of the clastogenic effects of diethylnitrosamine, dimethylnitrosamine and ethylmethanesulfonate, *Mutat. Res.* 107 (1983) 131-151.
- [22] J. Ashby, P.A. Lefevre, The rat-liver carcinogen N-nitrosomorpholine initiates unscheduled DNA synthesis and induces micronuclei in the rat liver in vivo, *Mutat. Res.* 225 (1989) 143-147.
- [23] J.P. Seiler, The Mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. IV. Cytogenetic effects of benzimidazole derivatives in the bone marrow of the mouse and Chinese hamster, *Mutat. Res.* 40 (1976) 339-347.
- [24] A.M. Sarraf, K.S. Bentley, L.J. Fu, R.M. O'Neil, V.L. Reynolds, R.G. Stahl, Evaluation of benomyl and carbendazim in the in vivo aneuploidy/micronucleus assay in BDF1 mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 310 (1994) 143-149.
- [25] R. Barale, C. Scapoli, C. Meli, D. Casini, M. Minunni, A. Marrazzini, N. Loprieno, I. Barrai, Cytogenetic effects of benzimidazoles in mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 300 (1993) 15-28.
- [26] A. Vanhauwaert, P. Vanparys, M. Kirsch-Volders, The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage, *Mutagenesis* 16 (2001) 39-50.
- [27] N. Asano, T. Morita, Y. Watanabe, Micronucleus test with colchicine given by intraperitoneal injection and oral gavage, *Mutat. Res.* 223 (1989) 391-394.
- [28] P. Vanparys, F. Vermeiren, M. Sysmans, R. Temmerman, The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity, *Mutat. Res.* 244 (1990) 95-103.
- [29] I.D. Adler, U. Kliesh, P. van Hummelen, M. Kirsch-Volders, Mouse micronucleus test with known and suspect spindle poisons: results from two laboratories, *Mutagenesis* 6 (1991) 47-53.
- [30] P. Van Hummelen, A. Deleener, P. Vanparys, M. Kirsch-Volders, Discrimination of aneuploidogens from clastogens by C-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrow, *Mutat. Res.* 271 (1992) 13-28.
- [31] R.J. Trzos, G.L. Petzold, M.N. Brunden, J.A. Swenberg, The evaluation of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test, *Mutat. Res.* 58 (1978) 79-86.
- [32] M.T. Goldberg, D.H. Blakey, W.R. Bruce, Comparison of the effects of 1,2-dimethylhydrazine and cyclophosphamide on micronucleus incidence in bone marrow and colon, *Mutat. Res.* 109 (1983) 91-98.
- [33] V.S. Zhurkov, L.P. Sycheva, O. Salamatova, I.F. Vyskubenko, E.G. Feldt, N.I. Sherenesheva, Selective induction of micronuclei in the rat/mouse colon and liver by 1,2-dimethylhydrazine: a seven-tissue comparative study, *Mutat. Res.* 368 (1996) 115-120.
- [34] W. Ohyama, M. Gonda, H. Miyajima, K. Kondo, T. Noguchi, J. Yoshida, S. Hatakeyama, E. Watabe, Y. Ueno, M. Hayashi, T. Tokumitsu, Collaborative validation study of the in vivo micronucleus test using mouse colonic epithelial cells, *Mutat. Res.* 518 (2002) 39-45.
- [35] M.T. Goldberg, R.N. Schop, Assessment of 1,2-dimethylhydrazine in bone marrow micronucleus assay: Variations in protocol and response, *Environ. Mol. Mutagen.* 17 (1991) 155-162.
- [36] W. Ohyama, T. Tokumitsu, An in vivo micronucleus test using colonic epithelial cells of mice, *Environ. Mutagen. Res. Commun.* 17 (1996) 265-269 (in Japanese).
- [37] A. Basler, Aneuploidy-inducing chemicals in yeast evaluated by the micronucleus test, *Mutat. Res.* 174 (1986) 11-13.
- [38] S.L. He, R. Baker, Micronuclei in mouse skin cells following in vivo exposure to benzo[a]pyrene, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, chrysene, pyrene and urethane, *Environ. Mol. Mutagen.* 17 (1991) 163-168.
- [39] S. Haesen, M. Timmermans, M. Kirsch-Volders, Induction of micronuclei and karyotype aberrations during in vivo mouse skin carcinogens, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2319-2327.
- [40] T. Nishikawa, M. Haresaku, K. Adachi, M. Masuda, M. Hayashi, Study of a rat skin in vivo micronucleus test: data generated by mitomycin C and methyl methanesulfonate, *Mutat. Res.* 444 (1999) 159-166.
- [41] N. Asano, T. Hagiwara, The mouse peripheral blood micronucleus test with 2-acetylaminofluorene using the acridine orange supravital staining method, *Mutat. Res.* 278 (1992) 153-157.
- [42] N. Asano et al. (personal communication)
- [43] T. Nishikawa, T. Nakamura, A. Fukushima, Y. Takagi, Further evaluation of the skin micronucleus test: Results obtained using 10 polycyclic aromatic hydrocarbons, *Mutat. Res.* 588 (2005) 58-63.
- [44] T. Nishikawa, M. Hasekura, A. Fukushima, T. Nakamura, K. Adachi, M. Masuda, M. Hayashi, Further evaluation of an in vivo micronucleus test on rat and mouse skin: results with five skin carcinogens, *Mutat. Res.* 513 (2002) 93-102.
- [45] R.S. Baker, A.M. Bonin, A. Arlauskas, S. He, M.M.

- Coombs, Tumorigenicity of cyclopenta[a]phenanthrene derivatives and micronucleus induction in mouse skin, *Carcinogenesis* 13 (1992) 329-332.
- [46] R. Ciranni, R. Barale, G. Ghelardini, N. Loprieno, Benzene and the genotoxicity of its metabolites. II. The effect of the route of administration on the micronuclei and bone marrow depression in mouse bone marrow cells, *Mutat. Res.* 209 (1988) 23-28.
- [47] S. Itoh, M. Katoh, K. Furuhashi, *In vivo* photochemical micronucleus induction due to certain quinolone antimicrobial agents in the skin of hairless mice, *Mutat. Res.* 520 (2002) 133-139.
- [48] Gibson et al., (personal communication)
- [49] A. Tungul, A.M. Bonin, S. He, R.S. Baker, Micronuclei induction by dichlorvos in the mouse skin, *Mutagenesis* 6 (1991) 405-408.
- [50] H.H. Steinell, A.N. Bonin, S. He, R.S. Baker, Cytogenetic damage and tumor incidence in mouse skin after single, topical applications of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Mutat. Res.* 285 (1993) 19-26.
- [51] A.O. Asita, M. Hayashi, Y. Kodama, A. Matsuoka, T. Suzuki, T. Sofuni, Micronucleated reticulocyte induction by ethylating agents in mice, *Mutat. Res.* 271 (1992) 29-37.
- [52] M. Nakajima, M. Kikuchi, K. Saeki, Y. Miyata, M. Terada, F. Kishida, R. Yamamoto, C. Furihata, S.W. Dean, Mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide in the Muta™ Mouse, *Mutat. Res.* 444 (1999) 321-336.
- [53] H.H. Steinell, A.M. Bonin, K. Meher-Homji, R.S. Baker, Skin carcinomas and micronucleus induction in epidermal keratinocytes following 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and mezerein treatment, *Mutagenesis* 7 (1992) 199-203.
- [54] S.L. He, R.S. Baker, Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cells, *Environ. Mol. Mutagen.* 14 (1989) 1-5.
- [55] J. Maki-Paakkanen, M. Hayashi, T. Suzuki, H. Tanabe, M. Honma, T. Sofuni, Analysis by fluorescence in situ hybridization with a mouse gamma satellite DNA probe of isolated micronuclei induced in mice by two clastogens and two spindle poisons, *Mutagenesis* 10 (1995) 513-516.
- [56] A. Russo, G. Gabbani, B. Simoncini, Weak genotoxicity of acrylamide on premeiotic, somatic cells of the mouse, *Mutat. Res.* 309 (1994) 263-272.
- [57] J. Lähdetie, A. Keisi, A. Suutari, J. Toppari, Etoposide (VP-16) is a potent inducer of micronuclei in male rat meiosis: spermatid micronucleus test and DNA flow cytometry after etoposide treatment, *Environ. Mol. Mutagen.* 24 (1994) 192-202.
- [58] Y. Xiao, A.D. Tate, Increased frequencies of micronuclei in early spermatids of rats following exposure of young primary spermatocytes to acrylamide, *Mutat. Res.* 309 (1994) 245-254.
- [59] A.M. Tommasi, S. de Conti, M. Dobrzynska, A. Russo, Evaluation and characterization of micronuclei in early spermatids of mice exposed to 1,3-butadiene, *Mutat. Res.* 397 (1998) 45-54.
- [60] Y. Xiao, A.D. Tate, Clastogenic effects of 1,3-butadiene and its metabolites 1,2-epoxybutene and 1,2,3,4-diepoxbutane in splenocytes and germ cells of rats and mice *in vivo*, *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1995) 97-108.
- [61] J. Lähdetie, K. Peltonen, T. Sjöblom, Germ cell mutagenicity of three metabolites of 1,3-butadiene in the rat: induction of spermatid micronuclei by butadiene mono-, di-, diepoxyoxides *in vivo*, *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (1997) 230-239.
- [62] F. Matsuo, M. Nakai, T. Nasu, The fungicide carbendazim induces meiotic micronuclei in the spermatids of the rat testis, *J. Vet. Med. Sci.*;61 (1999) 573-576.
- [63] J.W. Allen, B.W. Collins, P.A. Evansky, Spermatid micronucleus analyses of trichloroethylene, chloral hydrate effects in mice, *Mutat. Res.* 323 (1994) 81-88.
- [64] E.V. Nutley, A.C. Tcheong, J.W. Allen, B.W. Collins, M. Ma, X. Lowe, J.B. Bishop, D.H. Moore, A.J. Wyrobek, Micronuclei induced in round spermatids of mice after stem-cell treatment with chloral hydrate: evaluations with centromeric DNA probes and Kinetochore antibodies, *Environ. Mol. Mutagen.* 28 (1996) 80-89.
- [65] A. Russo, C. Nogara, L. Renzi, A.M. Tommasi, Micronucleus induction in germ and somatic cells of the mouse after exposure to the butadiene metabolites diepoxybutane and epoxybutene, *Mutat. Res.* 390 (1997) 129-139.
- [66] M. Kallio, J. Lähdetie, Effects of the DNA topoisomerase II inhibitor merbarone in male mouse meiotic divisions *in vivo*: cell cycle arrest, induction of aneuploidy, *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (1997) 16-27.
- [67] J.W. Allen, B.W. Collins, A. Lori, A.J. Afshari, M.H. George, A.B. DeAngelo, J.C. Fuscoe, Erythrocyte and spermatid micronucleus analyses in mice chronically exposed to potassium bromate in drinking water, *Environ. Mol. Mutagen.* 36 (2000) 250-253.
- [68] C. Tiveron, A. Russo, B. Bassani, F. Pacchierotti, Genotoxicity of trophosphamide in mouse germ cells:

assessment of micronuclei in spermatids and chromosome aberrations in one-cell zygotes, *Mutagenesis* 11 (1996) 125-130.

[69] A. West, A. Suutari, J. Lähdetie, Detection of germ cell mutagenicity of trophosphamide by the spermatid micronucleus test in the rat, *Mutagenesis* 10 (1995) 287-290.

[70] E.V. Nutley, A.C. Tcheong, J.W. Allen, B.W. Collins, M. Ma, X.R. Lowe, J.B. Bishop, D.H. Moore, II, A.J. Wyrobek, Micronuclei induced in round spermatids of mice after stem-cell treatment with chloral hydrate: Evaluations with centromeric DNA probes and kinetochore antibodies, *Environ. Mol. Mutagen.* 28 (1996) 80-89.