

Table 2  
Results of the liver micronucleus assay

Chemical and dose (mg/kg)	No. of animals	Sampling time (days)	MNHEP (%) mean $\pm$ S.D.	Mitotic cell (%) mean $\pm$ S.D.
<b>MDA</b>				
Lab 1				
0	4	5	0.11 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.35
200	4	3	0.14 $\pm$ 0.11	0.23 $\pm$ 0.10
	4	4	0.19 $\pm$ 0.13	1.35 $\pm$ 0.94
	4	5	0.16 $\pm$ 0.09	0.73 $\pm$ 0.49
	4	3	0.10 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.18
300	3	4	0.08 $\pm$ 0.10	0.43 $\pm$ 0.40
	4	5	0.10 $\pm$ 0.09	0.50 $\pm$ 0.19
	2	3	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.11
400	2	4	0.20 $\pm$ 0.14	0.28 $\pm$ 0.32
	3	5	0.18 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.13
	4	5	1.21 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	0.25 $\pm$ 0.12
Lab 2				
0	4	5	0.00 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.09
150	4	3	0.00 $\pm$ 0.00	0.18 $\pm$ 0.12
	4	4	0.05 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.12
	4	5	0.03 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00
	3	3	0.10 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.13
300	3	4	0.02 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.03
	4	5	0.08 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.03
	4	5	0.44 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.09
DEN*				
Lab 2				
0	4	5	0.06 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.26
1000	4	3	0.06 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.43
	4	4	0.06 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.25
	4	5	0.08 $\pm$ 0.05	1.56 $\pm$ 0.14
	4	3	0.04 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.13
2000	4	4	0.08 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.35
	4	5	0.09 $\pm$ 0.08	1.04 $\pm$ 0.29
	4	5	0.66 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup>	0.65 $\pm$ 0.31
DEN*				
Lab 2				
0	5	5	0.07 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.22
1000	5	3	0.04 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.23
	5	4	0.10 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.17
	5	5	0.11 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.06
	5	3	0.08 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.21
2000	5	4	0.07 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.08
	5	5	0.05 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.12
	5	5	1.04 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>	0.95 $\pm$ 0.08
DEN*				
Quinoline				
Lab 1				
0	4	5	0.09 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.33
75	4	3	0.16 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.10
	4	4	0.39 $\pm$ 0.20 <sup>d</sup>	0.15 $\pm$ 0.07
	4	5	0.20 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.27

Table 2 (Continued)

Chemical and dose (mg/kg)	No. of animals	Sampling time (days)	MNHEP (%) mean $\pm$ S.D.	Mitotic cell (%) mean $\pm$ S.D.
150	4	3	0.58 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.21
	4	4	0.33 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.15
	4	5	0.35 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.16
	DEN*	4	5	0.21 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
Lab 2				
0	5	5	0.03 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.10
75	5	3	0.36 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.12
	5	4	0.22 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.10
	5	5	0.12 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.10
150	5	3	1.22 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.06
	5	4	0.93 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.15
	5	5	0.61 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.06
DEN*	5	5	0.84 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.10
<i>o</i> -Toluidine				
Lab 1				
0	4	5	0.05 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.09
300	4	3	0.10 $\pm$ 0.07	0.16 $\pm$ 0.20
	4	4	0.10 $\pm$ 0.09	0.09 $\pm$ 0.05
	4	5	0.11 $\pm$ 0.10	0.40 $\pm$ 0.37
	4	3	0.05 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.17
600	4	4	0.06 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.06
	4	5	0.01 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.08
	DEN*	4	5	0.85 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
Lab 2				
0	4	5	0.04 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.30
300	4	3	0.04 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.06
	4	4	0.05 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.17
	4	5	0.08 $\pm$ 0.12	0.66 $\pm$ 0.36
	4	3	0.04 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.18
600	4	4	0.04 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.14
	4	5	0.01 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.26
	DEN*	4	5	0.68 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
CPDA				
Lab 1				
0	4	5	0.11 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.13
150	4	3	0.11 $\pm$ 0.13	0.10 $\pm$ 0.07
	4	4	0.20 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.09
	4	5	0.15 $\pm$ 0.16	0.46 $\pm$ 0.42
	4	3	0.21 $\pm$ 0.09	0.01 $\pm$ 0.03
300	4	4	0.21 $\pm$ 0.13	0.04 $\pm$ 0.03
	4	5	0.23 $\pm$ 0.13	0.09 $\pm$ 0.12
	DEN*	4	5	0.88 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>
Lab 2				
0	4	5	0.09 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.09
150	4	3	0.05 $\pm$ 0.00	0.48 $\pm$ 0.09
	4	4	0.08 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.09
	4	5	0.06 $\pm$ 0.05	0.76 $\pm$ 0.27

Table 2 (Continued)

Chemical and dose (mg/kg)	No. of animals	Sampling time (days)	MNHEP (%) mean $\pm$ S.D.	Mitotic cell (%) mean $\pm$ S.D.
300	4	3	0.06 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.09
	4	4	0.04 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.12
	4	5	0.10 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.20
DEN*	4	5	0.68 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.13
<b>DMN</b>				
Lab 1				
0	4	5	0.04 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.30
	4	3	0.36 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.03 $\pm$ 0.12
5	4	4	0.35 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.44
	4	5	0.33 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.27
	4	3	0.31 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.27
	4	4	0.51 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.10
10	4	5	0.36 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.86 $\pm$ 0.17
	4	5	1.04 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.18
	4	5	1.04 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.18
DEN*	4	5	1.04 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.18
Lab 2				
0	4	5	0.05 $\pm$ 0.00	0.78 $\pm$ 0.43
	4	3	0.15 $\pm$ 0.07	0.38 $\pm$ 0.23
5	4	4	0.34 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.20
	4	5	0.36 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	0.73 $\pm$ 0.27
	4	3	0.26 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.36
	4	4	0.51 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.22
10	4	5	0.46 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.27
	4	5	0.86 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.33
	4	5	0.86 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.33
DEN*	4	5	0.86 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.33
<b>DAB</b>				
Lab 1				
0	4	5	0.03 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.07
	4	3	0.19 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.15
71	4	4	0.11 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.23 $\pm$ 0.13
	4	5	0.08 $\pm$ 0.10	0.44 $\pm$ 0.10
	4	3	0.35 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.10
	4	4	0.16 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.03
142	4	5	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.12
	4	5	0.63 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.18
	4	5	0.63 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.18
DEN*	4	5	0.63 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.18
Lab 2				
0	4	5	0.19 $\pm$ 0.11	0.19 $\pm$ 0.18
	4	3	0.36 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.17
120	4	4	0.48 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.12
	4	5	0.61 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.12
	4	3	0.25 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.21
	4	4	0.41 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.36 $\pm$ 0.16
240	4	5	0.38 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.44 $\pm$ 0.19
	4	5	0.95 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.05
	4	5	0.95 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.05
DEN*	3	5	0.95 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.05
<b>DEHP</b>				
Lab 1				
0	4	5	0.05 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.19
	4	3	0.05 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.46
1000	4	4	0.05 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.08
	4	5	0.06 $\pm$ 0.09	0.43 $\pm$ 0.10

Table 2 (Continued)

Chemical and dose (mg/kg)	No. of animals	Sampling time (days)	MNHEP (%) mean $\pm$ S.D.	Mitotic cell (%) mean $\pm$ S.D.
2000	4	3	0.04 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.49
	4	4	0.05 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.10
	4	5	0.05 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.34
	DEN*	4	5	1.66 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
Lab 2				
0	4	5	0.08 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.36
1000	4	3	0.04 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.06
	4	4	0.09 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.47
	4	5	0.06 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.06
2000	4	3	0.09 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.16
	4	4	0.09 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.06
	4	5	0.09 $\pm$ 0.09	0.28 $\pm$ 0.17
DEN*	4	5	0.98 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.16
MMS				
Lab 1				
0	4	5	0.05 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.34
40	4	3	0.08 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.30
	4	4	0.01 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.21
	4	5	0.04 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.40
	4	5	0.04 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.40
80	4	3	0.11 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.24
	4	4	0.11 $\pm$ 0.08	0.58 $\pm$ 0.40
	4	5	0.08 $\pm$ 0.05	0.80 $\pm$ 0.41
DEN*	4	5	0.88 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.42

MDA, 4,4'-methylenedianiline; DEN\*, diethylnitrosamine (as a positive control, 40 mg/kg); CPDA, 4-chloro-*o*-phenylenediamine; DMN, dimethylnitrosamine; DAB, *p*-dimethylaminoazobenzene; DEHP, di (2-ethylhexyl) phthalate; MMS, methylmethanesulfonate.

<sup>a</sup> Significantly different from the solvent control (Kastenbaum and Bowman test;  $P < 0.01$ ).

<sup>b</sup> Significantly different from the solvent control (Kastenbaum and Bowman test;  $P < 0.05$ ).

laboratories. Deaths occurred at 400 mg/kg of MDA in sampling groups as follows: two animals on Day 3, two on Day 4, and one on Day 5. Thus, the positive response in samples harvested on Day 3 was based on only two animals. At 300 mg/kg of MDA, one animal died on Day 4. MDA was negative at 300 mg/kg in each sampling day. The other five chemicals were negative.

The appearance of mitotic cells was confirmed in all laboratories with all chemicals.

### 3.2. Peripheral blood micronucleus assay

Table 3 shows the results of the peripheral blood micronucleus assay. Kojic acid, *o*-toluidine, and DAB were positive in both laboratories, MMS in the one that tested it. Quinoline was positive in one of the two laboratories. CPDA was significantly cytotoxic, decreasing the % RET in both laboratories.

## 4. Discussion

We conducted the liver and peripheral blood micronucleus assays concurrently in young rats with nine mutagenic and/or carcinogenic chemicals. Table 4 compares the data generated in this collaboration with published bone marrow and hepatocarcinogenicity data.

The mean incidence of MNHEPs (%) for 70 rats in the solvent control groups was  $0.07 \pm 0.06\%$ . This low incidence suggests the robustness of the assay.

Quinoline, DMN and DAB were positive in the liver micronucleus assay. The MNHEP (%) induced by 150 mg/kg quinoline tended to decrease with sampling time in both labs. This may have been due to inhibition of hepatocyte proliferation, as evidenced by the decrease in mitotic cells. The same may be applicable to DAB at 142 mg/kg. Although a statistically significant increase in MNHEP (%) was induced by 400 mg/kg

Table 3  
Results of the peripheral blood micronucleus assay

Chemical and dose (mg/kg)	No. of animals	MNRET (%) mean $\pm$ S.D.	RET (%) mean $\pm$ S.D.
<b>MDA</b>			
Lab 1			
0	4	0.06 $\pm$ 0.06	14.0 $\pm$ 1.3
200	4	0.09 $\pm$ 0.03	11.6 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>
400	3	0.15 $\pm$ 0.05	14.4 $\pm$ 3.3
DEN*	4	0.05 $\pm$ 0.04	13.0 $\pm$ 1.7
CP**	4	0.73 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>
Lab 2			
0	4	0.04 $\pm$ 0.03	
150	4	0.13 $\pm$ 0.03	
300	4	0.09 $\pm$ 0.08	NT
DEN*	4	0.01 $\pm$ 0.03	
CP**	4	0.93 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	
<b>Kojic acid</b>			
Lab 1			
0	4	0.19 $\pm$ 0.12	8.3 $\pm$ 1.2
1000	4	0.15 $\pm$ 0.04	6.2 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>
2000	4	0.70 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	7.1 $\pm$ 0.6
DEN*	4	0.16 $\pm$ 0.08	7.6 $\pm$ 1.6
CP**	4	1.43 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>
Lab 2			
0	5	0.07 $\pm$ 0.05	11.6 $\pm$ 0.3
1000	5	0.16 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 0.6
2000	5	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	11.7 $\pm$ 0.8
CP**	5	0.93 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	10.4 $\pm$ 0.9
<b>Quinoline</b>			
Lab 1			
0	4	0.13 $\pm$ 0.03	4.2 $\pm$ 0.6
75	4	0.11 $\pm$ 0.06	5.0 $\pm$ 0.5
150	4	0.10 $\pm$ 0.00	4.0 $\pm$ 0.9
DEN*	4	0.10 $\pm$ 0.07	4.7 $\pm$ 0.2
CP**	4	1.14 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 0.5
Lab 2			
0	5	0.07 $\pm$ 0.03	12.2 $\pm$ 0.4
75	5	0.08 $\pm$ 0.00	11.9 $\pm$ 0.3
150	5	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 0.9
CP**	5	0.95 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	10.3 $\pm$ 1.0
<b>o-Toluidine</b>			
Lab 1			
0	4	0.08 $\pm$ 0.06	13.6 $\pm$ 0.7
300	4	0.25 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	17.1 $\pm$ 2.1 <sup>d</sup>
600	4	0.36 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	18.7 $\pm$ 3.6
DEN*	4	0.08 $\pm$ 0.06	16.8 $\pm$ 3.5
CP**	4	0.86 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	13.7 $\pm$ 2.2
Lab 2			
0	4	0.21 $\pm$ 0.08	11.0 $\pm$ 1.5
300	4	0.19 $\pm$ 0.03	13.5 $\pm$ 2.7

Table 3 (Continued)

Chemical and dose (mg/kg)	No. of animals	MNRET (%) mean $\pm$ S.D.	RET (%) mean $\pm$ S.D.
600	4	0.46 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	13.6 $\pm$ 3.7
CP**	4	0.93 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	9.2 $\pm$ 0.7
CPDA			
Lab 1			
0	4	0.05 $\pm$ 0.06	7.5 $\pm$ 2.4
150	4	0.10 $\pm$ 0.07	5.8 $\pm$ 1.4
300	4	0.08 $\pm$ 0.06	3.6 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>
DEN*	4	0.05 $\pm$ 0.04	6.8 $\pm$ 1.0
CP**	4	0.90 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	6.4 $\pm$ 0.8
Lab 2			
0	4	0.05 $\pm$ 0.06	12.0 $\pm$ 2.2
150	4	0.08 $\pm$ 0.03	12.1 $\pm$ 3.1
300	4	0.13 $\pm$ 0.06	7.8 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>
DEN*	4	0.03 $\pm$ 0.03	12.5 $\pm$ 1.3
CP**	4	0.76 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	12.3 $\pm$ 3.2
DMN			
Lab 1			
0	4	0.08 $\pm$ 0.06	17.7 $\pm$ 1.9
5	4	0.04 $\pm$ 0.05	17.4 $\pm$ 3.1
10	4	0.15 $\pm$ 0.08	16.9 $\pm$ 2.5
DEN*	4	0.03 $\pm$ 0.03	13.5 $\pm$ 2.3
CP**	4	1.01 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	12.6 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>
Lab 2			
0	4	0.11 $\pm$ 0.09	16.1 $\pm$ 3.7
5	4	0.19 $\pm$ 0.14	15.6 $\pm$ 2.1
10	4	0.18 $\pm$ 0.09	15.4 $\pm$ 2.5
DEN*	4	0.25 $\pm$ 0.07	17.4 $\pm$ 1.7
CP**	4	0.89 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	15.4 $\pm$ 3.2
DAB			
Lab 1			
0	4	0.03 $\pm$ 0.05	
71	4	0.05 $\pm$ 0.06	NT
142	4	0.43 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	
CP**	4	0.64 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	
Lab 2			
0	4	0.05 $\pm$ 0.04	13.6 $\pm$ 2.1
120	4	0.03 $\pm$ 0.03	14.0 $\pm$ 2.8
240	4	0.25 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	21.9 $\pm$ 6.4 <sup>d</sup>
CP**	4	0.55 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	11.8 $\pm$ 1.4
DEHP			
Lab 1			
0	4	0.14 $\pm$ 0.09	29.0 $\pm$ 2.5
1000	4	0.18 $\pm$ 0.16	21.7 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>
2000	4	0.18 $\pm$ 0.06	22.3 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>
DEN*	4	0.06 $\pm$ 0.05	14.7 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>
CP**	4	1.23 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	13.1 $\pm$ 2.6 <sup>c</sup>

Table 3 (Continued)

Chemical and dose (mg/kg)	No. of animals	MNRET (%) mean $\pm$ S.D.	RET (%) mean $\pm$ S.D.
Lab 2			
0	4	0.16 $\pm$ 0.05	23.1 $\pm$ 2.4
1000	4	0.25 $\pm$ 0.14	27.1 $\pm$ 7.4
2000	4	0.16 $\pm$ 0.05	23.1 $\pm$ 3.8
DEN*	4	0.19 $\pm$ 0.08	21.9 $\pm$ 3.3
CP**	4	1.06 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	21.9 $\pm$ 2.2
MMS			
Lab 1			
0	4	0.14 $\pm$ 0.10	8.5 $\pm$ 1.0
40	4	2.04 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	12.5 $\pm$ 4.8
80	4	0.96 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
DEN*	4	0.18 $\pm$ 0.05	12.4 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>
CP**	4	1.54 $\pm$ 1.03 <sup>d</sup>	7.8 $\pm$ 1.8

MDA, 4,4'-methylenedianiline; DEN\*, diethylnitrosamine (the first positive control, 40 mg/kg); CP\*\*, cyclophosphamide (the second positive control, 10 mg/kg); CPDA, 4-chloro-*o*-phenylenediamine; DMN, dimethylnitrosamine; DAB, *p*-dimethylaminoazobenzene; DEHP, di(2-ethylhexyl) phthalate; MMS, methylmethanesulfonate. NT: not tested.

<sup>a</sup> Significantly different from the solvent control (Kastenbaum and Bowman test;  $P < 0.01$ ).

<sup>b</sup> Significantly different from the solvent control (Kastenbaum and Bowman test;  $P < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Significantly different from the solvent control (Student *t*-test;  $P < 0.01$ ).

<sup>d</sup> Significantly different from the solvent control (Student *t*-test;  $P < 0.05$ ).

MDA in samples harvested 3 days after dosing, the data were from only two animals. In conjunction with Lab 2 results, MDA was considered to be negative in this assay. Quinoline, DMN and DAB, are chemicals were also positive in the presence of metabolic activation in *in vitro* genotoxicity assays [21–23]. Quinoline and DMN induce hepatocellular carcinoma in mice and rats [24–26], while DAB induces hepatocellular carcinoma in rats, but not in mice [27]. Four chemicals that were negative in this study have been reported to be carcinogenic. MDA and CPDA induce hepatocel-

lular carcinoma in male and female mice [28–30] and neoplastic nodules in rats [29–31]. *o*-Toluidine induces hepatocellular carcinomas and hemangiosarcomas in mice and multiple organs tumors in rats [32]. DEHP induces hepatocellular carcinoma in mice and rats [33], but this chemical, unlike quinoline, DMN, and DAB, is a peroxisome proliferator, not a genotoxic carcinogen [34]. So the negative results in this assay are understandable. MMS induces carcinomas in the nasal cavity, central nervous system, and injection sites [35], but did not induce micronuclei in this study. *O*-Alkylation

Table 4

Micronucleus assay results for nine chemicals in this study compared with results from published bone marrow and hepatocarcinogenicity assays

Chemical	MN		BM		Hepatocarcinogenicity	
	L	PB	Mouse	Rat	Mouse	Rat
MDA	–	–	– [1]	ND	+ [28,29]	+ [28,29]
Kojic acid	–	+	– [41,50]	ND	– [42]	ND
Quinoline	+	–, +	+ (–) [44,45]	ND	+ [25]	+ [24]
<i>o</i> -Toluidine	–	+	– [1]	ND	+ [32]	– [32]
CPDA	–	–	+ [16]	+ (–) [16]	+ [30,31]	+ [30,31]
DMN	+	–	– (+) [46,47]	ND	+ [26]	+ [26]
MMS	–	+	+ [16]	+ [16]	ND	– [35]
DAB	+	+	– [1]	ND	ND	+ [27]
DEHP	–	–	– [1]	ND	+ [33]	+ [33]

MN, micronucleus assay; L, liver; PB, peripheral blood; BM, bone marrow micronucleus assay; parentheses show peripheral blood micronucleus assay. ND, no data found.

is more efficient than *N*-alkylation in the formation of micronuclei [36–38], and considering that MMS causes primarily *N*-7-methylguanine formation [39], the negative results were expected. Regarding P450 levels in young rats, 1A2, 2A1, 2B1, 2B2, 2E1, 3A1, and 3A2 levels increase with age, and reaching a maximum at approximately 30 days. Thereafter, the levels are suppressed by growth hormones, and 2C7, 2C11, 2C12, and 2C22 levels increase [40]. Therefore, P450 changes may have affected the results of the assay. Quinoline, DMN, and DAB are clearly genotoxic in *in vitro* only following metabolic activation [21–23], which makes them suitable for this assay.

In summary, quinoline, DMN, and DAB, which are rat hepatocarcinogens, induced liver micronuclei in this study. MDA, kojic acid [41,42], *o*-toluidine, and CPDA, which possess weak or uncertain hepatocarcinogenic potential in rats, did not, nor did DEHP, a non-genotoxic rat hepatocarcinogen. All chemicals, except MMS, were evaluated in two laboratories with similar results, as noted.

Although we did not statistically analyze the incidence of mitosis, we observed an increase or decrease for each chemical. The mitotic index reflected only three time points and did not give any information about the total number of mitoses. Thus, a correlation between MNHEP (%) and mitotic index was not always evident. These results may reflect increased mitotic activity or cytotoxic action of test chemicals on dividing hepatocytes [43].

The mean incidence of MNRETs (%) for 70 rats in the solvent control groups was  $0.10 \pm 0.08\%$ . This low incidence suggests the robustness of the assay like the liver assay.

Quinoline at 150 mg/kg was positive in the peripheral blood micronucleus assay only in Lab 2. Inconsistent results for quinoline have been reported before: the compound was positive in mouse bone marrow micronucleus assays [44] and negative in transgenic mouse peripheral blood micronucleus assays [45]. Thus, quinoline induces micronuclei in the liver but may not in hepatopoietic tissue. DMN was negative in peripheral blood micronucleus assay in rats, but has been reported to be positive in transgenic mice [46]. It is also negative in the mouse bone marrow micronucleus assay [47]. These results may reflect the fact that *N*-nitroso chemicals are difficult to evaluate in bone marrow micronucleus assays [1]. The rate of

*N*-hydroxylation of DAB is higher in rats than in mice [48]. *N*-hydroxylation of amino azo dyes generates mutagenic metabolites [49], which may yield different results. Although kojic acid and *o*-toluidine were positive in this study, they are negative in mouse bone marrow micronucleus assays [50,51]. The MNRET (%) for CPDA in Lab 2 tended to increase in a dose-dependent manner, though it did not reach a statistically significant level. Because of the MNRET (%) were not dose-dependent in Lab 1, CPDA was considered to be negative. Although, CPDA was negative in this assay, it is positive in mouse bone marrow assays [16]. Thus, species differences are evident for kojic acid, *o*-toluidine and CPDA. The results of MMS, a direct alkylating agent, were consistent with those of mouse/rat bone marrow micronucleus assays [16].

In the present study, we evaluated known hepatocarcinogenic chemicals for micronucleus-inducing effects in 4-week-old rats. For some chemicals, our peripheral blood results differed from those reported by others, perhaps because younger rats are more sensitive to mutagens [52]. Accordingly, the simultaneous liver and peripheral blood assay system may bring out different result to previously reported one. In this assay, rodent hepatocarcinogens have been mainly used. Further evaluation using other organ carcinogens should be performed to assess this system in future.

As shown with quinoline, DMN, and DAB, the liver MN assay detected chemicals that required metabolic activation. Thus, it could be used to confirm positive responses in *in vitro* genotoxicity assays. These assays could expand the information obtained, for example, in the *in vivo/in vitro* UDS (unscheduled DNA synthesis) assay or the *in vivo* single cell gel electrophoresis (Comet) assay.

In conclusion, this assay system enabled us to simultaneously detect hepatocyte and peripheral blood micronucleus induction in the same animal. We also obtained information on differences in clastogen sensitivity between rats and mice. More chemicals should be studied to elucidate the validity and the sensitivity of this assay system.

#### Acknowledgment

This article was communicated by the Mammalian Mutagenicity Study group (MMS) of the Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS).



## References

- [1] 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/JEMS-MMS, *Mutat. Res.* 389 (1997) 3–122.
- [2] F.A. Angelosanto, Tissues other than bone marrow that can be used for cytogenetic analyses, *Environ. Mol. Mutagen.* 25 (1995) 338–343.
- [3] I. Cllet, E. Fournier, C. Melcion, A. Cordier, In vivo micronucleus test using mouse hepatocytes, *Mutat. Res.* 216 (1989) 321–326.
- [4] 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.
- [5] 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) 11–20.
- [6] A.D. Tates, L. den Engelse, The role of short-lived lesions in the induction of micronuclei in rat liver by ethylnitrosourea and methyl methanesulfonate: the importance of experimental design, *Mutat. Res.* 210 (1989) 271–279.
- [7] I. Braithwaite, J. Ashby, A non-invasive micronucleus assay in the rat liver, *Mutat. Res.* 203 (1988) 23–32.
- [8] 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.
- [9] S. Sawada, T. Yamanaka, K. Yamatsu, C. Furihata, T. Matsushima, Chromosome aberrations, micronuclei and sister-chromatid exchanges (SCEs) in rat liver induced in vivo by hepatocarcinogens including heterocyclic amines, *Mutat. Res.* 251 (1991) 59–69.
- [10] A.M. Rossi, M. Romano, L. Zaccaro, R. Pulci, M. Salmona, DNA synthesis, mitotic index, drug-metabolising systems and cytogenetic analysis in regenerating rat liver, *Mutat. Res.* 182 (1987) 75–82.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] G.I. Sipes, A.J. Gandolfi, Biotransformation of toxicants, in: M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klassen (Eds.), *Casarett and Doull's Toxicology, The Basic science of poisons*, McGraw-Hill, New York, 1993, pp. 88–126.
- [14] R.A. Fumer, T.E. Gram, R.E. Stitzel, The influence of age, sex and drug treatment on microsomal drug metabolism in four rat strains, *Biochem. Pharmacol.* 18 (1969) 1635–1641.
- [15] M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides, *Mutat. Res.* 245 (1990) 245–249.
- [16] 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.
- [17] D. Lorke, A new approach to practical acute toxicity testing, *Arch. Toxicol.* 54 (1983) 275–287.
- [18] P.I. Countryman, J.A. Heddle, The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.* 41 (1976) 321–331.
- [19] The 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 the CSGMT/JEMS-MMS, *Mutat. Res.* 278 (1992) 83–98.
- [20] M.A. Kastenbaum, K.O. Bowman, Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.* 9 (1970) 527–549.
- [21] M. Ishidate Jr. (Ed.), *Data Book of Chromosomal Aberration Test In Vitro*, Revised ed., Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [22] A.T. Natarajan, A.D. Tates, P.P.W. Van Buul, M. Meijers, N. De Vogel, Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system in vitro. Part I: Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by diethylnitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of rat-liver microsomes, *Mutat. Res.* 37 (1976) 83–90.
- [23] E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck, *Salmonella* mutagenicity tests. III: Results from the testing of 255 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.* 9 (Suppl. 9) (1987) 1–110.
- [24] K. Hirano, Y. Shinohara, H. Tsuda, S. Fukushima, M. Takahashi, N. Ito, Carcinogenic activity of quinoline on rat liver, *Cancer Res.* 36 (1976) 329–335.
- [25] Y. Shinohara, T. Ogiso, M. Hananouchi, K. Nakanishi, T. Yoshimura, N. Ito, Effect of various factors on the induction of liver tumors in animals by quinoline, *Gann* 68 (1977) 785–796.
- [26] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 17, *N*-Nitrosodimethylamine, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1978.
- [27] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 8, *para*-Dimethylaminoazobenzene, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1975.
- [28] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 39, 4,4'-Methylenedianiline and its Dihydrochloride, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1986.
- [29] E.K. Weisburger, A.S. Murthy, H.S. Lilja, J.C. Lamb IV, Neoplastic response of F344 rats and B6C3F1 mice to the polymer and dyestuff intermediates 4,4'-methylenebis(*N,N*-dimethyl)-

- benzenamine, 4,4'-oxydianiline, and 4,4'-methylenedianiline, J. Natl. Cancer Inst. 72 (6) (1984) 1457–1463.
- [30] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 27, 4-Chloro-*ortho*-phenylenediamine and 4-Chloro-*meta*-phenylenediamine, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1982.
- [31] E.K. Weisburger, A.S. Murthy, R.W. Fleischman, M. Hagopian, Carcinogenicity of 4-chloro-*o*-phenylenediamine, 4-chloro-*m*-phenylenediamine, and 2-chloro-*p*-phenylenediamine in Fischer 344 rats and B6C3F<sub>1</sub> mice, Carcinogenesis 1 (1980) 495–499.
- [32] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 77, *ortho*-Toluidine, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2000.
- [33] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 29, Some Industrial Chemicals and Dyestuffs, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1982.
- [34] T. Suga, Hepatocarcinogenesis by peroxisome proliferators, J. Toxicol. Sci. 29 (1) (2004) 1–12.
- [35] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 71, Methyl-methanesulfonate, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1987.
- [36] A.D. Tate, I. Neuteboom, A.H.M. 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 methanesulfonate. Correlation with DNA *O*-alkylation, Carcinogenesis 7 (7) (1986) 1053–1058.
- [37] L. Den Engelse, R.J. De Brij, E. Scherer, B.G. Froot, Persistence and accumulation of (potential) single-strand breaks in liver DNA of rats treated with ethyl methanesulphonate, Cancer Lett. 11 (1980) 199–208.
- [38] T. Suzuki, M. Hayashi, X. Wang, K. Yamamoto, T. Ono, B.C. Myhr, T. Sofuni, A comparison of the genotoxicity of ethylnitrosourea and ethyl methanesulfonate in *lacZ* transgenic mice (Muta<sup>TM</sup> Mouse), Mutat. Res. 395 (1997) 75–82.
- [39] D.T. Beranek, Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, Mutat. Res. 231 (1990) 11–30.
- [40] R. Kato, Y. Yamazoe, Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex- and species-related differences in drug toxicity, Toxicol. Lett. 64–65 (1992) 661–667.
- [41] G.J. Nohynek, D. Kirkland, D. Marzin, H. Toutain, C. Leclere-Ribaud, H. Jinnai, An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one], Food Chem. Toxicol. 42 (2004) 93–105.
- [42] N. Fujimoto, H. Watanabe, T. Nakatani, G. Roy, A. Ito, Induction of thyroid tumors in (C57BL/6N × C3H/N)<sub>F</sub><sub>1</sub> mice by oral administration of kojic acid, Food Chem. Toxicol. 36 (1998) 697–703.
- [43] K. Müller, P. Kasper, L. Müller, An assessment of the in vitro hepatocyte micronucleus assay, Mutat. Res. 292 (1993) 213–224.
- [44] M.A. Hamoud, T. Ong, M. Petersen, J. Nath, Effects of quinoline and 8-hydroxyquinoline on mouse bone marrow erythrocytes as measured by the micronucleus assay, Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 9 (1989) 111–118.
- [45] T. Suzuki, Y. Miyata, K. Saeki, Y. Kawazoe, M. Hayashi, T. Sofuni, In vivo mutagenesis by the hepatocarcinogen quinoline in the *lacZ* transgenic mouse: evidence for its in vivo genotoxicity, Mutat. Res. 412 (2) (1998) 161–166.
- [46] 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 (4) (1996) 348–353.
- [47] D. Jenssen, C. Ramel, Factors affecting the induction of micronuclei at low doses of X-rays, MMS and dimethylnitrosamine in mouse erythroblasts, Mutat. Res. 58 (1) (1978) 51–65.
- [48] T. Kimura, M. Kodama, C. Nagata, A correlation of the rate of *N*-hydroxylation of aminoazo dyes with their carcinogenic activity in the rat, Carcinogenesis 3 (12) (1982) 1393–1396.
- [49] S. Ohnishi, M. Murata, M. Degawa, S. Kawanishi, Oxidative DNA damage induced by an *N*-hydroxy metabolite of carcinogenic 4-dimethylaminoazobenzene, Jpn. J. Cancer Res. 92 (2001) 23–29.
- [50] M. Nonaka, H. Omura, T. Sofuni, M. Hayashi, Kojic acid did not induce micronuclei in mouse bone marrow hematopoietic cells, MMS Commun. 4 (2) (1996) 109–112.
- [51] Y. Nakai, K. Hirabayashi, Y. Takahashi, D. Miura, Y. Kasahara, K. Morita, Y. Izawa, The genetic toxicology of *o*-toluidine with special reference to its non-clastogenicity in vivo, MMS Commun. 2 (1994) 99–108.
- [52] S. Hamada, K. Nakajima, T. Serikawa, M. Hayashi, The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay, Mutagenesis 18 (3) (2003) 273–275.

# げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびに その行政面への応用

林 真\*

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

---

## The rodent micronucleus test

—The basic research and application to regulatory use—

Makoto Hayashi

Division of Genetics and Mutagenesis, NIHS, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

### Summary

Genotoxicity is an important consideration in the safety evaluation of chemicals. It is well known that there are *in vitro* and *in vivo* assay systems with different endpoints for evaluating chemical genotoxicity. 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 from the viewpoint of weight of evidence. There are several *in vivo* assay systems that have been developed and which are based on various 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 a positive result in the *in vitro* chromosome aberration test but were negative in the rodent micronucleus test. In such case, as a rule, the *in vivo* negativity is considered dominant to the *in vitro* positivity.

It is important and necessary to reduce use of test animals without any loss of evaluation accuracy. In the micronucleus test, development of the method using peripheral blood instead of bone marrow cells succeeded in reducing the total number of animals required for chromosomal aberration evaluation *in vivo*. Sampling of very small amounts of blood can be done without killing animals, which is one of the most important advantages of the method; it also permits combining with other assays for different endpoints that require different optimal sampling times. Based on this development, *in vivo* multiple endpoint assay systems will be realized and will lead to further reduction of animal use for the evaluation of chemical genotoxicity. In this manuscript, I 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

---

---

\* E-mail: hayashi@nihs.go.jp

受付: 2005年1月17日 受理: 2005年2月28日

© 日本環境変異原学会

Table 1 Representative genotoxicity assays

	Gene mutation	Chromosomal aberration
In vitro	Ames assay MLA	Metaphase analysis using cultured cells MLA
In vivo	Transgenic animal model	Bone marrow metaphase analysis Erythrocyte micronucleus assay

MLA: mouse lymphoma assay using L5178Y cells

## 緒 言

化学物質の安全性を評価するのに、変異原性は重要な意味を持つ。また、がん原性は安全性を考える上で最も大きな関心事の一つであり、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。このがん原性を短期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始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るようになってきた。すなわち、がん原性のメカニズムに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、との考えが定着しており、この考えを基に化学物質の評価がなされる。特に、発がんの部位において変異原性が認められるか否かは重要で、in vivo 試験系が重要な役割を果たす。

変異原性試験は、その指標と試験に用いる材料で分類される。変異原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。1976年の10月に当時の国立衛生試験所薬品病理部に入所し、すぐにげっ歯類を用いる小核試験に取り組むことになった。この試験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。試験を始めた当時は、げっ歯類の骨髓細胞を用い、分裂中期像を直接顕微鏡観察して評価していた。最初に、小核の生成機構に関して検討し、骨髓細胞で見られる切断型の構造異常の90%程度が小核の生成に寄与するが、交換型異常では35%程度しか寄与しない場合もあることを明らかにした(Hayashi et al., 1984)。その後、手法の開発も行い、アクリジンオレンジ蛍光染色法を導入して観察の精度を高め(Hayashi et al., 1983)、今ではOECD等のガイドラインでも推奨されている(OECD, 1997)。また、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)。

この間、日本環境変異原学会、特にMMS研究会(分科会)で多くの共同研究を行い、試験結果に影響する要因(性差、系統差、投与回数、投与経路等)について質の高いデータを世界に向けて発信してきた(CSGMT, 1986;

1988; 1990; 1995a; Hayashi et al., 1989)。また、新しい手法のバリデーションに関する共同研究の成果も含め(CSGMT, 1992; Morita et al., 1997; Wakata et al., 1998; Hamada et al., 2001)、ICHやOECDのガイドライン策定に大きな影響と貢献を果たしてきた。現在は、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)等に注目が集まっているとともに、結果の評価(Hauschke et al., 1997; Adler et al., 1998; Hayashi et al., 1985; 1989; 1994)、解釈(Kirkland et al., 2000; 2003; Müller et al., 2003)についても多くの議論がなされている。ここでは末梢血を用いる小核試験を中心に、その開発と応用、行政への反映についてまとめる。

## 1. 小核試験

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と考えられている。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と、遺伝子突然変異をin vivoで検出するすぐれた試験系が確立されていない点が考えられる。

げっ歯類の骨髓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、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、骨髓中の

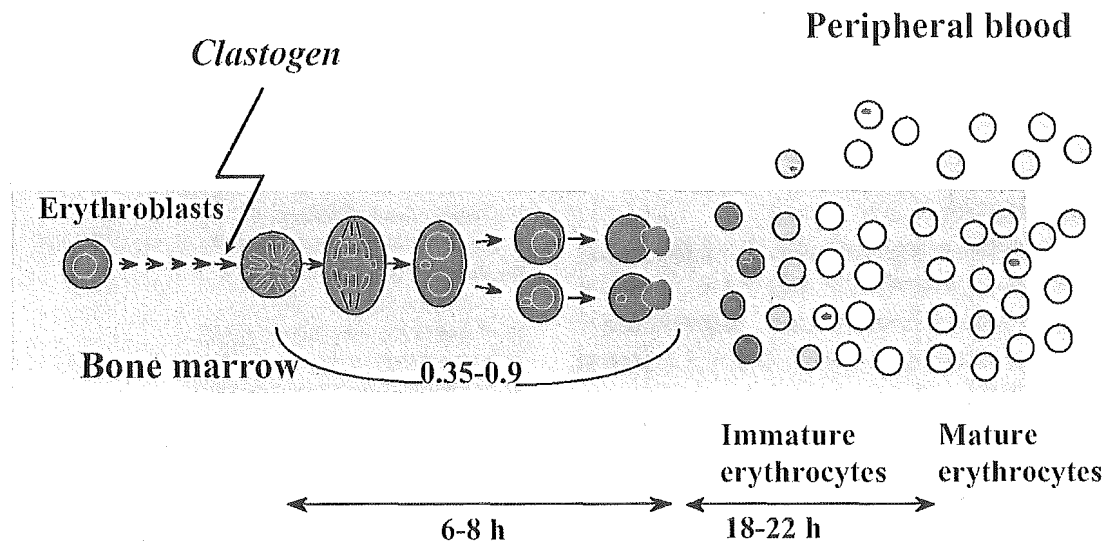


Fig. 1 Micronucleus formation in erythrocyte

幼若赤血球である多染性赤血球を観察対照としてきた。小核試験全般に関しては成書(林, 1991)を参照されたい。

## 2. 末梢血を用いる小核試験

Fig. 1に示したように、幼若な赤血球は骨髓中にしばらくとどまるとともに、確率論的に血流に出ていく。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割には、あまり普及しなかったようである。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、骨髓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。骨髓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良く壊されてしまうが、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; 1992b; 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、骨髓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できれば、動物をその都度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も可能である。

### 1) 標本作成法

アクリジン・オレンジ(A.O.)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、530 nm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、590 nm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グラスに塗布しておき、そこへ微量の末梢血をのせ、カバーグラスで覆うと、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, 1995b)を参照されたい。

### 2) 観察方法

標本作成後すぐにも蛍光顕微鏡により観察可能であるが、細胞の動きがおさまるのを数時間待って観察する。観察は波長490 nm付近の励起光、観察用フィルタとして515-530 nm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。以下の条件を満たす良好な観察箇所

を選定する。

- (1) 白血球の核が黄緑色の蛍光を発していること
- (2) 網赤血球の網状構造が赤色の蛍光を発していること
- (3) 赤血球の重なりがないこと
- (4) 細胞の破損がないこと、である。

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られることができる。小核を有する網赤血球(MNRET)の出現頻度は、骨髓中の小核を持つ多染性赤血球(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) 実験動物の削減

さて、末梢血を用いる小核試験を行うことにより、骨髓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。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とする。単回投与の場合は、2回の標本作製が必要とされており、骨髓を用いる方法では、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できるので、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ので、陰性対照群を個別に設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のメンテナンスの議題と考えられている。もしそのようなことが認められるなら、15匹の動物で試験が完結することとなり、骨髓の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になる。

## 3. 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る。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ナル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つの化学物質を2機関で比較検討した。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

Table 2 Participants in collaborative study

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.

\*Organizer

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合わせた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なかったことを意味する。すなわち、経験のないものが本試験を実施しても、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

**Table 3** List of chemicals tested

Chemical tested
<b>Alkylating agents</b>
Cyclophosphamide monohydrate
Dimethylnitrosamine
Ethyl methanesulfonate
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea
Methyl methanesulfonate
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
Triethylenemelamine
<b>Base analogues and related chemical</b>
1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine
5-Fluorouracil
6-Mercaptopurine
Methotrexate
<b>Aromatic amines</b>
2-Acetylaminofluorene
Phenacetin
<b>Polycyclic aromatic hydrocarbons</b>
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene
7,12-Dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracene
<b>Crosslinking agent</b>
Mitomycin C
<b>Inorganic chemicals</b>
Potassium bromate
Potassium chromate (VI)
<b>Spindle poisons</b>
Colchicine
Vincristine sulfate
<b>Miscellaneous chemicals</b>
Benzene
Procarbazine hydrochloride
Urethane

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。骨髓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判明した。

#### 4. 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をMMS研究会として行った(Sato et al., 1995)結果を示す。系統により多少

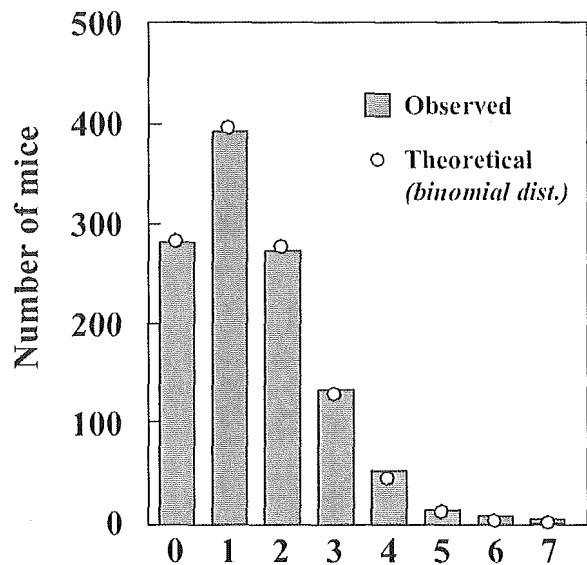


Fig. 2 Number of MNRETs/1000 RETs

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ロバストであり、その他の要件により週齢を選ぶことが可能である。

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多染性赤血球の指標に大きな影響を与えることはないので、他の試験と組み合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., 1994; Kohara et al., 2002a; 2002b; 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ない。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い、末梢血中では観察が困難であるとされている。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することにより、小核が観察できることが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

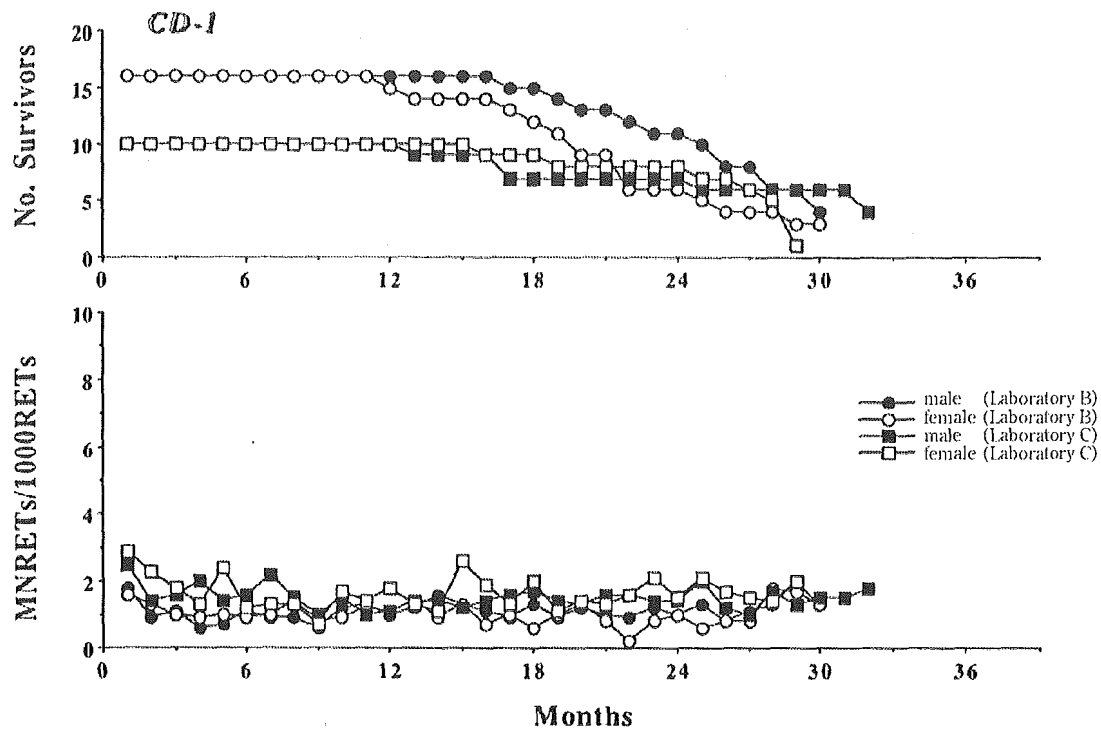


Fig. 3 Aging effect on the spontaneous frequencies of MNRET in CD-1 mice

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を MMS 研究会で行った (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, 今後の発展が期待できる結果となった.

ここに一つの試験法の開発の歴史を示した. 日本環境変異原学会 MMS 研究会の非常に強力な共同研究の成果に支えられ, 多くの新しいことが判明した. それらの結果は多くの論文にまとめられ, Mutation Research, Mutagenesis, Environmental and Molecular Mutagenesis, MMS Communications 等の雑誌を通じて広く海外にも発信された. 現在のガイドラインでは, 小核試験に末梢血を用いることも認めており, 行政面への貢献を述べて本稿の終わりとして, 「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドライン: 動物個体を用いて染色体損傷を検出する試験としては, 通常げっ歯類の骨髓細胞を用いる染色体異常試験と造血系細胞を用いる小核試験が用いられる. 染色体異常を観察する試験では, 様々な染色体の変化が検出できる. また, 染色体異常に起因して生成する小核を骨髓または末梢血を用いて検出する小核試験は, 染色体異常誘発物質を検出する簡便な試験法として, 前者と同等に受け入れられる. さらに小核試験では異数性誘発物質を検出できる可能性がある (医薬審 第 1604 号平成 11 年 11 月 1 日).」

## 謝 辞

これまでも述べてきたように, ここで述べた大半の研究は日本環境変異原学会 MMS 研究会の共同研究として行われたものであり, 今回の受賞は私個人ではなく, MMS 研究会の全員が受賞対象であり, 私はその代表としての役割であったと考える. さらに, このたびの推薦者を始め, これまでご支援, ご協力いただいた各位にこの場を借りて深謝申し上げます.

## 参考文献

- Adler, I.-D., J. Bootman, J. Favor, G. Hook, G. Schriever-Schwenmer, 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.
- 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, S.D., J.T. MacGregor, M. Bishop, J.P. McNamee, M. Hayashi, N. Asano, M. Nakajima, A. Wakata, M. Moore and D.K. Torous (2005) Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Inter- and intra-laboratory comparison with microscopic methods, *Env. Mol. Mutagen* (in preparation).
- 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, サイエンス社, 東京.
- Hayashi, M., S. Hashimoto, Y. Sakamoto, C. Hamada, T. Sofuni and I. Yoshimura (1994) 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.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides, *Mutat. Res.*, 245, 245-249.
- Hayashi, M., H. Norppa, T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1992a) Flow cytometric micronucleus test with mouse peripheral erythrocytes, *Mutagenesis*, 7, 257-264.
- Hayashi, M., H. Norppa, T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1992b) Mouse bone marrow micronucleus test using flow cytometry, *Mutagenesis*, 7, 251-256.
- 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., S. Sutou, H. Shimada, S. Sato, Y.F. Sasaki and A. Wakata (1989) 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., T. Suzuki and T. Sofuni (1994) The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction, *Environ. Mut. Res. Commun.*, 16, 67-77.
- Hayashi, M., R.R. Tice, J.T. MacGregor, D. Anderson, D.H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F.B. Oleson, F. Pacchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou and B. Vannier (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.*, 312, 293-304.
- 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. (1989) A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 347-356.
- Heddle, J.A., M.C. Cimino, M. Hayashi, F. Romagna, M.D. Shelby, J.D. Tucker, Ph. Vanparys and J.T. MacGregor (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 (Muta<sup>TM</sup>Mouse), *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 (Muta<sup>TM</sup>Mouse), *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.
- Ohshima, W., M. Gonda, H. Miyajima, K. Kondo, T. Noguchi, J. Yoshida, S. Hatakeyama, 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. Itoh, M. Igarashi, N. Higashikuni, S. Sutou and Y.F. Sasaki (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.
- Suzuki, T., M. Hayashi, B. Myhr and T. Sofuni (1995) Diethylnitrosamine is mutagenic in liver but not in bone marrow of *lacZ* transgenic mice (Muta<sup>TM</sup>Mouse), *MMS Commun.*, 3, 33-39.
- Suzuki, T., M. Hayashi and T. Sofuni (1994) Initial experiences and future directions for transgenic mouse mutation assays, *Mutat. Res.*, 307, 489-494.
- Suzuki, T., M. Hayashi, T. Sofuni and B.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, 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.
- 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.

## 遺伝毒性：DNA直接作用物質に閾値は存在するのか!?

祖父尼 俊雄<sup>1\*</sup>, 能美 健彦<sup>2</sup>, 太田 敏博<sup>3</sup>, 林 真<sup>2</sup>

<sup>1</sup>元国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部, <sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

<sup>3</sup>東京薬科大学生命科学部 〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

### Genotoxicity: Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substances!?

Toshio Sofuni<sup>1</sup>, Takehiko Nohmi<sup>2</sup>, Toshihiro Ohta<sup>3</sup> and Makoto Hayashi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ex-Director,

<sup>2</sup>Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>3</sup>School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science  
1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

#### Summary

The concept of a "biological threshold" is attracting interest as an evaluation criterion for the mutagenic activity of DNA-targeting mutagens. In this context, the concept is defined as "a concentration of a chemical which does not produce any damage through its inability to perform the necessary biochemical reactions, even though present at the target in finite amount". To clarify whether this criterion is indeed applicable to DNA-targeting mutagens, we re-evaluated the reverse mutation assay data using DNA repair-deficient bacterial strains, such as *S. typhimurium* strains lacking the *O*<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase genes (*ada<sub>ST</sub>* and *ogt<sub>ST</sub>*), the nucleotide excision repair gene (*uvrB*) or the 8-hydroxyguanine DNA glycosylase gene (*mutM<sub>ST</sub>*), and *E. coli* strains lacking the nucleotide excision repair gene (*uvrA*). Mutagenic responses of 20 test chemicals including alkylating and non-alkylating agents were compared between the repair-deficient and their wild-type strains.

All the alkylating agents, such as MNNG, ENNG, EMS, ENU, DMN and DEN, exhibited more sensible mutagenic responses in strains YG7108 (*Δada<sub>ST</sub>*, *Δogt<sub>ST</sub>*) and YG7113 (same as YG7108 but containing the plasmid pKM101) than in the parental strains TA1535 and TA100 (same as TA1535 but containing the pKM101), respectively. Upon applying MNNG, YG7108 showed about 2–100 fold increase in the number of His<sup>+</sup> revertants above the spontaneous level over the range of 0.00025–0.25 μg/plate, whereas TA1535 did not show any significant increase in the number of His<sup>+</sup> revertants over the same dose range. On TA1535, an increasing tendency of the number of revertants was observed at 0.5 μg/plate or above. This indicates an approximate 2,000-fold difference at the mutagenic concentration level between the wild-type and the repair-deficient strains. Other alkylating agents also showed significant differences in mutagenic responses

\* E-mail: toshi\_sofu@yahoo.co.jp

Present address: 916-3 Kokuki, Shiraoka, Minami-Saitama,  
Saitama 349-0217, Japan

受付: 2005年4月5日 受理: 2005年4月5日

©日本環境変異原学会

本稿は第33回日本環境変異原学会、第18回日本動物実験代替法学会合同学術会議、JEMS & JSAAE 合同シンポジウム1「発がん性と遺伝毒性の閾値-リスクアセスメントにおける問題点-」で発表された。  
This paper was presented to the JEMS & JSAAE combination symposium 1 "Threshold of carcinogenicity and genotoxicity -- issues for risk assessment --" at the 33rd JEMS annual meeting and the 18th JSAAE annual meeting, 2004.

between YG7108 and TA1535, or between YG7113 and TA100 respectively, with some variations among test chemicals. On the other hand, non-alkylating agents, such as 4-NQO, AF-2, 2-NF and MX, did not show any differences in the dose-response relationships between YG7113 and TA100. When non-alkylating agents, such as 4-NQO, 2-NF and MX were applied to TA1535 ( $\Delta uvrB$ ), TA1538 ( $\Delta uvrB$ ) and WP2uvrA ( $\Delta uvrA$ ), clearly different mutagenic responses, i.e. about 30- to 60-fold, were observed between the repair-deficient and the parental strains (TA1975, TA1978 and WP2, respectively). 4-NQO showed different mutagenic responses between YG3002 ( $\Delta mutM_{ST}$ ) and TA1975 (about 10-fold), though the application of other oxidative agents such as hydrogen peroxide resulted in less than 10-fold differences. The present results indicate that the wild-type strains having normal repair capacity show no gene mutation induction at the concentrations at which gene mutations are clearly induced in the repair-deficient strains through DNA damage. Thus, the present results suggest the existence of a "biological threshold" below which no mutagenic response is induced by DNA-targeting mutagenic substances.

**Keywords:** threshold, biological threshold, DNA-targeting mutagens, DNA repair-deficient strains, alkylating agents

## 緒 言

遺伝毒性には閾値が存在しないという考え方がこれまで一般的に受け入れられてきたが、近年DNAを直接標的としないう物質、例えば細胞分裂阻害剤やDNA合成阻害剤など、DNA以外の酵素や蛋白などへの影響によってもたらされる遺伝毒性には閾値が存在するとの考え方が国際的にも急速に受け入れられてきている(Elhajouji et al., 1995; 1997)。一方、DNAを直接標的とする物質には閾値が存在しないという考え方は依然として広く浸透しており、化学物質の安全性評価においてもこの考え方が支配的な状態にあるといえる。

閾値という概念にはいくつかの定義付けがなされている(Kirsch-Volders et al., 2000)が、その中に生物学的な閾値(biological threshold)という考え方が提唱されている。これはDNAを直接標的とする物質がDNAと直接作用する場がありながら、最終的な影響(例えば突然変異)の発現に必要とする全ての生物学的なプロセスが完遂できない(例えば修復メカニズムにより)低用量域が存在する、という考え方である。細菌を用いる復帰変異試験では*Salmonella typhimurium*(以下サルモネラ菌と略)のTA1535, TA1537, TA1538が用いられるが、これらはいずれもヌクレオチド除去修復欠損株( $\Delta uvrB$ )であり、それらの野生株であるTA1975, TA1977, TA1978に比べ変異原物質に対する感受性が高いことは一般に知られていることである。また、アルキル化DNA損傷を修復する $O^6$ -methylguanine methyltransferase (MGT)を欠損した菌株が作製され、その野生株との比較から欠損株が野生株に比べてアルキル化剤に高感受性を示すことが認められている(Hakura et al., 1991; Yamada et al., 1995; 1997; 山田, 1999)。このようなDNA損傷修復欠損株を用いた研究では、多くの場合変異原物質の高感度検出や修復機構解明に視点が向けられ、必ずしも閾値の概念に結び付けようとするものではなかった。しかし、このような

DNA損傷修復欠損株と野生株の感受性の違いそのものが、上述の生物学的閾値の存在を意味しているものとして捉えるようになってきた(Sofuni et al., 2000)。DNAの酸化的損傷を修復する8-hydroxyguanine(8-OH-G)DNA glycosylaseを欠損する菌株が作製され、野生株との酸化的損傷に対する感受性が検討されており(Suzuki et al., 1997; Kim et al., 2004)、これらの菌株も含めて改めてこの問題について検討した結果を報告する。用いた菌株、被験物質、変異コロニー数のデータなどはここで引用した文献に基づいており、閾値の議論に必要な場合には、より低用量または高用量について同様の条件で追加実験を行っている。ヌクレオチド除去修復欠損株については本研究で得られた新たな実験結果を示している。

## 実験材料および方法

### 1) 使用菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に供した試験菌株をTable 1に示す。サルモネラ菌にはアルキル化DNA損傷修復酵素( $O^6$ -methylguanine DNA methyltransferase: MGT)として2つの遺伝子 $ogt_{ST}$ と $ada_{ST}$ があり、これらを欠損した菌株YG7104( $\Delta ogt_{ST}$ )とYG7108( $\Delta ogt_{ST}$ ,  $\Delta ada_{ST}$ )およびその野生株TA1535, 並びにTA1535株にpKM101プラスミドを導入したTA100とそのMGT欠損株YG7112( $\Delta ogt_{ST}$ )とYG7113( $\Delta ogt_{ST}$ ,  $\Delta ada_{ST}$ )を用いてアルキル化剤について突然変異誘発性を比較した。

非アルキル化剤については、ヌクレオチド除去修復欠損株を用いた。サルモネラ菌では、TA1535( $\Delta uvrB$ )とその野生株TA1975, TA1538( $\Delta uvrB$ )とその野生株TA1978, 並びに大腸菌株ではWP2uvrA( $\Delta uvrA$ )とその野生株WP2との間で比較検討した。

酸化的DNA損傷については、サルモネラ菌の8-hydroxyguanine DNA glycosylaseの遺伝子欠損株を用いた。YG3001( $\Delta mutM_{ST}$ )とその野生株TA1535, YG3002( $\Delta mutM_{ST}$ )とその野生株TA1975, 並びにYG3003