

Short Communication



CrossMark

Open Access

Chinese Hamster Lung Cell을 이용한 *in vitro* 소핵시험의 세포질 최적화 연구

백민경*, 김아름누리, 신혜림, 전경미, 박경훈, 류지혁, 문병철

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과

Study on Optimization of Cytoplasm Conditions for *in vitro* Micronucleus Test Using Chinese Hamster Lung Cells

Min Kyoung Paik*, Areumnuri Kim, Hye Rim Shin, Kyongmi Chon, Kyung-Hun Park, Ji-Hyock Yoo and Byeong Chul Moon (Chemical Safety Division, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea)

Received: 14 August 2018/ Revised: 17 September 2018/ Accepted: 21 September 2018

Copyright © 2018 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Min Kyoung Paik

<http://orcid.org/0000-0001-6002-6358>

Abstract

BACKGROUND: *in vitro* micronucleus test (vitMNT) is one of the promising alternative testing methods in genotoxicity test and was adopted as OECD test guideline for chemical registration. This study was conducted to optimize the cytoplasm conditions in vitMNT using Chinese hamster lung (CHL) cell.

METHODS AND RESULTS: In this study cytokinesis-block micronucleus test was conducted. Mitomycin C and colchicine were used as positive control chemicals and were treated for three hours (short time) or twenty-four hours (long time). Giemsa solution was used for cell staining. For optimization of vitMNT, the final fixative was prepared as five concentrations (0%, 1%, 3%, 5%, and 25%) of acetic acid in methanol, and treatment times of the final fixative were varied under four conditions (immediately, one hour, four hours, and one day).

CONCLUSION: Acetic acid at 1% in methanol as the final fixative was most adequate to preserve the cytoplasm around the nucleus in the interphase cells. Also, fixative

treatment time of cell suspension for one to four hours may minimize the cell rupture. These results can be helpful for getting an accurate result promptly due to clear visual distinction to score micronucleus in vitMNT using giemsa solution.

Key words: Cytoplasm conditions, *In vitro* micronucleus test, Optimization

서 론

유전독성은 시험물질이 유전자 또는 염색체에 미치는 상해작용을 평가하는 시험법이며, 농약의 등록과정에서 필수적으로 수행하는 시험항목으로 잠재적인 발암성 또는 돌연변이 유발물질을 검출하기 위해 수행하는 시험이다(OCED, 2014; Kirkland *et al.*, 2011). 우리나라는 농약 등록단계에서 복귀 돌연변이시험, *in vitro* 염색체이상시험, *in vivo* 소핵시험의 3가지 시험법으로 유전독성을 평가하고 있다. 특히, 설치류의 혈구세포를 이용하는 *in vivo* 소핵시험은 의약품규제조화위원회(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, ICH)에서 권고하는 유전독성 표준조합 중의 한 방법으로 사용되고 있다(ICH, 2011).

독성시험법들은 동물복지 차원에서 전세계적으로 동물을 사용하지 않고 세포나 조직 등을 이용하는 대체시험법의 개

*Corresponding author: Min Kyoung Paik
Phone: +82-63-238-3253; Fax: +82-63-238-3238;
E-mail: mink1114@korea.kr

발이 매우 활발하게 진행되고 있다(Yamamoto *et al.*, 2005). 이에 따라, 소핵시험도 포유류 배양세포를 이용한 *in vitro* 소핵시험법(*in vitro* micronucleus test, vitMNT)이 개발되어, 염색체이상으로 생겨난 염색체의 파편 혹은 딸세포로의 분리에 실패한 온전한 염색체가 다시 핵막으로 싸여 이루어진 소핵(micronucleus, MN)을 관찰하고 그 출현집도를 산출하여 유전독성을 평가하고 있다(OCED, 2017). 유전독성은 염색체의 수적 이상(numerical aberration)과 밀접하게 관련되어 있는데, 다른 유전독성 시험법 중 하나인 염색체이상 시험은 염색체의 수적 이상을 유발하는 물질들 중 DNA와 직접 반응을 하지 않는 물질들을 검출하기가 통상적으로 어려운 반면, vitMN 시험은 구조적 이상에 의한 염색체의 파편으로부터 생성된 MN 뿐 아니라 염색체의 수적 이상으로 생성된 소핵 역시 계수가 가능하여 상대적으로 더 넓은 범위의 유전독성을 검색할 수 있다(Lee *et al.*, 2011).

하지만, 발암물질을 이용해 복귀돌연변이시험과 vitMNT의 표준조합으로 시험한 결과 민감도는 높으나 특이도가 낮게 나타나 포유류 배양세포를 이용한 유전독성시험에서 높은 양성률이 관찰되는 문제가 제기되었다(Kirkland *et al.*, 2005; Matthews *et al.*, 2006). 이에 따라 ICH에서는 *in vitro* 유전독성시험에서 유전자의 수적이상 유발물질 검출의 한계점 등을 해결하기 위하여 2011년 기존 유전독성 가이드라인인 S2B (ICH, 1995)와 S2A (ICH, 1997)를 통합하여 유전독성 시험 및 자료해석 가이드라인(S2(R1))을 개정하여 유전독성 조합시험법, 결과 평가 등에 대한 평가기준을 명확히 제시하는 등 *in vitro* 유전독성시험법을 이용한 시험결과의 판정의 신뢰도를 높이기 위해 노력하고 있다(ICH, 2011).

소핵시험법 중 Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) 방법은 전통적인 소핵 분석방법으로 선행연구로 재현성과 타당성이 검증된 방법이다(Fenech *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Könen-Adıgüzel *et al.*, 2018). CBMN은 최소한 1회 이상 분열한 세포에 대한 소핵 계수로 제한할 수 있어서, 세포가 유전독성물질에 노출될 때 발생하는 소핵의 빈도가 달라질 수 있는 문제를 해결할 수 있다(Kirsch-Volders *et al.*, 2011).

한편, vitMNT는 관찰 단위가 세포인 시험이기 때문에, 세포 준비, 처리, 고정, 퍼짐성, 염색 및 채점과 같은 많은 단계들이 세포막의 무결성 측면에서 중요하다. 더욱이, 소핵은 주요 핵과 독립적인 작은 개체이기 때문에, 부적절한 고정 또는 퍼짐성 절차가 적용되면 쉽게 잃어버릴 수 있다. 본 시험에서는 OECD 시험법 가이드라인 487, *in vitro* mammalian cell micronucleus test에서 의거하여 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 사용하여 CBMN 조건에서 vitMNT 증소핵 계수 단계의 cytoplasm과 그 band의 판별이 용이한 최상의 조건을 선정하고자 하였다. 양성대조물질인 mitomycin C (MMC)와 colchicine (Col)을 이용하여 1) 최종 현탁액인 3차 고정액인 메탄올 중 아세트산 농도 5조건(0%, 1%, 3%, 5%, 25%), 2) 최종 고정액의 처리시간 차이(즉시, 1시간, 4시간, 1일 경과)별로 현탁액을 슬라이드로 적정한 후 육안으로

소핵관찰이 용이한지 살펴보기 위하여 현미경을 이용해 세포질의 퍼짐성과 세포의 터짐성(cell rupture)을 관찰하였다.

재료 및 방법

시약

양성대조물질로는 염색체의 구조적 이상을 유발하는 MMC와 수적이상을 유발하는 Col은 Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 본 실험에서 실험수행의 적합성 검증을 위해 사용되었다. MMC는 멸균 증류수에, Col은 dimethyl sulphoxide (DMSO)에 용해하여 사용하였으며, 음성대조물질은 멸균 증류수를 사용하였다. 그 외의 모든 시약은 Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포주 및 세포배양

실험에서 사용된 세포주는 CHL cell로 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로 부터 구매하였으며, 세포는 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine가 포함된 MEM (Minimum essential medium)를 모두 Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하여 배양하는데 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂조건에서 2~3일 간격으로 계대배양하였으며, 세포의 doubling time은 25시간이었다. 액틴의 polymerizationin 저해제로 사용되는 cytochalasinB (cyto B)는 Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

시험방법

시험은 OECD TG 487의 vitMNT (OECD, 2016)을 근거로 하였으며, cyto B를 첨가한 CBMN 시험으로 진행하였다. 세포 수는 1×10⁵ cells/plate로 물질처리시간은 3시간(단시간 노출)과 24시간(장기간노출)으로 하였으며, 사용된 cyto B의 농도는 3 µg/ml이다.

실험절차는 다음과 같다. 시험물질 처리 개시로부터 24시간 후 세포를 수거하여 고정액(methanol:acetic acid, 3:1)으로 2회 고정시켰으며 최종적으로 3차 고정액을 처리 후 슬라이드에 적하한 후 공기건조법으로 세포표본을 만들었다. 10% giemsa 염색액으로 염색 후 현미경(Nikon, Eclipse 80i, Japan)으로 1,000배에서 관찰하였다.

본 시험에서는 세포질의 최적화 조건을 선정하고자 3차 고정액인 최종 고정액을 메탄올 중 acetic acid 농도가 5가지 농도(0%, 1%, 3%, 5%, 25%)가 되도록 조제하여 현탁하였으며, 또한 최종 고정액의 처리시간 차이 별로 4가지 조건(즉시, 1시간, 4시간, 1일 경과)으로 달리하였다.

소핵판정 기준

소핵의 판독은 Fenech (2006)이 제시한 기준에 따라 판정하였다. Cyto B를 처리하지 않은 시험에서는 각 농도군당 2,000개의 단핵세포(mononucleated cell)로부터 소핵을 가

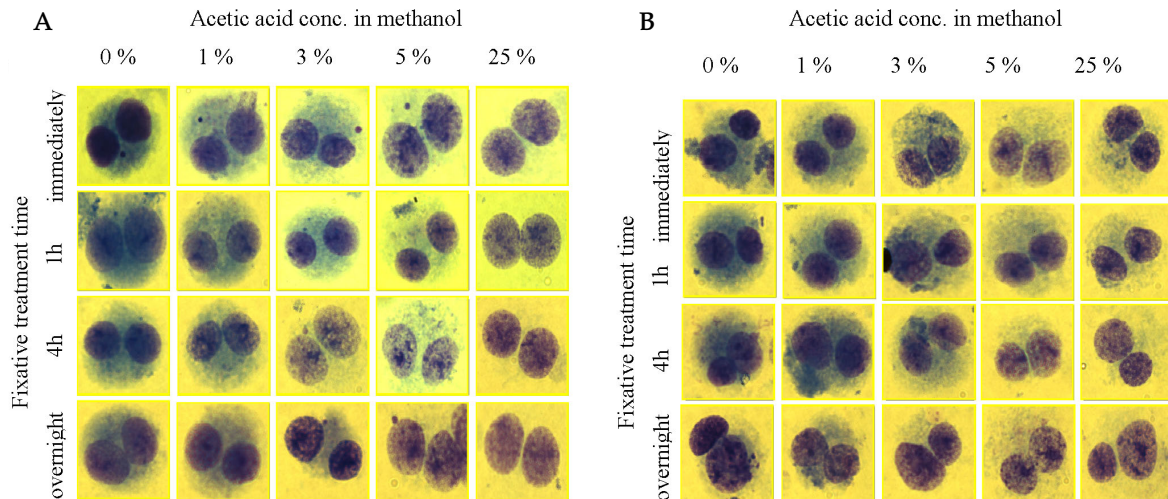


Fig. 1. Effect of acetic acid concentration in third fixative solution and fixative treatment time on the spread of cytoplasm of Chinese hamster lung cell treated with mitomycin C (A) and colchicine (B) for 3 hours.

진 세포(micronucleated cell, MNC)를 계수하지만, 본 시험에서는 Cyto B를 처리하였기에 단핵세포(mononucleated cell), 이핵세포(binucleated cell), 다핵세포(multinucleated cell)의 합계가 500개가 될 때까지 세포를 계수하고, 이핵세포가 1000개가 될 때까지 소핵을 계수하여 기록하였다. 결과 해석을 위해 RI (Replicative Index)와 CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation index)를 산출하여 평가하였다.

통계처리 및 판정은 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences, version 18.0)를 이용하였으며, 시험조건 군별 검증을 위해서 one-way ANOVA (analysis of variance)를 실시하고 유의수준 0.05에서 Duncan test로 유의성을 검증하였다. 판정기준은 음성대조군에 비해 3배 이상의 소핵형성과 통계적인 유의성을 보일 때 양성으로 판정하고 계수하였다(Miller *et al.*, 1995).

결과 및 고찰

세포질의 퍼짐성

MMC와 Col의 세포질 퍼짐성은 아세트산 농도가 5% 이상인 고정액을 사용한 군에서는 MMC (Fig. 1A)와 Col (Fig. 1B) 모두 cell의 세포질이 명확하게 구분되지 않았다. 또한 아세트산을 포함하지 않은 고정액 사용군에서는 세포질이 좁고 어두워서 이핵에서 소핵을 계수하기 어려웠지만 아세트산이 1%와 3%인 고정액 사용군에서 세포질이 뚜렷하게 보였고 band가 적절하여 소핵을 관찰하기에 효과적이었다.

고정액으로서의 메탄올은 소수성 및 수소결합을 파괴함으로써 단백질의 소수성 그룹을 노출시켜 물의 3차구조와 용해성을 바꿈으로써 조직 내 물을 치환하여 탈수작용을 하며, 메탄올과 아세트산을 함유하는 고정액은 염색체(chromosome) 구조는 보존되지만 세포질은 거의 용해된다고 보고하였다(Ruzin, 1999). 최종 고정액에서의 아세트산의 농도가 높아질수록 세포질의 팽윤(swelling)이 커져서, 아세트산을 18%

함유한 용액으로 고정된 세포는 세포질이 부분적으로 분산되어서 각각의 세포의 영역이 불명확해지며, 아세트산의 농도가 높아질수록 세포질 확인이 어려운 것을 알 수 있다.

최종 고정액의 처리시간 차이에 따른 세포질 결과를 살펴보면, 적하시간이 1일이 경과한 경우 세포질이 거의 사라져서 보이지 않았으며, 4시간 경과 후 적하한 군에서는 세포질이 매우 흐리게 나타났다. 따라서 세포를 현탁시킨 후 4시간 이전에 적하하는 것이 좋을 수 있다. 그러나 적하시간을 현탁 후 즉시 또는 1시간 후에 시행한 군에서도 고정액의 아세트산 비율이 증가할수록 세포질은 점점 더 흐려 세포질 중 소핵의 관찰이 더 어려웠다.

세포 터짐성

vitMNT는 간기(interphase) 세포 1,000개 중 소핵을 정확하고 신속하게 계수하여야 하므로 최종 단계까지 세포가 터지지 않고 세포질의 형태를 유지하는 것이 중요하다(Yamamoto *et al.*, 2005). 따라서 본 연구에서는 최종 고정액 중 acetic acid 농도별, 최종 고정액의 처리 시간별로 1,000개의 세포 중 터진 세포의 수를 계수하였으며, 양성대조군인 MMC와 Col를 단시간(3시간) 처리한 경우와 장시간(24시간) 처리한 경우로 구분하였다(Fig. 2).

MMC를 단시간 처리군은 고정액을 즉시 처리한 경우 고정액 중 acetic acid의 농도가 0%, 1%, 3%인 경우 세포의 터짐성이 세포 1,000개 당 각각 8.1개, 8.3개, 14.4개로 나타났으며, 고정액 중 acetic acid의 농도가 0과 1%인 경우 고정액을 1시간 처리한 경우 각각 1.2개와 4.0개로 51.9%와 48.3%로 터짐성이 유의적으로 감소하였으나 acetic acid의 농도가 3%인 경우 유의적인 감소는 나타나지 않았다. MMC를 장시간 처리한 경우 고정액 중 acetic acid의 농도가 0%와 3%인 군에서 고정액 처리시간이 증가할수록 세포의 터짐성은 증가하였으나, 1% acetic acid를 함유한 고정액을 처리한 군에서는 고정액 처리 후 즉시 적하한 군(22.4개)에 비해

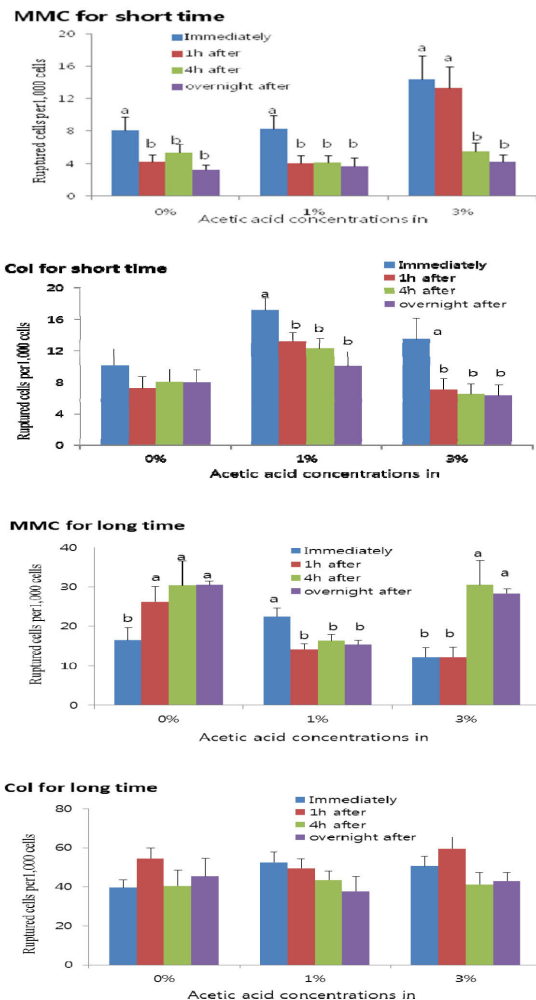


Fig. 2. Effect of acetic acid concentration in third fixative solution and fixative treatment time on the ruptured cells per 1,000 cells of Chinese hamster lung cell treated with mitomycin C (MMC) and colchicine (Col) for short and long time, respectively. a, b, indicate a significantly difference between means by Duncan test at $p < 0.05$.

고정액 처리를 1시간, 4시간, 1일 처리한 경우 터짐성이 각각 14.2개, 16.3개, 15.4개로 즉시 적하한 군에 비해 터짐성이 63.4%, 72.8%, 68.8%로 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. 즉 MMC와 Col의 2개의 양성대조물질을 단시간 처리한 경우 3% acetic acid를 함유한 고정액을 처리한 군에서 고정액을 즉시 처리한 군에 비해 1시간 이상 처리한 군에서 세포의 터짐성이 감소하였다.

MMC를 장시간 처리한 경우에도 고정액 중 acetic acid의 모든 농도군에서 최종 고정액 처리시간이 길어질수록 세포의 터짐성은 감소하였는데, 특히 acetic acid의 농도가 1%와 3%의 고정액을 처리한 경우는 고정액을 즉시 적하한 군에서 세포 터짐성이 각각 17.2개와 13.5개였으나 고정액을 1시간 처리한 경우 터짐성이 13.2개와 7.1개로 76.7%와 52.6%로 세포 터짐성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 반면, 장시간 Col을 처리한 군에서는 고정액 중

acetic acid의 농도나 고정액 처리시간에 따른 터짐성의 변화가 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). 본 시험에서 고정액 처리시간에 따른 세포의 터짐성 차이는 세포가 매탄올에 노출되는 시간이 늘어날수록 세포의 조직이 단단해지기 때문인 것으로 생각된다(Ruzin, 1999). 따라서 세포의 터짐성을 낮추기 위해서는 최종 고정액 중 acetic acid 농도가 1%인 고정액으로, 처리시간은 1시간에서 4시간 이내로 처리하는 것이 가장 적절한 것으로 사료된다.

소핵발생률

vitMNT는 해당 시험조건에서 양성대조물질의 소핵유발률이 음성대조군에 비해 유의적으로 높은 수준으로 historical range에 드는지에 대한 신뢰성이 검증되어야 한다. 따라서, CHL 세포에 음성대조군과 양성대조군을 단기간 및 장기간 처리한 vitMN시험에서 세포질의 최적화 조건으로 제안된 시험조건인 1) 1% acetic acid의 최종 고정액 사용, 2) 고정액 처리시간 1시간으로 수행했을 때의 소핵의 발생률을 조사하였다(Table 1).

MMC와 Col을 단시간 처리시 소핵발생률은 각각 4.0%와 4.3%였으며, 장기간 처리시 각각 4.1%와 9.2%로 나타났으며, 이는 음성대조군에 비해 유의적으로 증가한 경향을 보였다. 또한 Cyto B 처리했을 때 시험의 타당성을 확인하는 RI는 음성대조군 대비 양성대조군의 500개 이상의 단핵, 이핵, 다핵세포의 수로부터 산출하게 되는데, 본 시험에서 양성대조물질의 단기간 및 장기간 처리한 군에서 67~82%로 나타내어, RI 값의 감소 경향이 일관성을 나타내어 본 시험에서 사용된 방법의 신뢰도가 높음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, vitMNT의 소핵 계수를 위한 신속성 및 용이성, 정확성을 확보하기 위해서는 고정액에 포함된 acetic acid의 함량은 1%로, 고정액 처리시간을 1시간에서 4시간 이내로 하는 것이 가장 적절한 것으로 생각된다.

2010년 OECD TG 487로 채택되면서 국제 및 국내에서 많은 검증시험을 진행한 바 있는(OECD, 2014; Lee *et al.*, 2011) vitMNT는 세포 독성뿐만 아니라 유전적으로 가능성이 있는 것뿐만 아니라 체점, 정확성, 다양한 세포 유형에서의 광범위한 적용 가능성을 탐지 할 수 있는 능력 때문에 유전독성 시험에 대한 매력적인 도구이다(Parry and Sors 1993; Kirsch-Volders 1997; Kirsch-Volders *et al.*, 2011). 그렇지만 OECD의 Expert Consultation의 논의에서 세포독성의 지표인 Relative Increased in Cell Count (RICC)를 지표로 할 경우 vitMN의 유전독성 물질 검출능이 저하될 우려가 제기되었다(ICH, 2011).

반면, 소핵시험은 단순 원형의 소핵을 평가하고 이론적으로 평가에 사용하는 세포의 수에 제한이 없으므로, 평가에 사용된 표본 수를 크게 하여 판독 시 분별력을 높이면 시험의 민감도(sensitivity)를 향상시키고 평가자의 주관이 배제되어 더욱 객관성 있는 결과를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있어 (Lee *et al.*, 2011), 본 연구와 같이 판독 시 분별력을 높일

Table 1. Frequency of micronuclei (MN) in Chinese hamster lung cells with treatment with mitomycin C (MMC) and colchicine (Col) compared to negative controls

Test material	Dose (μg/ml)	Treat time + Recovery time (hours)	RI(%) ¹⁾	% MN ²⁾ (mean±SD)
Negative control (Distilled water)	0	3+21	100	1.2±0.1
	0	24+0	100	1.2±0.1
MMC	0.125	3+21	70	4.0±0.8
	0.0625	24+0	67	4.1±0.6
Col	0.5	3+21	82	4.3±0.5
	0.1	24+0	82	9.2±0.9

¹⁾ RI (Replication index) = $\frac{\text{No. binucleated cells} + 2 \times \text{No. multinucleate cells}}{\text{Total number of cells treated cultures}} \div \frac{\text{No. binucleated cells} + 2 \times \text{No. multinucleate cells}}{\text{Total number of cells control cultures}} \times 100$

²⁾ %MN, Micronuclei in cells.

수 있는 최적화 연구가 vitMNT를 통해 얻은 시험결과와 정확도 향상에 도움이 될 것으로 생각된다.

요 약

In vitro 소핵시험(vitMNT)은 유전독성의 유망한 대체시험법 중 하나로, OECD에서 TG로 채택되어 화학물질의 등록에 사용되고 있다. 본 시험에서는 CHL cell을 사용한 vitMN test에서 소핵을 판별하기 위한 최적화된 세포질 조건을 찾고자 하였으며, 양성대조물질로 MMC와 Col을 사용하고 세포 염색을 위해 giemza 용액을 사용하였다. 시험결과, 세포현탁을 위해 사용되는 고정액의 acetic acid의 농도는 1%로 하는 것이 band의 두께와 세포질의 퍼짐성 측면에서 적당하였다. 또한 세포의 깨짐을 최소화하는 최종 고정액의 적하시간은 현탁 후 1~4시간이었다. 이러한 결과는 vitMNT에서 소핵관찰의 신속성, 용이성 및 정확성을 확보하는데 도움이 될 것이다.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ01092304)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1), 58-66.
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., & Müller, L. (2005). Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 584(1), 1-256.
- Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajoui, A., Plas, G., Aardema, M. J., & Fenech, M. (2011). *in vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*, 26(1), 177-184.
- Kirsh-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, 392, 1-4.
- Könen-Adigüzel, S., & Ergene, S. (2018). *in vitro* evaluation of the genotoxicity of CeO₂ nanoparticles in human peripheral blood lymphocytes using cytokinesis-block micronucleus test, comet assay, and gamma H2AX. *Toxicology and Industrial Health*, 34(5), 293-300.
- Lee, H., Kim, J., Lee, W., Maeng, E., Lee, J., Chung, Y., Kim, C., Kim, Y., Jang, M., Lee, S., & Jeon, T. (2011). Validation study of the *in vitro* micronucleus test. *Journal of Alternatives to Animal Experiments*, 5(1), 11-50.
- Lee, Y., H., Kim, Y. J., Choi, Y. J., & Lee, J. W. (2010). Recent advances in micronuclei assay for the monitoring of genotoxic effects of environmental pollutants in human populations. *The Korean Journal of Public Health*, 47(1), 16-25.
- Matthews, E. J., Kruhlak, N., Cimino, M., Benz, R. D., & Contrera, J. F. (2006). An analysis of genetic toxicology, reproductive and developmental toxicity and carcinogenicity data : I. identification of carcinogens using surrogate end points. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44(2), 83-96.
- Miller, B. M., Pujadas, E., & Gocke, E. (1995). Evaluation of the micronucleus test *in vitro* using Chinese

- hamster cells: results of four chemicals weakly positive in the *in vivo* micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26(3), 240-247.
- Parry, J. M., & Sors, A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environment chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, 287, 3-15.
- Ruzin, S. E. (1999). Plant microtechnique and microscopy (eds. Ruzin, S. E), pp. 190-203. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Yamamoto, M., Motegi, A., Seki, J., & Miyamae, Y. (2005). The optimized conditions for the *in vitro* micronucleus (MN) test procedures using chamber slides. *Environmental Mutagen Research*, 27(3), 145-151.