

Title	除草剤によるメダカ鰓細胞での小核誘発
Sub Title	Induction of micronuclei by herbicides in medaka (<i>Oryzias latipes</i>)gill cells
Author	金谷, 信宏(Kanaya, Nobushiro) 坪川, 達也(Thubokawa, Tatsuya)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2007
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of natural science). No.41 (2007. 3) ,p.1- 14
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20070331-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

除草剤によるメダカ鰓細胞での小核誘発

金谷信宏・坪川達也

Induction of micronuclei by herbicides in medaka (*Oryzias latipes*) gill cells

Nobuhiro KANAYA and Tatsuya TSUBOKAWA

Summary— Effects of two herbicides, glufosinate and amitrole, on induction of micronuclei in medaka gill cells were examined. The medaka fish were exposed to each herbicide for 3 hours, recovered in dechlorinated tap water for 48 hours, and fixed in methanol:acetic acid (3:1). Gill cells were stained by the Feulgen's staining method and cells with micronuclei were observed with a light microscope. The treatments of cells with glufosinate at 2.5–5 mM or with amitrole at 2.5–10 mM gave rise to significant increases in cells with micronuclei. Number of pulverized nuclei increased after the treatments with glufosinate.

Key words: medaka gill cells, herbicide, glufosinate, amitrole, micronucleus

序論

我々の身の回りには様々な環境汚染物質が存在している。その中でも特に遺伝子に傷をつける変異原は発がん物質であることが多いので、それらを見つけることはがんの予防の点からも重要である。変異原を見つけるための変異原性試験にはエームス試験と呼ばれている、サルモネラ菌での突然変異を検出する復帰変異試験 (Ames et al., 1975)、哺乳動物培養細胞や植物細胞を用い、細胞分裂期に遺伝子が凝縮された構造体として観察される染色体の形や数が、異常なものに変わることを調べる染色体異常試験 (Evans, 1976; 菊池, 1988; Kanaya et al., 1994) や、図 1 に示されたような染色体構造異常や細胞分裂異常に起因する小核の誘発を調べ

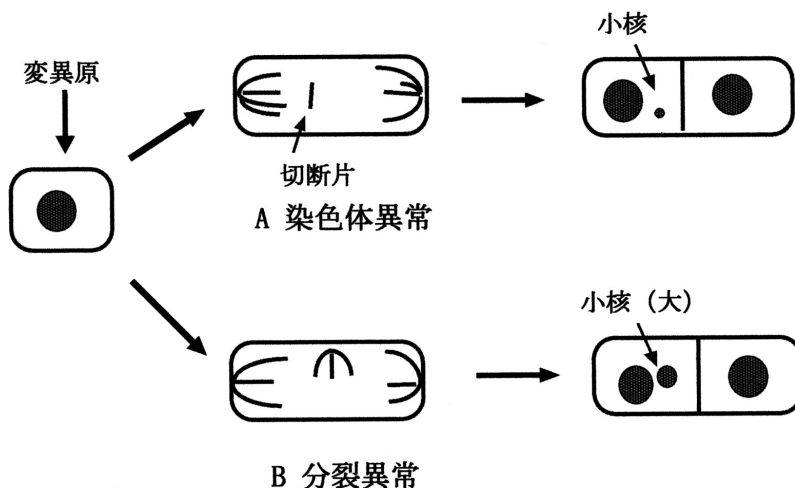


図1 変異原による小核を持つ細胞の誘発

A. 変異原処理により染色体切断が起こった場合、その切断片は次の間期に小核として観察される。B. 変異原処理により分裂異常が引き起こされた場合、次の間期に、正常な間期核の直径の1/4より大きな小核として観察される。

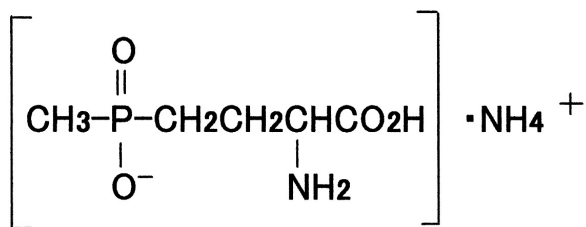
る小核試験 (Schmid, 1976; 林, 1991) などがある。

農薬は様々な短期、長期試験を経て安全性が確認されてから認可され、実際に使用される。短期試験である染色体異常試験と小核試験では、通常は哺乳動物培養細胞を使っていてその結果からヒトへの影響を推し量っている。実際に農薬がヒトに影響を及ぼすのは、散布の際に曝露された時だけでなく、野菜などの植物に残留してそれを食べた時でもある。さらに農薬が河川などに流れ込むことによりそこに生育する魚にも取り込まれ、食物連鎖により最終的にはヒトにも入ってくる危険性も考えられることから、農薬が魚に対して変異原性をもつかどうかを調べることは重要であると思われる。そこで、本研究ではメダカを材料として、除草剤であるグルホシネートとアミトロールがメダカの鰓細胞に変異原性の指標の一つである小核を誘発するのか調べた。

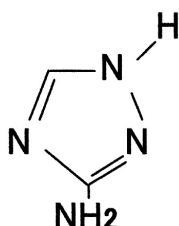
材料と方法

ヒメダカ (*Oryzias latipes*) はアクアリウム (川崎) より購入してすぐに、脱塩素水道水を入れた水槽で、テトラベルケ社 (ドイツ) のテトラフィンを毎日餌として与え、2-3日室温で飼育してから長さ3cm前後の個体を実験に使用した。

使用した除草剤はグルホシネート標準品と、アミトロール標準品 (和光純薬工業㈱, 大阪) である (図2)。陽性対照としてマイトマイシンC (MMC; 協和醸酵工業㈱, 東京) を使用した。これらの化学物質は脱塩素した水道水で溶かし、直径9cm、深さ8.5cmのシャーレに80ml入れ、そこにメダカを移し、室温で3時間処理した。脱塩素水道水だけの処理を陰性



Glufosinate: Ammonium DL-Homoalanin-4-yl-(methyl)phosphinate
 $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}=198.16$ (CAS: 77182-82-2)



Amitrole: 3-Amino-1H-1,2,4-Triazole
 $\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4=84.08$ (CAS: 61-82-5)

図2 グルホシネートとアミトロールの化学式

対照とした。

処理後メダカを取り出し、脱塩素水道水に5分間おいて洗浄し、別のシャーレに移し、25℃で明暗各12時間にセットしたインキュベータ内で48時間回復させて固定した。この間餌は与えず、水の交換は行わなかった。固定はメダカを氷水に入れて動けなくしてから、メタノール：酢酸(3:1)溶液に固体全体を浸けることにより行われた。メダカの雌雄判定は固定直前に行った。

固定したメダカの体から鰓(図3-A-g)を取り出し、プラスチックチューブに移し、水道水で洗浄後、次のようにフォイルゲン染色した。チューブに1規定塩酸を入れ、室温に5分おいてから60℃で8分間加水分解した。水道水で洗浄してからシッフ試薬(ナカライテスク(株), 京都)を入れ、4℃で12時間染色した。シッフ試薬を取り除き、水道水で洗浄後45%酢酸を加えた。鰓の一部(図4-A)をスライドグラスに載せ、カバーグラスをかけて細胞の塊を払ってから、押しつぶして標本作製した。個体あたり鰓上皮細胞(図3-E-Se)を1,000細胞以上、倍率1,000倍の光学顕微鏡で観察し小核をもつ細胞(図5-A)の頻度と、図6に示された分裂期細胞を数えて分裂指数を調べた。処理あたり3個体以上のメダカを使用した。小核を持つ細胞の頻度が化学物質処理により有意に増加したのかどうかの有意差検定は、陰性対照とのStudent's *t*-testにより行った。

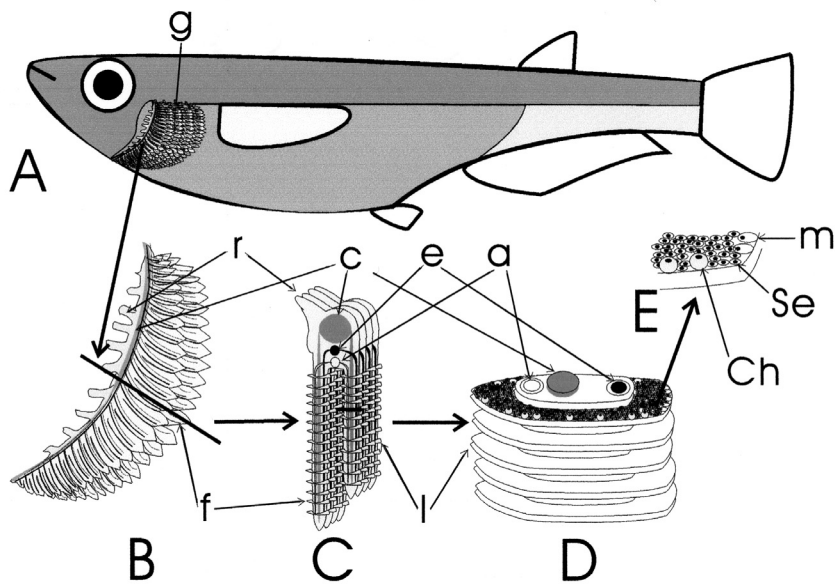


図3 メダカ鰓上皮細胞の解剖学的，組織学的説明

A. メダカ全体図（鰓蓋を切除），鰓（gill）が見える。B. 第一鰓弓（gill arch）拡大図，基部に鰓弓軟骨（c, cartilage），鰓把（r, raker）が前に突出している。長，短二つの鰓弁（f, filament）が見える。C. 鰓弁の拡大図，基部及び鰓弁内に軟骨（c），入鰓動脈（a, afferent），出鰓動脈（e, efferent）があり，最弁に鰓薄板（l, lamella）が直行する形で何層も付いている。D. 鰓薄板の拡大図，最弁の中心部に軟骨（c），入鰓動脈（a），出鰓動脈（e）があり，鰓薄板は細胞群で構成されている。E. 鰓薄板の前角部の拡大図，前面に粘液細胞（m, mucous cell）が，側面には塩類細胞（Ch, chloride cell）が僅かに見られるが形態で区別が付き，ほとんどを鰓上皮細胞（Se, stratified epithelium）が占める。

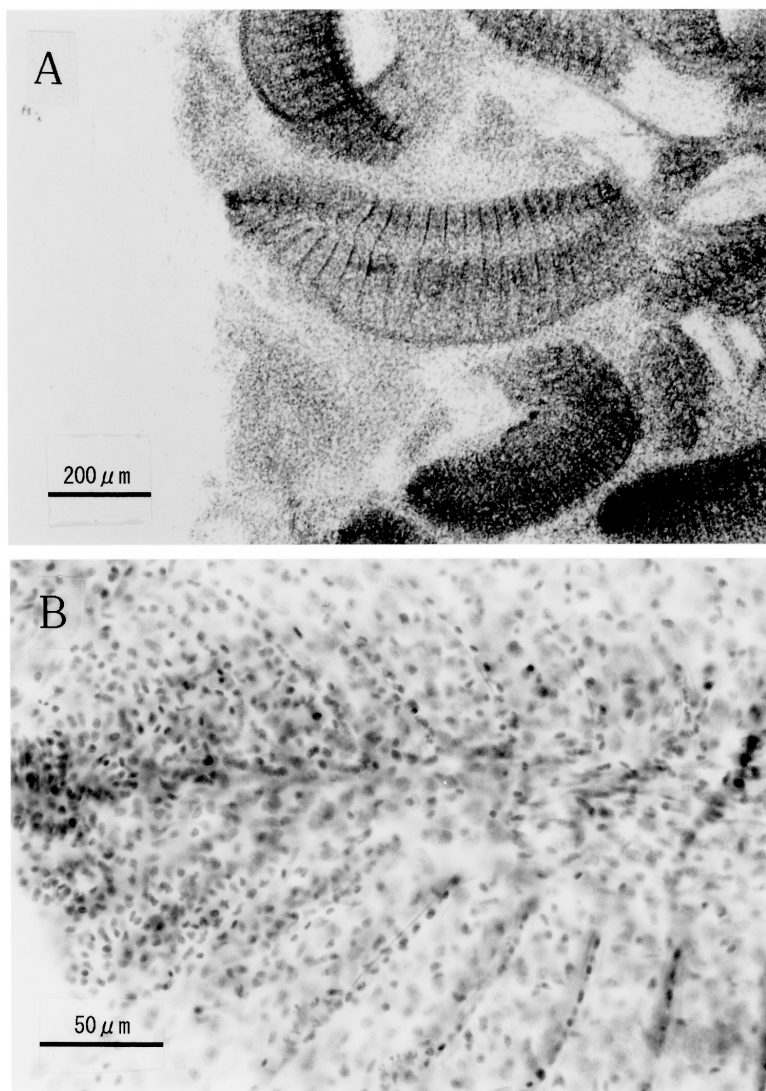


図4 フォイルゲン染色されたメダカの鰓
A. 鰓の鰓弁 (図3 - Bの filament)。B. Aの拡大写真で、血管の部分が葉脈のように濃く見え、鰓上皮細胞の核が染まって見える。

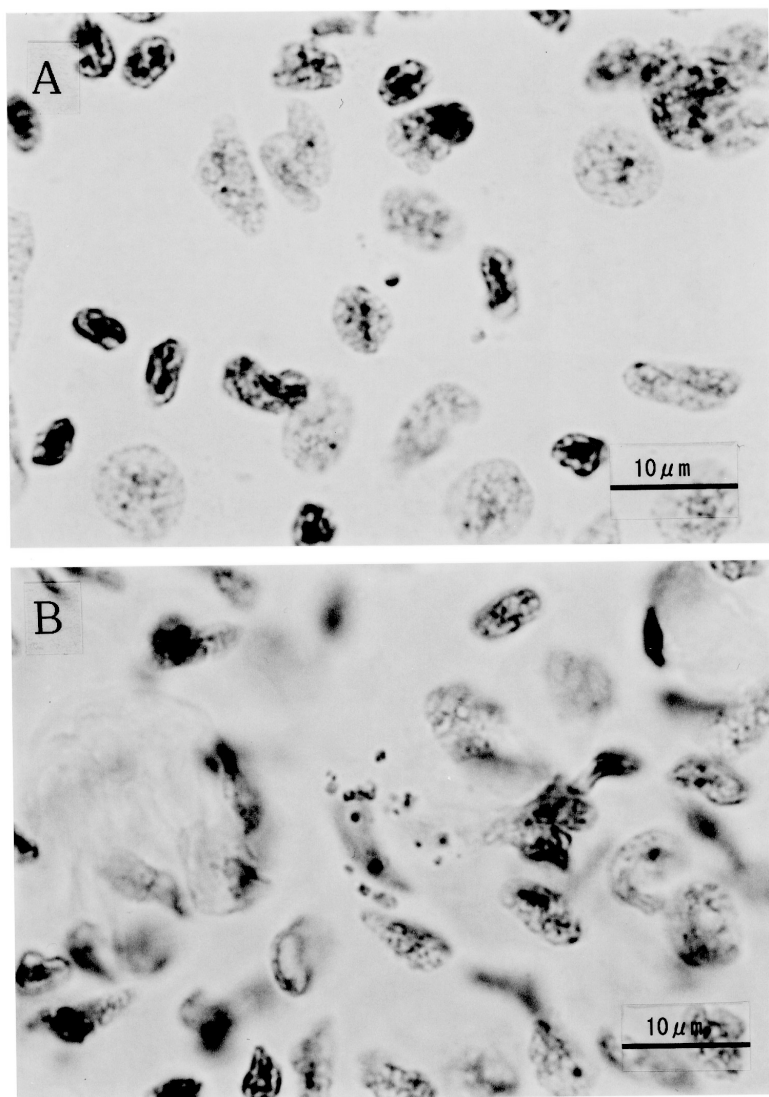


図5 メダカ鰓上皮細胞

A. 小核を持つ鰓上皮細胞。B. 粉砕化された核をもつ上皮細胞。

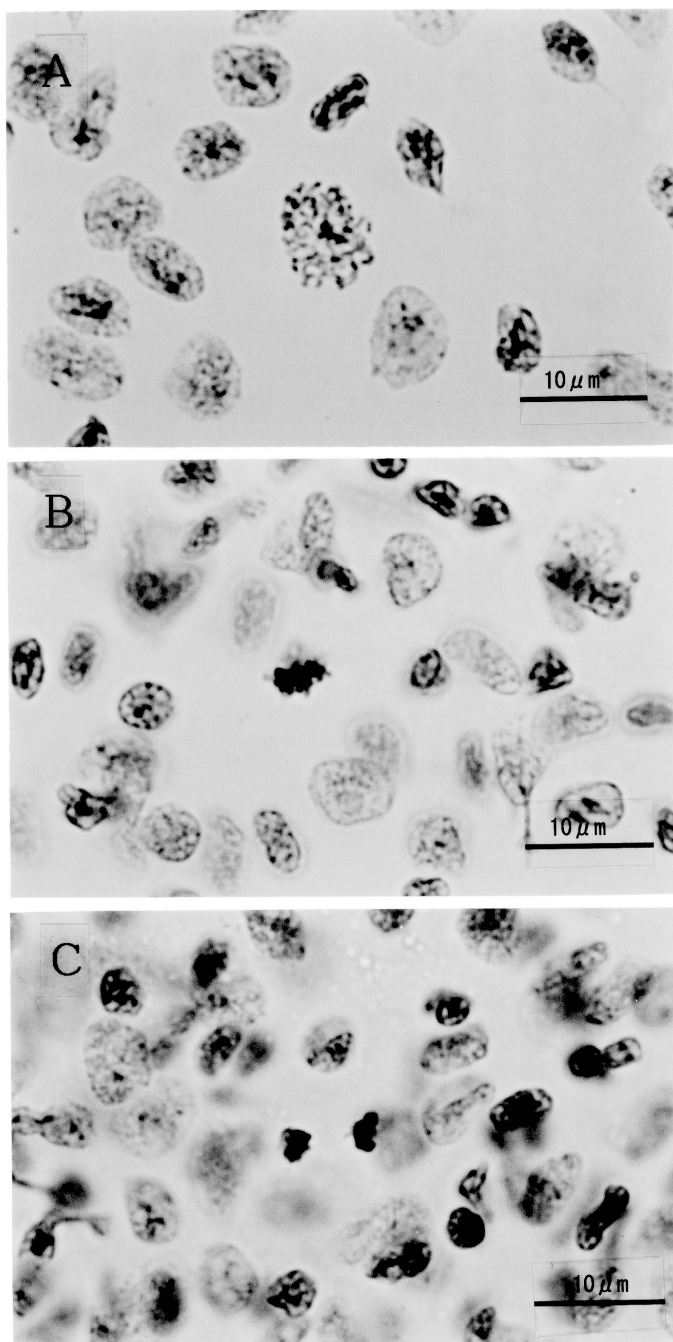


図6 分裂期のメダカ鰓上皮細胞
A. 前期細胞。B. 中期細胞。C. 後期細胞。

表1 マイトマイシンC (MMC) によるメダカ鰓細胞での小核 (MN) 誘発

Experiment No.	Treatment	No. of fish	No. of cells observed	No. of cells with MN	Total MN	Mean % of cells with MN $\pm$ S.D.	Mitotic index	No. of nuclei pulverized	<i>t</i>
1	Control	4	6,000	11	12	0.20 ± 0.12	0.4	1	-
2	Control	4	3,000	5	6	0.17 ± 0.09	0.3	1	-
1+2	Control	8	9,000	16	18	0.18 ± 0.11	0.4	2	-
1	MMC $5\mu\text{M}$	3	4,000	22	25	0.48 ± 0.25 (n.s.)	0.5	8	1.50
2	MMC $5\mu\text{M}$	3	3,000	16	18	0.53 ± 0.21 (n.s.)	0.7	6	2.20
1+2	MMC $5\mu\text{M}$	6	7,000	38	43	$0.54 \pm 0.25^*$	0.6	14	3.40
1	MMC $10\mu\text{M}$	3	4,000	28	30	$0.65 \pm 0.19^{**}$	0.9	5	3.26
2	MMC $10\mu\text{M}$	3	3,000	23	23	$0.77 \pm 0.33^{**}$	0.5	5	2.54
1+2	MMC $10\mu\text{M}$	6	7,000	51	53	$0.73 \pm 0.26^*$	0.7	10	5.00
1	MMC $20\mu\text{M}$	3	4,000	30	31	$0.68 \pm 0.28^{**}$	0.4	11	2.54
2	MMC $20\mu\text{M}$	3	3,000	19	21	$0.63 \pm 0.17^{**}$	0.5	3	3.22
1+2	MMC $20\mu\text{M}$	6	7,000	49	52	$0.70 \pm 0.24^*$	0.5	14	5.10

*, $p<0.01$; **, $p<0.05$; n.s., not significant

表2 グルホシネート (GF) によるメダカ鰓細胞での小核 (MN) 誘発

Experiment No.	Treatment	No. of fish	No. of cells observed	No. of cells with MN	Total MN	Mean % of cells with MN $\pm$ S.D.	Mitotic index	No. of nuclei pulverized	<i>t</i>
1	Control	4	6,000	11	12	0.20 ± 0.12	0.4	1	-
2	Control	4	3,000	5	6	0.17 ± 0.09	0.3	1	-
1+2	Control	8	9,000	16	18	0.18 ± 0.11	0.4	2	-
1	MMC $10\mu\text{M}$	3	4,000	28	30	$0.65 \pm 0.19^{**}$	0.9	5	3.26
2	MMC $10\mu\text{M}$	3	3,000	23	23	$0.77 \pm 0.33^{**}$	0.5	5	2.54
1+2	MMC $10\mu\text{M}$	6	7,000	51	53	$0.73 \pm 0.26^*$	0.7	10	5.00
2	GF 2.5 mM	3	3,000	22	27	$0.73 \pm 0.17^*$	0.6	3	3.86
1	GF 5 mM	3	4,000	28	29	$0.80 \pm 0.29^{**}$	0.6	4	3.11
2	GF 5 mM	3	3,000	30	32	$1.00 \pm 0.14^*$	0.8	3	7.03
1+2	GF 5 mM	6	7,000	58	61	$0.83 \pm 0.23^*$	0.7	7	6.57
1	GF10 mM	3	4,000	27	28	0.60 ± 0.29 (n.s.)	0.4	1	2.07

*, $p<0.01$; **, $p<0.05$; n.s., not significant

結果

各化学物質処理中と、脱塩素水道水中で回復中のメダカの泳ぎ方を陰性対照と比較したが、化学物質処理による異常な泳ぎは特に見られなかった。

最初に陽性対照として使用したMMCによる小核誘発を調べた。表1には2回の実験結果と、それらを合わせた結果が示されている。5 μ Mでの処理により小核を有する細胞の頻度は増加したが、各実験での陰性対照との有意差はなかった。2つの実験を合わせることでサンプル数が増え、統計的に有意な増加となった。10–20 μ MのMMC処理では各実験で有意な増加を示したが、20 μ M処理での頻度は10 μ Mでの頻度より若干低かった。分裂指数はMMC処理により低下しなかったため、分裂阻害による低下ではないと考えられた。観察の際、視野は任意に選んだが、その誤差によるものと思われた。このようにMMC処理により小核を有する細胞の頻度は、完全に濃度に依存はしなかったが有意に増加した。図5–Bのような粉碎されたような核を持つ細胞が、特にMMC処理により多く見られたが、MMC濃度依存的ではなかった。陰性対照でもMMC処理でも図1に示されたような分裂異常による、間期核の直径の1/4より大きな小核は見られなかった。次の除草剤処理実験では、陽性対照として10 μ MのMMC処理を合わせて行った。

表2には1～2回のグルホシネートを使った実験結果が示されている。2.5mMのグルホシネート処理は1回だけ行ったが、小核を有する細胞の頻度は有意に増加した。5 mMでは2回行ったがいずれも有意な増加を示し、その頻度は2.5mMでの結果より高かった。10mMでは陰性対照の3倍の頻度であったが、統計的には有意な違いはなかった。分裂指数は陰性対照と同じだったので分裂阻害による低下ではなく、観察誤差だと考えられた。粉碎化された核の数は5 mMグルホシネート処理により増加したが、分裂異常による大きな小核は誘発されなかった。

表3には2.5–10mMのアミトロールで処理した2回の実験結果と、それらを合わせた結果が示されている。5 mMでの実験1の結果以外は有意な増加を示した。5 mM処理で頻度は少し低下したことにより濃度依存的ではなかった。粉碎化された核の数は陰性対照と同じくらいだった。実験1での10mM、実験2での5 mMアミトロール処理で各1匹のメダカが死んだことにより、アミトロールはグルホシネートより毒性が強いことが考えられた。アミトロールにより分裂異常による大きな小核は誘発されなかった。

Takaiら(2004)により、自然に起こる小核頻度およびX線照射により誘発された小核頻度はメダカのオス、メス、体のサイズに無関係であると報告されているので、本研究でもオス、メスにより小核誘発頻度が異なるのか、各実験の結果を合わせてオス、メスに分けて平均値を算出し、*t*-testを行った。表4に示されたように、陰性対照、MMC処理による陽性対照、グルホシネート処理、アミトロール処理のいずれの場合でも、オス、メスの頻度に有意差はなかった。*t*値が最も高かったのは10mMグルホシネート処理の結果で、観察したオスは2匹で平均値が0.80%で、観察したメスは1匹だけで頻度は0.20%であった。この差は統計的には有意で

表3 アミトロール (AT) によるメダカ鰓細胞での小核 (MN) 誘発

Experiment No.	Treatment	No. of fish	No. of cells observed	No. of cells with MN	Total MN	Mean % of cells with MN $\pm$ S.D.	Mitotic index	No. of nuclei pulverized	<i>t</i>
1	Control	3	3,000	5	5	0.17 ± 0.05	0.2	2	-
2	Control	3	3,000	7	7	0.23 ± 0.17	0.9	5	-
1+2	Control	6	6,000	12	12	0.20 ± 0.14	0.6	7	-
1	MMC 10 μ M	3	3,000	28	29	$0.93 \pm 0.09^*$	0.4	2	8.54
2	MMC 10 μ M	3	3,000	36	42	$1.20 \pm 0.36^{**}$	1.8	7	3.48
1+2	MMC 10 μ M	6	6,000	64	71	$1.07 \pm 0.32^*$	1.1	9	6.30
1	AT 2.5 mM	3	3,000	18	19	$0.60 \pm 0.08^*$	0.6	2	6.98
2	AT 2.5 mM	3	3,000	24	29	$0.80 \pm 0.16^{**}$	1.3	3	3.41
1+2	AT 2.5 mM	6	6,000	42	48	$0.70 \pm 0.18^*$	0.9	5	6.62
1	AT 5 mM	3	3,000	17	18	0.57 ± 0.29 (n.s.)	0.7	2	2.01
2	AT 5 mM	2 ^a	2,000	16	16	$0.80 \pm 0.00^{**}$	1.1	2	3.61
1+2	AT 5 mM	5	5,000	33	34	$0.66 \pm 0.28^{**}$	0.9	4	3.57
1	AT 10 mM	2 ^a	2,000	18	24	$0.90 \pm 0.20^*$	1.2	4	4.80
2	AT 10 mM	3	3,000	25	26	$0.83 \pm 0.12^{**}$	0.6	2	3.76
1+2	AT 10 mM	5	5,000	43	50	$0.86 \pm 0.18^*$	0.9	6	6.79

a, one fish died

*, $p < 0.01$; **, $p < 0.05$; n.s., not significant

表4 メダカのオスとメスにおける、マイトマイシンC (MMC), グルホシネート (GF), アミトロール (AT) 誘発小核頻度の比較

Treatment	Mean % of cells with MN $\pm$ S.D. (n)		<i>t</i>
	Male	Female	
Control	0.22 ± 0.16 (9)	0.15 ± 0.06 (4)	0.83 (n.s.)
MMC, 5 μ M	0.58 ± 0.36 (4)	0.50 ± 0.14 (2)	0.37 (n.s.)
MMC, 10 μ M	0.96 ± 0.35 (10)	0.90 ± 0.71 (2)	0.32 (n.s.)
MMC, 20 μ M	0.83 ± 0.15 (3)	0.57 ± 0.25 (3)	1.53 (n.s.)
GF, 2.5mM	1.30 (1)	0.70 ± 0.28 (2)	1.71 (n.s.)
GF, 5mM	0.77 ± 0.32 (3)	1.10 ± 0.20 (3)	1.43 (n.s.)
GF, 10mM	0.80 ± 0.14 (2)	0.20 (1)	3.47 (n.s.)
AT, 2.5mM	0.63 ± 0.15 (3)	0.97 ± 0.47 (3)	1.40 (n.s.)
AT, 5mM	0.53 ± 0.31 (3)	0.90 ± 0.14 (2)	1.63 (n.s.)
AT, 10mM	1.03 ± 0.47 (4)	0.90 (1)	0.25 (n.s.)

n.s., not significant

はなかった。

考察

グルホシネートは1984年6月14日に登録され、現在も使用されている除草剤である。グルホシネートの化学式はグルタミン酸と似ていて、植物体内に取り込まれると、アンモニアとグルタミン酸からグルタミンを合成する、グルタミン合成酵素の作用を拮抗的に阻害する。その結果植物体内にアンモニアが蓄積し、その植物は枯死するのである (Cox, 1996)。突然変異原性、発がん性については陰性結果が報告されている (Ebert et al., 1990; Hoerlein, 1994; Cox, 1996)。本研究でグルホシネートはメダカ鰓細胞に小核を誘発したことから、変異原性があることが認められたので、全く安全な除草剤であるとはいえないと考えられた。使用にあたっては推奨濃度を守ることが大事だと思われる。グルホシネートはマウス胚の神経上皮細胞でアポトーシスを誘発することが報告されている (Watanabe, 1997)。本研究でグルホシネート処理により粉砕化された核が陰性対照よりも多く観察されたが、これはアポトーシスによるものかもしれない。

アミトロールは1962年7月23日に登録され、1975年3月31日に失効した除草剤であり、サルモネラ菌でアミノ酸の一種であるヒスチジンを合成する酵素を阻害する (Weyter and Broquist, 1960; Hilton et al., 1965)。アミトロールの変異原性は材料により異なる結果が報告されている。細菌を使った突然変異試験では陰性の結果 (Bamford et al., 1976; Croker et al., 1992) だけでなく、陽性の結果 (Kada, 1981; Venit and Crofton-Sleigh, 1981) も報告されている。ショウジョウバエを使った翅毛スポット試験では陽性であった (Tripathy et al., 1990; Kaya et al., 2000)。哺乳動物培養細胞を使った実験では、マウスのリンパ腫の培養細胞で突然変異を誘発しない (McGregor, et al., 1987)、ヒト細胞、ラット細胞でDNA粉砕化を起こさない (Mattioli et al., 1994)、そしてチャイニーズハムスター培養細胞やヒトリンパ球細胞に染色体異常を誘発しない (Sofuni and Ishidate Jr., 1988; Meretoja et al., 1976) という陰性結果だけでなく、マウス肺線維芽細胞に小核を誘発した (Cicchetti and Argentin, 2003) という報告もある。アミトロールの発ガン性はTsudaら (1976)、Steinhoffら (1983) により、ラットに甲状腺腫を誘発することが報告された。IARCの分類でもクラス2Bとされていて、ヒトに対して発ガン性を示す可能性がかなり高いと判定されている (IARC, 1982)。本研究ではメダカ鰓細胞に小核を誘発したことから、アミトロールは変異原であることが示唆された。すでに失効していて新たに使用されることはないが、過去に使われたものが残留していてそれが河川に流入する可能性はあると思われる。

魚を使った小核試験はManna and Sadhukhan (1986) により行われており、腎臓細胞や赤血球よりも鰓細胞の感度が高いことが報告された。Al-Sabti and Metcalfe (1995) により、この試験は魚生体内での遺伝毒性を調べるのに使え、ヒトへの発がん性、催奇形性を持つ可能性のある化学物質が水系に含まれていないかをスクリーニングするために有効であると推奨され

ている。その後実際に河川水や海水の汚染が著しいほど、魚での小核頻度が高いことが多くの研究者により報告されている (Minissi et al., 1996; Sánchez-Galán et al., 1998; Hayashi et al., 1998; Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005)。さらに哺乳動物であるマウスよりも魚 (Tilapia) の方が、小核誘発感度が高いという、Grisolia (2002) の報告も、魚を使った小核試験の有効性を示すものである。本研究で、除草剤であるグルホシネートとアミトロールはメダカ鰓細胞に小核を誘発したことから、これらは変異原であることが示唆された。グルホシネートなどの変異原性を示す除草剤使用の可能性のある田畑やゴルフ場のそばの河川水を、メダカなどの魚を使った小核試験で調べることで、河川への除草剤の流入の可能性をチェックできるのではないと思われる。また、本研究では小核の観察はManna and Sadhukhan (1986) と同じように、フォイルゲン染色後に光学顕微鏡でおこなったが、多くの場合は、アクリジンオレンジという蛍光色素で染色後に蛍光顕微鏡で観察する方法をとっている。しかし、蛍光顕微鏡は通常の光学顕微鏡より高価であり、水系汚染が特に問題になりそうな地域では、コストの面から広範囲に設置しにくいと考えられる。従ってこれらの地域で小核試験を行う時は、安価な顕微鏡で観察できるフォイルゲン染色法が有効だと思われる。

謝辞

本研究の一部は慶應義塾学事振興資金により行われた。

引用文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting cacinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31, 347–364.
- Al-Sabti, K and C. D. Metcalfe (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Res.*, 343, 121–135.
- Bamford, D., M. Sorsa, U. Gripenberg, I. Laamanen and T. Meretoja (1976) Mutagenicity and toxicity of amitrole. III. Microbial tests. *Mutation Res.*, 40, 197–202.
- Çavaş, T. and S. Ergene-Gözükara (2005) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ. Mol. Mutagen.*, 46, 64–70.
- Cicchetti, R. and G. Argentin (2003) The role of oxidative stress in the *in vitro* induction of micronuclei by pesticides in mouse lung fibroblasts. *Mutagenesis*, 18, 127–132.
- Cox, C. (1996) Herbicide factsheet—glufosinate. *J. Pesticide Reform*, 16, 15–19.
- Crocker, P., A. M. Bonin and N. H. Stacey (1992) Evaluation of amitrole mutagenicity in *Salmonella typhimurium* using prostaglandin synthase activation. *Mutation Res.*, 283, 7

-11.

- Ebert, E., K.-H. Leist and D. Mayer (1990) Summary of safety evaluation toxicity studies of glufosinate ammonium. *Food Chem. Toxicol.*, 28, 339-349.
- Evans, H. J. (1976) Cytological methods for detecting chemical mutagens. In "Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection", Vol. 4, pp. 1-29, ed. A. Hollaender, Plenum Press.
- Grisolia, C. K. (2002) A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Res.*, 518, 145-150.
- 林 真(1991) 小核試験, 石館 基編『毒性試験講座12; 変異原性, 遺伝毒性』, pp. 147-153, 地人書館
- Hayashi, M., T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, N. Kinae, K. Saotome, N. Tanaka, A. Takai, Y. F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni and Y. Ojima (1998) Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms, *Mutation Res.*, 399, 125-133.
- Hilton, J. L., P. C. Kearney and B.N. Ames (1965) Mode of action of the herbicide, 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole): inhibition of an enzyme of histidine biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 112, 544-547.
- Hoerlein, G. (1994) Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 138, 73-145.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1982) Amitrole (Group 2B). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans. IARC Monographs, volumes 1-29 (Suppl., 4), 38-40.
- Kada, T. (1981) The DNA-damaging activity of 42 coded compounds in the rec-assay. *Progress in Mutation Res.*, 1, 175-182.
- Kanaya, N., B. S. Gill, I. S. Grover, A. Murin, R. Osiecka, S.S. Sandhu and H.C. Andersson (1994) *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Res.*, 310, 231-247.
- Kaya, B., A. Yanikoğlu, A. Creus and R. Marcos (2000) Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Res.*, 465, 77-84.
- 菊池康基 (1988) 染色体異常の意義, 日本環境変異原学会哺乳動物試験分科会編『化学物質による染色体異常アトラス』, pp. 3-15, 朝倉書店
- Manna, G. K. and A. Sadhukhan (1986) Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT). *Current Sci.*, 55, 498-501.
- Mattioli, F., L. Robbiano, L. Fazzuoli and P. Baracchini (1994) Studies on the mechanism of the carcinogenic activity of amitrole. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23, 101-106.
- McGregor, D. B., R. Martin, P. Cattanaach, I. Edwards, D. McBride and W.J. Caspary (1987) Responses of the L5178Y tk⁺/tk⁻ mouse lymphoma cell forward mutation assay to coded

- chemicals. I: Results for nine compounds. Environ. Mutagen., 9, 143–160.
- Meretoja, T., U. Gripenberg, D. Bamford, I. Laamanen and M. Sorsa (1976) Mutagenicity and toxicity of amitrole. II. Human lymphocyte culture tests. Mutation Res., 40, 191–196.
- Minissi, S., E. Ciccotti and M. Rizzoni (1996) Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. Mutation Res., 367, 245–251.
- Sánchez-Galán, S., A. R. Linde, J.I. Izquierdo and E. García-Vázquez (1998) Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. Mutation Res., 412, 219–225.
- Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis. In "Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection", Vol. 4, pp. 31–53, ed. A. Hollaender, Plenum Press.
- Sofuni, T. and M. Ishidate Jr. (1988) Induction of chromosomal aberrations in active oxygen-generating systems. I. Effects of paraquat in Chinese hamster cells in culture. Mutation Res., 197, 127–132.
- Steinhoff, D., H. Weber, U. Mohr and K. Boehme (1983) Evaluation of amitrole (aminotriazole) for potential carcinogenicity in orally dosed rats, mice, and golden hamsters. Toxicol. Appl. Pharmacol., 69, 161–169.
- Takai, A., N. Kagawa and K. Fujikawa (2004) Susceptibility of male and female medaka (*Oryzias latipes*) fish to spontaneous and X-ray induced micronucleus formation in gill cells. Mutation Res., 558, 131–136.
- Tripathy, N. K., F. E. Würgler and H. Frei (1990) Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the Drosophila wing spot test. Mutation Res., 242, 169–180.
- Tsuda, H., M. Hananouchi, M. Tatematsu, M. Hirose, K. Hirao, M. Takahashi and N. Ito (1976) Tumorigenic effect of 3-amino-1H-1,2,4-triazole on rat thyroid. J. Nat. Cancer Inst., 57, 861–864.
- Venitt, S. and C. Crofton-Sleigh (1981) Mutagenicity of 42 coded compounds in a bacterial assay using *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Progress in Mutation Res., 1, 351–360.
- Watanabe, T. (1997) Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture. Neurosci. Lett., 222, 17–20.
- Weyter, F. W. and H. P. Broquist (1960) Interference with adenine and histidine metabolism of microorganisms by aminotriazole. Biochim. Biophys. Acta, 40, 567–569.