有糸分裂阻害薬で誘発される小核の形態とその由来

小前憲久,^{*,a} 成田弘和,^a 日比野康英,^b 菅野延彦^b富山化学工業株式会社 総合研究所,^a 富山医科薬科大学薬学部^b

Morphology and Origin of Micronuclei Induced by Mitotic Inhibitors

Norihiisa KOMAE,^{*,a} Hirokazu NARITA,^a Yasuhide HIBINO,^b
and Nobuhiko SUGANO^b*Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd.,^a 2-4-1 Shimookui,
Toyama 930, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama
Medical and Pharmaceutical University,^b 2630 Sugitani,
Toyama 930-01, Japan*

(Received August 26, 1996)

In order to elucidate the morphological variation and the origin of erythrocytic micronuclei induced by mitotic inhibitors, each of clastogens (mitomycin C and cyclophosphamide) and spindle poisons (vincristine and colchicine) was administered intraperitoneally into a rat. After 24 h, the bone marrow smear was prepared and subjected to the microscopic analysis. In consequence, the sizes of micronuclei (MNSs) induced by spindle poisons were generally larger than those (MNCs) induced by clastogens. On the other hand, the bone marrow cells containing micronucleated erythrocytes were fractionated by cellulose column chromatography and then Percoll-gradient centrifugation. The micronuclear DNA was extracted from the resulting erythrocyte fraction and subjected to the dot blot hybridization with a centromeric or telomeric DNA probe. This experiment showed that centromeric and/or telomeric DNAs are enriched more in MNSs than in MNCs. Thus, such hybridization techniques and the morphological analysis would be available for classifying micronucleus-inducing drugs.

Key words—micronucleus; hybridization; centromeric/telomeric DNA; clastogen; spindle poison

緒 言

化学物質の染色体異常誘発性を検出する試験法の1つに、*in vivo* 小核試験がある。この試験法は骨髓赤血球中の小核の出現頻度を調査することにより、間接的に染色体異常誘発性を検出する方法であり、熟練を要する染色体観察より容易であることから、広く一般的に使用されている。¹⁻³⁾

小核形成については、現在、次の2つの機序が考えられている。¹⁾ 化学物質の染色体異常誘発性により、染色体に切断や部分的交換が起こり、結果として紡錘糸の付着部位を持たない無動原体断片が形成される。これらの無動原体断片は、細胞分裂後期においても、両極に移動できず赤道板付近に遅滞する。そして、両極に集まった娘染色体群の周りに核膜が形成される細胞

分裂終期に、これらの無動原体断片はそれ自体で通常の核より小さい第二の核、すなわち、小核を形成する。したがって、この小核の有無を観察することによって、間接的に染色体異常誘発性を知ることができる。一方、同様な現象は紡錘体形成阻害作用のある薬剤においても観察される。しかし、この場合は小核を形成するのは切断された無動原体断片ではなく、両極に移動せず遅滞した1個ないしは複数個の染色体と考えられている。このように、小核形成には異なる2つの機序が考えられることから、小核の顕微鏡的観察からだけでは、小核誘発原がどちらのタイプに属しているのかを知ることは困難とされている。

種々の先天異常（ダウン症候群など）が、染色体の数的異常によって引き起こされることは古くから知られている。また、近年、不妊、流産、発がんなどが、染色体の異数性と深く関連していることが明らかになりつつあり、⁴⁻⁸⁾ 化学物質の紡錘体形成阻害作用を検出する意義が重要視されている。

これまでに、小核の由来に関する研究、すなわち、小核が染色体断片からなるのか、あるいは1個ないしは複数個の染色体からなるのかを明らかにする試みとして、小核径の測定、⁹⁻¹¹⁾ 小核 DNA 量の測定、¹²⁻¹⁵⁾ C 分染法（ヘテロクロマチン DNA 染色）、¹⁶⁻¹⁸⁾ 抗キネトコア抗体によるキネトコア染色法、¹⁹⁻²⁷⁾ 染色体に特異的な DNA プロブを用いた *in situ* ハイブリッド形成法^{28, 29)} などによる報告がなされている。

しかし、これらの報告はいずれも小核の定性的な研究が主体であり、小核由来 DNA について定量的に解析し、小核誘発原の調査・研究を行った報告はない。そこで今回、小核誘発薬剤を投与したラットの骨髓赤血球から、小核由来 DNA を抽出し、分子生物学的手法を用いて、定量的にその性質を明らかにするとともに、小核の形態学的特徴との関連性を調査することによって、薬剤によって誘発される小核の形成機序を解明することを目的として、本研究を行った。

実 験 の 部

1. 薬物 染色体切断薬として、マイトマイシン C (MMC, マイトマイシン協和 S, 協和醸酵工業(株)) 及びシクロホスファミド (CP, エンドキサン[®], 塩野義製薬(株)) を、また、紡錘体形成阻害薬として、硫酸ビンクリスチン (VCR, オンコビン[®], 日本イーライリリー(株)) 及びコルヒチン (COL, 和光純薬工業(株)) を用いた。

2. 試薬 微結晶セルロース (Sigmacell[®] type 50, Sigma Chemical Co.), α -セルロース (Sigma Chemical Co.), ウシ胎児血清 (FBS, GIBCO BRL), エタ沈メイト (和光純薬工業(株)), パーコール (Sigma Chemical Co.), メイグリュンワルド/ギムザ液 (Merck), PicoGreen[™] (フナコシ(株)), ランダムプライマー DNA ラベリングシステム (GIBCO BRL) を用いた。

3. 動物 6週齢の Donryu 系雄ラット (日本エスエルシー(株)) を購入し、1週間馴化飼育した後、実験に供した。

実験期間中は、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12時間間隔人工照明の環境下で、固型飼料 (CE-2, 日本クレア(株)) 及び水道水を自由に与えて飼育した。

4. 方法 実験 1) 小核の形態学的観察——MMC, VCR, COL は生理食塩液 (日本薬局方, (株)大塚製薬工場) に、CP は注射用水 (日本薬局方, (株)大塚製薬工場) に溶解した。そして、MMC, 3 mg/kg; CP, 50 mg/kg; VCR, 0.2 mg/kg; COL, 2 mg/kg を、それぞれラット腹腔内に1回投与した。なお、これらの投与量は予備検討実験の結果 (Table 1) より、小核を誘発する最適な投与量として設定した。

投与 24 時間後, ラットをエーテル麻酔下で頸椎脱臼死させ両大腿骨を摘出した。さらに, これら大腿骨の両端を切断し, FBS で骨髓細胞を洗い出して塗抹標本作製した。次に, 標本を自然乾燥させた後, メイグリュンワルド/ギムザ液で染色して小核の観察を行った。

各薬剤で処理したラットから無作為に 35 個の小核含有多染性赤血球を選び, この顕微鏡写真より, これら赤血球と小核の直径を測定した。直径はいずれも長径と短径の平均値として算出した。また, 各標本につき 1000 個の多染性赤血球を観察して, 小核出現頻度並びに全赤血球中に占める多染性赤血球の割合を求めた。

実験 2) 小核由来 DNA の抽出及び小核由来 DNA とセントロメアあるいはテロメア DNA プローブとのハイブリッド形成——

1) 骨髓細胞の採取及びセルロースカラムによる有核細胞の除去: MMC, CP, VCR, COL をそれぞれ, 実験 1 と同様の方法でラットに投与し, 投与 24 時間後に大腿骨を摘出し骨髓を採取した。一方, セルロースカラムを Romagna

ら³⁰⁾の方法に準じて以下の要領で作製した。20 ml のプラスチック製注射筒 ((株)トップ) に, 微結晶セルロースと α -セルロースの混合物 (1:1, w/w) を 1.5 g 入れ, 注射筒の内筒で加圧して容積を 4.5 ml とした。次に, 採取した骨髓細胞浮遊液をカラム上面の中心部に滴下し, 直ちにハンクス平衡塩類溶液 (フェノールレッドを含まず) を 20 ml 加えた。赤血球を含む滴下液を遠心管に集め, $800 \times g$, 10 分間遠心分離し, 上清を除去した後, 沈澱を少量の FBS 中に懸濁した。

2) パーコール密度勾配遠心処理による細胞破碎物の除去: パーコール密度勾配溶液を Rennie³¹⁾の方法に従って調製した。遠心管に 80% パーコール溶液を 1.5 ml 入れ, その上に 30% パーコール溶液を 1.5 ml 重層した。次に, セルロースカラムを通して得られた赤血球浮遊液をこれらの溶液上に重層し, $800 \times g$, 10 分間遠心分離し, 密度勾配溶液の界面に集積した赤血球を回収した。

3) 小核由来 DNA の抽出及び DNA 量の測定: パーコール密度勾配遠心処理して得られた赤血球を TNE (Tris-HCl, NaCl, EDTA; pH 7.5) 溶液中に懸濁し, これを常法に従って 10% ドデシル硫酸ナトリウム, プロテイナーゼ K, RNase A で処理した後, フェノール/クロロホルム混液 (1:1, v/v) で抽出し, 水層を分取した。次に, この水層にエタノールを加え, 得られた沈澱 (エタ沈メイト使用) を小核由来 DNA とした。小核由来 DNA の定量は蛍光色素 (PicoGreenTM) 染色によって行った。

4) プローブの調製: セントロメア DNA プローブ: 染色体セントロメアは短い繰り返し配列が高度に反復している。^{32, 33)} Ikeda ら³⁴⁾の方法に従って調製したラット肝細胞核由来の高度反復配列クローン化 DNA (*Hind*III 断片, 370-bp) を鋳型とし, ランダムプライマー DNA ラベ

Table 1. Frequency of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes in Rats Treated with MMC, CP, VCR or COL

Drug	Dose (mg/kg)	Frequency ^{a)} of micronucleated PCEs (%)
Untreated	0	0.0
MMC	2	2.2
	3	2.7
	5	2.4
	6	1.8
CP	50	2.8
	100	2.7
	200	2.4
VCR	0.05	1.0
	0.1	2.2
	0.2	3.5
COL	1	0.1
	2	0.8
	3	— ^{b)}
	5	—

PCE, polychromatic erythrocyte. a) Estimated from 1000 PCEs. b) Death of animals.

Table 2. Frequency of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes and an Amount of Micronuclear DNA Extracted from Purified Bone Marrow Erythrocytes

Drug	Dose (mg/kg)	Frequency of micronucleated PCEs (%)	Ratio ^{a)} of PCEs (%)	Extracted DNA ^{b)} (ng/rat)
Untreated	0	0.03±0.06 ^{c)}	67.8±1.7 ^{c)}	1.3
MMC	3	2.50±0.46	51.6±3.8	58.5
CP	50	2.57±0.47	49.1±8.9	51.2
VCR	0.2	3.73±0.95	42.4±7.3	48.8
COL	2	0.90±0.26	50.5±3.0	26.8

PCE, polychromatic erythrocyte. a) (number of PCEs/number of all erythrocytes)×100. b) Micronuclear DNA was extracted from purified bone marrow erythrocytes of rats. c) Mean±S.D. (n=3 animals).

リング法 (ランダムプライマー DNA ラベリングシステム使用) によって [³²P]dATP でラベルした DNA をプローブとした。

テロメア DNA プローブ: 染色体テロメアはヘキサヌクレオチド (5'-TTAGGG-3') の縦列繰り返し配列により構成されている。^{35, 36)} この繰り返し配列の 8 量体 (48 mer) を合成し、アンチセンス鎖の 3'-AATCCC-5' をプライマーとし、上記方法と同様に [³²P]dATP でラベルした DNA をプローブとした。

5) ハイブリッド形成: 熱変性した小核由来 DNA をナイロン膜 (Hybond-N, Amersham) にブロットした後、これに紫外線を照射し、DNA を膜に固定した。次に変性ニシン精子 DNA を用いて 2 時間、前ハイブリッド形成を行った後、[³²P]dATP でラベルしたセントロメアあるいはテロメア DNA プローブと共に、60°C、20 時間、ハイブリッド形成を行った。ハイブリッド形成の解析は、膜のオートラジオグラフィ及びバイオイメーキングアナライザー (BAS 2000, 富士写真フイルム(株)) により行った。

結 果 と 考 察

各薬剤によって誘発された骨髓赤血球中の小核出現頻度を Table 2 に示した。小核出現頻度は MMC 投与群が 2.50%, CP 投与群が 2.57%, VCR 投与群が 3.73%, COL 投与群が 0.90% であり、無処置群の 0.03% に比べて、いずれの薬剤投与群においても、小核出現頻度が上昇した。

Fig. 1. Correlation between Diameters of Micronucleated Erythrocytes and Micronuclei Induced by MMC, CP, VCR or COL

Thirty five of the micronucleated erythrocytes (MNEs) were randomly selected under the microscope. Then, each of the diameters of MNEs and their micronuclei was measured on the microphotograph.

Fig. 2. Micronuclei Induced by MMC or VCR

(A)—(D), MMC-treated; (E)—(H), VCR-treated. Bar, 10 μ m.

これら薬剤によって誘発された小核含有赤血球（小核赤血球）とその小核の直径について、薬剤間で比較した (Fig. 1—3, Table 3). 染色体切断薬である MMC あるいは CP 投与によって誘発された小核赤血球の多く (MMC 投与群: 85.7%, CP 投与群: 82.9%) は、直径が 6—8 μ m の範囲内にあり、ほぼ形態的に均一な細胞集団として認められた。一方、紡錘体形成阻害薬で

ある VCR あるいは COL 投与群のそれらは 3—11 μm にわたる大きさを示した (Fig. 1, 2). 小核の平均直径は MMC, CP 投与群で各々 1.22, 1.41 μm であったのに対し, VCR, COL 投与群では各々 1.93, 1.52 μm であり, VCR, COL 投与群では MMC 投与群と比較して有意に大きかった. また, 小核径のこれを含む赤血球径に対する比においても, VCR, COL 投与群では MMC 投与群と比較して有意に大きかった (Table 3, Student's *t*-test, $p < 0.05$ 又は $p < 0.01$). また, 小核径が 1.5 μm 未満の小さな小核の割合は, MMC, CP 投与群で多かった (Fig. 3).

これらの結果から, 紡錘体形成阻害薬で誘発される小核は, 染色体切断薬で誘発されるそれと比較して大きなものが多いことが判明した. この理由として, 紡錘体形成阻害薬で誘発される小核は, 細胞分裂の際に両極に移動せず遅滞した 1 個ないしは複数個の染色体から形成されているため, 染色体切断作用による染色体断片から形成される小核より大きいことが推測された. したがって, この仮説を証明するため, 小核誘発薬剤を投与したラットの骨髓赤血球より小核由来 DNA を抽出し, ドットプロット法によりこの小核由来 DNA とセントロメアあるいはテロメア DNA プロブとのハイブリッド形成を行い, バイオイメージングアナライザーを用いて定量的解析を行った.

小核由来 DNA を得るために, まず, 小核誘発薬剤を投与したラットから骨髓細胞を採取した後, セルロースカラムを通してこれらから有核細胞を除去した. さらに, 細胞の破砕物などを除去するために, カラム通過細胞をパーコール密度勾配遠心処理した. これら一連の処理によって, 処理前では骨髓細胞中にメイグリュンワルド/ギムザ染色で青紫色に濃く染まる有核細胞が多数認められたのに対し, 処理後ではこのような有核細胞は認められず, 赤血球のみが認められた. また, これら赤血球集団中に小核赤血球も認められた (Fig. 4). このようにして採取した骨髓赤血球から, エタノール沈澱により小核由来 DNA を抽出した. 抽出した DNA 量を Table 2 に示した. 小核誘発薬剤を投与したラットから, 1 匹当たり 26.8—58.5 ng の小核由来 DNA を得た. 無処置ラットではその量は 1.3 ng であることから, 小核誘発薬剤の投与により, 小核由来 DNA 量は 20—45 倍増加した.

Fig. 3. Size Distribution of Micronuclei Induced by MMC, CP, VCR or COL

□, 3.0 μm <; ▨, 2.5 < 3.0 μm ; ▩, 2.0 < 2.5 μm ; ▤, 1.5 < 2.0 μm ; ▦, 1.0 < 1.5 μm ; ▢, 0.5 < 1.0 μm

Table 3. Diameters of Micronucleated Erythrocytes and Micronuclei induced by MMC, CP, VCR or COL

Drug	Dose (mg/kg)	Diameter of MNE (μm)	Diameter of MN (μm)	Ratio (MN/MNE)
MMC	3	7.12 $\pm$ 0.73 ^{a)}	1.22 $\pm$ 0.58	0.173 $\pm$ 0.088
CP	50	6.80 $\pm$ 0.98	1.41 $\pm$ 0.60	0.221 $\pm$ 0.127
VCR	0.2	6.71 $\pm$ 1.66	1.93 $\pm$ 0.88**	0.308 $\pm$ 0.156**
COL	2	7.06 $\pm$ 2.57	1.52 $\pm$ 0.43*	0.273 $\pm$ 0.189**

MN, micronucleus; MNE, micronucleated erythrocyte.

a) Mean $\pm$ S.D. ($n = 35$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from MMC treated group.

Fig. 4. Microphotograph of Bone Marrow Cells Stained with May-Gruenwald/Giemsa's Solution

(A) and (B), bone marrow smear before treatments with a cellulose column and Percoll gradient. (C) and (D), bone marrow cells after treatments with a cellulose column and Percoll gradient. (B) and (D) magnify (A) and (C), respectively. The micronucleated erythrocyte is shown in each photograph by an arrow. Bars in (A) or (C) and in (B) or (D) correspond to 50 and 10 μm , respectively.

Fig. 5. Dot Blot Hybridization with Centromeric DNA Probe

Micronuclear DNA was blotted on a nitrocellulose membrane and hybridized with a centromeric DNA probe. Then, the membrane was subjected to the autoradiographic assay. A highly repetitive DNA component (370-bp, *HindIII* fragment) was used as a template of centromeric probe.

小核由来 DNA とセントロメア DNA プロブとのハイブリッド形成の結果を, Fig. 5 及び 7 に示した. バイオイメージングアナライザーによる定量的解析の結果, ハイブリッド形成の割合は, COL 投与群の値を 100 とした場合, MMC 投与群では 28.3, CP 投与群では 55.2 であり, 紡錘体形成阻害薬で誘発された小核由来 DNA 中に占めるセントロメア DNA の割合は, 染色体切断薬で誘発されたそれに比べて明らかに多かった. この結果は, 紡錘体形成阻害薬で誘発される小核は, 染色体セントロメア領域を多く含んだ染色体, すなわち, まるごとの染色体から形成されていることを示唆している. 小核中のキネトコアあるいはセントロメアに関する研究として, Degrassi ら²⁰⁾の培養細胞を用いたキネトコア免疫蛍光染色による報告, あるいは, Miller ら²⁹⁾のマウス骨髓細胞に対する γ -サテライト DNA プロブを用いた *in situ* ハイブリッド形成による報告などがある. 今回のセントロメア DNA プロブを用いた解析結果は, これらの定性的観察結果と矛盾はなく, かつ, 薬剤の染色体への作用を定量的に示している.

一方, 小核由来 DNA とテロメア DNA プロブとのハイブリッド形成の結果を, Fig. 6 及び 7 に示した. 染色体切断薬の MMC, CP によって誘発された小核由来 DNA 中にも, テロメア DNA が確認されたが, その割合は COL と比較して著しく少なかった. Miller ら³⁷⁾は γ 線誘発マウス線維芽細胞の小核について, テロメア DNA プロブによる *in situ* ハイブリッド形成を

Fig. 6. Dot Blot Hybridization with Telomeric DNA Probe

Micronuclear DNA was blotted on a nitrocellulose membrane and hybridized with a telomeric DNA probe. Then, the membrane was subjected to the autoradiographic assay. Rat telomere DNA is a repetitive tandem array of a hexanucleotide sequence (5'-TTAGGG-3'). This hexamer was synthesized and used as a template.

Fig. 7. Densitometric Assay

Micronuclear DNA was blotted on a nitrocellulose membrane and hybridized with a centromeric or telomeric DNA probe. Then, the membrane was subjected to the autoradiographic and densitometric assays. The density was measured with an image analyzer (BAS 2000). The result is expressed as the density relative to that from COL treatment. Shaded bar, with centromeric probe; hatched bar, with telomeric probe.

行った結果、染色体切断により誘発される小核は、定性的にはテロメア DNA を含むものが多いことを報告している。しかし、今回の実験結果が示すように、定量的には染色体切断薬では紡錘体形成阻害薬に比べてテロメア DNA の割合が少なかった。この理由としては、紡錘体形成阻害薬で誘発される小核は、ほぼ完全な染色体で構成されているため、本来のテロメア領域がそのままの形で存在していると考えられるのに対して、染色体切断薬により誘発される小核では、薬剤の作用によりテロメア領域も断片化され、本来のテロメアが短縮されているためと考えられる。

以上の結果より、紡錘体形成阻害薬によって誘発される小核由来 DNA では、染色体切断薬によって誘発される小核のそれと比較して、セントロメア DNA の割合が多いことから、前者薬剤によって誘発される小核は、細胞分裂において両極に移動せず遅滞した1個ないしは複数個の染色体からなると考えられる。一方、染色体切断薬によって誘発される小核由来 DNA 中には、セントロメアあるいはテロメア DNA が確認されるが、それらの占める割合が少ないことから、これら薬剤によって誘発される小核は、主として、染色体切断作用によって生じた無動原体断片からなると推定される。そして、これら薬剤の小核誘発機構の差違が、小核の形態的差違となって反映されていると考えられる。

したがって、小核の形態学的解析及び小核由来 DNA 中に占めるセントロメア及びテロメア DNA の比較定量的結果は、小核誘発原の作用が、染色体切断あるいは紡錘体形成阻害のどちらに起因するのかを判定する上で、有用な一指針となると考えられる。また、今回報告した小核から DNA を抽出する手法を用いることにより、これまで形態学的にしか研究されていなかった小核形成機構の解明において、分子生物学的手法を用いての新たな研究の可能性を提示するものと考えられる。

引用文献

- 1) Schmid W., *Mutation Res.*, **31**, 9 (1975).
- 2) Ashby J., *Mutation Res.*, **115**, 177 (1983).
- 3) Ashby J., *Mutagenesis*, **1**, 3 (1986).
- 4) Parry J. M., Parry E. M., Barrett J. C., *Nature (London)*, **294**, 263 (1981).
- 5) Klinger H. P., *Cytogenet. Cell Genet.*, **32**, 68 (1982).
- 6) Hook E. B., *Mutation Res.*, **114**, 389 (1983).
- 7) Tsutsui T., Maizumi H., Barrett J. C., *Carcinogenesis*, **5**, 89 (1984).
- 8) Van Goethem F., de Stoppelaar J., Hoebee B., Kirsch-Volders M., *Carcinogenesis*, **16**, 1825 (1995).
- 9) Yamamoto K.I., Kikuchi Y., *Mutation Res.*, **71**, 127 (1980).
- 10) Hogstedt B., Karlsson A., *Mutation Res.*, **156**, 229 (1985).
- 11) Wakata A., Sasaki M. S., *Mutation Res.*, **190**, 51 (1987).
- 12) Heddle J. A., Carrano A. V., *Mutation Res.*, **44**, 63 (1977).
- 13) Nüsse M., Kramer J., *Cytometry*, **5**, 20 (1984).
- 14) Pincu M., Callisen H., Norman A., *Int. J. Radiat. Biol.*, **47**, 423 (1985).
- 15) Grawé J., Zetterberg G., Amnéus H., *Mutagenesis*, **8**, 249 (1993).
- 16) Banduhn N., Obe G., *Mutation Res.*, **156**, 199 (1985).
- 17) Verschaeve L., Vanderkerken K., Kirsch-Volders M., *Stain Technol.*, **63**, 351 (1988).

- 18) Vanderkerken K., Vanparys Ph., Verschaeve L., Kirsch-Volders M., *Mutagenesis*, **4**, 6 (1989).
- 19) Thomson E. J., Perry P. E., *Mutagenesis*, **3**, 415 (1988).
- 20) Degraassi F., Tanzarella C., *Mutation Res.*, **203**, 339 (1988).
- 21) Hennig U. G. G., Rudd N. L., Hoar D. I., *Mutation Res.*, **203**, 405 (1988).
- 22) Eastmond D. A., Tucker J. D., *Mutation Res.*, **224**, 517 (1989).
- 23) Eastmond D. A., Tucker J. D., *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 34 (1989).
- 24) Miller B. M., Adler I.-D., *Mutagenesis*, **5**, 411 (1990).
- 25) Gudi R., Sandhu S. S., Athwal R. S., *Mutation Res.*, **234**, 263 (1990).
- 26) Nüsse M., Recknagel S., Beisker W., *Mutagenesis*, **7**, 57 (1992).
- 27) Krishna G., Fiedler R., Theiss J. C., *Mutation Res.*, **282**, 159 (1992).
- 28) Becker P., Scherthan H., Zankl H., *Genes Chromosomes Cancer*, **2**, 59 (1990).
- 29) Miller B. M., Zitzelsberger H. F., Weier H.-Ul. G., Adler I.-D., *Mutagenesis*, **6**, 297 (1991).
- 30) Romagna F., Staniforth C. D., *Mutation Res.*, **213**, 91 (1989).
- 31) Rennie C. M., Thompson S., Parker A. C., Maddy A., *Clin. Chim. Acta*, **98**, 119 (1979).
- 32) Fuke M., Davis F. M., Busch H., *FEBS Lett.*, **102**, 46 (1979).
- 33) Blackburn E. H., *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 163 (1984).
- 34) Ikeda Y., Nakamura K., Iwakami N., Hibino Y., Sugano N., *Cancer Lett.*, **55**, 201 (1990).
- 35) Moyzis R. K., Buckingham J. M., Cram L. S., Dani M., Deaven L. L., Jones M. D., Meyne J., Ratliff R. L., Wu J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 6622 (1988).
- 36) Blackburn E. H., *Nature (London)*, **350**, 569 (1991).
- 37) Miller B. M., Werner T., Weier H.-U., Nüsse M., *Radiat. Res.*, **131**, 177 (1992).