

## 컴퓨터 이미지 분석법을 이용한 마우스 골수세포에서 소핵의 계수

권정 · 홍미영 · 고우석 · 정문구 · 이미가엘\*  
한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

## Computerized Image Analysis of Micronucleated Reticulocytes in Mouse Bone Marrow

Jung Kwon, Mi-Young Hong, Woo Suk Koh, Moon-Koo Chung and Michael Lee\*

Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 123, Yusong,  
Daejeon 305-600, Republic of Korea  
(Received November 4, 2002)  
(Accepted November 29, 2002)

**ABSTRACT :** The present study was performed to validate an automated image analysis system (Loats Automated Micronucleus Scoring System) for the mouse bone marrow micronucleus assay, comparing with conventional microscopic scoring. Two studies were conducted to provide slides for a comparison of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) values collected manually to those collected by the automated system. Test article A was used as an example of a compound negative for the induction of micronuclei and test article B was used as a micronucleus-inducing agent to elicit a positive response. Cyclophosphamide was included to provide an positive control in two studies. Bone marrow samples were collected 24 h after administration of test article A and B in male ICR mice. The cells were fixed with absolute methanol and stained with May-Grunwald and Giemsa. The number of MNPCEs was determined by the analysis of 1000 total PCEs per bone marrow sample. In addition to micronucleus scoring, an index of bone marrow toxicity based on PCE ratio (% of PCEs to total erythrocytes) was determined for each sample. The automated and manual scoring was similar when the MNPCEs incidence induced by each test article was less than 10. However, manual scoring was able to effectively enumerate micronucleated PCEs in mouse bone marrow when MNPCEs incidence was more than 10, such as cyclophosphamide treatment. Conversely, PCE ratio was superior in computer-assisted image analysis. Taken together, it is suggested that improvement of the automated image analysis may be necessary to render the automatic scoring as sensitive as manual scoring for routine counting of micronuclei, especially because it is superior in objectivity and high throughput scoring.

**Key Words :** Micronucleus assay, Image analysis, Automation, Giemsa staining

### I. 서 론

인간의 유전자에 돌연변이를 유발해서 암을 유발할 수 있는 물질을 조기에 찾아내기 위해서 수행되는 유전독성 시험을 위해서 지금까지 많은 시험법이 개발되었다. 하지만 어느 시험법도 모든 유전독성물질을 찾아 낼 수는 없

으므로 대부분 국가의 guideline에서는 3~4가지의 유전독성 시험법을 함께 수행하기를 권장하고 있다. 대표적인 유전독성법으로는 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험과 염색체이상시험, *in vivo* 소핵시험이 있고, 경우에 따라서 염색체이상시험대신에 mouse lymphoma assay(MLA)를 추가하고 있다. 특히 최근에는 comet analysis나 fluorescence *in situ* hybridization(FISH) 와 같이 생명공학적 기법이나 computer image analysis 이용한 방법들이 각광을 받고 있는 추세이다. 하지만, 이러한 *in vitro* 시험을 위주로 하는 많은 시험법에 대해서 독성을 마지막으로 정확하게 확인하기 위해서는 실험동물을 사용하는 *in vivo* 시험

\*To whom correspondence should be addressed

List of Abbreviation: PCE, Polychromatic erythrocyte; NCE, Normochromatic erythrocyte; MNPCE, micronucleated PCE; CPA, Cyclophosphamide; MLA, Mouse lymphoma assay; FISH, Fluorescence *in situ* hybridization

법이 반드시 필수적이라고 할 수 있다. 이런 면에서 20년 이상 수행되어 와서 검증이 가장 잘 된 *in vivo* 시험법 중의 하나인 *in vivo* 소핵시험은 유전독성의 검색에 매우 중요하다고 할 수 있다.

*In vivo* 소핵시험은 염색체 구조이상(clastogen)과 숫적 이상(aneugen)을 일으키는 물질을 찾아내기 위해서 고안된 시험법(Krishna와 Hayashi, 2000)으로서, 시험물질에 의해서 손상받은 염색체 조각이 main nucleus 대신 secondary nucleus으로 들어가는데 주핵보다 크기가 훨씬 작아 소핵(micronucleus)이라고 한다. 특히 적혈구는 마지막 세포분열 후 몇 시간 내에 핵을 상실하므로 소핵시험에 가장 민감한 모델이라고 할 수 있다. 지금까지 20여년간 수행되어 온 기본적인 소핵시험 방법은 골수세포를 Giemsa staining 후 육안으로 소핵을 판정하는 것이었다. 하지만 이 방법은 소핵시험의 판정을 위해서 많은 시간이 소요됨은 물론이고 몇 년간의 훈련과 실험을 통해서 소핵의 판정에 능력이 있다고 검증된 인력을 요구한다. 특히, Giemsa staining 방법은 염색의 특성상 미성숙적혈구와 성숙적혈구, 소핵의 구분이 쉽지 않기 때문에 1990년에 Hayashi 등(1990)은 DNA-specific dye인 acridine orange를 이용한 염색법을 개발하기도 하였다. 이러한 acridine orange 염색법과 flow cytometry 분석법을 접목시킨 자동화 분석법도 많이 보고되고 있는 실정이다(Dertinger 등, 1997). 더 최근에는 전통적인 Giemsa 염색법으로 준비된 검체 자체를 그대로 컴퓨터를 이용한 이미지 분석법을 통해서 분석할 수 있는 방법이 개발되었다(Parton 등, 1996). 이러한 추세에 따라 유전독성 국제전문가 그룹에 의해서 자동화 분석법에 대한 검토가 진행중이다(Hayashi 등, 2000).

본 시험에서는 Giemsa 염색된 slide를 이용하여 전통적인 manual scoring과 컴퓨터 이미지 분석을 이용한 automatic scoring을 비교하기 위해서 음성판정을 받은 시험물질 A와 양성판정을 받은 시험물질, 그리고 양성대조물질로 널리 쓰이는 cyclophosphamide의 3가지 시험물질을 이용하여 소핵시험을 수행하였다. 본 시험의 결과는 비록 소핵빈도 수가 높아 질수록 측정의 절대값 차이가 커지긴 하였지만, 두 시험법 사이에 일정정도 이상의 상관관계가 있음을 보여주었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질 및 시약

본 시험에 사용한 시험물질은 시험의뢰기관으로부터 받은 것이고, cyclophosphamide 등의 양성대조물질은 Sigma 사(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 골수세포의 분리에

사용한 fetal bovine serum(FBS)은 GIBCO BRL(Grand Island, NY)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험동물 및 사육환경

시험을 위해서 약 5.5주령의 SPF ICR 마우스 수컷을 바이오제노믹스(서울)로부터 구입하였으며, 입수후 10일간 검역 및 순화기간을 거쳐서 건강한 동물만을 사용하였다. 본 시험은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 환기회수 10~20회/hr, 조명시간 12 hr, 조도 150~300 Lux로 설정된 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소의 실험동물동에서 실시하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(PMI Nutrition International, Richmond, IN)를 방사선멸균(13.2 kGy)하여 자유선택시켰다. 본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정(AAALAC International)을 준수하여 실시하였으며, 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소의 동물관리사용위원회(IACUC)에 의해 검토되었다.

### 3. 투여량 설정과 시험군의 구성

시험물질의 투여용량은 예비시험을 통해서 결정하였다. 시험물질 A의 경우에는 예비시험에서는 소핵시험의 한계 용량인 2000 mg/kg의 용량을 최고용량으로 하여 5단계 처리군에 1일 1회 투여하고(군당 4마리), 투여개시일 포함 8일간 관찰한 결과에 따라 개략적인 독성 증상을 파악하였다. 예비시험 결과, 시험물질 A의 경우에는 투여후 3일째 까지 암수 모두 1000 mg/kg 이상의 농도에서는 모든 동물이 사망하였고, 500 mg/kg 처리군의 경우에서도 각각 2마리의 사망동물이 발견되었다. 따라서 동물이 사망하지 않는 범위 내에서 더 높은 투여 용량이 사망을 예상하게 하는 독성의 징후를 나타내는 용량인 250 mg/kg을 본시험의 최고용량으로 결정하고 250, 125, 62.5 mg/kg의 3단계 농도군에서 소핵시험을 수행하였다. 반면 시험물질 B의 경우에는 LD<sub>50</sub>값이 약 1500 mg/kg로 알려져 있으므로 이 농도를 최고용량으로 하여 예비시험을 수행하였다. 투여후 7일간의 관찰결과 1500 mg/kg 투여군에서 사망동물 한 마리가 발견되었다. 따라서, 본 시험에서도 예비시험과 동일하게 1500 mg/kg를 최고용량으로 하고 1500, 750, 375, 185 mg/kg의 4단계 농도군에서 본 시험을 수행하였다. 두 시험물질 모두에서 성 특이적 증상은 보이지 않았으므로 수컷을 이용하여 시험을 수행하였다. 시험물질 A는 임상 예정경로인 정맥투여를 했고, 시험물질 B는 일반적 소핵 시험 투여경로인 경구투여를 하였다. 두 시험물질 모두 군당 6마리씩 1일 1회 투여하였고, 투여 24시간 후에 골수 세포를 분리하였다.

#### 4. 골수세포의 분리 및 검체의 제작

골수세포의 분리는 Schmid(1975)의 방법에 따라 수행하였다. 각 동물로부터 적출한 대퇴골로부터 23 게이지 주사침을 사용, 3 ml FBS으로 골수를 씻어내려 혼탁하여 1000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상동액을 제거하고, 침전된 골수세포를 slide glass에 도말, 실온에서 충분히 전조한 후 메틸알콜에 5분간 담궈 세포를 고정하였다. 동물당 2매의 도말검체를 제작하였다.

#### 5. 염색 및 소핵의 육안 계수

전조가 끝난 검체는 May-Grunwald와 Giemsa 염색(Schmid, 1975)을 하고 1000배의 배율로 검경하였다. 각 동물로부터 제작한 검체 중 염색 상태가 양호한 1매를 선택하여 무작위로 코드화한 후 검경하였다. 계수시 세포 직경의 1/5~1/20의 크기로 주변 유핵세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형과 타원형 소체를 소핵으로 계수하였으며, 소핵과 이물질의 구별에 주의하였다. 시험 결과는 개체당 1000개의 미성숙적혈구(PCE, polychromatic erythrocyte) 중에 나타나는 micronucleated PCE(MNPCE)를 계수하여 평균±S.D.로 표시하였으며 이를 소핵 유발 빈도로 하였다. 소핵 계수 후 소핵 유무에 상관없이 미성숙적혈구와 성숙적혈구(NCE, normochromatic erythrocyte)를 계수하여 전체 적혈구수에서 미성숙적혈구수의 비율을 산출, 세포독성의 지표로 삼았다.

#### 6. 이미지 분석법을 이용한 자동 계수

육안 계수를 위해서 사용된 동일한 Giemsa 염색 slide를

자동 계수를 위해서도 사용하였다. 소핵의 자동 계수를 위해서 Loats Associates사(Westminster, MD)에서 개발한 자동 소핵계수장치를 이용하였다. 이 장치는 컴퓨터와 CCD 카메라, 자동총점장치, 16개의 slide stage가 있는 현미경, 자동stage 조절기등으로 구성되어 있어서, 16개의 slide를 시험자 없이 계수하도록 되어 있다. 또한, 본 장치는 Giemsa 염색된 골수 검체를 이용하여 되어 있으며 CCD 카메라를 통해서 읽어 들인 이미지를 통해서 PCE와 NCE를 자동으로 구분할 수 있다. 그리고, 시험자가 미리 컴퓨터상에 일정 정도까지 염색상이 주위부와 다른 부위에 대해서 특정 크기와 특정형태를 가진 경우를 소핵으로 계수하도록 지정을 하면, 이러한 정의에 맞는 부위를 가진 세포를 소핵으로 계수한다. 소핵을 가진 PCE와 NCE가 발견되면 시험자가 육안으로 판찰이 가능하도록 자동으로 대안렌즈부위로 옮겨진다.

### III. 결 과

#### 1. 소핵의 계수

소핵의 육안 계수법과 컴퓨터 이미지 계수법 모두 시험물질의 음성과 양성 판정에는 동일한 결과를 보여주었다(Table 1). 육안 판정시 음성으로 나타났던 시험물질 A의 경우 음성대조군을 제외하면 컴퓨터 이미지 분석법으로 계수시 약 2배 정도 그 값이 높게 나타났지만 소핵의 빈도가 최고농도군에서 0.6대 1.3 등으로 워낙 낮기 때문에 결과의 판정 등에는 전혀 영향을 미치지 않았다. 또한, 시험물질 B의 경우에도 육안 판정과 동일하게 컴퓨터 이미지 분석법에서도 양성으로 나타났다. 하지만 양성판정을 받은 시험물질 B의 경우에는 시험물질 A의 경우와는 반

**Table 1.** Comparison of automated and manual microscopic micronucleus data with test article A, test article B and cyclophosphamide

Treatment	Dose (mg/kg)	MNPCEs <sup>a</sup> (mean±SD)		%PCE <sup>b</sup> (mean±SD)	
		Manual	Automatic	Manual	Automatic
Test article A	0	1.0±0.6	0.7±0.6	56.2±6.3	56.4±3.6
	62.5	0.3±0.5	0.9±0.4	51.3±4.5	43.5±7.6*
	125	0.5±0.5	1.2±0.8	50.2±2.6	43.6±5.6*
	250	0.6±0.5	1.3±0.6	45.6±9.4	37.9±12.4*
	CPA <sup>c</sup>	70	26.7±6.2**	12.4±3.9**	46.0±3.0*
Test article B	0	0.8±0.5	1.2±0.8	49.8±6.5	49.6±10.1
	185	2.0±0.0**	1.8±0.8	48.6±7.4	45.6±8.8
	375	5.2±0.8**	5.2±3.3**	39.8±5.4	44.8±4.9
	750	6.0±0.8**	5.0±2.6**	38.0±5.5	42.5±8.7
	1500	7.6±0.6**	5.0±2.6**	41.0±5.7	41.0±6.7
CPA	70	20.0±3.2**	8.0±8.1**	38.2±5.4*	34.2±7.7*

<sup>a</sup>MNPCEs = Micronucleated polychromatic erythrocytes. Values are based on 1000 PCEs per animal.

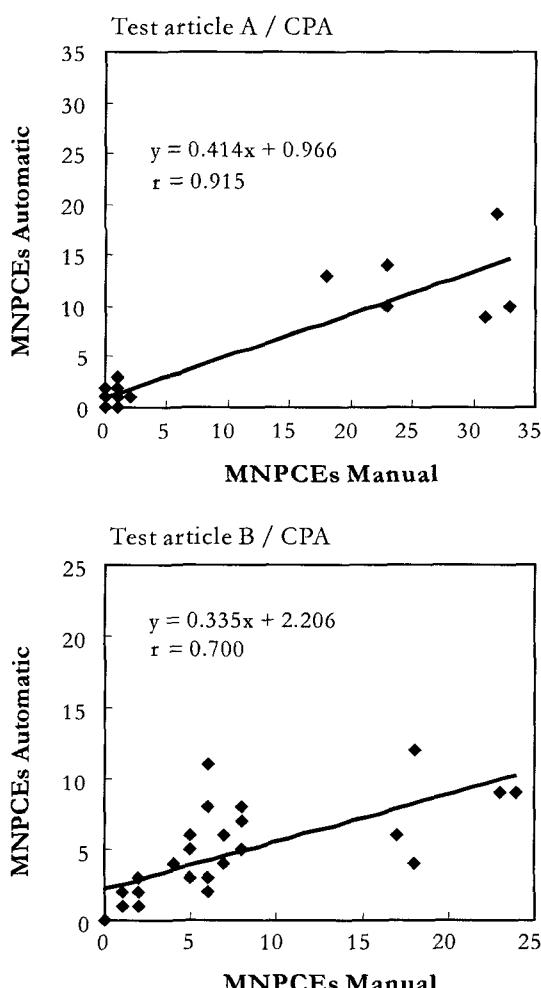
<sup>b</sup>%PCEs = 100×PCE/(PCE + NCE). Values are based on 1000 erythrocytes per animal.

<sup>c</sup>CPA: cyclophosphamide.

\*p < 0.05 when compared to vehicle control, one tailed t-test.

\*\*p < 0.01 when compared to vehicle control, one tailed t-test.

대로 시험물질 처리군에서 소핵의 계수가 오히려 낮았다. 최고농도군인 1500 mg/kg의 경우를 보더라도 육안 계수시에는 7.6이었으나 컴퓨터 이미지 분석을 이용한 계수시에는 5.0이었다. 이러한 현상은 소핵빈도가 20 이상인 양성대조군에서 더 강하게 나타났다. 본 시험에서는 두 번의 시험모두에서 양성대조군으로 소핵시험시 가장 널리 쓰이는 cyclophosphamide를 사용하였다. 육안 계수시에는 cyclophosphamide를 처리한 군에서 두 번의 시험 모두에서 소핵의 빈도수가 20 이상으로 나타난 반면, 컴퓨터 이미지 분석법을 이용한 자동화 계수시에는 첫번째 시험에서는 12.4, 두 번째 시험에서는 8.0으로 육안 계수시에 비해 그 값이 50%에도 미치지 못했다. 이에 대한 두 시험법 사이의 정확한 상관관계를 알아보기 위해 컴퓨터 이미지 분석법을 이용한 자동화 계수치를 그에 상응하는 육안 계수치에 대해서 그래프로 그려보았다(Fig. 1). 그림에서 두

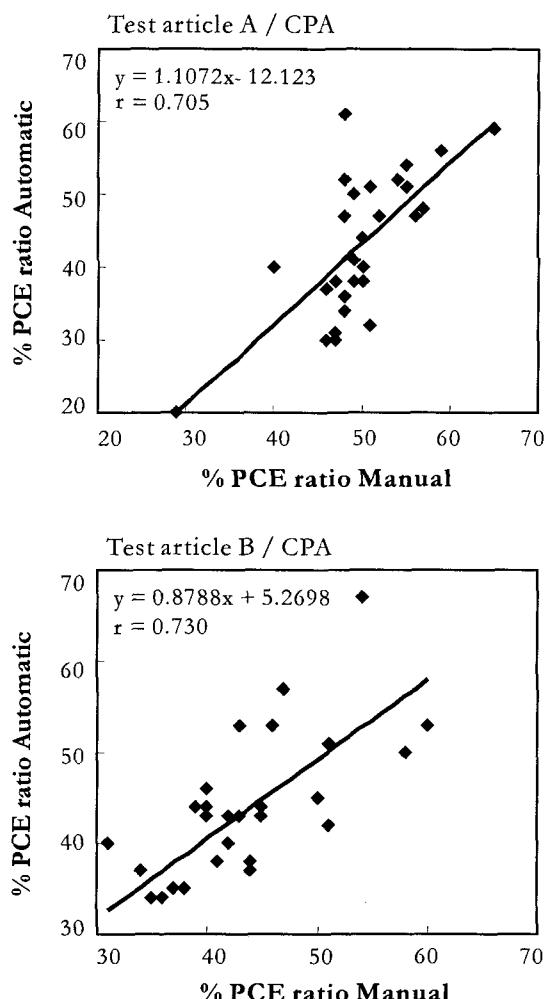


**Fig. 1.** Correlation between automated analysis and manual analysis of MNPCEs. The automated MNPCEs scoring of each mouse is plotted against the corresponding manual scoring. The *r*-value indicates a correspondence existing between two methods.

번의 시험 모두에서 기울기가 0.5 이하인 것에서 알 수 있는 것처럼 소핵의 빈도수가 커질수록 자동화 계수법에서 소핵의 계수가 상대적으로 육안계수보다 낮음을 알 수 있다. 하지만 두 시험법의 상관관계를 보여주는 *r* 값이 음성 물질을 이용한 첫번째 시험에서는 0.915, 양성물질을 이용한 두번째 시험에서는 0.700으로서 비록 소핵빈도가 높을 수록 *r*값이 낮아지긴 하지만 어느 정도는 두 시험법에 상관관계가 있음을 보여주고 있다.

## 2. 세포독성의 지표로서 %PCEs의 측정

일반적으로 시험물질의 투여후 그 물질에 대한 세포독성여부와 그 물질이 체내에 제대로 흡수 및 분포가 되었는지를 확인하기 위해서 소핵시험에서는 그 지표로서 전



**Fig. 2.** Correlation between automated analysis and manual analysis of %PCE. %PCE was determined by analyzing 1000 total erythrocytes. The automated %PCE of each mouse is plotted against the corresponding manual scoring. The *r*-value indicates a correspondence existing between two methods.

체 적혈구수에 대한 미성숙적혈구(PCE, polychromatic erythrocytes)수의 비율(%PCE)을 측정한다. 따라서, 본 시험에서도 두 시험법 모두에서 이 비율을 측정하였다. Table 1에서 보는 것처럼, 음성물질을 이용한 첫번째 시험에서는 컴퓨터 이미지 분석법이 더 민감하게 %PCE 비율을 보여주어서, 육안 판정시 음성대조군에 비해서 세포독성이 없는 것으로 판정이 되었던 시험물질 A가 컴퓨터 이미지 분석을 이용한 자동화 시험법에서는 가장 낮은 처리군인 62.5 mg/kg 처리군에서부터 세포독성이 있음을 보여주고 있다. 반면에 양성물질을 이용한 두 번째 시험에서 육안 분석법이 더 민감한 %PCE 비율을 보여주었다. Fig. 2에서 보는 것처럼 %PCE 비율에 대한 두 시험법의 상관관계( $r$ )는 두 번의 시험 모두에서 유사하게(0.705 vs. 0.730) 나타났다.

#### IV. 고 칠

본 연구의 목적은 일반적으로 육안으로 소핵을 판정하는 방법을 벗어나서 컴퓨터 이미지 분석법을 이용하여 소핵의 계수를 자동화하자는 것이다. 현재 본 실험실이 소장하고 있는 Loats Automated Micronucleus Scoring System은 Giemsa 염색된 slide를 사용하도록 고안되어 있기 때문에 Giemsa 염색을 통해서 slide를 준비하였다. 비록 현재는 acridine orange를 이용한 염색방법이 더 선호되긴 하지만(Tinwell과 Ashby, 1989), Giemsa 염색법은 acridine orange 염색법보다 염색이 오래가고 안정하다는 장점을 가지고 있고, 또한 최근에 개최된 유전독성시험법에 관한 국제회의에서 *in vivo* 소핵시험을 검토한 국제전문가 그룹에 의해서 acridine orange 염색법과 더불어 인정받은 염색법이기도 하다(Hayashi 등, 2000).

본 시험 결과는 Table 1에서 보는 것처럼, 비록 전통적인 육안으로 하는 소핵 시험과 컴퓨터 이미지 분석법을 이용한 소핵 시험시 음성과 양성의 판정에는 동일한 결과를 보여주었지만, 계수한 소핵의 수치에는 두 방법사이에 어느 정도의 차이가 있었다. 특히, 소핵의 빈도수가 10 이상으로 많이 나타날 경우에는 그 차이가 심해져서 이미지 분석법으로 계수한 소핵빈도수가 육안계수시의 빈도수에 비해 50%에도 미치지 못했다. 소핵의 빈도가 10 이하인 경우에는 유사한 값을 보이다가 그 이상으로 올라가면 큰 차이를 보이는 이유에 대해서는 현재로서는 명확한 해답을 얻을 수는 없었다. 하지만, 현재까지의 지식으로 유추해 볼 수 있는 첫번째 가정은 시험자가 컴퓨터상에 미리 소핵으로 계수하도록 입력해 놓은 소핵의 정의에 대한 문제점일 수 있다. 시험자가 미리 컴퓨터상에 일정 정도까지 염색상이 주위부와 다른 부위에 대해서 특정 크기와 특정 형태를 가진 경우를 소핵으로 계수하도록 지정을 하는데,

이때 모든 소핵의 이미지가 일정한 기준을 가지고 동일하지는 않으므로 육안으로는 소핵으로 계수할 수 있는 많은 경우가 컴퓨터에 의해서는 배제될 수 있을 것 같다. 또 다른 가정은 분열중인 세포들과 같이 두 개의 세포가 붙어 있거나 겹쳐져 있을 경우 컴퓨터가 이 이미지는 그냥 지나쳐 간다는 것이다. 하지만, 이러한 경우에 의해서 지나쳐 가는 소핵의 빈도는 그다지 많을 것 같지는 않으므로 두 분석법의 차이는 아마도 전자에 의한 것이 아닌가 싶다. 만일 전자의 경우라면 좀 더 정확한 소핵의 정의를 컴퓨터상에 부여해야 할 것이다.

하지만 세포독성을 나타내는 지표인 전체 적혈구수에 대한 미성숙적혈구수의 비율(%PCEs)은 두 시험법 사이에 소핵의 계수만큼이나 큰 차이는 없었다. 다만, 시험물질 A를 가지고 수행한 첫번째 시험에서는 컴퓨터 이미지 분석법이 더 민감하게 %PCE 비율을 보여주어서, 육안 판정시 음성대조군에 비해서 세포독성이 없는 것으로 판정이 되었던 시험물질 A가 컴퓨터 이미지 분석을 이용한 자동화 시험법에서는 세포독성이 있음을 나타내었다. 반면에 시험물질 B를 가지고 수행한 두 번째 시험에서 육안 분석법이 더 민감한 %PCE 비율을 보여주었다. 하지만, 두 번째 시험에서는 장기를 강하게 착색하는 시험물질의 특성 때문에 컴퓨터가 정확하게 미성숙적혈구와 성숙적혈구의 구분하는 데에 문제가 있었으리라 사료된다. 이상의 결과를 통계학적으로 분석한 결과 두 시험법 사이의 상관관계를 보여주는  $r$ 값이 두 번의 시험에서 소핵의 계수시에는 0.915와 0.700, %PCEs에서는 0.705와 0.730으로 그다지 높게는 나오지 않았다. 비록 이 값이 0.9이상으로 나타나야 두 시험법 사이에 상관관계가 높다고 할 수 있지만 0.7 이상의 값이면 양성과 음성을 판정하는 데에 있어서 두 시험법 사이에 다른 판정이 나올 확률은 그다지 높지 않다고 본다.

종합적으로 컴퓨터를 이용한 이미지 분석법이 소핵의 계수에 있어서 아직까지는 육안 계수법만큼 효과적이지는 못하지만, 20분 이내에 1000개의 적혈구를 분석할 수 있고, slide changer가 있어서 16장 이상의 slide를 시험자가 없이도 밤새 계수가 가능하다는 장점이 있다. 또한 최근 각광 받고 있는 flow cytometry scoring은 분석속도가 매우 뛰어나서 몇 분내에 수십만 개의 적혈구 측정이 가능한 반면, slide 제작 없이 세포가 suspension인 상태에서 측정을 하기 때문에 육안 계수와의 호환성이 전혀 없는 단점이 있으나, 이미지분석을 이용한 소핵계수법은 육안 계수법과 같은 slide를 사용하므로 언제든지 호환이 가능하다. 그리고 flow cytometry scoring 방법에 비해서 가장 뒤떨어지는 부분인 분석 속도는 컴퓨터 processor의 발달에 따라 쉽게 올릴 수 있을 것으로 보인다. 따라서, 좀 더 많은 시험물질에 대한 검증을 통해서 이미지 분석을 통한 자

동화 시험법이 확립되면 시험의 객관성을 높일 수 있고, 시간과 인력의 절감을 통한 high throughput scoring이 가능할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Dertinger, S.D., Torous, D.K. and Tometsko, K.R. (1997): Flow cytometric analysis of micronucleated reticulocytes in mouse bone marrow. *Mutat. Res.*, **390**, 257-262.
- Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, D.G., Adler, I.-D., Blakey, D.H., Dertinger, S.D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A. and Sutou, S. (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., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990): The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, **245**, 245-249.
- Krishna, G. and Hayashi, M. (2000): *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.*, **455**, 155-166.
- Parton, J.W., Hoffman, W.P. and Garriott, M.L. (1996): Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system. *Mutat. Res.*, **370**, 65-73.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 1-9.
- Tinwell, H. and Ashby, J. (1989): Comparison of acridine orange and Giemsa stains in several mouse bone marrow micronucleus assay - including a triple dose study. *Mutagenesis*, **4**, 476-481.