

## Ames test와 자매염색분체교환분석법(SCE)에서의 positive control에 의한 유전독성 비교연구

임흥빈, 이영구, 이동욱, 김용태

한국인삼연구초연구소 화학부

## A Comparative Study of the Induction by Positive Control of Revertant Colonies in *Salmonella typhimurium* TA98 and SCE in Human Lymphocytes

H. B. Lim, Y. G. Lee, D. W. Lee and Y. T. Kim

Division of Chemical Research, Korea Ginseng & Tobacco  
Research Institute, Taejon 305-345, Korea

### Abstract

Ames test using special strains which are histidine requiring mutant of *Salmonella typhimurium*, is widely utilized as short-term bioassay to evaluate the genotoxicity of chemicals. This method requires the liver microsomes(S-9 fraction) to provide mammalian metabolism of the compounds. Therefore, the mutagenic potency of the chemicals is affected by not only the intrinsic properties of them but also the efficiency of the *in vitro* microsomal activation system. For this reason, the complex mixtures such as environmental pollutants from occupational sources, natural products or cigarette smoke condensates(CSC), might be often appeared the false results. Induction of sister chromatid exchange(SCE) in cultured cells is known as another sensitive and powerful tool for the measurement of genotoxicity and the method has also an advantage which is able to apply to the *in vitro* and *in vivo* systems.

In the present study, the inducibilities of revertant colonies in tester strain TA98 and SCE in human lymphocytes by positive controls and total particulated materials(TPM) obtained from various brand(domestic and imported) cigarettes were compared in order to investigate whether the results in Ames test are in agreement with those in SCE analysis. The mutagenic activities of well known mutagens such as B(a)P showed excellent dose-response in the both methods although the induction mechanism was different each other, but cyclophosphamide resulted such effect only in SCE analysis. Most TPM tested showed a similar pattern in the mutagenic activities in those methods. However, only two(one imported brand and one domestic sample cigarettes) among the TPM obtained from various cigarettes appeared the higher induction in SCE than Ames test.

## 서 론

인간을 포함한 모든 생물체의 유전적 장애는 유전자나 또는 염색체 그 자체가 변화됨으로써 유발되고 있으며, 오늘날 인류는 수 많은 돌연변이 유발물질이나 암유발물질 등에 노출되고 있어 그 기회는 점점 많아지고 있다. 이들 물질은 유전자와 상호 작용함으로써 유전자 손상 즉 암이나 유전적 출생결함의 주요원인이 되고 있다.

생식세포의 유전적 손상은 그 후손에 유전적 결함을 초래할 수 있고, 체세포의 유전자 손상은 세포증식의 조절 또는 억제하는 유전자상에 내포되어있는 정상적인 세포조작을 돌연변이시켜 암을 유발할 수 있어<sup>1)</sup> 그 문제점은 심각하다. 이들에 관한 연구는 이런 유전자 돌연변이 유발물질이나 암유발물질을 밝히는 것<sup>2)</sup>과 유전자 손상을 줄이거나 회복을 촉진 시키는 분야로 연구되고 있다<sup>3)</sup>.

Ames 등<sup>7,8)</sup>에 의해 개발 보안되어온 방법으로서 미생물을 이용하여 화합물의 돌연변이 유발성을 검정하는 *Salmonella* mutagenicity test는 short-term test의 일종으로 대표적인 유전독성측정방법중의 하나이다. 발암성 예측에 있어 Ames test의 효율성은 화합물 그 자체로는 돌연변이 유발성을 갖고 있지 않으나, 고등 동물의 대사과정에 의해 돌연변이 유발물질로 전환될 수 있는 화합물에 대해 Mammalian microsomal enzyme system을 도입함으로써 크게 높아졌는데, 발암성 물질의 약 80~90%는 Ames test에서 돌연변이 유발물질로 작용하는 것으로 알려졌다<sup>9,10)</sup>.

그러나 미생물과 고등동물간에는 유전적 또는 생리적으로 큰 차이점이 있으며, Ames test가 *in vitro*에서 활성이 있는 모든 물질을 검출할 수 있는 완벽한 방법이 아니라는 점등을 고려해 볼 때, 어떤 화합물에 대한 발암성 또는 돌연변이 유발성을 Ames test에서 얻어진 결과만을 갖고 판단 하기에는 다소 무리가 있다.

근래에 이르러 세포유전학적 연구분야에서 고등 척추동물의 특정 세포를 사용한 염색체 변이의 검정

실험에 있어서 *in vivo*<sup>12)</sup>에서 뿐만아니라 *in vitro*<sup>13,14)</sup>에서도 가장 민감한 지표로 알려져 있는 자매염색분체교환분석(SCE)은 DNA복제기간동안 새로이 합성된 DNA가닥과 기존의 DNA가닥사이의 DNA극성에 의한 상호교환에 의해 형성되고 DNA복제의 반보존적 특성때문에 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)을 함유한 배양액에서 2회의 분열을 거친 중기염색체의 두 염색분체 사이의 상호 교환현상을 관찰할 수 있다.

본 실험에서는 positive control과 여러 제품담배(국산, 외산)로부터 얻은 연기응축물을 *Salmonella typhimurium* TA98 변이원성균주를 이용 Ames test을 실시하고, 건강한 성인 남자의 혈액을 채혈하여 백혈구를 분리 배양하고 시료에 의한 배양백혈구의 자매염색분체교환빈도를 조사하였으며, 두 방법에서 얻은 결과를 비교분석하였다.

## 재 료

### 시 약

L-Histidine, D-biotine, glucose-6-phosphate, NADP, 2-aminofluorene, benzo(a)pyrene, heparin, 및 Hoechst 33258 등은 Sigma사에서, fetal bovine serum, RPMI 1640, penicillin, streptomycins, phytohematoglutinin(M-form) 및 5-bromo-2-deoxyuridine 등은 Gibco사에서, cyclophosphamide는 Aldrich사에서, Aroclor1254는 Analab사에서, Nutrient broth는 Oxoid Ltd에서 각각 구입하였으며, 기타 일반시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

### 담배 연기응축물의 조제

본 실험에 이용된 모든 담배의 TPM은 시료담배를 자동직연장치(Heiner, Borgwalt RM20/CS, West Germany)을 사용하여 CORESTA표준조건에 따라 연소시키고, 92mm Cambridge filter로 포집한 전연기응축물을 methanol로 추출한 다음, 감압농축하여 methanol을 완전히 제거하고 dimethyl sulfoxide에 재용해하여 실험에 사용하였다.

## 실험방법

### 1. Ames test

#### (1) 사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 frame shift 돌연변이체인 his D3052를 모균으로 하여, 돌연변이 유발원에 대한 감수성을 높이기 위해 막의 구성성분인 lipopolysaccharide가 결여된 rfa 돌연변이와 DNA excision repair system에 관여하는 유전인자가 결여된 uvr B 돌연변이 및 R-factor plasmide의 일종인 pKM 101을 도입시킨 균주로서 다양한 frame shift 돌연변이 유발물질의 검출하는데 이용된다. 이 균주는 본래의 성질을 잃어버릴 염려가 있어 Maron과 Ames의 방법<sup>15)</sup>에 따라 histidine 요구성, rfa 돌연변이, uvr B 돌연변이 등을 정기적으로 검사하였으며 검사가 끝난 균주는 -80°C에서 장기보관하고, 실험에 사용하였다.

#### (2) S-9 분획의 조제

Aroclor 1254 (polychlorinated biphenyl mixture)를 200mg/ml로 희석하여 체중 약 200g의 웅성 흰쥐 (Sprague-Dawley)에 500mg/kg의 비율로 복강내로 주사하였다. 5일 후 경추이탈법으로 희생시키고, 간을 절취하여 동량의 0.15M KCl로 씻은 뒤 3배부피의 0.15M KCl을 넣고 멸균된 가위로 잘게 썰다음, Teflon Pestle Homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄물을 9,000x g로 10분간 원심분리한 다음, 상등액을 취해 용량 2ml의 Cryo tube에 나누어 넣고 -80°C에서 냉동보관하였다. 모든 실험작업은 0-4°C에서 행하였고, 용매와 기구는 멸균된 것을 무균적으로 사용하였다.

#### (3) 미생물의 배양

Maron과 Ames의 방법<sup>15)</sup>에 따라 다음과 같이 행하였다. 멸균된 test tube를 45°C 항온조에서 미리 20분 예열한 후, 멸균된 Top agar에 100ml의 1mM histidine/biotin 용액을 잘 혼합한 뒤 1ml씩 시험관에 취하고 시료와 배양된 균현탁액(1-2 x 10<sup>9</sup> cells/ml) 0.1ml와 필요한 경우 S-9mix. 0.5ml을 가한 다음 약 3

초간 잘 혼합한 뒤 곧 준비된 Vogel-Bonner agar plate에 부어 굳기 전에 여러 방향으로 고루 퍼지게 하였다. Top agar가 굳으면 뒤집어서 37°C 항온기에서 48시간 배양 한 후, plate상에 생성된 revertant colony의 수를 계수하였다.

### 2. 자매염색분체교환 분석법(SCE)

#### (1) 사람백혈구 분리

자매염색분체교환분석은 Julian<sup>16)</sup>의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉 채혈전 수개월 이내에는 약물의 정기적 복용이나 특정 virus의 감염경험이 없는 건강한 성인남자로부터 각각 혈액을 공여받아 실험에 사용하였다. 항응고제를 넣은 주사기로 채혈하여 실온에서 약 1시간 세워 놓아둔 후 백혈구를 함유한 혈장과 적혈구가 서로 구분되면 1~2ml의 상등액을 취하여 실험에 사용하였다.

#### (2) 세포배양

배양액은 RPMI 1640 Medium을 사용하였으며 penicillin(최종농도 100units/ml)과 streptomycin(최종농도 100µg/ml)을 가한 후 sodium bicarbonate를 가하고 pH는 7.3~7.4로 하였다. 56°C water bath에서 30분간 열처리하여 불활성화시킨 FBS를 최종농도가 15%가 되도록 배양액에 첨가하였으며 배양액 10ml당 세포수가 1~1.2x10<sup>7</sup>개가 되도록 백혈구를 첨가하였다. 다음은 phytohemagglutinin M(PHA-M)을 배양액 1ml당 최종농도 0.01ml(1%)가 되도록 가한 후, 5% CO<sub>2</sub>을 유지하는 37°C incubator에서 72시간 배양하였다. PHA-M을 투여한지 24시간후에 Brdu를 최종농도 8µg/ml되게 시료와 함께 가한 다음 Brdu-Substituted DNA가 빛에 의한 photolysis를 방지하기 위해서 배양기를 Aluminum foil로 감싸 빛을 차단시켰으며 모든 실험 조작은 빛이 차단된 상태에서 실시하였다.

#### (3) 배양세포의 분리 및 염색

72시간 배양한 후 원심분리하여 세포를 회수하였

으며 세포회수 2시간 전에 colcemide(0.6 $\mu$ g/ml)를 처리하였다. 배양이 끝난 세포는 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)로 세척한 후 acetic acid-methanol(3 : 1)용액으로 고정시켰으며, 적당량을 희석하여 slide를 제작하였다. 이 slide를 실온에서 3일간 건조시킨 후 Hoechst 33258 용액과 4% Gimsa 용액으로 염색한 후 염색체는 잘 흩어지고 SCE염색이 선명한 중기염색체만을 광학현미경(Leitz)으로 관찰하였다. SCE빈도는 대조군에서 총 100개의 중기세포를 관찰하여 평균빈도를 산출하고 SCE는 광학현미경 1000배에서 나타나는 명확한 SCE염색의 차이를 기준으로 하여 구분하였다.

### 결과 및 고찰

대표적인 발암물질로 알려진 benzo(a)pyrene<sup>16)</sup>,

2-aminofluorene<sup>4)</sup>, cyclophosphamide<sup>17,18)</sup>와 상품담배의 연기응축물을 대하여 Ames test와 자매염색분체교환분석 빈도를 분석하였다<sup>19,20)</sup>.

Table 1은 Ames test에서 이들 positive control과 상품담배의 연기응축물이 S-9혼합액을 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때의 결과를 비교한 것이다. S-9혼합액을 첨가하지 않았을 때 TA 98균주를 사용하여 돌연변이 유발성을 시험한 결과 positive control과 연기응축물에서 revertant colony가 spontaneous와 전혀 차이를 보이지 않았다. 그러나 S-9혼합액을 첨가하였을 때는 benzo(a)pyrene, 2-aminofluorene, 담배연기응축물 모두에서 돌연변이 유발성이 있음을 알 수 있었고 cyclophosphamide 경우에는 S-9혼합액 첨가에 관계없이 revertant colony생성에 유의한 변화를 보이지 않았다.

Table 1. Induction of revertants in *Salmonella typhimurium* TA98 by positive controls and CSCs in the absence or presence of S-9 mixtures

	Revertants/plate	
	-S-9 mixture	+S-9 mixture
Benzo(a)pyrene(5 $\mu$ g)	-	++++
Aminofluorene(5 $\mu$ g)	-	++++++
Cyclophosphamide(250 $\mu$ g)	-	-
CSCs(500 $\mu$ g)	-	+

Fig. 1은 positive control의 투여량을 증가시키면서 revertant colony수의 변화를 관찰한 결과이다. S-9 혼합액 존재하에서 benzo(a)pyrene과 2-aminofluorene은 투여량이 증가함에 따라 revertant colony의 형성이 증가되었고 spontaneous에 비해 5 $\mu$ g의 benzo(a)pyrene은 4배, 2-aminofluorene은 6배의 증가를 보임으로서 강력한 돌연변이 유발성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 cyclophosphamide는 투여량을 300 $\mu$ g까지 증가시키면서 관찰하였으나 dose에 관계없이 spontaneous와 비슷한 수준이었으며 TA

98 균주를 이용한 Ames test로는 돌연변이 유발성을 확인할 수 없었다. 이와 같은 결과로 보아 benzo(a)pyrene, 2-aminofluorene 및 담배연기응축물 그 자체는 돌연변이 유발성은 갖지 않으나 이들 물질이 간 microsome의 효소계에 의해 대사된 후 그 대사산물이 돌연변이를 유발함을 알 수 있었고 이는 benzo(a)pyrene이나 2-aminofluorene이 간의 microsomal P-450 효소계에 의한 이들의 대사산물이 강력한 돌연변이 유발물질로 작용한다는 Gelboin et al<sup>21)</sup>과 Okamoto 등<sup>22)</sup>의 결과와 일치하였다.

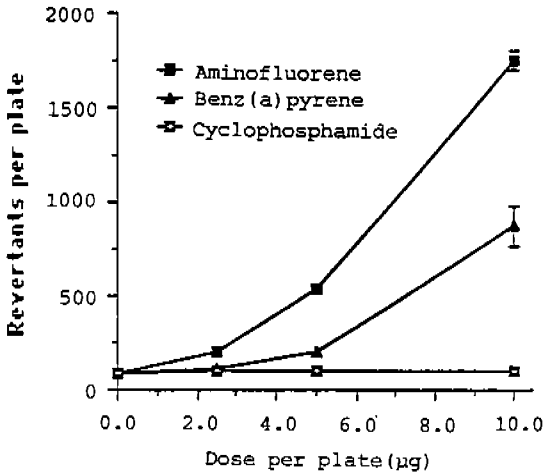


Fig. 1. Dose-response of mutagenic activity induced by positive controls(*Salmonella typhimurium* TA98 was used in the presence of S-9 mixture).

Fig. 2는 건강한 사람의 positive control에 의한 백혈구의 자매염색분체교환빈도를 관찰한 결과이다. 정상인 백혈구의 SCE빈도는  $8.1 \pm 1.5$ 인 반면, benzo(a)pyrene의 경우  $2.5\mu\text{g}$ 투여시 SCE빈도는  $16.8 \pm 2.0$ 개이었고  $25\mu\text{g}$ 투여시에는  $22.8 \pm 2.2$ 개로 증가하였다. 한편 cyclophosphamide는 생체내의 효소계에 의해 cyclophosphamide mustard로 되는 활성화 반응을 이용하여 항암제로 사용되고 있으나, 자매염색분체교환빈도를 증가시키는 대표적인 약물중의 하나이다. 본 실험에서도 이 약물의 투여량이 증가함에

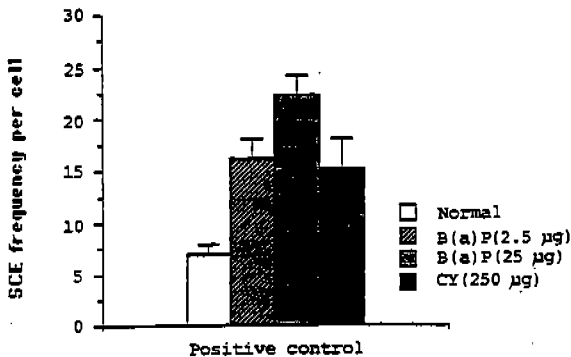


Fig. 2. Frequencies of SCE induced by positive control in human lymphocytes.

따라 SCE빈도가 증가하였으며  $250\mu\text{g}$  투여시 SCE빈도는  $15.2 \pm 2.1$ 개로 정상세포 비해 2배로 증가하였다. 이것은  $2.5\mu\text{g}$ 의 B(a)P의 결과와 비슷하였다. 이는 cyclophosphamide가 Ames test에서 TA 98균주에 대한 돌연변이 유발성을 나타내지 않았지만 SCE분석법으로는 유의하게 염색체변이가 증가하여 DNA 손상으로 인한 유전독성을 갖고 있음을 확인하였다.

Fig. 3은 S-9혼합액 존재하에서 TA 98균주를 사용하여 저 Tar담배, 중등도의 Tar담배 및 고 Tar담배를 CORESTA표준조건하에서 연소하여 얻은 TPM에 대한 돌연변이 유발성을 측정된 결과이다.

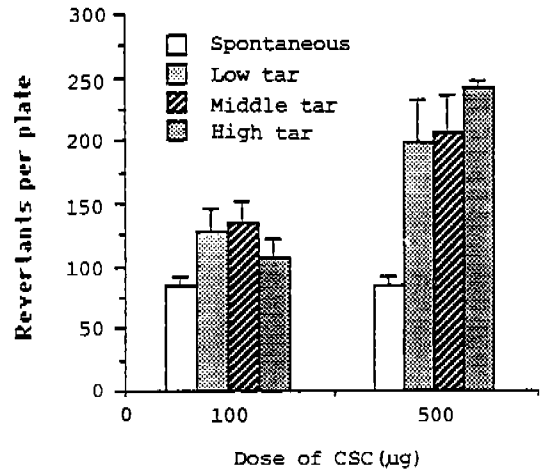


Fig. 3. Comparison of mutagenic activities induced by smoke condensates obtained from various cigarettes(*Salmonella typhimurium* TA98 was used in the presence of S-9 mixture).

각 담배의 연기응축물을 처리하였을 때 시료 모두 투여량이 증가함에 따라 revertant colony수가 증가되었다. 담배의 종류에 따라서는 같은 양을 처리했을 때 revertant colony수가 Tar의 함량이 높은 담배일수록 다소 증가되었으나 유의성은 없었으며 그 또한  $300\mu\text{g}$ 까지 처리하였을 때에도 revertant colony가 증가되었지만 양성으로 판단할 만큼 증가되지 않았으며  $500\mu\text{g}$ 를 처리하였 때는 spontaneous의 약 2~3배까지 증가되었다. 그러나 담배종류별로는 차이를 보이지 않았다.

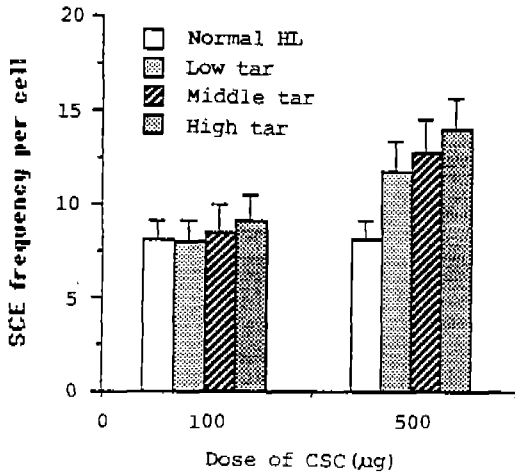


Fig. 4. Comparison of SCE frequencies induced by smoke condensates obtained from various cigarettes in human lymphocytes.

Fig. 4는 위와 같은 담배응축물에 대한 SCE분석 결과이다. SCE분석법에서도 Ames test 결과와 같이 dose량이 증가 함에 따라 SCE빈도수가 증가하였고 담배종류에 따라 유의성 있는 SCE빈도 차이를 보이지 않았으며, 투여량에 따른 SCE빈도수의 변화는 Hopkin<sup>23)</sup> 등의 결과와 비슷한 양상이었다. 그러나 이와 같은 유전독성이 positive control과 비교해 볼때 mutagenic activity는 극히 낮았다.

시판담배 연기응축물에 대한 이들 두 유전독성실험에서 제품별로는 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었지만, 한 종류의 sample담배와 외산약용담배는 SCE에서만 특이하게 구별되었다.

Fig. 5에서와 같이 Ames test에서는 담배종류별로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 반면 SCE분석법에서는 그 빈도가 이들 담배연기응축물을 처리시 증가

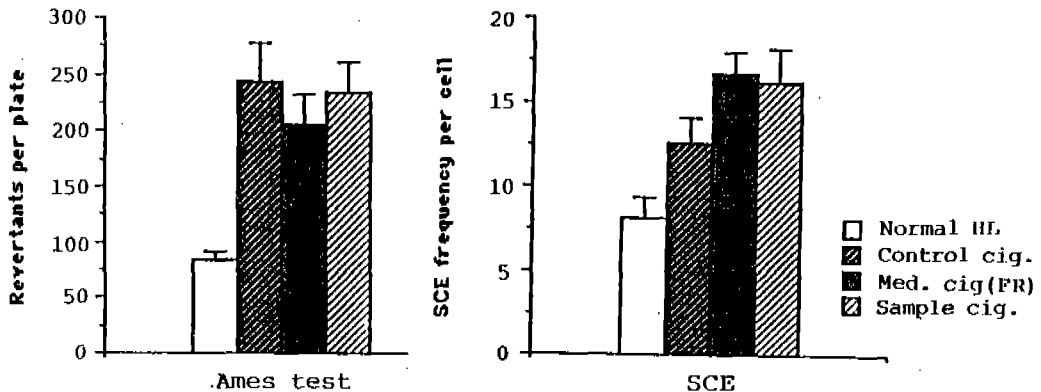


Fig. 5. Comparison of genotoxicity of TPM obtained from several cigarettes smoke in Ames test and SCE analysis.

하였다. 즉 정상인 백혈구에서의 SCE빈도는  $8.1 \pm 1.5$  이었고, 시판상품담배에서는  $12.8 \pm 3.7$ 이였으며, 외산의 약용담배는  $16.8 \pm 2.8$ 이었고 그리고 한종류의 시제품담배는  $16.3 \pm 4.0$ 이었다.

이상의 모든 결과를 종합해 보면, Ames test가 간단하게 유전독성을 측정할 수 있는 방법이지만은 하나 matrix가 복잡한 화합물이나 보다 정확한 상대적인 독성을 비교하기 위해서는 적어도 이들 두 방법을

병행해서 평가되어야 할 것으로 사료된다.

### 결론

대표적인 돌연변이 유발물질로 알려진 화합물중 2-aminofluorene, benzo(a)pyrene, cyclophosphamide을 positive control로 하고 제품담배의 TPM을 적용하여 *Salmonella tryphimurium* TA 98 strain을 이용한 Ames test와 사람의 백혈구를 이용한 자매염

색분체교환분석법으로 이들의 유전독성을 비교하였다. TA 98균주를 이용한 Ames test결과 S-9혼합액 존재하에서 2-aminofluorene, benzo(a)pyrene은 dose가 증가함에 따라 revertant colony가 유의하게 증가하여 돌연변이 유발성을 나타내었지만, cyclophosphamide는 뚜렷한 증가를 보이지 않았다. 3종의 담배연기응축물들도 담배종류별로는 유의성 있는 돌연변이 유발성의 차이를 보이지 않았다. 그러나 자매염색분체교환분석법에서는 positive control 모두 SCE빈도가 증가하였고, 3종의 담배연기응축물도 종류별로 염색분체교환빈도의 차이를 확인할 수 있었다. 두 방법중의 Ames test가 SCE분석법보다 다소 민감한 dose response를 보였으나 cyclophosphamide와 같이 Ames test에서 검출되지 않은 mutagen이나 담배연기응축물과 같이 복잡한 화합물에 대해서는 SCE분석법이 보다 민감함을 알 수 있었다. 따라서 보다 정확한 유전독성의 평가를 위해서는 다양한 실험이 요구됨을 알 수 있다.

### 참고문헌

1. Ames, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204 : 587-593(1979)
2. Matsushima, T., Matsumoto, H., Shirai, A., Sawamura, M., and Sugimura, T., Mutagenicity of the naturally occurring carcinogen cyasin and synthetic methlazoxymethanol conjugates in *Salmonella Typhimurium*. *Cancer Res.* 39 : 3780-3782(1972)
3. Aravindakshan, M., Chauhan, P. S., and Sundaram, K., Studies on germinal effects of quercetin, a naturally occurring flavonoid. *Mutation Res.* 144 : 99-106(1985)
4. Radman, M., Jeggo, P., Wagner, R., Chromosomal rearrangement and carcinogenesis. *Mutation Res.* 98 : 249-264(1982)
5. Julian Prestion, R., San Sebastian, J. R., Mc

- Fee, A. F., The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutation Res.* 189 : 175-183(1987)
6. Pohlova, H., Cerna, M., Rossner, R., Chromosomal aberrations, SCE and urine mutagenicity in workers occupationally exposed to cytostatic drugs. *Mutation Res.* 174 : 213-219 (1986)
7. Ames, B. N., Duston, W. E., Yamasaki, E., and Lee, F. D., Carcinogen and mutagens : A simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 70 : 2281-2285(1973)
8. Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31 : 347-364(1975)
9. McCann, J., and Ames, B. N., The *Salmonella*-microsome mutagenicity test : Predictive value for animal carcinogenicity. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. p. p 1431-1445(1977)
10. Ames, B. N., and McCann, J., Validation of the *Salmonella* test : A reply to Rinkus and Legator. *Cancer Res.* 41 : 4192-4196(1981)
11. McCann, J., Choi, E., Yamaski, E., and Ames, B. N., Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* microsome test : Assay of 300 chemicals *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 : 5135-5139(1975)
12. Schmid, E., Bauchinger and Hauf, R., Chromosome changes with time in lymphocytes after occupational exposure to toluene. *Mutation Res.* 142 : 37-39(1985)
13. Norppa, H., Vainio, H., and Sorsa, M., Metabolic activation of styrene by erythrocytes detected as increased sister chromatid exchanges

- in cultured human lymphocytes. *Cancer Res.* 43 : 3579-3582(1983)
14. Bender, M. A., Leonard, O. W., Costantino, Jr., J. P., and Redmond, C. K., Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in lymphocytes from Coke Oven workers. *Mutation Res.*, 206 : 11-16(1988)
  15. Maron, D. M., and Ames, B. N., Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 113 : 173-215(1983)
  16. Abe, S., Nemoto, N., and Sasaki, M., Sister-chromatid exchange induction by indirect mutagens/carcinogens, aryl hydroxylase activity and benzo(a)pyrene metabolism in cultured human hepatoma cells. *Mutation Res.*, 109 : 83-90(1983)
  17. AU, W., Sokova, O. I., Kopnin, B., Arrighi, F. E., Cytogenetic toxicity of cyclophosphamide and its metabolites in vitro. *Cytogenetic Cell Genet.* 26 : 108-116(1980)
  18. Krishna, G., Nath, J., and Ong, T., Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Res.* 46 : 2670-2674(1986)
  19. Chien-song, K. S., Robert, L. F., Jacqueline W. P., Elaine, C. L., and Bruce, A. C., Increased fragile site and sister chromatid exchange in bone marrow and peripheral blood of young cigarette smoke condensates. *Mutation Res.* 47 : 6278-6282(1987)
  20. Jansson, T., Curvall, M., Hedin, A., and Enzell, C. R., In vitro studies of biological effects of cigarette smoke condensates. *Mutation Res.* 169 : 129-139(1986)
  21. Golboin, H. V., and Ts'o, P. O. P. Poly hydrocarbons and cancer. Volume, Academic Press (1978)
  22. Okamoto, H., Mizusaki, S., Yoshida, D., and Mataumoto, T., Enhancing effect of carbohydrate pyrolysates on mutagenesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Agric. Biol. Chem.* 32(7) : 1433-1438(1979)
  23. Hopkin, J. M., Evans, H. J., Cigarette smoke condensates damage DNA in human lymphocytes. *Nature* 279 : 7441-7442(1979)