

H Menthol (Nicotine Free-Tobacco Free) Herbal Cigarette의 흡입독성시험

강경선 · 조성대 · 조종호 · 김경배 · 이지해 · 안남식 · 정지원 · 양세란 · 박준석 · 이영순*
서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Inhalation Toxicity Study of H Menthol (Nicotine Free-Tobacco Free) Herbal Cigarettes

Kyung-Sun Kang, Sung-Dae Cho, Jong-Ho Cho, Kyung-Bae Kim, Ji-Hae Lee, Nam-Shik Ahn, Ji-Won Jung, Se-Ran Yang, Joon-Suk Park, and Yong-Soon Lee*
Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

(Received April 17, 2002 / Accepted June 20, 2002)

ABSTRACT : Nowadays a huge variety of products that aim to assist to quit smoking or reduce addictive symptoms are developed and manufactured with safety evaluation, but the safety of the most recent products of interest which do not contain tobacco and nicotine, and shape cigarettes is not evaluated and guaranteed relatively. This study was carried out to evaluate the single and repeated dose inhalation toxicity and genotoxicity of H menthol (Nicotine free-tobacco free) herbal cigarettes provided by Cigastop Ltd. in ICR mice. In this study, doses which we determined to expose to mice were 40 cigarettes for 6 hours a day to mice in single dose and 20 (high dose), 10 (middle dose) and 5 cigarettes (low dose) a day for 28 days in repeated dose inhalation toxicity, in vivo chromosome aberration test and micronucleus test. The particulate substances from H menthol herbal cigarettes also were gathered and used in the *Salmonella typhimurium*/microsome assay (*Salmonella* test; Ames test). We could find neither significant changes between control and treatment groups nor dose-response effects of test material at all except serum Ca level of female middle dose treatment group in repeated dose inhalation toxicity test. In conclusion, H menthol herbal cigarettes, when applied clinically intended dose we used, might not show any toxic and/or mutagenic effect.

Keywords : Inhalation toxicity test, Herbal cigarette, Ames test, Chromosome aberration test, Micronucleus test, Mutagenicity

서 론

일반적으로 담배는 흡연시 생체에 여러 해로운 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 담배가 연소할 때 여러 종류의 물질이 생성되는데 이중 tar에 포함된 catechol, hydroquinone 등은 랫드의 흉선세포에서 superoxide, H₂O₂, hydroxyl radical 등을 유도하여 DNA damage를 일으키고(Pryor *et al.*, 1998), benzopyrene-diol-epoxide-2(BPDE-2)는 new born mice에서 DNA에 결합하여 폐암을 강력하게 유발하는 물질로 알려져 있다(Rubin, 2001). 또한 nicotine은 임신동물에게 투여했을 때 fetal CNS의 발달을 저해하거나 유산을 유

발하며(Dempsey *et al.*, 2001), 성인에게는 관상동맥 질환(Ismail *et al.*, 1996, Benowitz *et al.*, 1993)등을 일으키는 주요한 원인으로 알려져 있고, 특히 간접흡연에 의해서도 폐암 발생율이 증가한다고 알려져 있다(Hackshaw, 1998). 최근 건강에 대한 일반인들의 관심이 증가함에 따라 위와 같이 여러 위해 작용을 나타내는 흡연을 줄이거나 금연하는 것에 대한 요구 혹은 관심 또한 증가하고 있다. 그리고 이러한 요구에 발맞추어 금연 시 발생하는 여러 가지 금단증상을 완화시키기 위한 목적으로 nicotine patch 등이 개발되어 왔으나, nicotine에 의한 여러 유해 작용으로부터 완전히 자유롭지는 못하다(Benowitz *et al.*, 1993).

근래에는 담배와 유사한 모양과 맛을 가지고 있으나 담배가 포함되지 않아 nicotine에 의한 유해작용을 막고, 금연자

*To whom correspondence should be addressed

에게 심리적인 안정감을 줄 수 있도록 제조된 피우는 금연 보조제가 개발되어 널리 판매되고 있다. 그러나 이러한 피우는 금연보조제는 유해작용이 널리 알려진 담배와는 달리 그 안전성이 검증되지 않은 것이 대부분이다.

본 실험에서는 피우는 금연보조제로 개발되어 세계 각국에 이미 판매되고 있는 H menthol(nicotine free-tobacco free) herbal cigarette의 ICR 마우스에 대한 단회, 반복 투여 흡입독성시험 및 유전독성을 식품의약품안전청 고시(1999. 12. 12.)의 의약품 등의 독성시험기준 제 1999-61호 및 Kim 등의 방법(Kim *et al.*, 2001)에 준하여 실시하여 그 독성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

시험물질

시험물질은 (주)시가스탐에서 공급받은 H menthol herbal cigarette을 사용하였고, 복귀돌연변이 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 TA102 균주는 식품의약품안전청에서 분양받아 사용하였으며, ICR mice는 SLC(SLC Japan, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Nitrocellulose membrane은 ADVANTEC MFS(Pleasanton, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며 Sigma사의 n-Hexane(St. Louis, Missouri, USA)와 Katayama chemical의 ethyl acetate (Japan)을 이용하여 추출하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), 2-aminofluorene(2-AF), sodium azide(SAZ), ICR191, Mitomycin C와 histopaque-1077는 Sigma(St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였으며 colcemid와 FBS는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

실험동물 및 사육조건

실험동물은 SLC Japan의 4주령의 ICR mouse를 중앙실험동물에서 공급받아 사용하였다. 순화 및 검역기간동안은 폴리카보네이트 케이지에 각각 10마리씩 사육하였으며 시험기간동안은 전신 흡입노출 챔버(Whole-body inhalation exposure chamber)에 맞게 고안된 스테인리스 케이지에 5마리씩 사육하였다. 사육실은 온도 22±3°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 10-12회/hr, 명암주기 12시간, 조도 150-200lux로 유지하였으며 순화기간 및 시험기간 중에는 실험동물용 고형사료(삼양사 배합사료)를 섭취시켰으며, 음수는 상수도를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

흡연장비 및 흡입 챔버

본 실험에 사용된 담배연기발생장치는 사람의 흡연과 유사

한 환경을 위해 1분에 1회 흡입하고, 1회 흡입 시 35cc의 흡입량을 2초에 걸쳐 흡입하며, 초속 25 cm의 속도로 필터 끝 32 mm 지점에서 멈추도록 고안되었으며, 담배연기발생장치를 통하여 발생된 각각의 main과 side stream 담배연기를 0.5 m³ whole-body inhalation exposure chamber에 동시에 붙여넣어 H menthol herbal cigarette의 안전성을 평가하였다.

시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 국내의 20세 이상 매일흡연자의 하루 평균 흡연량은 17.53개피라는 보건복지부의 조사결과에 의거해 하루 평균 흡연량의 2배 이상인 40개피를 고용량군으로 대조군은 filtered-air control으로 하여 각 군 당 암·수 각 5마리씩을 단회투여 흡입독성시험의 시험군으로 설정하였다. 반복투여 흡입독성시험의 경우 대조군은 filtered-air control으로 하고 저용량군(5개피), 중간용량군(10개피) 및 고용량군(20개피)의 3개 농도의 시험군을 설정하였으며, 각 군당 암·수 각 10마리씩을 사용하였으며, *in vivo* 염색체이상 시험 및 소핵시험에서는 같은 용량에 대해 군 당 5마리씩을 사용하였다.

흡입노출

선정된 농도의 시험물질을 공기와 섞어 챔버 안에 주입시키고, 이때 챔버 내의 공기유동은 시간당 15회가 되도록 공기주입속도를 조절하였다. 또한 산소의 비율은 19%, 온도는 22±3°C, 습도는 30~70%로 유지하였다. 실험동물이 차지하는 공간은 챔버 전체공간의 5% 이내가 되도록 하였다. 단회투여 흡입독성시험의 경우 투여시간은 챔버 안의 시험물질의 농도가 균일하게 된 후 6시간으로 단회흡입시켰고 반복투여 흡입독성시험 및 *in vivo* 염색체이상 시험 및 소핵시험의 경우에는 매일 6시간, 주 5회, 28일간 투여하였다.

일산화탄소와 호흡성 분진 측정

각 시험군의 흡입 챔버에 일산화탄소 가스 측정기(Model MSA, USA)와 개인용 공기시료채취기(personal air sampler, Model MSA, USA)를 각각 설치하여 담배연기발생장치에서 생성되는 일산화탄소와 호흡성분진을 측정하였다. 일산화탄소의 경우 시험기간중 5회에 걸쳐, 하루 총 발생시간인 6시간 중 1시간마다 측정하여 그 값의 평균과 오차를 구하였다. 또한 호흡성분진의 경우는 NIOSH 지침에 따라 총 5회 포집하여 그 중량을 측정하였다.

단회투여흡입독성시험

14일의 투여기간동안 매일 1회 이상 모든 실험동물에 대하여 일반증상 및 사망여부를 관찰하였으며, 체중은 시험직 전과 시험종료 시 측정하고 시험기간 중에는 투여 후 1일, 4일, 7일, 14일에 측정하였고, 시험종료 후 부검하여 육안적으로 상세히 관찰하였다.

반복투여흡입독성시험

28일의 투여기간동안 매일 1회 이상 모든 실험동물에 대하여 일반증상 및 사망여부를 관찰하였으며, 체중 및 사료섭취량은 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험기간 중 매주 1회 측정, 기록하였다. 모든 생존동물은 부검 전 1일간 절식시킨 후 부검하여 뇌, 뇌하수체, 흉선, 폐, 심장, 간, 비장, 신장, 부신, 고환(난소), 부고환, 전립선(자궁), 타액선 등의 장기무게를 측정하였고, 상기 장기 및 상부호흡기계(기관, 비인두조직), 림프절, 타액선, 골 및 골수, 흉선, 심장, 갑상선, 부갑상선, 식도, 위, 십이지장, 소장, 대장, 간(담낭), 췌장, 비장, 방광, 자궁, 뇌, 뇌하수체, 동맥, 말초신경 등의 육안적 병변 유무를 관찰하고, 10% 중성포르말린에 고정된 후 파라핀 포매하여 4 μ m 절편을 제작, hematoxylin & eosin 염색을 실시하여 광학현미경에서 관찰하였다. 부검 시 채혈한 혈액의 일부는 항응고제로 EDTA가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기로 혈액학적 지표를 측정하였고 나머지는 4°C 냉장 보관한 후 원심분리하여 Auto Dry Chemistry Analyzer(SPOTCHEM SP-4410, ARKRAY, KDK Corporation, Japan)를 이용하여 혈청생화학적 지표를 측정하였다. 반복투여 흡입독성시험에서의 체중변화, 사료섭취량, 혈액학적 분석결과, 혈액생화학적 분석결과 및 장기무게 측정결과에 대한 통계학적인 분석은 등분산일 경우는 One way Analysis of Variance(ANOVA) 검정을 실시하였고, ANOVA 검정에서 유의성이 인정된 경우에는 Dunnet's t-test를 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 수준에서 실시하였다.

복귀돌연변이 시험

H menthol herbal cigarette 20개피(고용량), 10개피(중용량) 및 5개피(저용량)를 6시간동안 노출시키며 personal air sampler(Model MSA, USA)를 이용하여 nitrocellulose membrane에 H menthol herbal cigarette의 분진성분을 흡착시켜, n-Hexane, ethyl acetate로 추출한 후, 각 분획의 용매를 증발시킨 각 시험물질 1 mg을 dimethyl sulfoxide 3 ml에 재용해시킨 다음 100 μ l/plate로 처리하였으며 대사활성제의 존재(S9+)와 부재(S9-)하에 시험을 시행하였다. 용매 대조군으로는 DMSO를, *Salmonella typhimurium* TA98, TA102 strain에서 2-AF, TA100, TA1535 strain에서 SAZ,

TA1537 strain에서 ICR191 처치군을 양성대조군으로 사용하였으며, 매 용량마다 3매 이상의 플레이트를 사용하였다. 37°C incubator에서 48시간 배양한 후 colony counter 위에서 background lawn 보다 큰 colony를 계산하였다.

In vivo 염색체이상 시험

노출종료 후 마우스의 비장을 적출하여 균질화한 다음, lymphocyte가 포함된 mononuclear cell층을 분리해 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 resuspend하여 72시간동안 humidified incubator (5% CO₂, 포화습도, 37°C)에서 배양하였다. 배양 후 colcemid(Gibco, 15212-012)를 최종농도 0.2 μ g/ml가 되도록 각 dish에 처리해 2 시간 더 배양한 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하고, 저장액(0.075 M KCl)을 가하여 37°C 수욕상에서 15분간 처리하였다. 이를 다시 원심분리하고 냉각된 고정액으로 고정한 후 공기건조법으로 염색체 표본을 만들고 5% Giemsa액으로 염색해 광학현미경하에서 염색체이상 발생 빈도를 관찰하였다.

소핵시험

최종 노출 후 16시간, 24시간, 48시간에 소핵을 계수하여 소핵이 최대로 나오는 시간인 24시간을 본 시험의 골수세포 수거시간으로 하였으며, 경추탈구 후 대퇴골을 분리하여 0.5 ml fetal bovine serum(FBS)으로 골수를 관류시킨 다음 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 침전된 골수를 슬라이드에 도말하여 실온에서 하루동안 건조한 다음 Giemsa액으로 염색해 광학현미경에서 1000배의 배율로 관찰하였다.

결 과

일산화탄소와 호흡성 분진 측정

일산화탄소가 전혀 발생되지 않은 대조군에 비하여 H menthol herbal cigarette 20 개피, 10개피와 5개피에서 발생된 일산화탄소는 각각 18.80 ± 2.28 , 11.00 ± 1.58 과 5.60 ± 1.34 ppm이었으며, 총 5회에 걸쳐 측정된 호흡성분진의 중량 측정결과는 각각 6.84 ± 1.62 , 4.58 ± 1.40 과 3.36 ± 0.62 mg/2L이었다.

단회투여 흡입독성시험

투여용량군에서 시험기간동안 사망한 동물은 없었으며, 시험물질에 의한 독성으로 인정되는 증상도 나타나지 않았다. 체중변화에 있어서도 암수의 대조군과 투여용량군 모두에서 정상적인 체중증가를 나타내었으며, 모든 생존개체에서 특이 할만한 부검소견이 관찰되지 않았다.

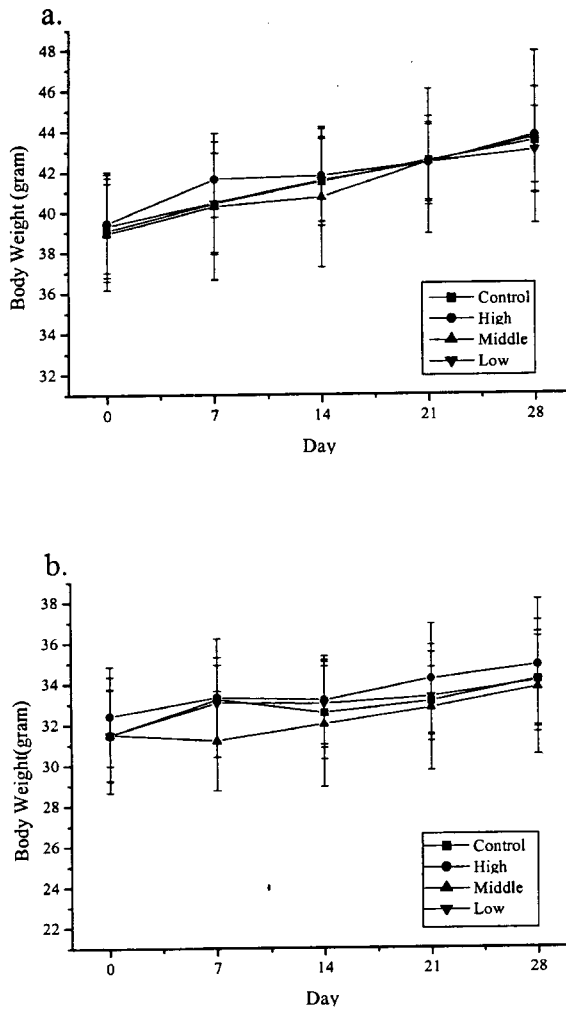


Fig. 1. Body weights of male (a.) and female (b.) ICR mice treated with H menthol herbal cigarettes for 4 weeks by inhalation. Control: filtered air control, Low: 5cigarettes/6 hr/day, Middle: 10 cigarettes/6 hr/day, High: 20 cigarettes/6 hr/day.

반복투여 흡입독성시험

암수의 대조군과 투여용량군에서 시험기간동안 사망한 개체는 없었으며, 시험물질에 의한 독성으로 인정되는 증상도 나타나지 않았고, 정상적인 체중 증가를 나타냈다(Fig. 1). 또한 시험기간중 모든 군에서 대조군과 비교하여 사료섭취량의 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다.

부검후의 혈액학적 및 혈액생화학적 검사결과 암컷 중간용량군의 칼슘(Ca)수치가 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$)있는 차이를 보였으나 나머지 항목에서는 대조군에 비해 유의할 만한 변화를 관찰하지 못하였다(Table 1, 2).

암수의 모든 투여용량군에서 부검 시 이상소견은 발견되지 않았고, 부검 후 장기에 대한 절대중량과 상대중량을 측

정한 결과, 대조군과 각 용량군 간에 유의할 만한 차이는 발견되지 않았으며(Table 3, 4), 조직병리검사에서 시험물질에 기인한다고 사료되는 특이한 병리학적 소견을 관찰할 수 없었다.

복귀돌연변이 시험

H menthol herbal cigarette에 대하여 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, 그리고 TA1537 균주를 이용하여 복귀돌연변이 시험을 수행한 결과, n-Hexane과 ethyl acetate 추출물의 모든 처치용량군에서 대사활성제 존재 유무와 관계없이 음성대조군에 비한 유의적인 변화가 발견되지 않았다(Table 5).

In vivo 염색체 이상시험

수컷 마우스의 경우 각 시험용량군의 염색체이상세포의 출현빈도는 처리군(고용량 : 2.20 ± 1.10 %, 중간용량 : 1.20 ± 1.30 %, 저용량 : 1.20 ± 1.30 %) 모두 대조군(1.80 ± 1.30 %)과 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 또한 암컷 마우스의 경우도 대조군(1.80 ± 1.48 %)에 비하여 시험군 (고용량 : 1.80 ± 1.30 %, 중간용량 : 2.00 ± 1.58 %, 저용량 : 2.40 ± 1.82 %)의 염색체이상세포의 출현빈도는 유의성 있는 변화를 보이지 않았다(Table 6).

소핵 시험

수컷 마우스의 경우 대조군에서의 다염성적혈구 2000개당 소핵다염성적혈구의 관찰빈도는 0.310 ± 0.065 %이고 시험물질투여군에서는 저용량, 중간용량, 고용량군이 각각 0.290 ± 0.082 , 0.030 ± 0.079 , 0.330 ± 0.045 %로서, 대조군에 비하여 시험물질투여군 모두에서 통계학적으로 유의성있는 변화를 볼 수 없었다. 또한 총 적혈구대비 다염성 적혈구의 관찰빈도는 대조군은 48.07 ± 0.85 %, 저용량군에서는 48.16 ± 0.93 %, 중간용량군에서는 48.22 ± 0.78 %, 고용량군에서는 48.75 ± 1.22 %로 이 역시 대조군에 비해 전 시험용량군에서 유의차가 관찰되지 않았다. 암컷마우스에서는 대조군에서의 다염성적혈구 2000개당 소핵다염성적혈구의 관찰빈도는 0.330 ± 0.076 %이고 시험물질투여군에서는 저용량, 중간용량, 고용량군이 각각 0.290 ± 0.082 , 0.300 ± 0.079 , 0.330 ± 0.045 %로서, 대조군에 비하여 시험물질투여군 모두에서 통계학적으로 유의성있는 변화를 볼 수 없었다. 또한 총 적혈구대비 다염성 적혈구의 관찰빈도는 대조군은 47.09 ± 2.18 %, 저용량군에서는 48.06 ± 0.85 %, 중간용량군에서는 48.59 ± 1.54 %, 고용량군에서는 47.23 ± 1.58 %로 이 역시 대조군에 비해 전 시험물질투여군에서 유의차가 관찰되지 않았다(Table 7).

Table 1. Hematological findings of the mice treated with H menthol herbal cigarettes for 4 weeks by inhalation

sex	Male				Female				
	Group	Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
Items	No.of animal	10	10	10	10	10	10	10	10
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		3.44 \pm 1.26	4.06 \pm 0.64	4.35 \pm 0.57	3.90 \pm 0.72	4.32 \pm 1.56	4.23 \pm 0.70	4.16 \pm 1.83	4.34 \pm 2.00
NE (%)		8.00 \pm 3.13	7.90 \pm 3.48	9.70 \pm 7.86	10.10 \pm 4.56	9.50 \pm 5.13	8.70 \pm 3.97	10.60 \pm 3.13	8.80 \pm 7.11
LY (%)		90.00 \pm 4.29	90.8 \pm 3.85	88.90 \pm 8.70	88.70 \pm 5.58	89.40 \pm 5.78	90.20 \pm 4.49	88.30 \pm 4.19	89.10 \pm 7.92
MO (%)		2.00 \pm 2.21	1.20 \pm 1.81	1.10 \pm 1.20	1.00 \pm 0.94	1.10 \pm 1.66	1.00 \pm 1.25	1.10 \pm 1.60	2.10 \pm 1.85
EO (%)		0	0.10 \pm 0.32	0.30 \pm 0.48	0.20 \pm 0.42	0	0.10 \pm 0.32	0	0
BA (%)		0	0	0	0	0	0	0	0
RBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		8.73 \pm 0.33	8.80 \pm 0.46	8.96 \pm 0.47	8.77 \pm 0.40	8.48 \pm 1.01	8.57 \pm 0.68	8.67 \pm 0.70	8.49 \pm 1.25
Hb (g/dl)		14.43 \pm 0.75	14.60 \pm 1.03	14.60 \pm 1.05	14.18 \pm 0.73	15.34 \pm 1.21	15.23 \pm 0.64	14.81 \pm 1.84	14.35 \pm 2.01
Hct (%)		47.70 \pm 3.20	48.50 \pm 3.34	47.80 \pm 3.55	48.10 \pm 2.96	45.30 \pm 7.83	47.80 \pm 3.36	48.90 \pm 6.49	46.40 \pm 7.38
MCV (fL)		54.70 \pm 3.27	55.16 \pm 3.25	53.30 \pm 2.16	54.70 \pm 1.42	53.70 \pm 9.09	56.15 \pm 6.23	56.40 \pm 7.34	55.00 \pm 6.20
MCH (pg)		16.70 \pm 0.67	16.63 \pm 1.40	16.40 \pm 0.70	16.30 \pm 0.48	18.40 \pm 2.84	17.89 \pm 1.68	17.10 \pm 2.02	16.90 \pm 1.97
MCHC (%)		30.40 \pm 1.35	30.21 \pm 2.71	30.60 \pm 1.07	29.60 \pm 1.07	35.00 \pm 7.97	32.01 \pm 2.77	30.40 \pm 2.95	31.10 \pm 2.33
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{l}$)		806.40 \pm 303.38	871.00 \pm 95.28	933.10 \pm 86.41	874.30 \pm 224.30	898.60 \pm 72.79	898.20 \pm 62.43	880.00 \pm 107.30	899.50 \pm 74.50

Each value represents mean \pm S.D.

WBC: White Blood Cell, NE: Neutrophil, LY: Lymphocyte, MO: Monocyte, EO: Eosinophil, BA: Basophil, RBC: Red Blood Cell, Hb: Hemoglobin, Hct: Hematocrit, MCV: Mean Corpuscular Volume, MCH: Mean Corpuscular hemoglobin, MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration.

Control: filtered air control.

Low: 5cigarettes/6hr/day.

Middle: 10cigarettes/6hr/day.

High: 20cigarettes/6hr/day.

Table 2. Biochemical findings of the mice treated with H menthol herbal cigarettes for 4 weeks by inhalation

sex	Male				Female				
	Group	Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
Items	No.of animal	10	10	10	10	10	10	10	10
T-Pro(g/dl)		12.71 \pm 2.90	12.14 \pm 3.02	12.95 \pm 3.62	13.69 \pm 3.77	10.30 \pm 2.13	10.89 \pm 2.01	11.68 \pm 2.04	11.07 \pm 2.10
Alb(g/dl)		2.84 \pm 1.09	2.61 \pm 1.03	2.82 \pm 0.27	2.77 \pm 0.65	3.15 \pm 0.45	3.12 \pm 0.35	3.09 \pm 0.32	3.09 \pm 0.19
Glu(mg/dl)		50.90 \pm 22.55	52.80 \pm 17.16	51.6 \pm 14.49	55.80 \pm 16.16	52.80 \pm 28.40	59.40 \pm 24.88	50.90 \pm 29.71	62.70 \pm 24.41
T-Cho(u/l)		132.70 \pm 6.20	131.90 \pm 12.55	132.80 \pm 28.29	133.20 \pm 14.19	112.20 \pm 14.60	110.30 \pm 17.08	103.60 \pm 19.49	106.70 \pm 14.77
BUN(u/l)		21.00 \pm 11.43	21.00 \pm 6.43	19.40 \pm 10.75	20.80 \pm 9.99	16.20 \pm 9.34	18.70 \pm 10.67	19.30 \pm 12.57	25.30 \pm 7.29
T-Bili(mg/dl)		0.58 \pm 0.29	0.62 \pm 0.27	0.81 \pm 0.51	0.67 \pm 0.42	0.86 \pm 0.67	0.88 \pm 0.35	0.88 \pm 0.35	0.84 \pm 0.41
GOT(mg/dl)		88.50 \pm 32.36	84.60 \pm 21.62	79.30 \pm 28.72	86.60 \pm 41.30	70.10 \pm 17.67	67.60 \pm 18.66	64.10 \pm 16.20	68.50 \pm 19.39
GPT(mg/dl)		56.70 \pm 17.19	56.00 \pm 16.03	81.60 \pm 29.38	70.90 \pm 35.13	45.60 \pm 12.53	47.40 \pm 21.48	42.30 \pm 18.54	36.10 \pm 16.77
Ca(mEq/L)		3.78 \pm 0.78	4.01 \pm 0.74	4.42 \pm 1.54	4.14 \pm 1.30	4.45 \pm 0.83	4.76 \pm 1.00	5.73 \pm 1.36*	5.59 \pm 1.14
Cre(mg/dl)		0.40 \pm 0.34	0.41 \pm 0.34	0.40 \pm 0.16	0.58 \pm 0.63	0.41 \pm 0.14	0.41 \pm 0.09	0.41 \pm 0.13	0.46 \pm 0.13
ALP(mg/dl)		64.30 \pm 17.16	67.00 \pm 13.34	71.70 \pm 12.76	73.30 \pm 22.62	65.10 \pm 16.83	70.90 \pm 16.98	80.40 \pm 18.58	79.90 \pm 23.94

Each value represents mean \pm S.D., * Significantly different from control at $p < 0.05$.

T-Pro: Total Protein, Alb: Albumin, Glu: Glucose, T-Cho: Total Cholesterol, BUN: Blood Urea Nitrogen, T-Bili: Total Bilirubin, GOT: Glutamic-Oxaloacetic Transaminase, GPT: Glutamic-Pyruvic Transaminase, Ca: Calcium, Cre: Creatinine, ALP: Alkaline Phosphatase.

Control: filtered air control.

Low: 5cigarettes/6hr/day.

Middle: 10cigarettes/6hr/day.

High: 20cigarettes/6hr/day.

고 찰

담배에서는 약 4000개 정도의 성분이 검출되며(Dube and Green, 1982), 여기에 새로운 첨가물을 추가하는 경우 각각의 성분들이 증가, 감소하거나 전혀 새로운 성분이 생겨나기

도 하므로(Kapfer *et al.*, 1989, Rustemeier *et al.*, 2002) 담배에 대한 독성학적 연구가 비교적 오랫동안 지속되었음에도 독성 발현의 기전이 여전히 불명확한 상태로 남아있다. 최근 담배의 독성 혹은 체내 작용을 연구하기 위한 여러 시도에서 placebo로 개발되어 이용되는 니코틴제거 담배가 심박수

Table 3. Absolute organ weights of the mice treated with H menthol herbal cigarettes for 4 weeks by inhalation (unit : mg)

sex	Male				Female				
	Group	Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
No. of animal	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Brain	433.33±56.61	429.28±39.55	466.33±41.57	461.85±31.76	438.75±35.43	422.97±47.12	425.55±38.65	434.98±55.73	
Hypophysis	2.12±0.64	2.46±0.79	2.39±0.93	1.79±0.38	3.82±1.03	4.15±0.83	3.18±0.84	2.75±2.24	
Thymus	59.42±18.51	59.93±14.71	56.84±12.75	66.67±15.07	69.22±21.25	69.43±12.24	67.82±12.76	70.95±26.71	
Lung	204.89±37.79	202.51±31.13	226.15±24.57	212.19±24.80	203.37±21.02	179.08±22.41	196.22±37.48	210.29±35.21	
Heart	173.86±26.00	201.04±27.09	176.39±39.34	174.96±25.81	146.98±18.18	159.10±17.21	139.73±33.25	134.36±17.49	
Liver	1890.80±216.28	1837.88±213.39	1959.09±227.60	1986.12±168.41	1458.36±157.05	1531.99±60.14	1376.27±123.38	1486.29±266.18	
Spleen	112.61±34.88	111.72±21.57	140.70±54.20	122.07±24.89	154.32±49.92	161.68±21.65	120.28±36.56	131.77±61.06	
Kidney(L)	282.88±53.17	262.37±55.66	304.10±38.57	294.51±45.40	204.48±27.81	203.38±14.89	188.12±37.58	210.93±38.18	
Kidney(R)	309.08±48.15	273.96±31.72	310.50±34.11	303.84±43.63	208.16±24.75	208.51±9.66	191.96±36.98	218.01±42.84	
Adrenal(L)	3.11±0.96	3.55±0.72	3.70±1.87	3.73±1.88	4.39±2.23	3.39±0.58	3.97±2.10	4.68±1.90	
Adrenal(R)	3.32±0.85	3.37±0.48	4.18±1.50	3.42±1.09	4.63±1.78	4.05±1.05	3.44±1.46	3.98±0.95	
Testis(L)	111.33±16.70	116.14±11.99	125.68±20.65	121.28±22.97	-	-	-	-	
Testis(R)	115.65±20.29	120.82±12.12	127.31±20.71	125.36±24.02	-	-	-	-	
Epididymis(L)	44.75±17.91	44.11±6.67	53.15±20.81	46.98±12.81	-	-	-	-	
Epididymis(R)	37.29±13.54	41.71±4.31	49.61±20.50	48.12±15.07	-	-	-	-	
Prostate	320.74±43.17	319.23±33.47	369.08±64.02	353.03±60.97	-	-	-	-	
Salivary(L)	117.91±26.31	113.38±16.08	119.16±19.35	123.03±17.10	86.63±4.80	83.33±8.56	74.89±22.41	80.99±13.08	
Salivary(R)	111.36±17.91	120.39±9.37	117.72±24.13	124.63±15.27	85.28±8.04	85.16±10.32	77.88±19.42	82.18±16.73	
Ovary(L)	-	-	-	-	12.53±3.36	13.32±1.16	12.01±2.22	10.95±2.68	
Ovary(R)	-	-	-	-	12.24±3.54	13.68±1.54	12.60±4.86	11.66±4.13	
Uterus	-	-	-	-	152.39±34.92	161.88±36.90	144.17±67.65	167.57±52.23	

Each value represents mean±S.D., Control: filtered air control, Low: 5cigarettes/6hr/day.

Middle: 10cigarettes/6hr/day, High: 20cigarettes/6hr/day.

Table 4. Relative organ weights of the mice treated with H menthol herbal cigarettes for 4 weeks by inhalation. (unit : %)

sex	Male				Female				
	Group	Control	Low	Middle	High	Control	Low	Middle	High
No. of animal	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Brain	0.998±0.118	1.000±0.090	1.077±0.130	1.060±0.098	1.291±0.139	1.239±0.133	1.277±0.203	1.254±0.161	
Hypophysis	0.005±0.002	0.006±0.002	0.006±0.002	0.004±0.001	0.011±0.004	0.012±0.002	0.009±0.002	0.008±0.007	
Thymus	0.137±0.042	0.139±0.031	0.131±0.031	0.153±0.038	0.203±0.060	0.204±0.035	0.200±0.027	0.208±0.083	
Lung	0.470±0.068	0.471±0.069	0.520±0.047	0.486±0.050	0.598±0.073	0.525±0.062	0.593±0.156	0.602±0.067	
Heart	0.400±0.055	0.468±0.059	0.407±0.097	0.401±0.057	0.432±0.061	0.468±0.059	0.423±0.135	0.388±0.060	
Liver	4.347±0.325	4.290±0.603	4.494±0.306	4.543±0.276	4.267±0.277	4.501±0.350	4.130±0.664	4.256±0.511	
Spleen	0.258±0.074	0.260±0.051	0.324±0.131	0.279±0.050	0.452±0.138	0.473±0.058	0.366±0.143	0.370±0.134	
Kidney(L)	0.652±0.122	0.612±0.133	0.702±0.106	0.671±0.077	0.599±0.073	0.597±0.058	0.566±0.151	0.603±0.064	
Kidney(R)	0.711±0.097	0.639±0.087	0.717±0.096	0.693±0.075	0.611±0.070	0.613±0.054	0.578±0.150	0.622±0.074	
Adrenal(L)	0.007±0.002	0.008±0.002	0.009±0.005	0.009±0.004	0.013±0.006	0.010±0.002	0.012±0.006	0.014±0.006	
Adrenal(R)	0.008±0.002	0.008±0.001	0.010±0.004	0.008±0.003	0.014±0.005	0.012±0.003	0.010±0.005	0.012±0.003	
Testis(L)	0.256±0.034	0.271±0.029	0.290±0.054	0.277±0.048	-	-	-	-	
Testis(R)	0.266±0.042	0.281±0.027	0.294±0.053	0.286±0.048	-	-	-	-	
Epididymis(L)	0.103±0.041	0.103±0.017	0.125±0.053	0.107±0.029	-	-	-	-	
Epididymis(R)	0.086±0.031	0.097±0.012	0.115±0.049	0.110±0.034	-	-	-	-	
Prostate	0.739±0.088	0.746±0.100	0.850±0.152	0.810±0.146	-	-	-	-	
Salivary(L)	0.271±0.065	0.263±0.028	0.276±0.051	0.282±0.038	0.255±0.021	0.245±0.029	0.227±0.074	0.232±0.031	
Salivary(R)	0.257±0.042	0.280±0.023	0.272±0.060	0.285±0.029	0.250±0.025	0.250±0.034	0.234±0.064	0.236±0.044	
Ovary(L)	-	-	-	-	0.037±0.010	0.039±0.004	0.036±0.009	0.032±0.008	
Ovary(R)	-	-	-	-	0.036±0.009	0.040±0.005	0.039±0.019	0.034±0.013	
Uterus	-	-	-	-	0.451±0.114	0.473±0.100	0.442±0.230	0.489±0.173	

Each value represents mean±S.D., Control: filtered air control, Low: 5cigarettes/6hr/day.

Middle: 10cigarettes/6hr/day, High: 20cigarettes/6hr/day.

Table 5. Reverse mutation test of extracts of H menthol herbal cigarettes in *S. typhimurium*

Group	S9 mix	No. of revertant per plate (Mean±S.D.)									
		n-Hexane extract					Ethyl acetate extract				
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA102	TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA102
Negative control	-	21.67 ±3.51	199.00 ±10.58	19.33 ±3.51	16.00 ±6.24	204.33 ±23.44	22.00 ±6.56	183.00 ±13.11	19.00 ±4.58	18.00 ±2.65	173.67 ±29.01
High(33 µg/pl.)	-	19.33 ±4.16	195.00 ±10.44	19.67 ±1.53	19.67 ±6.66	217.33 ±15.50	22.33 ±3.51	184.33 ±12.86	21.33 ±3.51	20.67 ±4.93	179.33 ±20.11
Middle(16.5 µg/pl.)	-	19.67 ±5.51	196.67 ±15.57	18.33 ±3.06	15.67 ±4.04	212.00 ±20.22	18.67 ±4.16	196.67 ±15.57	17.00 ±2.65	17.33 ±5.03	181.33 ±18.34
Low(8.25 µg/pl.)	-	21.67 ±3.06	201.00 ±12.12	17.00 ±3.61	18.67 ±6.51	194.33 ±10.97	21.67 ±3.06	175.00 ±11.00	22.00 ±7.55	20.00 ±1.73	182.00 ±17.52
2-AF(10.0 µg/pl.)	-	74.67 ±7.02*	NT ^{a)}	NT	NT	1149.67 ±112.04*	88.33 ±12.66*	NT ^{a)}	NT	NT	1191.00 ±212.80*
SAZ(1.5 µg/pl.)	-	NT	1208.67 ±195.93*	293.67 ±17.62*	NT	NT	NT	1345.33 ±284.09*	258.33 ±57.50*	NT	NT
ICR191(1.0 µg/pl.)	-	NT	NT	NT	213.67 ±24.38*	NT	NT	NT	NT	214.00 ±37.00*	NT
Negative control	+	24.67 ±3.51	197.33 ±20.31	18.00 ±4.58	18.67 ±4.73	220.33 ±21.13	28.33 ±6.66	205.33 ±22.68	20.67 ±7.37	20.33 ±4.16	213.33 ±19.55
High(33 µg/pl.)	+	25.00 ±3.61	203.67 ±21.39	19.67 ±4.16	18.33 ±6.43	234.00 ±20.52	24.67 ±2.52	210.33 ±18.90	21.00 ±3.00	23.33 ±6.66	221.00 ±38.16
Middle(16.5 µg/pl.)	+	26.67 ±3.79	195.00 ±21.66	22.00 ±5.29	17.67 ±2.31	204.67 ±24.34	30.67 ±4.16	191.67 ±18.90	19.33 ±2.52	22.67 ±3.06	198.33 ±21.59
Low(8.25 µg/pl.)	+	23.00 ±3.61	214.00 ±40.04	21.33 ±5.69	19.33 ±1.15	194.33 ±10.97	25.33 ±4.04	206.67 ±14.74	22.67 ±3.51	24.00 ±5.29	210.33 ±17.21
2-AF(10.0 µg/pl.)	+	612.33 ±63.22*	NT	NT	NT	1389.33 ±141.74*	661.67 ±65.38*	NT	NT	NT	1504.00 ±244.28*
SAZ(1.5 µg/pl.)	+	NT	1076.33 ±120.03*	226.67 ±30.02*	NT	NT	NT	1138.33 ±155.57*	222.33 ±23.46*	NT	NT
ICR191(1.0 µg/pl.)	+	NT	NT	NT	265.67 ±30.02*	NT	NT	NT	NT	259.00 ±24.88*	NT

^{a)}NT: not tested. * Significantly different from negative control (p<0.05).
Each value represents mean±S.D.

Table 6. Effect on Chromosome aberration induced in ICR mice lymphocytes treated with H menthol herbal cigarettes

Sex	Group	Total no. of examined metaphases	No. of metaphases with different types of chromosomal aberrations						Frequency of cells with chromosome aberration (%)
			Chromatid gap	Chromatid Break	Chromatid Exchange	Chromosome Gap	Chromosome Break	Chromosome Exchange	
Male	Control	500	4	8	0	1	0	1	1.80±1.30
	High	500	5	9	1	3	1	0	2.20±1.10
	Middle	500	7	5	0	1	1	0	1.20±1.30
	Low	500	8	4	1	0	0	1	1.20±1.30
Female	Control	500	5	8	0	1	1	0	1.80±1.48
	High	500	8	8	1	1	0	0	1.80±1.30
	Middle	500	7	10	0	1	0	0	2.00±1.58
	Low	500	6	9	1	0	1	0	2.40±1.82

Each value represents mean±S.D.

Control: filtered air control.

Low: 5cigarettes/6hr/day.

Middle: 10cigarettes/6hr/day.

High: 20cigarettes/6hr/day.

와 혈압, 뇌파의 변화를 유발하지 않으면서 흡연 욕구를 감소시키는 효과가 있다고 알려졌으나 이러한 니코틴제거 담배가 나타내는 placebo 효과의 자세한 기전에 대해서는 밝혀

지지 않았다(Robinson *et al.*, 2000). 본 실험에 사용된 H menthol herbal cigarette는 피우는 금연보조제이며, tobacco를 포함하고 있지 않기 때문에 근본적으로 니코틴제거 담배

Table 7. *In vivo* micronucleus test in ICR mice treated with H menthol herbal cigarettes

Sex	Group	Route	No. of animal	No. of MNPCE ¹⁾ (%, Mean±SD/2000 PCE)	PCE ²⁾ (%, Mean±SD/500 Erythrocyte)
Male	Negative control	inhalation	5	0.310±0.065	48.07±0.85
	High	inhalation	5	0.330±0.045	48.75±1.22
	Middle	inhalation	5	0.300±0.079	48.22±0.78
	Low	inhalation	5	0.290±0.082	48.16±0.93
	Mitomycin C (0.25 mg/kg)	intraperitoneal	5	1.770±0.228**	44.74±2.00**
Female	Negative control	inhalation	5	0.330±0.076	47.09±2.18
	High	inhalation	5	0.360±0.082	47.23±1.58
	Middle	inhalation	5	0.280±0.057	48.59±1.54
	Low	inhalation	5	0.300±0.094	48.06±0.85
	Mitomycin C(0.25 mg/kg)	intraperitoneal	5	1.780±0.208**	47.46±1.83*

*, Significantly different from negative control at 5% level.

**, Significantly different from negative control at 1% level.

Each value represents mean±S.D.

¹⁾MNPCE: Micronucleated Polychromatic Erythrocyte.

²⁾PCE: Polychromatic Erythrocyte.

Control: filtered air control.

Low: 5cigarettes/6hr/day.

Middle: 10cigarettes/6hr/day.

High: 20cigarettes/6hr/day.

와 다르지만 흡연에 대한 placebo 효과를 얻으려는 의도로 개발되었다는 점은 동일하다. 게다가 담배에 비해 비교적 최근에 개발되었고, 그 성분 또한 명확하게 밝혀지지 않아 피우는 금연보조제에 대한 안전성연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 H menthol herbal cigarette의 독성 유무를 규명하기 위하여 식품의약품안전청 고시(1999. 12. 12.)의 의약품 등의 독성시험기준 제 1999-61호 및 Kim 등의 방법(Kim *et al.*, 2001)에 준하여 ICR 마우스에 단회 및 반복흡입투여하여 그 흡입독성을 평가하였고, 유전독성을 평가하기 위해 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험, *in vivo* 염색체이상시험 및 소핵시험을 실시하였다.

ICR계 암수 마우스에 H menthol herbal cigarette의 1일 최대 사용 추정치의 두 배인 40개피를 단회 흡입투여한 후 2주동안 관찰한 결과 투여기간동안의 사망동물은 없었고, 일반적인 임상증상 및 부검소견에 있어 시험물질투여로 인한 이상변화는 관찰되지 않았다. 따라서 H menthol herbal cigarette의 흡입투여에 의한 LD50는 40개피 이상일 것으로 사료된다.

또한 H menthol herbal cigarette 20개피를 노출시킨 고용량군과 10개피를 노출시킨 중간용량군, 또한 5개피를 노출시킨 저용량군에 대하여 ICR 마우스에 하루에 6시간, 주 5일, 4주간 연속적으로 흡입투여하여 얻은 결과 시험기간중 사망동물은 없었으며, 전 투여군에서 별다른 임상증상이 관찰되지 않았다. 체중변화 및 사료 섭취량 역시 대조군과 비교하여 암·수 전 투여군에서 유의차가 관찰되지 않았고, 부

검시의 혈액학적 검사소견에서도 전 투여군에서 대조군과 비교하여 유의할 만한 차이가 관찰되지 않았으나, 혈액생화학적 검사에 대한 측정결과에서 암컷 중간용량군의 칼슘(Ca) 수치가 유의성있는 변화를 보였다. 그러나 이는 용량의존적 반응이 아니므로 시험물질에 의한 영향이라고 사료되지는 않는다. 부검시의 절대장기중량 및 체중에 대한 상대장기 중량을 측정한 결과 암·수 전 투여군에서 유의차가 관찰되지 않았으며 병리조직학적 검사결과 대조군과 비교하여 시험물질로 인한 개체의 전 장기에서 아무런 이상을 발견하지 못하였다. 따라서 본 실험에서 사용된 H menthol herbal cigarette의 무독성 용량은 ICR 마우스에서 최고 20 개피 이상일 것으로 추정된다.

20개피, 10개피 및 5개피를 6시간동안 포집하고 추출하여 제조된 시료를 이용한 복귀돌연변이 시험에서는 S9 mix 비첨가(직접법) 및 S9 mix 첨가(대사활성법)시에 모든 군주에서 복귀돌연변이 집락 수에 유의적인 변화가 나타나지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험조건하에서 시험물질인 H menthol herbal cigarette는 아무런 돌연변이 유발능을 가지지 않는다는 것을 알 수 있었다. 반복투여와 같은 조건으로 노출시킨 동물의 비장을 이용한 염색체이상 시험에서 염색체이상세포 출현빈도 또한 시험물질투여군과 대조군 간 유의한 변화가 관찰되지 않았고, 같은 용량을 노출시킨 마우스의 골수 세포를 이용한 소핵시험에서도 역시 골수세포중식 억제지표로 총 적혈구대비 다염성 적혈구의 관찰빈도를 조사한 결과 시험물질 투여군에서는 저용량, 중간용량, 고용량군

모두 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합하면, H menthol herbal cigarette에 대한 전임상시험으로서 단회 및 반복투여 흡입독성 시험, 복귀돌연변이 시험, 염색체이상 시험, 그리고 소핵시험의 유전독성시험을 수행한 결과, H menthol herbal cigarette는 한국인의 하루 평균 흡연량에 의거하여 결정된 본 실험 용량 조건 하에서는 독성을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ames B.N., Mccann J., Yamasaki E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347-364.
- Benowitz N.L., Fitzgerald G.A., Wilson M., Zhang Q. (1993): Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking. *J Am Coll Cardiol.* **22**(4), 1159-67.
- Dale L.C., Hurt R.D., Offord K.P., Lawson G.M., Croghan I.T., Schroeder D.R. (1995): High-dose nicotine patch therapy. Percentage of replacement and smoking cessation. *JAMA* **274**(17), 1353-8.
- Dempsey D.A., Benowitz N.L. (2001): Risks and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* **24**(4), 277-322.
- Dube M.F., Green C.R. (1982): Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Advances in Tobacco Science* **8**, 42-102.
- Hackshaw A.K. (1998): Lung cancer and passive smoking. *Stat Methods Med Res.* **7**(2), 119-36.
- Halimi J.M., Philippon C., Mimran A. (1998): Contrasting renal effects of nicotine in smokers and non-smokers. *Nephrol Dial Transplant* **13**(4), 940-4.
- Haustein K.O. (1999): Cigarette smoking, nicotine and pregnancy. *Int J Clin Pharmacol Ther* **37**(9), 417-27.
- Ismail A., Frishman W.H., Klapholz M. (1996): Smoking, Nicotine, Nicotine Replacement, and Cardiovascular Disease. *Am J Ther* **3**(5), 348-357.
- Jang B.S., Lim J.H., H.I., Park J.I., Ha C.S., Kim J.C., Kim H.Y., Chung Y.H., Jeong J.H., and Y.M. (2000): Subchronic Inhalation Toxicity of Iso-Butylalcohol in Rats. *J. Toxicol. Pub. Health* **16**(4), 303-309.
- Kapfer G.F., Nitz S., Drawert F. (1989): Bound aroma compounds in tobacco smoke condensates. *Zeitschrift fur Lebensmittel -untersuchung und -forschung* **188**, 512-516.
- Kim M.Y., Son J.W., Cho M.H. (2001): Genotoxicity in B6C3F1 Mice Following 0.5 ppm Ozone Inhalation. *J. Toxicol. Pub. Health* **17**(1), 1-6.
- Krishna G., Hayashi M. (2000): In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* **455**, 155-166.
- Maha A.F., Fawzia A.E. (2000): In vivo and In vitro studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice. *J. Appl. Toxicol.* **20**, 231-238.
- Mortelmans K., Zeiger E. (2000): The Ames *Salmonella* microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **455**, 29-60.
- Pryor W.A., Stone K., Zang L.Y., Bermudez E. (1998): Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem Res Toxicol* **11**(5), 441-8.
- Robinson M.L., Houtsmuller E.J., Moolchan E.T., Pickworth W.B. (2000): Placebo cigarettes in smoking research. *Exp Clin Psychopharmacol* **8**(3), 326-32.
- Rubin H. (2001): Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* **22**(12), 1903-30.
- Rustemeier K., Stabbert R., Haussmann H.-J., Roemer E., Carmine E.L. (2002): Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of main stream smoke. *Food Chemical Toxicology* **40**, 93-104.
- Schmid W. (1975): The micronucleus test. *Mutat. Res.* **31**, 9-15.
- Wong W.Y., Thomas C.M., Merkus H.M., Zielhuis G.A., Doeburg W.H., Steegers-Theunissen R.P. (2000): Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril* **74**(5), 930-5.
- 김종호, 이은영, 김달현, 김현석 (2001): CJ-50005 (A형 간염백신)에 대한 유전독성시험. *J. Toxicol. Pub. Health*, **17**(3), 235-239.
- 보건복지부, 한국보건사회연구원(1999): 1998년도 국민건강·영양조사 - 보건위식행태조사(20세이상 성인)부문.
- 식품의약품안전청 (1999): 의약품 등의 안전성·유효성심사에 관한 규정.