

## 담배연기응축물의 소핵생성 측정시 두가지 방법간의 민감성 비교

신한재\* · 손형옥 · 이영구 · 한정호 · 허재연 · 이동욱 · 현학철

KT&G 중앙연구원  
(2004년 11월 1일 접수)

### Comparison of the Sensitivity of Two Micronucleus Assays for Detection of Micronucleus Induction by Cigarette-Smoke Condensate

Han-Jae Shin\*, Hyung-Ok Sohn, Young-Gu Lee, Jung-Ho Han  
Jae-Yeon Hur, Dong-Wook Lee and Hak-Chul Hyun

KT&G Central Research Institute, Daejeon, Korea

(Received November 1, 2004)

**ABSTRACT** : Among short-term *in vitro* genotoxicity assays, micronucleus assays are rapid, inexpensive, and less labor-intensive system. We have undertaken a comparative study of sensitivity of cigarette smoke condensate(CSC) by general micronucleus(MN) assay and cytokinesis-block micronucleus(CBMN) assay. In this study, V79 Chinese hamster cells were employed to evaluate and compare the genotoxicity of CSC of Kentucky Reference Cigarette 2R4F by 2 kinds of *in vitro* MN assay methods. To determine the optimum concentration of cytochalasin B(CYB) to obtain the maximal number of binucleated cells for CBMN assay, triplicate cultures of growing cells were treated with CYB for 15 h. CYB treatments caused a concentration-dependent increase in cytotoxicity(1~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and proportion(0.25~1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of binucleated cells. These data suggested that 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of CYB is as an optimum dose for CBMN assay in binucleated V79 cells. Short treatment(4 h) of CSC induced a micronucleated cells with a concentration-dependent response in the presence or absence of CYB, but CSC-induced MNs were weakened when S9 was present. Long treatments(19 h) of CSC also induced a significant increase MN formation with a concentration-dependent response. At a concentration of 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the MN cell frequencies of general MN assay and CBMN assay were 6.5% and 11.7%, respectively. Linear regression analysis revealed a good correlation in CBMN assay between a concentration of CSC and MN cell frequency. All these data indicated that CBMN assay is more sensitive to the induction CSC-induced MN than general MN assay.

**Key word** : cigarette smoke condensate, V79 cells, genotoxicity assay, micronucleus

최근에 담배의 품질에 있어서 생물학적 안전성  
에 관한 사항이 중요시되고 있다. 담배의 안전성  
평가에 사용되는 시료는 주로 담배연기응축물

(cigarette smoke condensate)이며, 안전성 평가 방  
법으로는 세균을 이용한 돌연변이성 평가와 포유  
류 세포를 이용하는 세포독성 및 유전독성 평가

\*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302번지, KT&G중앙연구원

\*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon  
305-805, Korea

등이 이용된다(DeMarini, 1983; Doolittle *et al.*, 1990; Veltel and Hoheneder, 1996; Bombick *et al.*, 1997).

유전독성을 염색체 수준에서 평가하기 위해 널리 사용되는 *in vitro* 방법으로는 염색체이상시험(chromosome aberration test)과 소핵시험(micronucleus test) 등이 있다. 소핵시험은 화학물질에 의해 비정상적으로 생성된 소핵을 계수하여 유전독성을 평가하는 방법으로서, 염색체이상시험보다 간단하면서도 경제적인 시험법으로 알려져 있으며(Kirsch-Volders *et al.*, 1997), 세포질분열을 억제하는 cytochalasin B의 처리 유·무에 따라 세포질분열억제 소핵시험과 일반 소핵시험으로 구분되어진다(French, 1993). 세포질분열억제 소핵시험(CBMN assay)은 일반 소핵시험(MN assay)에 비해 민감성이 높고, 시험물질에 의한 유전독성을 보다 정확하게 측정할 수 있지만, cytochalasin B 자체가 세포독성이 있으므로 적절한 시험조건을 확립해야 한다는 단점이 있다(Fenech, 2000). 본 연구에서는 표준담배(Kentury Reference Cigarette, 2R4F)의 담배연기응축물에 대하여 일반 소핵시험과 세포질분열억제 소핵시험을 수행하여, 두 시험간 소핵생성 측정의 민감성을 비교 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin solution, phosphate-buffered saline (PBS) 등은 GIBCO(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO), mitomycin C(MMC), colchicine, cyclophosphamide, Giemsa, neutral red 등은 Sigma(St, Louis, USA) 제품을 사용하였다. 대사활성계(S-9 mix)와 cytochalasin B는 Moltax (Boone, NC, USA) 제품을 사용하였고, 대사활성계에 사용된 cofactor는 Wako Pure Chem.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 그 외의 유기용매들은 특급시약을 사용하였다.

### 담배연기응축물의 제조

담배연기응축물(CSC)은 표준담배 20개피를 RM20/

CS 흡연장치(Heinr Borgwaldt, Germany)를 이용하여 CORESTA 표준흡연조건(puff volume: 35 mL, puff frequency: 60 sec, puff duration: 2 sec)하에서 연소시키고, 92 mm cambridge filter pad를 이용하여 포집하였다. DMSO를 사용해서 filter pad로부터 CSC를 추출하여 농도가 10 mg/mL이 되도록 한 후 -70°C에 보관하면서 시험에 사용하였다.

### 세포주 및 세포배양

실험에 사용한 V79 Chinese hamster lung fibroblast(V79) 세포주는 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였으며, 세포주기는 14 ± 2시간이다. V79 세포는 10% FBS, 100 U penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL와 2 mM L-glutamine이 포함된 DMEM 배양액을 사용하였다. 배양된 세포는 2~3일마다 0.25% trypsin-0.03% EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다. 세포주의 자연발생적 돌연변이생성을 최소화하고자 구입 후부터 10번 미만으로 계대 배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 배양은 CO<sub>2</sub> 배양기(VISION, Korea)를 이용하여 포화습도하에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태로 배양하였다.

### 시험물질의 처리 및 배양조건

모든 실험에서 사용되는 대조군은 최고농도의 CSC에 첨가된 DMSO(1.0 또는 0.75%) 처리군으로 하였다. CSC의 처리시간은 단기처리인 경우 대사활성계(S-9 mix) 유·무와 관계없이 4시간 처리 후 새로운 배양액으로 교환하여 15 시간 더 배양하였다. 장기처리인 경우 대사활성계 없이 CSC만을 첨가해서 19 시간 배양 후 세포독성 및 소핵 생성을 측정하였다. 세포질분열억제 소핵시험에서는 세포 배양이 끝나기 15 시간 전에 cytochalasin B를 첨가하였다.

### 세포독성 시험

Cytochalasin B 및 시험물질의 세포독성은 리소솜에 의한 neutral red 흡수 정도를 측정하는 neutral red cytotoxicity assay 방법을 사용하였다(Borenfreund and Puerner, 1985). V79 세포(1×10<sup>4</sup> cells)를 96 well plate(n=3)에 이식해서 24 시간동

안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 시험물질의 처리 후 세포 배양이 끝나면 배양액을 제거한 후 200  $\mu$ l의 neutral red 용액(40  $\mu$ g/mL)을 처리하여 37°C에서 배양하였다. 3시간 경과 후 neutral red 용액을 제거하고, 200  $\mu$ l의 고정액(0.5% formaldehyde-1% CaCl<sub>2</sub>)으로 세포를 세척하였다. 유기용매 용액(50% ethanol-1% acetic acid) 100  $\mu$ l을 첨가해서 실온에서 15 분간 neutral red를 추출한 후 microplate reader (BIO-TEK, USA)를 사용해서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다.

#### 소핵시험

V79 세포( $1.4 \times 10^4$  cells)를 slide chamber 8 well plate(n=3)에 이식하여 24 시간동안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 시험물질을 처리하여 19 시간동안 배양한 후 세포를 PBS로 세척하고, 0.75 M KCl 용액을 넣어 4°C에서 5 분간 보관하였다. 상등액을 제거 한 후 고정액(methanol:acetic acid = 3:1)으로 세포들을 고정시킨 다음 공기건조법으로 슬라이드를 제작하여 5% Giemsa 용액으로 30 분간 염색하였다. 양성 대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 대사활성계 미적용시(직접법)에서는 MMC(0.5  $\mu$ g/mL)을, 대사활성계 적용시에는 cyclophosphamide(5  $\mu$ g/mL)을 사용하였다. 일반 소핵시험에서는 시험 농도당 1,000개의 세포를 광학현미경(Nikon microphot FXA, Japan)을 이용하여  $\times 1,000$  배율에서 소핵세포를 판독하였고, 세포 질분열억제 소핵시험에서는 2개 이상의 핵을 가진 세포(500개)에서 소핵세포를 계수하였다. 정상핵의 1/3 크기의 핵을 소핵으로 판정하였으며, 하나 이상의 소핵을 가지고 있는 세포를 소핵세포로 계수하였다.

#### 통계학적인 방법

모든 측정값은 평균값  $\pm$  표준편차로 표시하였으며, SPSS(version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA test를 실시하였고, 사후검정

으로는 Dunnet's multiple-range test를 통해서  $p < 0.05$ 의 수준에서 처리군과의 유의성을 검정하였다. 시료의 농도별 소핵세포 생성율에 관한 용량 상관성은 선형회귀분석을 통하여 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### Cytochalasin B 처리 적정용량 결정

소핵시험에서 V79 세포의 배양시간은, Krishna 등(1989)이 Cytochalasin B에 의해서 2핵 세포수가 최대가 되는 세포주기( $14 \pm 2$ 시간) 및 세포주기 kinetic 분석을 통하여 적당하다고 보고한 15 시간으로 하였다. 세포질분열억제 소핵시험에 사용되는 cytochalasin B의 적정농도를 결정하기 위해 V79 세포에 대한 cytochalasin B의 농도별 세포독성 및 2핵을 가진 세포의 수를 조사하였다. 4  $\mu$ g/mL의 cytochalasin B를 최고 농도로 하여 단계적으로 희석하여 세포독성을 측정된 결과, 1~4  $\mu$ g/mL 농도에서 농도 의존적으로 세포독성이 증가되었다(Fig. 1).

1  $\mu$ g/mL의 cytochalasin B 처리시 세포생존율이 약 95% 이었으나, 4  $\mu$ g/mL 처리시 세포생존율은 약 70%로 감소되었다. Neutral red cytotoxicity 측정에 의한 결과를 근거로, cytochalasin B 농도별 (0~3  $\mu$ g/mL) 2핵 세포 최적 수를 조사한 결과, 0.75  $\mu$ g/mL 이상에서 2핵 세포수가 증가하기 시작

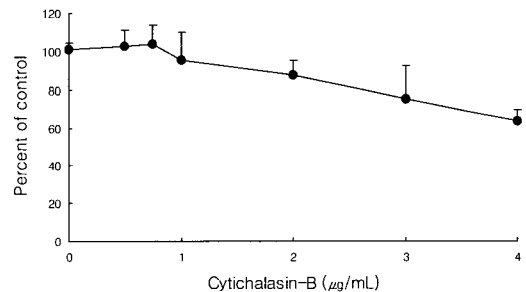


Fig. 1. Cytotoxicity of Cytochalasin B in V79 cells. Cells were treated with various concentration of Cytochalasin B for 15 h. Cytotoxicity was determined by neutral red up take assay and calculated as a percentage of the control. Data were expressed as mean  $\pm$  S.D.

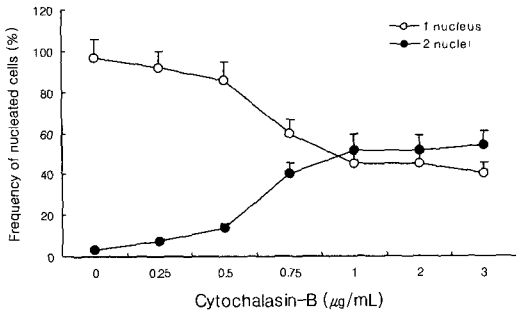


Fig. 2. Cell cycle kinetic analysis of V79 in various concentration of Cytochalasin B. Cells were treated various concentration of Cytochalasin B for 15 h. Cells were washed with PBS and fixed with a solution(methanol : acetic acid, 3 : 1). Cells were dried in the air and then 5% Giemsa solution was applied to stain micronucleus(MN).

하였으며, 세포독성이 약한 농도인 1 µg/mL 처리했을때 2핵 세포의 비율이 약 55 %로 나타났으며, 1 µg/mL 이상의 농도에서 2핵세포의 비율은 증가되지 않았다(Fig. 2). 정해진 농도(4.5 µg/mL)의 cytochalasin B를 사용하는 human lymphocyte 소핵시험과는 달리, 세포주를 이용한 소핵시험에서 세포의 분열 양상은 세포수 및 배양조건에 따라 상당한 차이를 보이고 있다(Kirsch-Volders *et al.*, 2000). 또한 V79 세포를 이용한 세포질분열억제 소핵시험에서 사용되는 2핵 세포의 비율은 50~80%로 다양하게 나타내고 있다(Ellard *et al.*, 1991). 본 연구의 세포질분열억제 소핵시험에 사용되는 cytochalasin B의 농도는 2핵세포 생성비율이 높으면서도(55%), 세포독성이 약한 1 µg/mL으로 정하였다.

**일반 소핵시험과 세포질분열억제 소핵시험에 대한 CSC의 소핵생성 비교**

*In vitro* 소핵시험에서 화학물질의 처리방법은 단기처리(2~6 h) 또는 장기처리(20~24 h)가 있으며, 단기처리시에는 대사활성제를 함께 처리하는 대사활성법과 직접법(대사활성제 미적용) 등이 있다. 본 연구에서는 neutral red 세포독성 측정방법에 의한 독성 결과를 근거로(data not shown)하여,

일반 소핵시험과 세포질억제 소핵시험에서 CSC에 대한 소핵생성을 비교하기 위하여 단기와 장기처리 두 방법을 다 적용하여 수행하였다. Fig. 3 에서와 같이 일반 소핵시험에서는 대부분 하나의 핵을 가진 세포에서 소핵이 관찰되어(A), 1,000개 세포로부터 소핵 세포를 계수하였으며, 세포질분열억제 소핵시험에서는 2핵이상의 세포(B) 500개로부터 소핵세포를 계수하였다.

예비독성시험에서 결정된 약 50% 이하 세포독성을 가지는 4 단계의 농도(0, 25, 50, 75 µg/mL)로 CSC를 단기처리(4 h) 한 후, 일반 소핵시험과 세포질분열억제 소핵시험의 소핵세포 생성율을 비교한 결과, 두 시험법 모두에서 CSC 처리농도가 증가함에 따라 소핵세포가 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 일반 소핵시험과 세포질분열억제 소핵시험에서의 자발적 소핵세포 생성율은 각각 2.1 ± 0.3%와 3.6 ± 2.0% 이었으며, CSC 75 µg/mL 처리시 소핵세포 생성을 각각 4.1 ± 0.8%와 9.6 ± 1.5%

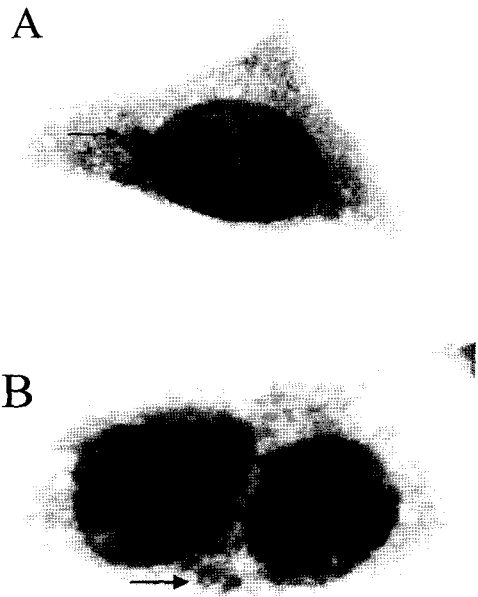


Fig. 3. Photomicrographs of typical (A) mono-nucleated cell and (B) binucleated cell with micronucleus indicated by an arrow.

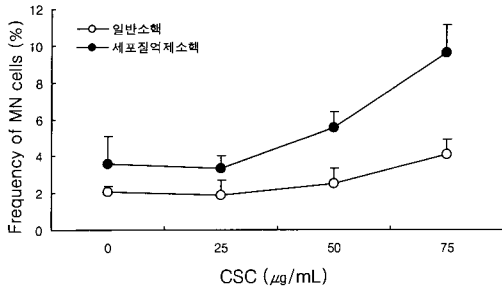


Fig. 4. Effect of short treatment of CSC on the induction of micronucleus in the absence of S9. Cells were treated with various dose of CSC for 4 h and then, cells were washed with media and replaced with fresh media in the presence or absence of cytochalasin B(1 μg/mL). The cells were cultured for a further 15 h prior to fixation and staining. Data were reported as mean±S.D. DMSO(0.75%) was used for solvent control.

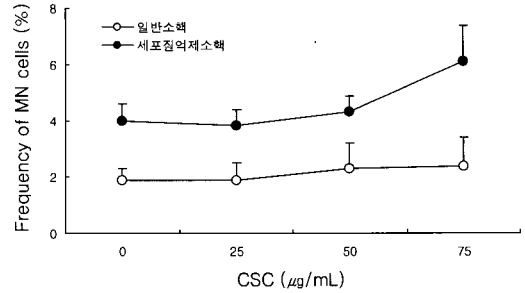


Fig. 5. Effect of short treatment of CSC on the induction of micronucleus in the presence of S9. Cells were treated with various dose of CSC with S9 for 4 h and then cells were washed with media and replaced with fresh media in the presence or absence of cytochalasin B(1 μg/mL). The cells were cultured for a further 15 h prior to fixation and staining. Data were reported as mean±S.D.

로, 세포질분열억제 소핵시험시 소핵생성율이 높게 나타났다. 두 방법간에 소핵생성율의 차이는 소핵 세포를 관찰하는 시점이 세포분열 전·후의 차이로서, 일반 소핵시험의 경우는 세포분열(2배의 세포수) 후에 소핵을 측정하기 때문에 핵분열시 생성된 소핵은 일반적으로 소핵을 가지지 않은 세포와 소핵을 가진 세포로 양분된다. 그러므로 일반 소핵시험에서의 소핵 세포 생성율은 세포분열 말기세포에서(세포질분열억제 소핵시험)의 소핵생성율을 보다 낮게 나타나는 것으로 사료된다. 또한 세포의 핵분열시 나타나는 소핵은 세포질분열 등을 거치면서 세포의 복귀 시스템에 의해 제거될 가능성이 있음으로 일반 소핵시험보다 세포질분열억제 소핵시험에서 소핵생성율이 더 높을 가능성도 배제할 수 없다(French, 1993). 대사활성계 적용시 소핵세포 생성을 비교한 결과, 세포질분열억제 소핵시험에서 CSC 75 μg/mL 처리 했을때 소핵세포가 다소 증가하였으나, 대사활성계 미적용시보다는 소핵세포 생성율이 낮았다(Fig. 5).

이와같은 결과는 CSC의 유전독성을 자매염색분체시험법에 의해 측정된 결과, 대사활성계를 적용했을때가 미적용시보다 유전독성(자매염색분체 빈

도수)이 낮아진다는 보고(Bombick *et al.*, 1997)와 일치하는 결과이다. 그러나 박테리아 균주를 이용하여 돌연변이성을 측정하는 Ames assay에 의하면, CSC의 돌연변이성은 대사활성계를 적용함으로써 증가된다고 보고되고 있다(Doolittle *et al.*, 1990; Roemer *et al.*, 2002). CSC를 농도별(0~75 μg/mL)로 장기처리(19 h) 후 일반 소핵시험과 세포질분열억제 소핵시험에 의한 소핵세포 생성율은 두 시험법 모두에서 농도의존적으로 증가 되었다. CSC 75 μg/mL 처리시 일반 소핵시험과 세포질분열억제 소핵시험에서의 소핵세포 생성율은 각각 6.5±0.6%와 11.7±1.1%로 세포질분열억제 소핵시험이 더 높았으며, 단기처리에 비해 소핵세포 생성율이 증가되었다(Fig. 6).

소핵시험법 처리방법에 따른 소핵생성율을 비교하고자 선형회귀분석을 실시하였다. Table 1의 회귀식에서 나타난 바와 같이, 단기처리와 장기처리 모두 세포질억제 소핵시험이 일반 소핵시험보다 소핵생성 빈도수가 높았다. CSC 처리방법에 따른 용량 상관관계를 조사한 결과, 상관계수 값(R)도 일반 소핵시험보다 세포질분열억제 소핵시험에서 1에 가까웠으며, 장기처리시 0.895로 상관계수가

담배연기응축물의 소핵생성 측정시 두가지 방법간의 민감성 비교

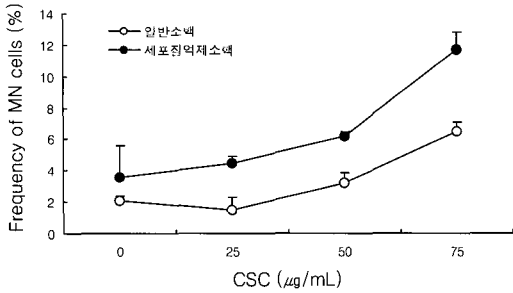


Fig. 6. Effect of long treatment of CSC on the induction of micronucleus. Cells were treated with various dose of CSC without S9 for 19 h. In cytokinesis-block method, cells was added with cytochalasin B(1 µg/mL) and then cells were cultured for a further 15 h prior to fixation and staining. Data were reported as mean±S.D.

가장 높게 나타났다.

담배연기응축물에서의 유전독성 측정은 유전독성의 유·무 판별보다는, 유전독성의 정도를 비교 평가하는 것이 중요하기 때문에 소핵생성 빈도 및 민감성(susceptibility)이 높은 세포질분열억제 소핵시험법을 이용하는 것이 효율적이라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 V79 Chinese hamster lung 세포주를 이용하여 표준담배(2R4F)의 연기 응축물(CSC)에

대한 일반 소핵시험과 세포질분열억제 소핵시험간에 민감성을 비교 평가하였다. 세포질분열억제 소핵시험을 위해 사용되는 적절한 cytochalasin B 농도를 결정하기 위해 V79 세포에 대한 cytochalasin B의 농도(0~4 µg/mL)에 따른 세포독성과 2핵 세포의 수를 조사하였다. 1 µg/mL cytochalasin B 처리 시 세포생존율과 2핵을 가진 세포의 비율이 각각 약 95% 와 55 %로 나타났으며, 이와같은 결과로부터 세포질분열억제 소핵시험을 위해 사용되는 cytochalasin B의 농도는 1 µg/mL로 결정하였다. CSC의 농도별(0~75 µg/mL)로 단기처리(4 h) 후 일반 소핵시험과 세포질분열억제 소핵시험에서 소핵세포 생성율을 비교한 결과, 두 시험법모두에서 농도 의존적으로 소핵세포가 증가 되었다. 대사활성계 적용시에는 세포질분열억제 소핵시험에서만 소핵세포가 다소 증가 되었고, 대사활성계 미적용시 보다는 소핵세포 생성율이 낮았다. CSC의 장기처리(19 h) 경우 두 시험법 모두에서 농도 의존적으로 소핵세포가 증가 되었고, 세포질분열억제 소핵시험시 소핵세포의 증가폭이 더 컸다. 회귀분석을 이용하여 CSC 처리방법에 따른 소핵생성 빈도수를 계산한 결과, 모든 처리방법에서 일반 소핵시험보다 세포질분열억제 소핵시험에서 소핵생성 빈도수와 상관계수 값(R)이 더 높았다. 이상의 결과로부터 담배시료의 소핵생성 평가에는 소핵생성율이 높게 측정되는 세포질분열억제 소핵시험법을 이용하는 것이 효율적인 것으로 판단된다.

Table 1. The dose-response relationship in induction of micronucleus in V79 cells by the CSC

Treatment condition	Linear regression equation	Correlation coefficient	p value
General MN assay			
short exposure(not S9)	$Y = 1.63 + 0.0269 X (\mu\text{g/mL})$	0.722	0.08
short exposure(S9)	$Y = 1.82 + 0.0076 X (\mu\text{g/mL})$	0.314	0.32
long exposure	$Y = 1.09 + 0.0594 X (\mu\text{g/mL})$	0.836	0.01
Cytokinesis-block MN assay			
short exposure(not S9)	$Y = 2.10 + 0.0868 X (\mu\text{g/mL})$	0.841	0.01
short exposure(S9)	$Y = 3.46 + 0.0265 X (\mu\text{g/mL})$	0.660	0.04
long exposure	$Y = 2.61 + 0.1030 X (\mu\text{g/mL})$	0.895	0.03

## 참 고 문 헌

- Bombick, B. R., Murli, H., Avalos, J. T., Bombick, D. W., Morgan, W. T., Putnam, K. P. and Doolittle, D. J. (1997) Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 2. *In vitro* toxicity of mainstream smoke condensate. *Food Chemical Toxicol.* 36: 183-190.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119-124.
- DeMarini, D. M. (1983) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate. *Mutat. Res.* 114: 59-89.
- Doolittle, D. J., Lee, C. K., Ivett, J. L., Mirsalis, J. C., Riccio, E., Rudd, C. J., Burger, G. T. and Hayes A. W. (1990) Comparative studies on the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15: 93-105.
- Ellard, S., Mohammed, Y., Dogra, S., Wolfel, C., Doehmer, J. and Parry, J. M. (1991) The use of genetically engineered V79 Chinese hamster cultures expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. *Mutagenesis* 6: 461-470.
- Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique : A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285: 35-44.
- Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and VanHummelen, P. (1997) The *in vitro* micronucleus test : a multipoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* 392: 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aartema, S.A., Albertini, A., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidata, jr, M., Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., Hude, W. and Wakata, A.(2000) Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 167-172.
- Krishna, G., Kropko, M. L. and Theiss, J. C. (1989) Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 Chinese hamster lung cells : results with mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 222: 63-69.
- Roemer, E., Tewes, F. J., Meisgen, T. J., Veltel, D. J. and Carmines, E. L. (2002) Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 3: *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 40: 105-111.
- Veltel, D. and Hoheneder, A. (1996) Characterization of cigarette smoke-induced micronucleic *in vitro*. *Exp. Toxic. Pathol.* 48: 548-550.