

교애사물탕의 변이원성 및 간독성에 관한 연구

우덕안 · 홍희탁 · 문진영 · 이태균 · 김철호 · 김준기 · 최미정¹ · 남경수^{1*}
동국대학교 한의과대학, ¹의과대학

Mutagenicity and Hepato-Toxicity of Kyoaesamultang

Duck-An Woo, Jin-Young Moon, Hee-Tack Hong, Tae-Kyun Lee,
Cheorl-Ho Kim, June-Ki Kim, Mi-Jung Choi¹ and Kyung-Soo Nam^{1*}

College of Oriental Medicine, ¹College of Medicine, Dongguk University, Kyongju, 780-714
(Received June 9, 1997)
(Accepted August 5, 1997)

ABSTRACT : Kyoaesamultang(KAT) has been used as an important prescription for various diseases including threatened abortion, associated with pregnancy in traditional medicine. In order to identify the safety of KAT, this study was designed to determine mutagenicity and hepato-toxicity. In Rec-assay, *Bacillus subtilis* H-17(Rec⁺) and M-45(Rec⁻) strains were used to clarify the DNA damage property. In Ames test, *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 were used for mutagenicity testing. In SOS umu test, *Salmonella typhimurium* TA1535 containing plasmid pSK1002 was used as a tester strain, and the levels of umu operon expression were monitored by measuring the β -galactosidase activity. From tested results, KAT did not show DNA damage and mutagenicity. On the other hand, hepato-toxicity of KAT to female ICR mice was monitored by the measurements of s-GOT, s-GPT and LDH activities after oral feeding for 15 days. KAT showed 34% increase of s-GOT and s-GPT activities, also exhibited 35% increase of LDH activity in mice sera.

Key Words : Kyoaesamultang, Mutagenicity, Rec-assay, Ames test, Hepato-toxicity, SOS umu test

I. 서 론

최근 인체에 암을 일으키는 물질중 85% 이상이 환경중에 존재하는 화학물질이 원인이 된다는 보고 아래 우리들이 일상생활에서 손쉽게 접하게되는 의약품, 식품첨가물, 농약등을 비롯한 많은 화학물질의 발암성 유무를 단시일내에 검색하는 일은 매우 중요한 일이라 생각된다(Doll, 1977; Wynder 등, 1977; Sugimura, 1982). Ames 등에 의해 기존의 발암성물질중 약 90% 이상이 세균에 대해서도 돌연변이원성을 가진다는 보고 이래(Ames 등, 1973; Ames 등, 1975; McCann 등, 1975; McCann 등, 1976; Hollstein, 1979), 현재 화학물질의 발암성 유무를 검색하는 방법으로 세균을 사용한 돌연변이 실험이 발암성 물질검출의 단기 스크리닝법으로서 전세계적으로 가장 널리 이용되고 있다.

본 실험에서는 한방 부인과에서 습관성 유산에 널리 사용하는 교애사물탕(膠艾四物湯, KAT)의 안전성

평가를 위한 독성실험의 일환으로 발암성 및 변이원성에 대한 실험을 행하고자 하였다. 특히 교애사물탕은 임신중인 여성에게 장기간 복용되는 약물로서 경우에 따라서는 임신부 뿐만 아니라 태아에 까지 그 영향을 줄 수 있다고 판단되는 처방으로 그 안전성 평가에 대한 의의는 아무리 강조해도 지나치지 않다고 생각된다.

그래서 저자 등은 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*)을 이용한 Ames test 및 umu test, 그리고 고초균(*Bacillus subtilis*)을 이용한 Rec-assay법으로 교애사물탕의 변이원성을 조사하고 실제로 마우스에 투여했을 경우 동물의 간세포에 미치는 영향 등을 조사하였기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용한 시약중 B-2 broth, yeast extract 및 agar는 Difco사(Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.

*본 논문에 관한 문의는 이저자에게
경북 경주시 석장동 707 동국대학교 의과대학 약리학교실

A.), 그리고 L-histidine, biotin, glucose-6-phosphate, NADP, NPD(4-nitro-o-phenylenediamine) 및 AF-2(furylfuramide)는 sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. 한편 SOS umu-test용 kit는 대총제약사(Oozuka Chem. Co., Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. 그외 사용된 모든 시약들은 Sigma사 및 Wako사의 특급 내지 일급제품들을 사용하였다.

2. 실험동물

본 연구에 사용된 실험동물은 10주령의 암컷 ICR mouse(체중 25g 내외)로서 경북대학교 의과대학 부속 실험동물실에서 구입하였으며, 실험전 본 동물사 사육실에서 1주일 이상 양육한 뒤 실험에 사용하였다.

3. 교애사물탕 물 추출액의 조제

처방은 방약합편에 수록된 교애사물탕으로 숙지황(Rehmanniae Radix Preparat), 당귀(Angelicae gigantis Radix), 백작약(Paeoniae Radix Alba), 천궁(Cnidii Rhizoma), 아교주(Asini Gelatinum), 애엽(Artemisiae Radix), 황금(Scutellariae Radix), 백출(Atractylodis macrocephalae), 향부자(Cyperus Rhizoma), 사인(Amomi Fructus)을 각각 4g으로 1첩을 구성하였으며, 약제는 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 교애사물탕 40g에 증류수 350 ml를 넣고 회전감압 증류기를 사용하여 60°C에서 2시간 추출한 다음, 전량이 300 ml가 되도록 증류수로 조절하였다. 추출액 중에 남아있는 미량의 침전물은 4°C에서 2,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 제거하였으며, 상층액은 membrane filter(0.22 µm, 직경 25 mm, Millipore Corp., Bedford, U.S.A.)로 여과멸균하여 교애사물탕 원액으로 실험에 사용하였다.

4. Rec-assay에 의한 DNA 손상성 검토

실험에 사용한 균주는 고초균(Bacillus subtilis)으로서 야생균주인 Rec⁺(H17)와 DNA 손상성 수복능 결손 균주인 Rec (M45)를 사용하였으며(Kada 등, 1972; 田島彌太郎 등, 1980), 음성대조군(negative control)은 DMSO (10%)를, 양성대조군(positive control)으로는 저지대의 길이가 잘 알려진 AF-2를 사용하였다. 배지는 B-2 broth 10g, Yeast extract 10g, NaCl 5g을 증류수 1,000 ml에 용해하고 pH 7.0으로 조정하는 다음, 고압멸균

하여 조제하였고, 고형배지를 조제할 경우에는 한천분말을 1.5%되도록 가하였다. 적당히 건조시킨 고형 배지에 소형 pipette(1 ml)로 Rec⁺ 및 Rec 균을 배지표면이 손상되지 않도록 주의하면서 streak하였다. 시료를 직경 12 mm의 멸균여지 disk에 균등히 퍼지게 한 다음, 시료를 흡수시킨 disk를 Rec⁺ 와 Rec 균을 streak한 기점에 덮어서 37°C에서 24시간 배양시킨 후, 생육저지대의 길이를 측정하였다.

5. Salmonella typhimurium TA series에 의한 돌연변이원성 검토

본 실험에는 Salmonella typhimurium TA 98과 TA 100 균주를 사용하였으며, 음성대조군으로서는 DMSO(10%)를 사용하였고, 양성대조군으로서는 sodium azide 및 NPD를 사용하였다. 동결보존인 균 현탁액으로부터 소량의 균을 취하여 3ml의 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양을 행해서 균액을 얻은 다음, 이 균을 실험 직전까지 빙수중에 보존하였고, 시료용액은 모두 사용직전에 조제하여 사용하였으며, 변이원성 검토는 Ames 방법(Maron과 Ames, 1983)에 준하여 행하였다. 먼저 건열멸균된 test tube를 45°C의 항온수조에서 미리 20분 정도 예열한 뒤, 준비된 top agar(agar 0.6g, NaCl 0.5g, 증류수 100 ml, 0.5 mM L-histidine · HCl · H₂O 및 0.5 mM biotin 용액 10 ml)를 2 ml 가하여 잘 섞고 최종 24시간 배양한 균 현탁액을 0.1 ml 가했으며, microsomal activation system을 사용할 경우에는 S-9 mixture를 가하여 거품이 일지 않도록 혼합하고 준비된 Vogel-Bonner citrate medium E plate (agar 15g, 증류수 1,000 ml, 50×VB salts 20 ml, 40% glucose 50 ml) 위에 부어 배지상에 고루 퍼지게 하였다. S-9 mixture는 그 활성이 불과 몇 초밖에 유지되지 않으므로 bacteria를 먼저 가한 후 S-9을 가해야 하며, S-9 mixture를 가하고 plate 상에 부어 고루 퍼지게 하기 까지의 시간이 20초가 넘지 않도록 주의하였다.

6. S-9 mixture의 조제

S-9 mixture는 Maron(Maron과 Ames, 1983)의 방법에 따라 조제하였다. 먼저 체중 200g 내외의 웅성 rat를 도살하기 4일전에 phenobarbital 생리식염수 용액을 kg당 30 mg을 복강내로 주사하였고, 또한 도살 3일전, 2일전, 1일전에는 kg당 60 mg을 복강내로 주사한 다음, 16시간 절식시켜 S-9 fraction을 얻었으며, rat의 도

살 후 이하 모든 조작은 멸균적으로 0~4°C 에서 행하였다. 먼저 복부를 개방한 다음, 냉각한 생리식염수를 간장에 관류시킨 후, 간장을 적출해서 가위로 저민 다음 3배량의 0.15M KCl을 가해 homogenate를 9,000×g에서 10분간 원심분리해서, 그 supernatant를 취해 S-9 fraction으로 하였다. S-9 fraction은 균에 처리하기 직전에 NADPH regenerating system을 포함한 S-9 mixture로 만들어 실험에 사용하였다.

7. SOS *umu* test에 의한 돌연변이원성 시험

시료의 돌연변이원성을 시험하기 위하여 본 실험에서는 *umu* test kit를 사용하여(Oda 등, 1985; Quillardet 등, 1985) 아래와 같이 측정하였다. 먼저 냉동 보관중인 TGA(tryptone 10g, NaCl 5g, glucose 2g, ampicillin 20 µg/ml) 배양액 10.4 ml을 실온(10~25°C)에서 용해하여 *umu* test용 균 동결건조품에 넣어서 교반하고 10분간 정치시킨 다음, 37°C에서 3시간 배양하였다. 위의 과정동안 양성대조물질인 AF-2(furylfuramide, 0.9 µg/ml in 10% DMSO)와 S-9 처리용 양성대조물질인 2-AA(2-aminoanthracene, 30 µg/ml in 10% DMSO)의 3배 단계희석액, 음성대조물질인 10% DMSO, 그리고 농도별 시료를 96well plate에 10 µl씩 분주하였다. 그리고 S-9 mixture 동결건조품에 멸균증류수 1 ml을 넣고, 잘 교반한 후, 적정량의 균액과 혼합하여 준비한다. 준비가 완료되면 균액을 well당 100 µl씩 분주하고, microsomal activation system을 사용하는 경우에는 위에서 준비한 S-9 mixture를 well당 100 µl씩 분주하여, 37°C에서 2시간 배양시킨다. 그 후 37°C에서 예열한 발색기질액 (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 4 mg/0.1M phosphate buffer pH7.0)을 100 µl씩 분주하고, 다시 37°C에서 1시간 배양시킨다. 배양이 완료되면 반응정지액(1M Na₂CO₃)을 100 µl씩 가하여 반응을 종결시키고, 2~3분간 정치하여 색조를 안정시킨 다음, OD620 nm에서 흡광도를 측정한다. 결과 판정은 음성대조에 비하여 흡광도가 2배 이상 높으면 그 검체는 변이원성을 보유하고 있는 것으로 판정하고, 반면 음성대조보다 흡광도가 오히려 낮을 경우에는 검체가 균의 생육을 저해한 것으로 판정하였다.

8. 교애사물탕이 마우스의 간에 미치는 영향

암컷 ICR 마우스를 각 군당 7마리로 하여 물을 15일간 자유로이 먹도록 한 군과 교애사물탕 물 추출액을 2배 희석하여 15일간 물대신 먹인 군에서 혈액을 채취

하여 혈청을 대상으로 몇가지 간 경변 지표의 변화를 측정하였다.

1) s-GOT, s-GPT 활성도의 측정

혈청중 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 및 glutamic pyruvate transaminase (GPT)의 활성도는 혈청중 transaminase 측정용 kit(아산제약주식회사, 한국)을 사용하여 Reitman-Frankel법에 의하여 측정하였다. 그리고 s-GOT 및 s-GPT의 활성도는 표준곡선에 의해 활성치를 계산하여, 혈청 1 ml당 Karmen unit로 표기하였다.

2) 혈청중 lactate dehydrogenase(LDH) 활성도의 측정

혈청중 LDH의 활성도는 LDH 측정용 kit(아산제약주식회사, 한국)을 사용하여 효소법(젖산기질법)에 의하여 측정하였다. 그리고 LDH 활성도는 표준혈청으로 작성한 표준검량곡선에 의해 계산하여, Wröblewski unit로 표기하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Rec-assay에 의한 DNA 손상성 검토

미생물의 DNA 손상회복 방법은 크게 나누어 excision repair와 recombination repair의 2가지의 형이 있는데 전자가 결여된 균을 Hcr 변이주라 하며, 후자가 결여된균을 Rec 라고 한다. 본 실험에서 사용한 고초균(*Bacillus subtilis*)의 Rec 는 DNA에 손상이 생기면 그 손상을 수복할 수 없기 때문에 수복능을 갖는 Rec⁺(야생균주)에 비하여 변이원에 노출되었을 때 쉽게 죽는다. 여기서 야생균주와 수복능 결여균주와의 치사감 수성을 조사·비교함으로써 DNA 손상성 유무를 간단히 알 수 있다. "Rec assay"에 의한 실험결과를 Table 1에 나타내었다. 교애사물탕 물 추출액을 흡착시킨 멸균 disc(직경 12 mm)의 기점에서 균이 성장한 점까지의 길이를 측정하여 Rec⁺와 Rec⁻균의 저지대의 차이가 2.0 mm이상일 때에 DNA손상성이 있는 것으로 판정하였다. 그 결과 교애사물탕은 2배 농축액, 원액 및 그보다 낮은 농도에서도 Rec⁺ 및 Rec⁻에서 저지대가 나타나지 않는 것으로 봐서 본 처방으로 인한 DNA손상성은 관찰되지 않음을 알 수 있었다.

2. *Salmonella typhimurium* TA series에 의한 돌연변이원성 검토

Table 1. Evaluation of mutagenicity of KAT by the Rec-assay

Group	Dose 30 µl/disk	Length of inhibition zone		Inhibition zone
		M45(Rec ⁻)	H17(Rec ⁺)	(Rec ⁻ -Rec ⁺) mm
Negative control(10% DMSO)		0.0±0.0 ^a	0.0±0.0	0.0±0.0
Positive control(AF-2)	5 µg/30 µl	3.7±0.2	0.0±0.0	3.7±0.2*
KAT	×2 solution	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	×1 solution	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	×0.5 solution	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	×0.2 solution	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	×0.1 solution	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

^a Each value represents the mean ± SE for triplicate experiments.; * More than 2 mm of inhibition zone

Table 2. Mutagenicity of KAT on *Salmonella typhimurium* TA strain

Concentration	Histidine revertants per plate*				
	- S-9		+ S-9		
	TA98	TA100	TA98	TA100	
Negative Control(DMSO)	17 ^a	56	39	78	
Positive Control(NPD)	10 µg/0.1 ml	668*	-	708*	
Positive Control(NaN ₃)	10 µg/0.1 ml	-	914*	-	
KAT	×2 solution	24	76	66	99
	×1 solution	21	68	57	102
	×0.5 solution	19	63	72	82
	×0.2 solution	0	24	61	96
	×0.1 solution	22	59	43	72

* Two-fold increase in revertant colonies(His⁺) above the control was defined to be positive.

^a Each value represents the mean for triplicate experiments.

Salmonella typhimurium TA98 및 TA100을 사용하여 교배사물탕 물 추출액의 돌연변이원성을 실험한 결과를 Table 2에 나타내었다. 돌연변이원성의 정량은 3배의 plate를 사용하여 얻어지는 결과를 3회 평균하여 나타내었으며, 음성대조군에 비해서 revertant colony수가 2배 이상일 때 돌연변이원성이 있는 것으로 판정하였다. S-9 mixture를 첨가하지 않았을 경우에는 음성대조군을 DMSO(10%)로, 양성대조군은 TA98에는 NPD를, TA100에는 NaN₃를 각각 사용하였다. 교배사물탕의 2배액, 원액 및 조제한 각 농도는 TA98 및 TA100에서의 실험에서 revertant colony수가 각각의 음성대조군에서 보다는 다소 증가하는 것으로 나타났으나 이는 colony의 수가 2배 이하이기 때문에 별다른 유의성이 없으므로 돌연변이원성이 없는 것으로 판정하였다. 한편 S-9 mixture를 첨가한 경우에서도 음성대조군을 DMSO로, 양성대조군은 TA98에는 NPD를, TA100에는 NaN₃를 각각 사용하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 S-9 mixture의 존재하에서는 revertant colony수가 S-9 mixture를 첨가하지 않은 경우보다는 다소 증가했으며, 각 농도에서도 음성대조군보다는 증가했으나 그 수가 2배 이하이기 때문에 별다른 유의성이 없었다. 그러므로 교배사물탕은 *in vitro*에서 대사가 된 후에도 돌

연변이원성이 없는 것으로 생각된다.

3. SOS *umu* test에 의한 돌연변이원성 시험

Salmonella typhimurium TA1535/pSK 1002를 사용하여 교배사물탕 물 추출액의 돌연변이원성을 관찰한 결과가 Table 3이다. 음성대조군(DMSO)에 비해 β-galactosidase 활성이 2배 이상 증가 할 때 돌연변이원성이 있는 것으로 판정하였다. 음성대조군의 β-galactosidase 활성이 S-9을 첨가하지 않았을 경우 0.117인데 비해 AF-2로 유도한 효소 활성은 0.1 µg/ml이상의 농도에서는 0.244이상이므로 돌연변이원성을 관찰할 수 있었다. 한편 교배사물탕의 물 추출액의 경우에는 모든 농도에서 0.165이하로 나타남으로 돌연변이원성이 나타나지 않았다. 한편, S-9을 첨가시킨 경우에는 음성대조군에서 0.095의 흡광도를 보였으며 2AA를 투여한 양성대조군의 경우에는 1.1 µg/ml 이상의 농도부터 돌연변이원성이 나타남을 알았다. 그러나 교배사물탕 물 추출액을 투여한 경우에는 오히려 저농도에서 약한 돌연변이활성이 보이거나 이는 유의성이 없었으며, 따라서 S-9을 첨가하지 않은 경우에서와 같이 돌연변이원성이 없는 것으로 판정된다.

Table 3. Evaluation of mutagenicity of KAT by the SOS *umu*-Test.

Group	Concentration	β -galactosidase activity (OD630 nm)	
		- S-9	+ S-9
Negative control (10% DMSO)		0.117*	0.095
Positive control (AF-2)	0.9 μ g/ml	0.310*	-
	0.3 μ g/ml	0.316*	-
	0.1 μ g/ml	0.244*	-
	0.033 μ g/ml	0.161	-
	0.011 μ g/ml	0.129	-
	0.0037 μ g/ml	0.121	-
	0.0012 μ g/ml	0.117	-
Positive control (2AA)	30 μ l	-	0.591*
	10 μ l	-	0.522*
	3.3 μ l	-	0.317*
	1.1 μ l	-	0.214*
	0.37 μ l	-	0.166
	0.12 μ l	-	0.164
KAT	0.04 μ l	-	0.176
	$\times 2$ solution	0.156	0.191*
	$\times 1$ solution	0.169	0.181
	$\times 0.5$ solution	0.134	0.185
	$\times 0.2$ solution	0.141	0.208*
$\times 0.1$ solution	0.133	0.220	

* Two-fold increase in β -galactosidase activity above the control value was defined to be positive.

* Each value represents the mean for triplicate experiments.

4. s-GOT, s-GPT 활성도의 측정

물 추출 생약에서는 각 생약 특유의 배당체가 다량 용출되어 나오므로 실제로 사람이 처방약을 장기간 복용할 때 각 생약에서 추출되어지는 여러 배당체들로 인한 인체의 여러 장기중 특히 간손상을 우려하지 않을 수 없다. 본 실험에서는 15일간 교애사물탕 물 추출액을 물 대신 먹게한 자성 ICR 마우스의 혈청을 대상으로 간세포 이상의 지표로 널리 측정하고 있는 s-GOT 및 s-GPT를 측정하여 간세포에 미치는 작용을 알아 보았다. Table 4에 그 결과를 나타낸 바와 같이 교애사물탕을 투여한 군에서는 물을 투여한 음성대조군에 비해 s-GOT 및 s-GPT의 활성이 각각 34%씩 증가하였으며 교애사물탕 처방 투여 기간중에는 간세포에 영향을 미

Table 4. Effect of KAT on serum GOT, GPT and LDH activities in mice.

Group	GOT activity	GPT activity	LDH activity
	Karmen unit	Wröblewski unit	
Control	93.22 \pm 13.10 ^a	41.77 \pm 5.74	855.40 \pm 122.13
KAT	124.95 \pm 12.30	55.91 \pm 6.57	1155.50 \pm 105.25

* Each value represents the mean \pm SE

침을 알 수 있었다.

5. 혈청중 lactate dehydrogenase(LDH) 활성도의 측정

LDH는 대표적인 혈청 비특이적인 효소로서 isoenzyme의 종류에 따라 장기특이성이 있으나 본 실험에서는 혈청중의 total enzyme을 사용하였으므로 간 질환, 심근경색, 심폐질환 및 기타 혈액질환의 유무를 알아내는 지표로 사용할 수 있다. Table 4에 그 결과를 나타낸 바와 같이 교애사물탕을 투여한 군에서는 물을 투여한 음성대조군에 비해 LDH의 활성이 35% 증가함을 알 수 있었다.

IV. 결 론

한방에서 부인과의 처방중 임신중에 자주 사용되는 처방인 교애사물탕을 사용하여 DNA손상으로 인한 돌연변이 및 간 세포독성 유무를 알아보기 위해 미생물 (*Bacillus subtilis* 및 *Salmonella typhimurium*)과 마우스를 사용하여 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. Rec-assay의 경우 교애사물탕은 *Bacillus subtilis*의 DNA에는 별다른 영향을 미치지 않음을 알았다.

2. *Salmonella typhomurium* TA 98 및 TA100을 이용한 돌연변이원성 실험에서 교애사물탕은 어느 군에서도 돌연변이원성을 나타내지 않았으며, 이는 S-9 mixture에 의해 교애사물탕이 대사가 된후에도 유사한 경향을 나타내었다.

3. SOS *umu* test의 경우에서도 β -galactosidase활성에는 큰 영향을 미치지 않았으며 이는 S-9 mixture를 첨가한 후에도 같은 결과를 나타내었다. 그러므로 교애사물탕은 대사유무와 관계없이 돌연변이원성을 일으키지 않는 것으로 판정되었다.

4. 교애사물탕 복용기간 중 간독성을 알아보기 위한 실험에서 마우스 혈청중의 효소 s-GOT, s-GPT 및 LDH는 활성변화를 측정한 결과, s-GOT 및 s-GPT는 각각 34%, 그리고 LDH는 35%의 증가를 보였다. 따라서 교애사물탕의 장기간 복용은 간세포에 영향을 미칠 수 있다고 생각된다.

참고문헌

田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (1980): 環境變異原實驗法, 講談社(東京), p.47-68.

- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. and Lee, F. D. (1973): Carcinogens are mutagens. A simple test system combining liver homogenates for activation and bacterial detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 2281.
- Ames, B. N., McCann J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test, *Mutation Res.* **31**, 347-364.
- Doll, S. R. (1977): Strategy for detection of cancer hazards to man, *Nature* **265**, 589-596.
- Hollstein, M. and McCann, J. (1979): Short-term tests for carcinogens and mutagens, *Mutation Res.* **65**, 133-226
- Kada, T., Tutikada, K. and Sadale, Y. (1972): In vitro and hostmediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens; and phloxine, A mutagenic Red dye detected, *Mutation Res* **16**, 165-174.
- Maron D. M. and Ames B. N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.* **113**, 173-215.
- McCann, J. and Ames, B. N. (1976): Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 950-954.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. (1975): Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella microsome test. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 5135-5139.
- Sugimura, T. (1982): Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food, *Cancer* **49**, 1970-1984.
- Wynder, E.L. and Gori, G.B. (1977): Contribution of the environment to cancer incidence: An epidemiologic exercise, *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 825-832.
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagawa, H. (1985): Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Res.* **147**, 219.
- Quillardet, P. and Hofnung, M. (1985): The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures, *Mutation Res.* **147**, 65.