J. Fd Hyg. Safety 21(2), 107–112 (2006)

목초액 (거성 Y.L.S-95)의 유전독성에 관한 연구

이수용* · 이광용 · 윤호권 · 정은정 · 김연수 · 이혜영 · 이병훈†
*한국과학기술연구원, 서울대학교 약학대학

Studies on the Genetic Toxicity of Guh Sung Y.L.S.-95

Sooyong Lee*, Guang-Yong Li, Hu-Quan Yin, Eun-Jung Jung, Youn-Su Kim, Hye-Young Lee, and Byung Hoon Lee†
*Bioanalysis and Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received May 17, 2006/Accepted June 14, 2006)

ABSTRACT – Guh Sung Y.L.S-95 (GS95) is a kind of polyacidic solution, which contains acetic acid as a main component. We investigated in the present study the genetic toxicity of GS95 according to the standard operation procedure from Korean Institute of Toxicology. In the *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay using TA1535, TA1537, TA98 and TA100, GS95 did not induce mutation up to 5,000 μg/plate. GS95 did not induce chromosome aberration in Chinese hamster lung fibroblast in the concentration range between 1.25 and 5 mg/mL. In the rodent micronucleus assay, the frequency of micronucleated polychromatic erythrocyte in GS95 treated mice were not increased up to 5,000 mg/kg compared to the vehicle treated mice. Taken all these data together, GS95 was proven to be nongenotoxic in the concentration ranges tested.

Key words: polyacidic solution, genetic toxicity, Guh Sung Y.L.S-95

Guh Sung Y.L.S-95 (GS95)는 목재의 열분해에 의하여 얻어지는 목초액으로 주성분은 유기산계 280여종(초산 등), 미네랄 12종(칼슘, 마그네슘, 나트륨, 철 등), 미량원소 13종(게르마늄, 알란토인, 비타민 등)으로 알려지고 있다. GS95는 소취성분으로 효과를 발휘할 수 있는 많은 요인을 가지고 있으며, 저분자 페놀성분의 부패균에 대한 살균작용을 가지고 있다. 이러한 다양한 성분을 가지고 있기 때문에, 이들 각 성분의 상승, 상쇄 및 화학결합작용 등에 의해 악취를 제거한다. 특히, 해충(모기, 파리, 등에, 진드기 등)의 기피효과도 우수하고, 분뇨처리장에서의 사용 등, 악취원의 제거에 많은 연구가 진행되고 있다. 한편, GS95의 정제형태이며 천연 식물성농축액으로 음이온을 가진 알카리성 액체는 인체에 유익한 효과가 많이 보고되고 있어, 기능성 식품으로서의 가능성에 주목 받고 있다. 즉, 성인병과 피부노화 등의 개선효과, SOD(활성산소 소거능력)등으로 매우 뛰어난 건강기능성 음료로서 세포재생 등의 개선효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 따라서, 인체섭취를 위한 안전성의 확보가 시급한 형편으로 각종 독성시험의 필요성이 증대되고 있는 현실이다. 김 등은 GS95가 4주 아급성독성 시험에서 5 g/kg/day의 용량까지 안전하다고 보고한 바 있어[1], 본 연구에서는 급성독성시험 자료를 바탕으로 하여, 국립독성연구원의 「의약품 등의 독성시험기준」 및 「독성시험 표준작업지침서」의 유전독성시험법에 따라 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험을 실시하였다[2].

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

Salmonella typhimurium을 이용한 복귀돌연변이시험

대조물질 – 본 시험에 사용한 음성대조물질로는 시험물질의 용매로 사용한 인산완충액을, 양성대조물질로는 대사활성부재하의 시험계에서는 Sodium azide, 2-Nitrofluorene, 9-Aminoacridine, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)를 대사활성존재하의 시험계에서는 2-Aminofluorene, 2-Aminoanthracene을 각각 사용하였다. Sodium azide의 경우는 증류수를, 그 외의 물질들에 대해서는 Dimethylsulfoxide (DMSO)를 용매로 사용하였다.

시험균주 – 시험에 사용한 균주인 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100은 서울대학교 약학대학에

서 계대 보존중인 것을 사용하였다.

형질확인 및 시험 균주의 보관 – 분양받은 균주는 Maron 및 Ames (1983)의 방법에 따라 Histidine요구성, Crystal violet감수성, UV감수성, Ampicillin내성, 자발복귀돌연변이수 등의 유전자형을 확인하고 Nutrient broth에서 37°C, 14시간 배양한 후 배양액 당 10%(v/v)의 비로 DMSO를 가한 후 cryo tube에 분주하여 -75°C 냉동고에 보존하였다[3].

사용배지 및 plate의 제작 – 균주 전배양시 사용되는 Nutrient broth는 증류수 1liter당 Nutrient broth 8 g, NaCl 5 g의 조성으로 만든 후 121°C, 15lbs의 조건으로 autoclave하여 사용하였다.

본 시험에 사용되는 Minimal agar plate는 Bacto agar 15 g을 증류수 930 ml에 가하여 autoclave한 것에 멸균된 Vogel-Bonner E 배지(1 liter당 $MgSO_4$, $7H_2O$ 10g, Citric acid monohydrate 100g, K_2HPO_4 500g, $NaNH_2PO_4$, $4H_2O$ 175 g) 20 ml, 과 멸균된 40% Glucose 50 ml을 가하여 제조하였다. 또한 균주를 증층 배양하기 위하여 Top agar를 autoclave하여 제조한 후 시험 직전에 멸균된 0.5 ml Histidine/ biotin을 10%(v/v)되게 가하여 사용하였다.

시험물질의 조제 및 처리농도 결정을 위한 예비독성시험 – 시험물질인 GS95는 0.2M Sodium phosphate buffer에 적당한 농도로 희석하여 0.2 μm filter를 통과시킨 후 사용하였다. 시험농도의 설정은 *S. typhimurium* TA100을 이용한 예비독성시험을 통하여 이루어졌다.

S-9 mixture의 제조 – *In vitro* 에서의 대사활성화를 위하여 Maron 및 Ames (1983)의 방법에 따라 S-9 fraction을 제조하여 사용하였다[3].

복귀변이시험 – *S.typhimurium*을 이용한 복귀변이시험은 Maron 및 Ames (1983)의 방법에 따라 수행하였으며 비교적 감도가 좋은 pre-incubation법을 사용하였다. 즉, 균액 0.1 ml, 대사활성 존재하의 시험계의 경우는 S-9 mixture 0.5 ml, 부재하의 시험계인 경우는 0.2 M Sodium phosphate buffer 0.5 ml, 시험물질 0.1 ml을 넣어 37°C에서 30분간 pre-incubation 하였다. 이 혼합액에 0.5 mM Histidin/biotin(10% v/v)을 가한 top agar 2.5 ml을 가하여 수초간 vortexing한 후 minimal glucose agar plate에 중층하여 수분간 고화시킨 후 37°C incubator에서 48 시간동안 배양하였다.

결과의 판정 – 결과의 판정은 복귀돌연변이 colony의 수가 용량 의존적으로 증가하고 그 수가 음성대조군에 비해서 2배 이상이거나 통계학적 유의성을 나타낼 경우에 양성으로 판정한다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험

대조물질 – 음성제조물질로는 시험물질의 용매인 Phosphate buffered saline(pH 7.4)을, 양성대조물질로는 대사활성 조건하에서는 Benzo(a)pyrene을 Dimethylsulfoxide에 용해시켜 사용하였으며, 대사활성 부재 하에서는 Mitomycin C를 멸균증류수에 용해시켜 사용하였다.

포유류 배양 세포주 – 본 시험에서 사용한 Chinese hamster lung fibroblast (CHL)는 서울대학교 약학대학에서 계대 보존중인 것을 사용하였다.

사용배지 – Minimal essential medium에 Fetal bovine serum을 5%되게 첨가하여 사용하였다.

배양조건 – 포화습도 하에서 5%의 CO_2가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였고 배양된 세포는 3일마다 0.5% Trypsin-EDTA액을 이용하여 계대하였다.

시험물질의 농도 설정을 위한 예비독성시험 – 본 시험에 적용하기 위한 50% 증식억제농도를 구하기 위하여 세포를 1회용 24 well plate에 2.5 $X10^5$ cells/2 ml이 되도록 파종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 60~80%의 성장상태를 보이면 Dulbeco phosphate buffer saline(DPBS) 2 ml로 세척하였다. 한 농도당 4개의 well을 할당하여 시험물질을 5단계까지의 농도로 10배씩 희석한 후 배양액에 가하여 처리하고 6번째 well은 무처리 대조군으로 하였다. 37°C CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후 DPBS 2 ml로 2회 세척하고 methanol 2 ml로 고정시켰다. 고정이 끝나면 공기 중에서 완전히 건조시킨 후 5% Giemsa 염색액으로 15분간 염색한 후 증류수로 세척하고 건조시켰다. 이와 같이 처리한 plate를 Inverted microscope로 관찰하여 50% 증식억제 농도를 추정하였다. 이상과 같은 방법으로 얻어진 약 50% 증식억제 농도를 기준으로 공비 2로 3단계의 농도를 설정하여 본 실험을 하였다. 세포독성이 전혀 관찰되지 않은 경우에는 10 mM 또는 5 mg/ml을 최고농도로 하였다.

염색체이상시험 – 예비독성시험에서 결정된 50% 증식억제 농도를 최고 농도로 하고 공비 2로 3단계의 농도를 설정하였다. 또한 무처리 대조군, 용매대조군, 그리고 양성대조군을 두었으며, 대사활성부재(without S-9 mixture) 및 존재(with mixture)하로 구분하여 시험하였다.

대사활성 부재 하에서의 시험 – 배양세포를 60 mm의 tissue culture dish에 1×10^5 cells/5 ml 이 되도록 파종한 후 37°C, CO_2 배양기에서 3일간 배양한 후 각 tissue culture dish에 시험물질과 양성대조물질을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간 동안 더 배양하였다. 22시간이 경과하면 각 tissue culture dish에 colcemid를 1 μm이 되도록 처리한 후 2시간동안 배양하여 총 검체처리 시간이 24시간이 되도록 하였다.

대사활성 존재 하에서의 시험 – S-9 mixture(20%, v/v), 시험물질 및 양성대조물질이 포함된 배양액으로 6시간 배양

한 후 보통의 배양액으로 교환하여 16시간 동안 더 배양한 후 colcemid를 처리하였다.

염색체이상 시험을 위한 표본의 제작 – 0.05% Trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 1500rpm에서 5분간 원침한 후, 상층액을 버리고 저장액 (0.075 M KCl) 5 ml에 잘 현탁시키고 37°C water bath에서 15분간 방치시켰다. 냉동보관한 고정액 (Methanol : acetic acid = 3:1, v/v)을 10방울 정도 적하한 후 1500rpm에서 상층액을 버리고 5분간 원침하고 고정액 처리과정을 한번 더 반복한 후 냉동실에서 하룻밤 보관하였다. 다음날, 원침시킨 후 새로이 만든 고정액 5㎖을 넣어 원침시키고 상층액을 버려 적당한 농도의 현탁액을 만들었다. 증류수에 담가 냉장고에 보관된 slide 위에 세포 현탁액을 한 방울 적하시켜 염색체 이상 시험을 위한 표본을 제작하고 공기건조시킨 후 5% Giemsa 염색액에 5분간 염색시킨 후 증류수에 세척 건조시켰다[4-5].

염색체이상시험 결과의 판정 – 광학 현미경하에서 1000배의 배율로 각 시험군당 100개의 잘 펴진 분열 증기 상을 관찰한 다음 처리군에 대한 구조이상의 총 출현빈도를 다음과 같은 판정기준에 따라 판정하였다[6].

음 성 (-) : 5% 미만
의양성(±): 5% 이상 10% 미만
양 성 (+) : 10% 이상

설치류 골수세포를 이용한 소핵시험

실험동물 및 시험물질의 투여 – 다물실업에서 분양받은 ICR 마우스를 사용하였으며, 동물 입수후 약 1주일간의 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 온도 25±1°C, 습도 55 ±5%, 조도 300~500 Lux로 12시간 자동 점. 소등 장치가 설치되었다. 동물은 순화 및 시험 기간 중에 polycarbonate cage에 6마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 삼양사의 고형사료를, 물은 수돗물을 자유로이 공급하였다.

대조물질 – 음성대조물질로는 시험물질의 용매로 사용한 증류수를 경구투여 하였고, 양성대조물질로는 Mitomycin C를 증류수에 녹여 복강내 투여하였다.

군 분리 및 식별 – 순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 소정의 범위에 드는 동물을 무작위로 각 시험군에 6마리씩 배분하였고, 각 시험군의 식별은 cage별 tag표시법을 이용하였다.

투여 량과 표본제작시기의 결정을 위한 예비시험 – 본 시험에서의 시험물질 투여 량은 GS95의 급성독성시험 결과를 근거로 설정하였으며 1 ml 용량의 일회용 주사기와 26gauge 주사침을 사용하여 10 ml/kg으로 본 시험물질의 실제적인 투여경로에 맞추어 경구투여하고 채취시간을 24시간, 48시간으로 하여 골수도말 표본을 제작하고 광학현미경 (×1000)하에서 1000개의 다염성적혈구에서 소핵출현 빈도수를 계수하여 소핵출현 빈도수가 가장 많은 시간을 표본제작시기로 하였다.

골수세포표본의 제작 – 예비시험에 의해 얻어진 결과에 따라 시험적용 최고농도를 1/2씩 3단계의 농도를 설정 투여한 후 Schmid의 방법에 따라 골수세포 표본을 제작하였다. 즉, 마우스를 경추탈골에 의하여 도살시킨 후, 양쪽 대퇴골로부터 1 ml의 Calf serum을 주입시킨 주사기 (24 gauge침 사용)를 이용하여 골수를 채취한 후 골수세포 부유액을 1000 rpm에서 5분간 원침하였다. 상층액을 제거하고 적당한 양으로 골수세포의 현탁액을 만들어 한 방울을 세척된 슬라이드에 적하시킨 후 도말하고 풍건시킨 후 메탄올에 5분간 고정하였다. 표본은 각 동물당 2매씩 제작하였고 고정 건조시킨 후 4% Giemsa 염색시약에 슬라이드를 30분간 염색시켰다.

골수도말 표본의 관찰 – 마우스 1개체당 1000개의 적혈구에서 다염성적혈구(poly-chromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 1000개의 다염성적혈구중에서 소핵을 갖는 다염성적혈구의 출현빈도를 구하였다. 소핵이라 생각되는 과립이 세포내에 있는 경우 초점을 상하로 움직여 확인하며 이때 백색광을 나타내지 않는 것을 소핵으로 간주하였다. 아울러 소핵은 핵막을 갖고 있어 윤곽이 확실하므로 주위가 백색으로 보이는 경우 소핵으로 인정하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별가능한 범위까지로 하였으며 주변 유핵세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다[7-9].

통계학적 평가 – Hayashi 등의 방법에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1단계에서는 Hayashi 등이 제시한 음성 및 양성대조군에 대한 배경 data와 비교해 보았고[7], 2단계에서는 각 처리군의 MNPCE (micronucleated poly-chromatic erythrocyte) 출현빈도를 음성대조군의 비교자료로부터 추정하여 2항분포를 통하여 검정을 하였고 여기에서 유의한 차이를 나타내면 3단계로서 음성대조군과 시험물질처리군의 결과에 대해서 용량반응관계가 있는가를 Cochran Armitage 경향검정을 통하여 추정하였다 (유의수준 0.05).

결과 및 고찰

복귀돌연변이시험에서 농도 결정을 위한 예비시험

S. typhimurium TA100을 이용한 예비독성시험에서 시험적용 최고농도인 5000 μg/plate에서도 세포독성이 나타나지 않아 이를 시험적용 최고농도로 설정하였다.

복귀돌연변이시험 결과

예비독성시험을 통하여 얻어진 시험적용 최고농도인 5000 μg/plate를 공비 3으로 5단계의 시험농도군을 설정하여 시험한 결과, 사용한 모든 시험균주에서 음성대조군과 비교해서 유의성있게 복귀변이집락의 증가를 보이지 않았다. 각 시험균주에서 각 농도별 복귀변이집락의 수는 표 1에 나타내었다.

염색체이상 시험에서 농도설정을 위한 예비독성시험

GS95에 대한 예비독성시험을 수행한 결과 독성을 나타내지 않아, 이러한 경우 적용 가능한 최고농도인 5 mg/ml을 시험적용 최고농도로 설정하였다.

염색체이상시험 결과

염색체이상 시험의 결과는 표 2에 나타내었다. 시험적용농도는 5, 2.5, 1.25 mg/ml이며, 모든 시험농도에서 5% 미만의 염색체이상 유발능을 보인바, 대사활성존재 및 부재하에서 본 시험물질이 염색체이상을 나타내지 않는 것으로 판정되었다(표 2).

Table 1. Reverse mutation test of GS95 using *S. typhimurium*

Treatment	Concentration (μg/plate)	S9 mix	His^+ revertants per plate			
			TA98	TA100	TA1535	TA1537
2-NF	10	-	3464±296			
9-AA	8	-				2864±64
NaNs	0.5	-			456±17	
MNNG	0.5	-		3688±440		
GS95	0	-	35±3	168±3	24±3	8±2
	62	-	36±6	164±21	19±2	10±1
	185	-	40±3	164±17	23±3	13±1
	556	-	41±3	178±12	19±4	13±2
	1667	-	41±3	156±17	21±3	19±2
	5000	-	41±3	181±29	29±3	14±1
2-AF	2	+	2224±192	3944±440		
2-AA	2	+			160±27	54±1
GS95	0	+	38±3	152±11	19±2	12±1
	62	+	55±9	150±4	22±5	13±2
	185	+	50±4	161±6	17±2	11±1
	556	+	49±4	160±24	12±4	12±3
	1667	+	55±6	165±14	20±5	11±2
	5000	+	50±3	159±16	19±5	14±1

2-NF, 2-Nintofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine; 2-AF, 2-Aminofluorene; 2-AA, 2-Aminoanthracene; MNNG, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

Table 2. Chromosome aberration assay of GS95 using Chinese hamster lung fibroblast

Treatment	Concentration (μg/mL)	S9 mix	ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	nor	total
PBS	-	-	1						99	100
GS95	5000	-	1						99	100
	2500	-	2						968	100
	1250	-							100	100
MMC	0.2	-	13	5	14	3	1		70	100
PBS	-	+	1						99	100
GS95	5000	+	1	1					98	100
	2500	+							100	100
	1250	+							100	100
B[a]P	50	+	11	6	2	3	1		78	100

PBS, Phosphate buffered saline; MMC, Mitomycin C; B[a]P, Benzy[a]pyrene; ctg, chromatid gap; ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csg, chromosome gap; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange; nor, normal

Table 3. In vivo micronucleus test in ICR mice administered with GS95

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Sampling time (h)	MNPCE % (Mean ± SD)	Ratio % PCE/(PCE+NCE) (Mean ± SD)
D.W	0	6	24	0.20± 0.06	44.97±1.18
GS95	5000	6	24	0.16±0.08	43.40±2.20
	2500	6	24	0.14±0.08	43.94±1.76
	1250	6	24	0.16±0.08	45.57±1.44
MMC	0.05	6	24	1.12±0.03	44.77±1.82

MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocytes; PCE, Polychromatic erythrocytes; NCE, normochromatic erythrocytes

소핵시험에서 투여량과 표본제작시기 결정을 위한 예비시험

예비시험에서 시험물질을 투여한 동물의 LD_{50}이 5000 mg/kg이상으로 나왔으며, 이는 GS95 원액의 1/2배 희석한 양에 해당되므로 본 소핵시험적용 최고용량은 5000 mg/kg으로 하였다. 투여 후 24, 48시간에 소핵표본을 제작, 관찰한 결과 유의할 만한 차이를 나타내지 않아 본 시험에서의 표본제작 시기는 투여 후 24시간으로 결정하였다.

소핵시험 결과

GS95의 본 시험결과는 표 3에 나타내었다. 전 시험용량 단계에 걸쳐 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현율이 음성대조군과 유의한 차이를 나타내지 않아 본 시험물질이 설치류를 이용한 소핵시험에서 소핵을 유발하지 않았다(표 3).

결 론

1. GS95는 *S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100을 이용한 복귀돌연변이시험에서 시험적용농도 62-5000 μg/plate 범위에서 복귀돌연변이를 유발하지 않았다.

2. GS95는 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험에 1.25-5 mg/ml의 시험적용농도에서 염색체이상을 유발하지 않았다.

3. GS95는 시험적용용량 1250 – 5000 mg/kg의 범위에서 설치류는 이용한 소핵시험에서 소핵을 유발하지 않았다.

국문초록

Guh Sung Y.L.S-95 (GS95)는 초산을 주성분으로 하는 목초액으로 본 연구에서는 GS95의 유전독성을 국립독성연구원의 표준작업지침서에 따라 수행하였다. *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100을 이용한 복귀돌연변이시험에서 GS95는 최고농도 5,000 μg/plate까지 돌연변이 집락수를 유의적으로 증가시키지 않았다. Chinese hamster lung fibroblast를 이용한 염색체이상 시험에서 GS95는 1.25-5 mg/mL의 농도범위까지 음성의 결과를 나타내었다. 또한 ICR mouse를 이용한 소핵시험에서 GS95는 최고농도 5,000 mg/kg까지에서 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현율이 음성대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이상의 연구결과에 따라 GS95는 상용량에서 유전독성을 유발하지 않을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Kim, P.G., Wang, S.H. and Kim, D.Y.: Subacute toxicity test of Guh Sung Y.L.S.-95. J. Fd Hyg. Safety, 12, 234-239 (1997)
2. 국립독성연구원: 유전독성시험법
3. Maron, D.M, and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella in mutagenicity test. Mutat. Res., 113, 173-215 (1983)
4. Ishidate, M. and Odashima, S.: Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – a screening for chemical carcinogens. Mutat. Res., 48, 337-354 (1977)
5. Ivett, J.L., Brown, B.M., Rodgers, C., Anderson, B.E. Rensnick, M.A. and Zeiger, E.: Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. IV. Results with 15 chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 14, 165-187 (1989)
6. Chung, Y.S., Hong, E.K., Kim, S.G., Ahn, E.T., Lee, K.Y. and Kang, J.K.: Genotoxicity studies of the complex of acriflavine and guanosine. Environ. Mutagens Carcinogens 21, 106-111 (2002)

7. Hayashi, M., Yoshmura, I., Sofuni, T. and Ishidate, M.: A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. Environ. Mol. Mutagen., 13, 347-356 (1989)
8. Salamore, M.: Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. Mutat. Res., 74, 347-356 (1980)
9. Schmid, W.: The micronucleus test. Mutat. Res., 31, 9-15 (1975)