

Phenylenediamine과 그 유도체들의 돌연변이 유발성(제1보)

변 우 현·백 상 기·이 세 영

(한국원자력연구소 분자생물학실)

Mutagenicity of Phenylenediamines and their Derivatives(I)

BYEON, Woo Hyeon, Sang Gi PAIK, and Se Yong LEE

(Molecular Biology Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute)

ABSTRACT

Mutagenic action of *p*-phenylenediamine(PA) and nitro-*p*-phenylenediamine(NPA) has been investigated using auxotroph mutants of *S. typhimurium* LT-2 strain. PA, the major component of hair dye in South and East Asia and South America, was proved as potent frame-shift mutagen only after activation system. On the contrary, NPA was directly mutagenic in this system.

緒 論

Salmonella typhimurium LT-2 균주의 histidine auxotroph를 이용하여 돌연변이 유발물질을 검출하는 방법은 B.N Ames와 H.J. Whitefield Jr. 에 의해 1966년 처음 소개된 뒤 여러 학자들에 의해 보완되어와 최근에는 mutagenesis의 중요한 영역으로 인정되고 있다. 이는 어떤 특정한 화학물질이 histidine auxotroph 균주를 배양과정에서 prototroph로 바꿔줄 수 있는가의 여부 및 그 강도에 따라 그 물질의 잠재 돌연변이 유발능력을 검출해 내는 방법이다.

발암성, 돌연변이 유발성 및 기형유발성의 관계에서 지금까지 밝혀진 실험적인 사실(Ames, 1971; Ames, 1972; Ames, Durston, Yamasaki 및 Lee, 1973; Ames, Gurney, Miller 및 Bartisch, 1972; Ames, Lee 및 Durston, 1973; Ames, Sims 및 Grover, 1972)로는 발암물질의 대부분은 돌연변이 유발성을, 돌연변이 유발물질은 거의 모두가 기형 유발성을 각각 갖기 때문에

돌연변이 유발성을 가진 물질은 일단 높은 발암확률과 기형유발성을 갖는 것으로 간주되고 있다. 실제적으로 암유발물질의 생체 실험이 많은 시간과 경비의 소모를 요구하기 때문에 새로이 합성되는 수많은 화합물들에 대해 모두 이실험을 한다는 것은 거의 불가능하며, 따라서 위에 언급한 바와 같은 실험적 근거로 돌연변이 유발능력의 검출방법이 발암물질의 검출에 이용되고 있는 것이다. 이는 mammalian cell system을 이용하거나(Lee, 1973) 혹은 본고에서처럼 세균의 어느 쪽도 이용할 수 있는데, 검출기간이 짧고 적은 경비 또 많은 시료를 동시에 처리할 수 있기 때문에 매우 효율적인 방법으로 보고되고 있다. 사용하는 균주에 따라 이 방법은 시험물질이 유발하는 돌연변이의 종류가 어떤 것인가를 식별해 낼 수 있을 뿐만 아니라(Ames, 1971) 직접 돌연변이 유발을 하지 못하는 화합물이라도 rat liver homogenate의 "s-9" fraction을 첨가하여, 그 물질이 고등동물에 섭취된 뒤 대사과정에서 돌연변이 유발물질로 변하는가의

여부도 검증해 낼 수 있다(Garner, 1972). 대개의 발암물질이나 aflatoxin B₁, dimethylnitrosoamine 등의 물질의 돌연변이 유발성이 이 방법으로 검출되고 있으며(Ames 등, 1973) 이때 첨가되는 "s-9" fraction은 microsomal 효소원으로 사용되는 것이고 따로 첨가되는 cofactor는 NADP이다.

본 논문은 각종 환경오염성 물질에 대한 돌연변이 유발능력의 내재를 검토하기 위해 농약, 살충제, 식품첨가방부제, 공업폐기물 및 독성이 강한 의약품등 생활과 직접 연관을 맺고 접촉의 기회가 높은 유기 화합물들을 수집, 전술한 방법에 적용시킨 실험의 1차적 보고이다. 아시아 및 남미에서 머리 염색약으로 쓰이고 있는 *p*-phenylenediamine (PA)과 유럽 및 북미에서 쓰이고 있는 nitro-*p*-phenylenediamine의 두 방향족 아민화합물이 이 실험에서 재료로 쓰여졌으며 이들의 돌연변이 유발성에 대해 직접 및 microsomal activation system에 의한 실험이 수행되었다. 사용된 균주 TA 1535, TA 100, TA 1538 및 TA98은 B.N. Ames 에 의해 제공된 것이다. 이 실험에서 우리나라에서 널리 사용되고 있는 머리 염색약의 주성분인 PA가 microsomal 효소를 이용한 실험 과정에서 활성화되면 돌연변이를 강하게 유발시킨다는 것이 확인되었다.

材料 및 方法

균주 : *Salmonella typhimurium* LT-2

의 histidine auxotroph 중 base substitute 돌연변이 균주인 hisG46과 frame-shift 돌연변이 균주인 hisD3052의 두 균주를 모준으로써 시약에 대한 투과성을 높이기 위해 막의 구성성분인 lipopolysaccharide가 결여된 deep rough (rfa)형과 repair system이 결여된 Δ uvrB형의 두 돌연변이를 각각 도입시켜 만든 TA1535와 TA1538의 두 균주가 실제로 실험에 사용되었고 이 두 균주에 다시 plasmid pKM 101을 도입한 TA 100과 TA98의 도합 네 균주가 사용되었다. Antibiotics resistant factor의 일종인 pKM 101 plasmid가 도입된 이들 두 균주는 그 원인이 확실히 밝혀져 있지는 않지만 돌연변이 유발물질에 대해 높은 감수성을 나타냈고 같은 R-factor 중에서도 utrecht나 R-46 등이 도입된 균주는 그 감수성에 별 차이를 나타내지 않았다고 보고되어 있다(McCann 등, 1975).

사용된 균주들의 유전자적 구성은 다음의 표와 같다(Table 1).

균주의 동정 및 분리 : B.N. Ames로부터 분양받은 균주는 single colony분리후 각 유전형질의 확인을 위해 다음 세가지 실험이 수행되었다.

1) Deep rough (rfa)-crystal violet과 sodium deoxycholate에 대한 감수성 결사로 crystal violet 10 μ g 혹은 sodium deoxycholate 2mg을 직경 6mm 멸균 여지에 흡수시킨 뒤 균이 접종된 (2 \times 10⁸cells/plate)

Table 1. Genotype of the TA strains used for testing mutagens

Induced R-factor pKM 101	Additional mutations in:		Histidine mutation in strain	
	LPS	Repair	hisG46	hisD3052
—	+	—	hisG46	hisD3052
—	rfa	Δ uvrB	TA1535	TA1538
—	rfa	Δ uvrB	TA100	TA98

Abbreviation: LPS, lipopolysaccharide.

All strains were originally derived from *S. typhimurium* LT-2. Wild-type genes are indicated by a +. The deletion (Δ) through uvrB also includes the nitrate reductase (chl) and biotin (bio) genes. The rfa mutations eliminate the polysaccharide side chain of the LPS that coats the bacterial surface.

nutrient agar상에서 37°C로 12시간 배양했을때 균 생장이 저해받은 투명 환상부위가 여지주위에 crystal violet의 경우 14 mm로, sodium deoxycholate의 경우 13 mm로 각각 나타나는 균주를 선택했다.

2) uvrB—균이 접종된 Petri dish의 agar plate 반면을 15W 자외선 살균등아래 33cm의 거리에서 6초간 조사한 뒤 12시간 배양시켜 감수성이 큰 균주를 골랐다.

3) R-factor—pKM101이 도입된 TA100과 TA98은 균접종이 된 Petri dish에 ampicillin을 spotting하여 저해부위가 전혀 생기지 않는 균주를 선택했다. 이와 관련하여 이들 R-factor가 도입된 균주들에 대한 강한 UV-resistancy는 MacPhee의 보고(MacPhee, 1972)에 유의하여 uvrB deletion에 의한 감수성과 R-factor에 의한 저항성이 서로 보상, 혼동되지 않도록 같은 균주의 factor가 없는 균과 uvrB가 정상인 균을 기준으로 비교, 결정했다.

상기의 세 형질의 확인시 균이 histidine auxotroph의 성질을 잃어버리고 역돌연변이에 의해 wild-type으로 되어 버리거나 않는가가 항상 점검되어야 했으며 이는 histidine이 한계량으로 가해진 Spizizen's medium상에서 균의 생장이 가능한가로 결정되었다.

분리 동정된 균은 다시 nutrient broth에 접종, 24시간 동안 배양후, 배양액 0.8ml와 0.07ml의 멸균 dimethylsulfoxide를 역시 멸균된 1-dram cap vial에서 섞은 후 곧 dry-ice상에서 급냉동시켜 80°C의 deep freezer에서 보관했다. 균의 사용시는 멸균된 목재 접종봉으로 동결된 broth의 면을 긁어 모은 작은 얼음과편들을 접종분으로 사용했고 nutrient broth에서 37°C로 24시간 배양후 사용했다.

배지 :

Vogel-Bonner Citrate medium E(Vogel 및 Bonner, 1975).

A. Agar	15 g
water	1 l

B. 50×VB salts 20 ml(in tube)

C. 40% glucose 50 ml (in bottle)

각각을 따로 고압증기멸균하여 뜨거운 배합액에 잘 섞은 뒤 plate를 만든다. 50×VB Salts 용액의 제조는 다음과 같이 한다.

Warm dist. Water (about 45°C)	670 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 g
Citric acid·H ₂ O	100 g
K ₂ HPO ₄	500 g
NaH ₂ NH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O	175 g

각 구성물을 순서대로 넣어가며 한가지가 다 녹은 뒤 다음 것을 더한다. 실온으로 식힌 뒤 1l당 5ml의 chloroform을 더해 마개가 잘 맞는 병에 담아 실온에서 보관한다.

Spizizen's medium

A. 4× salt solution

(NH ₄) ₂ SO ₄	8.0 g
K ₂ HPO ₄	56.0 g
KH ₂ PO ₄	24.0 g
Na-Citrate	4.0 g
MgSO ₄	0.8 g
H ₂ O	upto 1 l

B. Agar 15.0 g

H₂O to 650 ml

C. glucose 5.0 g

H₂O to 100 ml

각각을 따로 고압증기멸균(15 lb/in² 15min)하여 50°C로 식힌뒤 250ml의 4×salt solution(A)과 100ml의 5% glucose solution(C)을 650ml의 agar solution에 더한다. 균기전 0.25mg/ml의 biotin 용액을 1l당 2ml 더해서 최종농도가 0.5μg/ml되게 하고 동시에 4.0mg/ml 농도의 histidine을 1ml 더해 최종으로 4.0μg/ml의 농도가 되게한다.

top agar

Agar	6 g
NaCl	5 g
H ₂ O	1 l

시약 : *p*-phenylenediamine 및 nitro-*p*-phenylenediamine은 같이 독일 Hoechst 사 제품으로 국내에서 머리염색약 제조에 직접 사용되는 제품을 썼고 이를 멸균증류수에

0.125mg/ml, 0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 및 1mg/ml로 녹여 top agar에 0.1ml씩 처리했다. 이들의 화학구조식은 그림에서 보는 바와 같다(Fig. 1).

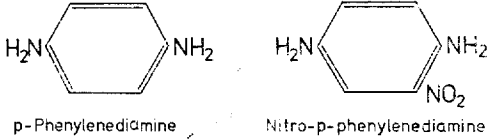


Fig. 1. Chemical structure of *p*-phenylenediamine(PA) and nitro-*p*-phenylenediamine.

s-9 fraction: 직접 균에 돌연변이를 초래하지 못하는 물질일 경우 포유동물의 liver homogenate의 microsomal enzyme에 의해 활성화된 후 작용을 나타내는 경우가 많으며 대부분의 발암물질은 이런 부류에 속한다(Ames, Durston, Yamasaki 및 Lee, 1973; Gletten 등, 1975; Larry 등, 1974; Malling, 1974; Weekes 및 Brusick, 1975). 이에 필요한 liver homogenate는 9000×g에서의 상등액을 사용했고 (s-9 fraction) NADPH generating system이 포함된 s-9 mix 상태로 처리되었다. 간의 enzyme induction을 위해 0.1% phenobarbital 수용액을 200g 전후의 rat에게 도살전 7일간 섭식시켰고(Garner 등, 1972), 도살된 rat의 간은 무균적으로 절취된 후 멸균된 0.5M KCl에서 1회 세척후 weight의 3배 0.15M KCl을 더한 뒤 Potter Elvehjem 기구를 사용해 homogenation한 뒤 9000×g에서 10분간 원심분리 했다. 그 상등액을 3ml씩 멸균된 cap vial에 나누어 담은뒤 급냉동하여 80°C deep freezer에 저장, 필요시마다 한 vial

씩 꺼내 썼다. s-9 fraction은 세균에 처리 직전 NADPH-generating system을 포함한 혼합액으로 만들어 졌고 그 혼합액의 조성은 다음과 같다(Table 2).

Top agar: 멸균된 top agar는 식어서 응고되기 전 100ml당 10ml의 멸균된 0.5mM biotin용액과 histidine용액을 가했다. Histidine용액은 필요에 따라 역돌연변이 개체를 위한 실험에서는 0.5mM용액 10ml를, total viable count를 위해서는 15mM용액 10ml를 각각 더했고 잘 섞은 뒤 사용전까지 45°C 항온수조에서 보관했다.

방법: 건열멸균된 cap test tube(13×100 mm)를 45°C의 항온수조에서 20분간 예열 후 준비된 top agar를 2ml씩 나누어 담는다. 여기에 시료의 수용액 혹은 물에 불용성인 물질은 dimethylsulfoxide에 녹인 용액 0.1ml를 더해 잘 섞는다. Activation system을 사용할 경우는 s-9 mix 0.5ml를 더해 잘 섞고 최종 12시간 배양된 균현탁액(약 2×10^8 cells/ml) 0.1ml를 더해 잘 혼합한 뒤 준비된 Vogel-Bonner agar plate에 부어, 균기 전 여러 방향으로 기울여 표면에 고루 퍼지게 한다. s-9 mix와 균을 가한 뒤 이 top agar를 Petri plate에 부을 때까지의 전 시간이 1분을 넘지 않도록 했다. 45°C에서 s-9 mix에 포함된 효소가 불활성화되거나 더해진 세균이 열에 의해 피해를 받지 않을 만큼 짧은 시간동안 처리되도록 많은 주의가 요구되었다. s-9 mix를 넣지 않은 대조구에는 top agar의 volume에 의한 균과 시료물질의 희석효과를 균일하게 해주기 위해 s-9 mix와 같은 양의 0.5ml 멸균 증류수가 더해졌다.

Total viable count를 정하기 위해서는 histidine의 양을 15mM로 넣어 주었고 집종균량도 원배양액의 10^5 배 희석액을 0.1ml씩 넣어 주었다. Top agar 100ml당 0.5 mM 용액 10ml씩 더해진 histidine 양은 (0.1μmole/plate) agar plate상에서 돌연변이 유발물질이 작용할 수 있도록 세균의 수회의 분열에 필요한 양으로서 back ground

Table 2. Composition of s-9 mix.

Component	Final concentration
s-9 fraction	30 %
MgCl ₂	8 mM
KCl	33 mM
Glucose-6-phosphate	5 mM
NADP	4 mM
Sodium phosphate(pH7.4)	100 mM

를 우유빛 현탁 정도의 약한 성장을 가져오게 하며 역돌연변이 prototroph 균주는 colony의 형성이 정상으로 나타나게 된다. 15mM 용액 10ml씩 가한(2μmole/plate) histidine으로는 auxotroph도 완전한 colony를 형성한다.

s-9 mix를 처리한 구와 s-9을 처리하지 않은 구 사이에 생긴 total viable count의 차이를 같게 해주기 위해 s-9 비처리구에는 yeast extract를 plate당 1mg 되게 top agar에 처리 했는데 이 농도는 total viable count의 수가 s-9을 처리한 구와 가장 가까와지게 하는 최소농도이다.

접종된 plate는 agar가 굳은 뒤 뒤집어 37°C에서 48시간 배양 후 colony를 세었다. 접종시 top agar에 첨가하는 각 농도의 시료와 s-9의 오염 측정은 매번의 실험에 항상 병행해서 수행되었었다.

계산방법 :

$$MF = \frac{\text{His revertant/ml}}{\text{CFU/ml in undiluted exudate}}$$

$$MF_t/MF_c = \frac{MF \text{ of experimented sample}}{MF \text{ of controlled sample}}$$

MF : Mutant frequency
CFU: Colony-forming unit

結 果

PA 및 NPA가 유발하는 돌연변이의 종

Table 3. Reversion of auxotroph strains of *S.typhimurium* LT-2 with *p*-phenylenediamine (PA) and nitro-*p*-phenylenediamine (NPA). Concentration of chemicals is 50μg/plate.

Chemical	Strain				
	s-9	TA1535	TA100	TA1538	TA98
PA	+	11	99	2813	2776
	-	14	92	14	10
NPA	+	12	86	494	564
	-	16	97	434	484
Spontaneous revertant	+	7	103	12	18
	-	8	85	9	11

류를 가리기 위해 TA1535, TA100, TA1538, 및 TA98의 네 균주에 plate당 50μg씩 시료가 처리되도록 한 실험의 결과는 표에서 보는 바와 같다(Table 3).

두 화합물이 모두 base substituted mutant인 TA1535와 TA100에 대해서는 microsomal enzyme에 의한 활성화에 관계없이 작용이 없었다. TA100의 spontaneous reversion rate가 높은 것은 Ames에 의해 언급된 바 대로이다. 한편 TA1538과 TA98의 두 frame-shift mutant에 대해서는 PA와 NPA가 모두 높은 돌연변이 유발효과를 나타냈으나 두 화합물의 작용방식은 다른 것으로 나타났다. PA는 microsomal activation system이 적용됐을 때는 약품이 처리되지 않은 대조구에 비해 높은 mutant frequency의 증가를 나타냈으나, activation system이 적용되지 않은 구에서는 약품이 처리된 구와 처리되지 않은 구 사이에 차이가 거의 없었다. 이는 PA가 microsomal enzyme의 작용을 받아야 돌연변이 유발물질로 전환된다는 것을 나타낸다. 한편 NPA의 경우는 microsomal activation system을 처리했을 때와 하지 않았을 때의 차이가 없이 모두 돌연변이 유발성이었다.

이어서 TA1538에 대한 PA와 NPA의 dose response를 보기 위해 약품의 농도를 12.5, 25, 50, 및 100μg/plate되게 처리했을 때 얻어진 결과는 그림에서 보는 바와 같다(Fig 2).

PA는 s-9 mix가 처리된 구에서는 50μg/plate까지 균의 MF가 농도에 비례해서 증가되었으며 시약의 독성에서 오는 total viable count의 감소는 전구간에서 거의 없었다. NPA는 s-9 mix 처리구와 비처리구에서 거의 같은 비율로 MF를 증가시켰으나 100μg/plate 처리한 경우 s-9 처리구의 MF가 s-9 비처리구에서의 MF 370보다 약간 높은 437을 나타냈다. 이는 방법에서 언급한 바와 같이 s-9 mix 비첨가구의 total viable count가 처리구에 비해 턱 낮은 값을 보였기 때문에, auxotroph가 자라지 않

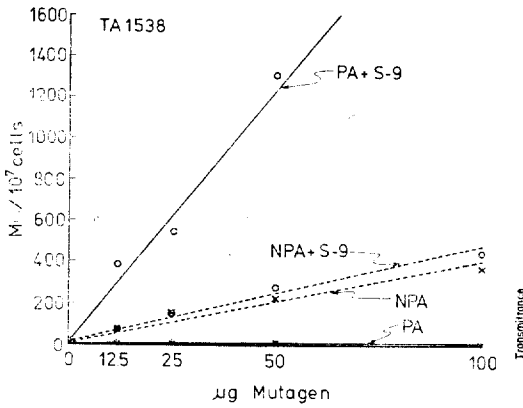


Fig. 2. Dose response of PA and NPA on TA 1538.

는 한도 내에서 yeast extract를 s-9 mix의 효소원 이외의 영양물질 대용물로 plate 당 1mg 정도로 더해주어 거의 회복되고 남은 차이이다. 1mg/plate 이상의 yeast extract 첨가도 s-9 첨가구와 같은 total viable

및 revertant count의 완전한 회복이나 나아가 그 수의 증가를 가져오지는 못했었다. 그러나 약품을 첨가하지 않았던 대조구에 대한 MF의 증가비(MFt/MFc)를 보면 이 차이는 오히려 없는 것으로 나타났다. 이는 대조구에서 s-9 처리구와 비처리구 사이에서 생긴 spontaneous revertant의 숫자가 그대로 기준점이 되었기 때문이다 (Table 4).

Table 4. MFt/MFc of TA1538 with PA and NPA

Chemical	Conc. of chemical (µg/plate)				
	s-9	12.5	25	50	100
PA	+	65.7	91.8	231.0	238.2
	-	0.7	1.2	1.8	0.8
NPA	+	11.7	28.7	46.6	72.8
	-	14.8	34.0	46.0	74.0

어쨌든 yeast extract의 첨가로 띄어 높은

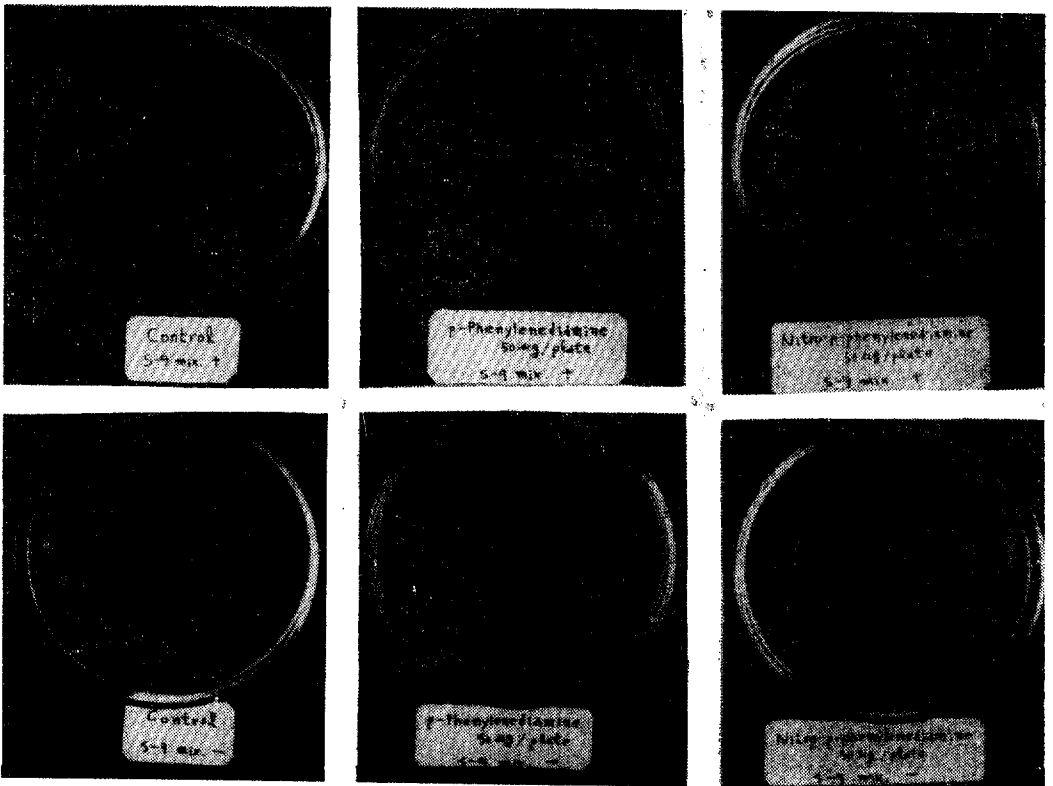


Fig 3 Reversion of TA 1538 by PA and NPA

비율의 total viable count가 회복된 것은 사실이며 이는 Ames로부터 분양받은 균종 TA1538과 TA98이 표1에 기재된 mutation 이외에도 다른 영양요구성을 잠정적으로 가지고 있다는 증거가 되며 이는 차후에 밝혀져야 될 문제이다. TA1538의 PA 및 NPA에 의한 역돌연이개체 형성은 그림에서 보는 바와 같다(Fig 3).

考 察

상기의 결과에서 나타난 바로 PA와 NPA는 다른 화합물과 비교해서 상당히 강력한 돌연변이 유발성 물질에 속한다. 그렇지만 PA는 microsomal enzyme에 의해 활성화가 되어야 돌연변이 유발성을 가지며 NPA는 직접으로 효과가 있고 microsomal enzyme에 의해서는 거의 증가를 가져오지 않는 것으로 나타났다. PA의 microsomal enzyme에 의한 활성화는 hydroxylation으로 짐작하고 있지만 이는 실험적으로 밝혀져야 될 과제이다.

PA는 국내 머리염색약 거의 모두의 주성분으로서 지금까지는 이 약품의 알레르기성 반응등에 대해서 약간 보고가 되어 왔으나 돌연변이 유발 및 암유발 가능성에 대해서는 보고된 바가 없었다. NPA는 최근 외신보도로 암유발능력이 있다고 보고된 상태이고, 이 실험에 쓰였던 PA는 이처럼 NPA보다 오히려 훨씬 강력한 돌연변이 유발능력이 있는 것으로 밝혀졌으며, 화학구조상 NPA의 유사체일 뿐만 아니라 돌연변이 유발기작면에서도 NPA와 동류의 변이를 일으킨다는 관점에서 암유발능의 잠재력을 인정해야 할 상태가 되었다고 생각한다. 한편 PA를 머리 염색과정에서 거치는 바와 같은 산화로 발색시키고 난 후 여기서 생성된 물에 불용성이 물질로 예비 실험한 결과에 따르면 이는 PA를 그대로 처리했을 때 보다 훨씬 높은 돌연변이 유발성의 가지고 있는 것으로 나타났으며 아마도 산화로 생성된 diazo 화합물의 부산물이 아닌가 생각되고 있고 이에 대한 연구가 현재 진행중에 있다.

摘 要

S. typhimurium LT-2의 histidine auxotroph를 이용한 돌연변이 유발물질 검출방법으로 PA 및 NPA의 돌연변이 유발능을 실험했다.

PA는 microsomal enzyme에 의해 강한 돌연변이 유발효과를 나타냈으며 NPA는 직접 처리했을 때 강한 돌연변이 유발효과를 나타냈고 microsomal enzyme에 의한 활성화로는 그 비율이 증가되지 않았다.

謝 辭

본 실험에 많은 기술적인 도움을 준 본 연구실 김명훈씨께 깊이 감사한다.

引 用 文 獻

1. Ames, B.N., 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in A. Hollaender(Ed.), *Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection*, Plenum, New York, 267—282.
2. Ames, B. N., 1972. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in A. Hollaender(Ed.), *Environmental Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, Plenum, New York, 57—66.
3. Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, & F. D. Lee, 1973. Carcinogens are

- mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**, 2281—2285.
4. Ames, B. N., E. G. Gurney, J. A. Miller, & H. Bartsch, 1972. Carcinogens as frame-shift mutagens: Metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3128—3132.
 5. Ames, B. N., F. D. Lee, & W. E. Durston, 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 782—786.
 6. Ames, B. N., P. Sims, & P. L. Grover, 1972. Epoxides of carcinogenic polycyclic hydrocarbons are frame-shift mutagens. *Science* **176**, 47—49.
 7. Ames, B. N., & H. Jr. Whitefield, 1966. Frame-shift mutagenesis in *Salmonella*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 221—225.
 8. Garner, R. G., E. C. Miller, & J. A. Miller, 1972. Liver microsomal metabolism of Aflatoxin B₁ to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. *Cancer Res.* **32**, 2058—2066.
 9. Gletten, F., M. Weekes, & D. Brusick, 1975. *In vitro* metabolic activation of chemical mutagens. I. Development of an *in vitro* mutagenicity assay using liver microsomal enzymes for the activation of dimethylnitrosoamine to a mutagen. *Mutation Res.* **28**, 113—122.
 10. Larry, D. K., E. Yamasaki, & B. N. Ames, 1974. Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4159—4163.
 11. Lee, S. Y., 1973. Current status of the host-mediated L5178Y system for detecting chemical mutagens. *Environmental Health Perspectives* **6**, 145—149.
 12. MacPhee, D. G., 1972. Effect of an R factor on resistance of *Salmonella typhimurium* to radiation and chemical treatment. *Mutation Res.* **14**, 450—453.
 13. Malling, H.V., 1974. Mutagenic activation of dimethylnitrosoamine and diethylnitrosoamine in the host-mediated assay and the microsomal system. *Mutation Res.* **26**, 465—472.
 14. McCann, J., N. E. Spingarn, J. Kobori, & B. N. Ames, 1975. The detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 979—983.
 15. Vogel, H. J., and D. M. Bonner, 1956. Acetylornithase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* **218**, 97—106.
 16. Weekes, U., & D. Brusick, 1975. *In vitro* metabolic activation of chemical mutagens. II. The relationships among mutagen formation, metabolism and carcinogenicity for dimethylnitrosoamine and diethylnitrosoamine in livers, kidneys and lungs of BALB/cJ, C57BL/6J and RF/J mice. *Mutation Res.* **31**, 175—183.