Kor. J. Food Hygiene 8 (3), 171-179(1993)

식용 및 외용색소의 유전독성에 관한 연구 (1)

하광원 · 정해관 · 오혜영 · 허옥순 · 손수정 · 한의식 ·
정성철 · 한순영 · 최선주 · 조율희*
국립보건안전연구원 독성부 *한양대학교 의과대학

Mutagenicity studies of food and cosmetic dyes (1)

Kwang-Won Ha, Hai-Kwan Jung, Hye-Young Oh, Ok-Soon Heo, Soo-Jung Sohn, Eui-Sik Han, Sung-Chul Jung, Soon-Young Han, Sun-Ju Choi, and Youl-Hee Cho*
Department of Toxicology, National Institute of Safety Research, 122-020 Seoul
**College of Medicine, Han Yang University, 133-791 Seoul*

ABSTRACT—**The mutagenicity of 22 food and cosmetic dyes had been evaluated. Two different short-term mutagenicity tests were used: (1) *Salmonella typhimurium* preincubation assay (Ames test) (2) Chromosome aberration test with cultured Chinese hamster lung (CHL) fibroblast cells. Orange No. 203 was mutagenic in *Salmonella typhimurium* with and without rat liver microsomal activation, and Red No. 204 was mutagenic in *Salmonella typhimurium* with rat liver microsomal activation. Red No. 104-1 and Red No. 215 showed slight increase of chromosomal aberration in CHL cells.**

Keyword □ **Food and cosmetic dyes, Ames test, Chromosome aberration test.**

인체에 암을 유발시키는 환경인자[1]들이 늘어감에 따라 식품, 의약품, 화장품 등에서 광범위하게 사용되고있는 여러 색소들에 대한 유전독성시험 데이타가 요구되어지고 있다. 유전독성시험은 발암성시험의 전과정의 검색법으로써 화학물질의 유전자에 미치는 영향을 단기간에 볼 수 있는 시험으로, 미국의 FDA, 일본 후생성 등 선진외국에서는 이들에 대한 자료가 체계적으로 이루어져 오고 있으나,[2-4] 국내 자체적인 자료는 거의 전무한 실정이다. 저자 등이 1988년부터 국내 시판화장품 및 시약급 색소원료의 유전독성에 대한 평가를 실시한 이래 현재까지 계속되고 있는 '식용 및 외용색소의 유전독성에 관한 연구'는, 식용 또는 외용색소가 국민생활과 밀착되어 있는 만큼 국내 자체적 유전독성자료를 확보함으로써 안전성기준을 마련하고 국민보건향상에 이바지하고자 실시하였다.

Received for publication 12 October, 1993
Reprint request: H.-Y. Oh at the above address

22가지의 색소를 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험과 Chinese hamster lung cell을 이용한 염색체이상 시험을 실시하였고, 그 중 FDA에서 동물실험 결과 발암성물질로 판정을 받은 적색 203호, 적색204호, 적색213호, 적색215호, 등색 203호, 적색3호도 포함시켰다.

재료 및 방법

*Salmonella*를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험

시험용 균주—시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537주는 미국 캘리포니아대학 B.N. Ames교수로부터 직접 인수하였으며 그 유전적 특성은 Table 1과 같다. 각 균주는 Maron & Ames원저[5]에 제시된 방법에 따라, 본 시험에 앞서 ① Histidine 요구성 ② Crystal violet 감수성 ③ UV 감수성 ④ Ampicillin 또는 Tetracycline내성 ⑤ 자발 복귀변이 빈도 등의 유전적

Table 1. Genetic characteristics of *Salmonella typhimurium* in Ames test

균 주	유전적특성	참고문헌
Salmonella typhimurium		
TA98	*his*D3052, *rfa*, △*uvr*B pkM101	Maron & Ames
TA100	*his*G46, *rfa*, △*uvr*B pKM101	Maron & Ames
TA102	*his*G428, *rfa*, pAQ1	Maron & Ames
TA1535	*his*G46, *rfa*, △*uvr*B,	Maron & Ames
TA1537	*his*G3076, *rfa*, △*uvr*B,	Maron & Ames

특성을 확인하였다. 각 균주는 −70℃의 DMSO 동결 보존으로부터 직접 10 ml의 Nutrient broth에 접종하여 37℃에서 12시간 회전식 진탕배양에 의해 시험에 사용할 균 현탁액으로 하였다.

배지−1) Minimal glucose agar medium : 유전독성 검색용의 배지로써 Vogel-Bonner medium E에 1.5% Bacto-Difco agar와 2% glucose를 함유한다. Plate당 용량은 25 ml이며 plate는 γ선 멸균제품(Corning 100 mm×20 mm)을 사용하였다. Vogel-Bonner medium E(50x)의 liter당 조성은 다음과 같다.

warm distilled water (45℃)	670 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g
citric acid monohydrate	100 g
K_2HPO_4	500 g
$NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$	176 g

2) Top agar : 0.6% Difco agar와 0.5%의 NaCl을 함유한다. 사용에 앞서 microwave oven에서 녹인후 top agar 100 ml당 10 ml의 0.5 mM L-histidine HCl/0.5 mM biotine 용액을 첨가하여 사용하였다.

3) Nutrient broth : 시험용 균주의 액체배양에 사용하며 Oxoid nutrient broth No. 2를 2.5% 함유한다. 이상 각 배지의 멸균은 고압 증기 멸균(121℃, 15 min)에 의하였다.

S-9 mix의 조제−*In vitro* 대사활성화를 위하여 S-9분획을 다음과 같이 조제하여 사용하였다. 국립보건안전연구원에서 생산 및 사육한 SPF SD계 rat (male, 8주령, 약 200 g)에, corn oil에 희석시킨 Arochlor 1254 (200 mg/ml)를 1회 복강내 투여(500 mg/kg)하여 4일째에 경추탈골에 의하여 도살하였다. 적출한 간 중량의 3배량의 냉각한 0.15 M KCl용액을 넣어 균질화하고, 9,000 g에서 10분간 원심분리 후 그 상등액을 S-9분획으로 하였다. 이상의 모든 과정은 고압 증기 멸균한 용액과 초자류를 사용하여 무균적으로 행하였고, 조제한 S-9분획 0.1 ml를 Top agar와 함께 유전독성 검색용 배지에 plating하여 무균성을 확인하였다. S-9 mix의 50 ml당 조성은 다음과 같다.

S-9 mix

S-9 분획	2.0 ml
0.4 M $MgCl_2$, 1.65 M KCl	1.0 ml
1M glucose-6-phosphate	0.25 ml
0.1 M NADP	2.0 ml
0.2 M phosphate buffer, pH 7.4	25.0 ml
멸균증류수	19.75 ml
total	50.00 ml

예비독성시험−TA100을 사용하여 DMSO를 용매로 최고용해 농도로부터 공비 3의 8단계로 세포독성시험을 실시하여 최고농도를 정했다.

복귀돌연변이 시험−예비독성 시험에서 결정된 최고 용해농도를 최고농도로 공비 3으로 6단계 농도를 설정하여 실험하였다. 모든 검체를 preincubation method[6,7]로 시험하였다. 전시험관(13 mm×100 mm, glass)에 *S. typhimurium* TA 98, TA100, TA 102, TA 1535, TA 1537의 각각의 배양균액 0.1 ml, 시험물질의 H_2O용액 0.1 ml 및 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 ml(대사활성화법에서는 S-9 mix 0.5 ml)를 넣어 혼합한 후 37℃에서 30분간 진탕배양하였다. Incubation종료 후 바로 top agar 2 ml를 첨가하여 혼합하고 변이원성 검색용 배지(minimal glucose agar medium)에 중층, 37℃에서 48시간 배양후 복귀변이 집락의 수를 자동집락 계수기(Artek model 880), 또는 수동식 집락 계수기로 계수하였다. 복귀변이집락의 수는 3매의 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이 유발성의 판정은 용매대조의 2배 이상의 복귀변이 집락수를 나타내었으며 또한 용량의 의존성을 가지는 경우를 양성으로 하였다. 음성대조물질은 용매인 DMSO를 사용하였고, 양성대조물질로서는 사용한 균주의 유전학적 특성 및 대사활성화법의 적용여부에 따라 2-nitrofluorene (2NF), sodium azide(SAZ), 2-aminofluorene(2AF),

ICR-191등을 적의 사용하였다.

CHL 배양세포를 이용한 염색체이상시험

사용세포 및 배양방법－사용한 포유동물 세포는 Chinese hamster lung fibroblast(CHL)[8]로서 일본 국립위생시험소의 Sofuni 박사로부터 분양받아 사용하였다. Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다(Koyama *et al.*, 1970).

배양액은 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 1%의 antibiotic-antimycotic용액(100x 용액, Gibco)을 포함한 Eagle's minimal essential medium (EMEM, Gibco)을 사용하여, 포화 습도하에서 5% CO_2를 공급하는 37℃의 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 3～5일마다 0.05% trypsin-EDTA (Gibco)용액을 이용하여 계대 유지하였다.

대사활성계－Maron and Ames(1983)의 방법에 따라, 당원 SPF사에서 사육한 체중 200 g 정도의 Sprague Dawley male rat에 Aroclor-1254를 복강내 투여하였다. S-9 mix는 각 시험개시 직전에 조제하여 사용하였고, 그 조성은 다음과 같다.

S-9 mix

Distilled water	1.43 m*l*
0.2 M phosphate buffer pH 7.4	1.8 m*l*
0.1 M NADP	0.144 m*l*
1M glucose-6-phosphate	0.018 m*l*
$MgCl_2$-KCl salt solution	0.144 m*l*
S-9	1.48 m*l*
total	5.006 m*l*

예비독성시험－배양세포의 50% 증식억제농도를 구하였다. 세포계대시에 1회용 24well plate에 1 well당 1×10^4개의 세포를 파종하여 2일간 배양한 후, 한 농도당 4개의 well을 할당하고 시험물질을 1% DMSO를 함유한 배양액으로 용해하여 최고용해농도인 1 mg/m*l*을 최고농도로 하여 공비 2로 5단계의 농도를 설정하였다. 6번째 well은 무처리 대조군으로 하였다. 37℃에서 24시간 배양한 후 배지를 버리고 미리 37℃ 수욕상에서 가온한 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS) 0.5 m*l*로 2회 세척한 후 methanol로 10분간 고정하여 5% Giemsa용액(in phosphate buffer pH 6.8)으로 15분간 염색한 후 현미경으로 관찰하여 50% 세포독성을 보이는 농도를 구하였다. 1차 예비독성시험에서 대략의 50% 세포독성을 보이는 농도를 결정한 후, 다시 좁은 농도 구배내에서의 2차 예비독성시험을 실시하였다.

염색체이상시험－예비독성시험에서 결정된 50% 세포독성농도를 최고농도로하고, 공비 2로 3단계의 농도를 시험농도로 하였다. 또한, 무처리 대조군과 기지의 양성대조군을 두었으며, 대사활성 부재 및 존재하에서 시험하였다.

대사활성 부재하의 시험은 CHL 세포를 60 mm의 petri dish에 1×10^5 cells/5 m*l*가 되도록 파종하여 3일간 배양한 후, 각각 시험 물질과 양성 대조 물질등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간동안 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid(Gibco)를 1 μM되도록 처리한 후 2시간동안 더 배양하여 총 검체처리기간이 24시간이 되도록 하였다. 0.05% trypsin-EDTA로 15 m*l* 원심분리관에 세포를 모은 후 1회 원심분리하고, 상등액은 버리고 침전된 세포에 37℃의 저장액(0.075 M KCl) 4 m*l*을 잘 현탁 시킨 후 37℃ 수조에 15～20분간 방치하고, 고정액(methanol : acetic acid=3 : 1)으로 3회 고정시킨 후 slide를 제작하여, 공기중에서 충분히 건조시킨 후 5% Giemsa로 15분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

대사활성 존재하의 시험은 CHL 세포를 60 mm의 petri dish에 1×10^5 cells/5 m*l*가 되도록 파종하여 3일간 배양한 후, 각각 S9 mix(배양액의 20% 비율)와 시험물질 또는 양성 대조물질이 포함된 배양액으로 6시간 배양한 후, 보통의 배양액으로 교환하여 18시간동안 더 배양하여 세포 수거 2시간 전에 colcemid를 처리한 후 세포를 수거, 슬라이드를 제작하였다.

양성대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 대사활성 부재하에서는 mitomycin-C 0.05 μg/m*l*을, 대사활성 존재하에서는 Benzo(a)pyrene 0.2 mg/m*l*을 사용하였다.

결과의 판정－한 시험 농도당 100개의 세포분열 중기상을 현미경하에서 관독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상(structural aberration)과 숫적이상(numerical aberration)으로 분류하고, 그것을 관찰하는 대상은 다음과 같다.

구조이상 : gap(염색분체형 ctg, 염색체형 csg)
염색분체절단(ctb)
염색분체교환(cte)
염색체절단(csb)
염색체교환(dicentric, ring 등 : cse)
숫적이상 : 배수체(polyploidy)

이상의 종류를 1개이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류는 각각 기록하였다. CHL세포의 경우 통상 음성대조군에서 염색체 이상을 가진 세포의 출현율은 3%를 초과하는 일이 거의 없다.[9-11] 그러므로 시험결과를 다음의 기준에 따라 평가하였다.

이상세포의 평균 출현율	최종판정
5%미만	음성(−)
5%이상 10%미만	의양성(±)
10%이상 20%미만	양성(+)
20%이상 50%미만	양성(++)
50%이상	양성(+++)

실험결과

국내에서 식용 및 외용색소로 실제 사용되고 있는 19종의 색소, 적색 102호, 적색103-1호, 적색 104-1호, 적색 201호의 바륨레이크, 적색 202호의 칼슘레이크, 적색 203호, 적색 204호, 적색 213호, 적색 215호, 등색203호, 적색 2호, 적색 3호, 적색 105-1호, 적색 218호, 적색 223호, 적색 220호, 적색 225호, 적색 226호, 적색 227호에 대하여 복귀돌연변이 시험과 염색체이상시험을 실시하였다.

복귀돌연변이 시험의 경우, 예비독성시험에서 결정된 용매 DMSO에 대한 최고 용해농도인 적색 102호는 333 μg/plate, 적색 103-1호는 10 mg/plate, 적색 104-1호는 33 mg/plate, 적색 201호의 바륨레이크는 3 mg/plate, 적색 202호의 칼슘레이크는 1.5 mg/plate, 적색 203호는 1.5 mg/plate, 적색 204호는 3.0 mg/plate, 적색 213호는 3.0 mg/plate, 적색 215호는 3.0 mg/plate, 등색 203호는 1.0 mg/plate, 적색 2호는 1 μg/plate, 적색 3호는 1 μg/plate, 적색 105-1호는 3.3 μg/plate, 적색 218호는 3.3 μg/plate, 적색 223호는 3.3 μg/plate, 적색 220호는 3.3 mg/ml, 적색 225호는 10 mg/ml, 적색 226호는 10 mg/ml, 적색 227호는 100 mg/ml를 공비 3으로 6단계 농도를 설정하여 Preincubation method로 실험한 결과 Table 2의 결과를 얻었다. 적색 204호는 대사활성계 존재하에서 돌연변이 유발성을 보였으며, 등색 203호는 대사활성계 존재유무와 관계없이 돌연변이 유발성을 나타내었다.

염색체이상 시험의 경우, 예비독성시험에서의 50% 세포독성을 보이는 농도는 적색 102호에서 6.0 mg/ml, 적색 103-1호는 0.25 mg/ml, 적색 104-1호는 0.125 mg/ml, 적색 201호의 바륨레이크는 250 μg/ml, 적색 202호의 칼슘레이크는 100 μg/ml, 적색 203호는 280 μg/ml, 적색 204호는 150 μg/ml, 적색 213호는 32.5 μg/ml, 적색 215호는 188 μg/ml, 등색 203호는 500 μg/ml, 적색 2호는 1.25 mg/ml, 적색 3호는 0.313 mg/ml, 적색 105-1호는 0.156 mg/ml, 적색 218호는 0.125 mg/ml, 적색 223호는 1 mg/ml, 적색 220호는 0.5 mg/ml, 적색 225호는 1 mg/ml, 적색 226호는 62.5 μg/ml, 적색 227호는 1mg/ml였다. 이들 농도를 최고농도로하여 공비 2로 3단계의 농도로 시험하여 검체처리 후 24시간 경과한 후에 염색체 표본 슬라이드를 제작한 결과 Table 3의 결과를 얻었다. 적색 104-1호와 적색 215호에서 의양성을 나타내었으나, 나머지 다른 색소들은 직접법 또는 대사활성화법에서 음성으로 나타났다.

고 찰

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀변이시험은 Ames 등에 의해 개발된 것으로 그 신속성, 간편성으로 인하여 *in vitro*에서의 돌연변이물질 검색법으로 현재 가장 널리 이용되고 있는 시험법이다. 동 시험법은 직접법과, 시험용균주를 시험물질의 용액에 노출시켜 37℃에서 일정시간 배양한 후 유전독성 검색용 배지에 상층배양하는 preincubation 법이 있다. 본 시험에서는 보다 높은 검색 감도를 기대하여 후자의 preincubation법을 채용하였다. 시험용 균주로는 시험물질의 균주특이적 변이유기에 의한 검출오류의 가능성을 배제하려는 배려에서 의약품 등의 유전독성 검색의 목적으로 널리 이용되고 있는 TA98, TA100, TA102,TA1535, TA1537의 5개

Table 2. Summary of test results for colorants, Ames test with *Salmonella typhimurium*

	TA 98		TA 100		TA 102		TA 1535		TA 1537	
	S9(−)	*S9*(+)	*S9*(−)	*S9*(+)	*S9*(−)	*S9*(+)	*S9*(−)	*S9*(+)	*S9*(−)	*S9*(+)
Red No. 102*	−	−	−	−			−	−	−	−
Red No. 102	−	−	−	−			−	−	−	−
Red No. 103-1*	−	−	−	−			−	−	−	−
Red No. 103-1	−	−	−	−			−	−	−	−
Red No. 104-1*	−	−	−	−				−	−	−
Red No. 104-1	−	−	−	−			−	−	−	−
Red No. 201. Ba-lake	−	−	−	−			−	−		
Red No. 202. Ca-lake	−	−	−	−			−	−		
Red No. 203	−	−	−	−			−	−		
Red No. 204	−	+	−	+			−	+		
Red No. 213	−	−	−	−			−	−		
Red No. 215	−	−	−	−			−	−		
Red No. 203	+	+	+	+			+	+		
Red No. 2	−	−	−	−			−	−		
Red No. 3	−	−	−	−			−	−		
Red No. 105-1	−	−	−	−			−	−		
Red No. 218	−	−	−	−			−	−		
Red No. 223	−	−	−	−			−	−		
Red No. 220	−	−	−	−	−	−				
Red No. 225	−	−	−	−	−	−				
Red No. 226	−	−	−	−	−	−				
Red No. 227	−	−	−	−	−	−				

S9(−), without *S9* mix; *S9*(+), with *S9* mix.

* Reagent grade purchased from Sigma Chemical Company.

균주를 선택하였다.

또한 화학물질의 유전독성을 검출하기 위한 시험으로서, 세포유전학적시험, 즉 염색체이상유발시험이 있는데 많은 연구결과들로부터, Ames test 등에서 유전자복귀 돌연변이를 유발하는 변이원의 많은 물질들이 염색체 절단작용을 같이 유날시키는 것으로 보고되고 있다. 현재 가장 일반적으로 배양세포를 이용한 *in vitro*시험으로 염색체 수가 비교적 적은 Chinese hamster 유래의 세포 CHO, CHL, DON, V79 등이 널리 사용되고 있는데 이들 시험의 장점으로는 시험방법이 간단하여 시간과 경비가 비교적 적게 들며, 검체의 처리농도와 처리시간을 정확하게 조절할 수 있는 점에 있다. 또한, *in vivo*계에 비해 일반적으로 감도가 높고, S9 mix의 사용으로 대사활성화 영향을 검색할 수 있으며, 보다 상세한 분석을 위하여, 방사선동위원소로 라벨한 DNA 전구물질을 병용함으로써 세포주기와의 관계등도 조사해 볼 수 있는 잇점이 있다. 본 연구과제에서는 일본 국립위생시험소로부터 분양받은 CHL세포를 이용하여 우리원에서 제정된 표준지침에 따라 염색체이상시험을 실시하였다. 두 시험계에 모두 1988년부터 2년간의 시험자료는 화장품에 사용되는 외용색소라는 특성을 고려하여 대사활성화법을 배제 하였으나, 그 이후 시험에서는 간접적인 경로의 복용을 고려하여 대사활성화법을 병용하였다. 시험물질의 선정은 국내에서 허용되고 있는 타르색소를 기준으로 일본[12-16]과 구미지역[17-24]에서 자체 평가되지 않았거나, 미생물계의 시험결과만 보고되어 있는 물질을

Table 3. Summary of test results for colorants, chromosome aberration test with CHL cells

Test compounds**	Frequencies (%) of aberrant cells						
	gap	ctb	cte	csb	cse	polyploid	total
without S9 mix							
Red No. 102*	1	2					3
Red No. 102	2						
Red No. 103-1*	3						3
Red No. 103-1	1				1		2
Red No. 104-1*	5	1				1	3
Red No. 104-1	1	1				1	3
Red No. 201. Ba-lake	1						1
Red No. 202. Ca-lake	2	1					3
Red No. 203	2	1					1
Red No. 204	1						1
Red No. 213	1						1
Red No. 215	7						7
Orange No. 203	1						1
Red No. 2	3						3
Red No. 3	2						2
Red No. 105-1	3						3
Red No. 218	3						3
Red No. 223	3						3
Red No. 220	2						2
Red No. 225	2						2
Red No. 226	2						2
Red No. 227							0
with S9 mix							
Red No. 2	2						2
Red No. 3	3						3
Red No. 105-1	5						5
Red No. 218	5						5
Red No. 223	5						5
Red No. 220		1					1
Red No. 225	1						0
Red No. 226							0
Red No. 227							0

gap, chromatid and isochromatid gap; ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange.

* Reagent grade purchased from Sigma Chemical Company.

** Data of these test materials were obtained from their highest dose showing 50% cytotoxicity.

선정하여 국내제조업소로부터 협조를 받아 사용하였고, 입수가 불가능한 경우는 시약용을 구입하여 사용하였다. 또한 *Salmonella typhimurium*을 이용한 Ames test의 경우, TA100을 이용한 예비독성시험을 통하여 세포독성이 없는 DMSO 용해최고농도를 얻어 공비 3으로 6단계 농도를 설정하여 실험하였다.

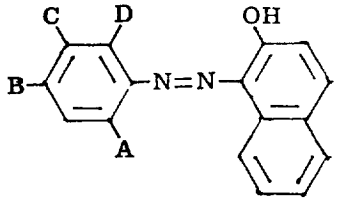

Figure 1. Structures of three azo dyes

Dyes	A	B	C	D
D&C Red No. 8	SO_3Na	Cl	CH_3	H
D&C Red No. 9	SO_3	Cl	CH_3	H
D&C Orange No. 17	H	NO_2	H	NO_2

모든 시험에서 용매 DMSO를 음성대조군으로 쓴 결과와 직접법에서 TA98에서는 2-nitrofluorene, TA 100과 TA1535에서는 sodium azide, TA102에서는 Mitomycin C, TA1537에서는 9-aminoacridine을 쓰고, 대사활성화법에서는 2-aminofluorene을 사용한 양성대조군의 결과는 모두 적절하게 나타났다. 각 색소의 Ames test 결과는 외용 색소인 적색 204호가 대사활성계 존재하에서 양성대조물질의 2~4배 정도의 복귀변이 집락수를, 등색 203호가 대사활성계 존재 유무와 관계없이 각 각 양성대조물질의 2~16배, 2.6~22배 정도의 복귀변이 집락수를 보여 유전독성을 나타내었다.

염색체이상시험의 경우에는, 시험물질이 배지에 잘 녹지 않을 경우에는 DMSO 1%를 함유한 배지에 용해시키고, 그 외에는 배지에 직접 용해시켜서 시험하였다. 배지에 대한 최고농도 1mg/ml을 최고농도로 하여, 50% 세포독성을 나타내는 농도를 예비독성시험을 통하여 얻은 후 이를 공비 2로 하여 3단계의 농도를 설정하여 실험하였다. 시험물질의 용해에 사용한 용매대조군(음성대조군)에서는 1% 이하의 염색체이상 유발율을 나타내었으며, 기지의 염색체이상 유발물질을 사용한 양성대조군에서 직접법의 Mitomycin C는 30% 이상, 대사활성화법에서는 Benzo(a)pyrene은 20% 이상의 염색체이상 유발율을 나타내어 일반적인 CHL세포에서의 시험결과와 일치하였다. 색소의 경우 외용색소인 적색 104-1호와 적색 215호가 직접법에서 6~10%의 염색체이상 유발율을 나타내어 의양성으로 판정되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 Ames test에서 적색 204호와 등색203호가, 염색체이상시험에서 적색 104-1호와 적색 215호가 의양성으로 판정되었는데, 적색 204호와 등색 203호, 적색215호는 FDA의 발암성 판정과 일치하는 결과를 나타내었고, 적색203호와 적색 213호, 적색 3호는 FDA의 발암성 판정과 다른 음성으로 나타났다. 이러한 불일치는 각종 유전독성시험의 결과와 발암성의 관련성을 연구해 온 보고[28]에서와 같이 과거로부터 현재까지 논란의 대상이 되는 것으로서, 각 유전독성 단기시험 결과간의 해석 및 발암성과의 관련은 시험의 성격에 따라 유전자 수준으로부터 단백질의 역할에 이른 총체적인 실험결과만이 말할 수 있는 것으로 사료된다. 적색 104-1호의 경우 Sigma Chemical Company로부터 구입한 시약의 경우 의양성을 보였으나, 국내 화장품에 사용되고 있는 화장품 원료급에서는 음성으로 판정되었다. 이러한 결과는 사용된 시험물질의 순도차이에 의한 것으로 보여진다. 본 실험에서 양성으로 나타난 색소와 FDA에서 암유발물질로 판정을 받은 색소들의 화학구조를 살펴 보면 적색 203호(D&C Red No. 8), 적색 204호(D&C Red No. 9), 등색 203호(D&C Orange No. 17)등은 azo dye(Fig. 1.)이며, 적색 213호(D&C Red No. 19), 적색 215호(D&C Red No. 37), 적색 104-1호(Phroxin B), 식용색소인 적색 3호(FD&C Red No. 3)는 xanthene dye(Fig. 2.)였다. Azo dye와 xanthene dye에 대한 전체적인 실험을 시행하지 않은 상태에서의 유추에 다소 무리가 있지만, 현재 본 실험실의 경우에서는 실험에 사용된 azo dye보다 xanthene dye에서 더 높은 비율의 유전독성을 나타내는 경향을 보여준다. 또한 Xanthene dye는 외용제제로 사용될 경우 광독성을 나타낼 가능성에 관한 보고[29]가 있으므로, 유전독성시험에서도 시험물질에 노출 후 특정의 광(형광)을 照射하여, 이에 따른 유전독성발현에 관한 영향도 재고되어야 할 것으로 생각된다.

본 실험은 1988년부터 1992년까지(1993년에도 실험 중) 계속적으로 진행된 것으로 국내에서 실제로 쓰이고 있는 색소의 유전독성을 검색, 판정해내는데 의미가 크다고 보여지나, Ames test 및 염색체이상시험만으로는 유전독성 전반에 관한 결론을 내리기에는 부족하며, 발암성시험을 위한 추출물질의 선택과정이라는 면에서 의의를 두며 유전독성에 관한 좀더 명확한 결론을 말하기 위해서는 동물의 말초

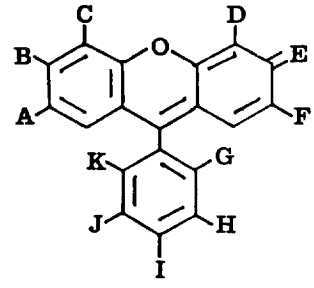

Figure 2. Structures of four xanthene dyes

Dyes	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
D&C Red No. 19	H	NEt_2	H	H	NEt_2Cl^-	H	COOH	H	H	H	H
D&C Red No. 37	H	NEt_2	H	H	$NEt_2C_{17}H_{35}COO^-$	H	COOH	H	H	H	H
FD&C Red No. 3	I	NaO	I	I	O	I	COONa	H	H	H	H
Phroxin B	Br	NaO	Br	Br	O	Br	COONa	Cl	Cl	Cl	Cl

혈액을 이용하는 자매염색분체교환실험, *in vivo* 소핵시험과 초파리 날개를 이용한 유전독성 시험[30,31] 등을 추가로 시행하여 포괄적인 결과로부터 결론을 내려야 한다고 사료된다. 그 결과 양성을 나타낸 물질에 대하여는 실험동물을 이용한 장기 발암성에 관한 연구가 추진되어야 할 것이다. 또한 본 실험에 사용된 색소 이외의 더 많은 식용 및 외용색소에 대한 유전독성시험과 azo dye와 xanthene dye[32,33] 등과 같은 화학구조별 연구도 더욱 진행되어야 할 과제이다.

국문요약

국내에서 실제 사용되고 있는 22가지의 식용 및 외용색소에 대하여 유전독성실험을 실시하였다. *Salmonella typhimurium*을 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)과 Chinese hamster lung cell을 이용한 염색체이상 시험을 시행한 결과 Ames test에서는 등색 203호(D&C Orange No. 17)가 대사활성계의 존재 유무와 관계없이 돌연변이 유발성을 보였고, 적색 204호(D&C Red No. 9)는 대사활성계의 존재하에서 돌연변이 유발성을 나타내었다. 염색체이상 시험에서는 적색 104-1호(Phroxin B)의 시약급과 적색 215호(D&C Red No. 37)가 의양성을 나타내었다.

참고문헌

1. Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, W., Speck, W. and Zeiger, E.: *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals, *Environ. Mutagenesis*, supplement. 3-142 (1983).
2. OECD: OECD *Guideline for testing of chemicals*. **471**, 1 (1983).
3. Dean, B.J., Books, T.M., Hodson-Walker, G. and Hutson, D.H.: Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. *Mutation Research*, **153**, 57 (1985).
4. Kier, L.E., Brusick, K.J., Auletta, E.S. and Von Halle: The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay-A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, **168**, 69 (1986).
5. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut. Res.*, **113**, 173 (1983).
6. Claxton, L.D., Allen, J. and Auletta, A.: Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutation Research*, **189**, 83 (1987).

7. Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K.: *Salmonella* Mutagenicity Tests IV. Results from the Testing of 300 Chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **11**, suppl. **12**, 1 (1988).
8. Ishidate Jr., M. and Sofunim, T.: The *in vitro* chromosomal aberration test using Chinese Hamster Lung(CHL) fibroblast cells in culture. *Mutation Research*, **5**, 427 (1985).
9. Margolin, B.H.: Statistical analysis for *in vitro* cytogenic assays using Chinese Hamster Ovary cells. *Environmental Mutagenesis*, **8**, 183 (1986).
10. Gulati, D.K.: Test for the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in cultured Chinese Hamster Ovary(CHO) cells. *Mutation Research*, **5**, 413 (1985).
11. Ishidate Jr., M.: 食品添加物의 變異原成 試驗成績 (2報). 變異原과 毒性, **4**(6), 80 (1982).
12. Ishidate Jr., M.: 食品添加物의 變異原成 試驗成績 (3報). 變異原과 毒性, **5**(6), 579 (1982).
13. Ishidate Jr., M.: 食品添加物의 變異原成 試驗成績 (4報). 變異原과 毒性, **6**(6), 671 (1983).
14. .Ishidate Jr., M.: 食品添加物의 變異原成 試驗成績 (5報). 變異原과 毒性, **7**(6), 634 (1984).
15. Ishidate Jr., M.: 食品添加物의 變異原成 試驗成績 (6報). 變異原과 毒性, **8**(6), 705 (1985).
16. Brown, J.P., Dietrich, P.S. and Bakner,C.M.: Mutagenicity testing of some drug and cosmetic dye lakes with the *Salmonella*/mammalian microsome assay. *Mutation Research*, **66**, 181-185 (1979).
17. Anon: FD & C Red 3 is carcinogenic in rats. NTP *paper reviewers conclude, Food Chem. News*. **25**, 50 (1983).
18. Au, W. and Hsu, T.C.: Studies on clastogenic effects of biological strains and dyes. *Environ. Mutagenesis*, **1**, 27 (1979).
19. Auletta, A.E. and Kuzava, J.M.: Lack of mutagenic activity of a series of food dyes for *Salmonella typhimuriun*. *Mut. Res.*, **56**, 203 (1977).
20. Bonin, A.M. and Baker, R.S.U.: Mutagenicity testiong of some approved food additives with *Salmonella*/microsome assay. *Food Technical*. Aust., **32**, 608 (1980).
21. Brown, J.P., Rohem, G.W. and Brown, R.J.: Mutagenicity testing of certified food colors and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the *Salmonella* microsome system. *Mut. Res.*, **56**, 249 (1978).
22. Butterworth, K.R., Gaunt, I.F., Grasso, P. and Gangolli, S.D.: Acute and short term toxicity studies of Erythrosine BS in rodents. *Food Cosmet. Toxicol.*, **14**, 525 (1976).
23. Sankaranarayanan, N. and Murthy, M.S.S.: Testing of some permitted food colours for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mut. Res.*, **67**, 309 (1979).
24. Lin, G.H.Y. and Brusick, D.J.: Mutagenicity studies on FD&C Red No. 3. *Mutagenesis*, **1**, 253 (1986).
25. Matula, T.I. and Downie, R.H.: Genetic toxicity of erythrosine in yeast. *Mut. Res.*, **138**, 153 (1984).
26. Price, P.J., Suk, W.A., Freeman, A.E., Lane, W.T., Peters, R.L., Vernon, M.L. and Huebner, R.J.: *In vitro* and *in vivo* indications of the carcinogenicity and toxicity of food dyes. *Int. J. Cancer*, **21**, 361 (1978).
27. Rosenkranz, H.S., Zhang, Y.P. and Klopman, G.: Implications of newly recognized relationships between mutaenicity, genotoxicity and carcinogenicity of molecules. *Mut. Res.*, **250**, 24 (1991).
28. Konishi, H.: 培養細胞を用いたXanthene系色素の光毒性研究. 信州醫誌, **29**(4), 386 (1981).
29. Lindsey, D.L. and Grell, E.H.: Genetic variations of *Drosophila melanogaster. Carnegie Inst. Wash. Publ.*, **627**, 472 (1968).
30. Lindsley, D.L. and Zimm, G.: The genome of *Drosophila melanogaster*. Part 1 : A-K. *Drosophila Inform. Serv.*, **62**, 1 (1985).
31. Luck, H., Wallnofer, P. and Bach, H.: Food additives and mutagenic effects, 7. Investigations of some xanthene dyes for mutagenic effects in *E. coli*. *Pathol. Microbiol.*, **26**, 206 (1963).
32. Combes, R.D. and Haveland-Smith, R.B.: A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mut. Res.* **98**, 101 (1982).
33. Chung, K.T. and Cerniglia, C.E.: Mutagenicity of azo dyes: structural-activity relationships. *Mut. Res.*, **277**, 201 (1992).