J. Fd Hyg. Safety, 13(2), 135 - 142(1998)

외용색소의 유전독성에 관한 연구(2)

하광원† · 김명희 · 오혜영 · 허옥순 · 한의식
식품의약품안전청 독성연구소 유전독성과

Mutagenicity Studies of Cosmetic Dyes (2)

Kwang-Won Ha†, Myung-Hee Kim, Hye-Young Oh, Ok-Soon Heo and Eui-Sik Han
Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

ABSTRACT — The mutagenicity of three external colorants, lake red CBA (D&C Red No.9, R-9), rhodamine B stearate (D&C Red No.37, R-37) and permanent orange (D&C Orange No.17, O-17) was evaluated. In this study, the genetic toxicity of the these dyes was examined by *in vitro* chromosome aberration test in cultured mammalian cells, *in vivo* micronucleus test in ddY mice, and somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. Three dyes did not induce mutagenicity in chromosome aberration test and micronucleus test. But Red No. 9 and Red No. 37 showed slight increase of abnormal wing spots in *Drosophila melanogaster*.

Key words External colorants, Chromosome aberration test, Micronucleus test, Somatic mutation and Recombination Test

현대 산업사회의 발달과 함께 많은 합성화학물질이 등장하게 되었고 이들의 사용량이 늘어감에 따라 환경을 오염시키고 인체에도 직·간접적으로 노출되어 암 등의 여러 가지 질환의 원인이 되고 있다.[1] 합성화학물질은 천연물질의 단점을 보완하는 목적으로 발달하기 시작하였으나, 그에 따르는 부작용으로 인체에 위해한 경우가 생겨나게 되자 이들에 대한 안전성 문제가 대두되고 있다. 특히 식품, 의약품과 화장품 등에서 광범위하게 사용되고 있는 합성타르색소는 미량이지만 인체에 다양한 경로로 흡수되어 불특정다수에게 지속적으로 노출되고 있어 안전성평가의 중요성이 커지고 있다. 또한 암을 포함한 여러 질환이 세포내 유전물질의 손상으로부터 기인되고, 이러한 손상이 차세대에까지 유전될 수 있다는 사실로부터 물질의 유전독성평가가 요구되고 있다.

색은 기호성을 좌우하는 중요한 요인 중의 하나로서 천연색소와 합성타르색소로 분류한다. 천연색소는 가격이 비싸고 공급도 불충분하며 가공이나 유통과정 중 색의 변색, 탈색을 일으키는 단점들로 인하여 화학적 안정성이 우수하며 저렴한 가격으로 충분한 공급이 가능한 합성타르색소가 널리 사용되고 있다. 합성타르색소는 대부분 립스틱, 입술전용 화장품, 눈 전용 화장품, 크림, 로션, 파우더 등의 화장품이나 샴푸, 린스, 컨디셔너, 머리염색제 또는 매니큐어 등의 외용으로 널리 쓰이고 있으나 적색40호와 같이 식용으로도 사용되고 있다.[2,3]

이러한 합성타르색소는 생체기능에 변화를 가져오고 유전적인 영향을 미치게 된다는 보고[4]도 있다. 이들에 대한 돌연변이 유발성 및 발암 가능성에 대한 중요성이 커짐에 따라 미국의 FDA(Food and Drug Administration), 일본의 후생성에서는 합성타르색소에 대한 유전독성 검색을 활발히 수행하고 있으며 국내에서도 유전적 위험평가에 대한 연구의 관심이 증가하여 각종 화학물질에 대한 안전성이 검토되고 있으므로 실제 국내에서 사용되어지고 있는 합성타르색소에 대한 유전독성평가의 중요성은 크다.

본 연구자들은 제 1보에서 미국 FDA의 동물실험결과 발암성 물질로 판정을 받은 적색203호, 적색204호, 적색213호, 적색215호, 등색203호, 적색3호를 포함시킨 22가지의 색소를 Salmonella Typhimurium을 이용한 복귀돌연변이시험을 실시하여 적색204호는 대사활성계 존재 하에서 돌연변이 유발성을 보였으며, 등색203호는 대사활성계 존재유무와 관계없이 돌연변이 유발성을 나타내었음을 보고하였고 Chinese hamster lung cell을 이용한 염색체이상시험을 실시하여 적색104-1호와 적색215호에서 의양성을 나타내었음

†Author to whom correspondence should be addressed.

을 보고한 바 있다.[5]

본 실험에서는 미국 FDA에서 발암판정을 받은 것 중 국내에서 화장품 색소 원료로 계속 사용되어지고 있는 적색204호, 적색215호, 등색203호의 3가지 색소에 대하여 국내 화장품회사에서 현재 원료로 사용하고 있는 색소를 시험물질로 선정하여 유전독성 단기검색법중 *in vitro* 시험으로 대표적인 Chinese hamster lung(CHL) 세포에서의 염색체이상시험과 *in vivo* 시험으로 ddY mouse를 이용한 소핵시험 및 초파리 날개를 이용한 체세포돌연변이 재조합 시험을 이용하여 유전독성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

시험물질

적색204호(R-9, lake red CBA), 적색215호(R-37, rhodamine B stearate), 등색203호(0-17, permanent orange)의 3가지 색소를 국내 화장품회사(주식회사 태평양)에서 공급받아 사용하였다.

시험물질들은 염색체이상시험의 경우에는 DMSO를 용매로 사용하였으며, 소핵시험의 경우는 생리식염수를 용매로 사용하였고, 체세포 돌연변이시험의 경우는 멸균수를 용매로 사용하였다.

CHL 배양세포를 이용한 염색체이상시험

사용세포 및 배양방법—사용한 포유동물 세포는 Chinese hamster lung(CHL) cell로서 일본 국립의약품식품 위생시험소의 Sofuni 박사로부터 분양 받아 사용하였다. Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다. 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)과 1%의 antibiotic-antimycotic용액(100x 용액)을 포함한 Eagle's minimum essential medium (EMEM)을 사용하여, 포화 습도 하에서 5% CO_2를 공급하는 37°C의 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 3~5일마다 0.05% trypsin-EDTA 용액을 이용하여 계대유지하였다.

대사활성계—*In vitro* 대사활성화를 위하여 S-9 mix를 제조하였다. S9의 제조는 Maron and Ames의 방법[6]에 따라, 식품의약품안전청에서 생산 및 사육한 SPF계 Sprague Dawley male rat(7주령, 약 250 g)를 10일간 예비 사육한 후, corn oil에 희석시킨 Aroclor-1254(200 mg/m*l*)를 1회 복강투여(500 mg/kg)하고, 투여후 6일째에 경추탈구에 의하여 도살하였다. 적출한 간 중량의 3배량의 냉각한 0.15 M KCl용액을 넣어 균질화 하고, 9,000 g에서 10분간 원심 분리한 후 그 상등액을 S-9으로 하였다. 이상의 모든 과정은 고압증기 멸균한 용액과 초자류를 사용하여 무균적으로 행하였다. S-9 mix는 각 시험 개시 직전에 조제하여 사용하였고, 그 조성은 증류수 2.35 m*l*, 0.1 M HEPES(pH 7.55) 0.2 m*l*, 0.1 M NADP 0.2 m*l*, 0.1 M glucose-6-phosphate 0.25 m*l*, $MgCl_2$-KCl salt solution 0.5 m*l*, S-9 1.5 m*l*이었다.

예비독성시험-배양세포의 50% 증식억제농도를 구하였다. 세포 계대시에 1회용 24 well plate에 1 well당 1×10^4개의 세포를 파종하여 2일간 배양한 후, 한 농도당 4개의 well을 할당하고 시험물질을 0.5% DMSO를 함유한 배양액으로 용해하여 최고용해도인 1 mg/m*l*을 최고농도로 하여 공비 2로 5단계의 농도를 설정하였다. 6번째의 well은 무처리 대조군으로 하였다. 검체처리 후 37°C에서 24시간 배양한 후 배지를 버리고 미리 37°C 수욕상에서 가온한 dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS) 0.5 m*l*로 2회 세척한 후 메탄올로 10분간 고정하여 5% Giemsa용액(p H6.8의 1/150 M의 phosphate buffer)으로 30분간 염색한 후 현미경으로 관찰하여 50% 세포독성을 보이는 농도를 구하였다. 1차 예비독성시험에서 대략의 50% 세포독성을 보이는 농도를 결정한 후, 다시 좁은 농도 구배에서 2차 예비독성시험을 실시하였다.

염색체이상시험—예비독성시험에서 결정된 50% 세포독성농도를 최고농도로하고, 공비2로 3단계의 농도를 시험농도로 하였다. 또한, 무처리 대조군과 기지의 양성대조군을 두었으며, 대사활성 존재 하에서 시험하였다. 대사활성존재하의 시험은 CHL 세포를 60 mm의 petri dish에 5×10^4 cells/m*l*가 되도록 파종하여 3일간 더 배양한 후, 각각 S-9 mix (배양액의 20% 비율)와 시험물질 또는 양성 대조물이 포함된 배양액으로 6시간 배양한 후, 보통의 배양액으로 교환하여 18시간동안 더 배양하여 세포 수거 2시간 전에 colcemid를 처리한 후 세포를 수거, 슬라이드를 제작하였다. 양성대조군으로는 benzo(α)pyrene 0.2 mg/m*l*을 사용하였다.

결과의 판정—한 시험 농도당 100개의 세포분열 중기 상을 현미경하(×1000)에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상(structural aberration)과 숫적이상(numerical aberration)으로 분류한다. 염색체이상중 구조적이상은 염색체형(chromosome type)과 염색분체형(chromatid type)으로 구분되며 그것을 관찰하는 대상은 gap(염색분체형 ctg, 염색체형 csg), 염색분체절단(ctb), 염색분체교환(cte), 염색체절단(csb), 염색체교환(cse)이 있고, 숫적이상에는 배수체(polyploidy)가 있다. 본 실험에서는 일차 분열한 염색체(first metaphase)에서의 이상빈도(number of aberration)와 이상세포수(number of abnormal cells)로 구분하여 관찰하였다. 이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류는 각각 기록하였다. CHL세포의 경우 통상 음성대조군에서 염색체

이상을 가진 세포의 출현율은 3%를 초과하는 일이 거의 없다.[7] 결과의 판정은 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.[8]

Mouse를 이용한 소핵시험

시험동물—식품의약품안전본부 실험동물실에서 생산하여 사육한 SPF계 ddY mouse 암, 수 5주령 이상 된 것을 공급받아 10일간 예비 사육하면서 발육상태를 관찰하고 체중을 측정하여, 25~35 g에 해당하는 정상동물을 실험에 사용하였다. 사육실 환경은 온도 23±2°C 상대습도 55±5%, 배기 10~18회/hr, 명암교대 약 12시간, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(70W×240L×120H mm)케이지에 10마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 고형사료(신촌사료:주 조성-조단백 25.00%, 조지방 6.13%, 조섬유 3.38%, 조회분 8.00%, 칼슘 1.40%, 인 1.08% 등)를 구입하여 고압증기 멸균기에서 121°C, 15분간 멸균한 다음 실험동물에 자유로이 공급하였다. 또한 음료수는 상수를 자유로이 섭취하게 하였다.

예비시험—본시험에서의 투여량 결정을 위하여 한 군에 수컷 3마리씩을 배정하고, 시험물질의 경우 각 군의 mouse에 용매 및 시험물질 투여시 50% 치사량(LD_{50})의 1/2 농도를 최고농도로 하고 공비 2로 하여 LD_{50}의 1/4, 1/8 농도를 1회 강제 경구투여 하였다. 시험물질은 용매인 생리식염수로 희석하여 투여하였다. 투여 후 24시간에 골수를 채취하여 도말 표본을 제작하고 4% Giemsa 용액으로 염색하여 광학현미경하에서 1,000개의 다염성 적혈구에서의 소핵 출현빈도수를 계수하였으며 골수채취시 까지 치사한 동물이 없고, 소핵의 출현빈도수가 가장 많은 투여량을 본시험에서의 최고 투여량으로 결정하였다. 음성대조군으로는 생리식염수를 사용하여 강제 경구투여 하였고, 양성대조군은 mitomycin C(MMC) 2 mg/kg을 복강내 투여하였다.

본시험—각 시험물질에 대한 본시험은 예비시험으로부터 얻은 125 mg/kg을 최고농도로 하여 공비 2의 농도인 62.5, 31.25 mg/m*l*의 3농도 군으로 실시하였다. 각 시험물질을 농도처리 군당 수컷 5마리씩 1회 강제 경구투여한 후 24, 48시간째에 골수를 채취하여 관찰하였다. 또한 24시간 간격으로 2회 경구 투여하고 1회 투여 후 30시간과 48시간 후 골수를 채취하여 관찰하였다.

골수세포 표본의 제작 관찰 및 평가—Schmid의 방법[9]에 따라 골수표본을 제작하였다. 경추탈구에 의해 도살한 mouse의 양쪽 대퇴골로부터 0.5 m*l*의 FBS을 주입한 1 m*l*용 1회용 주사기(23 gauge 주사침 사용)를 삽입하여 골수를 채취한 후, 골수세포 부유액을 1.000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 슬라이드에 떨어뜨려 도말하고, 공기 중에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 건조가 끝난 표본을 Giemsa액(Gurr R-66, pH 6.8의 1/150 M phosphate buffer에 4%(v/v)로 제조한 것)에 30분간 염색하였다. 염색후 동일 완충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산수용액에 다시 수초간 세척한 다음, 증류수에 수회 세척하고 공기 중에서 건조시켰다. Mouse 1개체당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 1,000개의 다염성적혈구중에서 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유핵세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

결과의 통계분석은 Hayashi 등의 방법[10]에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하였다. 1, 2단계의 비교자료 활용에 의한 검정을 거쳐, 3단계에는 음성대조군과 시험물질 투여 군과의 소핵을 가진 적혈구의 출현빈도에 관한 유의 차를 Cochran Armitage 경향 검정을 행하였다(유의수준 0.05 미만).

초파리를 이용한 Somatic mutation and Recombination Test

초파리—스위스의 독성연구소의 Dr. U. Graf로부터 분양받은, 제3 염색체의 left arm에 marker를 갖는 *mwh*와 *flr*^{3}/*In(3LR)TM3, Ser* 2종류의 *Drosophila melanogaster*를 사용하였다. 이들의 유전적 marker에 관해서는 Lindsley & Grell(1968),[11] Garcia-Bellido & Dapena(1974)[12]와 Lindsley & Zimm(1985)[13]이 설명하였다. 이들 초파리는 standard corn meal media(agar 8 g, corn meal 70 g, sugar 100 g, yeast 15 g, ebiose 15 g, propionic acid 4 m*l*, D. W. 1,000 m*l*)가 담긴 well-yeasted 배양 병에서 온도 25°C, 습도 60%의 환경에서 사육하였다.

예비시험—신선한 배지가 담긴 배양병에 *mwh* 종의 암컷 40마리와 *flr*^{3}/*In(3LR)TM3, Ser* 종의 수컷 40마리를 넣어주고 12시간 후에 배양병의 성충을 새 배양병에 옮겨, 8시간 후 배양병으로부터 성충을 제거하고 알이 성장하도록 하였다. 3일후, 애벌레(larvae)가 72±4시간 되었을 때 애벌레를 20% NaCl 수용액으로 세척한 후 증류수로 다시 세척하였다. Instant medium 1.5 g과 5 m*l* 시험물질이 담긴 vials에 약 200마리 정도의 애벌레를 넣어 성충이 나타날 때까지 사육하여 200개의 애벌레에 대한 살아있는 성충의 숫자로서 LD_{50}을 구하였다. 용매대조군으로는 증류수를 사용하며 양성대조군으로는 0.625 mM MMC 수용액을 사용하였다.

본시험—시험법은 Graf 등의 방법[14]에 따라 실시하였다. Trans-heterozygous larvae를 얻기 위해 *mwh* 암컷을 *flr³/In(3LR)TM3, Ser* 수컷과 8시간 동안 교배시킨 다음 얻은 *mwh-flr³*(non-serate trans-dihybrid flies), *mwh-TM3, Ser* (serate flies heterozygous for both mwh and the multiple inversions contained in TM)종으로부터 생성된 알을 well-yeasted culture bottles에서 8시간 동안 수집하였다. 애벌레가 72±4시간 되었을 때 20% NaCl 수용액으로 세척하여 애벌레만 수집하였다. 애벌레는 instant medium 1.5 g(Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC)에 시험물질 5 m*l*을 처리한 시험관 속에 약 200마리씩 넣어 사육하였다. 성충이 되어 나온 초파리는 70% ethanol에 저장하였다. Trans-heterozygous(mwh+/+flr³) genotype의 초파리의 양쪽날개를 입체현미경하에서 fauer's solution(gum arabic 30 g, glycerol 20 m*l*, chloral hydrate 50 g in D.W 50 m*l*)으로 슬라이드에 고정시켰다. 고정된 슬라이드를 37°C에서 24시간 방치 후에 cover glass로 덮고 그 위에 약 200 g의 납으로 된 추를 올려놓아 고정시켰다. 광학현미경을 사용하여 400배의 배율로 mosaic spot의 출현을 관찰한 다음 multiple wing hair(mwh)나 flare(flr³) 표현형을 보이는 single spot과, mwh와 flr³부분이 인접한 twin spot으로 나누어 기록하였다.

Single spot은 두 지표사이의 mitotic recombination이나 somatic gene mutation에 의해 생성된다. Spot의 크기는 mutant phenotype을 보이는 wing cell의 수를 세어 결정하였다. 1~2 cell 이하의 spot은 small single spot로, 2 cell 이상은 large single spot로 나누었다. 결과의 통계적 처리는 χ^2-test를 실시하였으며, 5% 유의수준에서 판정하였다.

결 과

염색체이상시험

세포독성시험으로부터 얻은 50% 세포독성을 보이는 농도를 각 김체의 최고농도로 하였으며 공비 2의 3단계 농도로 시험하였다. 즉, 적색204호는 150, 75, 37.5 μg/m*l* 농도로, 적색215호는 188, 94, 47 μg/m*l* 농도로, 등색203호는 500, 250, 125 μg/m*l* 농도로 시험한 결과, 용매대조군에서는 1% 이하의 염색체이상 유발율을 나타내었으며, 양성대조군에서는 20% 이상의 염색체이상 유발율을 나타내어 일반적인 CHL세포에서의 시험결과와 일치하였다. 적색204호, 적색215호, 등색203호는 전 용량에서 이상세포의 평균출현율이 5% 미만으로 나타나 음성의 결과를 보여 유전독성을 나타내는 변이원으로서는 작용하지 않는 것으로 나타났다(Table 1).

소핵시험

소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도에 있어서 양성대조군은 6.75%의 소핵유발율을 나타내어 Hayashi 등[15]의 참고자료의 상, 하한의 범위 내에 들었으며, 용매대조군(생리식염수)에서는 0.05%로 일반적인 음성대조군의 소핵유발율을 나타내었다. 적색204호, 적색215호, 등색203호를 1회 경구투여한 후 24시간 후에 골수를 채취하여 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도를 관찰한 결과 적색204호, 적색215호, 등색203호의 모든 군에서 세포독성을 나타내는 PCE/PCE+NCE 비율이 0.52~0.56으로 용매대조군인 0.55와 비슷한 수준으로 나타났다. 125 mg/kg에서는 적색204호는 0.35, 적색215호는 0.60, 등색203호는 0.15의 MNPCE(%) 유발율

Table 1. Chromosome aberration test of lake red CBA, rhodamine B stearate and permanent orange with Chinese hamster lung cell

Treatment (μg/m*l*)	Types of aberration (%)							No. of aberration cells* (mean±S.D.)
	gap	ctb	cte	csb	cse	pol	nor	
DMSO	0.5±0.6		0.3±0.5				99.3±0.5	0.8±0.50
R-9 150	0.8±1.0		0.3±0.5				99.0±0.8	1.0±0.82
75	0.5±0.6	0.3±0.5	0.3±0.5				99.0±0.0	1.0±0.00
37.5	0.5±0.6		0.5±0.6				99.3±0.8	1.0±0.82
R-37 188	0.8±0.5		0.3±0.5				99.0±0.8	1.0±0.00
94	0.3±0.5		0.5±0.6				99.3±0.5	0.8±0.50
47	0.5±0.6		0.5±0.6				99.0±0.8	1.0±0.82
O-17 500	0.3±0.5		0.5±0.6				99.3±0.5	0.8±0.50
250	0.5±0.6		0.3±0.5				99.3±0.5	0.8±0.50
125	0.5±0.6		0.5±0.6				99.0±0.0	1.0±0.00
B(α)P	9.8±5.1	1.3±1.0	10.0±3.0		1.3±1.5		77.3±5.0	24.8±6.50

gap: chromatid and isochromatid gap, ctb: chromatid breakage, cte: chromatid exchange, csb: chromosome breakage, cse: chromosome exchange, pol: polyploid, nor: normal, DMSO: dimethyl sulfoxide, B(α)P: benzo(α)pyrene, R-9: lake red CBA, R-37: rhodamine B stearate, O-17: permanent orange, number of cells analyzed: 100, *mean±standard deviation (n=4).

을 보여주었으나 유의성은 없었다(Table 2).

또 각 검체를 1회 경구투여한 후 48시간 후에 골수를 채취하여 소핵유발율을 관찰한 결과 125, 62.5, 31.3 mg/kg의 농도에서, 각각 적색204호는 0.30, 0.15, 0.15%, 적색215호는 0.1, 0.1, 0.05%, 등색203호는 0.1, 0.05, 0.05%의 소핵유발율을 나타내었다. 또한, 1회 경구투여 후 24, 48시간 후의 mouse 도살시간을 달리한 경우, 소핵유발율의 차이는 적색204호, 적색215호, 등색203호 모두 유의성을 나타내지는 않았으나 48시간 처리군은 24시간 처리군보다 MNPCEs비율이 전 농도에서 약간 낮아지는 경향을 나타내었다(Table 2).

한편, 각 검체를 24시간 간격으로 2회 경구투여하였고 1회 경구투여후 30시간, 48시간 후에 각각 골수를 채취하여 소핵유발율을 관찰하였다. 30시간 후 골수를 채취한 경우, 125, 62.5, 31.3 mg/kg의 각 농도에서 적색204호는 0.15, 0.10, 0.05, 적색215호는 0.25, 0.10, 0.10, 등색203호는 0.15, 0.05, 0.05%의 소핵유발율을 나타내었고, 48시간 후 골수를 채취한 경우, 각 농도에서 적색 204호는 0.05, 0.05, 0, 적색215호는 0.05, 0.10, 0, 등색203호는 전 농도에서 0.05%의 소핵유발율을 나타내었다. 이러한 결과는 모두 유의성이 없었고 시험물질 투여에 의한 어떠한 독성 징후도 관찰되지 않아 유전독성을 나타내지 않는 것으로 판단되었다. 또한, 2회 경구투여한 후 30, 48시간으로 도살시간을 달리한 경우에 따른 소핵유발율의 차이는 적색204호, 적색215호, 등색203호의 경우 모두 전 농도에서 큰 차이를 나타내지 않았으나 125 mg/kg에서는 30시간 보다 48시간의 경우가 소핵유발율이 전체적으로 낮게 나타났다(Table 3).

Table 2. Micronucleus test of lake red CBA, rhodamine B stearate and permanent orange with ddY mice

Test Compound	Sex	Dose (mg/kg)	No. of mice	Sampling time (hr)	MNPCE (%) (Mean ±S.D.)	Ratio of PCE/PCE+NCE (Mean±S.D.)
Saline	male	0.0	5	24	0.05±0.07	0.55±0.00
R-9	male	125.0	5	24	0.35±0.21	0.54±0.01
		62.5	5	24	0.20±0.14	0.55±0.02
		31.3	5	24	0.15±0.07	0.55±0.01
R-37	male	125.0	5	24	0.60±0.28	0.53±0.01
		61.5	5	24	0.55±0.21	0.56±0.04
		31.3	5	24	0.30±0.14	0.54±0.02
O-17	male	125.0	5	24	0.15±0.07	0.54±0.00
		61.5	5	24	0.05±0.07	0.52±0.00
		31.3	5	24	0.05±0.07	0.54±0.03
Mitomycin C	male	2.0	5	24	6.75±0.35	0.56±0.02
Saline	male	0.0	5	48	0.05±0.07	0.54±0.00
R-9	male	125.0	5	48	0.30±0.14	0.56±0.04
		62.5	5	48	0.15±0.07	0.55±0.01
		31.3	5	48	0.15±0.07	0.54±0.04
R-37	male	125.0	5	48	0.10±0.00	0.58±0.03
		61.5	5	48	0.10±0.14	0.58±0.02
		31.3	5	48	0.05±0.07	0.57±0.01
O-17	male	125.0	5	48	0.10±0.00	0.54±0.02
		61.5	5	48	0.05±0.07	0.52±0.01
		31.3	5	48	0.05±0.00	0.52±0.00
Mitomycin C	male	2.0	5	48	5.50±0.49	0.53±0.00

MNPCE %: micronucleated polychromatic erythrocytes/100 polychromatic erythrocytes, PCE/PCE+NCE: polychromatic erythrocytes/1000 erythrocytes, R-9: lake red CBA, R-37: Rhodamine B stearate, O-17: permanent orange.

Table 3. Micronucleus test of double treatment of lake red CBA, rhodamine B stearate and permanent orange with ddY mice

Test Compound	Sex	Dose (mg/kg)	No. of mice	Sampling time (hr)	MNPCE (%) (Mean ±S.D.)	Ratio of PCE/PCE+NCE (Mean±S.D.)
Saline	male	0.0	5	30	0.05±0.07	0.56±0.04
R-9	male	125.0	5	30	0.15±0.07	0.54±0.03
		62.5	5	30	0.10±0.00	0.54±0.00
		31.3	5	30	0.05±0.07	0.57±0.01
R-37	male	125.0	5	30	0.25±0.35	0.54±0.02
		61.5	5	30	0.10±0.14	0.56±0.01
		31.3	5	30	0.10±0.00	0.56±0.02
O-17	male	125.0	5	30	0.15±0.14	0.54±0.06
		61.5	5	30	0.05±0.07	0.57±0.01
		31.3	5	30	0.05±0.07	0.59±0.01
Mitomycin C	male	2.0	5	30	6.60±0.28	0.51±0.00
Saline	male	0.0	5	48	0.05±0.07	0.55±0.40
R-9	male	125.0	5	48	0.05±0.07	0.53±0.03
		62.5	5	48	0.05±0.07	0.55±0.02
		31.3	5	48	0.00±0.00	0.57±0.01
R-37	male	125.0	5	48	0.05±0.07	0.55±0.00
		61.5	5	48	0.10±0.00	0.54±0.05
		31.3	5	48	0.00±0.00	0.56±0.01
O-17	male	125.0	5	48	0.05±0.07	0.58±0.02
		61.5	5	48	0.05±0.07	0.54±0.01
		31.3	5	48	0.05±0.07	0.55±0.01
Mitomycin C	male	2.0	5	48	6.10±0.21	0.55±0.01

MNPCE %: micronucleated polychromatic erythrocytes/100 polychromatic erythrocytes. PCE/PCE+NCE: polychromatic erythrocytes/1000 erythrocytes, R-9: lake red CBA, R-37: rhodamine B stearate, O-17: permanent orange, *Lake red CBA, rhodamine B stearate and permanent orange was administered twice (at 24 hours and 6 hours before sacrifice) for 2 days. ddY mice bone marrow cell was collected at 6 hours after last treatment.

초파리를 이용한 Somatic mutation and Recombination Test

예비시험을 통해 얻은 LD_{50} 이하의 최대허용농도인 100 mg/m*l*을 최고농도로 하여 50, 25 mg/m*l*의 3농도로 처리한 시험관으로부터 성충이 되어 나온 초파리를 70% 에탄올에 저장하여 슬라이드를 제작하여 관찰한 결과를 나타내었다 (Table 4). Single small spot의 출현빈도는 적색204호, 적색215호 및 등색203호에서 모두 최고농도인 100 mg/m*l* 농도에서 $p<0.05$의 유의수준에서 증가양상을 보였다. 한편, twin spot의 빈도수는 적색204호는 50 mg/m*l* 농도에서, 적색215호는 100 mg/m*l* 농도에서 $p<0.05$의 유의수준에서 증가양상을 보였고 등색203호는 전 농도에서 유의수준에서 증가양상을 나타내지 않았다. 또한, 증류수를 사용한 용매대조군에서 발생하는 자연발생변이 spot의 빈도 수는 small single spot이 0.18%, large single spot이 0.02%, twin spot이 0%로 나타났다. 또한, 각 세포분열단계에서 일어나는 변이를 알 수 있는 spot의 크기는 1인 경우가 99%, 2인 경우가 27%, 3~4인 경우가 5%, 5~8인 경우가 4%, 9~16인 경우가 4%, 16~32인 경우가 1%의 빈도수를 나타내었다. 이것은 음성대조군으로 널리 사용되는 증류수에 의한 자연발생변이 차를 여러 실험실에서 나온 결과들과 비교해보면, 본 실험이 적절히 이루어졌음을 알 수 있고 세포분열 마지막 단계에서 주로 변이가 일어난 것으로 판단되었다.

Table 4. Somatic mutation and Recombination test of lake red CBA, rhodamine B stearate and permanent orange with *Drosophila melanogaster*

Test Compound	Dose (mg/m*l*)	No. of wing scored	Frequency of spots per wing scored (%)		
			Single spots		Twin spots (TW)
			Small (SS)[a]	Large (LS)[b]	
D. W.	0	160	0.18(28)	0.02(3)	0.00(0)
R-9	100	100	0.47(47)*	0.09(9)*	0.03(3)
	50	100	0.30(30)	0.10(10)*	0.04(4)*
	25	100	0.12(12)	0.04(4)	0.01(1)
R-37	100	100	0.43(43)*	0.02(2)	0.04(4)*
	50	100	0.24(24)	0.02(2)	0.00(0)
	25	100	0.20(20)	0.01(1)	0.00(0)
O-17	100	100	0.45(45)*	0.02(2)	0.00(0)
	50	100	0.36(36)*	0.01(1)	0.00(0)
	25	100	0.23(23)	0.01(1)	0.00(0)
MMC	0.625 mM	38	2.24(85)	1.58(60)	0.16(6)

MMC: mitomycin C
[a]Number of small single spot: 1~2 cells
[b]Number of large single spot: 2 cells, R-9: lake red CBA, R-37: rhodamine B stearate, O-17: permanent orange.
* $p<0.05$.

고 찰

Chinese hamster lung(CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험의 경우에 그 동안 연구되어온 내용들은 시험물질이 주로 화장품에 사용되는 외용색소라는 특성으로 직접법으로 시험되어 적색215호는 의양성으로 나타났고 적색204호, 등색203호는 음성으로 나타났다는 보고[5,15]가 있으며, 염색체이상의 의의 및 암과의 관계[16]를 보면, 암세포들은 성장이 불규칙적인 돌연변이체 세포의 반복분열에 의해 생겨 클론을 이루고, 클론내의 세포들에서는 염색체이상, 과잉염색체, 소실염색체, 결실, 중복, 전좌가 발견되고 있다. 이러한 염색체이상은 세포의 불규칙한 성장을 수반하여 일정한 형태의 유전자 질환을 유발하게 된다. 한편, 등색203호의 경우 두 nitro groups의 aniline ring이 발암과 돌연변이물질의 원인이 된다는 보고[17]와 함께 다른 색소의 경우에서도 어떤 구성성분이 직접 또는 간접적으로 유전독성을 나타내는지에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다. 이에 본 연구에서는 대사활성화물질인 S-9 mix를 이용한 대사활성화법을 실시하였는데 적색204호, 적색215호 및 등색203호는 전 용량에서 이상세포의 발현율이 음성으로 나타나 변이원으로서는 작용하지 않는 것으로 나타났다.

ddY mouse를 이용한 소핵시험의 경우에서는 동물의 성, 계통, 투여경로 차이, 검체투여방법과 채취시간에 따른 골수세포의 적혈구 생성에 미치는 영향에 관한 연구가 계속되어 왔다.[18,19] 최근에는 말초혈액을 이용하여 동물을 도살하지 않고, 한 동물에서 계속 혈액을 채취함으로써 동물의 수를 줄이고, 시간변화에 따른 소핵 생성변화의 자료를 얻을 수 있으며, 소핵이 더 쉽게 구분되고 슬라이드 제작도 간편한 acridine orange를 이용한 형광염색법이 개발되고 있다.[20] 등색203호가 1% 함유된 립스틱을 하루 한번에서 다섯번까지 사용한 경우 하루에 4~6 mg의 색소를 바르게 되는 것이므로 많은 양에 노출되게 되는 것이며 이는 체내에서 흡수되고 대사되는 동안에 알려져있지 않은 독성을 나타내게 될 수도 있다는 보고[21]가 있고 이들에 대한 연구가 계속되고 있다. 또한, 적색204호와 등색203호의 성분인 azo 염료와 xanthene 염료등을 함유한 여러 색소를 동물에 경구 투여한 연구결과 암컷의 rat에서 유방암을 나타내는 보고[22]로부터 동물계에서 특히 민감하게 작용하는 구성성분이 있음이 증명되었다. 또한, xanthene 염료는 외용제제로 사용될 경우 광독성을 나타낼 가능성에 관한 보고[23]가 있으므로, 유전독성시험에서도 시험물질에 노출후 특정의 형광을 조사하여, 이에 따른 유전독성 발현에 관한 영향도 재고되어야 할 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, 앞으로의 실험에서도 동물실험으로부터 얻어지는 유전독성 및 발암판

정에서는 동물의 성별, 계통차이와 투여경로 등을 달리하여 실험하는 다양한 연구가 요구된다. 본 연구에서는 이러한 차이를 보고자 투여 횟수, 노출시간에 따른 시험을 수행한 바 적색204호, 적색215호 및 등색203호는 전 용량에서 소핵 유발의 차이는 관찰되지 않는 음성의 결과를 보여주었다.

초파리 날개를 이용한 체세포 돌연변이시험(somatic mutation recombination test)은 화학물질등이 유발시키는 *Drosophila melanogaster*의 제3 염색체에서 일어나는 돌연변이와 재조합을 검출하기 위한 시험으로써, 시험물질에 의해 일어난 초파리 날개의 체세포 유전자의 변화가 표현형으로 나타나는 것을 검색하는 시험이다. 이 시험법은 진핵생물을 이용하기 때문에 조작이 쉽고 신속하며 경제적인 장점을 가지고 있는 매우 유용한 것으로 돌연변이원과 돌연변이 전구물질에 대해 넓은 범위에 걸쳐 검출능력을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.[24] 초파리 날개를 이용한 체세포 돌연변이시험에서 spot의 형성은 *mwh*와 *flr* 유전자로부터 세포의 유사분열시에 일어나는 유전자 재조합 결과 나타나는 것으로 크게 single spot과 twin spot으로 구분된다.[25] Twin spot은 인접한 *flr* 또는 *mwh marker*로 인하여 나타나며 single spot은 결실, 한 점의 돌연변이, 재결합, 불분리현상 됨으로써 일어난다. *mwh*는 초파리의 제3 염색체 왼쪽 arm에 위치하는 열성유전자로 한 세포에서 다수(2~5개)의 hair가 생성되는 것이고 *flr*는 초파리의 제3 염색체 왼쪽 arm에 위치하는 열성유전자로 hair의 형태가 불꽃에 그을린 것처럼 생성되는 것이다. Casida는 그의 연구에서 포유동물의 간에서 일어나는 것과 똑같은 효소적 환원반응이 집파리의 microsome에서 나타남을 보고하였으며,[26] Vogel은 여러 가지 간접 발암원물질이 초파리에서 강한 돌연변이 작용을 보인 반면, 다른 돌연변이 검출계에서는 대부분 음성을 보였음을 보고하였다.[27] 따라서 본 연구에서 실시한 초파리를 이용한 체세포돌연변이 재조합 시험결과, 적색204호 및 적색215호에서 약한 돌연변이원성을 나타내는 것은 이와 같은 맥락에서 이해될 수 있으며 이들 색소의 만성독성 등에 관하여 더 진전된 연구들이 필요하다고 사료된다.

국문요약

국내 화장품 업계에서 실제 사용되고 있는 합성타르색소인 적색204호, 적색215호, 등색203호의 3가지 색소에 대하여 유전독성시험을 행하였다. Chinese hamster lung(CHL) 세포에서의 염색체이상시험과 ddY마우스를 이용한 소핵시험 및 초파리 날개를 이용한 체세포돌연변이 재조합 시험을 실시하였다. 그 결과 염색체이상시험과 소핵시험에서는 적색204호, 적색215호, 등색203호에서는 유전독성을 나타내는 변이원으로서는 작용하지 않는 것으로 나타났고 초파리날개를 이용한 체세포돌연변이시험에서는 각각 100 mg/m*l*에서 single small spot의 출현빈도가 $p<0.05$의 유의수준에서 대조군에 비해 증가양상을 보였고, twin spot의 빈도 수는 적색204호의 경우는 50 mg/m*l* 농도에서, 적색215호의 경우는 100 mg/m*l* 농도에서 $p<0.05$의 유의수준에서 증가양상을 보여 약한 돌연변이원성을 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. CTFA International Committee: CTFA International color handbook. 117 (1986).
3. Hart, R.W., Freni, S.C., Gaylor, D.W., Gillette, J.R., Lowry, L.K., Ward, J.M., Leopore, P. and Turturro, A.: Final report of the color additive scientific review panel. *Risk Anal.*, **6**, 117 (1986).
4. 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. *Mut. Res.*, **66**, 181 (1979).
5. Ha, K.W., Jung, H.K., Oh, H.Y., Heo, O.S., Sohn, S.J., Han, E.S., Jung, S.C., Han, S.Y., Choi, S.J. and Cho, Y. H.: Mutagenicity studies of food and cosmetic dyes (1). *Kor. J. Food Hygiene*, **8**, 171 (1993).
6. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut. Res.*, **113**, 173 (1983).
7. Margolin, B.H.: Statistical analysis for in vitro cytogenic assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mutagenesis*, **8**, 183 (1986).
8. 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호 (1996)
9. Schimid, W.: The micronucleus test. *Mut. Res.*, **31**, 9 (1975).

10. Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ. Mol. Mutagen,* **13**, 347 (1989).
11. Lindsley, D.L. and Grell, E.H.: Genetic variation of *Drosophila melanogaster. Carnegie Inst. Wash. Publ.*, 627 (1968).
12. Garcia-Bellido, A. and J. Dapena: Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila. Mol. Gen. Genet.,* **128**, 117 (1974).
13. Lindsley, D.L. and Zimmermann, G.: The genome of Drosophila melanogaster. Part 1: A-K. *Drosophila Inform. Serv.,* **62**, 1 (1985).
14. Graf, U., Juon, H., Katz, A.J., Frei, H.J. and Wurgler, F. E.: A pilot study on a new Drosophila spot test. *Mut. Res.,* **120**, 233 (1983).
15. Hayashi, M.: The micronucleus test. *Scientist, Tokyo*, 56 (1991).
16. IARC working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: Some aromatic amines and related nitro compouds, *IARC Monogr. Eval. Carcin. Risk Chem. Man.* 16 (1978).
17. Miller, E.C.: Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals. *Cancer Research,* **38**, 1479 (1978).
18. Vanparys, P., Deknudt, G., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Marsboom, R.: Sampling times in micronucleus testing. *Mut. Res.,* **282**, 191 (1992).
19. Hayashi, M., Sofuni, T. and Morita, T.: Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mut. Res.,* **252**, 281 (1991).
20. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, Jr.M.: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mut. Res.,* **245**, 245 (1990).
21. Ames, B.N., Kammen, H.O., Yamasaki, E.: Hair dyes are mutagenic: Identification of variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 2423 (1976).
22. Griswold, D.P.Jr., Casey, A.E., Weisburger, E.K., Weisburger, J.H.: The carcinogenicity of multiple intragastric doses of aromatic and heterocyclic nitro or amino derivatives in young female Sprague-Dawley rats. *Cancer Research,* **28**, 924 (1968).
23. 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).
24. Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, Jr.M.: An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mut. Res.,* **120**, 241 (1983).
25. Hayashi, M. and Sofuni, T.: The micronucleus assay with rodent peripheral blood and acridine orange supravital staining. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, 203 (1994).
26. Casida, J.E.: Insect microsomes and insecticide chemical oxidation in microsomes and drug oxidations. *Academic Press, New York,* p. 517 (1969).
27. Vogel, E.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung, VI. Induktion dominanter und rezessiv-Geschlechtsgebundener Letalmutationen durch Aryldialkyltriazene bei *Drosophila melanogaster. Mut. Res.,* **2**, 397 (1971).