J. Fd Hyg. Safety 9(2), 67-74(1994)

방사선조사 인삼의 유전독성에 관한 연구

하광원 · 정해관 · 오혜영* · 허옥순 · 손수정 · 한의식 · 정성철
최부영 · 김영미 · 김필선 · 문화회
국립보건안전연구원 독성부

Studies on the Genotoxicity of the Gamma-irradiated *Panax Ginseng Radix In Vitro* and *In Vivo*

Kwang-Won Ha, Hai-Kwan Jung, Hye-Young Oh*, Ok-Soon Heo, Soo-Jung Sohn, Eui-Sik Han, Sung-Chul Jung, Bu-Young Choi, Young-Mi Kim, Pil-Sun Kim, and Hwa-Hoey Moon
Department of Toxicology, National Institute of Safety Research ,122-020 Seoul

ABSTRACT—This study was aimed to find out the comparative effects between non-irradiated, and 5 kGy—10 kGy of gamma-irradiated *Panax Ginseng Radix* powder on the genotoxicity for identification of possibility of DNA damage causing cancer. Four different short-term mutagenicity tests were used: (1) *Salmonella typhimurium* reversion assay (Ames test) (2) Chromosome aberration test in cultured Chinese hamster lung (CHL) fibroblast cells. (3) Micronucleus test in ddY mouse (4) Somatic mutation and recombination test in the wing cells of *Drosophila melanogaster*.

Gamma-irradiated *Panax Ginseng Radix* powder revealed negative results in these four mutagenicity tests. This means gamma-irradiated ginseng could be safe on the genotoxic point of view.

Keywords □ Gamma-irradiated Ginseng, Ames Test, Chromosome Aberration Test, Micronucleus Test, Drosophila Wing Spot Test

방사선조사 식품에 대한 사용자의 인체 유해성 문제는 1980년 국제식량농업기구(FAO) 및 세계보건기구(WHO)의 합동전문가위원회가 당시까지 수행된 방사선조사 식품에 대한 독성시험자료에 근거하여 총 평균선량 10 kGy 이하의 조사식품에 대하여는 독성시험이 필요하지 않다는 결론을 제출한 바 있다. 그러나 발암성 등에 대한 소비자의 불안은 불식되지 않고 있어 조사식품의 실용화에 있어서는 10 kGy 이하의 선량에 대해서도 각 품목별로 하나하나 그 안전성을 확인할 필요가 있다. 이러한 관점에서 1980년 이후에도 많은 품목에 대한 독성시험이 실시되어 오고 있으며, 지금까지의 결과에서는 특별히 문제가 예로 보아 안전성의 확보상의 큰 문제는 없을 것으로 없다는 결론이 내려져 있다. 인삼에 있어서도 이러한 보이나 앞으로 야기될 수 있는 국내외의 유해론에 대응할 수 있는 구체적인 시험자료를 갖춘다는 것은 인삼이 전국민적으로 애용되는 전통생약재로서 뿐만 아니라 해외에서도 방대한 수요 또는 잠재수요를 가지고 있다는 점에서 중요한 의의를 가지게 될 것으로 사료된다. 이러한 취지에서 저자 등은 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험 및 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험 등의 *in vitro* 유전독성시험을 실시하고, *in vivo* 시험으로 실험동물에게 직접투여하여 체내의 대사활성화계의 영향을 받게하는 소핵시험과 초파리를 이용한 날개 체세포 돌연변이 및 재조합 시험을 실시하였다.

Received for publication May 2, 1994
*To whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

시험물질의 조제 및 농도－수삼을 건조하여 제조한 백삼분말에 ^{60}Co 감마선을 일정선량 조사(5 kGy, 10 kGy)한 시험물질을 무처리 대조군과 함께 50℃에서 70% 에탄올로 3회 추출하여 얻어진 엑기스를 건조 분말화하여 시험에 사용하였다.

***Salmonella typhimurium*을 이용한 유전자 복귀 돌연변이시험**－시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537균주는 미국캘리포니아대학 B. N. Ames 교수로부터 직접 입수하였다. 각 균주는 Maron & Ames 원저[1]에 제시된 방법에 따라, 유전적 특성을 확인 하였다. 각 균주는 －80℃의 DMSO 동결보존으로부터 직접 10 ml의 Nutrient broth에 접종하여 37℃에서 12시간 회전식 진탕배양에 의하여 시험에 사용할 균현탁액으로 하였다. 시험관(13 mm×100 mm, glass)에 *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA1537의 각각의 배양균액 0.1 ml, 시험물질의 DMSO용액 0.1 ml 및 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 ml(대사활성법에서는 S-9 mix, 4%, 0.5 ml)[1]을 넣어 혼합한 후 37℃에서 30분간 전배양을 행하였다. 배양 종료 후 바로 top agar 2 ml을 첨가하여 혼합하고 변이원성 검색용 배지(minimal glucose agar medium)에 중층, parafilm으로 밀전하여 37℃에서 48시간 배양 후 복귀변이 집락의 수를 자동 집락계수기(Artek model 880), 또는 수동식 집락계수기로 계수하였다. 복귀변이집락의 수는 3매의 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이 유발성의 판정은 용매 대조의 2배 이상의 복귀변이 집락수를 나타내고 또한 용량의 의존성을 가지는 경우를 양성으로 하였다.

CHL 배양세포를 이용한 염색체이상시험－시험물질을 세포배양배지에 대한 최고용해농도인 1 g/ml로 용해하여 여과(공경 0.2 μm)한 것을 최고농도는 배지 용량의 10%로 하고 공비 2로 배지에 희석하여 사용하였고, 음성 대조군으로는 희석액인 세포배양배지를, 양성 대조군으로는 직접법에서는 Mitomycin C(Sigma, M 0503) 0.04 μg/ml을 주사용 증류수에 녹여 사용하였고, 대사활성화법에서는 benzo(a)pyrene(Sigma, B 1760) 0.02 mg/ml을 DMSO에 녹여 사용하였다. 시험에 사용한 Chinese hamster lung fibroblast (CHL) 세포는 염색체의 수가 25개이며, 1회 세포주기는 15시간[2]으로서 염색체이상시험에 적합한 조건을 갖춘 세포로서 일본 위생시험소의 T. Sofuni 박사로부터 직접 입수하여 사용하였다. 대사활성 부재하의 시험은 CHL 세포를 60 mm의 petri dish에 세포 1×10^5개를 파종하고 3일간 배양한 후 시험물질을 농도별로 처리하고 세포수집 2시간전에 Colcemid를 최종농도 1 μM로 처리한 후, 2시간동안 더 배양하여 총 검체처리시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.05% trypsin-EDTA로 15 ml 원심분리관에 세포를 수집한 후 37℃의 저장액(0.075 M KCl) 10 ml에 잘 현탁시켜 37℃ 수조에 15분간 방치한 후, 고정액(methanol: acetic acid, 3 : 1)으로 3회 고정시킨 후 공기건조법으로 염색체표본을 제작하여, 5% Giemsa 염색액으로 15분간 염색하고 광학현미경으로 1000배에서 관찰하였다. 대사활성 존재하의 시험은 상기와 동일하게 세포를 배양한 후, 각 농도별로 시험물질, S9 mix (배지의 20% 비율), 양성 대조물질이 포함된 배양액으로 교환하여 6시간동안 배양하고 신선한 배지로 교환하여 16시간 더 배양하고 Colcemid를 처리한 2시간 후 세포를 수집, 염색체표본을 제작하였다. 결과의 판정은 시험농도당 100개의 세포분열 중기상을 현미경하에서 판독하여 염색체 이상[3] 유무를 관찰하여 이상의 종류를 1개이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고, 통상 음성 대조군에서 염색체이상을 가진 세포의 출현율은 3%를 초과하는 일이 거의 없기 때문에 이상세포의 평균 출현율이 5% 미만을 음성으로 하고 5% 이상 10% 미만을 의양성, 10% 이상을 양성으로 하였다.

ddY 마우스를 이용한 소핵시험－예비시험으로부터 구한 2500 mg/20 ml/kg을 최고농도로 하고 공비 2로 3단계의 농도를 설정하였다. 시험물질은 투여직전에 소정의 양을 주사용 생리식염수에 현탁하여 사용하였다. 용매 대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 주사용 생리식염수를 사용하였고 양성 대조물질은 mitomycin C를 증류수에 용해시켜 사용하였다. 각 농도의 시험물질 용액은 1 ml 용량의 일회용주사기와 sonde를 사용하여 24시간 간격으로 2회 투여하였고, 양성 대조물질은 1회 복강투여 하였다. 5주령 ddY계 마우스를 체중을 측정, 소정의 범위에 드는 동물을 선별하여 무작위로 각 군에 6마리씩 배분하였고, 24시간 간격으로 2회 경구투여하여 최종투여 후 24시간에 Schmid[4]의 방법에 따라 골수표본을 제작하였다. 마우스 1개체당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 1,000개의 다염성적혈구중에서 소핵을 가진 다

Table 1. *Salmonella typhimurium* reversion assay with Gamma-irradiated Ginseng (5 kGy)

Test materials	Concentration (mg/plate)	S9 mix	His$^+$ revertants/plate			
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537
H_2O		−	28± 7	118± 13	18± 1	8± 2
Ginseng(5 kGy)	30,000	−	32± 4	*11± 4	*4± 0	7± 1
	10,000	−	28± 5	56± 11	12± 1	8± 3
	3,000	−	31± 3	95± 1	19± 7	8± 4
	1,000	−	30± 6	99± 7	13± 1	9± 3
	300	−	24± 4	115± 4	18± 4	7± 3
	100	−	32± 4	108± 11	17± 6	12± 5
2-Nitrofluorene	10	−	406± 22			
Sodium azide	10	−		1500± 114	1298± 3	
ICR-191	1	−				1755± 23
2-Aminofluorene	10	−	36± 2			
H_2O		+	35± 7	109± 5	16± 1	8± 3
Ginseng(5 kGy)	30,000	+	45± 5	*26± 8	*5± 2	2± 2
	10,000	+	35± 5	82± 8	15± 2	9± 1
	3,000	+	41± 8	123± 7	16± 4	11± 4
	1,000	+	27± 3	111± 4	16± 5	9± 1
	300	+	39± 5	122± 7	15± 3	10± 3
	100	+	27± 6	118± 4	17± 2	9± 2
2-Aminofluorene	10	+	1247± 58	952± 12	19± 3	63± 10

*Very thin bactereial lawn due to toxicity of the test material

염성적혈구의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유핵세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하여 표본을 관찰하였고 Hayashi[5] 등의 방법에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1, 2단계의 비교자료 활용에 의한 검정을 거쳐, 3단계에는 음성 대조군과 시험물질 투여군과의 소핵적혈구의 출현빈도에 관한 유의차를 Cochran Armitage 경향검정을 행하였다(유의수준 0.05미만).

초파리 체세포 돌연변이 및 재조합 시험 – 시험물질을 증류수에 현탁시켜 사용하였으며, 배지에 첨가할 수 있는 최대용량을 기준으로 하여 200, 400, 800 mg/5 m*l*의 용량을 사용하였다. 용매 대조군으로는 시험물질의 현탁에 사용한 증류수를 사용하였고, 양성 대조군으로는 mitomycin C를 0.125 mM로 조제하여 사용하였다. 시험에 사용한 초파리(*Drosophila melanogaster*)는 제 3염색체의 left arm에 지표를 갖는 *mwh*와 *flr*^{3}/TM3, Ser이다. 시험법은 Graf 등[6]의 방법에 따라 얻은 trans-heterozygous larvae를 시험물질이 함유된 배지에서 성충이 때까지 사육하여 70% 에탄올에 보관하였다가, 입체현미경하에서 Fauer's solution(arabic gum 30 g, glycerol 20 m*l*, chloral hydrate 50 g in D.W. 50 m*l*)을 사용하여 슬라이드에 고정시켰다.

광학현미경하에서 400배의 배율로 관찰하여 날개의 mosaic spot[6]의 출현을 조사하였고, spot은 multiple wing hair(*mwh*)나 flare(*flr*) 표현형을 보이는 single spot와, *mwh*와 *flr* 부분이 인접한 twin spot으로 나누어 기록하였다. Spot의 크기는 mutant phenotype을 보이는 wing cell의 수를 세어 결정하였다. 1~2 cell 이하의 spot은 small single spot(SS)로, 2 cell 이상은 large single spot(LS)로 나누었다. 결과의 통계적처리는 X^2-test를 실시하였으며, 5% 유의수준에서 판정하였다.

실험결과

*Samonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험은 대상물질이 천연생약제임을 고려하여 세포의 치사 또는 생육저해 등 세포독성작용이 나타나는

Table 2. *Salmonella typhimurium* reversion assay with Gamma-irradiated Ginseng (10 kGy)

Test materials	Concentration (mg/plate)	S9 mix	His$^+$ revertants/plate			
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537
H_2O		−	29± 1	107± 3	14± 1	8± 1
Ginseing(10 kGy)	30,000	−	45± 1	*7± 3	*1± 1	3± 2
	10,000	−	29± 6	36± 6	7± 2	4± 2
	3,000	−	28± 5	67± 6	14± 5	5± 1
	1,000	−	27± 5	117± 7	15± 3	7± 4
	300	−	27± 3	105± 7	17± 1	8± 3
	100	−	27± 7	100± 6	18± 3	8± 1
2-Nitrofluorene	10	−	606± 21			
Sodium azide	10	−		1396± 138	1298± 108	
ICR-191	1	−				1496± 18
H_2O		+	36± 7	108± 6	16± 4	10± 4
Ginseng(10 kGy)	30,000	+	37± 7	*17± 3	*4± 3	7± 1
	10,000	+	41± 5	96± 16	18± 2	9± 2
	3,000	+	40± 5	113± 8	18± 4	14± 5
	1,000	+	39± 6	119± 2	13± 5	12± 3
	300	+	42± 5	102± 15	16± 3	9± 2
	100	+	41± 6	115± 2	13± 3	13± 2
2-Aminofluorence	10	+	2422± 29	847± 90	23± 1	42± 5

*Inhibition of growth due to toxicity of the test compound

Table 3. *Salmonella typhimurium* reversion assay with non-irradiated Ginseng

Test materials	Concentration (mg/plate)	S9 mix	His$^+$ revertants/plate			
			TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537
H_2O		−	31± 6	109± 13	18± 5	7± 2
Ginseng(0 kGy)	30,000	−	47± 5	*5± 1	*2± 1	6± 1
	10,000	−	30± 1	30± 9	8± 3	4± 1
	3,000	−	24± 6	57± 9	18± 3	4± 1
	1,000	−	29± 4	124± 9	20± 1	8± 2
	300	−	24± 1	118± 7	13± 1	7± 3
	100	−	30± 3	115± 19	19± 1	9± 1
2-Nitrofluorene	10	−	593± 15			
Sodium azide	10	−		1207± 61	1359± 109	
ICR-191	1	−				1638± 106
H_2O		+	30± 3	108± 6	16± 4	10± 4
Ginseng(0 kGy)	30,000	+	46± 6	17± 3	4± 3	7± 1
	10,000	+	43± 3	96± 16	18± 2	9± 2
	3,000	+	42± 9	113± 8	18± 4	14± 5
	1,000	+	37± 3	119± 2	13± 5	12± 3
	300	+	24± 7	102± 15	16± 3	9± 2
	100	+	28± 6	115± 2	13± 3	13± 2
2-Aminofluorene	10	+	1696± 118	913± 67	22± 7	50± 3

*Inhibition of growth due to toxicity of the test compound

Table 4. Summary results of chromosome abberation test with Gamma-irradiated Ginseng

Test materals	Concentration (mg/ml)	S9	No. of cells scored	Frequencies of aberrant cells						
				ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	nor
(−) control		−	100		1					99
Ginseng(0 kGy)	10	−		1	1					98
	5	−			2					98
	2.5	−		2						98
Ginseng(5 kGy)	10	−		3	1					96
	5	−		1	2					97
	2.5	−		2						98
Ginseng(10 kGy)	10	−		2	1					97
	5	−		4						96
	2.5	−		1						99
Mitomycin C	0.04 μg/ml	−		6	6	5			2	76
(−) control		+	100							100
Ginseng(0 kGy)	10	+								100
	5	+		1	2					97
	2.5	+				1				99
Ginseng(5 kGy)	10	+			1					99
	5	+		2						98
	2.5	+		1						99
Ginseng(10 kGy)	10	+		1						100
	5	+								100
	2.5	+		1						99
Benzo(a)pyrene	0.02	+		2	4	13	2		1	78

ctg, chromatid gap; ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csg, chromosome gap; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange; nor, normal; MMC, mitomycin C; B(a)P,Benzo(a)pyrene

Table 5. Summary results of micronucleus test with Gamma-irradiated Ginseng

Test materials	Dose[a] (mg/kg)	No. of mice tested	Sampling time (hrs)	MNPCE% (mean± SD)	Ratio PCE/PCE+NCE (mean± SD)
NS	0	6	48	0.08± 0.07	0.65± 0.03
Mitomycin C	2.0[b]	6	30	6.75± 0.68	0.54± 0.01
Ginseng(0 kGy)	2500	6	48	0.15± 0.10	0.55± 0.05
	1250	6	48	0.17± 0.11	0.62± 0.03
	625	6	48	0.10± 0.12	0.62± 0.06
Ginseng(5 kGy)	2500	6	48	0.05± 0.08	0.50± 0.02
	1250	6	48	0.03± 0.05	0.01± 0.01
	625	6	48	0.07± 0.08	0.54± 0.02
Ginseng(10 kGy)	2500	6	48	0.05± 0.07	0.55± 0.10
	1250	6	48	0.08± 0.09	0.62± 0.03
	625	6	48	0.05± 0.08	0.61± 0.01

NS: normal saline. MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes/1,000 polychromatic erythrocytes. PCE/PCE+NCE: polychromatic erythrocytes/1,000 erythrocytes. [a] p.o. twice, with a 24 hrs interval. [b] i.p. once. ($p<0.05$)

Table 6. Summary results of Drosophila wing spot test with Gamma-irradiated Ginseng

Test materials	Dose[b] (mg/5 ml)	No. of wing scored	Frequency of spots per wing scored			Conclusion
			Single spots		Twin spots	
			Small(SS)[a]	Large(LS)[b]	(TW)	
Control	D.W.	116	0.04(5)	0.01(1)	0.00(0)	
Mitomycin C	0.125 mM	74	1.41(104)	1.57(116)	0.16(12)	
Ginseng(0 kGy)	800	76	0.05(4)	0.00(0)	0.00(0)	NEG
	400	80	0.01(1)	0.00(0)	0.00(0)	NEG
	200	72	0.00(0)	0.01(1)	0.00(0)	NEG
Ginseng(5 kGy)	800	78	0.03(3)	0.00(0)	0.00(0)	NEG
	400	80	0.11(9)	0.00(0)	0.00(0)	NEG
	200	78	0.06(5)	0.01(1)	0.00(0)	NEG
Ginseng(10 kGy)	800	120	0.07(8)	0.02(0)	0.00(0)	NEG
	400	80	0.01(1)	0.03(2)	0.00(0)	NEG
	200	80	0.0545)	0.01(1)	0.00(0)	NEG

NEG: negative. [a]Number of small single spot: 1-2 cells. [b]Number of large single spot: >2 cells. ($p<0.05$)

30 mg/plate의 농도를 최고용량으로 하여 실험한 결과 Table 1, 2, 3의 결과를 얻었다. 방사선조사 인삼은 대사활성화법을 적용하지 않은 경우는 물론 적용한 시험에 있어서도 전 시험용 균주에 공통적으로 복귀변이 집락수의 증가를 인정할 수 없었다.

CHL 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서는 백삼분말에 방사선 무처리군, 5 kGy, 10 kGy처리군 3종류의 시험물질의 70% 에탄올 건조엑기스를 배지에 1 g/ml 용액으로 제조하여 최종농도 10 mg/ml로 처리시 세포의 50% 증식억제를 보여 이를 본시험에서의 최고농도로 설정하였다. 염색체이상 본시험의 구성 및 결과를 Table 4에 나타내었다. 대사활성 부재 및 존재하의 무처리군에서 1%이하의 염색체이상 빈도를 보였고, 모든 시험농도에서 5%이하의 염색체이상 빈도를 나타내어 음성으로 판정되었다.

ddY 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험 결과는 Table 5에 나타내었다. 방사선(γ-ray)을 조사한(조사선량: 5 kGy, 10 kGy) 백삼분말을 주사용 생리식염수에 현탁하여 ddY 수컷마우스에 투여할 수 있는 최대농도인 2500 mg/20 ml/kg으로 24시간 간격으로 2회 투여하고 최종투여 후 24시간에 골수세포를 채취하여, 골수세포의 분열에 미치는 영향을 조사한 결과, 방추사저해 또는 염색체절단에 의한 소핵의 출현빈도가 대조군 및 무처리군과 비교하여 유의하게 증가하지 않았다. 또한 투여 후의 마우스에서도 방사선조사 인삼의 투여에 의한 어떠한 독성의 징후도 나타나지 않았으며, 방사선의 조사선량의 차이에 의한 소핵유발율의 차이도 관찰되지 않았다.

초파리의 Wing spot test에서 방사선 조사선량(5 kGy, 10 kGy)에 따른 spot의 출현빈도는 차이를 보이지 않았다(Table 6). 또한 각 방사선조사 인삼에서 투여용량에 따른 spot 출현빈도의 차이도 보이지 않았다. 또한 방사선조사 백삼분말을 함유한 배지에서의 초파리의 생육상태도 정상을 나타내었다.

고 찰

수출전략 품목인 한국산 인삼 및 인삼제품은 제품의 장기 보존을 위한 살균 및 살충의 방편으로 에칠렌옥사이드(Ethylene oxide: EO가스)훈증 처리를 해 왔다. 최근의 연구보고서[7]에 의하면 에칠렌옥사이드를 처리한 식품의 장기 복용시 잔류물질에 의한 인체 유해성에 관한 문제가 제기되어 오던 중, 1991.7.1.자로 우리나라에서도 식품에 대한 EO가스 훈증처리 방법의 사용이 금지되었다. 그 대체 방법으로서 phosphine 가스 훈증방법 등이 사용되고 있다. 방사선조사 기술의 발달로 식품 등의 공정에 있어 방사선을 조사하면 가장 경제적으로 우수한 살균 살충효과를 나타냄이 국제적으로 연구 인정되어 점차 실용화 되고 있는 추세이며 이에 따라 대량의 시료를 단시간에 처리할 수 있는 방사선조사 기술의 개발에 관심이 모아지고 있다. 인삼 및 인삼제품 또한 방사선조사에 의하여 품질의 유지 및 장기보존이 가능해졌으나 일반적인 방사선에 대한 유해성 통념으로 인하여 이의

안전성이 확립되지 않고는 실용화가 될 수 없다. 방사선조사 인삼의 안전성(safety)을 생체전반에 걸쳐 평가하기 위하여 일련의 독성시험을 실시하여야 하는데, 저자 등은 1차로 장기 발암성시험의 전단계 평가 방법인 *in vitro* 유전독성시험(genetic toxicity test)의 일환으로서 미생물계를 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유동물 배양세포계를 이용한 염색체이상 시험을 실시하였으며, 2차로 *in vitro* 유전독성시험을 확장하여 *in vivo* 유전독성 시험인 마우스를 이용한 소핵시험과 초파리 체세포 돌연변이 및 재조합 시험을 실시하였다.

유전독성을 검사하는 단기시험법은 한 가지 시험법에서 얻어진 결과만으로써 유전독성을 평가하는 것은 위험하며 될 수 있는 대로 지표가 다른 많은 시험계에서 얻어진 결과로부터 종합적으로 평가되어야 할 것으로 판단된다. 우리나라의 유전독성 시험 기준에 있어서는, OECD(경제협력개발기구)의 유전독성에 관한 기본적인 사고방식에 입각하여 2개의 지표 즉, 유전자 돌연변이와 염색체이상을 채택하고 있다. 전자에는 주로 세균을 이용하는 복귀돌연변이 시험이 채택되고 있으며, 후자의 염색체이상을 지표로 하는 시험에는 포유동물 배양세포를 이용하는 생체외 염색체이상 시험이 채택되어 있다. *Salmonella* 복귀돌연변이 시험[1,8]은 시험용균주의 염색체상에 염기쌍치환이나 frame shift 변이를 일으키는 화학물질에 의해서 유발되는, His^+로부터 His^-로의 복귀변이를 검출하는 미생물검정계로서, 1971년 Ames에 의하여 제창되어 그후 급속한 발전을 거듭하였다. 재현성이 있으며 조작이 간단하고 단기간에 많은 화학물질을 취급할 수 있는 장점이 있다. 염색체 이상 시험은 1970년대 초 Schimid 등에 의하여 확립된 시험법으로서, 염색체 이상의 출현은 화학물질과 세포와의 반응결과 생긴 유전물질의 상해가 클 경우, 완전히 수복되지 않고 남아 세포분열에 지장을 줄 뿐 아니라 세포에 치명적인 요인이 되기도 한다. 본 시험법은 배양세포에서의 염색체 이상의 검출을 목적으로 하는 시험계로서 통상적으로 시험물질처리 후 최초의 유사분열시에 세포를 분석한다.

일반적으로 단일성분의 화학물질을 대상으로 한 *S. typhimurium* 복귀돌연변이 시험에 있어서는 5 mg 또는 10 mg/plate의 농도를 최고용량으로 하는 것이 보편적이나 본 시험에 있어서는 대상물질이 천연생약제임을 고려하여 세포의 치사 또는 생육저해 등 세포독성 작용이 나타나는 30 mg/plate의 농도를 최고용량으로 하였다. 방사선조사 인삼은 대사활성화법을 적용하지 않은 경우는 물론 적용한 시험에 있어서도 전 시험용 균주에 공통적으로 복귀변이 집락수의 증가를 인정할 수 없었는데 이는 동시험물질이 본 실험조건하에서 직접변이원으로서 뿐만 아니라 간접변이원으로서도 작용치 않음을 나타내는 것이다. 포유류 배양 세포를 이용하여 방사선조사한 인삼(5 kGy, 10 kGy)과 무처치 인삼의 염색체이상 시험을 실시한 결과 대사활성 부재 및 존재하 모두 음성의 결과를 나타내어 인삼제품의 품질 개선을 위한 방법으로서 방사선조사에 의한 살균, 살충법은 이상의 실험결과로 볼 때 포유동물 배양세포에 대하여 직접변이원으로서 뿐만 아니라 간접변이원으로서도 작용하지 않는 안전한 방법으로 판단된다.

또한 단기유전 독성시험의 특성을 고려하여 체내 유전 독성시험(*in vivo*)을 병행하였는데, 체내에서 물질투여에 의한 염색체이상을 평가할 수 있는 소핵시험을 ddY 마우스를 이용하여 실시하였고, 유전학의 기초연구에 가장 많이 사용되며, 유전자에 대한 해석이 가장 많이 밝혀져 있는 초파리를 이용하여 한 종류의 열성인자를 갖는 두 종류의 초파리 교배에 의하여 얻은 trans-heterozygous larvae를 시험물질이 함유된 배지에서 성충이 될 때까지 사육시켜 체세포에서의 유전자의 돌연변이와 재조합을 표현형으로 볼 수 있는 *Drosophila* somatic mutation and recombination test(SMART)를 수행하였다. 5 kGy, 10 kGy의 감마선을 조사한 백삼분말을 주사용 생리식염수에 현탁하여 ddY 수컷마우스에 투여할 수 있는 최대농도인 2500 mg/20 ml/kg으로 24시간 간격으로 2회 투여하고 최종투여 후 24시간에 골수세포를 채취하여, 골수세포의 분열에 미치는 영향을 조사한 결과, 방추사저해 또는 염색체절단에 의한 소핵의 출현빈도가 대조군 및 무처리군과 비교하여 유의하게 증가하지 않았다. 또한 투여 후의 마우스에서도 방사선조사 인삼의 투여에 의한 어떠한 독성의 징후도 나타나지 않았으며, 방사선의 조사 선량의 차이에 의한 소핵 유발율의 차이도 관찰되지 않았다. SMART는 *Drosophila melanogaster*의 제 3염색체에서 일어나는 체세포 돌연변이와 재조합을 검출하는 시험법으로서, 초파리 larvae는 대사활성화능을 가지고 있어, 직접 작용하는 mutagen과 bioactivation을 요구하는 mutagen을 검출할 수 있는 시험법으로서 매우 유용한 것으로 판명되어 왔다[6,9,10]. 또한 이 시험법은 조작이 쉽고 신속하며 경제적인 장점을 가지고 있으며 날개

슬라이드의 영구보존이 가능하다. 감마선을 조사한 백삼분말과 무처리 대조군에 대하여 800 mg/5 ml를 최고농도로 실험한 결과, 용매 대조군으로 사용된 증류수 투여군에서 발생한 spot는 자연돌연변이로 생성되는 spot의 빈도와 유사하였으며, 양성 대조군으로 사용된 mitomycin C군에서는 single spot와 twin spot의 빈도가 용매 대조군에 비교하여 유의하게 증가하여 본 실험이 적절히 행하여졌음을 보여주었고, 방사선 조사선량(5 kGy, 10 kGy)에 따른 spot의 출현빈도는 차이를 보이지 않았다. 또한 각 방사선조사 인삼에서 투여용량에 따른 spot 출현빈도의 차이도 보이지 않았다. 또한 방사선조사 백삼분말을 함유한 배지에서의 초파리의 생육상태도 정상을 나타내었다. *mwh*의 표현형을 나타내는 single spot은 염색체상의 *mwh*와 *flr*^{3} 지표간의 mitotic recombination이나, somatic gene mutation에 의해 생성된다. 이상의 결과로 볼 때 방사선조사 인삼은 초파리의 유전물질에 대하여 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 판단된다.

이상과 같이 방사선조사 인삼은 대표적인 *in vitro* 유전독성시험인 *Salmonella typhimurium* 복귀돌연변이 시험(Ames test) 및 염색체이상 시험(chromosome aberration test)에서 음성을 나타내었고, *in vivo* 유전독성학적 측면에서도 거의 안전하다는 근거자료가 마련되었다. 그러나 인삼이 불특정 다수인에 의해서 장기에 걸쳐 대량 상용되는 생약제라는 점과 수출품목으로서의 중요성 등을 고려하여, 현재 본 연구원에서 시행중인 체내 장기시험인 만성독성시험과 주산기·수유기시험결과가 추가될 때 방사선조사 인삼의 복용 안전성을 명확히 가늠할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이상의 연구는 1992년과 1993년도 과학기술처 특정연구개발과제로 2년간에 걸쳐서 시행되었다.

국문요약

방사선조사 인삼에 대한 유전독성시험을 실시하였다. 방사선(gamma-ray)을 조사한(조사선량: 5 kGy, 10 kGy) 백삼분말에 대하여 *in vitro* 시험으로는 *Salmonella typhimurium*을 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)과 Chinese hamster lung cell을 이용한 염색체이상시험을 실시하고, *in vivo* 시험으로는 ddY 마우스의 골수세포를 이용한 소핵시험과 초파리를 이용한 체세포 돌연변이 및 재조합시험을 실시하여 모든 시험에서 음성의 결과를 얻었다. 이상의 결과로 보아 방사선조사 인삼은 대표적인 유전독성단기 시험에서 변이유발성이 없음을 확인하였다.

참고문헌

1. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983).
2. Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T.: A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann*, **61**, 161-167 (1970).
3. 日本環境衛生學會·哺乳動物分科會編: 化學物質による染色體異狀 アトラス. (1988).
4. Schmid, W.: The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15 (1975).
5. Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr.: A procedure for data anlysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 347-356 (1989).
6. Graf, U., Wügler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G.: Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **6**, 153-188 (1984).
7. World Health Organization Published: Food irradiation-A technic for preserving and improving the safety of food (1988).
8. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens & mutagenes with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364 (1975).
9. Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A. J. and Wügler, F.E.: Thirty compounds tested in Drosophila wing spot test. *Mutat. Res.*, **222**, 359-373 (1989).
10. Graf, U. and Schaik, N.V.: Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **271**, 59-67 (1992).