J. Fd Hyg. Safety 16(2), 145–151 (2001)

에폭시화 대두유의 유전독성 연구

한의식† · 정해관 · 김종원 · 박미선 · 엄미옥 · 강혁준 · 민수진 · 오혜영
식품의약품안전청 독성연구소 유전독성과

Studies on Genetic Toxicity of Epoxidized Soy Bean Oil

Eui Sik Han†, Hai Kwan Jung, Jong Won Kim, Mi Sun Park, Mi Ok Eom, Hyuck Joon Kang, Su Jin Min and Hye Young Oh
Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 122-704 Seoul

ABSTRACT – Epoxidized soy bean oil (ESBO) is a plasticizer of PVC which is being widely used as a gaskets for the lid of glass jars including baby food. Using reverse mutation assay, chromosome aberration test and micronucleus test, ESBO were evaluated the mutagenicity. In the reverse mutation test, ESBO did not induced mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102 with and without metabolic activation. In the chromosome aberration test using CHL cells, the results showed no increased structural and numerical aberrations in the concentration of sample producing cytotoxicity with and without metabolic activation. The *in vivo* induction of micronuclei was measured in polychromatic erythrocytes of bone marrow of young (3 weeks old) and adult (6 weeks old) ddY mice of both sex. At 24 hours after treatment with ESBO 20, 10, 5, 2.5 g/B.W. kg/corn oil 10 ml by oral route animals were sacrificed and bone marrow cells were prepared for smear slides. The results showed no increased micronucleated polychromatic erythrocytes regardless of sex and age. It was concluded that water soluble ESBO did not show certain genotoxicity within our studies conducted.

Key words □ Ames test, Chromosome aberration test, Micronucleus test, Epoxidized soy bean oil

가소제는 플라스틱의 특성을 개선시키기 위해 플라스틱에 첨가하는 물질이며, 보통 플라스틱 필름, 병마개의 봉함제, 프린트용 잉크, 접착제, can lacquers 등 음식물과 직접 접촉하는 polymer에 이용된다. 이와 같은 가소제에는 adipates류 (diethylhexyl adipate), phthalates류 (diethylhexyl phthalate), citrates, phosphates와 에폭시화 식물유 등이 잘 알려져 있다. 이중 에폭시화 대두유(Epoxidized soy bean oil, ESBO)와 같은 에폭시화 식물유들은 polyvinyl chloride (PVC), polyvinylidene chloride (PVDC), 랩 (wrap) 뿐만 아니라 유아 식품중의 병마개 등에 약 30%까지 함유되어 합성수지 및 고무의 가소제로 많이 사용되고 있다. 그러나 최근 유럽 등지에서 식품으로의 유리가 보고되어 안전성에 대한 재평가가 요구되어지고 있다. 이렇게 생활주변에서 폭로될 가능성이 높은 에폭시화 대두유에 관해 영국의 BIBRA (British Industrial Biological Research Association)는 ESBO를 처리하였을 때, rat에서 NOAEL은 100 mg/kg/day로 비교적 독성은 낮지만 토끼의 경우 경증의 피부 자극과 안 자극을 나타냈으며, guinea pig 감작실험에서는 감작성이 나타나지 않았다고 보고하였다. 또한 간장 및 신장 등 표적장기 독성에 대하여는 반복하여 경구투여 하였을 때 간장, 신장, 정소 및 자궁에 영향이 있었음을 보고하였으나, 유전독성 및 발암성은 나타나지 않은 것으로 보고하였다[1]. 그러나 유전독성시험의 경우 bacteria를 이용한 복귀돌연변이시험만을 수행한 결과로서 ICH에서 요구하는 기본 유전독성시험 battery의 조건을 충족시키지 못하고 있으며, 다양한 기전을 통해 유전독성을 평가해야 하는 과학적 기준에 매우 미흡한 결과이다. 그러므로 에폭시화 대두유의 유전독성을 정확히 평가하기 위해서는 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 계를 이용한 유전독성시험의 수행이 필요하다. 본 연구에서는 ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)에서 제시하는 유전독성시험인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험[2]과 포유류 배양세포인 chinese hamster lung cell을 대상으로 검색하는 체외 염색체이상시험[3], 설치류의 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험[4]을 수행함으로써 에폭시화 대두유가 유전독성에 미치는

†Author to whom correspondence should be addressed.

영향을 확인하고 작용기전을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

시험물질

에폭시화 대두유는 국내에서 사용하는 가소제의 공급처인 (주)신동방으로부터 구입하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험

예비독성시험 – TA100 균주를 이용하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시킨 에폭시화 대두유 5 mg/plate를 최고농도로 제조하여 직접법과 S9 mix를 이용한 대사활성법을 실시하였다. 복귀변이집락의 수는 1매를 사용하여 판정하였다. 예비독성시험 결과 5 mg/plate의 농도에서 시험물질에 의한 세포독성을 보이지 않아 본시험에서의 최고 농도로 하였다.

복귀돌연변이시험 – 시험관 (13 × 100 mm, glass)에 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102 각각의 배양균 액 0.1 ml, 시험물질 0.1 ml 및 0.2 M phosphate buffered saline (pH 7.4) 0.5 ml (대사활성법에서는 S9 mix 0.5 ml)를 넣어 혼합한 후 37°C에서 30분간 전배양(preincubation)을 행하였다. 배양 종료 후 top agar 2 ml을 첨가하여 혼합하고 변이원성 검색용 배지 minimal glucose agar plate에 중층, 37°C에서 48시간 배양 후 복귀변이 집락의 수를 자동 집락계수기 (Artek model 880)와 수동식 집락계수기로 계수 하였다.

결과의 판정 – 복귀변이 집락의 수는 3매의 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이 유발성의 판정은 대사활성계 존재 유, 무에 관계없이 최소 1개 균주에서 평판 당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

예비독성시험 – 에폭시화 대두유를 DMSO에 녹여 세포배양 배지에 0.5% 되도록 첨가하여 세포독성시험을 실시하였다. 세포 계대시에 1회용 24 well plate에 1 well당 1×10^4개의 세포를 파종하여 2일간 배양한 후, 최고 투여용량인 5 mg/ml의 농도로부터, 공비 2로 9단계의 농도를 설정하여 MTT assay[5]를 수행하여 증식억제 농도 (IC_{50})를 구하였다. 예비독성시험 결과 5 mg/ml의 농도에서 시험물질에 의한 세포독성을 보이지 않아 본시험에서의 최고 농도로 하였다.

염색체이상시험 – 예비독성시험에서 결정된 5 mg/ml 농도를 최고 농도로 하고, 공비 2로 4단계의 농도를 시험농도로 하였다. 6시간 검체 처리의 경우 대사활성 부재 및 존재로 나누어 배양세포를 60 mm의 tissue culture dish에 1×10^5 cell/ml이 되도록 파종하여 1일간 배양하였다. 배양 후 시험물질과 양성대조물질 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 6시간 동안 배양한 후 새로운 배지로 교환하여 다시 16시간 배양하고 colcemid를 0.2 μg/ml이 되도록 처리하여 2시간이 경과한 후 표본을 제작하였다. 6시간 검체 처리시 결과가 음성으로 나타나 검체 처리시간을 24시간으로 하여 연속처리 시험을 하였다[6]. 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 모아 원침한 후 37°C의 저장액 (0.075 M KCl) 4 ml에 현탁 시킨 후 37°C 수조에 20분간 방치하고, 고정액 (methanol:acetic acid=3:1 v/v)으로 3회 고정시킨 후 공기 건조법으로 슬라이드를 제작하여, 5% Giemsa로 30분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 양성대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 대사활성 부재 하에서는 mitomycin C (MMC, Sigma, M-0503) 0.1 mg/ml을, 대사활성 존재 하에서는 benzo(a) pyrene (B(a)P) 20 μg/ml을 사용하였다.

결과의 판정 – 하나의 시험농도 당 100개의 세포분열 중기상을 현미경하에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 크게 구조이상 (structural aberrations)과 수적이상(numerical aberration)으로 분류하고, 구조이상은 gap (chromatid and chromosome gap), ctb (chromatid break), cte (chromatid exchange), csb (chromosome break), cse (chromosome exchange)으로 구분하였으며, 수적이상은 4배수체 이상만을 기록하였다. 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류를 각각 기록하였다. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

소핵시험

시험물질의 조제 및 농도 – 에폭시화 대두유는 예비시험으로부터 구한 20 g/kg/10 ml을 최고농도로 하여 공비 2의 4단계 농도를 설정하였다. 시험물질은 투여직전에 소정의 양을 corn oil에 현탁 하여 사용하였다. 용매대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 corn oil을 사용하였고 양성대조물질은 MMC를 주사용 증류수에 용해시켜 사용하였다. 각 농도의 시험물질 및 용매대조물질은 1회 경구투여 하였으며, 양성대조물질은 1회 복강투여 하였다.

시험계 및 사육환경 – 시험구역은 식품의약품안전청 동물실험실이며, 청정구역에서 생산된 SPF (특정 병원체 부재) 5주령 ddY계 mouse를 공급받아 온도 23 ± 1°C, 습도 55 ± 5%, 배기 10-18 회/hr, 형광등 명암 12hr cycle, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(70W × 240L × 120H mm)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 2주일간의 순

화 사육기간 동안에 관찰하여 체중이 평균이상이며 특이한 외형상의 문제점이 나타나지 않는 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 신촌사료주식회사의 실험동물사료를 구입하여 고압증기 멸균기에서 121°C, 15분간 멸균한 다음 실험동물에 자유로이 공급하였다.

골수세포를 이용한 소핵시험 – 에폭시화 대두유는 예비시험의 결과에 따라 선정된 20 g/kg을 최고농도로 하여 4단계의 농도로 1회 경구투여한 후, 24시간째에 Schmid[4]의 방법에 따라 골수 표본을 제작하였다. 경추탈구에 의해 도살한 동물의 양쪽 대퇴골로부터 골수를 0.5 ml의 fetal bovine serum (FBS, Gibco)으로 채취한 골수세포 부유액을 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 침전된 골수를 소량의 혈청에 고르게 현탁 시켜 슬라이드에 떨어뜨려 도말 하고 공기 중에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 건조가 끝난 표본을 Giemsa액 (Gurr R-66, pH 6.8의 1/150 M phosphate buffer에 5%(v/v)로 제조한 것)에 30분간 염색하였다. 염색 후 동일 완충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산 수용액에 다시 수초간 세척한 다음, 증류수에 수회 세척하고 공기 중에서 건조시켜 optical microscope로 관찰하였다 (×1000).

골수도말표본의 관찰 – Mouse 1개체 당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구 (polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구 (norchromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 2,000개의 다염성적혈구 중에서 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별 가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유핵세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

통계학적 평가 - Hayashi등[7]의 방법에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1단계는 본시험의 음성대조군과 양성대조군의 소핵 출현빈도가 기존의 historical background data의 범위에 있는지를 확인하였고, 2단계는 chi-square법에 의하여 각 시험군을 음성대조군과 비교하여 유의성을 평가하였다 ($p<0.05$). 3단계는 시험군의 용량에 따른 경향을 평가하기 위해 Cochran-Armitage 경향검정을 이

Table 1. Reverse mutation tests of ESBO in *Salmonella typhimurium*

Compound[a]	Dose (μg/plate)	S9 Mix	No. of revertant colonies per plate (Mean ± S.D.)				
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
DMSO		-	15.0 ± 1.0	115.7 ± 12.1	265.3 ± 31.5	11.7 ± 5.5	5.3 ± 1.2
ESBO	5000	-	11.7 ± 5.1	121.7 ± 14.6	223.3 ± 33.7	11.3 ± 4.0	7.0 ± 3.6
	2500	-	15.3 ± 3.5	119.3 ± 13.0	226.3 ± 17.4	10.7 ± 1.5	7.0 ± 1.7
	1250	-	13.7 ± 2.5	114.0 ± 0.0	206.0 ± 14.7	10.0 ± 3.5	5.3 ± 0.6
	625	-	15.7 ± 0.6	135.7 ± 12.5	223.7 ± 25.7	13.3 ± 2.1	5.0 ± 1.0
	313	-	14.3 ± 4.5	131.7 ± 5.5	224.7 ± 19.0	10.7 ± 6.7	5.0 ± 2.6
	156	-	16.7 ± 3.2	131.0 ± 8.5	236.0 ± 14.0	12.0 ± 6.6	7.7 ± 0.6
	78	-	13.0 ± 3.0	144.3 ± 15.0	220.7 ± 21.0	11.7 ± 2.9	6.7 ± 0.6
2NF	1.0	-	169.0 ± 16.5				
SAZ	1.5	-		722.7 ± 33.5		575.0 ± 46.4	
ICR-191	1.0	-					844.3 ± 114.2
MMC	1.0	-			771.7 ± 18.2		
DMSO		+	40.3 ± 3.1	156.0 ± 20.1	307.0 ± 16.4	17.7 ± 1.5	15.0 ± 2.0
ESBO	5000	+	42.3 ± 5.0	159.7 ± 18.8	248.3 ± 27.8	18.7 ± 1.2	15.3 ± 0.6
	2500	+	48.0 ± 3.0	174.7 ± 13.1	230.7 ± 22.1	17.0 ± 2.0	9.3 ± 2.5
	1250	+	47.0 ± 5.3	161.7 ± 4.0	250.0 ± 10.8	20.7 ± 5.1	12.7 ± 2.3
	625	+	43.3 ± 6.5	178.3 ± 14.0	249.7 ± 7.1	16.7 ± 8.5	10.3 ± 6.1
	313	+	44.7 ± 8.6	184.7 ± 12.4	234.3 ± 18.8	20.3 ± 2.5	9.0 ± 3.5
	156	+	49.3 ± 7.5	166.7 ± 20.3	248.3 ± 28.5	21.7 ± 2.1	14.3 ± 2.1
	78	+	44.3 ± 4.2	173.3 ± 4.9	238.7 ± 41.1	21.3 ± 2.5	13.0 ± 1.0
2AA	0.5	+	372.3 ± 44.8				
	1.0	+		629.7 ± 53.7			
	2.0	+				283.0 ± 11.5	214.0 ± 14.8
	10.0	+			868.3 ± 194.0		

[a]DMSO, dimethyl sulfoxide; 2NF, 2-nitrofluorene; SAZ, sodium azide,; MMC, mitomycin C; 2AA, 2-aminoanthracene; ESBO, Epoxidized soy bean oil.

용하였다.

실험결과

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험

*S. typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험에서 에폭시화 대두유는 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102 등 5종의 시험균주에서 S9 mix를 적용하지 않은 직접법의 경우, 모든 용량 단계에 걸쳐 전체 시험용 균주에서 음성대조와 같은 정도 또는 그 이하의 복귀돌연변이 집락수를 나타내었다. S9 mix를 이용한 대사활성화법의 경우에도 S9 mix를 적용하지 않은 직접법과 유사한 결과를 나타내었다. 양성대조화합물은 직접법과 S9 mix를 첨가한 대사활성화법 모두에서 각각의 시험용 균주에 대하여 복귀변이 집락수를 증가시켜 본 실험이 적정히 행하여졌음을 나타내었다 (Table 1).

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

Chinese hamster lung 세포를 이용한 염색체이상시험에서 시험물질인 에폭시화 대두유는 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02 mg/ml의 농도에서 예비독성시험을 시행한 결과 전 농도에서 세포독성은 관찰되지 않았다. 따라서 에폭시화 대두유의 염색체이상시험 본시험 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/ml로 하였다. 에폭시화 대두유의 염색체이상시험 직접법과 대사활성화법, 6시간과 24시간 처리의 결과를 Table 2에 나타내었다. 에폭시화 대두유에 대한 대사활성부재 및 존재 하의 염색체이상시험 결과 모든 농도에서 염색체이상을 나타내는 세포의 수가 통계학적(Student T-test)으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하지 않았다.

소핵시험

암컷과 수컷의 어린 (3주령) ddY mouse를 이용한 *in vivo* 소핵시험에서 에폭시화 대두유는 모든 용량단계에 걸쳐 성별에 따른 차이를 보이지 않고 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현이 거의 관찰되지 않았다 (Table 3). 전체 적혈구에 대한 PCE의 비율에서는 모든 용량단계에서 대조군에 비하여 차이가 없었다. 양성대조군은 Hayashi등[8]의 참고 data의 상, 하한의 범위 내에 들었으며, 용매대조군에서는 일반적인 음성대조군의 소핵 유발율을 나타내었다. 또한 암컷과 수컷의 성숙 (6주령) ddY mouse를 이용한 *in vivo* 소핵시험에

Table 2. Chromosome aberration tests of ESBO in Chinese hamster lung cells

Compound[a]	Dose (mg/ml)	S9 mix	Time (hr)[b]	No. of metaphase	No. of aberration[c]						No. of normal cells[d]
					gap	ctb	cte	csb	cse	num	
DMSO		-	24	100 ± 0[d]	1.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.7	3.0 ± 1.4	0.5 ± 0.7	94.5 ± 0.7
ESBO	0.625			100 ± 0	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	2.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	97.0 ± 0.0
	1.25			100 ± 0	1.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	96.5 ± 0.7
	2.5			100 ± 0	0.5 ± 0.7	1.5 ± 0.7	1.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7	0.5 ± 0.7	94.0 ± 0.0
	5			100 ± 0	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.4	0.5 ± 0.7	1.5 ± 0.7	1.0 ± 0.0	95.5 ± 0.7
MMC	0.0001			100 ± 0	4.5 ± 0.7	11.0 ± 0.0	11.5 ± 2.1	3.5 ± 2.1	11.0 ± 0.0	1.5 ± 0.7	62.5 ± 3.5
DMSO		-	6+18	100 ± 0	1.5 ± 0.7	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	2.5 ± 2.1	0.5 ± 0.7	94.5 ± 0.7
ESBO	0.625			100 ± 0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.4	0.5 ± 0.7	95.0 ± 1.4
	1.25			100 ± 0	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.5 ± 0.7	0.5 ± 0.7	93.5 ± 0.7
	2.5			100 ± 0	1.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	95.5 ± 0.7
	5			100 ± 0	2.5 ± 2.1	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	3.5 ± 0.7	0.5 ± 0.7	92.5 ± 2.1
MMC	0.0001			100 ± 0	5.5 ± 2.1	10.5 ± 0.7	14.5 ± 6.4	2.5 ± 0.7	14.5 ± 5.0	1.0 ± 1.4	59.0 ± 8.5
DMSO		+	6+18	100 ± 0	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	98.0 ± 1.4
ESBO	0.625			100 ± 0	2.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	94.5 ± 0.7
	1.25			1000	1.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.0 ± 1.4	0.5 ± 0.7	93.5 ± 0.7
	2.5			1000	1.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	93.0 ± 1.4
	5			1000	1.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.7	8.0 ± 1.4	0.5 ± 0.7	90.0 ± 1.4
B(a)P	0.02			1000	5.5 ± 2.1	5.5 ± 6.4	10.0 ± 12.7	2.5 ± 0.7	17.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	65.0 ± 17.0

[a]MMC, mitomycin C; B[a]P, benzo[a]pyrene; ESBO, Epoxidized soy bean oil.
[b]Treatment time - expression time.
[c]gap, chromatid and chromosome gap; ctb, chromosome break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; num, numerical aberration.
[d]mean ± standard deviation (n=2)

Table 3. Micronucleus tests of ESBO in young (3 weeks old) ddY mice

Compound	Route	Dose (g/kg)	No. of mice	Sex	Sampling time (hr)	MNPCE[a] (‰, Mean ± S.D.)	PCE/(PCE+NCE)[b] (%, Mean ± S.D.)
corn oil	p.o		5	male	24	1.6 ± 0.2	62.8 ± 4.8
ESBO	p.o	2.5	5	male	24	1.9 ± 1.6	53.2 ± 9.1
	p.o	5	5	male	24	0.6 ± 0.4	62.6 ± 2.8
	p.o	10	5	male	24	1.3 ± 0.9	70.8 ± 5.2
	p.o	20	5	male	24	2.1 ± 1.5	64.71 ± 3.8
MMC	i.p.	0.002	5	male	24	15.9 ± 9.1	46.0 ± 3.9
corn oil	p.o		5	female	24	0.8 ± 0.4	52.0 ± 1.4
ESBO	p.o	2.5	5	female	24	0.0 ± 0.0	52.0 ± 9.6
	p.o	5	5	female	24	0.4 ± 0.6	51.2 ± 4.0
	p.o	10	5	female	24	0.9 ± 0.3	51.8 ± 2.6
	p.o	20	5	female	24	1.3 ± 0.4	52.0 ± 5.7
MMC	i.p.	0.002	5	female	24	23.3 ± 4.6	42.0 ± 9.9

ESBO, Epoxidized soy bean oil; MMC, Mitomycin C; PCE, polychromatic erythrocyte; NCE, norchromatic erythrocyte
[a]The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was calculated from 2000 PCEs per animal.
[b]The percentage of PCE in 1000 erythrocytes per animal.

Table 4. Micronucleus tests of ESBO in adult (6 weeks old) ddY mice

Compound	Route	Dose (g/kg)	No. of mice	Sex	Sampling time (hr)	MNPCE[a] (‰, (Mean ± S.D.)	PCE/(PCE+NCE)[b] (%, Mean ± S.D.)
corn oil	p.o		5	male	24	1.4 ± 0.7	54.8 ± 4.1
ESBO	p.o	2.5	5	male	24	1.6 ± 1.0	50.0 ± 4.8
	p.o	5	5	male	24	1.0 ± 0.4	54.8 ± 3.8
	p.o	10	5	male	24	1.0 ± 0.4	49.4 ± 5.0
	p.o	20	5	male	24	2.3 ± 2.4	53.3 ± 5.5
MMC	i.p.	0.002	5	male	24	69.7 ± 8.3	45.2 ± 5.9
corn oil	p.o		5	female	24	0.8 ± 0.9	56.0 ± 6.7
ESBO	p.o	2.5	5	female	24	1.2 ± 0.6	51.2 ± 8.1
	p.o	5	5	female	24	1.0 ± 0.9	50.8 ± 3.0
	p.o	10	5	female	24	1.7 ± 0.4	56.63.4
	p.o	20	5	female	24	2.0 ± 0.8	51.0 ± 4.3
MMC	i.p.	0.002	5	female	24	52.8 ± 7.7	46.6 ± 5.8

ESBO, Epoxidized soy bean oil; MMC, Mitomycin C; PCE, polychromatic erythrocyte; NCE, norchromatic erythrocyte
[a]The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was calculated from 2000 PCEs per animal.
[b]The percentage of PCE in 1000 erythrocytes per animal.

서도 어린 (3주령) ddY mouse와 유사한 정도의 소핵 유발율을 나타내었다 (Table 4). 한편, 시험물질인 에폭시화 대두유는 투여 후 동물에서 육안적인 어떠한 독성의 징후도 나타나지 않았다.

고 찰

유전물질의 손상으로 나타나는 발암에 대한 관심이 높아지면서 돌연변이 및 발암물질을 단기적으로 쉽게 검색할 수 있는 유전독성 시험법의 개발이 진행되어 왔으며 *in vitro* 시험인 Ames 등이 개발한 복귀돌연변이시험[2] 및 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험[3]과 *in vivo* 시험인 동물을 이용한 소핵시험[4]은 국제적으로 널리 이용하고 있는 대표적인 유전독성시험법이다. 한편, polyvinyl chloride (PVC), polyvinylidene chloride (PVDC), 랩 (wrap) 뿐만 아니라 유아 식품중의 병마개 등에 함유되어 합성수지 및 고무의 가소제로 많이 사용되고 있는 에폭시화 대두유는 PVC film으로 싸여진 식품에서 1~85 mg/kg, 포장된 유아식과 금속 캔에서 0.1~7.6 mg/kg이 검출되었음이 보고되었으며[9], 최근에는 PVC gasket을 통하여 유아식품에 최대 50.8 mg/kg까지

평균 11.9 mg/kg 정도 유리됨이 보고되었다[10]. 이는 'Scientific Committee for Food of the European Commision'에서 제안한 성인의 TDI (1 mg/kg bw)를 초과하지 않기 위해서는 유아식내의 에폭시화 대두유의 양은 31.5 mg/kg을 넘지 않아야 하나 이를 초과하는 양이었다. 한편 에폭시화 대두유에 대한 돌연변이 유발성을 시험한 결과 살모넬라균주를 이용한 복귀돌연변이시험에서 음성을 나타내었다는 보고가 있다[11]. 그러나 이러한 유전독성 결과는 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험만을 수행한 결과로서 다양한 기전을 통해 유전독성을 평가해야 하는 과학적 기준에 매우 미흡한 결과이다. 그러므로 본 연구에서는 최근 유럽 등지에서 식품으로의 유리가 보고되어 안전성에 대한 재평가가 요구되어지고 있으며, 생활주변에서 폭로될 가능성이 높은 에폭시화 대두유의 유전독성을 정확히 평가하기 위해서 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 계를 이용한 유전독성시험을 수행하였다.

*S. typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험에서 에폭시화 대두유는 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102 등 5종의 시험용 균주에서 S9 mix를 적용하지 않은 직접법의 경우, 전용량 단계에 걸쳐 모든 시험용 균주에서 음성대조와 같은 정도 또는 그 이하의 복귀변이 집락수를 나타내었다. S9 mix를 이용한 대사활성화법의 경우에도 S9 mix를 적용하지 않은 직접법과 유사한 결과를 나타내었다. Heath 등[11]의 시험에 이용한 균주와 농도, 실험에 사용한 plate수를 추가, 보완하여 실시한 본 연구의 결과는 Heath 등[11]의 보고와 일치하는 결과이며, 이상의 결과로 보아 본 시험조건에 있어서 에폭시화 대두유는 돌연변이 유발성을 가지지 않는 것으로 판단된다.

또한, chinese hamster lung 세포를 이용한 염색체이상시험에서 시험물질인 에폭시화 대두유는 예비독성시험을 시행한 결과 전 농도에서 세포독성은 관찰되지 않아 본시험 농도를 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/ml로 하였으며 대사활성 부재 및 존재하의 염색체이상시험 결과 모든 농도에서 염색체이상을 나타내는 세포의 수가 통계학적(Student T-test)으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하지 않았다. 이 결과로 보아 에폭시화 대두유에 의한 염색체이상 유발작용은 없는 것으로 사료된다.

한편, 포유동물인 설치류의 골수내 다염성적혈구를 이용한 소핵시험법은 1975년 Schmid[8]에 의해 개발된 이후, 화학물질 등의 변이원성을 평가하는 *in vivo* 시험법으로 세계적으로 이용되어 오고 있다. 설치류의 적혈구를 target으로 한 소핵시험은 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체 성분인 소핵의 유도를 지표로 하는 cytogenetic 시험법이다. 이 소핵시험은 많은 연구를 통하여 동물의 성, 계통[12,13], 투여경로 차이[14]에 따른 비교 논문들이 보고되어 있으며, 검체 투여방법, 채취시간에 따른 골수세포의 적혈구 생성에 미치는 영향에 관한 연구가 계속되어 왔다[15,16,17]. 본 연구에서는 유아용 식품 포장용기로부터 유리될 수 있는 에폭시화 대두유의 유아에 대한 염색체의 손상정도를 관찰하고자 암컷과 수컷의 어린 (3주령) ddY mouse를 이용하여 *in vivo* 소핵시험을 실시하였다. 에폭시화 대두유는 모든 용량단계에 걸쳐 성별에 따른 차이를 보이지 않았고 소핵을 가진 미성숙 적혈구의 출현이 거의 관찰되지 않았다. 또한, 시험물질의 세포분열시 미치는 독성을 측정할 수 있는 전체 적혈구에 대한 미성숙 적혈구의 비율은 모든 용량단계에서 음성대조군에 비하여 차이가 없었다. 또한 암컷과 수컷의 성숙 (6주령) ddY mouse를 이용한 *in vivo* 소핵시험에서도 어린 (3주령) ddY mouse와 유사한 정도의 소핵 유발율을 나타내었다. 이 결과로부터 에폭시화 대두유는 mouse의 골수 적아구 세포의 분화과정에서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합하여, 본 시험조건 중 에폭시화 대두유는 *in vitro* 시험인 *Salmonella* 균주를 이용한 복귀돌연변이시험과 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 *in vivo* 시험인 mouse를 이용한 소핵시험에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

국문요약

유아 식품중의 병마개 등에 약 30%까지 함유되어 합성수지 및 고무의 가소제로 많이 사용되고 있으나 최근 유럽 등지에서 식품으로의 유리가 보고되어 안전성에 대한 재평가가 요구되어지고 있는 에폭시화 대두유 (Epoxidized soy bean oil, ESBO)의 유전독성을 평가하기 위해서 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험과 포유류 배양세포를 대상으로 검색하는 체외 염색체이상시험, 설치류의 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험을 수행하였다. *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102균주를 이용한 복귀돌연변이 시험결과 직접법 및 대사활성화법에서 돌연변이 유발성을 가지지 않는 음성의 결과를 나타내었으며, chinese hamster lung cell을 이용한 염색체이상시험을 실시한 결과, 직접법 및 대사활성화법에서 염색체이상 유발작용을 보이지 않는 음성의 결과를 나타내었다. 또한 성별, 연령별에 따라서 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험에서 에폭시화 대두유는 미성숙 적혈구중 유의성 있는 소핵 유발은 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합하여, 본 시험조건 중 에폭시화 대두유는 *in vitro* 시험인 *Salmonella* 균주

를 이용한 복귀돌연변이시험과 포유동물 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 *in vivo* 시험인 마우스를 이용한 소핵시험에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. BIBRA(British Industrial Biological Research Association), Toxicity profile. (1997).
2. 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).
3. Ishidate, jr. M. and Odashima, S.: Chromoseome tests with 134 compounds on chinese hamster cells in vitro - a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.*, **48**, 337-354 (1977).
4. Schmid, W.: The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15 (1975).
5. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunolo. Methods,* **65**, 55-63 (1983).
6. Galloway, M.S., Sofuni, T., Shelby, M.D., Thilagar, A., Kumaroo, V., Kaur,P., Anderson, B., Zeiger, E. and Ishidate, M.Jr.: Multilaboratory comparison of in vitro tests for chromosome aberration in CHO and CHL cells tested under the same protocols, *Environ. Mutagens and Carcinogens*, **29(2)**, 189-207 (1997).
7. Hayashi, M., I. Hashimoto, S., Sakamoto, Y., Hamada, C., Sofuni, T. and M. Yoshimura, I.: Statistical analysis of data in mutagenicity assays; Rodent micronucleus assay. *Environ. Health Perspect. supp.,* **102(1)**, 49-52 (1994).
8. Hayashi, M., Sutou, S., Shimida, H., Sato, S., Sasaki, Y.F. and Wakada, A.: Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **223**, 329-344 (1989).
9. Castle, L., Mayo, A. and Gilbert, J.: Migration of epoxidised soya bean oil into foods from retail packaging materials and plasticised PVC film used in the home. *Food Additives and Contaminants,* **7**, 29-36 (1990).
10. Hammarling, L., Gustavsson, H., Stvensson, K., Karlsson, S. and Oskarsson, A.: Migration of epoxidised soya bean oil from plasticised PVC gaskets into baby food. *Food Additives and Contaminants,* **15**, 203-208 (1998).
11. Heath, J.L. and Reilly, M.: Mutagenesis testing of acetyltributylcitrate and epoxidized soy bean oil, *Poultry Science*, **61**, 2517-2519 (1982).
12. Sutou, S.: Sex difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **172**, 151-163 (1986).
13. Sutou, S.: Strain difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **204**, 307-316 (1988).
14. Hayashi, M., Sutou, S., Shimida, H., Sato, S., Sasaki, Y.F. and Wakada, A.: Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **223**, 329-344 (1989).
15. Vanparys, P., Deknudt, G., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Marsboom, R.: Sampling times in micronucleus testing, *Mutat. Res.*, **282**, 191-196 (1992).
16. Hayashi, M., Sofuni T. and Morita, T. : Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.*, **252**, 281-287 (1991).
17. Hayashi, M., Sofuni T. and Ishidate, Jr. M.: A pilot experiment for the micronucleus test: The multi-sampling at multi-dose levels method, *Mutat. Res.*, **141**, 165-169 (1984).