J. Fd Hyg. Safety 12(3), 217-227(1997)

감마선 조사 생약재의 안전성에 관한 유전독성학적 평가

조성기†

한국원자력연구소, 방사선식품공학연구팀

Genotoxicological Safety of the Gamma-Irradiated Medicinal Herbs

Sung-Kee Jo†

Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

ABSTRACT—These experiments were performed to investigate the safety of the three medicinal herbs—*Curcuma longa* Linne, *Paeonia japonica* Miyabe, *Scutellaria baikalensis* George—irradiated with gamma rays in respect of genotoxicity. The methanol-soluble and water-soluble fractions of the methanol-water extracts of the 10 kGy gamma-irradiated herbs were examined in two short-term *in vitro* tests : (1) *Salmonella typhimurium* reversion assay (Ames test) in strain TA 98, TA 100 and TA 102 (2) Micronucleus test in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. No mutagenicity was detected in the two assays with or without metabolic activation. From these results, the safety of the herbs irradiated with gamma rays at practical doses could be revealed in further tests of genotoxicity *in vivo*, chronic and reproductive toxicity.

Key words □ irradiated medicinal herb, Ames test, micronucleus test, CHO cells

식품 및 보건관련 산업의 고도화와 국제화 시대를 맞아 고부가가치의 가공제품을 생산하기 위해서는 원료의 안정 공급, 위생적 제품생산, 효율적 제조공정, 안전한 저장 유통 기술 등이 확보되어야 한다. 제품의 가공, 저장, 위생화에 있어서 지금까지 이용되어온 온열처리, 냉장/냉동, 화학약품처리(보존제, 훈증제 등) 등은 처리효과, 처리비용, 건전성, 환경공해 등 많은 문제점이 지적되면서 세계적으로 사용이 점차 제한을 받고 있다. 특히 식품 및 보건산물의 안전성에 대한 국민관심이 높아짐에 따라서, 식품에서 기인되는 질병의 예방과 위생적인 식품의 생산기반 확립을 위해 이러한 문제점을 해결하거나 개선할 수 있는 대체기술 개발의 필요성이 보건당국 및 산업계로 부터 시급히 요구되고 있다. 이와같은 문제점을 해결하기 위한 일환으로, 국제기구와 주요 선진국에서는 방사선 조사기법의 효과와 잠재력을 인정하여 식품위생화를 위한 대체방안으로서 이 기술의 실용화 확대를 적극 추진하고 있으며, 현재 37개국에서 식품의 방사선 조사를 허가하였고 이중 25개국에서 상업적으로 실용화되고 있다.[1] 국내에서도 상업적 방사선 조사 시설 1기가 1987년 6월부터 가동되고 있으며, 현재까지 13개 식품 품목군에 대한 방사선 조사가 보건복지부로부터 허가되었다.[2]

최근까지 현대의학의 눈부신 발전에도 불구하고 성인병에 대하여 뚜렷한 치료책이 나오지 못하고 있는 실정이기 때문에 성인병을 예방 또는 치료하고자 하는 사람들은 이들 질병에 효과가 있을 것으로 믿어지는 소위 "건강식품"에 보다 많은 관심을 갖게되었다. 한편, 건강보조식품/제약의 가공원료로 수요가 급증하고 있는 생약재의 위생화, 원료의 안전공급, 효율적 제조공정 등에 이용되어온 기존 위생화 방법인 화학약품(훈증제 포함) 처리방법의 많은 문제점이 제기되고 있다. 이에 이 문제점을 해결할 수 있는 감마선 조사기술을 이용한 새로운 위생화 방법 개발이 요구되고 있다.[2,3]

방사선 조사 식품의 건전성에 관해서는 1980년 국제기구인 조사식품공동전문위원회가 종합평가로서 "평균 10 kGy 이하로 조사된 모든 식품은 독성학적으로 안전하며, 영양학적으로도 문제가 되지않는다"고 결론을 지었다.[4] 그러나 한편으로는 조사식품의 안전성에 대한 논란이 계속되어, 1992년 5월 WHO에서는 국제소비자연맹(IOCU)의 대표단과 식품조사를 반대하는 식품과학 및 식품화학 전공 교수들의 참석하에 회의를 개최한 결과, 조사 식품의 안전성 및 영양적 적합성을 재확인하면서 식품을 제조관리수칙에 따라 방사선을 조사할 경우 인간의 건강을 해롭게 하는

† Author to whom correspondence should be addressed.

어떠한 성분변화나 이물질이 생성되지 않으며, 소비자들에게 미생물학적 위험성을 증가시키지 않는다고 발표하였다.[5] 그럼에도 불구하고 방사선 조사식품에 대한 소비자들의 불안은 불식되지 않고있다.

따라서, 저자 등은 천연생약재의 위생화를 위한 감마선 조사기술의 이용 가능성을 검토하기 위해 이미 미생물학적, 이화학적 안전성을 확인하였고, 본연구는 오염유기체 완전 구제 선량인 10 KGy의 감마선으로 조사된 생약재의 유전독성학적 안전성을 평가하고자, 1차적으로 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험 및 배양된 Chinese hamster ovary(CHO) 세포를 이용한 소핵시험 등을 실시하였다.

재료 및 방법

시료조제

시험대상 생약재는 울금(*Curcuma longa* Linne), 작약(*Paeonia japonica* Miyabe), 황금(*Scutellaria baiklensis* George)이었으며, 경동시장에서 한국산으로 구입하였다.

생약재의 방사선 조사는 한국원자력연구소에 소재하는 감마선 조사시설(선원: Co-60, 10만 Ci)을 이용하여 실온에서 시간당 1 KGy의 선량율로 10 KGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 이때 흡수선량을 확인하기 위하여 free radical dosimeter와 ceric cerous dosimeter를 이용하였다.

감마선 조사 및 비조사 생약재 40 g에 10배량의 50% methanol 수용액을 가하여 60°C water bath에서 8시간씩 2회 추출하고 여지(Whatman No. 5)로 여과한 후 감압농축하여 85° Brix의 생약추출물을 제조하였다. 그 다음 methanol에 녹는 분획과 물에 녹는 분획으로 나누어 수집한 후 methanol 가용분은 감압농축하여 DMSO에 녹이고 물 가용분은 동결건조하여 물에 녹였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험

시험을 위한 배지, 시약 및 S9 mix의 조제와 시험방법은 Marton & Ames의 방법[6,7]에 따랐다. S9 분획은 Microbiological Associates(Bethesda, Maryland, U.S.A.)에서 구입하였다.[8,9]

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102는 식품의약품안전본부로 부터 분양받았다. 각 균주는 histidine 요구성, deep rough(rfa) 특성, UV에 대한 민감도(uvrB 돌연변이), R-factor에 의한 ampicillin 또는 tetracycline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다.

시험은 대사활성화시키지 않는 경우(standard plate incorporation test)와 대사활성화시키는 경우(preincubation test)로 나누어 시행하였다. 시험관에 인산완충용액 0.5 m*l* (대사활성화시키는 경우에는 S9 mix 0.5 m*l*), 시료용액 0.1 m*l*과 Oxoid nutrient broth에서 하룻밤 배양시킨 균배양액 0.1 m*l*을 넣어 가볍게 vortex하였다. 대사활성화시키는 경우에는 30분간 37°C에서 예비배양한 다음(대사활성화시키지 않는 경우에는 바로) histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C)를 2 m*l* 가하고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate 상에 부어 평판고화시켰다. 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant colony를 계수하였다. 돌연변이 유발성의 판정은 원저의 제시에 따라 복귀변이 집락수가 용매대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다.

포유류 배양세포를 이용한 소핵시험

시험에 사용된 Chinese hamster ovary(CHO) 세포는 서울대학교 보건대학원 정해원 교수로부터 분양받았다. 배지는 10% fetal bovine serum, 100 U/m*l* penicillin, 100 μg/m*l* streptomycin, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol 및 20 mM HEPES buffer를 첨가시킨 McCoy's 5A 배지를 사용하였으며, 모두 GIBCO BRL, Inc.(U.S.A.)에서 구입하였다. 배양은 포화 상대습도 조건하에서 5% CO2를 공급하는 37°C의 CO_2 Incubator에서 수행하였다.

시험방법은 CHO 세포 8×10^4개를 Flaskette(19.8×51.8 mm, Nunc)에 파종하여 2일간 배양한 후, 시험물질을 첨가하고 24시간 후에 세포 표본을 만들었다. Fenech and Morley의 cytokinesis-block(CB) method[10]에 따라 cytochalasin B(Cyt-B; 3 μg/m*l*, Aldrich)를 시험물질과 함께 첨가하였다. 배양액을 suction out 시킨 다음, 75 mM KCl 용액 2 m*l*을 가하여 5분간 방치한 다음, 고정액(methanol : acetic acid, 3:1)으로 3회 고정시킨 후 공기건조법으로 세포표본을 만들었다. 3% Giemsa 염색액(pH 6.5)으로 15분간 염색하여 광학현미경으로 400배에서 관찰하였다. Cyt-B는 DMSO에 2 mg/m*l*로 녹여 -70°C에 보관하고, 사용하기 직전에 녹여 Hanks' balanced salt solution으로 희석하여 사용하였다. 대사활성 존재하의 시험은 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 시험물질과 S9 mix(배지의 20% 비율)를 첨가하여 6시간 동안 배양한 다음, 신선한 배지로 교환하고 Cyt-B를 첨가하여 18시간 더 배양한 후 세포표본을 만들었다.

시험물질은 시료용매로 희석하였으며, 시료의 첨가량은 물가용분의 경우 배양용량의 1/10(methanol 가용분의 경우에는 1/200)을 넘지않게 하였다. 음성 대조군으로는 희석액인 시료용매를, 양성 대조군으로는 직접법에서는 증류수에 녹인 mytomycin C(Sigma)를 0.1 μg/m*l*로, 대사활성화법에

서는 DMSO에 녹인 benzo(α)pyrene(Sigma)을 0.02 mg/ml로 첨가하였다.

Micronuclei(MN)의 판독은 Almássy 등[11]의 기준에 따랐다. 1,000개의 binucleated CB세포들 중 MN을 갖는 세포를 계수하였다.

결과 및 고찰

돌연변이원성 검증

시험대상은 오염유기체 완전 구제 선량인 10 KGy의 감마선으로 조사된 울금, 황금, 작약 추출물의 methanol 가용분과 물 가용분이었다.

대상물질이 천연생약재임을 고려하여 50%의 균주생장억제를 나타내는 농도를 최고농도로 하여, *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 및 TA102의 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과를 Table 1~6에 나타내었다. 각 시험에서 음성대조군의 복귀변이 집락수는 문헌치[6,7,12]의 범위 이내이었고, 양성대조 화합물에 의해 복귀변이 집락수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 행하여 졌음을 알 수 있었다.

대사활성화을 시키지 않은 경우와 시킨 경우 모두에서 감마선조사 생약추출물에 의한 각 균주의 복귀돌연변이 집락수의 증가를 인정할 수 없었다. 다만, 작약 물 가용분의 경우 첨가량의 증가에 따라 집락수가 다소 증가하는 경향은 작약 물 가용분에 포함된 histidine에 의한 증식작용에 기인한 것으로 사료된다. 그러나 각 용량에서 비조사군과 감마선조사군의 집락수는 거의 동일하였다.

따라서, 감마선조사 생약추출물이 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다. 이 결과는 하 등[12]이 방사선 조사 백삼분말을 시험한 결과와 일치하였다.

Table 1. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with methanol-soluble fraction of γ-irradiated *Curcuma longa* Linne

Test Material	Irradiation[a]	S9 Mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His^+) per plate		
				TA 98	TA 100	TA 102
DMSO	-	-		20 28 25 (24)	176 164 171 (170)	324 336 231 (297)
Test	-	-	40.0	35 32 (34)	157 175 (166)	288 316 (302)
material	-	-	13.3	33 23 (28)	163 148 (156)	346 324 (335)
	-	-	4.4	34 29 (32)	160 158 (159)	333 344 (338)
	-	-	1.3	27 29 (28)	146 162 (154)	300 319 (310)
	-	-	40.0	25 22 (24)	159 175 (167)	305 308 (307)
	+	-	0.4	21 30 (26)	164 152 (158)	313 303 (308)
	+	-	13.3	26 24 (25)	146 161 (154)	301 343 (322)
	+	-	4.4	24 23 (24)	142 140 (141)	298 310 (304)
	+	-	1.3	23 22 (23)	129 157 (143)	296 301 (299)
	+	-	0.4	26 22 (24)	145 163 (154)	322 304 (313)
NPD	-	-	20	2021 2076 (2049)		
Na-Azide	-	-	1.5		1216 1269 (1243)	
MMC	-	-	0.5			5012 5208 (5110)
DMSO	-	-		33 24 35 (31)	197 227 183 (202)	294 306 284 (295)
DMSO	-	+		37 37 28 (34)	224 209 241 (224)	320 322 346 (329)
Test	-	+	40.0	28 22 (25)	212 222 (217)	336 370 (353)
material	-	+	13.3	24 35 (30)	215 218 (217)	345 310 (328)
	-	+	4.4	38 28 (33)	203 209 (206)	301 325 (313)
	-	+	1.3	33 36 (35)	194 209 (202)	341 315 (328)
	-	+	0.4	40 30 (35)	221 224 (223)	312 337 (325)
	+	+	40.0	23 37 (30)	206 224 (215)	297 311 (304)
	+	+	13.3	33 29 (31)	214 211 (213)	314 325 (320)
	+	+	4.4	30 19 (25)	213 203 (208)	323 303 (313)
	+	+	1.3	36 32 (34)	207 216 (212)	300 261 (281)
	+	+	0.4	26 31 (29)	209 227 (218)	276 279 (278)
2-AF	-	+	10	1287 1207 (1247)	732 690 (711)	454 521 (488)

[a] Irradiation (10 KGy of Co-60 gamma-ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide (sodium azide), MMC (mitomycin C) and 2-AF (2-aminofluorene) were used as positive controls for the corresponding strains.

Table 2. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with water-soluble fraction of γ-irradiated *Curcuma longa* Linne

Test Material	Irradiation[a]	S9 Mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His$^+$) per plate		
				TA 98	TA 100	TA 102
H_2O	-	-		22 31 26 (26)	239 260 223 (241)	278 310 343 (310)
Test	-	-	7,500	34 29 (32)	277 273 (275)	396 385 (391)
material	-	-	2,500	26 28 (27)	235 268 (252)	354 387 (371)
	-	-	833	26 27 (27)	245 228 (237)	366 352 (359)
	-	-	278	26 22 (24)	240 235 (238)	333 278 (306)
	-	-	93	25 19 (22)	231 249 (240)	279 314 (297)
	+	-	7,500	22 21 (22)	268 244 (256)	394 374 (384)
	+	-	2,500	28 28 (28)	216 221 (219)	350 351 (351)
	+	-	833	22 27 (25)	222 227 (225)	306 318 (312)
	+	-	278	28 21 (25)	216 247 (232)	269 283 (276)
	+	-	93	23 27 (25)	253 228 (241)	266 294 (280)
NPD	-	-	20	2203 2125 (2164)		
Na-Azide	-	-	1.5		1098 1174 (1136)	
MMC	-	-	0.5			5107 5302 (5205)
H_2O	-	-		27 21 22 (23)	216 221 204 (214)	298 288 297 (294)
H_2O	-	+		44 29 34 (36)	273 235 256 (255)	307 330 334 (324)
Test	-	+	7,500	27 38 (33)	237 219 (228)	335 352 (344)
material	-	+	2,500	28 42 (35)	254 258 (256)	347 325 (336)
	-	+	833	36 31 (34)	244 234 (239)	263 367 (315)
	-	+	278	41 29 (35)	237 263 (250)	319 365 (342)
	-	+	93	37 37 (37)	222 231 (227)	271 345 (308)
	+	+	7,500	31 36 (34)	229 257 (243)	346 361 (354)
	+	+	2,500	29 38 (34)	242 280 (261)	338 354 (346)
	+	+	833	30 35 (33)	218 272 (245)	291 349 (320)
	+	+	278	26 34 (30)	220 224 (222)	303 321 (312)
	+	+	93	36 39 (38)	229 279 (254)	300 348 (324)
2-AF	-	+	10	1168 1203 (1186)	720 804 (762)	646 531 (589)

[a] Irradiation (10 KGy of Co-60 gamma-ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide (sodium azide), MMC (mitomycin C) and 2-AF (2-aminofluorene) were used as positive controls for the corresponding strains.

Table 3. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with methanol-soluble fraction of γ-irradiated *Paeonia japonica* Miyabe

Test Material	Irradiation[a]	S9 Mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His$^+$) per plate		
				TA 98	TA 100	TA 102
DMSO	-	-		33 25 14 (24)	257 225 256 (246)	287 327 283 (299)
Test	-	-	GI(50%)[b]	23 27 (25)	226 228 (227)	328 266 (297)
material	-	-	GI(50%)/3	20 19 (20)	221 197 (209)	319 297 (308)
	-	-	GI(50%)/3^2	21 23 (22)	198 229 (214)	296 299 (298)
	-	-	GI(50%)/3^3	21 32 (27)	241 246 (244)	295 356 (326)
	-	-	GI(50%)/3^4	24 21 (23)	211 253 (232)	314 299 (307)
	+	-	GI(50%)	27 26 (27)	219 207 (213)	325 338 (332)
	+	-	GI(50%)/3	25 22 (24)	215 229 (222)	313 281 (297)
	+	-	GI(50%)/3^2	30 27 (29)	259 249 (254)	336 346 (341)
	+	-	GI(50%)/3^3	31 24 (28)	241 235 (238)	354 306 (330)
	+	-	GI(50%)/3^4	14 21 (18)	211 224 (218)	287 333 (310)
NPD	-	-	20	1868 1925 (1897)		
Na-Azide	-	-	1.5		1091 896 (994)	
MMC	-	-	0.5			5954 5726 (5840)

Table 3. Continued

Test Material	Irradiation[a]	S9 Mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His$^+$) per plate		
				TA 98	TA 100	TA 102
DMSO	-	-		28 21 27 (25)	203 228 241 (224)	328 338 346 (337)
DMSO	-	+		29 29 36 (31)	240 257 238 (245)	352 333 369 (351)
Test	-	+	GI(50%)	28 28 (28)	248 224 (236)	363 310 (337)
material	-	+	GI(50%)/3	26 35 (31)	213 214 (214)	359 341 (350)
	-	+	GI(50%)/3^2	32 25 (29)	221 226 (224)	337 339 (338)
	-	+	GI(50%)/3^3	19 21 (20)	225 227 (226)	367 397 (382)
	-	+	GI(50%)/3^4	32 21 (27)	214 197 (206)	356 341 (349)
	+	+	GI(50%)	27 26 (27)	239 279 (259)	318 350 (334)
	+	+	GI(50%)/3	25 22 (24)	219 207 (213)	361 374 (368)
	+	+	GI(50%)/3^2	30 27 (29)	222 223 (223)	363 402 (383)
	+	+	GI(50%)/3^3	31 24 (28)	237 224 (231)	323 332 (328)
	+	+	GI(50%)/3^4	14 21 (18)	199 229 (214)	348 336 (342)
2-AF	-	+	10	1157 1023 (1090)	824 719 (772)	597 508 (553)

[a] Irradiation (10 KGy of Co-60 gamma-ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
[b] GI(50%)=concentration of 50% growth inhibition; 50 μg/plate for TA98, 400 μg/plate for TA100, 2,000 μg/plate for TA102
NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide (sodium azide), MMC (mitomycin C) and 2-AF (2-aminofluorene) were used as positive controls for the corresponding strains.

Table 4. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with water-soluble fraction of γ-irradiated *Paeonia japonica* Miyabe

Test Material	Irradiation[a]	S9 Mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His$^+$) per plate		
				TA 98	TA 100	TA 102
H_2O	-	-		23 15 32 (23)	220 210 226 (219)	340 335 323 (333)
Test	-	-	15,000	36 30 (33)	291 274 (283)	402 436 (419)
material	-	-	5,000	24 22 (23)	284 247 (266)	414 360 (387)
	-	-	1,667	24 30 (27)	209 213 (211)	372 367 (370)
	-	-	556	24 14 (19)	215 201 (208)	345 344 (345)
	-	-	185	22 25 (24)	212 205 (209)	351 340 (346)
	+	-	15,000	38 23 (31)	272 265 (269)	381 413 (397)
	+	-	5,000	31 28 (30)	238 241 (240)	372 402 (387)
	+	-	1,667	18 18 (18)	196 216 (206)	373 376 (375)
	+	-	556	13 22 (18)	220 198 (209)	329 331 (330)
	+	-	185	18 21 (20)	216 209 (213)	342 338 (340)
NPD	-	-	20	2275 2405 (2340)		
Na-Azide	-	-	1.5		1301 1156 (1229)	
MMC	-	-	0.5			4972 5405 (5189)
H_2O	-	-		24 28 20 (24)	235 225 221 (227)	314 320 293 (309)
H_2O	-	+		33 28 32 (31)	262 260 250 (257)	349 323 353 (342)
Test	-	+	15,000	33 29 (31)	332 297 (315)	396 392 (394)
material	-	+	5,000	31 19 (25)	261 246 (254)	395 369 (382)
	-	+	1,667	23 27 (25)	253 262 (258)	358 375 (367)
	-	+	556	23 40 (32)	253 239 (246)	333 369 (351)
	-	+	185	20 20 (20)	225 245 (235)	310 332 (321)
	+	+	15,000	31 27 (29)	297 305 (301)	415 406 (411)
	+	+	5,000	23 24 (24)	222 230 (226)	372 384 (378)
	+	+	1,667	33 19 (26)	229 229 (229)	325 375 (350)
	+	+	556	17 33 (25)	255 239 (247)	319 338 (329)
	+	+	185	24 25 (25)	240 205 (223)	326 311 (319)
2-AF	-	+	10	1752 1529 (1641)	964 853 (909)	490 571 (531)

[a] Irradiation (10 KGy of Co-60 gamma-ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide (sodium azide), MMC (mitomycin C) and 2-AF (2-aminofluorene) were used as positive controls for the corresponding strains.

Table 5. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with methanol-soluble fraction of γ-irradiated *Scutellaria baikalensis* George

Test Material	Irradiation[a]	S9 Mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His$^+$) per plate		
				TA 98	TA 100	TA 102
DMSO	-	-		19 23 23 (22)	162 164 158 (161)	269 264 276 (270)
Test	-	-	GI(50%)[b]	24 15 (20)	156 151 (154)	295 240 (268)
material	-	-	GI(50%)/3	16 19 (18)	157 167 (162)	296 313 (305)
	-	-	GI(50%)/3^2	16 25 (21)	173 162 (168)	302 272 (287)
	-	-	GI(50%)/3^3	25 13 (19)	140 164 (152)	281 307 (294)
	-	-	GI(50%)/3^4	12 14 (13)	150 155 (153)	286 297 (292)
	+	-	GI(50%)	18 13 (16)	169 169 (169)	284 270 (277)
	+	-	GI(50%)/3	18 14 (16)	149 159 (154)	259 290 (275)
	+	-	GI(50%)/3^2	17 17 (17)	165 165 (165)	277 300 (289)
	+	-	GI(50%)/3^3	13 22 (18)	137 164 (151)	304 305 (305)
	+	-	GI(50%)/3^4	15 22 (19)	165 118 (142)	281 281 (281)
NPD	-	-	20	2039 2317 (2178)		
Na-Azide	-	-	1.5		1349 1104 (1227)	
MMC	-	-	0.5			5268 5772 (5520)
DMSO	-	-		25 25 21 (24)	204 247 211 (221)	280 307 304 (297)
DMSO	-	+		34 38 33 (35)	264 213 245 (241)	340 338 326 (335)
Test	-	+	GI(50%)	22 29 (26)	230 212 (221)	359 354 (357)
material	-	+	GI(50%)/3	36 27 (32)	217 221 (219)	357 376 (367)
	-	+	GI(50%)/3^2	33 28 (31)	230 218 (224)	323 349 (336)
	-	+	GI(50%)/3^3	28 36 (32)	229 200 (215)	380 326 (353)
	-	+	GI(50%)/3^4	25 24 (25)	200 199 (200)	303 307 (305)
	+	+	GI(50%)	22 30 (26)	220 214 (217)	355 371 (363)
	+	+	GI(50%)/3	32 35 (34)	218 213 (220)	328 360 (344)
	+	+	GI(50%)/3^2	32 26 (29)	195 184 (190)	298 382 (340)
	+	+	GI(50%)/3^3	35 26 (31)	177 165 (171)	339 333 (336)
	+	+	GI(50%)/3^4	31 33 (32)	192 195 (194)	308 316 (312)
2-AF	-	+	10	1772 1601 (1687)	884 857 (871)	466 580 (523)

[a] Irradiation (10 KGy of Co-60 gamma-ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
[b] GI(50%)=concentration of 50% growth inhibition; 24 μg/plate for TA98, 84 μg/plate for TA100, 160 μg/plate for TA102
NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide (sodium azide), MMC (mitomycin C) and 2-AF (2-aminofluorene) were used as positive controls for the corresponding strains.

Table 6. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with water-soluble fraction of γ-irradiated *Scutellaria baikalensis* George

Test Material	Irradiation[a]	S9 Mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His$^+$) per plate		
				TA 98	TA 100	TA 102
H_2O	-	-		34 26 22 (27)	223 189 198 (203)	330 293 328 (317)
Test	-	-	1,500	39 29 (34)	194 210 (202)	340 352 (346)
material	-	-	500	31 25 (28)	216 203 (210)	329 310 (320)
	-	-	167	24 35 (30)	192 183 (188)	304 321 (313)
	-	-	56	21 18 (20)	213 192 (203)	334 312 (323)
	-	-	19	36 21 (29)	205 210 (208)	307 308 (308)
	+	-	1,500	27 22 (25)	193 184 (189)	359 361 (360)
	+	-	500	27 28 (28)	192 200 (196)	324 310 (317)
	+	-	167	30 33 (32)	181 172 (177)	326 333 (330)
	+	-	56	38 25 (32)	193 177 (185)	315 310 (313)
	+	-	19	34 28 (31)	195 189 (192)	313 341 (327)
NPD	-	-	20	2348 2104 (2226)		
Na-Azide	-	-	1.5		1451 1273 (1362)	
MMC	-	-	0.5			5426 5103 (5265)

Table 6. Continued

Test Material	Irradiation[a]	S9 Mix	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies (His$^+$) per plate		
				TA 98	TA 100	TA 102
H_2O	-	-		20 29 23 (24)	243 253 261 (252)	312 355 302 (323)
H_2O	-	+		42 38 34 (38)	254 277 279 (270)	259 332 407 (345)
Test	-	+	1,500	35 40 (38)	269 276 (273)	350 394 (372)
material	-	+	500	46 40 (43)	256 255 (256)	352 358 (355)
	-	+	167	30 30 (30)	262 270 (266)	293 390 (342)
	-	+	56	40 35 (38)	262 254 (258)	297 338 (318)
	-	+	19	51 33 (42)	235 213 (224)	288 306 (297)
	+	+	1,500	28 25 (27)	267 306 (287)	322 383 (353)
	+	+	500	36 39 (38)	274 241 (258)	315 298 (307)
	+	+	167	28 35 (32)	216 229 (223)	305 321 (313)
	+	+	56	28 29 (29)	218 229 (224)	334 319 (327)
	+	+	19	29 27 (28)	206 224 (215)	290 295 (293)
2-AF	-	+	10	1400 1895 (1648)	840 907 (874)	570 641 (606)

[a] Irradiation (10 KGy of Co-60 gamma-ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide (sodium azide), MMC (mitomycin C) and 2-AF (2-aminofluorene) were used as positive controls for the corresponding strains.

소핵 유발성 검증

CHO 세포 배양에서 50%의 세포 증식억제를 보인 시험물질의 농도를 최고농도로 하여, binucleated cells 중에 형성된 소핵을 조사한 결과를 Table 7~12에 나타내었다. 음성대조군의 경우 1,000개의 binucleated cells 중에 형성된 소핵은 22±5.7개 즉 2.2±0.57%로서 문헌치[13-15]의 수준이었고, 양성대조 화합물에 의해 소핵 수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 행하여 졌음을 알 수 있었다. 대사활성화시키지 않은 경우와 시킨 경우 모두에서 감마선 조사 생약재의 추출물에 의한 소핵 수의 증가를 인정할 수 없었으며, 각 용량 단계에서 모두 3% 이하의 소핵 빈도를 보여 음성으로 판정되었다. 즉, 감마선조사 생약재의 추출물이 직

Table 7. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with methanol-soluble fraction of γ-irradiated *Curcuma longa* Linne

Material	IR[a]	S9 Mix	Dose (μg/ml)	Cells without MN	Frequency of the cells with MN				No. of MN	MN/1000 cells[b] (Mean±S.D.)
					1	2	3	4		
DMSO	-	-		2,937	60	3	0	0	66	22.0±5.7
Test	-	-	150	2,929	58	11	2	0	87	29.0±9.2
material	-	-	50	2,921	69	10	0	0	89	29.6±2.1
	-	-	15	2,919	74	6	1	0	89	29.7±3.1
	+	-	150	2,919	72	9	0	0	90	30.0±5.0
	+	-	50	2,917	78	4	1	0	89	29.7±2.3
	+	-	15	2,930	65	5	2	0	81	27.0±11.5
MMC	-	-	0.1	2,704	256	32	6	2	346	115.3±19.6
DMSO	-	+		2,944	53	2	1	0	60	20.0±4.6
Test	-	+	150	2,945	52	3	0	0	58	19.3±5.5
material	-	+	50	2,938	58	5	0	0	68	22.7±2.5
	-	+	15	2,949	48	3	0	0	54	18.0±3.6
	+	+	150	2,949	47	4	0	0	55	18.3±3.1
	+	+	50	2,946	50	4	0	0	58	19.3±3.1
	+	+	15	2,942	54	5	0	0	64	21.3±3.8
B(α)P	-	+	20	2,648	311	35	5	1	400	133.3±21.4

[a] Irradiation(10 KGy of Co-60 gamma ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
[b] Number of MN/1000 binucleated cells in the triplicate experiments in which 1,000 cells were scored.
MMC (Mitomycin C) and B(α)P (benzo(α)pyrene) were used as positive controls.

Table 8. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with water-soluble fraction of γ-irradiated *Curcuma longa* Linne

Material	IR[a]	S9 Mix	Dose (μg/ml)	Cells without MN	Frequency of the cells with MN				No. of MN	MN/1000 cells[b] (Mean±S.D.)
					1	2	3	4		
H_2O	-	-		2,938	57	4	1	0	68	22.7±6.1
Test	-	-	1,000	2,953	43	4	0	0	51	17.0±3.6
material	-	-	300	2,949	46	5	0	0	56	18.7±3.1
	-	-	100	2,948	50	2	0	0	54	18.0±2.6
	+	-	1,000	2,943	52	4	0	0	60	20.0±4.0
	+	-	300	2,962	36	2	0	0	40	13.3±2.5
	+	-	100	2,955	38	7	0	0	52	17.3±5.7
MMC	-	-	0.1	2,709	249	34	7	1	342	114.3±15.8
H_2O	-	+		2,964	52	1	1	0	57	19.0±3.9
Test	-	+	1,000	2,952	47	1	0	0	49	16.3±6.7
material	-	+	300	2,937	56	7	1	0	70	23.3±2.5
	-	+	100	2,939	58	3	0	0	64	21.3±2.5
	+	+	1,000	2,954	42	3	0	0	49	16.3±2.1
	+	+	300	2,954	40	2	0	0	48	16.0±5.6
	+	+	100	2,943	52	5	0	0	62	20.7±4.0
B(α)P	-	+	20	2,653	304	37	6	0	396	132.0±19.4

[a] Irradiation(10 KGy of Co-60 gamma ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
[b] Number of MN/1000 binucleated cells in the triplicate experiments in which 1,000 cells were scored.
MMC (Mitomycin C) and B(α)P (benzo(α)pyrene) were used as positive controls.

접변이원이나 간접변이원으로서 세포 핵분열 중에 이상을 유발하지 않음을 알 수 있었다. 이 결과는 하 등[12]이 방사선 조사 백삼분말의 유전독성학적 안전성 평가의 일환으로 염색체 이상 유발성을 시험한 결과와 유사하였다.

소핵은 polychromatic erythrocytes에서 관찰되는 과립 즉 Howell-Jolly body로 혈액학자들에 의해 알려졌으며 염색

Table 9. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with methanol-soluble fraction of γ-irradiated *Paeonia japonica* Miyabe

Material	IR[a]	S9 Mix	Dose (μg/ml)	Cells without MN	Frequency of the cells with MN				No. of MN	MN/1000 cells[b] (Mean±S.D.)
					1	2	3	4		
DMSO	-	-		2,938	58	3	1	0	67	22.3±5.8
Test	-	-	500	2,941	50	7	2	0	70	23.3±6.8
material	-	-	150	2,942	53	5	0	0	63	21.0±3.4
	-	-	50	2,939	54	6	1	0	69	23.0±2.9
	+	-	500	2,932	60	7	1	0	77	25.6±5.4
	+	-	150	2,936	59	4	1	0	70	23.3±2.5
	+	-	50	2,937	55	6	2	0	73	24.3±4.1
MMC	-	-	0.1	2,720	237	38	5	0	328	109.3±17.1
DMSO	-	+		2,943	54	2	1	0	61	20.3±4.7
Test	-	+	500	2,925	67	6	2	0	85	28.3±7.8
material	-	+	150	2,960	36	4	0	0	44	14.7±3.8
	-	+	50	2,956	42	2	0	0	46	15.3±4.5
	+	+	500	2,946	47	7	0	0	62	20.7±5.1
	+	+	150	2,966	30	4	0	0	38	12.7±5.7
	+	+	50	2,957	43	5	0	0	53	17.7±1.5
B(α)P	-	+	20	2,650	309	36	4	1	397	132.3±15.4

[a] Irradiation(10 KGy of Co-60 gamma ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
[b] Number of MN/1000 binucleated cells in the triplicate experiments in which 1,000 cells were scored.
MMC (Mitomycin C) and B(α)P (benzo(α)pyrene) were used as positive controls.

Table 10. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with water-soluble fraction of γ-irradiated *Paeonia japonica* Miyabe

Material	IR[a]	S9 Mix	Dose (μg/ml)	Cells without MN	Frequency of the cells with MN				No. of MN	MN/1000 cells[b] (Mean±S.D.)
					1	2	3	4		
H_2O	-	-		2,940	56	4	0	0	64	21.3±5.0
Test	-	-	1,500	2,925	68	7	0	0	82	27.3±7.8
material	-	-	500	2,944	47	5	0	0	57	19.0±3.6
	-	-	150	2,943	50	7	0	0	64	21.3±2.5
	+	-	1,500	2,934	60	6	0	0	72	24.0±12.0
	+	-	500	2,951	44	5	0	0	54	18.0±2.6
	+	-	150	2,934	57	2	2	0	67	22.3±4.7
MMC	-	-	0.1	2,712	247	33	8	0	337	112.3±16.1
H_2O	-	+		2,944	53	2	1	0	60	20.0±4.9
Test	-	+	1,500	2,938	54	8	0	0	70	23.3±2.5
material	-	+	500	2,934	59	7	0	0	73	24.3±4.5
	-	+	150	2,927	66	3	1	0	75	25.0±4.6
	+	+	1,500	2,951	48	1	0	0	50	16.7±2.1
	+	+	500	2,951	45	1	0	0	47	15.7±2.5
	+	+	150	2,957	43	0	0	0	43	14.3±2.1
B(α)P	-	+	20	2,656	298	38	7	1	399	133.0±20.5

[a] Irradiation(10 KGy of Co-60 gamma ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
[b] Number of MN/1000 binucleated cells in the triplicate experiments in which 1,000 cells were scored.
MMC (Mitomycin C) and B(α)P (benzo(α)pyrene) were used as positive controls.

체 상해와 관련되어 세포핵으로부터 나온 것으로 믿어졌다. 인위적인 소핵유발은 감마선이나 fast neutron으로 조사된 콩의 뿌리끝에서 관찰되었다. 그후 돌연변이원성 물질을 검색하기 위하여 설치류의 골수에서의 소핵형성 시험이 이용되기 시작하였으며, 최근에는 배양된 동물세포를 이용한 소핵 시험법이 이용되기 시작하였다. 소핵 시험은 clastogen

Table 11. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with methanol-soluble fraction of γ-irradiated *Scutellaria baikalensis* George

Material	IR[a]	S9 Mix	Dose (μg/ml)	Cells without MN	Frequency of the cells with MN				No. of MN	MN/1000 cells[b] (Mean±S.D.)
					1	2	3	4		
DMSO	-	-		2,941	54	4	1	0	65	21.7±7.2
Test	-	-	150	2,936	56	8	2	0	78	26.0±5.9
material	-	-	50	2,936	69	4	1	0	70	23.3±6.1
	-	-	15	2,932	60	6	2	0	78	26.0±4.1
	+	-	150	2,929	62	9	0	0	70	23.3±3.3
	+	-	50	2,927	68	4	1	0	79	26.3±3.0
	+	-	15	2,932	61	5	2	0	77	25.7±2.8
MMC	-	-	0.1	2,720	239	34	7	0	328	109.3±19.7
DMSO	-	+		2,944	53	2	1	0	60	20.0±4.4
Test	-	+	150	2,934	60	6	0	0	72	24.0±3.6
material	-	+	50	2,944	51	5	0	0	61	20.3±2.5
	-	+	15	2,945	50	4	1	0	61	20.3±4.7
	+	+	150	2,949	49	2	0	0	53	17.7±3.5
	+	+	50	2,955	38	5	2	0	48	16.0±3.0
	+	+	15	2,955	40	4	1	0	51	17.0±4.2
B(α)P	-	+	20	2,706	244	40	9	1	355	118.3±14.6

[a] Irradiation(10 KGy of Co-60 gamma ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
[b] Number of MN/1000 binucleated cells in the triplicate experiments in which 1,000 cells were scored.
MMC (Mitomycin C) and B(α)P (benzo(α)pyrene) were used as positive controls.

Table 12. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with water-soluble fraction of γ-irradiated *Scutellaria baikalensis* George

Material	IR[a]	S9 Mix	Dose (μg/ml)	Cells without MN	Frequency of the cells with MN				No. of MN	MN/1000 cells[b] (Mean±S.D.)
					1	2	3	4		
H_2O	-	-		2,938	59	2	1	0	66	22.0±3.9
Test	-	-	500	2,920	64	16	0	0	106	32.0±9.5
material	-	-	150	2,945	46	5	2	0	62	20.7±3.1
	-	-	50	2,924	66	4	2	0	80	26.7±3.1
	+	-	500	2,913	78	6	3	0	110	32.3±11.5
	+	-	150	2,944	51	5	0	0	61	20.1±4.2
	+	-	50	2,934	62	2	2	0	71	23.7±3.8
MMC	-	-	0.1	2,722	234	35	8	1	332	110.7±12.4
H_2O	-	+		2,946	51	2	1	0	58	19.3±4.3
Test	-	+	500	2,943	53	3	0	0	59	19.7±3.8
material	-	+	150	2,962	37	1	0	0	39	13.0±4.6
	-	+	50	2,967	29	4	0	0	37	12.3±3.2
	+	+	500	2,939	56	5	0	0	66	22.0±2.6
	+	+	150	2,960	33	6	1	0	48	16.0±2.6
	+	+	50	2,957	39	4	0	0	47	15.7±5.7
B(α)P	-	+	20	2,719	239	36	9	0	338	112.7±17.5

[a] Irradiation(10 KGy of Co-60 gamma ray) was treated to the medicinal herb before extraction.
[b] Number of MN/1000 binucleated cells in the triplicate experiments in which 1,000 cells were scored.
MMC (Mitomycin C) and B(α)P (benzo(α)pyrene) were used as positive controls.

뿐만아니라 spindle 형성에 영향을 주는 물질도 검색할 수 있는 유전독성의 좋은 지표이며, 돌연변이원성 물질을 쉽고 빨리 검색할 수 있는 방법으로 보고되어 있다.[13,15-18]

시료의 유전독성을 판정하기 위한 시험은 세균의 유전자 돌연변이 시험, 포유류 세포의 염색체 이상 시험 등의 시험관내 시험법과 설치류에서의 소핵 시험 및 우성치사 시험, 초파리에서의 반성열성치사 시험, 포유류 골수세포의 유전학적 시험 등의 생체 시험법이 있다.[19-21] 저자 등은 1차적으로 세균의 유전자 돌연변이 시험들 중 대표적인 *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험과 포유류 배양세포를 이용한 소핵 시험을 시행하여, 감마선 조사 생약재의 추출물이 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않음을 알 수 있었다. 유전독성의 평가는 지표가 다른 여러가지 시험계에서 얻은 결과로부터 종합적으로 판정되어야 한다고 사료되므로, 생체내 시험이 추가로 시행되어야 할 것으로 생각된다. 나아가서 만성독성 시험 및 생식독성 시험 등이 추가된다면 감마선 조사 생약재의 안전성을 명확히 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

국문요약

감마선 조사된 생약재의 유전독성학적 안전성을 평가하기 위하여 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)과 배양된 Chinese hamster ovary(CHO) 세포를 이용한 소핵시험을 시행하였다. 시험대상은 오염유기체 완전 구제 선량인 10 KGy의 감마선으로 조사된 울금, 황금, 작약 추출물의 메탄올 가용분과 물 가용분이었으며, 시험농도는 대상물질이 생약재임을 고려하여 50%의 균주생장억제를 나타내는 농도를 최고 농도로 하였다. 시험은 대사활성화시키지 않은 경우와 S9 mix 첨가로 대사활성화시킨 경우로 나누어 시행하였다. 복귀돌연변이 시험 결과 각 시료에 의한 집락수의 증가를 인정할 수 없었으며, 각 용량단계에서 비조사군과 감마선 조사군 간의 차이도 볼 수 없었으므로 음성으로 판정하였다. 소핵시험에서는 cytokinesis-blocked binucleated(CB) cell 내에 생성된 소핵을 계수한 결과 음성 대조군의 경우 소핵수가 22±5.7개/1,000 CB cells(2.2±0.57%)이었으며, 비조사군과 감마선 조사군의 각 용량단계에서 모두 3% 이하의 소핵 빈도를 보였

으며 시료 첨가에 의한 소핵빈도의 증가를 인정할 수 없어 음성으로 판정되었다. 따라서 감마선 조사된 각 시료가 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않으며, 세포분열 중에 유전학적으로 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 보아 생체내 유전독성시험, 만성독성시험 및 생식독성시험 등이 추가된다면 감마선 조사 생약재의 안전성을 명확히 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ahmed, M.: Food irradiation, Up-to-date status. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, IAEA 6626F, Vienna, 27, Nov. (1991).
2. Byun, M.W., Yook, H.S., Jo, S.K. and Chong, Y.J. : Status and prospects of food irradiation technology in korea. *J. Food Sci. Nutr.* **1**(2), 262-268 (1996).
3. 변명우: 식품산업에서 원자력 기술의 이용. 동위원소회보, **9**, 32 (1993).
4. WHO: Wholesomeness of irradiated food. Report of a joint FAO/IAEA/WHO expert committee on the wholesomeness of irradiated food. Technical Report Series 659, (1981).
5. Daferstein, F.K.: Food irradiation; The position of the World Health Organization. 36th General Conference of the International Atomic Energy Agency, Scientific session, Vienna, 23 Sept. 1992 (1992).
6. Marton, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 173-215 (1983).
7. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**, 347-364 (1975).
8. Ashwood-Smith, M.J.: Stability of frozen microsome preparations for use in the Ames Salmonella mutagenicity assay. *Mutation Res.*, **69**, 199-200 (1980).
9. Hubbard, S.A., Brooks, T.M., Gonzalez, L.P. and Bridges, J.W.: Preparation and characterisation of S9-fractions. In Parry, J.M. and Arlett, C.F. (Eds), Comparative Genetic Toxicology. Macmillan, London, pp. 413-438 (1985).
10. Fenech, M. and Morley, A.A.: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* **147**, 29-36 (1985).
11. Almassy, Z., Krepinsky, A.B., Bianco, A. and Koteles, G.J.: The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl. Radiat. Isot.*, **34**, 241-249 (1987).
12. 하광원, 정해관, 오혜영, 허옥순, 손수정, 한의식, 정성철, 최부영, 김영미, 김필선, 문화회: 방사선조사 인삼의 유전독성에 관한 연구. 한국식품위생 · 안전성학회지, **9**, 67-74 (1994).
13. Lasne, C., Gu, Z.W., Venegas, W. and Chouroulinkov, I.: The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens: comparison with the in vitro sister-chromatid exchange assay. *Mutation Res.*, **130**, 273-282 (1984).
14. Lin, R.H., Wu, L.J., Lee, C.H. and Lin-Shiau, S.Y.: Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.*, **319**, 197-203 (1993).
15. Wakata, A. and Sasaki, M.S.: Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutation Res.*, **190**, 51-57 (1987).
16. Hubber, R., H. Braselmann and M. Bauchinger: Intra- and inter-individual variation of background and radiation-induced micronucleus frequencies in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 655-661 (1992).
17. Kligerman, A.D., E.C. Halperin, G.L. Erexson, G. Honore, B. Westvrook-collins and J.W. Allen: A cytogenetic comparison of the responses of mouse and human peripheral blood lymphocytes to ^{60}Co γ radiation, *Radiat. Res.*, **115**, 334-346 (1988).
18. Savage, J.R.K.: Acentric chromosomal fragments, and micronuclei : the displacement factor, *Mutation Res.*, **225**, 171-173 (1989)
19. Brusick, D.: Genetic Toxicology. In Principles and Methods of Toxicology (3rd Ed.), Hayes, A.W.(Ed.), Raven Press, New York, p.545 (1994).
20. Department of Health: Guidelines for the Testing of Chemicals for Mutagenictiy. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Report on Health and Social Security No. 35. HMSO, London (1989).
21. Erexson, G.L. and A.D. Kligerman: A modified mouse peripheral blood lymphocyte culture system for cytogenetic analysis, *Environ. Mol. Mutagen.*, **10**, 377-386 (1987).