

천연감미료 스테비오사이드와 스테비올의 생체내, 시험관내 유전독성평가

오혜영* · 한의식 · 최돈웅 · 김종원 · 손수정
엄미옥 · 강일현 · 강혁준 · 하광원
식품의약품안전청
(Received June 4, 1999)

In vitro and *In vivo* Evaluation of Genotoxicity of Stevioside and Steviol, Natural Sweetner

Hye-Young Oh[#], Eui-Sik Han, Don-Woong Choi, Jong-Won Kim, Mi-Ok Eom,
Il-Hyun Kang, Hyuck-Joon Kang and Kwang-Won Ha
Korea Food and Administration, 5 Nokbundong Eunpyunggu, Seoul 122-704, Korea

Abstract — The standard operation procedure of mouse lymphoma L5178Y tk^{+/−}-3.7.2C gene mutation assay (MOLY) has been regarded as a sensitive *in vitro* mammalian cell gene mutation assay that is capable of detecting clastogens as well as mutagens. Using MOLY, one of natural sweetner, stevioside (5 mg/ml) and its aglycon, steviol (340 µg/ml) were evaluated the mutagenicity. Stevioside and steviol did not induce mutagenicity in MOLY. On the other hand, stevioside (250 mg/kg, B.W.) and steviol (200 mg/kg, B.W.) were also evaluated their ability to induce micronuclei in regenerating hepatocytes and bone marrow cells of ddY mice. From these results, stevioside and steviol did not induce any mutagenic effect both MOLY and *in vivo* micronucleus test.

Keywords □ Mouse lymphoma assay (MOLY), micronucleus (MN), stevioside, steviol.

스테비오사이드는 남미 원산의 *Stevia rebaudiana Bertoni*, Compositae(국화과) 식물로부터 유래된 감미 성분으로, *Stevia rebaudiana*의 잎은 남미, 페루 등지에서 1600년대부터 감미제로 사용되어 왔으며, 1980년대 초에 일본에서 분리되어 현재 일본, 우리나라를 비롯한 동남아에서 사용되고 있는, 설탕의 100~300배의 감미를 갖고 있는 성분이다. 스테비오사이드는 3개의 당과 결합된 배당체로서 aglycone 부분을 스테비올이라 한다. 본 연구에서는 최근까지 그 안전성이 논란이 되었던 천연감미료인 스테비오사이드와 체내에서 생성되어 다시 간에서 대사를 받을 것으로 예상되고 그 대사체가 일부 유전독성시험에서 유전독성을 나타냈

다고 보고된 바 있는 스테비올의 유전독성을 평가하기 위하여 mouse lymphoma L5178Y tk^{+/−}-3.7.2C gene mutation assay(MOLY) 및 마우스를 이용한 생체내 소핵시험을 실시하여 두 물질의 변이유발성을 평가하고자 하였다. MOLY는 Clive 등¹⁾이 soft agar를 이용한 유용성을 처음으로 소개한 이래, Cole 등²⁾이 96 microwell을 이용한 cloning법을 개발하였고, Clement 등³⁾은 microtiter법을 개발하였다. 소핵시험의 경우는 가장 일반적으로 실시하는 골수세포에서의 문체점을 보완하기 위하여 간세포를 사용하는 시험을 병행하였다. 이는 스테비오사이드가 장내 미생물총에 의해 스테비올로 되고 이것이 장간순환을 통하여 간으로 이행되어 대사된다는 가정을 반영하여, 반감기가 짧은 대사체에 의한 영향도 볼 수 있는 매우 중요한 시험으로서 스테비올 대사체의 간세포에서의 유전독성을 평가하고자 하

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1792 (팩스) 02-380-1793

었다. 한편, 본 연구에서는 ICH에서 권장하고 있는 MOLY²⁾ 및 간세포^{6,7)} 및 골수세포^{5,8)}를 이용한 소핵시험을 이용하여 스테비오사이드와 스테비올의 유전독성을 평가함으로써 생체내 안전성을 확보하고자 하였다.

실험방법

시험물질 - Mitomycin C(MMC)와 corn oil은 Sigma Chemical Company, USA로부터 구입하였으며, 스테비오사이드(CAS No. 57817-89-7)와 스테비올은 태평양화학(한국)으로부터 제공받았다. *Stevia rebaudiana* 추출물로부터 분리한 스테비오사이드와 스테비오사이드로부터 획득한 스테비올을 HPLC로 분석한 결과, 스테비오사이드와 스테비올의 순도는 각각 96.8%, 98.4%를 나타내었다. 분석조건은 스테비오사이드의 경우 Lichrosorb NH₂ column, acetonitrile : water (4:1); 스테비올의 경우 Nucleosil 5C₁₈ column, acetonitrile : water(4:1)으로 하였다. MOLY의 경우, 스테비오사이드와 스테비올 모두 증류수에 녹지 않았으며 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용매로 하여 검체용액을 제조하였다. 용매대조물질은 DMSO(1%)를 사용하였으며 양성대조물질은 직접법에서는 methylmethane sulfonate(MMS; 20 µg/ml)를, 대사활성법에서는 cyclophosphamide(CP; 320 µg/ml)를 사용하였다. 소핵시험의 경우, 투여직전에 소정의 양을 corn oil에 현탁하여 사용하였다. 용매대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 corn oil을 사용하였고 양성대조물질은 MMC(2 mg/kg)를 주사용 증류수에 용해시켜 사용하였다. 각 농도의 시험물질 및 용매대조물질은 1회 경구투여 하였으며, 양성대조물질은 1회 복강투여 또는 1회 정맥주사 하였다.

세포배양 - 마우스 림프종 세포(mouse lymphoma tk⁺-3.7.2C cell)는 일본 의약품식품위생연구소의 T. Sofuni 박사로부터 분양받아 액체질소 탱크에 동결시켜 보관하였다. 배양액은 다음의 세가지 형태의 RPMI 1640 medium이 사용되었다. 조성은 다음과 같다.

	RPMI 0	RPMI 10	RPMI 20
Horse serum (v/v %)	0	10	20
Penicillin (unit/ml)	100	100	100
Streptomycin (unit/ml)	100	100	100
Sodium pyruvate (mg/l)	200	200	200
Pluronic F68 (mg/ml)	0.5	0.5	0

여기서 사용한 horse serum은 사용전에 56°C에서 30분 동안 불활성화 시킨 후에 사용하였다. 포화 습도하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일마다 계대 유지하였다.

또한 L5178Y 세포주의 자연돌연변이를 낮게 유지하기 위하여 기존의 TFT 저항 세포(자연돌연변이체: tk⁻)를 다음의 방법을 통해 정화시켰으며, 예비세포독성시험 및 유전자 돌연변이시험 직전에 수행하였다. 75 cm² 배양 플라스크에 THMG(thymidine 3 µg/ml, hypoxanthine 5 µg/ml, glycine 7.5 µg/ml, methotrexate 0.1 µg/ml)가 포함된 RPMI 10배지를 넣고 L5178Y를 3×10⁵ cells/ml 접종 후 24시간, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 24시간 배양 후에 methotrexate를 제거하기 위하여 원심분리한 후 침전물을 THG(위 THMG 조성중 methotrexate을 제외한 것과 동일)가 포함된 RPMI 10으로 다시 부유시킨 후 세포농도를 1×10⁵ cells/ml로 조정한 후 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 이렇게 정화된 세포는 액체질소에 동결 보관하거나 계대하여 사용하였다.

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

대사활성계 - Maron & Ames (1983)⁴⁾의 방법에 따라 체중 200 g 정도의 Sprague Dawley계 수컷 rat에 Aroclor 1254를 복강내 투여하여 효소를 유도시킨 간장으로부터 S-9 분획을 제조하였다. MOLY에 사용한 S9 혼합물은 Glucose-6-phosphate(180 mg/ml), NADP(25 mg/ml), 150 mM KCl, 각 1.0 ml, S-9 분획 2.0 ml의 조성으로 이루어졌으며, 이들 혼합물은 검체를 포함하는 세포배양액에 1.0/19.0 ml 비율로 첨가하여 사용하였다.

포유류 배양세포를 이용한 유전자 돌연변이 시험법 (MOLY)

용량 설정을 위한 예비 세포독성 시험 - 시험물질의 최고용량은 시험물질의 특성에 따라 선정하는데, 비독성 시험물질은 5 mg/ml 또는 10 mM 상당의 농도를, 세포독성시험물질은 80% 이하의 독성농도를, 난용성 시험물질은 용해한계 농도를 최고 용량으로 선정한다. 스테비오사이드는 최고농도를 5 mg/ml로, 스테비올은 최고 용해도인 1365 µg/ml로 하여 공비 2로 하여 5농도에 대해 직접법과 대사활성법에서 모두 예비 세포독성 시험을 실시하였다.

먼저 세포를 RPMI 10배지에 5×10^5 cells/ml로 조정 후 시험물질을 처리하여 37°C에서 3시간 반응시킨 후 원심분리하여 시험물질을 제거하였다. 침전물은 RPMI 10으로 다시 부유시켜 세포농도를 8 cells/ml로 조정하였다. 이것을 96 well plate에 각각 200 µl씩 분주하여 세포수를 1.6 cells/well이 되게 하였다. 5% CO₂ 배양기에서 10일 동안 배양한 후 형성된 집락수를 계수하였다. 그 결과 상대적 생존율(RS0, relative survival at 0 day)을 고려하여 판단하며, 세포독성을 보이는 경우 20% 이상인 농도를 최고농도로 하여 유전자 돌연변이 시험을 실시하였다.

유전자 돌연변이 시험 - 정화된 L5178Y cell을 RPMI 10으로 5×10^5 cells/ml되게 조절하여 각 농도의 시험물질을 처리하였다. 대사활성법에서는 S9 혼합물이 5%가 되게 처리하여 실험하였다. 스테비오사이드와 스테비올은 각각 5 mg/ml, 341 µg/ml를 최고농도로 하여 공비 2의 3농도로 처리하였다. 37°C에서 3시간 반응시킨 후 시험물질 제거를 위해 원심분리(200 g, 5분)하였으며 RPMI 10으로 다시 부유시킨 후 세포농도를 2×10^5 cells/ml로 조정하여 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. RPMI 20으로 8 cells/ml되게 희석하고 다시 평균 1.6 cells/well이 되게 조절하였다. 배양기에서 10~12일 배양한 후(37°C, 5% CO₂), 형성된 집락수를 계수하였다.

돌연변이가 발현되는 2일 동안 세포 농도를 1×10^6 cells/ml이하로 유지하기 위하여 배양접시에서 24시간 배양한 후 RPMI 10으로 2×10^5 cells/ml되게 조절하여 계대배양 하였다. 발현시간이 끝날 때 세포농도를 RPMI 20으로 1×10^4 cells/ml되게 조절한 후 2×96 well plate의 well에 200 µl씩 분주하여 평균 1.6 cells/well이 되게 조절하였다. 배양기에서 10~12일 배양한

후 (37°C, 5% CO₂), 형성된 집락수를 계수하였다.

발현시간이 끝날 때 세포농도를 RPMI 20으로 1×10^4 cells/ml되게 조절한 후 trifluorothymidine(TFT, 최종농도 3 µg/ml)를 처리하고 2×96 well plate의 well에 200 µl씩 분주하여 2×10^3 cells/well이 되게 하였다. 배양기에서 10~12일 배양한 후(37°C, 5% CO₂), 배양된 집락수를 stereo zoom microscope를 이용하여 큰 집락수, 작은 집락수로 구분하여 계수하였다.

본 연구에서는 ICH guideline에서 권하는 표준시험인 직접법, 대사활성법에서의 3시간 처리를 따랐다. 스테비오사이드의 경우에는 직접법 24시간 연속처리도 수행하였다. 시험물질 처리의 경우, 3시간 처리는 교반기 내에서 closed tube(15 ml centrifuge tube)에서 수행하였으며, 24시간 연속처리는 CO₂ 배양기안에 open dish(60 mm culture dish)에서 수행하였다.

관찰 및 결과의 분석 - TFT-저항 돌연변이 집락수는 큰 집락수와 작은 집락수로 구분하여 계수하였다. 큰 집락수는 well 직경의 1/4 이상의 크기인 것으로 하였고, 작은 집락수는 그 이하인 것으로 하였다. 생존률(survival), 생활성(viability), 돌연변이율(mutation frequency, MF) 결정과 통계처리는 MOLY 통계처리 소프트웨어(MUTANT V2.40 for windows; York Elec-tronic Research)를 이용하였다.

판정 - 다음의 허용기준에 부합될 때 실험이 유효하다고 인정받을 수 있다. 첫째, 음성대조군의 돌연변이율이 역사적 평균값의 3배 미만이어야 한다. 둘째, 양성대조군의 최소 한 농도에서 돌연변이율이 분명한 증가를 보여야 한다. 또한 다음의 기준을 만족시킬 때 시험물질을 변이원성 물질로 고려할 수 있다. 첫째, 시험이 허용기준을 만족하며, 유효해야 한다. 둘째, 한 용량이상에서 돌연변이율이 음성대조군에 비해 유의성 있게 증가해야 한다. 셋째, 직선 경향 분석에 의해 유의성 있는 용량의존성을 나타내어야 한다. 넷째, 시험의 재현성이 있어야 한다.

골수세포를 이용한 소핵시험 - 스테비오사이드는 예비시험의 결과에 따라 선정된 250 mg/kg을 최고 투여량으로 하여 3단계의 농도로 1회 경구투여한 후, 24시간째에 Schmid⁵⁾의 방법에 따라 골수 표본을 제작하였다. 경추탈구에 의해 도살한 동물의 양쪽 대퇴골로부터 0.5 ml의 우태아 혈청(FBS, Gibco)을 이용하여 골수세포를 채취한 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 침전된 골수세포를 소량

의 혈청에 고르게 현탁시켜 슬라이드에 떨어뜨려 도말하고 공기중에서 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. 염색 후 동일 완충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산 수용액에 다시 수초간 세척한 다음, 증류수에 수회 세척하고 공기 중에서 건조시켜 광학 현미경으로 관찰하였다(x 1000). 마우스 1개체 당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(norchromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 1,000개의 다염성적혈구 중에서 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별 가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유헤세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

간세포를 이용한 소핵시험 - 스테비오사이드의 경우는 예비시험의 결과에 따라 선정된 250 mg/kg을 최고 투여량으로 하고, 스테비올은 200 mg/kg을 최고 투여량으로 하여 3단계의 농도로 1회 경구투여 하였으며, 용매대조군으로서 시험물질의 조제에 사용한 corn oil을 사용하였고 양성대조물질은 MMC를 주사용 증류수에 용해시켜 각각 1회 경구투여, 정맥주사 하였다. 각 물질투여 후, 24시간째에 Higgins 등⁶⁾의 방법에 따라 간 부분절제술을 실시하였다. 간 부분절제술을 받은 마우스를 5일간 사육한 후 Uryvaeva와 Delone⁷⁾의 방법에 따라 간세포를 분리하였다. 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 마우스를 도살한 후 적출한 간을 4% 포르말린 용액(in Sorensen 인산 완충액 pH 6.8)에 10일간 고정시켰다. 증류수로 30초간 세척하고 12N KOH 용액에 넣고 16시간동안 실온에서 진탕시켰다. 12N KOH 용액을 제거한 후 60 mesh 여과지로 여과한 간을 증류수에 4시간 넣어두었다. 증류수를 제거한 후 고르게 현탁시켜 슬라이드에 떨어뜨려 도말하고 공기중에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 건조가 끝난 표본을 Giemsa액(Gurr R-66, pH 6.8의 1/150 M 인산 완충액에 3 v/v %로 제조한 것)에 15분간 염색하였다. 염색후 동일 완충액에 1회 세척하고 증류수에 2분간 세척한 후 공기 중에서 건조시켜 광학 현미경으로 관찰하였다(x 400). 마우스 1개체 당 1,000개의 간세포에서 소핵을 가진 간세포의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 핵의 직경

의 1/2보다 작으며, 핵 근처에 위치하고 있으며, 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

통계학적 평가 - 골수소핵시험의 경우는 Hayashi 등⁸⁾의 방법에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1, 2단계의 비교자료 활용에 의한 검정을 거쳐, 3단계에는 음성대조군과 시험물질 투여군과의 소핵적혈구의 출현빈도에 관한 유의차를 Cochran Armitage 경향검정을 행하였다(유의수준 0.05미만). 간세포 소핵시험의 경우는 Dunnett *t*-test와 Student's *t*-test로 수행하였다.

실험 결과

포유류 배양세포를 이용한 유전자 돌연변이 시험법 (MOLY) - 스테비오사이드에 대한 예비 세포독성시험 결과 직접법과 대사활성법 모두 최고 용량인 5 mg/ml의 농도에서 독성을 보이지 않았고 각각 82, 80%의 상대적 생존율을 나타내어 직접법과 대사활성법에서 5 mg/ml를 최고농도로 설정하여 유전자 돌연변이 시험을 실시하였다. 스테비오사이드의 MOLY 실험결과를 Table I에 나타내었다. 용매대조군의 돌연변이율은 직접법과 대사활성법에서 각각 95, 41를 나타내었으며 양성대조군의 돌연변이율은 각각 1294, 800을 나타내었다. 이 값은 허용 기준을 만족시키고 있다. 스테비오사이드의 상대적 생존율은 직접법과 대사활성법에서 각각 76~135%, 80~103%를 나타내었다. 스테비오사이드는 전 용량에서 돌연변이율이 용매대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 유의성 있는 용량 의존성을 나타내지 않아 음성으로 판정되었다.

스테비올에 대한 예비독성시험의 결과, 1365 µg/ml 이상에서는 시험물질처리 즉시 흰색 결정이 생겼다. 682 µg/ml에서는 3시간 반응 후 세포농도가 2×10^5 cells/ml이 되지 않아 더 이상의 실험을 진행하지 않았다. 341 µg/ml에서 직접법과 대사활성법에서 각각 74%, 33% 상대적 생존율을 나타내어 341 µg/ml를 최고농도로 설정하여 MOLY를 실시하였다. 스테비올의 MOLY에 대한 결과를 Table II에 나타내었다. 직접법과 대사활성법 모두에서 허용기준을 만족시켰다. 대사활성법에서 최고농도인 341 µg/ml에서 상대 총 성장(relative total growth; RTG)이 0.05으로 세포독성을 보였으며, 세포독성농도에서도 돌연변이율은 용매대조군과 유사하였다. 스테비올은 전용량에서 돌연변이율

Table I – Mutant frequencies and cytotoxicities in *tk* gene mutation assay in L5178Y cells after 3 hour treatment with stevioside

Compounds ^a	Dose (µg/ml)	S9	%RS ^b	RTG ^c	MF ^d	Linear trend
DMSO		-	100.00 ^e	1.00	95.85	
Stevioside	1250	-	76.05	0.72	153.54	NS ^f
	2500	-	135.74	1.07	87.58	
	5000	-	135.74	0.81	90.76	
MMS	20	-	106.64	0.34	1294.36	
DMSO		+	100.00	1.00	41.10	
Stevioside	1250	+	90.62	1.17	32.45	NS
	2500	+	103.17	1.18	61.14	
	5000	+	80.05	1.01	48.67	
CP	3	+	61.10	0.38	800.00	

^a DMSO, dimethyl sulfoxide; MMS, methyl methanesulfonate; CP, cyclophosphamide^b %RS, Percent relative survival^c RTG, Relative total growth^d MF, mutation frequency; 5-TFT resistant mutants/10⁶ viable cells 2 days after treatment^e n=2^f NS, not significant**Table II** – Mutant frequencies and cytotoxicities in *tk* gene mutation assay in L5178Y cells after 3 hour treatment with steviol

Compounds ^a	Dose (µg/ml)	S9	%RS ^b	RTG ^c	MF ^d	Linear trend
DMSO		-	100.00 ^e	1.00	81.34	
steviol	42.66	-	NT ^f	NT	NT	NS ^g
	85.31	-	105.26	0.89	81.78	
	170.63	-	99.65	0.88	104.99	
341.25	-	87.72	0.65	96.78		
MMS	20	-	89.12	0.52	574.99	
DMSO		+	100.00	1.00	77.06	
steviol	42.66	+	97.52	1.09	77.97	NS
	85.31	+	89.01	0.76	74.01	
	170.63	+	79.08	0.73	86.96	
	341.25	+	40.78	0.05	78.62	
CP	3	+	65.60	0.51	762.89	

^a DMSO, dimethyl sulfoxide; MMS, methyl methane sulfonate; CP, cyclophosphamide^b %RS, Percent relative survival^c RTG, Relative total growth^d MF, mutation frequency; 5-TFT resistant mutants/10⁶ viable cells 2 days after treatment^e n=2^f NT, not tested^g NS, not significant

이 용매대조군에 비해 한 농도이상에서 유의성 있는 증가를 보이지 않았으며, 유의성 있는 용량의존성을 나타내지 않아 음성으로 판정되었다.

스테비오사이드의 경우 직접법에서 24시간 연속처리를 수행하였으며, Table III에 나타내었다. 상대적 생존율은 55~114%를 나타내었으며, 돌연변이율은 용매대조군에 비하여 유의성 있는 증가도, 용량의존성도 보이지 않았다.

골수세포 및 간세포를 이용한 소핵시험 – 스테비오사이드의 골수세포 및 간세포를 이용한 소핵시험 결과를

Table IV에 나타내었다. 골수세포를 이용한 소핵시험 결과, 스테비오사이드는 전 용량단계에 걸쳐 소핵을 가진 다염성적혈구의 출현율이 거의 관찰되지 않았다. 시험물질을 투여한 동물의 육안적 관찰에서는 특이한 독성의 징후가 발견되지 않았으며, 전체 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율에서는 전 용량단계에서 대조군에 비하여 차이가 없었다. 간세포를 이용한 소핵시험의 경우 스테비오사이드는 전 용량단계에 걸쳐 소핵을 가진 간세포의 출현이 거의 관찰되지 않았다.

스테비오사이드의 간세포를 이용한 소핵시험 결과는 Table

Table III – Mutant frequencies and cytotoxicities in *tk* gene mutation assay in L5178Y cells after 24 hour treatment with stevioside

Compounds ^a	Dose (µg/ml)	S9	%RS ^b	RTG ^c	MF ^d	Linear trend
DMSO		-	100.00 ^e	1.00	55.44	
Stevioside	625	-	114.33	1.21	66.20	
	1250	-	104.22	1.04	102.98	NS ^f
	2500	-	88.90	1.08	81.90	
	5000	-	135.74	0.81	90.76	
MMS	20	-	70.24	0.57	1324.94	

^aDMSO, dimethyl sulfoxide; MMS, methyl methanesulfonate

^b%RS, Percent relative survival

^cRTG, Relative total growth

^dMF, mutation frequency; 5-TFT resistant mutants/10⁶ viable cells 2 days after treatment

^en=2

^fNS, not significant

Table IV – Results of bone marrow and hepatocyte micronucleus of stevioside in ICR mice

Compound	Dose (ml, mg/kg)	No. of mice	Time (hr)	MNPCE ^a (% mean ± S.D)	PCE/(PCE+NCE) ^b (% mean ± S.D)	MNHPC ^c (% mean ± S.D)
Corn Oil (p.o)	10	5	24	0.7 ± 0.82	55.5 ± 0.49	2.2 ± 0.84
Stevioside(p.o)	62.5	5	24	1.5 ± 1.38	63.6 ± 10.0	2.8 ± 0.84
	125	5	24	0.2 ± 0.41	55.2 ± 2.62	3.4 ± 1.14
	250	5	24	0.5 ± 0.58	40.4 ± 3.28	3.8 ± 0.84
	MMC (i.p)	2	5	30	46.5 ± 8.26	41.0 ± 4.02

^aThe number of micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) was calculated from 1000 PCEs per animal.

^bThe percentage of PCE in 1000 erythrocytes per animal.

^cThe number of micronucleated hepatocyte (MNHPC) was calculated from 1000 HPCs per animal.

MMC; Mitomycin C

Table V – Results of hepatocyte micronucleus test of steviol in ICR mice

Compound	Route	Dose (ml, mg/kg)	No. of animals	MNHPC(% ^a) (mean ± S.D)
Corn Oil	p.o	10	5	2.2 ± 0.84
Steviol	p.o	50	5	2.6 ± 0.89
		100	5	2.8 ± 0.84
		200	5	3.4 ± 1.34
		MMC	i.p	2

^aThe number of micronucleated hepatocyte (MNHPC) was calculated from 1000 HPCs per animal.

MMC, Mitomycin C

에 나타내었다. 시험물질을 투여한 동물의 육안적 관찰에서는 특이한 독성의 징후가 발견되지 않았으며, 전 용량단계에 걸쳐 소핵을 가진 간세포의 출현이 거의 관찰되지 않았다.

고 찰

스테비오사이드에 돌연변이 유발성을 시험한 결과 살모넬라균주를 이용한 복귀돌연변이시험,¹⁰⁻¹⁶⁾ 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험,¹⁰⁾ 및 마우스를 이용한 *in vivo* 소핵시험¹⁰⁾에서 음성을 나타내었다. 그리

고 사람 말초혈 임파구를 이용한 염색체이상시험,¹¹⁾ 자매염색분체 교환시험, umu test,¹⁰⁾ Rec assay¹⁰⁾ 및 포유류 배양세포를 이용한 유전자돌연변이시험¹⁰⁾에서 대사활성화계 존재여부와 관계없이 변이유발성이 없는 물질로 보고되었다. 한편, 스테비올은 살모넬라 균주 TM677을 이용한 전방돌연변이시험에서만 높은 변이유발성을 보였고,¹⁵⁾ 다른 살모넬라균주(TA98, TA100, TA102, TA97)를 이용한 복귀돌연변이시험에서는 변이유발성을 나타내지 않아, TM677 균주가 스테비올이 일으키는 DNA 염기결실 또는 삽입에 의한 1개 이상의 염기쌍 변화를 가장 민감하게 검출할 수 있는 균주로 판명되었다. 스테비올의 화학구조로 볼 때 특정위치 즉 스테비올의 13 위치의 수산기, 16 및 17 위치의 불포화탄소가 변이를 일으키는 필요 조건으로 밝혀졌다.¹⁴⁾ 스테비오사이드의 유전독성 결과는 그 자체로서는 무해하지만 체내에 흡수되어 여러가지 대사경로를 거치는 동안 일어날 수 있는 변이유발물질의 생성에 대한 가능성을 배제할 수 없다. 그래서 본 연구에서는 스테비오사이드 및 스테비올의 유전독성을 평가하기 위하여 MOLY 및 생체내 마우스 간세포 및 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

MOLY는 많은 확인과 재평가^{16,21)}되어 가장 널리 쓰이는 유전독성시험법의 하나로 대두되고 있으며, 복귀 돌연변이시험과 염색체이상시험의 장점을 두루 갖추며, 그 이상의 최종지표를 가져 돌연변이원 발암물질 및 비변이원 발암물질의 검출을 가능하게 하고 있다. 또한 변이원성의 정량적 분석을 가능하게 해준다. 이 시험법은 L5178Y- 3.7.2C tk^{+/+}가 tk^{-/-}로의 TFT 저항 돌연변이원이 큰 집락수와 작은 집락수를 형성하게 되는데 이는 DNA 손상의 정도와 세포의 성장정도에 따라 그 유전독성의 특성을 파악할 수 있게 하였다.²²⁾ 본 연구에서 스테비오사이드 및 대사산물인 스테비올에 대해 MOLY를 수행한 결과, 스테비오사이드에서 직접법, 대사활성법의 경우, 최고농도 5 mg/ml까지 돌연변이율의 어떤 유의한 증가도 나타내지 않았으며, 스테비올의 경우도 돌연변이율의 유의한 증가를 보이지 않았다.

실치류의 골수내 다염성적혈구를 이용한 골수 소핵 시험법은 1975년 Schmid⁹⁾에 의해 개발된 이후, 화학물질 등의 변이원성을 평가하는 생체내 시험법으로서, 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체 성분인 소핵의 유도를 지표로 하는 세포유전학적 시험법으로 널리 이용되어 오고 있다. 주류 등에 감미료로 사용되고 있는 스테비오사이드의 체내 가수분해 산물인 스테비올의 유전독성을 평가하기 위해 골수세포를 이용한 소핵시험을 수행한 Matsui 등¹⁰⁾은 소핵 유발빈도의 증가가 없었다고 보고하였다. 본 연구에서는 골수세포를 이용한 소핵시험결과 스테비오사이드의 경우 250 mg/kg을 최고 투여량으로 하여 3단계의 농도로 1회 경구투여한 후 소핵 유발빈도를 측정한 결과 용매 대조군에 비하여 유의성 있는 소핵의 발현은 관찰할 수 없었으며, 스테비올의 경우도 200 mg/kg을 최고 투여량으로 하여 3단계의 농도로 1회 경구투여한 후 소핵 유발빈도를 측정하였을 때 스테비오사이드와 유사한 결과를 나타내었다.

Parton과 Garriott²³⁾는 간세포 소핵시험을 수행하여 diethylnitrosamine, 2-acetylaminofluorene, MMC, cyclophosphamide, 2-nitrofluorene의 소핵 유발정도를 골수세포를 이용한 소핵시험과 비교하여 화합물에 따라 소핵 유발빈도가 차이가 있음을 보고하여 간세포를 이용한 소핵시험이 화합물 특이성이 있음을 제시하였는데 본 연구에서 실시한 스테비오사이드 및 스테비올에 대한 간세포 소핵시험에서는 골수세포를 이용한 소

핵시험과 마찬가지로 전 농도에 걸쳐 소핵출현의 유의성 있는 증가는 관찰할 수 없었다.

이상의 결과를 종합하여, 본 시험조건 중 스테비오사이드 및 스테비올은 시험관내 시험인 MOLY 및 생체내 시험인 마우스를 이용한 소핵시험에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

결 론

1. 스테비오사이드 및 스테비올은 MOLY 시험결과 직접법과 대사활성화법 3시간처리에서 음성의 결과를 나타내었고, 스테비오사이드는 직접법 24시간처리에서도 음성의 결과를 나타내었다.
2. 스테비오사이드는 생체내 마우스 골수세포 및 간세포를 이용한 소핵시험에서 음성을 나타내었다.
3. 스테비올은 간세포를 이용한 소핵시험에서 음성을 나타내었다.

문 헌

- 1) Clive, D., Flamm, W. G., Machesko, M. R. and Gernheim, N. J. : A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* **16**, 77 (1972).
- 2) Cole, J., Arlett, C., Green, M. H. L., Lowe, J. and Muriel, W. : A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* **111**, 191 (1983).
- 3) Julie Clements : Gene mutation assays in mammalian cells; *Methods in Molecular Biology Vol 43 In Vitro Toxicity Testing Protocol.* 277 (1990).
- 4) Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173(1983).
- 5) Schmid, W. : The micronucleus test. *Mutat. Res.* **31**, 9 (1975).
- 6) Higgins, G. M. and Anderson, R. M. : Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* **12**, 186 (1931).
- 7) Uryvaeva, I. V. and Delone, G. V. : An improved method of mouse liver micronucleus analysis: an

- application to age-related genetic alteration and polyploidy study. *Mutat. Res.* **334**, 71 (1995).
- 8) Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni, T. and Ishidate, Jr., M. : A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ. Mol. Mutagen.* **13**, 347 (1989).
 - 9) Robinson, W. D., Healy, M. J. R., Green, M. H. L., Cole, J., Gatehouse, D. and Garner, R. C. : Statistical evaluation of bacteria/mammalian fluctuation test. In Kirkland D. J.(eds) : "Statistical evaluation of mutagenicity test data", Cambridge : Cambridge University Press. 102 (1989).
 - 10) Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., Sawada, M., Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K., Ishidate, Jr, M. and Sofuni, T. : Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis* **11**, 573 (1996).
 - 11) Suttajit, M., Vinitketkaumnun, U., Meevatee, U. and Buddhasukh, D. : Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environ. Health Perspect.* **101**, 53 (1993).
 - 12) Procincka, E., Bridges, B. A. and Hanson, R. : Interpretation of results with the 8-azaguanine resistance system in *Salmonella typhimurium*: no evidence for direct acting mutagenesis Interpretation by 15-oxosteviol, a possible metabolite of steviol. *Mutagenesis* **6**, 165 (1991).
 - 13) Compadre, D. M., Hussain, R. A., Nanayakkara, N. P., Perzzuto, J. M. and Kinghorn, A. D. : Mass spectral analysis of some derivatives and in vitro metabolites of steviol, the aglycone of the natural sweeteners, stevioside, rebaudioside A and rubusoside. *Biomed. and Environ. Mass spectrom.* **15**, 211 (1988).
 - 14) Perzzuto, J. M., Nanayakkara, N. P., Compadre, C. M., Swanson, S. M., Kinghorn, A. D., Guenther, T. M., Sparmins, V. L. and Lam, L. K. : Characterization of bacterial mutagenicity mediated 13-hydroxy-entkaurenoic acid (stevion) and several structurally-related derivatives and evaluation of potential to induce glutathione S-transferase in mice. *Mutat. Res.* **169**, 93 (1986).
 - 15) Perzzuto, J. M., Compadre, C. M., Swanson, S. M., Nanayakkara, N. P. and Kinghorn, A. D. : Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2478 (1985).
 - 16) Sofuni, T., Wilcox, P., Shimada, H., Clements, J., Honma, M., Clive, D., Green, M., Thybaud, V., San, R. H. C., Elliott, B. M. and Miller, L. : Mouse lymphoma workshop: Victoria, British Columbia, Canada, March 27, 1996 protocol issues regarding the use of the microwell method of the mouse lymphoma assay. *Environ. and Mol. Mutagen.* **29**, 434 (1997).
 - 17) Matsuoka, A., Yamakage, K., Kusakabe, H., Wakuri, S., Asakura, M., Noguchi, T., Sugiyama, T., Shimada, H., Nakayama, S., Kasahara, Y., Takahashi, Y., Miura, K. F., Hatanaka, M., Ishidate, Jr, M., Morita, T., Watanabe, K., Hara, M., Odawara, K., Tanaka, N., Hayashi, M. and Sofuni, T. : Re-evaluation of chromosomal aberration induction on nine mouse lymphoma assay 'unique positive' NTP carcinogens. *Mutat. Res.* **369**, 243 (1996).
 - 18) Garriott, M. L., Casciano, D. A., Schechtman, L. M. and Probst, G. S. : International workshop on mouse lymphoma assay testing practices and data interpretations: Portland, Oregon, May 7, 1994. *Environ. and Mol. Mutagen.* **25**, 162 (1995).
 - 19) Clive, D., Bloccsfoldi, G., Clements, J., Cole, J., Honma, M., Majeska, J., Moore, M., Muller, L., Myhr, B., Oberly, T., Oudelhkim, M., Rudd, C., Shimada, H., Sofuni, T., Thybaud, V. and Wilcox, P. : Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop: Portland, Oregon, May 7, 1994. *Environ. and Mol. Mutagen.* **25**, 165 (1995).
 - 20) Clive, D., Caspary, W., Kirby, P. E., Krehl, R., Moore, M., Mayo, J. and Oberly, T. J. : Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity. *Mutat. Res.*, **189**, 143 (1987).
 - 21) Clive, D. and Spector, J. F. S. : Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the tk locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* **31**, 17 (1975).
 - 22) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Tuner, N. T. and Sawyer, J. : Analysis of TFR mutants of L5178Y TK^{+/+} mouse lymphoma

- cells. *Mutat. Res.* **15**, 161 (1985).
- 23) Parton, J. W. and Garriott, M. L. : An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using four-week-old rats treated with known clastogens. *Environ. and Mol. Mutagen.* **29**, 379 (1997).