

감마선조사 감초, 진피(陳皮) 및 시호 열수 추출물의 *in vitro* 유전독성학적 안전성 평가

조성기[†] · 함연호 · 박혜란 · 오 현 · 변명우

한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학 연구과제팀

Genotoxicological Safety of Hot Water Extracts of the γ -Irradiated *Glycyrrhizae Radix*, *Aurantii nobilis Pericarpium* and *Bupleuri Radix in vitro*

Sung-kee Jo[†], Yeon-ho Ham, Hae-ran Park, Heon Oh and Myung-woo Byun

Radiation Food Technology and Bioscience team, Korea Atomic Energy Research Institute,
Taejon 305-353, Korea

Abstract

The γ -irradiated medicinal herbs were examined the genotoxicological safety to consider the possibility of application of the irradiation technology for hygienic purpose. The three medicinal herbs -*Glycyrrhizae Radix*, *Aurantii nobilis Pericarpium* and *Bupleuri Radix*- were irradiated with γ -rays at the practical dosage of 10 kGy. The hot water extracts of the irradiated herbs were examined in two short-term *in vitro* tests: (1) Ames test in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, (2) Micronucleus test in cultured Chinese hamster ovary(CHO) cells. In the *Salmonella* reversion assays both with and without metabolic activation, the number of revertant colonies was not increased with each extract from the irradiated herbs, compared with negative controls. No significant difference in formation of the colonies was observed between non-irradiated and 10 kGy-irradiated herbs. These results indicated that no mutagenicity of the irradiated herbs was detected. In the micronucleus tests in cultured CHO cells, the incidences of micronucleus were not increased with irradiated herbs, and no significant difference in the incidences was observed between non-irradiated and irradiated herbs. These results indicated that no cytogenetic toxicity of the irradiated herbs was detected. The results of the two *in vitro* tests suggest that the irradiated herbs do not show mutagenic effects and cytogenetic toxicity. Further tests of *in vivo* genotoxicity and chronic toxicity are needed to determine the safety of the herbs irradiated with γ -rays at practical doses.

Key words: Ames test, micronucleus, mutagenicity, genotoxicity, irradiated herbs

서 론

최근 국제간 농축산물의 무역에서 방사선 조사 품목이 증가하는 추세이다. 이는 지금까지 식품의 저장·유통을 위해 사용되어 온 화학혼증제(ethylene oxide, methyl bromide 등)의 사용 금지에 따른 대체방법으로 방사선 조사 기술의 적용이 확대되고 있기 때문이다(1,2). 이 기술의 현황을 살펴보면, 현재 37개국에서 방사선 조사 식품이 허가되었고 이중 25개국에서 상업적으로 실용화되고 있다(3). 국내에서도 상업적 방사선 조사 시설 1기가 1987년 6월부터 가동되고 있으며, 2000년까지 13개 식품 품목군에 대한 방사선 조사가 보건복지부로부터 허가되었으며 2001년부터는 품목이 좀더 확대될 전망이다(4). 그러나 방사선 조사 식품에 대한 소비자들의 막연한 불안감은 불식되지 않고 있다.

1921년 미국에서 육류 기생충사멸을 위해 방사선 조사처리가 최초로 사용된 이래 조사식품의 건전성에 관한 연구가 활발히 이루어지기 시작하였다. 이에 따라 1961년 FAO/IAEA/WHO 공동으로 식품조사의 안전성 평가에 관한 최초 회의를 소집하여 "식품조사공동전문위원회(JECFI: Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Food)"를 설치하였으며, 1970년 FAO/IAEA 및 OECD는 WHO의 권유에 따라 24개국이 참여한 식품조사분야 국제과제를 신설하였다. 많은 연구과제를 통하여 방사선 조사에 따른 유해물질 생성 가능성, 잔류 방사선, 독성학적 안전성 등에 관한 연구가 수행되었다. 먼저 조사체의 화학적 변화로는 수용액상에서 옥수수 전분을 방사선 조사하면 당, 알데히드, 케톤, 알콜, 산 및 퍼록사이드 등이 생성된다고 보고되었으며(5), 방사선 조사에 의한 탄소-질소 결합의 분리나 S-S

[†]Corresponding author. E-mail: skjo@kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8063, Fax: 82-42-868-8043

결합의 분리 등에 의한 단백질 분해물이 생성가능하나 50 kGy 이하의 선량에서는 아미노산 조성의 변화가 관찰되지 않는다고 보고되었다(6). 방사선 조사된 지방의 화학반응은 지방이 불용성이므로 물이 주요 역할을 하는 탄수화물, 단백질과 상대적으로 비교된다. 즉 조사후 지질에서 생성된 양이온 라디칼($\cdot R^+$)과 여기된 상태의 분자(RH^*)들의 dimer형성과, 탈카르복실화 등이 지방의 변화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(7). 또한 비타민은 건조물보다 수용액상태에서 조사에 의한 손실이 많은 것으로 알려졌다(8). 이상의 연구결과들을 보면, 수용액 상태의 식품을 고선량의 방사선으로 조사한 경우 성분변화가 일어남을 알 수 있다. 독성학적 안전성 연구는 수용액 상태 혹은 건조되지 않은 식품의 방사선 조사시에 생성된 분해산물들의 아급성 독성, 생식, 기형독성, 만성독성, 유전독성 등 다양한 측면에서 광범위하게 수행되었다(9-11). 이러한 결과를 토대로 1980년 국제기구인 조사식품공동전문위원회(FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Foods, JECFI)가 종합평가로서 “평균 10 kGy 이하로 조사된 모든 식품은 독성학적으로 안전하며, 영양학적으로도 문제가 되지 않는다”고 결론을 지었다(12). 또 한편, 1992년 5월 WHO에서는 국제소비자연맹(IOC)의 대표단과 식품조사를 반대하는 식품과학 및 식품화학 전공 교수들의 참석 하에 회의를 개최한 결과, 조사 식품의 안전성 및 영양적 적합성을 재확인하면서 “식품을 제조관리수칙에 따라 방사선을 조사할 경우 인간의 건강을 해롭게 하는 어떠한 성분변화나 이물질이 생성되지 않으며, 소비자들에게 미생물학적 위험성을 증가시키지 않는다”고 발표하였다(13). 그럼에도 불구하고, 방사선 조사 식품에 대한 소비자들의 수용성 증진과 이 기술의 적용확대를 위해서는 방사선 조사 식품의 안전성에 대한 소비자들의 의구심을 해소하는 것이 당면 과제이다.

최근 천연 생리활성물질 등을 활용하는 기능성 식품 및 대체의학의 개념 정립과 더불어 생약재와 같은 천연물의 식품·생물 산업적 활용이 증가되고 있다. 이에 우리나라 식품공전에서 식품 원재료가 아니지만 식품에 사용 가능성이 있는 천연 동·식물 소재들을 “주원료”, “부원료”, “제한적 원료”로 사용 가능한 것, “사용 불가 원료” 등으로 분류 등재함으로써 식품 산업계에서의 그 이용을 뒷받침해 주고 있으며, 향후 사용 가능 소재들의 추가가 전망되고 있다.

생약재 등 천연물의 활용 증가에 따라 원료 및 제품의 안전한 저장·유통 기술이 산업계로부터 요구되고 있다. 유럽에서는 프랑스, 벨기에, 덴마크, 네덜란드 등 8개국에서 허브류의 살충·살균 목적으로 방사선 조사가 허가되어 있으며, 미국, 캐나다, 멕시코, 가나, 파키스탄 등에서도 허가되어 있다(세계 식품조사 허가 현황; May 2000, IAEA website www.iaea.org/icgfi). 일부 허브류의 경우 고 선량의 방사선 조사에 따른 향미 성분 및 색소의 감소가 보고(14-16)되는 등 성분의 변화에 관한 논란의 소지가 있으나, 일반적으로 10 kGy의 방

사선 조사의 경우 약효 및 유효성분의 변화가 없는 것으로 보고(17-22)되고 있다. 한편, 국내에서도 1990년부터 특산품인 인삼제품에 대한 조사식품의 안전성 연구가 4개 연구기관(서울대학교 천연물과학연구소, 국립보건안전연구원, 한국원자력연구소, 원광대학교)에서 공동으로 5년간 수행되어 영양학적, 미생물학적, 약리효능 및 유전독성학적 안전성을 입증한 바 있다(23). 본 연구팀에서도 당귀 등 생약재를 대상으로 약리효능 및 유전독성학적 안전성을 입증한 바 있다(24,25).

본 연구에서는 생약재의 가공, 저장 및 유통을 위한 안전한 위생화 기술로 감마선 조사기술의 적용 가능성을 검토하기 위해 국내시장에서 많이 유통되고 있는 건조생약재 중 감초, 진피(陳皮) 및 시호를 시험대상으로 유전독성학적 안전성을 평가하고자 하였다.

감초(*Glycyrrhizae Radix*)는 다년초로 주로 중국대륙에 분포하며 뿌리에는 감미 성분인 glycyrrhizin이 6~14%로 함유되어 있으며 보비익기(補裨益氣), 비위허약(脾胃虛弱), 거담 등에 효과가 있으며, 진피(*Aurantii nobilis Pericarpium*)는 껍질로써 건위, 소화불량, 진해, 거담 등에 효능을 갖는 것으로 알려져 있으며, 시호(*Bupleuri Radix*)는 전국에 걸쳐 야생하며 그 뿌리를 약재로 사용하고 청량성 해열, 두통, 감기, 진통, 진정 및 황달 등에 사용되고 있다(26). 감초와 진피는 식품공전의 식품원재료 분류에 “주원료”로 등재되어 있다. 시호는 식품공전에 등재되지는 않았으나, 최근 항암 및 항염증 효과를 나타내는 것으로 보고되면서 건강보조식품 산업계의 관심 대상이 되고 있는 품목이다(27,28).

시험은 감마선(10 kGy) 조사 시료의 유전독성학적 안전성을 평가하고자 2가지 시험관내 시험 즉, *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험과 배양된 Chinese hamster ovary(CHO) 세포를 이용한 소핵유발 시험으로 시행하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 시료조제

시험대상 생약재료는 시장에서 유통되고 있는 건조제품으로 감초(*Glycyrrhizae Radix*: the root of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer DC), 진피(*Aurantii nobilis Pericarpium*: the fruit peel of *Citrus unshiu* Markovich) 및 시호(*Bupleuri Radix*: the root of *Bupleurum falcatum* L. var. *scorzonerifolium* Ledeb)였으며 경동시장에서 1999년 12월에 구입하였다.

생약재의 방사선조사는 한국원자력연구소에 소재하는 감마선 조사시설(선원: Co-60, 10만 Ci)을 이용하여 실온에서 시간당 2 kGy의 선량율로 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다.

감마선조사 및 비조사 생약재료 각 30 g에 약 10배량의 증류수를 가하여 약탕기에서 2시간씩 3회 열수추출하고 여

과와 원심분리를 한 후 감압농축하여 시료로 사용하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험(Ames test)

시험방법은 Maron과 Ames의 방법(29,30)에 따라 사용되는 배지, 시약 및 S9 mix를 조제하여 시험에 사용하였다. S9 분획(31,32)은 Pheno-barbital과 5,6-benzoflavone으로 유도한 Sprague-Dawley rat의 간으로부터 분리한 것으로 Oriental Yeast Co(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, 4%의 S9 mix를 제조하여 실험에 사용하였다.

시험에 사용된 박테리아 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100으로 Ames 교수(University of California, Berkeley, California, USA)로부터 직접 분양 받았으며, his-tidine 요구성, deep rough(*rfa*) 특성, UV에 대한 민감도(*uvrB* 돌연변이), R-factor에 의한 ampicillin 또는 tetracycline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다.

대사 활성화시키지 않는 직접법의 경우는 standard plate incorporation test로, S9 mix로 대사 활성화시키는 간접법의 경우에는 top agar를 pouring하기 전에 균배양액을 30분간 예비 배양한 후 petridish에 도포하는 preincubation test로 시행하였다. 시험관에 인산완충용액 0.5 mL(대사 활성화시키는 경우에는 S9 mix 0.5 mL), 시험물질 0.1 mL과 Oxoid nutrient broth에서 12시간 배양시켜 대수기(약 2×10^9 cells/mL)에 이르도록 한 상태의 균배양액 0.1 mL을 넣어 가볍게 vortex하였다. 직접법의 경우에는 곧바로(간접법은 30분간 37°C에서 예비 배양한 후) histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C)를 2 mL 가하고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate 상에 부어 평판고화시켰다. Petri dish는 뒤집어서 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 집락수를 계수하였다. 또한, 실험조건의 적합 여부 판정을 위하여, 양성대조물질로 직접법의 경우에는 4-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD)와 sodium azide를 간접법의 경우에는 2-aminofluorene(2-AF)을 각 시험 균주의 특성에 맞추어 사용하였다.

포유류 배양세포를 이용한 *in vitro* 소핵형성 시험

시험에 사용된 동물세포는 중국 햄스터 난소 섬유아세포 (Chinese hamster ovary cells; CHO cells)로 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas VA, USA)로부터 구입하였다. 세포 배양액으로는 2N HCl로 pH 7.2를 맞춘 RPMI 배지에 15 mM HEPES buffer를 첨가한 후, fetal bovine serum을 10%로, penicillin-streptomycin을 50 ug-50 unit/mL로 첨가시킨 완전배지를 사용하였다. 세포배양은 포화 상대습도 조건하에서 5% CO₂를 공급해주는 37°C의 배양기에서 수행하였다.

시험은 Fenech와 Morley의 cytokinesis-block(CB) method (33)에 따랐다. 이 방법은 증식하고 있는 세포에 cytochalasin B(Cyt-B)를 처리함으로써 세포분열에서 핵분열 후의 세포질 분열을 blocking 시켜 하나의 세포 안에 두 개의 핵이 형성

된 binucleated cells 내에서 핵분열 중 염색체 이상에 의해 형성된 소핵을 관찰하는 방법이다.

시험방법은 CHO 세포 5×10^4 개를 culture dish(Ø 60mm)에 파종하여 2일간 배양하여 세포가 대수 증식기에 이르게 한 후, 시료를 첨가하였다. 대사활성화 시키지 않는 직접법에서는 Cyt-B를 최종농도가 3 µg/mL이 되게 시험물질과 함께 첨가하고 24시간 배양한 후 세포표본을 만들었다. Cyt-B는 DMSO에 2 mg/mL로 녹여 -70°C에 보관하고, 사용 직전에 녹여 Hanks' balanced salt solution(HBSS)으로 희석하여 사용하였다. 이 때 첨가되는 DMSO는 총 배양용액의 1/200 이하가 되도록 하였다. 대사활성화 시키는 경우의 시험은 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 시험물질과 25% S9 mix(배지의 20% 비율)를 첨가하여 6시간 동안 배양한 다음, 신선한 배지로 교환하고 Cyt-B를 첨가하여 18시간 동안 배양한 후 세포표본을 만들었다. 각 배양접시의 배양액을 suction out 시킨 다음, hypotonic 용액(75 mM KCl) 2 mL을 가하여 1분 30초간 세포를 팽윤시킨 다음, 고정액(methanol:acetic acid, 3:1과 6:1)으로 2회 고정시킨 후 공기건조시켜 세포표본을 만들었다. 세포 내의 핵을 관찰하기 위하여 3% Giemsa 염색액(인산완충용액(pH 6.5)으로 희석시킨 것)으로 17분간 염색하고 공기건조 후 광학현미경으로 1000배에서 관찰하였다.

시료는 증류수로 희석하였으며 시료첨가는 배양용량의 1/10 이하로 하였다. 음성 대조군으로는 증류수를, 양성 대조군으로는 직접법에서는 증류수에 녹인 mytomycin C(0.1 µg/mL)를, 대사활성화법에서는 DMSO에 녹인 benzo(a)pyrene (0.02 mg/mL)을 첨가하였다.

형성된 소핵(MN)의 판독은 Almasy 등(34)의 기준에 따랐으며 1,000개의 binucleated CB세포들 중 소핵을 갖는 세포를 계수하였다.

결과 및 고찰

*Salmonella typhimurium*을 이용한 돌연변이원성 검증 감마선(10 kGy)으로 조사된 각 생약재료 즉, 감초, 진피 및 시호의 물추출물이 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100 균주의 복귀돌연변이 집락 형성에 미치는 영향을 조사하여 각 시료의 돌연변이원성을 판정하고자 하였다. 대상시료가 균주생장 억제를 거의 나타내지 않음을 예비실험에서 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 의약품 등의 독성시험 기준(식품의약품안전청 고시 제 1999-61호, 1999년 12월 22일)에 따라 최고농도를 5 mg/plate로 하고 2배수로 희석하여 시험하였다. 그 결과의 복귀돌연변이 집락수를 각 시료별로 Table 1, 2 및 3에 나타내었다.

음성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 각 시험에서 TA98 균주의 경우 18~22개, TA100은 144~196개의 범위 내로 나타났으며, 이 결과는 Maron과 Ames의 원저(29,30)에서 음성대조군의 집락은 자연 복귀돌연변이에 의해 형성되는 것으로서

Table 1. Revertant colonies of the *S. typhimurium* strains in Ames test with hot water extract of γ -irradiated Glycyrrhizae Radix

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/plate)	No. of revertant colonies (His ⁺) per plate	
				TA98	TA100
H ₂ O	-	-		22, 20, 23 (22)	183, 208, 197 (196)
Glycyrrhizae Radix	-	-	5	26, 18 (22)	221, 212 (216)
	-	-	2.5	24, 24 (24)	191, 173 (182)
	-	-	1.25	25, 23 (24)	179, 177 (178)
	-	-	0.63	23, 21 (22)	188, 189 (189)
	-	-	0.32	21, 23 (22)	160, 192 (176)
	+	-	5	25, 29 (27)	194, 205 (200)
	+	-	2.5	19, 24 (22)	209, 190 (200)
	+	-	1.25	16, 20 (18)	177, 185 (181)
	+	-	0.63	22, 18 (20)	187, 187 (187)
	+	-	0.32	24, 26 (25)	187, 198 (193)
NPD	-	-	0.02	2089, 2130 (2110)	
Na-Azide	-	-	0.0015	1120, 1159 (1140)	
H ₂ O	-	-		26, 19, 22 (22)	170, 181, 195 (182)
Glycyrrhizae Radix	-	+		24, 26, 21 (24)	221, 209, 207 (212)
	-	+	5	26, 28 (27)	237, 185 (211)
	-	+	2.5	24, 23 (24)	201, 172 (187)
	-	+	1.25	32, 29 (31)	170, 173 (172)
	-	+	0.63	25, 26 (26)	163, 156 (160)
	-	+	0.32	29, 27 (28)	162, 176 (169)
	+	+	5	26, 29 (28)	210, 204 (207)
	+	+	2.5	28, 14 (21)	225, 202 (214)
	+	+	1.25	20, 18 (19)	172, 187 (180)
	+	+	0.63	38, 23 (31)	171, 158 (165)
+	+	0.32	28, 18 (23)	188, 157 (173)	
2-AF	-	+	0.010	1204, 1229 (1217)	746, 771 (759)

¹⁾Irradiation (10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

*Positive control: NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide and 2-AF (2-aminofluorene).

Table 2. Revertant colonies of the *S. typhimurium* strains in Ames test with hot water extract of γ -irradiated *Aurantii nobilis* Pericarpium

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/plate)	No. of revertant colonies (His ⁺) per plate	
				TA98	TA100
H ₂ O	-	-		21, 25, 21 (22)	186, 169, 152 (169)
<i>Aurantii nobilis</i> Pericarpium	-	-	5	29, 24 (27)	169, 178 (174)
	-	-	2.5	29, 19 (24)	146, 160 (153)
	-	-	1.25	25, 25 (25)	174, 164 (169)
	-	-	0.63	24, 25 (25)	160, 148 (154)
	-	-	0.32	29, 24 (27)	147, 162 (155)
	+	-	5	28, 22 (25)	150, 176 (163)
	+	-	2.5	24, 23 (24)	135, 158 (147)
	+	-	1.25	21, 16 (19)	174, 155 (165)
	+	-	0.63	25, 21 (23)	125, 142 (134)
	+	-	0.32	19, 21 (20)	153, 139 (146)
NPD	-	-	0.02	1963, 1987 (1975)	
Na-Azide	-	-	0.0015	1017, 1052 (1035)	
H ₂ O	-	-		21, 18, 21 (20)	174, 166, 167 (169)
<i>Aurantii nobilis</i> Pericarpium	-	+		27, 28, 27 (27)	170, 195, 166 (177)
	-	+	5	18, 28 (23)	190, 185 (188)
	-	+	2.5	28, 20 (24)	175, 179 (177)
	-	+	1.25	28, 26 (27)	179, 182 (181)
	-	+	0.63	22, 30 (26)	165, 177 (171)
	-	+	0.32	29, 31 (30)	173, 176 (175)
	+	+	5	26, 23 (25)	181, 176 (179)
	+	+	2.5	21, 20 (21)	186, 191 (189)
	+	+	1.25	18, 25 (22)	167, 197 (182)
	+	+	0.63	22, 28 (25)	183, 165 (174)
+	+	0.32	26, 21 (24)	173, 158 (166)	
2-AF	-	+	0.010	1089, 1132 (1111)	758, 778 (768)

¹⁾Irradiation (10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

*Positive control: NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine), Na-Azide and 2-AF (2-aminofluorene).

Table 3. Revertant colonies of the *S. typhimurium* strains in Ames test with hot water extract of γ -irradiated Bupleuri Radix

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/plate)	No. of revertant colonies (His ⁺) per plate	
				TA98	TA100
H ₂ O Bupleuri Radix	-	-		16, 8, 22 (15)	142, 162, 136 (147)
	-	-	5	22, 23 (23)	144, 143 (144)
	-	-	2.5	13, 12 (13)	145, 144 (144)
	-	-	1.25	15, 18 (17)	140, 126 (133)
	-	-	0.63	20, 15 (18)	143, 142 (143)
	-	-	0.32	13, 6 (10)	148, 145 (147)
NPD Na-Azide	+	-	5	21, 16 (19)	146, 170 (158)
	+	-	2.5	14, 14 (14)	142, 141 (142)
	+	-	1.25	21, 17 (19)	146, 144 (145)
	+	-	0.63	17, 19 (18)	138, 147 (143)
	+	-	0.32	17, 15 (16)	137, 134 (136)
	-	-	0.02	2042, 2068 (2055)	
H ₂ O H ₂ O Bupleuri Radix	-	-		19, 16, 18 (18)	158, 135, 138 (144)
	-	+		31, 21, 31 (28)	153, 152 (153)
	-	+	5	32, 26 (29)	150, 176 (163)
	-	+	2.5	41, 30 (36)	161, 163 (162)
	-	+	1.25	44, 25 (35)	146, 162 (154)
	-	+	0.63	28, 22 (25)	155, 158 (157)
	-	+	0.32	28, 18 (23)	156, 151 (154)
	+	+	5	20, 35 (28)	164, 168 (166)
	+	+	2.5	33, 29 (31)	179, 173 (176)
	+	+	1.25	23, 26 (25)	177, 172 (175)
2-AF	+	+	0.63	29, 37 (33)	154, 159 (157)
	+	+	0.32	30, 21 (26)	187, 186 (187)
	-	+	0.010	1089, 1132 (1111)	758, 778 (768)

¹⁾Irradiation (10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

*Positive control: NPD (4-nitro-*o*-phenylenediamine) and Na-Azide.

TA98의 경우 20~50개 정도, TA100의 경우 120~200개 정도로 제시된 범위와 잘 일치하였다. 또한, 양성대조 화합물에 의해 복귀돌연변이 집락수가 현저하게 증가되어 나타남으로써 본 실험이 적절하게 수행되었음을 확인할 수 있었다.

감마선(10 kGy) 조사 시료에 대한 결과를 살펴보면, 감초에 대한 시험(Table 1)에서 대사활성화를 시키지 않은 경우, 적용농도인 5.0~0.32 mg/plate의 범위에서 18~27개(TA98) 및 176~216개(TA100)로 농도 의존적인 증가 혹은 감소를 보이지 않았으며 음성대조군(H₂O)의 20~23개(TA98) 및 183~208개(TA100)와 비교해서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 대사활성화 시킨 경우 즉 S9 mix를 첨가한 상태에서 시험을 수행한 결과에서도 감마선 조사된 감초의 물추출물은 각각의 시험적용 농도에서 복귀돌연변이 집락수의 증가를 보이지 않았다. 또한, 대사활성화시키지 않은 경우와 대사활성화 시킨 경우 모두에서 감마선 조사 시료와 비조사 시료 처리군 간의 비교에서도 유의한 집락수의 차이가 나타나지 않았다. 감마선 조사 진피 및 시호 물추출물에 대한 시험에서도 대사활성화 시키지 않은 경우와 대사활성화 시킨 경우 모두에서 복귀돌연변이 집락수는 농도 의존적인 증가 혹은 감소를 보이지 않았으며 음성대조군과 비교해서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고, 감마선 조사 시료와 비조사 시료 처리군 간의 비교에서도 유의한 차이가 나타나지 않았다. 돌연변이 유발성의 판정은 복귀돌연변이 집락수가 용매대

조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하는 것으로 제시되어 있다(29,30). 본 시험 결과 감마선 조사 감초, 진피 및 시호의 물추출물의 경우 전 적용시험농도에서 음성대조군에 비해 복귀돌연변이 집락수의 증가를 보이지 않음으로써, 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않는 것으로 판단되었다. 이 결과는 *Salmonella typhimurium*의 복귀돌연변이 시험에서 방사선 조사된 백삼분말(35), 쇠고기(36), 닭고기(37) 등의 유전독성학적 안전성을 검증한 결과와 일치하였다.

포유류 배양세포를 이용한 *in vitro* 소핵 유발성 검증

소핵은 polychromatic erythrocytes에서 관찰되는 과립 즉 Howell-Jolly body로 혈액학자들에 의해 알려졌으며 염색체상해와 관련되어 세포핵으로부터 나온 것으로 믿어졌다. 인위적인 소핵유발은 감마선이나 fast neutron으로 조사된 콩의 뿌리 끝에서 관찰되었다. 그 후 돌연변이원성 물질을 검색하기 위하여 설치류의 골수를 이용한 소핵형성 시험이 이용되기 시작하였으며, 최근에는 배양된 동물세포를 이용한 *in vitro* 소핵 시험법이 이용되고 있다. 소핵 시험은 clastogen 뿐만 아니라 spindle 형성에 영향을 주는 물질도 검색할 수 있어 유전독성의 좋은 지표이며, 유전독성 물질을 쉽고 빨리 검색할 수 있는 방법으로 보고되어 있다(38-45). 최근의 보고들(46-49)에 있어서도 유전독성 물질의 검색을 위한 *in vitro* 소핵 시험의 유용성이 입증되었다.

예비시험에서 각 생약재료 즉 감초, 진피 및 시호의 물추출물은 CHO 세포 배양에 고농도 첨가 시 세포증식 억제를 나타내었다. 세포증식 억제 즉 세포분열 억제 상태에서는 세포 핵분열이 일어나지 않으므로 cytokinesis-block(CB) method 이용 시에 binucleated cells이 생성되지 않아 소핵형성을 관찰할 수 없다. 따라서 본 시험에서는 독성시험 기준에 따라 50%의 세포증식 억제를 나타내는 농도를 최고농도로 하였으며, 3배수로 희석하여 3단계 농도에서 감마선 조사된 각 시료의 물추출물이 세포분열 중 유전독성 유발 여부를 시험하였다. 각 시료별 시험에서 소핵을 형성한 binucleated cells

을 조사한 결과를 Table 4, 5 및 6에 나타내었다.

음성대조군의 경우 1,000개의 binucleated cells 중에 형성된 소핵은 평균 20~30개(2~3%) 정도로 문헌치(38,39,50)의 수준이었고, 양성대조 화합물에 의해 소핵 수가 5배 이상 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 수행되었음을 확인할 수 있었다.

감마선(10 kGy) 조사 시료에 대한 결과를 살펴보면, 감초에 대한 시험(Table 4)에서 대사 활성화시키지 않은 경우와 대사활성화시킨 경우 모두, 적용농도인 1.0~0.1 mg/mL의 범위에서 2~4%의 소핵 출현 빈도를 보였다. 이는 음성대조

Table 4. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with water extract of γ -irradiated Glycyrrhizae Radix

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/mL)	No. of CB cells with n MN					Total No. of MN	MN/1000 cells (Mean \pm SD)
				0	1	2	3	4		
H ₂ O	-	-	-	2,942	50	7	1	-	67	21.3 \pm 6.6
Glycyrrhizae Radix	-	-	1	2,937	56	6	1	-	71	23.7 \pm 1.5
	-	-	0.3	2,940	56	4	-	-	64	21.3 \pm 7.0
	-	-	0.1	2,948	49	3	-	-	55	18.3 \pm 1.5
	+	-	1	2,899	90	9	2	-	114	38.0 \pm 4.6
	+	-	0.3	2,908	84	6	2	-	102	34.0 \pm 1.7
	+	-	0.1	2,930	61	6	3	-	82	27.3 \pm 3.1
MMC	-	-	0.0001	2,698	266	30	5	1	345	115.0 \pm 12.6
H ₂ O	-	+	-	2,920	73	7	-	-	87	29.0 \pm 6.9
Glycyrrhizae Radix	-	+	1	2,911	82	7	-	-	96	32.7 \pm 7.1
	-	+	0.3	2,910	78	12	-	-	102	34.0 \pm 9.6
	-	+	0.1	2,909	84	7	-	-	98	32.7 \pm 3.2
	+	+	1	2,906	84	9	1	-	105	35.0 \pm 3.5
	+	+	0.3	2,888	96	9	3	-	123	41.0 \pm 4.6
	+	+	0.1	2,907	88	5	-	-	98	32.7 \pm 2.7
B(a)P	-	+	0.02	2,634	324	35	6	1	415	138.3 \pm 19.4

¹⁾Irradiation (10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

*Positive control: MMC (mytomycin C) and B(a)P benzo(a)pyrene).

Table 5. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with water extract of γ -irradiated Aurantii nobilis Pericarpium

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/mL)	No. of CB cells with n MN					Total No. of MN	MN/1000 cells (Mean \pm SD)
				0	1	2	3	4		
H ₂ O	-	-	-	2,948	45	7	-	-	59	19.7 \pm 3.1
Aurantii nobilis Pericarpium	-	-	1	2,944	54	2	-	-	58	19.3 \pm 4.6
	-	-	0.3	2,950	46	4	-	1	58	19.3 \pm 1.2
	-	-	0.1	2,962	38	-	-	-	38	12.7 \pm 3.1
	+	-	1	2,954	42	3	1	-	51	17.0 \pm 5.3
	+	-	0.3	2,969	24	6	-	1	40	12.0 \pm 5.3
	+	-	0.1	2,963	35	1	1	-	40	13.3 \pm 2.3
MMC	-	-	0.0001	2,698	266	30	5	1	345	115.0 \pm 12.6
H ₂ O	-	+	-	2,913	79	7	1	-	96	32.0 \pm 3.5
Aurantii nobilis Pericarpium	-	+	1	2,911	82	7	-	-	96	32.0 \pm 2.6
	-	+	0.3	2,910	81	7	2	-	101	33.7 \pm 2.3
	-	+	0.1	2,901	87	10	2	-	113	37.7 \pm 2.3
	+	+	1	2,897	93	8	2	-	115	38.3 \pm 6.5
	+	+	0.3	2,917	79	4	-	-	87	29.0 \pm 1.0
	+	+	0.1	2,891	96	11	2	-	124	41.3 \pm 4.2
B(a)P	-	+	0.02	2,634	324	35	6	1	415	138.3 \pm 19.4

¹⁾Irradiation (10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

*Positive control: MMC (mytomycin C) and B(a)P (benzo(a)pyrene).

Table 6. Frequency of micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked CHO cells following treatment with water extract of γ -irradiated Bupleuri Radix

Test material	Irradiation ¹⁾	S9 mix	Dose (mg/mL)	No. of CB cells with n MN					Total No of MN	MN/1000 cells (Mean \pm SD)
				0	1	2	3	4		
H ₂ O	-	-	-	2,946	48	5	1	-	61	20.3 \pm 5.5
Bupleuri Radix	-	-	1	2,923	66	10	1	-	89	29.7 \pm 5.1
	-	-	0.3	2,926	72	1	-	1	78	27.0 \pm 2.8
	-	-	0.1	2,954	41	3	2	-	53	17.7 \pm 4.2
	+	-	1	2,910	74	15	1	-	107	35.7 \pm 3.2
	+	-	0.3	2,941	53	4	1	1	68	22.7 \pm 2.1
	+	-	0.1	2,942	55	2	1	-	62	20.7 \pm 1.5
MMC	-	-	0.0001	2,698	266	30	5	1	345	115.0 \pm 12.6
H ₂ O	-	+	-	2,941	57	1	1	-	62	20.5 \pm 3.3
Bupleuri Radix	-	+	1	2,930	66	3	-	1	76	25.3 \pm 2.5
	-	+	0.3	2,946	53	1	-	-	55	18.3 \pm 1.2
	-	+	0.1	2,961	37	1	1	-	42	14.0 \pm 3.5
	+	+	1	2,940	54	3	1	2	71	23.7 \pm 4.9
	+	+	0.3	2,955	42	2	-	1	50	16.7 \pm 2.5
	+	+	0.1	2,955	40	1	3	1	55	18.3 \pm 0.6
B(a)P	-	+	0.02	2,634	324	35	6	1	415	138.3 \pm 19.4

¹⁾Irradiation (10 kGy of Co-60 γ -ray) was treated to the sample before extraction.

*Positive control: MMC (mytomycin C) and B(a)P (benzo(a)pyrene).

군에 비해 소핵 수가 증가되지 않은 것으로써, 시료가 소핵형성을 유발시키지 않음을 알 수 있었다. 감마선 조사 진피 및 시호 물추출물에 대한 시험(Table 5, 6)에서도 적용 시험농도 모두에서 2~4%의 소핵 출현 빈도를 보여, 각 시료가 소핵형성을 유발시키지 않음을 알 수 있었다.

결과적으로, CHO세포를 이용한 *in vitro* 소핵유발성 시험에서 감마선조사 감초, 진피 및 시호의 열수추출물은 음성으로 판정됨으로써, 세포 핵분열 중에 직접적으로나 혹은 간접적으로 이상을 유발시키지 않는 것으로 사료된다. 이 결과는 Ha 등(35)이 CHL(Chinese hamster lung fibroblast) 세포를 이용한 *in vitro* 염색체 이상 유발성 시험에서 방사선조사 백삼분말의 유전독성학적 안전성을 입증한 결과와 일치하였으며, Kang 등(36,37)이 염색체 이상 시험 또는 설치류 조혈세포를 이용한 소핵 시험 등으로 방사선조사 쇠고기 및 닭고기의 유전독성학적 안전성을 입증한 보고와 일치하였다.

시료의 유전독성 판정을 위해 권고되고 있는 시험법으로는 세균의 유전자 돌연변이 시험, 포유류 세포의 염색체 이상 시험 등의 시험관내 시험법과 설치류에서의 소핵시험 및 우성치사 시험, 초파리에서의 반성열성치사 시험, 포유류 골수 세포의 유전학적 시험 등의 생체 시험법이 있다(43,51,52). 저자들은 1차적으로 두가지 *in vitro* 유전독성 시험 즉 *Salmonella typhimurium*을 이용한 돌연변이원성 시험과 포유류 배양세포를 이용한 소핵 유발성 시험을 시행하여 감마선 조사 감초, 진피 및 시호의 열수 추출물이 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않을 뿐만 아니라, 세포 핵분열 중에 유전학적으로 이상을 유발하지 않음을 확인하였다. 유전독성의 평가는 지표가 다른 여러 가지 시험계에서 얻은 결과로부터 종합적으로 판정되어야 한다고 사료되므로, 이외의 시험관 내 시험 및 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.

요 약

생약재의 기능성 식품 및 대체의약 원료로의 이용 증대에 따라 위생적 저장·유통을 위한 감마선조사 기술의 이용 가능성을 검토할 목적의 일환으로 실제 이용선량의 최고 선량인 10 kGy의 감마선 조사 생약재 3종의 유전독성학적 안전성을 평가하고자 하였다. 공시 재료는 감마선 조사된 생약재료 감초, 진피 및 시호로 하였다. 시험은 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 유전자 복귀돌연변이 시험(Ames test)과 배양된 Chinese hamster ovary(CHO) 세포를 이용한 *in vitro* 소핵유발 시험으로 시행하였다. 시료는 오염유기체 완전 구제 선량인 10 kGy의 감마선으로 조사된 감초, 진피 및 시호의 열수 추출물이었으며, 시료의 농도는 복귀돌연변이 시험의 경우 5 mg/plate로, 소핵유발 시험의 경우 50%의 세포증식 억제율을 나타내는 농도를 최고 농도로 하였다. 시험은 대사 활성화시키지 않은 경우와 S9 mix 첨가로 대사 활성화시킨 경우로 나누어 시행하였다. 복귀돌연변이 시험 결과 각 시료에 의한 복귀변이 집락수의 증가를 인정할 수 없었으며, 각 용량단계에서 감마선 비조사군과 조사군간의 차이도 볼 수 없었으므로 음성으로 판정하였다. 소핵유발 시험에서 cytokinesis-blocked binucleated(CB) cells 내에 생성된 소핵을 계수한 결과, 음성 대조군의 경우 소핵 출현빈도가 20~30/1,000 CB cells(2~3%) 정도였으며, 비조사 시료군과 감마선 조사 시료군의 각 용량단계에서 모두 2~4%의 소핵 출현빈도를 보여 시료에 의한 소핵 출현빈도의 증가를 인정할 수 없

었다. 따라서 감마선이 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

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

문 헌

- Jung, G.T., Ju, I.O. and Choi, J.S. : Studies on drying and preservation of Omija (*Schizandra chinensis* Baill). *Korean J. Post-harvest Sci. Technol.*, **5**, 217-223 (1998)
- Anon : Food safty. *Food Irradiation Newsletter*, **17**, 4-10 (1993)
- 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)
- 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**, 262-268 (1996)
- Dauphin, J. and Saint-Lebe, L.R. : Radiation chemistry of carbohydrates. In *Radiation Chemistry of Major Food Components*, Elias, P.S. and Cohen, A.J. (eds.), Elsevier, Amsterdam, p.131 (1977)
- Radola, B.J. : Identification of irradiated meat by thinlayer gell chromatography and thinlayer isoelectric focussing. Identification of irradiated foodstuffs, Commission of the European Communities, EUR 5126, Luxembourg, p.59 (1974)
- Vajdi, M. and Merritt, C. Jr. : Identification of adduct radiolysis products from pork fat. *J. Am. Oil Soc.*, **62**, 1252-1255 (1985)
- Diehl, J.F. : Thiamin in irradiated foods. 1. Influence of various conditions and of time after irradiation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **157**, 317-320 (1975)
- Aiyar, A.S. and Rao, S. : Studies on mutagenicity of irradiated solutions in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.*, **48**, 17-20 (1978)
- Zaycev, A.N. : Toxicologic and hygienic investigation of potatoes irradiated with a beam of fast electrons and gamma rays to control sprouting. *Toxicol.*, **4**, 267-274 (1975)
- Zaitsev, A.P. : Report on the study of toxicity and mutagenicity of irradiated food products used in an experiment. WHO Irradiated Onion Monograph (1980)
- 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)
- 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)
- Zareena, A.V., Variyar, P.S., Gholap, A.S. and Bongirwar, D.R. : Chemical investigation of gamma-irradiated saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 687-691 (2001)
- Yang, J.S. : Effects of gamma irradiation on the flavor composition of food commodities. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **434**, 277-284 (1998)
- Farag, S.E., Aziz, N.H. and Attia, E.S. : Effect of irradiation on the microbiological status and flavouring materials of selected spices. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, **201**, 283-288 (1995)
- Steele, J.H. : Food irradiation: a public health challenge for the 21st century. *Clin. Infect. Dis.*, **33**, 376-377 (2001)
- Owczarczyk, H.B., Migdal, W. and Kedzia, B. : The pharmacological activity of medical herbs after microbiological decontamination by irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **57**, 331-335 (2000)
- Migdal, W., Owczarczyk, B., Kedzia, B., Holderna-Kedzia, E. and Segiet-Kujawa, E. : The effect of ionizing radiation on microbiological decontamination of medical herbs and biologically active compounds. *Radiat. Phys. Chem.*, **52**, 91-94 (1998)
- Fang, X. and Wu, J. : Feasibility of sterilizing traditional chinese medicines by gamma-irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **52**, 53-58 (1998)
- Moy, J.H. and Wong, L. : Efficacy of gamma-radiation as a quarantine treatment of fruits, herbs, and ornamentals for hawaii. *Radiat. Phys. Chem.*, **48**, 373-374 (1996)
- Wu, J., Zhang, X., Yuan, R. and He, Y. : Radiolysis of herbs. *Radiat. Phys. Chem.*, **46**, 275-279 (1995)
- 진강, 홍연탁, 한병훈, 권중호 : 방사선 조사 인삼의 안전성 및 효능평가에 관한 연구(III). 과학기술처 (1992)
- Jo, S.K., Park, H.R., Yu, Y.B., Song, B.C. and Yee, S.T. : Stability in immunomodulation Activity of irradiated *Angelica gigas* Nakai. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 134-139 (2000)
- Yu, Y.B. and Jo, S.K. : Evaluation on the of γ -irradiated *Angelica gigas* Nakai: Stability of active components and safety in genotoxicity test. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 300-306 (2000)
- 육창수 : 아세아 생약도감. 도서출판 경원 (1997)
- Kok, L.D., Wong, C.K., Leung, K.N., Tsang, S.F., Fung, K. P. and Choy, Y.M. : Activation of the anti-tumor effector cells by Radix bupleuri. *Immunopharmacology*, **30**, 79-87 (1995)
- Ikarashi, Y., Yuzurihara, M., Sakakibara, I., Takahashi, A. and Ishimaru, H. : Effect of an oriental herbal medicine, "Saiboku-to", and its constituent herbs on Compound 48/80-induced histamine release from peritoneal mast cells in rats. *Phytomed. Int'l. J. Phytother. Pytopharmacol.*, **8**, 8-15 (2001)
- Maron, D.M. and Ames, B.N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 173-215 (1983)
- 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)
- Ashwood-Smith, M.J. : Stability of frozen microsome preparations for use in the Ames *Salmonella* mutagenicity assay. *Mutation Res.*, **69**, 199-200 (1980)
- Hubbard, S.A., Brooks, T.M., Gonzalez, L.P. and Bridges, J.W. : Preparation and characterisation of S9-fractions. In *Comparative Genetic Toxicology*, Parry, J.M. and Arlett, C.F. (eds.), Macmillan, London, Vol. 413 (1985)
- Fenech, M. and Morley, A.A. : Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*, **147**, 29-36 (1985)
- 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)
- Ha, K.W., Jung, H.K., Oh, H.Y., Heo, O.S., Sohn, S.J., Han, E.S., Jung, S.C., Choi, B.Y., Kim, Y.M., Kim, P.S. and Moon,

- H.H. : Studies on the genotoxicity of the gamma-irradiated *Panax Ginseng Radix* *in vitro* and *in vivo*. *J. Food Hyg. Safety*, **9**, 67-74 (1994)
36. Kang, I.J., Kwak, H.J., Lee, B.H. and Kim, K.H. : Genotoxicological and acute toxicological safeties of gamma irradiated beef. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 775-780 (1998)
 37. Kang, I.J., Lee, Y.S., Lee, S.J., Yook, H.S. and Byun, M.W. : Four-week oral toxicity study of gamma irradiated chickens in mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**, 234-238 (2001)
 38. 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)
 39. 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)
 40. Hubber, R., Braselmann, H. and Bauchinger, M. : Intra- and inter-individual variation of background and radiation-induced micronucleus frequencies in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 655-661 (1992)
 41. Kligerman, A.D., Halperin, E.C., Erexson, G.L., Honore, G., Westvook-collins, B. and Allen, J.W. : A cytogenetic comparison of the responses of mouse and human peripheral blood lymphocytes to ⁶⁰Co γ -radiation. *Radiat. Res.*, **115**, 334-346 (1988)
 42. Savage, J.R.K. : Acentric chromosomal fragments, and micronuclei: the displacement factor. *Mutation Res.*, **225**, 171-173 (1989)
 43. Brusick, D. : Genetic toxicology. In *Principles and Methods of Toxicology*, 3rd ed., Hayes, A.W. (ed.), Raven Press, New York, p.545 (1994)
 44. Department of Health : Guidelines for the Testing of Chemicals for Mutagenicity. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Report on Health and Social Security No. 35. HMSO, London (1989)
 45. Erexson, G.L. and Kligerman, A.D. : A modified mouse peripheral blood lymphocyte culture system for cytogenetic analysis. *Environ. Mol. Mutagen*, **10**, 377-386 (1987)
 46. Erexson, G.L., Periago, M.V. and Spicer, C.S. : Differential sensitivity of Chinese hamster V79 and Chinese hamster ovary (CHO) cells in the *in vitro* micronucleus screening assay. *Mutation Res.*, **495**, 75-80 (2001)
 47. Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Poetter, F., Martus, H.J., Fjallman, A., Friauff, W. and Suter, W. : Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 843-858 (2001)
 48. Himmelstein, M.W., Gladnick, N.L., Donner, E.M., Snyder, R.D. and Valentine, R. : *In vitro* genotoxicity testing of (1-chloroethenyl)oxirane, a metabolite of β -chloroprene. *Chemico-Biological Interactions*, **135-136**, 703-713 (2001)
 49. Wang, J.L., Chen, W.L., Tsai, S.Y., Sung, P.Y. and Huang, R.N. : An *in vitro* model for evaluation of vaporous toxicity of trichloroethylene and tetrachloroethylene to CHO-K1 cells. *Chemico-Biological Interactions*, **137**, 139-154 (2001)
 50. 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)
 51. Department of Health Guidelines for the Testing of Chemicals for Mutagenicity. Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment : *Report on Health and Social Security* No. 35 (1989)
 52. Erexson, G.L. and Kligerman, A.D. : A modified mouse peripheral blood lymphocyte culture system for cytogenetic analysis. *Environ. Mol. Mutagen*, **10**, 377-386 (1987)

(2001년 6월 29일 접수)