

감마선 조사 황기, 백출 및 승마 열수 추출물의 *in vitro* 유전독성학적 안전성 평가

박혜란 · 함연호 · 정우희 · 정일윤 · 조성기[†]

한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학기술 개발팀

Genotoxicological Safety of Hot Water Extracts of the γ -Irradiated Astragali Radix, Atractylodes Rhizoma, and Cimicifugae Rhizoma *in Vitro*

Hae-Ran Park, Yeon-Ho Ham, Uhee Jung, Ill-Yun Jeong and Sung-Kee Jo[†]

Radiation Food Technology and Bioscience Team, Korea Atomic Energy
Research Institute, Daejeon 305-600, Korea

Abstract

As the utilization of medicinal herbs in food and bio-industry increases, safe hygienic technologies for them are demanded. To consider the possibility of application of radiation technology for this purpose, the genotoxicological safety of three γ -irradiated medicinal herbs were studied. Astragali Radix, Atractylodes Rhizoma and Cimicifugae Rhizoma were irradiated at 10 kGy, and then were extracted with hot water. The genotoxicity of the extracts was examined in two short-term *in vitro* tests: (1) *Salmonella* reversion assay (Ames test) in strains of TA98 and TA100; (2) Micronucleus test in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. The extract was treated at maximum doses of 5 mg/plate in *Salmonella* reversion assay, and 1 mg/mL in micronucleus test where growth of CHO cells was inhibited by 50%. In *Salmonella* reversion assay with or without metabolic activation, both extracts of irradiated and non-irradiated herbs showed no significant differences in formation of revertant colonies compared with the negative control. And also in micronucleus test, the incidences of micronucleus in CHO cells cultured with extracts of irradiated herbs were almost same as negative control in less than 3%. These results of two *in vitro* tests suggest that γ -irradiated herbs do not show mutagenicity and cytogenetic toxicity. Further tests of *in vivo* genotoxicity and chronic toxicity are needed to ascertain the safety of γ -irradiated herbs.

Key words: herbs, irradiation, Ames test, micronucleus test, mutagenicity

서 론

최근 국제 간 농축산물의 무역에서 방사선 조사 품목이 증가하는 추세이다. 이는 기존의 식품 저장·유통에 사용되는 화학 훈증제가 환경공해, 건강장해 및 유해물질 생성 등의 문제로 사용 금지될 전망이므로 대체방법의 하나인 방사선 조사기술의 적용이 확대되고 있기 때문이다(1-5). 식품의 보존과 위생화를 위한 방사선 식품 조사기술은 식품고유의 특성을 유지하면서 살균효과를 충분히 나타낼 뿐만 아니라 유해 부산물을 생성시키지 않아 환경 친화적이고 위해성이 없으며, 처리비용 절감 및 저장기간 연장 등의 효율성이 인정되어, 현재 52개국에서 방사선 조사 식품이 허가되었고 그 중 40개국에서 상업적으로 실용화되고 있다(6). 국내에서도 상업적 방사선 조사시설 1기가 1987년 6월부터 가동된 이래 최근 13개 식품 품목 군에 대해 보건복지부로부터 방사선 조사가 허용되었으며, 향후 기능성 식품소재와 소비량이 많은 천연의약품 소재에도 적용 가

능성이 제시되고 있다(7).

방사선 조사 식품의 안전성에 관한 연구는 1921년 미국에서 육류 기생충 사멸을 위해 방사선 조사처리가 처음 도입되면서 부터 시작되었다. 1961년 FAO/IAEA/WHO 공동으로 개최한 식품조사의 안전성 평가에 관한 최초의회의에서 "식품조사공동전문위원회(JECFI: Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Food)"를 설치하였으며, 그 이후 1970년에 FAO/IAEA 및 OECD는 WHO의 권유에 따라 24개국이 참여한 식품조사분야 국제과제가 신설되어, 방사선 조사에 따른 유해물질 생성 가능성, 잔류 방사선, 독성학적 안전성 등에 관한 연구가 구체적으로 수행되었다. 1980년 국제기구인 조사식품공동전문위원회(JECFI)가 연구 결과를 종합 평가하여 "평균 10 kGy 이하로 조사된 모든 식품은 독성학적으로 안전하며, 영양학적으로도 문제가 되지 않는다"고 결론을 지었다(8). 또한, 1992년 5월 WHO에서는 국제소비자연맹(IOCU)의 대표단과 식품조사를 반대하는 식품과학

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

및 식품화학 전공 교수들의 참석 하에 회의를 개최한 결과, 조사 식품의 안전성 및 영양적 적합성을 재확인하면서 “식품을 제조 관리수칙에 따라 방사선을 조사할 경우 인간의 건강을 해롭게 하는 어떠한 성분변화나 이물질이 생성되지 않으며, 소비자들에게 미생물학적 위험성을 증가시키지 않는다”고 발표하였다(9). 그러나 방사선 조사식품에 대한 소비자의 수용성 증진과 의구심의 해소는 아직도 미흡한 실정이다.

최근 기능성 식품 및 대체의학의 개념정립과 더불어 생약재 등 생리활성물질을 함유하고 있는 천연소재의 식품·생물 산업적 활용의 증가에 따라 식품에 사용 가능한 천연 동·식물 소재들을 구체적으로 “사용가능원료(주원료, 부원료, 제한적 원료)”와 “사용불가 원료”로 식품공전에서 분류 등재함으로써 식품산업계의 이용 근거가 되고 있으며 향후 사용 가능한 소재들이 추가될 전망이다. 이와 같이 생약재 등 천연소재들의 수요 증가에 따라 원료 및 제품의 안전한 저장·유통기술 개발이 산업계로부터 요구되고 있다.

생약재의 살충·살균 목적의 방사선 조사기술은 프랑스를 비롯한 유럽 8개국과 미국 등에서는 이미 허가가 되었다. 국내에서도 1990년부터 인삼제품에 대한 조사식품의 안전성 연구가 수행되어 영양학적, 미생물학적, 약리효능 및 유전독성학적 안전성이 입증되었으며(10), 최근 본 연구팀에서도 당귀 등을 대상으로 감마선 조사 생약재의 약리효능과 유전독성학적 안전성을 보고한 바가 있다(11,12).

본 연구에서는 생약재의 가공·저장 및 유통을 위한 안전한 위생화 기술로 감마선 조사기술의 적용 가능성을 검토하기 위한 일환으로 감마선 조사 황기, 백출, 승마의 유전 독성학적 안전성을 검증하고자 하였다. 황기는 다년초로써 전국에 분포하고, 원기부족, 다한증, 당뇨, 강장 등 생약 및 식품에 이용하며, 백출은 삼주의 뿌리로 위장염, 신경통 및 부종 등에 사용되고, 승마는 다년초 식물로 근경을 발한, 해열 및 두통 등에 사용하는 생약재이다(13). 본 실험에서는 오염유기체 완전 구제 선량인 10 kGy의 감마선을 조사한 시료의 유전독성학적 안전성을 평가하고자, *Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험과 배양된 Chinese hamster ovary 세포를 이용한 소핵유발시험을 시행하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 시료조제

생약재는 건조된 것으로 황기(*Astragal Radix*: the root of *Astragalus membranaceus* Bunge, 한국 재천산), 백출(*Atractylodes Rhizoma*: the root of *Atractylodes japonica* Koidzumi, 한국 영천산) 및 승마(*Cimicifugae Rhizoma*: the root of *Cimicifuga heracleifolia* Komarov, 중국산)를 경동시장에서 구입하였다.

생약재의 방사선 조사는 한국원자력연구소에 소재하는 감마선 조사시설(Co 60, 10만 Ci)을 이용하여 실온에서 시간당 2

kGy의 선량율로 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다.

감마선 조사 및 비조사 생약재 30 g에 약 10배량의 증류수를 가하여 약탕기에서 2시간씩 3회 열수 추출하고 여과와 원심분리를 거친 후 감압 농축하여 실험시료로 사용하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀 돌연변이 시험 (Ames test)

시험방법은 Maron과 Ames의 방법(14,15)에 따라 배지, 시약 및 4% S9 mix를 조제하여 시험에 사용하였으며, S9 분획(16,17)은 Pheno-barbital과 5,6-benzoflavone으로 유도한 Sprague-Dawley rat의 간으로부터 분리한 것으로 일본 Oriental Yeast Co., LTD.에서 구입하였다.

시험에 사용된 박테리아 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100으로 Ames 교수로부터 직접 분양 받았으며, histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 특성, UV에 대한 민감도(*uvrB* 돌연변이), R-factor에 의한 ampicillin 또는 tetracycline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다.

물질대사를 활성화시키지 않는 직접법의 경우는 standard plate incorporation test로, S9 mix로 물질대사를 활성화시키는 간접법의 경우에는 top agar를 pouring하기 전에 균 배양액을 30분간 예비 배양한 후 plate에 도포하는 preincubation test로 시행하였다. 시험관에 인산완충용액 0.5 mL(대사 활성화시키는 경우에는 S9 mix 0.5 mL), 일정농도의 시료용액 0.1 mL과 Oxid nutrient broth에서 12시간 배양시킨 균 배양액 0.1 mL을 넣어 가볍게 vortex하였다. 직접법의 경우에는 곧바로(간접법의 경우에는 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 평판고화시킨 후 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 복귀변이 집락을 계수하였다. 돌연변이 유발성의 판정은 원저의 제시에 따라 복귀돌연변이 집락수가 용매대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다. 또한 직접법의 경우에는 4-nitro-*o*-phenylenediamine(NPD)와 sodium azide를, 간접법의 경우에는 2-aminofluorene(2-AF)을 양성대조물질로 하여 실험의 적합 여부를 판정하였다.

포유류 배양세포를 이용한 *in vitro* 소핵 시험

시험에 사용된 동물세포는 Chinese hamster ovary(CHO) 세포주로 ATCC(Manassas, VA)에서 구입하였으며, GIBCO BRL Inc.의 RPMI 1640 배지에 HEPES buffer 15 mM, fetal bovine serum 10%, penicillin-streptomycin 50 µg-50 unit/mL을 첨가시킨 완전배지를 사용하여 배양하였다. 포화 상대 습도 조건 하의 37°C, 5% CO₂를 공급해주는 배양기에서 세포들을 배양하였다.

시험방법은 직접법의 경우 CHO 세포 5×10⁴개를 culture dish(Ø 60 mm)에 파종하여 2일간 배양한 후, Fenech와 Morley(18)의 cytokinesis-block(CB) method에 따라 세포질의 분열을 억제하는 물질인 cytochalasin B(Cyt-B; 3 µg/mL)를 시

험물질과 함께 첨가하고 24시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 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 공기 건조시켜 세포표본을 만들었다. 세포들의 핵을 염색하기 위하여 3% Giemsa 염색액으로 17분간 염색하고 건조한 후 광학현미경으로 1000배에서 관찰하였다. 간접법에서는 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 시험물질과 20% S9 mix를 첨가하여 6시간동안 배양한 다음, 신선한 배지로 교환하고 Cyt B를 첨가하여 18시간 동안 더 배양한 후 세포표본을 만들고 염색하였다.

시료는 증류수로 희석하였으며 시료첨가는 배양용량의 1/10로 하였고, 음성대조물질로는 증류수를, 양성대조물질로는 직접법에서는 mitomycin C(0.1 µg/mL), 간접법에서는 DMSO에 녹인 benzo[a]pyrene(0.02 mg/mL)을 사용하였다.

소핵(MN)의 판독은 Almasy 등(19)의 기준에 따랐으며 세포핵 분열 후의 Cyt-B에 의한 세포질 분열 봉쇄로 생성된 1,000개의 binucleated CB세포들 중 소핵을 갖는 세포를 계수하였다.

결과 및 고찰

*Salmonella typhimurium*을 이용한 돌연변이원성 검증

감마선이 조사된 대상 생약재(황기, 백출, 승마)의 열수 추출물이 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100 균주의 복귀 돌연변이 집락 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 예비실험 결과 본 시료들은 균주 생장억제를 거의 나타내지 않음이 확인되었다. 본 실험에서는 의약품 등의 독성시험 기준에 따라 최고농도를 5 mg/plate로 하여 5단계의 용량으로 시험하였으며, 복귀 돌연변이 집락수에 대한 실험 결과를 시료별로 Table 1, 2 및 3에 각각 나타내었다.

각 실험에서 음성대조군의 복귀변이 집락수는 TA98의 경우 15~24개, TA100의 경우 122~184로서 문헌(14,15,20)에 나타난 범위(TA98의 경우 20~50개, TA100의 경우 120~200) 내에 포함되었으며, 양성대조 화합물에 의해 복귀돌연변이 집락수가 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 수행되었음이 확인되었다.

감마선 조사 황기에 대한 시험결과(Table 1), 대사활성화시

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

Test material ¹⁾	Dose (mg/plate)	S9 mix	No. of revertant colonies (His ^r) per plate ²⁾	
			TA98	TA100
H ₂ O		-	19, 29, 25 (24)	182, 184, 183 (183)
Astragali Radix (non-irradiated)	5	-	28, 27 (28)	186, 157 (172)
	2.5	-	29, 23 (26)	173, 184 (179)
	1.25	-	23, 26 (25)	172, 175 (174)
	0.63	-	29, 22 (26)	176, 175 (176)
	0.32	-	17, 20 (19)	190, 165 (178)
Astragali Radix (irradiated)	5	-	24, 24 (24)	191, 192 (192)
	2.5	-	19, 25 (22)	152, 171 (162)
	1.25	-	22, 21 (22)	188, 177 (183)
	0.63	-	22, 25 (24)	190, 205 (198)
	0.32	-	25, 20 (23)	196, 182 (189)
NPD*	0.02	-	2042, 2068 (2055)	
Na Azide*	0.0015	-		1235, 1258 (1247)
H ₂ O		-	20, 21, 26 (22)	178, 171, 202 (184)
H ₂ O		+	29, 24, 36 (30)	204, 196, 188 (196)
Astragali Radix (non-irradiated)	5	+	34, 32 (33)	227, 191 (209)
	2.5	+	28, 33 (31)	173, 194 (184)
	1.25	+	34, 31 (33)	199, 167 (183)
	0.63	+	28, 26 (27)	193, 161 (177)
	0.32	+	28, 32 (30)	191, 172 (182)
Astragali Radix (irradiated)	5	+	24, 37 (31)	198, 192 (195)
	2.5	+	24, 23 (24)	208, 178 (192)
	1.25	+	29, 33 (31)	178, 189 (184)
	0.63	+	25, 22 (24)	166, 190 (178)
	0.32	+	33, 23 (28)	174, 168 (171)
2-AF*	0.010	+	1183, 1207 (1195)	723, 757 (740)

¹⁾Sample was irradiated at 10 kGy and extracted with hot water. The extract was tested with or without metabolic activation using S9 mix.

²⁾After 48 hr of incubation the revertant colonies on the plates were counted. Data present the number of colonies in each plate and the numbers in parenthesis are the mean of two or three plates.

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

Table 2. Revertant colonies of *S. typhimurium* strains in Ames test with hot water extract of γ -irradiated *Atractylodes Rhizoma*

Test material ¹⁾	Dose (mg/plate)	S9 mix	No. of revertant colonies (His ⁺) per plate ²⁾	
			TA98	TA100
H ₂ O	-	-	19, 20, 21 (20)	145, 144, 142 (144)
Atractylodes Rhizoma (non-irradiated)	5	-	23, 21 (22)	158, 155 (157)
	2.5	-	23, 22 (23)	138, 134 (136)
	1.25	-	18, 25 (22)	145, 140 (143)
	0.63	-	20, 22 (21)	144, 141 (143)
	0.32	-	19, 21 (20)	144, 136 (140)
Atractylodes Rhizoma (irradiated)	5	-	35, 26 (31)	157, 146 (152)
	2.5	-	22, 19 (21)	134, 157 (146)
	1.25	-	28, 23 (26)	133, 136 (135)
	0.63	-	17, 17 (17)	148, 140 (144)
	0.32	-	21, 21 (21)	151, 146 (149)
NPD*	0.02	-	2042, 2068 (2055)	
Na Azide*	0.0015	-	1235, 1258 (1247)	
H ₂ O	-	-	19, 16, 18 (18)	158, 135, 138 (144)
H ₂ O	-	+	31, 21, 31 (28)	153, 152 (153)
Atractylodes Rhizoma (non-irradiated)	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)
Atractylodes Rhizoma (irradiated)	5	+	20, 35 (28)	164, 168 (166)
	2.5	+	33, 29 (31)	179, 173 (176)
	1.25	+	23, 26 (25)	177, 172 (175)
	0.63	+	29, 37 (33)	154, 159 (157)
	0.32	+	30, 21 (26)	187
2-AF*	0.010	+	1089, 1132 (1111)	758, 778 (768)

The legends were same as Table 1.

키지 않은 직접법의 경우 적용농도 5.0~0.32 mg/plate의 범위에서 TA98과 TA100 균주에서 각각 22~24개 및 162~198개로서 농도 의존적 증감을 보이지 않았으며, 음성 대조군(H₂O)의 수치(TA98: 19~29개, TA100: 182~184개)와 비교해서도 유의한 차이를 보이지 않았다. 대사 활성화(S9 mix 첨가)의 경우(간접법)에서도 각각의 시험 적용 농도에서 복귀변이 집락수의 증가를 나타내지 않았다. 직접법 및 간접법 모두에서 감마선 조사 및 비조사 시료 처리 군간의 비교에서도 집락수의 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 감마선 조사 백출(Table 2) 및 승마(Table 3)에 대한 시험에서도 복귀변이 집락수의 유의한 증가는 관찰되지 않았으며, 감마선 조사 시료와 비조사 시료 처리군 간에도 유의한 차이가 나타나지 않아, 황기에 대한 시험결과와 유사한 결과를 보였다.

결과적으로 감마선이 조사된 황기, 백출, 승마의 열수 추출물은 복귀변이 집락수를 증가시키지 않았으므로 직접 및 간접 변이원으로 작용하지 않는 것으로 판정되었다. 이 결과는 *Salmonella typhimurium*의 복귀돌연변이 시험에서 방사선 조사된 백삼분말(20), 쇠고기(21), 닭고기(22) 등의 유전독성학적 안전성을 입증한 보고와 일치하였다.

포유류 배양세포를 이용한 소핵 유발성 검증

세포증식 억제 상태에서는 세포의 핵분열이 일어나지 않아

cytokinesis-block(CB) method 이용 시에 binucleated cells이 생성되지 않으므로써 소핵이 관찰되지 않는다. 예비실험에서 대상시료인 황기, 백출, 승마의 열수 추출물은 CHO세포 배양에 고농도로 첨가하였을 때 세포증식 억제를 나타내었다. 따라서, 본 시험에서는 독성시험 기준에 따라 50%의 세포증식 억제를 보인 1 mg/mL을 최고 농도로 하여 3단계 농도에서 각 시료에 의한 세포 분열 중 유전독성 유발여부를 시험하였다. 각 시료별로 binucleated cells 내의 소핵유발에 대한 시험결과를 Table 4, 5, 및 6에 나타내었다.

음성대조군의 경우 1,000개의 binucleated cells 중에 형성된 소핵은 22±5.7개 (2.2±0.57%)로서 문헌(23-25)에 나타난 수준이었고, 양성대조 화합물 처리 시 소핵 수가 5배 이상 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 수행되었음을 확인할 수 있었다. 감마선 조사 황기의 열수 추출물에 대한 시험(Table 4)에서 대사 활성화시키지 않은 직접법 및 대사 활성화 간접법의 경우 모두, 적용 농도인 1.0~0.1 mg/mL의 범위에서 2~3%의 소핵 형성 빈도를 나타냄으로써, 음성대조군과 비교해 볼 때 시료가 소핵 형성을 유발시키지 않음을 알 수 있었다. 감마선 조사의 백출 및 승마의 열수 추출물에 대한 시험(Table 5, 6)에서도 적용 시험농도 범위에서 모두 거의 같은 결과를 나타내어, 각 시료가 소핵을 유발시키지 않음을 알 수 있었다.

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

Test material ¹⁾	Dose (mg/plate)	S9 mix	No. of revertant colonies ('His') per plate ²⁾	
			TA98	TA100
H ₂ O		-	17, 33, 15 (22)	161, 131, 120 (137)
Cimicifuge Rhizoma (non-irradiated)	5	-	34, 32 (33)	143, 170 (157)
	2.5	-	31, 24 (28)	139, 140 (140)
	1.25	-	26, 26 (26)	143, 132 (138)
	0.63	-	25, 26 (26)	123, 119 (121)
	0.32	-	32, 30 (31)	115, 116 (116)
Cimicifuge Rhizoma (irradiated)	5	-	33, 33 (33)	250, 221 (236)
	2.5	-	40, 34 (37)	175, 202 (189)
	1.25	-	33, 33 (33)	153, 167 (160)
	0.63	-	30, 25 (28)	145, 140 (143)
	0.32	-	26, 30 (28)	145, 168 (157)
NPD*	0.02	-	2042, 2068 (2055)	
Na-Azide*	0.0015	-	1235, 1258 (1247)	
H ₂ O		-	19, 10, 16 (15)	127, 116 (122)
H ₂ O		+	24, 19, 23 (22)	120, 113 (117)
Cimicifuge Rhizoma (non-irradiated)	5	+	28, 25 (27)	122, 119 (121)
	2.5	+	19, 23 (21)	102, 94 (98)
	1.25	+	29, 20 (25)	109, 100 (105)
	0.63	+	19, 29 (24)	81, 110 (96)
	0.32	+	19, 18 (19)	108, 102 (105)
Cimicifuge Rhizoma (irradiated)	5	+	31, 31 (31)	172, 212 (192)
	2.5	+	24, 11 (18)	132, 123 (128)
	1.25	+	24, 28 (26)	137, 120 (129)
	0.63	+	18, 24 (21)	128, 127 (128)
	0.32	+	22, 17 (20)	110, 110 (110)
2-AF*	0.010	+	1089, 1132 (1111)	758, 778 (768)

The legends were same as Table 1.

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

Test material ¹⁾	Dose (mg/mL)	S9 mix	No. of CB cells with n MN ²⁾					Total No. of MN	MN/1000 cells (Mean \pm SD)
			0	1	2	3	4		
H ₂ O	-	-	2,944	53	2	-	1	61	20.3 \pm 4.0
Astragali Radix (non-irradiated)	1	-	2,937	58	5	-	-	68	22.7 \pm 3.5
	0.3	-	2,945	49	6	-	-	61	20.3 \pm 5.0
	0.1	-	2,964	34	2	-	-	38	12.7 \pm 0.6
Astragali Radix (irradiated)	1	-	2,938	52	9	1	-	73	27.7 \pm 10.0
	0.3	-	2,958	36	5	-	1	50	15.3 \pm 4.0
	0.1	-	2,965	34	1	-	-	36	12.0 \pm 3.0
MMC*	0.0001	-	2,698	266	30	5	1	345	115.0 \pm 12.6
H ₂ O	-	+	2,944	50	6	-	-	62	20.7 \pm 4.0
Astragali Radix (non-irradiated)	1	+	2,937	57	6	-	-	69	23.0 \pm 2.0
	0.3	+	2,948	47	5	-	-	57	19.0 \pm 4.0
	0.1	+	2,939	55	6	-	-	67	22.3 \pm 0.6
Astragali Radix (irradiated)	1	+	2,927	65	8	-	-	81	27.0 \pm 1.0
	0.3	+	2,935	53	12	-	-	77	25.7 \pm 1.5
	0.1	+	2,931	63	6	-	-	75	25.0 \pm 6.0
B[a]P*	0.02	+	2,634	324	35	6	1	415	138.3 \pm 19.4

¹⁾Sample was irradiated at 10 kGy and extracted with hot water. The extract was tested with or without metabolic activation using S9 mix.

²⁾After 24 hr of culture with sample, 1000 cytokinesis-blocked (CB) binucleated cells were analyzed for micronuclei (MN), in triplicate experiments.

*Positive control: MMC (mitomycin 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 *Atractylodes Rhizoma*

Test material ¹⁾	Dose (mg/mL)	S9 mix	No. of CB cells with n MN ²⁾					Total No. of MN	MN/1000 cells (Mean±SD)
			0	1	2	3	4		
H ₂ O	-	-	2,945	51	4	-	-	59	19.7±3.2
<i>Atractylodes Rhizoma</i> (non-irradiated)	1	-	2,944	51	5	-	-	61	20.3±6.8
	0.3	-	2,962	38	-	-	-	38	12.7±1.5
	0.1	-	2,946	40	13	1	-	69	22.3±6.4
<i>Atractylodes Rhizoma</i> (irradiated)	1	-	2,953	43	3	1	-	52	17.3±4.9
	0.3	-	2,953	43	4	-	-	51	17.0±3.0
	0.1	-	2,954	43	3	-	-	49	16.3±3.8
MMC*	0.0001	-	2,698	266	30	5	1	345	115.0±12.6
H ₂ O	-	+	2,956	38	6	-	-	50	16.7±0.6
<i>Atractylodes Rhizoma</i> (non-irradiated)	1	+	2,957	34	8	1	-	53	17.7±8.1
	0.3	+	2,957	35	7	1	-	52	17.3±5.5
	0.1	+	2,941	45	12	1	1	76	25.3±8.7
<i>Atractylodes Rhizoma</i> (irradiated)	1	+	2,950	40	8	2	-	62	20.6±6.5
	0.3	+	2,945	45	8	1	-	64	21.3±4.0
	0.1	+	2,948	44	4	4	-	64	21.3±5.1
B[a]P*	0.02	+	2,634	324	35	6	1	415	138.3±19.4

The legends were same as Table 4.

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

Test material ¹⁾	Dose (mg/mL)	S9 mix	No. of CB cells with n MN ²⁾					Total No. of MN	MN/1000 cells (Mean±SD)
			0	1	2	3	4		
H ₂ O	-	-	2,944	51	5	-	-	61	20.3±7.4
<i>Cimicifugae Rhizoma</i> (non-irradiated)	1	-	2,955	41	4	-	-	49	16.3±3.1
	0.3	-	2,948	49	3	-	-	55	18.3±2.3
	0.1	-	2,938	58	4	-	-	66	22.0±4.3
<i>Cimicifugae Rhizoma</i> (irradiated)	1	-	2,961	39	-	-	-	39	13.0±2.6
	0.3	-	2,952	46	2	-	-	50	16.7±4.7
	0.1	-	2,949	46	4	1	-	57	18.8±1.0
MMC*	0.0001	-	2,698	266	30	5	1	345	115.0±12.6
H ₂ O	-	+	2,949	45	4	2	-	56	19.7±2.1
<i>Cimicifugae Rhizoma</i> (non irradiated)	1	+	2,941	53	5	1	-	66	22.0±3.6
	0.3	+	2,946	49	3	1	1	62	20.7±7.6
	0.1	+	2,939	51	9	1	-	72	24.0±6.6
<i>Cimicifugae Rhizoma</i> (irradiated)	1	+	2,949	43	6	1	1	62	20.7±10
	0.3	+	2,957	40	3	-	-	46	15.3±1.5
	0.1	+	2,940	48	10	1	1	75	22.7±5.5
B[a]P*	0.02	+	2,634	324	35	6	1	415	138.3±19.4

The legends were same as Table 4.

결과적으로, CHO세포를 이용한 *in vitro* 소핵 유발성 시험에서 감마선조사 황기, 백출 및 승마의 열수 추출물이 음성으로 판정됨에 따라, 세포 핵 분열시 직접 또는 간접적으로 유전적 이상을 유발시키지 않는 것으로 사료된다. 이 결과는 Ha 등(20)이 CHL(Chinese hamster lung fibroblast) 세포를 이용한 염색체 이상 시험에서 방사선조사 백삼분말의 유전독성학적 안전성을 입증한 결과와 일치하였으며, Kang 등(21,22)이 염색체 이상 시험과 설치류에서의 소핵시험 등으로 방사선조사 쇠고기 및 닭고기의 유전독성학적 안전성을 입증한 보고와 일치하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이, 저자 등은 1차적으로 두 가지 *in vitro* 유전독성 시험 즉 *Salmonella typhimurium*을 이용한 돌연변이원성 시험과 포유류 배양세포를 이용한 소핵 유발성 시험을 시행하여 감마선 조사 황기, 백출 및 승마의 열수 추출물의 유전독성학적 안전성을 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 사료 된다.

요 약

생약재의 식품·생물 산업적 이용 증대에 따라 생약재의 안전한 위생화 기술이 요구되고 있다. 본 연구에서는 생약재의 위생화 기술로서 방사선 조사기법의 활용 가능성을 검토하기 위하여, 감마선을 조사한 생약재 3종에 대한 유전독성학적 안전성을 평가하고자 하였다. 공시 재료는 오염유기체 완전 구제 선량인 10 kGy의 감마선을 조사시킨 황기, 백출 및 승마로 하였으며, 각각의 열수 추출물의 유전독성을 *in vitro* 시험으로 평가하였다. 유전독성 평가는 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100 균주를 이용한 복귀 돌연변이 시험(Ames test)과 Chinese hamster ovary(CHO) 세포를 이용한 *in vitro* 소핵 유발 시험으로 시행하였다. 각각의 시험은 S9 mix를 첨가한 대사 활성화 시스템과 첨가하지 않은 비활성화 시스템으로 구분하여 실시하였으며, 시료의 최고 처리 농도는 복귀돌연변이 시험에서는 5 mg/plate로, 소핵유발시험에서는 50%의 세포증식 억제율을 나타내는 농도(1 mg/mL)로 하였다. 복귀 돌연변이 시험 결과 대사 활성화 및 비활성화의 경우 모두에서 각 시료에 의한 복귀변이 집락수의 증가를 인정할 수 없었으며, 각 용량단계에서 감마선 조사군과 비조사군 간의 차이도 볼 수 없었으므로 음성으로 판정하였다. 소핵 유발시험에서도 음성대조군 및 감마선 조사군과 비조사군 모두 각 용량 단계에서 세포 내에 생성된 소핵의 빈도가 3% 이하로 나타남에 따라, 시료에 의한 소핵의 유발을 인정할 수 없었으므로 음성으로 판정하였다. 따라서 감마선이 조사된 각각의 시료는 직접 및 간접 돌연변이원으로 작용하지 않으며 세포유전 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 향후, 생체 내 유전독성시험, 만성독성시험 및 생식독성시험 등의 추가적인 *in vivo* 실험이 행하여진다면 감마선 조사 생약재의 안전성을 보다 명확히 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행된 연구의 결과이며, 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Jung GT, Ju IO, Choi JS. 1998. Studies on drying and preservation of Omija (*Schizandra chinensis* Baill.). *Korean J Postharvest Sci Technol* 5: 217-223.
- Anon. 1993. Food safty. *Food Irradiation Newsletter* 17: 4-10.
- Kwon JH, Byun MW, Lee SJ. 1994. Comparative effects of gamma irradiation and ethylene oxide fumigation on sorption properties and microbiological quality of white ginseng powder. *Korean J Food Sci Technol* 26: 272-277.
- Kwon JH, Belanger JMR, Sigouin M, Lanthier J, Willemot C, Pare JRJ. 1990. Chemical constituents of *Panax ginseng* exposed to γ -irradiation. *J Agric Food Chem* 38: 830-833.
- Juri ML, Ito H, Watanabe H, Tamura N. 1986. Distribution of microorganism in spices and their decontamination by gamma-irradiation. *Agric Biol Chem* 50: 347-350.
- IAEA/ICGFI. 2000. 2000 World List for Clearance. IAEA website www.iaea.org/icgfi.
- Byun MW, Yook HS, Jo SK, Chong YJ. 1996. Status and prospects of food irradiation technology in Korea. *J Food Sci Nutr* 1: 262-268.
- WHO: *Wholesomeness of irradiated food*. 1981. Report of a joint FAO/IAEA/WHO expert committee on the wholesomeness of irradiated food. *Technical Report Series* p 659.
- Daferstein FK. 1992. Food irradiation; The position of the World Health Organization. 36th General Conference of the International Atomic Energy Agency, Scientific session, Vienna.
- Jin G, Hong HT, Han BH, Kwon JH. 1992. Studies on safety and efficacy of gamma-irradiated ginseng (III). The Ministry of Science and Technology, Korea.
- Jo SK, Park HR, Yu YB, Song BC, Yee ST. 2000. Stability in immunomodulation activity of irradiated *Angelica gigas* Nakai. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 134-139.
- Yu YB, Jo SK. 2000. 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.
- Yook CS. 1997. *An illustrated guide to Asia herb*. Gyeongwon Publishing Co Inc, Seoul.
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res* 113: 173-215.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 31: 347-364.
- Ashwood-Smith, MJ. 1980. Stability of frozen microsome preparations for use in the Ames *Salmonella* mutagenicity assay. *Mutation Res* 69: 199-200.
- Hubbard SA, Brooks TM, Gonzalez LP, Bridges JW. 1985. Preparation and characterisation of S9-fractions. In *Comparative Genetic Toxicology*. Parry JM, Arlett CF, eds. Macmillan, London. Vol 413.
- Fenech M, Morley AA. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res* 147: 29-36.
- Almassy Z, Krepinsky AB, Bianco A, Koteles GJ. 1987. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl Radiat Isot* 34: 241-249.
- Ha KW, Jung HK, Oh HY, Heo OS, Sohn SJ, Han ES, Jung SC, Choi BY, Kim MY, Kim PS, Moon HH. 1994. Studies on the genotoxicity of the gamma-irradiated *Panax ginseng* Radix *in vitro* and *in vivo*. *J Food Hyg Safety* 9: 67-74.
- Kang IJ, Kwak HJ, Lee BH, Kim KH. 1998. Genotoxicological and acute toxicological safeties of gamma irradiated beef. *Korean J Food Sci Technol* 30: 775-780.
- Kang IJ, Lee YS, Lee SJ, Yook HS, Byun MW. 2001. Four-week oral toxicity study of gamma irradiated chickens in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 234-238.
- Lasne C, Gu ZW, Venegas W, Chouroulinkov I. 1984. 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.
- Lin RH, Wu LJ, Lee CH, Lin Shiao SY. 1993. Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res* 319: 197-203.
- Wakata A, Sasaki MS. 1987. 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.

(2002년 7월 19일 접수; 2002년 9월 16일 채택)