

감마선 조사 계란의 유전독성학적 안전성 평가

송현파 · 신은혜 · 윤혜정¹ · 조철훈¹ · 김동호[†]

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소, ¹충남대학교 동물자원생명과학과

Establishing the Genotoxicological Safety of Gamma-irradiated Egg White and Yolk

Hyun-Pa Song, Eun-Hye Shin, Hyejeong Yun¹, Cheorun Jo¹ and Dongho Kim[†]

Department of Radiation Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongseup 580-185, Korea

¹Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

The genotoxicological safety of gamma-irradiated egg white and yolk was examined to ensure that required safety parameters were met, and in an effort to further apply gamma-irradiation for improvement of the hygienic qualities of eggs. Egg white and yolk were irradiated at 20 kGy, much higher than the legally approved dose (less than 5 kGy), and possible genotoxicity was evaluated using *in vitro* and *in vivo* tests. The SOS chromotest employing *Escherichia coli* PQ37, and a chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster lung (CHL) cells, were performed *in vitro* with or without metabolic activation (S9). An *in vivo* micronucleus development test was conducted using mouse bone marrow cells. Negative results were obtained in the SOS chromotest. The incidence of chromosomal aberration in CHL cells and the frequency of micronuclear development in mouse bone marrow cells treated with irradiated samples were not significantly different from those of non-irradiated controls. Thus, it may be concluded that up to 20 kGy of gamma irradiation applied to egg white and yolk did not show any genotoxic effects under our experimental conditions.

Key words : gamma irradiation, egg, genotoxicological safety

서 론

계란은 비타민 A, E 및 B2 등의 비타민과 단백질, 지방 및 미네랄 등을 다량 함유하고 있는 완전식품이나 높은 영양과 수분함량으로 인해 저장과 유통과정에서 미생물에 의한 오염 가능성이 크며 때로는 식중독의 원인이 되기도 한다(1,2). 지금까지의 보고에 의하면 *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* 및 *S. heidelberg* 등이 계란의 주요 오염 원인 균이며, 오염경로는 산란 시 난각에 부착된 뒤 내부로 이동하는 수평적 이동이 주된 오염 경로인 것으로 알려져 있다(3). *Salmonella*에 오염된 날계란이나 조리가 덜된 계란의 섭취는 인간의 살모넬라증에 주요 원인이 되며(4), 특히

계란은 일반 가정에서 뿐만 아니라 가공식품에 부원료로도 많이 사용되기 때문에 병원성미생물에 오염된 계란은 병원성미생물의 확산과 질병에 대한 위험성이 더욱 높아질 수 있다. 계란은 자체 미생물 방어기능이 있어 저온에서 비교적 장기간 보존할 수 있으나, 일반적으로 계란의 유통 및 판매가 냉장이 아닌 실온조건에서 이루어지는 경우가 많으므로 실온에서의 신선도 유지 및 미생물학적 안전성을 확보할 수 있는 기술 개발의 필요성이 대두되어 왔다. 현재까지 계란의 살균 및 신선도 확보를 위한 가장 일반적인 방법으로는 살균제 및 세척 방법이 이용되고 있으나 세척의 경우 세척 과정 중 계란의 외각 cuticle 층이 파괴되어 비 세척란보다 오히려 저장성이 떨어지는 경우도 있으므로 주의가 필요하다(5). 최근에는 mineral oil, gelatin, dextrin 및 chitosan 등의 피복처리방법이 보고되고 있으나 설비 및 기계장치 도입 등 경제적 문제점이 지적되고 있다(6,7)

[†]Corresponding author. E-mail : fungikim@kaeri.re.kr,
Phone : 82-63-570-3140, Fax : 82-63-570-3149

방사선 조사 기술은 미생물의 살균에 의한 식품 및 농산물의 부패방지와 여러 공중보건산물의 위생화에 매우 효과적인 방법으로 인정되어 세계적으로 점차 그 이용범위가 확대되고 있는 추세이다(8,9). 현재 국제기구(FAO/IAEA/WHO)와 선진국에서는 안전성과 기술적 타당성을 인정하여 현재 약 40개국에서 230여 품목에 대해서 식품 방사선조사가 이루어지고 있으며 우리나라에서는 1987년 이래로 총 26개 품목의 식품에 대하여 감마선 조사가 허가되었다(10). 한편, 국내에서도 최근 방사선을 이용한 계란의 위생화 및 가공적성 개선에 관한 연구결과가 보고된바 있다. 김 등(11)은 계란에 대한 방사선 조사기술 적용 연구의 일환으로 계란의 주요 오염 미생물을 분리하여 감마선에 대한 감수성을 평가한 결과 3 kGy의 조사선량으로 유통계란의 미생물 제거가 가능할 것으로 보고하였으며, 송 등(12)은 감마선을 조사한 난백의 기포형성능이 향상되었으며, 감마선 조사 난백을 이용하여 케익을 제조한 결과 케익의 관능적 품질이 향상되어 제과/제빵에의 적용가능성을 확인한 바 있다. 현재 미국 식품의약국(US FDA)은 계란의 이온화 방사선 처리 후 화학, 영양, 독성 및 미생물 분야의 연구결과를 바탕으로 살모넬라를 제거하고 위생적이고 안전한 계란의 생산을 위하여 3 kGy까지의 방사선 조사를 허용하고 있다(13). 이와 같이 방사선 조사 기술은 식품의 위생화 및 안전저장/유통, 제조 및 가공공정 개선에 효과적인 방법으로 세계적으로 여러 분야에 이용되고 있으며, 평균 75 kGy의 고선량 조사식품에 대해 안전성과 건전성이 보고되었음에도 불구하고 방사선 조사 식품의 안전성에 대한 소비자들의 부정적인 선입견이 여전히 남아 있어 이를 해결하기 위한 꾸준한 노력이 필요하다(14).

방사선 조사 식품의 안전성을 평가하는 방법 중 가장 일반적인 방법은 동물에게 조사된 식품을 섭취시키고, 동물의 성장, 번식 및 일반 건강 상태 등을 관찰하는 방법이다(15). 그러나 조사 허용 품목은 날이 늘어가고 있는 실정이나 이러한 실험동물을 이용한 독성시험은 몇 년에 이르는 기간과 막대한 비용이 소요되어 적은 비용으로 단기간에 발암성을 예측할 수 있는 유전독성실험을 몇 가지 조합하여 실시함으로써 발암성 및 변이원 기능성에 대한 예측 능력을 높이려는 노력이 이루어지고 있다. 유전독성시험은 시험물질이 유전자 또는 유전자의 담체인 염색체에 미치는 상해작용을 검사함으로써 시험물질이 DNA나 염색체에 손상을 주어서 형태적 변화나 기능적 이상을 일으키는 현상을 관찰하는 시험으로, 새로운 신약이나 화학물질을 개발 시 발암성 및 변이원성을 찾아내기 위해 반드시 수행해야 하는 중요한 시험항목이다(16). 따라서 본 연구에서는 계란의 위생화와 물리적 특성 개선을 위하여 감마선 조사기술의 이용 가능성이 높아짐에 따라 이들의 안전성을 검토할 목적으로 20 kGy의 고선량 감마선 조사 계란의 유전독성학적 안전성을 평가하였다.

재료 및 방법

시료의 구입 및 감마선 조사

계란은 시중 대형마트에서 구입하여 난백과 난황을 각각 분리하여 감마선 조사하였다. 시료의 감마선 조사는 한국 원자력연구원의 선원 100,000 Ci, Co-60 감마선 조사시설(AECL, IR-79, Canada)을 이용하여 15°C의 실온에서 분당 70 Gy의 선량률로 각각 0 및 20 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 감마선 흡수선량의 확인은 5 mm-diameter alanine dosimeter (Brucker Instruments, Rjeomstettem, Germany)를 사용하였고, 총 흡수선량의 오차는 ±5% 이내였다. 감마선 조사된 난백과 난황은 동결건조한 다음, 시료무게의 10배에 해당하는 증류수 또는 50% MeOH (methanol : H₂O = 1:1, v/v)을 넣어 mixer로 3분간 균질화 하고 shaking incubator(10°C, 50 rpm)에서 하룻밤 동안 추출하였다. 추출액은 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 감압농축한 후 동결건조하여 시험에 이용하였다.

SOS chromotest

SOS chromotest는 Quillardet와 Hofnung의 방법에 준하여 실시하였다(17). 하룻밤 전배양한 *E. coli* PQ37 배양액(1×10⁹ CFU/mL)을 L-medium(bacto tryptone, bacto yeast extract, NaCl, ampicillin)으로 1:50(v/v)으로 희석하고 37°C에서 약 2시간 진탕배양하였다(5×10⁶ CFU/mL). 이 배양액을 직접변이원 시험의 경우 L-medium으로, 간접변이원 시험의 경우 활성대사효소계(S9 mix)를 이용하여 10배(v/v) 희석하였다. S9 mix는 S9 fraction과 시판 cofactor(Wako Co., Japan)로 조제하였다. 이 희석배양액 0.6 mL에 각 농도의 감마선 조사 계란과 양성대조물질(변이원) 20 μL를 첨가한 다음 2시간 배양하여(37°C, 210rpm) SOS 반응을 유도하였다. 시료 색소로 인한 흡수 spectrum 영향을 차단하기 위하여 배양액을 3500 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 잔사에 0.6 mL의 L-medium을 현탁시켰다. 이 현탁액 0.2 mL을 취한 다음, β-galactosidase와 alkaline phosphatase assay을 실시하였다. β-galactosidase assay는 배양액 0.2 mL에 B buffer(Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ · H₂O, KCl, MgSO₄ · 7H₂O, sodium dodecyl sulfate, β-mercaptoethanol) 1.8 mL를 첨가하고 37°C에서 10분간 방치하여 온도를 균일화시킨 다음, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG) 0.4 mL를 첨가하여 정색반응을 15분간 진행시켰다. 1 M Na₂CO₃용액 1.4 mL을 첨가하여 반응을 정지시키고 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Alkaline phosphatase assay는 B buffer 대신에 P buffer(SDS, Tris)를, ONPG 대신에 P-nitrophenyl phosphate disodium(PNPP, 4 mg/mL)를, 1 M Na₂CO₃대신에 3.75 M HCl 0.7 mL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 10분 후 2 M tris 용액 0.7 mL를 첨가하여 발색시킨 다음 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성단위는

흡광도 \times 1000/반응시간(min)으로 나타내었다. Ratio(R) 값은 β -galactosidase unit/alkaline phosphatase unit로 계산하였고, SOS 반응의 유도 정도를 나타내는 유도지수(induction factor, IF) 값은 $R(C)/R(0)$ 로 계산하였다. R(C)는 변이원을 첨가한 시험구의 값이며, R(0)는 변이원을 첨가하지 않았을 때의 R 값이다.

염색체 이상 시험

염색체 이상 시험은 Chinese hamster 유래 폐섬유아세포(CHL)를 이용하여 Ishidate 등 및 Dean과 Danford의 방법에 준하여 실시하였다(18,19). 배지는 minimal essential medium에 fetal bovine serum을 5% 되도록 첨가하여 사용하였다. 배양면적 25 cm²인 플라스크당 2 x 10⁴ 세포를 5 mL의 배양액으로 분주하여 약 3 일간 배양하였다. 활성대사효소계 미적용 시험구의 경우 두 개의 그룹으로 나누어, 배양액을 모두 제거한 후 신선한 배양액 4.5 mL를 각 플라스크에 분주하여 1시간 이상 배양한 후 시험물질용액(0.5 mL)을 분주하여 합계 5 mL이 되도록 하여 각각 6시간 및 24시간 처리하였다. 활성대사효소계 적용 6 시간 처리군의 경우 기존 배양액을 제거하고 신선한 배양액 2.2 mL을 분주하여 1 시간 이상 경과한 후 시험물질 용액 및 S-9 mix를 분주하여 3 mL이 되도록 하였다. 활성대사효소계 적용/미적용 6 시간 처리군의 경우 처리종료 시각에 처리액을 제거하고 5 mL의 Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free Dulbecco's phosphate buffered saline로 세포층을 1 회 세척한 후 신선한 배양액 5 mL을 분주하여 다시 배양을 하였다. 모든 플라스크에 대해 시험물질 처리 개시로부터 약 22 시간 후에 콜히친(최종농도 1 μ M)을 각 플라스크에 처리하여 2 시간 경과 후 진탕법으로 중기세포를 수거, 공기건조법으로 염색체 표본을 제작하고 5% Giemsa액으로 염색하여 염색체의 구조적 및 숫적 이상을 계수하였다. 염색체 구조적 이상은 염색체형 절단(chromosome breake) 및 교환(chromosome exchange)과 염색분체형 절단(chromatid breake) 및 교환(chromatid exchange)을 계수하였으며, 숫적 이상의 계수는 염색체 이상의 유무에 관계 없이 염색체 수에 따라 diploid(DP, 23-36 동원체), polyploid(PP, 37 \leq 동원체) 및 핵내배화(endoreduplication, ER)로 분류, 100 중기상당 관찰되는 빈도를 기록하였다.

마우스를 이용한 소핵시험

ICR 마우스(수컷 5 주령)를 사용하여 약 1주일간의 순화 기간을 거친 후 감마선 조사 시료를 경구투여 한 후 약 24시간 후에 Schmid 방법에 준하여 골수검체를 제작하였다(20). 즉, 각 마우스로부터 적출한 우측 대퇴골로부터 우태아혈청(FBS, GibcoBRL)으로 골수를 씻어내려 현탁시킨 다음 1,000 rpm 으로 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 침전된 골수 세포를 슬라이드글라스에 도말, 실온에서 건조시켜 메틸알콜에 5분간 담궈 고정였다. 고정 및 건조가

끝난 검체는 may-grunwald 염색액에서 소핵의 빈도는 개체당 2000개의 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)에서 관찰되는 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 수를 평균 \pm 표준편차로 나타냈다. 계수시 세포 직경의 1/5~1/20의 크기로 주변 유헤세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형 내지 타원형 소체를 소핵으로 계수하였다. 소핵의 유무에 상관없이 합계 200개의 PCE 및 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)를 계수하여 PCE/(PCE+NCE) 비율, 즉 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율을 산출해 세포독성의 지표로 하였다. 생존한 동물의 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율이 모드 0.1 이상일때 시험은 유효한 것으로 하며 각 동물로부터 얻은 기초자료에 대해 통계처리를 실시하였으며, 투여군과 음성대조군과의 차이를 검사하였다. 동물의 체중은 시험물질 투여시 및 부검시에 실시하였다. 투여군에서의 MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며 용량의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성 반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다.

통계분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 SAS software(21)를 이용하여 general linear model procedure를 수행하고 유의적인 차이가 보일 때 평균값간 차이를 Duncan의 multiple range test법을 사용하여 평가하였다(P<0.05).

결과 및 고찰

SOS chromotest

SOS chromotest는 *E. coli* PQ37을 유전독성 물질에 노출시키면 DNA 복제가 저해되어 유도되는 SOS response 중 생성되는 효소의 기질분해반응을 이용한 방법으로 흡광도를 측정하여 판정한다. 따라서 Ames test의 단점인 콜로니 계수시의 주관적 편차나 아미노산 등의 외적 요인의 문제점을 보완할 수 있으며, 또한 시험결과에 있어 Ames test와 90% 이상의 높은 상관성을 나타낸다(17). SOS chromotest는 시험균주와 시험물질을 함께 일정 시간 배양후 β -galactosidase 함께 alkaline phosphatase를 측정하여 일반적인 단백질 합성을 평가하는 방법으로, 고농도의 시험물질 또는 변이원을 첨가시 치사에 의한 균수의 감소나 균의 성장억제 또는 효소저해 때문에 위양성(false positive) 결과를 나타낼 수 있다. 따라서 시험물질이나 양성대조물질의 사용량은 dose response test를 통하여 최적의 농도를 설정한 후 사용하였다. 또한 유도지수(induction factor; I.F)는 균의 활력과 농도, 완충액의 pH, S9의 농도에 따라 영향을 받므로 이들의 각각의 조건을 설정하여 사용하였다(22,23).

감마선 조사 난백의 *E. coli* PQ37에 대한 돌연변이 유발

능을 조사한 결과를 Table 1에 나타냈다. 대사활성효소계 미적용의 경우, 감마선 조사 난백의 시험적용 농도인 50,000 µg/assay까지의 농도에서 대조구와 유사한 범위의 IF값을 나타냈다. 또한, 대사활성계를 첨가한 조건에서도 각각의 시험적용 농도에서 대조구와 감마선 조사구 모두 1.5 이하의 유사한 IF값을 보였다. 전체적으로 IF값은 농도 의존적인 증가 혹은 감소를 보이지 않았으며 감마선 조사구의 경우 비조사 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면, 양성대조 물질인 4-nitroquinoline-N-oxide(4NQO) 및 benzo(a)pyrene[B(a)P]에 의해 IF 값이 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 수행되었음을 확인하였다. 감마선 조사 난황의 *E. coli* PQ37에 대한 SOS chromotest 시험결과도 난백의 결과와 유사한 경향을 보였다(Table 2). 대사활성계 적용 및 미적용의 각 시험농도에서 감마선 조사구와 비조사의 IF 값의 유의적인 차이는 없었으며, 농도 의존적인 증가 혹은 감소도 관찰되지 않았다.

이상의 결과, 고선량으로 감마선 조사된 난백 및 난황은 SOS chromotest의 본 시험조건에서 돌연변이를 유발하지 않아 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않는 것으로 사료된다.

Table 1. SOS chromotest (*E. coli* PQ37) of gamma-irradiated egg white

Sample	Dose (µg/assay)	S-9 mix	β-gal ²⁾ (unit)	ap ²⁾ (unit)	Ratio	IF ²⁾
D.W. ²⁾	-	-	2.00	10.70	0.19	1.00
Non-irradiated	5000	-	2.83	11.76	0.24	1.27
	1250	-	2.70	11.74	0.23	1.21
	625	-	2.45	12.00	0.20	1.07
	313	-	2.61	12.05	0.22	1.14
20 kGy-irradiated	5000	-	3.00	12.80	0.23	1.23
	1250	-	2.56	10.97	0.23	1.23
	625	-	2.66	12.83	0.21	1.09
	313	-	2.62	12.19	0.21	1.13
4-NQO ²⁾	0.03	-	17.47	16.5	1.06	5.04 ¹⁾
D.W. ²⁾	-	+	2.92	14.69	0.20	1.00
Non-irradiated	5000	+	3.34	14.49	0.23	1.15
	1250	+	3.71	16.27	0.23	1.14
	625	+	2.39	12.26	0.19	0.97
	313	+	2.60	13.83	0.19	0.94
20 kGy-irradiated	5000	+	3.40	14.85	0.23	1.14
	1250	+	2.94	12.48	0.24	1.18
	625	+	2.79	13.29	0.21	1.05
	313	+	2.54	12.82	0.20	0.99
B(a)P ²⁾	2.5	+	16.20	10.50	1.73	6.43 ¹⁾

¹⁾Significantly different from the control at P < 0.05.

²⁾abbreviations: DW, distilled water; β-gal, β-galactosidase; ap, alkaline phosphatase; IF, induction factor; 4-NQO, 4-nitroquinoline-N-oxide; B(a)P, benzo(a)pyrene.

Table 2. SOS chromotest (*E. coli* PQ37) of gamma-irradiated egg yolk

Sample	Dose (µg/assay)	S-9 mix	β-gal ²⁾ (unit)	ap ²⁾ (unit)	Ratio	IF ²⁾
DMSO ²⁾	-	-	3.10	15.00	0.21	1.00
Non-irradiated	5000	-	3.00	13.20	0.23	1.08
	1250	-	3.27	16.80	0.19	0.93
	625	-	3.30	14.30	0.23	1.10
	313	-	3.60	17.20	0.21	1.00
20 kGy-irradiated	5000	-	4.20	18.40	0.23	1.09
	1250	-	3.62	16.70	0.22	1.03
	625	-	3.90	17.00	0.23	1.09
	313	-	3.27	18.60	0.18	0.84
4-NQO ²⁾	0.03	-	17.47	16.5	1.06	5.04 ¹⁾
DMSO ²⁾	-	+	2.51	10.55	0.24	1.00
Non-irradiated	5000	+	3.05	13.10	0.23	0.97
	1250	+	3.64	12.57	0.29	1.21
	625	+	3.21	12.89	0.25	1.04
	313	+	2.60	10.79	0.24	1.00
20 kGy-irradiated	5000	+	3.59	12.84	0.28	1.16
	1250	+	3.60	11.60	0.31	1.29
	625	+	2.83	10.57	0.27	1.12
	313	+	2.69	10.64	0.25	1.05
B(a)P ²⁾	-	+	16.20	10.50	1.73	6.43 ¹⁾

¹⁾Significantly different from the control at P < 0.05.

²⁾abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; β-gal, β-galactosidase; ap, alkaline phosphatase; IF, induction factor; 4-NQO, 4-nitroquinoline-N-oxide; B(a)P, benzo(a)pyrene.

염색체 이상 시험

염색체 이상 시험은 포유동물 배양세포에서의 염색체 이상 검출을 목적으로 하는 시험으로서, 시험물질처리 후 최초의 유사분열시에 세포를 분석하여 독성의 유무를 평가한다. 염색체 이상의 출현은 화학물질과 세포와의 반응결과 생긴 유전물질의 상해가 클 경우 완전히 회복되지 않고 남아 세포분열에 영향을 주는 요인이 되는데, 이상이 유발된 세포는 대부분 증식되지 않고 사멸하는 것으로 알려졌지만 생존한 경우 정상과 다른 염색체 구성을 가진 세포집단으로 이행될 수 있다(18). 염색체의 이상은 염색체의 구조적 및 숫적 이상을 계수하여 평가하였으며, 이상중기상의 빈도에 대한 통계처리는 OECD guideline을 참조하여 실시하였다(16). 시험물질 처리군에서 염색체 이상을 가진 중기상의 수가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 용량의 의존적인 증가를 나타내거나, 한 농도 이상에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

Chinese hamster 유래 폐섬유아세포(CHL)를 이용하여 감마선 조사 난백의 염색체 이상 시험을 수행한 결과는

Table 3과 같다. 시험물질은 세포배양액에 대한 최고용해농도를 최고농도로 하여 공비 2로 배양액에 희석하여 사용하였다. 활성대사효소계를 적용하지 않은 경우, 6시간 처리군에 있어서 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대조군, 2500 µg/mL 처리군, 5000 µg/mL 처리군 및 10,000 µg/mL 처리군 모두 0~2 범위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 음성대조군의 polyploid의 빈도는 0.0 이었으며 핵내배화는 관찰되지 않았으며, 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 한편 양성대조군(EMS, 6 hrs)에서는 이상중기상의 빈도에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다(P<0.05). 24시간 처리군에 있어서도 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대

Table 3. Chromosome aberration test of gamma-irradiated egg white

Test material	Treatment		Abnormalities						Aberrant Meta-phases	Total Aberrations
	Dose (µg/mL)	Time (hr)	S-9 mix	CsB ²⁾	CsE ²⁾	CtB ²⁾	CtE ²⁾	PP ²⁾ +ER ²⁾		
Control	-	6	-	0	0	0	0	0+0	0	0
	-	24	-	0	0	0.5	0	0.5+0	0.5	0.5
	-	6	+	0	0	0	0	0+0	0	0
Non-irradiated	10000	6	-	0	0	1	0	1.5+0	1	1
	5000	6	-	0	0	1	0	2+0	1	1
	2500	6	-	0	0	0	0	0+0	0	0
	10000	24	-	1	0	1	0	0.5+0	2	2
	5000	24	-	1	0	0	0	1+0	1	1
	2500	24	-	0	0	1	0	0.5+0	1	1
	10000	6	+	1	0	0	0	1.5+0	1	1
	5000	6	+	0	0	1	0	1+0	1	1
	2500	6	+	0	0	1	0	0.5+0	1	1
20kGy-irradiated	10000	6	-	0	0	0	1	1+0	1	1
	5000	6	-	1	0	0	0	0.5+0	1	1
	2500	6	-	1	0	0.5	0	1+0	1.5	1.5
	10000	24	-	1	0	0	0	0.5+0	1	1
	5000	24	-	0	0	1	0	0.5+0	1	1
	2500	24	-	0	0	1	0	0+0	1	1
	10000	6	+	1	0	1	0	1.5+0	2	2
	5000	6	+	1	0	1	0	1+0	2	2
	2500	6	+	0	0	1	0	0.5+0	1	1
EMS	400	6	-	6	1	2	30	2+0	22 ¹⁾	39 ¹⁾
	300	24	-	5	1	6	24	1.5+0	20 ¹⁾	34 ¹⁾
CPA	50	6	+	25	1.5	16	45	1+0	53.5 ¹⁾	87.5 ¹⁾

¹⁾Significantly different from the control at P < 0.05.

²⁾Abbreviations: CsB, Chromosome break; CsE, Chromosome exchange; CtB, Chromatid break; CtE, Chromatid exchange; PP, Polyploid; ER, Endoreduplication.

조군 및 각 농도별 시험물질 처리군 모두 0~2 범위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 음성대조군의 polyploid의 빈도는 0~1 범위였으며 핵내배화는 관찰되지 않았다. 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 한편 양성대조군(EMS, 24 hrs)에서는 이상중기상의 빈도에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다(P<0.05). 활성대사효소계 도입시의 경우, 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대조군, 2500 µg/mL 처리군, 5000 µg/mL 처리군 및 10,000 µg/mL 처리군 모두 0~2 범위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 증가를 나타내지 않았다. 또, 음성대조군의 polyploid의 빈도는 0이었고, 시험물질 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 한편 양성대조군(CPA)에서는 이상중기상의 빈도에서 통계학적으로 유의하며 확실한 증가가 관찰되어 본 실험이 적합하게 수행되었음을 확인하였다(P<0.05).

CHL 세포를 이용하여 감마선 조사 난황의 염색체 이상 시험을 수행한 결과는 Table 4와 같다. 활성대사효소계 미적용시의 경우, 6시간 처리군에 있어서 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대조군, 2500 µg/mL 처리군, 5000 µg/mL 처리군 및 10000 µg/mL 처리군 모두 0~1 범위였으며, 감마선 조사 난황을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 24시간 처리군에 있어서도 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대조군 및 각 시험농도에서 모두 0~2 범위였으며, 감마선 조사 난황을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 없었다. 활성대사효소계 적용시의 경우도, 이상중기상 및 염색체 이상의 빈도는 음성대조군 및 각 시험물질 처리군 모두 0~2 범위였으며, 시험물질을 처리한 모든 군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 증가를 나타내지 않았다. 또한 모든 감마선 조사 난황 처리군의 polyploid 및 핵내배화 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다.

이상과 같이, 포유류 배양세포를 이용하여 감마선 조사 난백 및 난황의 염색체 이상 시험을 수행한 결과 대사활성계의 적용 및 미적용 모두 음성의 결과를 나타내어 감마선 조사 난백 및 난황이 포유동물 배양세포에 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않는 것으로 사료된다.

마우스를 이용한 소핵시험

소핵은 polychromatic erythrocytes에서 관찰되는 과립 즉 Howell-Jolly body로 염색체 상해와 관련되어 세포핵으로

Table 4. Chromosome aberration test of gamma-irradiated egg yolk

Test material	Treatment			Abnormalities					Aberrant Meta-phases	Total Aberrations
	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time (hr)	S-9 mix	CsB ²⁾	CsE ²⁾	CtB ²⁾	CtE ²⁾	PP ²⁾ +ER ²⁾		
Control	-	6	-	0	0	0	0	0+0	0	0
	-	24	-	0	0	1	0	0.5+0	1	1
	-	6	+	0	0	0	0	0+0	0	0
Non-irradiated	10000	6	-	0	0	0	0	1+0	1	0
	5000	6	-	0	0	1	0	2+0	1	1
	2500	6	-	0	0	0	0	0+0	0	0
	10000	24	-	1	0	0	0	0+0	2	1
	5000	24	-	1	0	0	0	1+0	1	1
	2500	24	-	0	0	1	0	0+0	1	1
	10000	6	+	1	0	1	0	1.5+0	1	2
	5000	6	+	0	0	1	0	1+0	1	1
	2500	6	+	0	0	1	0	0.5+0	1	1
	20kGy-irradiated	10000	6	-	0	0	0	1	1+0	1
5000	6	-	1	0	0	0	0.5+0	1	1	
2500	6	-	0	0	0.5	0	0+0	0.5	0.5	
10000	24	-	1	0	0	0	0+0	1	1	
5000	24	-	0	0	1	1	1.5+0	2	2	
2500	24	-	0	0	1	0	0+0	1	1	
10000	6	+	1	0	1	0	1+0	2	2	
5000	6	+	1	0	0	0	1+0	2	1	
2500	6	+	0	0	2	0	0+0	2	2	
EMS	400	6	-	6	1	2	30	2+0	22 ¹⁾	39 ¹⁾
	300	24	-	5	1	6	24	1.5+0	20 ¹⁾	34 ¹⁾
CPA	50	6	+	25	1.5	16	45	1+0	53.5 ¹⁾	87.5 ¹⁾

¹⁾Significantly different from the control at P < 0.05.

²⁾Abbreviations: CsB, Chromosome break; CsE, Chromosome exchange; CtB, Chromatid break; CtE, Chromatid exchange; PP, Polyploid; ER, Endoreduplication.

부터 나오는 것으로 보고되었으며, 돌연변이원성 물질을 검색하기 위해 설치류의 골수를 이용한 소핵형성 시험이 이용되어 왔다. 소핵시험은 clastogen 뿐만 아니라 spindle 형성에 영향을 주는 물질도 검색할 수 있어 유전독성의 좋은 지표이며, 유전독성 물질을 쉽고 빨리 검색할 수 있는 방법으로 보고되고 있다(20).

감마선 조사 난백 및 난황의 *in vivo* 유전독성학적 안전성을 평가하고자 약 5주령의 수컷 마우스를 이용하여 소핵시험을 실시하였다. 투여 용량 결정을 위한 예비시험에서 독성의 징후를 나타내지 않아 시험 최고 용량인 2000 mg/kg으로 감마선 조사 난백 및 난황을 단회 경구투여하고, 투여 후 약 24시간에 골수세포를 수거하여 소핵유발을 평가하였다. 모든 시험군에서 부검 당일까지 사망 동물은 없었으며, 부검시 체중은 감마선 비조사 또는 조사된 난백 및 난황

투여군 모두 평균 체중 약 33~34 g을 유지하였으며 약간의 증가 혹은 감소의 경향은 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다(P<0.05, Table 5). 본 시험에 적용한 용량범위 내에서 개체당 2000개의 PCE를 대상으로 소핵을 계수한 결과 감마선 조사 난백을 투여한 어느 투여군에서도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 소핵을 가진 PCE의 빈도는 음성대조군, 감마선 비조사 난백 투여군, 감마선 조사 난백 투여군 및 양성대조군의 순으로 평균 0.35, 0.67, 0.72 및 31.17으로, 시험물질 투여군의 소핵 빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가는 없었다(Table 6). 한편 양성대조군에서는 소핵 빈도에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다(P<0.05). 세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은 순서로 평균 0.57, 0.46, 0.45 및 0.42였으며, 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적인 차이는 없었다. 감마선 조사 난황의 투여군에서도 소핵을 가진 PCE는 음성대조군과 통계학적인 유의성을 보이지 않았으며, PCE/(PCE+NCE) 비율도 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 감소를 나타내지 않았다. 따라서 감마선 조사된 난백 및 난황은 본 시험조건하에서 마우스 골수 세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

Table 5. Body weights of male ICR mice tested

Test material	Irradiation (kGy)	Body weights (mean±S.D.) at the time of	
		Administration (No. of animal)	Sacrifice (No. of animal)
Water		33.92±2.04	34.03±1.99
	0	34.05±1.50	34.40±1.60
Egg white	20	33.80±2.03	33.05±2.50
	0	33.85±1.89	32.17±1.99
Egg yolk	20	34.87±1.51	33.15±1.99
	30	33.17±1.87 ¹⁾	3.26±1.20

¹⁾Significantly different from the control at P < 0.05.

Table 6. Micronucleus test of gamma-irradiated egg white and yolk in male ICR mice

Test material	Irradiation (kGy)	Dose (mg/kg)	No. of animal	MNPCE ²⁾ /2000PCE ²⁾ (mean±S.D.)	PCE/NCE ²⁾ +PCE (mean±S.D.)
Water	-	-	6	0.35±0.6	0.57±0.02
Egg white	0	2000	6	0.67±0.82	0.46±0.02
	20	2000	6	0.72±0.89	0.45±0.03
Egg yolk	0	2000	6	0.50±0.55	0.48±0.05
	20	2000	6	1.00±0.66	0.46±0.08
CPA ²⁾	-	70	6	31.17±1.87 ¹⁾	0.42±0.02

¹⁾Significantly different from the control at P < 0.05.

²⁾Abbreviations: MNPCE, micronucleated polychromatic erythrocyte; PCE, polychromatic erythrocyte; NCE, normochromatic erythrocyte; CPA, Cyclophosphamide.

요 약

감마선 조사 계란의 유전독성학적 안전성을 평가하기 위하여 *Escherichia coli* PQ37 균주를 이용한 SOS chromotest, Chinese hamster lung cell을 이용한 염색체 이상 시험의 *in vivo* 시험과 *in vivo* 시험으로 마우스를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 대사활성계 적용 및 미적용의 *in vitro*의 모든 시험에서 음성대조군과 통계학적으로 유의적인 차이는 없었다. 또한 *in vivo* 시험에서도 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 독성을 나타내지 않았다. 따라서 감마선 조사된 난백 및 난황은 본 시험조건하에서 직접변이원이나 간접변이원으로 작용하지 않는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Kim, J.W., Kim, H.C. and Hur, J.W. (1998) Quality changes of egg products during storage. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 1480-1483
- Surai, P.F. and Sparks, N.H.C. (2001) Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. Trends Food Sci. Technol., 12, 7-16
- Schoeni, J.L., Glass, K.A., McMernott, J.L. and Wong, A.C.L. (1995) Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in egg. Int. J. Food Microbiol., 24, 385-396
- Jones, F.T., Rives, D.V. and Carey, J.B. (1995) *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. Poultry Sci., 74, 753-757
- Lee, S.H., No, H.K. and Jeong, Y.H. (1996) Effect of chitosan coating on quality of egg during storage (in Korea). J. Korean Soc. Food Nutr., 25, 288-293.
- Jang, K.I., Park, J.H. and Kim, K.Y. (1999) Studies on *Salmonella enteritidis* contamination in chicken egg using confocal scanning laser microscopy. Korean J. Food Sci. Technol., 31, 771-777
- Farag, R.S., Daw, Z., Shallan, M.A. and Ebtesam, A.M. (1994) Biochemical and microbial studies on the efficiency of some coating materials for egg preservation. Int. J. Food Sci. Nutr., 45, 263-273
- FAO/IAEA/WHO (1999) High-dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. In: WHO technical report series 890. World Health Organization, Geneva. p.49-77
- Byun, M.W. (1997). Application and aspect of irradiation technology in food industry. Food Sci. Ind., 30, 89-100
- Byun, M.W. and Lee, J.W. (2003) Application of irradiation technology for food safety and security. Food Sci. Ind., 36, 25-41
- Kim, D.H., Yun, H.J., Song, H.P., Lim, B.L. and Jo, C. (2008) Isolation of egg-contaminating bacteria and evaluation of bacterial radiation sensitivity. Korean J. Food Preserv., 15, 774-781
- Song, H.P., Kim, B., Choe, J.H., Jung, S. Kim, K.S., Kim, D.H. and Jo, C. (2009) Improvement of foaming ability of egg white product by irradiation and its application. Radiat. Phys. Chem., 78, 217-221
- USFDA (2000) Irradiation in the production, processing and handling of food. In: FDA Federal Register, 65(141), p.45280-45282
- Bruhn, C. (1995) Consumer attitudes and market response to irradiated food. J. Food Protect., 58, 175-179
- Kraybill, H.F. and Whitehair, L.A. (1967) Toxicological safety of irradiated foods, Annu. Rev. Pharmacol., 7, 357-380
- OECD (1997) OECD guidelines for the testing of chemicals. Guideline 474
- Quillardet, P. and Hofnung, M. (1985) The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. Mutat. Res., 147, 65-78
- Ishidate, M. Jr., Sofuni, T. and Yoshikawa, K. (1981) Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens, GANN Monograph on Cancer Res., 27, 95-107
- Dean, B.J. and Danford, N. (1984) Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In: Mutagenicity testing - a practical approach, Venitt, S. and Parry, J.M.(Editors) IRL Press Limited, Eynsham, England, p.187-232
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, Mutat. Res. 31, 9-15
- SAS. (2000) SAS User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Mersch V., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S. and Mochayed, S. (1991) Sources of variability of the *Escherichia coli* PQ37 genotoxicity assay, Mutat. Res., 252, 51-60
- Marzin, D.R., Olivier, P. and Vophi, H. (1986) Kinetic determination of enzymatic activity and modification of the metabolic activation system in the SOS Chromotest, Mutat. Res., 164, 356-359