

## 이온화 에너지를 조사한 수입 오렌지의 유전독성학적 안전성 평가

황옥화 · 정다운 · 강일준<sup>†</sup>

한림대학교 식품영양학과·한국영양연구소

### Genotoxicological Safety Evaluation of Imported Oranges Irradiated with Ionizing Energy

Yu-Hua Huang, Da-Woon Jung, and Il-Jun Kang<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Nutrition & The Korean Institute for Nutrition,  
Hallym University, Gangwon 200-702, Korea

**ABSTRACT** This study was carried out to evaluate the genotoxicity of imported oranges irradiated with ionizing energy (0.5 and 1 kGy). In bacterial reversion assays with *Salmonella* Typhimurium TA98, TA100, TA1535, and TA1537, imported oranges irradiated with ionizing energy (0.5 and 1 kGy) showed no significant increase in the number of revertant colonies in both the absence and presence of the S9 metabolic activation system. In chromosomal aberration tests with Chinese hamster ovary (CHO) cells, imported oranges irradiated with ionizing energy (0.5 and 1 kGy) showed no increase in the frequency of chromosomal aberrations. In *in vivo* mouse micronucleus assay, imported oranges irradiated with ionizing energy (0.5 and 1 kGy) showed no increase in the frequency of polychromatic erythrocytes with micronucleus. These results indicate that imported oranges irradiated with ionizing energy (0.5 and 1 kGy) showed no genotoxic effects under these experimental conditions.

**Key words:** bacterial reversion assay, chromosomal aberration tests, micronucleus assay, orange, ionizing energy

## 서 론

식품의 방사선 조사 기술은 식품이나 농산물의 살균·살충, 저장기간 연장, 과채류의 숙성 지연 등으로 각국 정부와 식품산업계로부터 관심이 높아지고 있다(1,2). 식품 및 보건 관련 산물의 살균·살충에 사용되어온 화학혼중제(3), 열처리(4), 환경 기체 조절(5) 등은 효과가 불충분하거나 환경공해, 건강장해, 유해물질 생성 및 잔류 등 많은 문제점을 내포하고 있으며, 특히 화학혼중제인 EO, MeBr 등은 오존층 파괴 물질로 밝혀지면서(6) 그 사용이 세계적으로 일부는 사용이 금지되고 있는 실정이다. 방사선 조사는 혼중제, 살균제, 농약 등의 화학약제와 열처리 등의 대안으로 그 효과와 타당성이 인정되면서(7) FAO, WHO 등은 공중보건제품의 위생적 생산에 방사선 기술을 검역관리 프로그램으로 이용할 것을 권고하고 있다(8).

현재 방사선 기술은 우리나라를 포함한 50여 개국에서 이용을 허가하였고, 30여 개국에서 상업적으로 실용화되고 있다(7). 오렌지를 포함한 과일류는 살충·살균, 숙도 지연, 저장기간 연장 등을 목적으로 현재 11개국에서 1 kGy까지의 범위의 방사선 조사가 허가되어 있다(9). 미국은 농산물

수출입 검역 관리를 위한 방사선 조사를 하와이, 캘리포니아, 플로리다에서 주로 수행하였고, 신선 과일류의 방사선 조사는 150~400 Gy의 흡수선량으로 실시하고 있다. 2006년 2월 미국 농무성의 동식물보건검사국(Animal and Plant Health Inspection Service, APHIS)은 미국에 수입되는 과채류의 해충을 사멸시키기 위해 400 Gy 방사선 조사를 허용하는 협약을 태국과 체결하였다(10). 미국은 태국의 망고, 망고스틴, 과인애플, 람부탄, 리찌, 용안 6종의 방사선 조사 과일 수입을 허가하였고, 태국은 미국으로부터 감귤류 등의 방사선 조사 제품 수입을 허가할 예정이다. 인도는 400 Gy의 방사선을 조사하여 2007년부터 망고를 미국으로 수출하고 있으며, 중국의 경우 1990년대 초반부터 상하이와 일부 도시에서 방사선 조사 사과가 판매되고 있다(10).

식품공전에 따르면 우리나라는 4차례에 걸쳐서 여러 품목에 대하여 방사선 조사 확대를 허가하였다. 감자, 양파, 마늘, 밤, 버섯 등 신선식품류를 비롯하여 건조식육, 어패류 분말, 된장분말, 고추장분말, 간장분말, 효소식품, 효모식품, 인삼, 건조향신료, 복합조미식품 등으로 다양하며 선량은 최저 0.15 kGy에서 최고 10 kGy까지 방사선의 사용이 허용되어 있다(11). 그러나 과일류의 방사선 조사는 아직 허가되지 않은 상태이다(9). 방사선 조사 과일은 살충을 위해 기존에 쓰였던 화학살충제 처리 과일에 비해 인체에 유해하지 않다고 알려지고 있지만 방사선 자체에 대한 소비자들의 부정적

Received 6 February 2014; Accepted 27 February 2014

<sup>†</sup>Corresponding author.

E-mail: ijkang@hallym.ac.kr, Phone: +82-33-248-2135

인 선입견이 여전히 남아있는 실정이다(12). 농수산물무역 정보(13)에 의하면 오렌지의 수입량은 매년 증가 추세에 있으며, 소비자들이 방사선 조사된 수입 과일에 대한 자유로운 선택을 할 수 있도록 방사선 조사 수입 과일류의 안전성을 검토할 필요성이 대두되고 있다. 현재까지 오렌지를 포함하여 극히 저선량을 사용하고 있는 과일류에 대한 안전성 평가 연구는 매우 국한되어 있다. 일부 랫드를 사용한 번식시험 및 최기형성시험 등을 제외하고 유전독성학적 안전성 평가에 대한 연구는 미흡한 실정이므로 방사선 조사에 따른 수입 오렌지의 독성학적 안전성 시험법을 다각도로 수행하여 소비자 수용성을 증진시킬 수 있는 기반을 확립하는 것이 무엇보다도 필요하다.

따라서 본 연구에서는 방사선 조사 오렌지의 수입 가능성이 높아짐에 따라 이들의 안전성을 검토할 목적으로 오렌지의 상업적 사용선량(0.15~0.4 kGy)보다 조금 높은 0.5 kGy와 과일류의 최대허가 선량인 1 kGy로 조사한 수입 오렌지의 유전독성학적 안전성 평가를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 방사선 조사

본 연구에 사용한 오렌지는 미국 캘리포니아 산으로 시중에서 판매 중인 오렌지를 구입하여 사용하였다. 감마선 조사는 한국원자력연구원(Jeongeup, Korea) 내 선원 11.1 PBq,  $^{60}\text{Co}$  감마선 조사시설(Point Source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co., Ltd., Ottawa, ON, Canada)을 이용하였다. 수입 오렌지를 실온( $14\pm 1^\circ\text{C}$ )에서 시간당 10 kGy의 선량율로 0.5와 1 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter(5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다. 한편 조사된 수입 오렌지는 껍질을 제거한 다음 동결건조기(Vacuum Freeze Dryer, Model SFDSF12, Samwon Freezing Co., Seoul, Korea)에 동결건조 하여 독성시험 시료로 사용하였다.

### 복귀돌연변이시험

시험에 사용된 균주는 *Salmonella* Typhimurium LT2를 친주로 하는 *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537로 국립보건안전연구원으로부터 분양받아 계대 보존한 것을 사용하였다. 이들 균주는 사용에 앞서 histidine 요구성, crystal violet 감수성, ampicillin 내성, spontaneous 복귀변이 수 등을 확인하였다. 균주를 nutrient broth에 하룻밤 동안 배양하여 대수기( $2\times 10^9$  cells/mL) 상태에 이르도록 한 다음 배양액 0.1 mL에 시험물질인 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy) 및 비조사 수입 오렌지 0.1 mL(최대 10 mg/mL), S-9 mixture(또는 0.2 M Na-phosphate

buffer) 0.5 mL를 혼합하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 pre-incubation 하였다. Histidine/biotin을 함유한 top agar 2.5 mL를 가하여 minimal glucose agar 배지에 부어 굳힌 후에  $37^\circ\text{C}$ 에서 48시간 동안 배양한 후 복귀돌연변이 집락을 계수하였다. 양성대조물질로는 2-nitrofluorene(2-NF), N-methyl-N'-nitrosoguanidine(MNNG), 9-aminoacridine(9AA), 2-aminofluorene(2-AF) 등을 각 시험균주의 특성에 맞추어 사용하였다(14).

### 염색체이상시험

Chinese hamster ovary(CHO) fibroblast를 사용하여 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)의 염색체이상시험을 실시하였다(15). 배지는 minimal essential medium에 fetal bovine serum을 5% 되도록 첨가하여 사용하였고, 음성대조물질로는 시험물질의 용매인 phosphate buffered saline(pH 7.4)을, 양성대조물질로는 대사활성 조건 하에서 benzo(a)pyrene을 dimethylsulfoxide에 용해시켜 사용하였으며 대사활성 부재 하에서는 mitomycin C를 멸균증류수에 용해시켜 사용하였다. 먼저 본 시험에 적용하기 위한 50% 증식억제농도를 추정한 다음, 이 농도를 기준으로 공비 2로 4단계의 농도를 설정하여 본 실험을 하였다. 즉 S-9 mixture(20%, v/v), 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy) 및 양성대조물질이 포함된 배양액으로 6시간 배양한 후 보통의 배양액으로 교환하여 16시간 동안 더 배양한 후 colcemid를 처리한 다음 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 모아 염색체이상시험을 위한 표본을 제작하였다. 염색체이상시험 결과의 판정은 광학현미경 하에서 1,000배의 배율로 각 시험군당 100개의 잘 퍼진 분열 중기상을 관찰한 다음 처리군에 대한 구조이상의 총 출현빈도를 음성(-, 5% 미만), 의양성( $\pm$ , 5% 이상 10% 미만), 양성(+, 10% 이상)의 기준에 따라 판정하였다.

### 소핵시험

ICR 마우스(웅성; 5~6주령)를 사용하여 약 1주일간의 순화기간을 거친 후 시험물질인 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)를 투여하였다. 투여량은 예비시험으로부터 경구투여가 가능한 최고농도를 고용량으로 설정하였고, 이를 1/2로 희석하여 저용량으로 하였다. 시험 최고농도는 마우스 체중 kg당 2,000 mg이었으며, 검체 균질액을 24시간 간격으로 2회 경구투여 하였다. 마지막 투여 후 24시간이 경과한 후, Hayashi(16)의 방법에 준하여 acridine orange 용액(0.5 mg/mL)을 slide glass에 도포하여 공기 중에 건조시킨 다음, 마우스의 골수로부터 채취한 혈액 약 5  $\mu\text{L}$ 를 slide glass 위에 떨어뜨리고 cover glass로 덮었다. 세포를 고정시킨 후 형광현미경 하에서 마우스 1마리당 1,000개의 망상적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)를 관찰하여 그 중에서 초록색 형광을 띠는 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte: MNPCE)를 측

정하여 소핵생성 빈도를 계산하였다.

### 통계분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one way ANOVA 분석을 하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로  $P < 0.05$  수준에서 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 복귀돌연변이시험

돌연변이 유발성을 시험하기 위해 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)를 시험물질로 사용하여 *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537에 대한 복귀돌연변이 집락수를 조사하였다. 감마선 조사 수입 오렌지의 농도에 따라 탁도와 점도가 높아지기 때문에 용해 가능한 최고 적용 농도인 10 mg/plate를 공비 2로 희석하여 용량단계 6단계로 설정하였으며, S9 mixture를 가하지 않은 대사활성 부재 시스템 및 S9 mixture를 가한 대사활용 적용 시스템으로 나누어 본 시험을 수행하였다. 먼저 S9 mixture를 가하지 않은 대사활성 부재 시의 경우, 감마선 조사 수입

오렌지(0.5, 1 kGy)는 모든 시험균주에서 시험적용 농도인 0.625~10 mg/plate의 범위에서 복귀변이 집락수의 농도 의존적인 증가 혹은 감소를 보이지 않았으며 용매대조군 및 비조사(0 kGy) 수입 오렌지와 비교해서도 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 1). 대사활성계를 도입한 즉 S9 mixture를 가한 상태에서도 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)는 각각의 시험적용 농도에서 복귀변이 집락수의 증가를 보이지 않았다(Table 2).

일반적으로 돌연변이원성의 판정은 음성대조군 복귀변이 집락수의 2배 이상인 경우를 양성으로 한다(14). 본 실험에서 TA98과 TA100의 양성대조물질로 사용한 2-AF는 각각 약 59배 및 11배의 복귀변이 집락수의 증가를 보여 강한 돌연변이원성을 나타낸 반면 시험물질로 사용한 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy) 시료는 모든 시험적용 농도에서 용매대조군 및 비조사 대조군과 유사한 복귀변이 집락수를 나타내었다. 따라서 1 kGy까지 조사한 수입 오렌지는 유해할 만한 복귀돌연변이 증가를 나타내지 않는 것으로 보아 돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단된다.

### 염색체이상시험

염색체이상시험은 변이원 물질을 검색하기 위한 수단으로 가장 먼저 채택되는 시험법의 하나로 보편적으로 *in vitro*

**Table 1.** *S. Typhimurium* reversion assay with gamma irradiated imported orange (0.5 and 1 kGy) in the absence of S9 metabolic activation system

Test compound	Conc. (mg/plate)	No. of His <sup>+</sup> revertants per plate <sup>1)</sup>			
		TA98	TA100	TA1535	TA1537
0 kGy	10	37±7	128±14	22±6	8±8
	5	35±9	132±15	26±8	10±6
	2.5	36±8	132±18	26±9	8±6
	1.25	38±8	127±15	24±8	8±5
	0.625	36±10	128±18	23±7	10±7
	0	37±10	127±16	24±6	9±5
	0.5 kGy	10	39±9	126±14	20±9
5		40±8	134±12	24±8	8±8
2.5		41±9	130±16	22±6	9±7
1.25		37±11	128±18	24±8	10±8
0.625		40±9	132±14	22±9	10±6
0		37±10	127±16	24±6	9±5
1 kGy		10	39±12	132±16	22±7
	5	41±9	128±14	26±8	10±8
	2.5	38±10	134±18	24±6	9±7
	1.25	40±10	126±16	22±8	10±6
	0.625	36±8	129±15	20±8	10±8
	0	37±10	127±16	24±6	9±5
	2-AF <sup>2)</sup>	0.01	1,729±136*	ne <sup>3)</sup>	ne
MNNG	0.01	ne	1,785±164*	1,257±117*	ne
9-AA	0.08	ne	ne	ne	213±28*

<sup>1)</sup>Each value represents the mean±SD of three plates and expressed of revertant colonies per plate.

<sup>2)</sup>2-AF (2-aminofluorene), MNNG (N-methyl-N'-nitrosoguanidine), and 9-AA (9-aminoacridine) were used as positive controls for the corresponding strains.

<sup>3)</sup>Not examined.

\*Significantly different from negative control ( $P < 0.05$ ).

**Table 2.** *S. Typhimurium* reversion assay with gamma irradiated imported orange (0.5 and 1 kGy) in the presence of S9 metabolic activation system

Test compound	Conc. (mg/plate)	No. of His <sup>+</sup> revertants per plate <sup>1)</sup>			
		TA98	TA100	TA1535	TA1537
0 kGy	10	38±8	136±14	18±8	8±3
	5	40±12	138±16	16±6	9±4
	2.5	42±12	140±14	20±6	9±4
	1.25	39±14	138±16	16±8	10±4
	0.625	40±12	143±12	15±6	8±3
	0	38±14	146±18	20±8	9±3
	0.5 kGy	10	37±10	139±18	18±10
5		39±13	138±16	20±8	12±3
2.5		42±12	142±14	16±11	10±4
1.25		40±9	138±18	18±12	9±4
0.625		36±8	140±20	16±10	8±4
0		38±14	146±18	20±8	9±3
1 kGy		10	36±10	140±16	20±8
	5	42±10	142±18	16±8	9±4
	2.5	36±9	138±14	20±10	9±5
	1.25	39±11	140±16	18±8	8±6
	0.625	40±12	142±20	18±6	10±4
	0	38±14	146±18	20±8	9±3
	2-AF <sup>2)</sup>	0.01	2,246±184*	1,642±155*	ne <sup>3)</sup>
2-AA	0.002	ne	ne	184±27*	176±24*

<sup>1)</sup>Each value represents the mean±SD of three plates and expressed of revertant colonies per plate.

<sup>2)</sup>2-AF (2-aminofluorene) and 2-AA (2-aminoanthracene) were used as positive controls for the corresponding strains.

<sup>3)</sup>Not examined.

\*Significantly different from negative control ( $P<0.05$ ).

법이 많이 사용되고 있다. 이 시험법은 1970년대 초 Schmid에 의하여 제창되어(17) 그 동안 많은 발전을 거듭하였으며 기존의 많은 화학물질에 대하여 실시되어 기초 자료가 풍부하고 실험의 재현성도 인정받고 있는 시험법이다. 과거 염색체 이상을 관찰하기 위해서는 설치류의 골수세포를 이용한 *in vivo* 세포유전학적 시험이 널리 이용되어 왔다. 그러나 배양세포를 이용하는 시험법이 생체 내 시험법보다 훨씬 감수성이 높고 조작이 간편할 뿐만 아니라 정량적 검사가 용이하며, 대부분의 발암성 물질이 본 시험에서 양성을 나타낸다. 또한 에임즈 시험(복귀돌연변이시험)에서 검출되기 어려운 물질도 본 시험법에서는 양성으로 나타나므로 복귀돌연변이시험의 보충시험으로서 유용하게 사용되고 있다(18). 염색체구조이상(chromosome structural aberration)은 일반적으로 DNA 이중쇄 절단(double strand breaks)에 기인한다고 알려져 있다. 구조 이상이 유발된 세포가 사멸하지 않고 생존하는 경우에는 정상과 다른 염색체 구성(염색체 변이)을 가진 세포집단으로 이행될 가능성이 높다(19).

본 연구에서는 CHO fibroblast 세포를 대상으로 하여 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)의 염색체 이상 시험을 평가하였다. 감마선 조사 수입 오렌지에 대한 예비독성시험을 수행한 결과 독성을 나타내지 않아, 적용 가능한 최고 농도인 10 mg/mL를 시험적용 최고농도로 설정하여 4단계로 희석하면서 염색체 이상 시험을 실시하였다. 즉 CHO fibro-

blast 세포배양에서 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)의 시험적용 농도를 10, 5, 2.5, 1.25 mg/mL 4단계로 설정하여 염색분체 결손(chromatid gap; ctg), 염색분체 절단(chromatid breakage; ctb), 염색분체 교환(chromatid exchange; cte), 염색체 결손(chromosome gap; csg), 염색체 절단(chromosome breakage; csb) 및 염색체 교환(chromosome exchange; cse)의 염색체 이상 유무를 측정하였다. 우선 S9 mixture를 가하지 않은 대사활성 부재 시의 시험에서 용매대조군인 PBS는 100개의 분열 염색체에서 1개의 chromatid exchange, 1개의 chromosome gap 및 1개의 chromosome exchange를 제외하고 97개 모두 정상으로 관찰되어 염색체 이상 유발성이 없었으며, 기지의 염색체 이상 유발물질인 양성대조군 MMC(mitomycin C)는 61개만이 정상을 나타내어 양성의 염색체 이상 유발능을 나타내었다. 1 kGy 감마선 조사 수입 오렌지의 경우 1.25 mg/mL 농도 투여군은 97개, 최고 농도인 10 mg/mL의 투여군에 있어서도 1개의 chromatid breakage, 1개의 chromosome gap과 1개의 chromosome breakage를 제외하고는 97개 모두 정상을 나타내 염색체 이상 유발능을 보이지 않았다(Table 3). 대사활성계를 도입한 즉 S9 mixture를 가한 상태에서 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy) 시료는 모든 시험농도에서 5% 미만의 염색체 이상 유발능을 보였다(Table 4). 즉 양성대조군인 benzo(a)pyrene은 63개만이

**Table 3.** Chromosomal aberration on gamma irradiated imported orange (0.5 and 1 kGy) in the absence of S9 metabolic activation system using a Chinese hamster ovary cell line

Test compound	Conc. (mg/mL)	ctg <sup>3)</sup>	ctb	cte	csg	csb	cse	nor	Total
PBS <sup>1)</sup>	—	0	0	1	1	0	1	97	100
0 kGy	10	1	0	1	1	1	0	96	100
	5	1	1	1	0	0	0	97	100
	2.5	0	1	0	1	1	0	97	100
	1.25	0	1	1	0	1	1	96	100
	10	0	1	1	1	1	0	96	100
0.5 kGy	5	0	1	1	1	0	0	97	100
	2.5	1	0	1	0	1	0	97	100
	1.25	0	1	1	1	1	0	96	100
	10	0	1	0	1	1	0	97	100
	5	0	0	1	1	1	1	96	100
1 kGy	2.5	1	1	0	0	1	0	97	100
	1.25	0	1	1	1	0	0	97	100
	10	0	1	0	1	1	0	97	100
	5	0	0	1	1	1	1	96	100
MMC <sup>2)</sup>	0.002	8	9	6	7	4	5	61	100

<sup>1)</sup>Phosphate buffered saline (negative control).

<sup>2)</sup>Mitomycin C (positive control).

<sup>3)</sup>ctg, chromatid gap; ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csg, chromosome gap; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange; nor, normal.

**Table 4.** Chromosomal aberration on gamma irradiated imported orange (0.5 and 1 kGy) in the presence of S9 metabolic activation system using a Chinese hamster ovary cell line

Test compound	Conc. (mg/mL)	ctg <sup>3)</sup>	ctb	cte	csg	csb	cse	nor	Total
PBS <sup>1)</sup>	—	0	1	1	0	1	0	97	100
0 kGy	10	0	1	1	1	0	0	97	100
	5	1	1	0	1	0	0	97	100
	2.5	0	1	0	0	1	0	98	100
	1.25	1	0	0	1	0	0	98	100
	10	0	1	1	1	1	0	96	100
0.5 kGy	5	1	0	1	0	0	0	98	100
	2.5	0	1	1	0	0	1	97	100
	1.25	1	0	0	1	0	0	98	100
	10	1	0	1	0	1	0	97	100
1 kGy	5	0	1	1	1	1	0	96	100
	2.5	0	1	0	1	1	0	97	100
	1.25	1	0	0	1	0	1	97	100
	10	1	0	1	0	1	0	97	100
B(a)p <sup>2)</sup>	0.05	9	8	5	6	4	5	63	100

<sup>1)</sup>Phosphate buffered saline (negative control).

<sup>2)</sup>Benzo(a)pyrene (positive control).

<sup>3)</sup>ctg, chromatid gap; ctb, chromatid breakage; cte, chromatid exchange; csg, chromosome gap; csb, chromosome breakage; cse, chromosome exchange; nor, normal.

정상을 나타내어 양성의 염색체이상 유발능을 나타낸 반면, 감마선 조사 수입 오렌지(1 kGy)의 경우는 최고 농도인 10 mg/mL에서도 97개 모두 정상을 나타내 염색체이상 유발능을 보이지 않았다. CHO 세포의 경우 통상 자연발생의 염색체이상을 가진 세포 출현율은 3%를 초과하는 일이 거의 없으므로 5% 미만의 염색체이상 평균 출현율을 음성으로 판정한다(17). 따라서 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)는 대사활성 부재 및 대사활성 도입계 모두에서 유의할 만한 염색체이상을 나타내지 않는 것으로 보아 염색체이상 유발성이 없는 것으로 판단된다.

### 소핵시험

생체 내 유전독성시험으로 설치류, 특히 마우스를 이용하는 소핵시험(micronucleus test)이 제시되고 있다. 본 시험법은 골수세포의 염색체이상을 관찰하는 대신 골수에서 생산되는 적혈구 중에 출현되는 소핵을 관찰하는 방법으로 유전독성의 좋은 지표이며, 돌연변이성 물질을 쉽고 빨리 검색할 수 있는 방법으로 보고되고 있다. 소핵은 polychromatic erythrocytes에서 관찰되는 과립 즉 Howell-Jolly body로 혈액학자들에 의해 알려졌으며 염색체 상해와 관련되어 세포핵으로부터 나오는 것으로 생각되고 있다(20). 인위적인

**Table 5.** Frequency of micronuclei from marrow in mice treated with gamma irradiated imported orange (0.5 and 1 kGy)<sup>1)</sup>

Test compound	Dose (mg/kg)	No. of mice tested	MNPCE/1,000 PCE <sup>2)</sup>
Saline (0.9%)		10	3.6±1.4
0 kGy	2,000	10	3.6±1.0
	1,000	10	3.8±1.2
	500	10	4.0±1.6
	250	10	4.0±1.4
0.5 kGy	2,000	10	4.0±1.0
	1,000	10	4.0±1.4
	500	10	3.8±1.2
	250	10	3.4±1.2
1 kGy	2,000	10	3.7±1.4
	1,000	10	3.6±1.0
	500	10	4.0±1.2
	250	10	3.8±1.4
MMC <sup>3)</sup>	2	10	32.4±7.2*

<sup>1)</sup>Each value represents the mean±SD of three plates.

<sup>2)</sup>MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte, PCE: polychromatic erythrocyte.

<sup>3)</sup>Mitomycin C (positive control).

\*Significantly different from negative control ( $P<0.05$ ).

소핵유발은 감마선이나 fast neutron으로 조사된 콩의 뿌리에서 관찰되었으며 그 후 유전독성학적 안전성을 검색하기 위하여 설치류의 골수에서 소핵형성 시험이 이용되기 시작하였다. 염색체의 형태 변화(구조이상)에는 다양한 종류가 있으나 최초로 염색체 절단이 일어나고 이것이 수복되지 않으면 동원체를 갖지 않는 염색체 단편이 형성되며, 이 단편이 세포 분열 시에 잔존하여 소핵을 형성하므로 소핵은 염색체의 구조이상을 반영하고 있다. 또한 세포의 분열장치에 대한 장애가 원인이 되어 염색체 1개 내지 여러 개가 세포 분열 시에 잔존하게 되어도 소핵화 된다는 점에서 염색체의 수적 이상까지도 검출할 수 있다. 결론적으로 본 시험법은 골수중의 분열 중기상을 해석하는 염색체이상시험과 함께 생체 내에서 염색체이상 유발물질을 검출하는 시험계로서 받아들일 수 있다(21).

감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)의 소핵시험 결과, 모든 시험용량 단계를 걸쳐 소핵을 가진 망상적혈구의 출현율이 음성대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 5). 즉 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)를 시험동물 kg 당 250~2,000 mg의 범위로 경구투여 한 결과, 1,000개의 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵을 가진 다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)가 전 적용용량 범위에서 3.4~4.0의 수준을 나타내어 용매 대조군(0.9% saline) 3.6에 비해 소핵 발현 빈도가 유의성 있게 증가하지 않았다. 한편 양성대조물질로 사용한 mitomycin C는 소핵수가 현저히 증가한 32.4개의 소핵 빈도를 보임으로써 본 시험이 적합하게 행하여졌음을 알 수 있었다. 따라서 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)는 유의할 만한 소핵 발현을 유도하지 않는 것으로

보아 소핵 유발성이 없는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 보면 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)는 대표적인 *in vitro* 유전독성시험인 *S. Typhimurium* 복귀돌연변이 시험 및 염색체이상시험에서 음성을 나타내었고, *in vivo* 유전독성시험인 소핵시험에서도 음성을 나타내었다. 따라서 오렌지의 상업적 사용선량(0.15~0.4 kGy)보다 조금 높은 0.5 kGy와 과일류의 최대허가 선량인 1 kGy로 조사한 수입 오렌지는 본 시험조건에서 유전독성이 없는 것으로 보이며, 본 연구결과는 실험동물을 이용한 단·장기 독성 연구의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 방사선 조사 오렌지의 수입 가능성이 높아짐에 따라 이들의 안전성을 검토할 목적으로 0.5, 1 kGy 감마선 조사 수입 오렌지의 복귀돌연변이 시험, 소핵 및 염색체이상시험의 유전독성학적 안전성 평가를 수행하였다. *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537에 대한 감마선 조사 수입 오렌지(0.5, 1 kGy)의 복귀변이 집락수를 조사한 결과, 대사활성계 도입 및 부재 시 0.625~10 mg/plate의 범위에서 복귀변이 집락수의 농도 의존적인 증가 혹은 감소를 보이지 않았다. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서 0.5, 1 kGy 감마선 조사 수입 오렌지는 1.25~10 mg/mL의 시험적용 용량에서 염색체이상 유발능이 5% 미만이어서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 나타났다. 설치류 망상적혈구를 이용한 소핵형성 시험을 수행한 결과, 시험적용 용량인 250~2,000 mg/kg의 범위에서 0.5, 1 kGy 감마선 조사 수입 오렌지는 소핵을 가진 망상적혈구의 출현율이 음성대조군과 유의한 차이를 나타내지 않아 소핵을 유발하지 않음을 확인하였다. 이상의 결과, 0.5, 1 kGy 감마선 조사 수입 오렌지는 본 시험조건에서 유전독성이 없는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 수출전략기술개발사업의 위탁과제에 의하여 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Yang JS. 1997. General survey of detection methods for irradiated foods. *Food Sciences and Industry* 29: 500-507.
2. Farkas J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food. *Int J Food Microbiol* 44: 189-204.
3. Jessup AJ. 1998. Response of 'Lambert' and 'Ron's Seedling' sweet cherries to fumigation with methyl bromide plus cold storage. *Aust J Exp Agric* 28: 431-434.
4. Couey M. 1989. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. *Hortscience* 24: 198-202.

5. Delate KM, Brecht JK, Coffelt JA. 1990. Controlled atmosphere treatments for control of sweet potato weevil (Coleoptera: Curculionidae) in stored tropical sweet potatoes. *J Econ Entomol* 83: 461-465.
6. UNEP. 1995. Montreal protocol on substances that deplete the ozone layer. Report of the methyl bromide technical options committee. p 294.
7. Kume T, Furuta M, Todoriki S, Uenoyama N, Kobayashi Y. 2009. Status of food irradiation in the world. *Raidat Phys Chem* 78: 222-226.
8. WHO. 1981. Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO expert committee of the wholesomeness of irradiated food. Technical Report Series. p 659-682.
9. IAEA. 2011. International atomic energy agency. nucleus. [iaea.org/ifa/FoodAuthorisationDisplay.aspx?start=20&page=3&sort=0&search=FRUITS](http://iaea.org/ifa/FoodAuthorisationDisplay.aspx?start=20&page=3&sort=0&search=FRUITS).
10. FoodSafety. 2006. [www.foodsafety.go.kr/fsafe/safeGuideView.fs?idx=33225&cate\\_id=2012082800371&f\\_idx=275&imgno=7](http://www.foodsafety.go.kr/fsafe/safeGuideView.fs?idx=33225&cate_id=2012082800371&f_idx=275&imgno=7).
11. KFDA. 2009. Korea Food Code. 2-1-9-2-1-10
12. ICGFI. 1994. Summary report on eleventh meeting of the international consultative group on food irradiation. Denpasar, Bali, Indonesia, November.
13. KATI. 2001. [www.kati.net/sta/staRes1Event.do?menuCode=120&topMenuCode=120&expImpData=0&agCode=agName=&rdoExpImp=I&choiceOpt=1&expImpCd=00&fromYY=2001&fromMM=06&codeLevel=0&rdoType=01](http://www.kati.net/sta/staRes1Event.do?menuCode=120&topMenuCode=120&expImpData=0&agCode=agName=&rdoExpImp=I&choiceOpt=1&expImpCd=00&fromYY=2001&fromMM=06&codeLevel=0&rdoType=01).
14. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
15. Koyama H, Utakoji T, Ono T. 1970. A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann* 61: 161-167.
16. Hayashi M. 1991. *The micronucleus test*. Scientist Press Inc, Tokyo, Japan. p 65-69.
17. 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. *Mutat Res* 190: 51-57.
18. Dean BJ, Danford N. 1984. Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In *Mutagenicity Testing: a practical approach*. Venitt S, Parry JM, eds. IRL Press, Oxford, Arlington. p 187-232.
19. Ishidate M Jr, Sofuni T, Yoshikawa, K. 1981. Chromosomal aberration tests *in vitro* as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *Gann Monogr Cancer Res* 27: 95-107.
20. Hayashi M, Yoshimura I, Sofuni T, Ishidate M Jr. 1989. A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ Mol Mutagen* 13: 347-356.
21. Bothner H, Waaler T, Wik O. 1998. Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation. *Int J Biol Macromol* 10: 287-297.