

Neutron Dose Response of *Tradescantia* Stamen Hair Pink Mutations and RBE

Jin-Kyu Kim and Won-Rok Kim
Korea Atomic Energy Research Institute

자주달개비 수술털 분홍돌연변이의 중성자 선량반응과 RBE

김진규 · 김원록

한국원자력연구소

Abstract - Dose response relationships for one of biological end-points (gene mutation) in somatic cells of *Tradescantia* 4430 clones were studied using neutrons coming out of a californium-252 isotopic source. And the relative biological effectiveness (RBE) of neutrons in relation to X-rays in the induction of TSH pink mutations was assessed. Inflorescences were irradiated with X-ray from X-ray generator and neutrons from ²⁵²Cf source. Irradiated cuttings were incubated with aeration in nutrient solution under the controlled condition. For more than 4 weeks after irradiation cell mutations were scored. Pink mutation frequencies were calculated from the pooled data for the peak interval (days 6 to 13 post-irradiation). Somatic cell mutations in TSH showed linear dose response relationships in the range of neutron doses available for the experiment. The RBE values estimated for neutrons in relation to X-rays were in the range 3.1 to 6.8, which were much lower than normally recognized value.

Key words : neutrons, TSH pink mutation, dose response, RBE

요약 - 자주달개비 4430 클론에 있어서 ²⁵²Cf 중성자에 의해 유발되는 유전자 돌연변이의 선량반응 관계를 확립함과 동시에 TSH 분홍돌연변이를 유발함에 있어서 X-선에 대비한 중성자의 생물학적 효과비를 산출하였다. 돌연변이의 분석은 공시재료의 방사선조사후 4주 이상 이뤄졌으며 최대변이율을 보이는 조사후 6일부터 13일까지의 분석결과로부터 돌연변이빈도를 산출하였다. 가용한 실험범위내에서 중성자 선량의 증가에 따라 돌연변이빈도의 선형적 증가 양상을 나타내었다. X-선에 비교하여 산출한 중성자의 RBE값은 3.1에서 6.8의 범위를 보였으며 이러한 값은 일반적으로 인지되고 있는 중성자의 RBE값에 비해 상당히 낮은 값이다.

중심어 : 중성자, TSH분홍돌연변이, 선량반응, RBE

서 론

자주달개비(*Tradescantia*)는 실제로 인간집단이 접하게 되는 저선량 영역의 이온화 방사선에 의해서도 쉽게 유전적 변이를 일으키기 때문에 방사선에 대한 식물학적 감시기구로서의 중요한 과학적 수단이 되고 있으며 방사선생물학, 핵의학 분야는 물론 환경연구 등 다양한 분야에서 효용성 있는 연구수단의 역할을 담당하고 있다[1]. 우주비행에 따른 방사선의 생체영향 연구[2], 비키니 섬의 방사능 오염토양의 생물학적 영향 및 토양 건전성 평가를 위한 자주달개비 응용[3], 중성자를 이용한 암치료시설 외부의 방사선 감시 수단으로서의 자주달개비 응용사례[4], 자주달개비를 이용한 보론-중성자 포획치료(BNCT)의 전임상 연구[5,6] 등은 자주달개비가 다양한 응용성을 갖고 있음을 보여주는 사례들이다.

화색이 다른 두가지 종을 인위적으로 교잡시켜 만든 종간 잡종(interspecific hybrid)클론인 *Tradescantia* 4430(T-4430)은 꽃색에 있어서 유전적 이형성을 가지며 정상적으로 우성인 남색꽃을 피운다. 하나의 화서(花序)는 각기 다른 성숙도를 가진 10여개의 화아(花芽)로 이뤄져 있다. 각각의 화아 속에 있는 분열중인 수술털(TSH; *Tradescantia* Stamen Hair)의 선단세포(先端細胞)는 분열 능력이 있어 발생 또는 분열과정중 이온화방사선에 의해 유전적 손상을 받으면 자주색에서 분홍색 또는 무색 세포로 유전자 돌연변이를 일으키거나 거대세포출현, 분열능력상실(치사돌연변이) 등의 여러 가지 체세포돌연변이를 일으키는 데[7], 특히 수술털 세포의 분홍돌연변이는 방사선량의 증가에 따라 돌연변이율도 증가하는 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타낸다[8,9].

본 연구는 TSH assay를 응용한 방사선생물학적 연구의 일환으로 수행되었다. T-4430 식물체에 있어서 저 LET 방사선인 감마선 조사에 의한 TSH 체세포 돌연변이 반응은 이미 보고된 바[10, 11]와 같이 선량증가에 따른 돌연변이율 증가가 거의 선형적 양상으로 나타나다가 포화선량인 약 2Gy를 기점으로 TSH 돌연변이율이 다시 감소하는 이른바 선형적 - 이차함수적 선량 반응(linear-quadratic dose-response)을 나타낸다. 본 연구는 고 LET 방사선인 중성자가 0.2Gy 이하의 저선량 영역에서 자주달개비의 체세포 분홍돌연변이를 유

발함에 있어서 나타내는 선량반응 관계를 확립하고 이때 중성자가 나타내는 상대적 생물학적 효과비(RBE; relative biological effective-ness)를 규명함으로써 방사선생물학 및 핵의학 분야에 적용 가능한 실험결과를 획득하고자 하였다

재료 및 방법

공시재료(供試材料) : 실험용 식물체는 방사선에 민감하게 반응하면서도 자발돌연변이율(intrinsic mutation rate)이 비교적 낮은 *Tradescantia* 4430(T-4430) 클론을 사용하였다. 건전하게 생육된 T-4430 식물체로부터 10개 정도의 화아를 가지고 있는 화서를 절취하여 24시간 동안 실험실 조건에 순치시킨 다음 10~12개의 화서를 하나의 실험군으로 사용하였다.

방사선 조사 : 중성자 조사를 위해서 한국원자력연구소 검교정용 표준선장 ^{252}Cf 중성자 선원을 사용하였으며 X-선 조사는 한국원자력연구소 표준선장의 X-선 발생장치(150kvp, 10mA)를 사용하였다. 중성자의 선량률은 선원으로부터 2미터의 거리에서 0.483mGy/h였으며, X-선의 공기흡수선량률은 2미터 거리에서 12.69mGy/h였다. 중성자 조사는 선원으로부터 일정한 거리를 두고 시료를 공기중에서 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1 및 0.2Gy의 선량으로 동시 조사하였으며, X-선의 경우는 0.1, 0.3 및 0.5Gy를 실험군별로 각각 조사하였다.

화서배양 : 방사선을 조사한 화서군은 Hougland No. 2 solution 6배 희석액[12]에 담구어 생장상(生長床) 내에서 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교체하였으며 전 배양기간 동안 기포발생기를 이용하여 폭기를 실시하였다. 배양조건은 명기(明期) 14시간 동안은 20℃, 습도 80%, 광도 6,000 lux, 암기(暗期)는 10시간, 18℃, 상대습도 85%를 유지하였다.

검경분석 : 실체현미경을 이용하여 배울 25배하에서 돌연변이를 계수하였다. 만개상태의 화기(花器)를 실험군별로 채취한 다음 6개의 수술을 모두 떼어내 파라핀유가 도말된 슬라이드상에 퍼서 검경(檢鏡)용 프레파라트를 제작하였다. 돌연변이 세포의 계수는 방사선 조사후 4주 이상 지속적으로 실

시되었으며 특히 방사선 조사후 돌연변이율 증가가 두드러진 일정기간(peak interval ; 조사후 6-13일)의 검경결과를 통합한 자료(pooled data)로부터 돌연변이빈도(pink mutation events/flower)를 산정하였다.

결과 및 고찰

중간선량인 0.05Gy 조사군을 기준으로 했을 때 방사선에 의한 분홍돌연변이율의 증가는 조사후 3일 경부터 나타나기 시작하여 조사 10일후 최대값을 보였다. 따라서 돌연변이율이 확연하게 증가한 고조기간(peak interval)은 조사후 6일째부터 13일까지로 설정하였다. 이같은 고조기간은 통상 방사선 조사후 6일에서 20일 사이에 나타나지만 공시 식물체의 생육상태 및 실험처리시의 손상정도 등에 따라 약간 다르게 나타날 수 있다. 연구자에 따라서는 돌연변이가 최대값을 보이는 3일간의 결과(three day-maximum value) 만을 기준으로 삼기도 한다. 설정된 고조기간중의 검경결과를 통합하여 선량별로 화기당 평균 돌연변이율을 산정하였으며 방사선을 조사하지 않은 대조시료의 분홍돌연변이율을 보정자료로 사용하였다. 표 1에서 보는 바와 같이 선량별 분홍돌연변이율은 0.005Gy~0.2Gy 범위에서 선량의 증가에 따라 일차함수적으로 증가하는 양상을 나타내었다 (Fig. 1). 자주달개비 수술털 시스템(TSH)을 이용하여 방사선을 감시하는 경우 일반적 방사능 계측이론이 그

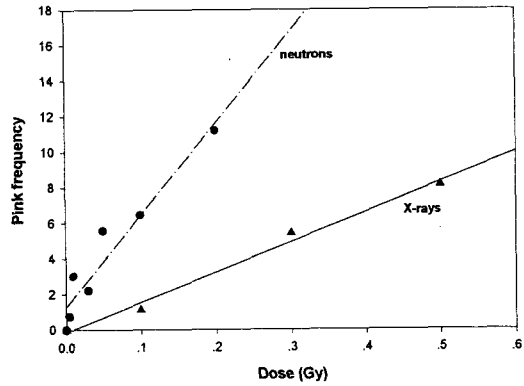


Fig. 1. Dose-response of TSH pink mutation Frequency

대로 적용된다고 볼 수 있다. 즉, 방사선을 조사하는 공시재료의 양을 무한하게 증가시킨다면 통계적 유의성 또한 증가하게 되므로 아주 작은 선량까지도 감지가 가능하다. 그러나 여러 가지 현실적인 문제점 및 제약으로 인하여 통상적 분석이 가능한 규모로 실험을 수행하게 되며 이같은 통상 규모하에서의 감지가 가능한 최저선량은 얼마인지가 관심의 초점이 되기에 충분하다. 본 연구에서 한 실험군은 10~12 화서로 구성되므로 실험기간중 실험군당 약 100개 이상의 화기가 분석가능하며 따라서 충분한 통계적 유의성을 가질 수 있다. 실험최저선량인 0.005Gy 실험군의 분홍돌연변이율은 2.19 ± 0.48 로서 대조군의 분홍돌연변이율 1.43 ± 0.27 에 비해 현저히 높았다. 0.005Gy 조사실험군과 대조군의 분홍돌연변이율을 t-test를 통해 검정한 결과, 평균차(平均差)=0.762, $t=1.85$, 자유도=47로서 두 실험군의 분홍돌연변이율은 매우 유의한 차이($p=0.035$)를 가지는 것으로 평가되어 TSH를 이용한 저선량 중성자 감시가 가능하다는 것을 보여주었다.

방사선에 의한 생물학적 효과중 특히 유전자에 유발되는 돌연변이에 관해서 획득된 데이터의 양이 풍부할 경우 다음과 같이 정교한 선량반응식을 사용하여 돌연변이가 유발되는 데 있어서의 각종 변수들이 갖는 의미를 설명할 수 있다. Chadwick과 Leenhouts[13]의 방사선 작용에 관한 분자이론에 따르면 자주달개비의 체세포 돌연변이 유발에 대한 선량반응 관계는 다음과 같은 수식으로 표현될 수 있다.

Table 1. Pink frequencies measured in T-4430 on days 6-13 after irradiation

Dose (Gy)	number of hairs in a stamen	pink frequency	corrected mean pink frequency	remarks
0.00	11,379	1.43 ± 0.27	0.00	
0.005	8,534	2.19 ± 0.48	0.76	
0.01	14,630	4.44 ± 0.74	3.01	
0.03	8,941	3.64 ± 0.78	2.20	
0.05	7,722	7.00 ± 1.61	5.57	
0.10	6,909	7.88 ± 1.91	6.45	
0.20	3,251	12.63 ± 4.46	11.20	

$$M = \frac{[1 - \exp\{-q(\alpha D + \beta D^2)\}]\exp\{-(s+p)(\alpha D + \beta D^2)\}}{\alpha D + \beta D^2} \quad (1)$$

여기서,

M = 돌연변이 빈도

D = 방사선량 (Gy)

α = 단위선량당 에너지 축적에 의해 DNA 두 가닥절단(dsb)이 일어날 확률

β = 단위선량 자승당 에너지 축적에 의해 DNA dsb가 일어날 확률

q = 유발된 DNA dsb에 의해 특정한 돌연변이가 나타날 확률

s = 유발된 DNA dsb에 의해 특정한 돌연변이 출현이 억제될 확률

p = 유발된 DNA dsb에 의해 세포분열능력 상실이 나타날 확률

(1)식에 따르면 특정한 돌연변이 유발의 억제나 세포분열능력 상실에 의해 돌연변이가 억제되는 확률을 나타내는 상수항 $[s+p]$ 값이 일정할 경우 선량반응을 나타내는 곡선의 높이 (돌연변이율 최대값)는 $[q]$ 값에 의해서 결정된다. 이때 나타나는 선량반응을 보면 일정한 선량까지는 돌연변이율이 상승하다가 선량이 더욱 증가되면 오히려 돌연변이율이 감소하기 시작하여 어느선량에 이르러서는 사망에 의해서 돌연변이가 더 이상 나타나지 않는 점에 이른다. $[q]$ 값에 의해 peak의 높이가 다르게 나타날 뿐 세포사멸에 의해 돌연변이율이 더 이상 나타나지 않는 사멸선량의 값이 거의 같은 특징을 갖는다. 반면에 $[q]$ 값이 일정할 경우는 $[s+p]$ 값이 적어짐에 따라 반응곡선상의 최대값이 상승하고 동시에 전체 곡선의 편향성(skewness)이 증가하기 때문에 세포사멸에 이르는 선량값은 증가한다. 저선량 영역에서는 s, p, β 값이 영(zero)에 가깝고 상대적 생물학적 효과비(RBE)가 최대값에 이르는 구간이므로 $RBE = \alpha_n / \alpha_x$ 이 된다. 특히 고 LET 방사선인 중성자의 경우 저선량 영역에서는 방사선량의 증가에 따른 생물학적 반응이 거의 선형적으로 증가할 뿐 아니라 (1)식으로 표현되는 증가양상 또한 일반적 일차함수와 거의 같은 양상으로 나타난다.

일반적으로 방사선에 의한 돌연변이, 염색체 이상 또는 중앙유발 등의 생물학적 효과는 다음식과 같이 간단한 선형적-이차함수적 선량반응 관계로

표현할 수 있다[14].

$$M = \alpha D + \beta D^2 \quad (2)$$

여기서,

M = 돌연변이빈도

D = 방사선량 (Gy)

α = 단위선량당 나타나는 돌연변이 빈도

β = 단위선량 자승당 나타나는 돌연변이 빈도

(2)식에 제시된 linear-quadratic dose-response의 경우도 선량포화가 나타나지 않는 저선량 영역에서는 βD^2 로 표현되는 이차함수항의 기여분이 무시할 수 있는 수준이므로 다음과 같이 단순한 일차함수를 이용하여 저선량 영역에 있어서의 반응 관계를 표현할 수 있다.

$$M = \alpha D + b_0 \quad (3)$$

여기서,

M = 돌연변이빈도

α = 단위선량당 나타나는 돌연변이 빈도

D = 방사선량 (Gy)

b_0 = 기저돌연변이 빈도

위 (3)식은 단순화된 선량반응관계식에 실험결과를 적용하는 경우 데이터의 양이 풍부하지 않을 경우 자료의 자유도(degree of freedom) 감소 등 통계처리에 따른 문제점을 배제시킬 수 있다. 또한 본 연구가 저선량 영역의 방사선에 국한되었다는 점을 감안할 때 일차함수를 이용한 선량반응 관계식의 정립이 정당화될 수 있을 것이다. 실험의 결과를 (3)식에 맞춰 회귀분석을 실시한 결과 선량증가에 따른 TSH 돌연변이 발생 빈도의 일차함수적 증가가 통계적으로도 타당함이 확인되었다 (표 2, Fig. 1).

Table 2. Least square regression of linear dose-response relationships

Radiation	α coefficient (slope)	b_0 intercept (background mutations)	r^2 (regression coefficient)	remarks
Neutrons from ^{252}Cf	51.74	1.25	0.92	
X-rays (150kVp)	16.68	0.50	0.94	

기준 공시재료를 이용한 X-선 조사실험 결과와 중성자 조사실험 결과로부터 α_n/α_x 값을 구하였다. 동일한 방식으로 수행된 3회의 실험결과를 통합적으로 분석하여 자주달개비 수술털 세포의 분홍돌연변이를 유발함에 있어서의 α_n/α_x 값으로 중성자 RBE를 산출하여 표 3에 제시하였다.

Table 3. RBE's of ^{252}Cf estimated for pink mutations in *Tradescantia* 4430

Exp. no	radiation	α_{PF} coefficient (slope of line)	estimated RBE	remarks (peak interval)
1	neutrons	51.74	3.1	6~13th day after irradiation
	X-rays	16.68		
2	neutrons	76.7	4.6	10~20th day after irradiation
	X-rays	16.6		
3	neutrons	33.4	6.8	7~20th day after irradiation
	X-rays	4.9		

본 연구에서 TSH를 이용하여 구한 중성자의 RBE는 3.1~6.8로 평가되었다. 동일한 공시재료인 T-4430을 이용하여 동일한 선원으로 방사선 조사를 실시하고 같은 방식으로 수행된 실험이었으나 실험실시 시기에 따라서 RBE 값에 차이를 나타내었다. 각각의 실험에서 돌연변이의 고조기간이 약 간씩 차이를 보이고 있는 것은 공시식물체의 생리적 상태가 실험별로 차이가 있음을 의미하며 이러한 점이 RBE 값에 차이를 나타내는 하나의 원인이 될 수 있을 것이라는 판단을 가능케 한다. Cebulska-Wasilewska 등[15]에 따르면 방사선의 RBE는 생물학적 말단점(biological end-point)에 따라서 각기 다르게 나타나며, 특히 자주달개비의 경우 클론의 종류는 물론 동일 클론을 이용한 경우라도 유발된 돌연변이 종류에 따라서 중성자의 RBE가 다르게 평가되어 3~20의 넓은 범위에 걸친 값을 나타내었다고 보고하였다. 식물체를 이용한 중성자 조사연구에서는 대부분 높은 RBE 값이 보고되었다. Underbrink 등[16]은 fission neutron에 의한 자주달개비 분홍돌연변이의 경우 ^{60}Co 감마선과 비교했을 때 RBE가 100이고 200keV X-선과 비교했을 때 50인 것을 보고하였다. 동물을 이용한 실험에서도 중성자의 RBE 값은 매우 넓은

범위를 나타내고 있다. Grahn 등[17]은 생쥐 정원세포에서의 우성 치사돌연변이, 염색체의 전좌 및 기타 비정상성 등 여러 가지 효과들을 연구하였다. 그들은 생물학적 기준에 입각하여 fission neutrons과 X-선을 비교했을 때 RBE 값은 10~45로 밝혀졌다. 높은 RBE 값은 정원세포에 있어서의 염색체 전좌에서 나타나고 또 중성자 조사시는 낮은 조사선량에서 감마선과 비교하여 1주일에 한번 중성자선을 조사할 때 나타났다. Sinclair[18]에 따르면 중성자의 RBE는 주어진 기준 또는 각각의 연구에 따라서 3부터 200에 이르는 넓은 차이를 보이고 있다. 예를 들면 중앙유발의 경우 3~200, 포유동물의 유전적 효과 10~45, 백내장 25~200, 미세핵 생성 6~60 등으로 RBE 값의 범위가 다양하게 나타나고 있다.

결론

^{252}Cf 중성자를 조사하였을 때의 TSH 분홍돌연변이율의 증가는 0.005Gy~0.2Gy의 조사선량 범위에서 선형적 양상을 보였다. TSH 분홍돌연변이 유발에 있어서 RBE 값이 3.1~6.8의 범위로서 지금까지 보고된 중성자의 RBE 값들의 범위에 속하고 있었다. 이같은 결과를 통해 생물학적 말단점과 실험조건에 따라서 RBE가 다르다는 점이 분명히 밝혀졌다. 특히 중성자의 선질계수(quality factor)를 그대로 RBE로 사용하는 일반적 관례에 대한 재고의 필요성과 함께 RBE 값을 제시할 때에 있어서의 명확한 서술기준이 필요함을 시사하였다.

따라서 RBE와 관련된 내용을 기술함에 있어 방사선의 특성은 물론 생물학적 효과를 평가하기 위해서 사용된 생물학적 말단점이 무엇이었던지도 명시되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구의 중성자 및 X-선 조사를 위하여 많은 도움을 주시고 연구내용에 관한 기술적 조언과 격려를 해주신 한국원자력연구소 방사선관리실 장시영 실장님, 김장렬씨, 김봉환씨께 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. A. H. Sparrow, A. G. Underbrink and H. H. Rossi, "Chromosome and cellular radiosensitivity, I : The relationship of Do to chromosome volume and complexity in seventy-nine different organisms." *Radiat. Res.* **32**, 915-945 (1967).
2. N. L. Delone, V. V. Antipov and G. P. Parfenov, "New type of chromosomal aberrations in microspores of *Tradescantia paludosa* in flight experiments on board of space satellites." *Doklady Akademi Nauk SSSR*, **290**, 979-981 (1986).
3. S. Ichikawa and C. Ishii, "Somatic mutation frequencies in the stamen hairs of grown in soli samples from the Bikini Island Marshall Island north pacific ocean." *Jpn J. Genet.* **66**, 27-40(1991).
4. J. Huczkowski, A. Cebulska-Wasilewska and B. Lazarska, "*Tradescantia* stamen hairs : a biological monitor of dose outside the neutron beam used cancer therapy." *Radiobiologia Radiotherapia*, **26**, 65-69(1985).
5. J. K. Kim, K. Rekas and A. Cebulska-Wasilewska, "Application of TSH bioindicator for studying the biological efficiency of neutrons from californium-252 source." in *Radioactivity : Risk and Hope*, Book of Abstract, Workshop in memory of Maria Sklodowska-Curie, Krakow Poland, Oct 6-7, (1997).
6. K. Rekas, A. Cebulska-Wasilewska and J. Capala, "Biological efficiency of epidermal neutrons estimated from gene mutations in TSH assay." *ibid.*(1997).
7. A. G. Underbrink, L. A. Schairer and A. H. Sparrow, *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, Ed. A. Hollaender, Plenum Press, New York, **3**, 171-207(1973).
8. A. H. Sparrow, A. G. Underbrink and H. H. Rossi, "Mutations induced in *Tradescantia* by small dose of X-rays and neutrons: analysis of dose-response curves." *Science*, **176**, 916 (1972).
9. C. H. Nauman, A. H. Sparrow and L. A. Schairer, "Comparative effects of ionizing-radiation and two gaseous chemical mutagens on somatic mutation induction in one mutable and two non-mutable clones of *Tradescantia*." *Mut. Res.* **38**, 53-70(1976).
10. S. Ichikawa, S. C. H. Nauman, A. H. Sparrow and C. S. Takahashi, "Influence of radiation exposure rate on somatic mutation frequency and loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs." *Mut. Res.* **52**, 171-180(1978).
11. J. K. Kim, Y. K. Lee, H. S. Song, K. J. Chun and K. C. Kim, "*Tradescantia* as biological indicators of radiation.", *Proc. KARP Autumn Mtg., Cheju, Korea, Nov. 8, 1996*, pp.24-28(1996). (in Korean)
12. A. Conger, "A simple liquid-culture method of growing plants." *Proc. Florida State Horticultural Society*, **77**, 3-6(1964).
13. K. H. Chadwick, and H. P. Leenhouts, *The Molecular Theory of Radiation Action*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 92-117 (1980).
14. M. Tubiana, J. Dutreix and A. Wambersie, *Introduction to Radiobiology*, Taylor & Francis, London, pp. 301-303(1990).
15. A. Cebulska-Wasilewska, M. Litwiniszyn and B. Palka, "RBE of 5.6 MeV neutrons assessed for the various biological endpoints in two clones of *Tradescantia*." *Nukleonika* **40** : 21-32(1995).
16. A. G. Underbrink, A., M. Kellerer, R. E. Mills and A. H. Sparrow, "Comparison of X-ray and gamma-ray-dose response curves for pink somatic mutations in *Tradescantia* clones 02." *Radiat. Environ. Biophys.* **13**, 295-303(1976).
17. D. Grahn, B. A. Carnes, B. H. Farrington and C. H. Lee, "Genetic injury in hybrid

- male mice exposed to low doses of ^{60}Co γ rays or fission neutrons. I. Response to single doses." *Mut. Res.* **129**, 215-229(1984).
18. W. K. Sinclair, "Experimental RBE values of high-LET radiations at low doses and the implications for quality factor assignment." *Radiation Protection Dosimetry*, **13**, 319-326 (1985).