

생체 내 Pig-a 유전자 돌연변이시험에 대한 세 시험실의 전수가능성 평가

정영신^{1,2*}, 박범수¹, 한세희¹, 이지연¹, 김지영³, 백승민³, 박초롱⁴, 김수환⁴, 이종권⁵

¹호서대학교 생명공학과, ²호서대학교 기초과학연구소, ³안전성평가연구소,
⁴(주)바이오톡스텍, ⁵식품의약품안전평가원 독성평가연구부 특수독성과

Evaluation of the transferability of *in vivo* Pig-a gene mutation assay across three laboratories

Young-Shin Chung^{1,2*}, Bumsso Pak¹, Sehee Han¹, Jiyeon Lee¹, Jiyoung Kim³, Seng-Min Back³, Cho-Rong Park⁴,
Su-Hwan Kim⁴, Jong-Kwon Lee⁵

¹Department of Biotechnology, Hoseo University, ²The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University,

³Korea Institute of Toxicology (KIT), ⁴Biototech Co., Ltd.,

⁵Toxicological Screening and Testing Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

ABSTRACT. In order to establish a pig-a gene mutation assay as a regulatory test for evaluating *in vivo* genotoxicity in Korea, the transferability study as a stage II validation was performed using the test substance, N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) across three laboratories. The lead laboratory (KIT) standardized the protocol using Rat MutaFlow® Kit and transferred the methodology to two participating laboratories (Hoseo University and Biototech Co. Ltd.). Sprague Dawley rats were treated with vehicle or three dose levels of ENU (10, 20, 40mg/kg) by oral gavages on the 3 consecutive days. On the day 15 after the first treatment, bloods were collected and analyzed to estimate the percentage of reticulocytes (%RETs), mutant type of RETs and erythrocytes (RBC) using flowcytometer. In results, the exposure of ENU induced the dose-dependent increases in the mutant frequencies of RBC^{CD59-} and RET^{CD59-}, while %RETs were not affected. Data comparisons among three participating laboratories indicated the good transferability with the high correlation coefficients (0.97-0.99) between the lead and participating laboratories. In conclusion, the *pig-a* gene mutation assay may be the effective test for the estimation of *in vivo* gene mutation and the validation studies may be needed using more test substances in Korea.

KEY WORDS: *Pig-a* gene, CD59, *in vivo* mutagenicity, N-ethyl-N-nitrosourea, transferability

Introduction

Pig-a 유전자는 당인지질 중 하나인 glycosylphosphatidylinositol (GPI)를 합성하는 데 관여하는 N-acetylglucosamine transferase의 subunit A를 발현하는 유전

자이며, GPI의 인지질은세포막 속에 끼어있고 당 부위가 세포막 밖으로 돌출되어 surface marker들이 결합할 수 있는 anchor를 제공한다(Kinoshita *et al.*, 2008). *Pig-a* 유전자에돌연변이가 유발되면 anchor가 부족하여 surface marker들(CD24, CD55, CD59 등)이 결합하지 못함으로 인해RBC가 기능을 잃게 된다(Hu *et al.*, 2009). 항체를 사용하여 RBC 또는 RET의 surface marker를 평가함으로써 *pig-a* gene 돌연변이 유발 여부를 예측하는 생체 내 유전자돌연변이 시험법을 설치류에서 개발하여 보고하였다(Bryce *et al.*, 2008; Miura *et al.*, 2008; Dertinger *et al.*, 2010).

In vitro 유전독성시험의 시험결과를 *in vivo* 시험에서 다시 확인하고자 할 때, 일차적으로 마우스 골수

Received: 28 November 2017

Revised: 19 December 2017

Accepted: 21 December 2017

* Corresponding author: Young-Shin Chung, Ph.D.
Associate Professor
Department of Biotechnology, Hoseo University 20,
Hoseo-ro 79beon-gil, Baebang-eup, Asan, Chungcheongnam-do, 336-795, Republic of Korea
Tel: 82-41-540-9671 Fax: 82-41-540-9538
E-mail: yschung@hoseo.edu

를 이용한 소핵시험(Mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD TG484)을 수행하는데, 소핵시험은 유전자돌연변이 보다는 염색체이상 유발물질(clastogen)을 평가할 수 있는 시험 방법이며, OECD에 등재된 형질전환 설치류(“Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays”, OECD TG488)를 사용하여 유전자돌연변이를 측정할 수 있으나 비용 및 시간적인 측면에서 선호되는 시험이 아니다. “Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) lymphocyte assay”(Aidoo *et al.*, 1997)를 사용하여 *in vivo* 유전자돌연변이를 측정할 수 있으나 지속적인 사용을 위해 시험법의 최적화가 필요한 실정이다(ICH, 1995, 1996). 따라서, *in vivo* 유전자 돌연변이를 평가할 수 있는 *pig-a* gene mutation assay에 세계적인 관심이 집중되고 있다(Miura, 2014; Gollapudi *et al.*, 2015).

Pig-a gene mutation assay는 분석을 위한 생체 시료로 말초 혈액을 소량(μ l 용량) 사용하므로 동물을 희생시키지 않는 장점이 있고, 반복독성시험 또는 다른 유전독성시험(*in vivo* 소핵시험 또는 comet assay) 등과 통합하여 동일한 동물에서 평가함으로써 실험동물 수를 줄일 수 있으므로 동물 윤리에 적합한 것으로 평가되고 있다(Dobrovolsky *et al.*, 2010). *Pig-a* 유전자는 염기서열에 있어서 종간에 매우 보존적이므로 실험동물 결과의 인체 예측력이 높고, 설치류 뿐 아니라 대동물 및 인체에서도 말초 혈액 시료에서 *Pig-a* gene mutation assay가 가능한 것으로 평가되고 있다(Horibata *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2016). *Pig-a* 유전자가 성염색체인 X-염색체에 위치하고 있어 유전자 돌연변이로 인한 RBC/RET mutant 출현 민감도가 크며(Dobrovolsky *et al.*, 2010), 반복투여에 대하여 반응이 증가하므로 누적 영향을 평가할 수 있다(Shi *et al.*, 2011; Stankowski *et al.*, 2011). Flowcytometer를 사용하여 wild & mutant type의 분리가 빠르고 정확하며 분석에 걸리는 시간이 길지 않고 background 결과가 매우 낮고($< 5 \times 10^{-6}$ 세포), 돌연변이원성 물질에 대한 반응이 커서 결과평가에 용이하다(Gollapudi *et al.*, 2015).

이러한 장점들로 인하여, *pig-a* gene mutation assay 시험법이 2008년 처음 보고된(Bryce *et al.*, 2008) 이래 빠르게 Stage II & III 시험법의 밸리데이션이 진행되었고(Dertinger *et al.*, 2011a,c; Cammerer *et al.*, 2011; Lynch *et al.*, 2011; Bhalli *et al.*, 2011), immunomagnetic separation을 사용하여 시험법을 개선함으로써 신뢰성, 정확성, 재현성 등을 높였

다(Dertinger *et al.*, 2011b). 미국 및 유럽을 중심으로 *pig-a* assay의 개발과 일본을 중심으로 PIGRET 시험법(Kimoto *et al.*, 20012, 2013) 개발이 진행 중이다.

Pig-a gene mutation assay는 Lymphocyte[®]-Mammal을 사용하여 혈액에서 적혈구를 수집하고 PE-표지된 CD59 항체를 사용하여 CD59 항체와 결합력이 있는 wild type RBC/RET (RBC^{CD59}/RET^{CD59})와 항체 결합력이 없는 CD59 결핍 mutant type (RBC^{CD59-}/RET^{CD59-})을 flowcytometer를 사용하여 평가한다(Bryce *et al.*, 2008). 또한, SYTO[®]13로 핵산을 염색함으로써 RBC와 RET를 분석한다(Dertinger *et al.*, 2010). PIGRET 시험법은 CD71 항체를 사용하여 RBC와 RET를 분리하고 각각 HIS49와 CD59 항체를 사용하여 wild type과 mutant type의 erythrocytes를 분석하여 평가한다(Kimoto *et al.*, 2012, 2013). 정상 생체는 RBC/RET의 돌연변이 세포수가 1×10^6 세포 중 5개 이하로 존재하므로 1×10^6 이상의 RBC/RET 세포를 분석하기 위해 immunomagnetic separation을 활용하여 RBC/RET 돌연변이 세포를 농축하는 과정을 도입하여 정확성 및 재현성을 확보하고 있다(Dertinger *et al.*, 2011b).

Pig-a gene mutation assay 개발을 위한 국제적 노력은 신규화학물질 또는 의약품 인증을 위한 독성규격시험으로 사용하기 위한 것이며(Gollapudi *et al.*, 2015), OECD 시험법으로 등재하기 위한 계획을 세우고 *pig-a* assay를 다양한 물질 또는 다수의 물질에 적용하여 시험법의 특성을 파악하고자 하는 노력으로 이어지고 있다(Dertinger *et al.*, 2012; Bhalli *et al.*, 2013; Labash *et al.*, 2016; Muto *et al.*, 2016). 따라서, 국내에서도 본 시험법의 검증연구가 필요한 것으로 사료되어 본 연구를 수행하게 되었다.

본 연구는 국제적으로 개발중인 *pig-a* gene mutation assay를 국내에서도 확립하고 검증하기 위해 세 기관, 안전성평가연구소(KIT), 호서대학교 생명공학과 독성학연구실(HOBT), 바이오톡스텍(BTT)이 참여하여 시험법 밸리데이션 2단계인(Stage II) 전수가능성 평가 시험을 수행하고 결과 일치도를 확인하는 것을 목표로 하였다. 본 연구를 통하여 국내에서 최적화된 시험법 및 표준작업지침서(SOP)를 제정하였으며 다양한 물질을 사용한 시험법 밸리데이션 stage III 단계 실험을 진행할 수 있을 것으로 판단된다.

Materials and Methods

1. 시험물질 및 재료

본시험에 사용된 시험물질과 시약은 대부분 한 기관에서 구입하여 다른 두 기관에 보내어 동일한 것을 사용하였다. N-ethyl-N-nitrosourea (Cas no. 759-73-9, 59%)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Ca & Mg free PBS (pH 7.2)는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Pig-a assay 시약 중 Anti-CD59-PE solution, Anti-CD61-PE solution, Nucleic Acid Dye solution (contains SYTO[®] 13)은 Rat MutaFlow[®] Kit (Litron laboratories, Rochester, NY, USA)으로 사용하였고, Lympholyte[®]-Mammal은 CedarLane (Burlington, NC, USA)에서, Anti-PE MicroBeads, LS columns and Quadro- MACS[™] separato는 Mitenyi Biotec (Bergisch, Gladbach, Germany)에서, CountBright[™] Absolute count bead는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. FBS는 각 기관에서 구입하여 사용하였다.

2. 전수 가능성 평가시험

전수도 시험에 참여한 세 기관의 명칭은 Table 1에 기재하였다. 리드랩(KIT)에서 N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)를 시험물질로 사용하여 채혈, 시험법 및 보관 등의 조건을 통해 pig-a assay 시험법을 최적화하였고 워크샵을 통해 두 참여기관(HOBT & BTT)에 시험법을 전수하였으며, 시험법을 전수받은 참여기관은 ENU를 사용하여 각각의 기관에서 pig-a assay 시험을 수행하였고 세 기관의 결과를 비교하였다.

3. 동물 사육조건

동물실험을 수행하기 위하여 각 기관의 동물실험윤리위원회에서 IACUC 기준에 따른 시험계획서 사전승인절차를 따라 시험계획서 승인(KIT, 1603-0095; HOBT, HTRC-16-21; BTT, 160539)을 받은 후 실험동물을 구입하였다. Sprague-Dawley rats (7~8주령, male, SPF)을 사용하였고 구입처와 origin은 Table 1에 제시하였다. 사육 조건은 명암주기 08:00~20:00 조명(12시간 점등/ 12시간 소등), 온도 22±3 °C, 습도 55±20 %, 환기회수 10~20 회/시간, 조도 150~300 Lux를 유지하였다. 실험동물 케이지는 폴리프로필렌 재질을 사용하였고 사료와 물은 자유 급이 시켰다. 5~7일간 순화시킨 후 군당 6마리씩 4군(부형제 1군, 시험물질 ENU 투여 3군)으로 분리하였다.

4. 시험물질 투여 및 채혈

시험물질 ENU는 PBS (pH 6.0)를 사용하여 투여 당일 사용시 조제하였고, 참고문헌에 따라 3개 농도, 10, 20, 40 mg/kg을 사용하였으며 (Dertinger *et al.*, 2011c) 음성대조군(부형제군)은 PBS (pH 6.0)를 사용하였고 경구로 강제 투여하였다. 첫 투여 일을 day1으로 하고 24시간 간격으로 3회 투여하였다. 첫 투여 후 15일에 채혈을 위하여 rats를 warminig cabinet 또는 적외선을 조사기를 사용하여 혈관을 확장시킨 후 보정기에 고정하였고, 항응고제로 코팅한 25G needle을 꼬리 정맥에 삽입하고 흐르는 전혈 300ul (7~9방울)를 K₂EDTA tube에 수집하였다.

5. Pig-a assay

Pig-a assay는 Dertinger에 의해 개발된 시험방법을 사용하였으며(Dertinger *et al.*, 2010, 2011b) 상세 방법은 다음과 같다. 혈액 샘플(80ul)을 항응고용액과 혼합하여 Lympholyte[®]-Mammal 용액 상층에

Table 1. Animals and flowcytometers in participating laboratories

Laboratory (abbreviation)	Role for study	Rat Origin Distributor	Flowcytometer model; software
Korea Institute of Toxicology (KIT)	Lead laboratory	CrI:SD OrientBio	BD FACS Calibur; Cell Quest Pro
Hoseo University Department of Biotechnology (HOBT)	Participant	Hsd:SD [™] KOATECH	BD AccuriC6; AccuriC6 pro
Biotoxtech Co., Ltd. (BTT)	Participant	CrI:SD OrientBio	Beckman Coulter, Cytomics FC50; AK39260 ver. CXP

Table 2. The effects of ENU exposure on body weights during experimental period in each participating laboratories

Laboratories	Dose levels (mg/kg/day)	Body weight (g)		Body weight change (g) (percentage of control)
		day 1	day 15	
KIT	0	223±6.4	322±15.0	100±10.8 (100)
	10	226±6.1	316±18.8	91±15.8 (91)
	20	224±9.1	315±19.8	90±13.2 (91)
	40	222±6.1	304±21.1	81±16.3 (81)
HOBt	0	201±4.1	294±16.5	93±12.7 (100)
	10	201±7.4	282±11.8	81± 5.7 (87)
	20	201±7.5	284± 6.5	83± 1.5 (89)
	40	201±4.5	277±13.5	76±10.2 (82) *
BTT	0	264±8.2	377± 7.7	113± 9.8 (100)
	10	264±7.4	362±12.4	98±12.2 (87)
	20	263±7.2	373±18.2	110±12.9 (97)
	40	264±6.9	353±12.5*	88.9± 8.6 (78) **

* Significant difference from the vehicle control group ($p<0.05$)

** Significant difference from the vehicle control group ($p<0.01$)

올려놓고 원심분리(2000rpm)하여 상층액의 lymphocytes를 제거하였다. 침전물을 buffer에 용해하여 일부는 flowcytometer를 calibration 하기 위한 ICS (instrument calibration standard) 제조에 mimic mutant 시료로 사용하였고 일부는 working antibody 용액(PE-conjugated anti-CD59와 PE-conjugated anti-CD61)과 반응시켜 anti-CD59로 wild type erythrocytes를 표지하고 anti-CD61로 잔여 platelets를 표지 하였다. Anti-CD59와 anti-CD61로 표지 된 시료를 anti-PE conjugated beads (100 ul)와 반응시켜 일부 시료는 pre-column 시료로 wild type RBC와 RET 분석에 사용하였고, 일부는 magnetic field에서 LS column을 통과시켜 post-column 시료로 mutant type RBC와 RET 분석에 사용하였다. Pre-와 post-column 시료 각각은 flowcytometer 분석을 수행하기 전 SYTO[®] 13와 반응시켜 RET를 표지하고 Countbright beads를 첨가하여 magnetic separation에 의한 농축 비율 산출에 활용하였다.

Mimic mutant와 wild type erythrocytes를 혼합하여 ICS를 제조하였고 flowcytometer의 calibration에 사용하였다. PMT voltage와 compensation을 조절하여 4분면을 구획하였고, y-축은 FITC 형광파장(SYTO[®] 13)으로 RET와 RBC를 분리하고 x-축은 PE 형광파장(anti-CD59-PE)으로 mutant RET와 RBC를 분리하였다. 따라서, 4분면의 좌측상단으로부터 시계 방향으로 mutant RET, wild type RET, wild type RBC, mutant RBC로 계수하였다. Flowcytometer 분석을 통하여 4가지 종류 세포 수 및 Countbright beads의 수를 계수하였고, 계산식을 사용하여 %RET 및 1×10^6 세포 중 mutant RET와 mutant RBC의 수를 산출하여 유전자 돌연변이 유발 여부를 평가하였다.

6. 통계 처리

체중, %RET, RBC & RET의 mutant frequency data의 통계처리를 위하여 Levene's test를 사용하여 등분산성을 분석하였고 등분산성인 경우, one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하였다. 유의차가 확인 되면 Dunnett's t-test의 다중검정을 수행하여 음성대조군 대비 시험물질 투여군의 통계 유의적 차이(at $p<0.05$ or at $p<0.01$)를 분석하였다. 등분산성이 기각되는 경우, Steel's test를 사용하였다(at $p<0.05$ or at $p<0.01$).

통계처리는 SPSS ver. 17.0을 사용하여 분석하였다.

전수도 평가를 위하여 리드랩과 두 참여기관의 결과 상관성과 일치성을 확인하였다. 상관성은 concordance correlation coefficient (CC) 및 Pearson correlation coefficient를 사용하여 평가하였고, Wilcoxon rank sum test를 사용하여 농도별, 리드랩과 각 기관 간 평균값의 일치도를 분석하였다.

Results

1. 일반증상 관찰 및 체중 변화

ENU 투여 1일과 채혈 시(day 15), rats의 체중과 체중 변화를 Table 2에 제시하였다. 채혈 시 체중은 세 기관 모두 음성대조군과 비교하여 고용량군에서 낮은 경향이 관찰되었고 BTT의 경우 통계적인 유의성이 관찰되었다($p<0.05$). 시험기간 동안 체중 증가도 고용량군에서 통계 유의적으로 작은 것으로 평가되었다(HOBT at $p<0.05$; BTT at $p<0.01$).

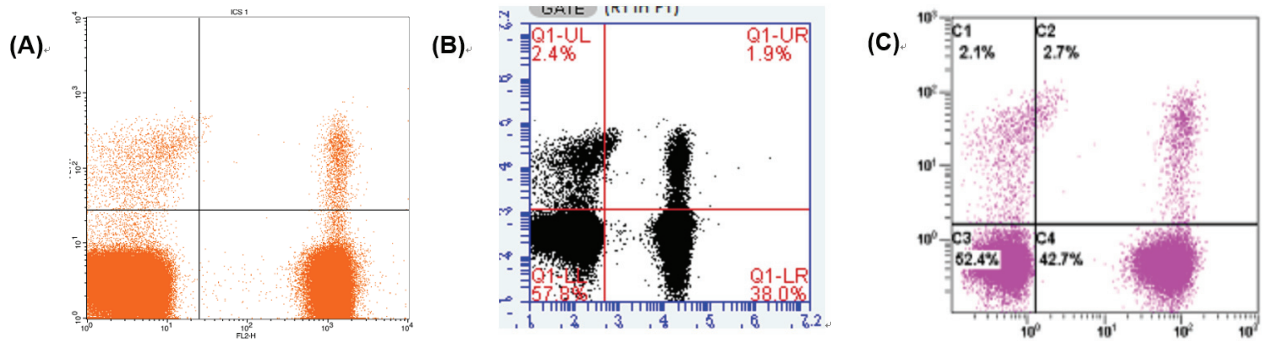


Figure 1. Flowcytometric calibration using ICS including mutant-mimic and wild type erythrocytes in three participating laboratories; (A) KIT, (B) HOBT, and (C) BTT. X-axis and Y-axis are FITC-H and PE-H, respectively. Upper-left quadrant is for mutant RET, upper-right for wild type RET, lower-left for mutant RBC, and lower-right wild type RBC.

2. ENU 노출에 의한 유전자 돌연변이

Pig-a assay 결과 측정을 위하여 각 기관의 flowcytometer 표준화(calibration)를 위하여 ICS를 사용하여 calibration 수행하였고, 결과를 Figure 1에 제시하였다. 세 기관의 실험 조건을 동일하게 하기 위하여 24마리의 혈액 시료를 1일 냉장 보관하였고 그 후 24시간 내에 세 사이클의 pig-a mutant 표현형 분석을 실시하였으며, 각 사이클마다 ICS를 준비하여 calibration을 수행하였다.

세 기관의 ENU에 대한 Pig-a assay 결과를 %RET 및 1×10^6 세포 중 mutant RET와 mutant RBC의 세포 수로 나타내었고 Figure 2에 제시하였다. 세 기관에서 %RET 결과 값은 ENU 투여군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 리드랩(KIT)과 두 참여기관 HOBT, BTT에서 4개 실험군의 평균값은 각각 3.7~4.1%, 4.7~5.3%, 4.7~5.4% 범위로 참여기관과 비교하여 리드랩에서 유의적으로($p < 0.01$) 낮았고 참여기관 간에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 세 기관에서 모두 mutant RET와 mutant RBC의 발생빈도는 ENU 투여에 의하여 유사한 정도의 농도 의존적 증가를 보였고, 20, 40 mg/kg 투여 군에서 통계적 유의성이 관찰되었다($p < 0.01$). 또한 ENU 모든 농도군에서 mutant RBC의 발생빈도보다 mutant RET의 발생빈도가 3~4 배 정도 더 높았다. 음성대조군에서의 mutant RET는 세 기관, KIT, HOBT, BTT에서 각각 0.4 ± 0.3 , 3.4 ± 1.5 , 1.3 ± 1.1 로 평가되었고 mutant RBC는 각각 0.3 ± 0.1 , 1.4 ± 0.4 , 1.2 ± 0.5 로 산출되어 모두 5×10^{-6} 보다 적기 때문에 각 기관에서 수행한 본 시험의 타당성이 입증되었다.

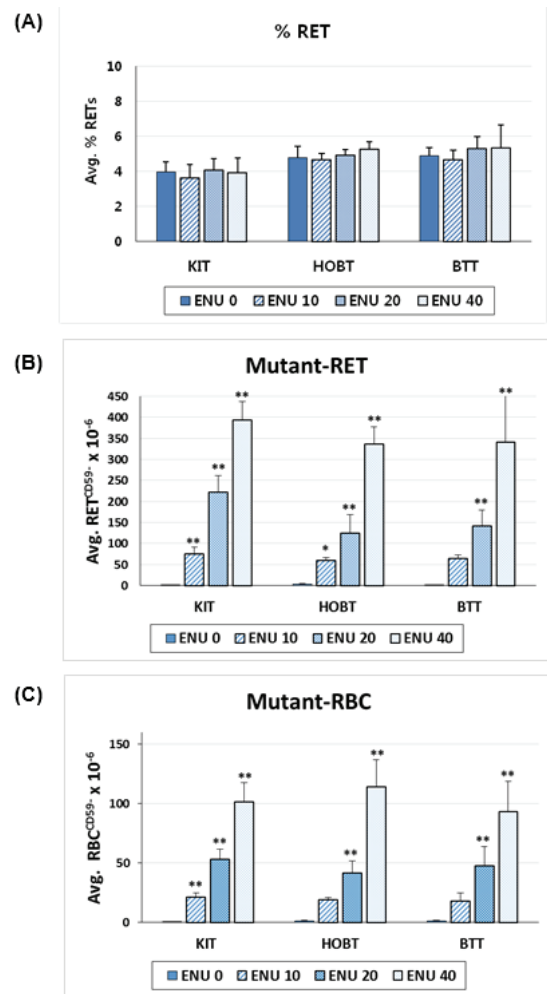


Figure 2. End points profiles of the pig-a assay in comparison among participating laboratories; (A) the percentage of reticulocytes (%RET), (B) mutant phenotype of reticulocytes (RET^{CD59^+}) and (C) mutant phenotype of erythrocytes (RBC^{CD59^+}). *, ** Significant difference from the vehicle control group ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively).

3. Pig-a assay의 전수 가능성 평가 시험

리드랩과 참여기관의 전수가능성을 평가하기 위하여 리드랩과 각 참여기관 간의 mutant RET와 mutant RBC 값의 상관성을 Figure 3에 나타내었다. Pearson correlation coefficients는 0.97이상으로($p < 0.05$) 그리고 concordance correlation coefficients는 0.99로 ($p < 0.05$) 리드랩과 각 참여기관의 간의 상관성이 높게 나타났다. ENU 농도별 리드랩과 각 기관의 평균값의 일치도를 Wilcoxon rank sum test로 검정한 결과 mutant RBC는 모든 농도에서 $p > 0.05$ 였으며 mutant RETs는 20mg/kg에서만 $p < 0.05$ 로 평가되어 mutant RET & RBC 결과 값의 일치도가 높은 것으로 판정되었다.

Discussion

본 연구는 최근 국제적으로 개발되고 있는 *pig-a* 유전자 돌연변이시험법을 국내에서도 규격시험으로 사용할 수 있을 지를 평가하기 위하여 국내 다기관이 참여하여 시험법을 최적화하고 검증하고자 검증연구 2단계 전수가능성 평가연구를 수행하였다. 리드랩에서 Bryce (2008) and Dertinger (2001c)의 방법을 사용하여 시험법을 최적화하였고 Rat MutaFlow® Kit을 기반으로 하였다. 채혈방법, 혈액시료 운반, 저장 및 분석 시점, 상등액 진공흡입법, flowcytometry 표준화 등을 최적화하였고 최종 프로토콜 및 SOPs를 제정하였다. 전수 가능성 시험을 위한 세 기관의 시험수행에 있어서 결과의 신뢰성을 확보하기 위하여 동일한 종의 동물을 사용하였고, 한 기관에서 시험물질 및 시험수행에 필요한 핵심 시약들을 구입하여 세 기관에 공급하였다. 시험 방법은 리드랩에서 최적화한 프로토콜을 동일하게 사용하였다.

ENU는 alkylating 화학물질로써 유전자변이 유발물질이며, 국제적으로 *pig-a* 시험법 검증 물질 및 양성 대조물질로 사용하고 있어 사용된 용량과 보고된 결과들이 많으므로 본 연구에서 시험물질로 사용하였다 (Cammerer *et al.*, 2011; Dertinger *et al.*, 2011b,c; Dobo *et al.*, 2011; Labash *et al.*, 2016). 혈액에서 총 RBC 대비 RET의 비율(%RET)은 7주령 rats에 음성대조물질 투여 시 10% 정도이며, 첫 투여 후 day15에 낮아지고 29일에 더 낮아져서 지속된다고 보고되었다(Dertinger *et al.*, 2011c). 이러한 감소는 말초혈액의 소핵 함유 RET 분석 시에도 관찰되는 결과로 시

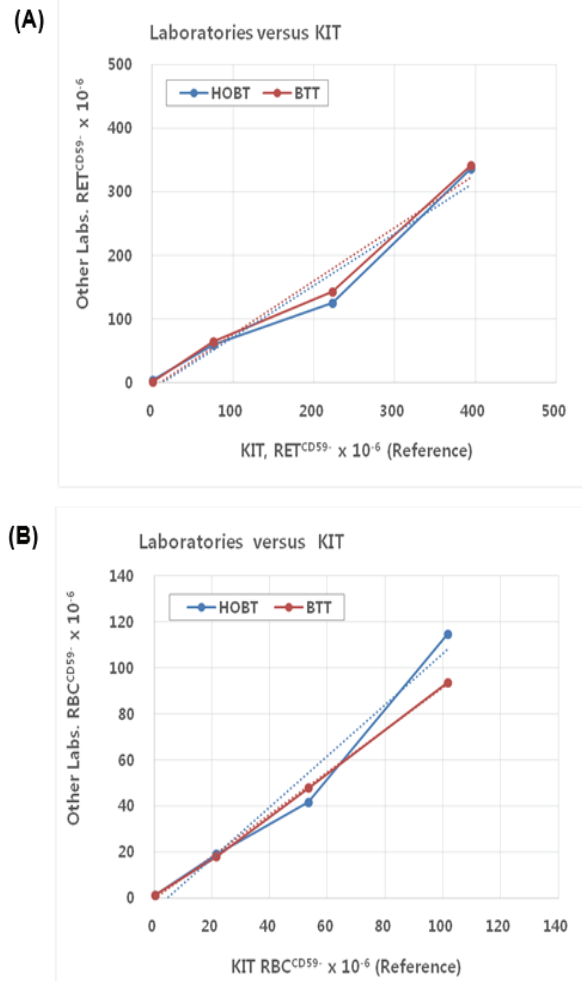


Figure 3. Correlation plots in the mutant frequencies of RET (A) and RBC (B) induced with ENU and vehicle between lead (x-axis) and participant laboratories (y-axis)

험물질의 농도와는 관계가 없으며 age에 따른 감소로 보고되었다(Dobo *et al.*, 2011; Dertinger *et al.*, 2012). 다만, 몇몇 시험물질에서는 day15에 시험물질 농도에 따른 %RET의 감소경향이 관찰되었고, day29에 시험물질 최고 농도에서 유의적으로 높아지기도 하였다(Bhalli *et al.*, 2013). 본 시험 결과는 첫 투여 후 day15일의 혈액시료 분석결과로 %RET에 있어서 세 기관 모두 시험물질에 의한 유의적 차이는 관찰되지 않았고, 단지 KIT의 %RET 값이 낮은 것은 flowcytometry 분석의 사분면 구획에 있어서 FITC 형광 값(y-axis) 구분을 다소 높게 결정한 탓으로 ENU는 %RET 값에 영향을 주지 않은 것으로 평가되었다. 세 기관의 %RET 값이 시험물질 농도에 영향을 받지 않은 결과는 기존의 *pig-a* assay 결과 보고와

일치하는 것으로 본 시험의 타당성을 입증하는 것으로 사료된다.

본 연구에서 mutant RET 발생빈도가 mutant RBC 발생빈도 보다 높게 관찰된 것은 ENU가 골수의 적혈구 생성 과정에 유전자 돌연변이를 발생시켜 미성숙 적혈구인 RET에 돌연변이가 먼저 나타났고 RET가 성숙 RBC가 되면서 mutant RBC가 증가하는 것으로 설명될 수 있으며 이러한 결과도 ENU를 사용한 다른 보고에서도 동일하게 확인된다. ENU 처리 시 mutant RET는 day 15 또는 29에 최고에 도달하여 계속 유지되거나, 다소 감소하는 경향을 보이기도 하였다. 그러나, mutant RET가 정상으로 회복되는 보고는 없었고, mutant RBC는 day 15부터 증가하여 계속 증가하는 것으로 보고되었다(Dobo *et al.*, 2011; Phonethepswath *et al.*, 2010). 다른 시험물질의 경우도 mutant RET & RBC 증가 pattern이 유사하여 mutant RET가 *pig-a* gene 돌연변이에 민감하며, mutant RBC는 안정적인 증가를 보여 두 가지 측정치를 모두 사용하는 것을 권장하고 있다(Gollapudi *et al.*, 2015). 또한, ENU는 강한 돌연변이원성이므로 본 연구에서 day 15에 혈액을 채취하여 분석하였으나, 약한 변이원성인 경우는 day 29에 측정하는 것을 더 권장한다(Gollapudi *et al.*, 2015).

국가의 14개 기관에서 진행한 전수도 시험에서 상관성을 평가하기 위하여 concordance correlation coefficient (CC) 값을 평가하였고 mutant RET는 0.91 이상의 상관성을 그리고 mutant RBC는 0.87 이상의 상관성을 보고하였다(Dertinger *et al.*, 2011c). 실험동물은 Sprague-Dawley, Wistar, Fisher 344 rats를 사용하였다. 본 연구에서는 리드랩과 두 참여 기관 각각의 상관성을 평가하기 위하여 CC 값을 평가하였고 data의 수가 적어 Pearson correlation coefficient를 함께 비교하였으며 *pig-a* assay의 전수가능성이 높은 것으로 평가되었다. 기관 간 평균값의 일치도 분석에서도 절대 수치에 있어서 일치도가 높은 것으로 나타나 전수가능성, 반복성 및 정확성이 높은 것으로 평가되었다. 본 연구에서는 모두 동일한 Sprague-Dawley rats를 사용하였으나 flowcytometer는 서로 다른 brand를 사용하였다. 대부분의 연구에서 BD사의 flowcytometer를 사용하였으며, 다른 brand를 사용한 연구는 본연구가 처음으로 다양한 제조사의 flowcytometer라도 calibration을 통해 정확한 결과 도출이 가능한 것으로 평가되었다. ENU를 사용한 밸리데이션 연구에서도 Pfizer, FDA-NCTR, Litron의 시험 결과에 있어서 유사한 결과를 제시하여

pig-a assay의 신뢰성을 시사하였으며(Cammerer *et al.*, 2011), ENU외에 N-methyl-N-nitrosourea, 4-nitroquinoline 1-oxide, 1,3-propanesultone 등의 물질의 *pig-a* assay 밸리데이션 연구에서도 높은 일치도를 보고하였다(Lynch *et al.*, 2011; Stankowski *et al.*, 2011; Dertinger *et al.*, 2011a).

결론적으로 국내 세 기관에서 ENU의 3일 연속 투여 후 수행한 *pig-a* gene mutation assay에서 ENU에 의한 mutant RET와 mutant RBC의 뚜렷한 증가가 확인 되었고, 용량의존적인 결과로 ENU의 돌연변이원성에 대한 신뢰성 있는 판정이 가능하였다. 또한, 세 기관의 결과가 일치도가 높은 것으로 평가되어 전수가능성 및 정확성이 높은 시험으로 평가되어 밸리데이션 stage III 국내 연구에 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 2016년도 식품의약품안전처의 연구개발비(16182MFDS388)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Aidoo A, Morris SM, and Casciano DA. (1997). Development and utilization of the rat lymphocyte *hprt* assay. *Mutat. Res.* 387:69-88.
- Bhalli JA, Shaddock JG, Pearce MG, Dobrovolsky VN, Cao X, Heflich RH, and Vohr HW. (2011). Report on stage III *Pig-a* mutation assays using Benzo[a]pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 731-737.
- Bhalli JA, Shaddock JG, Pearce MG, and Dobrovolsky VN. (2013). Sensitivity of the *Pig-a* assay for detecting gene mutation in rats exposed acutely to strong clastogens. *Mutagenesis.* 28(4): 447-455.
- Bryce SM, Bemis JC, and Dertinger SD. (2008). *In Vivo* mutation assay based on the endogenous *Pig-a* locus. *Environ. Mol. Mutagen.* 49: 256-264.
- Cammerer Z, Bhalli JA, Cao X, Coffing SL, Dickinson D, Dobo KL, Dobrovolsky VN, Engel M, Fiedler RD, Gunther WC, Heflich RH, Pearce MG, Shaddock JG, Shutsky T, Thiffeault CJ, and Schuler M. (2011). Report on stage III: *Pig-a* mutation assays using N-ethyl-N-nitrosourea comparison with other *in vivo* genotoxicity endpoints. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 721-730.
- Cao Y, Yang L, Feng N, Shi O, Xi J, You X, Yin C, Yang H, Horibata K, Honma M, Qian B, Weng W, and Luan Y. (2016). A population study using the human erythrocyte *PIG-A* assay. *Environ Mol Mutagen.* 57, 605-614.
- Dertinger SD, Phonethepswath S, Franklin D, Weller P, Torous DK, Bryce SM, Avlasevich S, Bemis JC, Hyrien O, Palis J, and MacGregor JT. (2010). Integration of

- mutation and chromosomal damage endpoints into 28-day repeat dose toxicology studies. *Toxicol. Sci.* 115:401-411.
- Dertinger SD, Phonetheswath S, Weller P, Avlasevich S, Torous DK, Mereness JA, Bryce SM, Bemis JC, Bell S, Portugal S, Aylott M, and MacGregor JT. (2011a). Interlaboratory *Pig-a* gene mutation assay trial: Studies of 1,3-Propane sultone with immunomagnetic enrichment of mutant erythrocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 748-755.
- Dertinger SD, Bryce SM, Phonetheswath S, and Avlasevich SL. (2011b). When pigs fly: immunomagnetic separation facilitates rapid determination of *Pig-a* mutant frequency by flow cytometric analysis. *Mutat. Res.* 721:163-170.
- Dertinger SD, Phonetheswath S, Weller P, Nicolette J, Murray J, Sonders P, Vohr HW, Shi J, Krsmanovic L, Gleason C, Custer L, Henwood A, Sweder K, Stankowski LF Jr, Roberts DJ, Giddings A, Kenny J, Lynch AM, Defrain C, Nesslany F, Leede BM, Doninck TV, Schuermans A, Tanaka K, Hiwata Y, Tajima O, Wilde E, Elhajouji A, William CG, Thiffeault CJ, Shutsky TJ, Fiedler RD, Kimoto T, Bhalli JA, Heflich RH, and MacGregor JT. (2011c). International *Pig-a* gene mutation assay trial: Evaluation of transferability across 14 laboratories. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 690-698.
- Dertinger SD, Phonetheswath S, Avlasevich SL, Torous DK, Mereness J, Bryce SM, Bemis JC, Bell S, Weller P, and MacGregor JT. (2012). Efficient monitoring of *in vivo* *Pig-a* gene mutation and chromosomal damage: Summary of 7 published studies and results from 11 new reference compounds. *Toxicol. Sci.* 130:328-348.
- Dobo KL, Fiedler RD, Gunther WC, Thiffeault CJ, Cammerer Z, Coffing SL, Shutsky T, and Schuler M. (2011). Defining EMS and ENU dose-response relationships using the *Pig-a* mutation assay in rats. *Mutat. Res.* 725: 13– 21.
- Dobrovolsky VN, Miura D, Heflich RH, and Dertinger SD. (2010). The *in vivo* *Pig-a* gene mutation assay, a potential tool for regulatory safety assessment. *Environ. Mol. Mutagen.* 51: 825-835.
- Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Froetschl R, Horibata K, Kenyon MO, Kimoto T, Lovell DP, Stankowski LF Jr, White PA, Witt KL, and Tanir JY. (2015). The *in vivo* *Pig-a* assay: A report of the international workshop on genotoxicity testing (IWGT) workgroup. *Mutat. Res.* 783: 23–35.
- Horibata K, Ukai A, Ishikawa S, Sugano A, and Honma M. (2016). Monitoring genotoxicity in patients receiving chemotherapy for cancer: application of the *PIG-A* assay. *Mutat. Res.* 808: 20-26.
- Hu R, Mukhina GL, Lee SH, Jones RJ, Englund PT, Brown P, Sharkis SJ, Buckley JT, and Brodsky RA. (2009). Silencing of genes required for glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Burkitt lymphoma. *Exp. Hematol.* 37:423-434.
- International Conference on Harmonization (ICH). (1996). Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals, S2A. Available at: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074925.pdf. Accessed on Aug. 24, 2010.
- International conference on Harmonization (ICH). (1997). Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals, S2B. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074929.pdf>. Accessed on Aug. 24, 2010.
- Kimoto T, Chikura S, Kumiko SO, Kobayashi XM, Itano Y, Miura D, and Kasahara Y. (2012). Effective use of the *Pig-a* gene mutation assay for mutagenicity screening: measuring CD59-deficient red blood cells in rats treated with genotoxic chemicals. *Toxicol. Sci.* 37(5): 943-955.
- Kimoto T, Horibata K, Chikura S, Hashimoto K, Itoh S, Sanada H, Muto S, Uno Y, Yamada M, and Honma M. (2013). Interlaboratory trial of the rat *Pig-a* mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody. *Mutat. Res.* 755: 126– 134.
- Kinoshita T, Fujita M, and Maeda Y. (2008). Biosynthesis, remodeling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: Recent progress. *J. Biochem.* 144:287–294.
- Labash C, Avlasevich SL, Carlson K, Berg A, Torous DK, Bryce SM, Bemis JC, MacGregor JT, and Dertinger SD. (2016). Mouse *Pig-a* and micronucleus assays respond to N-Ethyl-N-Nitrosourea, Benzo[a]pyrene, and Ethyl Carbamate, but not Pyrene or Methyl Carbamate. *Environ. Mol. Mutagen.* 57: 28-40.
- Lynch AM, Giddings A, Custer L, Gleason C, Henwood A, Aylott M, and Kenny J. (2011). International *Pig-a* gene mutation assay trial(Stage III): Results with N-methyl-N-nitrosourea. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 699-710.
- Miura D, Dobrovolsky VN, Kasahara Y, Katsura Y and Heflich RH. (2008). Development of an *in vivo* gene mutation assay using the endogenous *Pig-a* gene: I. flow cytometric detection of CD59-negative peripheral red blood cells and CD48-negative spleen T-cells from the rat. *Environ. Mol. Mutagen.* 49:614-621.
- Miura D. (2014). The *in vivo* *Pig-a* gene mutation assay. *Genes and Environ.* 36(4): 169-173.
- Muto S, Yamada K, Kato T, Ando M, Inoue Y, Iwase Y, and Uno Y. (2016). Evaluation of the mutagenicity of alkylating agents, methyl nitrosourea and temozolomide, using the rat *Pig-a* assay with total red blood cells or reticulocytes. *Mutat. Res.* 811: 117–122.
- OECD, Series on Testing and Assessment, Number 488. (2013). Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development.
- Phonetheswath S, Franklin D, Torous DK, Bryce SM, Bemis JC, Raja S, Avlasevich S, Weller P, Hyrien O, Palis J, MacGregor JT, and Dertinger SD. (2010). *Pig-a* mutation: Kinetics in rat erythrocytes following exposure to five prototypical mutagens. *Toxicol. Sci.* 114(1): 59–70.
- Shi J, Krsmanovic L, Bruce S, Kelly T, Paranjpe M, Szabo K, Arevalo M, Samuel AS, Debelie F, LaForce MK, Sly J, and Springer S. (2011). Assessment of genotoxicity induced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene or Diethylnitrosamine in the *Pig-a*, micronucleus and comet assays integrated into 28-day repeat dose studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 711-720.
- Stankowski LF Jr, Roberts DJ, Chen H, Lawlor T, McKeon M, Murli H, Thakur A, and Xu Y. (2011). Integration of *Pig-a*, micronucleus, chromosome aberration, and comet Assay endpoints in a 28-day rodent toxicity study with 4-Nitroquinoline-1-oxide. *Environ. Mol. Mutagen.* 52: 738-747.