

Saxitoxin 검출을 위한 Neuro-2a 시험법 조건 확립 및 실험실 간 변동성 비교 연구

김영진^{1,2,3†} · 서주리^{1,4†} · 김준² · 박정인^{1,2} · 김종희^{1,5} · 박현⁶ · 한영석^{3*} · 김연정^{1,2*}

¹인천대학교 해양학과

²인천대학교 기초과학연구소

³(주)네오엔비즈

⁴성균관대학교 과학수사학과

⁵극지연구소

⁶고려대학교 생명공학부

Establishment of Test Conditions and Interlaboratory Comparison Study of Neuro-2a Assay for Saxitoxin Detection

Youngjin Kim^{1,2,3†}, Jooree Seo^{1,4†}, Jun Kim², Jeong-In Park^{1,2}, Jong Hee Kim^{1,5}, Hyun Park⁶,
Young-Seok Han^{3*}, Youn-Jung Kim^{1,2*}

¹Department of Marine Science, Incheon National University, Incheon, 22012 Korea

²Research Institute of Basic Sciences, Incheon National University, Incheon 22012, Korea

³Institute of Environmental Protection and Safety, NeoEnBizCo., Bucheon 14523, Korea

⁴Department of Forensics, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, Korea

⁵Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Korea

⁶Devison of Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea

Corresponding Author

Youn-Jung Kim

Department of Marine Science, Incheon
National University, Incheon 22012, Korea
E-mail : duckyj@inu.ac.kr

Young-Seok Han

Institute of Environmental Protection
and Safety, NeoEnBizCo., Bucheon
14523, Korea
E-mail : han-kong@hanmail.net

Received : May 20, 2024

Revised : May 27, 2024

Accepted : May 31, 2024

† These authors contributed equally to
this work.

마비성 패류 독소(Paralytic shellfish poisoning, PSP)는 유해 조류에 의해 생성되며, 독소에 노출된 수산물을 섭취하였을 때 중독이 발생한다. 수산물 중 PSP를 검출하는 표준 시험법인 Mouse bioassay (MBA)는 낮은 검출한계와 동물 윤리 문제로 대체 시험법의 개발 필요성이 대두되고 있다. 이러한 대체 시험법 중, PSP가 신경 세포막의 Na⁺ 채널을 차단하는 기전을 이용한 마우스 뇌신경 모세포종 세포 기반 시험법(Neuro-2a assay)의 표준화를 위한 노력이 대두되고 있다. Neuro-2a assay의 원리는 Neuro-2a 세포주에 Na⁺/K⁺ ATPase 억제제인 Ouabain (O)과 Na⁺ 채널 활성화제인 Veratridine (V)을 처리하여 과도한 Na⁺ 유입으로 인한 세포사멸을 유도한 상태에서, Na⁺ 채널 억제제인 PSP를 처리하게 되면 Na⁺ 유입이 차단되어 세포가 생존하는 것을 측정하는 것이다. 본 연구에서는 PSP 검출을 위한 Neuro-2a assay를 국내 연구 환경에 맞게 다양한 매개변수를 개선하여 최적 시험법을 확립하고자 하였다. 고려한 매개변수들은 세포밀도, 배양 조건 및 PSP 처리 조건 등으로, 그 결과는 아래와 같다. 초기 세포밀도는 40,000 cells/well로, 세포 배양시간 및 처리시간은 각각 24시간으로 설정하였다. 또한 최적 O/V 농도는 500/50 μ M로 설정하였다. 본 연구에서 PSP 중 Saxitoxin (STX)에 대해서 O/V 처리가 된 상태에서 S자형 용량-반응 그래프가 도출되는 8가지 농도(368~47,056 fg/ μ l)를 확인하였고, Neuro-2a assay의 실험실 간 변동성 비교를 통해, 실험의 적정성 확인을 위한 5가지 Quality Control Criteria와 실험 데이터의 신뢰가능 범위(Data Criteria) 6가지를 설정하였다. 확립된 조건으로 Neuro-2a assay를 진행한 결과 반수영향농도(EC₅₀) 값은 약 1,800~3,500 fg/ μ l로 나타났다. 실험실 간 변동성 비교 결과, Quality Control Criteria 값 및 Data criteria 값의 변동계수(coefficients of variation (CVs))가 1.98~29.15% 범위로 산출되어 실험의 적정성 및 재현성이 확인되었다. 본 연구를 통해 우리나라에서 활용할 수 있는 PSP 검출용 Neuro-2a assay 시험법의 최적 조건 및 5가지 Quality control 기준을 제시하였고, PSP 중 대표적인 독소인 STX을 대상으로 Neuro-2a assay를 실시한 결과 유의한 EC₅₀ 값을 산출할 수 있었으며, 향후 국내 수산물을 대상으로 MBA를 대체할 수 있는 PSP 검출법으로 활용될 것으로 기대된다.

Paralytic shellfish poisoning (PSP) including Saxitoxin (STX) is caused by harmful algae, and poisoning occurs when the contaminated seafood is consumed. The mouse bioassay (MBA), a standard test method for detecting PSP, is being sanctioned in many countries due to its low detection limit and the animal concerns. An alternative to the MBA is the Neuro-2a cell-based assay. This study aimed to establish various test conditions for Neuro-2a assay, including cell density, culture conditions, and STX treatment conditions, to suit the domestic laboratory environment. As a result, the initial cell density was set to 40,000 cells/well and the incubation time to 24 hours. Additionally, the concentration of Ouabain and Veratridine (O/V) was set to 500/50 μM , at which most cells died. In this study, we identified eight concentrations of STX, ranging from 368 to 47,056 fg/ μl , which produced an S-shaped dose-response curve when treated with O/V. Through inter-laboratory variability comparison of the Neuro-2a assay, we established five Quality Control Criteria to verify the appropriateness of the experiments and six Data Criteria (Top and Bottom OD, EC_{50} , EC_{20} , Hill slope, and R^2 of graph) to determine the reliability of the experimental data. The Neuro-2a assay conducted under the established conditions showed an EC_{50} value of approximately 1,800~3,500 fg/ μl . The intra- & inter-lab variability comparison results showed that the coefficients of variation (CVs) for the Quality Control and Data values ranged from 1.98% to 29.15%, confirming the reproducibility of the experiments. This study presented Quality Control Criteria and Data Criteria to assess the appropriateness of the experiments and confirmed the excellent repeatability and reproducibility of the Neuro-2a assay. To apply the Neuro-2a assay as an alternative method for detecting PSP in domestic seafood, it is essential to establish a toxin extraction method from seafood and toxin quantification methods, and perform correlation analysis with MBA and instrumental analysis methods.

Keywords: Saxitoxin(삭시톡신), Neuro-2a assay(Neuro-2a 시험법), Paralytic shellfish poisoning(마비성 패류 독소), Cell-based assay(세포-기반 시험법), Interlaboratory comparison(실험실 간 비교)

서론

최근 지구 온난화로 인하여 전 세계적으로 유해성 플랑크톤 및 해양생물독소 발생 사례가 보고되고 있다(Nam and Oh, 2021). 우리나라 역시 지구 온난화에 기인하여 마비성 패류 독소(Paralytic Shellfish Poison; PSP)의 원인 플랑크톤의 발생이 우려되고 있으며, 실제로 우리나라는 대규모 PSP 발생으로 어민들의 피해가 크고, 10년 동안의 발생 시기를 비교해 본 결과, 2018년도에 독소 허용 기준치 초과 시기가 가장 빠르게 나타났다. 우리나라 PSP 검출의 최초 공식 보고는 1986년 4월 부산 지역에서 발생한 집단 중독 사례로 원인 패류는 진주담치(blue mussel, *Mytilus edulis*)였다. 이후 지속적으로 국립수산물안전원에 의해 모니터링이 진행되어 매년 전해만 해역에 마비성 패류 독화가 일어나는 것으로 보고되고 있으며, 매년 4~5월에 집중적으로 기준치 한계를 초과하여 검출되는 지역이 나타나고 있다(Jang et al., 2005).

우리나라 연안의 PSP는 *Alexandrium tamarense*가 주로 관여하며, *A. tamarense* 밀도와 패류의 독성은 상당히 밀접한 관계가 있어 대체로 원인 플랑크톤의 밀도가 높아지면 패류의 독성도 높아진다(Han et al., 1992). 생산 해역 및 수산물 내 PSP 기준치는 0.8 mg/kg으로 해외의 기준치와 동일하다(Wekell et al., 2004). 국내에서는 PSP 검출법으로 Mouse Bioassay (MBA)를 기준으로 하

고 있지만, 유통 수산물 대상의 경우 정확하고 정밀한 분석을 위해서 LC-MS/MS를 이용한다(Jang et al., 2005). 분석 대상 독소는 Saxitoxin (STX), gonyautoxin (GTX) 1, GTX 2, GTX 3, GTX 4이며 국내의 경우 GTX가 주로 검출되고 STX의 경우 미량 검출되는 것으로 보고된다(Song et al., 2013). PSP에는 STX 그룹(STX, neoSTX), gonyautoxin 그룹(GTX 1, 2, 3, 4), N-sulfocarbamoyl toxin 그룹(GTX 5, 6, C1, 2, 3, 4), dicarbamoyl toxin 그룹(dcSTX, dcneoSTX, dcGTX1, 2, 3, 4), deoxydecarbamoyl toxin 그룹(doSTX, doGTX2, 3) 등 20종류 이상의 유사체가 있는 것으로 알려져 있다(Song et al., 2013).

국내 관리독소 독성 평가 방법은 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC 959.08, 2000) 동물 시험법 MBA를 표준 분석법으로 규정하고 있으며, 균질화한 수산물 검체를 0.1 N HCl을 용매로 추출한 뒤 상층액을 마우스 복강 내 주사하고 치사하는 시간을 측정하여 Mouse Unit (MU)를 산출한다. 1 MU는 독력 단위로 20 g의 mouse를 15분만에 사망하게 하는 독력을 의미하고 STX 0.18 mg을 주사한 독력과 동일하며(Egmond, 2004), 대부분의 국가에서 기준치 초과 수준은 400 MU/패류 100 g 해당한다(Schantz et al., 1958). MBA의 검출한계는 약 40 μg STX 등가물(STXeq) /패류 100 g이다. 우리나라를 비롯하여 해외 많은 국가에서 해양생물독소를 검출하기 위해 MBA를 표준 분석법으로 사용

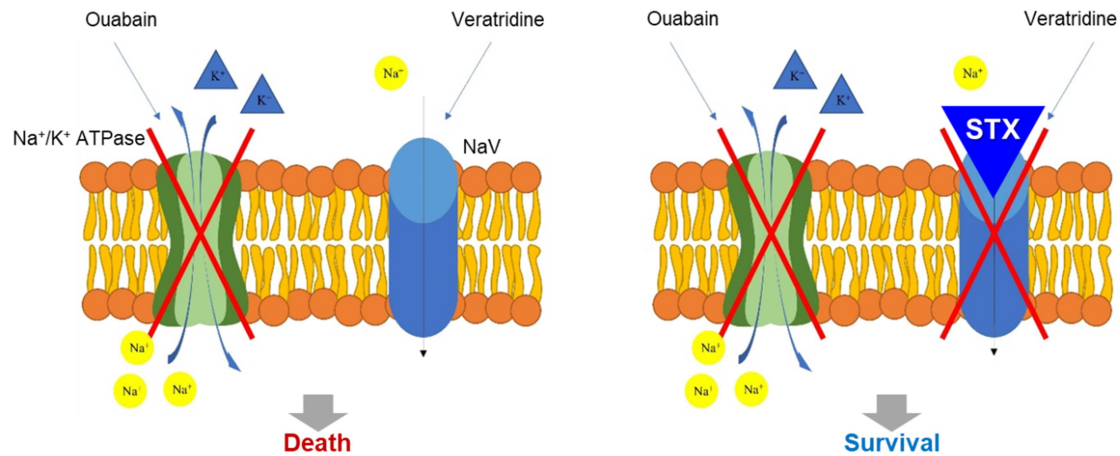


Fig. 1. Principle of Neuro-2a assay for saxitoxin (STX) detection.

하여 모니터링과 규제를 시행하고 있으나, 정확도 및 재현성이 떨어진다는 단점과 동물윤리에 대한 사회적 이슈가 잇따라 MBA 대체 시험법 개발 연구가 많이 시도되고 있다(Jellet et al., 2002; Louzao et al., 2003; David and Nicholson 2004).

화학적 분석 방법을 이용한 대체 시험법으로 각광받고 있는 연구분야는 액체 크로마토그래피(LC) 기반 기술로, PSP 측정에 가장 널리 사용되고 있으며, 자동화된 LC 방법의 개발이 꾸준히 연구되고 있다(Sullivan 1988; European Commission, 2011; Turner et al., 2019, 2020). 또 다른 대체 분석법은 LC-MS/MS 기법이 주로 사용되며, 최근에는 장비 도입이 상대적으로 용이하고 분석 당 비용이 상당히 감소되어 보급이 확대되고 있는 추세이다(Jaim et al., 2001; Quilliam et al., 2001). 하지만 여전히 표준독소가 있어야만 분석이 가능하다는 한계점을 가진다(Humpage et al., 2007).

PSP가 신경 세포의 기능에 영향을 주는 기전이 MBA 대체 시험법으로 제안되었다. PSP는 세포의 정상적인 탈분극을 방해하는 신경 세포막의 Voltage gated Na^+ 채널(VGSC; NaV)에 결합하여 작용을 억제하는데, PSP의 결합량은 독성에 비례한다. 이러한 기전을 이용해 Kogure et al. (1988)에 의해 마우스 신경모세포종 세포(Neuro-2a cell line, N2a)를 이용한 접근법이 개발되었다. N2a 세포는 Ouabain (O)과 Veratridine (V)이 함께 처리될 경우, Ouabain은 Na^+/K^+ ATPase를 억제하여 세포 내 Na^+ 이 빠져나가지 못하게 만들고, Veratridine은 Na^+ 채널을 활성화하여 세포 내로 Na^+ 이 유입되게 하여 결국 세포 내 Na^+ 농도가 너무 높아져 세포가 사멸하게 만든다. 이 때 Na^+ 채널을 차단하는 PSP (Saxitoxin)가 처리되면 O/V의 작용이 억제되고 세포는 생존하게 된다(Fig. 1).

이 시험법은 O/V의 작용으로부터 세포가 보호되는 농도와 PSP의 농도가 정비례하는 것을 원리로 진행된다. Jellet et al. (1992)이 개선한 Neuro-2a assay는 검출 한도가 추출물 ml 당 약 10 ng STXeq인 것으로 나타났으며 표준 시험법인 MBA와 비교되었을

때 AOAC 절차에 따라 제조된 47개의 패류 추출물에 대해 상관 계수(r) > 0.96로 유사한 결과를 나타냈으며, MBA의 검출한계인 40 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 보다 더 민감한 수치(1.2~31.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)를 나타내는 것으로 보고되었다(Jellet et al., 1992). Neuro-2a assay와 같은 Cell-based assay (CBA) 대체 시험법은 유럽을 중심으로 활발하게 연구되고 있으며, 최근에는 STX 뿐만 아니라 시구아톡신(Ciguatoin) 및 지용성 독소의 수산물 중 검출에도 Neuro-2a assay를 사용한 논문들이 지속적으로 보고되고 있다(Catterall and Nirenberg, 1973; Nicolas et al., 2014a, 2014b, 2015). 이들 문헌 중 Viallon et al. (2020)은 Neuro-2a assay의 표준화된 프로토콜의 부재를 강조하며 전반적인 실험법의 매개변수들을 재검토하여 참조가능한 프로토콜을 제시하였다. 또한 2021년 5월 유럽식품안전청(Europe food safety authority, EFSA)은 시구아톡신 검출을 위한 Neuro-2a assay 시험법의 가이드라인을 제시한 바 있다(Diogenè et al., 2021). 이와 같이 Neuro-2a assay의 해양생물독소 검출을 위한 MBA 대체 시험법으로서의 가능성은 지속적으로 확인되고 있어 국내 도입이 필요한 실정이다(Pawlowicz et al., 2013; Aballay-Gonzalez et al., 2016).

이에 본 연구에서는 세포주를 이용한 대체 시험법인 Neuro-2a assay를 PSP 중 STX 검출이 가능하도록 배양 조건 및 처리 조건과 같은 많은 매개변수들을 국내 실험 환경에 맞게 시험법을 최적화하고, 실험실 간 변동성 비교 분석을 통해 시험의 적정성을 확인할 수 있는 Criteria를 설정함으로써 세포를 이용한 시험법의 제한점을 극복할 수 있는 방법을 제시하였다.

재료 및 방법

1. 세포 및 시료 준비

마우스 유래 Neuro-2a 세포는 American Type Culture Collection

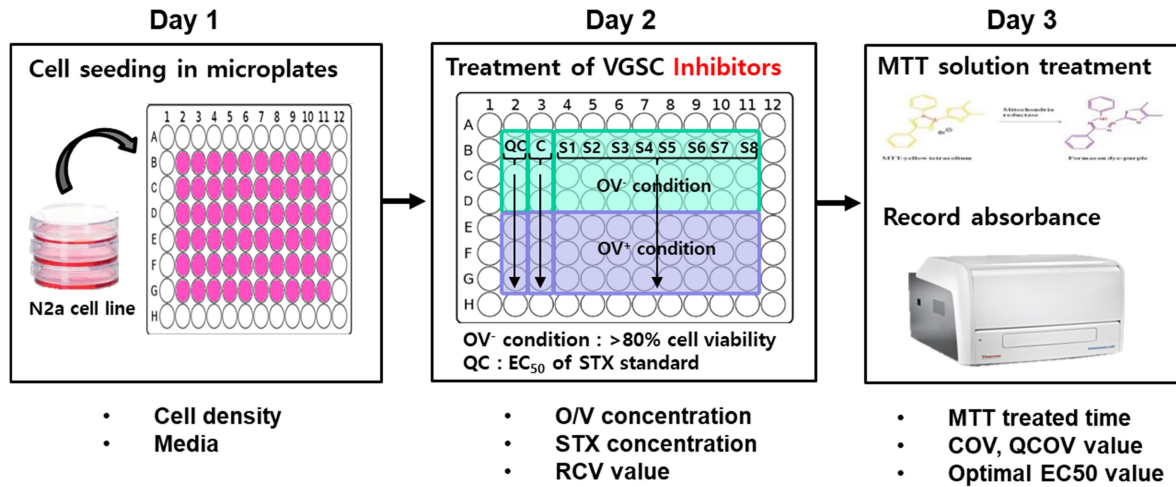


Fig. 2. Neuro-2a assay procedure and established parameters.

(ATCC; USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포주의 배양은 RPMI 1640 (Gibco, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco, USA), 1% Pen Strep (Gibco, USA), 2 mM GlutaMAX (Gibco, USA), 1% Sodium pyruvate (Gibco, USA), 2.5 g/ml Amphotericin B (Gibco, USA)를 첨가한 배지를 사용하였다. 세포주는 5% CO₂, 37°C 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세포를 유지하거나 계대배양 시 사용되는 배양 배지로 RPMI 1640 배양 배지(FBS 10%)를 제조하였다. 또한 RPMI 실험 배지(FBS 2%, FBS 5%)를 제조하여 FBS 5% 배지는 Seeding 과정에 FBS 2% 배지는 독소 처리과정과 MTT 처리과정에서 사용하였다. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; Gibco, USA)는 세포 세척 시 사용하였다.

Saxitoxin dihydrochloride (STX) 표준물질(Sigma Aldrich, USA)를 구매한 후, 500 µl의 STX (20.3 µg/ml)를 25 µl씩 소분하여 냉동보관(-20°C) 하였다. Ouabain octahydrate (O; Sigma Aldrich, USA)는 멸균된 3차 증류수로 용해시켜 20 mM의 농도로 제조하여 차광 튜브에 600 µl씩 소분하여 빛이 차단된 곳에 실온상태로 보관하였다. Veratridine (V; Sigma Aldrich, USA)은 pH를 2로 조정하여 멸균된 3차 증류수로 용해시키고, 이를 230 µl씩 소분하여 냉동보관(-20°C) 하였다. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT; Sigma Aldrich, USA) 100 mg을 20 ml의 PBS에 녹이고 0.22 µm Millex syringe filter unit (Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 필터 후 냉장보관(4°C) 하였다.

2. Neuro-2a assay 시험법 최적 조건 확립

2.1. 실험과정 개요

Neuro-2a assay는 Viallon et al. (2020)의 시험법 표준화 연구를

참고하여, 총 3일(Day 3) 과정으로 설계하였다(Fig. 2). 첫 번째 날은 96 well-plate에 세포를 동일한 농도로 분주하여 배양하는 세포 접종 과정이다. 두 번째 날은 최대밀도에 도달한 세포에 마비성 패류 독소 혹은 STX를 처리하는 독소 처리과정이다. 세 번째 날은 MTT 시약을 통해 흡광도를 측정하여 용량-반응 그래프를 나타내어 반수영향농도(50% Effective concentration; EC₅₀) 값을 산출하는 MTT 처리과정으로 구성된다. 본 연구에서는 실험과정에서 배지 밀도와 배양시간, O/V 처리 농도, STX 처리 농도, 독소 처리시간 등 여러 매개변수들을 국내 환경에 맞춰 최적화하고자 하였다.

2.2. Neuro-2a 세포주 배양

Neuro-2a 세포가 배양접시(100 mm cell culture dish, Corning, USA)의 90% 이상 성장하였을 때 계대배양 하였다. 먼저 배양접시의 배지를 제거하고 5 ml PBS를 분주하여 세척한다. 세척한 PBS를 제거하고 0.25% Trypsin/EDTA (Gibco, USA)를 5분간 처리하여 세포를 떼어낸다. 이 후 125 g, 5 min, 24°C 조건으로 원심분리하여 세포를 모아주고 1:6 비율로 희석하여 37°C 5% CO₂ 조건의 세포배양기에서 배양하며, 2일마다 계대배양 하였다. 세포는 계대주기에 따라 구분하여 배양하였다.

2.3. Neuro-2a assay를 위한 세포밀도 및 배양시간 확립

세포밀도 및 배양시간 확립 실험은 96 well-plate에서 Neuro-2a 세포의 최대밀도에 도달하기 위한 세포의 농도와 배양시간을 확립하기 위한 실험이다. 먼저 Neuro-2a 세포를 330,000 cells/ml로

하여 세포 현탁액을 제조한다. 이를 총 12개의 T25 플라스크(cell culture flask, SPL, Korea)에 플라스크당 RPMI 1640 배지(FBS 10%) 10 ml에 세포 현탁액 1 ml를 넣고 혼합한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양을 진행하였다. 배양 후 22시간이 지난 뒤부터 6시간마다 플라스크 1개씩 꺼내어 KOVA Glasstic slides (KOVA, USA)를 이용하여 하나의 플라스크 당 10번의 세포계수를 진행하여 평균값을 기록했다. 이 때 22시간부터 76시간까지 6시간마다 측정하며, 추가로 배양 후 85시간, 100시간을 측정하여 기록하고 기록한 세포밀도를 그래프로 나타내어 최대밀도와 밀도가 2배로 증가하는 시간을 산출하였다. 또한 세포접종 시 세포밀도와 배양시간을 설정해 확립한 배양 조건으로 96 well-plate에 세포접종을 하고 흡광도를 측정하여 초기 세포 생존율을 나타내는 기준인 RCV (reference cell viability) 값을 산출하였다. 세포접종은 내부 60개 well에 진행하고 외부 36개 well의 경우 멸균된 3차 증류수를 동일 부피로 채워 온도에 의한 영향을 최소화하였다.

2.4. 배지의 조성 확립 및 STX에 의한 세포독성 확인

Neuro-2a assay에서 배양 조건과 처리 조건에서 사용할 배지의 FBS의 함량을 확립하는 실험으로 보다 경제적인 실험법으로 최적화하고 STX에 의한 세포독성 확인을 위한 단계이다. 실험 조건은 3가지 조건으로 설정하였다. 조건 1(배양 배지 FBS 10%, 처리 배지 FBS 10%), 조건 2(배양 배지 FBS 5%, 처리 배지 FBS 5%), 조건 3(배양 배지 FBS 5%, 처리 배지 FBS 2%)으로 24시간 배양한 후 배양한 배지는 제거하고, 각 농도별 STX 10 µl와 각 조건에 부합하는 배지 200 µl를 24시간 처리하고 흡광도를 측정했다. 흡광도 측정은 처리했던 용액을 제거하고 5 mg/ml 농도의 MTT 시약을 FBS 2% 배지와 1:6으로 희석하여 well 당 60 µl씩 45분간 37°C, 5% CO₂ 조건으로 처리 후 용액을 최대한 제거하여 형성된 Formazan을 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 100 µl로 용해시킨 후 흡광도를 비교하였다.

2.5. Ouabain/Veratridine 처리 조건 확립

Neuro-2a assay는 나트륨-칼륨 펌프 억제제인 Ouabain (O)과 나트륨 채널 활성제 Veratridine (V)을 처리하여 나트륨 채널 관여 독소를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 확인하여 독성을 나타내는 원리를 이용한다. 우리가 사용할 STX의 경우 나트륨 채널 억제제로 독성을 확인하기 위해 O/V 농도를 세포가 80% 이상 사멸하는 농도로 처리해야 한다. 따라서 O/V 농도를 0/0~360/36 µM 사이의 1가지 농도와 추가로 500/50 µM 농도를 설정하고, 40,000 cells/ml 농도의 세포를 24시간 배양 후 최대밀도에 도달하였을 때 O/V를 24시간, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 처리하고 MTT를 45분 처리한 후, 형성된 포르마잔을 DMSO 100 µl로 용해시켜 플

레이트 리더로 흡광도를 측정해 세포 생존율 그래프를 확인하여 80% 이상의 세포가 사멸하는 O/V 처리 농도를 확립하였다.

2.6. STX 처리 농도 조건 확립

나트륨 채널 억제제인 STX의 처리 농도를 설정하는 실험이다. 앞서 설정한 O/V를 세포가 사멸하는 농도(500/50 µM)로 처리하고 STX 농도는 기존 표준화 진행 연구(Viallon et al., 2020)를 참고하여 3~188,222 fg/µl 사이의 17가지 농도로 설정하였다. 이 때 처리는 총 부피 210 µl를 처리하고 그 중 10 µl를 독소를 처리하기 때문에 독소는 21배로 농축하여 제조되었다. 각 농도 제작은 최고 농도인 188,222 fg/µl는 먼저 STX 표준독소와 처리 배지(FBS 2%)를 혼합하여 21배 농축하여 제조 후 이를 반수 희석하여 17개의 농도로 제작되었다. 이를 O/V가 처리 배지와 처리하지 않은 배지와 각각 혼합하여 최종 처리 용액으로 제조하고 96 well-plate에 210 µl씩 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 처리하였다. O/V 유무에 적절한 대조군을 설정하여(COV 및 COV*) 독소가 없는 상태에서의 세포 생존율과 O/V 처리 효과를 각각 확인하였다. 처리 조건이나 흡광도를 측정하는 과정은 전 실험과 동일하게 진행되었으며, 총 17가지 농도의 흡광도를 측정하여 용량-반응 그래프로 나타내고 EC₅₀을 산출할 수 있는 S자형 모델이 나오는 8가지 농도를 실험농도로 설정했다. EC₅₀ 값 산출의 경우 GraphPad Software 5 (PRISM, San Diego, CA, USA)를 통해 분석하며 계산식은 다음과 같다.

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{Hillslope}))}$$

3. Neuro-2a assay의 실험실 간 변동성 비교 실험

3.1. 실험실 선정

STX 검출을 위한 Neuro-2a assay의 실험실 내 및 실험실 간 교차 검증을 위해 3개의 각기 다른 기관의 실험실이 선택되었다. 이 실험실들은 세포배양 및 MTT 흡광도 분석 등을 포함하여 연구의 기술적 요구사항을 수행할 수 있는 곳으로 제안요청서를 보내 응답을 한 연구실험실을 선택했다. 3개의 실험실은 Lab-1, 2, 3로 지정되었다.

3.2. 실험실 내(Intra-laboratory; Intra-lab) 및 실험실 간(Inter-laboratory; Inter-lab) 연구

실험실 내 및 실험실 간 변동성 연구는 일반적인 실험실 성능(예; 기술 문제, 테스트 및 보고시간 등)을 평가하고, 시험법의 숙련도 및 신뢰도 확보를 위한 Quality Control Criteria 및 Data Criteria를 개선함으로써 향후 수산물 추출물을 대상으로 정량 분석 연구

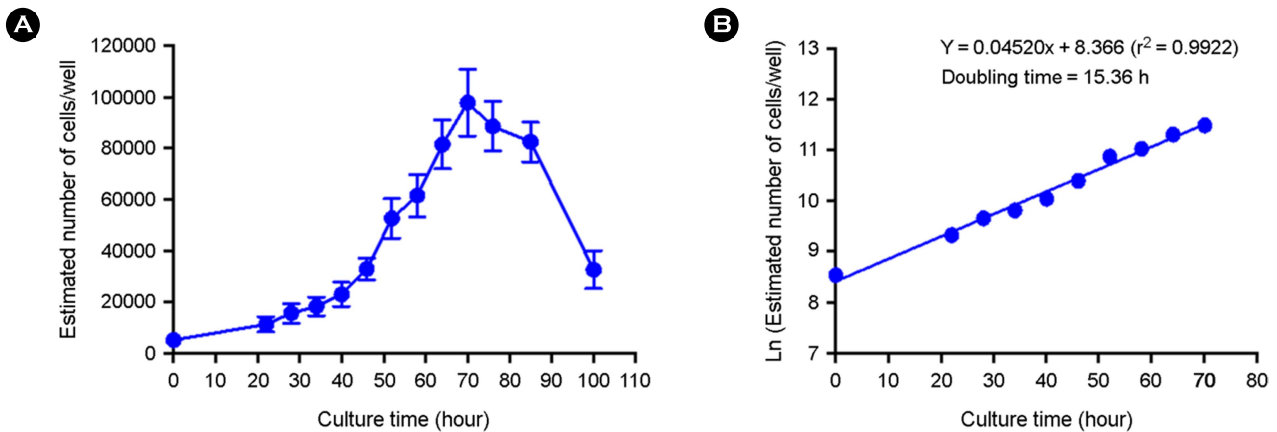


Fig. 3. Neuro-2a cell growth graph. (A) shows the maximum density of cells by cell seeding of the N2a cell line in a 25T flask at 30,000 cells/ml and counting cells every 6 hours from 22 hours of incubation. (B) shows a trend line by replacing the cell growth section with $Y = \ln(Y)$ in the cell growth graph to calculate the time for the cell to double and set the culture time.

를 수행하기 전에 각 실험실이 능숙하게 Neuro-2a assay를 수행하도록 하는데 있다.

이를 위해 모든 실험실은 제공된 시료 및 템플릿을 통해 연구 조건 및 실험 데이터를 기록했다. 각 실험실은 방법 2.6에 제시된 Neuro-2a assay 방법에 따라 동일하게 3명의 다른 실험자가 3번 반복 실험을 수행하였다. 각 실험에서 기록된 순 흡광도 값을 획득하여 용량-반응 그래프로 나타내고 5가지의 Quality Control 및 EC_{50} 값을 비롯한 6가지 데이터 등을 산출한 후, 실험실 내(intra-lab) 변동성 비교를 위해서는 한 실험에서 3개의 microplate에서 얻어진 결과값을 비교 분석($n=3$)하였고, 실험실 간(inter-lab) 변동성 비교를 위해서는 실험실별 1개의 데이터를 비교 분석하여($n=3$) 적절한 Criteria를 확립하였다.

3.3. 데이터 분석

각 실험실에서 수행된 Neuro-2a assay의 용량-반응 곡선의 Quality Control 및 데이터 값들의 평균값(mean)과 표준편차(standard deviation; SD)를 이용하여 변동계수(Coefficients of variation; CV=표준편차/평균값(%))를 계산하고 시험의 반복성 및 재현성을 평가하였다.

결 과

1. Neuro-2a assay 실험 조건 확립

1.1. 세포밀도 및 배양시간 확립

Neuro-2a assay의 첫 번째 단계인 세포접종과정에서 96 well-

plate에 접종할 N2a 세포의 밀도를 설정하고 접종 후 최적 배양시간을 확립하였다. 22시간에서 100시간까지의 세포계수 결과, 세포의 최대밀도는 70시간 배양하였을 때 T25 플라스크 기준 7,628,500 cells/flask로 이를 세포접종 할 96 well-plate 기준으로 단위면적으로 보정하여 나타냈을 때, 97,644.8 cells/well로 확인되었다(Fig. 3(A)). 또한 시간대비 세포밀도를 세포 성장그래프를 나타내고 세포밀도인 Y 값을 $\ln(Y)$ 단위로 치환하여 그래프를 나타내 추세선을 표시하고 이를 통해 세포가 2배로 증가하는 시간을 15.36시간으로 산출하였다(Fig. 3(B)). 이러한 결과를 바탕으로, Neuro-2a assay에 적용할 접종 세포 농도를 40,000 cells/well로 정하고 배양시간을 24시간으로 확립하였다. 96 well-plate에 40,000 cells/well로 200 μ l씩 접종하고 24시간 동안 배양하여 Neuro-2a assay의 초기 세포 생존율을 나타내는 기준인 RCV (reference cell viability) 대조군 값을 산출하였다. 60개 well의 흡광도 값의 평균은 0.970, 표준편차는 0.047으로 측정되어 RCV 대조군의 흡광도 기준을 0.9 이상으로 설정하였다.

1.2 배지의 조성 최적화 및 STX의 세포독성 결과

N2a assay에서 배양 조건과 STX 처리 조건에서 사용할 배지의 FBS의 함량을 최적화하기 위해, 3가지 조건(조건 1; 배양 배지 FBS 10%, 처리 배지 FBS 10%, 조건 2; 배양 배지 FBS 5%, 처리 배지 FBS 5%, 조건 3; 배양 배지 FBS 5%, 처리 배지 FBS 2%)으로 Neuro-2a 세포를 접종하고 STX를 처리하였다. 3가지 배양 조건의 결과를 비교하였을 때, 유의미한 차이를 나타내지 않아 경제적인 조건을 선택하였으며 배양 배지의 FBS 함량은 5%, 처리 배지의 FBS는 2%로 최적화하였다(Fig. 4). 또한 STX의 세포독성의 경우 367~94,095 fg/μ l 농도로 처리한 결과 STX를 처리하지 않은 대조

군과 유의미한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4).

1.3. Ouabain/Veratridine 처리 조건 확립

Neuro-2a assay의 원리는 나트륨-칼륨 펌프 억제제인 Ouabain

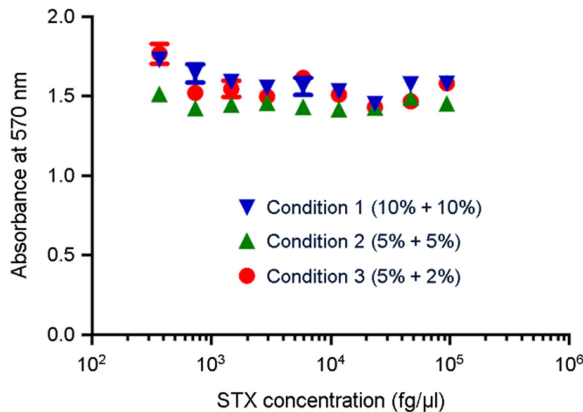


Fig. 4. Optimization of FBS concentration and evaluation of STX cytotoxicity. Neuro-2a cells were seeded in 96-well plate at 40,000 cells/well with culture medium for 24 hours and treated STX in the treatment medium for 24 hours under 5% CO₂ at 37°C, and absorbance was measured by MTT assay. The FBS content of the culture medium and STX treatment medium for each condition is as follows. Condition 1; culture medium with 10% FBS and treatment medium with 10% FBS. Condition 2; culture medium with 5% FBS and treatment medium with 5% FBS. Condition 3; culture medium with 5% FBS and treatment medium with 2% FBS.

(O)과 나트륨 채널 활성제 Veratridine (V)을 처리하여 과도한 Na⁺의 유입으로 세포가 사멸하도록 유도한 후, 나트륨 채널 억제제로 작용하는 독소(예; STX)를 처리하였을 때 세포가 생존하는 것을 확인하여 독소의 함유 여부를 평가하는 원리이다. 따라서 세포가 사멸하는 O/V의 농도를 찾기 위한 실험을 수행하였다. O/V 농도 실험은 세포의 계대배양 횟수(cell passage #)가 높은 세포와 비교적 낮은 세포를 비교하였다. 먼저 높은 계대배양 횟수 (passage # 236)의 세포는 O/V 농도 200/20 μM에서부터 대부분의 세포사멸이 관찰된 반면, 낮은 계대배양 횟수 (passage # 195)의 세포에서는 O/V 농도를 500/50 μM 이상 처리해야 실험 조건에 부합하는 세포사멸이 관찰되었다(Fig. 5(A)). 실제로 낮은 계대배양 횟수(195)를 지닌 N2a 세포주를 이용해서 STX와 O/V 농도를 각각 260/26 μM, 500/50 μM을 처리하였을 때 낮은 O/V 농도에서는 세포사멸 효과가 거의 일어나지 않았다(Fig. 5(B)). 이를 통해 세포의 계대배양 횟수가 실험에 영향을 주는 것으로 판단되어 O/V 농도를 두 조건 모두에서 세포사멸을 유발하는 500/50 μM로 설정하고, 계대배양 횟수가 195~235에 해당하는 세포를 사용하는 것으로 확립하였다.

1.4. STX 처리 농도 조건 확립

PSP 표준독소로서 STX의 처리 농도를 설정하였다. 앞서 설정한 O/V를 세포가 80% 이상 사멸하는 농도(500/50 μM)로 처리하고 STX 농도는 문헌을 참고하여 3~188,222 fg/μl 사이의 17개 농도로 설정하여 24시간 동안 처리하였다. 처리 조건이나 흡광도를 측정하는 과정은 전 실험과 동일하게 진행하였다. 두 번의 반복 실험 결과를 바탕으로, 17개 농도의 흡광도를 측정하여 용량-반응 그래

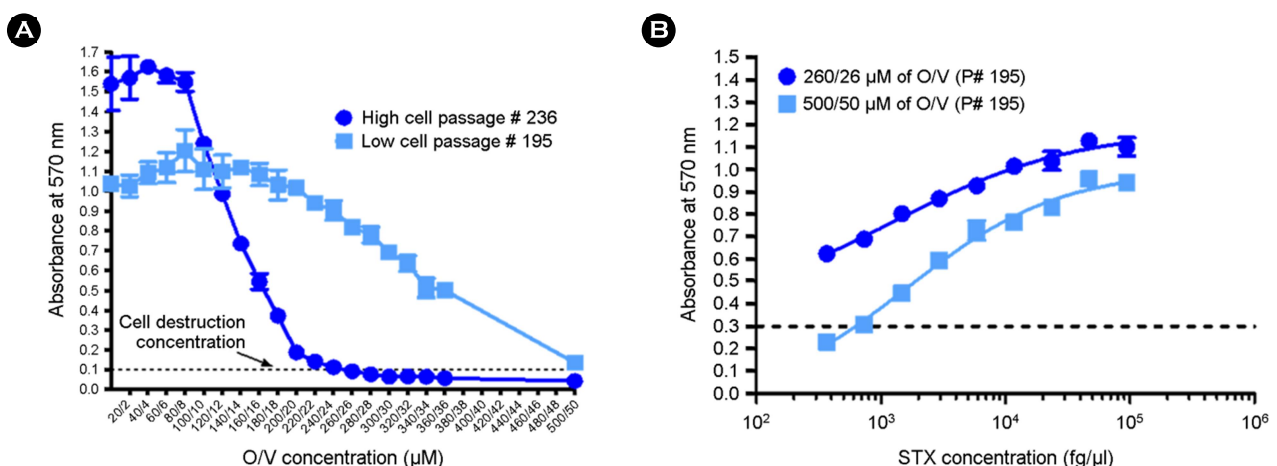


Fig. 5. Establishment of O/V concentration according to the number of cell passages. (A) As the result of O/V treatment by cell passage #, the circle symbol on the graph shows the result of high cell passage # (236) and the square symbol shows the result of cell line with low cell passage # (195). (B) The result of Neuro-2a assay of STX by setting the O/V concentration to 260/26 μM and 500/50 μM, respectively, for cell lines with low cell passage (P# 195).

프로 나타내고 EC_{50} 을 산출할 수 있는 S자형 모델이 나오는 8개의 농도 구간인 368~47,056 fg/μl를 처리 농도로 설정하였다. 두 실험을 통해 도출된 EC_{50} 값은 각각 3,445 fg/μl과 3,945 fg/μl이었다(Fig. 6).

2. Neuro-2a assay의 변동성 비교 실험

본 논문에서 적용한 STX 검출용 Neuro-2a assay는 Viallon et al. (2020) 등의 시험법 표준화 연구에서 제시된 방법을 참고하여, 앞서 수행된 조건 확립 실험을 통해 국내 환경에 맞게 최적화된 시험법을 변동성 비교 실험에 적용하였다. 향후 MBA 시험법의 대체 시험법으로서 활용성 제고를 위해 실험실 간 결과들의 재현성 및 반복성을 파악하기 위해서는 변동성 비교 연구가 필수적이다. 비교를 위한 매개변수들은 Viallon et al. (2020) 등이 사용한 5가지의 Quality Control 및 EC_{50} 값을 비롯한 6가지 데이터 등을 분석하였다.

2.1. Neuro-2a assay의 실험실 내(Intra-lab) 변동성 비교 연구

먼저 실험실 내(Intra-lab) 변동성 비교를 위해, STX 표준독소를 사용하여 동일 실험실의 3명의 실험자가 동일한 날짜에 실험을 실시하였다. 실험은 앞서 확립한 조건들을 토대로 진행하여 용량-반응 그래프를 확보하였으며, 추가적인 매개변수들의 값을 도출하였다(Fig. 7, Table 1). 실험실 내 실험 결과를 토대로 Neuro-2a assay의 2가지 기준(Criteria)을 설정하였다(Table 1).

첫 번째 Quality control criteria는 각각 Reference Cell Viability (RCV), viability controls (C) without and under O/V treatment (COV, COV⁺), quality control (QC) without and under O/V treatment (QCOV⁻, QCOV⁺)이다. 각 매개변수들에 대한 실험실 내 변동성 비교를 실시한 결과, 시험자간 결과값들의 CV% 값들이 2.91~11.76%로 반복성이 높은 것을 확인하였고, 이 값들의 평균값과 참고한

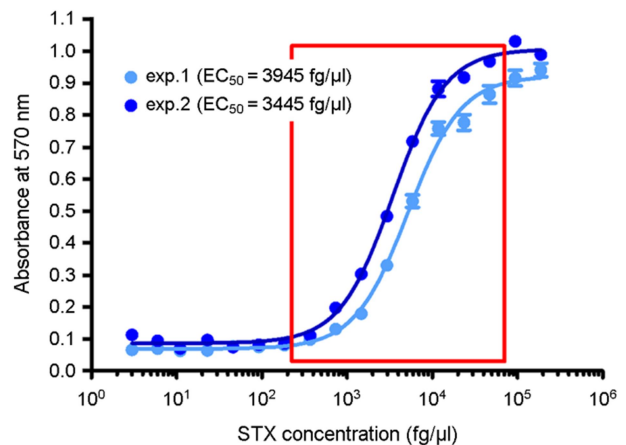


Fig. 6. Establishment of the STX concentration range applying to Neuro-2a assay. Results by treatment of 3~188,222 fg/μl of STX at an O/V concentration of 500/50 μM. Eight concentrations (368~47,056 fg/μl) were selected for which the concentration-response graph exhibited a sigmoidal shape for the calculation of EC_{50} values. Each experimental data set was conducted in triplicate.

Table 1. Results of intra-laboratory Neuro-2a assay for criteria setting experiments

Criteria			Researcher			Mean	SD	CV%
			Lab 1-1	Lab 1-2	Lab 1-3			
Quality control criteria	RCV	≥ 0.9	1.150	1.230	1.180	1.187	0.040	3.41
	COV ⁻	≥ 0.9	1.335	1.411	1.352	1.366	0.040	2.91
	COV ⁺	≤ 0.3	0.253	0.226	0.241	0.240	0.014	5.68
	QCOV ⁻	≥ 0.9	1.242	1.387	1.333	1.321	0.073	5.53
	QCOV ⁺	–	0.472	0.586	0.493	0.517	0.061	11.76
Data criteria	Bottom OD	≤ 0.3	0.217	0.242	0.223	0.227	0.013	5.56
	Top OD	≥ 0.9	0.969	1.000	0.985	0.985	0.015	1.56
	EC_{50} (fg/μl)	2982±523	2921.0	2710.0	2954.0	2861.7	132.380	4.63
	EC_{20} (fg/μl)	Viallon et al., 2020 1195±123	924.8	1179.0	1137.0	1080.3	136.266	12.61
	HillSlope	1.545±0.127	1.205	1.665	1.452	1.441	0.230	15.98
	R ²	≥ 0.85	0.991	0.996	0.993	0.993	0.003	0.28

문헌(Viallon et al. (2020))의 값들을 참고하여 기준치(Criteria)를 설정하였다(Table 1). RCV는 40,000 cells/well로 세포접종 24시간 뒤 초기 세포 생존율을 나타내며 흡광도(570 nm) 값이 0.9 이상일 경우 충족한다. COV⁻는 STX를 처리하지 않고 O/V의 24시간 처리에 의한 세포사멸을 의미하므로 분석 결과의 흡광도 최대값의 20% 보다 작은 경우인 흡광도 0.3 이하의 값을 기준으로 한다. COV⁻의 경우 초기 세포 생존율의 보존을 의미하는 기준으로 RCV 값

의 기준인 0.9 이상인 경우를 기준으로 한다. QCOV⁺는 Neuro-2a assay를 진행하였을 때 EC₅₀ 값을 나타내는 독소(STX)의 농도를 처리하는 기준으로 그 값이(0.2 x RCV 흡광도 값 + 0.8 x COV⁺ 흡광도 값)과 (0.8 x RCV 흡광도 값 + 0.2 x COV⁺ 흡광도 값) 사이로 나타날 경우 기준치를 충족하는 것으로 한다. 마지막으로 QCOV⁻는 O/V의 처리 없이 STX만 처리한 결과로 처리한 STX 농도로는 세포사멸이 일어나지 않기 때문에 기준치를 RCV와 동일하게 0.9

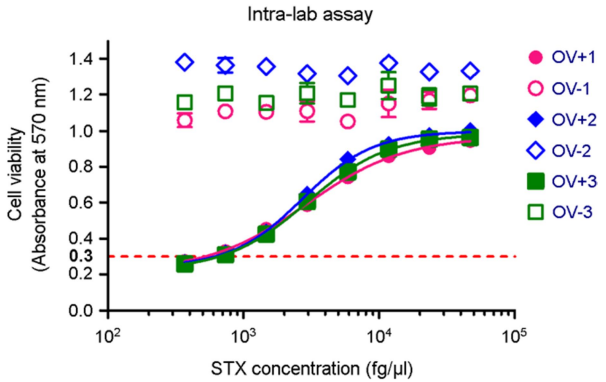


Fig. 7. Dose response curve from Intra-lab Neuro-2a assay for criteria setting experiment. Based on the established parameters, three researchers (1, 2, and 3) in a laboratory conducted the Neuro-2a assay under the same conditions. Cell passage number was 216. Neuro-2a cells were exposed to eight concentrations of STX standard for 24 hours, in without OV (OV⁻) and with OV (OV⁺) conditions at 500/50 μM. Data represent the mean ± SD in triplicate.

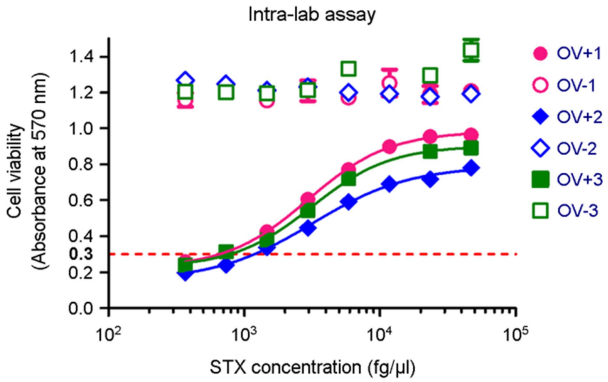


Fig. 8. Dose response curve from Inter-lab Neuro-2a assay for criteria setting experiment. Based on the established parameters, each researchers in three laboratories (1, 2, and 3) conducted the Neuro-2a assay under the same conditions. Cell passage numbers were 216~223. Neuro-2a cells were exposed to eight concentrations of STX standard for 24 hours, in without OV (OV⁻) and with OV (OV⁺) conditions at 500/50 μM. Data represent the mean ± SD in triplicate.

Table 2. Results of inter-laboratory Neuro-2a assay for criteria setting experiments

Criteria			Laboratory			Mean	SD	CV%
			Lab 1	Lab 2	Lab 3			
Quality control criteria	RCV	≥ 0.9	1.180	1.100	1.18	1.153	0.046	4.00
	COV ⁻	≥ 0.9	1.352	1.310	1.209	1.290	0.074	5.70
	COV ⁺	≤ 0.3	0.241	0.141	0.176	0.186	0.051	27.28
	QCOV ⁻	≥ 0.9	1.333	1.162	1.155	1.217	0.101	8.29
	QCOV ⁺	–	0.493	0.347	0.382	0.407	0.076	18.75
Data criteria	Bottom OD	≤ 0.3	0.223	0.153	0.227	0.201	0.042	20.84
	Top OD	≥ 0.9	0.985	0.892	0.904	0.894	0.097	10.85
	EC ₅₀ (fg/μl)	2982±523	2954.0	3194.0	3162	3103.3	130.312	4.20
	EC ₂₀ (fg/μl))	Viallon et al., 2020 1195±123	1137.0	1024.0	1262	1141.0	119.050	10.43
	HillSlope	1.545±0.127	1.452	1.218	1.51	1.393	0.155	11.09
	R ²	≥ 0.85	0.993	0.995	0.985	0.991	0.005	0.52

이상으로 한다.

또한 Neuro-2a assay가 제대로 수행된 것인지 판단할 수 있는 기준치인 6개의 Data 기준치(criteria) 설정을 위해, 표준독소인 STX를 처리하여 확보된 용량-반응 곡선에서 EC_{50} 값, EC_{20} 값, 가장 낮은 OD 값, 가장 높은 OD 값, 그래프의 기울기 및 R^2 값을 도출하였다. 각 Data의 시험자간 CV% 값을 비교한 결과, 0.28~15.98%로 도출되었고, 특히 중요한 Data인 EC_{50} 값의 CV%가 4.63%로 시험의 반복성이 높음을 확인할 수 있었다. 이들 결과값들의 최소값, 최대값 등을 이용하여 최적의 Data 기준치를 설정하였다(Table 1).

2.2. Neuro-2a assay의 실험실 간(Inter-lab) 변동성 비교 연구

다음은 실험실 내(intra-lab) 실험 결과를 토대로 설정한 Quality control criteria 및 Data criteria 값들의 적정성을 평가하기 위해, 실험실 간(inter-lab) 실험 결과들의 변동성을 확인하고자 하였다. 이를 위해, STX 표준독소를 사용하여 3개의 다른 기관의 실험실에서 1명의 실험자가 실험을 실시하였다(Fig. 8, Table 2).

각 Quality control들에 대한 실험실 간 변동성 비교를 실시한 결과, 실험실 간 결과값들의 CV% 값들이 4.00~27.28%로 도출되었고, 각 Data 값들의 CV% 역시 0.52~20.84%로 실험실이 다른 조건에서 수행했음에도 불구하고 Neuro-2a assay 시험의 재현성이 높음을 확인할 수 있었다(Table 2).

특히 inter-lab 실험의 결과값들이 intra-lab 변동성 실험에서 설정한 각 매개변수들의 기준치(Criteria)의 범주에 모두 충족하여, 설정된 기준치(Criteria) 값들이 적절함이 검증되었다(Table 2).

고 찰

수산물 중 PSP의 검출을 위한 방법으로 다양한 생물 기반 평가 기술이 적용되고 있다(Egmond, 2004). MBA는 분석법이 빠르고, 간섭이 적으며, 정량적이라는 장점으로 지금까지도 PSP의 검출법으로 사용되고 있으나(Munday et al., 2013), 낮은 민감도와 많은 동물을 희생해야 하는 윤리적인 문제로 대체 시험법 개발의 필요성은 지속적으로 증가하고 있다(Jellett et al., 1992; Ledreux et al., 2009; Sérandour et al., 2012; Aballay-Gonzalez et al., 2016). 따라서, 본 연구에서는 Viallon et al. (2020)이 제시한 표준화된 Neuro-2a assay 방법을 참고하여 국내에 적용할 수 있도록, 초기 세포밀도, 배지의 조성, Ouabain/Veratridine 처리 조건, STX 처리 조건 등 독소 표준품을 통해 시험법을 최적화 후 실험실 간 변동성 비교 분석을 통해 시험법의 반복성 및 재현성을 평가한 후, 시험법의 적정성을 검증할 수 있는 5가지 Quality Control 및 6가지 Data 기준(Criteria)들을 설정함으로써, 향후 수산물 중 PSP 검출 시험법으로서 활용 가능성을 제고하고자 하였다.

먼저 Neuro-2a assay의 실험 조건들이 최적화되었다. 첫째, 세포 접종은 96 well-plate 기준 1개의 well의 최대밀도인 100,000 cells/well로 배양하기 위해 초기 접종 세포는 40,000 cells/well 농도로 24시간 배양하는 조건으로 확립되었다(Fig. 3). 이때 MTT 처리 후 측정된 흡광도 값(570 nm)이 RCV 대조군로 정의되며 이 값이 0.9 이상의 결과가 나와야 적정성을 얻는다. 이 때 세포계수는 20×10^4 cells/ml보다 낮은 경우 0.9 이하로 측정되는 경우가 종종 발생하여, $20 \sim 22.5 \times 10^4$ cells/ml로 계수하여 접종하는 것으로 확립하였다. 본 연구와 달리 Viallon et al. (2020)은 50,000 cells/well로 22시간 배양하는 조건으로 설정하였는데, 이외에도 문헌마다 다른 세포접종 밀도를 사용하기 때문에(Manger et al., 1993; Lewis et al., 2016; Hardison et al., 2016; Pisapia et al., 2017) 실험실 조건에 따라 세포 성장률 확인 실험이 필요함을 시사한다.

두 번째로 고려된 조건은 배양 배지 및 처리 배지의 조성이었다. 실험 결과로부터 FBS 조성(10, 5, 2%)에 따라 RCV, COV 및 STX 독성이 크게 달라지지 않음을 확인할 수 있었고, 이에 FBS의 절약을 위해 5% FBS가 함유된 배양 배지 및 2% FBS가 함유된 처리 배지를 사용하는 것이 Neuro-2a assay 전체에 걸쳐 세포 생존율을 안정화하기에 충분하다고 판단되었다(Fig. 4).

셋째, Ouabain/Veratridine (O/V) 처리 조건은 0/0~500/50 μ M 사이의 농도를 처리하여 세포가 80% 이상 사멸하는 농도를 설정하였다. 이 때 계대배양 횟수가 높았을 때 진행했던 실험에서 260/26 μ M의 농도를 처리하였을 때 80% 이상 세포가 사멸하였지만, 계대배양 횟수가 낮은 세포의 경우 효과가 거의 없었고 500/50 μ M로 처리해야 80% 이상 사멸하는 결과가 나타났다(Fig. 5). 260/26 μ M과 500/50 μ M 농도로 O/V를 처리 후 Neuro-2a assay를 수행한 결과, 낮은 Passage 세포에서 260/26 μ M 농도는 효과가 부족한 것으로 확인되었다. 다른 문헌들에서 사용한 O/V 농도를 조사한 결과, Viallon et al. (2020)은 270/27~300/30 μ M를 사용했고, Jellett et al. (1992)이 본 연구와 동일하게 500/50 μ M를 사용하였다. 이들 문헌들 중 세포 계대배양 횟수를 고려하여 O/V의 농도를 설정한 정보는 제공되지 않았다. 따라서, 세포 계대배양 횟수에 따른 O/V 독소의 효과 차이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 결과는 제시되지 않았지만, Viallon et al. (2020)도 고찰에서 언급한 바와 같이 세포접종 24시간 후에 기존의 배양 배지를 모두 제거하고 OV 및 독소를 포함한 처리 배지를 새로 추가하는 것이 OV의 처리 효율성에 도움이 된다는 것을 본 연구에서도 확인할 수 있었다(Manger et al., 1993).

넷째, STX 처리 조건은 EC_{50} 값을 산출할 수 있도록 STX 독소와 흡광도의 용량-반응 그래프가 S자 형태를 나타내는 농도 범위를 설정해야 한다(Viallon et al., 2020; Aballay-González et al., 2020). 이에 STX 표준독소를 3~188,222 fg/ μ l 사이 17가지 농도를 처리하여 3반복씩 총 2회 실험 진행한 결과, 용량-반응 그래프가 S자 형태 나타나는 368~47,056 fg/ μ l 범위의 8개 농도로 선정하였다(Fig. 6).

Neuro-2a assay의 최근 연구 동향에서는 데이터의 정확성을 평가할 수 있는 기준 및 조건들을 설정하여 시험법을 표준화하려는 노력이 지속되고 있다(Dechraoui et al., 2005; Ledreux et al., 2009; Caillaud et al., 2012; Viallon et al., 2020). 본 연구에서 역시 확립된 실험 조건들을 바탕으로 STX 표준물질을 이용하여 N2a assay를 진행하고 실험의 정확성을 위한 5가지 Quality Control 기준을 제시하고자 하였다. 배양 후 초기 세포 생존율을 나타내는 RCV 대조군, O/V 처리가 80% 이상의 세포사멸 효과를 나타내는지 확인할 수 있는 COV⁺ 대조군, 배지조성이 달라진 후 초기 세포 생존율이 유지되는 것을 확인할 수 있는 COV⁻ 대조군, O/V와 STX를 혼합하여 처리하여 독성을 확인하는 QCOV⁺ 대조군, O/V 처리 없이 STX만을 처리하였을 경우 초기 세포 생존율이 유지되는지 확인하는 QCOV⁻ 대조군을 5가지 기준으로 한다(Table 1). 기존에 보고된 Neuro-2a assay의 데이터는 세포 생존율을 백분율(%)로 나타내었으나(Pawlowicz et al., 2013; Nicolas et al., 2015; Aballay-Gonzalez et al., 2016), Viallon et al. (2020)이 제안한 순 흡광도 값을 이용하고 이 값의 적정성을 RCV 대조군을 통해 제어함으로써 실험실 간 오차를 줄이고 시험법을 표준화하기 수월해지는 장점이 있다. 각 Quality Control 기준치는 실험실 내 및 실험실 간 변동성 비교 실험을 통해 적절한 범위를 결정하였으며, 값은 Table 1에 제시되었다.

Neuro-2a assay의 민감도를 결정하는 값은 EC₅₀ 값이다. 이전에 보고된 STX의 EC₅₀ 값은 Viallon et al. (2020)이 2982 ± 523 fg/μl로 도출하였고, 500/50 μM O/V 처리 조건에서 8.5 nM (Aballay-González et al., 2020)과 4 nM (Humpage et al., 2007)로 도출한 바 있다. 이는 본 연구의 실험실 내 결과인 2861.7 ± 132 fg/μl (3.42 nM)와 매우 유사하였다(Table 1).

확립된 시험법으로 수행된 Neuro-2a assay의 용량-반응 곡선의 주요 결과값들에 대해 반복성이나 재현성을 확인하기 위해 실험실 내 및 실험실 간 변동성 비교 실험을 수행하였다. 그 결과 EC₅₀ 값의 CV값은 각각 4.63%, 4.20%로 나타났으며 이는 기능 테스트에 허용되는 값으로 간주된다. 일반적으로 최대 30% 이내의 변동성이 인정되며(Van Dolah et al., 2009, 2012; Díaz-Asencio et al., 2018), 나머지 항목들도 모두 30% 이내의 변동성을 지님을 확인하였다.

본 연구는 PSP 중 STX 검출법으로 기존에 진행중인 MBA를 대체할 시험법 확립 연구로써 Neuro-2a assay를 국내 연구 환경에 맞게 세포밀도, 배양 조건 및 처리 조건과 같은 다양한 시험 조건들을 확립하고 시험의 적정성을 판단할 수 있는 5가지 Quality control 기준과 Data 기준을 제시하였으며, 실험실 변동성 연구를 통해 반복성 및 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다. 향후 국내 수산물에 대상으로 PSP를 검출하기 위한 대체 시험법으로 적용하기 위해서는 Neuro-2a assay에 적용할 수 있는 수산물 중 독소 추출법을 확립하고, 다양한 종들에 대한 적용을 통해 독소 정량 방법을 확립하고, MBA와 기기 분석법과의 상관성 분석을 수

행함으로써, 시험법의 한계점을 파악하고 해결하는 연구가 필수적으로 이루어져야 할 것이다.

사 사

본 연구는 2023년도 식품의약품안전처의 연구개발비(20163-MFDS641)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Aballay-Gonzalez A, Ulloa V, Rivera A, Hernández V, Silva M, Caprile T, Delgado-Rivera L, Astuya A. 2016. Matrix effects on a cell-based assay used for the detection of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish samples. *Food Additives & Contaminants: Part A* 33: 869-875.
- Aballay-González A, Gallardo-Rodríguez JJ, Silva-Higuera M, Rivera A, Ulloa V, Delgado-Rivera L, Rivera-Belmar A, Astuya A. 2020. Neuro-2a cell-based assay for toxicity equivalency factor-proposal and evaluation in Chilean contaminated shellfish samples. *Food Additives & Contaminants: Part A* 37: 162-173.
- Association of Analytical Communities (AOAC). 2000. AOAC Official Method 959.08. Paralytic shellfish poison, biological method. Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Caillaud A, Eixarch H, de la Iglesia P, Rodriguez M, Dominguez L, Andree KB, Diogène J. 2012. Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatera-like toxicity detection in fish: Application to fish caught in the Canary Islands. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29: 1000-1010.
- Catterall WA, Nirenberg M. 1973. Sodium uptake associated with activation of action potential ionophores of cultured neuroblastoma and muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 3759-3763.
- David LS, Nicholson RA. 2004. Quantitation of paralytic shellfish toxins using mouse brain synaptoneurosomes. *Chemosphere* 55: 1315-1321.
- Dechraoui MY, Tiedeken JA, Persad R, Wang Z, Granade HR, Dickey RW, Ramsdell JS. 2005. Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: Application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon* 46: 261-270.
- Díaz-Asencio L, Clausing RJ, Rañada ML, Alonso-Hernández CM, Dechraoui Bottein MY. 2018. A radioligand receptor binding assay for ciguatoxin monitoring in environmental samples:

- Method development and determination of quality control criteria. *Journal of Environmental Radioactivity* 192: 289-294.
- Diogène J, Rambla M, et al. 2021. Evaluation of ciguatoxins in seafood and the environment in Europe. *EFSA Supporting Publications* 18: 6648E.
- Egmond HP. 2004. Marine biotoxins. Vol. 80. Food & Agriculture Organization.
- European Commission. 2011. COMMISSION REGULATION (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. *Official Journal of European Community* 6: 4.
- Han M-S, Jeon J-K, Kim Y-O. 1992. Occurrence of dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, a causative organism of paralytic shellfish poisoning in Chinhae Bay, Korea. *Journal of plankton research* 14: 1581-1592.
- Hardison DR, Holland WC, McCall JR, Bourdelais AJ, Baden DG, Darius HT, Chinain M, Tester PA, Shea D, Quintana HA, Morris JA Jr, Litaker RW. 2016. Fluorescent Receptor Binding Assay for Detecting Ciguatoxins in Fish. *PLoS ONE* 11: e0153348.
- Humpage AR, Ledreux A, Fanok S, Bernard C, Briand JF, Eaglesham G, Papageorgiou J, Nicholson B, Steffensen D. 2007. Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: Interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1512-1519.
- Jaim E, Hummert C, Hess P, Luckas B. 2001. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 929: 43-49.
- Jang JH, Yun SM, Lee JS. 2005. Paralytic shellfish poison profile in commercial shellfishes. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 34: 924-928.
- Jellett JF, Marks LJ, Stewart JE, Dorey ML, Watson-Wright W, Lawrence JF. 1992. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: automated endpoint determination and standardization of the *in vitro* tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. *Toxicon* 30: 1143-1156.
- Jellett JF, Roberts RL, Laycock MV, Quilliam MA, Barrett RE. 2002. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert™, a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC® mouse bioassay. *Toxicon* 40: 1407-1425.
- Kogure K, Tamplin ML, Simidu U, Colwell RR. 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon* 26: 191-197.
- Ledreux A, Krys S, Bernard C. 2009. Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon* 53: 300-308.
- Lewis RJ, Inserra M, Vetter I, Holland WC, Hardison DR, Tester PA, Litaker RW. 2016. Rapid extraction and identification of maitotoxin and ciguatoxin-like toxins from Caribbean and Pacific Gambierdiscus using a new functional bioassay. *PLoS ONE* 11: e0160006.
- Louzao MC, Rodriguez Vieytes M, Garcia Cabado A, Vieites Baptista De Sousa JM, Botana LM. 2003. A fluorimetric microplate assay for detection and quantitation of toxins causing paralytic shellfish poisoning. *Chemical Research in Toxicology* 16: 433-438.
- Manger RL, Leja LS, Lee SY, Hungerford JM, Wekell MM. 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: Semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. *Analytical Biochemistry* 214: 190-194.
- Munday R, Thomas K, Gibbs R, Murphy C, Quilliam MA. 2013. Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration. *Toxicon* 76: 77-83.
- Nam KT, Oh SJ. 2021. Influence of Water Temperature and Salinity on the Production of Paralytic Shellfish Poisoning by Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Group I). *Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety* 27: 119-126.
- Nicolas J, Hendriksen PJ, Gerssen A, Bovee TF, Rietjens IM. 2014a. Marine neurotoxins: State of the art, bottlenecks, and perspectives for mode of action based methods of detection in seafood. *Molecular Nutrition & Food Research* 58: 87-100.
- Nicolas J, Hendriksen PJ, van Kleef RG, de Groot A, Bovee TF, Rietjens IM, Westerink RH. 2014b. Detection of marine neurotoxins in food safety testing using a multielectrode array. *Molecular Nutrition & Food Research* 58: 2369-2378.
- Nicolas J, Bovee TF, Kamelia L, Rietjens IM, Hendriksen PJ. 2015. Exploration of new functional endpoints in neuro-2a cells for the detection of the marine biotoxins saxitoxin, palytoxin and tetrodotoxin. *Toxicology in Vitro* 30: 341-347.
- Pawlowicz R, Darius HT, Cruchet P, Rossi F, Caillaud A, Laurent D, Chinain M. 2013. Evaluation of seafood toxicity in the Australes archipelago (French Polynesia) using the neuro-

- blastoma cell-based assay. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30: 567-586.
- Pisapia F, Holland WC, Hardison DR, Litaker RW, Fraga S, Nishimura T, Adachi M, Nguyen-Ngoc L, Séchet V, Amzil Z, Herrenknecht C, Hess P. 2017. Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. *Harmful Algae* 63: 173-183.
- Quilliam MA, Hess P, Dell'Aversano C. 2001. Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. pp. 383-391. In: *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium*. de Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, & Sabino M (eds). Wageningen, The Netherlands.
- Schantz EJ, McFarren EF, Schafer ML, Lewis KH. 1958. Purified shellfish poison for bioassay standardization. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists* 41: 160-168.
- Sérandour AL, Ledreux A, Morin B, Derick S, Augier E, Lancelleur R, Hamlaoui S, Moukha S, Furger C, Biré R, Kryz S, Fessard V, Troussellier M, Bernard C. 2012. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part I: Screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403: 1983-1993.
- Song KC, Lee KJ, Yu HS, Mok JS, Kim JH, Lim K-S, Lee M-A. 2013. Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) Analysis using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46: 154-159.
- Sullivan JJ. 1988. Methods of analysis for DSP and PSP toxins in shellfish: a review. *Journal of Shellfish Research* 7: 587-595.
- Turner AD, Hatfield RG, Maskrey BH, Algoet M, Lawrence JF. 2019. Evaluation of the new European Union reference method for paralytic shellfish toxins in shellfish: A review of twelve years regulatory monitoring using pre-column oxidation LC-FLD. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 113: 124-139.
- Turner AD, Dhanji-Rapkova M, Fong SYT, Hungerford J, McNabb PS, Boundy MJ, Harwood DT; Collaborators. 2020. Ultrahigh-performance hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the determination of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin in mussels, oysters, clams, cockles, and scallops: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 103: 533-562.
- Van Dolah FM, Leighfield TA, Doucette GJ, Bean L, Niedzwiedek B, Rawn DF. 2009. Single-laboratory validation of the microplate receptor binding assay for paralytic shellfish toxins in shellfish. *Journal of AOAC International* 92: 1705-1713.
- Van Dolah FM, Fire SE, Leighfield TA, Mikulski CM, Doucette GJ. 2012. Determination of paralytic shellfish toxins in shellfish by receptor binding assay: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 95: 795-812.
- Viallon J, Chinain M, Darius HT. 2020. Revisiting the neuroblastoma cell-based assay (CBA-N2a) for the improved detection of marine toxins active on voltage gated sodium channels (VGSCs). *Toxins* 12: 281.
- Wekell JC, Hurst J, Lefebvre KA. 2004. The origin of the regulatory limits for PSP and ASP toxins in shellfish. *Journal of Shellfish Research* 23: 927-930.