

테트로도톡신 검출을 위한 Neuro-2a 시험법의 시험 매개변수 최적화 및 실험실 간 검증 연구

박정인^{1,2‡} · 김준^{1,3‡} · 홍시윤¹ · 김영진^{1,2,4} · 박현⁵ · 한영석^{4*} · 김연정^{1,2*}

¹인천대학교 해양학과, ²인천대학교 기초과학연구소,
³한양대학교 생명과학부, ⁴㈜엔이비, ⁵고려대학교 생명공학부

Optimization of Test Parameters and Interlaboratory Validation of Neuro-2a Assay for the Detection of Tetrodotoxin

Jeong-In Park^{1,2‡}, Jun Kim^{1,3‡}, Si-Yun Hong¹, Youngjin Kim^{1,2,4}, Hyun Park⁵, Young-Seok Han^{4*}, Youn-Jung Kim^{1,2*}

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

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

³Department of Life Science, Hanyang University, Seoul, Korea

⁴NEB Co., Seoul, Korea, ⁵Division of Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea

(Received October 21, 2024/Accepted October 25, 2024)

ABSTRACT - Tetrodotoxin (TTX) is a potent marine-derived neurotoxin. Existing detection methods for TTX, such as mouse bioassay (MBA) and LC-MS/MS, are limited by ethical concerns, and low detection thresholds, particularly in the absence of reference standards. Alternative testing methods are thus critically needed. The Neuro-2a assay is a well-established cell-based assay that uses mouse-derived Neuro-2a cells treated with ouabain (O) and veratridine (V), to induce cell death via excessive Na⁺ influx. This assay quantitates TTX based on its ability to inhibit Na⁺ influx, thereby allowing the cells to survive. In this study, we optimized parameters including TTX treatment conditions and O/V concentrations, to adapt the Neuro-2a assay for domestic laboratory conditions. The optimal O/V concentrations were determined to be 600/60 μM. We also identified eight concentration points (50-0.195 ng/mL) that generated a sigmoidal dose-response curve. By conducting 24 replicate experiments, we established six key data criteria to ensure reliability, with EC₅₀ values ranging from 3.824 to 1.268 ng/mL. A comparison of inter-laboratory variability revealed that all quality control and data criteria values, except for COV⁺ and Bottom OD, showed coefficients of variation (CVs) ranging from 1.31 to 14.92%, confirming the assay's accuracy and reproducibility. In this study, we also elucidate optimal assay conditions, validated quality control and data criteria for TTX detection using the Neuro-2a assay in local laboratories. Additionally, we conducted an assay with 4,9-anhydroTTX, a TTX analog, and determined a TEF value of 0.2098, demonstrating the applicability of this method for detecting TTX and its analogs. This optimized Neuro-2a assay is expected to serve as an effective alternative to MBA for detecting TTX in domestic seafood products.

Key words: Tetrodotoxin, Neuro-2a assay, Alternative test, Interlaboratory comparison, Toxic equivalency factor

‡These authors contributed equally to this work.

*Co-Correspondence to : Youn-Jung Kim, Department of Marine Sciences, Incheon National University, Incheon, 22012, Korea

Tel: +82-32-835-8861, Fax: +82-32-835-0806

E-mail: duckyj@inu.ac.kr

*Co-Correspondence to : Young-Seok Han, NEB Co., Seoul, 08054, Korea

Tel: +82-2-6332-5714, Fax: +82-2-6005-9246

E-mail: neb.yshan@gmail.com

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지구 온난화로 인한 해양 환경 변화로 인해 전 세계적으로 다양한 유해 플랑크톤과 해양 생물 독소의 발생 사례가 증가하고 있으며¹⁾, 테트로도톡신(tetrodotoxin, TTX) 또한 주요 해양 독소로 주목받고 있다. 우리나라에서도 기후 변화로 인한 해양 환경 변화에 따라 TTX를 함유한 해양 생물의 출현 가능성이 증가하고 있으며, 이에 따른 인체 피해가 우려되고 있다. 특히, 파란고리문어(*Hapalochlaena* spp.)와 같은 고위험 생물의 출현 가능성이 증가하고 있으며, 최근 국내 일부 해역에서는 TTX를 함유한 복족류 및 두족류에서 독소가 검출된 사례가 보고되었다^{2,3,4,5)}. 국내 연구에 따르면, 복족류인 성게고둥(naticidae)과 두족류인 문어류에서 TTX가 검출된 바 있으며, 이는 전 세계적으로 TTX 함유 해양 생물의 서식지 확장 경향과 일치한다. 이러한 독성 생물의 서식 확장은 인체 건강과 해양 생태계에 잠재적인 위협을 초래하고 있으며, 체계적인 관리와 모니터링의 필요성이 강조된다.

TTX는 강력한 신경독으로, 지금까지 약 30여 종의 유사체(analogues)가 보고되고 있다⁶⁾. 주요 유사체로는 4-epi-TTX, 11-deoxyTTX, 5,6,11-trideoxyTTX, 6,11-dideoxyTTX, 4,9-anhydro-TTX 등이 있으며, 이들 유사체는 화학 구조에서 TTX와 유사한 변형을 보이면서도, 독성 강도와 작용 기전에서는 전압 의존성 나트륨 채널(voltage gated sodium channel, VGSC)을 차단하는 공통된 메커니즘을 공유한다⁷⁾. TTX와 그 유사체는 다양한 해양 및 육상 생물에서 복합적으로 존재하며, 이는 독성 평가와 검출에서 혼동을 초래할 수 있다. 따라서 유사체의 분석과 관리를 위해 정확한 이해와 표준 검출법의 정립이 요구된다⁸⁾.

국내에서 TTX가 처음으로 공식 보고된 사례는 1996년 부산 인근 해역에서 발생한 대규모 식중독 사건으로, 원인 생물은 복어(*Takifugu* spp.)로 확인되었다⁹⁾. 이후, 국립수산물시험원의 모니터링 결과, 특정 해역에서 복어류 및 일부 무척추동물에서 TTX의 지속적인 검출이 확인되었으며, 이는 주로 수온 상승 등 해양 환경 요인과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다⁴⁾. 국내에서 설정된 TTX의 검출 기준치는 2.0 mg/kg으로, 이는 일본의 기준치와 동일하다^{10,11)}. 유럽연합에서는 아직 구체적인 기준치를 명시하지 않았으나, 유럽식품안전청(European Food Safety Authority, EFSA)은 2017년에 TTX의 모니터링 필요성을 강조하며 0.044 mg/kg 이하를 안전한 한계로 제안한 바 있다¹²⁾.

TTX의 검출을 위한 기존 방법으로는 주로 mouse bioassay (MBA)가 사용되어 왔다. 그러나, 정밀도와 재현성의 한계 및 동물 윤리 문제로 인해 Liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS/MS)나 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)와 같은 화학적 분석법이 각광받고 있다¹³⁾. LC-MS/MS는 분석 정밀도와 효율성이 크게 향상되었으나, 모든 유사체에 대한 표준 독소 물질이 확보되지 않은 한계가 여전히 존재한다¹⁴⁾. 따라서 유사체를 포함한 다양한

독소에 대한 검출이 가능한 대체 시험법의 정립이 필요하다.

TTX는 VGSC에 선택적으로 결합하여 신경 세포막의 탈분극을 차단하고, 이를 통해 신경과 근육 기능을 억제하는 메커니즘을 가진다⁷⁾. 이러한 기전을 바탕으로, Kogure 등¹⁵⁾은 마우스 신경모세포종 세포주인 Neuro-2a 세포주를 이용한 접근법을 개발하였다. 이 방법은 ouabain (O)과 veratridine (V)을 함께 처리하여 세포 내 나트륨 농도를 조절하고, TTX에 의해 O/V 효과가 억제됨에 따라 세포의 생존율을 측정하는 방식이다. Jellett 등¹⁶⁾에 따르면, Neuro-2a assay를 통한 TTX 검출은 MBA에 비해 더 높은 민감도를 나타내었으며, 약 10 ng TTX eq./mL의 검출 한계를 보였다. 이는 MBA의 검출 한계인 40 g/100 g보다 민감도가 높다.

Neuro-2a assay는 기존의 MBA를 대체할 수 있는 세포 기반 분석법으로 연구되고 있으며, 최근 유럽을 중심으로 시구아톡신(ciguatoin)과 지용성 독소의 검출에도 활용 가능성이 높아지고 있다^{17,18)}. Viallon 등¹⁹⁾은 Neuro-2a assay의 표준화된 프로토콜의 중요성을 강조하며, 다양한 실험 조건에 대한 검토를 통해 참조 가능한 프로토콜을 제시하였다. 이와 같은 연구 동향을 바탕으로 Neuro-2a assay는 해양 생물 독소 검출을 위한 표준 시험법으로서의 가능성을 확인하고 있으며, 국내에서도 이를 도입하여 활용할 필요성이 대두되고 있다^{20,21)}. 이에 본 연구진은 마비성 패류독소(paralytic shellfish poison, PSP)인 삭시톡신(saxitoxin,STX) 검출을 위한 Neuro-2a assay의 최적 조건을 확립하고, 실험실간 비교 연구를 통해 STX 검출 방법으로서의 가능성을 확인한 바 있다²²⁾.

본 연구에서는 기 확립한 STX 검출용 세포 기반 분석법인 Neuro-2a assay를 활용하여 TTX 검출을 위한 배양 조건과 처리 조건을 국내 실험 환경에 맞게 최적화하고, 실험실 간 변동성을 분석하여 시험법의 적정성을 검증하였다. 또한 TTX 유사체인 4,9-anhydroTTX를 Neuro-2a assay에 적용하여 TTX 대비 독성등가치수(toxic equivalency factor, TEF) 값을 산출하였다. 이를 통해 기존 분석법의 한계를 극복하고, 보다 신뢰성 높은 TTX 검출법을 구축할 수 있는 조건을 제시하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 조제

TTX 표준물질(6.74 µg/mL)은 National Research Council Canada (NRC, Halifax, NS, Canada)에서 구매한 후, 70 µL 씩 소분한 뒤, -20°C에서 냉동보관하였다. 4,9-AnhydroTTX는 Alomone lab 사(Jerusalem, Israel)의 CRM을 구입하여 사용하였다. Ouabain octahydrate(O; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)는 멸균 3차 증류수에 용해하여 20 mM 농도로 제조한 뒤, 빛 차단을 위해 차광튜브에 600 µL씩

나누어 실온에서 보관하였다. Veratridine (V; Sigma Aldrich)은 pH 2로 조정된 멸균 3차 증류수로 용해하여 230 µL씩 소분 후, 냉동보관(-20°C) 하였다. MTT 시약은 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma Aldrich)를 5 mg/mL로 PBS에 녹인 후, 0.22 µm filter를 사용하여 여과한 뒤 4°C에서 냉장보관하였다. 모든 시약은 실험의 재현성과 정확성을 높이기 위해 철저히 관리되었다.

Neuro-2a assay 시험법 최적 조건 확립

Neuro-2a assay의 최적화 과정은 Kim 등²²⁾의 연구에서 확립된 STX 검출용 방법을 참조하여 진행되었다. 본 연구의 Neuro-2a assay는 3일에 걸쳐 세포 접종, 독소 처리, 흡광도 측정의 단계로 구성되었다(Fig. 1). 본 연구에서는 기존 배양 조건과 처리 조건을 바탕으로 TTX 검출을 위한 O/V 및 TTX 농도를 최적화하였다.

Neuro-2a 세포주 배양 및 흡광도 측정

사용된 Neuro-2a 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구입한 마우스 유래 신경모세포종 세포이다. 배양 배지는 RPMI 1640 (Gibco, Waltham, MA, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco), 1% Pen Strep (Gibco), 2 mM GlutaMAX (Gibco), 1% Sodium pyruvate (Gibco), 2.5 g/mL Amphotericin B (Gibco)를 첨가한 배지를 사용하였다. 세포는 일정 주기로 계대배양되었으며, 세포 밀도가 일정 기준 이상에 도달할 때마다 배양접시를 이용해 1:6 비율로 희석하여 37°C, 5% CO₂ 조

건에서 배양하였다. 또한 5% FBS 배지는 Seeding과정에 2% FBS 배지는 독소처리과정과 MTT 처리과정에서 사용하였다.

Neuro-2a assay를 위해서 70,000 cells/mL 농도의 세포를 96 well-plate에 접종을 하고 24시간 후 흡광도를 측정하여 초기 세포 생존율(reference cell viability, RCV) 값을 산출하였다. 흡광도 측정은 5 mg/mL농도의 MTT 시약을 45분간 37°C, 5% CO₂ 조건으로 처리 후 형성된 formazan을 100 µL dimethyl sulfoxide (DMSO) 용해시킨 후 흡광도를 측정하였다.

TTX 처리 농도 조건 확립

TTX 처리 농도 설정 실험에서는 기존 연구²³⁾ 자료를 기반으로 농도 범위를 설정하였다. 먼저 200-0.781 ng/mL 농도로 TTX 만 처리한 후 세포독성을 확인하였다. 이후 200-0.781 ng/mL, 100-0.0.391 ng/mL, 50-0.195 ng/mL 세가지 농도 범위를 각각 8개 단계로 설정하여 Neuro-2a assay를 실시하였다. Kim 등²²⁾이 제시한 방법을 따라, 모든 실험은 O/V를 세포 사멸 농도(600/60 µM)로 설정하여 수행되었다. 각 농도에서의 세포 생존율은 O/V 처리가 포함된 그룹(COV⁺)과 독소가 없는 그룹(COV⁻)으로 구분하여 비교되었다. 흡광도 값은 MTT 시약을 이용하여 측정하였으며, 이를 바탕으로 용량-반응 곡선을 생성하고 EC₅₀ 값을 도출하였다.

Ouabain/Veratridine(OV) 처리 조건 확립

Neuro-2a assay에서 TTX의 나트륨 채널 억제 효과를 평가하기 위해, Na⁺/K⁺ 펌프 억제제인 ouabain과 Na⁺ 채널

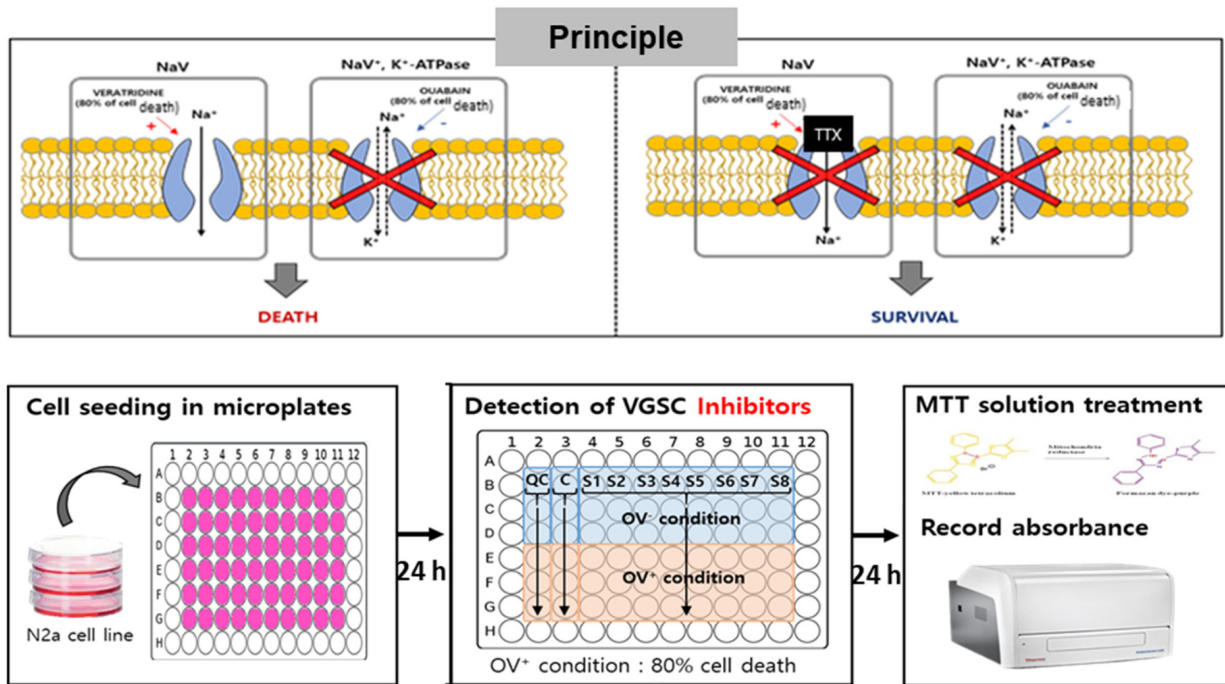


Fig. 1. Principle & process of Neuro-2a assay for tetrodotoxin (TTX) detection.

활성제 veratridine의 처리 농도를 조정하였다. 50 ng/mL의 TTX와 함께 O/V 농도를 600/60, 400/40, 200/100, 125/200 μ M 4가지 경우로 처리하여 24시간 이후의 흡광도를 측정해 80% 이상의 세포사멸과 TTX 농도에 따른 세포 생존을 확인하여 최적 O/V 처리 농도를 확립하였다.

TTX 검출용 Neuro-2a assay의 실험실 간 변동성 비교 실험

Neuro-2a assay의 TTX 검출 재현성을 검증하기 위해, 총 3개의 독립적인 실험실(Lab-1, 2, 3)을 선정하였다. 각 실험실은 연구의 모든 기술적 요구 사항을 수행할 수 있는 곳으로 선정되었다. 실험실 내 및 실험실 간 변동성 연구는 Neuro-2a 시험법의 숙련도 및 신뢰도 확보를 위한 quality control criteria 및 data criteria 확립을 목표로 수행하였다.

모든 실험실은 제공된 시료와 템플릿을 사용하여 동일한 실험 조건 하에 데이터를 수집하였다. 각 실험실에서 한 명의 실험자가 Neuro-2a assay를 3회 반복하여 실험을 수행하였으며, 실험 중 기록된 모든 데이터를 바탕으로 quality control 기준을 설정하였다. 실험실 내의 변동성을 평가하기 위해, 각 실험에서 24개의 microplate로부터 얻은 데이터(n=24)를 비교 분석하였고, 실험실 간의 변동성은 각 실험실에서 산출된 데이터(n=3)를 바탕으로 분석하였다.

Neuro-2a assay를 이용한 4,9-anhydroTTX의 TEF 확인

TTX 및 4,9-anhydroTTX를 50-0.195 ng/mL의 농도로 설정하여 Neuro-2a assay를 실시하였다. 각 독소들과 600/60 μ M의 O/V를 처리한 후 세포 생존율을 나타내는 흡광도 값을 측정하였으며, 이를 바탕으로 용량-반응 곡선을 생성하고 EC₅₀ 값을 도출하였다. TEF 값은 기준 독소인 TTX의 EC₅₀에 대한 유사체인 4,9-anhydroTTX의 EC₅₀의 비율로 계산하였다.

데이터 분석

각 실험실에서 수집된 데이터를 바탕으로, 용량-반응 곡선을 생성하고 평균값(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 계산하였다. 이러한 데이터는 quality control criteria를 설정하는 데 활용되었으며, 변동계수(coefficient of variation, CV%)를 통해 실험의 반복성(repeatability) 및 재현성(reproducibility)을 평가하였다. 데이터 분석은 GraphPad Software 5 (PRISM, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다.

Results and Discussion

TTX의 세포독성 결과

TTX의 세포독성의 경우 200-0.781 ng/mL 농도로 처리

한 결과, TTX를 처리하지 않은 대조군과 유의미한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

TTX 처리 농도 조건 확립

Neuro-2a 시험법에 적용할 TTX의 최적 처리 농도 구간을 설정하였다. O/V를 세포가 80% 이상 사멸하는 농도(600/60 μ M)로 처리하고 TTX 농도는 문헌을 참고하여 200-0.781 ng/mL, 100-0.391 ng/mL, 50-0.195 ng/mL 사이의 8개 단계로 24시간동안 처리하여 확보된 흡광도 값을 이용하여 용량-반응 곡선을 도출하고, EC₅₀값을 확인하였다. 또한 데이터 값이 고농도와 저농도 구간에 적절히 분포하는 S자형 곡선이 도출되는 농도구간을 확인하였다. 각 실험을 통해 도출된 EC₅₀ 값은 각각 6.444 ng/mL, 2.368 ng/mL, 2.594 ng/mL으로 산출되었으며, 50-0.195 ng/mL 구간이 다른 농도 구간보다 S자에 가까운 곡선이 도출되어, 이 농도 구간을 처리 농도 조건으로 선정하였다(Fig. 3(A)).

Ouabain/Veratridine 처리 조건 확립

Neuro-2a assay의 원리는 나트륨-칼륨 펌프 억제제인 ouabain (O)과 나트륨 채널 활성제 veratridine (V)을 처리하여 과도한 Na⁺의 유입으로 세포가 사멸하도록 유도한 후, 나트륨 채널 억제제로 작용하는 독소인 TTX를 처리하였을 때 세포가 생존하는 것을 확인하여 독소의 함유 여부를 평가하는 원리이다. 따라서 세포가 사멸하는 O/V의 농도를 찾기 위한 실험을 수행하였다. 문헌조사²³⁾ 내용을 바탕으로 O/V 처리농도 비율을 600/60 μ M, 400/40 μ M, 200/20 μ M, 120/200 μ M 4가지 그룹으로 다양하게 처리하였으며, 위에서 설정한 TTX의 농도인 50-0.195 ng/mL로 Neuro-2a 시험을 실시하였다. 120/200 μ M에서 가장 높은 TTX 민감도를 나타낸 Alkassar 등²³⁾의 결과와 달리, 본 연구에서는 600/60 μ M 비율에서 적절한 S자 곡선을 형성했으며,

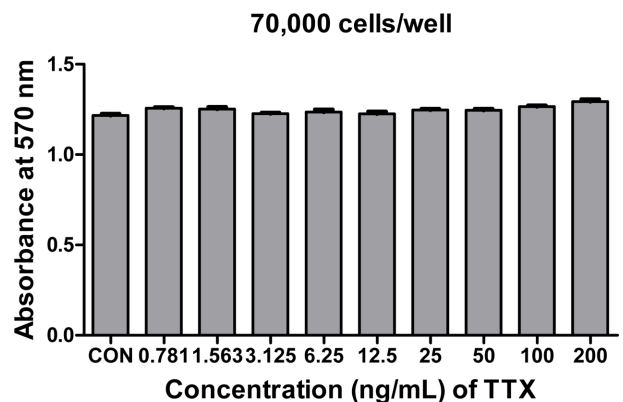


Fig. 2. Cytotoxicity of TTX. Neuro-2a cells were seeded in 96-well plate at 70,000 cells/well with culture medium for 24 h and treated with TTX in the treatment medium for 24 h under 5% CO₂ at 37°C, and absorbance was measured by MTT assay at 570 nm.

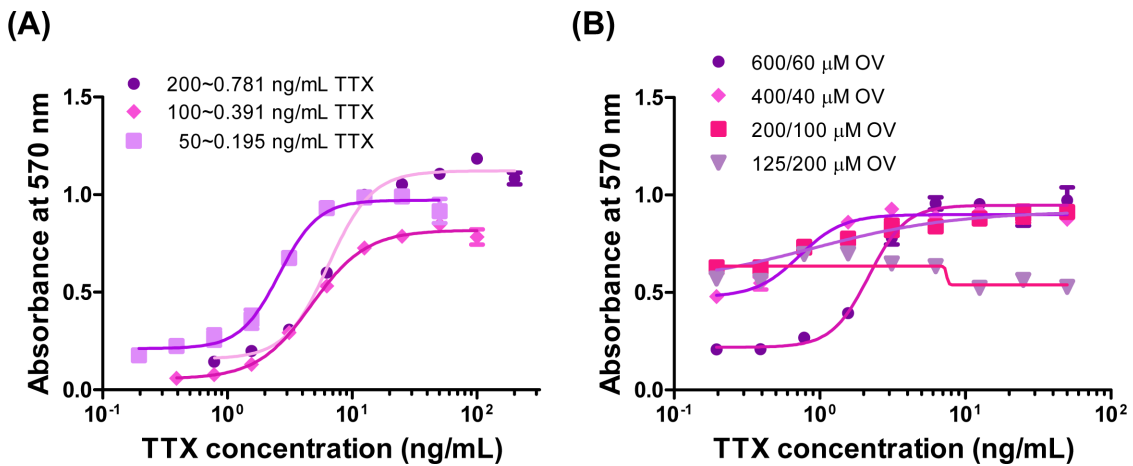


Fig. 3. Establishment of the TTX concentration range and O/V concentration range applying to Neuro-2a assay. (A) Results by treatment of 200-0.781, 100-0.391, 50-0.195 ng/mL of TTX at an O/V concentration of 600/60 μM. Eight concentrations (50-0.195 ng/mL) were selected for which the concentration-response graph exhibited a sigmoidal shape for the calculation of EC₅₀ values. Each experimental data set was conducted in triplicate. (B) The result of Neuro-2a assay of TTX (50 to 0.195 ng/mL), with O/V treatments applied at 600/60, 400/40, 200/100, and 125/200 μM, respectively. The 600/60 μM group induced 80% cell death and formed a characteristic S-shaped dose-response.

Table 1. O/V concentrations and the calculated EC₅₀ values of TTX in the Neuro-2a assay from this study and previous literatures

O/V Concentration (μM)	EC ₅₀ (ng/mL)	References
600/60	2.1690	This study
400/40	0.7247	
200/100	0.8845	
120/200	-7.437	
100/55	1.4993	Saruhashi S et al. ²⁴⁾
500/44	1.4674	Yotsu-Yamashita, M. et al. ²⁵⁾
1000/50	2.1054	Hamasaki K et al. ²⁶⁾

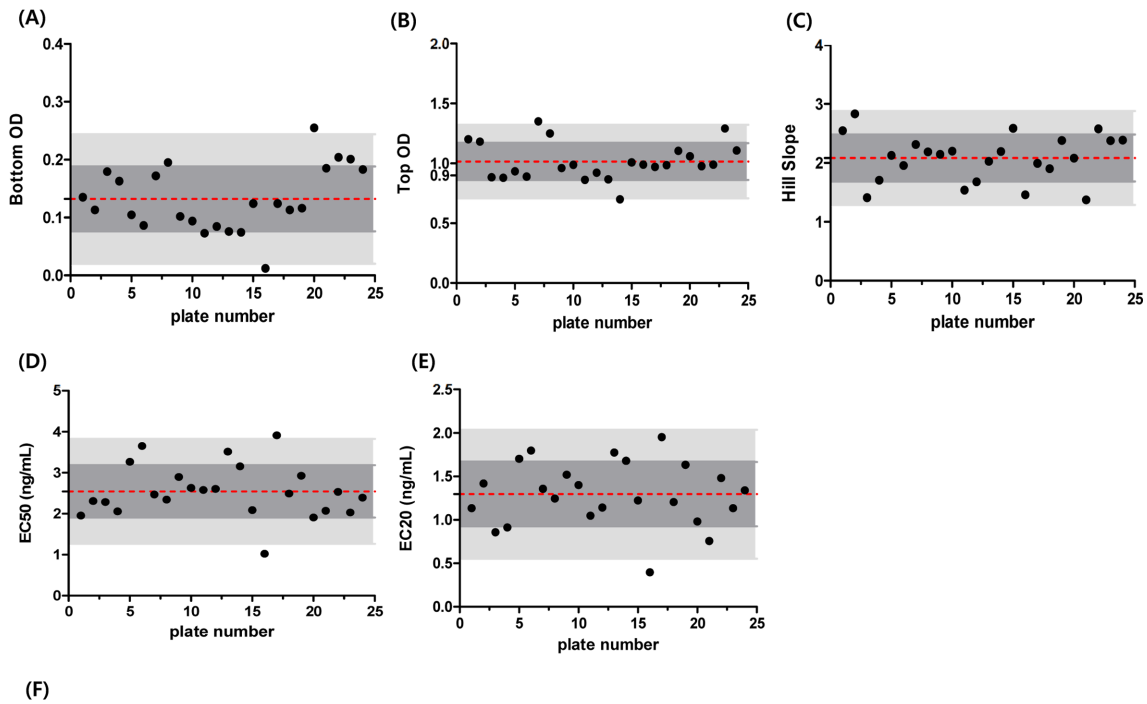
다른 농도에서는 충분한 세포사멸이 유도되지 않아 Neuro-2a 시험에 적합하지 않음을 확인하였다(Fig. 3(B)). 또한 각각의 O/V 비율에 따른 용량 반응 곡선으로부터 도출된 EC₅₀값을 기존 문헌에서 보고된²⁴⁻²⁶⁾ O/V 농도 비율과 EC₅₀ 값과 비교했을 때(Table 1), 600/60 μM로 처리시 2.1690 ng/mL로 기존에 보고된 EC₅₀값과 가장 유사하게 도출되어, 600/60 μM을 최적 O/V 처리 농도 조건으로 설정하였다.

TTX 검출용 Neuro-2a assay의 기준값 확립 연구

최근 Neuro-2a assay의 연구 동향에서는 실험 신뢰도를 평가하기 위한 다양한 기준들이 설정되며, 세포 실험의 변동성을 줄이기 위한 표준화 노력이 지속되고 있다^{19,22,27,28)}. 본 연구에서는 TTX 검출을 위한 Neuro-2a assay의 신뢰도 확보를 위한 기준들을 제시하고자 하였다.

TTX 검출용 Neuro-2a assay의 적정성 판단 근거로 활용될 data criteria 신뢰구간 확립을 위해, TTX 표준독소를 사용하여 동일 실험실 내 2명의 실험자가 총 24번의 Neuro-

2a assay를 반복 수행하였고, 각 실험의 결과를 바탕으로 용량-반응 그래프를 작성하였다. 각 매개변수들의 평균값(mean)과 표준편차(SD)값을 계산한 결과(Fig. 4(A)-(E))를 통해 신뢰 구간을 설정하였다. 24번의 수행한 실험 결과의 mean±2SD 값을 Neuro-2a assay의 적정한 신뢰 구간에 해당하는 data criteria로 설정하였다. 그 결과, Bottom OD는 최대 mean±2SD 값인 0.244 이하로, Top OD값은 최소 mean±2SD 값인 0.707 이상으로, EC₅₀값은 mean±2SD에 해당하는 1.268-3.824 ng/mL 범위로, EC₂₀값은 마찬가지로 mean±2SD에 해당하는 0.555-2.035 ng/mL 범위로, Hill slope은 1.287 이상으로 설정하였다(Fig. 4(F)). 이와 같은 신뢰구간 설정은 세포 실험 시 실험 조건 및 환경의 변동성으로 인해 발생할 수 있는 불확실성을 최소화하는 데 목적이 있다²⁹⁾. 따라서 본 연구에서는 mean±2SD를 기준으로 신뢰 구간을 설정하여, Neuro-2a assay의 적정성을 평가할 수 있는 기준을 제시하였다.



Data Criteria	Mean	1SD	2SD	Experimental	95% CI
				acceptable values (2SD)	
Bottom OD	0.132	0.056	0.112	0.020-0.244	0.108-0.156
Top OD	1.015	0.154	0.308	0.707-1.323	0.950-1.018
EC ₅₀	2.546	0.639	1.278	1.268-3.824	2.276-2.816
EC ₂₀	1.295	0.370	0.740	0.555-2.035	1.139-1.451
Hill slope	2.083	0.398	0.796	1.287-2.879	1.915-2.251

Fig. 4. Data plots per plate numbers for (A) Bottom OD, (B) Top OD, (C) Hill Slope, (D) EC₅₀, and (E) EC₂₀. The dashed red lines represent respective means and the shaded areas signify 1SD and 2SD. (F) represents the experimental acceptable ranges of each data criteria parameters calculated based on the mean ± 2SD.

TTX 검출용 Neuro-2a assay의 실험실 내(Intra-lab) 변동성 비교 연구

본 연구에서는 동일한 실험실 내 3명의 실험자가 TTX 검출용 Neuro-2a assay를 수행한 결과를 분석하여 실험의 반복성과 신뢰성을 평가하였다(Fig. 5(A), Table 2). 실험 결과를 바탕으로 Neuro-2a assay의 두 가지 기준(criteria) 충족 여부를 확인하였으며, 각 기준의 정의는 Kim 등²²⁾에서 설명된 바 있다. 첫 번째 quality control criteria는 RCV, COV⁻ 및 COV⁺, **QCOV⁻ 및 QCOV⁺**로 정의되며, RCV의 경우 0.8 이상의 값을 기준으로 설정하였다. COV⁺는 0.3 이하, COV⁻는 0.8 이상의 값을 충족해야 하며, QCOV⁺는 값이 (0.2×RCV 흡광도 값+0.8×COV⁺+흡광도 값)과 (0.8×RCV 흡광도 값+0.2×COV⁺+흡광도 값) 사이에 위치해

야 기준치를 만족한다고 정의되었다. 마지막으로 QCOV⁻는 0.8 이상의 값을 기준으로 하였다. 실험자 간 변동성을 분석한 결과, CV%는 각 기준에서 2.79%에서 26.15% 사이로, 반복성이 우수함을 확인할 수 있었다(Table 2).

또한 TTX 대상 Neuro-2a assay의 적정성 판단 기준치인 6개의 data criteria 충족 여부를 확인하였다. 각 data (EC₅₀값, EC₂₀값, Bottom OD값, Top OD값, 그래프의 기울기 및 R² 값)의 시험자간 CV% 값을 비교한 결과, 0.90-20.85%로 도출되었고, 특히 EC₅₀값의 CV%가 9.61%로 시험의 반복성이 높음을 확인할 수 있었다. 이들 결과값들은 모두 24번의 실험에서 도출된 mean±2SD 값의 범위를 충족하였으며, 이를 통해 설정된 data criteria 값의 적정성을 검증할 수 있었다(Table 2). 이와 같은 결과를

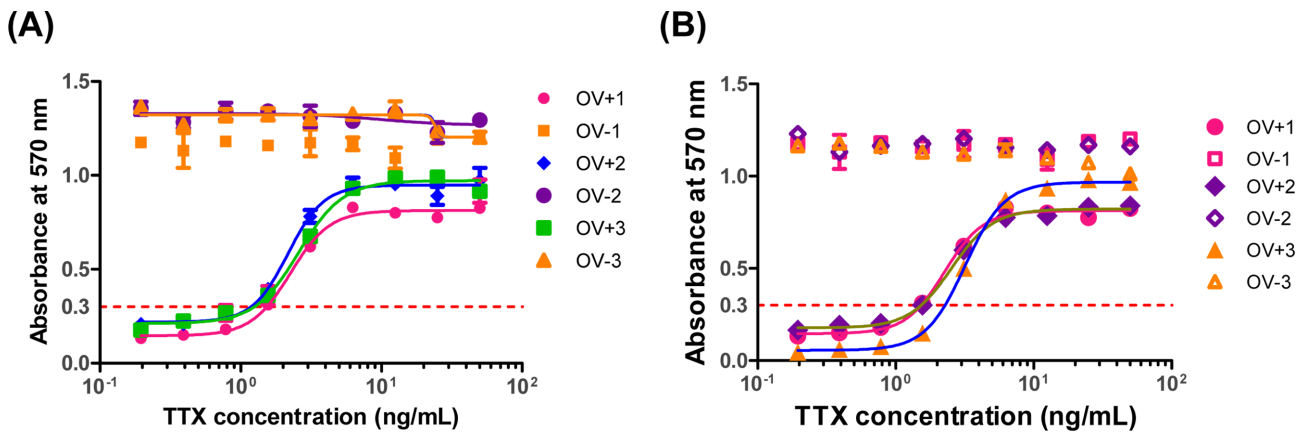


Fig. 5. (A) Dose response curve from Intra-lab Neuro-2a assay on TTX for criteria setting experiment. Based on the established parameters, three researchers (1,2, and 3) in a laboratory conducted the Neuro-2a assay under the same conditions. Neuro-2a cells were exposed to eight concentrations of TTX standard for 24 h, in without OV(OV⁻) and with OV(OV⁺) conditions at 600/60 μM. Data represent the mean ± SD in triplicate. (B) Dose response curve from Inter-lab Neuro-2a assay for criteria setting experiment. Based on the established parameters, each researcher in three laboratories (1,2, and 3) conducted the Neuro-2a assay under the same conditions. Data represent the mean ± SD in triplicate.

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

Criteria	Criteria	researcher			Mean	SD	CV%	
		Lab1-1	Lab1-2	Lab1-3				
Quality control criteria	RCV	≥ 0.9	1.139	1.072	1.072	1.094	0.039	3.53
	COV	≥ 0.8	1.209	1.349	1.342	1.300	0.079	6.07
	COV ⁺	≤ 0.3	0.089	0.153	0.128	0.123	0.032	26.15
	QCOV	≥ 0.8	0.929	0.888	0.883	0.900	0.025	2.79
	QCOV ⁺	-	0.299	0.337	0.317	0.318	0.019	5.96
Data criteria	Bottom OD	≤ 0.244	0.146	0.219	0.212	0.192	0.040	20.85
	Top OD	≥ 0.707	0.813	0.948	0.972	0.911	0.086	9.41
	EC ₅₀ (ng/mL)	1.268-3.824	2.255	2.169	2.594	2.339	0.225	9.61
	EC ₂₀ (ng/mL)	0.555-2.035	1.443	1.446	1.574	1.488	0.075	5.03
	HillSlope	≥ 1.287	3.106	3.421	2.774	3.100	0.324	10.44
	R ²	≥ 0.85	0.989	0.974	0.973	0.979	0.009	0.90

통해 TTX 검출을 위한 Neuro-2a assay의 실험실 내 변동성이 낮고, 시험법의 신뢰성과 반복성이 우수함을 확인하였다.

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

TTX 표준독소를 사용하여 3개의 다른 기관의 실험실에서 동일한 조건으로 실험을 수행하여 실험실 간(inter-lab) 변동성을 분석하였다(Fig. 5(B), Table 3). 각 Quality control에 대한 변동성을 분석한 결과, 실험실 간 CV% 값은 6.94-58.57%로 도출되었고, 각 data criterial 값들의 CV%는 1.31-55.17%로 나타났다(Table 3). 일반적으로 CV%가 30% 이내일 때 변동성이 허용되지만³⁰⁻³², 다소 높은 CV값이 관찰된 항목은 COV⁺값과 Bottom OD 값으로,

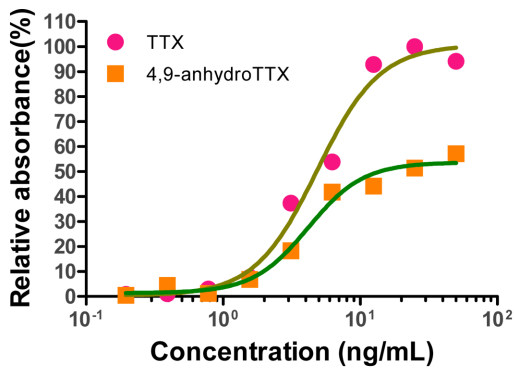
이는 수치가 낮아 작은 값의 차이로도 높은 변동성을 보이는 것으로 판단된다. 다만, 이들 값들은 모두 기준치 아래로 측정되어 결과의 신뢰도 평가 시 중요하게 고려하지 않았다. EC₅₀값의 경우, CV%가 12.77%로 실험실이 다른 조건에서 수행했음에도 불구하고 Neuro-2a assay 시험의 재현성이 높음을 확인하였다(Table 3). 또한, inter-lab 실험의 결과값들이 설정된 기준 범위 내에 있어 기준치의 적절성도 검증되었다(Table 3).

Neuro-2a assay를 이용한 4,9-anhydroTTX의 TEF 확인

본 연구에서는 TTX 검출을 위해 확립된 Neuro-2a assay를 활용하여 TTX와 4,9-anhydroTTX의 EC₅₀ 값을 산출하고, 이를 바탕으로 TEF 값을 확인하였다. 그 결과, TTX의 EC₅₀

Table 3. Results of inter-laboratory Neuro-2a assay on TTX for criteria setting experiments

Criteria	Criteria	Lab			Mean	SD	CV%	
		Lab 1	Lab 2	Lab 3				
Quality control criteria	RCV	≥ 0.9	1.072	0.979	1.150	1.067	0.086	8.02
	COV ⁻	≥ 0.8	1.342	1.162	1.155	1.220	0.106	8.69
	COV ⁺	≤ 0.3	0.128	0.117	0.030	0.092	0.054	58.57
	QCOV ⁻	≥ 0.8	0.883	0.807	0.926	0.872	0.060	6.94
	QCOV ⁺	-	0.317	0.289	0.254	0.287	0.031	10.98
Data criteria	Bottom OD	≤ 0.244	0.212	0.177	0.056	0.148	0.082	55.17
	Top OD	≥ 0.707	0.972	0.822	0.968	0.920	0.085	9.27
	EC ₅₀ (ng/mL)	1.268-3.824	2.594	2.534	3.174	2.767	0.353	12.77
	EC ₂₀ (ng/mL)	0.555-2.035	1.574	1.563	2.012	1.716	0.256	14.92
	HillSlope	≥ 1.287	2.774	2.869	3.039	2.894	0.134	4.64
	R ²	≥ 0.85	0.973	0.996	0.995	0.988	0.013	1.31



	EC ₅₀ (ng/mL)	TEF
TTX	4.529	1
4,9-anhydroTTX	21.577	0.2098

Fig. 6. EC₅₀ and TEF of TTX and 4,9-anhydroTTX from Neuro-2a assay. Neuro-2a cells were exposed to eight concentrations of TTX and 4,9-anhydroTTX standard for 24 h, in without OV(OV⁻) and with OV(OV⁺) conditions at 600/60 μM. The EC₅₀ values for each toxin were calculated using a probit analysis. Data represent the mean ± SD in triplicate.

값은 4.529 ng/mL, 4,9-anhydroTTX는 21.577 ng/mL로 측정되었으며, TEF 값은 0.2098로 산출되었다(Fig. 6). 기존 연구³³⁾의 MBA 결과에서는 TTX와 4,9-anhydroTTX의 독성이 각각 4,500 MU/mg과 92 MU/mg으로 TEF 값은 0.02로 보고되었다. 이를 통해 Neuro-2a assay가 다양한 독소 유사체들의 상대적 독성 평가에 유효하며, MBA의 대체 방법으로 활용 가능함을 확인하였다.

본 연구는 Neuro-2a assay를 활용하여 TTX 검출법을 확립하는 연구로, 국내 실험 환경에 맞게 다양한 시험 조건을 정립하였다. 또한, 시험법의 적정성을 평가하기 위해 5

가지의 quality control criteria과 data criteria을 설정하였다. 실험실 간 변동성 연구 결과, 본 방법이 높은 반복성과 재현성을 갖추고 있음을 확인하였다. 본 연구를 통해 세포 기반 MBA 대체 시험법인 Neuro-2a assay가 기존의 동물 기반 시험법과 비교하여 윤리적 문제를 줄이고, 정밀도와 민감도를 향상시킬 수 있는 장점을 가지는 방법임을 확인할 수 있었다. 앞으로, Neuro-2a assay가 국내 수산물에서 TTX를 검출하기 위한 대체 시험법으로 활용되기 위해서는, 수산물에서 독소 추출 및 정량화 방법의 표준화가 필요하며, 기존의 MBA, ELISA, 기기 분석법과의 상관성 연구를 통해 시험법의 한계를 확인하고 개선해야 할 것이다.

Acknowledgement

본 연구는 2023도 식품의약품안전처의 연구개발비(20163MFDS641)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

테트로도톡신(tetrodotoxin, TTX)은 강력한 해양생물 유래 신경독소로, 수산물 내 TTX를 검출하기 위해 기존에 주로 사용되는 mouse bioassay (MBA)와 LC-MS/MS 기법은 낮은 검출한계와 동물 윤리 문제 등의 한계가 있어 이를 대체할 새로운 시험법 개발이 필요합니다. Neuro-2a assay는 대표적인 세포기반 대체 시험법으로, 이 방법은 마우스 신경모세포인 Neuro-2a 세포주에 ouabain (O)과 veratridine (V)을 처리하여 과도한 Na⁺ 유입으로 인한 세포 사멸을 유도한 후, Na⁺ 채널 억제제인 TTX가 Na⁺ 유입을 차단해 세포를 보호하는 원리를 이용해 TTX를 정량합니다. 본 연구에서는 Neuro-2a assay를 국내 실험실 환

경에 적용하기 위해 TTX 처리 조건과 O/V 농도 등의 매개변수를 최적화하였습니다. 그 결과, 최적 O/V 농도로 600/60 μM 를 설정하였으며, S자형 용량-반응 곡선이 도출되는 8가지 농도(50-0.195 ng/mL)를 확인하였습니다. 또한, 24번의 반복 실험을 통해 데이터의 신뢰도를 평가할 수 있는 6가지 data criteria를 확립하였으며, 이 중 EC50 값은 약 3.824-1.268 ng/mL로 나타났습니다. 실험실 간 변동성 비교 결과, COV+와 Bottom OD값을 제외한 모든 품질 관리 기준(quality control criteria)과 데이터 기준(data criteria)의 변동계수(CVs)는 1.31-14.92%로 도출되어, 실험의 적정성과 재현성이 확인되었습니다. 본 연구는 국내에서 활용 가능한 TTX 검출용 Neuro-2a assay의 최적 조건과 신뢰성을 평가할 수 있는 quality control criteria와 data criteria를 제시하였습니다. 아울러, TTX뿐만 아니라 유사체인 4,9-anhydroTTX에 대한 TEF 값을 0.2098로 산출하여, TTX뿐 아니라 다양한 유사체의 검출이 가능함을 확인하였습니다. 향후, 본 시험법은 국내 수산물 내 TTX 검출을 위한 MBA 대체법으로 활용될 것으로 기대됩니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Youngjin Kim	https://orcid.org/0009-0005-3525-2886
Jeong-In Park	https://orcid.org/0009-0007-6404-8096
Si-Yun Hong	https://orcid.org/0009-0008-1877-0667
Jun Kim	https://orcid.org/0009-0004-1214-4340
Hyun Park	https://orcid.org/0000-0002-8055-2010
Young-Seok Han	https://orcid.org/0000-0002-1897-292X
Youn-Jung Kim	https://orcid.org/0000-0003-1482-8506

References

- Nam, K.T., Oh, S.J., Influence of water temperature and salinity on the production of paralytic shellfish poisoning by toxic dinoflagellate alexandrium catenella (Group 1). *J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf.*, **27**, 119-126 (2021).
- Lee, K.J., Ha, K.S., Jung, Y.J., Mok, J.S., Son, K.T., Lee, H.C., Kim, J.H., Paralytic shellfish toxins (PSTs) and tetrodotoxin (TTX) of Korean pufferfish. *Fish. Aquat. Sci.*, **24**, 360-369 (2021).
- Kim, H.S., Kwun, H.J., Bae, H., Park, J., First reliable record of the blue-lined octopus, *Hapalochlaena fasciata* (Hoyle, 1886) (Cephalopoda: Octopodidae), from Jeju Island, Korea. *J. Asia-Pac. Biodivers.*, **11**, 21-24 (2018).
- Kim, J.H., Suzuki, T., Shim, K.B., Oh, E.G., The widespread distribution of the venomous and poisonous blue-lined octopus *Hapalochlaena* spp., in the East/Japan Sea: possible effects of sea warming. *Fish. Aquat. Sci.*, **15**, 1-8 (2012).
- Kim, J.H., Kim, D.W., Cho, S.R., Lee, K.J., Mok, J.S., Tetrodotoxin and the geographic distribution of the blue-lined octopus *Hapalochlaena fasciata* on the Korean coast. *Toxins*, **15**, 279 (2023).
- Yasumoto, T., Yotsu-Yamashita, M., Chemical and etiological studies on tetrodotoxin and its analogs. *J. Toxicol.: Toxin Rev.*, **15**, 81-90 (1996).
- Isbister, G.K., Kiernan, M.C., Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol.*, **4**, 219-228 (2005).
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O'Riordan, A., Furey, A., Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*, **6**, 693-755 (2014).
- Kim, J.H., Gong, Q.L., Mok, J.S., Min, J.G., Lee, T.S., Park, J.H., Characteristics of puffer fish poisoning outbreaks in Korea (1991-2002). *J. Food. Hyg. Saf.*, **18**, 133-138 (2003).
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2021. Standards and management measures for the detection of tetrodotoxin (TTX) in seafood, MFDS, Cheongju, Korea.
- Japan Food Hygiene Association (JFHA), 1990. Standard methods of analysis in food safety regulation, biology, JFHA, Tokyo, Japan, pp. 86-87.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Rose, M., Roudot, A.-C., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Arnich, N., Benford, D., Botana, L., Viviani, B., Arcella, D., Binaglia, M., Horvath, Z., Steinkellner, H., van Manen, M., Petersen, A. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA J.*, **15**, 4752 (2017).
- Park, B.K., Jang, W.J., Park, K.H., Lee, H.S., Lee, W.O., Choi, K.S., Lee, J., Tetrodotoxin and its Analogs: a review of analysis methods and levels in pufferfish. *J. Food. Hyg. Saf.*, **36**, 105-117 (2003).
- Yasumoto, T., Fukui, M., Sasaki, K., Sugiyama, K., Determinations of marine toxins in foods. *J. AOAC Int.*, **78**, 574-581 (1995).
- Kogure, K., Tamplin, M.L., Simidu, U., Colwell, R.R., A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin, and related toxins. *Toxicon*, **26**, 191-197 (1988).
- Jellett, J.F., Marks, L.J., Stewart, J.E., Dorey, M.L., Watson-Wright, W., Lawrence, J.F., 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 (1992).
- Castro, D., Manger, R., Vilariño, O., Gago-Martínez, A., Evaluation of matrix issues in the applicability of the neuro-2a cell based assay on the detection of CTX in fish samples. *Toxins*, **12**, 308 (2020).

18. Nicolas, J., Bovee, T.F., Kamelia, L., Rietjens, I.M., Hendriksen, P.J., Exploration of new functional endpoints in neuro-2a cells for the detection of the marine biotoxins saxitoxin, palytoxin and tetrodotoxin. *Toxicol. in vitro*, **30**, 341-347 (2015).
19. Viallon, J., Chinain, M., Darius, H.T., 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 (2020).
20. Aballay-Gonzalez, A., Ulloa, V., Rivera, A., Hernández, V., Silva, M., Caprile, T., Delgado-Rivera, L., Astuya, A., Matrix effects on a cell-based assay used for the detection of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish samples. *Food Addit. Contam. Part A*, **33**, 869-875 (2016).
21. Aballay-González, A., Gallardo-Rodríguez, J. J., Silva-Higuera, M., Rivera, A., Ulloa, V., Delgado-Rivera, L., Rivera-Belmar, A., Astuya, A., Neuro-2a cell-based assay for toxicity equivalency factor - proposal and evaluation in Chilean contaminated shellfish samples. *Food Addit. Contam. Part A*, **37**, 162-173 (2020).
22. Kim, Y., Seo, J., Kim, J., Park, J.I., Kim, J.H., Park, H., Han, Y.S., Kim, Y.J., Establishment of test conditions and interlaboratory comparison study of neuro-2a assay for saxitoxin detection. *J. Marine Life Sci.*, **9**, 9-21 (2024).
23. Alkassar, M., Sanchez-Henao, A., Reverté, J., Barreiro, L., Rambla-Alegre, M., Leonardo, S., Mandalakis, M., Peristeraki, P., Diogène, J., Campàs, M., Evaluation of toxicity equivalency factors of tetrodotoxin analogues with a neuro-2a cell-based assay and application to puffer fish from Greece. *Mar. drugs*, **21**, 432 (2023).
24. Saruhashi, S., Konoki, K., Yotsu-Yamashita, M., The voltage-gated sodium ion channel inhibitory activities of a new tetrodotoxin analogue, 4,4-anhydrotetrodotoxin, and three other analogues evaluated by colorimetric cell-based assay. *Toxicon*, **119**, 72-76 (2016).
25. Yotsu-Yamashita, M., Urabe, D., Asai, M., Nishikawa, T., Isobe, M., Biological activity of 8,11-dideoxytetrodotoxin: lethality to mice and the inhibitory activity to cytotoxicity of ouabain and veratridine in mouse neuroblastoma cells, Neuro-2a. *Toxicon*, **42**, 557-560 (2003).
26. Hamasaki, K., Kogure, K., Ohwada, K., A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicon*, **34**, 490-495 (1996).
27. Ledreux, A., Krys, S., Bernard, C., Suitability of the neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phyco toxins). *Toxicon*, **53**, 300-308 (2009).
28. Caillaud, A., Eixarch, H., de la Iglesia, P., Rodriguez, M., Dominguez, L., Andree, K.B., Diogène, J., Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: application to fish caught in the Canary Islands. *Food Addit. Contam. Part A*, **29**, 1000-1010 (2012).
29. Larsson, P., Engqvist, H., Biermann, J., Werner, R., Almlöf, J., Johansson, F., Lundberg, E., Evers, K., Axen, M., Forssell-Aronsson, E., Kovács, A., Karlsson, P., Helou, K., Parris, T.Z., Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Sci. Rep.*, **10**, 5798 (2020).
30. Van Dolah, F.M., Fire, S.E., Leighfield, T.A., Mikulski, C.M., Doucette, G.J., Determination of paralytic shellfish toxins in shellfish by receptor binding assay: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **95**, 795-812 (2012).
31. Van Dolah, F.M., Leighfield, T.A., Doucette, G.J., Bean, L., Niedzwiadek, B., Rawn, D.F., Single-laboratory validation of the microplate receptor binding assay for paralytic shellfish toxins in shellfish. *J. AOAC Int.*, **92**, 1705-1713 (2009).
32. Díaz-Asencio, L., Clausing, R.J., Rañada, M.L., Alonso-Hernández, C.M., Dechraoui Bottein, M.Y., A radioligand receptor binding assay for ciguatoxin monitoring in environmental samples: Method development and determination of quality control criteria. *J. Environ. Radioact.*, **192**, 289-294 (2018).
33. Nakamura, M., Yasumoto, T., Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1341-1345 (1985).