

## 일반사육시설 마우스의 유전적 오염에 대한 실태조사 연구

이홍식 · 김철규\*

서울대학교 수의과대학 및 농생명공학부  
\*국립독성연구소 일반독성부  
(2001년 8월 27일 게재승인)

## Studies on genetic monitoring of inbred mice in conventional breeding unit

Heungshik S. Lee, Chul-kyu Kim\*

College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University

\*National Institute of Toxicological Safety Research

(Accepted by August 27, 2001)

**Abstract :** These studies were carried out to survey the genetic contamination of six inbred mice (A, BALB/c, C3H, C57BL/6, CBA and KK) produced and supplied from the conventional breeding unit for improving the quality of mice as experimental animal. We examined alleles of five loci (*Akp-1*, *Car-2*, *Hbb*, *Es-1* and *Trf*) by the use of biochemical markers with cellulose acetate electrophoresis. As the results of test, BALB/c, A, C3H, C57BL/6, CBA and KK showed standard alleles in *Akp-1*, *Car-2* and *Hbb*. But *Es-1* of A and C57BL/6 and *Trf* of A, C3H, C57BL/6 and CBA did allelic divergence in loci. These results suggest that the colonies of A, C3H, C57BL/6 and CBA did allelic divergence in loci. These results suggest that the colonies of A, C3H, C57BL/6 and CBA did allelic divergence in loci. These results suggest that the colonies of A, C3H, C57BL/6 and CBA did allelic divergence in loci. These results suggest that the colonies of A, C3H, C57BL/6 and CBA did allelic divergence in loci. Therefore, we recommend to eliminate the genetically contaminated mice thoroughly, to check on genetic monitoring regularly and to consider a counterplan for improving the quality control as soon as possible.

**Key words :** genetic monitoring, genetic contamination, alleles, locus, biochemical marker

### 서 론

생명과학 분야에서 널리 쓰이는 실험동물의 품질관리는 동물실험 결과의 정확성과 재현성 및 신뢰성을 높이기 위해 필수 불가결한 요소이다. 그 이유는 아무리 건강한 실험동물이라 하더라도 품종이나 계통에 따라 어떤 실험에서는 특이하게 반응할 수 있는 내재된 유전형질이 있기 때문이다. 따라서 실험동물 사용자도 모르는 불가항력적인 계통간 교잡에 의한 유전적 오염으로 계통변이가 야기되었을 때 계통 고유의 생물학적 특성은 무시된 채 단지 모색에 의한 계통 구별로만 실험동물을 분양하는 경우 실험동물 사용자는 전혀 다른 결과가 얻어져도 그 원인이 실험동물 계통 차이에 따라 발생한 것인지 여부를 판단할 수 없기 때문에 연구결과 해석에 오

류를 범할 가능성도 크기 때문이다<sup>1-3)</sup>.

실험동물 품질관리에 영향을 미치는 주요 요인은 크게 유전적 요인, 환경적 요인, 질병적 요인 등이 있으며 세계 각국은 이들 요인을 효과적으로 통제하기 위해 국제적으로 표준화된 가이드라인에 따라 유전적 모니터링(genetic monitoring), 미생물학적 모니터링(microbiological monitoring), 환경적 모니터링(environmental monitoring)을 실시하고 있는 것이 현실이다<sup>4,6)</sup>.

우리 나라 국공립 및 사립 실험동물 사용장도 예외는 아니어서 이들에 의한 모니터링에 의해 유전적 관리, 환경관리, 질병관리가 이루어지고 있다. 그러나 실험동물의 품질관리를 위한 환경요인이나 질병요인에 관한 검색보고는 다수 있으나<sup>7-14)</sup>, 유전적 요인에 대한 보고는 소수에 불과하다<sup>5,15)</sup>. 이는 아마도 유전적 관리에 대한

이 연구는 서울대학교 정책연구비 및 BK21 농생명공학사업단과 수의과대학 수의과학연구소 연구비 지원에 의하여 수행되었음  
Address reprint requests to Dr. Heungshik S. Lee, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea (E-mail: leehss@snu.ac.kr)

인식 부족과 함께 많은 경비와 노력이 소요되는 것에 원인이 있을 것으로 사료된다.

그러나 실험동물 고유의 유전적 형질을 그대로 유지하도록 관리하는 유전적 모니터링은 근교계 실험동물의 계대유지에 있어서 야기될 수 있는 유전적 변이 및 계통간 유전적 오염의 발생을 감시하고 통제하며 방지하기 위해 실험동물 사육장에서는 반드시 요구되는 사항이다<sup>2,3)</sup>.

Groen<sup>16)</sup> 53계통의 근교계 마우스 중 5계통에서, Krog<sup>17)</sup>은 15계통 중 3계통에서 유전적 오염이 있음을 관찰하여 보고한 바 있다. 또한 김 등<sup>15)</sup>은 8계통의 근교계 마우스 중 2계통의 유전적 오염을 보고한 바 있고 송 등<sup>4)</sup>은 3계통의 마우스 중 2계통에서 유전적 오염의 가능성이 있음을 조사 보고한 바 있다. 이 보고들을 종합해 볼 때 이는 실험동물을 집단 사육하는 실험동물 사육장에서는 유전적 오염이나 유전적 변이가 언제라도 야기될 수 있는 가능성이 많다는 것을 시사하는 사실로 판단된다.

지금까지 알려진 유전적 모니터링 방법은 모색감별 (coat color), 생화학적 표지(biochemical marker), 면역유전학적 표지(immunogenetic marker), 세포유전학적 분석(cytogenetic analysis), 형태계측 분석(morphometric analysis) 등과 함께 FISH, PCR, mRNA 분석 등을 이용한 분자유전학적 분석(molecular genetic analysis) 등이 있으나 유전적 모니터링의 기본 원칙이 정확·신속·용이하고 경제적이야 한다는 점에서 계통에 따라 관련 유전자에 의해 발견되는 각종 효소의 양상이 각기 상이하다는 점에 착안하여 고안된 표지 유전자의 생화학적 표지법이 보편화되어 있다<sup>1,2)</sup>.

따라서 이 연구에서는 생화학적 표지법을 이용하여 일반사육시설에서 사육되는 근교계 마우스의 유전적 오염 실태를 확인하여 고품질의 마우스 생산과 공급을 위한 기초 자료를 마련하고자 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

일본 Clea 사로부터 분양받아 계통번식한 후 43세대에 이른 A, 50세대에 이른 CBA, 46세대에 이른 C3H, 40세대에 이른 C57BL/6, 43세대에 이른 BALB/c, 40세대에 이른 KK 마우스 각각 3마리 (6주령, 수컷)를 대상으로 하되 KK 마우스를 대조군으로 하였다. 조사대상의 Y-실험동물사육장은 각 계통의 마우스를 도입한 후 지금까지 유전적 모니터링을 실시한 바 없었으며 사육 조건은 보건사회부 고시 88-39호 (실험동물의 사육 및 관리 등에 관한 기준)에 따라 사육하되 동일 모색의 계

**Table 1.** Biochemical marker used for genetic monitoring

Locus symbol	Name	Chromosome	Alleles
<i>Akp-1</i>	Alkaline phosphatase-1	# 1	a, b
<i>Car-2</i>	Carbonic anhydrase-2	# 3	a, b
<i>Hbb</i>	Hemoglobin beta-chain	# 7	d, p, s
<i>Es-1</i>	Esterase-1	# 8	a, b
<i>Trf</i>	Transferrin	# 9	a, b

통은 각각 독립된 사육실에서 별개의 케이지에서 사육되었다.

### 측정항목

생화학적 표지 중 Katoh 등<sup>18)</sup>이 제시한 critical subset 인 *Hbb*와 *Car-2*를 중심으로 *Akp-1*, *Trf*, *Es-1* 등을 측정하였다. 이들 각각의 유전자 좌위(locus)와 명칭, 염색체 번호 및 대립형질(alleles)은 Table 1과 같다.

### 시료준비

생화학적 표지를 위한 시료채취는 ICLAS 권장방법<sup>6)</sup>에 따라 다음과 같이 준비하였다. 즉, *Es-1*과 *Trf*의 분석을 위한 혈장은 각 계통의 마우스를 에테르로 마취하여 심장에서 채혈한 후 EDTA가 들어 있는 원심분리관에 넣어 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 4°C 냉장고에 보관하여 사용하였다. *Car-2*와 *Hbb* 분석을 위한 적혈구는 채혈하여 생리적 식염수로 3회 세척 후 증류수를 3배 가하여 용혈시키고 -20°C에 냉동한 다음 4°C 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다. *Akp-1* 분석을 위해 콩팥을 채취하여 -20°C에 보관한 다음 Potter-Elvehjem 균질기(Wheaton, USA)에서 균질화시킨 다음 0°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상등액을 채취하여 4°C 냉장고에 보관하여 사용하였다.

### 전기영동

Cellulose acetate strip (Gelman, USA)을 지지체로 ICLAS 권장방법<sup>6)</sup>에 따라 Sepratek Chamber (Gelman, USA)를 이용하여 전기영동하여 유전자 좌위의 대립형질을 검사하였다. 이때 사용한 완충액 제조와 전기영동 조건도 ICLAS 권장방법<sup>6)</sup>에 준하여 시행하였다.

전기영동 완료 후 지지체를 분리하여 ICLAS 권장방법<sup>6)</sup>에 따라 fast blue RR 또는 Ponceau S가 함유된 염색액으로 염색하였다. 염색이 완료되면 band를 확인하고 반응정지와 탈색을 위해 5% acetic acid에 행군 후 상온에서 말려 판독에 사용하고 사진 촬영을 하였다.

### 결 과

A, BALB/c, C3H, C57BL/6, CBA, KK 계통 근교 계 마우스를 대상으로 실시한 유전자 좌위에 대한 대립형질의 생화학적 표지법에 의한 *Akp-1*, *Car-2*, *Hbb*, *Es-1*, *Trf*의 유전적 모니터링 결과, 대조군으로 사용한 KK 마우스와 BALB/c를 제외한 A, C3H, C57BL/6, CBA 마우스에서 Table 2와 같이 유전적 오염이 확인되었다.

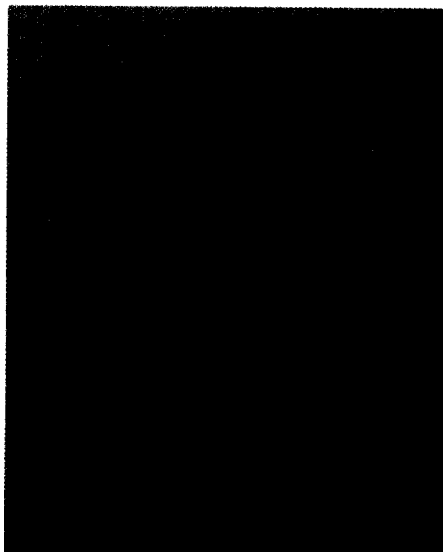
즉, *Es-1*은 원래 BALB/c, C3H, CBA, KK, A 마우스 모두가 대립형질이 b형이 정상이지만 모니터링 결과, A 마우스의 경우 공시된 3마리 모두가 a형으로 판명되었고 C57BL/6는 고유의 대립형질이 a형이지만 공시된 3마리 모두가 b형으로 나타났다. 아울러 *Trf*의 정상적인 대립형질이 A, BALB/c, C3H, C57BL/6 마

우스는 모두가 b형인데 A, C3H, C57BL/6 마우스의 경우 각 계통에 공시된 모든 동물이 a형으로 확인되었고 CBA의 경우 정상 대립형질이 a형인데 3마리 모두 b형으로 확인되었다. 그러나 *Es-1*과 *Trf* 이외의 *Akp-1*, *Car-2*, *Hbb*의 대립형질은 공시된 A, BALB/c, C3H, C57BL/6, CBA, KK 마우스 계통 모두가 표준형과 동일한 고유의 대립형질을 나타내었다(Fig 1~5).

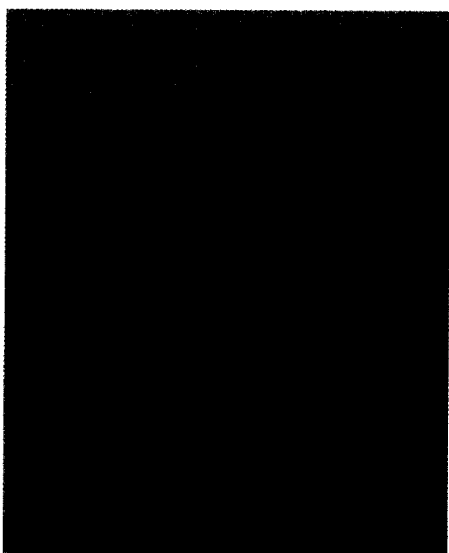
**Table 2.** Genetic profiles of inbred mice (standard/test)

Locus	Strain					
	A	BALB/c	C3H	C57BL/6	CBA	KK
<i>Akp-1</i>	b/b	b/b	b/b	a/a	a/a	b/b
<i>Car-2</i>	b/b	b/b	b/b	a/a	*/a	a/a
<i>Hbb</i>	d/d	d/d	d/d	s/s	d/d	s/s
<i>Es-1</i>	<u>b/a</u>	b/b	b/b	<u>a/b</u>	b/b	b/b
<i>Trf</i>	<u>b/a</u>	b/b	<u>b/a</u>	<u>b/a</u>	<u>a/b</u>	a/a

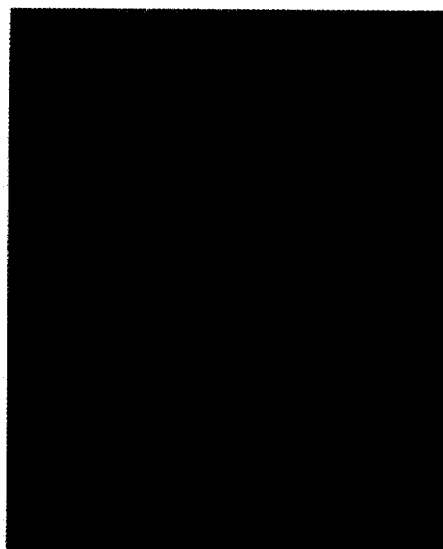
\* : Not all substrains have the same allele



**Fig 2.** Electropherogramme of carbonic anhydrase-2 (*Car-2*) in the inbred mice.



**Fig 1.** Electropherogramme of alkaline phosphatase-1 (*Akp-1*) in the inbred mice.



**Fig 3.** Electropherogramme of hemoglobin beta-chain (*Hbb*) in the inbred mice.



Fig 4. Electropherogramme of esterase-1 (*Es-1*) in the inbred mice.

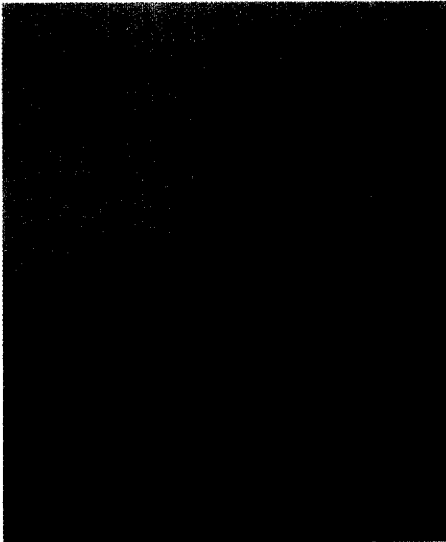


Fig 5. Electropherogramme of transferrin (*Tf*) in the inbred mice.

## 고 찰

실험동물이 갖고 있는 본래의 생물학적 특성을 유지하는 것은 실험동물의 품질관리에서 가장 중요한 사안임에도 불구하고 사육관리와 분양과정 중 즉시 확인되지 않는다는 점에서 간과되기 쉬운 것이 현실이다.

그러나 미생물학적 모니터링이나 환경적 모니터링이 완벽하게 이루어지는 최고 시설의 실험동물 사육장을 운영하면서도 실험동물 품질관리 특히 유전적 요인의 모니터링을 소홀히 하는 경우 부적격의 실험동물을 공급하는 기관이라는 오명으로 실험동물사육장이 존재의 위기상황까지 봉착할 수 있다는 점에서 유전적 모니터링은 반드시 유의하여야 될 점이다. 그 이유는 동일 모색을 가진 2개의 다른 계통의 마우스를 사육하는 경우 사육관리의 부주의로 유전적 오염이 일어날 수 있고 또한 태어난 동물은 외견상 동일 모색으로 계통이 구분되지 않아 혼용될 가능성이 크다.

나아가서 이들은 잠중강세에 의하여 생물학적 특성이 더욱 우세해지는 경향이 크고 번식능력이 증가한다는 일반적인 유전학적 이유 때문이다. 더구나 유전적 오염이 발생한 생산시설에서 생산된 실험동물을 사용하는 경우 정상적인 계통의 실험동물을 사용하여 실험한 결과와는 상이한 결과가 초래되는 것은 필연적인 사실로 연구자의 연구결과가 모두 수포로 돌아가는 치명적 타격을 입을 수도 있기 때문이다<sup>1,2)</sup>.

생화학적 표지법으로 유전자 좌위에 대한 대립형질의 유전적 모니터링을 실시한 이 조사에서 A, C3H, BALB/c, C57BL/6, CBA, KK 등 6계통 중 A, C3H, C57BL/6, CBA 마우스 4계통의 *Es-1*와 *Tf* 유전자 좌위에서 유전적 오염이 확인되었다. 이와 같은 결과가 얻어진 이유는 아마도 C57BL/6, C3H, CBA 마우스가 모두 C57 계통으로 모색이 흑색~갈색으로 변화되어 갈 수 있다는 점에서 김 등<sup>15)</sup> 및 송 등<sup>4)</sup>이 지적한 바와 같이 사육장의 사육관리 부주의에 의하여 계통간 교잡이 이루어져 야기된 결과로 사료된다. 아울러 모색이 백색인 A 마우스의 경우에도 모색이 같은 KK 또는 BALB/c 나 ICR과 계통간 교잡에 의하여 야기된 유전적 변이로 판단된다. 또한 조사 대상이 된 실험동물 사육장의 경우 계대유지를 위해 마우스의 혈연계수나 근교계수는 무시한 채 단순히 체중, 유두형태, 산자수, 이유수, 암수비 등의 번식능력 위주의 판단에만 의존하여 우세한 모체는 보존 유지하면서 열세 마우스는 도태시켜 근교계의 계대에만 치중하고 지금까지 한번도 유전적 모니터링을 실시한 바 없었다는 것은 실험동물 공급자 측면에서 여러 가지 점을 소홀히 취급하였다고 판단된다. 더구나 이 실험에 공시된 6계통 중 4계통에서 유전적 오염이 확인되었다는 사실은 Esaki<sup>19)</sup>가 보고한 바 근교계 마우스 10계통을 조사한 바 4계통에서 유전적 오염이 관찰되었다는 보고 및 송 등<sup>4)</sup>이 3계통 중 2계통에서 유전적 오염이 관찰되었다고 한 보고와 김 등<sup>15)</sup>이 8계통의 근교계 마우스를 대상으로 조사한 바, 2계통에서 유전적 오염이 관찰되었다는 보고에 비추어 조사대상이 된

실험동물 사육장의 경우 유전적 오염이 심각한 것으로 사료된다.

아울러 이 조사에 공시된 A, C3H, C57BL/6, CBA 마우스의 100%가 표준형과 다른 대립형질을 보인 것은 Kahan 등<sup>20)</sup>이 BALB/c 마우스의 2/3가 유전적 오염이 되었다고 한 보고나 송 등<sup>4)</sup>이 BALB/c와 C57BL/6 각 12마리를 대상으로 생화학적 표지를 이용하여 유전적 모니터링을 한 결과 각각 9마리(75%)와 1마리(8%)가 표준형과 다른 대립형질을 보였다는 보고들에 비추어 볼 때 아주 높은 유전적 오염의 발현으로 사료된다.

이 조사에서는 *Akp-1*, *Car-2*, *Hbb*의 경우 A, BALB/c, C3H, C57BL/6, CBA, KK 마우스 모두에서 고유의 대립형질을 보였으나 *Es-1*에서 A, C57BL/6 마우스가, *Tfj*에서 A, C3H, C57BL/6 마우스가 상이한 대립형질을 보였는데 이들 변이가 나타난 대립형질이 동형접합체인지 이형접합체인지 여부는 이 연구에서 확인할 수 없었고 이와 같은 유전적 오염이 이미 오래 전에 야기된 것인지 아니면 근간에 일어난 것인지 확인할 수도 없었다. 그러나 1개 유전자 좌위에서 변이가 있으면 돌연변이가 일어난 것으로 판단하고 이형접합체이면 최근에 변이가 일어난 것으로 판단할 수 있으며 2~3개 좌위에서 변이가 일어났다면 이미 아계로 고정된 것으로 보아야 한다는 지적에<sup>21)</sup> 비추어 볼 때 조사 대상이 된 실험동물 사육장의 마우스들은 이미 오래 전에 변이가 일어나 고정된 것으로 판단되므로 이번 에 발견된 유전적 오염 대상 마우스를 즉시 전량 도태하고 계통이 분명한 새로운 마우스를 도입·대체하여야만 할 것이다.

아울러 앞으로 유전적 관리는 정확한 기록과 철저한 계통도 작성을 우선으로 하여 번식 능력이 현저히 변화할 때는 즉시 유전적모니터링을 실시하는 한편 정기적으로도 모니터링을 실시하여 유전적 오염 여부를 확인하여 적절한 조치를 신속히 취하여야 할 것이다.

나아가서 동일 모색을 갖는 계통은 각각 독립된 사육실에서 사육하고 케이지 내 계통이 불확실한 마우스나 탈출한 마우스는 끈끈이 등을 이용하여 포획하는 즉시 도태시키는 방법으로 계획번식 외의 임의교배에 의하여 유전적 오염이 일어나지 않도록 사전에 조치를 철저히 하고 1개 사육실에 1개 계통의 1개 가계만 유지토록 대책을 세워 실험동물 생산에 질적 향상을 꾀하여야만 할 것이다.

그러나 이와 같은 유전적 모니터링에 의한 대책은 유전적 오염에 대한 현재의 상태를 검사하는 것에 지나지 않는 것으로 유전적 오염을 방지하는 근본적 대책이 아니라 사실을 명심하고 유전적 오염을 방지할 수 있는 대책을 조속히 시행하여야 할 것이다.

## 결 론

일반시설에서 사용되어 공급되는 A, BALB/c, C3H, C57BL/6, CBA, KK 마우스의 유전적 오염 실태를 조사하여 고품질의 마우스 생산과 공급에 필요한 기초자료를 마련코자 생화학적 표지법으로 *Akp-1*, *Car-2*, *Hbb*, *Es-1*, *Tfj* 유전자 좌위에 대한 대립형질을 확인한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. A, BALB/c, C3H, C57BL/6, CBA, KK 마우스의 *Akp-1*, *Car-2*, *Hbb* 유전자 좌위의 대립형질은 표준형과 동일하였다. 그러나 *Es-1* 유전자 좌위의 경우 A와 C57BL/6에서 상이한 대립형질이 관찰되었으며 *Tfj* 유전자 좌위의 경우 A, C3H, C57BL/6, CBA 마우스에서 상이한 대립형질이 관찰되어 이들 A, C57BL/6, C3H, CBA 마우스는 유전적 오염이 의심된다.
2. 이와 같은 사실에 비추어 볼 때 조사 대상이 된 실험동물 사육장에서는 조속한 시일내에 유전적 오염이 의심되는 모든 마우스를 도태하고 향후 유전적 오염의 발생을 방지하는 대책을 수립하여 철저히 관리하고 고품위의 마우스를 생산·공급토록 배전의 노력을 하여야 될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 현병화. 실험동물의 유전적 monitoring. 한국실험동물학회지 6(부록):7-13, 1990.
2. KIST 생명공학연구소 유전자원센터. 실험동물 workshop 자료집. 생명공학연구소. 대전. pp. 35-44, 1995.
3. 현병화, 김용준, 김환목 등. 실험동물 계통유지보존에서의 biochemical marker를 중심으로 한 유전적 monitoring. 한국실험동물학회지 7:107-111, 1991.
4. 송창우, 한상섭, 정길생. 국내 주요 근교계 마우스에 대한 biochemical marker의 측정용 이용한 유전적 실태조사에 대한 연구. 한국실험동물학회지. 7:113-121, 1991.
5. 이영순. 실험동물의학. 서울대학교 출판부. 서울. pp. 4-42, 1989.
6. Nomura T, Esaki K, Tomita T. ICLAS Manual for genetic monitoring of inbred mice. University of Tokyo Press, Tokyo. pp. 26-90, 1984.
7. 이홍식, 성노현, 김경진 등. 일반시설에서 사용되는 마우스의 품질향상을 위한 기초 조사 연구. 대한수의학회지 40:611-625, 2000.
8. 이홍식, 황인구, 윤성태 등. 개방식 시설사육 마우스의 건강 실태 조사 연구. 서울대수의대논문집 24:55-65, 1999.
9. 이홍식, 이인세, 강태천. 관행사육 마우스의 불현성 감염 조사 연구. 서울대수의대논문집 22:35-44, 1997.

10. 이홍식, 이영순, 이정주 등. 일반사육시설 마우스의 잠재질병 조사 연구. 한국실험동물학회지. 10:167-176, 1994.
11. 이홍식. 국내실험동물의 건강 실태 조사 1. 흰쥐와 생쥐의 생체계측. 서울대수의대논문집 6:173-188, 1981.
12. 정유열, 이학철. 국내 사육 실험동물에 대한 미생물학적 모니터링에 관한 연구(III). 한국실험동물학회지 10:57-71, 1994.
13. 김철규, 김재연. 실험동물에 있어 미생물 모니터링에 관한 연구. 한국실험동물학회지 6(부록):14-32, 1990.
14. 박종성, 김희진, 이민재 등. 실험동물 엔리치먼트로서의 깔짚 종류별 암모니아가스 농도 변화에 관한 연구. 한국실험동물학회지 15:221-226, 1999.
15. 김재연, 조정식, 이종욱 등. 근교계 실험동물의 유전적 모니터링에 관한 연구(II). 국립보건안전연구원보 1:71-84, 1988.
16. Groen A. Identification and genetic monitoring of mouse inbred strains using biochemical polymorphism. *Lab. Anim.* 11:209-214, 1977.
17. Krog HH. Identification of inbred strains of mice, *Mus musculus*. I. Genetic control of inbred strains of mice using starch gel electrophoresis. *Biochem Genet.* 14: 319-326, 1976.
18. Katoh H, Moriwaki K, Nomura T. Genetic monitoring : with emphasis on the usefulness of the critical subsets. In "Proceedings of the IX ICLAS International symposium on laboratory animal science". Erichsen S. Coates E. Chatikavanij P. ed. Thai Watana Panich, Bangkok. pp. 261-278, 1990.
19. Esaki K. Current status of genetic monitoring in Japan. In "ICLAS manual for genetic monitoring of inbred mice". Nomura T. Esaki K. Tomita T. ed. University of Tokyo Press, Tokyo. pp. 174-175, 1984.
20. Kahan B, Anerbach R, Later BH, Bath FH. Histocompatibility and isozyme differences in commercially supplied "BALB/c" mice. *Science*, 217:379-381, 1982.
21. 김재연, 조정식, 우계승 등. 근교계 실험동물의 유전적 모니터링에 관한 연구. 국립보건원보. 24:903-912, 1987.