



형질전환 마우스 모델 발암성 평가의 최신 지견

손우찬¹ · 김배환² · 장동덕³ · 김철규³ · 한범석³ · 김종춘⁴ · 강부현⁵ · 이제봉⁶ · 최양규⁷ · 김형진⁷

¹Huntingdon Life Sciences, Woolley Road, Alconbury, Huntingdon, UK,

²주태평양 기술연구원 전임상연구센터, ³국립독성연구원 독성연구부,

⁴전남대학교 수의과대학 독성학교실, ⁵한국화학연구원 안전성평가연구소,

⁶농촌진흥청 농업과학기술원, ⁷한국생명공학연구원 질환동물모델평가연구소

Recent Progress in Transgenic Mouse Models as an Alternative Carcinogenicity Bioassay

Woo-Chan Son¹, Bae-Hwan Kim², Dong-Deuk Jang³, Chull-Kyu Kim³, Beom-Seok Han³,
Jong-Choon Kim⁴, Boo-Hyon Kang⁵, Je-Bong Lee⁶, Yang-Kyu Choi⁷ and Hyoung-Chin Kim⁷

¹Huntingdon Life Sciences, Pathology, Woolley Road, Alconbury, Huntingdon, PE27 4HS, UK

²Pre-clinical Research Center, AMOREPACIFIC R&D CENTER, Kyeonggi 449-729

³Division of Toxicological Research, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704

⁴Department of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757

⁵Korean Institute of Toxicology, KRIT, Daejeon 305-600

⁶Division of Agricultural safety, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707

⁷Lab. of Animal Model Evaluation, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),
Daejeon 305-600, Korea

Received February 2, 2005; Accepted March 5, 2005

ABSTRACT. Transgenic mouse models have been introduced and accepted by regulatory bodies as an alternative to carcinogenicity assay models to predict and evaluate chemical carcinogens. The recent research outcomes in transgenic mouse models have made progressive advances in the understanding of chemical carcinogenesis and the evaluation of potential human carcinogens. However, these models still remain to be insufficient assay systems although the insufficiencies have been recognised and are being resolved. Based on up to date information from literature, this review article intends to understand currently accepted transgenic mouse models, issues arising from study design, interpretation of the study, results of validation project and their cancer prediction rate, and further perspectives of cancer assay models from the regulatory view point.

Keywords: Transgenic mouse, Alternative cancer bioassay, Tg.rasH2, Tg.AC, XPA^{+/+}, p53^{+/+}.

이상적인 발암성 평가 모델

현재까지 개발된 어떤 발암성 평가모델도 이상적인 발암성 평가모델로 갖추어야 할 요건을 완전히 충족시켜주

는 모델은 없다. Jacobson-Kram *et al.*(2004)은 이상적인 발암성 평가모델이 갖추어야 할 몇 가지 요건을 제시하였다. 첫째, 동물시험에서 일단 발암성 물질로 판명되었으면 이 물질은 사람의 역학조사나 임상적인 결과에서 발암성을 나타내야 한다. 즉, 위양성(false positive)이나 위음성(false negative) 결과를 보이지 않아야 한다. 과거 화학발암 평가과정에서 Delany Clause 이후, 비유전독성 발암물질과 유전독성 발암물질간의 명확한 발암기전의 차이를 고려하지 않고, 일방적인 규제를 실시하였던 오류가

Correspondence to: Hyoung-Chin Kim, Lab. of Animal Model Evaluation, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), PO Box 115, Yusong, Daejeon 305-600, Korea

E-mail: hckim@kribb.re.kr or bhkim@amorepacific.com

있었다. 최근엔 유전독성 발암물질에도 역치(threshold)가 있다는 주장이 있기는 하지만, 동물 발암성시험은 결과적으로 사람의 발암성 여부를 예측하는데 필요한 위해성을 평가하기 위한 것이므로 사람과의 관련성 여부가 우선적으로 예측될 수 있는 모델이어야 한다. 둘째, 어떤 물질이 발암성 물질이라면 그 물질의 발암성 정도가 측정될 수 있는 모델이어야 한다. 독성물질은 노출용량에 따라서 독성의 정도가 달라지므로 발암성 물질도 폭로된 발암성 물질의 용량관계 등과 종양발생빈도에 대한 정보를 동물평가 시스템을 통하여 얻을 수 있어야 한다. 셋째, 동물평가 시스템을 통하여 다양한 종양의 형태와 발생위치에 대한 정보를 얻을 수 있어야 한다. 종양은 발생 부위, 시기, 형태 등에 따라 위해성도 다르고 종양의 진행과정도 다르기 때문에 이에 대한 충분한 정보를 얻는 것이 필요하다. 넷째, 발암성의 형상이나 기전이다. 단순히 발암성의 유무나 종양의 분류 등의 정보획득 외에 분자생물학적인 정보를 포함한 발암발생기전을 이해하는데 필요한 정보를 발암성 검색 시스템을 통하여 얻을 수 있다면, 사람의 발암성을 이해하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것이다. 그리고 마지막으로 가능한 적은 비용으로 단기간 내에 평가할 수 있다면 더욱 좋을 것이다. 이런 모든 조건을 만족시키는 모델을 찾기는 어려우나 몇 가지 평가모델을 통하여 상호 보완적인 정보를 얻을 수 있다면 보다 향상된 발암성 평가가 될 수 있을 것이다.

발암성 검색법의 발전

발암성을 검색하는데 설치류를 이용한 2년 발암성 시험이 오랫동안 이용되어 왔으며, 현재까지 이를 대체시킬 만한 시험법은 없다고 알려져 있다(Ochoa, 2002; Mastorides and Maronpot, 2002). 그러나 2년 설치류 발암성 시험법은 많은 긍정적인 측면에도 불구하고 시험에 비용이 많이 들고, 시험기간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 이 외에도 과학적 측면에서도 몇 가지 단점이 지적되었다. 예를 들면 용량설정시 이용하는 최대내성용량(Maximally Tolerated Dose, MTD)에 근거한 용량설정법의 비합리성, 사용하는 동물 품종에 따라 특정종양이나 병변이 각기 다르게 나타난다는 점, 그리고 발암 형태가 유전독성 기전을 보유한 물질인지 아니면 비유전 독성물질의 기전을 보유한 발암성인가의 차이를 구분하기가 쉽지 않다는 것 등의 단점들이 지적되었다(Ochoa, 2002). 이런 설치류 2년 발암성 시험결과로 사람의 발암 위해성을 예측·평가하는 것이 합리적이지 않은 면이 있다는 것이다. 심지어 1970년대 초반까지 이 시험법으로 평가된 물질의 상당수가 사람의 위해성 측면에서 볼 때 사람의 발암성과 직

접 관련성이 크지 않다고 까지 하였다(ICH S1B, 1998). 따라서 미국의 EPA, FDA 혹은 유럽의 규제기관에서는 좀더 합리적인 발암성시험 프로토콜을 개발하여 정형화하기 위한 노력을 하였다. 이런 이유로 인해 보다 새롭고 효율적인 발암성 검색법에 대한 탐색이 이루어져 왔다. 그러던 중 1980년대에 급격히 축적된 분자생물학 및 유전학에 대한 성과로 발암작용 기전에 대한 이해가 확대되었고, 이를 기초로 한 형질전환 마우스 모델에 대한 연구가 상당한 성과를 거두었다. 1990년대에 이르면서 이들 형질전환 마우스를 이용한 발암성 검색법에 대한 다양한 결과가 소개되었다. 1998년 International Conference on Harmonization(ICH)에서는 설치류를 이용한 2년 발암성 시험의 결과로 사람 발암성의 위해도를 평가하는 방법상 한계를 인식하여 대체 발암성 시험법을 소개 하였는데, 그 중 하나의 가능성으로 제시한 것이 형질전환 마우스를 이용한 발암성 검색법이었고, 형질전환 마우스 모델에 대한 규제기관의 최초문서였다(ICH S1B, 1998). 이 가이드라인은 형질전환 마우스 모델을 규제기관에서 수용할 수 있다는 가능성을 열었다는 데에 큰 의미가 있는 합의였으며, 이는 이 모델에 대한 연구가 활발히 진행되는 계기가 되었다. 또한 가이드라인 발행 이후, 형질전환 마우스를 이용한 발암성 시험결과가 규제기관에 신물질 허가 신청자료로 제출·검토되기도 하였다. 그러나 이 모델은 많은 장점에도 불구하고 아직까지 검증(validation)과 표준화의 확립이 더 요구되는 방법이기도 하다. 본 총설에서는 형질전환 마우스 모델에 대한 연구결과를 소개하고 그 과학적 유용성 및 규제기관의 입장 등에 대하여 검토하여 관련 연구자들의 이해에 도움을 주고자 한다.

형질전환 마우스 모델의 장점

형질전환 마우스 모델은 발암성을 검색 및 평가하는 방법으로서 많은 장점을 가지고 있다. 즉, 종양이 시험물질 투여 후 약 6개월 정도의 단기간 내에 유도되므로 오랜 기간(2년) 요구되는 설치류 발암성 검색법의 단점을 보완할 수 있는 좋은 모델이며, 형질전환 마우스 자체가 특정 유전자 정보를 변형시켜 만들어진 것이므로 형질전환 마우스를 이용한 검색법으로 발암성 기전에 대한 정보를 얻을 수 있으며, 사용 동물을 줄일 수 있다는 것인데, 그럼으로써 동물윤리문제로부터 좀더 자유로울 수 있으며 이를 통하여 발암성 검색에 드는 비용도 절감시킬 수 있다.

대표적인 형질전환 마우스 모델

형질전환 마우스는 마우스의 게놈을 조작하는 방법으로

Table 1. Characteristic features of various transgenic mouse models

Models	Tg.rasH2	Tg.AC	p53 ^{+/-}	XPA
	Nomura and Katsuki, 1990	Leder <i>et al.</i> , 1990	Donehower, 1992	de Vries <i>et al.</i> , 1995
Description	Insertion		Deletion	
	normal human Ha-ras	mutant mouse ν -Ha-ras, x-globin control	p53 ^{+/-}	XPA ^{-/-}
Common Phenotype tumours	Alveolar/bronchiolar adenoma in the lung Hemangiosarcoma in the spleen Squamous papilloma in the skin	Squamous papilloma in the skin	Thymic malignant lymphoma	Malignant lymphoma, but not dominantly
References	Takaoka <i>et al.</i> , 2003	French <i>et al.</i> , 2000	Floyd <i>et al.</i> , 2002	de Vries <i>et al.</i> , 1995

개발한다. 즉, 사람의 종양관련 유전자를 마우스의 전핵에 주입하여 발암성 기전의 개시(initiation)가 시작되게 하거나 배아줄기세포에서 상동 재조합(homologous recombination) 조작을 통해 유전자를 제거 하는 방법으로 만든다. 이런 조작을 한 형질전환 마우스는 화학물질 등의 영향에 민감하게 반응하여 종양이 쉽게 유발되고 또한 상당히 이른 시기에 발생된다. International Life Sciences Institute(ILSI) Health and Environmental Science Institute(HESI)는 총 7가지의 대체 발암성 시험법에 대해서 시험을 평가하였는데 이중 5가지가 형질전환 마우스 모델 이었다(MacDonald *et al.*, 2004). 대표적인 형질전환 마우스 모델을 간략히 살펴보면 다음과 같다(Table 1).

Tg.rasH2 형질전환 마우스 모델

Ras 발암 유전자에는 Ki, Ha, N 등이 있는데 이들 원형 세포 종양유전자(proto-oncogene)가 세포의 분화, 증식 그리고 세포자멸사 등에 중요한 역할을 한다. 이들 유전자에 결함이 생기면 종양유전자가 활성화되고 세포증식의 조절이 어렵게 되어 발암 과정으로 진행된다. 이런 결함이 있는 유전자는 사람뿐만 아니라 화학물질에 의해서 유도된 설치류의 종양에서도 많이 발견되었다(Maronpot *et al.*, 1995). 그러므로 연구자들은 발암과정에 관여된 유전자들을 조작하여 형질전환 마우스를 생산하게 되었다. Tg.rasH2 마우스 모델은 일본의 Nomura와 Katsuki에 의해서 확립되었다(Nomura and Katsuki, 1990). 이것은 5~6개의 human prototype c-Ha-ras 종양 유전자를 유전자의 증진인자와 함께 마우스의 배아 전핵에 주입하여 만든 것이다. 처음 만든 마우스는 C57BL/6L과 BALB/cByJ의 역교배로 만들어졌고 이후 C57BL/6J 암컷으로 20대 이상 유지·보존되고 있다(Morton *et al.*, 2002). 이 Tg.rasH2 형질전환 마우스는 사람과 마우스의 ras 유전자인 p21이 야생형 마우스보다 약 2~3배 높은 수준으로

발현된다. 약 6개월령부터 종양이 형성되기 시작하여 폐의 선종과 선암종, 전위부 유두종, 비장의 혈관육종 등이 나타난다. 유전적으로 안정적이고, 모델 반응의 불안정성 등이 거의 없는 상태로 유지되고 있는 형질전환 마우스 모델이다(Suemizu *et al.*, 2002).

Tg.AC 형질전환 마우스 모델

Tg.AC 형질전환 마우스 모델은 글로불린 유전자의 증진인자와 결합된 ν -Ha-ras 종양 유전자를 가지고 있는 형질전환 마우스이다. 즉 이것은 태아 제타 글로불린과 결합된 ν -Ha-ras 유전자를 FVB/N 마우스의 전핵에 주입하여 얻어진 모델이다(Leder *et al.*, 1990). ν -Ha-ras transgene이 12번과 59번 코돈(codon)에서 점돌연변이를 일으키고 피부종양을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다. 현재까지 이 모델로 많은 시험이 진행되었는데, Tg.AC 형질전환 마우스는 발암증진인자 혹은 발암성을 가지는 화학물질을 피부에 적용하였을 때, 형질전환 유전자가 활성화되어 상피 유두종을 빠른 속도로 발생하게 하는 성질을 가지고 있다(Spalding *et al.*, 1993; Hansen and Tennant, 1994; Hansen *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 1994; Nylander-French and French, 1998; Albert *et al.*, 1996; French *et al.*, 2000). 피부의 유두종이 약 3주 내에 발견되기도 하지만 대개 20주 내에 종양이 나타난다(Tennant *et al.*, 1995). 그러나 이 Tg.AC 모델 마우스의 특징은 형질전환된 유전자가 본질적으로 피부에 발현되지 않으며, 화학물질을 투여하지 않은 마우스에서 유두종이 거의 나타나지 않는다는 것이다. Tg.AC 형질전환 마우스 모델은 유전독성 발암물질 뿐만 아니라 비유전 독성 발암물질에 의해서도 반응하는 것으로 알려져 있다.

p53^{+/-} 녹아웃 마우스 모델

종양억제 유전자(heterozygous p53^{+/-})는 세포주기 조

절 및 DNA 수복에 필수적인 유전자이며 설치류 혹은 사람의 종양에서 이 유전자는 소실 또는 돌연변이 형태로 발견된다. $p53$ 유전자 녹아웃 마우스 모델은 1992년 Donehower에 의해서 작제되었으며, $p53$ 유전자의 4번 인트론과 5번 코돈의 억제 및 소실에 의해서 만들어진다 (Donehower *et al.*, 1992). 하나의 야생형 $p53$ 대립유전자(allele)의 결핍으로 돌연변이 유전자가 유도되며, 이것은 종종 사람의 Li-Fraumeni syndrome 같은 유전적 발암 위험성과도 관련된다(Donehower *et al.*, 1992). $p53^{+/+}$ 유전자 상태에서는 종양억제기능을 상실할 가능성이 높아지거나, 혹은 돌연변이 세포의 확장성 증식으로 유전자의 불안정성이 높아지게 되는 방식으로 발암에 중요한 요소로 작용한다(Tennant *et al.*, 1995). Nullizygous $p53^{-/-}$ 유전자 형질전환 모델에서 많은 수의 종양이 아주 이른 시기에 나타나고 이형접합체(heterozygous) 상태에서는 약 12개월령의 나이에서 배경종양이 매우 낮은 빈도로 보고되고 있다(Harvey *et al.*, 1993a; Harvey *et al.*, 1993b). 이 마우스의 유전적 배경은 C57BL/6(B6)와 SJL 품종에서 기원한다. $p53^{+/+}$ 마우스는 약 70%에서 생애 중 초기에 종양이 발생되고 약 6개월령에 사망하게 된다 (Floyd *et al.*, 2002). 주로 발생하는 배경종양은 악성 림프종, 골육종과 혈관육종 등을 포함한 다양한 육종들이다 (Table 1).

XPA^{-/-} 녹아웃 마우스 모델과 XPA^{-/-}/p53^{-/-} 이중 녹아웃 마우스 모델

DNA 수선 유전자 결핍을 이용하여 만든 형질전환 마우스 모델은 네덜란드의 National Institute of Public Health and the Environment의 de Vries *et al.*(1995)이 선도적인 역할을 하고 있다. 발암시 다단계 발암과정에서 유전적 손상이 나타나게 되는데, DNA 수선 유전자를 조작하여 발암을 촉진하는 것이 이 형질전환 마우스 모델의 배경이다. DNA 수선 유전자가 불활성화 되어 있으므로 이들 유전자로부터 부호화(encoding)되는 단백질은 DNA 손상의 수선과 nucleotide excision repair (NER) 경로에 큰 영향을 미치게 된다. NER은 5개의 서로 다른 DNA 수선과정의 하나인데, 자외선 등에 의해 손상된 DNA를 제거하는 역할을 한다. 사람의 Xeroderma Pigmentosum(XPA) 환자는 자외선에 매우 민감하여 젊은 나이에 피부암으로 사망하게 된다. 그러므로 NER이 정상적으로 기능을 하지 않으면 화학물질 등에 의하여 손상된 DNA가 정상적으로 제거되지 않아서 종양의 발생이 높아지게 된다. 동물의 XPA^{-/-} 유전자와 사람의 XPA 환자의 상관성은 많이 밝혀져 있다(Berg *et al.*, 1997). XPA^{-/-} 모델 마우스에 자외선 조사를 하면 피부종양이 나타나며,

benzo[a]pyrene(B[a]P)을 경구로 투여할 때도 야생형의 C57BL/6보다 더욱 조기에 더 많은 빈도수의 림프종이 나타났다(Vries *et al.*, 1997). 또한 화학물질을 처리 하지 않은 마우스에서는 배경병변으로 나타나는 종양발생율이 현저하게 낮아서 12개월 동안 생존시 약 6% 내외의 종양 발생율만 보였다(Linda *et al.*, 2004). 이것은 이 모델을 이용 하여 오랜 기간 동안 유지시키면서 발암성 검색을 할 수 있다는 것을 의미하므로 이 모델의 큰 장점이 될 수 있다. 이 모델은 어느 특정조직에 발암이 한정되지 않는다는 장점도 있다. Van Oostrum *et al.*(1999)은 XPA^{-/-} 녹아웃 마우스 모델을 $p53^{+/+}$ 이중 녹아웃 마우스와 교배하여 XPA^{-/-}/p53^{-/-} 이중 녹아웃 마우스 모델을 만들었을 때 유전독성 발암 물질에 대한 감수성이 높았으며, 이것은 세포자멸사와 세포주기 정지감소로 인한 것 이라고 설명하였다. XPA^{-/-} 녹아웃 마우스 모델과 XPA^{-/-}/p53^{-/-} 이중 녹아웃 마우스 모델 은 Tg.rasH2 형질전환 마우스 모델, Tg.AC 형질전환 마우스 모델 그리고 $p53^{+/+}$ 녹아웃 마우스 모델과 함께 대체 단기 발암성 평가 모델로 선택되어 ILSI/HESI 프로그램에서 검토되었다(Robinson and MacDonald, 2001).

형질전환 마우스 모델의 표준화에 관련된 쟁점

평가모델의 선정

발암성 검색시 2년 설치류 발암성 시험과 형질전환 마우스 모델을 함께 사용할 때에는 여러 모델 중 어느 형질전환 모델이 적합한지를 결정하여야 한다. 이때 종양의 표현형뿐만 아니라 모델의 작용기전을 고려하여 검색하려는 시험물질에 적합한 모델을 선정하여야 한다. 일반적으로 시험물질의 특성에 따라서 이에 적합한 모델을 결정하게 된다. 유전독성 발암물질이라면 $p53$, XPA와 Tg.rasH2 모델이 적합하다. 이러한 모델들은 유전독성 발암물질을 검색하는데 초점을 맞출 수 있으므로 사전에 물질에 대한 변이원성 시험결과를 충분히 검토해야 한다. 만일 물질의 발암성 기전에 대한 정보를 얻는 것이 목적이라면 $p53$ 모델이 고려대상이 될 수 있다. 이 모델은 또한 용량관계와 역치에 대한 정보를 얻기에도 유리하다. 변이원성을 보이지 않는 물질을 효율적으로 검색하는 모델은 완전성 측면에서 미흡하기는 하나 Tg.rasH2 모델이 유리할 것이다. 이 외에도 대사, 독성동태, 작용기전, 표적장기, 그리고 분자생물학적인 분석 가능성 등이 고려되어야 한다 (MacDonald *et al.*, 2004).

시험기간

형질전환 마우스 모델의 시험기간은 일반적으로 6개월

이 일반적이거나 이는 Tg.AC 및 Tg.rasH2 모델에서 적용되는 시험기간이고 $p53$ 형질전환 모델에서는 논란이 있다. Recio *et al.*(2000)은 $p53$ 형질전환 마우스로 9개월 동안 시험하였을 때에도 배경 종양의 발생빈도가 매우 낮게 나타나는 것을 보고 하였다. NTP에서는 더 많은 시험을 실시하였는데 여기서도 이런 경향이 관찰 되었다(MacDonald *et al.*, 2004). 그러나 Storer *et al.*(2001)에 의하면 대부분의 시험에서 6개월 동안의 시험기간에 양성반응을 보였고, 통계학적으로도 유의성이 관찰되었다. 따라서 시험기간은 모델종류 뿐만아니라 시험방법을 고려하여 각기 다르게 적용해야 할 것이다(MacDonald *et al.*, 2004).

사용동물의 연령

아직 형질전환 모델로 시험된 발암성시험의 수는 많지 않아 시험시작 시기가 시험 결과에 어떤 영향을 미치는지에 대한 정보가 부족한 편이다. 보통은 약 8주령에 시험을 시작하는데 어떤 시험은 12주령에 시작하기도 하였다. 현재까지 이들 시험시작 시기에 대한 면밀한 분석은 잘 되어 있지 않다.

사용동물의 수

형질전환 마우스 모델의 사용 초기에는 각 성별로 한 투여군에 15마리의 마우스를 사용하였다. ILSI/HESI에서도 군당 15마리에 대한 큰 의문을 가지지 않았었다(Floyd *et al.*, 2002). 그러나 FDA의 발암성 평가위원회(FDA Carcinogenicity Assessment Committee)에서는 15마리의 동물수가 통계학적인 유의성을 평가하기에는 부족하다고 지적하였다(Morton *et al.*, 2002). 문제는 고전적인 2년 설치류 발암성평가에서 군당 50마리를 사용하므로 이에 통계학적으로 비슷한 의미를 가질 수 있는 동물수를 사용하여야 한다는 것이다. 통계학적인 관점에서 통계적 신뢰도는 사용하는 동물수가 많고, 배경종양이 많을수록 감소한다. 즉, 배경병변으로 나타나는 특정종양의 발생빈도와 비교하여 발생율이 15% 정도 증가되어야 양성반응이라고 판단할 수 있다. 만일 배경병변으로 약 5%의 발생율을 나타내는 종양은 투여군에서 약 20%의 발생율을 나타내야만 투여물질에 의한 종양이라고 판단할 수 있다. 이런 방식으로 계산하였을 때, 배경병변으로 나타나는 종양이 약 3.75%라면 약 $0.05 > p$ 의 신뢰구간에서 실제로 15% 증가된 종양을 찾아낼 수 있는 동물 수는 약 20~25 마리이다(Morton *et al.*, 2002). 통계적 신뢰도를 높이기 위해서 암수 모든 동물을 합하여 통계처리할 수도 있으나, 이에 대한 찬반 논란도 있으므로 Morton *et al.* (2002)은 적절한 동물수는 각 성별, 투여군당 약 20~25 마리 라고 하였다. $p53$ 형질

전환 마우스 모델에서도 군 당 25마리가 적합하다고 할 수 있다(MacDonald *et al.*, 2004).

양성대조군과 계통간의 차이

대부분의 형질전환 마우스 모델에서 양성 대조군을 사용하는 것은 여러 측면에서 의미가 있다고 여겨지고 있다. $p53$ 모델의 경우 규제기관에서도 양성대조군을 포함할 것을 요구하고 있다(DeGeorge, 2001; Floyd *et al.*, 2002). 특히 $p53$ 모델에서는 p -cresidine을 양성 대조군으로 사용할 것이 권장된다. Tg.AC 모델이나 Tg.rasH2 모델에서도 양성대조군을 사용하는 것이 시험결과 해석에 도움을 준다고 하였다(MacDonald *et al.*, 2004). 이에 대한 전제조건은 표현형으로 나타나는 종양이 안정화되어 있어야 한다는 것이다(MacDonald *et al.*, 2004). 이때 형질전환 마우스를 어떤 품종으로 만들었는가에 따라서 특정종양의 발생빈도가 다를 수 있으므로 이에 대한 고려도 동시에 하여야 한다. 형질전환 마우스 모델은 아직 배경병변이 충분히 축적되어 있지 않으므로 이를 보완하는 데이터 베이스의 확보가 필요하다.

용량 설정

형질전환 마우스 모델에서도 일반독성 시험에서의 같이 3개의 시험물질 처치군과 하나 혹은 둘의 대조군을 둔다. 고용량군의 용량은 MTD 또는 Maximally Feasible Dose (MFD)로 설정한다. 여기에 야생형 마우스의 고용량군과 대조군을 두는 것도 결과해석시 매우 유용한 정보를 준다(Floyd *et al.*, 2002). 6개월간의 형질전환 마우스 모델로 시험을 실시할 때 MTD의 결정은 이 모델에 상응하는 야생형 마우스에서 30일 동안 시험하여 결정한다. 즉 30일 시험에서 체중증가가 10% 이하인 용량수준이 최대내성 용량이다. 그러나 형질전환 마우스로 실시한 이전 시험에서 얻어진 정보를 충분히 검토하여 용량수준을 결정하여야 한다. 왜냐하면 2년 발암성시험에서 MTD를 기준으로 한 용량설정이 너무 과도한 용량인 것으로 지적된 것처럼 형질전환 마우스 모델에서도 독성이 나타날 가능성이 있기 때문이다(de Vries *et al.*, 2004).

관찰항목

형질전환 마우스를 이용한 발암성시험도 일반적으로 독성시험 혹은 발암성시험에서 측정하는 관찰항목 즉, 체중, 사료섭취량, 임상증상, 독성동태 등을 측정한다(Floyd *et al.*, 2002). 비교 독성동태학적인 관점에서 형질전환 마우스와 야생형 마우스간의 차이가 있는 지를 보기 위한 몇 가지 시험이 실시되었다. 그러나 기초대사 측면에서 여러 효소활성이 형질전환 마우스와 야생형 마우스에 비슷하게

나타나는 것으로 알려져 있다(Sanders *et al.*, 2001). 병리검사도 모든 장기의 부검과 조직병리학적 검사를 실시한다. 그러나 통계학적 처리의 경우 형질전환 마우스 모델에서는 사망률이 많지 않으므로 사망시기를 통계에 고려하는 Peto test 등을 적용하는 대신에 Cochran-Armitage test나 Fischer's Exact test 등의 통계처리 방법을 사용한다(Floyd *et al.*, 2002).

형질전환 마우스 모델 발암성 시험 결과의 평가 방법

형질전환 마우스 모델이든 혹은 2년 설치류 발암성시험이든 대조군과 비교하는 방법으로 평가한다. French *et al.*(2000)은 형질전환 마우스 모델을 사용하여 시험할 때 세가지 충족조건을 제시하였다(Floyd *et al.*, 2002). 즉, 첫째, 시험계획서가 규제기관 등에서 제시 하는 최소한의 요건을 갖춘 시험이어야 하고, 둘째, 양성대조군으로 사용한 동물들이 명확한 종양성 반응을 보여야 하며, 마지막으로, 암수 모두 MTD나 MFD의 용량으로 투여되어야 한다고 하였다. 시험결과를 평가할 때 양성반응으로 판단하는 경우는, 시험에 사용된 음성대조군보다 종양의 증가와 암컷이나 수컷의 한쪽 성에서만 증가가 관찰되어야 한다. 이때, 배경종양의 발생율이 1% 이상인 빈발종양의 경우에는 반드시 종양의 발생빈도가 통계적인 유의성을 보여야 하며, 발생빈도가 비교적 낮은 종양의 경우에는 통계적 유의성을 보일 필요는 없지만 생물학적인 견지에서 유의한 결과일 수가 있다. 그렇다고 단 하나의 종양이 발생된 것을 생물학적으로 의미있는 종양이라고 판단하기는 곤란하다. 또한 시험결과를 양성으로 판단하려면, 종양이 빈발종양이든 드물게 발생하는 종양이든 배경종양 발생예보다 발생 빈도가 통계학적인 유의성을 나타내면서 증가된 발생 예를 보여야 한다. 이런 판단을 하는데 보조적인 자료로 활용할 수 있는 데이터로는 군간의 용량·반응 상관성, 그리고 과형성의 증가에 등이 있다. 이를 달리 표현하면 음성결과의 경우, 음성대조군과 비교시 빈발종양의 발생 예가 통계학적인 유의성을 나타내는 정도로 증가하지 말아야 하며, 희귀한 형태의 종양은 생물학적인 의미를 가지는 정도로 증가하지 않아야 하고, 발생빈도가 작제된 동물의 유전적인 배경종양 발생 예보다 낮아야 한다(French *et al.*, 2000; Floyd *et al.*, 2002).

모델의 검증

NTP 및 ILSI 검증 연구과제

어떤 화학물질에 대해 독성 및 발암성에 관한 정보를

얻으려면 적어도 7년이란 긴 세월이 걸린다. 장기간의 독성시험이 종료되어도 그 결과로 부터 발암성에 대한 작용기전과 사람에의 연관성에 대한 정보를 얻기에는 질과 양적으로 턱없이 부족하다. 이런 공감대 하에 NTP에서는 발암성대체시험으로서의 가능성을 확인하기 위하여 형질전환 마우스 모델을 이용한 많은 발암성 시험을 실시하였다(Eastin *et al.*, 1998; Bucher, 1998; Pritchard *et al.*, 2003). ILSI HESI에서도 민간회사가 참여하는 공동 콘소시엄 형태로 형질전환마우스를 이용하여 약 22개의 시험물질에 대한 발암성 실험을 실시하였다(Table 2). HESI의 Alternatives Carcinogenicity Testing(ACT) technical committee는 세가지 목표로 활동하였는데, 첫째, 사람의 발암성에 대한 평가법의 제공 및 개발에 관련된 과학적인 기여를 하고, 둘째, 발암성 평가에 관련된 데이터 베이스의 축적 및 공유를 하며, 그리고 마지막으로 이들 활동을 통한 국제적 가이드라인의 개발에 기여한다는 것이다. 이 프로젝트에는 Aventis, Bayer 등 대표적인 관련업체 24개 회사가 참여하고, 미국 FDA, 일본의 CIEA 등 공공기관, 미국 미시간 주립대학, 일본의 게이오 대학, 그리고 네덜란드의 독성수탁 기관인 TNO 등 11개 기관 등 총 50여 실험실이 참여하였다. 이들의 NTP 연구 결과는 Toxicologic Pathology volume 29(supplement), 2001에 상세히 소개되어 있고, ILSI HESI의 검증결과도 2003년 미국 NTP 워크샵의 형태로 발표되어 The use of genetically-modified mouse assays for identifying human carcinogens: a basic understanding and path forward란 제목으로 2004년 Toxicological Sciences에 게재되었다(MacDonald *et al.*, 2004). 2003년 종료된 ILSI HESI 프로젝트의 성과는 미국 유럽 및 일본에서 p53 모델과 rasH2 모델을 약물의 발암성 검색방법으로 인정하게 된 것이라고 할 수 있다(Table 5). 이어서 HESI의 Cancer Hazard Identification Strategies 소위원회가 2004년 6월 새로운 발암성 검색방법을 개발하는 것을 임무로 새롭게 발족되었다.

NTP의 마우스 모델에 대한 검증은 두 가지 방향으로 실시되었다. 첫 번째는 돌연변이를 일으키는 발암물질을 신속하게 검출하는 방법이고, 두 번째는 분자생물학적인 측면에서 유전자의 역할 및 기능이 발암성에 관여하는 기전을 파악하고, 사람과 마우스에서 같은 형태로 나타나는 조직학적인 표현형에서 실제로 유전자의 차이가 어떻게 다른지 등을 살펴보는 방식 등이었다.

초기단계에서는 NCI/NTP의 설치류 2년 발암성시험에 사용되었던 화학물질을 가지고 형질전환 마우스를 이용한 모델에 적용하여 그 결과를 비교하는 방식으로 진행하였다. 이때, 화학물질은 유전독성 발암물질과 비유전독성 발

Table 2. Profiles of strategic testing projects and outcome response to the compounds

Classes	Compounds	IARC classification	Models		Tg.rash2		TG.AC		p53 ^{+/+}		XPA ^{-/-}		XPA ^{+/+} /p53 ^{+/+}	
			G.T	No. S	No. S	Resp	No. S	Resp	No. S	Resp	No. S	Resp	No. S	Resp
1 human carcinogen (genotoxic)	Cyclophosphamide	1	+	3	+, +, eq	2	eq	1	+	1	+	nd	nd	nd
	Melphalan	1	+	1	nd	1	eq	1	+	1	+	nd	nd	nd
	Phenacetin	2A	+	1	+	1	-	1	-	2	-, -	1	-	-
2 human carcinogen (imm. supp.)	Cyclophosphorin A	1	-/eq	2	eq	1	+	2	eq	3	-, +, +	1	+	2
	Diethylstilbestrol	1	+/eq	3	+	1	+	1	-	1	-, +	1	+	1
3 hormones	Estradiol	1	+/eq	3	-	1	+	1	-	3	-, eq	1	-	1
	Phenobarbital	2B	-	2	-	1	inad	1	inad, inad	2	-, -	1	-	1
4 rodent carcinogens/putative human non-carcinogens (epidemiology)	Clofibrate	3	-	3	eq, +	1	+	1	nd	3	-, -	1	inad	nd
	Methapyrilene	3	-/eq	1	-	1	-	1	-	2	-	-	-	1
	Reserpine	3	-	1	-	1	nd	1	nd	1	-	1	nd	nd
	Dieldrin	NE	eq	1	-	1	-	1	nd	1	-, -	1	nd	nd
5 rodent carcinogens/putative human non-carcinogens (mechanism)	Haloperidol	NE	-	1	-	1	nd	1	nd	2	-	2	-	1
	Chlorpromazine	NE	-	1	-	1	nd	1	nd	2	-, -	1	nd	nd
	Chloroform	2B	-	1	-	1	nd	2	nd	1	eq	1	nd	nd
	Metaproterenol	NE	-	1	-	1	nd	1	nd	2	-, -	1	nd	nd
	WY-14, 643	NE	-	1	nd	1	-	1	eq	1	-	1	+	nd
	Diethylhexylphthalate	3	-/eq	1	+	1	-	1	-	1	eq	1	-	1
	Sulphamethoxazole	3	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1
6 non-carcinogens	Ampicillin	3	-	1	-	1	nd	1	nd	1	-	2	-	nd
	D-Mannitol	NE	-	1	-	1	nd	1	nd	1	-	1	-	1
	Sulfisoxazole	3	eq	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	nd
7 genotoxic, rodent carcinogen	Glycidol			1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	nd
	Total			31	18	19	34	16						

G.T, genotoxicity; No. S, no. of studies; Res, response; NE, not evaluated; +, positive; -, negative; -, negative; eq, equivocal; inad, inadequate; nd, not tested. Adapted from de Vries *et al.*, 2004; ILSI HESI web sites (<http://hesi.ilsil.org>; <http://www.item.fraunhofer.de/reni>).

암물질, 비 발암물질들을 동시에 사용하였다. NIEHS/NTP에서 선정한 첫 번째 그룹은 이들 모델들이 잘 반응하는지를 확인하기 위하여 사람과 설치류의 돌연변이원성 화학물질을 선정하였으며, 두 번째 그룹에서는 NTP에서 시험되고 있는 물질들로 구성하였다. 이러한 복잡한 구성은 선입견에 의한 차이를 배제하려는 목적이었다. ILSI HESI 검증 프로젝트에서는 시험 계획서와 병리검사 그리고 통계학적 검사를 일정하게 통일시키려고 하였다. 충분한 데이터, 사람의 위해성 평가결과, 2년 설치류 시험결과여부, 작용기전 등의 엄격한 기준으로 시험할 물질들을 선정하였으며, 사람의 유전독성 발암물질, 비유전독성 발암물질, 비발암물질 등으로 상세하게 분류하여 전략적인 시험이 될 수 있게 하였다(Table 2).

검증 결과

검증 프로젝트의 결과는 매우 성공적이었다(Table 2). 예상대로 이들 시험결과에서 돌연 변이원성 발암물질들은 이들 시험계에서 잘 반응하였다. $p53$ 모델에서는 변이원성 발암물질이 특히 잘 반응하는 것으로 나타났으며, 일반적으로 Tg.AC 모델에서는 유전독성 및 비유전 독성 발암물질에 대한 반응이 높은 비율로 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 모델마다 차이가 있지만, 대체로 대부분의 설치류에서 발암성을 보이는 사람의 비발암성 물질은 형질전환 모델에서도 대부분 음성으로 나타났었다(de Vries *et al.*, 2004). $p53^{+/}$ 모델에서는 12개의 설치류 발암성 화학물질중 10개가 음성으로 나타났으며, 2개가 모호한 것(equivocal)으로 판명되었다. 그러나 Tg.rasH2 모델에서는 11개 중 2개 만이 양성을 보여서 다소 부정확한 결과를 보였고 XPA/ $p53$ 모델에서는 모두 음성으로 나타났었다(Table 2). 그러나 de Vries *et al.*(2004)은 5개의 시험으로 최종적인 결론을 내리기에는 실시된 시험의 숫자가 충분하지 않다고 하였다. NTP 결과에서도 38개의 시험물질중 13개는 반응하지 않는 것으로 나타났는데, 그 중 11개의 화학물질이 2년 설치류 시험에서는 발암성을 보였으나 형질전환 모델에서는 반응하지 않았다. 2개의 화학물질은 B6C3F1 마우스에서 흔히 관찰되는 배경종양인 간세포 선암으로 나타났고 4개의 물질들 역시 간 종양과 신장 혹은 부신의 종양이 같이 나타났다. 그 중 한 물질에서는 설치류 2년 시험에서 랫드 비강의 종양과 마우스 간의 종양이 나타났다.

형질전환 마우스 모델을 사용하기를 주저하는 이유는 혹시 형질전환 마우스 모델이 너무 예민해서 발암성을 과잉으로 검색해 낼지도 모른다는 우려도 있기 때문이다. NTP 시험에서도 2개의 화학물질이 2년 장기시험에서 음성의 결과를 보였지만 형질전환 마우스 모델에선 양성을

보인 경우가 있었다. 한 예로, Tg.AC 모델에서 흔한 종양이 아닌 골수이형성(myelodysplasia)을 보였기 때문에 $p53^{+/}$ 모델은 인정하나 Tg.AC 모델을 인정 하기는 어렵다는 것이 현재의 입장이다. 이유는, 화학물질이 발암성을 나타내는 것이 vHa ras 유전자의 제타 글로빈 증진인자를 활성화시키는 것인데, 이는 진정한 발암 물질에 의한 발암유도인지 아니면 종양증진 효과에 의한 것인지를 분별하기 어렵다는 이론에 근거한 것이다. 그러나 이런 결과로도 형질전환 마우스 모델이 과잉으로 발암성을 검색하는 모델이라고 판단하기는 힘들다. ILSI HESI 검증 연구과제의 결과에서 보듯이 오히려 2년 설치류 시험과 비교할 때, 위양성 결과를 감소시키는 것으로 나타났다. Table 2에서처럼 어떤 모델에서도 비발암성 물질이 양성으로 나타나지 않았다.

그러나 형질전환 마우스 모델은 아직도 위음성의 가능성이 있기 때문에, 발암성 검색에 완벽한 모델이라고 할 수 없다. 즉 형질전환 마우스모델에서도 발암물질을 검색해 내지 못하는 경우가 있다. 사람의 발암물질인 phenacetin은 Tg.rasH2 모델에서만 양성으로 나타났고 나머지 어떤 형질전환 모델도 발암성 양성의 결과를 보이지 않았다. de Vries *et al.*(2004)은 아마도 이 물질 자체가 아주 약한 발암물질이거나 또는 종양을 검색하기엔 형질전환 마우스 모델의 시험기간이(6개월) 짧았다고 여겨진다고 하였다. 그러나 발암성 물질이 형질전환 마우스에서 검색되지 않은 이유가 투여량의 문제인지, 시험기간이 짧아서인지 혹은 품종간의 차이인지에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

또 다른 예로, 비유전 독성 발암물질이면서 면역억제 작용기전으로 발암성을 나타내는 cyclosporine A는 모든 모델에서 양성을 보였다. 이는 $p53$ 과 XPA 모델이 유전독성 발암 물질만 검색해 낸다고 믿었던 것과는 상이한 결과였다. 그러나 이런 모든 결과를 종합해 볼 때 형질전환 모델이 발암성시험에 적용할 완전한 모델은 아니지만 강력한 발암성 검색법이라고 주장 할 수는 있다.

형질전환 마우스 모델의 적중률

ILSI HESI에서 대규모의 전략적인 검증 연구과제가 매우 성공적인 결과를 보여주었지만 대부분의 시험물질이 일반화학물질이 아닌 의약품에 국한되었고 또한 충분한 검증을 하기에는 시험수 및 화합물질 수가 충분하지 않다. NTP에서 실시한 10년 간의 자료는 ILSI HESI 검증 연구과제에서 이용한 모델보다 더욱 다양한 모델들을 사용하였는데(Tennant *et al.*, 1996), 이들 결과를 토대로 Pritchard *et al.*(2003)이 형질전환 마우스 모델의 발암성 예측 정확도를 발표하였다. 이는 미국 NIHES(National

Institute of Environmental Sciences)의 그간 실시된 대부분의 형질전환 마우스 모델을 이용한 발암성 시험의 결과를 조사하여 2년 설치류 발암성시험의 결과와 비교한 것이었다. 이 보고에 의하면 NTP의 ROC(Report on Carcinogen) (NTP, 2002)와 IARC(International Agency for Research on Cancer)의 분류법을 기준으로 하였을 때, 14개의 화학물질이 알려진 사람의 발암물질(known human carcinogen)로, 32개의 화학 물질은 사람의 발암 가능물질(probable or possible human carcinogens), 그리고 53개 화학 물질이 사람에서 발암과 관련된 증거가 명확하지 않은 물질(inadequate evidence of human carcinogenicity)이었다(Pritchard *et al.*, 2003; Jacobson-Kram, 2004). 이는 형질전환 마우스 모델로 발암성 시험을 실시하는 것이 얼마나 유용한지에 대한 요약된 정보를 주기 때문에 이 분야 연구자들의 큰 관심을 끌었다. 한편 유럽에서는 네덜란드 연구자들에 의한 XPA/p53 이중 녹아웃 마우스 모델에 대한 연구가 많이 발표되고 있다(de Vries *et al.*, 1995, 1997, 2004). 이 모델은 ILSI HESI에 포함시켜 검증이 진행되었지만 그 숫자가 적다는 이유로 미국에서 유용성에 의문을 제기하는 모델로 인식되고 있었으나 최근 결과들은 매우 정확도가 높다고 보고되고 있다(de Vries *et al.*, 2004; Linda *et al.*, 2004). de Vries *et al.*(2004)은 최근 XPA/p53 모델에서 생산된 결과와 NTP, ILSI HESI에서 수행한 결과를 모아서 형질전환 마우스 모델의 정확도에 대한 보고서를 발표하였다. 현재까지 진행된 대부분의 결과들을 2년 설치류 발암성 시험의 결과와 비교하여 간략히 소개하면 Table 3 및 4와 같다. Table 3에서와 같이 형질전환마우스 모델들은 유전독성

발암물질과 비유전독성 발암물질로 구별하는데 탁월한 결과를 보였다. 위에서 살펴본 바와 같이 p53 모델은 유전독성 발암물질에 대한 적중률이 높았다. Table 4에는 de Vries *et al.*(2004)의 결과를 종합한 것인데 p53 모델과 더불어 XPA/p53 모델의 적중률이 상대적으로 높음을 알 수 있다. 특히 발암성 물질이 아닌 IARC분류법 class 3에 해당하는 물질에 대해서는 어느 시험에서도 양성결과가 나오지 않았다. 그러나 이 결과는 아직까지 p53 모델에 비해 XPA/p53 모델의 시험된 숫자가 적다는 측면이 있으므로 더욱 많은 시험으로 증명되어야 할 것으로 여겨진다.

형질전환 마우스 모델에서 제기되는 문제점

형질전환 마우스 모델에서 나타나는 위양성 및 위음성과, 앞에서 살펴 본 불완전성 이외에도 용량관계가 미흡한 면과 이것을 설명하는 독성동태학적인 정보가 부족하다는 것 등이 문제점으로 제기되었다(Bucher, 1998; <http://ntp.niehs.nih.gov/>).

하나의 이슈는 위해성 평가에 관련된 것이었다. 형질전환 마우스 모델의 단점은 사람에서의 위해성 평가에서 제기되는데, 사람은 형질전환된 상태가 아니기 때문에 형질이 전환된 마우스로 시험한 결과를 사람에게 외삽하는 데에는 큰 거리가 있다는 것이다. 또한 몇몇 종양에 대해서 양성반응을 보이지 않았다는 것인데, 이는 형질전환 마우스 모델에 대한 또 다른 단점으로 인식되고 있다. 사람 혹은 설치류의 종양에서 ras 유전자나 p53 유전자가 종양에서 변형된 채로 발현하는 것은 사실이나 역시 많은 수의 종양에서 이런 유전자변이 없이 종양이 발생하는 것도 사실이다. 그러므로 종양이 이런 유전자와 관련없이 발생

Table 3. Summary results of the transgenic carcinogenicity bioassays

	Noncarcinogens		Carcinogens		
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Tg.rasH2	6	17	21	7	75% (38/51)
Tg.AC	10	29	17	6	74% (44/62)
p53 ^{+/+}	1	27	21	10	81% (48/59)
XPA ^{+/+} and/or XPA ^{+/+} /p53 ^{+/+}	1	8	7	2	83% (15/18)
NTP life time bioassay	18	17	23	0	69% (40/58)

*, based one of the two or both models; Adapted from Jacobson-Kram *et al.*, 2004; Pritchard *et al.*, 2003; de Vries *et al.*, 2004.

Table 4. Positive response of the transgenic carcinogenicity bioassays classified by IARC classification

	Models				
	Tg.rasH2	Tg.AC	p53 ^{+/+}	XPA ^{+/+} and/or XPA ^{+/+} /p53 ^{+/+}	
1	57% (4/7)	89% (8/9)	83% (10/12)	100% (4/4)	81% (26/32)
2A	100% (9/9)	50% (2/4)	62% (5/8)	50% (1/2)	74% (17/23)
2B	67% (2/3)	64% (7/11)	55% (6/11)	67% (2/3)	63% (24/38)
3	29% (4/14)	21% (3/14)	0% (0/13)	0% (0/6)	15% (7/47)

*, based one of the two or both models; Adapted from de Vries *et al.*, 2004.

하는 종양일 경우, 이들 유전자의 형질변환 모델로는 정확한 발암성 평가를 할 수 없다고 보는 것이다.

마우스 계통마다 종양에 대한 감수성이 다른데 형질전환 마우스 모델에서도 동일한 영향이 관찰되는지도 하나의 쟁점이다. Harvey *et al.*(1993a, b)은 형질전환 마우스를 이용하여 계통간 종양의 감수성 차이가 존재한다는 것을 입증하는 다양한 시험을 실시하였다. $p53^{-/-}$ 모델로 양성 림프종이 많이 나타나는 품종과 덜 나타나는 품종을 비교하였는데, 이 형질전환 모델이 야생형 마우스보다 림프종이 더 많이 발생하는 것을 관찰했다. 또한 아주 드문 종양인 기형종이 어떤 특정 계통을 배경으로 작제된 형질전환 마우스에서만 증가하는 것을 관찰하였다. 형질전환 모델이 개발될 당시에는 이런 계통에서 다른 종양 감수성이 나타나지 않을 것으로 생각하였다(Tennant *et al.*, 1995). 왜냐하면 형질전환 마우스는 6개월간의 짧은 시험기간에 시험하는 것이므로 유전자 조작에 의한 영향을 받지 않은 종양은 나타나지 않을 것으로 예상하였기 때문이다.

형질전환 마우스 모델에 대한 일반적인 이해 및 합의

대체로 형질전환 마우스 모델을 이용한 발암성 검색시험의 적응률은 높은 편이었다. 대부분의 모델들은 잘 알려진 사람의 발암물질에 대해서는 거의 모두 반응하였다. 그러나 2년 설치류 발암성 시험에서 검색된 종양에 대하여 모두 양성 반응을 보이지는 않았다. 위양성 반응은 있었지만 이것이 형질전환 마우스가 모든 종양에 대하여 매우 예민하다는 의미는 아니었다. 앞서 언급된 형질전환 마우스 모델에 대한 많은 연구결과의 축적으로 규제기관 및 관련 학계에서 어느 정도 합의된 이해를 도출할 수 있었다. 첫째, 부분적인 차이가 있기는 하지만 미국, 유럽, 그리고 일본의 규제기관에서 형질전환 마우스 모델에 대하여 화학물질의 발암성 검색법의 대체방법으로 인정하고 있다는 것이다(Table 5; ICH, 1997). 그러나 이런 모델들을 이용한 시험결과는 발암성 시험의 일부로서만 인정이 될 뿐이지 형질전환 모델의 이용결과가 바로 해당 물질의 발암성을 결정하는 시험으로 인정되지는 않고 보충적인 데이터로 활용된다. 그 중 Tg.rasH2, Tg.AC, $p53^{+/+}$,

XPA^{+/+}/ $p53^{+/+}$ 등이 현재 가장 유용한 것으로 받아들여지고 있다(MacDonald *et al.*, 2004). Tg.AC 모델은 피부적용 물질에 한해야 한다. 미국에서는 현재 가장 많은 경험을 가지고 있는 것이 $p53^{+/+}$ 모델이다. 유럽에서는 이 모델이 유전 독성 발암물질과 비유전 독성물질 모두에 반응하는 것으로 받아들이고 있지만, 미국과 일본은 오직 유전독성 발암물질에 한하여 인정하고 있다(MacDonald *et al.*, 2004; Table 4). 그러나 Tg.rasH2 모델로 비유전독성 발암물질에 대한 많은 시험이 필요하고 $p53^{+/+}$ 모델로 유전 독성 발암물질에 대한 더 많은 시험해 보아야 할 것이다. 둘째, 구체적인 시험 방법에서, Tg.rasH2, Tg.AC, $p53^{+/+}$, XPA^{+/+}/ $p53^{+/+}$ 모델 모두에서 약간의 차이가 있지만 대체로 공통적인 견해를 가지고 있고 약간의 차이는 조율중이다. 즉, 동물수는 한 군당 20~25마리로 무리없이 받아들여지는 반면, $p53^{+/+}$ 모델의 시험기간을 6개월에서 9개월로 연장하는 것의 유용성에 대한 논의가 진행중이다. 셋째, 배경자료가 부족하기 때문에 더 많은 배경 자료가 모아져야 하고, 양성 대조군에 대한 정의, 시험시작시의 연령, 그리고 더 다양한 모델에 대한 연구가 이루어져야 한다는 것 등에 대한 합의가 이루어지고 있으나 충분히 평가된 상태는 아니다(de Vries *et al.*, 2004).

NTP 위원회에서도 몇 가지에 대하여 권고를 하였는데, 첫 번째, 발암성에 대한 연구와 시험에 적합한 모델을 찾기 위한 노력은 더욱 진행되어야 하고 두 번째, $p53$ 모델은 어느 정도 유용성이 있지만 Tg.AC 모델에 대해서는 회의적으로 생각하였다. 세 번째, 용량반응관계, 독성동태의 정보, 그리고 2년 설치류 시험에서 관찰되는 종양이 나타나지 않는 형질전환 마우스 모델의 한계를 극복 및 보완하여야 한다고 하였다. 그리고 마지막으로 형질전환 마우스에서 생산된 발암성 시험 결과를 어떻게 사람의 위해성 평가에 적용할 것인가에 대한 연구가 더 많이 진행되어야 한다고 하였다(Bucher, 1998; <http://ntp.niehs.nih.gov/>).

규제기관의 경험 및 입장

미국 FDA에서 발표한 ICH S1B 이후, 형질전환 마우스

Table 5. Regulatory perspectives for transgenic mouse models in carcinogenicity bioassay

Models	FDA, USA	CPMP, EU	Japan, MHLW	Korea, KFDA
Tg.rasH2		Accepted, genotoxic and non-genotoxic		in-progress
$p53^{+/+}$	Accepted, clear or equivocal genotoxic	Accepted, genotoxic or non-genotoxic	Accepted, clear or equivocal genotoxic	in-progress
Tg.AC	Accepted, dermal application only		Not accepted	in-progress
XPA ^{+/+} , XPA ^{+/+} / $p53^{+/+}$		Not accepted		in-progress

Adapted from MacDonald *et al.*, 2004; Watanabe, 2004.

를 사용한 결과를 제출하는 것이 원칙적으로는 가능하게 되었으나 제약회사 등에서는 위양성 결과 등을 이유로 형질 전환 마우스 모델에 회의적인 입장이었다. 그러나 형질전환 마우스 모델은 규제기관으로부터 점점 더 신뢰성을 얻어가고 있는 추세이다.

미국 FDA의 형질전환 마우스 모델의 평가경험

과거 2년간 미국 FDA에 제출된 마우스 발암성 시험의 약 25%가 대체시험법이었다 (MacDonald *et al.*, 2004). 미국 FDA의 CDER(Center for Drug Evaluation and Research)에서 2003년 5월까지 형질전환 마우스 모델을 이용한 발암성 시험의 계획서가 총 81건이 제출되었다. 그 중 50건은 $p53$, 26건은 Tg.AC, 4건은 Tg.rasH2, 그리고 1건은 XPA/ $p53$ 이었다. 제출된 24건의 시험결과에서 사용된 마우스 모델은 $p53$ 가 17건, Tg.AC가 5건, 그리고 Tg.rasH2가 2건이었다. 또한 이의 발암성결과를 살펴보면 5건의 Tg.AC 중 3건, 그리고 하나의 $p53$ 모델에서 양성결과가 나타났고 나머지는 모두 음성결과를 보였다(Jacobson-Kram, 2004; MacDonald *et al.*, 2004). 제출된 시험계획서의 시험에 사용되는 동물 모델들이 $p53$ 이었는데, 이는 유전독성 발암물질에 대하여 $p53$ 모델이 예측도가 높다는 것을 의미한다. 반면 Tg.rasH2 모델은 ILSI HESI의 결과를 보더라도 유전독성 및 비유전독성 발암물질에 대하여 비교적 잘 반응한다는 것을 알 수 있다.

규제기관의 입장

ILSI HESI 워크숍에서는 연구된 각 모델에 대하여 각국의 규제기관의 입장이 어떻게 서로 다른지를 정리하여 발표하였다(MacDonald *et al.*, 2004; Table 4). $p53$ 모델에 대한 입장을 살펴보면 유럽의 Committee for Proprietary Medicinal products(CPMP)는 수용하는데 꼭 유전독성 발암물질에만 한정하지 않았다는 것이다. 반면 미국 FDA와 일본 NIHS에서는 명확하거나 불분명한 유전독성 발암물질에 대하여서도 긍정적인 입장을 취하고 있다. Tg.rasH2 모델에 대해서는 CPMP, 미국 FDA, 그리고 일본 National Institute of Health Sciences(NIHS) 모두 유전독성 발암물질 및 비유전독성 발암물질 양쪽에 대해서는 긍정적인 입장을 보이고 있다. Tg.AC 모델에 대해서는 유럽 CPMP에서는 오직 발암성 물질로 의심되는 피부적용 물질에 대한 스크리닝 목적으로 한정하는 신중한 입장을 보이고 있다. 하지만 유럽 CPMP와 미국 FDA의 동의하에 이 모델은 피부적용 약물에 한정해 사용하는 것이 허용되며 일부의 예에서는 전신분포를 위한 피부적용 시험의 경우에 적용한 예도 있었다(MacDonald *et al.*,

2004). 일본 NIHS에서는 이 모델의 표현형이 안정화되어 있지 않은 것에 대하여 우려를 표시한 적이 있다 (MacDonald *et al.*, 2004). XPA^{+/+}, XPA^{-/-} 및 $p53$ ^{+/+} 모델에 대해서는 사람에게 알려진 발암물질에 대하여 보다 많은 자료가 필요하다는 신중한 입장을 보인 반면, 미국 FDA와 일본 NIHS에서는 모두 이 모델에 대한 경험이 없음을 들어 부정적인 입장을 보인 상태이다. $p53$ ^{+/+} 모델에 대해서는 미국과 유럽이 약간의 견해차를 보이기 때문에 적절한 조화가 요구된다. 이런 입장의 차이로 보아서 이 $p53$ ^{+/+} 모델은 발암물질의 유전독성 여부를 확실하게 결정하는 모델로 사용하기 보다는 발암 가능성이 의심되는 물질에 대하여 정보를 얻는 시험에 사용되어야 할 것이다.

형질전환 마우스 모델에 대한 제약업계의 이용

1997년 미국의 Federal Register에서도 이를 신약의 발암성 평가 자료로 제출할 경우에 인정한다는 것을 밝힌 바 있음에도 불구하고 아직 소수의 자료만이 제출되어 검토되고 있는 실정이다(ICH, 1997). 그것도 미국과 일본에서는 비교적 활용도가 높아지는데 반해 유럽에서는 더욱 보수적인 입장을 보이고 있다. 이렇게 제약회사에서 이를 이용하는데 적극적이지 못한 몇 가지 이유가 있다. 첫째, 제약회사에서 형질전환 마우스 모델을 이용함에 따른 이익을 잘 인식하지 못하고 있다. 형질전환 마우스 모델을 사용하면서 얻을 수 있는 장점으로 동물의 수를 줄일 수 있고, 시험에 드는 노동력, 시험시설 등의 비용을 절감하고, 또한 시험기간을 단축시킬 수 있다는 것 등인데, 제약회사의 입장에서 큰 이점으로 인식하기에는 설득력이 부족하다. 의약품을 개발하는데 천문학적 비용이 소요되며, 신약개발 자체를 도박에 비유할 정도로 신약개발이 성공할 확률이 낮는데, 시험계의 우수성이 아닌, 비용적인 측면에서의 이점을 큰 장점으로 인식시키기는 어렵다. 더군다나 랫드 2년 발암성시험을 반드시 수행해야 하는 입장에서는 발암성 여부가 신약개발에 중요한 시험이고 신약개발 기간의 단축이 요구된다고는 하나 78주 마우스 시험을 6개월 시험(26주)으로 대체시키는 것 자체가 신약개발 프로그램에 큰 영향을 준다고 여기지 않기 때문이다. 둘째, 발암성 시험으로 사용하기에는 아직 배경 병변 데이터가 너무 부족하다. 아무리 형질전환 마우스가 배경병변 종양이 적다고 해도 결국 종양 발생률과 배경종양 빈도와 비교하는 것인데, 비교할 만한 충분한 데이터가 축적되어 있지 않다는 점이 실제 이 모델을 이용하는 제약회사가 불안해 하는 점이다. 마지막으로 또 하나의 이유는 아직 형질전환 마우스 모델을 사용해 발암성 시험을 수행하여 허가를 받은 회사의 선택이 부족하여 불안해

한다는 것이다. 이는 형질전환 마우스 모델에 대한 과학적 유용성에 대한 불안감도 있겠지만 대체로 형질전환 마우스에 대한 과학적 이해의 부족에서 오는 경우가 적지 않을 것으로 생각된다.

그러나 형질전환 마우스 모델이 신약개발 과정에서 큰 장점으로 부각되는 경우는 전략적인 측면에서 조기에 발암성 여부의 신속한 평가가 필요한 약물일 경우이다. 형질전환 마우스 모델이 단기간 내에 동물에서의 발암성 결과를 알려주는 강력한 시험계이므로 이를 개발 후보물질 몇 개에 대하여 실시하여 개발 물질을 조기에 선정할 수 있다. 더욱이 개발물질이 통상적인 유전독성시험에서 양성을 보인 경우에는 형질전환 마우스를 이용한 시험으로 이를 더 확실하게 증명하는 것이 가능하다. 즉 일부 유전독성시험에서 유전독성의 결과가 나왔더라도 형질전환 마우스 모델에서 음성의 결과가 나오면 발암성 시험의 문제로부터 안심할 수 있는 전략적인 개발의 방안이 될 수 있다. 이 외에도 시험물질 자체가 적어서 2년 설치류 발암성 시험을 하기 힘든 경우에 유리한 방법이 될 수 있다.

향후 발암성 검색 모델의 연구방향

현재의 추세라면 조만간 형질전환 마우스 모델과 전통적인 설치류 2년 발암성 시험 특히 랫드 2년 시험을 병행하는 것이 발암성 검색법으로 자리잡을 것으로 예상된다. 그러면 마우스 형질전환 모델과 랫드 2년 발암성 시험을 조합한 것이 이상적인 발암성 검색법일까? 문제점은 랫드 2년 발암성 시험에서 발암성양성의 결과를 나타낸 물질이 형질전환 마우스 모델에서 음성의 결과를 보였을 경우에 이 화학물질이 과연 사람에서 발암성을 보이지 않는 결과일 것인가 하는 것이다. 현재까지 개발된 모델은 이를 정확하게 검색해 내지 못하는 것으로 알려져 있다. 그렇다면 이런 한계를 보완하는 또 다른 발암성 시험법이 개발되어야 하는지도 모른다(Jacobson-Kram, 2004; Pritchard, 2003). 문제는 마우스 형질전환 모델로 검색해 내지 못하는 발암물질 즉 불완전한 검색법으로 발암성을 평가하는 것은 위험하므로 더 많은 연구가 필요하다. 아마도 마우스가 아닌 랫드를 이용한 형질전환 모델을 만드는 것이나 기존의 랫드 2년 발암성시험을 더욱 보완하는 것이 대안이 될 수도 있다(Jacobson-Kram, 2004; Pritchard, 2003). 이런 관점에서 보면 마우스 형질전환 모델은 아마도 완벽한 발암성 검색법을 개발하는 과정에서 중간 위치에 있는지도 모른다. 즉 더 완전한 모델로 개발되기 위한 보완적인 방법에 지나지 않는 발암성 검색법일 것이다(Jacobson-Kram, 2004). 향후 독성유전체학이나 단백질 유전체학 등이 더욱 발전되어 화학물질에 의해서 유도된

발암이라는 것을 증명하는 방법이나 조직이 증식성 병변으로 발전하는 징후를 초기단계에서 돌연변이를 찾아내는 식의 방법 등이 향후 발암성을 검색해 내는 방향이 될 수도 있을 것이다(Jacobson-Kram, 2004).

국내 상황 및 방향

국내에서도 일부 독성수탁 연구기관에서 형질전환 마우스 모델로 발암성 평가를 하고 있으며 또 일부 연구기관에서는 발암성 모델동물을 개발하고 있다. 또한 규제기관에서도 기초자료확보를 통한 규제기관의 가이드라인을 제정할 목적으로 발암성 대체시험으로 형질전환 마우스 모델에 대한 연구를 활발히 하고 있다. 국내의 연구기술력은 충분히 갖추어져 있어 형질전환 마우스를 이용하여 질환모델을 작출하는 기반연구가 확립되어 있다. 그러나 규제기관 제출용으로서 자료 축적은 아직 미흡한 실정이다. 형질전환 모델 마우스의 작출에 관련된 기초연구, 이를 발암성 검색시험의 일환으로 이용하여 제출자료를 생성하는 제약업계, 그리고 이를 심사하는 규제기관 모두가 공감대를 가져야 형질전환 모델이 활발히 연구되고 이용될 것이다. 시급한 것은 규제기관에서 이를 어떻게 수용할 것인지를 문서화 하여 가이드라인으로 발표하는 것이다(Table 5).

본 총설에서 화학물질의 발암성 검색방법에 대한 최근 경향을 검토한 결과와 여러나라 규제기관의 입장변화 등의 흐름에 비추어 보면, 현재의 상황은 꼭 발암성 검색은 랫드와 마우스 두 종에 대하여, 암컷과 수컷 모두에서, 2년의 장기간 동안 물질에 노출시켜서 얻어지는 자료만이 유일한 방법이라는 전통적인 관념보다 좀더 앞서가고 있다고 보아야 할 것이다(MacDonald *et al.*, 2004). 형질전환 모델의 단점이 지적되고 있지만 더 많은 연구로 이를 보완하는 모델을 개발될 것이고, 2년 랫드의 발암성시험과 형질전환 마우스 모델을 이용한 시험을 적절히 병용하여 평가하는 것이 경우에 따라서는 합리적일 수 있다.

감사의 글

본 연구는 과기부 독성평가기술개발사업(M1-0312-00-0002)의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

Albert, R., French, J., Maronpot, R., Spalding, J. and Tennant, R. (1996): Mechanism of skin tumorigenesis by contact sensitizers: The effect of the corticosteroid flucinolone

- acetone on inflammation and tumor induction by 2,4-dinitro-1-fluorobenzene in the skin of the Tg.AC (ν -Ha-ras) mouse. *Environmental Health Perspectives*, **104**, 1062-1068.
- Berg, R.J.W., De Vries, A., Van Steeg, H. and De Gruijl, F.R. (1997): Relative susceptibilities of XPA knockout mice, and their heterozygous, and wild-type littermates to UVB-induced skin cancer. *Cancer Res.*, **57**, 581-584.
- Bucher, J.R. (1998): Update on National Toxicology Program (NTP) assays with genetically altered or "Transgenic" mice. *Environmental Health Perspectives.*, **106**, 619-622. <http://ntp.niehs.nih.gov/>
- DeGeorge, J. (2001): Regulatory perspective on application of the transgenic alternatives in pharmaceutical development. Presented at the annual meeting of the society of toxicologic pathologists, Orlando, FL.
- de Vries, A., Van Oostrum, C.T.M., Hofhuis, F.M.A., Dortant, P.M., Berg, R.J.W., De Gruijl, F.R., Wester, P.W., Van Kreijl, C.F., Capel, P.J.A., Van Steeg, H. and Verbeek, S.J. (1995): Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogenesis of mice lacking the DNA excision repair gene *Xpa*. *Nature*, **337**, 169-173.
- de Vries, A., Van Oostrum, C.T.M., Hofhuis, F.M.A., Dortant, P.M., Beems, R.B., Berg, R.J.W., Van Kreijl, C.F., Capel, P.J.A. and Van Steeg, H. (1997): Spontaneous liver tumours and benzo[a]pyrene-induced lymphomas in Xpa deficient mice. *Molec. Carcinogen.*, **19**, 46-53.
- de Vries, A., van Steeg, A. and Opperhuizen. (2004): RIVM report 340700001/2004, Transgenic mice as alternatives in carcinogenicity testing: current status, Netherlands.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A.J., Butel, J.S. and Bradley, A. (1992): Mice deficient for *p53* are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature*, **356**, 215-221.
- Eastin, W.C., Haseman, J.K., Mahler, J.F. and Bucher J.R. (1998): The National Toxicology program evaluation of genetically altered mice as predictive models for identifying carcinogens. *Toxicol. Pathol.*, **26**, 461-473.
- Floyd, E., Mann, P., Long, G. and Ochoa, R. (2002): The Trp53 hemizygous mouse in pharmaceutical development: points to consider for pathologists. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 147-156.
- French, J., Haseman, J., Donehower, L., Hajian, G., LeGrand, E., Long, G., Ochoa, R., Sagartz, J., Mixon, L., Soper, K. and Storer, R. (2000): The *P53^{+/-}* heterozygous knockout mouse model for short-term carcinogenicity testing. ILSI/HESI workshop on evaluation of alternative methods for carcinogenicity testing, Leesburg, VA.
- Hansen, L.A. and Tennant, R.W. (1994): Follicular origin of epidermal papillomas in ν -Ha-ras transgenic TG.AC mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7822-7826.
- Hansen, L.A., Trempus, C.S., Mahler, J.F. and Tennant, R.W. (1996): Association of tumor development with increased cellular proliferation and transgene overexpression but not *c-Ha-ras* mutations, in ν -Ha-ras transgenic Tg.AC mice. *Carcinogenesis*, **17**, 1825-1833.
- Hansen, L.A., Spalding, J.W., French, J.E. and Tennant, R.W. (1994): A transgenic mouse model (TG.AC) for skin carcinogenesis: Inducible transgene expression as a second critical event. In McClain, R.M., Slaga, T.J., LeBoeuf, R. and Pitot, H. (eds.), *Growth Factors and Tumor Promotion: Implications for Risk Assessment*, Vol. 391. Wiley-Liss, Barton Creek, Texas, pp. 223-235.
- Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A.J., Butel, J.S., Bradley, A. and Donehower, L.A. (1993a): Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in *p53*-deficient mice. *Nat. Genet.*, **5**, 225-229.
- Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A.J., Bradley, A. and Donehower, L.A. (1993b): Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in *p53*-deficient mice. *FASEB J.*, **7**, 938-943.
- <http://hesi.ilsil.org>, ILSI HESI ACT: Alternatives to Carcinogenicity Testing.
- <http://ntp.niehs.nih.gov/>, Bucher, J.R. Update on National Toxicology Program (NTP) assays with genetically altered or "Transgenic" mice.
- <http://www.item.fraunhofer.de/reni>, ACT: Alternatives to Carcinogenicity Testing.
- ICH (1997): Guidance on safety testing for carcinogenicity of pharmaceuticals. *Fed. Reg.*, **63**, 8983-8986.
- ICH (1998): Expert working group on safety, Guidance for industry S1B testing for carcinogenicity of pharmaceuticals.
- Jacobson-Kram, D., Sistare F.D. and Jacobs, A.C. (2004): Use of transgenic mice in carcinogenicity hazard assessment. *Toxicol. Pathol.*, **32**(Suppl. 1), 49-52.
- Leder, A., Kuo, A., Cardiff, R.D., Sinn, E. and Leder, P. (1990): ν -Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: Effects of phorbol esters and retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9178-9182.
- Linda, B.A., Woutersen, R.A., Buijntjes, J.P., Benthem, J.V., van den Berg, J.A.H., Monbaliu, J., Thoolen, B.J.J.M., Beems, R.B. and van Kreijl, C.F. (2004): Evaluation of the Xpa-deficient transgenic mouse model for short-term carcinogenicity testing: 9-month studies with haloperidol, reserpine, phenacetin, and d-mannitol. *Toxicol. Pathol.*, **32**, 192-201.
- MacDonald, J., French, J.E., Gerson, R.J., Goodman, G.J., Inoue, T., Jacobs, A., Kasper, P., Keller, D., Lavin, A., Long, G., McCullough, B., Sistare, F.D., Storer, R. and van der laan, J.W. (2004): The utility of genetically modified mouse assays for identifying human carcinogens: a basic understanding and path forward. *Toxicol. Sci.*, **77**, 188-194.
- Maronpot, M.M., Fox, T., Malarkey, D.E. and Goldworthy, T. (1995): Mutations in the ras proto-oncogene: Clues to etiology and molecular pathogenesis of mouse liver tumors. *Toxicology*, **101**, 125-156.
- Mastorides, S. and Maronpot, R.R. (2002): Carcinogenesis. In: Handbook of toxicologic pathology. 2nd ed. Ed Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., Wallig, M.A., pp. 83-122.
- Morton, D., Alden, C.L., Roth, A.J. and Usui, T., (2002): The Tg rasH2 mouse in cancer hazard identification. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 139-146.
- Nylander-French, L. and French, J. (1998): Tripropylene glycol diacrylate, but not ethyl acrylate, induces skin tumors in a twenty week short term tumorigenesis study in Tg.AC (ν -Ha-ras) mice. *Toxicol. Pathol.*, **26**, 476-483.
- Ochoa R. (2002): Pathology issues in the design of toxicol-

- ogy studies. In: Handbook of toxicologic pathology. 2nd ed. Ed Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., Wallig, M.A., pp. 307-326.
- Pritchard, J.B., French, J.E., Davis, B.J. and Haseman, J.K. (2003): The role of transgenic mouse models in carcinogen identification. *Environ. Health. Prospect.*, **111**, 1-11.
- Recio, L., Boley, S., Everitt, J., James, R.A., Janszen, D., Healy, L., Roberts, K., Walker, D., Pluta, L. and French, J.E. (2000): Cancer bioassay and genotoxicity of inhaled benzene in *p53^{+/-}* and C57B16 mice. *Toxicologist*, **54**, 222.
- Robinson, D.E. and MacDonald, J.S. (2001): Background and frame work for ILSI's collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment. *Toxicol. Pathol.*, **29**(Suppl), 13-19.
- Sanders, J.M., Burka, L.T., Chanas, B. and Matthews, H.B. (2001): Comparative xenobiotic metabolism between Tg.AC and *p53^{+/-}* genetically altered mice and their respective wild types. *Toxicol. Sci.*, **61**, 54-61.
- Storer, R.D., French, J.E., Haseman, J., Hajian, G., LeGrand, E.K., Long, G.G., Mixon, L.A., Ochoa, R., Sagartz, J.E. and Soperm K.A. (2001): *P53^{+/-}* hemizygous knock-out mouse: overview of the available data. *Toxicol. Pathol.*, **29**(Suppl), 30-50.
- Spalding, J.W., Momma, J., Elwell, M.R. and Tennant, R.W. (1993): Chemical induced skin carcinogenesis in a transgenic mouse line (TG.AC) carrying a *v-Ha-ras* gene. *Carcinogenesis*, **14**, 1335-1341.
- Suemizu, H., Ohnishi, Y., Maruyama, C., Tomisawa, M., Muguruma, K., Hioki, K., Usui, T., Kimura, M., Tamaoki, N. and Nomura, T. (2002): Molecular biological studies in the rasH2 transgenic mouse. In: Workshop on the evaluation of alternative methods for carcinogenicity testing. International Life Sciences Institute, Washington, DC.
- Takaoka, M., Sehata, S., Maejima, T., Imai, T., Torii, M., Satoh, H., Toyosawa, K., Tanakamaru, Z.-Y., Adachi, T., Hisada, S., Ueda, M., Ogasawara, H., Matsumoto, M., Kobayashi, K., Mutai, M. and Usui, T. (2003): Interlaboratory comparison of short-term carcinogenicity studies using CB6F₁-rasH2 transgenic mice. *Toxicol. Pathol.*, **31**, 191-199.
- Tennant, R.W., French, J.E. and Spalding, J.W. (1995): Identification of chemical carcinogens and assessing potential risk in short term bioassays using transgenic mouse models. *Environ. Health. Perspect.*, **103**, 942-950.
- Tennant, R.W., Spalding, J.W. and French, J.E. (1996): Evaluation of transgenic mouse bioassays for identifying carcinogens and non-carcinogens. *Mut. Res.*, **395**, 119-127.
- Van Oostrum, C.T.M., Boeve, M., Van den Berg, J., de Vries, A., Dolle, M.E.T., Beems, R.B., Van Kreijl, C.F., Vijg, J. and Van Steeg, H. (1999): The effect of heterozygous loss of *p53* on benzo[a]pyrene-induced mutations and tumours in DNA repair-deficient *Xpa* mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, **34**, 124-30.
- Watanabe, K. (2004): Research and development of the Tg rasH2 mice model. Presented at the seminar at Huntingdon Life Sciences, Huntingdon, UK.