



ORIGINAL ARTICLES

In chemico 펩타이드 반응성 시험(Direct Peptide Reactivity Assay)을 이용한 농약 원제의 피부 감작성 평가

이명지 · 이 슬 · 함성남 · 박연기 · 오진아 · 신지영*

국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과

Assessment of Pesticides using *In chemico* Direct Peptide Reactivity Assay for Skin Sensitization

Myung-Ji Lee, Seul Lee, Seong-Nam Ham, Yeon-Ki Park, Jin A Oh, Ji-Young Shin*

Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, 166, Nongsaeogmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea.

(Received on August 13, 2020. Revised on September 11, 2020. Accepted on September 14, 2020)

Abstract Skin sensitizers are chemical substances that can elicit allergic responses or diseases in skin upon contact. To assess of the skin sensitizing potential of chemicals, agrochemicals, and cosmetic ingredient, there is performed animal test, such as guinea-pig maximization test (GP), buehler occluded patch test (BT) and local lymph node assay (LLNA). However, due to the animal welfare and European Union (EU) legislation for test of cosmetic ingredients have developed various alternatives to animal test. *In chemico* skin sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA, OECD Test Guideline 442C) is composed of applying a test substance on synthetic peptides containing cysteine or lysine and determining skin sensitization measured by reactivity of pesticides. In this study, the alternative method using DPRA was conducted for evaluation of skin sensitization on 10 pure pesticides of concern as potential sensitizing. These results showed that benomyl (50.00%), butachlor (27.23%), carbosulfan (50.00%), fluazinam (55.56%), pretilachlor (43.88%) and terbufos (20.94%) were reported positive, while diazinon (1.23%), glufosinate ammonium (1.31%), oxadiazon (1.71%) and tebuconazole (0.48%) were found negative in the DPRA method. Compared with *in vivo* tests (LLNA and GP data), 6 pesticides were predicted correctly with sensitizer, whereas 4 pesticides also correctly predicted them to be non-sensitizers. This study suggested that DPRA could be a simple, fast and high throughput screening tool to predict on skin-sensitizing chemicals. In addition, DPRA method could be an important part of assessment of new ingredients in agrochemical for sensitization potential.

Key words animal alternative methods, direct peptide reactivity assay (DPRA), skin sensitization, pesticides

서 론

우리나라에서는 농약을 등록·판매하기 위해서 농약관리법에 따라(RDA, 2020) 연간 신규 및 10년 경과된 농약 원제 250-300여건과 농약 품목 1,300-1,400여건이 검토·평가되고 있다(Jin et al., 2018). 이 중 농약의 독성 평가 항목 시험 중 피부에 농약이 노출되었을 때 나타나는 독성을 평가하는 피부 감작성 시험이 있다. 농약 사용 시 피부를 통해 직, 간접

적으로 흡수되면 T세포 매개 면역 독성의 일환인 피부 감작성으로 인한 대표적인 질환으로 알려지성 접촉 피부염(allergic contact dermatitis, ACD)을 유발할 수 있으므로 이에 대한 평가는 매우 중요하다(Girolomoni et al., 2004; Maxwell et al., 2011; Ezendam et al., 2016).

피부 감작성을 평가하기 위해 기니피그가 실험동물로 가장 많이 사용되고 있으며, 이를 이용한 기니피그 극대화 시험 방법(Guinea pig maximization test (GPMT), Magnusson and Kligaman, 1969; Magnusson, 1980)과 폐쇄접촉시험 방법(Buehler test (BT), Buehler, 1965) 등의 여러가지 시험법

*Corresponding author
E-mail: shinji00@korea.kr

들이 오랫동안 가장 보편적으로 사용되어 왔다. 하지만 이러한 시험법들은 많은 수의 실험동물이 요구되며 시험기간도 장기적이다. 또한 실험동물 사용에 의한 윤리적인 문제가 대두되면서, 3R 원칙(replacement, refinement, reduction, 3R)에 의거하여(Rosholt, 2005; MFDS, 2017), 경제협력개발기구(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) 및 유럽연합의 유럽대체실험검증센터(European Union Reference Laboratory for alternative to Animal Testing, EURL-ECVAM)에서는 개발되고 있는 동물대체시험을 검증하고 채택하기 시작하였다(EURL-ECVAM 2013; OECD, 2015a; OECD, 2015b; OECD, 2016a; OECD, 2016b; Ezendam et al., 2016). 가장 보편화 된 대체시험방법으로 마우스의 국소 림프절의 세포내 ATP량을 측정하여 림프구 증식 정도를 분석하는 국소림프절시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)이 OECD 가이드라인에(OECD Test Guideline 429) 등재되어 피부 감작성 평가에 사용되고 있으나, 이 방법 또한 마우스가 필요하며 방사선 동위원소를 사용해야 하는 어려움이 있었다. 이를 완화한 DA (developed by Daicel Chemical Industries, Ltd.)법을 이용한 국소림프절 시험법(LLNA: DA, OECD TG 442A) 및 ELISA법을 이용한 국소림프절 시험법(LLNA: BrdU-ELISA, OECD TG 442B)이 등재되었다(OECD, 2010a; OECD, 2010b; OECD, 2010c). 그 후 동물을 사용하지 않는 인체 유래 각질세포, 단백질 등을 사용하는 *in chemico* 또는 *in vitro* 실험으로 발전하여 특정 화학물질과 피부조직 단백질과 결합 정도를 이용한 펩타이드 반응성 시험(*In chemico* skin sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA, OECD TG 442C), ARE-Nrf2 루시페라아제 시험(*In vitro* skin sensitisation: ARE-Nrf2 luciferase test method, OECD TG 442D) 및 THP-1 세포주를 통해 특정 항원의 발현 정도를 이용한 인체 세포주 활성화 시험(Human Cell Line Activation Test, h-CLAT, OECD TG 442E) 등의 다양한 시험법이 등재 되었다(OECD, 2015a; OECD, 2015b; OECD, 2016).

피부 감작성 대체시험법 중 펩타이드 반응성 시험법(DPRA)은 피부 감작성 물질이 피부를 통해 체내에 들어오면 시스테인 또는 리신 등의 단백질과 결합하여 화학적 변형으로 거대 분자 면역원인 합텐-단백질 복합체(haptenized protein)를 형성하는 합텐화 과정(Girolomoni et al., 2004; Adler et al., 2011; Maxwell et al., 2011; Vinken, 2013)에서 착안하였다. DPRA는 리신 및 시스테인이 함유된 펩타이드와 시험 물질의 합텐화 과정 평가를 통해 결합된 펩타이드를 제외하고 순수 펩타이드 검출이 어느 정도로 감소(depletion)하는지를 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 측정하는 방법으로 다양한 피부 감작성 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP) 중 첫번째 주요반응(key event 1)을 이용하여 분자 시작단계(molecular initiating)에

서 피부 감작성을 평가하는 시험법이다(Maxwell et al., 2014; OECD, 2015a; Tollefsen et al., 2014; MFDS, 2016).

이러한 국제적인 추세에 맞춰 우리나라에서도 화장품, 농약 등의 안전성을 평가하기 위해 동물대체시험법을 도입하여 운영하고 있다. 식품의약품안전처에서는 화장품의 동물대체시험법 가이드라인을 통해 화장품 독성시험 분야에 대체시험법을 보급하였다(MFDS, 2016). 농촌진흥청 고시 농약 및 원제의 등록기준에 따라 인축독성 시험기준과 방법에 *in chemico* 피부 감작성시험: 펩타이드 반응성 시험법(DPRA)을 2019년에 추가 신설해 두었다 (RDA, 2020). 그러나 아직까지 DPRA 시험법에 관해서는 화장품 분야에 사용되는 원료를 대상으로 연구가 진행되고 있으며, 농약에 대해서는 피부 감작성을 평가한 연구 사례는 매우 적은 상황이다. 이에 본 연구에서는 국내 등록되어 사용중인 농약 중 2014년부터 2018년도 까지 출하량이 높은 농약 원제 10종(KCPA, 2019)을 선발하여 DPRA를 이용하여 피부 감작성을 평가하였다.

재료 및 방법

시험농약

시험에 사용한 농약은 살균제 Benomyl (98%), fluazinam (98%), terbuconazole (99%), 살충제 carbosulfan (98%), diazinon (98%), terbufos (85%), 제초제 butachlor (95%), glufosinate ammonium (98%), oxadizaon (96%), pretilachlor (94%)으로 농약 회사에서 제공받거나 sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

숙련도 물질 및 대조물질

숙련도 물질 10종 2,4-Dinitrochlorobenzne (99%), oxazolone (90%), formaldehyde (36.5%), benzylideneacetone (98%), farnesal (85%), 2,3-butanedione (97%), 1-butanol (99%), 6-methylcoumarin (99%), lactic acid (85%), 4-methoxyacetophenone (99%)과 양성대조물질 cinnamaldehyde (95%)은 sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

펩타이드(peptide) 제작

펩타이드인 cysteine (Ac-RFAACCA-COOH, >96%, molecular weight 750.35) 및 lysine (Ac-RFAAKAA-COOH, >98%, molecular weight 775.43)은 (주)펩트론(Daejeon, Republic of Korea)에서 주문 제작하였다.

펩타이드 반응성 시험(Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA)

본 연구는 OECD TG 442C로 등재된 *In Chemico* Skin

Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) 및 유럽연합 동물대체시험법 관련 연구 추진기관(EURL-ECVAM)의 검증 연구(ECVAM Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA for skin sensitisation testing DB-LAM Protocol No.15)에 의거하여 시험을 수행하였다(EURL-ECVAM, 2013; OECD, 2015a; MFDS, 2016; DB-ALM, 2020). 표준검량곡선을 작성하기 위해 시스테인 및 리신 함유 펩타이드 표준용액 0.534-0.0167 mM을 총 6 개 농도로 준비하였다. 농약 원제, 숙련도 물질 및 양성대조군 (cinnamaldehyde)에 대한 용매는 acetonitrile, distilled water (DW), DW:acetonitrile=1:1(v/v), isopropanol, acetone, isopropanol:acetone=1:1(v/v), DMSO:acetone=1:9(v/v), DMSO:acetone=1:1(v/v)의 순으로 완전히 용해되는 것을 우선적으로 선정하였다. 시스테인 및 리신 함유 펩타이드 용액에 100 mM 시험 물질을 각각 1:10 및 1:50 비율로 혼합 하였다. 25 ± 2.5°C에서 24 ± 2시간 동안 암실에서 반응시킨 후, 펩타이드 용액은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)에서 UV 검출기를 이용하여 220 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 펩타이드 소실률은 다음과 같은 식을 통하여 산출하였다.

$$\text{펩타이드 소실 백분율} = \left[1 - \left(\frac{\text{검체의 펩타이드 피크 면적}}{\text{참고 대조군 C의 펩타이드 피크 면적 평균}} \right) \right] \times 100$$

평가된 시험 물질에 대해 산출된 시스테인 및 리신 소실률을 합산한 평균값으로 각각 4가지 무반응성, 저반응성, 중반응성 및 고반응성으로 분류된 예측모델을 통해 피부 감작성에 대해 판정하였다. 본 시험 전에 OECD TG에서 제시된 숙련도 물질을 통해 시험의 숙련도를 검증하였으며, 실험은 총 3반복하여 진행하였다. 펩타이드 반응성 시험법에 대한 시험 진행과정을 도식화 하여 Fig. 1에 나타내었다.

시험 물질 준비 및 조제

시스테인 함유 펩타이드 표준원액은 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)에, 리신 함유 펩타이드 표준원액은 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 10.2)에 녹여 0.667 mM이 되도록 준비하였다. 표준검량곡선 측정을 위해 각 펩타이드 표준원액 1600 µL와 acetonitrile 400 µL를 혼합하여 0.534 mM 농도로 제조한 후 희석용액(Dilution buffer, 0 mM)과 1:1(v:v) 비율로 6개의 농도까지 계대희석 하였다. 희석용액은 각 펩타이드 표준원액의 용매인 0.1 M phosphate buffer solution 또는 ammonium acetate buffer 8 mL에 acetonitrile 2 mL를 혼합하였다. 본 시험에 들어가기에 앞서 시험 물질 조제 및 OECD TG 442C에 제시되어 있는 5개의 대조군(참고대조군 A, B, C, 양성대조군 및 동시용출대조군)을 제조 하였다. 참고대조군 A는 시험 물질을 분석하기 전 HPLC 시스템의 적합성을 증명하는 대조군, 참고대조군 B는 분석 시간 경과에 따른 안정성을 증명하는 대조군, 참고대조군 C는 시험 물질에 사용된 용매가 펩타이드 소실률에 영향을 주지 않는 것을 증명하는 대조군이다. 양성대조군은 양성 반응이 나타나는 물질로써 시험 물질과 펩타이드가 적절한 반응을 나타내는지 증명하는 대조군이다. 동시용출대조군은 시험 물질의 머무름 시간(Retention time)이 펩타이드 머무름 시간과 같아 겹치는지를 증명하기 위한 대조군이다. Acetonitrile 및 water를 Fisher-Scientific (Hampton, Rockingham, USA)사에 구입하여 용매로 사용하였으며 숙련도 물질, 선정된 시험 농약 10종 및 양성대조물질을 100 mM의 농도로 3 mL씩 제조하였다. 본 시험에서는 시험 물질(100 mM)을 시스테인 펩타이드 용액과는 1:10, 리신 펩타이드 용액과 시험 물질은 1:50 비율로 혼합하여 각 군당 3개씩 조제하였다. 5개의 대조군의 경우, 시험 물질 대신 같은 용량의 용매를 넣어주어 각 군당 3개씩 조제하였으며 모든 시험 물질 및 대조군은 2 mL vial에 차광하여 반응시켰다.

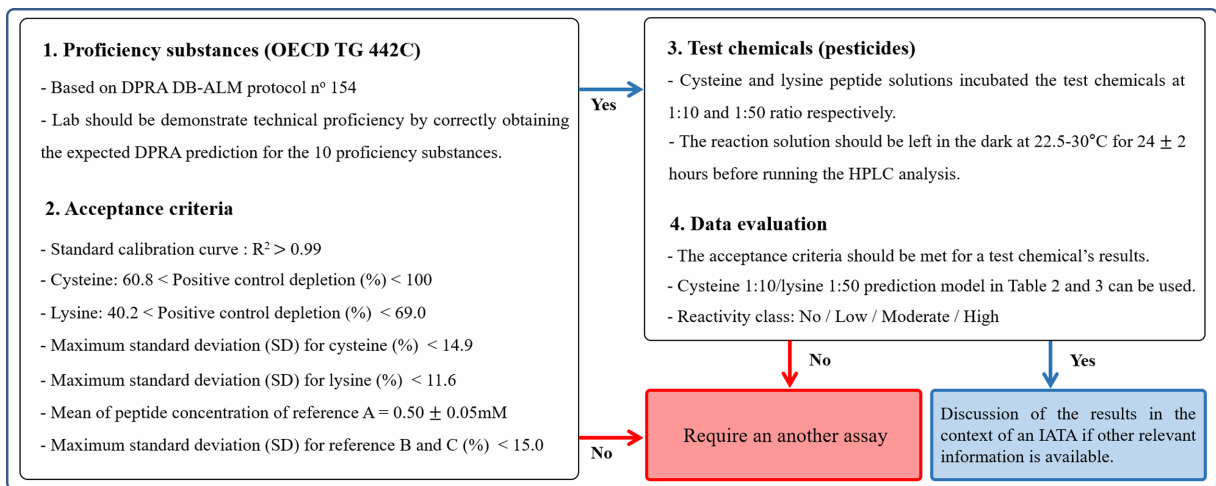


Fig. 1. Procedure of Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitization.

HPLC 조건 및 분석 순서

펩타이드와 시험 물질을 반응시킨 시료를 분석하기 위해 고성능액체크로마토그래피(HPLC, Model: Agilent 1220 series HPLC system, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다. 칼럼은 Zorbax SB-C18 (3.5 µm, 2.1 mm × 100 mm, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하였고, 용매 A (0.1% (v/v) Trifluoroacetic acid in water)와 용매 B (0.085% (v/v) Trifluoroacetic acid in acetonitrile)를 이동상으로 하여 0-10 분에 이동상 용매 B가 10%에서 25%로 직선구배 후 10-13 분에 90%, 13 분에서 13.5 분에 10%, 13.5 분에서 20 분까지 10%가 되도록 하여, flow rate 0.35 mL/min로 설정하였

다. UV spectrometer를 통해 220 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 주입량은 5 µL로 설정하였다(Table 1). 시험 분석 순서는 검량표준액(STD1-6 및 희석용액)와 참고대조군 A, 동시용출대조군, 참고대조군 B, 분석시료 3반복(참고대조군 C, 양성대조군 및 시험물질 순으로) 및 참고대조군 B의 순서로 물질 분석 디자인을 설정하여 분석하였다.

Table 1. HPLC condition for DPRA

Conditions	
Mobile phase	(A) 0.1% Trifluoroacetic acid in DW (B) 0.085% Trifluoroacetic acid in ACN
Column	Agilent Zorbax SB-C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 µm)
Colum temp.	30°C
Sample temp.	25°C
Flow rate	0.35 mL/min
Detector	Fixed Wavelength Absorbance detector with 220 nm signal
Run time	20 min
Gradient (%)	0.35 mL/min
	0 min: (A)90% (B)10%
	10 min: (A)75% (B)25%
	11 min: (A)10% (B)90%
	13 min: (A)10% (B)90%
	13.5 min: (A)90% (B)10% → re-equilibration time (7 min)
	20 min: (A)90% (B)10%

시험 결과 유효성 기준 및 판정 기준

펩타이드 소실률은 각 검체에서 피크 면적을 구하고 참고대조군 C의 평균 피크 면적으로 나눈 값으로 결정하였다. HPLC분석의 유효성 기준으로는 표준검량곡선의 상관계수 R²값이 0.99를 초과하여야 하며, 양성대조군(cinnamaldehyde)의 평균 소실률은 3 반복하였을 때, 시스테인 함유 펩타이드는 60.8-100%, 리신 펩타이드는 40.2-69% 범위의 값을 나타내야 한다. 시험 물질 및 양성대조군 반복간 소실률의 표준편차의 경우 시스테인 및 리신이 각각 14.9%, 11.6% 미만이어야 한다. 참고대조군 A 및 C의 펩타이드 평균 농도는 0.5 ± 0.05 mM 범위에 속해야 하고, 참고대조군 B와 C의 펩타이드 변이계수(coefficient variation) 값은 15% 이하여야 한다. 또한 동시용출대조군 간섭 물질 면적이 참고대조군 C 피크 면적 평균 10% 이상을 경우를 포함하여 위의 기준 중에 하나라도 충족하지 못할 시에는 재시험을 수행하였다. 예측모델을 통해 시스테인 및 리신 펩타이드 소실률 평균값이 0-6.38%일 경우 무반응성(음성), 6.38-22.62%일 경우 저반응성(양성), 22.62-42.47%일 경우 중반응성(양성), 42.47-100%일 경우 고반응성(양성)으로 판정하였다(Table 2). 또한 리신 펩타이드 피크 면적 값이 동시용출을 보일 경우, 시스테인 펩타이드 소실률 만으로 결과를 판정하였다(Table 3).

Table 2. Cysteine 1:10/lysine 1:50 prediction model for the *in chemico* DPRA^a

Mean of cysteine and lysine (%) depletion	Reactivity class	Prediction model
0 < mean % depletion ≤ 6.38%	No or minimal	Negative
6.38% < mean % depletion ≤ 22.62%	Low	
22.62% < mean % depletion ≤ 42.47%	Moderate	Positive
42.47% < mean % depletion ≤ 100%	High	

^a) Prediction model based on OECD TG 442C (OECD, 2019).

Table 3. Cysteine 1:10 prediction model for the *in chemico* DPRA^a

Cysteine (%) depletion	Reactivity class	Prediction model
0% < cysteine % depletion ≤ 13.89%	No or minimal	Negative
13.89% < cysteine % depletion ≤ 23.09%	Low	
23.09% < cysteine % depletion ≤ 98.24%	Moderate	Positive
98.24% < cysteine % depletion ≤ 100%	High	

^a) In cases where co-elution occurs only with the lysine peptide, then the cysteine 1:10 prediction model can be used.

결과 및 고찰

숙련도 시험 결과

본 시험을 수행하기에 앞서 시험의 유효성을 검증하기 위해 OECD TG 442C에 기술된 부록 2 숙련도 시험 (Proficiency test)을 수행하였다. 그 결과, 시스테인 및 리신 펩타이드에 대한 표준검량곡선의 상관계수 R^2 값은 0.99를 초과하였으며, 참고대조군 A, B, C 펩타이드 평균 농도가 0.5 ± 0.05 mM로 기준을 충족하였으며, 분산계수 또한 모두 15% 이하임을 확인하여 검증기준에 충족하였다. 양성대조군인 cinnamaldehyde의 반복의 평균 펩타이드 소실률 (peptide depletion)은 각각 71.88% (cysteine peptide 기준 60.8-100%), 58.79% (lysine peptide 기준 40.2-69%)로 모두 허용 범위에 포함되었다.

숙련도 물질에 대한 시스테인과 리신 펩타이드 소실률 (peptide depletion)의 평균은 2,4-Dinitrochlorobenzene에서 58.60% (고반응성, 양성), oxazolone은 65.64% (고반응성, 양성), formaldehyde는 24.88% (중반응성, 양성), benzylideneacetone은 46.38% (고반응성, 양성), farnesal은 13.23% (중반응성, 양성), 2,3-butanedione은 46.80% (고반응성, 양성), 1-butanol은 1.55% (무반응성, 음성), 6-methylcoumarin은 0.81% (무반응성, 음성), lactic acid는 1.55% (무반응성, 음성), 4-methoxyacetophenone에서 1.05% (무반응성, 음성)로 나타났다(Table 4). 1-Butanol에서 리신 펩타이드 피크와 동시용출(co-elution)이 보여 시스테인 펩타이드(Table 3)의 결과로 양성 여부를 판단하였다. 피부 감작성 판정은 OECD TG 442C 가이드라인에 기술된 결과와 비교하였을 때(Table 4) 모두 정확하게 판정되었다. 결론적으로, 숙련도 물질 10개 모두 OECD 가이드라인에 기술된 기준에 부합하여 본 시험을 진행하였다.

시험 농약 10종 피부 감작성 결과

농약 원제 10종에 대한 시험을 수행 하기 위해서 숙련도 시험과 마찬가지로 시험의 유효성을 확보하였다. 그 결과, 시스테인 및 리신 펩타이드에 대한 표준검량곡선의 상관계수 R^2 값은 0.99 이상이었으며, 참고대조군 A, B, C 모두 펩타이드 평균 농도가 0.5 ± 0.05 mM으로 나타났다. 변이계수 또한 모두 15% 이하임을 확인하였다. 양성대조군인 cinnamaldehyde 평균 소실률은 각각 65.80% (cysteine peptide 기준 60.8-100%), 56.56% (lysine peptide 기준 40.2-69%)로 모두 허용 범위에 포함되었다.

DPRA를 이용한 선정된 농약 원제 10종의 피부 감작성을 평가한 결과 농약 원제 10종 중에서 총 6종이 피부 감작성 양성으로 분류되었다(Table 4). 시스테인과 리신 펩타이드 소실률의 평균은 Benomyl에서 50.00% (고반응성, 양성), butachlor는 27.23% (중반응성, 양성), carbosulfan은 50.00%

(고반응성, 양성), diazinon은 1.23% (무반응성, 음성), fluazinam은 59.91% (고반응성, 양성), glufosinate ammonium은 1.31% (무반응성, 음성), oxadiazon은 1.71% (무반응성, 음성), pretilachlor은 43.88% (고반응성, 양성), tebuconazole은 0.05% (무반응성, 음성), terbufos에서 20.94% (저반응성, 양성)로 나타났다(Table 4). Benomyl의 경우, 리신 펩타이드 피크와 동시용출이 보여 시스테인 펩타이드의 (Table 3) 결과로 양성 여부를 판단하였다. 농약 원제에 대한 피부 감작성 성적을 농약회사에서 등록 신청 시 제출한 자료 및 국제기구에서 기니피그 또는 마우스를 이용한 감작성 시험 결과 자료(*in vivo data*)를 바탕으로 하여 본 연구에서 사용한 동물대체시험법인 펩타이드 반응성 시험(DPRA)의 결과와 비교하여 피부 감작성 예측 정도를 확인한 결과 (Table 4), 농약 원제 10종의 피부 감작성 판정은 기존 *in vivo* 실험 결과와 비교하였을 때, 모두 부합하는 것으로 나타났다. Benomyl, butachlor, carbosulfan, pretilachlor 및 terbufos 와 같은 일부 농약 원제의 경우, 시스테인 펩타이드 모델에서는 높은 감작성을 보였으나 리신 펩타이드에서는 상대적으로 낮거나 반응성이 없었다(Table 4). 이러한 시스테인과 리신 함유 펩타이드 소실률의 차이를 보이는 현상은 다른 연구 결과에서도 나타났다(Takenouchi et al 2014; Avonto et al., 2018). 이 현상은 DPRA 시험법에서 사용되는 두 종류의 펩타이드와 시험 물질의 특성 차이에 의한 것으로 판단된다. 즉, 피부 감작성을 일으키는 알레르겐의 대부분이 친전자성(electrophile) 특성을 보이는 물질이기 때문에 DPRA법에서 사용되는 친핵성(nucleophile) 아미노산과 공유결합이 이루어 지는데, 이러한 원리와 연관지어 볼 수 있다. 시험 물질과 펩타이드 간의 공유결합력은 Gerberick et al. (2004)이 친핵체와 친전자체 사이의 상호 작용 메커니즘을 설명해주는 굳은 산 및 무른 산 이론(Hard and Soft Acid and Base theory, HSAB theory)을 제시하였고, 이와 관련하여 상대적으로 경질 친핵체(hard nucleophile)인 리신 펩타이드의 경우, 피부 감작성 물질이 연질 친전자성(soft electrophile)인 경우에 서로 반응성이 낮아 펩타이드 소실률에 영향을 줄 수 있는 것으로 보고하였으며, 본 연구에서도 이와 같은 이유로 시스테인과 리신 간의 펩타이드 소실률 차이가 나타날 수 있다. 또한 펩타이드 산화를 촉진하는 물질의 경우에는 펩타이드 소실이 실제보다 과대평가 될 수 있을 가능성으로 인해 농약 원제에 대한 펩타이드 반응성이 다를 수 있다(Lepoittevin, 2006; OECD, 2015a; Avonto et al., 2018; Cho, 2018). 최근에는 펩타이드 산화를 일으키는 물질에 대해 측정이 어려운 DPRA 시험법의 단점을 보완하여, 좀 더 안정된 형태의 펩타이드 모델을 이용한 Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)방법 및 시험 조건을 완화한 시험법들이 다양하게 개발되고 있다(Gerberick et al., 2009; Lalko et al., 2012; Yamamoto et al., 2015;

Table 4. Test chemicals for demonstrating skin sensitization with *in chemico* Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

Test chemicals	Chemical name	CAS	Physical state	Solubility	Cys-DPRA % depletion (% S.D)	Lys-DPRA % depletion (% S.D)	Mean of cysteine and lysine		Classification based DPRA from OECD 442C	Classification from published <i>in vivo</i> data
							% depletion	Reactivity		
Proficiency chemicals ^{a, c}	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	ACN	100 (0.00)	17.20 (0.63)	58.60	High	Positive	Sensitiser
	Oxazolone	15646-46-5	Solid	ACN	75.20 (0.27)	56.08 (0.46)	65.64	High	Positive	Sensitiser
	Formaldehyde	50-00-0	Liquid	ACN	46.23 (0.72)	3.52 (0.49)	24.88	Moderate	Positive	Sensitiser
	Benzylideneacetone	122-57-6	Solid	ACN	90.10 (0.60)	2.65 (4.59)	46.38	High	Positive	Sensitiser
	Farnasal	19317-11-4	Liquid	ACN	25.95 (1.08)	0.51 (0.89)	13.23	Moderate	Positive	Sensitiser
	2,3-Butanedione	431-03-8	Liquid	ACN	73.66 (7.33)	19.94 (2.19)	46.80	High	Positive	Sensitiser
	1-Butanol ^b	71-36-3	Liquid	ACN	1.57 (0.30)	1.52 (2.63)	1.55	No/Minimal	Negative	Non-sensitiser
	6-Methylcoumarin	92-48-8	Solid	ACN	1.61 (0.96)	0.00 (0.00)	0.81	No/Minimal	Negative	Non-sensitiser
	Lactic acid	50-21-5	Liquid	ACN	1.67 (0.70)	1.42 (2.47)	1.55	No/Minimal	Negative	Non-sensitiser
	4-Methoxyacetophenone	100-06-1	Solid	ACN	2.09 (1.32)	0.00 (0.00)	1.05	No/Minimal	Negative	Non-sensitiser
Pesticides	Benomyl ^b	18804-35-2	Solid	ACN	100 (0.00)	0.00 (0.00)	50.00	High	Positive	Sensitiser (JMPR, 1995)
	Butachlor	23184-66-9	Liquid	ACN	53.89 (2.56)	0.57 (0.99)	27.23	Moderate	Positive	Sensitiser (NAS, 2006)
	Carbosulfan	55285-14-8	Solid	ACN	100 (0.00)	0.00 (0.00)	50.00	High	Positive	Sensitiser (JMPR, 2003a)
	Diazinon	333-41-5	Liquid	Water	1.54 (1.66)	0.91 (0.82)	1.23	No/Minimal	Negative	Non-sensitiser (NRA, 2002)
	Fluazinam	79622-59-6	Solid	ACN	99.84 (0.28)	19.98 (1.76)	59.91	High	Positive	Sensitiser (EC, 2011)
	Glufosinate ammonium	77182-82-2	Solid	Water	1.83 (0.83)	0.79 (0.20)	1.31	No/Minimal	Negative	Non-sensitiser (JMPR, 2012)
	Oxadiazon	19666-30-9	Solid	ACN	3.42 (2.04)	0.00 (0.00)	1.71	No/Minimal	Negative	Non-sensitiser (WSDOT, 2006)
	Pretilachlor	51218-49-6	Liquid	ACN	87.75 (2.86)	0.00 (0.00)	43.88	High	Positive	Sensitiser (NAS, 2006)
	Tebuconazole	107534-96-3	Solid	ACN	0.10 (0.17)	0.00 (0.00)	0.05	No/Minimal	Negative	Non-sensitiser (BCPC, 2003)
	Terbufos	2921-88-2	Liquid	ACN	41.47 (3.76)	0.41 (0.71)	20.94	Low	Positive	Sensitiser (JMPR, 2003b)

^{a)} Recommended 10 proficiency chemicals described in OECD TG 442C (OECD, 2019).

^{b)} Lysine peptide co-elution.

^{c)} The *in vivo* hazard (and potency) predictions from OECD TG 442C (OECD, 2019).

Zhang et al., 2018; Patel et al., 2019; Cho et al., 2019).

화학물질의 독성 연구에 대해 기존의 연구자들은 수많은 동물의 희생이 불가피 한 것으로 여기고 실험동물을 사용하였지만, 윤리적인 문제 및 동물시험에서의 결과와 실제 결과가 일치하지 않는 경우도 존재하였다. 또한 실험동물의 사용을 줄이고 대체하자는 국제적인 동향에 따라 그동안 기니피그 또는 마우스를 이용하여 평가했던 피부 감작성 평가를 *in chemico* 대체시험법인 DPRA를 활용하여 합성 펩타이드 모델로 대체하는 것은 다른 피부 감작성시험들과 비교하여 사용 가능한 가장 간단하고 예측력이 높은 방법 중 하나이다(Gerberick et al., 2007; Dimitrov et al., 2015; Avonto et al., 2018). 이외에도 시험에 소요되는 기간이 짧으며 시험 비용을 절감할 수 있다(MFDS, 2017; Cho et al., 2019). 그러나 DPRA 시험법은 HPLC 분석 기기를 이용하기 때문에 종류와 분석 조건에 따라라도 결과가 실험실 간 다소 차이를 보일 수 있어 *in vivo* 시험법인 LLNA 시험에 비해 정확도가 낮을 수 있다(Gerberick et al., 2007; MFDS, 2016; Cho et al., 2019). 그 밖에도 DPRA 시험법은 세포를 사용하지 않는 *in chemico* 방법이기 때문에 시험 물질마다 피부에 접촉되기 이전 또는 세포 내에서 어떠한 변형을 거칠 경우 DPRA 시험법으로는 정확한 판정이 어려울 수 있다(Lepoittevin, 2006; Troutman et al., 2011; Lalko et al., 2012; MFDS, 2016). 따라서 동물대체시험법을 이용한 피부 감작성 평가의 정확도를 재고하기 위해서는 추가적으로 피부 감작 독성발현경로(AOP)의 다른 주요한 단계(key event 2-4)들을 함께 보완할 수 있는 다양한 *in vitro* 시험법들과 조합하여 통합독성평가(Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA)를 해야 한다. 농촌진흥청의 고시 중 농약의 인축독성 시험성적서 검토 기준에서도 마찬가지로 key event를 바탕으로 순차적인 시험 전략을 이용하여 피부 감작성을 검토하도록 되어있다(Takenouchi et al., 2014; Tollefsen et al., 2014; OECD, 2016b; Avonto et al., 2018; Ohtake et al., 2018; RDA, 2020).

농약 원제 및 품목에 대한 독성 및 안전성 평가는 매우 중요하기 때문에 적절한 절차와 객관적인 시험기법으로 검증하는 필수적인 과정이 요구된다. DPRA는 주로 화장품의 원료로 쓰이는 단일 물질에 한하여 동물대체 피부 감작성시험으로 확대되고 있는데 비해, 농약 원제에 대해서는 선행 연구가 많이 부족하다는 한계를 가지고 있다. 따라서 본 연구를 통해 DPRA를 활용하여 농약의 등록에 필요한 독성 평가 시험 자료로 제공될 수 있을 것이라고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01423701)의 지원에 의하여 이루어

진 것입니다.

Author Information and Contributions

Myung-Ji Lee, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-3348-6222>

Seul Lee, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

Seong-Nam Ham, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

Yeon-Ki Park, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

Jin A Oh, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

Ji-Young Shin, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-3177-161X>

Literature Cited

- Alder S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, Benthem J, et al., 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Arch. Toxicol. 85:367-485.
- Avonto C, Wang YH, Chittiboyina AG, Vukmanovic S, Khan IA, 2018. *In chemico* assessment of potential sensitizers: stability and direct peptide reactivity of 24 fragrance ingredients. J. Appl. Toxicol. 39(2):398-408.
- BCPC, 2003. The pesticide manual: A world compendium of pesticides. British Crop Protection Council. UK.
- Buehler EV, 1965. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. Arch Dermatol. 91(2):171-175.
- Cho AR, 2018. Skin sensitizing potentials of chemical household products through Direct Peptide Reactivity Assay. Daegu Catholic Univ., MA Diss., Daegu, Republic of Korea.
- Cho SA, Choi MS, Park SR, An SS, Park JH, 2019. Application of spectro-DPRA, KeratinsensTM and h-CLAT to estimation of the skin sensitization potential of cosmetics ingredients. J. Appl. Toxicol. 40(2):300-312.
- DB-ALM, 2020. Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing p.1-21. <http://ecvamdbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
- Dimitrov S, Detroyer A, Piroird C, Gomes C, Eilstein J et al., 2015. Accounting for data variability, a key factor in in vivo/in vitro relationships: application to the skin sensitization potency (in vivo LLNA versus in vitro DPRA) example. J. Appl. Toxicol. 36:1568-1578.
- EC, 2011. CLH report proposal for harmonized classification

- and labelling based on regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation) annex VI, part 2, substance Name: Fluazinam, European Commission, Brussels, Kingdom of Belgium.
- Ezendam J, Braakhuis HM, Vandebriel RJ, 2016. State of the art in non- animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. *Arch. Toxicol.* 90(12):2861-2883.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, et al., 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* 81(2):332-343.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, et al., 2007. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicol. Sci.* 97(2):417-427.
- Gerberick GF, Troutman JA, Foertsch LM, Vassallo JD, Quijano M, et al., 2009. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol. Sci.* 112(1):164-174.
- Girolomoni G, Gisondi P, Ottaviani C, Cavani A, 2004. Immuno-regulation of allergic contact dermatitis. *J Dermatol.* 31:264-270.
- European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM), 2013. EURL ECVAM recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DRPA) for skin sensitization testing European Commission Joint Research Centre. Europe.
- Jin JH, Lee NL, Park ES, Kim BS, Hong SM, 2018. Study of coidentity verification of pesticide products and active ingredients through FT-NIR and FT-IR. *Korean J. Pestic. Sci.* 22(4):337-344.
- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues (JMPR), 1995. Pesticide residues in Food 1995, evaluations 1995 part II Toxicological and environmental. Geneva, Swiss.
- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues (JMPR), 2003a. Pesticide Residues in Food. Toxicological Evaluations. Ethephon. 3-31. JMPR (WHO/PCS/03.1). Geneva, Swiss.
- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues (JMPR), 2003b. Pesticide Residues in Food. Toxicological Evaluations. Ethephon. 333-385. JMPR (WHO/PCS/03.1). Geneva, Swiss.
- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues (JMPR), 2012. Pesticide Residues in Food. Toxicological Evaluations. Ethephon. 547-652. JMPR (WHO/PCS/03.1). Geneva, Swiss.
- Korea Crop Protection Association (KCPA), 2019. Agrochemical year book. Seoul, Republic of Korea.
- Lalko JF, Kimber I, Gerberick GF, Foertsch LM, Api AM, et al., 2012. The direct peptide reactivity assay: selectivity of chemical respiratory allergens. *Toxicol. Sci.* 129(2):421-431.
- Lepoittevin JP, 2006. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehaptens? Contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 54(2):73-74.
- Magnusson B, Kligman AM, 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol.* 52:268-276.
- Magnusson B, 1980. Identification of contact sensitizers by animal assay. *Contact dermatitis.* 6(1):46-50.
- Maxwell G, Aeby P, Ashikaga T, Bessou-Touya S, Diembeck W, et al., 2011. Skin sensitisation: the Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment. *Altex* 28(1):50-55.
- Maxwell G, MacKay C, Cubberley R, Davies M, Gellatly N, et al., 2014. Applying the skin sensitization adverse outcome pathway (AOP) to quantitative risk assessments. *Toxicol. Vitro* 28(1):8-12.
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2016. OECD guideline for the testing of chemicals, in chemico direct peptide reactivity assay, B1-2016-4-001. Cheongju, Republic of Korea.
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2017. The establishment study of alternative method to animal test for Korean cosmetic safety evaluations. Cheongju, Republic of Korea. p. 32-215.
- National Institute of Environmental Research (NIER), 2016. Application of alternative test methods for evaluation of household products toxicity. Incheon, Republic of Korea. p. 1-40.
- National Institute of Agricultural Sciences (NAS), 2006. 36 Report for safety management of technical concentrate of pesticides (IV). Wanju-gun, Republic of Korea. p. 505-507
- NRA, 2002. National Registration Scheme for agricultural and veterinary chemicals Australia existing chemicals review program review of the mammalias toxicology and metabolism/toxicokinetics of diazinon. Department of Health & Aged care Canberra, Australia.
- OECD, 2010a Guidelines for the testing of chemicals. Section 4: health effects. Test No. 429. Skin sensitization: local lymph node assay. OECD Publishing, Paris
- OECD, 2010b Guidelines for the testing of chemicals. Section 4: health effects. Test no. 442A skin sensitization: local lymph node assay: DA. OECD Publishing, Paris
- OECD, 2010c OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 4: health effects. Test no. 442B skin sensitization: local lymph node assay: BrdU-ELISA. OECD Publishing, Paris
- OECD, 2015a. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. Test No. 442C: in chemico skin sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). OECD Publishing, Paris
- OECD, 2015b. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. Test No. 442D: in vitro skin sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase test method. OECD Publishing, Paris
- OECD, 2016a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 442E: in vitro skin sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT) vol ENV/JM/WRPR(2016)19]. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2016b. Guidance document on the reporting of defined

- approaches and individual information sources to be used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for skin sensitisation In: OECD Environment HaSP (ed) Series on testing and assessment, vol ENV/JM/HA(2016)11.OECD Publishing, Paris.
- Ohtake T, Maeda Y, Hayashi T, Yamanak H, Nakai M, et al., 2018. Applicability of an integrated testing strategy consisting of in silico, in chemico and in vitro assays for evaluating the skin sensitization potencies of isocyanates. *Toxicology*. 393:9-14.
- Rosholt AP, 2005. The seventh amendment directive an unnecessary measure to a necessary end possible legal challenges to directive 2003/15/EC of the European parliament and of the council amending council directive 76/768/EEC under European union law. *Food Drug Law J* 60(3):421-446.
- Rural Development Administration (RDA), 2020. Pesticide control act. Jeonju, Republic of Korea.
- Park KH, Song GC, Choo HY, Heo Y, Kim BH, 2017. Condition establishment study of the direct peptide reactivity assay in Korea. *J. Prev. Vet. Med.* 41(4):174-179.
- Patel NH, Mishra PK, Nagane R, Deshpande A, Tamboli IY et al., 2019. Comparison of in chemico skin sensitization methods and development of in chemico skin photosensitization assays. *ALTEX-Alt. Anim. Exp.* 36(3):373-387.
- Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, et al., 2014. Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J. Appl. Toxicol.* 35:1318-1332.
- Tollefsen KE, Scholz S, Cronin MT, Edwards SW, Knecht J, et al., 2014. Applying adverse outcome pathways (AOPs) to support integrated approaches to testing and assessment (IATA). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70(3):629-640.
- Troutman JA, Foertsch LM, Kern PS, Dai HJ, Quijano M, et al., 2011. The incorporation of lysine into peroxidase peptide reactivity assay for skin sensitization assessments. *Toxicol. Sci.* 122(2):422-436.
- Vinken M, 2013. The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology. *Toxicology*. 312:158-165.
- WSDOT, 2006. Oxadiazon, Roadside vegetation management herbicide fact sheet. Washington State Department of Transportation, USA.
- Yamamoto Y, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, et al., 2015. A novel in chemico method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions, *J Appl. Toxicol.* 35:1348-1360.
- Zhang F, Erskine T, Klapacz J, Settivari R, Marty S, 2018. A highly sensitive and selective high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC/MS-MS) method for the direct peptide reactivity assay (DPRA). *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 94:1-15.

In chemico 펩타이드 반응성 시험(Direct Peptide Reactivity Assay)을 이용한 농약 원제의 피부 감작성 평가

이명지 · 이 슬 · 함성남 · 박연기 · 오진아 · 신지영*

국립농업과학원 농산물안전성부 농자재평가과

요 약 농작업자가 농약 사용시 피부를 통해 직, 간접적으로 노출되면 농약 성분 내 여러 화학물질이 피부 감작성으로 인해 야기되는 알러지성 접촉 피부염 등의 다양한 피부 질환을 유발 시킬 수 있다. 따라서 농약 원제에 대한 독성 및 안전성 평가가 필요하며, 독성 평가 중 피부 감작성 평가는 주로 기니피그와 같은 실험동물 모델을 이용한 시험방법들이 오랫동안 보편적으로 사용되어 왔다. 하지만 많은 수의 실험동물의 희생과 사용에 의한 윤리적인 문제가 대두되고 있어 본 연구에서는 OECD TG 442C로 등재된 *in chemico* 펩타이드 반응성 시험(Direct peptide reactivity assay, DPRA)인 동물대체 피부 감작성 시험을 통해 OECD 가이드라인에 기술된 숙련도 검증 및 선발된 국내 농약 원제 10종에 대해 피부 감작성 여부를 평가하였다. 농약 원제 10종의 피부 감작성을 평가한 결과, 시스테인과 리신 펩타이드 소실률의 평균은 Benomyl에서 50.00%(고반응성, 양성), butachlor는 27.23%(중반응성, 양성), carbosulfan은 50.00%(고반응성, 양성), diazinon은 1.23%(무반응성, 음성), fluazinam은 59.91%(고반응성, 양성), glufosinate ammonium은 1.31%(무반응성, 음성), oxadiazon은 1.71%(무반응성, 음성), pretilachlor은 43.88%(고반응성, 양성), tebuconazole은 0.05%(무반응성, 음성), terbufos에서 20.94%(저반응성, 양성)로 나타났다. 총 농약 원제 10종 중에서 6종이 피부 감작성 양성으로 분류되었다. 농약 원제 10종의 피부 감작성 평가를 기존 *in vivo* 실험 결과와 비교하였을 때, 피부 감작성 예측 결과는 일치하는 것으로 나타났다. DPRA 시험법은 *in chemico* 방법으로 모든 시험 물질에 대해서 정확한 피부 감작성 예측 결과를 얻을 수 없지만, 피부감작성을 평가할 수 있는 다양한 *in vitro* 시험방법들을 추가적으로 병행하여 수행할 경우 보완이 가능하다. 또한 DPRA법은 다른 피부감작성시험들과 비교하여 사용 가능한 가장 간단하고 예측력이 높은 방법 중 하나이다. 따라서 본 연구를 통해 DPRA 시험법이 농약의 독성 평가에 적용할 수 있도록 평가기법의 기본 자료를 제공하여 향후 동물대체 피부 감작성 시험에 대한 기술력 증진에 기여할 수 있을 것이다.

색인어 농약, 동물대체시험법, 펩타이드 반응성 시험(DPRA), 피부 감작성